

ÖZET

BİR ALFA-AMİLAZ İÇEREN SIVI DETERJAN BİLEŞİMLERİ

Mevcut buluş bir yüzey aktif madde sistemi, bir şelatlaştırıcı madde ve bir alfa-amilaz içeren sıvı deterjan bileşimlerine ilişkindir.

İSTEMLER

1. Aşağıdakileri içeren sıvı deterjan bileşimi:

a) ağırlıkça en az %5 su;

b) ağırlıkça en az %3 bir yüzey aktif madde sistemi, burada yüzey aktif madde sistemi ağırlıkça %10 ila %100 bir anyonik yüzey aktif madde içerir;

c) DİZİ İD. NO: 1'le en az %95 dizi özdeşliğine sahip bir alfa-amilaz ve söz konusu alfa-amilaz numaralandırma için DİZİ İD. NO: 1 kullanıldığında G46A+T47I+G105A+I199F süstitüsyonlarını içerir;

burada deterjan ayrıca bir şelatlaştırıcı madde içerir; ve burada şelatlaştırıcı madde HEDP

veya aynı koşullar altında HEDP'ye eşit veya daha yüksek şelatlaştırma kapasitesine sahip bir başka şelatlaştırıcı maddedir, burada söz konusu HEDP veya bir başka şelatlaştırıcı madde ağırlıkça en az %0.25 bir konsantrasyonda mevcuttur.

2. İstem 1'deki sıvı deterjan olup, burada yüzey aktif madde sistemi, yüzey aktif madde sistemi ağırlıkça %0 ila %85 doğrusal alkilbenzen sülfonat (LAS) içerir.

3. İstem 2'deki sıvı deterjan olup, burada yüzey aktif madde sistemi, yüzey aktif madde sistemi ağırlıkça %10 ila %75 doğrusal alkilbenzen sülfonat (LAS) içerir.

4. İstem 1'deki sıvı deterjan olup, burada yüzey aktif madde sistemi, yüzey aktif madde sistemi ağırlıkça %0 ila %90 alkol etersülfat, tercihen sodyum lauril eter sülfat (SLES) içerir.

5. Yukarıdaki istemlerden herhangi birindeki sıvı deterjan olup, ayrıca yüzey aktif madde sistemi ağırlıkça %0 ila %60 bir noniyonik yüzey aktif madde içerir.

6. Yukarıdaki istemlerden herhangi birindeki sıvı deterjan olup, yüzey aktif madde sistemi ağırlıkça %5 ila %75 doğrusal alkilbenzen sülfonat (LAS), yüzey aktif madde sistemi ağırlıkça %5 ila %90 sodyum lauril eter sülfat (SLES) ve yüzey aktif madde sistemi ağırlıkça %5 ila %60 noniyonik yüzey aktif madde içerir.

7. Yukarıdaki istemlerden herhangi birindeki sıvı deterjan olup, burada alfa-amilaz G46A+T47I+G105A+I199F süstitüsyonları olan DİZİ İD. NO: 1'e ait diziye sahiptir.

8. Yukarıdaki istemlerden herhangi birindeki sıvı deterjan olup, en az 8 bir pH'a sahiptir.

9. İstem 1'deki gibi bir sıvı deterjanda bir alfa-amilazın kullanımı olup, söz konusu amilaz DİZİ İD. NO: 1'e sahip alfa-amilazla en az %95, en az %96, en az %97, en az %98, en az

%99 ancak %100'den daha az dizi özdeşliğine sahiptir ve söz konusu alfa-amilaz numaralandırma için DİZİ İD. NO: 1 kullanıldığında G46A+T47I+G105A+I199F süstitüsyonlarını içerir.

10. Tercihen 40 °C veya daha düşük sıcaklıklarda veya daha tercihen 30 °C veya daha düşük
5 bir sıcaklıkta veya daha da tercihen 20 °C veya daha düşük bir sıcaklıkta çamaşır yıkamak için İstem 9'daki gibi bir sıvı deterjanda bir alfa-amilazın kullanımı.

11. Kumaşların yıkanmasına ilişkin bir işlem olup, bir kumaşın tercihen 40 °C veya daha düşük bir sıcaklıkta veya daha tercihen 30 °C veya daha düşük bir sıcaklıkta veya daha da tercihen 20 °C veya daha düşük bir sıcaklıkta İstem 1-8'den herhangi birindeki gibi bir sıvı
10 deterjan bileşimiyle yıkanmasını içerir.

TARİFNAME

BİR ALFA-AMİLAZ İÇEREN SIVI DETERJAN BİLEŞİMLERİ

BULUŞUN TEKNİK ALANI

Mevcut buluş bir yüzey aktif madde sistemi, bir şelatlaştırıcı madde ve bir alfa-amilaz içeren sıvı deterjan bileşimlerine ilişkindir. Daha hususiyetle, buluş en az %5 su; ağırlıkça %10 ila %100'ü anyonik yüzey aktif maddeden oluşan ağırlıkça en az %3 bir yüzey aktif madde sistemi; ağırlıkça %0.25 bir şelatlaştırıcı madde, burada şelatlaştırıcı madde HEDP veya aynı koşullar altında HEDP'ye eşit veya daha yüksek şelatlaştırma kapasitesine sahip bir başka şelatlaştırıcı maddedir; ve DİZİ İD. NO:1'le en az %95 dizi özdeşliğine sahip bir alfa-amilaz içeren sıvı deterjan bileşimlerine ilişkin olup, burada söz konusu alfa-amilaz numaralandırma için DİZİ İD. NO:1 kullanıldığında G46A+T47I+G105A +1199F süstitüsyonlarını içerir.

BULUŞA İLİŞKİN BİLİNER HUSUSLAR

Anyonik yüzey aktif maddeler, örneğin alkilbenzen sülfonat (LAS) ve bir alfa-amilaz içeren sulu sıvı deterjan bileşimleri teknikte gayet iyi bilinir. Örneğin, US-A-4 537 706'da (Severson) ağırlıkça en az %5 doğrusal alkilbenzen sülfonat (LAS) yüzey aktif madde, sodyum lauriletoksisülfat (SLES), noniyonik, yağ asidi içeren bir yüzey aktif madde sistemi ve bir alfa-amilaz içeren çeşitli sıvı deterjan bileşimleri açıklanmaktadır.

Alfa-amilazlar (alfa-1,4-glukan-4-glukanohidrolazlar, E.C. 3.2.1.1) nişastanın ve diğer doğrusal ve dallı 1,4-glukozidik oligo- ve polisakaritlerin hidrolizini katalize eden bir enzimler grubunu oluşturmaktadır. Kullanılan ilk bakteriyel alfa-amilazlar arasında, özellikleri kapsamlı bir şekilde tanımlanmış Termamyl™ olarak da bilinen B.licheniformis'e ait bir alfa-amilaz bulunmaktadır ve bu enzimin kristal yapısı belirlenmiştir. Termamyl™ ve yüksek etkili birçok başka alfa-amilaz etkinleşmek için kalsiyuma ihtiyaç duyar. Termamyl™ için dört kalsiyum atomunun, negatif yüklü amino asit kalıntılarıyla koordineli alfa-amilaz yapıya bağlı oldukları bulunmuştur. Diğer alfa-amilazlarda yapıya bağlı kalsiyum iyonlarının miktarı farklı olabilir. Nişastanın sıvılaştırılması ve biyoyakıt üretimi gibi başka uygulamalarda çoğunlukla şelatlaştırıcılar eklenmez ancak kuvvetli şelatlaştırıcı bileşiklerin mevcut olduğu uygulamalarda, örneğin deterjanlarda bu kalsiyum gerekliliği bir dezavantaj oluşturur.

Alfa-amilaz içeren bu tür sıvı deterjan bileşimleriyle yaşanan en önemli sorun deterjan bileşiminde enzimlerin depolanma stabilitesinin sıklıkla arzu edilenden uzak olmasıdır. Sulu

sıvı veya jel deterjan bileşimlerinde, amilazları kolaylıkla parçalayabilen proteazlar mevcut olduğunda amilazların stabilize edilmesi özellikle zorlaşır. Deterjan bileşimlerini içeren bu tür bir sıvı deterjanla bağlantılı bir başka sorun anyonik yüzey aktif maddelerin, özellikle de alkilbenzen sülfonatın (LAS) enzimleri, örneğin alfa-amilaz enzimini etkisiz kılma eğiliminin olmasıdır.

Bu nedenle US-A-4 537 706'da (Severson) borik asidin veya bir alkali metal boratın kalsiyum iyonu ve tercihen bir polioller bir karışımını içeren enzim stabilize edici bir sistem kullanılmaktadır. Borik asidin veya bir alkali metal boratın kalsiyum iyonu ve tercihen bir polioller bir karışımını içeren bu tür enzim stabilize edici sistemlerin bir dezavantajı bu içerik maddelerin aslında temizleme etkinliğine katkı sağlamamasıdır. Dahası, kuvvetli şelatlaştırıcı bileşiklerin mevcut olduğu uygulamalarda, örneğin deterjanlarda ve temizlik bileşimlerinde kalsiyuma gerek duyulması bir dezavantaj oluşturur. Bir sıvı deterjana kalsiyum eklenmesi formülasyona, yani deterjanın fiziksel stabilitesine ilişkin de sorunlar ortaya çıkartabilir. Çevresel nedenlerden ötürü boron daha az tercih edilmektedir.

Yakın zamanda, şelatlaştırıcı maddelerin mevcudiyetinde daha stabil kalan alfa-amilazlar geliştirilmiştir . Örneğin WO-A-2011/100410'da (Procter&Gamble) Bacillus suşları NCIB 12289, NCIB 12512, NCIB 12513 ve DSM 9375'in herhangi birinden elde edilebilen bir alfa-amilaz SP722'nin varyantlarını içeren temizlik bileşimleri açıklanmaktadır. Bu alfa amilaz varyantlarının bir kısmı anyonik yüzey aktif maddelerin ve şelatlaştırıcı maddelerin mevcudiyetinde pH 8.2'de iyi depolama stabilitesi sergilemektedir.

WO-A-2011/082429'da (Novozymes) kalsiyuma duyarlı bir alfa-amilaz A domenini, kalsiyuma duyarsız bir alfa-amilaz B domenini ve kalsiyum duyarlı bir alfa-amilaz C domenini içeren düşük kalsiyum duyarlılığına sahip çok sayıda başka alfa-amilaz varyantı açıklanmaktadır. Bu varyantların nişastanın işlenmesi (örneğin, sıvılaştırılması); yağ öğütme işlemleri; karbonhidrat kaynaklarından alkol üretimi; deterjanlar; bulaşık yıkama bileşimleri; tekstil endüstrisinde nişasta haşılının sökülmesi; pişirme uygulamaları; içecek endüstrisi; sondaj işlemlerinin yapıldığı petrol sahaları; geri dönüştürme işlemleri, örneğin kağıdın mürekkebinden arındırılması ve hayvan yemi gibi çeşitli uygulamalarda kullanışlı oldukları söylenmektedir.

Alfa-amilazların bu çeşitli uygulamalarında koşulların oldukça farklı olması nedeniyle her özel uygulama için farklı alfa-amilazlar geliştirilmiştir. Dolayısıyla, deterjan alfa-amilazları alkali pH (8'in üstü) ve nispeten düşük sıcaklık (15-60 °C) kullanılan uygulamalar için

optimize edilmişken, biyoyakıt üretiminde veya nişastanın sıvılaştırılmasında kullanılan alfa-amilazlar asidik pH (6'nın altı) ve 80 °C'nin üzerindeki sıcaklıklar için optimize edilmiştir. Dolayısıyla, sıvılaştırmada veya biyoyakıt üretiminde kullanım için tasarlanmış amilazların deterjanlarda kullanım için uygun olması beklenmemelidir.

5 Anyonik yüzey aktif maddeler içeren; hem depolama durumunda stabil kalan hem iyi temizleme performansı sergileyen; bileşimlerin şelatlaştırıcı maddeler içermesi durumunda bile enzim stabilize edici sistemlere gerek duyulmayan başka veya gelişmiş sıvı deterjan bileşimlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Şelatlaştırıcı maddeler deterjan bileşimlerine yıkama sırasında suyun sertliğini azaltmak için dahil edilir, aynı şekilde mevcut olabilecek ağartıcı maddeleri korur ve ayrıca bazı lekelerin çıkartılmasında da doğrudan etkiye sahip olabilirler. 10 Ayrıca, alfa-amilazların bazen kendilerini içeren sıvı deterjan bileşimlerinde kötü koku sorunlarına yol açtıkları bulunmuştur.

Dolayısıyla mevcut buluşun bir amacı alfa-amilazlar ve anyonik yüzey aktif maddeler içeren sıvı deterjan bileşimleri sağlamak olup, söz konusu bileşimler çok benzer alfa-amilazları içeren bileşimlerle karşılaştırıldıklarında gelişmiş depolama stabilitesine ve/veya depolama sonrası yıkama performansına sahiptir. 15

Mevcut buluşun bir başka amacı şelatlaştırıcıların bulunduğu çamaşır yıkama bileşimlerinde kullanılacak alfa-amilazları içeren sıvı deterjan bileşimleri sağlamaktır.

Son olarak, mevcut buluşun bir diğer amacı bazen gözlemlenen kötü koku sorunlarını önleyen alfa-amilazları içeren sıvı deterjan bileşimleri sağlamaktır. Şimdi şaşırtıcı bir şekilde buluşa uygun sıvı deterjan bileşimleriyle bu amaçlardan birine veya daha fazlasına ulaşılabileceğini bulduk; burada söz konusu buluşa uygun bileşimler a) ağırlıkça en az %5 su; b) ağırlıkça en az %3 bir yüzey aktif madde sistemi, burada söz konusu yüzey aktif madde sistemi ağırlıkça %10 ila %100 bir anyonik yüzey aktif maddeden oluşur; c) DİZİ İD. NO: 1'le en az %95 dizi özdeşliğine sahip bir alfa-amilaz içerir, burada söz konusu alfa-amilaz numaralandırma için 25 DİZİ İD. NO: 1 kullanıldığında G46A+T47I+G105A+I199F sübstitüsyonlarını içerir; burada deterjan ayrıca bir şelatlaştırıcı madde içerir; ve burada şelatlaştırıcı madde HEDP veya aynı koşullar altında HEDP'ye eşit veya daha yüksek şelatlaştırma kapasitesine sahip bir başka şelatlaştırıcı maddedir; burada söz konusu HEDP veya bir başka şelatlaştırıcı madde ağırlıkça 30 en az %0.25 bir konsantrasyonda mevcuttur. Yine şaşırtıcı bir şekilde buluşa uygun sıvı deterjan bileşimlerinin bazı kötü koku sorunlarının üstesinden gelebildikleri de bulunmuştur

BULUŞUN AÇIKLAMASI

Buluşun bir ilk yönü itibarıyla aşağıdakileri içeren bir sıvı deterjan bileşimi sağlanmaktadır:

- a) ağırlıkça en az %5 su;
- b) ağırlıkça en az %3 bir karışık yüzey aktif madde sistemi, burada yüzey aktif madde sistemi ağırlıkça %10 ila %100 bir anyonik yüzey aktif madde içerir;
- 5 c) DİZİ İD. NO: 1'le en az %95 dizi özdeşliğine sahip bir alfa-amilaz, burada söz konusu alfa-amilaz numaralandırma için DİZİ İD. NO: 1 kullanıldığında G46A+T47I+G105A+I199F süstitüsyonlarını içerir; burada deterjan ayrıca bir şelatlaştırıcı madde içerir ve burada şelatlaştırıcı madde HEDP veya aynı koşullar altında HEDP'ye eşit veya daha yüksek şelatlaştırma kapasitesine sahip bir başka şelatlaştırıcı maddedir, burada söz konusu HEDP veya bir başka şelatlaştırıcı madde 10 ağırlıkça en az %0.25 bir konsantrasyonda mevcuttur.

