



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

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

(11)



1-0044570

(51)^{2020.01} C11D 3/386; C11D 11/00

(13) B

(21) 1-2021-02892

(22) 30/10/2019

(86) PCT/EP2019/079657 30/10/2019

(87) WO2020/104158 A1 28/05/2020

(30) 18207288.4 20/11/2018 EP

(45) 25/04/2025 445

(43) 25/11/2021 404A

(71) Unilever Global IP Limited (GB)

Port Sunlight, Wirral, Merseyside CH62 4ZD, United Kingdom

(72) BENNINGHOFF Jens Carlo (DE); DE ROSE Simone Antonio (IT); ISUPOV

Michail (GB); LANG Dietmar Andreas (DE); LITTLECHILD-BOND Jennifer Ann

(GB); SMITH Sarah Rebecca (GB); THOMPSON Mark Lawrence (GB).

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

(54) CHẾ PHẨM TÂY RỬA VÀ PHƯƠNG PHÁP XỬ LÝ NỀN VẢI CÓ VẾT BẨN BÃ NHỒN

(21) 1-2021-02892

(57) Sáng chế đề xuất chế phẩm tẩy rửa chứa: (i) chất hoạt động bề mặt với hàm lượng từ 1% đến 60% trọng lượng; và, (ii) enzym sterol esteraza với hàm lượng từ 0,0005% đến 5% trọng lượng; phương pháp xử lý nền vải có vết bẩn bã nhờn, phương pháp này bao gồm việc đưa enzym sterol esteraza có trình tự tương đồng với trình tự SEQ ID NO: 1 ưu tiên là 60%, ưu tiên hơn là ít nhất 70%, ưu tiên hơn nữa là ít nhất 75%, ưu tiên hơn nữa là ít nhất 80%, ưu tiên hơn nữa là ít nhất 85%, thậm chí ưu tiên hơn nữa là ít nhất 90%, thậm chí ưu tiên hơn nữa là ít nhất 95%, ưu tiên hơn cả là ít nhất 97%, ít nhất 98% hoặc thậm chí ít nhất là 99%, tốt nhất là 100%, vào chế phẩm tẩy rửa dạng lỏng chứa chất hoạt động bề mặt với lượng từ 1 đến 60% trọng lượng; và xử lý tiếp theo đối với nền vải có vết bẩn nhờn, với chế phẩm đã nêu.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm tẩy rửa, cụ thể hơn là chế phẩm tẩy giặt, chế phẩm này chứa một enzym sterol esteraza mới.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bã nhờn, loại vết bẩn dạng dầu, vẫn là loại vết bẩn khó tẩy sạch khỏi quần áo đã sòn cũ. Với mục tiêu khuyến khích người tiêu dùng giặt ở nhiệt độ thấp hơn, việc đáp ứng đòi hỏi loại bỏ bã nhờn hiệu quả vẫn luôn là một thách thức. Bã nhờn chứa một số chất béo và este bao gồm este sáp, este cholesterol, squalene và nhiều rượu/axit béo tự do. Bã nhờn có dạng lỏng ở nhiệt độ cơ thể, nhưng có dạng rắn ở nhiệt độ môi trường xung quanh.

Những đặc tính này đặc biệt quan trọng đối với việc loại bỏ vết bẩn bám ở cổ áo/cổ tay áo vì dễ loại bỏ dầu cơ thể dạng lỏng hơn dạng rắn khỏi quần áo. Các enzym tẩy giặt hiện tại không thể làm suy rã tất cả các thành phần của bã nhờn, khiến việc loại bỏ khỏi quần áo trở nên khó khăn.

Vấn đề với việc loại bỏ bã nhờn là các chất tẩy rửa chứa các enzym thương mại hiện tại không loại bỏ được bã nhờn một cách thoả đáng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng việc kết hợp một enzym sterol esteraza mới trong các chế phẩm giặt tẩy giúp cải thiện việc loại bỏ bã nhờn khỏi vải.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm tẩy rửa dạng lỏng gồm có:

(i) chất hoạt động bề mặt với lượng từ 1 đến 60% trọng lượng, tốt hơn là từ 2 đến 50% trọng lượng, tốt hơn nữa là từ 3 đến 45% trọng lượng, thậm chí tốt hơn nữa là từ 5 đến 40% trọng lượng, tốt nhất là từ 6 đến 40% trọng lượng; và,

(ii) enzym sterol esteraza với lượng từ 0,0005 đến 5% trọng lượng, tốt hơn là từ 0,005 đến 2,5% trọng lượng, tốt hơn nữa là từ 0,01 đến 1% trọng lượng,

trong đó enzym sterol esteraza có trình tự tương đồng với trình tự bất kỳ trong các trình tự SEQ ID NO: 1 hoặc 2 ít nhất là 60%, tốt hơn là ít nhất 70%, tốt hơn nữa là ít nhất 75%, tốt hơn nữa là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 85%.

Tốt hơn là enzym sterol esteraza có trình tự tương đồng với trình tự bất kỳ trong các trình tự SEQ ID NO: 1 hoặc 2 ít nhất là 90%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 95%, tốt nhất là ít nhất 97%, ít nhất 98% hoặc thậm chí ít nhất 99%.

Tốt nhất là enzym sterol esteraza có trình tự tương đồng với trình tự bất kỳ trong các trình tự SEQ ID NO: 1 hoặc 2 là 100%.

Tốt hơn là chế phẩm tẩy rửa chứa polyme tách loại vết bẩn với lượng từ 0,1 đến 10% trọng lượng, tốt hơn là từ 0,2 đến 9% trọng lượng, tốt hơn nữa là từ 0,25 đến 8, thậm chí tốt hơn nữa là từ 0,5 đến 6% trọng lượng, tốt nhất là từ 1 đến 5% trọng lượng, tốt hơn là polyme tách loại vết bẩn gốc polyeste.

Tốt hơn là polyme tách loại vết bẩn gốc polyeste là polyme tách loại vết bẩn gốc polyetylen và/hoặc polypropylen terephthalat, tốt hơn là polyme tách loại vết bẩn gốc polypropylen terephthalat.

Tốt hơn là chế phẩm tẩy rửa chứa polyamin được alkoxyl hóa, tốt hơn là ở mức từ 0,1 đến 8% trọng lượng, tốt hơn nữa là từ 0,2 đến 6% trọng lượng, tốt nhất là từ 0,5 đến 5% trọng lượng.

Tốt hơn là chế phẩm tẩy rửa là chế phẩm tẩy giặt.

Tốt hơn là chất hoạt động bề mặt trong chế phẩm tẩy rửa bao gồm chất hoạt động bề mặt anion và/hoặc không ion, trong một trường hợp bao gồm cả chất hoạt động bề mặt anion và không ion.

Chế phẩm giặt tẩy được ưu tiên, đặc biệt là chế phẩm tẩy giặt còn bao gồm thêm một loại enzym được chọn từ nhóm bao gồm: lipaza, proteaza, xenlulaza, alpha-amylaza, peroxidaza/oxidaza, pectat lyaza và/hoặc mannaza.

Các chế phẩm tẩy giặt được ưu tiên, đặc biệt là các chế phẩm tẩy giặt còn bao gồm một thành phần khác được chọn từ chất huỳnh quang, hương liệu, thuốc nhuộm tạo bóng và polyme, và hỗn hợp của chúng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp xử lý nền vải có vết bẩn nhờn, phương pháp này bao gồm việc kết hợp enzym sterol esteraza có trình tự tương đồng với trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 1 đến 2 ít nhất là 60%, tốt hơn là ít nhất 70%, tốt hơn nữa là ít nhất 75%, tốt hơn nữa là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 85%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 90%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 95%, tốt nhất là ít nhất 97%, ít nhất 98% hoặc thậm chí ít nhất là 99%, tốt nhất là 100%, vào chế phẩm tẩy rửa chứa chất hoạt động bề mặt với lượng từ 1 đến 60% trọng lượng; và xử lý tiếp theo đối với nền vải có vết bẩn nhờn, với chế phẩm đã nêu.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng enzym sterol esteraza để cải thiện việc làm sạch vết bẩn nhờn trên vải, trong đó enzym sterol esteraza có trình tự tương đồng với trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 1 đến 2 ít nhất 60%, tốt hơn là ít nhất 70%, tốt hơn nữa là ít nhất 75%, tốt hơn nữa là ở ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 85%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 90%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 95%, tốt nhất là ít nhất 97%, ít nhất 98% hoặc thậm chí ít nhất là 99%, tốt nhất là 100%.

Mô tả chi tiết sáng chế

Mạo từ không xác định số ít và mạo từ xác định tương ứng như được sử dụng trong tài liệu này có nghĩa là ít nhất một, hoặc một hoặc nhiều hơn, trừ khi có chỉ định khác.

Tất cả các lượng % của các thành phần trong các chế phẩm (công thức) được liệt kê ở đây tính theo % trọng lượng dựa trên tổng chế phẩm trừ khi có chỉ định khác.

Được hiểu rằng mọi tham chiếu đến thành phần được ưu tiên của chế phẩm tẩy rửa được coi là đối tượng có thể kết hợp với bất kỳ thành phần được ưu tiên nào khác của chế phẩm tẩy rửa được bộc lộ trong tài liệu này.

