

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2003 - 267

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **19.07.2001**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **28.07.2000 28.07.2000**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **2000/10036752 2000/10036753**

(33) Země priority: **DE DE**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **18.06.2003**

(Věstník č. 6/2003)

(86) PCT číslo: **PCT/EP01/08359**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO02/010356**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷ :

C 12 N 9/00

(71) Přihlašovatel:

**HENKEL KOMMANDITGESELLSCHAFT AUF
AKTIEN, Düsseldorf, DE;**

(72) Původce:

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) Zástupce:

Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Amylolytický protein

(57) Anotace:

Řešení se týká nového amylolytického enzymu z mikroorganismu *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368) a dostatečně podobných proteinů s amylolytickou funkcí, způsobu jejich výroby a různých možností použití těchto proteinů. Kromě uvedených možností použití se mohou dále rozvíjet pro další především technické účely. Zvláště se týká pracího a čistícího prostředku s tímto amylolytickým proteinem, způsobu čištění textilií nebo tvrdých povrchů za účasti tohoto amylolytického proteinu nebo odpovídajícího prostředku a jejich použití pro čištění textilií nebo tvrdých povrchů.

CZ 2003 - 267 A3

Amylolytický protein

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká nového amylolytického enzymu extrahovaného z mikroorganismu *Bacillus sp. A 7-7* (MSM 12368) a dostatečně podobných proteinů s amylolytickou funkcí, způsobu jejich výroby a různých způsobů použití těchto proteinů. Kromě uvedených způsobů použití se mohou dále rozvinout pro jiné, především technické účely. Předkládaná přihláška se týká zvláště pracího a čisticího prostředku s obsahem těchto amylolytických proteinů, způsobu čištění textilií nebo tvrdých povrchů za účasti těchto amylolytických proteinů nebo odpovídajících prostředků a jejich použití pro čištění textilií nebo tvrdých povrchů.

Dosavadní stav techniky

α -Amylázy (E.C. 3.2.1.1) hydrolyzují α -1,4-glykozidické vazby škrobu a polymerů podobných škrobu, které se nacházejí uvnitř polymeru, jako je například amyloza, amylopektin nebo glykogen, za vzniku dextrinů a rozvětvených β -1,6- oligosachridů. Patří vůbec k nejdůležitějším průmyslově využitelným enzymům. A to ze dvou důvodů: Na jedné straně se jako mnoho biologicky odbouratelných enzymů většinou rozkládají mikroorganismy do okolního prostředí, takže se v průmyslovém měřítku mohou při srovnatelně malých nákladech získat z kultivovaného prostředí fermentací a čištěním. Na druhé straně se amylázy uplatňují v širokém spektru použití.

Důležitým technickým použitím α -amylázy je výroba glukózového sirupu. Existují i jiná uplatnění, například jako aktivní složky pracích a čisticích

prostředků, pro úpravu surovin v textilním průmyslu, pro výrobu lepidel nebo pro výrobu potravin s obsahem cukru nebo složek potravin.

Enzymy jako proteázy, amylázy, lipázy nebo celulázy se již desítky let používají jako složky pracích a čisticích prostředků. Jejich přínosem pro prací popřípadě čisticí účinek konkrétního prostředku je v případě proteázy schopnost odbourávání nečistot s obsahem proteinu, v případě amylázy odbourávání nečistot s obsahem škrobu a v případě lipázy schopnost štěpit tuky. Celulázy se zvláště vzhledem k přínosu sekundárního pracího účinku pracího prostředku a vzhledem jejího působení na vlákna textilií s výhodou používá v pracích prostředcích. Produkty hydrolýzy se zbývajícími složkami pracího prostředku pohlcují, rozpouštějí, emulgují nebo suspendují nebo se na základě jejich větší rozpustnosti v prací lázni vyplaví, takže dochází k synergickým účinkům mezi enzymy a ostatními složkami.

α -Amylázou často používanou v pracích a čisticích prostředcích je α -amyláza z *Bacillus licheniformis*. Odpovídající produkt firmy Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Dánsko, například nese obchodní název Termamyl®; od firmy Genencor Int., Rochester, New York, USA se nazývá Purastar®. Homolog získaný z *B. subtilis*, popřípadě *B. amyloliquefaciens* a zveřejněný v přihlášce US 1 227 374 se vyrábí firmou Novo Nordisk A/S pod názvem BAN®.

Tato molekula amylázy, popřípadě její blízcí příbuzní, byly dále rozvinuty v mnoha vynálezech, které měly za úkol pomocí různých molekulárně-biologických modifikací optimalizovat své enzymatické vlastnosti pro specifická použití. Tyto optimalizace se mohou například týkat specifity substrátu, stability enzymu za různých reakčních podmínek nebo samotné enzymatické aktivity. Například lze pro tyto optimalizace ohledně specifických použití uvést následující přihlášky: EP 0410498 pro textilní břečky a WO 96/02633 pro ztekucování škrobu.

α -Amylázy se ale také především vzhledem k jejich použití v pracích a čistících prostředcích dále rozvíjejí. Jako příklady lze pouze uvést následující přihlášky: Amylázy podle přihlášky WO 99/02702 jsou při vyšších teplotách stabilnější než výchozí molekula. Enzymy podle přihlášky WO 99/23211 jsou při vyšších hodnotách pH za přítomnosti iontů vápníku a při vyšších teplotách stabilní. α -Amylázy podle přihlášky WO 97/43424 vykazují změněný způsob vazby iontů vápníku a tím změněné enzymatické vlastnosti. Způsob mutagenese podle přihlášky WO 99/20768 vede k variantám α -Amylázy, které jsou za přítomnosti složek čistícího prostředku zvláště stabilní. Při těchto modifikacích se prakticky vždycky změni jednotlivé enzymatické vlastnosti na jiné vlastnosti a změni se prací účinek konkrétního enzymu. Příkladem takto získaným optimalizačním produktem, mezitím komerčně uvedeným na trh, je Duramyl® (WO 94/02597) se sníženou oxidační citlivostí (Fa. Novo Nordisk A/S, Bagsvaerg, Dánsko; *SÖFW-Journal* 123, (1997), str. 723-731).

Protože vývoje, které spočívají pouze v optimalizaci je málo známých výchozích enzymů, jsou podle možností omezeny jen na dosažitelné výsledky, hledají se proto paralelně intenzivně srovnatelné enzymy z jiných přírodních zdrojů. Byly identifikovány enzymy schopné štěpit škrob například z *Pimelobacter*, *Pseudomonas* a *Thermus* pro výrobu potravin, kosmetiku a farmaka (EP 0 636693), rovněž *Rhizobium*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium* a *Micrococcus* (EP 0 628 630), z *Pyrococcus* (WO 94/19454) a *Sufolobus* pro ztekucování škrobu při vysokých teplotách, popřípadě za silně kyselých reakčních podmínek (EP 0 727 485 a WO 96/02633). Pro použití při alkalických hodnotách pH byly nalezeny amylázy z *Bacillus* sp. (WO 95/26397 a WO 97/00324). Vzhledem k jejich nízké citlivosti na detergenty jsou pro použití v pracích a čistících prostředcích vhodné jiné amylázy z různých *Bacilli* (EP 0 670 367).

Enzymy z nově objevených organismů jsou možná vhodnější vzhledem k jejich původu než málo etablované enzymy pro další rozvoj specifických použití. Příkladem je amyláza z *Thermoalcalibacter* (WO 98/13481), jejíž

přirozená aktivita je velmi necitlivá na ionty vápníku, takže s sebou přináší dobré předpoklady pro použití v pracích prostředcích.

Další optimalizace enzymů izolovaných z přírodních zdrojů pro tuto oblast použití lze například provést molekulárně-biologickými způsoby (podle US 5171673 nebo WO 99/20768) nebo chemickými modifikacemi (DE 4013142). V patentové přihlášce WO 99/43793 se například popisuje další rozvoj známé α -amylázy Novamyl®. Přitom se využívá sekvenčních podobností mezi Novamyl® a známými cyklodextringlukanotransferázami (CGTázy), aby se pomocí molekulárně-biologických zkonstruovala soustava příbuzných molekul. Přitom se jedná o α -amylázy s dalšími konsenzus sekvencemi a funkcemi specifickými na CGTázu (Boxy) nebo obráceně, o CGTázy s dalšími oblastmi a funkcemi typickými pro α -amylázy nebo o chiméry obou molekul. Smysl tohoto vývoje spočívá v tom, aby se optimalizoval Novamyl® pro tato použití.

V přihlášce WO 99/57250 se zveřejňují další metody, jak mohou enzymy pracích prostředků, například Lipázy, celulázy, proteázy, amylázy nebo také CGTázy zvýšit jeho prací účinek. Popsaný princip spočívá v tom, že tyto enzymy se kovalentně váží neaminokyselinovými vazbami na vazebné domény celulózy (CBD) bakteriálního původu. Ty se starají o to, že je enzym na povrchu textlie silně účinný. Spisem WO 99/57252 se do tohoto konceptu zahrnují další možné vazby a spisem WO 99/57254 jiné enzymy, jako například glykozyl-transferázy nebo acyl-transferázy, které jsou vázány na CBD buď za vzniku chimerního proteinu nebo vazbami uvedenými v WO 99/57252.

Každá amyláza, která se používá pro prací a čisticí prostředek, má individuální profil účinku, což se projevuje tím, že některá znečištění se odstraňují lépe jedním enzymem a jiná jiným enzymem. To dokládá navíc nutnost obohatit stav techniky o další amylolytické enzymy, které mají rovněž individuální spektrum působení. Tato nutnost vzniká také z měnících se zvyklostí a nároků

spotřebitele, podle kterých například existuje rostoucí potřeba po pracích prostředcích pro čištění při nižších a středních teplotách.

Proto mohou nové enzymy, které se mohou získat z organizmů doposud naépoužitých pro tento účel, ve smyslu „proteinového inženýrství“ sloužit jako výchozí bod pro další genově-technické modifikace. Cílem je dosažení vlastností, které dosud známé enzymy nebo od nich odvozené enzymy nemají nebo nemohou mít.

Na druhé straně se ale právě tyto přírodní enzymy jeví jako zvláště vhodní kandidáti pro tyto optimalizace, které společně s obvyklými pracími nebo čisticími složkami mají jistý prací, popřípadě čisticí účinek.

Přes všechny tyto vývoje ale existuje beze změny úkol, vedle málo přírodních amylolytických enzymů, které se v nezměněné formě nebo v podobě dalšího vývoje skutečně průmyslově využívají, nalézt další enzymy, které *a priori* mají široké spektrum použití a mohou sloužit jako výchozí bod pro další specifický vývoj.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález si položil za úkol identifikovat přírodní dosud nepopsanou α -amylázu, která se samotná jeví jako vhodná pro technické možnosti použití, zvláště v pracích a čisticích prostředcích nebo může sloužit jako základ pro specifická použití při dalším rozvoji.

Dílčí úkol spočíval v tom, aby se získaly nukleové kyseliny kodované pro tuto α -amylázu, protože jsou nepostradatelné jak pro biotechnologickou výrobu, tak také pro další vývoj těchto enzymů.

Další dílčí úkol spočíval v tom, aby se našel organismus, který tyto α -amylázy přirozeným způsobem produkuje.

Další dílčí úkol spočíval v tom, aby se umožnila biotechnologická výroba nalezené α -amylázy.

Další dílčí úkol spočíval v tom, aby se vyrobil prací nebo čisticí prostředek, jehož prací popřípadě čisticí účinek se pomocí nalezené α -amylázy zlepší, to znamená, že lze prací popřípadě čisticí účinek alespoň z části přisoudit amylolytickému proteinu podle vynálezu.

Další dílčí aspekty spočívají ve vytvoření odpovídajícího způsobu praní nebo čištění a uvedení odpovídajících možností použití.

Další dílčí úkol spočíval v tom, aby se definovaly další technické možnosti použití pro α -amylázu, která se v první řadě jeví jako vhodná pro použití v pracích a čisticích prostředcích.

Řešení úkolu a tím prvního předmětu vynálezu představují amylolytické proteiny, jejichž sekvence aminokyselin je identická k sekvenci aminokyselin uvedené v SEQ ID No.2 alespoň z 96 %, výhodně alespoň z 98 %, zvláště výhodně ze 100 %, zvláště v dílší oblasti, která odpovídá aminokyselinám 32 až 516 podle SEQ ID No.2.

Patří k nim takové amylolytické proteiny, které se odvozují od jedné nukleotidové sekvence, která je identická k nukleotidové sekvenci uvedené v SEQ ID NO.1 alespoň z 85 %, výhodně alespoň z 90 % a zvláště výhodně ze 100 %, zvláště v dílčí oblasti, která odpovídá aminokyselinám 32 až 516 podle SEQ ID NO.2. Patří k nim také takové proteolytické enzymy, které jsou jim dostatečně podobné nebo mohou být známými metodami odvozeny. Výhodné zástupce lze ovšem izolovat z mikroorganismů, zvláště gram-pozitivních bakterií rodu *Bacillus*, zvláště druhu *Bacillus sp. A 7-7*, a z toho zvláště z *Bacillus sp. A 7-7* (DSM 12368).

Druhý předmět podle vynálezu tvoří nukleové kyseliny kodující pro amylolytické proteiny, jejichž nukleotidová sekvence je identická k nukleotidové sekvenci uvedené v SEQ ID NO.1, alespoň z 85 %, výhodně z 90 % a zvláště výhodně ze 100 %, zvláště v dílčí oblasti, která odpovídá aminokyselinám 32 až 516 SEQ ID NO.2. Patří k nim odpovídající nukleové kyseliny, které kodují pro uvedené proteiny prvního předmětu vynálezu.

Třetí předmět vynálezu tvoří přírodní organizmy, které tvoří protein nebo derivát prvního předmětu vynálezu nebo obsahují kodující nukleové kyseliny. Zvláště výhodnou formou provedení je kmen *Bacillus sp. A 7-7*, který byl uložen pod označením DSM (12368).

Čtvrtý předmět vynálezu tvoří vektory s nukleovými kyselinami druhého předmětu vynálezu, hostitelské buňky transformované těmito vektory a

všechny biotechnologické způsoby býroby proteinu nebo derivátu podle prvního předmětu vynálezu.

Pátý předmět vynálezu tvoří prací a čisticí prostředky, které se vyznačují tím, že obsahují protein nebo derivát podle prvního předmětu vynálezu. Patří k nim s výhodou ty, které obsahují amylolytický protein nebo derivát v podílech 0,000001 % hmotn. až 5 % hmotn., zvláště 0,00001 až 3 % hmotn., které obsahují další enzymy, které existují ve známých formách podávání nebo ve kterých amylolytická aktivita plní funkci pro uvolňování složek prostředku nebo se sama kontroluje.

Šestý předmět vynálezu tvoří způsob čištění textilií nebo tvrdých povrchů, které se vyznačují tím, že alespoň v některém technologickém kroku je amylolytický protein nebo derivát prvního předmětu vynálezu aktivní. S výhodou se zde používají prostředky podle pátého předmětu vynálezu; a s výhodou dochází k použití amylolytického proteinu nebo derivátu v konkrétním technologickém kroku v množství 0,01 mg až 200 mg na použití, výhodně 0,02 mg až 100 mg na použití

Sedmý předmět vynálezu tvoří odpovídající možnosti použití proteinů nebo derivátů prvního předmětu vynálezu nebo prostředků pátého předmětu vynálezu pro čištění textilií nebo tvrdých povrchů nebo pro uvolňování složek odpovídajících prostředků; s výhodou pro použití v myčce nádobí nebo pračce prádla, v množství 0,01 mg až 200 mg, výhodně 0,02 mg až 100 mg amylolytického proteinu nebo derivátu.

Osmý předmět vynálezu tvoří další technické možnosti použití nalezených α -amyláz. Patří k nim způsob ztekucování škrobu, zvláště pro výrobu ethanolu, dočasný způsob lepení a různé možnosti použití, zvláště pro úpravu surovin nebo meziproduktů v textilní výrobě, zvláště pro odšlichtování bavlny, pro výrobu oligosacharidů s lineárním a/nebo s krátkým řetězcem, pro

hydrolýzu cyklodextrinů, pro uvolňování nízkomolekulárních sloučenin z polysacharidových nosičů nebo cyklodextrinů, pro výrobu potravin a/nebo potravinových složek, pro výrobu krmiva pro zvířata a/nebo složek krmiv pro zvířata a pro rozpouštění lepených spojů obsahujících škrob.

Proteinem se ve smyslu předkládané přihlášky rozumí polymer, který je složen z přírodních aminokyselin, nadále lineárně vystavěn, a má pro vykonávání své funkce většinou trojrozměrnou strukturu. V předkládané přihlášce se 19 proteinových genů, L-aminokyselin vyskytujících se v přírodě, označují mezinárodně používanými kódy s 1 a 3 písmeny.

Enzymem se ve smyslu předkládané přihlášky rozumí protein, který vykonává určitou biochemickou funkci. Amylolytickými proteiny nebo enzymy s amylolytickou funkcí se rozumí ty, které hydrolyzují α -1,4-glykozidické vazby polysacharidů, zvláště ty, které jsou uvnitř polysacharidů. Označují se také proto jako α -1,4-amylázy (E.C.3.2.1.1).

Četné proteiny se tvoří jako takzvané preproteiny, tedy společně se signálním peptidem. Tím se potom rozumí N-koncová část proteinu, jehož funkce spočívá většinou v tom, že se zajistí převedení vytvořeného proteinu z produkující buňky do periplazmy nebo okolního prostředí a/nebo jeho správné řasení. Následně se signální peptid za přirozených podmínek odštěpí signálpeptidázou od zbývajícího proteinu, takže vytváří svou vlastní katalytickou aktivitu bez dřívějšího T-zakončení. Přírodní α -amyláza z *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368) je například dlouhá 516 aminokyselin, jak je uvedeno v SEQ ID NO.2. Jak je uvedeno v SEQ ID NO.1, obsahuje signální peptid tohoto enzymu 31 aminokyselin, takže z toho pro zralý (mature) enzym vyplývá délka 485 aminokyselin.

Pro technická použití jsou z důvodu své enzymatické aktivity výhodnější zralé (mature) peptidy, to znamená enzymy procesované po jejich výrobě, oproti pre-proteinům.

Pro-proteiny jsou inaktivní předstupně proteinů. Jejich předchůdci se signální sekvencí se označují jako pre-pro-proteiny.

Nukleovými kyselinami se ve smyslu předkládané přihlášky se rozumí molekuly vystavěné z nukleotidů a sloužící jako nosiče informace, které kódují lineární sled aminokyselin v proteinech nebo enzymech. Mohou existovat jako jedinný provazec nebo jako komplementární jedinný provazec k tomuto jedinnému provazci nebo jako dvojitý provazec. Jako dlouhodobý nosič informace je pro molekulárně-biologické práce ovšem výhodná nukleová kyselina DNA. Tím se pro realizaci vynálezu v přirozeném prostředí, jako v exprimující buňce, tvoří RNA, čímž molekuly RNA podstatně podle vynálezu rovněž představují formy provedení předkládaného vynálezu.

U DNA je nutné vzít v úvahu sekvence obou komplementárních provazců ve všech třech možných čtecích rastroch. Dále je nutné vzít v úvahu, že se mohou kódovat různé kodonové tripletty pro stejné aminokyseliny, takže lze odvodit určitý sled aminokyselin mnoha různých nukleotidových sekvencí, které mají možná jen nepatrnou identitu (degenarace genetického kódu). Kromě toho mají různé organizmy rozdíly v použití tohoto kodonu. Z těchto důvodů se musí jak aminokyselinové sekvence, tak také nukleotidové sekvence zahrnout do oblasti ochrany a na uvedené nukleotidové sekvence se pohlíží jen jako na příkladné kódování pro určitý sled aminokyselin.

Informační jednotka odpovídající proteinu se ve smyslu předkládané přihlášky označuje jako gen.

Dnes obecně známé metody, jako je například chemická syntéza nebo polymerázová řetězová reakce (PCR), společně s molekulárněbiologickými a/nebo proteinchemickými standardními metodami umožňují odborníkovi na základě známých DNA- a/nebo aminokyselinových sekvencí vyrobit odpovídající nukleové kyseliny až úplné geny. Tyto metody jsou známy například z „Lexikon der Biochemie“, Spektrum Akademischer Verlag, Berlin, 1999, Svazek 1, Str. 267-271 a Svazek 2, Str. 227-229.

Změny nukleotidové sekvence, ke kterým může docházet například známými molekulárněbiologickými metodami, se označují jako mutace. Podle druhu změny jsou známy například deleční, inzertní nebo substituční mutace nebo takové, u kterých různé geny nebo části genů spolu fuzují (shuffling); to jsou genové mutace. Příslušné organizmy se označují jako mutanty. Proteiny odvozené od nukleových kyselin se označují jako varianty. Tak vytvářejí například deleční, inzertní a substituční mutace nebo fuze delečně, inzertně a substitučně mutované nebo fuzní geny a na proteinové rovině odpovídající deleční, inzertní nebo substituční varianty, popřípadě fuzní proteiny.

Fragmenty se rozumí všechny proteiny nebo peptidy, které jsou menší než přírodní proteiny nebo takové, které odpovídají zcela translačním genům a mohou se například získat také synteticky. Na základě svých aminokyselinových sekvencí se mohou přiřadit příslušným úplným proteinům. Mohou mít například stejnou strukturu nebo prokazovat proteolytické aktivity nebo částečné aktivity, jako je například komplexace substrátu. Fragmenty a deleční varianty výchozích proteinů jsou principiálně stejné; zatímco fragmenty představují spíše menší úlomky, chybějí delečním mutantům spíše jen krátké oblasti, a tím jen jednotlivé částečné funkce.

Chimerní nebo hybridní proteiny se ve smyslu předkládané přihlášky rozumí takové proteiny, které se skládají z prvků, které ovšem pocházejí z různých polypeptidických řetězců z téhož organismu nebo z různých organismů. Tento postup se také nazývá shuffling nebo fuzní mutageneze. Smysl takové fuze

může spočívat například v tom, že se pomocí nafuzované proteinové části způsobí nebo modifikuje určitá enzymatická funkce.

Proteiny, které se získají inzertní mutací, se rozumí varianty, které byly získány zmánými metodami připojením fragmentu nukleové kyseliny popřípadě proteinu do výchozích sekvencí. Řadí se v důsledku své stejnorodosti k chimerním proteinům. Liší se od nich pouze v poměru velikosti nezměněné části proteinu k velikosti celého proteinu. V těchto inzertně mutovaných proteinech je podíl cizího proteinu menší než v chimerních proteinech.

Inverzní mutagenese, tedy částečná obrácení sekvence, lze považovat jako zvláštní formu jako delece, tak také inserce. To samé platí pro nové seskupení různých molekul odchylojících se od původního sledu aminokyselin. Může se považovat jak za deleční variantu, tak inzertní varianta, tak také za variantu shufflig původního proteinu.

Deriváty se ve smyslu předkládaného vynálezu rozumí takové proteiny, jejichž čistý aminokyselinový řetězec byl chemicky modifikován. Tato tvorba derivátů může probíhat například biologicky v souvislosti s biosyntézou proteinu organizmem hostitele. Přitom se mohou použít molekulárně biologické metody. Mohou se ale také provést chemicky, a sice chemickou přeměnou postranního řetězce aminokyseliny nebo kovalentní vazbou jiné sloučeniny na protein. U takové sloučeniny se může jednat o jiné proteiny, který se na proteiny podle vynálezu váží například bifunkčními chemickými součeninami. Rovněž se tvorbou derivátů rozumí kovalentní vazba na makromolekulární nosič.

Ve smyslu předkládaného vynálezu výše uvedený pojem proteiny zahrnuje všechny enzymy, proteiny, fragmenty a deriváty, pokud se explicitně jako takové nemusí uvádět.

Vektory se ve smyslu předkládaného vynálezu rozumí prvky sestávající z nukleových kyselin, které jako charakteristickou oblast nukleové kyseliny obsahují zvláště důležitý gen. Dosáhnou toho v jednom druhu nebo jedné buněčné linii mnoha generacemi nebo buněčných dělení, než se ze zbyvajících genomu etabluje nezávisle replikovaný, stabilní genetický prvek. Vektory jsou zvláště při použití u bakterií speciální plazmidy, tedy cirkulární genetické prvky. V genové technice se rozlišuje na jedné straně mezi těmi vektory, které slouží k uložení a tím jistým způsobem k genové technické práci, takzvanými klonovacími vektory, a na druhé straně těmi, které splňují funkci, kterou se důležitý gen realizuje v buňce hostitele, to znamená, že umožňuje expresi příslušného proteinu. Tyto vektory se označují jako expresní vektory.

Srovnáním se známými enzymy, které jsou například uloženy ve všeobecně přístupných databankách, lze z aminokyselinové nebo nukleotidové sekvence odvodit charakteristické molekulové části, jako například strukturní prvky nebo enzymatickou aktivitu sledovaného enzymu. Takové srovnání se provede tak, že se vzájemně přiřazují podobné sledy v nukleotidové nebo aminokyselinové sekvence sledovaných proteinů. To se nazývá homologizace. Tabulkové přiřazení příslušných pozic se označuje jako alignment (seřazení do řady). Při analýze nukleotidových sekvencí jsou opět zohledněny obě komplementární vlákna a všechny tři možné čtecí rastry; rovněž degenerace genetického kódu a organismu specifický codon-usage. Mezitím se alignmenty zjistí počítačovým programem, jako například algoritmem FASTA nebo BLAST; tento postup je například popsán D.J.Lipman a W.R.Pearson (1985) v Science, Svazek 227, Str. 1435-1441. Souhrn všech shodných poloh ve srovnávaných sekvencích se označuje jako konsenzuální sekvence (Consensus-Sequenz).

Takové porovnání umožňuje také výpověď o podobnosti nebo homologii vzájemně porovnávaných sekvencí. To se opakuje v procentové identitě, to

znamená podílu identických nukleotidů nebo aminokyselinových zbytků ve stejných polohách. Další obsažený homologový pojem zahrnuje v této hodnotě konzervované aminokyselinové výměny. Jedná se potom o podobnosti v procentech. Takové výpovědi se mohou týkat celého proteinu nebo genu nebo jen jednotlivých oblastí.

Homologické oblasti různých proteinů jsou většinou oblasti se stejnými strukturními prvky a/nebo funkcemi, které lze poznat shodami v primární aminokyselinové sekvenci. Jde až k úplným identitám v nejmenších oblastech, takzvaných boxů, které obsahují jen málo aminokyselin a většinou vykonávají podstatné funkce pro celkovou aktivitu. Funkcemi homologických oblastí se většinou rozumí nejmenší dílčí funkce celkové funkce vykonávané celým proteinem, jako například vytvoření jednotlivých vazeb vodíkových můstků pro komplexaci substrátu nebo přechodových komplexů.

Enzymatická aktivita se může kvalitativně nebo kvantitativně modifikovat jinými oblastmi proteinu, které se nepodílí na vlastní reakci. To se týká například stability enzymu, aktivity, reakčních podmínek nebo specifity substrátu.