Mevcut buluşun bir ikinci yönü bu tür bir sıvı deterjan bileşiminin çamaşır yıkamakta kullanımına ilişkindir.

- Mevcut buluşun bir üçüncü yönü itibarıyla kumaşların yıkanmasına ilişkin bir işlem 15 sağlanmakta olup, söz konusu işlem bir kumaşın tercihen 40 °C veya daha az bir sıcaklıkta yukarıda belirtilen sıvı deterjan bileşimiyle yıkanmasını içerir.

BULUŞA İLİŞKİN AYRINTILI AÇIKLAMA

Tanımlar

- Alfa-Amilaz:** (Alfa-1,4-glukan-4-glukanohidrolazlar, E.C. 3.2.1.1) nişastanın ve diğer 20 doğrusal ve dallı 1,4-glukozidik oligo ve polisakaritlerin hidrolizini katalize eden bir enzimler grubunu oluşturur. Burada kullanıldığı şekliyle, "alfa-amilazlar" enzimin alfa-amilaz etkinliğine sahip olduğu anlamına gelir.

DİZİ İD. NO: 1'e Sahip Alfa-Amilaz:

VNGTLMQYFE	WYTPNDGQHW	KRLQNDAEHL	SDIGITAWWI
PPAYKGTSA	DVGYGAYDLY	DLGEFHQKGT	VRTKYGTKGE
LQSAIKSLHS	RDINVYGDVV	INHKGADAT	EDVTAVEVDP
ADRNRRVISGE	HLIKAWTHFH	FPGRGSTYSD	FKWYWHFDFG
TDWDESRKLN	RIYKFQKQKW	DWEVSNEFGN	YDYLMYADID
YDHPDVVAEI	KRWGTWYANE	LQLDGFRLDA	VKHKFSFLR
DWVNHVREKT	GKEMFTVAEY	WSNDLGALEN	YLNKTNFNHS
VFOVPLHYQF	HAASTQGGY	DMRKLNGTV	VSKHPLKSVT
FVDNHDTQPG	QSLESTVQTW	FKPLAYAFIL	TRESGYPQVF

YGD MYG TKGD	SQREIPALKH	KIEPILKARK	QYAYGAQHDY
FDHHDIVGWT	REGDSSVANS	GLAALITDGP	GGAKRMYVGR
QNAGETWHDI	TGNRSEPVVI	NSEGWGEFHV	NGGSVSIYVQ
R			

DİZİ İD. NO 1'e sahip bu amilaz yapaydır ve teknikte bilinen usullerle imal edilebilir.

DİZİ İD. NO: 2'ye Sahip Alfa-Amilaz:

VNGTLMQYFE	WYTPNDGQHW	KRLQNDAEHL	SDIGITAVWI
PPAYKAISQA	DVGYGAYDLY	DLGEFHQKGT	VRTKYGTKGE
LQSAIKSLHS	RDINVYGDVW	INHKAGADAT	EDVTAVEVDP
ADRNRVISGE	HLIKAWTHFH	FPGRGSTYSD	FKWYWYHFDG
TDWDESRKLN	RIYKFQKQKW	DWEVSNEFGN	YDYLMYADFD
YDHPDVVAEI	KRWGTWYANE	LQLDGFRLDA	VKMIKFSFLR
DWVNHVREKT	GKEMFTVAEY	WSNDLGALEN	YLNKTNFNHS
VFDVPLHYQF	HAASTQGGGY	DMRKLNGTV	VSKHPLKSVT
FVDNHDTQPG	QSLESTVQTW	FKPLAYAFIL	TRESGYPQVF
YGD MYG TKGD	SQREIPALKH	KIEPILKARK	QYAYGAQHDY
FDHHDIVGWT	REGDSSVANS	GLAALITDGP	GGAKRMYVGR
QNAGETWHDI	TGNRSEPVVI	NSEGWGEFHV	NGGSVSIYVQ
R			

- 5 Bu, DİZİ İD. NO: 1'e ait ancak G46A+T47I+G105A+I199F substitüsyonlarının olduğu amilazdır.

Allelik Varyant: "Allelik varyant" terimi bir genin aynı kromozomal lokusta bulunan iki veya daha fazla alternatif formundan herhangi biri anlamına gelir. Allelik varyasyon mutasyon yoluyla doğal olarak ortaya çıkar ve popülasyonlarda polimorfizme neden olabilir.

- 10 Gene mutasyonları sessiz olabilir (kodlanan polipeptitte değişiklik olmadan) veya farklılaşmış amino asit dizilerine sahip polipeptitleri kodlayabilir. Bir polipeptide ait bir allelik varyant bir gene ait bir allelik varyant tarafından kodlanan bir polipeptittir.

- 15 **cDNA:** "cDNA" terimi ökaryotik veya prokaryotik bir hücreden elde edilen olgun, uç birleştirmesi yapılmış, bir mRNA molekülünden ters transkripsiyonla hazırlanabilecek bir DNA molekülü anlamına gelir. cDNA'da, karşılık gelen genomik DNA'da bulunabilecek intron dizileri bulunmaz. Başlangıç, birincil RNA transkripti uç birleşmesi yapılmış olgun mRNA olarak ortaya çıkmadan önce uç birleştirme dahil bir dizi aşamayla işlenen bir mRNA prekürsörüdür.

Kodlayıcı Dizi: "Kodlayıcı dizi" terimi doğrudan bir varyant amino asit dizisini belirleyen bir polinükleotit anlamına gelir. Kodlayıcı dizinin sınırları genellikle ATG, GTG veya TTG gibi bir başlama kodonuyla başlayan ve TAA, TAG veya TGA gibi bir bitiş kodonuyla sonlanan bir açık okuma çerçevesiyle belirlenir. Kodlayıcı dizi bir genomik DNA, cDNA, sentetik DNA veya bunların bir kombinasyonu olabilir.

Kontrol Dizileri: "Kontrol dizileri" terimi mevcut buluşa ait bir varyantı kodlayan bir polinükleotidin ekspresyonu için gerekli nükleik asit dizileri anlamına gelir. Her bir kontrol dizisi varyantı kodlayan polinükleotide doğal (yani, aynı genden) veya yabancı (yani, farklı bir genden) olabilir veya birbirine doğal veya yabancı olabilir. Bu tür kontrol dizileri, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla bir öncüyü, poliadenilasyon dizisini, propeptit dizisini, promotörü, sinyal peptidi dizisini ve transkripsiyon sonlandırıcıyı içerir. Kontrol dizileri en azından bir promotörü ve transkripsiyonu ve translasyonu sonlandırma sinyallerini içerir. Kontrol dizilerinde, söz konusu kontrol dizilerinin bir varyantı kodlayan polinükleotidin kodlama bölgesiyle bağlanmasını kolaylaştıran spesifik restriksiyon alanlarını sağlamak amacıyla bağlayıcılar bulundurulabilir.

Ekspresyon: "Ekspresyon" terimi bir varyantın üretilmesi ile bağlantılı ve bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla transkripsiyon, post-transkripsiyonal modifikasyon, translasyon, post-translasyonel modifikasyon ve salgılama dahil herhangi bir aşamayı içer.

Ekspresyon Vektörü: "Ekspresyon vektörü" terimi bir varyantı kodlayan bir polinükleotidi içeren ve bunun ekspresyonunu sağlayan kontrol dizilerine işlevsel bağlanmış doğrusal veya dairesel bir DNA molekülü anlamına gelir.

Konak Hücre: "Konak hücre" terimi bir nükleik asit yapısıyla veya mevcut buluşa ait bir polinükleotidi içeren ekspresyon vektörüyle transformasyona, transfeksiyona, transdüksiyona veya benzerine eğilimli herhangi bir hücre türü anlamına gelir. "Konak hücre" terimi bir parent (soy) hücrenin, replikasyon sırasında oluşan mutasyonlar nedeniyle parent hücre ile özdeş olmayan herhangi bir dölünü de kapsar.

Gelişmiş Özellik: "Gelişmiş özellik" terimi bir varyant veya bir alfa-amilazla bağlantılı olarak parent veya en yakın önceki tekniğe ait amilazla karşılaştırıldığında gelişmiş bir nitelik anlamına gelir. Bu tür gelişmiş özellikler, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla katalitik etkinlik, katalitik hız, kimyasal stabilite, pH etkinliği, pH stabilitesi, spesifik etkinlik, depolama koşulları altında stabilite, yıkama performansı ve depolama sonrası yıkama performansını içerir; burada depolama süresi 30, 37, 40 veya 45 °C'de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8

veya daha fazla hafta olabilir.

Ayrıştırılmış: "Ayrıştırılmış" terimi doğada oluşmayan bir formda veya ortamda bulunan bir madde anlamına gelir. Ayrıştırılmış maddelerin bunlarla sınırlı kalmayan örnekleri (1) doğal oluşumlu olmayan herhangi bir maddeyi; (2) doğada birlikte bulunduğu doğal oluşumlu bileşenlerinin birinden veya daha fazlasından veya tamamından en azından kısmen ayrılmış halde ve bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla herhangi bir enzimi, varyantı, nükleik asidi, proteini, peptiti veya kofaktörü içeren bir maddeyi; (3) doğada bulunan haliyle bir maddeye göre insan eliyle modifiye edilmiş bir maddeyi; veya (4) madde miktarının doğal olarak birlikte bulunduğu diğer bileşenlere göre artırılmasıyla modifiye edilmiş bir maddeyi (örneğin, maddeyi kodlayan bir genin çoklu kopyaları; maddeyi kodlayan genle doğal olarak bağlantılı promotörden daha kuvvetli bir promotörün kullanılması). Ayrıştırılmış bir madde bir fermentasyon sıvı besiyeri numunesinde mevcut olabilir.

Mutant: "Mutant" terimi bir varyantı kodlayan bir polinükleotit anlamına gelir.

Nükleik Asit Yapısı: "Nükleik asit yapısı" terimi doğal oluşumlu bir genden ayrıştırılmış veya doğada mevcut olmayacağı bir tarzda nükleik asit segmentlerini içerecek şekilde modifiye edilmiş veya sentezle elde edilmiş, bir veya daha fazla kontrol dizisini içeren, gerek tek gerek iki iplikli bir nükleik asit molekülü anlamına gelir.

Parent veya Parent Alfa-Amilaz: "Parent" veya "parent alfa-amilaz" terimi enzim varyantlarını üretmek üzere bir alterasyonun yapıldığı bir alfa-amilaz anlamına gelir. DİZİ İD. NO: 1'e sahip alfa-amilazın parent olduğu söylenebilir, oysa örneğin G46A, T47I, G105A ve I199F sübstitüsyonlarından birini veya daha fazlasını içeren DİZİ İD. NO: 1'e sahip alfa-amilazın DİZİ İD. NO: 1'e sahip alfa-amilazın bir varyantı olduğu söylenebilir. Parent doğal oluşumlu (yabani tip) bir polipeptit veya bunun bir varyantı veya fragmanı veya DİZİ İD. NO: 1'e sahip alfa-amilazla en az %80 dizi özdeşliğine sahip, örneğin DİZİ İD. NO: 1'e sahip alfa-amilazla en az %85, %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98 veya en az %99 dizi özdeşliğine sahip bir başka alfa-amilaz olabilir.

Dizi Özdeşliği: İki amino asit dizisi arasındaki veya iki nükleotit dizisi arasındaki ilintililik "dizi özdeşliği" parametresi ile tanımlanır. Mevcut buluşun amaçları dahilinde iki amino asit dizisi arasındaki dizi özdeşliği, tercihen 5.0.0 veya ileri sürümlü EMBOSS paketi (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite (Avrupa Moleküler Biyoloji Açık Yazılım Paketi), Rice ve diğerleri, 2000, Trends Genet. 16: 276-277) Needle programında uygulamaya geçirilen Needleman-Wunsch algoritmasını (Needleman ve Wunsch, 1970, J.

Mol. Biol. 48: 443453) kullanarak belirlenir. Kullanılan parametreler 10 boşluk açma cezası, 0.5 boşluk uzatma cezası ve EBLOSUM62 (BLOSUM62 EMBOSS sürümü) süstitüsyon matrisidir. "En uzun özdeşlik" etiketli Needle çıktısı (-nobrief opsiyonunu kullanarak elde edilir) özdeşlik yüzdesi olarak kullanılır ve aşağıdaki şekilde hesaplanır:

$$5 \quad (\text{Özdeş Kalıntılar} \times 100) / (\text{Hizalama Uzunluğu} - \text{Hizalamadaki Toplam Boşluk Sayısı})$$

Varyant: "Varyant" terimi bir veya daha fazla (örneğin birkaç) konumda bir alterasyon, yani bir süstitüsyon, insersiyon ve/veya delesyon içeren alfa-amilaz etkinliğine sahip bir polipeptit anlamına gelir. Süstitüsyon bir konumda bulunan amino asidin farklı bir amino asitle yer değiştirmesi anlamına gelir; delesyon bir konumda bulunan amino asidin

10 çıkartılması anlamına gelir; ve insersiyon bir konumda bulunan amino asidin bitişiğine ve hemen arkasına bir amino asidin eklenmesi anlamına gelir. Mevcut buluşa ait alfa-amilaz varyantları 37 °C'de sıvı deterjan modeli B içinde iki hafta depolama sonrasında başlangıçtaki alfa-amilaz etkinliğinin tercihen en az %90'ına, en az %95'ine veya en az %100'üne sahiptir.

Yabani Tip Alfa-Amilaz: "Yabani tip" alfa-amilaz doğal oluşumlu bir mikroorganizma, 15 örneğin doğada bulunan bakteri, maya veya lifli mantar tarafından eksprese edilen bir alfa-amilaz anlamına gelir.

