ÖZET

BACİLLUS TÜRLERİNİN SERİN PROTEAZLARI

Mevcut açıklama *Bacillus akibai*'den ve *Bacillus clarkii*'den klonlanmış serin proteazları ve bunların varyantları ile ilgilidir. Serin proteazlarını içeren bileşimler kumaşları ve sert yüzeyleri temizlemede aynı zamanda çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanım için uygundur.

İSTEMLER

1. Bir rekombinant *Bacillus akibai/clarkii*-kladı subtilisin polipeptidi veya bunun bir aktif fragmanı olup, burada rekombinant polipeptit veya bunun aktif fragmanı proteolitik aktiviteye sahiptir ve SEQ ID NO: 11'in, 14'ün, 17'nin, 32'nin, 35'in, 38'in, 41'in veya 84'ün bir amino asit dizisine en az %72'lik özdeşliğe veya SEQ ID NO: 3'ün, 6'nın, 20'nin, 23'ün, 26'nın veya 29'un bir amino asit dizisine en az %70'lik özdeşliğe sahip olan bir amino asit dizisi içerir ve burada rekombinant polipeptit veya bunun aktif fragmanı SEQ ID NO: 42'nin, 43'ün, 44'ün, 45'in, 46'nın, 47'nin veya 48'in bir amino asit dizisini içerir.

2. İstem 1'e göre rekombinant polipeptit olup, burada polipeptit bir sürfaktan varlığında proteaz aktivitesine sahiptir ve/veya bir deterjan bileşimi içinde temizleme aktivitesine sahiptir, burada deterjan bileşimi opsiyonel olarak bir otomatik bulaşık yıkama deterjanıdır veya bir çamaşır deterjanıdır.

3. İstem 2'ye göre rekombinant polipeptit olup, burada proteaz aktivitesi kazein hidrolizi içerir ve/veya temizleme aktivitesi bir yumurta sarısı substratının veya kandan, sütten, mürekkepten ve bunların kombinasyonlarından oluşan gruptan seçilen bir substratın hidrolizini içerir.

4. İstem 3'e göre rekombinant polipeptit olup, burada polipeptit 8 ila 12'lik bir pH aralığında ve/veya 50°C ila 75°C'lik bir sıcaklık aralığında bunun maksimal proteaz aktivitesinin en az %50'sini muhafaza eder.

5. Bir sürfaktan ve 1-4 arasındaki istemlerin herhangi birine göre rekombinant polipeptidi içeren bir bileşim olup, burada sürfaktan opsiyonel olarak bir anyonik sürfaktandan, bir katyonik sürfaktandan, bir zwitteriyonik sürfaktandan, bir amfolitik sürfaktandan, bir yarı-polar iyonik-olmayan sürfaktandan ve bunların bir kombinasyonundan oluşan gruptan seçilir.

6. İstem 5'e göre bileşim olup, burada bileşim, opsiyonel olarak bir çamaşır deterjanından, bir kumaş yumuşatıcı deterjandan, bir bulaşık yıkama deterjanından ve bir sert-yüzey temizleme deterjanından oluşan gruptan seçilen, bir deterjan bileşimidir.

7. İstem 5'e veya 6'ya göre bileşim olup, burada söz konusu bileşim ilaveten en az bir kalsiyum iyonu ve/veya çinko iyonu; en az bir stabilazör; ağırlık olarak yaklaşık %0,001 ila yaklaşık %1,0 söz konusu rekombinant polipeptidi; en az bir ağartma ajanı, en az bir yardımcı içerik maddesi ve/veya açil transferazlardan, alfa-amilazlardan, beta-amilazlardan, alfa-galaktosidazlardan, arabinosidazlardan, aril esterazlardan, beta-galaktosidazlardan, karajenazlardan, katalazlardan, sellobiyohidrolazlardan, selülozlardan, kondroitinazlardan, kütinazlardan, endo-beta-1,4-glukanazlardan, endo-beta-mannanazlardan, esterazlardan, ekzo-mannanazlardan, galaktanazlardan, glukoamilazlardan, hemiselülazlardan, hiyalüronidazlardan, keratinazlardan, lakkazlardan, laktazlardan, ligninazlardan, lipazlardan, lipoksijenazlardan, mannanazlardan, oksidazlardan, pektat liyazlardan, pektin asetil esterazlardan, pektinazlardan, pentozanazlardan, peroksidazlardan, fenoloksidazlardan, fosfatazlardan, fosfolipazlardan, fitazlardan, poligalaktüronazlardan, proteazlardan, pullulanazlardan, redüktazlardan, ramnogalaktüronazlardan, beta-glukanazlardan, tannazlardan, transglutaminazlardan, ksilan asetil-esterazlardan, ksilanazlardan, ksiloglukanazlardan, ksilosidazlardan, metalloproteazlardan, ilave serin protezlarından ve bunların kombinasyonlarından oluşan gruptan seçilen bir veya birden fazla ilave enzim veya enzim türevi içerir.

8. İstemler 5-7'den herhangi birine göre bileşim olup, burada söz konusu bileşim fosfatsızdır; fosfat içerir; boratsızdır veya borat içerir.

9. Temizlemenin bir yöntemi olup, bir yüzeyi veya bir eşyayı İstemler 1-4'ten herhangi birine göre rekombinant polipeptidi içeren bir bileşim veya İstemler 5-8'den herhangi birine göre bileşim ile temas ettirmeyi içerir, burada söz konusu eşya opsiyonel olarak tabak çanaktır veya kumaştır.

10. Bir rekombinant polipeptit üretmek için bir yöntem olup, aşağıdakileri içerir:

bir konak hücreyi İstemler 1-4'ten herhangi birine göre polipeptidi şifreleyen bir polinükleotid içeren bir ekspresyon vektörü ile kalıcı bir şekilde transforme etme;

söz konusu transforme edilmiş konak hücreyi söz konusu polipeptidi üretmesi için söz konusu konak hücre için uygun olan koşullar altında yetiştirme ve

söz konusu polipeptidi geri-kazanma.

11. Bir polinükleotid olup, aşağıdaki şekilde olan bir nükleik asit içerir:

(i) SEQ ID NO: 3'ten, SEQ ID NO: 6'dan, SEQ ID NO: 11'den, SEQ ID NO: 14'ten ve SEQ ID NO: 17'de oluşan gruptan seçilen bir amino asit dizisine sahip olan bir serin proteazını şifreleyen;

(ii) (a) SEQ ID NO: 3'ün, 6'nın, 20'nin, 23'ün, 26'nın, 29'un veya 84'ün bir amino asit dizisine en az %70'lik özdeşliğe sahip olan ve (b) SEQ ID NO: 42'nin, 43'ün, 44'ün, 45'in, 46'nın, 47'nin veya 48'in bir amino asit dizisini içeren bir amino asit dizisine sahip olan bir serin proteazını şifreleyen;

(iii) (a) SEQ ID NO: 11'in, 14'ün, 17'nin, 32'nin, 35'in, 38'in veya 41'in bir amino asit dizisine en az %72'lik özdeşliğe sahip olan ve (b) SEQ ID NO: 42'nin, 43'ün, 44'ün, 45'in, 46'nın, 47'nin veya 48'in bir amino asit dizisini içeren bir amino asit dizisine sahip olan bir serin proteazını şifreleyen;

(iv) bir serin proteazını şifreleyen ve SEQ ID NO: 1'e, 4'e, 18'e, 21'e, 24'e veya 27'ye en az %70'lik özdeşliğe sahip olan; veya

(v) bir serin proteazını şifreleyen ve SEQ ID NO: 9'a, 12'ye, 15'e, 30'a, 33'e, 36'ya veya 39'a en az %72'lik özdeşliğe sahip olan.

12. Bir ekspresyon vektörü olup, İstem 11'e göre polinükleotidi içerir.

13. Bir konak hücre olup, İstem 12'ye göre vektör ile transforme edilir.

14. Bir tekstil, deri veya tüy işleme veya kontakt lens veya yara temizleme bileşimi olup, İstemler 1-4'ten herhangi birine göre polipeptidi içerir.

TARİFNAME
BACİLLUS TÜRLERİNİN SERİN PROTEAZLARI

BULUŞ SAHASI

Mevcut açıklama *Bacillus spp.*'den klonlanmış serin proteazları ve bunların varyantları ile ilgilidir.

BULUŞUN ALT YAPISI

Serin proteazları proteinlerin peptit bağlarının hidrolizini başlatan bir serin aktif yerine sahip olan enzimlerdir (EC No. 3.4.21). Bunların yapısına göre iki geniş serin proteazları kategorisi vardır: kimotripsin-benzeri (tripsin-benzeri) ve subtilisin-benzeri. Prototipik subtilisin (EC No. 3.4.21.62) ilk olarak *Bacillus subtilis*'ten elde edilmiştir. Subtilisinler ve bunların homologları MEROPS sınıflandırma şemasının S8 peptidaz familyasının üyeleridir. S8 familyasının üyeleri bunların amino asit dizisinde Asp, His ve Ser sırasında bir katalitik triada sahiptir.

Serin proteazlarının endüstriyel enzimler tekniğinde uzun süredir bilinmesine rağmen, özel durumlar ve kullanımlar için uygun olan ilave serin proteazlarına yönelik bir ihtiyaç hâlâ vardır.

WO 09/054185 *Bacillus Gibsoni*'den (DSM 14391) subtilisin tipindeki bir yeni alkalin proteazı aynı zamanda bunların ilgili proteinlerini ve türevlerini tarif eder. WO 03/055974, *Bacillus sp.*'den (DSM 14392) subtilisin tipindeki bir yeni alkalin proteaz ve bunun çeşitli ilgili proteinleri ve türevleri ile ilgilidir.

Buluşun Kısa Açıklaması

Mevcut bileşimler ve yöntemler, bu tarz yöntemlerin ve bileşimlerin istemlerde tanımlandığı şekilde olması kaydıyla, *Bacillus spp.*'den klonlanmış rekombinant serin proteazları ve bunların varyantları ile ilgilidir. Serin proteazlarını içeren bileşimler kumaşları ve sert yüzeyleri temizlemede aynı zamanda çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanım için uygundur ve istemlerde tanımlandığı şekildedir.

Bir birinci yönünde, buluş bir rekombinant *Bacillus akibai/clarkii*-kladı subtilisin polipeptididir veya bunun bir aktif fragmanıdır, burada rekombinant polipeptit veya bunun aktif fragmanı proteolitik aktiviteye sahiptir ve SEQ ID NO: 11'in, 14'ün, 17'nin, 32'nin, 35'in, 38'in, 41'in veya 84'ün bir amino asit dizisine en az %72'lik özdeşliğe veya SEQ ID NO: 3'ün, 6'nın, 20'nin, 23'ün, 26'nın veya 29'un bir amino asit dizisine en az %70'lik özdeşliğe sahip olan bir amino asit dizisi içerir ve SEQ ID NO: 42'nin, 43'ün, 44'ün, 45'in, 46'nın, 47'nin veya 48'in bir amino asit dizisini içerir.

Bazı uygulamalarda, yukarıdaki rekombinant polipeptitlerin en az biri proteaz aktivitesine, spesifik olarak kazein hidrolizine, sahiptir. Bazı uygulamalarda, yukarıdaki rekombinant polipeptitlerin en az biri 8 ila 12'lik bir pH aralığında bunun maksimal proteaz aktivitesinin en az %50'sini muhafaza eder. Bazı uygulamalarda, yukarıdaki rekombinant polipeptitlerin en az biri 50°C ila 75°C'lik bir sıcaklık aralığında bunun maksimal proteaz aktivitesinin en az %50'sini muhafaza eder. Bazı uygulamalarda, yukarıdaki rekombinant polipeptitlerin en az biri bir otomatik bulaşık yıkama deterjanı ve bir çamaşır yıkama deterjanı dâhil olmak üzere bir deterjan bileşimi içinde temizleme aktivitesine sahiptir.

Bazı uygulamalarda, buluş bir sürfaktan ve yukarıda ifade edilen rekombinant polipeptitlerin en az birini içeren bir bileşimdir. Bazı uygulamalarda, sürfaktan bir iyonik-olmayan sürfaktandan, bir anyonik sürfaktandan, bir katyonik sürfaktandan, bir zwitteriyonik sürfaktandan, bir amfolitik sürfaktandan, bir yarı-polar iyonik-olmayan sürfaktandan ve bunların bir kombinasyonundan oluşan gruptan seçilir. Bazı uygulamalarda, bileşim bir deterjan bileşimidir, örneğin, bir çamaşır deterjanıdır, bir kumaş yumuşatıcı deterjandır, bir bulaşık yıkama deterjanıdır ve bir sert-yüzey temizleme deterjanıdır. Bazı uygulamalarda, bileşim ilaveten en az bir kalsiyum iyonu ve/veya çinko iyonu, en az bir stabilazör, en az bir ağartma ajanı, fosfat veya borat içerir. Bazı uygulamalarda, bileşim fosfatsızdır ve/veya boratsızdır. Bazı uygulamalarda, bileşim bir granüler, pudra, katı, çubuk, sıvı, tablet, jel, macun veya birim doz bileşimidir. Bazı uygulamalarda, bileşim ilaveten açil transferazlardan, alfa-amilazlardan, beta-amilazlardan, alfa-galaktosidazlardan, arabinosidazlardan, aril esterazlardan, beta-galaktosidazlardan, karajenazlardan, katalazlardan, sellobiyohidrolazlardan, selülozlardan, kondroitinazlardan, kütinazlardan, endo-beta-1,4-glukanazlardan, endo-beta-mannanazlardan, esterazlardan, ekzo-mannanazlardan, galaktanazlardan, glukoamilazlardan, hemiselülazlardan,

hiyalüronidazlardan, keratinazlardan, lakkazlardan, laktazlardan, ligninazlardan, lipazlardan, lipoksijenazlardan, mannanazlardan, oksidazlardan, pektat liyazlardan, pektin asetil esterazlardan, pektinazlardan, pentozanazlardan, peroksidazlardan, fenoloksidazlardan, fosfatazlardan, fosfolipazlardan, fitazlardan, poligalaktüronazlardan, proteazlardan, pullulanazlardan, redüktazlardan, ramnogalaktüronazlardan, beta-glukanazlardan, tannazlardan, transglutaminazlardan, ksilan asetil-esterazlardan, ksilanazlardan, ksiloglukanazlardan, ksilosidazlardan, metalloproteazlardan, ilave serin protezlarından ve bunların kombinasyonlarından oluşan gruptan seçilen bir veya birden fazla ilave enzim veya enzim türevi içerir.

Bazı uygulamalarda, buluş temizlemenin, bir yüzeyi veya bir eşyayı yukarıda listelenen bir bileşim ile temas ettirmeyi içeren, bir yöntemidir. Bazı uygulamalarda, buluş bir rekombinant polipeptit üretmek için, bir konak hücreyi yukarıdaki rekombinant polipeptidin en az birini şifreleyen bir polinükleotid içeren bir ekspresyon vektörü ile kalıcı bir şekilde transforme etmeyi içeren, bir yöntemidir.

ŞEKİLLERİN KISA AÇIKLAMASI

Şekil 1, BspAI02518 serin proteazının ekspresyonu için pHYT-BspAI02518'in bir plazmid haritasını sağlar.

Şekil 2, BspU02193 serin proteazının ekspresyonu için pBN-BspU02193'ün bir plazmid haritasını sağlar.

Şekil 3, BspAI02518'in bir DMC substratı üzerindeki proteaz aktivitesinin bir grafiğini sağlar.

Şekil 4, BspU02193'ün bir DMC substratı üzerindeki proteaz aktivitesinin bir grafiğini sağlar.

Şekil 5A, BspAI02518'in ağır kir sıvı (HDL) çamaşır deterjanlarındaki temizleme etkililiği eğrilerini sağlar. Şekil 5B, BspAI02518'in ağır kir kuru (HDD) çamaşır deterjanlarındaki temizleme etkililiği eğrilerini sağlar. Şekil 5C, BspAI02518'in otomatik bulaşık yıkama (ADW) deterjanlarındaki temizleme etkililiği eğrilerini sağlar.

Şekil 6A, BspU02193'ün ağır kir kuru (HDD) çamaşır deterjanlarındaki temizleme etkililiği eğrilerini sağlar. Şekil 6B, BspU02193'ün otomatik bulaşık yıkama (ADW) deterjanlarındaki temizleme etkililiği eğrilerini sağlar.

Şekil 7A-F, BspAl02518'in (SEQ ID NO: 3) ve BspU02193'ün (SEQ ID NO: 6) matür formlarının amino asit dizilerinin çeşitli bakteriyel serin proteazlarının amino asit dizileri (SEQ ID NO.'ları: 49-79) ile bir hizalamasını sağlar. Bir konsensüs dizisi hizalamanın altında gösterilir (SEQ ID NO: 81).

Şekil 8, BspAl02518'in, BspU02193'ün ve çeşitli bakteriyel serin proteazlarının bir filogenetik ağacını sağlar.

ŞEKİL 9A-C, BspAl02518'in (SEQ ID NO: 3), BspU02193'ün (SEQ ID NO: 6), Bakn00315'in (SEQ ID NO: 11), Bcl04009'un (SEQ ID NO: 14) ve SWT66_254731'in (SEQ ID NO: 17) matür formlarının amino asit dizilerinin bir kaç bakteriyel serin proteazının dizileri bir bir hizalamasını sağlar. *B. pseudofirmus*'tan (SEQ ID NO: 49), *B. lentus*'tan (SEQ ID NO: 600), *Bacillus sp.* LG12'den (SEQ ID NO: 62), *B. licheniformis*'ten (SEQ ID NO: 67) ve *B. amyloliquefaciens*'ten (SEQ ID NO: 73) elde edilen subtilisinlerin amino asit dizileri ADC49870, P29600, AAC43580, CAJ70731 ve CAA24990 NCBI Erişim Numaraları'na karşılık gelir.

Şekil 10, BspAl02518'in, BspU02193'ün, Bakn00315'in, Bcl04009'un, SWT66_254731'in ve çeşitli başka bakteriyel serin proteazlarının bir filogenetik ağacını sağlar.

Şekil 11A, SWT66_254731'in OMO ağır kir sıvı (HDL) çamaşır deterjanındaki temizleme etkililik eğrilerini sağlar. Şekil 11B, SWT66_254731'in OMO ağır kir kuru (HDD) çamaşır deterjanındaki temizleme etkililik eğrilerini sağlar. Şekil 11C, SWT66_254731'in pH 9'da durulanmamış numunelik kumaş parçaları kullanılarak Quantum otomatik bulaşık yıkama (ADW) deterjanındaki temizleme etkililik eğrilerini sağlar. Şekil 11D, SWT66_254731'in pH 9'da durulanmış numunelik kumaş parçaları kullanılarak Quantum otomatik bulaşık yıkama (ADW) deterjanındaki temizleme etkililik eğrilerini sağlar. Şekil 11E, SWT66_254731'in pH 10'da durulanmamış numunelik kumaş parçaları kullanılarak GSMB otomatik bulaşık yıkama (ADW) deterjanındaki temizleme etkililik eğrilerini sağlar. Şekil 11F, SWT66_254731'in pH 10'da durulanmış

numunelik kumaş parçaları kullanılarak GSMB otomatik bulaşık yıkama (ADW) deterjanındaki temizleme etkililik eğrilerini sağlar.

Şekil 12A-C, aşağıdakilerin matür formlarına: BspAl02518 (SEQ ID NO: 3), BspU02193 (SEQ ID NO: 6), Bakn00315 (SEQ ID NO: 11), Bcl04009 (SEQ ID NO: 14), SWT66_254731 (SEQ ID NO: 17), ACB102 (SEQ ID NO: 20), COG104 (SEQ ID NO: 23), ACB83 (SEQ ID NO: 26), ACB90 (SEQ ID NO: 29), ACB82 (SEQ ID NO: 32), ACB89 (SEQ ID NO: 35), ACB92 (SEQ ID NO: 38), DETPh35 (SEQ ID NO: 41) ve *B.s amyloliquefaciens*'ten, *B. lentus*'tan, *B. licheniformis*'ten, *Bacillus sp.* LG12'den ve *B. pseudofirmus*'tan (sırasıyla, CAA24990, P29600, CAJ70731, AAC43580 ve ADC49870 NCBI Erişim Numaraları) elde edilen subtilisinlerin matür formlarına karşılık gelen 18 amino asitlik dizilerin bir hizalamasını sağlar.

Şekil 13, BspAl02518'in, BspU02193'ün, Bakn00315'in, Bcl04009'un, SWT66_254731'in, ACB102'nin, COG104'ün, ACB83'ün, ACB90'ın, ACB82'nin, ACB89'un, ACB92'nin, DETPh35'in ve çeşitli başka bakteriyel serin proteazlarının *B. akibai/clarkii*-kladı subtilisinleri kapsayan dizileri gösteren bir köşeli parantez ile bir filogenetik ağacını sağlar.

Şekil 14A-C, BspAl02518'in, BspU02193'ün, Bakn00315'in, Bcl04009'un, SWT66_254731'in, ACB102'nin, COG104'ün, ACB83'ün, ACB90'ın, ACB82'nin, ACB89'un, ACB92'nin ve DETPh35'in (yani, *B. akibai/clarkii*-kladı subtilisinlerin) *B. amyloliquefaciens*'ten BPN' subtilisini (pdb kaydı 2STI), *B. licheniformis*'ten Carlsberg (pdb kaydı 3UNX), *B. lentus* subtilisini (pdb kaydı 1JEA) ve subtilisin LG12'in tecilli yapısı ile bir yapı-temelli dizi hizalamasını sağlar. Asp32, H62 ve S215 aktif yer triadı ve Bacillus subtilisinlerinin oksianyon deliğine katkıda bulunan N153 (BspAl02518 numaralandırması) vurgulanır. Ayrıca, burada *B. akibai/clarkii*-kladı subtilisin dizilerinin Val (V)91 ila Gly (G)99 veya Ser (S)99 arasında bir ortak motife sahip olduğu yapı-temelli hizalamanın bir bölgesi de vurgulanır.

Şekil 15, *B. lentus* subtilisin (pdb kaydı 1JEA) yapısı üzerinde modellenmiş *B. akibai/clarkii*-kladı subtilisinlerin ana zincir katlanmasındaki DRN motifinin katalitik triad açısından beklenen lokasyonunu gösterir. Tüm serin proteazları için ortak olan katalitik triadın rezidü yan zincirleri siyah renklendirilir.

DETAYLI AÇIKLAMA

C-M2-3'ten, GICC 2089392'den, ATCC No. 43226'dan, DSM 8720'den, ACB102_2847966'dan, COG104_4065768'den, ACB83_2687815'ten, ACB90_2720294'ten, ACB82_2683104'ten, ACB89_2715301'den, ACB92_2732966'dan ve DETPh35_2828044'ten *B. akibai/clarkii*-kladı suşlarından elde edilen rekombinant serin proteazları ile ilgili bileşimler ve yöntemler tarif edilir. Bileşimler ve yöntemler, kısmen, rekombinant BspAl02518'in ve BspU02193'ün bir sürfaktan varlığında, bazik reaksiyon koşullarında ve yükseltilmiş sıcaklıklarda proteaz aktivitesine sahip olduğu gözlemine dayanır. BspAl02518'in ve BspU02193'ün, Bakn00315, Bcl04009, SWT66_254731, ACB102, COG104, ACB83, ACB90, ACB82, ACB89, ACB92 ve DETPh35 tarafından paylaşıldığı tahmin edilen, bu özellikleri bu proteazları kumaşları ve sert yüzeyleri temizlemede aynı zamanda tekstil, deri ve tüy işlemede kullanım için gayet uygun hâle getirir. Sonuç olarak, en azından BspAl02518 ve BspU02193 aynı zamanda Bakn00315, Bcl04009, SWT66_254731, ACB102, COG104, ACB83, ACB90, ACB82, ACB89, ACB92 ve DETPh35, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, çamaşır ve bulaşık yıkama deterjanları dâhil olmak üzere, protein parçalanması için bileşimlere dâhil edilme için gayet uygundur. BspAl02518 ve BspU02193 aynı zamanda Bakn00315, Bcl04009, SWT66_254731, ACB102, COG104, ACB83, ACB90, ACB82, ACB89, ACB92 ve DETPh35 de kişisel bakım bileşimlerine aynı zamanda insan gıda ve hayvan yemi uygulamalarına dâhil edilme için uygundur.

I. Tanımlar

Mevcut bileşimleri ve yöntemleri detaylı bir şekilde tarif etmeden önce, aşağıdaki terimler açık olması için tanımlanır. Tanımlanmamış terimler ve kısaltmalar teknikte kullanıldığı üzere bunların olağan anlamına uyumlu hâle getirilmelidir. Burada aksi tanımlanmadıkça, burada kullanılan tüm teknik ve bilimsel terimler teknikte normal uzmanlığı olan bir kişi tarafından yaygın bir şekilde anlaşılan ile aynı anlama sahiptir. Aksi gösterilmedikçe, mevcut açıklamanın tatbiki moleküler biyolojide, protein mühendisliğinde ve mikrobiyolojide yaygın bir şekilde kullanılan geleneksel teknikleri içerir. Burada tarif edilenlere benzer veya eş-değer olan herhangi bir yöntemin veya malzemenin mevcut açıklamanın tatbikinde kullanım alanı bulmasına rağmen, bazı

uygun yöntemler ve malzemeler burada tarif edilir. Hemen aşağıda tanımlanan terimler Spesifikasyon'a atıf ile bir bütün olarak daha tam olarak tarif edilir.

Burada kullanıldığı şekliyle, tekil "bir", "biri" ve "bu" bağlam açık bir şekilde aksini göstermedikçe çoğulları içerir. Aksi gösterilmedikçe, nükleik asit dizileri 5' ila 3' oryantasyonunda soldan sağa doğru yazılır ve amino asit dizileri amino ila karboksi oryantasyonunda soldan sağa doğru yazılır. Bu açıklamanın, aksinin bir gösterimi olmadıkça, burada tarif edilen özel metodoloji, protokoller ve reaktifler ile sınırlandırılmadığı anlaşılacaktır.

Bu Spesifikasyon boyunca verilen her maksimum sayısal sınırlandırmanın, bu tarz daha düşük sayısal sınırlandırmalar burada açık bir şekilde yazılmış gibi, her daha düşük sayısal sınırlandırmayı içermesi amaçlanır. Bu Spesifik boyunca verilen her minimum sayısal sınırlandırma, bu tarz daha yüksek sayısal sınırlandırmalar burada açık bir şekilde yazılmış gibi, her daha yüksek sayısal sınırlandırmayı içerecektir. Bu Spesifikasyon boyunca verilen her sayısal aralık, bu tarz daha dar sayısal aralıkların tümü burada açık bir şekilde yazılmış gibi, bu tarz daha geniş sayısal aralığın içinde kalan her daha dar sayısal aralığı içerecektir.

Bir sayısal değer ile bağlantılı olarak burada kullanıldığı üzere, "yaklaşık" terimi, terim bağlamda spesifik olarak başka şekilde tanımlanmadıkça, sayısal değerin +/- 0,5'i olan bir aralığı ifade eder. Örneğin, bir "yaklaşık 6 olan pH değeri", pH değeri spesifik olarak başka şekilde tanımlanmadıkça, 5,5 ila 6,5 aralığındaki pH değerlerini ifade eder.

Burada kullanıldığı şekliyle, "proteaz" ve "proteinaz" terimleri proteinlerin ve peptitleri yıkama yetisine sahip olan bir enzimi ifade eder. Bir proteaz proteini oluşturan bir peptit veya polipeptit zinciri içinde amino asitleri birbirine bağlayan peptit bağlarının hidrolizi ile "proteoliz" gerçekleştirme yetisine sahiptir. Bir proteazın bir protein-sindirme enzimi olarak bu aktivitesi "proteolitik aktivite" olarak ifade eder. Proteolitik aktiviteyi ölçmek için çok sayıda iyi-bilinen prosedür vardır. Örneğin, proteolitik aktivite ilgili proteazın bir uygun substratı hidrolize etme yetisini analiz eden karşılaştırmalı analizler ile tespit edilebilir. Proteaz veya proteolitik aktivitenin analizinde kullanışlı olan emsal substratlar, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, di-metil kazeini (Sigma C-9801), bovin kollajenini (Sigma C-9879), bovine elastinini (Sigma E-1625) ve bovine keratinini (ICN Biomedical 902111), içerir. Bu substratlardan yararlanan kolorimetrik analizler teknikte iyi bilinir

(Bakınız, *örn.*, WO 99/34011 ve 6,376,450 Numaralı U.S. Patenti). pNA peptidil analizi (Bakınız, *örn.*, Del Mar et al., Anal Biochem, 99:316-320, 1979) de aktif enzim konsantrasyonunu belirlemede kullanım alanı bulur. Bu analiz enzim bir çözünebilen sentetik substratı, örneğin, süksinil-alanin-alanin-prolin-fenilalanin-p-nitroanilidi (sük-AAPF-pNA), hidrolize ettikçe p-nitroanilinin salındığı hızı ölçer. Hidroliz reaksiyonundan sarı rengin üretim hızı bir spektrofotometrede 410 nm'de ölçülür ve aktif enzim konsantrasyonu ile orantılıdır. Buna ek olarak, 280 nano metredeki (nm'deki) absorbans ölçümleri saflaştırılmış proteinin bir örneğindeki toplam protein konsantrasyonunu belirlemek için kullanılabilir. Substrat/protein konsantrasyonu üzerindeki aktivite enzim spesifik aktiviteyi verir.

Bir polipeptit açısından "varyant" terimi, bunun bir amino asidin bir veya birden fazla doğal-oluşumlu veya insan eliyle yapılmış sübstitüsyonunu, içeri yerleştirmesini veya silinmesini içermesi açısından bir belirtilmiş doğal-tip, parenteral veya referans polipeptitten farklı olan bir polipeptidi ifade eder. Benzer şekilde, bir polinükleotid açısından "varyant" terimi, nükleotid dizisi açısından bir belirtilmiş doğal-tip, parental veya referans polinükleotidden farklılık gösteren bir polinükleotidi ifade eder. Doğal-tip, parental veya referans polipeptidin veya polinükleotidin kimliği bağlamdan aşikâr olacaktır.

Burada kullanıldığı şekliyle, "Bacillus cinsi", bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, *B. subtilis, B. licheniformis, B. lentus, B. brevis, B. stearothermophilus, B.* alkalophilus, *B. amyloliquefaciens, B. clausii, B. halodurans, B. megaterium, B. coagulans, B. circulans, B. lautus, B. gibsonii,* B. *agaradhaerens, B akibai, B. clarkii* ve *B. thuringiensis*, dâhil olmak üzere teknikte uzmanlığı olan kişiler tarafından bilindiği üzere "Bacillus" cinsindeki tüm türleri içerir. Bacillus cinsinin taksonomik yeniden-organizasyon geçirmeye devam ettiği fark edilir. Dolayısıyla, cinsin, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, şimdi "*Geobacillus stearothermophilus*" olarak adlandırılan, *B. stearothermophilus* tarzındaki organizmalar dâhil olmak üzere, yeniden-sınıflandırılmış olan türleri içermesi amaçlanır. Bu karakteristiğin ayrıca yakın tarihlerde adlandırılan *Alicyclobacillus, Amphibacillus, Aneurinibacillus, Anoxybacillus, Brevibacillus, Filobacillus, Gracilibacillus, Halobacillus, Paenibacillus, Salibacillus, Thermobacillus, Ureibacillus* ve *Virgibacillus* için de geçerli olmasına rağmen, stresli çevresel koşullar altında dirençli endosporların üretimi Bacillus cinsinin tanımlayıcı özelliği olarak düşünülür.

Burada birbiri ile değiştirilebilir bir şekilde kullanılan "polinükleotid" ve "nükleik asit" terimleri bir zincir içinde kovalent olarak bağlanmış herhangi bir uzunluktaki nükleotid monomerlerinin bir polimerini ifade eder. DNA (deoksiribonükleik asit), deoksiribonükleotidler içeren bir polinükleotid, ve RNA (ribonükleik asit), ribonükleotidlerin bir polimeri, belirgin biyolojik fonksiyonlara sahip olan polinükleotidlerin veya nükleik asitlerin örnekleridir. Polinükleotidler veya nükleik asitler, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, bir tek-, çift- veya üç-sarmallı DNA'yı, genomik DNA'yı, cDNA'yı, RNA'yı, DNA-RNA hibridini veya pürin ve pirimidin bazları veya başka doğal, kimyasal olarak, biyokimyasal olarak modifiye edilmiş, doğal-olmayan veya türevlendirilmiş nükleotid bazları içeren bir polimeri, içerir. Aşağıdakiler, polinükleotidlerin sınırlayıcı-olmayan örnekleridir: genler, gen fragmanları, kromozomal fragmanlar, eksprese edilmiş dizi etiketi (etiketleri) (EST (EST'ler)), ekzonlar, intronlar, mesajcı RNA (mRNA), taşıyıcı RNA (tRNA), ribozomal RNA (rRNA), ribozimler, komplementer DNA (cDNA), rekombinant polinükleotidler, dallanmış polinükleotidler, plazmidler, vektörler, herhangi bir dizinin izole edilmiş DNA'sı, herhangi bir dizinin izole edilmiş RNA'sı, nükleik asit probları ve primerler.

Burada kullanıldığı şekliyle, "mutasyon" terimi bir referans amino asit veya nükleik asit dizisine yapılmış değişimleri ifade eder. Terimin sübstitüsyonları, içeri yerleştirmeleri ve silinmeleri kapsaması amaçlanır.

Burada kullanıldığı şekliyle, "vektör" terimi nükleik asidi (asitleri) bir hedef hücreye veya dokuya uygulamak veya transfer etmek için kullanılan bir nükleik asit yapısını ifade eder. Bir vektör tipik olarak yabancı DNA'yı bir hücreye veya dokuya uygulamak için kullanılır. Vektörler, plazmidleri, klonlama vektörlerini, bakteriyofajları, virüsleri (*örn.,* viral vektörü), kozmidleri, ekspresyon vektörlerini, mekik vektörlerini ve benzerlerini içerir. Bir vektör tipik olarak bir replikasyon orijini, bir çoklu-klonlama yeri ve bir seçilebilen belirteç içerir. Bir vektörü bir hedef hücreye yerleştirme prosesi tipik olarak transformasyon olarak ifade edilir. Mevcut buluş, bazı uygulamalarda, bir uygun konakta DNA dizisinin ekspresyonunu ve rekombinant polipeptit dizisinin katlanmasını ve translokasyonunu gerçekleştirebilen bir uygun pro-diziye (*örn.,* sekretuvar, sinyal peptidi dizisine, vb.) operatif olarak bağlanmış bir serin proteazı polipeptidini (*örn.,* öncül veya matür serin proteazı polipeptidini) şifreleyen bir DNA dizisi içeren bir vektör içerir.

Burada kullanıldığı şekliyle, "ekspresyon kaseti", "ekspresyon plazmidi" veya "ekspresyon vektörü" terimi söz konusu bir nükleik asidin bir hedef hücredeki ekspresyonu için rekombinant olarak veya sentetik olarak üretilmiş bir nükleik asit yapısını veya vektörü ifade eder. Bir ekspresyon vektörü veya ekspresyon kaseti tipik olarak, yabancı nükleik asidin ekspresyonunu tahrik eden bir promotör nükleotid dizisi içerir. Ekspresyon vektörü veya kaseti ayrıca tipik olarak, bir özel nükleik asidin bir hedef hücredeki transkripsiyonuna izin veren herhangi bir başka belirtilmiş nükleik asit elemanı da içerir. Bir rekombinant ekspresyon kaseti bir plazmide, kromozoma, mitokondriyal DNA'ya, plastid DNA'sına, virüse veya nükleik asit fragmanına katılabilir. Çok sayıda prokaryotik ve ökaryotik ekspresyon vektörü piyasada satılmaktadır.

Burada kullanıldığı şekliyle, bir "plazmid" kromozomal DNA'dan bağımsız olarak kopyalayabilen bir ekstrakromozomal DNA molekülünü ifade eder. Bir plazmid çift-sarmallıdır (ds) ve dairesel olabilir ve tipik olarak bir klonlama vektörü olarak kullanılır.

Burada kullanıldığı şekliyle, bir nükleik asit dizisini bir hücreye uygulama bağlamında, "uygulanmış" terimi nükleik asit dizisini hücreye transfer etmek için uygun olan herhangi bir yöntemi ifade eder. Uygulama için bu tarz yöntemler, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, protoplast füzyonunu, transfeksiyonu, transformasyonu, elektroporasyonu, konjugasyonu ve transdüksiyonu, içerir. Transformasyon bir hücrenin genetik materyalin (*örn.,* DNA'nın) alımından, opsiyonel genomik katılımından ve ekspresyonundan kaynaklanan genetik değişimini ifade eder.

Burada kullanıldığı şekliyle, bir nükleik asit, bu bir başka nükleik asit dizisi ile bir fonksiyonel ilişki hâlinde yerleştirildiğinde, bir başka nükleik asit dizisine "operatif olarak bağlanır". Örneğin, bir promotör veya hızlandırıcı, promotör kodlama dizisinin transkripsiyonunu etkilendiğinde, bir nükleotid kodlama dizisine operatif olarak bağlanır. Bir ribozom bağlama yeri, bu kodlama dizisinin translasyonunu kolaylaştıracak şekilde konumlandırıldığında, bir kodlama dizisine operatif olarak bağlanabilir. Tipik olarak, "operatif olarak bağlanmış" DNA dizileri bitişiktir. Bununla birlikte, hızlandırıcıların bitişik olması gerekmez. Bağlama geleneksel restriksiyon yerlerinde ligasyon ile yapılır. Bu tarz yerler var olmadığında, sentetik oligonükleotid adaptörleri veya bağlayıcıları geleneksel tatbike uygun şekilde kullanılabilir.

Burada kullanıldığı şekliyle, "gen" terimi bir polipeptidi şifreleyen ve kodlama bölgelerinden önce gelen ve sonra gelen bölgeleri içeren bir polinükleotidi (*örn.,* bir DNA segmentini) ifade eder. Bazı durumlarda, bir gen münferit kodlama segmentleri (ekzonlar) arasındaki araya giren dizileri (intronları) içerir.

Burada kullanıldığı şekliyle, bir hücreye atfen kullanıldığında "rekombinant" tipik olarak hücrenin bir yabancı nükleik asit dizisinin uygulanması ile modifiye edilmiş olduğunu veya hücrenin bu şekilde modifiye edilmiş bir hücreden türetildiğini gösterir. Örneğin, bir rekombinant hücre hücrenin natif (rekombinant-olmayan) formundaki ile özdeş formda bulunmayan bir gen içerebilir veya bir rekombinant hücre modifiye edilmiş olan ve hücreye yeniden-uygulanmış olan (hücrenin natif formunda bulunan) bir natif gen içerebilir. Bir rekombinant hücre hücreden nükleik asidi çıkarmadan modifiye edilmiş olan hücreye endojen olan bir nükleik asit içerebilir; bu tarz modifikasyonlar gen replasmanı, yer-spesifik mutasyon ve teknikte normal uzmanlığı olan kişiler tarafından bilinen ilgili teknikler ile elde edilenleri içerir. Rekombinant DNA teknolojisi *in vitro* rekombinant DNA üretimi ve rekombinant DNA'nın eksprese edilebildiği veya çoğaltılabildiği böylece bir rekombinant polipeptidin üretilebildiği hücrelere transferi için teknikleri içerir. Polinükleotidlerin veya nükleik asitlerin "rekombinasyonu" veya yeniden-birleştirilmesi" genel olarak, iki veya daha fazla nükleik asit veya polinükleotid sarmalının veya fragmanının bir yeni polinükleotid veya nükleik asit üretecek şekilde birleşmesini veya birleştirilmesini ifade eder.

Bunun natif hâlinde veya teknikte uzmanlığı olan kişiler tarafından bilinen yöntemler ile manipüle edildiğinde, polipeptidi veya bunun bir fragmanını üretecek şekilde transkribe edilebildiğinde ve/veya aktarılabildiğinde, bir nükleik asidin veya polinükleotidin, bir polipeptidi "şifrelediği" söylenir. Bu tarz bir nükleik asidin rehber sarmalının da diziyi şifrelediği söylenir.

"Konak suş" veya "konak hücre" terimleri söz konusu bir DNA dizisini içeren bir ekspresyon vektörü için bir uygun konağı ifade eder.

Bir "protein" veya "polipeptit" amino asit rezidülerinin bir polimerik dizisini içerir. "Protein" ve "polipeptit" terimleri burada birbiri ile değiştirilebilir bir şekilde kullanılır. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) ile uyumlu olarak tanımlandığı üzere amino asitler için tek ve 3-harfli kod bu açıklama boyunca kullanılır.

Tek X harfi yirmi amino asidin herhangi birini ifade eder. Ayrıca, bir polipeptidin genetik kodun dejenere olmasından dolayı birden fazla nükleotid dizisi tarafından kodlanabileceği de anlaşılır. Mutasyonlar ana amino asit için tek harfli kod sonrasında bir pozisyon numarası ve akabinde varyant amino asit için tek harfli kod ile adlandırılabilir. Örneğin, pozisyon 87'deki glisinin (G'nin) serine (S'ye) mutasyona uğratılması "G087S" veya "G87S" olarak temsil edilir. Modifikasyonları tarif ederken, bir pozisyon akabinde parantezler içinde listelenen amino asitler listelenen amino asitlerin herhangi biri tarafından bu pozisyondaki sübstitüsyonların bir listesini gösterir. Örneğin, 6(L,I) pozisyon 6'nın bir lösin veya izolösin ile sübstüte edilebileceği anlamına gelir. Bazen, bir dizi içinde, bir eğik çizgi (/) sübstitüsyonları tanımlamak için kullanılır, *örn.,* F/V, özel pozisyonun bu pozisyonda bir fenilalanine veya valine sahip olabileceğini gösterir.

Bir "pro-dizi" veya "pro-peptit dizisi", proteazın uygun katlanması ve salgılanması için gerekli olan, sinyal peptidi dizisi ve matür proteaz dizisi arasındaki bir amino asit dizisini ifade eder; bunlar bazen intra-moleküler şaperonlar olarak ifade edilir. Pro-dizi veya pro-peptit dizinin klevajı bir matür aktif proteaz ile sonuçlanır. Bakteriyel serin proteazları sıklıkla pro-enzimler olarak eksprese edilir.

"Sinyal dizisi" ve "sinyal peptidi" terimleri, bir proteinin matür veya öncül formunun salgılanmasına veya doğrudan taşınmasına katılabilen amino asit rezidülerinin bir dizisini ifade eder. Sinyal dizisi tipik olarak öncül veya matür protein dizisinin N-ucunda konumlandırılır. Sinyal dizisi endojen veya ekzojen olabilir. Bir sinyal dizisi normal olarak matür proteinde bulunmaz. Bir sinyal dizisi tipik olarak protein taşındıktan sonra bir sinyal peptidazı tarafından proteinden yarılır.

Bir proteinin, polipeptidin veya peptidin "matür" formu terimi sinyal peptidi dizisi ve pro-peptit dizisi olmadan proteinin, polipeptidin veya peptidin fonksiyonel formunu ifade eder.

Bir proteinin veya peptidin "öncül" formu terimi proteinin amino veya karbonil ucuna operatif olarak bağlanmış bir pro-diziye sahip olan proteinin bir matür formunu ifade eder. Öncül ayrıca, pro-dizinin amino ucuna operatif olarak bağlanmış bir "sinyal" dizisine de sahip olabilir. Öncül ayrıca post-translasyonel aktiviteye dâhil edilen ilave

polipeptitlere (*örn.,* bir proteinin veya peptidin matür formunu serbest bırakacak şekilde bundan yarılan polipeptitlere) de sahip olabilir.

Bir amino asit dizisine veya nükleik asit dizisine atfen "doğal-tip" terimi, amino asit dizisinin veya nükleik asit dizisinin bir natif veya doğal-oluşumlu dizi olduğunu gösterir. Burada kullanıldığı şekliyle, "doğal-oluşumlu" terimi doğada bulunan herhangi bir şeyi (*örn.,* proteinleri, amino asitleri veya nükleik asit dizilerini) ifade eder. Aksine, "doğal-oluşumlu olmayan" terimi, doğada bulunmayan herhangi bir şeyi (*örn.,* laboratuvarda üretilen rekombinant nükleik asitleri ve protein dizilerini veya doğal-tip dizinin modifikasyonunu) ifade eder.

Amino asit rezidüsü pozisyonlarına ilişkin burada kullanıldığı şekliyle, "-'e karşılık gelen" veya "-e karşılık gelir" veya "karşılık gelir", bir proteindeki veya peptitteki sayılan pozisyondaki bir amino asit rezidüsünü veya bir proteindeki veya peptitteki bir sayılan rezidüye analog, homolog veya eş-değer olan bir amino asit rezidüsünü ifade eder. Burada kullanıldığı şekliyle, "karşılık gelen bölge" genel olarak bir ilgili proteinlerdeki veya bir referans proteindeki bir analog pozisyonu ifade eder.

"-den türetilmiş" ve "-den elde edilen" terimleri yalnızca söz konusu organizmanın bir suşu tarafından üretilmiş veya üretilebilen bir proteini değil aynı zamanda bu tarz suştan izole edilmiş bir DNA dizisi tarafından şifrelenen ve bu tarz DNA dizisini içeren bir konak organizmada üretilen bir proteini de ifade eder. Ek olarak, terim sentetik ve/veya cDNA orijinli bir DNA dizisi tarafından şifrelenen ve söz konusu proteinin tanımlayıcı karakteristiklerine sahip olan bir proteini ifade eder. Örneklendirmek amacıyla, "Bacillustan türetilmiş proteazlar" Bacillus tarafından doğal olarak üretilen proteolitik aktiviteye sahip olan enzimleri aynı zamanda Bacillus kaynakları tarafından üretilenlere benzeyen ancak genetik mühendisliği tekniklerinin kullanımı yoluyla serin proteazlarını şifreleyen bir nükleik asit ile transforme edilmiş başka konak hücreler tarafından üretilen serin proteazlarını da ifade eder.

İki polinükleotid veya polipeptit dizisi bağlamında "özdeş" terimi, dizi karşılaştırma veya analiz algoritmaları kullanılarak ölçüldüğü üzere, iki dizide maksimum korespondans için hizalandığında aynı olan rezidüleri ifade eder.

Burada kullanıldığı şekliyle, "özdeşlik %'si" veya "özdeşlik yüzdesi" veya "PID" dizi özdeşliğini ifade eder. Özdeşlik yüzdesi teknikte bilinen standart teknikler kullanılarak belirlenebilir. Kullanışlı algoritmalar BLAST algoritmalarını (Bakınız, Altschul et al., J Mol Biol, 215:403-410, 1990 ve Karlin and Altschul, Proc Natl Acad Sci USA, 90:5873-5787, 1993) içerir. BLAST programı, çoğu varsayılan değerlere ayarlanmış olan, bir kaç arama parametresi kullanır. NCBI BLAST algoritması biyolojik benzerlik açısından en ilgili dizileri bulur ancak 20 rezidüden daha kısa olan sorgu dizileri için tavsiye edilmez (Altschul et al., Nucleic Acids Res, 25:3389-3402, 1997 ve Schaffer et al., Nucleic Acids Res, 29:2994-3005, 2001). Bir nükleik asit dizisi aramaları için emsal varsayılan BLAST parametreleri aşağıdakileri içerir: Komşu sözcükler eşik-değeri = 1; E-değeri kesim-değeri = 10; Skorlama Matriksi = NUC.3.1 (eşleşme = 1, yanlış-eşleşme = -3); Boşluk Açıklığı = 5 ve Boşluk Uzantısı = 2. Bir amino asit dizisi aramaları için emsal varsayılan BLAST parametreleri aşağıdakileri içerir: Sözcük boyutu = 3; E-değeri kesim-değeri = 10; Skorlama Matriksi = BLOSUM62; Boşluk Açıklığı = 11 ve Boşluk Uzantısı = 1. Bir amino asit dizisi özdeşlik yüzdesi (%) değeri eşleşen özdeş rezidülerin sayısını optimal/maksimum hizalama için program tarafından oluşturulan herhangi bir boşluk dâhil olmak üzere "referans" dizinin rezidülerinin toplam sayısına bölme ile belirlenir. BLAST algoritmaları "referans" diziyi "sorgu" dizisi olarak ifade eder.

Burada kullanıldığı şekliyle, "homolog proteinler" veya "homolog proteazlar" primer, sekonder ve/veya tersiyer yapıda belirgin benzerliğe sahip olan proteinleri ifade eder. Protein homoloji proteinler hizalandığında lineer amino asit dizisindeki benzerliği ifade edebilir. Protein dizilerinin homolog araması 0,001 olan eşik-değeri (E-değeri kesim-değeri) ile NCBI BLAST'tan BLASTP ve PSI-BLAST kullanılarak yapılabilir. (Altschul SF, Madde TL, Shaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI BLAST a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 1997 Set 1;25(17):3389-402). Bu bilgi kullanılarak, protein dizileri gruplandırılabilir. Bir fliogenetik ağaç amino asit dizileri kullanılarak inşa edilebilir. Amino asit dizileri bir programa, örneğin, Vector NTI Advance program çiftine, girilmiştir ve bir Kılavuz Ağaç Komşu Birleştirme (NJ) yöntemi kullanılarak oluşturulmuştur (Saitou ve Nei, Mol Biol Evol, 4:406-425, 1987). Ağaç yapımı dizi mesafesi için Kimura düzeltmesi ve boşlukları olan pozisyonları yok sayma kullanılarak hesaplanabilir. Bir program, örneğin, AlignX, filogenetik ağaç üzerinde gösterilen molekül adından sonra parantez içinde hesaplanan mesafe değerlerini gösterebilir.

Moleküller arasındaki homoloji anlama moleküllerin evrimsel tarihini aynı zamanda bunların fonksiyonu hakkındaki bilgiyi ortaya çıkarabilir; bir yeni dizilenmiş protein bir hâlihazırda karakterize edilen proteine homolog olduğunda, burada yeni proteinin biyokimyasal fonksiyonunun bir güçlü gösterimi vardır. İki varlık arasındaki en temel ilişki homolojidir; bunlar bir ortak atadan türetilmiş olduğunda, iki molekülün homolog olduğu söylenir. Homolog moleküller veya homologlar paraloglar ve ortologlar olan iki sınıfa bölünebilir. Paraloglar bir tür içinde bulunan homologlardır. Paraloglar sıklıkla bunların detaylandırılmış biyokimyasal fonksiyonları açısından farklılık gösterir. Ortologlar farklı türlerde bulunan homologlardır ve çok benzer veya özdeş fonksiyonlara sahiptir. Bir protein süper-familyası bunlar için ortak atanın çıkarımının yapılabildiği proteinlerin en geniş gruplamasıdır (kladıdır). Genel olarak bu ortak ata dizi hizalamasına ve mekanistik benzerliğe dayandırılır. Süper-familyalar tipik olarak familya içinde dizi benzerliği gösteren bir kaç protein familyası içerir. "Protein klanı" terimi yaygın olarak MEROPS proteaz sınıflandırma sistemine göre proteaz süper-familyaları için kullanılır.

CLUSTAL W algoritması bir dizi hizalama algoritmasının bir başka örneğidir (Bakınız, Thompson et al., Nucleic Acids Res, 22:4673-4680, 1994). CLUSTAL W algoritması için varsayılan parametreler aşağıdakileri içerir: Boşluk açıklığı kaybı = 10,0; Boşluk uzantısı kaybı = 0,05; Protein ağırlıklı matriks = BLOSUM serisi; DNA ağırlıklı matriks = IUB; Geç ıraksak diziler %'si = 40; Boşluk ayırma mesafesi = 8; DNA geçişleri ağırlığı = 0,50; Hidrofilik rezidüler listesi = GPSNDQEKR; Negatif matriks kullanımı = KAPALI; Toggle Rezidüsü spesifik kayıplar = AÇIK; Toggle hidrofilik kayıpları = AÇIK ve Toggle uç boşluk ayırma kaybı = KAPALI. CLUSTAL algoritmalarında her bir uçta bulunan silinmeler dâhil edilir. Örneğin, 500 amino asitlik bir polipeptidin her bir ucunda (veya polipeptit içinde) bir beş amino asitlik silinme taşıyan bir varyant "referans" polipeptide kıyasla %99'luk (495/500 özdeş rezidü x 100) bir dizi özdeşliği yüzdesine sahip olacaktır. Bu tarz bir varyant, polipeptide "en az %99'luk dizi özdeşliğine" sahip olan bir varyant tarafından kapsanacaktır.

Bir nükleik asit veya polinükleotid, bu, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, örneğin, diğer proteinleri, nükleik asitleri, hücreleri, vb., içeren, diğer bileşenlerden en azından kısmen veya tamamen ayrıldığında, "izole edilmiştir". Benzer şekilde, bir polipeptit, protein veya peptit, bu, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, örneğin, diğer proteinleri, nükleik asitleri, hücreleri, vb., içeren, diğer bileşenlerden en azından kısmen veya tamamen

ayrıldığında, "izole edilmiş"tir. Bir molar temelde, bir izole edilmiş tür bir bileşim içindeki diğer türlere kıyasla daha boldur. Örneğin, bir izole edilmiş tür mevcut tüm makro-moleküler türlerin (bir molar temelde) en az yaklaşık %60'ını, yaklaşık %65'ini, yaklaşık %70'ini, yaklaşık %75'ini, yaklaşık %80'ini, yaklaşık %85'ini, yaklaşık %90'ını, yaklaşık %91'ini, yaklaşık %92'sini, yaklaşık %93'ünü, yaklaşık %94'ünü, yaklaşık %95'ini, yaklaşık %96'sını, yaklaşık %97'sini, yaklaşık %98'ini, yaklaşık %99'unu veya yaklaşık %100'ünü içerebilir. Tercihen, söz konusu tür esasen homojenliğe kadar saflaştırılır (yani, kontaminant tür geleneksel saptama yöntemleri ile bileşim içinde saptanamayabilir). Saflık ve homojenlik teknikte iyi bilinen çok sayıda teknik, örneğin, bir nükleik asit veya bir protein örneğinin, sırasıyla, agaroz veya poliakrilamid jel elektroforezi, akabinde boyama üzerine görselleştirme, kullanılarak belirlenebilir. Arzu edildiğinde, bir yüksek-çözünürlüklü teknikten, örneğin, yüksek performanslı sıvı kromatografisinden (HPLC'den) veya bir benzer araçtan malzemenin saflaştırılması için yararlanılabilir.

Nükleik asitlere veya polipeptitlere uygulandığı üzere "saflaştırılmış" terimi genel olarak, teknikte iyi bilinen analitik teknikler ile belirlendiği üzere başka bileşenlerden esasen yoksun olan bir nükleik asidi veya polipeptidi gösterir (*örn.,* bir saflaştırılmış polipeptit veya polinükleotid bir elektroforetik jelde, kromatografik eluatta ve/veya yoğunluk gradyanlı sentrifügasyona tâbi tutulan bir vasatta bir ayrık bant oluşturur). Örneğin, bir elektroforetik jelde esasen bir banda sebebiyet veren bir nükleik asit veya polipeptit "saflaştırılmıştır". Bir saflaştırılmış nükleik asit veya polipeptit en az yaklaşık %50 saftır, genel olarak en az yaklaşık %60, yaklaşık %65 yaklaşık %70, yaklaşık %75, yaklaşık %80, yaklaşık %85, yaklaşık %90, yaklaşık %91, yaklaşık %92, yaklaşık %93, yaklaşık %94, yaklaşık %95, yaklaşık %96, yaklaşık %97, yaklaşık %98, yaklaşık %99, yaklaşık %99,5, yaklaşık %99,6, yaklaşık %99,7, yaklaşık %99,8 veya daha fazla saftır (*örn.,* bir molar temelde ağırlığa göre yüzde). Bir ilgili anlamda, bir bileşim, burada bir saflaştırma veya zenginleştirme tekniğinin uygulanmasından sonra molekülün konsantrasyonunda bir kayda değer artış olduğunda, bir molekül açısından zenginleştirilmiştir. "Zenginleştirilmiş" terimi, bir bileşim içinde bir başlangıç bileşimine kıyasla daha yüksek olan bir bağıl veya mutlak konsantrasyonda bulunan bir bileşiği, polipeptidi, hücreyi, nükleik asidi, amino asidi veya başka belirtilmiş materyali veya bileşeni ifade eder.

Burada kullanıldığı şekliyle, "fonksiyonel analiz" terimi, bir proteinin aktivitesinin bir gösterimini sağlayan bir analizi ifade eder. Bazı uygulamalarda, terim bir proteinin bunun olağan kapasitesinde bunun işlev gösterme yetisi için analiz edildiği analiz sistemlerini ifade eder. Örneğin, bir proteaz durumunda, bir fonksiyonel analiz proteazın bir proteinöz substratı hidrolize etme etkililiğini belirlemeyi içerir.

"Temizleme aktivitesi" terimi, açıklamanın proteolitik, hidrolize etme, temizleme veya başka prosesi sırasında hakim olan koşullar altında bir serin proteazı polipeptidi veya referans proteaz tarafından sağlanan bir temizleme performansını ifade eder. Bazı uygulamalarda, bir serin proteazı polipeptidinin veya referans proteazın temizleme performansı bir eşya veya yüzey üzerindeki bir veya birden fazla çeşitli enzime duyarlı lekeyi (*örn.,* gıdadan, çimenden, kandan, mürekkepten, sütten, sıvı yağdan ve/veya yumurta proteininden kaynaklanan bir lekeyi) temizlemek için çeşitli analizler kullanılarak belirlenebilir. Bir varyant veya referans proteazın temizleme performansı eşya veya yüzey üzerindeki lekeyi standart yıkama koşuluna (koşullarına) tabi tutma ve lekenin çıkarılma derecesini çeşitli kromatografik, spektrofotometrik veya başka kantitatif metodolojileri kullanarak değerlendirme ile belirlenebilir. Emsal temizleme analizleri ve yöntemleri teknikte bilinir ve bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, WO 99/34011'de ve 6,605,458 Numaralı U.S. Patenti'nde tarif edilenleri aynı zamanda aşağıda sağlanan Örnekler'e dâhil edilen temizleme analizlerini ve yöntemlerini, içerir.

Bir serin proteazı polipeptidinin veya referans proteazın "temizleme etkili miktarı" terimi, proteazın bir spesifik temizleme bileşimi içinde bir arzu edilen düzeyde enzimatik aktivite sağlayan miktarını ifade eder. Bu tarz etkili miktarlar teknikte normal uzmanlığı olan bir kişi tarafından kolaylıkla tespit edilir ve çok sayıda faktöre, örneğin, kullanılan özel proteaza, temizleme uygulamasına, temizleme bileşiminin spesifik bileşimine ve bir sıvı veya kuru (*örn.,* granüler, tablet, çubuk) bileşimin gerekli olup olmamasına, vb., bağlıdır.

"Temizleme yardımcı malzemesi" terimi, açıklamanın bir serin proteazı polipeptidi dışında temizleme bileşimine dâhil edilen herhangi bir sıvı, katı veya gazlı malzemeyi ifade eder. Bazı uygulamalarda, mevcut açıklamanın temizleme bileşimleri bir veya birden fazla temizleme yardımcı malzemesi içerir. Her bir temizleme yardımcı malzemesi tipik olarak temizleme bileşiminin özel tipine ve formuna (*örn.,* sıvı, granül, pudra, çubuk, macun, sprey, tablet, jel, köpük veya başka bileşim) bağlı olarak seçilir.

Tercihen, her bir temizleme yardımcı malzemesi bileşim içinde kullanılan proteaz enzimi ile uyumludur.