Chế phẩm tẩy rửa là chất lỏng.

Chế phẩm tẩy rửa có thể được áp dụng cho bất kỳ bề mặt thích hợp nào. Chất nền được ưu tiên đặc biệt là hàng dệt. Các chế phẩm giặt tẩy được ưu tiên đặc biệt là các chế phẩm tẩy giặt.

Thông tin trình tự

Trình tự được bộc lộ ở đây là SEQ ID NO. 1 hoặc 2.

SEQ ID 1 là một trình tự bị cắt ngắn bắt nguồn từ SEQ ID NO. 2 từ *Corynebacterium*

Trình tự là:

MNLALSGTFFNVNIRHLEGDGFSLFVDSDDKKGEEDVPTARLKMEHAV
ASDLCLYVTTDLPAVGESTLALKAKGDNSVEATGLLVGASNIEGSLVMQDA
NVGIDASQLSQSADPGTWGLYAKQVSLTADDVRATSLGAKTLSAKNVGVSV
ERGRGNVC

SEQ ID 2 là từ *Corynebacterium*

Trình tự là:

MGRINVPKAAVGLVAGFAAFGVAGVAVAQGGTLANLALSGTFFNVNI
RHLEGDGFSLFVDSDDKKGEEDVPTARLKMEHAVASDLCLYVTTDLPAVGES
TLALKAKGDNSVEATGLLVGASNIEGSLVMQDANVGIDASQLSQSADPGTW
GLYAKQVSLTADDVRATSLGAKTLSAKNVGVSVVERGRGNVC

Enzym sterol esteraza

Enzym sterol esteraza có trình tự tương đồng với bất kỳ một trong số SEQ ID NO: 1 hoặc 2 ít nhất là 60%.

Tốt hơn là enzym sterol esteraza có trình tự tương đồng với bất kỳ một trong số SEQ ID NO: 1 hoặc 2 ít nhất là 70%, tốt hơn nữa là ít nhất 75%, tốt hơn nữa là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 85%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 90%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 95%, tốt nhất là ít nhất 97%, ít nhất 98% hoặc thậm chí ít nhất 99%.

Tốt nhất là enzym sterol esteraza có trình tự tương đồng với trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 1 hoặc 2 là 100%.

Sterol esteraza có thể được mô tả là thuộc loại enzym EC 3.1.1.13.

Các esteraza sterol được ưu tiên là từ *Corynebacterium*

Chất hoạt động bề mặt

Chế phẩm tẩy rửa chứa chất hoạt động bề mặt (có thể chứa một chất hoạt động bề mặt đơn lẻ hoặc hỗn hợp của hai hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt). Chế phẩm chứa chất hoạt động bề mặt với lượng từ 1 đến 60% trọng lượng, tốt hơn là từ 2 đến 50% trọng lượng, tốt hơn nữa là từ 3 đến 45% trọng lượng, thậm chí tốt hơn nữa là từ 5 đến 40% trọng lượng, tốt nhất là từ 6 đến 40% trọng lượng.

Chế phẩm tẩy rửa (tốt hơn là chế phẩm tẩy giặt) bao gồm chất hoạt động bề mặt anion và/hoặc không ion, tốt hơn là chứa cả chất hoạt động bề mặt anion và không ion.

Các hợp chất tẩy rửa anion thích hợp có thể được sử dụng thường là các muối kim loại kiềm tan trong nước của sulfat hữu cơ và các muối sulfat có gốc alkyl chứa từ khoảng 8 đến khoảng 22 nguyên tử cacbon, thuật ngữ alkyl được sử dụng để bao gồm phần alkyl của các gốc alkyl cao hơn.

Ví dụ về các hợp chất tẩy rửa anion tổng hợp thích hợp là natri và kali alkyl sulfat, đặc biệt là các hợp chất thu được bằng cách sulfat hóa rượu C_8 đến C_{18} cao hơn, được sản xuất ví dụ từ mỡ động vật hoặc dầu dừa, natri và kali alkyl C_9 đến C_{20} benzen sulfat, đặc biệt là natri alkyl bậc hai C_{10} đến C_{15} benzen sulfonat; và natri alkyl glyxeryl ete sulfat, đặc biệt là các ete của rượu cao hơn có nguồn gốc từ mỡ động vật hoặc dầu dừa và rượu tổng hợp có nguồn gốc từ dầu hỏa.

Chất hoạt động bề mặt anion tốt hơn nên được chọn từ: alkyl benzen sulfonat mạch thẳng; alkyl sulfat; alkyl ete sulfat; xà phòng; alkyl (tốt hơn là metyl) este sulfonat, và hỗn hợp của chúng.

Các chất hoạt động bề mặt anion được ưu tiên nhất được lựa chọn từ: alkyl benzen sulfonat mạch thẳng; alkyl sulfat; alkyl ete sulfat và hỗn hợp của chúng. Tốt hơn là alkyl ete sulfat là n-alkyl ete sulfat C_{12} - C_{14} với trung bình từ 1 đến 3 đơn vị EO (etoxylat).

Natri lauryl ete sulfat được đặc biệt ưu tiên (SLES). Tốt hơn là alkyl benzen sulfonat mạch thẳng là natri C_{11} đến C_{15} alkyl benzen sulfonat. Tốt hơn là các alkyl sulfat là natri alkyl sulfat từ C_{12} đến C_{18} mạch thẳng hoặc mạch nhánh. Natri dodecyl sulfat được đặc biệt ưu tiên, (SDS, còn được gọi là alkyl sulfat bậc một).

Trong các chế phẩm dạng lỏng, tốt hơn là có hai hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt anion, ví dụ như alkyl benzen sulfonat mạch thẳng cùng với alkyl ete sulfat.

Trong các chế phẩm dạng lỏng, tốt hơn là chế phẩm tẩy giặt ngoài chất hoạt động bề mặt anion còn bao gồm chất hoạt động bề mặt không ion alkyl được extoyl hóa, tốt hơn là chất hoạt động bề mặt không ion alkyl được etoxyl hóa với lượng từ 2 đến 8% trọng lượng.

Các hợp chất tẩy rửa không ion thích hợp có thể được sử dụng bao gồm, cụ thể là các sản phẩm phản ứng của các hợp chất có nhóm kỵ nước béo và nguyên tử hydro phản ứng, ví dụ, rượu béo, axit hoặc amit, đặc biệt là oxit etylen, đơn lẻ hoặc với oxit propylen. Các hợp chất tẩy rửa không chứa ion được ưu tiên là sản phẩm ngưng tụ của rượu béo từ C₈ đến C₁₈ mạch thẳng hoặc mạch nhánh bậc một hoặc bậc hai với oxit etylen.

Tốt nhất là hợp chất tẩy rửa không ion là chất hoạt động bề mặt không ion alkyl được etoxyl hóa là rượu bậc một từ C₈ đến C₁₈ với etoxyl hóa trung bình từ 7 đến 9 đơn vị EO.

Tốt hơn là chất hoạt động bề mặt được sử dụng là chất bão hòa.

Polyme tách loại vết bẩn

Tốt hơn là polyme tách loại vết bẩn nên có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 10% trọng lượng. Lượng bao gồm polyme tách loại vết bẩn được ưu tiên tốt hơn là từ 0,2 đến 9% trọng lượng, tốt hơn nữa là từ 0,25 đến 8% trọng lượng, thậm chí tốt hơn nữa là từ 0,5 đến 6% trọng lượng, tốt nhất là từ 1 đến 5% trọng lượng.

Tốt hơn là polyme tách loại vết bẩn là polyme tách loại vết bẩn gốc polyeste. Tốt hơn nữa là polyme tách loại vết bẩn polyeste là polyme tách loại vết bẩn gốc polyetylen và/hoặc polypropylen terephthalat, tốt nhất là polyme tách loại vết bẩn gốc polypropylen terephthalat.

Các polyme tách loại vết bẩn gốc polyeste thích hợp được mô tả trong WO 2014/029479 và WO 2016/005338.

Polyamin được alkoxyl hóa

Chế phẩm tẩy rửa tốt hơn là chứa polyamin alkoxy hóa. Đặc biệt là khi chế phẩm tẩy rửa ở dạng chế phẩm tẩy giặt, thì chất polyamin alkoxy hóa được ưu tiên được bao gồm.

Lượng polyamin được alkoxy hóa được ưu tiên nằm trong khoảng từ 0,1 đến 8% trọng lượng, tốt hơn là từ 0,2 đến 6% trọng lượng, tốt hơn nữa là từ 0,5 đến 5% trọng lượng. Một mức được ưu tiên khác là từ 1 đến 4% trọng lượng.

Polyamin được alkoxy hóa có thể là mạch thẳng hoặc mạch nhánh. Nó có thể được phân nhánh ở mức độ mà nó là dendrime. Alkoxy hóa thường có thể là etoxy hóa hoặc propoxy hóa, hoặc hỗn hợp của cả hai. Trong trường hợp nguyên tử nitơ được alkoxy hóa, mức độ alkoxy hóa trung bình được ưu tiên là từ 10 đến 30, tốt hơn là từ 15 đến 25.