Yıkama Performansı: "Yıkama performansı" terimi bir enzimin, örneğin yıkama veya sert yüzey temizliği sırasında temizlenecek eşyanın üzerinde bulunan lekeleri çıkarma kapasitesi anlamında kullanılır. Yıkama performansı buradaki tanımda açıklanan şekilde delta remisyon 20 değeri (ΔRem) denilen değerle hesaplanmasıyla belirlenir.

Delta Remisyon Değeri (ΔRem): Burada "delta remisyonu" veya "delta remisyon değeri" terimleri bir test materyalinde, örneğin bir CS-28 kumaş parçasında 460 nm'de yapılan yansıtma veya remisyon ölçümünün sonucu olarak tanımlanır (Center For Testmaterials BV, P.O. Box 120, 3133 KT Vlaardingen, Hollanda). Kumaş parçasında zemin değer olarak aynı 25 koşullar altında yıkanan en az bir başka kumaş parçasıyla birlikte ölçüm yapılır. Delta remisyonu, amilaz olmadan yıkanan test materyalinin remisyon değerinden çıkartılan amilazla yıkanan test malzemesinin remisyon değeridir.

Gelişmiş Yıkama Performansı: Burada "gelişmiş yıkama performansı" terimi yıkama performansında, örneğin artan leke temizliğiyle bir başkalaşma sergileyen bir (varyant) enzim 30 (ayrıca enzimlerin bir karışımı, sadece varyantlar olması şart değildir omurgalar da olabilir ve bazı temizlik bileşimleri ile kombinasyon halinde vb.) olarak tanımlanır.

Deterjan Bileşimi

Mevcut buluşa ait deterjan bileşimleri çevre sıcaklığında (örneğin 25 °C) sıvı haldedir.

İzotropik veya yapılaşmış olabilirler ve viskoziteleri oldukça düşük ila çok yüksek arası olabilir, dolayısıyla jellere benzeyebilirler. Ağırlıkça en az %5 su içerirler ve tercihen su

5 esaslıdır, yani bileşimde çözücünün esas kısmını su oluşturur. Yardımcı çözücüler olarak sudan daha az bir miktarda propilen glikol ve gliserol/gliserin gibi hidrotroplar dahil edilebilir. Bileşimde yüzey aktif maddenin, polimerlerin, çözücü geliştirici maddelerinin, enzimlerin ve benzerinin çözeltide tutulması için su gereklidir. Belirtilen su miktarı hem serbest suyu hem bağlı suyu içerir. Bileşimde su miktarı tercihen ağırlıkça en az %20, daha

10 tercihen ağırlıkça en az %30'dur.

Yüzey Aktif Madde Sistemi

Buluşa uygun sıvı deterjan ağırlıkça en az %3 bir yüzey aktif madde sistemi içermekte olup,

burada yüzey aktif madde sistemi ağırlıkça %10 ila %100 bir anyonik yüzey aktif madde

15 içerir. Tercihen, sıvı deterjan ağırlıkça en az %3 ila yaklaşık %40 yüzey aktif madde sistemi,

örneğin yaklaşık %5 ila yaklaşık %30, örneğin yaklaşık %5 ila yaklaşık %15 veya yaklaşık

%20 ila yaklaşık %25 yüzey aktif madde sistemi içerir. Yüzey aktif madde sistemi tamamen

bir veya daha fazla anyonik yüzey aktif maddeden oluşabildiği gibi noniyonik ve/veya

katyonik yüzey aktif maddeler gibi başka yüzey aktif maddeleri de içerebilir. Yüzey aktif

madde(maddeler) uygulamanın türüne göre seçilir ve teknikte bilinen herhangi bir geleneksel

20 yüzey aktif maddeyi(maddeleri) içerir. Yüzey aktif madde sistemini oluşturan yüzey aktif

maddeler 'Surface Active Agents' Cilt 1, Schwartz ve Perry, Interscience 1949; Cilt 2,

Schwartz, Perry ve Berch, Interscience 1958; Manufacturing Confectioners Company

tarafından yayınlanan 'McCutcheon's Emulsifiers and Detergents' veya Tenside Taschenbuch',

H. Stache, 2. Baskı, Carl Hauser Verlag, 1981 referanslarında açıklanan yüzey aktif

25 maddelerden seçilebilir.

Anyonik yüzey aktif maddelerin bunlarla sınırlı kalmayan örnekleri sülfatlar ve sülfonatlar,

özellikle doğrusal alkilbensülfonatlar (LAS), LAS izomerleri, dalı alkilbensülfonatlar

(BABS), fenilalkansülfonatlar, alfa-olefinsülfonatlar (AOS), olefin sülfonatlar, alken

sülfonatlar, alkan-2,3-diilbis(sülfatlar), hidroksialkansülfonatlar ve disülfonatlar, alkil

30 sülfatlar (AS), örneğin sodyum dodesil sülfat (SDS), yağ alkolü sülfatları (FAS), primer alkol

sülfatları (PAS), alkol etersülfatlar (AES veya AEOS veya FES, alkol etoksisülfatları veya

yağ alkolü eter sülfatları olarak da bilinir), sekonder alkansülfonatlar (SAS), parafin

sülfonatlar (PS), ester sülfonatlar, sülfonlu yağ asidi gliserol esterleri, alfa-sülfö yağ asidi metil esterleri (alfa-SFMe veya SES), örneğin metil ester sülfonat (MES), alkil veya alkenilsüksinik asit, dodesenil/tetradesenil süksinik asit (DTSA), amino asitlerin yağ asidi türevleri, sülfö-süksinik asit veya sabun diesterleri ve monoesterleri ve bunların

5 kombinasyonlarını içerir. Tercih edilen bir alkol etersülfat sodyum lauril eter sülfat veya SLES'dir.

Oldukça tercih edilen bir yüzey aktif madde sistemi iki farklı anyonik yüzey aktif madde, tercihen doğrusal alkil benzen sülfonat ve bir sülfat, örneğin LAS ve SLES içerir.

Anyonik yüzey aktif madde sabun da (yağ asidi tuzu) içerebilir. Tercih edilen bir sabun
10 hidrojene hindistancevizi yağ asidinin, örneğin Prifac(R) 5908'in (Croda) nötrale edilmesiyle yapılır. Doymuş ve doymamış yağ asitlerinin karışımları da kullanılabilir.

Tercihen, yüzey aktif madde sistemi ağırlıkça %10 ila %100, daha tercihen ağırlıkça %25 ila %50 doğrusal alkilbenzen sülfonat (LAS) yüzey aktif madde sistemi içerir. Daha da tercihen, yüzey aktif madde sistemi ağırlıkça %5 ila %75 doğrusal alkilbenzen sülfonat (LAS) yüzey
15 aktif madde sistemi ve ağırlıkça %5 ila %90 sodyum lauril eter sülfat (SLES) yüzey aktif madde sistemi içerir.

Deterjan bileşimleri anyonik yüzey aktif maddeye ilaveten genellikle yüzey aktif madde sistemi ağırlığına yaklaşık %0.2 ila yaklaşık %50, örneğin yüzey aktif madde sistemi ağırlığına yaklaşık %0.5 ila yaklaşık %30, özellikle yaklaşık %1 ila yaklaşık %20, yaklaşık
20 %3 ila yaklaşık %10, örneğin yaklaşık %3 ila yaklaşık %5 veya yaklaşık %8 ila yaklaşık %12 bir noniyonik yüzey aktif madde içerir. Uygun noniyonik yüzey aktif maddeler alkol etoksilatlar (AE veya AEO), alkol propoksilatlar, propoksillenmiş yağ alkolleri (PFA), alkoksillenmiş yağ asidi alkil esterleri, örneğin etoksillenmiş ve/veya propoksillenmiş yağ asidi alkil esterleri, alkilfenol etoksilatlar (APE), nonilfenol etoksilatlar (NPE),
25 alkilpoliglikozitler (APG), alkoksillenmiş aminler, yağ asidi monoetanolamitleri (FAM), yağ asidi dietanolamitleri (FADA), etoksillenmiş yağ asidi monoetanolamitleri (EFAM), propoksillenmiş yağ asidi monoetanolamitleri (PFAM), polihidroksi alkil yağ asidi amitleri veya glukozaminin N-açıl N-alkil türevleri (glukamitler, GA veya yağ asidi glukamidi, FAGA) ve ayrıca SPAN ve TWEEN ticari isimleriyle piyasada bulunan ürünleri ve bunların
30 kombinasyonlarını içerir. Tercih edilen bir noniyonik yüzey aktif madde molekül başına 3 ila 9 etilen oksit birimi içeren bir C12-C18 etoksillenmiş alkoldür. Daha fazla tercih edilen ortalama 5 ila 9 etilen oksit gruplu, daha tercihen ortalama 7 etilen oksit gruplu C12-C15

primer, doğrusal etoksillenmiş alkollerdir.

Özellikle tercih edilen buluşa uygun bir sıvı deterjan, yüzey aktif madde sistemi ağırlığınca %5 ila %75 doğrusal alkilbenzen sülfonat (LAS), yüzey aktif madde sistemi ağırlığınca %5 ila %90 sodyum lauril eter sülfat (SLES) ve yüzey aktif madde sistemi ağırlığınca %5 ila %60 bir noniyonik yüzey aktif madde içerir.

Yüzey aktif madde(maddeler) tipik olarak ağırlıkça yaklaşık %0.1 ila %60, örneğin yaklaşık %1 ila yaklaşık %40 veya yaklaşık %3 ila yaklaşık %20 veya yaklaşık %3 ila yaklaşık %10 bir seviyede bulunur. Yüzey aktif madde(maddeler) arzu edilen temizlik uygulamasına göre seçilir ve teknikte bilinen herhangi bir geleneksel yüzey aktif maddeyi(maddeleri) içerir.

10 Deterjanlarda kullanım için teknikte bilinen herhangi bir yüzey aktif madde kullanılabilir.

Eğer istenirse, buluşa uygun sıvı deterjan bileşimleri ağırlıkça yaklaşık %0 ila yaklaşık %10 bir kationik yüzey aktif madde de içerebilir. Kationik yüzey aktif maddelerin bunlarla sınırlı kalmayan örnekleri alkildimetil etanolamin kuat (ADMEAQ), setiltrimetil -amonyum bromür (CTAB), dimetil distearilamonyum klorür (DSDMAC) ve alkilbenzil-dimetil amonyum, alkil kuaterner amonyum bileşikler, alkoksillenmiş kuaterner amonyum (AQA) bileşikler ve bunların kombinasyonlarını içerir.

15 Buluşa ait sıvı deterjan bileşimi ağırlıkça yaklaşık %0 ila yaklaşık %10 yarı kutuplu bir yüzey aktif madde de içerebilir. Yarı kutuplu yüzey aktif maddelerin bunlarla sınırlı kalmayan örnekleri amin oksitleri (AO), örneğin alkildimetil aminoksit, N-(koko alkil)-N,N-dimetil amin oksit ve N-(donyağı-alkil)-N,N-bis(2-hidroksietil)amin oksidi, yağ asidi alkanolamitlerini ve etoksillenmiş yağ asidi alkanolamitlerini ve bunların kombinasyonlarını içerir.

25 Son olarak, buluşa ait sıvı deterjan bileşimi ağırlıkça yaklaşık %0 ila yaklaşık %10 bir zwitteriyonik yüzey aktif madde içerebilir. Zwitteriyonik yüzey aktif maddelerin bunlarla sınırlı kalmayan örnekleri betain, alkildimetil betain, sülfobetain ve bunların kombinasyonlarını içerir.

Alfa-Amilaz

Varyantların İsimlendirilmesine ve Amino Asit Konumu Sayısına İlişkin

Konvansiyonlar

30 Mevcut buluşun amaçları dahilinde, DİZİ İD. NO: 1'de açıklanan olgun polipeptit bir başka alfa-amilazda karşılık gelen amino asit kalıntısının belirlenmesinde kullanılır. Bir başka alfa-

amilazın amino asit dizisi DİZİ İD. NO: 1'de açıklanan olgun polipeptitle hizalanır ve hizalamaya dayanarak, DİZİ İD. NO: 1'de açıklanan olgun polipeptitteki herhangi bir amino asit kalıntısına karşılık gelen amino asit konumu sayısı, tercihen 5.0.0 veya ileri sürümlü EMBOSS paketi (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite (Avrupa Moleküler Biyoloji Açık Yazılım Paketi), Rice ve diğerleri, 2000, Trends Genet. 16: 276-277) Needle programında uygulamaya geçirilen Needleman-Wunsch algoritmasını (Needleman ve Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) kullanarak belirlenir. Kullanılan parametreler 10 boşluk açma cezası, 0.5 boşluk uzatma cezası ve EBLOSUM62 (BLOSUM62 EMBOSS sürümü) süstitüsyon matrisidir. Bir başka alfa-amilazda karşılık gelen amino asit kalıntısının tanımlanması çeşitli bilgisayar programlarını kullanarak çok sayıda polipeptit dizisinin hizalanmasıyla belirlenebilir; söz konusu bilgisayar programları bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla varsayılan ilgili parametrelerinin kullanıldığı MUSCLE (log beklentili çoklu dizi karşılaştırması; 3.5 veya daha ileri sürüm; Edgar, 2004, Nucleic Acids Research 32: 1792-1797), MAFFT (6.857 veya daha ileri sürüm; Katoh ve Kuma, 2002, Nucleic Acids Research 30: 3059-3066; Katoh ve diğerleri, 2005, Nucleic Acids Research 33: 511-518; Katoh ve Toh, 2007, Bioinformatics 23: 372-374; Katoh ve diğerleri, 2009, Methods in Molecular Biology 537: 39-64; Katoh ve Toh, 2010, Bioinformatics 26: 1899-1900) ve ClustalW uygulamalı EMBOSS EMMA'yı (1.83 veya daha ileri sürüm; Thompson ve diğerleri, 1994, Nucleic Acids Research 22: 4673-4680) içerir.