Temizleme bileşimleri ve temizleme formülasyonları herhangi bir objeyi, eşyayı ve/veya yüzeyi temizlemek, ağartmak, dezenfekte etmek ve/veya sterilize etmek için uygun olan herhangi bir bileşim içerir. Bu tarz bileşimler ve formülasyonlar, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, örneğin, temizleme veya deterjan bileşimleri (*örn.,* sıvı, tablet, jel, çubuk, granül ve/veya katı çamaşır temizleme veya deterjan bileşimleri ve ince kumaş deterjan bileşimleri) dâhil olmak üzere sıvı ve/veya katı bileşimleri; sert yüzey, örneğin, cam, yün, seramik ve metal mutfak tezgahları ve pencereler için, temizleme bileşimlerini ve formülasyonlarını; halı temizleyicilerini; fırın temizleyicilerini; kumaş tazeleyicilerini; kumaş yumuşatıcılarını ve tekstil, çamaşır destekleyici temizleme veya deterjan bileşimlerini, çamaşır katkı maddesi temizleme bileşimlerini ve çamaşır beneklenme-öncesi temizleme bileşimlerini; el ile veya manüel bulaşık yıkama bileşimleri (*örn.,* "el ile" veya "manüel" bulaşık yıkama deterjanları) ve otomatik bulaşık yıkama bileşimleri (*örn.,* "otomatik bulaşık yıkama deterjanları") dâhil olmak üzere bulaşık yıkama bileşimlerini, içerir. Ayrıca, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, haplar, tabletler, jel kapsüller veya başka tek dozajlı birimler, örneğin, önceden-ölçülmüş pudralar veya sıvılar, dâhil olmak üzere, tek dozajlı birim formlar da mevcut buluş ile kullanım alanı bulur.

Burada kullanıldığı şekliyle, temizleme bileşimi veya temizleme formülasyonları, aksi gösterilmedikçe, granüler veya pudra-formlu çok-amaçlı veya ağır-iş yıkama ajanlarını, özellikle temizleme deterjanlarını; sıvı, granüler, jel, katı, tablet, macun veya birim dozaj formunda çok-amaçlı yıkama ajanlarını, özellikle ağır-iş sıvı (HDL) deterjan veya ağır-iş kuru (HDD) deterjan olarak adlandırılan deterjan tiplerini; sıvı ince-kumaş deterjanlarını; yüksek-köpürme tipinde olanlar dâhil olmak üzere el ile veya manüel bulaşık yıkama ajanlarını; ev içi ve kurumsal kullanım için çeşitli tablet, pudra, katı, granüler, sıvı, jel ve parlatıcı tipleri dâhil olmak üzere el ile veya manüel bulaşık yıkama, otomatik bulaşık yıkama veya tabak çanak veya sofra takımı yıkama ajanlarını; antibakteriyel el-yıkama tipleri, temizleme çubukları, ağız çalkantı suları, dentur temizleyicileri, araba şampuanları, halı şampuanları, banyo temizleyicileri dâhil olmak üzere sıvı temizleme ve dezenfekte etme ajanlarını; insanlar ve diğer hayvanlar için saç şampuanlarını ve/veya saç durulamalarını; duş jellerini ve banyo köpüklerini ve metal temizleyicilerini aynı zamanda temizleme yardımcılarını, örneğin, çamaşır suyu

katkı maddelerini ve "leke-çubuğunu" veya ön-muamele tiplerini, içerir. Bazı uygulamalarda, granüler bileşimler "kompakt" formadır; bazı uygulamalarda, sıvı bileşimler bir "konsantre" formdadır.

Burada kullanıldığı şekliyle, "kumaş temizleme bileşimleri" çamaşır katkı maddesi bileşimleri ve lekelenmiş kumaşların (*örn.,* elbiselerin, ev tekstilinin veya başka tekstil malzemelerinin) sıvı içinde bekletilmesinde ve/veya ön-muamelesinde kullanım için uygun olan bileşimler dâhil olmak üzere eş ile ve makine çamaşır deterjanı bileşimlerini içerir.

Burada kullanıldığı şekliyle, "kumaş-dışı temizleme bileşimleri", bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, örneğin, el ile veya manüel veya otomatik bulaşık yıkama deterjanı bileşimleri, oral temizlik bileşimleri, dentur temizleme bileşimleri, kontakt lens temizleme bileşimleri, yara debridman bileşimleri ve kişisel temizlik bileşimleri dâhil olmak üzere tekstil-dışı (yani, kumaş-dışı) yüzey temizleme bileşimlerini içerir.

Burada kullanıldığı şekliyle, "deterjan bileşimi" veya "deterjan formülasyonu" terimi özel kumaş ve/veya kumaş-dışı objeler veya eşyalar dâhil olmak üzere kirlenmiş veya kirli objelerin temizlenmesi için bir yıkama vasatında kullanım için amaçlanan bir bileşime atfen kullanılır. Mevcut açıklamanın bu tarz bileşimleri herhangi bir özel deterjan bileşimi veya formülasyonu ile sınırlandırılmaz. Bazı uygulamalarda, açıklamanın deterjanları açıklamanın en az bir serin proteazı polipeptidini ve buna ek olarak bir veya birden fazla sürfaktan, transferaz (transferazlar), hidrolitik enzimler, oksido redüktazlar, inşa ediciler (*örn.,* bir inşa edici tuz), ağartma ajanları, çamaşır suyu aktivatörleri, mavileştirme ajanları, flüoresan boyalar, kekleştirme inhibitörleri, maskeleme ajanları, enzim aktivatörleri, antioksidanlar ve/veya çözündürücüler, içerir. Bazı durumlarda, bir inşa edici tuz, tercihen fosfata (*örn.,* sodyum tripolifosfata) kıyasla daha fazla silikat (*örn.,* sodyum metasilikat) ile, bir silikat tuzunun ve bir fosfat tuzunun bir karışımıdır. Açıklamanın bazı bileşimleri, örneğin, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, temizleme bileşimleri veya deterjan bileşimleri herhangi bir fosfat (*örn.,* fosfat tuzu veya fosfatlı inşa edici) içermez.

Burada kullanıldığı şekliyle, "ağartma" terimi bir malzemenin (*örn.,* kumaşın, çamaşırın, kâğıt hamurunun, vb.) veya yüzeyin malzemenin bir parlamasını (yani, beyazlamasını) ve/veya temizlenmesini gerçekleştirmek için yeterli olan bir süre boyunca ve/veya

uygun pH ve/veya sıcaklık koşulları altında muamelesini ifade eder. Ağartma için uygun olan kimyasalların örnekleri, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, örneğin, ClO_2'yi, H_2O'yi, persitleri, NO_2'yi, vb., içerir.

Burada kullanıldığı şekliyle, bir proteazın (*örn.,* açıklamanın bir serin proteazı polipeptidinin) "yıkama performansı" bir serin proteazı polipeptidinin yıkamaya, bileşime serin proteazı polipeptidi eklenmeden deterjana kıyasla deterjana ilave temizleme performansı sağlayan, katkısını ifade eder. Yıkama performansı ilgili yıkama koşulları altında karşılaştırılır. Bazı test sistemlerinde, diğer ilgili faktörler, örneğin, deterjan bileşimi, sabun köpüğü konsantrasyonu, su sertliği, yıkama mekanikleri, süresi, pH'ı ve/veya sıcaklığı, bir belirli piyasa diliminde ev içi uygulama (*örn.,* el ile veya manüel bulaşık yıkama, otomatik bulaşık yıkama, tabak çanak temizleme, sofra takımı temizleme, kumaş temizleme, vb.) için tipik olan koşulun (koşulların) taklit edildiği şekilde kontrol edilebilir.

"İlgili yıkama koşulları" terimi burada, bir el ile bulaşık yıkama, otomatik bulaşık yıkama veya çamaşır deterjanı piyasa diliminde ev içinde gerçekten kullanılan koşulları, özel olarak yıkama sıcaklığını, süresini, yıkama mekaniklerini, sabun köpüğü konsantrasyonunu, deterjan tipini ve su sertliğini, göstermek için kullanılır.

Burada kullanıldığı şekliyle, "dezenfekte etme" terimi, yüzeylerden kontaminantların uzaklaştırılmasını aynı zamanda eşyaların yüzeyleri üzerindeki mikropların inhibisyonunu veya öldürülmesini ifade eder. Mevcut açıklamanın herhangi bir özel yüzey, eşya veya uzaklaştırılacak olan kontaminant (kontaminantlar) veya mikroplar ile sınırlandırılması amaçlanmaz.

Buradaki temizleme bileşimlerinin "kompakt" formu yoğunluk ile ve bileşim açısından, inorganik dolgu tuzunun miktarı ile en iyi yansıtılır. İnorganik dolgu tuzları pudra formundaki deterjan bileşimlerinin geleneksel içerik maddeleridir. Geleneksel deterjan bileşimlerinde, dolgu tuzları kayda değer miktarlarda, tipik olarak, toplam bileşimin ağırlığı olarak yaklaşık %17'si ila yaklaşık %35'i aralığında bulunur. Aksine, kompakt bileşimlerde, dolgu tuzu toplam bileşimin yaklaşık %15'ini aşmayan miktarlarda bulunur. Bazı uygulamalarda, dolgu tuzu bileşimin ağırlığı olarak yaklaşık %10'unu veya daha tercihen yaklaşık %5'ini aşmayan miktarlarda bulunur. Bazı uygulamalarda,

inorganik dolgu tuzları sülfatların ve klorürlerin alkali ve toprak alkali metal tuzlarından seçilir. Bazı uygulamalarda, dolgu tuzu sodyum sülfattır.

II. Serin Proteazı Polipeptitleri

Mevcut açıklama yeni serin proteazı enzimleri sağlar. Mevcut açıklamanın serin proteazı polipeptitleri izole edilmiş, rekombinant, büyük ölçüde saf veya doğal-oluşumlu olmayan polipeptitleri içerir. Bazı uygulamalarda, polipeptitler temizleme uygulamalarında kullanışlıdır ve buna ihtiyacı olan bir eşyayı veya bir yüzeyi temizleme yöntemlerinde kullanışlı olan temizleme bileşimlerine katılabilir.

Bazı uygulamalarda, buluş subtilisinlerin bir *B. akibai/clarkii*-kladıdır. Diğer uygulamalarda, buluş bir DRN motifi içeren bir *B. akibai/clarkii*-kladı subtilisinin bir rekombinant polipeptididir veya bunun aktif fragmanıdır. Bazı uygulamalarda, DRN motifi VKVLDRNGR^{1}G'dir, burada R^1, G veya S arasından seçilir (SEQ ID NO: 42). Diğer uygulamalarda, DRN motifi VKVLDRNGGG'dir (SEQ ID NO: 43). Daha da başka uygulamalarda, DRN motifi VKVLDRNGSG'dir (SEQ ID NO: 44). Bir başka uygulamada, DRN motifi D95R96N97'dir (SEQ ID NO: 45). Bir ilave uygulamada, DRN motifi V91K92V93L94D95R96N97G98G/S99G100'dür (SEQ ID NO: 46). Bir daha ilave uygulamada, DRN motifi V91K92V93L94D95R96N97G98G99G100'dür (SEQ ID NO: 47). Bir başka uygulamada, DRN motifi V91K92V93L94D95R96N97G98S99G100'dür (SEQ ID NO: 48). Hatta bir ilave uygulamada, DRN motifi VKVLDRNGR^{1}G, burada R^1, G veya S arasından seçilir (SEQ ID NO: 42); VKVLDRNGGG (SEQ ID NO: 43); VKVLDRNGSG (SEQ NO: 44); D95R96N97 (SEQ ID NO: 45); V91K92V93L94D95R96N97G98G/S99G100 (SEQ ID NO: 46); V91K92V93L94D95R96N97G98G99G100 (SEQ ID NO: 47) ve V91K92V93L94D95R96N97G98S99G100 (SEQ ID NO: 48) arasından seçilir. SEQ ID NO.'ları: 45'te, 46'da, 47'de ve 48'de izah edilen dizi numaralandırması BspAI02518 SEQ ID NO: 3 dizi numaralandırmasına göredir.

Bazı uygulamalarda, mevcut buluşun polipeptidi, emsallendirilmiş polipeptitlere bir belirtilen derecede amino asit dizisi homolojisine, *örn.,* SEQ ID NO: 3'ten, SEQ ID NO: 6'dan oluşan gruptan seçilen amino asit dizisine %70'lik, %72'lik, %74'lük, %76'lık, %78'lik, %80'lik, %85'lik, %90'lık, %95'lik, %96'lık, %97'lik, %98'lik, %99'luk veya %100'lük dizi özdeşliğine, sahip olan bir polipeptittir ve SEQ ID NO: 42'nin, 43'ün,

44'ün, 45'in, 46'nın, 47'nin veya 48'in bir amino asit dizisini içerir. Bir daha ilave uygulamada, mevcut buluşun polipeptidi, emsallendirilmiş polipeptitlere bir belirtilen derecede amino asit dizisi homolojisine, *örn.,* SEQ ID NO: 3'ün, SEQ ID NO: 6'nın, SEQ ID NO: 11'in, SEQ ID NO: 14'ün, SEQ ID NO: 17'nin, SEQ ID NO: 20'nin, SEQ ID NO: 23'ün, SEQ ID NO: 26'nın, SEQ ID NO: 29'un, SEQ ID NO: 32'nin, SEQ ID NO: 35'in, SEQ ID NO: 38'in, SEQ ID NO: 41'in veya SEQ ID NO: 84'ün amino asit dizisine %72'lik, %74'lük, %76'lık, %78'lik, %80'lik, %85'lik, %90'lık, %95'lik, %96'lık, %97'lik, %98'lik, %99'luk veya %100'lük dizi özdeşliğine, sahip olan bir polipeptittir ve SEQ ID NO: 42'nin, 43'ün, 44'ün, 45'in, 46'nın, 47'nin veya 48'in bir amino asit dizisini içerir. Homoloji, burada tarif edildiği üzere, *örn.,* bir program, örneğin, BLAST, ALIGN veya CLUSTAL, kullanılarak, amino asit dizisi hizalaması ile belirlenebilir. Bazı uygulamalarda, polipeptit proteaz aktivitesine sahip olan bir izole edilmiş, rekombinant, büyük ölçüde saf veya doğal-oluşumlu olmayan enzimdir.

Diğer uygulamalarda, mevcut buluşun polipeptidi veya bunun bir aktif fragmanı, bir *B. akibai/clarkii*-kladı subtilisinden elde edilir, burada polipeptit veya bunun aktif fragmanı proteolitik aktiviteye sahiptir.

Bir başka uygulamada, mevcut buluşun polipeptidi veya bunun bir aktif fragmanı, bir *B. akibai/clarkii*-kladı subtilisinden elde edilir, burada polipeptit veya bunun aktif fragmanı proteolitik aktiviteye sahiptir ve SEQ ID NO: 42'nin, 43'ün, 44'ün, 45'in, 46'nın, 47'nin veya 48'in bir amino asit dizisini içerir.

Mevcut buluşa göre, mevcut buluşun polipeptidi veya bunun bir aktif fragmanı, bir *B. akibai/clarkii*-kladı subtilisinden elde edilir, burada proteolitik aktiviteye sahip olan ve SEQ ID NO: 42'nin, 43'ün, 44'ün, 45'in, 46'nın, 47'nin veya 48'in bir amino asit dizisini içeren polipeptit veya bunun aktif fragmanı ilaveten en azından aşağıdakilere sahip olan bir amino asit dizisi içerir: (i) SEQ ID NO: 11'in, 14'ün, 17'nin, 32'nin, 35'in, 38'in, 41'in veya 84'ün bir amino asit dizisine %72'lik özdeşlik; (ii) SEQ ID NO: 11'in, 14'ün veya 17'nin bir amino asit dizisine %72'lik özdeşlik; (iii) ID NO: 3'ün, 6'nın, 20'nin, 23'ün, 26'nın, 29'un bir amino asit dizisine %70'lik özdeşlik veya (iv) SEQ ID NO: 3'ün, 6'nın, 20'nin, 23'ün, 26'nın, 29'un bir amino asit dizisin %70'lik özdeşlik.

Mevcut buluşa göre, mevcut buluşun polipeptidi veya bunun bir aktif fragmanı, SEQ ID NO: 42'nin, 43'ün, 44'ün, 45'in, 46'nın, 47'nin veya 48'in bir amino asit dizisini içeren

proteolitik aktiviteye sahiptir ve en azından aşağıdakilere sahip olan bir amino asit dizisi içerir: (i) SEQ ID NO: 3'ün, SEQ ID NO: 6'nın, SEQ ID NO: 20'nin, SEQ ID NO: 23'ün, SEQ ID NO: 26'nın veya SEQ ID NO: 29'un amino asit dizisine %70'lik özdeşlik; (ii) SEQ ID NO: 3'ün, SEQ ID NO: 6'nın amino asit dizisine %70'lik özdeşlik; (iii) SEQ ID NO: 11'in, SEQ ID NO: 14'ün, SEQ ID NO: 17'nin, SEQ ID NO: 32'nin, SEQ ID NO: 35'in, SEQ ID NO: 38'in, SEQ ID NO: 41'in veya SEQ ID NO: 84'ün amino asit dizisine %72'lik özdeşlik; (iv) SEQ ID NO: 11'in, SEQ ID NO: 14'ün veya SEQ ID NO: 17'nin amino asit dizisine %72'lik özdeşlik veya (v) SEQ ID NO: 32'nin, SEQ ID NO: 35'in, SEQ ID NO: 38'in, SEQ ID NO: 41'in veya SEQ ID NO: 84'ün amino asit dizisine %72'lik özdeşlik.

Mevcut buluşa göre, proteaz aktivitesine, örneğin, SEQ ID NO: 42'nin, 43'ün, 44'ün, 45'in, 46'nın, 47'nin veya 48'in bir amino asit dizisini içeren alkali proteaz aktivitesine, sahip olan ve önceden tarif edilen hizalama yöntemlerinin herhangi biri kullanılarak hizalandığında, SEQ ID NO: 3'ün, 6'nın, 11'in, 14'ün, 17'nin, 20'nin, 23'ün, 26'nın, 29'un, 32'nin, 35'in, 38'in, 41'in veya 84'ün amino asit dizisinden en fazla 50, en fazla 40, en fazla 30, en fazla 25, en fazla 20, en fazla 15, en fazla 10, en fazla 9, en fazla 8, en fazla 7, en fazla 6, en fazla 5, en fazla 4, en fazla 3, en fazla 2 veya en fazla 1 amino asit rezidüsü (rezidüleri) ile farklılık gösteren bir amino asit dizisi içeren, mevcut buluşun bir polipeptit enzimi sağlanır.

Yukarıda bildirildiği üzere, buluşun varyant enzim polipeptitleri enzimatik aktiviteye (*örn.,* proteaz aktivitelerine) sahiptir ve bundan dolayı, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, tabak çanak eşyalarını, sofra takımı eşyalarını, kumaşları ve sert yüzeylere sahip olan eşyaları (*örn.,* bir tablonun, masa üstünün, duvarın, mobilya eşyasının, zeminin, tavanın, vb. sert yüzeyini) temizlemek için yöntemler dâhil olmak üzere temizleme uygulamalarında kullanışlıdır. Buluşun bir veya birden fazla varyant serin proteaz enzimi polipeptidini içeren emsal temizleme bileşimleri *infra* tarif edilir. Buluşun bir enzim polipeptidinin enzimatik aktivitesi (*örn.,* proteaz enzimi aktivitesi) teknikte normal uzmanlığı olan kişiler tarafından iyi bilinen prosedürler kullanılarak kolaylıkla belirlenebilir. *İnfra* sunulan örnekler enzimatik aktiviteyi ve temizleme performansını değerlendirmek için yöntemleri tarif eder. Buluşun polipeptit enzimlerinin lekeleri (*örn.,* bir protein lekesini, örneğin, kan/süt/mürekkep veya yumurta sarısı), çıkartmadaki, sert yüzeyleri temizlemedeki veya çamaşırları, tabak çanak veya sofra takımı eşyasını (eşyalarını) temizlemedeki performansı teknikte iyi bilinen prosedürler kullanılarak

ve/veya Örnekler'de izah edilen prosedürler kullanılarak kolaylıkla belirlenebilir. Bazı uygulamalarda, buluş buluşun bir rekombinant polipeptididir veya bunun aktif fragmanıdır, burada polipeptit bir sürfaktan varlığında proteaz aktivitesine sahiptir. Bazı uygulamalarda, proteaz aktivitesi kazein hidroliz aktivitesini içerir. Bazı uygulamalarda, proteaz aktivitesi dimetilkazein hidroliz aktivitesini içerir.

Mevcut buluşun serin proteazı polipeptitleri bir geniş pH aralığı koşullarında proteaz aktivitesine sahip olabilir. Bazı uygulamalarda, serin proteazı polipeptitleri, Örnek 4'te gösterildiği üzere, bir substrat olarak azo-kazein üzerinde proteaz aktivitesine sahiptir. Bazı uygulamalarda, serin proteazı polipeptitleri yaklaşık 4,0 ila yaklaşık 12,0 aralığında olan bir pH'ta proteaz aktivitesine sahiptir. Bazı uygulamalarda, serin proteazı polipeptitleri yaklaşık 8,0 ila yaklaşık 12,0 aralığında olan bir pH'ta proteaz aktivitesine sahiptir. Bazı uygulamalarda, serin proteazı polipeptitleri yaklaşık 8,0 ila yaklaşık 12,0 aralığında olan bir pH'ta maksimal proteaz aktivitesinin en az %50'sine, %60'ına, %70'ine, %80'ine veya %90'ına sahiptir. Bazı uygulamalarda, serin proteazı polipeptitleri 8,0'ın, 8,5'in, 9,0'ın, 9,5'in, 10,0'ın, 10,5'in, 11,0'ın veya 11,5'in üstündeki bir pH'ta proteaz aktivitesine sahiptir. Bazı uygulamalarda, serin proteazı polipeptitleri 12,0'ın, 11,5'in, 11,0'ın, 10,5'in, 10,0'u, 9,5'in, 9,0'ın veya 8,5'in altındaki bir pH'ta proteaz aktivitesine sahiptir.

Bazı uygulamalara, mevcut buluşun serin proteazı polipeptitleri yaklaşık 10°C ila yaklaşık 90°C aralığındaki bir sıcaklıkta proteaz aktivitesine sahiptir. Bazı uygulamalara, mevcut buluşun serin proteazı polipeptitleri yaklaşık 50°C ila yaklaşık 75°C aralığındaki bir sıcaklıkta proteaz aktivitesine sahiptir. Bazı uygulamalara, serin proteazı polipeptitleri yaklaşık 50°C ila yaklaşık 75°C aralığındaki bir sıcaklıkta maksimal proteaz aktivitesinin en az %50'sine, %60'ına, %70'ine, %80'ine veya %90'ına sahiptir. Bazı uygulamalarda, serin proteazları 50°C'nin, 55°C'nin, 60°C'nin, 65°C'nin veya 70°C'nin üstündeki bir sıcaklıkta aktiviteye sahiptir. Bazı uygulamalarda, serin proteazları 75°C'nin, 70°C'nin, 65°C'nin, 60°C'nin veya 55°C'nin altındaki bir sıcaklıkta aktiviteye sahiptir.

Bazı uygulamalarda, mevcut buluşun serin proteazı polipeptitleri bir temizleme bileşimi içinde temizleme performansı gösterir. Temizleme bileşimleri sıklıkla, temizleme bileşimlerini, fonksiyonunu idame ettirmesi için enzimler, *örn.,* serin proteazları, için bir zorlu ortam hâline getiren, enzimlerin kararlılığı ve performansı için zararlı olan içerik

maddeleri içerir. Dolayısıyla, bir enzimin bir temizleme bileşimine konulması ve enzimatik fonksiyon (*örn.,* mesela temizleme performansı ile gösterilen, serin proteazı aktivitesi) beklenmesi önemsiz değildir. Bazı uygulamalarda, mevcut buluşun serin proteazı polipeptitleri otomatik bulaşık yıkama (ADW) deterjanı bileşimlerine temizleme performansı gösterir. Bazı uygulamalarda, otomatik bulaşık yıkama (ADW) deterjanı bileşimlerindeki temizleme performansı yumurta sarısı lekelerinin temizlenmesini içerir. Bazı uygulamalarda, mevcut buluşun serin proteazı polipeptitleri çamaşır deterjanı bileşimlerinde temizleme performansı gösterir. Bazı uygulamalarda, çamaşır deterjanı bileşimlerindeki temizleme performansı kan/süt/mürekkep lekelerinin temizlenmesini içerir. Temizleme bileşimlerinin her birinde, mevcut buluşun serin proteazı polipeptitleri bir çamaşır suyu bileşeni ile veya bir çamaşır suyu bileşeni olmadan temizleme performansı gösterir.

Buluşun bir polipeptidi, burada bu tarz değişimlerin polipeptidin enzimatik aktivitesini büyük ölçüde değiştirmediği değişimler dâhil olmak üzere, çeşitli değişimlere, örneğin, bir veya birden fazla amino asit içeri yerleştirmesine, silinmesine ve/veya sübstitüsyonuna, konservatif veya konservatif-olmayan, tabi tutulabilir. Benzer şekilde, buluşun bir nükleik asidi de, çeşitli değişimlere, örneğin, bir özel kodonun (*örn.,* şifrelenmiş amino asit nükleotid mutasyonu tarafından değiştirilmediğinde) bir sessiz varyasyon veya sessiz-olmayan varyasyon ile sonuçlanan, aynı veya bir farklı amino asidi şifreleyeceği şekilde, bir veya birden fazla kodondaki bir veya birden fazla nükleotidin bir veya birden fazla sübstitüsyonuna, dizideki bir veya birden fazla nükleik asidin (veya kodonun) bir veya birden fazla silinmesine, dizideki bir veya birden fazla nükleik asidin (veya kodonun) bir veya birden fazla eklenmesine veya içeri yerleştirilmesine ve/veya dizideki bir veya birden fazla nükleik asidin (veya kodonun) klevajına veya bir veya birden fazla kırpılmasına, tabi tutulabilir. Nükleik asit dizisindeki çok sayıda bu tarz değişim, orijinal nükleik asit dizisi tarafından şifrelenen polipeptit enzime kıyasla elde edilen şifrelenmiş polipeptit enzimin enzimatik aktivitesini büyük ölçüde değiştirmeyebilir. Buluşun bir nükleik asit dizisi ayrıca, arzu edildiğinde, söz konusu bir veya birden fazla kodon hâlâ aynı amino asidi (asitleri) şifrelerken, bir ekspresyon sisteminde (*örn.,* bakteriyel ekspresyon sisteminde) optimum ekspresyon sağlayan bir veya birden fazla kodon içerecek şekilde de modifiye edilebilir.

Bazı uygulamalarda, mevcut buluş burada tarif edilen amino asit sübstitüsyonlarına sahip olan diziler içeren ve aynı zamanda bir veya birden fazla ilave amino asit

sübstitüsyonu, örneğin, konservatif ve konservatif-olmayan sübstitüsyon, içeren arzu edilen enzimatik aktiviteye (*örn.,* proteaz enzimi aktivitesine veya temizleme performansı aktivitesine) sahip olan enzim polipeptitlerinin bir cinsini sağlar, burada polipeptit arzu edilen enzimatik aktiviteyi (*örn.,* istem 1'e göre polipeptit enziminin temizleme aktivitesinde veya performansında yansıtıldığı üzere, proteolitik aktiviteyi) gösterir, idame ettirir veya yaklaşık olarak idame ettirir. Bazı uygulamalarda, proteolitik aktivitesi istem 1'e göre polipeptit enziminin temizleme aktivitesinde veya performansında yansıtılır. Buluşa uygun şekilde amino asit sübstitüsyonları, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, bir veya birden fazla konservatif-olmayan sübstitüsyonu ve/veya bir veya birden fazla konservatif amino asit sübstitüsyonunu, içerebilir. Bir konservatif amino asit rezidüsü sübstitüsyonu tipik olarak, amino asit rezidülerinin bir fonksiyonel sınıfı içindeki bir üyeyi aynı fonksiyonel sınıfa ait olan bir rezidü ile değiştirmeyi içerir (konservatif amino asit rezidülerinin fonksiyonel olarak homolog olduğu fonksiyonel homoloji yüzdesini hesaplamada korunmuş olduğu düşünülür). Bir konservatif amino asit sübstitüsyonu tipik olarak bir amino asit dizisi içindeki bir amino asidin bir fonksiyonel olarak benzer amino asit ile sübstitüsyonunu içerir. Örneğin, alanin, glisin, serin ve treonin fonksiyonel olarak benzerdir ve dolayısıyla bir diğeri için konservatif amino asit sübstitüsyonları görevi görebilir. Aspartik asit ve glutamik asit bir diğeri için konservatif sübstitüsyonlar görevi görebilir. Asparajin ve glutamin bir diğeri için konservatif sübstitüsyonlar görevi görebilir. Arjinin, lizin ve histidin bir diğeri için konservatif sübstitüsyonlar görevi görebilir. İzolösin, lösin, metiyonin ve valin bir diğeri için konservatif sübstitüsyonlar görevi görebilir. Fenilalanin, tirozin ve triptofan bir diğeri için konservatif sübstitüsyonlar görevi görebilir.

Diğer konservatif amino asit sübstitüsyonu grupları göz önünde bulundurulur. Örneğin, amino asitler benzer fonksiyon veya kimyasal yapı veya bileşim ile (*örn.,* asidik, bazik, alifatik, aromatik, sülfür-içeren) gruplandırılabilir. Örneğin, bir alifatik gruplama aşağıdakileri içerebilir: Glisin (G), Alanin (A), Valin (V), Lösin (L), İzolösin (I). Bir diğeri için konservatif sübstitüsyonlar olduğu düşünülen amino asitler içeren diğer gruplar aşağıdakileri içerir: aromatik: Fenilalanin (F), Tirozin (Y), Triptofan (W); sülfür-içeren: Metiyonin (M), Sistein (C); Bazik: Arjinin (R), Lizin (K), Histidin (H); Asidik: Aspartik asit (D), Glutamik asit (E); polar-olmayan yüksüz rezidüler: Sistein (C), Metiyonin (M) ve Prolin (P); hidrofilik yüksüz rezidüler: Serin (S), Treonin (T), Asparajin (N) ve Glutamin (Q). Amino asitlerin ilave gruplamaları teknikte uzmanlığı olan kişiler tarafından iyi-bilinir ve çeşitli standart ders kitaplarında tarif edilir. Yukarıdaki sübstitüsyon grupları ile

bağlantılı olarak, buradaki bir polipeptit dizisinin listelemesi tüm konservatif bir şekilde sübstüte edilmiş polipeptit dizilerinin bir açık listelemesini sağlar.

Daha konservatif sübstitüsyonlar, aynı zamanda veya alternatif olarak uygun olabilen, yukarıda tarif edilen amino asit rezidüsü sınıfları içinde var olur. Daha konservatif olan sübstitüsyonlar için konservasyon grupları aşağıdakileri içerir: valin-lösin-izolösin, fenilalanin-tirozin, lizin-arjinin, alanin-valin ve asparajin-glutamin.

Buluşun bir polipeptit dizisinin konservatif olarak sübstüte edilmiş varyasyonları (*örn.,* buluşun varyant serin proteazları), aynı konservatif sübstitüsyon grubunun, bir konservatif olarak seçilmiş amino asidi ile, polipeptit dizisinin amino asitlerinin bir küçük yüzdesinin, bazen %5'inden, %4'ünden, %3'ünden, %2'sinden veya %1'inden daha azının sübstitüsyonlarını veya 10'dan, 9'dan, 8'den, 7'den, 6'dan, 5'ten, 4'ten, 3'ten, 2'den veya 1'den daha az amino asidinin sübstitüsyonlarını içerir.

III. Serin Proteazlarını Şifreleyen Nükleik Asitler

Buluş, buluşun polipeptitlerini şifreleyen, topluca "buluşun nükleik asitleri" veya buluşun polinükleotidleri" olarak ifade edilebilen izole edilmiş, doğal-oluşumlu veya rekombinant nükleik asitler sağlar. Aşağıda tarif edilenlerin tümü dâhil olmak üzere, buluşun nükleik asitleri, tipik olarak söz konusu polipeptidi veya bunun fragmanını şifreleyen bir dizi içeren bir plazmid ekspresyon vektörünün ekspresyonu yoluyla, buluşun polipeptitlerinin rekombinant üretiminde (*örn.,* ekspresyonunda) kullanışlıdır. Yukarıda tartışıldığı üzere, polipeptitler temizlenmeye ihtiyacı olan bir eşyayı veya bir yüzeyi (*örn.,* bir eşyanın yüzeyini) temizleme için temizleme uygulamalarında ve temizleme bileşimlerine kullanışlı olan enzimatik aktiviteye (*örn.,* proteolitik aktiviteye) sahip olan serin proteazı polipeptitlerini içerir.

Bazı uygulamalarda, mevcut buluşun polinükleotidi emsallendirilen polinükleotide bir belirtilen derecede nükleik asit homolojisine sahip olan bir polinükleotiddir. Bazı uygulamalarda, polinükleotid SEQ ID NO: 1'den, SEQ ID NO: 4'ten, SEQ ID NO: 9'dan, SEQ ID NO: 12'den ve SEQ ID NO: 15'ten oluşan gruptan seçilen bir nükleik asit dizisi içerir. Diğer uygulamalarda, polinükleotid SEQ ID NO: 1'e, 4'e, 18'e, 21'e, 24'e veya 27'ye en az %70'lik, %72'lik, %73'lük, %74'lük, %75'lik, %80'lik, %85'lik, %90'lık, %91'lik, %92'lik, %93'lük, %94'lük, %95'lik, %96'lık, %97'lik, %98'lik, %99'luk veya

%100'lük özdeşliğe sahip olan bir nükleik asit dizisi içerir. Diğer uygulamalarda, mevcut buluşun polinükleotidi ayrıca SEQ ID NO: 1'den, SEQ ID NO: 4'ten, SEQ ID NO: 9'dan, SEQ ID NO: 12'den ve SEQ ID NO: 15'ten oluşan gruptan seçilen bir nükleik asit dizisine bir komplementer nükleik asit dizisine de sahip olabilir. Bir ilave uygulamada, mevcut buluşun polinükleotidi ayrıca SEQ ID NO: 1'e, 4'e, 9'a, 12'ye, 15'e, 18'e, 21'e, 24'e, 27'ye, 30'a, 33'e, 36'ya veya 39'a bir komplementer nükleik asit dizisine de sahip olabilir. Bazı uygulamalarda, mevcut buluşun bir polinükleotidi SEQ ID NO: 3'ün, 6'nın, 20'nin, 23'ün, 26'nın veya 29'un amino asit dizisine en az %70'lik, %71'lik, %72'lik, %73'lük, %74'lük, %75'lik, %80'lik, %85'lik, %90'lık, %95'lik, %96'lık, %97'lik, %98'lik, %99'luk veya %100'lük dizi özdeşliğine sahip olan bir amino asit dizisini şifreleyen bir nükleik asit dizisine sahiptir ve SEQ ID NO: 42'nin, 43'ün, 44'ün, 45'in, 46'nın, 47'nin veya 48'in bir amino asit dizisini içerir. Homoloji, burada tarif edildiği üzere, *örn.,* bir program, örneğin, BLAST, ALIGN veya CLUSTAL, kullanılarak, amino asit dizisi hizalaması ile belirlenebilir.

Bir ilave uygulamada, mevcut buluşun polinükleotidi SEQ ID NO: 42'nin, 43'ün, 44'ün, 45'in, 46'nın, 47'nin veya 48'in bir amino asit dizisini şifreler ve ilaveten SEQ ID NO: 3'ün, 6'nın, 20'nin, 23'ün, 26'nın veya 29'un bir amino asit dizisine en az %70'lik özdeşliğe sahip olan bir amino asit dizisini şifreler. Bir başka uygulamada, mevcut buluşun polinükleotidi SEQ ID NO: 42'nin, 43'ün, 44'ün, 45'in, 46'nın, 47'nin veya 48'in bir amino asit dizisini şifreler ve ilaveten SEQ ID NO: 3'ün veya 6'nın bir amino asit dizisine %70'lik özdeşliğe sahip olan bir amino asit dizisini şifreler. Mevcut buluşa göre, mevcut buluşun polinükleotidi SEQ ID NO: 42'nin, 43'ün, 44'ün, 45'in, 46'nın, 47'nin veya 48'in bir amino asit dizisini şifreler ve ilaveten SEQ ID NO: 11'in, 14'ün, 17'nin, 32'nin, 35'in, 38'in veya 41'in bir amino asit dizisine %72'lik özdeşliğe sahip olan bir amino asit dizisini şifreler. Daha bir ilave uygulamada, mevcut buluşun polinükleotidi SEQ ID NO: 42'nin, 43'ün, 44'ün, 45'in, 46'nın, 47'nin veya 48'in bir amino asit dizisini şifreler ve ilaveten SEQ ID NO: 11'in, 14'ün veya 17'nin bir amino asit dizisine %72'lik özdeşliğe sahip olan bir amino asit dizisini şifreler.

Bazı uygulamalarda, buluş yukarıda "Buluşun Polipeptitleri" başlıklı bölümde ve burada başka yerde tarif edilen buluşun (herhangi bir füzyon proteini, vb. dâhil olmak üzere) herhangi bir polipeptidini şifreleyen bir nükleotid dizisi içeren bir izole edilmiş, rekombinant, büyük ölçüde saf veya doğal-oluşumlu olmayan nükleik asit sağlar. Bazı uygulamalarda, buluş burada tarif edilen buluşun (herhangi bir füzyon proteini, vb. dâhil

olmak üzere) herhangi bir polipeptidini şifreleyen bir nükleotid dizisi içeren bir sentetik olarak türetilmiş nükleik asit sağlar. Buluş ayrıca, yukarıda veya burada başka yerde tarif edilen buluşun herhangi bir polipeptidinin ikisinin veya daha fazlasının bir kombinasyonunu şifreleyen bir izole edilmiş, rekombinant, büyük ölçüde saf veya doğal-oluşumlu olmayan nükleik asit de sağlar. Buluş ayrıca burada tarif edilen buluşun herhangi bir polipeptidinin ikisinin veya daha fazlasının bir kombinasyonunu şifreleyen bir nükleotid dizisi içeren bir sentetik olarak türetilmiş nükleik asit de sağlar. Mevcut buluş, mevcut buluşun bir serin proteazı polipeptidini şifreleyen nükleik asitler sağlar, burada serin proteazı polipeptidi proteolitik aktiviteye sahip olan bir matür formdur. Bazı uygulamalarda, serin proteazı (*örn.,* BspAI02518) bir homolog pro-peptit dizisi (*örn.,* BspAI02518 pro-peptidi) ile rekombinant olarak eksprese edilir. Diğer uygulamalarda, serin proteazı bir heterolog pro-peptit dizisi (*örn.,* aşağıdaki şekilde izah edilen GG36 pro-peptit dizisi:

[illegible] SEQ ID NO:82)

ile rekombinant olarak eksprese edilir.

Buluşun nükleik asitleri herhangi bir uygun sentez, manipülasyon ve/veya izolasyon tekniği veya bunların kombinasyonları kullanılarak üretilebilir. Örneğin, buluşun bir polinükleotidi standart nükleik asit sentezi teknikleri, örneğin, teknikte uzmanlığı olan kişiler tarafından iyi-bilinen katı-faz sentez teknikleri, kullanılarak üretilebilir. Bu tarz tekniklerde, en fazla 50 veya daha fazla nükleotid bazlık fragmanlar tipik olarak sentezlenir, akabinde esasen herhangi bir arzu edilen bitişik nükleik asit dizisini oluşturmak için (*örn.,* enzimatik veya kimyasal ligasyon yöntemleri ile) bağlanır. Buluşun nükleik asitlerinin sentezi ayrıca, tipik olarak otomatikleştirilmiş sentetik yöntemlerde tatbik edildiği üzere, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, klasik fosforamidit yönteminin (Bakınız, *örn.,* Beaucage et al., Tetrahedron Letters 22:1859-69 [1981]) veya Matthes et al., tarafından tarif edilen yöntemin (Bakınız, Matthes et al., EMBO J. 3:801-805 [1984] kullanıldığı kimyasal sentezi, içeren, teknikte bilinen herhangi bir uygun yöntem ile de kolaylaştırılabilir. Buluşun nükleik asitleri ayrıca bir otomatik DNA sentezleyici kullanılarak da üretilebilir. İsteğe göre uyarlanmış nükleik asitler çeşitli ticari kaynaklardan (*örn.,* The Midland Certified Reagent Company, the Great American Gene Company, Operon Technologies Inc., ve DNA2.0) sipariş edilebilir. Nükleik asitleri sentezlemek için diğer teknikler ve ilgili prensipler teknikte bilinir (Bakınız, *örn.,*

Itakura et al., Ann. Rev. Biochem. 53:323 [1984] ve Itakura et al., Science 198:1056 [1984]).

Yukarıda gösterildiği üzere, nükleik asitlerin modifikasyonunda kullanışlı olan rekombinant DNA teknikleri teknikte iyi bilinir. Örneğin, teknikler, örneğin, restriksiyon endonükleaz sindirimi, ligasyon, ters transkripsiyon ve cDNA üretimi ve polimeraz zincir reaksiyonu (*örn.,* PCR) teknikte uzmanlığı olan kişiler tarafından bilinir ve kolaylıkla kullanılır. Buluşun nükleotidleri ayrıca, buluşun bir serin proteazı polipeptidini (polipeptitlerini) şifreleyen polinükleotidlere hibridize olabilen veya bunları PCR ile çoğaltabilen bir veya birden fazla oligonükleotid probunu kullanarak cDNA kütüphanelerini tarama ile de elde edilebilir. cDNA klonlarını taramak ve izole etmek için prosedürler ve PCR amplifikasyon prosedürleri teknikte uzmanlığı olan kişiler tarafından iyi bilinir ve teknikte uzmanlığı olan kişiler tarafından bilinen standart referanslarda tarif edilir. Buluşun bazı nükleik asitleri bir doğal-oluşumlu (*örn.,* bir enzimi veya ana proteazı şifreleyen) polinükleotid omurgasını, örneğin, bir bilinen mutajenez prosedürü (*örn.,* yere-yönlendirilmiş mutajenez, yer satürasyon mutajenezi ve *in vitro* rekombinasyon), ile değiştirme ile elde edilebilir. Buluşun serin proteazı polipeptitlerini şifreleyen buluşun modifiye edilmiş polinükleotidlerini üretmek için uygun olan, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, örneğin, yer-satürasyon mutajenezi, tarama mutajenezi, içeri yerleştirme ile ilgili mutajenez, silinme mutajenezin, rastgele mutajenez, yere-yönlendirilmiş mutajenez ve yönlendirilmiş-evrim aynı zamanda çeşitli başka rekombinasyonel yaklaşımlar, dâhil olmak üzere, çeşitli yöntemler teknikte bilinir.

Serin Proteazları Üretmek için Vektörler, Konak Hücreler ve Yöntemler

Mevcut buluş, burada tarif edilen buluşun en az bir serin proteazı polinükleotidini (*örn.,* burada tarif edilen buluşun bir serin proteazı polipeptidini şifreleyen bir polinükleotid) içeren vektörler, buluşun en az bir nükleik asidini veya polinükleotidini içeren ekspresyon vektörleri veya ekspresyon kasetleri, buluşun en az bir nükleik asidini veya polinükleotidini içeren büyük ölçüde saf veya rekombinant DNA yapıları, buluşun en az bir polinükleotidini içeren izole edilmiş veya rekombinant hücreler ve bu tarz vektörlerin, nükleik asitlerin, ekspresyon vektörlerinin ekspresyon kasetlerinin, DNA yapılarının, hücrelerin, hücre kültürlerinin veya bunların herhangi bir kombinasyonunun veya karışımının birini veya birden fazlasını içeren bileşimler sağlar.

Bazı uygulamalarda, buluş buluşun en az bir nükleik asidini veya polinükleotidini içeren buluşun en az bir vektörünü (*örn.,* ekspresyon vektörünü veya DNA yapısını) içeren rekombinant hücreler sağlar. Başka yöntemlerin teknikte mevcut olmasına ve bilinmesine rağmen, bazı bu tarz rekombinant hücreler bu tarz en az bir vektör ile transforme edilir veya transfekte edilir. Bu tarz hücreler tipik olarak konak hücreler olarak ifade edilir. Bazı bu tarz hücreler, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, *Bacillus sp.* hücreleri, örneğin, *B. subtilis* hücreleri, dâhil olmak üzere, bakteriyel hücreleri içerir. Buluş ayrıca, buluşun en az bir serin proteazı polipeptidini içeren rekombinant hücreler (*örn.,* rekombinant konak hücreler) de sağlar.

Bazı uygulamalarda, buluş buluşun bir nükleik asidini veya polinükleotidini içeren bir vektör sağlar. Bazı uygulamalarda, vektör, içinde buluşun bir serin proteazı polipeptidini şifreleyen buluşun bir polinükleotid dizisinin etkili gen ekspresyonu için gerekli olan bir veya ilave nükleik asit segmentine (*örn.,* buluşun bir serin proteazı polipeptidini şifreleyen buluşun polinükleotidine operatif olarak bağlanmış bir promotöre) operatif olarak bağlandığı, bir ekspresyon vektörüdür veya ekspresyon kasetidir. Bir vektör bir transkripsiyon sonlandırıcı ve/veya bir seleksiyon geni, örneğin, plazmid ile enfekte edilmiş konak hücrelerin anti-mikrobiyal-içeren vasatlarda büyümesi ile sürekli kültürel idamesine olanak sağlayan, bir antibiyotik direnç geni, içerebilir.

Bir ekspresyon vektörü bir plazmidden veya viral DNA'dan türetilebilir veya alternatif uygulamalarda, her ikisinin elemanlarını da içerir. Emsal vektörler, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, pC194'ü, pJH101'i, pE194'ü, pHP13'ü (Bakınız, Harwood and Cutting [eds.], Chapter 3, Molecular Biological Methods for Bacillus, John Wiley & Sons [1990]; *B. subtilis* için uygun kopyalama plazmidleri sf. 92'de listelenenleri içerir), Bakınız, ayrıca, Perego, Integrational Vectors for Genetic Manipulations in *B. subtilis,* in Sonenshein et al., [eds.] B. subtilis and Other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics, American Society for Microbiology, Washington, D.C. [1993], pp. 615-624) ve p2JM103BBI'yı, içerir.

Bir hücre içinde söz konusu proteinin (*örn.,* serin proteazı polipeptidinin) ekspresyonu ve üretimi için, serin proteazı polipeptidini şifreleyen bir polinükleotidin en az bir kopyasını içeren ve bazı durumlarda çok sayıda kopyasını içeren en az bir ekspresyon vektörü serin proteazının ekspresyonu için uygun olan koşullar altında hücreye transforme edilir. Mevcut buluşun bazı uygulamalarında, serin proteazı polipeptidini

şifreleyen bir polinükleotid dizisi (aynı zamanda vektöre dâhil edilen diğer diziler) konak hücrenin genomuna entegre edilirken, diğer uygulamalarda, serin proteazı polipeptidini şifreleyen bir polinükleotid dizisi içeren bir plazmid vektörü hücre içinde otonom ekstrakromozomal element olarak kalır. Buluş hem ekstrakromozomal nükleik asit elementlerini hem de konak hücre genomuna entegre edilmiş yeni gelen nükleotid dizilerini sağlar. Burada tarif edilen vektörler buluşun serin proteazı polipeptitlerinin üretimi için kullanışlıdır. Bazı uygulamalarda, serin proteazı polipeptidini şifreleyen bir polinükleotid yapısı serin proteazı polipeptidini şifreleyen polinükleotidin konak kromozomuna entegrasyonuna ve opsiyonel olarak amplifikasyonuna olanak sağlayan bir entegre etme vektörü üzerinde bulunur. Entegrasyon için yerlerin örnekleri teknikte uzmanlığı olan kişiler tarafından iyi bilinir. Bazı uygulamalarda, buluşun bir serin proteazı polipeptidini şifreleyen bir polinükleotidin transkripsiyonu seçilmiş öncül proteaz için doğal-tip promotör olan bir promotör tarafından gerçekleştirilir. Bazı başka uygulamalarda, promotör öncül proteaza heterologdur ancak konak hücre içinde fonksiyoneldir. Spesifik olarak, bakteriyel konak hücrelerde kullanım için uygun promotörlerin örnekler, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, örneğin, amyE, amyQ, amyL, pstS, sacB, pSPAC, pAprE, pVeg, pHpaII promotörlerini, *B. stearothermophilus* maltojenik amilaz geninin, *B. amyloliquefaciens* (BAN) amilaz geninin, *B. subtilis* alkalin proteaz geninin, *B. clausii* alkalin proteaz geninin, *B. pumilis* ksilosidaz geninin, *B. thuringiensis* cryIIIA'nın ve *B. licheniformis* alfa-amilaz geninin promotörünü, içerir. İlave promotörler, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, A4 promotörünü aynı zamanda faj Lamda PR veya PL promotörlerini ve *E. coli* lac, trp veya tac promotörlerini, içerir.

Mevcut buluşun serin proteazı polipeptitleri bakteriler ve funguslar dâhil olmak üzere, herhangi bir uygun mikroorganizmanın konak hücrelerinde üretilebilir. Bazı uygulamalarda, mevcut buluşun serin proteazı polipeptitleri Gram-pozitif bakterilerde üretilebilir. Bazı uygulamalarda, konak hücreler *Bacillus spp.*'dir, *Streptomyces spp.*'dir, *Escherichia spp.*'dir, *Aspergillus spp.*'dir, *Trichoderma spp.*'dir, *Pseudomonas spp.*'dir, *Corynebacterium spp.*'dir, *Saccharomyces spp.*'dir veya *Pichia spp.*'dir. Bazı uygulamalarda, serin proteazı polipeptitleri *Bacillus sp.* konak hücreleri tarafından üretilir. Buluşun serin proteazı polipeptitlerinin üretiminde kullanım alanı bulan *Bacillus sp.* konak hücrelerinin örnekleri, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, *B. licheniformis*'i, *B. lentus*'u, *B. subtilis*'i, *B. amyloliquefaciens*'i, *B. lentus*'u, *B. brevis*'i, *B. stearothermophilus*'u, *B. alkalophilus*'u, *B. coagulans*'ı, *B. circulans*'ı, *B. pumilis*'i, *B. thuringiensis*'i, *B. clausii*'yi ve *B. megaterium*'u aynı zamanda Bacillus cinsi içindeki

diğer organizmaları, içerir. Bazı uygulamalarda, *B. subtilis* konak hücreleri serin proteazı polipeptitlerinin üretimi için kullanılır. 5,264,366 ve 4,760,025 (RE 34,606) Numaralı U.S. Patentleri, başka uygun suşların kullanılabilmesine rağmen, buluşun serin proteazı polipeptidini üretmek için kullanılan çeşitli bacillus konak suşlarını tarif eder.

Buluşun serin proteazı polipeptitlerini üretmek için kullanılabilen bir kaç bakteriyel suş, rekombinant-olmayan (yani, doğal-tip) *Bacillus sp.* suşlarını aynı zamanda doğal-oluşumlu suşların ve/veya rekombinant suşların varyantlarını içerir. Bazı uygulamalarda, konak suş bir rekombinant suştur, burada söz konusu bir polipeptidi şifreleyen bir polinükleotid konağa uygulanmıştır. Bazı uygulamalarda, konak suş bir *B. subtilis* konak suşudur ve özel olarak bir rekombinant *B. subtilis* konak suşudur. Bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, örneğin, 1A6 (ATCC 39085), 168 (1A01), SB19, W23, Ts85, B637, PB1753 ila PB1758, PB3360, JH642, 1A243 (ATCC 39,087), ATCC 21332, ATCC 6051, MI113, DE100 (ATCC 39,094), GX4931, PBT 110 ve PEP 211 suşu dâhil olmak üzere çok sayıda *B. subtilis* suşu bilinir (Bakınız, *örn.,* Hoch et al., Genetics 73:215-228 [1973]; Bakınız, *örn.,* 4,450,235 ve 4,302,544 Numaralı U.S. Patentleri ve EP 0134048). *B. subtilis*'in bir ekspresyon konak hücreleri olarak kullanımı teknikte iyi bilinir (Bakınız, *örn.,* Palva et al., Gene 19:81-87 [1982]; Fahnestock ve Fischer, J. Bacteriol., 165:796-804 [1986] ve Wang et al., Gene 69:39-47 [1988]).

Bazı uygulamalarda, Bacillus konak hücresi aşağıdaki genlerin en az birinde bir mutasyon veya silinme içeren bir *Bacillus sp.*'dir, degU, degS, degR ve degQ. Bazı uygulamalarda, mutasyon bir degU genindedir ve bazı uygulamalarda, mutasyon degU(Hy)32'dir (Bakınız, *örn.,* Msadek et al., J. Bacteriol. 172:824-834 [1990] ve Olmos et al., Mol. Gen. Genet. 253:562-567 [1997]). Bazı uygulamalarda, Bacillus konağı scoC4'te (Bakınız, *örn.,* Caldwell et al., J. Bacteriol. 183:7329-7340 [2001]); spoIIE'de (Bakınız, *örn.,* Arigoni et al., Mol. Microbiol. 31:1407-1415 [1999]) ve/veya oppA'da veya opp operonunun diğer genlerinde (Bakınız, *örn.,* Perego et al., Mol. Microbiol. 5:173-185 [1991]) bir mutasyon veya silinme içerir. Gerçekte, opp operonunda oppA'daki bir mutasyon ile aynı fenotipe neden olan herhangi bir mutasyonun buluşun değiştirilmiş Bacillus suşunun bazı uygulamalarında kullanım alanı bulacağı düşünülür. Bazı uygulamalarda, bu mutasyonlar tek başına gerçekleşirken, diğer uygulamalarda, mutasyonların kombinasyonları mevcuttur. Bazı uygulamalarda, buluşun bir serin proteazı polipeptidini üretmek için kullanılabilen bir

değiştirilmiş Bacillus konak hücresi suşu yukarıda-bahsedilen genlerin birinde veya birden fazlasında hâlihazırda bir mutasyon içeren bir Bacillus konağı suşudur. Buna ek olarak, endojen proteaz genlerinin mutasyonunu (mutasyonlarını) ve/veya silinmelerini içeren *Bacillus sp.* konak hücreleri kullanım alanı bulur. Bazı uygulamalarda, Bacillus konak hücresi aprE ve nprE genlerinin bir silinmesini içerir. Diğer uygulamalarda, *Bacillus sp.* konak hücresi 5 proteaz geninin bir silinmesini içerirken, diğer uygulamalarda, *Bacillus sp.* konak hücresi 9 proteaz geninin bir silinmesini içerir (Bakınız, *örn.,* 2005/0202535 Numaralı U.S. Patent Başvurusu Yayını).

Konak hücreler buluşun en az bir serin proteazı polipeptidini şifreleyen en az bir nükleik asit ile teknikte bilinen herhangi bir uygun yöntem kullanılarak transforme edilir. Bir nükleik asidi (*örn.,* DNA'yı) plazmid DNA yapılarından veya vektörlerden yararlanan Bacillus hücrelerine veya *E. coli* hücrelerine uygulamak ve bu tarz plazmid DNA yapılarını veya vektörleri bu tarz hücrelere transforme etmek için yöntemler iyi bilinir. Bazı uygulamalarda, plazmidler bunu takiben *E. coli* hücrelerinden izole edilir ve Bacillus hücrelerine transforme edilir. Bununla birlikte, araya giren mikroorganizmalar, örneğin, *E. coli*, kullanmak esansiyel değildir ve bazı uygulamalarda, bir DNA yapısı veya vektör bir Bacillus konağına doğrudan uygulanır.

Teknikte uzmanlığı olan kişiler buluşun nükleik asit dizilerini Bacillus hücrelerine uygulamak için uygun olan yöntemlerin gayet farkındadır (Bakınız, *örn.,* Ferrari et al., "Genetics," in Harwood et al., [eds.], Bacillus, Plenum Publishing Corp. [1989], pp. 57-72; Saunders et al., J. Bacteriol. 157:718-726 [1984]; Hoch et al., J. Bacteriol. 93:1925 -1937 [1967]; Mann et al., Current Microbiol. 13:131-135 [1986]; Holubova, Folia Microbiol. 30:97 [1985]; Chang et al., Mol. Gen. Genet. 168:11-115 [1979]; Vorobjeva et al., FEMS Microbiol. Lett. 7:261-263 [1980]; Smith et al., Appl. Env. Microbiol. 51:634 [1986]; Fisher et al., Arch. Microbiol. 139:213-217 [1981] ve McDonald, J. Gen. Microbiol. 130:203 [1984]). Gerçekte, protoplast transformasyonu ve transfeksiyon dâhil olmak üzere transformasyon, transdüksiyon ve protoplast füzyonu tarzındaki yöntemler iyi bilinir ve mevcut buluşta kullanım için uygundur. Bacillus hücrelerini transforme etmek için teknikte bilinen yöntemler bir donör plazmidin bir kısmen homolog yerleşik plazmid taşıyan kompetan hücreler tarafından alımını içeren plazmid belirteçli kurtarma transformasyonu tarzında yöntemleri içerir (Bakınız, Contente et al., Plasmid 2:555-571 [1979]; Haima et al., Mol. Gen. Genet. 223:185-191 [1990]; Weinrauch et al., J. Bacteriol. 154:1077-1087 [1983] ve Weinrauch et al., J. Bacteriol.

169:1205-1211 [1987]). Bu yöntemde, gelen donör plazmid kromozomal transformasyonu taklit eden bir proseste yerleşik "yardımcı" plazmidin homolog bölgesi ile yeniden-birleşir.

Yaygın olarak kullanılan yöntemlere ek olarak, bazı uygulamalarda, konak hücreler buluşun bir serin proteazı polipeptidini şifreleyen bir nükleik asit içeren bir DNA yapısı veya vektör ile doğrudan transforme edilir (yani, bir ara hücre konak hücreye uygulamadan önce DNA yapısını veya vektörü çoğaltmak veya başka şekilde işlemek için kullanılmaz). Buluşun DNA yapısının veya vektörünün konak hücrelere uygulanması konak genomuna içeri yerleştirme olmadan bir konak hücreye bir nükleik asit dizisini (*örn.,* DNA dizisini) uygulamak için teknikte bilinen fiziksel ve kimyasal yöntemleri içerir. Bu tarz yöntemler, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, kalsiyum klorür presipitasyonunu, elektroporasyonu, çıplak DNA'yı, lipozomları ve benzerlerini, içerir. İlave uygulamalarda, DNA yapıları veya vektör, plazmid içine yerleştirilmeden, bir plazmid ile birlikte-transforme edilir. İlave uygulamalarda, bir selektif belirteç değiştirilmiş Bacillus suşundan teknikte bilinen yöntemler ile silinir (Bakınız, Stahl et al., J. Bacteriol. 158:411-418 [1984] ve Palmeros et al., Gene 247:255 -264 [2000]).

Bazı uygulamalarda, mevcut buluşun transforme edilmiş hücreleri geleneksel besin vasatları içinde kültürlenir. Uygun spesifik kültür koşulları, örneğin, sıcaklık, pH ve benzerleri teknikte uzmanlığı olan kişiler tarafından bilinir ve bilimsel literatürde iyi tarif edilir. Bazı uygulamalarda, buluş buluşun en az bir serin proteazı polipeptidini veya en az bir nükleik asidini içeren bir kültür (*örn.,* hücre kültürü) sağlar.

Bazı uygulamalarda, buluşun en az bir serin proteazı polipeptidini şifreleyen en az bir polinükleotid dizisi ile transforme edilmiş konak hücreler mevcut proteazın ekspresyonuna izin veren koşullar altında bir uygun besin vasatı içinde kültürlenir, bundan sonra elde edilen proteaz kültürden geri-kazanılır. Bazı uygulamalarda, hücreler tarafından üretilen proteaz, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, örneğin, konak hücreleri sentrifügasyon veya filtrasyon ile vasattan ayırma, süpernatantın veya filtratın proteinöz bileşenlerini bir tuz (*örn.,* amonyum sülfat) vasıtasıyla çökeltme, kromatografik saflaştırma (*örn.,* iyon değişim, jel filtrasyon, afinite, vb.), dâhil olmak üzere, geleneksel prosedürler ile kültür vasatından geri-kazanılır.

