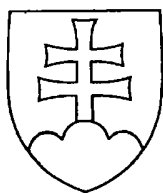


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

**ZVEREJNENÁ
PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA**

(11), (21) Číslo dokumentu:

91-2003

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁷:

**C12N 9/28,
C11D 3/386**

- (22) Dátum podania prihlášky: **19. 7. 2001**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **100 36 752.6
100 36 753.4**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **28. 7. 2000
28. 7. 2000**
(33) Krajina alebo regionálna
organizácia priority: **DE, DE**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **1. 7. 2003**
Vestník ÚPV SR č.: **7/2003**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky
v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky
podľa PCT: **PCT/EP01/08359**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky
podľa PCT: **WO02/10356**

(71) Prihlasovateľ: **HENKEL KOMMANDITGESELLSCHAFT AUF AKTIEN, Düsseldorf, DE;**

(72) Pôvodca: **Breves Roland, Ratingen, DE;
Maurer Karl-Heinz, Erkrath, DE;
Kottwitz Beatrix, Düsseldorf, DE;
Polanyi Laura, Köln, DE;
Hellebrandt Angela, Köln, DE;
Schmidt Irmgard, Solingen, DE;
Stehr Regina, Düsseldorf, DE;
Weber Angrit, Bergisch-Gladbach, DE;**

(74) Zástupca: **Majlingová Marta, Ing., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Amylolytický proteín, nukleová kyselina kódujúca tento proteín, organizmus produkujúci tento proteín,
vektor nukleovej kyseliny, pracie a čistiace prostriedky s jeho obsahom a jeho použitie**

(57) Anotácia:
Je uvedený amylolytický enzým z mikroorganizmu *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368) a dostatočne podobné proteíny s amylolytickou funkciou, spôsoby ich prípravy, ako aj rôzne možnosti použitia týchto proteínov. Okrem uskutočnených možností použitia ich možno ďalej vyvíjať aj na iné, predovšetkým technické účely, v oblasti pracích a čistiacich prostriedkov obsahujúcich takéto amylolytické proteíny, spôsoby čistenia textílií alebo tvrdých povrchov s použitím takýchto amylolytických proteínov.

Amylolytický proteín, nukleová kyselina kódujúca tento proteín, organizmus produkujúci tento proteín, vektor nukleovej kyseliny, pracie a čistiace prostriedky s jeho obsahom a jeho použitie

Oblasť techniky

Vynález sa týka nového amylolytického enzýmu z mikroorganizmu *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368) a dostatočne podobných proteínov s amylolytickou funkciou, spôsobov ich prípravy, ako aj rôznych možností použitia týchto proteínov. Okrem uskutočnených možností použitia ich možno ďalej vyvíjať aj na iné, predovšetkým technické účely. Vynález sa týka osobitne pracích a čistiacich prostriedkov s takýmito amylolytickými proteínmi, spôsobov čistenia textílií alebo tvrdých povrchov s použitím takýchto amylolytických proteínov alebo zodpovedajúcich prostriedkov, ako aj ich použitia na čistenie textílií alebo tvrdých povrchov.

Doterajší stav techniky

α -Amylázy (E.C. 3.2.1.1.) vo vnútri polymérov hydrolyzujú α -1,4-glykozidické väzby škrobu a škrobu podobných polymérov, ako je napríklad amylóza, amylopektín alebo glykogén, pričom vznikajú dextríny a β -1,6-rozvetvené oligosacharidy. Patria vôbec k najdôležitejším priemyselne využívaným enzýmom, a to z dvoch dôvodov: na jednej strane sa väčšinou vylučujú do okolitého média ako mnohé enzýmy mikroorganizmov odbúravajúce substrát, takže ich možno s pomerne malými nákladmi získať fermentáciou a čistením z kultivačného média v priemyselnom merítku. Na strane druhej amylázy sú užitočné v širokej oblasti využitia.

Dôležité technické využitie α -amylázy je výroba glukózového sirupu. V iných oblastiach sa využívajú napríklad ako aktívne komponenty v pracích a čistiacich prostriedkoch, na spracovanie surovín vo výrobe textilu, na výrobu lepidiel, na výrobu potravín obsahujúcich cukor alebo na výrobu potravinových komponentov.

Enzýmy ako napríklad proteázy, amylázy, lipázy alebo celulázy sa už desaťročia používajú ako aktívne komponenty v pracích a čistiacich prostriedkoch.

Ich úloha v procese prania alebo čistenia daného prostriedku v prípade proteázy je schopnosť odbúravať znečistenia obsahujúce proteíny, v prípade amylázy odbúravať znečistenia obsahujúce škrob, a v prípade lipázy je to aktivita pri štiepení tukov. Celulázy sa zvlášť výhodne používajú v pracích prostriedkoch pre ich prínos do sekundárneho pracieho výkonu pracieho prostriedku a pre pôsobenie na vlákna textílií. Ostatné komponenty pracieho alebo čistiaceho produktu napadnú produkty hydrolýzy, rozpustia a emulgujú ich, alebo ich suspendujú, alebo ich pre vyššiu rozpustnosť vyplavia s pracím kúpeľom, takže medzi enzýmami a ostatnými zložkami dochádza k synergickému účinku.

Jedna z α -amyláz, ktoré sa často používajú v pracích a čistiacich prostriedkoch, je α -amyláza z *Bacillus licheniformis*. Zodpovedajúci produkt firmy Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Dánsko, má napríklad obchodný názov Termamyl[®], produkt firmy Genencor Int., Rochester, New York, USA, sa nazýva Purastar[®]. Homologický produkt získaný z *B. subtilis* prípadne z *B. amyloliquefaciens* opísaný v prihláške US 1 227 374 firma Novo Nordisk A/S predáva pod názvom BAN[®].

Táto molekula amylázy, prípadne blízko príbuzné molekuly, boli ďalej vyvinuté v mnohých vynálezoch, ktorých základnou úlohou bolo optimalizovať ich enzymatické vlastnosti pre špecifické oblasti použitia pomocou rôznych molekulárne biologických modifikácií. Takéto optimalizácie sa môžu týkať napríklad substrátovej špecificity, stability enzýmu v rôznych reakčných podmienkach, alebo samotnej enzymatickej aktivity. Ako príklady takýchto optimalizácií ohľadne špecifického použitia sa uvádzajú nasledujúce prihlášky: EP 0410498 na šlichtovanie textílií a WO 96/02633 na skvapalňovanie škrobu.

α -Amylázy však boli ďalej vyvíjané aj ohľadne použitia v pracích a čistiacich prostriedkoch. Ako príklady sa uvádzajú len nasledujúce príklady: amylázy z prihlášky WO 99/02702 sú pri vyšších teplotách stabilnejšie ako počiatočná molekula. Enzýmy z prihlášky WO 99/23211 sú pri vysokom pH, v prítomnosti vápnikových iónov a pri vyšších teplotách stabilné. α -Amylázy z prihlášky WO 97/43424 majú zmenenú schopnosť viazať vápnikové ióny a tým aj zmenené enzymatické vlastnosti. Spôsob mutagenézy z prihlášky WO 99/20768 vedie k takým variantom α -amylázy, ktoré sú v prítomnosti komponentov čistiaceho prostriedku zvlášť stabilné. Pri takýchto modifikáciách majú zmeny v jednotlivých

enzymatických vlastnostiach prakticky vždy dopad aj na iné vlastnosti a na práci výkon daného enzýmu. Príkladom takto získaného a medzitým aj komerčne dostupného optimalizovaného produktu je Duramyl® (WO 94/02597) so zníženou oxidačnou citlivosťou (firma Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Dánsko; SÖFW-Journal 123, (1997), 723-731).

Pretože vývoj, ktorý pozostáva iba z optimalizácie len niekoľkých známych počiatočných enzýmov, je ohľadne dosiahnuteľných výsledkov možno obmedzený, uskutočňuje sa paralelne s ním aj intenzívne hľadanie podobných enzýmov z iných prirodzených zdrojov. Enzýmy štiepiace škrob sa získali napríklad z *Pimelobacter*, *Pseudomonas* a *Thermus* na výrobu potravín, kozmetiky a liekov (EP 0 636693), také isté enzýmy sa získali aj z *Rhizobium*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium* a *Micrococcus* (EP 0 628 630), z *Pyrococcus* (WO 94/19454) a *Sulfolobus* na skvapalňovanie škrobu pri vysokých teplotách, prípadne vo veľmi kyslých reakčných podmienkach (EP 0 727 485) a WO 96/02633). Na použitie pri alkalickom pH sa získali amylázy z *Bacillus* sp. (WO 95/26397 a WO 97/00324). Pre nízku citlivosť voči detergentom sú in amylázy z rôznych druhov rodu *Bacillus* (EP 0 670 367) vhodné na použitie v prácach alebo čistiacich prostriedkoch.

Enzýmy z novozískaných organizmov sú pre svoj pôvod možno vhodnejšie na to, aby boli ďalej vyvíjané pre špecifické oblasti použitia, ako tých niekoľko už zavedených enzýmov. Príkladom je amyláza z *Thermoalcalibacter* (WO 98/13481), ktorej prirodzená aktivita je do značnej miery necitlivá voči vápnikovým iónom, takže má vopred dané dobré predpoklady na to, aby bola použitá v prácach prostriedkoch.

Ďalšiu optimalizáciu enzýmov izolovaných z prirodzených zdrojov pre danú oblasť použitia možno uskutočniť napríklad molekulárne biologickými spôsobmi (podľa US 5171673 alebo WO 99/20768) alebo chemickými modifikáciami (DE 4013142). Napríklad v patentovej prihláške WO 99/43793 sa opisuje ďalší vývoj známej Novamyl®- α -amylázy. Využívajú sa pritom podobnosti v sekvenciách medzi enzýmom Novamyl® a známymi cyklodextrínglukanotransferázami (CGTázami), aby sa pomocou molekulárne biologických spôsobov vytvorilo množstvo príbuzných molekúl. Sú to α -amylázy s dodatočnými konsenznými sekvenciami (boxmi) a funkciami špecifickými pre CGTázy, alebo naopak, sú to CGTázy s dodatočnými oblasťami a funkciami typickými pre α -amylázy, alebo sú to chiméry oboch molekúl.

Zmysel takéhoto vývinu spočíva v optimalizácii enzýmu Novamyl® na takéto použitie.

V patentovej prihláške WO 99/57250 sa opisuje ďalší spôsob na zvýšenie práce výkonnosti enzýmov v pracích prostriedkoch, ako sú napríklad lipázy, celulázy, proteázy, amylázy, alebo aj CGTázy. Princíp opisovaný v uvedenej prihláške spočíva v tom, že príslušné enzýmy sa kovalentne naviažu prostredníctvom neaminokyselinovej spojky na celulóзовú väzbovú doménu (CBD) bakteriálneho pôvodu. Tieto domény sa starajú o to, aby enzým bol na povrchu textilu účinnejší. V patente WO 99/57252 sa do tohto konceptu zavádzajú ďalšie možné spojky, a v patente WO 99/57254 sa zavádzajú ďalšie enzýmy, ako napríklad glykozyltransferázy alebo acyltransferázy, ktoré sa na CBD naviažu buď vytvorením chimérneho proteínu alebo prostredníctvom spojky uvádzanej v patente WO 99/57252.

Každá amyláza použitá v pracích a čistiacich prostriedkoch má individuálny profil výkonu, ktorý sa prejavuje tým, že niektoré nečistoty možno odstrániť jedným enzýmom, kým iné zase iným enzýmom. Tým vzniká dodatočná potreba obohacovať danú problematiku o ďalšie amylolytické enzýmy, ktoré majú takisto individuálne spektrá účinku. Táto potreba vzniká aj kvôli meniacim sa zvykom a nárokom spotrebiteľov, podľa ktorých je napríklad zvýšený dopyt po pracích prostriedkoch na čistenie pri nízkych a stredných teplotách.

Okrem toho nové enzýmy, ktoré možno získať z organizmov zatiaľ neobjavených na tieto účely, môžu slúžiť v zmysle "proteínového inžinierstva" ako východisko pre ďalšie modifikácie s použitím spôsobov génového inžinierstva. Ich cieľom je vytvoriť vlastnosti, ktoré doteraz známe enzýmy alebo od nich odvodené práce enzýmy nemajú alebo ani nemôžu mať.

Na druhej strane sa však ukazujú práve takéto enzýmy ako osobitne vhodní kandidáti na také optimalizácie, ktoré v spolupráci s komponentmi bežných pracích alebo čistiacich prostriedkov vykazujú určitý prací prípadne čistiaci výkon.

Napriek všetkému vývoju však stále existuje úloha nachádzať popri niekoľkých prirodzených amylolytických enzýmoch, ktoré sa skutočne využívajú v priemyselnom merítke nezmenené alebo vo forme ďalej vyvinutých enzýmov, také

enzýmy, ktoré apriórne majú široké spektrum použitia a ktoré môžu slúžiť ako východisko pre ďalší špecifický vývoj.

Úlohou tohto vynálezu je preto nájsť takú, zatiaľ neopísanú α -amylázu, ktorá bude vhodná pre možnosti technického využitia, osobitne v prácach alebo čistiacich prostriedkoch, alebo ktorá môže slúžiť ako základ pre ďalší vývoj s cieľom špecifického využitia.

Čiastkovou úlohou je získať nukleovú kyselinu kódujúcu takúto α -amylázu, pretože takáto nukleová kyselina je nevyhnutne potrebná jednak pre biotechnologickú výrobu a jednak aj pre ďalší vývoj týchto enzýmov.

Ďalšou čiastkovou úlohou je nájsť taký organizmus, ktorý uvedenú α -amylázu prirodzene produkuje.

Ďalšou čiastkovou úlohou je umožniť biotechnologickú produkciu nájdenej α -amylázy.

Ďalšou čiastkovou úlohou je pripraviť prací alebo čistiaci prostriedok, ktorého prací prípadne čistiaci výkon sa prostredníctvom nájdenej α -amylázy zlepší, to znamená, že prací prípadne čistiaci výkon tohto prostriedku sa dá aspoň čiastočne pripísať amylolytickému proteínu podľa vynálezu.

Ďalším čiastkovým aspektom je pripraviť zodpovedajúci spôsob prania prípadne čistenia a nájsť zodpovedajúce možnosti využitia.

Ďalšou čiastkovou úlohou je definovať ďalšie technické možnosti využitia α -amylázy, ktorá je vhodná predovšetkým na použitie v prácach a čistiacich prostriedkoch.

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu sú amylolytické proteíny, ktorých sekvencia aminokyselín je so sekvenciou uvedenou v SEQ ID č. 2 identická aspoň na 96 %, výhodne aspoň na 98 %, zvlášť výhodne na 100 %, a to osobitne v oblasti zodpovedajúcej aminokyselinám 32 až 516 podľa SEQ ID č. 2.

Patria sem také amylolytické proteíny, ktoré sú odvodené zo sekvencie nukleotidov, ktorá je so sekvenciou nukleotidov uvedenou v SEQ ID č. 1 identická aspoň na 85 %, výhodne na 90 %, a zvlášť výhodne na 100 %, osobitne v oblasti

zodpovedajúcej aminokyselinám 32 až 516 podľa SEQ ID č. 2. Patria sem aj také proteolytické enzýmy, ktoré s týmito proteínmi vykazujú dostatočnú podobnosť alebo z ktorých ich možno známymi spôsobmi odvodiť. Výhodných zástupcov možno izolovať prirodzeným spôsobom z mikroorganizmov, osobitne z grampozitívnych baktérií rodu *Bacillus*, osobitne z druhu *Bacillus* sp. A 7-7, a osobitne z druhu *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368).

Druhým predmetom vynálezu sú nukleové kyseliny kódujúce amylolytické proteíny, ktorých sekvencia nukleotidov je so sekvenciou nukleotidov uvedenou v SEQ ID č. 1 identická aspoň na 85 %, výhodne aspoň na 90 % a zvlášť výhodne na 100 %, osobitne v oblasti zodpovedajúcej aminokyselinám 32 až 516 podľa SEQ ID č.2. Podľa toho sem patria výhodne nukleové kyseliny, ktoré kódujú proteíny podľa prvého predmetu vynálezu.

Tretím predmetom vynálezu sú prirodzené organizmy, ktoré produkujú proteín alebo derivát podľa prvého predmetu vynálezu, alebo obsahujú nukleové kyseliny kódujúce takýto proteín alebo derivát. Osobitne výhodnou formou uskutočnenia je kmeň *Bacillus* sp. A 7-7, ktorý bol uložený pod označením DSM (12368).

Štvrtým predmetom vynálezu sú vektory s nukleovými kyselinami podľa druhého predmetu vynálezu, hostiteľské bunky transformované takýmito vektormi a všetky biotechnologické spôsoby na prípravu proteínu alebo derivátu podľa prvého predmetu vynálezu.

Piatym predmetom vynálezu sú pracie alebo čistiace prostriedky, ktoré obsahujú proteín alebo derivát podľa prvého predmetu vynálezu. Patria sem výhodne také prostriedky, ktoré obsahujú amylolytický proteín alebo derivát v pomere 0,000001 % hmotnostných až 5 % hmotnostných, osobitne 0,00001 až 3 % hmotnostné, ktoré obsahujú ďalšie enzýmy prítomné v známych formách, alebo v ktorých funkcia amylolytickej aktivity je uvoľniť alebo kontrolovať látky obsiahnuté v prostriedku.

Šiestym predmetom vynálezu sú spôsoby čistenia textílií alebo tvrdých povrchov, v ktorých aspoň v jednom kroku týchto spôsobov sa aktivuje amylolytický proteín alebo derivát podľa prvého predmetu vynálezu. Na tento účel sa výhodne použijú prostriedky podľa piateho predmetu vynálezu; a amylolytický proteín alebo

derivát sa v danom kroku použije v množstve 0,1 mg až 200 mg v jednom použití, výhodne 0,02 až 100 mg v jednom použití.

Siedmym predmetom vynálezu sú zodpovedajúce možnosti použitia proteínov alebo derivátov podľa prvého predmetu vynálezu alebo prostriedkov piateho predmetu vynálezu na čistenie textílií alebo tvrdých povrchov alebo na uvoľňovanie látok obsiahnutých v zodpovedajúcich prostriedkoch; v jednom použití v plnoautomatickom umývači riadu alebo v práčke v množstve 0,01 mg až 200 mg, výhodne 0,02 mg až 100 mg amylolytického proteínu alebo derivátu.

Ôsmym predmetom vynálezu sú ďalšie technické možnosti použitia nájdenej α -amylázy. Patria sem spôsoby na skvapalňovanie škrobu, osobitne na produkciu etanolu, spôsoby na dočasné lepenie a rôzne možnosti použitia, osobitne na spracovanie surovín alebo medziproduktov pri výrobe textilov, osobitne na šlichtovanie bavlny, na výrobu lineárnych a/alebo krátkych oligosacharidov, na hydrolýzu cyklodextrínov, na uvoľňovanie nízkomolekulárnych zlúčenín z nosičov polysacharidov alebo cyklodextrínov, na výrobu potravín a/alebo potravinových komponentov, na výrobu krmív pre zvieratá a/alebo komponentov do krmív pre zvieratá a na rozpúšťanie lepiacich zlúčenín obsahujúcich škrob.

Proteín podľa vynálezu znamená polymér pozostávajúci z prirodzených aminokyselín, do značnej miery lineárny, ktorý na vykonávanie svojej funkcie nadobúda väčšinou trojrozmernú štruktúru. V tomto vynáleze 19 proteinogénnych, prirodzene sa vyskytujúcich L-aminokyselín sa označilo medzinárodne používanými 1- a 3-písmenovými kódmi.

Enzým podľa vynálezu znamená proteín, ktorý vykonáva určitú biochemickú funkciu. Amylolytické proteíny alebo enzýmy s amylolytickou funkciou znamenajú také proteíny, ktoré hydrolyzujú α -1,4-glykozidické väzby polysacharidov, osobitne také, ktoré ležia vo vnútri polysacharidov. Označujú sa preto aj ako α -1,4-amylázy (E.C. 3.2.1.1).

Mnohé proteíny sa tvoria ako takzvané predproteíny, čiže spolu so signálnym proteínom. Rozumie sa tým *N*-terminálna časť proteínu, ktorej úloha je vyplaviť vytvorený proteín z produkujúcej bunky do periplazmy alebo do okolitého média a/alebo zabezpečiť jeho správne priestorové usporiadanie. Následne sa signálny peptid odštiepi z ostatného proteínu za prirodzených podmienok prostredníctvom

signálnej peptidázy tak, aby tento proteín vykonával svoju vlastnú katalytickú aktivitu bez zatiaľ prítomného *N*-terminálneho konca. Napríklad natívna α -amyláza z *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368) podľa SEQ ID č. 2 má dĺžku 516 aminokyselín. Podľa SEQ ID č. 1 signálny peptid tohto enzýmu má 31 aminokyselín, takže zrelý enzým má dĺžku 485 aminokyselín.

Na technické využitie sú na základe svojich enzymatických aktivít výhodné zrelé peptidy, to znamená, že enzýmy upravované po príprave v porovnaní s predproteínmi.

Predproteíny sú inaktívne prekurzory proteínov. Ich prekurzory so signálnou sekvenciou sa označujú ako pred-pro-proteíny.

Nukleové kyseliny podľa vynálezu znamenajú molekuly slúžiace ako nosiče informácií pozostávajúce prirodzene z nukleotidov, ktoré kódujú lineárny sled aminokyselín v proteínoch alebo v enzýmoch. Môžu byť prítomné vo forme jedného vlákna, vo forme jedného vlákna komplementárneho k tomuto vláknu, alebo vo forme dvojitého vlákna. Ako prirodzene trvanlivejší nosič informácií je pre molekulárne biologické práce výhodná nukleová kyselina DNA. Na uskutočnenie vynálezu v prirodzenom prostredí, ako napríklad v experimentálnej bunke, sa vytvára RNA, preto molekuly RNA dôležité pre vynález sú takisto formami uskutočnenia vynálezu.

U DNA je potrebné vziať do úvahy sekvencie oboch komplementárnych vlákien vo všetkých troch možných čítacích rámcoch. Ďalej je potrebné vziať do úvahy, aby rôzne kodónové triplety mohli kódovať tie isté aminokyseliny, aby určitý sled aminokyselín viacerých rôznych nukleotidových sekvencií možno iba s malou identitou bol odvoditeľný (degenerovanosť genetického kódu). Okrem toho rôzne organizmy vykazujú rozdiely v používaní týchto kodónov. Z tohto dôvodu je v ochrannej oblasti potrebné brať do úvahy jednak sekvenciu aminokyselín, jednak aj sekvenciu nukleotidov a udávané sekvencie nukleotidov je potrebné chápať vždy iba ako príklad kódovania určitého sledu aminokyselín.

Informačná jednotka zodpovedajúca jednému proteínu sa podľa vynálezu označuje ako gén.

Pre odborníka v problematike je možné pomocou dnes všeobecne známych spôsobov, ako je napríklad chemická syntéza alebo polymerázová reťazová reakcia

(PCR), v spojení so štandardnými spôsobmi molekulárnej biológie a/alebo chémie proteínov pripraviť s použitím známych sekvencií DNA a/alebo aminokyselín zodpovedajúce nukleové kyseliny až kompletne gény. Takéto spôsoby sú známe napríklad z publikácie "Lexikon der Biochemie", vydavateľstvo Spektrum Akademischer Verlag, Berlín, 1999, zväzok 1, strany 267-271, a zväzok 2, strany 227-229.

Zmeny v sekvencii nukleotidov, ako ich možno vyvolať napríklad známymi molekulárne biologickými spôsobmi, sa označujú ako mutácie. Podľa druhu zmeny sa mutácie delia napríklad na delécie, inzercie alebo substitúcie, alebo na také, v ktorých sa gény alebo časti génov vzájomne fúzujú (shuffling); toto sú génové mutácie. Zodpovedajúce organizmy sa označujú ako mutanty. Proteíny odvodené od zmutovaných nukleových kyselín sa označujú ako varianty. Tak napríklad delečné, inzerčné alebo substitučné mutácie alebo fúzie vedú k delečným, inzerčným, substitučným alebo fúznym génom a na úrovni proteínov k zodpovedajúcim delečným, inzerčným alebo substitučným variantom, prípadne k fúznym proteínom.

Fragmenty znamenajú všetky proteíny alebo peptidy, ktoré sú menšie ako prirodzené proteíny, alebo také, ktoré plne zodpovedajú translačným génom, a možno ich získať napríklad synteticky. Na základe ich aminokyselinovej sekvencie ich možno priradiť k príslušným kompletným proteínom. Môžu mať napríklad rovnakú štruktúru alebo môžu vykazovať proteolytické alebo čiastočné aktivity, ako je napríklad komplexovanie substrátu. Fragmenty a delečné varianty počiatočných proteínov sú principiálne rovnocenné; kým fragmenty sú skôr menšími zlomkami, delečným mutantom chýbajú skôr iba krátke oblasti a tým iba jednotlivé čiastkové funkcie.

Chiméry alebo hybridné proteíny podľa vynálezu znamenajú také proteíny, ktoré sa skladajú z elementov, ktoré prirodzene pochádzajú z rôznych polypeptidových reťazcov z toho istého organizmu alebo z rôznych organizmov. Takýto postup sa nazýva shuffling alebo fúzna mutagenéza. Zmysel takejto fúzie spočíva napríklad v tom, že pomocou fúzovanej časti proteínu možno vykonávať alebo modifikovať určitú enzymatickú funkciu.

Proteíny získané inzerčnou mutáciou znamenajú také varianty, ktoré sa získali známymi spôsobmi prostredníctvom začlenenia fragmentu nukleovej kyseliny prípadne proteínu do počiatočných sekvencií. Pre zásadnú podobnosť sa zaraďujú medzi chimérne proteíny. Odlišujú sa však od nich iba pomerom veľkosti nezmenenej časti proteínu k veľkosti celého proteínu. V takýchto inzerčne zmutovaných proteínoch je podiel cudzieho proteínu menší ako v chimérnych proteínoch.

Inverzná mutagenéza, teda čiastočné obrátenie sekvencie, môže byť chápaná ako osobitná forma jednak delécie, jednak aj inzercie. To isté platí aj pre nové zoskupenie rôznych častí molekúl odlišujúce sa od pôvodného sledu aminokyselín. Môže sa chápať jednak ako delečný variant, ako inzerčný variant, aj ako shufflingový variant pôvodného proteínu.

Deriváty podľa vynálezu znamenajú také proteíny, ktorých čistý aminokyselinový reťazec bol chemicky modifikovaný. Takéto derivatizácie možno uskutočniť napríklad biologicky v súvislosti s biosyntézou proteínov hostiteľským organizmom. Na tento účel možno použiť spôsoby molekulárnej biológie. Možno ich však uskutočniť aj chemicky, a to chemickou konverziou bočného reťazca aminokyseliny alebo kovalentnou väzbou ďalšej zlúčeniny na proteín. V prípade takejto ďalšej zlúčeniny môže ísť napríklad o iné proteíny, ktoré sa na proteíny podľa vynálezu naviažu prostredníctvom bifunkčných chemických väzieb. Takisto derivatizácia znamená kovalentnú väzbu na makromolekulárny nosič.

Podľa vynálezu sa všetky enzýmy, proteíny, fragmenty a deriváty hromadne označujú ako proteíny, pokiaľ nie je potrebné explicitne ich takto označiť.

Vektory podľa vynálezu znamenajú elementy pozostávajúce z nukleových kyselín, ktoré ako značenú oblasť nukleovej kyseliny obsahujú daný gén. Dokážu tento gén zachovať v jednom biologickom druhu alebo v bunkovej línii počas viacerých generácií alebo bunkových delení ako stabilný genetický element replikujúci sa nezávisle od ostatného genómu. Vektory sú špeciálne plazmidy, teda cirkulárne genetické elementy, osobitne pri použití v baktériách. V génovom inžinierstve poznáme jednak také vektory, ktoré slúžia na skladovanie (takzvané klonovacie vektory), a tým sú určené do určitej miery aj na génové inžinierstvo, a na druhej strane sú aj také vektory, ktorých funkciou je realizovanie daného génu

v hostiteľskej bunke, t.j. ich úlohou je umožniť expresiu daného proteínu. Tieto vektory sa označujú ako expresné vektory.

Porovnávaním so známymi enzýmami, ktoré sú uložené napríklad vo všeobecne prístupných databázach, sa dajú zo sekvencie aminokyselín alebo nukleotidov sledovať charakteristické časti molekúl ako sú napríklad štrukturálne elementy alebo enzymatická aktivita sledovaného enzýmu. Takého porovnanie sa uskutoční tak, že podobné sledy sekvencií nukleotidov alebo aminokyselín sledovaného proteínu sa vzájomne priradia. Toto sa nazýva homologizácia. Tabuľkové priradenie príslušných pozícií sa nazýva alignment. Pri analýze sekvencií nukleotidov je opäť potrebné brať do úvahy obe komplementárne vlákna a všetky tri možné čítacie rámce; a takisto aj degenerovanosť genetického kódu a používanie kodónov špecifických pre daný organizmus. Medzitým sa alignmenty uskutočňujú pomocou počítačových programov, ako napríklad prostredníctvom algoritmov FASTA alebo BLAST; takýto postup opísali D. J. Lipman a W. R. Pearson (1985) v Science, 227, 1435-1441. Zostavenie všetkých súhlasných pozícií v porovnávaných sekvenciách sa označuje konsenzná sekvencia.

Takéto porovnávanie umožňuje posúdiť aj podobnosť alebo homológiu porovnávaných sekvencií. Vyjadruje sa ako percento identity, t.j. podiel identických nukleotidov alebo aminokyselinových zvyškov v rovnakých pozíciách. Širšie chápaný pojem homológie zahŕňa do tejto hodnoty aj zakonzervované výmeny aminokyselín. Hovorí sa potom o percentách podobnosti. Takéto hodnotenia možno uskutočniť o celých proteínoch alebo génoch alebo iba o jednotlivých úsekoch.

Homologické oblasti rôznych proteínov sú zväčša oblasti s rovnakými štrukturálnymi elementmi a/alebo funkciami, ktoré sa rozpoznávajú podľa zhody v primárnej sekvencii aminokyselín. Tieto sekvencie môžu byť úplne identické až v najmenších oblastiach, takzvaných boxoch, ktoré obsahujú iba niekoľko aminokyselín a zodpovedajú zväčša za celkovú aktivitu esenciálnych funkcií. Funkcie homologických oblastí znamenajú najmenšie čiastkové funkcie z celkovej funkcie vykonávanej celým proteínom, ako je napríklad tvorba jednotlivých vodíkových mostíkov na komplexovanie substrátu alebo prechodného komplexu.

