



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(21)(22) Заявка: 2010148557/10, 01.06.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
01.06.2009

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
06.06.2008 US 61/131,227;  
14.11.2008 US 61/114,519

(43) Дата публикации заявки: 27.07.2012 Бюл. № 21

(45) Опубликовано: 20.08.2014 Бюл. № 23

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: US 6815192 B2, 09.11.2004. DATABASE: UniProtKB/Swiss-Prot, P29719 (GUNA\_PAELA), 01.04.1993. DATABASE: UniProtKB/Swiss-Prot, P71140 (P71140\_CLOTM), 01.02.1997. В. HENRISSAT, et al. "A scheme for designating enzymes that hydrolyse the polysaccharides in the cell walls of plants", FEBS Letters 425, 1998, pp. 352-354. RU 2291901 C2, 20.01.2007

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 11.01.2011

(86) Заявка РСТ:  
US 2009/045770 (01.06.2009)

(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2009/148983 (10.12.2009)

Адрес для переписки:  
105215, Москва, а/я 26, Н.А. Рыбиной

(72) Автор(ы):

**ЛАНТ Нейл Жозеф (GB),  
БЕСЕНМЭТТЕР Вернер (DK),  
ФРИС Эсбен Питер (DK),  
ГИБСОН Кейс (DK),  
РАСМУССЕН Франк (DK),  
СКДЖОТ Мишел (DK)**

(73) Патентообладатель(и):

**ДЗЕ ПРОКТЕР ЭНД ГЭМБЛ КОМПАНИ  
(US)**

**(54) МОЮЩАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ ВАРИАНТ КСИЛОГЛЮКАНАЗЫ СЕМЕЙСТВА 44**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Представлена моющая композиция, содержащая изолированный мутантный вариант исходной ксилотриглицеридфосфатазы, от 2 до 50 мас.% поверхностно-активного вещества и вспомогательный ингредиент, где вариант исходной ксилотриглицеридфосфатазы содержит одну из представленных в описании групп изменений;

исходная ксилотриглицеридфосфатаза является ксилотриглицеридфосфатазой, имеющей по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:3, представленной в описании; и вариант обладает ксилотриглицеридфосфатазной активностью. Предложено применение указанной композиции для придания хлопку грязеотталкивающих свойств в процессе

последующей стирки. Изобретение позволяет получить моющую композицию со стабильной ксилотриглицеридом для придания хлопку

грязеотталкивающих свойств в процессе последующей стирки. 2 н. и 9 з.п. ф-лы, 1 ил., 56 табл., 29 пр.

R U 2 5 2 5 6 6 9 C 2

R U 2 5 2 5 6 6 9 C 2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2010148557/10, 01.06.2009**(24) Effective date for property rights:  
**01.06.2009**

Priority:

(30) Convention priority:  
**06.06.2008 US 61/131,227;**  
**14.11.2008 US 61/114,519**(43) Application published: **27.07.2012** Bull. № 21(45) Date of publication: **20.08.2014** Bull. № 23(85) Commencement of national phase: **11.01.2011**(86) PCT application:  
**US 2009/045770 (01.06.2009)**(87) PCT publication:  
**WO 2009/148983 (10.12.2009)**Mail address:  
**105215, Moskva, a/ja 26, N.A. Rybinoj**

(72) Inventor(s):

**LANT Nejl Zhozef (GB),**  
**BESENMEHTTER Verner (DK),**  
**FRIS Ehsben Piter (DK),**  
**GIBSON Kejs (DK),**  
**RASMUSSEN Frank (DK),**  
**SKDZhOT Mishel (DK)**

(73) Proprietor(s):

**DZE PROKTER EhND GEhMBL KOMPANI**  
**(US)**(54) **DETERGENT COMPOSITION CONTAINING VERSION OF FAMILY 44 XYLOGLUCANASE**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology. Disclosed is a detergent composition containing an isolated mutant version of a parent xyloglucanase, 2-50 wt % surfactant and an auxiliary ingredient, where the version of the parent xyloglucanase contains one of the groups of alterations presented in the description; the parent xyloglucanase is xyloglucanase having at least 90% identity to the amino acid sequence SEQ ID NO:

3, presented in the description; and the version has xyloglucanase activity. Disclosed is use of said composition for endowing cotton with dirt-repellent properties during subsequent washing.

EFFECT: invention enables to obtain a detergent composition with stable xyloglucanase for endowing cotton with dirt-repellent properties during subsequent washing.

11 cl, 1 dwg, 56 tbl, 29 ex

## ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к моющей композиции, содержащей вариант ксилоглюканазы, принадлежащей к семейству 44 гликозилгидролаз.

## ИЗВЕСТНЫЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

5 Ксилоглюкан является основным структурным полисахаридом в первичной (растущей) клеточной стенке растений. Структурно, ксилоглюканы состоят из целлюлозаподобной бета-1,4-связанной глюкозной основной цепи, которая часто  
10 замещена различными боковыми цепями. Считается, что функцией ксилоглюкана в первичной стенке растений является сшивание целлюлозных микрофибрил с образованием целлюлозно-ксилоглюкановой сетки.

Ксилоглюканазы способны катализировать солибилизацию ксилоглюкана до ксилоглюкановых олигосахаридов. Некоторые ксилоглюканазы проявляют только ксилоглюканазную активность, тогда как другие обладают как ксилоглюканазной, так  
15 и целлюлазной активностью. Ксилоглюканазы могут быть классифицированы как ЕС 3.2.1.4 или ЕС 3.2.1.151. Ферменты с ксилоглюканазной активностью описаны, например, в Vincken et al. (1997) Carbohydrate Research 298(4): 299-310, где охарактеризованы три  
20 разные эндогликаназы EndoI, EndoV и EndoVI, выделенные из *Trichoderma viride* (близкий к *T.reesei*). EndoI, EndoV и EndoVI принадлежат к семействам 5, 7 и 12 гликозилгидролаз, соответственно, см. Henrissat, B., et al. (1991, 1993). WO 94/14953 раскрывает  
25 ксилоглюканазу семейства 12 (EG II), клонированную из гриба *Aspergillus aculeatus*. WO 99/02663 раскрывает ксилоглюканазы семейства 12 и семейства 5, клонированные из *Bacillus licheniformis* и *Bacillus agaradhaerens*, соответственно. WO 01/062903 раскрывает ксилоглюканазы семейства 44.

В частности, WO 99/02663 и WO 01/062903 высказывают предположение о том, что  
30 ксилоглюканазы могут быть использованы в моющих средствах.

Целью настоящего изобретения является обеспечение композиции моющего средства, содержащей вариант ксилоглюканазы, принадлежащий к семейству 44 гликозилгидролаз, с улучшенными свойствами по сравнению с ее исходным ферментом.

## СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

35 Настоящее изобретение относится к моющей композиции, содержащей изолированные варианты исходной ксилоглюканазы, содержащие изменения в одном или больше (нескольких) положениях, выбранных из группы, состоящей из номеров позиций 68, 123, 156, 118, 200, 129, 137, 193, 92, 83, 149, 34, 340, 332, 9, 76, 331, 310, 324, 498, 395, 366, 1, 374, 7, 140, 8, 14, 21, 211, 37, 45, 13, 78, 87, 436, 101, 104, 111, 306, 117, 119, 414, 139, 268,  
40 142, 159, 164, 102, 168, 176, 180, 482, 183, 202, 206, 217, 4, 222, 19, 224, 228, 232, 2, 240, 244, 5, 247, 249, 328, 252, 259, 406, 267, 269, 275, 179, 166, 278, 281, 288, 298, 301, 18, 302, 165, 80, 303, 316, 169, 322, 120, 146, 342, 348, 147, 353, 380, 468, 382, 383, 38, 384, 389, 391, 10, 392, 396, 177, 397, 399, 409, 237, 413, 253, 415, 418, 40, 443, 445, 148, 449, 225, 450, 454, 3, 455, 456, 299, 461, 470, 204, 476, 488, 347 и 507, где позиции соответствуют положению  
45 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:3 и где изменение (изменения) независимо представляют собой:

- i) инсерцию аминокислоты справа от аминокислоты, занимающей данную позицию,
- ii) делецию аминокислоты, занимающей данную позицию, или
- iii) замещение аминокислоты, занимающей данную позицию, на другую аминокислоту;

и  
45 исходная ксилоглюканаза является ксилоглюканазой семейства 44; и вариант обладает ксилоглюканазной активностью.

## ДЕТАЛЬНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к моющей композиции, содержащей вариант исходных ксилоглюканаз семейства 44, содержащий изменение, предпочтительно, в форме замещения, и/или инсерции, и/или делеции в одной или больше (нескольких) позициях, где нумерация позиций соответствует нумерации позиций в SEQ ID NO:3.

5 Варианты настоящего изобретения обладают ксилоглюканазной активностью и, потенциально, также целлюлолитической активностью. Варианты настоящего изобретения имеют улучшенные свойства по сравнению с исходной ксилоглюканазой. В одном аспекте, варианты имеют повышенную стабильность в жидких моющих средствах, особенно, жидких композициях моющих средств для стирки.

10 Определения

Ксилоглюканазная активность: термин "ксилоглюканазная активность" определяется тут как катализируемый ферментом гидролиз ксилоглюкана. Реакция включает эндогидролиз 1,4-бета-D-глюкозидных связей в ксилоглюкане. В целях настоящего изобретения, ксилоглюканазную активность определяют с использованием AZCL-  
15 ксилоглюкана (фирмы Megazyme) в качестве субстрата реакции. Анализ может проводиться несколькими способами, например, как описано в Примере 2 данной заявки или как описано в WO 01/62903. Единица ксилоглюканазной активности (XyloU) определяется в соответствии с методом анализа, описанным в WO 01/62903, страница 60, строки 3-17.

20 Целлюлазная активность: термин "целлюлазная активность" определяется тут как катализируемый ферментом гидролиз 1,4-бета-D-глюкозидных связей в бета-1,4-глюкане (целлюлозе). В целях настоящего изобретения целлюлазную активность определяют с использованием AZCL-HE-целлюлозы (фирмы Megazyme) в качестве субстрата реакции.

25 Вариант: термин "вариант" определяется тут как полипептид, обладающий ксилоглюканазной активностью, содержащий изменение, такое как замещение, инсерция и/или делеция, одного или больше (нескольких) аминокислотных остатков в одной или больше (нескольких) конкретных позициях, соответствующих аминокислотным позициям в SEQ ID NO:3. Варианты по изобретению могут также обладать целлюлазной  
30 активностью. Измененный полипептид (вариант) получают с вмешательством человека путем модификации полинуклеотидной последовательности, кодирующей исходный фермент. Исходный фермент может кодироваться SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:6, или последовательностью, по меньшей мере на 75% идентичной с одной из этих последовательностей. Вариант полипептидной последовательности,  
35 предпочтительно, не встречается в природе.

Фермент дикого типа: термин ксилоглюканаза "дикого типа" обозначает ксилоглюканазу, экспрессируемую природным микроорганизмом, таким как бактерии, дрожжи или нитчатый гриб, встречающийся в природе. Термин "дикого типа" может быть использован взаимозаменяемо с термином "встречающийся в природе".

40 Исходный фермент: термин "исходная" ксилоглюканаза или "родительская" ксилоглюканаза, в используемом тут значении, обозначает ксилоглюканазу, с которой производится модификация, например замещение (замещения), инсерция (инсерции), делеция (делеции) и/или укорачивание (укорачивания), для получения вариантов фермента по настоящему изобретению. Этот термин также относится к полипептиду, с которым осуществляется сравнение и выравнивание варианта. Исходная форма может  
45 быть встречающимся в природе (дикого типа) полипептидом, таким как фермент с SEQ ID NO:2, или SEQ ID NO:3, или SEQ ID NO:5, или SEQ ID NO:7. Исходный полипептид, однако, также может быть вариантом встречающегося в природе полипептида,

подвергнутого модифицированию или изменению аминокислотной последовательности. Исходная форма также может быть аллельным вариантом, который представляет собой полипептид, кодируемый любой из двух или больше альтернативных форм гена, занимающих один и тот же хромосомный локус.

5 Изолированный вариант или полипептид: термин "изолированный вариант" или "изолированный полипептид", в используемом тут значении, относится к варианту или полипептиду, выделенному из источника, например клетки-хозяина, которая его экспрессирует, или ферментного комплекса, в котором он нормально присутствует. Предпочтительно, полипептид является чистым по меньшей мере на 40%, более  
10 предпочтительно, чистым по меньшей мере на 60%, еще более предпочтительно, чистым по меньшей мере на 80%, наиболее предпочтительно, чистым по меньшей мере на 90%, и еще более предпочтительно, чистым по меньшей мере на 95%, при определении методом SDS-PAGE.

По существу чистый вариант или полипептид: термин "по существу чистый вариант"  
15 или "по существу чистый полипептид" обозначает тут препарат полипептида, содержащий не более 10%, предпочтительно, не более 8%, более предпочтительно, не более 6%, более предпочтительно, не более 5%, более предпочтительно, не более 4%, более предпочтительно, не более 3%, еще более предпочтительно, не более 2%, наиболее  
20 предпочтительно, не более 1%, и еще более предпочтительно, не более 0,5% мас. другого полипептидного материала, с которым он нативно или рекомбинантно ассоциирован. Таким образом, предпочтительно, чтобы по существу чистый вариант или полипептид был чистым на по меньшей мере 92%, предпочтительно, чистым на по меньшей мере  
94%, более предпочтительно, чистым на по меньшей мере 95%, более предпочтительно, чистым на по меньшей мере 96%, более предпочтительно, чистым на по меньшей мере  
25 96%, более предпочтительно, чистым на по меньшей мере 97%, более предпочтительно, чистым на по меньшей мере 98%, еще более предпочтительно, чистым на по меньшей мере 99%, наиболее предпочтительно, чистым на по меньшей мере 99,5%, и еще более предпочтительно, чистым на 100% мас. от общего количества полипептидного  
30 материала, присутствующего в препарате. Варианты и полипептиды по настоящему изобретению, предпочтительно, находятся в по существу чистой форме. Это может быть достигнуто, например, путем получения варианта или полипептида хорошо известными рекомбинантными способами или классическими методами очистки.

Зрелый полипептид: термин "зрелый полипептид" определяется тут как полипептид, обладающий ксилоглюканазной активностью, находящийся в своей конечной форме  
35 после трансляции и любых посттрансляционных модификаций, таких как N-терминальный процессинг, C-терминальное укорачивание, гликозилирование, фосфорилирование и т.д. Для полипептида, описываемого SEQ ID NO:2, зрелая ксилоглюканазная последовательность может теоретически начинаться с положения 28 SEQ ID NO:2. Зрелая последовательность заканчивается положением 551 SEQ ID  
40 NO:2. Теоретическая зрелая ксилоглюканазная последовательность приведена в SEQ ID NO:3.

Последовательность, кодирующая зрелый полипептид: термин "последовательность, кодирующая зрелый полипептид" определяется тут как нуклеотидная последовательность, которая кодирует зрелый полипептид, обладающий  
45 ксилоглюканазной активностью. В одном аспекте, последовательность, кодирующая зрелый полипептид, представляет собой нуклеотиды 82-1653 SEQ ID NO:1.

Идентичность: степень сродства двух аминокислотных последовательностей или двух нуклеотидных последовательностей описывается параметром "идентичность".

В целях настоящего изобретения степень идентичности двух аминокислотных последовательностей определяют с использованием алгоритма Нидлмана-Вунша (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443-453), реализованного в программе Needle пакета EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends in Genetics 16: 276-277; <http://emboss.org>). предпочтительно, версии 3.0.0 или более поздней. Используемыми необязательными параметрами являются штраф за открытие пробела, равный 10, штраф за продолжение пробела, равный 0,5, и матрица замещения EBLOSUM62 (версия BLOSUM62 для EMBOSS). Результат вычислений Needle, называемый "наиболее протяженная идентичность" (longest identity) (получаемый с использованием опции - nobrief), используется в качестве процента идентичности и рассчитывается следующим образом:

(Идентичные остатки × 100) / (Длина выравнивания - Общее число пробелов в выравнивании).

В целях настоящего изобретения, степень идентичности между двумя дезоксирибонуклеотидными последовательностями определяют с использованием алгоритма Нидлмана-Вунша (Needleman and Wunsch, 1970, supra), реализованного в программе Needle пакета EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, supra; <http://emboss.org>). предпочтительно, версии 3.0.0 или более поздней. Используемыми необязательными параметрами являются штраф за открытие пробела, равный 10, штраф за продолжение пробела, равный 0,5, и матрица замещения EDNAFULL (версия NCBI NUC4.4 для EMBOSS). Результат вычислений Needle, называемый "наиболее протяженная идентичность" (longest identity) (получаемый с использованием опции - nobrief), используется в качестве процента идентичности и рассчитывается следующим образом:

(Идентичные дезоксирибонуклеотиды × 100) / (Длина выравнивания - Общее число пробелов в выравнивании).

Функциональный фрагмент: термин "функциональный фрагмент полипептида" используется для описания полипептида, который получен из более длинного полипептида, например зрелого полипептида, и который был укорочен в N-терминальной области или в C-терминальной области или в обеих областях с образованием фрагмента исходного полипептида. Для того, чтобы представлять собой функциональный полипептид, фрагмент должен сохранять по меньшей мере 20%, предпочтительно, по меньшей мере 40%, более предпочтительно, по меньшей мере 50%, более предпочтительно, по меньшей мере 60%, более предпочтительно, по меньшей мере 70%, более предпочтительно, по меньшей мере 80%, еще более предпочтительно, по меньшей мере 90%, наиболее предпочтительно, по меньшей мере 95% и еще более предпочтительно, по меньшей мере 100% ксилотрансферазной активности непроцессированного/зрелого полипептида.

Аллельный вариант: термин "аллельный вариант" обозначает тут любую из двух или больше альтернативных форм гена, занимающих один и тот же хромосомный локус. Аллельные варианты возникают в природных условиях в результате мутаций и могут приводить к полиморфизму в популяциях. Генные мутации могут быть молчащими (отсутствие изменений в кодированном полипептиде) или могут кодировать полипептиды, имеющие измененные аминокислотные последовательности. Аллельный вариант полипептида представляет собой полипептид, кодированный аллельным вариантом гена.

Изолированный полинуклеотид: термин "изолированный полинуклеотид", в используемом тут значении, относится к полинуклеотиду, который был выделен из

источника. В одном аспекте, изолированный полинуклеотид является по меньшей мере на 40% чистым, более предпочтительно, по меньшей мере на 60% чистым, еще более предпочтительно, по меньшей мере на 80% чистым, наиболее предпочтительно, по меньшей мере на 90% чистым и еще более предпочтительно, по меньшей мере на 95% чистым при определении методом электрофореза на агарозе.

По существу чистый полинуклеотид: термин "по существу чистый полинуклеотид", в используемом тут значении, относится к препарату полинуклеотида, не содержащему других посторонних или нежелательных нуклеотидов и находящемуся в форме, пригодной для использования в системах продуцирования модифицированного методами генной инженерии полипептида. Таким образом, по существу чистый полинуклеотид содержит не более 10%, предпочтительно, не более 8%, более предпочтительно, не более 6%, более предпочтительно, не более 5%, более предпочтительно, не более 4%, более предпочтительно, не более 3%, еще более предпочтительно, не более 2%, наиболее предпочтительно, не более 1% и еще более предпочтительно, не более 0,5% мас. другого полинуклеотидного материала, с которым он нативно или рекомбинантно ассоциирован. По существу чистый полинуклеотид может, однако, включать встречающиеся в природе 5'- и 3'-нетранслируемые области, такие как промоторы и терминаторы.

Предпочтительно, чтобы по существу чистый полинуклеотид был по меньшей мере на 90% чистым, предпочтительно, по меньшей мере на 92% чистым, более предпочтительно, по меньшей мере на 94% чистым, более предпочтительно, по меньшей мере на 95% чистым, более предпочтительно, по меньшей мере на 96% чистым, более предпочтительно, по меньшей мере на 97% чистым, еще более предпочтительно, по меньшей мере на 98% чистым, наиболее предпочтительно, по меньшей мере на 99% и еще более предпочтительно, по меньшей мере на 99,5% мас. чистым. Полинуклеотиды по настоящему изобретению находятся, предпочтительно, в по существу чистой форме, т.е. препарат полинуклеотида по существу не содержит другого полинуклеотидного материала, с которым он нативно или рекомбинантно ассоциирован. Полинуклеотиды могут быть геномного, кДНК, РНК, полусинтетического, синтетического происхождения или любой их комбинацией.

Кодирующая последовательность: при использовании в данном описании термин "кодирующая последовательность" означает полинуклеотид, который непосредственно определяет аминокислотную последовательность его полипептидного продукта. Границы кодирующей последовательности обычно определяются открытой рамкой считывания, которая обычно начинается с иницирующего кодона АТГ или альтернативных иницирующих кодонов, таких как GTG и TTG, и заканчивается терминирующим кодоном, таким как TAA, TAG и TGA. Кодирующая последовательность может быть ДНК, кДНК, синтетическим или рекомбинантным полинуклеотидом.

Функционально связанный: термин "функционально связанный" обозначает тут конфигурацию, в которой контрольная последовательность размещена в соответствующем положении по отношению к кодирующей последовательности полинуклеотидной последовательности таким образом, чтобы контрольная последовательность направляла экспрессию кодирующей последовательности полипептида.

Клетка-хозяин: термин "клетка-хозяин", в используемом тут значении, включает любой тип клеток, восприимчивый к трансформации, трансфекции, трансдукции и т.п. конструктором нуклеиновой кислоты или вектором, содержащим полинуклеотид по настоящему изобретению. Термин "клетка-хозяин" охватывает любое потомство

родительской клетки, не идентичное родительской клетке вследствие мутаций, происходящих при репликации.

Повышенная химическая стабильность: термин "повышенная химическая стабильность" определяется тут как вариант фермента, обладающий способностью к сохранению ферментативной активности после периода инкубации в присутствии химиката или химикатов, будь то встречающихся в природе или синтетических, которые снижают ферментативную активность исходного фермента. Повышенная химическая стабильность может также приводить к вариантам, способным лучше катализировать реакцию в присутствии таких химикатов. В определенном аспекте изобретения повышенная химическая стабильность является повышенной стабильностью в моющем средстве, в частности в жидком моющем средстве. Повышенная стабильность моющего средства обозначает, в частности, повышенную стабильность ксилотриглицеридной активности при введении варианта ксилотриглицеридазы по настоящему изобретению в рецептуру жидкого моющего средства и последующем его хранении при температуре в интервале от 15 до 50°C.

В настоящем изобретении жидкие моющие средства являются особенно пригодными для использования в качестве жидких моющих средств для стирки.

Принятые правила обозначения вариантов

В целях настоящего изобретения аминокислотная последовательность ксилотриглицеридазы, раскрытая в SEQ ID NO:3, используется для определения соответствующего аминокислотного остатка в другой ксилотриглицеридазе. Аминокислотная последовательность другой ксилотриглицеридазы сравнивается путем выравнивания с аминокислотной последовательностью ксилотриглицеридазы, раскрытой в SEQ ID NO:3, и на основании выравнивания может быть определен номер позиции аминокислоты, соответствующий любому аминокислотному остатку в аминокислотной последовательности ксилотриглицеридазы, раскрытой в SEQ ID NO:3.

Выравнивание полипептидных последовательностей может быть проведено, например, с использованием "ClustalW" (Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J., 1994, CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice, Nucleic Acids Research 22:4673-4680). Выравнивание ДНК-последовательностей может быть проведено с использованием полипептидного выравнивания в качестве матрицы путем замены аминокислот на соответствующий кодон ДНК-последовательности.

При описании различных вариантов ксилотриглицеридаз по настоящему изобретению для простоты используется описанная ниже номенклатура. Во всех случаях используются принятые IUPAC однобуквенные или трехбуквенные сокращенные обозначения аминокислот.

Замещения. Для аминокислотных замещений используется следующая номенклатура: исходная аминокислота/положение/замещенная аминокислота. Соответственно, замещение треонина на аланин в положении 226 обозначается как "Thr226Ala" или "T226A". Множественные мутации разделяются знаками сложения ("+"), например "G205R+S411F" обозначает мутации в положениях 205 и 411 с замещениями глицина (G) на аргинин (R) и серина (S) на фенилаланин (F), соответственно. В тех случаях, когда исходная аминокислота может быть замещена на аминокислоту, выбранную из группы, это обозначается как "K129R,S,A,I,F,Q", указывая на замещение лизина (K) в положении 129 на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из: аргинина (R), серина (S), аланина (A), изолейцина (I), фенилаланина (F) и глутамина (Q). Альтернативно, "K129R,S,A,I,F,Q" может быть записано как K129R, или K129S, или K129A, или K129I,

или K129P, или K129Q.

Делеции. Для делеций аминокислот используется следующая номенклатура: исходная аминокислота/положение/символ звездочки (\*). Соответственно, делеция глицина в положении 195 обозначается как "Gly195\*" или "G195\*". Множественные делеций разделены знаками сложения ("+"), например, "G195\*+S411\*".

Инсерции. Для инсерций аминокислот используется следующая номенклатура: Символ звездочки (\*)/положение/строчная буква/вставленная аминокислота, где строчная буква указывает добавление аминокислоты справа от (после) указанного номера позиции. Соответственно, инсерция глутаминовой кислоты (E) справа от положения 10 обозначается "\*10aE". Если вторая аминокислота, например валин (V), должна быть вставлена справа от положения 10 после глутаминовой кислоты (E), она обозначается "\*10aE+\*10bV". Добавления к N-концу полипептида обозначаются как 0 (ноль). Добавление глутаминовой кислоты (E) и валина (V) к N-концевой аминокислоте полипептида обозначается как \*0aE+\*0bV.

Исходные ксилоглюканазы

В настоящем изобретении исходная ксилоглюканаза является или (a) ксилоглюканазой, принадлежащей к семейству 44 гликозилгидролаз, также называемых ксилоглюканазами семейства 44; или (b) полипептидом, выбранным из группы, состоящей из SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:7; или (c) полипептидом, содержащим аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичности со зрелым полипептидом SEQ ID NO:3; или (d) полипептидом, кодируемым полинуклеотидом, который гибридизуется в условиях по меньшей мере средней жесткости с (i) последовательностью, кодирующей зрелый полипептид SEQ ID NO:1, или SEQ ID NO:4, или SEQ ID NO:6, (ii) последовательностью геномной ДНК, содержащей последовательность, кодирующую зрелый полипептид SEQ ID NO:1, или SEQ ID NO:4, или SEQ ID NO:6 или (iii) непротранскрибированной комплементарной цепью (i) или (ii); или (e) полипептидом, кодируемым полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичности с последовательностью, кодирующей зрелый полипептид SEQ ID NO:1.

В первом аспекте исходная ксилоглюканаза содержит аминокислотную последовательность, имеющую степень идентичности со зрелым полипептидом SEQ ID NO:3, равную, предпочтительно, по меньшей мере 70%, более предпочтительно, по меньшей мере 75%, более предпочтительно, по меньшей мере 80%, более предпочтительно, по меньшей мере 85%, более предпочтительно, по меньшей мере 90%, более предпочтительно, по меньшей мере 95%, более предпочтительно, по меньшей мере 96%, еще более предпочтительно, по меньшей мере 97%, наиболее предпочтительно, по меньшей мере 98%, или еще более предпочтительно, по меньшей мере 99%, обладающим ксилоглюканазной активностью (тут и далее "гомологичные полипептиды"). В одном аспекте гомологичные полипептиды имеют аминокислотную последовательность, которая отличается на десять аминокислот, предпочтительно, на девять, более предпочтительно, на восемь, более предпочтительно, на семь, более предпочтительно, на шесть, более предпочтительно, на пять аминокислот, более предпочтительно, на четыре аминокислоты, еще более предпочтительно, на три аминокислоты, наиболее предпочтительно, на две аминокислоты и еще более предпочтительно, на одну аминокислоту от зрелого полипептида SEQ ID NO:3.

По существу гомологичные исходные ксилоглюканазы могут иметь одно или больше (несколько) аминокислотных изменений, таких как замещения, делеции и/или инсерции. Эти изменения, предпочтительно, являются незначительными по природе, т.е.

консервативными аминокислотными замещениями и другими замещениями, которые существенно не влияют на трехмерную укладку или активность белка или полипептида; маленькими делениями, типично, от одной до примерно 9 аминокислот, предпочтительно, от одной до примерно 15 аминокислот и, наиболее предпочтительно, от одной до примерно 30 аминокислот; и маленькими амино- или карбокситерминальными выступами, такими как аминотерминальный остаток метионина, маленький линкерный пептид, состоящий из от примерно пяти до десяти остатков, предпочтительно, от 10 до 15 остатков и, наиболее предпочтительно, от 20 до 25 остатков, или маленьким выступающим концом, который облегчает очистку (аффинная метка), таким как полигистидиновый тракт, или белок А (Nilsson et al., 1985, EMBO J. 4:1075; Nilsson et al., 1991, Methods Enzymol. 198: 3. См. также, в общем, Ford et al., 1991, Protein Expression and Purification 2:95-107).

Хотя описанные выше изменения, предпочтительно, являются незначительными по природе, такие изменения также могут иметь существенный характер, такой как слияние более крупных полипептидов размером до 300 аминокислот или больше, в виде как амино-, так и карбокситерминальных выступов.

Примеры консервативных замещений принадлежат к группам основных аминокислот (аргинин, лизин и гистидин), кислотных аминокислот (глутаминовая кислота и аспарагиновая кислота), полярных аминокислот (глутамин и аспарагин), гидрофобных аминокислот (лейцин, изолейцин и валин), ароматических аминокислот (фенилаланин, триптофан и тирозин) и малых аминокислот (глицин, аланин, серин, треонин и метионин). Аминокислотные замещения, которые в общем не изменяют специфическую активность, известны специалистам и описаны, например, в: Neurath and Hill, 1979, The Proteins, Academic Press, New York. Наиболее часто встречающимися заменами являются Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu и Asp/Gly.

