

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patent numeris: **3963**

(51) Int.Cl.⁵: **C12N 15/52,
C12N 9/14,
C11D 3/386**

(21) Paraiškos numeris: **IP1650**

(22) Paraiškos padavimo data: **1993 12 21**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 07 25**

(45) Patent paskelbimo data: **1996 05 27**

(60) SU duomenys: **PCT/NL 89/00005, 1989 02 13 SU 4742168, 1989 10 10**

(31,32,33) Prioritetas: **88200255, 1988 02 11, EP**

(72) Išradėjas:

**Christiaan Albertus Gerardus van Eekelen, NL
Leonardus Johannes Sofie Marie Mulleners, NL
Johannes Cornelis van der Laan, NL
Onno Misset, NL
Roelck Anneke Cuperus, NL
Johan Herman Albert Lensink, NL**

(73) Patent savininkas:

GIST-BROCADES N. V., Wateringseweg 1, P. O. Box 1, 2600 MA Delft, NL

(74) Patentinis patikėtinis:

Reda Žaboliienė, 7, UAB "Metida", Pilies g. 8/1-2, 2600 MTP Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Fermentinis produktas, kuriame yra mutantinis proteolitinis fermentas, proteolitinio fermento atrinkimo būdas, mutantinis genas, ekspresijos vektorius, prokariotinis kamienas-šėlmininkas, mutantinio proteolitinio fermento gavimo būdas, plaunančios medžiagos sudėtis

(57) Referatas:

Pasiūlyti nauji proteolitiniai fermentai su pagerintomis savybėmis, tinkami naudoti plovikliuose, ypač skalbimui naudojamuose plovikliuose. Šie fermentai gaunami ekspresija geno, koduojančio proteolitinį fermentą su aminorūgščių seka, kuri skiriasi mažiausiai viena aminorūgštimi nuo laukinio tipo fermento. Siūlomi fermentai priklauso serino proteazėms, gautoms iš naujų Bacillus PB92 rūšies mutantų.

Šis išradimas susijęs su naujų proteolitinių fermentų, naudojamų plovikliuose, savybių pagerinimu. Šios savybės apima geresnį nešvarumų šalinimą skalbimo kompozicijose, padidintą stabilumą laikant skalbimo milteliuose ir padidintą stabilumą paruoštose ploviklių muilo putose.

Fermentinių priedų, konkrečiai proteolitinių fermentų, panaudojimas ploviklių kompozicijose, padaręs įmanoma baltyminių nešvarumų šalinimą, yra pakankamai dokumentuotas. Pavyzdžiui, žr. publikuotas Europos patentų paraiškas (EP-A-) 0220921 ir 0232269, JAV patentus Nr. Nr. 4 480 037 ir Re 30 602, straipsnį "Production of Microbial Enzymes" (Mikrobinių fermentų gamyba), Microbial Technology, 1 (1979) 281-311, Academic Press.

Ploviklių mišiniai gali būti miltelių, skysčio ir pastos pavidalu. Jų aktyviają medžiagą gali būti vienas ar daugelis anijoninių, nejoninių, katijoninių, cviterjoninių ar amfoterinių junginių. Tokie junginiai yra plačiai aprašyti Schwartz, Perry ir Berch "Surface Active Agents", 11, Interscience Publishers (1958). Be to, juose gali būti granuliuojančių, stabilizuojančių, aromatizuojančių junginių ir atskirais atvejais oksidantų, paprastai vadinamų balinimo medžiagomis. Ploviklių mišiniai yra naudojami kietų paviršių valymui, tualetų tvarkymui, indų plovimui (rankomis ir automatuose) ir skalbimui.

Skalbimui naudojami plovikliai dažniausiai yra dviejų pagrindinių tipų, skysti ar milteliai. Skystuose plovikliuose gana didelė paviršiaus aktyvių medžiagų koncentracija, neutralus arba šiek tiek šarminis pH, dažniausiai be balinimo medžiagų. Miltelių pavidalo plovikliai dažniausiai yra stipriai šarmiški (putų pH 9-11), juose yra inhibitorių, tokių kaip natrio trifosfatas ir, priklausomai nuo taikomo skalbimo būdo tose šalyse,

kur jie parduodami, gali būti su balinimo priemonėmis ar be jų.

Šiuo metu į skalbimo kompozicijas fermentai dedami skystų suspensijų, zolių arba granulių pavidalu. Pavyzdžiui, miltelių tipo detergentuose proteolitiniai fermentai paprastai yra kapsulių (granulių) formoje (pavyzdžiui, Maxatase^R ir Maxacal^R) arba granulių formoje (pvz., Savinase^R ir Alcalase^R). Maksatazė ir Maksakolį išleidžia firma International Bio- Synthetic B.V. Rijswijk, Olandija), Savinazę ir Alkalazę - firma NOVO Industry A/S (Bagsvaerd, Danija). Skystuose plovikliuose fermentai dažniausiai yra ištirpę.

Proteolitiniai fermentai, kaip taisyklė, blogai derinasi su skalbimo kompozicijomis. Fermentai turi būti stabilūs ir neprarasti aktyvumo skalbiant, pavyzdžiui, šalinant baltymų dėmes 10 -60°C intervale ir aukštesnėje temperatūroje. Be to jie turi likti stabilūs skalbimo produkte ilgai juos laikant. Atitinkamai, fermentai turi būti stabilūs ir funkcionalūs ir tuo atveju, kai didelis šarmingumas, o kai kada, esant balinimo priemonėms ir aukštoje temperatūroje.

Kadangi nėra universalių ploviklių, kaip nėra ir universalių skalbimo sąlygų (pH, temperatūra, tirpalo koncentracija, vandens kietumas) visame pasaulyje, reikalavimai fermentams skiriasi, priklausomai nuo ploviklio, su kuriuo jie panaudojami, ir skalbimo sąlygų.

Sąlygos, turinčios įtakos fermentų stabilumui miltelių pavidalo plovikliuose, kaip taisyklė, nėra optimalios. Pavyzdžiui, laikant miltelių ploviklius, kuriuose yra fermento, nežiūrint tariamo fermento ir ploviklio komponentų fizinio atsiribojimo fermento kapsulinės formos dėka, ploviklio oksidantai veikia proteazę, mažindami jos aktyvumą. Kita fermento nestabilumo ploviklio mil-

teliuose priežastis ta, kad fermentas laikant hidrolizuoja pats save, ypač esant didelei drėgmei. .

Dar daugiau, ploviklio milteliuose esančių oksidintojų trūkumas, kuris turi įtakos dėmių pašalinimo efektyvumui skalbiant skalbyklose, yra tas, kad baltymų dėmės fiksuojamos audiniuose. Be oksidintojų ir kiti ploviklio komponentai, inhibitoriai, sumažina proteazės efektyvumą, šalinant dėmes.

Skystų ploviklių atveju, susiduriame su tokia svarbia problema, kaip sparti fermento inaktyvacija, ypač aukštesėse temperatūrose. Kadangi fermentai tokiuose plovikliuose tirpioje būklėje, dezaktyvacija vyksta jau laikant, to pasekoje fermento aktyvumas žymiai krenta dar iki ploviklio panaudojimo. Anijoninės paviršiaus aktyvios medžiagos, tokios kaip alkilsulfatai kartu su vandeniu ir kitais komponentais ypač linkę negrižtamai denatūruoti fermentą, padarydami jį neaktyvų ir netinkamą atlikti proteolotinį skaldymą.

Iš dalies fermento stabilumo skystuose mišiniuose problemą išsprendžia mišinio modifikavimas, pavyzdžiui, stabilizatorių, mžianančių fermento inaktyvavimą, priedai. Žr. Europos patentų paraiškas Nr. 0126505 ir 0199405, JAV patentą Nr. 4318818 ir Didžiosios Britanijos patento paraišką Nr. 2178055A.

Kitas būdas stabilizuoti fermentą skystuose plovikliuose pateiktas Europos patento 0238216 paraiškoje, kurioje fermento molekulės ir skysta agresyvi ploviklio matrica atskiriamos ypatingos mišinio paruošimo technologijos dėka. Ploviklių milteliams gaminti siūlomi alternatyvūs kapsuliavimo variantai (pvz., žr. Europos patento paraišką Nr. 0170360).

Tuo, kas pasakyta, susumuotos sąlygos, kurias reikia sukurti, norint, kad proteolitinis fermentas optimaliai funkcionuotų ploviklyje, taip pat susumuoti apribojimai šiuo metu skalbimo kompozicijose naudojamiems fermentams. Nežiūrint visų pastangų apsaugoti fermentą skalbimo kompozicijose, vis tiek daug jo aktyvumo prarandama laikant ir naudojant įprastose sąlygose.

Naujų fermentų identifikavimas ir skyrimas, norint juos panaudoti apibrėžtose srityse, pavyzdžiui ploviklių gamybai, turi būti vykdomi keliais būdais. Vienas šių būdų - tai parinkimas organizmų ar mikroorganizmų, pasižyminčių norimu fermentiniu aktyvumu, (mikro)organizmo arba skystos (mikro)organizmo kultūros paruošimas, fermento skyrimas ir gryninimas, o taip pat fermento biocheminių savybių nustatymas ir tikrinimas, ar šios biocheminės savybės atitiks panaudojimo reikalavimus. Kai tokio fermento ar jį produkuojančio mikroorganizmo neįmanoma išskirti, gali būti taikoma genų inžinerijos technologija, fermentą koduojančio geno skyrimas, geno ekspresija kitame organizme, išryškinto fermento išskyrimas ir gryninimas ir jo tinkamumo numatytoje srityje tyrimas.

Kitas būdas gauti naujiems fermentams, tinkamiems panaudoti numatytoje srityje - tai egzistuojančių fermentų modifikavimas, kas tarp kitų, gali būti pasiekta cheminiais metodais (žr. I.Svendsen, Carsberg Res. Comm. **44**, (1976) 237-291). Kaip taisyklė, tokie metodai visai nespecifiški, tai išryškėja modifikuojant visas prieinamas liekanas įprastose šoninėse grandinėse arba tada, kai modifikacija priklauso nuo modifikacijai tinkamų aminorūgščių buvimo, be to dažnai neįmanoma modifikuoti sunkiai prieinamų aminorūgščių, neišskleidus fermento molekulės. Tokiu būdu, reikia manyti, kad fermento modifikacijos būdas, taikant koduojančio geno mutagenezę yra perspektyvesnis.

Mutagenezė gali būti atsitiktinė arba sait-specifinė. Atsitiktinė mutagenezė, veikiant visą mikroorganizmą cheminiu mutagenu arba mutagenezę iššaukiančiu spinduliavimu, savaime suprantama, gali modifikuoti ir fermentą. Tuo atveju reikia turėti labai efektyvą atrankos metodą, įgalinantį išryškinti nepaprastai retus mutantus su pasirinktomis savybėmis. Didelis mutantinių fermentų išskyrimo patikimumas atsitiktinės mutagenezės būdu gali būti pasiektas, klonuojant koduojantį geną, atliekant jo mutagenezę *in vitro* arba *in vivo* ir koduoto fermento ekspresiją, pakartotinai klonuojant koduojantį geną tinkamoje ląstelėje-šeimininke. Ir šiuo atveju turi būti taikomi efektyvūs biologinės atrankos būdai, turint tikslą atrinkti reikalingus mutantinius fermentus (žr. Tarptautinę patento paraišką WO 87/05050), šiais biologinės atrankos būdais nebūtinai bus gauti fermentai, tinkami naudoti plovikliuose.

Specifiškesnis modifikuotų fermentų gavimo būdas yra sait-specifinė mutagenezė, leidžianti specifiškai pakeisti vieną ar kelias aminorūgštis bet kuria kita amino rūgštimi. Europos patento Nr. 0130756 paraiškoje pateiktas tokios technologijos pavyzdys, kai ekspresavus mutantinės protezės genus, vėliau buvo gauti modifikuoti proteolitiniai fermentai.

Neseniai sait-specifinės mutagenezės galimybės buvo pademonstruotos, panaudojant mutageninius oligonukleotidus, susintetintus iš įvairių bazių keliose norimose padėtyse. Tuo pasiekama eilė įvairių mutacijų, kurios įterpiamos į specifinę DNR sekos dalį, pritaikant vieną sintetinį oligonukleotido preparatą, tai parodyta šiuose darbuose: Hui ir kiti, EMBO J. 3 (1984) 623-629; Matteucci ir kt., Nucl. Acids. Res., **11**, (1983) 3113-3121; Murphy ir kt., Nukl. Acids. Res. 11 (1983) 7695-7700; Wells ir kt., Gene, **34** (1985) 315-323; Hutchinson ir kt., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986)

710-714 ir F.M. Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology 1987-1988. Greene Publishers Association and Willey, Interscience, 1987.

- 5 Jau Stauffer su bendr., (J.Biol. Chem. **244** (1969) 5333-5338) aptiko, kad veikiant vandenilio peroksidu, Carlsberg subtilizino metioninas 221 padėtyje oksiduojasi į sulfoksidimetioniną ir yra atsakingas už žymų aktyvumo sumažėjimą.
- 10 Dviejų būdų mutagenezės, atsitiktinės ir sait-specifinės, rezultate, iš *Bacillus amyloliquefaciens* serino protezės, kuri dar vadinama "BPN' subtilizinu", buvo išskirti ir charakterizuoti modifikuoti mutantiniai fermentai. Patente WO 87/05050 aprašytas termostabilė-
- 15 nis BPN' subtilizino mutantas. Europos patento paraiškoje Nr. 0150756 pasakyta, kad sait-specifinė visų 19-kos BPN' subtilizino aminorūgščių mutagenėzė metionino 222 padėtyje, panaudojant "kasetins mutagenėzės" me-
- 20 todą, gali duoti fermentus, atsparius vandenilio peroksidui. Tačiau pastaruoju atveju daugumos mutantų proteolitinis aktyvumas yra žemas. Rasta, kad geriausi mutantai yra M222A ir M222S, kurių specifinis aktyvumas buvo atitinkamai 53% ir 35% palyginus su natyvaus BPN
- 25 subtilizino aktyvumu (žr. Estell ir kt. J. Biol. Chem. **260**, (1985) 6518-6521).

Ankstesniame darbe, kuriant modifikuotas proteazes, parodyta, kad galima gauti BPN' subtilizino mutantus su

30 pakitusiu stabilumu ir pakitusiomis kinetinėmis charakteristikomis (žr. ankstesnes nuorodas, ir kitas, pvz., Rao ir kt., Nature, **328** (1987) 551-554. Bryan ir kt. Proteins, **1** (1986) 326-334. Cunningham ir Wells. Protein Engineering, **1** (1987) 319-325. Russel ir kt. J. Mol. Biol. **193** (1987) 803-819. Katz ir Kossiakoff. J. Biol. Chem. **261** (1986) 15480-15485, o taip pat apžvalgas Shaw, Biochem. J. **246** (1987) 1-17 ir Gait ir

35

kt. Protein Engineering, 1 (1987) 267-274. Tačiau nė vienas iš šių šaltinių nepaskatino geresnių ir plovikliuose stabilesnių proteolitinių fermentų pramoninės gamybos. Nė vienu iš proteazių modifikavimo atvejų ne-
5 ivertinti jų komercinė reikšmė kai ir pranašumas prieš šiuo metu plovikliams apibrėžtose sąlygose panaudojamus fermentus.

Vienas iš šio išradimo objektų yra nauji mutantiniai
10 proteolitiniai fermentai, gauti ekspresuojant genus, koduojančius šių fermentų aminorūgščių sekas, besiskiriančias mažiausiai viena aminorūgštimi nuo atitinkamo laukinio tipo fermentų. Šie mutantiniai fermentai pasižymi geresnėmis savybėmis, naudojant juos plovikliuose, ypač skalbimo detergentuose. rekomenduojama
15 išradimą realizuoti PB92 serino proteazėse.

