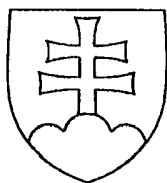


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD  
PRIEMYSELNÉHO  
VLASTNÍCTVA  
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

## ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

- (22) Dátum podania: 09.12.93  
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 92204079.5  
(32) Dátum priority: 23.12.92  
(33) Krajina priority: EP  
(43) Dátum zverejnenia: 11.10.1995  
(86) Číslo PCT: PCT/EP93/03551, 09.12.93

(21) Číslo dokumentu:

**802-95**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>:

**C 12 N 15/55,**  
C 12 N 1/15,  
C 12 N 1/19,  
C 12 N 9/18,  
C 11 D 3/386,  
C 12 N 15/62

(71) Prihlasovateľ: Unilever NV, Al Rotterdam, NL;

(72) Pôvodca vynálezu: Egmond Maarten Robert, Utrecht, NL;  
Hijden van der Hendrikus Theodorus W. M., Capelle a/d IJssel, NL;  
Musters Wouter, Maassluis, NL;  
Peters Hans, Rotterdam, NL;  
Verrips Cornelis Theodorus, Maassluis, NL;  
De Vlieg Jakob, Maassluis, NL;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Variant kutinázy, spôsob jeho výroby, DNA, vektor a hostiteľ**

(57) Anotácia:

Určujú sa kutinázové varianty zdrojovej kutinázy, v ktorých bola sekvencia aminokyselín modifikovaná tak, aby sa zlepšila ich znášanosť s aniónovými povrchovoaktívnymi látkami. Podrobnejšie, znášanosť k aniónovým povrchovoaktívnym látkam sa zlepšila zoslabením väzby aniónovej povrchovoaktívnej látky a enzýmu, zmenšením elektrostatickej interakcie medzi aniónaktívnym tenzidom a enzýmom náhradou jedného alebo viacerých kladne nabitých arginínových zvyškov, ktoré sú umiestnené v blízkosti hydrofóbnej časti schopnej viazať apolárny koniec aniónaktívneho tenzidu zvyškami lyzínu, nenabitými aminokyselinovými zvyškami alebo záporne nabitými zvyškami aminokyselín, a/alebo náhradou jedného alebo viacerých zvyškov aminokyselín, ktoré sú umiestnené v hydrofóbnej časti, schopnej viazať apolárny koniec aminoaktívneho tenzidu, menej hydrofóbnymi zvyškami aminokyselín.

Variant kutinázy, spôsob jeho výroby, DNA, vektor a hos-  
titeľ

### Oblasť techniky

Tento vynález sa vo všeobecnosti vzťahuje na oblasť lipolytických enzýmov. Podrobnejšie sa vynález týka lipolytických enzýmov, ktoré boli modifikované pomocou rekombinantnej DNA techniky, ďalej spôsobov ich výroby a ich použitia, osobitne v kompozíciách enzymatických detergentov.

### Doterajší stav techniky

Lipolytické enzýmy sú enzýmy, ktoré sú schopné hydrolyzovať triglyceridy na voľné mastné kyseliny a diglyceridy, monoglyceridy a eventuálne až na glycerol. Môžu tiež štiepiť zložitejšie estery, ako sú kutinové tkanivá v rastlinách alebo sebum kože. V priemysle sa lipolytické enzýmy používajú pri rôznych enzymatických spôsoboch ako sú inter- alebo trans- esterifikácie triglyceridov a syntézy esterov. Používajú sa tiež do detergentov s cieľom zvýšiť schopnosť detergentu odstraňovať mastnoty.

Najviac využívané lipolytické enzýmy sú lipázy (EC 3.1.1.3). Napríklad, EP - A - 258 068 a EP - A - 305 216 (obidve Novo Nordisk) opisujú výrobu fungálnej lipázy cestou heterohostovských mikroorganizmov pomocou rDNA techník, osobitne lipázy z Thermomyces lanuginosus/Humicola lanuginosa. EP - A 331 376 (Amano) opisuje lipázy a ich výrobu technikami rDNA, použitie lipáz, vrátane sekvencie aminokyselín lipázy z Pseudomonas cepacia. Ďalšie príklady lipáz, vyrábanými technikami rDNA, sú uvedené v WO 89/09263 a v EP - A - 218 272 (oba Gist - Brocades). Napriek veľkému počtu publikácií o lipázach a ich modifikáciách, komerčné rozšírenie našla iba lipáza z Humicola lanuginosa vo funkcii aditíva v detergentoch pod obchodnou značkou Lipolase (TM).

Charakteristickou vlastnosťou lipáz je ich aktivácia na fázovom rozhraní. To znamená, že aktivita enzýmu je oveľa

vyššia na substráte, ktorý vytvára medzifázové rozhrania alebo micely, ako na celkom rozpustnom substráte. Medzifázová aktivácia sa prejavuje v náhlom zvýšení lipolytickej účinnosti, keď sa koncentrácia substrátu zvýši nad kritickú koncentráciu pre vznik mycel (CMC - critical micell concentration) a vzniknú fázové rozhrania. Tento jav možno pozorovať experimentálne ako diskontinuitu v graficky znázornenej závislosti účinnosti enzýmu od koncentrácie substrátu.

Mechanizmus medzifázovej aktivácie lipáz je vysvetľovaný konformačnými zmenami proteínovej štruktúry lipázovej molekuly. Vo voľnom, neviazanom stave, špirálová čiapočka pokrýva katalyticky aktívne miesto. Aby vzniklo spojenie s lipidovým substrátom, čiapočka sa posunie a katalytické miesto je vystavené expozícii. Predpokladá sa, že špirálová čiapočka je v interakcii s lipidovým rozhraním a tak umožňuje enzýmu, aby zostal viazaný k medzifázovému rozhraniu.

VO-A-92/05249 (Novo Nordisk) opisuje geneticky modifikované lipázy, bližšie lipázu z Humicola lanuginosa, ktorá bola modifikovaná v kontaktnej lipidovej zóne. Lipidová kontaktná zóna je v prihláške definovaná ako povrch, ktorý je v aktívnej forme pokrytý špirálovou čiapočkou. Modifikácia záleží vo vynechaní alebo náhrade jednej alebo viacerých zvyškov aminokyselín v kontaktnej lipidovej zóne tak, že sa zvýši elektrostatický náboj a/alebo sa zníži hydrofobicita lipidovej kontaktnej zóny, alebo že sa tak zmení povrchové usporiadanie lipidovej kontaktnej zóny. Toto sa dosahuje vynechaním jedného alebo viacerých negatívne nabitých zvyškov aminokyselín lipidovej kontaktnej zóny, alebo náhradou týchto zvyškov neutrálnymi alebo viac pozitívne nabitými zvyškami aminokyselín a/alebo substitúciou jedného alebo viacerých neutrálnych zvyškov aminokyselín v lipidovej kontaktnej zóne aminokyselinami s kladným nábojom a/alebo vynechaním jedného alebo viacerých hydrofilných zvyškov aminokyselín v kontaktnej lipidovej zóne, alebo náhradou týchto zvyškov hydrofóbnymi aminokyselinami.

Kutinázy sú podtriedou enzýmov (EC 3.1.1.50), hydroláz voskových esterov. Tieto enzýmy sú schopné degradovať kutín,

sieť esterifikovaných dlhoreťazcových mastných kyselín a mastných alkoholov, ktorý vzniká v rastlinách ako ochranný povlak na listoch a stopkách. Navyše vykazujú určitú lipolytickú účinnosť, t.zn. sú schopné hydrolyzovať triglyceridy. Tak sa môžu považovať za špeciálny druh lipáz. Na rozdiel od lipáz, kutinázy nevykazujú nijakú významnú medzifázovú aktiváciu.

Kutinázy možno získať z celého radu zdrojov, ako sú rastliny (napríklad peľ), baktérie alebo huby. Pre ich degradačné vlastnosti voči mastnotám sa kutinázy navrhli do enzymatických kompozícií detergentov. Napríklad WO - A - 88 /09367 (Genencor) navrhuje kombinácie tenzidu a v podstate čistého bakteriálneho kutinázového enzýmu na formuláciu účinnej čistiacej kompozície. Sú zverejnené kompozície detergentov, zahrňujúce kutinázu získanú z gram negatívnych baktérií Pseudomonasa putida ATCC 53552. V neskoršej prihláške európskeho patentu EP- A - 476 915 (Clorox) je zverejnené, že rovnaký enzým - ktorý je potom označovaný ako lipáza - nie je na odstraňovanie mastných škvŕn z textílií viac účinný ako ostatné, ak sa používa pri bežných spôsoboch čistenia.

Nedávno bola určená trojrozmerná štruktúra kutinázy z Fusarium solani pisi (Martinez et al.(1992) Nature 356, 615 - 618). Zistilo sa, že táto kutináza nevykazuje špirálové pokrývanie katalytických väzbových miest. Miesto toho vzniká aktívne miesto serínového zvyšku, prístupné pre rozpúšťadlo. Zdá sa, že toto zistenie potvrdzuje súčasnú teóriu o mechanizme medzifázovej aktivácie lipáz.

Kutinázový gén z Fusarium solani pisi sa klonoval a sekvenoval (Ettinger et al., (1987) Biochemistry 26, 7883 - 7892). WO - A - 90/09446 (Plant Genetics Systems) opisuje klonovanie a produkciu tohto génu v E.coli. Kutináza môže účinne katalyzovať hydrolýzu a syntézu esterov vo vodnom aj v nevodnom prostredí, za prítomnosti alebo bez prítomnosti rozhrania medzi kutinázou a substrátom. Na základe jej všeobecnej stálosti sa predpokladá, že by táto kutináza mohla byť využitá na prípravu čistiacich činidiel ako sú pracie

prostriedky a iné prostriedky, určené na rozpúšťanie mastnôt, ako sú kozmetické kompozície a šampóny. Spôsob, akým ekonomicky vyrábať uvedený enzým, nebol doteraz zverejnený, a neboli zverejnené ani špecifické enzymatické kompozície detergentov, obsahujúce kutinázu.

V dôsledku uvedeného charakteristického znaku, t.zn. v dôsledku chýbajúcej medzifázovej aktivácie, definujeme pre účel tejto patentovej prihlášky kutinázy ako lipolytické enzýmy, ktoré v podstate nie sú aktivované na rozhraní fáz. Kutinázy sa preto odlišujú od klasických lipáz tým, že nevykazujú špirálovité zakrytie katalytického väzbového miesta.

Ako bolo už uvedené hore, iba lipáza odvodená od Humicola lanuginosa našla široké komerčné uplatnenie pod obchodnou značkou Lipolase (TM). Henrik Malmos v svojom článku v Chemistry and Industry 1990, str. 183 - 186 poznamenáva, že je známe, že vo všeobecnosti je účinnosť lipáz v pracom procese nízka, a Lipolase (TM) nie je výnimka. V priebehu procesu sušenia, keď sa znižuje obsah vody v textíliách, enzým znova obnovuje svoju účinnosť a mastné škvrny sa hydrolyzujú. V priebehu nasledujúceho plákacieho cyklu sa hydrolyzovaný materiál odstráni. Toto tiež vysvetľuje, prečo účinok lipáz je nízky v prvom pracom procese, ale je významný v nasledovných cykloch. A tak stále zostáva potreba lipolytických enzýmov, ktoré by mali významnú účinnosť v priebehu vlastného pracieho procesu.

Teraz sa zistilo, že kutinázy, osobitne kutinázy z Fusarium solani pisi, majú zjavný účinok počas vlastného prania. Stále však treba kutinázové varianty so zvýšenou lipolytickou účinnosťou v kompozíciách bohatých na aniónové detergenty a spôsoby, ako takéto enzýmy vyrábať.

V tomto vynáleze sa predkladajú varianty kutinázy, v ktorých je modifikovaná sekvencia aminokyselín tak, aby sa zlepšila ich kompatibilita s aniónaktívnymi tenzidmi. Podrobnejšie sa zistilo, že lipolytická účinnosť eukaryotických kutináz v kompozíciách bohatých na aniónaktívne detergenty, podrobnejšie kutináz z Fusarium solani pisi, Colletotrichum capsici, Colletotrichum gloeosporioides a Magnaporthe grisea

sa môže zlepšiť znížením sily väzby aniónovej povrchovo aktívnej látky k enzýmu.

#### Podstata vynálezu

Variant kutinázy zdrojovej kutinázy, v ktorom sa sekvencia aminokyselín modifikovala tak, že sa zlepšila jeho kompatibilita k aniónaktívnym tenzidom, osobitne zoslabením väzby aniónových povrchovo aktívnych látok k enzýmu.

Vynález sa vzťahuje na varianty kutinázových enzýmov. Ako bolo diskutované už hore, kutináza sa môže získať z mnohých zdrojov, ako sú rastliny (napríklad peľ), baktérie a huby. Kutináza, ktorá sa má použiť ako zdrojová kutináza, alebo východiskový materiál v tomto vynáleze, na modifikáciu spôsobom rekombinantnej DNA techniky, vyberie sa zo skupiny eukaryotických kutináz. Eukaryotické kutinázy sa môžu získať z rôznych zdrojov, ako sú rastliny (napríklad peľ), alebo huby.

Skupina (eukaryotických) fungálnych kutináz sa javí ako pozostávajúca z dvoch rodov s rozdielnymi špecifickosťami, s listovou špecifickosťou a stopkovou špecifickosťou. Kutinázy s listovou špecifickosťou majú sklon k optimálnemu pH v oblasti kyslej alebo neutrálnej, zatiaľ čo kutinázy so stopkovou špecifickosťou majú sklon k optimu pH v alkalicknej oblasti. Kutinázy, ktoré majú optimum v alkalicknej oblasti sú vhodnejšie v alkalicky riešených kompozíciách detergentov, ako sú vysoko účinné textilné pracie prášky a tekutiny. Kutinázy, ktoré majú optimum pH v kyslej až neutrálnej oblasti sú vhodnejšie pre výroby s miernym účinkom alebo ako kondicionery plákania, alebo tiež na priemyselné čistiace prípravky.

V nasledujúcej tabuľke I sú uvedené štyri rozdielne kutinázy so stopkovou špecifickosťou a ich optimá hodnôt pH.

Tabuľka I

|                                                                          |     |
|--------------------------------------------------------------------------|-----|
| Príklady kutináz so stopkovou špecifickosťou pH <sup>-</sup> - optimálne |     |
| <u>Fusarium solani pisi</u>                                              | 9   |
| <u>Fusarium roseum culmorum</u>                                          | 10  |
| <u>Rhizoctonia solani</u>                                                | 8,5 |
| <u>Alternaria brassicicola</u> (PNBase I)                                | 9   |

Podľa tohto vynálezu sú osobitne výhodné kutinázy, ktoré sa môžu odvodiť z divého typu Fusarium solani pisi (Ettinger et al. 1987). Ak sa použijú v určitých kompozíciách detergentov, majú tieto kutinázy zjavné účinky pri vlastnom praní.

Ako zdrojové kutinázy alebo východiskový materiál na modifikáciu rekombinatnou DNA technikou sú v tomto vynáleze tiež vhodné kutinázy, ktoré majú vysoký stupeň homológie sekvencie ich aminokyselín ku kutináze z Fusarium solani pisi. Príklady sú kutinázy z Colletotrichum capsici, Colletotrichum gloeosporioides a Magnaporthe grisea. Čiastkové sekvencie aminokyselín týchto kutináz sú ukázané na obrázku 11 a je z nich zrejмый vysoký stupeň homológie.

Alternatívou na zlepšenie kutinázy z Fusarium solani pisi modifikáciou jej génu môže byť izolácia kutináz s geneticky zakódovanými informáciami z iných eukaryotických organizmov, využitím vzoriek 5'- a 3'- DNA, odvodených z cDNA z Fusarium solani pisi, Colletotrichum capsici, Colletotrichum gloeosporioides a Magnaporthe grisea, kódujúce (pro)kutinázu, a vzoriek rozoznávajúcich konzervované sekvencie ďalších kutináz, a ak je nevyhnutné, využitím týchto vzoriek na znásobenie c-deoxynukleových kyselín, odvodených z informačných ribonukleových kyselín (mRNA) kutinázu produkujúcich eukaryotických buniek, použitím technológie polymérázovej reťazovej (chain) reakcie (PCR) (pozri, napríklad, WO - A - 92/05249). Po klonovaní a expresii štandardnými spôsobmi takto získaných, kutinázami kódovaných génov v E.coli sa hodnotil ich účinok pri odstraňovaní (mastnej) špiny za vhodných podmienok. Týmto spôsobom sa môže získať

veľký počet prirodzene sa vyskytujúcich variantov hore uvedených kutináz so zlepšenou účinnosťou počas prania. Navyiac, sekvencie týchto prirodzene sa vyskytujúcich kutináz vytvárajú vynikajúcu bázu proteínového inžinierstva kutináz Fusaria solani pisi.

Na základe nových názorov na faktory určujúce aktivitu lipolytických enzýmov pri vlastnom praní, a na základe starostlivého prehodnotenia trojrozmernej štruktúry kutinázy Fusaria solani pisi (Martinez et al. (1992) Nature 356, 615 - 618), sme zistili množstvo možností, ako pomocou rekombinantných DNA techník zlepšiť znášanlivosť týchto kutináz, a kutináz všeobecne, k aniónovým povrchovo aktívnym látkam.

Vychádzajúc zo známej priestorovej štruktúry kutinázy z Fusarium solani pisi sa získala priestorová štruktúra kutinázy z Colletotrichum gloeosporioides použitím zákonitostí porovnávacích modelovacích techník ako sú implementované do modulu COMPOSER balíka programov molekulového modelovania SYBYL (TRIPOS associates, Inc. St. Louis, Missouri). Získaný model kutinázy z Colletotrichum gloeosporioides sa upresnil pomocou techník minimalizácie energie (EM) a molekulovej dynamiky (MD), ako sú tieto implementované v programovom balíku pre molekulové modelovanie BIOSYM (BIOSYM, San Diego, Kalifornia). V priebehu EM a MD upresňovania modelu sa aplikoval znalostný prístup. Model sa simultánne optimalizoval podľa energiových termov funkcie potenciálnej energie a podľa známych štrukturálnych kritérií. Kvalita modelu sa posudzovala kritériami ako sú počet a kvalita vodíkových väzieb, usporiadanie vodíkových väzieb v sekundárnych prvkoch štruktúry, orientácia peptidových jednotiek, hodnoty dihedrálnych uhlov hlavných reťazcov, uhol interakcie aromatických skupín a veľkosť dutín. Model sa navyiac kontroloval pomocou nepríslušného rozdelenia nábojov, extrémne exponovaných hydrofóbných zvyškov a energeticky nevýhodných polôh disulfidových mostíkov. Relevantné bočné rotaméry sa vybrali z rotamérovej knižnice Pondera a Richardsa (Ponder et al. (1987) J.Mol. Biol. 193, 775 - 791). Konečný výber osobitných rotamérov bočných reťazí z uvedenej knižnice bol založený na zhodnote-

ní štruktúrnych kritérií, ako bolo uvedené hore. MD sa použila na umiestenie atómov bočných reťazí do ich polôh. Podobný prístup sa použil na získanie trojrozmernej štruktúry kutinázy z Magnaporthe grisea.

Tento vynález ukazuje, že sa kutinázy môžu modifikovať tak, aby sa ich interakcia s aniónovými povrchovo aktívnymi látkami mohla znížiť bez toho, aby sa zmenil ich zjavný účinok počas vlastného prania.

Toto sa môže dosiahnuť viacerými spôsobmi. Po prvé, spojenie aniónovej povrchovo aktívnej látky k enzýmu sa môže zoslabiť znížením elektrostatickej interakcie medzi aniónovoaktívnym tenzidom a enzýmom. Napríklad, náhradou jedného alebo viacerých kladne nabitých arginínových zvyškov, ktoré sú viazané v blízkosti hydrofóbného miesta, schopného viazania apolárneho konca aniónovej povrchovo aktívnej látky, lyzínovým zvyškom. Tiež možno znížiť elektrostatickú interakciu medzi aniónovoaktívnym tenzidom a enzýmom zatienením kladného náboja arginínového zvyšku tak, že sa zavedie záporný náboj do vzdialenosti asi 6 Å od uvedeného arginínu, napríklad zvyškom glutámovej kyseliny. Alternatívne sa interakcia medzi aniónovou povrchovo aktívnou látkou a enzýmom môže zoslabiť náhradou jedného alebo viacerých kladne nabitých arginínových zvyškov, ktoré sú umiestené v blízkosti hydrofóbného miesta, schopného spojenia s apolárnym koncom aniónovoaktívneho tenzidu, zvyškami aminových kyselín bez náboja. Ďalej, elektrostatická interakcia medzi aniónovoaktívnym tenzidom a enzýmom sa môže znížiť nahradením jedného alebo viacerých kladne nabitých zvyškov arginínu, ktoré sú v blízkosti hydrofóbnej časti, schopnej viazať apolárny koniec aniónovoaktívneho tenzidu, záporne nabitými zvyškami aminokyselín.

Iný prístup k zoslabeniu spojenia medzi aniónovou povrchovo aktívnou látkou a enzýmom je založený na náhrade jedného alebo viacerých zvyškov aminokyselín, ktoré sú v blízkosti hydrofóbnej časti, schopnej spojenia apolárneho konca aniónovoaktívneho tenzidu, menej hydrofóbnymi zvyškami aminokyselín. Tieto menej hydrofóbne zvyšky aminokyselín sú

výhodne vybrané zo skupiny, pozostávajúcej z glycínu, serínu, alanínu, aspartovej kyseliny a treonínu.

Varianty kutinázy, pripravené podľa tohto vynálezu, môžu v dôsledku ich zlepšenej aniónovej kompatibility viesť k výhodnej enzýmovej účinnosti, pri ich použití ako súčasť kompozície detergenta alebo čistiaceho prípravku, bohatých na aniónoaktívne látky. V kontexte tohto vynálezu aniónovo bohatá znamená, že detergent alebo čistiaca kompozícia obsahuje povrchovo aktívny systém, ktorý pozostáva z viac ako 5 %, všeobecne viac ako 10 % a osobitne viac ako 20 % aniónových povrchovo aktívnych látok.

Zistilo sa, že kutinázové varianty podľa tohto vynálezu majú zlepšenú použiteľnosť počas vlastného prania, teda v priebehu hlavného pracovného úseku spôsobu prania. Výrazom zlepšená použiteľnosť počas vlastného prania, teda v priebehu hlavného pracovného úseku spôsobu prania, sa rozumie, že kompozícia detergenta, obsahujúca enzým, je schopná odstrániť významný podiel mastnej špiny zo zašpineného textilu v jednostupňovom pracom spôsobe európskeho typu automatických pračiek, pri použití bežných podmienok prania, pokiaľ sa týka koncentrácie, tvrdosti vody a teploty. Treba si uvedomiť, že pri rovnakých podmienkách, na trhu bežne dostupný lipolytický enzým Lipolase (TM) z Novo Nordisk neprejavuje nijaký zjavný účinok priamo počas vlastného prania mastnej špiny.

