



HU000229959B1

(19) **HU**(11) Lajstromszám: **229 959**(13) **B1****MAGYARORSZÁG**
Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 03 04049**(51) Int. Cl.: **C12N 9/00** (2006.01)(22) A bejelentés napja: **2002. 04. 24.**

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:

PCT/EP 02/04489(40) A közzététel napja: **2004. 03. 29.**(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértesítőben: **2015. 03. 30.**

(87) A nemzetközi közzétételi szám:

WO 02088340

(30) Elsőbbségi adatok: 101 21 463.4 2001. 05. 02. DE	(73) Jogosult(ak): BASF SE, Ludwigshafen (DE)
(72) Feltaláló(k): Kottwitz, Beatrix, Düsseldorf (DE) Maurer, Karl-Heinz, Erkrath (DE) Breves, Roland, Ratingen (DE)	(74) Képviselő: SBGK Szabadalmi és Ügyvédi Irodák, Budapest

(54) **Új alkalikus proteáz-variánsok és ezeket tartalmazó mosó- és tisztítószer**

(57) Kivonat

A találmány tárgyát képezik szubtilizin típusú alkalikus proteázok, azzal jellemezve, hogy a Bacillus lentus DSM 5483-ból származó szubtilizin számozása szerint a 199-es pozícióban izoleucint és a 211-es pozícióban glicint a 3-as pozícióban treonint, a 4-es pozícióban izoleucint tartalmaznak, valamint ezek előállítására, alkalmazására mosó- és tisztítószerben, textíliák kezelésére és textíliapolóként, kozmetikai célokra, élelmiszerek és takarmányok előállítására.

	1	70
Találmány szerinti variáns	(1)	AQTI PHGISRVQAPAAHNRGLTGSQVKVAVLDTGIS - THPDLNIRGGASFVPGEPS - TQDGNHGHTHVAG
Subtilisín 309	(1)	AQSVPMGISRVQAPAAHNRGLTGSQVKVAVLDTGIS - THPDLNIRGGASFVPGEPS - TQDGNHGHTHVAG
Subtilisín PB92	(1)	AQSVPMGISRVQAPAAHNRGLTGSQVKVAVLDTGIS - THPDLNIRGGASFVPGEPS - TQDGNHGHTHVAG
Subtilisín Carlsberg	(1)	AQTVFYGIPLIKADEVQAGGFKGMVVKVAVLDTGIQASHFDLNVVGGASFVAGEAY - NTQGNHGHTHVAG
Subtilisín BPN'	(1)	AQSVFYGVQIKAPALHSQGVYTGSHUKVAVIDSGIDSSHFDLVVAGGASHVVPSETNPFQDGNHGHTHVAG
Konszenzus	(1)	AQSVPMGISRVQAPAAHNRGLTGSQVKVAVLDTGIS - THPDLNIRGGASFVPGEPS - TQDGNHGHTHVAG
	71	140
Találmány szerinti variáns	(69)	TIAALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVLGADGRCATISQIAQGLEWAGNNGMHVANLSLGSFSPSATLEQAVN
Subtilisín 309	(69)	TIAALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVLGASGSGSVSSIAQGLEWAGNNGMHVANLSLGSFSPSATLEQAVN
Subtilisín PB92	(69)	TIAALNNSIGVLGVAPNAELYAVKVLGASGSGSVSSIAQGLEWAGNNGMHVANLSLGSFSPSATLEQAVN
Subtilisín Carlsberg	(70)	TVAALDNTIGVLGVAPSVSLYAVKVLNSGSGCTYSGIVSGIEWATTNOMDVIINMSLGGPSGSTAMKQAVD
Subtilisín BPN'	(71)	TVAALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVLGADGSGQYSNIINGIEWAIANNMDVINMSLGSFSGSAALKRAVD
Konszenzus	(71)	TIAALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVLGASGSGSVSSIAQGLEWAGNNGMHVANLSLGSFSPSATLEQAVN
	141	210
Találmány szerinti variáns	(139)	SATSRGVLVVAASGNSG----ASSISYPARYANAMAVGATDQNNRRASFQYQAGLDIVAPGVNVQSTYP
Subtilisín 309	(139)	SATSRGVLVVAASGNSG----AGSISYPARYANAMAVGATDQNNRRASFQYQAGLDIVAPGVNVQSTYP
Subtilisín PB92	(139)	SATSRGVLVVAASGNSG----AGSISYPARYANAMAVGATDQNNRRASFQYQAGLDIVAPGVNVQSTYP
Subtilisín Carlsberg	(140)	NAYARGVVVVAAGNSGSGSNTTIGYPAKYDSVIAVCAVDNSRRASFSSVGALEVMAPGAVVQSTYP
Subtilisín BPN'	(141)	KAVARGVVVVAAGNEGTSQSSSTVCGYKYPVSVIACVAVDSSVQRASFSSVCFELDVMAFGVSIQSTLR
Konszenzus	(141)	SATSRGVLVVAASGNSG A SISYPARYANAMAVGATDQNNRRASFQYQAGLDIVAPGVNVQSTYP
	211	275
Találmány szerinti variáns	(205)	GSTYASNGTSMATPHVAGAAALVKQKNPSWNVQIRNHLKNTATSLGSTNLYGSGLVNAEAAATR
Subtilisín 309	(205)	GSTYASLNGTSMATPHVAGAAALVKQKNPSWNVQIRNHLKNTATSLGSTNLYGSGLVNAEAAATR
Subtilisín PB92	(205)	GSTYASLNGTSMATPHVAGAAALVKQKNPSWNVQIRNHLKNTATSLGSTNLYGSGLVNAEAAATR
Subtilisín Carlsberg	(210)	TSTYATLNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNLSASQVNRNLSSTATYLGSSFYQKGLINVEAAAQ
Subtilisín BPN'	(211)	GNKYQAYNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNNTQVASSLENTTILKGDSPFYQKGLINVQAAAQ
Konszenzus	(211)	GSTYASLNGTSMATPHVAGAAALVKQKNPSWNVQIRNHLKNTATSLGSTNLYGSGLVNAEAAATR

P0304049

A. B. G. & K.
Subtilisin Light 41 hoda
H-1061 Budapest, Árkád utca 113.
Telefon: 461-2200, Fax: 461-1099

MEGADÁS ALAPJÁUL
SZOLGÁLÓ VÁLTOZAT

77.830/ZSO

Új alkalikus proteáz-variánsok és ezeket tartalmazó mosó- és tisztítószerek

Az alábbi találmány tárgyát új alkalikus proteáz-variánsok képezik, melyeket természetes vagy modifikált szubtilizin-proteázokból vezetünk le. Az eddig ismert szubtilizinekkel szemben a Bacillus lentusból származó szubtilizinek a számozás szerint rendelkeznek mindkét 199I és 211G aminosav-pozícióval és legalább egy, a molekula stabilitását szolgáló modifikációval, különösen pontmutáció után treonint a 3-as és izoleucint a 4-es pozícióban. Különösen kedvelt a S3T/V4I/V199I/L211G B. lentus-alkalikus proteáz variáns. Ezek a variánsok a többi proteáz-variánssal szemben a mosó- és tisztítószerekben mutatott, a mosási teljesítményhez való hatékonyabb hozzájárulással jellemezhetőek. Emiatt az alábbi találmány tárgyát ezen enzimeken túl, ezek különböző technikai eljárásokban való alkalmazási lehetőségei, és különösen ezeket az új alkalikus proteáz-variánsokat tartalmazó mosó- és tisztítószerek képezik.

A szubtilizin típusú proteázokat (szubtilázok, szubtilopeptidázok, EC 3. 4. 21. 62) a katalitikus hatású aminosavak miatt a szerin-proteázok közé soroljuk. Ezeket a mikroorganizmusok, különösen a Bacillus-fajok természetes úton termelik és szekretálják. Nem specifikus endopeptidáz hatásúak, ami annyit tesz, hogy peptidok, vagy proteinek belsejében található tetszés szerinti savamidkötéseket hidrolizálnak. A

pH optimumuk legtöbbször a jelentősen alkalikus tartományban található. Egy áttekintést kaphatunk erről a családról a „Subtilases: Subti-lisin-like Proteases” cikkből R. Siezen-től, 75-95 oldal a „Subtilisin enzymes”-ben, kiadta R. Bott és C. Betzel, New York, 1996. A szubtilizinek technikai alkalmazási módok sokaságára alkalmasak, különösen mosó- és tisztítószer-aktív adalékként.

Az olyan enzimek mellett, mint például az amilázok, lipázok vagy cellulázok, a proteázokat már évtizedek óta alkalmazzák mosó- és tisztítószer-aktív komponenseként. Rendelkezik azzal a képességgel, hogy lebontsák a proteintartalmú szennyeződések a tisztítandó anyagról, például textíliákról vagy edényekről.

A hidrolizisproduktaimok a mosóoldatban való nagyobb oldékonyságuk miatt kiáznak vagy a többi mosó- vagy tisztító-szer-alkotóelemek támadják meg, oldják fel, emulgeálják vagy szuszpendálják. Így az enzimek és az illető mosó- és tisztító-szer többi alkotóeleme között szinergista hatások adódhatnak.

A szubtilizinek előnyös enzimikus tulajdonságaiknak - mint például stabilitás vagy pH-optimum- köszönhetően a mosó- és tisztító-szerproteázok között kiemelkedő helyet foglalnak el. A továbbiakban bemutatjuk a legfontosabb eddig mosószerekben alkalmazott szubtilizin-proteázokat, melyeknél részben természetes molekulákról, részben variánsokról beszélünk, melyek a vad típusú enzimek mutagenézisével vezethetőek le.

A szubtilizin BPN', amely *Bacillus amyloliquefaciens*-ből, illetve *B. subtilis*-ből származik, Vasantha et al. (1984) in *J. Bacteriol* Volume 159, S. 811-819 és J. A. Wells et al. (1983) in *Nucleic Acids Research*, Volume 11, S. 7911-7925 munkáiból ismertek. Ebből az enzimből a loop-régióban történő pontmutációval kapott variáns, amely csökkent erősségű szubsztrátkötő, és ezzel egyidejűleg megnövekedett hidrolizációs rátájú, kerül bemutatásra, például a WO 95/07991 és WO 95/30010 szabadalmakban. Ilyen BPN'-variánsokat tartalmazó mosószereket találhatunk például a WO 95/29979 szabadalomban.

Két az alábbi szabadalomban tárgyalt aminosavpozíció, nevezetesen a 3-as és a 4-es nem a loop-régióban található; a maradék 199-es és 211-es a BPN' 205-ös, illetve 217-es pozíciójával homológ, melyek, mint például a megnevezett szabadalmakban leírásra került, a molekula 6. loop-jában találhatóak. Ez részt vesz a szubsztrátkötésben. A BPN'-nél a 205-ös pozícióban természetesen egy izoleucin (I) található. A WO 95/07991 szabadalomban számos lehetséges aminosavat felsorolnak, melyek a természetesen a 217-es pozícióban elhelyezkedő tirozinnal (Y) kicserélhetőek, de a molekula stabilizáló mutációival kapcsolatban nem; amennyiben egy 217G-variánsra van szükség, akkor csak más, ezen szubsztrátkötő loop-ban található katalitikusan kompenzáló pontmutációval összefüggésben. Az egyedüli, ténylegesen kinyilvánított, a 205-ös és/vagy a 217-es pozícióban kicseréléseket tartalmazó variánsoknál (S. 14) mindkét maradékot térkitöltő, legtöbbször alifás aminosavakkal cserélték ki. Ez ugyanúgy igaz a WO 95/29979 szabadalomra. A WO 95/30010 szabadalom szubtili-

zinjei, ha a 6. loop-ban egy mutációval rendelkeznek, akkor legalább még egy mutációval rendelkeznek egy másik loop-ban. Z17G-variánsként közölték még például az Y217G/S138D-t vagy például még több nem a 6-os loop-ban történt kicserélődéssel rendelkező variánst, melyek homológ aminosavai a találmánynak megfelelő variánsban változatlanok.

A szubtilizin BPN' a pozíciók számozását tekintve a szubtilizin referenciaenzimeként alkalmazható. Így például az EP 130756 szabadalom összes szubtilizinre vonatkozó pontmutációját a BPN' számozása alapján adták meg. Ide tartozik a 217-es pozíció is, ami a találmánynak megfelelő enzimben a 211-es pozíciónak felel meg. Ez az írat nem ír elő további releváns pozíciót.

A Calsberg proteáz szubtilizin az E. L. Smith et al. 1968 in J. Biol. Chem., Volume 243, S. 2184-2191 és a Jacobs et al. (1985) Nucl. Acids Res., 13 kötet, S. 8913-8926 publikációkban kerül bemutatásra. Természetes úton a Bacillus licheniformis termeli és Alcalase® néven beszerezhető a Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dánia, cégtől. A WO 96/28566 szabadalomból ismerhetjük ennek pontmutációkkal kapható variánsait, melyek szubsztrátkötése csökkentett és ezzel egyidőben hidrolizációs rátájuk nagyobb. Itt, mint a fent említett BPN'-szabadalmak esetében, variánsokról van szó, melyekben egy vagy többszörös kicserélődést végeztek a molekula loop-régiójaiban; 204I/216G variáns (Calsberg-számozással) nem kerül említésre.

A PB92 proteázt természetes óton az alkalifil baktérium, a *Bacillus nov. spec. 92* termeli és a Gist-Brocades, Delft, Niederlande gyár forgalmazza Mazacal® kereskedelmi néven. Eredeti szekvenciájában az EP 283075 szabadalomban került leírásra. Az ennek az enzimnek pontmutációi által kapott variánsok, melyek mosó- és tisztítószerekben való alkalmazásra megfelelőek, a WO 94/02618 és EP 328229 szabadalmakban kerülnek leírásra. Az elsőből csupán az L211G/N212D rendelkezik egy az itt leírásra került variánssal identikus cserével; a másodikban nem találunk releváns variánsokat.

A 147-es és 309-es szubtilizint Esperase®, illetve Savinase® kereskedelmi néven forgalmazza a Novozymes cég. Ezek *Bacillus clausii*-törzsekből származnak, melyek a GB 1243784 szabadalomból ismertek. Ezen enzimek pontmutációkkal - a mosó- vagy tisztítószerekben való hatás tekintetében - továbbfejlesztett variánsai például a WO 89/06279, WO 95/30011, WO 99/27082 és WO 00/37599 szabadalmakban kerültek leírásra.

A WO 89/06279 szabadalom célja a proteázok magasabb oxidációs stabilitásának, megnövelt proteolitikus rátájának és megnövelt mosóteljesítményének elérése. Az (S. 14)-ből következik, hogy a 147-es és 309-es szubtilizin fizikai és kémiai tulajdonságait csak bizonyos pozíciókban történő kicserélések változtatják meg; itt a 3-as, 4-es és 211-es pozíció nem kerül említésre. A WO 95/30011 szabadalomban a szubtilizin 309 variánsai kerülnek bemutatásra, melyek a molekulák loop-régióiban pontmutációkkal rendelkeznek és ezzel alacsonyabb szubsztrát-abszorpciót mutatnak egy megnövekedett

hidrolizációs rátával egyidejűleg; ez alatt a 3-as és 4-es pontokon nem rendelkeznek mutációval; az egyetlen, az alábbi szabadalom variánsával valóban megegyező pontmutáció az L211G csere, amely azonban semmi esetre sem korrelál egy V199I cserével. A WO 99/27082 szabadalomban például a szubtilizin 309-ből készítenek variánsokat, melyek megnövelt mosóképességgel rendelkeznek az aktív loop-ok több, mint egy aminosav inszerciójával való megnövelése következtében. Tehát az alábbi találmánnyal ellentétben nem szubsztitúcióról van szó.

További, mosó- és tisztítószerként való alkalmazásra etablirozott proteázok például:

- a Bacillus spec. 164-A1 -ből kinyert 164-A1 proteázok a Chemgen Corp., Gaithersburg, MD, USA gyártól és Vista Chemical Company, Austin, TX, USA gyártól (WO 93/07276);
- a Bacillus sp. -ből származó PD138 NCIME 40338 alkali-kus proteáz a Novozymes gyártól (WO 93/18140);
- a Bacillus sp. Ferm. BP-3376 -ből származó K-16 proteáz a Kao Corp., Tokyo, Japan gyártól (US 5344770);
- a Nedkov et al. 1985 Biol. Chem Hoppe-Seyler, 366 kötet, S. 421-430 által leírt szubtilizin DY, amelyet a WO 96/28557 szabadalommal főként mosó- és tisztítószerekben való alkalmazásra optimalizáltak, éspedig ugyancsak az aktív loopokban való pontmutációkkal, bár egy V204I (a találmánynak megfelelő enzimben a 199-es pozíciónak megfelelő pozíció) variáns egyedül vagy más cserékkel kombinált előfordulása nélkül; és

a *Thermocactinomyces vulgaris* (Meloun et al., FEBS Lett. 1983, S. 195-200) által termelt és például a WO 96/28558 szabadalom szerint optimalizált termitáz.

A számos lehetséges termitáz variáns közül az utóbb említett iratban az L221G (a találmánynak megfelelő enzim 211-es pozíciójának megfelelő) cserével rendelkező is leírásra került. Mivel az enzim természetes állapotában a 209-es pozícióban (a találmánynak megfelelő enzim 199-es pozíciójának megfelelő) izoleucint találunk, ezért két a találmány szempontjából alapvető aminosavmaradék a megfelelő pozícióban lett előírva, azonban anélkül a kiegészítő jelleg nélkül, hogy a molekulát ennek a két aminosavnak a jelenlétében a két pozícióban stabilizálnák. Különösen nem irnak elő egy a 3-as pozícióban treonin által történő, vagy a 4-es pozícióban (a *B. lentus*-alkalikus proteáz szerint) izoleuccinnal történő stabilizálást. A *B. lentus*-ból származó alkalikus proteáz pozícióival homológ 10-es és 11-es pozícióban a termitáz mindazonáltal szerint és arginint (vesd össze WO 96/28556) tartalmaz.

Ezen kívül a termitázok esetén olyan molekulákról beszélünk, melyek összességében jelentős mennyiségű szekvenciaeltérést mutatnak a többi szubtilizinnel ellentétben (Meloun et al. S. 198). Így a maturális termitáz fehérjék és a *B. lentus*-alkalikus proteázok közötti homológia 45 %-os identitást mutat (62 % hasonló aminosavak). Hasonló igaz a *K* proteázokra is (WO 96/28556). Ezek homológiája a *B. lentus*-alkalikus

proteázokkal a naturális proteinek szintjén csak 33 %-ot tesz ki (46 % hasonló aminosavak).

További proteázok kerülnek például leírásra az EP 199404, EP 251446, WO 91/06637 és WO 95/10591 szabadalmakban, melyeket a Procter & Gamble Comp., Cincinnati, OH, USA, mint „proteáz A”, „proteáz B”, „proteáz C”, illetve „proteáz D” említ, és mosó- és tisztítószerekben alkalmazhat (vesd össze WO 00/47707, S. 73). Az EP 199404 szabadalom proteázai különböző variánsok, melyek az EP 130756 szabadalmon alapulnak, ám mégsem tartalmazzák az alábbi szabadalom szempontjából releváns pozíciókat (vesd össze EP 199404 A2, Sp. 20). Az EP 251446 B1 (S. 49) szabadalom 10. példájában bemutatásra kerül, hogy az Y217G variáns kevésbé stabil, mint a vad típusú enzim és emiatt ezt a cserét nem alkalmazzák. A „proteáz C”-k a WO 91/0667 szabadalom alapján a 123-as és 274-es pozíciókban történt pontmutációkkal tűnnek ki. A „proteáz D” minden variánsa a WO 95/10591 alapján mutációkat hordoznak a 76-os pozícióban, amely az alábbi proteázokban változatlan és a BPN'-ével identikus; ugyanez igaz a WO 95/10615, US 6017871 és US 6066611 szabadalmakra.

További ismert proteázok a Durazym®, Relase®, Everlase®, Na-fizym®, Natalase® és Kannase® kereskedelmi néven, a Novozy-mes cég által forgalmazott termékek, a Purafect®, Purafect OxP® és Properase® kereskedelmi nevű termékek a Genecor cégtől, Protosol® kereskedelmi néven az Advanced Biochemicals Ltd. Cégtől, Thane, India és a Wuxi® kereskedelmi néven a Wuxi Snyder Bioproducts Ltd. Cég, Kína, által forgalmazott enzimek.

A szubtilizinek mosási teljesítményének növelésére számos szabadalomban az aktív loopokba történő kiegészítő aminosavak inzerciójának stratégiáját követték, például ez eddig említett szabadalmak mellett a WO 00/37599, WO 00/37621 - WO 00/37627 és WO 00/71683 - WO 00/71691 szabadalmakban.

Egy további stratégia a molekulák felületi töltésének megváltoztatása. Így például a WO 91/00334, WO 91/00335, WO 91/00345, EP 479870, EP 945502 vagy EP 563103 szabadalmakban számos aminosav-csere kerül ismertetésre, mellyel a molekula izoelektromos pontja növelhető vagy csökkenthető. A WO 00/24924 szabadalom egy a megfelelő variánsok identifikálására alkalmas eljárást mutat be. Ugyanez igaz a WO 96/34935 szabadalmat illetően, amely szerint ugyanezen eljárás alapján a molekulák hidrofóbitása is változtatható.

Egy további stratégia a szubtilizinek mosási teljesítményének növelésére abból áll, hogy ismert molekulákban statisztikusan pontmutációkat hozunk létre, majd vizsgáljuk azok hozzájárulását a mosási teljesítményhez. Ezt a stratégiát követi például az US 5700676 szabadalom; az egyetlen leírásra kerülő, a jelen találmányt érintő pozícióban történő csere a 217-es pozícióban (BPN'-számozással) történik több másik csere mellett. Ugyanez igaz az US 5310675, US 5801038, US 5955340, WO 99/20723 és WO 99/20727 szabadalmakra. Az US 4760025 szabadalomban is egyetlen, jelen szabadalom szempontjából releváns mutáció kerül említésre a 217-es pozícióban, mégpedig azért, mert az aktív centrum ezáltal érintett. Arra, hogy a többi találmánynak megfelelő csere a mosási teljesítményre

vonatkozóan szerepet játszhatna, az iratok nem tesznek utalást.

Az enzimfejlesztés egyik modern irányzatának lényege, hogy ismert, egymással rokon fehérjékből származó elemeket egy statisztikus eljáráson keresztül új enzimekké kombinálnak, melyek addig nem elért tulajdonságokat mutatnak. Az ilyen eljárásokat Directed Evolution főfogalom alatt foglaljuk össze. Ide tartoznak például az alábbi eljárások: A STEP-módszer (Zhao et al. (1998), Nat. Biotechnol., Band 16, S. 258-261), Random priming recombination (Shao et al., (1998), Nucleic Acids Res., Band 26, S. 681-683), DNA-shuffling (Stemmer, W. P. C. (1994), Nature, Band 370, S. 389-391) vagy RACHITT (Coco, W.M. et al. (2001), Nat. Biotechnol., Band 19, S. 354-359).

Egy további, legfőképpen kiegészítő stratégia lényege, hogy növeljük az érintett proteázok stabilitását, és ezzel növeljük hatékonyságukat. Ilyen jellegű proteáz stabilizálás, melyet a kozmetikában alkalmaznak, például az US 5230891-ben kerül leírásra. Mosó- és tisztítószeres stabilizálására ezzel szemben a pontmutációs stabilizálás az ismertebb. Így az US 6087315 és US 5230891 alapján a proteázok megfelelő tirozinmaradékainak más maradékokkal való kicserélésével stabilizálhatóak. További lehetőségek például:

- megfelelő aminosavmaradékok kicserélése prolinra az EP 583339 alapján;
- polárosabb vagy töltött csoportok bevitele a molekulák felszínére az EP 995801 szerint;

- fémiononok kötésének megváltoztatása, különösen a kalcium-kötőhelyeken, például a WO 88/08028 és WO 88/08033 szabadalmak alapján;

További lehetőségek szubtilizinek, különösen *Bacillus lentus*-ból kinyerhető szubtilizinek stabilizálására az US 5340735, US 5500364, US 5985639 és US 6136553 szabadalmakban kerülnek leírásra.

A *B. lentus*-ból származó alkalikus proteázok esetén *Bacillus* species-ből származó nagymértékben alkalikus proteázokról beszélünk. Ezen törzsek egyike a DSM 5483 számot kapta (WO 91/02792, illetve EP 493398 és US 5352604). Ennek az enzimnek a pontmutációk által kapott, mosó- és tisztítószerekben alkalmazható variánsai a WO 92/21760, WO 95/23221 és WO 98/30669 -ben kerültek leírásra.

A vad típusú enzim egy olyan producensből származik, amelyet eredetileg alkalifil *Bacillus*-törzsek screening-je közben kaptunk, és önmaga is egy viszonylag magas stabilitást mutat oxidációval és detergensnek hatásaival szemben. A WO 91/02792, illetve EP 493398 és US 5352604 szabadalmakban ennek heterológ expressziója kerül leírásra a *Bacillus licheniformis* ATCC 53926 gazdában. A nevezett US-szabadalom igénypontjaiban a 208, 210, 212, 213 és 268 pozíciókat jellemzik a *B. lentus*-alkalikus proteázainak karakterisztikus pontjainak, de a 61-es és 211-es pozíciókon cseréket tartalmazó variánsok nem kerülnek említésre.

A WO 92/21760 szabadalom szintén a B. lentus-alkalikus proteáz vad típusú enzimét írja le SEQ ID NO:52 alatt aminosavszekvenciájában és SEQ ID NO:106 alatt a nukleotidszekvenciájában. Ebből következően ebben a szabadalomban 51 különböző variáns kerül leírásra, melyek a vad típustól számos pozícióban eltérnek, ezek közé tartozik az S3T, V4I és V199I is.

A WO 95/23221 és WO 98/30669 szabadalmakban szintén olyan mosó- és tisztítószerként alkalmazható B. lentus-alkalikus proteáz-variánsokból indulnak ki, melyek az S3T, V4I és V199I pozíciókban a találmánynak megfelelő enzimmel megegyeznek. Ebből következően mindegyik két vagy három további pontmutációval rendelkezik a B. lentus DSM 5483-ból származó vad típusú enzimmel szemben. Részben viselnek egy további mutációt a 211-es pozícióban, mégpedig a 211D (F49, F54 és F55 variánsok); logikusan ezek a szabadalmak a 211D és 211E cseréket védik le.

Mint ahogy azt ezek a hosszú időtartam alatt végzett munkák is bizonyítják, nagy kereslet mutatkozik mosó- és tisztítószerként alkalmazható alternatív proteázokra. A legújabb publikációk, mint például a WO 00/71683 - WO 00/71691 bizonyítják, hogy még a hosszú idő óta etablirozott szubtilizin-proteázok családjánál is újra és újra felmerül a mosó- és tisztítószerként való alkalmazás tekintetében történő optimalizálás igénye. Ez az érintett enzimek aminosavszekvenciájának variációit célzó rengeteg munkával jár. Persze a lehetséges kiszámítható enzimátikus tulajdonságok alapján

(vesd össze DS 5801039, US 5985639 és US 6136553) nem lehet minden további nélkül ezen enzimek mosó- vagy tisztítószer-receptúra kontextusában való viselkedésére következtetni. Itt további faktorok játszanak szerepet, mint például stabilitás oxidáló ágensekkel, tenzidek által való denaturációval, gyürődési effektusokkal szemben, vagy megkivánt szinergiák más adalékanyagokkal.

Az alábbi találmány feladatául tűzte ki olyan szubtilizinek feltalálását, melyek a technikai felhasználások során jobb teljesítményt nyújtanak. Különösen olyan szubtilizinek feltalálása, melyek a mosó- és/vagy tisztítószer mosó-, illetve tisztítóhatását javítják.

A találmány egy részfeladata volt, hogy a proteázokat ne csak hidrolizisaktivitásuk tekintetében javítsuk, hanem a megfelelő mosó- és tisztítószer-receptúrákban való stabilitásukat is.

Az alábbi szabadalom ennek a problémának a tekintetében azt a stratégiát követte, hogy a *Bacillus lentus*-ból származó szubtilizin különösen a WO 91/02792, WO 92/21760 és WO 95/23221 szabadalmakban leírt molekulákkal ellentétben, mosó- és tisztítószerekben való alkalmazhatóságát javítsa.

Meglepő módon azt találtuk, hogy az izoleucin és glicin aminosavak a 199-es és 211-es pozíciókban egy megnövekedett hozzájárulást eredményeznek a mosási teljesítményben, és a treonin és izoleucin aminosavak a 3-as, illetve a 4-es po-

zicióban vélhetően egy stabilizáló effektuson keresztül erősítik azt.