Kitas išradimo objektas yra nauji fermentiniai plovikliai su proteolitiniu fermentiniu produktu, kuriame
20 yra mažiausiai vienas iš tokių naujų mutantinių proteolitinių fermentų.

Dar vienas šio išradimo objektas yra efektyvus mutantinių proteolitinių fermentų atrankos būdas, iš viso
25 tuzino fermentų atrenkant labiausiai tinkamus naudoti plovikliuose. Tokie fermentai gaunami mutagenizuotos proteazės genų ekspresijos būdu.

TRUMPAS FIGŪRŲ APRAŠYMAS

30

Fig.1 A pavaizduota mutacijos vektoriaus, turinčio PB92 proteazės geną, konstrukcija.

35

Fig.1 B schematiškai pavaizduota naudojama mutacijos procedūra.

Fig.1 C parodyta ekspresijos vektoriaus, turinčio mutantinį PB92 proteazės geną konstrukcija.

Fig.2 A, 2 B ir 3 pavaizduota skalbimo efektyvumo priklausomybė nuo įvairių PB92 proteazės mutantų specifinio proteolitinio aktyvumo įvairiose skalbimo sąlygose.

Fig.4 parodyta PB92 proteazės geno nukleotidų seka ir koduoto fermento pirmtako aminorūgščių seka.

DETALUS IŠRADIMO APRAŠYMAS

Išsireiškimas "pasižymintis geresnėmis savybėmis", kuris šiame aprašyme vartojamas aptariant, "mutantinius proteolitinius fermentus", suprantamas, kaip proteolitiniai fermentai, kurių plovimo galia arba stabilumas, išsaugant plovimo galia, yra padidinti, lyginant juos su atitinkama laukinio tipo proteaze.

Šiame aprašyme terminas mutantinio proteolitinio fermento "plovimo galia" suprantamas, kaip mutantinio proteolitinio fermento papildomas indėlis į skalbimo procesą, lyginant su plovimo kompozicijos veikimu be fermento, atitinkamose skalbimo sąlygose.

Išsireiškimas "atitinkamos skalbimo sąlygos" vartojamas pažymėti sąlygoms, kaip antai: skalbimo temperatūra, trukmė, skalbimo mechanizmai, tirpalo koncentracija, ploviklio tipas ir vandens kietumas, kurie realiai būna namų sąlygomis naudojant pramoninius ploviklius (detergentus).

Terminas "padidinta plovimo galia" vartojamas, norint pažymėti geresnį galinį rezultatą, šalinant dėmes "atitinkamose skalbimo sąlygose", arba kad sunaudojama mažiau mutantinio proteolitinio fermento masės, tam pa-

čiam rezultatui gauti, negu naudojant laukinio tipo fermentą.

- 5 Išsireiškimas "išsaugota plovimo galia" vartojamas, nurodant, mutantinio proteolitinio fermento plovimo galia, paskaičiuotą jo masei, kuri sudaro ne mažiau 80% laukinio tipo proteazės plovimo galios "atitinkamose skalbimo sąlygose".
- 10 Terminas "padidintas stabilumas" pavartotas, nurodant didesnę mutantinių proteolitinių fermentų stabilumą plovikliuose ir juos laikant, ir/arba jų stabilumą putose, ir ši sąvoka apima atsparumą oksidantų, inhibitorių poveikiui, autolizei, paviršiaus aktyvių medžiagų
- 15 ir šarminės aplinkos veikimui, lyginant su atitinkamu laukinio tipo fermentu.
- Biocheminės savybės, nustatytos aprobuotose laboratorinėse sąlygose, nėra labai patikimi rodikliai, norint
- 20 atspėti konkrečios ploviklio proteazės elgesį užsiimuotose sąlygose. Šios pastabos taikomos ir kinetiniams rodikliams, gautiems panaudojant griežtai apibrėžtus baltyminius substratus, tokius kaip kazeinas, dimetil-kazeinas ir hemoglobinas arba oligonukleotidiniai sub-
- 25 tratai, pavyzdžiui, SAAPFpNA (sukcinil- L-alanil- L-alanil- L-prolil- L-fenilalanil- para-nitroanalidas). Be abejo, kiti proteazių požymiai apsprendžia jų, kaip skalbimo detergentų, efektyvumą.
- 30 Šis išradimas paremtas išsiaiškinimu to, kad, nežiūrint egzistuojančių baltymų aminorūgščių modifikacijos metodų, kurie gali sukelti esminius jų biocheminių rodiklių pakitimus, vis dar labai menkai galima numatyti specifinės mutacijos įtaką realiose taikymo sąlygose,
- 35 jeigu tai aplamai įmanoma.

Sutinkamai su šiuo išradimu, po intensyvių tyrimų ir eksperimentavimo buvo rastas mutantinių proteazių gavimo būdas, kuriame mutantinių proteazių paruošimas suderintas su efektyvia proteazių atrankos pagal jų veikimą metodika. Visai netikėta buvo tai, kad šiuo būdu pagal jų veikimą gali būti atrinktas palyginti didelis fermentų skaičius.

Išradimo test-sistema paremta proteazėms jautrių dėmių pašalinimu iš audinių pavyzdžių, panaudojant prietaisą, kuriuo nustatomas audinio atsparumas skalbimo arba temperatūros poveikiui, imituojant atitinkamas skalbimo sąlygas. Kai tinkami testai gali būti panaudoti firmos EMPA (Eidgenossische Material Prufungs und Versuch Anstalt, St. Gallen, Šveicarija) komercinių audinių gabalėliai dirbtinai sutepti baltyminėmis dėmėmis. Kitos dėmės, kuriomis buvo suteršti audinių pavyzdžiai proteazėms tirti - tai kraujas, žolė, šokoladas ir kt.

Be to, tokioje test-sistemoje kiti atitinkami faktoriai, tokie kaip: ploviklio sudėtis, putų koncentracija, vandens kietumas, skalbimo mechanizmai, trukmė, pH ir temperatūra turi būti reguliuojami taip, kad pakartotų tipišką namų ūkio arba tam tikros rinkos sferos sąlygas.

Proteazių plovimo galią paprastai nustato pagal jų gebėjimą pašalinti tam tikras charakteringas dėmes atitinkamose tyrimo sąlygose. Šis sugebėjimas gali būti nustatytas atspindžio matavimais, audinio gabalėlius išskalbus su fermentu ar be jo, prietaise audinių atsparumui matuoti arba tergotometre. Laboratorinė išradimo test-sistema turi pliusų imituotose namų ūkio sąlygose tiriant DNR mutagenezės būdu modifikuotų proteolitinių fermentų panaudojimą.

Atitinkamai išradimas leidžia testuoti daugelį įvairių fermentų ir atrinkti tuos iš jų tuos, kurie labiau tinka naudojamo ploviklio tipui. Tokiu keliu gali būti atrinkti "pagaminti pagal užsakymą" fermentai, skirti panaudoti ypatingose sąlygose.

Kai kurias bakterines serino proteazes vadina subtilizinais. Subtilizinais - tai *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* ("BPN' subtilizinais") ir *Bacillus licheniformis* (Carlsberg'o subtilizinas). Žr. apžvalgą Markland ir Smith (1971) "The Enzymes" (Bayer ed.), 3t., 561-608, Academic Press, New-York. Kai kurie alkalofiliniai *Bacillus* kamienai produkuoja kitokias proteazes. Pastarųjų pavyzdžiu gali būti Maksakalio serino proteazės, toliau žymimos kaip PB92 proteazės (iš naujos rūšies PB92 *Bacillus* genties) ir anksčiau minėta Savinazė.

PB92 proteazės aminorūgščių seka parodyta Fig. 4. Pilna proteazė susideda iš 269 amino rūgščių, jos molekulinė masė apie 27000 D, jos izoelektrinis taškas sutampa su aukšto šarmingumo reikšmėmis. Proteazės PB92 aktyvumas baltyminio substrato atžvilgiu išreiškiamas šarmingumo Delta vienetais (ŠDV). Aktyvumas ŠDV nustatomas pagal metodiką, pateiktą Didžiosios Britanijos patente Nr.1353317, išskyrus tai, kad vietoje pH 8,5, matuojama prie pH 10. Grynintos PB92 proteazės aktyvumas 21000 ŠDV. Katalitinė konstanta (k_{cat}), matuojant su kazeinu, yra 90 sek^{-1} .

Gryninto Karlsbergo subtilizino specifinis aktyvumas (Delange ir Smith. J. Biol. Chem. **243** (1968) 2184) yra 10000 ŠDV/mg. BPN' subtilizino (Matsubora ir kt., J. Biol. Chem. **240** (1965) 1125) - iki 7000 SDV/mg. Be tokių rodiklių, kaip specifinis aktyvumas ir K_{cat} PB proteazė skiriasi nuo Karlsbergo subtilizino, BPN' subtilizino ir kitų tipų proteazių, panaudojamų plovikliuose

(pvz., Maksatazėje ir Alkalazėje), tuo, kad turi didelį teigiamą krūvį, kas gali būti vizualiai nustatyta, atliekant natūralaus baltymo gel-elektroforezę (žr. eksperimentinę dalį 4).

5

Kadangi PB92 proteazė aktyviai šalina dėmes šarminėje aplinkoje, ją paprastai naudoja kaip priedą plovikliuose kartu su kitais jų komponentais, tokiais kaip: paviršiaus aktyvios medžiagos, struktūrikliai ir oksidantai. Pastarieji komponentai dažniausiai naudojami miltelių pavidalu. Šalinant dėmes, PB92 proteazė pasižymi didesniu aktyvumu, negu kiti anksčiau minėti subtilizina. Tai reiškia, kad PB92 proteazės reikės mažiau, norint gauti tą patį skalbimo efektą.

15

PB92 proteazės, kaip ir kitų žinomų plovikliuose naudojamų serino proteazių, didelis trūkumas yra polinkis oksiduotis (žr. Stauffer ir kt., J. Biol. Chem., **244** (1969) 5333-5338; Estell ir kt. J. Biol. Chem. **263** (1985) 6518-6521). PB92 proteazės oksidacija vandenilio peroksidu arba perrūgštimis, susidarančiomis aktyvatoriaus sistemoje, kurioje yra perborato tetrahidratas, sumažina fermento aktyvumą atitinkamai iki 50% ir 10% (ŠDV), palyginus su neoksiduota PB92 proteaze (žr. Eksperimentinę dalį, 1 ir 7 pavyzdžius).

25

Šio išradimo būdu labai sėkmingai gali būti gaunami ir atrenkami mutantiniai proteolitiniai fermentai, kilę iš natūraliomis sąlygomis bakterijų produkuojamų serino proteazių. Tokių mutantų pavyzdžiu gali būti mutantai, koduojami geno, gauto iš laukinio tipo alkalofilinio *Bacillus* kamieno, geriausiai PB92, geno. Taip pat tinka ir mutantai, gauti iš šarminės serino proteazės Savinazės (*Bacillus*). Be to šis būdas gali būti sėkmingai panaudotas atrenkant modifikuotas proteazes iš proteazių, besiskiriančių nuo alkalofilinių *Bacillus* PB92 kamienų serino proteazių. Pavyzdžiui, yra žinomi genai,

35

koduojuantys *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis* serino proteazės, ir jie gali būti panaudoti kaip mutagenizacijos objektai. Akivaizdu, kad norint įvykdyti efektyvią proteazės geno mutaciją, gali būti panaudota tiek sait-specifinė mutagenizacija, da-
lyvaujant oligonukleotidui, tiek ir nukreipta į visą sritį atsitiktinė mutagenizacija, arba bet kuri kita mutagenizacijos rūšis.

- 10 Mutantinių proteolitinių fermentų atrankos būdas (api-
mantis mutantų gavimą ir atskyrimą) susideda iš šių
stadijų; mutagenizacija klonuoto geno, koduojančio norimą
gauti proteolitinį fermentą ar jo fragmentą; gauto mu-
tantinio proteazės geno ar genų išskyrimas; mutantinio
15 proteazės geno ar genų įvedimas į atitinkamą kamieną-
šeimininką, geriausiai pasinaudojant tinkamu vektoriu-
mi, ekspresijai ir fermento gaminimui; gautos mutanti-
nės proteazės išskyrimas ir pagerintų savybių mutanti-
nės proteazės, tinkamos panaudoti plovikliuose, identi-
fikacija.

Mutantinių proteazių produkavimui tinkami kamienai-šei-
mininkai - tai linę transformuoti mikroorganizmai, ku-
riuose gali būti gauta proteazių ekspresija. Ypač tam
25 tinka tos pačios genties ir rūšies kamienai-šeimininkai,
iš kurių proteazės yra išskirtos, tarp jų yra ir
Bacillus kamienai, bet labiausiai pageidaujamas nauja
Bacillus PB92 rūšis ir jos mutantai, turintys iš esmės
tas pačias savybes. Rekomenduojami taip pat kamienai iš
30 *B. subtilis*, *B. licheniformis* ir *B. amyloliquefaciens*.
Kiti tinkami ir rekomenduojami kamienai-šeimininkai,
tai tie kamienai, kurie iš esmės nesugebėjo produkuoti
nelastelinių proteolitinių fermentų prieš transforma-
ciją mutantiniu genu. Ypatingai dėmesio verti *Bacillus*
35 kamienai-šeimininkai, pasižymintys proteazės deficitu,
tokie kaip nauja *Bacillus* PB92 rūšis. Proteazės ekspre-
sija pasiekama panaudojant ekspresijos signalus, iš-

ryškėjančius pasirinktame kamiene-šeiminike. Ekspresijos signalai įjungia DNR sekas, reguliuojančias proteazės genų transkripciją ir transliaciją. Tinkami vektoriai sugeba replikuotis, sudarydami pakankamai didelių kopijų skaičių pasirinktame kamiene-šeimininke, arba proteazės genas patvariai įsitvirtina kamiene-šeimininke, įvykus chromosominei integracijai.

Pagal šį išradimą mutantiniai proteolitiniai fermentai gali būti gauti, kultivuojant atitinkamose fermentacijos sąlygose transformuotą kamieną-šeimininką, turintį pageidaujamą mutantinį proteolitinį geną arba genus, vėliau išskiriant gautus fermentus.

Rekomenduojama, kad ekspresuotos proteazės būtų sekretuojamos į kultūrinę terpę, kas palengvintų jų išskyrimą, arba gram-teigiamų bakterijų kamienų-šeimininkų atveju, susikaupų periplazmoje. Sekretavimui naudojama aminorūgščių signalinė seka, geriausiai tam tinka signalinė seka, koduojama inicijuojančio geno, jeigu jis funkcionalus pasirinktame kamiene-šeimininke.

Sutinkamai su vienu iš išradimo aspektų, gali būti sukurti plovimo galios tyrimo metodai, kai pakartojamos bet kokios namų skalbimo sąlygos, atitinkančios rinkos siūlymus. Pavyzdžiui, sukurtas metodas tirti Europos rinkos padiktuotomis griežtomis sąlygomis naudojamus skalbimo miltelius, kuriuose panaudojami miltelių komponentai su balinimo medžiagomis arba be jų, kai ploviklio koncentracija tirpale 1-10 g/l, vandens kietumas 10-20°KL (kietumo laipsniai) ir temperatūra 25-80°C. Konkrečiau, ploviklis susideda iš miltelių komponentų, jame taip pat yra TAED ir perboratas, ploviklio koncentracija tirpale 4,7 ar 10g/l, temperatūra 15°C ir 40°C.

Be to, pateikiami bandymo metodai, imituojantys skalbimą skystais plovikliais. Tokių ploviklių koncentracija paprastai būna 1,5-5 g/l tirpalo, esant 5-10°KL, temperatūros intervalas 15-40°C. Konkrečiau, panaudojamos skystos skalbimo kompozicijos be balinimo priemonių, esant ploviklio koncentracijai 1,5 g/l tirpalo, 5°KL ir 25-40°C, kas atitinka sąlygas, taikomas Europoje skystiems plovikliams.