Diğer enzim, geleneksel dizi bazlı karşılaştırmanın aralarındaki ilişkiyi saptamakta başarısız kalacağı şekilde DİZİ İD. NO: 1'e sahip olgun polipeptitten sapma gösterdiğinde (Lindahl ve Elofsson, 2000, J. Mol. Biol. 295: 613-615) başka ikili dizi karşılaştırma algoritmaları kullanılabilir. Veri tabanlarında arama yapmakta polipeptit ailelerinin (profiller) olasılıksal temsillerinin uygulandığı arama programlarının kullanılmasıyla dizi bazlı aramada yüksek hassasiyet elde edilebilir. Örneğin, PSI-BLAST programında profiller yinelemeli bir veri tabanı arama işlemi ile üretilir ve uzak homologları saptama kapasitesine sahiptir (Atschul ve diğerleri, 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402). Eğer polipeptit ailesi veya üst ailesi protein yapısı veri tabanlarında bir veya daha fazla temsilciye sahipse daha da büyük bir hassasiyet elde edilebilir. GenTHREADER (Jones, 1999, J. Mol. Biol. 287: 797-815; McGuffin ve Jones, 2003, Bioinformatics 19: 874-881) gibi programlar, bir sorgu dizisinin yapısal katlanışını kestiren bir sinir ağına girdi olarak çeşitli kaynaklardan (PSI-BLAST, sekonder yapı kestirimi, yapısal hizalama profilleri ve çözünme potansiyelleri) gelen bilgiyi kullanır. Aynı şekilde, yapısı bilinmeyen bir dizinin SCOP veri tabanında bulunan üst

aile modelleriyle hizalanmasında Gough ve diğerleri, 2000, J. Mol. Biol. 313: 903-919 referansında açıklanan usul kullanılabilir. Bu hizalamalar polipeptit için homoloji modellerinin oluşturulmasında da kullanılabilir ve bu modeller bu amaçla geliştirilmiş çeşitli araçları kullanarak doğruluk açısından incelenebilir.

- 5 Yapısı bilinen proteinlerde yapısal hizalamaların alınması ve oluşturulması için çeşitli araçlar ve kaynaklar mevcuttur. Örneğin proteinlerin SCOP üst aileleri yapısal olarak hizalanmıştır ve bu hizalamalar erişilebilir ve indirilebilir haldedir. İki veya daha fazla protein yapısı mesafe hizalama matrisi (Holm ve Sander, 1998, Proteins 33: 88-96) veya kombinatoryal uzatma (Shindyalov ve Bourne, 1998, Protein Engineering 11: 739-747) gibi çeşitli
- 10 algoritmaları kullanarak hizalanabilir ve bu algoritma uygulamaları ilaveten bir ilgili yapıyla yapı veri tabanlarının sorgulanmasında kullanılabilir ve bu şekilde olası yapısal homologlar keşfedilebilir (örneğin, Holm ve Park, 2000, Bioinformatics 16: 566-567). Mevcut buluşa ait varyantların açıklanmasında referans kolaylığı sağlamak için aşağıda açıklanan nomenklatür uyarlanmıştır. Kabul edilmiş IUPAC tek harfli veya üç harfli amino asit kısaltması
- 15 kullanılmıştır.

Süstitüsyonlar. Bir amino asit süstitüsyonu için aşağıdaki nomenklatür kullanılır: Orijinal amino asit, konum, süstitüe edilmiş amino asit. Dolayısıyla, treoninin konum 226'da alaninle süstitüsyonu "Thr226Ala" veya "T226A" olarak gösterilir. Çoklu mutasyonlar artı ("+") işaretleriyle ayrılır, örneğin "Gly205Arg + Ser411 Phe" veya "G205R + S411F" sırasıyla

20 konum 205 ve 411'de glisin (G) argininle (R) ve serinin (S) fenilalaninle (F) süstitüsyonlarını temsil eder.

- Delesyonlar. Bir amino asit delesyonu için aşağıdaki nomenklatür kullanılır: Orijinal amino asit, konumu, *. Dolayısıyla glisin konum 195'te delesyonu "Gly195*" veya "G195*" olarak gösterilir. Çoklu delesyonlar artı işaretleriyle ("+"), örneğin, "Gly195* + Ser411*" veya "G195* + S411*" şeklinde gösterilir.
- 25

- İnsersiyonlar. Bir amino asit insersiyonu için aşağıdaki nomenklatür kullanılır: Orijinal amino asit, konum, orijinal amino asit, eklenen amino asit. Dolayısıyla konum 195'te glisinden sonra lizin insersiyonu "Gly195GlyLys" veya "G195GK" şeklinde gösterilir. Çok sayıda amino asit insersiyonu [Orijinal amino asit, konum, orijinal amino asit, eklenen amino asit #1, eklenen
- 30 amino asit #2; vb.] şeklinde gösterilir. Örneğin, konum 195'te glisinden sonra lizin ve alanin insersiyonu "Gly195GlyLysAla" veya "G195GKA" şeklinde gösterilir.

Bu durumlarda eklenen amino asit kalıntısı(kalıntıları), eklenen amino asit

kalıntısı(kalıntıları) öncesinde amino asit kalıntısının konum sayısına küçük harfler ekleyerek numaralandırılır. Yukarıdaki örnekte, dizi aşağıdaki şekilde olacaktır:

Parent:	Varyant:
195	195 195a 195b
G	G - K - A

Çoklu Alterasyonlar. Çoklu alterasyonlar içeren varyantlar artı işaretleriyle ("+") ayrılır, örneğin "Arg170Tyr+Gly195Glu" veya "R170Y+G195E" konum 170 ve 195'te arginin ve glisinin sırasıyla tirozin ve glutamik asitle bir süstitüsyonunu temsil eder.

Farklı Alterasyonlar. Bir konumda farklı alterasyonların yerleştirilebilmesi durumunda, farklı alterasyonlar bir virgülle ayrılır, örneğin "Arg170Tyr,Glu" argininin konum 170'te tirozin veya glutamik asitle bir süstitüsyonunu temsil eder. Dolayısıyla, "Tyr167Gly,Ala + Arg170Gly,Ala" şu varyantları gösterir: "Tyr167Gly+Arg170Gly", "Tyr167Gly+Arg170Ala", "Tyr167Ala+Arg170Gly" ve "Tyr167Ala+Arg170Ala".

Buluşa ait sıvı deterjan bileşimi DİZİ İD. NO: 1'le en az %95 dizi özdeşliğine sahip bir alfa-amilaz içerir ve numaralandırma için DİZİ İD. NO: 1 kullanıldığında söz konusu alfa-amilaz G46A+T47I+G105A+I199F süstitüsyonlarını içerir.

Alfa-amilaz başka alterasyonlar da içerebilir. Örneğin amilaz ayrıca 1-20 alterasyon örneğin 1-10 veya 1-5, örneğin 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 veya 10 başka alterasyon içerebilmekte olup, burada alterasyonlar bağımsız olarak süstitüsyonlar, delesyonlar ve/veya insersiyonlardır ve alterasyonlar DİZİ İD. NO: 1'e sahip amino asit dizisiyle ilişkilidir.

Amino asit değişiklikleri veya alterasyonları önemsiz bir yapıda olabilir, yani proteinin katlanmasını ve/veya etkinliğini anlamlı ölçüde etkilemeyen koruyucu amino asit süstitüsyonları veya insersiyonları; tipik olarak 1-30 amino asitlik küçük delesyonlar; küçük amino veya karboksil terminal uzantıları, örneğin bir amino-terminal metionin kalıntısı; 20-25 kalınlık küçük bir bağlayıcı peptit; veya net yükü veya bir başka fonksiyonu değiştirerek saflaştırmayı kolaylaştıran küçük bir uzanti, örneğin bir poli-histidin kısmı, bir antijenik epitop veya bir bağlayıcı domen olabilir. Koruyucu süstitüsyonların örnekleri bazik amino asitler (arginin, lizin ve histidin), asidik amino asitler (glutamik asit ve aspartik asit), kutuplu amino asitler (glutamin ve asparajin), hidrofobik amino asitler (lösin, izolösin ve valin), aromatik amino asitler (fenilalanin, triptofan ve tirozin) ve küçük amino asitler (glisin, alanin, serin, treonin ve metionin) gruplarındadır. Spesifik etkinliği genel olarak farklılaştırmayan

amino asit sübstütüsyonları teknikte bilinmekte ve örneğin H. Neurath ve R.L. Hill, 1979, "The Proteins", Academic Press, New York referansında açıklanmaktadır. Bildik sübstütüsyonlar 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 ve Asp/Gly

5 şeklindedir. Alternatif olarak, amino asit değışiklikleri polipeptitlerin fiziksel ve kimyasal özelliklerini farklılaştıran bir yapıdadır. Örneğin, amino asit değışiklikleri polipeptidin ısı stabilitesini iyileştirebilir, substrat spesifikliğini farklılaştırabilir, pH optimumunu ve benzerini değıştirebilir.

Bir polipeptitteki esansiyel amino asitler teknikte bilinen usullere göre, örneğin alana

10 yönlendirilmiş mutagenез veya alanin taramalı mutagenез yoluyla tanımlanabilir (Cunningham ve Wells, 1989, Science 244: 1081-1085). İkinci bahsedilen teknikte, moleküldeki her kalıntıda tekli alanin mutasyonları yapılır ve ortaya çıkan mutant moleküller alfa-amilaz etkinliği bakımından test edilerek molekülün etkinliği açısından kritik önemi olan amino asit kalıntıları tanımlanır. Ayrıca bakınız, Hilton ve diğerleri, 1996, J. Biol. Chem. 271:

15 4699-4708. Enzimin etkin bölgesi veya bir başka biyolojik etkileşim de fiziksel yapı analizi ile belirlenebilir, örneğin varsayılan temas alanı amino asitleri mutasyonu ile birlikte nükleer manyetik rezonans, kristallografi, elektron kırınımı veya foto-afiniteli işaretleme gibi tekniklerle belirlenir. Bakınız örneğin, de Vos ve diğerleri, 1992, Science 255: 306-312; Smith ve diğerleri, 1992, J. Mol. Biol. 224: 899-904; Wlodaver ve diğerleri, 1992, FEBS

20 Lett. 309: 59-64. Esansiyel amino asitlerin kimlikleri de bir ilgili polipeptitle hizalama yaparak çıkartılabilir.

Başka düzenlemelerde, buluşa ait sıvı deterjan bileşiminin amilazı DİZİ İD. NO: 1'e ait amilazla en az %96 veya en az %97 veya en az %98 veya en az %99 ancak %100'den az dizi özdeşliğine sahiptir ve G46A+T47I+G105A+I199F sübstütüsyonlarını içerir.

25 Sonuç olarak, depolama sonrasında gelişmiş stabiliteye ve/veya etkinliğe ve/veya sıvı deterjanların depolanması sonrasında nişasta içeren lekeler üzerinde gelişmiş yıkama performansına sahip sıvı deterjan bileşimleri sağlanmaktadır. Depolama süresi en az 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 veya en az 26 hafta veya hatta daha da uzun süreler olabilir. Depolama sırasındaki sıcaklık uygun herhangi bir

30 sıcaklık, örneğin 20 ve 40 °C arası, örneğin 20, 22, 25, 30, 35, 37 veya 40 °C olabilir. Mevcut buluşu yapanlar, örneğin 40 °C'de 1 hafta sonrasında veya 37 °C'de 2 hafta depolama sonrasında, mevcut buluşa ait sıvı deterjanın DİZİ İD. NO: 1'e sahip alfa-amilaz içeren benzer

bir sıvı deterjanla karşılaştırıldığında, özellikle nişasta içeren lekeler üzerinde gelişmiş yıkama performansına sahip olduğunu bulmuşlardır (bakınız aşağıdaki Örnekler). Yıkama performansında görülen bu gelişmenin bir nedeni DİZİ İD. NO: 1’de yukarıda bahsedilen sübstitüsyonlara sahip amilazların, DİZİ İD. NO: 1’e sahip amilazla karşılaştırıldığında sıvı deterjanlarda gelişmiş stabiliteye sahip olmaları olabilir. Dolayısıyla, bir düzenlemede buluş yukarıda tanımlanan şekilde bir alfa-amilaz içeren bir sıvı deterjan bileşimine ilişkin olup, burada söz konusu alfa-amilaz DİZİ İD. NO: 1’e sahip alfa-amilaza göre sıvı deterjanlarda gelişmiş bir depolama stabilitesine sahiptir.

Gelişmiş depolama stabilitesi 1 ila 8 hafta, örneğin 2-6 hafta, tercihen 2, 3, 4, 5 veya 6 hafta bir depolama süresi sonrasında kalıntı etkinlik olarak belirlenebilir (bakınız Örnekler). Bir başka düzenlemede, buluş yukarıda açıklanan şekilde bir amilaz içeren bir sıvı deterjan bileşimine ilişkin olup, burada sıvı deterjan bileşimi söz konusu sıvı deterjanların 37 °C’de iki hafta depolanmasından sonra DİZİ İD. NO: 1’e sahip alfa-amilaz içeren sıvı deterjan bileşimine göre gelişmiş yıkama performansına sahiptir.

Buluşa ait sıvı deterjan bileşimi ayrıca bir şelatlaştırıcı madde içermekte olup, burada şelatlaştırıcı madde HEDP veya aynı koşullar altında HEDP’ye eşit veya daha yüksek şelatlaştırma kapasitesine sahip bir başka şelatlaştırıcı maddedir, burada söz konusu HEDP veya bir başka şelatlaştırıcı madde ağırlıkça en az %0.25 bir konsantrasyonda mevcuttur. Yukarıda bahsedildiği gibi, deterjan bileşimlerine şelatlaştırıcı maddeler ilave edilebilir. Bu maddeler bileşimde serbest kalsiyum iyonlarının konsantrasyonunu azaltma işlevini görür. Bununla birlikte, alfa-amilazların çoğu etkinleşmek için kalsiyuma ihtiyaç duyar. Mevcut buluşu yapanlar İstem 1’de tanımlanan şekildeki alfa-amilazın şelatlaştırıcı maddeler içeren sıvı deterjanlarda şaşırtıcı bir şekilde stabil kaldığını ve hatta yüksek veya çok yüksek konsantrasyonda şelatlaştırıcı madde içeren sıvı deterjanlarda bile stabil kaldığını bulmuşlardır. Şelatlaştırıcı maddelerin serbest kalsiyum iyonu konsantrasyonunu azaltma kapasiteleri Örnek 5’e uygun şekilde tanımlanabilir (ayrıca bakınız Tablo 12.1).

Bir düzenlemede, buluşa uygun sıvı deterjan en az %0.25 (ağ/ağ), örneğin en az %0.3 veya en az %0.4, örneğin en az %0.5 veya %0.6, %0.7, %0.8, %0.9, %1.0 (ağ/ağ) veya hatta en az %1.5 (ağ/ağ) bir konsantrasyonda bir şelatlaştırıcı madde içerir. Şelatlaştırıcı madde, %0.25’te (ağ/ağ) şelatlaştırıcı madde HEDP’nin serbest kalsiyum iyonu konsantrasyonunu azaltma kapasitesine eşit veya bundan daha iyi bir serbest kalsiyum iyonu konsantrasyonunu azaltma kapasitesine sahiptir. Serbest kalsiyumun azaltılmasına ilişkin bu kapasite 21 °C veya 37

°C’de model deterjan 2 sıvı deterjanda ölçülebilir. Sonuç olarak, şelatlaştırıcı maddeler serbest kalsiyum iyonu konsantrasyonunu azaltma kapasitesinin, %0.25’te (ağ/ağ) HEDP’nin gösterdiği söz konusu kapasiteye en azından eşit olacak bir konsantrasyonda eklenmelidir.