Chất liệu được ưu tiên là polyetylen đã được alkoxy hóa, tốt nhất là polyetylenimin được etoxy hóa, với mức độ etoxy hóa trung bình là từ 10 đến 30, tốt hơn là từ 15 đến 25, trong đó nguyên tử nitơ được etoxy hóa.

Enzym bổ sung

Các enzym bổ sung, ngoài lipaza được chỉ định có thể có trong chế phẩm tẩy rửa. Ưu tiên là các enzym bổ sung có trong chế phẩm tẩy giặt được ưu tiên.

Nếu có, thì lượng mỗi enzym trong chế phẩm tẩy giặt theo sáng chế là từ 0,0001% trọng lượng đến 0,1% trọng lượng.

Lượng enzym có trong chế phẩm tốt hơn là liên quan đến mức độ của enzym dưới dạng protein tinh khiết.

Các enzym khác được ưu tiên bao gồm những enzym trong nhóm bao gồm: lipaza, proteaza, xenlulaza, alpha-amylaza, peroxidaza/oxidaza, pectat lyaza và/hoặc mannaza. Các enzym bổ sung được ưu tiên nói trên bao gồm hỗn hợp của hai hoặc nhiều loại enzym này.

Tốt hơn là enzym khác được chọn từ: lipaza, proteaza, xenlulaza và/hoặc alpha-amylaza.

Lipaza thích hợp bao gồm những loại có nguồn gốc vi khuẩn hoặc nấm. Các đột biến biến đổi hóa học hoặc biến đổi protein được bao gồm. Ví dụ về lipaza hữu ích bao

gồm lipaza từ *Humicola* (từ đồng nghĩa *Thermomyces*), ví dụ: từ *H. lanuginosa* (*T. lanuginosus*) như được mô tả trong EP 258 068 và EP 305 216 hoặc từ *H. insolens* như được mô tả trong WO 96/13580, một 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 và cộng sự (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 và WO 97/07202, WO 00/60063.

Các enzym lipaza thương mại được ưu tiên bao gồm Lipolase™ và Lipolase Ultra™, Lipex™ và Lipoclean™ (Novozymes A/S).

Phương pháp theo sáng chế có thể được thực hiện khi có mặt của phospholipaza được phân loại là EC 3.1.1.4 và/hoặc EC 3.1.1.32. Như được sử dụng trong tài liệu này, thuật ngữ phospholipaza là một enzym có hoạt tính đối với phospholipit.

Phospholipit, chẳng hạn như lecithin hoặc phosphatidylcholin, bao gồm glycerol được este hóa với hai axit béo ở vị trí ngoài (sn-1) và giữa (sn-2) và được este hóa với axit phosphoric ở vị trí thứ ba; đến lượt nó, axit phosphoric có thể được este hóa thành rượu amin. Phospholipaza là các enzym tham gia vào quá trình thủy phân các phospholipit. Có thể phân biệt một số loại hoạt hóa của phospholipaza, bao gồm phospholipaza A1 và A2 thủy phân một nhóm axyl béo (ở vị trí sn-1 và sn-2, tương ứng) để tạo thành lysophospholipit; và lysophospholipaza (hoặc phospholipaza B) có thể thủy phân nhóm axyl béo còn lại trong lysophospholipit. Phospholipaza C và phospholipaza D (phosphodiesteraza) tách loại diaxyl glycerol hoặc axit phosphatidic tương ứng.

Enzym proteaza thủy phân các liên kết trong peptit và protein, trong bối cảnh tẩy giặt, điều này dẫn đến việc tăng cường loại bỏ vết bẩn chứa protein hoặc peptit. Ví

dự về các họ proteaza thích hợp bao gồm proteaza aspartic; proteaza xystein; proteaza glutamic; asparagin peptit lyaza; proteaza serin và proteaza threonin. Các họ proteaza như vậy được mô tả trong cơ sở dữ liệu peptidaza MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>). Proteaza serin được ưu tiên hơn. Proteaza serin loại subtilaza được ưu tiên hơn. Thuật ngữ "subtilaza" dùng để chỉ nhóm phụ của serin proteaza theo Siezen và cộng sự, Protein Engng. 4 (1991) 719-737 và Siezen và cộng sự, Protein Science 6 (1997) 501 -523. Proteaza serin là phân nhóm của proteaza có đặc điểm là có serin ở trung tâm hoạt động, tạo thành cộng hóa trị với chất nền. Các subtilaza có thể được chia thành 6 phân bộ, tức là họ Subtilisin, họ Thermitaza, họ Proteinaza K, họ Lantibiotic peptidaza, họ Kexin và họ Pyrolysin.

Ví dụ về subtilaza là những loại có nguồn gốc từ *Bacillus* như *Bacillus lentus*, *B. alkalophilus*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* và *Bacillus gibsonii* được mô tả trong; US7262042 và WO09/021867, và subtilisin lentus, subtilisin Novo, subtilisin Carlsberg, *Bacillus licheniformis*, subtilisin BPN', subtilisin 309, subtilisin 147 và subtilisin 168 được mô tả trong WO 89/06279 và proteaza PD138 được mô tả trong (WO 93/18140). Các proteaza hữu ích khác có thể được mô tả trong WO 92/175177, WO 01/016285, WO 02/026024 và WO 02/016547. Ví dụ về các proteaza giống trypsin là trypsin (ví dụ nguồn gốc từ lợn hoặc bò) và proteaza *Fusarium* được mô tả trong WO 89/06270, WO 94/25583 và WO 05/040372, và các proteaza chymotrypsin có nguồn gốc từ *Cellulomonas* được mô tả trong WO 05/052161 và WO 05/052146.

Tốt nhất là proteaza là subtilisins (EC 3.4.21.62).

Ví dụ về subtilaza là những loại có nguồn gốc từ *Bacillus* như *Bacillus lentus*, *B. alkalophilus*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* và *Bacillus gibsonii* được mô tả trong; US7262042 và WO09/021867 và subtilisin lentus, subtilisin Novo, subtilisin Carlsberg, *Bacillus licheniformis*, subtilisin BPN', subtilisin 309, subtilisin 147 và subtilisin 168 được mô tả trong WO89/06279 và proteaza PD138 được mô tả trong (WO93/18140). Tốt hơn là subtilisin có nguồn gốc từ *Bacillus*, tốt hơn là *Bacillus lentus*, *B. alkalophilus*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* và

Bacillus gibsonii như được mô tả trong US 6 312 936 B1, US 5 679 630, US 4 760 025, US 7 262 042 và WO 09/021867. Tốt nhất là subtilisin có nguồn gốc từ *Bacillus gibsonii* hoặc *Bacillus Lentus*.

Các enzym proteaza có bán trên thị trường thích hợp bao gồm các enzym được bán dưới tên thương mại Alcalase®, Blaze®; Duralase™, Durazym™, Relase®, Relase® Ultra, Savinase®, Savinase® Ultra, Primase®, Polarzyme®, Kannase®, Liquanase®, Liquanase® Ultra, Ovozime®, Coronase®, Coronase® Ultra, Neutrase®, Everlase® và Esperase® tất cả đều có thể được bán dưới dạng Ultra® hoặc Evity® (Novozymes A/S).

Chế phẩm có thể sử dụng cutinaza, được phân loại trong EC 3.1.1.74. Cutinaza được sử dụng theo sáng chế có thể có nguồn gốc bất kỳ. Tốt hơn là các cutinaza có nguồn gốc vi sinh vật, đặc biệt là vi khuẩn, nấm hoặc nấm men.

Các amylaza thích hợp (alpha và/hoặc beta) bao gồm các amylaza có nguồn gốc vi khuẩn hoặc nấm. Các đột biến biến tính hóa học hoặc biến tính protein được bao gồm. Amylaza bao gồm, ví dụ, alpha-amylaza thu được từ *Bacillus*, ví dụ: chủng *B. licheniformis* đặc biệt, được mô tả chi tiết hơn trong GB 1 296 839, hoặc các chủng *Bacillus sp.* được bộc lộ trong WO 95/026397 hoặc WO 00/060060. Các amylaza có sẵn trên thị trường là Duramyl™, Termamyl™, Termamyl Ultra™, Natalase™, Stainzyme™, Amplify™, Fungamyl™ và BAN™ (Novozymes A/S), Rapidase™ và Purastar™ (từ Genencor International Inc.).

Xenlulaza thích hợp bao gồm những chất có nguồn gốc vi khuẩn hoặc nấm. Các đột biến biến tính hóa học hoặc biến tính protein được bao gồm. Các xenlulaza thích hợp bao gồm xenlulaza từ các chi *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, ví dụ: xenlulaza nấm được tạo ra từ *Humicola insolens*, *Thielavia terrestris*, *Myceliophthora thermophila*, và *Fusarium oxysporum* được bộc lộ trong US 4 435 307, US 5 648 263, US 5 691 178, US 5 776 757, WO 89/09259, WO 96/029397, và WO 98/012307. Xenlulaza có sẵn trên thị trường bao gồm Celluzyme™, Carezyme™, Celluclean™, Endolase™, Renozyme™ (Novozymes

A/S), Clazinase™ và Puradax HA™ (Genencor International Inc.) và KAC-500(B)™ (Kao Corporation). Celluclean™ được ưu tiên.