Účinok enzýmu na masťnú špinu priamo počas vlastného prania sa môže overiť použitím nasledujúcej skúšky. Nová polyesterová skúšobná tkanina, ktorá má obsah bavlny menej ako 10 % sa predperie za použitia bezenzýmového detergentného prípravku, takého ako je uvedený ďalej, a následne sa starostlivo vypláka. Takto nezašpinená tkanina sa potom zašpiní olivovým olejom alebo inou vhodnou hydrolyzovateľnou masťou špinou. Každá skúšobná tkanina (s hmotnosťou približne 1 g) sa inkubovala v 30 ml pracieho roztoku v 100 ml polystyrénovej nádobke. Prací roztok obsahoval detergentný prípravok, uvedený nižšie, v dávke 1 g v litri. Nádobky s obsahom sa miešali 30 minút v Miele TMT práčke, naplnenej vodou

a s použitím bežného 30 °C hlavného pracieho programu. K praciemu roztoku sa vopred pridal variant kutinázy v množstve 3 LU/ml. Kontrolný pokus neobsahoval žiaden enzým. Prací prášok mal ďalej uvedené zloženie ( v % hmotnostných):

|                  |      |
|------------------|------|
| LAS              | 6,9  |
| Mydlo            | 2,0  |
| Neiógenný tenzid | 10,0 |
| Zeolit           | 27,0 |
| Uhličitan sodný  | 10,2 |
| Síran sodný      | 13,0 |

Po praní sa tkaniny starostlivo vyplákali v studenej vode a sušili sa v bubnovej sušičke studeným vzduchom. Potom sa stanovilo zvyškové množstvo tuku v tkanine. To sa môže vykonať viacerými spôsobmi. Bežný spôsob využíva extrakciu skúšobnej tkaniny petroléterom v Soxhletovom extrakčnom zariadení, oddestilovanie rozpúšťadla a váženie zvyšku tukového materiálu a vyjadrenie v percentách ako podiel k pôvodnému množstvu mastnoty na tkanine.

Podľa druhého spôsobu, ktorý je citlivejší, sa na zašpinenie skúšobnej tkaniny používa brómovaný olivový olej (Richards, S., Morris, M.A. and Arklay, T.H. (1968), Textile Research Journal 38, 105 - 107). Každá skúšobná tkanina sa potom inkubuje v 30 ml pracieho roztoku v 100 ml polystyrénových nádobkách. Celá séria nádobiek sa potom mieša v práčke, naplnenej vodou pri použití bežného 30 °C hlavného pracieho programu. Po hlavnom praní sa skúšobné tkaniny starostlivo vyplákali v studenej vode počas 5 sekúnd. Ihneď po plákaní sa skúšobné tkaniny sušili studeným vzduchom v sušičke. Po vysušení sa zvyšok tuku stanovil určením obsahu brómu v tkanine pomocou röntgenovej fluorescenčnej spektrometrie. Odstránený tuk sa môže vyjadriť ako percentuálne množstvo z pôvodne prítomného tuku na skúšobnej tkanine:

$$\% \text{ odstránenie špiny} = [(\text{bróm}_{bw} - \text{bróm}_{aw}) : \text{bróm}_{bw}] * 100 \%$$

kde  $\text{bróm}_{bw}$  znamená percentuálny obsah brómu v tkanine pred práním a  $\text{bróm}_{aw}$  sú percentá brómu v tkanine po praní.

Ďalší spôsob na vyhodnotenie enzymatickej účinnosti je

meranie odrazivosti svetla pri 460 nm štandardnou technikou.

V kontexte tohto vynálezu, výrazy modifikovaný, premenený alebo mutantný enzým alebo variant enzýmu znamenajú enzým, ktorý je produktom mutantného organizmu, ktorý exprimuje mutantný gén. Mutantý gén ( iný ako ten, ktorý obsahuje len "mlčiace" kľudové mutácie) znamená gén kódujúci enzým, ktorý má sekvenciu aminokyselín, ktorá bola priamo alebo nepriamo odvodená zo sekvencie zodpovedajúceho zdrojového enzýmu a ktorá je na jednom alebo na viacerých miestach rozdielna. Zdrojový enzým znamená génový produkt zodpovedajúceho nezmeneného génu. "Mlčiaca" kľudová mutácia génu znamená zmenu alebo odlišnosť, vzniknutú v polynukleotidovej sekvencii génu, ktorá (v dôsledku redundancie vo vzťahoch kodón - aminokyselina) nevedie k nijakej zmene sekvencie aminokyselín enzýmu, kódovaného týmto génom.

Pozmenený alebo mutantný mikroorganizmus znamená mikroorganizmus, ktorý je zdrojovým mikroorganizmom, alebo je zdedený zo zdrojového mikroorganizmu, podrobený mutácii vzhľadom na jeho enzýmový gén. Takáto mutácia organizmu sa môže previesť alebo (a) mutáciou zodpovedajúceho génu (zdrojového génu) už prítomného v zdrojovom mikroorganizme, alebo (b) prenosom (vložením) zodpovedajúceho génu, získaného priamo alebo nepriamo z iného zdroja, a potom vloženého (vrátane mutácie génu) do mikroorganizmu, ktorý sa stáva mutantným mikroorganizmom. Hostiteľský mikroorganizmus je mikroorganizmus, ktorého časťou je mutantný gén, alebo prenášaný gén iného pôvodu. Vo všeobecnosti môže byť z rovnakého alebo odlišného kmeňa alebo druhu, vznikajúci alebo dedený ako zdrojový mikroorganizmus.

Vynález osobitne predkladá mutantné formy kutinázy Fusaria solani pisi, zverejnenej v WO - A 90/09446 (Plant Genetics Systems), a kutináz z Colletotrichum capsici, Colletotrichum gloeosporioides a Magnaporthe grisea. Tieto kutinázové varianty sa môžu pripraviť rDNA modifikovaným mikroorganizmom, obsahujúcim gén získaný alebo pripravený pomocou rDNA techník.

Ak boli zvyšky aminokyselín identifikované tak, že ich

treba nahradiť iným zvyškom aminokyseliny, potom sa náhrada vykoná napríklad mutáciou R17E, príbuznou sekvenciou kutinázy z Fusarium solani pisi, alebo jej homológom.

Odborníkom z tejto oblasti je zrejmé, že takéto modifikácie ovplyvňujú štruktúru kutinázy. Samozrejme sú preferované modifikácie, ktoré veľmi neovplyvňujú elektrostatický náboj v okolí aktívnych miest. Pôvodcovia vynálezu vyvinuli potrebnú úroveň poznatkov na pochopenie rovnováhy medzi nežiadúcou distorziou konformácie enzýmu a zvýšením účinnosti enzýmu, čo umožňuje s vysokou úspešnosťou predpovedať a pripraviť varianty kutinázy. V nasledujúcej tabuľke II a na iných miestach sú aminokyseliny a zvyšky aminokyselín v sekvencii peptidov uvádzané jednopísmenovou a trojpísmenovou skratkou:

Tabuľka II

|                          |                          |
|--------------------------|--------------------------|
| A = Ala = Alanín         | V = Val = Valín          |
| L = Leu = Leucín         | I = Ile = Izoleucín      |
| P = Pro = Prolín         | F = Phe = Fenylalanín    |
| W = Trp = Tryptofán      | M = Met = Metionín       |
| G = Gly = Glycín         | S = Ser = Serín          |
| T = Thr = Treonín        | C = Cys = Cysteín        |
| Y = Tyr = Tyrozín        | N = Asn = Asparagín      |
| Q = Gln = Glutamín       | D = Asp = Kys. aspartová |
| E = Glu = Kys. glutámová | K = Lys = Lyzín          |
| R = Arg = Arginín        | H = His = Histidín       |

Podľa tejto špecifikácie sa môže potom opísať mutácia, prítomná v sekvencii aminokyselín proteínu, a tak aj samotný proteínový mutant, polohou a podstatou mutácie nasledujúcou skrátenou formou: identitou zvyšku pôvodnej aminokyseliny ovplyvneného mutáciou, miestom (číslo sekvencie) mutácie a identitou zvyšku aminokyseliny, substituovanému na tom mieste za pôvodný zvyšok. Ak sa jedná o vloženie inej aminokyseliny do sekvencie navyše, jej poloha sa uvedie jedným alebo viacerými indexami, pripojenými k číslu posledného

predchádzajúceho člena pravidelnej sekvencie alebo referenčnej sekvencie.

Napríklad mutant, ktorý je charakterizovaný substitúciou arginínu glutamínom v polohe 17 sa označí ako Arg17Glu alebo R17E. (Hypoptetické) vloženie ďalšieho zvyšku aminokyseliny ako je prolín po arginínu sa označí ako Arg17ArgPro alebo R17RP, alternatívne ako \*17aP, s vloženým zvyškom, označeným číslom polohy 17a. (Hypotetické) vynechanie arginínu v rovnakej polohe sa označí ako Arg17\* alebo R17\*. Hviezdička znamená alebo vynechanie alebo chýbajúci aminokyselinový zvyšok vo vyznačenej polohe, či sa ráta ako chýbajúci skutočným vynechaním alebo len porovnaním alebo homológiou s inou, alebo referenčnou sekvenciou, ktorá má nejaký zvyšok v uvedenej polohe.

Násobné mutácie sa oddeľujú znamienkami plus, napríklad R17E+S54I+A128F znamená mutantný proteín nesúci tri substitučné mutácie, ako je uvedené pre každú z nich vo vyznačených troch polohách sekvencie aminokyselín. Mutácie udané v nasledujúcej tabuľke sa môžu v prípade potreby kombinovať.

Tabuľka III, uvedená ďalej, obsahuje niektoré príklady užitočných kutinázových variantov podľa tohto vynálezu, založených na sekvencii kutináz z Fusarium solani pisi a Magnaporthe grisea.

### Tabuľka III

Varianty kutinázy od Fusarium solani pisi:

R17L, R17K, R17E, L51A, L51S, R78L, T80D, R88E, R96N, R96Q, R156L, A195S, R196A, R196K, R196E.

Varianty kutinázy od Magnaporthe grisea:

A80D, A88E, R156L.

Z iného aspektu tento vynález predkladá spôsob prípravy variantov kutinázy podľa tohto vynálezu. Prirodzene sa nachádzajúce mikroorganizmy, produkujúce kutinázu, sú zvyčajne rastlinné patogény a tieto mikroorganizmy nie sú veľmi

vhodné ako hostiteľské bunky modifikovaných kutinázových génov. Preto génové kódovanie modifikovaných (pro)kutináz bolo zahrnuté do rDNA vektorov, ktoré sa môžu preniesť do hostiteľských mikroorganizmov rDNA technológiou. Na tento účel sa môžu použiť rDNA vektory v podstate podobné rDNA vektorom, opísaným v WO-A-90/09446.

V prírode sa nachádzajúce mikroorganizmy, ktoré produkujú kutinázu, nie sú veľmi vhodné na fermentačný proces. Na zvýšenie výťažku fermentácie zlepšením kutináz sa génové kódovanie preniesie do mikroorganizmov, ktoré môžu rásť rýchlejšie, na lacnom médiu a ktoré sú schopné syntetizovať a vylučovať veľké množstvá kutinázy. Takéto, vhodnou rDNA modifikované (hostiteľské mikroorganizmy) podľa tohto vynálezu sú baktérie, medzi inými Bacilli, Corynebacteria, Staphylococci, a Streptomyces, alebo nižšie eukaryoty ako je Saccharomyces cerevisiae a príbuzné druhy, Kluyveromyces marxianus a príbuzné druhy, Hansenula polymorpha a príbuzné druhy, s druhu rodu Aspergillus. Uprednostnenými hostiteľskými mikroorganizmami sú nižšie eukaryoty, pretože vo fermentačnom procese vo veľkom množstve produkujú a vylučujú enzýmy. Ďalej sú schopné vykonať glykolyzáciu molekuly kutinázy. Glykolyzácia môže prispievať k stabilite kutinázy v systéme detergenta.

Vynález ďalej predkladá genetický materiál, odvodený vložením modifikovaných génov eukaryotických kutináz, napríklad génu z Fusarium solani pisi do klonujúceho rDNA vektora, a ďalej použitie týchto na transformáciu nových hostiteľských buniek a na expresiu génov variantov kutinázy v nových hostiteľských bunkách.

Podstatu vynálezu tiež tvoria polynukleotidy, pripravené alebo modifikované rDNA technikou, ktoré kódujú varianty kutinázy, rDNA vektory obsahujúce uvedené polynukleotidy, a rDNA modifikované mikroorganizmy, obsahujúce uvedené polynukleotidy a/alebo uvedené rDNA vektory. Vynález tiež predkladá zodpovedajúce polynukleotidy kódujúce modifikované eukaryotické kutinázy, napríklad polynukleotidy, ktoré majú sekvenziu báz, ktorá kóduje zrelý variant kutinázy, v ktorej

polynukleotidový koncový translačný kodón je nasledovaný zastavovacím (stop) kodónom a ktorý voliteľne má nukleotidové sekvencie, kódujúce prepro- alebo pro- sekvencie tohto variantu kutinázy priamo proti nukleotidovým sekvenciám variantu zrelej kutinázy.

V takom polynukleotide sa kutinázovo kódovaná nukleotidová sekvencia, odvodená od organizmu z ktorého vznikla, môže modifikovať takým spôsobom, že sa najmenej jeden kodón, a výhodne toľko kodónov koľko je možné, stane predmetom "mlčiacich" mutácií za vzniku kodónov, kódujúcich ekvivalentné zvyšky aminokyselín a ktoré sú uprednostňované novým hostiteľom, a tak dosiahnuť v bunkách tohto hostiteľa informačnú-RNA na vkladanie génov zlepšenej stability.

Protismerne nukleotidovým sekvenciám kódujúcim pro- alebo zrelé kutinázy, môžu byť umiestená nukleotidová sekvencia, ktorá kóduje signálnu alebo sekrečnú sekvenciu, vhodnú pre zvoleného hostiteľa. Vyhotovenie podľa tohto vynálezu sa tak vzťahuje na rDNA vektor, do ktorého je vložená nukleotidová sekvencia, kódujúca kutinázový variant, alebo jeho prekursor.

Táto nukleotidová sekvencia sa môže odvodiť napríklad z:

- (a) prírodne sa vyskytujúcej sekvencie ( napríklad kódujúcej pôvodnú sekvenciu aminokyselín prepro- alebo pro-kutinázy produkovanej Fusarium solani pisi);
- (b) chemicky syntetizovaných nukleotidových sekvencií, pozostávajúcich z kodónov, uprednostňovaných novým hostiteľom, a z nukleotidových sekvencií poskytujúcich stabilnú informačnú RNA nového hostiteľa, stále kódujúc pôvodnú sekvenciu aminokyselín;
- (c) geneticky konštruovaných nukleotidových sekvencií, odvodených z jednej zo sekvencií nukleotidov, uvedených v predchádzajúcich bodoch a alebo b, kódujúcich kutinázy Fusarium solana pisi s odlišnou sekvenciou aminokyselín, ale ktoré majú vynikajúcu stálosť a/alebo účinnosť v systémoch detergentov.

Zhrňujúc, horeuvedené rDNA vektory, schopné riadiť ex-

presiu nukleotidovej sekvencie kódujúcej gén kutinázy v jednom z preferovaných hostiteľov, výhodne obsahujú nasledovné zložky:

- (a) dvojvláknové (ds) DNA, kódujúce zrelú kutinázu alebo prekutinázu alebo zodpovedajúcu prekutinázu, v ktorej sa odstránila najmenej časť pre-sekvencie priamo v smere za sekrečným signálom sa odstránila (uprednostnené pre vybranú hostovskú bunku). V prípadoch, keď časť génu, ktorý má byť presunutý, nezačína kodónom ATG, musí sa na čelo ATG kodón vložiť. Posunutá časť génu musí vždy končiť vhodným zastavovacím (stop) kodónom;
- (b) Regulón expresie (vhodný pre vybraný hostiteľský organizmus), situovaný protismerne k plus vláknu ds DNA, kódujúcej kutinázu (zložka (a));
- (c) Terminátorová sekvencia (vhodná pre vybraný hostiteľský organizmus), situovaná v smere plus vlákna ds DNA, kódujúcej kutinázu (zložka (a));
- (d1) Nukleotidové sekvencie, umožňujúce integráciu ds DNA do do genómu vybraného hostiteľa, alebo
- (d2) zdroj replikácie, vhodný pre vybraného hostiteľa;
- (e1) Voliteľne (auxotrofný) výberový značkovač (marker). Auxotrofný značkovač môže obsahovať kódovaciu oblasť auxotrofného značkovača a neúplný promótor;
- (e2) prípadne ds DNA sekvenciu, kódujúcu proteíny pri kultivácii a/alebo sekrécii jednej z prekurzorových foriem kutinázy vo vybranom hostiteľovi.

Protismerne a/alebo v smere polynukleotidu, ako bol skôr definovaný, môže uvedený rDNA vektor tiež niesť ďalšie sekvencie, ktoré uľahčujú funkčnú expresiu kutinázy. Uvedený auxotrofný značkovač môže pozostávať z kódujúcej oblasti auxotrofného značkovača a z oblasti neúplného promótora.

Iný príklad tohto vynálezu je fermentačná produkcia jedného z variantov kutinázy, opísaných hore. Fermentácia môže byť alebo bežná násadová fermentácia, viacdávková násadová fermentácia alebo kontinuálna fermentácia. Výber použitého spôsobu závisí od hostiteľského kmeňa a od zvýhodneného súprudeho spôsobu výroby (známeho ako *per se*). Vynález tak

predkladá tiež spôsob na prípravu variantu kutinázy, ako je špecifikovaný na inom mieste. Postup pozostáva zo stupňov fermentatívnej kultivácie mikroorganizmu s modifikovanou rDNA, obsahujúceho gén vytvorený rDNA technikou, ktorý nesie najmenej jednu mutáciu, ovplyvňujúcu sekvenciu aminokyselín kutinázy, pričom prepožičiava kutináze zlepšenú účinnosť v porovnaní so zodpovedajúcim zdrojovým enzýmom, ďalej spôsob pozostáva z prípravy variantu kutinázy odseparovaním mikroorganizmom pripravenej kutinázy z fermentačného bujónu, alebo oddelením buniek mikroorganizmu z uvedeného fermentačného bujónu, z desintegrácie oddelených buniek a zo skoncentrovania alebo čiastočného čistenia variantu kutinázy z uvedeného bujónu alebo z uvedených buniek, pomocou fyzikálnych alebo chemických spôsobov koncentrácie a čistenia. Výhodne sa zvolia podmienky tak, že variant kutinázy je vylučovaný mikroorganizmom do fermentačného bujónu, enzým sa získa z bujónu po odstránení buniek, alebo filtráciou, alebo odstredením. Voliteľne sa potom variant kutinázy môže skoncentrovať a čistiť do vyžadovaného stupňa. Vlastné fermentačné spôsoby, bez ohľadu na špecifický druh mikroorganizmov, môžu byť založené na známych fermentačných technikách a bežne používanej fermentácii a na súprudných výrobných zariadeniach.

Vynálezom sa tiež predkladá spôsob prípravy modifikovaného mikroorganizmu, schopného produkcie variantu kutinázy technikami rDNA, ktorého podstatou je, že génové kódovanie variantu kutinázy, ktoré je vkladané do mikroorganizmu, je spojené fúziou v jeho 5'- konci ku génovému fragmentu kódujúceму (modifikovaný) pre-sekvenčný funkcionál ako signálnu alebo sekrečnú sekvenciu hostiteľského organizmu.

V ďalšom aspekte vynález predkladá rDNA modifikovaný mikroorganizmus, obsahujúci gén variantu kutinázy, a schopný produkovať variant kutinázy kódovaný uvedeným génom. V rDNA modifikovanom mikroorganizme je výhodne odstránený gén (ak je pôvodne prítomný), kódujúci prírodnú kutinázu, napríklad nahradením iným štruktúrnym génom.

Podľa ďalšieho aspektu tohto vynálezu sa predkladajú

zloženia enzymatického detergenta, pozostávajúceho z variant kutinázy podľa vynálezu. Tieto zloženia sú kombinácie variant kutinázy a ďalších prísad, ktoré sú bežne používané do systémov detergentov, vrátane aditív do kompozícií detergentov, a celkom vyformulované detergentné a čistiace kompozície, napríklad druhov známych ako *per se* a opísaných napríklad v EP-A- 258 068.

Ďalšie zložky týchto detergentných kompozícií môžu byť ktoréhokoľvek zo známych druhov, napríklad také, aké sú opísané v GB - 1 372 034 (Unilever), US - A 3 950 277, US - A 4 011 169, EP - A 179 533 (Procter & Gamble), EP - A 205 208 a EP - A - 206 390 (Unilever), JP - A - 63-078 000 (1988), a zverejnenie výskumu 29056 z júna 1988, spolu s každou z viacerých špecifikácií v nich uvedenými, ktoré sú tu všetky zahrnuté odkazmi.

Varianty kutinázy podľa tohto vynálezu môžu byť užitočne zahrnuté do kompozícií detergentov, formulovaných v akejkoľvek vhodnej forme, t. zn. v granulovanej forme, roztoku alebo suspenzie enzýmu, alebo na nosnom materiáli (napríklad ako je v EP - A - 258 068 a výrobky spoločnosti Novo Nordisk Savinase(TM) a Lipolase(TM)).

Pridané množstvo variantu kutinázy sa môže zvoliť v širokom rozmedzí, napríklad od 10 až 20 000 LU na gram, a výhodne 50 až 2 000 LU na gram kompozície detergenta. V tomto označovaní LU znamená lipázové jednotky, ktoré sú definované rovnako ako v EP - A - 258 068 (Novo Nordisk).

Podobné úvahy možno použiť *mutatis mutandis* v prípade ďalších enzýmov, ako sú proteázy, amylázy, celulózy, ktoré tiež môžu byť prítomné. Môžu sa dosiahnuť také výhodné kompozície detergentov, v ktorých je prítomná proteáza spolu s variantom kutinázy, kde proteáza je vybraná z proteáz, ktoré majú pI nižšie ako 10. EP - A - 271 154 (Unilever) opisuje väčší počet takýchto proteáz. Proteázy na spoločné použitie s variantmi kutinázy môžu zahŕňať subtilizín napríklad BPN typu, alebo mnohé iné typy subtilizínu, zverejnené v literatúre, napríklad mutantné proteázy, ktoré sa opisujú napríklad v EP - A 130 756 alebo EP - A - 251 446

( oba Genetech), US - A - 4 760 025 (Genecor), EP - A - 214 435 (Henkel), WO - A - 87/04661 (Amgen), WO - A - 87/05 050 (Genex), Thomas et al. J. Mol. Biol. (1987) 193, 803 - 813, Russel et al. Nature (1987) 328, 496 - 500.