Yani, eğer aşağıda açıklanan şekilde serbest kalsiyum iyonu konsantrasyonunu azaltma

- 5 kapasitesine sahip bir şelatlaştırıcı madde kullanılırsa ve bu kapasite sıvı deterjanlarda veya tamponda eşit konsantrasyonlarda HEDP’nin söz konusu kapasitesinden daha az ise, bu durumda şelatlaştırıcı madde %0.25’te (ağ/ağ) HEDP’nin söz konusu kapasitesiyle en azından eşit bir serbest kalsiyum iyonu konsantrasyonunu azaltma kapasitesine ulaşmak için daha yüksek konsantrasyonlarda eklenmelidir. Serbest kalsiyum iyonu konsantrasyonunu azaltma
- 10 kapasitesini etkileyen faktörler teknikte uzman kişi tarafından bilinir. Bunlar kalsiyum için bağlanma afinitesini ve şelatlaştırıcı madde konsantrasyonunu içerir. Bir başka düzenlemede, şelatlaştırıcı madde sıvı deterjana en az %0.3 veya en az %0.4, örneğin en az %0.5 veya %0.6, %0.7, %0.8, %0.9 veya %1.0 (ağ/ağ) HEDP veya hatta en az %1.5, %1.7, %1.8, %1.9 veya en az %2.0 (ağ/ağ) HEDP ilavesine karşılık gelen bir miktarda eklenir. Sonuç olarak,
- 15 şelatlaştırıcı maddeler sıvı deterjanda serbest kalsiyum iyonu konsantrasyonunu azaltma kapasitesinin, en az %0.3 veya en az %0.4, örneğin en az %0.5 veya %0.6, %0.7, %0.8, %0.9 veya %1.0 (ağ/ağ) veya hatta en az %1.5, %1.7, %1.8, %1.9 veya en az %2.0 (ağ/ağ) HEDP bir konsantrasyonda HEDP’nin söz konusu kapasitesine en azından eşit olacak bir konsantrasyonda eklenmelidir.

- 20 Bir başka düzenlemede, serbest kalsiyum iyonu konsantrasyonunu azaltma kapasiteleri söz konusu kapasitenin 21 °C’de ve pH 8.0’da 80 mM potasyum klorür ve 49 mM EPPS içinde ölçülmesiyle karşılaştırıldı. Bir şelatlaştırıcı maddenin serbest kalsiyum iyonu konsantrasyonunu azaltma kapasitesi aşağıda "Şelatlaştırıcı Maddelerin Özelliklerinin Belirlenmesi" altında daha ayrıntılı açıklanmaktadır. Bir düzenlemede, şelatlaştırıcı
- 25 HEDP’dir. Başka düzenlemelerde buluşa ait sıvı deterjan en az %0.25 (ağ/ağ), örneğin en az %0.3 veya en az %0.4, örneğin en az %0.5 veya %0.6, %0.7, %0.8, %0.9 veya %1.0 (ağ/ağ) veya hatta en az %1.2, %1.3, %1.4, %1.5, %1.6, %1.7, %1.8, %1.9 veya en az %2.0 (ağ/ağ) HEDP içerir.

Bir başka düzenlemede, buluşa ait sıvı deterjan, söz konusu deterjanda şelatlaştırma

- 30 kapasitesinin en azından %0.25 (ağ/ağ) HEDP eklendiğinde elde edilen şelatlaştırma kapasitelerine karşılık gelmesini sağlayan konsantrasyonlarda bir veya daha fazla şelatlaştırıcı madde içerir.

Bir başka düzenlemede, buluşa ait sıvı deterjan, söz konusu deterjanda şelatlaştırma kapasitesinin en azından %0.3 (ağ/ağ) HEDP eklendiğinde elde edilen şelatlaştırma kapasitelerine karşılık gelmesini sağlayan konsantrasyonlarda bir veya daha fazla şelatlaştırıcı madde içerir. Bir başka düzenlemede, buluşa ait sıvı deterjan, söz konusu deterjanda şelatlaştırma kapasitesinin en azından %0.4 (ağ/ağ) HEDP eklendiğinde elde edilen şelatlaştırma kapasitelerine karşılık gelmesini sağlayan konsantrasyonlarda bir veya daha fazla şelatlaştırıcı madde içerir. Bir başka düzenlemede, buluşa ait sıvı deterjan, söz konusu deterjanda şelatlaştırma kapasitesinin en azından %0.5 (ağ/ağ) HEDP eklendiğinde elde edilen şelatlaştırma kapasitelerine karşılık gelmesini sağlayan konsantrasyonlarda bir veya daha fazla şelatlaştırıcı madde içerir. Bir başka düzenlemede, buluşa ait sıvı deterjan, söz konusu deterjanda şelatlaştırma kapasitesinin en azından %0.6 (ağ/ağ) HEDP eklendiğinde elde edilen şelatlaştırma kapasitelerine karşılık gelmesini sağlayan konsantrasyonlarda bir veya daha fazla şelatlaştırıcı madde içerir.

Bir başka düzenlemede, buluşa ait sıvı deterjan, söz konusu deterjanda şelatlaştırma kapasitesinin en azından %0.7 (ağ/ağ) HEDP eklendiğinde elde edilen şelatlaştırma kapasitelerine karşılık gelmesini sağlayan konsantrasyonlarda bir veya daha fazla şelatlaştırıcı madde içerir. Bir başka düzenlemede, buluşa ait sıvı deterjan, söz konusu deterjanda şelatlaştırma kapasitesinin en azından %1.0 (ağ/ağ) HEDP eklendiğinde elde edilen şelatlaştırma kapasitelerine karşılık gelmesini sağlayan konsantrasyonlarda bir veya daha fazla şelatlaştırıcı madde içerir.

Bir başka düzenlemede, buluşa ait sıvı deterjan, söz konusu deterjanda şelatlaştırma kapasitesinin en azından %1.5 (ağ/ağ) HEDP eklendiğinde elde edilen şelatlaştırma kapasitelerine karşılık gelmesini sağlayan konsantrasyonlarda bir veya daha fazla şelatlaştırıcı madde içerir. Bir başka düzenlemede, buluşa ait sıvı deterjan, söz konusu deterjanda şelatlaştırma kapasitesinin en azından %2.0 (ağ/ağ) HEDP eklendiğinde elde edilen şelatlaştırma kapasitelerine karşılık gelmesini sağlayan konsantrasyonlarda bir veya daha fazla şelatlaştırıcı madde içerir.

Bir başka düzenlemede, şelatlaştırıcı madde en az %0.25 (ağ/ağ) veya en az %0.3 veya en az %0.4, örneğin en az %0.5 veya %0.6, %0.7, %0.8, %0.9 veya %1.0 (ağ/ağ) veya hatta en az %1.5, %1.7, %1.8, %1.9 veya en az %2.0 (ağ/ağ) bir konsantrasyonda DTMPA'dır.

Örneklerde mevcut buluşa ait sıvı deterjanın amilazının (örneğin DİZİ İD. NO: 1'e ait, G46A+T47I+G105A+I199F mutasyonlarına sahip amilaz), DİZİ İD. NO: 1'e ait amilazı

içeren sıvı deterjanlarla karşılaştırıldığında yüksek bir konsantrasyonda şelatlaştırıcı madde içeren sıvı deterjanlarda (model deterjan 2) gelişmiş stabiliteye ve gelişmiş yıkama performansına sahip olduğu görülebilmektedir. Daha uzun depolama sürelerinde ve daha yüksek sıcaklıklarda farklılık daha belirgin olacaktır. Dolayısıyla, mevcut buluşa ait sıvı deterjan bileşimi, yüksek şelatlaştırma kapasitelerinde bile (serbest kalsiyum iyonu konsantrasyonunu azaltmak için) amilazın stabil kalması ve iyi yıkama performansına sahip olma ve Termamyl™ veya DİZİ İD. NO 1'e ait amilaza göre daha iyi performans sergileme avantajına sahiptir.

Buluşa ait sıvı deterjan bileşimi bir çamaşır deterjanı bileşimidir. Buluşa ait sıvı deterjan bileşiminin pH'ı en az 7.5, 8.0, 8.5 veya 9.0 olabilir. Sıvı deterjan bileşimi ayrıca tercihen ağırlıkça %0.01 ila %99.9 bir miktarda aşağıda açıklanan şekilde bir veya daha fazla temizlemeye yardımcı madde içerebilir. Başka düzenlemelerde, buluşa ait sıvı deterjan bileşimi ilaveten bir veya daha fazla başka enzim, örneğin bir proteaz, lipaz, peroksidaz, bir başka amilolitik enzim, glukoamilaz, maltogenik amilaz, CGTaz, mannanaz, kutinaz, lakkaz ve/veya bir selülaz içerir.

Alfa-amilaz sıvı deterjan bileşimine yıkama çözeltisi litresi başına 0.001-200 mg proteine, örneğin 0.005-100 mg proteine, tercihen 0.01-50 mg proteine, örneğin 0.028 mg proteine veya daha tercihen 0.05-20 mg proteine, daha da tercihen 0.1-10 mg proteine karşılık gelen bir miktarda eklenebilir.

Kesin olarak şart olmasa da, buluşa ait deterjan bileşiminin alfa-amilazı geleneksel stabilize edici maddeleri kullanarak, örneğin propilen glikol veya gliserol gibi bir poliol, bir şeker veya şeker alkolü, laktik asit, borik asit veya bir borik asit türevi, örneğin bir aromatik borat ester veya bir fenil boronik asit türevi, örneğin 4-formilfenil boronik asit kullanarak stabilize edilebilir ve bileşim örneğin WO 92/19709 ve WO 92/19708'de açıklanan şekilde formüle edilebilir.

Diğer İçerik Maddeler

Hidrotroplar

Bir hidrotrop hidrofobik bileşikler sulu çözeltiler içinde (veya tersine kutuplu maddeleri bir kutupsuz ortamda) çözüdüren bir bileşiktir. Tipik olarak, hidrotroplar hem hidrofilik hem hidrofobik özelliğe sahiptir (yüzey aktif maddelerden bilinen amfifilik özellikler denilenler); bununla birlikte hidrotropların moleküler yapısı genellikle spontan kendiliğinden toplanmaya elverişli değildir, bu hususta örneğin, Hodgdon ve Kaler, 2007, Current

Opinion in Colloid & Interface Science 12: 121-128 referansındaki incelemeye bakılabilir. Hidrotropolar, miselli, katmanlı veya sınırları belli orta fazlar oluşturan yüzey aktif maddelerde ve lipitlerde bulunduğu gibi üzerine çıkıldığında kendiliğinden topaklanmanın olduğu bir kritik konsantrasyon sergilemez. Aksine, birçok hidrotrop kesintisiz türde bir topaklanma süreci sergilemekte olup, burada konsantrasyon arttıkça topakların boyutu büyür. Bununla birlikte, birçok hidrotrop su, yağ, yüzey aktif madde ve polimer karışımları gibi kutuplu ve kutupsuz özellikteki maddeleri içeren sistemlerin faz davranışını, stabilitesini ve kolloidal özelliklerini farklılaştırır. Hidrotropolar klasik olarak ilaç, kişisel bakım, gıda sanayilerinde ve teknik uygulamalarda kullanılır. Hidrotropoların temizlik veya deterjan bileşimlerinde kullanımı, örneğin faz ayrılması veya yüksek viskozite gibi istenmeyen olaylara neden olmaksızın daha konsantre yüzey aktif madde formülasyonları (sıvı deterjanların suyun atılmasıyla kompakt hale getirilmesi işleminde olduğu gibi) sağlar.

Deterjan ağırlıkça %0-25, örneğin yaklaşık %0.5 ila yaklaşık %10 veya yaklaşık %2 ila yaklaşık %5 bir hidrotrop içerebilir. Deterjanlarda kullanım için teknikte bilinen herhangi bir hidrotrop kullanılabilir. Hidrotrop örnekleri, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla sodyum benzen sülfonat, sodyum p-toluen sülfonat (STS), sodyum ksilen sülfonat (SXS), sodyum kümen sülfonat (SCS), sodyum simen sülfonat, amin oksitler (AO), alkoller ve poliglikoleterler, sodyum hidroksinaftoat, sodyum hidroksinaftalen sülfonat, sodyum etilheksil sülfat, monoetanolamin, dietanolamin, trietanolamin ve bunların kombinasyonlarını içerir.

Geliştirici Maddeler ve Yardımcı Geliştirici Maddeler

Deterjan bileşimi ağırlıkça yaklaşık %0-65, örneğin yaklaşık %5 ila yaklaşık %45 bir deterjan geliştirici madde veya yardımcı geliştirici madde veya bunların bir karışımını içerebilir.

Geliştirici madde ve/veya yardımcı geliştirici madde özellikle Ca ve Mg ile suda çözünür

kompleksler oluşturan bir şelatlaştırıcı madde olabilir. **Şelatlaştırıcı maddeler** veya

şelatlaştırıcılar bazı metal iyonlarıyla moleküller oluşturan, diğer elementlerle reaksiyona giremeyecekleri şekilde iyonları etkisiz kılan kimyasallardır, yani şelatlar oluşturarak

kimyasal etkinliği bastıran bir bağlayıcı maddedir. Şelatlaşma bir ligand ve tek bir merkezi atom arasında iki veya daha fazla ayrı bağlanmanın oluşması veya mevcut olmasıdır. Ligand

herhangi bir organik bileşik, bir silikat veya bir fosfat olabilir. Mevcut bağlamda "şelatlaştırıcı

maddeler" kalsiyum ve magnezyum gibi metal iyonlarıyla suda çözünür kompleksler

oluşturan şelatlaştırıcıları, şelatlaştırıcı maddeyi, şelatlaştırıcı maddeleri, kompleks oluşturan

maddeleri veya sekestrasyon maddelerini içerir. Şelat etkisi, şelatlaştırıcı olmayan bir benzer ligandlar grubunun aynı metal için afinitesi ile karşılaştırıldığında şelatlaştırıcı ligandların bir metal iyonu için güçlenmiş afinitesini tanımlar. Metal iyonlarıyla, özellikle kalsiyum (Ca^{2+}) iyonlarıyla bağlanma kapasitesine sahip şelatlaştırıcı maddeler genel olarak çamaşır veya

5 bulaşık yıkama gibi yıkamaya ilişkin deterjanlarda ve bileşimlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte şelatlaştırıcı maddelerin kendilerinin enzimatik etkinlik inhibisyonu yaptıkları gösterilmiştir. Mevcut başvuruda şelatlaştırıcı madde terimi "kompleks oluşturan madde" veya "şelatlaştırıcı madde" veya "şelatlaştırıcı" ile birbirinin yerine geçecek şekilde kullanılmaktadır.