Bazı uygulamalarda, bir rekombinant konak hücre tarafından üretilen bir serin proteazı polipeptidi kültür vasatına salgılanır. Bir saflaştırmayı kolaylaştırma alanını şifreleyen bir nükleik asit dizisi proteinlerin saflaştırılmasını kolaylaştırmak için kullanılabilir. Bir serin proteazı polipeptidini şifreleyen bir polinükleotid dizisi içeren bir vektör veya DNA yapısı ilaveten, serin proteazı polipeptidinin saflaştırılmasını kolaylaştırmak için bir saflaştırmayı kolaylaştırma alanını şifreleyen bir nükleik asit dizisi içerebilir (Bakınız, *örn.,* Kroll et al., DNA Cell Biol. 12:441-53 [1993]). Bu tarz saflaştırmayı kolaylaştırma alanları, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, örneğin, immobilize edilmiş metaller üzerine saflaştırmaya olanak sağlayan metal şelatlama peptitlerini, örneğin, histidin-triptofan modüllerini (Bakınız, Porath, Protein Expr. Purif. 3:263-281 [1992]), immobilize edilmiş immünoglobülin üzerinde saflaştırmaya olanak sağlayan protein A alanlarını ve FLAGS uzatma/afinite saflaştırma sisteminde yararlanılan alanları, içerir. Bir yarılabilen bağlayıcı dizinin, örneğin, Faktör XA'nın veya enterokinazın (*örn.,* Invitrogen, San Diego, CA, firmasından erişilebilen dizilerin) saflaştırma alanı ve heterolog protein arasına dâhil edilmesi de saflaştırmayı kolaylaştırmak için kullanım alanı bulur.

Bir enzimin, örneğin, buluşun bir serin proteazı polipeptidinin, enzimatik aktivitesini saptamak ve ölçmek için analizler iyi bilinir. Proteazların (*örn.,* buluşun serin proteazı polipeptitlerinin) aktivitesini saptamak ve ölçmek için çeşitli analizler de teknikte normal uzmanlığı olan kişiler tarafından bilinir. Özel olarak, proteaz aktivitesini ölçmek için, 280 nm'de absorbans olarak veya Folin yöntemi kullanılarak kolorimetrik olarak ölçülen, kazeinden veya hemoglobinden asitte-çözünebilen peptitlerin salımına dayanan analizler mevcuttur. Başka emsal analizler, kromojenik substratların çözündürülmesini içerir (Bakınız, *örn.,* Ward, "Proteinases," in Fogarty (ed.)., Microbial Enzymes and Biotechnology, Applied Science, London, [1983], pp. 251-317). Başka emsal analizler, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, süksinil-Ala-Ala-Pro-Phe-para nitroanilid analizini (sük-AAPF-pNA) ve 2,4,6-trinitrobenzen sülfonat sodyum tuzu analizini (TNBS analizini), içerir. Teknikte olanlar tarafından bilinen çok sayıda ilave referans uygun yöntemler sağlar (Bakınız, *örn.,* Wells et al., Nucleic Acids Res. 11:7911-7925 [1983]; Christianson et al., Anal. Biochem. 223:119 -129 [1994] ve Hsia et al., Anal Biochem. 242:221-227 [1999]).

Bir konak hücredeki bir matür proteazın (*örn.,* mevcut buluşun matür serin proteazı polipeptitlerinin) üretim düzeyini belirlemek için çeşitli yöntemler kullanılabilir. Bu tarz yöntemler, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, örneğin, proteaza spesifik poliklonal

veya monoklonal antikorlardan yararlanan yöntemleri, içerir. Emsal yöntemler, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, enzime-bağlı bağışıklık analizlerini (ELİZA'yı), radyoimmünoanalizleri (RIA'yı), flüoresan immünoanalizleri (FIA'yı) ve flüoresan aktive edilmiş hücre ayırmayı (FACS'ı), içerir. Bu ve başka analizler teknikte iyi bilinir (Bakınız, *örn.,* Maddox et al., J. Exp. Med. 158:1211 [1983]).

Bazı başka uygulamalarda, buluş buluşun bir matür serin proteazı polipeptidini yapmak veya üretmek için yöntemler sağlar. Bir matür serin proteazı polipeptidi bir sinyal peptidi veya bir pro-peptit dizisi içermez. Bazı yöntemler buluşun bir serin proteazı polipeptidini, bir rekombinant bakteriyel konak hücre, örneğin, mesela, bir *Bacillus sp.* hücresi (*örn.,* bir *B. subtilis* hücresi), içinde yapmayı veya üretmeyi içerir. Bazı uygulamalarda, buluş buluşun bir serin proteazı polipeptidini üretmek içni bir yöntem sağlar, bu yöntem buluşun bir serin proteazı polipeptidini şifreleyen bir nükleik asit içeren bir rekombinant ekspresyon vektörü içeren bir rekombinant konak hücreyi serin proteazı polipeptidinin üretimi için elverişli olan koşullar altında yetiştirmeyi içerir. Bazı bu tarz yöntemler ilaveten serin proteazı polipeptidini kültürden geri-kazanmayı içerir.

Bazı uygulamalarda, buluş buluşun bir serin proteazı polipeptidini üretmenin yöntemlerini sağlar, bu yöntemler aşağıdakileri içerir: (a) buluşun bir serin proteazı polipeptidini şifreleyen bir nükleik asit içeren bir rekombinant ekspresyon vektörünü hücrelerin (*örn.,* bakteriyel hücrelerin, örneğin, *B. subtilis* hücrelerinin) bir popülasyonuna uygulama ve (b) hücreleri ekspresyon vektörü tarafından şifreleyen serin proteazı polipeptidini üretmek için elverişli olan koşullar altında bir kültür vasatı içinde kültürleme. Bazı bu tarz yöntemler ilaveten aşağıdakini içerir: (c) serin proteazı polipeptidini hücrelerden veya kültür vasatından izole etme.

V. Serin Proteazları İçeren Bileşimler

A. Kumaş ve Ev Bakım Ürünleri

Aksi bildirilmedikçe, burada sağlanan tüm bileşen veya bileşim düzeyleri bu bileşenin veya bileşimin aktif düzeyine atfen yapılır ve piyasada satılan kaynaklarda bulunabilen, safsızlıkları, örneğin, rezidüel çözücüleri veya yan-ürünleri, dışarıda bırakır. Enzim bileşenlerinin ağırlıkları toplam aktif proteine göredir. Tüm yüzdeler ve oranlar aksi gösterilmedikçe ağırlığa göre hesaplanır. Tüm yüzdeler ve oranlar aksi gösterilmedikçe

toplam bileşime göre hesaplanır. Buluşun bileşimleri temizleme bileşimleri, örneğin, deterjan bileşimleri, içerir. Emsallendirilmiş deterjan bileşimlerinde, enzim düzeyleri toplam bileşimin ağırlığına göre saf enzim ile ifade edilir ve aksi belirtilmedikçe, deterjan içerik maddeleri toplam bileşimlerin ağırlığına göre ifade edilir.

Mevcut buluşun amaçları için esansiyel değil iken, buradan sonra örneklendirilen yardımcıların sınırlayıcı-olmayan listesi çabuk hazırlanan temizleme bileşimlerinde kullanım için uygundur. Bazı uygulamalarda, bu yardımcılar, örneğin, temizlenecek olan substratın muamelesi için, temizleme performansına yardımcı olmak veya temizleme performansını arttırmak için veya parfümler, renklendiriciler, boyalar veya benzerleri ile olan durumda olduğu gibi temizleme bileşiminin estetiklerini modifiye etmek için, katılır. Bu tarz yardımcıların mevcut buluşun serin proteazı polipeptitlerine ek olduğu anlaşılır. Bu ilave bileşenlerin tam doğası ve bunların katılım düzeyleri bileşimin fiziksel formuna ve bunun bunlar için kullanılacağı temizleme operasyonuna bağlı olacaktır. Uygun yardımcı malzemeler, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, çamaşır suyu katalizörlerini, başka enzimleri, enzim stabilize etme sistemleri, şelantları, optik parlatıcıları, kir salım polimerlerini, boya transferi ajanlarını, dağıtıcıları, sabun köpüğü baskılayıcılarını, boyaları, parfümleri, renklendiricileri, dolgu tuzlarını, foto-aktivatörleri, flüoreserleri, kumaş parlatıcıları, hidrolize edilebilen sürfaktanları, koruyucuları, antioksidanları, anti-çekme ajanlarını, anti-kırışıklık ajanlarını, germisitleri, fungisitleri, renk beneklerini, gümüş-bakımını, anti-matlaşma ve/veya anti-korozyon ajanlarını, alkalinite kaynaklarını, çözündürme ajanlarını, taşıyıcıları, işleme yardımcılarını, pigmentleri ve pH kontrolü ajanlarını, sürfaktanları, inşa edicileri, şelatlama ajanlarını, boya transferini inhibe etme ajanlarını, depolama yardımcılarını, dağıtıcıları, ilave enzimleri ve enzim stabilazörlerini, katalitik malzemeleri, çamaşır suyu aktivatörlerini, çamaşır suyu destekleyicilerini, hidrojen peroksidi, hidrojen peroksit kaynağını, önceden-oluşturulmuş perasitleri, polimerik dağıtma ajanlarını, kil kir uzaklaştırma/anti-yeniden-depolama ajanlarını, parlatıcıları, sabun köpüğü baskılayıcılarını, taşıyıcıları, hidrotopları, işleme yardımcılarını ve/veya pigmentleri, içerir. Aşağıdaki açıklamaya ek olarak, bu tarz başka yardımcıların uygun örnekleri ve kullanım düzeyleri 5,576,282, 6,306,812, 6,326,348, 6,610,642, 6,605,458, 5,705,464, 5,710,115, 5,698,504, 5,695,679, 5,686,014 ve 5,646,101 Numaralı U.S. Patentlerinde bulunur. Temizleme yardımcı malzemelerinin temizleme bileşimleri içindeki mevcut buluşun serin proteazı polipeptitleri ile uyumlu olmadığı uygulamalarda, o zaman iki bileşenin kombinasyonu uygun olana kadar temizleme yardımcı malzemelerini ve

proteazı (proteazları) ayrılmış (yani, bir diğeri ile temas etmeyen) şekilde tutmanın uygun yöntemleri kullanılır. Bu tarz ayırma yöntemleri teknikte bilinen herhangi bir uygun yöntemi (*örn.,* jel kapsüller, enkapsülasyonu, tabletleri, fiziksel ayırmayı, vb.) içerir. Yukarıda bahsedilen yardımcı içerik maddeleri mevcut buluşun temizleme bileşimlerinin dengesini oluşturabilir.

Mevcut buluşun temizleme bileşimleri, örneğin, çamaşır uygulamalarında, sert yüzey temizleme uygulamalarında, otomatik bulaşık yıkama ve elde bulaşık yıkama dâhil olmak üzere bulaşık yıkama uygulamalarında aynı zamanda kozmetik uygulamalarda, örneğin, denturların, dişlerin, saçın ve cildin temizlenmesinde, avantajlı bir şekilde kullanılır. Mevcut buluşun enzimleri ayrıca kontakt lensin temizlenmesinde ve yarar debridmanı uygulamalarında kullanım için de uygundur. Buna ek olarak, daha düşük sıcaklıktaki çözeltilerde arttırılmış etkililiğin eşsiz avantajlarından dolayı, mevcut buluşun enzimleri çamaşır uygulamaları için ideal bir şekilde uygundur. İlaveten, mevcut buluşun enzimleri granüler ve sıvı bileşimlerde kullanım alanı bulur.

Mevcut buluşun serin proteazı polipeptitleri ayrıca, temizleme katkı maddesi ürünlerinde de kullanım alanı bulur. Bazı uygulamalarda, düşük sıcaklıktaki çözelti temizleme uygulamaları kullanım alanı bulur. Bazı uygulamalarda, mevcut buluş, ilave ağartma etkililiği arzu edildiğinde, bir yıkama prosesine dâhil edilmesi ideal olarak uygun olan mevcut buluşun en az bir enzimini içeren temizleme katkı maddesi ürünleri sağlar. Bu tar durumlar, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, düşük sıcaklıktaki çözelti temizleme uygulamalarını, içerir. Bazı uygulamalarda, katkı maddesi ürünü bunun en basit formunda, bir veya birden fazla proteazdır. Bazı uygulamalarda, katkı maddesi bir temizleme prosesine eklenmesi için dozaj formunda ambalajlanır. Bazı uygulamalarda, katkı maddesi bir peroksijen kaynağının kullanıldığı ve arttırılmış ağartma etkililiğinin arzu edildiği bir temizleme prosesine eklenmesi için dozaj formunda ambalajlanır. Bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, haplar, tabletler, jel kapsüller veya başka tek dozajlı birimler, örneğin, öncede-ölçülmüş pudralar veya sıvılar, dâhil olmak üzere herhangi bir uygun tek dozajlı birim form mevcut buluş ile kullanım alanı bulur. Bazı uygulamalarda, dolgu (dolgular) veya taşıyıcı malzeme (malzemeler) bu tarz bileşimlerin hacmini arttırmak için dâhil edilir. Uygun dolgu veya taşıyıcı malzemeler, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, sülfatın, karbonatın ve silikatın çeşitli tuzlarını aynı zamanda talkı, kili ve benzerlerini, içerir. Sıvı bileşimler için uygun dolgu veya taşıyıcı malzemeler, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, suyu veya polioller ve dioller dâhil olmak üzere

düşük moleküler ağırlıklı primer ve sekonder alkolleri, içerir. Bu tarz alkollerin örnekleri, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, metanolü, etanolü, propanolü ve izopropanolü, içerir. Bazı uygulamalarda, bileşimler yaklaşık %5 ila yaklaşık %90 bu tarz malzemelerden içerir. Asidik dolgular pH'yı düşürmek için kullanım alanı bulur. Bazı uygulamalarda, temizleme katkı maddesi, aşağıda daha tam bir şekilde tarif edildiği üzere, yardımcı içerik maddeleri içerir.

Mevcut temizleme bileşimleri ve temizleme katkı maddeleri, tek başına veya başka proteazlar ve/veya ilave enzimler ile kombinasyon hâlinde, burada sağlanan serin proteazı polipeptitlerinin en az birinin bir etkili miktarını gerektirir. Enzimin gerekli olan düzeyi mevcut buluşun bir veya birden fazla serin proteazı polipeptidinin eklenmesi ile sağlanır. Tipik olarak, mevcut temizleme bileşimleri mevcut buluşun serin proteazı polipeptitlerinin en az birini en az yaklaşık 0,0001 ağırlık yüzdesinde, yaklaşık 0,0001 ila yaklaşık 10 aralığındaki, yaklaşık 0,001 ila yaklaşık 1 aralığındaki veya yaklaşık 0,01 ila yaklaşık 0,1 aralığındaki ağırlık yüzdesinde içerir.

Buradaki temizleme bileşimleri tipik olarak, sulu temizleme operasyonlarında kullanım sırasında, yıkama suyunun yaklaşık 4,0 ila yaklaşık 11,5 aralığında veya hatta yaklaşık 5,0 ila yaklaşık 11,5 aralığında veya hatta yaklaşık 5,0 ila yaklaşık 8,0 aralığında veya hatta yaklaşık 7,5 ila yaklaşık 10,5 aralığında olan bir pH'a sahip olacağı şekilde formüle edilir. Sıvı ürün formülasyonları tipik olarak yaklaşık 3,0 ila yaklaşık 9,0 aralığında veya hatta yaklaşık 3 ila yaklaşık 5 aralığında olan bir pH'a sahip olacak şekilde formüle edilir. Granüler çamaşır ürünleri tipik olarak yaklaşık 9 ila yaklaşık 11 aralığında bir pH'a sahip olacak şekilde formüle edilir. Bazı uygulamalarda, mevcut buluşun temizleme bileşimleri yıkama koşulları altında bir alkali pH'a, örneğin, yaklaşık 8,0 ila yaklaşık 12,0 aralığında veya yaklaşık 8,5 ila yaklaşık 11,0 aralığında veya yaklaşık 9,0 ila yaklaşık 11,0 aralığında olan bir pH'a, sahip olacak şekilde formüle edilebilir. Bazı uygulamalarda, mevcut buluşun temizleme bileşimleri yıkama koşulları altında bir nötral pH'a, örneğin, yaklaşık 5,0 ila yaklaşık 8,0 aralığında veya yaklaşık 5,5 ila yaklaşık 8.0 aralığında veya yaklaşık 6,0 ila yaklaşık 8,0 aralığında veya yaklaşık 6,0 ila yaklaşık 7,5 aralığında olan bir pH'a, sahip olacak şekilde formüle edilebilir. Bazı uygulamalarda, nötral pH koşulları temizleme bileşimi (ağ:ağ) 1:100 deiyonize su içinde 20°C'de çözündürüldüğünde ölçülebilir, bir geleneksel pH metre kullanılarak ölçülebilir. pH'ı tavsiye edilen kullanım düzeylerinde kontrol etmek için

teknikler, tamponlar, alkaliler, asitler, vb. kullanımları içerir ve teknikte uzmanlığı olan kişiler tarafından iyi bilinir.

Bazı uygulamalarda, serin proteazı polipeptidi (polipeptitleri) bir granüler bileşim veya sıvı içinde kullanıldığında, serin proteazı polipeptidini saklama sırasında granüler bileşimin diğer bileşenlerinden korumak için serin proteazı polipeptidinin bir enkapsüle edilmiş parçacık formunda olması arzu edilebilir. Buna ek olarak, enkapsülasyon ayrıca, temizleme prosesi sırasında serin proteazı polipeptidinin yararlanılabilirliğini kontrol etme yoluyladır. Bazı uygulamalarda, enkapsülasyon serin proteazı polipeptidinin (polipeptitlerinin) ve/veya ilave enzimlerin performansını arttırır. Bu açıdan, mevcut buluşun serin proteazı polipeptitleri teknikte bilinen herhangi bir uygun enkapsüle etme malzemesi ile enkapsüle edilir. Bazı uygulamalarda, enkapsüle etme malzemesi tipik olarak mevcut buluşun serin proteazı polipeptidinin (polipeptitlerinin) en azından parçasını enkapsüle eder. Tipik olarak, enkapsüle etme malzemesi suda-çözünebilir ve/veya suda-dağıtılabilir. Bazı uygulamalarda, enkapsüle etme malzemesi 0°C veya daha yüksek olan bir cam geçiş sıcaklığına (Tg'ye) sahiptir. Cam geçiş sıcaklığı WO 97/11151'de daha detaylı bir şekilde tarif edilir. Enkapsüle etme malzemesi tipik olarak karbonhidratlardan, doğal veya sentetik sakızlardan, kitinden, kitozandan, selülozdan ve selüloz türevlerinden, silikatlardan, fosfatlardan, boratlardan, polivinil alkolden, polietilen glikolden, parafin mumlarından ve bunların kombinasyonlarından oluşan gruptan seçilir. Enkapsüle etme malzemesi bir karbonhidrat olduğunda, bu tipik olarak monosakkaritler, oligosakkaritler, polisakkaritler ve bunların kombinasyonları arasından seçilir. Bazı tipik uygulamalarda, enkapsüle etme malzemesi bir nişastadır (Bakınız, *örn.,* EP 0 922 499; US 4,977,252; US 5,354,559 ve US 5,935,826). Bazı uygulamalarda, enkapsüle etme malzemesi plastikten, örneğin, termoplastiklerden, akrilonitrilden, metakrilonitrilden, poliakrilonitrilden, polimetakrilonitrilden ve bunların karışımlarından, yapılan bir mikro-küredir; kullanım alanı bulan piyasada satılan mikro-küreler, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, EXPANCEL® (Stockviksverken, Sweden) ve PM 6545, PM 6550, PM 7220, PM 7228, EXTENDOSPHERES®, LUXSIL®, Q-CEL® ve SPHERICEL® (PQ Corp., Valley Forge, PA) tarafından sağlananları, içerir.

Yıkamaya dâhil edilen proteazların bunlara maruz bırakıldığı deterjan formülasyonlarını, yıkama suyu hacimlerini, yıkama suyu sıcaklıklarını ve yıkama süresi uzunluklarını çeşitlendirmeyi içeren çeşitli yıkama koşulları vardır. Bir düşük-

derecede deterjan konsantrasyonlu sistem, yıkama suyunda yaklaşık 800 ppm'den daha az deterjan bileşenlerinin bulunduğu deterjanları içerir. Bir orta-derecede deterjan konsantrasyonlu sistem, yıkama suyu içinde yaklaşık 800 ppm ila yaklaşık 2000 ppm aralığında deterjan bileşenlerinin bulunduğu deterjanları içerir. Bir yüksek-derecede deterjan konsantrasyonlu sistem, yıkama suyu içinde yaklaşık 2000 ppm'den daha fazla deterjan bileşenlerinin bulunduğu deterjanları içerir. Bazı uygulamalarda, mevcut buluşun "soğuk sulu yıkama"sı yaklaşık 10°C ila yaklaşık 40°C aralığında veya yaklaşık 20°C ila yaklaşık 30°C aralığında veya yaklaşık 15°C ila yaklaşık 25°C aralığında aynı zamanda yaklaşık 15°C ila yaklaşık 35°C aralığı içindeki tüm diğer kombinasyonlarda ve 10°C ila 40°C içindeki tüm aralıklarda olan sıcaklıklarda yıkama için uygun olan "soğuk su deterjanı"ndan yararlanır.

Farklı coğrafyalar tipik olarak farklı su sertliğine sahiptir. Su sertliği genel olarak galon başına karma Ca^{2+}/Mg^{2+} taneciği cinsinden tarif edilir. Sertlik su içindeki kalsiyum (Ca^{2+}) ve magnezyum (Mg^{2+}) miktarının bir ölçüsüdür. Amerika Birleşik Devletleri'ndeki çoğu su serttir ancak sertliğin derecesi değişkenlik gösterir. Orta-derecede sert (60-120 ppm) ila sert (121-181 ppm) su milyonda 60 ila 181 parçaya sahiptir.

Tablo I. Su Sertliği

Su	**Galonda tanecik**	**Milyonda parça**
Yumuşak	1,0'dan daha az	17'den daha az
Hafif-derecede sert	1,0 ila 3,5	17 ila 60
Orta-derecede sert	3,5 ila 7,0	60 ila 120
Sert	7,0 ila 10,5	120 ila 180
Çok sert	10,5'ten daha fazla	180'den daha fazla

Bu doğrultuda, bazı uygulamalarda, mevcut buluş yıkama koşullarının (*örn.,* su sıcaklığının, su sertliğinin ve/veya deterjan konsantrasyonunun) en az bir grubunda şaşırtıcı yıkama performansı gösteren serin proteazı polipeptitleri sağlar. Bazı uygulamalarda, mevcut buluşun serin proteazı polipeptitleri yıkama performansı açısından diğer serin proteazı polipeptit proteazları ile karşılaştırılabilir. Mevcut buluşun bazı uygulamalarında, burada sağlanan serin proteazı polipeptitleri arttırılmış oksidatif kararlılık, arttırılmış termal kararlılık, çeşitli koşullar altında arttırılmış temizleme kapasiteleri ve/veya arttırılmış şelatör kararlılığı gösterir. Buna ek olarak, mevcut

buluşun serin proteazı polipeptitleri, yine tek başına veya inşa ediciler ve stabilazörler ile kombinasyon hâlinde, deterjanlar içermeyen, temizleme bileşimlerine kullanım alanı bulur.

Mevcut buluşun bazı uygulamalarında, temizleme bileşimleri bileşimin ağırlığı olarak yaklaşık %0,00001 ila yaklaşık %10 aralığında olan bir düzeyde mevcut buluşun en az bir serin proteazı polipeptidini ve bileşimin ağırlığı olarak temizleme yardımcı malzemeleri içeren (*örn.*, yaklaşık %99,999 ila yaklaşık %90,0 aralığında olan) dengeyi içerir. Mevcut buluşun bazı başka uygulamalarında, mevcut buluşun temizleme bileşimleri bileşimin ağırlığı olarak yaklaşık %0,0001 ila yaklaşık %10 aralığında, yaklaşık %0,001 ila yaklaşık %5 aralığında, yaklaşık %0,001 ila yaklaşık %2 aralığında, yaklaşık %0,005 ila yaklaşık %0,5 aralığında olan bir düzeyde en az bir serin proteazı polipeptidi ve temizleme yardımcı malzemeleri içeren temizleme bileşiminin (*örn.*, ağırlık olarak yaklaşık %99,9999 ila yaklaşık %90,0 aralığında, yaklaşık %99,999 ila yaklaşık %98 aralığında, yaklaşık %99,995 ila yaklaşık %99,5 aralığında olan) dengesini içerir.

Bazı uygulamalarda, mevcut buluşun temizleme bileşimleri temizleme performansı ve/veya kumaş bakımı ve/veya bulaşık yıkama yararları sağlayan bir veya birden fazla ilave deterjan enzimi içerir. Uygun enzimlerin örnekleri, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, açil transferazları, alfa-amilazları, beta-amilazları, alfa-galaktosidazları, arabinosidazları, aril esterazları, beta-galaktosidazları, karajenazları, katalazları, sellobiyohidrolazları, selülozları, kondroitinazları, kütinazları, endo-beta-1,4-glukanazları, endo-beta-mannanazları, esterazları, ekzo-mannanazları, galaktanazları, glukoamilazları, hemiselülazları, hiyalüronidazları, keratinazları, lakkazları, laktazları, ligninazları, lipazları, lipoksijenazları, mannanazları, oksidazları, pektat liyazları, pektin asetil esterazları, pektinazları, pentozanazları, peroksidazları, fenoloksidazları, fosfatazları, fosfolipazları, fitazları, poligalaktüronazları, proteazları, pullulanazları, redüktazları, ramnogalaktüronazları, beta-glukanazları, tannazları, transglutaminazları, ksilan asetil-esterazlar, ksilanazları, ksiloglukanazları ve ksilosidazları veya bunların herhangi bir kombinasyonunu veya karışımını, içerir. Bazı uygulamalarda, enzimlerin amilaz ile bağlantılı olarak proteaz, lipaz, kütinaz ve/veya selüloz gibi geleneksel uygulanabilir enzimleri içeren bir kombinasyonu (yani, bir "kokteyl") kullanılır.

Burada sağlanan serin proteazı polipeptitlerine ek olarak, herhangi bir başka uygun proteaz mevcut buluşun bileşimlerindeki kullanım alanı bulur. Uygun proteazlar hayvansal, bitkisel veya mikrobiyal orijinli olanları içerir. Bazı uygulamalarda, mikrobiyal proteazlar kullanılır. kimyasal olarak veya genetik olarak modifiye edilmiş mutantlar dâhil edilir. Bazı uygulamalarda, proteaz bir serin proteazıdır, tercihen bir alkali mikrobiyal proteazdır veya bir tripsin-benzeri proteazdır. Alkali proteazların örnekleri, subtilisinleri, özellikle *Bacillus*'tan türetilmiş olanları (*örn.,* subtilisin'i, lentus'u, amyloliquefaciens'i, subtilisin Carlsberg'i, subtilisin 309'u, subtilisin 147'yi ve subtilisin 168'i), içerir. İlave örnekleri RE 34,606; 5,955,340; 5,700,676; 6,312,936 ve 6,482,628 Numaralı U.S. Patentleri'nde tarif edilen mutant proteazları içerir. İlave proteaz örnekleri, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, tripisini (*örn.,* of domuz veya bovin orijinli olan) ve WO 89/06270'te tarif edilen Fusarium proteazını, içerir. Bazı uygulamalarda, mevcut buluşta kullanım alanı bulan piyasada satılan proteaz enzimleri, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, MAXATASE®'i, MAXACAL™'ı, MAXAPEM™'i, OPTICLEAN®'i, OPTIMASE®'i, PROPERASE®'i, PURAFECT®'i, PURAFECT® OXP'yi, PURAMAX™'ı, EXCELLASE™'i, PREFERENZ™ proteazlarını (*örn.,* P100'ü, P110'u, P280'i), EFFECTENZ™ proteazlarını (*örn.,* P1000'i, P1050'yi, P2000'i), EXCELLENZ™ proteazlarını (*örn.,* P1000'i), ULTIMASE®'i ve PURAFAST™'ı (Genencor); ALCALASE®'i, SAVINASE®'i, PRIMASE®'i, DURAZYM™'ı, POLARZYME®'ı, OVOZYME®'ı, KANNASE®'i, LIQUANASE®'i, NEUTRASE®'i, RELASE®'i ve ESPERASE®'i (Novozymes); BLAP™'ı ve BLAP™ varyantlarını (Henkel Kommanditgesellschaft auf Aktien, Duesseldorf, Germany) ve KAP'ı (*B. alkalophilus* subtilisinini; Kao Corp., Tokyo, Japan), içerir. Çeşitli proteazlar WO95/23221'de, WO 92/21760'ta, WO 09/149200'de, WO 09/149144'te, WO 09/149145'te, WO 11/072099'da, WO 10/056640'ta, WO 10/056653'te, WO 11/140364'te, WO 12/151534'te, 2008/0090747 Numaralı U.S. Patent Yayınında ve 5,801,039, 5,340,735, 5,500,364, 5,855,625, US RE 34,606, 5,955,340, 5,700,676, 6,312,936, 6,482,628, 8,530,219 Numaralı U.S. Patentlerinde ve çeşitli başka patentlerde tarif edilir. Bazı ilave uygulamalarda, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, WO1999014341'de, WO1999033960'ta, WO1999014342'de, WO1999034003'te, WO2007044993'te, WO2009058303'te, WO2009058661'de, WO2014194032'de, WO2014194034'te ve WO2014194054'te tarif edilen metaloproteazlar, dâhil olmak üzere, metaloproteazlar mevcut buluşta kullanım alanı bulur. Emsal metaloproteazlar nprE'yi, *B. subtilis*'de eksprese edilen nötral metaloproteazın rekombinant formunu (Bakınız, *örn.,* WO

07/044993), ve PMN'yi, *B. amyloliquefacients*'ten saflaştırılmış nötral metaloproteazı, içerir.

Buna ek olarak, herhangi bir uygun lipaz mevcut buluşta kullanım alanı bulur. Uygun lipazlar, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, bakteriyel veya fungal orijinli olanları, içerir. Kimyasal olarak veya genetik olarak modifiye edilmiş mutantlar mevcut buluş tarafından kapsanır. Kullanışlı lipazların örnekleri, *Humicola lanuginosa* lipazını (Bakınız, *örn.,* EP 258 068 ve EP 305 216), *Rhizomucor miehei* lipazını (Bakınız, *örn.,* EP 238 023), Candida lipazını, örneğin, *C. antarctica* lipazını (*örn., C. antarctica* lipazı A'yı veya B'yi; Bakınız, *örn.,* EP 214 761), Pseudomonas lipazlarını, örneğin, *P. alcaligenes* lipazını ve P. *pseudoalcaligenes* lipazını (Bakınız, *örn.,* EP 218 272), *P. cepacia* lipazını (Bakınız, *örn.,* EP 331 376), P. *stutzeri* lipazını (Bakınız, *örn.,* GB 1,372,034), *P. fluorescens* lipazını, Bacillus lipazını (*örn., B. subtilis* lipazını [Dartois et al., Biochem. Biophys. Acta 1131:253-260 [1993]); *B. stearothermophilus* lipazını [Bakınız, *örn.,* JP 64/744992] ve *B. pumilus* lipazını [Bakınız, *örn.,* WO 91/16422]) içerir.

İlaveten, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, *Penicillium camembertii* lipazı (Bakınız, Yamaguchi et al., Gene 103:61-67 [1991]), *Geotricum candidum* lipazı (Bakınız, Schimada et al., J. Biochem., 106:383-388 [1989]) ve çeşitli Rhizopus lipazları, örneğin, *R. delemar* lipazı (See, Hass et al., Gene 109:117-113 [1991]), bir *R. niveus* lipazı (Kugimiya et al., Biosci. Biotech. Biochem. 56:716-719 [1992]) ve *R. oryzae* lipazı, dâhil olmak üzere, çok sayıda klonlanmış lipaz mevcut buluşun bazı uygulamalarında kullanım alanı bulur.

Lipaz polipeptit enzimlerinin başka tipleri, örneğin, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, *Pseudomonas mendocina*'dan türetilmiş kütinaz (Bakınız, WO 88/09367) ve *Fusarium solani pisi*'den türetilmiş kütinaz (Bakınız, WO 90/09446), dâhil olmak üzere, kütinazlar, da mevcut buluşun bazı uygulamalarında kullanım alanı bulur.

İlave uygun lipazlar, lipazları, örneğin, M1 LIPASE™'ı, LUMA FAST™'ı ve LIPOMAX™'ı (Genencor); LIPEX®'i, LIPOLASE®'i ve LIPOLASE® ULTRA'yı (Novozymes) ve LIPASE P™ "Amano"'yı (Amano Pharmaceutical Co. Ltd., Japan), içerir.

Mevcut buluşun bazı uygulamalarında, mevcut buluşun temizleme bileşimleri ilaveten bileşimin ağırlığı olarak yaklaşık %0,00001 ila yaklaşık %10 ilave lipaz olan bir düzeyde lipazlar ve bileşimin ağırlığı olarak temizleme yardımcı malzemelerinin dengesini içerir. Mevcut buluşun bazı başka uygulamalarında, mevcut buluşun temizleme bileşimleri ayrıca bileşimin ağırlığı olarak yaklaşık %0,0001 ila yaklaşık %10, yaklaşık %0,001 ila yaklaşık %5, yaklaşık %0,001 ila yaklaşık %2, yaklaşık %0,005 ila yaklaşık %0,5 lipaz olan bir düzeyde lipazlar da içerir.

Mevcut buluşun bazı uygulamalarında, herhangi bir uygun amilaz mevcut buluşta kullanım alanı bulur. Bazı uygulamalarda, alkali çözeltilerde kullanım için uygun olan herhangi bir amilaz (*örn.,* alfa ve/veya beta) da kullanım alanı bulur. Uygun amilazlar, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, bakteriyel veya fungal orijinli olanları, içerir. Kimyasal olarak veya genetik olarak modifiye edilmiş mutantlar bazı uygulamalara dâhil edilir. Mevcut buluşta kullanım alanı bulan amilazlar, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, *B. licheniformis*'ten elde edilen α-amilazları, içerir (Bakınız, *örn.,* GB 1,296,839). İlave uygun amilazlar, WO9510603'te, WO9526397'de, WO9623874'te, WO9623873'te, WO9741213'te, WO9919467'de, WO0060060'ta, WO0029560'ta, WO9923211'de, WO9946399'da, WO0060058'de, WO0060059'da, WO9942567'de, WO0114532'de, WO02092797'de, WO0166712'de, WO0188107'de, WO0196537'de, WO0210355'te, WO9402597'de, WO0231124'te, WO9943793'te, WO9943794'te, WO2004113551'de, WO2005001064'te, WO2005003311'de, WO0164852'de, WO2006063594'te, WO2006066594'te, WO2006066596'da, WO2006012899'da, WO2008092919'da, WO2008000825'te, WO2005018336'da, WO2005066338'de, WO2009140504'te, WO2005019443'te, WO2010091221'de, WO2010088447'de, WO0134784'te, WO2006012902'de, WO2006031554'te, WO2006136161'de, WO2008101894'te, WO2010059413'te, WO2011098531'de, WO2011080352'de, WO2011080353'te, WO2011080354'te, WO2011082425'te, WO2011082429'da, WO2011076123'te, WO2011087836'da, WO2011076897'de, WO94183314'te, WO9535382'de, WO9909183'te, WO9826078'de, WO9902702'de, WO9743424'te, WO9929876'da, WO9100353'te, WO9605295'te, WO9630481'de, WO9710342'de, WO2008088493'te, WO2009149419'da, WO2009061381'de, WO2009100102'de, WO2010104675'te, WO2010117511'de ve WO2010115021'de bulunanları içerir. Mevcut buluşta kullanım alanı bulan piyasada satılan amilazlar, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, DURAMYL®'i, TERMAMYL®'i, FUNGAMYL®'i, STAINZYME®'ı,

STAINZYME PLUS®'ı, STAINZYME ULTRA®'yı ve BAN™'ı (Novozymes) aynı zamanda POWERASE™'i, RAPIDASE®'i ve MAXAMYL® P'yi (Genencor), içerir.

Mevcut buluşun bazı uygulamalarında, mevcut buluşun temizleme bileşimleri ilaveten bileşimin ağırlığı olarak yaklaşık %0,00001 ila yaklaşık %10 ilave amilaz olan bir düzeyde amilazlar ve bileşimin ağırlığı olarak temizleme yardımcı malzemelerinin dengesini içerir. Mevcut buluşun bazı başka uygulamalarında, mevcut buluşun temizleme bileşimleri ayrıca bileşimin ağırlığı olarak yaklaşık %0,0001 ila yaklaşık %10, yaklaşık %0,001 ila yaklaşık %5, yaklaşık %0,001 ila yaklaşık %2, yaklaşık %0,005 ila yaklaşık %0,5 amilaz olan bir düzeyde amilazlar da içerir.

Bazı ilave uygulamalarda, herhangi bir uygun selülaz mevcut buluşun temizleme bileşimlerinde kullanım alanı bulur. Uygun selülazlar, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, bakteriyel veya fungal orijinli olanları, içerir. Kimyasal olarak veya genetik olarak modifiye edilmiş mutantlar bazı uygulamalara dâhil edilir. Uygun selülazlar, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, *Humicola insolens* selülazlarını, içerir (Bakınız, *örn.,* 4,435,307 Numaralı U.S. Patenti). Özel olarak uygun selülazlar renk bakım yararlarına sahip olan selülazlardır (Bakınız, *örn.,* EP 0 495 257). Mevcut buluşta kullanım alanı bulan piyasada satılan selülazlar, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, CELLUZYME®'ı, CAREZYME®'ı (Novozymes), REVITALENZ™ 100'ü (Danisco US Inc) ve KAC-500(B)™'yi (Kao Corporation), içerir. Bazı uygulamalarda, selülazlar matür doğal-tip veya varyant selülazların kısımları veya fragmanları olarak katılır, burada N-ucunun bir kısmı silinir (Bakınız, *örn.,* 5,874,276 Numaralı U.S. Patenti). İlave uygun selülazlar, WO2005054475'te, WO2005056787'de, 7,449,318 Numaralı U.S. Patentinde ve 7,833,773 Numaralı U.S. Patentinde bulunanları içerir. Bazı uygulamalarda, mevcut buluşun temizleme bileşimleri ilaveten bileşimin ağırlığı olarak yaklaşık %0,00001 ila yaklaşık %10 ilave selülaz olan bir düzeyde selülazlar ve bileşimin ağırlığı olarak temizleme yardımcı malzemelerinin dengesini içerir. Mevcut buluşun bazı başka uygulamalarında, mevcut buluşun temizleme bileşimleri ayrıca bileşimin ağırlığı olarak yaklaşık %0,0001 ila yaklaşık %10, yaklaşık %0,001 ila yaklaşık %5, yaklaşık %0,001 ila yaklaşık %2, yaklaşık %0,005 ila yaklaşık %0,5 selülaz olan bir düzeyde selülazlar da içerir.

Deterjan bileşimlerinde kullanım için uygun olan herhangi bir mannanaz ayrıca mevcut buluşta da kullanım alanı bulur. Uygun mannanazlar, bunlarla sınırlı kalmamak

kaydıyla, bakteriyel veya fungal orijinli olanları, içerir. Kimyasal olarak veya genetik olarak modifiye edilmiş mutantlar bazı uygulamalara dâhil edilir. Mevcut buluşta kullanım alanı bulan çeşitli mannanazlar bilinir (Bakınız, *örn.,* 6,566,114 Numaralı U.S. Patenti, 6,602,842 Numaralı U.S. Patenti ve 6,440,991 Numaralı U.S. Patenti). Mevcut buluşta kullanım alanı bulan piyasada satılan mannanazlar, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, MANNASTAR®'ı, PURABRITE™'i ve MANNAWAY®'i, içerir. Bazı uygulamalarda, mevcut buluşun temizleme bileşimleri ilaveten bileşimin ağırlığı olarak yaklaşık %0,00001 ila yaklaşık %10 ilave mannanaz olan bir düzeyde mannanazlar ve bileşimin ağırlığı olarak temizleme yardımcı malzemelerinin dengesini içerir. Mevcut buluşun bazı başka uygulamalarında, mevcut buluşun temizleme bileşimleri ayrıca bileşimin ağırlığı olarak yaklaşık %0,0001 ila yaklaşık %10, yaklaşık %0,001 ila yaklaşık %5, yaklaşık %0,001 ila yaklaşık %2, yaklaşık %0,005 ila yaklaşık %0,5 mannanaz olan bir düzeyde mannanazlar da içerir.

Bazı uygulamalarda, proksidazlar mevcut buluşun bileşimlerinde hidrojen peroksit veya bunun bir kaynağı (*örn.,* bir perkarbonat, perborat veya persülfat) ile kombinasyon hâlinde kullanılır. Bazı alternatif uygulamalarda, oksidazlar oksijen ile kombinasyon hâlinde kullanılır. Enzimlerin her iki tipi de, tercihen bir hızlandırma ajanı ile birlikte, "çözelti ağartma" için (yani, kumaşlar bir yıkama likörü içinde birlikte yıkandığında, bir tekstil boyasının bir boyanmış kumaştan bir başka kumaşa transferini önlemek için) kullanılır (Bakınız, *örn.,* WO 94/12621 ve WO 95/01426). Uygun peroksidazlar/oksidazlar, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, bitkisel, bakteriyel veya fungal orijinli olanları, içerir. Kimyasal olarak veya genetik olarak modifiye edilmiş mutantlar bazı uygulamalara dâhil edilir. Bazı uygulamalarda, mevcut buluşun temizleme bileşimleri ilaveten bileşimin ağırlığı olarak yaklaşık %0,00001 ila yaklaşık %10 ilave peroksidaz ve/veya oksidaz olan bir düzeyde peroksidaz ve/veya oksidaz enzimleri ve bileşimin ağırlığı olarak temizleme yardımcı malzemelerinin dengesini içerir. Mevcut buluşun bazı başka uygulamalarında, mevcut buluşun temizleme bileşimleri ayrıca bileşimin ağırlığı olarak yaklaşık %0,0001 ila yaklaşık %10, yaklaşık %0,001 ila yaklaşık %5, yaklaşık %0,001 ila yaklaşık %2, yaklaşık %0,005 ila yaklaşık %0,5 peroksidaz ve/veya oksidaz olan bir düzeyde peroksidaz ve/veya oksidaz enzimleri de içerir.

Bazı uygulamalarda, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, perhidrolazlar, dâhil olmak üzere, ilave enzimler kullanım alanı bulur (Bakınız, *örn.,* WO2005/056782,

WO2007106293, WO2008063400, WO2008106214 ve WO2008106215). Buna ek olarak, bazı uygulamalarda, yukarıda bahsedilen enzimlerin karışımları, özel olarak bir veya birden fazla ilave proteaz, amilaz, lipaz, mannanaz ve/veya en az bir selülaz, burada kapsanır. Gerçekte, bu enzimlerin çeşitli karışımlarının mevcut buluşta kullanım alanı bulacağı düşünülür. Ayrıca, serin proteazı polipeptidinin (polipeptitlerinin) ve bir veya birden fazla ilave enzimin çeşitlilik gösteren düzeylerinin her ikisinin de bağımsız bir şekilde temizleme bileşiminin temizleme yardımcı malzemeleri olma dengesinin, yaklaşık %10 aralığında olabileceği de düşünülür. Temizleme yardımcı malzemelerinin spesifik seçimi temizlenecek olan yüzeyi, eşyayı veya kumaşı ve (*örn.,* yıkama deterjanı kullanımı yoluyla) kullanım sırasında temizleme koşulları için bileşimin arzu edilen formu düşünülerek kolaylıkla yapılabilir.

Bazı uygulamalarda, burada sağlanan bir veya birden fazla serin proteazı polipeptidinin (polipeptitlerinin) bir etkili miktarı proteinöz leke çıkarılmasına ihtiyacı olan çeşitli yüzeyleri temizleme için kullanışlı olan bileşimlere dâhil edilir. Bu tarz temizleme bileşimleri sert yüzeyleri, kumaşları ve tabakları temizleme tarzında uygulamalar içi temizleme bileşimleri içerir. Gerçekte, bazı uygulamalarda, mevcut buluş kumaş temizleme bileşimleri sağlarken, diğer uygulamalarda, mevcut buluş kumaş-dışı temizleme bileşimleri sağlar. Göze çarpan bir şekilde, mevcut buluş ayrıca (diş temizleme maddeleri, diş macunları, ağız çalkalama suları, vb. aynı zamanda dentur temizleme bileşimleri dâhil olmak üzere) oral bakım dâhil olmak üzere kişisel bakım için uygun temizleme bileşimleri, cilt ve saç temizleme bileşimleri de sağlar. Mevcut buluşun herhangi bir formda (yani, sıvı, granüler, çubuk, yarı-katı, jeller, emülsiyonlar, tabletler, kapsüller, vb.) olan deterjan bileşimlerini kapsaması amaçlanır.

Örnek olarak, burada mevcut buluşun serin proteazı polipeptitlerinin kullanım alanı bulduğu bir kaç temizleme bileşimi aşağıda daha detaylı bir şekilde tarif edilir. Mevcut buluşun temizleme bileşimlerinin çamaşır makinesi yıkama yönteminde (yöntemlerinde) kullanım için uygun bileşimler olarak formüle edildiği bazı uygulamalarda, mevcut buluşun bileşimleri tercihen en az bir sürfaktan ve en az bir inşa edici bileşik aynı zamanda tercihen organik polimerik bileşikler, ağartma ajanları, ilave enzimler, sabun köpüğü baskılayıcıları, dağıtıcılar, kalsiyum sabunu dağıtıcıları, kir süspansiyonu ve ati-yeniden-depolama ajanları ve korozyon inhibitörleri arasından seçilen bir veya birden fazla temizleme yardımcı malzemesi içerir. Bazı uygulamalarda, çamaşır bileşimleri ayrıca (yani, ilave temizleme yardımcı malzemeleri olarak) yumuşatma ajanları da

içerir. Mevcut buluşun bileşimleri ayrıca katı veya sıvı formda deterjan katkı maddesi ürünlerinde de kullanım alanı bulur. Bu tarz katkı maddesi ürünlerinin geleneksel deterjan bileşimlerinin performansına takviye yapması ve/veya bunu desteklemesi amaçlanır ve bunlar temizleme prosesinin herhangi bir evresinde eklenebilir. Bazı uygulamalarda, buradaki çamaşır deterjanı bileşimlerinin yoğunluğu 20°C'de ölçüldüğünde bileşimin yaklaşık 400 ila yaklaşık 1200 g/litresi aralığında iken, diğer uygulamalarda, bu yaklaşık 500 ila yaklaşık 950 g/litre aralığındadır.

Manüel bulaşık yıkama yöntemlerinde kullanım için bileşimler olarak formüle edilen uygulamalarda, buluşun bileşimleri tercihen en az bir sürfaktan ve tercihen organik polimerik bileşikler, sabun köpüğü arttırma ajanları, grup II metal iyonları, çözücüler, hidrotroplar ve ilave enzimler arasından seçilen en az bir ilave temizleme yardımcı malzemesi içerir.

Bazı uygulamalarda, çeşitli temizleme bileşimleri, örneğin, 6,605,458 Numaralı U.S. Patenti'nde sağlananlar, mevcut buluşun serin proteazı polipeptitleri ile kullanım alanı bulur. Dolayısıyla, bazı uygulamalarda, mevcut buluşun en az bir serin proteazı polipeptidini içeren bileşimler bir kompakt granüler kumaş temizleme bileşimi iken, diğer uygulamalarda, bileşim renkli kumaşların yıkanmasında kullanışlı olan bir granüler kumaş temizleme bileşimidir, ilave uygulamalarda, bileşim yıkama kapasitesi yoluyla yumuşatma sağlayan bir granüler kumaş temizleme bileşimidir, ilave uygulamalarda, bileşim bir ağır iş sıvı kumaş temizleme bileşimidir. Bazı uygulamalarda, mevcut buluşun en az bir serin proteazı polipeptidini içeren bileşimler kumaş temizleme bileşimleridir, örneğin, 6,610,642 ve 6,376,450 Numaralı U.S. Patentleri'nde tarif edilenlerdir. Buna ek olarak, mevcut buluşun serin proteazı polipeptitleri Avrupa veya Japonya yıkama koşulları altında özel yararı olan granüler çamaşır deterjanı bileşimlerinde kullanım alanı bulur (Bakınız, *örn.*, 6,610,642 Numaralı U.S. Patenti).

Bazı alternatif uygulamalarda, mevcut buluş burada sağlanan en az bir serin proteazı polipeptidi içeren sert yüzey temizleme bileşimleri sağlar Dolayısıyla, bazı uygulamalarda, mevcut buluşun en az bir serin proteazı polipeptidini içeren bileşimler bir sert yüzey temizleme bileşimidir, örneğin, 6,610,642, 6,376,450 ve 6,376,450 Numaralı U.S. Patentlerinde tarif edilenlerdir.

Daha ilave uygulamalarda, mevcut buluş burada sağlanan en az bir serin proteazı polipeptidi içeren bulaşık yıkama bileşimleri sağlar. Dolayısıyla, bazı uygulamalarda, mevcut buluşun en az bir serin proteazı polipeptidini içeren bileşimler bir sert yüzey temizleme bileşimidir, örneğin, 6,610,642 ve 6,376,450 Numaralı U.S. Patentlerinde tarif edilenlerdir. Bazı daha ilave uygulamalarda, mevcut buluş burada sağlanan en az bir serin proteazı polipeptidini içeren bulaşık yıkama bileşimleri sağlar. Bazı ilave uygulamalarda, mevcut buluşun en az bir serin proteazı polipeptidini içeren bileşimler oral bakım bileşimleri, örneğin, 6,376,450 ve 6,376,450 Numaralı U.S. Patentlerinde olanları, içerir. Yukarıda bahsedilen 6,376,450, 6,605,458, 6,605,458 ve 6,610,642 Numaralı U.S. Patentlerine dâhil edilen bileşiklerin ve temizleme yardımcı malzemelerinin formülasyonları ve açıklaması burada sağlanan serin proteazı polipeptitleri ile kullanım alanı bulur.

Mevcut buluşun temizleme bileşimleri herhangi bir uygun formda formüle edilir ve formülatör tarafından seçilen herhangi bir proses ile hazırlanır (*Bakınız, örn.,* 5,879,584, 5,691,297, 5,574,005, 5,569,645, 5,565,422, 5,516,448, 5,489,392, 5,486,303, 4,515,705, 4,537,706, 4,515,707, 4,550,862, 4,561,998, 4,597,898, 4,968,451, 5,565,145, 5,929,022, 6,294,514 ve 6,376,445 Numaralı U.S. Patentleri). Bir düşük pH'lı temizleme bileşimi arzu edildiğinde, bu tarz bileşimin pH'ıbir malzeme, örneğin, monoetanolamin veya bir asidik malzeme, örneğin, HCl, eklenmesi vasıtasıyla ayarlanır. Bazı uygulamalarda, mevcut buluşa göre temizleme bileşimleri bir asitleştirme parçacığı veya bir amino karboksilik inşa edici içerir. Bir amino karboksilik inşa edicinin örnekleri aminokarboksilik asitleri, bunların tuzlarını ve türevlerini içerir. Bazı uygulamada, amino karboksilik inşa edici bir aminopolikarboksilik inşa edicidir, örneğin, glisin-N,N-diasetik asittir veya MOOC-CHR-N $(CH_2COOM)_2$ genel formülünün türevidir, burada R, C_{1-12} alkildir ve M, alkali metaldir. Bazı uygulamalarda, amino karboksilik inşa edici metilglisin diasetik asit (MGDA), GLDA (glutamik-N,N-diasetik asit), iminodisüksinik asit (IDS), karboksimetil inülin ve bunun tuzları ve türevleri, aspartik asit-N-monoasetik asit (ASMA), aspartik asit-N,N-diasetik asit (ASDA), aspartik asit-N-monopropiyonik asit (ASMP), iminodisüksinik asit (IDA), N-(2-sülfometil) aspartik asit (SMAS), N-(2-sülfoetil)aspartik asit (SEAS), N-(2-sülfometil)glutamik asit (SMGL), N-(2-sülfoetil) glutamik asit (SEGL), IDS (iminodiasetik asit) ve bunun tuzları ve türevleri, örneğin, N-metiliminodiasetik asit (MIDA), alfa-alanin-N,N-diasetik asit (alfa-ALDA), serin-N,N-diasetik asit (SEDA), izoserin-N,Ndiasetik asit (ISDA), fenilalanin-N,N-diasetik asit (PHDA), antranilik asit-N,N-diasetik asit (ANDA), sülfanilik

asit-N,N-diasetik asit (SLDA), taurin-N,N-diasetik asit (TUDA) ve sülfometil-N,N-diasetik asit (SMDA) ve bunun alkali metal tuzları ve türevleri olabilir. Bazı uygulamalarda, asitleştirme parçacığı yaklaşık 400 µ ila yaklaşık 1200 µ aralığında olan bir ağırlıklı geometrik ortalamalı parçacık boyutuna ve en az 550 g/L olan bir yığın yoğunluğuna sahiptir. Bazı uygulamalarda, asitleştirme parçacığı inşa edicinin en az yaklaşık %5'ini içerir.

Bazı uygulamalarda, asitleştirme parçacığı organik asitler ve mineral asitler dâhil olmak üzere herhangi bir asidi içerebilir. Organik asitler bir veya iki karboksile ve bazı durumlarda, en fazla 15 karbona, özellikle en fazla 10 karbona, sahip olabilir, örneğin, formik, asetik, propiyonik, kaprik, okzalik, süksinik, adipik, maleik, fumarik, sebasik, malik, laktik, glikolik, tartarik ve glioksilik asitler. Bazı uygulamalarda, asit sitrik asittir. Mineral asitler hidroklorik ve sülfürik asidi içerir. Bazı durumlarda, buluşun asitleştirme parçacığı bir yüksek düzeyde amino karboksilik inşa edici içeren bir hayli aktif parçacıktır. Sülfürik asidin nihai parçacığın kararlılığına ilaveten katkı sağladığı bulunmuştur.

Bazı uygulamalarda, mevcut buluşa göre temizleme bileşimleri en az bir sürfaktan ve/veya bir sürfaktan sistemi içerir, burada sürfaktan iyonik-olmayan sürfaktanlar, anyonik sürfaktanlar, katyonik sürfaktanlar, amfoterik sürfaktanlar, zwitteriyonik sürfaktanlar, yarı-polar iyonik-olmayan sürfaktanlar ve bunların karışımları arasından seçilir. Bazı uygulamalarda, sürfaktan, temizleme bileşiminin ağırlığı olarak, yaklaşık %0,1 ila yaklaşık %60 aralığındaki bir düzeyde bulunurken, alternatif uygulamalarda düzey yaklaşık %1 ila yaklaşık %50 aralığında iken, daha ilave uygulamalarda, düzey yaklaşık %5 ila yaklaşık %40 aralığındadır.

Bazı uygulamalarda, mevcut buluşun temizleme bileşimleri bir veya birden fazla deterjan inşa edici veya inşa edici sistem içerir. En az bir inşa edici katılan bazı uygulamalarda, temizleme bileşimleri temizleme bileşiminin ağırlığı olarak en az yaklaşık %1, yaklaşık %3 ila yaklaşık %60 aralığında veya hatta yaklaşık %5 ila yaklaşık %40 aralığında inşa edici içerir. İnşa ediciler, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, polifosfatların alkali metal, amonyum ve alkanolamonyum tuzlarını, alkali metal silikatları, toprak alkali ve alkali metal kabonatları, alüminosilikatları, polikarboksilat bileşiklerini, eter hidroksipolikarboksilatları, maleik anhidritin with etilen veya vinil metil eter ile kopolimerlerini, 1,3,5-trihidroksi benzen-2,4,6-trisülkonik asidi ve

karboksimetiloksisüksinik asidi, poliasetik asitlerin, örneğin, etilendiamin tetraasetik asidin ve nitrilotriasetik asidin çeşitli alkali metal, amonyum veya sübstüte edilmiş amonyum tuzlarını aynı zamana polikarboksilatları, örneğin, mellitik asidi, süksinik asidi, sitrik asidi, oksidisüsinik asidi, polimaleik asidi, benzen 1,3,5-trikarboksilik asidi, karboksimetiloksisüksinik asidi ve bunların çözünebilen tuzlarını, içerir. Gerçekte, herhangi bir uygun inşa edicinin mevcut buluşun çeşitli uygulamalarında kullanım alanı bulacağı düşünülür.

Bazı uygulamalarda, inşa ediciler suda-çözünebilen sertlikte iyon kompleksleri (*örn.,* tecrit edici inşa ediciler), örneğin, sitratlar ve polifosfatlar (*örn.,* sodyum tripolifosfat ve sodyum tripolifosfat hekzahidrat, potasyum tripolifosfat ve karma sodyum ve potasyum tripolifosfat, vb.) oluşturur. Teknikte (Bakınız, *örn.,* EP 2 100 949) bilinenler dâhil olmak üzere, herhangi bir uygun inşa edicinin mevcut buluşta kullanım alanı bulacağı düşünülür.

Bazı uygulamalarda, burada kullanım için inşa ediciler fosfatlı inşa ediciler ve fosfat-olmayan inşa ediciler içerir. Bazı uygulamalarda, inşa edici bir fosfatlı inşa edicidir. Bazı uygulamalara, inşa edici bir fosfat-olmayan inşa edicidir, Mevcut olduğunda, inşa ediciler bileşimin ağırlığı olarak %0,1 ila %80 aralığında veya %5 ila 60 aralığında veya %10 ila 50 aralığında olan bir düzeyde kullanılır. Bazı uygulamalarda, ürün fosfat ve fosfat-olmayan inşa edicilerin bir karışımını içerir. Uygun fosfatlı inşa ediciler, sodyum tuzları dâhil olmak üzere, bu bileşiklerin alkali metal tuzları dâhil olmak üzere, mono-fosfatları, di-fosfataru, tri-polifosfatları veya oligomerik-polifosfatları içerir. Bazı uygulamalarda, bir inşa edici sodyum tripolifosfat (STPP) olabilir. Ek olarak, bileşim karbonat ve/veya sitrat, tercihen buluşun bir nötral pH'lı bileşimini sağlamaya yardımcı olan sitrat, içerebilir. Başka uygun fosfat-olmayan inşa ediciler, polikarboksilik asitlerin ve bunların kısmen veya tamamen nötralize edilmiş tuzlarının, monomerik polikarboksilik asitlerin ve hidroksikarboksilik asitlerin ve bunların tuzlarının homopolimerlerini ve kopolimerlerini içerir. Bazı uygulamalarda, yukarıda bahsedilen bileşiklerin tuzları amonyum ve/veya alkali metal tuzlarını, yani, sodyum tuzları dâhil olmak üzere, lityum, sodyum ve potasyum tuzlarını, içerir. Uygun polikarboksilik asitler asiklik, alisiklik, hetero-siklik ve aromatik karbosiklik asitleri içerir, burada, bazı uygulamalarda, bunlar her bir durumda bir diğerinden, bazı durumlarda, en fazla iki karbon atomu, ile ayrılmış olan en az iki karboksil grubu içerebilir.

Bazı uygulamalarda, mevcut buluşun temizleme bileşimleri en az bir şelatlama ajanı içerir. Uygun şelatlama ajanları, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, bakır, demir ve/veya manganez şelatlama ajanlarını ve bunların karışımlarını, içerir. En az bir şelatlama ajanının kullanıldığı uygulamalarda, mevcut buluşun temizleme bileşimleri söz konusu temizleme bileşiminin ağırlığı olarak yaklaşık %0,1 ila yaklaşık %15 aralığında veya hatta yaklaşık %3,0 ila yaklaşık %10 aralığında şelatlama ajanı içerir.

Bazı daha ilave uygulamalarda, burada sağlanan temizleme bileşimleri en az bir depolama yardımcısı içerir. Uygun depolama yardımcıları, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, polietilen glikolü, polipropilen glikolü, polikarboksilatı, kir salım polimerlerini, örneğin, politeleftalik asidi, killeri, örneğin, kaoliniti, montmorilloniti, atapüljiti, illiti, bentoniti, haloysiti ve bunların karışımlarını, içerir.

Burada gösterildiği üzere, bazı uygulamalarda, anti-yeniden-depolama ajanları mevcut buluşun bazı uygulamalarında kullanım alanı bulur. Bazı uygulamalarda, iyonik-olmayan sürfaktanlar kullanım alanı bulur. Örneğin, otomatik bulaşık yıkama uygulamalarında, iyonik-olmayan sürfaktanlar, film oluşumunu ve beneklenmeyi önlemek için ve parlamayı iyileştirmek için, yüzey modifikasyon amaçları için, özellikle kaplama için, kullanım alanı bulur. Bu iyonik-olmayan sürfaktanlar ayrıca kirlerin yeniden-depolanmasını önlemede de kullanım alanı bulur. Bazı uygulamalarda, anti-yeniden-depolama ajanı teknikte bilindiği üzere bir iyonik-olmayan sürfaktandır (Bakınız, *örn.,* EP 2 100 949). Bazı uygulamalarda, iyonik-olmayan sürfaktan etoksillenmiş iyonik-olmayan sürfaktanlar, epoksi-başlıklandırılmış poli(oksialkillenmiş) alkollerin ve amin oksitlerin sürfaktanları olabilir.