10 Gali būti sukurti ir kiti plovimo galios išbandymo būdai, atitinką kitas rinkos diktuojamas sąlygas. Tiriant kokią specialią skalbimo ypatybę, panaudojami audinių pavyzdžiai. Konkrečiai, pavyzdžiai iš EMPA 116 ir 117, ištepti dėmėmis, kurias gali veikti proteazė, iš dalies
15 audiniai, ištepti krauju, žole, šokoladu arba baltyminiais produktais.

Gamtoje randamų arba patyrusių natūralią mutaciją proteazių savybė gali būti sustiprintos, sukialiant fermente eilę mutacijų. Dažniausiai mutacijos yra pavelduojamo pobūdžio, kaip konservatyvaus, taip ir nekonservatyvaus tipo, tačiau taip pat gali būti delecijos ir intarpai.

25 Konservatyviems pakeitimams gauti galima pasinaudoti lentele:

Alifatinės

Neutralios

nepoliarinės

G, A, P

L, I, V

poliarinės

C, M, S, T, N, Q

Turinčios krūvį

anijoninės

D, E

katijoninės

K, R

Aromatinės

F, H, W, Y

- kur bet kuri aminorūgštis gali būti pakeista kita tos pačios kategorijos aminorūgštimi, tarp jų ir esančia toje pačioje eilutėje. Be to, poliarinės aminorūgštys N, Q gali pakeisti arba būti pakeistos turinčiomis
- 5 krūvį aminorūgštimis. Šio išradimo tikslams ypatingai įdomūs pakeitimai, sustiprinantys proteazės anijoninę prigimtį, ypač su aktyviais centrais nesusijusiose vietose.
- 10 Mutacijoms ypač svarbios tos aminorūgštys, kurios lokalizuotos srityje, per 4Å nutolusioje nuo inhibitoriaus molekulės Eglin C, kai Eglin C susirišęs su aktyviu saitū.
- 15 Žemiau pateikta numeracija, pasiremiant PB92 proteazės struktūra, tačiau tie samprotavimai tinka ir kitoms homologiškoms serino proteazėms, iš dalies proteazėms, kurių homologiškumas viršija 70%, o ypač, kai viršija 90%. Šios padėtys - tai: 32, 33, 48-54, 58-62, 94-107,
- 20 116, 123-133, 150, 152-156, 158-161, 164, 169, 175-186, 197, 198, 203-216, ir pagrindinė nurodytų padėčių dalis turi būti prieinama betarpiškam kontaktui su baltyminiu substratu. Paprastai, 32, 62, 153 ir 215 padėtyse nesiekama daryti pakeitimų, kadangi mutacijos šiuose
- 25 saituose sumažina plovimo galią.
- Ypatingą reikšmę pakeitimo prasme turi šios padėtys: 60, 62, 94, 97, 102, 105, 116, 123-128, 150, 152, 153, 160, 183, 203, 211, 212 ir 213-216. Kai kuriose padėtyse
- 30 turės tendenciją pakeisti neatsparią oksidininui aminorūgštį, pavyzdžiui metioniną, atsparesnę, pavyzdžiui treoniną, tuo pačiu išsaugant šioje padėtyje bendrą konformaciją ir aminorūgšties tūrį. Kaip buvo pastebėta kitose situacijose, gamtinės aminorūgšties pakeitimas
- 35 bet kuria kita aminorūgštimi gali pagerinti rezultatus, ypač, pakeičiant hidroksilintas aminorūgštis S ir T

poliarine, nepoliarine arba netgi aromatine aminorūgštimimi.

Ypatingo susidomėjimo verti šie pakeitimai:

5

G116 I,V,L

S126 bet kuri aminorūgštis

P127 bet kuri aminorūgštis

S128 bet kuri aminorūgštis

S160 anijoninė ar neutrali aminorūgštis, arba R

A166 turinti krūvį, ypač anijoninė aminorūgštis

M169 neutrali alifatinė, geriau nepoliarinė aminorūgštis

N122 anijoninė aminorūgštis

M216 alifatinė poliarinė, ypač S, T, N, Q

Netikėta buvo tai, kad tuo metu, kai daugelis mutacijų sumažina specifinį proteazės aktyvumą įprastų substratų atžvilgiu, jų plovimo galia lieka tokia pat arba padidėja, palyginus su natyviais fermentais, daugeliu atvejų padidėja stabilumas laikant.

Kai kurių PB92 proteazės mutantų plovimo galia, išreiškus ją kaip atvirkščią dydį santykiniam fermento kiekiui, kuris būtinas norint pasiekti tą patį efektą kaip ir natyvinių proteazių atveju, padidėja iki 120%, kai kuriais atvejais - iki 180%.

Dar vienas išradimo aspektas - tai, kad gaunami PB92 proteazės mutantai, kurie, palyginus su natyvia PB92 proteaze, yra stabilesni, laikant miltelių pavidalo skalbimo kompozicijoje su balinimo priemone, o jų plovimo galia nepakinta. Tokių mutantų pavyzdžiu gali būti M216S ir M216Q, kurie turi ne mažiau vienos iš nurodytųjų mutacijų šalia mutacijų kituose saituose.

Dar vienas išradimo aspektas yra tas, kad netikėtai pastebėta, kad skystoje skalbimo kompozicijoje (be oksidintojo) PB92 proteazės mutantai M216S, M216Q, S160D ir N212D išsaugo savo aktyvumą geriau negu PB92 proteazė. Iš paminėtų mutantų M216S ir M216Q išsaugo plovimo galia, o S160D ir N212D ją dar pagerina. Laikant nurodytame skystame ploviklyje, stabilumas ypač padidėja turint S160D ir M216Q mutantus. Taip pat galima derinti kelias mutacijas, didinant proteazės stabilumą skalbimo kompozicijose. Kelios mutacijos, teigiamai veikiančios vienos ir tos pačios proteazės plovimo galia, gali susijungti viename mutavusios proteazės gene, tuo atveju gali būti gautos dar geresnės proteazės, pavyzdžiui [S126M, P127A, S128G, S160D] ir [G116V, S126N, P127S, S128A, S160D]. Nauji proteazės mutantai gali būti gauti, derinant gerą jų plovimo galia, pavyzdžiui, dėka N212D ir S160D mutacijų, su geresniu stabilumu dėl M216S ir M216Q mutacijų. Pavyzdžiui, mutantai [S160D, M216S] pasižymi stipresne plovimo galia ir didesniu stabilumu laikant.

Vertingi mutantai gali būti gauti, derinant bet kurią mutaciją su eile šiame skyriuje aprašytų mutacijų. Be to galima derinti aprašytas mutacijas su mutacijomis kituose saituose, rezultate jos gali iš esmės pakeisti fermento savybes arba jų nepakeisti.

Rekomenduojami šio išradimo realizacijos variantai PB92 proteazėje gali būti tokie: [M216S]; [M216Q]; [N212D]; [S160D]; [S160G, N212D]; [S160D, M216Q]; [S160D, M216S]; [A166D, M169I]; [G116V, S126V, P127E, S128K]; [G116V, S126G, P127Q, S128I]; [G116V, S126L, P127N, S128V]; [G116V, S126L, P127Q, S128A]; [G116V, S126V, P127M]; [G116V, S126H, P127Y]; [G116V, S126R, P127S, S128P]; [G116V, S126F, P127Q]; [G116V, S126F, P127L, S128T]; [S126M, P127A, S128G]; [S126M, P127A, S128G, S160D] ir [G116V, S126N, P127S, S128A, S160D].

Norint pailiustruoti šiame išradime panaudoto naujų plovikliams tinkamų proteazių gavimo būdo svarbą, t.y. išbandymą tipiškose skalbimo sąlygose, naudojant kaip pirminės atrankos kriterijų, PB92 proteazės mutantų plovimo galios tyrimo rezultatai buvo lyginami su biocheminiais rodikliais, dažniausiai nustatomais biocheminiuose ir enzimologiniuose baltymų tyrimuose. Palyginimo rezultatai leidžia padaryti išvadą apie tai, kad nėra jokio ryšio tarp plovimo galios ir rodiklių, lemiančių giminingumą pasirinktiems substratams bei proteolitinių reakcijų kinetiką (žr. 1 lentelę, 1 pavyzdyje).

Tokiu būdu, savaime aišku, galima apjungti du ar daugiau mutantus su skirtingomis savybėmis viename fermentiniame produkte arba tame pačiame skalbimo procese. Toks derinimas gali turėti arba neturėti sinergetinio poveikio.

Išradimas taip pat apima vieno ar kelių proteolitinių mutantinių fermentų panaudojimą skalbimo kompozicijoje arba skalbimo procese.

Ir pagaliau aišku, kad delecija arba aminorūgščių in-tarpai proteazės polipeptidų grandinėje, įterpti dirbtiniu būdu mutagenezės pagalba arba atsiradę natūraliai proteazėse, homologiškose PB92 proteazei, gali pakeisti aminorūgščių numeraciją. Tačiau būtina paaiškinti, kad padėtys, homologiškos padėtimis PB92 proteazėje, taip pat įeina į teisių turinį.

Išradimo iliustravimui siūlome šiuos pavyzdžius, tačiau be išradimo apribojimų.

EKSPERIMENTINĖ DALIS

Medžiagos ir metodai

5 **1. PB92 proteazės mutantų konstravimas**

Bazinė konstrukcija, nuo kurios pradedama mutagenezė, pažymėta kaip pM58 ir detaliai aprašyta Europos patento paraiškoje Nr.0283075.

10

Konstravimo strategiją sudaro sekančios trys fazės:

1. a. Mutagenezės vektoriaus M13M1 konstravimas.

15 **1. b. Mutacijos atlikimas.**

1. c. Vektoriaus pM58 Eco konstravimas ir mutacinio DNR fragmento subklonavimas šiame vektoriuje.

20 **1. a. Mutagenezės vektoriaus M13M1 konstravimas.**

Bazinė konstrukcija pM58 surenkama restrikcijos fermentų HpaI ir Ball pagalba. Fragmentas iš 1400 bazių porų, turintis PB92 proteazės geną, gryninamas žemos lydomosi temperatūros agarozėje (Maniatis, Molecular cloning. Laboratory manual, Cold Spring Harbor, 1982).

25

Vektorius M13MP11 (Messing ir kt., Nukl. Acids Res. **9**, (1981)303-321) sukonstruojamas, panaudojant SmaI. Anksčiau gautas DNR fragmentas iš 1400 bazių porų įstatomas į šį vektorių ir transformuojamas į *E. coli* JM101 pagal metodiką, aprašytą Cohen su bendr. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **69**, (1972) 2110-2114.

30

Po faginio padauginimo *E. coli* JM101, išskiriamas ssDNR fragmentas, (Heidecker ir kt., Gene **10**, (1980) 69-73., intarpas ir jo orientacija kontroliuojami DNR sekvena-

35

vimu (Sanger ir kt. Proc. Natl. Acad. Acad. Sci. USA 74 (1977) 6463.

5 Rezultate gaunamas mutagenezei atlikti tinkamas vekto-
rius, kuris pažymėtas M13M1. Aprašyta procedūra schema-
tiškai pavaizduota Fig.1A.

1. b. Mutacijos atlikimas.

10 Mutagenezė atliekama panaudojant M13M1, su šio vekto-
riaus ssDNR ir M13mpl9 su dsDNR (Messing ir kt.,
Nucleic Acids Res. 9, (1988)303-321), po to pastarasis
vektorius pritaikomas restrikcijos fermentais EcoRI ir
15 Hind III, vėliau išgryninat didįjį fragmentą žemos ly-
dymosi temperatūros agarozėje.

Mutagenezė atliekama pagal Kramer ir kt. metodiką:
Nucl. Acids Res., 12 (1984) 9441-9456, pakeitus joje
tai, kad mutantų atrankai vietoje *E. coli* WK 30-3 pa-
20 naudojama *E. coli* JM105.

Specifinių mutacijų sukūrimui naudojami oligonukleo-
tidai susideda iš 22 nukleotidų. Specifinės mutacijos
sritis, kuri panaudojama kelių mutacijų sukūrimui vienu
25 metu specifinėje DNR sekoje, gaunama, panaudojant 40
nukleotidų preparatą turintį visus keturis nukleotidus
netvarkingai įterptus į saitų, atitinkančius pasirink-
tą mutacijai aminorūgštį ar rūgštį.

30 Po mutagenezės kiekviena potencialių mutantų mutacija
buvo tikrinama, sekvenuojant didezoksi metodu (Sanger,
žr. aukščiau). Visas vienos grandinės fragmentas (žr.
Fig.1 B buvo sekvenuojamas, norint patikrinti, ar nėra
antrinių mutacijų. Metodika schematiškai parodyta Fig.1 B.

Išdėstyta procedūra gali būti panaudota, norint sukurti DNR fragmentus su mutacijomis proteazės geno 3' gale (aminorūgštys 154-269).

- 5 Norint sukurti DNR fragmentus su mutacija proteazės geno 5' gale *Bacillus* vektoriuje, gali būti panaudoti alternatyvūs restrikcijos fermentai ir gali būti sukonstruoti modifikuoti PB92 proteazės genai pagal metodiką, analogišką metodikai, parodytai Fig.1 A.

10

1. c. Vektoriaus pM58δEco konstravimas ir mutacinių DNR fragmentų subklonavimas šiame vektoriuje (Fig. 1 C).

- 15 Norint sukonstruoti pM58 δ Eco, pM58 buvo skaldomas restrikcijos fermentu Eco RI ir praskiedimo sąlygose liguojamas su T4 ligaze. Gautas ligavimo mišinys buvo panaudotas *B. subtilis* 1-A40 (*Bacillus* genetinių kamienų centras, Ohio) transformacijai pagal Spizizen ir kt., J. Bacteriol. **81** (1961) 741-746.

20

Ląstelės iš transformacijos mišinio buvo perkeltos į minimalias lėkšteles su 20 µg/ml neomicino, kaip aprašyta Europos patento Nr.0283075 1 pavyzdyje.

- 25 Plazmidinės DNR transformantai išskiriami pagal Birnboim ir Doly, Nucleic Acids Res. **7** (1979) 1513-1523, ir charakterizuoti analizuojant restrikcijos fermentais. Tokiu būdu buvo išskirtas pM58δ Eco (žr. Fig.1 c).

- 30 Norint gauti mutantinį fermentą, DNR fragmentai M13M1, turintys pageidaujamas mutacijas, sukauptas, kaip aprašyta 1 b skyriuje, buvo subklonuoti į pM58δEco. M13M1 dsDNR (aprašyta aukščiau) buvo skaldoma su EcoRI ir liguojama į pM58 Eco saitą EcoRI. Ligavimo mišinys
35 panaudojamas transformuoti *B. subtilis* DB104, Doi, J. Bacteriol. (1984) 160, 442-444, panaudota Spizizen ir kt. metodą (žr. aukščiau).

Ląstelės iš transformacijos mišinio perkeliamos į minimalias lėkšteles su 20 µg/ml neomicino ir 0,4% kazeino (Europos patentas Nr. 0283075). Proteazės, produkuojančios transformantus, DNR buvo išskirta pagal metodą, aprašytą Birnboim ir Doly, (žr. aukščiau) ir charakterizuota, analizuojant restrikcijos fermentų pagalba.