Enzymatickú aktivitu možno kvalitatívne alebo kvantitatívne modifikovať inými oblasťami proteínu, ktoré sa nezúčastňujú na vlastnej reakcii. Týka sa to napríklad enzymatickej stability, aktivity, reakčných podmienok alebo substrátovej špecificity.

Výraz amylolytický proteín podľa vynálezu teda neznamená iba proteín s čistou funkciou hydrolýzy α -1,4-glykozidických väzieb, ktorá sa odvodzuje od niekoľkých aminokyselinových zvyškov predpokladaného katalyticky aktívneho centra. Zahŕňa okrem toho všetky funkcie podporujúce hydrolýzu α -1,4-glykozidickej väzby. Takéto funkcie možno dosiahnuť napríklad u jednotlivých peptidov, ako aj u jednej alebo viacerých častí proteínu, pôsobením na samotné katalyticky aktívne oblasti. Výraz amylolytická funkcia zahŕňa aj takéto modifikované funkcie. Na jednej strane nie je presne známe, ktoré aminokyselinové zvyšky proteínu podľa vynálezu v skutočnosti katalyzujú hydrolýzu, a na druhej strane ich nemožno dopredu stanovenými jednotlivými funkciami definitívne vylúčiť z účasti na katalýze. K pomocným funkciám alebo k čiastkovým aktivitám patria napríklad väzba substrátu, medziproduktu alebo koncového produktu, aktivácia alebo inhibícia alebo prenos regulačného vplyvu na hydrolytickú aktivitu. Môže ísť pritom napríklad aj o tvorbu štrukturálneho elementu, ktorý leží ďaleko od aktívneho centra, alebo môže ísť o signálny peptid, ktorého funkcia je vyplaviť vytvorený proteín z bunky a/alebo správne ho priestorovo usporiadať a bez ktorého sa *in vivo* spravidla nevytvorí funkčný enzým. Musí sa však uskutočniť hydrolýza α -1,4-glykozidických väzieb škrobu alebo škrobu podobných polymérov.

Výkon enzýmu znamená jeho účinnosť v sledovanej technickej oblasti. Zakladá sa na vlastnej enzymatickej aktivite, okrem toho však závisí od ďalších faktorov, relevantných pre daný postup. Patrí medzi ne napríklad stabilita, väzba na substrát, vzájomné pôsobenie s materiálom nesúcim substrát alebo vzájomné pôsobenie s inými obsiahnutými látkami, osobitne synergie. Tak napríklad pri zisťovaní, či je daný enzým vhodný na použitie v pracích alebo čistiacich prostriedkoch, berie sa do úvahy jeho prínos k praciemu alebo čistiacemu výkonu prostriedku formulovaného s ďalšími komponentmi. Na rôzne technické oblasti použitia možno daný enzým ďalej vyvíjať alebo optimalizovať známymi, osobitne vyššie uvedenými molekulárne biologickými spôsobmi.

Podľa Budapeštianskej zmluvy o medzinárodnom uznávaní uloženia mikroorganizmov zo dňa 28. apríla 1977 sa v Nemeckej zbierke mikroorganizmov a bunkových kultúr (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) v Braunschweigu (DSMZ) pre túto prihlášku uložil nasledujúci mikroorganizmus: *Bacillus* sp. A 7-7. Má registračné číslo DSM 12368 (DSM 98-587). Dôležité údaje o vlastnostiach tohto biologického materiálu, ako boli stanovené v DSMZ pri uložení, sú zhrnuté v nasledujúcej tabuľke 1.

Tabuľka 1: Mikrobiologické vlastnosti *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368)
(Stanovené v DSMZ dňa 9.10.1998)

Vlastnosť	Výsledok
Bunková forma	Tyčinky
Šírka [μm]	3,0 až 4,5
Dĺžka [μm]	0,8 až 1,0
Spóry	pozitívny/oválny
Sporangium	nadutý
Oxidáza	pozitívny
Kataláza	pozitívny
Anaeróbny rast	pozitívny
VP reakcia	negatívny
pH vo VP médiu	9,1
Rast pri 40 °C	pozitívny/slabý
Rast pri 50 °C	negatívny
Rast v	
Médium pH 7,0	negatívny
NaCl 2 %	pozitívny
NaCl 5 %	pozitívny
NaCl 7 %	pozitívny
NaCl 10 %	pozitívny
NaCl 12 %	negatívny

NaCl 16 % Lyzozýmové médium	negatívny pozitívny
Kyselina z D-glukózy L-arabinózy D-xylózy D-manitu D-fruktózy	negatívny negatívny negatívny pozitívny pozitívny
Hydrolyza Škrobu Želatíny Kazeínu Tyrozínu Tween 80 Tween 60 Tween 40 Tween 20	pozitívny pozitívny pozitívny slabý pozitívny pozitívny pozitívny negatívny
Lecitináza	pozitívny
Pululan	pozitívny
Hydrolyza hipurátu	pozitívny
Eskulín	pozitívny
Zhodnotenie Citrátu Propionátu	pozitívny pozitívny
NO ₂ z NO ₃	pozitívny
Indolová reakcia	negatívny
Fenylalaníndezamináza	negatívny
VÝSLEDOK	<i>Bacillus</i> sp. (RNA skupina VI, alkalifilný)
Poznámka	Výsledky fyziologických testov poukazujú na druh <i>B. alcalophilus</i> alebo <i>B. horikoshii</i> , avšak ani jeden z uvedených druhov sa nedal jednoznačne identifikovať.

	Kmeň vykazoval 2 formy kolónii, ktoré sa však po analýze mastných kyselín ukázali ako varianty jedného druhu. Parciálne sekvenovanie 16S rDNA dokázalo 94,8%-nú zhodu s <i>B. alcalophilus</i> U kmeňa A 7-7 ide pravdepodobne o zástupcov nového druhu.
--	---

Ako sa okrem tejto charakterizácie prekvapujúco zistilo, amylolytický enzým produkovaný týmto kmeňom má vlastnosti, ktoré ho predurčujú na použitie v mnohých technických postupoch. Okrem toho kmeň má aj vlastnosti, ktoré umožňujú ľahkú kultiváciu.

Amylolytický enzým podľa vynálezu z kmeňa *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368) možno podľa podrobného opisu v príklade 2 biochemicky charakterizovať nasledujúcim spôsobom: ako zrelý proteín má v denaturujúcej SDS polyakrylovej gélovej elektroforéze približnú molekulovú hmotnosť 58 kD, kým z proteínovej sekvencie (SEQ ID č. 2) pozostávajúcej z 516 aminokyselín sa dá odvodiť molekulová hmotnosť približne 59 kD, prípadne po odštiepení signálneho peptidu obsahujúceho 31 aminokyselín má molekulovú hmotnosť 55,5 kD. Podľa izoelektrickej fokusácie izoelektrický bod zrelého proteínu má hodnotu 6,0. Má aktivitu na štiepenie škrobu. Pri inkubácii počas 10 min a pri pH 10 je stabilný do teploty 50 °C. Pri 60 °C sa zisťuje ešte 50 % zvyškovej aktivity. Enzým je pri inkubácii nad 10 min pri 40 °C do značnej miery stabilný medzi hodnotami pH 5 až 12, kým najlepšia stabilita bola zistená pri pH 9. V prítomnosti 0,1 % SDS po 15-minútovej inkubácii a 50 °C má enzým ešte 98%-nú zvyškovú aktivitu. V prítomnosti 10 HPE/ml na proteázovú aktivitu a po 15-minútovej inkubácii pri pH 10 a pri 50 °C má enzým ešte 74%-nú zvyškovú aktivitu.

Súčasný vynález teda poskytuje prirodzene sa vyskytujúci enzým, ktorý na základe sekvenčnej homológie s doteraz známymi enzýmami a na základe enzymatickej aktivity treba považovať za α -amylázu. Možno ju v podstate použiť všade tam, kde sa vyžaduje amylolytická funkcia. Je vhodná osobitne pre také použitie, ktoré prebieha pri alkalických hodnotách pH a stredne vysokých teplotách, osobitne pri pH vyššom ako 9 a/alebo pri teplotách nad 40 °C. Spektrum použitia sa

rozširuje aj pomerne vysokou stabilitou enzýmu voči detergentom a proteázam. Ukazuje sa, že je osobitne vhodná na použitie v prácach alebo čistiacich prostriedkoch.

Sekvencia nukleotidov tohto enzýmu sa udáva v sekvenčnom protokole pod označením SEQ ID č. 1. Je tým k dispozícii napríklad pre ďalší vývoj prostredníctvom známych molekulárne biologických spôsobov. Aminokyselinová sekvencia tohto enzýmu sa udáva v sekvenčnom protokole pod označením SEQ ID č. 2.

Porovnateľné amylolytické proteíny sú takisto formami uskutočnenia súčasného vynálezu a nárokuje sa do tej miery, do akej sekvencie proteínov alebo DNA sú v oblasti podobnosti so sekvenciami udanými v SEQ ID č. 1 a/alebo SEQ ID č. 2. Táto oblasť podobnosti zahŕňa všetky proteíny, ktorých sekvencia aminokyselín je so sekvenciou aminokyselín uvedenou v SEQ ID č. 2 identická aspoň na 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,5 % alebo na 100 %. Oblasť podobnosti zahŕňa všetky proteíny, ktorých sekvencia nukleotidov je so sekvenciou nukleotidov uvedenou v SEQ ID č. 1 identická aspoň na 85 %, 87,5 %, 90 %, 92,5 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % alebo na 100 %. Platí to zvlášť pre tie čiastkové oblasti proteínov, ktoré sa týkajú aminokyselín 32 až 516.

Pri ďalšom podobnom proteíne známom ku dňu 17.3.2000 ide o α -amylázu z *Bacillus alcalophilus* s označením P 19571 v databáze Swiss-Prot (Geneva Bioinformatics (GeneBio) S.A., Ženeva, Švajčiarsko; <http://www.genebio.com/sprot.html>). Tento proteín vykazuje s amylolytickým enzýmom z *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368) podľa vynálezu sekvenčnú homológiu s identitou 93,4 % na úrovni proteínu. Proteín podľa vynálezu sa v homologických oblastiach charakterizuje jednoznačne ako α -amyláza. Reprezentatívne príbuzné proteíny sú uvedené v alignmentte obrázku 1.

Na základe týchto alignmenttov môžu proteíny podľa vynálezu nadobudnúť do značnej miery rovnaké sekundárne a terciárne štruktúry ako proteíny použité v homologizácii. Ich štruktúrne prvky si možno stiahnuť zo všeobecne prístupných databáz ako je napríklad EMBL-European Bioinformatics Institute (EBI) v Cambridgi, Veľká Británia (<http://www.ebi.ac.uk>), Swiss-Prot alebo GenBank (National Center for Biotechnology Information NCBI, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Keby vznikli štruktúry odlišné od uvedených, alebo by sa

zistilo, že existujú varianty s rôznym priestorovým usporiadaním s odlišnými amylolytickými vlastnosťami, čo sa týka napríklad optimálnych reakčných podmienok alebo substrátovej špecificity, potom všetky budú zahrnuté do rozsahu súčasného vynálezu. Na jednej strane môže priestorové usporiadanie závisieť od podmienok prípravy, napríklad v prítomnosti alebo v neprítomnosti leader-peptidu. Na druhej strane sa môže ukázať, že tieto varianty sú osobitne vhodné na rôzne možnosti použitia, napríklad na kvantitatívne skvapalňovanie škrobu, na hydrolýzu cyklodextrínov alebo na použitie v pracích alebo čistiacich prostriedkoch.

Osobitný záujem sa venuje čiastkovej sekvencii, ktorá zodpovedá sekvencii aminokyselín 32 až 516 uvedenej v SEQ ID č. 2. Prvých 31 aminokyselín, ako sa dá zistiť zo sekvencie aminokyselín, je signálnym peptidom, ktorý pri produkcii v zodpovedajúcom mikroorganizme spúšťa pravdepodobne vyplavenie proteínu z bunky do okolitého média. Tento signálny peptid sa po vyplavení *in vivo* odštiepi, aby ostatná časť proteínu mohla vykonávať vlastnú amylolytickú aktivitu.

Pre vlastnú amylolytickú funkciu majú aminokyseliny 1 až 31 pravdepodobne iba malý význam, majú však význam pre produkciu, a to zvlášť pre potrebné priestorové usporiadanie. Nemožno ich preto zo súčasného vynálezu vylúčiť.

Keby sa ukázalo, že pri príprave, napríklad jedným alebo iným bakteriálnym kmeňom, vzniknú odlišnosti v dĺžke signálneho peptidu a/alebo zrelého proteínu, potom pre príslušné odlišné varianty platia nároky zodpovedajúce pre pozície 1 až 31, prípadne 32 až 516 podľa SEQ ID č. 2. Bolo by tak napríklad možné, aby sa v translácii proteínu z *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368) použilo už šesť nukleotidov pred sekvenciou nukleotidov uvedenou v SEQ ID č. 1. Pred týmto začiatkom považovaným za pravdepodobný začiatok leží šesť nukleotidov ATG ACG. Tieto by sa mohli translatovať ako Met-Thr, čím sa *N*-terminálny koniec signálneho peptidu predĺži o dve aminokyseliny a vznikne určitá podobnosť s amylázou z *Bacillus* sp. # 707 uvedenou na obrázku 1 pod číslom 2. Takisto sú možné aj variácie pri odštiepení signálneho peptidu.

Medzi variantmi nachádzajúcimi sa v rámci vyššie uvedenej oblasti podobnosti sú zvlášť výhodné tie, ktoré majú optimalizované vlastnosti ohľadne očakávaných možností použitia. Takéto varianty, ako sa uvádza vyššie, sa dajú pripraviť známymi, výhodne molekulárne biologickými spôsobmi. Bolo by napríklad

možné s použitím návodu z prihlášky WO 94/18314 deletovať metionínové, tryptofánové, cysteínové a/alebo tyrozínové zvyšky proteínov podľa vynálezu a/alebo substituovať ich ťažšie oxidovateľnými aminokyselinovými zvyškami. Možno tým zlepšiť oxidačnú stabilitu, pH profilu aktivity a/alebo termostabilitu. Ďalší vývoj bodovými mutáciami možno orientovať napríklad aj na prihlášky WO 99/09183 a WO/99/23211.

Fragmenty podľa vynálezu znamenajú všetky proteíny alebo peptidy, ktoré sú menšie ako tie proteíny, ktoré zodpovedajú proteínom uvedeným v SEQ ID č. 1 alebo SEQ ID č.2, v zodpovedajúcich čiastkových sekvenciách sú však s nimi dostatočne homologické. Pokiaľ majú amylolytickú funkciu alebo aspoň funkciu, ktorá vykonáva podporu hydrolýzy α -1,4-glykozidickej väzby, považujú sa za amylolyticky aktívne fragmenty a sú formami uskutočnenia súčasného vynálezu. Týka sa to napríklad takých fragmentov, ktoré prispievajú ku komplexovaniu substrátu alebo k produkcii štrukturálneho elementu potrebného na hydrolýzu. U fragmentov môže ísť napríklad o jednotlivé domény alebo o zlomky, ktoré nie sú s doménami zhodné. Takéto fragmenty možno pripraviť s malými nákladmi, určité, prípadne nevýhodné charakteristiky počiatočnej molekuly už neobsahujú, ako majú napríklad regulačný mechanizmus na zníženie aktivity alebo výhodnejší profil aktivity. Takéto proteínové fragmenty možno pripraviť aj ináč ako biosynteticky, napríklad chemicky. Chemická syntéza môže byť výhodná napríklad vtedy, kedy sa následne po syntéze majú uskutočniť chemické modifikácie.

Fragmenty sa dajú pre principiálnu zhodu priradiť aj k proteínom, ktoré možno získať delečnou mutáciou. Takéto fragmenty môžu byť s počiatočnou molekulou do značnej miery zhodné, alebo jednotlivé funkcie už práve nemajú. Je to osobitne účelné napríklad pri delícii inhibičných oblastí. Výsledkom delécieí môže byť jednak špecializácia, jednak rozšírenie oblasti použitia daného proteínu. Pokiaľ sa tým zachová, modifikuje, špecifikuje alebo vôbec nadobudne amylolytická funkcia v najširšom zmysle, ide ako u delečných variantov, tak aj u fragmentov o proteíny podľa vynálezu; jediným dodatočným predpokladom je, aby v prítomnej homologickej čiastkovej sekvencii boli v medziach vyššie uvedenej oblasti podobnosti so sekvenciami uvedenými v SEQ ID č. 1 a SEQ ID č. 2.

S odvolaním sa na WO 99/57250 je napríklad možné proteín podľa vynálezu alebo jeho časti opatriť prostredníctvom peptidických alebo nepeptidických spojok väzbovými doménami z iných proteínov a tým zefektívniť hydrolýzu substrátu. Takéto konštrukty sú potom v rozsahu súčasného vynálezu, ak majú amylolytickú aktivitu a ak sú časti konštruktov, ktoré tieto funkcie vykonávajú, majú dostatočnú podobnosť s uvedenými sekvenciami podľa vynálezu. Takisto možno amylolytické proteíny podľa vynálezu spojiť napríklad aj s proteázami, aby sa dosiahla dvojité funkcia.

Aj proteíny a signálne proteíny získané z predproteínov odštiepením *N*-terminálnych aminokyselín možno považovať za prirodzene vzniknuté fragmenty, prípadne delečne zmutované proteíny. Takýto štiepny mechanizmus možno použiť aj na predkladanie špecifických štiepných miest v rekombinantných proteínoch prostredníctvom určitých sekvenčných oblastí, ktoré signálne peptidázy rozpoznávajú. Možno tak uskutočniť aktiváciu a/alebo dezaktiváciu proteínov podľa vynálezu. Na každý z týchto proteínov sa vynález vzťahuje, pokiaľ sa nachádza v rozmedzí rozsahu ochrany a má amylolytickú aktivitu.

Chiméry alebo hybridné proteíny podľa vynálezu znamenajú také proteíny, ktoré sa skladajú z takých elementov, ktoré prirodzeným spôsobom pochádzajú z rôznych polypeptidových reťazcov. Tento spôsob sa volá tiež shufflingová alebo fúzna mutagenéza. Ide potom o chimérne proteíny podľa vynálezu, kedy fúziou získané proteíny majú amylolytickú aktivitu v najširšom zmysle. Túto aktivitu môže uskutočňovať alebo modifikovať časť molekuly, ktorá je odvodená od proteínu podľa vynálezu a nachádza sa v rámci požadovaného rozsahu oblasti podobnosti. Zmysel takejto fúzie môže spočívať napríklad v tom, aby sa prostredníctvom fúzovaného proteínu podľa vynálezu vytvorila alebo modifikovala amylolytická funkcia alebo funkcia podporujúca hydrolýzu α -1,4-glykozidickej väzby. V zmysle vynálezu pritom nie je podstatné, či takýto chimérny proteín pozostáva z jediného polypeptidického reťazca alebo z viacerých podjednotiek, medzi ktorými možno rozdeliť rôzne funkcie. Na uskutočnenie tejto poslednej alternatívy napríklad jediný chimérny polypeptidický reťazec je možné posttranslačne alebo až po vyčistení rozložiť na viaceré reťazce cieleným proteolytickým štiepením. Predmetom vynálezu sú aj také chimérne proteíny, ktoré v dôsledku svojej konštrukcie majú po celej

sekvencii aminokyselín a/alebo nukleotidov voliteľne nižšiu identitu ako bola definovaná vyššie pre oblasť podobnosti podľa vynálezu, ktorá sa jej však môže priradiť aspoň v jednej oblasti vzniknutej fúziou a ktorá v tejto časti má tie isté funkcie ako amyláza, ktorá po celej svojej dĺžke spadá do uvedenej homologickej oblasti.

Proteíny podľa vynálezu získané inzerčnou mutáciou znamenajú varianty proteínov spadajúcich po celej svojej dĺžke do označených ochranných oblastí sekvencií SEQ ID č. 1 alebo SEQ ID č. 2, ktoré boli získané zavedením fragmentu nukleovej kyseliny, prípadne proteínu do príslušných sekvencií. Zmyslom inzerčnej mutagenézy, podobne ako tvorby hybridov, môže byť kombinovanie jednotlivých proteínov alebo vlastností proteínov podľa vynálezu s vlastnosťami iných proteínov. Ide potom o proteíny podľa vynálezu získané inzerčnou mutáciou alebo o chimérne proteíny, ak homológia oblastí odvodených zo sekvencií SEQ ID č. 1 alebo SEQ ID č. 2 má zodpovedajúcu hodnotu a proteín na základe týchto oblastí má amylolytickú funkciu v najširšom zmysle.

Aj proteíny získané inverznou mutagenézou a proteíny s novým zoskupením rôznych molekulových častí líšiacich sa od pôvodného sledu aminokyselín sa týmto zahŕňajú do záberu súčasného vynálezu. Možno ju považovať za delečný variant, inzerčný variant, ako aj za shufflingový variant pôvodného proteínu.

Amylolyticky aktívne deriváty podľa vynálezu znamenajú také amylolytické proteíny, ktoré boli modifikované, napríklad v súvislosti s biosyntézou proteínov počas spracovania hostiteľským organizmom, alebo chemicky, napríklad prekonvertovaním bočného reťazca aminokyseliny alebo kovalentnou väzbou ďalšej zlúčeniny na proteín. V prípade takejto zlúčeniny môže ísť napríklad o ďalšie proteíny, ktoré sa na proteíny podľa vynálezu viažu napríklad prostredníctvom bifunkčných chemických väzieb. Takéto modifikácie môžu napríklad ovplyvniť substrátovú špecificitu alebo silu väzby na substrát, alebo spôsobiť prechodné zablokovanie enzymatickej aktivity, ak v prípade tejto pripojenej látky ide o inhibítor. Môže to mať význam pre obdobie skladovania. Ďalšou formou uskutočnenia sú také deriváty, ktoré sa získali prostredníctvom kovalentnej väzby na makromolekulárny nosič, akým je napríklad polyetylén glykol alebo polysacharid.

Ďalším riešením úlohy podľa vynálezu sú amylolytické proteíny alebo deriváty, ktoré majú aspoň jednu antigénovú determinantu spoločnú s jedným z vyššie uvedených proteínov alebo derivátov.

Pre vykonávanie enzymatických aktivít je rozhodujúci nielen púhy sled aminokyselín proteínu, ale aj elementy sekundárnej štruktúry a ich trojrozmerné usporiadanie. Domény výrazne odlišné svojou primárnou štruktúrou môžu tak vytvoriť štruktúry, ktoré sú priestorovo značne zhodné a tým môžu umožniť rovnaké enzymatické správanie. Takéto zhody v sekundárnej štruktúre antiséra alebo čisté alebo monoklonálne protilátky obyčajne rozpoznávajú ako zhodné antigénne determinanty. Prostredníctvom imunochemických krížových reakcií tak možno zisťovať a zaraďovať štrukturálne podobné proteíny alebo deriváty.

Preto sa do rozsahu súčasného vynálezu zaraďujú práve aj také proteíny alebo deriváty, ktoré majú amylolytickú aktivitu a ktoré možno zaradiť medzi vyššie definované proteíny alebo deriváty podľa vynálezu nie pre svoju hodnotu homológie v primárnej štruktúre, ale pre imunochemickú príbuznosť.

Proteíny podľa vynálezu pochádzajúce z prirodzených zdrojov sú výhodnými formami uskutočnenia súčasného vynálezu, osobitne ak pochádzajú z mikroorganizmov, ako sú napríklad jednobunkové huby alebo baktérie. Možno s nimi pracovať väčšinou jednoduchšie ako s mnohobunkovými organizmami alebo s bunkovými kultúrami odvodenými z mnohobunkových organizmov. Tieto znamenajú pre špeciálne formy uskutočnenia užitočné možnosti voľby.

Osobitne výhodné sú proteíny alebo deriváty podľa vynálezu z gram-pozitívnych baktérií, pretože nemajú vonkajšiu membránu a sekretované proteíny vylučujú bezprostredne do okolitého média.

Celkom osobitne výhodné sú proteíny alebo deriváty z gram-pozitívnych baktérií rodu *Bacillus*, pretože sa ako produkčné organizmy vyznačujú osobitne vysokým produkčným výkonom.

Medzi proteínmi alebo derivátmi podľa vynálezu z druhov rodu *Bacillus* sú výhodné proteíny z alkalifilných bacilov rodu *Bacillus*, medzi nimi osobitne z *Bacillus* sp. A 7-7, a celkom osobitne z kmeňa *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368). Z tohto kmeňa bola pôvodne získaná forma uskutočnenia enzýmu podľa vynálezu, ktorého

príslušné sekvencie sú uvedené v sekvenčnom protokole a ktorého enzymatické charakteristiky sú opísané v príkladoch.

Z produkčných dôvodov sú výhodné vždy také kmene, ktoré vytvorený amylolytický proteín vylúčia do okolitého média.

Je možné, že prirodzene sa vyskytujúci producenti môžu síce vyprodukovať amylolytický enzým podľa vynálezu, avšak ho za uvedených podmienok exprimujú a/alebo vylučujú do okolitého média iba v nepatrnej miere. Podliehajú však záberu podľa súčasného vynálezu dovedy, kým existuje možnosť experimentálne zistiť vhodné podmienky okolitého prostredia alebo nízkomolekulárne alebo iné faktory, pôsobením ktorých možno indukovať produkciu proteínu podľa vynálezu, ktorá umožní jeho priemyselné využitie. Takýto regulačný mechanizmus možno na biotechnologickú produkciu použiť cielene, napríklad na reguláciu zodpovedných promótorov.

Podľa získania, spracovania alebo prípravy proteínu ho možno zlúčiť s rôznymi inými látkami, osobitne ak sa získal z prirodzených producentov tohto proteínu. Možno ho potom, avšak aj nezávisle od toho, cielene zmiešať s určitými inými látkami, napríklad na zlepšenie skladovateľnosti. Výraz proteín podľa vynálezu sa preto vzťahuje okrem toho aj na všetky prípravky vlastného proteínu podľa vynálezu. Nezávisí to ani od toho, či sa v určitom prípravku táto enzymatická aktivita prejaví alebo nie. Môže byť žiadúce, aby pri skladovaní nebola nijaká alebo iba nízka aktivita, a aby sa táto amylolytická funkcia prejavila až v čase použitia. Môže to závisieť napríklad od stavu priestorového usporiadania proteínu alebo môže byť výsledkom reverzibilnej väzby jednej alebo viacerých sprievodných látok z prípravku, alebo výsledkom iného kontrolného mechanizmu.

Proteíny podľa vynálezu možno chrániť osobitne počas skladovania stabilizátormi napríklad pred denaturáciou, rozpadom alebo inaktiváciou napríklad fyzikálnymi vplyvmi, oxidáciou alebo proteolytickým štiepením. U proteínov získaných z mikroorganizmov je inhibícia proteolýzy osobitne kritická, pretože väčšina mikroorganizmov vylučuje do okolitého média rôzne proteázy ako tráviace enzýmy. Tieto tráviace enzýmy môžu dané proteíny počas následného čistenia značne poškodiť.

Jedna skupina stabilizátorov sú reverzibilné inhibítory proteáz, ako je napríklad benzamidín hydrochlorid a leupeptín, bórax, kyseliny bóru, ich soli alebo estery, peptidaldehidy alebo čisto peptidické inhibítory ako je napríklad ovomucid alebo špecifické inhibítory subtilizínu. Ďalšie bežné stabilizátory enzýmov sú aminoalkoholy ako je napríklad mono-, di-, trietanol a -propanolamín, alifatické karboxylové kyseliny až po C₁₂, dikarboxylové kyseliny, nižšie alifatické alkoholy, predovšetkým polyoly, ako je napríklad glycerín, etylénglykol, propylénglykol alebo sorbit. Taktiež sa používajú vápnikové soli, ako je napríklad kalciumacetát alebo kalciumformiát, horčíkové soli, rôzne polyméry ako je napríklad lignín, celulozoéter, polyamid alebo vo vode rozpustné vinylové kopolyméry, aby sa enzymatický prípravok stabilizoval predovšetkým voči fyzikálnym vplyvom alebo kolísaniu hodnoty pH. Redukčné prostriedky a antioxidanty, ako je napríklad natriumsulfit alebo redukčné cukry, zvyšujú stabilitu proteínov voči oxidatívne mu rozpadu.

Aj vo forme uskutočnenia zodpovedajúcich nukleových kyselín sa súčasný vynález uskutoční, pokiaľ príslušné nukleové kyseliny kódujú amylolytický proteín v najširšom zmysle a majú so sekvenciou uvedenou v SEQ ID č. 1 dostatočnú, vyššiu definovanú podobnosť, osobitne také nukleové kyseliny, ktoré kódujú proteín, ktorý zodpovedá čiastkovej oblasti aminokyselín 32 až 516 aminokyselinovej sekvencie uvedenej v SEQ ID č. 1.

Osobitne výhodnou formou uskutočnenia sú tie nukleové kyseliny, ktoré kódujú jeden z vyššie uskutočnených amylolytických proteínov podľa vynálezu. Zahŕňa aj tie varianty, ktoré nevyhovujú po celej svojej dĺžke oblasti podobnosti definovanej podľa SEQ ID č. 1, avšak v jednotlivých oblastiach jej vyhovujú. Patria sem napríklad nukleotidové sekvencie, ktoré boli získané inzerčnou alebo delečnou mutáciou, chimérne proteíny alebo proteínové fragmenty. Avšak formami uskutočnenia súčasného vynálezu sú aj takzvané antisense-konstrukty, napríklad na jednotlivých čiastkových úsekoch, pretože ich možno použiť na reguláciu amylolytickej aktivity.

Nukleové kyseliny sú východiskovým bodom pre molekulárne biologický výskum a ďalší vývoj. Takéto spôsoby sú opísané napríklad v príručke autorov Fritsch, Sambrook a Maniatis, "Molecular cloning: a laboratory manual", Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1989. Na géne, osobitne na klonovanom

géne, sú založené aj všetky spôsoby génového inžinierstva a biochémie proteínov, ktoré sú v stave techniky zhrnuté pod pojmom proteínové inžinierstvo. S takýmito spôsobmi možno proteíny podľa vynálezu ďalej optimalizovať z hľadiska rôznych použití, napríklad bodovou mutagenézou alebo fúziou so sekvenciami z iných génov.