Bazı uygulamalarda, mevcut buluşun temizleme bileşimleri bir veya birden fazla boya transferini inhibe etme ajanı içerir. Uygun polimerik boya transferini inhibe etme ajanları, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, polivinilpirrolidon polimerlerini, poliamin N-oksit polimerlerini, N-vinilpirrolidonun ve N-vinilimidazolün kopolimerlerini, polivinilokzazolidonları ve polivinilimidazolleri veya bunların karışımlarını, içerir. En az bir boya transferini inhibe etme ajanının kullanıldığı uygulamalarda, mevcut buluşun temizleme bileşimleri temizleme bileşiminin ağırlığı olarak yaklaşık %0,0001 ila yaklaşık %10 aralığında, yaklaşık %0,01 ila yaklaşık %5 aralığında veya hatta yaklaşık %0,1 ila yaklaşık %3 aralığında içerir.

Bazı uygulamalarda, silikatlar mevcut buluşun bileşimlerine dâhil edilir. Bazı bu tarz uygulamalarda, sodyum silikatlar (*örn.,* sodyum disilikat, sodyum metasilikat ve kristalli fillosilikatlar) kullanım alanı bulur. Bazı uygulamalarda, silikatlar yaklaşık %1 ila yaklaşık %20 aralığında olan bir düzeyde mevcuttur. Bazı uygulamalarda, silikatlar bileşimin ağırlığı olarak yaklaşık %5 ila yaklaşık %15 aralığında olan bir düzeyde mevcuttur.

Bazı daha ilave uygulamalarda, mevcut buluşun temizleme bileşimleri ayrıca dağıtıcılar da içerir. Uygun suda çözünebilen organik malzemeler, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, homo- veya ko-polimerik asitleri veya bunların tuzlarını, içerir, burada polikarboksilik asit bir diğerinden en fazla iki karbon atomu ile ayrılmış en az iki karboksil radikali içerir.

Bazı ilave uygulamalarda, temizleme bileşimlerinde kullanılan enzimler herhangi bir uygun teknik ile stabilize edilir. Bazı uygulamalarda, burada kullanılan enzimler bu tarz iyonları enzimlere sağlayan bitmiş bileşimlerde kalsiyum ve/veya magnezyum iyonlarının suda-çözünebilen kaynaklarının varlığı ile stabilize edilir. Bazı uygulamalarda, enzim stabilazörleri oligosakkaritleri, polisakkaritleri ve toprak alkali metaller, örneğin, kalsiyum tuzları, örneğin, kalsiyum format, dâhil olmak üzere inorganik iki-değerlikli metal tuzlarını içerir. Enzim stabilizasyonu için çeşitli tekniklerin mevcut buluşta kullanım alanı bulacağı düşünülür. Örneğin, bazı uygulamalarda, burada kullanılan enzimler bu tarz iyonları enzimlere sağlayan bitmiş bileşimlerde çinko (II), kalsiyum (II) ve/veya magnezyum (II) iyonlarının aynı zamanda başka metal iyonlarının (*örn.,* baryum (II), skandiyum (II), demir (II), manganez (II), alüminyum (III), Kalay (II), kobalt (II), bakır (II), nikel (II) ve oksovanadiyum (IV) iyonlarının) suda-çözünebilen kaynaklarının varlığı ile stabilize edilir. Klorürler ve sülfatlar da mevcut buluşun bazı uygulamalarında kullanım alanı bulur. Uygun oligosakkaritlerin ve polisakkaritlerin (*örn.,* dekstrinlerin) örnekleri teknikte bilinir (Bakınız, *örn.,* WO 07/145964). Bazı uygulamalarda, geri-dönüşümlü proteaz inhibitörleri, örneğin, bor-içeren bileşikler (*örn.,* borat, 4-formil fenil boronik asit), de kullanım alanı bulur ve/veya bir tripeptit aldehiti, arzu edildiği üzere, kararlılığı ilaveten iyileştirmek için kullanım alanı bulur.

Bazı uygulamalarda, çamaşır suları, çamaşır suyu aktivatörleri ve/veya çamaşır suyu katalizörleri mevcut buluşun bileşimlerinde mevcuttur. Bazı uygulamalarda, mevcut

buluşun temizleme bileşimleri inorganik ve/veya organik ağartma bileşiği (bileşikleri) içerir. İnorganik çamaşır suları, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, perhidrat tuzlarını (*örn.,* perborat, perkarbonat, perfosfat, persülfat ve persilikat tuzlarını) içerir. Bazı uygulamalarda, inorganik perhidrat tuzları alkali metal tuzlarıdır. Bazı uygulamalarda, perhidrat tuzları, bazı başka uygulamalarda, tuzun kaplanmış olmasına rağmen, ilave koruma olmadan, kristalli katı madde olarak dâhil edilir. Teknikte bilinen herhangi bir uygun tuz mevcut buluşta kullanım alanı bulur (Bakınız, *örn.,* EP 2 100 949).

Bazı uygulamalarda, çamaşır suyu aktivatörleri mevcut buluşun bileşimlerinde kullanılır. Çamaşır suyu aktivatörleri tipik olarak 60°C ve altındaki sıcaklıklardaki temizleme sürecinde ağartma etkisini arttıran organik perasit öncülleridir. Burada kullanım için uygun olan çamaşır suyu aktivatörleri, perhidroliz koşulları altında, tercihen yaklaşık 1 ila yaklaşık 10 karbon atomuna, özel olarak yaklaşık 2 ila yaklaşık 4 karbon atomuna, sahip olan alifatik peroksoilkarboksilik asitler ve/veya opsiyonel olarak sübstüte edilmiş perbenzoik asitler veren bileşikleri içerir. İlave çamaşır suyu aktivatörleri teknikte bilinir ve mevcut buluşta kullanım alanı bulur (Bakınız, *örn.,* EP 2 100 949).

Buna ek olarak, bazı uygulamalarda ve burada ilaveten tarif edildiği üzere, mevcut buluşun temizleme bileşimleri ilaveten en az bir çamaşır suyu katalizörü içerir. Bazı uygulamalarda, manganez triazasiklononan ve ilgili bileşikler aynı zamanda kobalt, bakır, manganez ve demir kompleksleri kullanım alanı bulur. İlave çamaşır suyu katalizörleri mevcut buluşta kullanım alanı bulur (Bakınız, *örn.,* US 4,246,612, 5,227,084, 4,810410, WO 99/06521 ve EP 2 100 949).

Bazı uygulamalarda, mevcut buluşun temizleme bileşimleri bir veya birden fazla katalitik metal kompleksi içerir. Bazı uygulamalarda, bir metal-içeren çamaşır suyu katalizörü kullanım alanı bulur. Bazı uygulamalarda, metal çamaşır suyu katalizörü, çamaşır suyu katalitik aktivitesi tanımlanmış bir geçiş metali katyonu (*örn.,* bakır, demir, titanyum, rutenyum, tungsten, molibdenum veya manganez katyonları), çok az çamaşır suyu katalitik aktivitesine sahip olan veya hiç çamaşır suyu katalitik aktivitesine sahip olmayan bir yardımcı metal katyonu (*örn.,* çinko veya alüminyum katyonları) ve katalitik ve yardımcı metal katyonları için kararlılık sabitleri tanımlanmış olan bir tecrit edici içeren bir katalizör sistemi içerir, özel olarak etilendiamintetraasetik asit, etilendiamintetra (metilenfosfonik asit) ve bunların suda-çözünebilen tuzları kullanılır

(Bakınız, *örn.,* 4,430,243 Numaralı U.S. Patenti). Bazı uygulamalarda, mevcut buluşun temizleme bileşimleri bir manganez bileşiği aracılığıyla katalizlenir. Bu tarz bileşiklerin ve kullanım düzeyleri teknikte iyi bilinir (Bakınız, *örn.,* 5,576,282 Numaralı U.S. Patenti). İlave uygulamalarda, kobaltlı çamaşır suyu katalizörleri mevcut buluşun temizleme bileşimlerinde kullanım alanı bulur. Çeşitli kobaltlı çamaşır suyu katalizörleri teknikte bilinir (Bakınız, *örn.,* 5,597,936 ve 5,595,967 Numaralı U.S. Patentleri) ve bilinen prosedürler ile kolaylıkla hazırlanır.

Bazı ilave uygulamalarda, mevcut buluşun temizleme bileşimleri bir makropolisiklik sert ligandın (MRL'nin) bir geçiş metali kompleksini içerir. Pratik anlamda ve sınırlandırma olmadan, bazı uygulamalarda, mevcut buluş tarafından sağlanan bileşimler ve temizleme prosesleri sulu yıkama vasatında en azından yüz milyonda bir parça mertebesinde aktif MRL türü sağlayacak şekilde ayarlanır ve bazı uygulamalarda, sıvı likör içinde yaklaşık 0,005 ppm ila yaklaşık 25 ppm aralığında, daha tercihen yaklaşık 0,05 ppm ila yaklaşık 10 ppm aralığında ve en tercihen yaklaşık 0,1 ppm ila yaklaşık 5 ppm aralığında, MRL sağlar.

Bazı uygulamalarda, çabuk hazırlanan geçiş-metalli çamaşır suyu katalizöründeki geçiş-metalleri, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, manganezi, demiri ve kromu, içerir. MRL'ler ayrıca, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, çapraz-köprülenmiş özel ultra-sert ligandları (*örn.,* 5,12-dietil-1,5,8,12-tetraazabisiklo[6.6.2]hekzadekan)'ı, içerir. Uygun geçiş metalli MRL'er bilinen prosedürler ile kolaylıkla hazırlanır (Bakınız, *örn.,* WO 2000/32601 ve 6,225,464 Numaralı U.S. Patenti).

Bazı uygulamalarda, mevcut buluşun temizleme bileşimleri metal bakım ajanları içerir. Metal bakım ajanları alüminyum, paslanmaz çelik ve ferröz-olmayan metaller (*örn.,* gümüş ve bakır) dâhil olmak üzere metallerin matlaşmasını, korozyonunu ve/veya oksidasyonunu önlemede ve/veya azaltmada kullanım alanı bulur. Uygun metal bakım ajanları EP 2 100 949'da, WO 9426860'ta ve WO 94/26859'da tarif edilenleri içerir. Bazı uygulamalarda, metal bakım ajanı bir çinko tuzudur. Bazı ilave uygulamalarda, mevcut buluşun temizleme bileşimleri ağırlık olarak yaklaşık %0,1 ila yaklaşık % aralığında bir veya birden fazla metal bakım ajanı içerir.

Bazı uygulamalarda, temizleme bileşimi bir varyant serin proteazı polipeptit proteazına sahip olan bir yüksek yoğunluklu sıvı (HDL) bileşimdir. HDL sıvı çamaşır deterjanı

(lineer veya dallanmış veya rastgele zincirli, sübstüte edilmiş veya sübstüte edilmemiş alkil sülfatların, alkil sülfonatların, alkil alkoksillenmiş sülfatın, alkil fosfatların, alkil fosfonatların, alkil karboksilatların ve/veya bunların karışımlarından oluşan bir gruptan seçilen) bir anyonik temizlemeyi sürfaktan ve opsiyonel olarak (lineer veya dallanmış veya rastgele zincirli, sübstüte edilmiş veya sübstüte edilmemiş alkil alkoksillenmiş alkolün, örneğin, bir C_8-C_{18} alkil etoksillenmiş alkolün ve/veya C_6-C_{12} alkil fenol alkoksilatların bir grubundan seçilen) iyonik-olmayan sürfaktan dâhil olmak üzere, bir temizlemeyi sürfaktan (ağ/ağ %10-%40) içerebilir, opsiyonel olarak burada (6,0 ila 9 aralığında bir hidrofilik indeksi (Hlc'si) olan) anyonik temizleyici sürfaktanın iyonik-olmayan temizleyici sürfaktana ağırlık oranı 1:1'den daha büyüktür. Uygun temizleyici sürfaktanlar ayrıca (alkil piridinyum bileşiklerinin, alkil kuaterner amonyum bileşiklerinin, alkil kuaterner fosfonyum bileşiklerinin, alkil ternari sülfonyum bileşiklerinin ve/veya bunların karışımlarının bir grubundan seçilen) katyonik temizleyici sürfaktanları; (alkanolamin sülfo-betainlerin bir grubundan seçilen) zwitteriyonik ve/veya amfoterik temizleyici sürfaktanları; amfolitik sürfaktanları; yarı-polar iyonik-olmayan sürfaktanları ve bunların karışımlarını da içerir.

Bileşim opsiyonel olarak, (ağ %0,05-ağ %10 aralığında, dallanmış hidrofilik ve hidrofobik özelliklere sahip olan alkoksillenmiş polimerlerin, örneğin, alkoksillenmiş polialkileniminlerin, bir grubundan seçilen) amfifilik alkoksillenmiş makine yağı temizleme polimerlerinden oluşan bir sürfaktanlık destekleyici polimer ve/veya (tipik olarak aşağıdakilerden oluşan gruptan seçilen monomerler: doymamış C_1-C_6 karboksilik asitler, eterler, alkoller, aldehitler, ketonlar, esterler, şeker birimleri, alkoksi birimleri, maleik anhidrit, doymuş polialkoller, örneğin, gliserol ve bunların karışımlarını ve aşağıdakilerden oluşan gruptan seçilen hidrofobik yan zincir (zincirler): C_4-C_{25} alkil grubu, polipropilen, polibütilen, bir doymuş C_1-C_6 mono-karboksilik asidin vinil esterini, akrilik veya metakrilik asidin C_1-C_6 alkil esterini ve bunların karışımlarını içeren hidrofilik omurgadan oluşan) rastgele greft polimerler, içerebilir.

Bileşim ilave polimerler, örneğin, (aniyonik olarak ucu-başlıklandırılmış polyesterleri, örneğin, SRP1'i, sakkarit, dikarboksilik asit, poliol ve bunların kombinasyonları arasından seçilen en az bir monomer birimini, rastgele veya blok konfigürasyonunda, içeren polimerleri, etilen tereftalat-temelli polimerleri ve rastgele veya blok konfigürasyonunda bunların ko-polimerlerini, örneğin, Repel-o-tex SF'yi, SF-2'yi ve SRP6'yı, Texcare SRA100'ü, SRA300'ü, SRN100'ü, SRN170'i, SRN240'ı, SRN300'ü ve

SRN325'i, Marloquest SL'yi) içeren) kir salım polimerlerini; (ağ %0,1 ila ağ %10, karboksilat polimerlerini, örneğin, akrilik asit, maleik asit (veya maleik anhidrit), fumarik asit, itakonik asit, akonitik asit, mezakonik asit, sitrakonik asit, metilenmalonik asit ve bunların herhangi bir karışımı arasından seçilen en az bir monomer içeren polimerleri, vinilpirrolidon homopolimerini ve/ve 500 ila 100.000 Da aralığında moleküler ağırlığı olan, polietilen glikolü içeren) anti-yeniden-depolama polimerlerini; (örnekleri karboksimetil selülozu, metil selülozu, metil hidroksietil selülozu, metil karboksimetil selülozu ve bunların karışımlarını içeren, alkil selüloz, alkil alkoksialkil selüloz, karboksialkil selüloz, alkil karboksialkil selüloz arasından seçilenleri içeren) selülozik polimeri ve polimerik karboksilatı (örneğin, maleat/akrilat rastgele kopolimerini veya poliakrilat homopolimerini), içerir.

Bileşim ilaveten doymuş veya doymamış yağ asitleri, tercihen doymuş veya doymamış C12-C24 yağ asidi (ağ %0 ila ağ %10); depolama yardımcıları (örnekleri polisakkaritleri, tercihen selülozik polimerleri, poli diallil dimetil amonyum halidleri (DADMAC'yi) ve DAD MAC'ın vinil pirrolidon, akrilamidler, imidazoller, imidazolinyum halidleri ve bunların karışımları ile, rastgele veya blok konfigürasyonunda, ko-polimerlerini, katyonik guar zamkını, katyonik selülozu, örneğin, katyonik hidroksietil selülozu, katyonik nişastayı, katyonik poliaçilamidleri ve bunların karışımlarını içerir) içerebilir.

Bileşim ilaveten örnekleri manganez ftalosiyanini, peroksidazları, polivinilpirrolidon polimerlerini, poliamin N-oksit polimerlerini, N-vinilpirrolidonun ve N-vinilimidazolün kopolimerlerini, polivinilokzazolidonları ve polivinilimidazolleri ve/veya bunların karışımlarını içeren boya transferini inhibe etme ajanları; örnekleri etilen-diamin-tetraasetik asidi (EDTA'yı); dietilen triamin penta metilen fosfonik asidi (DTPMP'yi); hidroksi-etan difosfonik asidi (HEDP'yi); etilendiamin N,N'-disüksinik asidi (EDDS'yi); metil glisin diasetik asidi (MGDA'yı); dietilen triamin penta asetik asidi (DTPA'yı); propilen diamin tetrasetik asidi (PDT A'yı); 2-hidroksipiridin-N-oksidi (HPNO'yu) veya metil glisin diasetik asidi (MGDA'yı); glutamik asit N,N-diasetik asidi (N,N-dikarboksimetil glutamik asit tetrasodyum tuzunu (GLDA'yı); nitrilotriasetik asidi (NTA'yı); 4,5-dihidroksi-m-benzendisülfonik asidi; sitrik asidi ve bunun herhangi bir tuzunu; N-hidroksietiletilendiaminetri-asetik asidi (HEDTA'yı), trietilentetraaminhekzaasetik asidi (TTHA'yı), N-hidroksietiliminodiasetik asidi

(HEIDA'yı), dihidroksietilglisini (DHEG'yi), etilendiamintetrapropiyonik asidi (EDTP'yi) ve bunların türevlerini içeren şelatlama ajanları içerebilir.

Bileşim opsiyonel olarak proteazlar, amilazlar, lipazlar, selülazlar, kolin oksidazlar, peroksidazlar/oksidazlar, pektat liyazlar, mannanazlar, kütinazlar, lakkazlar, fosfolipazlar, lizofosfolipazlar, açiltransferazlar, perhidrolazlar, arilesterazlar ve bunların herhangi bir karışımı arasından seçilen enzimler (genel olarak yaklaşık ağ %0,01 aktif enzim ila ağ %0,5 aktif enzim) içerebilir. Bileşim (örnekleri poliolleri, örneğin, propilen glikolü veya gliserolü, şekeri veya şeker alkolünü, laktik asidi, geri-dönüşümlü proteaz inhibitörünü, borik asidi veya bir borik asit türevini, *örn.,* bir aromatik borat esterini veya bir fenil boronik asit türevini, örneğin, 4-formilfenil boronik asidi içeren) bir enzim stabilazörü içerebilir.

Bileşim ilaveten silikon veya yağ-asidi temelli sabun köpüğü baskılayıcıları; renk tonlama boyaları, kalsiyum ve magnezyum katyonları, görsel sinyalleme içerik maddeleri, köpük-önleyici (ağ %0,001 ila yaklaşık ağ %4,0) ve/veya (ağ %0,01 ila ağ %5, digliseritlerden ve trigliseritlerden, etilen glikol distearattan, mikro-kristalli selülozdan, selüloz bazlı malzemelerden, mikro-fiber selülozdan, biyopolimerlerden, ksantan sakızından, jellan sakızından ve bunların karışımlarından oluşan gruptan seçilen) yapılandırıcı/kıvamlaştırıcı içerebilir.

Bileşim herhangi bir sıvı formda, örneğin, bir sıvı veya jel formunda veya bunların herhangi bir kombinasyonu hâlinde olabilir.

Bazı uygulamalarda, mevcut buluşun temizleme bileşimleri, tabletler, kapsüller, tek dozluk paketler, keseler ve çok-kompartımanlı keseler dâhil olmak üzere birim doz formunda sağlanır. Bazı uygulamalarda, birim doz formayı bir çok kompartımanlı kese (veya başka birim doz formatı) içinde içerik maddelerinin kontrollü salımını sağlayacak şekilde tasarlanır. Uygun birim doz ve kontrollü salım formatları teknikte bilinir (Bakınız, *örn.,* birim doz ve kontrollü salım formatlarında kullanım için uygun malzemeler için EP 2 100 949, WO 02/102955, 4,765,916 ve 4,972,017 Numaralı U.S. Patentleri ve WO 04/111178). Bazı uygulamalarda, birim doz formu bir suda-çözünebilen film veya suda-çözünebilen keseler ile sarılmış tabletler ile sağlanır. Çeşitli birim doz formatları EP 2 100 947'de ve WO2013/165725'te sağlanır ve teknikte bilinir.

Bazı uygulamalarda, temizleme bileşimi bir varyant serin proteazı polipeptit proteazına sahip olan bir yüksek yoğunluklu pudra (HDD) bileşimidir. HDD pudra çamaşır deterjanı anyonik temizleyici sürfaktanlar (*örn.,* lineer veya dallanmış veya rastgele zincirli, sübstüte edilmiş veya sübstüte edilmemiş alkil sülfatlar, alkil sülfonatlar, alkil alkoksillenmiş sülfat, alkil fosfatlar, alkil fosfonatlar, alkil karboksilatlar ve/veya bunların karışımları), (lineer veya dallanmış veya rastgele zincirli, sübstüte edilmiş veya sübstüte edilmemiş C_8-C_{18} alkil etoksilatların ve/veya C_6-C_{12} alkil fenol alkoksilatların bir grubundan seçilen) iyonik-olmayan temizleyici sürfaktan, katyonik temizleyici sürfaktanlar (*örn.,* alkil piridinyum bileşikleri, alkil kuaterner amonyum bileşikleri, alkil kuaterner fosfonyum bileşikleri, alkil ternari sülfonyum bileşikleri ve bunların karışımları), zwitteriyonik ve/veya amfoterik temizleyici sürfaktanlar, *örn.,* alkanolamin sülfo-betainler); amfolitik sürfaktanlar; yarı-polar iyonik-olmayan sürfaktanlar ve bunların karışımları dâhil olmak üzere bir temizleyici sürfaktan; inşa ediciler (fosfatsız inşa ediciler [örneğin, ağ %0 ila ağ %10'dan daha az aralığında, örnekleri zeolit A'yı, zeolit X'i, zeolit P'yi ve zeolit MAP'ı içeren zeolite inşa ediciler]; fosfatlı inşa ediciler (örneğin, ağ %0 ila ağ %10'dan daha az aralığında, sodyum tri-polifospat]; ağ %15'ten daha az aralığında sitrik asit, sitrat tuzları ve nitrilotriasetik asit veya bunun tuzları); silikat tuzu (*örn.,* ağ %0 ila ağ %10'dan daha az aralığında sodyum veya potasyum silikat veya sodyum meta-silikat veya katmanlaştırılmış silikat (SKS-6)); karbonat tuzu (*örn.,* ağ %0 ila ağ %10'dan daha az aralığında sodyum karbonat ve/veya sodyum bikarbonat) ve (foto-ağartıcılar, (*örn.,* sülfonatlanmış çinko ftalosiyaninler, sülfonatlanmış alüminyum ftalosiyaninler, ksanten boyalar ve bunların karışımları; (*örn.,* dodekanoil oksibenzen sülfonatı, dekanoil oksibenzen sülfonatı, dekanoil oksibenzoik asidi veya bunların tuzlarını, 3,5,5-trimeti hekzanoil oksibenzen sülfonatı, tetraasetil etilen diamin-TAED'yi ve nonanoiloksibenzen sülfonat-NOBS'yi nitril kuatlarını ve bunların karışımlarını içeren) hidrofobik veya hidrofilik çamaşır suyu aktivatörleri; hidrojen peroksit kaynakları (*örn.,* örnekleri perboratın, perkarbonatın, persülfatın, perfosfatın veya persilikatın mono veya tetra hidrat sodyum tuzunu içeren inorganik perhidrat tuzları); önceden-oluşturulmuş hidrofilik ve/veya hidrofobik perasitler (*örn.,* perkarboksilik asitler ve tuzları, perkarbonik asitler ve tuzları, perimidik asitler ve tuzları, peroksimonosülfürik asitler ve tuzları ve bunların karışımları) ve/veya çamaşır suyu katalizörleri (*örn.,* (örnekleri iminiyum katyonlarını ve poliiyonları içeren) imin çamaşır suyu destekleyicileri; iminiyum zwitteriyonları; modifiye edilmiş aminler; modifiye edilmiş amin oksitler; N-sülfonil iminler; N-fosfonil iminler; N-açil iminler; tiyadiazol dioksitler; perfloroiminler; siklik şeker ketonları ve bunların karışımları ve metal-içeren

çamaşır suyu katalizörleri (*örn.,* bir yardımcı metal katyonları, örneğin, çinko veya alüminyum ve bir tecrit edici, örneğin, etilendiamintetraasetik asit, etilendiaminetetra(metilenfosfonk asit) ve bunların suda-çözünebilen tuzları, ile birlikte bakır, demir, titanyum, rutenyum, tungsten, molibdenum veya manganez katyonları) dâhil olmak üzere) ağartma ajanları içerebilir.

Bileşim tercihen enzimler, *örn.,* proteazlar, amilazlar, lipazlar, selülazlar, kolin oksidazlar, peroksidazlar/oksidazlar, pektat liyazlar, mannanazlar, kütinazlar, lakkazlar, fosfolipazlar, lizofosfolipazlar, açiltransferaz, perhidrolaz, arilesteraz ve bunların herhangi bir karışımını, içerir.

Bileşim ilaveten, parfüm mikro-kapsülleri, nişasta enkapsüle edilmiş parfüm uyumu, renk tonlama ajanları dâhil olmak üzere ilave deterjan içerik maddeleri, kumaş bütünlük ve katyonik polimerler, boya hapsetme içerik maddeleri, kumaş-yumuşatma ajanları, parlatıcılar (örneğin, C.I. Flüoresan parlatıcılar), yumaklaştırma ajanları, şelatlama ajanları, alkoksillenmiş poliaminler, kumaş depolama yardımcıları ve/veya siklodekstrin dâhil olmak üzere ilave polimerler içerebilir.

Bazı uygulamalarda, temizleme bileşimi mevcut buluşun bir serin proteazına sahip olan bir otomatik bulaşık yıkama (ADW) deterjanı bileşimidir. ADW deterjanı bileşimi ağırlık olarak %0 ila 10 aralığındaki miktarlarda bulunan etoksillenmiş iyonik-olmayan sürfaktanların, alkol alkoksillenmiş sürfaktanların, epoksi-başlıklandırılmış poli(oksialkillenmiş) alkollerin veya amin oksit sürfaktanların bir grubundan seçilen iki veya daha fazla iyonik-olmayan sürfaktan; ağırlık olarak %0,5 ila %50 aralığında fosfatın (mono-fosfatların, di-fosfatların, tri-polifosfatların veya oligomerik-polifosfatların, tercih edilen sodyum tripolifosfat-STPP'nin veya fosfatsız inşa edicilerin [örnekleri MGDA'yı (metil-glisin-diasetik asit)'i ve bunun tuzlarını ve türevlerini, GLDA'yı (glutamik-N,Ndiasetik asit)'i ve bunun tuzlarını ve türevlerini, IDS'yi (iminodisüksinik asit)'i ve bunun tuzlarını ve türevlerini, karboksi metil inülini ve bunun tuzlarını ve türevlerini ve bunun karışımlarını, nitrilotriasetik asidi (NTA'yı), dietilen triamin penta asetik asidi (DTPA'yı), B-alanindiasetik asidi (B-ADA'yı) ve bunların tuzlarını içeren amino asit temelli bileşiklerinin], polikarboksilik asitlerin ve bunların kısmen veya tamamen nötralize edilmiş tuzlarının, monomerik polikarboksilik asitlerin ve hidroksikarboksilik asitlerin ve bunların tuzlarının homopolimerlerinin ve kopolimerlerinin herhangi birini içeren %5-60 aralığında inşa ediciler; ağırlık olarak

yaklaşık %0,1 ila yaklaşık %50 aralığında sülfonatlanmış/karboksillenmiş polimerler (ürüne boyutsal kararlılık sağlar); ağırlık olarak yaklaşık %0,1 ila yaklaşık %10 aralığında (polyesterler, özellikle opsiyonel olarak polikondensasyon için elverişli olan 3 ila 6 işlevselliği, spesifik olarak asit, alkol veya ester işlevselliği, olan ilave monomerler ile birlikte anyonik polyesterler, polikarbonat-, poliüretan- ve/veya poliüre-poliorganosiloksan bileşikleri veya reaktif siklik karbonat ve üre tipindeki bunun öncül bileşikleri arasından seçilen) kurutma yardımcıları; ağırlık olarak yaklaşık %1 ila yaklaşık %20 aralığında silikatlar (sodyum veya potasyum silikatlar, örneğin, sodyum disilikat, sodyum meta-silikat ve kristalli fillosilikatlar); çamaşır suyu-inorganik (örneğin, perhidrat tuzları, örneğin, perborat, perkarbonat, perfosfat, persülfat ve persilikat tuzları) ve organik (örneğin, diaçil ve tetraaçilperoksitler, özellikle diperoksidodekandiok asit, diperoksitetradekandiok asit ve diperoksihekzadekandiok asit, dâhil olmak üzere organik peroksiasitler); ağırlık olarak yaklaşık %0,1 ila yaklaşık %10 aralığında çamaşır suyu aktivatörleri-organik perasit öncülleri; (manganez triazasiklononan ve ilgili kompleksler, Co, Cu, Mn ve Fe bispiridilamin ve ilgili kompleksler ve pentamin asetat kobalt(III) ve ilgili kompleksler arasından seçilen) çamaşır suyu katalizörleri; ağırlık olarak yaklaşık %0,1 ila %5 aralığında (benzatriazoller, metal tuzları ve kompleksleri ve/veya silikatlar arasından seçilen) metal bakım ajanları; otomatik bulaşık yıkama deterjanı bileşiminin her bir gramı için aktif enzimin yaklaşık 0,01 ila 5,0 mg'ı aralığında enzimler (açil transferazlar, alfa-amilazlar, beta-amilazlar, alfa-galaktosidazlar, arabinosidazlar, aril esterazlar, beta-galaktosidazlar, karajenazlar, katalazlar, sellobiyohidrolazlar, selülozlar, kondroitinazlar, kütinazlar, endo-beta-1,4-glukanazlar, endo-beta-mannanazlar, esterazlar, ekzo-mannanazlar, galaktanazlar, glukoamilazlar, hemiselülazlar, hiyalüronidazlar, keratinazlar, lakkazlar, laktazlar, ligninazlar, lipazlar, lipoksijenazlar, mannanazlar, oksidazlar, pektat liyazlar, pektin asetil esterazlar, pektinazlar, pentozanazlar, peroksidazlar, fenoloksidazlar, fosfatazlar, fosfolipazlar, fitazlar, poligalaktüronazlar, proteazlar, pullulanazlar, redüktazlar, ramnogalaktüronazlar, beta-glukanazlar, tannazlar, transglutaminazlar, ksilan asetil-esterazları, ksilanazlar, ksiloglukanazlar ve ksilosidazlar ve bunların herhangi bir karışımı) ve (oligosakkaritler, polisakkaritler ve inorganik iki-değerlikli metal tuzları arasından seçilen) enzim stabilazör bileşenleri içerebilir.

Bazı uygulamalarda, temizleme bileşimi boratsızdır. Bazı uygulamalarda, temizleme bileşimi fosfatsızdır. Bazı uygulamalarda, temizleme bileşimi bileşim içinde 10 ppm'den

daha az veya 5 ppm'den daha az veya 1 ppm'den daha az boratlara ve/veya fosfatlara sahip olabilir.

Mevcut buluşun bir serin proteazı polipeptidini yararlı bir şekilde içeren temsili deterjan formülasyonları, WO2013063460'ta, 78-152 arasındaki sayfalarda ve özel olarak 94 ila 152 arasındaki sayfalardaki tablolarda, bulunan deterjan formülasyonlarını içerir. Serin proteazları normal olarak bileşimin ağırlığı olarak %0,00001 ila %10'u olan bir düzeyde enzim proteini deterjan bileşimine katılır. Bazı uygulamalarda, deterjan bileşimi bileşimin ağırlığı olarak %0,0001'den, %0,001'den, %0,01'den veya %0,1'den daha fazla serin proteazı içerir. Bazı uygulamalarda, deterjan bileşimi bileşimin ağırlığı olarak %1'den, %0,1'den, %0,01'den veya %0,001'den daha az serin proteazı içerir.

B. Tekstil İşleme

Ayrıca, mevcut buluşun bir serin proteazı polipeptidini kullanarak (*örn.,* bir tekstilin haşılını sökmek için) kumaşlara muamele etmenin bileşimleri ve yöntemleri de sağlanır. Kumaşa-muamele yöntemleri teknikte iyi bilinir (*bakınız, örn.,* 6,077,316 Numaralı U.S. Patenti). Örneğin, bir kumaşın hissi ve görünüşü kumaşı bir çözelti içindeki bir serin proteazı ile temas ettirmeyi içeren bir yöntem ile iyileştirilebilir. Kumaşa basınç altında çözelti ile muamele edilebilir.

Mevcut buluşun bir serin proteazı bir tekstilin dokunması sırasında veya sonrasında, haşıl sökme evresinde veya bir veya birden fazla ilave kumaş işleme adımında uygulanabilir. Tekstillerin dokunması sırasında, iplikler kayda değer mekanik gerilmeye maruz bırakılır. Mekanik dokuma tezgahları üzerinde dokunmadan önce, çözgü iplikleri sıklıkla, bunların mukavemetini arttırmak için ve kırılmayı önlemek için haşıllama nişastası veya nişasta türevleri ile kaplanır. Mevcut buluşun bir serin proteazı bu haşıllama nişastasını veya nişasta türevlerini uzaklaştırmak için dokunma sırasında veya sonrasında uygulanabilir. Dokunmadan sonra, serin proteazı bir homojen ve su-geçirmez sonucu garantilemek için kumaşı ilave işlemeden önce haşıl kaplamayı uzaklaştırmak için kullanılabilir.

Mevcut buluşun bir serin proteazı, *örn.,* sulu bileşimler içinde, deterjan katkı maddeleri olarak, pamuk-içeren kumaşlar dâhil olmak üzere kumaşların haşılı sökmek için tek başına veya başka haşıl sökme kimyasal reaktifleri ve/veya haşıl sökme enzimleri ile

kullanılabilir. Bir amilaz da indigo-renkli denim kumaşı ve giysiler üzerinde bir taşlanmış görünüm üretmek için bileşimlerde ve yöntemlerde kullanılabilir. Elbiselerin üretimi için, kumaşlar kesilebilir ve elbiseler veya giysiler olarak dikilebilir, bundan sonra aprelenir. Özel olarak, denim kot pantolonların üretimi için, farklı enzimatik apreleme yöntemleri geliştirilmiştir. Denim giysinin aprelenmesi normalde, bu sırada giysilerin kumaşa yumuşaklık sağlamak ve pamuğu müteakip enzimatik apreleme adımları için daha erişilebilir hâle getirmek amacıyla proteolitik enzimlerin etkisine tabi tutulduğu, bir enzimatik haşıl sökme adımı ile başlatılır. Serin proteazı denim giysileri apreleme (*örn.,* bir biyo-taşlama prosesi), enzimatik haşıl sökme ve kumaşlara yumuşaklık sağlama ve/veya apreleme prosesi yöntemlerinde kullanılabilir.

C. Deri ve Tüy İşleme

Burada tarif edilen serin proteazı polipeptitleri hayvanlardan proteinlerin enzim yardımlı uzaklaştırılmasında ve bunların, örneğin, tüylerin, cildin, kılın, postun ve benzerlerinin, müteakip parçalanmasında veya imha edilmesinde ilave kullanım alanı bulur. Bazı durumlarda, hayvan karkasının mevcut buluşun bir serin proteazı polipeptidini içeren bir çözeltiye batırılması geleneksel kaynar suya batırma veya tüy yolma prosesine kıyasla cildi hasardan koruyacak şekilde etki edebilir. Bir uygulamada, tüylere kuş tüylerini sindirmek veya bunların parçalanmasını başlatmak için uygun olan koşullar altında mevcut buluşun bir izole edilmiş serin proteazı polipeptidi püskürtülebilir. Bazı uygulamalarda, mevcut buluşun bir serin proteazı, yukarıda olduğu gibi, bir oksitleme ajanı ile kombinasyon hâlinde, kullanılabilir.

Bazı uygulamalarda, ham tüyler ile ilişkilendirilmiş sıvı yağın veya katı yağın uzaklaştırılmasına mevcut buluşun bir serin proteazı polipeptidini kullanma ile yardım edilir. Bazı uygulamalarda, serin proteazı polipeptitleri tüyleri temizlemek için aynı zamanda lifleri sterilize etmek ve kısmen dehidrate etmek için bileşimler içinde kullanılır. Daha başka uygulamalarda, açıklanan serin proteazı polipeptitleri kuş tüyünden proteinin geri-kazanılmasında kullanım alanı bulur. Bazı başka uygulamalarda, serin proteazı polipeptitleri (hacim/hacim) yaklaşık %0,5'te bir sürfaktan ile veya bir sürfaktan olmadan %95'lik etanol veya başka polar organik çözücü ile kombinasyon hâlinde bir yıkama çözeltisi içinde uygulanır.

D. Hayvan Yemi Uygulamaları

Buluşun bir ilave yönünde, mevcut buluşun serin proteazı polipeptitleri bir serin proteazı ve bunun varyantlarını içeren bir hayvan yemi bileşiminin bir bileşeni, hayvan yemi katkı maddesi ve/veya evcil hayvan gıdası olarak kullanılabilir. Mevcut buluş ilaveten bu tarz bir hayvan yemi bileşimini, hayvan yemi katkı maddesi bileşimi ve/veya evcil hayvan gıdasını hazırlamak için, bir veya birden fazla hayvan yemi içerik maddesi ve/veya hayvan yemi içerik katkı maddesi ve/veya evcil hayvan gıda içerik maddesi ile serin proteazı polipeptidini karıştırmayı içeren, bir yöntem ile ilgilidir. İlaveten, mevcut buluş bir hayvan yemi bileşiminin ve/veya hayvan yemi katkı maddesi bileşiminin ve/veya evcil hayvan gıdasının preparasyonunda serin proteazı polipeptidinin kullanımı ile ilgilidir.

"Hayvan" terimi, tüm geviş getirmeyen ve geviş getiren hayvanları içerir. Bir özel uygulamada, hayvan bir geviş getirmeyen hayvandır, örneğin, bir attır veya bir tek-mideli hayvandır. Tek-mideli hayvanların örnekleri, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, domuzları (pigs) ve domuzu (swine), örneğin, yavru domuzları, büyümekte olan domuzları, dişi domuzları; kümes hayvanlarını, örneğin, hindileri, ördekleri, tavukları, etlik civcivleri, yumurtlayanları; balıkları, örneğin, somonu, alabalığı, tatlısu çipurasını, kedi balığını ve sazangilleri ve kabukluları, örneğin, karidesleri ve büyük karidesleri, içerir. Bir ilave uygulamada, hayvan, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, sığırlar, genç buzağılar, keçiler, koyunlar, zürafalar, bizonlar, muslar, elkler, yaklar, su bufaloları, geyikler, develer, alpakalar, lamalar, antiloplar, çatalboynuzlu antiloplar ve Hint ceylanları dâhil olmak üzere, bir geviş getiren hayvandır.

Mevcut bağlamda, "evcil hayvan gıdası" teriminin bir ev hayvanı, örneğin, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, köpekler, kediler, çöl fareleri, hamsterlar, çinçillalar, süslü sıçanlar, gine domuzları; kuş evcil hayvanları, örneğin, kanaryalar, muhabbet kuşları ve papağanlar; sürüngen evcil hayvanları, örneğin, kaplumbağalar, kertenkeleler ve yılanlar ve sucul evcil hayvanlar, örneğin, tropikal balıklar ve kurbağalar, için bir gıda anlamına gelecek şekilde anlaşılması amaçlanır.

"Hayvan yemi bileşimi", "hayvan yemi" ve "kuru ot" terimleri birbiri ile değiştirilebilir bir şekilde kullanılır ve a) a) tahılları, örneğin, küçük tanecikleri (*örn.,* buğdayı, arpayı, çavdarı, yulafları ve bunların kombinasyonlarını) ve/veya büyük tanecikleri, örneğin, darıyı ve sorgumu; b) tahıllardan elde edilen yan ürünleri, örneğin, mısır gluten ununu,

Kurutulmuş damıtma kalıntıları ve çözünür maddeleri (DDGS) (özellikle mısır bazlı Kurutulmuş damıtma kalıntıları ve çözünür maddeleri (cDDGS), buğday kepeğini, buğday kaba ununu, buğday ince kepeğini, pirinç kepeğini, pirinç kavuzunu, yulaf kavuzunu, palm çekirdeğini ve turunçgil posasını; c) kaynaklardan, örneğin, soyadan, ayçiçeğinden, yer fıstığından, acı bakladan, bezelyelerden, bakladan, pamuktan, kanoladan, balık ununda, kurutulmuş plazma proteinden, etten ve kemik tozundan, patates proteininden, peynir altı suyundan, kopradan, susamdan, elde edilen proteini; d) bitkisel ve hayvansal kaynaklardan elde edilen sıvı yağları ve katı yağları; e) mineralleri ve vitaminleri içeren gruptan seçilen bir veya birden fazla yem malzemesi içerebilir.

E. Kâğıt Hamuru Beyazlatma

Burada tarif edilen proteaz polipeptitleri kâğıt hamurlarının, örneğin, kimyasal hamurların, yarı-kimyasal hamurların, kraft hamurların, mekanik hamurların veya sülfit yöntemi ile hazırlanan hamurların, enzim yardımcı beyazlatılmasında ilave kullanım alanı bulur. Genel terimlerde, kâğıt hamurları kâğıt hamurunu beyazlatmak için uygun olan koşullar altında mevcut buluşun bir proteaz polipeptidi ile inkübe edilir.

Bazı uygulamalarda, hamurlar oksijen, ozon, peroksit veya peroksiasitler ile beyazlatılmış klorsuz kâğıtlardır. Bazı uygulamalarda, proteaz polipeptitleri düşük lignin içerikleri gösteren modifiye edilmiş veya sürekli hamur yapma yöntemleri ile üretilmiş hamurların enzim yardımcı beyazlatılmasında kullanılır. Bazı başka uygulamalarda, proteaz polipeptitleri tek başına veya tercihen ksilanazlar ve/veya endoglukanazlar ve/veya alfa-galaktosidaz ve/veya sellobiyohidrolaz enzimleri ile kombinasyon hâlinde uygulanır.

F. Protein parçalanması

Burada tarif edilen proteaz polipeptitleri hayvanlardan proteinlerin enzim yardımlı uzaklaştırılmasında ve bunların, örneğin, tüylerin, cildin, kılın, postun ve benzerlerinin, müteakip parçalanmasında veya imha edilmesinde ilave kullanım alanı bulur. Bazı durumlarda, hayvan karkasının mevcut buluşun bir proteaz polipeptidini içeren bir çözeltiye batırılması geleneksel kaynar suya batırma veya tüy yolma prosesine kıyasla cildi hasardan koruyacak şekilde etki edebilir. Bir uygulamada, tüylere kuş tüylerini

sindirmek veya bunların parçalanmasını başlatmak için uygun olan koşullar altında mevcut buluşun bir izole edilmiş proteaz polipeptidi püskürtülebilir. Bazı uygulamalarda, mevcut buluşun bir proteazı, yukarıda olduğu gibi, bir oksitleme ajanı ile kombinasyon hâlinde, kullanılabilir.

Bazı uygulamalarda, ham tüyler ile ilişkilendirilmiş sıvı yağın veya katı yağın uzaklaştırılmasına mevcut buluşun bir proteaz polipeptidini kullanma ile yardım edilir. Bazı uygulamalarda, proteaz polipeptitleri tüyleri temizlemek için aynı zamanda lifleri sterilize etmek ve kısmen dehidrate etmek için bileşimler içinde kullanılır. Bazı başka uygulamalarda, proteaz polipeptitleri (hacim/hacim) yaklaşık %0,5'te bir sürfaktan ile veya bir sürfaktan olmadan %95'lik etanol veya başka polar organik çözücü ile kombinasyon hâlinde bir yıkama çözeltisi içinde uygulanır. Daha başka uygulamalarda, açıklanan proteaz polipeptitleri kuş tüyünden proteinin geri-kazanılmasında kullanım alanı bulur. Açıklanan proteaz polipeptitleri uygun tüy işleme yöntemlerinde ve proteolitik yöntemlerde, örneğin, PCT/EP2013/065362'de, PCT/EP2013/065363'te ve PCT/EP2013/065364'te açıklananlarda, tek başına veya kombinasyon hâlinde kullanılabilir, bazı uygulamalarda, geri-kazanılmış protein bunu takiben hayvan veya balık yeminde kullanılabilir.

G. Doku Debridmanı

Burada tarif edilen proteaz polipeptitleri dokunun enzim yardımlı debridmanında ilave kullanım alanı bulur. Bu ölü veya hasar görmüş dokunun uzaklaştırılmasını, örneğin, iyileşmeye yardımcı olmak için yaralardan uzaklaştırılmasını, içerir.

H. Doku Kültürü

Burada tarif edilen proteaz polipeptitleri doku kültüründe ilave kullanım alanı bulur. Özel olarak, mevcut buluşun proteazları, örneğin, hücreleri hasat etme prosesi sırasında, bir hücre kültürü duvarına yapışık hücreleri süspanse etmek veya yeniden-süspanse etmek için kullanılabilir. Mevcut buluşun proteazları kültürlenmiş hücreler ve petri kabı arasındaki protein bağlarını yarmak için kullanılabilir bu hücrelerin çözelti içinde süspanse edilmiş hâle gelmesine olanak sağlar.

I. Gıda Uygulamaları

Burada tarif edilen proteaz polipeptitleri bir gıda katkı maddesi, bir sindirime yardımcı veya bir gıda işleme yardımcısı olarak ilave kullanım alanı bulur.

ÖRNEKLER

Aşağıdaki örnekler mevcut açıklamanın belirli tercih edilen uygulamalarını ve yönlerini göstermek ve açıklamak için sağlanır ve bunlardan sınırlayıcı olarak anlam çıkarılmamalıdır.

Aşağıdaki deneysel açıklamada, aşağıdaki kısaltmalar geçerlidir: ADW (otomatik bulaşık yıkama); BMI (kan/süt/mürekkep); BSA (bovin serum albümini); CAPS (N-siklohekzil-3-aminopropansülfonik asit); CHES (N-siklohekzil-2-aminoetansülfonik asit); DMC (dimetil kazein); HDD (ağır iş kuru/pudra); HDL (ağır iş sıvı); HEPES (4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansülfonik asit); MTP (mikro-titre plaka); ND (yapılmadı); OD (optik yoğunluk); PCR (polimeraz zincir reaksiyonu); ppm (milyonda parça); QS (yeterli miktar); rpm (dakikadaki devir sayısı); AAPF (süksinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilid); TNBSA (2,4,6-trinitrobenzen sülfonik asit); hacim/hacim (hacim ila hacim); ağ/hacim (ağırlık ila hacim).

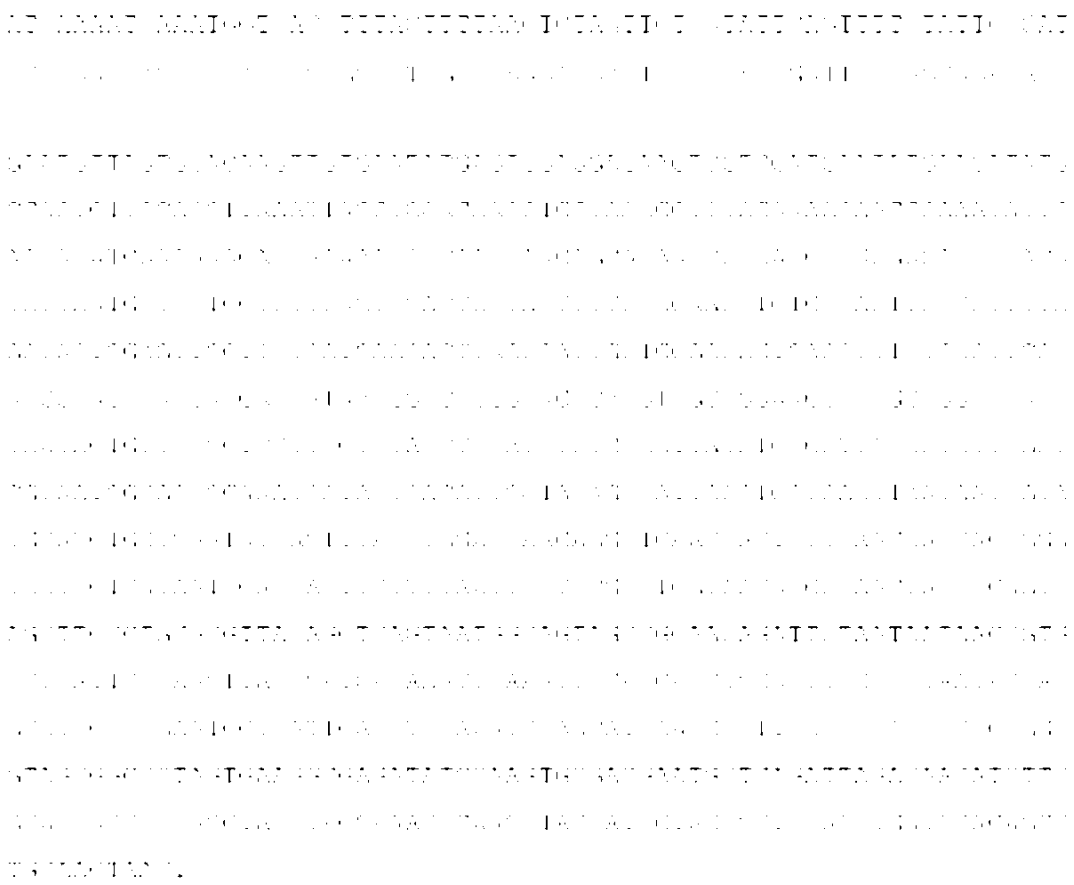
ÖRNEK 1

Bacillus sp. Serin Proteazları BspAI02518'in ve BspU02193'ün Klonlanması

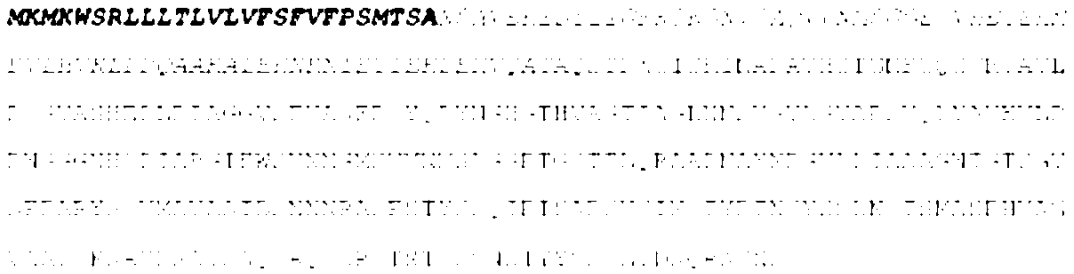
Serin Proteazı BspAI02518

B. akibai C-M2-3 suşu (Dupont Kültür Koleksiyonu) çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanışlı enzimler için bir potansiyel kaynak olarak seçilmiştir. *Bacillus sp.* C-M2-3 suşunun tüm genomu sentez teknolojisi ile ILLUMINA® dizileme kullanılarak dizilenmiştir. Genom dizileme ve dizi verilerinin birleştirilmesi BaseClear (Leiden, The Netherlands) tarafından gerçekleştirilmiştir. Contig'ler BioXpr (Namur, Belgium) tarafından şerhlenmiştir. *B. akibai* C-M-2-3'te bu yolla tanımlanan genleri biri diğer bakterilerin serin proteazlarına homoloji gösteren bir serin proteazını şifreler.

BspAI02518n'nin nükleotid dizisi SEQ ID NO: 1 olarak izah edilir:



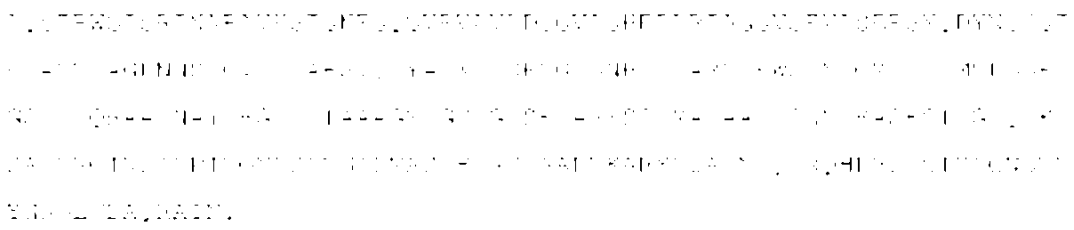
Tarafından şifrelenen preproenzimin amino asit dizisi *BspAI02518n* tarafından şifrelenen preproenzimin aminoasit dizisi SEQ ID NO: 2 olarak izah edilir:



N-ucunda, preproenzim SignalP-NN (Emanuelsson et al., Nature Protocols, 2:953-971, 2007) kullanılarak belirlendiği üzere 26 amino asitlik bir tahmin edilen uzunluğu olan (SEQ ID NO: 2'de ***kalın ve italik olarak*** yazılmış) bir sinyal peptidine sahiptir. Bir sinyal peptidi dizisinin varlığı bu serin proteazının bir salgılanmış enzim olduğunu gösterir. Diğer serin proteazları gibi, enzim 71 amino asitlik bir tahmin edilen uzunluğu olan (SEQ ID NO: 2'de *italik* yazılmış) bir pro-diziye sahiptir. Pro-dizi tahmini homolog serin

proteazları, örneğin, BPN' (Wells et al., Nucleic Acids Res, 11:7911-25, 1983) ve PB92 proteazı (van der Laan et al., Appl Environ Microbiol, 57:901-909, 1991), içindeki promatür birleşme yeri bilgisine dayandırılmıştır.

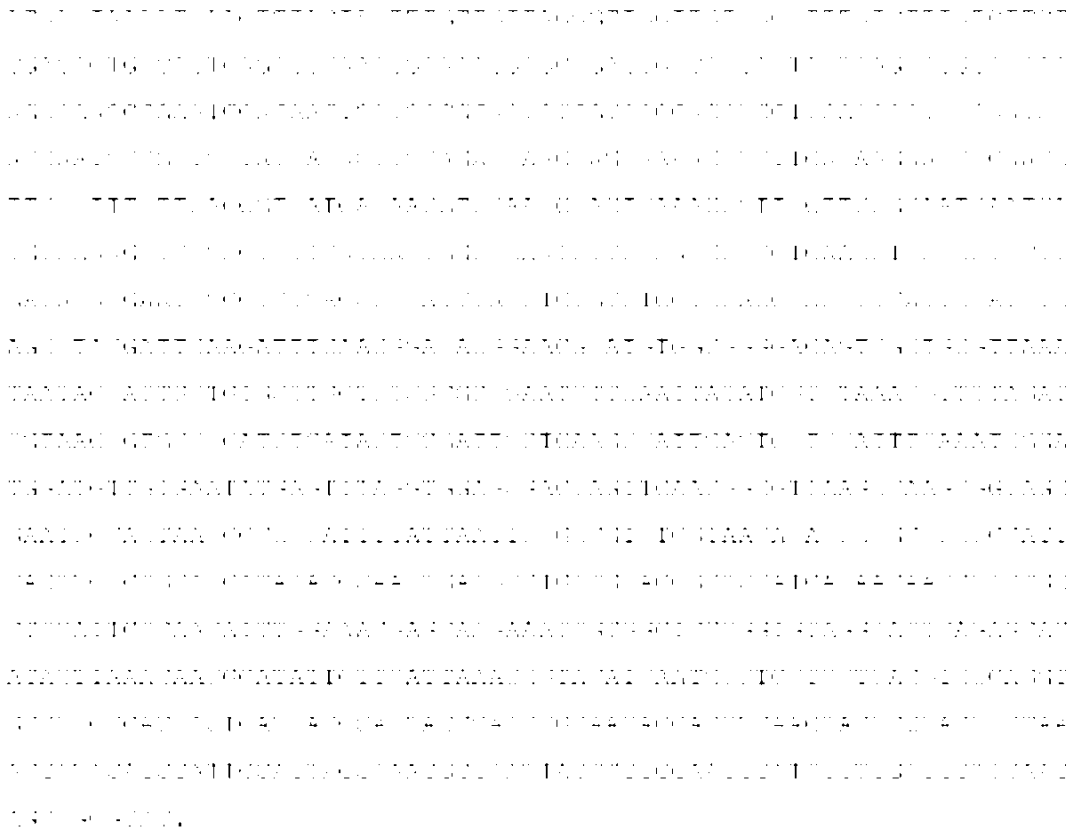
Tam olarak işlenmiş matür enzimin, BspAI02518'in (269 amino asitlik), amino asit dizisi SEQ ID NO: 3'te gösterilir.



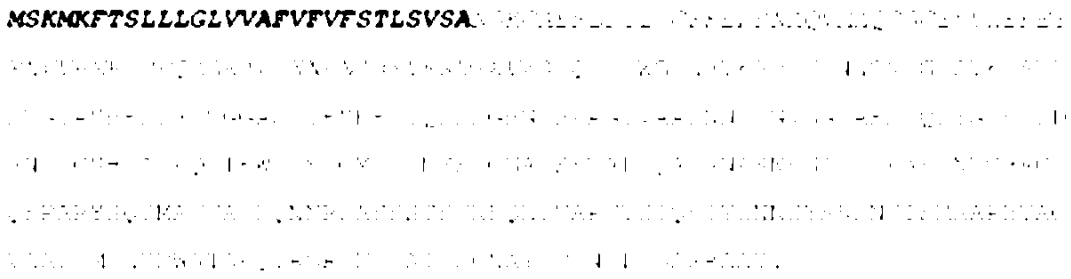
Serin Proteazı BspU02193

B. akibai GICC 2089392 suşu (Dupont Kültür Koleksiyonu) çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanışlı enzimler için bir potansiyel kaynak olarak seçilmiştir. *Bacillus* sp. GICC 2089392 suşunun tüm genomu sentez teknolojisi ile ILLUMINA® dizileme kullanılarak dizilenmiştir. Genom dizileme ve dizi verilerinin birleştirilmesi BaseClear (Leiden, The Netherlands) tarafından gerçekleştirilmiştir. Contig'ler BioXpr (Namur, Belgium) tarafından şerhlenmiştir. *B. akibai* GICC 2089392'de bu yolla tanımlanan genleri biri diğer bakterilerin serin proteazlarına homoloji gösteren serin proteazını şifreler.

BspU02193n'nin nükleotid dizisi SEQ ID NO: 4'te gösterilir.



BspU02193n tarafından şifrelenen preproenzimin amino asit dizisi SEQ ID NO: 5'te izah edilir:



N-ucunda, preproenzim SignalP-NN (Emanuelsson et al., Nature Protocols, 2:953-971, 2007) kullanılarak belirlendiği üzere 28 amino asitlik bir tahmin edilen uzunluğu olan (SEQ ID NO: 5'te ***kalın ve italik olarak*** yazılmış) bir sinyal peptidine sahiptir. Bir sinyal peptidi dizisinin varlığı bu serin proteazının bir salgılanmış enzim olduğunu gösterir. Diğer serin proteazları gibi, enzim 69 amino asitlik bir tahmin edilen uzunluğu olan (SEQ ID NO: 5'te *italik* yazılmış) bir pro-diziye sahiptir. Pro-dizi tahmini homolog serin proteazları, örneğin, BPN' (Wells et al., Nucleic Acids Res, 11:7911-25, 1983) ve PB92

proteazı (van der Laan et al., Appl Environ Microbiol, 57:901-909, 1991), içindeki pro-matür birleşme yeri bilgisine dayandırılmıştır.