2. Mutantinių proteazių gavimas.

Transformantais DB104, kuriuose aptiktas vektorius su mutaciniu proteazės genu, užsėjama 10 ml triptono - sojos buljono (TSB), į kurią pridėta 20 ml µg/ml neomicino, ir inkubuojama 24 val. 37°C temperatūroje. Kultūros mėginiais (0,1 ml) užsėjamos 500 ml tūrio kratyklinės kolbos su 100 ml terpės proteazei gaminti: 12,5 g/l mielių ekstrakto (Difco), 0,97 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2,25 g/l $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 20 mg/l $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1mg/l $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g/l citrato, 0,5 ml/l putų gesintojo 5693, 6% (svor./tūr.) maltozės, 0,2 M fosfatinio buferio pH 6,8 su 20 µ/ml neomicino.

Po 65 val. inkubavimo, pastoviai maišant, matuojamas proteazės aktyvumas pagal Lin ir bendr. metodiką, (J. Biol. Chem. **244** (1969) 789-793) su substratu dimetilkazeinu. Norint gauti didelius kiekius laukinio tipo PB92 proteazės ir mutantinės PB92 proteazės, tuos pačius kamienus augina 37°C temperatūroje aeruojamuose 10 l talpos ir didesniuose fermentatoriuose su tokia pat terpe, kaip ir kratyklinėse kolbose.

Gauti kultūriniai skysčiai naudojami proteazei išskirti.

3. PB92 laukinio tipo proteazės ir jos mutantų grynimas ir koncentravimas

Mutantinė ar natyvi pB92 proteazė, gauta iš *Bacillus subtilis* DB104 kratyklinėse kolbose arba 10 l talpos

- fermentatoriuose, gryninama katijonų mainų chromatografijos būdu, panudojant diskus Zeta-Prep^R arba PS tipo (LKB) patronus. Fermentacijos mišinys centrifuguojamas (3000 x g, 10 min.), skystis atskiriamas ir 10 kartų praskiedžiamas 10mM natrio fosfato buferiu (pH 5,5) po to perkiamas į kolonėlę su sorbentu. Patronas plaukamas keliais tūriais fosfatinio buferio, proteazė eliuojama 0,4 M NaCl. Aktyvios frakcijos koncentruojamos ultrafiltracijos būdu Amicon aparate, filtras PM-10. Natrio chlorido koncentracija sumažinama iki 50 mM praskiedžiant proteazės tirpalą fosfatiniu buferiu ir sukcentruojant. Laikoma -30°C temperatūroje esant baltymo koncentracijai 1-10 mg/ml.
- Arba PB92 proteazės mutantai iš didelių suspensijos tūrių išskiriami, pridedant CaCl (1% sv./sv.) į acetoną (30% sv./sv.) po filtracijos ląstelių masė atskiriama, proteazė išsodinama iš gauto filtrato, pridedant 0,2-2% (sv./sv.%) CaCl₂·2H₂O ir dar pridedant acetono iki jo galinės koncentracijos > 60,0% (sv.%). Nuosėdas filtruoja, apšlaksto acetonu ir išdžiovinę gauna pradinio fermento miltelius (PFM).

4. Proteazių grynumo kontrolė.

- Proteazės laikomos grynios, jeigu elektrforezėje arba HPLC chromatografijos metodais gaunama viena juosta arba pikas.
- Elektroforezė poliakrilamido gėlyje (PAGE) su natrio dodecilsulfatu (NaDS) atliekama pagal Laemmli, Nature, **227** (1970) 680-685. Norint išvengti fermento denatūravimosi NaDS, 100°C temperatūroje ir jo autodegradavimo, reikia proteazę inaktyvuoti, inkubuojant ją su fenilmetilsulfonilfluoridu (FMSF) (1 mM, 30 min. kambario temperatūroje) arba išsodinti trichloracto rūgštimi (TChA, 8%, 30 min., lede). PAGE atliekama prie pH 7,45

(gėlio buferis, susideda iš 20 mM histidino (His) ir 50 mM 3-/N-morfolino/propansulfonrūgšties (MOPS) 5% poliakrilamido gėlyje (akrilamido: bioakrilamido santykis 20:1). Baltymo pavyzdžiai užnešami viršutinėje gėlio plokštelės dalyje ir elektroforeze nukreipiami katodo link. Tas pats His/MOPS buferis naudojamas atliekant elektroforezę rezervuare, tačiau prie pH 6,3. Po elektroforezės 1,5-2 val., 350 V) baltymai fiksuojami gėlyje 8% acto rūgštimi, nudažomi Coomassie brilliant mėlynuoju R250 ir išplaunami pagal standartinę metodiką.

Grynumas tikrinamas HPLC chromatografija katijonitų kolonėlėse (MonoS-Pharmacia Fine Chemicals) ir gel-filtracija kolonėlėse (TSK 2000 SW-LKB). Chromatografijai naudojamas 10 mM natrio fosfato buferis pH 5,5, proteazės eliacija atliekama linijiniu 10-300 mM natrio fosfato buferio (pH 5,5) gradientu. Gel filtracijos kolonėlėse naudojamas 0,25 M natrio acetatas (pH 5,5).

20 5. Proteazės koncentracijos nustatymas.

Baltymo koncentracija gryninto fermento tirpale nustatoma:

25 1. matuojant absorbciją ties 280 nm, pasinaudojant paskaičiuotu ekstinkcijos koeficientu (e_M) ir

2. aktyvaus saito titravimu.

30 Ekstinkcijos koeficientas skaičiuojamas, remiantis triptofanų ($e_M = 5600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) ir tirozinų ($e_M = 1330 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) skaičiais, tenkančiais proteazės molekulei. PB92 proteazei $e_M = 26100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. (3 Trp, 7 Tyr liekanų), kas ekvivalentiška koeficientui $E_{1\text{cm}}^{\frac{1}{2}}$, išmatuotam ties 280 nm =
35 9,7 ($M_r = 26729 \text{ Da}$). Turint mutantus su skirtingu Tyr ir Trp kiekiu, padaromos atitinkamos pataisos.

Aktyvių fermento molekulių skaičius nustatomas, titruojant aktyvų saitą. Kadangi plačiai naudojamas N-trans-cinamoiloimidazolo metodas (M.L. Bendor ir kt., J. Am. Chem. Soc. **88** (1966) 5890-5931 neduoda patenkinamų rezultatų PB92 proteazės atveju, mes sukūrėme metodą su FMSF. Pagal šį metodą žinomos koncentracijos (matuojant absorbciją 280 nm) proteazės tirpalas sumaišomas atitinkamai su 0,25, 0,5, 0,75, 1,0 arba 1,25 ekvivalentais FMSF ir paliekama 1 val. kambario temperatūroje 10 mM natrio fosfate (pH 6,5). Fermento koncentracija turi būti ne mažiau 50 μ M.

Liekamasis aktyvumas išmatuojamas spektrofotometru, kaip substratą panaudojanti suksinil- L-alanil- L alanil- L-prolil- L-fenil-alanil-paranitroanilidą (sAAPFpNA), (žr. žemiau).

FMSF grynumas, o (tuo pačiu ir koncentracija) nustatoma BMR-spektroskopijos pagalba, tiriamieji tirpalai ruošiami izopropanolyje. Rezultatai, gauti titruojant aktyvią fermento zoną, sutampa su HPLC rezultatais.

6. Laukinio tipo ir mutantinių proteazių kinetinių parametrų nustatymas

1°. Aktyvumai su baltyminiiais substratais (kazeinu) matuojami prie pH 10 pagal Didžiosios Britanijos patentą Nr. 1353317 (išreiškiamas šarminiais Delfta vienetais, ŠDV).

2°. Efektyvumas, matuojant su kazeino substratu, nustatomas pH-statū. Į reakcijos kamerą (Radiometer, Kopenhaga) įpilama 10 ml 0,1 M KCL, kuriame ištirpinta 50 mg kazeino (Hammerstein) Merck). Protonai, išsiskybę po kazeino hidrolizės proteaze, titruojami 10 mM NaOH, palaikant pH 10 (40°C azoto dujų srovėje).

3°. Aktyvumai sintetinių peptidų atžvilgiu matuojami, panaudojant sAAPFpNA. Susidaręs (geltonas) paranitroanilidas (pNA) matuojamas spektrofometru UVIKON 860 (KONTRON) ties 410 nm: $e_M = 8480 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (E.G. Delmar ir kt. Anal. Biochem. **94** (1979) 316-320) šešių kiuvečių termostatuotoje kasetėje. Kinetinės konstantos k_{cat} ir K_m gaunamos, matuojant pradinį reakcijos greitį įvairiose substrato koncentracijose (PB92 proteazei 0,1-6,0 mM), priartindami gautus duomenis prie hiperbolinės funkcijos nelineinės regresijos būdu. Paskaičiuojamos specifškumo konstantos (k_{cat}/K_m). Matuojama 25°C temperatūroje 1 ml tūryje, kuriame yra 0,1 M Tris-HCl + 0,1 M NaCl, pH 8,6. Natrio chloridas būtinas, kadangi be jo PB92 proteazei negaunama Linweaver-Burck'o kreivių linijinės priklausomybės dėl inhibicijos substratu. Substratas pradžioje gaminamas 200 mM koncentracijos, po to praskiedžiamas iki 20 mM 0,1 M Tris-HCl (pH 8,6) buferiu (matuojama spektrofotometru ties 315 nm; $e_M = 14000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Jokios korekcijos dėl kintančios tirpiklio koncentracijos (0,05-3% t./t.) nereikia.

7. PB92 proteazės oksidininimas

PB92 proteazės jautrumas oksidacijai H_2O_2 tiriamas Estell metodika (J. Biol. Chem. **260** (1985) 6518-652) išskyrus tai, kad:

- 1) vietoje 100 mM H_2O_2 imamas 20 mM tirpalas ir
- 2) kaip papildomas oksidintojas naudojamas 20 mM natrio perborato tirpalas su 10 mM TAED.

8. Plovimo galios tyrimas

PB92 proteazės mutantai tiriami specialiai sukurtame skalbimo eksperimente panaudojant medvilnės arba poliesterio-medvilnės gabalėlius, išteptus pienu, krauju ir

rašalu (pažymėti 116 ir 117 numeriais, 5,0x5,0 cm, gauti iš EMPA, St. Gallen, Šveicarija).

Bandymai atliekami firmos Atlas prietaisu LEF-FC, kuriuo matuojamas audinių atsparumas skalbimui. Prietaiso komplekte skalbimo indai iš nerūdijančio plieno, kiekvienas iš jų užpildomas nurodyta skalbimo kompozicija, pridedant tiriamą proteazę (PB92 proteazės mutantai arba PB92 proteazė). Jeigu nėra atskirų nurodymų, bandymas trunka 30 min užsiduotoje temperatūroje. Po skalbimo audinių pavyzdžiai džiovinami oru ir Photovolt fotometru (modelis 577) su žaliu filtru, 680 nm matuojama bandomų audinių atspindžio galia. Duomenys, gauti audinio gabaliukus išskalbus plovikliais, kuriuose yra atitinkami PB92 proteazės mutantai, palyginami su serija matavimų, kai panaudoti plovikliai su PB92 proteaze. Mutantinių proteazių plovimo galia apskaičiuojama dalijant PB92 proteazės baltymo kiekį (mg) iš mutantinės PB92 proteazės baltymo kiekio (mg), kurio prireikė tai pačiai atspindžio galiai pasiekti, x 100%.

1 PAVYZDYS

A. Įvairių PB92 proteazės mutantų plovimo galia Europos skalbimo milteliuose nustatoma aukščiau išdėstytu metodu.

Į bandymui naudojamus nerūdijančio plieno indus, su nurodytu kiekiu skalbimo miltelių IES, ištirpintų 250 ml vandens (KL 15°), įmerkama po du medvilnės ir poliesterio/medvilnės audinio pavyzdžius. Skalbimo miltelių IEC sudėtis:

<u>Komponentas</u>	<u>masės%</u>
Linijinis natrio alkilbenzensulfonatas (vidutinis alkano grandinės ilgis C11.5)	6,4
Etoksilintas aukštesnysis alkoholis (14 EO)	2,3
Natrio muilas	2,8
Natrio tripolifosfatas (NaTPF)	35,0
Natrio silikatas	6,0
Magnio silikatas	1,5
Karboksimetil/celiuliozė	1,0
Natrio sulfatas	16,8
Natrio perborato tetrahidratas	18,5
TAED	1,5
Įvairūs + vanduo	iki 100.

5 Į kiekvieną indą pridedamas pasirinktas grynas PB92 proteazės mutantas koncentracijos intervale 0-1,74 mg (grynos) proteazės litrai pamuilių su priedais. Viena indė kontrolinė PB92 proteazė. Skalbiama 40°C temperatūroje. Rezultatai pateikti 1 lentelėje.

1 lentelė

PB92 proteazės ir kai kurių jos mutantų savybės

Proteazė	Plovimo galia, lyginant su PB92 proteaze %		Santykinis aktyvumas, lyginant su PB92 proteazės aktyvumu		Kinetiniai parametrai		
	Ploviklio koncentracija skalbimo tirpale	4g/l	7g/l	%	K_m mM	k_{cat} 1/s	k_{cat}/K_m 1/s.mM
PB92 proteazė	100	100	100	100	1,0	105	102
M216-oksiduota	80	80	80	50	1,1	10	9
M216S	100	90	90	40	1,3	7	5
M216Q	110	90	90	37	1,7	5	3
M216C	50			36	1,2	37	30
S160K	21	25	25	47	1,2	12	11
S160D	215	155	155	73	1,2	14	12
S160C	108			48	0,98	20	21
N212D	220	75	75	100	1,2	104	86
S160G, N212D	170			76	1,7	30	18
N212S	78			85			
E134K	13			95	1,1	56	49

1 lentelė (tesinys)

Proteazė	Plovimo galia, lyginant su PB92 proteaze %			Santykinis aktyvumas, lyginant su PB92		Kinetiniai parametrai		
	Ploviklio koncentracija skalbimo tirpale			%		K_m mM	k_{cat} 1/s	k_{cat}/K_m 1/s.mM
	4g/l	7g/l						
A166D, M169I	136			100				
S160D, M216Q	70	35		12				
S160D, M216S	145	70		17				
M117L, M216Q	68	70		27		0,9	4	2
M117L, M216S	61	80		36		1,7	8	8
G116V, S126V, P127E, S128K	250	105		43		3,0	260	86
G116V, S126L, P127N, S128V	165	165		81		4,1	260	65
G116V, S126L, P127Q, S128A	200	200		62		5,1	290	57
G116V, 126V, P127M	250	250		69		2,1	207	98
S126M, 127A, S128G	200	200		115		2,0	356	180
M169I, 216S	80	95		44				
G116V, S126Y, P127G, S128L	80	75		69				
G116V, S126N, P127H, S128I	90	110		115				

1 lentelė (tęsinys)

Proteazė	Plovimo galia, lyginant su PB92 proteaze %			Santykinis aktyvumas, lyginant su PB92		Kinetiniai parametrai		
	Ploviklio koncentracija	skalbimo tirpale	%	proteazės aktyvumu	%	K_m mM	k_{cat} 1/s	k_{cat}/K_m 1/s.mM
	4g/l	7g/l						
G116V, S126H, P127Y	113	87	73					
G116V, S126R, P127S, S128P	130	175	81					
G116V, S126F, P127Q	225	95						
G116V, S126G, P127Q, S128I	75	110	95			3,2	41	13
G116V, S126F, P127L, S128T	150	80				11,0	200	19

32

* Plovimo galia nustato prie 40°C NaTPF-te, kuriame yra skalbimo miltelių IEC

** Santykinis PB92 proteazės aktyvumas, priimta kaip 100%. Aktyvumas matuotas ŠDV metodu.

+ Matavimų sąlygos: substratas - sAAPFPNA; buferis - 0,1 M Tris-HCl, pH 8,6; 0,1 M NaCl; 25°C.

B. Plovimo galios tyrimų matavimai pakartojami 25°C temperatūroje su tais pačiais plovikliais ir su tais pačiais PB92 proteazės mutantais. Kontrolei naudojama ta pati PB92 proteazė. Kitos tyrimo sąlygos tos pačios, kaip aprašyta. Gauti rezultatai pateikti 2 lentelėje.