A találmánynak megfelelően tehát ezt a feladatot szubtilizin típusú alkalikus proteázok segítségével oldjuk meg, melyek azzal jellemezhetőek, hogy a *Bacillus lentus* DSM 5483-ból származó szubtilizin számozása szerint a 199-es pozícióban izoleucint, a 211-es pozícióban glicint és legalább egy stabilizálót találunk, kedvelt módon treonin aminosavat a 3-as és/vagy izoleucint a 4-es pozícióban.

Ezt ugyancsak szubtilizin-variánsokkal oldjuk, melyek azzal jellemezhetőek, hogy a *Bacillus lentus* DSM 5483-ból származó szubtilizin számozása szerint a 199-es pozícióban izoleucint és a 211-es pozícióban glicint tartalmaznak, és egyre inkább kedvelt módon egy vagy mindkét aminosavat, treonint a 3-as és izoleucint a 4-es pozícióban tartalmazza.

Ezt ugyancsak szubtilizin variánsokkal oldjuk, melyek azzal jellemezhetőek, hogy a *Bacillus lentus* DSM 5483-ból származó szubtilizin számozása szerint a 3-as pozícióban treonint, a 4-es pozícióban izoleucint, a 199-es pozícióban izoleucint és a 211-es pozícióban glicint tartalmaznak.

Különösen szubtilizin-típusú alkalikus proteázokban oldódik, melyek azzal jellemezhetőek, hogy azokat egy *Bacillus*, különösen a *Bacillus lentus*, természetes úton termeli vagy egy ilyen szubtilizinből levezethetőek.



Különösen jól oldódik olyan alkalikus proteázokban, melyeket a *Bacillus lentus* DSM 5483 természetes úton termel vagy egy ilyen alkalikus proteázból levezethetőek, és ezen belül különösen az SEQ ID NO.4 -ben megadott aminosavszekvencia szerinti *B. lentus*-alkalikus proteáz S3T/V4I/V199I/L211G.

Mivel a WO 92/21760-ból ismert variáns a találmánynak megfelelő *B. lentus* alkalikus proteáz S3T/V4I/V199I/L211G variánssal nagyfokú egyezést mutat, az M131 *B. lentus*-alkalikus proteáz variánst el kell látnunk az S3T/V4I/A188P/V193M/V199I jelölendő cserékkel. Ezek a találmánynak megfelelő variánssal három pontban megegyeznek. A különbséget a két csere, az A188P és a V193M adják, amely helyeken a találmánynak megfelelő variánsok a vad típusal megegyezők. Mint például a WO 95/30011 szabadalomból látható, a *B. lentus*-szubtilizinek 193-as aminosava a 6. Loop kezdetén található, míg a 188-as aminosav nem loop-hoz, hanem a fehérje egy köztes helyzetű kompakt területéhez rendelhető. Ezek szerint a mutációk a molekula struktúráisan különböző területein találhatóak. Az alábbi találmánnyal meglepő módon azt találtuk, hogy a 188-as és 193-as pozícióknak a vad típusal való reverziója és egy további, a 211-es pozícióban, tehát a 6. loop hátsó régiójában, történő mutációval egy olyan enzimet kapunk, amely mosó-, illetve tisztítóteljesítményében felülmúlja az eddig ismert enzimeket, különösen a *B. lentus*-alkalikus proteázok eddig ismert variánsait.

A WO 95/23221 és WO 98/30669 szabadalmak variánsaitól az különbözteti meg a találmánynak megfelelően különösen kedvelt

enzimet, hogy az több pozícióban is revertált, azaz a vad típussal megegyező és azon a 211-es pozícióban a vad típus leucinja, vagy a fent nevezett variánsok aszparaginsavja helyett a nem térkitöltő és töltés nélküli glicin aminosav található.

Enzimológiai szempontból nézve meglepő, hogy a jobb mosó-, illetve tisztítóteljesítményt egyetlen aminosav cseréjével értük el, amely feltehetően a reakció szubsztrátkötésében és/vagy katalizálásában vesz részt; mégpedig a térkitöltő jellegű, hidrofób oldalláncú leucinnak az egy protonra redukált oldalláncú glicinre való cseréjével. Ezzel egyidőben a 6. loop második - a vad típussal szemben - mutált pozíciója, mégpedig a 199-es nem kell, hogy az izoleucinból a vad típus valinjára revertálódjon. A WO 95/23221 vagy WO 98/30669 szabadalmakkal való összehasonlításnál a pontmutáció egy savas csoporttá, azaz L211D vagy L211E ajánlottabb lett volna, mint más mutálódó pontok reverziója vad típussá. A kezdetben felhozott iratok, melyek a különböző szubtilizinek aktív loop-jainak variálását írják le, különösen a WO 95/30011, a 211-es pozíciót érintő variációknál egy másik aktív loop változtatása, vagy ugyanazon loop-on belül egy további drasztikus változtatás szükséges, mint például V199S/L211D, P204E/L211G vagy G196S/L211G, hogy a katalitikus vonatkozású változást kompenzálják, ám semmi esetre sem szabad ragaszkodni a V199I cseréhez.

Az alkalmazástechnikai használhatóság szempontjából, különösen mosó- és tisztítószerekben az a meglepő, hogy az egy

teljesítménynövekedéshez vezet, különösen az ilyen enzimeknek a különböző szennyeződéseknek eltávolításában a mosó- és tisztítóteljesítmény hozzájárulásának növekedéséhez. A találmánynak megfelelő szubtilizinek sikeres alkalmazhatósága a megfelelő mosó-, illetve tisztítószerreceptúrákban (vesd össze 2 - 5 példa) arra enged következtetni, hogy az érintett variánsok stabilitása is megfelelően magas ahhoz, hogy az enzimeket elég hosszú ideig aktívan tartsa, és ezzel hozzájárul a jobb teljesítményhez.

Az alábbi találmány egy tárgya egy szubtilizin típusú alkalikus proteáz, amely azzal jellemezhető, hogy a *Bacillus lentus* DSM 5483-ből származó szubtilizin számozása szerint a 199-es pozícióban izoleucint és a 211-es pozícióban glicint és legalább egy stabilizálót tartalmaz. Előnyös módon ennél a stabilizálónál egy további treonin aminosavról beszélünk a 3-as pozícióban és egy izoleucinról a 4-es pozícióban.

A találmány ezen tárgyának további kivitelezési formái a szubtilizin-típusú alkalikus proteázok, melyek azzal jellemezhetőek, hogy a *Bacillus lentus* DSM 5483-ből származó szubtilizin számozása szerint a 3-as pozícióban treonint, a 4-es pozícióban izoleucint, a 199-es pozícióban izoleucint, a 211-es pozícióban glicint tartalmaznak; hogy azok egy *Bacillus*, különösen egy *Bacillus lentus* által természetes úton termelt, vagy egy ilyen *Bacillus*ból levezethető szubtilizinek; hogy azok egy *Bacillus lentus* DSM 5483 által természetes úton termelt, vagy egy ilyenből levezetett szubtilizinek, különösen *B. lentus*-alkalikus S3T/V4I/V199I/L211C

proteázok az SEQ ID NO.4 -ben megadott aminosavszekvenciának megfelelően.

A találmány ezen tárgyának további kivitelezési formái a megfelelő szubtilizin-típusú alkalikus proteázokból levezethető proteinek, különösen fragmentáció vagy deléciós mutagenézis, inzerciós mutagenézis, szubsztitúciós mutagenézis vagy legalább egy más fehérjével való legalább egy fúzió által; olyanok, melyek továbbá, azzal jellemezhetőek, hogy továbbá derivatizáltak; hogy egy proteolitikus aktivitást, különösen egy a kiindulási molekulával szembeni, illetve nem-derivatizált molekulákkal szembeni magas proteolitikus aktivitást, és különösen egy jobb teljesítmény mutatnak; és/vagy hogy továbbá stabilizáltak.

A találmány egy további tárgyát képezik a nukleinsavak, melyek a találmány első tárgyának leírásában említett proteinek kódolják, különösen a szubtilizin-proteázokat kódoló nukleinsavak, melyek nukleotidszekvenciája az SEQ ID NO.3-ban megadott nukleotidszekvenciával megegyeznek, különösen azokon a tartományokon, amelyek a 199-es pozíciójú izoleucint és a 211-es pozíciójú glicint és különösen azokon a tartományokon, amelyek a 3-as pozíciójú treonint, és a 4-es pozíciójú izoleucint, a 199-es pozíciójú izoleucint és a 211-es pozíciójú glicint kódolják.

A találmány egy további tárgyát képezik a vektorok, melyek egy fent leírásra került nukleinsavtartományt tartalmaznak, amely a találmány első tárgyának leírásában említett proteinek, vagy

azok származékait kódolja. Kedvelt kivitelezési formáknál klónozó vektorokról beszélünk, melyek egy fentebb említett nukleinsavtartományt tartalmaznak és különösen egy olyan nukleinsavtartományt tartalmaznak, amely egy a találmány első tárgyának leírásában jellemzett proteint vagy annak származékait kódolja; vagy expressziós vektorokról, melyek egy fentebb említett nukleinsavtartományt tartalmaznak és különösen egy olyan nukleinsavtartományt tartalmaznak, amely a találmány első tárgyának leírásában említett proteineket vagy ezek származékait kódolják, és ezek bioszintézisét teszik lehetővé.

A találmány egy további tárgyát képezik sejtek, melyek a találmány fent említett tárgya szerinti vektort tartalmaznak; melyek előnyös módon a találmány első tárgyának leírásában említett proteineket vagy ezek származékait termelik, vagy ezek expressziójára serkenthetőek, különösen egy fentebb említett expressziós vektor alkalmazásával; melyek előnyös módon azzal jellemezhetőek, hogy baktériumok, különösen olyanok, melyek a termelt fehérjét az őket körülvevő médiumba szekretálják; melyek előnyös módon azzal jellemezhetőek, hogy a *Bacillus* nemzetségébe tartoznak, különösen a *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* vagy *Bacillus alcalophilus* fajok; vagy azzal jellemezhetőek, hogy eukarióta sejtek, különösen olyanok, melyek a termelt fehérjét poszttranszlációsan módosítják.

A találmány egy további tárgyát képezik a találmány első tárgyának megfelelő proteolitikus enzim vagy ennek származékainak előállítását szolgáló eljárás, melynél a fent le

írásra került gazdasejtet és/vagy a fent leírásra került vektorokat és/vagy a fent leírásra került nukleinsavat alkalmazzuk.

A találmány egy további tárgyát képezik olyan szerek, melyek megfelelő proteolitikus enzimeket tartalmazzák, különösen mosó- és tisztítószeres, különösen egy 2 µg - 20 mg / g szer mennyiségben; előnyös módon olyanok, melyek azzal jellemezhetőek, hogy további enzimeket tartalmaznak, különösen más proteázokat, amilázokat, cellulázokat, hemicellulázokat és/vagy lipázokat.

A találmány egy további tárgyát képezik textilnyersanyagok kezelését szolgáló, vagy textilápoló szerek, melyek azzal jellemezhetőek, hogy egyedül vagy más aktív adalékanyagokkal együtt a találmány első tárgyának megfelelő proteolitikus enzimet tartalmaznak, különösen természetes alkotóelemekkel rendelkező -különösen gyapjú és selyem- szálak vagy textíliák tisztítására.

A találmány egy további tárgyát képezik textíliák vagy kemény felületek gépesített tisztításának eljárásai, melyek azzal jellemezhetőek, hogy az eljárás legalább egy lépése során a találmány első tárgyának megfelelő proteolitikus enzim aktiválódik, kiváltképpen egy 40 µg - 4 g / alkalmazás, különösen egy 400 µg - 400 mg / alkalmazás mennyiségben.

A találmány egy további tárgyát képezik textilnyersanyagok kezelését vagy textilápolást szolgáló eljárások, melyek azzal

jellemezhetőek, hogy az eljárás legalább egy lépése során a találmány első tárgyának megfelelő proteolitikus enzim aktiválódik, különösen természetes alkotóelemekkel rendelkező -különösen gyapjú és selyem- szálak vagy textíliák tisztítására.

A találmány egy további tárgyát képezik a találmány első tárgyának megfelelő proteolitikus enzimek textíliák vagy kemény felületek tisztítására való alkalmazásai, különösen 40 µg - 4 g / alkalmazás, különösen egy 400 µg - 400 mg / alkalmazás mennyiségben.

A találmány egy további tárgyát képezik a találmány első tárgyának megfelelő proteolitikus enzimek mosó- vagy tisztítószerek adalékanyagainak aktiválására vagy deaktiválására való alkalmazásai.

A találmány egy további tárgyát képezik a találmány első tárgyának megfelelő proteolitikus enzimek kismolekulájú vegyületek vagy proteinek biokémiai analizisére vagy szintézisére való alkalmazásai.

A találmány egy további tárgyát képezik a találmány első tárgyának megfelelő proteolitikus enzimek természetes szövetek vagy biológiai nyersanyagok preparációjára, tisztítására vagy szintézisére való alkalmazásai.

A találmány egy további tárgyát képezik a találmány első tárgyának megfelelő proteolitikus enzimek természetes nyers-

szövetek kezelésére való alkalmazásai, különösen felületi kezelésre, különösen egy bőrkezelési eljárásban.

A találmány egy további tárgyát képezik a találmány első tárgyának megfelelő proteolitikus enzimek nyersanyagok vagy köztitermékek kinyerésére vagy kezelésére való alkalmazásai a textilgyártásban, különösen szövetek védőrétegeinek eltávolításánál.

A találmány egy további tárgyát képezik a találmány első tárgyának megfelelő proteolitikus enzimek textilnyersanyagok kezelésére vagy textilápolóként való alkalmazásai, különösen gyapjú vagy selyem, vagy gyapjú-, vagy selyemtartalmú keveréktextíliák kezelésére.

A találmány egy további tárgyát képezik a találmány első tárgyának megfelelő proteolitikus enzimek fotografikus filmek kezelésére való alkalmazásai, különösen zselatintartalmú vagy hasonló védőrétegek eltávolítására.

A találmány egy további tárgyát képezik a találmány első tárgyának megfelelő proteolitikus enzimek élelmiszerek vagy takarmányok előállítására való alkalmazásai.

A találmány egy további tárgyát képezik a találmány első tárgyának megfelelő proteolitikus enzimet tartalmazó kozmetikumok, vagy a találmány első tárgyának megfelelő proteolitikus enzim bevonásával végzett kozmetikai eljárások, vagy a találmány első tárgyának megfelelő proteolitikus enzim

kozmetikai célokra való alkalmazása, különösen a megfelelő eljárás keretein belül vagy a megfelelő szerekben.

Egy **protein** alatt az alábbi szabadalom értelmében egy természetes aminosavakból felépülő, nagymértékben lineáris felépítésű, hatásának kifejtéséhez leginkább háromdimenziós struktúrát felvevő polimert értünk. Az 1. táblázatban a 19 proteínogén, természetes előfordulású L-aminosavat tüntettük fel, az egy és hárombetűs kódokkal, amely rövidítéseket az alábbi szabadalomban is alkalmazunk.

1. táblázat: A proteínogén aminosavak

Egybetűs kód	Hárombetűs kód	Teljes név
A	Ala	Alanin
C	Cys	Cisztein
D	Asp	Aszparaginsav
E	Glu	Glutaminsav
F	Phe	Fenilalanin
G	Gly	Glicin
H	His	Hisztidin
I	Ile	Izoleucin
K	Lys	Lizin
L	Leu	Leucin
M	Met	Metionin
N	Asn	Aszparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin

R	Arg	Arginin
S	Ser	Szerin
T	Thr	Treonin
V	Val	Valin
W	Trp	Triptofán

Ezeknek a jeleknek és egy számnak a kombinációja azt jelzi, hogy az adott proteinben melyik aminosav található az adott pozícióban. Így például az 33 azt jelenti, hogy a 3-as pozícióban egy szerin-csoport található, a számolást az adott protein N-terminálisáról kezdve. Egy ezen a helyen történt pontmutációt, például egy treonin aminosavra való cserét a nomenklatura szerint az S3T jelöléssel rövidítünk. Több pontmutációval rendelkező variánsok leírására ezeket a cseréket perjelekkel elválasztva egymás után írjuk. Az S3T/V4I variáns ezek szerint azzal jellemezhető, hogy abban a 3-as pozícióban levő szerint egy treoninra, és a 4-es pozíciójú valint egy izoleucinra cseréltük.

Az alábbi szabadalom pozíciómeghatározásai, amennyiben nincs más megadva, az érintett protein mindenkori maturális formájára vonatkoznak, azaz a szignálpeptidek (lásd lentebb) nélküli proteinre.

Az alábbi találmány értelmében **enzim** alatt egy olyan proteint értünk, amely egy meghatározott biokémiai funkciót lát el. Például **proteolitikus enzimek** alatt, vagy **proteolitikus** funkciójú enzimek alatt általában olyanokat értünk, melyek a

proteinek savamid-kötéseit hidrolizálják, különösen azokat, melyek a proteinek belsejében fekszenek, és ezért azokat endopeptidázoknak is nevezhetjük. A szubtilizin-proteázok olyan endopeptidázok, melyeket természetes úton gram-pozitív baktériumok termelnek, és legtöbbször szekretálnak, vagy ezekből, például molekuláris biológiai módszerekkel levezettek és olyan területeikkel, mint struktúraépítő vagy funkcióhordozó régiók a természetes szubtilizin-proteázokkal homologizálhatóak. Például a „Subtilases: Subtilisin-like Proteases” című cikkben R. Siezen -től, 75-95 oldal, és a „Subtilisin enzymes” című cikkben R. Bott és C. Betzel-től, New York, 1996, kerül leírásra.

Számos protein úgynevezett **preproteinként**, azaz egy **szignálpeptiddel** együtt épül fel. Ez alatt a fehérje N-terminális végét értjük, melynek funkciója nagyrészt abból áll, hogy a felépített proteint a termelő sejtéből a periplazmába vagy a sejtet körülvevő médiumba juttassa és/vagy a protein helyes hajtogatását biztosítsa. Végül a szignálpeptidet természetes körülmények között egy szignálpeptidáz lehasítja a proteintről, úgyhogy az tulajdonképpen katalitikus aktivitását az addig jelen lévő N-terminális aminosavak nélkül végzi. A WO 91-02792 1. ábrája alapján a *Bacillus lentus*-ból származó szubtilizin preproteinjé 380 aminosavat tartalmaz. A maturális protein ezzel szemben csak 269 -et; a számozás a maturális protein első aminosavával kezdődik, ez esetben tehát az alaninnal, ami alapján a preprotein a 112-es számot kapná. Az SEQ ID NO.1 és 2 szerint a *B. licheniformis* ATCC 68614-ből származó szubtilizin szignálpeptidje 111 aminosav hosszúságú

és a naturális peptid 269 aminosav hosszúságú. Enélkül a felosztás nélkül a teljes protein egy 380 aminosavas hosszúsággal rendelkezik, ahogy az az SEQ ID NO.2-ből következik. Ugyanez igaz az SEQ ID NO.3 és 4 alapján a különösen kedvelt kivitelezési formára.

Technikai alkalmazások esetén enzimatis aktivitásuk miatt a **naturális peptidok**, azaz az előállításuk után processzált fehérjék a **preproteinekkal** szemben, kedveltebbek.

A pro-proteinek a proteinek inaktív előanyagai. Ezek szignálszekvenciával rendelkező előfutárait **pre-pro-proteineknek** nevezzük.

Az alábbi szabadalom értelmében nukleinsavak alatt a természetes módon nukleotidokból felépülő, információhordozó szerepű molekulákat értjük, melyek a proteinekben vagy enzimekben található aminosavsorrendet kódolják. Előfordulhatnak egy szálként, egy ezzel komplementer szálként, vagy dupla-szálként. Mint természetes módon stabil információhordozó, a DNS nukleinsav a molekuláris biológiai munkákban közkedvelt. Ezzel szemben a találmány realizálásához természetes környezetben, mint például egy exprimáló sejtben, egy RNS épül fel, ami miatt a találmány szempontjából lényeges RNS-molekulák ugyancsak az alábbi találmány kivitelezési formáihoz tartoznak.

Egy nukleinsav egy proteinek megfelelő információs egységét **génnek** nevezzük az alábbi szabadalom értelmében. A DNS-nél a

szekvenciákat mind a két komplementer szál mindhárom lehetséges olvasási rászterével kell figyelembe venni. Továbbá figyelembe kell vennünk, hogy különböző kodon-tripletek ugyanazt az aminosavat kódolhatják, így egy meghatározott aminosavsorrend több különböző és alkalmasint csak csekély identitást mutató nukleotidszekvenciákból is levezethető (a genetikai kódok degeneráltsága). Ezen kívül különböző organizmusok különbségeket mutatnak ezen kodonok használatában. Ezen okokból kifolyólag mind az aminosavszekvenciák, mind a nukleotidszekvenciák a védelmi terület alá kell, hogy kerüljenek és egy megadott nukleotidszekvencia mindig csak egy meghatározott aminosavsorrend egy példászerű kódolásának tekintendő.

Egy szakember a manapság általánosan ismert módszerek, mint például a kémiai szintézis vagy a polimeráz-láncreakció (PCR) molekuláris biológiai és/vagy proteinkémiai standard módszerekkel összekötve képes, ismert DNS- és/vagy aminosavszekvenciák alapján teljes gének előállítására. Ehhez ideális kiindulópontot jelentenek letétbe helyezett és/vagy kereskedelembe beszerezhető mikroorganizmusokból származó DNS-preparációk. Ilyen módszerek ismertek például a „Lexikon der Biochemie“-ből, Spektrum Akademischer Verlag, Berlin, 1999, 1. Kötet, 267-271 oldal és 2. Kötet 227-229 oldal.

A nukleotidszekvencia változásait, melyek ismert molekuláris biológiai módszerekkel előidézhetőek, **mutációknak** nevezzük. A megváltozás módja szerint ismerünk **deléciós-**, **inzerciós-** vagy **szubsztitúciós mutációkat** vagy olyanokat, melyeknél különböző

gének vagy géndarabok **fuzionálnak** egymással (**shuf-fling**); ezek génmutációk. Az ide tartozó organizmusokat **mutánsoknak** nevezzük. A mutálódott nukleinsavakból levezethető proteineket **variánsoknak** nevezzük. Így vezetnek például deléciós-, inzerciós- szubsztitúciós mutációk vagy fúziók deléciós-, inzerciós- szubsztitúciós mutáns vagy fúziós génekhez és a proteinek szintjén a megfelelő deléciós-, inzerciós- vagy szubsztitúciós variánsokhoz, illetve fúziós proteinekhez.

Az alábbi szabadalom értelmében **vektorok** alatt nukleinsavakból álló elemeket értünk, melyek jelző nukleinsavtartományként egy jelölő gént tartalmaznak. Ezek lehetővé teszik, hogy a vektor egy egyedben vagy egy sejtvonalban több generáción vagy sejtosztódáson keresztül a többi genomtól függetlenül replikálódó, stabil genetikai elemet etablirozzon. A vektorok különösen a baktériumokon való alkalmazás esetén speciális plazmidok, azaz cirkuláris genetikai elemek. A géntechnikán belül egyrészt megkülönböztetünk olyan vektorokat, melyeknek a tárolás és így bizonyos fokig a gén-technikai munka a szerepük, az úgynevezett **klónvektorokat**, és másrészt azokat, melyek azt a funkciót látják el, hogy a kiválasztott gént a gazdasejtbe juttatják, ami annyit tesz, hogy lehetővé teszik az illető fehérje expresszióját. Ezeket a vektorokat **expressziós vektoroknak** nevezzük.

A **homologizálás** segítségével, ami ismert enzimekkel való összehasonlítást jelent, mint például egy kiegyenesítés után, az aminosav- vagy nukleotid-szekvenciából következtethetünk az illető enzim aktivitására. Ez a fehérje más tartományain

keresztül, melyek a tulajdonképpeni reakcióban nem vesznek részt, kvalitatív vagy kvantitatív módon modifikálhatóak. Ez érintheti például az enzimstabilitást, az aktivitást, a reakciókörülményeket vagy a szubsztrátspecifitást.

A **proteolitikus enzim** vagy **proteáz** kifejezés alatt ezért a katalitikusan aktív centrum pár aminosavcsoportjának funkcióján túl minden funkciót értünk, mivel az egész maradék protein, vagy egy része, vagy több része a maradék proteinnak a tulajdonképpeni katalitikusan aktív tartományt adják. Az ilyen, csak modifikáló funkciókat vagy részaktivitásokat is, amennyiben egy proteolitikus reakciót támogatnak, a találmány értelmében proteolitikus aktivitásnak tekintünk. Az ilyen segédfunkciókhoz vagy részaktivitásokhoz tartoznak például egy szubsztrát, egy közti- vagy végtermék megkötése, egy reguláló behatás aktiválása, vagy gátlása, vagy közvetítése a hidrolitikus aktivitásra. Itt akár például egy struktúrelem kiépítéséről is lehet szó, amely az aktív centrumtól távol található. A második feltétele a találmánynak megfelelő proteinnak természetesen az, hogy a tulajdonképpeni aktív részek egyedüli, vagy a modifikáló részek segítségével való kémiai behatása révén peptid-kötések hidrolízisét végzi. Ezen felül az is lehetséges, hogy egy vagy több részének segítségével kvalitatív vagy kvantitatív módon befolyásolja más proteinek aktivitását. Más faktorok ilyen jellegű befolyásolását proteolitikus aktivitásnak tekintjük. Proteolitikusan aktív enzimek továbbá az olyanok, melyek aktivitása egy adott időpontban, valamilyen inhibitor által

gátolt. A döntő az elvi alkalmasság a megfelelő pró-teolizis-reakciókban.

Fragmentumok alatt minden olyan proteint és peptidet értünk, melyek kisebbek, mint a természetes proteinek, vagy olyanokat, melyek teljesen transzlált géneknek felelnek meg, és például szintetikus úton is előállíthatóak. Aminosavszekvenciájuk alapján hozzárendelhetők az érintett teljes proteinhez. Felvehetnek például megegyező struktúrát vagy proteolitikus aktivitást vagy részaktivitást mutathatnak, mint például egy szubsztrát komplexizálása. A kiindulási proteinek fragmentumai és deléciós variánsai tulajdonképpen egyformák; míg a fragmentumok kisebb törési darabokat jelentenek, addig a deléciós mutánsoknak csak rövid régióik, és így csak részfunkcióik hiányoznak.

Kiméra vagy **hibrid** protein alatt az alábbi találmány értelmében olyan proteineknek értünk, melyek olyan elemekből állnak, melyek természetes úton ugyanazon organizmus különböző polipeptidláncaiból, vagy különböző organizmusok polipeptidláncaiból származnak. Ezt az eljárást **shufflingnak** vagy **fúziós mutagenézisnek** is nevezik. Egy ilyen fúzió értelme abban lehet, hogy a fuzionált találmánynak megfelelő protein segítségével egy enzimátikus funkciót idézünk elő, vagy modifikálunk. Az alábbi találmány értelmében lényegtelen, hogy egy ilyen kiméra protein egyetlenegy polipeptidláncból vagy több alegységből áll, melyeken különféle funkciók lehetnek jelen. Az utóbbi alternatíva megvalósításához lehetséges egyetlenegy kiméra polipeptidlánc poszttranszlációs, vagy csak

egy azt megelőző tisztítólépés utáni, célzott proteolitikus hasítása több polipeptidlánccá.

Inzerációs mutációval kapott proteinek alatt olyan variánsokat kell érteni, melyeket az ismert módszerek segítségével nukleinsav- illetve proteinflagmentumoknak a kiindulási szekvenciába való beillesztésével kapunk. Elvi hasonlóságukat a kiméra proteineknek köszönhetik. Egymástól az egész protein nagyságához viszonyított változatlan proteinrész méretarányában különböznek. Az ilyen inzerációs mutáns proteinekben az idegen-protein aránya kisebb, mint a kiméra proteinekben.

Az inverziós mutagenézis, tehát egy parciális szekvencia-átfordulás, tekinthető mind a deléció, mind az inzeráció speciális esetének. Ugyanez igaz egy különböző molekuladaraknak az eredeti aminosavsorrendtől eltérő újracsoportosítása esetén. Ez tekinthető az eredeti protein deléziós variánsának, inzerációs variánsának, valamint shuffling variánsának.