- 10 Alfa-amilazların çoğu kalsiyuma duyarlı olduğu için şelatlaştırıcı maddelerin mevcut olması enzim etkinliğini zayıflatabilir. Alfa-amilazların kalsiyum duyarlılığı verili bir alfa-amilazın kuvvetli bir şelatlaştırıcı madde mevcudiyetinde inkübe edilmesi ve bu inkübasyonun söz konusu alfa-amilazın etkinliği üzerindeki etkisinin analiz edilmesiyle belirlenebilir. Kalsiyum duyarlı bir alfa-amilaz inkübasyon sırasında etkinliğinin önemli bir kısmını veya tamamını
- 15 kaybedecektir.

Şelatlaştırıcı Maddelerin Özelliklerinin Belirlenmesi: Belirtildiği üzere şelat etkisi veya şelatlaştırıcı etki şelatlaştırıcı olmayan bir benzer ligandlar grubunun aynı metal için afinitesi ile karşılaştırıldığında şelatlaştırıcı ligandların bir metal iyonu için güçlenmiş afinitesini tanımlar. Ancak bu şelat etkisinin gücü çeşitli analiz türleriyle veya ölçüm usulleriyle

20 belirlenebilir, bu şekilde şelatlaştırıcı maddelerin gösterdikleri şelatlaştırıcı etkiye (veya güce) göre farklılaştırılması veya derecelendirilmesi sağlanır. Bir analizde, örneğin M.K. Nagarajan ve diğerleri, JAOCs, Cilt 61, No. 9 (Eylül 1984), s. 1475-1478 referansında açıklanan usule dayanan bir testin kullanılmasıyla şelatlaştırıcı maddeler pH 8.0'da serbest kalsiyum iyonları (Ca^{2+}) konsantrasyonunu 2.0 mM'den 0.10 mM'ye veya daha azına düşürme kapasitelerine

25 göre tanımlanabilmektedir. Şelatlaştırıcı maddelerin Nagarajan ve diğerleri tarafından açıklanan usulü kullanarak tanımlanmasına ilişkin bir örnek Örnek 3a'da açıklanmaktadır. Tercihen, buluşa uygun şelatlaştırıcı madde, aynı koşullar altında serbest kalsiyum iyonu konsantrasyonunu 2.0 mM'den 0.10 mM'ye düşürmek için gerekli HEDP konsantrasyonuna eşit veya bundan daha düşük bir konsantrasyonda serbest kalsiyum iyonları konsantrasyonunu

30 2.0 mM'den 0.1 mM'ye düşürebilen şelatlaştırıcı maddeleri kapsar. Dolayısıyla, mevcut buluşa ait şelatlaştırıcı madde benzer veya aynı koşullar altında HEDP ile eşit veya HEDP'den daha iyi "serbest kalsiyumu" düşürme kapasitesine sahip olabilir.

Tercihen, buluša uygun Őelatlařtırıcı madde 80 mM potasyum klorür ve 49 mM EPPS ((4-(2-hidroksietil)piperazin-1-propansülfonik asit)) içinde pH 8'de ve 21 °C'de ölçüldüğünde 10 mM'nin altında, tercihen 9.5 mM'nin altında, tercihen 9 mM'nin altında, tercihen 8.5 mM'nin altında, tercihen 8 mM'nin altında, tercihen 7.5 mM'nin altında, tercihen 7 mM'nin altında, tercihen 6.5 mM'nin altında, tercihen 6 mM'nin altında, tercihen 5.5 mM'nin altında, tercihen 5 mM'nin altında, tercihen 4.5 mM'nin altında, tercihen 4 mM'nin altında, tercihen 3.5 mM'nin altında, tercihen 3 mM'nin altında, tercihen 2.5 mM'nin altında, tercihen 2 mM'nin altında, tercihen 1.5 mM'nin altında veya tercihen 1 mM'nin altında bir konsantrasyonda serbest kalsiyum iyonları konsantrasyonunu 2.0 mM'den 0.1 mM'ye düşürebilen Őelatlařtırıcı maddeleri kapsar. Özellikle tercih edilen bir düzenlemede Őelatlařtırıcı madde "Malzemeler ve Usuller" bölümü altında açıklandığı gibi 80 mM potasyum klorür ve 49 mM EPPS içinde pH 8'de ve 21 °C'de ve serbest kalsiyum konsantrasyonu saptaması için kalsiyum iyonu seçici bir elektrot kullanarak ölçüldüğünde serbest kalsiyum iyonları konsantrasyonunu 2.0 mM'den 0.1 mM'ye düşürebilir. Dolayısıyla tercihen, Őelatlařtırıcı maddeler "Malzemeler ve Usuller" bölümü altında açıklandığı gibi pH 8.0 ve 21 °C'de test edildiğinde 10 mM'nin altında, tercihen 9.5 mM'nin altında, tercihen 9.0 mM'nin altında, tercihen 8.5 mM'nin altında, tercihen 8.0 mM'nin altında, tercihen 7.5 mM'nin altında, tercihen 7.0 mM'nin altında, tercihen 6.5 mM'nin altında, tercihen 6.0 mM'nin altında, tercihen 5.5 mM'nin altında, tercihen 5.0 mM'nin altında, tercihen 4.5 mM'nin altında, tercihen 4.0 mM'nin altında, tercihen 3.5 mM'nin altında, tercihen 3.0 mM'nin altında, tercihen 2.5 mM'nin altında, tercihen 2.0 mM'nin altında, tercihen 1.5 mM'nin altında veya tercihen 1.0 mM'nin altında bir konsantrasyonda serbest kalsiyum iyonları konsantrasyonunu 2.0 mM'den 0.10 mM'ye düşürebilen Őelatlařtırıcı maddeleri kapsar.

Özellikle tercih edilen bir düzenlemede, Şelatlaştırıcı madde 80 mM potasyum klorür ve 49 mM EPPS içinde pH 8'de ve 21 °C'de ölçüldüğünde 9 mM ila 0.5 mM, tercihen 9 mM ila 1 mM, tercihen 8 mM ila 1 mM, tercihen 7 mM ila 1 mM, tercihen 6 mM ila 1 mM, tercihen 5 mM ila 1 mM, tercihen 4 mM ila 1 mM, tercihen 3 mM ila 1 mM, tercihen 2 mM ila 1 mM, tercihen 9.0 mM ila 1.5 mM, tercihen 8.0 mM ila 1.5 mM, tercihen 7.0 mM ila 1.5 mM, tercihen 6.0 mM ila 1.5 mM, tercihen 5.0 mM ila 1.5 mM, tercihen 4.0 mM ila 1.5 mM, tercihen 3.0 mM ila 1.5 mM, tercihen 2.5 mM ila 1.0 mM, tercihen 2.0 mM ila 1.1 mM, tercihen 1.85 mM ila 1.0 mM bir konsantrasyonda serbest kalsiyum iyonları konsantrasyonunu 2.0 mM'den 0.10 mM'ye düşürebilir.

Serbest kalsiyum iyonu konsantrasyonunda görülen 2.0 mM Ca ila 0.10 mM Ca arası düşüş su

sertliğinin 200 ppm'den (asidik CO₂ mevcudiyetinde Ca(HCO₃)₂ formunda CaCO₃ olarak) 10 ppm'ye düşürülmesine karşılık gelir. Minimum geliştirici madde seviyesi şelatlaştırıcı sodyum tuzundan ve %100 kuru şelatlaştırıcı baz alınarak hesaplanır.

Şelatlaştırıcı maddenin şelatlaştırıcı etkisi sitrata göre de ölçülebilir. Serbest kalsiyum iyonu konsantrasyonu miktarını 2.0 mM'den 0.10 mM'ye düşürebilen sitrat konsantrasyonuna 1 değeri verilir ve şelatlaştırıcı maddelerin sonuçları bu değerle karşılaştırılır. Tercih edilen buluşa uygun şelatlaştırıcı madde, pH 8.0'de ve 21 °C'de ölçüldüğünde, sitrat konsantrasyonu ile karşılaştırıldığında 0.9 katın altında, örneğin 0.8 katın altında, örneğin 0.7 katın altında, örneğin 0.6 katın altında, örneğin 0.5 katın altında, örneğin 0.4 katın altında, örneğin 0.3 katın altında, örneğin 0.2 katın altında, örneğin 0.1 katın altında daha düşük bir konsantrasyonda serbest kalsiyum konsantrasyonunu 2.0 mM'den 0.10 mM'ye düşürme kapasitesine sahiptir. Tercih edilen buluşa uygun şelatlaştırıcı madde, pH 8.0'da ve 21 °C'de 80 mM potasyum klorür ve 49 mM EPPS içinde ve serbest kalsiyum konsantrasyonu saptaması için pH 8.0'da ve 21 °C'de kalsiyum iyonu seçici bir elektrot kullanarak ölçüldüğünde sitrat konsantrasyonu ile karşılaştırıldığında 0.9 katın altında, örneğin 0.8 katın altında, örneğin 0.7 katın altında, örneğin 0.6 katın altında, örneğin 0.5 katın altında, örneğin 0.4 katın altında, örneğin 0.3 katın altında, örneğin 0.2 katın altında, örneğin 0.1 katın altında daha düşük bir konsantrasyonda serbest kalsiyum konsantrasyonunu 2.0 mM'den 0.10 mM'ye düşürme kapasitesine sahiptir.

Özellikle tercih edilen bir düzenlemede, şelatlaştırıcı madde, pH 8.0 ve 21 °C'de ölçüldüğünde, serbest kalsiyum iyonları konsantrasyonunu 2.0 mM'den 0.10 mM'ye düşürebilen sitrat konsantrasyonu ile karşılaştırıldığında 1.0 ila 0.1 katın altında, örneğin 0.9 ila 0.1 katın altında, örneğin 0.8 ila 0.1 katın altında, örneğin 0.7 ila 0.1 katın altında, örneğin 0.6 ila 0.1 katın altında, örneğin 0.5 ila 0.1 katın altında, örneğin 0.4 ila 0.1 katın altında, örneğin 0.35 ila 0.1 katın altında, örneğin 0.3 ila 0.1 katın altında daha düşük bir şelatlaştırıcı madde konsantrasyonunda serbest kalsiyum iyonları konsantrasyonunu 2.0 mM'den 0.10 mM'ye düşürebilir. Dolayısıyla buluşa uygun şelatlaştırıcı madde serbest kalsiyum iyonu konsantrasyonunu 2.0 mM'den 0.10 mM'ye, aynı koşullar altında serbest kalsiyum iyonu konsantrasyonunu 2.0 mM'den 0.10 mM'ye düşürmek için gereken HEDP konsantrasyonundan daha düşük bir konsantrasyonda düşürebilir.

Alternatif olarak, şelatlaştırıcı madde ve metal iyonları, örneğin kalsiyum ve/veya magnezyum arasında oluşturulan kompleksin gücü log K değeri (denge veya bağlanma veya ayırma veya stabilite sabiti) olarak ifade edilir. Bu sabit verili bir pH'ta, verili bir sıcaklıkta

ve verili bir iyonik güçte ölçülebilir. Yukarıda bahsedildiği gibi şelatlaştırıcı madde ve metal iyonları örneğin kalsiyum ve/veya magnezyum arasında oluşturulan kompleksin gücü log K değeri (denge veya bağlanma veya ayrışma veya stabilite sabiti) olarak ifade edilebilmekte olup, burada sabit A. Nielsen ve diğerleri, Anal. Biochem. Cilt 314, (2003), s. 227-234

5 referansında açıklanan şekilde ve K değerinden izotermal titrasyon kalorimetresiyle (ITC) ölçülebilir, log K ise K değerinin logaritması (10 tabanı) şeklinde hesaplanabilir. Bu usulle ölçülen log K değeri sıcaklık, pH ve iyon gücüne bağlıdır, dolayısıyla log K değerlerini karşılaştırırken bunların benzer, tercihen aynı koşullar altında belirlenmiş olmaları önemlidir. Ayrıca, referans olarak bir standart, örneğin sitrat kullanarak deneylerdeki varyasyonlardan

10 kaynaklanan etkiler azaltılabilir. Tercihen log K mevcut başvurunun "Malzemeler ve Usuller" bölümü altında açıklanan şekilde belirlenir, dolayısıyla buluşun bir düzenlemesinde buluşa uygun bileşimdeki şelatlaştırıcı madde, log K "Malzemeler ve Usuller" bölümünde açıklanan şekilde pH 10'da ve 19 °C'de ölçüldüğünde en az 3, örneğin en az 4, örneğin en az 5, örneğin en az 6, örneğin en az 7, örneğin en az 8, örneğin en az 9, örneğin en az 10, örneğin en az 11

15 bir log K'ye sahiptir. Buluşa uygun bileşimlerdeki şelatlaştırıcı maddenin log K değeri 3-11, örneğin 3-10, örneğin 3-9, örneğin 3-8, örneğin 4-11, örneğin 5-11, örneğin 6-11, örneğin 4-10, örneğin 5-10, örneğin 4-9, örneğin 5-9, örneğin 4-8, özellikle 5-8 aralığında da olabilir. Tercihen, buluşa uygun bileşimdeki şelatlaştırıcı maddenin log K'si, "Malzemeler ve Usuller" bölümü altında açıklanan şekilde belirlenen sitrat log K'sinin en az 1, örneğin en az 1.33,

20 örneğin en az 1.67, örneğin en az 2, örneğin en az 2.33, örneğin en az 2.67, örneğin en az 3, örneğin en az 3.33, örneğin en az 3.67 katıdır. Buluşa uygun bileşimlerdeki şelatlaştırıcı madde "Malzemeler ve Usuller" bölümü altında açıklanan şekilde belirlenen sitrat log K'sinin 1-3.67, örneğin 1-3.33, örneğin 1-3.00, örneğin 1-2.67, örneğin 1.33-3.67, örneğin 1.33-3.33, örneğin 1.33-3.00, örneğin 1.33-2.67, örneğin 1.67-3.67, örneğin 1.67-3.33, örneğin 1.67-3,

25 özellikle 1.67-2.67 katı aralığında da olabilir. Kullanışlı şelatlaştırıcı maddeler, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla aşağıdakileri içerir: N-(1,2-dikarboksietil)-D,L-aspartik asit (IDS), N-(2-hidroksietil)iminodiasetik asit (EDG), aspartik asit-N-monoasetik asit (ASMA), aspartik asit-N,N-diasetik asit (ASDA), aspartik asit-N-monopropionik asit (ASMP), iminodisüksinik asit (IDA), N-(2-sülfometil) aspartik asit (SMAS), N-(2-sülfoetil) aspartik asit (SEAS), N-(2-sülfometil) glutamik asit (SMGL), N-(2-sülfoetil) glutamik asit (SEGL), N-metil iminodiasetik asit (MIDA), α -alanin-N,N-diasetik asit (α -ALDA), serin-N,N-diasetik asit (SEDA), izoserin-N,N-diasetik asit (ISDA), fenilalanin-N,N-diasetik asit (PHDA), antranilik asit-N,N-diasetik asit (ANDA), sulfanilik asit-N,N-diasetik asit (SLDA), taurin-N,N-

30

diasetik asit (TUDA), sülfometil -N,N-diasetik asit (SMDA), N-(hidroksietil)-etil idendiamintriasetat (HEDTA), dietanolglisin (DEG), aminotris(metilenfosfonik asit) (ATMP).