Pod pojmem amylolytický protein podle vynálezu se tím nerozumí samotný amylolytický protein s čistou funkcí, provádějící hydrolýzu α -1,4-glykozidických vazeb, které opět vznikají na několika aminokyselinových zbytcích pravděpodobného katalyticky aktivního centra. Obsahuje proto všechny funkce podporující hydrolýzu α -1,4-glykozidické vazby. Mohou se dosáhnout například jednotlivými peptidy a také jedním nebo více jednotlivými díly proteinu působením na původní katalyticky aktivní oblasti. Pojem amylolytická funkce však obsahuje také tyto modifikované funkce. Neboť na jedné straně není přesně známo, které aminokyselinové zbytky proteinu podle vynálezu skutečně katalyzují hydrolýzu, a na druhé straně nelze výše uvedené jednotlivé funkce definitivně vyloučit z podílu na katalýze. K pomocným funkcím nebo dílčím aktivitám patří například vazba substrátu, meziprojektu

nebo konečného produktu, aktivace nebo inhibice nebo zprostředkování regulujícího vlivu na hydrolytickou aktivitu. Přitom se může také například jednat o vytvoření strukturního prvku, který leží daleko od aktivního centra, nebo o signální peptid, jehož funkce se týká vyloučení vytvořeného proteinu z buňky a/nebo jeho skládání a aniž se zpravidla vytvoří *in vivo* funkční enzym. Ovšem celkově musí vzninout hydrolýza α -1,4-glykozidických vazeb škrobu nebo polymerů podobných škrobu.

Účinkem enzymu se rozumí jeho účinnost ve sledované technické oblasti. Je založen na vlastní enzymatické aktivitě, přičemž však také závisí na dalších faktorech, které jsou relevantní k uvedenému procesu. Patří k nim například stabilita, vazba substrátu, změna účinku materiálem, který nese substrát nebo změny účinků jinými obsaženými látkami, zvláště synergie. Tak se například při výzkumu, zda je enzym vhodný pro použití v pracím nebo čisticím prostředku, sleduje jeho přínos pro práci nebo čisticí účinek prostředku formulovaným s dalšími složkami. Pro různá technická použití lze enzym pomocí známých molekulárněbiologických technik dále rozvíjet a optimalizovat.

Podle Budapeštské smlouvy o mezinárodním uznávání uložení mikroorganismů z 28. dubna 1977 byl pro předkládaný vynález uložen u Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH v Braunschweigu DSMZ) následující mikroorganismus: *Bacillus* sp. A7-7. Je označen registračním číslem DSM 12368 (DSM 98-587). Rozhodující údaje o znacích tohoto biologického materiálu, které byly stanoveny DSMZ při uložení, jsou shromážděny v následující tabulce 1.

Tabulka 1

Mikrobiologické vlastnosti Bacillus sp. A 7-7 (DSM 12368) (stanoveno DSMZ 9.10. 1998)

Vlastnost	Výsledek
Tvar buňky	Tyčinky
Šířka (μm)	3,0 - 4,5
Délka (μm)	0,8 - 1,0
Spory	pozitivní/ovální
Sporangium	nabobtnalé
Oxidáza	pozitivní
Kataláza	pozitivní
Anaerobní růst	pozitivní
Reakce VP	negativní
Hodnota pH v prostředí VP	9,1
Růst při teplotě 40 °C	pozitivní/slabá
Růst při teplotě 50 °C	negativní
Růst v	
prostředí pH 7,0	negativní
NaCl 2 %	pozitivní
NaCl 5 %	pozitivní
NaCl 7 %	pozitivní
NaCl 10 %	pozitivní
NaCl 12 %	negativní
NaCl 16 %	negativní
prostředí lysozymu	pozitivní
Kyselina z	
D-glukózy	negativní
L-arabinózy	negativní
D-xylózy	negativní
D-Manitu	pozitivní
D-fruktózy	pozitivní

Pokračování tabulky 1

Hydrolýza	
škrobu	pozitivní
želatiny	pozitivní
kaseinu	pozitivní
tyrozinu	slabá
tweenu 80	pozitivní
tweenu 60	pozitivní
tweenu 40	pozitivní
tweenu 20	negativní
Lecitináza	pozitivní
Pululan	pozitivní
Hydrolýza hipurátu	pozitivní
Esculin	pozitivní
Využití	
citrátu	pozitivní
propionátu	pozitivní
NO ₂ z NO ₃	pozitivní
Indolová reakce	negativní
Dezamináza feny alaninu	negativní
Výsledek	Bacillus sp. (RNA-skupina VI, alcaliphil)
Poznámka	Fyziologické výsledky testů ukazují na rod <i>B. Alcalophilus</i> nebo <i>B. Horikoshii</i>, nemusejí však jednoznačně identifikovat žádný z uvedených rodů. Kmenn ukazuje 2 formy kolonií, které však byly pomocí analýzy mastné kyseliny stanoveny jako varianty jednoho vzorku. Částečné sekvencování 16S rDNA poskytlo potvrzení 94,8 % <i>B. Alcalophilus</i>. Jedná se pravděpodobně u kmene A 7-7 o zástupce nového rodu.

Protože se vycházelo z této charakteristiky, bylo možné s překvapením zjistit, že amylolytický enzym, vyrobený z tohoto kmene, má vlastnosti, které jej

předurčují pro použití v mnoha technických procesech. Přitom kmen disponuje vlastnostmi, které příznivě působí na kultivaci.

Amylolytický enzym kmene *Bacillus sp.* A 7-7 (DSM 12368) podle vynálezu lze, jak je podrobně předloženo v příkladu 2, následujícím způsobem biochemicky charakterizovat: Jako zralý protein má při denaturující SDS-polyakryldelové elektroforéze zřejmu molekulární hmotnost 58 kD, zatímco lze z proteinové sekvence (SEQ ID No.2), obsahující 516 aminokyselin, odvodit molekulární hmotnost cirká 59 kD, popřípadě po odštěpení signálního peptidu, obsahujícího 31 aminokyselin, molekulární hmotnost 55,5 kD. Podle izoelektrické fokuzace je izoslektrický bod zralého proteinu 6,0. Má aktivitu štěpící škrob. Při inkubaci 10 minut při hodnotě pH 10 a teplotě až 50 °C je stabilní. Při teplotě 60 °C existuje ještě 50 % zbytkové aktivity. Enzym je při inkubaci nad 10 minut při teplotě 40 °C nadále stabilní při hodnotách pH 5 až 12, nejlepší stabilita je pozorována při hodnotě pH 9. Za přítomnosti 0,1 % SDS po inkubaci 5 minut při hodnotě pH 10 a teplotě 50 °C má enzym ještě zbytkovou aktivitu 98 %. Navíc za přítomnosti 10 HPE/ml na aktivitu proteázy a po inkubaci 15 minut při hodnotě pH 10 a teplotě 50 °C má enzym ještě zbytkovou aktivitu 74 %.

Předkládaným vynálezem se tedy dává k dispozici v přírodě se vyskytující enzym, na který je nutno na základě jeho sekvenčních homologií k dosud známým enzymům a na základě jeho enzymatické aktivity pohlížet jako na α -amylázu. Lze jej principiálně použít pro všechna použití, která vyžadují amylolytickou funkci. Je vhodný zvláště pro taková použití, která probíhají při alkalických hodnotách pH a středních oblastech teplot, zvláště při hodnotách pH nad 9 a/nebo teplotách nad 40 °C. Spektrum použití se rozšiřuje srovnatelně s vysokou stabilitou enzymu proti detergentům a proteázám. Zdá se tím být zvláště vhodný pro použití v pracím a čistícím prostředku.

Nukleotidová sekvence tohoto enzymu se v sekvenčním protokolu uvádí pod označím SEQ ID No.1. Je tak například k dispozici pro další vývoj pomocí

známých molekulárně biologických metod. Aminokyselinová sekvence tohoto enzymu se v sekvenčním protokolu uvádí pod označením SEQ ID No. 2.

Srovnatelné amylolytické proteiny představují rovněž formy provedení předkládaného vynálezu a budou dále nárokovány ty, které mají proteinovou nebo DNA-sekvenci, které jsou v rozmezí podobnosti k sekvencím uvedeným v SEQ ID No.1 a/nebo SEQ ID No.2. Tato oblast podobnosti obsahuje proteiny, jejichž aminokyselinová sekvence je identická k aminokyselinové sekvenci, uvedené v SEQ ID NO.2, alespoň z 96 %, z 96,5 %, z 97 %, z 97,5 %, z 98 %, z 98,5 %, z 99 %, z 99,5 % nebo ze 100 %. Oblast podobnosti obsahuje také všechny proteiny, jejichž nukleotidová sekvence je identická k nukleotidové sekvenci, uvedené v SEQ ID No.1, alespoň z 85 %, z 87,5 %, z 90 %, z 92,5 %, z 95 %, z 96 %, z 97 %, z 98 %, z 99 % nebo ze 100 %. To zvláště platí pro ty části proteinu, které se týkají aminokyselin 32 až 516.

U dalšího podobného proteinu, známého do 17.3.2000, se jedná o α -amylázu z *Bacillus alcalophilus* s označením P 19571 v databance Swiss-Prot (Geneva Bioinformatics (GeneBio) S.A., Genf, Schweiz; <http://www.genebio.com/sprot.html>). Ten má vzhledem k amylolytickému enzymu z *Bacillus sp.* A 7-7 (DSM 12368) podle vynálezu 93,4% identitu sekvenční homologie na proteinové rovině. Protein podle vynálezu je homologickými oblastmi jednoznačně charakterizován jako α -amyláza. Reprezentativní příbuzné proteiny jsou uvedeny v uspořádání na obrázku 1.

Na základě tohoto uspořádání mohou proteiny podle vynálezu dále zaujímat stejné sekundární nebo terciární struktury, jako proteiny určené pro homologizaci. Jejich strukturní prvky lze získat v obecně přístupných databankách, jako je například na EMBL-European Bioinformatics Institute (EBI) v Cambridge, Velké Británii (<http://www.ebi.ac.uk>), Swiss-Prot nebo GenBank (National Center for Biotechnology Information NCBI, National Institutes of health, Bethesda, MD, USA). Kdyby se vyskytly odchylné struktury nebo by vyvstalo, že existují různé složené varianty s různými

amylolytickými vlastnostmi, což například týká optimálních reakčních podmínek nebo specifity substrátu, budou všechny zahrnuty do rozsahu ochrany předkládaného vynálezu. Neboť na jedné straně může řazení záviset na výrobních podmínkách, například na přítomnosti nebo nepřítomnosti vedoucího peptidu (Leader-peptid). Na druhé straně se mohou různé možnosti použití, například pro kvantitativní ztekucení škrobu, pro hydrolýzu cyklodextrinu nebo pro použití v pracím nebo čisticím prostředku, ukázat jako zvláště vhodné.

Zvláštní význam má dílčí sekvence, která odpovídá aminokyselinám 32 až 516 ze sekvence uvedené v SEQ ID No.2. Neboť prvních 31 aminokyselin představují, jak je možno usoudit z aminokyselinové sekvence, signální peptid, který zřejmě při tvorbě v odpovídajících mikroorganismech zahajuje vylučování proteinu a vnitřní části buňky do prostředí okolo buněk. Tento signální peptid se po vyloučení *in vivo* odštěpí, takže se využívá vlastní amylolytická aktivita zbývajících částí proteinu.

Pro vlastní amylolytickou funkci mají tak pravděpodobně aminokyseliny 1 až 31 malý význam, jinak je tomu pro výrobu a zvláště pro žádané řazení. Proto je nelze vyloučit z oblasti ochrany předkládaného vynálezu.

Kdyby nastalo, že by se při výrobě vyskytly odchylky v délce signálního peptidu a/nebo přírodního peptidu, například jedním nebo jiným kmenem bakterie, tak platí nároky vztažené na polohy 1 až 31, popřípadě 32 až 516 podle SEQ ID No.2 podle variant odchylky. Tak by bylo například možné, že nastane přenos proteinu z *Bacillus sp. A 7-7* (DSM 12368) již šest nukleotidů před nukleotidovou sekvencí uvedenou v SEQ ID No.1. Před tímto pravděpodobným začátkem leží šest nukleotidů ATGACG. Mohly by být přeneseny jako Met-Thr, přičemž N-koncový signální peptid bude o dvě aminokyseliny delší a vznikne určitá podobnost k amyláze z *Bacillus sp. # 707* uvedené pod číslem 2 na obrázku 1. Rovněž jsou možné variace při odštěpení signálního peptidu.

Mezi variantami, které se nacházejí v oblasti podobnosti uvedené výše, jsou zvláště výhodné ty, které mají vzhledem k předpokládaným možnostem použití optimální vlastnosti. Ty jsou vyrobitelné známými, výhodně molekulárně biologickými metodami. Například by bylo také možné, při použití znalostí z přihlášky WO 94/18314, deletovat methioninové, tryptofanové, cysteinové a/nebo tyrozinové zbytky proteinů podle vynálezu a/nebo substituovat nesnadno oxidovatelné aminokyselinové zbytky. Tím lze zlepšit oxidační stabilitu, profil aktivity hodnoty pH a/nebo termostabilitu. Další vývoj přes cílené bodové mutagenese se mohou orientovat například na přihlášky WO 99/09183 a WO 99/23211.

Fragmenty podle vynálezu se rozumí všechny proteiny nebo peptidy, které jsou menší než proteiny, které odpovídají proteinům z SEQ ID No. 1 nebo SEQ ID No.2., a jsou k nim v odpovídajících dílčích sekvencích dostatečně homologické. Pokud mají amylolytickou funkci nebo alespoň funkci, která podporuje hydrolýzu α -1,4-glykozidické vazby, jsou pokládány za amylolyticky aktivní fragmenty a představují formy provedení předkládaného vynálezu. To se týká například těch fragmentů, které přispívají ke tvorbě komplexu substrátu nebo ke tvorbě strukturního prvku požadovaného pro hydrolýzu. U fragmentů se může například jednat o jednotlivé domény nebo o úlomky, které nesouhlasí s doménami. Takové fragmenty se mohou vyrobit s nižšími náklady, přičemž již nemají určité eventuálně nevýhodné vlastnosti výchozí molekuly, které možná rozvíjejí regulační mechanismus snižující aktivitu nebo příznivější profil aktivity. Tyto proteinové fragmenty se mohou také vyrobit nebiosynteticky, nýbrž například chemicky. Chemická syntéza může být potom například výhodná, když se v návaznosti na syntézu mají provést chemické modifikace.

Fragmentům jsou vzhledem k jejich principiální stejnorodosti také pomocí deleční mutace přiřazeny získané proteiny. Ty se mohou nadále shodovat biochemicky s výchozími molekulami nebo již nemít jednotlivé funkce. To se

jeví jako smysluplné zvláště například v oblastech inhibujících deletaci. Ve výsledku může delecemi docházet jak ke specializaci, tak také k rozšíření oblastí použití proteinu. Pokud se tím v nejširším smyslu zachová, modifikuje, specifikuje nebo také nejprve dosáhne amylolytické funkce, jedná se u delečních variant, jako jsou fragmenty, o proteiny podle vynálezu; navíc jediným předpokladem pro to je, že se přes ještě existující homologickou dílčí sekvenci nacházejí uvnitř oblasti podobnosti k sekvencím SEQ ID No. 1 a SEQ ID No. 2.

Tak je možné se opřít o WO 99/57250, jak protein podle vynálezu nebo jeho části opatřit peptidickou nebo nepeptidickou vazbou s vazebnými doménami z jiných proteinu a tím efektivněji vytvořit hydrolýzu substrátu. Tyto sestavy potom patří do obalsti ochrany předkládaného vynálezu, pokud vykazují amylolytické aktivity a části sestavy, které vykazují tuto funkci, jsou dostatečně podobné uvedených sekvencím podle vynálezu. Rovněž také mohou být amylolytické proteiny podle vynálezu například spojeny s proteázami, aby vykazovaly dvojítu funkci.

Jako fragmenty vytvořené v přírodě, popřípadě delečně mutované proteiny, lze také považovat proteiny a signální peptidy, získané odštěpením N-koncových aminokyselin od preproteinů. Tento mechanismus odštěpení lze použít také k tomu, aby se pomocí určitých sekvenčních oblastí, které jsou známé signálním peptidázám, předem v rekombinantních proteinech určily specifická místa odštěpení. Tím se mohou *in vitro* předem stanovit aktivace a/nebo deaktivace proteinů podle vynálezu. Na každý z těchto proteinů se vztahuje rozsah ochrany předkládaného vynálezu, pokud leží v nárokovaném rozsahu ochrany a poskytuje amylolytickou aktivitu.

Chimerními nebo hybridními proteiny podle vynálezu se rozumí takové proteiny, které se skládají z prvků, které přirozeně pocházejí z různých polypeptidických řetězců. Tento způsob se také nazývá Schufflingova nebo fuzní mutageneze. Jedná se potom o chimerní proteiny podle vynálezu, pokud

proteiny získané fuzí mají v nejširším smyslu amylolytickou aktivitu. Tu může vykazovat část molekuly nebo se může modifikovat, přičemž se vychází z proteinu podle vynálezu, který leží uvnitř nárokové oblasti podobnosti. Smysl této fuze může například spočívat v tom, že pomocí nafuzovaných proteinových částí podle vynálezu vznikne nebo se modifikuje amylolytická funkce nebo funkce podporující hydrolýzu α -1,4-glykkozidických vazeb. Je přitom ve smyslu předkládaného vynálezu nepodstatné, zda se takový chimerní protein skládá z jediného polypeptidického řetězce nebo více podjednotek, na které se mohou rozdělit různé funkce. Pro realizaci poslední uvedené alternativy je například možné, aby se jediný chimerní polypeptidický řetězec cíleným proteolytickým štěpením rozložil na více částí posttraslačně nebo teprve po kroku čištění. K předmětu vynálezu také patří takové chimerní proteiny, které na základě své stavby mají po celé své aminokyselinové a/nebo nukleotidové sekvenci případně menší identitu než pro oblast podobnosti podle vynálezu definovanou výše, které mu ale mohou přičítat přinejmenším jednu z oblastí získanou fuzí a v této části vykazují stejné funkce jako v amyláze, která svou celou délkou spadá do uvedené homologické oblasti.

Proteiny podle vynálezu, získané inzertní mutací, se rozumí varianty proteinů spadající celou svou délkou sekvence do uvedeného rozsahu ochrany sekvencí SEQ ID No.1 nebo SEQ ID No. 2. které byly získány vložením fragmentu nukleové kyseliny, popřípadě proteinu do příslušných sekvencí. Smysl inzertní mutagenese, jako tvorby hybridu, spočívat v tom, že se kombinují jednotlivé vlastnosti proteinů podle vynálezu s vlastnostmi jiných proteinů. Jedná se potom o proteiny podle vynálezu, získané inzertní mutací nebo chimerní proteiny, pokud přes svou homologii k oblastem, které vedou zpět na sekvence SEQ ID No.1 nebo SEQ ID No.2, mají odpovídající homologické hodnoty a protein má na základě těchto oblastí amylolytickou funkci v nejširším smyslu.

Také proteiny získané inverzní mutagenezí a ty s novým seskupením různých molekulových částí odchylojících se od původního aminokyselinového sledu jsou tak začleněny do rozsahu ochrany předkládaného vynálezu. To samé platí. Může se na ní pohlížet jak na deleční variantu, tak na inzertní variantu, tak také jako Shufflingovu variantu původního proteinu.

Amylolyticky aktivními deriváty podél vynálezu se rozumí takové amylolytické proteiny, které byly modifikovány, například v souvislosti s proteinovou biosyntézou při zpracování hostitelským organismem nebo chemicky přeměnou postranního řetězce aminokyseliny nebo kovalentní vazbou jiné sloučeniny na protein. U takové sloučeniny se může například jednat o jiné proteiny, které se například váží přes bifunkční chemické sloučeniny na proteiny podle vynálezu. Tyto modifikace mohou například ovlivnit specifitu substrátu nebo sílu vazby na substrát nebo předcházející blokaci enzymatické aktivity, pokud se u připojené substance jedná o inhibitor. To může mít například smysl po dobu ukládání. Další formou provedení jsou deriváty, které byly získány kovalentní vazbou na makromolekulárním nosiči, jako je například polyehylenglykol nebo poly-sacharid.

Dalším řešením úkolu podle vynálezu jsou amylolytické proteiny nebo deriváty, které mají alespoň jeden antigenní determinant společně s jedním z výše uvedených proteinů nebo derivátů.

Protože rozhodující pro vykazování enzymatických aktivit není samotný čistý sled aminokyselin, nýbrž také jeho sekundární strukturní prvky a jeho troj-rozměrné řazení. Tak mohou ve své primární struktuře výrazně od sebe odchylné domény nadále vytvářet prostorově shodné struktury a tím umožňují stejné enzymatické chování. Tyto společné znaky v sekundární struktuře se obvykle uznávají jako shodné antigenní determinanty antisér nebo čisté nebo monoklonální protilátky. Imunochemickými křížovými reakcemi se tak mohou společně detekovat a přiřazovat vzájemně strukturálně podobné proteiny nebo deriváty.

Proto se do rozsahu ochrany předkládaného vynálezu zahrnují právě také takové proteiny nebo deriváty, které mají amylolytickou aktivitu a možná, že se nemohou homologickými hodnotami v primární struktuře, ale ani svou imunochemickou příbuzností přiřadit výše definovaným proteinům podle vynálezu.

Proteiny podle vynálezu, které pocházejí z přírodních zdrojů, jsou výhodné formy provedení předkládaného vynálezu, zvláště pokud pocházejí z mikroorganismů, jako jsou jednobuněčné houby a bakterie. Neboť ty se jsou většinou k dispozici jako mnohobuněčné organizmy nebo buněčné kultury odvozené od mnohobuněčných. Představují pro speciální formy provedení smysluplné volby.

Zvláště výhodné jsou proteiny nebo deriváty podle vynálezu z gram-pozitivních bakterií, protože nemají žádné vnější membrány a vyloučené proteiny tak bezprostředně odevzdávají do okolního prostředí.

Ještě výhodnější jsou proteiny nebo deriváty podle vynálezu z gram-pozitivních bakterií rodu *Bacillus*, protože se v technickém procesu etablují jako produkční organizmy se zvláště vysokým produkčním výkonem.

Mezi proteiny nebo deriváty podle vynálezu z rodu *Bacillus* jsou opět výhodné ty z alkylifilních *Bacilli*, z toho zvláště z *Bacillus sp. A 7-7*, a zvláště výhodné z kmene *Bacillus sp. A 7-7* (DSM 12368). Neboť z toho byla původně získána forma provedení enzymu podle vynálezu, jehož příslušné sekvence jsou uvedeny v sekvenčním protokolu a jehož enzymatické vlastnosti jsou popsány v příkladech.

Z výrobnětechnických důvodů jsou výhodné ty kmeny, které vytvořený amylolytický protein odevzdávají do okolního prostředí.

Je možné, že v přírodě existující producenti mohou sice vyrobit amylolytický enzym podle vynálezu, který ale exprimují a/nebo uvolňují do okolního prostředí za dříve zjištěných podmínek pouze v malém množství. Spadají tak dlouho do rozsahu ochrany předkládaného vynálezu, jak dlouho existuje experimentální možnost zajistit vhodné podmínky prostředí nebo nízkomolekulární nebo jiné faktory, za jejichž působení mohou podnítit produkci proteinu podle vynálezu, která se zdá mít hospodářské využití. Takový regulační mechanismus se může použít pro biotechnologickou výrobu, například pro regulaci odpovědných promotorů.

Podle získávání, zpracování nebo preparace proteinu se může sloučit s jinými diverzními látkami, zvláště když byl získán z přírodních producentů tohoto proteinu. Může být potom, ale nezávisle na tom, cíleně smíchán s určitými jinými látkami, například pro zvýšení jeho skladovatelnosti. Pojmem protein podle vynálezu se proto navíc rozumí také všechny preproteiny vlastního proteinu podle vynálezu. To je také nezávisle na tom, zda se v určité preparaci tato enzymatická aktivita skutečně rozvíjí nebo ne. Protože může být žádoucí, aby při skladování neměl žádnou nebo malou aktivitu, a teprve v době používání rozvinul svou amylolytickou aktivitu. To může být například závislé na stavu rozvinutí nebo vyplývat z reverzibilní vazby jedné nebo více doprovodných látek z preparace nebo z jiného kontrolního mechanismu.

Proteiny podle vynálezu mohou být zvláště během skladování chráněny stabilizátory, například před denaturací, rozpadem nebo inaktivací a sice fyzikálními vlivy, oxidací nebo proteolytickým štěpením. U proteinů, které se získávají z mikroorganismů, je inhibice proteolýzy zvláště kritická, protože většina mikroorganismů vylučuje různé proteázy jako trávicí enzymy do okolního prostředí. Ty mohou zájmové proteiny během následujícího stupně čištění výrazně poškodit.

Skupinou stabilizátorů jsou reverzní inhibitory proteázy, jako je například benzamidin-hydrochlorid a leupeptin, borax, kyselina boru, jejich soli nebo estery; peptidaldehyd nebo čistě peptidické inhibitory, jako je ovomucoid nebo specifické subtilizinové inhibitory. Dalšími běžnými enzymovými stabilizátory jsou aminoalkoholy, jako je mono-, di-, triethanol- a -propanolamin, alifatické karboxylové kyseliny až C₁₂, dikarboxylové kyseliny, nižší alifatické alkoholy, polyoly, jako například glycerin, ethylenglykol, propylenglykol nebo sorbit. Rovněž se používají soli vápníku, jako například octan vápenatý nebo mravenčan vápenatý, soli hořčíku, různé polymery, jako například lignin, ether-celulóza, polyamidy nebo ve vodě rozpustné vinyl-kopolymery, aby se enzymatické přípravky stabilizovaly proti fyzikálním vlivům nebo kolísání hodnoty pH. Redukční prostředky nebo antioxidanty, jako například siřičitan sodný nebo redukovaný cukr, zvyšují stabilitu proteinů proti oxidativnímu rozpadu.

Také ve formě provedení odpovídajících nukleových kyselin se předkládaný vynález uskutečňuje, pokud příslušné nukleové kyseliny v nejširším smyslu kódují amylolytický protein a mají k sekvenci uvedené pod SEQ ID No.1 dostatečnou, výše definovanou podobnost, zvláště takové nukleové kyseliny, které kódují pro protein, který odpovídá části aminokyselin 32 až 516 aminokyselinové sekvence uvedené v SEQ ID No.1.

Zvláště výhodné formy provedení představují nukleové kyseliny, které kódují některý z výše uvedených amylolytických proteinů podle vynálezu. To zahrnuje také varianty, které po celé své délce sekvence nespádají do oblasti podobnosti definované podle SEQ ID No.1, to ale v jednotlivých oblastech ano. Patří sem například nukleotidové sekvence, které, jak je uvedeno výše, byly získány inzertní nebo deleční mutací, chimerní proteiny nebo proteinové fragmenty. Ale také takzvané protismyslové konstrukce, například jednotlivými dílčími úseky, představují formy provedení podle předkládaného vynálezu, protože se mohou použít pro regulaci amylolytické aktivity.