K variantom proteínu, ktorý sa dá získať známymi molekulárne biologickými spôsobmi, patria osobitne také varianty s jednotlivými aminokyselinovými výmenami alebo náhodnými bodovými mutáciami, deléciami jednotlivých aminokyselín alebo čiastkovými sekvenciami, fúziami s inými fragmentmi alebo inými enzýmami, inzerciami alebo inverziami, teda parciálne obrátenými sekvenciami. Takéto mutácie alebo modifikácie môžu pre špecifické použitie znamenať výhodné formy uskutočnenia. Takúto mutagenézu možno uskutočniť cielene alebo spôsobmi náhodnej mutagenézy. Možno ju skombinovať napríklad s následným spôsobom rozpoznávania a/alebo výberu (skrining a selekcia) zameraným na aktivitu na klonovaných génoch. Mutáciou získané gény sú v rozsahu súčasného vynálezu, ak kódujú amylolytické proteíny v najširšom zmysle a nachádzajú sa vo vyššie definovanej oblasti podobnosti; prinajmenšom v homologických a funkčne relevantných oblastiach.

Ďalším riešením úlohy podľa vynálezu a tým predmetu vynálezu sú organizmy, ktoré prirodzeným spôsobom produkujú proteín alebo derivát podľa vynálezu alebo obsahujú nukleové kyseliny, ktoré kódujú proteín alebo derivát podľa vynálezu. Ich nájdenie umožní uskutočnenie myšlienky vynálezu. Takéto organizmy možno získať s použitím všeobecne známych spôsobov, napríklad izoláciou kmeňov z prirodzeného habitatu alebo skriningom génových bánk. Sekvencia nukleotidov uvedená v SEQ ID č. 1 sa môže pritom použiť napríklad ako sonda na skrining alebo môže slúžiť ako predloha na skonštruovanie zodpovedajúcej PCR sondy. Analogicky možno použiť aj peptidy s krátkym reťazcom alebo kompletne peptidy so sekvenciou aminokyselín podľa SEQ ID č. 2 na vytvorenie zodpovedajúcich antisér, pomocou ktorých možno identifikovať zodpovedajúce organizmy, prípadne nimi produkované proteíny.

Podľa vyššie uvedených uskutočnení sú predovšetkým pre možnosť kultivácie výhodné mikroorganizmy, výhodne baktérie, medzi nimi grampozitívne

baktérie, medzi nimi rod *Bacillus*, osobitne *Bacillus* sp. A 7-7, a celkom osobitne *Bacillus* sp. A 7-7 DSM (12368).

Vlastný predmet vynálezu sa pripisuje vektorom, ktoré obsahujú jednu z oblastí nukleových kyselín podľa druhého predmetu vynálezu.

Na prácu s nukleovými kyselinami sa DNA vhodne naklonuje do vektoru. Patria k nim napríklad také, ktoré sú odvodené od bakteriálnych plazmidov, od vírusov alebo od bakteriofágov, alebo prevažne syntetické vektory alebo plazmidy s elementmi najrôznejšieho pôvodu. Spolu s ďalšími prítomnými genetickými elementmi sa môžu vektory zachovať v príslušných hostiteľských bunkách počas viacerých generácií ako stabilné jednotky. Podľa vynálezu je pritom nepodstatné, či sa tieto vektory zachovávajú extrachromozomálne ako samostatné jednotky alebo či sa integrujú do chromozómu. To, ktorý systém sa zvolí spomedzi mnohých systémov známych zo stavu techniky, závisí od konkrétneho prípadu. Rozhodujúci môže byť napríklad dosiahnuteľný počet kópií, prítomné selekčné systémy, medzi nimi predovšetkým rezistencia na antibiotiká, alebo podmienky kultivácie hostiteľských buniek schopných inkorporovať tieto vektory.

Vektory sú vhodným východiskom molekulárne biologického a biochemického výskumu daného génu alebo príslušného proteínu a pre ďalší vývoj podľa vynálezu a napokon aj pre amplifikáciu a produkciu proteínov podľa vynálezu. Sú formami uskutočnenia predkladaného vynálezu, ak sekvencie získaných oblastí nukleových kyselín podľa vynálezu ležia v rámci vyššie definovanej homologickej oblasti.

Výhodnými formami uskutočnenia predkladaného vynálezu sú klonovacie vektory. Hodia sa okrem ukladania, biologickej amplifikácie alebo selekcie daného génu na charakterizovanie daného génu, a to zostavením reštrikčnej mapy alebo prostredníctvom sekvenovania. Klonovacie vektory sú výhodnými formami uskutočnenia predkladaného vynálezu aj preto, lebo sú prenosnou a skladovateľnou formou nárokovanej DNA. Sú výhodným východiskom aj pre molekulárne biologické spôsoby, ktoré sa neviažu na bunky, ako je napríklad polymerázová reťazová reakcia.

Expresné vektory obsahujú čiastkové sekvencie, ktoré im umožňujú, aby sa v hostiteľských organizmoch optimalizovaných na produkciu proteínov replikovali

a aby tam exprimovali gén, ktorý obsahujú. Výhodnými formami uskutočnenia sú tie expresné vektory, ktoré samy nosia genetické elementy potrebné na expresiu. Expresiu ovplyvňujú napríklad promótor, ktoré regulujú transkripciu génu. Expresia sa tak môže uskutočniť prirodzeným promótorom, pôvodne lokalizovaným pred týmto génom, avšak aj po genetickej fúzii, jednak promótorom s napojeným expresným vektorom, jednak aj modifikovaným promótorom alebo celkom iným promótorom z iného organizmu.

Výhodnými formami uskutočnenia sú také expresné vektory, ktoré sú regulovateľné prostredníctvom zmeny kultivačných podmienok alebo pridaním určitých zlúčenín, ako je napríklad hustota buniek alebo špeciálne faktory. Expresné vektory umožňujú, aby sa príslušný proteín produkoval heterológne, čiže v inom organizme ako v tom, z ktorého ho možno získať prirodzenou cestou. Aj homologické získanie proteínu z hostiteľského organizmu, ktorý gén exprimuje prirodzeným spôsobom prostredníctvom vhodného vektoru, je v rozsahu predkladaného vynálezu. Toto môže mať výhodu, že prirodzené modifikačné reakcie súvisiace s transláciou sa na vznikajúcom proteíne vykonávajú práve tak, ako by sa uskutočnili aj prirodzeným spôsobom.

Formami uskutočnenia súčasného vynálezu môžu byť aj bezbunkové expresné systémy, v ktorých sa biosyntéza proteínov dokončí *in vitro*. Takéto expresné systémy sú v stave techniky takisto zavedené.

Ďalšou formou uskutočnenia tohto predmetu vynálezu sú bunky, ktoré obsahujú jeden z vyššie definovaných vektorov, osobitne klonovací alebo expresný vektor. Osobitne v priebehu molekulárne biologických prác, ktoré sú potrebné napríklad pre mutagenézu, sekvenovanie alebo ukladanie vektorov, sa uskutočňuje ich transformácia v zodpovedajúcich bunkách. Pre tento účel, v závislosti od použitého spôsobu, môžu byť vhodné napríklad grampozitívne, osobitne však aj gramnegatívne baktérie.

Ďalšou formou uskutočnenia sú hostiteľské bunky, ktoré exprimujú proteín alebo derivát podľa prvého predmetu vynálezu alebo k expresii ktorého ich možno indukovať, výhodne s použitím vyššie definovaného expresného vektoru.

Výhodná *in vivo* syntéza amylolytického enzýmu podľa vynálezu vyžaduje prenos príslušného génu do hostiteľskej bunky. Ako hostiteľské bunky sú vhodné

princiálne všetky organizmy, to znamená prokaryonty, eukaryonty alebo sinice. Výhodné sú také hostiteľské bunky, s ktorými sa dá geneticky dobre manipulovať, čo sa týka napríklad transformácie s expresným vektorom a jeho stabilného zavádzania, napríklad jednobunkové huby alebo baktérie. Okrem toho výhodné hostiteľské bunky sa vyznačujú dobrou mikrobiologickou a biotechnologickou manipulovateľnosťou. Je to napríklad ľahká kultivácia, dobrý rast, malé požiadavky na fermentačné médiá a dobrá produkcia a sekrécia cudzích proteínov. Z veľkého počtu rôznych systémov, ktoré sú podľa stavu techniky k dispozícii, optimálne expresné systémy pre daný prípad sa musia často zisťovať experimentálne. Každý proteín podľa vynálezu možno takto získať z veľkého počtu hostiteľských organizmov.

Výhodné formy uskutočnenia sú také hostiteľské bunky, ktorých aktivita je regulovateľná na základe genetických regulačných elementov, ktoré sú napríklad k dispozícii na expresnom vektore, avšak môžu byť už aj predtým prítomné v týchto bunkách. Možno ich indukovať na expresiu napríklad kontrolovaným pridávaním chemických zlúčenín, ktoré majú funkciu aktivátorov, zmenou kultivačných podmienok alebo po dosiahnutí určitej hustoty buniek. Umožňuje to veľmi hospodárnu produkciu daného proteínu.

Variantom tohto pokusného princípu sú expresné systémy, v ktorých dodatočné gény, napríklad také, ktoré sú prítomné na iných vektoroch, ovplyvňujú produkciu proteínu podľa vynálezu. Môže ísť o modifikujúce génové produkty, alebo o také produkty, ktoré majú byť vyčistené spoločne s proteínom podľa vynálezu, napríklad aby sa ovplyvnila jeho amylolytická funkcia. Môže pritom ísť o iné proteíny alebo enzýmy, inhibítory, alebo o také elementy, ktoré ovplyvňujú vzájomné pôsobenie s rôznymi substrátmi.

Výhodné hostiteľské bunky sú prokaryotické alebo bakteriálne bunky. Baktérie sa oproti eukaryontom vyznačujú spravidla kratším generačným časom a menšími nárokmi na kultivačné podmienky. Možno tým zaviesť finančne výhodné spôsoby na získavanie proteínov podľa vynálezu.

Osobitne výhodné sú hostiteľské bunky, zvlášť baktérie, ktoré vytvorený proteín alebo derivát sekretujú do okolitého média, aby exprimované proteíny podľa vynálezu mohli byť priamo vyčistené.

Jedna forma uskutočnenia súčasného vynálezu využíva samotný *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368), aby sa proteíny podľa vynálezu mohli homologicky exprimovať. Môže sa to uskutočniť prostredníctvom vloženého vektora, ktorý vnáša už endogénne prítomný gén alebo jeho obmeny podľa vynálezu, do týchto buniek, napríklad vo veľkom počte kópií. Môže to byť osobitne výhodné vtedy, keď proteín následne po svojej syntéze má byť upravený modifikáciami, ktoré výhodným spôsobom uskutočnia samy bunky.

Oproti tomu však je výhodná heterológna expresia. Grampozitívne baktérie, ako sú napríklad aktinomycety alebo bacily, nemajú vonkajšiu membránu, takže sekretované proteíny vylučujú bezprostredne do okolitého média. Medzi baktérie vhodné na heterológnu expresiu patria baktérie rodu *Bacillus*, osobitne druhy *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* alebo *Bacillus alcalophilus*.

Na heterológnu expresiu možno použiť aj gramnegatívne baktérie. U nich sa sekretujú mnohé proteíny do periplazmatického priestoru, čiže do kompartmentu medzi obe membrány obklopujúce bunky. Môže to byť výhodné pre špecifické prípady použitia. Patria sem napríklad rody *Klebsiella* alebo *Escherichia*, výhodne druh *Escherichia coli*, osobitne výhodne kmene *E. coli* JM 109, *E. coli* DH 100B alebo *E. coli* DH 12S.

Na produkciu amylolytických proteínov podľa vynálezu môžu byť vhodné aj eukaryotické bunky, napríklad kvasinky rodu *Saccharomyces* alebo *Kluyveromyces*. Môže to byť výhodné osobitne vtedy, keď proteíny v súvislosti so svojou syntézou sa majú upraviť špecifickými modifikáciami, ktoré takéto systémy umožňujú. Patria sem napríklad väzby nízkomolekulových zlúčenín ako je napríklad membránová kotva alebo oligosacharidy.

Všetky vyššie uvedené elementy možno skombinovať do spôsobu na prípravu proteínov podľa vynálezu. Pre každý proteín podľa vynálezu je pritom možný veľký počet kombinačných možností jednotlivých krokov spôsobu. Všetky uskutočňujú základnú myšlienku súčasného vynálezu, čiže kvantitatívne pripraviť zástupcov proteínového typu definovaného amylolytickou funkciou a zároveň vysokou homológiou so sekvenciami udanými v sekvenčných protokoloch pomocou

príslušnej genetickej informácie. Optimálny spôsob sa musí pre každý konkrétny prípad experimentálne odskúšať.

V princípe sa pritom postupuje nasledujúcim spôsobom: nukleové kyseliny podľa vynálezu, čiže nukleové kyseliny, ktoré ležia v rámci vyššie definovanej oblasti podobnosti so sekvenciou uvedenou v SEQ ID č. 1, sa vhodným spôsobom inkorporujú vo forme DNA do vhodného expresného vektoru. Tento vektor sa transformuje do hostiteľskej bunky, napríklad do buniek ľahko kultivovateľného bakteriálneho kmeňa, ktorý proteíny, ktorých gény sú pod kontrolou zodpovedajúcich genetických elementov, vyplaví do okolitého nutričného média; príslušné regulačné elementy môžu byť napríklad k dispozícii z expresného vektoru. Z okolitého média sa môže proteín podľa vynálezu vyčistiť prostredníctvom viacerých čistiacich krokov, ako sú napríklad precipitácie alebo chromatografie. Systém, ktorý bol v laboratórnom merítke optimalizovaný, je odborník schopný preniesť aj do výroby v priemyselnom merítke.

V ďalšom sa uvádzajú najdôležitejšie technické možnosti použitia proteínov podľa vynálezu. Mnohé možnosti použitia amylolytických enzýmov zavedené v technike sú uvedené v príručkách, ako napríklad v knihe "Industrial enzymes and their applications" autora H. Uhlig, vydavateľstvo Wiley, New York, 1998. Nasledujúca zostava sa nemá chápať ako vylučujúci zoznam, ale ako výber zo všetkých teoreticky možných možností použitia. Keby sa zistilo, že jednotlivé proteíny podľa vynálezu sú vhodné pre dodatočné, tu vyslovene nenárokované možnosti použitia, tak sa tieto možnosti týmto zahŕňajú do záberu súčasného vynálezu.

Dôležitá oblasť použitia amylolytických enzýmov je ich použitie ako aktívnych komponentov v pracích a čistiacich prostriedkoch na čistenie textílií alebo tvrdých povrchov. V týchto použitíach slúži amylolytická aktivita na hydrolytické rozpúšťanie znečistení obsahujúcich uhľohydráty, osobitne škroby, a/alebo na ich uvoľnenie z podkladu. Môžu byť pri tom použité samostatne, vo vhodných médiách alebo aj v pracích alebo čistiacich prostriedkoch. Tieto prostriedky sa vyznačujú tým, že amylolytické enzýmy a ostatné komponenty synergicky odstránia znečistenie, napríklad tak, že produkty hydrolýzy amylolytických proteínov sa solubilizujú prostredníctvom iných zložiek prostriedku, ako sú napríklad tenzidy. Proteín podľa

vynálezu sa môže uplatniť ako v prostriedkoch pre veľkospotrebitel'ov alebo technických užívateľov, tak aj v produktoch pre súkromných užívateľov.

Vlastným predmetom vynálezu sú tým všetky pracie prostriedky alebo čistiace prostriedky, ktoré obsahujú amylolytický proteín alebo derivát.

Myslia sa tým všetky možné čistiace prostriedky, ako koncentráty, tak aj prostriedky, ktoré sa majú použiť nezriedené; na použitie v komerčnom merítku, v práčke alebo pri ručnom praní prípadne čistení. Patria sem napríklad pracie prostriedky na textílie, koberce alebo prírodné vlákna, pre ktoré sa používa označenie prací prostriedkov podľa vynálezu. Patria sem napríklad aj prostriedky na čistenie pre plnoautomatické umývače riadu alebo prostriedky pre ručné čistenie riadu alebo čistiace prostriedky pre tvrdé povrchy ako je napríklad kov, sklo, porcelán, keramika, obkladačky, kameň, lakované povrchy, umelé hmoty, drevo alebo koža; pre takéto povrchy sa použije výraz čistiaci prostriedok podľa vynálezu. Každý druh čistiaceho prostriedku znamená formu uskutočnenia podľa súčasného vynálezu, ak je obohatený o proteín podľa vynálezu.

Formy uskutočnenia súčasného vynálezu zahŕňajú všetky podľa stavu techniky zavedené alebo všetky účelné formy prostriedku podľa vynálezu. Patria sem napríklad tuhé, práškové, tekuté, gélové alebo pastovité prostriedky pozostávajúce voliteľne aj z viacerých fáz, komprimované alebo nekomprimované; ďalej patria sem napríklad extrudáty, granuláty, tablety alebo vrecúška, balené v kuse alebo aj porciované.

Prostriedok podľa vynálezu obsahuje okrem enzýmu podľa vynálezu voliteľne aj ďalšie zložky ako sú napríklad tenzidy, napríklad neiónové, aniónové a/alebo amfotérne tenzidy, a/alebo bieliace prostriedky, a/alebo buildery, ako aj voliteľne ďalšie obvyklé zložky.

Ako neiónové tenzidy sa používajú výhodne alkoxylované, výhodne etoxylované, zvlášť primárne alkoholy výhodne s 8 až 18 atómami uhlíka a priemerne s 1 až 12 mólmi etylénoxidu (EO) v jednom móle alkoholu, v ktorých alkoholový zvyšok môže byť lineárny alebo v polohe 2 výhodne metylovaný, prípadne lineárne a metylované zvyšky môže obsahovať vo forme zmesi, tak ako sú obvyčajne prítomné v oxoalkoholových zvyškoch. Osobitne sú však výhodné alkohol-etoxyláty s lineárnymi zvyškami z alkoholov natívneho pôvodu s 12 až 18 atómami

uhlíka, napríklad z kokosového, palmového, lojového alebo oleylalkoholu, a výhodne 2 až 8 EO na jeden mól alkoholu. K výhodným etoxylovaným alkoholom patria napríklad C₁₂₋₁₄-alkoholy s 3 EO alebo 4 EO, C₉₋₁₁-alkohol so 7 EO, C₁₃₋₁₅-alkoholy s 3 EO, 5 EO, 7 EO alebo 8 EO, C₁₂₋₁₈-alkoholy s 3 EO, 5 EO alebo 7 EO a ich zmesi, ako napríklad zmesi C₁₂₋₁₄-alkoholu s 3 EO a C₁₂₋₁₈-alkoholu s 5 EO. Uvedené etoxylačné stupne sú štatisticky priemerné hodnoty, ktoré pre špeciálny produkt môžu znamenať celé alebo desatinné číslo. Výhodné alkoholetoxyláty majú zúžené rozpätie homológov (narrow range ethoxylates, NRE). Okrem týchto neiónových tenzidov možno použiť aj masťné alkoholy s viac ako 12 EO. Je to napríklad lojový alkohol s 14 EO, 25 EO, 30 EO alebo 40 EO.

Ďalšou skupinou výhodne použitých neiónových tenzidov, ktoré sa používajú alebo ako samostatný neiónový tenzid alebo v kombinácii s inými neiónovými tenzidmi, sú alkoxylované, výhodne etoxylované alebo etoxylované a propoxylované alkylestery masťných kyselín, výhodne s 1 až 4 atómami uhlíka v alkylovom reťazci, osobitne metylestery masťných kyselín.

Ďalšou skupinou neiónových tenzidov, ktoré môžu byť výhodne použité, sú alkylpolyglykozidy (APG). Použiteľné alkylpolyglykozidy vyhovujú všeobecnému vzorcu RO(G)_z, v ktorom R znamená lineárny alebo rozvetvený, osobitne v polohe 2 metylovaný, nasýtený alebo nenasýtený alifatický zvyšok s 8 až 22, výhodne 12 až 18 atómami uhlíka a G je glykózová jednotka s 5 alebo 6 atómami uhlíka, výhodne glukóza. Stupeň glykozylácie je pritom 1,0 až 4,0, výhodne 1,0 až 2,0, a osobitne 1,1 až 1,4. Výhodne sa použijú také lineárne alkylpolyglukozidy, teda alkylpolyglykozidy, v ktorých polyglykozylový zvyšok je glukózový zvyšok a alkylový zvyšok je n-alkylový zvyšok.

Vhodné môžu byť aj neiónové tenzidy typu aminoxidov, napríklad *N*-kokosalkyl-*N,N*-dimetylamínoxid a *N*-lojalkyl-*N,N*-dihydroxyetylaminoxid, a alkanolamidov masťných kyselín. Podiel týchto neiónových tenzidov výhodne nie je vyšší ako podiel etoxylovaných masťných alkoholov, osobitne nepresahuje polovicu tejto hodnoty.

Ďalšie vhodné tenzidy sú polyhydroxyamidy masťných kyselín vzorca II



v ktorom RCO znamená alifatický acylový zvyšok so 6 až 22 atómami uhlíka, R^1 znamená atóm vodíka, alkylový alebo hydroxyalkylový zvyšok s 1 až 4 atómami uhlíka a [Z] znamená lineárny alebo rozvetvený polyhydroxyalkylový zvyšok s 3 až 10 atómami uhlíka a 3 až 10 hydroxylovými skupinami. V prípade polyhydroxyamidov mastných kyselín ide o známe látky, ktoré možno obyčajne získať redukčnou amináciou redukčného cukru s amoniakom, alkylamínom alebo s alkanolamínom a následnou acyláciou s mastnou kyselinou alkylesterom mastnej kyseliny alebo chloridom mastnej kyseliny.

Do skupiny polyhydroxyamidov mastných kyselín patria aj zlúčeniny vzorca III



v ktorom R znamená lineárny alebo rozvetvený alkylový alebo alkenylový zvyšok so 7 až 12 atómami uhlíka, R^1 znamená lineárny, rozvetvený alebo cyklický alkylový zvyšok alebo arylový zvyšok s 2 až 8 atómami uhlíka, a R^2 znamená lineárny, rozvetvený alebo cyklický alkylový zvyšok alebo arylový zvyšok alebo oxyalkylový zvyšok s 1 až 8 atómami uhlíka, pričom sú výhodné C_{1-4} -alkylové alebo fenylové zvyšky a [Z] znamená lineárny polyhydroxyalkylový zvyšok, ktorého alkylový reťazec je substituovaný aspoň dvoma hydroxylovými skupinami, alebo alkoxylované, výhodne etoxylované alebo propoxylované deriváty tohto zvyšku.

[Z] sa výhodne získa redukčnou amináciou redukčného cukru, napríklad glukózy, fruktózy, maltózy, laktózy, galaktózy, manózy alebo xylózy. *N*-alkoxy- alebo *N*-aryloxy substituované zlúčeniny možno prekonvertovať napríklad zmiešaním s metylestermi mastných kyselín v prítomnosti alkoxidu ako katalyzátora na potrebné polyhydroxyamidy mastných kyselín.

Ako aniónové tenzidy sa používajú napríklad tenzidy typu sulfonátov a sulfátov. Ako tenzidy typu sulfonátov prichádzajú pritom do úvahy výhodne C_{9-13} -alkylbenzénsulfonáty, olefinové sulfonáty, to znamená zmesi alkénových a hydroxy-

alkánových sulfonátov ako aj disulfonátov, ktoré sa získavajú napríklad z C_{12-18} -monoolefínov s koncovou alebo vnútri molekuly sa nachádzajúcou dvojitou väzbou sulfonáciou plynným oxidom sírovým a následnou alkalickou alebo kyslou hydrolýzou produktov sulfonácie. Vhodné sú aj alkánové sulfonáty, ktoré sa získajú z C_{12-18} -alkánov napríklad sulfochlorináciou alebo sulfoxidáciou s následnou hydrolýzou prípadne neutralizáciou. Takisto sú vhodné aj estery α -sulfomastné kyseliny (estersulfonáty), napríklad α -sulfónované metylestery hydratovanej kokosovej, palmovej alebo lojovej mastnej kyseliny.

Ďalšie vhodné aniónové tenzidy sú sulfované glycerínestery mastných kyselín. Glycerínestery mastných kyselín znamenajú mono-, di- a triestery ako aj ich zmesi, získané v príprave esterifikáciou jedného monoglycerínu s 1 až 3 mólmi mastnej kyseliny alebo transesterifikáciou triglyceridov s 0,3 až 2 mólmi glycerínu. Výhodné sulfované glycerínestery mastných kyselín sú pritom sulfované produkty nasýtených mastných kyselín so 6 až 22 atómami uhlíka, napríklad kyseliny kaprónovej, kaprylovej, kaprínovej, myristínovej, laurínovej, palmitovej, steárovej alebo behenovej.

Ako alk(en)ylsulfáty sú výhodné alkalické a osobitne sodné soli poloesterov kyseliny sírovej $C_{12}-C_{18}$ mastných alkoholov, napríklad z kokosového mastného alkoholu, lojového mastného alkoholu, lauryl-, myristyl-, cetyl- alebo stearylalkoholu alebo $C_{10}-C_{20}$ -oxoalkoholu a tie poloestery sekundárnych alkoholov s takýmito dĺžkami reťazcov. Ďalej sú výhodné alk(en)ylsulfáty s uvedenou dĺžkou reťazca, ktoré obsahujú syntetický, petrochemicky pripravený alkylový zvyšok s priamym reťazcom, ktoré majú analogický spôsob degradácie, ako sú adekvátne zlúčeniny na báze surovín z oblasti chémie tukov. Z hľadiska práce techniky sú výhodné $C_{12}-C_{16}$ -alkylsulfáty a $C_{12}-C_{15}$ -alkylsulfáty, ako aj $C_{14}-C_{15}$ -alkylsulfáty. 2,3-Alkylsulfáty sú tiež vhodné aniónové tenzidy.

Vhodné sú aj monoestery kyseliny sírovej C_{7-21} -alkoholov s priamym alebo rozvetveným reťazcom etoxylovaných s 1 až 6 mólmi etylénoxidu, ako sú napríklad 2-metylovou skupinou rozvetvené C_{9-11} -alkoholy priemerne s 3,5 mólu etylénoxidu (EO) alebo C_{12-18} -mastné alkoholy s 1 až 4 EO. V čistiacich prostriedkoch sa pre vysokú penivosť používajú iba v relatívne malých množstvách, napríklad v množstvách až 5 % hmotnostných, obvyčajne 1 až 5 % hmotnostných.

Ďalšie vhodné aniónové tenzidy sú aj soli kyseliny alkylsulfoantárrovej, ktoré sa označujú aj ako sulfosukcináty alebo ako estery kyseliny sulfoantárrovej a znamenajú monoestery a/alebo diestery kyseliny sulfoantárrovej s alkoholmi, výhodne s masnými alkoholmi a osobitne s etoxylovanými masnými alkoholmi. Výhodné sulfoantárany obsahujú zvyšky C_{8-18} -masných alkoholov alebo ich zmesi. Osobitne výhodné sulfoantárany obsahujú zvyšok masného alkoholu, ktorý je odvodený z etoxylovaných masných alkoholov, ktoré znamenajú neiónové tenzidy (opis je uvedený nižšie). Osobitne výhodné sú pritom sulfoantárany, ktorých zvyšky masných alkoholov sa odvodzujú z etoxylovaných masných alkoholov so zníženou homológiou. Taktiež možno použiť aj kyselinu alk(en)ylantárovú výhodne s 8 až 18 atómami uhlíka v alk(en)ylom reťazci alebo jej soli.

Ako ďalšie aniónové tenzidy osobitne prichádzajú do úvahy mydlá. Vhodné sú mydlá nasýtených masných kyselín, ako sú soli kyseliny laurínovej, myristínovej, palmitovej, steárovej, hydratovanej kyseliny erukovej a behenovej, ako aj zmesi mydiel odvodené z prirodzených masných kyselín, ako je napríklad masná kyselina kokosová, palmová alebo lojová.

Aniónové tenzidy včítane mydiel môžu byť prítomné vo forme svojich sodných, draselných alebo amónnych solí, ako aj vo forme rozpustných solí organických zásad, ako je napríklad mono-, di- alebo trietanolamín. Aniónové tenzidy sú výhodne prítomné vo forme sodných alebo draselných solí, osobitne vo forme sodných solí.

Tenzidy môžu byť prítomné v čistiacich alebo prácnych prostriedkoch podľa vynálezu výhodne v množstve 5 % hmotnostných až 50 % hmotnostných, osobitne 8 % hmotnostných až 30 % hmotnostných, vo vzťahu k hotovému prostriedku.

Prostriedky podľa vynálezu môžu obsahovať bieliace prostriedky. Medzi zlúčeninami slúžiacimi ako bieliace prostriedky poskytujúce vo vode H_2O_2 majú osobitný význam peroxouhličitan sodný, tetrahydrát peroxoboritanu sodného a monohydrát peroxoboritanu sodného. Ďalšie použiteľné bieliace prostriedky sú napríklad peroxypyrofosfáty, citrátperhydráty ako aj peroxosoli poskytujúce H_2O_2 alebo peroxokyseliny, ako sú napríklad persulfáty prípadne kyselina peroxodisírová. Použiť sa môže aj peroxohydrát močoviny perkarbamid, ktorý možno vyjadriť vzorcom $H_2N-CO-NH_2 \cdot H_2O_2$. Osobitne v prípade použitia prostriedkov na

čistenie tvrdých povrchov, napríklad v automatickej umývačke riadu, môžu obsahovať voliteľne aj bielidlá zo skupiny organických bielidiel, hoci ich použitie je principiálne možné aj v prostriedkoch na pranie textílií. Typické organické bielidlá sú diacylperoxydy, ako napríklad dibenzoylperoxid. Ďalšie typické organické bielidlá sú peroxykyseliny, pričom ako príklady sa uvádzajú zvlášť alkylperoxykyseliny a arylperoxykyseliny. Výhodnými zástupcami sú perbenzoové kyseliny a ich substituované deriváty ako sú napríklad alkylperbenzoové kyseliny, ale aj kyselina peroxy- α -naftoová a magnézium-monoperftalát, alifatické alebo substituované alifatické peroxykyseliny, ako je napríklad kyselina peroxy-laurová, peroxy-steárová, ϵ -ftalimidoperoxykaprónová (kyselina ftalimidoperoxyhexánová, PAP), kyselina o-karboxybenzamidoperoxykaprónová, kyselina *N*-nonenylamidoperadipová a *N*-nonenylamidopersukcináty, a alifatické a aralifatické peroxydikarboxylové kyseliny, ako je napríklad kyselina 1,12-diperoxykarboxylová, 1,9-diperoxyazelaínová, diperoxysebacínová, diperoxybrasylová, diperoxyftálové kyseliny, 2-decyldiperoxybután-1,4-dikyselina, kyselina *N,N*-tereftaloyl-di(6-aminoperkaprónová).