Các peroxidaza/oxidaza thích hợp bao gồm các chất có nguồn gốc thực vật, vi khuẩn hoặc nấm. Các đột biến biến tính hóa học hoặc biến đổi protein được bao gồm. Ví dụ về peroxidaza hữu ích bao gồm peroxidaza từ *Coprinus*, ví dụ: từ *C. cinereus*, và các biến thể của chúng như được mô tả trong WO 93/24618, WO 95/10602 và WO 98/15257. Các peroxidaza có bán trên thị trường bao gồm Guardzyme™ và Novozym™ 51004 (Novozymes A/S).

Các enzym khác phù hợp để sử dụng được thảo luận trong WO 2009/087524, WO 2009/090576, WO 2009/107091, WO 2009/111258 và WO 2009/148983.

Tốt hơn là dung dịch nước được sử dụng trong phương pháp này có mặt enzym. Tốt hơn là enzym có trong dung dịch nước được sử dụng trong phương pháp ở nồng độ trong khoảng từ 0,01 đến 10ppm, tốt hơn là từ 0,05 đến 1ppm.

Chất ổn định Enzym

Bất kỳ enzym nào có trong chế phẩm đều có thể được ổn định bằng cách sử dụng các chất ổn định thông thường, ví dụ, polyol như propylen glycol hoặc glyxerol, đường hoặc rượu đường, axit lactic, axit boric, hoặc dẫn xuất axit boric, ví dụ, este borat thom, hoặc dẫn xuất axit phenyl boronic như axit boronic 4-formylphenyl, và chế phẩm có thể được tạo thành như được mô tả trong ví dụ WO 92/19709 và WO 92/19708.

Các chất liệu khác

Các chất liệu tùy chọn nhưng được ưu tiên hơn nữa có thể được bao gồm trong chế phẩm tẩy rửa (tốt hơn là chế phẩm giặt tẩy) bao gồm chất huỳnh quang, hương liệu, thuốc nhuộm bóng, polyme và chất tạo chelat.

Chất huỳnh quang

Chế phẩm tốt hơn là bao gồm chất huỳnh quang (chất tăng trắng quang học). Các chất huỳnh quang đã được biết đến nhiều và nhiều chất huỳnh quang như vậy được bán trên thị trường. Thông thường, các chất huỳnh quang này được cung cấp và sử dụng dưới dạng muối kim loại kiềm của chúng, ví dụ, muối natri.

Tổng lượng chất huỳnh quang hoặc các chất được sử dụng trong chế phẩm nói chung là từ 0,0001 đến 0,5% trọng lượng, tốt hơn là từ 0,005 đến 2% trọng lượng, tốt hơn nữa là từ 0,01 đến 0,1% trọng lượng.

Các loại chất huỳnh quang được ưu tiên là: Các hợp chất di-styryl biphenyl, ví dụ Tinopal (Nhãn hiệu) CBS-X, các hợp chất axit di-amin stilben di-sulfonic, ví dụ Tinopal DMS tinh khiết Xtra và Blankophor (Nhãn hiệu) HRH, và các hợp chất Pyrazolin, ví dụ Blankophor SN.

Chất huỳnh quang được ưu tiên là chất huỳnh quang có CAS-No 3426-43-5; CAS-No 35632-99-6; CAS-No 24565-13-7; CAS-No 12224-16-7; CAS-No 13863-31-5; CAS-No 4193-55-9; CAS-No 16090-02-1; CAS-No 133-66-4; CAS-No 68444-86-0; CAS-No 27344-41-8.

Các chất huỳnh quang được ưu tiên nhất là: natri 2 (4-styryl-3-sulfophenyl) -2H-naphthol[1,2-d]triazol, dinatri 4,4'-bis{[(4-anilino-6-(N methyl-N-2 hydroxyetyl) amino 1,3,5-triazin-2-yl)] amino}stilben-2-2'disulfonat, dinatri 4,4'-bis{[(4-anilino-6-morpholino-1,3,5-triazin-2-yl)]amino}stilben-2-2'disulfonat, và dinatri 4,4'-bis(2-sulfostyryl)biphenyl.

Dung dịch nước được sử dụng trong phương pháp này có mặt chất huỳnh quang. Chất huỳnh quang có trong dung dịch nước được sử dụng trong phương pháp này tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,0001g/l đến 0,1g/l, tốt hơn nữa là 0,001 đến 0,02 g/l.

Hương liệu

Chế phẩm tốt hơn là chứa hương liệu. Nhiều ví dụ phù hợp về hương liệu được cung cấp trong International Buyers Guide 1992 của CTFA (Hiệp hội mỹ phẩm, đồ vệ sinh và nước hoa), được xuất bản bởi CFTA Publications và OPD Chemicals Buyers Directory 1993 Phiên bản hàng năm thứ 80, được xuất bản bởi Schnell Publishing Co.

Tốt hơn là hương liệu bao gồm ít nhất một hương (hợp chất) từ: alpha-isometyl ionon, benzyl salixylat; xitronellol; coumarin; hexyl xinnamal; linalool; axit pentanoic, 2-metyl-, etyl este; octanal; benzyl axetat; 1,6-octadien-3-ol, 3,7-dimetyl-, 3-axetat; xiclohexanol, 2-(1,1-dimetyletyl) -, 1-axetat; delta-damascon; beta-ionon; verdyl axetat; dodecanal; aldehyt hexyl xinnamic; xiclopentadecanolit; axit benzenaxetic, 2-

phenyletyl este; amyl salixylat; beta-caryophyllen; etyl undexylenat; geranyl antranilat; alpha-iron; beta-phenyl etyl benzoat; alpa-santalol; xedrol; xedryl axetat; xedry format; xyclohexyl salixyat; gamma-dodecalacton; và, beta phenyletyl phenyl axetat.

Các thành phần hữu ích của hương liệu bao gồm các chất liệu có nguồn gốc tự nhiên và tổng hợp. Chúng bao gồm các hợp chất đơn và hỗn hợp. Các ví dụ cụ thể về các thành phần như vậy có thể được tìm thấy trong tài liệu hiện tại, ví dụ, trong Handbook of Flavour Ingredients của Fenaroli, 1975, CRC Press; Synthetic Food Adjuncts, 1947 của M. B. Jacobs, do Van Nostrand biên tập; hoặc Perfume and Flavour Chemicals của S. Arctander 1969, Montclair, N.J. (Hoa Kỳ).

Việc có nhiều thành phần hương liệu trong một chế phẩm là điều bình thường. Trong các chế phẩm của sáng chế, dự kiến rằng sẽ có bốn hoặc nhiều hơn, tốt hơn là năm hoặc nhiều hơn, tốt hơn nữa là sáu hoặc nhiều hơn hoặc thậm chí bảy hoặc nhiều thành phần hương liệu khác nhau.

Trong hỗn hợp hương liệu, tốt hơn là từ 15 đến 25% trọng lượng là hương đầu. Hương đầu được xác định bởi Poucher (Tập chí của Hiệp hội các nhà hóa mỹ phẩm 6 (2):80 [1955]). Tầng hương đầu được ưu tiên lựa chọn từ dầu cam quýt, linalool, linalyl axetat, hoa oải hương, dihydromyrcenol, oxit hoa hồng và cis-3-hexanol.

Hiệp hội Hương thơm Quốc tế đã công bố danh sách các thành phần hương thơm (hương liệu) vào năm 2011. (<http://www.ifraorg.org/en-us/ingredient#.U7Z4hPldWzk>)

Viện nghiên cứu về nguyên liệu tạo mùi thơm cung cấp cơ sở dữ liệu về hương liệu (hương thơm) với thông tin an toàn.

Tầng hương đầu của hương liệu có thể được sử dụng để thể hiện lợi ích về độ trắng và độ sáng của sáng chế.