Незаменимые аминокислоты в полипептидах ксилоглюканазы по настоящему изобретению могут быть идентифицированы в соответствии с процедурами, известными специалистам, такими как направленный мутагенез или аланин-сканирующий мутагенез (Cunningham and Wells, Science 244:1081-1085, 1989). В последней методике одиночные аланиновые мутации вводят в каждый остаток молекулы и полученные мутантные молекулы тестируют на биологическую активность (т.е. ксилоглюканазную активность) для идентификации аминокислотных остатков, критических для активности молекулы. См. также Hilton et al., J. Biol. Chem. 271:4699-4708, 1996. Активный сайт фермента или другие биологические взаимодействия также могут быть определены путем физического анализа структуры с использованием таких методик, как ядерный магнитный резонанс, кристаллография, электронная дифракция или фотоаффинное мечение, в сочетании с мутацией предполагаемого контактного сайта аминокислоты. См., например, de Vos et al., Science 255:306-312, 1992; Smith et al., J. Mol. Biol. 224:899-904, 1992; Wlodaver et al., FEBS Lett. 309:59-64, 1992. Точное определение незаменимых аминокислот также может быть проведено на основании анализа гомологии с полипептидами, родственными с полипептидом по изобретению. Кристаллическая структура фермента, принадлежащего к семейству 44 гликозилгидролаз, была опубликована Kitago et. al, J. Biol. Chem. Vol. 282:35703-35711, 2007. На основании этой структуры можно сгенерировать трехмерную структуру исходной ксилоглюканазы (SEQ ID NO:3) *in silico* (методами компьютерного моделирования). На основании сравнения с опубликованной структурой следующие остатки в SEQ ID NO:3 были идентифицированы как критические для ферментативной функции: E187 (каталитическая кислота/основание), E358 (каталитическая -

нуклеофильная), E56 (карбоксилатная группа, координирующая  $\text{Ca}^{2+}$ ) и D154 (карбоксилатная группа, координирующая  $\text{Ca}^{2+}$ ). Поэтому эти положения в исходном ферменте, предпочтительно, не должны мутировать.

5 Исходная ксилоглюканаза, предпочтительно, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3 или ее аллельный вариант; или ее фрагмент, обладающий ксилоглюканазной активностью. В одном аспекте исходная ксилоглюканаза содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2. В другом аспекте исходная ксилоглюканаза содержит зрелый полипептид SEQ ID NO:2. В другом аспекте исходная ксилоглюканаза состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:3 или ее аллельного варианта; или ее фрагмента, обладающего ксилоглюканазной активностью. В другом аспекте исходная ксилоглюканаза содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, или ее аллельный вариант; или ее фрагмент, обладающий ксилоглюканазной активностью. В другом аспекте исходная ксилоглюканаза содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, или ее аллельный вариант; или ее фрагмент, обладающий ксилоглюканазной активностью.

10 Фрагмент зрелого полипептида SEQ ID NO:3 представляет собой полипептид, имеющий делеции одной или больше (нескольких) аминокислот из amino- и/или карбоксильного конца этой аминокислотной последовательности, но все еще сохраняющий ксилоглюканазную активность.

20 Во втором аспекте исходные ксилоглюканы кодируются полинуклеотидами, которые гибридизуются в условиях очень низкой жесткости, предпочтительно, в условиях низкой жесткости, более предпочтительно, в условиях средней жесткости, более предпочтительно, в условиях средневысокой жесткости, еще более предпочтительно, в условиях высокой жесткости, и наиболее предпочтительно, в условиях очень высокой жесткости, с (i) последовательностью, кодирующей зрелый полипептид SEQ ID NO:1, или SEQ ID NO:4, или SEQ ID NO:6, (ii) последовательностью геномной ДНК, содержащей последовательность, кодирующую зрелый полипептид SEQ ID NO:1, или SEQ ID NO:4, или SEQ ID NO:6, (iii) субпоследовательностью (i) или (ii), или (iv) непротранскрибированной комплементарной нитью (i), (ii) или (iii) (J. Sambrook, E.F. Fritsch and T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d edition, Cold Spring Harbor, New York). Субпоследовательность может кодировать полипептидный фрагмент, обладающий ксилоглюканазной активностью. В одном аспекте, комплементарная нить представляет собой непротранскрибированную комплементарную нить последовательности, кодирующей зрелый полипептид SEQ ID NO:1, или SEQ ID NO:4, или SEQ ID NO:6.

35 Субпоследовательность кодирующей последовательности зрелого полипептида SEQ ID NO:1, или SEQ ID NO:4, или SEQ ID NO:6, или ее гомолог, представляет собой нуклеотидную последовательность с делениями одного или больше (нескольких) нуклеотидов из 5'- и/или 3'-конца, где полипептид кодируется субпоследовательностью, обладающей ксилоглюканазной активностью.

Исходные ферменты также могут быть аллельными вариантами полипептидов, обладающих ксилоглюканазной активностью.

45 Полинуклеотид по SEQ ID NO:1, или SEQ ID NO:4, или SEQ ID NO:6; или его субпоследовательность; а также аминокислотная последовательность SEQ ID NO:3, или SEQ ID NO:5, или SEQ ID NO:7; или ее фрагмент; могут быть использованы для конструирования зондов нуклеиновых кислот для идентификации и клонирования ДНК, кодирующей исходные ксилоглюканы из штаммов разных родов или видов в соответствии со способами, хорошо известными специалистам. В частности, такие

зонды могут быть использованы для гибридизации с геномной или кДНК рода или вида, представляющего интерес, в соответствии со стандартными процедурами саузерн-блоттинга, с целью идентификации и выделения их соответствующего гена. Такие зонды могут быть значительно короче целой последовательности, но должны иметь по меньшей мере 14, предпочтительно, по меньшей мере 25, более предпочтительно, по меньшей мере 35 и наиболее предпочтительно, по меньшей мере 70, нуклеотидов в длину. Однако, предпочтительно, чтобы зонд нуклеиновой кислоты имел по меньшей мере 100 нуклеотидов в длину. Например, зонд нуклеиновой кислоты может иметь по меньшей мере 200 нуклеотидов, предпочтительно, по меньшей мере 300 нуклеотидов, более предпочтительно, по меньшей мере 400 нуклеотидов, или наиболее предпочтительно, по меньшей мере 500 нуклеотидов в длину. Могут быть использованы даже более длинные зонды, например зонды нуклеиновой кислоты, имеющие, предпочтительно, по меньшей мере 600 нуклеотидов, более предпочтительно, по меньшей мере 700 нуклеотидов, еще более предпочтительно, по меньшей мере 800 нуклеотидов, предпочтительно, по меньшей мере 900 нуклеотидов в длину, предпочтительно, по меньшей мере 1000 нуклеотидов в длину, предпочтительно, по меньшей мере 1100 нуклеотидов в длину, предпочтительно, по меньшей мере 1200 нуклеотидов в длину, предпочтительно, по меньшей мере 1300 нуклеотидов в длину, предпочтительно, по меньшей мере 1400 нуклеотидов в длину, предпочтительно, по меньшей мере 1500 нуклеотидов в длину или, наиболее предпочтительно, по меньшей мере 1600 нуклеотидов в длину. Могут быть использованы как ДНК, так и РНК зонды. Зонды, типично, метят для детектирования соответствующего гена (например, с использованием  $^{32}\text{P}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{35}\text{S}$ , биотина или авидина). Такие зонды входят в объем настоящего изобретения.

Библиотека геномной ДНК, приготовленная из других организмов, может быть подвергнута скринингу на ДНК, которая гибридизуется с описанными выше зондами и кодирует исходную ксилотриптофаназу. Геномная или другие ДНК из других организмов могут быть выделены электрофорезом на агарозном или полиакриламидном геле или другими методами разделения. ДНК из библиотек или выделенная ДНК могут быть перенесены на и иммобилизованы на нитроцеллюлозе или других пригодных материалах носителя. Для идентификации клона или ДНК, гомологичных с SEQ ID NO:1 или ее субпоследовательностью, материал носителя используется для проведения саузерн-блоттинга. В целях настоящего изобретения гибридизация указывает, что полинуклеотид гибридизуется с меченым нуклеотидным зондом, соответствующим полинуклеотиду, приведенному в SEQ ID NO:1, его комплементарной нитью, или его субпоследовательностью, в условиях от низкой до очень высокой жесткости. Молекулы, с которыми гибридизуется зонд, могут быть детектированы с использованием, например, рентгеновской пленки или любого другого средства детектирования, известного специалистам.

В одном аспекте зонд нуклеиновой кислоты представляет собой последовательность, кодирующую зрелый полипептид SEQ ID NO:1. В другом аспекте, зонд нуклеиновой кислоты представляет собой нуклеотиды 82-1653 SEQ ID NO:1. В другом аспекте, зонд нуклеиновой кислоты представляет собой полинуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид SEQ ID NO:2, или его субпоследовательность. В другом аспекте, зонд нуклеиновой кислоты представляет собой SEQ ID NO:1.

Для длинных зондов, имеющих по меньшей мере 100 нуклеотидов в длину, условия от очень низкой до очень высокой жесткости определяются как предгибридизация и гибридизация при  $42^\circ\text{C}$  в  $5\times\text{SSPE}$ ,  $0,3\%$  SDS, 200 микрограмм/мл деградированной в условиях гидродинамического сдвига и денатурированной ДНК спермы лосося и или

25% формамида для очень низкой и низкой жесткости, или 35% формамида для средней и средневысокой жесткости, или 50% формамида для высокой и очень высокой жесткости, в соответствии со стандартной процедурой саузерн-блоттинга, оптимально, в течение 12-24 часов.

5 Для длинных зондов, имеющих по меньшей мере 100 нуклеотидов в длину, материал носителя в конце промывают трижды, каждый раз в течение 15 минут, с использованием 2×SSC, 0,2% SDS, предпочтительно, при 45°C (очень низкая жесткость), более предпочтительно, при 50°C (низкая жесткость), более предпочтительно, при 55°C (средняя жесткость), более предпочтительно, при 60°C (средневысокая жесткость), еще  
10 более предпочтительно, при 65°C (высокая жесткости) и наиболее предпочтительно, при 70°C (очень высокая жесткость).

Для коротких зондов, имеющих от примерно 15 нуклеотидов до примерно 70 нуклеотидов в длину, условия жесткости определяют как предгибридизация, гибридизация и промывка после гибридизации при температуре ниже расчетной  $T_m$  на  
15 величину от примерно 5°C до примерно 10°C, в соответствии с расчетами Bolton and McCarthy (1962, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 48:1390) в 0,9 М NaCl, 0,09 М Tris-HCl, pH 7,6, 6 мМ EDTA, 0,5% NP-40, 1× растворе Денхардта, 1 мМ пиродифосфата натрия, 1 мМ первичном кислом фосфате натрия, 0,1 мМ АТФ и 0,2 мг РНК дрожжей на мл, в соответствии со стандартными процедурами саузерн-блоттинга,  
20 оптимально, в течение 12-24 часов.

Для коротких зондов, имеющих от примерно 15 нуклеотидов до примерно 70 нуклеотидов в длину, материал носителя промывают один раз в 6×SSC плюс 0,1% SDS в течение 15 минут, и дважды, каждый раз по 15 минут, с использованием 6×SSC при  
25 температуре, на 5-10°C ниже расчетной  $T_m$ .

В третьем аспекте исходная ксилотрипсиногена кодирована полинуклеотидом, содержащим или состоящим из нуклеотидной последовательности, имеющей степень идентичности с последовательностью, кодирующей зрелый полипептид SEQ ID NO:1, равной, предпочтительно, по меньшей мере 65%, более предпочтительно, по меньшей мере 70%, более предпочтительно, по меньшей мере 75%, более предпочтительно, по  
30 меньшей мере 80%, более предпочтительно, по меньшей мере 85%, еще более предпочтительно, по меньшей мере 90%, наиболее предпочтительно, по меньшей мере 95% и еще более предпочтительно, 96%, 97%, 98% или 99%, которая кодирует активный полипептид. В одном аспекте кодирующая последовательность зрелого полипептида представляет собой нуклеотиды 82-1653 SEQ ID NO:1.  
35

Исходная ксилотрипсиногена может быть получена из микроорганизмов любого рода. В одном аспекте исходная ксилотрипсиногена секретируется внеклеточно.

В следующем аспекте исходная ксилотрипсиногена может быть бактериальной ксилотрипсиногеназой. Например, ксилотрипсиногеназа может быть полипептидом  
40 грамположительных бактерий, таких как Bacillus, предпочтительно, из подразделения Bacillus/Lactobacillus, предпочтительно, видов рода Paenibacillus, особенно Paenibacillus polymyxa, например, Paenibacillus polymyxa ATCC 832, предпочтительно, ксилотрипсиногеназа является ксилотрипсиногеназой семейства 44, например, как описано в WO 01/62903, более предпочтительно, ксилотрипсиногеназой SEQ ID NO:5, более предпочтительно, ксилотрипсиногеназой SEQ ID NO:7 и наиболее предпочтительно, ксилотрипсиногеназой SEQ ID  
45 NO:2 или ее зрелым полипептидом.

Генерирование вариантов

Варианты исходной ксилотрипсиногеназы могут быть получены в соответствии с любой процедурой мутагенеза, известной специалистам, такой как неспецифический и/или

направленный мутагенез, конструирование синтетических генов, конструирование полусинтетических генов, неспецифический мутагенез, перемешивание и т.д.

Конструирование синтетических генов предусматривает *in vitro* синтез спроектированной полинуклеотидной молекулы, кодирующей полипептидную молекулу, представляющую интерес. Синтез гена может осуществляться с использованием ряда методик, таких как технология на основе мультиплексных микрочипов, описанная Tian et. al. (Tian, et. al., Nature 432:1050-1054), и подобные технологии, в которых олигонуклеотиды синтезируются и собираются на фотопрограммируемых микрожидкостных чипах.

Конструирование полусинтетических генов осуществляется путем объединения аспектов конструирования синтетических генов, и/или направленного мутагенеза, и/или неспецифического мутагенеза, и/или перемешивания. Типичным примером полусинтетического конструирования является способ, использующий синтезируемые полинуклеотидные фрагменты, в комбинации с методами ПЦР. Таким образом, определенные участки генов могут быть синтезированы *de novo*, в то время как другие участки могут быть амплифицированы с использованием сайт-специфических мутагенных праймеров, а еще другие участки могут быть подвергнуты амплификации методом ошибочно-направленной ПЦР или не-ошибочно-направленной ПЦР. Полинуклеотидные фрагменты затем могут быть перемешаны.

Направленный мутагенез представляет собой методику, в которой одна или несколько мутаций создаются в определенном сайте полинуклеотидной молекулы, кодирующей исходную ксилоглюканазу. Методика может быть осуществлена *in vitro* или *in vivo*.

Направленный мутагенез может осуществляться *in vitro* методом ПЦР с использованием олигонуклеотидных праймеров, содержащих желательную мутацию.

Направленный мутагенез также может осуществляться *in vitro* путем кассетного мутагенеза, предусматривающего расщепление рестрикционным ферментом по сайту плазмиды, содержащему полинуклеотид, кодирующий исходную ксилоглюканазу, и последующее лигирование олигонуклеотида, содержащего мутацию в полинуклеотиде. Обычно плазида и олигонуклеотид гидролизуются одним и тем же рестрикционным ферментом, что позволяет лигировать друг с другом липкие концы плазмиды и вставки. Дополнительное описание пригодных методик приведено в Sambrook et al. (1989), *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor lab., Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, F.M. et al. (eds.) *"Current Protocols in Molecular Biology"*. John Wiley and Sons, 1995; Harwood, C.R. and Cutting, S.M. (eds.) *"Molecular Biological Methods for Bacillus"*. John Wiley and Sons, 1990, и WO 96/34946; Scherer and Davis, 1979, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4949-4955; и Barton et al., 1990, *Nucleic Acids Research* 18:7349-4966.

После лигазной реакции лигационная смесь может быть использована для трансформирования клетки-хозяина; в целях клонирования часто используются клетки *E.coli*, как описано Ausubel, F.M. et al. Трансформированные клетки *E.coli* могут размножаться в жидкой среде или на твердых агаровых пластинах, плазмиды могут быть выделены из трансформированных клеток и использованы для трансформации клеток *B.subtilis*. Пригодные компетентные клетки *Bacillus*, такие как MB1510, 168-производное (например, доступная от BGSC (*Bacillus Genetic Stock Center*) с номером доступа 1A1 168 *trpC2*), могут быть трансформированы, как описано в WO 03/095658. Переносимая плазмидой *E.coli* интеграционная кассета для конструирования библиотеки может быть использована для трансформации *Bacillus*. Способ описан детально в WO 03/095658. Альтернативно, может быть использован *in vitro* амплифицированный продукт PCR-SOE (ПЦР с сочленением фрагментов путем элонгации перекрывающихся участков)

(Melnikov and Youngman, *Nucleic Acid Research* 27, 1056).

Направленный мутагенез может быть осуществлен *in vivo* способами, известными специалистам. См., например, публикацию патентной заявки США 2004/0171154; Storici et al., 2001, *Nature Biotechnology* 19: 773-776; Kren et al., 1998, *Nat. Med.* 4:285-290; и Calissano and Macino, 1996, *Fungal Genet. Newslett.* 43:15-16.

Любая процедура направленного мутагенеза может быть использована в настоящем изобретении. Имеется множество доступных коммерческих наборов, которые могут быть использованы для получения вариантов исходных ксилоглюканаз.

Одиночные или множественные аминокислотные замещения, делеции и/или инсерции могут быть выполнены и протестированы с использованием известных способов мутагенеза, рекомбинации и/или перемешивания, с последующей соответствующей процедурой скрининга, так как раскрыто Reidhaar-Olson and Sauer, 1988, *Science* 241:53-57; Bowie and Sauer, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2152-2156; WO 95/17413 или WO 95/22625. Другие методы, которые могут быть использованы, включают ошибочно-направленную ПЦР, фаговый дисплей (например, Lowman et al., 1991, *Biochem.* 30:10832-10837; патент США №5223409; WO 92/06204) и участок-направленный (region-directed) мутагенез (Derbyshire et al., 1986, *Gene* 46:145; Ner et al., 1988, *DNA* 7:127).

Способы мутагенеза/перемешивания, описанные выше, могут быть объединены с высокопроизводительными автоматизированными методами скрининга для детектирования активности клонированных мутированных полипептидов, экспрессируемых клетками-хозяевами, например *Bacillus*, как описано выше. Мутированные молекулы ДНК, кодирующие полипептиды с ксилоглюканазной активностью, могут быть выделены из клеток-хозяев и быстро секвенированы с использованием стандартных методов, известных специалистам.

#### Варианты

В настоящем изобретении изолированные варианты исходной ксилоглюканазы содержат изменения в одном или больше (нескольких) положениях, выбранных из группы, состоящей из номеров позиций 68, 123, 156, 118, 200, 129, 137, 193, 92, 83, 149, 34, 340, 332, 9, 76, 331, 310, 324, 498, 395, 366, 1, 374, 7, 140, 8, 14, 21, 211, 37, 45, 13, 78, 87, 436, 101, 104, 111, 306, 117, 119, 414, 139, 268, 142, 159, 164, 102, 168, 176, 180, 482, 183, 202, 206, 217, 4, 222, 19, 224, 228, 232, 2, 240, 244, 5, 247, 249, 328, 252, 259, 406, 267, 269, 275, 179, 166, 278, 281, 288, 298, 301, 18, 302, 165, 80, 303, 316, 169, 322, 120, 146, 342, 348, 147, 353, 380, 468, 382, 383, 38, 384, 389, 391, 10, 392, 396, 177, 397, 399, 409, 237, 413, 253, 415, 418, 40, 443, 445, 148, 449, 225, 450, 454, 3, 455, 456, 299, 461, 470, 204, 476, 488, 347 и 507, где вариант, обладающий ксилоглюканазной активностью, содержит аминокислотную последовательность, имеющую степень идентичности, равную по меньшей мере 70%, более предпочтительно, по меньшей мере 75%, более предпочтительно, по меньшей мере 80%, более предпочтительно, по меньшей мере 85%, еще более предпочтительно, по меньшей мере 90%, более предпочтительно, по меньшей мере 95%, более предпочтительно, по меньшей мере примерно 97%, наиболее предпочтительно, по меньшей мере 98% и еще более предпочтительно - 99% с аминокислотной последовательностью исходной ксилоглюканазы. Нумерация позиций относится к аминокислотной последовательности SEQ ID NO:3. Предпочтительно, варианты, содержащие изменения в одном или нескольких из вышеуказанных положений, имеют повышенную стабильность в моющем средстве, предпочтительно, в жидком моющем средстве по сравнению с исходной ксилоглюканазой.

В предпочтительном варианте исполнения вариант содержит одну или больше (несколько) следующих комбинаций изменений:

V1\*+V2\*+H3\*;  
 V1Q+\*1aE+\*1bV;  
 H3A;  
 H3A+H436A;  
 5 K8A,Q,S;  
 T9D;  
 T9D+L34F+A83E+Q149E+H193T+S332P+R340T;  
 I10V+D33E+M40L+A41T+Q67M+Y73F+S76D+G78A+Q82K+T92A+L102Q+Q137E+  
 I222V+V228I+D249N+S269N+V272A+E333A+I337L+M356L+T374A+S416A+D444Y+  
 10 A469E+K470T+I473G+T517A+S522\*;  
 I10V+F17S+D33E+M40L+A41T+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+Q137E+V219A+  
 D249N+V272A+I337L+M356L+V397A+S416A+T421I+S424N+N441D+D444Y+V450I+  
 K470T+I473S+V477I;  
 I10V+F17S+D33E+M40L+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+T92A+L102Q+Q137E+  
 15 H164N+N168K+T172A+V219A+I222V+V228I+D249N+S269N+V272A+E333A+I337L+  
 M356L+N415S+T421I+S424H+N441D+D444Y+S522P+P523V+V524E;  
 I10V+F17S+D33E+M40L+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+T92A+L102Q+Q137E+I  
 22V+V228I+D249N+V272A+I337L+M356L+T374A+V397A+S416A+T421I+S424N+N441  
 D+D444Y+V450I+A469E+K470T+I473G+T517A+S522P+P523V+V524E;  
 20 I10V+F17S+D33E+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+T92A+L102Q+Q137E+N168K+  
 T172A+I222V+V228I+D249N+V272A+E333A+I337L+M356L+V397A+S416A+T421I+S424H+  
 N441D+D444Y+A469E+K470T+I473S+V477I+E489A+A490V+T517A+S522\*;  
 I10V+F17S+M40L+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+T92A+L102Q+Q137E+I222V+  
 V228I+D249N+S269N+V272A+T320A+I337L+M356L+T374A+V397A+N415S+T421I+S424H+  
 25 N441D+D444Y+A469E+K470T+I473S+V477I+T517A+S522P+P523V+V524E;  
 I10V+F17S+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+T104A+Q137E+N153K+R156Q+V219A+  
 I222V+V228I+D249N+S269N+V272A+E333A+I337L+M356L+V397A+N415S+D420G+  
 T421I+S424H+N441D+D444Y+V450I+A469E+K470T+I473G+T517A+S522\*;  
 I10V+F17S+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+T92A+T104A+Q137E+R156Q+V159A+  
 30 H164N+N168K+T172A+I222V+V228I+D249N+V272A;  
 I10V+F17S+Y53H+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+T92A+L102Q+Q137E+T172V+  
 A177T+I222V+V228I+D249N+S269N+I337L+M356L+V397A+S416A+T421I+S424H+N441D+  
 D444Y+A469E+K470T+I473G+T517A+S522\*;  
 K13A+K129A;  
 35 K13A+Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P;  
 K13A,R;  
 K18R;  
 R20A;  
 K21Q+K129A;  
 40 K21Q,R,T;  
 Q32H+M40L+R49G+D65E+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+T92A+L102Q+T104A+  
 Q137E+H164N+K202E+I222V+V228I+D249N+M356L+T374A;  
 D33V+Q68H+N168H+V450I;  
 L34F,I,M,V;  
 45 L34I+K129A;  
 D37G,N+K129A+R156Y;  
 E38I,V;  
 M40L+A41T+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+Q137E+N153K+H164N+D249N+V272A+

I337L+M356L+V397A+N415S+T421I+S424N+N441D+V450I+E489A+A490V+T517A+S522\*;

M40V;

L45I;

Q68H,M,N;

5 Q68H+G200P+N331F;

Q68H+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F;

Q68H+K118A+R156V+G200P+N331F;

Q68H+K118A+R156Y+H193T+D366H;

Q68H+K118R+R156F,Y;

10 Q68H+K118R+R156Y+G200P;

Q68H+K118S+R156F+G200P+G274D+N331F;

Q68H+K129AJ+R156K+G200P+N331F;

Q68H+R156F,V,Y+G200P+N331F;

Q68H+R156Y;

15 Q68H+R156Y+H193T;

Q68H+R156Y+H193T+D366H;

Q68H+R156Y+H193T+G200P+M310V;

Q68H+S76W+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+N331F;

Q68H+T92A,D,I,S,V,Y+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F;

20 Q68H+T92N+D97N+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F;

Q68H+T92S+K118A+K129A+R156Y+G200P+G274D+N331F;

Q68H+T92V+G200P+M310V;

Q68H+T92V+G200P+M310V+N331F;

Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+A224P+N331F;

25 Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F;

Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T;

Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+D366H;

Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+G200P+M310V+E446K;

Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+N331H,K,Q;

30 Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T;

Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T+D366H;

Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T+G200P+M310V;

Q68H+T92V+K118A+Q137E+N140F+R156Y+G200P+K470T;

Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+D324N;

35 Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+K470T;

Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+M310L;

Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+N331F;

Q68H+T92V+K118A,R+R156Y,F;

Q68H+T92V+K118A+S123PJ+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F;

40 Q68H+T92V+K118R+R156Y+H193T+D366H;

Q68H+T92V+R156F+G200P+M310V+S484C;

Q68H+T92V+R156F,V,Y+G200P+M310V;

Q68H+T92V+R156F,V,Y+G200P+M310V+N331F;

Q68H+T92V+R156F,Y+H193T;

45 Q68H+T92V+R156F,Y+H193T+D366H;

Q68H+T92V+R156F,Y+H193T+G200P+M310V;

Q68H+T92V+R156Y;

S76E,I,K,M,R,T,V,W;

S76W+G200P;  
 S76W+G200P+A224P;  
 G78A+K118A+K129A+R156Y;  
 G78A+K118A+K129A+R156Y;  
 5 G78A+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F;  
 G78A+K118A+K129A+R156Y+K169A;  
 G78A,N,S;  
 G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y;  
 G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F;  
 10 G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y+K169A;  
 L80V;  
 A83D,E,H,I,L,N,R,S,T,Y;  
 K87Q;  
 K87V+K129A+K169A;  
 15 T92I,V;  
 T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F;  
 T92V+K118A+K129A+R156Y;  
 T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F;  
 T92V+K118A+K129A+R156Y+H164N+G200P+N331F;  
 20 T92V+K129A+R156Y;  
 K101A+K129A;  
 K101R;  
 K101R+L102I;  
 T104A+P111Q+A117S+K129A+R156Y;  
 25 P111Q;  
 K118A+K129A;  
 K118A+K129A+F146L+R156Y+G200P+N331F;  
 K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F;  
 K118A+K129A+R156Y;  
 30 K118A+K129A+R156Y+A224P;  
 K118A+K129A+R156Y+G200P;  
 K118A+K129A+R156Y+G200P+M310V+N331F;  
 K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F;  
 K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F+N399I;  
 35 K118A+K129A+R156Y+K169A+G200P+N331F;  
 K118A+K129A+R156Y+K470T;  
 K118A,R;  
 K118A+R156Y;  
 K118A+R156Y+G200P;  
 40 D119L;  
 G120A;  
 S123PJ;  
 S123T+K129A+R156Y;  
 K129A,F,I,K,R,S,T;  
 45 K129A+K169A;  
 K129A+K176P;  
 K129A+K275Q;  
 K129A+K445S;

K129A+K470T;  
K129A+Q137E+R156Y;  
K129A+Q137E+R156Y+G200P;  
K129A+Q137E+R156Y+K470T;  
5 K129A+Q137E+V139K+N140F+Q147S+R156Y;  
K129A+R156Y;  
K129A+R156Y+A177T+V179I+A183S;  
K129A+R156Y+A328G;  
K129A+R156Y+D247G;  
10 K129A+R156Y+D249G,N,S;  
K129A+R156Y+D303I,K,S,V;  
K129A+R156Y+D324N;  
K129A+R156Y+D366H+T374A;  
K129A+R156Y+D461N,Q,T;  
15 K129A+R156Y+E288Q;  
K129A+R156Y+G200P;  
K129A+R156Y+G200P+G204T+R211K;  
K129A+R156Y+H164N;  
K129A+R156Y+H436Y;  
20 K129A+R156Y+I10V+V14I+D19E;  
K129A+R156Y+I222V+A224P+V228I+V232A;  
K129A+R156Y+K176P,S;  
K129A+R156Y+K275T;  
K129A+R156Y+K322I+K454Q;  
25 K129A+R156Y+K406N+N415G;  
K129A+R156Y+K454Q;  
K129A+R156Y+L380F+N383Y+D384G+N389T;  
K129A+R156Y+N298F+E299N+G301T;  
K129A+R156Y+N302K+D303L,S;  
30 K129A+R156Y+N331F;  
K129A+R156Y+P507A;  
K129A+R156Y+R267H;  
K129A+R156Y+R409L,T;  
K129A+R156Y+S443D+K445S+L449I+V450I+S455N+M456Y;  
35 K129A+R156Y+T244D;  
K129A+R156Y+V159M+H164N+F165Y;  
K129A+R156Y+V259I+R267K+L268K+S269A;  
Q137D,E;  
N140F;  
40 K142A,Q,R;  
F146C+H164C;  
F146K,L;  
F146L+K322I;  
L148K+N168D;  
45 Q149E;  
R156A,D,E,F,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y;  
R156Y+N331F;  
V159M;

H164A,N;  
L166I;  
N168D;  
K169A,Q,R;  
5 K176P;  
A177E,T;  
K180R;  
H193A,D,S,T;  
R197A,L;  
10 H199A;  
G200A,C,D,E,F,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y;  
G200P+A224P;  
K202N,Q,R;  
S214E;  
15 K217A;  
A221K;  
G225S;  
V232A;  
G237A,S,V;  
20 K240A,Q,R;  
K252A,Q,R;  
G253A;  
R267A;  
L268I;  
25 K275A,Q,R;  
L278I;  
F281L;  
M290R;  
R295A;  
30 K306A,R;  
K307Q;  
M310I,L,V;  
M310V+N399I;  
R314A;  
35 G316I;  
K322A,R;  
D324N;  
N331A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y;  
S332M,P;  
40 S332P+V397I;  
R340A,N,T;  
K342A;  
V345I;  
K347A,Q,R;  
45 D348G;  
K353Q,R;  
D366H;  
M373Q;

T374A;  
 L380F;  
 K382A;  
 N383Y;  
 5 N389A,F,N,V;  
 W391V;  
 K392G,Q;  
 D395G;  
 G396P;  
 10 V397S;  
 N3991;  
 K406N;  
 G413A,S;  
 K414A;  
 15 N415S;  
 T417K;  
 F418I;  
 V431E;  
 H436A;  
 20 N441G+A442E+S443D;  
 S443E,K,Q;  
 K445A,R,S;  
 K445C+K470C;  
 H448A;  
 25 K454R;  
 S467R+G468S+A469T;  
 G468S,Y;  
 K470P,R,T;  
 I473T;  
 30 K476Q;  
 K482A,Q,R;  
 K488A,Q,R,T;  
 A490R;  
 G498A,D,S;  
 35 R500A,T,V;  
 H512A;  
 T517A+G518D или  
 G518D;

В одном аспекте общее число изменений аминокислот в вариантах настоящего  
 40 изобретения составляет, предпочтительно, 55, предпочтительно, 52, более  
 предпочтительно, 50, более предпочтительно, 40, более предпочтительно, 30, более  
 предпочтительно, 20, более предпочтительно, 15, более предпочтительно, десять, более  
 предпочтительно, девять, более предпочтительно, восемь, еще более предпочтительно,  
 семь, еще более предпочтительно, шесть, еще более предпочтительно, пять, еще более  
 45 предпочтительно, четыре, еще более предпочтительно, три и наиболее предпочтительно,  
 два изменения и наиболее предпочтительно, одно изменение. В другом аспекте общее  
 число изменений составляет одно, предпочтительно, два, более предпочтительно, три,  
 еще более предпочтительно, четыре, еще более предпочтительно, пять, еще более

предпочтительно, шесть, еще более предпочтительно, семь, еще более предпочтительно, восемь, еще более предпочтительно, девять, наиболее предпочтительно, десять.