Nukleové kyseliny tvoří výchozí bod pro molekulárně biologická vyšetření a další vývoj. Tyto metody jsou například popsány v příručce Fritsch, Sambrook a Maniatis „Molecular cloning: a laboratory manual“, *Cold Spring Harbour Laboratory Press*, New York, 1989. Na gen, zvláště na klonovaný gen se odvolávají všechny genetické a protein-biochemické metody shromážděné ve stavu techniky pod pojmem proteinové inženýrství. Pomocí těchto metod lze proteiny podle vynálezu s ohledem na různá použití dále optimalizovat, například bodovou mutagenezí nebo fuzí se sekvencemi z jiných genů.

K variantám proteinu podle vynálezu, získaných známými molekulárně biologickými metodami, patří zvláště varianty s jednotlivými cílenými výměnami aminokyselin nebo náhodné bodové mutace, delece jednotlivých aminokyselin nebo dílčích sekvencí, fuze s jinými fragmenty nebo jinými enzymy, inserce nebo inverze, také parciální obrácení sekvencí. Takové mutace nebo modifikace mohou představovat výhodné formy provedení pro specifická použití. Taková mutageneze se může provést cíleně nebo náhodnými metodami. To lze například kombinovat s následným a na aktivitu zaměřeným výběrovým a/nebo poznávacím postupem (Screening a Sektion) na klonovaných genech. Geny získané mutací spadají do rozsahu ochrany popsaného vynálezu, pokud v nejširším smyslu kódují amylolytické proteiny a leží ve výše definované oblasti podobnosti; alespoň v homologických a funkčně relevantních oblastech.

Další řešení úkolu podle vynálezu a tím vlastního předmětu vynálezu představují organizmy, které ovšem tvoří protein nebo derivát podle vynálezu nebo obsahují nukleové kyseliny, které kódují protein nebo derivát podle vynálezu. Neboť jejich nalezení umožňuje uskutečnění vynálezecké myšlenky. Tyto organizmy se získají při použití obecně známých technik, například izolací kmenů z přírodního zdroje nebo pomocí screeningu genových bank. Nukleotidová sekvence uvedená v SEQ ID No.1 lze přitom použít jako sondu pro screening nebo sloužit jako předloha pro konstrukci odpovídajícího PCR-

primeru. Analogicky k tomu se mohou použít peptidy s krátkým řetězcem nebo úplné peptidy s aminokyselinovými sekvencemi podle SEQ ID No.2 pro tvorbu odpovídajících antisér, jejichž pomocí se mohou identifikovat odpovídající organizmy, popřípadě proteiny, které uvolňují.

Podle výše vytvořených provedení jsou především na základě kultivovatelnosti výhodné mikroorganismy, výhodně bakterie, z těchto gram-pozitivní bakterie, z těchto bakterie rodu *Bacillus*, zvláště *Bacillus sp. A 7-7* a nejvýhodnější *Bacillus sp. A 7-7* DSM (12368).

K vlastnímu předmětu vynálezu patří vektory, které obsahují jednu z oblastí nukleové kyseliny druhého předmětu vynálezu.

Neboť se jedná o nukleové kyseliny, klonuje se DNA vhodným způsobem do vektoru. Patří k nim například vektory, které se odvodí od bakteriálních plazmidů, virů nebo od bakteriofágů, nebo převážně syntetické vektory nebo plazmidy s prvky různého původu. S dalšími existujícími genetickými prvky se vektory mohou s příslušným hostitelským buňkami po celé generace etablovat jako stabilní jednotky. Přitom je ve smyslu vynálezu nepodstatné, zda se jako zvláštní jednotky etablojí extrachromozomálně nebo se integrují do chromozomu. Který z mnoha systémů, známých ze stavu techniky, se zvolí, závisí na jednotlivém případě. Rozhodující mohou například být dosažitelný počet kopií, selekční systémy, které jsou k dispozici, z nichž především rezistence na antibiotika, nebo kultivovatelnost hostitelských buněk, které jsou schopné přijmout vektory.

Vektory tvoří vhodné výchozí body pro molekulárně biologická a biochemická vyšetření příslušného genu nebo proteinu a pro další vývoj podle vynálezu a konečně pro amplifikaci a produkci proteinů podle vynálezu. Představují do té míry formy provedení předkládaného vynálezu, jak sekvence obsažených

oblastí nukleových kyselin podle vynálezu leží uvnitř výše blíže označené homologické oblasti.

Výhodné formy provedení předkládaného vynálezu jsou klonované vektory. Jsou vedle skladování, biologické amplifikace nebo selekce důležitého genu vhodné pro učení vlastností příslušného genu, a sice sestavením restriční karty nebo sekvencováním. Klonované vektory jsou také proto výhodné formy provedení předkládaného vynálezu, protože představují transportovatelnou a skladovatelnou formu nárokováných DNA. Jsou také výhodnými výchozími body pro molekulárně biologické techniky, které nejsou vázané na buňky, jako například polymerázová řetězová reakce.

Expresní vektory mají dílčí sekvence, které jim umožňují, aby se v hostitelském organismu, optimálním pro výrobu proteinů, replikovaly a tam přivedly obsažený gen k expresi. Výhodné formy provedení jsou expresní vektory, které samy mají genetické prvky potřebné pro expresi. Expres se například ovlivní promotory, které regulují transkripci genu. Tak může exprese probíhat přírodním promotorem lokalizovaným původně před tímto genem, ale také po gentechnické fuzi, jak promotorem hostitelské buňky, připraveným na expresním vektoru, tak také modifikovaným nebo zcela jiným promotorem jiného organismu.

Výhodné formy provedení jsou takové expresní vektory, které jsou regulovatelné změnou kultivačních podmínek nebo přidavkem určitých sloučenin, jako je například hustota buněk nebo speciální faktory. Expresní vektory umožňují, aby se příslušný protein vyrobil heterologicky, tedy v jiném organismu, než v tom, ze kterého jej lze přirozeně získat. Také homologické získání proteinu vhodným vektorem z hostitelského organismu, který přirozeně exprimuje gen, je v rozsahu ochrany předkládaného vynálezu. To může mít výhodu v tom, že se přírodní modifikační reakce, které souvisejí s translací, na vznikajícím proteinu provádějí stejným způsobem, jakým by přirozeně probíhaly.

Formy provedení předkládaného vynálezu mohou být také expresní systémy bez buněk, u kterých se následně provede proteinová biosyntéza *in vitro*. Takové expresní systémy jsou ve stavu techniky rovněž etablované.

Další formu provedení předmětu vynálezu představují buňky, které obsahují některý z výše definovaných vektorů, zvláště klonovaný nebo expresní vektor. Neboť zvláště v průběhu molekulárně biologických prací, které jsou nutné například pro mutagenezi, sekvencování nebo ukládání vektorů, probíhá jejich transformace v odpovídajících buňkách. Přitom mohou být vhodné, v závislosti na metodě, například gram-pozitivní, zvláště ale také gram-negativní bakterie.

Další formou provedení jsou hostitelské buňky, které exprimují protein nebo derivát podle prvního předmětu vynálezu nebo mohou k jejich expresi podněcovat, výhodně při použití některého z výše definovaných expresních vektorů.

Tedy výhodná syntéza *in vivo* amylolytického enzymu podle vynálezu vyžaduje transfer příslušného genu do hostitelské buňky. Jako hostitelské buňky jsou vhodné v principu všechny všechny organizmy, to znamená prokaryonty, eukaryonty nebo kyanofyta. Výhodné jsou takové hostitelské buňky, s kterými lze geneticky dobře zacházet, což se například týká transformace s expresním vektorem a jeho stabilního etablování, například jednobuněčné houby nebo bakterie. K tom se výhodné hostitelské buňky vyznačují dobrou mikro-biologickou a biotechnologickou zpracovatelností. To se například týká snadné kultivovatelnosti, vysoké rychlosti růstu, nízkými požadavky na fermentační prostředí a dobré produkční a sekreční rychlosti pro cizí proteiny. Často se musí z množství různých systémů, které jsou k dispozici ve stavu techniky, experimentálně pro jednotlivý případ zjistit optimální expresní systémy.

Každý protein podle vynálezu lze tímto způsobem získat z mnoha hostitelských organizmů.

Výhodné formy provedení představují takové hostitelské buňky, které jsou na regulovatelné ve své aktivitě základě genetických regulačních prvků, které jsou například k dispozici na expresním vektoru, ale také mohou existovat v těchto buňkách. Například řízeným přidavkem chemických sloučenin, které slouží jako aktivátory, změnou kultivačních podmínek nebo dosažením určité hustoty buněk se mohou přimět k expresi. To umožňuje velmi hospodárnou produkci žádaných proteinů.

Variantu tohoto experimentálního principu představují expresní systémy, u kterých další geny, například takové, které jsou k dispozici na jiných vektorech, ovlivňují produkci proteinů podle vynálezu. Přitom se může jednat o modifikované genové produkty nebo o takové, které mají být společně s proteinem podle vynálezu vyčištěny, aby ovlivňovaly jeho amylolytickou funkci. Přitom se může například jednat o jiné proteiny nebo enzymy, o inhibitory nebo o takové prvky, které s různými substráty ovlivňují vzájemný účinek.

Výhodné hostitelské buňky jsou prokaryontní nebo bakteriální buňky. Bakterie se vyznačují oproti eukaryontům zpravidla kratšími generečními dobami a menšími nároky na kultivační podmínky. Tím se mohou etablovat levnější způsoby získání proteinů podle vynálezu.

Zvláště výhodné jsou hostitelské buňky, zvláště bakterie, které uvolňují vytvořený protein do okolního prostředí, takže mohou exprimované proteiny podle vynálezu přímo čistit.

Forma provedení podle vynálezu používá samotstatně *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368), aby se proteiny podle vynálezu homologicky exprimovaly. To může například probíhat zavedeným vektorem, který do těchto buněk zavádí již endogenní gen nebo jeho obměny podle vynálezu, například v mnohonásobném počtu kopií. To může být potom zvláště výhodné, když má protein v návaznosti na svou syntézu získat modifikace, které se vhodným způsobem provádějí samotnými příslušnými buňkami.

Naproti tomu je však výhodná heterologická exprese. Grampozitivní bakterie, jako je například actinomycten nebo bacilli, nemají žádnou vnější membránu, takže uvolňují proteiny bezprostředně do okolního prostředí. K bakteriím, výhodným pro heterologickou expresi, tak patří bakterie rodu *Bacillus*, zvláště druh *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amylolyquefaciens*, *Bacillus subtilis* nebo *Bacillus alcalophilus*.

Také gram-negativní bakterie se mohou použít pro heterologickou expresi. U nich se uvolňuje mnoho proteinů v periplazmatickém prostoru, tedy v oblasti mezi oběma membránami obklopujícími buňky. To může být výhodné pro speciální použití. K nim patří například bakterie rodu klebsiella nebo escherichia, výhodně druhu *Escherichia coli*, zvláště kmenů *E.coli* JM 109, *E.coli* DH 100B nebo *E.coli* DH 12S.

Také eukariontní buňky mohou být vhodné pro výrobu amylolytických proteinů podle vynálezu. Příkladem jsou kvasnice, jako *Saccharomyces* nebo *Kluyveromyces*. To může být například zvláště výhodné tehdy, když mají proteiny v souvislosti se svou syntézou získat specifické modifikace, které takové systémy umožňují. K tomu patří například vazba nízkomolekulárních sloučenin, jako je membránová kotva (Membrananker) nebo oligosacharid.

Všechny již výše uvedené prvky se mohou v postupu kombinovat, aby se vyrobily proteiny podle vynálezu. Je přitom myslitelných mnoho kombinačních

možností postupových kroků pro každý protein podle vynálezu. Všechny uskutečňují myšlenku, která je základem předkládaného vynálezu, aby se totiž zástupce proteinového typu, definovaný amylolytickou funkcí a současně vysokou homologií k sekvencím uvedeným v sekvenčních protokolech, kvantitativně vyrobil pomocí příslušné genetické informace. Optimální postup se musí experimentálně zjistit pro každý konkrétní jednotlivý případ. Principiálně se k tomu dospěje následujícím způsobem: Nukleové kyseliny podle vynálezu, tedy nukleové kyseliny, které leží uvnitř výše definované oblasti podobnosti k sekvenci SEQ ID No.1, se podváží vhodným způsobem ve formě DNA ve vhodném expresním vektoru. Ten se transformuje do hostitelské buňky, například do buněk kmene bakterií, které se snadno kultivují, který vylučuje proteiny, jejichž geny jsou pod kontrolou odpovídajících genetických prvků, do okolního živného prostředí; regulující prvky mohou být k dispozici například od expresního vektoru. Z okolního prostředí se může protein podle vynálezu čistit více čistícími kroky, jako například srážením nebo chromatograficky. Odborník v oboru je schopen systém, který byl v laboratorním měřítku experimentálně optimalizován, převést do provozního výrobního měřítka.

Následně se uvádějí důležité technické možnosti použití proteinů podle vynálezu. Četné možnosti použití pro amylolytické enzymy, etablované ve stavu techniky, se uvádějí v příručkách, jako například v knize „Industrial enzymes and their applications“ od H. Uhlig, nakladatelství Wiley, New York, 1998. Následujícím přehledem se nerozumí uzavřený výčet, nýbrž představuje výběr ze všech teoreticky myslitelných možností použití. Kdyby se stalo, že jednotlivé proteiny podle vynálezu nejsou pro další, zde výslovně nenárokové možnosti použití vhodné, zahrnují se tímto do rozsahu ochrany předkládaného vynálezu.

Důležitou oblastí použití pro amylolytické enzymy je jejich použití jako aktivní složky v pracím nebo čistícím prostředku pro čištění textilií nebo pevných povrchů. V těchto použitích slouží amylolytická aktivita k tomu, aby se

nečistoty obsahující uhlovodany, zvláště nečistoty podobné škrobu, hydrolyticky odstranily a/nebo odstranily z podkladu. Přitom se mohou použít samostatně ve vhodných prostředích nebo také v pracím nebo čistícím prostředku. Tyto prostředky se vyznačují tím, že amylolytické enzymy a ostatní složky synergicky působí na odstranění nečistot, například tím, že se produkty hydrolýzy amylolytických proteinů rozpouštějí jinými složkami prostředku, jako jsou tenzidy. Protein podle vynálezu může nalézt použití jak v prostředcích pro velkospotřebitele nebo technické uživatele, tak také v produktech pro soukromé spotřebitele.

Zvláštní předmět vynálezu tak představují všechny prací prostředky nebo čistící prostředky, které se vyznačují tím, že obsahují amylolytický protein podle vynálezu.

Tím se myslí všechny myslitelné druhy čistících prostředků, jako koncentráty, tak také prostředky používané v nezředěném stavu; pro použití v komerčním měřítku, v pračce nebo při ručním praní, popřípadě ručním čistění. Patří sem například prací prostředky pro textilie, koberce nebo přírodní vlákna, pro které se podle předkládaného vynálezu používá označení prací prostředek. Patří sem například také prostředky pro mytí nádobí pro myčky nádobí nebo pro ruční mytí nádobí nebo čističe pro tvrdé povrchy, jako je kov, sklo, porcelán, keramika, kachle, kámen, lakované povrchy, plastické hmoty, dřevo nebo kůže; pro tyto prostředky se podle předkládaného vynálezu používá označení čistící prostředky. Každý druh čistícího prostředku představuje formu provedení předkládaného vynálezu, pokud je obohacen o protein podle vynálezu.

Formy provedení předkládaného vynálezu obsahují všechny podle stavu techniky etablované a/nebo všechny účelné formy podávání prostředku podle vynálezu. Patří sem například pevné, práškové, tekuté, gelové nebo pastozní prostředky, popřípadě také prostředky z více fází, komprimované nebo

nekomprimované; dále sem patří například: extrudáty, granuláty, tablety nebo pouches, balené jak ve velkých baleních nebo po částech.

Vedle enzymu podle vynálezu obsahuje prostředek podle vynálezu případně další složky, jako tenzidy, například neionické, anionické a/nebo amfoterní tenzidy, a/nebo bělicí prostředek a/nebo stavební složky a případně další obvyklé složky.

Jako neionické tenzidy se přednostně používají alkoxylované, s výhodou ethoxylované, zvláště primární alkoholy výhodně s 8 až 18 atomy C a průměrně 1 až 12 mol ethylenoxidu (EO) na mol alkoholu, kde může být alkoholový zbytek lineární nebo výhodně v poloze 2 rozvětvený skupinou methyl, popřípadě může ve směsi obsahovat lineární zbytek nebo skupinou methyl rozvětvený zbytek a obvykle existují v oxoalkoholových zbytcích. Zvláště jsou však výhodné alkoholethoxyláty s lineárními zbytky z alkoholů přírodního původu s 12 až 18 atomy C, například z kokosového, palmového, lojového nebo oleylalkoholu a průměrně 2 až 8 EO na mol alkoholu. K výhodným ethoxylovaným alkoholům patří například C_{12-14} -alkoholy s 3 EO nebo 4 EO, C_{9-11} -alkohol s 7 EO, C_{13-15} -alkoholy s 3 EO, 5 EO, 7 EO nebo 8 EO, C_{12-18} -alkoholy s 3 EO, 5 EO nebo 7 EO a z těchto směsí, jako jsou směsi z C_{12-14} -alkoholu s 3 EO a C_{12-18} -alkoholu s 5 EO. Uvedené stupně ethoxylace statistické střední hodnoty, které mohou být pro speciální produkt celé nebo zlomkové číslo. Výhodné alkoholethoxyláty mají zúžené homologické rozdělení (narrow range ethoxylates, NRE). Navíc k těmto neionickým tenzidům se mohou také použít mastné alkoholy s více než 12 EO. Příkladem je lojový alkohol s 14 EO, 25 EO, 30 EO nebo 40 EO.

Další třídou výhodně používaných neionických tenzidů, které se používají buď jako samostatný neionický tenzid nebo v kombinaci s jinými neionickými tenzidy, jsou alkoxylované, výhodně ethoxylované nebo ethoxylované a propoxylované alkylestery mastných kyselin, výhodně s 1 až 4 atomy uhlíku v alkylovém řetězci, zvláště methylester mastné kyseliny.

Další třídou neionických tenzidů, které se mohou s výhodou použít, jsou alkylpolyglykozidy (APG). Použitelné alkylpolyglykkozidy mají obecný vzorec $RO(G)_z$, kde R znamená lineární nebo rozvětvený, zvláště rozvětvený v poloze 2, nasycený nebo nenasycený, alifatický zbytek s 8 až 22, výhodně 12 až 18 atomy C a G je symbol, který znamená jednotku glykózy s 5 nebo 6 atomy C, výhodně glukózu. Stupeň glykozylace z je přitom mezi 1,0 a 4,0, výhodně mezi 1,0 a 2,0 a zvláště mezi 1,1 a 1,4. Výhodně se používají lineární alkylpolyglukozidy, tedy alkylpolyglykozidy, kde polyglykozylový zbytek je glukózový zbytek a alkylový zbytek je n-alkylový zbytek.

Také neionické tenzidy typu aminoroxidu, například N-kokosalkyl-N,N-dimethylaminoxid a N-lojovýalkyl-N,N-dihydroxyethylaminoxid a alkanolamidy mastné kyseliny mohou být vhodné. Podíl těchto neionických tenzidů není výhodně vyšší než podíl ethoxylovaných alkoholů, zvláště není větší než polovina.

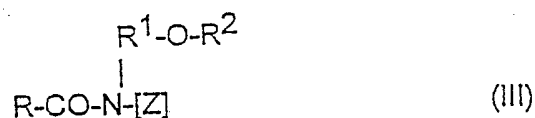
Další výhodné tenzidy jsou amidy polyhydroxymastné kyseliny podle vzorce (II)



kde

RCO znamená alifytická alkylový zbytek s 6 až 22 atomy uhlíku, R^1 znamená atom vodíku, alkylový nebo hydroxyalkylový zbytek s 1 až 4 atomy uhlíku a (Z) znamená lineární nebo rozvětvený polyhydroxyalkylový zbytek s 3 až 10 atomy uhlíku a 3 až 10 hydroxylovými skupinami. U amidů polyhydroxymastné kyseliny se jedná o známé látky, které se mohou obvykle získat reduktivní aminací redukujícího cukru s amoniakem, alkylaminem nebo alkanolaminem a následnou acylací s mastnou kyselinou, alkylesterem mastné kyseliny nebo chloridem mastné kyseliny.

Ke skupině amidů polyhydroxymastné kyseliny patří také sloučeniny podle vzorce (III),



kde

R znamená lineární nebo rozvětvený alkylový nebo alkenylový zbytek s 7 až 12 atomy uhlíku, R^1 znamená lineární, rozvětvený nebo cyklický alkylový

zbytek nebo arylový zbytek s 2 až 8 atomy uhlíku a R^2 znamená lineární, rozvětvený nebo cyklický alkylový zbytek nebo arylový zbytek nebo oxy-alkylový zbytek s 1 až 8 atomy uhlíku, přičemž C_{1-4} -alkylový nebo fenylový zbytek je výhodný a (Z) znamená lineární polyhydroxyalkylový zbytek, jehož alkylový řetězec je substituován alespoň dvěma hydroxylovými skupinami, nebo alkoxylované, výhodně ethoxylované nebo propoxylované deriváty tohoto zbytku.

(Z) se získá reduktivní aminací redukujícího cukru, například glukózy, fruktózy, maltózy, laktózy, galaktózy, manózy nebo xylózy. Sloučeniny substituované skupinou N-alkoxy- nebo N-aryloxy- se mohou například reakcí s methylestery mastných kyselin za přítomnosti alkoxidu jako katalyzátoru převést na žádané amidy polyhydroxymastné kyseliny.

Jako anionické tenzidy se používají například tenzidy typu sulfonátu nebo sulfátu. Jako tenzidy sulfonátového typu přitom přicházejí v úvahu s výhodou C_{9-13} -alkylbenzolsulfonáty, olefinsulfonáty, to znamená směsi z alken- a hydroxyalkansulfonátů a disulfonátů, které se například získají z C_{12-18} -monoolefinů s dvojnou vazbou, stojící na konci nebo uvnitř, sulfonací s plynným oxidem sírovým a následně alkalickou nebo kyselou hydrolýzou produktů sulfonace. Vhodné jsou také alkansulfonáty, které se získají z C_{12-18} -alkanů například sulfochlorací nebo sulfoxidací s následnou hydrolýzou, popřípadě neutralizací. Rovněž jsou také vhodné estery α -sulfomastných kyselin (ester-sulfonáty), například α -sulfonované methylestery hydrogenované kyseliny kokosové, palmového oleje nebo lojové.

Další vhodné anionické tenzidy jsou sulfonované glycerolestery mastných kyselin. Glycerolestery mastných kyselin se rozumí mono-, di a triestery a jejich směsi, které se získají při výrobě esterifikací monoglycerolu s 1 až 3 mol mastné kyseliny nebo při esterifikaci triglyceridů s 0,3 až 2 mol glycerolu. Výhodné sulfonované glycerolestery mastných kyselin jsou přitom produkty sulfonace nasycených mastných kyselin s 6 až 22 atomy uhlíku, například

kyseliny kapronové, kaprylové, kyprinové, myristinové, laurové, palmitové, stearové nebo behenové.

Jako alk(en)ylsulfáty jsou výhodné soli alkalických kovů a zvláště sodné soli poloesteru kyseliny sírové mastných alkoholů C_{12} - C_{18} , například z mastného alkoholu kokosu, mastného alkoholu loje, laural-, myristyl-, cetyl nebo stearylalkoholu nebo oxoalkoholů C_{10} - C_{20} a poloesterů sekundárních alkoholů těchto délek řetězce. Dále jsou výhodné alk(en)ylsulfáty uvedených délek řetězce, které obsahují syntetický alkylový zbytek s přímým řetězcem, vyrobený na petrochemické bázi, které mají analogický způsob odbourání jako adekvátní sloučeniny na bázi chemických surovin s obsahem tuku. Z hlediska techniky praní jsou výhodné C_{12} - C_{16} -alkylsulfáty a C_{12} - C_{15} -alkylsulfáty a C_{14} - C_{15} -alkyl-sulfáty. Také 2,3-alkylsulfáty jsou vhodnými anionickými tenzidy.

Jsou také vhodné monoestery kyseliny sírové C_{7-21} -alkoholů s přímým nebo rozvětveným řetězcem ethoxylovaných 1 až 6 mol ethylenoxidu, jako jsou C_9 - C_{11} -alkoholy rozvětvené skupinou 2-methyl v průměru s 3,5 mol ethylenoxidu (EO) nebo C_{12-18} -mastné alkoholy s 1 až 4 EO. Používají se v čisticích prostředcích na základě své vysoké pěnivosti jen v relativně malých množstvích, například v množstvích až 5 % hmotn., obvykle 1 až 5 % hmotnostních.

Dalšími vhodnými anionickými tenzidy jsou také soli kyseliny alkylsulfo-jantarové, které se také označují jako sulfosukcináty nebo jako estery kyseliny sulfojantarové, a představují monoestery a/nebo diestery kyseliny sulfojantarové s alkoholy, výhodně s mastnými alkoholy a zvláště s ethoxylovanými mastnými alkoholy. Výhodné sulfosukcináty obsahují zbytky mastných alkoholů C_8 - C_{18} nebo jejich směsi. Zvláště výhodné sulfosukcináty obsahují zbytek mastného alkoholu, který se odvodí od ethoxylovaného mastného alkoholu, které ze svého pohledu představují neionické tenzidy (popis viz níže). Přitom jsou zvláště výhodné opět sulfosukcináty, jejichž zbytky mastných alkoholů se odvodí od ethoxylovaných mastných alkoholů s

koncentrovaným homologickým rozdělením. Rovněž je také možné použít kyselinu alk(en)yljantarovou, výhodně s 8 až 18 atomy uhlíku v alk(en)ylovém řetězci nebo jejich soli.

Jako další anionické tenzidy přicházejí v úvahu zvláště mýdla. Vhodné jsou nasycená mýdla mastných kyselin, jako jsou soli kyseliny laurové, myristinové, palmitové, stearové, hydrogenované kyseliny erukové a behenové a zvláště z přírodních mastných kyselin, například z kyselin kokosové, palmových jader nebo loje, odvozené mýdlové směsi.

Anionické tenzidy včetně mýdel mohou existovat ve formě svých sodných, draselných nebo amonných solí a jako rozpustné soli organických bazí, jako je mono-, di- nebo triethanolamin. Výhodně jsou anionické tenzidy ve formě svých sodných nebo draselných solí, zvláště ve formě sodných solí.

Tenzidy mohou být v čistících nebo pracích prostředcích obsaženy celkově v množství výhodně 5 % hmotn. až 50 % hmotn., zvláště 8 % hmotn. až 30 % hmotn., vztaženo na hotový prostředek.

Prostředky podle vynálezu mohou obsahovat belící prostředek. Mezi sloučeniny, které slouží jako bělidla a jsou dodávány ve vodném H_2O_2 , mají zvláštní význam peroxouhličitan sodný, peroxoboritan sodný tetrahydrát a peroxoboritan sodný monohdrát. Dalšími potřebnými bělidly jsou například peroxypyrofosfáty, citrátperoxohydráty a v H_2O_2 dodávány soli peroxokyselin nebo peroxokyseliny, jako je peroxosulfát popřípadě kyselina peroxosírová. Použitelný je také peroxohdrát močoviny peroxokarbamid, který může být popsán vzorcem $H_2N-CO-NH_2 \cdot H_2O_2$. Zvláště při použití prostředků pro čištění tvrdých povrchů, například při strojovém mytí nádobí, mohou také podle potřeby obsahovat bělidla ze skupiny organických bělidel, ačkoliv jejich použití je také principiálně možné u prostředků pro praní textilií. Typickými organickými bělidly jsou diacylperoxydy, jako například dibenzoylperoxid.