Một số hoặc tất cả hương liệu có thể được bao nang, các thành phần hương liệu điển hình có lợi khi bao nang, bao gồm các thành phần có nhiệt độ sôi tương đối thấp, tốt hơn là các thành phần có nhiệt độ sôi nhỏ hơn 300, tốt hơn là 100-250 độ C. Cũng có lợi khi bao nang các thành phần hương liệu có CLog P thấp (tức là những thành

phần sẽ có xu hướng phân tách thành nước nhiều hơn), tốt hơn là với CLog P nhỏ hơn 3.0. Những chất liệu này, có nhiệt độ sôi tương đối thấp và CLog P tương đối thấp được gọi là thành phần hương liệu " khuếch tán chậm " và bao gồm một hoặc nhiều nguyên liệu sau: allyl caproat, amyl axetat, amyl propionat, aldehyt anisic, anisole, benzaldehyt, benzyl axetat, benzyl axeton, rượu benzyl, benzyl format, benzyl iso valerat, benzyl propionat, beta gamma hexenol, gồm camphor, laevo-carvone, d-carvone, rượu xinnamic, xinamyl format, cis-jasmone, cis-3-hexenyl axetat, rượu cuminic, cyclal c, dimetyl benzyl carbinol, dimetyl benzyl carbinol axetat, etyl axetat, etyl axeto axetat, etyl amyl xeton, etyl benzoat, etyl butyrat, etyl hexyl xeton, etyl phenyl axetat, eucalyptol, eugenol, fenchyl axetat (flo axetat) tricyclo Decenyl axetat), fruten (tricyclo Decenyl propionat), geraniol, hexenol, hexenyl axetat, hexyl axetat, hexyl format, rượu hydratropic, hydroxycitronellal, indone, rượu isoamyl, iso menthone, isopulegyl axetat, isoquinolon, ligustral, linalool, linalool oxit, linalyl format, menthone, mentyl axetphenol, metyl amyl xeton, metyl anthranilat, metyl benzoat, metyl benyl axetat, metyl eugenol, metyl heptenon, metyl heptin cacbonat, metyl heptyl xeton, metyl hexyl , metyl phenyl carbiny axetat, metyl salicylat, metyl-n-metyl anthranilat, nerol, octalacton, rượu octyl, p-cresol, p-cresol metyl ete, p-metoxi axetophenon, p-metyl axetophenon, phenoxy etanol, phenyl axetaldehyt, phenyl etyl axetat, rượu etylic phenyl, phenyl etyl dimetyl carbinol, prenyl axetat, propyl bornat, pulegon, oxit hoa hồng, safrole, 4-terpinenol, alpha-terpinenol và/hoặc viridin. Việc có nhiều thành phần hương liệu trong một công thức là điều bình thường. Trong các chế phẩm của sáng chế, dự kiến rằng sẽ có bốn hoặc nhiều hơn, tốt hơn là năm hoặc nhiều hơn, tốt hơn nữa là sáu hoặc nhiều hơn hoặc thậm chí bảy hoặc nhiều thành phần hương liệu khác nhau từ danh sách các chất hương liệu khuếch tán chậm được nêu ở trên có mặt trong hương liệu.

Một nhóm hương liệu khác mà sáng chế có thể được cấp phối cùng là các chất liệu được gọi là 'liệu pháp hương thơm'. Chúng bao gồm nhiều thành phần cũng được sử dụng trong hương liệu, bao gồm các thành phần tinh dầu như Clary Sage, Bạch Đàn,

Phong Lữ, Oải Hương, Chiết suất Nhục Đậu Khấu, Neroli, Hạt Nhục Đậu Khấu, Bạc Hà Lục, Lá Hoa Tím Thơm và Nữ Lang.

Ưu tiên là chế phẩm xử lý đồ giặt không chứa chất tẩy peroxygen, ví dụ, natri percacbonat, natri perborat và peraxit.

Thuốc nhuộm bóng

Tốt hơn khi chế phẩm này là chế phẩm tẩy giặt, thì chế phẩm này chứa thuốc nhuộm bóng. Tốt hơn là thuốc nhuộm tạo bóng có mặt với lượng từ 0,0001 đến 0,1% trọng lượng của chế phẩm.

Thuốc nhuộm được mô tả trong Color Chemistry Synthesis, Properties and Applications of Organic Dyes and Pigments, (H Zollinger, Wiley VCH, Zürich, 2003) và, Industrial Dyes Chemistry, Properties Applications. (K Hunger (ed), Wiley-VCH Weinheim 2003).

Thuốc nhuộm bóng để sử dụng trong các chế phẩm tẩy giặt tốt hơn nên có hệ số tắt ở mức hấp thụ tối đa trong phạm vi nhìn thấy (400 đến 700nm) lớn hơn $5000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, tốt hơn là lớn hơn $10000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Thuốc nhuộm có màu xanh lam hoặc tím.

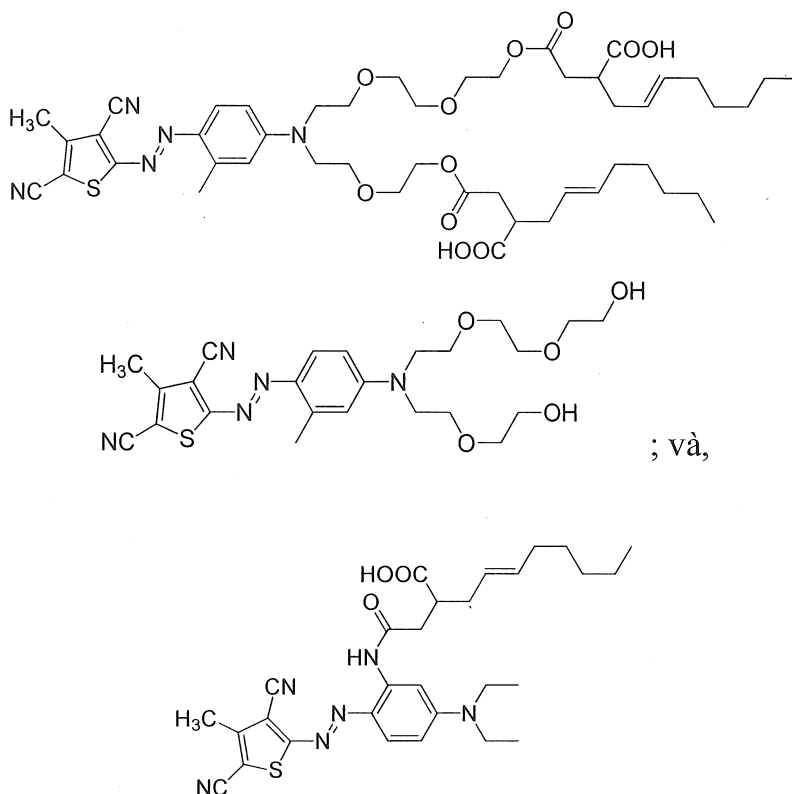
Các tế bào sắc tố của thuốc nhuộm bóng được ưu tiên là azo, azin, anthraquinon và triphenylmetan.

Thuốc nhuộm azo, anthraquinon, phthaloxyanin và triphenylmetan tốt hơn là mang anion thuần tích điện hoặc không tích điện. Azin tốt hơn là mang điện tích anion hoặc cation thuần. Thuốc nhuộm màu xanh lam hoặc tím lắng đọng vào vải trong bước giặt hoặc xả của quá trình giặt, tạo ra màu sắc có thể nhìn thấy được trên vải. Về vấn đề này, thuốc nhuộm tạo màu xanh lam hoặc tím cho vải trắng với góc màu từ 240 đến 345, tốt hơn nữa là 250 đến 320, tốt nhất là 250 đến 280. Vải trắng được sử dụng trong thử nghiệm này là bông dệt thoi không ngâm kiềm đã tẩy trắng.

Thuốc nhuộm bóng được thảo luận trong WO 2005/003274, WO 2006/032327 (Unilever), WO 2006/032397 (Unilever), WO 2006/045275 (Unilever), WO 2006/027086 (Unilever), WO 2008/017570 (Unilever), WO 2008/141880 (Unilever), WO 2009/132870 (Unilever), WO 2009/141173 (Unilever), WO 2010/099997

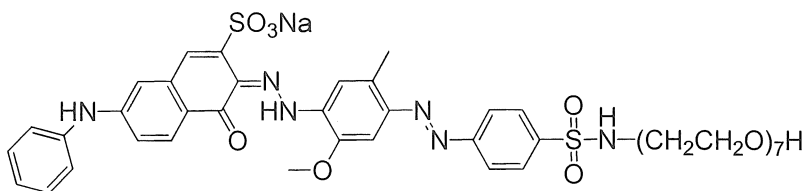
(Unilever), WO 2010/102861 (Unilever), WO 2010/148624 (Unilever), WO 2008/087497 (P&G), WO 2011/011799 (P&G), WO 2012/054820 (P&G), WO 2013/142495 (P&G) và WO 2013/151970 (P&G).

Thuốc nhuộm mono-azo tốt hơn là chứa dị vòng và tốt nhất là thuốc nhuộm thiophen. Thuốc nhuộm mono-azo tốt hơn là được alkoxy hóa và tốt hơn là không tích điện hoặc tích điện anion ở pH = 7. Thuốc nhuộm thiophen được alkoxy hóa được thảo luận trong WO/2013/142495 và WO/2008/087497. Dưới đây là các ví dụ được ưu tiên về thuốc nhuộm thiophen:



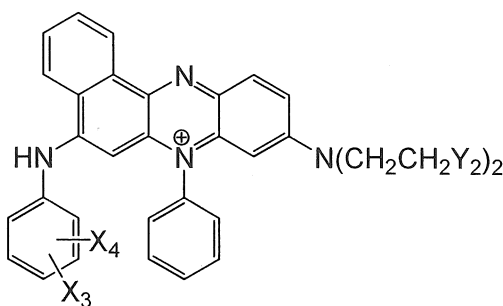
Thuốc nhuộm bis-azo tốt hơn là thuốc nhuộm bis-azo được sulfonat hóa. Các ví dụ được ưu tiên về các hợp chất bis-azo được sulfonat hóa là tím trực tiếp 7, tím trực tiếp 9, tím trực tiếp 11, tím trực tiếp 26, tím trực tiếp 31, tím trực tiếp 35, tím trực tiếp 40, tím trực tiếp 41, tím trực tiếp 51, tím trực tiếp 66, tím trực tiếp 99 và các phiên bản alkoxy hóa của chúng. Thuốc nhuộm bis-azo được alkoxy hóa được thảo luận trong WO2012/054058 và WO2010/151906.