Obsah bielidiel v prostriedku môže byť 1 až 40 % hmotnostných a výhodne 10 až 20 % hmotnostných, pričom sa výhodne použije monohydrát peroxoboritanu alebo peroxouhličitan. Synergické použitie amylázy s peroxouhličitanom alebo amylázy s peroxykarboxylovou kyselinou je opísané v prihláške WO 99/63036, prípadne WO 99/63037.

Aby sa počas prania pri teplotách do 60 °C, a osobitne počas predpierania, dosiahol lepší bieliaci účinok, prostriedky môžu obsahovať aj aktivátory bieliacich prostriedkov. Ako aktivátory bielidiel možno použiť zlúčeniny, ktoré v perhydrolyzačných podmienkach dávajú alifatické peroxykarboxylové kyseliny výhodne s 1 až 10 atómami uhlíka, výhodne s 2 až 4 atómami, a/alebo voliteľne substituovanú kyselinu perbenzoovú. Vhodné sú látky, ktoré obsahujú *O*- a/alebo *N*-acylové skupiny uvedeného počtu atómov uhlíka a/alebo voliteľne substituované benzoylové skupiny. Výhodné sú viacnásobne acylované alkyléndiamíny, výhodne tetraacetyletyléndiamín (TAED), acylované deriváty triazínu, osobitne 1,5-diacetyl-2,4-dioxohexahydro-1,3,5-triazín (DADHT), acylované glykolurily, osobitne 1,3,4,6-tetraacetyl-glykoluril (TAGU), *N*-acylimidy, osobitne *N*-nonanoylsukcínimid (NOSI), acylované fenolsulfonáty, osobitne *n*-nonanoyl- alebo izononanoyloxybenzén-

sulfonát (*n*- prípadne izo-NOBS), acylované hydroxykarboxylové kyseliny, ako je napríklad trietyl-O-acetylcitrát (TEOC), anhydridy karboxylových kyselín, osobitne anhydrid kyseliny ftálovej, anhydrid kyseliny izatovej a/alebo anhydrid kyseliny jantárovej, amidy karboxylových kyselín, ako je napríklad *N*-metyl-diacetamid, glykolid, acylované viacsýtne alkoholy, osobitne triacetín, etylénglykol-diacetát, izopropenylacetát, 2,5-diacetoxy-2,5-dihydrofurán a enolestery známe z nemeckých patentových prihlášok DE 196 16 693 a DE 196 16 767, ako aj acetylovaný sorbitol a manitol, prípadne ich zmesi (SORMAN) opísané v európskej patentovej prihláške EP 0 525 239, acylované deriváty cukrov, osobitne penta-acetylglukóza (PAG), pentaacetylfruktóza, tetraacetylxylóza a oktaacetylaktóza, ako aj acetylovaný, voliteľne *N*-alkylovaný glukamín prípadne glukonolaktón, triazol prípadne deriváty triazolu a/alebo kaprolaktámy vo forme čiastočiek a/alebo deriváty kaprolaktámu, výhodne *N*-acylované laktámy, napríklad *N*-benzoylkaprolaktám a *N*-acetylkaprolaktám, ktoré sú známe z medzinárodných patentových prihlášok WO 94/27970, WO 94/28102, WO 94/28103, WO 95/00626, WO 95/14759 a WO 95/17498. Hydrofilné substituované acylacetáty známe z nemeckej patentovej prihlášky DE 196 16 769 a acyllaktámy opísané v nemeckej patentovej prihláške DE 196 16 770, ako aj v medzinárodnej patentovej prihláške WO 95/14075 sa tiež výhodne použijú. Možno použiť aj kombinácie konvenčných aktivátorov bielidiel známe z nemeckej patentovej prihlášky DE 4443 177. Taktiež možno použiť nitrilové deriváty ako sú napríklad kyanopyridíny, nitrilkváty, napríklad *N*-alkylamóniumacetonitrily, a/alebo deriváty kyanamidu. Výhodné aktivátory bielidiel sú nátrium-4-(oktanoyloxy)-benzénsulfonát, *n*-nonanoyl- alebo izononanoyloxybenzénsulfonát (*n*- prípadne izo-NOBS), undecenoyloxybenzénsulfonát (UDOBS), nátriumdodekanoyloxybenzénsulfonát (DOBS), kyselina dekanoyloxybenzoová (DOBA, OBC 10) a/alebo dodekanoyloxybenzénsulfonát (OBS 12), ako aj *N*-metyl-morfolínacetonitril (MMA). Takéto aktivátory bielidiel môžu byť prítomné v obvyklých množstvách od 0,01 až 20 % hmotnostných, výhodne v množstvách 0,1 až 15 % hmotnostných, osobitne 1 % hmotnostné až 10 % hmotnostných vo vzťahu k celkovému zloženiu.

Dodatočne ku konvenčným aktivátorom bielidiel alebo namiesto nich môžu byť prítomné aj takzvané katalyzátory bielidiel. U týchto látok ide o soli prechodných

kovov, prípadne o komplexy prechodných kovov so zosilneným bieliacim účinkom, napríklad salénové alebo karbonylové komplexy obsahujúce Mn, Fe, Co, Ru alebo Mo. Aj Mn-, Fe-, Co-, Ru-, Mo-, Ti-, V- a Cu-komplexy s tripodovými ligandami obsahujúcimi N, ako napríklad amínové komplexy obsahujúce Co-, Fe-, Cu a Ru sú vhodné ako bieliace katalyzátory, pričom sa výhodne použijú tie zlúčeniny, ktoré sú opísané v patentovej prihláške DE 197 09 284 A1. Podľa prihlášky WO 99/63038 môžu mať účinok aktivátorov bieliacich prostriedkov aj deriváty acetonitrilu a podľa prihlášky WO 99/63041 aj komplexné zlúčeniny prechodných kovov v kombinácii s amylázami.

Prostriedky podľa vynálezu obsahujú spravidla jeden alebo viaceré buildery, osobitne zeolity, kremičitany, uhličitan, organické ko-buildery a tam, kde proti ich použitiu nie sú nijaké ekologické námietky, aj fosfáty. Fosfáty sú podporné látky osobitne v čistiacich prostriedkoch určených do automatických umývačiek riadu.

Je potrebné tu spomenúť aj kryštalické, vrstevnaté kremičitany sodné všeobecného vzorca $\text{NaMSi}_x\text{O}_{2x+1} \cdot \text{H}_2\text{O}$, pričom M znamená sodík alebo vodík, x znamená číslo medzi 1,6 až 4, výhodne 1,9 až 4,0, a y znamená číslo medzi 0 až 20 a výhodné hodnoty x sú 2, 3 alebo 4. Takéto kryštalické vrstevnaté kremičitany sú opísané napríklad v európskej patentovej prihláške EP 0 164 514. Výhodné kryštalické vrstevnaté kremičitany uvedeného vzorca sú tie, v ktorých M znamená sodík a x má hodnotu 2 alebo 3. Osobitne výhodné sú β -, ako aj δ -dikremičitany sodné $\text{Na}_2\text{Si}_2\text{O}_5 \cdot y\text{H}_2\text{O}$. Takéto zlúčeniny sú komerčne dostupné napríklad pod označením SKS[®] (firma Clariant). Tak napríklad v prípade SKS-6[®] ide prevažne o δ -dikremičitan sodný vzorca $\text{Na}_2\text{Si}_2\text{O}_5 \cdot y\text{H}_2\text{O}$, v prípade SKS-7[®] ide prevažne o β -dikremičitan sodný. Z δ -dikremičitanu sodného vzniká reakciou s kyselinami (napríklad s kyselinou citrónovou alebo uhličitou) kanemit $\text{NaHSi}_2\text{O}_5 \cdot y\text{H}_2\text{O}$, na trhu komerčne dostupný s označením SKS-9[®], prípadne SKS-10[®] (firma Clariant). Výhodné môže byť aj použitie chemických modifikácií týchto vrstevnatých kremičitanov. Možno napríklad vhodne ovplyvniť alkalitu vrstevnatých kremičitanov. Vrstevnaté kremičitany obohatené o fosfát prípadne o karbonát majú v porovnaní s δ -dikremičitanom sodným zmenenú kryštalovú morfológiu, rozpúšťajú sa rýchlejšie a v porovnaní s δ -dikremičitanom sodným majú zvýšenú schopnosť viazať vápnik.

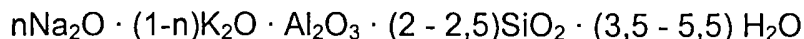
Vrstevnaté kremičitany všeobecného sumárneho vzorca $x \text{ Na}_2\text{O} \cdot y \text{ SiO}_2 \cdot z \text{ P}_2\text{O}_5$, v ktorom pomer x a y zodpovedá číslu 0,35 až 0,6, pomer x a y zodpovedá číslu 1,75 až 1200, a pomer y a z zodpovedá číslu 4 až 2800, boli opísané v patentovej prihláške DE 19601 063.

Rozpustnosť vrstevnatých kremičitanov možno zvýšiť, ak sa použijú vrstevnaté kremičitany s osobitne jemnými čiastočkami. Možno použiť aj zlúčeniny z kryštalických vrstevnatých kremičitanov s inými komponentmi. Uvádzajú sa pritom najmä zlúčeniny s derivátmi celulózy, ktoré majú výhody v dezintegrujúcom účinku a používajú sa osobitne v prácach prostriedkoch vo forme tabliet, ako aj zlúčeniny s polykarboxylátmi, napríklad kyselina citrónová, prípadne polymérne polykarboxyláty, napríklad kopolyméry kyseliny akrylovej.

Použiť možno aj amorfné sodné kremičitany s modulom $\text{Na}_2\text{O}:\text{SiO}_2$ v pomere 1:2 až 1:3,3, výhodne 1:2 až 1:2,8 a osobitne 1:2 až 1:2,6, ktoré majú spomalené rozpúšťanie a majú sekundárne pracie vlastnosti. Spomalené rozpúšťanie v porovnaní s pôvodnými amorfnými sodnými kremičitanmi možno vyvolať rôznymi spôsobmi, napríklad povrchovým spracovaním, zlučovaním, kompaktovaním/-zahustením alebo sušením. V rámci vynálezu výraz "amorfný" znamená aj röntgenovo amorfný. To znamená, že kremičitany v röntgendifrakčných experimentoch nedávajú ostré röntgenreflexy typické pre kryštalické látky, ale nanajvýš jeden alebo viaceré maximá rozptýleného röntgenového žiarenia, ktorých šírka je niekoľko stupňových jednotiek difrakčného uhlu. Môže však viesť k osobitne dobrým vlastnostiam, ak čiastočky kremičitanu v elektróndifrakčných experimentoch dávajú rozmazané alebo dokonca ostré difrakčné maximá. Treba to interpretovať tak, že produkty majú mikrokryštalické oblasti veľkosti 10 až niekoľko 100 nm, pričom sú výhodné hodnoty maximálne do 50 nm a osobitne maximálne do 20 nm. Osobitne výhodné sú zahustené/kompaktované amorfné kremičitany, kompaktované amorfné kremičitany a sušené röntgenamorfné kremičitany.

Voliteľne použiteľný mikrokryštalický syntetický zeolit obsahujúci naviazanú vodu je výhodne zeolit A a/alebo P. Ako zeolit P je osobitne výhodný zeolit MAP® (komerčný produkt firmy Crosfield). Vhodný je však aj zeolit X ako aj zmesi zeolitu A, X a/alebo P. Komerčne dostupný a podľa vynálezu výhodne použiteľný je napríklad aj ko-kryštalizát zeolitu X a zeolitu A (približne 80 % hmotnostných zeolitu

X), ktorý vyrába firma CONDEA Augusta S.p.A. s obchodným označením VEGOBOND AX® a ktorý možno vyjadriť vzorcom



Priemerná veľkosť častíček vhodných zeolitov je menej ako 10 μm (rozdelenie objemu; spôsob merania: Coulter Counter) a obsahujú 18 až 22 % hmotnostných, osobitne 20 až 22 % hmotnostných naviazanej vody.

Samozrejme možné je aj použitie všeobecne známych fosfátov ako builderových látok, pokiaľ sa dajú z ekologických dôvodov použiť. Medzi veľkým počtom komerčne dostupných fosfátov majú v priemysle čistiacich prostriedkov najväčší význam fosfáty alkalických kovov, najvýhodnejšie pentanátrium- prípadne pentakáliumtrifosfát (nátrium- prípadne káliumtripolyfosfát).

Fosfáty alkalických kovov sú pritom sumárnym označením solí alkalických kovov (osobitne sodíka a draslíka) rôznych fosforečných kyselín, ktoré možno rozdeliť okrem zástupcov s vyššou molekulárnou hmotnosťou na kyseliny metafosforečné $(\text{HPO}_3)_n$ a ortofosforečné H_3PO_4 . Fosfáty pritom v sebe spájajú viaceré výhody. Pôsobia ako alkalické nosiče, zabraňujú ukladaniu vápnika na časti strojov prípadne inkrustácii vápnika v tkanivách a okrem toho majú aj čistiaci účinok.

Hydrogenfosforečnan sodný NaH_2PO_4 existuje vo forme dihydrátu (hustota $1,91 \text{ g.cm}^{-3}$, teplota topenia 60°C) a vo forme monohyrátu (hustota $2,04 \text{ g.cm}^{-3}$). Obe soli sú biele, vo vode veľmi ľahko rozpustné prášky, ktoré počas ohrievania strácajú kryštalickú vodu a pri 200°C prechádzajú na slabo kyslý difosforečnan (hydrogenfosforečnan disodný, $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$), pri vyššej teplote na trimetafosforečnan sodný ($\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$) a Maddrellovu soľ (pozri nižšie). NaH_2PO_4 reaguje kyslo; vzniká vtedy, keď kyselina fosforečná sa lúhom sodným nastaví na hodnotu pH 4,5 a zmes sa rozstrieka. Dihydrogenfosforečnan draselný (primárny alebo jednomocný fosforečnan draselný, bifosforečnan draselný, KDP), KH_2PO_4 , je biela soľ s hustotou $2,33 \text{ g.cm}^{-3}$, má teplotu topenia 253°C [rozklad za tvorby polyfosfátu draselného $(\text{KPO}_3)_x$] a vo vode je ľahko rozpustný.

Hydrogenfosforečnan disodný (sekundárny fosforečnan sodný), Na_2HPO_4 , bezfarebná, vo vode veľmi ľahko rozpustná kryštalická soľ. Existuje v bezvodej forme a s 2 molmi vody (hustota $2,066 \text{ g.cm}^{-3}$, strata vody pri 95°C), 7 molmi vody

(hustota $1,68 \text{ g.cm}^{-3}$, teplota topenia 48°C pri strate $5 \text{ H}_2\text{O}$) a 12 molmi vody (hustota $1,52 \text{ g.cm}^{-3}$, teplota topenia 35°C pri strate $5 \text{ H}_2\text{O}$), sa pri 100°C stáva bezvodou a pri silnom ohriatí prechádza na difosforečnan $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$. Hydrogenfosforečnan disodný sa pripravuje neutralizáciou kyselinou fosforečnej s roztokom sódy s použitím fenolftaleínu ako indikátora. Hydrogenfosforečnan didraselný (sekundárny alebo dvojmocný fosforečnan draselný), K_2HPO_4 je amorfná, biela soľ, ktorá sa vo vode ľahko rozpúšťa.

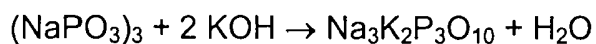
Fosforečnan sodný, terciárny fosforečnan sodný, Na_3PO_4 , tvorí bezfarebné kryštály, ktoré vo forme dodekahydrátu majú hustotu $1,62 \text{ g.cm}^{-3}$ a teplotu topenia 73 až 76°C (rozklad), vo forme dekahydrátu (zodpovedajúci 19 až 20% P_2O_5) má teplotu topenia 100°C a v bezvodej forme (zodpovedajúci 39 až 40% P_2O_5) má hustotu $2,536 \text{ g.cm}^{-3}$. Fosforečnan sodný je vo vode s alkalickou reakciou ľahko rozpustný a pripravuje sa odparením roztoku presne 1 mol fosforečnanu disodného a 1 mol NaOH . Fosforečnan draselný (terciárny alebo trojmocný fosforečnan draselný), K_3PO_4 je biely, zrnitý prášok hustoty $2,56 \text{ g.cm}^{-3}$ s teplotou topenia 1340°C a je vo vode s alkalickou reakciou ľahko rozpustný. Vzniká napríklad pri ohrievaní Thomasovej škvary s uhlíkov a síranom draselným. Napriek vyššej cene sú v priemysle čistiacich prostriedkov oveľa výhodnejšie ľahko rozpustné a tým aj vysoko účinné fosforečnany draselné oproti zodpovedajúcim sodným zlúčeninám.

Difosforečnan štvorsodný (pyrofosforečnan sodný), $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, existuje v bezvodej forme (hustota $2,534 \text{ g.cm}^{-3}$, teplota topenia 988°C , udáva sa aj 880°C) a vo forme dekahydrátu (hustota $1,815$ až $1,836 \text{ g.cm}^{-3}$, teplota topenia 94°C pri strate vody). Obe látky sú bezfarebné, vo vode s alkalickou reakciou rozpustné kryštály. $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ vzniká ohrievaním fosforečnanu disodného na teplotu nad 200°C , alebo ak sa kyselina fosforečná zmieša so sódou v stechiometrickom pomere a zmes odvodní rozstrekávaním. Dekahydrát komplexuje soli ťažkých kovov a tvrdiacich faktorov, čím znižuje tvrdosť vody. Difosforečnan draselný (pyrofosforečnan draselný), $\text{K}_4\text{P}_2\text{O}_7$, existuje vo forme trihydrátu ako bezfarebný, hygroskopický prášok s hustotou $2,33 \text{ g.cm}^{-3}$, ktorý je vo vode rozpustný, pričom pH 1%-ného roztoku je pri 25°C $10,4$.

Kondenzáciou NaH_2PO_4 , prípadne KH_2PO_4 vznikajú sodíkové a draslíkové fosfáty s vyššou molekulovou hmotnosťou, u ktorých sa rozlišujú cyklickí

zástupcovia, čiže natrium- prípadne káliummetafosfáty, a reťazovité typy, čiže natrium- prípadne káliumpolyfosfáty. Osobitne pre druhú skupinu sa používa veľký počet rôznych označení, ako napríklad tavené alebo žíhané fosforečnany, Grahamova soľ, Kurrolova soľ a Maddrelllova soľ. Všetky vyššie sodné a draselné fosfáty sa spoločne označujú ako kondenzované fosfáty.

Technicky dôležitý trifosforečnan pentasodný, $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ (polyfosforečnan sodný), je bezvodá alebo kryštalizujúca so 6 H_2O , nehygroskopická, biela soľ rozpustná vo vode, všeobecného vzorca $\text{NaO}[\text{P}(\text{O})(\text{ONa})\text{O}]_n\text{Na}$, kde $n = 3$. V 100 g vody sa pri izbovej teplote rozpustí približne 17 g, pri 60 °C približne 20 g, pri 100 °C približne 32 g kryštalickej bezvodej soli; po dvojhodinovom ohrievaní roztoku na 100 °C hydrolýzou vznikne približne 8 % ortofosfátu a 15 % difosfátu. Pri príprave trifosforečnanu pentasodného sa kyselina fosforečná uvedie do reakcie s roztokom sódy alebo s lúhom sodným v stechiometrickom pomere a roztok sa odvodní rozstrekávaním. Podobne ako Grahamova soľ a difosforečnan sodný, trifosforečnan pentasodný rozpúšťa mnohé nerozpustné zlúčeniny kovov (aj vápenaté mydlá atď.). Trifosforečnan pentadraselný, $\text{K}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ (tripolyfosforečnan draselný) prichádza na trh napríklad vo forme 50%-ného (hmotnostných %) (> 23 % P_2O_5 , 25 % K_2O). Polyfosforečnany draselné majú v priemysle pracích a čistiacich prostriedkov široké použitie. Ďalej existujú aj tripolyfosforečnany draselno-sodné, ktoré možno tiež použiť v rámci tohto vynálezu. Vznikajú napríklad hydrolýzou trimetafosforečnanu sodného s KOH:



Možno ich použiť podľa vynálezu práve ako tripolyfosforečnan sodný, tripolyfosforečnan draselný alebo ako zmesi oboch; podľa vynálezu možno použiť aj zmesi tripolyfosforečnanu draselného a tripolyfosforečnanu sodnodraselného alebo zmesi tripolyfosforečnanu draselného a tripolyfosforečnanu sodnodraselného alebo zmesi tripolyfosforečnanu sodného a tripolyfosforečnanu draselného a tripolyfosforečnanu sodnodraselného.

Ako organické ko-buildery možno v pracích a čistiacich prostriedkoch podľa vynálezu použiť osobitne polykarboxyláty alebo polykarboxylové kyseliny,

polymérne polykarboxyláty, kyselinu polyasparágovú, polyacetáty, voliteľne oxidované dextríny, ďalšie organické ko-buildery (pozri nižšie), ako aj fosfonáty. Tieto skupiny látok sú opísané nižšie.

Použiteľné organické podporné látky sú napríklad polykarboxylové kyseliny vo forme sodných solí, pričom polykarboxylové kyseliny znamenajú také karboxylové kyseliny, ktoré majú viac ako jednu kyselinovú funkciu. Je to napríklad kyselina citrónová, adipová, jantárová, glutarová, jablčná, vínna, maleínová, fumárová, cukrová, aminokarboxylové kyseliny, kyselina nitrilotrioctová (NTA), pokiaľ je ich použitie z ekologických dôvodov možné. Výhodné soli sú soli polykarboxylových kyselín, ako je napríklad kyselina citrónová, adipová, jantárová, glutárová, vínna, cukrová a ich zmesi.

Možno použiť aj samotné kyseliny. Popri svojom účinku ako buildery majú typicky aj vlastnosť kysliaceho komponentu a slúžia tak aj na úpravu nízkeho a mierneho pH prací alebo čistiacich prostriedkov, pokiaľ sa nevyžaduje pH vytvorené zmiešaním ostatných komponentov. Osobitne je potrebné uviesť kyseliny vhodné z hľadiska systému aj životného prostredia, ako je napríklad kyselina citrónová, octová, vínna, jablčná, mliečna, glykolová, jantárová, glutárová, adipová, glukónová a ich ľubovoľné zmesi. Ako regulátory pH však môžu slúžiť aj minerálne kyseliny, osobitne kyselina sírová alebo zásady, osobitne alkalické alebo amónne hydroxidy. Takéto regulátory sú v prostriedkoch podľa vynálezu prítomné v množstve výhodne nepresahujúce 20 % hmotnostných, výhodne 1,2 % hmotnostných až 17 % hmotnostných.

Ako buildery sú vhodné ďalšie polymérne polykarboxyláty, sú to napríklad soli alkalických kovov polyakrylových kyselín alebo polymetakrylových kyselín, napríklad kyselín s relatívnou molekulovou hmotnosťou 500 až 70000 g/mol.

U mólových hmotností uvedených pre polymérne polykarboxyláty ide v zmysle vynálezu o stredne veľké mólové hmotnosti M_w danej formy kyseliny, ktoré sa určovali prostredníctvom gélovej permeačnej chromatografie (GPC) s použitím UV detektora. Meranie sa uskutočnilo voči štandardu externej polyakrylovej kyseliny, ktorý na základe svojej štruktúrnej príbuznosti s vyšetrovanými polymermi poskytuje realistické hodnoty mólových hmotností. Tieto údaje sa výrazne líšia od údajov mólových hmotností, u ktorých sa ako štandard používajú polystyrol-

sulfónové kyseliny. Mólové hmotnosti namerané voči polystyrolsulfónovým kyselinám sú spravidla výrazne vyššie ako mólové hmotnosti udávané podľa vynálezu.

Vhodné polyméry sú osobitne polyakryláty, ktorých molekulová hmotnosť je výhodne 2000 až 20000 g/mol. Pre dobrú rozpustnosť z tejto skupiny môžu byť výhodné polyakryláty s krátkym reťazcom, ktoré majú mólovú hmotnosť 2000 až 10000 g/mol, a najvýhodnejšie 3000 až 5000 g/mol.

Okrem toho sú vhodné kopolymérne polykarboxyláty, osobitne kopolymérne polykarboxyláty kyseliny akrylovej s kyselinou metakrylovou a kyseliny akrylovej alebo metakrylovej s kyselinou maleínovou. Zistilo sa, že osobitne výhodné sú kopolyméry kyseliny akrylovej a kyselinou maleínovou, ktoré obsahujú 50 až 90 % hmotnostných kyseliny akrylovej a 50 až 10 % hmotnostných kyseliny maleínovej. Ich relatívna molekulová hmotnosť vo vzťahu k voľným kyselinám je všeobecne 2000 až 70000 g/mol, výhodne 20000 až 50000 g/mol a najvýhodnejšie 30000 až 40000 g/mol. (Ko-)polymérne polykarboxyláty možno použiť vo forme prášku alebo vo forme vodného roztoku. Obsah (ko-)polymérnych polykarboxylátov v prostriedkoch môže byť 0,5 až 20 % hmotnostných, výhodne 1 až 10 % hmotnostných.

Na zlepšenie rozpustnosti vo vode môžu polyméry obsahovať aj alyl-sulfónové kyseliny, ako napríklad kyselinu alyloxybenzénsulfónovú a kyselinu metalylsulfónovú vo forme monoméru.

Osobitne výhodné sú aj biologicky odbúrateľné polyméry pozostávajúce z viac ako dvoch rôznych monomérnych jednotiek, napríklad také, ktoré ako monoméry obsahujú soli kyseliny akrylovej a kyseliny maleínovej, ako aj vinylalkohol prípadne deriváty vinylalkoholu, alebo ako monoméry obsahujú soli kyseliny akrylovej a kyseliny 2-alkylalylsulfónovej ako aj deriváty cukru.

Ďalšie výhodné kopolyméry sú také, ktoré ako monoméry obsahujú výhodne akroleín a soli kyseliny akrylovej/akrylovej, prípadne akroleín a vinylacetát.

Ako ďalšie výhodné builderové látky je potrebné uviesť aj polymérne aminodikarboxylové kyseliny, ich soli alebo ich prekursor. Osobitne výhodné sú polyasparágové kyseliny prípadne ich soli a deriváty.

Ďalšie výhodné builderové látky sú polyacetály, ktoré možno získať prekonvertovaním dialdehydov s polyolkarboxylovými kyselinami, ktoré majú 5 až 7 atómov uhlíka a aspoň 3 hydroxylové skupiny. Výhodné polyacetály sa získajú z dialdehydov ako je napríklad glyoxál, glutaraldehyd, tereftalaldehyd ako aj ich zmesi, a z polyolkarboxylových kyselín, ako je napríklad kyselina glukónová a/alebo kyselina glukohéptónová.

Ďalšie vhodné organické builderové látky sú dextríny, napríklad oligoméry prípadne polyméry uhľohydrátov, ktoré možno získať parciálnou hydrolýzou škrobov. Hydrolýza sa môže uskutočniť obyčajnou, napríklad kyslou alebo enzymatickou katalýzou. Výhodne ide o produkty hydrolýzy so strednou mólovou hmotnosťou v rozsahu 400 až 500000 g/mol. Výhodný pritom je polysacharid s dextrózovým ekvivalentom (DE) v rozsahu 0,5 až 40, osobitne 2 až 30, pričom DE je užitočným merítkom redukčného pôsobenia polysacharidu v porovnaní s dextrózou, ktorej DE je 100. Použiť sa môžu jednak maltodextríny s DE medzi 3 až 20, jednak suché glukózové sirupy s DE medzi 20 až 37, ako aj takzvané žlté dextríny a biele dextríny s vyššími mólovými hmotnosťami v rozsahu 2000 až 30000 g/mol.

V prípade oxidovaných derivátov takýchto dextrínov ide o produkty konverzie s oxidačnými činidlami, ktoré sú schopné oxidovať aspoň jednu alkoholovú funkciu sacharidínového kruhu na funkciu karboxylovej kyseliny. Osobitne výhodné organické buildery pre prostriedky podľa vynálezu sú oxidované škroby, prípadne ich deriváty z patentových prihlášok EP 472 042, WO 97/25399, a EP 755 944.

Ďalšími vhodnými ko-buildermi sú aj oxydijantarany a iné deriváty dijantaranov, výhodne etyléndiamíndijantaran. Pritom etyléndiamín-*N,N'*-dijantaran (EDDS) je výhodný vo forme sodných alebo horečnatých solí. Okrem toho sú v tejto súvislosti výhodné aj glyceríndijantarany a glyceríntrijantarany. Vhodné množstvá na použitie v prostriedkoch obsahujúcich zeolity a/alebo kremičitany sú 3 až 15 % hmotnostných.

Ďalšie použiteľné organické ko-buildery sú napríklad acetylované hydroxykarboxylové kyseliny prípadne ich soli, ktoré môžu byť prítomné voliteľne aj vo forme laktónu a ktoré obsahujú aspoň 4 atómy uhlíka a aspoň jednu hydroxy-skupinu, ako aj maximálne dve kyselinové skupiny.

Ďalšou skupinou látok s vlastnosťami ko-builderov sú fosfonáty. Ide pritom osobitne o hydroxyalkán- prípadne aminoalkánfosfonáty. Medzi hydroxyalkánfosfonátmi má osobitný význam ako ko-builder 1-hydroxyetán-1,1-difosfonát (HEDP). Použije sa výhodne vo forme sodnej soli, pričom disodná soľ reaguje neutrálne a štvorsodná soľ reaguje alkalicky (pH 9). Ako aminoalkánfosfonát prichádza do úvahy výhodne etyléndiamíntetrametylénfosfonát (EDTMP), dietylén-triamínpentametylénfosfonát (DTPMP) ako aj ich vyššie homológy. Použijú sa výhodne vo forme neutrálne reagujúcej sodnej soli, napríklad ako šesťsodná soľ EDTMP prípadne ako hepta- a oktasodná soľ DTPMP. Ako builder sa zo skupiny fosfonátov výhodne použije HEDP. Okrem toho aminoalkánfosfonáty majú aj výraznú schopnosť viazať ťažké kovy. Podľa toho môže byť výhodné, osobitne ak prostriedky obsahujú a bielidlá, použiť aminoalkánfosfonáty, výhodnejšie DTPMP, alebo použiť zmesi uvedených fosfonátov.