2 lentelė

PB92 proteazės mutantų plovimo galia 25°C temperatūroje, skalbimo milteliai su NaTPF, lyginant su PB92 proteaze (%)

Proteazė	Plovimo galia %/	
	Ploviklio koncentracija skalbimo tirpale	
	4 g/l	7 g/l
M216S	90	80
M216Q	95	80
N212D	250	135
S160D	185	120

C. Proteazės plovimo galia taip pat buvo nustatyta Europos skalbimo milteliams su befosfatine balinimo priemone.

Bandymus atlieka prietaisu audinių atsparumui tirti, skalbiant 25° ir 40° temperatūroje. Ir šiuo atveju palyginimui naudoja PB92 proteazę. Kitos bandymo sąlygos atitinka anksčiau aprašytąsias. Gauti rezultatai parodyti 3 lentelėje.

3 lentelė

5 PB92 proteazės mutantų plovimo galia 25° ir 40°C temperatūroje su befosfatine balinimo priemone Europos skalbimo milteliuose, lyginant su PB92 proteaze (%).

Proteazė	Plovimo galia (%)			
	Ploviklio koncentracija skalbimo tirpale			
	4g/l	7g/l	4g/l	7g/l
	temperatūra 25°C		temperatūra 40°C	
M216S	80	85	100	100
M216Q	80	80	120	100
N212D	170	105	200	75
S160D	170	105	230	165

2 PAVYZDYS

10 Buvo tiriamas PB92 proteazės mutanto stabilumas, laikant skalbimo milteliuose IEC, kaip ir 1 pavyzdyje. Stabilumas laikant tiriamas klimatiniuose stenduose 30°C temperatūroje, santykinis drėgnumas (SD) 80%. Proteazė šiems bandymams buvo kapsuliuojama tokiu būdu:

15 paruošiamas mišinys, kuriame (sv./sv.): 2% grynintos proteazės, 50% nejoninio (etoksilinto C₁₄-C₁₈ alkoholio su 50-80 E.O. vienetų), 5% TiO₂, 3-10% CaSO₄.2H₂O, Na₂SO₄ iki 100%. Mišinys šildomas iki 65-90°C ir ataušinamas
20 iki kambario temperatūros. Gautos 0,5-1 mm dalelės atskiriamos sijoiant ir panaudojamos tirti stabilumui plovikliuose.

25 Skalbimo milteliai IEC (3,5 g), į kuriuos pridėtas 6140 ŠDV/g skalbimo miltelių mutantas M216S, buvo laikomi 18 ml talpos kolbutėse. Palyginimui tose pačiose sąlygose buvo laikoma PB92 proteazė. Po 2, 4, 5 ir 6 sa-

vaičių buvo nustatomas išlikęs proteazės aktyvumas. Gauti rezultatai parodyti 4 lentelėje.

4 lentelė

PB92 proteazės ir jos mutantų liekamasis aktyvumas, laikant (savaites) 30°C temperatūroje ir esant 80% SD, skalbimo milteliuose.

Proteazė	Liekamasis aktyvumas (%)				
	0 sav.	2 sav.	4 sav.	5 sav.	6 sav.
PB92 proteazė	100	25	5	3	2
M216S	100	68	31	20	11

3 PAVYZDYS

Buvo tiriamas PB92 proteazės ir įvairių jos mutantų stabilumas, laikant skalbimo milteliuose. Stabilumo tyrimuose buvo naudojama kapsuliuota proteazė.

Proteazės produktai buvo gaminami, sumaišant šiuos komponentus 80°C temperatūroje:

<u>Komponentas</u>	<u>% masė</u>
AE*	50
TiO ₂	2
proteazė (CPF)	7
PVP**	1,5
BHT***	1
Na ₂ SO ₄	iki 100

* AE = C₁₄-C₁₈ polietoksilintas alkoholis. Alkoholis buvo etoksilintas 50-80 etileno oksido (EO) grupėmis.

** PVP = polivinilpirolidonas K17

*** BHT = 2,6-bis (t-butyl)-4-metilfenolis.

5 Gautas mišinys kapsuliuojamas granuliuojant sukietinimo būdu, kaip aprašyta Didžiosios Britanijos patente Nr. 1603640. Dalelių frakcija tarp 0,3 ir 0,8 mm panaudojama nustatyti proteazių stabilumui laikant. Kapsuliuota proteazė (140 mg) buvo sumaišyta su ALL^R baze (6,4 g) ir natrio perborato tetrahidratu (0,6 g). /ALL užregistruotas firmos Unilever N.V. prekinis ženklas/. ALL bazėje nėra fermentų ir balinimo priemonių.

15 Fermento-ploviklio-natrio perborato tetrahidrato mišinių mišinys inkubuojamas 30°C temperatūroje, esant 80% SD. 5-je lentelėje pateiktas liekamasis aktyvumas, išlaikius nurodytą periodą.

5 lentelė

20

PB92 proteazės ir kai kurių jos mutantų liekamasis aktyvumas, 30°C temperatūroje, esant 80% SD, ploviklyje su balinimo priemone.

Proteazė	Liekamasis aktyvumas%			
	0 sav.	1 sav.	3 sav.	5 sav.
PB92 proteazė	100	51	25	15
M216Q	100	94	84	52
M216S	100	89	83	50
S160D	100	47	20	9
N212D	100	59	31	19

25

4 PAVYZDYS

PB92 proteazė ir įvairūs jos mutantai buvo kapsuliuojami tuo pačiu metodu, kaip 3 pavyzdyje. Tačiau šiame pavyzdyje apie 70 mg kapsuliuotos proteazės, kurios dalelių dydis 0,3-0,9 mm, buvo sumaišomos su 3,2 g ALL ir 0,3 g natrio perborato tetrahidrato. Pavyzdžiai buvo laikomi 30°C temperatūroje 18 ml kolbutėse vakuum eksikatoriuje. Pirmas tris dienas buvo palaikomas 25 mm Hg vakuumas.

Vakuume vandens garų pernešimo greitis didėja, todėl 80% SD pusiausvyra tokioje sistemoje buvo pasiekama greičiau, negu sistemoje be vakuumo. 80% SD buvo palaikoma prisotintu kalio bromido tirpalu.

6 lentelėje parodytas liekamasis aktyvumas, praėjus nurodytam laikui (savaitės)

20 6 lentelė

PB92 proteazės ir kai kurių jos mutantų liekamasis aktyvumas 30°C temperatūroje ir esant 80% SD, ploviklyje su balinimo priemone.

25

Proteazė	Liekamasis aktyvumas%			
	0 sav.	1 sav.	2 sav.	3 sav.
PB92 proteazė	100	27	22	14
M216Q	100	63	53	44
M216S	100	55	49	31
S160D	100	23	18	13

5 PAVYZDYS

Buvo paruoštas tokios sudėties skystas ploviklis:

<u>Komponentas</u>	<u>Svoris %</u>
linijinė C ₁₀ -C ₁₃ alkilbenzensulforūgštis	12
C ₁₃ alkoholio polietoksiliatas, 8 EO	13
laurino rūgštis	8
oleino rūgštis	4
trietanolaminas	6
1,2 propandiolis	6
etanolis	5
natrio citratas	4
dietilentriamino pentaacto rūgštis	0,3
kalcio formiatas	0,1
natrio formiatas	1
boraksas	1,9
NaOH, 25% m/m tirpalas	iki pH 11,2
vanduo	iki 100

5

I nurodytą kompoziciją prideda tokį kiekį PB92 proteazės ir įvairių jos mutantų, kad pradinė proteazės koncentracija būtų 0,13 % (sv.sv.).

10

Proteazės stabilumas (liekamasis aktyvumas, %) buvo nustatomas, išlaikius ją kompozicijoje 37°C temperatūroje nurodytą dienų skaičių. Gauti rezultatai parodyti 7 lentelėje.

7 lentelė

5 PB992 proteazės ir kai kurių jos mutantų liekamasis aktyvumas, išlaikius 37°C temperatūroje skystoje skalbimo kompozicijoje

Proteazė	Liekamasis aktyvumas (%)				
	0 d.	5 d.	11 d.	15 d.	21 d.
PB92 proteazė	100	23	10	5	3
S160D	100	57	30	14	8
M216Q	100	59	32	18	9
M216S	100	45	18	10	5
N212D	100	38	14	9	4

6 PAVVYZDYS

10 Su PB92 proteaze ir kai kuriais jos mutantais buvo gaminami tokios sudėties mišiniai:

<u>Komponentas</u>	<u>Masės %</u>
Amylogum CLS	45
sacharozė	23
sorbitas	17
glicerinas	4
parafino aliejus	3
NaH ₂ PO ₄	0,5
proteazė (CEP)	1,5
PVP K17	1,5
TiO ₂	1

Iš šio mišinio gaminami granuliatai naudojanti metodika, kaip 5 pavyzdyje pagal JAV patentą Nr.4242219, išskyrus tai, kad:

- 5 1° - pavyzdyje nurodytas mišinys pakeičiamas aukščiau pateiktuoju;
- 2° - naudoja ne 1 mm diametro angas, bet 0,7 mm;
- 10 3° - granulės nepadengiamos apvalkalu.

Gautos granulės (140 mg) sumaišomos su ALL baze (6,4 g) ir natrio perborato tetrahidratu (0,6 g), po to supilamos į 36 ml talpos kolbutes.

- 15 Matuojamas proteazės stabilumas (liekamojo aktyvumo %), išlaikius šias kolbutes 30°C temperatūroje, esant 80% SD, nustatytą savaičių skaičių. Gauti rezultatai parodyti 8 lentelėje.

20

8 lentelė

Granuliuotos PB92 proteazės ir kai kurių jos mutantų liekamasis aktyvumas, išlaikius 30°C temperatūroje, esant 80% SD ploviklyje.

25

Proteazė	Liekamasis aktyvumas (%)			
	0 sav.	1 sav.	3 sav.	5 sav.
PB92 proteazė	100	45	29	17
M216Q	100	93	66	45
M216S	100	90	70	41

7 PAVYZDYS

Pagaminamos PB92 proteazės ir kai kurių jos mutantų granulės ir sumaišomos su plovikliu ir balinimo priemone, kaip aprašyta 3 pavyzdyje.

Šių pavyzdžių stabilumas laikant (liekamojo aktyvumo %) buvo nustatomas 30°C temperatūroje, esant 60/80% SD (pakaitom 60% SD 12 valnadų ir 80% SD 12 valandų). Rezultatai pateikti 9 lentelėje.

9 lentelė

PB92 proteazės ir kai kurių jos mutantų liekamasis aktyvumas, išlaikius 30°C temperatūroje, esant 60/80% SD

Proteazė	Liekamasis aktyvumas (%)			
	0 sav.	1 sav.	3 sav.	5 sav.
PB92 proteazė	100	70	35	15
M216Q	100	98	88	67
M216S	100	93	!7	48
S160D	100	67	35	10
N212D	100	75	53	26

8 PAVYZDYS

20

Pagaminamos granulės su PB92 proteaze arba kai kuriais jos mutanatais ir sumaišomas su plovikliu ir balinimo priemone, kaip aprašyta 6 pavyzdyje.

25

Šių pavyzdžių stabilumas laikant (% liekamojo aktyvumo) buvo matuojamas po inkubacijos nustatytą laiką 30°C temperatūroje ir esant 60/80% SD, kuris pakaitom 12 val

buvo palaikomas 60% ir 12 val. 80%. Rezultatai pateikti 10 lentelėje.

10 lentelė

PB92 proteazės ir kai kurių jos mutantų granulių liekamasis aktyvumas, išlaikius 30°C temperatūroje, esant 60/80% SD.

Proteazė	Liekamasis aktyvumas (%)			
	0 sav.	1 sav.	3 sav.	5 sav.
PB92 proteazė	100	54	39	28
M216Q	100	93	81	67
M216S	100	99	87	72

9 PAVYZDYS

Buvo tiriamas PB92 proteazės ir kai kurių jos mutantų stabilumas laikant skalbimo milteliuose su balinimo priemone 30°C temperatūroje, esant 80% SD. Šiame eksperimente buvo naudojamos kapsuliuotos proteazės. Kiekviena proteazė kapsuliuojama tokiu būdu:

80°C temperatūroje buvo pagamintas tokios sudėties mišinys:

<u>Komponentas</u>	<u>svoris%</u>
Nejoninis*	45
TiO ₂	2
proteazė (CEP)	10
Na ₂ SO ₄	iki 100

Nejoninis = C₁₄-C₁₈ alkoholpolietoksilatas (50-80 EO grupės) EO grupės-etoksi-grupės.

Gautas mišinys aušinamas iki kambario temperatūros. Sukietėjusi masė susmulkinama į smulkias daleles..Išsijojamos dalelės 0,3-0,8 mm ir panaudojamos stabilumo eksperimentams.

5

Stabilumo bandymuose 140 mg kiekvienos kapsuliuotos proteazės buvo sumaišoma su 6,4 g bazinių ALL skalbimo miltelių ir 0,6 g natrio perborato tetrahidrato. Pagrindiniuose ALL milteliuose nėra nei fermento nei natrio perborato. ALL-proteazės-natrio perborato tetrahidrato mišinys buvo inkubuojamas 30°C temperatūroje, esant 80% SD.

10

Išlaikius 0, 1, 2 ar 4 savaites, nustatomas kiekvienos proteazės stabilumas (liekamasis aktyvumas, %). Rezultatai pateikti 11 lentelėje.

15

11 lentelė

20

PB92 proteazės ir kai kurių jos mutantų liekamasis aktyvumas, 30°C temperatūroje, esant 80% SD, skalbimo milteliuose su balinimo priemone

Proteazė	Liekamasis aktyvumas (%)			
	0 sav.	1 sav.	2 sav.	4 sav.
PB92 proteazė	100	61	36	12
[S160D, M216Q]	100	78	58	35
[S160D, M216S]	100	86	68	39

25

10 PAVYZDYS

PB92 proteazės mutantai buvo tiriami iš esmės tokiose pačiose kaip 1 pavyzdyje sąlygose, išskyrus tai, kad Launderometre (prietaise audinių atsparumui tirti) į

250 ml vandens 5°KL, buvo dedama 0,375 g skysto ploviklio, kurio sudėtis:

<u>Komponentas</u>	<u>svoris, %</u>
laurino rūgštis	8
oleino rūgštis	4
C ₁₀ -C ₁₃ linijinė alkilbenzensulforūgštis	12
C ₁₃ polietoksilintas alkoholis, 8 EO	13
trietanolaminas	6
1,2 propandiolis	6
etanolis	5
natrio hidroksidas, 45% sv./sv.	4
natrio citratas	4
vanduo (mišinio pH 7,2)	iki 100

- 5 Įvairių proteazių plovimo galia šiame skystame ploviklyje buvo nustatoma 25°C temperatūroje, skalbiant 30 min. prietaise audinių atsparumui tirti. Po skalbimo 1 pavyzdyje nurodytu metodu nustatomas tiriamų audinių atspindėjimas. Mutantinių proteazių plovimo galia nustatyta taip, kaip aprašyta 1 pavyzdyje. Gauti rezultatai pateikti 12 lentelėje.

12 lentelė

- 15 **PB92 proteazės mutantų plovimo galia 25°C temperatūroje skystame ploviklyje**

Proteazė	Plovimo galia	Specifinis aktyvumas nuo PB92 proteazės %
212D	+	100
160D	+	73

12 lentelė (tęsinys)

Proteazė	Plovimo galia	Specifinis aktyvumas nuo PB92 proteazės %
S160G,N212D	+	76
M216S	0	40
M216Q	0	37

0: 100% $\pm$ 20% nuo PB92 proteazės skalbimo galios (iš-
likusi plovimo galia)

+: > 120% nuo PB92 proteazės plovimo galios

-: < 80% nuo PB92 proteazės skalbimo galios.