Ví dụ về thuốc nhuộm bis-azo được alkoxy hóa là:



Thuốc nhuộm thiophen có sẵn từ Milliken với tên thương mại là Liquitint Violet DD và Liquitint Violet ION.

Thuốc nhuộm azin tốt hơn là được chọn từ thuốc nhuộm phenazin đã sulfonat hóa và thuốc nhuộm phenazin cation. Các ví dụ được ưu tiên là xanh axit 98, tím axit 50, thuốc nhuộm có CAS-No 72749-80-5, xanh axit 59 và thuốc nhuộm phenazin được chọn từ:



trong đó:

X_3 được chọn từ: -H; -F; -CH₃; -C₂H₅; -OCH₃; và, -OC₂H₅;

X_4 được chọn từ: -H; -CH₃; -C₂H₅; -OCH₃; và, -OC₂H₅;

Y_2 được chọn từ: -OH; -OCH₂CH₂OH; -CH(OH)CH₂OH; -OC(O)CH₃; và, C(O)OCH₃.

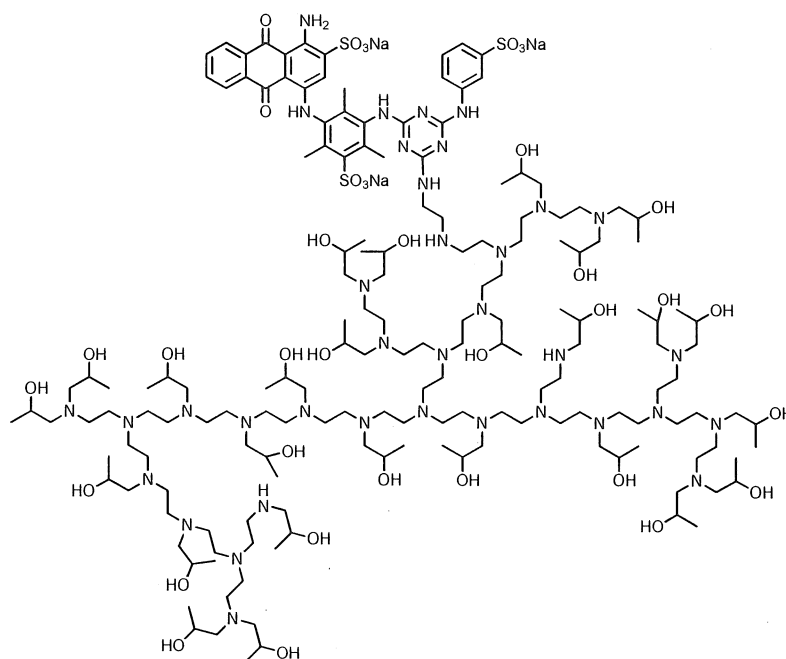
Thuốc nhuộm bóng có mặt trong chế phẩm nằm trong khoảng từ 0,0001 đến 0,5% trọng lượng, tốt hơn là từ 0,001 đến 0,1% trọng lượng. Tùy thuộc vào bản chất của thuốc nhuộm bóng, có các phạm vi được ưu tiên tùy thuộc vào hiệu quả của thuốc nhuộm bóng phụ thuộc vào loại và hiệu quả cụ thể trong bất kỳ loại cụ thể nào. Như đã nói ở trên thuốc nhuộm bóng là thuốc nhuộm bóng màu xanh lam hoặc tím.

Có thể sử dụng hỗn hợp thuốc nhuộm bóng.

Thuốc nhuộm bóng tốt nhất là thuốc nhuộm anthraquinon xanh có phản ứng hóa trị liên kết cộng hóa trị với polyetylenimin được alkoxyl hóa. Tốt hơn là alkoxyl hóa

được chọn từ etoxyl hóa và propoxy hóa, tốt nhất là propoxy hóa. Tốt hơn là 80 đến 95% mol các nhóm N-H trong polyetylen imin được thay thế bằng các nhóm rượu isopropyl bằng phương pháp propoxyl hóa. Tốt hơn là imin polyetylen trước khi phản ứng với thuốc nhuộm và propoxyl hóa có trọng lượng phân tử từ 600 đến 1800.

Cấu trúc ví dụ của antraquinon phản ứng được ưu tiên cộng hóa trị với imin polyetylen được propoxyl hóa là:



(Cấu trúc 1)

Các polyme

Chế phẩm có thể bao gồm một hoặc nhiều polyme khác. Ví dụ như cacboxymetylxenluloza, poly (etylen glycol), poly (rượu vinyl), polycacboxylat như polyacrylat, copolyme axit maleic/acrylic và copolyme axit lauryl metacrylat/axit acrylic.

Chất tạo chelat

Có thể có hoặc không có chất tạo chelat trong các chế phẩm tẩy rửa.

Nếu có, thì chất tạo chelat có với lượng từ 0,01 đến 5% trọng lượng.

Ví dụ chất tạo chelat axit phosphonic (hoặc muối của nó) là: axit 1-Hydroxyetylidene-1,1-diphosphonic (HEDP); Dietylentiainpenta (axit metylenphosphonic) (DTPMP); Hexametylendiamintetra (axit metylenphosphonic)

(HDTMP); Aminotris (axit metylenphosphonic) (ATMP); Etylendiamintetra (axit metylenphosphonic) (EDTMP); Tetrametylendiamintetra (axit metylenphosphonic) (TDTMP); và, axit phosphonobutandioxylic (PBTC).

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được chứng minh bằng các ví dụ không giới hạn sau đây.

Các ví dụ

Nhân bản & biểu hiện bao gồm thông tin trình tự

Trình tự DNA mã hóa một protein có hoạt tính esteraza cholesterol giả định đã được xác định trong cơ sở dữ liệu NCBI và được tổng hợp với sự tối ưu hóa codon cho *Escherichia coli*. Nhân bản được thực hiện bằng Bộ công cụ nhân bản và biểu hiện aLICator LIC cho thể His₆ ở đầu C (pLATE31) Trong quá trình nhân bản, vị trí đầu cuối N của protein chứa các xoắn xuyên màng được cắt bớt để protein hòa tan tốt hơn. *E. coli* XL2 blue được sử dụng làm dòng nhân bản và được biến nạp bằng phương pháp sốc nhiệt. Sau khi phân lập plasmid, plasmid được giải trình tự và xác nhận thành công nhân bản. *E. coli* BL21 (DE3) chứa plasmid pKJE7 để đồng biểu hiện chaperon đã được biến đổi (sốc nhiệt) và được sử dụng như một chủng biểu hiện để sản xuất protein.

Trình tự của protein bị cắt ngắn (SEQ ID 1):

MNLALSGTFFNVNIRHLEGDGFSLFVDSDDKKGEEDVPTARLKMEHAV
ASDLCLYVTDLPAVGESTLALKAKGDNSVEATGLLVGASNIEGSLVMQDA
NVGIDASQLSQSADPGTWGLYAKQVSLTADDVRATSLGAKTLSAKNVGVSV
ERGRGNVC

Protein có chiều dài đầy đủ (SEQ ID 2):

Cholesterol esteraza [*Corynebacterium*]

MGRINVPKAAVGLVAGFAAFGVAGVAVAQGGTLANLALSGTFFNVNI
RHLEGDGFSLFVDSDDKKGEEDVPTARLKMEHAVASDLCLYVTDLPAVGES
TLALKAKGDNSVEATGLLVGASNIEGSLVMQDANVGIDASQLSQSADPGTW
GLYAKQVSLTADDVRATSLGAKTLSAKNVGVSVVERGRGNVC

Lên men (thu hoạch) & thanh lọc

Sản xuất protein được thực hiện trong bình Erlenmeyer 2L với môi trường 1L LB và kháng sinh thích hợp để lựa chọn plasmid (Ampicillin, 100 $\mu\text{g/mL}$, Chloramphenicol 35 $\mu\text{g/mL}$). Môi trường LB được cấy với 1-3% (v/v) tiền nuôi cấy và ủ ở 37°C và 180rpm cho đến khi đạt $\text{OD}_{600} = 0,6$. Sự biểu hiện của các chaperon được gây ra bởi 20mg/mL L-arabinoase và nuôi cấy trong 30 phút ở 20°C. Sự biểu hiện gen được tạo ra bằng cách bổ sung IPTG vào 1mM cuối cùng và thực hiện trong 3 giờ ở 20°C và 180 vòng/phút. Tế bào được thu hoạch bằng cách ly tâm (4750 x g, 20 phút, 4°C) và được bảo quản ở -80°C. Quá trình ly giải tế bào được thực hiện bằng cách bơm lại dung dịch nhão tế bào trong dung dịch đệm cân bằng (25 mM Tris-HCl, pH 8,0., 500 mM NaCl, 20 mM Imidazole, 10mL đệm cho 1g trọng lượng ướt của tế bào) và siêu âm trên băng để phá vỡ tế bào. Quá trình tinh chế protein được thực hiện bằng cách sử dụng cột HisTrap FF 1mL sử dụng hệ thống lọc AKTA để sắc ký ái lực thông qua thẻ poly Histidine. Quá trình rửa giải protein được thực hiện thông qua một gradient mạch thẳng trong 30 phút sử dụng đệm có nồng độ imidazole tăng lên (25 mM Tris-HCl, pH 8,0., 500 mM NaCl, 500 mM Imidazole). Các phân đoạn rửa giải được xác định thông qua độ hấp thụ (280nm) và được áp dụng cho SDS-PAGE. Các phân đoạn chứa protein quan tâm được gộp lại và thẩm tách qua đệm với 5 L dung dịch đệm không chứa imidazole (25 mM Tris-HCl, pH 8,0, 500 mM NaCl). Protein đã thẩm tách được bổ sung 0,005% (v/v) natri azit và 10% (v/v) glyxerol để làm đông và bảo quản ở -80°C.