Tam olarak işlenmiş matür enzimin, BspU02193'ün (269 amino asitlik), amino asit dizisi SEQ ID NO: 6 olarak izah edilir:

[illegible]

ÖRNEK 2

BspAI02518'in ve BspU02193'ün Heterolog Ekspresyonu

BspAI02518 proteazı *B. subtilis aprE* promotöründen, *B. subtilis aprE* sinyal peptidi dizisinden, natif BspAI02518 proteazı pro-peptit dizisinden, matür BspAI02518 proteazı dizisinden ve bir BPN' sonlandırıcısından oluşan bir ekspresyon kaseti kullanılarak *B. subtilis* içinde üretilmiştir. BspAI02518 ekspresyon kaseti pHYT kopyalama mekik vektörüne klonlanmıştır ve bir uygun *B. subtilis* suşuna transforme edilmiştir. pHYT vektörü *Bst*EII ve *Eco*RI yerleri kullanılarak tetrasiklin direnç geninden sonra bir sonlandırıcı (sonlandırıcı dizi: SEQ ID NO: 7 olarak izah edilen GGTTACCTTG AATGTATATA AACATTCTCA AAGGGATTTC TAATAAAAAA CGCTCGGTTG CCGCCGGGCG TTTTTTATGC ATCGATGGAA) ekleme ile pHY300PLK'den (Takara) türetilmiştir. pHY300PLK içindeki *Hind*III yeri ayrıca *Bam*HI ve *Hind*III yerlerine klonlanmış bir bağlayıcı (bağlayıcı dizi: SEQ ID NO: 8 olarak izah edildiği üzere GGATCCTGAC TGCCTGAGCT T) kullanılarak da uzaklaştırılmıştır. BspAI02518 proteazının ekspresyonu için pHYT vektörünün (pHYT- BspAI02518'in) bir haritası Şekil 1'de gösterilir.

BspAI02518'i üretmek için, pHYT-BspAI02518'i içeren bir *B. subtilis* transformanı 12,5 ppm tetrasiklin içeren TSB (sıvı besi yeri) içinde 16 saat boyunca 15 mL'lik Falcon tüpler içinde kültürlenmiştir. Bu pre-kültürün 300 µl'si 25 ppm tetrasiklin ile takviye edilmiş 30 mL'lik kültivasyon vasatı ile doldurulmuş bir 500 mL'lik flaska eklenmiştir. Kültivasyon vasatı majör nitrojen kaynağı olarak üre, ana karbon kaynağı olarak glikoz

içeren ve güçlü hücre büyümesi için %1 soyton ile takviye edilmiş, MOPs tamponu temelli bir zenginleştirilmiş yarı-tanımlanmış vasattır. Flasklar 180 rpm'de sabit rotasyonel karıştırma ile 32°C'de 2 gün boyunca inkübe edilmiştir. Kültürler konik tüpler içinde 20 dk boyunca 14500 rpm'de sentrifügasyon ile hasat edilmiştir.

BspU02193 proteazı *B. subtilis aprE* promotöründen, *B. subtilis aprE* sinyal peptidi dizisinden, natif BspU02193 proteazı pro-peptidinden, matür BspU02193 proteazından ve bir BPN' sonlandırıcısından oluşan bir ekspresyon kaseti kullanılarak *B. subtilis* içinde üretilmiştir. BspU02193 ekspresyon kaseti bir pBN-temelli kopyalama mekik vektörüne klonlanmıştır (Babe' et al., Biotechnol Appl Biochem, 27:117-124, 1998) ve bir uygun *B. subtilis* suşuna transforme edilmiştir. BspU02193 proteazının ekspresyonu için pBN vektörünün (pBN- BspU02193'ün) bir haritası Şekil 2'de gösterilir.

BspU02193'ü üretmek için, pBN-BspU02193' ü içeren bir *B. subtilis* transformanı 10 ppm tetrasiklin içeren TSB (sıvı besi yeri) içinde 16 saat boyunca 15 mL'lik Falcon tüpler içinde kültürlenmiştir. Bu pre-kültürün 300 µl'si 10 ppm neomisin ile takviye edilmiş 30 mL'lik kültivasyon vasatı ile doldurulmuş bir 500 mL'lik flaska eklenmiştir. Kültivasyon vasatı majör nitrojen kaynağı olarak üre, ana karbon kaynağı olarak glikoz içeren ve güçlü hücre büyümesi için %1 soyton ile takviye edilmiş, MOPs tamponu temelli bir zenginleştirilmiş yarı-tanımlanmış vasattır. Flasklar 180 rpm'de sabit rotasyonel karıştırma ile 32°C'de 2 gün boyunca inkübe edilmiştir. Kültürler konik tüpler içinde 20 dk boyunca 14500 rpm'de sentrifügasyon ile hasat edilmiştir.

Protein boyasız Imager Criterion yöntemi ile kantifiye edilmiştir. Bu yöntem boyasız pre-kast PAGE jellerden yararlanmaya dayanır, burada her bir bandın yoğunluğu söz konusu protein içinde bulunan triptofan rezidülerinin miktarına bağlıdır. PAGE için CRITERION™ TGX (Tris-Glisin uzatılmış) STAIN-FREE™ prekast jeller eşsiz trihalo bileşikleri içerir. Bu, proteinlerin Gel Doc™ EZ görüntüleme sistemi ile çabuk flüoresan saptanmasına olanak sağlar. Trihalo bileşikleri, jeller içindeki Gel Doc EZ görüntüleyici tarafından kolaylıkla saptanabilen flüoresans üretecek şekilde bir UV-indüklü reaksiyonda triptofan rezidüleri ile reaksiyona girer. Analizde kullanılan reaktifler aşağıdakileri içerir: Konsantre (10X) Laemmli Örnek Tamponu (Kem-En-Tec, Katalog No: 42556); 18 veya 26-kuyucuklu Criterion TGX Boyasız Prekast jeller (Bio-Rad, Katalog No.'ları: sırasıyla, 567-8124 ve 567-8125) ve protein belirteçleri "Precision Plus Protein Standards" (Bio-Rad, Katalog No: 161- 0363). Analiz aşağıdaki şekilde

gerçekleştirilmiştir: Proteazı inaktive etmek ve kendi kendine hidrolize önlemek için 25 µl protein örneği ve 25 µl 0,5 M HCl buz üzerinde bir 96 kuyucuklu-PCR plakasına eklenmiştir. Asit protein karışımının 50 µl'si 96 kuyucuklu-PCR plakası içinde 0,385 mg DTT içeren 50 µL örnek tamponuna eklenmiştir. Plaka Bio-Rad firmasından Microseal 'B' Film ile sızdırmaz hâle getirilmiştir ve 10 dk boyunca 70°C'ye ısıtılması için bir PCR makinesine yerleştirilmiştir. Bundan sonra, bölme yürütme tamponu ile doldurulmuştur ve jel kaseti ayarlanmıştır. Akabinde belirteçler ile birlikte her bir örneğin 20 µL'si her bir cebe yüklenmiştir. 200 V'da 55 dk boyunca elektroforez başlatılmıştır. Elektroforezi takiben, jel bir Görüntüleyici'ye transfer edilmiştir ve Image Lab yazılımı her bir bandın yoğunluğunun hesaplanması için kullanılmıştır. Standart örneğin protein miktarı ve triptofan örneğini bilinerek, bir kalibrasyon eğrisi yapılabilir. Deneysel örneğin miktarı bant yoğunluğunun ve triptofan sayılarının protein konsantrasyonuna uyarlaması ile belirlenmiştir. Bu protein kantifikasyon yöntemi müteakip örneklerde tarif edilen analizlerde kullanım için BspAI02518 ve BspU02193 proteazlarının örneklerini hazırlamak amacıyla kullanılmıştır.

İzole edilmiş BspAI02518 ve BspU2193 proteazlarının örnekleri bunu takiben tarif edildiği üzere LC-MS/MS ile analiz edilmiştir. N- ve C-ucu belirlenmesi dâhil olmak üzere dizi konfirmasyonu için preparasyonda, BspAI02518 proteazının ve BspU2193 proteazının bir örneği bir 10 kDa'luk spin-filtre içinde bir dizi kimyasal muameleye tabi tutulmuştur. Örnekler üre ve DTT/İyodoasetamid muamelesi ile denatüre edilmiştir ve indirgenmiştir/alkillenmiştir. Bir guanidinasyon adımı lizin yan zincirlerini asetilasyondan korumak amacıyla lizinleri homoarjininlere dönüştürmek için gerçekleştirilmiştir. Sülfo-NHS-Asetat (Sülfosüksinimidil Asetat) kullanılan asetilasyon reaksiyonu yalnızca proteinin N-ucu rezidüsünü modifiye eder. Örnekler akabinde ağ/ağ %40 ^{18}O su: ağ/ağ %60 ^{16}O su ve protein sindirimi için kullanılan proteolitik enzimleri içeren bir tampon ile karıştırılmıştır. Elde edilen peptitler, peptitlerin izotopik paterninden aşikâr olacağı üzere, natif ^{16}O'yu muhafaza edecek olan Karboksil ucu dışında ^{18}O'nun ve ^{16}O'nun karışımlarını içerecektir. Proteinin N-ucundan köken alan peptit asetilenmiş tek peptit olarak görülecektir. Elde edilen peptitler bir nano-LC sistemi akabinde LTQ Orbitrap (Thermo Fisher) yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi kullanılarak ayrılmıştır ve analiz edilmiştir. Amino asit dizilerine peptitlerin MS/MS fragman spektrumlarından çıkarım yapılmıştır. Bu analize göre, izole edilmiş proteinin N-ucunun tahmin edilen matür diziden pozisyon 1'deki A ile başladığı konfirme edilmiştir. Matür proteinin dizisinin 269 amino asitten oluşan, SEQ ID NO: 3'te listelenen diziye karşılık geldiği

belirlenmiştir. Bu analize göre, izole edilmiş BspU2193 proteininin N-ucunun SEQ ID NO: 84'te listelenen tahmin edilen matür diziden pozisyon 2'deki Q ile başladığı konfirme edilmiştir.

İşlenmiş matür enzimin, ilave karakterizasyon için saflaştırılmış ve kullanılmış olan (268 amino asitlik) BspU2193'ün, amino asit dizisi SEQ ID NO: 84 olarak izah edilir:

[redacted]

ÖRNEK 3

BspAI02518'in ve BspU02193'ün Proteaz Aktivitesi

BspAI02518'in ve BspU02193'ün proteaz aktiviteleri bir dimetil kazein (DMC) substratının hidrolizini ölçme ile test edilmiştir. DMC analizi için kullanılan reaktif çözeltileri aşağıdakilerdir: 100 mM sodyum karbonat tamponu, pH 9,5, içinde ağ/hacim %2,5 DMC (Sigma C-9801), Reaktif A içinde %0,075 TNBSA (Thermo Scientific). Reaktif A: Deiyonize su içinde 1000 mL'lik bir nihai hacme ulaşacak şekilde15 mL 4 N NaOH içinde 45,4 g $Na_2B_4O_7.10H_20$ (Merck). Proteaz süpernatantları seyreltme çözeltisi içinde seyreltilmiştir: 5 dk boyunca hidroliz sırasında bir lineer yanıt sağlayacak şekilde arzu edilen konsantrasyona kadar 10 mM NaCl, 0,1 mM $CaCl_2$, %0,005 Tween-80. Bir 96-kuyucuklu mikro-titre plaka (MTP) 95 µl DMC substratı ile doldurulmuştur bunu 5 µl seyreltilmiş proteaz süpernatantı eklenmesi izlemiştir. Akabinde, Reaktif A içindeki 100 µL TNBSA yavaş karıştırma ile eklenmiştir. Aktivite RT'de kinetik modda bir SpectraMax plaka okuyucu kullanılarak 5 dk boyunca 405 nm'de ölçülmüştür. Herhangi bir proteaz içermeyen bir kör çözeltinin absorbansı her bir örnek okumasından çıkartılmıştır. Aktivite mOD/dk olarak ifade edilmiştir. BspAI02518 için proteaz aktivite eğrisi Şekil 3'te gösterilir ve BspU02193 için proteaz aktivite eğrisi Şekil 4'te gösterilir. DMC analizinde BspAI02518 proteazının spesifik aktivitesinin 46 mOD/min/ppm olduğu bulunmuştur (burada ppm analizdeki proteazın nihai konsantrasyonudur). DMC analizinde BspU02193 proteazının spesifik aktivitesinin123

mOD/dk/ppm olduğu bulunmuştur. GG36 ve BPN' proteazlarının spesifik aktivitelerinin, aynı analiz koşulları altında, sırasıyla 54 ve 23 mOD/dk/ppm olduğu bulunmuştur.

ÖRNEK 4

BspAl02518'in ve BspU02193'ün pH profilleri

BspAl02518'in ve BspU02193'ün proteolitik aktivitelerinin pH'a bağımlılığı 50 mM $CaCl_2$ içeren bir 50 mM'lık asetat/Bis-Tris/HEPES/CHES tamponu içindeki bir azo-kazein substratı kullanılarak çalışılmıştır. 4 ila 12 arasındaki pH'ın etkisi 1 pH birimlik artışlarla ölçülmüştür. Bir Protaxyme AK tableti (Megazyme, Ireland) 1,9 mL uygun tampon ile birlikte bir cam test tüpüne eklenmiştir bunu manyetik karıştırıcı ile donatılmış bir sıcaklık kontrollü su banyosu içinde 5 dk boyunca 40°C'de yumuşak hidrasyon izlemiştir. Yeni hazırlanmış (analiz için bir uygun konsantrasyona kadar deiyonize su içinde seyreltilmiş) proteazın bir 100 µl'lik örneği önceden-hidratlanmış substrata eklenmiştir ve reaksiyon 40°C'de 10 dk boyunca gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonu durdurmak için, 10 mL bir ağ/hacim %2'lik Tris tamponu, pH 12, eklenmiştir ve çözelti hemen bir Whatman No. 1 filtreden filtrelenmiştir. Süpernatant toplanmıştır ve 590 nm'de absorbans reaksiyonunun ürününü kantifiye etmek amacıyla süpernatant için ölçülmüştür. Bir yalnızca-tampon kontrolünden elde edilen absorbans her bir örnek okumasından çıkartılmıştır ve elde edilen değerler, optimal pH'taki aktiviteyi %100 olarak tanımlama ile, bağıl aktivitenin yüzdelerine dönüştürülmüştür. Bu analizin koşulları altında, BspAl02518'in 7,5-12 olan pH aralığı boyunca ≥%50'lik aktiviteyi idame ettirdiği belirlenmiştir ve BspU02193'ün 9-12 olan pH aralığı boyunca ≥%50'lik aktiviteyi idame ettirdiği belirlenmiştir.

ÖRNEK 5

BspAl02518'in ve BspU02193'ün Sıcaklık Profilleri

BspAl02518'in ve BspU02193'ün proteolitik aktivitelerinin sıcaklığa bağımlılığı pH 9'da 50 mM $CaCl_2$ içeren bir 50 mM'lık asetat/Bis-Tris/HEPES/CHES tamponu içindeki bir azo-kazein substratı kullanılarak ölçülmüştür. Aktivite 10°C'lik artışlar ile 30°C ila 80°C arasındaki sıcaklıklarda ölçülmüştür. Bir Protaxyme AK tableti (Megazyme, Ireland) 1,9 mL uygun tampon ile birlikte bir cam test tüpüne eklenmiştir bunu manyetik karıştırıcı

ile donatılmış bir sıcaklık kontrollü su banyosu içinde 5 dk boyunca ayarlanmış sıcaklıklarda yumuşak hidrasyon izlemiştir. Yeni hazırlanmış (analiz için bir uygun konsantrasyona kadar deiyonize su içinde seyreltilmiş) proteazın bir 100 µl'lik örneği önceden-hidratlanmış substrata eklenmiştir ve reaksiyon 40°C'de 10 dk boyunca gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonu sonlandırmak için, 10 mL bir ağ/hacim %2'lik Tris tamponu, pH 12, eklenmiştir ve çözelti hemen bir Whatman No. 1 filtreden filtrelenmiştir. Süpernatant toplanmıştır ve 590 nm'de absorbans reaksiyonunun ürününü kantifiye etmek amacıyla bu süpernatant için ölçülmüştür. Bir yalnızca-tampon kontrolünden elde edilen absorbans her bir örnek okumasından çıkartılmıştır ve elde edilen değerler, optimal sıcaklıktaki aktiviteyi %100 olarak tanımlama ile, bağıl aktivitenin yüzdelerine dönüştürülmüştür. Bu analizin koşulları altında, BspAl02518'in 30-65°C olan sıcaklık aralığı boyunca ≥%50'lik aktiviteyi idame ettirdiği belirlenmiştir ve BspU02193'ün 60-80°C olan sıcaklık aralığı boyunca ≥%50'lik aktiviteyi idame ettirdiği belirlenmiştir.

ÖRNEK 6

BspAl02518'in ve BspU02193'ün Temizleme Performansı

BspAl02518'in ve BspU02103'ün temizleme performansı çamaşır temelli uygulamalar için BMI (pamuk üzerindeki kan/süt/mürekkep) mikro-numunelik kumaş parçaları üzerinde (EMPA-116, Center for Testmaterials, The Netherlands) ve bulaşık temelli uygulamalar için yumurta sarısı (eski ve karbon siyahı boya ile renklendirilmiş poliakril kumaş üzerindeki yumurta sarısı) mikro-numunelik kumaş parçaları üzerinde (PAS-38, Center for Testmaterials, The Netherlands) test edilmiştir. (MTP üzerine takmak için) önceden-delinmiş numunelik kumaş parçaları içeren MTP'ler (Coming 3641) durulanmıştır ve enzimin eklenmesinden önce deterjan ile doldurulmuştur. Ticari deterjanlar var olan enzim aktivitesini ortadan kaldırmak için ısı ile inaktive edilmiştir ve Tablo 6-1'de tarif edildiği üzere dozlanmıştır.

Ağır iş sıvı (HDL) çamaşır deterjanları bir su banyosu içinde 95°C'de 4 saat boyunca ısıtma ile inaktive edilmiştir. Ağır iş kuru (HDD) çamaşır deterjanları bir ağ/hacim %10'luk çözelti hazırlama ve 95°C'de 4 saat boyunca ısıtma ile inaktive edilmiştir. Hem HDD hem de HDL deterjanlarını 4 saat boyunca ısıttıktan sonra, proteaz aktivitesinin var olmadığı belirlenmiştir.

Var olan deterjan proteazlarının inaktivasyonunu takiben, test proteazlarının aktivitesi bir sük-AAPF-pNA (AAPF) substratı kullanılarak analiz edilmiştir. AAPF hidroliz analizi için kullanılan reaktif çözeltileri aşağıdakilerdir: %0,005 TWEEN®-80 içeren 100 mM Tris/HCl pH 8,6, (Tris seyreltme tamponu); 10 mM $CaCl_2$ ve %0,005 TWEEN®-80 içeren 100 mM Tris tamponu, pH 8,6, (Tris/Ca tamponu) ve DMSO içindeki 160 mM sük-AAPF-pNA (sük-AAPF-pNA stok çözeltisi) (Sigma: S-7388). Bir substrat çalışma çözeltisi hazırlamak için, 1 ml sük-AAPF-pNA stok çözeltisi 100 ml Tris/Ca tamponuna eklenmiştir ve iyice karıştırılmıştır. Bir enzim örneği 1 mg/ sük-AAPF-pNA çalışma çözeltisi içeren bir MTP plakasına (Greiner 781101) eklenmiştir ve RT'de kinetik madde bir SpectraMax okuyucu kullanılarak 3 dk boyunca 405 nm'de aktivite için analiz edilmiştir. Proteaz aktivitesi $mOD \cdot dk^{-1}$ olarak ifade edilmiştir.

Tablo 6-1'de tarif edilen Nihai Deterjan Yıkama konsantrasyonları (g/L) ile yıkama çözeltileri yapılmıştır ve temizleme performans analizinde kullanılmıştır.

Tablo 6-1. Temizleme Performans Analizleri için Deterjan Koşulları

Deterjan*	Tip	Deterjan Yıkama Kons. (g/L)	Sertlik Kons. (ppm)	Tampon	pH
OMO color	HDD	5.3	250	2 mM $NaCO_3$	10,6
Kirkland Ultra	HDD	1.09	150	2 mM $NaCO_3$	10,6
OMO K & K	HDL	2.8	250	5 mM Na HEPES	8,2
Kirkland Ultra	HDL	0.71	150	5 mM Na HEPES	8,2
GSM-B 10.5	ADW	3	374	tamponlanmamış	-10,5
GSM-B 9	ADW	3	374	pH'ı ayarlamak için tamponlanmamış 1 M sitrat	9

*Deterjan kaynakları: Kirkland Ultra HDD ve HDL (Sun Products) 2012'de Amerika Birleşik Devletleri'ndeki lokal süpermarketten satın alınmıştır. OMO color HDD ve OMO Klein & Krachtig (Unilever) 2013'te Hollanda'daki lokal süpermarketlerden satın alınmıştır. GSM-B WFK Testgewebe GmbH, Germany, firmasından satın alınmıştır.

Tablo 6-2. GSM-B pH 10,5 Fosfatsız ADW Deterjan İçerik Maddeleri

Bileşen	**Ağırlık %'si**
Sodyum sitrat dehidrat	30,0
Maleik asit/akrilik asit kopolimeri sodyum tuzu (SOKALAN® CP5; BASF)	12,0
Sodyum perborat monohidrat	5,0
TAED	2,0
Sodyum disilikat: Protil A (Cognis)	25,0
Lineer yağlı alkol etoksilat	2,0
Sodyum karbonat anhidröz	100'e tamamlanır

Enzimin alikotları çamaşır analizi için bir 0,04 ila 10 ppm'lik nihai enzim konsantrasyonu ile 200 µL'lik bir nihai hacme ulaşacak şekilde bir deterjan-doldurulmuş mikro-numunelik kumaş parçası plakasına eklenmiştir. HDL veya HDD deterjanları ile çamaşır temizleme analizleri 25°C'de 15 dk boyunca gerçekleştirilmiş iken, otomatik bulaşık (ADW) analizleri 40°C'de 30 dk boyunca gerçekleştirilmiştir.

İnkübasyonu takiben, 100 µL süpernatant bir yeni MTP'ye (Costar 9017) transfer edilmiştir ve absorbans SpectraMax plaka okuyucu kullanılarak EMPA-116 numunelik kumaş parçaları için 600 nm'de veya PAS-38 numunelik kumaş parçaları için 405 nm'de okunmuştur. Bir yalnızca tampon kontrolünden elde edilen absorbans çıkartılmıştır ve (HDL ve HDD deterjanları için) 600 nm'de ve (ADW deterjanları için) 405 nm'de elde edilen OD değerleri proteaz konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak grafik hâline getirilmiştir. Veriler Langmuir denklemi kullanılarak uydurulmuştur. Çeşitli deterjanlarda BspAI02518'in temizleme performansı Şekil 5A-5C'de gösterilirken, çeşitli deterjanlarda BspU02193'ün temizleme performansı Şekil 6A-B'de gösterilir.

ÖRNEK 7

Homolog Proteazların Tanımlanması

BspAl02518'in (SEQ ID NO: 3) ve BspU02193'ün (SEQ ID NO: 6) matür formlarının amino asit dizileri NCBI artıksız protein veri tabanına karşı bir BLAST aramasına (Altschul et al., Nucleic Acids Res, 25:3389-402, 1997) tabi tutulmuştur. Bir benzer araştırma sorgu dizileri olarak sırasıyla SEQ ID NO: 3 ve SEQ ID NO: 6 kullanılarak varsayılan değerlere ayarlanmış arama parametreleri ile Genome Quest Patent veri tabanına karşı çalıştırılmıştır. Arama sonuçlarının alt-kümeleri BspAl02518 için Tablolar 7-1'de ve 7-2'de ve BspU02193 için Tablolar 7-3 ve 7-4'te gösterilir. Her iki arama kümesi için özdeşlik yüzdesi (PID) ikili hizalamada hizalanmış rezidülerin sayısına bölünmüş özdeş rezidülerin sayısı olarak tanımlanmıştır. "Dizi Uzunluğu" etiketli kolon listelenmiş Erişim No.'ları ile ilişkilendirilmiş protein dizilerinin (amino asitler cinsinden) uzunluğunu ifade ederken, "Hizalanmış Uzunluk" etiketli kolon PID hesaplaması için kullanılan hizalanmış protein dizisinin (amino asitler cinsinden) uzunluğunu ifade eder.

Tablo 7-1. NCBI Artıksız Protein Veri Tabanı'ndaki Kayıtları ile BspAl02518 tarafından Paylaşılan Dizi Özdeşliği (PID)

Erişim No.	PID	Organizma	Dizi Uzunluğu	Hizalama Uzunluğu
BAA05540	68	*Bacillus sp.;* AprM	361	268
BAB04574	68	*B. halodurans C-125*	361	268
ABI26631	68	*B. clausii*	361	268
ADD64465	67	*Bacillus sp. JB99*	361	268
ADC49870	67	*B. pseudofirmus OF4*	374	271
BAA06157	64	*B. sp. Sendai* [*Bacillus sp.* G-825-6]	382	267
BAD63300	64	*B. clausii KSM-K16*	380	268
AAA22212	63	*B. alcalophilus*	380	268
P29600	63	*B. lentus*	269	268
BAA25184	62	*Bacillus sp.;* AprN	379	267
AFK08970	62	*B. lehensis*	378	267
AAA87324	61	*B. subtilis*	378	267
BAD11988.2	60	*Bacillus sp. KSM-LD1;* SA-tipi	376	273

Erişim No.	PID	Organizma	Dizi Uzunluğu	Hizalama Uzunluğu
AAC43580	60	*Bacillus sp.;* SprC	378	273
YP_003972439	60	*B. atrophaeus*	382	273
BAD21128.1	60	*Bacillus sp. KSM-LD1;* SB-tipi	377	274
AAC43581	59	*Bacillus sp.;* SprD	379	274
WP_007497196	59	*B. stratosphericus* LAMA 585	383	275
CAJ70731	58	*B. licheniformis*	379	272
ADN04910	58	*B. circulans*	275	275
AFP23380	58	*B. lehensis*	276	275
ADK11996	58	*B. pumulis*	383	275
WP_010333625	58	*B. mojavensis*	381	273
CAA74536	58	*B. subtilis str. 168*	381	273
CAA24990	57	*B. amyloliquefaciens*	376	273
ABY25856	57	*Geobacillus stearothermophilus*	382	273
AGC81872	57	*B. methylotrophicus*	382	273
WP_010329279	57	*B. vallismortis*	381	273
BAN09118	57	*B. subtilis*	381	273
WP_006636716	55	*B. sonorensis*	378	272

Tablo 7-2. Genome Quest Veri Tabanı'ndaki Kayıtları ile BspAI02518 tarafından Paylaşılan Dizi Özdeşliği (PID)

Patent - SEQ	PID	Organizma	Dizi Uzunluğu	Hizalama Uzunluğu
US20110045572-0011	68.5	*B. lentus*	268	267
WO9100345-0009	68.5	*Synthetic*	268	267
WO2009087508-	68.3	*B. halodurans*	301	268

Patent - SEQ	PID	Organizma	Dizi Uzunluğu	Hizalama Uzunluğu
0006				
CN101270347-0003	68.3	*B. clausii*	360	268
JP1994078778	68.3	*Bacillus sp. B18-1*	361	268
DE102009027540	68.3	*Bacillus sp.*	269	268
DE102009027540	68.3	*Bacillus sp.*	269	268
JP1998066576-0001	67.9	*B. subtilis*	374	271
US20110028378-0002	67.8	*Bacillus sp.*	268	267
US7449187-0009	67.8	*Bacillus sp.*	272	270
US20030049619-0008	67.7	*Bacillus sp.*	375	272
US20040063155-0001	67.5	*B. lentus*	361	268
JP2011155932	67.5	*B. halodurans*	361	268
JP2011155932	67.5	*B. pseudofirmus FA30-01*	374	271
JP2011155932	67.5	*Bacillus sp. NKS-21*	374	271
US6908991-0002	67.4	*Bacillus sp.*	268	267
WO2012151480	64.6	*B. lentus*	269	268
DE10064983	64.6	*B. alcalophilus*	269	268
WO2010123754-0050	64.6	*B. clausii*	269	268
JP2012135214-0006	64.6	*B. clausii KSM-K16*	269	268
US20130071910-0007	64.6	*B. lentus*	269	268
JP2008022828	64.6	*B. clausii KSM-K16*	355	268
US20050009167-	64.6	*Bacillus sp. DSM*	380	268

Patent - SEQ	PID	Organizma	Dizi Uzunluğu	Hizalama Uzunluğu
0002		*14390*		
EP0415296	64.2	*B. alcalophilus*	269	268
WO9402618	64.2	*B. novalis*	269	268
WO2012151480	63.8	*B. lentus*	269	268
WO9402618	63.8	*B. novalis*	269	268
EP2100948	63.8	*B. alcalophilus;* PB92	269	268
WO9402618	63.4	*B. novalis*	269	268

Tablo 7-3. NCBI Artıksız Protein Veri Tabanındaki Kayıtlar ile BspU02193 tarafından Paylaşılan Dizi Özdeşliği (PID)

Erişim No.	PID	Organizma	Dizi Uzunluğu	Hizalama Uzunluğu
ERN52602	66	*B. marmarensis DSM21297*	374	271
ADC49870	65	*B. pseudofirmus OF4*	374	271
BAB04574	64	*B. halodurans C-125*	361	267
ABI26631	64	*B. clausii*	361	267
ADD64465	64	*Bacillus sp. JB99*	361	267
BAA05540	64	*Bacillus sp.;* AprM	361	267
BAA25184	62	*Bacillus sp.;* AprN	379	266
AFK08970	62	*B. lehensis*	378	266
BAD63300	61	*B. clausii KSM-K16*	380	266
AAA22212	61	*B. alcalophilus*	380	266
AAA87324	61	*B. subtilis*	378	266
AAC43580	61	*Bacillus sp.;* SprC	378	272
AGS78407	60	*B. gibsonii*	375	266
P29600	60	*B. lentus*	269	266

Erişim No.	PID	Organizma	Dizi Uzunluğu	Hizalama Uzunluğu
BAA06157	59	*B. sp. Sendai* [*Bacillus sp.* G-825-6]	382	267
BAD11988.2	59	*Bacillus sp. KSM-LD1;* SA tipi	376	273
YP_003972439	59	*B. atrophaeus*	382	273
BAD21128.1	59	*Bacillus sp. KSM-LD1;* SB tipi	377	274
CAJ70731	59	*B. licheniformis*	379	272
WP_007497196	59	*B. stratosphericus* LAMA 585	383	275
AAC43581	58	*Bacillus sp.;* SprD	379	273
WP_006636716	58	*B. sonorensis*	378	272
AFP23380	57	*B. lehensis*	276	273
ADK11996	57	*B. pumulis*	383	273
WP_010329279	57	*B. vallismortis*	381	273
ADN04910	56	*B. circulans*	275	273
WP_010333625	56	*B. mojavensis*	381	273
CAA74536	56	*B. subtilis str. 168*	381	273
BAN09118	56	*B. subtilis*	381	273
CAA24990	55	*B. amyloliquefaciens*	376	273
ABY25856	54	*Geobacillus stearothermophilus*	382	273
AGC81872	54	*B. methylotrophicus*	382	273

Tablo 7-4. Genome Quest Veri Tabanındaki Kayıtlar ile BspU02193 tarafından Paylaşılan Dizi Özdeşliği (PID)

Patent - SEQ	PID	Organizma	Dizi Uzunluğu	Hizalama Uzunluğu
US20030049619-0008	65.8	*Bacillus sp.*	375	272

Patent - SEQ	PID	Organizma	Dizi Uzunluğu	Hizalama Uzunluğu
JP2011155932-0012	66.1	*B. pseudofirmus FA30-01*	374	271
US7449187-0009	65.7	*Bacillus sp.*	272	271
JP1998066577-0001	65.7	*B. subtilis*	374	271
JP2011155932	65.7	*Bacillus sp. NKS-21*	374	271
DE102009027540	65.2	*Bacillus sp.*	269	267
US20110045572-0048	65.0	*Bacillus*	268	266
DE102009027540	64.8	*Bacillus sp.*	269	267
CN101270347-0003	64.8	*B. clausii*	360	267
JP1994078778	64.8	*Bacillus sp; B18-1*	361	267
JP2011155932	64.4	*B. halodurans*	361	267
US20040063155-0001	64.0	*B. lentus*	361	267
US20090099056-0002	64.3	*Bacillus*	268	266
US20050003504-0003	64.3	*B. gibsonii DSM 14391*	269	266
WO2012119955-0006	63.5	*Bacillus sp.*	269	266
US7569226-0002	62.4	*Bacillus sp. DSM 14392*	374	266
US7642080-0002	62.4	*Bacillus sp. strain Zi344*	381	266
EP0516200	61.8	*Synthetic*	270	267
WO9402618	61.7	*B. novalis*	269	266
EP2100948	61.7	*B. alcalophilus; PB92*	269	266

Patent - SEQ	PID	Organizma	Dizi Uzunluğu	Hizalama Uzunluğu
US8460893-0043	61.7	*B. clausii KSM-K16*	380	266
WO2012151534	61.3	*B. lentus*	269	266
US20130123162	60.9	*B. lentus*	269	266

BspAl02518 proteazının (SEQ ID NO: 3) ve BspU02193'ün (SEQ ID NO: 6) matür formlarının amino asit dizisi Tablolar 7-1 ila 7-4 arasında listelenen çok sayıda proteazın amino asit dizileri ile varsayılan parametreler ile CLUSTALW yazılımı kullanılarak (Thompson et al., Nucleic Acids Research, 22:4673-4680, 1994) hizalanmıştır. Şekil 7A-F CLUSTAL W (1.83) çok sayıda dizi hizalamasını gösterir.

BspAl02518 proteazının (SEQ ID NO: 3) ve BspU02193'ün (SEQ ID NO: 6) matür formlarının amino asit dizileri için bir filogenetik ağaç Tablolar 7-1 ila 7-4 arasında listelenen çok sayıda proteazın amino asit dizileri kullanılarak inşa edilmiştir. Diziler Vector NTI Advance program çiftine girilmiştir ve bir Kılavuz Ağaç Komşu Birleştirme (NJ) yöntemi kullanılarak oluşturulmuştur (Saitou ve Nei, Mol Biol Evol, 4:406-425, 1987). NJ yöntemi analiz edilecek olan dizilerin tüm çiftleri arasındaki mesafelerin bir matriksi üzerinde çalışır. Mesafeler diziler arasındaki ıraksama derecesi ile ilişkilendirilir. Kılavuz Ağaç diziler hizalandıktan sonra hesaplanmıştır. Ağaç yapımı aşağıdaki parametreler kullanılarak hesaplanmıştır: Dizi mesafesi için Kimura düzeltmesi ve boşlukları olan pozisyonları yok sayma. AlignX Şekil 8'de gösterilen ağaç üzerinde gösterilen molekül adından sonra parantez içinde hesaplanan mesafe değerlerini gösterir.

ÖRNEK 8

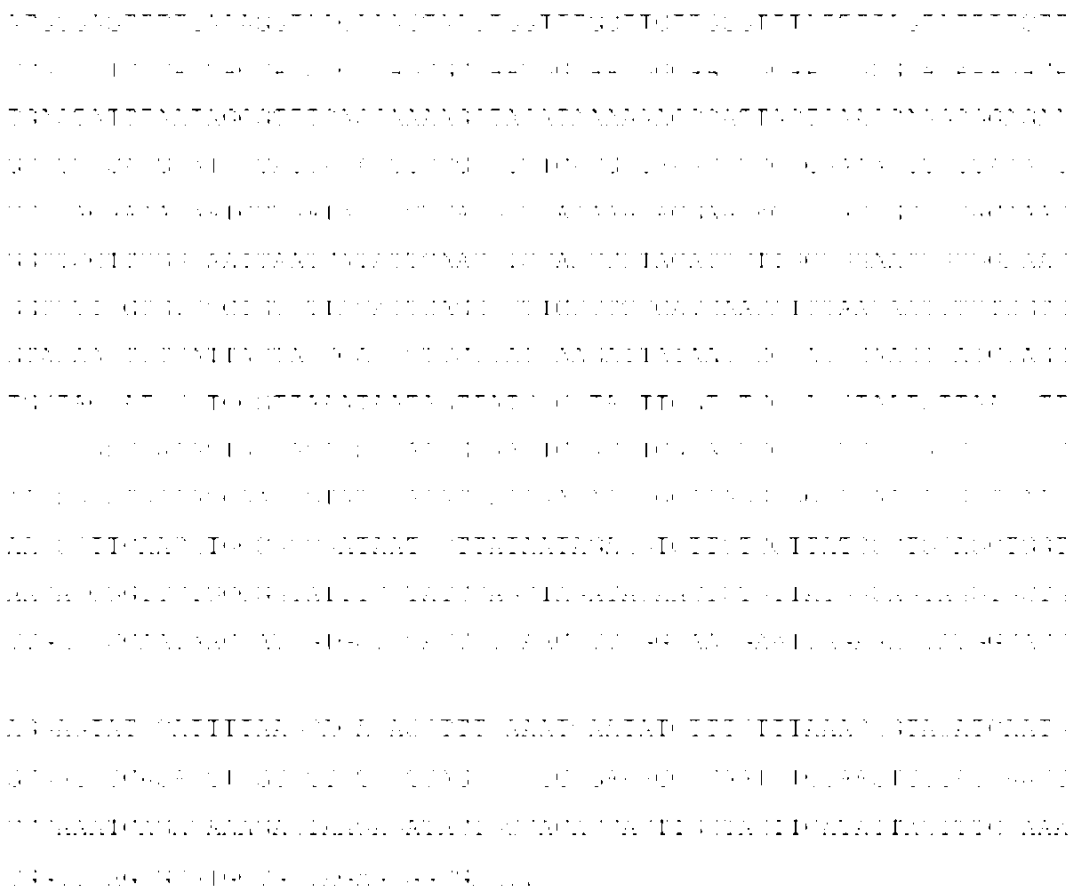
İlave *Bacillus spp.* Serin Proteazlarının Tanımlanması

İlave subtilisinler ilave *Bacillus* türlerinin genomlarını dizileme ile tanımlanmıştır. *B. akibai* ATCC No. 43226 DSMZ'den (Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) elde edilmiştir. *B. clarkii* suşu Dupont Kültür Koleksiyonu'ndan elde edilmiştir. Genom dizileme, birleştirme ve anotasyon esasen

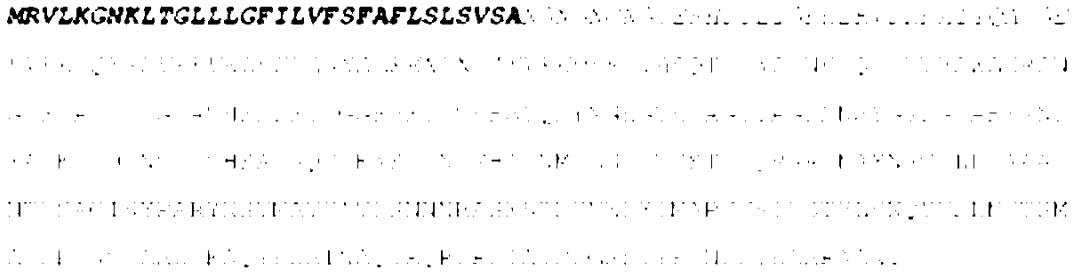
Örnek 1'de tarif edildiği şekildedir. Üç genomun üçü de BspAl02518'e ve BspU02193'e homolog proteinler şifrelemiştir.

Serine Proteazı Bakn00315

Bakn00315n'nin nükleotid dizisi SEQ ID NO: 9 olarak izah edilir:

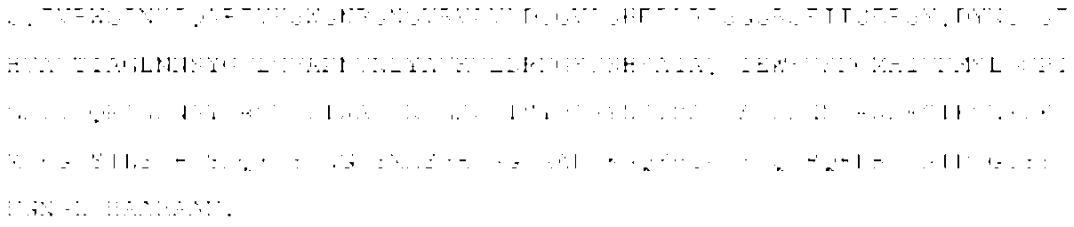


Bakn00315n tarafından şifrelenen preproenzimin amino asit dizisi SEQ ID NO: 10 olarak izah edilir ve NCBI Artıksız Protein Veri Tabanı Şubat 2014'e GAE36608 Erişim Numarası altında kaydedilir:



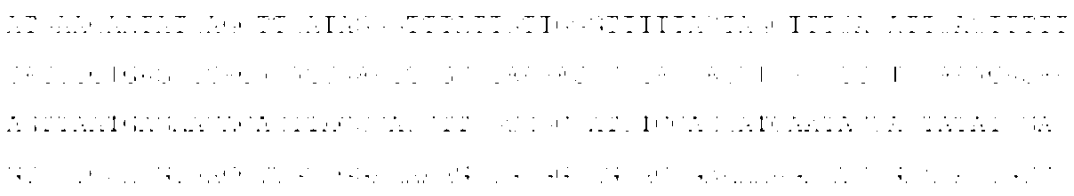
N-ucunda, preproenzim SignalP-NN (Emanuelsson et al., Nature Protocols, 2:953-971, 2007) kullanılarak belirlendiği üzere 31 amino asitlik bir tahmin edilen uzunluğu olan (SEQ ID NO: 10'da ***kalın ve italik olarak*** yazılmış) bir sinyal peptidine sahiptir. Bir sinyal peptidi dizisinin varlığı bu serin proteazının bir salgılanmış enzim olduğunu gösterir. Diğer serin proteazları gibi, enzim 73 amino asitlik bir tahmin edilen uzunluğu olan (SEQ ID NO: 10'da *italik* yazılmış) bir pro-diziye sahiptir. Pro-dizi tahmini homolog serin proteazları, örneğin, BPN' (Wells et al., Nucleic Acids Res, 11:7911-25, 1983) ve PB92 proteazı (van der Laan et al., Appl Environ Microbiol, 57:901-909, 1991), içindeki pro-matür birleşme yeri bilgisine dayandırılmıştır.

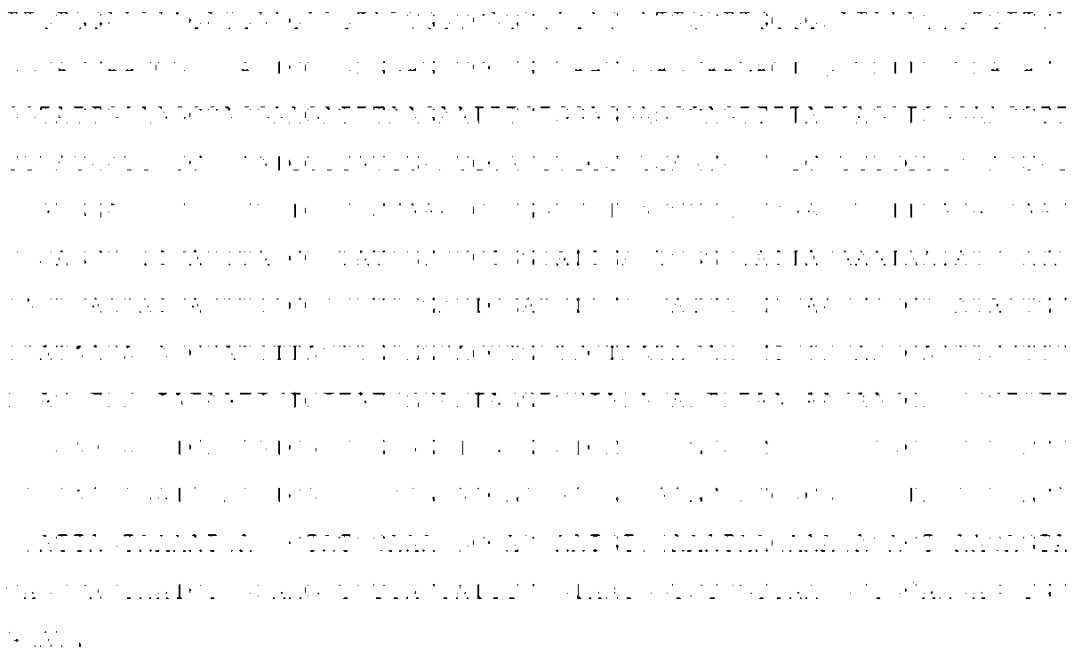
Tam olarak işlenmiş matür enzimin, Bakn00315'in (269 amino asitlik), amino asit dizisi SEQ ID NO: 11 olarak izah edilir:



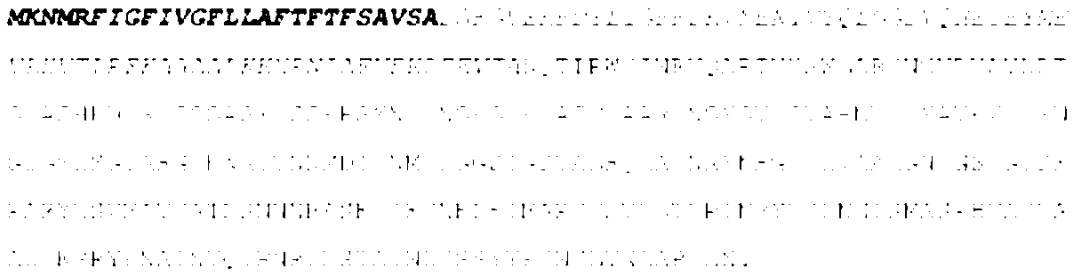
Serin Proteazı Bcl04009

Bcl04009n'nin nükleotid dizisi SEQ ID NO: 12 olarak izah edilir:



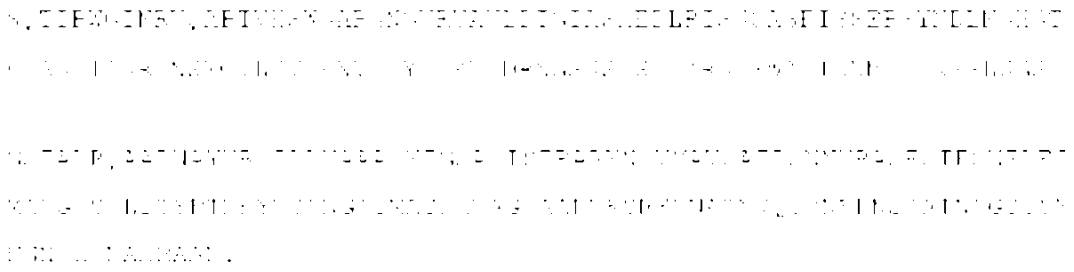


Bcl04009 tarafından şifrelenen preproenzimin amino asit dizisi SEQ ID NO: 13 olarak izah edilir:



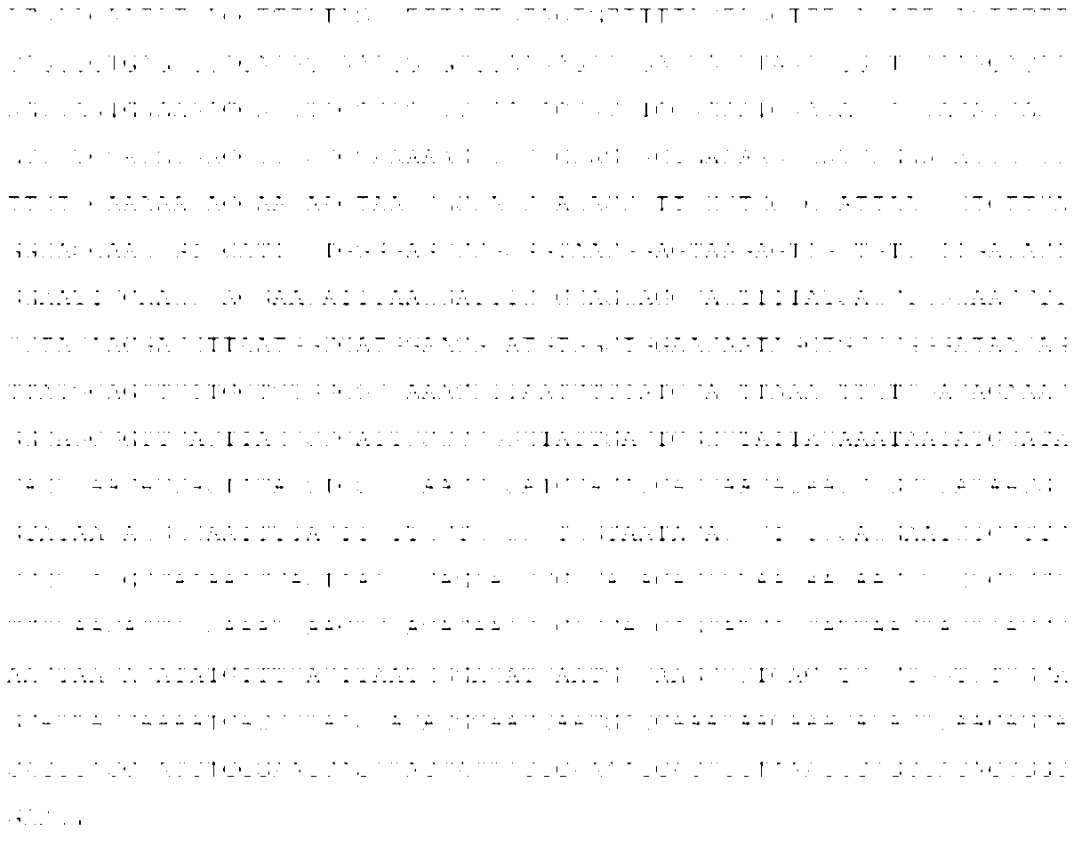
N-ucunda, preproenzim SignalP-NN (Emanuelsson et al., Nature Protocols, 2:953-971, 2007) kullanılarak belirlendiği üzere 26 amino asitlik bir tahmin edilen uzunluğu olan (SEQ ID NO: 13'te ***kalın ve italik olarak*** yazılmış) bir sinyal peptidine sahiptir. Bir sinyal peptidi dizisinin varlığı bu serin proteazının bir salgılanmış enzim olduğunu gösterir. Diğer serin proteazları gibi, enzim 69 amino asitlik bir tahmin edilen uzunluğu olan (SEQ ID NO: 13'te *italik* yazılmış) bir pro-diziye sahiptir. Pro-dizi tahmini homolog serin proteazları, örneğin, BPN' (Wells et al., Nucleic Acids Res, 11:7911-25, 1983) ve PB92 proteazı (van der Laan et al., Appl Environ Microbiol, 57:901-909, 1991), içindeki pro-matür birleşme yeri bilgisine dayandırılmıştır.

Tam olarak işlenmiş matür enzimin, Bcl04009'un (269 amino asitlik), amino asit dizisi SEQ ID NO: 14 olarak izah edilir:



Serin Proteazı SWT66_254731

SWT66_254731n'nin nükleotid dizisi SEQ ID NO: 15 olarak izah edilir:



SWT66_254731n tarafından şifrelenen preproenzimin amino asit dizisi SEQ ID NO: 16 olarak izah edilir:

MKNMRFIGFIVVFLLAFTFTFSAVSA

N-ucunda, preproenzim SignalP-NN (Emanuelsson et al., Nature Protocols, 2:953-971, 2007) kullanılarak belirlendiği üzere 26 amino asitlik bir tahmin edilen uzunluğu olan (SEQ ID NO: 16'da ***kalın ve italik olarak*** yazılmış) bir sinyal peptidine sahiptir. Bir sinyal peptidinin varlığı bu serin proteazının bir salgılanmış enzim olduğunu gösterir. Diğer serin proteazları gibi, enzim 69 amino asitlik bir tahmin edilen uzunluğu olan (SEQ ID NO: 16'da *italik* yazılmış) bir pro-diziye sahiptir. Pro-dizi tahmini homolog serin proteazları, örneğin, BPN' (Wells et al., Nucleic Acids Res, 11:7911-25, 1983) ve PB92 proteazı (van der Laan et al., Appl Environ Microbiol, 57:901-909, 1991), içindeki pro-matür birleşme yeri bilgisine dayandırılmıştır.

Tam olarak işlenmiş matür enzimin, SWT66_254731'in, bazı durumlarda SWT66 olarak ifade edilir, (269 amino asitlik), amino asit dizisi SEQ ID NO: 17 olarak izah edilir:

BspAl02518, BspU02193, Bakn00315, Bcl04009 ve SWT66_254731 subtilisinlerinin matür formlarının amino asit dizilerinin *B. amyloliquefaciens*'ten, *B. lentus*'tan, *B. licheniformis*'ten, *Bacillus sp. LG12*'den ve *B. pseudofirmus*'tan (sırasıyla NCBI Erişim No.'ları. CAA24990, P29600, CAJ70731, AAC43580 ve ADC49870) elde edilen subtilisinlerin matür formlarının dizileri ile bir hizalaması Şekil 9A-B'de gösterilir. Diziler varsayılan parametreler ile CLUSTALW yazılımı (Thompson et al., Nucleic Acids Research, 22:4673-4680, 1994) kullanılarak hizalanmıştır.

Tablo 8-1. Bacillus Subtilazlar tarafından Paylaşılan Özdeşlik Yüzdesi (PID)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 SWT66_254731	100	84	99	74	74	67	63	64	65	58
2 Bakn00315		100	84	80	75	71	61	64	59	57
3 Bcl04009			100	74	74	66	63	64	65	58
4 BspAl02518				100	68	68	64	60	58	59
5 BspU02193					100	66	60	62	59	56
6 Bps_ADC49870						100	63	62	62	57
7 Ble_P29600							100	64	62	61
8 Bsp_AAC43580								100	71	65
9 Bli_CAJ70731.1									100	70
10 Bam_CAA24990										100

Tablo 8-1'deki subtilisinlerin matür formlarının amino asit dizileri için bir filogenetik ağaç inşa edilmiştir. Diziler Vector NTI Advance program çiftine girilmiştir ve bir Kılavuz Ağaç Komşu Birleştirme (NJ) yöntemi kullanılarak oluşturulmuştur (Saitou ve Nei, Mol Biol Evol, 4:406-425, 1987). Ağaç yapımı aşağıdaki parametreler kullanılarak hesaplanmıştır: Dizi mesafesi için Kimura düzeltmesi ve boşlukları olan pozisyonları yok sayma. AlignX Şekil 10'da gösterilen ağaç üzerinde gösterilen molekül adından sonra parantez içinde hesaplanan mesafe değerlerini gösterir.

ÖRNEK 9

SWT66_254731 subtilisininin temizleme performansı

SWT66_254731 subtilisininin temizleme performansı Örnek 6'da tarif edildiği üzere çamaşır temelli uygulamalar için BMI (pamuk üzerindeki kan/süt/mürekkep) mikro-numunelik kumaş parçaları üzerinde (EMPA-116, Center for Testmaterials, The Netherlands) ve bulaşık temelli uygulamalar için yumurta sarısı (eski ve karbon siyahı boya ile renklendirilmiş poliakril kumaş üzerindeki yumurta sarısı) mikro-numunelik kumaş parçaları üzerinde (PAS-38, Center for Testmaterials, The Netherlands) test edilmiştir. (MTP üzerine takmak için) önceden-delinmiş numunelik kumaş parçaları içeren MTP'ler (Coming 3641), ADW analizleri için ya durulanmıştır ya da

durulanmamıştır ve enzimin eklenmesinden önce deterjan ile doldurulmuştur. Bir mikro-numunelik kumaş parçası HHD'de ve 2 mikro-numunelik kumaş parçası HD analizlerinde kullanılmıştır. SWT66_254731 subtilisininin çeşitli deterjanlar içindeki temizleme performansı Şekiller 11A-11F'de gösterilir.

ÖRNEK 10

İlave *B. akibai* Serin Proteazlarının Tanımlanması

İlave subtilisinler ilave *B. akibai* türlerinin genomlarını dizileme ile tanımlanmıştır. *B. akibai* suşları ACB102_2847966, COG104_4065768, ACB83_2687815, ACB90_2720294, ACB82_2683104, ACB89_2715301, ACB92_2732966 ve DETPh35_2828044 Dupont Kültür Koleksiyonu'ndan elde edilmiştir. Genom dizileme, birleştirme ve anotasyon esasen Örnek 1'de tarif edildiği şekildedir. Tüm genomlar BspAI02518'e ve BspU02193'e homolog proteinler şifrelemiştir.

Serin Proteazı ACB102_

ACB102_2847966.n'nin nükleotid dizisi SEQ ID NO: 18 olarak izah edilir:

ATGAAAATGAAATCGTCACGTTTAATTTTAACCCTACTTCTCCTATTCAGTTTTGTA
TTCCCATCTATGACAAGTGCAAACTCCGCTGTAGAAAAGAGGATTATCTGATCGG
TTTTAACCAGAAAGGGAATGTTAGTGCACAAGTTGTGAATATGAGTGCAGGACAAC
TCGTACATGAATATGAACATATCCCAGTCTTGCACCTTAAATTACCTCCACAAGCTG
CTAAAGCGTTAGAAAAGAACCCAAATATTCAATACATCGAAAAAGATGAAAAAGT
CCAAGCTACAGCACAATCGACACCTTGGGGGATTTCACCTATTAATGCTCCTGCTGT
TCACTCGACTGGTAATTTTGGACAAGCTGTCCGAGTTGCCGTTTTAGATAGTGGAGT
TGCTTCTCATGAAGACTTACGGATTGCTGGGGGAGTGAGCTTTGTCGCTTCAGAACC

TAGTTATCAAGATTATAATGGTCACCGAACACATGTTGCTGGAACCATTGCTGGTTT
AAATAATAGTGTTGGGGTCCTTGGTGTAGCTCCAICTGTCCAATTATATGCGGTTAA
GGTGTTCGATCCGAATGCCGGGGCGAATCATACTCACATTGCTAGAGGAATTGAGT
GGTCAGTTAATAATGGAATGCATGTGGTGAATATGAGTTTAGGTGCACCAACAGGG
TCAACGACTCTTCAACCAGCAGCCGATAATGCTTATAACAGAGGAGTTCTTTTAATT
GCCGCAGCTGGTAACACCGGAACTAGTGGGGTTAGCTTCCCTCCGCGTTATACCTCT
GTAATGGCAGTAGCCGCAACAGACTCTAATAATAACCGTGCTTCATTTTCAACTTAT
GGTCCAGAAATTGAAATTTCAGCACCTGGAGTTGGCATTAATACCACGTATCCAAC
GAATCGTTATTCAAGCTTAAATGGAACATCAATGGCTTCACCTCATGTCGCTGGTGT
AGCAGCTCTTGTGAAGGCGAGATATCCAAGTCGACGAATGCTCAGATTAGACAAC
ATCTTCCTAGCACTTCTACGTATCTACGAAACTCAACTTACTATCGTAGTCGTTTAG
TTCATGCACACCGTGCAGCTAACTAA

ACB102_2847966.n tarafından şifrelenen preproenzimin amino asit dizisi SEQ ID NO: 19 olarak izah edilir:

MKMKWSRLILTVLVLSFVFPSMTSANSAVEKEDTTGIKQAGNVSQDVYMSGGAVTH
EYEHMPVTHVKLPPQALKALEKNPNIEYIEKDEKVQATAQSTPWGISRINAPAVHSTGNFG
QGVRVAVLDSGVASHPDLRIAGGVSFVASEPSYQDYNGHGTHVAGTIAALNNSVGVLG
VAPSVQLYAVKVLDRNGGGNHSDIARGIEWSVNNGMHVVNMSLGGPTGSTTLQRAAD
NAYNRGVLLIAAAGNTGTSGVSYPARYSSVMAVAATDSNNNRASFSTYGPEIEISAPGV
GVNSTYPTNRYSSLNGTSMASPHVAGVAALVKARYPSATNAQIRQHLRNTSTYLGNSFY
YGSGLVDAQRAAN.