Vynález bude v ďalšom objasnený nasledujúcimi príkladmi. Všetky použité manipulačné techniky a analýzy materiálov nukleotidových kyselín sa vykonali v zásade podľa opisu v Sambrook et al. (1989), s vynímkou prípadov, kde je uvedené inak.

### Prehľad obrázkov na výkresoch

V sprievodných výkresoch je na:

obrázku 1A. Nukleotidová sekvencia kazety 1 syntetického kutinázového génu z Fusarium solani pisi a výstavbových oligonukleotidov. V kazetovej sekvencii sú vyznačené oligonukleotidové prechody. Malé písmená sa vzťahujú na vonkajšie nukleotidové polohy.

Obrázok 1B: Nukleotidová sekvencie kazety 2 syntetického kutinázového génu z Fusarium solani pisi a výstavbových oligonukleotidov. V kazetovej sekvencii sú vyznačené oligonukleotidové prechody.

Obrázok 1C: Nukleotidová sekvencia kazety 3 syntetického kutinázového génu z Fusarium solani pisi a výstavbových oligonukleotidov. V kazetovej sekvencii sú vyznačené oligonukleotidové prechody. Malé písmená sa vzťahujú na vonkajšie nukleotidové polohy.

Obrázok 1D: Nukleotidová sekvencia syntetického kutinázového génu, kódujúceho pre-pro-kutinázu Fusarium solani pisi. Je vyznačená kutinázová pre-sekvencia, pro-sekvencia a zrelá sekvencia. Malé písmená sa vzťahujú na vonkajšie nukleotidové polohy.

Obrázok 2: Nukleotidová sekvencia syntetického DNA fragmentu na spájanie kódovanej sekvencie pro-kutinázy Fusarium solani pisi k sekvencii kódovanej derivátom pre-sekvencie E. coli phoA. Sú vyznačené väzbové miesto (RBS) ribozómu a miesta restriktčného enzýmu, použité na klo-

novanie. Tiež sú znázornené sekvencie aminokyselín kódovanej phoA signálnej sekvencie a časť kutinázového génu s použitím jednopísmenového kódu.

Obrázok 3: Nukleotidová sekvencia kazety 8, SacI - BclI fragment, ktorý kóduje miesto fúzie kódujúcich sekvencií pre-sekvencie invertázy a zrelej kutinázy Fusarium solani pisi.

Obrázok 4: Plazmid pUR2741, získaný vynechaním 0,2 kb SalI - NruI z pUR2740, je kyvadlový vektor z E. coli-S.cerevisiae, obsahujúci časť z pBR322, východisko replikácie v kvasinkových bunkách, odvodenú od 2  $\mu$ m plazmidu, ďalej obsahuje kvasinkový leu2D gén a fúziu kódovej oblasti signálnej sekvencie kvasinkovej invertázy s rastlinným génom  $\alpha$ -galaktozidázy, ovládanej kvasinkovým promótorom gal7.

Obrázok 5: Plazmid pUR7219 je kyvadlový vektor z E. coli - S.cerevisiae, obsahujúci časť z pBR322, východisko replikácie v kvasinkových bunkách, odvodenú od 2  $\mu$ m plazmidu, ďalej obsahuje kvasinkový leu2D gén a fúziu kódovej oblasti signálnej sekvencie kvasinkovej invertázy s oblasťou kódovanou zdrojovou kutinázou z Fusarium solani pisi, ovládanou kvasinkovým promótorom gal7.

Obrázok 6: Plazmid pUR2740 je kyvadlový vektor z E. coli - S. cerevisiae, obsahujúci časť z pBR322, východisko replikácie v kvasinkových bunkách, odvodenú od 2  $\mu$ m plazmidu, ďalej obsahuje kvasinkový leu2D gén a fúziu kódovej oblasti signálnej sekvencie kvasinkovej invertázy s rastlinným génom  $\alpha$ -galaktozidázy, ovládanej kvasinkovým promótorom gal7.

Obrázok 7: Nukleotidová sekvencia kaziet 5, 6 a 7, obsahujúcich rôzne typy spojení kódových sekvencií pre-sekvencie ex1A a zrelej kutinázy z Fusarium solani pisi.

Obrázok 8: Plazmid pAW14B, získaný vložením 5,3 kb Sal fragmentu genómickej DNA z Aspergillus niger var. awamori na mieste SalI v pUC19.

Obrázok 9: Plazmid pUR7280, získaný nahradením fragmentu AflIII, obsahujúceho ex1A v pAW14B, s fragmentom BSPHI-AflIII, obsahujúcim pre-pro-kutinázovú kódovú sekvenciu

z Fusarium solani pisi. Plazmid pUR7280 tak obsahuje pre-pro-kutinázový gén z Fusarium solani pisi, ovládaný promótorom a terminátorom z Aspergillus niger var. awamori.

Obrázok 10: Plazmid pUR7281, získaný zavedením výberových značkovačov A. nidulans amdS a Aspergillus niger var. awamori pyrG do pUR7280.

Obrázok 11: Čiastková sekvencia aminokyselín kutináz z Fusarium solani pisi, Colletotrichum capsici, Colletotrichum gloeosporioides a Magnaporthe grisea, znázorňujúca umiestnenie zvyškov v 3 - D štruktúre.

Obrázok 12: Znášateľnosť kutinázy z Fusarium solani pisi a variantov kutinázy v kompozícii detergenta, založenej na LAS.

Obrázok 13: Znášateľnosť kutinázy z Fusarium solani pisi a variantov kutinázy v kompozícii detergenta, založenej na PAS.

Obrázok 14: Znášateľnosť kutinázy z Fusarium solani pisi a variantov kutinázy v kompozícii detergenta, založeného na vysoko neiónogénnom základe.

Obrázok 15: Znášateľnosť kutinázy z Fusarium solani pisi a variantov kutinázy s SDS.

Obrázok 16: Účinok kutinázy z Fusarium solani pisi a variantu kutinázy R17E pri vlastnom praní.

### Príklady uskutočnenia vynálezu

#### Príklad 1

Konstrukcia syntetického génu, kódujúceho pre-pro-kutinázu Fusaria solani pisi.

Syntetický gén, kódujúci pre-pro-kutinázu z Fusarium solani pisi sa pripravil v podstate spôsobom opísaným v EP - A 407 225 (Unilever). Na základe publikovanej nukleotidovej sekvencie génov Fusarium solani pisi (Soliday et al.(1984 a WO-A-90/09446, Plant Genetic systems), sa navrhol celkom syntetický DNA fragment, pozostávajúci z oblasti kódujúcej pre-pro-kutinázové polypeptidy z Fusaria solani pisi. V porovnaní s nukleotidovou sekvenciou pôvodného génu z Fu-

sarium solani pisi, syntetický kutinázový gén obsahuje niekoľko nukleotidových zmien, ktorými sa vkladajú rozoznávacie miesta reštrikčného enzýmu v príhodných polohách génu bez ovplyvnenia kódovanej sekvencie aminokyselín. Nukleotidová sekvencia celkom syntetického kutinázového génu je znázornená na obrázku 1D.

Konštrukcia syntetického kutinázového génu sa uskutočnila zostavením troch oddelených kaziet, počínajúc syntetickými DNA polynukleotidmi. Každá kazeta syntetickej DNA je vybavená miestom EcoRI na začiatku a miestom HindIII na konci. Oligonukleotidy sa syntetizovali s využitím DNA syntetizéra 380A od Applied Biosystems a purifikovali sa pomocou polyakrylamidovej gélovej elektroforézy. Na konštrukciu každej z kaziet sa použil ďalej uvedený spôsob. Zmiešali sa ekvimolové množstvá (50 pmol) oligonukleotidov tvoriacich danú kazetu, fosforylovali sa ich 5'- konce a vykonala sa ligácia štandardným spôsobom. Výsledná zmes dvojvláknových DNA molekúl sa štiepi účinkom EcoRI a HindIII, delí podľa veľkosti pomocou agarózovej gélovej elektroforézy a znova sa získajú z gélu pomocou elektroelúcie. Výsledná syntetická DNA kazeta sa podrobila ligácii s 2,7 kb EcoRI-HindIII fragmentom pUC9 a transformovala sa do Escherichia coli. Na overenie sekvencie syntetických kaziet sa EcoRI-HindIII-vsuvka viacerých klonov celkom sekvenovala v oboch smeroch za použitia vhodných polynukleotidových primérov. Použitím tohto spôsobu sa skonštruovali pUR7207 (obsahujúci kazetu 1, obrázok 1A), pUR7208 (obsahujúci kazetu 2, obrázok 1B) a pUR7209 (obsahujúci kazetu 3, obrázok 1C). Nakoniec sa zostavil syntetický kutinázový gén spojením 2,9 kb EcoRI-ApaI fragmentu z pUR7207 s 0,2 kb ApaI-NheI fragmentom z pUR7208 a s 0,3 kb NheI-HindIII fragmentom z pUR7209, čo poskytlo pUR7210. Tento plazmid obsahuje vzor, kódujúci úplnú pre-pro-kutinázu Fusaria solani pisi (obrázok 1D).

#### Príklad 2

Expresia (pro)kutinázy z Fusaria solani pisi v Escherichia coli.

Pomocou syntetickej kutinázy sa konštruoval expresný vektor pre E. coli, ktorý je funkčne podobný vektoru opísanému v WO-A-90/09446 (Plant Genetic Systems). Konštrukcia vektora bola riešená tak, že časti syntetického génu kódujúceho pro-kutinázu Fusarium solani pisi predchádza vhodný expresný signál E. coli, napríklad (i) indukovateľný promótor, (ii) ribozómové väzbové miesto a (iii) signálna sekvencia, ktorá poskytuje translačný iniciačný kodón a obsahuje informáciu vyžadovanú na export pro-kutinázy cez cytoplazmovú membránu.

Navrhol sa syntetický linker (pozri obrázok 2) na fúziu derivátu phoA signálnej sekvencie E. coli (Michaelis et al., 1983) s pro-sekvenciou syntetického kutinázového génu. Na optimalizáciu štiepenia signálneho peptidu a sekrécie pro-kutinázy sa zmenila nukleotidová sekvencia tohto linkera tak, že tri C-terminálne aminokyselinové zvyšky phoA signálnej sekvencie (Thr-Lys-Ala) sa zmenili na Ala-Asn-Ala, a N-terminálny aminokyselinový zvyšok kutinázovej pro-sekvencie (Leu 1, pozri obrázok 1D) sa zmenil na Ala. Táto konštrukcia zabezpečuje sekréciu kutinázy do periplazmatického priestoru (pozri WO - A - 90/09446, Plant Genetic Systems).

Aby sa získala takáto konštrukcia, odstránil sa 69 bp fragment EcoRI-SpeI, pozostávajúci z kutinázovej pro-kutinázy a častí pro-sekvencie z pUR7210, a nahradili sa syntetickou DNA linkerovou sekvenciou (EcoRI-SpeI fragment), poskytujúcou derivát phoA pre-sekvencie E. coli a zmenený N-terminálny aminokyselinový zvyšok kutinázovej pro-sekvencie (obrázok 2). Výsledný plazmid sa označil pUR7250 a použil sa na izoláciu 0,7 kb fragmentu BamHI-HindIII, obsahujúceho ribozómové väzbové miesto a pro-kutinázovú kódujúcu oblasť fúzovanú k phoA kódujúcej oblasti signálnej sekvencie. Tento fragment sa podrobil ligácii s 8,9 kb BamHI - HindIII fragmentom pMMB67EH (Fürste et al., 1986) na získanie pUR7220. V tomto plazmide je syntetický gén kódujúci pro-kutinázu fúzovaný k pozmenenej verzii phoA signálnej sekvencie a umiestený pod kontrolou indu-

kovateľného tac-promótoru.

Kmeň VK6 E. coli, prechováajúci pUR7220, sa nechal rásť v 2-litrovej nádobe za trepania, obsahujúcej 0,5 litra média IXTB (Tartof a Hobbs, 1988), pozostávajúceho z:

0,017 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

0,017 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$

12 g/l Bakto - tryptónu

24 g/l Bacto-kvasinkového extraktu

0,4 % glycerol (v/v).

Kultúry sa pestovali cez noc pri 25 °C - 30 °C za prítomnosti 100 µg/ml ampicilínu za výdatného pretrepávania (150 ot/min), až sa dosiahla hodnota OD 10 - 12 pri 610 nm. Potom sa pridal IPTG (iozopropyl-β-D-tiogalaktopyranozid) až do konečnej koncentrácie 10 µM a pokračovalo sa v inkubácii ďalších 12 - 16 hodín. Keď sa už nepozoroval nijaký ďalší nárast lipolytickej aktivity, čo sa posudzovalo analýzou vzoriek odoberaných z kultúr, bunky sa oddelili centrifugáciou a resuspendovaním pri 0 °C v pufri. Pufer mal rovnaký objem, ako bol pôvodný objem kultúry, a obsahoval 20 % sacharózy. Bunky sa opäť oddelili centrifugáciou a resuspendovali v ľadovej vode s rovnakým objemom, ako bol objem pôvodnej kultúry, čím nastala lýza buniek osmotickým šokom. Zvyšky buniek sa odstránili odstredením a čistý bunečný extrakt sa okyslil na pH 4,8 kyselinou octovou. Okyslený extrakt sa ponechal cez noc pri 4 °C a odstránil sa vylúčený podiel. V tomto stupni sa z extraktu простého buniek získala pomocou ultrafiltrácie a vymrazovaním čistá, lepšia ako 75 %-ná, kutináza, ktorá bola v podstate bez endogénnych lipáz. Alternatívne sa kutináza môže čistiť na homogénny preparát (t.zn.s čistotou lepšou 95 %) prenesením okysleného extraktu na SP-sephadex, elúciou enzýmu pufrom o pH 8,0, prepustením koncentrovaného alkalizovaného roztoku vhodným objemom DAE-celulózy (Whatman DE-52) a priamym použitím DEAE prietoku na Q-sepharózovom HP (Pharmacia) stĺpci. Elúciou s využitím soľného gradienta sa získal preparát homogénnej kutinázy s typickým celkovým výťažkom lepším ako 75 %.

### Príklad 3

Konštrukcia génov kódujúcich varianty kutinázy Fusarium solani pisi.

Použitím syntetického génu pre-pro-kutinázy Fusaria solani pisi, opísaného v príklade 1, sa konštruovali variantné gény, obsahujúce zmeny v kódovaných sekvenciách aminokyselín. Pri týchto konštrukciách sa v podstate postupovalo rovnako ako v príklade 1 pri konštrukcii troch kaziet úplného syntetického génu. Napríklad sa zostavila nová verzia kazety 1 použitím rovnakých oligonukleotidov (oligos) ako je uvedené v príklade 1, s výnimkou dvoch oligos, ktoré pokrývajú kódujúci triplet v polohe, ktorá sa má podrobiť mutácii. Na miesto nich sa použili dva nové oligos, ktoré obsahovali mutantnú sekvenciu, ale inak boli identické s pôvodnými oligos, ktoré nahradili.

### Príklad 3A

Konštruovalo sa génové kódovanie pre variant R17E kutinázy Fusaria solani pisi použitím variantu kazety 1, zabudovaním variantu CUTI1C IG (obsahujúceho GAG miesto AGA) a variantu CITI1I IG (obsahujúceho CTC miesto TCT) miesto CUTI1C IG a CUTO1I IG (pozri obrázok 1A). Nová kazeta 1 sa klonovala a sekvenovala v podstate tak, ako je opísané v príklade 1 a zamenil sa asi 120 bp DNA fragment EcoRI/NruI, obsahujúci mutáciu R17E za zodpovedajúci fragment v pUR7210, čím sa získal pUR7240(R17E). Z tohto plazmidu sa použil 0,6 kb fragment SpeI-HindIII na náhradu zodpovedajúceho fragmentu v pUR7220, čím sa získal expresný plazmid pUR7222(R17E) E. coli. Tento E. coli expresný plazmid sa transformoval do kmeňa WK6 E. coli. Transformanty sa kultivovali tak, ako je uvedené v príklade 2, a získal sa tak variant pro-kutinázového enzýmu, ktorý sa čistil v podstate rovnakým spôsobom, aký je uvedený v príklade 2. Podobne sa môže nahradiť Arg 17 s Lys alebo s Leu.

### Príklad 3B

Konštruovalo sa génové kódovanie pre variant R196E ku-

tinázy Fusaria solani pisi použitím variantu kazety 3, zabudovaním variantu CUTI3F MH (obsahujúceho GAG miesto CCG) a variantu CUTI3M MH (obsahujúceho CTC miesto CCG) miesto CUTI3F MH a CUTI3M MH (pozri obrázok 3A). Nová kazeta 3 sa klonovala a sekvenovala ako je uvedené v príklade 1 a zamenil sa asi 120 bp DNA fragment EcoRI/NruI, obsahujúci mutáciu R196E za zodpovedajúci fragment v pUR7210, čím sa získal pUR7241(R196E). Z tohto plazmidu sa použil 0,6 kb fragment SpeI-HindIII na náhradu zodpovedajúceho fragmentu v pUR7220, čím sa získal expresný plazmid pUR7225(R196E) E. coli. Tento E. coli expresný plazmid sa transformoval do kmeňa WK6 E. coli. Transformanty sa kultivovali tak, ako je uvedené v príklade 2 a získal sa tak variant pro-kutinázového enzýmu, ktorý sa čistil v podstate rovnakým spôsobom, aký je uvedený v príklade 2. Podobne sa môže nahradiť Arg 196 s Lys (196K) použitím variantu CUTI3F MH (obsahujúci AAG miesto CCG) a variantu CUTI 3M (obsahujúceho CTT miesto CCG) miesto CUTI3F MH a CUTI3M MH. Podobne sa Arg 196 môže nahradiť s Leu (R196L) použitím variantu CUTI3F MH (obsahujúceho CTT miesto CCG) a variantu CUTI3M MH (obsahujúceho AAG miesto CCG) na miesto CUTI3F MH a CUTI3M MH. Rovnaký spôsob sa použil k náhrade Arg 196 s Ala(R196A).

### Príklad 3C

Konstruovalo sa génové kódovanie pre variant L51A kutinázy Fusaria solani pisi použitím variantu kazety 1, zabudovaním variantu CUTI1F IG (obsahujúceho GCT miesto CTC) a variantu CITI1L IG (obsahujúceho AGC miesto GAG) miesto CUTI1F IG a CUTO1L IG (pozri obrázok 1A). Nová kazeta 1 sa klonovala a sekvenovala v podstate tak, ako je opísané v príklade 1 a zamenil sa asi 120 bp DNA fragment EcoRI/NruI, obsahujúci mutáciu L51A za zodpovedajúci fragment v pUR7210, čím sa získal pUR7242 (L51A). Z tohto plazmidu sa použil 0,6 kb fragment SpeI-HindIII na náhradu zodpovedajúceho fragmentu v pUR7220, čím sa získal expresný plazmid pUR7245 (L51A) E. coli. Tento E. coli expresný plazmid sa transformoval do kmeňa WK6 E. coli. Transformanty sa

kultivovali tak, ako je uvedené v príklade 2 a získal sa tak variant pro-kutinázového enzýmu, ktorý sa čistil v podstate rovnakým spôsobom, aký je uvedený v príklade 2. Podobne sa môže nahradiť Leu 51 s Ser.

#### Príklad 3D

Použitím kaziet konštruovaných v príkladoch 3A a 3B sa môže konštruovať variant kutinázy v dvoch modifikáciách. V príklade 3A sa opísala konštrukcia pUR7240 (R17E). V príklade 3B sa opísala konštrukcia DNA fragmentu EagI/HindIII, obsahujúceho mutáciu R196E. Na získanie pUR7243 (R17E+R196E) sa DNA fragment ApaI/HindIII plazmidu pUR7240 nahradil s DNA fragmentom ApaI/HindIII plazmidu pUR7241. Z uvedeného plazmidu pUR7243 (R17E+R196E) sa použil 0,6 kB DNA fragment SpeI-HindIII na náhradu zodpovedajúceho fragmentu v pUR7220, čím sa získal expresný plazmid E. coli pUR7226 (R17E+R196E). Tento expresný plazmid E. coli sa použil na transformáciu do kmeňa VK6 E. coli. Transformanty sa kultivovali rovnakým spôsobom, ako je uvedené v príklade 2 a variant pro-kutinázového enzýmu sa získal a čistil v podstate rovnakým spôsobom, aký je opísaný v príklade 2.

#### Príklad 3E

Použitím kaziet konštruovaných v príkladoch 3A a 3C sa môže konštruovať variant kutinázy v dvoch modifikáciách. V príklade 3A sa opísala konštrukcia pUR7240 (R17E). V príklade 3C sa opísala konštrukcia DNA fragmentu EagI/HindIII, obsahujúceho mutáciu L51A. Na získanie pUR7244 (R17E+L51A) sa DNA fragment ApaI/HindIII plazmidu pUR7240 nahradil s DNA fragmentom ApaI/HindIII plazmidu pUR7241. Z uvedeného plazmidu pUR7244 (R17E+L51A) sa použil 0,6 kB DNA fragment SpeI-HindIII na náhradu zodpovedajúceho fragmentu v pUR7220, čím sa získal expresný plazmid E. coli pUR7246 (R17E+L51A). Tento expresný plazmid E. coli sa použil na transformáciu do kmeňa VK6 E. coli. Transformanty sa kultivovali rovnakým spôsobom, ako je uvedené v príklade 2 a variant pro-kutinázového enzýmu sa získal a čistil v podstate

rovnakým spôsobom, aký je opísaný v príklade 2.

#### Príklad 4

Expresia kutinázy Fusarium solani pisi v Saccharomyces cerevisiae.

Na expresiu syntetického kutinázového génu Fusarium solani pisi v Saccharomyces cerevisiae sa konštruoval expresný vektor, v ktorom pred syntetickým génom kódujúcim zdrojovú kutinázu predchádza pre-sekvencia invertázy Saccharomyces cerevisiae (Taussig a Carlsson, 1983) a silný, indukovateľný gal7 promótor (Nogi a Fukasawa, 1983). Na prípravu syntetického génu kutinázy pre takú fúziu sa syntetizoval adaptorový fragment, v ktorom je fúzovaná kódujúca sekvencia pre invertázovú pre-sekvenciu k sekvencii kódujúcej N-terminál zrelej kutinázy. Tento fragment sa zostavil ako kazeta EcoRI-HindIII v pUC9 v podstate tak, ako sa opisuje v príklade 1 (kazeta 8, pozri obrázok 3), čím sa získal pUR217. Plazmidy pUR7210 a pUR7217 sa transformovali do JM 110 E.coli (kmeň postrádajúci bariéru metylázovej aktivity), a 2,8 kb BclI-HindIII fragment z pUR7217 sa podrobil ligácii s 0,6 kb BclI-HindIII fragmentom z pUR7210, čím sa získal pUR 7218, v ktorom kódujúca nukleotidová sekvencia zdrojového kutinázového polypeptidu je fúzovaná s časťou kódujúcej oblasti pre-sekvencie invertázy Saccharomyces cerevisiae.