Изменение может представлять собой i) инсерцию аминокислоты справа от аминокислоты, занимающей данное положение; ii) делецию аминокислоты, занимающей данное положение, или iii) замещение аминокислоты, занимающей данное положение, на другую аминокислоту. Изменения могут выполняться независимо друг от друга, например в одном положении может быть выполнена инсерция, в то время как во втором положении - замещение, а в третьем положении - делеция, по сравнению с исходной ксилотрофаназой. В предпочтительном варианте исполнения вариант содержит только замещения.

В одном аспекте изобретения положения, в которых должны быть выполнены мутации, идентифицируются на основании анализа консенсусной последовательности. Анализ проводится путем сравнения первичной последовательности SEQ ID NO:3 с SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:7, а также с другими последовательностями из базы данных Uniprot, на 30% идентичных с участком SEQ ID NO:3 гликозилгидролазы семейства 44. Полученные в результате консенсусные последовательности изображены на фигуре 1. Консенсусная последовательность 1 представляет собой последовательность, содержащую наиболее часто встречающиеся аминокислоты в данной позиции из выравнивания, консенсусная последовательность 2 представляет собой последовательность со 2-й наиболее часто встречающейся аминокислотой в данной позиции, и т.д. В одном аспекте изобретения один или больше (несколько) остатков SEQ ID NO:3 заменяют на соответствующий остаток из консенсусной последовательности 1, или консенсусной последовательности 2, или консенсусной последовательности 3, или консенсусной последовательности 4. В одном аспекте настоящего изобретения варианты содержат изменение в одной или больше (нескольких) позициях, выбранных из группы, состоящей из 52 позиций, идентифицированных путем анализа консенсусной последовательности, состоящей из номеров позиций 10, 19, 68, 80, 89, 104, 111, 117, 123, 129, 137, 139, 140, 147, 156, 159, 164, 165, 177, 179, 183, 200, 204, 211, 222, 224, 225, 228, 232, 259, 267, 268, 269, 281, 328, 345, 366, 374, 380, 383, 384, 406, 415, 436, 443, 445, 449, 450, 455, 456, 488 и 507. В предпочтительном варианте исполнения, изменение представляет собой замещение, или несколько замещений, выбранных из группы, состоящей из: I10V, D19E, Q68H, L80V, G89A, T104A, P111Q, A117S, S123P, K129T, Q137E, V139K, N140F, Q147S, R156Y, V159M, H164N, F165Y, A177T, V179I, A183S, G200P, G204T, R211K, I222V, A224P, G225S, V228I, V232A, V259I, R267K, L268K, S269A, F281L, A328G, V345I, D366H, T374A, L380F, N383Y, D384G, K406N, N415G, H436Y, S443D, K445S, L449I, V450I, S455N, M456Y, K488T и P507A.

В другом аспекте изобретения вариант генерируется путем изменения тех аминокислот в исходном пептиде, которые имеют положительные заряды и расположены на расстоянии до 20 Å от иона кальция, на нейтральные или отрицательно заряженные аминокислоты. Предпочтительные варианты настоящего изобретения включают варианты, в которых суммарный заряд на расстоянии до 20 Å от иона кальция был сделан более отрицательным. В таких вариантах положительно заряженные аминокислоты могут быть замещены на аминокислоты, являющиеся нейтральными или отрицательно заряженными в условиях применения. В соответствии с этим предпочтительные варианты могут содержать замещения аминокислотного остатка, который является частично или полностью положительно заряженным в условиях "химической стабильности" или применения, т.е. Lys, Arg или His, на отрицательно заряженную или нейтральную аминокислоту. Предпочтительными заменяющими

аминокислотами могут быть отрицательно заряженные аминокислоты, такие как Asp и Glu, или нейтральные аминокислоты, такие как Ala, Asn, Gln, Tyr, Trp и Phe.

Предпочтительный вариант по настоящему изобретению содержит изменение в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из номеров позиций 49, 87, 118, 129, 134, 142, 156, 169 и 197. В предпочтительном варианте исполнения, изменения представляют собой замещения в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из номеров позиций 87, 118, 129, 134, 142, 156 и 169. В предпочтительном варианте исполнения, замещение выбирают из группы, состоящей из: K87A; K129A,S,F,I; K118A; K142A,Q, R156Y,F,V,I,K,W,L,M и K169Q,A.

В одном аспекте вариант исходной ксилоглюканазы содержит изменение в одном или больше (нескольких) положениях, соответствующих позициям 68 или 123 или 156 или 118 или 200 или 129 или 137 или 193 или 92 или 76 или 331. Предпочтительно, вариант содержит замещение в положении 68 и одно или несколько замещений в одной или нескольких дополнительных позициях, выбранных из группы, состоящей из номеров позиций 123, 156, 118, 200, 129, 137, 193,92, 83, 149, 34, 340, 332, 9, 76, 331, 310, 324, 498, 395 и 366.

В другом аспекте вариант содержит замещение в положении 156 и одно или несколько замещений в одном или нескольких дополнительных положениях, выбранных из группы, состоящей из номеров позиций 10, 13, 14, 19, 37, 68, 78, 92, 118, 123, 129, 137, 139, 140, 147, 159, 164, 165, 169, 176, 177, 179, 183, 200, 204, 211, 222, 224, 244, 247, 249, 259, 267, 268, 269, 275, 288, 299, 301, 302, 303, 310, 324, 328, 331, 366, 380, 383, 384, 389, 406, 409, 415, 436, 443, 445, 449, 450, 454, 455, 456, 461, 470 и 507.

В другом аспекте вариант исходной ксилоглюканазы содержит изменения в двух или больше (нескольких) положениях, соответствующих позициям 68, или 123, или 156, или 118, или 200, или 129, или 137, или 193, или 92, или 76, или 331. Предпочтительно, вариант содержит замещение в положении 68, или 123, или 156, или 118, или 200, или 129. Еще более предпочтительно, вариант содержит замещение в положении 129 и положении 156.

В другом аспекте вариант исходной ксилоглюканазы содержит изменения в трех или больше (нескольких) положениях, соответствующих позициям 68, или 123, или 156, или 118, или 200, или 129, или 137, или 193, или 92, или 76, или 331.

В другом аспекте вариант исходной ксилоглюканазы содержит изменения в четырех или больше (нескольких) положениях, соответствующих позициям 68, или 123, или 156, или 118, или 200, или 129, или 137, или 193, или 92, или 76, или 331.

В другом аспекте, вариант исходной ксилоглюканазы содержит изменения в пяти или больше (нескольких) положениях, соответствующих позициям 68 или 123 или 156 или 118 или 200 или 129 или 137 или 193 или 92 или 76 или 331.

В другом аспекте вариант исходной ксилоглюканазы содержит изменения в шести или больше (нескольких) положениях, соответствующих позициям 68, или 123, или 156, или 118, или 200, или 129, или 137, или 193, или 92, или 76, или 331.

В другом аспекте вариант исходной ксилоглюканазы содержит изменения в семи или больше (нескольких) положениях, соответствующих позициям 68, или 123, или 156, или 118, или 200, или 129, или 137, или 193, или 92, или 76, или 331.

В другом аспекте вариант исходной ксилоглюканазы содержит изменения в положениях, соответствующих позициям 129, и 156, и 331, и 200, и 118.

В другом аспекте вариант исходной ксилоглюканазы содержит изменения в положениях, соответствующих позициям 68, и 129, и 156, и 331, и 200, и 118.

В другом аспекте вариант исходной ксилоглюканазы содержит изменения в

положениях, соответствующих позициям 68, и 92, и 129, и 156, и 331, и 200, и 118.

В другом аспекте вариант содержит одно или больше (несколько) замещений, выбранных из группы, состоящей из: Q68H,N,L; S123P,T; R156Y,F,V,I,K,W,L,M; K118A,R; G200P,E,S,D; K129T,A,S; Q137E; H193T,S,D; T92V,I,A,S; A83E; Q149E; L34F,I,V; R340T,N;

5 S332P; T9D; S76W,V,I,K,R,T; N331F,C; M310I,V,L; D324N; G498A,D; D395G и D366H. Предпочтительно, замещения выбирают из группы, состоящей из Q68H; S123P; R156Y,F; K118A; G200P,E; K129T,A; Q137E; H193T; T92V и N331F. Более предпочтительно, замещения выбирают из группы, состоящей из Q68H; S123P; R156Y,F; K118A; G200P,E; K129T,A; Q137E; T92V и N331F. Более предпочтительно, вариант содержит замещения

10 в девяти или восьми, семи или шести или пяти или четырех или трех или двух или одной позиции (позициях), где замещения выбирают из группы, состоящей из Q68H; S123P; R156Y,F; K118A; G200P,E; K129T,A; Q137E; T92V и N331F.

В следующем аспекте вариант содержит одну или больше (несколько) следующих комбинаций замещений:

15 Q68H  
S123P  
R156Y  
Q68H+R156Y  
K129A+R156Y

20 S123T+K129A+R156Y  
K129A+R156Y+G200P  
Q68H+K118R+R156F  
Q68H+R156Y+H193T  
Q68H+R156F+G200P+N331F

25 Q68H+T92V+K118A+R156Y  
K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F  
G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y  
Q68H+K129T+R156K+G200P+N331F  
K118A+K129A+R156Y+K169A+G200P+N331F

30 T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F  
G78A+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F  
G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y+K169A  
Q68H+T92V+Q137E+R156Y+G200P+N331F  
Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+N331F

35 Q68H+T92V+R156Y+G200P+M310V+N331F  
Q68H+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F  
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F  
Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+N331F  
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T+D366H

40 Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+D366H  
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F  
Q68H+T92V+K118A+S123P,T+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F  
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+A224P+N331F

В предпочтительном варианте исполнения все описанные выше варианты являются

45 вариантами исходной ксилотриглюканазы, которая принадлежит к семейству 44 гликозилгидролаз, более предпочтительно, исходную ксилотриглюканазу выбирают из ксилотриглюканазы, имеющей по меньшей мере 75% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:3, более предпочтительно, исходную ксилотриглюканазу

выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:7, и наиболее предпочтительно, исходные ксилоглюканазы состоят из SEQ ID NO: 3.

#### Композиции

5 Настоящее изобретение также относится к композициям, содержащим вариант ксилоглюканазы или полипептид по настоящему изобретению, обладающий ксилоглюканазной активностью. Предпочтительно, композиции обогащены таким вариантом или полипептидом. Термин "обогащенный" указывает, что ксилоглюканазная активностью композиции повышена, например, с коэффициентом обогащения, равным  
10 1,1 или больше. Предпочтительно, композиции составляются для обеспечения желательных характеристик, таких как низкий уровень окраски, низкий уровень запаха и приемлемая стабильность при хранении.

Композиция может содержать вариант или полипептид по настоящему изобретению в качестве основного ферментного компонента, например, монокомпонентной  
15 композиции. Альтернативно, композиция может содержать множество ферментативных активностей, таких как аминопептидаза, амилаза, карбогидраза, карбоксипептидаза, каталаза, целлюлаза, хитиназа, кутиназа, циклодекстрингликозилтрансфераза, дезоксирибонуклеаза, эстераза, альфа-галактозидаза, бета-галактозидаза, глюкоамилаза, альфа-глюкозидаза, бета-глюкозидаза, галоидпероксидаза, инвертаза, лакказы, липаза,  
20 маннозидаза, оксидаза, пектинолитический фермент, пептидоглутаминаза, пероксидаза, фитаза, полифенолоксидаза, протеолитический фермент, рибонуклеаза, трансклутаминаза или ксиланаза.

Полипептидные композиции могут быть получены в соответствии со способами, известными специалистам, и могут иметь форму жидкой или сухой композиции.

25 Например, полипептид может быть приготовлен в форме гранулята или микрогранулята. Вариант или полипептид для включения в композицию может быть стабилизирован в соответствии со способами, известными специалистам. В предпочтительном варианте исполнения, вариант ксилоглюканазы готовится в форме жидкой композиции.

#### Применение

30 Настоящее изобретение также касается способов применения вариантов ксилоглюканаз.

Варианты ксилоглюканаз, предпочтительно, включаются в и/или используются вместе с композициями моющих средств, например в композициях моющих средств для стирки, например композициях бытовых моющих средств для стирки, особенно  
35 жидких композициях моющих средств для стирки. Моющая композиция, типично, содержит обычные ингредиенты моющего средства, такие как поверхностно-активные вещества (анионные, катионные, неионные, цвиттерионные, амфотерные), добавки для усиления моющего действия, отбеливатели, полимеры, другие ферменты и другие ингредиенты, например, как описано в WO2007/130562 и WO2007/149806, которые  
40 настоящим целиком включены сюда в качестве ссылок.

Моющая композиция может находиться в любой форме, такой как твердая, жидкая, гелеобразная или любая их комбинация, предпочтительно, композиция находится в жидкой форме, предпочтительно, в форме жидкой моющей композиции для стирки.

Аспектом изобретения является использование варианта ксилоглюканазы или  
45 композиции варианта ксилоглюканазы по изобретению вместе с моющей композицией для придания ткани или предмету одежды полезных эффектов предотвращения скатывания, и/или смягчения ткани, и/или прояснения окраски, и/или удаления загрязнений, и/или предотвращения повторного отложения загрязнений, и/или

ингибирования переноса красителей.

Кроме того, изобретение относится к способу стирки тканей, включающему обработку тканей раствором для стирки, содержащим моющую композицию и вариант ксилоглюканазы или композицию варианта ксилоглюканазы по изобретению. Стирка может, например, осуществляться путем машинного способа стирки или ручного способа стирки. Раствор для стирки может, например, быть водным раствором для стирки, содержащим моющую композицию и имеющим рН от 3 до 12.

Во время стирки и использования поверхность тканей или предметов одежды обычно загрязняется оборванными или высвободившимися фрагментами волокон, которые могут придавать ткани полинявший и поношенный вид. Удаление этих поверхностных волокон с ткани частично восстанавливает исходную окраску и внешний вид ткани, приводя к прояснению окраски и улучшению внешнего вида. Вариант ксилоглюканазы или композиция варианта ксилоглюканазы по изобретению могут быть использованы для обеспечения прояснения окраски и/или улучшения внешнего вида путем использования при разовой или при многократных (повторных) циклах стирки.

Кроме того, микрофибрилы, выступающие с поверхности ткани, могут собираться в маленькие шарики, так называемые катышки или узелки, которые цепляются за поверхность и нарушают внешний вид ткани. Вариант ксилоглюканазы или композиция варианта ксилоглюканазы по изобретению могут быть использованы для удаления таких катышков, обеспечивая эффект, который называется депилинг (de-pilling).

Прояснение окраски и удаление катышков могут быть оценены путем визуального осмотра с использованием для проведения испытаний группы экспертов. Эффекты также могут быть измерены методами отражения света или определения ворсистости хлопка путем проведения оптических измерений. Эти методы широко известны специалистам и кратко описаны в *Enzymes in Detergency*, 1997, опубликованной Marcel Dekker, страницы 139-140.

На поверхности текстильных волокон, особенно, при увеличении числа циклов стирки, накапливаются отложения, которые могут включать дисперсные загрязнения, растворимые загрязнения, красители и пигменты и нерастворимые соли. Это может приводить к визуально воспринимаемому ухудшению чистящей эффективности стирки, например, приводя к сероватому или желтоватому виду ткани. Это можно предотвратить путем использования варианта ксилоглюканазы или композиции варианта ксилоглюканазы по изобретению во время циклов стирки. Этот эффект называется предотвращением повторного отложения или ингибированием переноса красителей или удалением загрязнений и может быть оценен с помощью оптических измерений.

Частицы загрязнений или нерастворимых солей, захватываемые поверхностью ткани и между волокнами, могут приводить к увеличению жесткости ткани. Благодаря использованию варианта ксилоглюканазы или композиции варианта ксилоглюканазы по изобретению в циклах стирки ткань может быть умягчена.

Ткани, подвергаемые обработке способами по настоящему изобретению, могут быть обычным пригодным для стирки бельем, например бытовым бельем для стирки. Предпочтительно, значительная часть белья для стирки представляет собой предметы одежды и ткани, включая вязаные изделия, текстильные изделия, изделия из джинсовой ткани, изделия из пряжи и изделия из ткани для полотенец, изготовленные из хлопка, хлопковых смесей или природных или искусственных целлюлозных материалов (например, на основе древесной целлюлозы) или их смесей. Примерами смесей являются смеси хлопка или искусственного шелка/вискозы с одним или несколькими дополнительными материалами, такими как шерсть, синтетические волокна (например,

полиамидные волокна, акриловые волокна, волокна из сложных полиэфиров, волокна из поливинилового спирта, поливинилхлоридные волокна, полиуретановые волокна, полимочевинные волокна, арамидные волокна) и целлюлозосодержащие волокна (например, искусственный шелк/вискоза, рами, льноволокно/льняная пряжа, джут, 5 волокна из ацетата целлюлозы, материал lyocell).

Общепризнанно, что обработка тканей и/или предметов одежды раствором моющего средства, содержащего вариант ксилоглюканазы или композицию варианта ксилоглюканазы по изобретению, может быть особенно пригодной, например, при 10 производстве новых волокон и/или тканей и/или предметов одежды, а также во время стирки поношенных тканей и/или предметов одежды, например при бытовой стирке или промышленной стирке.

Дозировка варианта ксилоглюканазы или композиции варианта ксилоглюканазы по настоящему изобретению и другие условия, в которых используется композиция, включая состав и концентрацию раствора моющего средства, могут быть определены 15 на основании способов, известных специалистам.

Ксилоглюканазы могут быть использованы в композициях по настоящему изобретению для обеспечения удаления загрязнений, содержащих производные целлюлозы или гемицеллюлозы, усиления эффекта предотвращения повторного отложения и улучшения удаления загрязнений. Ксилоглюканазы также могут быть 20 использованы в композициях по настоящему изобретению для придания хлопку грязеотталкивающих свойств при последующей стирке. Грязеотталкивающий эффект наблюдается на хлопчатобумажной ткани и на всех типах тканей, содержащих значительное количество хлопка, таких как смеси хлопок-синтетика (например, сложный полиэфир, полиамид, такой как нейлон™ и эластан).

25 Моющая композиция для стирки

Моющая композиция для стирки по настоящему изобретению содержит изолированный вариант исходной Ксилоглюканазы. Изолированный вариант исходной Ксилоглюканазы детально описан выше. Композиция, предпочтительно, содержит 30 специальный амфифильный алкоксилированный грязеудаляющий полимер. Композиция предпочтительно содержит моющее поверхностно-активное вещество, предпочтительно, имеет низкие уровни содержания моющего поверхностно-активного вещества. Специальный амфифильный алкоксилированный грязеудаляющий полимер описан детальнее ниже. Моющее поверхностно-активное вещество описано детальнее ниже. Композиция, предпочтительно, содержит статистический привитой сополимер.

35 Пригодные статистические привитые сополимеры описаны детальнее ниже.

Предпочтительно, композиция содержит соединение следующей общей структуры: бис((C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O)(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>)(CH<sub>3</sub>)-N<sup>+</sup>-C<sub>x</sub>H<sub>2x</sub>-N<sup>+</sup>-(CH<sub>3</sub>)-бис((C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O)(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>), где n = от 20 до 30 и x = от 3 до 8, или его сульфатированные или сульфонируемые варианты.

40 Предпочтительно, композиция содержит микрокапсулы ароматизатора, предпочтительно, ароматизатор инкапсулирован в меламино-формальдегидной пленке.

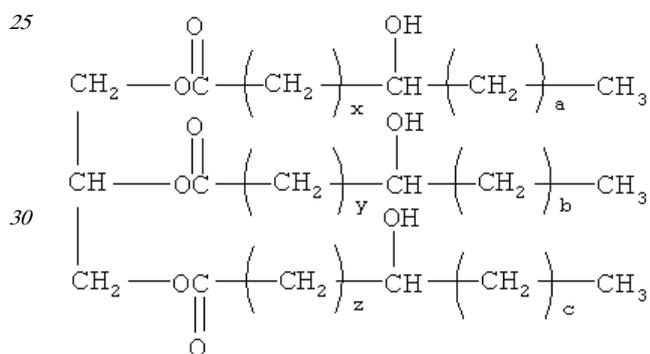
Моющая композиция, предпочтительно, содержит от примерно 0,00003% мас. до примерно 0,2% мас., от примерно 0,00008% мас. до примерно 0,05% мас. или даже от примерно 0,0001% мас. до примерно 0,04% мас. подщвечивающего агента для тканей. 45 Композиция может содержать от 0,0001% мас. до 0,2% мас. подщвечивающего агента для тканей; это может быть особенно предпочтительным в тех случаях, когда композиция имеет форму пакетика с унифицированной дозой.

Моющая композиция для стирки может находиться в любой форме, такой как твердая, жидкая, гелеобразная или любая их комбинация. Композиция может иметь форму

таблетки или пакетика, включая пакетики с несколькими отделениями. Композиция может иметь форму сыпучего порошка, такого как агломерат, высушенный распылительной сушкой порошок, инкапсулированный материал, экструдат, иголки, лентовидный материал, хлопья или любая их комбинация. Однако композиция, предпочтительно, имеет форму жидкости. Дополнительно, композиция находится в изотропной или анизотропной форме. Предпочтительно, композиция, или по меньшей мере ее часть, представляет собой ламеллярную фазу.

Композиция, предпочтительно, имеет низкие уровни содержания воды, такие как от 0,01% мас. до 10% мас., предпочтительно, до 5% мас., предпочтительно, до 4% мас., или до 3% мас., или до 2% мас., или даже до 1% мас. Это является особенно предпочтительным, если композиция имеет форму пакетика, типично, по меньшей мере частично, предпочтительно, полностью заключенного в водорастворимую пленку. Водорастворимая пленка, предпочтительно, содержит поливиниловый спирт.

Композиция может содержать структурообразователь, такой как гидрогенизированное касторовое масло. Один из пригодных типов структурообразующего агента, особенно пригодных для композиций по настоящему изобретению, содержит неполимерные (за исключением обычного алкоксилирования) кристаллические гидроксифункциональные материалы. Такие структурирующие материалы, типично, образуют в жидкой матрице ассоциированную межмолекулярную нитеобразную сеть, типично, кристаллизуясь в матрице *in situ*. Предпочтительными структурообразователями являются кристаллические гидроксилсодержащие жирные кислоты, сложные эфиры жирных кислот или жирные воска. Пригодные структурообразователи, типично, выбирают из материалов, имеющих следующую формулу:



35 в которой:

(x+a) имеет значение от 11 до 17;

(y+b) имеет значение от 11 до 17 и

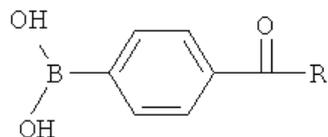
(z+c) имеет значение от 11 до 17.

40 Предпочтительно, в данной формуле x=y=z=10 и/или a=b=c=5. Конкретные примеры предпочтительных кристаллических гидроксилсодержащих структурообразователей включают касторовое масло и его производные. Особенно предпочтительными являются производные гидрогенизированного касторового масла, такие как гидрогенизированное касторовое масло и гидрогенизированный касторовый воск. Коммерчески доступные кристаллические гидроксилсодержащие структурообразователи на основе касторового масла включают ТНХСИН производства фирмы Rheox, Inc. (в настоящее время -

45 Elementis).

Композиция также предпочтительно содержит алканоламин для нейтрализации

кислотных компонентов. Примерами пригодных алканоламинов являются триэтаноламин и моноэтаноламин. Это особенно предпочтительно в тех случаях, когда композиция содержит стабилизаторы протеазы, такие как борную кислоту, или ее производные, такие как бороновая кислота. Примерами пригодных производных бороновой кислоты являются производные фенолбороновой кислоты следующей формулы:

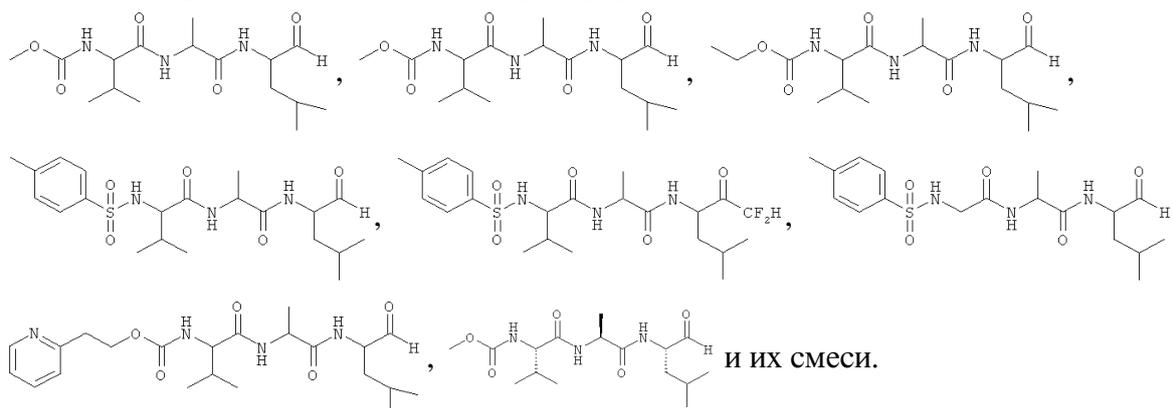


где R выбирают из группы, состоящей из водорода, гидрокси, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила, замещенного C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкенила и замещенного C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкенила.

Особенно предпочтительным стабилизатором протеазы является 4-формилфенилбороновая кислота. Другие пригодные производные бороновой кислоты, которые могут использоваться в качестве стабилизаторов протеазы, описаны в US 4963655, US 5159060, WO 95/12655, WO 95/29223, WO 92/19707, WO 94/04653, WO 94/04654, US 5442100, US 5488157 и US 5472628.

Композиция может содержать обратимый пептидный ингибитор протеазы.

Предпочтительно, обратимый пептидный ингибитор протеазы представляет собой трипептидный ингибитор фермента. Иллюстративные неограничивающие примеры пригодных трипептидных ингибиторов ферментов включают:



Обратимый пептидный ингибитор протеазы может быть получен любым пригодным способом. Иллюстративные неограничивающие примеры пригодных способов производства обратимых пептидных ингибиторов протеазы приведены в патенте США №6165966.

В одном варианте исполнения композиция содержит от примерно 0,00001% до примерно 5%, конкретнее, от примерно 0,00001% до примерно 3%, более конкретно, от примерно 0,00001% до примерно 1%, от веса композиции, обратимого пептидного ингибитора протеазы.

Композиция, предпочтительно, содержит растворитель. Растворитель, типично, является водой или органическим растворителем или их смесью. Предпочтительно, растворитель представляет собой смесь воды и органического растворителя. Если композиция имеет форму пакетика с унифицированной дозой, то, предпочтительно, композиция содержит органический растворитель и менее 10% мас., или 5% мас., или 4% мас., или 3% мас. свободной воды и может даже быть безводной, типично, не содержать целенаправленно добавляемой свободной воды. Свободную воду, типично, измеряют методом титрования по Фишеру (Karl Fischer). Экстрагируют 2 г композиции

моющего средства для стирки в 50 мл сухого метанола при комнатной температуре в течение 20 минут и анализируют 1 мл метанола путем титрования по Фишеру.

Композиция может содержать от более 0% мас. до 25% мас., или от более 0% мас. до 20% мас., или от более 0% мас. до 15% мас., или от более 0% мас. до 10% мас., или от более 0% мас. до 8% мас., предпочтительно, от более 0% мас. до 5% мас., наиболее предпочтительно, от более 0% мас. до 3% мас. органического растворителя. Пригодные растворители включают C<sub>4</sub>-C<sub>14</sub> простые эфиры и диэфиры, гликоли, алкоксилированные гликоли, C<sub>6</sub>-C<sub>16</sub> гликолевые простые эфиры, алкоксилированные ароматические спирты, ароматические спирты, алифатические разветвленные спирты, алкоксилированные алифатические разветвленные спирты, алкоксилированные линейные C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> спирты, линейные C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> спирты, амины, C<sub>8</sub>-C<sub>14</sub> алкильные и циклоалкильные углеводороды и галоидуглеводороды и их смеси.