10

Ivairių proteazių plovimo galia nustatyta komerciniuose skystuose plovikliuose: Tide^R, Wisk^R ir Ariel^R. Nerūdijančio plieno induose kiekviename buvo: 0,375 g Tide 250 ml vandens 5° kietumo laipsnio (KL) arba 0,375 g Wisk 250 ml vandens 5° KL arba 1,25 g Ariel 250 ml vandens 15°, atitinkamai. Plovimo galia buvo nustatoma 25°C arba 40°C temperatūroje. Gauti rezultatai pateikti 13 lentelėje.

20

13 lentelė

PB92 proteazės mutantų plovimo galia Tide, Wisk ir Ariel plovikliuose 25°C ir 40°C temperatūroje.

Proteazė	Tide		Wisk		Ariel	
	25°C	40°C	25°C	40°C	25°C	40°C
N212D	+	+	+	+	0	
S160D	+	+	+	+	+	

25

13 lentelė (tęsinys)

Proteazė	Tide		Wisk		Ariel	
	25°C	40°C	25°C	40°C	25°C	40°C
M216Q	0	+	0	+	+	
M216S	NN	0	0	0	0	
S160Q	-	-	-	-	-	
S160N	-	-	-	-	0	
S160K	-	-	-	-	-	
S160A	-	-	-	-	-	
S160D, M216Q	+	+	+	+	+	
S160D, M216S	0	-	+	+	0	
M117L, M216Q	ND	-	ND	-	0	
M117L, M216S	ND	-	ND	-	-	

ND - nebuvo nenustatoma

5

0: $100 \pm 20\%$ nuo PB92 proteazės plovimo galios

+: $> 120\%$ nuo PB92 proteazės plovimo galios

10

-: $< 80\%$ nuo PB92 proteazės plovimo galios

11 PAVYZDYS

15

PB92 proteazės mutantų plovimo galia buvo nustatoma statistiniuose tyrimuose įprastoje skalbimo mšinoje TNO, Delft, Olandija (Švaros palaikymo technikos tyrimo institutas). Mutantų plovimo galia buvo lyginama su PB92 proteaze.

Visos proteazės buvo dozuojamos į IEC ploviklį, remiantis baltymo kiekiu (0,007% sv./sv.). Šios dozės, išreiškus aktyvumu:

PB92 proteazė	1460 SDV/g ploviklio
M216S	679 SDV/g ploviklio
M216Q	479 SDV/g ploviklio
S160D	1080 SDV/g ploviklio
N212D	1455 SDV/g ploviklio

5

Su kiekviena proteazės-ploviklio kompozicija buvo atliekami 8 skalbimo eksperimentai 40°C temperatūroje identiškos 2 režimų AEG Turnamat skalbimo mašinose. Kiekvienoje skalbimo mašinoje buvo sunaudojama 170 g. ploviklio. Bandymo eigoje tiriamas ploviklis buvo panaudojamas tokiu būdu, kad kiekvienai milteliai patyrė toki patį skalbimo ciklą skaičių kiekvienoje mašinoje.

10

Visuose bandymuose buvo naudojamas normalus Delfto miesto vandentiekio vanduo, kurio rodikliai:

15

šarmingumas (M): 2,2 mmol/l
kietumas (H): 1,6 mmol/l (9°KL)
temperatūra: 20°C

Purvo pašalinimas iš tiriamų audinių

Kiekvienoje bandymų serijoje 6 gabaliukai trijų tipų EMPA medvilnės audinio (no. 111, 116 ir 117), buvo skalbiami kartu su nešvariais skalbiniais.

20

Dėmių ir purvo pašalinimo aktyvumas iš suteptų testuojamų gabaliukų buvo nustatomas praleidžiant trikomponentinę mėlyną šviesą statmenai audinio gabalėliui. Matuojamas šviesos kiekis atspindėtas nuo testuojamo

25

gabaliuko 45°C kampu. Sutinkamai su IEC publikacija 456, magnio oksido remisijos dydis prilyginamas 100. Kuo didesnė remisija, tuo labiau tinkamas skalbimo procesas konkrečiai užterštumo rūšiai.

5

Skalbimo mašinos užpildymas

Į skalbimo mašiną buvo sukrauta 4,75 kg tiriamų audinių ir kitokių skalbinių, kurie susiteršė, vartojant namuose.

10

Skalbiniai susidėjo iš:

6 virtuvės rankšluosčių

15

4 apatinių baltinių

4 paklodžių

20

4 užvalkalų.

Jeigu trūksta svorio, pridedama švorių paklodžių ar užvalkalų.

25

Kiekvienam skalbimui skalbiniai rūpestingai parenkami. Kiekvienas audinio gabalas skirtas vienai mašinai, turi savo analogą, skalbiama kitoje mašinoje. Rezultate - nešvarumų kiekis mašinose buvo vienodas.

30

Skalbimo proceso parametrai

programa	40°C
vanduo pagrindiniame skalbime	19 l
aukščiausios temperatūros trukmė	15 min
aukščiausia temperatūra	43°C
skalbimo trukmė	45 min

papildomas vandens kiekis 7 l
 temperatūra po pamuilių praskiedimo 30°C
 drenažas 17 l
 5 skalavimai, kiekvienas po 17 l šalto vandens

Vidutinė remisijos reikšmė (V) ir santykis (R) buvo nustatomi po 8 skalbimo testų. Dviejų nepriklausomų eksperimentų rezultatai pateikti 14 A ir 14 B lentelėse.

5

14 A lentelė

Dirbtinių nešvarumų pašalinimas

Proteazė	EMPA audinio pavyzdžiai, nr.						Bendras	
	111		116		117		V	R
	V	R	V	R	V	R		
PB92 proteazė	49	1,00	44	1,00	56	1,00	149	1,00
M216S	19	1,00	46	1,05	58	1,04	153	1,03

10

14 B lentelė

Dirbtinių nešvarumų pašalinimas

Proteazė	EMPA audinio pavyzdžiai						Bendras	
	111		116		117		V	R
	V	R	V	R	V	R		
PB92 proteazė	41	1,00	35	1,00	46	1,00	123	1,00
M216S	40	0,96	33	0,94	42	0,91	115	0,93
M216Q	42	1,01	35	0,99	43	0,94	120	0,98

15

15 lentelėje santykiniai dydžiai (R), kurie buvo gauti statistiniuose testuose įprastose skalbimo maši-

nose, dalijami iš atitinkamo santykinio dydžio (R'), paskaičiuoto iš plovimo galios reikšmių, gautų PB92 proteazei prietaise audinių atsparumui tirti analogiškose sąlygose (10g/l IEC, EMPA audinio gabalėliai 116 ir 117, skalbimo trukmė 30 min, temperatūra 40°C).

15 lentelė

Koreliacija tarp testų įprastose skalbimo mašinose ir prietaise audinių atsparumui tirti

Proteazė	R/R'
PB92 proteazė	1,00*
M216S	1.18
M216Q	1,10
S160D	1,02
N212D	0,98

* - pagal apibrėžimą

Mutantinių proteazių R/R' reikšmės, artimos 1,00, parodo, kad yra koreliacija tarp bandymų įprasto tipo skalbimo mašinose ir prietaisuose audinių atsparumui tirti (Launderometro testų).

12 PAVYZDYS

Fig. 2A ir Fig.2B pavaizduota įvairių PB92 proteazės mutantų, esančių 4 g IEC/l, plovimo galia, gauta tyrimuose, aprašytuose 1 pavyzdyje, lyginant su natyvia PB92 proteaze, kaip jų specifinio aktyvumo funkcija. Skaičiai diagramoje atitinka šias proteazes:

LT 3963 B

51

1 PB92 proteazè

2 M216A

3 M216C

4 M216S

5 M216L

6 M216E

7 M216K

8 M216H

9 M216N

10 M216Q

21 M169S

22 M216Y

23 M169I, M216S

24 M216-ox

25 N212S

26 N212D

27 S160G, N212D

28 L211Y

29 L211Y, N212S

30 A166D, M169I

41 S160N

42 S160G

43 S160P

44 S160T

45 S160C

46 S160Q

11 M216P

12 M216T

13 M216W

14 M216I

15 M216G

16 M117L, H118D

17 M117L, M216Q

18 M117L, H118D, M216Q

19 M117L, M216S

20 M117L, H118D, M216S

31 S259K

32 W235R

33 H243R

34 H243R, S259K

35 D175N

36 E134K

37 W235R, S259K

38 W235R, H243K

39 S259K

40 T207K

51 S160I

52 S160G, M216S

53 S160G, M216Q

54 S160L

55 S160Y

56 S160D, M216S

47 S160D	57 G116V, S126V, P127E, S128K
48 S160K	58 G116V, S126L, P127N, S128V
49 S160R	59 G116V, S126L, P127Q, S128A
50 S160A	60 G116V, S126V, P127M

61 S126M, P127A, S128G
 62 G116V, S126Y, P127G, S128L
 63 G116V, S126N, P127H, S128I
 64 G116V, S126H, P127Y,
 65 G116V, S126R, P127S, S128P
 66 G116V, S126F, P127Q,
 67 G116V, S126G, P127Q, S128I
 68 G116V, S126F, P127L, S128T
 69 G116V, S126Q, P127D,

5 Fig. 3 pavaizduota įvairių PB92 proteazės mutantų, esančių 7 g IEC/l, plovimo galia, nustatyta, kaip aprašyta 1 pavyzdyje, lyginant su natyvia PB92 proteaze, kaip jos specifinio aktyvumo funkcija. Skaičiai diagramoje atitinka tas pačias mutantines proteazes, kaip ir Fig. 2A ir 2B.

10

Visos publikacijos (taip pat ir patentinės paraiškos), paminėtos šiame aprašyme, informatyvios tik paruoštam specialistui tos srities, kuriai skirtas šis išradimas. Visos publikacijos pateiktos nuorodų pavidalu tokiu būdu, lyg kiekviena iš jų būtų specialiai duodama kaip nuoroda.

15

Nors šis išradimas pakankamai iliustruotas ir pateikti pavyzdžiai jam paaiškinti, specialistui akivaizdu, kad čia galimi įvairūs pakeitimai ir modifikacijos, nenu-
 20 tolstant nuo išradimo apibrėžties dvasios ir turinio.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Fermentinis produktas, b e s i s k i r i a n t i
tuo, kad susideda iš mutantinio proteolitinio fermento,
5 gauto ekspresuojant geną, koduojantį šį fermentą su
aminorūgščių seka, besiskiriančia bent viena aminorūgš-
timi nuo laukinio tipo fermento, be to, šis mutantinis
fermentas pasižymi tuo, kad jo savybės daro jį labiau
tinkamą panaudoti plovikliuose.
- 10 2. Fermentinis produktas pagal 1 punktą, b e s i s k i-
r i a n t i s tuo, kad mutantinis proteolitinis fer-
mentas pasižymi didesne plovimo galia skalbimo deter-
gentuose.
- 15 3. Fermentinis produktas pagal 1 punktą, b e s i s k i-
r i a n t i s tuo, kad mutantinis proteolitinis fermen-
tas pasižymi didesniu stabilumu laikant skalbimo deter-
gentuose, išsaugodamas plovimo galią.
- 20 4. Fermentinis produktas pagal 3 punktą, b e s i s k i-
r i a n t i s tuo, kad mutantinis proteolitinis fermen-
tas pasižymi didesniu stabilumu, kas pasireiškia atspa-
rumu oksidantams.
- 25 5. Fermentinis produktas pagal bet kurį iš 1-4 punktų,
b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad mutantinis
proteolitinis fermentas yra kilęs iš gamtinės bakte-
rinės serino proteazės.
- 30 6. Fermentinis produktas pagal bet kurį iš 1-5 punktų,
b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad nurodytas genas
yra kilęs iš laukinio tipo alkalofilinio *Bacillus ka-*
mieno.
- 35 7. Fermentinis produktas pagal bet kurį iš 1-5 punktų,
b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad nurodytas genas

yra kilęs iš laukinio tipo geno, kamieno, atrinkto iš grupės, jungiančios *B. subtilis*, *B. licheniformis* ir *B. amyloliquefaciens*.

- 5 8. Fermentinis produktas pagal 6 punktą, b e s i s k i-
r i a n t i s tuo, kad laukinio tipo genas koduoja
aminorūgščių seką, kuri mažiausiai 70% yra homologiška
PB92 serino proteazės aminorūgščių sekai.
- 10 9. Fermentinis produktas pagal 6 punktą, b e s i s k i-
r i a n t i s tuo, kad laukinio tipo genas iš esmės
koduoja tokią aminorūgščių seką:

15 H₂N-A-Q-S-V-P-W-G-I-S-R-V-Q-A-P-A-A-H-N-R-G-L-T-G-S-G-V-K-V-A-
V-L-D-T-G-I-S-T-H-P-D-L-N-I-R-G-G-A-S-F-V-P-G-E-P-S-T-Q-D-G-N-
G-H-C-T-H-V-A-G-T-I-A-A-L-N-N-S-I-G-V-L-G-V-A-P-N-A-E-L-Y-A-V-
K-V-L-G-A-S-G-S-G-S-V-S-S-I-A-Q-G-L-E-W-A-G-N-N-G-M-H-V-A-N-L-
S-L-G-S-P-S-P-S-A-T-L-E-Q-A-V-N-S-A-T-S-R-G-V-L-V-A-A-S-G-N-
S-G-A-G-S-I-S-Y-P-A-R-Y-A-N-A-M-A-V-G-A-T-D-Q-N-N-N-R-A-S-F-S-
20 Q-Y-G-A-G-L-D-I-V-A-P-G-V-N-V-Q-S-T-Y-P-G-S-T-Y-A-S-L-N-G-T-S-
M-A-T-P-H-V-A-G-A-A-A-L-V-K-Q-K-N-P-S-W-S-N-V-Q-I-R-N-H-L-K-N-
T-A-T-S-L-G-S-T-N-L-Y-G-S-G-L-V-N-A-E-A-A-T-R-COOH.

- 25 10. Fermentinis produktas pagal 9 punktą, b e s i s k i
r i a n t i s tuo, kad laukinio tipo genas yra kilęs iš
naujos PB92 *Bacillus* rūšies.
- 30 11. Fermentinis produktas, susidedantis iš mutantinio
proteolitinio fermento, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad pagerintos jo savybės daro jį labiau tinkamą
panaudoti plovikliuose, lyginant su laukinio tipo fer-
mentu; jo aminorūgščių seką iš esmės atitinka PB92
proteazės aminorūgščių seką, turi mažiausiai vienos iš
35 šių aminorūgščių 116,126,127, 128, 160, 166, 169, 212
ir 216 mutaciją.

12. Fermentinis produktas pagal 11 punktą, b e s i -
s k i r i a n t i s tuo, kad įvykdyta mutacija 116
aminorūgšties vietoje, pakeičiant gliciną aukštesnio
molekulinio svorio nepoliarine alifatine aminorūgštimi.
- 5
13. Fermentinis produktas pagal 11 punktą, b e s i -
s k i r i a n t i s tuo, kad 126 aminorūgšties mutacija
įvykdyta, pakeičiant seriną bet kuria nehidroksilinta
aminorūgštimi; 127 aminorūgštį pakeičiant bet kuria ki-
10 ta aminorūgštimi; 128 aminorūgštį pakeičiant bet kuria
kita aminorūgštimi.
14. Fermentinis produktas pagal 11 punktą, b e s i -
s k i r i a n t i s tuo, kad 216 aminorūgšties mutacija
15 įvyksta, pakeičiant metioniną kita tiorūgštimi.
15. Fermentinis produktas pagal 11 punktą, b e s i -
s k i r i a n t i s tuo, kad mutacija prie 160 ami-
norūgšties įvyksta, pakeičiant ją glicinu arba anijo-
20 nine aminorūgštimi.
16. Fermentinis produktas pagal 11 punktą, b e s i -
s k i r i a n t i s tuo, kad mutacija prie 166 amino-
rūgšties įvyksta, pakeičiant ją anijonine aminorūgš-
25 timi.
17. Fermentinis produktas pagal 11 punktą, b e s i -
s k i r i a n t i s tuo, kad mutacija prie 169
aminorūgšties įvyksta, pakeičiant ją nepoliarine alifa-
30 tine aminorūgštimi.
18. Fermentinis produktas pagal 11 punktą, b e s i -
s k i r i a n t i s tuo, kad mutacija prie 212 amino-
rūgšties įvyksta, pakeičiant ją anijonine aminorūgš-
35 timi.