Expresný vektor pUR2741 (pozri obrázok 4) sa odvodil z pUR2740 (Verbakel, 1991, pozri obrázok 6) izoláciou 8,9 kb NruI-SalI fragmentu pUR2740, vyplnením SalI vyčnievajúceho konca Klenowovou polymerázou a recirkuláciou uvedeného fragmentu. Na získanie pUR7219 (pozri obrázok 5) sa podrobil ligácii 7,3 kb fragment SacI-HindIII z pUR2741 s 0,7 kb fragmentom SacI-HindIII plazmidu pUR7218. Voliteľne sa môže umiestniť terminátor polII Saccharomyces cerevisiae za kutinázový gén v mieste HindIII, ktoré prázdne nie je užitočné pre účinnú expresiu kutinázového génu. E. coli - Saccharomyces cerevisiae kyvadlový plazmid pUR7219 obsahuje začiatok pre replikáciu v kmeňoch Saccharomyces cerevisiae, uchovávajúcich 2  $\mu$  plazmid ( $cir^+$  kmene), ďalej obsahuje

promótor-deficitnú verziu génu Leu2 Saccharomyces cerevisiae, dovoľujúcu výber vysokého počtu kópií transformantov v kmeňoch leu2<sup>-</sup> Saccharomyces cerevisiae, a syntetický gén kódujúci zrelú časť kutinázy Fusarium solani pisi, vhodne pripojenú k pre-sekvencii invertázy Saccharomyces cerevisiae pod kontrolou silného, indukovateľného gal7 promótoru Saccharomyces cerevisiae.

Ko-transformoval sa kmeň Saccharomyces cerevisiae SU50 /a,cir<sup>0</sup>, leu2, his4, can1), ktorý je identický s kmeňom YT6-2-1L (Erhart a Hollenberg, 1981), s ekvimólovou zmesou 2μ plazmidu Saccharomyces cerevisiae a pUR7219 za použitia štandardného protokolu elektroporácie kvasinkových buniek. Transformanty sa selektovali podľa leucínovej prototrófie a úplná DNA sa izolovala z väčšieho počtu transformantov. Všetky transformanty, u ktorých sa zistil obsah aj 2μ plazmidu aj pUR7219, tak dokladujú, že promótorovo-deficitná verzia leu2 génu, obsiahnutá na pUR7219, môže funkčne dopĺňať leu2 deficitné kmene v dôsledku súčasnej prítomnosti 2μ kvasinkového plazmidu, len ak je prítomná v značnom počte kópií. Jeden z transformantov bol spracovaný na pUR2719 plazmid kultiváciou na úplnom médiu na viac ako 40 generácií a následnou replikáciou na selektívnom a úplnom tuhom médiu sa získal kmeň SU51 (a, cir<sup>+</sup>, leu2, his4, can1) Saccharomyces cerevisiae.

Kmeň SU51 Saccharomyces cerevisiae uchovávajúcí pUR7219 sa kultivoval v 1 litrovej trepačke, obsahujúcej 0,2 litra MM média, pozostávajúceho z:

|                                 |         |
|---------------------------------|---------|
| -kvasinková dusíková báza (YNB) |         |
| bez aminokyselín                | 6,7 g/l |
| -histidín                       | 20 g/l  |
| -glukóza                        | 20 g/l  |

Kultúry sa pestovali cez noc pri 30 °C za silného pretrepávania (150 ot/min) až sa dosiahla OD hodnota 2 až 4 pri 610 nm. Bunky sa oddelili centrifugáciou a resuspendovaním do 1 litra média YPGAL, obsahujúceho:

|                     |        |
|---------------------|--------|
| -kvasinkový extrakt | 10 g/l |
| -bakto-peptón       | 20 g/l |
| -galaktóza          | 50 g/l |

v 2 litrovej nádobe a inkubácia pokračovala ďalších 12 až 16 hodín. V pravidelných intervaloch sa odoberali vzorky kultúry a biomasa sa z nich oddelila centrifugovaním. Supernatant sa analyzoval na aktivitu kutinázy automatickým titračným zariadením za použitia olivového oleja ako substrátu. Vždy 100 až 200  $\mu$ l každej vzorky sa za neustáleho miešania pridalo k 5,0 ml substrátu lipázy (Sigma, obsahujúceho olivový olej ako substrát pre lipázu) a 25,0 ml pufru (5 mM Tris.HCl pH 9,0, 40 mM HCl, 20 mM  $\text{CaCl}_2$ ). Skúška sa vykonala pri 30 °C a uvoľnené mastné kyseliny sa stanovili automatickou titráciou s 0,05 M NaOH na pH 9,0 za použitia titrátora Mettler DL25. Získala sa krivka množstva titranta v závislosti od času. Hodnota lipázovej účinnosti vzorky sa vypočítala z najväčšieho sklonu uvedenej krivky. Jedna jednotka enzymatickej aktivity je definovaná ako množstvo enzýmu, ktoré uvoľní 1  $\mu$ mol mastnej kyseliny z olivového oleja za jednu minútu v hore uvedených podmienkach. Odborníkom v danej oblasti sú tieto stanovenia známe.

Keď sa už kutinázová aktivita ďalej nezvyšuje, odstránia sa bunky centrifugáciou a číry bunečný extrakt sa okyslí na pH 4,8 kyselinou octovou. Kutináza sa získa spôsobom, aký je opísaný v príklade 1.

#### Príklad 5

Expresia variantov kutinázy Fusarium solani pisi v Saccharomyces cerevisiae.

Na získanie pUR7229 (R196E) sa použil 0,5 kb ApaI-HindIII fragment z pUR7241 (R196E) ako náhrada za analogický fragment v pUR7218. V uvedenom PUR7229 (R196E) je gén, ktorý je nositeľom mutácie, vhodne fúzovaný k sekvencii kódujúcej signálnu sekvenciu Saccharomyces cerevisiae. 7,0 kb fragment SacI-HindIII z pUR2741 sa podrobil ligácii s 0,7 kb SacI-HindIII fragmentom z pUR7229 (R196E), čím sa získal pUR7235 (R196E). Tento plazmid sa použil na transfor-

máciu do kmeňa SU51 Saccharomyces cerevisiae. Výsledné transformanty sa inkubovali spôsobom, aký je uvedený v príklade 4 a vytvorený variantný enzým sa z kultivačného prostredia získal spôsobom, aký je uvedený v príkladoch 1 a 4.

#### Príklad 6

Expresia kutinázy Fusaria solani pisi v Aspergilli.

Na expresiu syntetického kutinázového génu Fusarium solani pisi v Aspergillus niger var. awamori sa skonštruoval expresný vektor, v ktorom sa umiestil syntetický gén, kódujúci Fusarium solani pisi pre-pro-kutinázu. Umiestenie sa vykonalo pod kontrolou indukovateľného exlA promótoru Aspergillus niger var. awamori (Maat et al., 1992, Graaf et al., 1992)

Konštrukcia expresného plazmidu pre-pro-kutinázy (pUR7280) vychádzala z plazmidu pAW14B, ktorý bol uložený v kmeni JM109 E. coli z "Centraabureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands, pod číslom CBS 237.90 z 31.mája 1990, a obsahuje asi 5,3 kb SalI fragmentu, na ktorý je umiestený 0,7 kb enoxylanázový gén (exlA) spolu s 2,5 kb 5 - bočnými sekvenciami a 2,0 kb 3 - bočnými sekvenciami (obrázok 8). V pAW14B bola kódujúca oblasť exlA nahradená oblasťou kódujúcou pre-pro-kutinázu. Konštrukciu pUR7280 usnadňuje BspHI miesto (5'-TCATGA-3'), pozostávajúce z prvého kodónu (ATG) exl1A génu a AflII miesto (5'-CTTAAG-3'), pozostávajúce zo stop-kodónu (TAA) exlA génu.

Konštrukcia sa vykubala nasledovne: pAW14B (7,9 kb) sa čiastočne strihol s BspHI a linearizovaný plazmid sa izoloval z agarózového gélu. Potom sa izolovaný 7,9 kb fragment strihol s BsmI. Toto strihnutie nastáva niekoľko nukleotidov nižšie v smere od BspHI miesta a slúži na odstránenie plazmidov, linearizovaných na ďalších BspHI miestach. Fragmenty sa oddelili na agarózovom géle a izoloval sa 7,9 kb fragment BspHI-BsmI. Tento bol čiastočne strihnutý s AflII a izoloval sa výsledný 7,2 kb BsfHI-AflII fragment.

0,7 kb BsfHI-AflII fragment z pUR7210, obsahujúci úplný

vzor kódujúci pre-pro-kutinázu Fusarium solani pisi, sa podrobil ligácii s 7,2 kb BspHI-AflII fragmentom plazmidu pAW14B, čím sa získal pUR7280. Skonštruovaný vektor (pUR7280) sa môže potom preniesť (napríklad do Aspergillus niger, Aspergillus niger var. awamori a pod.) spôsobom bežných ko-transformačných techník a gén pre-pro-kutinázy sa potom môže exprimovať cestou indukcie promótora endoxylanázy II. Skonštruovaný rDNA vektor sa môže vybaviť tiež konvenčnými výberovými značkovačmi (napríklad *amdS* alebo *pyrG*, hygromycín a pod.) a hostiteľ sa môže transformovať výsledným vektorom rDNA tak, aby produkoval vyžadovaný proteín. Príkladom môže byť zavedenie výberových značkovačov *amdS* a *pyrG* do expresného vektora, poskytujúceho pUR7281 (obrázok 10). Na tento účel sa vytvorí miesto NotI premenením EcoRI miesta (prítomného 1,2 kb proti smeru ATG kodónu génu pre-pro-kutinázy) na NotI miesto, použitím syntetického oligonukleotidu (5'-AATTGCGGCCGC-3') za vzniku pUR7282. Vhodný DNA fragment, obsahujúci úplný gén *A.nidulans amdS* a *pyrG* gén Aspergillus niger var. awamori spolu s ich vlastnými promótormi a terminátormi, sa vybavil bočnými NotI miestami, na ktoré sa zaviedol pUR7282, čím sa získal pUR7281 (obrázok 10).

Ako alternatívny prístup expresie syntetického génu kutinázy Fusarium solani pisi v Aspergillus niger var. awamori sa skonštruovali expresné vektory, v ktorých syntetický gén, kódujúci zdrojovú kutinázu nieje predchádzaný jeho vlastnou pre-pro-sekvenciou, ale pre-sekvenciou Aspergillus niger var. awamori *exlA*.

Aby sa pripravil syntetický kutinázový gén pre takúto fúziu, syntetizovalo sa niekoľko adaptorových fragmentov, v ktorých kódujúca sekvencia *exlA* pre-sekvencie je pripojená rôznym spôsobom k sekvencii kódujúcej N-zakončenie zrelej kutinázy. Toto spojenie sa vykoná v kazete 5 fúziou pre-sekvencie *exlA* k pro-sekvencii kutinázy. V kazete 6 sa fúzuje pre-sekvencia *exlA* k N-terminálovému zvyšku zrelej kutinázy. Kazeta 7 je identická s kazetou 6, ale v nej sa zmenilo uvedené N-zakončenie zvyšku polypeptidu, kódovaného

v zdrojovú kutinázou, z pôvodného glycínového zvyšku na serínový zvyšok, aby sa lepšie splnili požiadavky na štiepenie signálneho peptidu. Kazety 5, 6 a 7 sa zostavili zo syntetických oligonukleotidov v podstate tak, ako sa opisuje v príklade 1 (pozri obrázok 7). Kazeta 5 sa použila na vytesnenie 0,1 kb EcoRI-SpeI fragmentu z pUR7210, čím vznikne pUR7287. Kazety 6 a 7 sa využili na vytesnenie 0,1 kb EcoRI-BclI fragmentu z pUR7210, čím sa získali pUR7288 a pUR7289. V každom z plazmidov pUR7287, pUR7288 a pUR7289 sa 0,7 kb fragmenty BspHI-AflII podrobili ligácii s 7,2 kb BspHI-AflII fragmentmi z pAW14B, čím sa získali pUR 7290, pUR7291 a pUR7292.

Skonštruované vektory rDNA sa potom preniesli na plesieň (Aspergillus niger, Aspergillus niger var. awamori) spôsobom bežnej ko-transformačnej techniky a pre-(pro)-kutinázový gén sa exprimoval cestou indukcie promotora enodxylanázy II. Skonštruované rDNA vektory môžu byť tiež vybavené bežnými výberovými značkovačmi (napríklad amdS alebo pyrG, hygromycín) a plesieň sa môže transformovať výsledným rDNA vektorom, aby produkovala vyžadovaný proteín, ako je znázornené v tomto príklade pre pUR7280 (pozri vyššie).

Kmene Aspergillus, transformované alebo s expresnými vektormi pUR7280, pUR7281, pUR7290, pUR7291 a pUR7292 (obsahujúce zdrojovú kutinázovú kódujúcu oblasť Fusarium solani pisi s, alebo bez zodpovedajúcej pro-sekvencie, alebo kutinázovú signálnu sekvenciu, alebo exlA signálnu sekvenciu pod kontrolou exlA promotora a terminátora z Aspergillus niger var. awamori) sa kultivovali v nasledujúcich podmienkach: 1-litrové trepacie nádoby so 400 ml syntetického média (pH 6,5) sa očkovali s spórmi (konečná koncentrácia 10E6/ml). Médium malo nasledovné zloženie (AW médium):

|                                       |          |
|---------------------------------------|----------|
| sacharóza                             | 10 g/l   |
| NaNO <sub>3</sub>                     | 6,0 g/l  |
| KCl                                   | 0,52 g/l |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>       | 1,52 g/l |
| MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O | 0,49 g/l |

|                                                      |          |
|------------------------------------------------------|----------|
| Kvasinkový extrakt                                   | 1,0 g/l  |
| ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                 | 22 mg/l  |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                       | 11 mg/l  |
| MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O                 | 5 mg/l   |
| FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                 | 5 mg/l   |
| CaCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O                 | 1,7 mg/l |
| CuSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O                  | 1,6 mg/l |
| NaH <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 1,5 mg/l |
| Na <sub>2</sub> EDTA                                 | 50 mg/l  |

Inkubovalo sa 24 hodín pri 30 °C pri 200 ot/min v Mk X inkubátorovej trepačke. Po kultivácii sa bunky oddelili filtráciou (0,45 µm filter), dvarazy premyli s AW médiom bez sacharózy a kvasinkového extraktu (solný roztok), resuspendovali v 50 ml solného roztoku a preniesli do 300 ml trepačkovej nádoby, obsahujúcej 50 ml solného roztoku ku ktorému sa pridala xylóza do konečnej koncentrácie 10 g/l (indukčné médium). Inkubácia pokračovala cez noc pri rovnakých podmienkach, ako sú opísané hore. Výsledné kultúry sa filtrovali miratkaninou na odstránenie biomasy a kutináza sa získala v podstate rovnakým spôsobom, ako je opísané v príklade 2.

#### Príklad 7

Expresia variantov kutinázy Fusarium solani pisi v *Aspergilli*.

Použitím v podstate zhodného spôsobu ako v príklade 6, ale teraz s použitím plazmidu pUR7240 (R17E) alebo pUR7241 (R196E), alebo pUR7242 (L51A) miesto pUR7210 na koštrukciu fungálneho expresného vektora, sa pripravili v Aspergillus niger var. awamori varianty kutinázy Fusarium solani pisi, pozostávajúce z hore uvedených mutácií.

#### Príklad 8

Identifikácia a izolácia génov príbuzných k génu kutinázy Fusarium solani pisi.

Gény kódujúce kutinázy s rôznym stupňom homológie s Fusarium solani pisi sa izolovali z rôznych húb. Fungálne kul-

túry sa pestovali v 500 ml trepačkách, obsahujúcich 200 ml média, opísaného Hankinom a Kolakuttudyom (1968) a doplneného s 0,25 % glukózy. Inkubovali sa 4 dni pri 28 °C v inkubačnej Mk X trepačke (100 ot/min). V tomto čase sa glukóza spotrebovala a produkcia kutinázy sa indukovala prídavkom kutínového hydrolyzátu, opísaného Ettingerom et al. (1987). V pravidelných intervaloch sa odoberali vzorky kultúry a hodnotila sa lipolytická účinnosť štandardným spôsobom (pozri príklad 4). Bežne po asi dvoch dňoch po indukcii sa objavila lipolytická aktivita a v tom čase sa bunky oddelili filtráciou bežným spôsobom. Mycélia sa premyli, zmrazili v tekutom dusíku a lyofilizovali bežným spôsobom. Bunkové RNA preparáty sa izolovali použitím guanidíntiokyanátového spôsobu a čistili sa centrifugáciou v gradiente hustoty roztoku chloridu cézneho, v podstate rovnako, ako opísal Sambrook et al. (1989). Izolovali sa polyA(+) mRNA frakcie použitím polyATtract mRNA izolačnej súpravy (Promga). PolyA(+) mRNA frakcie sa použili pri Southernovej hybridizačnej analýze bežnou technikou s použitím cDNA fragmentu z génu kutinázy Fusarium solani pisi ako porovnávacieho materiálu na overenie expresie kutinázy podobných génov. Na syntézu cDNA sa použili preparáty mRNA, pozostávajúce z materiálu, schopného hybridizácie porovnávacím materiálom, za použitia ZAP cDNA syntéznej súpravy (Stratagene, La Jolla) a spôsobu podľa pokynov dodávateľa, čím sa získali cDNA fragmenty s XhoI kohéznym koncom, odbočujúcim z poly-A oblasti a s EcoRI adaptorom na druhom konci. Získané cDNA fragmenty sa použili na konštrukciu expresných knižníc smerovým klonovaním v zmysle orientácie do lambda ZAPII vektorov (Stratagene, La Jolla), umožňujúcich expresiu  $\beta$ -galaktozidázou fúzovaných proteínov (Huse et al., 1988). Tieto knižnice sa triedili za použitia antiséra proti kutináze Fusarium solani pisi.

Alternatívne sa syntetizované cDNA frakcie podrobili PCR-screeningu za použitia kutinázových špecifických primérov (pozri tabuľku 2). Tieto priméry sa odvodili z porovnania aminokyselinovej sekvencie niekoľkých fungálnych kutiná-

zových génov (Ettinger et al., 1987). Podmienky na PCR reakciu sa optimalizovali pre každú skupinu primérov za použitia cDNA kutinázy z Fusarium solani pisi ako kontrolnej vzorky. V takých preparátoch cDNA, s ktorými sa môže generovať špecifický PCR fragment s dĺžkou podobnou (alebo väčšou) dĺžke PCR fragmentu vznikajúceho z cDNA kutinázy z Fusarium solani pisi za rovnakých podmienok, sa PCR fragment čistil gélovou elektroforézou a izoloval sa z gélu.

Ako alternatívny prístup sa technika PCR-screeningu za použitia kutinázových špecifických primérov použila tiež priamo na genomickú DNA niektorých fungálnych kmeňov s použitím genomickej DNA z Fusarium solani pisi ako pozitívnej kontrolnej vzorky. V tých preparátoch fungálnej genomickej DNA, s ktorými môže vznikať špecifický PCR fragment s dĺžkou podobnou (alebo väčšou) ako dĺžka PCR fragmentu vznikajúceho za rovnakých podmienok z cDNA kutinázy Fusarium solani pisi, sa PCR fragment čistil gélovou elektroforézou a izoloval sa z gélu.

V kmeňoch s pozitívnou reakciou pri uvedenej skúške či spôsobom s prístupom expresnej knižnice alebo s PCR screeningovým prístupom (alebo s cDNA, alebo s genomickou DNA), ako aj v početných ďalších kmeňoch sa izolovala genomická DNA s vysokou molekulovou hmotnosťou. Kmene sa pestovali v podstate rovnako ako je opísané Ettingerom et al., (1987) a genomická DNA sa izolovala podľa opisu de Graafa et al. (1988). Genomická DNA sa fermentovala s rôznymi restriktívnymi enzýmami a analyzovala Southernovou hybridizáciou za použitia alebo vloženia analogickej cDNA (prístup expresnej knižnice), alebo PCR fragmentu (PCR-screeningový prístup), alebo génu kutinázy z Fusarium solani pisi (ďalšie kmene) ako porovnávacieho materiálu, a potom sa konštruovala fyzikálna mapa kutinázových génov. Vhodný výluh genomickej DNA sa frakcionoval podľa veľkosti gélovou elektroforézou a fragmenty príslušnej veľkosti sa izolovali z gélu a subklonovali sa do pUC19. Tieto genomické knižnice sa triedili vložením zodpovedajúcej cDNA (prístup expresnej knižnice), alebo PCR fragmentu (PCR screeningový prístup), čím sa zís-

kali klony pozostávajúce z genómických kópií kutinázových génov. Tieto gény sa sekvenovali v oboch smeroch. Pomocou sekvenovania zodpovedajúcej cDNA, alebo porovnaním s inými kutinázovými sekvenciami (Ettinger et al., 1987) sa identifikovali intony. N-terminálny koniec zrelého kutinázového polypeptidu bol vydedukovaný tiež týmto porovnávaním. Intro-ny sa odstránili použitím bežnej PCR techniky a bezprostredne pod vzormi sa vybuďovalo HindIII. Kódujúca sekvencia pre pre-sekvenciu ivertázového génu (predchodcom je SacI miesto, porovnaj s kazetou 8, obrázok 3) Saccharomyces cerevisiae sa fúziou pripojila k sekvenciám kódujúcim N-koncový člen zre-lych kutináz. Získané SacI-HindIII fragmenty, obsahujúce ku-  
tinázové gény spojené k sekvencii kódujúcej pre-sekvenciu  
ivertázy S.cerevisiae, sa podrobili ligácii s 7,3 kb  
SacI-HindIII fragmentom plazmidu pUR7241 (pozri obrázok 4)  
a transformovali sa do kmeňa SU51 S.cervisiae. Fungálne ku-  
tinázy sa expimovali a z kultivačného prostredia sa získali  
spôsobom , aký je opísaný v príklade 4.

#### Príklad 9

Znášanlivosť variantov R17E, R196E a R17E+R196E kutinázy Fu-  
sarium solani pisi s rôznymi aniónovými povrchovo aktívnymi  
látkami.