N-ucunda, preproenzim SignalP-NN (Emanuelsson et al., Nature Protocols, 2:953-971, 2007) kullanılarak belirlendiği üzere 29 amino asitlik bir tahmin edilen uzunluğu olan (SEQ ID NO: 19'da ***kalın ve italik olarak*** yazılmış) bir sinyal peptidine sahiptir. Bir sinyal peptidinin varlığı bu serin proteazının bir salgılanmış enzim olduğunu gösterir. Diğer serin proteazları gibi, enzim 68 amino asitlik bir tahmin edilen uzunluğu olan (SEQ ID NO: 19'da *italik* yazılmış) bir pro-diziye sahiptir. Pro-dizi tahmini homolog serin proteazları, örneğin, BPN' (Wells et al., Nucleic Acids Res, 11:7911-25, 1983) ve PB92 proteazı (van der Laan et al., Appl Environ Microbiol, 57:901-909, 1991), içindeki pro-matür birleşme yeri bilgisine dayandırılmıştır.

Tam olarak işlenmiş matür enzimin, ACB102'nin, (269 amino asitlik), amino asit dizisi SEQ ID NO: 20 olarak izah edilir:

AQSTPWGISRINAPAVHSTGNTGQGVRVAVLDSGVASHEDLRIAGGVSFVASEPSYQDY
NGHGTHVAGTIAGLNNSVGVLGVAPSVQLYAVKVLDRNGGGNTISDIARGILWSVNNG

MHVVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLIAAAGNTGTSCVSFPARYSSVMAVAA
TDSNNNRASFSTYGPEIEISAPGVGINSTYPTNRYSSLNGTSMASPHVAGVAALVKARYP
SATNAQIRQHLRSTSTYLGNSTYYGSGLVDAQRAAN

Serin Proteazı COG104

COG104_4065768.n'nin nükleotid dizisi SEQ ID NO: 21 olarak izah edilir:

ATGAAAATGAAATCGTCACGTTTAATTTTAACCCTCGTTCTCGTATTCAGTTTTGTAT
TCCCATCTATCACAAGTCCAAACTCCGCTGTACAAAAAGAGGACTATCTGATCGCT
TTTAAACAGAAAGGGAATCTTAGTGCACAAGTTGTGAATACGAGTGGAGGAGAAGT
CGTCCATGAATATCAACATATGCCAGTCTTGCACGTTAAATTACCTTCACAAGCTGC
TAAAGCGTTAGAAAAGAACCCCAATATTGAATACATTGAAAAAGATCAAAAAGTCC
AAGCAACAGCACAATCGACACCTTGGGGAATTTCACGTATTAATGCTCCTGCTGTTC
ACTCGACTGGTAAATTTGGACAAGGTGTCCGACTTGCGGTTTTAGATAGTGGAGTTG
CTTCTCATGAAGACTTACGGATTCCTGGGGGAGTGAGCTTTGTCGCTTCAGAACCTA
GTTATCAAGATTATAATCGTCACGGAACACATGTTGCTGGAACCATTGCTGGTTTAA
ATAATAGTGTTGGGGTCCTTCGTGTAGCTCCATCTGTCCAATTATATCCGCTTAAGG
TGTTGGATCGTAATGGCGGGGGAAATCATACTGACATTGCTACAGGAATTGAGTGC
TCAGTTAATAATGCAATCCATGTGGTGAATATCAGTTTAGCTGGACCAACAGGGTC
AACTACTCTTCAACGAGCAGCGGATAATCCTTATAACACAGGAGTTCTTTTAATTGC
CGCAGCTGGGAACACGGGAACTAGTGGAGTTAGCTTCCCTGCGCGTTACAGCTCAG
TAATGGCAGTAGCCGCAACAGATTCTAATAATAACCGTGCTTCATTTTCAACTTATG
GAACACAAATTGAAATTCACGACCTGGAGTTGGCATTAATACGACGTATCCAACG
AATCGTTATTCAAGTTTAAATCGAACATCAATCGCTTCACCTCATGTAGCTGGTGTA
GCGGCCCTAGTGAAGCCGAGATATCCAAGTGCGACGAATGCTCAGATTAGACAACA
TCTTCGTAGCACTTCTACGTATCTAGCAAACTCAACTTACTATGGTAGTGCTCTAGT
TGATGCACAACGTGCAGCTAACTAA

COG104_4065768.n tarafından şifrelenen preproenzimin amino asit dizisi SEQ ID NO: 22 olarak izah edilir:

MKMAWSRLILLVLVTSFVFPSMTSANSAVTKTDYTGTKQKGNVSAQVVAMNGGFVAHF
VEIMPVLHVKTPSQAAALEKMPMIDYIEADEKVQATAQSTPWGISRINAPAVHSTGNFGQ
GVRVAVLDSGVASHEDLRIAGGVSFVASEPSYQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSVGVLGV
APSVQLYAVKVLDRNGCGNHSDIARGIEWSVNNGMHVVNMSLGGPTGSTTLQRAADN
AYNRGVLLIAAAGNTGTSGVSFPARYSSVMAVAATDSNNNRASFSTYGTQIEISAPGVG

INSTYPTNRYSSINGTSMASPHVAGVAALVKARYPSATNAQIRQHLRSTSTYLGNSFYY
GSGLVDAQRAAN.

N-ucunda, preproenzim SignalP-NN (Emanuelsson et al., Nature Protocols, 2:953-971, 2007) kullanılarak belirlendiği üzere 29 amino asitlik bir tahmin edilen uzunluğu olan (SEQ ID NO: 22'de ***kalın ve italik olarak*** yazılmış) bir sinyal peptidine sahiptir. Bir sinyal peptidinin varlığı bu serin proteazının bir salgılanmış enzim olduğunu gösterir. Diğer serin proteazları gibi, enzim 68 amino asitlik bir tahmin edilen uzunluğu olan (SEQ ID NO: 22'de *italik* yazılmış) bir pro-diziye sahiptir. Pro-dizi tahmini homolog serin proteazları, örneğin, BPN' (Wells et al., Nucleic Acids Res, 11:7911-25, 1983) ve PB92 proteazı (van der Laan et al., Appl Environ Microbiol, 57:901-909, 1991), içindeki pro-matür birleşme yeri bilgisine dayandırılmıştır.

Tam olarak işlenmiş matür enzimin, COG104'ün, (269 amino asitlik), amino asit dizisi SEQ ID NO: 23 olarak izah edilir:

AQSTPWGISRINAPAVHSTGNFGQGVRVAVLDSGVASHEDLRIAGGVSFVASEPSYQDY
NGHGTHVAGTIAGLNNSVGVLGVAPSVQLYAVKVLDRNGGGNHSDIARGILWSVNNG
MHVVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLIAAAGNTGTSGVSFPARYSSVMAVAA
TDSNNNRASFSTYGTQIEISAPGVGINSTYPTNRYSSINGTSMASPHVAGVAALVKARY
PSATNAQIRQHLRSTSTYLGNSFYYGSGLVDAQRAAN.

Serin Proteazı ACB83

ACB83_2687815.n'nin nükleotid dizisi SEQ ID NO: 24 olarak izah edilir:

ATGAAAATGAAATCGTCACGTTTAATTTTAACCCTAGTTCTCGTATTCAGTTTTGTAT
TCCCATCTATCACAAGTCCAAACTTCGCTCTAGAAAAACAGGATTATCTCATCGGTT
TTAAGCAGAAAGCGAATGTTAGTGCACAAGTTCTCAATATCAGTGGAGGAGAAGTC
GTCCATGAATATGAACATATGCCAGTCTTGCACGTGAAATTACCTCCGCAAGCTGCT
AAAGCGTTAGAAAAGAACCCAAATATTGAATACATCGAAAAAGATGAAAAGGTCC
AAGCTACAGCACAATCCACACCTTGGGCGATTTCACGTATTAATGCTCCTGCTGTTC
ACTCGACTGGTAATTTGGGACAAGGTGTCCGAGTTGCCGTTTTAGATAGTCGAGTTG
CTTCTCATGAAGACTTACGGATTGCTGGCGGAGTGAGCTTTGTCGCTTCAGAACCTA
GTTATCAAGATTATAATGGTCACGGAACACATGTTGCTGGAACCATTGCTGGTTTAA
ATAATAGTGTTGGGGTCCTTCGTGTAGCTCCATCTGTCCAATTATATGCGGTTAAGG
TGTTGGATCCTAATGGCGGGGGAAATCATACTCACATTGCTAGAGGAATTGAGTGC
TCAGTTAATAATGGAATCCATGTGGTGAATATCAGTTTAGCTGGACCAACAGGGTC
AACGACTCTGCAACGAGCAGCGGATAATGCTTATAACAGAGGAGTTCTTTTAATTC
CCGCAGCTGCTAACACGCGAACTACTGGGGTTAGCTTCCCTGCCCGTTATAGCTCA

GTAATCGCAGTAGCCGCAACAGACTCTAATAATAACCGTCCTTCATTTTCAACTTAT
GCTCCAGAAATTGAAATTTCAGCACCTGGAGTTGGCATTAATAGCACGTATCCAAC
GAATCGTTATTCAAGCTTAAATGGAACATCAATGGCTTCACCTCATGTCGCTCGTGT
AGCACCTCTTCTGAAGGCGAGATATCCAAGTGCGACCAATGCTCAGATTAGACAAC
ATCTTCGTAGCACTTCTACGAATCTAGGAAACTCAACTTACTATGGTAGTGGTCTAG
TTAATGCACAGGGTGCAGCTAACTAA

5

ACB83_2687815.n tarafından şifrelenen preproenzimin amino asit dizisi SEQ ID NO: 25 olarak izah edilir:

MKMKWSRLILTVLVFSFVFPSMTSANFAVTKTDTTGTKQKGATNAQVVNMSGGEVTI
EYEHMFVTHVKLFPQALKAIEKNFMFTEKDEKVQATAQSTPWGISRINAPAVHSTGNLG
QGARVAVLDSGVASHPDLRIAGGASFVASEPSYQDYNGHGTHVACTIACTNNSVGVLG
VAPSVQLYAVKVLDRNGGGNHSDIARGIEWSVNNGMHVVNMSLGGPTGSTTLQRAAD
NAYNRGVLLIAAAGNTGTSGVSFPARYSSVMAVAATDSNNNRASFSTYGPEIEISAPGV
GINSTYPTNRYSSLNGTSMASPHVAGVAALVKARYPSATNAQIRQHLRSTSTNLGNSTY
YGSGLVNAQRAAN.

10

N-ucunda, preproenzim SignalP-NN (Emanuelsson et al., Nature Protocols, 2:953-971, 2007) kullanılarak belirlendiği üzere 29 amino asitlik bir tahmin edilen uzunluğu olan (SEQ ID NO: 25'te ***kalın ve italik olarak*** yazılmış) bir sinyal peptidine sahiptir. Bir

sinyal peptidinin varlığı bu serin proteazının bir salgılanmış enzim olduğunu gösterir. Diğer serin proteazları gibi, enzim 68 amino asitlik bir tahmin edilen uzunluğu olan (SEQ ID NO: 25'te *italik* yazılmış) bir pro-diziye sahiptir. Pro-dizi tahmini homolog serin proteazları, örneğin, BPN' (Wells et al., Nucleic Acids Res, 11:7911-25, 1983) ve PB92 proteazı (van der Laan et al., Appl Environ Microbiol, 57:901-909, 1991), içindeki pro-matür birleşme yeri bilgisine dayandırılmıştır.

Tam olarak işlenmiş matür enzimin, ACB83'ün, (269 amino asitlik), amino asit dizisi SEQ ID NO: 26 olarak izah edilir:

AQSTPWGISRINAPAVHSTGNTGQGVRVAVLDSGVASHEDLRIAGGASFVASEPSYQDY
NGHGTHVAGTIAGLNNSVGVLGVAPSVQLYAVKVLDRNGGGNHSDIARGIEWSVNNG
MHVVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLVAAAGNTGTSGVSFPARYSSVMAVAA
TDSNNNRASFSTYGPELISAPGVGINSTYPTNRYSSLNGTSMASPHVAGVAALVKARYP
SATNAQIRQHLRSTSTNLGNSTYYGSGLVNAQRAAN.

Serin Proteazı ACB90

ACB90_2720294.n'nin nükleotid dizisi SEQ ID NO: 27 olarak izah edilir:

ATGAAAATGAAATGGTCACGTTTAATTTTAACCCTAGTTCTCGTATTCAGTTTTGTAT

TCCCATCTATGACAAGTCCAAACTCCGCTGTACAAAAAGAGGATTATCTCATCGGTT
TTAAGCAGAAAGCGAATGTTAGTGCACAAGTTCTCAATATCAGTGGAGGAGAAGTC
GTCCATGAATATGAACATATGCCAGTCTTGCACGTGAAATTACCTCCGCAAGCTGCT
AAAGCGTTAGAAAAGAACCCAAATATTGAATACATCGAAAAAGATGAAAAGGTCC
AAGCTACAGCACAATCCACACCTTGGGGGATTTCACGTATTAATGCTCCTGCTGTTC
ACTCGACTGGTAATTTGCGACAAGGTGTCCGAGTTGCCGTTTTAGATAGTCGAGTTG
CTTCTCATGAAGACTTACGGATTCCTGGCGGAGTGAGCTTTGTCGCTTCACAACCTA
GTTATCAAGATTATAATCGTCACGGAACACATGTTCCTGGAACCATTGCTGGTTTAA
ATAATAGTGTTGGGGTCCTTCGTGTAGCTCCATTTGTCCAATTATATGCGGTTAAGG
TGTTGGATCGTAATGGCGGGGGAAATCATACTCACATTGCTACAGGAATTGAGTGG
TCAGTTAATAATGGAATCCATGTGGTGAATATCAGTTTAGCTGGACCAACAGGGTC
AACGACTCTGCAACGAGCAGCGGATAATGCTTATAACAGAGGAGTTCTTTTAATTC
CCGCAGCTGGTAACACGCGAACTACTGGGGTTAGCTTCCCTGCCCGTTATAGCTCA
GTAATGGCAGTAGCCGCAACAGACTCTAATAATAACCGTGCTTCATTTTCAACTTAT
GGTCCAGAAATTGAAATTTCAGCACCTGGAGTTGGCATTAATACCACGTATCCAAC
GAATCGTTATTCAAGCTTAAATGGAACATCAATGGCTTCACCTCATCTCGCTGGTGT
AGCAGGCTCTTGTGAAGGCGAGATATCCAAGTCGACGAATGCTCAGATTAGACAAC
ATCTTCGTAGCACTTCTACGAATCTAGGAAACTCAACTTACTATGGTAGTGGTCTAG
TTAATGCACAGCGTGCAGCTAACTAA.

ACB90_2720294.n tarafından şifrelenen preproenzimin amino asit dizisi SEQ ID NO: 28 olarak izah edilir:

MKMKWNRLILTALVTSFVFPSMTNAASAVEKDYTGAKQAGNSAQVAQMNGGFVLH
VEHMPVLHKATPQAAKALKAPVHIEKADEAVQAIAQSTPWGISRINAPAVHSTGNTGQ
GVRVAVIDSGVASHEDLRIAGGVSFVASETNPYQDYNGHGTHVAGTIAALNNSVGVLGV
APEVQLYAVKVLDRNGCGNHSDIARGIEWSVNNGMHVVNMSLGGPTGSTTLQRAADN
AYNRGVLLIAAAGNTGTSGVSFPAKYSSVMAVAATDSNNNRASFSTYGPEIEISAPGVGI
NSTYPTNRYSSLNGTSMASPHVAGVAALVKARYPSWTNAQIRQHLRSTSTNLGNSFYY
GSGLVNAQRAAN

N-ucunda, preproenzim SignalP-NN (Emanuelsson et al., Nature Protocols, 2:953-971, 2007) kullanılarak belirlendiği üzere 29 amino asitlik bir tahmin edilen uzunluğu olan (SEQ ID NO: 28'de ***kalın ve italik olarak*** yazılmış) bir sinyal peptidine sahiptir. Bir sinyal peptidinin varlığı bu serin proteazının bir salgılanmış enzim olduğunu gösterir. Diğer serin proteazları gibi, enzim 68 amino asitlik bir tahmin edilen uzunluğu olan

(SEQ ID NO: 28'de *italik* yazılmış) bir pro-diziye sahiptir. Pro-dizi tahmini homolog serin proteazları, örneğin, BPN' (Wells et al., Nucleic Acids Res, 11:7911-25, 1983) ve PB92 proteazı (van der Laan et al., Appl Environ Microbiol, 57:901-909, 1991), içindeki pro-matür birleşme yeri bilgisine dayandırılmıştır.

Tam olarak işlenmiş matür enzimin, ACB90'ın, (269 amino asitlik), amino asit dizisi SEQ ID NO: 29 olarak izah edilir:

AQSTPWGISRINAPAVHSTGNTGQGVRVAVLDSGVASHEDLRIAGGASFVASEPSYQDY
NGHGTHVAGTIAGLNNSVGVLGVAPEVQLYAVKVLDRNGGGNHSDIARGIEWSVNNG
MHVVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLVAAAGNTGTSGVSFPARYSSVMAVAA
TDSNNNRASFSTYGPELSIAAPGVGINSTYPTNRYSSLNGTSMASPHVAGVAALVKARYP
SATNAQIRQHLRSTSTNLGNSTYYGSGLVNAQRAAN.

Serin Proteazı ACB82

ACB82_2683104.n'nin nükleotid dizisi SEQ ID NO: 30 olarak izah edilir:

ATGAGAGTTTTAAAAGGTACCAAACTTACCCGTTTACTTCTTGGGTTTATTTTATTAT
TTTCTTTCACCTTTTTGTCATTATCGGTTAGTGCTAACGGCAATGGAGTAGAAAGAC
ATGACTATTTAATAGGGTTTCACCAAAAGGTAGATAAAAAAGCCATAACTCAAGCA
ACCGCAGAAGTAGTTCACGAATATCAGTATATGCCTGTTCTTCATGTAAACCTTCCA
GAAAAAGCAGCAAAAGCTTTAGAAAAAAATCCTAATATTGCTTATGTTGAAAAAGA
CGAACAGGTTACTCCTTCACAAACGGTTCCTTCGGGAATTAATCATATCAAGCTCC
AACTGTACATTCTTGGGCGAATCGCCGAAACGGTGTTCCTGTCGCTGTGCTAGATTC
AGGGGTTCCTTCCCATCAAGATTTAAGAATTTCTGGCTGGTAGAAGTTTTATTACTAC
CGAGCCTTCTTATCAAGATTATAATGGCCATCGAACTCATGTAGCTGGTACCATCGC
TGGGTTTAAATAATAGTTACGGTGTACTTGGTGTCGCACCTAATGTTAATCTTTACGC
AGTAAAAGTATTACATCGTAATGGAAGTGGATCTACAGTGCGATTGCACAAGGGA
TTCAATGGTCTGTTAGCAACGGTATGCATATTCTTAACATGAGCTTAGGTGGGCCAA
CTGGTTCAACAACTCTTCAACCTCCCGCAGATAATGCTTATAATACAGGTGTTCTTC
TTATCCCTGCAGCTCGAAACACGCGTTCTGCTCGTATTTCCTATCCAGCTAGATACA
ACTCTGTTATGGCTGTAGGTGCCCTTGACTCCAATAATAATCGTGCTTCATTCTCGA
CTTTTCGGAAACGAATTAGAAATTATGGCACCAGGAGTATCAATATTAAGCACACAC
CTTTCAAATCAATATGTTTCTTTAAACGCTACATCTATGGCAACTCCTCATGTACCT
GGTGTTGCAGCTTTCGTGAAAGCTCAATATCCAAGTGCAACTAATGCCCAAATCAC
ACAAAGACTAAGAGATACTGCCACTCCACTTGGTAGTTCATATTACTTTGGAAATGG
TTTAGTCCATGCTACTAGAGCCGCTAATTAA

ACB82_2683104.n tarafından şifrelenen preproenzimin amino asit dizisi SEQ ID NO: 31 olarak izah edilir:

MRVLKGTKLTGLLLGFTLLFSFTTLSLSVSANGVGVTRHDYTLCTHEKVDKKAIQANGA
VHEYQFMPVLHVKLFLAAAKALLAAPNADVEKDLEVTASQTVPWGINHIQAPTVHSWGN
RGNGVRVAVLDSGVASHEDLRISGGRSFITSEPSYQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSYGVL
GVAPNVNLYAVKVLDRNGSGSHSAIAQGIEWSVSNGMHIVNMSLGGPTGSTTLQRAAD
NAYNRGVTLVAAAGNTGSAGISYPARYNSVMAVGAVDSNNNRASFSTFGNFLEIMAPG
VSILSTHLSNQYVSLNGTSMASPHVAGVAALVKAQYPSATNAQIRQRLRDTATPLGSSY
YFGNGLVHATRAAN

N-ucunda, preproenzim SignalP-NN (Emanuelsson et al., Nature Protocols, 2:953-971, 2007) kullanılarak belirlendiği üzere 31 amino asitlik bir tahmin edilen uzunluğu olan (SEQ ID NO: 31'de ***kalın ve italik olarak*** yazılmış) bir sinyal peptidine sahiptir. Bir sinyal peptidinin varlığı bu serin proteazının bir salgılanmış enzim olduğunu gösterir.

Diğer serin proteazları gibi, enzim 69 amino asitlik bir tahmin edilen uzunluğu olan (SEQ ID NO: 31'de *italik* yazılmış) bir pro-diziye sahiptir. Pro-dizi tahmini homolog serin proteazları, örneğin, BPN' (Wells et al., Nucleic Acids Res, 11:7911-25, 1983) ve PB92 proteazı (van der Laan et al., Appl Environ Microbiol, 57:901-909, 1991), içindeki pro-matür birleşme yeri bilgisine dayandırılmıştır.

Tam olarak işlenmiş matür enzimin ACB82'nin, (269 amino asitlik), amino asit dizisi, SEQ ID NO: 32 olarak izah edilir:

SQTVPWGINHIQAPTVHSWGNRGNGVRVAVIDSGVASHPDLRISGGRSFITSEPSYQDY
NGHGTHVAGTIAGLNNSYGVLGVAPNVNLYAVKVLDRNGSGSHSAIAQGIEWSVSNG
MHIVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLIAAAGNTGSAGISYPARYNSVMAVGA
VDSNNNRASFSTFGNELEIMAPGVSILSTHLSNQYVSLNGTSMASPHVAGVAALVKAQ
YPSATNAQIRQRLRDTATPLGSSYYFGNGLVHATRAAN.

Serin Proteazı ACB89

ACB89_2715301.n'nin nükleotid dizisi SEQ ID NO: 33 olarak izah edilir:

ATCAGAGTTTTGAAAGGTAACAAACTTACCGGTTTACTTCTTCGGTTTATTTTAGTA
TTTTCTTTCACCTTTTTGTCATTATCGGTTAGTGCTAACGGGAATGGCAATGGCAATC
GCAATGGAGTAGAGAGACATGACTATTTAATAGGGTTTCACGAAAAGGTAGATAAA
AAAGCCATAACTCAACCAAGCGGACAAGTAGTTCACGAATATCAGTATATGCCTGT
TCTTCATGTAAAGCTTCCAGAAAAAGCAGCAAAAGCTTTAGAAAAAAATCCTAATA
TTGCTTATGTTGAAAAAGACCAAGAGGTTACTGCTTCACAAACGCTTCCTTGGGGA
ATTAATCATATTCAAGCTCCAACTCTACATTCTTGGGGGAATCCTCGAAACGGCGTT

CGTGTTGCTGTGTTAGATTCAGGGGTTGCTTCCCATGAACATTTAAGAATTTTTGGT
GGTAGAAGTTTCATTACTAGCGAGCCTTCTTATCAAGATTATAATGGCCATGGAACT
CATGTCGCCGGAACCATCGCTGGCTTAAATAATAGTTACGGTGTACTTGGTGTTGCA
CCTAATGTTAATCTTTACGCAGTAAAACTATTAGATCGTAACGGAAGTGGATCTCAC
AGTGCGATTGCACAAGGGATTGAATGGTCTGTTAGCAACGGTATGCATATTGTTAA
CATGAGCTTACGTGGCCCAACAGGTTCAACAACTCTTCAACGTGCCGCTCATAATC
CTTATAATAGAGGTGTTCTCCTTATCGCTGCAGCTCGTAACACGGGTTCTCCTGGTA
TTTCCTATCCAGCTAGATACAACTCTGTTATGGCTGTAGGTGCCGTTGACTCCAATA
ATAATCGTGCTTCATTCTCGACTTTTGGAAACGAATTAGAAATTATGGCACCAGCAG
TATCAATTTTAAGCACGCACCTTTCAAATCAATATGTTTCTTTAAACGGTACATCTAT
GGCAAGTCCTCATGTAGCTGGTGTTGCAGCTTTGGTGAAAGCTCAATATCCAAGTGC
AACTAATGCCCAAATCAGACAAAGACTAAGACATACTGCCACTCCACTTGGTAGTT
CATATTACTTTGGAAATGCTTTAGTGCATGCTGCTAGAGCCGCTAATTAA

ACB89_2715301.n tarafından şifrelenen preproenzimin amino asit dizisi SEQ ID NO: 34 olarak izah edilir:

MRVLKGNKLIGLLLGFILVISFTFSLSVNAVGAGVGNGAVERHDTLIGIHEAVDKAI
IQAMGEVTHLFQDMPVLHVAAFLKAAKAIEKNPNAVVLADLLVIASQIVPWGINHIQAPI
VHSWGNRGNGVRVAVLDSGVASHEDLRIFGGRSFISEPSYQDYNGHGTHVAGTIAGL
NNSYGVIGVAPNVNLYAVKVLDRNGSGSHSAIAQGIEWSVSNGMHIVNMSLGGPTGST
TLQRAADNAYNRGVLLVAAGNTGSAGISYPARYNSVMAVGAVDSNNNRASFSTFGNE
LEIMAPGVSILSTHLSNQYVSLNGTSMASPHVAGVAALVKAQYPSATNAQIRQRLRDTA
TPLGSSYYFGNGLVHAARAAN.

N-ucunda, preproenzim SignalP-NN (Emanuelsson et al., Nature Protocols, 2:953-971, 2007) kullanılarak belirlendiği üzere 31 amino asitlik bir tahmin edilen uzunluğu olan (SEQ ID NO: 34'te ***kalın ve italik olarak*** yazılmış) bir sinyal peptidine sahiptir. Bir sinyal peptidinin varlığı bu serin proteazının bir salgılanmış enzim olduğunu gösterir. Diğer serin proteazları gibi, enzim 75 amino asitlik bir tahmin edilen uzunluğu olan (SEQ ID NO: 34'te *italik* yazılmış) bir pro-diziye sahiptir. Pro-dizi tahmini homolog serin proteazları, örneğin, BPN' (Wells et al., Nucleic Acids Res, 11:7911-25, 1983) ve PB92 proteazı (van der Laan et al., Appl Environ Microbiol, 57:901-909, 1991), içindeki pro-matür birleşme yeri bilgisine dayandırılmıştır.

Tam olarak işlenmiş matür enzimin, ACB89'un, (269 amino asitlik), amino asit dizisi SEQ ID NO: 35 olarak izah edilir:

SQTVPWGINHIQAPTVHSWGNRGNGVRVAVLDSGVASHEDLRIVGGRSFITSEPSYQDY

NGHGTHVAGTIAGLKNSYGVLGVAPNVNLYAVKVLDRNGSGSHSAIAQGIEWSVSNG

MHIVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLIAAAGNTGSAGISYPARYNSVMAVGA

VDSNNNRASFSTFGNELEIMAPGVSILSTHLSNQYVSLNGTSMASPHVAGVAALVKAQ

YPSATNAQIRQRLRDTATPLGSSYYFGNGLVHAARAAN

Serin Proteazı ACB92

ACB92_2732966.n'nin nükleotid dizisi SEQ ID NO: 36 olarak izah edilir:

ATGTCGAGTTTTAAAAAGCTACCAAACTTACTCGTTTACTTCTTGGGTTTATTTTAGTAT

TTTCTTTCGCTTTTTATCACTATCGGTTAGTCCTAATGGCAATGGCGTACAAAGAC

ATCACTATTTAATAGGGTTTCACGAAAAGGTAGATAAAAAAGCCATAACTCAAGCA

AGCGGAGAAGTAGTTCACGAATATCACTATATGCCTGTTCTTCATGTAAAGCTTCCA

GAAAAAGCAGCAAAAGCTTTAGAAAAAAATCCTAATATTGCTTATGTTGAAAAAGA

CGAACAGGTTACTGCTTCACAAACGGTTCCTTGGGGAATTAATCATATTCAACCTCC

AACTGTACATCTTGGGGGAATCCTCGAAACGGCGTCGTGCTGCTGTTAGATTC

AGGGGTTGCTTCCCATGAACATTTAAGAATTCTGGTGGTAGAAGTTCATTACTAC

CGAGCCTTCTTATCAAGATTATAATGGCCATGGAACTCATGTCGCCGGAACCATCGC

TGGGTTAAATAATAGTTACGGTGTACTTGGTGTTGCACCTAATGTTAATCTTTACGC

TGTAAAACTATTAGATCGTAACGGCAAGTGGATCTCACAGTGGCATTCCACAAGGGA

TTGAATGGTCTGTTAGCAACGGTATGCATATTGTTAACATGACCTTACGTGGGCCAA

CTGGTTCAGCAACTCTTCAACGTGCCGCAGATAATGCTTATAATAGAGGTCTGCTTC

TGATTGCTGCAGCTGGAAATACGCGTTCCGCTGCTATTTCCTATCCAGCAAGATACA

ATTCTCTTATGGCTGTAGGTCCCGTTCACTCCAATAACAATCGTGCTTCATTCTCGA

CTTTTCGAAACGAATTAGAAATTATGGCACCAGGACTATCCATTTTAAGCACACAC

CTTTCAAATCAATATATTTCTTTAAACGGTACATCTATGGCAAGTCCACATGTAGCT

GGTGTTGCAGCTTTGGTGAAAGCTCAATATCCAAGTGCGACTAATGCCCAAATCAG

ACAAAGACTAAGAGACACCGCTACTCCACTTGGTAGCTCATATTACTTTGGCAATG

GTTTACTGCACGCTGCTAGAGCCCCTAACTAA

ACB92_2732966.n tarafından şifrelenen preproenzimin amino asit dizisi SEQ ID NO: 37 olarak izah edilir:

MRVLKGTKLTGLLLGFHLAFSFAFTSLSVSAANGNGVLRHDYLIGDHIKVDKKAIQANGFA
VHEVQDAIPVLHKLDVKAAKALLKNPNIADVLKDLPLTASQLVPWGINHIQAPTVHSWGN
RGNGVRVAVLDSGVASHEDLRISGGRSFITSEPSYQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSYGVL
GVAPNVNLYAVKVLDRNGSGSHSAIAQGIEWSVSNGMHIVNMSLGGPTGSATLQRAA
5 DNAYNRGVLLIAAAGNTGSAGISYPARYNSVMAVGAVDSNNNRASFSTFGNELEIMAP

GVSILSTFHLSNQYISLNGTSMASPHVAGVAALVKAQYPSATNAQIRQRLRDTATPLGSS
YYFGNGLVHAARAAN.

N-ucunda, preproenzim SignalP-NN (Emanuelsson et al., Nature Protocols, 2:953-971,
10 2007) kullanılarak belirlendiği üzere 31 amino asitlik bir tahmin edilen uzunluğu olan (SEQ ID NO: 37'de ***kalın ve italik olarak*** yazılmış) bir sinyal peptidine sahiptir. Bir sinyal peptidinin varlığı bu serin proteazının bir salgılanmış enzim olduğunu gösterir. Diğer serin proteazları gibi, enzim 69 amino asitlik bir tahmin edilen uzunluğu olan (SEQ ID NO: 37'de *italik* yazılmış) bir pro-diziye sahiptir. Pro-dizi tahmini homolog serin
15 proteazları, örneğin, BPN' (Wells et al., Nucleic Acids Res, 11:7911-25, 1983) ve PB92 proteazı (van der Laan et al., Appl Environ Microbiol, 57:901-909, 1991), içindeki pro-matür birleşme yeri bilgisine dayandırılmıştır.

Tam olarak işlenmiş matür enzimin, ACB92'nin, (269 amino asitlik), amino asit dizisi
20 SEQ ID NO: 38 olarak izah edilir:

SQTVPWGINHIQAPTVHSWGNRGNGVRVAVLDSGVASHEDLRISGGRSFITSEPSYQDY
NGHGTHVAGTIAGLNNSYGVLGVAPNVNLYAVKVLDRNGSGSHSAIAQGIEWSVSNG
MHIVNMSLGGPTGSATLQRAADNAYNRGVLLIAAAGNTGSAGISYPARYNSVMAVGA
VDSNNNRASFSTFGNELEIMAPGVSILSTFHLSNQYISLNGTSMASPHVAGVAALVKAQY
PSATNAQIRQRLRDTATPLGSSYYFGNGLVHAARAAN.

Serin Proteazı DETPh35

25

DETPh35_2828044.n'nin nükleotid dizisi SEQ ID NO: 39 olarak izah edilir:

ATGAGAGTTTTGAAACGTAACAAACTTACCCGTTTACTTCTTGCGTTTATTTTAGTA
TTTTCTTTCACCTTTTTGTCATTATCGGTTAGTGCTAACGGGAATGGCAATGGAGTA
GAAAGACATGACTATTTAATAGGGTTTCACGAAAAGGTAGATAAAAAAGCCATAAC
TCAAGCAAGCGGAGAAGTACTTCACGAATATCAGTATATGCCTGTTCTTCATGTAA
AGCTTCCACAAAAAGCAGCAAAAGCTTTAGAAAAAAATCCTAATATTGCTTATGTT
GAAAAAGACGAAGACGGTTACTGCTTCACAAACGGTTCCTTGGGGAATTAATCATAT
TCAAGCTCCAACTGTACATTCTTCGGGGGAATCGTGGAAACGGCGTTCGTCTTGCTGT
GTTAGATTCAGGCGGTTGCTTCCCATGAACATTTAAGAATTTCTGGTGGTAGAAGTTT
CATTACTAGCGAGCCTTCTTATCAAGATTATAATGGCCATGGAACTCATGTCGCCGG
AACCATCGCTGGGTTAAATAATAGTTACGGTGTACTTGGTGTTGCACCTAATGTTAA
TCTTTACGCTGTAAAAGTATTAGATCGTAACGGCAAGTGGATCTCACAGTGGCATTCC
ACAACGGATTGAATGGTCTCTTACCAACGGTATGCATATTGTTAACATCAGCTTAG
GTGGGCCAACTGCTTCAGCAACTCTTCAACGTGCCGCAGATAATCCTTATAATAGA
GGTGTGCTTCTGATTGCTGCAGCTGGAAATACGGGTTCTGCTGCTATTTCCTATCCA

GCAAGATACAATTCTGTTATGCCTGTAGCTGCCGTTCACTCAATAACAATCGTGCT
TCATTCTCGACTTTTGGAAACGAATTAGAAATTATGGCACCAGGAGTATCCATTTTA
AGCACACACCTTTCAAATCAATATGTTTCTTTAAACGGTACATCTATGGCAAGTCCA
CATGTAGCTGCTGTTGCAGCTTTGGTGAAGGCTCAATATCCAAGTGCGACTAATGCC
CAAATCAGACAAAGACTAAGAGACACCGCTACTCCACTTGGTAGCTCATATTACTTT
GGCAATGGTTTAGTGCACGCTGCTAGAGCCCCTAATTAA

5

DETPh35_2828044.n tarafından şifrelenen preproenzimin amino asit dizisi SEQ ID NO: 40 olarak izah edilir:

MRVLKGNKLIGLLGFIIAVFSFTFFLMSVNAANGNGWGVIRHDYTIGFIRKVDKKAIQAAG
IVAHTQYMPVTHVKTPAAAAKATKAPNAAFVKDLCVTASQIVPWGINHIQAPTVHSWG
NRGNGVRVAVIDSGVASHEDLRISGGRSFITSEPSYQDYNGHGTHVAGTIAGLKNNSYG
VLGVAPNVNLYAVKVLDRNGNGSHSAIAQGIEWSVSNGMHIVNMSLGGPTGSAALQRA
ADNAYNRGVLLVAAAGNTGSAGISYPARYNSVMAVGAVDSNNNRASFSTFGNELEIMA
PGVSILSTFLSNQYVSLNGTSMASPHVAGVAALVKAQYPSATNAQIRQRLRDTATPLGS
SYYFGNGLVHAARAAN.

10

N-ucunda, preproenzim SignalP-NN (Emanuelsson et al., Nature Protocols, 2:953-971, 2007) kullanılarak belirlendiği üzere 31 amino asitlik bir tahmin edilen uzunluğu olan (SEQ ID NO: 40'ta ***kalın ve italik olarak*** yazılmış) bir sinyal peptidine sahiptir. Bir

sinyal peptidinin varlığı bu serin proteazının bir salgılanmış enzim olduğunu gösterir. Diğer serin proteazları gibi, enzim 71 amino asitlik bir tahmin edilen uzunluğu olan (SEQ ID NO: 40'ta *italik* yazılmış) bir pro-diziye sahiptir. Pro-dizi tahmini homolog serin proteazları, örneğin, BPN' (Wells et al., Nucleic Acids Res, 11:7911-25, 1983) ve PB92 proteazı (van der Laan et al., Appl Environ Microbiol, 57:901-909, 1991), içindeki pro-matür birleşme yeri bilgisine dayandırılmıştır.

Tam olarak işlenmiş matür enzimin, DETPh35'in, (269 amino asitlik), amino asit dizisi SEQ ID NO: 41 olarak izah edilir:

SQTVPWGINRIQAPTVHNRGNRGVRVAVIDSGVASHPDLRIAGGASFVPSEPSYQDG
NGHGTHVAGTIAALDNSIGVLGVAPNVNLYAVKVLDRNGSGSLSSVAQGIEWAVNN
NMHVANMSLGGPSGSATLEQAVNRAYARGVLVVAAAGNSGAGSISYPARYANAMAVGA
TDQNNNRASFSQYGAGLDIVAPGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMASPHVAGVAALVKSK
YPSATNAQIRQRLKNTATSLGSSNLYGSGLVNAEAATR.

BspAI02518 (SEQ ID NO: 3), BspU02193 (SEQ ID NO: 6), Bakn00315 (SEQ ID NO: 11), Bcl04009 (SEQ ID NO: 14), SWT66_254731 (SEQ ID NO: 17), ACB102 (SEQ ID NO: 20), COG104 (SEQ ID NO: 23), ACB83 (SEQ ID NO: 26), ACB90 (SEQ ID NO: 29), ACB82 (SEQ ID NO: 32), ACB89 (SEQ ID NO: 35), ACB92 (SEQ ID NO: 38) ve DETPh35 (SEQ ID NO: 41) subtilisinlerinin matür formlarının amino asit dizilerinin *B. amyloliquefaciens*'ten, *B. lentus*'tan, *B. licheniformis*'ten, *Bacillus* sp. LG12'den ve *B. pseudofirmus*'tan (sırasıyla NCBI Erişim No.'ları: CAA24990, P29600, CAJ70731, AAC43580 ve ADC49870) elde edilen subtilisinlerin matür formlarının dizileri ile bir hizalaması Şekil 12'de gösterilir. Diziler varsayılan parametreler ile Vector NTI Advance® Yazılımı'nın (Life Technologies) AlignX modülü kullanılarak hizalanmıştır.

Tablo 10-1. Çeşitli Bacillus Subtilazları tarafından Paylaşılan Özdeşlik Yüzdesi (PID)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1 Bsp_AAC43580	100	65	71	64	62	62	60	60	60	61	61	64	64	64	64	64	64	64
2 Bam_CAA24		100	70	61	57	56	60	59	59	60	60	58	58	57	57	58	58	57

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
990																		
3 Bli_CAJ70731.1			100	62	62	59	59	58	59	59	59	65	65	59	59	59	59	59
4 Ble_P29600				100	63	60	63	64	63	64	63	63	63	61	61	62	62	61
5 Bps_ADC49870					100	66	68	68	68	67	67	66	67	71	71	71	71	71
6 BspU02193						100	69	68	68	68	68	74	74	75	75	75	75	75
7 ACB102							100	98	99	99	98	75	75	81	81	80	80	81
8 BspAI02518								100	99	97	97	74	74	80	80	80	80	80
9 COG104									100	98	98	74	74	80	80	80	80	80
10 ACB83										100	99.6	75	75	81	81	80	80	81
11 ACB90											100	75	75	81	81	80	80	81
12 Bcl04009												100	99	83	83	83	83	84
13 SWT66_254731													100	84	84	84	84	84
14 ACB82														100	99	99	99	99.6
15 ACB89															100	99	99	99.6

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
16 ACB92																100	99.6	99
17 DETPh35																	100	99.6
18 Bakn00315																		100

Tablo 10-1'deki subtilisinlerin matür formlarının amino asit dizileri için bir filogenetik ağaç inşa edilmiştir. Diziler Vector NTI Advance program çiftine girilmiştir ve bir Kılavuz Ağaç Komşu Birleştirme (NJ) yöntemi kullanılarak oluşturulmuştur (Saitou and Nei, Mol Biol Evol, 4:406-425, 1987). Ağaç yapımı aşağıdaki parametreler kullanılarak hesaplanmıştır: Dizi mesafesi için Kimura düzeltmesi ve boşlukları olan pozisyonları yok sayma. AlignX Şekil 13'te gösterilen ağaç üzerinde gösterilen molekül adından sonra parantez içinde hesaplanan mesafe değerlerini gösterir.

ÖRNEK 11

***B. akibai/clarkii-kladı* subtilisinlerin eşsiz özellikleri**

Bir yapı temelli hizalama (Şekil 14) yapısal benzerlikleri aramak için Molecular Operating Environment (MOE) yazılımdaki (Chemical Computing Group, Montreal, Quebec, Canada) "hizala (align)" seçeneği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. BspAl02518 (SEQ ID NO: 3), BspU02193 (SEQ ID NO: 6), Bakn00315 (SEQ ID NO: 11), Bcl04009 (SEQ ID NO: 14), SWT66_254731 (SEQ ID NO: 17), ACB102 (SEQ ID NO: 20), COG104 (SEQ ID NO: 23), ACB83 (SEQ ID NO: 26), ACB90 (SEQ ID NO: 29) , ACB82 (SEQ ID NO: 32), ACB89 (SEQ ID NO: 35), ACB92 (SEQ ID NO: 38) ve DETPh35 (SEQ ID NO: 41) subtilisinlerinin matür formlarının amino asit dizileri *B. amyloliquefacien*'ten BPN' subtilisini (pdb kaydı 2STI), *B. licheniformis'ten* Carlsberg (pdb kaydı 3UNX), *B. lentus* subtilisini (pdb kaydı 1JEA) ve subtilisin LG12'nin tescilli yapısı (11 Eylül 2014'te dosyalanmış, PCT/US2014/55223 Numaralı PCT Patent Başvurusu) ile hizalanmıştır. Hizalama geleneksel dizi hizalamasına bir ilave kılavuz olarak korunmuş yapısal motiflere uygulanır. Bu hizalama MOE'nin 2012.10 dağılımında bulunan standart program varsayılanları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Şekil 14'te gösterildiği üzere, BspAl02518, BspU02193, Bakn00315, Bcl04009, SWT66_254731, ACB82, ACB83, ACB89, ACB90, ACB92, ACB102, COG104 ve DETPh35 subtitlisin dizilerinin yapısal hizalaması, bu *B. akibai/clarkii*-kladı dizilerin üç korunmuş amino asidin bir segmentine sahip olduğuna gösterir: diğer subtilisin enzimlerine kıyasla bu subtilisinler için eşsiz olan (bundan sonra "DRN motifi" olarak ifade edilen) (BspAl02518 SEQ ID NO: 3 dizi numaralandırmasına göre) rezidüler 95-97'de Asp-Arg-Asn (DRN). DRN motifinin her iki yanında çoğu Bacillus subtilisini boyunca hayli korunmuş amino asitler yer alır. Her iki yanında her alan korunmuş rezidüler N-ucunda KVL'dir ve C-ucunda GG/SG'dir. DRN yerine, ticari BPN' ve *B. lentus* subtilisinleri bu pozisyonlarda GAS/N'ye sahip iken, Carlsberg subtilisini NNS'ye sahiptir.

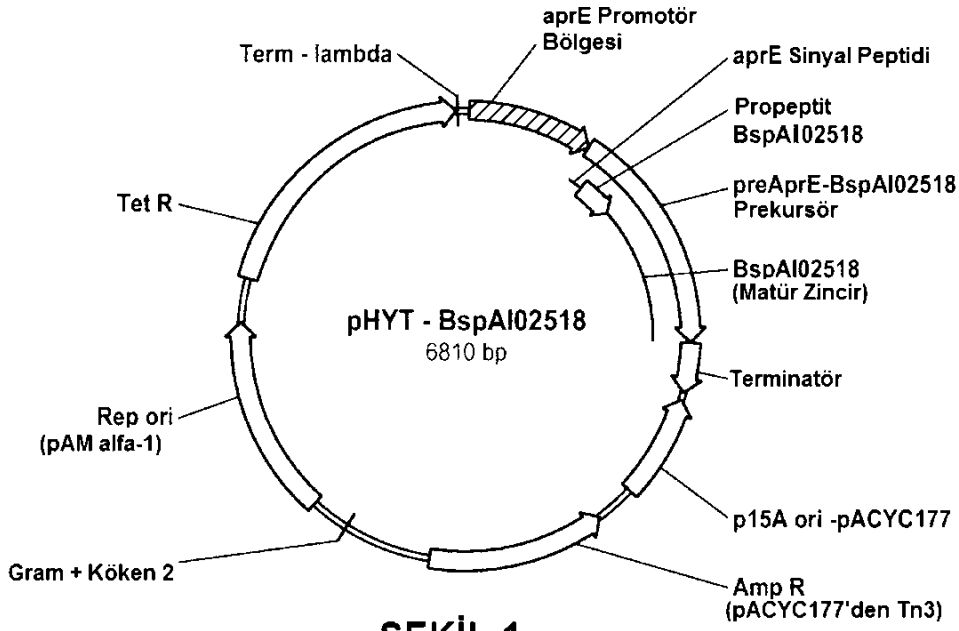
B. akibai/clarkii-kladı subtilisin dizisi DRN motif VKVLDRNGR[1]G, burada R[1], G veya S (SEQ ID NO: 42) arasından seçilir, VKVLDRNGGG (SEQ ID NO: 43) veya VKVLDRNGSG (SEQ ID NO: 44) olarak tanımlanabilir. *B. akibai/clarkii*-kladı subtilisin dizisi DRN motif ilaveten D95R96N97 (SEQ ID NO: 45), V91K92V93L94D95R96N97G98G/S99G100 (SEQ ID NO: 46), V91K92V93L94D95R96N97G98G99G100 (SEQ ID NO: 47) veya V91K92V93L94D95R96N97G98S99G100 (SEQ ID NO: 48) olarak tanımlanabilir. SEQ ID NO.'ları: 45'te, 46'da, 47'de ve 48'de izah edilen dizi numaralandırması BspAl02518 SEQ ID NO: 3 dizi numaralandırmasına göredir.

Şekil 15, katalitik triadın ve DRN motifinin *B. lentus* subtilisini (pdb kaydı 1JEA) proteazının üç-boyutlu yapısı üzerinde modellendiği üzere *B. akibai/clarkii*-kladı subtilisin proteazında nerede konumlandırıldığını gösterir. Bu yapısal hizalamada, karakteristik katalitik triad rezidüleri Asp32'nin, His62'nin ve Ser215'in subtilisin-benzeri proteazların eşit şekilde karakteristik "oksianyon deliği"ni oluşturan Asn153 boyunca korunduğu görülür. Hizalamada, ayrıca ticari subtilisinler Carlsberg'e ve (BPN')'ye ve tescilli subtilisin LG12'ye kıyasla *B. akibai/clarkii*-kladı dizilerin 156. ve 157. rezidüleri arasında *B. lentus* subtilisininde gözlemlenen bir ortak silinme tahminini de bulduk. Hizalamada, ayrıca ticari ve tescilli subtilisin proteazlarının aksine *B. akibai/clarkii*-kladı dizilerin bir DRN motifi içerdiğini de bulduk. *B. akibai/clarkii*-kladı dizilerin D95R96N97 rezidüleri kısmen BspAl02518'in lineer dizisindeki 99-102 arasındaki rezidüler tarafından oluşturulan substrat bağlama yerine giren bir sıkı kıvrım içinde

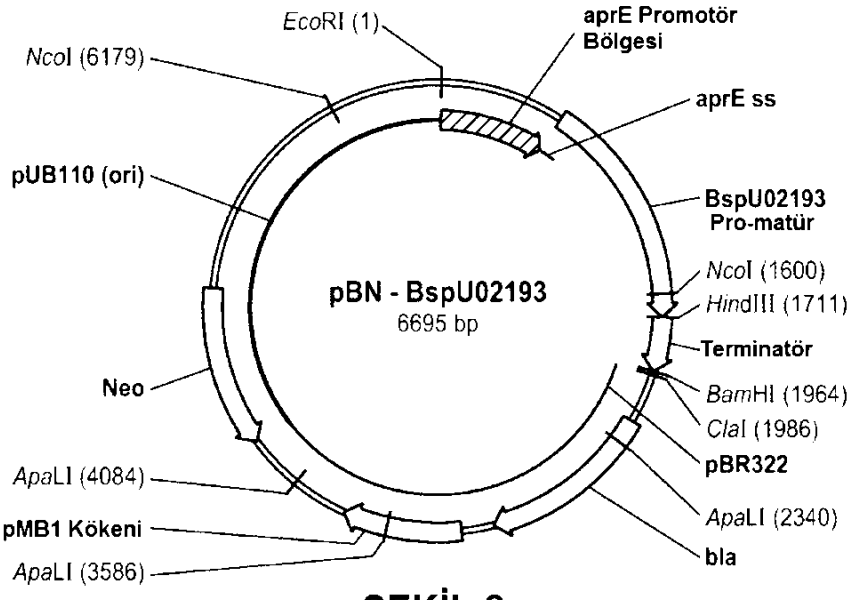
konumlandırılır. Bu motifin *B. akibai/clarkii*-kladı subtilisinlerin substrat ile bir yararlı şekilde etkileşimini modüle edebilmesi beklenir.

DRN motifinin yapısal çıkarımları:

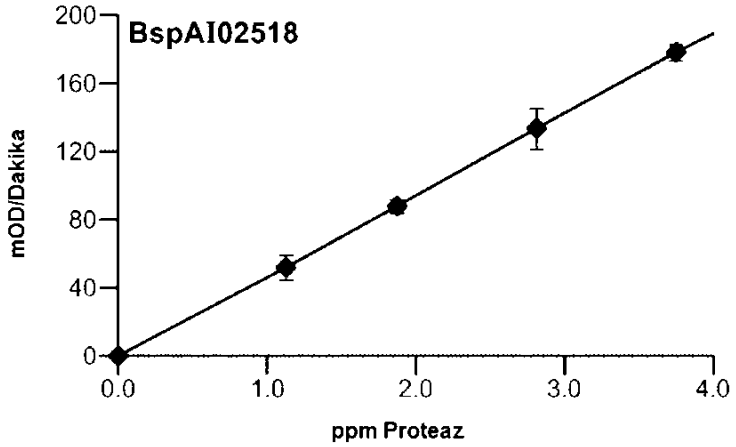
B. akibai/clarkii-kladı subtilisini-benzeri proteazların herhangi bir kristalografik yapısı yoktur. Bunun yerine, Şekil 15, DRN motifinin *B. akibai/clarkii*-kladı subtilisini benzeri proteazların performansındaki potansiyel önemini göstermek için bir destekleyici olarak *B. lentus* subtilisininin yapısını kullanır. Toplam ana zincir katlanmasının şematik temsili açık gri renkte gösterilir. Ayrıca, siyah çubuklar olarak, katalitik triad rezidüleri Asp32'nin, His62'nin ve Ser215'in yan zincirlerinin lokasyonu da gösterilir. DRN motifindeki rezidüler homolog pozisyonlarda *B. lentus* yapısı üzerinde modellenmiştir. Bu rezidülerin substrat bağlama rezidüleri 99-102'ye giren ve ayrıca substrat bağlama yerinin öndeki köşesini de oluşturan ve böylece substrat bağlamayı modüle etmek için bir pozisyona giren kıvrımı belirlediği görülebilir.