Tercih edilen şelatlaştırıcı madde bir amino grubu içerebilir ve örneğin bir amino-polikarboksilat veya bir fosfonat olabilir. Bir, iki veya üç amino grup (tipik olarak sekonder veya tersiyer amino grupları) içeren bir monomerik molekül olabilir ve iki, üç, dört veya beş karboksil grubu veya hatta daha fazla karboksil grubu içerebilir. Şelatlaştırıcı maddeler fosfor içeren veya fosforsuz maddeler olabilir. Şelatlaştırıcı maddelerin gruplandırılmasına ilişkin çeşitli yollar vardır ve bunlardan biri aşağıdaki şekilde olabilir:

Şelatlaştırıcı maddeler karboksilatlar olabilir veya karboksilat gruplarına dayanabilirler,

örnekleri EDTA (etilen diamin tetraasetat), NTA (2,2',2"-nitriлотriasetat), sitrat, 2-hidroksipropan-1,2,3-trikarboksilat, DTPA (dietilentriaminpentaasetik asit), MGDA (metil glisindiasetik asit veya N,N'-bis(karboksimetil)alanin), EGTA (etilen glikol tetraasetik asit), EDDS (etilendiamin-N,N-disüksinik asit), GLDA (L-Glutamik asit, N,N-diasetik asit), polikarboksilatlar, örneğin PAA [poli(akrilik asit)], PAA/PMA [kopoli(akrilik asit/maleik asit)] şeklindedir.

Fosfor içeren şelatlaştırıcı maddeler polifosfatlar veya fosfonatlar, örneğin sodyum tripolifosfat (STP), HEDP (1-Hidroksietiliden-1,1-Difosfonik asit), EDTMP [bis(fosfonometil)amino] metil fosfonik asit] veya (etilendiamin tetra(metilen fosfonik asit)), EDTMPA (etilendiamintetrametilentetrafosfonik asit), DTPMP (dietilentriamin penta (metilen fosfonik asit), DTMPA (dietilentriaminpenta(metilen-fosfonik asit)) olabilir. Şelatlaştırıcı maddeler EDTA, NTA, DTPA, PDTA, GLDA, MGDA, EDDS, EDTMP, EDTMPA ve DTPMP veya ASMA, ASDA, ASMP, IDA, SMAS, SEAS, SMGL, SEGL, MIDA, α -ALDA, SEDA, ISDA, PHDA, ANDA, SLDA, TUDA, SMDA, HEDTA, DEG, ATMP veya bunların karışımlarında olduğu gibi azot içerebilir.

Sonuç olarak, tercih edilen şelatlaştırıcı maddeler, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla etilendiamin-tetra-asetik asit (EDTA), dietilen triamin penta metilen fosfonik asit (DTMPA, DTPMP), hidroksi-etan difosfonik asit (HEDP), etilendiamin N,N'-disüksinik asit (EDDS), metil glisin di-asetik asit (MGDA), dietilen triamin penta asetik asit (DTPA), propilen diamin tetraasetik asit (PDTA), 2-hidroksipiridin-N-oksit (HPNO), metil glisin diasetik asit (MGDA), glutamik asit N,N-diasetik asit (N,N-dikarboksimetil glutamik asit tetrasodyum tuzu (GLDA) ve nitriлотriasetik asit (NTA) veya bunların karışımlarını içerebilir. Şelatlaştırıcı maddeler asit formlarında veya bir tuz şeklinde mevcut olabilir, tercihen şelatlaştırıcı maddeler sodyum,

potasyum, amonyum veya amin (örneğin trietanolamin ve monoetanolamin) tuzları şeklinde mevcut olabilir.

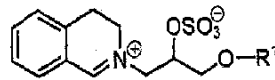
Başka şelatlaştırıcı maddeler bitkisel madde, örneğin aşağıda daha ayrıntılı açıklanan nişasta içeren madde kökenli şelatlaştırıcı maddeler olabilir. Bu tür doğal şelatlaştırıcı maddelerin örnekleri, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla fitik asit (İnozitol heksafosforik asit (IP6) veya tuz formda olduğunda fitin veya fitat), İnozitol difosforik asit, İnozitol trifosforik veya İnozitol pentafosforik asittir. Şelatlaştırıcı madde bileşimde ağırlıkça %0.0001 ila %20, tercihen ağırlıkça %0.01 ila %10, daha tercihen ağırlıkça %0.1 ila %5 bir miktarda mevcut olabilir.

10 Ağartıcı Sistemler

Buluşa ait sıvı deterjan bileşimi ağırlıkça %0-50, örneğin yaklaşık %0.1 ila yaklaşık %25 bir ağartıcı sistemi içerebilir. Sıvı çamaşır deterjanlarında kullanım bakımından teknikte bilinen herhangi bir ağartıcı sistemi kullanılabilir. Uygun ağartıcı sistemi bileşenleri ağartıcı katalizörlerini, foto-ağartıcıları, ağartıcı etkinleştiricilerini, hidrojen peroksit kaynaklarını, örneğin sodyum perkarbonat ve sodyum perboratları, önceden oluşturulmuş perasitleri ve bunların karışımlarını içerir. Önceden oluşturulmuş uygun perasitler, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla peroksikarboksilik asitleri ve tuzları, perkarbonik asitleri ve tuzları, perimidik asitleri ve tuzları, peroksimonosülfürik asitleri ve tuzları, örneğin Oxone'u (R) ve bunların karışımlarını içerir. Ağartıcı sistemlerinin, bunlarla sınırlı kalmayan örnekleri perasit oluşturucu bir ağartıcı etkinleştirici ile kombinasyon halinde, örneğin alkali metal tuzlar dahil bir inorganik tuz, örneğin perborat sodyum tuzları (genellikle mono- veya tetra-hidrat), perkarbonat, persülfat, perfosfat, persilikat tuzlarını içerebilecek peroksit bazlı ağartıcı sistemlerini içerir. Burada ağartıcı etkinleştirici terimi hidrojen peroksit gibi bir peroksijen ağartıcıyla reaksiyona girerek bir perasit oluşturan bir bileşik anlamına gelir. Bu şekilde oluşturulan perasit etkinleşmiş ağartıcıyı meydana getirir. Burada kullanılacak uygun ağartıcı etkinleştiriciler ester amitleri, imitleri veya anhidrürleri sınıfına ait olanları içerir. Uygun örnekleri tetrasetiletilen diamin (TAED), sodyum 4-[(3,5,5-trimetil heksanoil) oksij]benzen sülfonat (ISONOBS), diperoksi dodekanoik asit, 4-(dodekanoiloksi) benzensülfonat (LOBS), 4-(dekanoiloksi) benzensülfonat, 4-(dekanoiloksi)benzoat (DOBS), 4-(nonanoiloksi)benzensülfonat (NOBS) ve/veya WO 98/17767'de açıklananlardır. Söz konusu ağartıcı etkinleştiricilerin bir özel ailesi EP 624154'te açıklanmaktadır ve bu aileden özellikle tercih edilen asetil trietil sitrattır (ATC). ATC veya kısa zincirli bir trigliserit, örneğin triasetin

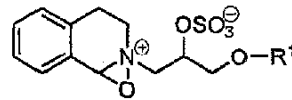
sonunda sitrik asit ve alkole bozunması nedeniyle çevre dostu olma avantajına sahiptir. Ayrıca asetil trietil sitrat ve triasetin depolamada ürün içinde iyi bir hidrolitik stabiliteye sahiptir ve etkili bir ağartıcı etkinleştiricisidir. Son olarak ATC çamaşır yıkama katkı maddesinde iyi bir gelişme kapasitesi sağlar. Alternatif olarak, ağartıcı sistemi örneğin amit, imit veya sülfon tipi peroksiasitler içerebilir. Ağartıcı sistemi 6(ftalimido)peroksiheksanoik asit (PAP) gibi perasitler de içerebilir. Ağartıcı sistemi bir ağartıcı katalizörü de içerebilir. Bazı düzenlemelerde ağartıcı bileşen bir organik katalizör olabilir ve aşağıdaki formüllere sahip organik katalizörlerden oluşan gruptan seçilebilir:

(i)



10

(ii)



(iii) ve bunların karışımları; burada her R1 bağımsız olarak 9 ila 24 karbon içeren bir dallı alkil grubu veya 11 ila 24 karbon içeren doğrusal alkil grubudur, tercihen her R1 bağımsız olarak 9 ila 18 karbon içeren bir dallı alkil grubu veya 11 ila 18 karbon içeren doğrusal alkil grubudur, daha tercihen her R1 bağımsız olarak 2-propilheptil, 2-butiloktil, 2-pentilnonil, 2-heksildesil, n-dodesil, n-tetradesil, n-heksadesil, n-oktadesil, izo-nonil, izodesil, izo-tridesil ve izo-pentadesilden oluşan gruptan seçilir. Diğer örnek ağartıcı sistemleri, örneğin WO 2007/087258, WO 2007/087244, WO 2007/087259 ve WO 2007/087242'de açıklanmaktadır. Uygun foto-ağartıcılar örneğin sülfonlu çinko ftalosiyenin olabilir.

15

20

Polimerler

Buluşa ait sıvı deterjan bileşimi ağırlıkça %0-10, örneğin %0.5-5, %2-5, %0.5-2 veya %0.2-1 bir polimer içerebilir. Deterjanlarda kullanım bakımından teknikte bilinen herhangi bir polimer kullanılabilir. Polimer yukarıda bahsedildiği gibi bir yardımcı geliştirici madde işlevi görebilir veya kir taşınmasını önleme, lif koruma, leke çıkarma, boya aktarımını engelleme, gres temizleme ve/veya köpük giderme özellikleri sağlayabilir. Bazı polimerlerde yukarıda bahsedilen özelliklerin birinden fazlası ve/veya aşağıda bahsedilen motiflerin birinden fazlası bulunabilir. Örnek polimerler (karboksimetil) selüloz (CMC), poli(vinil alkol) (PVA),

25

poli(vinilpirrolidon) (PVP), poli(etilenglikol) veya poli(etilen oksit) (PEG), etoksillenmiş poli(etilenimin), karboksimetil inülin (CMI) ve polikarboksilatlar, örneğin PAA, PAA/PMA, poli-aspartik asit ve lauril metakrilat/akrilik asit kopolimerleri, hidrofobik bakımdan modifiye edilmiş CMC (HM-CMC) ve silikonlar, tereftalik asit ve oligomerik glikollerin kopolimerleri, poli(etilen tereftalat) ve poli(oksieten tereftalat) kopolimerleri (PET-POET), PVP, poli(vinilimidazol) (PVI), poli(vinilpiridin-N-oksit) (PVPO veya PVPNO) ve polivinilpirrolidon-vinilimidazolü (PVPVI) içerir. Diğer örnek polimerler sülfonlu polikarboksilatlar, polietilen oksit ve polipropilen oksit (PEO-PPO) ve dikuaterniyum etoksi sülfatı içerir. Başka örnek polimerler örneğin WO 2006/130575'te açıklanmaktadır. Yukarıda bahsedilen polimerlerin tuzları da öngörülmüştür.

Kumaş Tonlama Maddeleri

Mevcut buluşa ait sıvı deterjan bileşimi boyalar veya pigmentler gibi kumaş tonlama maddelerini de içerebilmekte olup, bunlar deterjan bileşimlerinin formülünde bulunmaları durumunda, kumaş söz konusu deterjan bileşimlerini içeren bir yıkama çözeltisi ile temas ettiğinde söz konusu kumaş üzerinde birikebilir ve bu şekilde görünür ışığın soğurulması/yansıtılması yoluyla söz konusu kumaşın renk tonunu değiştirebilirler. Floresan beyazlatıcı maddeler en az biraz görünür ışık yayar. Tersine, kumaş tonlama maddeleri görünür ışık spektrumunun en az bir kısmını soğurdukları için bir yüzeyin renk tonunu değiştirirler. Uygun kumaş tonlama maddeleri boyaları ve boya-kil konjugatlarını içerir ve ayrıca pigmentleri de içerebilir. Uygun boyalar küçük molekülü boyaları ve polimerik boyaları içerir. Uygun küçük molekülü boyalar Direkt Mavi, Direkt Kırmızı, Direkt Viyole, Asit Mavi, Asit Kırmızı, Asit Viyole, Bazik Mavi, Bazik Viyole ve Bazik Kırmızı Renk İndeksi (C.I.) sınıflandırmalarına giren boyalardan veya bunların karışımlarından oluşan gruptan seçilen küçük molekülü boyaları, örneğin WO 2005/03274, WO 2005/03275, WO 2005/03276 ve EP 1876226'da (burada göndermeyle dahil edilmişlerdir) açıklananları içerir. Deterjan bileşimi tercihen ağırlıkça yaklaşık %0.00003 ila yaklaşık %0.2, ağırlıkça yaklaşık %0.00008 ila yaklaşık %0.05 veya hatta ağırlıkça yaklaşık %0.0001 ila yaklaşık %0.04 kumaş tonlama maddesi içerir. Bileşim ağırlıkça %0.0001 ila %0.2 kumaş tonlama maddesi içerebilmekte olup, bileşimin bir birim dozluk poşet formunda olması özellikle tercih edilebilir. Uygun tonlama maddeleri örneğin WO 2007/087257 ve WO 2007/087243'te de açıklanmaktadır.

İlave Enzimler

Sıvı deterjan bileşimi bir veya daha fazla ilave enzim, örneğin proteaz, lipaz, kutinaz, ilave amilaz, karbohidraz, selülaz, pektinaz, mannanaz, arabinaz, galaktanaz, ksilanaz, oksidaz, örneğin bir lakkaz ve/veya peroksidaz içerebilir. Genel olarak seçili enzimin(enzimlerin) özellikleri seçili deterjanla uyumlu olmalıdır (yani, pH optimumu, enzimatik ve enzimatik olmayan diğer içerik maddelerle uyumluluk, vb.) ve enzim(enzimler) etkili miktarlarda bulunmalıdır.