Derivátumok alatt az alábbi szabadalom értelmében olyan proteinekről beszélünk, melyek tiszta aminosavláncát kémiaiilag módosítottuk. Ilyen derivatizálás történhet például biológiailag a gazdaorganizmus proteínbioszintézisével összefüggésben. Erre molekuláris biológiai módszereket alkalmazhatunk. Történhet azonban kémiaiilag is, például egy aminosav oldalláncának kémiai átalakításával vagy egy másik vegyületnek a proteínre való kovalens rákötésével. Egy ilyen vegyület

lehet például egy másik protein, amely például bifunkcionális kémiai vegyülettel kötődik a találmánynak megfelelő proteinhez. Az ilyen jellegű modifikációk befolyásolhatják például a szubsztrátspecifitást vagy a szubsztrátkötési erősséget, vagy az enzimátikus aktivitás egy időleges gátlását okozhatják, ha az összekapcsolt anyag esetén egy inhibitorról beszélünk. Ez például a tárolási időtartam szempontjából lehet fontos. Ugyancsak derivatizálásról beszélünk egy makromolekuláris hordozóra való kovalens kötés esetén.

Az alábbi találmány értelmében minden enzimet, proteint, fragmentumot és derivátumot, amennyiben nem szükséges, hogy explicit megnevezzük őket, a **proteinek főfogalommal** foglalunk össze.

Egy **enzim teljesítménye** alatt annak a mindenkori technikai környezetében mutatott hatékonyságát értjük. Ez a tulajdonképpeni enzimátikus aktivitáson alapul, ebből következően azonban további, a mindenkori folyamatra jellemző faktoroktól függ. Ide tartoznak például a stabilitás, szubsztrát-kötés, a szubsztrátot hordozó anyaggal való cserehatékonyság, vagy más adalékanyagokkal, különösen szinergiákkal való cserehatékonyság.

Egy **szermosóteljesítménye** vagy **tisztítóteljesítménye** alatt az alábbi szabadalom értelmében azt a hatást értjük, amit a vizsgált szer a szennyeződött cikkre, például textiliára vagy kemény felületű tárgyakra gyakorol. Az ilyen szerek egyes komponenseit, például egyes enzimeket, az egész szer mosó-

vagy tisztítóhatáshoz való hozzájárulásuk alapján értékeljük. Mivel egy enzim enzimatikus tulajdonságaiból nem lehet minden további nélkül egy szer mosóteljesítményéhez való hozzájárulására következtetni. Itt fontos szerepet játszanak olyan további faktorok, mint például a stabilitás, szubsztrátkötés, a tisztítandó anyagra való kötés vagy a szer más adalékanyagaival való cserehatékonyág, különösen a szennyeződés eltávolításánál fellépő szinergiák.

A mikroorganizmusok letétbe helyezéséről szóló nemzetközi elismerést tartalmazó budapesti 1977. április 28-ai szerződés szerint 1989.08.10-én a WO 91/02792 szabadalommal összefüggésben a következő mikroorganizmus került letétbe a Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH-nál Braunschweig-ben (DSMZ): *Bacillus lentus* DSM 5483. Ott a DSM 5483 regisztrációs számot viseli (PA5-A0155, Strain 2 - 1). Ezen biológiai anyag jellegéről mértékadó adatokat a WO 91/02792-ben, összefoglalt 1. táblázatban (5 - 7 oldal) találunk. Az alábbi találmány szempontjából különösen releváns, ebből az organizmusból származó alkalikus proteázok DNS- és aminosavszekvenciái az SEQ ID NO:106 -ből, illetve az SEQ ID NO:52 -ből származnak.

A maturális proteinnak a *Bacillus lentus* DSM 5483-ból (WO 92/21760) származó szubtilizin számozása szerinti 3-as, 4-es, 199-es és 211-es pozíciói különösen fontosak a találmány szempontjából. Ezek a 2. táblázat szerint a fontosabb szubtilizinekből homologizálhatóak; ez a homologizátum bármely más szubtilizinre átvihető. Így például a „Subtilases: Subtilin-

like Proteases" R. Seizen-től, 75 - 95 oldal, a „Subtilizin enzymer”, kiadta R. Bott és C. Betzel, New York, 1996, cikkekben egy 20 feletti szubtilizin sorrendet találunk az ismert BPN' szubtilizin szekvenciához viszonyítva.

2. táblázat: A találmány szempontjából négy különlegesen fontos pozíció homologizálása.

Referen- cia- enzimek	Számozás a szek- vencia szerint	3-as pozíció	4-es pozíció	199-es pozíció	211-es pozíció
B. lentus- alkalikus proteáz	WO 92/21760	S3	V4	V199	L211
BPN'	Wells et al. (lásd feljebb)	S3	V4	I205	Y217
Carlsberg Szubtili- zin	Smith et al. (lásd feljebb)	T3	V4	V204	L216
PB 92	EP 283075	S3	V4	V199	L211
Szubtili- zin 309	WO 89/06279	S3	V4	V199	L211
Termitáz	WO 91/00345	S10	R11	I209	L211
K proteínáz	WO 91/00345	T4	A6	I208	I220

Egy a találmánynak megfelelő B. lentus alkalikus proteáz-
variáns aminosavsorrendjének meghatározását a legfontosabb,

előzőleg leírt szubtilizinekkal, mégpedig a szubtilizin 309 (Savinase®), a szubtilizin FB92, a Carlsberg szubtilizin és a BFN' szubtilizinnel megtaláljuk az alábbi találmány 1. ábráján.

A különböző ismert szubtilizinek közötti nagy mértékű strukturális hasonlóság és az ezek által kifejtett, az endogén savamidkötések hidrolízisét végző reakciómechanizmusok közötti hasonlóság alapján azt várnánk, hogy a nevezett pontmutációk az érintett molekulák esetén hasonló hatást fejtenek ki. Különösen az alábbi találmány tanulsága alapján várhatjuk, hogy az olyan szubtilizinek, melyeket mosó- és tisztítószerekben való alkalmazás céljára fejlesztettek ki, ezen pontmutációk átvételével mosó- illetve tisztítószerekben való alkalmazhatóságuk tovább javítható.

Különösen az izoleucin 199-es és a glicin aminosav 211-es homológ pozícióba való átvétele vezet az ismert enzimek megfelelő tisztítószerekben mutatott mosó- illetve tisztítóhatásának javulásához. A B. lentusból származó alkalikus proteázokkal kapcsolatos tapasztalatok alapján azonban érdemes az illető molekulát legalább egy további stabilizálással ellátnunk.

A 199I és 211G aminosav-pozíciókkal rendelkező találmánynak megfelelő proteázok stabilitását növelhetjük például polimerekkel való csatolással. Egy ilyen eljárás kerül leírásra például az US 5230891-ben. Azt igényli, hogy a proteinek alkalmazásuk előtt megfelelő szerekben egy kémiai kap-

csolólépesen keresztül ilyen jellegű polimerekkel kerüljenek kapcsolatba.

Kedveltek az olyan stabilizálások, melyek a molekula pontmutagenezise által megvalósíthatóak. Mivel ezek a proteinkitermelés során nem igényelnek további lépéseket. Néhány ilyen erre alkalmas pontmutáció a technika által ismert. Így az US 6087315 és US 6110884 alapján a proteázok stabilizálhatóak azáltal, hogy bizonyos tirozin-csoportokat más csoportokkal kicserélünk. Az SEQ ID NO.4 alapján a tirozincsoportoknak a találmánynak megfelelő, *Bacillus lentus*-ból levezetett proteineken történő cseréje a 89-es, 161-es, 165-ös, 208-as és 257-es csoportokban történik; a további két, ott megadott pozícióban a *B. lentus*-alkalikus proteázok esetén már eredetileg is tirozin-csoport található.

További lehetőségek például:

- Bizonyos aminosavcsoportok prolinra történő cseréje az EP 583339 alapján; ez a *B. lentus* -ből levezetett enzimeknél az S55P, A96P, A166P, A188P és/vagy S253P cseréket jelentené;
- Polárosabb vagy töltött csoportok bevitele a molekula felszínére az EP 995801 alapján;
- Fémionok kötésének megváltoztatása, különösen a kalcium-kötőhelyek esetén, például a WO 88/08028 és WO 88/08033 szabadalmak alapján. Az első irat alapján egy vagy több, a kalcium-kötésben résztvevő aminosav-csoport negatív töltésű csoportra való cseréje szükséges. A második irat alapján az arginin/glicin csoportok sorozatának egyikén pontmutációt kell végrehajtani; ez a *Bacillus lentus*-ból származó

szubtilizinek esetén például a 60/61, 115/116 és 212/213 pozíciókban található NG-sorozatokot érinti.

Az US 5453372 szabadalom szerint a proteinekét bizonyos mutációkon keresztül megvédhetjük a denaturáló ágensek, például tenzidek hatásaitól; az ebben megadott pozíciók a B. lentus-alkalikus proteázok esetén a 134-es, 155-ös, 158-as, 164-es, 188-as és/vagy 189-es pozícióknak felelnek meg.

További hasonló lehetőségeket az US 5340735, US 5500364, US 5985629 és US 6136553 szabadalmakban olvashatunk.

Kedvelt kivitelezési formák esetén a stabilizálást a Bacillus lentus 5483-ból származó szubtilizin számozása szerinti 3-as pozíciójú treonin és/vagy a 4-es pozíciójú izoleucin segítségével végezzük.

Az alábbi találmány példáiban vizsgált variánsok alapján arra következtethetünk, hogy megnövekedett stabilitásuk döntő fontosságú a 199I és 211G aminosavakkal való öszejték eredményeképpen mutatott megnövekedett mosási teljesítmény elérésében.

Ettől az elmélettől függetlenül minden olyan szubtilizin-típusú alkalikus proteáz a találmány céljának megoldását adja, amely azzal jellemezhető, hogy a Bacillus lentus 5483-ból származó szubtilizin számozása alapján a 199-es pozícióban izoleucint és a 211-es pozícióban glicint tartalmaz, és továbbá a 3-as pozíciójú treonin vagy 4-es pozíciójú izoleucin egyikével rendelkezik.

Ebből következően kedveltek az olyan variánsok, melyek a 199-es izoleucinén és a 211-es glicinén kívül mind a 3-as pozíciójú treoninnal, mind a 4-es pozíciójú izoleucinnal rendelkeznek.

Kedveltek a Bacillus-ok által természetes módon termelt alkalikus proteázoknak megfelelő, vagy ezekből levezethető variánsok. Mivel a Bacillus-proteázok eleve kedvező tulajdonságokkal rendelkeznek különböző technikai alkalmazási lehetőségek szempontjából. Ide tartozik a hőmérséklettel, oxidáló vagy denaturáló hatásokkal szembeni stabilitás. Ezen felül a mikrobiális proteázok biotechnológiai termelésével kapcsolatban nagy tapasztalattal rendelkezünk, ami például a kedvező klónozóvektorok előállítását, a gazdasejtek és fermentációs körülmények választékát vagy a kockázatok, mint például allergén jelleg felmérését illeti.

Különösen kedveltek manapság a Bacillus lentus-ból származó szubtilizinek, illetve olyan szubtilizinek, melyek ezekből a természetes úton előállított proteázokból levezethetőek, például mosó- és tisztítószerekben való alkalmazásra. Ide tartoznak a fentebb említett szubtilizin 147, szubtilizin 309 és a B. lentus-alkalikus proteázok. A tapasztalatok, melyeket ezen proteázok előállításával és alkalmazásával kapcsolatban szereztünk, ezen enzimek a találmánynak megfelelő továbbfejlesztéseinek köszönhető. Ide tartozik például más kémiai vegyületekkel, mint például mosó- vagy tisztítószer adalékanyagaival való kompatibilitása.

Egy különösen kedvelt kivitelezési forma olyan a találmánynak megfelelő proteázokra vonatkozik, melyek a *Bacillus lentus* 5483 által előállított enzimekből levezethetőek. Ide tartoznak például olyan variánsok, melyek a WO 92/21760 vagy WO 95/23221 vagy WO 98/30669 szabadalmakban kerültek leírásra. Ezen enzimeknek a találmánynak megfelelő a 199-es, 211-es, 3-as és/vagy 4-es pozíciókban végzett szubsztitúciókkal továbbfejlesztett változatai az alábbi találmány különösen kedvelt kivitelezési formáit jellemzik.

Az alábbi találmányban vizsgált *B. lentus*-alkalikus proteáz S3T/V4I/V199I/L211G a *B. lentus* DSM 5483-ból származó szubtilizin továbbfejlesztése, amely a WO 92/21760 szabadalom szekvencia-protokolljában az SEQ ID NO:52-ben aminosav-szekvencia és az SEQ ID NO:106 -ban nukleotidszekvencia formájában kerül leírásra.

Ezzel az új variánssal a megfelelő szerekben nagyobb hozzájárulást állapíthattunk meg a mosó-, illetve tisztító-teljesítményhez, mint az eddig erre a célra alkalmazott *B. lentus*-ból származó enzimek, például F49 proteáz és Savinase® (2 - 5 példa) esetén. A szekvenciaprotokollban ezen variánsoknak az aminosavszekvenciája az SEQ ID NO. 2 szám alatt van megadva. Az ezt az aminosav-sorrendet kódoló gén a szekvenciaprotokollban az SEQ ID NO.1 szám alatt kerül leírásra. A genetikai kód degeneráltsága miatt számos más nukleinsav-sorrend is elképzelhető, melyek ugyancsak ezeket a variánsokat kódolják és a találmány tárgyának ugyancsak kedvelt alternatíváit képezik.

Egy olyan, a szekvenciaprotokollban megadott DNS- és aminosavszekvenciájú *B. lentus*-alkalikus proteáz S3T/V4I/V199I/L211G variánst termelő Baktérium-, különösen *Bacillus*-törzs előállítható például az alábbi találmány 1. példájában megadott eljárás alapján.

Az eddig említett alkalikus proteázokból ismert molekuláris biológiai módszerekkel levezethetők további proteinek. Ilyen módszerek részletes leírásait találjuk például a Lehrbuch Fritsch, Sambrook és Maniatis „Molecular cloning: a laboratory manual”-ban, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1989.

Ide tartoznak például olyan variánsok, melyeknek szubsztitúciós mutációval, vagy további pontmutációkkal további tulajdonságokat kölcsönöztünk, melyek specifikus alkalmazási lehetőségeiket predesztinálják, például a felszíni töltések megváltoztatásával, mint ahogy azt a WO 00/36069-ben leírásra került, vagy a katalízisben vagy szubsztrátkötésben részt vevő loop-ok megváltoztatásával, mint például ahogy a WO 99/27082 -ben olvashatjuk. A variánsok nagyobb tartományait is alávehetjük mutációknak. Így például egy fragmetnumképzés vagy deléciós mutagenzis célja az is lehet, hogy a proteázok specifikus részfunkcióit kiválasszák, vagy ezzel ellenkezően kikapcsolják, például a szubsztrátkötést, illetve a molekula bizonyos részein gyakorolt más vegyületekkel való interakciókat.

Inzercióval, szubsztitúcióval vagy fúzióval a találmánynak megfelelő proteázokat további funkciókkal láthatjuk el. Ezek közül lehetséges például a bizonyos doménekre való kötés, esetleg cellulóz-kötő-doménekhez való kötés, mint például a WO 99/57154 - WO 99/57159 publikációkban olvasható. Az itt említett aminosav-linkerek megvalósíthatóak, amennyiben egy egységes fúziós proteint hozunk létre proteázokból, linker-régióból és kötődoménekből. Egy ilyen kötődoménnel származhat ugyanabból vagy egy másik proteázból, hogy a találmánynak megfelelő proteinnak egy proteáz-szubsztrátra való kötését erősítse. Ez megnöveli a lokális proteáz-koncentrációt, ami egyes alkalmazásokban, például nyersanyagok kezelése során előnyös lehet.

A nevezett proteázok lehetnek továbbá derivatizáltak, különösen mindenkori alkalmazási céljukra való optimalizálásuk miatt. Ide tartoznak a kémiai modifikációk, mint azt például a DE 40 13 142-ben olvashatjuk. Módosíthatóak továbbá kis- vagy nagy-molekulájú kémiai vegyületekkel való összekapcsolásukkal, amit természetes úton különböző organizmusok a proteinbioszintézissel összefüggésben végeznek, mint például egy zsírcavcsoport N-véghez közeli kötése, vagy a glikozilálás a szintézis során eukarióta gazdasejtekben. Az alábbi találmány tehát proteolitikus enzimeket vagy fragmenseket ismertet, melyek derivatizáltak.

A találmánynak megfelelő proteinek mosó- vagy tisztítószerekben való alkalmazásával összefüggésben például a más tisztító hatású vegyületekkel vagy enzimekkel való kapcsolás

különösen előnyös. Hasonló kapcsolási keverékek például a WO 00/18865 és WO 00/57155 szabadalomban kerülnek leírásra, mint cellulóz-kötődomének. Ezzel analóg módon a csatolás történhet makromolekuláris vegyületekre, mint például a polietilén-glikol, annak érdekében, hogy a molekula további tulajdonságait befolyásoljuk, mint stabilitás vagy bőrkímélő hatás. Egy ilyen modifikáció kerül leírásra az US 5230891 -ben, az érintett proteáz kozmetikai alkalmazhatóságának javítására.

A találmánynak megfelelő proteinek származékai alatt a leg-tágabb értelemben ezen enzimek preparációit is értjük. A ki-nyerés, feldolgozás vagy preparáció szerint egy protein különböző más anyagokkal társulhat, például a termelő mikro-organizmusok kultúrájából. Mivel már a proteáztermelő mikro-organizmusok kultúramaradéka is proteolitikus aktivitást mo-tat, ami arra utal, hogy már a nyers kivonatok is megfelelő alkalmazást találhatnak, esetleg más proteinogén aktivitások inaktiválására.

Egy proteint, például tárolási stabilitásának növelésére, megfelelő más anyagokkal célzottan vegyíthetünk. Ezért a találmánynak megfelelőek továbbá a találmánynak megfelelő protein preparációi is. Attól függetlenül, hogy egy megha-tározott preparációban ez az enzimaktivitás ténylegesen ki-fejződik, vagy sem. Mivel kívánatos lehet, hogy a tárolás során semmilyen, vagy csak csekély aktivitás jelenkezzen, és csak az alkalmazás időpontjában fejeződjön ki proteolitikus funkció. Ez függhet például a protein hajtogatottsági álla-

potától vagy a találmánynak megfelelő proteín preparációjából származó egy vagy több kísérőanyaggal való reverzibilis kötéstől. Különösen ismert a proteázoknak a proteáz-inhibitorokkal való együttes preparációja (WO 00/01831). Ide tartoznak a fúziós proteinek is, melyeknél az inhibitorok linkereken, különösen aminosav-linkereken keresztül kapcsolódnak a mindenkori proteázhoz (WO 00/01831).

Különösen célszerűek a találmánynak megfelelő proteinek nevezett továbbfejlesztései, derivatizálásai és preparációi, ha azok továbbra is kifejtik proteolitikus aktivitásukat, mivel ez a feltétele a találmánynak megfelelő alkalmazhatóságuknak. Előnyös módon a mindenféle mutagenézisen és/vagy derivatizáláson keresztül kapott proteinek a kiindulási molekulával, illetve a nem derivetizált molekulával szemben megnövekedett proteolitikus aktivitást és különösen egy megnövekedett teljesítményt mutatnak a mindenkori technikai alkalmazási területen. Ide tartozik különösen a mosó- és/vagy tisztítóteljesítmény javulása mosó- vagy tisztítószerekben való alkalmazásra.

Ez például a találmánynak megfelelő pontmutációk további pontmutációkkal való kombinálásával lehetséges, melyek a katalizált reakciókra vonatkoznak, esetleg az aktív centrumban. Így például a WO 95/30011 szabadalom eljárásának alkalmazásával lehetséges, a találmánynak megfelelő proteázoknak, melyek a *Bacillus lentus*-szubtilizin-ből levezethetőek, a loop-régióban történő mutációja vagy további aminosavak hozzáfűzése. Ilyen jellegű munkák az alábbi sza-

badalmakban kerültek leírásra: WO 00/36599, WO 00/37621 - WO 00/37672 és WO 00/71683 - WO 00/71691.

Az enzim egy olyan régiójának deléciója, amely a reakcióközegben más hatóanyagokkal kölcsönhat és így, esetleges hajtogatódási hatásokon keresztül, az összreakciót rontja, egy előnyös továbbfejlesztést jelent. Ezzel analóg módon meggondolandó a más hatásos enzimekkel, esetleg más proteázokkal való fúzió, egy megnövekedett hidrolizációs ráta elérésére.

Például a tárolás közbeni proteolitikus aktivitás reverzibilis blokkolása egy inhibitor kötése által megakadályozza az autoproteolizist, és így a reakcióelegyben való elegyítés időpontjában egy magas proteolitikus ráta eléréséhez vezet. Például a speciális kötődőménekre való kötés a tisztítási eljárás során megnöveli a proteáz koncentrációját a szubstrát közelében, és így növeli az enzim hozzájárulását a szer teljesítményéhez.

Számos lehetőséget ismerünk az enzimek, különösen a mosó- és tisztítószerekben alkalmazott enzimek stabilitásának növelésére (lásd feljebb). Ezek közül praktikus okokból, a találmány szempontjából releváns módszerek pontmutagenezisen alapulnak. Az összes fent említett lehetőség a találmánynak megfelelő variánsok kombinációjával is alkalmazható. Mivel a WO 89/09019 alapján kiindulhatunk abból, hogy több stabilizáló mutáció additív hatású. Így a találmánynak megfelelő variánsokat, melyeket már a 3T vagy 4I, vagy mindkét amino-

savval stabilizáltunk, egy polimerre való csatolással tovább stabilizálhatunk. Felmutathatnak azonban a molekula más területein további stabilizáló hatású mutációkat, például egy vagy több fent említett tirozin-csoport szubsztitúciójával, megfelelő prolin-csoportok bejuttatásával, a felületi töltések megváltoztatásával vagy a kalcium-kötőhelyek megváltoztatásával.

A nukleinsavak majd minden használatos, a proteinek molekuláris biológiai vizsgálatát, továbbfejlesztését, valamint termelését célzó folyamatnak kiindulópontjai. Ide tartoznak különösen a génszekvenálás és ezekből a megfelelő aminosav-szekvencia levezetése, minden mutagenézis és a proteinek expressziója. Ilyen módszerek, mint már feljebb említettük, például Fritsch, Sambrook és Maniatis kézikönyvében „Molecular cloning: a laboratory manual”, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1989, kerültek leírásra. A találmány második tárgyát így a találmány első tárgyának megfelelő proteineket vagy ezek derivátumait kódoló nukleinsavak képezik.

A DNS szintjén a találmány szempontjából lényeges enzimek a „Protein Engineering” kifejezés alatt összegyűjtött módszerek során különböző alkalmazásokra optimalizálhatóak. Különösen a következő, a proteinek szintjén realizálható tulajdonságokat érhetjük el: a levezetett protein oxidációs ellenállásának, denaturáló ágensekkel vagy proteázokkal szembeni stabilitásának, magas hőmérséklettel, savas vagy erősen lúgos körülményekkel szembeni ellenállásának növekedése, a

kalciummal vagy más kofaktorokkal szembeni érzékenység megváltozása, az immunogenitás vagy allergén hatás csökkenése.

A találmánynak megfelelő mutált génekhez tartoznak például azok, melyek egyes célzott báziscserékért vagy randomizált pontmutációkért, egyes bázisok vagy szekvenciadarabok deléciójért, más génekkel vagy génfragmentumokkal való fúziókért vagy inverziókért felelősek. A megfelelő nukleinsavból levezetett enzimek ilyen jellegű mutációi vagy modifikációi annak specifikus alkalmazásait predesztinálják. Egy ilyen mutagenézis a klónozott génen végezhető célzottan vagy véletlenszerű módszerekkel, például egy záró, az aktivitást vizsgáló felismerő- és/vagy kiválasztóeljárással (screening és szelekció).

Különösen azoknál a nukleinsavaknál, melyek protein-fragmenseket kódolnak, mind a három olvasási rásztart figyelembe kell venni mind sense-, mind antisense-irányban. Mivel az ilyen oligonukleotidok a polimeráz-láncreakciónál (PCR) rokon nukleinsavak szintézisének kiindulópontjaként alkalmazhatóak. Az ilyen oligonukleotidok, különösen, ha azok a 3-as, 4-es, 199-es és/vagy 211-es aminosav-pozícióknak megfelelő területeken átfednek, kifejezetten a szabadalom védelme alá kerülnek. Ez érvényes olyanokra is, melyek éppen ezekben a pozíciókban variábilis szekvenciákat tartalmaznak úgy, hogy sok primer populációból legalább egy lehet, amely egy ilyen pozícióban az SEQ ID NO.3-nak megfelelő szekvenciadarabot kódol. Ugyanez érvényes az antisense-oligo-

nukleotidokra, melyek például expressziós-regulációra alkalmazhatóak.

A találmánynak megfelelő proteázok továbbfejlesztése különösen a P. N. Bryan „Protein engineering” (2000) a *Biochim. Biophys. Acta*, kötet 1543, oldal 203 - 222, publikációjában leírt megfontolásokon alapul.

Kedveltek az olyan szubtilizin-proteázokat kódoló nukleinsavak, melyek nukleotidszekvenciája az SEQ ID NO.3-ban megadott nukleotidszekvenciával megegyezik. Ez különösen azokra a területekre érvényes, melyek a 199-es pozícióba izoleucint és a 211-esbe glicint kódolnak, és különösen azokra, melyek a 3-as pozícióba treonint, a 4-esbe izoleucint, a 199-esbe izoleucint és a 211-esbe glicint kódolnak.

Ez különösen érvényes azokra, melyek egy *Bacillus lentus*-proteáz szekvenciáról levezethetőek, és különösen, ha azok egy *Bacillus lentus* DSM 5483-proteáz szekvenciáról levezethetőek. Különösen kedvelt esetekben a nukleinsav a találmánynak megfelelő *B. lentus*-alkalikus proteáz S3T/V41/V199I/L211G - t kódolja és/vagy az SEQ ID NO.3 -ban megadott nukleotidszekvenciával megegyezik.

A védelem alá tartoznak még olyan nukleinsavak is, melyek proteolitikusan aktív inzerciós- vagy fúziós mutánsokat kódolnak. Így az ezért az aktivitásért felelős tartomány például fuzionálhat cellulóz-kötő doménnel vagy a nem katalitikus régiókban pontmutációkat hordozhat, lehetővé téve a

levezetett proteinnak egy polimerre kötését vagy allergén-jellegének csökkentését.

A találmány szempontjából lényeges nukleinsavak kezelésére azokat alkalmas módon vektorokba ligáljuk. Ide tartoznak azok a vektorok, melyeket bakteriális plazmidokból, vírusokból vagy bakteriofágokból levezethetők, vagy nagyrészt szintetikus vektorok. Ezek alkalmas kiindulópontot képeznek az adott gén, annak expressziójának vagy az ide tartozó proteín molekuláris biológiai és biokémiai vizsgálataihoz. Az alábbi találmány egy további tárgyát képezik a vektorok, melyek a fent leírt nukleinsavmolekulákat tartalmazzák, különösen olyanokat, melyek a fent leírt proteolitikus enzimeket kódolják.

A találmány ezen tárgyának kedvelt kivitelezési formáját képezik a klónozó vektorok. Ezek alkalmasak a tárolás mellett a vizsgált gén biológiai amplifikációjára vagy szelekciójára az érintett gén molekuláris biológiai karakterizálásához. Egyidejűleg képezik az igényelt nukleinsav transzportálható és tárolható formáját és nem sejthez kötött molekuláris biológiai technikák kiindulópontját, mint például a PCR vagy in-vitro-mutagenézis-eljárás. Keveltek az olyan klónozóvektorok, melyek a fent leírt proteolitikus enzimeket kódoló nukleinsavtartományokat tartalmaznak.

A találmánynak megfelelő expressziós vektorok képezik a találmány második tárgyának nukleinsavainak biológiai produkciós rendszerekben való realizálásának alapját és ezzel a találmány első tárgyának proteínjeinek termelését. A talál-

mány ezen tárgyának kedvelt kivitelezési formái az expressziós vektorok, melyek az összes az expresszióhoz szükséges genetikai elemet hordozzák, például a természetes, eredetileg ez előtt a gén előtt lokalizált promotert vagy egy másik organizmusból származó promotert. Ezek az elemek például egy úgynevezett expressziós kazetta formájában lehetnek elrendezve. Kedveltek az olyan expressziós vektorok, melyek az olyan nukleinsavtartományokat tartalmazzák, melyek a fent leírt proteolitikus enzimeket kódolják.

Az alábbi találmány egy további tárgyát sejtek képezik, melyek a találmány harmadik tárgya szerinti vektort tartalmaznak. Ezek így az alábbi találmány mikrobiológiai dimenzióját képezik, melyben például lehetővé teszik a megfelelő gének amplifikációját, vagy ezek mutagenézisét vagy transzkripcióját és transzlációját és végül biotechnológiai termelését.