Okrem toho možno použiť všetky zlúčeniny, ktoré sú schopné vytvárať komplexy s iónmi alkalických zemín.

Obsah builderových látok môže byť v prostriedkoch podľa vynálezu voľiteľne až 90 % hmotnostných. Ich obsah je výhodne až 75 % hmotnostných. Pracie prostriedky podľa vynálezu obsahujú buildery osobitne v množstve 5 % hmotnostných až 50 % hmotnostných. V čistiacich prostriedkoch podľa vynálezu určené na tvrdé povrchy, osobitne na automatické čistenie riadu, je obsah builderových látok osobitne 5 % hmotnostných až 88 % hmotnostných, pričom v takýchto prostriedkoch sa výhodne nepoužijú nijaké builderové materiály nerozpustné vo vode. Vo výhodnej forme uskutočnenia prostriedkov podľa vynálezu osobitne na použitie na automatické čistenie riadu je obsah organických builderov rozpustných vo vode, osobitne alkalického citrátu, 20 % hmotnostných až 40 % hmotnostných, 5 % hmotnostných až 15 % hmotnostných alkalického uhličitanu a 20 % hmotnostných až 40 % hmotnostných alkalického dikremičitanu.

Riedidlá, ktoré sa môžu použiť v tekutých až gélových formuláciách pracích a čistiacich prostriedkov, pochádzajú napríklad zo skupiny jedno- alebo viacmocných alkoholov, alkanolamínov alebo glykoléterov, pokiaľ sú v udanom koncentračnom rozsahu miešateľné s vodou. Zvolené riedidlo je výhodne etanol, *n*- alebo izopropanol, butanol, etylénglykolmetyléter, etylénglykoletyléter, etylénglykolpropyléter,

etylénglykolmono-*n*-butyléter, dietylénglykol-metyléter, dietylénglykoetyléter, propylénglykolmetyl-, -etyl- alebo -propyléter, dipropylénglykolmonometyl- alebo -etyléter, di-izopropylénglykolmonometyl- alebo -etyléter, metoxy-, etoxy- alebo butoxytriglykol, 1-butoxyetoxy-2-propanol, 3-metyl-3-metoxybutanol, propylénglykol-*terc*-butyléter ako aj zmesi týchto riedidiel.

Riedidlá v tekutých až gélových pracích a čistiacich prostriedkoch podľa vynálezu môžu byť prítomné v množstve 0,1 až 20 % hmotnostných, výhodne však pod 15 % hmotnostných, a osobitne výhodne pod 10 % hmotnostných.

Na nastavenie viskozity formulácie podľa vynálezu možno primiešať jedno alebo viaceré zahusťovacie prostriedky, prípadne zahusťovacie systémy. Tieto vysokomolekulové látky, nazývané aj prostriedky na napučanie, väčšinou nasávajú kvapaliny a pritom napučiavajú, a nakoniec prechádzajú do hustých, skutočných alebo koloidných roztokov.

Vhodné zahusťovacie prostriedky sú anorganické alebo polymérne organické zlúčeniny. Anorganické zahusťovacie prostriedky sú napríklad polykremičité kyseliny, ílové minerály ako sú napríklad montmorillonity, zeolity, kremičité kyseliny a bentonity. Organické zahusťovacie prostriedky pochádzajú zo skupiny prirodzených polymérov, odvodených prírodných polymérov a plne syntetických polymérov. Takéto polyméry pochádzajúce z prírody sú napríklad agar-agar, karagen, tragant, arabská guma, algináty, pektíny, polyózy, guarová múčka, múčka z chlebovníka, škroby, dextríny, želatíny a kazeín. Odvodené prírodné látky, ktoré možno použiť ako zahusťovací prostriedok, pochádzajú predovšetkým zo skupiny modifikovaných škrobov a celulóz. Ako príklady sa tu uvádzajú karboxymetylcelulóza a iné celulózové étery, hydroxyetyl a -propylcelulóza, ako aj étery z jadrovej múčky. Plne syntetické zahusťovacie prostriedky sú polyméry, ako sú napríklad polyakrylové a polymetakrylové zlúčeniny, vinylpolyméry, polykarboxylové kyseliny, polyétery, polyimíny, polyamidy a polyuretány.

Obsah zahusťovacích prostriedkov môže byť až 5 % hmotnostných, výhodne 0,05 až 2 % hmotnostné, a osobitne výhodne 0,1 až 1,5 % hmotnostných v hotovom prostriedku.

Prací a čistiaci prostriedok podľa vynálezu môže voliteľne obsahovať aj ďalšie bežné komponenty, sekvestračné prostriedky, elektrolyty a ďalšie pomocné

látky, ako sú napríklad optické zjasňovacie prostriedky, inhibítory zosivenia, inhibítory striebornej korózie, inhibítory zmeny farebnosti, protipenové prostriedky, abrazívne látky, farebné a/alebo aromatické látky, ako aj mikrobiálne účinné látky a/alebo látky absorbujúce UV svetlo.

Pracie prostriedky na textil podľa vynálezu môžu ako optické zjasňovacie prostriedky obsahovať deriváty kyseliny diaminostilbendisulfónovej, prípadne ich soli alkalických kovov. Vhodné sú napríklad soli kyseliny 4,4'-bis(2-anilino-4-morfolino-1,3,5-triazinyl-6-amino)stilben-2,2'-disulfónovej alebo zlúčeniny s podobnou štruktúrou, ktoré namiesto morfolinoskupiny majú dietanolamínoskupinu, metylamínoskupinu, anilínoskupinu alebo 2-metoxetylaminoskupinu. Okrem toho môžu byť prítomné zjasňovacie prostriedky typu substituovaných difenylstyrollov, napríklad alkalické soli 4,4'-bis(2-sulfostyryl)-difenylu, 4,4'-bis(4-chlór-3-sulfostyryl)-difenylu, alebo 4-(4-chlórstyryl)-4'-(2-sulfostyryl)-difenylu. Možno použiť aj zmesi uvedených optických zjasňovacích prostriedkov.

Úlohou inhibítorov zosivenia je udržať znečistenie rozpustené z textilných vlákien suspendované v kúpeli. Vhodné sú na to koloidy väčšinou organickej povahy rozpustné vo vode, napríklad škrob, glej, želatína, soli éterkarboxylových kyselín alebo étersulfónových kyselín škrobu alebo celulózy, alebo soli kyslých esterov kyseliny sírovej celulózy alebo škrobu. Na tento účel sú vhodné aj polyamidy obsahujúce kyslé skupiny rozpustné vo vode. Okrem toho možno použiť aj iné ako vyššie uvedené deriváty škrobu, napríklad aldehydové škroby. Výhodne možno použiť celulozoétery, ako je napríklad karboxymetylcelulóza (sodná soľ), metylcelulóza, hydroxyalkylcelulóza a zmesné étery, ako je napríklad metylhydroxyetylcelulóza, metylhydroxypropylcelulóza, metylkarboxymetylcelulóza a ich zmesi, napríklad v množstve 0,1 až 5 % hmotnostných vo vzťahu k hotovému prostriedku.

Na ochranu proti striebornej korózii možno v čistiacich prostriedkoch na riad použiť inhibítory striebornej korózie. Takéto inhibítory sú známe zo stavu techniky, napríklad benzotriazoly, chlorid železitý alebo CaSO_4 . Podľa európskeho patentu EP 0 736 084 B1 sú na spoločné použitie s enzýmami zvlášť vhodné inhibítory striebornej korózie soli a/alebo komplexy mangánu, titanu, zirkónu, hafnia, vanádia, kobaltu alebo céria, v ktorých uvedené kovy sú dvoj-, troj-, štvor-, päť- alebo

šesťmocné. Príklady takýchto zlúčenín sú MnSO_4 , V_2O_5 , V_2O_4 , VO_2 , TiOSO_4 , K_2TiF_6 , K_2ZrF_6 , $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_3$, ako aj ich zmesi.

Účinné látky "soil-release" alebo "soil-repellents" sú väčšinou polyméry, ktoré pri použití v pracom prostriedku dodávajú vláknam prádla vlastnosti odpudzujúce znečistenie a/alebo podporujú schopnosť ostatných komponentov pracieho prostriedku znečistenie rozpúšťať. Porovnateľný účinok možno pozorovať aj pri ich použití v čistiacich prostriedkoch na tvrdé povrchy.

Osobitne účinné a už dávno známe účinné látky "soil-release" sú kopolyestery s jednotkami dikarboxylových kyselín, alkylénglykolov a polyalkylénglykolov. Príklady sú kopolyméry alebo zmiešané polyméry z polyetyléntereftalátu a polyoxyetylénglykolu (DT 16 17 141, prípadne DT 22 00 911). V nemeckom patente DT 22 53 063 sú uvedené kyslé prostriedky, ktoré okrem iných obsahujú kopolymér z dibázickej karboxylovej kyseliny a z alkylén- alebo cykloalkylénpolyglykolu. Polyméry z etyléntereftalátu a polyetylénoxid-tereftalátu a ich použitie v pracích prostriedkoch sú opísané v nemeckých patentoch DE 28 57 292 a DE 33 24 258 a v európskom patente EP 0 253 567. Európsky patent EP 066 944 sa týka prostriedkov, ktoré obsahujú ko-polyester z etylénglykolu, polyetylénglykolu, aromatickej dikarboxylovej kyseliny a sulfónovanej aromatickej dikarboxylovej kyseliny v určitých mólových pomeroch. Z európskeho patentu EP 0 185 427 sú známe polyestery na koncoch uzavreté metylovou alebo etylovou skupinou s etylén- a/alebo propylén-tereftalátovými jednotkami a s polyetylénoxid-tereftalátovými jednotkami a pracie prostriedky, ktoré obsahujú takéto soil-release polyméry. Európsky patent EP 0 241 984 sa týka polyesteru, ktorý okrem oxyetylénových skupín a jednotiek kyseliny tereftalátovej obsahuje aj substituované etylénové jednotky ako aj glycerínové jednotky. Z európskeho patentu EP 0 241 985 sú známe polyestery, ktoré okrem oxyetylénových skupín a jednotiek kyseliny tereftalátovej obsahujú 1,2-propylén-, 1,2-butylén- a/alebo 3-metoxi-1,2-propylénové skupiny ako aj jednotky glycerínu a koncové skupiny sú uzavreté C_1 až C_4 alkylovými skupinami. Z európskej patentovej prihlášky EP 0 272 033 sú známe polyestery na koncoch uzavreté C_{1-4} -alkylovými alebo acylovými zvyškami s jednotkami polypropyléntereftalátu a polyoxyetyléntereftalátu. Európsky patent EP 0 274 907 opisuje soil-release polyestery s obsahom tereftalátu na koncoch

uzavreté sulfoetylovými skupinami. Podľa európskej patentovej prihlášky EP 0 357 280 sa pripravujú sulfonáciou nenasýtených koncových skupín soil-release polyesterov s jednotkami tereftalátu, alkylénglykolu a poly-C₂₋₄-glykolu. Medzinárodná patentová prihláška WO 95/32232 sa týka kyslých, aromatických polyesterov so schopnosťou rozpúšťať znečistenie. Z medzinárodnej patentovej prihlášky WO 97/31085 sú známe nepolymérne soil-repellent účinné látky s viacerými funkčnými jednotkami na bavlnené materiály: prvá jednotka, ktorá môže byť napríklad kationová, je usporiadaná na adsorpciu na bavlnený povrch vzájomným elektrostatickým pôsobením, a druhá jednotka, ktorá je hydrofóbná, je zodpovedná za zotrvanie účinnej látky na rozhraní voda/bavlna.

K inhibítorom zmeny farebnosti, ktoré prichádzajú do úvahy na použitie v pracích prostriedkoch na textílie podľa vynálezu, patria osobitne polyvinylpyrolidóny, polyvinylimidazoly, polymérne *N*-oxidy ako je napríklad poly-(vinylpyridín-*N*-oxid) a kopolyméry vinylpyrolidónu s vinylimidazolom.

Pri použití v automatickom spôsobe čistenia môže byť výhodné pridať do týchto prostriedkov protipenové prostriedky. Ako protipenové prostriedky sú vhodné napríklad mydlá prirodzeného alebo syntetického pôvodu, ktoré majú vysoký podiel C₁₈-C₂₄ mastných kyselín. Vhodné netenzidové protipenové prostriedky sú napríklad organopolysiloxány a ich zmesi s mikrojemnou, voliteľne silanizovanou kyselinou kremičitou, ako aj parafíny, vosky, mikrokryštalické vosky a ich zmesi so silanizovanou kyselinou kremičitou alebo bistearyletyléndiamidom. Výhodne možno použiť aj zmesi z rôznych protipenových prostriedkov, napríklad zmesi zo silikónov, parafínov alebo voskov. Protipenové prostriedky, osobitne protipenové prostriedky obsahujúce silikón a/alebo parafín, sú výhodne naviazané na granulárny, vo vode rozpustný prípadne dispergovateľný nosič. Osobitne výhodné sú pritom zmesi parafínov a bistearyletyléndiamidov.

Čistiaci prostriedok podľa vynálezu na tvrdé povrchy môže okrem toho obsahovať abrazívne pôsobiace komponenty, osobitne zo skupiny kremičitých múčok, drevných múčok, múčok z umelých hmôt, kried a mikrosklených guľôčok, ako aj ich zmesi. Obsah abrazívnych látok v čistiacich prostriedkoch podľa vynálezu výhodne nie je vyšší ako 20 % hmotnostných, výhodnejšie je 5 % hmotnostných až 15 % hmotnostných.

Farebné a aromatické látky sa pridávajú do pracích a čistiacich prostriedkov na zlepšenie estetického dojmu produktov a aby spotrebiteľ dostal k dispozícii okrem pracieho a čistiaceho výkonu aj vizuálne a senzoricky "typický a nezameniteľný" produkt. Ako parfumové oleje prípadne aromatické látky možno použiť jednotlivé aromatické zlúčeniny, napríklad syntetické produkty typu esterov, éterov, aldehydov, ketónov, alkoholov a uhľovodíkov. Aromatické zlúčeniny typu esterov sú napríklad benzylacetát, fenoxetylizobutyrate, *p*-*tert*-butylcyklohexylacetát, linalylacetát, dimetylbenzyl-karbonylacetát, fenyletylacetát, linalylbenzoát, benzylformiát, etylmetylfenyl-glycinát, alkyklohexylpropionát, styrylpropionát a benzylsalicylát. Medzi étery patrí napríklad benzyletyléter, medzi aldehydy patria napríklad lineárne alkanály s 8 až 18 atómami uhlíka, citral, citronelal, citronelyloxyacetaldehyd, cyklámenaldehyd, hydroxycitronelal, lilial a bourgeonal, medzi ketóny patria napríklad jonóny, α -izometylionón a metyl-cedrylketón, medzi alkoholy patrí anetol, citronelol, eugenol, geraniol, linalool, fenyletylalkohol a terpineol, k uhľovodíkom patria hlavne terpény ako je napríklad limonen a pinen. Výhodne sa však použijú zmesi rôznych aromatických látok, ktoré spolu vytvoria príjemnú vôňu. Takéto parfumové oleje môžu obsahovať aj prírodne zmesi aromatických látok, ktoré sú dostupné z rastlinných zdrojov, ako je napríklad borovicový, citrusový, jazmínový, pačuli, ružový alebo ylangový olej. Taktiež je vhodný muškátový olej, šalviový olej, rumančekový olej, klinčekový olej, medovkový olej, mäťový olej, škoricový olej, olej z lipového kvetu, borievkový olej, vetiverový olej, olibanový olej, galbanový olej alabdanový olej, ako aj olej z kvetov pomarančovníka, neroliol, olej z pomarančovej kôrky a santálový olej. Obsah farbív v pracích a čistiacich prostriedkoch je obyčajne nižší ako 0,01 % hmotnostných, kým aromatické látky môžu tvoriť až 2 % hmotnostné celkového prostriedku.

Aromatické látky možno zapracovať priamo do pracích a čistiacich prostriedkov, výhodné však môže byť aj naviazať aromatické látky na nosiče, ktoré zosilnia ukotvenie parfumu na čistený materiál a pomalším uvoľňovaním vône zabezpečia dlhotrvajúcu vôňu osobitne ošetrovaných textílií. Ako takéto nosičové materiály sa osvedčili napríklad cyklodextríny, pričom komplexy cyklodextrínu a parfumu môžu byť ešte dodatočne potiahnuté ďalšími pomocnými látkami. Ďalší výhodný nosič aromatických látok je vyššie opísaný zeolit X, ktorý namiesto

tenzidov alebo v zmesi s nimi môže na seba pribrať aj aromatické látky. Výhodné sú preto pracie a čistiace prostriedky, ktoré obsahujú opísaný zeolit X a aromatické látky, ktoré sú výhodne aspoň čiastočne absorbované na zeolity.

Výhodné farbivá, výber ktorých pre odborníka nie je vôbec problémom, majú vysokú skladovateľnosť a necitlivosť voči ostatným komponentom prostriedkov a voči svetlu, ani nijakú výraznú substantivitu voči textilným vláknam, aby ich nezafarbili.

Na boj proti mikroorganizmom môžu pracie a čistiace prostriedky obsahovať antimikrobiálne účinné látky. Podľa antimikrobiálneho spektra a mechanizmu účinku sa rozlišujú bakteriostatické a baktericídne prostriedky, fungistatické a fungicídne prostriedky, atď. Dôležité látky z týchto skupín sú napríklad benzalkóniumchloridy, alkylarylsulfonáty, halogénfenoly a fenolmerkuriacetát. Výrazy antimikrobiálny účinok a antimikrobiálna látka majú v rámci opisu podľa vynálezu obvyklý odborný význam, opísaný napríklad v publikácii K. H. Wallhäußer "Praxis der Sterilisation, Desinfektion - Konservierung: Keimidentifizierung - Betriebshygiene" (5. vydanie, Stuttgart; New York: Thieme, 1995), pričom všetky tam opisované látky možno použiť ako látky s antimikrobiálnym účinkom. Vhodné antimikrobiálne účinné látky sa výhodne volia zo skupiny alkoholov, amínov, aldehydov, antimikrobiálnych kyselín prípadne ich solí, esterov karboxylových kyselín, kyslých amidov, fenolov, fenolových derivátov, difenylov, difenylalkánov, derivátov močoviny, kyslíkových, dusíkových acetálov ako aj formálov, benzamidínov, izotiazolínov, derivátov ftalimidu, pyridínových derivátov, antimikrobiálnych povrchovo aktívnych zlúčenín, guanidínov, antimikrobiálnych amfotérnych zlúčenín, chinolínov, 1,2-dibróm-2,4-dikyanobutánu, jód-2-propyl-butyl-karbamátu, jódu, jodofóru, peroxozlúčenín, halogénových zlúčenín, ako aj ľubovoľné zmesi uvedených zlúčenín.

Antimikrobiálna účinná látka môže pritom byť etanol, *n*-propanol, *i*-propanol, 1,3-butándiol, fenoxyetanol, 1,2-propylénglykol, glycerín, kyselina undecylénová, kyselina benzoová, kyselina salicylová, kyselina dihydracetová, *o*-fenylfenol, *N*-metylmorfolínacetonitril (MMA), 2-benzyl-4-chlórphenol, 2,2'-metylén-bis-(6-bróm-4-chlórphenol), 4,4'-dichlór-2'-hydroxydifenyliéter (dichlosan), 2,4,4'-trichlór-2'-hydroxydifenyliéter (trichlosan), chlórhexidín, *N*-(4-chlórphenyl)-*N*-(3,4-dichlórphenyl)-močovina, *N,N'*-(1,10-dekán-diyldi-1-pyridinyl-4-ylidén)-bis-(1-oktánamín), dihydrochlorid, *N,N'*-

bis-(4-chlórfenyl)-3,12-diimino-2,4,11,13-tetraaza-tetradekándiimidamid, glukoprotamíny, antimikrobiálne povrchovo aktívne kvartérne zlúčeniny, guanidíny včítane bi- a polyguanidínov, ako je napríklad 1,6-bis-(2-etylhexyl-biguanido-hexán), dihydrochlorid, 1,6-di-(N_1, N_1' -fenyldiguanido- N_5, N_5')-hexán, tetrahydrochlorid, 1,6-di-(N_1, N_1' -fenyl- N_1, N_1' -metyldiguanido- N_5, N_5')-hexán, dihydrochlorid, 1,6-di-(N_1, N_1' -o-chlórfenyldiguanido- N_5, N_5')-hexán, dihydrochlorid, 1,6-di-(N_1, N_1' -2,6-dichlórfenyldiguanido- N_5, N_5')-hexán, dihydrochlorid, 1,6-di-[N_1, N_1' -beta-(*p*-metoxyfenyl)-diguanido- N_5, N_5']-hexán, dihydrochlorid, 1,6-di-(N_1, N_1' -alfa-metyl.beta.-fenyldiguanido- N_5, N_5')-hexán, dihydrochlorid, 1,6-di-(N_1, N_1' -*p*-nitrofenyldiguanido- N_5, N_5')-hexán, dihydrochlorid, omega:omega-di-(N_1, N_1' -fenyldiguanido- N_5, N_5')-di-*n*-propyléter, dihydrochlorid, omega:omega'-di-(N_1, N_1' -*p*-chlórfenyldiguanido- N_5, N_5')-di-*n*-propyléter, tetrahydrochlorid, 1,6-di-(N_1, N_1' -2,4-dichlórfenyldiguanido- N_5, N_5')-hexán, tetrahydrochlorid, 1,6-di-(N_1, N_1' -*p*-metylfenyldiguanido- N_5, N_5')-hexán, dihydrochlorid, 1,6-di-(N_1, N_1' -2,4,5-trichlórfenyldiguanido- N_5, N_5')-hexán, tetrahydrochlorid, 1,6-di-[N_1, N_1' -alfa-(*p*-chlórfenyl)-etyldiguanido- N_5, N_5']-hexán, dihydrochlorid, omega:omega-di-(N_1, N_1' -*p*-chlórfenyldiguanido- N_5, N_5')-*m*-xylén, dihydrochlorid, 1,12-di-(N_1, N_1' -*p*-chlórfenyldiguanido- N_5, N_5')-dodekán, dihydrochlorid, 1,10-di-(N_1, N_1' -fenyldiguanido- N_5, N_5')-dekán, tetrahydrochlorid, 1,12-di-(N_1, N_1' -fenyldiguanido- N_5, N_5')-dodekán, tetrahydrochlorid, 1,6-di-(N_1, N_1' -o-chlórfenyldiguanido- N_5, N_5')-hexán, dihydrochlorid, 1,6-di-(N_1, N_1' -o-chlórfenyldiguanido- N_5, N_5')-hexán, tetrahydrochlorid, etylén-bis-(1-tolylbiguanid), etylén-bis-(*p*-tolyl biguanid), etylén-bis-(3,5-dimetylfenylbiguanid), etylén-bis-(*p*-terc-amyľfenylbiguanid), etylén-bis-(nonyľfenylbiguanid), etylén-bis-(fenyľbiguanid), etylén-bis-(*N*-butylfenylbiguanid), etylén-bis-(2,5-dietoxyfenylbiguanid), etylén-bis-(2,4-dimetylfenylbiguanid), etylén-bis-(o-difenylbiguanid), etylén-bis-(mixed amyľnaftylbiguanid), *N*-butyl-etylén-bis-(fenyľbiguanid), trimetylén-bis-(o-tolylbiguanid), *N*-butyl-trimetylén-bis-(fenyľbiguanid) a zodpovedajúce soli ako sú napríklad acetáty, glukonáty, hydrochloridy, hydrobromidy, citráty, bisulfity, fluoridy, polymaleáty, *N*-kokosalkylsarkozináty, fosfity, hypofosfity, perfluóroktanoáty, silikáty, sorbáty, salicyláty, maleáty, vínany, fumaráty, etyléndiamíntetraacetáty, iminodiacetáty, cinamáty, tiokyanáty, argináty, pyromelitáty, tetrakarboxybutyráty, benzoáty, glutaráty, monofluórfosfáty, perfluórpropionáty, ako aj ich ľubovoľné zmesi. Okrem toho sú vhodné halogenované deriváty xylolu a krezolu, ako je

napríklad *p*-chlórmetakrezol alebo *p*-chlórmetaxylool, ako aj prirodzené antimikrobiálne účinné látky rastlinného pôvodu (napríklad z korenín alebo z bylín), živočíšneho ako aj mikrobiálneho pôvodu. Výhodne možno použiť antimikrobiálne pôsobiace povrchovo aktívne kvartérne zlúčeniny, prírodnú antimikrobiálnu účinnú látku rastlinného pôvodu a/alebo prírodnú antimikrobiálnu účinnú látku živočíšneho pôvodu, mimoriadne výhodne aspoň prírodnú antimikrobiálnu účinnú látku rastlinného pôvodu zo skupiny obsahujúcej kofeín, teobromín a teofylín, ako aj éterické oleje ako je napríklad eugenol, tymol a geraniol, a/alebo aspoň jednu prírodnú antimikrobiálnu účinnú látku živočíšneho pôvodu zo skupiny obsahujúcej enzýmy ako je bielkovina z mlieka, lyzozým a laktoperoxidáza, a/alebo aspoň jednu antimikrobiálne pôsobiacu povrchovo aktívnu kvartérnu zlúčeninu s jednou amónnou, sulfóniovou, fosfóniovou, jodóniovou alebo arsóniovou skupinou, peroxozlúčeniny a chlórzlúčeniny. Možno použiť aj látky mikrobiálneho pôvodu, takzvané bakteriocíny.

Kvartérne amónne zlúčeniny (QAV) vhodné ako antimikrobiálne účinné látky majú všeobecný vzorec $(R^1)(R^2)(R^3)(R^4)N^+X^-$, v ktorom R^1 až R^4 znamená rovnaké alebo rôzne C_1 - C_{22} -alkylové zvyšky, C_7 - C_{28} -aralkylové zvyšky alebo heterocyklické zvyšky, pričom dva, alebo v prípade aromatického naviazania ako v pyridíne dokonca tri zvyšky spolu tvoria spolu s atómom dusíka heterocyklu, napríklad pyridíniovú alebo imidazolíniovú zlúčeninu, a X^- znamená halogenidové ióny, sulfátové ióny, hydroxidové ióny alebo podobné anióny. Pre optimálny antimikrobiálny účinok dĺžka reťazca aspoň jedného zo zvyškov má 8 až 18, zvlášť 12 až 16 atómov uhlíka.

QAV možno pripraviť prekonvertovaním terciárnych amínov s alkylačnými činidlami, ako je napríklad metylchlorid, benzylchlorid, dimetylsulfát, dodecylbromid, ale aj etylénoxid. Alkylácia terciárnych amínov s jedným dlhým alkylovým zvyškom a dvoma metylovými skupinami prebieha zvlášť ľahko, aj kvarternáciu terciárnych amínov s dvoma dlhými zvyškami a s jednou metylovou skupinou možno uskutočniť s pomocou metylchloridu v miernych podmienkach. Amíny, ktoré majú tri dlhé alkylové zvyšky alebo hydroxy-substituované alkylové zvyšky, sú málo reaktívne a kvarternujú sa výhodne s dimetylsulfátom.

Vhodné QAV sú napríklad benzalkóniumchlorid (*N*-alkyl-*N,N*-dimetylbenzylamóniumchlorid, CAS č. 8001-54-5), benzalkón B (*m,p*-dichlórbenzyl-dimetyl-C12-alkylamóniumchlorid, CAS č. 58390-78-6), benzoxóniumchlorid (benzyl-dodecyl-bis-(2-hydroxyetyl)-amóniumchlorid), cetrimóniumbromid (*N*-hexadecyl-*N,N*-trimetylamóniumbromid, CAS č. 57-09-0), benzetóniumchlorid (*N,N*-dimetyl-*N*-[2-[2-[*p*-(1,1,3,3-tetrametylbutyl)-fenoxy]etoxy]etyl]-benzylamóniumchlorid, CAS č. 121-54-0), dialkyldimetylamóniumchlorid ako je napríklad di-*n*-decyl-dimetyl-amóniumchlorid (CAS č. 7173-51-5-5), didecyl-di-metylamóniumbromid (CAS č. 2390-68-3), dioktyl-dimetyl-amóniumchlorid, 1-cetylpyridíniumchlorid (CAS č. 123-03-5) a tiazolínjodid (CAS č. 15764-48-1) ako aj ich zmesi. Osobitne výhodné QAV sú benzalkóniumchloridy s C₈-C₁₈-alkylovými zvyškami, osobitne C₁₂-C₁₄-alkylbenzyl-dimetyl-amóniumchlorid.

Benzalkóniumhalogenidy a/alebo substituované benzalkóniumhalogenidy sú napríklad komerčne dostupné ako Barquat[®] firmy Lonza, Marquat[®] firmy Mason, Variquat[®] firmy Witco/Sherex a Hyamine[®] firmy Lonza, ako aj Bardac[®] firmy Lonza. Ďalšie komerčne dostupné antimikrobiálne účinné látky sú *N*-(3-chlóralyl)-hexamíniumchlorid ako je napríklad Dowicide[®] a Dowicil[®] firmy Dow, benzetóniumchlorid ako je napríklad Hyamine[®] 1622 firmy Rohm & Haas, metylbenzetóniumchlorid ako je napríklad Hyamine[®] 10X firmy Rohm & Haas, cetylpyridíniumchlorid ako je napríklad Cepacolchlorid firmy Merrell Labs.

Antimikrobiálne účinné látky sa použijú v množstve 0,0001 % hmotnostných až 1 % hmotnostné, výhodne 0,001 % hmotnostných až 0,8 % hmotnostné, výhodnejšie 0,005 % hmotnostných až 0,3 % hmotnostných, a najvýhodnejšie 0,01 až 0,2 % hmotnostných.

Prostriedky môžu obsahovať látky pohlcujúce UV svetlo (UV absorbery), ktoré sa naviažu na textílie a zlepšujú odolnosť vlákien voči svetlu a/alebo odolnosť iných komponentov formulácie voči svetlu. UV absorbery sú organické látky (ochranný filter proti svetlu), ktoré sú schopné absorbovať ultrafialové svetlo a prijatú energiu vyžarovať vo forme dlhovlnného žiarenia, napríklad tepla.