Phân tích sinh học

Xác định nồng độ protein

Tổng lượng protein của các mẫu enzyme được ước tính bằng cách sử dụng bộ xét nghiệm BCA Sigma-Aldrich (axit bicinchoninic). Thuốc thử BCA được chuẩn bị bằng cách trộn dung dịch A [1% (w/v) axit bicinchoninic ở dạng muối natri, 2% (w/v) natri cacbonat, 0,16% (w/v) natri tartrat, 0,4% (w/v) natri hydroxit, 0,95% (w/v) natri hydro cacbonat, pH 11,5] với dung dịch B [4% (w/v) đồng sulfat] theo tỷ lệ 50: 1 (v/v). Thực hiện pha loãng nối tiếp albumin huyết thanh bò (2mg/mL) trong nước khử ion để tạo ra 7 điểm của đường cong chuẩn. Để thực hiện xét nghiệm, thuốc thử BCA (200 μL)

được thêm vào các giếng của đĩa 96 giếng, sau đó là các dung dịch pha loãng protein mẫu (20 μ L). Các đĩa microtitre (MTP) được bít kín và ủ ở 37°C trong 30 phút. Sau khi ủ, độ hấp thụ ở bước sóng 540nm được đo trên máy quang phổ.

Xác định độ tinh khiết của enzym

Các mẫu chứa enzym (20 μ L) được chuẩn bị với đệm tải SDS-PAGE và được làm nóng ở 70°C trong 10 phút trước khi chạy trên gel NuPage Bis-Tris 4-12% với đệm MOPS ở 170V. Đánh dấu trọng lượng phân tử PageRulerPlus được chạy cùng với các mẫu để xác định khối lượng phân tử. Mỗi gel sau đó được nhuộm bằng cách sử dụng vết protein GelCode Blue Safe.

Xác định sinh hóa của hoạt tính sterol esteraza

Hoạt tính của sterol esteraza được xác định bằng phương pháp so màu sử dụng 4-nitrophenyl-valerat (C5) và 4-nitrophenyl-dodecanoat (C12) làm chất nền. 4-nitrophenyl-dodecanoat (25mg) hoặc 4-nitrophenyl-valerat (18mg) được hòa tan trong 10mL dung môi (methanol) để chuẩn bị dung dịch gốc 8mM. Trước khi tiến hành thử nghiệm, 1mL dung dịch gốc được thêm vào 7mL nước đã axit hóa (pH 4,5), để có nồng độ cuối cùng là 1mM. Trong các đĩa vi mô 96 giếng, 60 μ L dH₂O, 115 μ L đệm Tris-HCl (pH 8,5, 50mM), 5 μ L dung dịch enzym pha loãng và 20 μ L cơ chất (đa kênh ở cuối) đã được thêm vào. Đối với các mẫu trắng, dung dịch enzym được thay thế bằng dH₂O. Sau khi thêm thuốc thử, sự giải phóng sản phẩm (4-nitrophenol) được theo dõi ở 405nm trong 15 phút ở nhiệt độ môi trường.

THỬ NGHIỆM CẤP PHỐI

Chế phẩm mẫu thí nghiệm mô phỏng bã nhờn người và cấp phối cho vải

Bảng 1A cho thấy chế phẩm mẫu thí nghiệm mô phỏng bã nhờn người được sử dụng trong các nghiên cứu tẩy giặt, và có thể so sánh với bã nhờn của người được phân tích trong tài liệu (bảng 1B). Thuốc nhuộm tím Macrolex (0,4% w/w) được thêm vào mẫu thí nghiệm bã nhờn, và sau đó 100 μ L được cấp phối cho một mẫu polycotton 10x10cm đã được làm nóng trước đến 60°C. Việc lau vết bẩn được tạo điều kiện thuận lợi bằng cách để vết bẩn khô ở nhiệt độ 60°C. Độ đồng nhất của việc nhuộm được xác nhận bằng cách xác định bằng phương pháp đo màu các giá trị SRI trên mẫu màu sau

đó được cắt thành các vòng tròn đường kính 30 mm nhỏ hơn, cho phép vừa vặn với các tấm đa giếng 6 giếng cho các thử nghiệm rửa tiếp theo.

Bảng 1: (A) Chế phẩm mẫu thí nghiệm mô phỏng bã nhờn người được thử nghiệm. Được thể hiện trong so sánh (B) là thành phần của bã nhờn ở người theo đề xuất của Nikkari 1974, In Ro 2005, Stefaniak 2010. Mẫu thí nghiệm mô phỏng bã nhờn người được thiết kế để bắt chước mô tả trong tài liệu.

(A) Mẫu thí nghiệm mô phỏng bã nhờn người đã được thử nghiệm		
Thành phần	Loại	% Bao gồm
Axit Oleic	Axit béo (12%)	8
Axit Isostearic		4
Tricaprin	Triglixerit (39,2%)	1,8
Triolein		28,2
Triisostearin		9,2
Oleyl Oleat	Este sáp (29,8%)	11,9
Myristyl myristat		11,9
Isostearyl isostearat		6
Squalene	Squalene (12,8%)	13,8
Cholesterol oleat	Cholesterol (este) (5,1%)	3,4
Cholesterol		1,7
Tổng cộng		99,9

(B) Bã nhờn ở người (tài liệu)	
Loại	% trung bình bao gồm (phạm vi)
Axit béo	28,3 (2,3 – 38,3)
Triglixerit	32,5 (14,8 - 44)
Este sáp	25 (10 - 26)
Squalene	10,6 (3,3 – 20)
Cholesterol (este)	6 (1 – 9,5)

Nghiên cứu tẩy giặt về hiệu suất làm sạch bằng enzym để tẩy rửa mẫu mô phỏng bã nhờn người

Các chỉ số trước khi giặt được thực hiện đối với các vết bẩn có đường kính 30 mm để đo cường độ vết bẩn. Nghiên cứu tẩy giặt được thực hiện ở thể tích 5 mL (trong tấm 6 giếng, ở 40°C trong 1 giờ với tốc độ 100 vòng/phút) hoặc trong 100mL (trong chai thủy tinh, ở 40°C trong 1 giờ với tốc độ 100 vòng/phút). Các enzym có mặt với lượng 25 mg/L trong vòng 2 g/L của chế phẩm 7,5% chất hoạt động bề mặt. Sau đó, các vết bẩn được xả ba lần sau khi giặt để loại bỏ hoàn toàn nước giặt và bất kỳ enzym nào còn sót lại. Sau khi khô, các tấm vết bẩn được quét kỹ thuật số và đo deltaE. Giá trị này được sử dụng để thể hiện hiệu quả làm sạch và được định nghĩa là sự khác biệt về màu sắc giữa vải trắng và vải bị ố sau khi giặt.

Về mặt toán học, định nghĩa của deltaE là:

$$\text{deltaE} = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{1/2}$$

trong đó ΔL là số đo sự khác biệt về độ tối giữa vải đã giặt và vải trắng; Δa và Δb là số đo sự khác biệt về độ đỏ và độ vàng tương ứng giữa cả hai tấm vải. Từ phương trình này, rõ ràng là giá trị của deltaE càng thấp thì vải sẽ càng trắng. Liên quan đến kỹ thuật đo màu này, tham khảo Ủy ban Chiếu sáng Quốc tế (CIE); Recommendation on Uniform Colour Spaces, colour difference equations, psychometric colour terms, bổ sung số 2 đến CIE Publication, số 15, Colorimetry, Bureau Central de la CIE, Paris 1978.

Ở đây, hiệu quả làm sạch được biểu thị dưới dạng chỉ số loại bỏ vết bẩn (SRI):

$$\text{SRI} = 100 - \text{deltaE}.$$

SRI càng cao thì vải càng sạch, SRI = 100 (màu trắng).