A találmány tárgyának egy kivitelezési formája a gazdasejt, amely a találmánynak megfelelő proteinek egyikét exprimalja vagy azok expressziójára készíthető. Ezzel lehetővé teszik azok biotechnológiai termelését. Ehhez szükséges az illető gén, alkalmas módon egy vektoron keresztüli kinyerése, ami annak transzformálását jelenti. Ez a vektor a gazdasejtben előfordulhat extrakromoszómálisan, mint saját genetikai elem, vagy egy kromoszómába épülten. Előnyös módon a fent leírt expressziós vektorokról van szó.

Gazdasejtként elvileg bármilyen organizmus megfelel, azaz prokarióták, eukarióták vagy Cyanophytak. Kedveltek az olyan gazdasejtek, melyek genetikailag könnyen kezelhetőek, ami például az expressziós vektorral való transzformációt és ezek stabil etablírozását illeti, például egysejtű gombák vagy baktériumok. Ezen kívül a kedvelt gazdasejtek jó mikrobiológiai és biotechnológiai kezelhetőséggel jellemezhetőek. Ez például a könnyű kultiválhatóságra, magas növekedési rátára, fermentációs médiummal szemben mutatott csekély igényre és idegen proteinek jó produkciós- és szekrécións rátájára vonatkozik. Gyakran a különböző ismert és rendelkezésre álló rendszerek sokaságából kísérletes módszerrel kell az egyedi esetre optimális expressziós rendszert kiválasztani. Minden a találmánynak megfelelő protein kinyerhető ezzel a módszerrel gazdasejtek sokaságából.

Kedvelt kivitelezési formákat képeznek azok a gazdasejtek, melyek a megfelelő genetikai elemeknek köszönhetően szabályozható aktivitásúak, például kémiai vegyületek kontrollált adagolásával, a kultivációs feltételek változtatásával vagy a mindenkori sejtsűrűségtől függően. Ez a kontrollálható expresszió a célprotein egy nagyon gazdaságos termelését teszi lehetővé.

Kedvelt kivitelezési formát képeznek a bakteriális gazdasejtek, különösen olyanok, melyek a termelt proteint a környező médiumba szekretálják. Mivel a baktériumok rövid generációs idővel és a kultivációs körülményekkel szemben mutatott csekély igénnyel jellemezhetőek. Ezáltal kedvező

költségvetésű eljárásokat alkalmazhatunk. A gram-negatív baktériumok estén, mint például az *E. coli*, számos protein a periplazmatikus térbe szekretálódik. Ez speciális alkalmazásoknál előnyös lehet. A gram-pozitív baktériumok, mint például a *Bacilli*, ezzel szemben a szekretált proteint azonnal a sejtet körülvevő közeli médiumba adják le, melyből egy másik kedvelt kivitelezési forma szerint az exprimált találmánynak megfelelő proteinek közvetlenül kivonhatóak. A WO 01/81579 szabadalomban még egy eljárás is leírásra került, amellyel elérhető, hogy a gram-negatív baktériumok is az exprimált proteineket rögtön leadják.

Az alábbi találmány egyik kivitelezési formája magát a *Bacillus lentus* DSM 5483-at használja, találmánynak megfelelő proteinek (homológ) proteinek exprimálására. Ezzel szemben mégis a heterológ expresszió a kedvelt. A heterológ expressziónál kedvelt baktériumok a *Bacillus* nemzetségbe tartoznak, különösen a *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* fajba, vagy a *Bacillus alcalophilus* más fajaiba vagy törzseibe. Mivel ezek maguk is összehasonlítható szubtilizineket termelnek, úgyhogy ezzel az eljárással a találmánynak megfelelő proteinek és a gazdatörzsek által endogén módon termelt szubtiliznek keverékét kapjuk. Egy ilyen *B. lentus*-alkalikus proteáznak a *Bacillus licheniformis* ATCC 53926-ban való koexpressziója kerül leírásra a WO 91/02792 (EP 493398 B1) szabadalomban; itt számos lehetséges expressziós vektort is találunk. Várható, hogy az új, találmánynak megfelelő variánsok, különösen a *Bacillus lentus*-ból származó és különösen a *B. lentus*-

alkalikus S3T/V4I/V199I/L211G proteáz ezen vektorok segítségével és/vagy ezekben a gazdasejtekben előállítható.

A találmány ezen tárgyának egy további kivitelezési formáját képezik az eukarióta gazdasejtek, különösen azok, melyek a termelt proteint poszttranszlációsan módosítják. Példák alkalmas eukariótákra a gombák, mint *Actinomyces* vagy élesztőgombák, mint *Saccharomyces* vagy *Kluyveromyces*. A modifikációkhoz, melyek ilyen jellegű funkciókat leginkább a proteinszintézissel összfüggésben végeznek, tartoznak például kismolekulájú vegyületek, mint membránmarkerek vagy oligoszaharidok kötése. Az ilyen jellegű oligoszaharid-modifikációk például az allergén jelleg csökkentése esetén kívánatosak.

A találmány egy egyedülálló tárgyát képezik a találmánynak megfelelő proteolitikus enzimek vagy ezek derivátumainak előállítását szolgáló eljárások. Így például a fent leírt DNS-és aminosavszekvenciák alapján, melyek például a szekvenciaprotokollból is levezethetők, megfelelő oligopeptidok és oligonukleotidok akár a teljes gének proteinek szintetizálhatóak ismert molekuláris biológiai módszerek alapján. Az ismert szubtilizin-termelő mikroorganizmusokból kiindulva további természetes szubtilizin producensek izolálhatóak, melyek szubtilizinszekvenciája levezethető és az itt megadott előírások alapján továbbfejleszthető. Ilyen baktériumfajok a megfelelő előállítási eljárásokhoz kultiválhatóak és alkalmazhatóak. Például a WO 91/02792 szabadalomban leírt vektorokkal analóg módon új expressziós vektorok hozhatók

létre. Az alábbi találmány kivitelezési formáit képezhetik az idetartozó nukleinsavszekvenciákkal sejtmentes expressziós rendszerek, melyeknél a protein-bioszintézist *in vitro* végezzük. A fent levezetett alkotórészek mindegyike új eljárásokban kombinálható, a találmánynak megfelelő proteinek előállítására. Itt minden a találmánynak megfelelő protein számára az eljárási lépések kombinációs lehetőségeinek sokasága lehetséges, így minden konkrét esetre az optimális eljárást kísérletes úton célszerű meghatározni.

A találmány egy jellemző tárgyát képezik olyan szerek, melyek azzal jellemezhetőek, hogy egy találmánynak megfelelő proteolitikus enzimet tartalmaznak.

Gyakorlatilag a találmánynak megfelelő enzimeknek minden technikai felhasználási lehetősége attól függ, hogy a funkcióképes enzimet egy megfelelő médiumban alkalmazzuk. Így például a mikrobiológiai alkalmazási lehetőségek olyan szereket igényelnek, melyekben az enzim, legtöbbször nagy tisztaságú preparáció formájában a szükséges reakciópartnerekkel vagy kofaktorokkal egy közegben van. Nyersanyagok kezelése vagy kozmetikai készítmények esetén alkalmazott szerek szintén specifikus receptúrákkal jellemezhetőek. Ezek a receptúrák a találmány szerint, mint a találmánynak megfelelő enzimet tartalmazó szer értendőek.

A találmány ezen tárgyai mosó- vagy tisztítószerek kedvelt kivitelezési formáinak számítanak. Mivel, mint azt az alábbi szabadalom kivitelezési példáiban láthattuk, meglepő módon azt

tapasztalhattuk, hogy egy 1991/211G szubtilizin-variáns (számozás a B. lentus-alkalikus proteáz alapján), illetve egy S3T/V4I/V1991/L211G cserékkel rendelkező Bacillus lentus-variáns, különösen a Bacillus lentus DSM 5483-ból levezetett B. lentus-alkalikus proteáz S3T/V4I/V1991/L211G esetén különböző szennyeződéseknel egy jelentős teljesítménynövekedés tapasztalható (lásd 2. és 3.példa). Ez az etabliozott mosószer-proteázok szintjét felülmúlja aktivitás-azonos alkalmazás esetén. Ugyanez igaz a megfelelő gépi mosogatószerekre (lásd 4. és 5. példa). Ez a hatás reprodukálható módon jelentkezett különböző hőmérsékleteken és különböző koncentrációknál.

A találmány e tárgyához tartoznak még mindenféle tisztítószerfajták, mind koncentrátumok, mind a hígítatlanul alkalmazandó szerek; kereskedelmi mértékű alkalmazásra, a mosógépben vagy a kézi-mosásnál, illetve -tisztításnál. Ide tartoznak például mosószerek textíliák, szőnyegek, vagy természetes szövetek számára, melyeket az alábbi találmány szerint a mosószer kifejezéssel jelölünk. Ide tartoznak továbbá például mosogatószerek mosogatógépek számára vagy kézi mosogatószerek vagy kemény felületek, mint fém, üveg, porcelán, kerámia, csempe, kő, lakkozott felületek, műanyagok, fa vagy bőr tisztítószerrei; az ilyenek megnevezésére az alábbi találmány szerint a tisztítószer kifejezést használjuk. A nevezett tisztítószerfajták mindegyike a találmány egy tárgyát képezi, amennyiben a találmánynak megfelelő proteinnel dúsított.

Az alábbi találmány kivitelezési formáit képezi az összes, a technika által etablírozott és/vagy a találmánynak megfelelő szer minden célszerű adagolási formája. Ide tartoznak például szilárd, por formájú, folyékony, gél állagú vagy pasztózus szerek, adott esetben akár több komponensből, sűrítve vagy sűrítés nélkül; továbbá ide tartoznak még például: extrudátumok, granulátumok, tabletták vagy táskák, mind nagy csomagolású, mind proteinszintű kiszerezésben.

A találmánynak megfelelő szerek a találmánynak megfelelő enzimeket egy 2 µg - 20 mg és kedveltebb módon 5 µg - 17,5 mg, 20 µg - 15 mg, 50 µg - 10 mg, 100 µg - 7,5 mg, 200 µg - 5 mg és 500 µg - 1 mg / g szer mennyiségben tartalmazzák. Ezzel 40 µg - 4 g és kedveltebb módon 50 µg - 3 g, 100 µg - 2 g, 200 µg - 1 g és különösen kedvelt módon 400 µg - 400 mg / alkalmazás mennyiség adódik.

Az ilyen jellegű szerek proteázaktivitását a Tenside-ben, kötet 7 (1970), oldal 125 - 132, leírt módszerekkel határozhatjuk meg. Ennek megfelelően az eredményt PE -ben (protein-egység) adjuk meg. A szer proteázaktivitása akár 1.500.000 proteázegység / gramm is lehet.

A találmánynak megfelelő enzim mellett a találmánynak megfelelő szer tartalmaz még adott esetben további adalékanyagokat, mint tenzidek, például nemionos, anionos és/vagy amfoter tenzideket, és/vagy fehérítőket, és/vagy buildereket, valamint adott esetben további szokásos adalékanyagokat.

Nemionos tenzidként különösen alkoxilált, előnyös módon etoxilált, különösen primer alkoholokat alkalmazunk 8 - 18 C - atommal és átlagosan 1 - 12 mol etilánoxid (EO) / mol alkohol mennyiségben, melyben az alkoholcsoport lineáris vagy különösen a 2-es pozícióban metil-ágazást tartalmazhat, ahogy általában az oxoalkoholcsoportokban található. Különösen kedveltek mégis a természetes alkoholból származó lineáris, 12 - 18 C -atomos csoportokkal rendelkező alkohol-etoxilátok, például kókusz-, pálma-, faggyú- vagy oleil-alkohol, és 2 - 8 EO / mol alkohol mennyiségben. A kedvelt etoxilált alkoholokhoz tartoznak például C₁₂₋₁₄-alkoholok 3 EO vagy 4 EO-val, C₉₋₁₁-alkoholok 7 EO -val, C₁₃₋₁₅-alkoholok 3 EO, 5 EO, 7 EO vagy 8 EO-val, C₁₂₋₁₃-alkoholok 3 EO, 5 EO vagy 7 EO -val és ezek keverékei, mint például a C₁₂₋₁₃-alkohol 3 EO -val és C₁₂₋₁₃-alkohol 5 EO-val készült keverék. Ezek a megadott etoxiláltsági fokok egy statisztikai közép-értéket mutatnak, ami egy speciális terméknel egy egész vagy tört szám lehet. A kedvelt alkoholetoxilátok egy szűk homológeloszlást mutatnak (narrow range ethoxylates, NRE). Ezeken a nemionos tenzideken kívül több mint 12 EO -s zsír-alkoholokat is alkalmazhatunk. Példák erre a 14 EO, 25 EO, 30 EO vagy 40 EO-s faggyúzsíralkoholok.

A kedvelt módon alkalmazott nemionos tenzidek egy további csoportját, melyeket vagy egyedüli nemionos tenzidként vagy más nemionos tenzidekkel kombinálva alkalmazunk, az alkoxilált, különösen etoxilált vagy etoxilált és propoxilált zsírsavalkilészterek, előnyös módon 1 - 4 szénatommal az alkilláncban, különösen zsírsavmetilészterek alkotják.

A nemionos tenzidek egy további csoportját, melyek előnyös módon alkalmazhatóak, az alkilpoliglukozidok (APG) alkotják. Az alkalmazható alkilpoliglukozidok megfelelnek az $PO(G)_2$ általános képletnek, melyben R egy lineáris vagy elágazó, különösen a 2-es pozícióban metil elágazást tartalmazó, telített vagy telítetlen, alifás csoport 8 - 22, különösen 12 - 18 C -atommal és a G szimbólum egy 5 vagy 6 C -atomos glükózegységet, különösen glükózt jelez. A z glikolizációs fok itt 1,0 és 4,0 között, előnyös módon 1,0 és 2,0 között és különösen 1,1 és 1,4 között fekszik. Kedvelt továbbá a lineáris alkilpoliglukozidok alkalmazása, olyan alkilpoliglukozidoké is, melyekben a poliglukozcsoport egy glükózcsoporthoz és az alkilcsoport egy n-alkilcsoport.

Az aminosav típusú nemionos tenzidek, például N-kókuszalkil-N,N-dimetilaminoxid és N-faggyúalkil-N,N-dihydroxiethylaminoxid, és a zsírsavalkanolamidok is alkalmasak lehetnek. Ezeknek a nemionos tenzideknek az aránya előnyös módon nem haladja meg az etoxilált zsíralkoholok részarányát, különösen a mennyiségük felének arányát.

További alkalmas tenzidek a II. képlet szerinti polihidroxi-zsírsavamidok, amelyben az RCO egy alifás alkilcsoportot jelöl 6 - 22 szénatommal és [Z] egy lineáris vagy elágazó polihidroxi-alkilcsoportot 3 - 10 szénatommal és 3 - 10 hidroxilcsoporttal. A polihidroxi-zsírsavamidoknál ismert anyagokról beszélünk, melyek hagyományos módon előállíthatóak egy redukáló cukor, egy alkilamin vagy egy alkanol-amin ammóniával való aminationásával és ezután következő egy

zsírsavval, egy zsírsavalkilészterrel vagy egy zsírsavkloriddal történő acilezéssel.

A polihidroxiszírsavamidok csoportjához tartoznak a III. képlet szerinti vegyületek is, melyekben R egy lineáris vagy elágazó alkil- vagy alkenilcsoport 7 - 12 szénatommal, R^1 egy lineáris, elágazó vagy ciklikus alkilcsoport vagy egy arilcsoport 2 - 8 szénatommal és R^2 egy lineáris, elágazó vagy ciklikus alkilcsoport vagy egy arilcsoport vagy egy oxialkilcsoport 1 - 8 szénatommal, ahol a C_{1-4} -alkil- vagy fenilcsoportok kedveltek és [Z] egy lineáris polihidroxi-alkilcsoportot jelez, melynek alkilánca legalább két hidroxilcsoporttal szubsztituált, vagy ennek a csoportnak az alkoxizált, különösen etoxilált vagy propoxilált származékai.

[Z] -t előnyös módon egy redukáló cukor, például glukóz, fruktóz, maltóz, laktóz, galaktóz, mannóz vagy xilóz redukív aminationásával kapunk. Az N-alkoxi- vagy N-ariloxi-szubsztituált vegyületek például egy alkaloid, mint katalizátor jelenlétében zsírsavmetilészterrel való cserebomlással a kívánt polihidroxiszírsavamiddá alakíthatóak.

Anionos tenzidként például a szulfonátok és szulfátok e típusait alkalmazzuk. Szulfonát-típusú tenzidekként kedvelt módon C_{9-13} -alkilbenzolszulfonátok, oleinszulfonátok merülnek fel, azaz alkén- és hidroxialkán-szulfonátokból valamint diszulfonátokból álló keverékek, mint ahogy például előállíthatóak végállású vagy közbenső kettőskötésekkel rendelkező C_{12-16} -monoolefinek gázállapotú kéntrioxiddal való szul-

fonálásával és a szulfonálási termék ezután következő alkalis vagy savas hidrolízisével. Alkalmask továbbá az alkánszulfonátok, melyeket C_{12-18} -alkánokból nyerhetünk, például szulfoklórozáson vagy szulfoxidáción keresztül ezt követő hidrolízissel illetve neutralizációval. Ugyancsak alkalmasak az α -szulfozsírsavak észterei (észterszulfonátok), például az α -szulfonált metilészterei a hidrált kókuszpálmamag- vagy faggyúzsírsavaknak.

További alkalmas aniontenzidek a szulfált zsírsavglicerinészterek. A zsírsavglicerinészterek alatt a mono-, di- és triésztereket valamint ezek keverékét értjük, ahogy azokat az előállításnál egy monoglicerin 1 - 3 mol zsírsavval történő észterezésekor vagy triglicerideknek 0,3 - 2 mol glicerinnel való észterezésénél kapjuk. Kedvelt szulfált zsírsavglicerinészterek a 6 - 22 szénatomos telített zsírsavak szulfálási termékei, például a kapronsav, kapriilsav, kaprinsav, mirisztinsav, laurinsav, palmitinsav, sztearinsav vagy behensav.

Alk(en)ilszulfátokként kedveltek a $C_{12}-C_{18}$ -zsíralkoholok kénsavfélésztereiinek alkáli- és különösen nátriumsói, például kókuszszíralkoholból, faggyúzsíralkoholból, lauril-, mirisztil-, cetil- vagy sztearilalkoholból vagy a $C_{18}-C_{20}$ -oxoalkoholok és az ilyen lánchosszúságú szekunder alkoholok félészterei. Kedveltek továbbá az említett lánchosszúságú alk(en)ilszulfátok, melyek egy szintetikus, petrolkémiai úton előállított egyenes láncú alkilcsoportot tartalmaznak, melyek egy hasonló lebontási viselkedést mutatnak, mint az adekvát

zsírkémiai nyersanyagokon alapuló vegyületek. Mosás-technikai szempontból a C_{12} - C_{16} -alkilszulfátok és C_{12} - C_{15} -al-alkilszulfátok valamint C_{14} - C_{15} -alkilszulfátok kedveltek. A 2,3-alkilszulfátok szintén alkalmas aniontenzidék.

Az egyenesláncú vagy elágazó C_{7-21} -alkoholok 1 - 6 mol etilénoxiddal etoxilált kénsavmonoészterei is alkalmasak, mint a 2-metil-elágazású C_{9-11} -alkoholok átlagosan 3,5 mol etilénoxiddal (EO) vagy C_{12-18} -zsíralkoholok 1 - 4 EO-val. Tisztítószerekben magas habosodási tulajdonságuk miatt csak kis mennyiségekben alkalmazzuk, például 5 tömegszázalék, hagyományosan 1 - 5 tömegszázalék mennyiségben.

További alkalmas aniontenzidék az alkilszulfoborostyánsavak sói, melyeket szulfoszukcinátoknak vagy szulfoborostyánkősavésztereknek is nevezzük és a szulfoborostyánkősavészter alkohollal, különösen zsíralkoholokkal és különösen etoxilált zsíralkoholokkal képzett mono- és/vagy diésztereit adják. A kedvelt szulfoszukcinátok C_{8-18} -zsíralkohol-csoportokat vagy ezek keverékeit tartalmazzák. A különösen kedvelt szulfoszukcinátok egy zsíralkoholcsoportot tartalmaznak, amely etoxilált zsíralkoholokból levezethető, melyek nem ionos tenzideket jelentenek (leírást lásd feljebb). Itt a szulfoszukcinátok, melyek zsíralkohol-csoportjai korlátozott homológeloszlású etoxilált zsíralkoholokból levezethetőek, különösen kedveltek. Ugyancsak lehetséges, előnyös módon 8 - 18 szénatommal rendelkező alk(en)ilborostyánkősavnak az alk(en)illáncba vagy ezek sóiba való beültetése.

További anionos tenzidként különösen a szappanok jönnek szóba. Alkalmasak a telített zsírsavszappanok, mint a laurinsav, mirisztinsav, palmitinsav, sztearinsav, hidrált erukasav és behensav sói valamint különösen természetes zsírsavakból, például kókusz-, pálmamag- vagy faggyúzsírsavak, levezetett szappankeverékek.

Az anionos tenzidek, beleértve a szappanokat is jelen lehetnek nátrium-, kálium- vagy ammóniumsó valamint szerves bázisok, mint mono-, di- vagy trietanolamin oldható sóiként.

A tenzidek a találmánynak megfelelő tisztító- vagy mosószerekben összesen egy 5 - 50 tömegszázalékos, különösen egy 8 - 30 tömegszázalékos mennyiségben, a kész szerre vonatkoztatva, fordulhatnak elő.

A találmánynak megfelelő szerek tartalmazhatnak fehéritőt. A fehéritőszerekként alkalmazott, a vízben H_2O_2 -t biztosító vegyületek között a nátriumperkarbonát, a nátriumperborát-tetrahidrát és a nátriumperborátmonohidrát különös jelentőségű. További alkalmazható fehéritőszerek például a peroxo-pirofoszfátok, citrátperhidrátok valamint H_2O_2 -t biztosító persavas sók vagy persavak, mint perszulfátok illetve perkénsavak. Alkalmazható továbbá a karbamidperoxohidrát perkarbamid, amely a $H_2N-CO-NH_2 \cdot H_2O_2$ képlettel írható le. Különösen kemény felületek tisztításánál alkalmazott szerek esetén, például mosogatógépeknél, tartalmazhatnak fehéritőket a szerves fehéritők csoportjából, bár ezek alkalmazása elvileg textiltisztító anyagok esetén is lehetséges. Tipikus organikus

fehérítők a peroxisavak, mint például a dibenzoil-peroxid. További tipikus organikus fehérítők a peroxisavak, ahol példaként különösen az alkilperoxisavakat és az aril-peroxisavakat említjük. Kedvelt képviselői ennek a csoportnak a peroxibenzooesav és gyűrűszubsztituált származékai, mint az alkilperoxibenzooesavak, de például a peroxi- α -nafto-esavak és magnézium-monoperftalát is, valamint az alifás vagy szubsztituált alifás peroxisavak, mint peroxilaurinsav, peroxisztearinsav, ϵ -ftalimidoperoxikapronsav (ftalimidoperoxihexánsav, PAP) o-karboxibenzamidoperoxikapronsav, N-nonenilamidoperadipinsav és N-nonenilamidoperszukcinát, és alifás és aralifás peroxidikarbonsavak, mint 1,12-diperoxi-karbonsav, 1,9-diperoxiazelainsav, diperoxiszebacinsav, diperoxi-brasszilsav, a diperoxiftálsavak, 2-decildi-peroxibután-1,4-disav, N,N-tereftaloil-di(6-aminoperkarbonsav) is alkalmazhatóak.

A szer fehérítőtartalma 1 - 40 tömegszázalékot és különösen 10 - 20 tömegszázalékot tehet ki, ahol előnyös módon perborátmonohidrátot vagy perkarbonátot alkalmazunk.

Egy 60 °C -os vagy az alatti hőmérsékleten történő mosásnál, és különösen egy mosási előkezelés esetén a jobb fehérítő hatás elérésére, a szerek tartalmazhatnak fehérítő-aktiválókat is. Fehérítőaktivátorokként olyan vegyületeket alkalmazhatunk, melyek perhidrolizises körülmények között alifás peroxokarbonsavakat adnak 1 - 10 C -atommal, különösen 2 - 4 C -atommal, és/vagy adott esetben perbenzooesavat adnak. Alkalmask az olyan anyagok, melyek a fent leirt szénatomszámú

O- és/vagy N-acilcsoportokat és/vagy adott esetben szubsztituált benzoilcsoportokat hordoznak. Kedveltek a többszörösen acilált alkiléndiaminok, különösen a tetraacetiletiléndiamin (TAED), acilált tirazinszármazékok, különösen 1,5-diacetil-2,4-dioxohezahidro-1,3,5-triazin (DADHT) acilált glikoluril, különösen 1,3,4,6-tetraacetil-glikoluril (TAGU), N-acilimid, különösen N-nonanoil-szukcinimid (NOSI), acilált fenolszulfonát, különösen n-nonanoil- vagy izononaoiloxibenzolszulfonát (n- illetve izo-NOBS), acilált hidroxikarbonsavak, mint trietil-O-acetylcitrát (TEOC), karbonsavanhidrid, különösen ftálsavanhidrid, isato-savanhidrid és/vagy borostyánkőssavanhidrid, karbonsavamidok, mint N-metildiacetamid, glikolid, acilált többértékű alko-holok, különösen triacetin, etilén-glikoldiacetát, izoprop-anilacetát, 2,5-diacetoxi-2,5-dihidrofuran és a DE 196 16 693 és DE 196 16 767 német szabadalmakból ismert enolészter valamint acetilált szorbitol és mannitol illetve ezek az EP 0 525 239 európai szabadalomban leírásra került keverékei (SORMAN), acilált cukorszámazékok, különösen pentaacetil-glukóz valamint acetilált, adott esetben N-alkilált glukamin illetve glukonolakton, triazol illetve triazolszármazékok és/vagy részecskeformájú kaprolaktámok és/vagy kaprolaktám-származékok, különösen N-acilált laktámok, például N-ben-zoilkapolaktám és N-acetilkarpolaktám, amelyek a WO 94/27970, WO 94/28102, WO 94/ 28103, WO 95/00626, WO 95/14759 és WO 95/17498 nemzetközi szabadalmakból ismer-hetünk. A DE 196 16 769 német szabadalomból ismert hidrofil szubsztituált acilacetálokat és a DE 196 16 770 német valamint a WO 95/14075 nemzetközi szabadalomban leírásra került acillaktámokat

ugyancsak kedvelt módon alkalmazzák. A konvencionális tisztítószernek a DE 44 43 177 német szábadalomból ismert kombinációt szintén alkalmazhatjuk. Kedvelt fehérítőkombinációk a nátrium-4-(oktanoiloxi)-benzolszulfonát, n-nonanoil- vagy izononanoiloxibenzolszulfonát (n- illetve izo-NOBS), undekanoiloxibenzolszulfonát (UDOBS), nátriumdodekanoiloxibenzolszulfonát (DOBS), dekanoiloxibenzoesav (DOBA, OBC 10) és/vagy dodekanoiloxibenzolszulfonát (OBS 12), valamint N-metilmorfolinum-acetonitril (MMA). Ilyen jellegű fehérítővariációkat hagyományos 0,01 - 20 tömegszázalékos, különösen 0,1 - 15 tömegszázalékos, különösen 1 - 10 tömegszázalékos mennyiségben alkalmazhatjuk az egész keverék tömegére vonatkoztatva.

A konvencionális fehérítővel együtt, vagy azokat helyettesítve úgynevezett fehérítőkatalizátorokat is alkalmazhatunk. Ezeknél az anyagoknál fehérítést erősítő hatású átmenetifém-sókról illetve átmenetifémkomplexekről, mint például Mn-, Fe-, Co-, Ru- vagy Mo-szalenkomplexekről vagy -karbonilkomplexekről beszélünk. A Mn-, Fe-, Co-, Ru-, Mo-, Ti-, V- és Cu-komplexek N-tartalmú tripod-ligandumokkal valamint Co-, Fe-, Cu- és Ru-amminkomplexekkel ugyancsak alkalmasak fehérítőkatalizátorként, ahol olyan vegyületeket alkalmazunk előszeretettel, melyek a DE 197 09 284 A1-ben leírásra kerültek. A WO 99/63038 szerint az acetonitril és a WO 99/63041 szerinti fehérítőaktiváló átmenetifémkomplex-vegyületek amidázokkal kombinálva szintén fehérítő hatást fejtenek ki.

A találmásnak megfelelő szerek általában egy vagy több builder -t tartalmaznak, különösen zeolitokat, szilikátokat, karbonátokat, szerves kobuildereket és - ahol nincs ez ellen szóló ökológiai indok- foszfátokat. Leginkább gépi mosogatáshoz alkalmazott mosogatószerekben kedvelten alkalmazott adalékok a vázanyagok.

