



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0026653

(51)⁷ C11D 3/386

(13) B

(21) 1-2016-03604

(22) 19/03/2015

(86) PCT/EP2015/055805 19/03/2015

(87) WO2015/144561 A1 01/10/2015

(30) 14161796.9 26/03/2014 EP

(45) 25/12/2020 393

(43) 27/02/2017 347A

(73) UNILEVER N.V. (NL)

Weena 455, 3013 AL Rotterdam, The Netherlands

(72) MOLE, Vincent Charles (GB); Gleb Urevich PRIIMOV (GB); Dawn RIGBY (GB);
Alastair Richard SANDERSON (GB).

(74) Công ty TNHH Trần Hữu Nam và Đồng sự (TRAN H.N & ASS.)

(54) CHẾ PHẨM TẨY RỬA DẠNG LÔNG VÀ QUY TRÌNH GIẶT VẢI

(57) Sáng chế đề xuất chế phẩm tẩy rửa dạng lông lưu trữ ổn định chứa:

a) ít nhất 5% trọng lượng nước,

b) ít nhất 3% trọng lượng hệ chất hoạt động bề mặt chứa từ 10 đến 100% trọng lượng của hệ chất hoạt động bề mặt là chất hoạt động bề mặt anion,

c) alpha-amylaza có ít nhất 95% trình tự tương đồng với SEQ ID NO:1 và alpha-amylaza này chứa các phần tử thế G46A + T47I + G105A + I199F khi sử dụng trong SEQ ID NO:1 để đánh số.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế này liên quan đến các chế phẩm tẩy rửa dạng lỏng chứa hệ chất hoạt động bề mặt, chất càn hóa và alpha-amylaza. Cụ thể hơn là, nó liên quan đến chế phẩm tẩy rửa dạng lỏng chứa ít nhất 5% nước, ít nhất 3% trọng lượng hệ chất hoạt động bề mặt chứa từ 10 đến 100% trọng lượng chất hoạt động bề mặt anion, 0,25% trọng lượng của chất càn hóa, trong đó chất càn hóa là HEDP hoặc chất càn hóa khác có khả năng càn hóa bằng hoặc cao hơn so với HEDP dưới điều kiện đồng nhất và một alpha-amylaza có ít nhất 95% trình tự tương đồng với SEQ ID NO: 1 và alpha-amylaza này chứa các phân tử thể G46A + T47I + G105A + 1199F khi sử dụng trong SEQ ID SỐ: 1 để đánh số.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Chế phẩm tẩy rửa dạng lỏng chứa nước chứa hoạt động bề mặt anion như alkylbenzen sulphonat (LAS) và alpha-amylaza đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, US-A-4 537 706 (Severson) bộc lộ một số chế phẩm tẩy rửa dạng lỏng chứa ít nhất 5% trọng lượng của hệ chất hoạt động bề mặt, chứa chất hoạt động bề mặt alkylbenzen sulphonat mạch thẳng (LAS), natri lauryltoxysulfat (SLES), không ion, axit béo và alpha-amylaza.

Alpha-amylaza (alpha-1,4-glucan-4-glucanohydrolaza, EC 3. 2. 1. 1) là một nhóm các enzym mà xúc tác cho quá trình thủy phân tinh bột và oligo- 1,4-glucosidic mạch thẳng và mạch nhánh khác và polysacarit. Trong số các amylaza-alpha vi khuẩn đầu tiên được sử dụng là alpha-amylaza từ *B. licheniformis*, còn được gọi là Termamyl™, đã được đặc trưng rộng rãi và cấu trúc tinh thể đã được xác định đối với enzym này. Termamyl™ và nhiều amylaza hiệu quả cao khác cần có canxi đối với hoạt động. Đối với Termamyl™ nó đã được tìm thấy bốn nguyên

tử canxi được liên kết trong cấu trúc alpha-amylaza được kết hợp bởi các gốc axit amin mang điện tích âm. Trong các alpha-amylaza khác, lượng ion canxi được liên kết trong cấu trúc có thể khác nhau. Yêu cầu này đối với canxi có nhược điểm trong các ứng dụng nếu các hợp chất càng hóa mạnh có mặt, như trong các chất tẩy rửa, trong khi chất càng hóa thường không được thêm vào trong các ứng dụng khác như sự hóa lỏng của tinh bột và sản xuất nhiên liệu sinh học.

Vấn đề chính gặp phải với alpha-amylaza chứa chế phẩm tẩy rửa dạng lỏng tức là sự ổn định lưu trữ của các enzym trong chế phẩm tẩy rửa thường không được mong muốn. Nó đặc biệt khó khăn để ổn định amylaza trong sự có mặt của proteaza, mà có thể dễ dàng phân hủy amylaza trong chất lỏng hoặc chế phẩm tẩy rửa dạng gel. Một vấn đề nữa liên quan đến chất tẩy rửa dạng lỏng này chứa chế phẩm chất tẩy rửa dạng lỏng như chất hoạt động bề mặt anion, đặc biệt là alkylbenzen sulphonat (LAS), có xu hướng làm bất hoạt enzym, ví dụ như enzym alpha-amylaza.

Vì lý do này, US-A-4 537 706 (Severson) sử dụng một hệ thống ổn định enzym chứa hỗn hợp axit boric hoặc borat kim loại kiềm với ion canxi, và tốt nhất là polyol. Hệ thống enzym ổn định này bao gồm hỗn hợp của axit boric hoặc borat kim loại kiềm với ion canxi, và tốt hơn là polyol có nhược điểm mà các thành phần này cho mỗi lần dùng không đóng góp đối với các hoạt động làm sạch. Hơn nữa, các yêu cầu đối với canxi có nhược điểm trong các ứng dụng nếu các hợp chất càng hóa mạnh có mặt, như trong chất tẩy rửa và chế phẩm làm sạch. Việc bổ sung canxi vào một chất tẩy rửa dạng lỏng có thể còn là vấn đề hiện nay với chế phẩm, tức là sự ổn định vật lý của chất tẩy rửa. Boron ít được ưu tiên vì lý do môi trường.

Gần đây hơn, alpha-amylaza đã được phát triển ổn định hơn trong sự có mặt của các chất càng hóa. Ví dụ WO-A-2011/100410 (Procter & Gamble) bộc lộ chế phẩm làm sạch chứa các biến thể của SP722 alpha-amylaza có thể đạt được từ bất kỳ của NCIB chủng Bacillus 12289, NCIB 12512, 12513 NCIB và DSM 9375.

Một số các alpha-amylaza biến thể hiện sự ổn định lưu trữ tốt ở độ pH bằng 8,2 trong sự có mặt của chất hoạt động bề mặt anion và chất càn hóa.

Hơn nữa, WO-A-2011/082429 (Novozymes) bộc lộ một lượng lớn các biến thể alpha-amylaza với giảm sự nhạy canxi chứa một miền A của alpha-amylaza nhạy cảm canxi, một miền B của alpha-amylaza không nhạy cảm canxi và miền C của alpha-amylaza nhạy cảm canxi. Các biến thể này được cho là hữu ích đối với các ứng dụng cụ thể là trong quy trình chế biến tinh bột (ví dụ, sự hóa lỏng); quá trình nghiền ướt; sản phẩm rượu từ các nguồn carbohydrat; chất tẩy rửa; chế phẩm rửa chén; sự rũ hồ tinh bột trong các ngành công nghiệp dệt may; các ứng dụng làm bánh; các ngành công nghiệp nước giải khát; các mỏ dầu trong quá trình khoan; quá trình tái chế, ví dụ, giấy tẩy mực, và thức ăn gia súc.

Vì các điều kiện là hoàn toàn khác nhau trong các ứng dụng khác nhau của alpha-amylaza, nên các alpha-amylaza khác nhau được phát triển cho từng ứng dụng cụ thể. Do đó, chất tẩy rửa alpha-amylaza được tối ưu hóa với độ pH kiềm (lớn hơn 8) và các ứng dụng ở nhiệt độ tương đối thấp (từ 15 đến 60°C), trong khi alpha-amylaza sử dụng trong việc sản xuất nhiên liệu sinh học hoặc sự hóa lỏng của tinh bột được tối ưu hóa với độ pH axit (nhỏ hơn 6) và ở nhiệt độ trên 80°C. Do đó, amylaza sẽ không được mong đợi được thiết kế để sử dụng trong hóa lỏng hoặc sản xuất nhiên liệu sinh học, sẽ phù hợp để sử dụng trong các chất tẩy rửa.

Vẫn cần phải cung cấp thêm hoặc chế phẩm tẩy rửa dạng lỏng cần được cải thiện bao gồm các chất hoạt động bề mặt anion mà cả hai hiệu suất lưu trữ ổn định và cho thấy hiệu quả làm sạch tốt, mà không cần các hệ thống ổn định enzym, ngay cả khi chế phẩm chứa các chất càn hóa. Chất càn hóa được kết hợp trong chế phẩm tẩy rửa để làm giảm độ cứng của nước trong quá trình giặt, chúng bảo vệ các chất tẩy trắng có thể cũng có mặt, và chúng còn có thể có tác động trực tiếp vào việc loại bỏ các vết bẩn cụ thể.

Hơn nữa, alpha-amylaza đã được tìm thấy đôi khi gây ra vấn đề mùi hôi trong chế phẩm tẩy rửa dạng lỏng chứa chúng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó mục đích của sáng chế là đề xuất chế phẩm tẩy rửa dạng lỏng chứa alpha-amylaza và chất hoạt động bề mặt anion, các chế phẩm đã được cải thiện sự ổn định lưu trữ và/hoặc hiệu suất rửa sau khi bảo quản, so với chế phẩm chứa alpha-amylaza có liên quan chặt chẽ.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất chế phẩm tẩy rửa dạng lỏng chứa alpha-amylaza có thể được sử dụng trong chế phẩm làm sạch chứa chất càn hóa.

Cuối cùng, mục đích khác của sáng chế là đề xuất chế phẩm tẩy rửa dạng lỏng chứa alpha-amylaza mà tránh được các vấn đề mùi hôi mà đôi khi quan sát thấy. Các tác giả sáng chế ngạc nhiên khi thấy rằng một hoặc nhiều mục đích này có thể được thực hiện bằng các chế phẩm tẩy rửa dạng lỏng theo sáng chế chứa a) ít nhất 5% trọng lượng nước, b) ít nhất 3% trọng lượng hệ thống chất hoạt động bề mặt chứa từ 10 đến 100% trọng lượng của hệ chất hoạt động bề mặt là chất bề mặt anion, c) alpha-amylaza có ít nhất 95% trình tự tương đồng với SEQ ID NO: 1 và alpha-amylaza này chứa các phân tử thể G46A + T47I + G105A + I199F khi sử dụng trong SEQ ID NO: 1 để đánh số; trong đó chất tẩy rửa bao gồm thêm một chất càn hóa; và trong đó chất càn hóa là HEDP hoặc một chất càn hóa khác có khả năng càn hóa bằng hoặc cao hơn so với HEDP dưới điều kiện đồng nhất, trong đó HEDP hoặc một chất càn hóa khác có mặt với nồng độ ít nhất 0,25% trọng lượng. Ngạc nhiên khi thấy rằng các chế phẩm tẩy rửa dạng lỏng theo sáng chế có thể khắc phục được vấn đề mùi hôi nhất định.

Theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế, chế phẩm tẩy rửa dạng lỏng được đề xuất chứa:

- a) ít nhất 5% trọng lượng nước,

b) ít nhất 3% trọng lượng hệ chất hoạt động bề mặt hỗn hợp chứa từ 10 đến 100% trọng lượng của hệ chất hoạt động bề mặt là chất hoạt động bề mặt anion,

c) alpha-amylaza có ít nhất 95% trình tự tương đồng với SEQ ID NO: 1 và alpha-amylaza này chứa các phần tử thế G46A + T47I + G105A + I199F khi sử dụng trong SEQ ID NO:1 để đánh số; trong đó chất tẩy rửa bao gồm thêm một chất càngh hóa; và trong đó chất càngh hóa là HEDP hoặc một chất càngh hóa khác có khả năng càngh hóa bằng hoặc cao hơn so với HEDP dưới điều kiện đồng nhất, trong đó HEDP hoặc một chất càngh hóa khác có mặt với nồng độ ít nhất 0,25% trọng lượng.

Theo khía cạnh thứ hai của sáng chế, đã đề xuất một quá trình giặt vải, bao gồm việc giặt vải chứa chế phẩm tẩy rửa dạng lỏng nêu trên, tốt hơn là ở nhiệt độ 40°C hoặc thấp hơn.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình 1 thể hiện đặc tính độ pH của alpha-amylaza có SEQ NO1: với các phần tử thế G46A + T47I + G105A + I199F khi sử dụng SEQ ID NO: 1 cho đánh số.

Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa

Alpha-amylaza: (alpha-1,4-glucan-4-glucanohydrolases, EC 3. 2. 1. 1) là một nhóm các enzym, mà xúc tác quá trình thủy phân tinh bột và oligo-1,4 glucosidic mạch thẳng hoặc mạch nhánh và các polysacarit. Như được sử dụng trong bản mô tả sáng chế này, "alpha-amylaza" có nghĩa là các enzym có hoạt động alpha-amylaza.

Alpha-amylaza của SEQ ID NO: 1:

VNGTLMQYFE	WYTPNDGQHW	KRLQNDAEHL	SDIGITAVWI
PPAYKGTSQA	DVGYGAYDLY	DLGEFHQKGT	VRTKYGTKGE
LQSAIKSLHS	RDINVYGDVV	INHKGGADAT	EDVTAVEVDP
ADRN RVISGE	HLIKAWTHFH	FPGRGSTYSD	FKWYWYHFDG
TDWDESRKLN	RIYKFQGKTW	DWEVSNEFGN	YDYLMYADID
YDHPDVVAEI	KRWGTWYANE	LQLDGFRLDA	VKHIKFSFLR
DWVNVHVREKT	GKEMFTVAEY	WSNDLGALEN	YLNKTNFNHS
VFDVPLHYQF	HAASTQGGGY	DMRKLLNGTV	VSKHPLKSVT
FVDNHDTQPG	QSLESTVQTW	FKPLAYAFIL	TRESGYPQVF
YGD MYGTKGD	SQREIPALKH	KIEPILKARK	QYAYGAQH DY
FDHHDIVGWT	REGDSSVANS	GLAALITDGP	GGAKRMYVGR
QNAGETWHDI	TGNRSEPVVI	NSEGWGEFHV	NGGSVSIYVQ

R

Amylaza này của SEQ ID NO 1 là nhân tạo và có thể được sản xuất bằng phương pháp đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Alpha-amylaza của SEQ ID NO: 2:

VNGTLMQYFE	WYTPNDGQHW	KRLQNDAEHL	SDIGITAVWI
PPAYKAISQA	DVGYGAYDLY	DLGEFHQKGT	VRTKYGTKGE
LQSAIKSLHS	RDINVYGDVV	INHKAGADAT	EDVTAVEVDP
ADRN RVISGE	HLIKAWTHFH	FPGRGSTYSD	FKWYWYHFDG
TDWDESRKLN	RIYKFQGKTW	DWEVSNEFGN	YDYLMYADFD
YDHPDVVAEI	KRWGTWYANE	LQLDGFRLDA	VKHIKFSFLR
DWVNVHVREKT	GKEMFTVAEY	WSNDLGALEN	YLNKTNFNHS
VFDVPLHYQF	HAASTQGGGY	DMRKLLNGTV	VSKHPLKSVT
FVDNHDTQPG	QSLESTVQTW	FKPLAYAFIL	TRESGYPQVF
YGD MYGTKGD	SQREIPALKH	KIEPILKARK	QYAYGAQH DY
FDHHDIVGWT	REGDSSVANS	GLAALITDGP	GGAKRMYVGR

QNAGETWHDI TGNRSEPVVI NSEGWGEFHV NGGSVSIYVQ
R

Đây là amylaza của SEQ ID NO: 1 nhưng có các phân tử thể G46A + T47I + G105A + I199F.

Biến thể alen: Thuật ngữ "biến thể alen" có nghĩa là hai hoặc nhiều của bất kỳ dạng thể của gen chiếm locus trên nhiễm sắc thể giống nhau. Biến thể alen phát sinh một cách tự nhiên thông qua sự đột biến, và có thể dẫn đến đa hình trong quần thể. Đột biến gen có thể im lặng (không có sự thay đổi trong các polypeptit mã hóa) hoặc có thể mã hóa polypeptit có các trình tự axit amin thay đổi. Biến thể alen của polypeptit là một polypeptit được mã hóa bởi biến thể alen của gen.

ADN bổ trợ: Thuật ngữ "ADN bổ trợ" có nghĩa là một phân tử ADN có thể được điều chế bằng cách sao chép ngược từ một phân tử ARN thông tin ghép trưởng thành thu được từ một tế bào có nhân chuẩn hoặc tế bào nhân sơ. ADN bổ trợ thiếu trình tự intron có thể có mặt trong ADN của bộ gen tương ứng. Sản phẩm phiên mã chính ban đầu là tiền chất của ARN thông tin mà được xử lý thông qua các bước, bao gồm việc ghép, trước khi xuất hiện ARN thông tin được ghép trưởng thành.

Trình tự mã hóa: Thuật ngữ "trình tự mã hóa" có nghĩa là một polynucleotit, mà trực tiếp xác định trình tự axit amin của biến thể. Các ranh giới của trình tự mã hóa thường được xác định bởi một khung đọc mở, bắt đầu với một codon khởi đầu như ATG, GTG hoặc TTG và kết thúc với codon điểm dừng như TAA, TAG, hoặc TGA. Trình tự mã hóa có thể là ADN, ADN bổ trợ, ADN tổng hợp, hoặc sự kết hợp của chúng.

Trình tự kiểm soát: Thuật ngữ "trình tự kiểm soát" có nghĩa là trình tự axit nucleic cần thiết cho việc biểu hiện của một polynucleotit mã hóa một biến thể của sáng chế. Mỗi trình tự kiểm soát có thể là nguồn gốc (tức là, từ cùng một gen) và ngoại lai (tức là, từ một gen khác nhau) đến polynucleotit mã hóa các biến thể hoặc

nguồn gốc hoặc ngoại lai với nhau. Trình tự kiểm soát này bao gồm, nhưng không giới hạn, trình tự dẫn đầu, trình tự polyadenylat hóa, trình tự propeptit, trình tự khởi đầu, trình tự peptit tín hiệu, và đầu tận cùng phiên mã. Ở mức tối thiểu, các trình tự kiểm soát bao gồm một trình tự khởi đầu, và các tín hiệu dừng phiên mã và dịch mã. Các trình tự kiểm soát có thể được cung cấp với các bộ liên kết với mục đích đưa các vị trí hạn chế cụ thể tạo điều kiện thất của các trình tự kiểm soát với các vùng mã hóa của polynucleotit mã hóa biến thể.

Biểu hiện: Thuật ngữ "biểu hiện" bao gồm bất kỳ bước nào liên quan đến việc sản xuất của biến thể bao gồm, nhưng không giới hạn, sao chép, sửa đổi sau phiên mã, dịch mã, sửa đổi sau dịch mã, và bài tiết.

Vật truyền biểu hiện: Thuật ngữ "vật truyền biểu hiện" có nghĩa là phân tử ADN thẳng hoặc tròn bao gồm polynucleotit mã hóa biến thể và được liên kết một cách linh hoạt với trình tự kiểm soát cung cấp cho việc biểu hiện của nó.

Tế bào vật chủ: Thuật ngữ "tế bào vật chủ" có nghĩa là bất kỳ loại tế bào nào đó mà dễ bị biến đổi, chuyển nhiễm, dẫn truyền, hoặc tương tự với cấu trúc axit nucleic hoặc vật truyền biểu hiện chứa polynucleotit của sáng chế. Thuật ngữ "tế bào vật chủ" bao gồm bất kỳ thế hệ con cháu của tế bào gốc mà không giống với tế bào gốc do đột biến xảy ra trong quá trình sao chép.

Đặc tính được cải thiện: Thuật ngữ "đặc tính được cải thiện" có nghĩa là một đặc tính liên kết với một biến thể hoặc alpha-amylaza được cải thiện so với gốc hoặc gần giống với amylaza ở lĩnh vực kỹ thuật trước đó. Đặc tính được cải thiện này bao gồm, nhưng không giới hạn, hiệu quả xúc tác, tốc độ xúc tác, sự ổn định hóa học, hoạt động độ pH, sự ổn định độ pH, hoạt động cụ thể, sự ổn định trong điều kiện lưu trữ, hiệu suất rửa và hiệu suất rửa sau khi lưu trữ, nơi mà thời gian bảo quản có thể là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 hoặc nhiều tuần ở mức 30, 37, 40 hoặc 45°C.

Được phân lập: Thuật ngữ "được phân lập" có nghĩa là chất trong dạng hoặc môi trường mà không xảy ra trong tự nhiên. Ví dụ không giới hạn về chất được phân lập bao gồm: (1) chất bất kỳ không có trong tự nhiên, (2) chất bất kỳ bao gồm, nhưng không được giới hạn, bất kỳ enzym, biến thể, axit nucleic, protein, peptit hoặc đồng tác nhân, mà ít nhất được loại bỏ một phần từ một hoặc nhiều hoặc tất cả các thành phần tự nhiên mà nó được liên kết trong tự nhiên; (3) chất bất kỳ được biến đổi bởi bàn tay của người có liên quan với chất được tìm thấy trong tự nhiên; hoặc (4) chất bất kỳ được biến đổi bằng cách tăng lượng chất tương đối so với các thành phần khác có liên quan tự nhiên (ví dụ, nhiều bản sao của một gen mã hóa chất, sử dụng của trình tự khởi đầu mạnh hơn so với trình tự khởi đầu tự nhiên kết hợp với các gen mã hóa chất). Chất được phân lập có thể có mặt trong mẫu nước dùng lên men.

Đột biến: Thuật ngữ "đột biến" có nghĩa là một polynucleotit mã hóa một biến thể.