Znášanlivosť variantov R17E, R196E a R17E+R196E kutiná-  
zy Fusarium solani pisi s rôznymi aniónaktívnymi tenzidmi sa  
skúšala nasledovne. Pripravili sa roztoky enzýmu v rôznych  
detergentných prípravkoch. Roztoky sa inkubovali pri 40 °C  
a v určitých intervaloch sa odoberali vzorky. V týchto sa  
potom stanovovala aktivita enzýmu spôsobom, opísaným v prík-  
lade 4. Použili sa nasledovné detergentné prípravky A až C:

Prípravok A

| Zlúčenina                         | % (hmotnostné) |
|-----------------------------------|----------------|
| Lineárny alkylbezénsulfonát sodný | 11,7           |
| Neiónogénny saponát 7EO           | 5,8            |
| Neiónogénny saponát 3EO           | 3,2            |
| Zeolit                            | 38,8           |
| Sokolan CP7                       | 4,8            |
| Sodná soľ CMC                     | 0,8            |
| Uhličitan sodný                   | 13,9           |
| Perboritan sodný                  | 8,0            |
| TAED                              | 5,4            |
| Kremičitan sodný                  | 2,5            |

Prípravok B

| Zlúčenina                 | % (hmotnostné) |
|---------------------------|----------------|
| Primárny alkylsíran sodný | 6,5            |
| Neiónogenný saponát 7EO   | 6,5            |
| Neiónogénny saponát 3EO   | 8,3            |
| Mydlo                     | 2,3            |
| Zeolit                    | 38,0           |
| Uhličitan sodný           | 15,9           |
| Perboritan sodný          | 8,0            |
| TAED                      | 5,4            |
| Kremičitan sodný          | 2,5            |

### Prípravok C

| Zlúčenina                          | % (hmotnostné) |
|------------------------------------|----------------|
| Lineárny alkylbenzénsulfonát sodný | 6,9            |
| Neiónogénny saponát                | 10,0           |
| Mydlo                              | 2,0            |
| Zeolit                             | 27,0           |
| Uhličitan sodný                    | 10,2           |

Výsledky pre kompozície A až C sú udané v obrazoch 12 až 14. Z výsledkov vyplýva, že varianty kutinázy sú stabilnejšie najmä v aniónovo bohatej kompozícii A, ako prírodný typ kutinázy z Fusarium solani pisi.

#### Príklad 10

Znášanlivosť variantov 196K a R196L kutinázy z Fusarium solani pisi s dodecylsíranom sodným (SDS).

Znášanlivosť variantov 196K a R196L kutinázy z Fusarium solani pisi s dodecylsíranom sodným (SDS) sa skúšala následovne. Pripravili sa roztoky enzýmov v 0,4 mM SDS a 10 mM Tris pri 0 ° FH tvrdosti vody. Roztoky sa inkubovali pri 40 °C a v určitých intervaloch sa odoberali vzorky na analýzu. Stanovovala sa zvyšková enzýmová aktivita spôsobom, opísaným v príklade 4. Výsledky sú znázornené na obrázku 15. Na obrázku možno vidieť, že oba varianty kutinázy sú stabilnejšie k aniónovej povrchovo aktívnej látke dodecylsíranu sodnému (SDS), ako prírodné typy kutinázy z Fusarium solani pisi.

#### Príklad 11

Stanovenie účinnosti variantu R17E kutinázy z Fusarium solani pisi pri skúške prania.

Skúšobné plátno vyrobené z tkaniny polyester/bavlna sa zamastilo olivovým olejom. Každé skúšobné plátno sa potom inkubovalo v 30 ml pracieho roztoku v 100 ml polystyrénových nádobkách. Nádoby sa miešali v práčke Miele TMT, naplnenej

vodou za použitia normálneho 40 °C hlavného pracieho programu. Prací roztok obsahoval 2 g v litri (pri 27 ° FH francúzske stupne tvrdosti vody ) pracích práškov A alebo B z príkladu 9.

Výsledky sú znázornené na obrázku 16. Z obrázku je zrejmé zvýšenie pracej schopnosti (odstránenie mastnoty) variantu R17E kutinázy v rôznych podmienkách prania v porovnaní s prirodzeným typom kutinázy z Fusarium solani pisi. Pre porovnanie sa vykonali rovnaké skúšky s prípravkom Lipolase (TM). Vo všetkých prípadoch bol lepší kutinázový variant R17E.

## P A T E N T O V É   N Á R O K Y

(nové)

1. Kutinázový variant zdrojovej kutinázy, v ktorom sa modifikovala sekvencia aminokyselín tak, aby sa zvýšila znášanlivosť k aniónovo povrchovo aktívnym látkam zoslabením väzby aniónovej povrchovo aktívnej látky k enzýmu

(a) zmenšením elektrostatickej interakcie medzi aniónaktívnym tenzidom a enzýmom náhradou jedného alebo viacerých kladne nabitých arginínových zvyškov, ktoré sú umiestené v blízkosti hydrofóbnej časti schopnej viazať apolárny koniec aniónaktívneho tenzidu, zvyškami lyzínu, nenabitými aminokyselinovými zvyškami alebo záporne nabitými zvyškami aminokyselín, a/alebo

(b) náhradou jedného alebo viacerých zvyškov aminokyselín, ktoré sú umiestené v hydrofóbnej časti, schopnej viazať apolárny koniec aniónaktívneho tenzidu, menej hydrofóbnymi zvyškami aminokyselín.

2. Variant kutinázy podľa nároku 1, v ktorom menej hydrofóbne zvyšky aminokyselín sú vybrané zo skupiny, pozostávajúcej z glycínu, serínu, alanínu, aspartovej kyseliny a treonínu.

3. Variant kutinázy podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, v ktorom zdrojová kutináza je eukaryotická kutináza.

4. Variant kutinázy podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, v ktorom zdrojový enzým je kutináza, ktorá je imunologicky skrížená s protilátkou proti kutináze z Fusarium solani pisi.

5. Variant kutinázy podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, v ktorom modifikované zvyšky sú umiestené v jednej alebo vo viacerých z ďalej uvedených polôh v sekvencii aminokyselín kutinázy Fusaria solani pisi, alebo v zodpovedajúcich aminokyselinách odlišných kutináz: 17,

51, 78, 80, 88, 96, 156, 195 a 196.

6. Variant kutinázy podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, v ktorom modifikované zvyšky sú umiestené v hydrofóbnej časti okolo aminokyselín 51 a 195 kutinázy Fusaria solani pisi, alebo zodpovedajúcich aminokyselín odlišných kutináz.

7. Variant kutinázy podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, ktorý je variantom kutinázy Magnaporthe grisea a obsahuje jednu alebo viac z nasledovných mutácií: A80D, A88E, R156L.

8. Spôsob prípravy variantu kutinázy podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahrňuje stupeň fermentatívnej kultivácie rDNA modifikovaného mikroorganizmu, obsahujúceho gén pripravený technikou rDNA, ktorý kóduje variant kutinázy, a ďalej stupeň prípravy preparátu variantu kutinázy, oddelením variantu kutinázy, vyprodukovaného mikroorganizmom buď z fermentačného prostredia, alebo oddelením buniek mikroorganizmu z fermentačného média, desintegráciou oddelených buniek a koncentráciou alebo čiastočným čistením kutinázy buď z uvedeného média alebo z uvedených buniek, spôsobmi fyzikálneho alebo chemického skoncentrovania alebo čistenia.

9. rDNA modifikovaný mikroorganizmus, ktorý bol transformovaný rDNA vektorom, nesúcim gén kódujúci variant kutinázy podľa ktoréhokoľvek z prechádzajúcich nárokov 1 až 7 a ktorý je schopný exprimovať uvedený variant kutinázy.

10. rDNA modifikovaný mikroorganizmus podľa nároku 9, nesúci gén kódujúci variant kutinázy, ktorý je vložený do mikroorganizmu fúziou v jeho 5'- konci k fragmentu génu, kódujúceho (modifikovaný) pre-sekvenčný funkcionál ako signálnu alebo sekrečnú sekvenciu pre hostiteľský organizmus.

11. rDNA modifikovaný mikroorganizmus podľa nárokov 9 alebo 10, v ktorom hostiteľský organizmus je eukaryot, napríklad kvasinka rodu Saccharomyces alebo Kluyveromyces alebo rod Hansenula, alebo huba rodu Aspergillus.

12. rDNA modifikovaný mikroorganizmus podľa nárokov 9 až 11, nesúci rekombinatný DNA vektor, kódujúci pre variant kutinázy podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 7, pričom uvedený mikroorganizmus bol vytvorený ako auxotrófny mutant náhradou génu génového kódovania za auxotrófny značkovač v jednej z buniek jeho predkov.

13. Polynukleotid, ktorý má základnú sekvenciu, ktorá kóduje zdrojový kutinázový variant podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 7, v ktorom polynukleotide za koncovým translačným kodónom nasleduje zastavovací (stop) kodón a voliteľne má nukleotidovú sekvenciu, kódujúcu pre pre-sekvenciu tejto kutinázy priamo protismerne nukleotidovej sekvencie, kódujúcej pre zrelý enzým.

14. Polynukleotid, ktorý má základnú sekvenciu ktorá kóduje zdrojový variant kutinázy podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 7, v ktorom polynukleotide za koncovým translačným kodónom nasleduje zastavovací kodón a voliteľne má nukleotidovú sekvenciu, kódujúcu pre najmenej časť zodpovedajúcej pre-sekvencie a/alebo signálnu alebo sekrečnú sekvenciu, vhodné pre vybraný hostiteľský organizmus, priamo protismerne nukleotidovej sekvencie, kódujúcej pre zrelý enzým.

15. Polynukleotid, ktorý má základnú sekvenciu ktorá kóduje zdrojový variant kutinázy podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 7, v ktorom variant kutinázy, kódujúci nukleotidovú sekvenciu, odvodenú z organizmu vzniku, bol modifikovaný tak, že najmenej jeden kodón, a výhodne toľko kodónov koľko je možné, boli podrobené "mlčiacej" mutácii, aby vytvorili kodóny, kódujúce ekvivalentné zvyšky aminokyselín a aby boli preferované novým hostiteľom ako je určené v jednom z náro-

kov 9 až 12, a tým poskytnúť v bunkách takého hostiteľa informačnú RNA na vloženie génu zlepšenej stability.

16. Polynukleotid podľa niektorého z nárokov 13 až 15, v ktorom protismerne nukleotidovým sekvenciám kódujúcim pre pro- alebo zrelý kutinázový variant je umiestená nukleotidová sekvencia, ktorá kóduje pre signálnu alebo sekrečnú sekvenciu hostiteľa, ako je určené v ktoromkoľvek z nárokov 9 až 12.

17. Enzymatická kompozícia detergenta, obsahujúca variant kutinázy podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 7.

Obr. 1A

Syntetické oligonukleotidy použité na skonštruovanie kazety 1.

| KÓD       | dĺžka | 5' <---             | sekvencia               | ---> 3' |
|-----------|-------|---------------------|-------------------------|---------|
| CUTI1A IG | (44)  | aat tcg agc tca tca | TGA AAT TCT TCG CGT     |         |
|           |       | TAA CCA CAC TTC TC  |                         |         |
| CUTI1B IG | (39)  | GCC GCC ACG GCT TCG | GCT CTG CCT ACT AGT     |         |
|           |       | AAC CCT GCT         |                         |         |
| CUTI1C IG | (42)  | CAG GAG CTT GAG GCG | CGC CAG CTT GGT AGA     |         |
|           |       | ACA ACT CGC GAC     |                         |         |
| CUTI1D IG | (39)  | GAT CTG ATC AAC GGC | AAT AGC GCT TCC TGC     |         |
|           |       | GCC GAT GTC         |                         |         |
| CUTI1E IG | (33)  | ATC TTC ATT TAT GCT | CGA GGT TCA ACA GAG     |         |
|           |       | ACG                 |                         |         |
| CUTI1F IG | (28)  | GGC AAC TTG GGA     | ACT CTC GGG CCC AGC A   |         |
| CUTI1G IG | (31)  | GGT TAA CGC GAA     | GAA TTT CAT gat gag ctc |         |
|           |       | g                   |                         |         |
| CUTI1H IG | (39)  | ACT AGT AGG CAG AGC | CGA AGC CGT GGC GGC     |         |
|           |       | GAG AAG TGT         |                         |         |
| CUTI1I IG | (42)  | TGT TCT ACC AAG CTG | GCG CGC CTC AAG CTC     |         |
|           |       | CTG AGC AGG GTT     |                         |         |
| CUTI1J IG | (39)  | GCA GGA AGC GCT     | ATT GCC GTT GAT CAG ATC |         |
|           |       | GTC GCG AGT         |                         |         |
| CUTI1K IG | (33)  | TGA ACC TCG AGC     | ATA AAT GAA GAT GAC ATC |         |
|           |       | GGC                 |                         |         |
| CUTI1L IG | (41)  | AGC TTG CTG GGC     | CCG AGA GTT CCC AAG TTG |         |
|           |       | CCC GTC TCT GT      |                         |         |

|            |            |            |              |             |             |
|------------|------------|------------|--------------|-------------|-------------|
| 10         | 20         | 30         | 40           | 50          | 60          |
| aattcg     | agctcatc   | CAT        | GAAATTCTTC   | GCGTTAACCA  | CACTTCTGCG  |
| gc         | tcgagtag   | TA         | CTTTAAGAAG   | CGCAATTGGT  | GTGAAGAGCG  |
| 70         | 80         | 90         | 100          | 110         | 120         |
| CGCCACGGCT | TCGGCTCTGC | CTACTAGTAA | CCCTGCTCAG   | GAGCTTGAGG  | CGCGCCAGCT  |
| GCGGTGCCGA | AGCCGAGACG | GATGATCA   | TTGGGACGAGTC | CTCGAACTCC  | GCGCGGTCGA  |
| 130        | 140        | 150        | 160          | 170         | 180         |
| TGGTAGAACA | ACTCGCGACG | ATCTGATCAA | CGGCAATAGC   | GCTTCCTGCG  | CCGATGTCTAT |
| ACCATCTTGT | TGAGCGCTGC | TAGACTAGTT | GCCGTTATCG   | CGAAGGACGC  | GGCTACAGTA  |
| 190        | 200        | 210        | 220          | 230         | 240         |
| CTTCATTTAT | GCTCGAGGTT | CAACAGAGAC | GCGCAACTTG   | GGAACCTCTCG | GGCCAGCA    |
| GAAGTAAATA | CGAGCTCCAA | GTGTGCTCTG | CCCGTTGAAC   | CCTTGAGAGC  | CCGGGTCGTT  |

250

CGA

## Obr. 1B

Syntetické oligonukleotidy použité na skonštruovanie kazety 2.

| KÓD       | dĺžka | 5' <---                                 | sekvencia | ---> 3' |
|-----------|-------|-----------------------------------------|-----------|---------|
| CUTI2A MH | (40)  | AAT TCT CGG GCC CAG CAT TGC CTC CAA CCT |           |         |
|           |       | TGA GTC CGC C                           |           |         |
| CUTI2B MH | (36)  | TTC GGC AAG GAC GGT GTC TGG ATT CAG GGC |           |         |
|           |       | GTT GGC                                 |           |         |
| CUTI2C MH | (36)  | GGT GCC TAC CGA GCC ACC CTA GGA GAC AAT |           |         |
|           |       | GCT CTC                                 |           |         |
| CUTI2D MH | (39)  | CCG CGG GGA ACC TCT AGC GCC GCA ATC AGG |           |         |
|           |       | GAG ATG CTA                             |           |         |
| CUTI2E MH | (45)  | GGC CTC TTC CAG CAG GCC AAC ACC AAG TGC |           |         |
|           |       | CCT GAC GCG ACT TTG                     |           |         |
| CUTI2F MH | (46)  | ATC GCC GGT GGC TAC AGC CAG GGT GCT GCA |           |         |
|           |       | CTT GCA GCC GCT AGC A                   |           |         |
| CUTI2G MH | (45)  | CTT GCC GAA GGC GGA CTC AAG GTT GGA GGC |           |         |
|           |       | AAT GCT GGG CCC GAG                     |           |         |
| CUTI2H MH | (36)  | GTA GGC ACC GCC AAC GCC CTG AAT CCA GAC |           |         |
|           |       | ACC GTC                                 |           |         |
| CUTI2I MH | (36)  | TCC CCG CGG GAG AGC ATT GTC TCC TAG GGT |           |         |
|           |       | GGC TCG                                 |           |         |
| CUTI2J MH | (39)  | GAA GAG GCC TAG CAT CTC CCT GAT TGC GGC |           |         |
|           |       | GCT AGA GGT                             |           |         |
| CUTI2K MH | (45)  | ACC GGC GAT CAA AGT CGC GTC AGG GCA CTT |           |         |
|           |       | GGT GTT GGC CTG CTG                     |           |         |
| CUTI2L MH | (41)  | AGC TTG CTA GCG GCT GCA AGT GCA GCA CCC |           |         |
|           |       | TGG CTG TAG CC                          |           |         |

|            |            |            |            |            |            |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 10         | 20         | 30         | 40         | 50         | 60         |
| AATTCTC    | GGGCCAGCA  | TTGCCTCAA  | CCTTGAGTCC | GCCTTCGGCA | AGGACGGTGT |
| GAG        | CCCGGGTCGT | AACGGAGGTT | GGAATCAGG  | CGGAAGCCGT | TCCTGCCACA |
| 70         | 80         | 90         | 100        | 110        | 120        |
| CTGGATTCAG | GGCGTTGGCG | GTGCCTACCG | AGCCACCCTA | GGAGACAATG | CTCTCCCGCG |
| GACCTAAGTC | CCGCAACCGC | CACGGATCGC | TCGGTGGGAT | CCTCTGTTAC | GAGAGGGCGC |
| 130        | 140        | 150        | 160        | 170        | 180        |
| GGGAACCTCT | AGCGCCGCAA | TCAGGGAGAT | GCTAGGCCTC | TTCCAGCAGG | CCAACACCAA |
| CCCTTGGAGA | TCGCGGCGTT | AGTCCCTCTA | CGATCCGGAG | AAGGTCGTCC | GGTTGTGGTT |
| 190        | 200        | 210        | 220        | 230        | 240        |
| GTGCCCTGAC | GCGACTTTGA | TCGCCGGTGG | CTACAGCCAG | GGTGCTGCAC | TTGCAGCCGC |
| CACGGGACTG | CGCTGAAACT | AGCGGCCACC | GATGTCGGTC | CCACGACGTG | AACGTCGGCG |
| 250        |            |            |            |            |            |
| TAGCA      |            |            |            |            |            |
| ATCGTTCGA  |            |            |            |            |            |

Obr. 1C

Syntetické oligonukleotidy použité na skonštruovanie kazety 3.

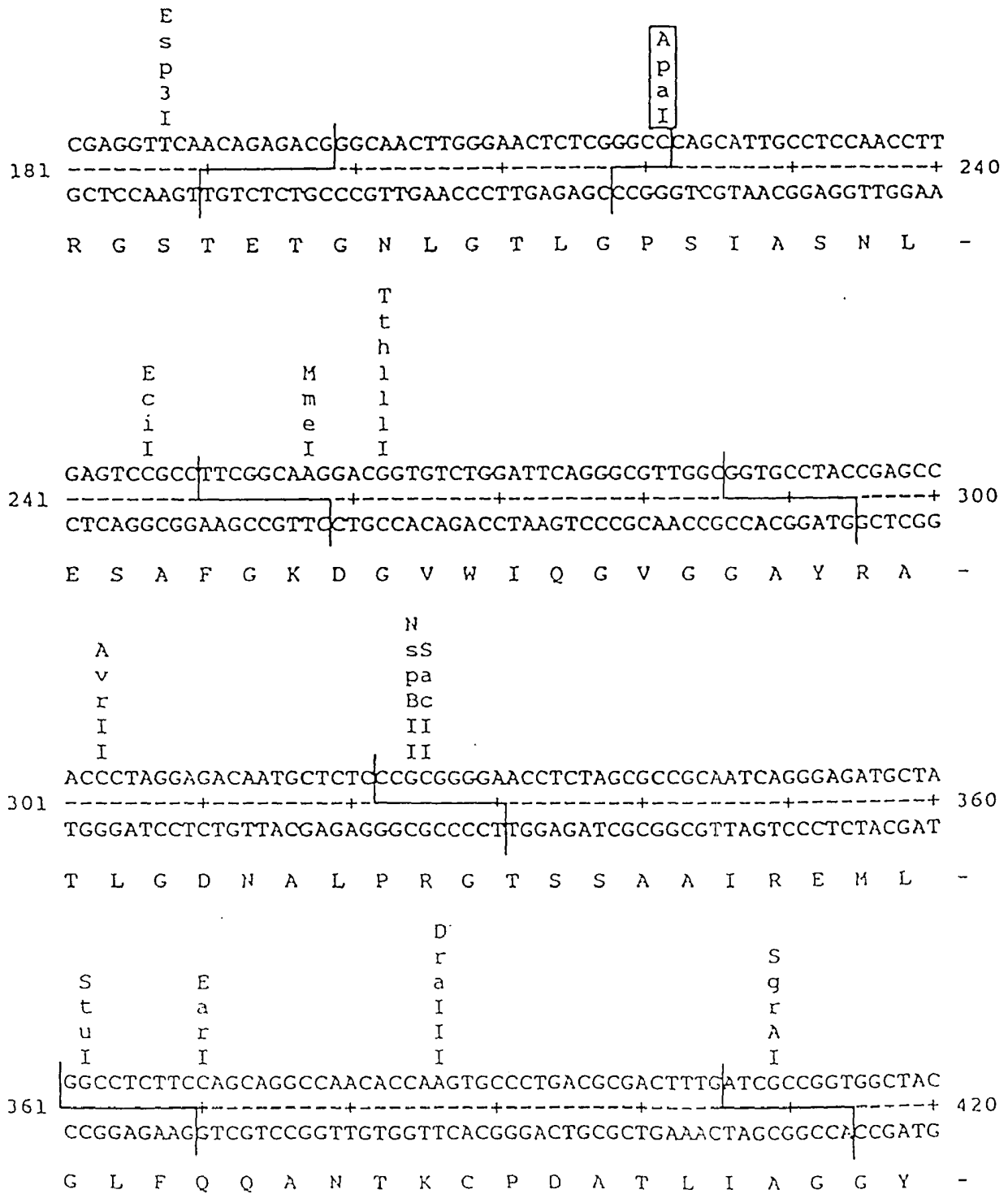
| KÓD     | dĺžka   | 5' <---                                 | sekvencia                   | ---> 3' |
|---------|---------|-----------------------------------------|-----------------------------|---------|
| CUTI3A  | MH (43) | AAT TCC CGC                             | TAG CAT CGA GGA CCT CGA CTC |         |
|         |         | GGC CAT TCG                             | TGA C                       |         |
| CUTI3B  | MH (45) | AAG ATC GCC GGT ACC GTT CTG TTC GGC TAC |                             |         |
|         |         | ACC AAG AAC CTA CAG                     |                             |         |
| CUTI3C1 | MH (42) | AAT CGC GGC CGA ATC CCC AAC TAC CCT GCC |                             |         |
|         |         | GAC AGG ACC AAG                         |                             |         |
| CUTI3D  | MH (42) | GTC TTC TGC AAT ACA GGA GAT CTC GTT TGT |                             |         |
|         |         | ACT GGT AGC TTG                         |                             |         |
| CUTI3E  | MH (39) | ATC GTT GCT GCA CCT CAC TTG GCA TAT GGT |                             |         |
|         |         | CCT GAT GCC                             |                             |         |
| CUTI3F  | MH (33) | CGG GGA CCT GCC CCT GAG TTC CTC ATC GAG |                             |         |
|         |         | AAG                                     |                             |         |
| CUTI3G1 | MH (32) | GTT CGG GCT GTC CGT GGT TCT GCT TGA gct |                             |         |
|         |         | ta                                      |                             |         |
| CUTI3H  | MH (30) | GGC CGA GTC GAG GTC CTC GAT GCT AGC GGC |                             |         |
| CUTI3I  | MH (45) | CTT GGT GTA GCC GAA CAG AAC GGT ACC GGC |                             |         |
|         |         | GAT CTT GTC ACG AAT                     |                             |         |
| CUTI3J1 | MH (42) | GTC GGC AGG GTA GTT GGG GAT TCG GCC GCG |                             |         |
|         |         | ATT CTG TAG GTT                         |                             |         |
| CUTI3K  | MH (42) | AGT ACA AAC GAG ATC TCC TGT ATT GCA GAA |                             |         |
|         |         | GAC CTT GGT CCT                         |                             |         |
| CUTI3L  | MH (39) | ACC ATA TGC CAA GTG AGG TGC AGC AAC GAT |                             |         |
|         |         | CAA GCT ACC                             |                             |         |
| CUTI3M  | MH (33) | GAG GAA CTC AGG GGC AGG TCC CCG GGC ATC |                             |         |
|         |         | AGG                                     |                             |         |
| CUTI3N1 | MH (45) | agc tta agc TCA AGC AGA ACC ACG GAC AGC |                             |         |
|         |         | CCG AAC CTT CTC GAT                     |                             |         |