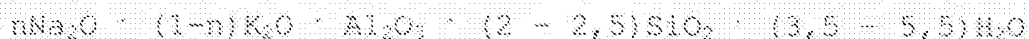
Itt a kristályos szerkezetű, réteges szerkezetű $\text{NaMSi}_2\text{O}_{2x+1}\text{H}_2\text{O}$ képletnek megfelelő nátriumszilikátokat kell megemlítenünk, ahol M nátrium vagy hidrogén, x egy 1,6 - 4, különösen 1,9 - 4,0 közötti szám és y egy 0 - 20 közötti szám és x kedvelt értékei 2, 3 vagy 4. Ilyen jellegű kristályos rétegszilikátok kerülnek leírásra az EP 0 164 514 nemzetközi szabadalomban. A megadott képlet szerinti kedvelt kristályos réteg-szilikátok olyanok, melyekben M nátriumot jelent és x 2-es vagy 3-as értéket vesz fel. Különösen kedveltek mind a β -, mind a δ -nátriumdiszilikátok, melyek megfelelnek a $\text{Na}_2\text{Si}_2\text{O}_5 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ képletnek. A kereskedelemben beszerezhetőek ilyen vegyületek például SKS[®] (Clariant cég) néven. Így az SKS-6[®] esetében lényegében egy $\text{Na}_2\text{Si}_2\text{O}_5 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ képletnek megfelelő δ -nátriumdiszilikátról, az SKS-7[®] estében pedig egy β -nátriumdiszilikátról beszélünk. Savakkal való reakción keresztül (pld. Citromsav, szénsav) a δ -nátriumdiszilikátból Kanemit keletkezik $\text{NaHSi}_2\text{O}_5 \cdot y\text{H}_2\text{O}$, melyet a kereskedelemben SKS-9[®] és SKS-10[®] (Clariant) néven találhatunk meg. Előnyös lehet továbbá, ezen rétegszilikátok kémiai módosulatinak alkalmazása. Így például a rétegszilikátok alkalitása alkalmas módon befolyásolható. A foszfáttal illetve karbonáttal dotált rétegszilikátok a δ -nátriumdiszilikátokkal összehasználtva

megváltozott kristálymorfológiát mutatnak, gyorsabban oldódnak és a δ -nátriumdiszilikátokhoz képest magasabb kalciumkötési képességgel rendelkeznek. Ilyenek az $x \text{ Na}_2\text{O} \cdot y \text{ SiO}_2 \cdot z \text{ P}_2\text{O}_5$ általános összegképletű rétegszilikátok, ahol x és y aránya egy 0,35 és 0,6 közötti szám, x és z aránya egy 1,75 és 1200 közötti szám és y és z aránya egy 4 és 2800 közötti szám, melyek a DE 196 01 063 szabadalomban kerültek leírásra. A rétegszilikátok oldhatósága szintén növelhető, miszerint különösen finomszerkezetű rétegszilikátokat alkalmazunk. A kristályos rétegszilikátokból származó komponensek más adalékanyagokkal együtt is alkalmazhatóak. Itt különösen a cellulózszármazékokat tartalmazó komponensek említendők, melyek a dezintegráló hatásban mutatják előnyüket, és különösen mosószertablettákban kerülnek alkalmazásra, valamint a polikarboxilatokat tartalmazó komponensek, például citrom-sav, illetve a polimer polikarboxilatok, például az akrilsav kopolimerei.

Alkalmazhatóak továbbá amorf nátriumszilikátok, melyek egy $\text{Na}_2\text{O} : \text{SiO}_2$ modulussal rendelkeznek $1 : 2 - 1 : 3,3$, különösen $1 : 2 - 1 : 2,8$ és különösen $1 : 2 - 1 : 2,6$, melyek lassított oldódásúak és egy másodlagos mosóhatást biztosítanak. A lassított oldódást a hagyományos amorf szilikátokkal szemben, különböző módokon érhetjük el, például felületi kezeléssel, elegyítés, kompaktálással/tömörítéssel vagy túl-száritással. A találmány keretein belül az „amorf” fogalom alatt „röntgenamorfot” is értünk. Ez azt jelenti, hogy a röntgenelhajlási kísérleteknél nem kapunk éles röntgen-reflexiókat, melyek a kristályos anyagokra jellemzőek, hanem

minden esetben az irányított röntgensugár egy vagy több maximumát, amelynek szélessége az elhajlási szög több fokegységének felel meg. Mégis kaphatunk azonban nagyon jó builder-tulajdonságokat, ha a szilikátrészecskék elektron-elhajlásos kísérleteknél elmosódott, vagy akár éles elhajlási maximumot adnak. Ez úgy interpretálható, hogy a termékek 10 nm-től pár száz nanométerig terjedő nagyságú mikro-kristályos területeket tartalmaznak, ahol max. 50 nm és különösen max. 20 nm -ig terjedő értékek kedveltek. Különösen kedveltek a tömörített/kompaktált amorf szilikátok, elegyített amorf szilikátok és túlezáritott röntgenamorf szilikátok.

Egy adott esetben alkalmazható, finomkristályos, szintetikus és kötött vizet tartalmazó zeolit előnyös módon egy zeolit A és/vagy P. különösen kedvelt zeolit P a MAP® (a Crosfield cég kereskedelmi terméke). Alkalmask az azonban a zeolit X valamint az A, Y és/vagy P-ből készített keverékek is. Kereskedelemben forgalmazott és az alábbi találmány keretein belül előszeretettel alkalmazott például egy zeolit X és zeolit A -ból álló keverékkristály (kb. 80 tömegszázalék zeolit X), melyet a CONEDA Augusta S.p.A. cég VEGOBOND AX® kereskedelmi néven forgalmaz és a



képlettel írható le. Az alkalmas zeolitok egy 10 µm-nél kisebb átlagos részecskemérettel rendelkeznek (térfogat-eloszlás; mérési módszer: Coulter Counter) és előnyös módon 18 - 22 tömegszázalék, különösen 20 - 22 tömegszázalék kötött vizet tartalmaznak.

Természetesen az általánosan ismert foszfátok alkalmazása is lehetséges builder-anyagként, mindaddig, míg egy ilyen jellegű alkalmazás ökológiai okok miatt nem kerülendő. A kereskedelmileg forgalmazott foszfátok sokasága közül az alkálifoszfátok, különösen a pentanátrium- illetve pentakáliumtrifoszfát (nátrium- illetve káliumtripolifoszfát) játszanak fontos szerepet a mosó- és tisztítószer-iparban.

Az alkálifoszfátok itt a foszforsavak alkálifém- (különösen nátrium- és kálium-) -sóit összefoglaló kifejezés, melyeken belül megkülönböztethetjük a metafoszforsavakat (HPO_3), és ortofoszforsavakat H_2PO_4 , a nagymolekulájú anyagoktól. A foszfátok több előnyt is összesítenek magukban: alkálihordozóként viselkednek, megakadályozzák a vízkőlerakódást a gépalkatrészekben, illetve a vízkőinkrusztációkat a szöveteken és ezen felül hozzájárulnak a tisztító hatáshoz.

A nátriumdihidrogénfoszfát, NaH_2PO_4 , létezik dihidrátként (sűrűség $1,91 \text{ gcm}^{-3}$, olvadáspont 60°) és monohidrátként (sűrűség $2,04 \text{ gcm}^{-3}$). Mindkét só fehér, vízben könnyen oldható por, melyek melegítés hatására a kristályvizet leadják és 200°C -on gyengén savas difoszfáttá (dinátriumdihidrogén-difoszfát, $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$), magasabb hőmérsékleten nátriumtrimetafoszfáttá ($\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$) és sóvá alakulnak (lásd alább). NaH_2PO_4 savasan reagál; akkor keletkezik, mikor a foszforsavat nátronlúggal 4,5-es pH-ra állítjuk be és a cefrét elporlasztjuk. Káliumdihidrogénfoszfát (primer vagy egybázisú káliumfoszfát, káliumbifoszfát, KDP), KH_2PO_4 , egy $2,33 \text{ gcm}^{-3}$ sűrűségű fehér por, 253°C -os olvadásponttal [bomlás

káliumfoszfát keletkezésével (KPO_3), amely vízben könnyen oldható.

Dinátriumhidrogénfoszfát (szekunder nátriumfoszfát), Na_2HPO_4 , egy szintelen, vízben nagyon könnyen oldható kristályos só. Létezik vízmentesen és 2 mol. (sűrűség $2,066 \text{ gcm}^{-3}$, vízvesztés 95°C -nál), 7 mol. (sűrűség $1,68 \text{ gcm}^{-3}$, olvadáspont 49°C 5 H_2O vesztesével) és 12 mol. vízzel (sűrűség $1,52 \text{ gcm}^{-3}$, olvadáspont 35°C 5 H_2O vesztesével), 100°C -on válik vízmentessé és erős hevítésnél difoszfáttá $Na_4P_2O_7$ alakul. A dinátriumhidrogénfoszfát foszforsav szódaoldattal való semlegesítésével fenolftalein indokátor alkalmazásával állítható elő. A dikáliumhidrogénfoszfát (szekunder vagy kétbázisú káliumfoszfát) K_2HPO_4 , egy amorf, fehér só, amely a vízben könnyen oldódik.

A trinátriumfoszfát, egy terciér nátriumfoszfát, Na_3PO_4 , szintelen kristály, amely $1,62 \text{ gcm}^{-3}$ sűrűségű és $73 - 76^\circ \text{C}$ olvadáspontú (bomlás), dekahidrátként (19 - 20 % P_2O_5 -nek megfelelően) 100°C -os olvadáspontú és vízmentes formájában (39 - 40 % P_2O_5 -nek megfelelően) $2,536 \text{ gcm}^{-3}$ sűrűségű. A trinátriumfoszfát vízben alkalikus reakcióval könnyen oldható és egy pontosan 1 mol dinátriumfoszfátból és 1 mol $NaOH$ -ból álló oldat begőzölésével előállítható. A trikáliumfoszfát (terciér vagy hárombázisú káliumfoszfát), K_3PO_4 , egy fehér, szétfolyó, szemcsés por, melynek sűrűsége $2,56 \text{ gcm}^{-3}$, olvadáspontja 1340° és vízben alkalikus reakcióval könnyen oldódik. Előállítható például Thomas-salaknak szénrel és káliumszulfáttal való hevítése közben. A magas ár ellenére a

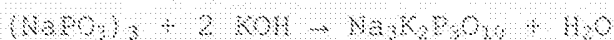
tisztítószer-iparban a könnyen oldódó, ezért magas hatékonyságú káliumfoszfátok sokkal inkább kedveltek a megfelelő nátrium-vegyületekkel szemben.

A tetranátriumdifoszfát (nátriumpirofoszfát), $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, létezik vízmentes formában (sűrűség $2,534 \text{ gcm}^{-3}$, olvadáspont 988° , 880° is megadva) és dekahidrátként (sűrűség $1,815 - 1,836 \text{ gcm}^{-3}$, olvadáspont 94° vízvesztéssel). Mindkét anyag szintelen, a vízben alkalikus reakcióval könnyen oldódó kristály. $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ dinátriumfoszfát 200° fölé hevítésével állítható elő, vagy foszforsavnak szódával sztöchiometrikus arányban való reagáltatásával és az oldat porlasztásos vízmentesítésével. A dekahidrát nehézfém sókat és vízkeménységet okozó anyagokat komplexál, és így csökkenti a víz keménységét. A káliumdifoszfát (káliumpirofoszfát), $\text{K}_4\text{P}_2\text{O}_7$, trihidrát formában fordul elő és egy szintelen, higroszkópos port alkot, melynek sűrűsége $2,33 \text{ gcm}^{-3}$, vízben könnyen oldható, melynek során az 1 %-os oldatnak 25° -on 10,4 a pH-ja.

A NaH_2PO_4 illetve KH_2PO_4 kondenzációja során nagymolekulájú nátrium- és káliumfoszfátok keletkeznek, melyeknél a nátrium- illetve káliummetafoszfátok ciklikus és a nátrium- illetve káliumpolifoszfátok láncformájú képviselőit különböztetjük meg. Különösen az utóbbi csoport esetén találunk számtalan használatban lévő megnevezést: olvadási- vagy izzófoszfátok, Graham só, Kurrol és Maddrell só. Az összes nagyobb nátrium- és káliumfoszfátot együtt kondenzált foszfátoknak nevezzük.

A technikailag fontos pentanátriumtrifoszfát, $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ (nát-

riumpolifoszfát), egy vízmentes vagy 6 H₂O-val kris-tályosodó, nem higroszkópos, fehér, vízoldható só a NaO-[P(O)(Ona)PO]_n-Na képlet szerint, ahol n=3. 100 g vízben szobahőmérsékleten kb. 17 g, 60 °-on kb. 20g, 100 °-on kerekén 32 g kristályvizmentes só oldódik; az oldat két órás hevítése után 100 ° -on hidrolizissal kb. 8 % ortofoszfát és 15 % difoszfát keletkezik. A pentanátriumtrifoszfát előállítása során a foszforsavat szódaoldat vagy nátronlóg sztöchiometrikus mennyiségével hozzuk reakcióba és az oldatot porlasztással víztelenítjük. A Graham sóhoz és a nátriumdifoszfáthoz hasonlóan a pentanátriumtrifoszfát sok oldhatatlan fémvegyületet (a mészszapant is) old. A penta-káliumtrifoszfát, K₅P₃O₁₀ (káliumtripolifoszfát), például egy 50 tömegszázalékos oldat (> 23 % P₂O₅, 25 % K₂O) formájában kerül forgalmazásra. A káliumpolifoszfátokat a mosó- és tisztítószer-iparban széleskörűen alkalmazzák. Léteznek még továbbá nátriumkáliumtripolifoszfátok is, melyek a találmány keretein belül ugyancsak alkalmazhatóak. Ezek például nátriumtrimetafoszfát KOH -dal való hidrolizise során keletkeznek:



Ezek a találmánynak megfelelően a nátriumtripolifoszfáttal, káliumtripolifoszfáttal vagy e kettő keverékeivel alkalmazhatóak; a nátriumtripolifoszfátból és nátriumkáliumtripolifoszfátból készült vagy káliumtripolifoszfátból és nátriumkáliumtripolifoszfátból készült vagy nátriumtripolifoszfátból és káliumtripolifoszfátból és nátriumkáliumtripoli-

foszfátból készült keverékek a találmánynak megfelelően ugyancsak alkalmazhatóak.

Organikus kobuilder -ként alkalmazhatunk a találmánynak megfelelő mosó- és tisztítószerekben különösen polikarboxilátokat vagy polikarbonsavakat, polimer polikarboxilátokat, poliaszparaginsavakat, poliacetátokat, adott esetben oxidált dextrineket, további szerves kobuildereket (lásd alább) valamint foszfónátokat. Ezeket az anyagosztályokat írjuk le a következőekben.

Alkalmas szerves vázanyagok például a nátriumsók formájában alkalmazható polikarbonsavak, ahol polikarbonsavak alatt olyan karbonsavakat értünk, melyek több mint egy sav-csoportot hordoznak. Ilyenek például a citromsav, adipinsav, borostyánkősav, glutársav, almasav, borkősav, maleinsav, fumársav, cukorsavak, aminokarbonsavak, nitrilotriecetsav (NTA), amennyiben egy ilyen alkalmazás ökológiai okokból nem kerülendő, valamint ezek keverékei. Kedvelt sók a polikarbonsavak, mint citromsav, adipinsav, borostyánkősav, glutársav, borkősav, cukorsavak és ezek keverékeinek sói.

A savakat megukban is alkalmazhatjuk. Builder-hatásuk mellett tipikus módon rendelkeznek egy savas komponens tulajdonságaival és ezzel a mosó- vagy tisztítószernek egy alacsonyabb és enyhébb pH-értékének beállításához is hozzájárulnak, amennyiben nem az egyéb komponensek keverékéből adódó pH-érték a kívánatos. Különösen a rendszer- és környezetkímélő savak említendők, mint a citromsav, ecetsav, bor-

kősav, almasav, tejsav, glikolsav, borostyánkősav, glutár-sav, adipinsav, glukonsav és ezekből összeállított tetszőleges keverék. Azonban ásványi savak, különösen kénsavak vagy bázisok, különösen ammónium- vagy alkálihidroxidok is szolgálhatnak pH-regulátorként. Az ilyen jellegű regulátorokat a találmánynak megfelelő szerekben kedvelt módon 20 tömegszázalék alatti, különösen 1,2 - 17 tömegszázalékos mennyiségben alkalmazzuk.

Builder-ként alkalmasak további polimer polikarboxilátok, ezek például a poliakrilsav vagy a polimetakrilsav alkálifémsói, például olyanok, melyek relatív molekulatömege 500 - 70 000 g/mol között van.

A polimer polikarboxilátoknál megadott móltömegek esetén az alábbi szabadalom értelmében a mindenkori sav móltömegének M_w súlyozott középértékét értjük, amelyet alapvetően gélpermeációs kromatográfiával (GPC) határoztunk meg, ahol egy UV-detektort alkalmaztunk. A mérést egy externális poliakril-sav-standarddal végeztük, amely a vizsgált polimerekkel való strukturális rokonsága miatt reális móltömegeket szolgáltatott. Ezek az adatok lényegesen eltérnek azoktól az adatoktól, melyeknél a polisztirolszulfonsavakat alkalmaztuk standardként. A polisztirolszulfonsavakkal szemben mért móltömegek rendszerint jelentősen magasabbak, mint a jelen iratban megadott móltömegek.

Különösen alkalmas polimerek a poliakrilátok, melyek kedvelt módon egy 2 000 - 20 000 g/mol közötti molekulatömeget

muattnak. Kimagaslóan jó oldhatóságuk miatt ebből a csoportból ismét a rövidláncú poliakrilátok a kedveltek, melyek móltömege 2 000 - 10 000 g/mol -t, és különösen kedvelt módon 3 000 - 5 000 g/mol -t tesz ki.

Alkalmasak továbbá a kopolimer polikarboxilátok, különösen az akrilsav metakrilsavval és az akrilsav vagy metakrilsav maleinsavval. Különösen alkalmasnak bizonyultak az akrilsavból és maleinsavból álló kopolimerek, melyek 50 - 90 tömegszázalék akrilsavat és 50 - 10 tömegszázalék maleinsavat tartalmaznak. Relatív molekulatömegük, a szabad savakra viszonyítva, általában 2 000 - 70 000 g/mol-t, előnyös módon 20 000 - 50 000 g/mol -t és különösen 30 000 - 40 000 g/mol-t tesz ki. A (ko-) polimer polikarboxilátok vagy por, vagy vizes oldat formájában alkalmazhatóak. A szerek (ko-) polimer polikarboxilát tartalma 0,5 - 20 tömegszázalékot, különösen 1 - 10 tömegszázalékot tehet ki.

A vízoldhatóság javítására a polimerek tartalmazhatnak monomerként allilszulfonsavakat, mint például alliloxibenzolszulfonsavat és metallilszulfonsavat.

Különösen kedveltek a biológiailag lebontható polimerek, melyek több mint két különböző monomer-egységből épülnek föl, például olyanok, melyek az akrilsavat és a maleinsavat valamint vinilalkoholt illetve vinilalkoholszármazékokat vagy monomer savakként akrilsavat és a 2-alkilallilszulfonsavat valamint cukor-származékokat tartalmaznak.

További kedvelt kopolimerek a monomerként kedvelt módon akroleint és akrilsavat/akrilsavsót illetve akroleint és vinilacetátot tartalmaznak.

További kedvelt builder-anyagokként megemlítendők még a polimer aminosavak, ezek sói vagy ezek előanyagai. Különösen kedveltek a poliaszparaginsavak illetve ezek sói és származékai.

További alkalmas builder-anyagok a poliacetálok, melyek a dialdehideknek az 5 - 7 szénatomot és legalább 3 hidroxil-csoportot tartalmazó polikarbonsavakkal való reakciójával állíthatók elő. A kedvelt poliacetálokat dialdehidekből, mint glioxál, glutáraldehid, tereftálaldehid valamint ezek keverékeiből és polikarbonsavakból, mint glukonsav és/vagy glukheptonsav állíthatjuk elő.

További alkalmas szerves builder-anyagok a dextrinek, például szénhidrátok oligomerjei illetve polimerjei, melyek keményítők parciális hidrolízisével állíthatóak elő. A hidrolízis történhet a hagyományos, például savas- vagy enzim-katalizált eljárásokon keresztül. Előnyös módon közepes mól-tömegű hidrolízis-termékekről beszélünk a 400 - 500 000 g/mol tartományban. Ennél egy 0,5 - 40 tartományba eső, különösen 2 - 30 tartományba eső dextróz-ekvivalensű (DE) poliszaharid a kedvelt, ahol DE egy poliszaharid redukáló hatásának meghatározásánál használt mutató a dextrózhoz viszonyítva, melynek DE értéke 100. Használhatóak továbbá a maltodextrinek egy 3 - 20 közötti DE értékkel és száraz glukózsirupok egy 20

- 37 közötti DE értékkel, valamint a magasabb móltömegű (2 000 - 30 000 g/mol), úgynevezett sárgadextrinek és fehér-dextrinek.

Az ilyen dextrinek oxidációs származékai esetén azok oxidálószerrel történt reakciójának termékeiről beszélünk, melyek képesek a szaharidgyűrű legalább egy alkohol-csoportjának karbonsavcsoporttá oxidálására. A találmánynak megfelelő szerek különösen kedvelt szerves builderjei az oxidált keményítők, illetve azok származékai az EP 472 042, WO 97/25399, és EP 755 944 -ből.

Az oxidiszukcinátok és más diszukcinát származékok, különösen az etiléndiaminszukcinát, további alkalmas kobuilderek. Ennél kedvelt módon az etiléndiamin-N,N'-diszukcinát (EDDS) nátrium- vagy magnéziumsóit alkalmazzuk. Kedveltek továbbá ebben az összefüggésben a glicerindiszukcinátok és glicerintriszukcinátok. A zeolit-, karbonát- és/vagy szilikáttartalmú kialakításokban az alkalmas mennyiségek 3 és 15 tömegszázalék között fekszenek.

További alkalmas szerves kobuilderek például az acetilált hidroxikarbonsavak illetve ezek sói, melyek adott esetben lakton-formában is előfordulhatnak és melyek legalább 4 szénatomot és legalább egy hidroxicsoportot valamint két savcsoportot tartalmaznak.

Egy további kobuilder-tulajdonságokat mutató anyagcsoportot képeznek a foszfonátok. Itt különösen hidroxialkán- illetve aminosalkánfoszfonátokról beszélünk. A hidroxialkánfoszfátok

közül az 1-hidroxi-2-aminopropan-1,1-difoszfonsav (HEDP) különleges jelentőségű kobuilder. Előnyös módon nátriumsóként alkalmazzuk, ahol a dinátriumsó semleges és a tetranátriumsó alkalikus (pH 9) reagál. Aminoalkánfoszfonsavaként előnyös módon az etiléndiamintetrametilénfoszfonsav (EDTMP), a dietilén-triaminpentametilfoszfonsav (DTPMP) valamint ezek magasabb homológjai jöhetnek szóba. Előnyös módon a semleges reagáló nátriumsó formájában alkalmazzuk, például az EDTMP hexanátriumsója illetve a DTPMP hepta- vagy oktanátriumsójaként. Builder-ként a foszfonsavak osztályából kedvelt módon a HEDP-t alkalmazzuk. Az aminoalkánfoszfonsavak rendelkeznek továbbá egy jellemző nehézfémkötő-képességgel is. Ennek megfelelően, különösen ha a szer fehérítőt is tartalmaz, előnyös lehet az aminoalkánfoszfonsavak, különösen a DTPMP, vagy a nevezett foszfonsavak keverékének alkalmazása.

Ebből kiindulva bármely vegyület alkalmazható kobuilderként, amely képes az alkáliföldfémionokkal komplexet képezni.

A builder-anyagok a találmánynak megfelelő szerekben adott esetben akár 90 tömegszázalékban is jelen lehetnek. Előnyös módon 75 tömegszázalékig terjedő mennyiségben fordulnak elő. A találmánynak megfelelő mosószeres különösen 5 - 50 tömegszázalék builder-tartalmat mutatnak. A találmánynak megfelelő, kemény felületek, különösen edények gépi mosására alkalmazott szerekben a builder-anyagok mennyisége különösen 5 - 88 tömegszázalékot tesz ki, ahol a hasonló szerekben előnyös módon nem alkalmazunk vízoldhatatlan builder-anyagokat. A találmánynak megfelelő szer egyik kedvelt kivitelezési

formájában edények különleges gépi tisztítására a vizoldható szerves builderek 20 - 40 tömegszázalékban fordulnak elő, különösen az alkálicitrát, 5 - 15 tömegszázalék alkálikarbonát és 20 - 40 tömegszázalék alkálidiszilikát.

Az oldószeres, melyek a mosó- és tisztítószeres folyékonytól a gélállapotig tejedő összetételeiben alkalmazhatóak, például az egy- vagy többértékű alkoholok, alkanolaminok vagy glikoléterek csoportjából származnak, amennyiben az adott koncentrációtartományban vízzel elegyíthetőek. Előnyös módon az oldószeres az etanol, n- vagy i-propanol, butanolok, etilén-glikolmetiléter, etilén-glikoletiléter, etilén-glikol-propiléter, etilén-glikolmono-n-butiléter, dietilén-glikolmetiléter, dietilén-glikoletiléter, propilén-glikol-metil-, etil- vagy -propil-éter, dipropilén-glikolmonometil-, vagy -etiléter, di-izopropilén-glikolmonometil-, vagy -etil-éter, metoxi-, etoxi- vagy butozitriglikol, 1-butoxi-2-propanol, 3-metil-3-metoxibutanol, propilén-glikol-t-butil-éter valamint ezen oldószeres keverékeiből választjuk.

Az oldószeres a találmánynak megfelelő folyékonytól a gél állapotú mosó- és tisztítószeresben 0,1 - 20 tömegszázalék, kedvelt módon azonban 15 tömegszázalék mennyiségben és különösen 10 tömegszázalék mennyiségben alkalmazzuk.

A találmánynak megfelelő összetétel viszkozitásának beállításához egy vagy több töményítőt, illetve töményítőrendszert alkalmazhatunk. Ezek a nagymolekulájú anyagok, melyeket duzzadóanyagoknak is nevezzük, legtöbbször felszívják a ned-

vességet, és ezzel megduzzadnak, míg végül viszkózus valódi vagy kolloid oldatokat kapunk.

Alkalmos duzzasztóanyagok az anorganikus vagy polimer organikus vegyületek. Az anorganikus duzzasztókhoz tartoznak például a polikovasavak, az agyagásványok, mint montmorillinit, zeolit, kovasavak és a betonit. Az organikus duzzasztók a természetes polimerek, a megváltoztatott természetes polimerek és a teljesen szintetikus polimerek csoportjából származnak. Ilyen, a természetből származó polimerek például az agar-agar, Carrageen, Tragant, Gummi arabicum, alginátok, pektinek, poliozok, guar-liszt, jánoskenyérfaagliszt, keményítő, deztrin, zselatin és kazein. A megváltoztatott természetes anyagok, melyeket duzzasztóként alkalmazunk, elsősorban a módosított keményítők és cellulózok csoportjából származnak. Példák erre a karboximetilcellulózok és más cellulózéterek, hidroxietil- és propilcellulóz valamint a lisztlángéter. Teljesen szintetikus duzzasztók a polimerek, mint poliakril- és poli-metakril-vegyületek, vinilpolimerek, polikarbonsavak, poli-éterek, poliiminek, poliamidok és poliuretánok.

A duzzasztók 0,05 - 2 tömegszázalékos, és különösen 0,1 - 1,5 tömegszázalékos mennyiségben alkalmazhatók a kész összetétel tömegére vonatkoztatva.

A találmánynak megfelelő mosó- és tisztítószer adott esetben tartalmazhat még további szokásos adalékanyagokat, mint zárszerek, elektrolitok és további segédanyagokat, mint op-

tikai fehérítők, szürkületgátlók, ezüstkorrozógátlók, színátviteli inhibitorok, habzásgátlók, abráziós anyagok, szín- és/vagy illatanyagok, valamint mikrobiális hatóanyagok és/vagy UV-abszorbensek.

A találmánynak megfelelő textilmosószeres optikai fehérítőként a diamínosztilbéndiszulfonsav származékait illetve alkálifémsóit tartalmazhatják. Alkalmask például a 4,4'-bisz(2-anilino-4-morfolino-1,3,5-triazinil-6-amino)sztilbén-2,2'-diszulfonsav sói vagy hasonló felépítésű vegyületek, melyek a morfolino-csoport helyett egy dietanolaminocsoportot, egy metilaminocsoportot, egy anilinocsoportot vagy egy 2-metoxietilaminocsoportot hordoznak. Jelen lehetnek továbbá a szubsztituált difenilsztiril típusú fehérítők, például a 4,4'-bisz(2-szulfosztiril)-difetil, a 4,4'-bisz(4-klór-3-szulfosztiril)-difetil, vagy a 4-(4-klórsztiril)-4'-(2-szulfosztiril)-difetil alkálisói. A fent nevezett optikai fehérítők keverékeit is alkalmazhatjuk.