Cấu trúc axit nucleic: Thuật ngữ "cấu trúc axit nucleic" có nghĩa là một phân tử axit nucleic, hoặc sợi đơn hoặc sợi kép, được phân lập từ một gen có trong tự nhiên hoặc được sửa đổi để chứa các phân đoạn của axit nucleic theo cách mà nếu không tồn tại trong tự nhiên hoặc là tổng hợp, trong đó bao gồm một hoặc nhiều trình tự kiểm soát.

Gốc hoặc amylaza gốc: Thuật ngữ "gốc" hay "alpha-amylaza gốc" có nghĩa là một alpha-amylaza mà một sự thay đổi được thực hiện để tạo ra các biến thể enzym. Alpha-amylaza của SEQ ID NO: 1 có thể được coi là gốc trong khi ví dụ, alpha-amylaza của SEQ ID NO: 1 có chứa một hoặc nhiều phân tử thế G46A, T47I, G105A và I199F có thể được cho là biến thể của alpha-amylaza của SEQ ID NO: 1. Gốc cũng có thể là polypeptit có trong tự nhiên (kiểu hoang) hoặc biến thể hoặc mảnh của chúng hoặc một alpha-amylaza có ít nhất 80% trình tự tương đồng với alpha-amylaza của SEQ ID NO: 1, như ít nhất là 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93,

94, 95, 96, 97, 98 hoặc ít nhất là 99% trình tự tương đồng với alpha-amylaza của SEQ ID NO: 1.

Trình tự tương đồng: Các liên hệ giữa hai trình tự axit amin hoặc giữa hai trình tự nucleotide được mô tả bởi các tham số "trình tự tương đồng". Đối với mục đích của sáng chế, trình tự tương đồng giữa hai trình tự axit amin được xác định bằng cách sử dụng thuật toán Needleman-Wunsch (Needleman và Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443. 453) như được thực hiện trong chương trình Needle của gói EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al. , 2000, Trends Genet. 16: 276-277), tốt hơn là phiên bản 5. 0. 0 hoặc mới hơn. Các thông số được sử dụng là điểm phạt mở khoảng cách là 10, điểm phạt mở rộng khoảng cách là 0,5, và chất nền thế EBLOSUM62 (phiên bản EMBOSS của BLOSUM62). Sản lượng kim được gắn nhãn "tương đồng dài nhất" (thu được bằng cách sử dụng (tùy chọn -nobrief) được sử dụng làm phần trăm tương đồng và được tính như sau:

$$(\text{Các gốc tương đồng} \times 100) / (\text{Chiều dài hàng} - \text{Tổng số khoảng cách trong hàng})$$

Biến thể: Thuật ngữ "biến thể" có nghĩa là polypeptit có hoạt động alpha-amylaza bao gồm sự thay đổi, nghĩa là một sự thay thế, tức là, chèn, và/hoặc xóa, tại một hoặc nhiều (ví dụ, một số) vị trí. Phần tử thế có nghĩa là thay thế các axit amin chiếm một vị trí với axit amin khác; xóa có nghĩa là loại bỏ các axit amin chiếm vị trí; và chèn có nghĩa là thêm một axit amin liền kề ngay sau các axit amin chiếm vị trí. Các biến thể alpha-amylaza của sáng chế tốt hơn là có ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc ít nhất là 100% các hoạt động amylaza ban đầu sau hai tuần lưu trữ trong mẫu chất tẩy rửa dạng lỏng B ở 37°C.

Alpha-amylaza kiểu hoang: Thuật ngữ alpha-amylaza "kiểu hoang" có nghĩa là alpha-amylaza được biểu hiện bằng vi sinh vật tự nhiên, như một loại vi khuẩn, nấm men, hoặc nấm sợi được thấy trong tự nhiên.

Hiệu suất rửa: Thuật ngữ "hiệu suất rửa" được sử dụng làm enzym có khả năng loại bỏ vết bẩn có mặt trên đối tượng được làm sạch trong ví dụ, rửa hoặc làm sạch bề mặt cứng. Hiệu suất rửa có thể được định lượng bằng cách tính toán được gọi là giá trị giảm delta (ΔRem) như được mô tả trong định nghĩa ở đây.

Giá trị giảm delta (ΔRem): thuật ngữ "giảm delta" hoặc "giá trị giảm Delta" được định nghĩa ở đây là kết quả của phản xạ hoặc đo lường giảm ở 460 nm của chất thử nghiệm, ví dụ, mẫu vải CS-28 (Center For Testmaterials BV, P. O. Box 120, 3133 KT Vlaardingen, Hà Lan). Mẫu vải được đo bằng ít nhất mẫu vải khác, được rửa sạch dưới điều kiện giống nhau, làm nền. Giảm delta là giá trị giảm của chất thử nghiệm được rửa sạch với amylaza trừ giá trị giảm của chất thử nghiệm rửa sạch mà không có amylaza.

Hiệu suất rửa được cải thiện: Thuật ngữ "hiệu suất rửa được cải thiện" được định nghĩa ở đây như (biến thể) enzym (cũng là một sự pha trộn của các enzym, không nhất thiết chỉ biến thể mà còn mạch chính, và kết hợp với các chế phẩm làm sạch cụ thể, v. v) hiển thị một sự thay đổi hiệu suất rửa ví dụ, bằng cách loại bỏ vết bẩn được tăng lên.

Chế phẩm tẩy rửa

Các chế phẩm tẩy rửa của sáng chế là chất lỏng ở nhiệt độ môi trường (ví dụ 25°C). Chúng có thể là đẳng hướng hoặc có cấu trúc và độ nhớt của chúng có thể là khá thấp đến rất cao để chúng có thể giống gel. Chúng chứa ít nhất 5 % trọng lượng nước và là tốt hơn là ở thể nước, theo đó nước tạo thành phần chính của dung môi trong chế phẩm. Các chất hướng hydrat như propylen glycol và glyxerol/glyxerin có thể được bao gồm như đồng dung môi với lượng ít hơn so với nước. Nước là cần thiết trong chế phẩm để giữ chất hoạt động bề mặt, các polyme bất kỳ, các chất phụ gia hòa tan, các enzym, v. v. trong dung dịch. Lượng nước nêu

trên bao gồm cả bất kỳ nước tự do và nước được liên kết. Tốt hơn là, lượng nước trong chế phẩm ít nhất là 20% trọng lượng, tốt hơn nữa ít nhất là 30% trọng lượng.

Hệ chất hoạt động bề mặt

Chất tẩy rửa dạng lỏng theo các sáng chế chứa ít nhất 3% trọng lượng của hệ chất hoạt động bề mặt chứa 10 đến 100% trọng lượng của hệ chất hoạt động bề mặt của chất hoạt động bề mặt anion. Tốt hơn là, chất tẩy rửa dạng lỏng chứa ít nhất khoảng 3 đến 40% trọng lượng của hệ chất hoạt động bề mặt, như khoảng từ 5 đến 30%, bao gồm khoảng từ 5 đến 15%, hoặc khoảng từ 20 đến 25% hệ chất hoạt động bề mặt. Hệ chất hoạt động bề mặt có thể hoàn toàn bao gồm một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt anion, nhưng nó cũng có thể bao gồm chất hoạt động bề mặt khác như chất hoạt động bề mặt không ion và/hoặc chất hoạt động bề mặt cation. Các chất hoạt động bề mặt được chọn dựa trên các loại ứng dụng và bao gồm các chất hoạt động bề mặt thông thường bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các chất hoạt động bề mặt tạo thành hệ chất hoạt động bề mặt có thể được chọn từ các chất hoạt động bề mặt được mô tả trong ấn phẩm "Surface Active Agents" Vol. 1, của Schwartz & Perry, Interscience 1949, Vol. 2 Schwartz, Perry & Berch, Interscience 1958, "McCutcheon's Emulsifiers and Detergents", được xuất bản bởi Manufacturing Confectioners Company hoặc trong "Tenside-Taschenbunch", H. Stache, Vol. 2, Carl Hauser Verlag, 1981.

Ví dụ không giới hạn về chất hoạt động bề mặt anion gồm sunfat và sulfonat, cụ thể là, alkylbenzensulfonat mạch thẳng (LAS), chất đồng phân của LAS, alkylbenzensulfonat mạch nhánh (BABS), phenylalkansulfonat, alpha-olefinsulfonat (AOS), sulfonat olefin, sulfonat anken, ankan-2, 3-diylbis (sunfat), hydroxyalkansulfonat và disulfonat, alkyl sulfat (AS) như natri dodexyl sulfat (SDS), sunfat rượu béo (FAS), sunfat rượu bậc một (PAS), rượu etesulfat (AES

hoặc AEOS hoặc FES, cũng đã biết như rượu etoxysulfat hoặc rượu béo sunfat etc), alkansulfonat bậc hai (SAS), sulfonat parafin (PS), sulfonat este, sulfo este axit béo glyxerol, alpha-sulfo axit béo metyl este (alpha-SFMe hoặc SES) gồm metyl este sulfonat (MES), alkyl-hoặc axit alkenylsuccinic, dodexenyl/ tetradexenyl axit succinic (DTSA), dẫn xuất của axit béo của các axit amin, dieste và monoeste axit sulfo-succinic hoặc xà phòng, và hỗn hợp của chúng. Rượu etesulfat được ưu tiên là natri lauryl ete sulfat hoặc SLES.

Hệ chất hoạt động bề mặt được ưu tiên cao chứa hai chất hoạt động bề mặt anion khác nhau, tốt hơn là alkyl benzen sulphonat mạch thẳng và sulfat, ví dụ LAS và SLES.

Chất hoạt động bề mặt anion cũng có thể bao gồm xà phòng (muối của axit béo). Xà phòng được ưu tiên được tạo ra bằng cách trung hòa axit béo dừa được hydro hóa, ví dụ, Prifac (R) 5908 (của Croda). Hỗn hợp axit béo bão hòa và không bão hòa cũng có thể được dùng.

Tốt hơn là, hệ chất hoạt động bề mặt chứa 10 đến 100% trọng lượng, tốt hơn nữa là từ 25 đến 50% trọng lượng của hệ chất hoạt động bề mặt của alkylbenzen sulphonat mạch thẳng (LAS). Thậm chí tốt hơn nữa là, hệ chất hoạt động bề mặt chứa 5 đến 75% trọng lượng của hệ chất hoạt động bề mặt của alkylbenzen sulphonat mạch thẳng (LAS) và 5 đến 90% trọng lượng của hệ chất hoạt động bề mặt của natri lauryl ete sulfat (SLES).

Ngoài chất hoạt động bề mặt anion, các chế phẩm tẩy rửa sẽ thường chứa khoảng từ 0,2 đến 50% trọng lượng của hệ chất hoạt động bề mặt của chất hoạt động bề mặt không ion, ví dụ, khoảng từ 0,5 đến 30%, cụ thể là khoảng từ 1 đến 20%, khoảng từ 3 đến 10%, như khoảng từ 3 đến 5%, hoặc khoảng từ 8 đến 12% hệ chất hoạt động bề mặt. Chất hoạt động bề mặt không ion thích hợp bao gồm rượu etoxylat (AE hay AEO), rượu propoxylat, rượu béo được propoxylat hóa

(PFA), este alkyl axit béo được alkoxylation hóa, như este alkyl axit béo được etoxylation và/hoặc propoxylation hóa, alkylphenol etoxylation (APE), nonylphenol etoxylation (NPE), alkylpolyglycosit (APG), amin alkoxylation, monoetanolamit axit béo (FAM), dietanolamit axit béo (Fada), etoxy monoetanolamit axit béo (EFAM), monoetanolamit axit béo được propoxylation hóa (PFAM), amit axit béo alkyl polyhydroxy, hoặc các dẫn xuất N-alkyl N-axyl của glucosamin (glucamit, GA, hoặc glucamit axit béo, FAGA), cũng như các sản phẩm có bán trên thị trường với tên nhãn hiệu SPAN và TWEEN, và các hỗn hợp của chúng. Chất hoạt động bề mặt không ion được ưu tiên là rượu được etoxylation hóa có 12 đến 18 nguyên tử cacbon, có 3 đến 9 đơn vị etylen oxit cho mỗi phân tử. Được ưu tiên hơn nữa là rượu được etoxylation hóa mạch thẳng, bậc một có 12 đến 15 nguyên tử cacbon với trung bình 5 đến 9 nhóm etylen oxit, tốt hơn nữa là mức trung bình là 7 nhóm etylen oxit.

Chất tẩy rửa dạng lỏng đặc biệt được ưu tiên theo các sáng chế chứa 5 đến 75% trọng lượng của hệ chất hoạt động bề mặt của alkylbenzen sulphonat mạch thẳng (LAS), 5 đến 90% trọng lượng của hệ chất hoạt động bề mặt của natri lauryl ete sulfat (SLES) và từ 5 đến 60% trọng lượng của hệ chất hoạt động bề mặt của chất hoạt động bề mặt không ion.

Các chất hoạt động bề mặt thường có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 60% trọng lượng, như nằm trong khoảng từ 1 đến 40%, hoặc nằm trong khoảng từ 3 đến 20%, hoặc nằm trong khoảng từ 3 đến 10%. Các chất hoạt động bề mặt được chọn dựa trên các ứng dụng làm sạch mong muốn, và bao gồm chất hoạt động bề mặt thông thường bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Chất hoạt động bề mặt bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này sử dụng trong chất tẩy rửa có thể được dùng.

Nếu muốn, các chế phẩm tẩy rửa dạng lỏng theo sáng chế cũng có thể chứa khoảng từ 0 đến 10% trọng lượng của chất hoạt động bề mặt cation. Các ví dụ

không giới hạn về chất hoạt động bề mặt cation bao gồm quat alkyl dimetyletanolamin (ADMEAQ), xetyltrimetyl-amoni bromua (CTAB), dimetyldistearylamoni clorua (DSDMAC), và alkylbenzyl-dimetylamoni, hợp chất amoni bậc bốn alkyl, hợp chất amoni bậc bốn (AQA) được alkoxylat hóa, và các hỗn hợp của chúng.

Chế phẩm chất tẩy rửa dạng lỏng theo sáng chế cũng có thể chứa khoảng từ 0 đến 10% trọng lượng của chất hoạt động bề mặt bán cực. Các ví dụ không giới hạn về chất hoạt động bề mặt bán cực bao gồm oxit amin (AO) như alkyl dimethylamine oxit, oxit N- (alkyl dứa) -N, oxit N-dimetylamin và N- (mỡ-alkyl) -N, N-bis (2-hydroxyetyl) amin, alkanolamit axit béo và alkanolamit axit béo được etoxylat hóa, và các hỗn hợp của chúng.

Cuối cùng, chế phẩm chất tẩy rửa dạng lỏng theo sáng chế có thể chứa khoảng từ 0 đến 10% trọng lượng của chất hoạt động bề mặt ion lưỡng tính. Các ví dụ không giới hạn về chất hoạt động bề mặt ion lưỡng tính bao gồm betain, alkyl dimethylbetain, sulfobetain, và các hỗn hợp của chúng.

Alpha-amylaza

Các quy ước đối với việc chỉ định biến thể và số vị trí axit amin

Đối với mục đích của sáng chế, polypeptit trưởng thành được bộc lộ trong SEQ ID NO: 1 được sử dụng để xác định gốc axit amin tương ứng trong amylaza khác. Trình tự axit amin của alpha-amylaza khác được liên kết với polypeptit trưởng thành được bộc lộ trong SEQ ID NO: 1, và dựa vào sự liên kết, số vị trí axit amin tương ứng với bất kỳ gốc axit amin trong polypeptit trưởng thành được bộc lộ trong SEQ ID NO: 1 được xác định bằng cách sử dụng thuật toán Needleman-Wunsch (Needleman và Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443. 453) như được thực hiện trong chương trình Needle của gói EMBOSS (EMBOSS: The European

Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al. , 2000, Trends Genet. 16: 276-277), tốt hơn là phiên bản 5.0.0 hoặc mới hơn. Các thông số được sử dụng là: khoảng cách mở điểm phạt là 10, khoảng cách mở rộng điểm phạt là 0,5, và chất nền thay thế EBLOSUM62 (phiên bản EMBOSS của BLOSUM62). Xác định gốc axit amin tương ứng trong alpha-amylaza khác có thể được xác định bởi liên kết của nhiều trình tự polypeptit bằng cách sử dụng một số chương trình máy tính bao gồm, nhưng không giới hạn, MUSCLE (so sánh nhiều trình tự bằng kỳ vọng log; phiên bản 3. 5 hoặc mới hơn; Edgar, 2004, Nucleic Acids Research 32: 1792-1797), MAFFT (phiên bản 6,857 hoặc mới hơn; Katoh và Kuma, 2002, Nucleic Acids Research 30: 3059-3066; Katoh et al, 2005, Nucleic Acids Research 33: 511-518; Katoh và Toh, 2007, Bioinformatics 23: 372-374; Katoh et al, 2009, Methods in Molecular Biology 537: 39-64; Katoh và Toh, 2010, Bioinformatics 26: 1899-1900), và EMBOSS EMMA sử dụng ClustalW (phiên bản 1. 83 hoặc mới hơn; Thompson et al, 1994, Nucleic Acids Research 22: 4673-4680), sử dụng các thông số mặc định tương ứng của chúng.

Khi enzym khác đã lệch với polypeptit trưởng thành của SEQ ID NO: 1 sao cho so sánh trình tự dựa trên truyền thống không phát hiện mối quan hệ giữa chúng (Lindahl và Elofsson, 2000, J. Mol. Biol. 295: 613-615), thuật toán so sánh trình tự từng cặp khác có thể được sử dụng. Độ nhạy lớn hơn trong việc tìm kiếm dựa vào trình tự có thể đạt được bằng cách sử dụng chương trình tìm kiếm mà sử dụng sự biểu diễn xác suất của các họ polypeptit (hồ sơ) để tìm kiếm cơ sở dữ liệu. Ví dụ, chương trình PSI-BLAST tạo ra đặc tính thông qua quá trình tìm kiếm cơ sở dữ liệu lặp đi lặp lại và có khả năng phát hiện đồng đẳng từ xa (Atschul et al, 1997, Nucleic Acids Res 25: 3389-3402). Ngay cả độ nhạy cao có thể đạt được nếu họ hoặc siêu họ đối với polypeptit có một hoặc nhiều sự biểu diễn trong cơ sở dữ liệu cấu trúc protein. Các chương trình như GenTHREADER (Jones, 1999, J. Mol. Biol. 287: 797-815; McGuffin và Jones, 2003, Bioinformatics 19: 874-881) sử dụng

thông tin từ nhiều nguồn khác nhau (PSI-BLAST, dự đoán cấu trúc thứ cấp, đặc tính liên kết cấu trúc, và tiềm năng solvat hóa) là đầu vào cho mạng lưới thần kinh có thể dự đoán những lần cơ cấu cho một trình tự truy vấn. Tương tự như vậy, các phương pháp của Gough et al. , 2000, J. Mol. Biol. 313: 903-919, có thể được sử dụng để sắp xếp trình tự của cấu trúc không rõ với các mô hình siêu họ có mặt trong cơ sở dữ liệu SCOP. Sự sắp xếp có thể quay lại được sử dụng để tạo ra các mô hình tương đồng với polypeptit, và các mô hình như vậy có thể được đánh giá về độ chính xác bằng cách sử dụng các công cụ được phát triển cho mục đích đó.

Đối với các protein cấu trúc đã biết, một số công cụ và nguồn có sẵn để lấy và tạo ra sự sắp xếp cấu trúc. Ví dụ, siêu họ SCOP của protein đã được sắp theo cấu trúc, và sự sắp này, có thể truy cập và tải về. Hai hoặc nhiều cấu trúc protein có thể được sắp cho thẳng hàng sử dụng các thuật toán như chất nền sắp theo khoảng cách (Holm và Sander, 1998, Protein 33: 88-96) hoặc mở rộng kết hợp (Shindyalov và Bourne, 1998, Protein Engineering 11: 739-747), và thực hiện các thuật toán này có thể bổ sung được sử dụng để truy vấn cơ sở dữ liệu cấu trúc với một cấu trúc quan tâm để có thể tìm ra cấu trúc đồng đẳng (ví dụ, Holm và Park, 2000, Bioinformatics 16: 566-567). Khi mô tả các biến thể của sáng chế, danh pháp được mô tả dưới đây là phù hợp để dễ tham khảo. Việc chữ cái đơn IUPAC hoặc chữ viết tắt axit amin ba từ được chấp thuận sử dụng.

Phần tử thể. Đối với phần tử thể axit amin, danh pháp sau đây được sử dụng: axit amin gốc, vị trí, được thể axit amin. Theo đó, phần tử thể của threonin ở vị trí 226 với alanin được chỉ định là "Thr226Ala" hoặc "T226A". Nhiều đột biến được phân tách bằng dấu cộng ("+"), ví dụ, "Gly205Arg + Ser411Phe" hoặc "G205R + S411F", thể hiện lần lượt các phần tử thể tại các vị trí 205 và 411 của glyxin (G) với arginin (R) và serin (S) với phenylalanin (F).

Mất đoạn. Đối với sự mất đoạn axit amin, danh pháp sau đây được sử dụng: axit amin gốc, vị trí, *. Theo đó, việc mất đoạn glyxin ở vị trí 195 được chỉ định là "Gly195 *" hoặc "G195 *". Nhiều mất đoạn được phân tách bằng dấu cộng ("+"), ví dụ, "Gly195 * + Ser411 *" hoặc "G195 * + S411 *".

Chèn. Đối với chèn axit amin, danh pháp sau đây được sử dụng: axit amin gốc, vị trí, axit amin gốc, chèn axit amin. Theo đó, việc chèn của lyzin sau glyxin ở vị trí 195 được chỉ định "Gly195GlyLys" hoặc "G195GK". Chèn nhiều axit amin được chỉ định [axit amin gốc, vị trí, axit amin gốc, axit amin được chèn # 1, axit amin được chèn # 2; v. v]. Ví dụ, việc chèn lyzin và alanin sau glyxin ở vị trí 195 được chỉ định là "Gly195GlyLysAla" hoặc "G195GKA".