Zlúčeniny, ktoré majú tieto požadované vlastnosti, sú napríklad bez žiarenia deaktivované účinné zlúčeniny a deriváty benzofenónu so substituentmi v polohe 2 a/alebo 4. Okrem toho sú vhodné aj substituované benzotriazoly, v polohe 3

fenylohm substituované akryláty (deriváty kyseliny škoricovej, voliteľne s kyano-skupinami v polohe 2), salicyláty, organické Ni-komplexy ako aj prírodné látky, ako je napríklad umbeliferón a telu vlastná kyselina urokánová. Osobitný význam majú bifenylové a predovšetkým stilbénové deriváty napríklad podľa opisu v EP 0728749 A a komerčne dostupné ako Tinosorb® FD alebo Tinosorb® FR firmy Ciba. Ako UV-B absorbery sa uvádzajú 3-benzylidengáfor prípadne 3-benzylidennorgáfor a ich deriváty, napríklad 3-(4-metylbenzylidén)gáfor podľa opisu v EP 0693471 B1; deriváty kyseliny 4-aminobenzoovej, výhodne 2-etylhexylester kyseliny 4-(dimetyl-amino)benzoovej, 2-oktylester kyseliny 4-(dimetyl-amino)benzoovej a amylester kyseliny 4-(dimetyl-amino)benzoovej; estery kyseliny škoricovej, výhodne 2-etylhexylester kyseliny metoxyškoricovej, propylester kyseliny 4-metoxyškoricovej, izoamylester kyseliny 4-metoxyškoricovej, 2-etylhexylester kyseliny 2-kyano-3,3-fenylškoricovej (oktokrylén); estery kyseliny salicylovej, výhodne 2-etylhexylester kyseliny salicylovej, 4-izopropylbenzylester kyseliny salicylovej, homomentylester kyseliny salicylovej; deriváty benzofenónu, výhodne 2-hydroxy-4-metoxybenzofenón, 2-hydroxy-4-metoxy-4'-metylbenzofenón, 2,2'-dihydroxy-4-metoxybenzofenón; estery kyseliny benzalmonovej, výhodne di-2-etylhexylester kyseliny 4-metoxybenzmalónovej; deriváty triazínu, ako napríklad 2,4,6-trianilino-(*p*-karbo-2'-etyl-1'-hexyloxy)-1,3,5-triazín a oktyltriazón, podľa opisu v EP 0818450 A1 alebo dioktylbutamidotriazón (Uvasorb® HEB); propán-1,3-dión, ako napríklad 1-(4-*terc*-butylfenyl)-3-(4'-metoxyfenyl)propán-1,3-dión; deriváty ketotricyklo(5.2.1.0)dekánu podľa opisu v EP 0694521 B1. Ďalej sú vhodné kyseliny 2-fenylbenzimidazol-5-sulfónové a ich alkalické soli, soli alkalických zemín, amónne, alkylamónne, alkanolamónne a glukamónne soli; deriváty sulfónových kyselín benzofenónov, výhodne kyselina 2-hydroxy-4-metoxybenzofenón-5-sulfónová a jej soli; deriváty kyseliny sulfónovej 3-benzylidengáfru, ako napríklad kyselina 4-(2-oxo-3-bornylidénmetyl)benzénsulfónová a kyselina 2-metyl-5-(2-oxo-3-bornylidén)-sulfónová a ich soli.

Ako typické UV-A filtre prichádzajú do úvahy osobitne deriváty benzoylmetánu, ako napríklad 1-(4'-*terc*-butylfenyl)-3-(4'-metoxyfenyl)propán-1,3-dión, 4-*terc*-butyl-4'-metoxydibenzoylmetán (Parsol 1789), 1-fenyl-3-(4'-izopropylfenyl)-propán-1,3-dión ako aj enaminové zlúčeniny podľa opisu v DE 19712033 A1

(BASF). UV-A a UV-B filtre môžu samozrejme pozostávať aj v zmesiach. Okrem uvedených rozpustných látok prichádzajú pre tento účel do úvahy aj nerozpustné pigmenty na ochranu proti svetlu, totiž jemne disperzné, výhodne nanoizované oxidy kovov prípadne soli. Príklady vhodných oxidov kovov sú osobitne oxid zinočnatý a oxid titaničitý, a okrem toho oxidy železa, zirkónu, kremíka, mangánu, hliníka a céria, ako aj ich zmesi. Ako soli možno použiť silikáty (mastenec), báriumsulfát alebo stearan zinočnatý. Oxidy a soli sa už používajú vo forme pigmentov do emulzií na ošetrovanie a ochranu pokožky a v dekoratívnej kozmetike. Častice by mali mať pritom stredný priemer menej ako 100 nm, výhodne medzi 5 a 50 nm a osobitne medzi 15 a 30 nm. Môžu mať sférický tvar, možno však použiť aj také častice, ktoré sú elipsoidné alebo sa iným spôsobom odchyľujú od sférického tvaru. Pigmenty môžu mať modifikovaný povrch, to znamená že môžu byť hydrofilizované alebo hydrofobizované. Typické príklady sú potiahnuté oxidy titaničité, ako napríklad oxid titaničitý T 805 (Degussa) alebo Eusolex® T2000 (Merck; ako hydrofóbne poťahovacie prostriedky prichádzajú do úvahy vhodné silikóny a osobitne vhodné trialkoxyoktylsilány alebo simetikóny. Výhodne sa použije mikronizovaný oxid zinočnatý. Ďalšie vhodné UV filtre v prehľadnej publikácii uviedol P. Finkel v SÖFW-Journal 122 (1996), 543.

UV absorbery sa obyčajne použijú v množstve 0,01 % hmotnostných až 5 % hmotnostných, výhodne 0,03 % hmotnostných až 1 % hmotnostné.

Aj v pracích a čistiacich prostriedkoch môžu proteíny podľa vynálezu a/alebo iné proteíny vyžadovať osobitnú ochranu. Prostriedky podľa vynálezu môžu na tento účel obsahovať stabilizátory.

Jednou skupinou stabilizátorov sú reverzibilné inhibítory proteáz, ktoré sa pri riedení prostriedku v pracom kúpeli oddisociujú. Na tento účel bol zavedený benzamidín hydrochlorid a leupeptín. Často sa používa bórax, kyseliny bóru alebo ich soli alebo estery, medzi nimi predovšetkým deriváty s aromatickými skupinami, ako napríklad podľa WO 95/12655 *orto*-substituované, podľa WO 92/19707 *meta*-substituované, a podľa US 5 972 873 *para*-substituované kyseliny fenyloborité, prípadne ich soli alebo estery. V prihláškach WO 98/13460 a EP 583 534 sa opisujú peptidaldehidy, to znamená oligopeptidy s redukovaným C-koncom, a síce oligopeptidy pozostávajúce z 2 až 50 monomérov, na reverzibilnú inhibíciu proteáz

v pracích a čistiacich prostriedkoch. Medzi peptidické reverzibilné inhibítory proteáz patrí okrem iných ovomukoid (WO 93/00418). Napríklad prihláška WO 00/01826 poskytuje špecifické, reverzibilné inhibítory peptidov pre proteázový subtilizín na použitie v prostriedkoch obsahujúcich proteázy, a v WO 00/01831 sa poskytujú zodpovedajúce fúzne proteíny z proteázy a inhibitor.

Ďalšie stabilizátory enzýmov sú aminoalkoholy ako je napríklad mono-, di-, trietanol- a -propanolamín a ich zmesi, alifatické karboxylové kyseliny až po C₁₂, ako je napríklad známe z prihlášok EP 0 378 261 a WO 97/05227, ako je napríklad kyselina jantárová, iné dikarboxylové kyseliny alebo soli uvedených kyselín. V prihláške DE 196 50 537 sa pre tento účel opisujú amidalkoxyláty mastných kyselín s uzavretými koncovými skupinami. Určité organické kyseliny použité ako buildery majú podľa opisu v WO 97/18287 schopnosť dodatočne stabilizovať enzým.

Nižšie alifatické alkoholy, predovšetkým však polyoly, ako je napríklad glycerín, etylénglykol, propylénglykol alebo sorbit sú ďalšie často používané stabilizátory enzýmov. Podľa novej patentovej prihlášky (EP 0 965 268) aj diglycerínfosfát chráni proti denaturácii prostredníctvom fyzikálnych vplyvov. Taktiež sa používajú soli vápnika, ako je napríklad kalciumacetát alebo kalciumformiát, opísaný pre tento účel v patente EP 0 028 865, a soli horčička, napríklad podľa európskej prihlášky EP 0 378 262.

Polyamidové oligoméry (WO 99/43780) alebo polymérne zlúčeniny, ako je napríklad lignín (WO 97/00932), vinylkopolyméry (EP 828 762), alebo podľa opisu v EP 702 712 celulózoéter, akrylpolyoméry a/alebo polyamidy stabilizujú prípravu enzýmu okrem iných proti fyzikálnym vplyvom alebo výkyvom hodnoty pH. Polyméry obsahujúce polyamín-*N*-oxid (EP 587 550 a EP 58175. 1) pôsobia zároveň ako stabilizátory enzýmov aj ako inhibítory zmeny farebnosti. Iné polymérne stabilizátory sú lineárne C₈-C₁₈ polyoxyalkylény opísané okrem iných komponentov v patente WO 97/05227. Alkylpolyglykozidy by podľa prihlášok WO 97/43377 a WO 98/45396 mohli stabilizovať enzymatické komponenty prostriedku podľa vynálezu a mohli by ich výkon dokonca zvýšiť. Zosieťované zlúčeniny obsahujúce N, podľa opisu v WO 98/17764, plnia dvojité funkcie, jednak ako soil-release prostriedky a jednak ako stabilizátory enzýmov. Hydrofóbny, neiónový polymér pôsobí v zmesi s inými

stabilizátormi podľa prihlášky WO 97/32958 stabilizujúco na celulázu, takže takéto alebo podobné komponenty by mohli byť vhodné aj pre enzým podľa vynálezu.

Redukčné činidlá a antioxidanty zvyšujú, okrem iného podľa opisu v EP 780 466, stabilitu enzýmov voči oxidatívne mu rozpadu. Redukčné činidlá obsahujúce síru sú známe napríklad z patentu EP 0 080 748 a EP 0 080 223. Iné príklady sú nátriumsulfit (EP 533 239) a redukčné cukry (EP 656 058).

Často sa používajú aj kombinácie stabilizátorov, napríklad polyolov, kyseliny boritej a/alebo bórxu v prihláške WO 96/31589, kombinácia kyseliny boritej alebo borátu, redukčných solí a kyseliny jantárovej alebo iných dikarboxylových kyselín v prihláške EP 126 505, alebo kombinácia kyseliny boritej alebo borátu s polyolmi alebo polyaminozlúčeninami a s redukčnými soľami podľa opisu v prihláške EP 080 223. Účinok stabilizátorov peptialdehydov sa podľa WO 98/13462 kombináciou kyseliny boritej a/alebo derivátov kyseliny boritej a polyolov zosilní a podľa WO 98/13459 sa dodatočným použitím iónov vápnika ešte viac zosilní.

Prostriedky so stabilizovanými enzymatickými aktivitami sú výhodné formy uskutočnenia vynálezu. Osobitne výhodné sú prostriedky s enzýmami, ktoré sú stabilizované viacerými z uvedených spôsobov.

Prostriedky podľa vynálezu obsahujú proteíny alebo deriváty podľa vynálezu výhodne v množstve 0,000001 % hmotnostných až 5 % hmotnostných, a výhodnejšie 0,00005 až 4 % hmotnostné, 0,00001 až 3 % hmotnostné, 0,0001 až 2 % hmotnostné, a osobitne výhodne 0,001 až 1 % hmotnostné. Koncentráciu proteínov možno určiť známymi spôsobmi, napríklad spôsobom BCA (kyselina bicínchonínová; kyselina 2,2'-bichinolyl-4,4'-dikarboxylová) alebo biuretovým spôsobom (A. G. Gornail, C. S. Bardawill a M. M. David, J. Biol. Chem. 177 (1948), 751-766).

Prostriedky podľa vynálezu môžu dodatočne okrem proteínov podľa vynálezu obsahovať iné amylolytické enzýmy, osobitne α -amylázy. Môžu sa medzi nimi nachádzať aj vyššie uvedené enzýmy zavedené na použitie v prácach a čistiacich prostriedkoch. Príklady komerčne dostupných amyláz sú BAN[®], Termamyl[®], Purastar[®], Amylase-LT[®], Maxamyl[®], Duramyl[®] a/alebo Purafect OxAm. Použijú sa, ak rôzne enzýmy majú schopnosť vzájomne sa doplniť. Takéto doplnenie sa môže uskutočniť napríklad z regulačného hľadiska, napríklad vzájomnou aktiváciou alebo

inaktiváciou. Môže vyplynúť napríklad z toho, že aspoň jedna časť enzýmu podľa vynálezu, ktorá nie je homologická so známou α -amylázou, má vplyv na amylolytické aktivity, ktoré nie sú podľa vynálezu. Spoločné použitie môže mať zmysel aj na základe odlišnej substrátovej špecificity. Obe sú formou uskutočnenia tohto vynálezu.

Osobitne v prípade chemicky rôznych znečistení môže byť výhodné použiť amylolytické enzýmy v pracích a čistiacich prostriedkoch spolu s inými pracími a/alebo čistiacimi enzýmami. Preto sú pracie alebo čistiace prostriedky, ktoré okrem proteínu podľa vynálezu sa dodatočne vyznačujú ďalšími enzýmami, výhodnými formami uskutočnenia tohto vynálezu.

Sú to popri ďalších amylázach napríklad proteázy, ale aj lipázy, kutinázy, esterázy, pululanázy, celulózy, hemicelulózy a/alebo xylanázy, ako aj ich zmesi. Osobitne výhodné sú proteázy, lipázy, β -glukanázy a/alebo celulózy. Ďalšie enzýmy rozširujú čistiaci výkon zodpovedajúcich prostriedkov o ich špecifický enzymatický výkon. Patria k nim napríklad oxidoreduktázy alebo peroxidázy ako komponenty enzymatických bieliacich systémov, lakázy (WO 00/39306), β -glukanázy (WO 99/06515 a WO 99/06516) alebo enzýmy rozpúšťajúce pektíny (WO 00/42145), ktoré sa používajú osobitne v špeciálnych pracích prostriedkoch.

Príklady komerčne dostupných enzýmov na použitie v prostriedkoch podľa vynálezu sú proteázy ako napríklad Subtilisin BPN', Properasee, BLAP, Optimase[®], Opticlean[®], Maxatase[®], Maacal[™], Maxapem[™], Alcalase[™], Esperase[™], Savinase[™], Durazym[™], Everlase[®], a/alebo Purafect[®] G alebo Purafect[®] OxP a lipázy ako napríklad Lipolase[®], Lipomax[®], Lumafast[®] a/alebo Lipozym[®].

Proteázovú aktivitu takýchto prostriedkov možno vyjadriť podľa spôsobu opísaného v Tenside, ročník 7 (1970), 125-132. Podľa toho sa udáva v jednotkách PE (proteázové jednotky). Proteázová aktivita výhodných prostriedkov môže mať hodnotu až 1500000 proteázových jednotiek v jednom grame prípravku (PE, stanovené podľa spôsobu opísaného v Tenside, zväzok ročník (1970), 125-132).

Z hľadiska ich získania, medzi použiteľnými enzýmami prichádzajú do úvahy v prvom rade enzýmy získané z mikroorganizmov, ako sú napríklad baktérie a huby, napríklad z *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Streptomyces griseus*, *Humicola lanuginosa*, *Humicola insolens*, *Pseudomonas pseudoalcaligenesi* alebo z

Pseudomonas cepacia, osobitne enzýmové zmesi tvorené týmito kmeňmi prirodzeným spôsobom, prípadne zmesi s enzýmami z iných kmeňov.

Získajú sa známym spôsobom fermentáciou z vhodných mikroorganizmov, ktoré sú opísané napríklad v nemeckých patentoch DE 19 40 488 a DE 21 21 397, v amerických patentoch US 3 623 957 a US 4 264 738, v európskej patentovej prihláške EP 006 638, ako aj v medzinárodnej patentovej prihláške WO 91/02792.

Aj tieto voliteľne dodatočne použité enzýmy môžu byť, napríklad podľa opisu v európskom patente EP 0 564 476 alebo v medzinárodnej patentovej prihláške WO 94/23005, adsorbované na nosiče a/alebo zapustené do obalových látok, aby boli chránené pred predčasnou inaktiváciou. Ich obsah v pracích prostriedkoch je výhodne až 10 % hmotnostných, výhodnejšie 0,2 % hmotnostných až 2 % hmotnostné, pričom osobitne výhodne možno proti oxidatívnej odbúraniu pridať stabilizované enzýmy, známe napríklad z medzinárodnej patentovej prihlášky WO 94/18314.

Prostriedky podľa vynálezu môžu pozostávať z viacerých fáz, napríklad aby sa v nich obsiahnuté účinné látky uvoľňovali časovo alebo priestorovo oddelene od seba. Môže ísť pritom o fázy v rôznych skupenstvách, osobitne však o dve fázy v rovnakých skupenstvách.

Prostriedky podľa vynálezu, ktoré sú zložené z viacerých tuhých komponentov, možno pripraviť jednoduchým spôsobom tak, že rôzne prášky alebo granuláty s rôznymi komponentmi a/alebo rôznym spôsobom uvoľňovania sa vzájomne zmiešajú v celkom voľnej forme. Príprava tuhých prostriedkov podľa vynálezu z jednej alebo viacerých fáz sa môže uskutočniť sušením pomocou rozstriedania alebo granuláciou, pričom enzýmy a prípadné ďalšie tepelne citlivé komponenty, ako sú napríklad bielidlá, sa voliteľne pridávajú neskôr oddelene. Na prípravu prostriedkov podľa vynálezu so zvýšenou sypkou hmotnosťou, osobitne v rozsahu 650 g/l až 950 g/l je výhodný spôsob známy z európskeho patentu EP 0 486 592, ktorý obsahuje extrúziu. Ďalšia výhodná príprava pomocou granulácie je opísaná v európskom patente EP 0 642 576.

Proteíny pre tuhé prostriedky možno použiť napríklad v sušenej, granulovanej, kapsulovanej forme alebo v kapsulovanej a dodatočne sušenej forme. Môžu sa primiešať separátne, to znamená ako vlastná fáza, alebo spolu

s inými komponentmi v rovnakej fáze, s kompaktovaním alebo bez neho. Ak sa majú spracovať mikrokapsulované enzýmy v tuhej forme, potom možno vodu odstrániť z vodných roztokov vzniknutých počas prípravy spôsobmi známymi zo stavu techniky, napríklad rozprašovaním, centrifugovaním alebo presolubilizovaním. Veľkosť takto získaných častíc je obyčajne 50 až 200 μm .

Kapsulovaná forma sa poskytuje vtedy, ak je potrebné chrániť enzýmy pred inými komponentmi, ako napríklad pred bielidlami, alebo ak je potrebné umožniť kontrolované uvoľňovanie (controlled release). Podľa veľkosti kapsúl sa rozlišujú mili-, mikro- a nanokapsuly, pričom pre enzýmy sú zvlášť vhodné mikrokapsuly. Takéto kapsuly sú opísané napríklad v patentových prihláškach WO 97/24177 a DE 199 18 267. Ďalší možný spôsob na kapsulovanie spočíva v tom, že enzýmy vhodné na použitie v prácach alebo čistiacich prostriedkoch, vychádzajúc zo zmesi enzýmového roztoku a roztoku alebo suspenzie škrobu alebo derivátu škrobu, sa zakapsulujú do škrobu, prípadne do derivátu škrobu. Takýto spôsob na kapsulovanie je opísaný v nemeckej patentovej prihláške DE 199 56 382 s nadpisom "Verfahren zur Herstellung von mikroverkapselten Enzymen".

Ďalšia možnosť poskytnúť tuhý prostriedok podľa vynálezu je lisovanie alebo kompaktovanie do tabliet. Takéto tablety môžu byť jedno- alebo viacfázové. Aj táto forma uskutočnenia tým poskytuje možnosť poskytnúť tuhý prostriedok podľa vynálezu s dvoma tuhými fázami. Na prípravu prostriedkov podľa vynálezu vo forme tabliet, ktoré môžu byť jedno- alebo viacfázové, jednofarebné alebo viacfarebné, a/alebo môžu pozostávať z jednej alebo z viacerých vrstiev, sa výhodne všetky komponenty zmiešajú - voliteľne po vrstvách - v mixéri, a zmes sa vylisuje prostredníctvom bežného tabletovacieho lisu, napríklad excentrického lisu alebo kruhového lisu s tlakovou silou v rozsahu 50 až 100 kN/cm^2 , výhodne 60 až 70 kN/cm^2 . Osobitne u viacvrstvových tabliet môže byť výhodné, ak sa jedna vrstva dopredu vylisuje. Toto sa uskutoční výhodne tlakovou silou 5 až 20 kN/cm^2 , osobitne tlakovou silou 10 až 15 kN/cm^2 . Hmotnosť takto pripravenej tablety je výhodne 10 g až 50 g, osobitne 15 g až 40 g. Tvar tablety je ľubovoľný a môže byť okrúhly, oválny alebo hranatý, pričom sú možné aj prechodné tvary.

Do tekutých, gélovitých alebo pastovitých prostriedkov podľa vynálezu možno pridať enzýmy a aj proteíny podľa vynálezu, vychádzajúc z jedného zo spôsobov

získavania proteínov uskutočneného podľa stavu techniky, a prípravy v koncentrovanom vodnom alebo nevodnom roztoku, napríklad v tekutej forme, napríklad ako roztok, suspenzia, alebo emulzia, ale aj vo forme gélu, alebo kapsulované, alebo ako vysušený prášok. Takéto práce alebo čistiace prostriedky podľa vynálezu vo forme roztokov v obvyklých rozpúšťadlách sa pripravujú spravidla jednoduchým zmiešaním komponentov, ktoré možno vo forme hmoty alebo roztoku umiestniť v automatickom mixéri.

Jedna z foriem uskutočnenia vynálezu sú také tekuté, gélovité alebo pastovité prostriedky, do ktorých sa pridá proteín podľa vynálezu a/alebo jeden z ostatných obsiahnutých proteínov a/alebo jeden z ostatných obsiahnutých komponentov vo forme mikrokapsúl. Osobitne výhodné sú kapsuly z materiálu, ktorý je senzitívny voči amyláze. Takéto spoločné použitie materiálov senzitívnych voči amyláze a amylolytického enzýmu podľa vynálezu v jednom pracom alebo čistiacom prostriedku môže vykazovať synergické účinky, napríklad tak, že enzým štiepiaci škrob podporí štiepenie mikrokapsúl a tak riadi proces uvoľnenia komponentov v kapsulách, aby ich uvoľnenie sa uskutočnilo nie počas skladovania a/alebo nie na začiatku čistenia, ale až v určenom čase. Na tomto mechanizme môžu spočívať komplexné práce a čistiace systémy s najrôznejšími komponentmi a s najrôznejšími typmi kapsúl, ktoré sú osobitne výhodné formy uskutočnenia vynálezu.

Porovnateľný účinok sa potom udáva vtedy, keď sa komponenty pracieho alebo čistiaceho prostriedku rozdelia aspoň na dve odlišné fázy, napríklad na dve alebo viaceré tuhé, vzájomne prepojené fázy pracieho alebo čistiaceho prostriedku v tabletách, alebo na rôzne granuláty v rámci toho istého práškoveho prostriedku. Dvoj- alebo trojfázové čistiace prostriedky sú podľa stavu techniky na použitie jednak do automatických čističov riadu, jednak aj do pracích prostriedkov. Aktivita amylolytického enzýmu v skôr aktivovanej fáze je predpokladom aktivácie neskoršej fázy, keď táto neskoršia fáza je obalená kapsulou alebo vrstvou senzitívnou voči amyláze, alebo materiál senzitívny voči amyláze je integrálnym komponentom tuhej fázy, pri čiastočnej alebo úplnej hydrolýze ktorej sa príslušná fáza dezintegruje. Použitie enzýmu podľa vynálezu pre tento účel je preto výhodnou formou uskutočnenia vynálezu.

Komponenty pracích a čistiacich prostriedkov majú schopnosť vhodným spôsobom sa vzájomne podporovať vo svojom výkone. Synergické použitie amylázy a inhibítorov zmeny farebnosti na zvýšenie čistiaceho výkonu sa opisuje napríklad v prihláške WO 99/63035. Je známe aj to, že polyméry, ktoré môžu byť použité zároveň ako ko-buildery, ako napríklad alkyl-poly-glykozidy, môžu stabilizovať a zvýšiť aktivitu a stabilitu získaných enzýmov, napríklad prihláška WO 98/45396. Taktiež je možné, že aj amylolytická aktivita podľa vynálezu sa modifikuje, zvlášť stabilizuje a/alebo zvyšuje jedným z ostatných, vyššie uvedených komponentov. Zodpovedajúce schválené formulácie prostriedkov podľa vynálezu sú preto zvlášť výhodnými formami uskutočnenia vynálezu. Platí to osobitne vtedy, ak sa tým zvýši práci prípadne čistiaci výkon prostriedku.

Aj v spôsoboch čistenia textílií alebo tvrdých povrchov vyznačujúcich sa tým, že aspoň v jednom kroku spôsobu sa aktivuje amylolytický proteín alebo derivát podľa vynálezu, sa uskutoční myšlienka tohto vynálezu.

Práve automatické čistiace spôsoby sa vyznačujú viacstupňovými čistiacimi programami, to znamená, že rôzne komponenty s čistiacou aktivitou sa privedú na predmet čistenia časovo oddelene. Takéto spôsoby sa použijú napríklad pri čistení priemyselných zariadení na výrobu potravín. Na druhej strane sú samy proteíny podľa vynálezu na základe enzymatickej aktivity schopné napádať znečistenia obsahujúce uhľohydráty, a to aj v čiastočnej alebo úplnej neprítomnosti detergentov alebo iných komponentov charakteristických pre pracie alebo čistiace prostriedky. Podľa jedného zo spôsobov uskutočnenia vynálezu možno tým zvoliť aj taký automatický spôsob čistenia textílií alebo tuhých látok, v ktorom proteín podľa vynálezu pôsobí na znečistenia počas určitej doby bez iných komponentov s čistiacou aktivitou.

Výhodné formy uskutočnenia vynálezu sú všetky čistiace spôsoby, medzi nimi aj ručné, osobitne však automatické čistiace spôsoby vyznačujúce sa tým, že aspoň v jednom z krokov sa aktivuje proteín alebo derivát podľa vynálezu. Môžu to byť jednak spôsoby na čistenie textílií alebo porovnateľných materiálov, ako aj spôsoby na čistenie tvrdých povrchov.

Ako je to uvedené v príkladoch, α -amyláza podľa vynálezu z *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368), ak je viazaná do účelných pracích alebo čistiacich prostriedkov, je

vhodná jednak na zvýšenie pracieho výkonu automatických pracích prostriedkov na textilie, jednak na zvýšenie čistiaceho výkonu prostriedkov do automatických umývačov riadu.

Taktiež výhodné formy uskutočnenia vynálezu sú tým aj všetky čistiace spôsoby, medzi nimi aj ručné, osobitne však automatické čistiace spôsoby vyznačujúce sa tým, že aspoň v jednom z krokov sa použije prostriedok podľa vynálezu. Môžu to byť jednak spôsoby na čistenie textílií alebo porovnateľných materiálov, ako aj spôsoby na čistenie tvrdých povrchov.

V čistiacich spôsoboch, napríklad v domácnosti v bežných automatických umývačoch riadu alebo v práčkach, osobitne vhodné množstvo proteínu alebo fragmentu podľa vynálezu je 0,02 mg až 400 mg amylolytického proteínu alebo fragmentu, výhodne 0,01 mg až 200 mg, osobitne 0,02 až 100 mg amylolytického enzýmu alebo fragmentu v jednom použití.

V jednom z možných foriem uskutočnenia automatického čistiaceho spôsobu na čistenie textílií alebo tuhých povrchov sa ukázalo, že pre proteín podľa vynálezu sú osobitne vhodné aktívne koncentrácie 0,0005 mg až 10 mg v jednom litri pracieho kúpeľa, výhodne 0,005 mg až 8 mg v jednom litri pracieho kúpeľa. Sú preto formami uskutočnenia vynálezu. V iných vhodných formách uskutočnenia sa môžu získať výrazne odlišné hodnoty, ak sa vezme do úvahy, že pre automatické čistiace spôsoby sa používajú zariadenia, ktoré realizujú 5 až 70 l pracieho kúpeľa pri takmer identických množstvách pracieho prípadne umývacieho prostriedku.

Aj použitie proteínu podľa vynálezu alebo prostriedku podľa vynálezu je formou uskutočnenia vynálezu. Môže viesť k automatickým alebo iným, osobitne ručným spôsobom. To sa týka čistenia všetkých možných materiálov, osobitne textílií alebo tvrdých povrchov. Pritom proteín podľa vynálezu môže byť včlenený do receptúry z iných látok s pracou aktivitou alebo podľa svojej povahy môže pôsobiť do značnej miery aj bez takýchto zlúčenín.

Zodpovedajúca forma uskutočnenia je aj použitie samotného proteínu podľa vynálezu na čistenie textílií alebo tvrdých povrchov, osobitne v rámci viac-stupňového čistiaceho spôsobu.

Výhodnou formou uskutočnenia sú všetky tie možnosti použitia, v ktorých sa použijú prostriedky na čistenie textílií alebo tvrdých povrchov podľa vynálezu.

Výhodné použitie sa vyznačuje tým, že v jednom použití v automatickom umývači riadu alebo v práčke sa použije 0,02 mg až 400 mg, výhodne 0,01 mg až 200 mg, osobitne 0,02 mg až 100 mg amylolytického proteínu alebo fragmentu.

Použitie proteínov alebo derivátov podľa vynálezu na čiastočné alebo úplné rozpustenie vrstiev znečistenia o komponenty tuhých prací alebo čistiacich prostriedkov alebo dezintegrácia tuhých fáz obsiahnutými alebo obklopujúcimi materiálmi senzitívnymi voči amyláze je taktiež spôsobom uskutočnenia vynálezu. Platí to aj pre formy uskutočnenia, v ktorých v jednej z týchto fáz amylolytické proteíny podľa vynálezu sú prítomné samostatne alebo spolu aspoň s jednou inou účinnou látkou s čistiacou aktivitou alebo podporujúcou čistiacu aktivitu. Do tej miery slúži amylolytický proteín aktivácii vlastnej fázy alebo iných fáz v pracom alebo čistiacom prostriedku pozostávajúcom z viac ako jednej fázy. Z tohto aspektu je osobitne výhodné uvoľnenie komponentov na realizáciu čistiaceho účinku komponentov na tvrdé povrchy alebo na materiál podobný textilu.