A szürkületgátlók feladata a textilszövetről leoldott szennyeződés oldatban szuszpendálva tartása. Erre leginkább a szerves természetű oldható kolloidok alkalmasak, például keményítő, enyv, zselatin, a keményítő vagy a cellulóz éter-karbonsavainak vagy éterszulfonsavainak sói vagy a cellulóz vagy a keményítő savanyú kénsavésztereinek sói. Vízoldható, savas csoportokat tartalmazó poliamidok is alkalmasak erre a célra. Továbbá más, fent nem nevezett keményítőszármazékok is alkalmazhatóak, például az aldehidkeményítők. Kedvelt módon cellulózétereket, mint karboximetilcellulóz (Na-só),

metilcellulóz, hidroxialkilcellulóz és keverékétereiket, mint metilhidroxietilcellulóz, metilhidroxipropilcellulóz, metilkarbozimetilcellulóz és ezek keverékeit alkalmazzuk 0,1 - 5 tömegszázalékos mennyiségben a szer tömegére vonatkoztatva.

Az ezüstkorrózióvédelem létrehozására a találmánynak megfelelő edény-tisztítószerekben ezüstkorróziós inhibitorokat alkalmazunk. Ilyen a technika által ismert inhibitorok például a benzotriazol, vas(III)-klorid vagy CoSO_4 . Mint azt például az EP 0 736 084 B1 európai szabadalomból tudjuk, az enzimekkel együtt történő alkalmazásra különösen alkalmas ezüstkorrózióinhibitorok a mangán-, titán-, cirkónium-, hafnium-, vanádium-, kobalt- vagy cériumsók és/vagy -komplexek, melyekben a nevezett fémek a II, III, IV, V vagy VI oxidációs fokos állapotban vannak. Példák ilyen vegyületekre a MnSO_4 , V_2O_4 , VO_2 , TiOSO_4 , K_2TiF_6 , $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_3$, valamint ezek keverékei.

A „soil-release”-hatóanyagok vagy „soil-repellents” legtöbbször polimerek, melyek egy mosószerben történő alkalmazás során a mosófázisnak szennyeződéseltávolító tulajdonságot biztosítanak és/vagy a többi mosószeralapanyag szennyeződéseltávolító hatását erősítik. Egy hasonló hatás tapasztalható kemény felületekre alkalmazott tisztítószerekben való alkalmazása során.

Különösen hatásos és hosszú ideig óta ismert Soil-Release-hatóanyagok a dikarbonsav-, alkilén-glikol- és polialkilén-glikolegységeket tartalmazó kopoliszterek. Példák erre a

polietiléntereftalát és polioxietilénglikol (DT 16 17 141, illetve DT 22 00 911) kopolimerjei és keverékpolymerjei. A DT 22 53 063 német szabadalomban savas szerek kerültek leírásra, melyek többek között egy kétbázisú karbonsav és egy alkilén- vagy cikloalkilénpoliglikol tartalmú kopolimert tartalmaznak. Etiléntereftalátból és polietilénoxid-tereftalátból készült polimereket és azok mosószerekben való alkalmazását a DE 28 57 292 és DE 33 24 258 német és EP 0 253 567 európai szabadalmakban olvashatunk. Az EP 066 944 európai szabadalom egy olyan szert ír le, amely egy meghatározott molarányok szerint etilénglikolból, polietilén-glikolból, aromás dikarbonsavból és szulfonált aromás dikarbonsavból álló kopolimer. Az EP 0 185 427 európai szabadalomból metil- vagy etilcsoporttal lezárt végű poliész-tereket ismerünk etilén- és/vagy propilén-tereftalát- és polietilénoxid-tereftalát-egységekkel és mosószereket, melyek egy ilyen jellegű Soil-Release-polimert tartalmaznak. Az EP 0 241984 európai szabadalom egy olyan poliésztert emlit, amely az oxietilén csoportok és tereftálsavegységek mellett szubsztituált etilénegységeket valamint glicerinegységeket is tartalmaz. Az EP 0 241 985 európai szabadalomból olyan poliésztereket ismerünk, melyek az oxietilén-csoportok és tereftálsavegységek mellett 1,2-propilén-, 1,2-butilén- és/vagy 3-metoxi-1,2-propilén-csoportokat valamint glicerinegységeket is tartalmaznak és C_1 - - C_4 -alkilcsoportokkal zárt végű. Az EP 0 272 033 európai szabadalomból leg-alább C_{1-4} -alkil- vagy acilcsoportok által részben lezárt végű poliésztereket ismerünk poli-propiléntereftalát- és polioxietiléntereftalát-egységekkel. Az EP 0 274 907 európai szabadalom szulfoetillel

lezárt végű tereftáltartalmú Soil-Release-poliésztereket ismertet. Az EP 0 375 280 európai szabadalom alapján tereftalát-, alkilén-glikol és poli-C₂₋₄-glikol-egységeket tartalmazó Soil-Release-poliésztereket a telítetlen végcsoportok szulfonálásával kaphatunk. A WO 95/32232 nemzetközi szabadalom savas, aromás szennyeződésleoldó tulajdonságú poliésztereket érint. A WO 97/31085 nemzetközi szabadalomból nem polimer soil-repellent-hatóanyagok ismertek: Az első egység, amely például kationos lehet, a pamutfelszínre való elektrosztatikus ad-szorpciót szolgálja, és egy második egység, amely hidrofób felépítésű, a hatóanyagok a víz/pamut-határfelületen való megmaradását segíti.

A találmánynak megfelelő textilmosószerekben alkalmazható színátadási-inhibitorokhoz különösen polivinilpirrolidonok, polivinilimidazolok, polimer N-oxidok, mint poli-(vinil-piridin-N-oxid) és a vinilpirrolidonnak vinilimidazollal képzett kopolimerjei tartoznak.

Gépi tisztítási eljárás során célszerű lehet a szerhez habzsgátlót elegyíteni. Habzsgátlóként alkalmasak például természetes vagy mesterséges eredetű szappanok, melyek nagy mennyiségben tartalmaznak C₁₈-C₂₄-zsírsavakat. Alkalmas nem tenzid jellegű habzásinhibitorok például az organopolisziloxánok és ezek keveréke mikroszemcsés, adott esetben szilanizált kovasavval valamint a paraffin, viasz, mikrokristályos viasz és ezek keveréke szilanizált kovasavval vagy biszteariletiléndiamiddal. Előnyösen alkalmazhatóak a különböző habzsgátlók keverékei is, például szilikonokból,

paraffinokból vagy viaszokból. Előnyös módon a habzástgátlók, különösen a szilikon és/vagy paraffin-tartalmú habzástgátlók egy szemcsés, vízben oldódó, illetve diszpergálódó hordozóanyaghoz kötöttek. Ezeknél különösen a paraffinokból és biszteariletiléndiaminokból álló keverékek kedveltek.

A kemény felületek tisztítását szolgáló találmánynak megfelelő tisztítószeres ebből kiindulva tartalmazhatnak abrazív hatású adalékokat, különösen a kvarclisztet, fahisztet, műanyagliszteket, krétákat és mikroöveggolyókat valamint ezek keverékeit magába foglaló csoportból. Az abrazív anyagok mennyisége a találmánynak megfelelő tisztítószeresekben nem haladja meg a 20 tömegszázalékot, előnyös módon 5 - 15 tömegszázalék közé esik.

A mosó- és tisztítószeresekhez szín- és illatanyagokat adagolunk, a termék esztétikai hatásának javítására és a felhasználó számára a mosó- és tisztítóhatás mellett egy vizuálisan és szenzorosan „tipikus és összekeverhetetlen” termék rendelkezésre bocsátása érdekében. Illatolajként illetve illatanyagokként alkalmazhatunk egyes illatanyagvegyületeket, például észter, éter, aldehid, keton, alkohol és szénhidrogén típusú szintetikus termékeket. Észter típusú illatvegyületek például a benzilacetát, fenozietil-isobutirát, p-terc.-butilciklohexilacetát, linalilacetát, dimetilbenzilcarbinilacetát, feniletilacetát, linalilbenzoát, benzilformiát, etilmetilfenilglicinát, allilciklohexilpropionát, sztirallilpropionát és benzilszalicitát. Az éterekhez tartoznak például a benziletiléter, az aldehidekhez

például a 8 - 18 szénatomos lineáris alkánok, citrál, citronellal, citronelliloxiacetaldehid, ciklámenaldehid, hidroxicitronellal, lillial és bourhecnal, aketonokhoz például a jonone, α -izometilnionon és metil-cedrilekton, az alkoholokhoz anethol, cironellol, eugenol, geraniol, linalcol, feniletilalkohol és terpeniol, a szénhidrátokhoz lényegében a terpének tartoznak, mint limonen és pinen. Kedvelt módon azonban a különböző illatanyagok keverékeit alkalmazzuk, amelyek együtt egy megfelelő illathatást adnak. Az ilyen illatanyagkeverékek tartalmazhatnak természetes illatolajokat is, ahogy azok a növényi forrásokból kinyerhetőek, például pine-, citrus-, jázmin-, patchouly-, rózsa- vagy ylang-ylang-olaj. Ugyancsak alkalmasak a muskotály, zsályaolaj, kamillaolaj, szegfűolaj, citromfűolaj, mentaolaj, fahéj-levélolaj, hárvirágolaj, borókabogyóolaj, vetiverolaj, oli-banumolaj, galbanumolaj és labdanumolaj valamint narancs-virágolaj, neroliol, narancshéjolaj és szantálfaolaj. A mosó- és tisztítószeresek színyanyagtartalma 0,01 tömegszázalék alatt van, illatanyagtartalma 2 tömegszázalékot tehet ki az egész keverékben.

Az illatanyagokat közvetlenül bevihetjük a mosó- és tisztítószeresekbe, de előnyös lehet az illatanyagoknak hordozókon történő bevitele, melyek az illatanyagoknak a tisztítandó terméken való megtapadását segítik és a lassított illatfelszabadulás miatt hosszan tartó illatot biztosítanak, különösen a kezelt textíliák esetében. Ilyen hordozóanyagok például a ciklodextrinek bizonyultak, ahol a ciklodextrin-illatanyag-komplexeket még további segédanyagokkal rétegez-

hetjük. További kedvelt illatanyaghordozó a már említett zeolit X, amely tenzidek helyett vagy azokkal keverékben szintén alkalmas illatanyagok felvételére. Kedveltek ezért az olyan mosó- és tisztítószeres, melyek a leírt zeolit X-et és illatanyagokat tartalmazzák, melyek előnyös módon legalább részben a zeolitokra abszorbált állapotban vannak.

A kedvelt színezékek, melyek kiválasztása szakember számára nem jelenthet nehézséget, magas tárolási stabilitást és a szer egyéb anyagaival és fényvel szembeni ellenállást mutatnak, valamint textilszövetekkel szemben nem fejtenek ki szubsztantivitást, tehát nem színezik azt.

Mikroorganizmusok leküzdésére a mosó- vagy tisztítószeres tartalmazhatnak antimikrobiális hatóanyagokat. Ennél mindig az antimikrobiális spektrum és hatásmechanizmus szerint megkülönböztetünk bakteriosztatikumokat és baktericidumokat, fungistatikumokat és fungicideket stb. Fontos anyagok ebből a csoportból például a benzalkoniumkloridok, alkilarilszulfonátok, halogénfenolok és a fenolmercuriacetát. Az antimikrobiális hatás és antimikrobiális hatóanyag kifejezések a találmánynak megfelelő tanulság keretein belül a hagyományos szakmai jelentésnek felelnek meg, amely például K. H. Wallhauser -től a „Praxis der Sterilization, Desinfektion - Konservierung : Keimidentifizierung - Betriebshygiene“ (5. Aufl. - Stuttgart; New York : Thieme, 1995)-ban olvasható, ahol az összes leírásra kerülő anyag antimikrobiális hatással alkalmazható. Az alkalmas antimikrobiális hatóanyagokat például az alkoholok, aminok, aldehidek, antimikrobiális savak

illetve ezek sói, szénsavészterek, savamidok, fenolok, fenolszármazékok, difenilek, difenilalkánok, karbamidszármazékok, oxigén-, nitrogén-acetálok valamint formálok, benzamidinek, izotiazolinok, ftálimidszármazékok, piridinszármazékok, antimikrobiális felületaktív anyagok, guanidinek, antimikrobiális amfoter vegyületek, kinolin, 1,2-dibróm-2,4-dici-anobután, jodo-2-propil-butyl-karbamát, jód, jodofór, peroxovegyületek, halogénvegyületek valamint az előbbieket tetszés szerinti keverékének csoportjából választjuk.

Az antimikrobiális hatóanyagot ennél az etanol, n-propanol, i-propanol, 1,3-butándiol, fenoxietanol, 1,2-propilén-glikol, glicerin, undecilénsav, benzoésav, szalicilsav, dihidroecetsav, o-fenilfenol, N-metilmorfolinacetonitril (MMA), 2-benzil-4-klórfenol, 2,2'-metilén-bisz-(6-brom-4-klórfenol), 4,4'-diklór-2'-hidroxidifeniléter (Dichlosan), 2,4,4'-tri-klór-2'-hidroxidifeniléter (Trichlosan), klórhexidin, N-(4-klórfenil)-N-(3,4-diklórfenil)-karbamid, N,N'-(1,10-dekandiildi-1-piridinil-4-ilidén)-bisz-(1-oktánamin)-dihidroklorid, N,N'-bisz-(4-klórfenil)-3,12-diimino-2,4,11,13-tetra-azetradekandiimidamid, glukoprotaminok, antimikrobiális felületaktív kvaterner vegyületek, guanidinekkel bezárólag a bi- és poliguanidinek, mint például 1,6-bisz-(2-etilhexilbiguanido-hexáno-dihidroklorid, 1,6-di-(N₁,N₁'-fenildiguanido-N₅,N₅')-hexán-tetrahidroklorid, 1,6-di-(N₁,N₁'-fenil-N₁,N₁'-metildiguanido-N₅,N₅')-hexán-dihidroklorid, 1,6-di-(N₁,N₁'-o-klorofenildiguanido-N₅,N₅')-hexán-dihidroklorid, 1,6-di-(N₁,N₁'-2,6-diklorofenildiguanido-N₅,N₅')-hexán-dihidroklorid, 1,6-di-(N₁,N₁'-beta-p-metoxifenil) diguanidino-N₅,N₅'-hexán-dihidro-



klorid, 1,6-di-(N_1, N_1' -alfa-metil-béta-fenildiguanido- N_5, N_5')-
 hexán-dihidroklorid, 1,6-d-(N_1, N_1' -p-nitrofenildiguanido-
 N_5, N_5')-hexán-dihidroklorid, omega:omega-di-(N_1, N_1' -fenil-
 diguanido- N_5, N_5')-di-n-poliéter-dihidroklo-rid, omega:omega'-
 di-(N_1, N_1' -p-klorofenildiguanido- N_5, N_5')-di-n-propiléter-tetra-
 hidroklorid, 1,6-di-(N_1, N_1' -2,4-dikloro-fenildiguanido- N_5, N_5' -
 hexán-tetrahidroklorid, 1,6-di-(N_1, N_1' -p-metilfenildiguanido-
 N_5, N_5')-hexán-dihidroklorid, 1,6-di-(N_1, N_1' -2,4,5-triklorofenil-
 diguanido- N_5, N_5')-hexán-tetra-hidroklorid, 1,6-di-[N_1, N_1' -alfa-
 (p-klorofenil)-etil diguani-do- N_5, N_5']-hexán-dihidroklorid,
 omega:omega-di-(N_1, N_1' -p-klo-rofenildiguanido- N_5, N_5')-m-zilén-
 dihidroklorid, 1,12-di-(N_1, N_1' -p-klorofenildiguanido- N_5, N_5')-
 dodekán-dihidroklorid, 1,10-di-(N_1, N_1' -fenildiguanido- N_5, N_5')-
 dekán-tetrahidroklorid, 1,12-di-(N_1, N_1' -fenildiguanido- N_5, N_5')-
 dodekán-tetrahidro-klorid, 1,6-di-(N_1, N_1' -o-klorofenil-
 diguanido- N_5, N_5')-hexán-dihidroklorid, 1,6-di-(N_1, N_1' -o-
 klorofenildiguanido- N_5, N_5')-hexán-tetrahidroklorid, etilén-
 bisz-(1-tolil biguanid), eti-lén-bisz-(p-tolil-biguanid),
 etilén-bisz-(3,5-dimetilfenil-biguanid), etilén-bisz-(p-terc-
 amilfenilbiguanid), etilén-bisz-(nonilfenilbiguanid), etilén-
 bisz-(fenilbiguanid), eti-lén-bisz-(N-butilfenilbiguanid),
 etilén-bisz-(2,5-dietoxi-fenilbiguanid), etilén-bisz-(2,4-
 dimetilfenil-biguanid), etilén-bisz-(o-difenilbiguanid),
 etilén-bisz-(kevert amil-naftilbiguanid), N-butil-etilén-bisz-
 (fenilbiguanid), trime-tilén-bisz-(o-tolilbiguanid), N-butil-
 trimetil-bisz-(fenil-biguanid) és a megfelelő sók, mint
 acetát, glukonát, hidro-klorid, hidrobromid, citrát,
 biszulfid, fluorid, polimaleát, N-cocosalkilezarkozinát,
 foszfit, hipofoszfit, perfluoro-oktanoát, szilikát, szorbát,

szalicilát, maleát, tartrát, fumarát, etilénsiamintetraacetát, iminodiacetát, cinnamát, tichiocianát, arginát, piromellitát, tetrakarboxibutírat, benzoát, glutarát, monofluorcfoszfát, perfluoropropionát valamint ezek tetszőleges keverékei közül választhatjuk. Alkalmasak továbbá halogenált xilol- és krezolszármazékok, mint p-klórmetakrezol vagy p-klór-meta-xilol, valamint növényi (pld. fűszerekből vagy gyógynövényekből), állati valamint mikrobiális eredetű természetes antimikrobiális hatóanyagok. Előnyös módon alkalmazhatóak antimikrobiális hatású felületaktív kvaterner vegyületek, növényi eredetű természetes antimikrobiális hatóanyagok és/vagy állati eredetű természetes antimikrobiális hatóanyagok, minden esetre különösen kedveltek a növényi eredetű antimikrobiális hatóanyagok a koffein, teobromin és teofilin valamint éteres olajok, mint eugenol, timol és geraniol csoportjából, és/vagy legalább egy állati eredetű antimikrobiális hatóanyag az olyan enzimeket, mint tejfehérje, lizozim és laktoperoxidáz tartalmazó csoportból és/vagy legalább egy antimikrobiális hatású felületaktív kvaterner vegyület egy ammónium-, szulfónium-, foszfónium-, jodónium- vagy arzóniumcsoporttal, valamint a peroxovegyületek és klórvegyületek. Mikrobiális eredetű, úgynevezett bakteriozinok is alkalmazhatóak.

A mikrobiális hatóanyagok alkalmas kvaterner ammóniumvegyületek az $(R^1)(R^2)(R^3)(R^4)N^+X^-$ általános képletnek felelnek meg, ahol $R^1 - R^4$ egyforma vagy különböző C_1-C_{22} -alkilcsoportok, C_7-C_{28} -alkilcsoportok vagy heterociklikus csoportok, ahol két vagy egy aromás kötés, mint a piridin eseté-

ben- akár három csoport a nitrogénnel együtt képezi a heterociklust, például egy piridinium- vagy imidazolinium-vegyület, és X^- halogenidion, szulfátion, hidroxidion vagy hasonló anion. Egy optimális antimikrobiális hatás esetén előnyös módon legalább a csoportok egyike egy 8 - 18, különösen egy 12 - 16 szénatomos hosszúságot mutat.

A QAV terciér aminoknak alkilizálószerekkel, mint például metilklorid, benzilklorid, dimetilszulfát, dodecylbromid, vagy etilénoxiddal való reagáltatásával állítható elő. A terciér aminoknak egy hosszú alkil-csoporttal és két metil-csoporttal való alkilezése különösen könnyen elvégezhető, a terciér aminok két hosszú csoporttal és egy metil-csoporttal való kvaternálása is enyhe körülmények között elvégezhető metilkloriddal. Az olyan aminok, melyek három hosszú alkil-csoportot vagy hidroxi-szubsztituált alkil-csoportokat tartalmaznak, kevésbé reaktívak és ezért kedvelt módon dimetilszulfáttal kvaternálják.

Alkalmos QAV például a benzalkoniumklorid (N-alkil-N,N-dimetil-benzil-ammóniumklorid, CAS No. 8001-54-5), benzalkon B (m,p-diklórbenzil-dimetil-C₁₂-alkilammóniumklorid, CAS No. 58390-78-6), benzoxóniumklorid (benzil-dodecyl-bisz-(2-hidroxi-etyl)-ammónium-klorid), cetrimoniumbromid) N-hexadecyl-n,n-trimetil-ammóniumbromid, CAS No. 57-09-0), benzetoniumklorid (N,N-dimetil-N-[2-[2-[p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenoxy]etoxi]etyl]-benzilammóniumklorid, CAS No. 121-54-0), dialkildimetilammónium-kloridok, mint di-n-decyl-dimetil-ammóniumklorid (CAS No. 7173-51-5-5), didecyl-di-metilammó-

niumbromid (CAS No. 2390-68-3), dioktil-dimetil-ammoniumklorid, 1-cetilpiridiniumklorid (CAS No. 123-03-5) és tiazoliniodid (CAS No. 15764-48-1) valamint ezek keverékei. Különösen kedvelt QAV a C_9 - C_{18} -alkilcsoportokkal rendelkező benzalkoniumkloridok, különösen a C_{12} - C_{14} -alkil-benzil-dimetil-ammoniumklorid.

A benzalkoniumhalogenidek és/vagy szubsztituált benzalkoniumhalogenidek a kereskedelemben beszerezhetőek Barquat[®] ex Lonza, Marquat[®] ex Mason, Variquat[®] ex Witco/Sherex és Hixamine[®] ex Lonza, valamint Bardac[®] ex Lonza néven. További forgalmazott antimikrobiális hatóanyagok az N-(3-klórallil)-hexaminiumklorid mint Dovicide[®] és Dovicil[®] ex Dow, benzetoniumklorid mint Hyamine[®] 1622 ex Rohm & Haas, metilbenzetoniumklorid mint Hyamine[®] 10X ex Rohm & Haas, cetilpiridiniumklorid mint cepakolklorid ex Merrell Labs.

Az antimikrobiális hatóanyagokat 0,0001 - 1 tömegszázalék, kedvelt módon 0,001 - 0,8 tömegszázalék, különösen 0,0005 - 0,3 tömegszázalék és különösen 0,01 - 0,2 tömegszázalék mennyiségben alkalmazzuk.

A szerek tartalmazhatnak UV-abszorbenseket, melyek a kezelt textiliákat bevonják és a szövetek színtartósságát és/vagy az egyéb receptúraanyagok fényállóságát növelik. Az UV-abszorbensek alatt olyan szerves vegyületeket (fényvédő-filter) értünk, melyek képesek az ultraibolya sugárzás abszorbeálására és a felvett energia nagy hullámhosszú sugárzás, például hő formájában való leadására.

Ilyen kívánt tulajdonságokat felmutató vegyületek például a sugárzás nélküli dezaktiválással hatásos vegyületek és a benzofenon származékai a 2-es és/vagy 4-es pozícióban található szubsztituensekkel. Alkalmask továbbá a szubsztituált benzotriazolok, a 3-as pozícióban fenilszubsztituált akrilátok (fahéjsavszármazékok, adott esetben cianocsoportokkal a 2-es pozícióban), szalicilátok, szerves Ni-komplexek valamint természetes anyagok, mint umbelliferon és az urokánsav. Különleges jelentőségűek a bifenil- és mindenek előtt sztilbényszármazékok, mint azt az EP 0728749 A szabadalomban is olvashatjuk, melyek a kereskedelemben Tinosorb® FD vagy Tinosorb® FR ex Ciba néven szerezhetőek be. UV-B-abszorbensként megemlítendőek: 3-benzilidénkampher illetve 3-benzilidénmorchamper és ezek származékai, például 3-(4-metilbenzilidén)champer, mint az az EP 0693471 B1 -ben leírásra került; 4-aminobenzoésavszármazékok, különösen 4-(dimetilamino)benzoésav-2-etilhexilészter, 4-(dimetilamino)benzoésav-2-oktilészter és 4-(dimetilamino)benzoésavamilészter; a citromsav észtere, különösen 4-metoxifahéjsav-2-etilhexilészter, 4-metoxifahéjsavpropilészter, 4-metoxifahéjsavizoamilészter, 2-ciano-3,3-fenilfahéjsav-2-etilhexilészter (Octocrylene); a szalicilsav észterei, különösen szalicilsav-2-etilhexilészter, szalicilsav-4-izopropilbenzilészter, szalicilsavhomomentilészter; a benzofenon származékai, különösen 2-hidroxi-4-metoxibenzofenon, 2-hidroxi-4-metoxi-4'-metilbenzofenon, 2,2'-dihidroxi-4-metoxibenzofenon; a benzalmalonsav észterei, különösen 4-metoxibenzmalonsavdi-2-etilhexilészter; triazinszármazékok, mint például 2,4,6-trianilino-(p-karbo-2'-etil-1'-hexiloxi)-1,3,5-

triazin és oktiltriazon, mint az az EP 0318450 -ban leírásra került vagy dioktil butamino triazon (Uvasorb® HEB); propán-1,3-dion, mint például 1-(4-terc.butilfenil)-3-(4'-metoxifenil)-propán-1,3-dion; ketotriciklo(5.2.1.0)-dekán-származékok, mint az az EP 0694521 B1 -ben leírásra került. Alkalmask továbbá a 2-fenilbenzilimidazol-5-szul-fonsav és annak alkáli-, földalkáli-, ammónium-, alkil-ammónium-, alkanolammónium- és glukammóniumsói; benzofenonok szulfonsavszármazékai, különösen 2-hidroxi-4-metoxibenzo-fenon-5-szulfonsav és ezek sói; a 3-benzilidénchamper szul-fonsavszármazékai, mint például 4-(2-oxo-3-bornilidénmetil)-benzol-szulfonsav és 2-metil-5-(2-oxo-3-bornilidén)-szulfon-sav és ezek sói.

Tipikus UV-A-szűrőként különösen a benzoilmetán származékai jönnek szóba, mint például 1-(4'-terc.butilfenil)-3-(4'-metoxifenil)-propán-1,3-dion, 4-terc.-butil-4'-metoxidiben-zoilmetán (Parsol 1789), 1-fenil-3-(4'-izopropilfenil)-pro-pán-1,3-dion valamint enaminyegyületek, mint a DE 19712033 A1 (BASF) -ban leírtak. Az UV-A és UV-B-szűrőket természetesen keverékekben is alkalmazhatjuk. Az eddig említett víz-oldható anyagok mellett szóba jöhetnek oldhatatlan fény-védőpigmentek is, például finomszemcsés, különösen nanoizált fémozidok illetve sók. Példák az alkalmas fémozidokra különösen a zinkoxid és titánoxid és emellett az acél, cirkónium, szilícium, mangán, alumínium és cérium oxidjai valamint ezek keverékei. Sóként alkalmazhatóak szilikátok (zsírkő), bárium-szulfát vagy cinksztearát. Az oxidokat és sókat pigmentek formájában bőrápoló és bőrvédő emulziókban és

dekoratív kozmetikumokban már alkalmazzák. A szemcsék átmérőjének középvértéke itt 100 nm -nél kisebb kell, hogy legyen, különösen 5 - 50 nm között és különösen 15 - 30 nm között. Lehetnek gömb alakúak, de olyan szemcsék is alkalmazhatóak, melyek ellipszoid, vagy más a gömbalaktól eltérő formával rendelkeznek. A pigmentek lehetnek felületkezelték is, ami hidrofilizálást vagy hidrofóbizálást jelent. Tipikus példák erre a köpeny nélküli titánoxidok, mint például a titán-dioxid T 805 (Degussa) vagy Eusolex® T2000 (Merck); hidrofób köpenyszernek a szilikonok és különösen a tri-alkoxioktilszilánok vagy a Simethicone jöhetnek szóba. Kedvelt módon mikronizált cinkoxidot alkalmazunk. További alkalmas UV-fényvédőszűrőket olvashatunk P. Finkel-től az SÖFW-Journal 122 (1996), S. 543 -ban.

Az UV-abszorbenseket 0,0- - 5 tömegszázalékok, különösen 0,03 - 1 tömegszázalékos mennyiségben alkalmazzuk.