Trong trường hợp này, gốc axit amin được chèn được đánh số bằng cách thêm chữ thường với số vị trí của gốc axit amin trước khi gốc axit amin được chèn vào. Trong ví dụ trên, trình tự có thể là:

Gốc:	biến thể:
195	195 195a 195b
G	G - K - A

Sự thay đổi nhiều. Các biến thể bao gồm nhiều thay đổi được phân tách bằng dấu cộng ("+"), ví dụ, "Arg170Tyr + Gly195Glu" hoặc "R170Y + G195E" thể hiện lần lượt các phần tử thể arginin và glyxin ở vị trí 170 và 195 với tyrosin và axit glutamic.

Sự thay đổi khác nhau. Nếu thay đổi khác nhau có thể được đưa vào vị trí, sự thay đổi khác nhau được phân tách bằng dấu phẩy, ví dụ, "Arg170Tyr, Glu" thể hiện phần tử thể arginin ở vị trí 170 với tyrosin hoặc axit glutamic. Do đó, "Tyr167Gly, Ala + Arg170Gly, Ala" chỉ định các biến thể sau đây: "Tyr167Gly + Arg170Gly", "Tyr167Gly + Arg170Ala", "Tyr167Ala + Arg170Gly", và "Tyr167Ala + Arg170Ala".

Chế phẩm chất tẩy rửa dạng lỏng của sáng chế chứa alpha-amylaza có ít nhất một alpha-amylaza có ít nhất 95% trình tự tương đồng với SEQ ID NO: 1 và alpha-amylaza này chứa các phần tử thể G46A + T47I + G105A + I199F khi sử dụng trong SEQ ID NO: 1 để đánh số.

Hơn nữa, alpha-amylaza cũng có thể chứa sự thay đổi. Ví dụ, amylaza có thể còn chứa từ 1 đến 20 sự thay đổi, ví dụ, 1 đến 10 hoặc 1 đến 5, như 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 sự thay đổi hơn, nếu sự thay đổi là các phần tử thể độc lập, mất và/hoặc chèn và thay đổi là tương đối so với các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1.

Các thay đổi hoặc biến đổi axit amin có thể có tính chất nhỏ, đó là các phần tử thể axit amin bảo thủ hoặc sự chèn đoạn mà không ảnh hưởng đáng kể đến việc gấp và/hoặc hoạt động của protein; sự mất đoạn nhỏ, thường là từ 1 đến 30 axit amin; sự kéo dài đầu tận cùng- cacboxy hoặc amino- nhỏ, như gốc methiionin đầu tận amino; chất liên kết nhỏ lên đến 20 đến 25 gốc peptit; hoặc sự kéo dài nhỏ tạo điều kiện cho sự thanh lọc bằng cách thay đổi điện tích hoặc chức năng khác, như đường poly-histidin, epitope kháng nguyên hoặc một miền liên kết. Các ví dụ về sự thay thế bảo thủ nằm trong các nhóm của các axit amin cơ bản (arginin, lysin và histidin), axit amino axidic (axit glutamic và axit aspartic), axit amin có cực (glutamin và asparagin), axit amin kỵ nước (leuxin, isoleuxin và valin), axit amin thom (phenylalanin, tryptophan và tyrosin), và các axit amin nhỏ (glyxin, alanin, serin, threonin và methionin). Phần tử thể axit amin thường không làm thay đổi hoạt động cụ thể đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và được mô tả, ví dụ, bởi H. Neurath và RL Hill, 1979, in "The protein", Academic Press, New York. Thay thế thường gặp là Ala/Ser, Val/Ile, ASP/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, ASP/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, và ASP/Gly. Ngoài ra, các thay đổi axit amin có tính chất như vậy mà tính chất lý

hóa của các polypeptit bị thay đổi. Ví dụ, các thay đổi axit amin có thể cải thiện sự ổn định nhiệt của polypeptit, làm thay đổi đặc hiệu chất này, thay đổi độ pH tối ưu, và tương tự.

Axit amin thiết yếu trong polypeptit có thể được xác định theo quy trình đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, như sự đột biến vị trí trực tiếp hoặc sự gây đột biến quét alanin (Cunningham và Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085). Theo kỹ thuật sau, đột biến alanin đơn được đưa vào ở mỗi gốc trong phân tử, và các phân tử đột biến thu được được kiểm tra đối với hoạt động alpha-amylaza với xác định gốc axit amin quan trọng đối với hoạt động của các phân tử. Xem thêm, Hilton et al. , 1996, *J. Biol. Chem.* 271: 4699-4708. Các vị trí hoạt tính của enzym hoặc sự tương tác sinh học khác cũng có thể được xác định bằng cách phân tích vật lý của cấu trúc, được xác định bằng các kỹ thuật này như cộng hưởng từ hạt nhân, tinh thể học, nhiễu xạ electron, hoặc dán nhãn ái lực ảnh, kết hợp với đột biến của axit amin vị trí tiếp xúc giả. Xem, ví dụ, de Vos et al, 1992, *Science* 255: 306-312; Smith et al. , 1992, *J. Mol. Biol.* 224: 899-904; Wlodaver et al. , 1992, *FEBS Lett.* 309: 59-64. Sự tương đồng của các axit amin thiết yếu cũng có thể được suy ra từ sự sắp thành hàng với polypeptit có liên quan.

Theo phương án khác, amylaza của chế phẩm tẩy rửa dạng lỏng của sáng chế có ít nhất là 96%, hoặc ít nhất là 97%, hoặc ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99% nhưng nhỏ hơn 100% trình tự tương đồng với amylaza SEQ ID NO: 1 và chứa các phân tử thế G46A + T47I + G105A + I199F.

Dưới đây, chế phẩm tẩy rửa dạng lỏng đã cải thiện sự ổn định và/hoặc hoạt động sau khi bảo quản và/hoặc hiệu suất rửa được cải thiện trên vết bẩn chứa tinh bột sau khi lưu trữ của các chất tẩy rửa lỏng được đề xuất. Thời gian lưu trữ có thể ít nhất là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, hoặc ít nhất là 26 tuần hoặc thời gian thậm chí lâu hơn. Nhiệt độ trong lưu trữ có thể là nhiệt độ có liên quan bất kỳ, như từ 20 đến 40°C, như 20, 22, 25, 30,

35, 37 hoặc 40°C. Các nhà sáng chế đã phát hiện ra rằng hiệu suất lưu trữ ví dụ sau 1 tuần ở 40°C hoặc sau 2 tuần ở 37°C, chất tẩy rửa dạng lỏng của sáng chế hiệu suất rửa được cải thiện so với chất tẩy rửa dạng lỏng tương tự chứa alpha-amylaza của SEQ ID NO: 1, cụ thể là trên các vết bẩn chứa hồ tinh bột (Xem ví dụ dưới đây). Một lý do đối với sự cải thiện này trong hiệu suất rửa có thể là amylaza có phần tử thể được đề cập ở trên trong SEQ ID NO: 1 đã được cải thiện sự ổn định trong chất tẩy rửa dạng lỏng so với amylaza SEQ ID NO: 1. Do đó, theo một phương án, sáng chế liên quan đến chế phẩm tẩy rửa dạng lỏng chứa amylaza như được định nghĩa ở trên, trong đó alpha-amylaza có một sự ổn định lưu trữ được cải thiện trong các chất tẩy rửa dạng lỏng tương đối so với alpha-amylaza của SEQ ID NO: 1.

Sự ổn định lưu trữ được cải thiện có thể được xác định là hoạt động dư lượng sau một thời gian lưu trữ từ 1 đến 8 tuần, như từ 2 đến 6 tuần, tốt hơn là 2, 3, 4, 5 hoặc 6 tuần (xem các ví dụ). Theo phương án khác, sáng chế liên quan đến chế phẩm tẩy rửa dạng lỏng chứa amylaza như được mô tả ở trên mà chế phẩm tẩy rửa dạng lỏng đã được cải thiện hiệu suất rửa sau khi bảo quản chất tẩy rửa dạng lỏng trong hai tuần ở 37°C, so với chế phẩm tẩy rửa dạng lỏng chứa alpha-amylaza SEQ ID NO: 1.

Chế phẩm tẩy rửa dạng lỏng của sáng chế bao gồm thêm một chất càn hóa, trong đó chất càn hóa là HEDP hoặc một chất càn hóa khác có khả năng càn hóa bằng hoặc cao hơn so với HEDP dưới điều kiện đồng nhất, trong đó HEDP hoặc một chất càn hóa khác có mặt với nồng độ ít nhất 0,25% trọng lượng. Như đã được đề cập ở trên, chất càn hóa có thể được bổ sung vào chế phẩm tẩy rửa. Các chất này hoạt động để giảm nồng độ của các ion canxi tự do trong chế phẩm. Tuy nhiên, hầu hết các alpha-amylaza cần canxi cho hoạt động. Các nhà sáng chế đã phát hiện ra rằng alpha-amylaza theo điểm 1, điều ngạc nhiên là sự ổn định trong chất tẩy rửa dạng lỏng chứa các chất càn hóa và mà ổn định ngay cả trong

chất tẩy rửa dạng lỏng chứa với lượng cao hoặc rất cao của các chất càn hóa. Các khả năng của chất càn hóa đối với việc giảm lượng ion canxi tự do có thể được mô tả theo ví dụ 5 (xem bảng 12. 1).

Theo một phương án, các chất tẩy rửa dạng lỏng theo sáng chế chứa chất càn hóa với lượng ít nhất 0,25% trọng lượng, như ít nhất là 0,3%, hoặc ít nhất là 0,4, như ít nhất là 0,5, 0,6, 0,7, 0. 8, 0,9, 1,0% trọng lượng hoặc thậm chí ít nhất 1,5% trọng lượng. Chất càn hóa có khả năng làm giảm lượng ion canxi tự do bằng hoặc tốt hơn so với khả năng làm giảm lượng ion canxi tự do của chất càn hóa HEDP với lượng 0,25% trọng lượng. Khả năng này của việc làm giảm canxi tự do có thể được đo trong chất tẩy rửa dạng lỏng của chất tẩy rửa mẫu 2 ở 21°C hoặc 37°C. Do đó, các chất càn hóa nên được thêm vào với lượng sao cho khả năng làm giảm lượng ion canxi tự do là ít nhất bằng khả năng của HEDP nêu trên với lượng 0,25% trọng lượng. Tức là, nếu sử dụng chất càn hóa với khả năng làm giảm lượng ion canxi tự do mà khả năng thấp hơn so với của HEDP với lượng tương đương trong chất tẩy rửa dạng lỏng hoặc trong chất đậm như được mô tả dưới đây, sau đó chất càn hóa nên được thêm vào với lượng cao hơn để đạt được khả năng làm giảm lượng ion canxi tự do mà là ít nhất bằng khả năng của HEDP nêu trên với lượng 0,25% trọng lượng. Các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng làm giảm lượng ion canxi tự do đã biết bởi các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Chúng bao gồm ái lực liên kết với canxi và lượng của chất càn hóa. Theo phương án khác, chất càn hóa được thêm vào với lượng tương ứng với thêm ít nhất 0,3%, hoặc ít nhất là 0,4, như ít nhất là 0,5, hoặc 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 hoặc 1,0% trọng lượng của HEDP hoặc thậm chí ít nhất là 1,5%, 1,7%, 1,8%, 1,9%, hoặc ít nhất là 2,0% trọng lượng của HEDP vào chất tẩy rửa dạng lỏng. Do đó, các chất càn hóa nên được thêm vào với lượng sao cho khả năng làm giảm nồng độ ion canxi tự do trong chất tẩy rửa dạng lỏng là ít nhất bằng với khả năng nêu trên của HEDP với lượng ít nhất là 0,3%, hoặc ít nhất là 0,4, như ít nhất là 0,5, hoặc 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 hoặc

1,0% trọng lượng của HEDP hoặc thậm chí ít nhất là 1,5%, 1,7%, 1,8%, 1,9%, hoặc ít nhất là 2,0% trọng lượng.

Theo phương án khác, khả năng làm giảm nồng độ ion canxi tự do được so sánh bằng cách đo khả năng nêu trên trong 80 mM kali clorua và 49 mM Epps ở 21°C và độ pH bằng 8,0. Khả năng của chất càng hóa làm giảm lượng ion canxi tự do được mô tả dưới đây dưới "chất càng hóa đặc trưng". Theo phương án, chất càng hóa là HEDP. Theo các phương án khác chất tẩy rửa dạng lỏng của sáng chế chứa ít nhất 0,25% trọng lượng HEDP, như ít nhất là 0,3%, hoặc ít nhất là 0,4, như ít nhất là 0,5, hoặc 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 hoặc 1,0% trọng lượng hoặc thậm chí ít nhất là 1,2%, 1,3%, 1,4%, 1,5%, 1,6%, 1,7%, 1,8%, 1,9%, hoặc ít nhất là 2,0% trọng lượng.

Theo phương án khác, chất tẩy rửa dạng lỏng của sáng chế chứa một hoặc nhiều chất càng hóa với lượng sao cho khả năng chất càng hóa trong chất tẩy rửa nêu trên ít nhất tương ứng với khả năng càng hóa thu được khi thêm 0,25% trọng lượng HEDP vào.

Theo phương án khác, chất tẩy rửa dạng lỏng của sáng chế chứa một hoặc nhiều chất càng hóa với lượng sao cho trong khả năng càng hóa trong chất tẩy rửa nêu trên ít nhất tương ứng với khả năng càng hóa thu được khi thêm 0,3% trọng lượng HEDP. Theo phương án khác, chất tẩy rửa dạng lỏng của sáng chế chứa một hoặc nhiều chất càng hóa với lượng sao cho trong khả năng càng hóa chất tẩy rửa nêu trên ít nhất tương ứng với khả năng càng hóa thu được khi thêm 0,4% trọng lượng HEDP. Theo phương án khác, chất tẩy rửa dạng lỏng của sáng chế chứa một hoặc nhiều chất càng hóa với lượng sao cho trong khả năng càng hóa chất tẩy rửa nêu trên ít nhất tương ứng với khả năng càng hóa thu được khi thêm 0,5% trọng lượng HEDP. Theo phương án khác, chất tẩy rửa lỏng của sáng chế chứa một hoặc nhiều chất càng hóa với lượng sao cho trong khả năng càng hóa chất tẩy rửa nêu

trên ít nhất tương ứng với khả năng càn hóa thu được khi thêm 0,6% trọng lượng HEDP.

Theo phương án khác, chất tẩy rửa lỏng của sáng chế chứa một hoặc nhiều chất càn hóa với lượng sao cho trong khả năng càn hóa chất tẩy rửa nêu trên ít nhất tương ứng với khả năng càn hóa thu được khi thêm 0,7% trọng lượng HEDP. Theo phương án khác, chất tẩy rửa lỏng của sáng chế chứa một hoặc nhiều các chất càn hóa với lượng sao cho trong khả năng càn hóa chất tẩy rửa nêu trên ít nhất tương ứng với khả năng càn hóa thu được khi thêm 1,0% trọng lượng HEDP.

Theo phương án khác, chất tẩy rửa lỏng của sáng chế chứa một hoặc nhiều chất càn hóa với lượng sao cho trong khả năng càn hóa chất tẩy rửa nêu trên ít nhất tương ứng với khả năng càn hóa thu được khi thêm 1,5 % trọng lượng HEDP. Theo phương án khác, chất tẩy rửa lỏng của sáng chế chứa một hoặc nhiều các chất càn hóa với lượng sao cho trong khả năng càn hóa chất tẩy rửa nêu trên ít nhất tương ứng với khả năng càn hóa thu được khi thêm 2,0% trọng lượng HEDP.

Theo phương án khác, chất càn hóa là DTMPA với lượng ít nhất là 0. 25% trọng lượng hoặc ít nhất là 0,3%, hoặc ít nhất là 0,4, như ít nhất là 0,5, hoặc 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 hoặc 1,0% trọng lượng của HEDP hoặc thậm chí ít nhất là 1,5%, 1,7%, 1,8%, 1,9%, hoặc ít nhất là 2,0% trọng lượng. Trong các ví dụ có thể thấy rằng amylaza của các chất tẩy rửa lỏng của sáng chế (như amylaza của SEQ ID NO: 1 có đột biến G46A + T47I + G105A + I199F) đã cải thiện về sự ổn định và hiệu suất rửa được cải thiện trong chất tẩy rửa dạng lỏng chứa lượng cao của chất càn hóa (chất tẩy rửa mẫu 2) so với chất tẩy rửa dạng lỏng chứa amylaza của SEQ ID NO: 1. Vào thời gian lưu trữ lâu hơn và nhiệt độ cao hơn, sự khác biệt sẽ thấy rõ rệt hơn. Do đó, chế phẩm tẩy rửa dạng lỏng của sáng chế có ưu điểm mà ngay cả ở khả năng càn hóa cao (để giảm lượng ion canxi tự do) amylaza là ổn định và có hiệu suất rửa tốt và hiệu suất này tốt hơn so với Termamyl™ hoặc amylaza của SEQ ID NO 1.

Chế phẩm tẩy rửa dạng lỏng của sáng chế là chế phẩm tẩy rửa giặt. Độ pH của chế phẩm tẩy rửa dạng lỏng của sáng chế có thể ít nhất là 7,5, 8,0, 8,5 hoặc 9,0. Chế phẩm tẩy rửa dạng lỏng có thể còn chứa một hoặc nhiều chất phụ gia làm sạch như được mô tả dưới đây, tốt hơn là với lượng nằm trong khoảng từ 0,01 đến 99,9% trọng lượng. Theo phương án khác, chế phẩm tẩy rửa dạng lỏng của sáng chế bổ sung chứa một hoặc nhiều enzym khác như proteaza, lipaza, peroxidaza, enzym vi khuẩn khác, glucoamylaza, amylaza maltogenic, CGTase, mananaza, cutinaza, lacaza và/hoặc xenlulaza.

Amylaza có thể được thêm vào chế phẩm tẩy rửa dạng lỏng với lượng tương ứng với 0,001 đến 200 mg protein, ví dụ ,005 đến 100 mg protein, tốt hơn là 0,01 đến 50 mg protein, như 0,028 mg protein hoặc tốt hơn nữa là 0,05 đến 20 mg protein, thậm chí tốt hơn nữa là 0,1 là 10 mg protein cho mỗi lít dung dịch làm sạch.

Mặc dù điều này không thực sự cần thiết, amylaza của chế phẩm tẩy rửa của sáng chế có thể được ổn định bằng các chất ổn định thông thường, ví dụ, polyol, propylen glycol hoặc glyxerol, một loại đường hoặc đường, axit lactic, axit boric, hoặc dẫn xuất axit boric, ví dụ, este borat thơm, hoặc dẫn xuất axit boronic phenyl như axit boronic 4-formylphenyl, và chế phẩm có thể được điều chế như được mô tả, ví dụ, WO92/19709 và WO92/19708.

Các thành phần khác

Chất hướng hydrat

Chất hướng hydrat là hợp chất mà hợp chất kỵ nước hòa tan trong dung dịch chứa nước (hoặc chất trái dấu, các chất phân cực trong môi trường không phân cực). Thông thường, chất hướng hydrat có cả hai đặc tính ưa nước và kỵ nước (được gọi là đặc tính có cả ưa nước và kỵ nước như đã biết từ chất hoạt động bề

mặt); Tuy nhiên cấu trúc phân tử của chất hướng hydrat thường không hỗ trợ tự tập hợp tự phát, ví dụ xem xét bởi Hodgdon và Kaler (2007), *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 12: 121-128. Các chất hướng hydrat không hiển thị nồng độ quan trọng trên mà tự tập hợp xảy ra như tìm thấy cho chất hoạt động bề mặt và vi hạt tạo ra lipit, dạng tấm hoặc được xác định rõ pha-meso. Thay vào đó, nhiều chất hướng hydrat thể hiện quá trình tập hợp kiểu liên tục mà các kích thước của chất cốt liệu tăng khi nồng độ tăng lên. Tuy nhiên, nhiều chất hướng hydrat làm thay đổi đặc tính pha, sự ổn định, và đặc tính keo của hệ thống có chứa các chất có tính phân cực và không phân cực, kể cả hỗn hợp của nước, dầu, chất hoạt động bề mặt, và polyme. Các chất hướng hydrat được sử dụng lâu đời qua các ngành công nghiệp từ dược phẩm, chăm sóc cá nhân, thực phẩm, đến các ứng dụng kỹ thuật. Sử dụng các chất hướng hydrat trong chế phẩm tẩy rửa và làm sạch cho phép ví dụ chế phẩm cô đặc hơn của chất hoạt động bề mặt (như trong quá trình nén chất tẩy rửa dạng lỏng bằng cách loại bỏ nước) mà không gây hiện tượng không mong muốn như tách pha hoặc độ nhớt cao.

Chất tẩy rửa có thể chứa 0 đến 25% trọng lượng, như khoảng từ 0,5 đến 10%, hoặc khoảng từ 2 đến 5% trọng lượng của chất hướng hydrat. Bất kỳ chất hướng hydrat đã biết trong lĩnh vực kỹ này dùng trong chất tẩy rửa có thể được sử dụng. Các ví dụ không giới hạn về các chất hướng hydrat bao gồm natri benzen sulfonat, natri p-toluen sulfonat (STS), natri xylen sulfonat (SXS), natri cumen sulfonat (SCS), natri xylen sulfonat, oxit amin, rượu và polyglycolete, natri hydroxynaphthoat, natri hydroxynaphtalen sulfonat, natri sulfat etylhexyl, Monoetanolamin, Dietanolamin, trietanolamin và các hỗn hợp của chúng.