Предпочтительные растворители выбирают из метоксиоктадеканола, 2-(2-этоксиэтокси)этанола, бензилового спирта, 2-этилбутанола и/или 2-метилбутанола, 1-метилпропоксиэтанола и/или 2-метилбутоксипропанола, линейных C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> спиртов, таких как метанол, этанол, пропанол, бутилдигликолевого простого эфира (BDGE), бутилтригликолевого простого эфира, трет-амилового спирта, глицерина, изопропанола и их смесей. Особенно предпочтительными растворителями, которые могут быть использованы по настоящему изобретению, являются бутоксипропоксипропанол, бутилдигликолевый простой эфир, бензиловый спирт, бутоксипропанол, пропиленгликоль, глицерин, этанол, метанол, изопропанол и их смеси. Другие пригодные растворители включают пропиленгликоль и диэтиленгликоль и их смеси.

Композиция, предпочтительно, содержит от примерно 0,1% до примерно 5%, от веса композиции, секвестранта для связывания кальция, имеющего условную константу устойчивости при pH 8 выше примерно 4. В одном варианте исполнения композиция, предпочтительно, в жидкой форме, может содержать секвестрант для связывания кальция, имеющий условную константу устойчивости при pH 8 выше примерно 4. Секвестрант для связывания кальция с условной константой устойчивости при pH 8 выше примерно 4 способен образовывать растворимые комплексы с ионами Ca. В одном варианте исполнения, секвестрант для связывания кальция выбирают из 1-гидроксиэтилиден-1,1-дифосфоновой кислоты (HEDP), диэтилентриаминпентауксусной кислоты (ДТРА), нитрилотриуксусной кислоты (НТА) и их комбинаций. Дополнительная информация о секвестрантах для связывания кальция и их константах устойчивости приведена в "Keys to Chelation with Versene Chelating Agents", опубликованной фирмой Dow Company, см. таблицы 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, и в Monsanto Technical Bulletin 53-39(E) ME-2.

Твердая моющая композиция для стирки

В одном варианте исполнения настоящего изобретения композиция представляет собой твердую моющую композицию для стирки, предпочтительно, твердую порошкообразную моющую композицию для стирки.

Композиция, предпочтительно, содержит от 0% мас. до 10% мас., или даже до 5% мас., цеолитной добавки для усиления моющего действия. Композиция также предпочтительно содержит от 0% мас. до 10% мас., или даже до 5% мас., фосфатной добавки для усиления моющего действия.

Композиция, типично, содержит анионное моющее поверхностно-активное вещество, предпочтительно, линейный алкилбензолсульфонат, предпочтительно, в комбинации со вспомогательным поверхностно-активным веществом. Предпочтительными

вспомогательными поверхностно-активными веществами являются алкилэтоксигированные сульфаты, имеющие среднюю степень этоксилирования от 1 до 10, предпочтительно, от 1 до 3, и/или этоксилированные спирты, имеющие среднюю степень этоксилирования от 1 до 10, предпочтительно, от 3 до 7.

5 Композиция, предпочтительно, содержит хелатирующее вещество, предпочтительно, композиция содержит от 0,3% мас. до 2,0% мас. хелатирующего вещества. Пригодным хелатирующим веществом является этилендиамин-N,N'-диянтарная кислота (EDDS).

Композиция может содержать целлюлозные полимеры, такие как натриевые или калиевые соли карбоксиметилцеллюлозы, карбоксиэтилцеллюлозы,  
 10 сульфозтилцеллюлозы, сульфопропилцеллюлозы, сульфат целлюлозы, фосфорилированную целлюлозу, карбоксиметилгидроксиэтилцеллюлозу, карбоксиметилгидроксипропилцеллюлозу, сульфозтилгидроксиэтилцеллюлозу, сульфозтилгидроксипропилцеллюлозу, карбоксиметилметилгидроксиэтилцеллюлозу, карбоксиметилметилцеллюлозу, сульфозтилметилгидроксиэтилцеллюлозу,  
 15 сульфозтилметилцеллюлозу, карбоксиметилэтилгидроксиэтилцеллюлозу, карбоксиметилэтилцеллюлозу, сульфозтилэтилгидроксиэтилцеллюлозу, сульфозтилэтилцеллюлозу, карбоксиметилметилгидроксипропилцеллюлозу, сульфозтилметилгидроксипропилцеллюлозу, карбоксиметилдодецилцеллюлозу, карбоксиметилдодекоил (dodecoyl) целлюлозу, карбоксиметилцианоэтилцеллюлозу и  
 20 сульфозтилцианоэтилцеллюлозу. Целлюлоза может быть замещенной целлюлозой, замещенной двумя или больше разными заместителями, такой как метил- и гидроксиэтилцеллюлоза.

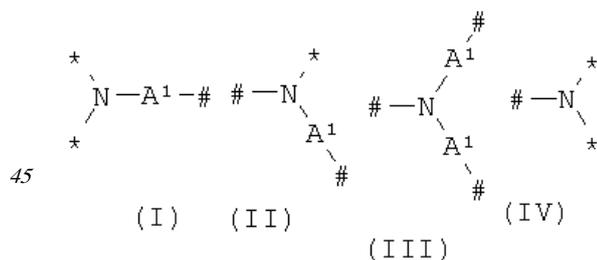
Композиция может содержать грязеотталкивающие полимеры, такие как Repel-o-Tech™. Другими пригодными грязеотталкивающими полимерами являются анионные  
 25 грязеотталкивающие полимеры. Пригодные грязеотталкивающие полимеры описаны детальнее в WO 05123835 A1, WO 07079850 A1 и WO 08110318 A2.

Композиция может содержать высушенный распылительной сушкой порошок. Высушенный распылительной сушкой порошок может содержать силикатную соль, такую как силикат натрия.

30 Амфифильный алкоксилированный грязеудаляющий полимер

Амфифильные алкоксилированные грязеудаляющие полимеры по настоящему изобретению относятся к любым алкоксилированным полимерам, имеющим сбалансированные гидрофильные и гидрофобные свойства, так чтобы они удаляли  
 35 частицы жира с тканей и поверхностей. Конкретные варианты исполнения амфифильных алкоксилированных грязеудаляющих полимеров по настоящему изобретению содержат структуру ядра и множество алкоксилатных групп, присоединенных к этой структуре ядра.

Структура ядра может представлять собой полиалкилениминовую структуру, содержащую, в конденсированной форме, повторяющиеся звенья формул (I), (II), (III)  
 40 и (IV):

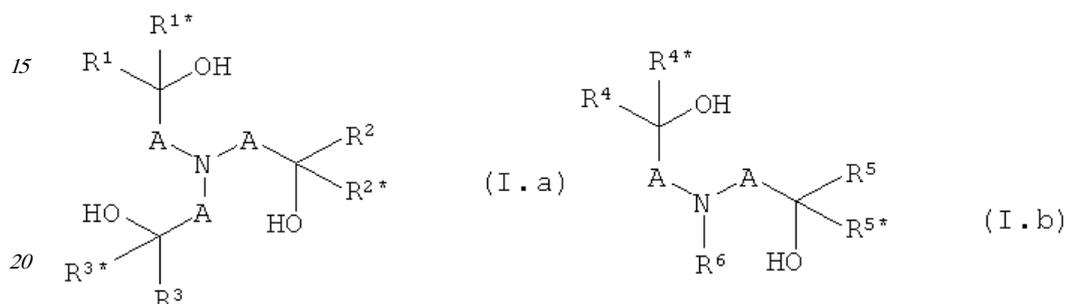


где # в каждом случае обозначает половину связи между атомом азота и свободным

положением связывания группы  $A^1$  двух соседних повторяющихся звеньев формул (I), (II), (III) или (IV); \* в каждом случае обозначает половину связи с одной из

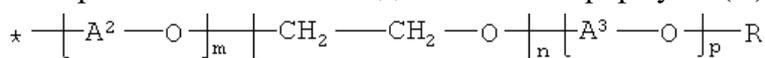
алкоксилатных групп; и  $A^1$  независимо выбирают из линейного или разветвленного  $C_2$ - $C_6$ -алкилена; где полиалкилениминовая структура состоит из 1 повторяющегося звена формулы (I), x повторяющихся звеньев формулы (II), y повторяющихся звеньев формулы (III) и y+1 повторяющихся звеньев формулы (IV), где x и y в каждом случае имеют величину в интервале значений от 0 до примерно 150 и где средний средневзвешенный молекулярный вес (Mw) полиалкилениминовой структуры ядра имеет величину в интервале значений от примерно 60 до примерно 10000 г/моль.

Структура ядра может, альтернативно, содержать полиалканоламиновую структуру, представляющую собой продукты конденсации по меньшей мере одного соединения, выбранного из N-(гидроксиалкил)аминов формул (I.a) и/или (I.b),



где A независимо выбирают из  $C_1$ - $C_6$ -алкилена;  $R^1$ ,  $R^{1*}$ ,  $R^2$ ,  $R^{2*}$ ,  $R^3$ ,  $R^{3*}$ ,  $R^4$ ,  $R^{4*}$ ,  $R^5$  и  $R^{5*}$  независимо выбирают из водорода, алкила, циклоалкила или арила, где три последние радикала могут быть необязательно замещенными; и  $R^6$  выбирают из водорода, алкила, циклоалкила или арила, где три последние радикала могут быть необязательно замещенными.

Множество алкиленоксидных групп, присоединенных к структуре ядра, независимо выбирают из алкиленоксидных звеньев формулы (V)



(V)

где \* в каждом случае обозначает половину связи с атомом азота повторяющегося звена формулы (I), (II) или (IV);  $A^2$  в каждом случае независимо выбирают из 1,2-пропилена, 1,2-бутилена и 1,2-изобутилена;  $A^3$  обозначает 1,2-пропилен; R в каждом случае независимо выбирают из водорода и  $C_1$ - $C_4$ -алкила; m имеет среднее значение в интервале от 0 до примерно 2; n имеет среднее значение в интервале от примерно 20 до примерно 50 и p имеет среднее значение в интервале от примерно 10 до примерно 50.

Конкретные варианты исполнения амфифильных алкоксилированных грязеудаляющих полимеров могут быть выбраны из алкоксилированных полиалкилениминов, имеющих внутренний полиэтиленоксидный блок и внешний полипропиленоксидный блок, у которых степень этоксилирования и степень пропоксилирования не выходят за определенные верхние или нижние предельные значения. Конкретные варианты исполнения алкоксилированных полиалкилениминов в соответствии с настоящим изобретением имеют минимальное соотношение

полиэтиленовых блоков к полипропиленовым блокам (n/p), равное примерно 0,6, и максимальное, равное примерно  $1,5(x+2y+1)^{1/2}$ . Было обнаружено, что алкоксилированные полиалкиленимины, имеющие соотношение n/p от примерно 0,8 до примерно  $1,2(x+2y+1)^{1/2}$ , обладают особенно полезными свойствами.

Алкоксилированные полиалкиленимины в соответствии с настоящим изобретением имеют основную цепь, состоящую из первичных, вторичных и третичных атомов азота аминов, которые присоединены друг к другу алкиленовыми радикалами А и расположены в случайном порядке. Фрагменты первичных аминов, которые начинают или заканчивают основную цепь и боковые цепи полиалкилениминовой основной цепи, и остальные атомы водорода которых впоследствии замещаются на алкиленоксидные звенья, называются тут повторяющимися звеньями формул (I) или (IV), соответственно. Фрагменты вторичных аминов, оставшийся атом водорода которых впоследствии замещается на алкиленоксидные звенья, называются повторяющимися звеньями формулы (II). Фрагменты третичных аминов, служащие разветвлениями основной цепи и боковых цепей, называются повторяющимися звеньями формулы (III).

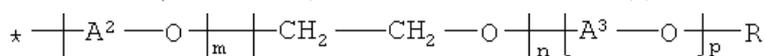
Поскольку при образовании полиалкилениминовой основной цепи может происходить циклизация, то в основной цепи также может присутствовать небольшое количество фрагментов циклических аминов. Такие полиалкиленимины, содержащие фрагменты циклических аминов, конечно, являются алкоксилированными таким же образом, как и материалы, состоящие из нециклических фрагментов первичных и вторичных аминов.

Полиалкилениминовая основная цепь, состоящая из атомов азота и групп  $A^1$ , имеет средний молекулярный вес Mw от примерно 60 до примерно 10000 г/моль, предпочтительно, от примерно 100 до примерно 8000 г/моль, и более предпочтительно, от примерно 500 до примерно 6000 г/моль.

Сумма  $(x+2y+1)$  соответствует общему числу алкилениминовых звеньев, присутствующих в одной индивидуальной полиалкилениминовой основной цепи, и, таким образом, прямо связана с молекулярным весом полиалкилениминовой основной цепи. Однако значения, приведенные в описании, относятся к среднечисловому значению для всех полиалкилениминов, присутствующих в смеси. Сумма  $(x+2y+2)$  соответствует общему числу аминогрупп, присутствующих в одной индивидуальной полиалкилениминовой основной цепи.

Радикалы  $A^1$ , соединяющие атомы азота аминов, могут быть одинаковыми или разными, линейными или разветвленными  $C_2$ - $C_6$ -алкиленовыми радикалами, такими как 1,2-этилен, 1,2-пропилен, 1,2-бутилен, 1,2-изобутилен, 1,2-пентандиил, 1,2-гександиил или гексаметилен. Предпочтительным разветвленным алкиленом является 1,2-пропилен. Предпочтительными линейными алкиленами являются этилен и гексаметилен. Более предпочтительным алкиленом является 1,2-этилен.

Атомы водорода первичных и вторичных аминогрупп полиалкилениминовой основной цепи замещаются на алкиленоксидные звенья формулы (V).



(V)

В данной формуле переменные, предпочтительно, имеют одно из указанных ниже значений:

$A^2$  в каждом случае выбирают из 1,2-пропилена, 1,2-бутилена и 1,2-изобутилена;

предпочтительно,  $A^2$  обозначает 1,2-пропилен.  $A^3$  обозначает 1,2-пропилен; R в каждом случае выбирают из водорода и  $C_1$ - $C_4$ -алкила, такого как метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, изобутил и трет-бутил; предпочтительно, R обозначает водород. Коэффициент m в каждом случае имеет значение от 0 до примерно 2; предпочтительно, m равен 0 или приблизительно 1; более предпочтительно, m равен 0. Коэффициент n имеет среднее значение в интервале от примерно 20 до примерно 50, предпочтительно, в интервале значений от примерно 22 до примерно 40, и более предпочтительно, в интервале значений от примерно 24 до примерно 30. Коэффициент p имеет среднее значение в интервале от примерно 10 до примерно 50, предпочтительно, в интервале значений от примерно 11 до примерно 40, и более предпочтительно, в интервале значений от примерно 12 до примерно 30.

Предпочтительно, алкиленоксидное звено формулы (V) представляет собой нестатистическую последовательность алкоксилатных блоков. Под нестатистической последовательностью подразумевается, что  $[-A^2-O-]_m$  прибавляют первым (т.е. ближайшим к связи с атомом азота повторяющегося звена формулы (I), (II), или (III)),  $[-CH_2-CH_2-O-]_n$  прибавляют вторым и  $[-A^3-O-]_p$  прибавляют третьим. Такая ориентация обеспечивает алкоксилированный полиалкиленимин с внутренним полиэтиленоксидным блоком и внешним полипропиленоксидным блоком.

Значительная часть этих алкиленоксидных звеньев формулы (V) образована этиленоксидными звеньями  $[-CH_2-CH_2-O-]_n$  и пропиленоксидными звеньями  $[-CH_2-CH_2(CH_3)-O-]_p$ . Алкиленоксидные звенья могут дополнительно также содержать небольшую

часть пропиленоксидных или бутиленоксидных звеньев  $[-A^2-O-]_m$ , т.е.

полиалкилениминовая основная цепь, насыщенная атомами водорода, может быть сначала введена в реакцию с небольшими количествами, составляющими до примерно 2 моль, особенно, от примерно 0,5 до примерно 1,5 моль, в частности, от примерно 0,8 до примерно 1,2 моль, пропиленоксида или бутиленоксида на моль присутствующих NH-групп, т.е. подвергнута первичному алкоксилированию.

Такая начальная модификация полиалкилениминовой основной цепи позволяет, при необходимости, снизить вязкость реакционной смеси при алкоксилировании. Однако модификация обычно не влияет на рабочие характеристики алкоксилированного полиалкиленимина и потому не является предпочтительной мерой.

Амфифильные алкоксилированные грязеудаляющие полимеры присутствуют в композициях моющих и чистящих средств по настоящему изобретению в количествах, составляющих от примерно 0,05% до 10% от веса композиции. Варианты исполнения композиций могут содержать от примерно 0,1% до примерно 5% мас. Более конкретно, варианты исполнения могут содержать от примерно 0,25 до примерно 2,5% грязеудаляющего полимера.

Моющее поверхностно-активное вещество

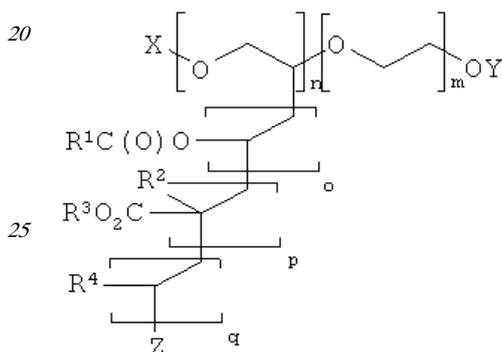
Композиция содержит моющее поверхностно-активное вещество. Моющее поверхностно-активное вещество может быть анионным, неионным, катионным и/или цвиттерионным. Предпочтительно, моющее поверхностно-активное вещество является анионным. Композиции, предпочтительно, содержат от 2% до 50% поверхностно-активного вещества, более предпочтительно, от 5% до 30%, наиболее предпочтительно, от 7% до 20%, моющего поверхностно-активного вещества. Композиция может содержать от 2% до 6% моющего поверхностно-активного вещества. Композиция,

предпочтительно, содержит моющее поверхностно-активное вещество в количестве, обеспечивающем от 100 ppm (млн<sup>-1</sup>) до 5000 ppm моющего поверхностно-активного вещества в растворе для стирки в процессе стирки. Это особенно предпочтительно в тех случаях, когда от 10 г до 125 г жидкой моющей композиции для стирки дозируют в раствор для стирки в процессе стирки. Композиция при контакте с водой, типично, образует раствор для стирки, содержащий от 0,5 г/л до 10 г/л моющей композиции.

Статистический привитой сополимер

Статистический привитой сополимер содержит: (i) гидрофильную основную цепь, содержащую мономеры, выбранные из группы, состоящей из: ненасыщенных C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> карбоновых кислот, простых эфиров, спиртов, альдегидов, кетонов, сложных эфиров, звеньев сахаров, алкоксидных звеньев, малеинового ангидрида, насыщенных многоосновных спиртов, таких как глицерин, и их смесей; и (ii) гидрофобную боковую цепь (цепи), выбранные из группы, состоящей из: C<sub>4</sub>-C<sub>25</sub> алкильной группы, полипропилена, полибутилена, винилового сложного эфира насыщенной C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> монокарбоновой кислоты, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкилового сложного эфира акриловой или метакриловой кислоты и их смесей.

Полимер, предпочтительно, имеет общую формулу



где X, Y и Z представляют собой концевые звенья, независимо выбранные из H или C<sub>1-6</sub> алкила; каждый R<sup>1</sup> независимо выбирают из метила и этила; каждый R<sup>2</sup> независимо выбирают из H и метила; каждый R<sup>3</sup> независимо обозначает C<sub>1-4</sub> алкил и каждый R<sup>4</sup> независимо выбирают из пирролидона и фенильных групп. Средневзвешенный молекулярный вес полиэтиленоксидной основной цепи, типично, составляет от примерно 1000 г/моль до примерно 18000 г/моль, или от примерно 3000 г/моль до примерно 13500 г/моль, или от примерно 4000 г/моль до примерно 9000 г/моль. Значения m, n, o, p и q выбирают так, чтобы боковые группы составляли по меньшей мере 50%, или от примерно 50% до примерно 98%, или от примерно 55% до примерно 95%, или от примерно 60% до примерно 90%, от веса полимера. Полимер, пригодный для использования по настоящему изобретению, типично имеет средневзвешенный молекулярный вес от примерно 1000 до примерно 100000 г/моль, или, предпочтительно, от примерно 2500 г/моль до примерно 45000 г/моль, или от примерно 7500 г/моль до примерно 33800 г/моль, или от примерно 10000 г/моль до примерно 22500 г/моль.

Пригодные привитые сополимеры описаны детальнее в WO07/138054, WO06/108856 и WO06/113314.

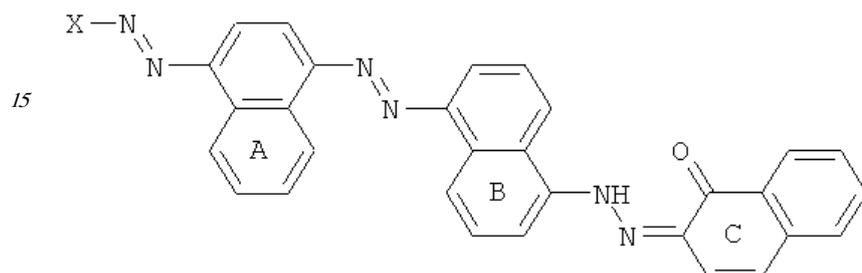
Пригодные подкрашивающие агенты для тканей

Флуоресцентные оптические осветлители излучают по меньшей мере некоторое количество видимого света. В отличие от них, подкрашивающие агенты для тканей

могут изменять оттенок поверхности, поскольку они поглощают по меньшей мере часть спектра видимого света. Пригодные подкрашивающие агенты для тканей включают красители, конъюгаты краситель-глина и пигменты, удовлетворяющие

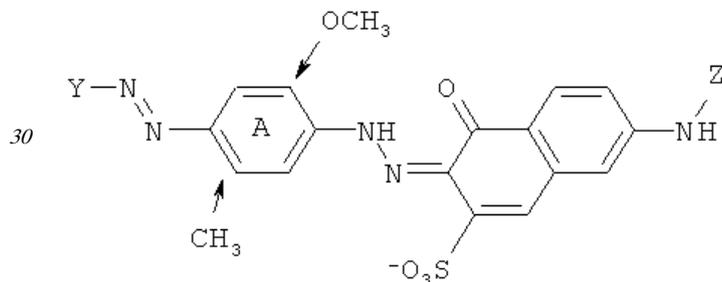
5 Пригодные красители включают красители с малыми молекулами и полимерные красители. Пригодные красители с малыми молекулами включают красители с малыми молекулами, выбранные из группы, состоящей из красителей, относящихся, по классификации цветового индекса (Colour Index, CI), к прямому синему, прямому красному, прямому фиолетовому, кислотному синему, кислотному красному, кислотному  
10 фиолетовому, основному синему, основному фиолетовому и основному красному или их смесям, например:

(1) Трис-азо прямые синие красители формулы



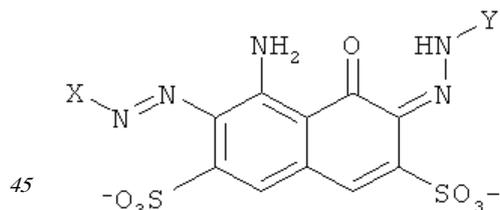
20 где по меньшей мере два из нафтильных колец A, B и C замещены сульфонатной группой, кольцо C может быть замещено в положении 5 группой NH<sub>2</sub> или NPh, X обозначает бензильное или нафтильное кольцо, замещенное до 2 раз сульфонатными группами, и может быть замещено в положении 2 группой OH и также может быть  
25 замещено группой NH<sub>2</sub> или NPh.

(2) Бис-азо прямые фиолетовые красители формулы



35 где Z обозначает H или фенил, кольцо A, предпочтительно, замещено метильной и метоксигруппой в положениях, указанных стрелочками, кольцо A также может быть нафтильным кольцом, группа Y обозначает бензильное или нафтильное кольцо, которое замещено сульфатной группой и может быть моно- или дизамещенным метильными группами.

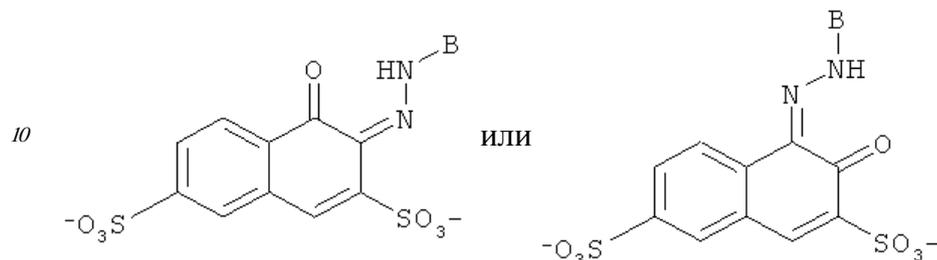
40 (3) Синие или красные кислотные красители формулы



где по меньшей мере одна из X и Y должна быть ароматической группой. В одном аспекте обе ароматические группы могут быть замещены бензильной или нафтильной

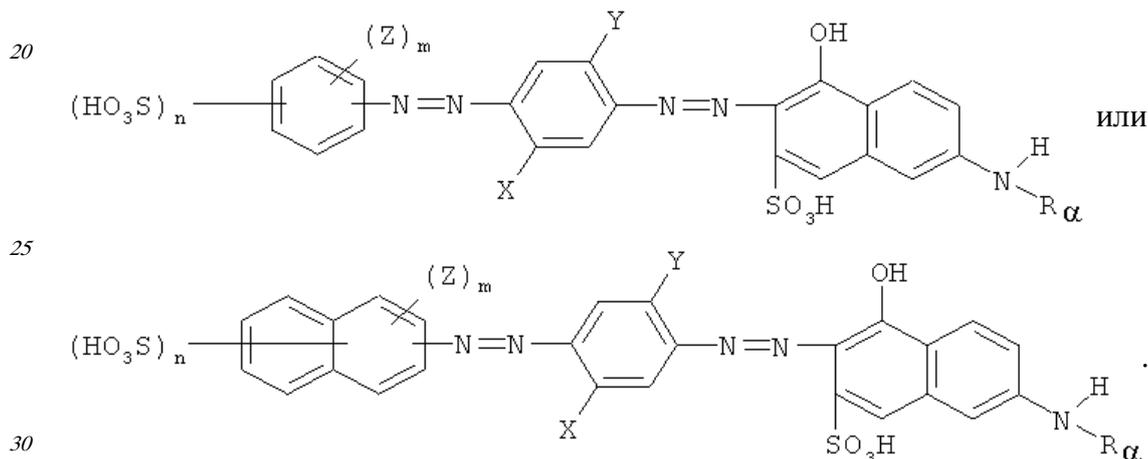
группой, которая может быть замещена не солюбилизирующимися в воде группами, такими как алкильные или алкилокси- или арилоксигруппы, X и Y не могут быть замещены солюбилизирующимися в воде группами, такими как сульфонаты или карбоксилаты. В другом аспекте X обозначает нитрозамещенную бензильную группу и Y обозначает бензильную группу.

(4) Красные кислотные красители структуры



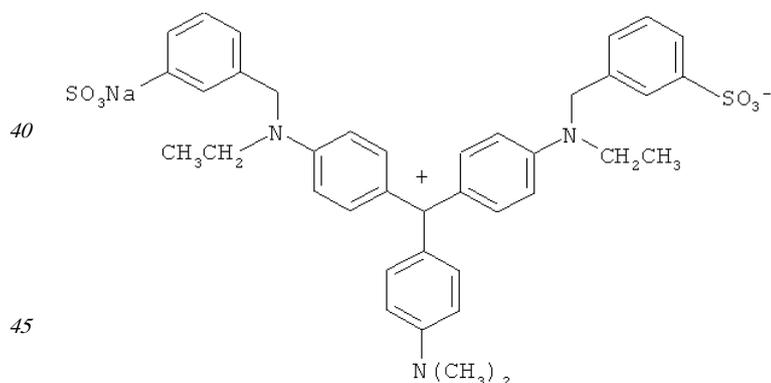
15 где B обозначает нафтильную или бензильную группу, которая может быть замещена не солюбилизирующимися в воде группами, такими как алкильные или алкилокси- или арилоксигруппы, B не может быть замещен солюбилизирующимися в воде группами, такими как сульфонаты или карбоксилаты.

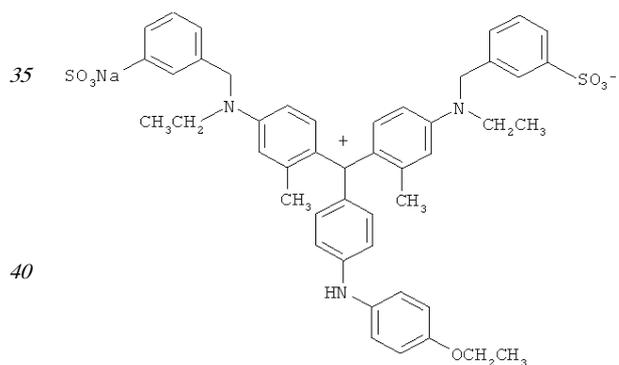
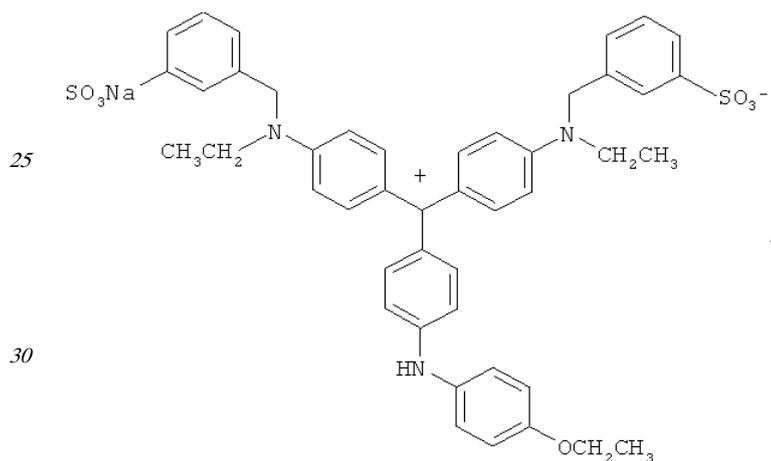
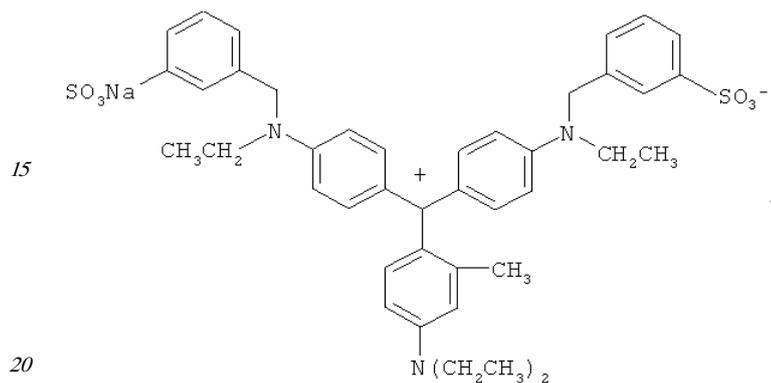
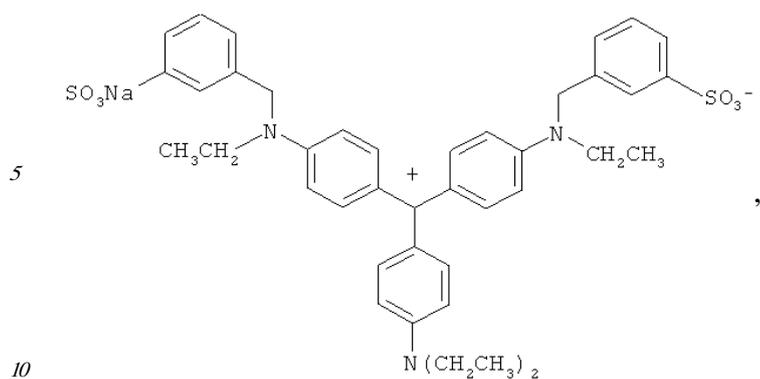
(5) Дис-азокрасители структуры



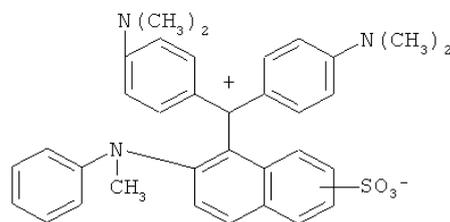
35 где X и Y, независимо друг от друга, обозначают каждый водород, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкил или C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкокси, R<sub>α</sub> обозначает водород или арил, Z обозначает C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкил; C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкокси; галоген; гидроксил или карбоксил, n равен 1 или 2 и m равен 0, 1 или 2, а также их соответствующие соли и их смеси.