A mosó- és tisztítószerekben általános adalékanyagokhoz számítjuk a mosó-, illetve tisztítóhatású enzimeket is. A találmánynak megfelelő proteinen kívül további enzimeket is felmutató mosó- és tisztítószer az alábbi találmány kedvelt kivitelezési formáit képezik. Ide tartoznak más proteázok, továbbá oxidoreduktázok, kutinázok, észterázok és/vagy hemi-cellulázok, és különösen lipázok, amilázok, cellulázok és/vagy β -glukanázok.

Az olyan enzimeket, mint a proteázok, amilázok, lipázok vagy cellulázok, évtizedek óta alkalmazzák mosó-, illetve tisztítószerekben.

tisztítószer-aktív komponenseiként. Az érintett szer tisztítóhatásához való mindenkori hozzájárulás a proteázok esetében a proteintartalmú szennyeződések lebontásának képességében, az amilázok esetében a keményítőtartalmú szennyeződések lebontásában és a lipázok esetében a zsírbontó aktivitásban rejlik. A cellulázokat szennyeződésetávolító hatásuk, azaz primer mosó-, illetve tisztítóhatásuk miatt, különösen egy mosószer másodlagos mosóteljesítményéhez való hozzájárulásuk és a textiliákra kifejtett szálhatásuk miatt alkalmazzák kedvelt módon mosószerekben. A mindenkori hidrolízis-termékeket a többi mosó- vagy tisztítószer-alkotóelem megtámadja, feloldja, emulgeálja vagy szuszpendálja, vagy magasabb oldhatóságuk segítségével, a mosóoldattal kiöblíti, így az enzimek és a többi alkotóelem között szinergista-hatás tapasztalható.

Egy szer szekunder mosóteljesítményéhez celluláz által kifejtett hozzájáruláshoz hasonló hatást fejthetnek ki proteázok természetes szövetekre, különösen gyapjúra és selyemre. Ilyen szövetek felszíni struktúráira kifejtett hatásuknak köszönhetően az anyagra kisimító hatást gyakorolnak, és ezzel gátolják a filcesedést.

További enzimek növelik a megfelelő szer tisztítóhatását specifikus enzimikus teljesítményük segítségével. Ide tartoznak például a β -glukanázok (WO 99/06515 és WO 99/06516), lakkázok (WO 00/39306) vagy pektin-oldó enzimek (WO 00/42145), melyek különösen a speciális tisztítószerekben kerülnek alkalmazásra.



A találmánynak megfelelő szerekben történő alkalmazásnál első sorban mikroorganizmusokból, mint baktériumok vagy gombák, kinyert enzimek jönnek számításba. Ezeket ismert módon fermentációs eljárásokkal nyerjük ki a megfelelő mikroorganizmusokból, melyek például a DE 1940488 és DE 2121397 német, az US 3623957 és US 4264738 US-amerikai, az EP 006638 európai valamint a WO 91/02792 nemzetközi szabadalmakban kerültek leírásra.

A találmánynak megfelelő proteineket és/vagy más tartalmazott proteineket különösen a tárolás során stabilizátorokkal védhetjük például fizikális behatások, oxidáció vagy proteolitikus hasítás miatt bekövetkező denaturációtól, széteséstől vagy inaktiválódástól.

A stabilizátorok egy csoportja reverzibilis proteázinhibitor, amely a szer hígításakor a mosóoldatba disszociál. A benzamidin-hidroklorid és leupeptin alkalmas ezekre a célokra. Gyakran kerül alkalmazásra a borax, bórsav, boronsavak vagy ezek sói vagy észterei, ezek közül főleg aromás gyűrűvel rendelkező származékok, például a WO 95/12655 szerint orto-szubsztituált, a WO 92/19707 szerint meta-szubsztituált és az US 5 972 873 szerint para-szubsztituált fenilboronsavak, illetve ezek sói vagy észterei. A WO 98/13460 és EP 583 534 szabadalmakban peptidaldehidek kerültek leírásra, azaz redukált C-terminusú oligopeptidek, melyek 2 - 50 monomerből állnak, mosó- és tisztítószer-proteázok reverzibilis gátlására. A peptidikus reverzibilis proteázinhibitorokhoz tartozik többek között az Ovomucoid (WO 93/00418). A WO

00/01826 szabadalomban a szubtilizin proteáz specifikus, reverzibilis peptid-inhibitorai kerültek leírásra proteáz-tartalmú szerekben való alkalmazásra, és a WO 00/01831 szabadalomban a megfelelő fúziós proteinek a proteázból és az inhibitorból.

További enzimstabilizátorok a monoalkoholok, mint mono-, di-, trietanol- és propanolamin és ezek keverékei, alifás karbonsavak C₁₂ lánchosszúságig, mint például azt az EP 0378 261 és WO 97/05227 szabadalmakból ismerjük, mint borostyánkősav, más dikarbonsavak vagy a nevezett savak sói. A DE 196 50 537 szabadalomban e célból zárt láncvégű zsírsavamidalkozilátok kerültek leírásra. Bizonyos builder-ként alkalmazott szerves savak, ahogy azt a WO 97/18287-ben olvashatjuk, képesek továbbá egy enzim stabilizálására.

A kismolekulájú alifás alkoholok, mindenek előtt a poliolok, mint glicerín, etilén-glikol, propilén-glikol vagy szorbit, további gyakran alkalmazott enzimstabilizátorok. Ugyancsak alkalmazunk kalciumsókat, mint például kalciumacetát vagy az EP 0 028 865 szabadalomban leírt kalcium-fómiát, és magnéziumsók, az EP 0 378 262 európai szabadalom alapján.

A poliamid-oligomerek (WO 99/43780) vagy polimer vegyületek, mint lignin (WO 97/00932), vízoldható vinil-kopolimerek (EP 828 762) vagy, mint az EP 702 712 -ben leírásra került, cellulóz-éter, akril-polimerek és/vagy poliamidok stabilizálják az enzimpreparációt többek között fizikális behatások vagy pH-érték-ingadozások ellen. A poliamin-N-oxid-



tartalmú polimerek (EP 587 550 és EP 581 751) egyidejűleg hatnak enzimstabilizátorként és színátviteli inhibitorokként. Más polimer stabilizátorok a WO 97/05227-ben többek között leírt lineáris C_8 - C_{18} polioxialkilének. Az alkilpoliglükoszidok, mint az a WO 97/43377 és WO 98/45396 szabadalmakban olvasható, képesek a találmánynak megfelelő szer stabilizálására és ezzel egyidejűleg annak teljesítményének növelésére. A térhálósított N-tartalmú vegyületek, mint az a WO 98/17764 -ban olvasható, kettős funkciót látnak el, mint Soil-release-ágensek és enzim-stabilizátorok. A hidrofób, nem ionos polimerek más stabilizátorokkal keverékben a WO 97/32958 szerint stabilizálólag hat egy cellulázra, így az ilyen vagy hasonló alkotóelemek a találmánynak megfelelő enzimek számára is alkalmasak lehetnek.

A redukálószeres és antioxidánsok megnövelik, mint azt az EP 780 466 -ban olvashatjuk, az enzimek stabilitását az oxidatív széteséssel szemben. Kéntartalmú redukálószeres ismertek például az EP 0 080 748 és EP 0 080 223 szabadalmakból. További példák a nátrium-szulfid (EP 533 239) és a redukáló cukrok (EP 656 058).

Sokszor alkalmazzuk a stabilizátorok kombinációit is, mint például poliolok, bórsav és/vagy borax keverékét a WO 96/31589 szabadalomban, bórsav vagy borát, redukáló sók és borostyánkősav vagy más dikarbonsavak keverékét az EP 126 505 szabadalomban, vagy bórsav, vagy borát poliolokkal vagy poliaminvegyületekkel és redukáló sókkal vett keverékét az EP 080 223 szabadalomban. A peptid-aldehid-stabilizátorok hatását

a WO 98/13462 szerint bórsavval és/vagy bórsavderivátumokkal és poliolokkal növeljük és a WO 98/13459 alapján kalcium-ionok további alkalmazásával tovább erősítjük.

A stabilizált enzimaktivitású szerek az alábbi találmány kedvelt kivitelezési formáját képezik. Különösen kedveltek az olyan enzimek, melyek az ismertetett módszerek többjével is stabilizáltak.

Mivel a találmánynak megfelelő szerek mindenféle formában alkalmazhatóak, a találmánynak megfelelő szerek, illetve enzimek mindenféle célszerű adagolási formái a mindenkori szerhez az alábbi találmány tárgyát képezik. Ide tartoznak például a folyékony, szilárd szemcsés vagy kapszulás kiszérelésű szerek.

A kapszulás kialakítás alkalmas az enzimeknek vagy más anyagoknak más adalékoktól, mint például fehérítőktől való megvédésére vagy kontrollált felszabadulás (controlled release) megvalósítására. Ezeknek a kapszuláknak a nagysága szerint megkülönböztetünk milli-, mikro- és nanokapszulákat, ahol a mikrokapszulák különösen alkalmasak enzimek számára. Ilyen kapszulák kerülnek például a WO 97/24177 és DE 199 18 267 szabadalmakban leírásra. Egy lehetséges kapszulázási eljárás lényege, hogy a proteinek, egy proteinoldatból és keményítőből vagy keményítőszármazékból készített oldatból vagy szuszpenzióból kiindulva, egy kapszulába zárjuk. Egy ilyen kapszulázási eljárás kerül leírásra a DE 199 56 382

szabadalomban „Eljárás mikrokapszulás enzimek előállítására” címmel.

Szilárd szerek esetén a proteineket például szárított, granulált és/vagy kapszulázott formában alkalmazhatjuk. Adagolhatjuk külön, azaz egyedi fázisként, vagy más adalékokkal együtt ugyanabban a fázisban kompaktálással vagy kompaktálás nélkül. Amennyiben a mikrokapszulás enzimeket szilárd formában kell feldolgoznunk, a víz a technika által ismert módszerrel a feldolgozásból adódó vizes oldatból eltávolítható, például porlasztásos szárítással, centrifugálással vagy szolubizálással. Az így kapott részecskék mérete egyébként 50 és 200 μm között van.

A folyékony, gél állapotú vagy pasztózus találmánynak megfelelő szerekhez az enzimeket valamint a találmánynak megfelelő proteint, egy a technika által ismert proteinkinyerés és preparáció alapján, adagolhatjuk koncentrált vizes vagy nem vizes oldat, szuszpenzió vagy emulzió formájában, vagy akár gél formában vagy kapszulákban, vagy szárított porként. Az ilyen jellegű találmánynak megfelelő mosó- vagy tisztítószereket általában az adalékanyagok egyszerű keverésével állítjuk elő, melyek szubsztanciaként vagy oldatként automatakeverőbe adagolhatóak.

Primer mosóteljesítményük mellett a mosószerben található proteázok azt a funkciót is elláthatják továbbá, hogy más enzimátikus alkotóelemeket proteolitikus hasítással aktíváljanak vagy megfelelő hatásidő után inaktíváljanak, mint azt

például a WO 94/29426 vagy EP 747 471 szabadalmakban olvashatjuk. Hasonló regulátor-funkciók a találmánynak megfelelő enzimek fölött is elképzelhetőek. Az alábbi találmány egy kivitelezési formáját képezik olyan proteázszenzitív anyagból felépített kapszulájú szerek, melyeket például a találmánynak megfelelő proteinek egy megfelelő időpontban hidrolizálnak és így azok tartalmát felszabadítják. Egy hasonló hatás érhető el többfázisú szereknél is.

A találmány egy tárgyát képezik olyan textilnyersanyagok kezelését vagy textilápolást szolgáló szerek, melyek azzal jellemezhetőek, hogy egyedül vagy más adalékanyagokkal együtt egy a találmánynak megfelelő proteolitikus enzimet tartalmaznak. Mivel különösen a természetes szövetek, mint például a gyapjú vagy selyem, egy karakterisztikus, mikrozkópius felszíni struktúrával jellemezhetőek. Ez, mint az a gyapjú példáján R. Beier cikkében a Melland Tex-tilberichte 1.4.2000 (263. Oldal) olvasható, hosszú távon nem kívánt következményekkel, mint például filcesedéssel járhat. Az ilyen hatások elkerülése érdekében a természetes nyersanyagokat a találmánynak megfelelő szerekkel kezeljük, melyek hozzájárulnak például, a proteinstruktúrán alapuló pikkelyesedő felszíni struktúrák kisímitésához, és ezzel gátolják a filcesedést. Egy különösen kedvelt kivitelezési formát képeznek a természetes alapú, különösen gyapjú vagy selyem szövetek vagy textíliák kezelését szolgáló szerek.

Az alábbi találmány egy kivitelezési formájában a szert egy a találmánynak megfelelő proteázzal úgy dolgozták ki, hogy az

rendszeresen alkalmazható ápolószerként, például a mosó-eljárás során, a mosás után vagy a mosástól függetlenül alkalmazható. A kívánt hatás abban rejlik, hogy a textilra sima felszíni-struktúráját kapjuk és/vagy a szövet károsodásait megelőzzük és/vagy csökkentjük.

A találmány egy sajátos tárgyát képezik textíliák vagy kemény felületek gépi tisztítását szolgáló eljárások, melyek azzal jellemezhetőek, hogy az eljárás lépéseinek legalább egyike során egy a találmánynak megfelelő proteolitikus enzim aktiválódik.

A textíliák gépi tisztítását szolgáló eljárások általában azzal jellemezhetőek, hogy a különböző eljárási lépések során a tisztítandó anyagra különböző tisztító hatású anyagokat viszünk föl, majd a hatásidő után, mosunk le vagy, hogy a tisztítandó anyagot egy tisztítószerrel vagy a szer egy oldatával kezeljük. Ugyanez érvényes minden nem textília anyagú tárgy gépi mosására, melyeket a kemény felületű anyagok névvel foglaltuk össze. Az ilyen jellegű eljárások legalább egy lépése bővíthető a találmánynak megfelelő proteinnel, és azok így a találmány kivitelezési formáját képezik.

Kedveltek az olyan eljárások, melyek során a találmánynak megfelelő enzimet egy 40 µg - 4 g és különösen 50 µg - 3 g, 100 µg - 2 g, 200 µg - 1 g és különösen kedvelt módon 400 µg - 400mg / alkalmazás mennyiségben használjuk.

Mivel a találmánynak megfelelő enzim természetes módon birtokában van egy proteínoldó aktivitásnak és azt olyan oldatokban is képes kifejteni, melyek egyébként nem rendelkeznek tisztító hatással, mint például egy egyszerű pufferben, egy textiliák gépi tisztítását szolgáló eljárás egyetlen részlépése állhat abból, hogy szükség esetén stabilizáló vegyületekkel, sókkal vagy pufferanyagokkal együtt egyetlen tisztító hatású komponensként a találmánynak megfelelő enzimet alkalmazzuk. Ez a találmány egy különösen kedvelt kivitelezési formáját képezi.

A találmány egy sajátos tárgyát képezik az olyan textilnyersanyagok kezelését vagy textilápolást szolgáló eljárások, melyek azzal jellemezhetőek, hogy az eljárás lépéseinek legalább egyikében egy a találmánynak megfelelő proteolitikus enzim aktiválódik. Lehet szó olyan eljárásokról, melyekben a textiliákban feldolgozásra kerülő anyagokat alkalmazzuk, esetleg filcesedés elleni védelemként, vagy például olyan eljárásokról, melyek a textiliák tisztítását ápoló komponensekkel gazdagítják. A proteázoknak bizonyos szövetekre kifejtett fent leírt hatása miatt a kedvelt kivitelezési formák esetén természetes alapú, különösen gyapjú vagy selyem textilnyersanyagokról vagy textiliákról beszélünk.

A találmány egy sajátos tárgyát képezik a találmánynak megfelelő proteolitikus enzim textiliák vagy kemény felületek tisztítására való alkalmazásai. Mivel a találmánynak megfelelő enzimek, különösen a fent leírt eljárásnak megfelelően alkalmazhatóak textiliák vagy kemény felületek prote-

intartalmú szennyeződéseinek eltávolítására. A találmány kedvelt kivitelezési formájáról beszélünk a gépi eljáráson kívül, például kézi mosás vagy a foltok textiliákról és kemény felületekről való manuális eltávolítása esetén.

A találmánynak megfelelő enzim alkalmazásonkénti kedvelt mennyisége 40 µg - 4g, különösen 50 µg - 3 g, 100 µg - 2 g, 200 µg - 1 g és különösen kedvelt módon 400 µg - 400 mg /alkalmazás.

A találmány egy sajátos tárgyát képezik a találmánynak megfelelő proteolitikus enzimeknek a mosó- vagy tisztítószeres adalékanyagainak aktiválására vagy deaktiválására való alkalmazása. Mivel, mint ismert, a mosó- vagy tisztítószeres protein-alkotórészei egy proteáz behatásával inaktiválhatóak. Ennek az egyébként nem kívánatos jelenségnek a célzott alkalmazása az alábbi találmány egy tárgyát képezi. Ugyancsak lehetséges, hogy a proteolízis segítségével egy másik komponenst aktiváljunk, például, ha az egy hibrid-protein a tulajdonképpeni enzimből és az ehhez illő inhibitorból, mint azt a WO 00/01831 szabadalomban olvashatjuk. Az ilyen jellegű reguláció egy másik példája, mikor egy aktiv komponenst annak védelmére, vagy aktivitásának kontrollálására egy olyan anyagú kapszulába zárunk, amit a proteolízis megtámad. A találmánynak megfelelő proteineket így alkalmazhatjuk inaktiváló-, aktiváló- vagy felszabadító-reakciókhoz.

A találmány egy sajátos tárgyát képezik a találmánynak megfelelő proteolitikus enzim biokémiai vagy molekuláris

biológiai analízisre való alkalmazásai, különösen egy enzimatisz analitikus eljárás keretein belül. A találmánynak megfelelően és Römpf, „Lexikon Chemie“ után (Version 2.0, Stuttgart/ New York: Georg Thieme Verlag 1999) enzimatisz analízisnek tekintünk minden olyan biokémiai analízist, amely specifikus enzimeket vagy szubsztrátokat igényel, egyrészt szubsztrátok identitásának és koncentrációjának, másrészt enzimek identitásának és koncentrációjának meghatározására. Alkalmazási területei közé tartozik az összes biokémiával rokon munkaterület. A találmány ezen formájának egy kedvelt kivitelezési formáját képezik egy szekvenciaanalízis keretein belül történő végcsoport-meghatározási eljárások.

A találmány egy sajátos tárgyát képezik a találmánynak megfelelő proteolitikus enzimeknek természetes szövetek vagy biológiai nyersanyagok preparációjára, tisztítására vagy szintézisére. Természetes szövetek vagy nyersanyagok tisztítása folyamán szükségszerű lehet például azoknak proteintartalmú szennyeződésektől való megtisztítása. Ennél lehet szó, például kismolekulájú vegyületekről, mindenféle sejttartalmi- vagy tartalékanyagokról vagy proteinekről. Ez mind laboratóriumi körülmények között, mind ipari dimenziókban, például nyersanyagok biotechnológiai előállítása során kivitelezhető.

A találmánynak megfelelő proteolitikus enzim proteinek vagy más kismolekulájú kémiai vegyületek előállítására való alkalmazása az általuk természetes óton katalizált reakciók megfordításával történik, például akkor, mikor protein-

fragmenseket kapcsolunk egymáshoz vagy mikor egy nagyrészt nem proteínből álló vegyületre aminosavat kötünk. Ilyen jellegű alkalmazási lehetőségeket találunk például az EP 380362 szabadalomban.

A találmány egy sajátos tárgyát képezi egy a találmánynak megfelelő proteolitikus enzim természetes nyersanyagok kezelésére való alkalmazása, ha azt protein-szennyeződésektől kell megszabadítanunk. Ez alatt elsősorban mikrobiológiailag nem előállítható nyersanyagokat értünk, például mezőgazdasági nyersanyagokat.

A találmány egy kedvelt tárgyát képezik a felületi kezelésekre való alkalmazás és különösen a gazdaságilag jelentős nyersanyag, a bőr kezelésének eljárása. Így a cserzési eljárás során, különösen az alkalikus puhítás (Römpp, „Lexikon Chemie“, Version 2.0, Stuttgart/ New York: Georg Thieme Verlag, 1999) lépésében a vízoldható proteineket proteolitikus enzimek segítségével távolítjuk el az anyagból. Erre alkalmasak, különösen alkalikus körülmények között és denaturáló ágensek jelenlétében, a találmánynak megfelelő enzimek.

A találmány egy sajátos tárgyát képezik a találmánynak megfelelő proteolitikus enzimnek nyersanyagok vagy köztitermékek kinyerésére vagy kezelésére való alkalmazásai a textilelőállítás során. Egy példa erre a pamut feldolgozása, amelyet egy írezésnek nevezett eljárás során meg kell szabadítanunk a tokmaradványoktól; egy további példa a gyapjú ke-

zelése; hasonlóan végezzük a nyersselyem feldolgozását is. Az enzimatis éjárások a hasonló kémiai éjárásokkal szemben előnyben vannak, különösen környezetkímélő tulajdonságaikban.

A találmány egy kedvelt kivitelezési formájában a találmánynak megfelelő proteineket textiliák, különösen köztitermékek vagy nyersanyagok védőrétegeinek eltávolítására alkalmazzuk vagy azok felületének simítására, mielőtt azok egy következő feldolgozási lépésben feldolgozásra kerülnének.

A találmány egy sajátos tárgyában a találmánynak megfelelő proteineket textilnyersanyagok kezelésére vagy textilápolásra alkalmazzuk, különösen gyapjú vagy selyem, vagy gyapjú- vagy selyemtartalmú keveréktextiliák felületi kezelésére. Ez igaz mind az ilyen textiliák előállítására, mind a használat közötti ápolásra, például a textiltisztítással összefüggésben (lásd fent).

A találmány egy sajátos tárgyát képezik a találmánynak megfelelő proteolitikus enzimeknek fotográfias filmek kezelésére való felhasználása, különösen géttartalmú vagy hasonló védőrétegek eltávolítására. Mivel a filmeket, mint például röntgenfilmeket ilyen védőrétegekkel, különösen ezüstó-tartalmú zselatin-emulziókkal vonják be, melyeket az expozíció után a hordozóanyagról le kell oldani. Ehhez alkalmazhatjuk különösen alkalikus és enyhén denaturáló körülmények között a találmánynak megfelelő proteázokat.

A találmány egy sajátos tárgyát képezik a találmánynak megfelelő proteolitikus enzim élelmiszerek és takarmányok előállítására való alkalmazásai. A proteázokat már régóta alkalmazzák élelisszerelőállításra. Egy példa erre az oltóanyag alkalmazása sajt vagy más tejtermékek tisztítására. Az ilyen eljárásokat végezhetjük a találmánynak megfelelő protein hozzáadásával vagy kizárólag a találmánynak megfelelő proteinnel. A szénhidrátban gazdag élelmiszerek vagy élelmiszernyersanyagok nem-táplálkozási célokra, mint például liszt vagy dextrin, a megfelelő proteázzal szintén kezelhetőek, hogy azokat a kísérő proteinektől megszabadítsuk. Az ilyen alkalmazásokra a találmánynak megfelelő proteázok szintén alkalmasak, különösen akkor, ha azt alkalikus vagy enyhén denaturáló közegben végezzük.

Ugyanez igaz a takarmányelőállításra is. Itt a proteinektől való teljes megszabadítás mellett cél lehet még, a proteintartalmú nyersanyagok vagy anyagkeverékek rövid időtartamú proteinekkel végzett kezelése, hogy azt a háziállatok könnyebben megemészthessék.

A találmány egy sajátos tárgyát képezik a találmánynak megfelelő proteolitikus enzimet tartalmazó kozmetikai szerek vagy a találmánynak megfelelő proteolitikus enzim bevonásával végzett eljárások vagy a találmánynak megfelelő proteolitikus enzim kozmetikai célokra való felhasználása, különösen a megfelelő eljárások keretein belül vagy a megfelelő szerekben.

Mivel a proteázok az emberi bőr sejtmegújulási menetében (Desquamation) is döntő szerepet játszanak (T. Egelrud et al., Acta Derm. Venerol., Band 71 (1991), S. 471 - 474). Ennek megfelelően a proteázokat bőrápolószerek bioaktív komponenseiként is alkalmazzuk, a száraz bőrben felszaporodó dezmoszómastruktúrák támogatására, például a WO 95/07688 vagy WO 99/18219 szabadalmak alapján. A szubtilizin-proteázok, különösen a már leírt B. lentus-alkalikus proteáz-variáns kozmetikai célokra való alkalmazása például a WO 97/07770 szabadalomban került leírásra. A találmánynak megfelelő proteázok, különösen az olyanok, melyek a mutagenézis után vagy megfelelő, azokkal kölcsönhatásba lépő anyagokkal kontrollálható aktivitásúak, alkalmasak bőr- vagy haj-tisztító- vagy ápolószerek aktív komponenseinek. Különösen kedveltek ezeknek az enzimeknek olyan preparációi, melyek, mint fent írtuk, például makromolekuláris hordozóra való kapcsolódással (v.ö. US 5230891) stabilizáltak és/vagy az allergén pozíciókban pontmutációval derivatizáltak, hogy az emberek számára egy magasabb tolerálhatóságot biztosítsanak.

Ennek megfelelően az ilyen proteolitikus enzimeknek kozmetikai célokra való alkalmazása szintén a találmány tárgyát képezi, különösen a megfelelő szerekben, mint például samponok, szappanok vagy tusfürdők, vagy ápolószerekben, melyek például krémek formájában kínálhatóak. Egy hámlást okozó gyógykészítményben való alkalmazás is a találmány tárgyát képezi.

Példák

1. példa

A találmánynak megfelelő proteáz előállítás

Az összes molekuláris biológiai munkalépés standard módszereket követ, melyeket például a Fritsch, Sambrook és Maniatis „Molecular cloning: a laboratory manual” kézikönyvben, Cold Spring Harbour Pres, New York, 1989, vagy a WO 92/21760 nemzetközi szabadalomban olvasható.

A mutagenезisfaktor konstrukciója

A mutagenезist a *B. lentus*-alkalikus proteáz M131 proteázvariánsból kiindulva végeztük. Ez a variáns a WO 92/21760 -ban került leírásra, és az ezt termelő, e szabadalomnak megfelelő törzs *Bacillus licheniformis* ATCC 68614 megnevezéssel az American Type Culture Collection-ban, Rockville, MD, USA, került elhelyezésre. Ebben a törzsben a *Bacillus* -ban replikálódó pCB56M131 plazmidban a gén egy ex-pressziós kazettában található, amely egy promoterből, egy riboszómakötőhelyből valamint az ATG-start-kodonból és a *Bacillus licheniformis* ATCC 53926-ból származó alkalikus proteáz 22 aminoterminális aminosavából áll, amely fuzionált a pre-pro-proteinnel és a *Bacillus lentus* DSM 5483-alkalikus proteáz mutálódott szekvenciájával. A *B. lentus*-alkalikus proteáz M131 variáns a natív szekvenciával összehasonlítva a következő mutációkat tartalmazza: S3T, V4I, A188P, V193M, V199I.

A mutagenézishez a Bam HI és Sac I restrikciós enzimek közötti egész expressziós kazettát kivágtuk és az ugyancsak Bam HI és Sac I metszett pUC18 vektorral (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) klónoztuk. Az így kapott pUC18M131 vektorral a következő mutációs lépéseket végeztük. A pUC18M131 vektort a 2. ábrán ábrázoltuk. A B. lentus-alkalikus proteáz M131 expressziós kazettáját tartalmazó DNS-fragmentet az SEQ ID NO.1 -ben dokumentáltuk; az SEQ ID NO.2 az ebből levezetett aminosavszekvenciát mutatja. Az SEQ ID NO.1 -ben mutatott Bam HI - Sac I-fragmens a 2. ábrán mutatott pUC18M131 vektorban az 1 - 1771 pozíciókban fekszik; a maradvék vektorterületek a kiindulási pUC18 plazmid szakaszaival megegyezők.

Mutagenézis

Először is a Bacillus lentus DSM 5483 -ből származó alkalikus proteázok 188 és 193 pozíciók közötti eredeti szekvenciáit állítottuk helyre. Ehhez a Stratagene cég (La Jolla, CA, USA) QuikChange[®]-eljárását alkalmaztuk az előállító útmutatásai alapján. Ezzel a rendszerrel mindig két komplementer, mutációt tartalmazó primer alkalmazásával egy mutált plazmidot hoztunk létre egy polimerizációs reakcióval. A kiindulási plazmid DpnI-el való emésztése után a reakció-keveréket E. coli XL-1 blue-ba transzformáltuk. A kapott klónokat adott esetben könnyen felismerhetjük egy a mutáció által beiktatott restrikciós-vágási hely segítségével, minden esetre az ellenőrzés egy lánctöréses módszer után egy hagyományos kit segítségével, DNS-szekvenálással elvégezhető.