Chất phụ gia và đồng chất phụ gia

Chế phẩm tẩy rửa có thể chứa khoảng 0 đến 65% trọng lượng, chẳng hạn như khoảng từ 5 đến 45% trọng lượng của chất phụ gia hoặc đồng chất phụ gia tẩy rửa, hoặc hỗn hợp của chúng. Chất phụ gia và/hoặc đồng chất phụ gia có thể cụ thể là một chất càn hóa mà càn hóa tan trong nước với Canxi và Magiê. Tác nhân càn hóa hoặc chất càn hóa là những chất mà tạo ra các phân tử với các ion kim loại nhất định, làm bất hoạt các ion để chúng không thể phản ứng với các nguyên tố khác do đó chất liên kết nhằm ngăn hoạt động hoá học bằng cách càn hóa. Sự càn hóa là sự tạo ra hoặc sự có mặt của hai hoặc nhiều liên kết riêng giữa phối tử và nguyên tử trung tâm duy nhất. Phối tử có thể là bất kỳ hợp chất hữu cơ, silicat hoặc phosphat. Trong bối cảnh sáng chế thuật ngữ "chất càn hóa" gồm chất càn hóa, tác nhân càn hóa, các tác nhân càn hóa, chất càn hóa, hoặc các chất cô lập mà càn hóa hòa tan trong nước với các ion kim loại như canxi và magiê. Hiệu quả càn hóa mô tả ái lực được cải thiện của phối tử càn hóa cho ion kim loại so với ái lực của tập hợp các phối tử không càn hóa tương tự cho kim loại tương tự. Chất càn hóa có khả năng liên kết với các ion kim loại, cụ thể là ion canxi (Ca^{2+}), và đã được sử dụng phổ biến trong các chất tẩy rửa và chế phẩm nói chung để rửa, chẳng hạn như giặt hoặc rửa đĩa. Tuy nhiên chất càn hóa đã thể hiện bản thân chúng ức chế hoạt động enzyme. Thuật ngữ chất càn hóa được dùng trong các ứng dụng hiện nay thay thế cho nhau với "tác nhân càn hóa" hoặc "tác nhân càn hóa" hoặc "chất càn hóa".

Vì hầu hết amylaza alph là canxi nhạy cảm, sự có mặt của chất càn hóa có thể làm giảm hoạt động của enzym. Độ nhạy canxi của alpha-amylaza có thể được xác định bằng cách ủ alpha-amylaza đã được đưa ra trong sự có mặt của chất càn hóa mạnh và phân tích ảnh hưởng của việc ủ này vào hoạt động của amylaza theo vấn đề. Alpha-amylaza nhạy cảm canxi sẽ mất đi phần lớn hoặc tất cả các hoạt động của nó trong quá trình ủ.

Các chất càng hóa đặc trưng: Như đã được đề cập ảnh hưởng càng hóa hoặc các hiệu ứng càng hóa mô tả ái lực được cải thiện của các phối tử càng hóa cho ion kim loại so với ái lực của tập hợp của các phối tử không càng hóa tương tự cho các kim loại như nhau. Tuy nhiên, sức mạnh của hiệu ứng càng hóa này có thể được xác định bởi các thử nghiệm hoặc các phương pháp đo lường qua đó phân biệt hoặc xếp hạng các chất càng hóa theo hiệu ứng càng hóa của chúng (hoặc sức mạnh). Theo một thử nghiệm các chất càng hóa có thể được đặc trưng bởi khả năng của chúng làm giảm nồng độ của các ion canxi tự do (Ca^{2+}) từ 2,0 mM xuống 0,10 mM hoặc nhỏ hơn ở độ pH bằng 8,0, ví dụ bằng cách dùng thử nghiệm dựa trên các phương pháp được mô tả bởi MK Nagarajan et al. , JAOCS, Vol. 61, no. 9 (September 1984), pp. 1475-1478. Một ví dụ về đặc tính của chất càng hóa bằng cách sử dụng Nagarajan et al. phương pháp cơ bản được mô tả trong ví dụ 3a. Tốt hơn là, chất càng hóa theo các sáng chế bao gồm các chất càng hóa có khả năng làm giảm nồng độ của các ion canxi tự do từ 2,0 mM xuống 0,1 mM ở nồng độ cân bằng hoặc thấp hơn nồng độ của HEDP cần thiết để làm giảm nồng độ ion canxi tự do từ 2,0 mM đến 0,10 mM ở cùng điều kiện. Vì vậy, chất càng hóa của sáng chế có thể bằng hoặc hơn "canxi tự do", làm giảm khả năng như HEDP trong điều kiện tương tự hoặc giống hệt nhau.

Tốt hơn là, chất càng hóa theo sáng chế bao gồm các chất càng hóa có thể làm giảm nồng độ của các ion canxi tự do từ 2,0 mM đến 0,1 mM ở nồng độ dưới 10 mM, tốt hơn là dưới 9,5 mM, tốt hơn là dưới 9 mM, tốt hơn là dưới 8,5 mM, tốt hơn là dưới 8 mM, tốt hơn là dưới 7,5 mM, tốt hơn là dưới 7 mM, tốt hơn là dưới 6,5 mM, tốt hơn là dưới 6 mM, tốt hơn là dưới 5,5 mM, tốt hơn là dưới 5 mM, tốt hơn là dưới 4,5 mM, dưới 4 mM, tốt hơn là dưới 3,5 mM, tốt hơn là dưới 3 mM, tốt hơn là dưới 2,5 mM, tốt hơn là dưới 2 mM, tốt hơn là dưới 1,5 mM hoặc tốt hơn là dưới 1 mM, khi được đo trong 80 mM kali clorua và 49 mM Epps ((4-(2hydroxyetyl) axit piperazin-1-propansulfonic)), ở độ pH bằng 8 ở 21°C. Theo

phương án được đặc biệt ưu tiên là chất càn hóa có thể làm giảm nồng độ của các ion canxi tự do từ 2,0 mM đến 0,1 mM khi được đo trong 80 mM kali clorua và 49 mM Epps, ở độ pH bằng 8 và 21°C và sử dụng ion canxi phân cực chọn lọc để xác định nồng độ canxi tự do, như được mô tả trong mục "Chất và phương pháp". Vì vậy tốt hơn là, chất càn hóa bao gồm chất càn hóa mà có thể làm giảm nồng độ của các ion canxi tự do từ 2,0 mM đến 0,10 mM ở nồng độ dưới 10 mM, tốt hơn là dưới 9,5 mM, tốt hơn là dưới 9,0 mM, tốt hơn là dưới 8,5 mM, tốt hơn là dưới 8,0 mM, tốt hơn là dưới 7,5 mM, tốt hơn là dưới 7,0 mM, tốt hơn là dưới 6,5 mM, tốt hơn là dưới 6,0 mM, tốt hơn là dưới 5,5 mM, tốt hơn là dưới 5,0 mM, tốt hơn là dưới 4,5 mM, tốt hơn là dưới 4,0 mM, tốt hơn là dưới 3,5 mM, tốt hơn là dưới 3,0 mM, tốt hơn là dưới 2,5 mM, tốt hơn là dưới 2,0 mM, tốt hơn là dưới 1,5 mM hoặc tốt hơn là dưới 1,0 mM khi được thử nghiệm ở độ pH bằng 8,0 và 21°C, như mô tả trong mục "Chất và phương pháp".

Theo phương án được ưu tiên đặc biệt, chất càn hóa có thể làm giảm nồng độ của các ion canxi tự do từ 2,0 mM đến 0,10 mM khi được đo trong 80 mM kali clorua và 49 mM Epps ở độ pH bằng 8 và 21°C ở nồng độ 9 mM đến 0,5 mM, tốt hơn là 9 mM đến 1 mM, tốt hơn là 8 mM đến 1 mM, tốt hơn là 7 mM đến 1 mM, tốt hơn là 6 mM đến 1 mM, tốt hơn là 5 mM đến 1 mM, tốt hơn là 4 mM đến 1 mM, tốt hơn là 3 mM đến 1 mM, tốt hơn là 2 mM đến 1 mM, tốt hơn là 9,0 mM đến 1,5 mM, tốt hơn là 8,0 mM đến 1,5 mM, tốt hơn là 7,0 mM đến 1,5 mM, tốt hơn là 6,0 mM 1,5 mM, tốt hơn là 5,0 mM đến 1,5 mM, tốt hơn là 4,0 mM đến 1,5 mM, tốt hơn là 3,0 mM đến 1,5 mM, tốt hơn là 2,5 mM đến 1,0 mM, tốt hơn là 2,0 mM đến 1,1 mM, tốt hơn là 1,85 mM đến 1,0 mM.

Việc giảm nồng độ ion canxi tự do từ 2,0 mM Ca^{2+} đến 0,10 mM, tương ứng với việc giảm độ cứng của nước từ 200 ppm (CaCO_3 , trong các hình thức của Ca (HCO_3)₂ trong sự hiện diện của CO_2 có tính axit) đến 10 ppm. Mức chất phụ

gia tối thiểu được tính từ muối natri của chất càn hóa và trên cơ sở chất càn hóa khô 100%.

Các hiệu ứng càn hóa của chất càn hóa cũng có thể được đo tương đối với xitrat. Nồng độ của xitrat có thể làm giảm nồng độ ion canxi tự do từ 2,0 mM đến 0,10 mM được gán giá trị là 1 và chất càn hóa thu được được so sánh với giá trị này. Chất càn hóa được ưu tiên theo sáng chế có khả năng làm giảm nồng độ canxi tự do từ 2,0 mM đến 0,10 mM ở nồng độ dưới 0,9, như dưới 0,8, như dưới 0,7, như dưới 0,6, như dưới 0,5, như dưới 0,4, như dưới 0,3, như dưới 0,2, như dưới 0,1 lần thấp hơn so với nồng độ xitrat, khi được đo ở độ pH 8,0 và 21°C. Chất càn hóa được ưu tiên theo sáng chế có khả năng làm giảm nồng độ canxi tự do từ 2,0 mM đến 0,10 mM ở nồng độ dưới 0,9, như dưới 0,8, như dưới 0,7, như dưới 0,6, như dưới 0,5, như dưới 0,4, như dưới 0,3, như dưới 0,2, như dưới 0,1 lần thấp hơn so với nồng độ xitrat, khi được đo ở độ pH bằng 8,0 ở 21°C bằng cách sử dụng ion canxi phân cực chọn lọc để xác định nồng độ canxi tự do khi được đo trong 80 mM kali clorua và 49 mM Epps ở 21°C và độ pH bằng 8,0.

Theo phương án đặc biệt được ưu tiên, chất càn hóa có thể làm giảm nồng độ của các ion canxi tự do từ 2,0 mM đến 0,10 mM ở nồng độ chất càn hóa dưới 1,0 đến 0,1, như dưới 0,9 đến 0,1, như dưới đây 0,8 đến 0,1, như dưới 0,7 đến 0,1, như dưới 0,6 đến 0,1, như dưới 0,5 đến 0,1, như dưới 0,4 đến 0,1, như dưới 0,35 đến 0,1, như dưới 0,3 đến 0,1 lần thấp hơn so với nồng độ xitrat có thể giảm nồng độ của các ion canxi tự do từ 2,0 mM đến 0,10 mM, khi đo ở độ pH 8,0 và 21°C. Vì vậy, chất càn hóa theo sáng chế có thể làm giảm nồng độ ion canxi tự do từ 2,0 mM đến 0,10 mM ở nồng độ thấp hơn nồng độ của HEDP cần thiết để làm giảm nồng độ ion canxi tự do từ 2,0 mM đến 0,10 mM ở cùng điều kiện.

Ngoài ra, sức mạnh của phức được tạo ra giữa chất càn hóa và các ion kim loại như canxi và/hoặc magiê, được thể hiện bằng trị số log K (cân bằng hoặc liên kết hoặc tách ra hoặc tính ổn định không đổi). Sự không đổi này có thể được đo ở

độ pH nhất định, ở một nhiệt độ nhất định, ở độ mạnh ion nhất định. Như đã đề cập ở trên sức mạnh của phức được tạo ra giữa chất cation hóa và ion kim loại, ví dụ, canxi và/hoặc magiê có thể được thể hiện như trị số Log K (cân bằng hoặc liên kết hoặc tách ra hoặc tính ổn định không đổi), hằng số có thể được đo bằng nhiệt lượng kế chuẩn đẳng nhiệt (ITC) như được mô tả trong A. Nielsen et al. , Anal. Biochem. Vol. 314, (2003), trang 227-234 và từ trị số K, Log K có thể được tính là logarit của trị số K (cơ số 10). Trị số log K được đo bằng phương pháp này sẽ phụ thuộc vào nhiệt độ, độ pH, độ mạnh ion, vì vậy điều quan trọng là khi so sánh trị số log K, chúng được xác định tương tự, tốt hơn là các điều kiện như nhau. Hơn nữa, bằng cách đưa vào tiêu chuẩn để tham khảo, như xitrat, tác động từ các thay đổi trong các thử nghiệm có thể được giảm. Tốt hơn là, log K được xác định như đã được mô tả trong mục "Chất và phương pháp" của các ứng dụng hiện nay, do đó theo một phương án của sáng chế chất cation hóa trong chế phẩm theo sáng chế có log K ít nhất là 3, như ít nhất là 4, như ít nhất là 5, như ít nhất là 6, như ít nhất là 7, như ít nhất là 8, như ít nhất là 9, như ít nhất là 10, như ít nhất là 11, khi log K được đo ở độ pH bằng 10 và 19°C như được mô tả trong mục "Chất và phương pháp". Trị số log K của chất cation hóa trong chế phẩm theo sáng chế cũng có thể nằm trong khoảng từ 3 đến 11, như nằm trong khoảng từ 3 đến 10, như nằm trong khoảng từ 3 đến 9, như nằm trong khoảng từ 3 đến 8, như nằm trong khoảng từ 4 đến 11, như nằm trong khoảng từ 5 đến 11, như nằm trong khoảng từ 6 đến 11, như nằm trong khoảng từ 4 đến 10, như nằm trong khoảng từ 5 đến 10, như nằm trong khoảng từ 4 đến 9, như nằm trong khoảng từ 5 đến 9, như nằm trong khoảng từ 4 đến 8, cụ thể là nằm trong khoảng từ 5 đến 8. Tốt hơn là, log K của chất cation hóa trong chế phẩm theo sáng chế là yếu tố ít nhất là 1, như ít nhất là 1,33, như ít nhất là 1,67, như ít nhất là 2, như ít nhất là 2,33, như ít nhất là 2,67, như ít nhất là 3, như ít nhất là 3,33, như ít nhất là 3,67 lần log K của xitrat được xác định như được mô tả trong mục "Chất và phương pháp". Chất cation hóa trong chế phẩm theo sáng chế

cũng có thể nằm trong phạm vi của yếu tố 1 đến 3,67, như nằm trong khoảng từ 1 đến 3,33, như nằm trong khoảng từ 1 đến 3,00, như nằm trong khoảng từ 1 đến 2,67, như nằm trong khoảng từ 1,33 đến 3,67, như nằm trong khoảng từ 1,33 đến 3,33, như nằm trong khoảng từ 1,33 đến 3,00, như nằm trong khoảng từ 1,33 đến 2,67, như nằm trong khoảng từ 1,67 đến 3,67, như nằm trong khoảng từ 1,67 đến 3,33, như nằm trong khoảng từ 1,67 đến 3, cụ thể là từ 1,67 đến 2,67 lần log K của xitrat được xác định như được mô tả trong mục "Chất và phương pháp". Chất càng hóa hữu ích có thể là, nhưng không giới hạn, các chất sau: axit N (1,2-dicarboxyetyl) -D, L-aspartic (IDS), axit N- (2-hydroxyetyl) iminodisuccinic (EDG), axit aspartic axit N-monoaxetic (ASMA), axit aspartic axit-N, N-diaxetic (ASDA), axit aspartic axit N-monopropionic (ASMP), axit iminodisuccinic (IDA), N- (2-sulfometyl) axit aspartic (SMAS), axit N- (2-sulfoetyl) aspartic (SEAS), axit glutamic N- (2-sulfometyl) (SMGL), axit glutamic N- (2-sulfoetyl) (SEGL), axit N-metyliminodisuccinic (MIDA), α -alanin-N, axit N-diaxetic (α -ALDA), serin-N, axit N-diaxetic (SEDA), isoserin-N, axit N-diaxetic (ISDA), phenylalanin-N, axit N-diaxetic (PHDA), anthranilic axit-N, N axit -diaxetic (ANDA), axit-N sulfanilic, axit N-diaxetic (SLDA), taurine-N, axit N-diacetic (TUDA), sulfomethyl-N, axit N-diacetic (SMDA), N - (hydroxyetyl) -etylidenediamintriaxetat (HEDTA), dietanoglyxin (DEG), aminotris (axit metylenphosphonic) (ATMP).

Chất càng hóa được ưu tiên chứa một nhóm amin và có thể là, ví dụ, aminopolycarboxylat hoặc phosphonit. Nó có thể là phân tử monome gồm một, hai hoặc ba nhóm amin (thường là nhóm amin bậc một hoặc nhóm amin bậc hai), và nó có thể chứa hai, ba, bốn hoặc năm nhóm carboxyl hoặc thậm chí nhiều nhóm carboxyl hơn. Các chất càng hóa có thể chứa phospho hoặc không chứa phospho. Có rất nhiều cách để nhóm các chất càng hóa một cách có thể như sau:

Chất càng hóa có thể được cacboxylat hoặc được dựa trên các nhóm carboxylat như EDTA (etylen diamin tetraaxetat), NTA (2,2',2''-nitrilotriaxetat),

xitrat, 2-hydroxypropan-1,2,3tricarboxylat, DTPA (axit diethylentriaminpentaaxetic), MGDA (axit metylglyxindiaxetic hoặc N, N'-bis(carboxymetyl) alanin), EGTA (etylen glycol axit tetraaxetic), EDDS (etylendiamin- N, N' axit -disucxinic), GLDA (axit L-Glutamic, axit N, N-diaxetic), Polycarboxylat như PAA [poly (axit acrylic)], PAA/PMA [copoly (axit acrylic/axit maleic)].

Chất cànghóa chứa phospho có thể là polyphosphat hoặc phosphonat, như natri tripolyphosphat (STP), HEDP (axit 1-Hydroxyetyliden-1,1-Diphosphonic), EDTMP [bis (phosphonometyl) amino] axit metylphosphonic] hoặc (etylendiamin tetra cànghóa (metylen axit phosphonic)), EDTMPA (axit etylendiamintetrametylenetetraphosphonic), DTPMP (diethylentriamin penta (metylen axit phosphonic), DTPMPA (diethylentriaminpenta (axit metylen-phosphonic)). Các chất cànghóa có thể chứa nitơ như trong EDTA, NTA, DTPA, PDTA, GLDA, MGDA, EDDS, EDTMP, EDTMPA, và DTPMP hoặc Asma, ASDA, ASMP, IDA, SMAS, SEAS, SMGL, SEGL, MIDA, α - ALDA, SEDA, ISDA, PHDA, ANDA, SLDA, TUDA, SMDA, HEDTA, DEG, ATMP, hoặc hỗn hợp của chúng.

Do đó, các chất cànghóa được ưu tiên có thể là nhưng không giới hạn như sau: axit etylendiamin-tetra-axetic (EDTA), dietylen triamin penta metylen axit phosphonic (DTMPA, DTPMP), hydroxy-etan axit diphosphonic (HEDP), etylendiamin N, axit N'-disucxinic (EDDS), metyl glyxin axit di-axetic (MGDA), dietylen triamin penta axit axetic (DTPA), propylen axit diamin tetraaxetic (PDTA), 2-hydroxypyridine-N-oxit (HPNO), metyl glyxin axit diaxetic (MGDA), axit glutamic N, axit N-diaxetic (N, N-dicarboxymetyl muối axit glutamic tetranatri (GLDA) và axit nitrilotriaxetic (NTA) hoặc hỗn hợp của chúng. Các chất cànghóa có thể có mặt ở dạng axit hoặc muối, tốt hơn là các chất cànghóa có thể

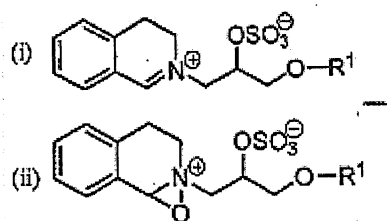
có mặt như natri, kali, amoni hoặc muối amin (như trietanolamin và Monoetanolamin).

Hơn nữa, chất càngh hóa có thể là chất càngh hóa có nguồn gốc từ thực vật, ví dụ, chất chứa tinh bột như được mô tả chi tiết dưới đây. Ví dụ về các chất càngh hóa tự nhiên này, nhưng không giới hạn, axit phytic (còn được gọi là inositol axit hexaphosphoric (IP6), hoặc phytin, hoặc phytat trong muối), Inositol axit diphosphoric, Inositol triphosphoric hoặc Inositol axit pentaphosphoric. Chất càngh hóa có thể có mặt trong chế phẩm với lượng nằm trong khoảng từ 0,0001 đến 20% trọng lượng, tốt hơn là từ 0,01 đến 10% trọng lượng, tốt hơn nữa là từ 0,1 đến 5% trọng lượng.