Použitie enzýmu podľa vynálezu, na uskutočnenie čiastočného alebo úplného rozpustenia kapsúl obsahujúcich uhľohydráty, osobitne nano-, mikro- alebo milikapsúl do tekutých, gélovitých alebo pastovitých prostriedkov, je formou uskutočnenia vynálezu, ktorého význam pre kontrolované uvoľňovanie kapsulovaných komponentov prostriedku už bolo vysvetlené vyššie. Ide potom o osobitne výhodnú formu uskutočnenia tohto vynálezu, keď sa uvoľnenie komponentov na zabezpečenie čistiaceho účinku komponentov uskutoční na tvrdý povrch alebo na materiál podobný textilu.

Ďalšia forma uskutočnenia je použitie proteínu alebo derivátu podľa vynálezu na opracovanie surovín alebo medziproduktov pri výrobe textilu, osobitne na šlichtovanie bavlny.

Suroviny a medziprodukty výroby textilu, napríklad suroviny a medziprodukty na báze bavlny, sa v rámci výroby a ďalšieho spracovania naškrobia, aby sa umožnilo lepšie spracovanie. Tento spôsob použitý ako na priadzu, medziprodukty, tak aj na textílie sa nazýva šlichtovanie (sizing). Na odstránenie šlichty, čiže ochrannej vrstvy obsahujúcej škrob (odšlichtovanie, desizing) sú vhodné amylolytické proteíny podľa vynálezu.

Ďalšou formou uskutočnenia sú spôsoby na skvapalnenie škrobu, osobitne na produkciu etanolu, vyznačujúce sa tým, že sa v nich použije proteín alebo derivát podľa vynálezu.

Na skvapalnenie škrobu sa napučaný škrob inkubuje vo vode alebo v tlmivom roztoku s amylolytickými enzýmami, čím sa polysacharid rozštiepi na menšie komponenty, nakoniec prevažne na maltózu. Enzýmy podľa vynálezu sa výhodne použijú v takomto spôsobe alebo v jednom kroku takéhoto spôsobu, keď sa na základe svojich biochemických vlastností dajú v zodpovedajúcom produkčnom spôsobe dobre uplatniť. Môže sa to stať napríklad vtedy, keď sa tieto enzýmy majú dodatočne pridať k iným enzýmom, ktoré vyžadujú rovnaké reakčné podmienky. Osobitne výhodné sú amylolytické proteíny podľa vynálezu, keď predmetom záujmu sú práve nimi vytvárané produkty. Skvapalnenie škrobu môže znamenať aj krok vo viacstupňovom spôsobe na získanie etanolu alebo od neho odvodených ďalších produktov.

Ďalšou formou uskutočnenia je použitie proteínu alebo derivátu podľa vynálezu na prípravu lineárnych oligosacharidov a/alebo oligosacharidov s krátkym reťazcom.

Na základe enzymatickej aktivity amylolytické proteíny podľa vynálezu z polymérov podobných škrobu tvoria po krátkej inkubácii prevažne oligosacharidy s vyššou molekulovou hmotnosťou, ako je napríklad maltohexóza, maltoheptóza alebo maltoóktóza. Po dlhšej inkubácii medzi reakčnými produktmi stúpa podiel nižších oligosacharidov, ako je napríklad maltóza alebo maltotrióza. Pri osobitnom záujme o určité reakčné produkty možno použiť zodpovedajúce varianty proteínov podľa vynálezu a/alebo sa môžu zodpovedajúcim spôsobom upraviť reakčné podmienky. Toto je zvlášť zaujímavé vtedy, ak nejde o čisté zlúčeniny, ale o zmesi podobných zlúčenín, ako napríklad pri tvorbe roztokov, suspenzií alebo gélov s určenými fyzikálnymi vlastnosťami.

Ďalšou formou uskutočnenia je použitie proteínu alebo derivátu podľa vynálezu na hydrolýzu cyklodextrínov.

Cyklodextríny sú α -1,4-glykozidicky spojené cyklické oligosacharidy, medzi ktorými najväčší priemyselný význam majú α -, β -, prípadne γ -cyklodextríny (alebo cyklohexa-, -hepta-, prípadne -okta-amylozy) pozostávajúce zo 6, 7 alebo 8

glukózových monomérov. S hydrofóbnymi hosťiteľskými molekulami, ako sú napríklad aromatické látky, dochucovacie látky alebo farmaceuticky účinné látky, tvoria inklúzne zlúčeniny, z ktorých hosťiteľské molekuly možno v prípade potreby opäť uvoľniť. Takéto inklúzne zlúčeniny majú význam podľa oblasti použitia komponentov napríklad pri výrobe potravín, liekov alebo kozmetiky, napríklad v zodpovedajúcich produktoch pre koncového spotrebiteľa. Uvoľňovanie komponentov z cyklodextrínov znamená preto možnosť použitia pre proteíny podľa vynálezu.

Ďalšia forma uskutočnenia je použitie proteínu alebo derivátu podľa vynálezu na uvoľňovanie nízkomolekulových zlúčenín z nosičov polysacharidov alebo z cyklodextrínov.

Na základe enzymatických aktivít môžu amylolytické proteíny podľa vynálezu uvoľňovať nízkomolekulové zlúčeniny aj z iných polysacharidov spojených α -1,4-glykozidicky. Môže sa to odohrať jednak na molekulárnej úrovni ako napríklad v prípade cyklodextrínov, jednak aj vo väčších systémoch, ako sú napríklad komponenty, ktoré sú uzavreté vo forme mikrokapsúl. Napríklad škrob je materiál zavedený do stavu techniky na kapsulovanie zlúčenín počas skladovania, napríklad enzýmov, ktoré sa majú v definovaných množstvách pridať do reakčných zmesí. Kontrolované uvoľňovanie z takýchto kapsúl môže byť podporované amylolytickými enzýmami podľa vynálezu.

Ďalšou formou uskutočnenia je použitie proteínu alebo derivátu podľa vynálezu na výrobu potravín a/alebo komponentov potravín.

Takisto ďalšou formou uskutočnenia tohto vynálezu je použitie proteínu alebo derivátu podľa vynálezu na výrobu krmív pre zvieratá a/alebo komponentov do krmív pre zvieratá.

Všade tam, kde škrob alebo uhľohydráty odvodené zo škrobu hrajú úlohu ako komponenty potravín alebo krmiva pre zvieratá, možno použiť amylolytickú aktivitu na prípravu takéhoto výrobku. Zvyšuje podiel mono- alebo oligomérov voči polymérnemu cukru, čo môže prospieť napríklad chuti, stráviteľnosti alebo konzistencii potravín. Môže to byť potrebné pri výrobe určitých krmív pre zvieratá, avšak napríklad aj pri výrobe ovocných štiav, vína alebo iných potravín, ak sa má znížiť podiel polymérneho cukru a zvýšiť podiel sladkých a/alebo ľahko rozpustných

cukrov. Vyššie uvedená možnosť použitia na skvapalnenie škrobu a/alebo na produkciu etanolu sa môže považovať za priemyselný variant tohto princípu.

Amylázy okrem toho pôsobia aj proti strate chuti pečiva (známej ako "zostarnutie", antistaling efekt). Pridávajú sa preto vhodne do cesta pred pečením. Výhodné formy uskutočnenia vynálezu sú preto také, v ktorých sa proteíny podľa vynálezu použijú na výrobu pečiva.

Ďalšia forma uskutočnenia je použitie proteínu alebo derivátu podľa vynálezu na rozpúšťanie lepiacich zlúčenín obsahujúcich škrob.

Formou uskutočnenia predmetu vynálezu sú aj dočasné lepiace spôsoby, v ktorých sa použije proteín alebo derivát podľa vynálezu.

Popri iných prírodných látkach sa už po stáročia aj škrob používa ako spojivový materiál vo výrobe papiera a pri lepení rôznych papierov a kartónov. Týka sa to hlavne grafík a kníh. Počas dlhého času sa môžu takéto papiere v dôsledku nepriaznivých podmienok, ako je napríklad vlhkosť, zvlniť alebo zlomiť, čo môže viesť k ich úplnému zničeniu. Pri reštaurovaní takýchto papierov a kartónov sa môže vyžadovať rozpustenie vrstiev lepidla, a použitie amylolytického proteínu podľa vynálezu to môže značne uľahčiť.

Rastlinné polyméry, ako je napríklad škrob alebo celulóza, a ich deriváty rozpustné vo vode sa použijú okrem iných aj ako lepidlá alebo škrobové lepidlá. Na to musia vo vode najprv napučať a po nanosení na lepený materiál musia uschnúť, čím sa tento materiál fixuje o podklad. Enzým podľa vynálezu možno pridať do takejto vodnej suspenzie, aby sa ovplyvnili lepiace vlastnosti vznikajúceho lepidla. Avšak namiesto toho, alebo dodatočne k tejto funkcii, sa môže pridať aj do lepidla, aby po uschnutí dlho, napríklad niekoľko rokov, zotrvali v inaktívnom stave na lepenom materiáli. Cieľená zmena podmienok prostredia, napríklad navlhčením, sa môže použiť aj na to, aby sa enzým aktivoval neskôr, a tým sa uskutočnilo rozpustenie škrobového lepidla. Týmto spôsobom sa lepený materiál dá ľahšie opäť oddeliť z podkladu. V tomto spôsobe enzým podľa vynálezu pôsobí na základe svojej amylolytickej aktivity ako rozdeľovacie činidlo v dočasnom lepiacom spôsobe ako takzvaný "spínač" na oddeľovanie lepeného materiálu.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Obrázok 1. Alignment amylolytického enzýmu podľa vynálezu z *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368) s tromi najpodobnejšími amylázami, v ktorom je:

1. Amyláza z *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368)
2. Zrelá amyláza z *Bacillus* sp. # 707 podľa: Tsukamoto, Kimura, Ishii, Takano a Yamane, Biochem. Biophys. Res. Commun. 151 (1988), 25-31.
3. Amyláza SEQ ID č. 1 z prihlášky WO 96/23873
4. Amyláza SEQ ID č. 2 z prihlášky WO 96/23873

Priklady uskutočnenia vynálezu

Příklad 1

Medzi kandidátmi mikrobiologického skrínungu na mikroorganizmy tvoriace amylázu s požiadavkou rastu a tvorby plakov na agarových platniach so škrobom ako jediným zdrojom uhlíka sa nachádzal aj kmeň *Bacillus* sp. (RNA skupina VI, alkalifilný) A 7-7, ktorý je uložený v Nemeckej zbierke mikroorganizmov a bunkových kultúr (DSMZ) (DSM ID 98-587, vklad DSM 12368).

Kultivácia sa uskutočnila v médiu YPSS, ktoré obsahuje 15 g/l rozpustného škrobu, 4 g/l kvasnicového extraktu, 1 g/l K_2HPO_4 a 0,5 g/l $MgSO_4 \times 7 H_2O$. Po autoklávaní sa pH upravilo 20%-ným roztokom uhličitanu sodného na 10,3. Do sterilných 100 ml Erlenmeyerových baniek sa pridalo po 25 ml média a médium sa naočkovalo kultúrou *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368), ktorá predtým rástla na agarovej platni YPSS. Kultivácia prebiehala pri 30 °C 48 hodín počas trepania pri 200 otáčkach/minútu.

Příklad 2

Nasledujúcimi čistiacimi krokmi sa z kultivačného média získal singulárny enzým: vyzrážanie kultivačného média etanolom; rozmiešanie proteínového peletu v 50 mM tlmivého roztoku Tris/HCl, pH 8,5; dialýza proti 50 mM tlmivého roztoku Tris/HCl, pH 8,5; kationová výmenná chromatografia na fast-flow-S-Sepharose® (firma Pharmacia-Amersham Biotech, Freiburg) s 50 mM tlmivého roztoku Tris/HCl,

pH 8,5 ako eluentom; výmena pufru amylázu zadržujúceho prieniku proti 20 mM tlmivého roztoku glycin/NaOH, pH 10, cez kolónu PD10[®] firmy Pharmacia-Amersham Biotech; aniónová výmenná chromatografia cez kolónu Mono-Q[®] (firma Pharmacia-Amersham Biotech) eluovaním tým istým tlmivým roztokom so stúpajúcim gradientom soli medzi 0 až 1 M NaCl. Amyláza eluovala približne pri 0,25 M NaCl.

Podľa opisu spôsobu BSA (kyselina bicínchónínová; kyselina 2,2'-bichinoly-4,4'-dikarboxylová) z 250 ml kultivačného média sa týmto spôsobom získalo 2,6 mg čistého proteínu, hodnotené podľa SDS-gélovej elektroforézy a farbenia striebrom.

V denaturačnej SDS-polyakrylamidovej gélovej elektroforéze v 8 až 25%-nom géle, v systéme PHAST[®] firmy Pharmacia-Amersham a po porovnaní s relevantným markerom veľkosti má amylolytický enzým z *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368) molekulovú hmotnosť 58 kD.

Podľa izoelektrickej fokusácie pH 3 až 9 v systéme PHAST[®] firmy Pharmacia-Amersham jeho izoelektrický bod je pri 6,0.

Amylolytická aktivita vyčisteného enzýmu sa určila prostredníctvom takzvaného DNS spôsobu, čiže s použitím kyseliny dinitrosalicylovej. Dokazujú sa pritom oligosacharidy, disacharidy a jednotky glukózy uvoľnené enzýmom počas hydrolýzy oxidáciou redukujúcich koncov s použitím kyseliny dinitrosalicylovej (DNS). Intenzita vzniku farby je pritom priamo úmerná počtu vzniknutých štiepných produktov. Tento test sa uskutoční nasledujúcim spôsobom: Po inkubácii 50 μ l roztoku enzýmu so 100 μ l 1%-ného rozpustného škrobu v tlmivom roztoku Tris/maleát, pH 6,5 (12,11 g Tris + 11,61 g kyselina maleínová ad 1 l, pH sa upraví s 0,2 N NaOH) pri 50 °C počas 15 min sa redukované sacharidy oxidujú s 300 μ l roztoku DNS (8,8 g kyseliny dinitrosalicylovej, 915 ml destilovanej vody, 250 g K-Na-vínanu, 334 ml 4,5 % NaOH, 6,3 g nátriumdisulfitu počas 20 min pri 100 °C. Po ochladení v ľadovom kúpeli sa absorpcia meria fotometricky pri 540 nm proti slepej (blank) hodnote. Kalibrácia testu sa uskutočňuje koncentračným radom maltózy. Aktivita sa udáva v μ mol redukujúceho cukru (v prepočte na maltózu) na min a ml.

Proteín z príkladu podľa tohto testu jednoznačne vykazuje amylolytickú aktivitu. V nasledujúcej časti takto stanovená aktivita bude slúžiť ako parameter stability enzýmu v rôznych podmienkach.

Teplotná stabilita enzýmu sa merala vždy počas 10-min inkubácie pri pH 10. Pri izbovej teplote, 30 °C, 40 °C a 50 °C je aktivita aspoň 85%-ná. Pri 40 °C má amyláza maximu zvyškovú aktivitu 90 %. Pri 60 °C má tento enzým 50%-nú aktivitu. Pri teplotách nad 60 °C silne stráca aktivitu, avšak pri 80 až 90 °C má ešte stále 10%-nú zvyškovú aktivitu.

Amylolytický enzým z *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368) je po inkubácii počas 10 min pri 40 °C a pri pH 5 až 12 do značnej miery stabilný. Pri pH 8 až 9 je amyláza stabilná na 100 %. Pri pH pod a nad týmito hodnotami aktivita pomaly klesá; enzým však pri pH 5 a 12 stále ešte vykazuje 65%-nú zvyškovú aktivitu.

Na ďalšie charakterizovanie sa zisťovalo ovplyvňovanie enzymatickej aktivity možnými rušivými faktormi, ako je napríklad proteáza alebo detergenty: po pôsobení 10 HPE/ml proteázy Savianse® (Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Dánsko; jednotky HPE boli stanovené podľa spôsobu uvedeného v Tenside 7 (1970), 125-132) a 0,1 % SDS pri pH 10 počas 15 min a 50 °C vykazuje enzým 74%-nú zvyškovú aktivitu. Po pôsobení 0,1 % SDS za rovnakých podmienok (pH 10, 15 min, 50 °C) enzým vykazuje 98%-nú aktivitu. A takisto v rovnakých podmienkach (pH 10, 15 min, 50 °C) v prítomnosti 3 mM EDTA vykazuje ešte 10%-nú zvyškovú aktivitu a v prítomnosti 1 mM EDTA má ešte 65%-nú aktivitu.

Príklad 3

Všetky molekulárne biologické postupy boli robené podľa štandardných spôsobov, ktoré sú uvedené napríklad v príručke autorov Fritsch, Sambrook a Maniatis: "Molecular cloning: a laboratory manual", Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1989.

Na stanovenie interných aminokyselinových sekvencií proteínu získaného podľa príkladu 1 a vyčisteného podľa príkladu 2 sa proteín najprv vyzrážal etanolom a prostredníctvom denaturujúcej SDS-polyakrylovej gélovej elektroforézy sa rozdelil. Po vystrihnutí zodpovedajúcich prúžkov z SDS-polyakrylamidového gélu sa proteín *in situ* trypticky natrávil, výsledné peptidy sa s použitím HPLC rozdelili a analyzovali sa pomocou Edmanovej degradácie a MALDI-TOF. Z veľkého počtu takto získaných tryptických fragmentov sa zvolili nasledujúce dva, D1 a D6:

D1: GITAVWIPPAWK 5'–GTN TGG ATH CCN CCN GCN TGG–3'
D6: QGYPSVFYGDYYGIPTH 5'–GGD ATN CCN TAN TAR TCN CC–3'

Podľa ich aminokyselinových sekvencií (uvedených vľavo) sa skonštruovali zodpovedajúce degenerované PCR próby. Ich nukleotidové sekvencie sú uvedené vpravo (N znamená ľubovoľné zásady; H znamená A alebo C alebo T; R znamená A alebo G, D znamená A, G alebo T).

Zo štandardne pripravenej chromozomálnej DNA z *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368) ako matrice sa s týmto sondovým párom v štandardnej PCR sa mohol amplifikovať približne 1000 bp veľký fragment. Tento PCR fragment sa klonoval na uloženie do vektora pGEM-Teasy® (firma Promega, Madison, Wisconsin, USA).

Príklad 4

Vyčistený PCR fragment sa podľa návodu označil nerádioaktívnym DIG High-Prime® zo súpravy na značenie firmy Boehringer Mannheim (Nemecko; číslo produktu 1745832) ako DNA sonda. Pre následnú hybridizáciu sa chromozomálna DNA kmeňa *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368) naštiepila reštrikčným enzýmom Xba I a rozdelila sa na 0,9%-nom agarózovom géle. DNA sa preniesla pomocou vákuového blotera na pozitívne nabitú nylonovú membránu (firma Roche, Mannheim). DNA hybridizácia a imunologická detekcia PCR fragmentu použitého ako sonda sa uskutočnila podľa návodu súpravy DIG-High-Prime® Labeling-and-Detection-Starter Kit I® firmy Boehringer Mannheim. Zistilo sa, že hľadaný gén sa nachádza v DNA úseku, ktorého veľkosť je zrejmé 3000-4000 bp. Fragmenty tejto veľkosti sa vyčistili na 0,9%-nom agarózovom géle a napokon sa inkorporovali do vektoru pCB56C (z *B. subtilis* DB104; opísaný v prihláške WO 91/02792) rozštiepeného reštrikčnými enzýmami Xba I a Nhe I. Po transformácii v kmeni *Bacillus subtilis* negatívnom na amylázu sa mohli klony pozitívne na amylázu identifikovať tvorbou plakov na agarových platniach obsahujúcich škrob. Jeden reprezentatívny izolát niesol požadovaný inzert.

Príklad 5

Sekvenovanie získaného plazmidu sa uskutočnilo štandardným spôsobom s použitím spôsobu frakcionácie reťazcov. Plazmid dostal inzert veľkosti 2 015 bp. Na ňom leží gén veľkosti 1545 gp kódujúci predmetný enzým, ktorý je uvedený ako

SEQ ID č. 1 v sekvenovacom protokole tejto prihlášky. Zodpovedá mu polypeptid obsahujúci 516 aminokyselín, ktorého sekvencia je uvedená v sekvenovacom protokole SEQ ID č. 2. Molekulová hmotnosť odvodená z tejto aminokyselinovej sekvencie je 59 kD, prípadne molekulová hmotnosť zrelého proteínu získaného po odštiepení 31 aminokyselín signálneho peptidu je 55,5 kD.

Porovnanie sekvencií spôsobom BLAST (S. F. Altschul a spol., Nucl. Acids Res., 25 (1997), 3389-3402) uskutočnené 17.3.2000 charakterizuje enzým ako α -amylázu. Homológia tohto proteínu voči známym proteínom vykazuje na úrovni proteínov identitu 71 až 95 % (tabuľka 2).

Tabuľka 2: Homológia enzýmu podľa vynálezu z *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368) voči najbližším podobným a ďalším reprezentatívnym proteínom udaná ako % identity na úrovni proteínov. ID udáva záznamy v Swiss-Prot-Datenbank (Ženeva, Švajčiarsko).

Organizmus	ID	Identita (%)
<i>B. alcalophilus</i>	P19571	95
<i>B. alcalophilus</i>	WO 96/23873	91
<i>B. licheniformis</i>	P06278	72
<i>B. amyloliquefaciens</i>	P00692	72
<i>B. stearothermophilus</i>	P06297	71

Alignment s reprezentatívnymi proteínmi je uvedený na obrázku 1. U všetkých ide o α -amylázu, takže na základe značných zhodností sa musí vychádzať z toho, že aj v prípade enzýmu podľa vynálezu ide o α -amylázu. Toto sa zhoduje s pôvodným získaním génu z mikroorganizmu odbúravajúceho škrob (príklad 1) a so zistením amylolytickej aktivity transformantu s plazmidom nesúcim inzert (príklad 4). Vlastnosti amylolytického proteínu získaného z tohto produkčného kmeňa súhlasia s vlastnosťami proteínu z kmeňa divého typu (príklad 2). Takýto produkčný kmeň možno pripraviť podľa príkladu 4.

Príklad 6

Bavlnené textilie sa štandardizovali štyrmi rôznymi znečisteniami: A (Mousse au chocolat), B (ovsené vločky s kakaom), C (ovsené vločky s kakaom a s malým množstvom mlieka) a D (zemiakový škrob) a s takto pripraveným materiálom sa launderometricky testovali rôzne receptúry pracích prostriedkov na ich práci výkon. Pomer kúpeľa sa nastavil na 1:12 a pralo sa 30 min pri teplote 30 °C. Dávkovanie bolo 5,88 g pracieho prostriedku v 1 litri pracieho kúpeľa. Tvrdosť vody bola 16° podľa nemeckej stupnice.

Ako kontrolný prací prostriedok pre A, B a C slúžila základná receptúra pracieho prostriedku s nasledujúcim zložením (všetky údaje sú v % hmotnostných): 4 % lineárneho alkylbenzénsulfonátu (sodná soľ), 4 % C₁₂-C₁₈-sulfátu mastných alkoholov (sodná soľ), 5,5 % C₁₂-C₁₈-mastného alkoholu so 7 EO, 1 % sodného mydla, 11 % uhličitanu sodného, 2,5 % amorfného dikremičitanu sodného, 20 % tetrahydrátu peroxoboritanu sodného, 5,5 % TAED, 25 % zeolitu A, 4,5 % polykarboxylátu, 0,5 % fosfonátu, 2,5 % protipenového granulátu, 5 % síranu sodného, 1 % proteázového granulátu, zvyšok: voda, optické zjasňovače, parfum, soli. V rôznych pokusných radoch sa použili rôzne amylázy, tak aby sa vždy získala konečná koncentrácia 44 TAU amylolytickej aktivity v 1 litri pracieho kúpeľa.

Na stanovenie amylolytickej aktivity v TAU sa použije modifikovaný *p*-nitrofenylmaltoheptaosid, ktorého koncová glukózová jednotka je blokovaná benzylidénovou skupinou. Tento *p*-nitrofenylmaltoheptaosid sa amylázou štiepil na *p*-nitrofenyl-oligosacharid, ktorý sa zase prostredníctvom pomocných enzýmov glukoamylázy a alfa-glukozidázy prekonvertuje na glukózu a *p*-nitrofenol. Týmto je množstvo uvoľneného *p*-nitrofenolu priamo úmerné aktivite amylázy. Meranie sa uskutoční napríklad s použitím súpravy Quick-Start®-Testkit firmy Abbott, Abbott Park, Illinois, USA. Narastanie absorpcie (405 nm) v testovanej vzorke sa sledovalo pri 37 °C počas 3 min voči slepej (blank) hodnote s použitím fotometra. Kalibrácia sa uskutoční prostredníctvom enzýmového štandardu so známou aktivitou (napríklad Maxamyl®/Purastar® 2900 firmy Genencor s 2900 TAU/g). Vyhodnotenie sa uskutoční nanesením absorpčného rozdielu dE (405 nm) za 1 min voči enzýmovej koncentrácii štandardu.

S amylolytickým enzýmom podľa vynálezu z *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368) sa porovnával Termamyl[®], Duramyl[®] a BAN[®] (výrobca: Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Dánsko). Pre znečistenie D sa použila tá istá základná receptúra, avšak bez proteázy, a použila sa ako kontrola k A až C, prípadne sa zmiešala s amylázami.

V tomto príklade sa belostný stupeň textílií meral s použitím systému CIELAB a s meracím prístrojom Minolta CR 310 pred a po praní v porovnaní so štandardom, ktorý sa nanormoval ako 100 %. Rozdiely získaných hodnôt z jednotlivých pokusov sa zhrnuli do nasledujúcej tabuľky 3. Udané sú stredné hodnoty vždy z 5 meraní. Umožňujú bezprostredný záver o príspevku získaného enzýmu k praciemu výkonu použitého prostriedku.

Tabuľka 3

Základný prací prostriedok s	A	B	C	D
Amylázou podľa vynálezu	29,3	26,0	20,9	15,2
Termamyl [®]	25,9	22,7	17,4	12,3
Duramyl [®]	28,6	23,4	20,2	14,3
BAN [®]	22,5	22,0	17,0	13,2
Kontrola bez amylázy	22,9	22,2	11,9	10,0
Smerodajná odchýlka	1,3	0,6	1,4	2,2

Vidieť, že α -amyláza z *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368) má na znečistenie B jednoznačne lepší prací účinok ako ktorýkoľvek z troch referenčných enzýmov. U ostatných typov znečistenia podáva v rámci chybovej hranice mierne zlepšený prací výkon, ktorý leží vždy výrazne nad porovnávacími hodnotami bez amylolytického enzýmu. Tento výsledok je o to presvedčivejší, že vo všetkých receptúrach pracích prostriedkov je prítomné bielidlo, na ktoré práve enzýmy divého typu reagujú všeobecne veľmi citlivo.

Príklad 7

Bavlnené textílie sa štandardným spôsobom znečistili znečistením B (ovsené vločky s kakaom) a znečistením C (ovsené vločky s kakaom a s malým množstvom mlieka). Launderometrické vyšetrenie sa uskutočnilo ako v príklade 1 s použitím ďalšej základnej receptúry pracieho prostriedku obsahujúceho (v % hmotnostných): 14 % alkylbenzénsulfonát sodný, 6 % natriumsulfonát mastného alkoholu, 6 % 7-násobne etoxylovaného C₁₂-C₁₈ mastného alkoholu, 1 % mydla, 25 % zeolitu Na-A, 10 % uhličitanu sodného, 5 % polymérneho polykarbonátu (Sokalan® CP5), 11 % dihydrátu trinátriumcitrátu, 4 % kyseliny citrónovej, 1 % konfekcionovaného protipenového prostriedku vo forme čiastočiek, 1 % proteázového granulátu, 5 % síranu sodného, zvyšok: voda a soli. Táto základná receptúra sa použila v rôznych testovacích radoch s rôznymi amylázami, tak aby výsledná koncentrácia amylolytickej aktivity v 1 litri pracieho kúpeľa bola 33,5 TAU, ako ju možno stanoviť spôsobom uvedeným v príklade 1. S amylolytickým enzýmom podľa vynálezu z *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368) sa porovnával Termamyl®, Duramyl® a BAN® (výrobca: Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Dánsko). Dávkovanie bolo vždy 4,45 g pracieho prostriedku v 1 litri pracieho kúpeľa.

Po praní sa stanovil stupeň belosti vypraných textílií rovnakým spôsobom ako je uvedené v predchádzajúcom príklade. Rozdiely získaných hodnôt sa zhrnuli do nasledujúcej tabuľky 4. Ide vždy o priemerné hodnoty z 5 meraní, ktoré umožňujú bezprostredný záver o príspevku získaného enzýmu k praciemu výkonu použitého prostriedku.

Tabuľka 4

Základný prací prostriedok s	B	C
Amylázou podľa vynálezu	30,6	17,5
Termamyl®	29,3	15,0
Duramyl®	29,2	16,7
BAN®	28,9	15,6
Kontrola bez amylázy	28,5	14,5
Smerodajná odchýlka	0,6	1,2

Vidieť, že α -amyláza z *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368) v tejto receptúre pracieho prostriedku bez bielidla podáva lepší prací výkon voči znečisteniu B a C ako ktorýkoľvek z referenčných enzýmov.

Príklad 8

Bavlnené textílie sa štandardne znečistili dvoma rôznymi typmi komerčne postupných druhov mliečneho kakaa (E a F). Tým sa uskutočnilo launderometrické vyšetrenie podľa opisu v príklade 1. Ako kontrolný prací prostriedok sa použila základná receptúra pracieho prostriedku z príkladu 2, avšak bez proteázy. Zmieša sa v rôznych testovacích radoch ako v príklade 2 s rôznymi amylázami a použije sa v rovnakom dávkovaní.

Po vypraní sa určil stupeň belosti vypraných textílií v porovnaní s síranom bárnatým, ktorý sa nanormoval ako 100 %. Meranie sa uskutočnilo na spektrometri Datacolor SF500-2 pri 460 nm (UV filter), clona 30 mm, bez lesku, druh svetla D65, 10°, d/8°. Získané výsledky sa zostavili do nasledujúcej tabuľky 5 ako % remisie, to znamená ako percentuálne údaje v porovnaní so síranom bárnatým. Udáva sa v nej vždy aj počiatočná hodnota. Udávajú sa priemerné hodnoty vždy z 5 meraní. Umožňujú bezprostredný záver o príspevku získaného amylolytického enzýmu k praciemu výkonu použitého prostriedku.