A 188-as pozícióban található aminosavat kódoló CCA (prolin) triplet GCC -vé (alanin) való átalakításához a két 5'-TCA CAG TAT GGC GCC GGG CTT GAC ATT-3' valamint 5'-AAT GTC AAG CCC GGC GCC ATA CTG TGA-3' primerket alkalmaztuk. Ezek a mutáció mellett közvetlenül tartalmazznak egy az aminosav-szekvenciát meg nem változtató Nar I-restríktíós vágási helyet.

A 193-as pozícióban található aminosavat kódoló ATG (metionin) triplet ATT -vé (izoleucin) való átalakításához a két 5'-GGG CTT GAC ATT GTG GCA CCC GGG GTA AAC-3' valamint 5'-GTT TAC CCC GGG TGC CAC AAT GTC AAG CCC-3' primerket alkalmaztuk. Ezek a mutáció mellett közvetlenül tartalmazznak egy az aminosavszekvenciát meg nem változtató Xma CI-res-tríktíós helyet.

Egy a duplán mutált plazmidot tartalmazó klón szolgáltatotta a mintát a 211-es pozíciójú TTA (leucin) triplet GGA (glicin) mutációjához. Ehhez a következő két komplementer primert alkalmaztuk: 5'-ACG TAT GCT AGC GGA AAC GGT ACA TCG-3' valamint 5'-CGA TGT ACC GTT TCC GCT AGC ATA CGT-3'. Ezek közvetlenül a mutációs hely mellett egy az aminosav-szekvenciát meg nem változtató Nhe I-restríktíós helyet tartalmazznak. A kapott, a várt fragmensek Nhe I-vel kapott klónjait DNS-szekvenálással ellenőriztük.

A mutáns BLAP-S3T, V4I, V199I, L211G egész proteáz kódozó génjének egész DNS-szekvenciáját a szekvenciaprotokoll SEQ ID NO.3 alatt találjuk. Ebből levezethető a szekvenciaprotokollban az SEQ ID NO.4 alatt megadott aminosavszekvencia.

Ezt a *B. lentus*-alkalikus proteáz-variánst a *B. lentus* DSM 5483-ből származó vad típusú enzimtől különböző pozíciói miatt *B. lentus*-alkalikus proteáz S3T/V4I/V199I/L211G-nek nevezzük.

A mutánsok expressziója és proteázpreparáció

A mutáns szekvenciával rendelkező expressziós kazettát *Bam* HI-*Sac* I-fragmentsként visezaklónoztuk a pCE56M131 vektornak az SEQ ID NO.1 -ben mutatott fragmensébe és a *Bacillus subtilis* DE 104 -be transzformáltuk. A *Bacillus subtilis* DE 104 törzs a *his*, *nprR2*, *nprE18*, *sprA3* genotípust mutatja (Kawa-mura, F. és Doi, R. H. (1984), *J. Bacteriol.*, kötet 160, 442 - 444 oldal). A *Bacillus* -ban a DNS transzformációja az eredetileg Chang és Cohen által kifejlesztett protoplaszt-módszernek (1979; *Molec. Gen. Genet.*, kötet 168, 111 - 115 oldal) a WO 91/02792 -ben leírt variánsa alapján történt.

Az így kapott proteáz-positív klónokat az ellenőrzés után 500 ml MLBSP-közegben (10 g/l Casiton; 20 g/l Trypton, 10 g/l élesztőkivonat, Becton Dickinson cég, Cockeysville; 5 g/l NaCl; 27 g/l nátrium-szekcinát; 100 mg/l $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$; 75 mg/l $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$; 0,5 μM $MnCl_2$; 0,5 μM $FeSO_4$; 2 % (W/V) glukóz; 50 mM PIPES-puffer (egy 1 M -os törzsoldatból, pH 7,2); 75mM KPO_4 (egy 1,5 M -os törzsoldatból, pH 7,0); pH = 7,0, KOH -val - valamint 10 $\mu g/ml$ -es tetraciklinnel- beállítva) 2000 ml -es rázólabdikokban inkubáljuk 72 óráig 37 °C -on és 200 fordulat per perc fordulaton. A sejtek le-centrifugálása után kapott maradékot a proteázaktivitás meg-határozása után (a Tenside -

ben, kötet 7 (1970), S. 125 - 132, leírt módszer alapján) a következő kísérletekhez alkalmaztuk.

2. példa

A következő két példához standardizáltan szennyezett textiliákat alkalmaztunk, melyeket az Eidgenössischen Materialprüfungs- und Versuchsanstalt-tól, St. Gallen, Schweiz (EMPA), vagy a Waschereiforschungsanstalt-tól, Krefeld, szereztünk be. A 2. példában a következő szennyező-décek/textiliákat alkalmaztuk: A (vér/tej/rozsdá pamuton), B (vér/tej/tus pamuton), C (vér/tej/tus egy poliészter-pamut-keverékszöveten) és D (tojás/rozsdá pamuton).

Ezekkel a tesztanyagokkal különböző mosószerreceptúrákat vizsgáltunk launderometrikusan mosóteljesítményük alapján. Ehhez mindig egy 1 : 12 fürdőarányt állítottunk be és 30 percig 40 °C -on mostunk. A dózis 5,88 g-ja a mindenkori szernek / 1 mosófürdő. A vízkeménység 16°-os német keménységi fok volt.

Kontroll-mosószerként egy az alábbi összeállítás szerinti mosószer-bázis-receptúra szolgált (minden adat tömegszázalékban): 4 % lineáris alkilbenzolszulfonát (nátrium-só), 4 % C₁₂-C₁₈-zsíralkoholszulfát (nátrium-só), 5,5 % C₁₂-C₁₈-zsír-alkohol 7 EO -val, 1 % nátrium-szappan, 11 % nátriumkarbonát, 2,5 % amorf nátriumdiszilikát, 20 % nátriumperborát-tetrahidrát, 5,5 % TAED, 25 % zeolit A, 4,5 % polikarboxilát, 0,5 % foszfonát, 2,5 % habinhibitor-granulátum, 5 % nátriumsulfát, maradék:

víz, optikai fehéritő, sók. Ezt a különböző kísérleti sorokhoz a következő proteázokkal ele-gyítettük úgy, hogy mindig egy 2.250 PE proteolitikus akti-vitás / 1 mosófürdő végkoncentráció adódjon: B. lentus-alka-likus proteáz F49 (WO 95/23221; előállító: Bíozyrn cég, Kundl, Ausztria), Savinase® (Novozymes cég A/S, Bagsvaerd, Dánia), illetve a találmánynak megfelelő B. lentus-alkalikus proteáz S3T/V4I/V199I/L211G.

A mosás után a mosott textiliák fehérségi fokát a bárium-szulfáthoz viszonyítva mértük, amelyet a 100 %-ra normáltunk. A mérés egy Datacolor SF500-2 spektrométeren történt 460 nm - en (UV-zárófilter 3), 30 mm -es blende, fény nélkül, D65 -ös fényfajta, 10°, d/8°. A kapott eredményeket százalékos remisszióként adjuk meg, azaz a százalékos adatokat a báriumszulfáthoz viszonyítva együtt a mindenkori kezdeti értékekkel a 3. táblázatban adjuk meg. A megadott értékek 4 mérésből származó középértékek. Lehetővé teszik a szerben alkalmazott enzimnek a mosóhatásban kifejtett hozzájárulá-sának közvetlen becslését.

3. táblázat:

Alapmosószer	A	B	C	D
Kezdeti érték	22,9	13,0	11,3	26,4
Proteáz nélküli kontroll	34,1	18,5	15,1	42,4

B. lentus-alkalikus proteáz S3T/V41/V1991/L211G	47,5	37,4	49,5	72,8
B. lentus-alkalikus proteáz F49	40,1	28,6	26,8	71,3
Savinase®	43,0	30,5	29,5	48,6
Standard érték	0,7	0,7	1,2	0,9

Felismerhető, hogy a találmánynak megfelelő proteázok minden szennyeződésnél jóval magasabb hozzájárulást mutatnak a mindenkori szer mosóteljesítményéhez, mint a hagyományos proteázok, a B. lentus-alkalikus proteáz F49 és a Savinase®.

1. példa

A 2. példában alkalmazott szennyeződések/textíliák mellett itt az E mintát (vér pamuton) is alkalmaztuk. A teszt-textíliákat a 2. példában alkalmazott módszerrel, a megfelelő mosóoldattal laundrométerben vizsgáltuk. Az egyetlen különbség a 2. példához képest, hogy itt egy 60 °C-os hőmérsékleten mostunk. A kísérleti sorok kiértékelése az előző példához hasonlóan történt; az alábbi 4. táblázat tartalmazza az eredményeket.

2. táblázat:

Alamosószer	A	B	C	D	E
Kezdeti érték	23,1	13,0	11,0	26,6	14,9
Proteáz nélküli kontroll	34,2	18,6	15,3	44,3	52,8
B. lentus-alkalikus proteáz S3T/V4I/V199I/L211G	46,2	46,2	60,3	72,5	64,0
B. lentus-alkalikus proteáz F49	30,7	30,7	32,2	72,4	5,3
Savinase®	35,9	35,9	36,4	56,5	54,0
Standard érték	0,9	0,9	1,8	0,8	1,3

Mint ez az eredmény is mutatja, a találmánynak megfelelő alkalikus proteáz S3T/V4I/V199I/L211G, a többi mosószerekben alkalmazott proteáznál, a B. lentus-alkalikus proteáz F49-nél és Savinase® -nál 60 °C -os mosási hőmérsékletnél is nagyobb hozzájárulást mutatott a mindenkori szer mosóteljesítményéhez, vagy a hibahatáron belül azokkal egyenértékű volt.

4. példa

Kemény és sima felületű edényeket standardizáltunk, ezeket (A) lágytojással, (B) tojás/tej -jel, (C) keményítőkeverékkel és (D) vagdalt hússal láttok el, majd 45 °C -on normál programmal egy Miele® G 676 típusú háztartási mosogatógéppel mostunk.

Mosásonként 20 g mosogatószert alkalmaztunk; a víz-keménység 16° német keménységi fok volt.

Mosogatószerként a következő alap-receptúra szolgált (minden adat tömegszázalékban megadva): 55 % nátriumpolifoszfát (vízmentesnek számolva), 4 % amorf nátriumdiszilikát (vízmentesnek számolva), 22 % nátriumkarbonát, 9 % nátriumperborát, 2 % TAED, 2 % nemionos tenzid, maradék: víz, színezékek, illatanyag. Ezt az alapreceptúrát a különböző kísérletek során egyenlő aktivitással úgy elegyítettük a különböző proteázokkal (B. lentus-alkalikus proteáz F49, Savinase[®], illetve a találmánynak megfelelő proteáz-variánsokkal (B. lentus-alkalikus proteáz S3T/V4I/V199I/L211G), hogy mosásonként mindig egy 10.000 PE -s aktivitás adódjon. Ez egy kb. 0,1 mg proteáz-protein / g tisztítószerek-koncentrátum koncentrációnk felelt meg.

A mosás után az A - C szennyeződések maradékát gravimetriáisan, százalékban állapítjuk meg. Ehhez a szennyezett edény és a mosott edény súlyának különbségét, és a nem mosott edény és a kezdeti tömeg különbségéhez viszonyított edény kezdeti tömegét viszonyítottuk a kezdeti tömeghez. Ez az arány százalékos maradéknak tekinthető. A D szennyeződésnél mosás után egy vizuális értékelést végeztünk tízes skála szerint, ahol a 0 = változatlan, azaz nagyon erős szennyeződés, a 10 = nem látható szennyeződés. A kapott eredményeket az alábbi 5. táblázatban foglaltuk össze. Itt 9 mérés középértékeit adtuk meg. Ezek lehetővé teszik a tartalmazott enzimnek az

alkalmazott szer tisztító hatásában való hozzájárulásának megállapítását.

5. táblázat:

Alapmosogatószer	A	B	C	D
	% maradék	% maradék	% maradék	% maradék
B. lentus-alkalikus proteáz S3T/V4I/V199I/L211G	25,2	27,3	69,3	9,8
B. lentus-alkalikus proteáz P49	26,2	22,4	65,2	7,6
Savinase®	12,5	12,0	63,3	8,4

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a találmánynak megfelelő B. lentus-alkalikus proteáz S3T/V4I/V199I/L211G gépi mosogatószeres tisztítóhatásához való hozzájárulása a többi tesztelt proteázénál nagyobb, vagy legalább egyenértékű; és ez már egy viszonylag alacsony alkalmazott aktivitásnál.

5. példa

Mint az előző példában, edényeket standardizáltunk és ugyanazon ezennyeződésekkel láttunk el és ugyanúgy ugyanazzal a tisztítószerreceptúrával mostuk. Az egyetlen különbség abból állt, hogy mindig 20.000 PE -nek megfelelő mennyiségű proteázt alkalmaztunk. Ez mindig kb. 0,2 mg proteáznak felelt meg a

tisztítószerkoncentrátumban. A 4. példával megegyezően kapott mérési eredményeket az alábbi 6. táblázatban összegeztük.

6. táblázat:

Alapmosogatószer	A	B	C
	% maradék	% maradék	% maradék
B. lentus-alkalikus proteáz S3T/V4I/V199I/L211G	35,4	37,6	9,4
B. lentus-alkalikus proteáz F49	33,2	32,7	9,1
Savinase®	12,4	14,0	8,7

Magasabb alkalmazott proteáz-aktivitásoknál is megmutatkozik a találmánynak megfelelő proteáz magasabb hozzájárulása az illető szer össztisztítóhatásához, szemben a gépi mosogatószerekként eddig alkalmazott proteázokkal, a B. lentus-alkalikus proteáz F49 -el és a Savinase® -al.

A képek leírása

1. ábra: A találmánynak megfelelő B. lentus-alkalikus proteáz-variánsok aminosavszekvenciáinak sorrendje a fontosabb ismert szubtilizinekkel, mindig maturális, azaz processzált formában.

Ezen belül jelenti:

Erf.-gen.

variánsok

A találmánynak megfelelő B. lentus-alkalikus S3T/V4I/V199I/L211G proteáz-variánsok;

Szubtilizin 309

A WO 89/06279 szerinti *Bacillus lentus* -ből származó szubtilizin;

Szubtilizin PB92

Az EP 283075 szerinti *Bacillus nov. spec.* 92 -ből származó szubtilizin;

Carlsber

Szubtilizin

Az E.L. Smith et al. (1968) *J. Biol. Chem.*, Volume 243, S. 2184 - 2191 szerinti *Bacillus licheniformis* -ből származó szubtilizin;

Szubtilizin BPN'

A J. A. Wells et al. (1983), *Nucleic Acids Research*, Volume 11, S. 7911 - 7925 szerinti *Bacillus amyloliquefaciens* -ből származó szubtilizin;

Consensus

A megadott szekvenciákkal nagyrészt megegyező pozíciók.

2. ábra:

pUC18M131 mutagenezisvektor.

A SEQ ID NO.1 -ben mutatott Bam HI - Sac I-fragmens ebben az 1 - 1771 pozíciók közt fekszik; a maradék vektorterületek a kiindulási pUC18 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) plazmid területeivel megegyezők.

Szabadalmi igénypontok

1. Szubtilizin típusú alkalikus proteázok, azzal jellemezve, hogy a *Bacillus lentus* DSM 5483-ból származó szubtilizin számozása szerint a 199-es pozícióban izoleucint, a 211-es pozícióban glicint és ezt kiegészítve a 3-as pozícióban treonint, vagy a 4-es pozícióban izoleucint tartalmaznak
2. Az 1. igénypont szerinti szubtilizin típusú alkalikus proteázok, azzal jellemezve, hogy a *Bacillus lentus* DSM 5483-ból származó szubtilizin számozása szerint a 3-as pozícióban treonint, a 4-es pozícióban izoleucint, a 199-es pozícióban izoleucint és a 211-es pozícióban glicint tartalmaz.
3. Az 1 vagy 2. igénypont szerinti alkalikus proteázok, azzal jellemezve, hogy azok egy *Bacillus*, különösen egy *Bacillus lentus* által természetes úton termelt, vagy egy ilyen *Bacillus*tól eredeztetett szubtilizinek.
4. A 3. igénypont szerinti alkalikus proteázok, azzal jellemezve, hogy azok egy *Bacillus lentus* DSM 5483 által természetes úton termelt, vagy ebből származtatott szubtilizinek.
5. A 4. igénypont szerinti alkalikus proteáz, amely az 1. ábra szerinti (a találmány szerinti) aminosav-szekvenciának megfelelő S3T/V41/V199I/L211G *B. lentus*-alkalikus proteáz.

6. Az 1 - 5. igénypontok egyike szerinti proteázok egyikéből, különösen fragmentációs, vagy deléciós mutagenezissel, inszerciós mutagenezissel, szubsztitúciós mutagenezissel vagy legalább egy más protein legalább egy részével való fúziójával levezetett, 1-5 igénypontok egyike szerinti alkalikus proteáz, ahol az abban említett pontmutációk megtartódnak.
7. Az 1 - 6. igénypontok egyike szerinti alkalikus proteáz, azzal jellemezve, hogy ezen felül derivatizált, különösen kémiai módosítás útján, kisebb vagy nagyobb molekulás kémiai vegyülethez való kapcsolás útján és /vagy egyéb anyagokkal való társítás útján.
8. A 6. vagy 7. igénypont szerinti alkalikus proteáz, azzal jellemezve, hogy különösen egy nem derivatizált kiindulási molekulával szemben megnövekedett proteolitikus hatást, és legfőképpen jobb teljesítményt mutat.
9. A 6 - 8. igénypontok egyike szerinti alkalikus proteáz, azzal jellemezve, hogy az ezen felül stabilizált, különösen más anyagokkal, különösen proteáz inhibitorokkal történő együttes előállítás útján, egy proteáz inhibitorral alkotott fúziós fehérje képzése útján, stabilizáló mutációk útján és/vagy egy polimerhez való hozzákapcsolás útján.
10. Nukleinsav, amely az 1 - 9. igénypontokban leírt proteázok

egyikét kódolja.

11. Egy szubtilizin-proteázt kódoló nukleinsav, melynek nukleotidszekvenciája a SEQ ID NO.3-ban megadott nukleotidszekvenciával megegyezik, különösen azokon a tartományokon, melyek a 199-es pozícióra izoleucint és 211-re glicint és mindenekelőtt azokon a tartományokon, ahol a 3-as pozícióra treonint, 4-re izoleucint, 199-re izoleucint és 211-re glicint kódolnak.
12. Egy vektor, amely egy a 10. vagy 11. igénypontok egyikében leírt nukleinsavszakaszt tartalmaz.
13. A 12. igénypont szerinti vektor, amely egy klónozóvektor.
14. A 12. igénypont szerinti vektor, amely egy expressziós vektor, amely az 1 - 9. igénypontokban leírt proteázok egyikének bioszintézisét teszi lehetővé.
15. Egy sejt, amely a 12 - 14. igénypontok egyike szerinti vektort tartalmaz.
16. Gazdasejt, amely az 1 - 9. igénypontokban leírt proteinek vagy derivátumok egyikét exprimálja, vagy ezek expressziójára készíthető, különösen a 14. igénypont szerinti expressziós vektor alkalmazásával.
17. A 16. igénypont szerinti gazdasejt, azzal jellemezve, hogy az egy baktérium, különösen egy olyan baktérium, amely a

felépített proteint a környezeti közegébe szekretálja.

18. A 17. igénypont szerinti gazdasejt, azzal jellemezve, hogy az egy a *Bacillus* nemzetségbe tartozó baktérium, különösen a *Bacillus lentus*, *Bacillus lichenformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* vagy *Bacillus alcalophilus* faj.
19. A 15. vagy 16. igénypont szerinti gazdasejt, azzal jellemezve, hogy az egy eukarióta sejt, különösen egy olyan sejt, amely a felépített proteint poszttranszlációsan modifikálja.
20. Eljárás egy 1 - 9. igénypontok egyike szerinti proteolitikus enzim előállítására, amelynek során egy a 15 - 19. igénypontok szerinti gazdasejtet alkalmazunk és/vagy egy a 12 - 14. igénypontok szerinti vektort alkalmazunk és/vagy egy a 10. vagy 11. igénypontok szerinti nukleinsavat alkalmazunk.
21. Egy szer, azzal jellemezve, hogy egy az 1 - 9. igénypontok egyike szerinti proteolitikus enzimet tartalmaz, különösen 2 µg - 20 mg/g mennyiségben, amely szer különösen egy mosó- vagy tisztítószert.
22. A 21. igénypont szerinti szer, azzal jellemezve, hogy további enzimeket tartalmaz, különösen további proteázokat, amilázokat, cellulázokat, hemicellulázokat és/vagy lipázokat.

23. Szerek textilnyersanyagok kezelésére vagy textilápolásra, azzal jellemezve, hogy magában, vagy más aktív anyagokkal együtt egy az 1 - 9. igénypontok egyike szerinti proteolitikus enzimet tartalmaz, különösen rostok vagy természetes alkotórészekkel rendelkező textiliák, különösen gyapjú és selyem kezelésére.
24. Eljárás textiliák, vagy kemény felületek gépi tisztítására, azzal jellemezve, hogy az eljárás legalább egy lépése során egy az 1 - 9. igénypontok egyike szerinti proteolitikus enzim aktiválódik, különösen egy 40 µg - 4g / alkalmazás, legfőképpen 400 µg - 400 mg / alkalmazás mennyiségben.
25. Eljárás textilnyersanyagok kezelésére vagy textilápolásra, azzal jellemezve, hogy az eljárás legalább egy lépése során egy az 1 - 9. igénypontok egyike szerinti proteolitikus enzim aktiválódik, különösen természetes alkotóelemekkel rendelkező textilnyersanyagok vagy textiliák, különösen gyapjú és selyem kezelésére.
26. Az 1 - 9. igénypontok egyike szerinti proteolitikus enzim alkalmazása textiliák, vagy kemény felületek tisztítására, különösen egy 40 µg - 4g / alkalmazás, legfőképpen 400 µg - 400 mg / alkalmazás mennyiségben.
27. Az 1 - 9. igénypontok egyike szerinti proteolitikus enzim

- alkalmazása mosó- vagy tisztítószeres alkotóanyagainak aktiválására vagy deaktiválására.
28. Az 1 - 9. igénypontok egyike szerinti proteolitikus enzim alkalmazása biokémiai analízisre vagy kismolekulájú vegyületek vagy proteinek szintézisére.
29. Az 1 - 9. igénypontok egyike szerinti proteolitikus enzim alkalmazása természetes anyagok vagy biológiai haszonanyagok előállítására, tisztítására vagy szintézisére.
30. Az 1 - 9. igénypontok egyike szerinti proteolitikus enzim alkalmazása természetes nyersanyagok kezelésére, különösen felületek kezelésére, különösen egy bőrkezelési eljárásban.
31. Az 1 - 9. igénypontok egyike szerinti proteolitikus enzim alkalmazása a textilelőállítás során előforduló nyersanyagok vagy köztitermékek kinyerésére vagy kezelésére, különösen szövetek védőrétegeinek eltávolítására.
32. Az 1 - 9. igénypontok egyike szerinti proteolitikus enzim alkalmazása textilnyersanyagok kezelésére vagy textilápolásra, különösen gyapjú vagy selyem, vagy gyapjú-, vagy selyemtartalmú keveréktexiliák kezelésére.
33. Az 1 - 9. igénypontok egyike szerinti proteolitikus enzim

alkalmazása fotófilmek kezelésére, különösen zselatintartalmú, vagy hasonló védőrétegek eltávolítására.

34. Az 1 - 9. igénypontok egyike szerinti proteolitikus enzim alkalmazása élelmiszerek és takarmány előállítására.

35. Az 1 - 9. igénypontok egyike szerinti proteolitikus enzimet tartalmazó kozmetikumok vagy egy az 1 - 9. igénypontok egyike szerinti proteolitikus enzim bevonásával végzett kozmetikai eljárások, vagy az 1 - 9. igénypontok egyike szerinti proteolitikus enzim alkalmazása kozmetikai célokra, különösen a megfelelő eljárás vagy a megfelelő szerek keretében.

A meghatalmazott

MEGADAR ALÁJÁRUL SZOLGALÓ VÁLTOZAI

1. ábra

1 70
 (1) AQTIPWGISRVQAPAAHNRGLTSGVKVAVLDTGIS--THFDLNIIRGGASFVPGEPS--TQDGNHGHTHVAG
 (1) ACSVPWGISRVQAPAAHNRGLTSGVKVAVLDTGIS--THFDLNIIRGGASFVPGEPS--TQDGNHGHTHVAG
 (1) AQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTSGVKVAVLDTGIS--THFDLNIIRGGASFVPGEPS--TQDGNHGHTHVAG
 (1) AQTVPYGIPLIKADKVOAQGFKANVAVLDTGIOASHFDLNVVGGASFVAGEAY--NTDGNHGHTHVAG
 (1) AQSVPYGVSOIKAPALHSQYTGSNVAVIDSGIDSSHFDLKVAGGASMPSETNPFQDNNSSHGHTHVAG
 (1) AQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTSGVKVAVLDTGIS THFDLNIIRGGASFVPGEPS TQDGNHGHTHVAG

Találmány szerinti variáns
 Subtillísisin 309
 Subtillísisin PB92
 Subtillísisin Carlsberg
 Subtillísisin BPN:
 Konszenzus

71 140
 (69) TIAALNNSIGVLGVAPSAELIYAVKVLGADGRGAISSIAQGLEWAGNMGHVANLSLGSFSPSATLEQAVN
 (69) TIAALNNSIGVLGVAPSAELIYAVKVLGASGCSVSSIAQGLEWAGNMGHVANLSLGSFSPSATLEQAVN
 (69) TIAALNNSIGVLGVAPNAELIYAVKVLGASGCSVSSIAQGLEWAGNMGHVANLSLGSFSPSATLEQAVN
 (70) TVAALDNTTGVLVAPSVSLIYAVKVLNNSGSGTYSCIVSIEWATTNNDVNMNLSLGGSPSGSTAMKQAVD
 (71) TVAALNNSIGVLGVAPSAELIYAVKVLGADGSGQYSWIINGIEKAIANNMDVINMNSLGGSPSCSAALKRAVD
 (71) TIAALNNSIGVLGVAPSAELIYAVKVLGASGCSVSSIAQGLEWAGNMGHVANLSLGSFSPSATLEQAVN

Találmány szerinti variáns
 Subtillísisin 309
 Subtillísisin PB92
 Subtillísisin Carlsberg
 Subtillísisin BPN:
 Konszenzus

141 210
 (139) SATSRGVLVVAASGNSG-----ASSISYPARYANAMAVGATDQNNNRASFQYAGGLDIVAPGVNIOSTYP
 (139) SATSRGVLVVAASGNSG-----AGSISYPARYANAMAVGATDQNNNRASFQYAGGLDIVAPGVNIOSTYP
 (139) SATSRGVLVVAASGNSG-----AGSISYPARYANAMAVGATDQNNNRASFQYAGGLDIVAPGVNIOSTYP
 (140) NAYARGVVVVAAGNSGSSGNTNTIGYFAKYDSVIAVGAVDSNSNRASFSSVGAELVMAFGAGVYISTYP
 (141) KAVASGVVVVVAAGNEGTSGSSSTVGYPKYPSVIAVGAVDSNSQKRAFSSVGPFLDVMAPGVSIQSTILP
 (141) SATSRGVLVVAASGNSG A SISISYPARYANAMAVGATDQNNNRASFQYAGGLDIVAPGVNIOSTYP

Találmány szerinti variáns
 Subtillísisin 309
 Subtillísisin PB92
 Subtillísisin Carlsberg
 Subtillísisin BPN:
 Konszenzus

211 275
 (205) GSTYASNGTSMATPHVAGAAALVKOKNPSWSNVQIRNHLKNTATSLGSTNLYGSLVNAEAATR
 (205) GSTYASLNGTSMATPHVAGAAALVKOKNPSWSNVQIRNHLKNTATSLGSTNLYGSLVNAEAATR
 (205) GSTYASLNGTSMATPHVAGAAALVKOKNPSWSNVQIRNHLKNTATSLGSTNLYGSLVNAEAATR
 (210) TSTYATLNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNLSAQVNRNLSSTATYLGSSFFYKGLINVEAARQ
 (211) GNKYGAYNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNWTNTQVPSLNTTTKLGDSFFYKGLINVOAARQ
 (211) GSTYASLNGTSMATPHVAGAAALVKOKNPSWSNVQIRNHLKNTATSLGSTNLYGSLVNAEAATR

Találmány szerinti variáns
 Subtillísisin 309
 Subtillísisin PB92
 Subtillísisin Carlsberg
 Subtillísisin BPN:
 Konszenzus