Hệ chất tẩy trắng

Chế phẩm tẩy rửa dạng lỏng của sáng chế có thể chứa 0 đến 50% trọng lượng, như khoảng từ 0,1 đến 25% trong hệ chất tẩy trắng. Bất kỳ hệ chất tẩy trắng đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này sử dụng trong chất tẩy rửa dạng lỏng có thể được sử dụng. Thành phần hệ chất tẩy trắng thích hợp bao gồm các chất xúc tác tẩy trắng, các chất tẩy trắng ảnh, chất kích hoạt tẩy trắng, nguồn của hydrogen peroxit như natri percarbonat và natri perborat, peraxit bánh và hỗn hợp của chúng. Peraxit bánh thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn, muối và axit peroxydicarboxylic, muối và axit percarbonic, muối và axit perimidic, muối và axit peroxymonosulfuric, ví dụ, Oxon (R), và hỗn hợp của chúng. Các ví dụ không giới hạn về hệ chất tẩy trắng bao gồm các hệ chất tẩy trắng dựa vào peroxit, trong đó có thể chứa, ví dụ, muối vô cơ, bao gồm muối kim loại kiềm như muối natri của perborat (thường là mono- hoặc tetra-hydrat), percarbonat, persulfat, perphosphat, muối persilicat, kết hợp với một chất kích hoạt tẩy trắng dạng peraxit. Chất kích hoạt tẩy trắng có nghĩa là hợp chất phản ứng với thuốc tẩy peroxygen như hydrogen peroxit để tạo

ra peraxit. Do đó, peraxit tạo ra chất tẩy được kích hoạt. Chất kích hoạt tẩy trắng thích hợp được dùng trong bản mô tả sáng chế này bao gồm các chất thuộc loại của este amit, imit hoặc anhydrit. Các ví dụ thích hợp là tetraoxetylen diamin (TAED), natri 4-[(3,5,5-trimethylhexanoyl)oxy] benzen sulfonat (ISONOBS), axit dodecanoic diperoxy, 4- (dodecanoyloxy) benzensulfonat (LOB), 4- (decanoyloxy) benzenesulfonat, 4- (decanoyloxy) benzoat (DOBS), 4-(nonanoyloxy) benzensulfonat (NOBS), và/hoặc các chất được bộc lộ trong WO98/17767. Nhóm cụ thể của các chất kích hoạt tẩy trắng quan tâm đã được bộc lộ trong EP624154 và được đặc biệt ưu tiên trong nhóm đó là axetyl trietyl xitrat (ATC). ATC hoặc triglyxerit chuỗi ngắn như triaxetin có ưu điểm mà nó là thân thiện với môi trường khi nó cuối cùng làm giảm tạo ra rượu và axit xitric. Hơn nữa axetyl trietyl xitrat và triaxetin có sự ổn định hydrolytical tốt trong sản phẩm khi lưu trữ và nó là chất kích hoạt tẩy trắng hiệu quả. Cuối cùng ATC cung cấp khả năng phụ gia tốt để phụ vụ giặt ủi. Ngoài ra, hệ chất tẩy trắng có thể bao gồm peroxyaxit của chúng, ví dụ, amit, imit, hoặc sulfon. Hệ chất tẩy trắng cũng có thể bao gồm peraxit như axit 6(phthalimido) peroxyhexanoic (PAP). Hệ chất tẩy trắng cũng có thể bao gồm chất xúc tác tẩy trắng. Trong một số phương án thành phần tẩy trắng có thể là chất xúc tác hữu cơ được chọn từ nhóm gồm các chất xúc tác hữu cơ có công thức sau:



(iii) và hỗn hợp của chúng; trong đó mỗi R^1 độc lập là một nhóm alkyl mạch nhánh có 9 đến 24 nguyên tử cacbon hoặc nhóm alkyl mạch thẳng có 11 đến 24 nguyên tử cacbon, tốt hơn là mỗi R^1 độc lập là nhóm alkyl mạch nhánh có 9 đến 18 nguyên tử cacbon hoặc nhóm alkyl mạch thẳng có 11 đến 18 nguyên tử cacbon,

tốt hơn nữa là mỗi R1 được chọn độc lập từ nhóm gồm 2 propylheptyl, 2-butyloctyl, 2-pentylnonyl, 2-hexyldexyl, n-dodexyl, n-tetradexyl, n-hexadexyl, n-octadexyl, iso-Nonyl, iso-dexyl, iso-tridexyl và iso-pentadexyl. Hệ chất tẩy trắng làm ví dụ khác được mô tả, ví dụ ở WO2007/087258, WO2007/087244, WO2007/087259 và WO2007/087242. Chất tẩy trắng ảnh thích hợp có thể ví dụ là phtaloxyanin kẽm được sunfonat.

Polyme

Chế phẩm tẩy rửa dạng lỏng của sáng chế có thể chứa 0 đến 10% trọng lượng, như 0,5 đến 5%, 2 đến 5%, 0,5 đến 2% hoặc 0,2 đến 1% của polyme. Bất kỳ polyme đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật để dùng trong chất tẩy rửa có thể được sử dụng. Polyme có chức năng như đồng chất phụ gia như đã được đề cập ở trên, hoặc có thể cung cấp khả năng chống lắng đọng, bảo vệ sợi, giải phóng vết bẩn, ức chế thuốc nhuộm, làm sạch dầu mỡ và / hoặc đặc tính chống tạo bọt. Một số polyme có thể có nhiều hơn một trong số các đặc tính nêu trên và/hoặc nhiều hơn một trong số các mẫu được đề cập dưới đây. Các polyme làm ví dụ bao gồm (carboxymetyl) xenluloza (CMC), poly (vinyl alcohol) (PVA), poly (vinylpyrrolidon) (PVP), poly (etylenglycol) hoặc poly (etylen oxit) (PEG), poly được etoxyl hóa (etylenimin), carboxymetyl inulin (CMI), và polycarboxylat như PAA, PAA/PMA, axit poly-aspartic, và metacrylat/acrylic copolyme axit lauryl, CMC được sửa đổi kỵ nước (HM-CMC) và silicon, copolyme của axit terephthalic và glycol oligomeric, copolyme poly (etylen terephthalat) và poly (oxyeten terephthalat) (PET-POET), PVP, poly (vinylimidazol) (PVI), poly (vinylpyridin-N-oxit) (PVPO hoặc PVPNO) và polyvinylpyrrolidon-vinylimidazol (PVPVI). Polyme khác làm ví dụ là polycarboxylat sulfo, polyetylen oxit và polypropylen oxit (PEO-PPO) và diquaternium sulfat etoxy. Polyme làm ví dụ khác được bộc lộ

trong, ví dụ, WO 2006/130575. Muối của các polyme nêu trên cũng đã được dự tính.

Chất tạo màu vải

Chế phẩm tẩy rửa dạng lỏng của sáng chế cũng có thể bao gồm các chất tạo màu vải như thuốc nhuộm hoặc chất màu, mà khi được bào chế trong chế phẩm tẩy rửa có thể kết tủa vào vải khi vải nêu trên được tiếp xúc với dung dịch rửa chứa các chế phẩm tẩy rửa nêu trên và do đó làm thay đổi màu của vải nêu trên thông qua sự hấp thụ/phản xạ của ánh sáng có thể nhìn thấy được. Chất làm trắng huỳnh quang phát ra ít nhất một số ánh sáng có thể nhìn thấy được. Ngược lại, các chất tạo màu vải làm thay đổi màu của bề mặt nếu chúng hấp thụ ít nhất một phần của quang phổ ánh sáng có thể nhìn thấy được. Chất tạo màu vải thích hợp bao gồm thuốc nhuộm và hợp chất thuốc nhuộm đất sét, và cũng có thể bao gồm các chất tạo màu. Thuốc nhuộm thích hợp bao gồm thuốc nhuộm phân tử nhỏ và thuốc nhuộm polyme. Thuốc nhuộm phân tử nhỏ thích hợp bao gồm thuốc nhuộm phân tử nhỏ được chọn từ nhóm bao gồm thuốc nhuộm rơi vào các phân loại chỉ số màu (CI) như thuốc nhuộm trực tiếp màu xanh, thuốc nhuộm trực tiếp màu đỏ, thuốc nhuộm trực tiếp màu tím, thuốc nhuộm axit màu xanh, thuốc nhuộm axit màu đỏ, thuốc nhuộm axit màu tím, thuốc nhuộm bazơ màu xanh, thuốc nhuộm bazơ màu tím và thuốc nhuộm bazơ màu đỏ, hoặc hỗn hợp của chúng, ví dụ, như được mô tả trong WO2005/03274, WO2005/03275, WO2005/03276 và EP1876226 (sau đây được dẫn chiếu). Tốt hơn là, chế phẩm tẩy rửa chứa trong khoảng từ 0,00003 đến 0,2% trọng lượng, trong khoảng từ 0,00008 đến 0,05%, hoặc thậm chí trong khoảng từ 0,0001 đến 0,04% trọng lượng chất tạo màu vải. Chế phẩm này có thể chứa từ 0,0001 đến 0,2% trọng lượng chất tạo màu vải, điều này có thể đặc biệt được ưu tiên khi chế phẩm ở dạng túi liều đơn vị. Chất tạo màu thích hợp cũng được bộc lộ trong, ví dụ WO 2007/087257 và WO2007/087243.

Các enzym bổ sung

Chế phẩm tẩy rửa dạng lỏng có thể chứa một hoặc nhiều enzym như proteaza, lipaza, cutinaza, amylaza bổ sung, carbohydraza, xenlulaza, pectinaza, mananaza, arabinaza, galactanaza, xylanaza, oxidaza, ví dụ, laccaza, và/hoặc peroxidaza. Nói chung các đặc tính của các enzym được chọn cần được tương thích với các chất tẩy rửa được chọn, (tức là, độ pH tối ưu, khả năng tương thích với các thành phần khác của enzym và không enzym, vv), và các enzyme sẽ có mặt với lượng hiệu quả.

Xenlulaza: xenlulaza thích hợp bao gồm các xenlulaza có nguồn gốc từ vi khuẩn hoặc nấm. Các thể đột biến được cải biến hóa học hoặc xử lý bằng protein cũng nằm trong số đó. Xenlulaza thích hợp bao gồm các xenlulaza từ vi khuẩn chi *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, ví dụ, xenlulaza nấm được sản xuất từ *insolen Humicola*, *Myceliophthora thermophila* và *Fusarium oxysporum* được bộc lộ trong US 4435307, US 5648263, US 5691178, US 5776757 và WO 89/09259. Xenlulaza được đặc biệt thích hợp là xenlulaza kiềm hoặc xenlulaza trung tính có lợi ích bảo vệ màu. Ví dụ về các xenlulaza như là xenlulaza được mô tả trong EP 0495257, EP 0531372, WO 96/11262, WO 96/29397, WO 98/08940, WO 02/099091. Các ví dụ khác là biến thể xenlulaza như được mô tả trong WO 94/07998, EP 0531315, US 5457046, US 5686593, US 5763254, WO 95/24471, WO 98/12307 và PCT/DK98/00299. Xenlulaza có bán trên thị trường bao gồm Celluzyme®, và Carezyme®, Carezyme Premium®, Celluclean® (Novozymes A/S), Clazinase™, và Puradax HA™ (Genencor International), và KAC-500 (B)™ (Kao Corporation).

Proteaza: proteaza thích hợp bao gồm các loài động vật, thực vật hoặc nguồn gốc của vi sinh vật. Nguồn gốc vi sinh vật là được ưu tiên. Các thể đột biến được

cải biến hóa học hoặc được xử lý bằng protein cũng nằm trong số đó. Proteaza có thể là serin proteaza hoặc metalloprotease, tốt hơn là proteaza kiềm từ vi sinh vật hoặc proteaza giống trypsin. Các ví dụ về các proteaza kiềm là subtilisin, cụ thể là các chất có nguồn gốc từ vi khuẩn *Bacillus*, ví dụ, subtilisin Novo, subtilisin Carlsberg, subtilisin 309, subtilisin 147 và subtilisin 168 (được mô tả trong WO 89/06279). Các ví dụ về các proteaza giống trypsin là trypsin (ví dụ, có nguồn gốc của bò và lợn) và proteaza *Fusarium* được mô tả trong WO 89/06270 và WO 94/25583. Các ví dụ về proteaza hữu ích là các biến thể được mô tả trong WO 92/19729, WO 98/20115, WO 98/20116 và WO 98/34946, cụ thể là các biến thể với các phần tử thể trong một hoặc nhiều vị trí sau: 27, 36, 57, 76, 87, 97, 101, 104, 120, 123, 167, 170, 194, 206, 218, 222, 224, 235, và 274. Enzym proteaza có bán trên thị trường được ưu tiên bao gồm Alcalase™, Savinase™, primase™, Duralase™, Esperase™, và Kannase™ (Novozym A/S), Maxatase™, Maxacal™, Maxapem™, Properase™, Purafect™, Purafect OxP™, FN2™, và FN3™ (Genencor International Inc.).

Lipaza và Cutinaza: lipaza và cutinaza thích hợp bao gồm các chất có nguồn gốc từ vi khuẩn hoặc nấm. Các thể đột biến được cải biến hóa học hoặc xử lý bằng protein cũng nằm trong số đó. Các ví dụ bao gồm lipaza từ *Thermomyces*, ví dụ, từ *T. lanuginosus* (tên trước đây là *Humicola lanuginosa*) như được mô tả trong EP 258 068 và EP 305 216, cutinaza từ *Humicola*, ví dụ, *H. insolens* như được mô tả trong WO 96/13580, lipaza *Pseudomonas*, ví dụ, từ *P. Alcaligenes* hoặc *P. pseudoalcaligenes* (EP 218 272), *P. cepacia* (EP 331 376), *P. stutzeri* (GB 1. 372. 034), *P. fluorescens*, chủng *Pseudomonas* sp. SD 705 (WO 95/06720 và WO 96/27002), *P. wisconsinensis* (WO 96/12012), lipaza *Bacillus*, ví dụ, từ *B. subtilis* (Dartois et al, 1993, *Biochemica et Biophysica Acta*, 1131. : 253-360), *B. stearothermophilus* (JP 64/744992) hoặc *B. pumilus* (WO 91/16422). Các ví dụ khác là các biến thể lipaza như được mô tả trong WO 92/05249, WO 94/01541, EP

407 225, EP 260 105, WO 95/35381, WO 96/00292, WO 95/30744, WO 94/25578, WO 95/14783, WO 95/22615, WO 97/04079, WO 97/07202, WO 00/060063, WO2007/087. 508 và WO 2009/109500. Các enzym lipaza có bán trên thị trường được ưu tiên bao gồm LipolaseTM, Lipolase UltraTM, và LipexTM; LecitaseTM, LipolexTM; LipocleanTM, LipoprimeTM (Novozymes A/S). Lipaza có bán trên thị trường khác bao gồm Lumafast (Genencor Int Inc); Lipomax (Gist-Brocades/Genencor Int Inc) và lipaza *Bacillus* sp. từ Solvay.

Peroxidaza/oxidaza: peroxidaza/oxidaza thích hợp bao gồm các chất có nguồn gốc thực vật, vi khuẩn hoặc nấm. Các thể đột biến được cải biến hóa học hoặc xử lý bằng protein cũng nằm trong số đó. Ví dụ về các peroxidaza hữu dụng bao gồm các peroxidaza từ *Coprinus*, ví dụ, từ *C. cinereus*, và các biến thể được mô tả trong WO 93/24618, WO 95/10602, và WO 98/15257. Peroxidaza có bán trên thị trường bao gồm peroxidaza với nhãn hiệu GuardzymeTM (Novozymes A/S).

Các enzym tẩy rửa có thể được bao gồm trong chế phẩm tẩy rửa bằng cách thêm các chất phụ gia riêng chứa một hoặc nhiều enzym, hoặc bằng cách thêm chất phụ gia kết hợp bao gồm tất cả các enzym. Chất phụ gia tẩy rửa của sáng chế, tức là, chất phụ gia riêng hoặc chất phụ gia kết hợp, có thể được điều chế, ví dụ, như chất kết hạt, chất lỏng, huyền phù, v. v. Chế phẩm phụ gia tẩy rửa được ưu tiên là các chất kết hạt, cụ thể là chất kết hạt không bụi, chất lỏng, cụ thể là chất lỏng được làm ổn định; hoặc huyền phù.

Chất kết hạt không bụi có thể được sản xuất, ví dụ như được bộ lộ trong US 4106991 và 4661452, và tùy ý có thể được phủ bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các ví dụ về các chất phủ sáp là các sản phẩm poly(etylen oxit) (Polyetylglycol, PEG) với trọng lượng phân tử trung bình là từ 1000 đến 20000; nonylphenol được etoxyl hóa có 16 đến 50 đơn vị etylen oxit; rượu béo được etoxyl hóa trong đó rượu có 12 đến 20 nguyên tử cacbon và trong

đó có 15 đến 80 đơn vị etylen oxit; rưoutj béo; axit béo; và mono-và di- và triglyxerit của các axit béo. Các ví dụ về chất phủ tạo màng thích hợp cho các ứng dụng của kỹ thuật chất lỏng được đưa ra trong GB 1483591. Chế phẩm enzym dạng lỏng có thể, ví dụ, được ổn định bằng cách thêm polyol như propylen glycol, đường hoặc rượu đường, axit lactic hoặc axit boric theo phương pháp được thành lập. Enzym được bảo vệ có thể được điều chế theo phương pháp được bộc lộ trong EP 238216.

Chất phụ trợ

Bất kỳ thành phần chất tẩy rửa đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này sử dụng trong chất tẩy rửa, chất lỏng cũng có thể được sử dụng. Thành phần chất tẩy rửa tùy ý khác bao gồm chất chống ăn mòn, chất chống co, chất chống lắng đọng vết bẩn, chất chống nhăn da, vi khuẩn, chất kết dính, chất ức chế ăn mòn, chất phân hủy/ chất làm tan rã, thuốc nhuộm, chất ổn định enzym (bao gồm cả axit boric, borat, CMC, và/hoặc polyol như propylen glycol), chất dưỡng vải bao gồm đất sét, chất độn/chất hỗ trợ xử lý, chất làm trắng huỳnh quang/chất tạo bóng quang học, chất làm tăng bọt, chất điều chỉnh bọt (bọt), hương liệu, chất tạo huyền phù vết bẩn, chất làm mềm, chất loại bọt, chất ức chế xín, và các chất thấm hút, hoặc một mình hoặc hỗn hợp. Sự lựa chọn của các thành phần này cũng nằm trong kỹ năng của người thợ thủ công.

Chất phân tán-Các chế phẩm tẩy rửa của sáng chế cũng có thể chứa các chất phân tán. Cụ thể là các chất tẩy rửa dạng bột có thể chứa các chất phân tán. Chất hữu cơ hòa tan trong nước thích hợp bao gồm các axit homo-hoặc copolyme hoặc các muối của chúng, trong đó axit polycarboxylic chứa ít nhất hai gốc carboxyl được phân tách với nhau bởi không quá hai nguyên tử cacbon. Chất phân tán thích

hợp là ví dụ được mô tả trong chất tẩy rửa dạng bột, chất hoạt động bề mặt khoa học tập 71, Marcel Dekker, Inc.

Chất ức chế chuyển thuốc nhuộm - các chế phẩm tẩy rửa của sáng chế cũng có thể bao gồm một hoặc nhiều chất ức chế chuyển thuốc nhuộm. Chất ức chế chuyển thuốc nhuộm polyme thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn, polyme polyvinylpyrrolidon, polyme polyamin N-oxit, copolyme của N-vinylpyrrolidon và N-vinylimidazol, polyvinylloxazolidon và polyvinylimidazol hoặc hỗn hợp của chúng. Khi có mặt trong chế phẩm đối tượng, chất ức chế chuyển thuốc nhuộm có thể có mặt với lượng nằm trong khoảng 0,0001 đến 10%, trong khoảng từ 0,01 đến 5% hoặc thậm chí trong khoảng từ 0,1 đến 3% trọng lượng của chế phẩm.

Chất làm trắng huỳnh quang - các chế phẩm tẩy rửa của sáng chế ưu tiên cũng chứa các thành phần bổ sung mà có thể thành phẩm tạo màu được làm sạch, chẳng hạn như chất làm trắng huỳnh quang hoặc chất làm sáng quang học. Tốt hơn, nếu chất làm trắng có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 0,01 đến 0,5%. Bất kỳ chất làm trắng huỳnh quang thích hợp sử dụng trong chế phẩm tẩy rửa giặt có thể được sử dụng trong chế phẩm của sáng chế. Các chất làm trắng huỳnh quang được sử dụng phổ biến nhất là các chất thuộc loại dẫn xuất của axit diaminostilben-sulfonic, các dẫn xuất diarylpyrazolin và các dẫn xuất bisphenyl-distyryl. Ví dụ về loại dẫn xuất axit diaminostilben-sulfonic của các chất làm trắng huỳnh quang bao gồm các muối natri của: 4,4'-bis- (2-dietanolamino-4-anilino-s-triazin-6-ylamino) stilben-2,2'- disulfonat 4,4'-bis- (2,4-dianilino-s-triazin-6-ylamino) stilben-2,2'-disulfonat 4,4'-bis- (2-anilino-4- (N- methyl-N-2-hydroxy-etylamin) -s-triazin-6-ylamino) stilben-2,2'-disulfonat 4,4'-bis- (4-phenyl-1,2,3-triazol-2- YL) stilben-2,2'-disulfonat và natri 5- (2H-naphtho [1,2-d] [1,2,3] triazol-2-yl) -2 - [(E) -2-phenylvinyl] benzensulfonat. Chất làm trắng huỳnh quang được ưu tiên là Tinopal DMS và Tinopal CBS có bán từ Ciba-Geigy AG, Basel, Thụy Sĩ. Tinopal DMS là muối dinatri của 4,4'-bis- (2-morpholino-4-anilino-s-triazin-6-ylamino) stilben-

2,2'-disulfonat. Tinopal CBS là muối dinatri của 2,2'-bis- (phenyl-styryl) -disulfonat. Các chất làm trắng huỳnh quang cũng được ưu tiên có bán trên thị trường là Parawhite KX, được cung cấp bởi Paramount Minerals and Chemicals, Mumbai, Ấn Độ. Các chất huỳnh quang khác thích hợp để sử dụng trong sáng chế bao gồm các pyrazolin 1-3-diaryl và 7-alkylaminocoumarin. Lượng chất làm trắng huỳnh quang thích hợp bao gồm lượng thấp hơn từ khoảng 0,01, từ khoảng 0,05, từ khoảng 0,1 hoặc thậm chí từ khoảng 0,2% trọng lượng với lượng trên 0,5 hoặc thậm chí 0,75% trọng lượng.