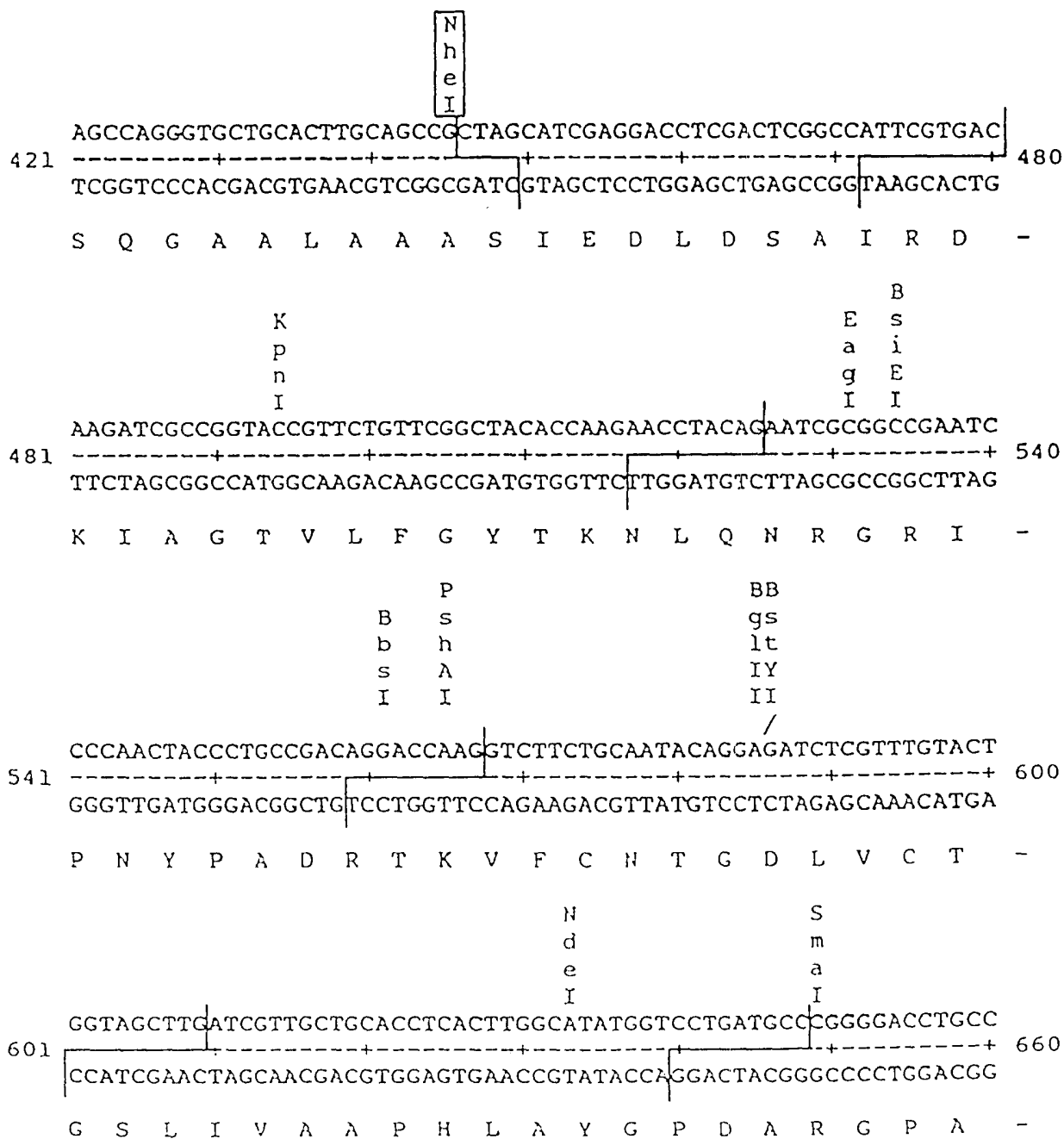
|             |            |            |             |             |            |
|-------------|------------|------------|-------------|-------------|------------|
| 10          | 20         | 30         | 40          | 50          | 60         |
| AATTCCCGC   | TAGCATCGAG | GACCTCGACT | CGGCCATTTCG | TGACAAAGATC | GCCGGTACCG |
| GGGCG       | ATCGTAGCTC | CTGGAGCTGA | GCCGGTAAGC  | ACTGTTCTAG  | CGGCCATGGC |
| 70          | 80         | 90         | 100         | 110         | 120        |
| TTCTGTTTCGG | CTACACCAAG | AACCTACAGA | ATCGCGGCCG  | AATCCCCAAC  | TACCCTGCCG |
| AAGACAAGCC  | GATGTGGTTC | TTGGATGTCT | TAGCGCCGGC  | TTAGGGGTTG  | ATGGGACGGC |
| 130         | 140        | 150        | 160         | 170         | 180        |
| ACAGGACCAA  | GSTCTTCTGC | AATACAGGAG | ATCTCGTTTG  | TACTGGTAGC  | TTGATCGTTG |
| TGTCCTGGTT  | CCAGAAGACG | TTATGTCCTC | TAGAGCAAAC  | ATGACCATCG  | AACTAGCAAC |
| 190         | 200        | 210        | 220         | 230         | 240        |
| CTGCACCTCA  | CTTGGCATAT | GGTCCTGATG | CGCGGGGACC  | TGCCCCCTGAG | TTCCTCATCG |
| GACGTGGAGT  | GAACCGTATA | CCAGGACTAC | GGGCCCTGG   | ACGGGGACTC  | AAGGAGTAGC |
| 250         | 260        | 270        | 280         |             |            |
| AGAAGGTTTCG | GGCTGTCCGT | GGTTCTGCTT | GAgctta     |             |            |
| TCTTCCAAGC  | CCGACAGGCA | CCAAGACGAA | CTcgaatttcg | a           |            |

R D D L I N G N S A S C A D V I F I Y A -

Obr. 1D (2. zo 4)

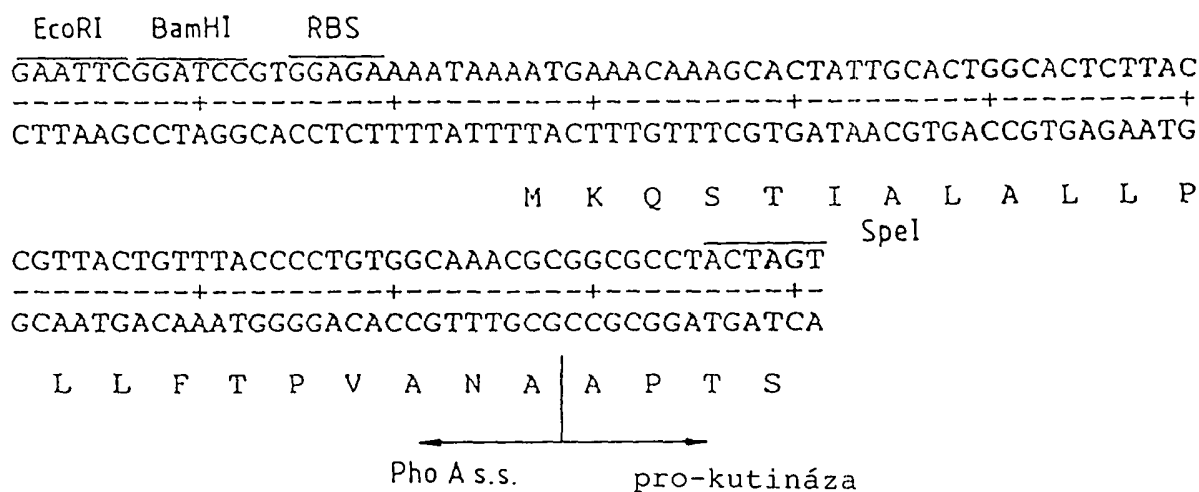


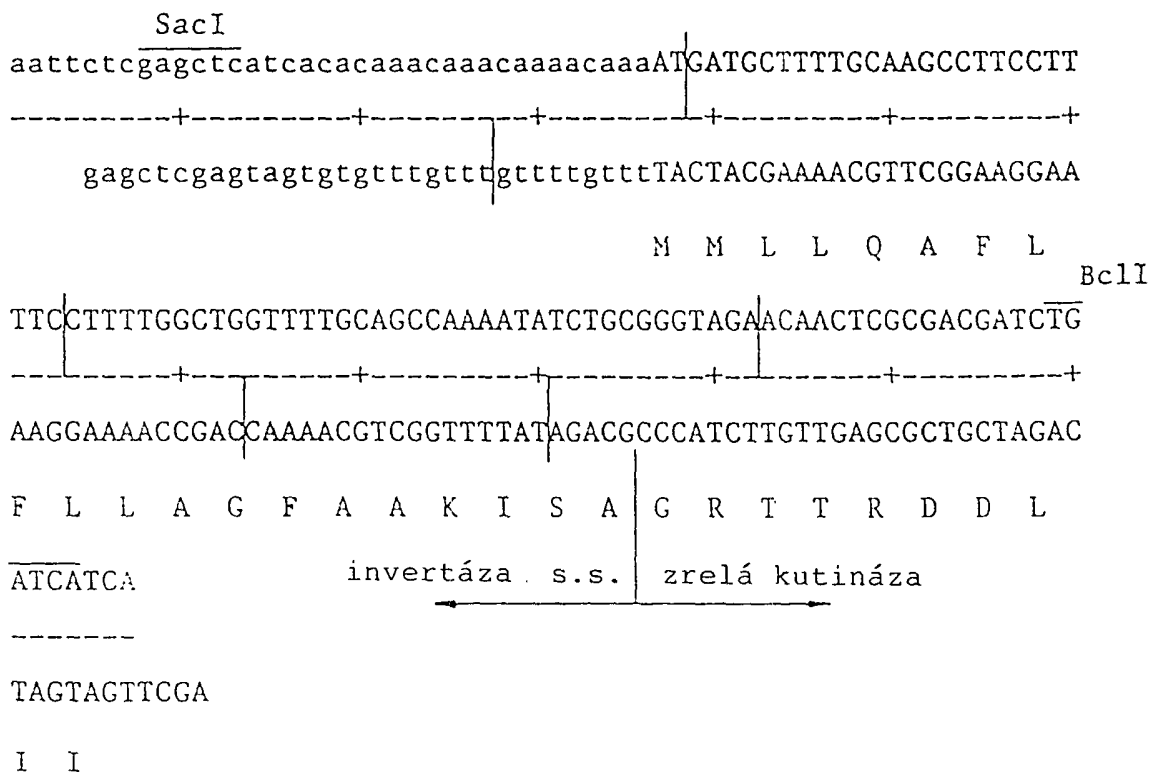
Obr. 1D (3. zo 4)