Hiệu suất làm sạch bằng enzyme chống lại bã nhờn giống như con người

Các nghiên cứu rửa ở thể tích rửa 5mL đã xác định rằng sterol esteraza cho thấy hiệu suất được cải thiện đối với việc loại mẫu mô phỏng bã nhờn người so với các chế phẩm đối chứng. Sự gia tăng SRI đối với enzym sterol esteraza thử nghiệm, cho thấy hiệu suất được cải thiện đối với việc loại mẫu mô phỏng bã nhờn người so với các mẫu đối chứng có bao gồm tiêu chuẩn esteraza giặt (Cutinaza) và tiêu chuẩn lipaza giặt

(Lipaza Evity). Mức tăng 4-6 đơn vị SRI đối với các enzym thử nghiệm được thể hiện là một cải tiến làm sạch được hình dung rõ ràng hơn so với mức tăng của enzym đối chứng (Cutinaza) và chuẩn lipaza giặt (Lipaza Evity). Thử nghiệm được thực hiện ba lần ở 40°C trong 1 giờ. Công thức được áp dụng chứa 7,5% tổng chất hoạt động bề mặt.

Mức tăng > 4 đơn vị SRI đối với enzym sterol esteraza theo sáng chế là một cải tiến làm sạch được hiển thị rõ ràng so với Cutinaza và Lipex Evity (bảng 2).

Mẫu	Hiệu suất giặt (SRI)
Đối chứng âm (nước)	68,5 ± 1,03
Đối chứng dương (chế phẩm + Lipex Evity)	70,6 ± 0,6
Đối chứng dương (chế phẩm + Cutinaza)	73,9 ± 0,98
Sáng chế (chế phẩm + sterol esteraza của SEQ ID 1)	78,8 ± 1,75

Bảng 2: Hiệu suất làm sạch của các enzym sterol esteraza của SEQ ID 1 (đối với mẫu mô phỏng bã nhờn người) được thể hiện so với các đối chứng của giặt trong: nước, hoặc chế phẩm cộng với esteraza thương mại chuẩn (Cutinaza) hoặc công thức cộng với lipaza giặt thương mại chuẩn (Lipex Evity)

Chỉ số loại bỏ vết bẩn (SRI) cho biết hiệu suất giặt đã được đo. Số liệu thống kê ± liên quan đến độ tin cậy 95%. Thử nghiệm cho thấy sterol esteraza của SEQ ID 1 có hiệu suất chống lại bã nhờn tốt hơn nhiều so với các enzym thương mại esteraza (Cutinaza) và lipaza (Lipex Evity).

Hiệu suất làm sạch mẫu mô phỏng bã nhờn người bằng enzym

Các nghiên cứu tẩy rửa ở thể tích 100mL xác nhận rằng sterol esteraza của SEQ ID 1 cho thấy hiệu suất được cải thiện trong việc loại bỏ mẫu mô phỏng bã nhờn người so với các mẫu đối chứng bao gồm các enzym thương mại hiện tại là esteraza (Cutinaza) và lipaza (Lipex Evity) (Bảng 3). Chế phẩm được cấp phối chứa tổng chất hoạt động bề mặt với lượng 7,5%.

Mẫu	Hiệu suất tẩy giặt (SRI)
Đối chứng âm (Nước)	$72,6 \pm 1,2$
Đối chứng dương (chế phẩm + Lipex Evity)	$79,7 \pm 1,28$
Đối chứng dương (chế phẩm + Cutinaza)	$81,4 \pm 1,65$
Sáng chế (chế phẩm + sterol esteraza của SEQ ID 1)	$85,3 \pm 0,36$

Bảng 3: Hiệu suất làm sạch của enzyme sterol esteraza của SEQ ID 1 (đối với mẫu thí nghiệm mô phỏng bã nhờn người) được thể hiện so với đối chứng của các chất giặt trong: nước, hoặc chế phẩm cộng với esteraza thương mại chuẩn (Cutinaza) hoặc chế phẩm cộng với lipaza giặt thương mại chuẩn (Lipex Evity)

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm tẩy rửa dạng lỏng chứa:

(i) chất hoạt động bề mặt với hàm lượng từ 1 đến 60% trọng lượng, ưu tiên là từ 2 đến 50% trọng lượng, ưu tiên hơn là từ 3 đến 45% trọng lượng, thậm chí ưu tiên hơn nữa là từ 5 đến 40% trọng lượng, ưu tiên hơn cả là từ 6 đến 40% trọng lượng; và,

(ii) enzyme sterol esteraza với hàm lượng từ 0,0005 đến 5% trọng lượng, ưu tiên là từ 0,005 đến 2,5% trọng lượng, ưu tiên hơn là từ 0,01 đến 1% trọng lượng,

trong đó enzyme sterol esteraza có trình tự tương đồng với trình tự SEQ ID NO: 1 ít nhất là 60%, ưu tiên là ít nhất 70%, ưu tiên hơn là ít nhất 75%, ưu tiên hơn nữa là ít nhất 80%, thậm chí ưu tiên hơn nữa là ít nhất 85%.

2. Chế phẩm tẩy rửa theo điểm 1, bao gồm polyme tách loại vết bẩn với hàm lượng từ 0,1 đến 10% trọng lượng.

3. Chế phẩm tẩy rửa theo điểm 2, bao gồm polyme tách loại vết bẩn với hàm lượng từ 0,2 đến 9% trọng lượng.

4. Chế phẩm tẩy rửa theo điểm 2, bao gồm polyme tách loại vết bẩn với hàm lượng từ 0,25 đến 8% trọng lượng.

5. Chế phẩm tẩy rửa theo điểm 2, bao gồm polyme tách loại vết bẩn với lượng từ 0,5 đến 6% trọng lượng.

6. Chế phẩm tẩy rửa theo điểm 2, bao gồm polyme tách loại vết bẩn với hàm lượng từ 1 đến 5% trọng lượng.

7. Chế phẩm tẩy rửa theo điểm 2, trong đó polyme tách loại vết bẩn là polyme tách loại vết bẩn gốc polyeste.

8. Chế phẩm tẩy rửa theo điểm 7, trong đó polyme tách loại vết bẩn gốc polyeste là polyme tách loại vết bẩn gốc polyetylen terephtalat và/hoặc polytrimetylen terephtalat.

9. Chế phẩm tẩy rửa theo điểm 8, trong đó polyme tách loại vết bẩn gốc polyeste là polyme tách loại vết bẩn gốc polytrimetylen terephtalat.

10. Chế phẩm tẩy rửa theo điểm 1, trong đó chế phẩm tẩy rửa chứa polyamin được alkoxyl hóa.
11. Chế phẩm tẩy rửa theo điểm 10, trong đó chế phẩm tẩy rửa chứa polyamin được alkoxyl hóa có hàm lượng từ 0,1 đến 8% trọng lượng.
12. Chế phẩm tẩy rửa theo điểm 10, trong đó chế phẩm tẩy rửa chứa polyamin được alkoxyl hóa có từ 0,2 đến 6% trọng lượng.
13. Chế phẩm tẩy rửa theo điểm 10, trong đó chế phẩm tẩy rửa chứa polyamin được alkoxyl hóa có hàm lượng từ 0,5 đến 5% trọng lượng.
14. Chế phẩm tẩy giặt theo điểm 1, trong đó chất hoạt động bề mặt bao gồm chất hoạt động bề mặt anion và/hoặc không ion
15. Chế phẩm tẩy giặt theo điểm 14, trong đó chất hoạt động bề mặt bao gồm cả chất hoạt động bề mặt anion và không ion.
16. Chế phẩm tẩy rửa theo điểm 1, còn chứa thêm enzym được chọn từ nhóm bao gồm: lipaza, proteaza, xenlulaza, alpha-amylaza, peroxidaza/oxidaza, pectat lyaza và/hoặc manna.
17. Chế phẩm tẩy rửa theo điểm 1, còn chứa thêm thành phần khác được chọn từ chất huỳnh quang, hương liệu, thuốc nhuộm tạo bóng và polyme, và hỗn hợp của chúng.
18. Chế phẩm tẩy rửa theo điểm 1, trong đó chế phẩm tẩy rửa là chế phẩm tẩy giặt.
19. Chế phẩm tẩy rửa theo điểm 1, bao gồm chất hoạt động bề mặt với hàm lượng từ 2% đến 50% trọng lượng.
20. Chế phẩm tẩy rửa theo điểm 1, bao gồm chất hoạt động bề mặt với hàm lượng từ 3% đến 45% trọng lượng.
21. Chế phẩm tẩy rửa theo điểm 1, bao gồm chất hoạt động bề mặt với hàm lượng từ 5% đến 40% trọng lượng.
22. Chế phẩm tẩy rửa theo điểm 1, bao gồm chất hoạt động bề mặt với hàm lượng từ 6% đến 40% trọng lượng.
23. Chế phẩm tẩy rửa theo điểm 1, bao gồm enzym sterol esteraza với hàm lượng từ 0,005 đến 2,5% trọng lượng.

24. Chế phẩm tẩy rửa theo điểm 1, bao gồm enzym sterol esteraza với hàm lượng từ 0,01% đến 1% trọng lượng.

25. Phương pháp xử lý bề mặt vải có vết bẩn nhờn, phương pháp này bao gồm việc đưa enzym sterol esteraza có trình tự tương đồng 100% với trình tự SEQ ID NO: 1 vào chế phẩm tẩy rửa dạng lỏng chứa chất hoạt động bề mặt với hàm lượng từ 1% đến 60% trọng lượng; và xử lý tiếp theo bề mặt vải có vết bẩn nhờn, với chế phẩm đã nêu.