Polyme giải phóng chất bẩn-các chế phẩm tẩy rửa của sáng chế cũng có thể bao gồm một hoặc nhiều polyme giải phóng chất bẩn mà hỗ trợ việc loại bỏ các loại chất bẩn từ các loại vải như cotton và vải polyeste, cụ thể là việc loại bỏ các loại vải kỵ nước từ vải polyeste. Polyme giải phóng chất bẩn có thể ví dụ là polyme terephthalate không chứa ion hoặc anion, polyvinyl caprolactam và các copolyme liên quan, copolyme được liên kết với vinyl, polyamit polyeste xem ví dụ Chương 7 trong chất tẩy rửa dạng bột, khoa học chất hoạt động bề mặt tập 71, Marcel Dekker, Inc. Loại khác của polyme giải phóng chất bẩn là polyme làm sạch nhớt được alkoxylat kỵ nước bao gồm cấu trúc lõi và nhiều nhóm alkoxylat được liên kết với cấu trúc lõi. Cấu trúc lõi có thể chứa cấu trúc polyalkylenimin hoặc cấu trúc polyalkanolamin như được mô tả chi tiết trong WO 2009/087523 (sau đây được dẫn chiếu). Hơn nữa, copolyme ghép ngẫu nhiên thích hợp là polyme giải phóng chất bẩn. Copolyme ghép thích hợp được mô tả chi tiết hơn trong WO 2007/138054, WO 2006/108856 và WO 2006/113314 (sau đây được dẫn chiếu). Polyme giải phóng chất bẩn là cấu trúc polysacarit được thể, cụ thể là cấu trúc xenluloza được thể như các dẫn xuất xenluloza được biến đổi như được mô tả trong EP 1867808 hoặc WO 2003/040279 (cả hai đều được kết hợp bằng cách tham chiếu). Polyme xenluloza thích hợp bao gồm xenluloza, este xenluloza, este xenluloza, amit xenluloza và hỗn hợp của chúng. Polyme xenluloza thích hợp bao

gồm xenluloza được biến đổi anion, xenluloza được biến đổi không ion, xenluloza được biến đổi cation, xenluloza được biến đổi ion lưỡng tính, và hỗn hợp của chúng. Polyme xenluloza thích hợp bao gồm metyl xelluloza, methyl xenluloza cacboxy, etyl xenluloza, etyl xenluloza hydroxyl, hydroxyl propyl metyl xenluloza, metyl xenluloza este carboxy, và hỗn hợp của chúng.

Chất chống lắng đọng - các chế phẩm tẩy rửa của sáng chế cũng có thể bao gồm một hoặc nhiều chất chống lắng đọng như carboxymetylxenluloza (CMC), rượu polyvinyl (PVA), polyvinylpyrrolidon (PVP), polyoxyetylen và/hoặc polyetylen glycol (PEG), polyme đồng nhất của axit acrylic, copolyme của axit acrylic và axit maleic, và polyetylenimin được etoxyl hóa. Polyme dựa vào xenluloza mô tả theo các polyme giải phóng chất bản ở trên cũng có chức năng như chất chống lắng đọng.

Các chất phụ trợ thích hợp khác bao gồm, nhưng không giới hạn, các chất chống nhăn da, vi khuẩn, chất kết dính, chất mang, thuốc nhuộm, chất ổn định enzym, chất làm mềm vải, chất đệm, chất điều chỉnh bột, chất hương hydrat, hương liệu, chất tạo màu, chất chống co, dung môi, và chất tạo kết cấu đối với chất tẩy rửa dạng lỏng và/hoặc chất làm linh hoạt cấu trúc.

Dạng của các sản phẩm chất tẩy rửa dạng lỏng

Chế phẩm tẩy rửa lỏng của sáng chế có thể ở dạng thuận tiện bất kỳ, ví dụ như, túi có một hoặc nhiều ngăn, bột nhão, gel, hoặc chất lỏng thông thường, đặc hoặc cô đặc. Có một số dạng chế phẩm tẩy rửa như lớp (các pha giống hoặc khác nhau), túi, cũng như các dạng cho đơn vị liều máy.

Túi có thể được bố trí một ngăn hoặc nhiều ngăn. Nó có thể có dạng, hình dạng và chất liệu bất kỳ mà phù hợp để đựng chế phẩm, ví dụ, không cho phép

việc giải phóng của chế phẩm để giải phóng của chế phẩm từ túi trước khi tiếp xúc với nước. Túi được làm từ màng hòa tan trong nước mà bao quanh thể tích bên trong. Thể tích bên trong có thể được chia thành các ngăn của túi. Màng được ưu tiên là chất polyme tốt hơn là các polyme được tạo ra từ màng hoặc tấm. Các polyme, copolyme hoặc các dẫn xuất của chúng được ưu tiên chọn từ polyacrylat, và copolyme acrylat hòa tan trong nước, metyl xenluloza, metyl xenluloza carboxy, natri dextrin, etyl xenluloza, xenluloza hydroxyetyl, metyl xenluloza hydroxypropyl, dextrin malto, poly metacrylat, tốt hơn là copolyme rượu polyvinyl và, metyl xenluloza hydroxypropyl (HPMC). Tốt hơn là, lượng polyme trong màng ví dụ PVA là ít nhất khoảng 60%. Trọng lượng phân tử trung bình được ưu tiên thường sẽ nằm trong khoảng từ 20000 đến 150000. Màng cũng có thể là các chế phẩm được pha trộn chứa chất thủy phân và hợp chất polyme hòa tan trong nước như polylactit và rượu polyvinyl (đã biết đến dưới sự tham chiếu M8630 được bán bởi MonoSol LLC, Indiana, Mỹ) chất làm mềm dẻo thêm như glyxerol, etylen glyxerol, propylen glycol, sorbitol và hỗn hợp của chúng. Túi có thể chứa chế phẩm làm sạch giặt dạng rắn hoặc một phần các thành phần và/hoặc chế phẩm làm sạch dạng lỏng hoặc một phần các thành phần được tách bởi màng hòa tan trong nước. Ngăn đối với các thành phần chất lỏng có thể khác nhau trong chế phẩm so với các ngăn chứa chất rắn. Ref: (US2009/0011970 A1).

Các thành phần chất tẩy rửa có thể được tách theo vật lý với nhau bởi các ngăn trong túi hòa tan trong nước hoặc trong các lớp khác nhau của viên nén. Do đó, sự tương tác lưu trữ tiêu cực giữa các chế phẩm có thể tránh được. Đặc tính hòa tan khác nhau của mỗi ngăn cũng có thể làm gia tăng sự hòa tan bị chậm của các thành phần được chọn trong dung dịch rửa.

Chất tẩy rửa dạng lỏng hoặc dạng gel, mà không phải là liều đơn vị, có thể là dung dịch nước, thường chứa ít nhất 20% trọng lượng và lên đến 95% trọng lượng nước, chẳng hạn như lên đến khoảng 70% trọng lượng nước, lên đến khoảng 65%

trọng lượng nước, lên đến khoảng 55% nước, lên đến khoảng 45% trọng lượng nước, lên đến khoảng 35% trọng lượng nước. Các loại khác của chất lỏng, bao gồm nhưng không giới hạn, alkanol, amin, diol, este và các polyol có thể được bao gồm trong chất lỏng hoặc gel chứa nước. Chất tẩy rửa dạng lỏng hoặc dạng gel chứa nước có thể chứa từ 0 đến 30% dung môi hữu cơ. Chất tẩy rửa dạng lỏng hoặc gel có thể không chứa nước chứa từ 5% đến dưới 15 hoặc 10% trọng lượng nước.

Chế phẩm tẩy rửa dạng lỏng của sáng chế có thể được điều chế, ví dụ, làm chế phẩm tẩy rửa giặt bằng tay hoặc bằng máy chứa chế phẩm phụ gia giặt phù hợp cho tiền xử lý các loại vải màu và chế phẩm làm mềm vải thêm việc giũ.

Điều chế alpha-amylaza để sử dụng trong sáng chế

Các alpha-amylaza (biến thể) của chế phẩm tẩy rửa có thể được điều chế bằng cách sử dụng bất kỳ quy trình đột biến đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, chẳng hạn như đột biến trực tiếp vị trí, cấu trúc gen tổng hợp, cấu trúc gen bán tổng hợp, đột biến ngẫu nhiên, xáo trộn mạch, v. v. Đột biến trực tiếp vị trí là kỹ thuật trong đó có một hoặc nhiều (ví dụ, một số) đột biến được đưa vào ở một hoặc nhiều vị trí được xác định trong polynucleotit mã hóa gốc.

Đột biến trực tiếp vị trí có thể được thực hiện in-vitro bằng PCR liên quan đến việc sử dụng chất mồi oligonucleotit chứa đột biến mong muốn. Đột biến trực tiếp vị trí cũng có thể được thực hiện in-vitro bằng cách đột biến cat-xet liên quan đến việc phân chia bởi enzym giới hạn ở một vị trí trong plasmit chứa polynucleotit mã hóa gốc và việc thất tiếp theo của oligonucleotit chứa các đột biến trong polynucleotit. Thông thường các enzym hạn chế tiêu hóa plasmit và oligonucleotit là như nhau, cho phép đầu dính của plasmit và chèn dễ buộc với nhau. Xem, ví dụ, Scherer và Davis, 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4949-4955; and Barton et al. , 1990, Nucleic Acids Res. 18: 7349-4966.

Đột biến trực tiếp vị trí cũng có thể được thực hiện in-vivo bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem, ví dụ, công bố đơn yêu cầu patent của Mỹ số 2004/0171154; Storici et al. , 2001, *Nature Biotechnol.* 19: 773-776; Kren et al. , 1998, *Nat. Med.* 4: 285-290; and Calissano and Macino, 1996, *Fungal Genet. Newslett.* 43: 15-16. Quy trình đột biến trực tiếp vị trí bất kỳ có thể được sử dụng trong sáng chế. Có rất nhiều kit có bán trên thị trường mà có thể được sử dụng để điều chế các biến thể. Cấu trúc gen tổng hợp đòi hỏi trong tổng hợp in vitro của phân tử polynucleotit được thiết kế để mã hóa polypeptit liên quan. Tổng hợp gen có thể được thực hiện bằng cách sử dụng một số kỹ thuật, chẳng hạn như công nghệ vi mạch dựa trên multiplex được mô tả bởi Tian et al. (2004, *Nature* 432: 1050-1054) và các công nghệ tương tự trong đó oligonucleotit được tổng hợp và lắp ráp trên chip vi lỏng lập trình hình ảnh.

Phân tử thể axit amin đơn hoặc đa, việc xóa, và/hoặc chèn có thể được thực hiện và được thử nghiệm sử dụng phương pháp đã biến của đột biến, sự tái tổ hợp, và/hoặc xáo trộn, tiếp theo quy trình sàng lọc liên quan, các quy trình này được bộc lộ bởi Reidhaar-Olson và Sauer, 1988, *Science* 241: 53-57; Bowie and Sauer, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2152-2156; WO 95/17413; or WO 95/22625. Các phương pháp khác có thể được sử dụng bao gồm PCR dễ lỗi, hiển thị thực khuẩn thể (ví dụ, Lowman et al. , 1991, *Biochemistry* 30: 10832-10837; U. S. Patent No. 5,223,409; WO 92/06204) và đột biến trực tiếp vùng (Derbyshire et al. , 1986, *Gene* 46: 145; Ner et al. , 1988, *DNA* 7: 127) Các phương pháp đột biến/xáo trộn có thể được kết hợp với hiệu suất cao, phương pháp sàng lọc tự động để phát hiện hoạt động của nhân bản vô tính, các polypeptit đột biến thể hiện bởi các tế bào vật chủ (Ness et al. , 1999, *Nature Biotechnology* 17: 893-896). Phân tử DNA đột biến mã hóa polypeptit hoạt tính có thể được thu hồi từ các tế bào vật chủ và nhanh chóng sắp xếp trình tự bằng cách sử dụng phương pháp chuẩn trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các phương pháp này cho phép xác định nhanh về tầm quan trọng của

gốc axit amin riêng trong polypeptit. Cấu trúc gen bán tổng hợp được thực hiện bằng cách kết hợp các khía cạnh của cấu trúc gen tổng hợp, và/hoặc đột biến trực tiếp vị trí, và/hoặc đột biến ngẫu nhiên, và/hoặc sự xáo trộn. Cấu trúc bán tổng hợp được đặc trưng bởi quá trình sử dụng mảnh polynucleotit được tổng hợp, kết hợp với các kỹ thuật PCR. Do đó, vùng được xác định của các gen có thể được tổng hợp lại một lần nữa, trong khi các vùng khác có thể được khuếch đại bằng cách sử dụng chất mồi gây đột biến vị trí cụ thể, trong khi các vùng khác có thể phải chịu PCR dễ bị lỗi hoặc sự khuếch đại PCR không dễ bị lỗi. Các phân tử polynucleotit sau đó có thể được xáo trộn. Gốc có thể là polypeptit dung hợp hoặc polypeptit dung hợp có thể chia tách trong đó polypeptit khác được hợp nhất ở đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của trình tự polypeptit của sáng chế. Polypeptit dung hợp được sản xuất bằng cách dung hợp polynucleotit mã hóa polypeptit khác với một polynucleotit của sáng chế. Kỹ thuật để sản xuất polypeptit dung hợp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, và bao gồm việc gắn các trình tự mã hóa polypeptit sao cho chúng có trong khung và biểu hiện của polypeptit dung hợp dưới sự kiểm soát của trình tự khởi đầu và đầu tận cùng giống nhau. Polypeptit dung hợp cũng có thể được tạo cấu trúc bằng công nghệ intein trong đó polypeptit dung hợp được tạo ra sau dịch mã (Cooper et al. , 1993, EMBO J. 12: 2575-2583; Dawson et al. , 1994, Science 266: 776-779).

Polypeptit dung hợp có thể chứa thêm điểm phân cắt giữa hai polypeptit. Khi bài tiết protein dung hợp, vị trí được phân cắt thành hai polypeptit. Ví dụ về các điểm phân cắt bao gồm, nhưng không giới hạn, các điểm được bộc lộ trong Martin et al. , 2003, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 3: 568-576; Svetina et al. , 2000, J. Biotechnol. 76: 245-251; Rasmussen-Wilson et al. , 1997, Appl. Environ. Microbiol. 63: 3488-3493; Ward et al. , 1995, Biotechnology 13: 498-503; and Contreras et al. , 1991, Biotechnology 9: 378-381; Eaton et al. , 1986, Biochemistry 25: 505-512; Collins-Racie et al. , 1995, Biotechnology 13: 982-987;

Carter et al. , 1989, Proteins: Structure, Function, and Genetics 6: 240-248; và Stevens, 2003, Drug Discovery World 4: 35-48.

Gốc có thể thu được từ các vi sinh vật của giống bất kỳ. Đối với mục đích của sáng chế, thuật ngữ "thu được từ" được sử dụng trong bản mô tả sáng chế này trong kết nối với một nguồn được đưa ra thì nghĩa là gốc được mã hóa bởi một polynucleotit được sản xuất bởi nguồn hoặc bởi một chủng trong đó polynucleotit từ nguồn đã được chèn . Theo khía cạnh, gốc được bài tiết ngoại bào. Gốc hoặc trong các thuật ngữ khác của alpha-amylaza có ít nhất 85% trình tự tương đồng với SEQ ID NO: 1 có thể là vi khuẩn alpha-amylaza. Ví dụ, alpha-amylaza (gốc) có thể là vi khuẩn polypeptit dương tính Gram như Bacillus, Clostridium, Enterococcus, Geobacillus, Lactobacillus, Lactococcus, Oceanobacillus, Staphylococcus, Streptococcus, hoặc alpha-amylaza Streptomyces hoặc vi khuẩn polypeptit âm tính Gram như Campylobacter, E. coli, Flavobacterium, Fusobacterium, Helicobacter, Ilyobacter, Neisseria, Pseudomonas, Salmonella, hoặc alpha-amylaza Ureaplasma.

Theo một khía cạnh, alpha-amylaza (gốc) là khuẩn hình que alkalophilus, khuẩn hình que amyloliquefaciens, khuẩn hình que brevis, khuẩn hình que circulans, khuẩn hình que clausii, khuẩn hình que coagulans, khuẩn hình que firmus, khuẩn hình que lautus, khuẩn hình que lentus, khuẩn hình que licheniformis, khuẩn hình que megaterium, khuẩn hình que pumilus, khuẩn hình que stearothermophilus, khuẩn hình que subtilis, hoặc alpha-amylaza khuẩn hình que thuringiensis.

Theo một khía cạnh khác, gốc alpha-amylaza là alpha-amylaza nhân tạo, ví dụ, alpha-amylaza của SEQ ID NO: 1. Cần được hiểu rằng đối với các loài nêu trên, sáng chế bao gồm cả các trạng thái hoàn hảo và không hoàn hảo, và đương lượng phân loại khác, ví dụ, các tiệm biên, bất kể tên các loài mà đã biết trong lĩnh vực

kỹ thuật này. Những kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ dễ dàng nhận ra tính tương đồng của các đương lượng thích hợp.

Chủng của các loài này dễ dàng tiếp cận với quần thể trong một số các trung tâm nuôi cấy, như American Type Culture Collection(ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS), và Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL).

Các gốc có thể được xác định và thu được từ các nguồn khác bao gồm các vi sinh vật được phân lập từ tự nhiên (ví dụ, đất, phân trộn, nước, vv) hoặc DNA mẫu lấy trực tiếp từ nguyên liệu tự nhiên (ví dụ, đất, phân trộn, nước, v. v) sử dụng trên đầu dò đã được đề cập ở trên. Kỹ thuật để phân lập các vi sinh vật và DNA trực tiếp từ môi trường sống tự nhiên đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Polynucleotit mã hóa gốc sau đó có thể thu được bằng cách sàng lọc tương tự như bộ gen ADN hoặc thư viện ADN bổ trợ của vi sinh vật, mẫu ADN hỗn hợp. Khi polynucleotit mã hóa gốc đã được phát hiện với đầu dò, polynucleotit có thể được phân lập hoặc nhân bản bằng cách sử dụng kỹ thuật đã biết đến bởi kỹ năng thông thường trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem thí dụ, Sambrook et al. , 1989, supra).

Sáng chế đã mô tả và được yêu cầu bảo hộ được trong bản mô tả sáng chế này không phải là để được giới hạn trong phạm vi bởi các khía cạnh cụ thể được bộc lộ trong bản mô tả sáng chế này, vì các khía cạnh này được dự định làm minh họa ở một số khía cạnh của sáng chế. Do đó, các thay đổi khác nhau của sáng chế, thêm vào đó các thể hiện và mô tả trong bản mô tả sáng chế này sẽ trở nên rõ ràng đối với các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này từ những mô tả trên đây. Trong trường hợp xung đột, việc công bố này bao gồm các định nghĩa sẽ kiểm soát.

Sáng chế sẽ được minh họa thêm bằng các ví dụ sau đây, không giới hạn, trong đó các bộ phận và tỷ lệ phần trăm được tính theo trọng lượng, trừ khi có chỉ định khác.

Chất và phương pháp

Điều chế chất tẩy rửa mẫu. Các chất tẩy rửa dạng lỏng mẫu với chất càn hóa khác nhau đã được điều chế để thử nghiệm amylaza khác nhau. Các chế phẩm của hai chất tẩy rửa mẫu được mô tả dưới đây:

	Mô hình 1	Mô hình 2
Thành phần	% trọng lượng	% trọng lượng
LAS	12	12
AEOS	4,9	4,9
Xà phòng (ca cao)	2,75	2,75
Xà phòng (đậu nành)	2,75	2,75
AEO N25-7	11	11
NaOH	1,75	1,75
Etanol	3	3
MPG	6	6
glyxerol	1,7	1,7
TEA	3,3	3,3
natri format	1	1
Natri xitrat	2	2
HEDP	0	0,5
PCA (Sokalan CP-5)	0,18	0,18
Nước trao đổi ion	34,2	34,2
DTMPA	0,2	0

Thử nghiệm amylaza PNP-G7

Hoạt động alpha-amylaza có thể được xác định bởi phương pháp sử dụng chất nền PNP-G7. PNP-G7 là viết tắt của 4,6-ethyliden (G7) p-nitrophenyl (G1) - α , D-maltoheptaosit, oligosacarit bị chặn có thể được phân cắt bằng amylaza-endo, như alpha-amylaza. Sau khi phân tách, alpha-glucosidaza bao gồm bộ tiêu hóa các chất nền được thủy phân hơn nữa để giải phóng phân tử PNP tự do mà có màu vàng và do đó có thể được đo bằng quang phổ khối có thể nhìn thấy ở $\lambda = 405\text{nm}$ (400 đến 420 nm). Kits chứa chất nền PNP-G7 và glucosidaza được sản xuất bởi Roche (cat. No. 11876473) SINH PHẨM: chất nền G7-PNP từ bộ tài liệu này có chứa 22 mM 4,6-ethylidene-G7-PNP và 52,4 mM HEPES (2- [4- (2-hydroxyethyl) -1-piperaziny] axit -ethanesulfonic), pH 7,0) .

Thuốc thử alpha-glucosidaza chứa 52,4 mM HEPES, 87 mM NaCl, 12. 6 mM MgCl₂, 0,075 mM CaCl₂, > 4 kU / L alpha-glucosidaza).

Dung dịch với chất nền được tạo ra bằng cách trộn 66 ml thuốc thử alpha-glucosidaza với 16 ml chất nền G7-PNP . Dung dịch làm việc chất nền này được thực hiện ngay trước khi sử dụng.

Chất đệm pha loãng: 30 mM CaCl₂ + 0,0026% Brij 35 (Polyoxyetylen-laurylete)

Quy trình:

Thử nghiệm này được thực hiện bằng cách chuyển 40 ml các mẫu enzym được pha loãng đến 96 tấm vi chuẩn tốt và thêm 220 ml dung dịch làm việc với chất nền. Dung dịch đã được trộn lẫn và được ủ trước 15 phút ở 37°C và sự hấp thụ được đo mỗi 20 giây. trên 10 phút ở OD 405 nm trên một "Spectra max 384 plus" bộ đọc Eliza (thiết bị phân tử). Độ dốc (độ hấp thụ mỗi phút) của thời gian phụ thuộc vào sự hấp thụ đường cong là tỷ lệ thuận trực tiếp với các hoạt động cụ thể

(hoạt động trên mỗi mg enzym) của alpha-amylaza trong vấn đề dưới các điều kiện được đưa ra.

Thử nghiệm đo lường của các ion canxi tự do

Thử nghiệm sau đây có thể được sử dụng để đo các ion canxi tự do trong dung dịch, và do đó để xác định tác nhân càn hóa (chất càn hóa) có khả năng làm giảm nồng độ của các ion canxi tự do (Ca^{2+}) ví dụ từ 2,0 mM đến 0,10 mM ở độ pH bằng 8.