Dalšími typickými organickými bělidly jsou peroxykyseliny, přičemž jako příklady se zvláště uvádějí alkylperoxykyseliny a arylperoxykyseliny. Výhodnými zástupci jsou peroxybenzoové kyseliny a jejich deriváty substituovaná v kruhu, jako jsou alkylperoxybenzoové kyseliny, ale také peroxy- α -naftoová kyseliny a mono-peroxoftalát hořečnatý, alifatické nebo substituované alifatické peroxykyseliny, jako je peroxylaurová kyselina, peroxysearová kyselina, ϵ -ftalimidoperoxy-kapronová kyselina (ftalimido-peroxyhexanová kyselina, PAP), o-karboxybenz-amido peroxykapronová kyselina, N-nonenylaminoperoxoadipová kyselina a N-nonylamido-peroxosukcinát, a alifatické a aralifatické peroxydikarboxylové kyseliny, jako je 1,12-diperoxykarboxylová kyselina, 1,9-diperoxyazelainová kyselina, diperoxysebaková kyselina, diperoxybrassylová kyselina, diperoxy-ftalové kyseliny, 2-decyldiperoxybutan-1,4-dikyselina, N,N-tereftaloyl-di-(6-aminoperoxokapronová kyselina).

Obsah bělidla v prostředku může činit 1 až 40 % hmotn., zvláště 10 až 20 % hmotn., přičemž se s výhodou použije peroxoborát monohydrát nebo peroxokarbonát. Synergické použití amylázy s peroxokarbonátem nebo amylázy s peroxokarboxylovou kyselinou je zveřejněno v přihlášce WO 99/63036, popřípadě WO 99/63037.

Aby se při praní při teplotách 60 °C a nižších a zvláště při předúpravě prádla dosáhlo zlepšeného bělicího účinku, mohou prostředky také obsahovat aktivátory bělení. Jako aktivátory bělení se mohou použít sloučeniny, které za podmínek peroxohydrolýzy poskytují alifatické peroxokarboxylové kyseliny, výhodně s 1 až 10 atomy C, zvláště 2 až 4 atomy C, a/nebo případně substituovanou peroxobenzoovou kyselinu. Vhodné jsou látky, které nesou O- a/nebo N-acylové skupiny uvedeného počtu atomu C a/nebo případně substituované benzoylové skupiny. Výhodné jsou vícekrát acylované alkylediaminy, zvláště tetraacetylthylendiamin (TAED), acylované triazin-deriváty, zvláště 1,5-diacetyl-2,4-dioxohexahydro-1,3,5-triazin (DADHT), acylované glykolurily, zvláště 1,3,4,6-tetraacetylglykoluril (TAGU), N-

acylimidy, zvláště N-nonanoylsukcinimid (NOSI), acylované fenolsulfonáty, zvláště n-nona-noyl- nebo isononanoyloxybenzolsulfonát (n- popřípadě iso-NOBS), acylované hydroxykarboxylové kyseliny, jako je triethyl-O-acetylcitrát (TEOC), anhydridy karboxylových kyselin, zvláště anhydrid kyseliny ftalové, anhydrid kyseliny isatové a/nebo anhydrid kyseliny jantarové, amidy karboxylových kyselin, jako je N-methyldiacetamid, glykolid, acylované vícesytné alkoholy, zvláště triacetin, ethylenglykoldiacetát, isopropenylacetát, 2,5-diacetoxy-2,5-dihydrofuran a enol-estery, známé z německých patentových přihlášek DE 196 16 693 a DE 196 16 767, acetylvaný sorbitol a manitol, popřípadě jejich směsi (SORMAN), popsané evropské patentové přihlášce EP 0 525 239, acylované cukerné deriváty, zvláště pentaacetylglukóza (PAG), pentaacetylfriktóza, tetraacetylxyulóza a oktaacetylaktóza a acetylovaný, popřípadě N-alkylovaný glukamin, popřípadě glukonolakton, triazol. Popřípadě triazolový derivát a/nebo kaprolaktam ve formě částic a/nebo kaprolaktamový derivát, výhodně N-acylované laktamy, například N-benzoylkaprolaktam a N-acetylkaprolaktam, které jsou známé z mezinárodních patentových přihlášek WO 94/27970, WO 94/28102, WO 94/28103, WO 95/00626, WO/14759 a WO 95/17498. Hydrofilně substituované acylacetaly, známé z německé patentové přihlášky DE 196 16 769 a acyllaktamy popsané v německé patentové přihlášce DE 196 16 770 a v mezinárodní patentové přihlášce WO 95/14075 se rovněž s výhodou používají. Také se mohou použít kombinace obvyklých aktivátorů bělení známé z německé patentové přihlášky DE 44 43 177. Rovněž se mohou použít nitrilové deriváty, jako jsou kyanopyridiny, kvrterní nitrily, například N-alkylamonium-acetonitril, a/nebo kyanamidové deriváty. Výhodné aktivátory bělení jsou natrium-4-(oktanoyloxy)-benzolsulfonát, n-nonanoyl- nebo isononanoyloxy-benzolsulfonát (n- popřípadě iso-NOBS), undecenoyloxybenzolsulfonát (UDOBS), dodekanoyloxybenzolsulfonát sodný (DOBS), dekanoyloxybenzoová kyselina (DOBA, OBC 10) a/nebo dodekanoyloxybenzolsulfonát (OBS 12), a N-methylmorfolinum-acetonitril (MMA). Tyto aktivátory bělení mohou být obsaženy v obvyklých množstvích 0,01 až 20 % hmotn., výhodně v množstvích 0,1 až 15 % hmotn., zvláště 1 % hmotn. až 10 % hmotn., vztaženo na celové složení.

Navíc k obvyklým aktivátorům bělení nebo na jejich místě mohou být také obsaženy takzvané katalyzátory bělení. U těchto látek se jedná o soli přechodných kovů posilující bělení, popřípadě komplex přechodných kovů, jako například Mn-, Fe-, Co-, Ru- nebo Mo-salenkomplexy nebo -karbonylové komplexy. Také Mn-, Fe-, Co-, Ru-, Mo-, Ti-, V- a Cu-komplexy s tripodligandy obsahující N a Co-, Fe-, Cu- a Ru-aminkomplexy jsou vhodné jako katalyzátory bělení, přičemž se s výhodou používají sloučeniny, které jsou popsány v DE 197 09 284 A1. Podle WO 99/63038 mohou také acetonitrilové deriváty a podle WO 99/63041 komplexní sloučeniny přechodných kovů aktivující bělení v kombinaci s amylázami rozvíjet účinek aktivující bělení.

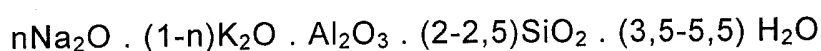
Prostředky podle vynálezu obsahují zpravidla jednu nebo více stavebních látek, zvláště zeolity, silikáty, karbonáty, organické pomocné stavební látky a - kde neexistují žádné ekologické důvody pro jejich použití - také fosfáty. Poslední uvedené jsou zvláště v čisticích prostředcích pro strojové mytí nádobí výhodně použitelné stavební látky.

Lze zde uvést krystalické, sodné silikáty ve formě vrstev obecného vzorce $\text{NaMSi}_x\text{O}_{2x+1} \cdot y\text{H}_2\text{O}$, přičemž M znamená sodík nebo vodík, x číslo od 1,6 až 4, výhodně 1,9 až 4,0 a y je číslo od 0 do 20 a výhodné hodnoty pro x jsou 2, 3 nebo 4. Tyto krystalické vrstevnaté silikáty se například popisují v evropské patentové přihlášce EP 0 164 514. Výhodné krystalické vrstevnaté silikáty uvedeného vzorce jsou ty, kde M znamená sodík a x zaujímá hodnotu 2 nebo 3. Zvláště výhodné jsou jak β -, tak také δ -sodné silikáty $\text{Na}_2\text{Si}_2\text{O}_5 \cdot y\text{H}_2\text{O}$. Na trhu se nacházejí například sloučeniny pod označím SKS[®] (Fa. Clariat). Tak se jedná u SKS-6[®] převážně o δ -sodný silikát vzorce $\text{Na}_2\text{Si}_2\text{O}_5 \cdot y\text{H}_2\text{O}$, u SKS-7[®] převážně o β -sodný silikát. Reakcí s kyselinami (například kyselinou citronovou nebo uhličitou vzniká z δ -sodného silikátu kanemit $\text{NaHSi}_2\text{O}_5 \cdot y\text{H}_2\text{O}$, na trhu pod označeními SKS-9[®], popřípadě SKS-10[®] (Fa. Clariant). Výhodné také může být použití modifikace těchto vrstevnatých silikátů. Tak se může vhodně ovlivnit například alkalita vrstevnatého silikátu. Fosfátem nebo

karbonátem dotované vrstavnaté silikáty mají ve srovnání s δ -sodným silikátem změněné krystalové morfologie, rozpouštějí se rychleji a vyznačují se ve srovnání s δ -sodným silikátem zvýšenou schopností vázat vápník. Tak jsou vrstevnaté silikáty obecného sumárního vzorce $x \text{ Na}_2\text{O} \cdot y \text{ SiO}_2 \cdot z \text{ P}_2\text{O}_5$, kde poměr x ku y odpovídá číslu 0,35 až 0,6, poměr x ku z odpovídá číslu 1,75 až 1200 a poměr y ku z odpovídá číslu 4 až 2800, popsané v patentové přihlášce DE 19601 063. Rozpustnost vrstevnatého silikátu se může také zvýšit tím, že se použijí zvláště jemné vrstevné silikáty. Mohou se také použít sloučeniny z krystalických vrstevných silikátů s obsahem jiných látek. Přitom lze uvést zejména sloučeniny s celulózovými deriváty, které mají výhody dezintegrujícího účinku, a používají se zejména v tabletách pracího prostředku, a sloučeniny s polykarboxyláty, například kyselina citronová, popřípadě polymerní polykarboxyláty, například kopolymery kyseliny akrylové.

Použitelné jsou také amorfnní sodné silikáty s modulem $\text{Na}_2\text{O}:\text{SiO}_2$ v poměrech 1:2 až 1:3,3, výhodně 1:2 až 1,2,8 a zvláště 1:2 až 1,2,6, které prodlužují rozpouštění a mají sekundární prací vlastnosti. Prodloužení rozpouštění může být oproti běžným amorfnním sodným silikátům přitom vyvoláno různým způsobem, například povrchovou úpravou, stmelením, zcelistvováním/utěsňováním nebo přesschnutím. V rámci tohoto vynálezu se pojmem „amorfnní“ rozumí také „rentgenamorfnní“. To znamená, že silikáty při experimentech ohybu rentgenového záření nezpůsobují žádné rentgenové reflexy, které jsou typické pro krystalické látky, nýbrž popřípadě jeden nebo více maxim rozptýleného rentgenového záření, které mají šířku několika jednotek stupňů úhlu ohybu. Může to však vést k dobrým nebo dokonce ke zvláště dobrým vlastnostem stavebních látek, pokud silikátové částice při experimentech ohynu elektronů poskytují nejasná nebo dokonce ostrá ohybová maxima. To lze interpretovat tak, že produkty mají mikrokystalické oblasti velikosti 10 až několik stovek nm, přičemž výhodné hodnoty jsou až max. 50 nm a zvláště až max. 20 nm. Zvláště výhodné jsou utěsněné/celistvé amorfnní silikáty, stmelené amorfnní silikáty a přesschnuté rentgenamorfnní silikáty.

Případně použitelným, syntetickým, jemně krystalickým zeolitem, obsahujícím vázanou vodu, je s výhodou zeolit A a/nebo P. Jako zeolit P je zvláště výhodný zeolit MAP® (obchodní produkt firmy Crosfield). Vhodné jsou však také zeolity X a směsi z A, X a/nebo P. Komerčně dostupný a v rámci předkládaného vynálezu použitelný je například také směsný krystalizát ze zeolitu X a zeolitu A (ca. 80 % hmotn. Zeolitu X), který prodává firma CONDEA Augusta S.p.A pod obchodním označením VEGOBOND AX® a může být popsán vzorcem



Vhodné zeolity mají střední velikost částic menší než 10 µm (objemové rozdělení; Metoda měření: Coulter Counter) a obsahují výhodně 18 až 22 % hmotn., zvláště 20 až 22 % hmotn. vázané vody.

Samozřejmě je možné také použití obecně známých fosfátů jako stavebních látek, pokud se takovému použití nemá z ekologických důvodů zabránit. Mezi mnoha komerčně dostupnými fosfáty mají v průmyslu pracích a čisticích prostředků největší význam fosfáty alkalických kovů, zvláště výhodný je trifosfát pentasodný nebo pentadraselný (polyfosfát sodný nebo draselný).

Fosfáty alkalických kovů je sumární označení pro soli alkalických kovů (zvláště sodná a draselná sůl) různých fosforečných kyselin, u nichž lze vedle vysokomolekulárních zástupců rozlišovat kyselinu metafosforečnou $(\text{HPO}_3)_n$ a ortfosforečnou H_3PO_4 . Fosfáty přitom v sobě sjednocují mnoho výhod: působí jako nosiče alkality, zbraňují vápenatým povlakům na strojírenských dílech popřípadě vápenatým inkrustacím tkanin a přispívají tím k čisticímu účinku.

Dihydrogenfosforečnan sodný, NaH_2PO_4 , existuje jako dihydrát (hustota $1,91 \text{ gcm}^{-3}$, teplota tání 60°C) a jako monohydrát (hustota $2,04 \text{ gcm}^{-3}$). Obě soli jsou bílé, ve vodě velmi snadno rozpustné prášky, které se při zahřátí ztrácejí krystalickou vodu a teplotě 200°C přecházejí na slabě kyselý difosfát (hydrogendifosforečnan dvojsodný, $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$), při vyšší teplotě na trimetafosforečnan sodný ($\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$) a maddrelschovu sůl (viz dole). NaH_2PO_4 reaguje kyselé, vzniká, když se kyselina fosforečná s hydroxydem sodným, nastaví na hodnotu pH 4,5 a rmut se rozpráší. Dihydrogenfosforečnan draselný (primární nebo jednosytný fosforečnan draselný, difosforečnan draselný KDP), KH_2PO_4 je bílá sůl o hustotě $2,33 \text{ gcm}^{-3}$, má teplotu tání 253°C (rozklad za tvorby polyfosfátu draselného $(\text{KPO}_3)_x$) a je snadno rozpustný ve vodě.

Hydrogenfosforečnan dvojsodný (sekundární fosforečnan sodný), Na_2HPO_4 , je bezbarvá, velmi snadno ve vodě rozpustná krystalická sůl. Existuje jako bezvodá a s 2 mol (hustota $2,066 \text{ gcm}^{-3}$, ztráta vody při teplotě 95°C), 7 mol (hustota $1,68 \text{ gcm}^{-3}$, teplota tání 48°C při ztrátě 5 H_2O) a 12 mol vody (hustota $1,52 \text{ gcm}^{-3}$, teplota tání 35°C při ztrátě 5 H_2O) a při teplotě 100°C bude bezvodá a při silném zahřátí přechází na difosforečnan $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$. Hydrogenfosforečnan disodný se vyrobí neutralizací kyselina fosforečné roztokem sody za použití fenoftalenu jako indikátoru. Hydrogenfosforečnan didraselný (sekundární nebo dvojsytný fosforečnan draselný), K_2HPO_4 , je amorfni bílá sůl, která je ve vodě snadno rozpustná.

Forforečnan trisodný, terciární fosforečnan sodný, Na_3PO_4 , jsou bezdarvé krystaly, které mají jako dodekahydrát hustotu $1,62 \text{ gcm}^{-3}$ a teplotu tání $63-76^\circ\text{C}$ (rozklad), jako dekahydrát (dopovídá 19-20 % P_2O_5) teplotu tání 100°C a v bezvodé formě (odpovídá 39-40 % P_2O_5) hustotu $2,536 \text{ gcm}^{-3}$. Fosforečnan trisodný je ve vodě za alkalické reakce snadno rozpustný a vyrobí se odpařením roztoku přesně z 1 mol fosforečnanu disodného a 1 mol NaOH . Fosforečnan tridraselný (terciární nebo trojsytný fosforečnan draselný), K_3PO_4 , je bílý, rozplývající se zrnitý prášek o hustotě $2,56 \text{ gcm}^{-3}$, má teplotu

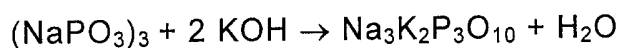
tání 1340 °C a je ve vodě při alkalické reakci snadno rozpustný. Vzniká například při zahřátí Thomasovy strusky s uhlím a síranem draselným. Přes vysokou cenu se v průmyslu čisticích prostředků dává mnohonásobně větší přednost snadno rozpustným, proto vysoce účinným, fosforečnanům draselným oproti odpovídajícím sodným sloučeninám.

Difosforečnan tetrasodný (pyrofosforečnan sodný), $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, existuje v bezvodé formě (hustota 2,534 gcm⁻³), teplota tání 988 °C, také se uvádí 880 °C) a jako dekahydrát (hustota 1,815-1,836 gcm⁻³, teplota tání 94 °C při ztrátě vody). Obě látky jsou bezbarvé, ve vodě s alkalickou reakcí rozpustné krystaly. $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ vzniká zahřátím fosforečnanu disodného na více než 200 °C nebo tím, že se provede reakce kyseliny fosforečné se sodou ve stechiometrickém poměru a roztok se rozprášením odvodní. Dekahydrát vytváří komplexy solí těžkých kovů a tvrdících přísad a snižuje proto tvrdost vody. Difosforečnan draselný (pyrofosforečnan draselný), $\text{K}_4\text{P}_2\text{O}_7$, existuje ve formě trihydrátu a představuje bezbarvý, hygroskopický prášek o hustotě 2,33 gcm⁻³, která je ve vodě rozpustný, přičemž hodnota pH 1% roztoku při teplotě 25 °C činí 10,4.

Kondenzací NaH_2PO_4 , popřípadě KH_2PO_4 , vzniká vysokomolekulární fosforečnan sodný a draselný, u nichž lze rozlišovat cyklické zástupce, metafosforečnan sodný nebo draselný a typy tvořící řetězce, polyfosfát sodný popřípadě draselný. Zvláště pro posledně uvedené se používá mnoho označení: tavící a žíhací fosfáty, Grahamova sůl, Kurrolschova a Maddrellschova sůl. Všechny výše uvedené fosforečnany sodné a draselné se společně označují jako kondenzované fosforečnany.

Technicky důležitý trifosforečnan pentasodný, $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ (polyfosforečnan sodný), je bezvodá nebo krystalizující s 6 H_2O , není hygroskopická, bílá, ve vodě rozpustná sůl obecného vzorce $\text{NaO}-(\text{P}(\text{O})(\text{ONa})-\text{O})_n-\text{Na}$, přičemž $n=3$. Ve 100 g vody se rozpustí při pokojové teplotě asi 17 g, při teplotě 60 °C ca. 20 g, při teplotě 100 °C okolo 32 g krystalické bezvodé soli; po dvouhodinovém zahřívání roztoku na teplotu 100 °C vzniká hydrolyzou asi 8 %

ortofosforečnanu a 15 % dofosforečnanu. Při výrobě trifosforečnanu pentasodného se provede reakce kyseliny fosforečné s roztokem sody nebo hydroxidu sodného ve stechiometrickém poměru a roztok se rozprášením odvodní. Podobně jako Grahamova sůl a difosforečnan sodný rozpouští trifosforečnan pentasodný mnoho nerozpustných sloučenin kovů (také vápenná mýdla a podobně.) Trifosforečnan pentadraselný, $K_5P_3O_{10}$ (polyfosforečnan draselný) přichází na trh například ve formě 50% hmotn. roztoku (více než 23 % P_2O_5 , 25 % K_2O). Polyfosforečnany draselné nalézají široké použití v průmyslu pracích a čisticích prostředků. Dále existují také tripolyfosforečnany sodnodraselné, které jsou rovněž použitelné v rámci předkládaného vynálezu. Vznikají například, hydrolyzou trimetafosforečnanu sodný pomocí KOH;



Použitelné podle vynálezu jsou tripolyfosfát sodný, tripolyfosfát draselný nebo jejich směsi; také směsi z tripolyfosforečnanu sodného a tripolyfosforečnanu sodnodraselného nebo směsi z tripolyfosforečnanu draselného a tripolyfosforečnanu sodnodraselného nebo směsi z tripolyfosforečnanu sodného a tripolyfosforečnanu draselného a tripolyfosforečnanu sodnodraselného jsou použitelné podle vynálezu.

Jako organické pomocné stavební látky pro prací a čisticí prostředky podle vynálezu se mohou použít zvláště polykarboxyláty nebo polykarboxylové kyseliny, polymerní polykarboxyláty, polyasparagová kyselina, polyacetal, případně oxidované dextriny, další organické pomocné stavební látky (viz dále) a fosfonáty. Tyto třídy látek jsou následovně popsány.

Použitelné organické strukturní látky jsou například polykarboxylové kyseliny použitelné ve formě svých sodných solí, přičemž polykarboxylovými kyselinami se rozumí karboxylové kyseliny, které nesou více než jednu

kyselinovou skupinu. Například to jsou kyselina citronová, kyselina adipová, kyselina jantarová, kyselina glutarová, kyselina jablečná, kyselina vinná, kyselina maleinová, kyselina fumarová, kyselina cukerná, kyselina aminokarboxylová, kyselina nitrilotrioctová (NTA), pokud se jejich použití nemusí z ekologických důvodů zabránit, a jejich směsi. Výhodnými solemi jsou soli polykarboxylových kyselin, jako je kyselina citronová, kyselina adipová, kyselina jantarová, kyselina glutarová, kyselina vinná, kyselina cukerná, a jejich směsi.

Také kyseliny jako takové se mohou použít. Mají vedle svého stavebního účinku obvykle také vlastnost kyselé složky a slouží tak také pro nastavení nižší a střední hodnoty pH pracího a čistícího prostředku, pokud není žádaná hodnota pH vzniklá smísením ostatních složek. Zvláště je možné uvést kyseliny přijatelné z hlediska systému a životního prostředí, jako jsou kyselina citronová, kyselina octová, kyselina vinná, kyselina jablečná, kyselina mléčná, kyselina glykolová, kyselina jantarová, kyselina glutarová, kyselina adipová, kyselina glukonová jejich libovolné směsi. Ale také minerální kyseliny, zvláště kyselina sírová a baze, zvláště hydroxid amonný a hydroxidy alkalických kovů mohou sloužit jako regulátory hodnoty pH. Tyto regulátory jsou v prostředcích podle vynálezu obsaženy výhodně v množství nepřesahující 20 % hmotn., zvláště 1,2 % hmotn. až 17 % hmotnostních.

Jako stavební látky jsou dále vhodné polykarboxyláty, jsou to například soli alkalických kovů kyseliny polyakrylové nebo kyseliny polymethakrylové, například soli s relativní molekulovou hmotností 500 až 70 000 g/mol.

U molových hmotností uvedených pro polymerní polykarboxyláty se ve smyslu tohoto spisu jedná o střední molovou hmotnost M_w příslušné formy kyseliny, které byly v zásadě stanoveny pomocí gelové chromatografie (GPC), přičemž byl použit detektor UV. Měření přitom probíhalo proti externímu standardu kyseliny polyakrylové, který na základě své strukturní příbuznosti ke zkoumaným polymerům poskytoval realistické hodnoty molové hmotnosti. Tyto

údaje mají výraznou odchylku od údajů molové hmotnosti, u nichž se jako standard používají kyseliny polystyrolsulfonové. Molové hmotnosti měřené proti polystyrolsulfonovým kyselinám jsou zpravidla vyšší, než molové hmotnosti uvedené v tomto spisu.

Vhodnými polymery jsou zvláště polyakryláty, které mají s výhodou molekulovou hmotnost 2000 až 20000 g/mol. V důsledku jejich větší rozpustnosti mohou být z této skupiny opět výhodné polyakryláty s krátkým řetězcem, které mají molovou hmotnost 2000 až 10000 g/mol, a zvláště výhodně 3000 až 5000 g/mol.

Dále jsou vhodné kopolymerní polykarboxyláty, zvláště polykarboxyláty kyseliny akrylové s kyselinou methakrylovou a kyseliny akrylové nebo methakrylové s kyselinou maleinovou. Jako zvláště výhodné se projeví kopolymery kyseliny akrylové s kyselinou maleinovou, které obsahují 50 až 90 % hmotn. kyseliny akrylové a 50 až 10 % hmotn. kyseliny maleinové. Jejich relativní molekulová hmotnost, vztaženo na volné kyseliny, činí obecně 2000 až 70000 g/mol, výhodně 20000 až 50000 g/mol a zvláště 30000 až 40000 g/mol. (Ko-)polymerní polykarboxyláty se mohou použít buď jako prášek nebo jako vodný roztok. Obsah prostředku na (ko-)polymerní polykarboxyláty může činit 0,5 až 20 % hmotn., zvláště 1 až 10 % hmotnostních.

Pro zlepšení rozpustnosti ve vodě mohou polymery také obsahovat kyseliny allylsulfonové, jako například kyselinu allyloxybenzensulfonovou a kyselinu methallylsulfonovou, jako monomer.

Zvláště výhodné jsou také biologicky odbouratelné polymery z více než dvou různých monomerních jednotek, například polymery, které jako monomery obsahují soli kyseliny akrylové a kyseliny maleinové a vinylalkohol popřípadě deriváty vinylalkoholu, nebo které jako monomery obsahují soli kyseliny akrylové a kyseliny 2-alkylallylsulfonové a deriváty cukru.

Dalšími výhodnými kopolymery jsou kopolymery, které jako monomery mají výhodně akrolein a kyselinu akrylovou/soli kyseliny akrylové, popřípadě akrolein a vinylacetát.

Rovněž lze jako další výhodné stavební látky uvést polymerní aminodikarboxylové kyseliny, jejich soli nebo jejich předchozí látky. Zvláště výhodné jsou kyseliny polyasparagové, popřípadě jejich soli a deriváty.

Dalšími vhodnými stavebními látkami jsou polyacetal, které se mohou získat reakcí dialdehydů s polykarboxylovými kyselinami, které mají 5 až 7 atomů C a alespoň 3 hydroxylové skupiny. Výhodné polyacetal se získají z dialdehydů, jako je glyoxal, glutaraldehyd, tereftalátaldehyd, a z jejich směsí a z polykarboxylových kyselin, jako je kyselina glukonová a/nebo kyselina glukonheptonová.