(6) Трифенилметановые красители следующих структур:





и/или



и их смеси. В другом аспекте пригодные красители с малыми молекулами включают красители с малыми молекулами, выбранные из группы, состоящей из соединений с номерами по Colour Index (Society of Dyers and Colourists, Bradford, UK) прямого фиолетового 9, прямого фиолетового 35, прямого фиолетового 48, прямого фиолетового 51, прямого фиолетового 66, прямого синего 1, прямого синего 71, прямого синего 80, прямого синего 279, кислотного красного 17, кислотного красного 73, кислотного

красного 88, кислотного красного 150, кислотного фиолетового 15, кислотного фиолетового 17, кислотного фиолетового 24, кислотного фиолетового 43, кислотного красного 52, кислотного фиолетового 49, кислотного синего 15, кислотного синего 17, кислотного синего 25, кислотного синего 29, кислотного синего 40, кислотного синего 5  
45, кислотного синего 75, кислотного синего 80, кислотного синего 83, кислотного синего 90 и кислотного синего 113, кислотного черного 1, основного фиолетового 1, основного фиолетового 3, основного фиолетового 4, основного фиолетового 10, основного фиолетового 35, основного синего 3, основного синего 16, основного синего 22, основного синего 47, основного синего 66, основного синего 75, основного синего 10  
159 и их смесей. В другом аспекте, пригодные красители с малыми молекулами включают красители с малыми молекулами, выбранные из группы, состоящей из соединений с номерами по Colour Index (Society of Dyers and Colourists, Bradford, UK) кислотного фиолетового 17, кислотного фиолетового 43, кислотного красного 52, кислотного красного 73, кислотного красного 88, кислотного красного 150, кислотного синего 25,  
15 кислотного синего 29, кислотного синего 45, кислотного синего 113, кислотного черного 1, прямого синего 1, прямого синего 71, прямого фиолетового 51 и их смесей. В другом аспекте, пригодные красители с малыми молекулами включают красители с малыми молекулами, выбранные из группы, состоящей из соединений с номерами по Colour Index (Society of Dyers and Colourists, Bradford, UK) кислотного фиолетового 17, прямого  
20 синего 71, прямого фиолетового 51, прямого синего 1, кислотного красного 88, кислотного красного 150, кислотного синего 29, кислотного синего 113 или их смесей.

Пригодные полимерные красители включают полимерные красители, выбранные из группы, состоящей из полимеров, содержащих конъюгированные хромогены (конъюгаты краситель-полимер), и полимеров с хромогенами, сополимеризованными  
25 в основную цепь полимера, и их смесей.

В другом аспекте пригодные полимерные красители включают полимерные красители, выбранные из группы, состоящей из субстантивных красящих веществ для тканей, продаваемых под наименованием Liquitint® (Milliken, Spartanburg, South Carolina, USA), конъюгаты краситель-полимер, образованные по меньшей мере одним  
30 реакционноспособным красителем и полимером, выбранным из группы, состоящей из полимеров, содержащих фрагмент, выбранный из группы, состоящей из гидроксильной группы, первичной аминогруппы, вторичной аминогруппы, тиольной группы и их смесей. В еще одном аспекте пригодные полимерные красители включают полимерные красители, выбранные из группы, состоящей из Liquitint® (Milliken, Spartanburg, South  
35 Carolina, USA) Violet CT, карбоксиметилцеллюлозы (СМС) конъюгированной с реакционноспособным синим, реакционноспособным фиолетовым или реакционноспособным красным красителем, такой как СМС, конъюгированная с С1 реакционноспособным синим 19, продаваемая фирмой Megazyme, Wicklow, Ireland под наименованием AZO-CM-CELLULOSE, код продукта S-ACMC, алкоксилированные  
40 трифенилметановые полимерные красящие вещества, алкоксилированные тиофеновые полимерные красящие вещества и их смеси.

Пригодные конъюгаты краситель-глина включают конъюгаты краситель-глина, выбранные из группы, содержащей по меньшей мере один катионный/основный краситель и смектитную глину, и их смесей. В другом аспекте пригодные конъюгаты  
45 краситель-глина включают конъюгаты краситель-глина, выбранные из группы, состоящей из одного катионного/основного красителя, выбранного из группы, состоящей из С1 основных желтых 1-108, С1 основных оранжевых 1-69, С1 основных красных 1-118, С1 основных фиолетовых 1-51, С1 основных синих 1-164, С1 основных

зеленых 1-14, CI основных коричневых 1-23, CI основных черных 1-11, и глины, выбранной из группы, состоящей из монтмориллонитовой глины, гекторитовой глины, сапонитовой глины и их смесей. В еще одном аспекте пригодные конъюгаты краситель-глина включают конъюгаты краситель-глина, выбранные из группы, состоящей из:

5 конъюгата монтмориллонита и основного синего B7 CI 42595, конъюгата монтмориллонита и основного синего B9 CI 52015, конъюгата монтмориллонита и основного фиолетового V3 CI 42555, конъюгата монтмориллонита и основного зеленого G1 CI 42040, конъюгата монтмориллонита и основного красного R1 CI 45160, конъюгата монтмориллонита и основного черного CI 2, конъюгата гекторита и основного синего

10 B7 CI 42595, конъюгата гекторита и основного синего B9 CI 52015, конъюгата гекторита и основного фиолетового V3 CI 42555, конъюгата гекторита и основного зеленого G1 CI 42040, конъюгата гекторита и основного красного R1 CI 45160, конъюгата гекторита и основного черного CI 2, конъюгата сапонита и основного синего B7 CI 42595, конъюгата сапонита и основного синего B9 CI 52015, конъюгата сапонита и основного

15 фиолетового V3 CI 42555, конъюгата сапонита и основного зеленого G1 CI 42040, конъюгата сапонита и основного красного R1 CI 45160, конъюгата сапонита и основного черного CI 2 и их смесей.

Пригодные пигменты включают пигменты, выбранные из группы, состоящей из флавантрона, индантрона, хлорированного индантрона, содержащего от 1 до 4 атомов

20 хлора, пирантрона, дихлорпирантрона, монобромдихлорпирантрона, дибромдихлорпирантрона, тетрабромпирантрона, диимида перилена-3,4,9,10-тетракарбонной кислоты, в котором имидные группы могут быть незамещенными или замещенными C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкилом или фенилом или гетероциклическим радикалом, и в

25 котором фенильный и гетероциклический радикалы могут дополнительно нести заместители, не придающие растворимости в воде, амидов антрапиримидинкарбонной кислоты, виолантрона, изовиолантрона, диоксазиновых пигментов, фталоцианина меди, который может содержать до 2 атомов хлора на молекулу, полихлорфталоцианина меди или полибромхлорфталоцианина меди, содержащих до 14 атомов брома на

30 молекулу, и их смесей.

В другом аспекте пригодные пигменты включают пигменты, выбранные из группы, состоящей из ультрамаринового синего (CI пигментный синий 29), ультрамаринового фиолетового (CI пигментный фиолетовый 15) и их смесей.

Вышеупомянутые подкрашивающие агенты для тканей могут быть использованы в комбинации (может быть использована любая смесь подкрашивающих агентов для

35 тканей). Пригодные подкрашивающие агенты для тканей могут быть закуплены у фирм Aldrich, Milwaukee, Wisconsin, USA; Ciba Specialty Chemicals, Basel, Switzerland; BASF, Ludwigshafen, Germany; Dayglo Color Corporation, Mumbai, India; Organic Dyetuffs Corp., East Providence, Rhode Island, USA; Dystar, Frankfurt, Germany; Lanxess, Leverkusen, Germany; Megazyme, Wicklow, Ireland; Clariant, Muttenz, Switzerland; Avecia, Manchester, UK и/или

40 приготовлены в соответствии с приведенными тут примерами.

Пригодные подцвечивающие агенты описаны детальнее в US 7208459 B2.

Вспомогательные ингредиенты

Пригодные вспомогательные материалы включают, без ограничений, поверхностно-активные вещества, добавки для усиления моющего действия, хелатирующие агенты,

45 агенты, ингибирующие перенос красителей, диспергенты, дополнительные ферменты и стабилизаторы ферментов, каталитические материалы, активаторы отбеливания, перекись водорода, источники перекиси водорода, предварительно подготовленные перкислоты, полимерные диспергенты, агенты для удаления глинистых загрязнений/

предотвращения повторного отложения, оптические осветлители, пеногасители, красители, ароматизаторы, агенты эластификации структуры, мягчители тканей, носители, гидротропные вещества, технологические добавки, растворители и/или пигменты. В дополнение к приведенному ниже описанию, пригодные примеры таких других вспомогательных веществ и уровни их использования содержатся в патентах США №№5576282, 6306812 и 6326348.

Настоящее изобретение далее описывается с помощью приведенных ниже примеров, которые не должны истолковываться как ограничивающие объем изобретения.

#### Примеры

##### Пример 1 - Получение и очистка вариантов ксилоглюканазы

Варианты ксилоглюканазы по настоящему изобретению получают по стандартным процедурам, вкратце: введение случайных и/или сайтспецифических мутаций в ген, трансформация клеток-хозяев *Bacillus subtilis* мутированными генами, ферментация трансформированных клеток-хозяев и получение варианта ксилоглюканазы из ферментативного бульона. Эталонную ксилоглюканазу (SEQ ID NO:3) получают рекомбинантно в *Bacillus subtilis* аналогичным образом.

Ферментацию проводят в культурах во встряхиваемых флаконах при 37°C в течение 4 дней встряхивания 100 мл PS-1 среды, содержащей одну таблетку CaCO<sub>3</sub> (0,5 г), в колбе Эрленмейера на 500 мл с перегородками. Композиция среды PS-1 содержит 100 г/л сахарозы, 40 г/л соевой муки, 10 г/л Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 0,1 мл/л Dowfax 63N10 и антибиотик в форме 6 мкг/мл хлорамфеникола.

После ферментации клетки из культурального бульона собирают центрифугированием (26000×g, 20 мин). Небольшой объем супернатанта стерильно фильтруют через 0,45 мкм фильтр и хранят в замороженном состоянии. Образцы оттаивают непосредственно перед началом описанных ниже анализов стабильности.

В некоторых случаях, образцы фермента очищают перед их использованием для тестов на стабильность.

Для очистки ферментов супернатанты фильтруют через фильтровальный блок NALGENE 0,2 мкм (№ по каталогу 569-0020) для удаления остатков клеток-хозяев. Величину pH фильтрата 0,2 мкм доводят до pH 5,0 с помощью 20% CH<sub>3</sub>COOH и фильтрат наносят на колонку XpressLine ProA (UpFront Chromatography A/S), уравнивают в 50 mM янтарной кислоты/NaOH, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 5,0. После тщательной промывки колонки XpressLine ProA уравнивающим буфером, ксилоглюканазу элюируют методом ступенчатого элюирования с помощью 50 mM Tris/HCl, pH 9,0. Фракции собирают во время элюирования. Фракции из колонки анализируют на ксилоглюканазную активность (Пример 2) и фракции с активностью объединяют. Величину pH пула доводят до pH 9,0 с помощью 3M Tris-основания и пул разбавляют деминерализованной водой до такой же (или более низкой) проводимости, как у 50 mM Tris/HCl, pH 9,0. Подготовленный раствор наносят на колонку SOURCE Q (GE Healthcare), уравниваемую в 50 mM Tris/HCl, pH 9,0. После тщательного промывания колонки SOURCE Q уравнивающим буфером фермент элюируют с линейным градиентом NaCl (0→0,5 M) в том же буфере, взятом в количестве, соответствующем пяти объемам колонки. Фракции из колонки снова анализируют на ксилоглюканазную активность и активные фракции дополнительно анализируют методом SDS-PAGE. Фракции, в которых наблюдается только одна полоса на окрашенном кумасси геле для SDS-PAGE, объединяют как очищенный препарат.

##### Пример 2 - Анализ ксилоглюканазы

Ксилоглюканазную активность образцов фермента, например, после очистки измеряют методом анализа с использованием AZCL-ксилоглюкана.

AZCL-ксилоглюкан (Megazyme) инкубируют с ксилоглюканазой и высвобождаемую синюю окраску измеряют при 650 нм. Ксилоглюканазную активность рассчитывают как усиление синей окраски во время инкубации после вычитания соответствующей величины для холостого раствора.

AZCL-ксилоглюкановый субстрат: 4 мг/мл AZCL-ксилоглюкан (Megazyme), гомогенно суспендированный в 0,01% Triton X-100 путем перемешивания.

Температура анализа: 37°C.

Буфер для анализа: 50 мМ янтарная кислота/NaOH, 0,01% Triton X-100, pH 5,0.

Помещают 500 мкл AZCL-ксилоглюканового субстрата на лед в пробирке Эппендорфа. Прибавляют 500 мл буфера для анализа и смесь выдерживают до охлаждения до температуры льда. Прибавляют 20 мл образца фермента (разбавленного 0,01% Triton X-100). Анализ инициируют путем переноса пробирки Эппендорфа в термомиксер Eppendorf, установленный на температуру анализа. Пробирку инкубируют в течение 15 минут на термомиксере Eppendorf при его наибольшей скорости встряхивания (1400 об/мин). Инкубацию останавливают путем переноса пробирки назад на ледяную баню. После того как пробирка охладится до температуры льда, пробирку недолго центрифугировали в охлажденной до температуры льда центрифуге для осаждения непрореагировавшего субстрата. Переносят 200 мл супернатанта на микротитровальный планшет и считывают  $A_{650}$ . Холостой результат для буфера (20 мл 0,01% Triton X-100 вместо фермента) включают в анализ и разница между значениями  $A_{650}$  для образца фермента и холостого буфера является мерой ксилоглюканазной активности.

Пример 3 - Стабильность вариантов ксилоглюканазы

Стабильность в моющем средстве вариантов ксилоглюканаз по настоящему изобретению оценивали путем измерения активности вариантов после инкубации в жидком моющем средстве.

Тест на стабильность проводится путем прибавления образца фермента в жидкое моющее средство и выдерживания его при повышенной температуре, например 35°C или 40°C. По истечении заданного времени выдерживания определяют активность фермента и сравнивают с активностью эквивалентного образца, хранившегося при приблизительно -18°C в течение такого же периода времени. Результатом теста на стабильность является активность, определенная для образца, хранившегося при повышенной температуре, выраженная в % от активности, определенной для образца, хранившегося на холоду.

Результаты для вариантов ксилоглюканаз сравнивают с результатом для исходной ксилоглюканазы (SEQ ID NO:3), тестируемой в таких же самых условиях. Соотношение между этими двумя результатами определения стабильности является коэффициентом повышения стабильности (Stability Improvement Factor, SIF).

Варианты, имеющие  $SIF > 1$ , являются более стабильными в условиях испытаний, чем исходная ксилоглюканаза. Предпочтительными являются варианты, имеющие высокие значения SIF в данном анализе.

Моющее средство

Жидкое моющее средство, использованное для тестов на стабильность, имеет следующую композицию.

	алкилбензолсульфонат	2,7%
	алкилсульфат	6,5%
	алкилэтоксилат	0,8%
	лимонная кислота	3,8%
5	жирная кислота	2,0%
	бура	3,0%
	формиат Na и Ca	0,2%
	аминэтоксилатные полимеры	3,4%
	диэтилентриаминпентауксусная кислота	0,4%
	Tinopal AMS-GX	0,2%
10	этанол	2,6%
	пропиленгликоль	4,6%
	диэтилен гликоль	3,0%
	полиэтиленгликоль	0,2%
	моноэтаноламин	2,7%
	NaOH	до pH 8,3
	второстепенные ингредиенты (протеаза, амилаза,	2,3%
15	ароматизатор, краситель)	
	вода	остальное

### Тест на хранение

Образцы фермента, приготовленные в соответствии с Примером 1, оттаивают непосредственно перед началом теста на стабильность при хранении.

20 Образцы фермента разбавляют до концентрации приблизительно 0,25 мг ферментного белка на мл.

Жидкое моющее средство разливается в стеклянные бутылки объемом приблизительно 12 мл, в количестве  $1,0 \pm 0,05$  грамма моющего средства в каждую бутылку.

25 Для каждого образца фермента готовят по две параллельные бутылки. Прибавляют в бутылки по 50 мкл разбавленного фермента и маленький стержень магнитной мешалки и плотно закрывают (для предотвращения испарения при хранении). Содержимое перемешивают с помощью стержня магнитной мешалки в течение примерно 5 минут. Одну из бутылок каждой пары помещают в морозильник при приблизительно  $-18^{\circ}\text{C}$ .  
30 Другую бутылку помещают в пригодный термостат с заданной повышенной температурой, например  $35^{\circ}\text{C}$  или  $40^{\circ}\text{C}$ , для тестирования. По истечении заданного времени хранения бутылок в термостате их переносят в морозильник.

### Анализ активности

35 Активность образцов фермента после выдерживания в моющем средстве измеряют с использованием следующей процедуры.

### Материалы и реагенты:

1М фосфатный буфер, pH7:

Растворяют 138 грамм  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  в примерно 750 мл воды. Прибавляют 4N NaOH до pH 7,0. Затем доводят конечный объем до 1000 мл.

40 Буфер для анализа (50 мМ фосфат, pH7):

Смешивают 950 мл воды, 50 мл 1М фосфатного буфера, pH7, и 5 мл Berol 537 (неионное поверхностно-активное вещество, поставляемое фирмой Akzo Nobel). Доводят конечный pH до  $7,00 \pm 0,02$ .

### Субстрат:

45 Таблетки Cellazyme C, поставляемые фирмой Megazyme International Ireland Ltd, номер по каталогу T-CCZ. Таблетки содержат шитую окрашенную HE-целлюлозу (гидроксиэтилцеллюлозу).

### Процедура

Примерно за 30 минут перед началом анализа бутылки переносят из морозильника в холодильник с температурой приблизительно 4°C. Непосредственно перед началом анализа бутылки вынимают из холодильника, помещают на лабораторный стол и открывают.

5 Прибавляют 10 мл буфера для анализа (комнатная температура) в каждую открытую бутылку. Бутылки затем переносят на водяную баню с температурой 30°C, оборудованную погружной многопозиционной магнитной мешалкой. Содержимое осторожно перемешивают в течение примерно 5 минут.

10 Прибавляют по одной таблетке Cellazyme C в каждую бутылку. Продолжают перемешивание при скорости мешалки, достаточной для того, чтобы приводить в движение частицы субстрата, не давая им оседать. Бутылки снимают с водяной бани через 30 минут после прибавления таблетки и затем оставляют стоять при комнатной температуре без перемешивания в течение 15 минут.

15 С помощью пипетки приблизительно 1 мл практически прозрачного супернатанта из верхней части каждой бутылки переносят в полумикрокювету спектрофотометра. Затем измеряют оптическое поглощение при 590 нм (Abs590) с помощью пригодного спектрофотометра. Все измерения выполняют в течение 15 минут.

В анализ включают холостые образцы, т.е. эквивалентные образцы моющего средства, не содержащие добавленного фермента ксилотриканазы.

20 Расчет

Для каждого образца фермента выполняют два измерения величины оптического поглощения (Abs590):

- A590f, которая представляет собой значение Abs590 образца, хранившегося при -18°C,

25 - A590w, которая представляет собой значение Abs590 образца, хранившегося при повышенной температуре.

Вычитают значение для холостого образца (A590b) из обоих значений - A590f (получая A590f - A590b) и A590w (получая A590w - A590b).

Стабильность рассчитывают как

30  $\% \text{ стабильности} = ((A590w - A590b) / (A590f - A590b)) \times 100\%.$

Для каждого фермента результаты для (A590f - A590b) должны находиться в интервале значений 0,1-1,2. Если значение выходит за пределы этого интервала, то результат для данного фермента должен считаться недостоверным, и тест должен быть повторен для другого разведения образца фермента.

35 Наконец, коэффициент повышения стабильности (SIF) для каждого варианта фермента рассчитывают следующим образом:

$SIF = \% \text{ стабильности образца фермента} / \% \text{ стабильности исходного фермента (SEQ ID NO:3)}.$

Результаты

40 Ниже приведены результаты определения стабильности вариантов ксилотриканазы, испытанных в разных условиях.

Таблица 1	
Стерильные фильтрованные образцы фермента, хранившиеся в течение 18 часов при 40°C.	
Мутации	SIF
K8Q	1,1
K8A	1,2
K13A	1,1
K18R	1,1
K87Q	1,1

	K129A	1,7
	K169Q	1,3
	K169R	1,4
	K169A	1,3
5	N140F	1,2
	G316I	1,1
	F418I	1,1
	L34I	1,1
	L166I	1,1
	L268I	1,1
	L278I	1,3
10	V1*+V2*+H3*	1,2
	*0aE+*0bV	1,3
	F146L	1,2
	Q137E	1,6
	R156Y	2,2
	R156Q	1,5
15	K8S	1,2
	K21T	1,4
	K176P	1,1
	K445S	1,4
	K470T	1,2

20	Таблица 2	
	Очищенные образцы фермента, хранившиеся в течение 18 часов при 40°C.	
	Мутации	SIF
	K87Q	1,1
	K129A	1,8
	K169A	1,1
25	A7T+G200P+A224P+G225K+R267K+L268K+S269A	1,3
	H164N+V179I+G200A+R267K	1,2
	H164N+V179I+G200A+R211K+G225D+F281L	1,5
	H164N+G200A+G225N+R267K	1,2

30	Таблица 3	
	Стерильные фильтрованные образцы фермента, хранившиеся в течение 24 часов при 40°C.	
	Мутации	SIF
	K101R+L102I	1,1
	K217A	1,1
	L380F	1,1
	N383Y	1,2
35	G78A	1,2
	M310V	1,2
	N399I	1,1
	G498S	1,1
	F146L	1,1
	Q137E	1,4
40	R156Y	2,0
	V1*+V2*+H3*+G4*+Q5*	1,1
	N331F	1,2
	K8S	1,1
	T92V	1,3
	K176P	1,2
45	G253A	1,1
	K445S	1,3
	K470T	1,2

Таблица 4

Очищенные образцы фермента, хранившиеся в течение 24 часов при 40°C.

Мутации	SIF
T92V	1,2
Q137E	1,5
R156Y	1,7
R156Q	1,2

Таблица 5

Стерильные фильтрованные образцы фермента, хранившиеся в течение 30 часов при 40°C.

Мутации	SIF
K118R	1,1
K118A	1,7
K129A+K169A	1,6
G200P	1,5
K129A+R156Y	2,0
K129A+Q137E+R156Y	2,2
K129A+R156Y+H164N	2,1

Таблица 6

Очищенные образцы фермента, хранившиеся в течение 30 часов при 40°C.

Мутации	SIF
T92V	1,3
R156Y	1,9
K129A+R156Y	2,1

Таблица 7

Стерильные фильтрованные образцы фермента, хранившиеся в течение 48 часов при 40°C.

Мутации	SIF
K118A	3,0
K252Q	1,1
K252R	1,2
K252A	1,1
K275Q	1,1
K275R	1,2
K275A	1,1
K306R	1,1
K306A	1,1
K347Q	1,1
K347R	1,1
K347A	1,1
K382A	1,1
K414A	1,2
K445R	1,3
K454R	1,1
K476Q	1,1
K482Q	1,1
K482A	1,1
K488Q	1,1
K488R	1,1
K488A	1,1
M40V	1,4
R156Y	2,9
G200P	1,8
K129A+R156Y	3,5
K129A+Q137E+R156Y+K470T	3,7
K406N	1,1
K445S	1,2
K488T	1,2

	T92V+K129A+R156Y	3,7
	K118A+K129A+R156Y	3,8
	T92V+K118A+K129A+R156Y	3,9
	K129A+R156Y+P507A	3,2
	K129A+R156Y+S443D+K445S+L449I+V450I+S455N+M456Y	3,8
5		
	K129A+R156Y+H436Y	3,9
	K129A+R156Y+K406N+N415G	3,5
	K129A+R156Y+L380F+N383Y+D384G+N389T	3,5
	K129A+R156Y+D366H+T374A	3,4
	K129A+R156Y+A328G	3,5
10	K129A+R156Y+V259I+R267K+L268K+S269A	3,5
	K129A+R156Y+T244D	3,4
	K129A+R156Y+1222V+A224P+V228I+V232A	2,0
	K129A+R156Y+G200P+G204T+R211K	3,6
	K129A+R156Y+A177T+V179I+A183S	2,9
	K129A+R156Y+V159M+H164N+F165Y	2,8
15	K129A+R156Y+I10V+V14I+D19E	4,0
	T104A+P111Q+A117S+K129A+R156Y	2,1
	S123T+K129A+R156Y	3,8
	K129A+Q137E+V139K+N140F+Q147S+R156Y	2,9
	K129A+R156Y+D324N	3,4
	K129A+R156Y+K176P	3,2
20	K129A+R156Y+D249N	3,2
	K129A+R156Y+D249G	3,3
	K129A+R156Y+D249S	3,1
	K129A+R156Y+D461N	3,6
	K129A+R156Y+D461T	3,9
	K129A+R156Y+D461Q	4,0
25	K129A+R156Y+R409T	3,8
	K129A+R156Y+R409L	3,6
	K129A+R156Y+D247G	1,4
	K129A+R156Y+E288Q	2,7
	D37G+K129A+R156Y	3,9
	D37N+K129A+R156Y	3,6
30	K129A+R156Y+R267H	3,8
	K129A+R156Y+D303I	4,1
	K129A+R156Y+D303K	3,7
	K129A+R156Y+K275T	3,5
	K129A+R156Y+G200P	3,9
35	K129A+R156Y+N331F	3,8
	R156Y+N331F	3,2
	K118A+K129A+R156Y+K470T	4,4
	K470R	1,1
	K470P	1,2
	G413A	1,1
40	K118A+K129A+R156Y+A224P	3,9
	D119L	1,3
	K87V+K129A+K169A	1,9
	K129A+K445S	1,8
	K118A+K129A+R156Y+G200P	3,8
	K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	4,2
45	G78A+K118A+K129A+R156Y	3,8
	G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y	3,8
	T92V+K118A+K129A+R156Y	3,7
	M310V+N399I	1,7
	L34I+K129A	1,9

	K101A+K129A	1,8
	K13A+K129A	2,0
	K129A+K470T	1,8
	K129A+K176P	1,9
5	G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y+K169A	4,8
	K118A+K129A+R156Y+K169A+G200P+N331F	4,7
	K118A+K129A+R156Y+G200P+M310V+N331F	4,7
	K129A+R156Y+K454Q	3,8
	G78A+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	4,2
	T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	4,3
10	K129A+R156Y+N302K+D303S	2,9
	K129A+R156Y+N302K+D303L	2,7
	S332P+V397I	1,1

	K129A+R156Y+K322I+K454Q	2,3
	Q68H+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	4,1
	Q68H+T92S+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	5,2
15	Q68H+T92A+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	4,7
	Q68H+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	5,0
	Q68H+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	5,7
	Q68H+T92D+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	3,3
	Q68H+T92I+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	4,4
	Q68H+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	4,4
20	Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	4,2
	K129S	1,1
	K129A	1,5
	R156M	1,3
	R156F	2,3
	R156W	1,6
25	R156L	1,4
	R156V	2,2
	G396P	1,3
	G413S	1,1
	A177T	1,1
	E38I	1,1
30	E38V	1,2
	G36V+D37A+E38*+N39*	1,2
	T104A	1,2
	L102A+T104V+*104P	1,3
	Q68L	1,3
	Q68H	3,6
35	N389A	1,1
	G468Y	1,1
	G237V	1,1

	Таблица 8	
	Очищенные образцы фермента, хранившиеся в течение 48 часов при 40°C.	
40	Мутации	SIF
	K118A	2,3
	R156Y	2,5
	K129A+K169A	1,7
	G200P	1,5
	K129A+R156Y	1,7
45	K129A+Q137E+R156Y	3,7
	K129A+R156Y+H164N	3,5
	K129A+Q137E+R156Y+K470T	4,2
	T92V+K129A+R156Y	4,5
	K118A+K129A+R156Y	3,8

	K129A+R156Y+G200P	4,8
	K129A+R156Y+N331F	4,1
	R156Y+N331F	3,5
	K118A+K129A+R156Y+G200P	4,2
5	K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	4,5
	G78A+K118A+K129A+R156Y	4,0
	G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y	4,3
	Q68H	3,7

Таблица 9		
Стерильные фильтрованные образцы фермента, хранившиеся в течение 72 часов при 40°C.		
10	Мутации	SIF
	K13R	1,3
	K206Q	1,1
	K129A+R156Y	5,1
	K129A+Q137E+R156Y+K470T	6,4
	T92V+K129A+R156Y	6,6
15	K118A+K129A+R156Y	7,2
	K129A+R156Y+G200P	7,7
	K129A+R156Y+N331F	5,9
	R156Y+N331F	5,3

Таблица 10		
Стерильные фильтрованные образцы фермента, хранившиеся в течение одной недели при 35°C.		
20	Мутации	SIF
	K8Q	1,4
	K8A	1,1
	K13Q	1,1
	K18Q	1,1
25	K18A	1,4
	K21Q	1,4
	K21R	1,4
	K21A	1,4
	K87Q	1,3
	K101R	1,3
30	K101A	1,6
	K118R	1,4
	K118A	2,3
	K101R+L102I	1,1
	K129A	2,1
	K169Q	1,4
35	K169R	1,5
	K169A	1,5
	K220Q	1,3
	K220A	1,2
	K252Q	1,1
	K252R	1,1
40	K275Q	1,1
	K275R	1,1
	K275A	1,1
	K306R	1,1
	K306A	1,1
	K307Q	1,2
45	K307R	1,1
	K454Q	1,6

	K454R	1,2
	K476Q	1,3

	K476R	1,3
	K476A	1,2
	K482Q	1,2
	K482A	1,2
5	K488Q	1,2
	K488R	1,2
	K488A	1,1
	N140F	1,7
	G78A	1,2
	M310V	1,3
10	G316I	1,1
	W391V	1,1
	N399I	1,4
	L34I	1,3
	L268I	1,1
	L278I	1,2
15	G498S	1,2
	*0aE+*0bV	1,4
	F146L	2,3
	Q137E	2,0
	R156Y	3,2
	R156Q	1,7
20	N331F	1,5
	K8S	1,3
	K21T	1,5
	K176P	1,2
	G253A	1,1
	K445S	1,5
25	K470T	1,6
	F146C	1,3

	K129A+K169A	1,8
	G200P	1,7
	A224P	1,1
	K129A+R156Y	2,6
30	K129A+Q137E+R156Y	2,6
	K129A+R156Y+H164N	2,6
	K406N	1,3
	K445S	1,2
	K488T	1,2
35	K129R	1,1
	R156F	2,0

Таблица 11

Очищенные образцы фермента, хранившиеся в течение одной недели при 35°C.