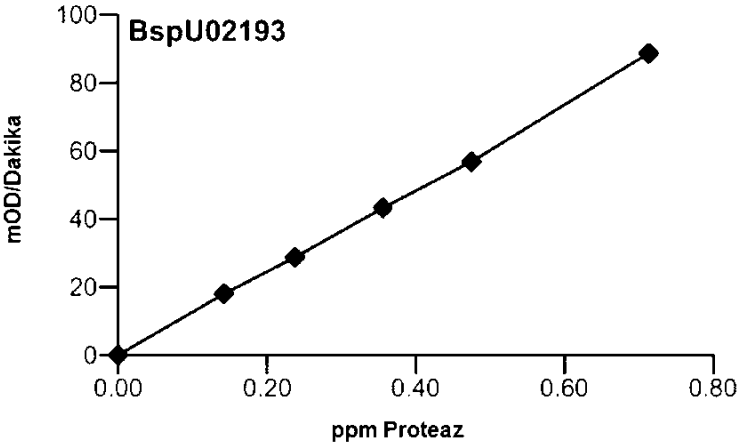
ŞEKİL 1



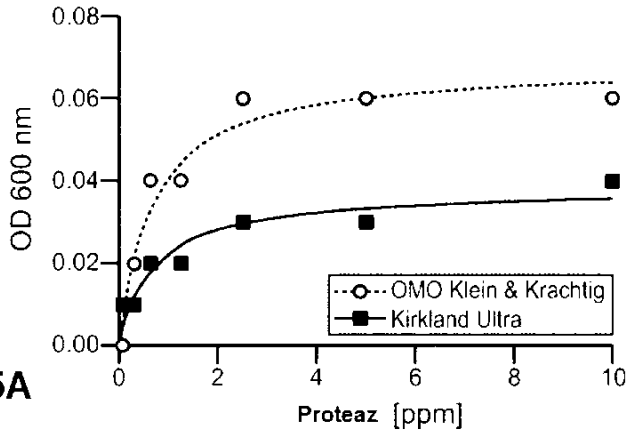
ŞEKİL 2



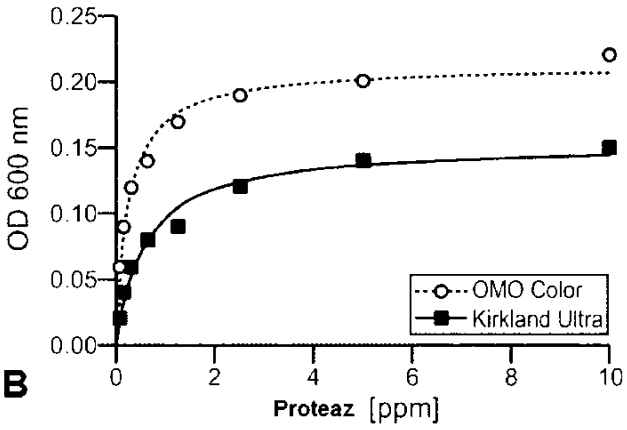
ŞEKİL 3



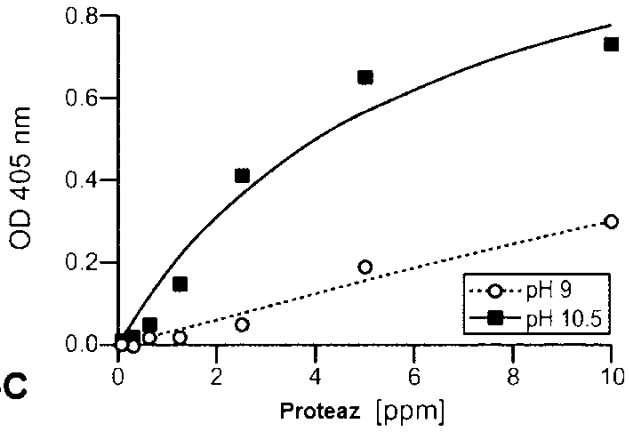
ŞEKİL 4



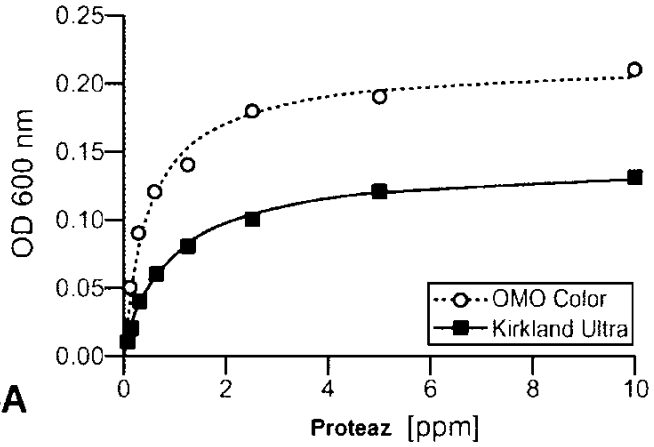
ŞEKİL 5A



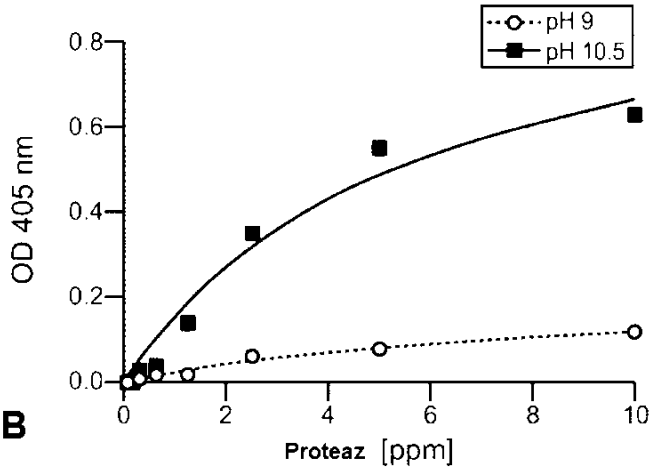
ŞEKİL 5B



ŞEKİL 5C

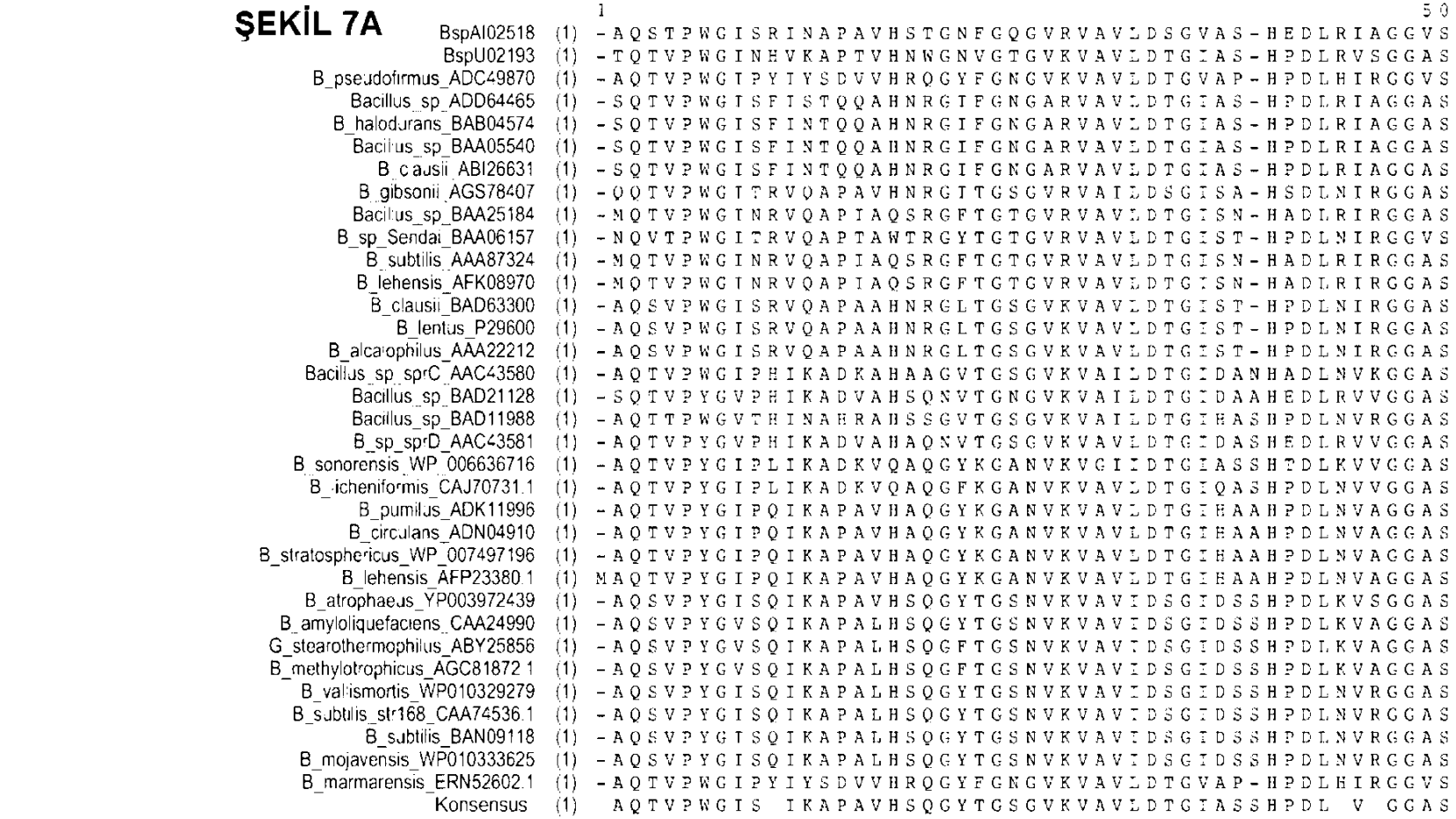


ŞEKİL 6A

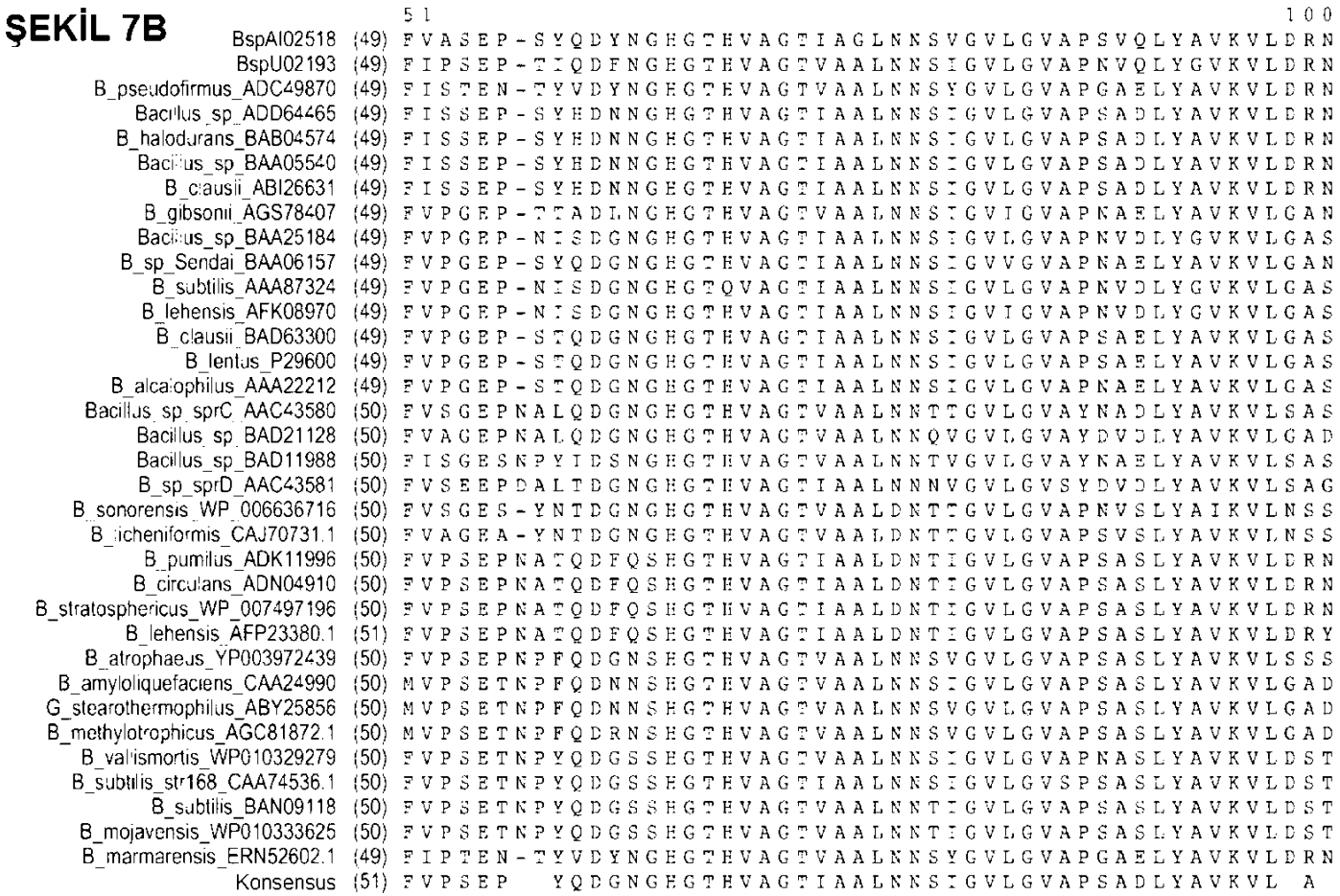


ŞEKİL 6B

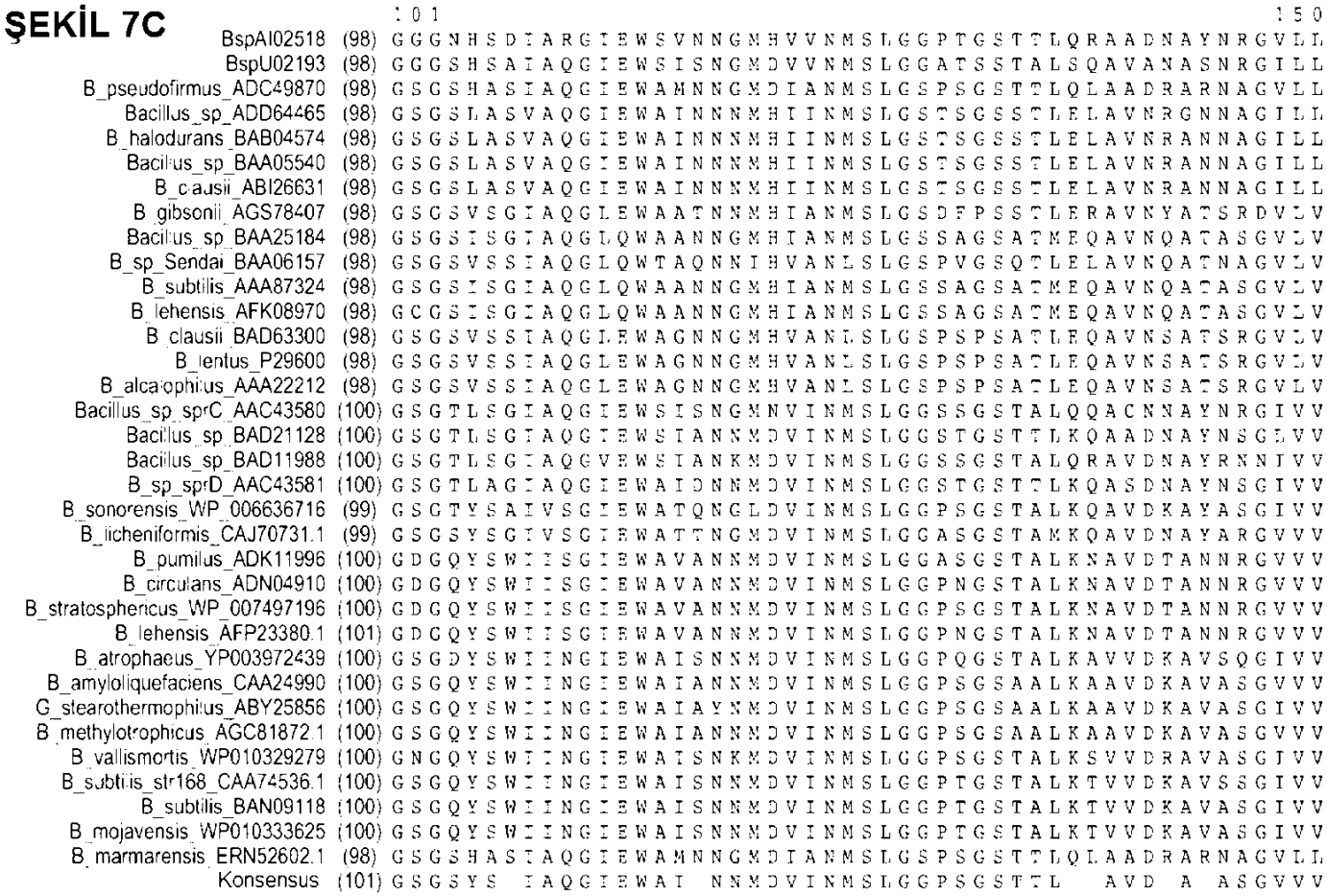
ŞEKİL 7A


1 50
BspAI02518 (1) -AQSTPWGISRINAPAVHSTGNFGQGVRVAVLDSGVAS-HEDLRIAGGVS
BspU02193 (1) -TQTVPWGINHVKAPTVHNWGNVGTGVKVAVLDTGIAS-HPDLRVSGGAS
B_pseudofirmus_ADC49870 (1) -AQTVPWGIPYIYSDVVHRQGYFGNGVKVAVLDTGVAP-HPDLHIRGGVS
Bacillus_sp_ADD64465 (1) -SQTVPWGISFISTQQAHNRGIFGNGARVAVLDTGIAS-HPDLRIAGGAS
B_halodurans_BAB04574 (1) -SQTVPWGISFINTQQAHNRGIFGNGARVAVLDTGIAS-HPDLRIAGGAS
Bacillus_sp_BAA05540 (1) -SQTVPWGISFINTQQAHNRGIFGNGARVAVLDTGIAS-HPDLRIAGGAS
B_clausii_ABI26631 (1) -SQTVPWGISFINTQQAHNRGIFGNGARVAVLDTGIAS-HPDLRIAGGAS
B_gibsonii_AGS78407 (1) -QQTVPWGITRVQAPAVHNRGITGSGVRVAILDSGISA-HSDLNIRGGAS
Bacillus_sp_BAA25184 (1) -MQTVPWGINRVQAPIAQSRGFTGTGVRVAVLDTGISN-HADLRIRGGAS
B_sp_Sendai_BAA06157 (1) -NQVTPWGITRVQAPTAWTRGYTGTGVRVAVLDTGIST-HPDLNIRGGVS
B_subtilis_AAA87324 (1) -MQTVPWGINRVQAPIAQSRGFTGTGVRVAVLDTGISN-HADLRIRGGAS
B_lehensis_AFK08970 (1) -MQTVPWGINRVQAPIAQSRGFTGTGVRVAVLDTGISN-HADLRIRGGAS
B_clausii_BAD63300 (1) -AQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTGSGVKVAVLDTGIST-HPDLNIRGGAS
B_lentus_P29600 (1) -AQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTGSGVKVAVLDTGIST-HPDLNIRGGAS
B_alcalophilus_AAA22212 (1) -AQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTGSGVKVAVLDTGIST-HPDLNIRGGAS
Bacillus_sp_sprC_AAC43580 (1) -AQTVPWGIPHIKADKAHAAGVTGSGVKVAILDTGIDANHADLNVKGGAS
Bacillus_sp_BAD21128 (1) -SQTVPYGVPHIKADVAHSQNVTGNGVKVAILDTGIDAAHEDLRVVGGAS
Bacillus_sp_BAD11988 (1) -AQTTPWGVTHINAHRAHSSGVTGSGVKVAILDTGIHASHPDLNVRGGAS
B_sp_sprD_AAC43581 (1) -AQTVPYGVPHIKADVAHAQNVTGSGVKVAVLDTGIDASHEDLRVVGGAS
B_sonorensis_WP_006636716 (1) -AQTVPYGIPLIKADKVQAQGYKGANVKVGIIDTGIASSHTDLKVVGGAS
B_licheniformis_CAJ70731.1 (1) -AQTVPYGIPLIKADKVQAQGFKGANVKVAVLDTGIQASHPDLNVVGGAS
B_pumilus_ADK11996 (1) -AQTVPYGIPQIKAPAVHAQGYKGANVKVAVLDTGIHAAHPDLNVAGGAS
B_circulans_ADN04910 (1) -AQTVPYGIPQIKAPAVHAQGYKGANVKVAVLDTGIHAAHPDLNVAGGAS
B_stratosphericus_WP_007497196 (1) -AQTVPYGIPQIKAPAVHAQGYKGANVKVAVLDTGIHAAHPDLNVAGGAS
B_lehensis_AFP23380.1 (1) MAQTVPYGIPQIKAPAVHAQGYKGANVKVAVLDTGIHAAHPDLNVAGGAS
B_atrophaeus_YP003972439 (1) -AQSVPYGISQIKAPAVHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLKVSGGAS
B_amyloliquefaciens_CAA24990 (1) -AQSVPYGVSQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLKVAGGAS
G_stearothermophilus_ABY25856 (1) -AQSVPYGVSQIKAPALHSQGFTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLKVAGGAS
B_methylotrophicus_AGC81872.1 (1) -AQSVPYGVSQIKAPALHSQGFTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLKVAGGAS
B_vallismortis_WP010329279 (1) -AQSVPYGISQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLNVRGGAS
B_subtilis_str168_CAA74536.1 (1) -AQSVPYGISQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLNVRGGAS
B_subtilis_BAN09118 (1) -AQSVPYGISQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLNVRGGAS
B_mojavensis_WP010333625 (1) -AQSVPYGISQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLNVRGGAS
B_marmarensis_ERN52602.1 (1) -AQTVPWGIPYIYSDVVHRQGYFGNGVKVAVLDTGVAP-HPDLHIRGGVS
Konsensus (1) AQTVPWGIS IKAPAVHSQGYTGSGVKVAVLDTGIASSHPDL V GGAS

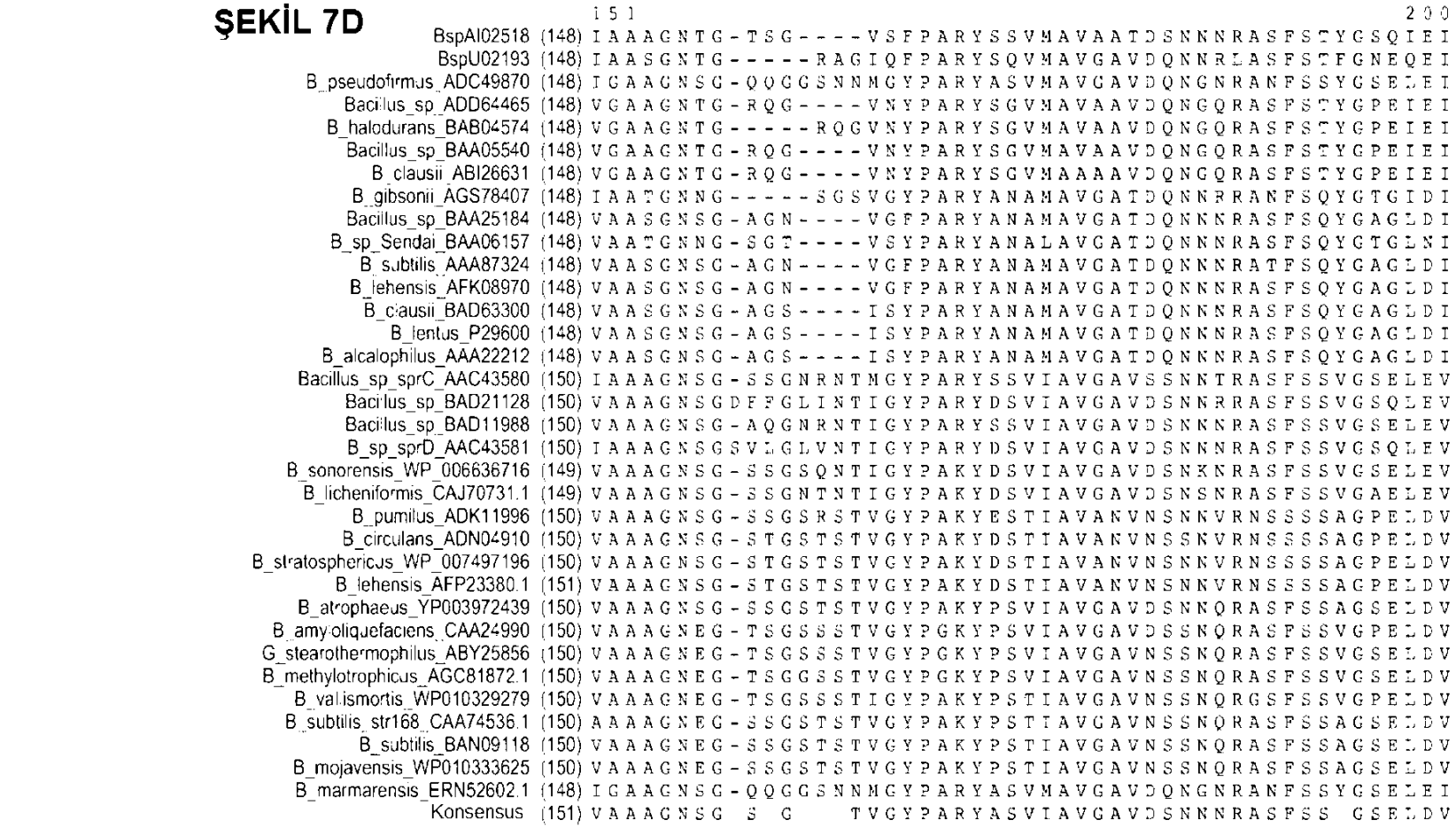
ŞEKİL 7B


51 100
BspAI02518 (49) FVASEP-SYQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSVGVLGVAPSVQLYAVKVLDRN
BspU02193 (49) FIPSEP-TIQDFNGHGTHVAGTVAALNNSIGVLGVAPNVQLYGVKVLDRN
B_pseudofirmus_ADC49870 (49) FISTEN-TYVDYNGHGTHVAGTVAALNNSYGVLGVAPGAELYAVKVLDRN
Bacillus_sp_ADD64465 (49) FISSEP-SYHDNNGHGTHVAGTIAALNNSIGVLGVAPSADLYAVKVLDRN
B_halodurans_BAB04574 (49) FISSEP-SYHDNNGHGTHVAGTIAALNNSIGVLGVAPSADLYAVKVLDRN
Bacillus_sp_BAA05540 (49) FISSEP-SYHDNNGHGTHVAGTIAALNNSIGVLGVAPSADLYAVKVLDRN
B_clausii_ABI26631 (49) FISSEP-SYHDNNGHGTHVAGTIAALNNSIGVLGVAPSADLYAVKVLDRN
B_gibsonii_AGS78407 (49) FVPGEP-TTADLNGHGTHVAGTVAALNNSIGVIGVAPNAELYAVKVLGAN
Bacillus_sp_BAA25184 (49) FVPGEP-NISDGNGHGTHVAGTIAALNNSIGVLGVAPNVDLYGVKVLGAS
B_sp_Sendai_BAA06157 (49) FVPGEP-SYQDGNGHGTHVAGTIAALNNSIGVVGVAPNAELYAVKVLGAN
B_subtilis_AAA87324 (49) FVPGEP-NISDGNGHGTQVAGTIAALNNSIGVLGVAPNVDLYGVKVLGAS
B_lehensis_AFK08970 (49) FVPGEP-NISDGNGHGTHVAGTIAALNNSIGVIGVAPNVDLYGVKVLGAS
B_clausii_BAD63300 (49) FVPGEP-STQDGNGHGTHVAGTIAALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVLGAS
B_lentus_P29600 (49) FVPGEP-STQDGNGHGTHVAGTIAALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVLGAS
B_alcalophilus_AAA22212 (49) FVPGEP-STQDGNGHGTHVAGTIAALNNSIGVLGVAPNAELYAVKVLGAS
Bacillus_sp_sprC_AAC43580 (50) FVSGEPNALQDGNGHGTHVAGTVAALNNTTGVLGVAYNADLYAVKVLSAS
Bacillus_sp_BAD21128 (50) FVAGEPNALQDGNGHGTHVAGTVAALNNQVGVLGVAYDVDLYAVKVLGAD
Bacillus_sp_BAD11988 (50) FISGESNPYIDSNGHGTHVAGTVAALNNTVGVLGVAYNAELYAVKVLSAS
B_sp_sprD_AAC43581 (50) FVSEEPDALTDGNGHGTHVAGTIAALNNNVGVLGVSYDVDLYAVKVLSAG
B_sonorensis_WP_006636716 (50) FVSGES-YNTDGNGHGTHVAGTVAALDNTTGVLGVAPNVSLYAIKVLNSS
B_licheniformis_CAJ70731.1 (50) FVAGEA-YNTDGNGHGTHVAGTVAALDNTTGVLGVAPSVSLYAVKVLNSS
B_pumilus_ADK11996 (50) FVPSEPNATQDFQSHGTHVAGTIAALDNTIGVLGVAPSASLYAVKVLDRN
B_circulans_ADN04910 (50) FVPSEPNATQDFQSHGTHVAGTIAALDNTIGVLGVAPSASLYAVKVLDRN
B_stratosphericus_WP_007497196 (50) FVPSEPNATQDFQSHGTHVAGTIAALDNTIGVLGVAPSASLYAVKVLDRN
B_lehensis_AFP23380.1 (51) FVPSEPNATQDFQSHGTHVAGTIAALDNTIGVLGVAPSASLYAVKVLDRY
B_atrophaeus_YP003972439 (50) FVPSEPNPFQDGNSHGTHVAGTVAALNNSVGVLGVAPSASLYAVKVLSSS
B_amyloliquefaciens_CAA24990 (50) MVPSETNPFQDNNSHGTHVAGTVAALNNSIGVLGVAPSASLYAVKVLGAD
G_stearothermophilus_ABY25856 (50) MVPSETNPFQDNNSHGTHVAGTVAALNNSVGVLGVAPSASLYAVKVLGAD
B_methylotrophicus_AGC81872.1 (50) MVPSETNPFQDRNSHGTHVAGTVAALNNSVGVLGVAPSASLYAVKVLGAD
B_vallismortis_WP010329279 (50) FVPSETNPYQDGSSHGTHVAGTVAALNNSIGVLGVAPNASLYAVKVLDST
B_subtilis_str168_CAA74536.1 (50) FVPSETNPYQDGSSHGTHVAGTIAALNNSIGVLGVSPSASLYAVKVLDST
B_subtilis_BAN09118 (50) FVPSETNPYQDGSSHGTHVAGTVAALNNTIGVLGVAPSASLYAVKVLDST
B_mojavensis_WP010333625 (50) FVPSETNPYQDGSSHGTHVAGTVAALNNTIGVLGVAPSASLYAVKVLDST
B_marmarensis_ERN52602.1 (49) FIPTEN-TYVDYNGHGTHVAGTVAALNNSYGVLGVAPGAELYAVKVLDRN
Konsensus (51) FVPSEP YQDGNGHGTHVAGTIAALNNSIGVLGVAPSADLYAVKVL A

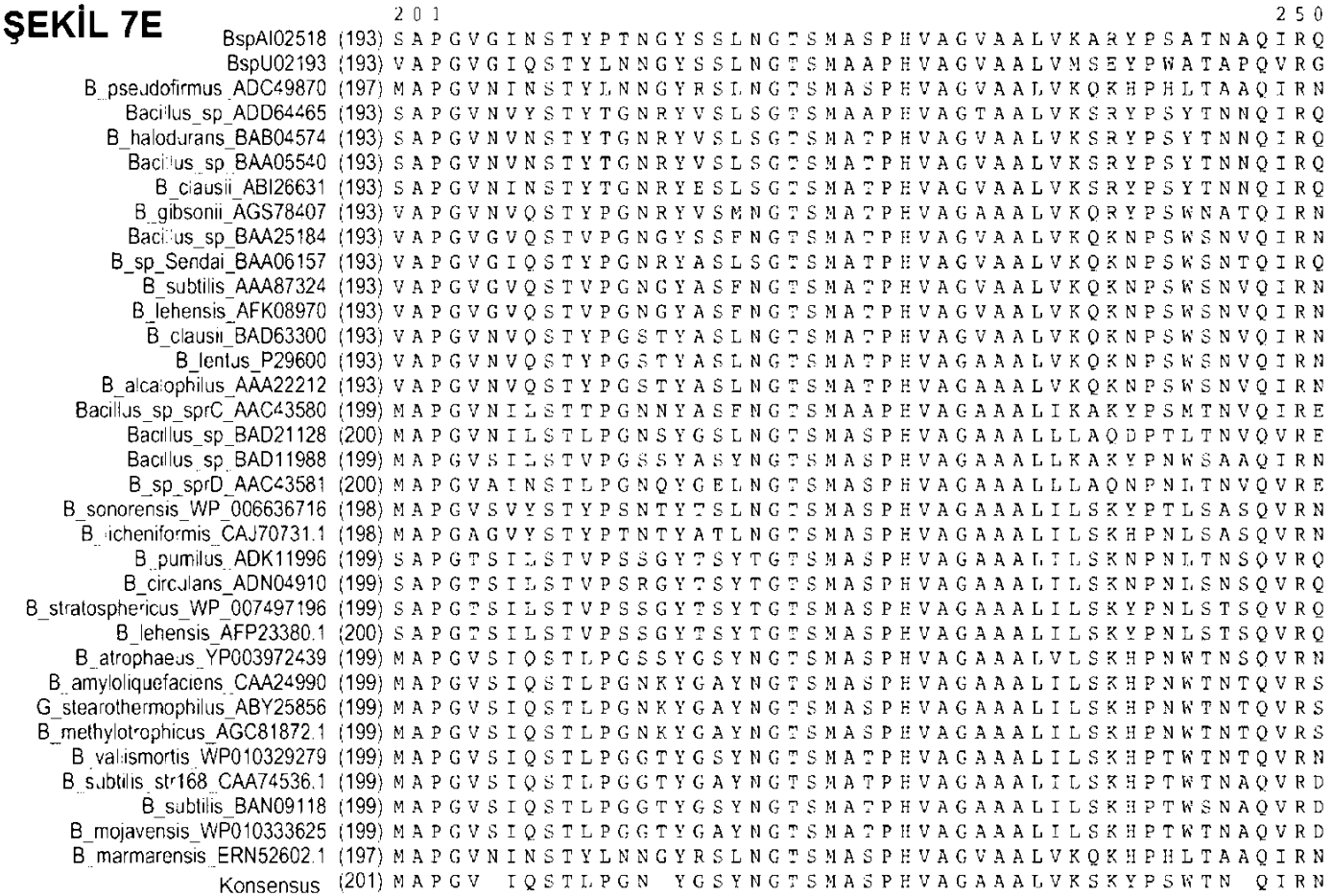
ŞEKİL 7C


101
150
BspAI02518 (98) GGGNHSDIARGIEWSVNNGMHVVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLL
BspU02193 (98) GGGSHSAIAQGIEWSISNGMDVVNMSLGGATSSTALSQAVANASNRGILL
B_pseudofirmus_ADC49870 (98) GSGSHASIAQGIEWAMNNGMDIANMSLGSPSGSTTLQLAADRARNAGVLL
Bacillus_sp_ADD64465 (98) GSGSLASVAQGIEWAINNNMHIINMSLGSTSGSSTLELAVNRGNNAGILL
B_halodurans_BAB04574 (98) GSGSLASVAQGIEWAINNNMHIINMSLGSTSGSSTLELAVNRANNAGILL
Bacillus_sp_BAA05540 (98) GSGSLASVAQGIEWAINNNMHIINMSLGSTSGSSTLELAVNRANNAGILL
B_clausii_ABI26631 (98) GSGSLASVAQGIEWAINNNMHIINMSLGSTSGSSTLELAVNRANNAGILL
B_gibsonii_AGS78407 (98) GSGSVSGIAQGLEWAATNNMHIANMSLGSDFPSSTLERAVNYATSRDVLV
Bacillus_sp_BAA25184 (98) GSGSISGIAQGLQWAANNGMHIANMSLGSSAGSATMEQAVNQATASGVLV
B_sp_Sendai_BAA06157 (98) GSGSVSSIAQGLQWTAQNNIHVANLSLGSPVGSQTLELAVNQATNAGVLV
B_subtilis_AAA87324 (98) GSGSISGIAQGLQWAANNGMHIANMSLGSSAGSATMEQAVNQATASGVLV
B_lehensis_AFK08970 (98) GCGSISGIAQGLQWAANNGMHIANMSLGSSAGSATMEQAVNQATASGVLV
B_clausii_BAD63300 (98) GSGSVSSIAQGLEWAGNNGMHVANLSLGSPSPSATLEQAVNSATSRGVLV
B_lentus_P29600 (98) GSGSVSSIAQGLEWAGNNGMHVANLSLGSPSPSATLEQAVNSATSRGVLV
B_alcalophilus_AAA22212 (98) GSGSVSSIAQGLEWAGNNGMHVANLSLGSPSPSATLEQAVNSATSRGVLV
Bacillus_sp_sprC_AAC43580 (100) GSGTLSGIAQGIEWSISNGMNVINMSLGGSSGSTALQQACNNAYNRGIVV
Bacillus_sp_BAD21128 (100) GSGTLSGIAQGIEWSIANNMDVINMSLGGSTGSTTLKQAADNAYNSGLVV
Bacillus_sp_BAD11988 (100) GSGTLSGIAQGVEWSIANKMDVINMSLGGSSGSTALQRAVDNAYRNNIVV
B_sp_sprD_AAC43581 (100) GSGTLAGIAQGIEWAIDNNMDVINMSLGGSTGSTTLKQASDNAYNSGIVV
B_sonorensis_WP_006636716 (99) GSGTYSAIVSGIEWATQNGLDVINMSLGGPSGSTALKQAVDKAYASGIVV
B_licheniformis_CAJ70731.1 (99) GSGSYSGIVSGIEWATTNGMDVINMSLGGASGSTAMKQAVDNAYARGVVV
B_pumilus_ADK11996 (100) GDGQYSWIISGIEWAVANNMDVINMSLGGASGSTALKNAVDTANNRGVVV
B_circulans_ADN04910 (100) GDGQYSWIISGIEWAVANNMDVINMSLGGPNGSTALKNAVDTANNRGVVV
B_stratosphericus_WP_007497196 (100) GDGQYSWIISGIEWAVANNMDVINMSLGGPSGSTALKNAVDTANNRGVVV
B_lehensis_AFP23380.1 (101) GDGQYSWIISGIEWAVANNMDVINMSLGGPNGSTALKNAVDTANNRGVVV
B_atrophaeus_YP003972439 (100) GSGDYSWIINGIEWAISNNMDVINMSLGGPQGSTALKAVVDKAVSQGIVV
B_amyloliquefaciens_CAA24990 (100) GSGQYSWIINGIEWAIANNMDVINMSLGGPSGSAALKAAVDKAVASGVVV
G_stearothermophilus_ABY25856 (100) GSGQYSWIINGIEWAIAYNMDVINMSLGGPSGSAALKAAVDKAVASGIVV
B_methylotrophicus_AGC81872.1 (100) GSGQYSWIINGIEWAIANNMDVINMSLGGPSGSAALKAAVDKAVASGVVV
B_vallismortis_WP010329279 (100) GNGQYSWIINGIEWATSNKMDVINMSLGGPSGSTALKSVVDRAVASGIVV
B_subtilis_str168_CAA74536.1 (100) GSGQYSWIINGIEWAISNNMDVINMSLGGPTGSTALKTVVDKAVSSGIVV
B_subtilis_BAN09118 (100) GSGQYSWIINGIEWAISNNMDVINMSLGGPTGSTALKTVVDKAVASGIVV
B_mojavensis_WP010333625 (100) GSGQYSWIINGIEWAISNNMDVINMSLGGPTGSTALKTVVDKAVASGIVV
B_marmarensis_ERN52602.1 (98) GSGSHASIAQGIEWAMNNGMDIANMSLGSPSGSTTLQLAADRARNAGVLL
Konsensus (101) GSGSYS IAQGIEWAI NNMDVINMSLGGPSGSTTL AVD A ASGVVV

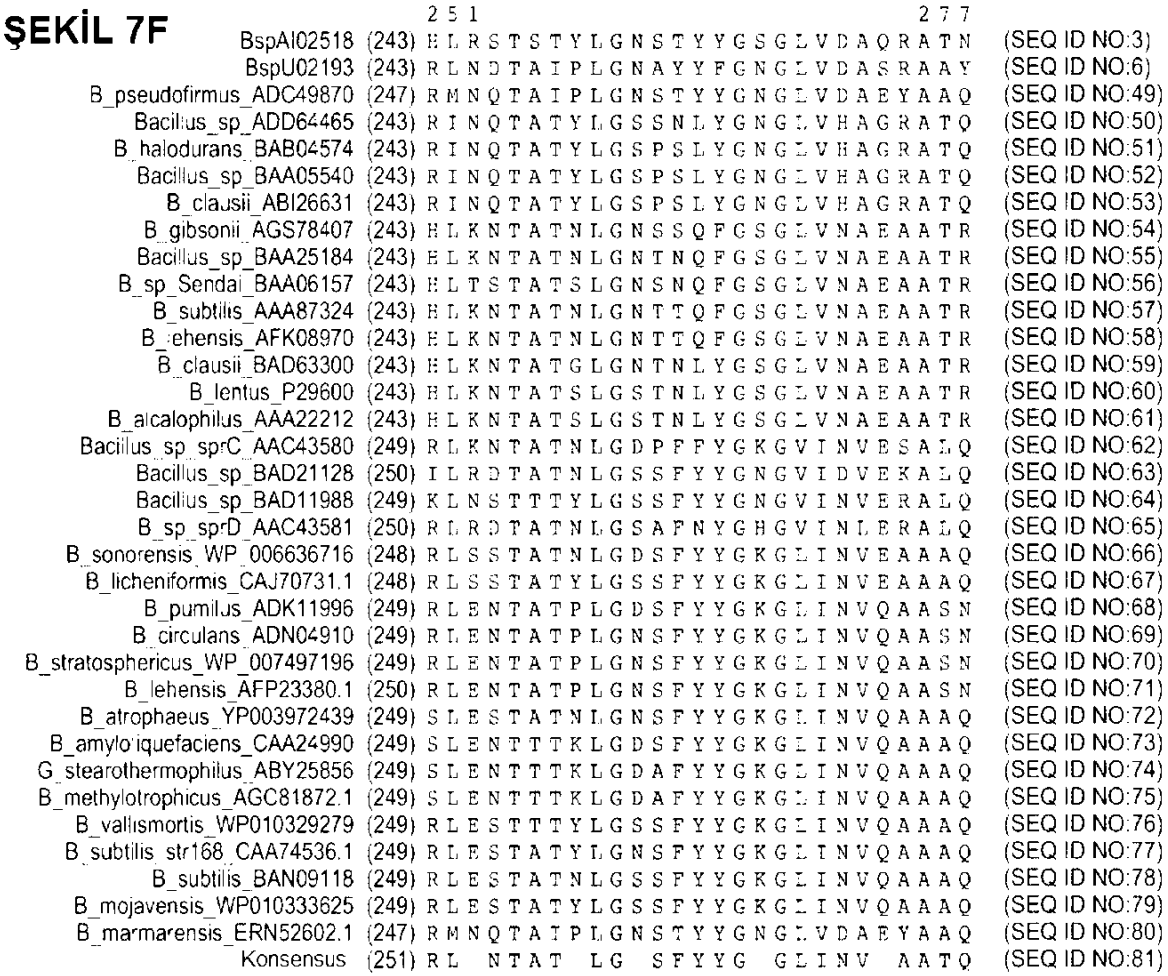
ŞEKİL 7D

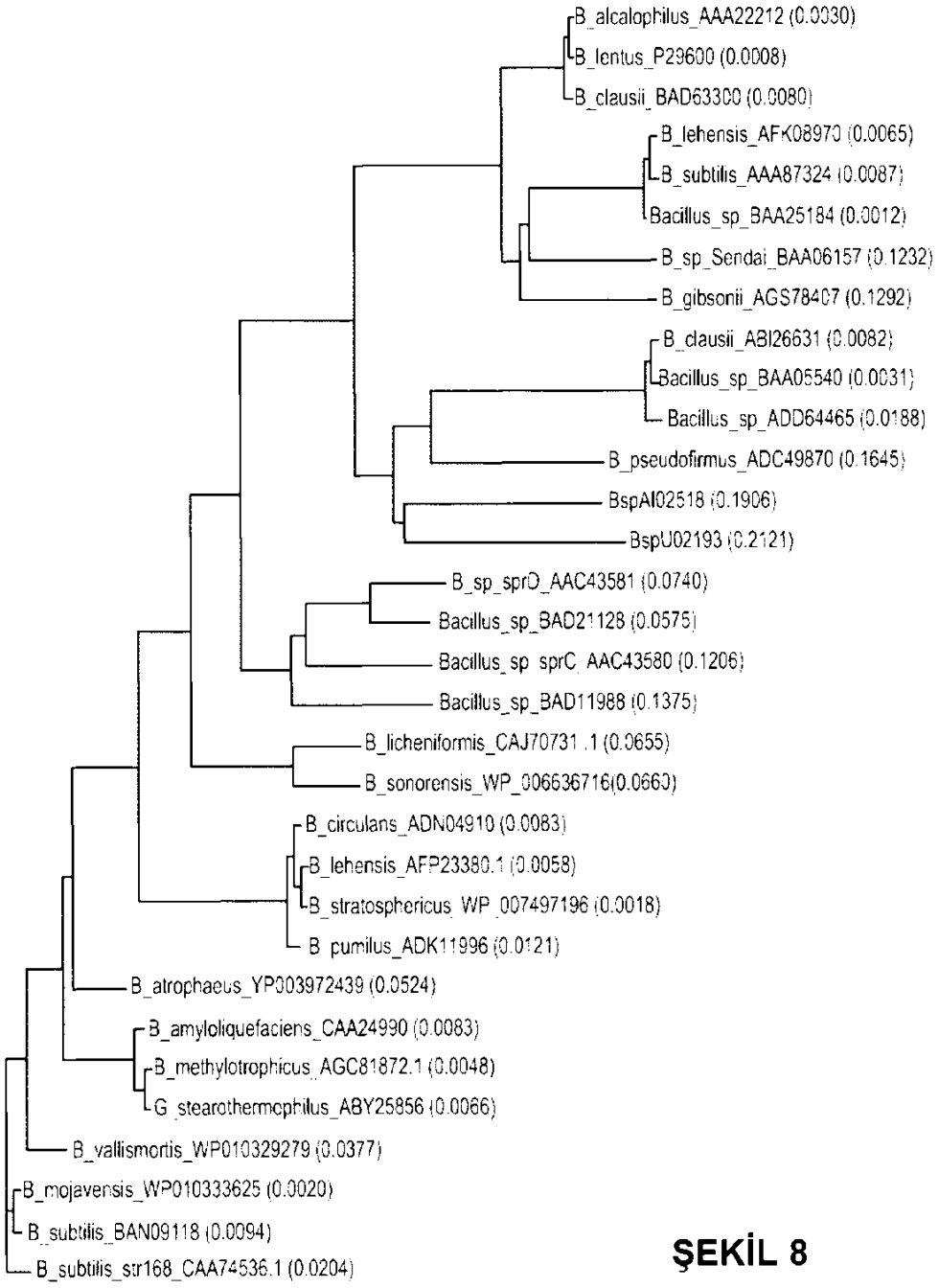

151 200
BspAI02518 (148) IAAAGNTG-TSG----VSFPARYSSVMAVAATDSNNNRASFSTYGSQIEI
BspU02193 (148) IAASGNTG-----RAGIQFPARYSQVMAVGAVDQNNRLASFSTFGNEQEI
B_pseudofirmus_ADC49870 (148) IGAAGNSG-QQGGSNNMGYPARYASVMAVGAVDQNGNRANFSSYGSELEI
Bacillus_sp_ADD64465 (148) VGAAGNTG-RQG----VNYPARYSGVMAVAAVDQNGQRASFSTYGPEIEI
B_halodurans_BAB04574 (148) VGAAGNTG-----RQGVNYPARYSGVMAVAAVDQNGQRASFSTYGPEIEI
Bacillus_sp_BAA05540 (148) VGAAGNTG-RQG----VNYPARYSGVMAVAAVDQNGQRASFSTYGPEIEI
B_clausii_ABI26631 (148) VGAAGNTG-RQG----VNYPARYSGVMAAAAVDQNGQRASFSTYGPEIEI
B_gibsonii_AGS78407 (148) IAATGNNG-----SGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYGTGIDI
Bacillus_sp_BAA25184 (148) VAASGNSG-AGN----VGFPARYANAMAVGATDQNNNRASFSQYGAGLDI
B_sp_Sendai_BAA06157 (148) VAATGNNG-SGT----VSYPARYANALAVGATDQNNNRASFSQYGTGLNI
B_subtilis_AAA87324 (148) VAASGNSG-AGN----VGFPARYANAMAVGATDQNNNRATFSQYGAGLDI
B_lehensis_AFK08970 (148) VAASGNSG-AGN----VGFPARYANAMAVGATDQNNNRASFSQYGAGLDI
B_clausii_BAD63300 (148) VAASGNSG-AGS----ISYPARYANAMAVGATDQNNNRASFSQYGAGLDI
B_lentus_P29600 (148) VAASGNSG-AGS----ISYPARYANAMAVGATDQNNNRASFSQYGAGLDI
B_alcalophilus_AAA22212 (148) VAASGNSG-AGS----ISYPARYANAMAVGATDQNNNRASFSQYGAGLDI
Bacillus_sp_sprC_AAC43580 (150) IAAAGNSG-SSGNRNTMGYPARYSSVIAVGAVSSNNTRASFSSVGSELEV
Bacillus_sp_BAD21128 (150) VAAAGNSGDFFGLINTIGYPARYDSVIAVGAVDSNNRRASFSSVGSQLEV
Bacillus_sp_BAD11988 (150) VAAAGNSG-AQGNRNTIGYPARYSSVIAVGAVDSNNNRASFSSVGSELEV
B_sp_sprD_AAC43581 (150) IAAAGNSGSVLGLVNTIGYPARYDSVIAVGAVDSNNNRASFSSVGSQLEV
B_sonorensis_WP_006636716 (149) VAAAGNSG-SSGSQNTIGYPAKYDSVIAVGAVDSNKNRASFSSVGSELEV
B_licheniformis_CAJ70731.1 (149) VAAAGNSG-SSGNTNTIGYPAKYDSVIAVGAVDSNSNRASFSSVGAELEV
B_pumilus_ADK11996 (150) VAAAGNSG-SSGSRSTVGYPAKYESTIAVANVNSNNVRNSSSSAGPELDV
B_circulans_ADN04910 (150) VAAAGNSG-STGSTSTVGYPAKYDSTIAVANVNSSNVRNSSSSAGPELDV
B_stratosphericus_WP_007497196 (150) VAAAGNSG-STGSTSTVGYPAKYDSTIAVANVNSNNVRNSSSSAGPELDV
B_lehensis_AFP23380.1 (151) VAAAGNSG-STGSTSTVGYPAKYDSTIAVANVNSNNVRNSSSSAGPELDV
B_atrophaeus_YP003972439 (150) VAAAGNSG-SSGSTSTVGYPAKYPSVIAVGAVDSNNQRASFSSAGSELDV
B_amyloliquefaciens_CAA24990 (150) VAAAGNEG-TSGSSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSSNQRASFSSVGPELDV
G_stearothermophilus_ABY25856 (150) VAAAGNEG-TSGSSSTVGYPGKYPSVIAVGAVNSSNQRASFSSVGSELDV
B_methylotrophicus_AGC81872.1 (150) VAAAGNEG-TSGGSSTVGYPGKYPSVIAVGAVNSSNQRASFSSVGSELDV
B_vallismortis_WP010329279 (150) VAAAGNEG-TSGSSSTIGYPAKYPSTIAVGAVNSSNQRGSFSSVGPELDV
B_subtilis_str168_CAA74536.1 (150) AAAAGNEG-SSGSTSTVGYPAKYPSTIAVGAVNSSNQRASFSSAGSELDV
B_subtilis_BAN09118 (150) VAAAGNEG-SSGSTSTVGYPAKYPSTIAVGAVNSSNQRASFSSAGSELDV
B_mojavensis_WP010333625 (150) VAAAGNEG-SSGSTSTVGYPAKYPSTIAVGAVNSSNQRASFSSAGSELDV
B_marmarensis_ERN52602.1 (148) IGAAGNSG-QQGGSNNMGYPARYASVMAVGAVDQNGNRANFSSYGSELEI
Konsensus (151) VAAAGNSG S G TVGYPARYASVIAVGAVDSNNNRASFSS GSELDV

ŞEKİL 7E


201 250
BspAI02518 (193) SAPGVGINSTYPTNGYSSLNGTSMASPHVAGVAALVKARYPSATNAQIRQ
BspU02193 (193) VAPGVGIQSTYLNNGYSSLNGTSMAAPHVAGVAALVMSEYPWATAPQVRG
B_pseudofirmus_ADC49870 (197) MAPGVNINSTYLNNGYRSLNGTSMASPHVAGVAALVKQKHPHLTAAQIRN
Bacillus_sp_ADD64465 (193) SAPGVNVYSTYTGNRYVSLSGTSMAAPHVAGTAALVKSRYPSYTNNQIRQ
B_halodurans_BAB04574 (193) SAPGVNVNSTYTGNRYVSLSGTSMATPHVAGVAALVKSRYPSYTNNQIRQ
Bacillus_sp_BAA05540 (193) SAPGVNVNSTYTGNRYVSLSGTSMATPHVAGVAALVKSRYPSYTNNQIRQ
B_clausii_ABI26631 (193) SAPGVNINSTYTGNRYESLSGTSMATPHVAGVAALVKSRYPSYTNNQIRQ
B_gibsonii_AGS78407 (193) VAPGVNVQSTYPGNRYVSMNGTSMATPHVAGAAALVKQRYPSWNATQIRN
Bacillus_sp_BAA25184 (193) VAPGVGVQSTVPGNGYSSFNGTSMATPHVAGVAALVKQKNPSWSNVQIRN
B_sp_Sendai_BAA06157 (193) VAPGVGIQSTYPGNRYASLSGTSMATPHVAGVAALVKQKNPSWSNTQIRQ
B_subtilis_AAA87324 (193) VAPGVGVQSTVPGNGYASFNGTSMATPHVAGVAALVKQKNPSWSNVQIRN
B_lehensis_AFK08970 (193) VAPGVGVQSTVPGNGYASFNGTSMATPHVAGVAALVKQKNPSWSNVQIRN
B_clausii_BAD63300 (193) VAPGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGVAALVKQKNPSWSNVQIRN
B_lentus_P29600 (193) VAPGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGAAALVKQKNPSWSNVQIRN
B_alcalophilus_AAA22212 (193) VAPGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGAAALVKQKNPSWSNVQIRN
Bacillus_sp_sprC_AAC43580 (199) MAPGVNILSTTPGNNYASFNGTSMAAPHVAGAAALIKAKYPSMTNVQIRE
Bacillus_sp_BAD21128 (200) MAPGVNILSTLPGNSYGSLNGTSMASPHVAGAAALLLAQDPTLTNVQVRE
Bacillus_sp_BAD11988 (199) MAPGVSILSTVPGSSYASYNGTSMASPHVAGAAALLKAKYPNWSAAQIRN
B_sp_sprD_AAC43581 (200) MAPGVAINSTLPGNQYGELNGTSMASPHVAGAAALLLAQNPNLTNVQVRE
B_sonorensis_WP_006636716 (198) MAPGVSVYSTYPSNTYTSLNGTSMASPHVAGAAALILSKYPTLSASQVRN
B_licheniformis_CAJ70731.1 (198) MAPGAGVYSTYPTNTYATLNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNLSASQVRN
B_pumilus_ADK11996 (199) SAPGTSILSTVPSSGYTSYTGTSMASPHVAGAAALILSKNPNLTNSQVRQ
B_circulans_ADN04910 (199) SAPGTSILSTVPSRGYTSYTGTSMASPHVAGAAALILSKNPNLSNSQVRQ
B_stratosphericus_WP_007497196 (199) SAPGTSILSTVPSSGYTSYTGTSMASPHVAGAAALILSKYPNLSTSQVRQ
B_lehensis_AFP23380.1 (200) SAPGTSILSTVPSSGYTSYTGTSMASPHVAGAAALILSKYPNLSTSQVRQ
B_atrophaeus_YP003972439 (199) MAPGVSIQSTLPGSSYGSYNGTSMASPHVAGAAALVLSKHPNWTNSQVRN
B_amyloliquefaciens_CAA24990 (199) MAPGVSIQSTLPGNKYGAYNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNWTNTQVRS
G_stearothermophilus_ABY25856 (199) MAPGVSIQSTLPGNKYGAYNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNWTNTQVRS
B_methylotrophicus_AGC81872.1 (199) MAPGVSIQSTLPGNKYGAYNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNWTNTQVRS
B_vallismortis_WP010329279 (199) MAPGVSIQSTLPGGTYGSYNGTSMATPHVAGAAALILSKHPTWTNTQVRN
B_subtilis_str168_CAA74536.1 (199) MAPGVSIQSTLPGGTYGAYNGTSMATPHVAGAAALILSKHPTWTNAQVRD
B_subtilis_BAN09118 (199) MAPGVSIQSTLPGGTYGSYNGTSMATPHVAGAAALILSKHPTWSNAQVRD
B_mojavensis_WP010333625 (199) MAPGVSIQSTLPGGTYGAYNGTSMATPHVAGAAALILSKHPTWTNAQVRD
B_marmarensis_ERN52602.1 (197) MAPGVNINSTYLNNGYRSLNGTSMASPHVAGVAALVKQKHPHLTAAQIRN
Konsensus (201) MAPGV IQSTLPGN YGSYNGTSMASPHVAGAAALVKSKYPSWTN QIRN

ŞEKİL 7F


251 277
BspAI02518 (243) HLRSTSTYLGNSTYYGSGLVDAQRATN (SEQ ID NO:3)
BspU02193 (243) RLNDTAIPLGNAYYFGNGLVDASRAAY (SEQ ID NO:6)
B_pseudofirmus_ADC49870 (247) RMNQTAIPLGNSTYYGNGLVDAEYAAQ (SEQ ID NO:49)
Bacillus_sp_ADD64465 (243) RINQTATYLGSSNLYGNGLVHAGRATQ (SEQ ID NO:50)
B_halodurans_BAB04574 (243) RINQTATYLGSPSLYGNGLVHAGRATQ (SEQ ID NO:51)
Bacillus_sp_BAA05540 (243) RINQTATYLGSPSLYGNGLVHAGRATQ (SEQ ID NO:52)
B_clausii_ABI26631 (243) RINQTATYLGSPSLYGNGLVHAGRATQ (SEQ ID NO:53)
B_gibsonii_AGS78407 (243) HLKNTATNLGNSSQFGSGLVNAEAATR (SEQ ID NO:54)
Bacillus_sp_BAA25184 (243) HLKNTATNLGNTNQFGSGLVNAEAATR (SEQ ID NO:55)
B_sp_Sendai_BAA06157 (243) HLTSTATSLGNSNQFGSGLVNAEAATR (SEQ ID NO:56)
B_subtilis_AAA87324 (243) HLKNTATNLGNTTQFGSGLVNAEAATR (SEQ ID NO:57)
B_ehensis_AFK08970 (243) HLKNTATNLGNTTQFGSGLVNAEAATR (SEQ ID NO:58)
B_clausii_BAD63300 (243) HLKNTATGLGNTNLYGSGLVNAEAATR (SEQ ID NO:59)
B_lentus_P29600 (243) HLKNTATSLGSTNLYGSGLVNAEAATR (SEQ ID NO:60)
B_alcalophilus_AAA22212 (243) HLKNTATSLGSTNLYGSGLVNAEAATR (SEQ ID NO:61)
Bacillus_sp_sprC_AAC43580 (249) RLKNTATNLGDPFFYGKGVINVESALQ (SEQ ID NO:62)
Bacillus_sp_BAD21128 (250) ILRDTATNLGSSFYYGNGVIDVEKALQ (SEQ ID NO:63)
Bacillus_sp_BAD11988 (249) KLNSTTTYLGSSFYYGNGVINVERALQ (SEQ ID NO:64)
B_sp_sprD_AAC43581 (250) RLRDTATNLGSAFNYGHGVINLERALQ (SEQ ID NO:65)
B_sonorensis_WP_006636716 (248) RLSSTATNLGDSFYYGKGLINVEAAAQ (SEQ ID NO:66)
B_licheniformis_CAJ70731.1 (248) RLSSTATYLGSSFYYGKGLINVEAAAQ (SEQ ID NO:67)
B_pumilus_ADK11996 (249) RLENTATPLGDSFYYGKGLINVQAASN (SEQ ID NO:68)
B_circulans_ADN04910 (249) RLENTATPLGNSFYYGKGLINVQAASN (SEQ ID NO:69)
B_stratosphericus_WP_007497196 (249) RLENTATPLGNSFYYGKGLINVQAASN (SEQ ID NO:70)
B_lehensis_AFP23380.1 (250) RLENTATPLGNSFYYGKGLINVQAASN (SEQ ID NO:71)
B_atrophaeus_YP003972439 (249) SLESTATNLGNSFYYGKGLINVQAAAQ (SEQ ID NO:72)
B_amyloliquefaciens_CAA24990 (249) SLENTTTKLGDSFYYGKGLINVQAAAQ (SEQ ID NO:73)
G_stearothermophilus_ABY25856 (249) SLENTTTKLGDAFYYGKGLINVQAAAQ (SEQ ID NO:74)
B_methylotrophicus_AGC81872.1 (249) SLENTTTKLGDAFYYGKGLINVQAAAQ (SEQ ID NO:75)
B_vallismortis_WP010329279 (249) RLESTTTYLGSSFYYGKGLINVQAAAQ (SEQ ID NO:76)
B_subtilis_str168_CAA74536.1 (249) RLESTATYLGNSFYYGKGLINVQAAAQ (SEQ ID NO:77)
B_subtilis_BAN09118 (249) RLESTATNLGSSFYYGKGLINVQAAAQ (SEQ ID NO:78)
B_mojavensis_WP010333625 (249) RLESTATYLGSSFYYGKGLINVQAAAQ (SEQ ID NO:79)
B_marmarensis_ERN52602.1 (247) RMNQTAIPLGNSTYYGNGLVDAEYAAQ (SEQ ID NO:80)
Konsensus (251) RL NTAT LG SFYYG GLINV AATQ (SEQ ID NO:81)


B_alcalophilus_AAA22212 (0.0030)
B_lentus_P29600 (0.0008)
B_clausii_BAD63300 (0.0080)
B_lehensis_AFK08970 (0.0065)
B_subtilis_AAA87324 (0.0087)
Bacillus_sp_BAA25184 (0.0012)
B_sp_Sendai_BAA06157 (0.1232)
B_gibsonii_AGS78407 (0.1292)
B_clausii_ABI26631 (0.0082)
Bacillus_sp_BAA05540 (0.0031)
Bacillus_sp_ADD64465 (0.0188)
B_pseudofirmus_ADC49870 (0.1645)
BspAI02518 (0.1906)
BspU02193 (0.2121)
B_sp_sprD_AAC43581 (0.0740)
Bacillus_sp_BAD21128 (0.0575)
Bacillus_sp_sprC_AAC43580 (0.1206)
Bacillus_sp_BAD11988 (0.1375)
B_licheniformis_CAJ70731.1 (0.0655)
B_sonorensis_WP_006636716(0.0660)
B_circulans_ADN04910 (0.0083)
B_lehensis_AFP23380.1 (0.0058)
B_stratosphericus_WP_007497196 (0.0018)
B_pumilus_ADK11996 (0.0121)
B_atrophaeus_YP003972439 (0.0524)
B_amyloliquefaciens_CAA24990 (0.0083)
B_methylotrophicus_AGC81872.1 (0.0048)
G_stearothermophilus_A8Y25856 (0.0066)
B_vallismortis_WP010329279 (0.0377)
B_mojavensis_WP010333625 (0.0020)
B_subtilis_BAN09118 (0.0094)
B_subtilis_str168_CAA74536.1 (0.0204)

ŞEKİL 8

```
                                    1                                                 50
SWT66_254731                        SQTVPWGINRVQAPTVHSWGARGNGVRVAVLDTGI-ASHEDLRISGGASF
Bcl04009                            SQTIPWGINRVQAPTVHSWGARGNGVRVAVLDTGI-ASHEDLRISGGASF
Bakn00315                           SQTVPWGINHIQAPTVHSWGNRGNGVRVAVLDSGV-ASHEDLRISGGRSF
BspAl02518                          AQSTPWGISRINAPAVHSTGNFGQGVRVAVLDSGV-ASHEDLRIAGGVSF
BspU02193                           TQTVPWGINHVKAPTVHNWGNVGTGVKVAVLDTGI-ASHPDLRVSGGASF
B_pseudofirmus_ADC49870             AQTVPWGIPYIYSDVVHRQGYFGNGVKVAVLDTGV-APHPDLHIRGGVSF
B_lentus_P29600                     AQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTGSGVKVAVLDTGI-STHPDLNIRGGASF
B_amyloliquefaciens_CAA24990        AQSVPYGVSQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLKVAGGASM
B_licheniformis_CAJ70731.1          AQTVPYGIPLIKADKVQAQGFKGANVKVAVLDTGIQASHPDLNVVGGASF
Bacillus_sp_sprC_AAC43580           AQTVPWGIPHIKADKAHAAGVTGSGVKVAILDTGIDANHADLNVKGGASF
                                    :*: *:*:  : :   :  *  * .*:**::*:*: : * **.: ** *:
Konsensus                    (1)    AQTVPWGI  I AP VHS G  G GVKVAVLDTGIAS HPDLRI GGASF

                                    51                                                100
SWT66_254731                        ISSEPSY-NDLNGHGTHVAGTIAARDNSYGVLGVAPNVNLYAVKVLDRNG
Bcl04009                            ISSEPSY-NDLNGHGTHVAGTIAARDNSYGVLGVAPNVDLYAVKVLDRNG
Bakn00315                           ITSEPSY-QDYNGHGTHVAGTIAGLNNSYGVLGVAPNVNLYAVKVLDRNG
BspAl02518                          VASEPSY-QDYNGHGTHVAGTIAGLNNSVGVLGVAPSVQLYAVKVLDRNG
BspU02193                           IPSEPTI-QDFNGHGTHVAGTVAALNNSIGVLGVAPNVQLYGVKVLDRNG
B_pseudofirmus_ADC49870             ISTENTY-VDYNGHGTHVAGTVAALNNSYGVLGVAPGAELYAVKVLDRNG
B_lentus_P29600                     VPGEPST-QDGNGHGTHVAGTIAALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVLGASG
B_amyloliquefaciens_CAA24990        VPSETNPFQDNNSHGTHVAGTVAALNNSIGVLGVAPSASLYAVKVLGADG
B_licheniformis_CAJ70731.1          VAGEAYN-TDGNGHGTHVAGTVAALDNTTGVLGVAPSVSLYAVKVLNSSG
Bacillus_sp_sprC_AAC43580           VSGEPNALQDGNGHGTHVAGTVAALNNTTGVLGVAYNADLYAVKVLSASG
                                    :. *     * *.********:*. :*: ****** ...**.****. .*
Konsensus                    (51)     SEP SYQD NGHGTHVAGT AALNNS GVLGVAPNV LYAVKVLDRNG
```