Dalšími vhodnými organickými stavebními látkami jsou dextry, například oligomery, popřípadě polymery uhlovodanů, které se mohou získat částečnou hydrolýzou škrobů. Hydrolýza se může provést podle obvyklých postupů, například kyselou nebo enzymatickou katalýzou. Výhodně se jedná o produkty hydrolýzy se středními molovými hmotnostmi v rozmezí 400 až 500000 g/mol. Přitom je výhodný polysacharid s ekvivalentem dextrózy (DE v rozsahu 0,5 až 40, zvláště 2 až 30, přičemž hodnota DE je obvyklým měřítkem pro snižující se účinek polysacharidu ve srovnání k dextróze, která má hodnotu DE 100. Použitelné jsou jak maltodextry s hodnotou DE 3 až 20 a suché glukózové sirupy s hodnotou DE 20 až 37 a také takzvané žluté dextry a bílé dextry s vyššími molovými hmotnostmi v rozmezí 2000 až 30000 g/mol.

U oxidovaných derivátů těchto dextrinů se jedná o jejich reakční produkty s oxidačními prostředky, které jsou schopné oxidovat alespoň jednu alkoholovou skupinu sacharidového kruhu na karboxylovou skupinu. Zvláště

výhodnými organickými stavebními látkami pro prostředky podle vynálezu jsou oxidované škroby, popřípadě jejich deriváty z přihlášky EP 472 042, WO 97/25399 a EP 755 944.

Také oxydisukcináty a jiné deriváty disukcinátů, výhodně ethylendiamindisukcinát, jsou dalšími vhodnými pomocnými stavebními látkami. Přitom se používá ethylendiamin-N,N'-disukcinát (EDDS), výhodně ve formě své sodné nebo hořečnaté soli. Dále jsou v této slouvislosti také výhodné glyceroldisukcináty a glyceroltrisukcináty. Vhodná množství pro použití ve formulacích s obsahem zeolitu a/nebo silikagelu jsou 3 až 15 % hmotnostních.

Dalšími použitelnými pomocnými stavebními látkami jsou například acetylované hydroxykarboxylové kyseliny, popřípadě jejich soli, které mohou být také případně ve formě laktonu a které obsahují alespoň 4 atomy uhlíku a alespoň jednu skupinu hydroxy a maximálně dvě kyselinové skupiny.

Další skupinou látek s vlastnostmi pomocných stavebních látek představují fosfonáty. Přitom se jedná zvláště hydroxyalkan- popřípadě aminoalkanfosfonáty. Mezi hydroxyalkanfosfonáty má jako pomocná stavební látka zvláštní význam 1-hydroxyethan-1,1-difosfonát (HEDP). Používá se výhodně jako sodná sůl, přičemž disodná sůl reaguje neutrálně a tetrasodná sůl alkalicky (hodnota pH 9). Jako aminoalkanfosfonáty přicházejí v úvahu výhodně ethylendiamin-tetramethylenfosfonát (EDTMP), diethylenetriamin-pentamethylenfosfonát (DTPMP) a jejich vyšší homology. Používají se výhodně ve formě neutrálně reagujících sodných solí, například jako hexasodná sůl EDTMP, popřípadně jako hepta- a oktasodná sůl DTPMP. Jako stavební látky se přitom ze třídy fosfonátů s výhodou používá HEDP. Aminoalkanfosfonáty mají k tomu výraznou schopnost vázat těžké kovy. Podle toho může být výhodné, zvláště když prostředek obsahuje také bělidla, použít aminoalkanfosfonáty, zvláště DTPMP, nebo použít směsi z uvedených fosfonátů.

Z toho vyplývá, že se všechny sloučeniny, které jsou schopné tvořit komplexy s ionty kovů alkalických zemin, používají jako pomocné stavební látky.

Stavební látky mohou být v prostředcích podle vynálezu obsaženy případně v množstvích až 90 % hmotn. Jsou obsaženy s výhodou v množstvích až 75 % hmotnostních. Prací prostředky podle vynálezu mají obsahy stavebních látek zvláště v rozsahu 5 % hmotn. až 50 % hmotnostních. V prostředcích podle vynálezu pro čištění tvrdých povrchů, zvláště pro strojové mytí nádobí, činí obsah stavebních látek zvláště 5 % hmotn. až 88 % hmotn., přičemž se v těchto prostředcích s výhodou nepoužívají žádné ve vodě nerozpustné stavební látky. Ve výhodné formě provedení prostředku podle vynálezu, zvláště pro strojové mytí nádobí, je obsaženo 20 % hmotn. až 40 % hmotn. ve vodě rozpustných organických stavebních látek, zvláště citrát alkalických kovů, 5 % hmotn. až 15 % hmotn. uhličitanu alkalických kovů a 20 % hmotn. až 40 % hmotn. disilikátu alkalických kovů.

Rozpouštědla, která se mohou použít v kapalných až gelovitých složeních pracích a čisticích prostředků, pocházejí například ze skupiny jedno- nebo vícesytných alkoholů, alkanolaminů nebo glykoetherů, pokud jsou mísitelné s vodou v uvedených oblastech koncentrací. Výhodně se rozpouštědla volí z ethanolu, n- nebo i-propanolu, butanolu, ethylenglykolmethyletheru, ethylenglykoethyletheru, ethylenglykolpropyletheru, ethylenglykolmono-n-butyl-etheru, diethylenglykol-methyletheru, diethylenglykoethyletheru, propylen-glykolmethyl-, -ethyl- nebo -propyl-etheru, dipropylenglykolmonomethyl- nebo -ethyletheru, di-isopropylenglykolmonomethyl- nebo -ethyletheru, methoxy-, ethoxy- nebo butoxytriglykolu, 1-butoxyethoxy-2-propanolu, 3-methyl-3-metoxybutanolu, propylen-glykol-t-butyletheru a směsí těchto rozpouštědel.

Rozpouštědla se mohou v kapalných až gelovitých pracích a čisticích prostředcích podle vynálezu používat v množstvích 0,1 až 20 % hmotn., výhodně ale pod 15 % hmotn. a zvláště pod 10 % hmotnostních.

Pro nastavení viskozity se může ke složení podle vynálezu přidat jeden nebo více zahušťovačů, popřípadě zahušťovacích systémů. Tyto vysokomolekulární látky, které se také nazývají jako bobtnadla, pohlcojí kapaliny a přitom bobtnají, aby nakonec přešly na viskózní pravé nebo koloidní roztoky.

Vhodnými zahušťovadly jsou anorganické nebo polymerní organické sloučeniny. K anorganickým zahušťovadlům patří například polykřemičité kyseliny, jílové minerály, jako jsou montmorillonity, zeolity, kyseliny křemičité a bentonity. Organická zahušťovadla pocházejí ze skupiny přírodních polymerů, pozměněných přírodních polymerů a zcela syntetických polymerů. Polymery pocházející z přírody jsou například agar-agar, karagen, tragant, arabská guma, algináty, pektiny, polyózy, guarová moučka, moučka svatojánského chlebičku, škroby, dextriny, želatina a kasein. Pozměněné přírodní látky, které se používají jako zahušťovadlo, pocházejí především ze skupiny modifikovaných škrobů a celulózy. Například lze uvést karboxymethylcelulózu a jiné ethery celulózy, hydroxyethyl- a propylcelulóza a ether žitné mouky. Zcela syntetickými zahušťovadly jsou polymery, jako je polyakrylové a polymethakrylové sloučeniny, vinylpolymery, polykarboxylové kyseliny, polyethery, polyiminy, polyamidy a polyurethany.

Zahušťovadla mohou být obsažena v množství až 5 % hmotn., výhodně 0,05 až 2 % hmotn. a zvláště výhodně 0,1 až 1,5 % hmotn., vztaženo na hotové složení.

Prací a čisticí prostředek podle vynálezu může případně jako další obvyklé složky obsahovat sequestrační prostředky (Sequestrierungsmittel), elektrolyty a další pomocné látky, jako jsou optické zjasňovače, inhibitory zešednutí, inhibitory koroze stříbra, inhibitory přenosu barvy, inhibitory pěny, abrazivní látky, barviva a/nebo vonné látky a mikrobiální účinné látky a/nebo látky absorbující UV.

Textilní prací prostředky podle vynálezu mohou jako optické zjasňovače obsahovat deriváty kyseliny diaminostilbensulfonové, popřípadě její soli alkalických kovů. Vhodné jsou například soli kyseliny 4,4'-bis(2-anilino-4-morfolino-1,3,5-triazinyl-6-amino)stilben-2,2'-disulfonové nebo podobným způsobem uspořádané sloučeniny, které místo morfolinové skupiny nesou diethanolaminovou skupinu, methylaminoskupinu, anilinovou skupinu nebo 2-methoxyethylaminovou skupinu. Dále mohou být přítomny optické zjasňovače typu substituovaných difenylstyrylů, například soli alkalických kovů 4,4'-bis(2-sulfonylstyryl)-difenylu, 4,4'-bis(4-chlor-3-sulfostryl)-difenylu nebo 4-(4-chlorstyryl)-4'-(2-sulfostryl)-difenylu. Mohou se také použít směsi výše uvedených optických zjasňovačů.

Inhibitory zešednutí mají za úkol udržovat nečistotu uvolněnou z textilního vlákna v suspenzi v prací lázni. K tomu jsou vhodné ve vodě rozpustné koloidy většinou organického původu, například škroby, kliš, želatiny, soli etherkarboxylových kyselin nebo ethersulfonových kyselin škrobu nebo celulózy nebo soli kyselých esteru kyseliny sírové celulózy nebo škrobu. Také ve vodě rozpustné polyamidy, obsahující kyselé skupiny, jsou pro tento účel vhodné. Dále se mohou použít jiné než výše uvedené deriváty škrobu, například aldehydové škroby. S výhodou se používají ethery celulózy, jako je karboxymethylcelulóza (sodná sůl), methylcelóza, hydroxyalkylcelulóza a směsné ethery, jako je methylhydroxyethylcelulóza, methylhydroxypropylcelulóza, methylkarboxymethylcelulóza a jejich směsi, například v množstvích 0,1 až 5 % hmotn., vztaženo na prostředek.

Aby vznikla ochrana proti korozi stříbra, mohou se v čisticích prostředcích podle vynálezu použít pro nádobí inhibitory koroze stříbra. Jsou známé ze stavu techniky, například benzotriazoly, chlorid železitý nebo CoSO_4 . Jak je například známo z patentového spisu EP 0 736 084 B1, jsou pro společné použití s enzymy zvláště vhodné inhibitory koroze stříbra soli a/nebo komplexy manganu, titanu, zirkonia, hafnia, vanadu, kobaltu nebo ceru, kde

jsou uvedené kovy v oxidačních stupních II, III, IV, V nebo VI. Příklady těchto sloučenin jsou MnSO_4 , V_2O_5 , V_2O_4 , VO_2 , TiOSO_4 , K_2TiF_6 , K_2ZrF_6 , $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_3$ a jejich směsi.

Účinné látky „soil-release“ nebo „soil-repelents“ jsou většinou polymery, které při použití v pracím prostředku propůjčují vláknům prádla vlastnosti odpuzující nečistotu a/nebo podporují schopnost odlučovat nečistotu ostatních složek pracího prostředku. Srovnatelný efekt lze také pozorovat při jejich použití v čisticích prostředcích pro tvrdé povrchy.

Zvláště účinné a dlouhou dobu známé účinné látky „soil-release“ jsou kopolyestery s dikarboxylovými kyselinami, alkylenglykoly a polyalkylglykoly. Příkladem jsou kopolymery nebo směsné polymery z polyethyltereftalátu a polyoxyethylenglykolu (DT 16 17 141, popřípadě DT 22 00 911). V německém zveřejněném spisu DT 22 53 063 jsou uvedeny prostředky, které mezi jiným obsahují kopolymer z dvojsytné karboxylové kyseliny a alkylen- nebo cykloalkylenpolyglykolu. Polymery z ethylentetraftalátu a polyethylenoxid-tereftalátu a jejich použití v pracích prostředcích jsou popsány v německých spisech DE 28 57 292 a DE 33 24 258 a v evropském patentovém spisu EP 0 253 567. Evropský patent EP 066 944 se týká prostředků, které obsahují kopolyester z ethylenglykolu, polyethylenglykolu, aromatické dikarboxylové kyseliny a sulfonované aromatické dikarboxylové kyseliny v určitých molových poměrech. Z evropského patentu EP 0 185 427 jsou známé polyestery koncově uzavřené skupinou methyl nebo ethyl s ethylen- a/nebo propylen-tereftalátem a polyethylenoxid-tetraftalátem a prací prostředky, které takový polymer „soil-release“ obsahují. Evropský patent EP 0 241 984 se týká polyesteru, který vedle oxyethylenových skupin a jednotek kyseliny tereftalové obsahuje také substituované ethylenové jednoty a glycerolové jednotky. Z evropského patentu EP 0 241 985 jsou známé polyestery, které vedle oxyethylenových skupin a jednotek kyseliny tereftalové obsahují skupiny 1,2-propylen, 1,2-butylen a/nebo 3-methoxy-1,2-propylen a glycerolové jednotky a jsou koncově uzavřené skupinami C_1 až C_4 -alkyl. Z evropské patentové

příhlášky EP 0 272 033 jsou známé polyestery alespoň částečně koncově uzavřené zbytky C_{1-4} -alkyl nebo acyl s polypropylentereftalátovými a polyoxyethylentereftalátovými jednotkami. Evropský patent EP 0 274 907 popisuje polyestery „soil-release“ s obsahem tereftalátu koncově uzavřené skupinou sulfoethyl. Podle evropské patentové příhlášky EP 0 357 280 se sulfonací nenasyčených koncových skupin vyrobí polyestery „soil-release“ tereftalátovými, alkylenglykolovými a poly- C_{2-4} -glykolovými jednotkami. Mezinárodní patentová příhláška WO 95/32232 se týká kyselých, aromatických polyesterů se schopností odlučovat nečistotu. Z mezinárodní patentové příhlášky WO 97/31085 nejsou známé polymerní účinné látky „soil-release“ pro materiály z bavlny s mnoha funkčními jednotkami: První jednotka, která může být například kationická, způsobuje adsorpci na povrchu bavlny elektrostatickým vzájemným působením a druhá jednotka, která je hydrofobní, je odpovědná za setrvání účinné látky na mezní ploše voda/bavlna.

K inhibitorům přenosu barvy, které přicházejí v úvahu pro použití v textilních pracích prostředcích podle vynálezu, patří zvláště polyvinylpyrrolidon, polyvinyl-imidazol, polymerní N-oxidy, jako je poly-(vinylpyridin-N-oxid) a kopolymery vinylpyrrolidonu s vinylimidazolem.

Při použití ve způsobu strojového čištění může být výhodné k prostředků přidat inhibitory tvorby pěny. Jako inhibitory tvorby pěny jsou vhodné například mýdla přírodního nebo syntetického původu, které mají vysoký podíl mastných kyselin C_{18} - C_{24} . Organopolysiloxany a jejich směsi s kyselinou křemičitou s jemnými částicemi, případně silanizovanou, jako jsou parafiny, vosky, mikrokrystalické vosky a jejich směsi se silanizovanou kyselinou křemičitou nebo biestearylethylendiamid. S výhodou se také používají směsi různých inhibitorů tvorby pěny, například ze silikonů, parafinů nebo vosků. Výhodně jsou inhibitory tvorby pěny, zvláště inhibitory tvorby pěny s obsahem silikonu a/nebo parafinu, vázány na granulární, ve vodě rozpustné, popřípadě dispergovatelné nosiče. Zvláště výhodné jsou přitom směsi z parafinů a bistearylethylendiamidů.

Čistící prostředek podle vynálezu pro tvrdé povrchy může podle toho obsahovat abrazivně působící složky, zvláště ze skupiny, obsahující křemenné moučky, dřevěné moučky, plastické moučky, křidu a skleněné mikrokuličky a jejich směsi. Obsah abrazivních látek v čistících prostředcích podle vynálezu nepřesahuje s výhodou 20 % hmotn., zvláště 5 % hmotn. až 15 % hmotnostních.

Barviva a vonné látky se do pracích a čistících prostředků přidávají, aby se zlepšil estetický dojem produktů a aby se spotřebiteli dal k dispozici prostředek, který vedle pracího a čistícího účinku představuje vizuálně a senzoricky „typický a nezaměnitelný“ produkt. Jako vonné oleje, popřípadě vonné látky, se mohou použít jednotlivé sloučeniny vonných látek, například syntetické produkty typu estery, ethery, aldehydy, ketony, alkoholy a uhlovodíky. Sloučeniny vonných látek typu estery jsou například benzylacetát, fenoxylethylisobutyrylát, p-terc.-butylcyklohexylacetát, linalylacetát, dimethylbenzylkarbonylacetát, fenylethyl-acetát, linalylbenzoát, benzylformiát, ethylmethylfenylglycinát, allylcyklohexyl-propionát, styrallylpropionát a benzylsalicylát. Mezi ethery patří například benzylethylether, mezi aldehydy například lineární alkanaly s 8-18 atomy C, citral, citronellal, citronellyl-oxyacetaldehyd, cyklamenaldehyd, hydroxycitronellal, lilial a bourgeonal, mezi ketony například jonony, α -isomethylionon a methylcedralketon, mezi alkoholy anethol, citronellool, eugenol, geraniol, linalool, fenylethylalkohol a terpineol, mezi uhlovodíky patří hlavně terpeny, jako jsou limoneny a pineny. Výhodné se však používají směsi různých vonných látek, které společně vytvoří oslovující vůni. Tyto parémové oleje mohou také obsahovat přírodní směsi vonných látek, které jsou dostupné z přírodních zdrojů, například piniový, citrusový, jasmínový patchoulyový, růžový nebo ylang-ylangový olej. Rovněž jsou vhodné muškátová, jasmínová, heřmánková, karafiátová, meduňková, mátová silice, silice ze skořicových listů, silice z lipových květů, silice z jalovcových bobulí, vetivenová, olibanumová, galbanumová a labdanumová silice a silice pomerančových květů, neroliová silice, silice z pomerančových slupek a silice ze sandelového dřeva. Obvykle je obsah

barviv v pracím a čisticím prostředku pod 0,01 % hmotn., zatímco vonné látky mohou tvořit až 2 % hmotn. celé formulace.

Vonné látky se mohou zapracovat přímo do pracího a čisticího prostředku, ale může být také výhodné nanést vonné látky na nosič, které posilují udržení parfému v čisticím prostředku a pomalejším uvolňováním vonné látky způsobují dlouhotrvající vůni, zvláště u textilií. Jako nosiče se například osvědčily cyklodextriny, přičemž komplexy cyklodextrin-parfém mohou být navíc opatřeny ještě dalšími pomocnými látkami. Dalším výhodným nosičem vonných látek je popsáný zeolit X, který místo nebo ve směsi s tenzidy může zahrnovat také vonné látky. Výhodné jsou proto prací a čisticí prostředky, které obsahují popsáný zeolit a vonné látky, které jsou s výhodou alespoň částečně absorbovány na zeolitu.

Výhodná barviva, jejichž výběr odborníkovi nedělá žádné potíže, mají velkou skladovatelnost a necitlivost proti ostatním složkám prostředku a proti světlu a žádnou výraznou substantivitu na textilní vlákna, aby se nenabarvila.

V boji proti mikroorganismům mohou prací nebo čisticí prostředky obsahovat antimikrobiální účinné látky. Přitom se rozlišují podle antimikrobiálního spektra a mechanismu účinku na bakteriostatika a bakteriocidy, fugistatika a fungicidy atd. Důležité látky z těchto skupin jsou například benzalkoniumchloridy, alkylarylsulfonáty, halogenfenoly a fenolmerkuriacetát. Pojmy antimikrobiální účinek a antimikrobiální účinná látka mají v rámci vynálezu obvyklý odborný význam, který se například nachází v *K.H.Wallhäusser: „Praxis der Sterilisation, Desinfektion - Konservierung: keimidentifizierung - Betriebs-hygiene“* (5.vydání - Stuttgart; New York: Thieme, 1995), přičemž se mohou použít všechny zde popsané látky s antimikrobiálním účinkem. Vhodnými antimikrobiálními účinnými látkami jsou výhodně zvoleny za skupin alkoholů, aminů, aldehydů, antimikrobiálních kyselin popřípadě jejich solí, esterů karboxylových kyselin, amidů kyselin, fenolů, fenolových derivátů, difenylů, difenylalkánů, derivátů močoviny,

kyslíkových, dusíkových acetalů a formalů, benzamidinů, isothiazolinů, ftalimidových derivátů, pyrimidových derivátů, antimikrobiálních povrchově aktivních sloučenin, guanidinů, antimikrobiálních amfoterních sloučenin, chinolinů, 1,2-dibrom-2,4-dikyanobutanu, jodo-2-propyl-butyl-karbamátu, jodu, jodoforů, peroxosloučenin, halogenových sloučenin a libovolných směsí výše uvedených látek.

Antimikrobiální účinná látka může být přitom zvolena z ethanolu, n-propanolu, i-propanolu, 1,3-butandiolu, fenoxylethanolu, 1,2-propylenglykolu, glycerinu, undecylenové kyseliny, kyseliny benzoové, kyseliny salicylové, kyseliny dihydrooctové, o-fenylfenolu, N-methylmorfolinacetonitrilu (MMA), 2-benzyl-4-chlorfenolu, 2,2'-methylen-bis-(6-brom-4-chlorfenolu), 4,4'-dichlor-2'-hydroxydifenyletheru (dichlorsan), 2,4,4'-trichlor-2'-hydroxydifenyletheru (trichlorsan), chlorhexidin, N-(4-chlorfenyl)-N-(3,4-dichlorfenyl)-močoviny, N,N'-(1,10-dekan-diyl-di-1-pyridinyl-4-yliden)-bis-(1-oktanamin)-dihydrochloridu, N,N'-bis-(4-chlor-fenyl)-3,11,2-diimino-2,4,11,13-tetraza-tetradekandiimidamidu, glukoprotaminů, antimikrobiálních povrchově aktivních kvarterních sloučenin, guanidinů včetně bi- a polyguanidinů, jako je například 1,6-bis-(2-ethylhexylbiguanido-hexan)-di-hydrochlorid, 1,6-di-(N₁,N₁'-fenyldiguanido-N₅,N₅')-hexan-tetrahydrochlorid, 1,6-di-(N₁,N₁'-fenyl-N₁,N₁-methylguanido-N₅,N₅')-hexan-dihydrochlorid, 1,6-di-(N₁,N₁'-o-chlorofenyldiguanido-N₅,N₅')-hexan-dihydrochlorid, 1,6-di-(N₁,N₁'-2,6-di-chlorofenyldiguanido-N₅,N₅')-hexan-dihydrochlorid, 1,6-di-(N₁,N₁'-beta-(p-me-thoxyfenyl)-diguanido-N₅,N₅')-hexan-dihydrochlorid, 1,6-di-(N₁,N₁'-alfa-methyl-beta-fenyldiguanido-N₅,N₅')-hexan-dihydrochlorid, 1,6-di-(N₁,N₁'-p-nitrofenyl-di-guanido-N₅,N₅')-hexan-dihydrochlorid, omega : omega'-di-(N₁,N₁'-fenyldiguanido-N₅,N₅')-di-n-propylether-dihydrochlorid, omega : omega'-di-(N₁,N₁'-p-chlorofenyl-diguanido-N₅,N₅')-di-n-propylether-tetrahydrochlorid, 1,6-di-(N₁,N₁'-2,4-dichloro-fenyldiguanido-N₅,N₅')-hexan-tetrahydrochlorid, 1,6-di-(N₁,N₁'-p-methylfenyldi-guanido-N₅,N₅')-hexan-dihydrochlorid, 1,6-di-(N₁,N₁'-2,4,5-trichlorofenyldi-guanido-N₅,N₅')-hexan-tetrahydrochlorid, 1,6-di-(N₁,N₁'-alfa-(p-chlorofenyl)-ethyldiguanido-N₅,N₅')-hexan-dihydrochlorid, omega : omega'-di-(N₁,N₁'-p-chloro-fenyldiguanido-N₅,N₅')-m-xylen-dihydrochlorid, 1,12-di-(N₁,N₁'-p-chlorofenyl-diguanido-N₅,

N_5')-dodekan-dihydrochlorid, 1,10-di-(N_1,N_1' -fenyldiguanido- N_5,N_5')-dekan-tetrahydrochlorid, 1,12-di-(N_1,N_1' -fenyldiguanido- N_5,N_5')-do-dekan-tetrahydrochlorid, 1,6-di-(N_1,N_1' -o-chlorofenyldiguanido- N_5,N_5')-hexan-dihydrochlorid, 1,6-di-(N_1,N_1' -o-chlorofenyldiguanido- N_5,N_5')-hexan-dihydro-chlorid, 1,6-di-(N_1,N_1' -o-chlorofenyldiguanido- N_5,N_5')-hexan-tetrahydrochlorid, ethylen-bis-(1-tolylbiguanid), ethylen-bis-(3,5-dimethylfenylbiguanid), ethylen-bis-(p-terc.-amylfenylbiguanid), ethylen-bis-(nonylfenylbiguanid), ethylen-bis-(fenylbiguanid), ethylen-bis-(N-butylfenylbiguanid), ethylen-bis-(2,5-diethoxy-fenylbiguanid), ethylen-bis-(2,4-dimethylfenyl-biguanid), ethylen-bis-(o-difenylbiguanid), ethylen-bis (směs amylnaftybiguanid), N-butyl-ethylen-bis-(fenylbiguanid), trimethylen bis (o-tolylbiguanid), N-butyl-trimethylen-bis-(fenylbiguanid) a odpovídající soli, jako jsou acetáty, glukonáty, hydrochloridy, hydrobromidy, citráty, bisulfity, fluoridy, polymaleáty, n-kokosalkylsarkosináty, fosfity, hypofosfity, perfluorooktanoáty, silikáty, sorbáty, salicyláty, maleáty, tartráty, fumaráty, ethylendiamintetraacetáty, iminoacetáty, cinnamáty, thio-kyanáty, argináty, pyromelitáty, tetrakarboxybutyráty, benzoáty, glutaráty, monofluorofosfáty, perfluorpropionáty a jejich libovolné směsi. Dále jsou vhodné halogenované xylolové a krezolové deriváty, jako je p-chlormetakrezol nebo p-chlor-meta-xylool a přírodní antimikrobiální účinné látky rostlinného původu (například z koření nebo bilín), živočišného a mikrobiálního původu. S výhodou se používají antimikrobiálně působící povrchově aktivní kvarterní sloučeniny, přírodní antimikrobiální účinná látka rostlinného původu a/nebo přírodní antimikrobiální účinná látka živočišného původu, zvláště výhodně alespoň jedna přírodní antimikrobiální účinná látka rostlinného původu ze skupiny, která obsahuje kofein, theobromin a theofylin a etherické oleje, jako je eugenol, thymol a geraniol, a/nebo alespoň jednu přírodní antimikrobiální účinnou látku živočišného původu ze skupiny, která obsahuje enzymy, jako je bílek z mléka, lysozym a laktoperoxidáza a/nebo alespoň jedna antimikrobiálně působící povrchově aktivní kvarterní sloučenina s amoniovou, sulfoniovou, fosfoniovou, jodoniovou nebo arsoniovou skupinou, peroxosloučeniny a chlorové sloučeniny. Také látky mikrobiálního původu, takzvané bakterioziny, se mohou použít.