Tabuľka 5

Základný prací prostriedok s	E	F
Amylázou podľa vynálezu	70,3	41,0
Termamyl®	67,3	39,7
Duramyl®	68,3	40,5
BAN®	68,7	39,8
Kontrola bez amylázy	61,1	31,4
Počiatočná hodnota	21,1	25,0
Smerodajná odchýlka	1,0	1,2

Vidieť, že α -amyláza z *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368) v tejto receptúre v prípade E podáva jednoznačne lepší prací výkon ako všetky testované referenčné enzýmy a v prípade F je porovnateľná.

Príklad 9

V čistiach pokusoch orientovaných na použitie sa nádoby s tvrdým, hladkým povrchom štandardne znečistili s nasledujúcim znečistením: A (DIN ovsené vločky), B (ovsené vločky napučané vo vode) a C (zmes škrobu) a pri 45 °C sa čistili s použitím normálneho programu bežného automatického umývača riadu typu Miele® G 575. V jednom čistiacom cykle sa použilo 20 g čistiaceho prostriedku; tvrdosť vody mala 16° podľa nemeckej stupnice.

Ako čistiaci prostriedok sa použila nasledujúca základná receptúra (všetky údaje v % hmotnostných): 55 % nátriumtripolyfosfátu (počítaného ako bezvodého), 4 % amorfného dikremičitanu sodného (počítaného ako bezvodého), 22 % uhličitanu sodného, 9 % peroxoboritanu sodného, 2 % TAED, 2 % neiónového tenzidu, 1,4 % granulátu proteázy, zvyšok: voda, farbivá, parfum. Táto základná receptúra sa v rôznych pokusoch zmiešala s rôznymi amylázami, ako je napríklad Termamyl®, Duramyl®, BAN® (výrobca: Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Dánsko) alebo s amylolytickým enzýmom podľa vynálezu z *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368) v účinnom množstve vždy 150 TAU amylolytickej aktivity v jednom čistiacom cykle podľa stanovenia spôsobom uvedeným v príklade 1.

Po opláchnutí sa odstránené znečistenie A po zafarbení jódom prostredníctvom reakcie jódu so škrobom vizuálne zaznamenalo na stupnici 0 (= bezo zmeny, to znamená veľmi silné znečistenie) až 10 (= nijaká stopa po znečistení). Znečistenie B a C sa vyjadrilo gravimetricky v percentách. K tomu sa sledoval rozdiel hmotnosti znečistenej a následne vyčistenej nádoby a počiatočnej hmotnosti nádoby vo vzťahu k rozdielu hmotnosti medzi nevyčistenou nádobou a počiatočnou hmotnosťou. Tento vzťah možno považovať za percento odstránenia.

Získané výsledky sa zhrnuli v nasledujúcej tabuľke 6. Uvádzajú sa priemerné hodnoty z deviatich meraní pre A a B, prípadne z 18 meraní pre C. Umožňujú bezprostredný záver o príspevku získaného amylolytického enzýmu k práci použitého prostriedku.

Tabuľka 6

Základný prací prostriedok s	A	B	C
		% odstránenia	% odstránenia
Amylázou podľa vynálezu	6,2	91,2	95,8
Termamyl [®]	3,7	91,2	15,7
Duramyl [®]	2,2	78,8	35,5
BAN [®]	3,7	69,1	34,2
Kontrola bez amylázy	4,3	31,7	0,6

Tieto výsledky ukazujú, že α -amyláza z *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368) ohľadne čistiaceho výkonu v čistiacich prostriedkoch do automatických umývačov riadu je v prípade všetkých troch znečistení pri 45 °C čistiacej teploty lepšia v porovnaní so všetkými testovanými amylázami.

Príklad 10

Nádoby s tvrdými, hladkými povrchmi boli znečistené tými istými znečisteniami ako v predchádzajúcom príklade a čistili sa pri 55 °C. Čistiace podmienky a receptúra použitého prostriedku zodpovedali podmienkam a receptúre z predchádzajúceho príkladu.

Po vyčistení sa odstránenie znečistenia A, tak ako v príklade 4, vyjadril vizuálne reakciou jódu a škrobu a ohodnotil sa na stupnici 0 až 10; a odstránenie znečistenia B a C sa takisto vyjadril gravimetricky v percentách. Získané výsledky sú zhrnuté v nasledujúcej tabuľke 7. Udvávajú sa v nej priemerné hodnoty z 9 meraní pre A, z 10 pre B, a z 18 pre C. Umožňujú bezprostredný záver o príspevku získaného amylolytického enzýmu k praciemu výkonu použitého prostriedku.

Tabuľka 7

Základný prací prostriedok s	A	B	C
		% odstránenia	% odstránenia
Amylázou podľa vynálezu	8,3	97	99
Termamyl [®]	6,7	95	53
Duramyl [®]	6,9	95	89
BAN [®]	6,2	92	77
Kontrola bez amylázy	5,3	71	27

Tieto výsledky ukazujú, že α -amyláza z *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368) ohľadne čistiaceho výkonu v čistiacich prostriedkoch do automatických umývačov riadu je v prípade všetkých troch znečistení aj pri 55 °C čistiacej teploty lepšia v porovnaní so všetkými testovanými amylázami.

Zoznam sekvencií

<110> Henkel Kommanditgesellschaft auf Aktien

<120> Amylolytický proteín, nukleová kyselina kódujúca tento proteín, organizmus produkujúci tento proteín, vektor nukleovej kyseliny, pracie a čistiace prostriedky s jeho obsahom a jeho použitie

<130> H 4713/H 4846

<140>

<141>

<150> DE 10036752

<151> 2000-07-28

<150> DE 10036753

<151> 2000-07-28

<160> 2

<170> PatentIn ver. 2.1

<210> 1

<211> 1551

<212> DNA

<213> *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368)

<220>

<221> CDS

<212> (1)...(1551)

<220>

<221> mat_peptid

<222> (94)

<400> 1

atg aga aaa cgt aaa aat gga tta atc agt att cta ttg gca ttt ttg	48
Met Arg Lys Arg Lys Asn Gly Leu Ile Ser Ile Leu Leu Ala Phe Leu	
-30 -25 -20	
ttg gta ctt aca tca ata cct ttt act tca gca aac gta gaa gca cac	96
Leu Val Leu Thr Ser Ile Pro Phe Thr Ser Ala Asn Val Glu Ala His	
-15 -10 -5 -1 1	
cat aat ggc aca aat gga aca atg atg caa tat ttt gaa tgg tat ttg	144
His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Leu	
5 10 15	
cca aat gac ggt aat cat tgg aat aga tta aga tca gat gca agt aat	192
Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Ser Asp Ala Ser Asn	
20 25 30	
ctt aaa gat aaa ggg att aca gcg gtt tgg ata cca cct gct tgg aaa	240
Leu Lys Asp Lys Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Trp Lys	
35 40 45	
ggg gct tct caa aat gat gta ggg tat gga gcc tat gat ctg tat gat	288
Gly Ala Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp	
50 55 60 65	
tta gga gaa ttc aat caa aaa gga acc gta cgt aca aag tac gga acc	336
Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr	
70 75 80	
cgt aat caa tta caa gct gca gta acc gcc tta aaa agt aat ggt att	384
Arg Asn Gln Leu Gln Ala Ala Val Thr Ala Leu Lys Ser Asn Gly Ile	
85 90 95	
caa gta tac gga gat gtc gta atg aat cat aag ggt gga gcg gat gcc	432
Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp Ala	
100 105 110	
act gag tgg gtt cga gcg gtt gaa gtg aac cca agt aat cgt aat caa	480
Thr Glu Trp Val Arg Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asn Arg Asn Gln	
115 120 125	
gaa gtc tct ggt gat tat acg att gag gct tgg act aag ttt gat ttt	528
Glu Val Ser Gly Asp Tyr Thr Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp Phe	
130 135 140 145	
cct ggt cga ggt aat acc cac tct aac ttt aaa tgg aga tgg tat cat	576
Pro Gly Arg Gly Asn Thr His Ser Asn Phe Lys Trp Arg Trp Tyr His	
150 155 160	

ttc gat ggt gta gat tgg gat cag tca cgt caa ttg cag aat cga atc	624
Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Gln Ser Arg Gln Leu Gln Asn Arg Ile	
165 170 175	
tat aaa ttc aga gga gat gga aaa ggt tgg gac tgg gaa gtt gat aca	672
Tyr Lys Phe Arg Gly Asp Gly Lys Gly Trp Asp Trp Glu Val Asp Thr	
180 185 190	
gag aac gga aac tat gac tat cta atg tac gcg gat att gat atg gat	720
Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Met Asp	
195 200 205	
cac cct gaa gta gtg aat gaa ctc aga aac tgg ggt gta tgg tat acc	768
His Pro Glu Val Val Asn Glu Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp Tyr Thr	
210 215 220 225	
aat aca ctg ggg cta gac ggg ttc aga ata ggt gcg gta aaa cat ata	816
Asn Thr Leu Gly Leu Asp Gly Phe Arg Ile Gly Ala Val Lys His Ile	
230 235 240	
aaa tat agc ttt act cgt gat tgg ctt act cac gtt aga aat acg aca	864
Lys Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Leu Thr His Val Arg Asn Thr Thr	
245 250 255	
ggt aaa aat atg ttt gca gtt gca gag ttc tgg aag aat gac ata ggt	912
Gly Lys Asn Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Ile Gly	
260 265 270	
gca att gaa aat tac tta agt aaa aca aat tgg aat cat tca gtt ttt	960
Ala Ile Glu Asn Tyr Leu Ser Lys Thr Asn Trp Asn His Ser Val Phe	
275 280 285	
gat gtg ccc ctg cat tat aac ctt tat aat gca tcg aga agt ggt ggc	1008
Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Arg Ser Gly Gly	
290 295 300 305	
aat tat gat atg agg caa ata ttt aat gga aca gtt gtt cag aga cat	1056
Asn Tyr Asp Met Arg Gln Ile Phe Asn Gly Thr Val Val Gln Arg His	
310 315 320	
cct aca cat gct gta aca ttt gtt gat aac cat gat tca cag ccg gaa	1104
Pro Thr His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro Glu	
325 330 335	
gaa gcc cta gag tca ttt gtt gaa gag tgg ttc aaa ccg tta gcg tgt	1152
Glu Ala Leu Glu Ser Phe Val Glu Glu Trp Phe Lys Pro Leu Ala Cys	
340 345 350	
gct ctc aca cta aca cgt gat caa gga tat cct tcc gtt ttt tat gga	1200
Ala Leu Thr Leu Thr Arg Asp Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr Gly	
355 360 365	
gat tat tat ggg att ccg acg cat ggt gta cca gca atg aaa tct aag	1248
Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Gly Val Pro Ala Met Lys Ser Lys	
370 375 380 385	
att gat ccg att tta gaa gca cgt caa aag tat gcg tac gga aaa caa	1296
Ile Asp Pro Ile Leu Glu Ala Arg Gln Lys Tyr Ala Tyr Gly Lys Gln	
390 395 400	

aat gat tat ttg gat cac cat aat atg att ggc tgg acg cgt gaa ggt	1344
Asn Asp Tyr Leu Asp His His Asn Met Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly	
405 410 415	
aat aca gca cat ccc aac tca gga cta gca act att atg tgg gat ggc	1392
Asn Thr Ala His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp Gly	
420 425 430	
cca gga gga aat aaa tgg atg tat gtt ggg cgt aat aag gct gga caa	1440
Pro Gly Gly Asn Lys Trp Met Tyr Val Gly Arg Asn Lys Ala Gly Gln	
435 440 445	
gtt tgg aga gat att aca gga aat cgc tca ggt acg gtg acg att aac	1488
Val Trp Arg Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Gly Thr Val Thr Ile Asn	
450 455 460 465	
gca gat ggg tgg ggt aat ttt tct gta aat ggt ggg tct gta tct ata	1536
Ala Asp Gly Trp Gly Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile	
470 475 480	
tgg gta aat aat taa	1551
Trp Val Asn Asn	
485	

<210> 2

<211> 516

<212> PRT

<213> *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368)

<400> 2

Met Arg Lys Arg Lys Asn Gly Leu Ile Ser Ile Leu Leu Ala Phe Leu	
1 5 10 15	
Leu Val Leu Thr Ser Ile Pro Phe Thr Ser Ala Asn Val Glu Ala His	
20 25 30	
His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Leu	
35 40 45	
Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Ser Asp Ala Ser Asn	
50 55 60	
Leu Lys Asp Lys Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Trp Lys	
65 70 75 80	
Gly Ala Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp	
85 90 95	
Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr	
100 105 110	
Arg Asn Gln Leu Gln Ala Ala Val Thr Ala Leu Lys Ser Asn Gly Ile	
115 120 125	
Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp Ala	
130 135 140	
Thr Glu Trp Val Arg Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asn Arg Asn Gln	
145 150 155 160	
Glu Val Ser Gly Asp Tyr Thr Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp Phe	
165 170 175	
Pro Gly Arg Gly Asn Thr His Ser Asn Phe Lys Trp Arg Trp Tyr His	
180 185 190	

[illegible]

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Amylolytický proteín so sekvenciou aminokyselín, ktorá je so sekvenciou aminokyselín udanou v SEQ ID č. 2 identická aspoň na 96 %.
2. Amylolytický proteín so sekvenciou aminokyselín, ktorá je so sekvenciou aminokyselín udanou v SEQ ID č. 2 identická aspoň na 98 %.
3. Amylolytický proteín so sekvenciou aminokyselín, ktorá je so sekvenciou aminokyselín udanou v SEQ ID č. 2 v polohe 32 až 516 identická aspoň na 96 %.
4. Amylolytický proteín so sekvenciou aminokyselín, ktorá je so sekvenciou aminokyselín udanou v SEQ ID č. 2 v polohe 32 až 516 identická aspoň na 98 %.
5. Amylolytický proteín, ktorý je odvodený zo sekvencie nukleotidov, ktorá je so sekvenciou nukleotidov uvedenou v SEQ ID č. 1 identická aspoň na 85 %, osobitne v čiastkovej oblasti, ktorá zodpovedá aminokyselinám 32 až 516 podľa SEQ ID č. 2.
6. Amylolytický proteín, ktorý je odvodený zo sekvencie nukleotidov, ktorá je so sekvenciou nukleotidov uvedenou v SEQ ID č. 1 identická aspoň na 90 %, osobitne v čiastkovej oblasti, ktorá zodpovedá aminokyselinám 32 až 516 podľa SEQ ID č. 2.
7. Amylolytický proteín, ktorý je so sekvenciou aminokyselín uvedenou v SEQ ID č. 2 celkove a/alebo v polohách 32 až 516 identický a/alebo ktorý je so sekvenciou nukleotidov uvedenou v SEQ ID č. 1 celkove a/alebo v polohách 32 až 516 identický.
8. Fragment amylolytického proteínu alebo amylolytický proteín získateľný delečnou mutáciou podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 7.

9. Amylolytický proteín získateľný inzerčnou mutáciou alebo amylolytický chimérny proteín, ktorý aspoň v jednej časti vykazujúcej amylolytickú aktivitu pozostáva z proteínu, ktorý je s proteínom alebo fragmentom podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 8 identický.

10. Amylolytický aktívny derivát proteínu podľa niektorého z nárokov 1 až 9.

11. Amylolytický proteín alebo derivát, ktorý má aspoň jeden antigénový determinant spoločný s jedným z proteínov alebo derivátov podľa nárokov 1 až 10.

12. Amylolytický proteín alebo derivát podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 11 získateľný prirodzeným spôsobom z mikroorganizmu.

13. Amylolytický proteín alebo derivát podľa nároku 12, kde v prípade mikroorganizmu ide o grampozitívnu baktériu.

14. Amylolytický proteín alebo derivát podľa nároku 13, kde v prípade grampozitívnej baktérie ide o rod *Bacillus*.

15. Amylolytický proteín alebo derivát podľa nároku 14, kde v prípade druhu *Bacillus* ide o druh *Bacillus* sp. A 7-7, najmä o *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368).

16. Nukleová kyselina kódujúca amylolytický proteín, ktorej nukleotidová sekvencia je s nukleotidovou sekvenciou uvedenou v SEQ ID č. 1 identická aspoň na 85 %, najmä v čiastkovej oblasti, ktorá zodpovedá aminokyselinám 32 až 516 podľa SEQ ID č. 2.

17. Nukleová kyselina kódujúca amylolytický proteín, ktorej nukleotidová sekvencia je s nukleotidovou sekvenciou uvedenou v SEQ ID č. 1 identická aspoň na 90 %, najmä v čiastkovej oblasti, ktorá zodpovedá aminokyselinám 32 až 516 podľa SEQ ID č. 2.

18. Nukleová kyselina kódujúca amylolytický proteín, ktorej nukleotidová sekvencia je s nukleotidovou sekvenciou uvedenou v SEQ ID č. 1 identická aspoň na 100 %, najmä v čiastkovej oblasti, ktorá zodpovedá aminokyselinám 32 až 516 podľa SEQ ID č. 2.

19. Nukleová kyselina, ktorá kóduje proteín alebo derivát podľa nárokov 1 až 15.

20. Prirodzený organizmus, ktorý produkuje jeden z proteínov alebo derivátov podľa nárokov 1 až 15 alebo ktorý obsahuje nukleovú kyselinu, ktorá ho kóduje.

21. Organizmus podľa nároku 20, ktorým je mikroorganizmus, výhodne baktéria.

22. Organizmus podľa nároku 21, kde v prípade baktérie ide o grampozitívnu baktériu.

23. Organizmus podľa nároku 22, kde v prípade grampozitívnej baktérie ide o rod *Bacillus*, výhodne *Bacillus* sp. A 7-7, najvýhodnejšie *Bacillus* sp. A 7-7 DSM (12368).

24. Vektor, ktorý obsahuje oblasť nukleovej kyseliny podľa nárokov 16 až 19, alebo ktorý obsahuje oblasť nukleovej kyseliny, ktorá kóduje jeden z proteínov alebo derivátov podľa nárokov 1 až 15.

25. Klonovací vektor podľa nároku 24.

26. Expresný vektor podľa nároku 24.

27. Bunka, ktorá obsahuje vektor podľa ktoréhokoľvek z nárokov 24 až 26.

28. Hostiteľská bunka, ktorá exprimuje jeden z proteínov alebo derivátov podľa nárokov 1 až 15, alebo k expresii ktorého ju možno indukovať, výhodne s použitím expresného vektora podľa nároku 26.

29. Hostiteľská bunka podľa nároku 28, kde táto bunka je baktéria, najmä baktéria, ktorá vytvorený proteín alebo derivát sekretuje do okolitého média.

30. Hostiteľská bunka podľa nároku 28 alebo 29, kde táto bunka je baktéria rodu *Bacillus*, najmä druh *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* alebo *Bacillus alcalophilus*.

31. Hostiteľská bunka podľa nároku 28 alebo 29, kde táto bunka je gramnegatívna baktéria.

32. Hostiteľská bunka podľa nároku 31, ktorá patrí do rodu *Escherichia*, výhodne je to druh *Escherichia coli*, výhodnejšie jeden z kmeňov *E. coli* JM 109, *E. coli* DH 100B alebo *E. coli* DH 12S.

33. Hostiteľská bunka podľa nároku 28, kde táto bunka je eukaryotická bunka, najmä bunka, ktorá vytvorený proteín posttranslačne modifikuje.

34. Spôsob prípravy proteínu alebo derivátu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 15, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa použije nukleová kyselina podľa ktoréhokoľvek z nárokov 16 až 19 a/alebo vektor podľa ktoréhokoľvek z nárokov 24 až 26 a/alebo hostiteľská bunka podľa ktoréhokoľvek z nárokov 28 až 33 alebo bunka, ktorá tento proteín alebo derivát tvorí prirodzeným spôsobom, najmä podľa ktoréhokoľvek z nárokov 20 až 23.

35. Prací alebo čistiaci prostriedok, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje proteín alebo derivát podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 15.

36. Prostriedok podľa nároku 35, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje 0,000001 % hmotnostných až 5 % hmotnostných, výhodne 0,00001 až 3 % hmotnostné amylolytického proteínu alebo derivátu.

37. Prostriedok podľa nároku 35 alebo 36, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že dodatočne obsahuje jeden alebo viaceré iné amylolytické proteíny, výhodne α -amylázy.

38. Prostriedok podľa ktoréhokoľvek z nárokov 35 až 37, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje ďalšie enzýmy, výhodne jednu alebo viaceré proteázy, lipázy, β -glukanázy a/alebo celulózy.

39. Prostriedok podľa ktoréhokoľvek z nárokov 35 až 38, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že pozostáva z viac ako jednej fázy.

40. Prostriedok podľa ktoréhokoľvek z nárokov 35 až 39, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že je tuhý a obsahuje aspoň dva zmiešané rôzne prášky alebo granuláty v celkove voľnej forme.

41. Prostriedok podľa nároku 39, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sú prítomné aspoň dve vzájomne zviazané tuhé fázy, najmä po spoločnom kompaktovanom kroku.

42. Tuhý prostriedok podľa ktoréhokoľvek z nárokov 39 až 41, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že aspoň jedna z fáz obsahuje materiál senzitívny voči amyláze, najmä škrob, alebo je týmto materiálom aspoň čiastočne obklopený alebo je ním potiahnutý.

43. Prostriedok podľa niektorého z nárokov 35 až 42, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že je tekutý, gélovitý alebo pastovitý a obsiahnutý proteín a/alebo aspoň jeden s obsiahnutých enzýmov a/alebo aspoň jeden z ostatných obsiahnutých komponentov je prítomný kapsulovaný samostatne alebo spoločne s inými

komponentmi, výhodne v mikrokapsulách, výhodnejšie v mikrokapsulách z materiálu senzitivneho voči amyláze.

44. Prostriedok podľa ktoréhokoľvek z nárokov 35 až 43, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že amylolytická aktivita je jedným z ostatných komponentov prostriedku modifikovaná, výhodne stabilizovaná a/alebo, čo sa týka prínosu k praciemu prípadne čistiacemu výkonu prostriedku, zvýšená.

45. Spôsob čistenia textílií alebo tvrdých povrchov, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že aspoň v jednom kroku spôsobu sa zaktivizuje amylolytický proteín alebo derivát podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 15.

46. Spôsob čistenia textílií alebo tvrdých povrchov, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že aspoň v jednom kroku spôsobu sa použije prostriedok podľa ktoréhokoľvek z nárokov 35 až 44.

47. Spôsob podľa nároku 45 alebo 46, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že amylolytický proteín alebo derivát sa v zodpovedajúcom kroku aplikuje v množstve 0,01 mg až 200 mg v jednom použití, výhodne 0,02 až 100 mg v jednom použití.

48. Použitie amylolytického proteínu alebo derivátu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 15 samostatne alebo spolu aspoň s jednou inou účinnou látkou s čistiacim účinkom alebo s účinkom podporujúcim čistiaci účinok na čistenie textílií alebo tvrdých povrchov.

49. Použitie prostriedku podľa ktoréhokoľvek z nárokov 35 až 44 na čistenie textílií alebo tvrdých povrchov.

50. Použitie podľa nároku 48 alebo 49, kde sa v jednom použití, výhodne v jednom použití v automatickej umývačke riadu alebo v práčke, použije 0,01 mg až 200 mg amylolytického proteínu alebo derivátu, výhodne 0,02 mg až 100 mg amylolytického proteínu alebo derivátu.

51. Použitie amylolytického proteínu alebo derivátu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 15 samostatne alebo spolu aspoň s jednou inou účinnou látkou s čistiacou aktivitou alebo s účinkom podporujúcim čistiaci účinok v pracom alebo čistiacom prostriedku pozostávajúcim z viac ako jednej fázy na aktiváciu vlastnej alebo inej fázy.

52. Použitie amylolytického proteínu alebo derivátu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 15 samostatne alebo spolu aspoň s jednou inou účinnou látkou s čistiacou aktivitou alebo s účinkom podporujúcim čistiaci účinok v pracom alebo čistiacom prostriedku s kapsulovanými komponentmi na uvoľňovanie komponentov z kapsúl.

53. Použitie proteínu alebo derivátu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 15 na spracovanie surovín alebo medziproduktov pri výrobe textílií, najmä na odšlichtovanie bavlny.

54. Spôsob skvapalnenia škrobu, najmä na výrobu etanolu, v y z n a č u j ú - c i s a t ý m, že sa použije proteín alebo derivát podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 15.

55. Použitie proteínu alebo derivátu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 15 na výrobu lineárnych oligosacharidov a/alebo oligosacharidov s krátkym reťazcom.

56. Použitie proteínu alebo derivátu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 15 na hydrolýzu cyklodextrínov.

57. Použitie proteínu alebo derivátu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 15 na uvoľňovanie nízkomolekulových zlúčenín z nosičov polysacharidov alebo cyklodextrínov.

58. Použitie proteínu alebo derivátu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 15 na výrobu potravín a/alebo komponentov do potravín.

59. Použitie proteínu alebo derivátu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 15 na výrobu krmiva pre zvieratá a/alebo komponentov do krmiva pre zvieratá.

60. Použitie proteínu alebo derivátu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 15 na rozpúšťanie lepiacich zlúčenín obsahujúcich škrob.

61. Spôsob dočasného lepenia, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa v ňom použije proteín alebo derivát podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 15.

1 70
1 (1) --MRFRKNGGLISILLAFLLVLTSPFTSANVEAHHNGTNGTMMQYFEWYLPNDGNHWNRLRSDASNLKDK
2 (1) MKMRFGKKGFLSILLAFLLVLTSPFTLVDVEAHHNGTNGTMMQYFEWYLPNDGNHWNRLNSDASNLKSK
3 (1) -----HHNGTNGTMMQYFEWYLPNDGNHWNRLRDDAANLKSK
4 (1) -----HHNGTNGTMMQYFEWHLPLNDGNHWNRLRDDASNLNR

71 140
1 (69) GITAVWIPPAWKGASQNDVGYGAYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTRNQLQAAVTALKSNGIQVYGDVVMNH
2 (71) GITAVWIPPAWKGASQNDVGYGAYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTRSQLQAAVTSLKNNGIQVYGDVVMNH
3 (38) GITAVWIPPAWKGTSQNDVGYGAYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTRNQLQAAVTSLKNNGIQVYGDVVMNH
4 (38) GITAIWIPPAWKGTSQNDVGYGAYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTRSQLESAIIHALKNNGVQVYGDVVMNH

141 210
1 (139) KGGAFATEWVRAVEVNPNSNRNQEVSGDYTIEAWTKFDFPGRGNTHSNFKWRWYHFDGVDWDQSRQLQNR
2 (141) KGGADATEMVRAVEVNPNNRNQEVSGDYTIEAWTKFDFPGRGNTHSSEFKWRWYHFDGVDWDQSRRLNR
3 (108) KGGADGTEIVNAVEVNRNQRNQTSGEYATIEAWTKFDFPGRGNTHSSEFKWRWYHFDGTDWDQSRQLQNK
4 (108) KGGADATENVLAVEVNPNSNRNQEISGDYATIEAWTKFDFPGRGNTYSDFKWRWYHFDGVDWDQSRQFNRI

211 280
1 (209) YKFRGDGKGWDWEVDTENGNYDYLYMYADIDMDHPEVVNELRNWGVWYTNLTGLDGFRIKAVKHIKYSFTR
2 (211) YKFRCHGKAWDWEVDTENGNYDYLYMYADIDMDHPEVVNELRNWGVWYTNLTGLDGFRIKAVKHIKYSFTR
3 (178) YKFRGTGKAWDWEVDTENGNYDYLYMYADVDMDHPEVIHELNRNWGVWYTNLTGLDGFRIKAVKHIKYSFTR
4 (178) YKFRGDGKAWDWEVDSENGNYDYLYMYADVDMDHPEVVNELRRWGEWYTNLTGLDGFRIKAVKHIKYSFTR

281 350
1 (279) DWLTHVRNTTGKNMFVAEAEFWKNDIGAIENYLSKTNWNHVSFVPLHYNLYNASRSGGNYDMRQIFNGTV
2 (281) DWINHVRSATGKNMFVAEAEFWKNDLGAIEENYLQKTNWNHVSFVPLHYNLYNASKSGGNYDMRNIFNGTV
3 (248) DWLTHVRNTTGKPMFAEAEFWKNDLGAIEENYLNKTSWNHSAFVPLHYNLYNASNSGGYDMRNILNGSV
4 (248) DWLTHVRNATGKEMFAEAEFWKNDLGAIEENYLNKTNWNHVSFVPLHYNLYNASNSGGNYDMAKLLNGTV

351 420
1 (349) VQRHPTHAVTFVDNHDSPQEEALESFVEEWFKPLACALTLTRDQGYPSVFYGDYYGIPTHGVPAMKSKID
2 (351) VQRHPSHAVTFVDNHDSPQEEALESFVEEWFKPLAYALTLTRDQGYPSVFYGDYYGIPTHGVPAMRSKID
3 (318) VQKHPTHAVTFVDNHDSPQGEALESFVQQWFKPLAYALVLTTRIQQGYPSVFYGDYYGIPTHGVPAMKSKID
4 (318) VQKHPMHAVTFVDNHDSPGESLESFVQEWFKPLAYALILTREQGYPSVFYGDYYGIPTHSVPMKAKID

421 490
1 (419) PILEARQKYAYGKQNDYLDHHNMIGWTREGNTAHPNSGLATIMSDGPGGNKWMYVGRNKAGQVWRDITGN
2 (421) PILEARQKYAYGKQNDYLDHHNIIIGWTREGNTAHPNSGLATIMSDGAGSKWMFVGRNKAGQVWSDITGN
3 (388) PLLQARQTFAYGTQHDYFDHDDIIIGWTREGNSSHPNSGLATIMSDGPGGNKWMYVGRNKAGQVWRDITGN
4 (388) PILEARQNFAYGTQHDYFDHDDNIIIGWTREGNTTHPNNSGLATIMSDGPGGEKWMYVQGNKAGQVWHHDITGN

491 518
1 (489) RSGTVTINADGWGNFVSNGGSVSIWVNN
2 (491) RTGTVTINADGWGNFVSNGGSVSIWVVK
3 (458) RTGTVTINADGWGNFVSNGGSVSIWVKQ
4 (458) KPGTVTINADGWANFVSNGGSVSIWVKR