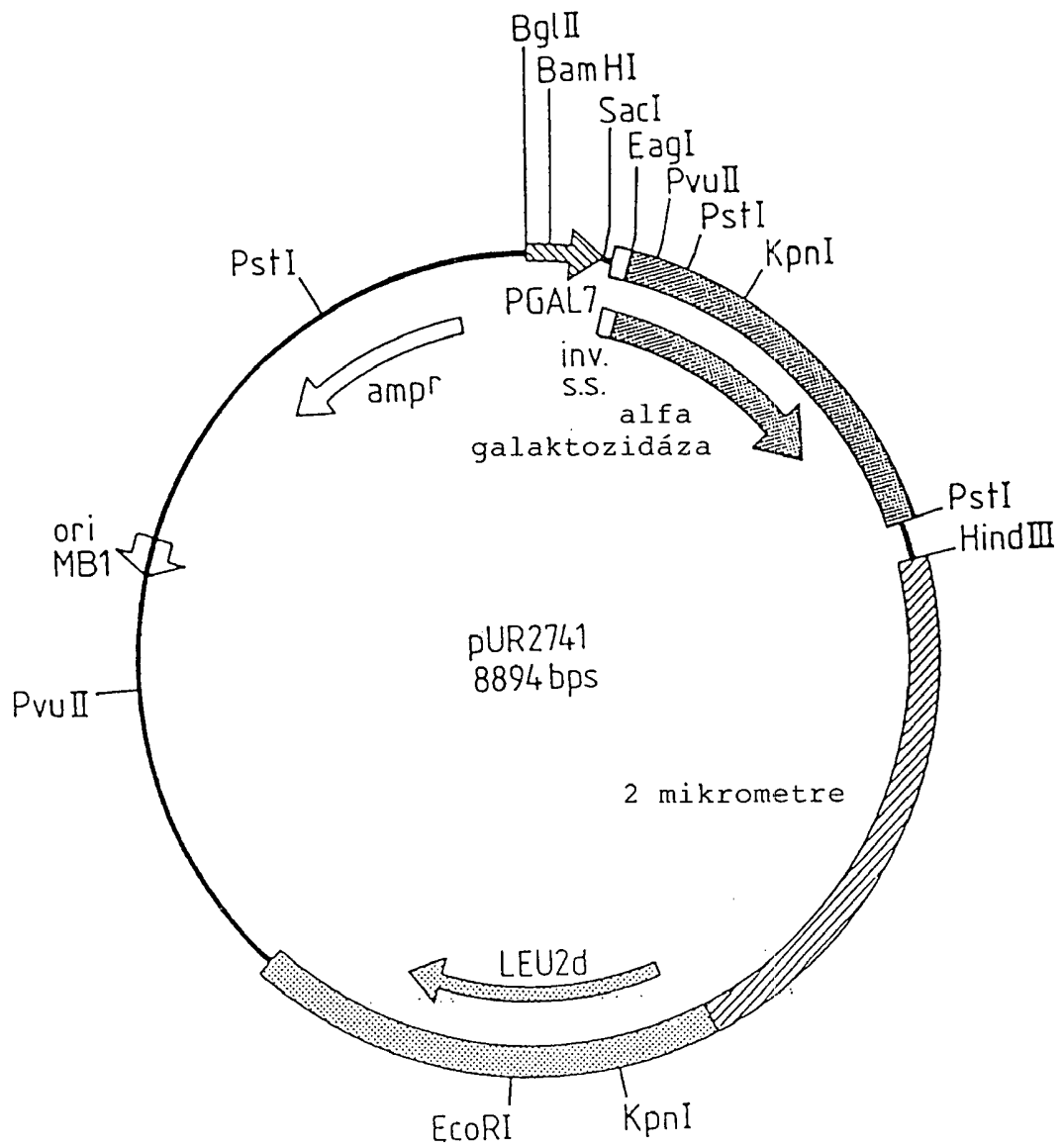


Obr. 2

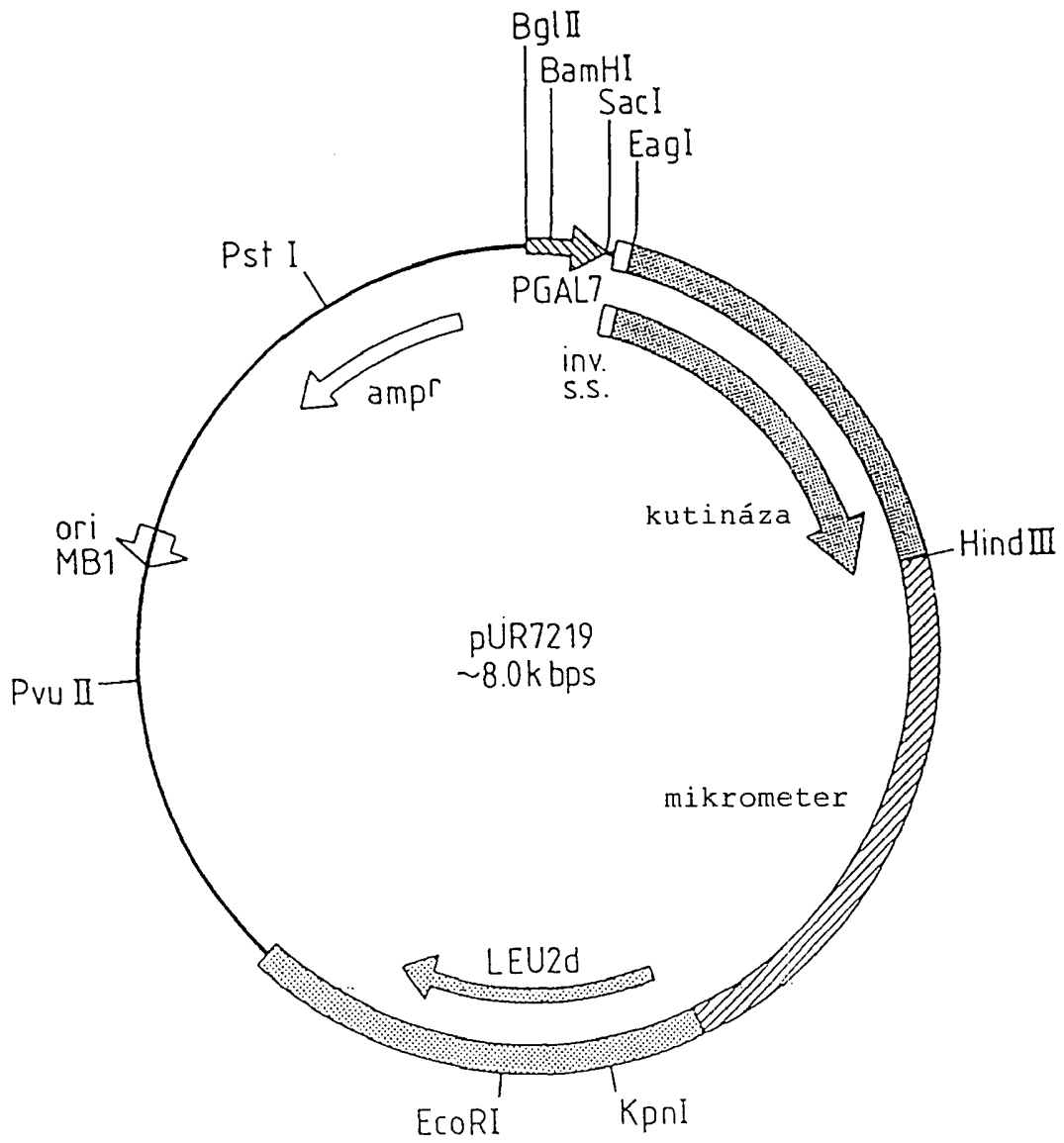




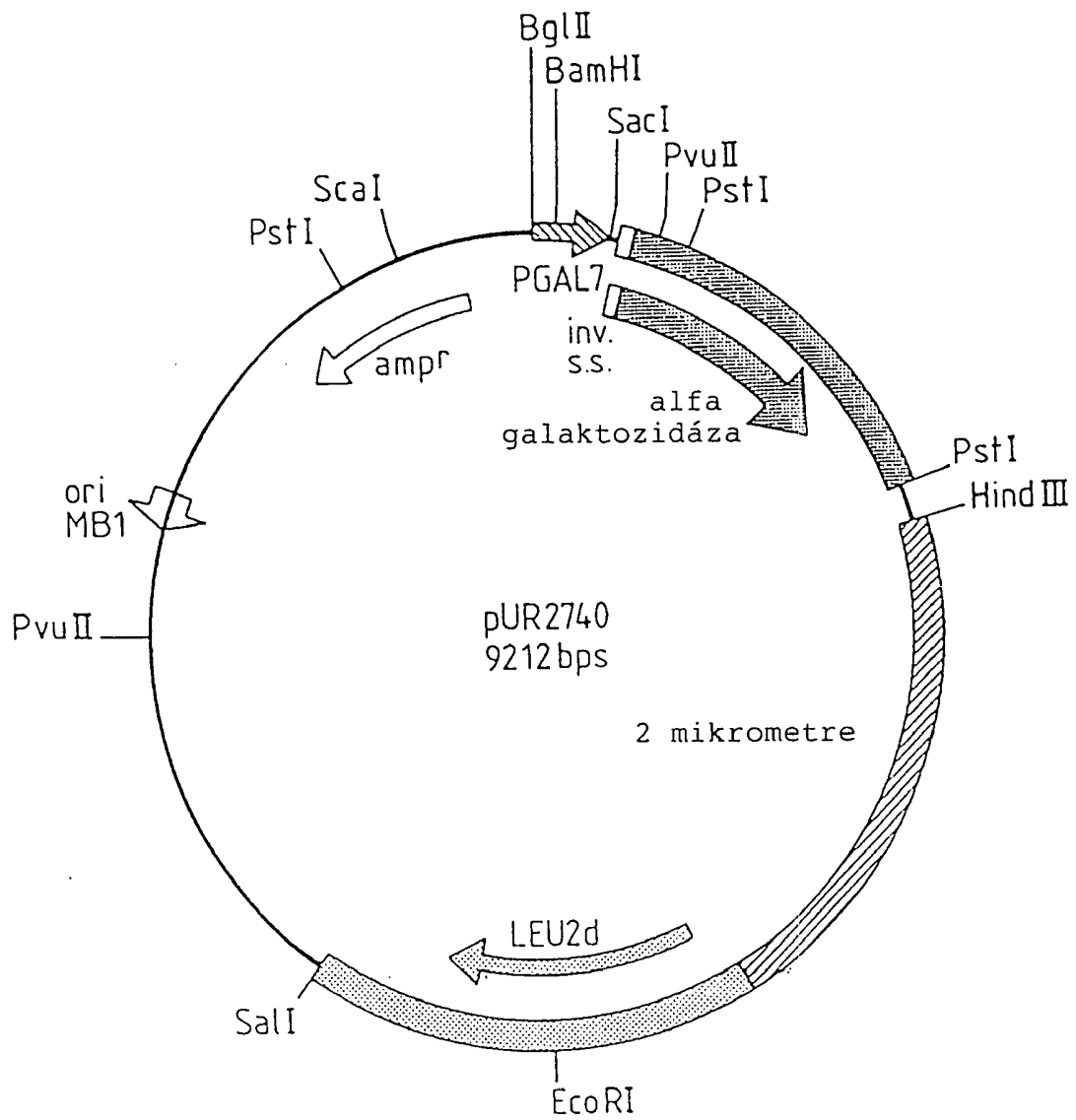
Obr. 4



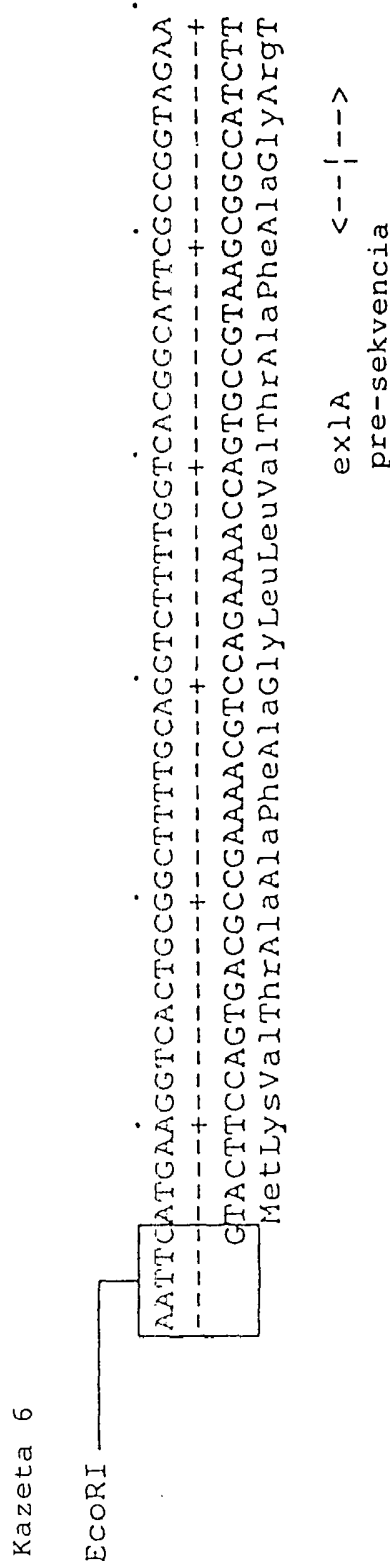
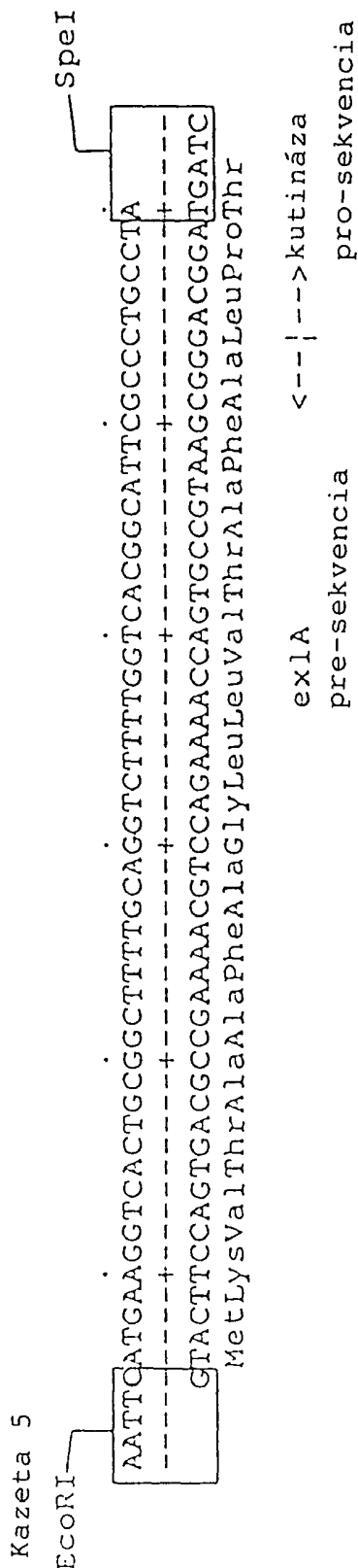
Obr. 5



Obr. 6



Obr. 7



Obr. 7 (pokračovanie)

CAACTCGCGACGATCT  
 -----+  
 GTTGAGCGCTGCTAGACTAG  
 hrThrArgAspLeuIle  
 zrelá kutináza

Bcl I

Kazeta 7

EcoRI

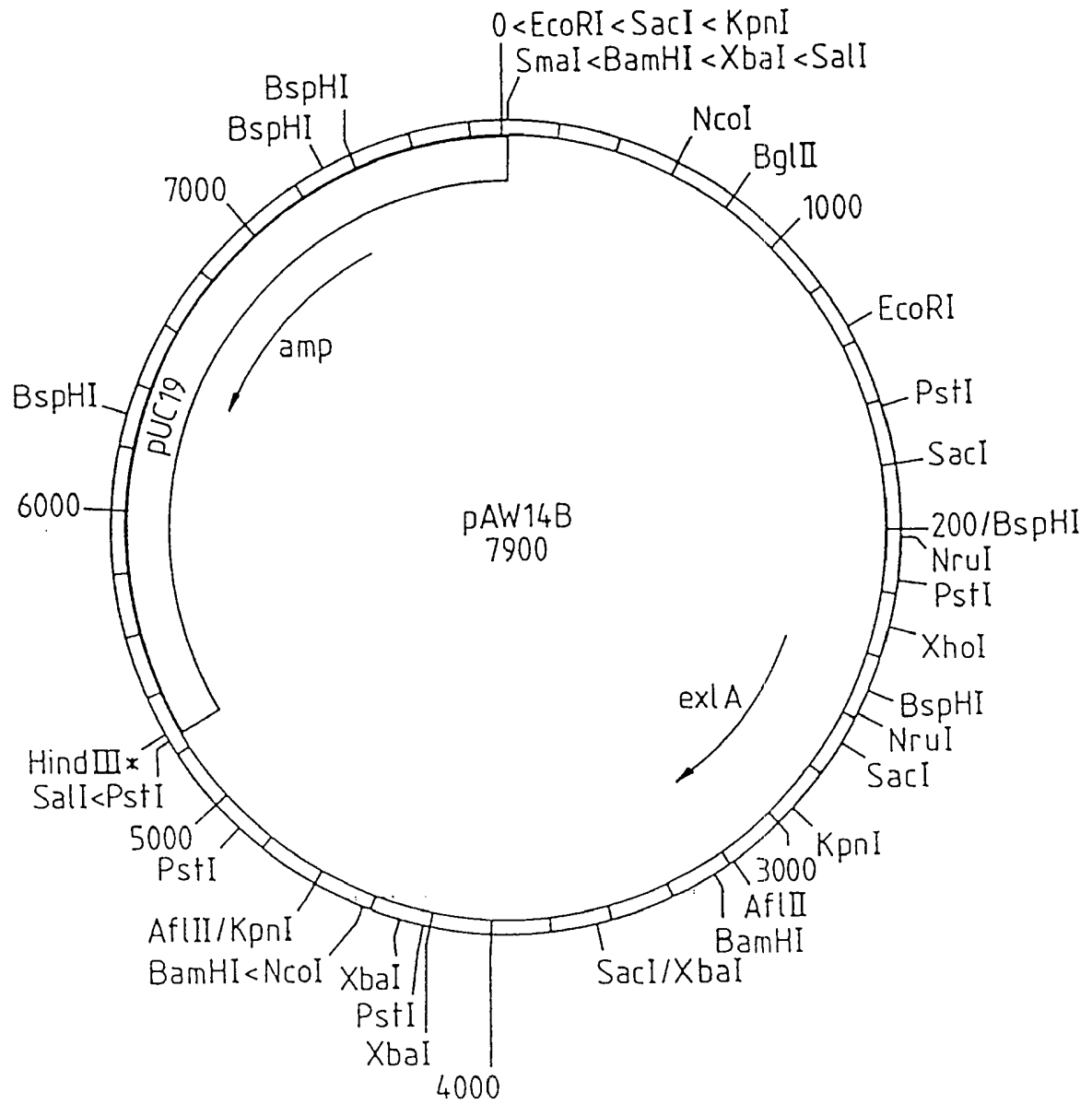
AAATTCATGAAGGTCACCTGCGGCTTTTGCAGGTCCTTTTGGTCACGGCATTCGCCCTCAAGAA  
 -----+  
 GTACTTCCAGTGACGCGCCGAAACCGTCCAGAAACCGTACGCGGAGTTCTT  
 MetLysvalThrAlaAlaPheAlaGlyLeuLeuValThrAlaPheAlaSerArgT

exlA <---|--->  
 pre-sekvencia

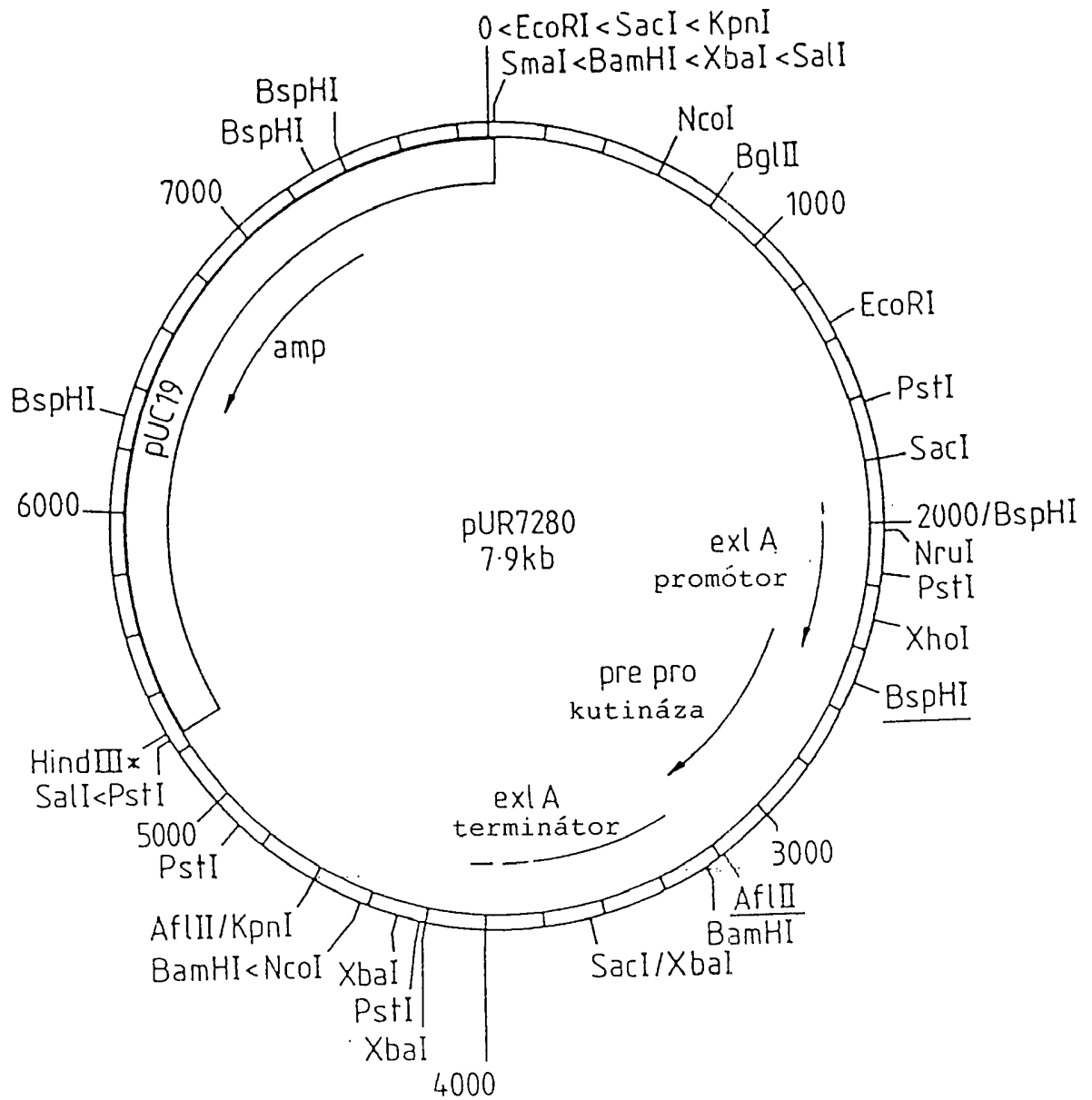
CAACTCGCGACGATCT  
 -----+  
 GTTGAGCGCTGCTAGACTAG  
 hrThrArgAspLeuIle  
 zrelá kutináza

Bcl I

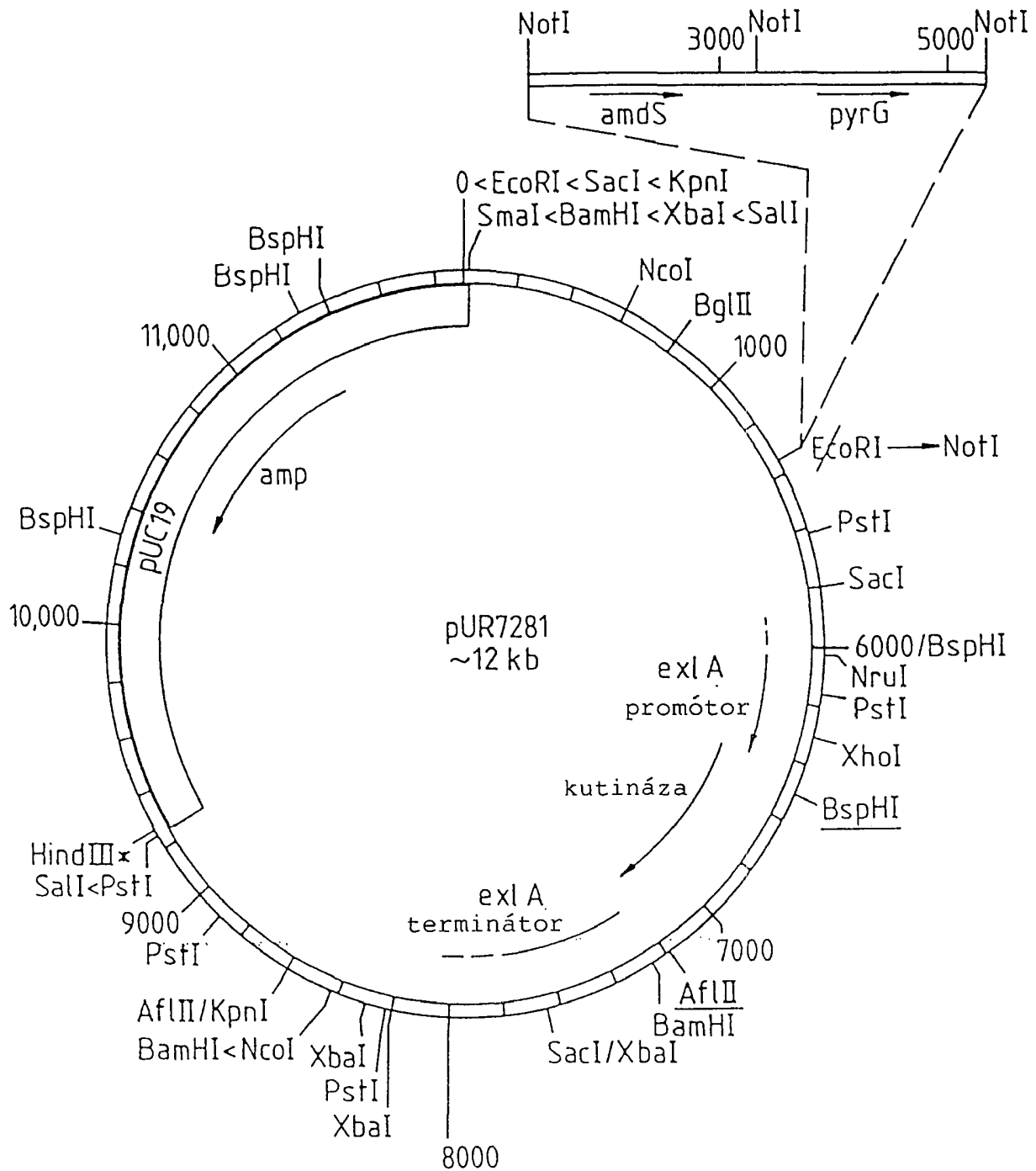
Obr. 8



Obr. 9



Obr. 10



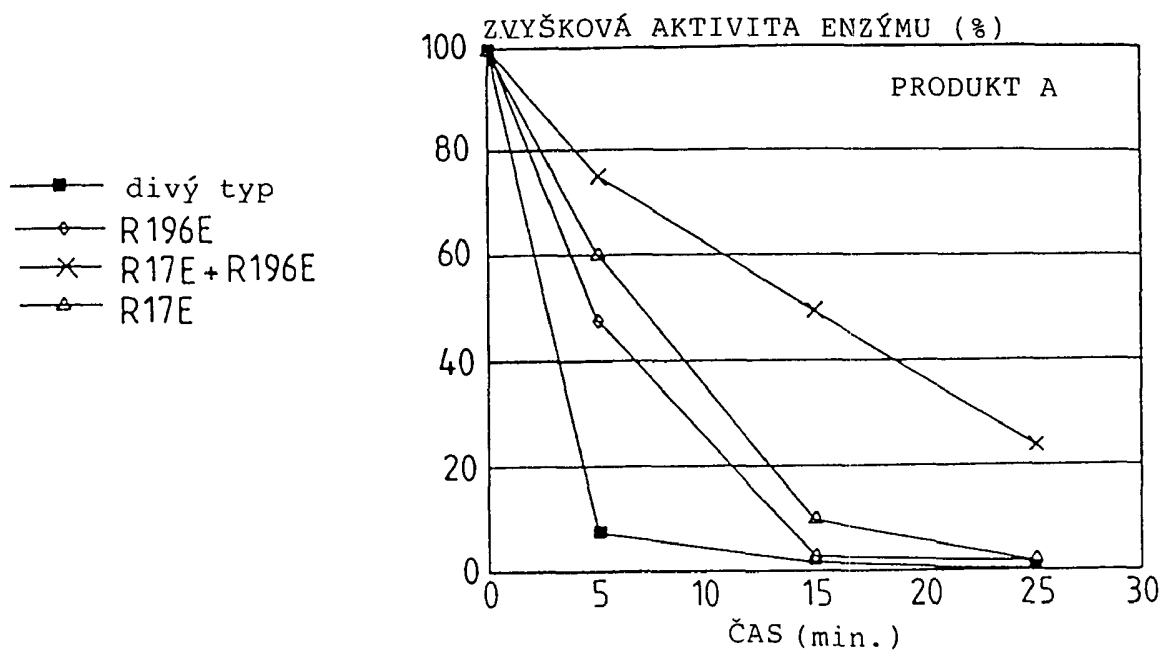
|       | 20   |    |       | 40      |    |     | 60 |       |       |   |      |      |        |
|-------|------|----|-------|---------|----|-----|----|-------|-------|---|------|------|--------|
| fsol  | GRIT | RD | DLING | NSASCAD | VI | FIY | AR | GSTET | GNLG- | T | LGPS | IASN | LESAFG |
| cglo  | QSST | RN | ELETG | SSSACPK | VI | YIF | AR | ASTEP | GNMGI | S | AGPI | VADA | LERIYG |
| ccap  | QSST | RN | ELESG | SSSNCPK | VI | YIF | AR | ASTEP | GNMGI | S | AGPI | VADA | LESRYG |
| mngri | LNSV | RN | DLISG | NAAACPS | VI | LIF | AR | ASGEV | GNMGL | S | AGTN | VASR | LEREF- |

|      | 80 |    |    |     |       |     | 100   |          |        |      |       |        |   |
|------|----|----|----|-----|-------|-----|-------|----------|--------|------|-------|--------|---|
| fsol | K  | DG | VW | IQG | VGGAY | RAT | LGDNA | L-PRGTS  | SAAIRE | MLGL | FQQAN | TKCPDA | T |
| cglo | A  | NN | VW | VQG | VGGPY | LAD | LASNf | L-PDGTS  | SAAINE | ARRL | FTLAN | TKCPNA | A |
| ccap | A  | SQ | VW | VQG | VGGPY | SAD | LASNf | I IPEGTS | RVAINE | AKRL | ETLAN | TKCPNS | A |
| mgri | R  | ND | IW | VQG | VGDPY | DAA | LSPNF | L-PAGTT  | QGAIDE | AKRM | FTLAN | TKCPNA | A |