19. Fermentinis produktas pagal 11 punktą, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad mažiausiai viena mutacija įvyks-
ta, pakeičiant neutralią aminorūgštį anijonine amino-
rūgštimi.

5

20. Fermentinis produktas pagal 11 punktą, b e s i -
s k i r i a n t i s tuo, kad mažiausiai viena mutacija
įvyksta 116 aminorūgšties vietoje, gliciną pakeičiant
valinu, izoleicinu arba leicinu.

10

21. Fermentinis produktas pagal 20 punktą, b e s i -
s k i r i a n t i s tuo, kad turi mažiausiai vieną
papildomą mutaciją 126, 127 ar 128 vietoje.

15

22. Mutantinis proteolitinis fermentas pagal bet kuri
iš 1-21 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad
yra atrinktas iš grupės PB92 serino proteazės mutantų,
būtent: [M216S] ; [M216Q] ; [N212D] ; [S160D] ; [S160G,
N212D] ; [S160D, M216Q] ; [S160D, M216S] ; [A166D, M169I] ;
20 [G116V, S126V, P127E, S128K] ; [G116V, S126G, P127Q,
S128I] ; [G116V, S126L, P127N, S128V] ; [G116V, S126L,
P127Q, S128A] ; [G116V, S126V, P127M] ; [G116V, S126H,
P127Y] ; [G116V, S126R, P127S, S128P] ; [G116V, S126F,
P127Q] ; [G116V, S126F, P127L, S128T] ; [S126M, P127A,
25 S128G] ; [S126M, P127A, S128G, S160D] ir [G116V, S126N,
P127S, S128A, S160D] .

30

23. Proteolitinio fermento, labiau tinkamo panaudoti
plovikliuose, atrankos būdas, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad susideda iš stadijų:

mutagenezė klonuoto geno, koduojančio dominantį fer-
mentą arba jo fragmentą;

35

gautos mutantinės proteazės išskyrimas, ir
identifikavimas mutantinių proteazių su pagerintomis
savybėmis panaudojimui plovikliuose.

24. Mutantinis genas, koduojantis mutantinį proteolitinį fermentą pagal 1-22 punktus.
25. Ekspresijos vektorius, turintis mutantinį geną pagal 24 punktą.
26. Prokariotinis kamienas-šeimininkas, transformuotas ekspresijos vektoriaus pagal 25 punktą pagalba.
27. Transformuotas prokariotinis kamienas-šeimininkas pagal 26 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad yra *Bacillus*.
28. Transformuotas prokariotinis kamienas-šeimininkas pagal 27 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad priklauso alkalofilinei *Bacillus* rūšiai.
29. Transformuotas prokariotinis kamienas šeimininkas pagal 28 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad yra nauja *Bacillus* PB92 arba jos mutantas.
30. Transformuotas kamienas-šeimininkas pagal 27 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad yra atrinktas iš grupės *B. subtilis*, *B. licheniformis* ir *B. amyloliquefaciens*.
31. Kamienas-šeimininkas pagal bet kurią iš 26-30 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad iki transformacijos iš esmės nesugeba gaminti nelastelinių proteolitinių fermentų.
32. Mutantinio proteolitinio fermento pagal bet kurią iš 1-22 punktų gavimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad apima kamieno-šeimininko, transformuoto ekspresijos vektoriumi, turinčiu mutantinį proteolitinį geną, kultivavimą atitinkamose fermentacijos sąlygose ir pagaminto fermento išskyrimą.

33. Ploviklio kompozicija su fermentiniais priedais, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad tokiu priedu gali būti vienas ar keli fermentiniai produktai pagal 1-22 punktus.