Kvarterní amoniové sloučeniny (QAV) vhodné jako antimikrobiální účinné látky mají obecný vzorec $(R^1)(R^2)(R^3)(R^4)N^+X^-$, kde R_1 až R_4 představují stejné nebo rozdílné zbytky C_1 - C_{22} -alkyl, C_7 - C_{28} -aralkyl nebo heterocyklické zbytky, přičemž dva nebo v případě aromatické vazby, jako v pyridinu, dokonce tři zbytky tvoří společně s atomem dusíku heterocyklus, například pyridiniovou nebo imidazoliniovou sloučeninu, a X^- jsou halogenidové ionty, sulfátové ionty, hydroxydové ionty nebo podobné anionty. Pro optimální antimikrobiální účinek s výhodou alespoň jeden ze zbytků délku řetězce 8 až 18, zvláště 12 až 16 atomů.

QAV lze vyrobit reakcí terciárních aminů s alkylačními činidly, jako je například methylchlorid, benzylchlorid, dimethylsulfát, dodecylbromid, ale také ethylen-oxid. Alkylace terciárních aminů s dlouhým alkylovým zbytkem dvěma methylovými skupinami se dosáhne obzvláště snadno, také kvarternaci terciárních aminů s dvěma dlouhými zbytky a jednou skupinou methyl může být provedena pomocí methylchloridu za mírných podmínek. Aminy, které disponují třemi dlouhými alkylovými zbytky nebo alkylovými zbytky substituovanými skupinou hydroxy, jsou málo reaktivní a kvarternizují se výhodně s dimethyl-sulfátem.

Vhodné QAV jsou například benzalkoniumchlorid (N-alkyl-N,N-dimethyl-benzyl-amoniumchlorid, CAS No. 8001-54-5), benzalkon (*m,p*-dichlorbenzyl-dimethyl- C_{12} -alkylamoniumchlorid, CAS No. 58390-78-6), benzoxoniumchlorid (benzyl-dodecyl-bis-(2-hydroxyethyl)-amonium-chlorid), cetrimoniumbromid (N-hexa-decyl-N,N-trimethyl-amoniumbromid, CAS No. 57-09-0), benzetoniumchlorid (N,N-dimethyl-N-(2-(2-(*p*-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-fenoxy)-ethoxy)-ethyl)-benzylamoniumchlorid, CAS No. 121-54-0), dialkyldimethyl-amoniumchloridy, jako je di-n-decyl-dimethyl-amoniumchlorid (CAS No. 7173-51-5-5), didecyl-di-methylamoniumbromid (CAS No. 2390-68-3), dioktyl-dimethyl-amoniumchlorid, 1-cetylpyridiniumchlorid (CAS No. 123-03-5) a thiazolinjodid (CAS No. 15764-48-1) a jejich směsi. Zvláště výhodné QAV jsou

benzalkoniumchlorid se zbytky C_8 - C_{18} -alkyl, zvláště C_{12} - C_{14} -alkyl-benzyl-dimethylamoniumchlorid.

Benzalkoniumhalogenidy a/nebo substituované benzalkoniumhalogenidy jsou například komerčně dostupné jako Barquat® od firmy Lonza, Marquat® od firmy Mason, Variquat® od firmy Witco/Sherex a Hyamin® od firmy Lonza a Bradac® od firmy Lonza. Dalšími komerčně dostupnými antimikrobiálními účinnými látkami jsou N-(3-chlorallyl)-hexaminiumchlorid, jako je Dowicid® a Dowicil® od firmy Dow, benzethiniumchlorid, jako je Hyamin® 1622 od firmy Rohm and Haas, cetylpyridiniumchlorid, jako je Cepacolchlorid od firmy Labs.

Mikrobiální účinné látky se používají v množstvích 0,0001 % hmotn. až 1 % hmotn., výhodně 0,001 % hmotn. až 0,8 % hmotn., zvláště výhodně 0,005 % hmotn. až 0,3 % hmotn. a zejména 0,01 až 0,2 % hmotnostních.

Prostředky mohou obsahovat absorbční prostředky UV (UV-absorbéry), které se nanášejí na upravované textilie a zlepšují odolnost vláknem proti světlu a/nebo odolnost jiných složek receptury proti světlu. UV-absorbéry se rozumí organické látky (ochranné filtry proti světlu, které jsou schopné absorbovat ultrafialové záření a přijatou energii ve formě dlouhovlnného záření, například ve formě tepla, opět odevzdávat.

Sloučeniny, které mají tyto žádané vlastnosti, jsou například sloučeniny účinné dezaktivací bez záření a deriváty benzofenonu se substituenty v poloze 2 a/nebo 4. Dále jsou také vhodné substituované benzotriazoly, akryláty substituované skupinou fenyl v poloze 3 (deriváty kyseliny skořicové, případně skupinami kyano v poloze 2), salicyláty, organické komplexy Ni a přírodní látky, jako je umbeliferon a tělu vlastní kyselina močová. Zvláštní význam mají bifenylové a především stilbenové deriváty, které jsou například popsány v EP 0728749 A a jsou komerčně dostupné jako Tinosorb® FD nebo Tinosorb® FR od firmy Ciba. Jako UV-absorbéry lze uvést: 3-benzylidenkafr

popřípadě 3-benzylidenkafr a jeho deriváty, například 3-(4-methylbenzyliden)kafr, který je popsán v EP 0693471; derivát kyseliny 4-amino-benzoové, výhodně 2-ethylhexylester kyseliny 4-(dimethylamino)benzoové, 2-oktylester kyseliny 4-(dimethylamino)benzoové a amylester kyseliny 4-(dimethylamino)benzoové; estery kyseliny skořicové, výhodně 2-ethylhexylester kyseliny 4-methoxy-skořicové; propylester 4-methoxyskořicové, isoamylester 4-methoxyskořicové, 2-ethylhexylester kyseliny 2-kyano-3,3-fenylskořicové (oktokrylen); estery kyseliny salicylové, výhodně 2-ethylhexylester kyseliny salicylové, 4-isopropyl-benzylester kyseliny salicylové, monomethylester kyseliny salicylové; deriváty benzofenonu, výhodně 2-hydroxy-4-methoxybenzofenon, 2-hydroxy-4-methoxy-4'-methylbenzofenon, 2,2'-dihydroxy-4-methoxybenzofenon; estery kyseliny benzylmalonové, výhodně di-2-ethylhexylester kyseliny 4-methoxybenz-malonové; triazinové deriváty, jako například 2,4,6-trianilino-(p-karbo-2'-ethyl-1'-hexyloxy)-1,3,5-triazin a oktyl triazon, který je popsán v EP 0818450 A1 nebo dioktylbutamido triazon (Unvasorb® HEB); propan-1,3-dion, jako například 1-(4-terc.-butylfenyl)-3-(4'-methoxyfenyl)-propan-1,3-dion; ketotricyklo(-5.2.1.0) dekanový derivát, který je popsán v EP0694521 B1. Dále jsou vhodné 2-fenylbenzimidazol-5-sulfonová kyselina a její soli alkalických kovů a alkylických zemin, amoniové, alkylamoniové alkanolamoniové a glukamoniové soli; deriváty kyseliny sulfonové benzofenonů, výhodně 2-hydroxy-4-methoxybenzofenon-5-sulfonová kyselina a její soli; deriváty kyseliny sulfonové 3-benzylidenkafru, jako například 4-(2-oxo-3-bornylidenmethyl)benzolsulfonová kyselina a 2-methyl-5-(2-oxo-3-bornyliden)sulfonová kyselina a její soli.

Jako typické UV-A-filtry přicházejí v úvahu deriváty benzoylmethanu, jako například 1-(4'-terc.-butylfenyl)-3-(4'-methoxyfenyl)propan-1,3-dion, 4-terc.-butyl-4'-methoxydibenzoylmethan (Parsol 1789), 1-fenyl-3-(4'-isopropylfenyl)-propan-1,3-dion a enaminové sloučeniny, které jsou popsány v DE 19712033 A1 (BASF). Filtry UV-A a UV-B se mohou také samozřejmě použít ve směsích. Vedle uvedených rozpustných látek přicházejí v úvahu pro tento účel také nerozpustné pigmenty na ochranu proti světlu, totiž jemné disperze, výhodně nanočástice oxidů kovů, popřípadě soli. Příkladem pro vhodné oxidy

kovů jsou zvláště oxid zinku a oxid titaničitý a vedle toho oxidy železa, zirkonia, křemíku, manganu, hliníku a ceru a jejich směsi. Jako soli se mohou použít silikáty (mastek), síran barnatý nebo stearan zinečnatý. Oxidy a soli se používají ve formě pigmentů již při péči o pokožku a jako emulze na ochranu pokožky a jako dekorativní kosmetika. Částice by přitom měly mít střední průměr menší než 100 nm, výhodně 5 až 50 nm a zejména 15 až 30 nm. Mohou mít sférickou formu, mohou se však použít takové částice, které mají elipsoidní formu nebo formu, která je nějakým způsobem odchylná od sférického tvaru. Pigmenty mohou také být povrchově upravené, to znamená hydrofilizované nebo hydrofobní. Typickými příklady jsou opláštěné oxidy titaničité, jako například oxid titaničitý T 805 (Degussa) nebo Eusolex® T2000 (Merck); jako hydrofobní prostředky pro povrchovou úpravu přicházejí výhodně v úvahu silikony a zvláště výhodně trialkoxyoktylsilany nebo simethikony. S výhodou se používá mikronizovaný oxid zinečnatý. Další vhodné filtry na ochranu proti UV lze uvést přehled od P.Finkel v SÖFW-Journal 122 (1996), strana 543.

Absorbční prostředky UV se obvykle používají v množstvích 0,01 % hmotn. až 5 % hmotn., výhodně 0,03 % hmotn. až 1 % hmotnostních.

Také v pracích a čisticích prostředcích mohou proteiny podle vynálezu a/nebo jiné proteiny potřebovat zvláštní ochranu. Prostředky podle vynálezu mohou pro tento účel obsahovat stabilizátory.

Skupinou stabilizátorů jsou reverzibilní inhibitory proteázy, které se při zředění prostředku v práci lázni oddisociují. Benzamidin-hydrochlorid a leupeptin jsou pro tento účel etablované. Často se používá borax, kyseliny borité nebo jejich soli nebo estery, z toho především deriváty s aromatickými skupinami, podle WO 95/12655 orto-substituované, podle WO 92/19707 meta-substituované a podle US 5 972 873 para-substituované fenylborité kyseliny, popřípadě jejich soli nebo estery. V přihláškách WO 98/13460 a EP 583 534 se zveřejňují peptidaldehidy, to znamená oligopeptidy s

redukovaným koncovým atomem C a sice z 2-50 monomerů, pro reverzibilní inhibici proteáz pracího a čisticího prostředku. K peptidickým reverzibilním inhibitorům proteázy patří mezi jiným ovomukoid (WO 93/00418). Například s přihláškou WO 00/01826 se zveřejňují specifické, reverzibilní peptidové inhibitory proteázy subtilizin pro použití v prostředcích s obsahem proteázy, a s přihláškou WO 00/01831 odpovídající fuzní proteiny z proteázy a inhibitor.

Dalšími enzymovými stabilizátory jsou aminoalkoholy, jako je mono-, di-, triethanol- a -propanolamin a jejich směsi, alifatické karboxylové kyseliny až C₁₂, jak je například známo z přihlášek EP 0 378 261 a WO 97/05227, jako je kyselina jantarová, jiné dikarboxylové kyseliny nebo soli uvedených kyselin. Přihláškou DE 196 50 537 se pro tento účel zveřejňují amidalkoxyláty mastné kyseliny s uzavřenými koncovými skupinami. Určité organické kyseliny používané jako stavební látka umožňují, jak je zveřejněno v přihlášce WO 97/18287, navíc stabilizovat obsažený enzym.

Nižší alifatické alkoholy, především ale polyoly, jako například glycerol, ethylenglykol, propylenglykol nebo sorbit, jsou dalšími často používanými enzymovými stabilizátory. Podle novější přihlášky (EP 0 965 268) chrání také diglycerolfosfát proti denaturaci fyzikálními vlivy. Rovněž se používají soli vápníku, jako například octan vápenatý, nebo mravenčan vápenatý zveřejněný pro tento účel v patentovém spisu EP 0 028 865, a soli hořčíku podle evropské přihlášky EP 0 378 262.

Polyamidové oligomery (WO 99/43780) nebo polymerní sloučeniny, jako je lignin (WO 97/00932), ve vodě rozpustné vinyl-kopolymery (EP 828 762) nebo, jak je zveřejněno v EP 702 712, ether celulózy, akrylové polymery a/nebo polyamidy stabilizují enzymatické přípravky mezi jiným proti fyzikálním vlivům nebo kolísání hodnoty pH. Polymery obsahující polyamin-N-oxid (EP 587 550 a EP 581 751) působí současně jako enzymové stabilizátory a jako inhibitory přenosu barvy. Jinými polymerními stabilizátory jsou lineární C₈-C₁₈ -polyoxyalkyleny zveřejněné vedle jiných složek v přihlášce WO 97/

05227. Alkylpolyglykozidy by mohly, jako v přihláškách WO 97/43377 a WO 98/45396, stabilizovat enzymatické složky prostředku podle vynálezu a dokonce zvýšit jejich účinek. Zesítné sloučeniny s obsahem N, které jsou zveřejněny v přihlášce WO 98/17764, splňují dvojitou funkci jako činidla „soil-release“ a jako enzymové stabilizátory. Hydrofobní, neionický polymer působí ve směsi s jinými stabilizátory podle přihlášky WO 97/32958 stabilizujícím způsobem na celulózu, takže by tyto nebo podobné složky mohly být také vhodné pro enzym podle vynálezu.

Redukční prostředky a antioxidanty zvyšují, jak je mezi jiným zveřejněno v EP 780 466, stabilitu enzymu proti oxidačnímu rozkladu. Redukční prostředky s obsahem síry jsou například známy z patentových spisů EP 0 080 748 a EP 0 080 223. Jinými příklady jsou siřičitan sodný (EP 533 239) a redukující cukr (EP 656 058).

Častokrát se také používají kombinace stabilizátorů, například jak je zveřejněno v přihlášce WO 96/31589 z polyolů, kyseliny borité a/nebo boraxu, v přihlášce EP 126 505 kombinace kyseliny borité nebo boritanu, redukujících solí a kyseliny jantarové nebo jiných dikarboxylových kyselin, nebo v přihlášce EP 080 223 kombinace kyseliny borité nebo boritanu s polyoly nebo polyaminovými sloučeninami a s redukujícími solemi. Účinek peptidoaldehydových stabilizátorů se podle WO 98/13462 zvyšuje kombinací s kyselinou boritou a/nebo deriváty kyseliny borité a polyoly a podle WO 98/13459 se navíc dále posiluje použitím vápenatých iontů.

Prostředky se stabilizovanými enzymovými aktivitami představují výhodné formy provedení předkládaného vynálezu. Zvláště výhodné jsou formy provedení s enzymy, které jsou stabilizovány mnoha z uvedených způsobů.

Prostředky podle vynálezu obsahují proteiny podle vynálezu nebo deriváty výhodně v množstvích 0,000001 % hmotn. až 5 % hmotn. a postupně

výhodněji 0,00005 až 4 % hmotn., 0,00001 až 3 % hmotn., 0,0001 až 2 % hmotn. a zvláště výhodně 0,001 až 1 % hmotnostní. Koncentrace proteinu se může stanovit pomocí známých metod, například způsobem BCA (kyselina bichinolová; 2,2'-bichinolyl-4,4'-dikarboxylová) nebo biuretovým způsobem (A.G.Gornall, C.S.Bardawill a M.M.David, J.Biol.Chem.177 (1948), str. 751-766).

Prostředky podle vynálezu mohou navíc kromě proteinu podle vynálezu obsahovat další amylolytické enzymy, zvláště α -amylázy. Mohou se mezi nimi také nacházet výše uvedené enzymy etablované pro použití v pracím a čisticím prostředku. Příkladem komerčně dostupných amyláz jsou BAN[®], Termamyl[®], Purastar[®], Amylase-LT[®], Maxamyl[®], Duramyl[®] a/nebo Purafect[®] OxAm. Ty se potom uplatní, když se mohou různé enzymy navzájem doplňovat. Z hlediska regulace může toto doplňování například probíhat vzájemnou aktivací nebo inaktivací. Může například nastat tím, že alespoň jedna nehomologická část ke známým α -amylázám enzymu podle vynálezu ovlivňuje neamylolytické aktivity podle vynálezu. Společné použití však může být užitečné v důsledku odlišných specifikací substrátu. Oba jsou formy provedení předkládaného vynálezu.

Zvláště na chemicky rozdílná znečištění může být výhodné používat amylolytické enzymy v pracím a čisticím prostředku společně s jinými pracími a/nebo čisticími aktivními enzymy. Tak představují prací a čisticí prostředky, které se kromě proteinu podle vynálezu navíc vyznačují dalšími enzymy, výhodné formy provedení předkládaného vynálezu.

Patří k nim vedle dalších amyláz například proteázy, ale také lipázy, kutinázy, esterázy, pululanázy, celulózy, hemicelulózy a/nebo xylanázy a jejich směsi. Zvláště výhodné jsou proteázy, lipázy, β -glukanázy a/nebo celulózy. Další enzymy rozšiřují účinek čištění odpovídajících prostředků o jejich specifický enzymatický účinek. Patří k nim například oxidoreduktázy nebo peroxidázy jako složky enzymatických bělicích systémů, laccázy (WO 00/39306),

β -glukanázy (WO 99/06515 a WO 99/06516) nebo enzymy rozpouštějící pektin (WO 00/42145), které se zvláště používají ve speciálních pracích prostředcích.

Příkladem komerčně dostupných enzymů pro potřeby prostředků podle vynálezu jsou proteázy, jako je Subtilisin BPN', Properase®, BLAP®, Optimase®, Opticlean®, Maxatase®, Maxacal®, Maxapem®, Alcalase®, Esperase®, Savinase®, Durazym®, Everlase® a/nebo Purafect®G nebo Purafect®OxP a lipázy, jako je Lipolase®, Lipomax®, Lumafast® a/nebo Lipozym®.

Aktivitu proteáz v těchto prostředcích lze zajistit způsobem uvedeným v *Tenside*, svazek 7 (1970), str. 125-132. Uvádí se podle toho v PE (jednotky proteázy). Aktivita proteáz výhodných prostředků může činit až 1,500.000 jednotek proteázy na gram přípravku (PE, stanoveno způsobem popsáným v *Tenside*, svazek 7 (1970), str. 125-132).

Z hlediska jejich získání přicházejí mezi použitelné enzymy v úvahu v první řadě ty, které se získají z mikroorganismů, jako jsou bakterie nebo plísňe, například z *Bacillus subtilis*, *bacillus licheniformis*, *Streptomyces griseus*, *Humicola lanuginosa*, *Humicola insolens*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* nebo *Pseudomonas cepacia*, zvláště z těchto kmenů přirozeým způsobem vytvořené enzymové, popřípadě směsi s jejich jinými kmeny. Získávají se známým způsobem fermentačním procesem z vhodných mikroorganismů, které jsou například popsány v německých zveřejněných spisech DE 19 40 488 a DE 21 21 397, v amerických patentových spisech US 3 623 957 a US 4 264 738, v evropské patentové přihlášce EP 006 638 a v mezinárodní patentové přihlášce WO 91/02792.

Také tyto případně navíc použité enzymy se mohou, jak je například popsáno v evropském patentu EP 0 564 476 nebo v mezinárodní patentové přihlášce

WO 94/23005, adsorbovat na nosiči a/nebo být součástí látek pro povrchovou úpravu, aby se chránily proti předčasné inaktivaci. Jsou v pracích prostředcích obsaženy výhodně v množství až 10 % hmotn., zvláště 0,2 % hmotn. až 2 % hmotn., přičemž se zvláště výhodně proti oxidačnímu odbourávání používají stabilizované enzymy, které jsou například známé z mezinárodní patentové přihlášky WO 94/18314.

Prostředky podle vynálezu se mohou skládat z více fází, například proto, aby se obsažené účinné látky časově nebo prostorově vzájemně odděleně uvolňovaly. Přitom se může jednat o fáze v různých skupenstvích, zvláště však o dvě fáze ve stejných skupenstvích.

Prostředky podle vynálezu, které se skládají z více pevných složek, se mohou jednoduchým způsobem vyrobit tím, že se různé prášky nebo granuláty smíchají společně s různými složkami a/nebo s rozdílným způsobem uvolňování do celkem volné formy. Výroba pevného prostředku podle vynálezu z jedné nebo více fází může probíhat známým způsobem, například suchým rozprašováním nebo granulací, přičemž se enzymy a eventuálně další termicky citlivé složky, jako například bělicí prostředky, mohou popřípadě později separátně přidat. Pro výrobu prostředků podle vynálezu se zvýšenou sytnou hmotností, zvláště v rozmezí 650 g/l až 950 g/l, je výhodný způsob s extruzním krokem známým z evropského patentu EP 0 486 592. Další výhodná výroba granulačním způsobem je popsána v evropském patentu EP 0 642 576.

Proteiny se mohou pro pevné prostředky použít například ve vysušené, granulované formě, ve formě kapslí nebo ve formě kapslí a navíc ve vysušené formě. Mohou se přidat zvlášť, to znamená jako vlastní fáze, nebo s jinými složkami společně ve stejné fázi, s nebo bez kompaktace. Když se mají enzymy ve formě mikrokapslí zpracovat v pevné formě, tak se může voda z vodných roztoků vzniklých ze zpracování odstranit způsobem známým ze stavu technik, jako sušení rozprašováním, odstředění nebo opakovanou

solubilizací. Tímto způsobem získané částičky mají obvykle velikost částic 50 až 200 μm .

Nabízí se forma kapslí, aby se enzymy chránily před jinými složkami, jako jsou například bělicí prostředky nebo aby se umožnilo řízené uvolňování (controlled release). Podle velikosti těchto kapslí se rozlišují mili-, mikro- a nanokapsle, přičemž mikrokapsle jsou pro enzymy zvláště výhodné. Tyto kapsle jsou například zveřejněny patentovými přihláškami WO 97/24177 a DE 1999 18 267. Další možný způsob kapslování spočívá v tom, že enzymy vhodné pro použití v pracím a čisticím prostředku, přičemž se vychází ze směsi enzymového roztoku s roztokem nebo suspenzí škrobu nebo derivátu škrobu, se kapslují v škrobu, popřípadě v škrobovém derivátu. Tento způsob kapslování je popsán v německé přihlášce DE 199 56 382 s názvem „Způsob výroby mikrokapslovaných enzymů“.

Jiná možnost, jak dát k dispozici pevný prostředek podle vynálezu, je slisování nebo kompaktace na tablety. Tyto tablety mohou být jedno nebo dvoufázové. Tím tato forma podávání nabízí možnost předkládat pevný prostředek podle vynálezu s dvěma pevnými fázemi. Při výrobě prostředků podle vynálezu ve formě tablet, které mohou být jednofázové nebo více fázové, jednobarevné nebo vícebarevné a/nebo mohou sestávat z mnoha vrstev, se výhodně všechny složky - případně po vrstvě - společně smíchají ve směšovači a směs se obvyklým tabletovacím lisem, například výstředníkovým lisem nebo kloběhovým lisem, slisují tlakem v rozmezí asi 50 až 100 kN/cm^2 , výhodně při 60 až 70 kN/cm^2 . Zvláště u vícevrstevných tablet může být výhodné, když se alespoň jedna vrstva stlačí předem. To se s výhodou provede například při tlacích 5 až 20 kN/cm^2 , zvláště při 10 až 15 kN/cm^2 . Výhodně má tímto způsobem vyrobená tableta hmotnost 10 g až 50 g, zvláště 15 g až 40 g. Prostorová forma tablet je libovolná a může být kulatá, oválná nebo hranatá, přičemž jsou také možné meziformy.

Ke kapalným, gelovitým nebo pastozním prostředkům podle vynálezu se mohou přidat enzymy a také protein podle vynálezu, přičemž se vychází ze způsobu získání proteinu provedeného podle stavu techniky a preparace v koncentrovaném vodném nebo nevodném roztoku, například v kapalně formě, jako roztok, suspenze nebo emulze, ale také ve formě gelu nebo kapslí nebo jako vysušený prášek. Tyto prací nebo čisticí prostředky podle vynálezu ve formě roztoků v obvyklých rozpouštědlech se zpravidla vyrobí jednoduchým smícháním složek, které se mohou do automatického směšovače vložit jako látka nebo roztok.

Formou provedení předkládaného vynálezu jsou takové tekuté, gelovité nebo pastozní prostředky, ke kterým byl přidán protein podle vynálezu a/nebo jeden z ostatních obsažených proteinů a/nebo jedna z ostatních obsažených složek ve formě mikrokapslí. Z nich zvláště výhodné jsou s kapslemi z materiálu, který je senzitivní na amylázu. Toto společné použití materiálů senzitivních na amylázu a amylolytického enzymu podle vynálezu v pracím a čisticím prostředku může vykazovat synergický účinek tak, že enzym štěpící škrob podporuje štěpení mikrokapslí a tím řídí proces uvolňování zakapslovaných složek, takže jejich uvolňování neprobíhá během skladování a/nebo na začátku čištění, nýbrž nejdříve k určitému časovému bodu. Na tomto mechanismu se mohou zakládat komplexy pracího a čisticího prostředku s různými složkami a různými typy kapslí, které představují zvláště výhodné formy provedení předkládaného vynálezu.

Srovnatelným účinek nastává tehdy, když se složky pracího nebo čisticího prostředku rozdělí alespoň na dvě různé fáze, například na dvě nebo více pevných, společně spojených fází pracího nebo čisticího prostředku ve formě tablet, nebo různé granuláty uvnitř stejného práškového prostředku. Dvou nebo vícefázové jsou stavem techniky pro použití jak ve strojových myčkách nádobí, tak také v pračkách prádla. Aktivita amylolytického enzymu v dříve aktivované fázi je předpokladem pro aktivaci podější fáze, když je opatřena obalem nebo vrstvou senzitivní na amylázu, nebo materiál senzitivní na

amylázu představuje integrální složku pevné fáze, jejíž částečnou nebo úplnou hydrolýzou se příslušná fáze dezintegruje. Použití enzymu podle vynálezu pro tento účel tak představuje výhodnou formu provedení předkládaného vynálezu.

Složky pracích a čisticích prostředků se mohou vhodným způsobem vzájemně podporovat ve svém účinku. Synergické použití amylázy a inhibitorů přenosu barvy pro zvýšení čisticího účinku je například zveřejněno patentovou přihláškou WO 99/63035. Z přihlášky WO 98/45396 je také známo, že polymery, které se mohou současně použít jako pomocné stavební látky, jako například alkyl-polyglykozidy, mohou stabilizovat a zvyšovat aktivitu a stabilitu obsažených enzymů. Rovněž je možné, že se amylolytická aktivita podle vynálezu také modifikuje jednou z ostatních výše uvedených složek, zejména stabilizuje a/nebo zvyšuje. Odpovídajícím způsobem schválené receptury prostředků podle vynálezu tak představují zvláště výhodné forma provedení předkládaného vynálezu. To platí zvláště tehdy, když se tím zvyšuje prací, popřípadě čisticí účinek prostředku.