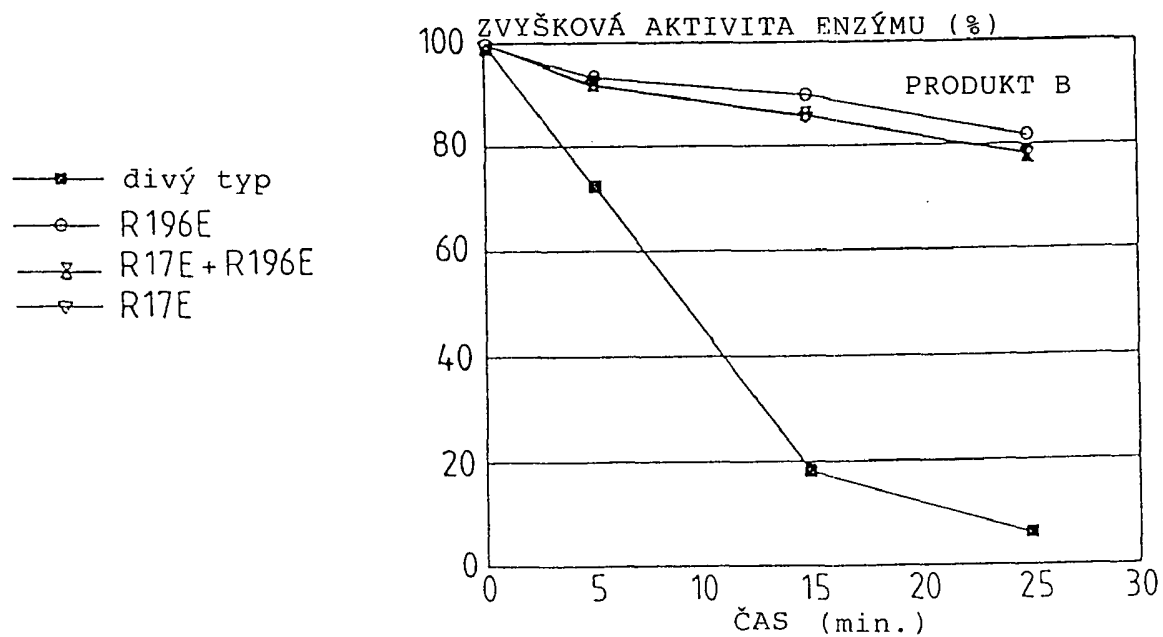
|      | 120 |   |     |    | 140     |       |           |    | 160 |           |      |     |
|------|-----|---|-----|----|---------|-------|-----------|----|-----|-----------|------|-----|
| fsol | LI  | A | GGY | SQ | GAALAA  | SIEDL | DSAIRDKIA | GT | VLF | GYTKNLQNR | GRIP | NYP |
| cglo | IV  | S | GGY | SQ | GTAVMAG | SISGL | STTIKNQIK | GV | VLF | GYTKNLQNL | GRIP | NFE |
| ccap | VV  | A | GGY | SQ | GTAVMAS | SISEL | SSTIQNQIK | GV | VLS | AITKNLQNL | GRIP | NFS |
| mgri | VV  | A | GGY | SQ | GTAVMEN | AVSEM | PAAVQDQIK | GV | VLF | GYTKNLQNR | GRIP | DFP |

|      | 180  |     |    |       |   | 200         |     |        |       |      |          |
|------|------|-----|----|-------|---|-------------|-----|--------|-------|------|----------|
| fsol | ADRT | KVF | CN | TGDLV | C | TGSLIVAAPHL | AYG | PDARGP | APEFL | IEKV | RAVRGS   |
| cglo | TSKT | EVY | CD | IADAV | C | YGTLEILPAHF | LYQ | TDAAVA | APREL | QARI | G-----   |
| ccap | TSKT | EVY | CA | LADAV | C | YGTLEILPAHF | LYQ | ADAATS | APREL | AARI | G-----   |
| mgri | TEKT | EVY | CN | ASDAV | C | FGTLFLLPAHF | LYT | TESSIA | APNWL | IRQI | RAA----- |

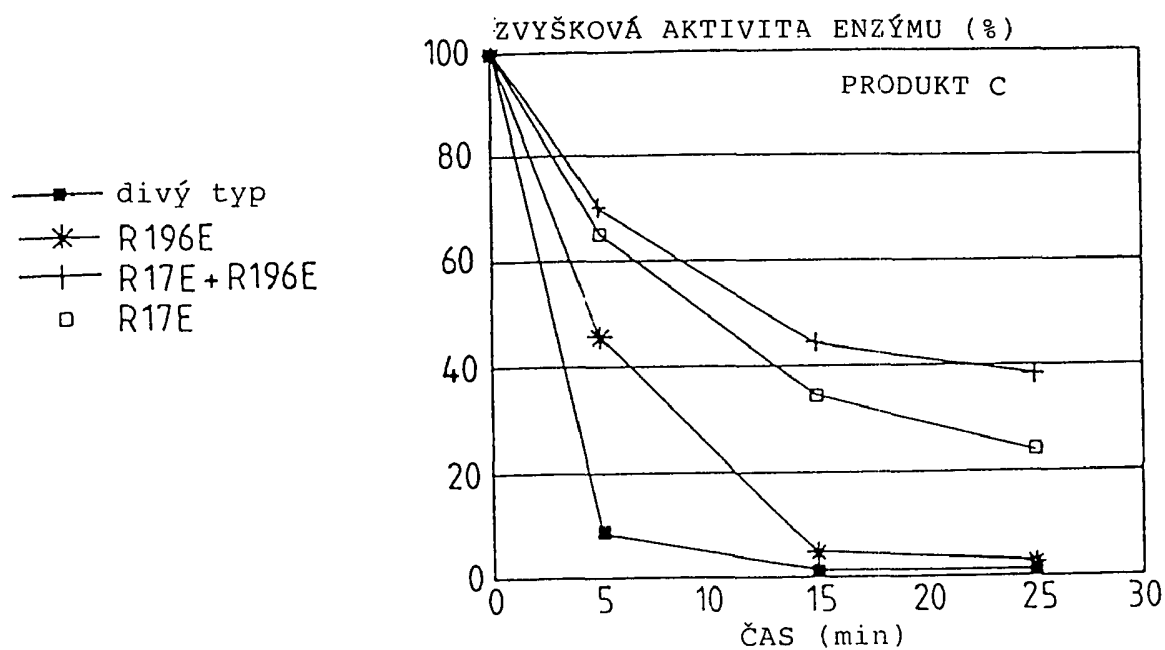
Obr. 12



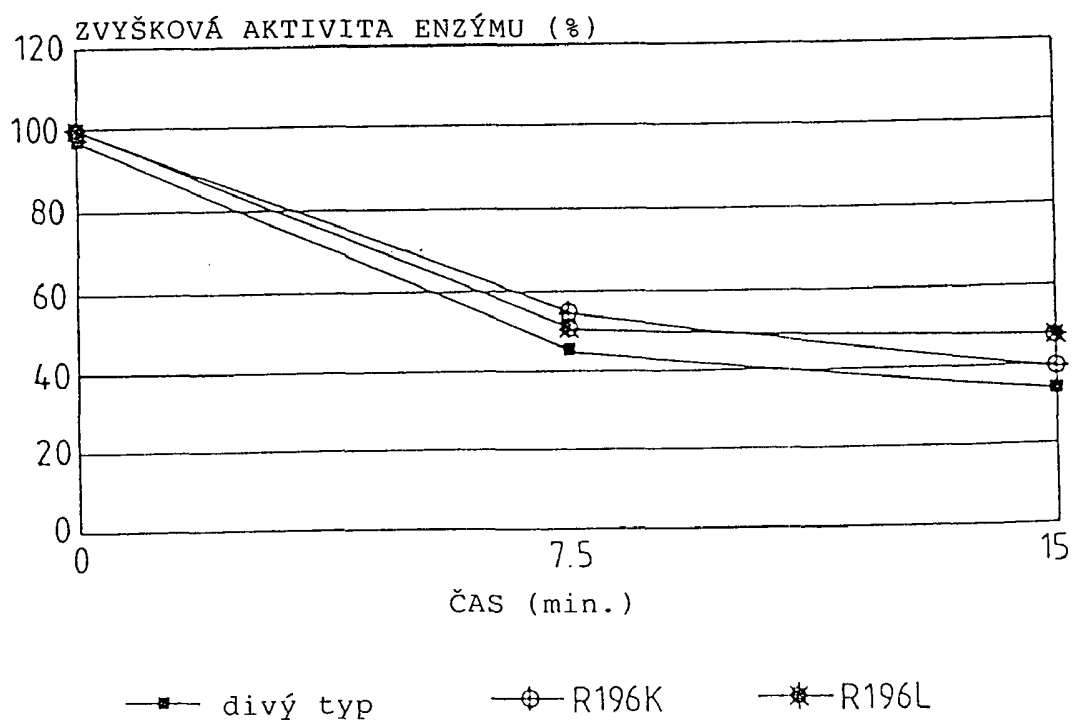
Obr. 13



Obr. 14

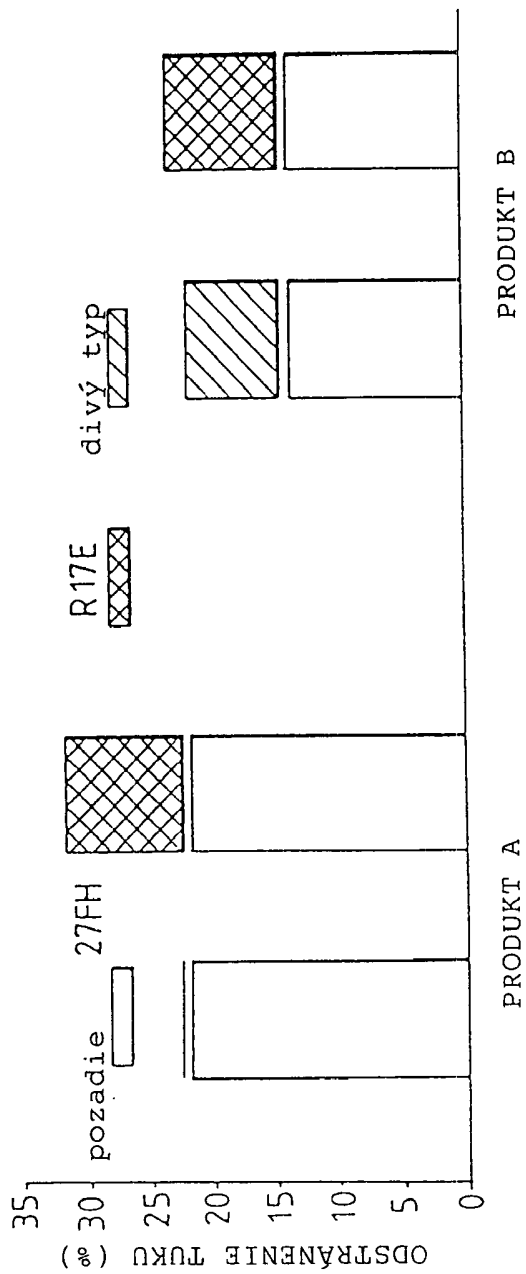


Obr. 15



Obr. 16

Prací účinok pri vlastnom praní, pri teplote 40 °C,  
porovnanie prírodného typu kutinázy a kutinázy modifikovanej R17E.



P A T E N T O V É    N Á R O K Y (pôvodné)

1. Variant kutinázy zdrojovej kutinázy, v ktorom bola modifikovaná sekvencia aminokyselín tak, že sa zlepšila znášanlivosť k povrchovým aniónaktívnym látkam.

2. Variant kutinázy podľa nároku 1, v ktorom sa znášanlivosť k aniónaktívnemu tenzidu zlepšila zoslabením väzby aniónaktívneho tenzidu k enzýmu.

3. Variant kutinázy podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, v ktorom sa väzba povrchovo aniónaktívnej látky k enzýmu zoslabila zoslabením elektrostatickej interakcie medzi povrchovo aniónaktívnou látkou a enzýmom.

4. Variant kutinázy podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 3, v ktorom sa elektrostatická interakcia medzi aniónaktívnym tenzidom a enzýmom zoslabila náhradou jedného alebo viacerých arginínových zvyškov s kladným nábojom, ktoré sú umiestené v blízkosti hydrofóbnej časti enzýmu a sú schopné viazať apolárny koniec aniónaktívneho tenzidu, lyzínovými zvyškami.

5. Variant kutinázy podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 3, v ktorom elektrostatická interakcia medzi aniónaktívnym tenzidom a enzýmom je zoslabená náhradou jedného alebo viacerých kladne nabitých arginínových zvyškov, ktoré sú umiestené v blízkosti hydrofóbnej časti a sú schopné viazať apolárny koniec aniónaktívneho tenzidu, zvyškami aminokyselín bez náboja.

6. Variant kutinázy podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 3, v ktorom elektrostatická interakcia medzi aniónaktívnym tenzidom a enzýmom je zoslabená náhradou jedného alebo viacerých kladne nabitých arginínových zvyškov, ktoré sú umiestené v blízkosti hydrofóbnej časti a sú schopné viazať apolárny koniec aniónaktívneho tenzidu, zvyškami aminokyselín

so záporným nábojom.

7. Variant kutinázy podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 3. v ktorom elektrostatická interakcia medzi aniónaktívnym tenzidom a enzýmom je zoslabená náhradou jedného alebo viacerých kladne nabitých arginínových zvyškov, ktoré sú umiestené v blízkosti hydrofóbnej časti a sú schopné viazať apolárny koniec aniónaktívneho tenzidu, menej hydrofóbnymi zvyškami aminokyselín.

8. Variant kutinázy podľa nároku 7, v ktorom menej hydrofóbne zvyšky aminokyselín sú vybrané zo skupiny, pozostávajúcej z glycínu, serínu, alanínu, aspartovej kyseliny a treonínu.

9. Variant kutinázy podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, v ktorom zdrojová kutináza je eukaryotická kutináza.

10. Variant kutinázy podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, v ktorom zdrojový enzým je kutináza, ktorá je imunologicky križená s protilátkou proti kutináze z Fusarium solani pisi.

11. Variant kutinázy podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, kódovaný génmi, ktoré majú širokú homológiu k 5 - a/alebo 3 koncom génov, kódujúcim kutinázu z Fusarium solani pisi, Colletotrochum capsici, Colletotrochum gloeosporioides, Mganaporthe grisiea a/alebo ku konzervovaným sekvenciám v kutinázach.

12. Variant kutinázy podľa ktoréhokoľvek z prechádzajúcich nárokov, v ktorom modifikované zvyšky sú umiestené v jednej alebo vo viacerých z ďalej uvedených polôh sekvencie aminokyselín kutinázy Fusarium solani pisi, alebo v zodpovedajúcich aminokyselinách odlišných kutináz: 17, 51, 78, 80, 88, 96, 156, 195 a 196.

13. Variant kutinázy podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, v ktorom modifikované zvyšky sú umiestené v hydrofóbnej časti okolo aminokyselín 51 a 195 kutinázy Fusarium solani pisi, alebo zodpovedajúcich aminokyselín odlišných kutináz.

14. Variant kutinázy podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, ktorý je variantom kutinázy Magnaporthe grisea a obsahuje jednu alebo viac z nasledujúcich mutácií: A80D, A88E, R156L.

15. Spôsob prípravy variantu kutinázy podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, ktorý zahrnuje stupeň fermentatívnej kultivácie rDNA modifikovaného mikroorganizmu, obašujúceho gén pripravený technikou rDNA, ktorý kóduje variant kutinázy, ďalej stupeň prípravy preparátu variantu kutinázy, oddelením variantu kutinázy, vyprodukovaného mikroorganizmom buď z fermentačného prostredia, alebo oddelením buniek mikroorganizmu z fermentačného média, desintegráciou oddelených buniek a koncentráciou alebo čiastočným čistením kutinázy buď z uvedeného média alebo z uvedených buniek, spôsobmi fyzikálneho alebo chemického skoncentrovania alebo čistenia.

16. rDNA modifikovaný mikroorganizmus, ktorý bol transformovaný rDNA vektorom nesúcim gén, kódujúci variant kutinázy, podľa ktoréhokoľvek z prechádzajúcich nárokov 1 až 14 a ktorý je schopný exprimovať uvedený variant kutinázy.

17. rDNA modifikovaný mikroorganizmus podľa nároku 16, nesúci gén, kódujúci variant kutinázy, ktorý je vložený do mikroorganizmu fúziou v jeho 5 - konci k fragmentu génu, kódujúceho (modifikovaný) pre-sekvenčný funkcionál ako signálnu alebo sekrečnú sekvenciu pre hostiteľský organizmus.

18. rDNA modifikovaný mikroorganizmus podľa nárokov 16 alebo 17, v ktorom hostiteľský organizmus je eukaryot, na-

príklad kvasinka rodu Saccharomyces alebo Kluyveromyces alebo rod Hansenula, alebo huba rodu Aspergillus.

19. rDNA modifikovaný mikroorganizmus podľa nárokov 16 až 18, nesúci rekombinatný DNA vektor, kódujúci pre variant kutinázy podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 14, pričom uvedený mikroorganizmus bol vytvorený ako auxotrófny mutant náhradou génu génového kódovania za auxotrófny značkovač v jednej z buniek jeho predkov.

20. Polynukleotid, ktorý má základnú sekvenciu, kódujúcu zrelý kutinázový variant podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 14, alebo funkčný ekvivalent alebo jeho mutant, v ktorom polynukleotide koncový translačný kodón je sledovaný zastavovacím (stop) kodónom a voliteľne má nukleotidovú sekvenciu, kódujúcu pre pre-sekvenciu tejto kutinázy priamo protismerne nukleotidovej sekvencie, kódujúcej pre zrelý enzým.

21. Polynukleotid, ktorý má základnú sekvenciu, ktorá kóduje kutinázový variant podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 14, v ktorom polynukleotide za koncovým translačným kodónom nasleduje zastavovací (stop) kodón a voliteľne má nukleotidovú sekvenciu, kódujúcu pre najmenej časť zodpovedajúcej pre-sekvencie a/alebo signálnu alebo sekrečnú sekvenciu, vhodné pre vybraný hostiteľský organizmus, priamo protismerne nukleotidovej sekvencie, kódujúcej pre zrelý enzým.

22. Polynukleotid, ktorý má základnú sekvenciu, ktorá kóduje zrelý variant kutinázy podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 14, alebo jeho funkčný ekvivalent alebo jeho mutant, v ktorom variant kutinázy kódujúci nukleotidovú sekvenciu, odvodenú z organizmu vzniku, bol modifikovaný tak, že najmenej jeden kodón, a výhodne toľko kodónov koľko je možné, boli podrobené "mlčiacej" mutácii, aby vytvorili kodóny kódujúce ekvivalentné zvyšky aminokyselín a aby boli preferované novým hostiteľom, ako je určené v jednom z nárokov 9 až 12,

a tým poskytnúť v bunkách takého hostiteľa informačnú RNA na vloženie génu zlepšenej stability.

23. Polynukleotid podľa niektorého z nárokov 20 až 22, v ktorom protismerne nukleotidovým sekvenciám, kódujúcim pre pro- alebo zdrojový kutinázový variant je umiestená nukleotidová sekvencia, ktorá kóduje pre signálnu alebo sekrečnú sekvenciu hostiteľa, ako je určené v ktoromkoľvek z nárokov 9 až 12.

24. Rekombinantný DNA vektor, schopný riadiť expresiu nukleotidovej sekvencie, kódujúcej variantný gén kutinázy, obsahujúci nasledovné zložky:

(a) dvojvláknovú (ds) DNA, kódujúcu pre zrelý variant kutinázy alebo prekutinázy alebo zodpovedajúcej prekutinázy, v ktorej bola najmenej jedna časť presekvencie odstránená priamo v smere sekrečného signálu (preferovaného pre vybrané hostiteľské bunky), za predpokladu že tam, kde časť génu, ktorý má byť posunutý, nezačína kodónom ATG, tam sa musí kodón ATG umiestiť na čelo, a tiež za predpokladu že časť génu, ktorá sa má posunúť, končí vhodným zastavovacím (stop) kodónom, alebo má taký kodón pridaný;

(b) regulón expresie (vhodný pre vybraný hostiteľský organizmus), umiestený proti smeru plus vlákna ds DNA, kódujúcej variant kutinázy (zložky (a));

(c) terminačnú sekvenciu (vhodnú pre vybraný hostiteľský organizmus), umiestenú v smere plus vlákna ds DNA, kódujúcej variant kutinázy (zložky (a));

(d1) nukleotidovú sekvenciu, ktorá umožňuje integráciu uvedenej ds DNA do genómu vybraného hostiteľa, alebo

(d2) počiatok replikácie, vhodný pre vybraného hostiteľa;

(e1) voliteľne (auxotrófny) výberový značkovač;

(e2) voliteľne ds DNA sekvenciu, kódujúcu proteíny spojené s kultiváciou a/alebo sekréciou jedného z prekursorov, ktorá vytvára variant kutinázy vo vybranom hostiteľovi.

25. Rekombinantný DNA vektor podľa nároku 24, ktorý tiež nesie protismerne a/alebo v smere polynukleotidu, ako je hore určené, ďalšie sekvencie, usnadňujúce funkčnú expresiu kutinázy.

26. Rekombinantý DNA vektor podľa ktoréhokoľvek z nárokov 24 a 25, ktorý nesie auxotrófny značkovač, pozostávajúci z kódujúcej oblasti auxotrófneho značkovača a z neúplnej promótorovej oblasti.

27. Enzymatická kompozícia detergenta, obsahujúca variant kutinázy podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 14.

## Príloha: Odkazy na literatúru

Sambrook, J. Fritsch, E.F. a Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning; a laboratory manual (2 nd ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, ISBN 0-87969-309-6.

Fürste, J.P., Pansegrau, W., Frank, R., Blöcker, H., Scholz, P., Bagdasarian, M., a Lanka, E. (1986). Molecular Cloning of plasmid RP4 primase region in multi-host-range tacP expression vector. *Gene* 48, 119 - 131.

Michaelis et al. (1983). *J. Bacteriol.* 154, 366.

Tartof a Hobbs (1988). *Gene* 67, 169 - 182.

Soliday, C.L., Flurkey, W.H., Okita, T.W. a Kolattukudy, P.E. (1984). Cloning and structure determination of cDNA for cutinase, an enzyme involved in fungal penetration of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 3939-3943.

Nogi, Y., a Fukasawa, T. (1983). Nucleotide sequence of the transcriptional initiation region of the yeast GAL7 gene. *Nucleic Acid Res.* 11, 8555 - 8568.

Taussig, R. a Carlsson, M. (1983). Nucleotide sequence of the yeast SUC2 gene for invertase. *Nucleic Acid Res.* 11, 1943 - 1954.

Erhart, E. a Hollenberg, C.P. (1981). Curing of Saccharomyces cerevisiae 2- $\mu$ m DNA by transformation. *Curr. Genet.* 3, 83 - 89.

Verbakel, J.A.M.V. (1991). Heterologous gene expression in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Ph.D. thesis, Rijks Universiteit Utrecht, The Netherlands.

Maat, J., Roza, M., Verbakel, J., Stam, J., Santos da Silva, M.J., Bosse, M., Egmond, M.R., Hagemans, M.L.D., v.Gorcom, R.F.M., Hessing, J.G.M., V.d. Hondel, C.A.M.J.J. a V. Rotterdam, C. (1992). Xylenases and their application in bakery. In: Visser, J., Beldam, G. Kusters-van Someren, M.A. a Voragen, A.G.J. (Eds), *Xylans and Xylanases. Progress in Biotechnology, Volume 7*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam. ISBN 0-444-89477-2.

de Graaf, L.H., van den Broek, H.C., van Ouijen, A.J.J. a Visser J. (1992). Structure and regulation of an Aspergillus xylanase gene. In: Visser, J., Beldman, G., Kusters-van Somewren, M.A. a Voragen, A.G.J. (Eds), Xylans and Xylanases. Progress in Biotechnology, Volume 7, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, ISBN 0-444-89477-2.

Hankin, L. a Kolattukudy, P.E. (1968). J. Gen. Microbiol. 51, 457 - 463.

Ettinger, W.F., Thukral, S.K. a Kolattukudy, P.E. (1987). Structure of cutinase gene, cDNA, and the derived amino acid sequence from phytopathogenic fungi. Biochemistry 26, 7883 - 7892.

Huse, W.D. a Hansen, C. (1988). Strategies 1, 1 - 3.

de Graaf, L.H., H.W.J. van den Broek a J. Visser (1988). Isolation and expression of the Aspergillus nudulans pyruvate kinase gene. Curr. Genet. 13, 315 - 321.