ŞEKİL 9A

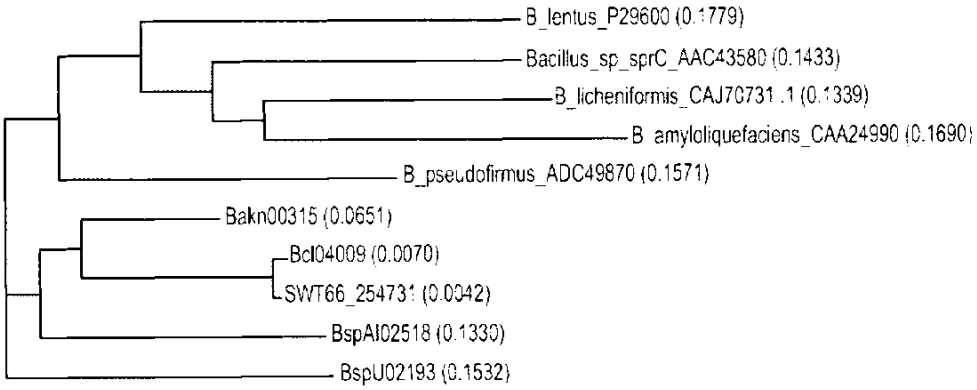
101 150
SWT66_254731 SGSLSGIARGIEWAITNNMDIVNMSLGGSTGSTALRQAADNAYNRGILLV
Bcl04009 SGSLSGIARGIEWAITNNMDIVNMSLGGSTGSTALRQAADNAYNRGILLV
Bakn00315 SGSHSAIAQGIEWSVSNGMHIVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLI
BspAl02518 GGNHSDIARGIEWSVNNGMHVVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLI
BspU02193 GGSHSAIAQGIEWSISNGMDVVNMSLGGATSSTALSQAVANASNRGILLI
B_pseudofirmus_ADC49870 SGSHASIAQGIEWAMNNGMDIANMSLGSPSGSTTLQLAADRARNAGVLLI
B_lentus_P29600 SGSVSSIAQGLEWAGNNGMHVANLSLGSPSPSATLEQAVNSATSRGVLVV
B_amyloliquefaciens_CAA24990 SGQYSWIINGIEWAIANNMDVINMSLGGPSGSAALKAAVDKAVASGVVVV
B_licheniformis_CAJ70731.1 SGSYSGIVSGIEWATTNGMDVINMSLGGASGSTAMKQAVDNAYARGVVVV
Bacillus_sp_sprC_AAC43580 SGTLSGIAQGIEWSISNGMNVINMSLGGSSGSTALQQACNNAYNRGIVVI
.* : * *:**: *.*.: *:***..: *::: * * *::::
Konsensus (101) SGS S IAQGIEWAI NGMDVVNMSLGGP GSTAL QAADNAYNRGVLL
151 200
SWT66_254731 AAAGNTGSAG----ISFPARYNSVMAVGATDSNNNRASFSTFGNELEIMA
Bcl04009 AAAGNTGSAG----ISFPARYNSVMAVGATDSNNNRASFSTFGNELEIMA
Bakn00315 AAAGNTGSAG----ISYPARYNSVMAVGAVDSNNNRASFSTFGNELEIMA
BspAl02518 AAAGNTGTSG----VSFPARYSSVMAVAATDSNNNRASFSTYGSQIEISA
BspU02193 AASGNTGRAG----IQFPARYSQVMAVGAVDQNNRLASFSTFGNEQEIVA
B_pseudofirmus_ADC49870 GAAGNSGQQGGSNNMGYPARYASVMAVGAVDQNGNRANFSSYGSELEIMA
B_lentus_P29600 AASGNSGAGS----ISYPARYANAMAVGATDQNNNRASFSQYGAGLDIVA
B_amyloliquefaciens_CAA24990 AAAGNEGTSGSSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSSNQRASFSSVGPELDVMA
B_licheniformis_CAJ70731.1 AAAGNSGSSGNTNTIGYPAKYDSVIAVGAVDSNSNRASFSSVGAELEVMA
Bacillus_sp_sprC_AAC43580 AAAGNSGSSGNRNTMGYPARYSSVIAVGAVSSNNTRASFSSVGSELEVMA
.*:** * . : :*.:* ..:**.*..... *.** * :: *
Konsensus (151) AAAGNTGS G ISYPARY SVMAVGAVDSNNNRASFST G ELEIMA

ŞEKİL 9B

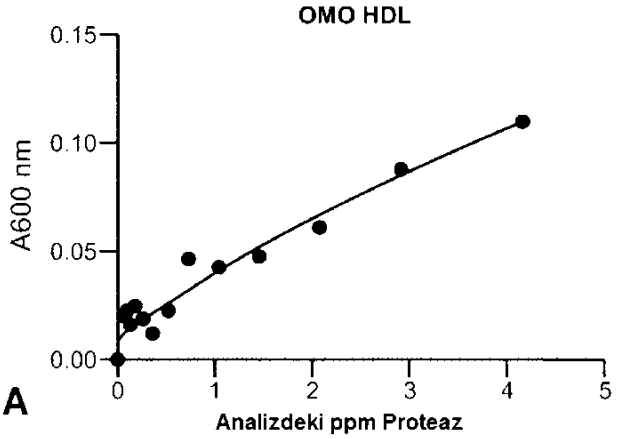
```
                                  201                                                 250
SWT66_254731                      PGVSVLSTYPTNRYVSLNGTSMASPHVAGVAALVKSRYPHATNVQIRNRL
Bcl04009                          PGVSVLSTYPTNRYVSLNGTSMASPHVAGVAALVKSRYPNATNVQIRNRL
Bakn00315                         PGVSILSTHLSNQYVSLNGTSMASPHVAGVAALVKAQYPSATNAQIRQRL
BspAl02518                        PGVGINSTYPTNGYSSLNGTSMASPHVAGVAALVKARYPSATNAQIRQHL
BspU02193                         PGVGIQSTYLNNGYSSLNGTSMAAPHVAGVAALVMSEYPWATAPQVRGRL
B_pseudofirmus_ADC49870           PGVNINSTYLNNGYRSLNGTSMASPHVAGVAALVKQKHPHLTAAQIRNRM
B_lentus_P29600                   PGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGAAALVKQKNPSWSNVQIRNHL
B_amyloliquefaciens_CAA24990      PGVSIQSTLPGNKYGAYNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNWTNTQVRSSL
B_licheniformis_CAJ70731.1        PGAGVYSTYPTNTYATLNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNLSASQVRNRL
Bacillus_sp_sprC_AAC43580         PGVNILSTTPGNNYASFNGTSMAAPHVAGAAALIKAKYPSMTNVQIRERL
                                  **..: **   . * : ******:*****.***:  . *  :  *:*  :
Konsensus                  (201)  PGV I STYP N Y SLNGTSMASPHVAGVAALVKSKYP ATN QIRNRL

                                  251                     275
SWT66_254731                      NSTATNLGSSYYFGNGLVNAARAAN   (SEQ ID NO:17)
Bcl04009                          NSTATNLGSSYYFGNGLVNAARAAN   (SEQ ID NO:14)
Bakn00315                         RDTATPLGSSYYFGNGLVHAARAAN   (SEQ ID NO:11)
BspAl02518                        RSTSTYLGNSTYYGSGLVDAQRATN   (SEQ ID NO:3)
BspU02193                         NDTAIPLGNAYYFGNGLVDASRAAY   (SEQ ID NO:6)
B_pseudofirmus_ADC49870           NQTAIPLGNSTYYGNGLVDAEYAAQ   (SEQ ID NO:49)
B_lentus_P29600                   KNTATSLGSTNLYGSGLVNAEAATR   (SEQ ID NO:60)
B_amyloliquefaciens_CAA24990      ENTTTKLGDSFYYGKGLINVQAAAQ   (SEQ ID NO:73)
B_licheniformis_CAJ70731.1        SSTATYLGSSFYYGKGLINVEAAAQ   (SEQ ID NO:67)
Bacillus_sp_sprC_AAC43580         KNTATNLGDPFFYGKGVINVESALQ   (SEQ ID NO:62)
                                   .*:  **..  :*.*::..  *
Konsensus                  (251)     TAT LGSS YYGNGLVNA RAA   (SEQ ID NO:83)
```

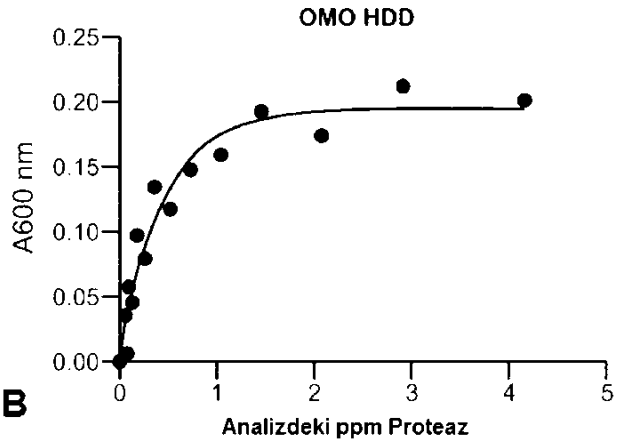
ŞEKİL 9C


B_lentus_P29600 (0.1779)
Bacillus_sp_sprC_AAC43580 (0.1433)
B_licheniformis_CAJ70731 .1 (0.1339)
B_amyloliquefaciens_CAA24990 (0.1690)
B_pseudofirmus_ADC49870 (0.1571)
Bakn00315 (0.0651)
Bcl04009 (0.0070)
SWT66_25473 1 (0.0042)
BspAI02518 (0.1330)
BspU02193 (0.1532)

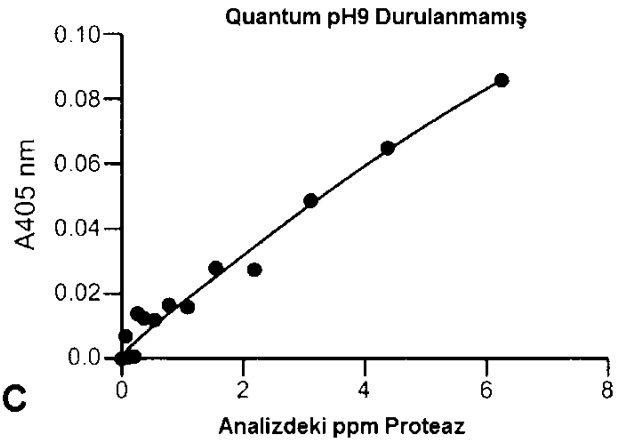
ŞEKİL 10



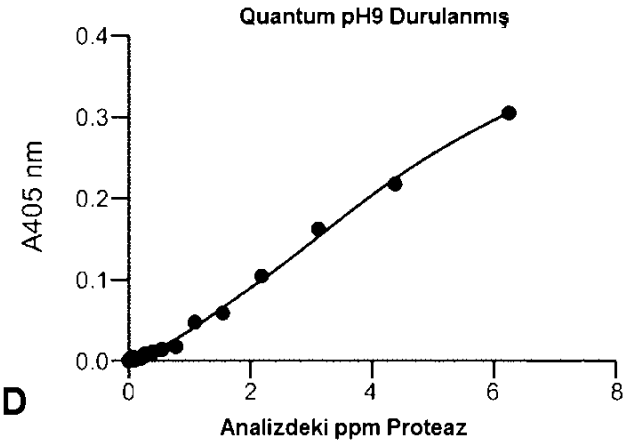
ŞEKİL 11A



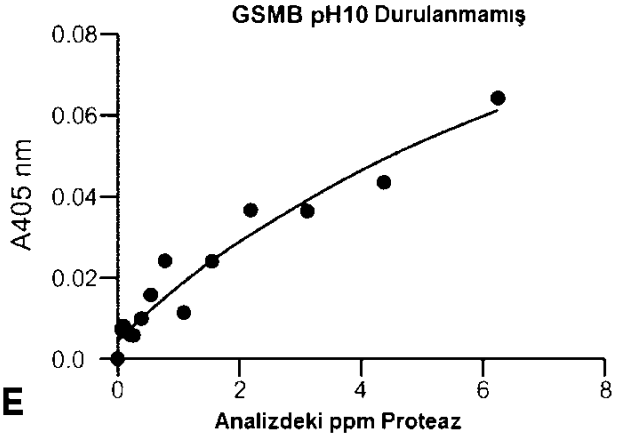
ŞEKİL 11B



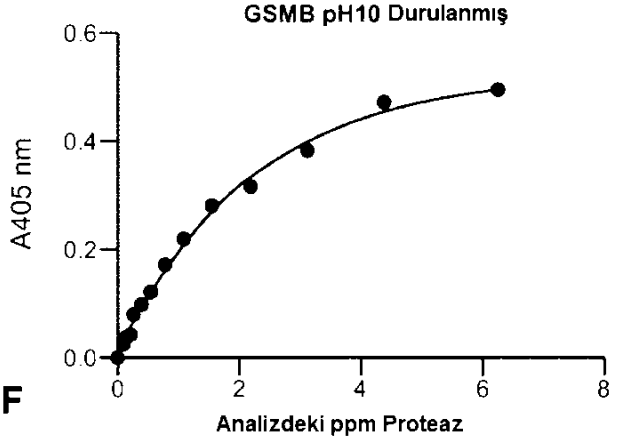
ŞEKİL 11C



ŞEKİL 11D



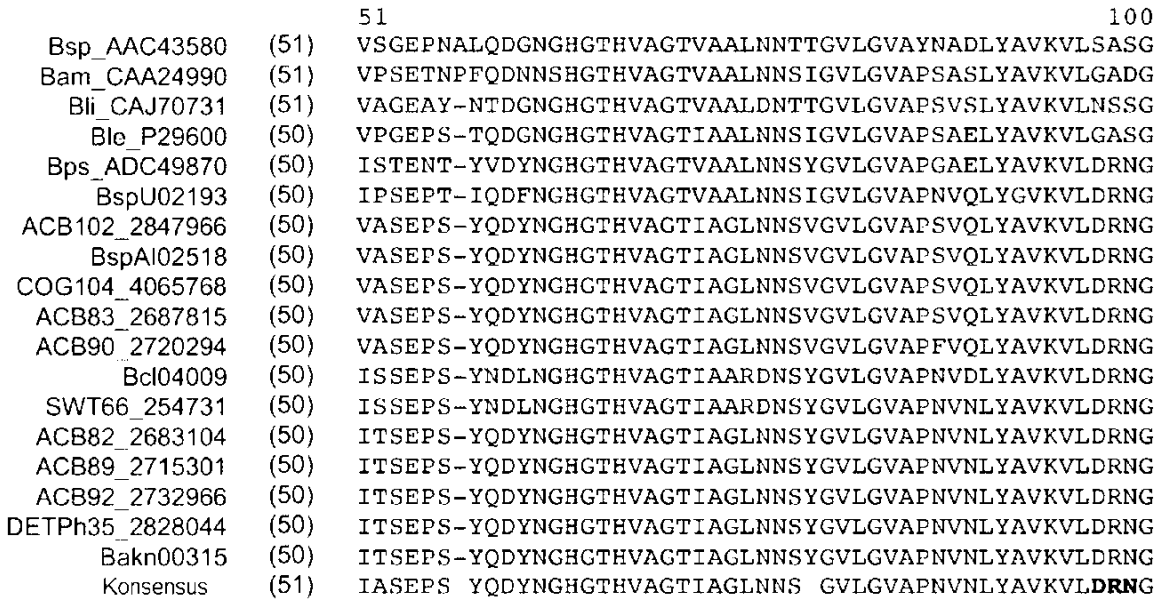
ŞEKİL 11E



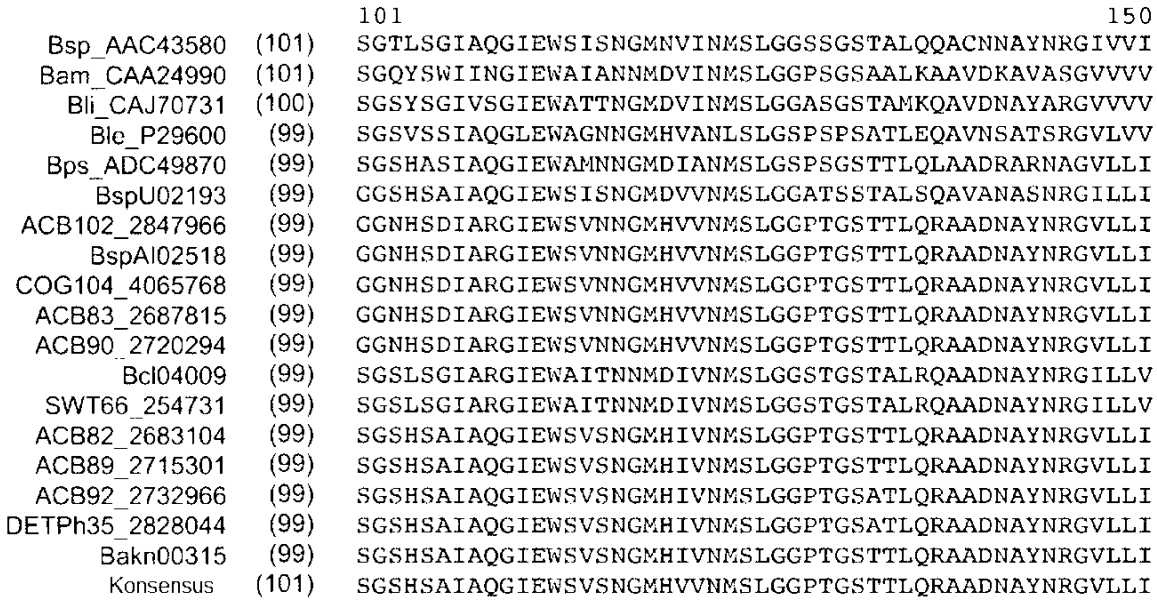
ŞEKİL 11F

```
                          1                                                50
Bsp_AAC43580      (1)     AQTVPWGIPHIKADKAHAAGVTGSGVKVAILDTGIDANHADLNVKGGASF
Bam_CAA24990      (1)     AQSVPYGVSQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLKVAGGASM
Bli_CAJ70731      (1)     AQTVPYGIPLIKADKVQAQGFKGANVKVAVLDTGIQASHPDLNVVGGASF
Ble_P29600        (1)     AQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTGSGVKVAVLDTGIST-HPDLNIRGGASF
Bps_ADC49870      (1)     AQTVPWGIPYIYSDVVHRQGYFGNGVKVAVLDTGVAP-HPDLHIRGGVSF
BspU02193         (1)     TQTVPWGINHVKAPTVHNWGNVGTGVKVAVLDTGIAS-HPDLRVSGGASF
ACB102_2847966    (1)     AQSTPWGISRINAPAVHSTGNFGQGVRVAVLDSGVAS-HEDLRIAGGVSF
BspAl02518        (1)     AQSTPWGISRINAPAVHSTGNFGQGVRVAVLDSGVAS-HEDLRIAGGVSF
COG104_4065768    (1)     AQSTPWGISRINAPAVHSTGNFGQGVRVAVLDSGVAS-HEDLRIAGGVSF
ACB83_2687815     (1)     AQSTPWGISRINAPAVHSTGNLGQGVRVAVLDSGVAS-HEDLRIAGGVSF
ACB90_2720294     (1)     AQSTPWGISRINAPAVHSTGNLGQGVRVAVLDSGVAS-HEDLRIAGGVSF
Bcl04009          (1)     SQTIPWGINRVQAPTVHSWGARGNGVRVAVLDTGIAS-HEDLRISGGASF
SWT66_254731      (1)     SQTVPWGINRVQAPTVHSWGARGNGVRVAVLDTGIAS-HEDLRISGGASF
ACB82_2683104     (1)     SQTVPWGINHIQAPTVHSWGNRGNGVRVAVLDSGVAS-HEDLRISGGRSF
ACB89_2715301     (1)     SQTVPWGINHIQAPTVHSWGNRGNGVRVAVLDSGVAS-HEDLRIFGGRSF
ACB92_2732966     (1)     SQTVPWGINHIQAPTVHSWGNRGNGVRVAVLDSGVAS-HEDLRISGGRSF
DETPh35_2828044   (1)     SQTVPWGINHIQAPTVHSWGNRGNGVRVAVLDSGVAS-HEDLRISGGRSF
Bakn00315         (1)     SQTVPWGINHIQAPTVHSWGNRGNGVRVAVLDSGVAS-HEDLRISGGRSF
Konsensus         (1)     AQTVPWGI  IQAP VHS GN GNGVRVAVLDSGVAS HEDLRISGG SF
```

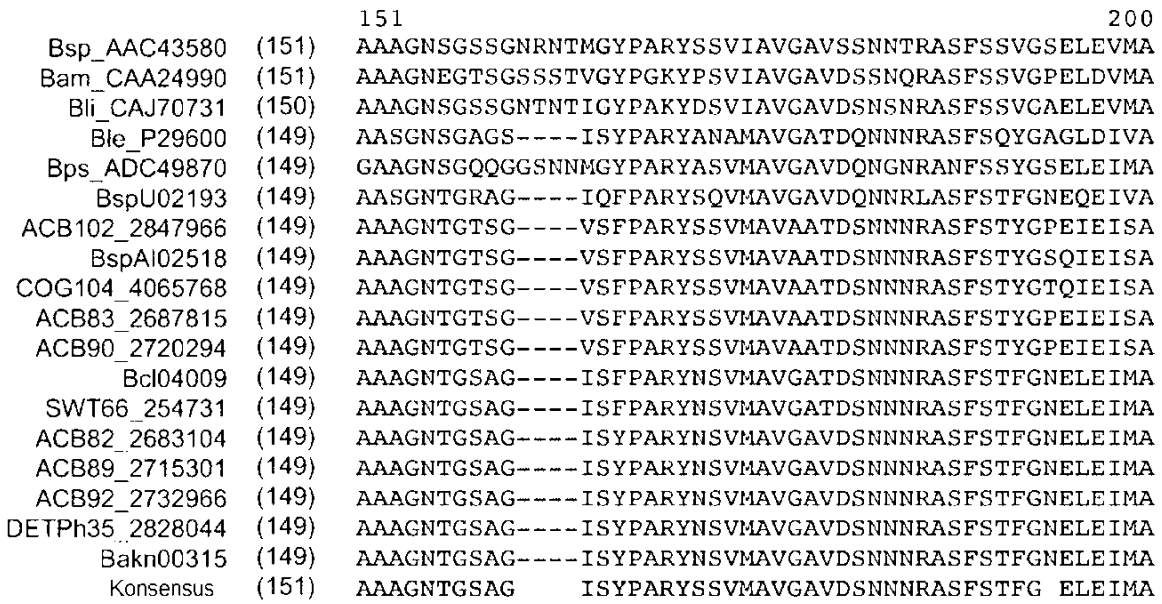
ŞEKİL 12A-1


51 100
Bsp_AAC43580 (51) VSGEPNALQDGNGHGTHVAGTVAALNNTTGVLGVAYNADLYAVKVLSASG
Bam_CAA24990 (51) VPSETNPFQDNNSHGTHVAGTVAALNNSIGVLGVAPSASLYAVKVLGADG
Bli_CAJ70731 (51) VAGEAY-NTDGNGHGTHVAGTVAALDNTTGVLGVAPSVSLYAVKVLNSSG
Blc_P29600 (50) VPGEPS-TQDGNGHGTHVAGTIAALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVLGASG
Bps_ADC49870 (50) ISTENT-YVDYNGHGTHVAGTVAALNNSYGVLGVAPGAELYAVKVLDRNG
BspU02193 (50) IPSEPT-IQDFNGHGTHVAGTVAALNNSIGVLGVAPNVQLYGVKVLDRNG
ACB102_2847966 (50) VASEPS-YQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSVGVLGVAPSVQLYAVKVLDRNG
BspAl02518 (50) VASEPS-YQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSVGVLGVAPSVQLYAVKVLDRNG
COG104_4065768 (50) VASEPS-YQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSVGVLGVAPSVQLYAVKVLDRNG
ACB83_2687815 (50) VASEPS-YQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSVGVLGVAPSVQLYAVKVLDRNG
ACB90_2720294 (50) VASEPS-YQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSVGVLGVAPFVQLYAVKVLDRNG
Bcl04009 (50) ISSEPS-YNDLNGHGTHVAGTIAARDNSYGVLGVAPNVDLYAVKVLDRNG
SWT66_254731 (50) ISSEPS-YNDLNGHGTHVAGTIAARDNSYGVLGVAPNVNLYAVKVLDRNG
ACB82_2683104 (50) ITSEPS-YQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSYGVLGVAPNVNLYAVKVLDRNG
ACB89_2715301 (50) ITSEPS-YQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSYGVLGVAPNVNLYAVKVLDRNG
ACB92_2732966 (50) ITSEPS-YQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSYGVLGVAPNVNLYAVKVLDRNG
DETPh35_2828044 (50) ITSEPS-YQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSYGVLGVAPNVNLYAVKVLDRNG
Bakn00315 (50) ITSEPS-YQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSYGVLGVAPNVNLYAVKVLDRNG
Konsensus (51) IASEPS YQDYNGHGTHVAGTIAGLNNS GVLGVAPNVNLYAVKVLDRNG

ŞEKİL 12A-2


101 150
Bsp_AAC43580 (101) SGTLSGIAQGIEWSISNGMNVINMSLGGSSGSTALQQACNNAYNRGIVVI
Bam_CAA24990 (101) SGQYSWIINGIEWAIANNMDVINMSLGGPSGSAALKAAVDKAVASGVVVV
Bli_CAJ70731 (100) SGSYSGIVSGIEWATTNGMDVINMSLGGASGSTAMKQAVDNAYARGVVVV
Ble_P29600 (99) SGSVSSIAQGLEWAGNNGMHVANLSLGSPSPSATLEQAVNSATSRGVLVV
Bps_ADC49870 (99) SGSHASIAQGIEWAMNNGMDIANMSLGSPSGSTTLQLAADRARNAGVLLI
BspU02193 (99) GGSHSAIAQGIEWSISNGMDVVNMSLGGATSSTALSQAVANASNRGILLI
ACB102_2847966 (99) GGNHSDIARGIEWSVNNGMHVVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLI
BspAI02518 (99) GGNHSDIARGIEWSVNNGMHVVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLI
COG104_4065768 (99) GGNHSDIARGIEWSVNNGMHVVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLI
ACB83_2687815 (99) GGNHSDIARGIEWSVNNGMHVVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLI
ACB90_2720294 (99) GGNHSDIARGIEWSVNNGMHVVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLI
Bcl04009 (99) SGSLSGIARGIEWAITNNMDIVNMSLGGSTGSTALRQAADNAYNRGILLV
SWT66_254731 (99) SGSLSGIARGIEWAITNNMDIVNMSLGGSTGSTALRQAADNAYNRGILLV
ACB82_2683104 (99) SGSHSAIAQGIEWSVSNGMHIVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLI
ACB89_2715301 (99) SGSHSAIAQGIEWSVSNGMHIVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLI
ACB92_2732966 (99) SGSHSAIAQGIEWSVSNGMHIVNMSLGGPTGSATLQRAADNAYNRGVLLI
DETPh35_2828044 (99) SGSHSAIAQGIEWSVSNGMHIVNMSLGGPTGSATLQRAADNAYNRGVLLI
Bakn00315 (99) SGSHSAIAQGIEWSVSNGMHIVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLI
Konsensus (101) SGSHSAIAQGIEWSVSNGMHVVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLI

ŞEKİL 12B-1


151 200
Bsp_AAC43580 (151) AAAGNSGSSGNRNTMGYPARYSSVIAVGAVSSNNTRASFSSVGSELEVMA
Bam_CAA24990 (151) AAAGNEGTSGSSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSSNQRASFSSVGPELDVMA
Bli_CAJ70731 (150) AAAGNSGSSGNTNTIGYPAKYDSVIAVGAVDSNSNRASFSSVGAELEVMA
Ble_P29600 (149) AASGNSGAGS----ISYPARYANAMAVGATDQNNNRASFSQYGAGLDIVA
Bps_ADC49870 (149) GAAGNSGQQGGSNNMGYPARYASVMAVGAVDQNGNRANFSSYGSELEIMA
BspU02193 (149) AASGNTGRAG----IQFPARYSQVMAVGAVDQNNRLASFSTFGNEQEIVA
ACB102_2847966 (149) AAAGNTGTSG----VSFPARYSSVMAVAATDSNNNRASFSTYGPEIEISA
BspAI02518 (149) AAAGNTGTSG----VSFPARYSSVMAVAATDSNNNRASFSTYGSQIEISA
COG104_4065768 (149) AAAGNTGTSG----VSFPARYSSVMAVAATDSNNNRASFSTYGTQIEISA
ACB83_2687815 (149) AAAGNTGTSG----VSFPARYSSVMAVAATDSNNNRASFSTYGPEIEISA
ACB90_2720294 (149) AAAGNTGTSG----VSFPARYSSVMAVAATDSNNNRASFSTYGPEIEISA
BcI04009 (149) AAAGNTGSAG----ISFPARYNSVMAVGATDSNNNRASFSTFGNELEIMA
SWT66_254731 (149) AAAGNTGSAG----ISFPARYNSVMAVGATDSNNNRASFSTFGNELEIMA
ACB82_2683104 (149) AAAGNTGSAG----ISYPARYNSVMAVGAVDSNNNRASFSTFGNELEIMA
ACB89_2715301 (149) AAAGNTGSAG----ISYPARYNSVMAVGAVDSNNNRASFSTFGNELEIMA
ACB92_2732966 (149) AAAGNTGSAG----ISYPARYNSVMAVGAVDSNNNRASFSTFGNELEIMA
DETPh35_2828044 (149) AAAGNTGSAG----ISYPARYNSVMAVGAVDSNNNRASFSTFGNELEIMA
Bakn00315 (149) AAAGNTGSAG----ISYPARYNSVMAVGAVDSNNNRASFSTFGNELEIMA
Konsensus (151) AAAGNTGSAG ISYPARYSSVMAVGAVDSNNNRASFSTFG ELEIMA

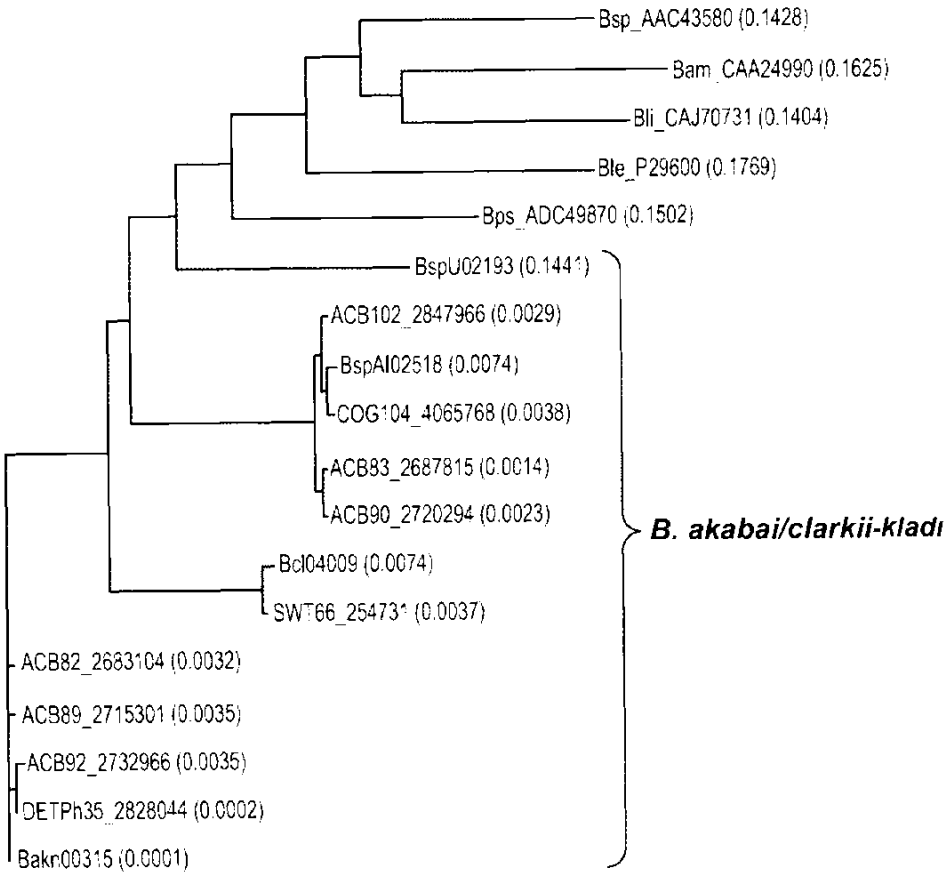
ŞEKİL 12B-2

```
                          201                                                 250
Bsp_AAC43580      (201)   PGVNILSTTPGNNYASFNGTSMAAPHVAGAAALIKAKYPSMTNVQIRERL
Bam_CAA24990      (201)   PGVSIQSTLPGNKYGAYNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNWTNTQVRSSL
Bli_CAJ70731      (200)   PGAGVYSTYPTNTYATLNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNLSASQVRNRL
Ble_P29600        (195)   PGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGAAALVKQKNPSWSNVQIRNHL
Bps_ADC49870      (199)   PGVNINSTYLNNGYRSLNGTSMASPHVAGVAALVKQKHPHLTAAQIRNRM
BspU02193         (195)   PGVGIQSTYLNNGYSSLNGTSMAAPHVAGVAALVMSEYPWATAPQVRGRL
ACB102_2847966    (195)   PGVGINSTYPTNRYSSLNGTSMASPHVAGVAALVKARYPSATNAQIRQHL
BspAI02518        (195)   PGVGINSTYPTNGYSSLNGTSMASPHVAGVAALVKARYPSATNAQIRQHL
COG104_4065768    (195)   PGVGINSTYPTNRYSSLNGTSMASPHVAGVAALVKARYPSATNAQIRQHL
ACB83_2687815     (195)   PGVGINSTYPTNRYSSLNGTSMASPHVAGVAALVKARYPSATNAQIRQHL
ACB90_2720294     (195)   PGVGINSTYPTNRYSSLNGTSMASPHVAGVAALVKARYPSATNAQIRQHL
Bcl04009          (195)   PGVSVLSTYPTNRYVSLNGTSMASPHVAGVAALVKSRYPNATNVQIRNRL
SWT66_254731      (195)   PGVSVLSTYPTNRYVSLNGTSMASPHVAGVAALVKSRYPHATNVQIRNRL
ACB82_2683104     (195)   PGVSILSTHLSNQYVSLNGTSMASPHVAGVAALVKAQYPSATNAQIRQRL
ACB89_2715301     (195)   PGVSILSTHLSNQYVSLNGTSMASPHVAGVAALVKAQYPSATNAQIRQRL
ACB92_2732966     (195)   PGVSILSTHLSNQYISLNGTSMASPHVAGVAALVKAQYPSATNAQIRQRL
DETPh35_2828044   (195)   PGVSILSTHLSNQYVSLNGTSMASPHVAGVAALVKAQYPSATNAQIRQRL
Bakn00315         (195)   PGVSILSTHLSNQYVSLNGTSMASPHVAGVAALVKAQYPSATNAQIRQRL
Konsensus         (201)   PGV INSTYPTN YSSLNGTSMASPHVAGVAALVKARYPSATNAQIRQRL
```

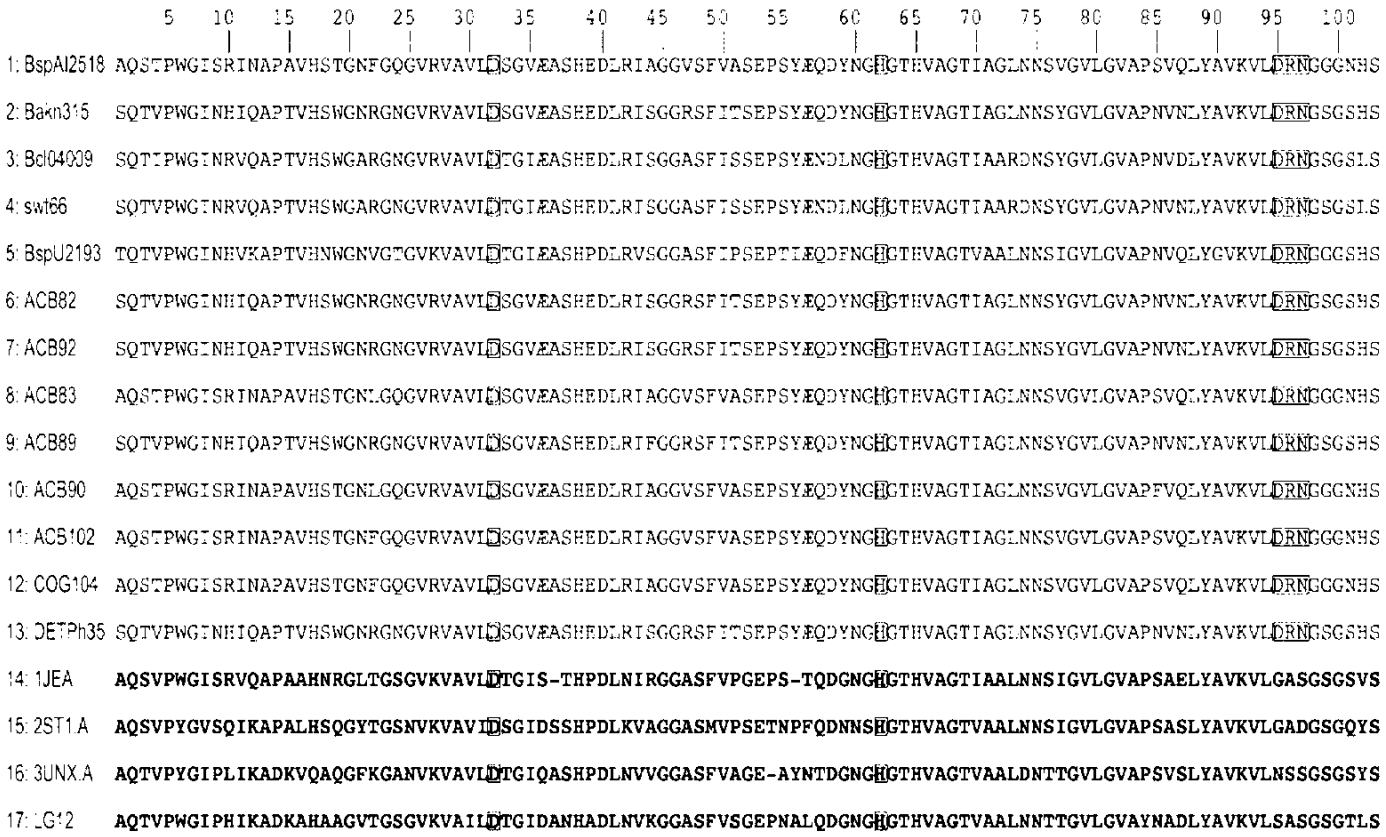
ŞEKİL 12C-1

		251 275
Bsp_AAC43580	(251)	KNTATNLGDPFFYGKGVINVESALQ
Bam_CAA24990	(251)	ENTTTKLGDSFYYGKGLINVQAAAQ
Bli_CAJ70731	(250)	SSTATYLGSSFYYGKGLINVEAAAQ
Ble_P29600	(245)	KNTATSLGSTNLYGSGLVNAEAATR
Bps_ADC49870	(249)	NQTAIPLGNSTYYGNGLVDAEYAAQ
BspU02193	(245)	NDTAIPLGNAYYFGNGLVDASRAAY
ACB102_2847966	(245)	RSTSTYLGNSTYYGSGLVDAQRAAN
BspAl02518	(245)	RSTSTYLGNSTYYGSGLVDAQRATN
COG104_4065768	(245)	RSTSTYLGNSTYYGSGLVDAQRAAN
ACB83_2687815	(245)	RSTSTNLGNSTYYGSGLVNAQRAAN
ACB90_2720294	(245)	RSTSTNLGNSTYYGSGLVNAQRAAN
Bcl04009	(245)	NSTATNLGSSYYFGNGLVNAARAAN
SWT66_254731	(245)	NSTATNLGSSYYFGNGLVNAARAAN
ACB82_2683104	(245)	RDTATPLGSSYYFGNGLVHATRAAN
ACB89_2715301	(245)	RDTATPLGSSYYFGNGLVHAARAAN
ACB92_2732966	(245)	RDTATPLGSSYYFGNGLVHAARAAN
DETPh35_2828044	(245)	RDTATPLGSSYYFGNGLVHAARAAN
Bakn00315	(245)	RDTATPLGSSYYFGNGLVHAARAAN
Konsensus	(251)	R TAT LGSSYYYGNGLV A RAAN

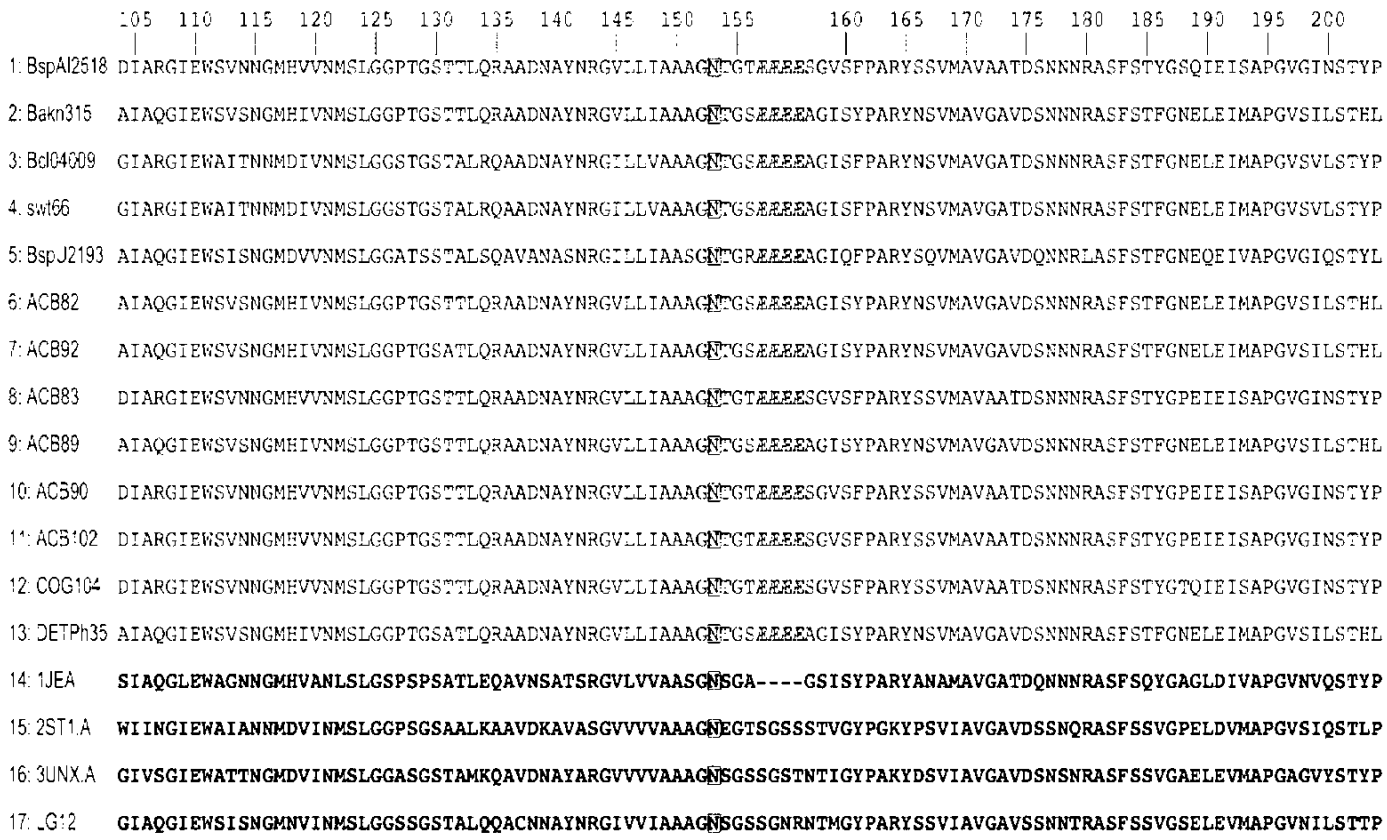
ŞEKİL 12C-2


Bsp_AAC43580 (0.1428)
Bam_CAA24990 (0.1625)
Bli_CAJ70731 (0.1404)
Ble_P29600 (0.1769)
Bps_ADC49870 (0.1502)
BspU02193 (0.1441)
ACB102_2847966 (0.0029)
BspAI02518 (0.0074)
COG104_4065768 (0.0038)
ACB83_2687815 (0.0014)
ACB90_2720294 (0.0023)
Bcl04009 (0.0074)
SWT66_254731 (0.0037)
ACB82_2683104 (0.0032)
ACB89_2715301 (0.0035)
ACB92_2732966 (0.0035)
DETPh35_2828044 (0.0002)
Bakn00315 (0.0001)
B. akabai/clarkii-kladı

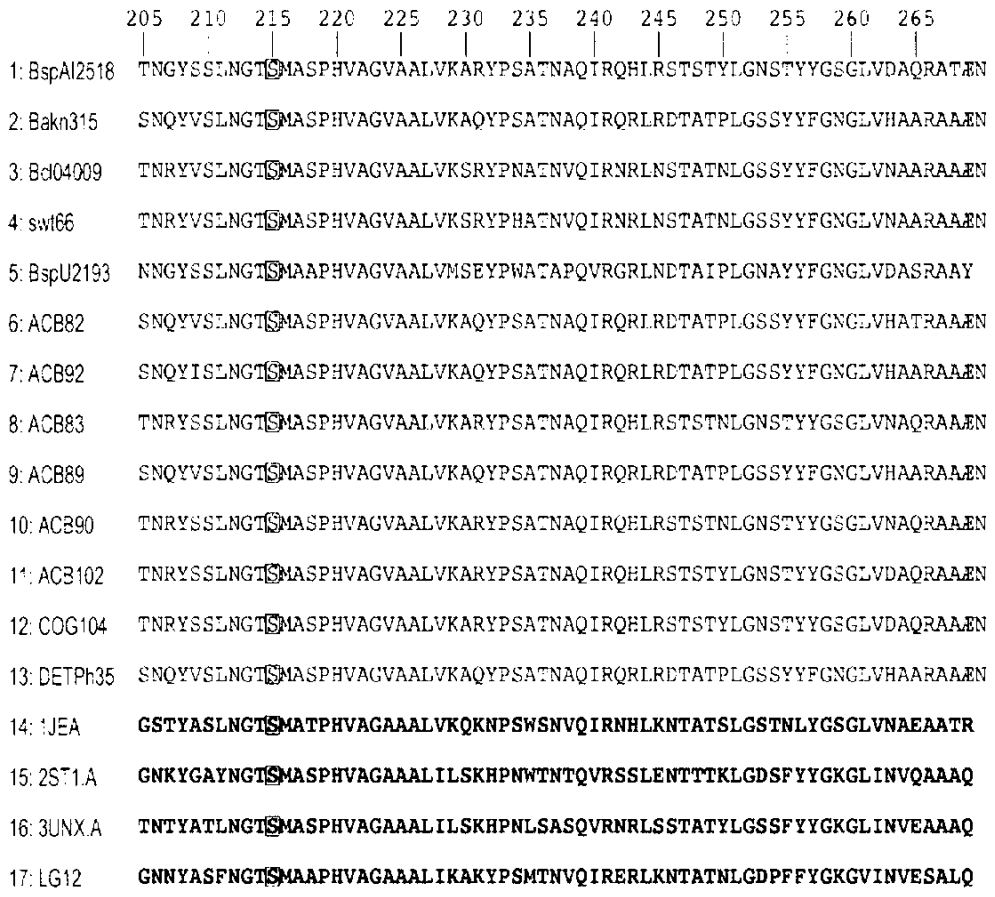
ŞEKİL 13


5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100
1: BspAI2518 AQSTPWGISRINAPAVHSTGNFGQGVRVAVLDSGVEASHEDLRIAGGVSFVASEPSYEQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSVGVLGVAPSVQLYAVKVLDRNGGGNHS
2: Bakn315 SQTVPWGINHIQAPTVHSWGNRGNGVRVAVLDSGVEASHEDLRISGGRSFITSEPSYEQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSYGVLGVAPNVNLYAVKVLDRNGSGSHS
3: Bdl04009 SQTIPWGINRVQAPTVHSWGARGNGVRVAVLDTGIEASHEDLRISGGASFISSEPSYENDLNGHGTHVAGTIAARDNSYGVLGVAPNVDLYAVKVLDRNGSGSLS
4: swt66 SQTVPWGINRVQAPTVHSWGARGNGVRVAVLDTGIEASHEDLRISGGASFISSEPSYENDLNGHGTHVAGTIAARDNSYGVLGVAPNVNLYAVKVLDRNGSGSLS
5: BspU2193 TQTVPWGINEVKAPTVHNWGNVGTGVKVAVLDTGIEASHPDLRVSGGASFIPSEPTIEQDFNGHGTHVAGTVAALNNSIGVLGVAPNVQLYGVKVLDRNGGGSHS
6: ACB82 SQTVPWGINHIQAPTVHSWGNRGNGVRVAVLDSGVEASHEDLRISGGRSFITSEPSYEQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSYGVLGVAPNVNLYAVKVLDRNGSGSHS
7: ACB92 SQTVPWGINHIQAPTVHSWGNRGNGVRVAVLDSGVEASHEDLRISGGRSFITSEPSYEQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSYGVLGVAPNVNLYAVKVLDRNGSGSHS
8: ACB83 AQSTPWGISRINAPAVHSTGNLGQGVRVAVLDSGVEASHEDLRIAGGVSFVASEPSYEQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSVGVLGVAPSVQLYAVKVLDRNGGGNHS
9: ACB89 SQTVPWGINHIQAPTVHSWGNRGNGVRVAVLDSGVEASHEDLRIFGGRSFITSEPSYEQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSYGVLGVAPNVNLYAVKVLDRNGSGSHS
10: ACB90 AQSTPWGISRINAPAVHSTGNLGQGVRVAVLDSGVEASHEDLRIAGGVSFVASEPSYEQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSVGVLGVAPFVQLYAVKVLDRNGGGNHS
11: ACB102 AQSTPWGISRINAPAVHSTGNFGQGVRVAVLDSGVEASHEDLRIAGGVSFVASEPSYEQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSVGVLGVAPSVQLYAVKVLDRNGGGNHS
12: COG104 AQSTPWGISRINAPAVHSTGNFGQGVRVAVLDSGVEASHEDLRIAGGVSFVASEPSYEQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSVGVLGVAPSVQLYAVKVLDRNGGGNHS
13: DETPh35 SQTVPWGINHIQAPTVHSWGNRGNGVRVAVLDSGVEASHEDLRISGGRSFITSEPSYEQDYNGHGTHVAGTIAGLNNSYGVLGVAPNVNLYAVKVLDRNGSGSHS
14: 1JEA AQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTGSGVKVAVLDTGIS-THPDLNIRGGASFVPGEPS-TQDGNGHGTHVAGTIAALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVLGASGSGSVS
15: 2ST1.A AQSVPYGVSQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLKVAGGASMVPSETNPFQDNNSHGTHVAGTVAALNNSIGVLGVAPSASLYAVKVLGADGSGQYS
16: 3UNX.A AQTVPYGIPLIKADKVQAQGFKGANVKVAVLDTGIQASHPDLNVVGGASFVAGE-AYNTDGNGHGTHVAGTVAALDNTTGVLGVAPSVSLYAVKVLNSSGSGSYS
17: LG12 AQTVPWGIPHIKADKAHAAGVTGSGVKVAILDTGIDANHADLNVKGGASFVSGEPNALQDGNGHGTHVAGTVAALNNTTGVLGVAYNADLYAVKVLSASGSGTLS

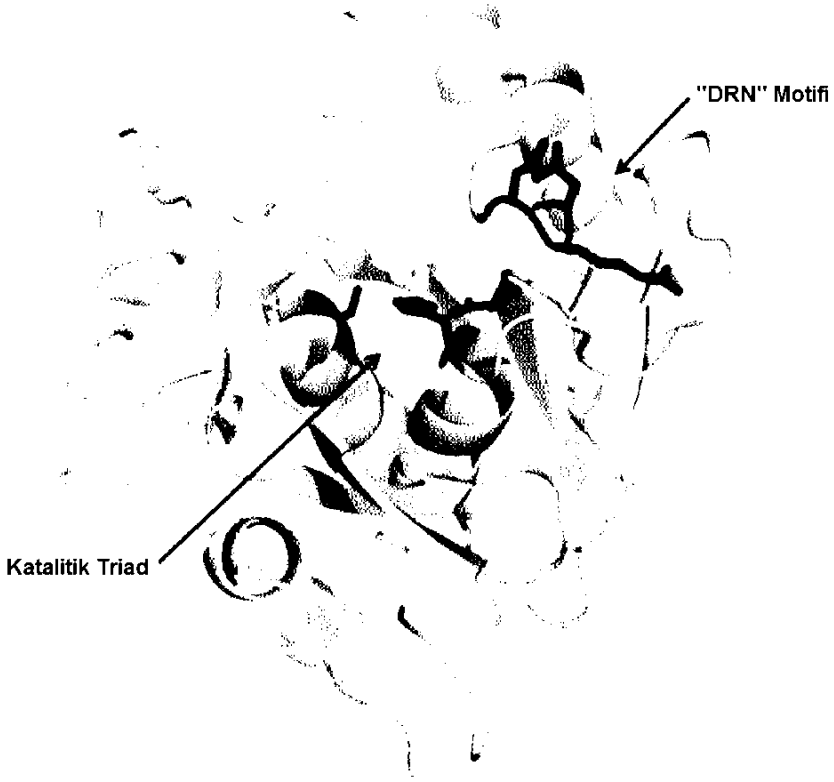
ŞEKİL 14A


105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200
1: BspAl2518 DIARGIEWSVNNGMHVVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLIAAAGNTGTÆÆÆSGVSFPARYSSVMAVAATDSNNNRASFSTYGSQIEISAPGVGINSTYP
2: Bakn315 AIAQGIEWSVSNGMHIVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLIAAAGNTGSÆÆÆAGISYPARYNSVMAVGAVDSNNNRASFSTFGNELEIMAPGVSILSTEL
3: Bcl04009 GIARGIEWAITNNMDIVNMSLGGSTGSTALRQAADNAYNRGILLVAAAGNTGSÆÆÆAGISFPARYNSVMAVGATDSNNNRASFSTFGNELEIMAPGVSVLSTYP
4. swt66 GIARGIEWAITNNMDIVNMSLGGSTGSTALRQAADNAYNRGILLVAAAGNTGSÆÆÆAGISFPARYNSVMAVGATDSNNNRASFSTFGNELEIMAPGVSVLSTYP
5: BspJ2193 AIAQGIEWSISNGMDVVNMSLGGATSSTALSQAVANASNRGILLIAASGNTGRÆÆÆAGIQFPARYSQVMAVGAVDQNNRLASFSTFGNEQEIVAPGVGIQSTYL
6: ACB82 AIAQGIEWSVSNGMHIVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLIAAAGNTGSÆÆÆAGISYPARYNSVMAVGAVDSNNNRASFSTFGNELEIMAPGVSILSTHL
7: ACB92 AIAQGIEWSVSNGMHIVNMSLGGPTGSATLQRAADNAYNRGVLLIAAAGNTGSÆÆÆAGISYPARYNSVMAVGAVDSNNNRASFSTFGNELEIMAPGVSILSTEL
8: ACB83 DIARGIEWSVNNGMHVVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLIAAAGNTGTÆÆÆSGVSFPARYSSVMAVAATDSNNNRASFSTYGPEIEISAPGVGINSTYP
9: ACB89 AIAQGIEWSVSNGMHIVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLIAAAGNTGSÆÆÆAGISYPARYNSVMAVGAVDSNNNRASFSTFGNELEIMAPGVSILSTHL
10: ACB90 DIARGIEWSVNNGMHVVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLIAAAGNTGTÆÆÆSGVSFPARYSSVMAVAATDSNNNRASFSTYGPEIEISAPGVGINSTYP
11: ACB102 DIARGIEWSVNNGMHVVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLIAAAGNTGTÆÆÆSGVSFPARYSSVMAVAATDSNNNRASFSTYGPEIEISAPGVGINSTYP
12: COG104 DIARGIEWSVNNGMHVVNMSLGGPTGSTTLQRAADNAYNRGVLLIAAAGNTGTÆÆÆSGVSFPARYSSVMAVAATDSNNNRASFSTYGTQIEISAPGVGINSTYP
13: DETPh35 AIAQGIEWSVSNGMHIVNMSLGGPTGSATLQRAADNAYNRGVLLIAAAGNTGSÆÆÆAGISYPARYNSVMAVGAVDSNNNRASFSTFGNELEIMAPGVSILSTEL
14: 1JEA SIAQGLEWAGNNGMHVANLSLGSPSPSATLEQAVNSATSRGVLVVAASGNSGA----GSISYPARYANAMAVGATDQNNNRASFSQYGAGLDIVAPGVNVQSTYP
15: 2ST1.A WIINGIEWAIANNMDVINMSLGGPSGSAALKAAVDKAVASGVVVVAAAGNEGTSGSSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSSNQRASFSSVGPELDVMAPGVSIQSTLP
16: 3UNX.A GIVSGIEWATTNGMDVINMSLGGASGSTAMKQAVDNAYARGVVVVAAAGNSGSSGSTNTIGYPAKYDSVIAVGAVDSNSNRASFSSVGAELEVMAPGAGVYSTYP
17: JG12 GIAQGIEWSISNGMNVINMSLGGSSGSTALQQACNNAYNRGIVVIAAAGNSGSSGNRNTMGYPARYSSVIAVGAVSSNNTRASFSSVGSELEVMAPGVNILSTTP

ŞEKİL 14B


205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265
1: BspAI2518 TNGYSSLNGTSMASPHVAGVAALVKARYPSATNAQIRQHLRSTSTYLGNSTYYGSGLVDAQRATAN
2: Bakn315 SNQYVSLNGTSMASPHVAGVAALVKAQYPSATNAQIRQRLRDTATPLGSSYYFGNGLVHAARAAAN
3: Bd04009 TNRYVSLNGTSMASPHVAGVAALVKSRYPNATNVQIRNRLNSTATNLGSSYYFGNGLVNAARAAAN
4: swf66 TNRYVSLNGTSMASPHVAGVAALVKSRYPHATNVQIRNRLNSTATNLGSSYYFGNGLVNAARAAAN
5: BspU2193 NNGYSSLNGTSMAAPHVAGVAALVMSEYPWATAPQVRGRLNDTAIPLGNAYYFGNGLVDASRAAY
6: ACB82 SNQYVSLNGTSMASPHVAGVAALVKAQYPSATNAQIRQRLRDTATPLGSSYYFGNGLVHATRAAAN
7: ACB92 SNQYISLNGTSMASPHVAGVAALVKAQYPSATNAQIRQRLRDTATPLGSSYYFGNGLVHAARAAAN
8: ACB83 TNRYSSLNGTSMASPHVAGVAALVKARYPSATNAQIRQHLRSTSTNLGNSTYYGSGLVNAQRAAAN
9: ACB89 SNQYVSLNGTSMASPHVAGVAALVKAQYPSATNAQIRQRLRDTATPLGSSYYFGNGLVHAARAAAN
10: ACB90 TNRYSSLNGTSMASPHVAGVAALVKARYPSATNAQIRQHLRSTSTNLGNSTYYGSGLVNAQRAAAN
11: ACB102 TNRYSSLNGTSMASPHVAGVAALVKARYPSATNAQIRQHLRSTSTYLGNSTYYGSGLVDAQRAAAN
12: COG104 TNRYSSLNGTSMASPHVAGVAALVKARYPSATNAQIRQHLRSTSTYLGNSTYYGSGLVDAQRAAAN
13: DETPh35 SNQYVSLNGTSMASPHVAGVAALVKAQYPSATNAQIRQRLRDTATPLGSSYYFGNGLVHAARAAAN
14: 1JEA GSTYASLNGTSMATPHVAGAAALVKQKNPSWSNVQIRNHLKNTATSLGSTNLYGSGLVNAEAATR
15: 2ST1.A GNKYGAYNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNWTNTQVRSSLENTTTKLGDSFYYGKGLINVQAAAQ
16: 3UNX.A TNTYATLNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNLSASQVRNRLSSTATYLGSSFYYGKGLINVEAAAQ
17: LG12 GNNYASFNGTSMAAPHVAGAAALIKAKYPSMTNVQIRERLKNTATNLGDPFFYGKGVINVESALQ

ŞEKİL 14C



ŞEKİL 15