Také ve způsobu čištění textilií nebo tvrdých povrchů, které se vyznačují tím, že se alespoň v jednom z kroků způsobu aktivuje amylolytický protein nebo derivát podle vynálezu, se uskuteční myšlenka podle předkládaného vynálezu.

Právě strojové způsoby čištění se vyznačují víceetapovým čisticím programem, tedy že se různé složky aktivního čištění od sebe včas oddělují a nanášejí na předmět čištění. Tento způsob se například používá při čištění průmyslových výrobních zařízení pro potraviny. Na druhé straně mají proteiny samotné podle vynálezu na základě své enzymatické aktivity schopnost rozpouštět nečistoty s obsahem uhlovodanů a sice také za částečné nebo úplné nepřítomnosti detergentů nebo jiných složek charakteristických pro prací nebo čisticí prostředky. Podle jedné formy provedení předkládaného vynálezu se může také zvolit strojový způsob čištění textilií nebo pevných

látek, při kterém na nečistoty působí protein podle vynálezu po určitou dobu bez přítomnosti jiných složek aktivního čištění.

Výhodné formy provedení předkládaného vynálezu představují všechny způsoby čištění, včetně manuálních, zvláště ale strojové způsoby čištění, které se vyznačují tím, že se alespoň v jednom z kroků způsobu aktivuje amylolytický protein nebo derivát podle vynálezu. Mohou to být jak způsoby čištění textilií nebo srovnatelných materiálů, tak také způsoby čištění tvrdých povrchů.

Jak je doloženo v příkladech, je α -amyláza podle vynálezu z *Bacillus sp.* A 7-7 (DSM 12368), když je vhodně vázána v pracím nebo čisticím prostředku, vhodná jak pro zvýšení pracího účinku pracích prostředků pro strojové praní textilií, tak také pro zvýšení pracího účinku prostředků pro strojové mytí nádobí.

Výhodné formy provedení předkládaného vynálezu tak rovněž představují všechny způsoby čištění, včetně manuálních, zvláště ale strojových způsobů čištění, které se vyznačují tím, že se alespoň v jednom z kroků způsobu použije prostředek podle vynálezu. To mohou být jak způsoby čištění textilií nebo srovnatelných materiálů, tak také způsoby čištění tvrdých povrchů.

Pro způsoby čištění, například v běžných myčkách nádobí nebo pračkách prádla pro domácnosti, byla zjištěna zvláště vhodná množství proteinu podle vynálezu nebo fragmentu 0,02 mg až 400 mg amylolytického proteinu nebo fragmentu, výhodně 0,01 mg až 200 mg, zejména 0,02 mg až 100 mg amylolytického enzymu nebo fragmentu na použití. V jedné možné formě použití strojového čištění textilií nebo pevných povrchů se pro protein podle vynálezu ukázaly jako zvláště vhodné koncentrace 0,0005 mg až 10 mg na l prací lázeň, výhodně 0,005 mg až 8 mg na l prací lázeň. Představují tak formy provedení předkládaného vynálezu. V jiných vhodných formách provedení

mohou vznikat značně odlišné hodnoty, pokud se zohlední, že pro strojové způsoby čištění se používají stroje, které provádějí 5 až 70 l pracích lázní při přibližně identickém množství pracího popřípadě čisticího prostředku.

Také použití proteinu podle vynálezu nebo prostředku podle vynálezu představuje formu provedení podle předkládaného vynálezu. Může probíhat strojově nebo jinak, zvláště manuálním způsobem. To se týká čištění všech pomyslitelných materiálů, zvláště textilií nebo tvrdých povrchů. Přitom se může protein podle vynálezu vložit do receptury z jiných látek s pracím účinkem nebo podle jeho povahy může nadále působit bez těchto sloučenin.

Odpovídající formu provedení také představuje použití samotného proteinu podle vynálezu pro čištění textilií nebo tvrdých povrchů, zvláště ve více-stupňovém způsobu čištění.

Výhodnou formu provedení představují všechny možnosti použití, při kterých se prostředek podle vynálezu používá pro čištění textilií nebo tvrdých povrchů.

Výhodné použití se vyznačuje tím, že se pro použití v myčce nádobí nebo pračce prádla používá 0,02 až 400 mg, výhodně 0,01 až 200 mg, zvláště výhodně 0,02 až 100 mg amylolytického proteinu nebo fragmentu.

Použití proteinů nebo derivátů podle vynálezu pro částečné nebo úplné rozpuštění nečistot ochranných vrstev a složek pevných pracích nebo čisticích prostředků nebo dezintegraci pevných fází obsahující nebo obklopující materiály senzitivní na amylázu, představuje rovněž formu provedení předkládaného vynálezu. To platí také pro formy provedení, u kterých se v jedné z těchto fází nacházejí amylolytické proteiny podle vynálezu samotné nebo společně s alespoň jednou jinou účinnou látkou s čisticím účinkem nebo účinnou látkou, která čisticí účinek podporuje. Do té míry slouží amylolytický

protein k aktivaci vlastní nebo jiné fáze v některém z pracích nebo čisticích prostředků, skládající se z více než jedné fáze. Zvláště výhodné je také pod tímto aspektem uvolňování složek, aby se přivodil čisticí efekt složek na tvrdé povrchy nebo textilní materiál.

Použití enzymu podle vynálezu, aby způsobily částečné nebo úplné rozpuštění kapslí s obsahem uhlovodanů, zvláště nano-, mikro nebo milikapslí v kapalných, gelovitých nebo pastózních prostředcích, představuje formu provedení předkládaného vynálezu, jehož význam pro řízený proces uvolňování zakapslovaných složek prostředku byl již probrán výše. Jedná se o zvláště výhodnou formu provedení tohoto vynálezu tedy, když uvolňováním složky dochází k čisticímu účinku složky na tvrdém povrchu nebo textilním materiálu.

Další forma provedení představuje použití proteinu nebo derivátu podle vynálezu pro úpravu surových materiálů nebo meziproduktů při výrobě textilu, zvláště při odšlichtování bavlny.

Suroviny a meziprodukty textilní výroby, například na bázi bavlny, se v rámci jejich výroby a dalšího zpracování upravují škrobem, aby se umožnilo lepší zpracování. Tento způsob používaný jak na příze, na meziprodukty, tak také na textílie, se nazývá šlichtování (sizing). Pro odstranění šlichty, tedy ochranné vrstvy s obsahem škrobu (odšlichtování, desizing) jsou vhodné amylolytické proteiny.

Další formu provedení představují způsoby ztekucování škrobu, zvláště pro výrobu ethanolu, která se vyznačuje tím, že přitom používá protein nebo derivát podle vynálezu.

Pro ztekucování škrobu se ve vodě nebo pufu inkubuje nabobtnalý škrob s amylolytickým enzymem, přičemž se polysacharid štěpí na menší složky,

převážně na maltózu. Enzymy podle vynálezu se s výhodou používají v tomto způsobu nebo jeho části, když se mohou na základě svých biochemických vlastností dobře přizpůsobit odpovídajícímu výrobnímu způsobu. Například to může být případ, když se mají v jednom kroku přivést s jinými dalšími enzymy, které vyžadují stejné reakční podmínky. Zvláště výhodné jsou amylolytické proteiny podle vynálezu, pokud právě produkty z nich samostatných vytvořené jsou v centru zájmu. Ztekucování škrobu může také představovat krok ve víceetapovém způsobu získávání ethanolu nebo z něho odvozených následných produktů, například kyseliny octové.

Další forma provedení představuje použití proteinu podle vynálezu nebo jeho derivátu pro výrobu lineárních oligosacharidů a/nebo oligosacharidů s krátkým řetězcem.

Na základě své enzymatické aktivity tvoří amylolytické proteiny podle vynálezu z polymerů s obsahem škrobu po kratší inkubační době převážně vysokomolekulární oligosacharidy, jako je například maltohexaoza, maltoheptaoza nebo maltooktaoza. Po delší inkubační době stoupá mezi reakčními produkty podíl nižších oligosacharidů, jako je například maltoza nebo maltotrioza. Při zvláštním zájmu na určitých reakčních produktech se mohou použít odpovídající varianty proteinů podle vynálezu a/nebo nastavit odpovídající reakční podmínky. To je zvláště atraktivní tehdy, když nezáleží na čistých sloučeninách, nýbrž na směsi podobných sloučenin, jako například při tvorbě roztoků, suspenzí nebo gelů pouze s určitými fyzikálními vlastnostmi.

Další forma provedení představuje protein nebo derivát podle vynálezu pro hydrolýzu cyklodextrinů.

Cyklodextriny jsou α -1,4-glykozidicky vázané, cyklické oligosacharidy, ze kterých mají hospodářsky největší význam α , β - popřípadě γ -cyklodextriny

(cyklohexa, -hepta- popřípadě -okta-amylozy) z monomerů 6, 7 nebo 8-glukózy. Mohou s hydrofobními hostitelskými molekulami, jako například s vonnými látkami, chuťovými látkami nebo farmaceutickými účinnými látkami, tvořit klatráty, ze kterých se hostitelské molekuly mohou podle potřeby opět uvolnit. Tyto klatráty mají podle oblasti použití složek význam například pro výrobu potravin, farmacií nebo kosmetiku, například v odpovídajících produktech pro konečné spotřebitele. Uvolňování složek z cyklodextrinů tak představuje možnost použití proteinů podle vynálezu.

Další forma provedení představuje použití proteinu nebo derivátu podle vynálezu pro uložování nízkomolekulárních sloučenin z polysacharidových nosičů nebo cyklodextrinů.

Na základě své enzymatické aktivity mohou amylolytické proteiny podle vynálezu uvolňovat nízkomolekulární sloučeniny také z jiných α -1,4-glykozidicky vázaných polysacharidů. To se může jako u cyklodextrinů odehrávat na molekulární úrovni, stejně tak na větších systémech, jako jsou například složky, které jsou zakapslovány ve formě mikrokapslí. Například škrob je materiál etablovaný ve stavu techniky, aby se sloučeniny, jako například enzymy, které se mají v definovaných množstvích přivádět do reakční vsázky, během skladování zakapslovaly. Řízený proces uvolňování z těchto kapslí se může amylolytickými enzymy podle vynálezu podpořit.

Další forma provedení představuje použití proteinu nebo derivátu podle vynálezu pro výrobu potravin a/nebo potravinových složek.

Rovněž použití proteinu nebo derivátu podle vynálezu pro výrobu krmiva a/nebo krmivových složek představuje formu provedení tohoto předmětu vynálezu.

Kde má stále význam škrob nebo od škrobu odvozené uhlovodany jako složky potravin nebo krmiv, může se amylolytická aktivita použít pro výrobu tohoto druhu zboží. Zvyšuje podíl mono- nebo oligomerů oproti polymerním cukrům, což může přispět například k chuti, stravitelnosti nebo konzistenci potraviny. To může být důležité pro výrobu určitých krmiv, například ale také při výrobě ovocných šťav, vína nebo jiných potravin, když se podíl polymerního cukru sníží a podíl sladkých a/nebo snadno rozpustných cukrů se má zvýšit. Na další výše uvedené možnosti použití pro ztekucování škrobu a/nebo výrobu ethanolu lze pohlížet jako na varianty tohoto principu pro velkovýrobu.

Z toho vyplývá, že amylázy působí také proti ztrátě chuti pečiva (anti staling-effect) při okorávání a tvrdnutí. Proto se vhodným způsobem přidávají do těsta před pečením. Výhodné formy provedení předkládaného vynálezu jsou tedy takové, při kterých se proteiny podle vynálezu používají pro výrobu pečiva.

Další forma provedení představuje použití proteinu nebo derivátu podle vynálezu pro rozpouštění lepidel s obsahem škrobu.

Rovněž dočasné způsoby lepení, které se vyznačují tím, že se při nich používá protein nebo derivát podle vynálezu, představují formu provedení předmětu vynálezu.

Vedle jiných přírodních látek se také škrob používá již stovky let jako pojivo při výrobě papíru a pro lepení různých papírů a lepenek. To se týká například grafik a knih. Během dlouhé doby se mohou tyto papíry za nepříznivých vlivů, jako například vlhkosti, zvlnit nebo lámat, což může vést k jejich úplnému zničení. Při restaurování těchto papírů a lepenek může být nutné rozpouštět vrstvy lepidla a při použití amylolytického enzymu to lze výrazně ulehčit.

Rostlinné polymery, jako škrob nebo celulóza a jejich ve vodě rozpustné deriváty se mezi jiným používají jako lepidla a tmely. Proto musí nejdříve bobtnat ve vodě a po nanesení na lepený předmět zaschnout, čímž se fixují na podklad. Enzym podle vynálezu se může přidat k této vodné suspenzi, aby se ovlivnily lepicí vlastnosti vznikajícího lepidla. Může se však také místo nebo navíc k této funkci přidat k lepidlu, aby po uschnutí na dlouhou dobu, například několik let, zůstalo na lepeném předmětu inaktivní. Cílená změna okolních podmínek, například zvlhnutím, lze potom použít k tomu, aby se enzym v pozdější době aktivoval a tím se přivedilo rozpuštění lepidla. Tímto způsobem se lepený předmět snadněji opět uvolní s podkladu. V tomto způsobu působí enzym podle vynálezu na základě své amylolytické aktivity jako oddělovací činidlo při dočasném způsobu lepení nebo jako takzvaný „spouštěč“ pro uvolnění lepeného předmětu.

Přehled obrázků na výkresech

Obrázek 1 Alignment amylolytického enzymu podle vynálezu z *Bacillus sp.* A 7-7 (DSM 12368) se třemi dalšími podobnými amylázami

Přitom znamenají:

1. Amyláza z *Bacillus sp.* A 7-7 (DSM 12368)
2. Zralá amyláza z *Bacillus sp.* # 707 podle: Tsukamoto, Kimura, Ishii, Takano a Yamane, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151 (1988), str. 25-31
3. Amyláza SEQ ID No. 1 z přihlášky WO 96/23873
4. Amyláza SEQ ID No. 2 z přihlášky WO 96/23873

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Mezi kandidáty mikrobiologického screeningu na mikroorganizmech tvořících amylázu s kritériem výběru růst a tvorba dvorce na agarových destičkách se šrobem jako jedinného zdrojem uhlíku se nachází také kmen *Bacillus sp* (skupina IV - RNA, alcaliphil) A 7-7, který byl uložen u DSMZ (DSM ID 98-587, uložení DSM 12368).

Pěstování probíhalo v prostředí YPSS, obsahující 15 g/l rozpuštěného škrobu, 4 g/l kvasnicového extraktu, 1 g/l K_2HPO_4 a 0,5 g/l $MgSO_4 \times 7 H_2O$. Hodnota pH byla po autoklávování 20% roztokem uhličitanu sodného nastavena na 10,3. Nyní bylo 25 ml prostředí naplněno do sterilní 100 ml erlenmayerovy baňky se šikanou a naočkovánou kulturou *Bacillus sp.* A 7-7 (DSM 12368), která vyrostla na agarové destičce YPSS. Pěstování probíhalo při teplotě 30 °C 48 hodin za třepání při 200 rpm.

Příklad 2

Následujícími kroky čištění byl prostředí kultur získán singulární enzym: srážení zbytku kultury ethanolem; pohlcení proteinových destiček v 50 mM pufru Tris/HCl, hodnota pH 8,5; dialýza proti 50 mM pufru Tris/HCl, hodota pH 8,5; chromatografie s výměnou kationtů na Fast-flow-S-Sepharose® (Fa. Pharmacia-Amersham Biotech, Freiburg) s 50 mM pufru Tris/HCl, hodnota pH 8,5 jako eluent; přepufrování propadu s obsahem amylázy proti 20 mM pufru glycin/NaOH, hodnota pH 10, přes kolony PD10® firmy Pharmacia-Amersham Biotech; chromatografie s výměnou aniontů přes Mono-Q® (Fa. Pharmacia-

Amersham Biotech) za eluce stejným puforem se stoupajícím gradientem soli 0 až 1 M NaCl. Amyláza eluovala při ca. 0,25 M NaCl.

Z 250 ml kultivačního prostředí bylo tímto způsobem, jak bylo zjištěno metodou BCA (Bicinchinonová kyselina; 2,2'-bichinoyl-4,4'-dikarboxylová kyselina), získáno 2,6 mg čistého proteinu podle SDS-Gelelektroforézy a zbarvení stříbrem.

Při denaturující SDS-polyakrylelektroforéze v 8-25% gelu, systému PHAST[®] firmy Pharmacia-Amersham a při srovnání s relevantními velkými značkami má amylytický enzym z *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368) molekulovou hmotnost 58 kD.

Podle izoelektrické fokuzace při hodnotě pH 3 až 9 v systému PHAST[®] firmy Pharmacia-Amersham leží jeho izoelektrický bod na hodnotě 6,0.

Amylytická aktivita vyčištěného enzymu byla stanovena pomocí takzvané metody DNS, tedy za použití kyseliny dinitrosalicylové. Přitom se prokázaly oligosacharidy, disacharidy, uvolňované enzymem při hydrolýze škrobu, a glukozové jednotky uvolňované oxidací redukovaných koncových skupin kyselinou dinitrosalicylovou (DNS). Intenzita vývoje barvy je přitom proporcionální k počtu vzniklých štěpných produktů. Tento test se provádí následujícím způsobem: Po inkubaci 50 μ l roztoku enzymu se 100 μ l 1% rozpuštěného škrobu v pufru Tris/maleát o hodnotě pH 6,5 (12,11 g Tris + 11,61 g kyseliny maleinové ad 1 l, hodnota pH nastavena 0,2 N NaOH) při teplotě 50 °C 15 minut, se redukované sacharidy oxidují 300 μ l roztokem DNS (8,8 g kyseliny dinitrosalicylové, 915 ml destilované vody, 250 g K-Na-tartrátu, 334 ml 4,5% NaOH, 6,3 g disiřičitanu sodného) při teplotě 100 °C 20 minut. Po ochlazení v ledové lázni se fotometricky při 540 nm detekuje absorpce proti hodnotě na slepo. Kalibrace testu probíhá řadou koncentrací maltózy. Aktivita se udává v μ mol redukujícího cukru (vztaženo na maltózu) na minutu a ml.

Protein podle příkladu má po tomto testu jednoznačně amylolytickou aktivitu. Následně slouží aktivita stanovitelná tímto způsobem jako parametr stability enzymu za různých podmínek.

Stabilita teploty enzymu byla měřena při 10-minutové inkubaci při hodnotě pH 10. Při pokojové teplotě, 30 °C, 40 °C a 50 °C je aktivita alespoň 85%. Při teplotě 40 °C má amyláza své maximum 90% zbytkové reaktivity. Při teplotě 60 °C má enzym 50% aktivitu. Při teplotách více než 60 °C ztrácí silně aktivitu, ale při teplotách 80 až 90 °C má vždy ještě 10% zbytkovou reaktivitu.

Amylolytický enzym z *Bacillus sp. A 7-7* (DSM 12368) je při hodnotách pH 5 až 12 nadále stabilní, pokud se inkubuje 10 minut při teplotě 40 °C. Při hodnotách pH 8 až 9 je amyláza 100% stabilní, při hodnotách pH nad a pod aktivita pomalu klesá; enzym disponuje však při hodnotách pH 5 a 12 ještě více než 65% zbytkovou reaktivitou.

Pro další charakteristiku bylo zkoumáno poškození enzymatické aktivity možnými rušivými faktory jako je proteáza nebo detergenty; Po působení 10 HPE/ml proteázy Savinase® (Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Dánsko; jednotky HPE jsou stanovitelné podle metody uvedené v *Tenside* 7 (1970) str. 125-132) a 0,1% SDS při hodnotě pH 10 po dobu 15 minut a teplotě 50 °C prokazoval enzym 64% zbytkovou aktivitu. Po působení 0,1% SDS za stejných podmínek (pH 10, 15 minut, teplota 50 °C) má enzym 98% zbytkovou aktivitu. A rovněž za těchto podmínek (hodnota pH 10, 15 minut, teplota 50 °C) má enzym za přítomnosti 3 mM EDTA ještě 10% zbytkovou aktivitu a za přítomnosti 1 mM EDTA ještě 65% zbytkovou aktivitu.

Příklad 3

Všechny molekulárněbiologické pracovní kroky probíhají podle standardních metod, které jsou například uvedeny v příručkách, jako je Fritsch, Sambrook a Maniatis „Molecular cloning; laboratory manual“, *Cold Spring Harbour Laboratory Press*, New York, 1989.

Nejdříve byl pro stanovení interních aminokyselinových sekvencí protein získaný podle příkladu 1 a čištěný podle příkladu 2 vysrážen ethanolen a oddělen pomocí denaturující SDS-polyakrylgelelektroforézy. Po vykrojení odpovídajícího pásu z SDS-polyakrylamid-gelu byl trypticky stráven *in situ*, výsledné peptidy děleny pomocí HPLC a analyzovány pomocí Edman-Abbau a MALDI-TOF. Z velkého množství tryptických fragmentů získaných tímto způsobem byly zvoleny následující 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'

Podle jejich (uvedeny vlevo) aminokyselinových sekvencí byly konstruovány odpovídající degenerované PCR-primery. Jejich nukleotidové sekvence jsou uvedeny vpravo (N znamená libovolnou bázi; H znamená A nebo C nebo T; R znamená A nebo G; D znamená A, G nebo T).

Ze standardně preparované chromozomální DNA z *Bacillus sp.* A 7-7 (DSM 12368) jako matrice se mohl tímto primerním párem ve standardní PCR amplifikovat ca. 1.000bp velký fragment. Tento PCR-fragment byl klonován pro uložení do vektoru pGEM-Teasy® (Fa. Promega, Madison, Wisconsin, USA).

Příklad 4

Vyčištěný PCR-fragment byl podle návodu značen neradioaktivním DIG-High-Prime® značkvacím kitem firmy Boehringer Mannheim (Německo; č.výrobku 1745832) jako sonda DNA. Pro následnou hybridizaci byla chromozomální DNA kmene *Bacillus sp* A 7-7 (DSM 12368) štěpena restriktním enzymem Xba I a rozdělena 0,9% gelem agarózy. DNA se mohla pomocí vakuového odsávače přenést na kladně nabitou nylonovou membránu (Fa. Roche, mannheim). Hybridizace DNA a imunologická detekce PCR-fragmentu, použitého jako sonda, probíhala podle předpisu DIG-High-Prime® Labeling-and-Detection-Starter kits I® firmy Boehringer Mannheim. Ukázalo se, že se hledaný gen nachází ve viditelném ca 3.000 - 4.000 bp velkém úseku DNA. Fragmenty tohoto uspořádání podle velikosti byly vyčištěny 0,9% gelem agarózy a následně ligovány do vektoru pCB56C (z *B. Subtilis* DB104; popsano v přihlášce WO 91/02792) protnutého restriktčními enzymy Xba I a Nhe I. Po transformaci na kmen *Bacillus subtilis* negativní na amylázu mohly být klony pozitivní na amylázu identifikovány tvorbou dvorce na agarové destičce s obsahem škrobu. Reprezentativní izolát nesl žádaný inzert.

Příklad 5

Sekvencování získaného plazmidu probíhalo standardním způsobem podle metody přerušování řetězce. Plazmid obsahoval jeden inzert o velikosti 2,015 bp. Potom je gen, obsahující 1,545 bp, pro žádoucí enzym, který je uveden v sekvenčním protokolu předkládaného vynálezu pod SEQ ID No.1. Tomu odpovídá polypeptid o 516 aminokyselin, jehož sekvence je uvedena v SEQ ID No. 2 v sekvenčním protokolu. Molekulová hmotnost odvozená z této aminokyselinové sekvence činí 59 kD, popřípadě pro zralý protein 55,5 kD, získaný odštěpením signálního peptidu obsahujícího 31 aminokyselin.

Porovnání sekvencí podle metody BLAST (S.F.Altschul et al., *Nucl.Acids Res.*, 25 (1997), str. 3389-3402), provedené 17.3.2000, chrakterizují enzym jako α -amylázu. Homologie tohoto proteinu ke známým proteinům je, jak ukazuje následující tabulka 2, na proteinové rovině 71 až 95% identity.

Tabulka 2: Homologie enzymu podle vynálezu z *Bacillus sp.* A 7-7 (DSM 12368) k nejbližšímu podobnému a dalším reprezentativním proteinům; uvedeno v % identity na proteinové rovině. ID se označují zápisy u Swiss-Prot-Datenbank (Genf, Schweiz).

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

Alignment s reprezentativními proteiny je zobrazen na obrázku 1. U všech se jedná o α -amylázu, takže na základě dalších stanovení se musí vycházet z toho, že se také u enzymu podle vynálezu jedná o α -amylázu. To se kryje s původním získáním genu z mikroorganismu odbourávajícího škrob (příklad 1) a zjištění amylolytické aktivity transformantu s plazmidem obsahující inzert (příklad 4). Vlastnosti amylolytického proteinu získaného z tohoto produkčního kmene jsou shodné s vlastnostmi kmene divokého typu (příklad 2). Takový produkční kmen se může vyrobit podle příkladu 4.

Příklad 6

Bavlněné textilie byly standardizovaně opatřeny třemi různými nečistotami A (Mousse au chocolat), B (ovesné vločky s kakaem), C (ovesné vločky s kakaem a trochu mléka) a D (bramborový škrob) a na základě materiálu připraveného tímto způsobem zkoumány různé receptury pracích prostředků z hlediska jejich pracího účinku. Proto byl nastaven poměr lázně 1:12 a pralo se 30 minut při teplotě 30 °C. Dávkování bylo 5,88 g pracího prostředku na l prací lázně. Tvrdost vody činila 16° německé stupnice tvrdosti.

Jako kontrolní prací prostředek sloužila pro A, B a C receptura základního pracího prostředku následujícího složení (všechny údaje jsou v % hmotn.):

4 %	lineárního alkylbenzolsulfonátu (sodná sůl),
4 %	sulfátu C ₁₂ -C ₁₈ -mastného aloholu (sodná sůl),
5,5 %	C ₁₂ -C ₁₈ -mastného alkoholu s 7 EO,
1 %	sodného mýdla,
11 %	uhličitanu sodného,
2,5 %	amorfního disilikátu sodného,
20 %	tetrahydrátu peroxoborátu sodného,
5,5 %	TAED,
25 %	zeolitu A,
4,5 %	polykarboxylátu,
0,5 %	fosfonátu,
2,5 %	granulátu inhibitoru pěny,
5 %	síranu sodného,
1 %	granulátu proteázy

Zbytek: voda, optický zjasňovač, parfém, soli.

Byla pro různé řady pokusů smíchána s různými amylázami, takže vznikla konečná koncentrace 44 TAU amylolytické aktivity na l prací lázeň.

Pro stanovení amylolytické aktivity v TAU se používá modifikovaný p-nitro-fenylmaltoheptaosid, jehož konečná glukozová jednotka je blokována benzyldenovou skupinou; to se amylázou rozštěpí na volný p-nitrofenyl-oligosacharid, který se pomocnými enzymy glukoamylázou a alfa-glukozidázou převede na glukózu a p-nitrofenol. Tím je množství uvolňovaného p-nitrofenolu aktivity amylázy proporcionální. Měření probíhá například testovacím kitem Quick-Start® firmy Abbott, Abbott park, Illinois, USA. Přírůstek absorpce (405 nm) se v testované vsázce detekuje při teplotě 37 °C 3 min vzhledem k hodnotě na slepo pomocí fotometru. Kalibrace probíhá enzymovým standardem známé aktivity (například Maxamyl®/Purastar® 2900 firmy Genenco s 2900 TAU/g). Vyhodnocení probíhá vynesením absorpčního rozdílu dE (405 nm) za min vzhledem ke koncentraci enzymu standardu.