Nguyên tắc thử nghiệm:

Lượng khác nhau của chất càn hóa được thêm vào dung dịch chứa 2,0 mM Ca^{2+} và lượng Ca^{2+} tự do được xác định bằng cách sử dụng Ion canxi phân cực lựa chọn ở độ pH và nhiệt độ cố định. Nồng độ của chất càn hóa cần thiết để làm giảm nồng độ canxi tự do từ 2,0 mM đến 0,10 mM có thể được xác định từ một sơ đồ của nồng độ canxi tự do được đo so với nồng độ chất càn hóa. Trong thử nghiệm này nồng độ của chất càn hóa cần thiết để làm giảm nồng độ canxi tự do từ 2,0 mM đến 0,10 mM được đo ở độ pH bằng 8, ở 21°C, kali clorua và 49 mM Epps.

Dung dịch:

Dung dịch điện phân: 4 M kali clorua trong nước siêu sạch (nước Milli-Q).
 chất đệm độ pH bằng 8: 50 mM Epps axit (4- (2-hydroxyetyl) piperazin-1-propansulfonic) được điều chỉnh độ pH bằng 8,0 bằng cách dùng lượng tối thiểu là 1 N natri hydroxit. Dung dịch canxi: 25 mM Ca^{2+} trong chất đệm độ pH bằng 8, được làm từ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Dung dịch chất càn hóa: 15 mM chất càn hóa (trên cơ sở chất càn hóa khô 100%) ở chất đệm có độ pH bằng 8, được điều chỉnh lại độ pH bằng 8,0 bằng cách dùng lượng tối thiểu là 1 M NaOH hoặc 1 M HCl.

Nước tinh khiết Ultra (Nước Milli Q) được dùng để điều chế tất cả các chất đệm và dung dịch.

Thiết bị

Ion canxi điện phân lựa chọn từ Thermo Scientific (cat. No. 9720BNWP) được hiệu chỉnh dung dịch tiêu chuẩn Canxi clorua. Các điện cực được hiệu chuẩn như được mô tả của các hướng dẫn điện cực sau đây.

Quy trình:

Một loạt các lọ được chuẩn bị, mỗi lọ chứa 4 ml dung dịch canxi (nồng độ cuối cùng là 2,0 mM), 1 ml dung dịch điện phân (nồng độ cuối cùng là 80 mM Kali clorua), dung dịch chất càng hóa với lượng khác nhau (0 đến 45 ml) và sử dụng chất đệm độ pH bằng 8 để điều chỉnh tổng khối lượng đến 50 ml. Các nồng độ cuối cùng của Epps trong thử nghiệm là 49 mM. Sau khi trộn, nồng độ của Ca^{2+} tự do được đo bằng điện cực canxi. Nồng độ canxi tự do nên được xác định với lượng đủ của nồng độ chất càng hóa khác nhau cho mỗi chất càng hóa được thử nghiệm, đảm bảo rằng thiết lập dữ liệu bao gồm toàn bộ nằm trong khoảng từ 2,0 mM ion canxi tự do đối với giá trị thấp dưới 0,10 mM hoặc nồng độ chất càng hóa cuối cùng trong thử nghiệm là cao hơn so với 10,0 mM. Số điểm dữ liệu thích hợp là 8 hoặc lớn hơn. Nồng độ chất càng hóa cần phải hạ ban đầu 2,0 mM ion canxi tự do đến 0,10 mM thu được từ một sơ đồ của nồng độ ion canxi tự do được đo so với nồng độ càng hóa bằng cách nội suy.

Các dung dịch được cân bằng theo nhiệt độ mong muốn, mà trong thử nghiệm này là 21°C.

Việc xác định log K

Tác nhân cang hóa cũng có thể được đặc trưng bởi hằng số liên kết của tác nhân cang hóa (chất cang hóa) và các ion canxi. Hằng số này có thể được xác định bởi ITC (đẳng nhiệt chuẩn độ nhiệt lượng) như được mô tả bởi AD Nielsen, CC Fuglsang and P Westh, *Analytical Biochemistry* Vol. 314 (2003) page 227-234 and T Wiseman, S Williston, JF Brandts and L-N Lin, *Analytical Biochemistry* Vol. 179 (1989) page 131-137.

Tất cả các chai thủy tinh và nhựa được dùng được rửa bằng 1% (trọng lượng), dung dịch EDTA và sau đó được rửa sạch kỹ lưỡng trong Chelex 100 được xử lý nước tinh khiết (nước Milli-Q). Dung dịch được lưu trữ trong chai nhựa và giữ ở 5°C cho đến khi sử dụng. Chất đệm:

20 mM HEPES axit (2- [4- (2-hydroxyetyl) -1-piperazinyl] -etansulfonic), độ pH bằng 8 được điều chế bằng nước tinh khiết (nước Milli-Q) 20mM glyxin, độ pH bằng 10 được điều chế bằng nước tinh khiết (nước Milli-Q).

Dung dịch:

-125 μ M chất cang hóa trong 20mM HEPES, độ pH bằng 8 hoặc 125 mM chất cang hóa trong 20mM glyxin, độ pH bằng 10

-4 mM CaCl₂ trong 20mM HEPES, độ pH bằng 8 hoặc 4 mM CaCl₂ trong 20mM glyxin, độ pH bằng 10

Nước siêu tinh khiết (Nước Milli-Q)

Tất cả các chất đệm được đi qua cột Chelex 100 (Sigma Aldrich C-7901, chất nền 1% được liên kết ngang với axit iminodiacetic nhóm hoạt tính chất nền polystyren (mẫu natri) việc gắn chất nền thông qua nhóm metyl vào vòng thơm) để loại bỏ các ion canxi. Tất cả các dung dịch được khử khí bằng cách khuấy dưới chân không trước khi thử nghiệm. Thiết bị:

MCS-ITC (MICROCAL Inc. , Northampton, MA, USA)

Quy trình:

Tế bào tham chiếu chứa đầy nước siêu tinh khiết (nước Milli-Q). Các tế bào mẫu được đổ đầy với dung dịch chất càn hóa ở độ pH được chọn và ống tiêm được đổ đầy với dung dịch canxi ở độ pH được chọn. Dung dịch được cân bằng với nhiệt độ mong muốn, ví dụ, 19°C. Các dung dịch chất càn hóa trong tế bào mẫu sau đó được chuẩn độ với 30 đến 40 phần phân ước của 8 ml dung dịch canxi.

Các tín hiệu thu được từ ITC sau đó được tích hợp bằng cách sử dụng phần mềm Origin cung cấp bởi MICROCAL Inc. Để có được đường đẳng nhiệt liên kết, chương trình hồi quy được thực hiện bằng cách sử dụng gói phần mềm tương tự. Các dữ liệu này sau đó được gắn vào mô hình sử dụng các tuyến đường được nhúng trong phần mềm ban đầu. Hiện nay mô hình "OneSites" được ưu tiên cho phù hợp nhất cho hầu hết các chất càn hóa thường được sử dụng, ví dụ, các phân cặn được phân bố đều trong khoảng 0. Từ trị số K và log K được tính bằng logarit (cơ số 10) trị số K.

Thử nghiệm để xác định hiệu suất rửa

Thử nghiệm hiệu suất rửa Terg-O-tometer (TOM)

Thử nghiệm hiệu suất rửa bằng cách sử dụng Terg-O-Tometer là thử nghiệm trong mô hình quy mô vừa của máy giặt và được sử dụng để đánh giá hiệu suất rửa amylaza. TOM về cơ bản là nhiệt độ cao được kiểm soát nước lên đến 12 cốc kim loại mở được ngâm vào nó. Mỗi cốc thủy tinh tạo ra một máy giặt nhỏ và trong thời gian thử nghiệm, mỗi của chúng sẽ chứa dung dịch của chất tẩy rửa/hệ thống enzym cụ thể và hiệu suất rửa vải bản hoặc không bản được thử nghiệm trên. Ứng suất cơ học đạt được bằng tay khuấy quay, mà khuấy chất lỏng trong mỗi cốc. Bởi vì cốc TOM không có nắp, có thể lấy mẫu trong một thử nghiệm TOM và thử nghiệm cho thông tin trực tuyến trong thời gian rửa. Thử nghiệm hiệu suất rửa TOM, bằng cách sử dụng cốc 1000 mL và khuấy cánh cung cấp chuyển động quay

dao động, 180° theo mỗi hướng, với tần số 120 trên phút, bao gồm các bước sau: 500 ml dung dịch rửa (15°dH với Ca/mg tỷ lệ 4: 1 chứa 40 mM NaHCO_3) được thêm vào cốc. Khi nhiệt độ được chọn để rửa, ví dụ, 40°C , chất tẩy rửa và enzym có được được thêm vào dung dịch rửa. Trong suốt quá trình rửa nồng độ chất tẩy rửa nên có 3,3 g chất tẩy rửa mỗi dung dịch rửa L (3,3 g/L ví dụ, mô hình chất tẩy rửa 1 hoặc 2 như đã được mô tả ở trên). Nồng độ enzym trong suốt quá trình rửa hoặc là 0 và/hoặc 0,028 mg protein enzym/dung dịch rửa L. 10 g đá balat được cắt trong 5x5 cm WFK80A (wfk Testgewebe GmbH, Christenfeld 10; D-41. 379 Bruggen-Bracht; Đức) được thêm cùng với 4 mẫu vải tinh bột gạo bông với 5x5 cm, ví dụ, CS-28 (Center For Testmaterials BV, P. O. Box 120, 3133 KT, Vlaardingen, Hà Lan), với dung dịch rửa để bắt đầu việc rửa. Sau thời gian rửa được chọn, ví dụ, 20 phút, việc rửa được dừng lại và mẫu vải ngay lập tức được rửa sạch trong 5 phút dưới nước vôi lạnh. Các mẫu vải được rửa sạch sau đó được làm khô trong bóng tối. Sau khi làm khô hiệu suất rửa được đánh giá bằng cách đo sự giảm của ánh sáng tới với 460 nm sử dụng màu mắt như được mô tả dưới đây. Các thử nghiệm với 0 mg protein enzym/L được sử dụng làm trống để có được trị số giảm delta.

Sự đo lường mất màu

Hiệu suất rửa được thể hiện như trị số giảm delta (ΔRem). Việc đánh giá giảm ánh sáng của các mẫu vải đã được thực hiện bằng cách sử dụng mắt màu Macbeth 7000 quang phổ kế giảm với khẩu độ tròn lớn (đường kính 25 mm). Các phép đo được thực hiện mà không UV trong ánh sáng tới và giảm ở 460 nm được chiết xuất. Mẫu vải màu được đo đã được đặt trên đỉnh của ba mẫu vải khác, việc được rửa sạch loại giống nhau dưới điều kiện giống nhau, trước khi được đo để giảm sự phản xạ từ các piston đẩy mẫu vải lên chống lại việc mở đo lường. Trị số

giảm delta đối với điều kiện rửa cụ thể được tính bằng cách trừ trị số giảm trung bình của các mẫu vải được rửa mà không được thêm amylaza (0 mg protein enzym/L) từ trị số giảm của mẫu vải được rửa bằng amylaza (0,028 mg protein enzym/L).

Thử nghiệm lực căng cơ học tự động (AMSA) cho máy giặt

Thử nghiệm hiệu suất rửa khác có thể được sử dụng là AMSA. Để đánh giá hiệu suất rửa trong việc giặt, thử nghiệm rửa có thể được thực hiện bằng cách sử dụng thử nghiệm lực căng cơ học tự động (AMSA). Với AMSA, hiệu suất rửa của các dung dịch enzym-chất tẩy rửa khối lượng nhỏ có thể được kiểm tra. Các tấm AMSA có một số khe cho các dung dịch thử nghiệm và một nắp mà ép dẹt phải được rửa sạch chống lại lỗ khe. Trong suốt quá trình rửa, tấm, dung dịch thử nghiệm, vải dẹt và nắp đã được rung động mạnh mẽ để mang lại dung dịch thử nghiệm tiếp xúc với vải dẹt và áp dụng lực căng cơ học trong quy tắc, định kỳ, cách thức dao động. Để mô tả kỹ hơn trong WO02/42740, cụ thể là phần "Các phương án phương pháp cụ thể", trang 23 đến 24.

Liều lượng chất tẩy rửa	5 g/L (chất tẩy rửa dạng lỏng)
Thể tích dung dịch thử nghiệm	160 vi L
Độ pH	Điều chỉnh độ pH 7 hoặc độ pH 6 (chất tẩy rửa dạng lỏng)
Thời gian rửa	20 phút
Nhiệt độ	60°C, 40°C và 20°C hoặc 15°C
Độ cứng của nước	15°dH

Mô hình chất tẩy rửa và các chất thử nghiệm có thể là như sau:

Mô hình chất tẩy rửa giặt	Natri alkyletoxyl sulfat (C-9-15, 2EO) 6. 0% Natri dodexyl benzen sulfonat 3,0% Natri toluen sulfonat 3,0% axit oleic 2,0% rượu bậc một etoxylat (C12-15, 7EO) 3,0% rượu bậc một etoxylat (C12-15, 3EO) 2,5% Etanol 0,5% Mono propylen glycol 2,0% Tri-natri xitrat dihydrat 4,0% Trietanolamin 0,4% Nước được ion hóa 100% Độ pH được điều chỉnh lên 8,5 với NaOH
Chất thử nghiệm	EMPA112 (bột cacao trên bông) PC-05 (Máu/sữa / mực trên bông/polyeste) WFK10PPM (Dầu thực vật/sữa /chất tạo màu trên bông) C-10 (Dầu/sữa/chất tạo màu trên bông) CS-28 (tinh bột gạo trên bông)

Các chất thử nghiệm được lấy từ EMPA Testmaterials AG, Mövenstrasse 12, CH-9015 St. Gallen, Thụy Sĩ, từ Center For Testmaterials BV, PO Box 120, 3133 KT Vlaardingen, Hà Lan, và WFK Testgewebe GmbH, Christenfeld 10, D-41. 379 Bruggen , Đức. Độ cứng của nước được điều chỉnh đến 15°dH bằng cách bổ sung CaCl_2 , MgCl_2 , và NaHCO_3 Ca^{2+} : Mg^{2+} = 4: 1: 7,5) để hệ thống kiểm tra. Sau khi giặt vải được rửa sạch trong nước máy và được làm khô. Hiệu suất rửa được đo

như độ sáng của màu sắc của vải được rửa sạch. Độ sáng cũng có thể được thể hiện như cường độ của ánh sáng phản xạ từ mẫu khi được chiếu sáng bằng ánh sáng trắng. Khi mẫu được nhuộm màu cường độ của ánh sáng phản xạ là thấp hơn so với mẫu sạch. Do đó, cường độ của ánh sáng phản xạ có thể được sử dụng để đo hiệu suất rửa. Đo màu được thực hiện bằng máy quét phẳng chuyên nghiệp (Kodak iQsmart, Kodak, Midtager 29, DK-2605 Brøndby, Đan Mạch), được sử dụng để chụp ảnh của vải được rửa sạch.

Để trích xuất một giá trị so với cường độ ánh sáng từ các hình ảnh được quét, các giá trị điểm ảnh 24-bit từ các hình ảnh được chuyển đổi thành các giá trị cho các màu đỏ, màu xanh lá cây và màu xanh dương (RGB). Giá trị cường độ (Int) được tính bằng cách cộng các giá trị RGB với nhau như các vật truyền và sau đó lấy độ dài của vật truyền thu được:

$$Int = \sqrt{r^2 + g^2 + b^2}$$

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1 - Xác định đặc tính độ pH.

Đặc tính độ pH được xác định cho alpha-amylaza có SEQ NO1: với các phân tử thể G46A + T47I + G105A + I199F khi sử dụng SEQ ID NO: 1 đánh số.

Thử nghiệm đường giảm:

Thử nghiệm để đo hoạt động phân giải tinh bột (hoạt động alpha-amylaza).

Hoạt động alpha-amylaza có thể được xác định bởi phương pháp sử dụng tinh bột chất nền như S7260 tinh bột gạo từ Sigma-Aldrich. Các alpha-amylaza

phân cắt chất nền và chất giảm cuối được tạo ra bởi amylaza được xác định bằng phản ứng với hydrazit axit p-hydroxybenzoic (thử nghiệm đường giảm). Điều này dẫn đến sự tạo ra của hydrazon, mà có thể được phát hiện bằng cách đo độ hấp thụ ở 405nm. Lượng đầu tận cùng giảm được tạo ra tỷ lệ với hoạt động amylaza.

Enzym này được pha loãng trong chất đệm pha loãng enzym (10 mM MES, độ pH bằng 7,0, 0,01% TritonX100, 0,100mM CaCl₂) đến một nồng độ enzyme nếu đường cong đáp ứng liều tuyến tính thu được trong thử nghiệm. Hoạt động pH được xác định sử dụng chất đệm hoạt động (50mM MES, 50 mM axit axetic, 50 mM Glyxin) được điều chỉnh đến độ pH từ 4 đến 11. Các chất nền (S7260 từ Sigma-Aldrich) (3mg/ml trong nước milliQ) được nấu trong 5 phút và để nguội xuống trước khi sử dụng. Đối với thử nghiệm chuyển 50µl chất nền (3mg/ml) thành tám vi chuẩn PCR và thêm 50µl chất đệm hoạt động (50mM MES, 50 mM axit axetic, 50 mM Glyxin, độ pH từ 4 đến 11). Thêm 50µl của enzyme được pha loãng và trộn đều. Ủ trong máy PCR trong 5 phút ở 40°C sau đó hạ nhiệt độ. Làm lạnh dung dịch bằng cách hòa tan hydrazid axit p-hydroxybenzoic (Sigma H-9882) ở Ka-Na tartrat-/ dung dịch NaOH (trong 1 lít: thêm 50g K-Na-tartrat (Merck 8087) và 20g NaOH) đến 15mg/ml. Thêm 75µl dung dịch lạnh và ủ 10 phút ở 95°C trong máy PCR. Chuyển 150µl thành tám vi chuẩn 96 và đo độ hấp thụ ở 405nm. Enzym cần pha loãng để nó nằm trong phạm vi tuyến tính của thử nghiệm hoạt động ở độ pH nhất định. Hoạt động amylaza được bình thường để hoạt động tối đa.

Đặc tính độ pH của alpha-amylaza có SEQ NO1: với các phân tử thể G46A + T47I + G105A + I199F khi sử dụng SEQ ID NO: 1 cho đánh số được xác định các kết quả được thể hiện trên hình 1. Có thể thấy rằng hoạt động tối đa đạt được giữa độ pH bằng 6 và 7 và hoạt động giảm xuống rõ rệt trong vùng có tính kiềm, do đó enzym dường như không thể hấp dẫn một cách đặc biệt để sử dụng trong chất tẩy rửa dạng lỏng kiềm. Các nhà sáng chế đã phát hiện ra rằng sự ổn định phi

thường của enzym alpha-amylaza (xem dưới đây) hơn đóng góp cho hoạt động thấp hơn trong chất tẩy rửa dạng lỏng có giá trị độ pH kiềm.

Trong ví dụ dưới đây, sự xác định thành phần viết tắt có ý nghĩa sau:

MPG là mono propylen glycol

TEA là triethanolamin

MEA là Monoethanolamin

NaOH là 47% dung dịch natri hydroxit

NI 7EO là rượu etoxylat có 12 đến 15 nguyên tử cacbon 7EO không ion Neodol® 25-7 (của Shell Chemicals)

Axit LAS là axit sulphonie alkylbenzen mạch thẳng có 12 đến 14 nguyên tử cacbon

Prifac® 5908 là axit béo lauric được bão hòa của Croda

SLES 3EO là natri lauryl ete sulphat với 3 mol EO

SLES 1EO là natri lauryl ete sulphat với 1 mol EO

EPEI là Sokalan HP20 -polyme làm sạch imin polyetylen được etoxyl hóa:

PEI (600) 20EO của BASF

Hương liệu là dầu hương liệu tự do

Dequest® 2010 là HEDP (axit 1-Hydroxyetyliden-1,1, -diphosphonic)

Chất bảo quản là Proxel GXL™ chất bảo quản chống vi trùng, 20% dung dịch 1,2 benzisothiazolin-3-on trong dipropylen glycol và nước của Arch Chemicals.

Huỳnh quang là Tinopal CBS-X™ của Ciba

Stainzyme™, Termamyl Ultra™, Savinase Ultra XL™, Mannaway™ là enzym thương mại của Novozymes

Ví dụ 2: sự ổn định lưu trữ Amylaza trong chất tẩy rửa dạng lỏng.

Một loạt các chế phẩm tẩy rửa dạng lỏng đã được điều chế với amylaza trong lĩnh vực kỹ thuật trước (Stainzyme và Termamyl Ultra) và amylaza của SEQ ID NO: 1 với các phần tử thế G46A + T47I + G105A + I199F (đó là SEQ amylase ID NO: 2). Các chế phẩm sử dụng được đưa trong bảng 1. Các mẫu enzym chất tẩy rửa đã được đổ vào lọ thủy tinh, và lọ thủy tinh sau đó được đóng lại. Các mẫu enzym chất tẩy rửa được ủ trong 2 và 4 tuần ở 37°C hoặc 45°C và bộ giống hệ thống của các mẫu đã được đông lạnh để thể hiện các mẫu mới. Sau khi lưu trữ hoạt động amylaza còn lại sau đó đã được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm hoạt động amylaza PNP-G7. Amylaza đã được thử nghiệm là Termamyl Ultra, Stainzyme (NovozymesA/S; Krogshoejvej 36; 2880 bagsvaerd; Đan Mạch) và amylaza của SEQ ID NO: 2.