	Мутации	SIF
40	K101R	1,1
	K101A	1,1
	K118A	2,3
	K129A	1,8
	K169R	1,2
	K169A	1,1
45	T92V	2,0
	F418I	1,1
	del(V1-Q5)	1,2
	Q137E	1,6
	R156Y	2,5
	R156Q	1,2

	K21T	1,1
	G200P	1,7
	K129A+R156Y	2,7
	K129A+Q137E+R156Y	3,0
	K129A+R156Y+H164N	3,1
5	A7T+G200P+A224P+G225K+R267K+L268K+S269A	1,3
	H164N+V179I+G200A+R267K	1,3
	H164N+V179I+G200A+R211K+G225D+F281L	1,8
	H164N+G200A+G225N+R267K	1,6

10	Таблица 12	
	Очищенные образцы фермента, хранившиеся в течение 16 часов при 44°C.	
	Мутация	SIF
	Q68H	5,8
	S123P	4,4
	R156Y	4,0
15	K118A	2,9
	G200P	2,6
	K129A	2,4
	Q137E	2,4
	H193T	2,1
	T92V	2,0
	S76W	1,7

#### 20 Пример 4 - Стабильность вариантов ксилотриглюканазы

Стабильность в моющем средстве вариантов ксилотриглюканазы в данном примере оценивалась путем измерения активности вариантов после инкубации в жидком моющем средстве.

25 Тест на стабильность проводили путем прибавления образца фермента в жидкое моющее средство и выдерживания его при повышенной температуре, например, 35°C или 46°C. Через заданный промежуток времени выдерживания активность фермента определяют и сравнивают с активностью идентичного образца, который хранился на холоду при приблизительно +5°C в течение такого же периода времени. Результатом теста на стабильность является активность, определенная для образца, выдержанного при повышенной температуре (подвергнутый стрессу образец), выраженная в % от 30 активности, определенной для эквивалентного образца, хранившегося на холоду (не подвергнутый стрессу образец).

Результаты для вариантов ксилотриглюканазы сравнивают с результатом для исходной ксилотриглюканазы (SEQ ID NO:3), тестируемой в таких же условиях.

#### 35 Моющее средство

Жидкое моющее средство, используемое для тестов на стабильность, имело следующий состав:

40	алкилэтоксисульфат	20,1%
	алкилбензолсульфонат	2,7%
	алкилсульфат	6,5%
	алкилэтоксилат	0,8%
	лимонная кислота	3,8%
	жирная кислота	2,0%
	бура	3,0%
45	формиат Na и Ca	0,2%
	аминэтоксилатные полимеры	3,4%
	диэтилентриаминпентауксусная кислота	0,4%
	Tinopal AMS-GX	0,2%
	этанол	2,6%

	пропиленгликоль	4,6%
	диэтиленгликоль	3,0%
	полиэтиленгликоль	0,2%
	моноэтаноламин	2,7%
	NaOH	до pH 8,3
5	второстепенные ингредиенты (протеаза, амилаза, ароматизатор, краситель)	2,3%
	вода	остальное

### Тест на хранение

Образцы фермента, приготовленные в соответствии с Примером 1, оттаивали непосредственно перед началом теста на стабильность при хранении.

Образцы фермента использовали без дополнительного разбавления.

Жидкое моющее средство дозировали в круглодонный полистирольный 96-луночный микротитровальный планшет (Планшет 1) по 190 мкл моющего средства на лунку.

Прибавляют в каждую лунку десять мкл образца фермента и маленький стержень магнитной мешалки и планшет плотно закрывают (для предотвращения испарения) с помощью крышек из клейкой алюминиевой фольги (Beckman Coulter). Содержимое перемешивают с помощью стержней магнитной мешалки в течение примерно 30 минут.

Затем из каждой лунки Планшета 1 переносят 20 мкл смеси моющее средство-фермент в новый пустой идентичный планшет (Планшет 2). После этого оба планшета герметично закрывают.

Исходный планшет (Планшет 1) помещают в термостат с заданной повышенной температурой, например, 35°C или 46°C, для тестирования. Другой планшет (Планшет 2) помещают в холодильник при приблизительно 5°C.

После инкубации в течение предварительно заданного периода времени планшеты вынимают из холодильника и термостата. Планшеты помещают на лабораторный стол по меньшей мере на полчаса для того, чтобы все планшеты дошли до комнатной температуры.

После этого 20 мкл из каждой лунки Планшета 1 переносят в новый пустой круглодонный 96-луночный планшет (Планшет 1a).

Планшет 1a теперь содержит 20 мкл подвергнутых стрессу образцов и Планшет 2 содержит 20 мкл не подвергнутых стрессу образцов.

### Анализ активности

Активность образцов фермента после выдерживания в моющем средстве измеряют в соответствии со следующей процедурой при комнатной температуре.

Принцип анализа:

Пара-нитрофенол-бета-D-целлотетраозид (pNP-бета-D-целлотетраозид) представляет собой синтетический субстрат, который гидролизует вследствие каталитического действия определенных ксилотетраозидных ферментов.

Субстрат сам по себе является бесцветным; однако при гидролизе терминальной гликозидной связи редуцирующего конца высвобождается пара-нитрофенол, имеющий желтую окраску в буфере pH8 вследствие сильного поглощения при 405 нм.

Сам pNP-бета-D-целлотетраозид является очень стабильным в данных условиях проведения анализа. Таким образом, увеличение оптического поглощения при 405 нм является характерным признаком ферментативной активности.

Мы обнаружили, что исходная ксилотетраозидная (SEQ ID NO:3) принимала pNP-бета-D-целлотетраозид в качестве субстрата, про что свидетельствует сильное увеличение оптического поглощения при 405 нм.

Материалы и реагенты:

Буфер для анализа: 100 мМ ЕРРS; 0,01% Tween 20; рН 8,0.

pNP-бета-D-целлотетраозид (CAS-#: 129411-62-7; Toronto Research Chemicals; Canada)

Раствор субстрата: 1 мМ pNP-бета-D-целлотетраозид в буфере для анализа.

Процедура:

5 Планшет 1а содержит 20 мкл подвергнутых стрессу образцов и Планшет 2 содержит 20 мкл не подвергнутых стрессу образцов.

Образцы разбавляют путем прибавления 50 мкл буфера для анализа во все лунки Планшета 1а и Планшета 2 и перемешивания в течение одного часа с помощью встряхивателя для микротитровального планшета. Затем дополнительно прибавляют по 50 мкл буфера для анализа во все лунки и встряхивание продолжают в течение еще 10 минут.

Переносят 20 мкл образцов с коэффициентом разбавления 6 на прозрачный 384-луночный полистирольный микротитровальный планшет и прибавляют во все лунки 20 мкл раствора субстрата. Образцы перемешивают путем кратковременного встряхивания микротитровального планшета. Немедленно начинают кинетические измерения ферментативной активности путем наблюдения скорости увеличения оптического поглощения при 405 нм с помощью спектрофотометрического ридера для 384-луночных планшетов.

Определяют начальную скорость (Abs/мин) реакции. Начальная скорость реакции является мерой ферментативной активности в образце, что подтверждается линейной калибровочной кривой в соответствующем интервале концентраций фермента.

Расчет:

% остаточной активности рассчитывают как ферментативную активность подвергнутого стрессу образца, деленную на ферментативную активность идентичного не подвергнутого стрессу образца.

% остаточной активности = "Abs/мин (подвергнутый стрессу образец)" / "Abs/мин (не подвергнутый стрессу образец)" × 100%.

Результаты

Ниже приведены результаты определения стабильности вариантов ксилотетраозиды при проведении тестирования в различных условиях.

Таблица 13	
Стерильные фильтрованные образцы фермента, хранившиеся в течение 16 часов при +44°C.	
Мутации	% остаточной активности
SEQ ID NO:3	7
K118A	24
R156Y	36
K129A+K169A	19
G200P	26
K129A+R156Y	51
K129A+Q137E+R156Y	72
K129A+R156Y+H164N	63

Таблица 14	
Стерильные фильтрованные образцы фермента, хранившиеся в течение 16 часов при +47°C.	
Мутации	% остаточной активности
SEQ ID NO:3	<5
Q68H+T92S+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	77
Q68H+T92A+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	83
Q68H+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	91
Q68H+T92D+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	49
Q68H+T92Y+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	78

	Q68H+T92I+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	89
	Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	95
	Q68H+T92S+K118A+K129A+R156Y+G200P+G274D+N331F	67
	Q68H+T92N+D97N+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	81
	Q68H	52
5	K118A+K129A+R156Y	52
	T92V+K118A+K129A+R156Y	88

	K129A+R156Y+G200P+G204T+R211K	68
	S123T+K129A+R156Y	65
	K129A+R156Y+G200P	73
10	K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	90
	G78A+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	98
	T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	95

Таблица 15		
Стерильные фильтрованные образцы фермента, хранившиеся в течение 16 часов при +44°C.		
15	Мутации	% остаточной активности
	SEQ ID NO:3	22
	R156Y	59
	K13R	34
	K307Q	31
	K414A	34
20	G253A	33
	G498S	31
	M310V	38
	N3991	30
	V1*+V2*+H3*+G4*+Q5*	31
	F146L	34
25	K445S	30
	K470T	30

Таблица 16		
Стерильные фильтрованные образцы фермента, хранившиеся в течение 16 часов при +45°C.		
	Мутации	% остаточной активности
30	SEQ ID NO:3	6
	R156Y	34
	K129A+R156Y	55
	K101R+L102I	12
	K118A+K129A+R156Y	72
	K129A+R156Y+P507A	57
35	K129A+R156Y+D366H+T374A	44
	K129A+R156Y+V259I+R267K+L268K+S269A	40
	K129A+R156Y+G200P+G204T+R211K	49
	K129A+R156Y+V159M+H164N+F165Y	30
	T104A+P111Q+A117S+K129A+R156Y	39
	S123T+K129A+R156Y	70
40	K129A+R156Y+D324N	60
	K129A+R156Y+D461N	59
	K129A+R156Y+D461T	61
	K129A+R156Y+D461Q	59
	D37G+K129A+R156Y	60
	D37N+K129A+R156Y	64
45	K129A+R156Y+R267H	64
	K129A+R156Y+D303I	62
	K129A+R156Y+D303K	65
	K129A+R156Y+K275T	68
	K129A+R156Y+G200P	92

K118A+K129A+R156Y+K470T	80
H164N	<5
K129A+R156Y+N302K+D303S	66
K129A+R156Y+N302K+D303L	64

5

Таблица 17	
Стерильные фильтрованные образцы фермента, хранившиеся в течение 16 часов при +44°C.	
Мутации	% остаточной активности
SEQ ID NO:3	26
R156Y	58
K118A+R156Y+G200P	84
K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F	92
K445C+K470C	32
F281L	32
D366H	35
K392G	26
D395G	35
S76W	47
G498D	32
G498A	36
D324N	39
S123T	36
Q68Y	6
Q68C	13
K129A+R156Y	89
K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	100

10

15

20

25

Таблица 18	
Стерильные фильтрованные образцы фермента, хранившиеся в течение 16 часов при +44°C.	
Мутации	% остаточной активности
SEQ ID NO:3	34
R156Y	66
R156M	39
R156F	63
R156W	44
R156L	34
R156P	<5
R156V	50
R156T	35
R156S	27
R156A	36
R156D	34
R156K	52
R156N	29
R156I	50
T92I	39
R156Q	34

30

35

40

Таблица 19	
Стерильные фильтрованные образцы фермента, хранившиеся в течение 16 часов при +44°C.	
Мутации	% остаточной активности
SEQ ID NO:3	25
R156Y	70
R156E	66
R156F	65
T92V	43
R156P	<5
R156V	53

45

R156K	38
R156I	31

Таблица 20	
Стерильные фильтрованные образцы фермента, хранившиеся в течение 16 часов при +44°C.	
Мутации	% остаточной активности
SEQ ID NO:3	31
R156Y	65
N415S	34
S443E	33
S443K	32
S443Q	35
K129T	46
K129A	50
G468Y	32
G237A	34
G237S	34
G237V	25
G468S	32

Таблица 21	
Стерильные фильтрованные образцы фермента, хранившиеся в течение 16 часов при +44°C.	
Мутации	% остаточной активности
SEQ ID NO:3	21
R156Y	45
S332P	41
K129A+R156Y+K176S	73
K129A+R156Y+D303V	77
K129A+R156Y+D303S	81
R197L	20
R340N	41
R340T	43
H193S	51
H193D	49
H193T	66
L34F	43
Q137D	24
Q149E	48
T9D	40
A83E	49
S214E	25
K129A+R156Y	98
T92V	49
T92I	36

Таблица 22	
Стерильные фильтрованные образцы фермента, хранившиеся в течение 16 часов при +47°C.	
Мутации	% остаточной активности
SEQ ID NO:3	<5
R156Y	29
Q68H+R156V+G200P+N331F	93
Q68H+R156F+G200P+N331F	ок. 100
Q68H+G200P+N331F	ок. 100
Q68H+T92V+R156V+G200P+M310V	86
Q68H+T92V+R156Y+G200P+M310V	86
Q68H+T92V+R156F+G200P+M310V	91
Q68H+T92V+R156F+G200P+M310V+S484C	82

	Q68H+T92V+G200P+M310V	82
	Q68H+T92V+R156V+G200P+M310V+N331F	ок. 100
	Q68H+T92V+R156Y+G200P+M310V+N331F	ок. 100
	Q68H+T92V+R156F+G200P+M310V+N331F	86
	Q68H+T92V+G200P+M310V+N331F	80
5	D366H	<5
	K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	81
	Q68H+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	87
	Q68H T92V K118A K129A R156Y G200P N331F	80
	M40L+A41T+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+Q137E+N153K+H164N+D249N+V272A+I337L+M356L+V397A+N415S+T421I+S424N+N441 D+V450I+E489A+A490V+T517A+S522*	41
10	I10V+F17S+D33E+M40L+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+T92A+L102Q+Q137E+I222V+V228I+D249N+V272A+I337L+M356L+T374A+V397A+S416A+T421I+S424N+N441D+D444Y+V450I+A469E+K470T+I473G+T517A+S522P+P523V+V524E	52
	Q32H+M40L+R49G+D65E+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+92A+L102Q+T104A+Q137E+H164N+K202E+I222V+V228I+D249N+M356L+T374A	41
15	I10V+F17S+Y53H+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+T92A+L102Q+Q137E+T172V+A177T+I222V+V228I+D249N+S269N+I337L+M356LV397A+S416A+T421I+S424H+N441D+D444Y+A469E+K470T+I473G+T517A+S522*	26

Таблица 23

Стерильные фильтрованные образцы фермента, хранившиеся в течение 64 часов при +46°C.

Мутации	% остаточной активности
SEQ ID NO:3	<5
R156Y	<5
20 Q68H+R156V+G200P+N331F	80
Q68H+R156F+G200P+N331F	84
Q68H+G200P+N331F	63
Q68H+T92V+R156V+G200P+M310V	52
Q68H+T92V+R156Y+G200P+M310V	67
Q68H+T92V+R156F+G200P+M310V	63
25 Q68H+T92V+R156F+G200P+M310V+S484C	68
Q68H+T92V+G200P+M310V	48
Q68H+T92V+R156V+G200P+M310V+N331F	93
Q68H+T92V+R156Y+G200P+M310V+N331F	100
Q68H+T92V+R156F+G200P+M310V+N331F	91
Q68H+T92V+G200P+M310V+N331F	80
30 K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	56
Q68H+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	86
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	88

Таблица 24

Стерильные фильтрованные образцы фермента, хранившиеся в течение 16 часов при +44°C.

Мутации	% остаточной активности
SEQ ID NO:3	16
R156Y	52
T374A	27
F146L+K322I	24
K129A+Q 137E+R156Y+G200P	87
40 Q68S	14
Q68T	<5
K129A+R156Y	71
F146L	26
K129A+R156Y+G200P	82
45 Q68H	77

Таблица 25

Стерильные фильтрованные образцы фермента, хранившиеся в течение 16 часов при +44°C.

Мутации	% остаточной активности
SEQ ID NO:3	19

	R156Y	53
	K101A+K129A	47
	K129A+K470T	46
	S332P	29
	G413A	30
5	K118A+K129A+R156Y+A224P	81
	K129A+K176P	50
	K118A+K129A+R156Y+K169A+G200P+N331F	89
	K118A+K129A+R156Y+G200P+M310V+N331F	86
	K129A+R156Y+K454Q	86
10	K13A+K129A	49
	G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y+K169A	93
	K129A+R156Y+K322I+K454Q	76
	K129A	47
	K129A+R156Y	74
	K118A+K129A+R156Y	77
	K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	ок. 100
15	G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y	93

Таблица 26

Стерильные фильтрованные образцы фермента, хранившиеся в течение 6 дней при +46°C.

	Мутации	% остаточной активности
	SEQ ID NO:3	<5
20	R156Y	<5
	Q68H+R156V+G200P+N331F	50
	Q68H+R156Y+G200P+N331F	60
	Q68H+R156F+G200P+N331F	64
	Q68H+G200P+N331F	40
	Q68H+T92V+R156V+G200P+M310V	32
25	Q68H+T92V+R156Y+G200P+M310V	42
	Q68H+T92V+R156F+G200P+M310V	43
	Q68H+T92V+R156F+G200P+M310V+S484C	34
	Q68H+T92V+G200P+M310V	27
	Q68H+T92V+R156F+G200P+M310V+N331F	93
	Q68H+T92V+G200P+M310V+N331F	58
30	K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	27
	Q68H+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	75
	Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	70

Таблица 27

Стерильные фильтрованные образцы фермента, хранившиеся в течение 64 часов при +44°C.

	Мутации	% остаточной активности
	SEQ ID NO:3	<5
	R156Y	9
	K101A+K129A	6
	K129A+K470T	4
	S332P	<5
40	G413A	<5
	K118A+K129A+R156Y+A224P	51
	K129A+K176P	6
	K118A+K129A+R156Y+K169A+G200P+N331F	67
	K118A+K129A+R156Y+G200P+M310V+N331F	63
	K129A+R156Y+K454Q	52
45	K13A+K129A	5
	G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y+K169A	72
	K129A	5
	K129A+R156Y	32
	K118A+K129A+R156Y	30

K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	63
G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y	72

Таблица 28	
Стерильные фильтрованные образцы фермента, хранившиеся в течение 64 часов при +46°C.	
5	Мутации
	% остаточной активности
	SEQ ID NO:3
	R156Y
	G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F
	K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F+N399I
	K118A+K129A+F146L+R156Y+G200P+N331F
10	T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F
	T92V+K118A+K129A+R156Y+H164N+G200P+N331F
	Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F
	Q68H+T92V+K118A+S123T+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F
	T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F
	K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F
15	Q68H T92V K118A K129A R156Y G200P N331F

Таблица 29	
Стерильные фильтрованные образцы фермента, хранившиеся в течение 16 часов при +44°C.	
	Мутации
	% остаточной активности
	SEQ ID NO:3
20	R156Y
	S123P
	V159M
	V345I
	G225S
	V232A

Таблица 30	
Стерильные фильтрованные образцы фермента, хранившиеся в течение 10 дней при +46°C.	
	Мутации
	% остаточной активности
	SEQ ID NO:3
	R156Y
30	G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F
	K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F+N399I
	K118A+K129A+F146L+R156Y+G200P+N331F
	T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F
	T92V+K118A+K129A+R156Y+H164N+G200P+N331F
	Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F
35	Q68H+T92V+K118A+S123T+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F
	T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F
	K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F
	Q68H T92V K118A K129A R156Y G200P N331F

Таблица 31	
Стерильные фильтрованные образцы фермента, хранившиеся в течение 16 часов при +44°C.	
	Мутации
	% остаточной активности
	SEQ ID NO:3
	R156Y
	Q68F
	Q68N
45	Q68Y
	Q68D
	Q68C
	Q68G
	Q68S

Q68E	<5
Q68A	<5
Q68M	27
Q68W	<10
Q68H	82

5

Таблица 32	
Стерильные фильтрованные образцы фермента, хранившиеся в течение 7 дней при +46°C.	
Мутации	% остаточной активности
SEQ ID NO:3	<5
R156Y	<5
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+A224P+N331F	81
Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+N331F	74
Q68H+T92V+Q137E+R156Y+G200P+N331F	80
Q68H+T92V+K118A+Q137E+G200P+N331F	65
Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+N331F	80
Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P	67
G78A+K118A+K129A+R156Y+K169A	14
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F	73
K129A+R156Y	<5
G78A+K118A+K129A+R156Y	7

10

15

Таблица 33	
Стерильные фильтрованные образцы фермента, хранившиеся в течение 48 часов при +46°C.	
Мутации	% остаточной активности
SEQ ID NO:3	<5
R156Y	9
K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	67
Q68H+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	79
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	85
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T+D366H	73
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+D366H	72
Q68H+T92V+R156Y+H193T+D366H	78
Q68H+T92V+R156F+H193T+D366H	78
Q68H+R156Y+H193T+D366H	68
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T	67
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T	80
Q68H+T92V+R156Y+H193T	84
Q68H+T92V+R156F+H193T	66
Q68H+R156Y+H193T	66
Q68H+R156Y+H193T+G200P+M310V	93
Q68H+T92V+R156F+H193T+G200P+M310V	82
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+G200P+M310V+E446K	76
Q68H+T92V+R156Y+H193T+G200P+M310V	73
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T+G200P+M310V	89
Q68H+K129T+R156K+G200P+N331F	95
Q68H+K129A+R156K+G200P+N331F	86
Q68H+K118A+R156V+G200P+N331F	81
Q68H+K118S+R156F+G200P+G274D+N331F	68

20

25

30

35

40

Таблица 34	
Стерильные фильтрованные образцы фермента, хранившиеся в течение 16 часов при +44°C.	
Мутации	% остаточной активности
SEQ ID NO:3	22
R156Y	61
S123T+K129A+R156Y	83
H193T	44
G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y	91

45

S123T	55
S123P	73
V232A	<10
K129A+R156Y	64
K118A+K129A+R156Y	68

5

Таблица 35	
Стерильные фильтрованные образцы фермента, хранившиеся в течение 16 часов при +44°C.	
Мутации	% остаточной активности
SEQ ID NO:3	17
R156Y	60
N140F	25
H164A	7
H193A	23
R500T	30
R500A	33
R500V	29
H199A	<10
H3A	26
H436A	26
H448A	<10
H512A	25
H96A	14
H3A+H436A	27

10

15

20

Таблица 36	
Стерильные фильтрованные образцы фермента, хранившиеся в течение 16 часов при +44°C.	
Мутации	% остаточной активности
SEQ ID NO:3	27
R156Y	66
N3991	33
L34F	35
Q149E	35
S332P	36
K129A	50
K21Q+K129A	54
K129A+K275Q	56
Q68F	6
T9D+L34F+A83E+Q149E+H193T+S332P+R340T	53

25

30

35

Таблица 37	
Стерильные фильтрованные образцы фермента, хранившиеся в течение 12 дней при +37°C.	
Мутации	% остаточной активности
SEQ ID NO:3	<5
R156Y	8
K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	52
Q68H+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	47
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	67
Q68H+R156Y+G200P+N331F	47
Q68H+R156F+G200P+N331F	66
Q68H+T92V+R156Y+G200P+M310V	41
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T+D366H	54
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H 193T+D366H	44
Q68H+T92V+R156Y+H193T+D366H	44
Q68H+T92V+R156F+H193T+D366H	37
Q68H+R156Y+H193T+D366H	36
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T	50
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T	56

40

45

	Q68H+T92V+R156Y+H193T	37
	Q68H+T92V+R156F+H193T	37
	Q68H+R156Y+H193T	44
	Q68H+R156Y+H193T+G200P+M310V	34
	Q68H+T92V+R156F+H193T+G200P+M310V	28
5	Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+G200P+M310V+E446K	47
	Q68H+T92V+R156Y+H193T+G200P+M310V	47
	Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T+G200P+M310V	56

Таблица 38		
Стерильные фильтрованные образцы фермента, хранившиеся в течение 16 часов при +44°C.		
10	Мутации	% остаточной активности
	SEQ ID NO:3	19
	R156Y	49
	G200S	28
	G200D	25
	G200Y	12
15	G200L	<5
	G200P	37
	G200W	<5
	G200I	<5
	G200N	9
	G200F	<5
20	G200V	9
	G200H	12
	G200Q	19
	G200C	17
	G200A	24
	G200M	6
25	G200K	11
	G200E	48
	G200R	<5
	G200T	5

Таблица 39		
Стерильные фильтрованные образцы фермента, хранившиеся в течение 16 часов при +44°C.		
30	Мутации	% остаточной активности
	SEQ ID NO:3	13
	R156Y	45
	K21Q+K129A	34
	K129A+K275Q	39
35	T9D+L34F+A83E+Q149E+H193T+S332P+R340T	43
	N3991	24
	L34F	22
	Q149E	23
	S332P	24
	K129A	58
40	G518D	19
	K118A+K129A	73
	K118A	48
	K129A+K169A	40

Таблица 40		
Очищенные образцы фермента, хранившиеся в течение 5 дней при +46°C.		
45	Мутации	% остаточной активности
	SEQ ID NO:3	<5
	R156Y	<5
	Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+D366H	73

	Q68H+R156Y+H193T	63
	Q68H	13
	Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+N331F	70
	G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y	44
5	K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	46
	Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	83
	Q68H+K129T+R156K+G200P+N331F	77
	Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T+D366H	85

Таблица 41		
Стерильные фильтрованные образцы фермента, хранившиеся в течение 5 дней при +46°C.		
10	Мутации	% остаточной активности
	SEQ ID NO:3	<5
	R156Y	<5
	Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+N331K	70
	Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+N331H	42
	Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+N331Q	24
15	Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T	33
	Q68H+K118A+Q137E+R156Y+G200P+N331F	74
	Q68H+S76W+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+N331F	87
	K13A+Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P	54
	Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+D324N	53
	Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+K470T	69
20	Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+N331F	75
	Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P	52

Таблица 42		
Стерильные фильтрованные образцы фермента, хранившиеся в течение 16 часов при +44°C.		
	Мутации	% остаточной активности
25	SEQ ID NO:3	13
	R156Y	43
	S76M	21
	S76I	36
	S76E	19
	S76R	26
30	S76K	27
	S76V	39
	S76R	24

Таблица 43		
Стерильные фильтрованные образцы фермента, хранившиеся в течение 16 часов при +44°C.		
	Мутации	% остаточной активности
35	SEQ ID NO:3	20
	R156Y	51
	K118A+R156Y	62
	R197A	<5
	R20A	26
40	R267A	26
	R295A	23
	R314A	<10
	R340A	23
	A221K	25
	M290R	23
45	M373Q	25
	V397S	25
	T417K	27
	N441G+A442E+S443D	30
	S467R+G468S+A469T	29

	I473T	24
	A490R	32
	T517A+G518D	31
	V431E	29
5	S76W+G200P+A224P	58
	S76W+G200P	59
	G200P+A224P	56
	S76T	42
	M310V	31
	G200P	47
10	G200E	59
	M310V+N399I	<10
	Q68W	<5

Таблица 44		
Стерильные фильтрованные образцы фермента, хранившиеся в течение 16 часов при +46°C.		
	Мутации	% остаточной активности
15	SEQ ID NO:3	8
	R156Y	40
	Q68H+T92V+K118A+Q137E+N140F+R156Y+G200P+K470T	89
	Q68H+T92V+K118A+S123P+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F	88
	T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+N331F	88
	S76W+G200P+A224P	44
20	S76W+G200P	45
	G200P+A224P	48
	S76T	26
	Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+M310L	91
	Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F	95
	G200P	39

Таблица 45		
Стерильные фильтрованные образцы фермента, хранившиеся в течение 9 дней при +46°C.		
	Мутации	% остаточной активности
	SEQ ID NO:3	<5
	R156Y	<5
30	Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+N331K	46
	Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+N331H	19
	Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+N331Q	9
	Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T	17
	Q68H+K118A+Q137E+R156Y+G200P+N331F	48
	Q68H+S76W+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+N331F	65
35	K13A+Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P	31
	Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+D324N	30
	Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+K470T	41
	Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+N331F	50
	Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P	30