Amylolytickým enzymem podle vynálezu z *Bacillus sp.* A 7-7 (DSM 12368) byly srovnány Termamyl®, Duramyl® a BAN® (výrobce: Novo Nordisk A/S, Bagsvead, Dánsko). Pro znečištění D byla použita stejná základní receptura, ovšem bez proteázy, a A - C jako kontrola, popřípadě smíchaná s amylázami.

V předkádaném příkladu byl stupeň bělosti textilií měřen v systému CIELAB měřicím přístrojem Minolta CR 310 před a po praní ve srovnání se standardem, který byl nominován na 100 %. Rozdíly ze získaných hodnot jsou shromážděny pro jednotlivé pokusy v následující tabulce 3. Uvedené jsou střední hodnoty z 5. měření. Dovolují bezprostřední zhodnocení přínosu obsaženého enzymu na prací účinek použitého prostředku.

Tabulka 3

Základní prací prostředek s	A	B	C	D
amylázou podle 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
Standardní odchylka	1,3	0,6	1,4	2,2

Je vidět, že α -amyláza z *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368) na nečistotě B přináší výrazně lepší prací účinky než každý ze tří referenčních enzymů. U ostatních typech znečištění prokazuje v rámci meze chyb mírně zlepšené prací účinky, které stále výrazně leží nad srovnávacími hodnotami bez amylolytického enzymu. Tento výsledek přesvědčuje tím víc, že je ve všech zkoumaných recepturách pracích prostředků obsažen bělicí prostředek, na který enzym divokého typu obecně velmi citlivě reaguje.

Příklad 7

Bavlněné textilie byly standardizovaně znečištěny nečistotami B (ovesné vločky s kakaem) a C (ovesné vločky s kakaem a trochu mléka). Launderometrické vyšetření probíhalo stejným způsobem jako v příkladu 1, za použití jiné základní receptury pracího prostředku, v hmotnostních procentech:

- 14 % alkylbenzolsulfonátu sodného,
- 6 % sodného sulfonátu mastného alkoholu,

6 %	7-krát ethoxylovaného C ₁₂ -C ₁₈ -mastného alkoholu,
1%	mýdla,
25 %	zeolitu Na-A,
10 %	uhličitanu sodného,
5 %	polymerního polykarbonátu (Sokalan®CP5),
11%	dihydrátu citronanu trisodného,
4 %	kyseliny citronové,
1%	konfekcionovaného inhibitoru pěny ve formě částic,
1 %	granulátu proteázy,
5 %	síranu sodného,
Zbytek:	voda a soli.

Tato základní receptura se pro různé řady pokusů smíchala s různými amylázami, takže vznikla konečná koncentrace 33,5 TAU amylolytické aktivity na l prací lázeň; která se může stanovit podle metody uvedené v příkladu 1. S amylolytickým enzymem z *Bacillus sp.* A 7-7 (DSM 12368) podle vynálezu byly porovnány Termamyl®, Duramyl® a BAN® (výrobce: Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Dánsko). Dávkování bylo 4,45 g pracího prostředku na l prací lázeň.

Po praní byl stanoven stupeň bělosti vypraných textilií, jako v předchozím příkladu. Získané rozdílné hodnoty jsou shromážděny v tabulce 4. Jedná se o střední hodnoty z 5. měření, které opět dovolují bezprostřední zhodnocení přínosu enzymu na prací účinek prostředku.

Tabulka 4

Základní prací prostředek s	B	C
amylázou podle 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
Standardní odchylka	0,6	1,2

Je vidět, že α -amyláza z *Bacillus sp.* A 7-7 (DSM 12368) v této receptuře pracího prostředku bez bělidla přináší lepší prací účinky na nečistoty B a C než každý z referenčních enzymů.

Příklad 8

Bavlněné textilie byly standardizovaně znečištěny dvěma různými typy komerčně dostupnými druhů mléčného kakaa (E a F). Potom probíhalo launderometrické vyšetření stejně jako v příkladu 1. Jako kontrolní prací prostředek sloužila základní receptura pracího prostředku z příkladu 2, avšak bez proteázy. Smíchala se pro různé řady pokusů, jako v příkladu 2, s různými amylázami a použily ve stejném dávkování.

Po praní byl měřen stupeň bělosti vypraných textilií ve srovnání se síranem barnatým, který byl normován na 100 %. Měření na spektrometru Datacolor SF500-2 při 460 nm (UV-clonový filtr 3), 30 mm clona, bez lesku, Druh světla D65, 10°, d/8°. Získané výsledky se shromáždily jako % remise, to znamená jako procentové údaje ve srovnání se síranem barnatým, v následující

tabulce. Je tam také uvedena počáteční hodnota. Uvedeny jsou střední hodnoty z 5 měření. Umožňují bezprostřední zhodnocení přínosu získaného amylolytického enzymu na práci účinek použitého prostředku.

Tabulka 5

Základní prací prostředek s	E	F
amylázou podle 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
Počáteční hodnota	21,1	25,0
Standardní odchylka	1,0	1,2

Je vidět, že α -amyláza z *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368) v této receptuře v případě E přináší významně lepší prací účinek než všechny testované referenční enzymy a v případě F srovnatelný účinek.

Příklad 9

Pro aplikované čisticí pokusy byly nádoby s tvrdým, hladkým povrchem standardizovaně opatřeny následujícími nečistotami: A (DIN-ovesné vločky), B (vodu nabobtnalé ovesné vločky) a C (škrobová směs) a při teplotě 45 °C umývány normálním programem domácí myčky nádobí typ Miele® G575. Na mytí bylo použito 20 g mycího prostředku; tvrdost vody činila 16° německé tvrdosti.

Jako mycí prostředek sloužila základní receptura (všechny údaje jsou hmotnostních procentech):

- 55 % polyfosfátu sodného (přepočteno na bezvodý),
- 4 % amorfního disilikátu sodného (přepočteno na bezvodý),
- 22 % uhličitanu sodného, 9 % peroxoborátu sodného,
- 2 % TAED,
- 2 % neionického tenzidu,
- 1,4 % granulátu proteázy,
- Zbytek: voda, barviva, parfém.

Tato základní receptura byla pro různé pokusy smíchána s různými amylázami, též Termamyl®, Duramyl®, BAN® (výrobce: Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Dánsko) nebo s amylolytickým enzymem z *Bacillus sp. A 7-7* (DSM 12368) podle vynálezu v účinných množstvích 150 TAU amylolytické aktivity na čisticí krok, jak je stanoveno podle metody uvedené v příkladu 1.

Po mytí byl vizuálně zaznamenán úbytek znečištění A po obarvení jódem pomocí jod-škrobové reakce na stupnici od 0 (= nezměněno, to znamená velmi silné znečištění) do 10 (= žádné znatelné znečištění). Úbytek znečištění B a C byl zjištěn gravimetricky v procentech. Přitom se použil rozdíl hmotnosti znečištěné a následně umyté nádoby a počáteční hmotnosti nádoby v relaci k rozdílu hmotnosti nemyté nádoby k počáteční hmotnosti. Na tyto relace lze pohlížet jako na procento úbytku.

Získané výsledky jsou shromážděny v následující tabulce 6. Uvedené jsou střední hodnoty z devíti měření pro A a B, popřípadě 18 měření pro C. Dovolují bezprostřední zhodnocení přínosu obsaženého enzymu na čisticí účinek použitého prostředku.

Tabulka 6

Základní receptura s	A	B	C
		Úbytek %	Úbytek %
amylázou podle vynálezu	6,2	91,2	95,8
Termamyl®	3,7	53,9	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

Tyto výsledky ukazují, že α -amyláza z *Bacillus sp* A 7-7 (DSM 12368) má vzhledem ke svému čisticímu účinku v prostředcích pro strojové mytí nádobí u všech třech znečištění při teplotě mytí 45 °C převahu nad všemi ostatními testovanými amylázami.

Příklad 10

Nádoby s tvrdými, hladkými povrchy byly opatřeny stejnými znečištěními jako v předcházejícím příkladu a umývány při teplotě 55 °C. Čisticí podmínky a receptura použitého prostředku odpovídaly rovněž těm z předcházejícího příkladu.

Po umytí byl úbytek znečištění A jako v příkladu A vizuálně zjišťován jodškrobovou reakcí a vyhodnocen na stupnici 0 až 10; a úbytek znečištění B a C byl rovněž jako v příkladu 4 zjišťován gravimetricky v procentech. Získané výsledky jsou shromážděny v následující tabulce. Uvedeny jsou zde střední hodnoty z 9. měření pro A, 10. pro B a 18. měření pro C. Dovolují

bezprostřední zhodnocení přínosu obsaženého enzymu na čisticí účinek použitého prostředku.

Tabulka 7

Základní receptura s	A	B	C
		Úbytek %	Úbytek %
amylázou podle 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

Tyto výsledky ukazují, že α -amyláza z *Bacillus sp.* A 7-7 (DSM 12368) vzhledem ke svému čisticího účinku v prostředcích pro strojové mytí má u všech třech znečištění při teplotě mytí 55 °C také převahu nad všemi ostatními testovanými amylázami.

Zastupuje:

28.03.03

ΦV4003-268

2988

Patentové nároky

1. Amylolytický protein s aminokyselinovou sekvencí, která je alespoň z 96 % identická s aminokyselinovou sekvencí uvedenou v SEQ ID NO.2.
2. Amylolytický protein s aminokyselinovou sekvencí, která je alespoň z 98 % identická s aminokyselinovou sekvencí uvedenou v SEQ ID NO.2.
3. Amylolytický protein s aminokyselinovou sekvencí, která je alespoň z 96 % identická s aminokyselinovou sekvencí uvedenou v SEQ ID NO. 2 v polohách 32 až 516.
4. Amylolytický protein s aminokyselinovou sekvencí, která je alespoň z 98 % identická s aminokyselinovou sekvencí uvedenou v SEQ ID NO. 2 v polohách 32 až 516.
5. Amylolytický protein, který se odvodí od nukleotidové sekvence, která je alespoň z 85 % identická s nukleotidovou sekvencí uvedenou v SEQ ID NO.1, zvláště v části, která odpovídá aminokyselinám 32 až 516 podle SEQ ID NO.2.
6. Amylolytický protein, který se odvodí od nukleotidové sekvence, která je alespoň z 90 % identická s nukleotidovou sekvencí uvedenou v SEQ ID NO.1, zvláště v části, která odpovídá aminokyselinám 32 až 516 podle SEQ ID NO.2.

7. Amylolytický protein, který je identický s aminokyselinovou sekvencí uvedenou v SEQ ID NO.2 celkově a/nebo v polohách 32 až 516 a/nebo který je identický s aminokyselinovou sekvencí odvozenou od nukleotidové sekvence uvedené v SEQ ID NO.1 celkově a/nebo v polohách 32 až 516.
8. Amylolytický proteinový fragment nebo amylolytický protein, získaný deleční mutací, podle některého z nároků 1 až 7.
9. Amylolytický protein, získaný inzertní mutací, nebo amylolytický chimerní protein, který alespoň v jedné části, propůjčující amylolytickou aktivitu, sestává z proteinu, který je identický s proteinem nebo s fragmentem podle některého z nároků 1 až 8.
10. Amylolytický aktivní derivát proteinu podle některého z nároků 1 až 9.
11. Amylolytický protein nebo derivát, který má alespoň jeden antigenní determinant společný s některým z proteinů nebo derivátů uvedených v nárocích 1 až 10.
12. Amylolytický protein nebo derivát podle některého z nároku 1 až 11, který se přirozeným způsobem získá z mikroorganismu.
13. Amylolytický protein nebo derivát podle nároku 12, přičemž mikroorganizmem je grampozitivní bakterii.
14. Amylolytický protein nebo derivát podle nároku 13, přičemž grampozitivní bakterie je rodu *Bacillus*.

15. Amylolytický protein nebo derivát podle nároku 14, přičemž rodem *Bacillus* je *Bacillus* sp. A 7-7, zvláště *Bacillus* sp. A 7-7 (DSM 12368).
16. Nukleová kyselina kódující amylolytický protein, jejíž nukleotidová sekvence je alespoň z 85 % identická s nukleotidovou sekvencí uvedenou v SEQ ID NO.1, zvláště v části, která odpovídá aminokyselinám 32 až 516 podle SEQ ID NO.2.
17. Nukleová kyselina kódující amylolytický protein, jejíž nukleotidová sekvence je alespoň z 90 % identická s nukleotidovou sekvencí uvedenou v SEQ ID NO.1, zvláště v části, která odpovídá aminokyselinám 32 až 516 podle SEQ ID NO.2.
18. Nukleová kyselina kódující amylolytický protein, která je ze 100 % identická s nukleotidovou sekvencí uvedenou v SEQ ID NO.1, zvláště v části, která odpovídá aminokyselinám 32 až 516 podle SEQ ID NO.2.
19. Nukleová kyselina, která kóduje některý z proteinů nebo derivátů, uvedených v nárocích 1 až 15.
20. Přirozený organizmus, který tvoří některý z proteinů nebo derivátů uvedených v nárocích 1 až 15 nebo obsahuje nukleové kyseliny, které je kódují.
21. Přirozený organizmus podle nároku 20, který je mikroorganizmem, výhodně bakterií.

22. Přirozený organizmus podle nároku 21, přičemž bakterií je gram-pozitivní bakterie.
23. Přirozený organizmus podle nároku 22, přičemž grampozitivní bakterie je rodu *Bacillus*, zejména *Bacillus sp A 7-7*, zvláště *Bacillus sp. A 7-7* DSM (12368).
24. Vektor, který obsahuje část nukleové kyseliny uvedenou v nárocích 16 až 19 nebo část nukleové kyseliny, která kóduje některý z proteinů nebo derivátů uvedených v nárocích 1 až 15.
25. Klonovací vektor podle nároku 24.
26. Expresní vektor podle nároku 24.
27. Buňka, která obsahuje vektor podle některého z nároků 24 až 26.
28. Hostitelská buňka, která exprimuje jeden z proteinů nebo derivátů uvedených v nárocích 1 až 15, nebo může dát k jeho expresi podnět, výhodně za použití expresního vektoru podle nároku 26.
29. Hostitelská buňka podle nároku 28, která je bakterií, zvláště bakterií, která vyměšuje vytvořený protein nebo derivát do okolního prostředí.
30. Hostitelská buňka podle nároku 28 nebo 29, která je bakterií rodu *Bacillus*, zvláště druhu *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* nebo *Bacillus alcalophilus*.

31. Hostitelská buňka podle nároku 28 nebo 29, která je grampozitivní bakterií.
32. Hostitelská buňka podle nároku 31, která patří do rodu *Escherichia*, výhodně do rodu *Escherichia coli*, zvláště výhodně do některého z kmenů *E.coli* JM 109, *E.coli* DH 100B nebo *E.coli* DH 12S.
33. Hostitelská buňka podle nároku 28, která je eukaryontní buňkou, zvláště buňkou, která vytvořený protein posttranslačně modifikuje.
34. Způsob výroby proteinu nebo derivátu podle některého z nároků 1 až 15, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se použije nukleová kyselina podle některého z nároků 16 až 19 a/nebo se použije vektor podle některého z nároků 24 až 26 a/nebo se použije hostitelská buňka podle některého z nároků 28 až 33 nebo se použije buňka, která jej tvoří, zvláště buňka podle některého z nároků 20 až 23.
35. Prací nebo čisticí prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje protein nebo derivát podle některého z nároků 1 až 15.
36. Prací nebo čisticí prostředek podle nároku 35, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje 0,000001 % hmotn. až 5 % hmotn., zvláště 0,00001 % hmotn. až 3 % hmotn. amylolytického proteinu nebo derivátu.
37. Prací nebo čisticí prostředek podle některého z nároků 35 nebo 36, v y z n a č u j í c í s e t í m, že navíc obsahuje jeden nebo více jiných amylolytických proteinů, zvláště α -amylázy.

38. Prací nebo čisticí prostředek podle některého z nároků 35 až 37, v y z n a č u j í c í s e t í m, že navíc obsahuje jiné enzymy, zvláště jednu nebo více proteáz, lipáz, β -glukanáz a/nebo celuláz.
39. Prací nebo čisticí prostředek podle některého z nároků 35 až 38, v y z n a č u j í c í s e t í m, že sestává z více než jedné fáze.
40. Prací nebo čisticí prostředek podle některého z nároků 35 až 39, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je pevný a alespoň dva různé prášky nebo granuláty jsou společně smíchány v celkem volné formě.
41. Prací nebo čisticí prostředek podle nároku 39, v y z n a č u j í c í s e t í m, že alespoň dvě pevné fáze jsou navzájem spojené, zvláště po společném kompakčním kroku.
42. Pevný prací nebo čisticí prostředek podle některého z nároků 39 až 41, v y z n a č u j í c í s e t í m, že alespoň jedna z fází obsahuje materiál senzitivní na amylázu, zvláště škrob, nebo je jím alespoň částečně obklopena nebo povrchově upravena.
43. Prací nebo čisticí prostředek podle některého z nároků 35 až 42, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je tekutý, gelovitý nebo pastozní a obsažený protein a/nebo alespoň jeden z obsažených enzymů a/nebo alespoň jedna z ostatních obsažených složek je samostatně nebo společně s jinými složkami ve formě kapslí, výhodně v mikrokapslích, zvláště výhodně v kapslích z materiálu senzitivního na amylázu

44. Prací nebo čisticí prostředek podle některého z nároků 35 až 43, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se amylolytická aktivita modifikuje jednou z ostatních složek prostředku, zvláště stabilizuje, a/nebo přispívá ke zvýšení pracího popřípadě čisticího účinku prostředku.
45. Způsob čištění textilií nebo tvrdých povrchů, v y z n a č u j í c í s e t í m, že alespoň v některém z kroků způsobu je amylolytický protein nebo derivát podle nároků 1 až 15 aktivní.
46. Způsob čištění textilií nebo tvrdých povrchů, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se alespoň v některém z kroků způsobu použije prostředek podle některého z nároků 35 až 44.
47. Způsob podle nároku 45 nebo 46, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se amylolytický protein nebo derivát v příslušném kroku způsobu použije v množství 0,01 mg až 200 mg na použití, výhodně 0,02 mg až 100 mg na použití.
48. Použití amylolytického proteinu nebo derivátu podle některého z nároků 1 až 15 samotného nebo společně s alespoň jednou jinou účinnou látkou s čisticím účinkem nebo podporující čisticí účinek pro čištění textilií nebo tvrdých povrchů.
49. Použití pracího nebo čisticího prostředku podle některého z nároků 35 až 44 pro čištění textilií nebo tvrdých povrchů.
50. Použití podle nároku 48 nebo 49, přičemž se na použití, výhodně na použití v myčce nádobí nebo v pračce prádla, použije 0,01 mg až

200 mg amylolytického proteinu nebo derivátu, výhodně 0,02 mg až 100 mg amylolytického proteinu nebo derivátu.

51. Použití amylolytického proteinu nebo derivátu podle některého z nároků 1 až 15 samotného nebo společně s alespoň jednou jinou účinnou látkou s čisticím účinkem nebo podporující čisticí účinek v pracím nebo čisticím prostředku, sestávajícím z více než jedné fáze, pro aktivaci vlastní nebo jiné fáze.
52. Použití amylolytického proteinu nebo derivátu podle některého z nároků 1 až 15 samotného nebo společně s alespoň jednou jinou účinnou látkou s čisticím účinkem nebo podporující čisticí účinek v pracím nebo čisticím prostředku se složkami ve formě kapslí pro uvolňování těchto složek z kapslí.
53. Použití proteinu nebo derivátu podle některého z nároků 1 až 15 pro úpravu surovin nebo meziproductů při výrobě textilií, zvláště pro odšlichtování bavlny.
54. Způsob ztekucování škrobu, zvláště při výrobě ethanolu, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se přitom použije protein nebo derivát podle některého z nároků 1 až 15.
55. Použití proteinu nebo derivátu podle některého z nároků 1 až 15 pro výrobu lineárních oligosacharidů a/nebo oligosacharidů s krátkým řetězcem.
56. Použití proteinu nebo derivátu podle některého z nároků 1 až 15 pro hydrolýzu cyklodextrinů.

57. Použití proteinu nebo derivátu podle některého z nároků 1 až 15 pro uvolňování nízkomolekulárních sloučenin z polysacharidových nosičů nebo cyklodextrinů.
58. Použití proteinu nebo derivátu podle některého z nároků 1 až 15 pro výrobu potravin a/nebo potravinových složek.
59. Použití proteinu nebo derivátů podle některého z nároků 1 až 15 pro výrobu krmiva pro zvířata a/nebo krmivových složek pro zvířata.
60. Použití proteinu nebo derivátu podle některého z nároků 1 až 15 pro rozpouštění lepidel s obsahem škrobu.
61. Dočasný způsob lepení, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se přitom použije protein nebo derivát podle některého z nároků 1 až 15.

Zastupuje:

25.03.03

PV 2003-267

21988

70

1 1 (1) --MRKRKNGLISILLAFLLVLTSPFTSANVEAHHNGTNGTMMQYFEWYLPNDGNHWNRLRSDASNLKDK
2 1 (1) MKMRTGKKGFLSILLAFLLVLTSPFTLVDVEAHHNGTNGTMMQYFEWYLPNDGNHWNRLNSDASNLKSK
3 1 (1) -----HHNGTNGTMMQYFEWYLPNDGNHWNRLRDDAANLKSK
4 1 (1) -----HHNGTNGTMMQYFEWHLPLNDGNHWNRLRDDASNLNR

71 140
1 1 (69) GITAVWIPPAWKASQNDVGAYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTRNQLQAAVTALKSNGIQVYGDVVMNH
2 1 (71) GITAVWIPPAWKASQNDVGAYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTRSQLQAAVTSLNNGIQVYGDVVMNH
3 1 (38) GITAVWIPPAWKGTSONDVGAYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTRNQLQAAVTSLNNGIQVYGDVVMNH
4 1 (38) GITAIWIPPAWKGTSONDVGAYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTRSQLESAIHALKNNGVQVYGDVVMNH

210
141
1 1 (139) KGGADATEWVRAVEVNPNSNRNQEVSGDYTIEAWTKFDFPGRGNTHSNFKWRWYHFDGVDWDQSRQLQNR
2 1 (141) KGGADATEMVRAVEVNPNNRNQEVSGDYTIEAWTRFDFPGRGNTHSSFKWRWYHFDGVDWDQSRRLNNR
3 1 (108) KGGADGTEIVNAVEVNRNQRNQETSGEYAIIEAWTKFDFPGRGNTHSSFKWRWYHFDGTDWDQSRQLQNKI
4 1 (108) KGGADATENVLAVEVNPNSNRNQEISGDYTIEAWTKFDFPGRGNTYSDFKWRWYHFDGVDWDQSRQFQNR

280
211
1 1 (209) YKFRGDGKGWDWEVDTEGNNDYLYMYADIDMDHPEVVNELRNWGVWYTNLTGLDGFGRIGAVKHIKYSFTR
2 1 (211) YKFRGHGKAWDWEVDTEGNNDYLYMYADIDMDHPEVVNELRNWGVWYTNLTGLDGFGRIDAVKHIKYSFTR
3 1 (178) YKFRGTGKAWDWEVDTEGNNDYLYMYADVDMDHPEVIHELNRNWWGVWYTNLTGLDGFGRIDAVKHIKYSFTR
4 1 (178) YKFRGDGKAWDWEVDSENGNDYLYMYADVDMDHPEVVNELRRWGEWYTNLTGLDGFGRIDAVKHIKYSFTR

25.03.03

PV 2003-267 21988

281	350	
1 (279)	DWLTHVRNTTGKNMFAVAEEFWKNDIGAIENYLSKTNWNHVSFVDFPLHYNLYNASRSGGNYDMRQIFNGTV	
2 (281)	DWINHVRSATGKNMFAVAEEFWKNDIGAIENYLQKTNWNHVSFVDFPLHYNLYNASKSGGNYDMRNIFNGTV	
3 (248)	DWLTHVRNTTGKPMFAVAEEFWKNDIGAIENYLNKTSWNHSAFVDFPLHYNLYNASNSGGYDMRNILNGSV	
4 (248)	DWLTHVRNATGKEMFAVAEEFWKNDIGALENYLNKTNWNHVSFVDFPLHYNLYNASNSGGNYDMAKLLNGTV	
351	420	
1 (349)	VQRHPHVAFTFVDNHDSQPEEALESFVEEWFKPLACALTLTRDQGYPSVFYGDYYGIPTHGVPAMKSKID	
2 (351)	VQRHPHVAFTFVDNHDSQPEEALESFVEEWFKPLAYALTLTRDQGYPSVFYGDYYGIPTHGVPAMRSKID	
3 (318)	VQKHPHVAFTFVDNHDSQPEEALESFVQQWFKPLAYALVLTTRIQQGYPSVFYGDYYGIPTHGVPAMKSKID	
4 (318)	VQKHPHVAFTFVDNHDSQPGESLESFVQEWFKPLAYALILTREQQGYPSVFYGDYYGIPTHSVPMKAKID	
421	490	
1 (419)	PILEARQKYAYGKQNDYLDHNNMIGWTREGNTAHPNSGLATIMSDGPGGNKWMYVGRNKAGQVWRDITGN	
2 (421)	PILEARQKYAYGKQNDYLDHNNIIGWTREGNTAHPNSGLATIMSDGAGGSKWMFVGRNKAGQVWSDITGN	
3 (388)	PLLQARQTFAYGTQHDYFDHDDIIGWTREGNSHPNSGLATIMSDGPGGNKWMYVGRNKAGQVWRDITGN	
4 (388)	PILEARQNFAYGTQHDYFDHNNIIGWTREGNTTHPNSGLATIMSDGPGGEKWMYVQGNKAGQVWHHDITGN	
491	518	
1 (489)	RSGTVTINADGWGNFSVNGGSVSIWVNN	
2 (491)	RTGTVTINADGWGNFSVNGGSVSIWVVK	
3 (458)	RTGTVTINADGWGNFSVNGGSVSVWKQ	
4 (458)	KPGTVTINADGWANFSVNGGSVSIWVKR	

28.03.03

1

FV2003-267

21988

SEKVENČNÍ PROTOKOL

<110> HENKEL akciová a komanditní společnost

<120> Nový amylolytický enzym z Bacillis sp A 7-7 (DSM 12368)
a prací a čisticí prostředek s tímto novým amylolytickým enzymem

<130> H 4713 / H 4846

<140>

<141>

<150> DE10036752

<151> 2000-07-28

<150> DE10036753

<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

<222> (1)..(1551)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (94)

<400> 1

atg	aga	aaa	cgt	aaa	aat	gga	tta	atc	agt	att	cta	ttg	gca	ttt	ttg	40
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	ggt	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	

25.03.03

2

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 tcg 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 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