5

34. Vieno ar kelių mutantinių proteolitinių fermentų pagal 1-22 punktus panaudojimas ploviklių kompozicijose.

10

35. Vieno ar kelių mutantinių proteolitinių fermentų pagal 1-22 punktus panaudojimas skalbimo procese.

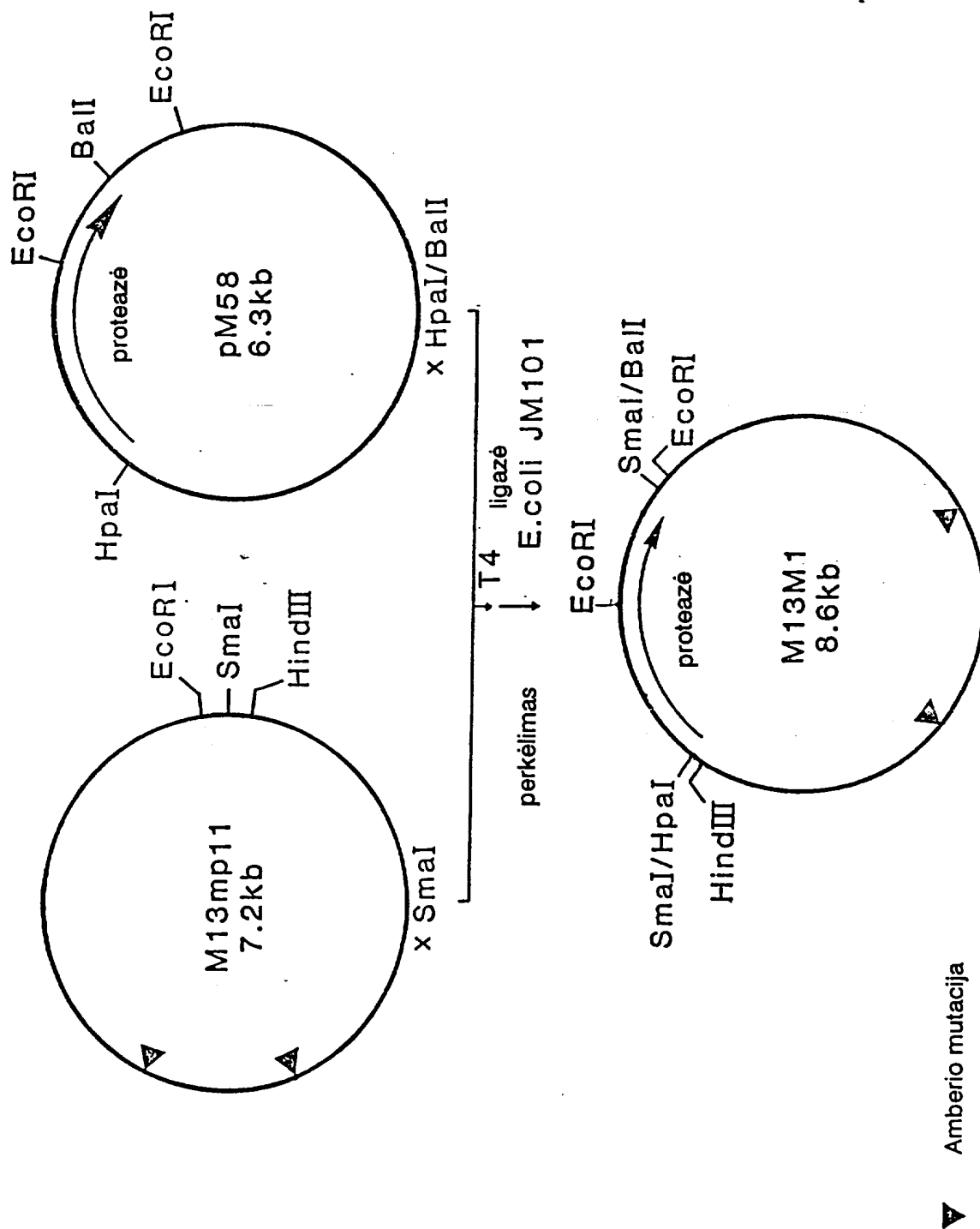


Fig.1a

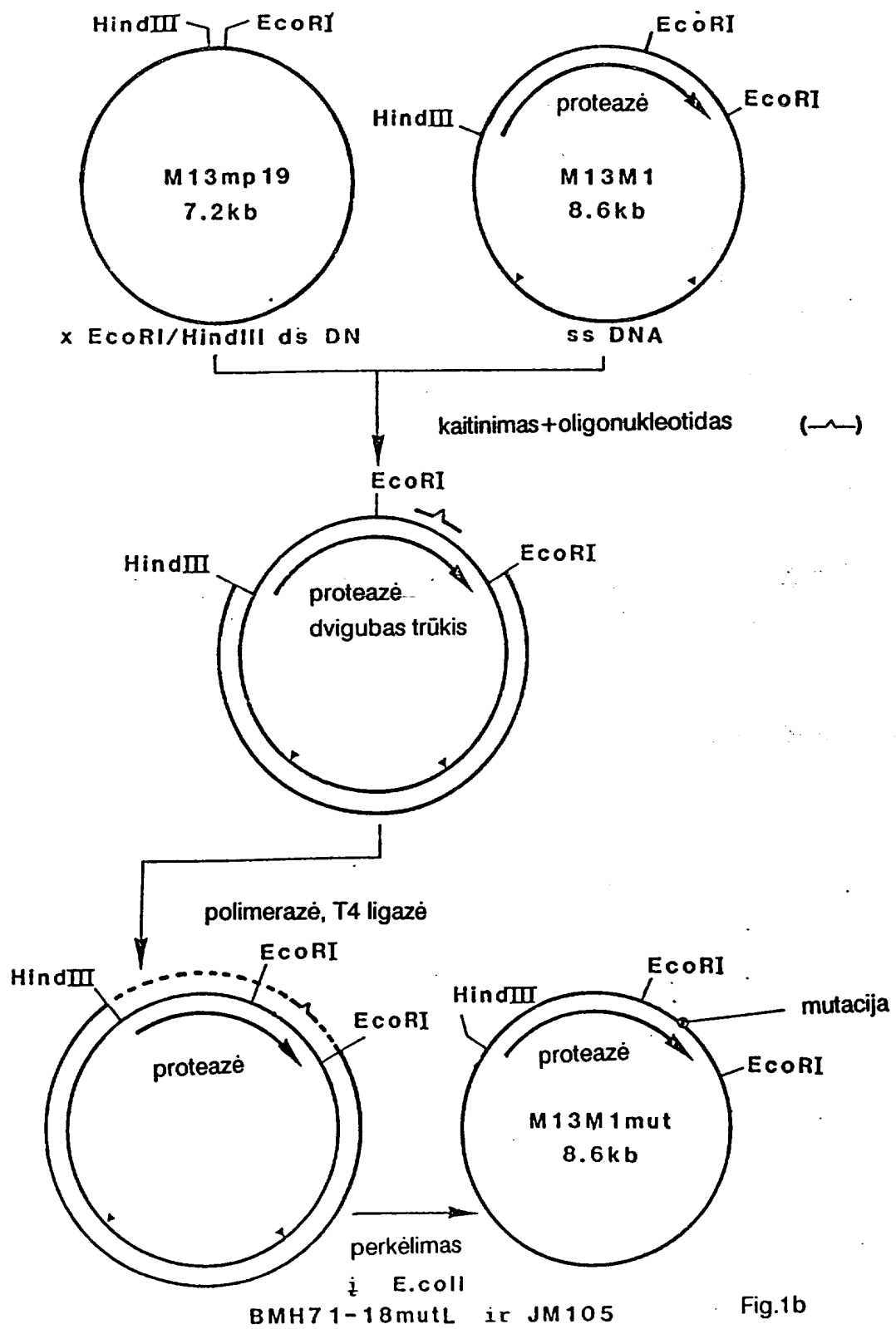


Fig.1b

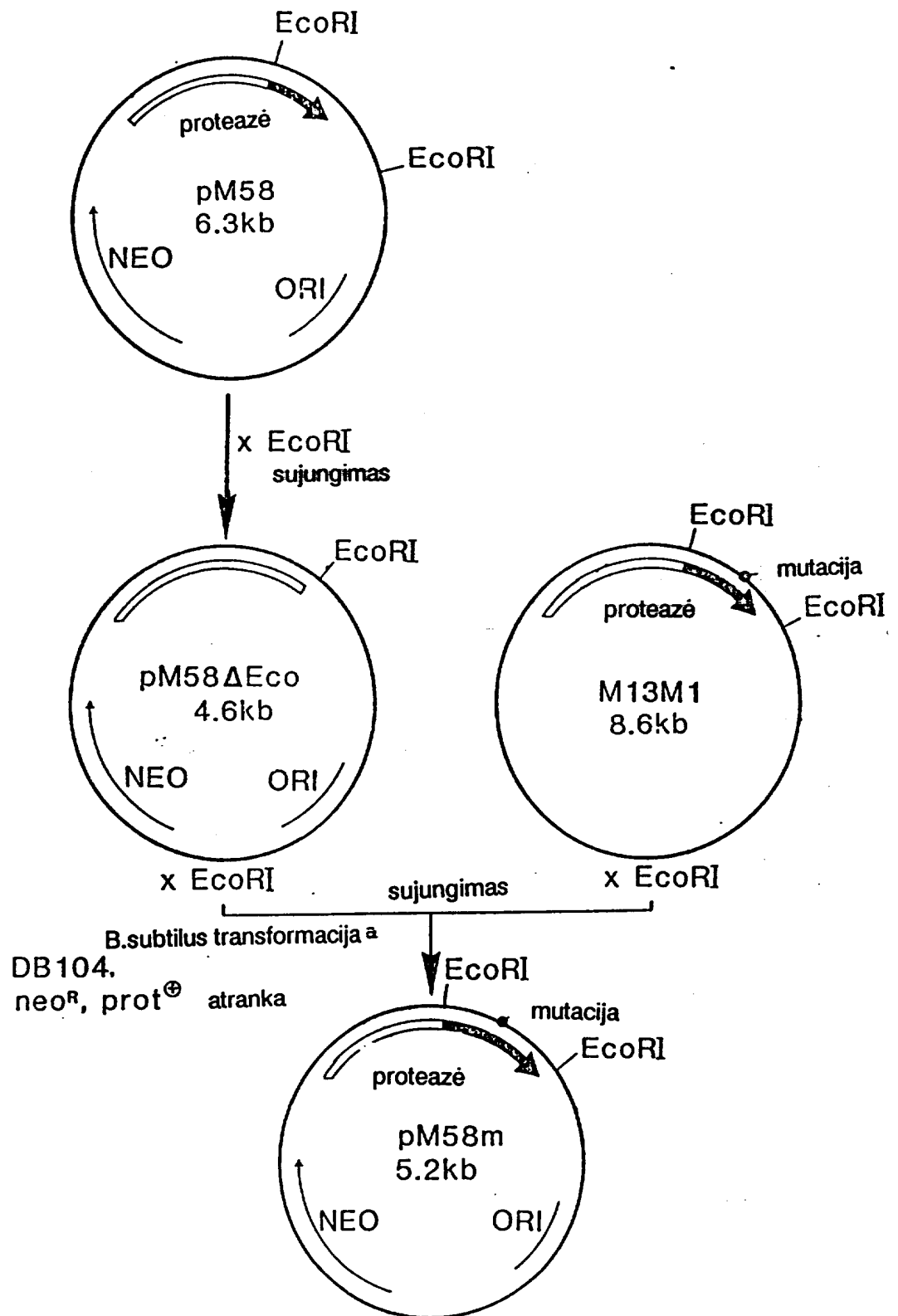


Fig.1c

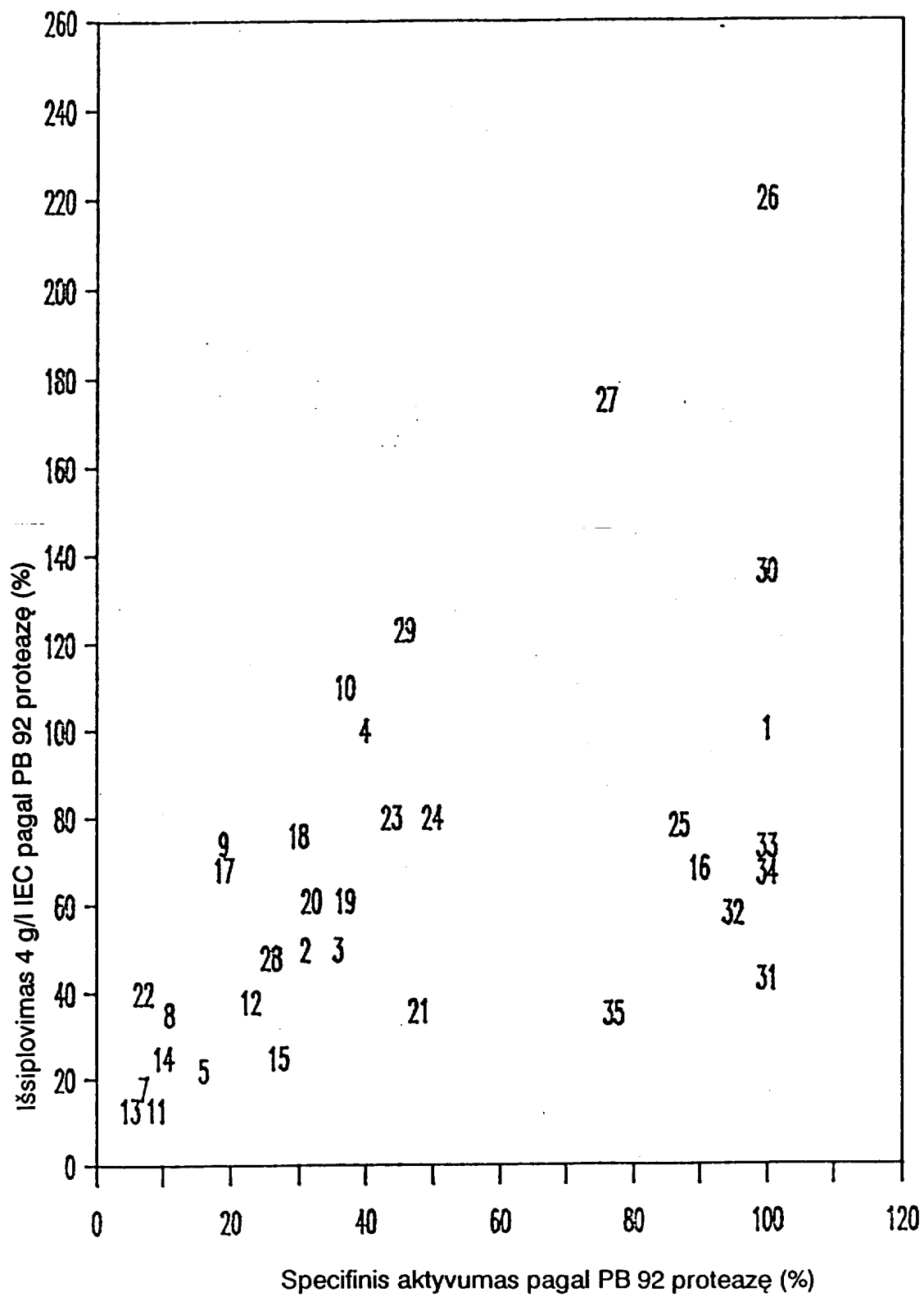


Fig.2a

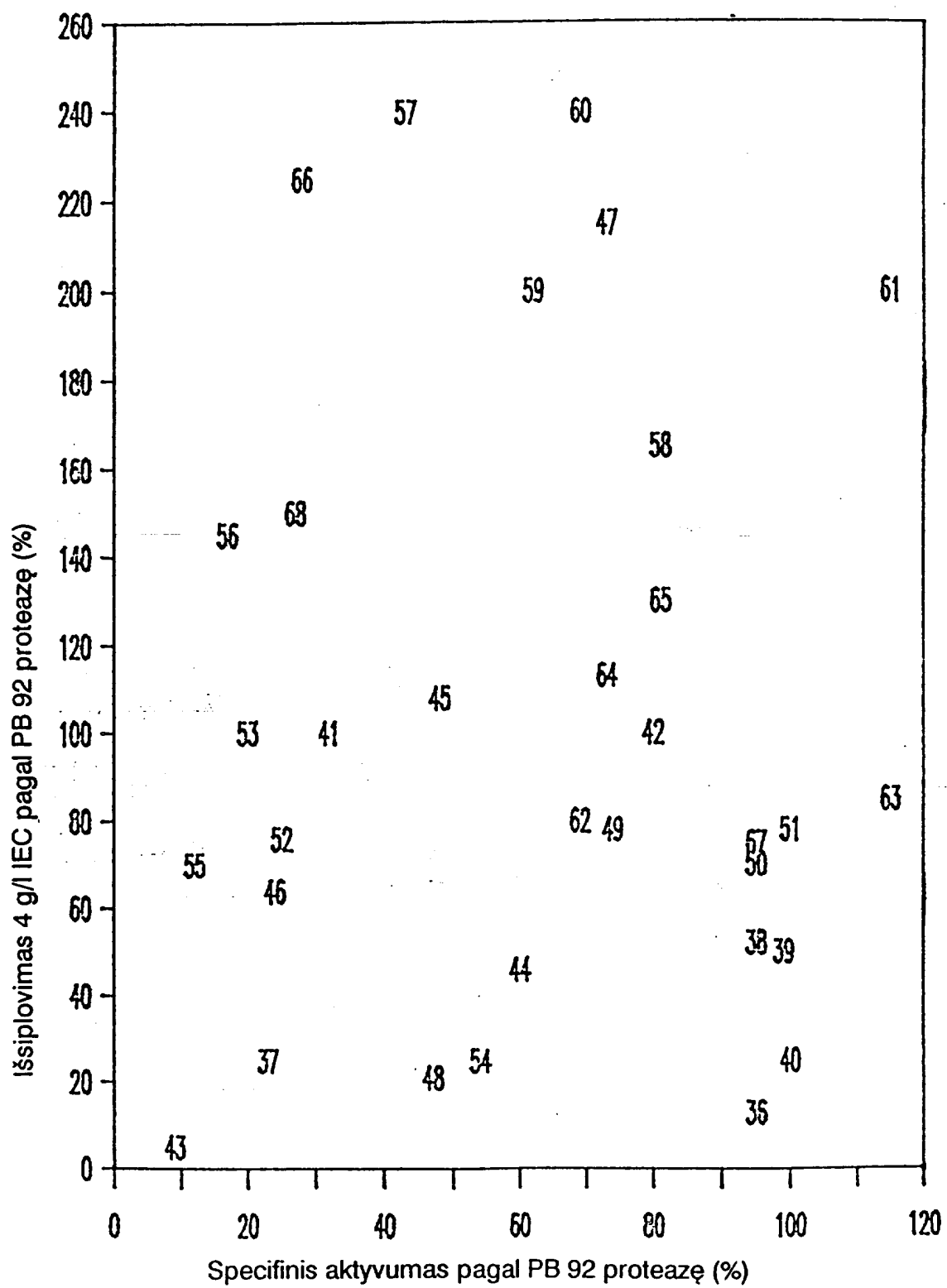


Fig.2b

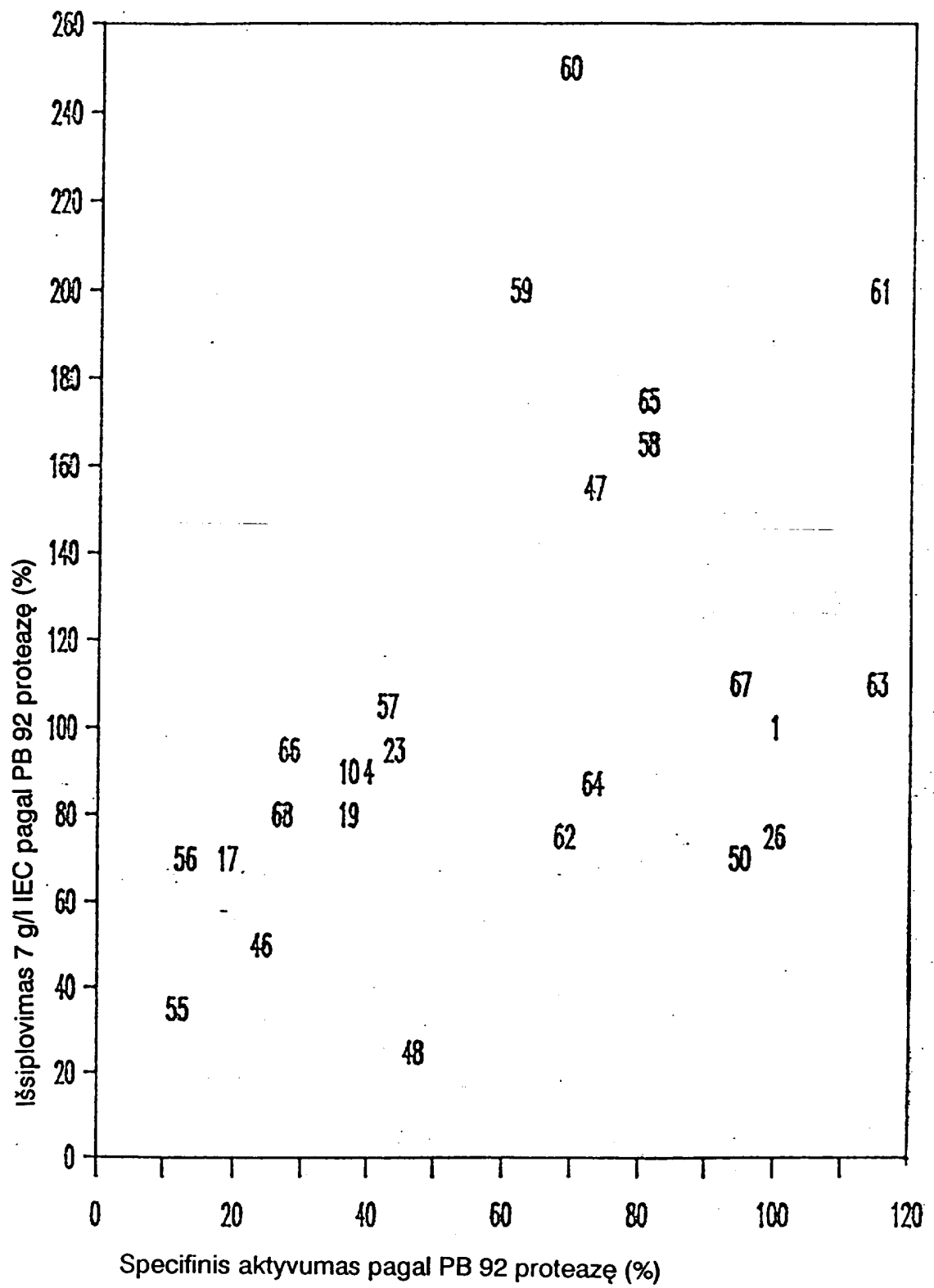


Fig.3

LT 3963 B

-----Pre
 -100
 -----ATGAAGAAACCGTTGGGGAAAATTGTCGCAAGC
 M K K P L G K I V A S

-90
 -ACCGCACTACTCATTCTGTTGCTTTTAGTTCATCGATCGCATCGGCTGCTGAAGAAGCA
 T A L L I S V A F S S S I A S A A E E A

-70
 AAAGAAAAATATTTAATTGGCTTTAATGAGCAGGAAGCTGTCACTGAGTTTGTAGAACAA
 K E K Y L I G F N E Q E A V S E F V E Q

-50
 GTAGAGGCAAATGACGAGGTCGCCATTCTCTGAGGAAGAGGAAGTCGAAATTGAATTG
 V E A N D E V A I L S E E E E V E I E L

-30
 CTTTCATGAATTTGAAACGATTTCCTGTTTTATCCGTTGAGTTAAGCCCAGAAGATGTGGAC
 L H E F E T I P V L S V E L S P E D V D

-10
 GCGCTTGAACCTCGATCCAGCGATTTCCTTATATTGAAGAGGATGCAGAAGTAACGACAATG
 A L E L D P A I S Y I E E D A E V T T M

subrendusi
 +1 10 20
 GCGCAATCAGTGCCATGGGGAATTAGCCGTGTGCAAGCCCCAGCTGCCCATACCGTGGAA
 A Q S V P W G I S R V Q A P A A H N R G

30 40
 TTGACAGGTTCTGGTGTAAGGTTGCTGTCCTCGATACAGGTATTTCCACTCATCCAGAC
 L T G S G V K V A V L D T G I S T H P D

50 60
 TTAAATATTCGTGGTGGCGCTAGCTTTGTACCAGGGGAACCATCCACTCAAGATGGGAAT
 L N I R G G A S F V P G E P S T Q D G N

70 80
 GGGCATGGCAGCATGTGGCTGGGACGATTGCTGCTTTAAACAATTTCGATTGGCGTTCTT
 G H G T H V A G T I A A L N N S I G V L

Fig.4

LT 3963 B

90 100
 GCGTAGCACCGAACGCGGAAGTATACGCTGTAAAGTATTAGGGGCGAGCGGTTCAGGT
 G V A P N A E L Y A V K V L G A S G S G

110 120
 TCGGTCAGCTCGATTGCCCAAGGATTGGAATGGGCAGGGAACAATGGCATGCACGTTGCT
 S V S S I A Q G L E W A G N N G M H V A

130 140
 AATTTGAGTTTAGGAAGCCCTTCGCCAAGTGCCACACTTGAGCAAGCTGTAAATAGCGCG
 N L S L G S P S P S A T L E Q A V N S A

150 160
 ACTTCTAGAGGCGTTCTTGTGTAGCGGCATCTGGGAATTCAGGTGCAGGCTCAATCAGC
 T S R G V L V V A A S G N S G A G S I S

170 180
 TATCCGGCCCCGTTATGCGAACCGAATGGCAGTCGGAGCTACTGACCAAACAACAACCGC
 Y P A R Y A N A M A V G A T D Q N N N R

190 200
 GCCAGCTTTTCACAGTATGGCGCAGGGCTTGACATTGTGCGCACCAGGTGTAAACGTGCAG
 A S F S Q Y G A G L D I V A P G V N V Q

210 220
 AGCACATACCCAGGTTCAACGTATGCCAGCTTAAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCAT
 S T Y P G S T Y A S L N G T S M A T P H

230 240
 GTTGCAGGTGCAGCAGCCCTTGTTAAACAAAAGAACCCATCTTGGTCCAATGTACAAATC
 V A G A A A L V K Q K N P S W S N V Q I

250 260
 CGCAATCATCTAAAGAATACGGCAACGAGCTTGGGAAGCACGAACCTTGATGGAAGCGGA
 R N H L K N T A T S L G S T N L Y G S G

270
 CTTGTCAATGCAGAAGCGGCAACACGCTAA
 L V N A E A A T R galas

Fig.4 (təsinys)