Bảng 1 - chế phẩm tẩy rửa dạng lỏng

	% trọng lượng chế phẩm theo 100%						
Thành phần	%AD	A	B	C	D	E	F
Nước Khoáng	100	Cân bằng	Cân bằng	Cân bằng	Cân bằng	Cân bằng	Cân bằng
MPG	100	5	5	5	5	1,1	0
Glyxerol	100	0	0	2,2	2,2	4,5	2,2
MEA	100	3,21	3,95	2,83	3,66	0	0
TEA	100	1,87	1,87	1,5	1,5	4,08	1,5
NaOH	47	0	0	0	0	1,81	1,56
NI 7EO	100	3,92	3,92	1,16	1,16	3,31	1,16
Axit LAS	97,1	5,23	5,23	4,63	4,63	13,23	4,63

Prifac 5908	100	1,63	1,63	0	0	0	0
SLES 3EO	70	3,92	3,92	0	0	0	0
SLES 1EO	70	0	0	5,79	5,79	16,54	5,79
EPEI	80	1,4	1,4	0	0	0	0
Dequest 2010	60	0	0,7	0	0,7	0	0
Axit xitric	50	1,17	1,17	2	2	1,25	2
Natri sulfit	98	0,12	0,12	0	0	0	0
Chất bảo quản	20	0,02	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03
Chất huỳnh quang	100	0,12	0,12	0,1	0,1	0,09	0,03
Hương liệu	100	0,65	0,65	0,34	0,34	0,98	0,34
Amylaza SEQ ID No:2 (14,6 mg hoạt tính/g	100	0 đến 0,2	0 đến 0,2	0 đến 0,2	0 đến 0,2	0 đến 0,3	0 đến 0,11
Stainzym (13,7 mg hoạt tính/g)	100	0 đến 0,2	0 đến 0,2	0 đến 0,2	0 đến 0,2	0 đến 0,3	0 đến 0,11
Termamyl	100	0 đến	0 đến	0 đến	0 đến	0	0

Ultra (24,8 mg hoạt tính/g)		0,2	0,2	0,2	0,2		
Savinase Ultra XL (48 mg hoạt tính/g)	100	0	0	0	0	1	0,35
Mannaway (4,4 mg hoạt tính/g)	100	0	0	0	0	0,3	0,11
Tổng	100	100	100	100	100	100	100
pH@25°C		8,5	8,5	8,5	8,5	8,2	8,2

Bảng 2

	Hoạt động còn lại, 37°C					
	Amylaza SEG IH No:		Termamyl Ultra		Staizym	
	2 tuần	4 tuần	2 tuần	4 tuần	2 tuần	4 tuần
Chất tẩy rửa A	82	69	29	10	5	1
Chất tẩy rửa B	90	80	83	61	50	25
Chất tẩy rửa C	89	83	38	16	7	1
Chất tẩy rửa D	92	78	71	46	37	15

Bảng 3

	Hoạt động còn lại, 45°C					
	Amylaza SEG IH No:		Termamyl Ultra		Staizym	
	2 tuần	4 tuần	2 tuần	4 tuần	2 tuần	4 tuần
Chất tẩy rửa A	60	40	0	0	0	0
Chất tẩy rửa B	79	69	36	17	4	1
Chất tẩy rửa C	70	53	2	0	0	0
Chất tẩy rửa D	77	72	21	5	2	1

Bảng 4

	Hoạt động còn lại, 37°C				Hoạt động còn lại, 45°C			
	Amylaza SEQ ID No:2		Stainzym		Amylaza SEQ ID No: 2		Stainzym	
	2 tuần	4 tuần	2 tuần	4 tuần	2 tuần	4 tuần	2 tuần	4 tuần
Chất tẩy rửa E	100	100	82	69	99	96	49	30
Chất tẩy rửa E	96	96	66	36	89	82	10	0

Theo các điều kiện thử nghiệm, rõ ràng rằng amylaza SEQ ID NO: 1 với các phần tử thế G46A + T47I + G105A + I199F (đó là amylaza SEQ ID NO: 2) ổn định đáng kể hơn Termamyl Ultra™ và Stainzyme™ trong tất cả các mẫu chất tẩy rửa.

Ví dụ 3: sự ổn định lưu trữ trong chất tẩy rửa dạng lỏng.

Các amylaza được thử nghiệm đã được thêm vào chất tẩy rửa để đạt nồng độ protein cuối cùng là 0084 mg EP/g. 5g các mẫu chất tẩy rửa với amylaza trong vắn đề đã được đổ trong lọ thủy tinh kín trong 1 tuần ở 40°C hoặc 2 tuần ở 37°C. Hoạt động amylaza đã được đo theo thử nghiệm amylaza PNP-G7 được mô tả ở trên. Hoạt động còn lại của amylaza đã được tính toán bằng cách so sánh với mẫu tham khảo được lưu trữ trong 1 và 2 tuần ở -18°C.

Bảng 5

1 tuần ở 40°C	SEQ NO1: G46A+T47I+G105A+I199F	SEQ NO1:	Termamyl
Mô hình 1	96%	100%	30%
Mô hình 2	94%	84%	16%

Bảng 6

2 tuần ở 37°C	SEQ NO1: G46A+T47I+G105A+I199F	SEQ NO1:	Termamyl
Mô hình 1	93%	95%	38%
Mô hình 2	93%	85%	18%

{Từ ví dụ này, rõ ràng là amylaza của SEQ ID NO: 1 có độ ổn định lưu trữ tốt trong mô hình 1, nhưng hoạt động giảm đáng kể trong mô hình chất tẩy rửa 2; sau khi đã lưu trữ một tuần ở 40°C. Rõ ràng là amylaza SEQ ID NO: 1 có các phân tử thể của G46A + T47I + G105A + I199F có độ ổn định cao trong cả hai mô hình chất tẩy rửa 1 và 2. Do đó, amylaza này của SEQ ID NO: 1 có các phân tử thể của

G46A + T47I + G105A + I199F là ổn định trong mô hình 2, trong đó chứa nồng độ cao hơn của chất càngh hóa so với mô hình 1. Termamyl là không ổn định trong hai mô hình chất tẩy rửa.

Ví dụ 4: hiệu suất rửa amylaza còn lại sau khi lưu trữ trong chất tẩy rửa.

Điều chế mẫu enzym chất tẩy rửa

Mẫu enzym chất tẩy rửa chứa 0,084 mg protein enzym amylaza/g chất tẩy rửa, ví dụ, mô hình chất tẩy rửa 1 hoặc 2, đã được đổ vào lọ thủy tinh, và các lọ thủy tinh sau đó được đóng lại. Các mẫu enzym chất tẩy rửa được ủ trong 1 tuần ở 40°C hoặc hoặc 2 tuần ở 37°C và bộ giống hết nhau của các mẫu đã được đông lạnh để biểu thị các mẫu mới. Sau khi lưu trữ hiệu suất rửa sau đó đã được xác định trong Terg-O-Tometer của cả hai mẫu đông lạnh và ủ. Amylaza đã được thử nghiệm là Termamyl (Novozymes A/S; Krogshoejvej 36; 2880 bagsvaerd; Đan Mạch), amylaza của SEQ ID NO: 1, và amylaza của SEQ ID NO: 1 với các phần tử thế sau G46A + T47I + G105A + I199F.

Thử nghiệm hiệu suất rửa trong Terg-O-Tometer

Sau khi lưu trữ hiệu suất rửa của Termamyl, amylaza của SEQ ID NO: 1, và amylaza của SEQ ID NO: 1 với các phần tử thế sau G46A + T47I + G105A + I199F được đánh giá trong Terg-O-Tometer dưới điều kiện thử nghiệm được mô tả dưới đây:

Bảng 7

Nồng độ tẩy rửa trong sốt quá trình rửa	3,3 g/L
---	---------

Nhiệt độ rửa	40°C
Thời gian rửa	20 phút
Độ cứng của nước của dung dịch rửa	15°dH (tỷ lệ Ca/Mg 4:1 với 40 mM NaHCO ₃ Mg)
Dao động trên phút	120
Độ pH	như thực trạng
Nồng độ enzym trong dung dịch thử nghiệm	0; 0,028 mg EP/L
Thể tích dung dịch thử nghiệm	500 mL
Dệt trên cốc	4 bông với vải tinh bột gạo (CS-28, 5 * 5 cm) và 10 g bông Ballast (WFK 80A, 5 * 5 cm)

Để có được 3,3g chất tẩy rửa cuối cùng trên dung dịch rửa L, 1,485 g chất tẩy rửa (ví dụ, mô hình 1 hoặc mô hình 2) được thêm vào 500 ml dung dịch rửa với độ cứng của nước là 15°dH, sau đó 0,165 g mẫu amylaza \ chất tẩy rửa được kiểm tra cho hiệu suất rửa đã được bổ sung. Lượng chất tẩy rửa hiện tại là 3,3 g chất tẩy rửa trên dung dịch rửa L, và lượng amylaza 0,028 mg protein enzym trên dung dịch rửa L.

10 g đá balat được cắt với 5x5 cm WFK80A (wfk Testgewebe GmbH, Christenfeld 10; D-41. 379 Bruggen-Bracht; Đức) đã được thêm vào cùng với bốn mẫu vải với 5x5 cm CS-28 (Center For Testmaterials BV, P. O. Box 120, 3133 KT, Vlaardingen, Hà Lan) vào dung dịch rửa để bắt đầu rửa. Sau khi rửa 20 phút ở 40 C, việc rửa đã được ngừng lại và các mẫu vải CS-28 ngay lập tức được rửa sạch trong 5 phút trong nước vôi lạnh. Sau khi làm khô giá trị giảm của các mẫu vải CS-

28 được đo bằng quang phổ khối giảm Macbeth Color Eye 7000. Hiệu suất rửa (ΔRem) sau khi ủ được thu thập và sử dụng để tính toán hiệu suất rửa cần thể hiện như là tỷ lệ giữa hiệu suất rửa của Termamyl, amylaza của SEQ ID NO: 1, và amylaza của SEQ ID NO: 1 với các phần tử thể sau G46A + T47I + G105A + I199F. Hiệu suất rửa (ΔRem) sau khi ủ của amylaza của SEQ ID NO: 1 được thiết lập đến 100% (bảng 2. 1 & 2. 2). Ngoài việc hiệu suất rửa cần của amylaza cá nhân đã được tính toán bằng cách chia hiệu suất rửa trung bình (ΔRem) của các mẫu được lưu trữ với hiệu suất rửa trung bình (ΔRem) của mẫu đông lạnh giống hệt nhau (Bảng 8 & 9).

Bảng 8: Tỷ lệ hiệu suất rửa phần cần sau khi lưu trữ 1 tuần ở 40°C của Termamyl, amylaza của SEQ ID NO: 1, và amylaza của SEQ ID NO: 1 với các phần tử thể sau G46A + T47I + G105A + I199F. Với hiệu suất rửa phần cần của amylaza của SEQ ID NO: 1 được thiết lập đến 100% trong mỗi chất tẩy rửa.

Bảng 8

1 tuần ở 40°C	Mô hình chất tẩy rửa 1	Mô hình chất tẩy rửa 2
Termamyl	24%	20%
Amylaza trong SEQ ID NO: 1	100%	100%
Amylaza trong SEQ ID NO: 1 với G46A + T47I + G105A + I199F	83%	119%

Từ các kết quả này, rõ ràng là hiệu suất rửa cần của amylaza SEQ ID NO: 1 với các phần tử thể sau G46A + T47I + G105A + I199F rửa tốt hơn sau khi lưu trữ 1 tuần so với amylaza SEQ ID NO: 1 khi sử dụng mô hình chất tẩy rửa 2. Khi sử dụng mô hình chất tẩy rửa 1, amylaza của SEQ ID NO: 1 có hiệu suất rửa cần cao

nhất sau khi lưu trữ. Sự khác biệt này được cho là do nồng độ cao của chất cặn hóa trong mô hình 2 so với mô hình 1. Do đó, amylaza của SEQ ID NO: 1 với các phần tử thế sau G46A + T47I + G105A + I199F có hiệu suất rửa tốt sau khi lưu trữ trong chất tẩy rửa chứa một lượng lớn các chất cặn hóa.

Bảng 9: Tỷ lệ hiệu suất rửa phần cặn sau 2 tuần lưu trữ ở 37°C của Termamyl, amylaza của SEQ ID NO: 1, và amylaza của SEQ ID NO: 1 với các phần tử thế sau G46A + T47I + G105A + I199F. Với hiệu suất rửa phần cặn của amylaza SEQ ID NO: 1 được thiết lập đến 100%.

Bảng 9

2 tuần ở 37°C	Mô hình chất tẩy rửa 1	Mô hình chất tẩy rửa 2
Termamyl	34%	3%
Amylaza trong SEQ ID NO: 1	100%	100%
Amylaza trong SEQ ID NO: 1 với G46A + T47I + G105A + I199F	103%	138%

Các kết quả sau khi lưu trữ 2 tuần ở 37°C xác nhận các kết quả sau khi lưu trữ 1 tuần.

Bảng 10: Hiệu suất rửa cặn cá nhân sau khi bảo quản 1 tuần ở 40°C của Termamyl, amylaza của SEQ ID NO: 1, và amylaza của SEQ ID NO: 1 với các phần tử thế sau G46A + T47I + G105A + I199F.

Bảng 10

1 tuần ở 40°C	Mô hình chất tẩy rửa	Mô hình chất tẩy
---------------	----------------------	------------------

	1	rửa 2
Termamyl	47%	34%
Amylaza trong SEQ ID NO: 1	96%	71%
Amylaza trong SEQ ID NO: 1 với G46A + T47I + G105A + I199F	107%	108%

Các kết quả này thể hiện hiệu suất rửa của amylaza trong hai chất tẩy rửa so với các mẫu đông lạnh của amylaza. Do đó, các mẫu đông lạnh được thiết lập đến 100%. Từ đó có thể thấy rằng amylaza của SEQ ID NO: 1 giảm hiệu suất rửa trong mô hình 2 trong khi đây không phải là trường hợp đối với amylaza của SEQ ID NO: 1 với các phân tử thể G46A + T47I + G105A + I199F.

Bảng 11: Hiệu suất rửa cận cá nhân sau khi bảo quản 2 tuần ở 37°C của Termamyl, amylaza của SEQ ID NO: 1, và amylaza của SEQ ID NO: 1 với các phân tử thể sau G46A + T47I + G105A + I199F.

Bảng 11

2 tuần ở 37°C	Mô hình chất tẩy rửa 1	Mô hình chất tẩy rửa 2
Termamyl	67%	5%
Amylaza trong SEQ ID NO: 1	75%	61%
Amylaza trong SEQ ID NO: 1	90%	102%

với G46A + T47I + G105A + I199F		
---------------------------------	--	--

Theo các điều kiện thử nghiệm, rõ ràng là amylaza của SEQ ID NO: 1 là ổn định hơn Termamyl, và phần tử thể (G46A + T47I + G105A + I199F) cung cấp cho amylaza của SEQ ID NO: 1 được cải thiện sự ổn định và cải thiện hiệu suất rửa trong mô hình chất tẩy rửa 2.

Ví dụ 5: Đặc tính của chất càn hóa

Ví dụ 5a - Đo các ion canxi tự do.

Tác nhân càn hóa (chất càn hóa) có thể được xếp hạng bởi khả năng của chúng để làm giảm nồng độ của các ion canxi tự do (Ca^{2+}) từ 2,0 mM đến 0,10 mM ở độ pH bằng 8 được phát triển từ phương pháp được mô tả bởi MKNagarajan et al. , JAOCS, Vol. 61, no. 9 (September 1984), pp. 1475-1478. Thử nghiệm được mô tả ở trên trong "Chất và phương pháp" để đo của các ion canxi tự do được sử dụng. Theo đó, nồng độ của chất càn hóa cần thiết để làm giảm độ cứng của nước từ 2,0 mM đến 0,10 mM được xác định như được đã mô tả ở trên. Thử nghiệm được tiến hành với chất đệm có độ pH bằng 8 ở 21°C. Nồng độ cuối cùng của chất càn hóa được dùng và nồng độ Ca^{2+} tự do được đo được thể hiện trong bảng 3. 1 dưới đây.

Bảng 12. 1: Nồng độ Ca^{2+} tự do được xác định trong hỗn hợp chứa 2,0 mM Ca^{2+} và lượng khác nhau của tác nhân càn hóa ở độ pH bằng 8.

Dung dịch nguyên liệu	Dung dịch điện phân	Chất đệm độ pH mL	Chất càn hóa mL	Nồng độ cuối cùng
--------------------------	------------------------	----------------------	--------------------	----------------------

canxi mL	mL			chất còng hóa nM
4	1	45,0	0,0	0,00
4	1	44,0	1,0	0,30
4	1	43,0	2,0	0,60
4	1	41,0	4,0	1,20
4	1	39,0	6,0	1,80
4	1	38,5	6,5	1,95
4	1	38,0	7,0	2,10
4	1	37,5	7,5	2,25
4	1	37,0	8,0	2,40
4	1	36,5	8,5	2,55
4	1	36,0	9,0	2,70
4	1	35,5	9,5	2,85
4	1	35,0	10,0	3,00
4	1	32,5	12,5	3,75
4	1	30,0	15,0	4,50
4	1	25,0	20,0	6,00
4	1	20,0	25,0	7,50
4	1	15,0	30,0	9,00
4	1	10,0	35,0	10,50

Từ các dữ liệu này, nồng độ của chất còng hóa cần thiết để giảm Ca^{2+} tự do
 Nồng độ từ 2,0 mM xuống dưới 0,10 mM được xác định bằng phép nội suy.
 Một số chất còng hóa được đặc trưng bởi cách sử dụng thử nghiệm này, và nồng độ
 chất còng hóa cần thiết để làm giảm nồng độ của các ion canxi tự do từ 2,0 mM

đến 0,10 mM ở độ pH bằng 8,0 trong 49 mM chất đệm Epps và 80 mM KCl được thể hiện trong Bảng 12. 2. Do đó, bảng này cũng có thể được sử dụng để so sánh khả năng của chất càngh hóa cho việc giảm nồng độ của các ion canxi tự do. Bảng 12. 2

	mM	Tương đối với xitrat
xitrat	8,36	1,00
EGTA	2,60	0,33
EDTA	1,90	0,21
HEDP	1,60	0,20
DTPA	1,87	0,24
DTMPA	1,17	0,25
MGDA	2,56	0,33

Ví dụ 5b - Xác định log K

Ngoài ra, các chất càngh hóa có thể được đặc trưng bởi hằng số liên kết của các tác nhân càngh hóa (chất càngh hóa) và các ion canxi. Hằng số này có thể được xác định bởi ITC (đẳng nhiệt chuẩn độ nhiệt lượng) như được mô tả bởi AD Nielsen, CC Fuglsang and P Westh, *Analytical Biochemistry* Vol. 314 (2003) page 227-234 and T Wiseman, S Williston, JF Brandts and L-N Lin, *Analytical Biochemistry* Vol. 179 (1989) page 131-137. Quy trình để xác định log K được mô tả chi tiết ở trên trong phần "Chất và phương pháp". Sử dụng phương pháp này để xác định log K, các giá trị log K sau cho một số chất càngh hóa đã được xác định ở độ pH bằng 10 (Bảng 12. 3).

Bảng 12. 3

	Log K	Log K tương đối với log K đối với xitrat
xitrat	3	1,00
EGTA	9	3,0
EDTA	8	2,7
HEDP	6	2,0
DTPA	7	2,7
MGDA	2,56	0,33

Yêu cầu bảo hộ

1. Chế phẩm tẩy rửa dạng lỏng chứa:

- a) ít nhất 5% trọng lượng nước,
- b) ít nhất 3% trọng lượng hệ chất hoạt động bề mặt chứa từ 10 đến 100% trọng lượng của hệ chất hoạt động bề mặt là chất hoạt động bề mặt anion,
- c) alpha-amylaza có ít nhất 95% trình tự tương đồng với SEQ ID NO: 1 và alpha-amylaza này chứa các phân tử thế G46A + T47I + G105A + I199F khi sử dụng trong SEQ ID NO:1 để đánh số;

trong đó chất tẩy rửa bao gồm thêm một chất càn hóa; và trong đó chất càn hóa là HEDP hoặc một chất càn hóa khác có khả năng càn hóa bằng hoặc cao hơn so với HEDP dưới điều kiện đồng nhất, trong đó HEDP hoặc một chất càn hóa khác có mặt với nồng độ ít nhất 0,25% trọng lượng.

2. Chất tẩy rửa dạng lỏng theo điểm 1, trong đó hệ chất hoạt động bề mặt chứa từ 0 đến 85% trọng lượng của hệ chất hoạt động bề mặt alkylbenzen sulphonat mạch thẳng (LAS).

3. Chất tẩy rửa dạng lỏng theo điểm 2, trong đó hệ chất hoạt động bề mặt chứa từ 10 đến 75% trọng lượng của hệ chất hoạt động bề mặt alkylbenzen sulphonat mạch thẳng (LAS).

4. Chất tẩy rửa dạng lỏng theo điểm 1, trong đó hệ chất hoạt động bề mặt chứa từ 0 đến 90% trọng lượng của hệ chất hoạt động bề mặt rượu etesulfat, tốt hơn là natri lauryl eter sulfat (SLES).

5. Chất tẩy rửa dạng lỏng theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chất này còn chứa từ 0 đến 60% trọng lượng của hệ chất hoạt động bề mặt chất hoạt động bề mặt không ion.

6. Chất tẩy rửa dạng lỏng theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chất này chứa từ 5 đến 75% trọng lượng của hệ chất hoạt động bề mặt alkylbenzen sulphonat mạch thẳng (LAS), từ 5 đến 90% trọng lượng của hệ chất hoạt động bề mặt natri lauryl ete sulfat (SLES) và từ 5 đến 60% trọng lượng của hệ chất hoạt động bề mặt chất hoạt động bề mặt không ion.

7. Chất tẩy rửa dạng lỏng theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó alpha-amylaza có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 với các phân tử thế sau đây: G46A + T47I + G105A + I199F.

8. Chất tẩy rửa dạng lỏng theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chất này có độ pH ít nhất bằng 8.

9. Quy trình giặt vải bao gồm việc giặt vải với chế phẩm tẩy rửa dạng lỏng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, tốt hơn là ở nhiệt độ 40°C hoặc thấp hơn, hoặc tốt hơn nữa là ở nhiệt độ 30°C hoặc thấp hơn hoặc thậm chí tốt hơn nữa là ở nhiệt độ 20°C hoặc thấp hơn.

Hình 1

Sơ đồ độ pH ở 40°C và 0,1mM Canxi
(giảm thử nghiệm đường với tinh bột gạo)