Таблица 46		
Очищенные образцы фермента, хранившиеся в течение 9 дней при +46°C.		
	Мутации	% остаточной активности
	SEQ ID NO:3	<5
	R156Y	<5
	Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+D366H	52
45	Q68H+R156Y+H193T	34
	Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+N331F	45
	G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y	14
	K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	18
	Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	56

Q68H+K129T+R156K+G200P+N331F	47
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T+D366H	52
Q68H+R156Y+H193T	31

Таблица 47	
Стерильные фильтрованные образцы фермента, хранившиеся в течение 30 дней при +37°C.	
Мутации	% остаточной активности
SEQ ID NO:3	<5
R156Y	<5
K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	33
Q68H+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	42
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	52
Q68H+R156Y+G200P+N331F	41
Q68H+R156F+G200P+N331F	58
Q68H+T92V+R156Y+G200P+M310V	41
Q68H+T92V+R156F+G200P+M310V	42
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T+D366H	50
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+D366H	32
Q68H+T92V+R156Y+H193T+D366H	33
Q68H+T92V+R156F+H193T+D366H	28
Q68H+R156Y+H193T+D366H	25
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T	41
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T	43
Q68H+T92V+R156Y+H193T	27
Q68H+T92V+R156F+H193T	23
Q68H+R156Y+H193T	33
Q68H+R156Y+H193T+G200P+M310V	28
Q68H+T92V+R156F+H193T+G200P+M310V	21
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+G200P+M310V+E446K	35
Q68H+T92V+R156Y+H193T+G200P+M310V	35
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T+G200P+M310V	46

Таблица 48	
Стерильные фильтрованные образцы фермента, хранившиеся в течение 16 часов при +44°C.	
Мутации	% остаточной активности
SEQ ID NO:3	15
R156Y	49
A83S	15
A83N	9
A83Y	10
A83H	14
A83I	8
A83L	10
A83R	16
A83D	17
A83T	12
A83E	31
L34V	22
L34M	19
L34I	24
M310I	21
M310V	20
M310L	18

Таблица 49	
Стерильные фильтрованные образцы фермента, хранившиеся в течение 3 дней при +35°C.	
Мутации	% остаточной активности
SEQ ID NO:3	61

	R156Y	89
	N331K	57
	N331R	54
	N331L	39
5	N331H	62
	N331G	59
	N331M	70
	N331W	55
	N331S	58
	N331V	57
10	N331T	46
	N331Y	55
	N331I	47
	N331A	87
	N331Q	82
	N331C	70
	N331E	58
15	N331D	63
	N331P	26
	N331F	51

Таблица 50		
Стерильные фильтрованные образцы фермента, хранившиеся в течение 16 часов при +44°C.		
20	Мутации	% остаточной активности
	SEQ ID NO:3	20
	R156Y	58
	I10V+F17S+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+T104A+Q137E+N153K+R156Q+V219A+I222V+V228I+D249N+S269N+V272A+E333A+I337L+M356L+V397A+N415S+D420G+T421I+S424H+N441D+D444Y+V450I+A469E+K470T+I473G+T517A+S522*	72
25	I10V+D33E+M40L+A41T+Q67M+Y73F+S76D+G78A+Q82K+T92A+L102Q+Q137E+I222V+V228I+D249N+S269N+V272A+E333A+I337L+M356L+T374A+S416A+D444Y+A469E+K470T+I473G+T517A+S522*	71
	I10V+F17S+D33E+M40L+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+T92A+L102Q+Q137E+H164N+N168K+T172A+V219A+I222V+V228I+D249N+S269N+V272A+E333A+I337L+M356L+N415S+T421I+S424H+N441 D+D444Y+S522P+P523V+V524E	78
30	I10V+F17S+D33E+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+T92A+L102Q+Q137E+N168K+T172A+I222V+V228I+D249N+V272A+E333A+I337L+M356L+V397A+S416A+T421I+S424H+N441 D+D444Y+A469E+K470T+I473S+V477I+E489A+A490V+T517A+S522*	74
	I10V+F17S+M40L+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+T92A+L102Q+Q137E+I222V+V228I+D249N+S269N+V272A+T320A+I337L+M356L+T374A+V397A+N415S+T421I+S424H+N441D+D444Y+A469E+K470 T+I473S+V477I+T517A+S522P+P523V+V524E	73
	I10V+F17S+D33E+M40L+A41T+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+Q137E+V219A+D249N+V272A+I337L+M356L+V397A+S416A+T421I+S424N+N441D+D444Y+V450I+K470T+I473S+V477I	64
35	I10V+F17S+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+T92A+T104A+Q137E+R156Q+V159A+H164N+N168K+T172A+I222V+V228I+D249N+V272A	66
	K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	98
	Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	ок. 100

Таблица 51		
Стерильные фильтрованные образцы фермента, хранившиеся в течение 2 дней при +44°C.		
40	Мутации	% остаточной активности
	SEQ ID NO:3	<5
	R156Y	20
	Q68H+R156Y	61
	Q68H+T92V+K118A+R156Y	66
	Q68H+T92V+R156Y	68
45	Q68H+K118A+R156Y+H193T+D366H	74
	Q68H+T92V+K118R+R156Y+H193T+D366H	65
	Q68H+T92V+K118R+R156F	63
	Q68H+K118R+R156Y	68
	Q68H+T92V+R156Y+H193T+D366H	69

	Q68H+K118R+R156Y+G200P	74
	Q68H+K118R+R156F	66
	K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	79
	Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	91
	Q68H	55
5	D33V+Q68H+N168H+V450I	70
	S123T	10
	K129A	10

Жидкие композиции моющих средств для стирки

10 Композиции 1-8: Жидкие композиции моющих средств для стирки, пригодные для автоматических стиральных машин с передней загрузкой.

Ингредиент	Состав (% мас. композиции)							
	1	2	3	4	5	6	7	8

15	Алкилбензолсульфоновая кислота	7	11	4,5	1,2	1,5	16,3	5,2	4
	Натрия С <sub>12-14</sub> алкилэтокси(3) сульфат	2,3	3,5	4,5	4,5	7	15	1,8	2
	С <sub>14-15</sub> алкил(8)этоксилат	5	8	2,5	2,6	4,5	4	3,7	2
	С <sub>12</sub> алкилдиметиламинооксид	-	-	0,2	-	-	-	-	-
20	С <sub>12-14</sub> алкилгидроксиэтил-диметиламмоний хлорид	-	-	-	0,5	-	-	-	-
	С <sub>12-18</sub> жирная кислота	2,6	4	4	2,6	2,8	7,2	2,6	1,5
	Лимонная кислота	2,6	3	1,5	2	2,5	4,1	2,6	2
	Протеаза (Purafect® Prime)	0,5	0,7	0,6	0,3	0,5	2	0,5	0,6
	Амилаза (Natalase®)	0,1	0,2	0,15	-	0,05	0,5	0,1	0,2
	Маннаназ (Mannaway®)	0,05	0,1	0,05	-	-	0,1	0,04	-
25	Ксилоглюканаза* (мг аер/100 г моющего средства)	1	4	3	3	2	8	2,5	4
	Статистический привитой сополимер <sup>1</sup>	1	0,2	1	0,4	0,5	0,3	0,3	1
30	Соединение следующей общей структуры: бис((С <sub>2</sub> Н <sub>5</sub> О)- (С <sub>2</sub> Н <sub>4</sub> О) <sub>n</sub> )(СН <sub>3</sub> )-N <sup>+</sup> -С <sub>x</sub> Н <sub>2x</sub> -N <sup>+</sup> -(СН <sub>3</sub> )бис((С <sub>2</sub> Н <sub>5</sub> О)(С <sub>2</sub> Н <sub>4</sub> О) <sub>n</sub> ), где n = от 20 до 30 и x = от 3 до 8, или их сульфатированные или сульфонируемые варианты	0,4	2	0,4	0,2	1,5	0,2	0,7	0,3
	Этоксированный гексаметилендиаминдиметил-кват	-	-	-	0,4	-	-	-	-
35	Этоксированный полиэтиленмин <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	0,3	-	-
	Амфифильный алкоксилированный грязеудаляющий полимер <sup>3</sup>	0,1	0,2	0,1	0,2	0,3	0,3	0,2	0,3
	Диэтоксированный поли(1,2-пропилентерефталатный)	-	-	-	-	-	-	0,3	-
40	Грязеотталкивающий полимер с короткими блоками								
	Диэтилтриаминпента-(метиленфосфоновая) кислота	0,2	0,3	-	-	0,2	-	0,2	0,3
	Гидроксиэтандифосфоновая кислота	-	-	0,45	-	-	1,6	-	0,1
	FWA	0,1	0,2	0,1	-	-	0,2	0,05	0,1
45	Растворители (1,2-пропандиол, этанол), стабилизаторы	3	4	1,5	1,5	2	1,9	2	1,5
	Производное гидрогенизированного касторового масла, структурообразователь	0,4	0,4	0,3	0,1	0,3	-	0,4	0,5
	Борная кислота	1,5	2,5	2	1,5	1,5	0,5	1,5	1,5

	Формиат Na	-	-	-	1	-	-	-	-
	Обратимый ингибитор протеазы <sup>4</sup>	-	-	0,002	-	-	-	-	-
	Ароматизатор	0,5	0,7	0,5	0,5	0,8	1,7	0,5	0,8
5	Суспензия микрокапсул ароматизатора (30% акт.в-ва)	0,2	0,3	0,7	0,2	0,05	-	0,9	0,7
	Этоксированный тиофеновый оттеночный краситель							0,007	0,008
	Буферы (гидроксид натрия, моноэтаноламин)	до pH 8,2							
10	Вода и второстепенные добавки (антивспениватель, добавки для придания эстетических характеристик)	до 100%							

Композиции 9-16: Жидкие композиции моющих средств для стирки, пригодные для автоматических стиральных машин с верхней загрузкой.

15	Ингредиент	Состав (% мас. композиции)			
		9	10	11	12
	G <sub>12-15</sub> Алкилэтоксид(1,8)сульфат	20,1	15,1	20,0	15,1
	C <sub>11,8</sub> Алкилбензолсульфонат	2,7	2,0	1,0	2,0
	C <sub>16-17</sub> Разветвленный алкилсульфат	6,5	4,9		4,9
20	C <sub>12-14</sub> Алкил(9)этоксилат	0,8	0,8	0,8	0,8
	C <sub>12</sub> диметиламиноксид			0,9	
	Лимонная кислота	3,8	3,8	3,8	3,8
	C <sub>1-18</sub> жирная кислота	2,0	1,5	2,0	1,5
	Протеаза (Purafect® Prime)	1,5	1,5	0,5	1,5
	Амилаза (Natalase®)	0,3	0,3	0,3	0,3
25	Амилаза (Stainzyme®)				
	Маннаназа (Mannaway®)	0,1			
	Пектатлиаза (Pectawash®)	0,1			
	Ксилоглюканаза* (мг аер/100 г моющего средства)	5	13	2	5
	Бура	3,0	3,0		
30	Формиат Na и Ca	0,2	0,2		0,2
	Соединение следующей общей структуры: бис((C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O)(C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) <sub>n</sub> ) (CH <sub>3</sub> )-N <sup>+</sup> -C <sub>x</sub> H <sub>2x</sub> -N <sup>+</sup> -(CH <sub>3</sub> )-бис((C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O)(C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) <sub>n</sub> ), где n = от 20 до 30 и x = от 3 до 8, или их сульфатированные или сульфонируемые варианты	1,6	1,6	3,0	1,6
35	Статистический привитой сополимер <sup>1</sup>	0,4	0,2	1,0	0,5
	Диэтилентриаминпентауксусная кислота	0,4	0,4	0,4	0,4
	Tinopal AMS-GX	0,2	0,2	0,2	0,2
	Tinopal CBS-X				
40	Амфифильный алкоксилированный грязеудаляющий полимер <sup>3</sup>	1,0	1,3	1,3	1,4
	Texcare 240N (Clariant)				1,0
	Этанол	2,6	2,6	2,6	2,6
	Пропиленгликоль	4,6	4,6	4,6	4,6
	Диэтиленгликоль	3,0	3,0	3,0	3,0
	Полиэтиленгликоль	0,2	0,2	0,2	0,2
45	Моноэтаноламин	2,7	2,7	2,7	2,7
	Триэтаноламин				
	NaOH	до pH 8,3	до pH 8,3	до pH 8,3	до pH 8,3
	Пенегаситель				
	Краситель	0,01	0,01	0,01	

	Ароматизатор	0,5	0,5	0,5	0,5
	Суспензия микрокапсул ароматизатора (30% акт.в-ва)	0,2	0,5	0,2	0,3
	Этоксированный тиофеновый оттеночный краситель				
5	Вода	остальное	остальное	остальное	остальное

	Ингредиенты	Состав (% мас. композиции)			
		13	14	15	16
	C <sub>12-15</sub> Алкилэтоксигликолят	13,7	16,7	10,0	9,9
10	C <sub>11,8</sub> Алкилбензолсульфонат	5,5	5,6	3,0	3,9
	C <sub>16-17</sub> Разветвленный алкилсульфат	3,0	9,0	2,0	
	C <sub>12-14</sub> Алкил(9)этоксигликолят	8,0	1,5	0,3	11,5
	C <sub>12</sub> Диметиламинооксид				
	Лимонная кислота	3,5	3,5	2,0	2,1
15	C <sub>12-18</sub> жирная кислота	4,5	2,3		0,9
	Протеаза (Purafect® Prime)	1,0	1,8	0,5	0,5
	Амилаза (Natalase®)	0,2	0,4		
	Амилаза (Stainzyme®)				1,1
	Маннаназа (Mannaway®)		0,1		
	Пектаглиаза (Pectawash®)		0,2		
20	Ксилотрансфераза* (мг аер/100 г моющего средства)	20	1	2	3
	Бура	2,0	3,0	3,0	3,3
	Формиат Na и Ca	0,2		0,7	
	Соединение следующей общей структуры: бис((C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O)(C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) <sub>n</sub> ) (CH <sub>3</sub> )-N <sup>+</sup> -C <sub>x</sub> H <sub>2x</sub> -N <sup>+</sup> -(CH <sub>3</sub> )-	2,0	1,6	1,3	1,2
25	бис((C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O)(C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) <sub>n</sub> ), где n = от 20 до 30 и x = от 3 до 8, или их сульфатированные или сульфонируемые варианты				
	Статистический привитой сополимер <sup>1</sup>	0,6	1,0	0,8	1,0
	Диэтилтриаминапентауксусная кислота	0,2	0,3	0,8	
30	Tinopal AMS-GX	0,2	0,3	0,1	
	Tinopal CBS-X		0,1		0,2
	Амфифильный алкоксигликольный грязеудаляющий полимер <sup>3</sup>	1,0	1,1	1,0	1,0
	Texcare 240N (Clariant)				
35	Этанол	1,8	3,0	1,3	
	Пропиленгликоль	3,0	4,0	2,5	
	Диэтиленгликоль	3,0	2,7	3,6	
	Полиэтиленгликоль	0,1	0,3	0,1	1,4
	Моноэтаноламин	4,7	3,3	1,7	0,4
	Триэтаноламин				0,9
40	NaOH	до pH 8,3	до pH 8,3	до pH 8,3	до pH 8,5
	Пенегаситель				
	Краситель	0,01	0,01	0,01	0,0
	Ароматизатор	0,7	0,7	0,8	0,6
	Суспензия микрокапсул ароматизатора (30% акт.в-ва)	0,1	0,3	0,9	1,0
45	Этоксированный тиофеновый оттеночный краситель	0,002	0,004		
	Вода	остальное	остальное	остальное	остальное

Композиция 17: Жидкая моющая композиция для стирки в форме пакетика, инкапсулированного в пленку из поливинилового спирта.

Ингредиент	Состав 17 (% мас. композиции)
Алкилбензолсульфоновая кислота	21,0
C <sub>14-15</sub> алкил(8)этоксилат	18,0

5	C <sub>12-18</sub> жирная кислота	15,0
	Протеаза (Purafect® Prime)	1,5
	Амилаза (Natalase®)	0,2
	Маннаназ (Mannaway®)	0,1
	Ксилоглюканаза* (мг аер/100 г моющего средства)	7
10	Соединение следующей общей структуры: бис((C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O)(C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) <sub>n</sub> )(CH <sub>3</sub> )-N <sup>+</sup> -C <sub>x</sub> H <sub>2x</sub> -N <sup>+</sup> -(CH <sub>3</sub> )-бис((C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O)(C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) <sub>n</sub> ), где n = от 20 до 30 и x = от 3 до 8, или их сульфатированные или сульфонируемые варианты	2,0
	Этоксированный полиэтиленмин <sup>2</sup>	0,8
	Гидроксиэтандинфосфоновая кислота	0,8
	FWA	0,2
15	Растворители (1,2-пропандиол, этанол), стабилизаторы	15,0
	Производное гидрогенизированного касторового масла, структурообразователь	0,1
	Ароматизатор	1,6
	Этоксированный тиофеновый отеночный краситель	0,004
	Буферы (гидроксид натрия, моноэтаноламин)	до pH 8,2
20	Вода и второстепенные добавки (антивспениватель, добавки для придания эстетических характеристик)	до 100%

### Примеры 18-29

Ниже приведены гранулированные композиции моющих средств, изготовленные в соответствии с изобретением, пригодные для стирки тканей.

25		18	19	20	21	22	23	
	Линейный алкилбензолсульфонат с длиной алифатической углеродной цепи C <sub>11</sub> -C <sub>12</sub>	15	12	20	10	12	13	
	Другие поверхностно-активные вещества	1,6	1,2	1,9	3,2	0,5	1,2	
	Фосфатная добавка (добавки) для усиления моющего действия	2	25	4	3	2		
30	Цеолит		1		1	4	1	
	Силикат	4	5	2	3	3	5	
	Карбонат натрия	9	20	10	17	5	23	
	Полиакрилат (MW 4500)	1	0,6	1	1	1,5	1	
	Амфифильный алкоксиллированный грязеудаляющий полимер <sup>3</sup>	0,2		0,3	0,4		1,0	
35	Карбоксиметилцеллюлоза (Finnfix BDA фирмы CPKelco)	1		0,3		1,1		
	Ксилоглюканаза* (мг аер/100 г моющего средства)	1,5	2,4	1,7	0,9	5,3	2,3	
	Другие порошкообразные ферменты	0,23	0,17	0,5	0,2	0,2	0,6	
	Флуоресцентный отбеливатель (отбеливатели)	0,16	0,06	0,16	0,18	0,16	0,16	
	Диэтилентриаминпентауксусная кислота или этилендиаминтетрауксусная кислота	0,6		0,6	0,25	0,6	0,6	
40	MgSO <sub>4</sub>	1	1	1	0,5	1	1	
	Отбеливатель (отбеливатели) и активатор(ы) отбеливания	6,88		6,12	2,09	1,17	4,66	
	Сульфат/Влага/Ароматизатор	до 100%						
		24	25	26	27	28	29	
45	Линейный алкилбензолсульфонат с длиной алифатической углеродной цепи C <sub>11</sub> -C <sub>12</sub>	8	7,1	7	6,5	7,5	7,5	
	Другие поверхностно-активные вещества	2,95	5,74	4,18	6,18	4	4	
	Слоистый силикат	2,0	-	2,0	-	-	-	
	Цеолит	7	-	2	-	2	2	
	Лимонная кислота	3	5	3	4	2,5	3	



D395G;  
 E38I,V;  
 F146C,L;  
 F146L+K322I;  
 5 F281L;  
 F418I;  
 G200A,D,E,PS;  
 G200P+A224P;  
 G225S;  
 10 G237A,S;  
 G253A;  
 G316I;  
 G36V+D37A+E38\*+N39\*;  
 G396P;  
 15 G413S;  
 G468S,Y;  
 G498A,D,S;  
 G518D;  
 G78A+K118A+K129A+R156Y;  
 20 G78A+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F;  
 G78A+K118A+K129A+R156Y+K169A;  
 G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y;  
 G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F;  
 G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y+K169A;  
 25 H164N+G200A+G225N+R267K;  
 H164N+V179I+G200A+R211K+G225D+F281L;  
 H164N+V179I+G200A+R267K;  
 H193A,D,S,T;  
 H199A;  
 30 H3A;  
 H3A+H436A;  
 H436A;  
 I10V+D33E+M40L+A41T+Q67M+Y73F+S76D+G78A+Q82K+T92A+L102Q+Q137E+  
 I222V+V228I+D249N+S269N+V272A+E333A+I337L+M356L+T374A+S416A+D444Y+  
 35 A469E+K470T+I473G+T517A+S522\*;  
 I10V+F17S+D33E+M40L+A41T+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+Q137E+V219A+  
 D249N+V272A+I337L+M356L+V397A+S416A+T421I+S424N+N441D+D444Y+V450I+  
 K470T+I473S+V477I;  
 I10V+F17S+D33E+M40L+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+T92A+L102Q+Q137E+  
 40 H164N+N168K+T172A+V219A+I222V+V228I+D249N+S269N+V272A+E333A+I337L+  
 M356L+N415S+T421I+S424H+N441D+D444Y+S522P+P523V+V524E;  
 I10V+F17S+D33E+M40L+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+T92A+L102Q+Q137E+  
 I222V+V228I+D249N+V272A+I337L+M356L+T374A+V397A+S416A+T421I+S424N+N441D+  
 D444Y+V450I+A469E+K470T+I473G+T517A+S522P+P523V+V524E;  
 45 I10V+F17S+D33E+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+T92A+L102Q+Q137E+N168K+  
 T172A+I222V+V228I+D249N+V272A+E333A+I337L+M356L+V397A+S416A+T421I+S424H+  
 N441D+D444Y+A469E+K470T+I473S+V477I+E489A+A490V+T517A+S522\*;  
 I10V+F17S+M40L+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+T92A+L102Q+Q137E+I222V+

V228I+D249N+S269N+V272A+T320A+I337L+M356L+T374A+V397A+N415S+T421I+S424H+N441D+D444Y+A469E+K470T+I473S+V477I+T517A+S522P+P523V+V524E;

I10V+F17S+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+T104A+Q137E+N153K+R156Q+V219A+I222V+V228I+D249N+S269N+V272A+E333A+I337L+M356L+V397A+N415S+D420G+T421I+S424H+N441D+D444Y+V450I+A469E+K470T+I473G+T517A+S522\*;

I10V+F17S+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+T92A+T104A+Q137E+R156Q+V159A+H164N+N168K+T172A+I222V+V228I+D249N+V272A;

I10V+F17S+Y53H+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+T92A+L102Q+Q137E+T172V+A177T+I222V+V228I+D249N+S269N+I337L+M356L+V397A+S416A+T421I+S424H+N441D+D444Y+A469E+K470T+I473G+T517A+S522\*;

I473T;

K101A;

K101A+K129A;

K101R;

K101R+L102I;

K118A,R;

K118A+K129A;

K118A+K129A+F146L+R156Y+G200P+N331F;

K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F;

K118A+K129A+R156Y;

K118A+K129A+R156Y+A224P;

K118A+K129A+R156Y+G200P;

K118A+K129A+R156Y+G200P+M310V+N331F;

K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F;

K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F+N399I;

K118A+K129A+R156Y+K169A+G200P+N331F;

K118A+K129A+R156Y+K470T;

K118A+R156Y;

K118A+R156Y+G200P;

K129A,R,S,T;

K129A+K169A;

K129A+K176P;

K129A+K275Q;

K129A+K445S;

K129A+Q137E+R156Y;

K129A+Q137E+R156Y+G200P;

K129A+Q137E+R156Y+K470T;

K129A+Q137E+V139K+N140F+Q147S+R156Y;

K129A+R156Y+A177T+V179I+A183S;

K129A+R156Y+A328G;

K129A+R156Y+D247G;

K129A+R156Y+D249G;

K129A+R156Y+D249N;

K129A+R156Y+D249S;

K129A+R156Y+D303I;

K129A+R156Y+D303K;

K129A+R156Y+D303S;

K129A+R156Y+D303V;

K129A+R156Y+D324N;  
K129A+R156Y+D366H+T374A;  
K129A+R156Y+D461N;  
K129A+R156Y+D461Q;  
5 K129A+R156Y+D461T;  
K129A+R156Y+E288Q;  
K129A+R156Y+G200P;  
K129A+R156Y+G200P+G204T+R211K;  
K129A+R156Y+H164N;  
10 K129A+R156Y+H436Y;  
K129A+R156Y+I10V+V14I+D19E;  
K129A+R156Y+I222V+A224P+V228I+V232A;  
K129A+R156Y+K176P;  
K129A+R156Y+K176S;  
15 K129A+R156Y+K275T;  
K129A+R156Y+K322I+K454Q;  
K129A+R156Y+K406N+N415G;  
K129A+R156Y+K454Q;  
K129A+R156Y+L380F+N383Y+D384G+N389T;  
20 K129A+R156Y+N302K+D303L;  
K129A+R156Y+N302K+D303S;  
K129A+R156Y+N331F;  
K129A+R156Y+P507A;  
K129A+R156Y+R267H;  
25 K129A+R156Y+R409L;  
K129A+R156Y+R409T;  
K129A+R156Y+S443D+K445S+L449I+V450I+S455N+M456Y;  
K129A+R156Y+T244D;  
K129A+R156Y+V159M+H164N+F165Y;  
30 K129A+R156Y+V259I+R267K+L268K+S269A;  
K13A,Q,R;  
K13A+K129A;  
K13A+Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P;  
K169A,Q,R;  
35 K176P;  
K18A,Q,R;  
K206Q;  
K217A;  
K21A,Q;  
40 K21Q+K129A;  
K21R,T;  
K220A,Q;  
K252A,Q,R;  
K275A,Q,R;  
45 K306A,R;  
K307Q,R;  
K347A,Q,R;  
K382A;

K406N;  
 K414A;  
 K445C+K470C;  
 K445R,S;  
 5 K454Q,R;  
 K470P,R,T;  
 K476A,Q,R;  
 K482A,Q;  
 K488A,Q,R,T;  
 10 K87Q;  
 K87V+K129A+K169A;  
 K8A,Q,S;  
 L102A+T104V+\*104P;  
 L166I;  
 15 L268I;  
 L278I;  
 L34F,I,M,V;  
 L34I+K129A;  
 L380F;  
 20 M290R;  
 M310I,L,V;  
 M373Q;  
 M40L+A41T+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+Q137E+N153K+H164N+D249N+V272A+  
 I337L+M356L+V397A+N415S+T421I+S424N+N441D+V450I+E489A+A490V+T517A+S522\*;  
 25 M40V;  
 N140F;  
 N331A,C,D,G,H,M,Q;  
 N383Y;  
 N389A;  
 30 N399I;  
 N441G+A442E+S443D;  
 Q137D;  
 Q149E;  
 Q32H+M40L+R49G+D65E+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+T92A+L102Q+T104A+  
 35 Q137E+H164N+K202E+I222V+V228I+D249N+M356L+T374A;  
 Q68H,L,M,N;  
 Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F;  
 Q68H+G200P+N331F;  
 Q68H+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F;  
 40 Q68H+K118A+Q137E+R156Y+G200P+N331F;  
 Q68H+K118A+R156V+G200P+N331F;  
 Q68H+K118A+R156Y+H193T+D366H;  
 Q68H+K118R+R156F;  
 Q68H+K118R+R156Y;  
 45 Q68H+K118R+R156Y+G200P;  
 Q68H+K118S+R156F+G200P+G274D+N331F;  
 Q68H+K129A+R156K+G200P+N331F;  
 Q68H+K129T+R156K+G200P+N331F;

Q68H+R156F+G200P+N331F;  
 Q68H+R156V+G200P+N331F;  
 Q68H+R156Y;  
 Q68H+R156Y+G200P+N331F;  
 5 Q68H+R156Y+H193T;  
 Q68H+R156Y+H193T+D366H;  
 Q68H+R156Y+H193T+G200P+M310V;  
 Q68H+S76W+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+N331F;  
 Q68H+T92A+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F;  
 10 Q68H+T92D+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F;  
 Q68H+T92I+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F;  
 Q68H+T92N+D97N+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F;  
 Q68H+T92S+K118A+K129A+R156Y+G200P+G274D+N331F;  
 Q68H+T92S+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F;  
 15 Q68H+T92V+G200P+M310V;  
 Q68H+T92V+G200P+M310V+N331F;  
 Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+A224P+N331F;  
 Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F;  
 Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T;  
 20 Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+D366H; Q68H+T92V+K118A+  
 K129A+Q137E+R156Y+H193T+G200P+M310V+E446K;  
 Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+N331H;  
 Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+N331K;  
 Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+N331Q;  
 25 Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F;  
 Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T;  
 Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T+D366H;  
 Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T+G200P+M310V;  
 Q68H+T92V+K118A+Q137E+G200P+N331F;  
 30 Q68H+T92V+K118A+Q137E+N140F+R156Y+G200P+K470T;  
 Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P;  
 Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+D324N;  
 Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+K470T;  
 Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+M310L;  
 35 Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+N331F;  
 Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+N331F;  
 Q68H+T92V+K118A+R156Y;  
 Q68H+T92V+K118A+S123P+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F;  
 Q68H+T92V+K118A+S123T+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F;  
 40 Q68H+T92V+K118R+R156F;  
 Q68H+T92V+K118R+R156Y+H193T+D366H;  
 Q68H+T92V+Q137E+R156Y+G200P+N331F;  
 Q68H+T92V+R156F+G200P+M310V;  
 Q68H+T92V+R156F+G200P+M310V+N331F;  
 45 Q68H+T92V+R156F+G200P+M310V+S484C;  
 Q68H+T92V+R156F+H193T;  
 Q68H+T92V+R156F+H193T+D366H;  
 Q68H+T92V+R156F+H193T+G200P+M310V;

Q68H+T92V+R156V+G200P+M310V;  
 Q68H+T92V+R156V+G200P+M310V+N331F;  
 Q68H+T92V+R156Y;  
 Q68H+T92V+R156Y+G200P+M310V;  
 5 Q68H+T92V+R156Y+G200P+M310V+N331F;  
 Q68H+T92V+R156Y+H193T;  
 Q68H+T92V+R156Y+H193T+D366H;  
 Q68H+T92V+R156Y+H193T+G200P+M310V;  
 Q68H+T92Y+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F;  
 10 R156A,E,F,I,K,M,T,V,W;  
 R156Y+N331F;  
 R20A;  
 R267A;  
 R295A;  
 15 R340A;  
 R340N,T;  
 R500A;  
 R500T,V;  
 S123P,T;  
 20 S123T+K129A+R156Y;  
 S214E;  
 S332P+V397I;  
 S443E,K,Q;  
 S467R+G468S+A469T;  
 25 S76E,I,K,M,R,T,V,W;  
 S76W;  
 S76W+G200P;  
 S76W+G200P+A224P;  
 T104A;  
 30 T104A+P111Q+A117S+K129A+R156Y;  
 T417K;  
 T92I,V;  
 T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F;  
 T92V+K118A+K129A+R156Y;  
 35 T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F;  
 T92V+K118A+K129A+R156Y+H164N+G200P+N331F;  
 T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+N331F;  
 T92V+K129A+R156Y;  
 T9D;  
 40 T9D+L34F+A83E+Q149E+H193T+S332P+R340T;  
 V1\*+V2\*+H3\*;  
 V1\*+V2\*+H3\*+G4\*+Q5\*;  
 V159M;  
 V345I;  
 45 V397S;  
 V431E;  
 W391V;  
 при этом:

а) нумерация позиций соответствует положению в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:3;

б) исходная ксилотрипептида является ксилотрипептидом, имеющей по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:3; и

5 с) вариант обладает ксилотрипептидной активностью;

ii) от 2 до 50 мас.% поверхностно активного вещества и

iii) вспомогательный ингредиент.

2. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что исходную ксилотрипептиду выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:7.

10 3. Композиция п.1 или 2, отличающаяся тем, что вариант имеет повышенную химическую стабильность по сравнению с исходной ксилотрипептидой.

4. Композиция по п.3, отличающаяся тем, что повышенная химическая стабильность приводит к повышенной стабильности моющего средства.

5. Композиция по п.1 или 2, отличающаяся тем, что композиция представляет собой 15 жидкую моющую композицию для стирки.

6. Композиция по п.1 или 2, отличающаяся тем, что композиция содержит один или несколько ингредиентов, выбранных из:

(а) амфифильного алкоксилированного грязеудаляющего полимера;

(б) статистического привитого сополимера, где статистический привитой сополимер 20 содержит:

(i) гидрофильную основную цепь, содержащую мономеры, выбранные из группы, состоящей из: ненасыщенных C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> карбоновых кислот, простых эфиров, спиртов, альдегидов, кетонов, сложных эфиров, звеньев сахаров, алкоксидных звеньев, 25 малеинового ангидрида, насыщенных многоосновных спиртов, таких как глицерин, и их смесей; и

(ii) гидрофобной боковой цепи (цепей), выбранных из группы, состоящей из: C<sub>4</sub>-C<sub>25</sub> алкильной группы, полипропилена, полибутилена, винилового сложного эфира насыщенной C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> монокарбоновой кислоты, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкилового сложного эфира 30 акриловой или метакриловой кислоты и их смесей;

(с) соединения, имеющего следующую общую структуру: бис((C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O)(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>) (CH<sub>3</sub>)-N<sup>+</sup>-C<sub>x</sub>H<sub>2x</sub>-N<sup>+</sup>-(CH<sub>3</sub>)-бис((C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O)(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>), где n = от 20 до 30 и x = от 3 до 8, или его сульфатированных или сульфонируемых вариантов.

7. Композиция по п.1 или 2, отличающаяся тем, что композиция содержит 35 микрокапсулы ароматизатора.

8. Композиция по п.1 или 2, отличающаяся тем, что композиция содержит подцвечивающий агент для тканей.

9. Композиция по п.1 или 2, отличающаяся тем, что композиция содержит от примерно 0,1% до примерно 5%, от веса композиции, секвестранта для связывания кальция, 40 имеющего условную константу устойчивости при рН 8 выше примерно 4.

10. Композиция по п.1 или 2, отличающаяся тем, что композиция находится в твердой форме.

11. Применение композиции по любому из предшествующих пунктов формулы для 45 придания хлопку грязеотталкивающих свойств в процессе последующей стирки.

## ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> ДЗЕ ПРОКТЕР ЭНД ГЭМБЛ КОМПАНИ

<120> МОЮЩАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ ВАРИАНТ КСИЛОГЛЮКАНАЗЫ СЕМЕЙСТВА 44

<130> CM3305L

<160> 7

<170> Патентуется в версии 3.5

<210> 1

<211> 1695

<212> ДНК

<213> *Paenibacillus polymyxa*

<400> 1

```

atgaagaaac cgttggggaa aattgtcgcg agcaccgcac tactcatttc tgttgctttt      60
agttcatoga tcgcatcggc tgtagttcac ggtcaaacgg caaagactat tactattaaa      120
gtagatacat tcaaggatcg taagcctatt agcccttata tatacggtac aaatcaggat      180
ttggcaggcg atgaaaatat ggctgccaga cgacttggtg gcaaccgaat gaccggatac      240
aactgggaaa acaatatgtc caatgcagga agtgactggc agcaatctag cgataactat      300
ttatgcagta atggtggcct gacacaagcc gaatgtgaaa agccaggagc ggtgacgact      360
tcgtttcatg accaatcgct gaagcttggc acttattctt tagttacggt gccgatggcc      420
ggttatgtgg ctaaggatgg aaacggaagt gtgcaggaaa gcgaaaaggc cccttccgct      480
cgttggaatc aggtcgtaaa cgccaaaaat gcaccgttcc aactacagcc tgatctgaat      540
gacaatcggg tctatgtgga tgagttcgtc ctttttttag tgaacaagta cggcaactgct      600
tcaacaaagg cgggggtgaa aggatatgcc ctcgacaatg aaccogctct ctggtcgcat      660
acgcaccac gcattcatgg tgaaaaagtc ggagcgaag agttggtaga ccggtcagtc      720
agtttatcca aagctgtgaa agcgattgac gcgggggcag aggttttttg cccggttctt      780
tacggatttg gcgctataa agatcttcaa actgcacctg attgggactc tgtaaaaggc      840
aattatagct ggttcgtaga ctattacctg gatcaaatgc gccttagctc gcaagtcgaa      900
ggcaagagat tgctggatgt attcgacgta cactggatc ccgaagcgat gggcggaggc      960
atacgaatta cgaatgaggt aggcaatgac gaaacgaaga aagccagaat gcaggcacct     1020
cgcaccttgt gggaccgcac ctataaggaa gatagttgga tcgctcaatg gaacagcgag     1080
tttttgccca tactacctcg attgaagcag tcggtggata aatattatcc gggaaaccaag     1140
ctggcaatga ccgagtatag ctatggcggc gaaaatgata tttccggcgg gattgcgatg     1200
accgatgtgc tgggtatctt gggcaaaaat gatgtttata tggcaacta ctggaagcta     1260
aaggatggtg tcaacaacta cgttagtgcc gcttacaagc tttatcgcaa ttatgacgga     1320
aaaaactcta ctttcggtga taccagtgtt agtgcgcaaa catcggatat tgtcaatagc     1380

```

RU 2 525 669 C2

tccggtccatg cttctgtaac gaatgcatcc gacaaagaac tgcattctcgt tgtcatgaat 1440  
 aaaagcatgg acagcgcatt cgacgcccac tttgatcttt ccggcgcgaa gacttacatt 1500  
 tccggtaaag tatggggggtt cgataaaaac agctcgcaaa ttaaagaagc agcgccaatc 1560  
 acgcaaattt caggcaaccg ttttacttat accgtaccgc ctttgacggc atatcacatt 1620  
 gtgctgacta ctggcaatga cacgtctcca gtgtaaggcg tacttgtttg gggaaccgag 1680  
 ccgacagcta attaa 1695

<210> 2  
 <211> 551  
 <212> PRT  
 <213> Paenibacillus polymyxa

<400> 2

Met Lys Lys Pro Leu Gly Lys Ile Val Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ile  
 1 5 10 15

Ser Val Ala Phe Ser Ser Ser Ile Ala Ser Ala Val Val His Gly Gln  
 20 25 30

Thr Ala Lys Thr Ile Thr Ile Lys Val Asp Thr Phe Lys Asp Arg Lys  
 35 40 45

Pro Ile Ser Pro Tyr Ile Tyr Gly Thr Asn Gln Asp Leu Ala Gly Asp  
 50 55 60

Glu Asn Met Ala Ala Arg Arg Leu Gly Gly Asn Arg Met Thr Gly Tyr  
 65 70 75 80

Asn Trp Glu Asn Asn Met Ser Asn Ala Gly Ser Asp Trp Gln Gln Ser  
 85 90 95

Ser Asp Asn Tyr Leu Cys Ser Asn Gly Gly Leu Thr Gln Ala Glu Cys  
 100 105 110

Glu Lys Pro Gly Ala Val Thr Thr Ser Phe His Asp Gln Ser Leu Lys  
 115 120 125

Leu Gly Thr Tyr Ser Leu Val Thr Leu Pro Met Ala Gly Tyr Val Ala  
 130 135 140

Lys Asp Gly Asn Gly Ser Val Gln Glu Ser Glu Lys Ala Pro Ser Ala  
 145 150 155 160

Arg Trp Asn Gln Val Val Asn Ala Lys Asn Ala Pro Phe Gln Leu Gln  
 165 170 175

RU 2 525 669 C2

Pro Asp Leu Asn Asp Asn Arg Val Tyr Val Asp Glu Phe Val His Phe  
180 185 190

Leu Val Asn Lys Tyr Gly Thr Ala Ser Thr Lys Ala Gly Val Lys Gly  
195 200 205

Tyr Ala Leu Asp Asn Glu Pro Ala Leu Trp Ser His Thr His Pro Arg  
210 215 220

Ile His Gly Glu Lys Val Gly Ala Lys Glu Leu Val Asp Arg Ser Val  
225 230 235 240

Ser Leu Ser Lys Ala Val Lys Ala Ile Asp Ala Gly Ala Glu Val Phe  
245 250 255

Gly Pro Val Leu Tyr Gly Phe Gly Ala Tyr Lys Asp Leu Gln Thr Ala  
260 265 270

Pro Asp Trp Asp Ser Val Lys Gly Asn Tyr Ser Trp Phe Val Asp Tyr  
275 280 285

Tyr Leu Asp Gln Met Arg Leu Ser Ser Gln Val Glu Gly Lys Arg Leu  
290 295 300

Leu Asp Val Phe Asp Val His Trp Tyr Pro Glu Ala Met Gly Gly Gly  
305 310 315 320

Ile Arg Ile Thr Asn Glu Val Gly Asn Asp Glu Thr Lys Lys Ala Arg  
325 330 335

Met Gln Ala Pro Arg Thr Leu Trp Asp Pro Thr Tyr Lys Glu Asp Ser  
340 345 350

Trp Ile Ala Gln Trp Asn Ser Glu Phe Leu Pro Ile Leu Pro Arg Leu  
355 360 365

Lys Gln Ser Val Asp Lys Tyr Tyr Pro Gly Thr Lys Leu Ala Met Thr  
370 375 380

Glu Tyr Ser Tyr Gly Gly Glu Asn Asp Ile Ser Gly Gly Ile Ala Met  
385 390 395 400

Thr Asp Val Leu Gly Ile Leu Gly Lys Asn Asp Val Tyr Met Ala Asn  
405 410 415

Tyr Trp Lys Leu Lys Asp Gly Val Asn Asn Tyr Val Ser Ala Ala Tyr  
420 425 430

RU 2 525 669 C2

Lys Leu Tyr Arg Asn Tyr Asp Gly Lys Asn Ser Thr Phe Gly Asp Thr  
 435 440 445

Ser Val Ser Ala Gln Thr Ser Asp Ile Val Asn Ser Ser Val His Ala  
 450 455 460

Ser Val Thr Asn Ala Ser Asp Lys Glu Leu His Leu Val Val Met Asn  
 465 470 475 480

Lys Ser Met Asp Ser Ala Phe Asp Ala Gln Phe Asp Leu Ser Gly Ala  
 485 490 495

Lys Thr Tyr Ile Ser Gly Lys Val Trp Gly Phe Asp Lys Asn Ser Ser  
 500 505 510

Gln Ile Lys Glu Ala Ala Pro Ile Thr Gln Ile Ser Gly Asn Arg Phe  
 515 520 525

Thr Tyr Thr Val Pro Pro Leu Thr Ala Tyr His Ile Val Leu Thr Thr  
 530 535 540

Gly Asn Asp Thr Ser Pro Val  
 545 550

<210> 3  
 <211> 524  
 <212> PRT  
 <213> Paenibacillus polymyxa

<400> 3

Val Val His Gly Gln Thr Ala Lys Thr Ile Thr Ile Lys Val Asp Thr  
 1 5 10 15

Phe Lys Asp Arg Lys Pro Ile Ser Pro Tyr Ile Tyr Gly Thr Asn Gln  
 20 25 30

Asp Leu Ala Gly Asp Glu Asn Met Ala Ala Arg Arg Leu Gly Gly Asn  
 35 40 45

Arg Met Thr Gly Tyr Asn Trp Glu Asn Asn Met Ser Asn Ala Gly Ser  
 50 55 60

Asp Trp Gln Gln Ser Ser Asp Asn Tyr Leu Cys Ser Asn Gly Gly Leu  
 65 70 75 80

Thr Gln Ala Glu Cys Glu Lys Pro Gly Ala Val Thr Thr Ser Phe His  
 85 90 95

Asp Gln Ser Leu Lys Leu Gly Thr Tyr Ser Leu Val Thr Leu Pro Met

RU 2 525 669 C2

100 105 110  
 Ala Gly Tyr Val Ala Lys Asp Gly Asn Gly Ser Val Gln Glu Ser Glu  
 115 120 125  
 Lys Ala Pro Ser Ala Arg Trp Asn Gln Val Val Asn Ala Lys Asn Ala  
 130 135 140  
 Pro Phe Gln Leu Gln Pro Asp Leu Asn Asp Asn Arg Val Tyr Val Asp  
 145 150 155 160  
 Glu Phe Val His Phe Leu Val Asn Lys Tyr Gly Thr Ala Ser Thr Lys  
 165 170 175  
 Ala Gly Val Lys Gly Tyr Ala Leu Asp Asn Glu Pro Ala Leu Trp Ser  
 180 185 190  
 His Thr His Pro Arg Ile His Gly Glu Lys Val Gly Ala Lys Glu Leu  
 195 200 205  
 Val Asp Arg Ser Val Ser Leu Ser Lys Ala Val Lys Ala Ile Asp Ala  
 210 215 220  
 Gly Ala Glu Val Phe Gly Pro Val Leu Tyr Gly Phe Gly Ala Tyr Lys  
 225 230 235 240  
 Asp Leu Gln Thr Ala Pro Asp Trp Asp Ser Val Lys Gly Asn Tyr Ser  
 245 250 255  
 Trp Phe Val Asp Tyr Tyr Leu Asp Gln Met Arg Leu Ser Ser Gln Val  
 260 265 270  
 Glu Gly Lys Arg Leu Leu Asp Val Phe Asp Val His Trp Tyr Pro Glu  
 275 280 285  
 Ala Met Gly Gly Gly Ile Arg Ile Thr Asn Glu Val Gly Asn Asp Glu  
 290 295 300  
 Thr Lys Lys Ala Arg Met Gln Ala Pro Arg Thr Leu Trp Asp Pro Thr  
 305 310 315 320  
 Tyr Lys Glu Asp Ser Trp Ile Ala Gln Trp Asn Ser Glu Phe Leu Pro  
 325 330 335  
 Ile Leu Pro Arg Leu Lys Gln Ser Val Asp Lys Tyr Tyr Pro Gly Thr  
 340 345 350  
 Lys Leu Ala Met Thr Glu Tyr Ser Tyr Gly Gly Glu Asn Asp Ile Ser

RU 2 525 669 C2

355 360 365

Gly Gly Ile Ala Met Thr Asp Val Leu Gly Ile Leu Gly Lys Asn Asp  
 370 375 380

Val Tyr Met Ala Asn Tyr Trp Lys Leu Lys Asp Gly Val Asn Asn Tyr  
 385 390 395 400

Val Ser Ala Ala Tyr Lys Leu Tyr Arg Asn Tyr Asp Gly Lys Asn Ser  
 405 410 415

Thr Phe Gly Asp Thr Ser Val Ser Ala Gln Thr Ser Asp Ile Val Asn  
 420 425 430

Ser Ser Val His Ala Ser Val Thr Asn Ala Ser Asp Lys Glu Leu His  
 435 440 445

Leu Val Val Met Asn Lys Ser Met Asp Ser Ala Phe Asp Ala Gln Phe  
 450 455 460

Asp Leu Ser Gly Ala Lys Thr Tyr Ile Ser Gly Lys Val Trp Gly Phe  
 465 470 475 480

Asp Lys Asn Ser Ser Gln Ile Lys Glu Ala Ala Pro Ile Thr Gln Ile  
 485 490 495

Ser Gly Asn Arg Phe Thr Tyr Thr Val Pro Pro Leu Thr Ala Tyr His  
 500 505 510

Ile Val Leu Thr Thr Gly Asn Asp Thr Ser Pro Val  
 515 520

<210> 4  
 <211> 1590  
 <212> ДНК  
 <213> Paenibacillus polymyxa

<400> 4  
 gtagttcagc gtcaaacggc aaagactggt accattaaag tcgatacatc caaggatcgt 60  
 aagcctatta gcccttatat ttacggtacg aatcaggagt tggcaggcga tgagaatctg 120  
 actgccagac gacttgggtg caatcgaatg accggatata actgggaaaa caatatgtcc 180  
 aatgcaggaa gcgactggat gcagtccagc gatagctatt tatgcgaaa cgcggattg 240  
 acaaaagccg aatgtgaaaa gccagggtgcg gtggcaacct cgtttcacga tcaatcgtg 300  
 aagcagggca catattcttt agtcacactg ccgatggccg gttatgtggc caaggatgga 360  
 aacggaagtg tgcaggaaa cgaaaaggct ccttccgctc ggtggaatga ggtcgtaaac 420  
 gctaaaaatg cgccgtttca attgcagcct gatctgaaag acaatcaggt ttatgaggat 480

gaattcgtca acttttttagt gaaaaagtac ggcggtgctt caacaaaaaac gggcgtgaaa 540  
 ggatactcgc tcgacaatga acccgctctc tggtcgcata cgcatccgcg cattcatggt 600  
 gaaaagggtcg gagcgaaaga gttggtagac cggtcggtaa gtttatccaa agccgctaag 660  
 gcggttgacg cgggtgcgga aatttttggg cccgttcttt acggtttttg cgcctataaa 720  
 gatcttcaaa ctgcaoctga ttggaactct gtaaaaggca actacagctg gttcgtggac 780  
 tattacctcg atcaaatgcg cctcagctcg caagccgaag gcaagagatt gctggatgtc 840  
 ttcgatgtac actggtatcc tgaagcgatg ggcggaggca tacgaattac aaatgaggta 900  
 ggcaacgacg aaacgaagaa agccagaatg caagcgctc gtactttgtg ggatccgacc 960  
 tacaaggaag atagctggat cgctcaatgg aacagtgaat tcttgcccttt actgcctcga 1020  
 ttaaagcagt cggtgataa gtattaccog ggaaccaagc tggctttgac tgagtatagc 1080  
 tatggtggcg aaaatgatat ttccggcggc atcgctatgg ccgatgtgct gggcatcttg 1140  
 ggcaaaaacg acgtttatat ggcaaaactac tggaaagtaa aggatggtgc caacaactac 1200  
 gttagtgcg cttacaagct ttaccgcaat tatgacggaa aaagctctac tttcggatgac 1260  
 atcagcgttc atgcgcaaac gtcggatatt gttaatagct cggatgatgc ttccgtaacg 1320  
 gatgcatcct acaaagaact gcacctcgtt gtcatgaata aaagcatgga cagtgcattc 1380  
 gacgccaat ttgatctttc cggcgagacg acttacggtt ccggtaaagt atggggtttc 1440  
 gacaaaaata gctcgcaaat taaggaagca gcgccaatca cscaaatttc aggcaaccgy 1500  
 tttacctata cagtaccgcc tttgacggct tatcacatcg tgttgactgc cggcaatgat 1560  
 acacctgtag aaaatcctga aagctttgcg 1590

<210> 5  
 <211> 530  
 <212> PRT  
 <213> Paenibacillus polymyxa

<400> 5

Val Val His Gly Gln Thr Ala Lys Thr Val Thr Ile Lys Val Asp Thr  
 1 5 10 15

Ser Lys Asp Arg Lys Pro Ile Ser Pro Tyr Ile Tyr Gly Thr Asn Gln  
 20 25 30

Glu Leu Ala Gly Asp Glu Asn Leu Thr Ala Arg Arg Leu Gly Gly Asn  
 35 40 45

Arg Met Thr Gly Tyr Asn Trp Glu Asn Asn Met Ser Asn Ala Gly Ser  
 50 55 60

Asp Trp Met Gln Ser Ser Asp Ser Tyr Leu Cys Asp Asn Ala Gly Leu



RU 2 525 669 C2

325 330 335  
 Leu Leu Pro Arg Leu Lys Gln Ser Val Asp Lys Tyr Tyr Pro Gly Thr  
 340 345 350  
 Lys Leu Ala Leu Thr Glu Tyr Ser Tyr Gly Gly Glu Asn Asp Ile Ser  
 355 360 365  
 Gly Gly Ile Ala Met Ala Asp Val Leu Gly Ile Leu Gly Lys Asn Asp  
 370 375 380  
 Val Tyr Met Ala Asn Tyr Trp Lys Leu Lys Asp Gly Ala Asn Asn Tyr  
 385 390 395 400  
 Val Ser Ala Ala Tyr Lys Leu Tyr Arg Asn Tyr Asp Gly Lys Ser Ser  
 405 410 415  
 Thr Phe Gly Asp Ile Ser Val His Ala Gln Thr Ser Asp Ile Val Asn  
 420 425 430  
 Ser Ser Val His Ala Ser Val Thr Asp Ala Ser Tyr Lys Glu Leu His  
 435 440 445  
 Leu Val Val Met Asn Lys Ser Met Asp Ser Ala Phe Asp Ala Gln Phe  
 450 455 460  
 Asp Leu Ser Gly Glu Thr Thr Tyr Gly Ser Gly Lys Val Trp Gly Phe  
 465 470 475 480  
 Asp Lys Asn Ser Ser Gln Ile Lys Glu Ala Ala Pro Ile Thr Gln Ile  
 485 490 495  
 Ser Gly Asn Arg Phe Thr Tyr Thr Val Pro Pro Leu Thr Ala Tyr His  
 500 505 510  
 Ile Val Leu Thr Ala Gly Asn Asp Thr Pro Val Glu Asn Pro Glu Ser  
 515 520 525

Phe Ala  
530

<210> 6  
 <211> 1575  
 <212> ДНК  
 <213> Paenibacillus polymyxa

<400> 6  
 gtggttcacg gtcaaacggc aaagaccggt accattaaag tcgatacatc caaggatcgt 60  
 aagcctatta gtccttatat atacggtaag aatcaggatt tggcaggcga tgaaaatctg 120

RU 2 525 669 C2

gctgccagac gacttgggtg caatcgaatg accggataca actgggaaaa taatatgtcc 180  
aatgcgggaa gcgattggca gcaatccagc gataactttt tatgcaacaa tgggtggcctg 240  
acaaaagccg aatgtgaaaa gccgggagca gtgacgactt cgtttcatga tcaatcgetg 300  
aagctgggcg cttattcttt agtcacgctg ccgatggccg gttatgtggc caaggatgga 360  
aacggaagtg tgcaggaaaag cgaacaggct ccttccgctc gttggaatca ggtcgtaaata 420  
gccaaaaatg gcgcttcca actacagcct gatctgaatg acaatcaggt atatgcggat 480  
gaattcgtca attttttagt gaaaaagtac ggcgctgctt caacaaaggc ggggtgtgaaa 540  
ggatatgcgc tcgacaatga acccgctctc tggtcgcata cgcacccgcg cattcatggt 600  
gaaaaggctg gagcgaaaga gttggtagac cggtcggtaa gtttatccaa agctgttaaa 660  
gcggttgacg cgggtgcaga aatttttggg ccggttcttt acggtttttg cgcctataca 720  
gatcttcaaa ctgcacctga ttggaactct gtaaaaggca actatagctg gttcgtggac 780  
tattacctgg atcaaatgcg cctcaactcg caagccgarg gcaagagatt gctggaygta 840  
ttcgatgtgc actggtatcc cgaagcgatg ggcggaggca tacgaattac aaatgaggta 900  
ggcaatgacg aaacgaagaa agccagaatg caggcgcctc gtactttgtg ggacccgacc 960  
tacaaggaag atagctggat cgctcaatgg aacagcgcac tcttgccctt actgcctcga 1020  
ttgaagcagt cgggtggaaa gtattaccg ggaaccaagc tggctttgac cgagtatagc 1080  
tacggcggcg aaaatgatat ttccggcggg attgctatga ccgatgtgct gggcatcttg 1140  
ggcaaaaacg acgtttatat ggcgaactat tggaagttaa aggatggtgc caacaactac 1200  
gtagcgcggc cttacaagct ttaccgcaat tatgacggaa aaaacgctac tttcggcgat 1260  
atcagcgtta atgcgcaaac gtcggatatt gttaatagct cggtgcatgc ttccgtaacg 1320  
gatgcatcct acaagaact gcacctcatt gtcatgaata aaagcatgga cagcgcattc 1380  
gacgcccaat tcgatctttc cggcgagacg acttacagtt ccggtaaaat atggggcttc 1440  
gataaaaata gctcgcaaat taaggcagta gcgccaatca cgcaaatttc aggcaaccgc 1500  
tttacctata cagtaccacc tttgacggct tatcacatcg tgttgactgc cgacaatgat 1560  
acacctgtgc cataa 1575

<210> 7  
<211> 524  
<212> PRT  
<213> Paenibacillus polymyxa

<400> 7

Val Val His Gly Gln Thr Ala Lys Thr Val Thr Ile Lys Val Asp Thr  
1 5 10 15

Ser Lys Asp Arg Lys Pro Ile Ser Pro Tyr Ile Tyr Gly Thr Asn Gln



RU 2 525 669 C2

275		280		285											
Ala	Met	Gly	Gly	Gly	Ile	Arg	Ile	Thr	Asn	Glu	Val	Gly	Asn	Asp	Glu
	290					295					300				
Thr	Lys	Lys	Ala	Arg	Met	Gln	Ala	Pro	Arg	Thr	Leu	Trp	Asp	Pro	Thr
305					310					315					320
Tyr	Lys	Glu	Asp	Ser	Trp	Ile	Ala	Gln	Trp	Asn	Ser	Ala	Phe	Leu	Pro
				325					330					335	
Leu	Leu	Pro	Arg	Leu	Lys	Gln	Ser	Val	Asp	Lys	Tyr	Tyr	Pro	Gly	Thr
			340					345					350		
Lys	Leu	Ala	Leu	Thr	Glu	Tyr	Ser	Tyr	Gly	Gly	Glu	Asn	Asp	Ile	Ser
		355					360					365			
Gly	Gly	Ile	Ala	Met	Thr	Asp	Val	Leu	Gly	Ile	Leu	Gly	Lys	Asn	Asp
	370					375					380				
Val	Tyr	Met	Ala	Asn	Tyr	Trp	Lys	Leu	Lys	Asp	Gly	Ala	Asn	Asn	Tyr
385					390					395					400
Val	Ser	Ala	Ala	Tyr	Lys	Leu	Tyr	Arg	Asn	Tyr	Asp	Gly	Lys	Asn	Ala
				405					410					415	
Thr	Phe	Gly	Asp	Ile	Ser	Val	Asn	Ala	Gln	Thr	Ser	Asp	Ile	Val	Asn
			420					425					430		
Ser	Ser	Val	His	Ala	Ser	Val	Thr	Asp	Ala	Ser	Tyr	Lys	Glu	Leu	His
		435					440					445			
Leu	Ile	Val	Met	Asn	Lys	Ser	Met	Asp	Ser	Ala	Phe	Asp	Ala	Gln	Phe
	450					455					460				
Asp	Leu	Ser	Gly	Glu	Thr	Thr	Tyr	Ser	Ser	Gly	Lys	Ile	Trp	Gly	Phe
465					470					475					480
Asp	Lys	Asn	Ser	Ser	Gln	Ile	Lys	Ala	Val	Ala	Pro	Ile	Thr	Gln	Ile
				485					490					495	
Ser	Gly	Asn	Arg	Phe	Thr	Tyr	Thr	Val	Pro	Pro	Leu	Thr	Ala	Tyr	His
			500					505					510		
Ile	Val	Leu	Thr	Ala	Asp	Asn	Asp	Thr	Pro	Val	Pro				
		515					520								

SEQ\_ID NO 3 VVBGQAKTITIKVVDTPDKKPSPIYITGNO... DLADGEMMARLGGNRMTOTMNNMNSA...
SEQ\_ID NO 5 VVBGQAKTITIKVVDTPDKKPSPIYITGNO... DLADGEMMARLGGNRMTOTMNNMNSA...
SEQ\_ID NO 7 VVBGQAKTITIKVVDTPDKKPSPIYITGNO... DLADGEMMARLGGNRMTOTMNNMNSA...

SEQ\_ID NO 3 MAENAPPOIQDPLDND... RYVDFEVLVFNKYGTA...
SEQ\_ID NO 5 MAENAPPOIQDPLDND... RYVDFEVLVFNKYGTA...
SEQ\_ID NO 7 MAENAPPOIQDPLDND... RYVDFEVLVFNKYGTA...

SEQ\_ID NO 3 SSVQGRLLDVLQVYHVPAMGGGIRIN... EFGNDETEKARMOAPRTLMDPTIK...
SEQ\_ID NO 5 SSVQGRLLDVLQVYHVPAMGGGIRIN... EFGNDETEKARMOAPRTLMDPTIK...
SEQ\_ID NO 7 SSVQGRLLDVLQVYHVPAMGGGIRIN... EFGNDETEKARMOAPRTLMDPTIK...

Фиг. 1А

SEQ\_ID NO 3 KLYRNDGKNSPTGDISVHAQSDIVNSSTHASVINDAKLEHLVYMNKSMDSAPDAQFDL...
SEQ\_ID NO 5 KLYRNDGKNSPTGDISVHAQSDIVNSSTHASVINDAKLEHLVYMNKSMDSAPDAQFDL...
SEQ\_ID NO 7 KLYRNDGKNSPTGDISVHAQSDIVNSSTHASVINDAKLEHLVYMNKSMDSAPDAQFDL...

Фиг. 1В