Selülazlar: Uygun selülazlar bakteri veya mantar kökenli olanları içerir. Kimyasal olarak modifiye edilmiş veya protein mühendisliğine tabi tutulmuş mutantlar dahildir. Uygun selülazlar Bacillus, Pseudomonas, Humicola, Fusarium, Thielavia, Acremonium cinslerine ait selülazları, örneğin US 4,435,307, US 5,648,263, US 5,691,178, US 5,776,757, WO 89/09259'da açıklanan Humicola insolens, Myceliophthora thermophila ve Fusarium oxysporum'dan üretilen mantar selülazlarını içerir. Özellikle uygun selülazlar renk koruma faydaları olan alkali veya nötral selülazlardır. Bu tür selülazların örnekleri EP 0 495 257, EP 0 531 372, WO 96/11262, WO 96/29397, WO 98/08940 ve WO 02/099091'de açıklanan selülazlardır. Diğer örnekler örneğin WO 94/07998, EP 0 531 315, US 5,457,046, US 5,686,593, US 5,763,254, WO 95/24471, WO 98/12307 ve PCT/DK 98/00299'da açıklananlar gibi selülaz varyantlarıdır.

Ticari olarak piyasada mevcut selülazlar Celluzyme® ve Carezyme®, Carezyme Premium®, Celluclean® (Novozymes A/S), Clazinase™ ve Puradax HA™ (Genencor International Inc.) ve KAC-500(B)™ (Kao Corporation) selülazlarını içerir.

Proteazlar: Uygun proteazlar hayvansal, bitkisel veya mikrobiyal kökenli olanları içerir. Mikrobiyal kökenli olanlar tercih edilir. Kimyasal olarak modifiye edilmiş veya protein mühendisliğine tabi tutulmuş mutantlar dahildir. Proteaz bir serin proteaz veya bir metallo proteaz, tercihen bir alkali mikrobiyal proteaz veya tripsin benzeri bir proteaz olabilir. Alkali proteazların örnekleri subtilisinler, bilhassa Bacillus'tan türetilenler, örneğin subtilisin Novo, subtilisin Carlsberg, subtilisin 309, subtilisin 147 ve subtilisin 168'dir (WO 89/06279'da açıklanmaktadır). Tripsin benzeri proteazların örnekleri tripsin (örneğin domuz veya sığır kökenli) ve WO 89/06270 ve WO 94/25583'te açıklanan Fusarium proteazıdır. Kullanışlı proteazların örnekleri WO 92/19729, WO 98/20115, WO 98/20116 ve WO 98/34946'da açıklanan varyantlar, özellikle 27, 36, 57, 76, 87, 97, 101, 104, 120, 123, 167, 170, 194, 206, 218, 222, 224, 235 ve 274 konumlarının birinde veya daha fazlasında süstitüsyonları olan varyantlardır. Ticari olarak piyasada mevcut tercih edilen proteaz enzimleri Alcalase™,

Savinase™, Primase™, Duralase™, Esperase™ ve Kannase™ (Novozymes A/S), Maxatase™, Maxacal™, Maxapem™, Properase™, Purafect™, Purafect OxP™, FN2™ ve FN3™ (Genencor International Inc.) proteaz enzimlerini içerir.

Lipazlar ve Kutinazlar: Uygun lipazlar ve kutinazlar bakteri veya mantar kökenli olanları içerir. Kimyasal olarak modifiye edilmiş veya protein mühendisliğine tabi tutulmuş mutantlar dahildir. Örnekleri Thermomyces, örneğin EP 258 068 ve EP 305 216'da açıklanan T. lanuginosus (daha önce Humicola lanuginosa isimli) lipazı, Humicola, örneğin WO 96/13580'de açıklanan H. insolens kutinazı, bir Pseudomonas lipazı, örneğin P. alcaligenes veya P. pseudoalcaligenes (EP 218 272), P. cepacia (EP 331 376), P. stutzeri (GB 1,372,034), P. fluorescens, Pseudomonas sp. suşu SD 705 (WO 95/06720 ve WO 96/27002), P. wisconsinensis (WO 96/12012) lipazı, bir Bacillus lipazı, örneğin B. subtilis (Dartois ve diğerleri, 1993, Biochemica et Biophysica Acta, 1131: 253-360), B. stearothermophilus (JP 64/744992) veya B. pumilus (WO 91/16422) lipazını içerir. Diğer örnekleri örneğin 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, WO2007/087508 ve WO 2009/109500'de açıklanan lipaz varyantlarıdır. Ticari olarak piyasada mevcut tercih edilen lipaz enzimleri Lipolase™, Lipolase Ultra™ ve Lipex™; Lecitase™, Lipolex™; Lipoclean™, Lipoprime™ (Novozymes A/S) lipaz enzimlerini içerir. Ticari olarak piyasada mevcut diğer lipazlar Lumafast (Genencor Int Inc); Lipomax (Gist-Brocades/Genencor Int Inc) ve Solvay'dan Bacillus sp. lipazı içerir.

Peroksidazlar/Oksidazlar: Uygun peroksidazlar/oksidazlar bitki, bakteri veya mantar kökenli olanları içerir. Kimyasal olarak modifiye edilmiş veya protein mühendisliğine tabi tutulmuş mutantlar dahildir. Kullanışlı peroksidazların örnekleri Coprinus'a ait, örneğin WO 93/24618, WO 95/10602 ve WO 98/15257'de açıklanan C. cinereus ve varyantlarına ait peroksidazları içerir. Ticari olarak piyasada mevcut peroksidazlar Guardzyme™ (Novozymes A/S) peroksidazları içerir.

Deterjan enzimi(enzimleri) bir deterjan bileşimine bir veya daha fazla enzim içeren ayrı katkı maddelerinin eklenmesiyle veya bu enzimlerin tamamını içeren birleşik bir katkı maddesinin eklenmesiyle dahil edilebilir. Buluşa ait bir deterjan katkı maddesi, yani bir ayrı katkı maddesi veya bir birleşik katkı maddesi örneğin bir granül, sıvı, sulu karışım, vb. şeklinde formüle edilebilir. Tercih edilen deterjan katkı maddesi formülasyonları granüller, özellikle tozlanmamış granüller, sıvılar, özellikle stabil sıvılar veya sulu karışımlardır.

Tozlanmamış granüller örneğin US 4,106,991 ve 4,661,452’de açıklanan şekilde üretilebilir ve isteğe bağlı olarak teknikte bilinen usullerle kaplanabilir. Mumsu kaplama maddelerinin örnekleri 1000 ila 20000 ortalama mol ağırlıklarında poli(etilen oksit) ürünler (polietilenglikol, PEG); 16 ila 50 etilen oksit birimine sahip etoksillenmiş nonilfenoller; 5 alkolün 12 ila 20 karbon atomu içerdiği ve 15 ila 80 etilen oksit biriminin bulunduğu etoksillenmiş yağ alkolleri; yağ alkolleri; yağ asitleri; ve yağ asitlerinin mono-ve di- ve trigliseritleridir. Akışkan yataklı tekniklerle uygulanmak için uygun film oluşturan kaplama maddelerinin örnekleri GB 1483591’de açıklanmaktadır. Sıvı enzim preparasyonları yerleşik usullere göre örneğin bir poliöl, örneğin propilen glikol, bir şeker veya şeker alkolü, laktik asit 10 veya borik asit ekleyerek stabilize edilebilir. Korunmuş enzimler EP 238,216’da açıklanan usule göre hazırlanabilir.

Yardımcı Maddeler

Sıvı çamaşır deterjanlarında kullanım için teknikte bilinen herhangi bir deterjan bileşeni de kullanılabilir. İsteğe bağlı diğer deterjan bileşenleri gerek tek başına gerek kombinasyon 15 halinde korozyon önleyici maddeler, çekme önleyici maddeler, kir taşıyıcı maddeler, kırışma önleyici maddeler, bakterisitler, bağlayıcılar, korozyonu engelleyici maddeler, dağıtıcı maddeler/dağıtım maddeleri, boyalar, enzim stabilizatörleri (borik asit, boratlar, CMC ve/veya polioller, örneğin propilen glikol dahil), killeri içeren kumaş kondisyonlama maddeleri, dolgu maddeleri/işlem yardımcıları, floresan beyazlatıcı maddeler/optik parlaticılar, köpük 20 artırıcılar, köpük (sabun köpüğü) düzenleyiciler, parfümler, kir süspansiyonlama maddeleri, yumuşatıcılar, sabun köpüğü bastırıcı maddeler, matlaşma engelleyici maddeler ve fitilleme maddeleridir. Bu tür içerik maddelerin seçimi uzman kişinin bilgisine kalmıştır.

Dağıtıcı Maddeler - Mevcut buluşa ait deterjan bileşimleri dağıtıcı maddeler de içerebilir. Özellikle toz haldeki deterjanlar dağıtıcı maddeler içerebilir. Uygun suda çözünür organik 25 maddeler homo- veya ko-polimerik asitleri veya bunların tuzlarını içermekte olup, burada polikarboksilik asit birbirinden en fazla iki karbon atomuyla ayrılmış en az iki karboksil radikali içerir. Uygun dağıtıcı maddeler Powdered Detergents, Surfactant Science Series Cilt 71, Marcel Dekker, Inc referansında açıklanmaktadır.

Boya Aktarımını Engelleyici Maddeler - Mevcut buluşa ait deterjan bileşimleri bir veya daha 30 fazla boya aktarımını engelleyici madde de içerebilir. Uygun polimerik boya aktarımını engelleyici maddeler, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla polivinilpirrolidon polimerleri, poliamin N-oksit polimerleri, N-vinilpirrolidon ve N-vinilimidazol kopolimerlerini,

poliviniloksazolidonları ve polivinilimidazolleri veya bunların karışımlarını içerir. Söz konusu edilen bir bileşimde mevcut olması durumunda, boya aktarımını engelleyici maddeler bileşim ağırlığınca yaklaşık %0.0001 ila yaklaşık %10, yaklaşık %0.01 ila yaklaşık %5 veya hatta yaklaşık %0.1 ila yaklaşık %3 seviyelerinde mevcut olabilir.

- 5 Floresan Beyazlatıcı Madde - Mevcut buluşa ait deterjan bileşimleri tercihen temizlenmekte olan eşyaların renk tonunu açabilecek ilave bileşenler, örneğin floresan beyazlatıcı madde veya optik parlaticılar da içerebilir. Mevcut olduğunda parlaticı tercihen yaklaşık %0.01 ila yaklaşık %0.5 bir seviyededir. Mevcut buluşa ait bileşimde bir çamaşır deterjanı bileşiminde kullanımı uygun herhangi bir floresan beyazlatıcı madde kullanılabilir. En yaygın kullanılan
- 10 floresan beyazlatıcı maddeler diaminostilben-sülfonik asit türevleri, diarilpirazolin türevleri ve bisfenil-distiril türevleri sınıflarına ait olanlardır. Diaminostilben-sülfonik asit türevi türü floresan beyazlatıcı madde örnekleri 4,4'-bis-(2-dietanolamino-4-anilino-s-triazin-6-ilamino) stilben-2,2'-disülfonat, 4,4'-bis-(2,4-dianilino-s-triazin-6-ilamino) stilben-2,2'-disülfonat, 4,4'-bis-(2-anilino-4-(N-metil -N-2-hidroksi-etil amino)-s-triazin-6-ilamino) stilben-2,2'-
- 15 disülfonat, 4,4'-bis-(4-fenil-1,2,3-triazol-2-il)stilben-2,2'-disülfonat ve sodyum 5-(2H-nafto[1,2-d][1,2,3]triazol-2-il)-2-[(E)-2-fenilvinil]bensensülfonat sodyum tuzlarını içerir. Tercih edilen floresan beyazlatıcı maddeler Ciba-Geigy AG, Basel, İsviçre'den temin edilen Tinopal DMS ve Tinopal CBS maddeleridir. Tinopal DMS 4,4'-bis-(2-morfolino-4-anilino-s-triazin-6-ilamino) stilben-2,2'-disülfonat disodyum tuzudur. Tinopal CBS 2,2'-bis-(fenil-
- 20 stiril)-disülfonat disodyum tuzudur. Yine aynı şekilde tercih edilen floresan beyazlatıcı madde ticari olarak piyasada mevcut ve Paramount Minerals and Chemicals (Mumbai, Hindistan) tarafından temin edilen Parawhite KX'tir. Buluşta kullanımı uygun diğer floreserler 1-3-diaril pirazolinleri ve 7-alkilaminokumarinleri içerir. Uygun floresan parlaticı seviyeleri ağırlıkça yaklaşık %0.01, %0.05, yaklaşık %0.1 veya hatta yaklaşık %0.2 alt seviyelerinden ağırlıkça
- 25 %0.5 veya hatta %0.75 üst seviyelerine dek olan seviyeleri içerir.

- Leke Çıkarıcı Polimerler - Mevcut buluşa ait deterjan bileşimleri bir veya daha fazla leke çıkarıcı polimer de içerebilmekte olup, bunlar pamuk ve polyester bazlı kumaşlardan lekelerin çıkarılmasına, özellikle polyester bazlı kumaşlardan hidrofobik lekelerin çıkarılmasına yardımcı olurlar. Leke çıkarıcı polimerler örneğin noniyonik veya anyonik tereftalat bazlı
- 30 polimerler, polivinil kaprolaktam ve ilgili kopolimerler, vinil aşu kopolimerleri, poliester poliamitler olabilir; bu konuda örneğin Powdered Detergents, Surfactant Science Series Cilt 71, Marcel Dekker, Inc. referansında Bölüm 7'ye bakılabilir. Leke çıkarıcı polimerlerin bir diğer türü bir çekirdek yapı ve bu çekirdek yapıya bağlı halde çok sayıda alkoksilat grubu

- içeren amfifilik alkoksillenmiş gres temizleyici polimerlerdir. WO 2009/087523'te (buraya referansla eklenmiştir) ayrıntılı olarak açıklandığı üzere çekirdek yapısı polialkilenimin bir yapı veya polialkanolamin bir yapı içerebilir. Ayrıca rastgele aşılı ko-polimerler uygun leke çıkarıcı polimerlerdir. Uygun aşılı ko-polimerleri WO 2007/138054, WO 2006/108856 ve WO 5 2006/113314'te (buraya referansla eklenmişlerdir) daha ayrıntılı açıklanmaktadır. Diğer leke çıkarıcı polimerler süstitüe edilmiş polisakarit yapılar, bilhassa süstitüe edilmiş selülozik yapılar, örneğin EP 1867808 veya WO 2003/040279'da (her ikisi de buraya referansla eklenmiştir) açıklananlar gibi modifiye selüloz türevleridir . Uygun selülozik polimerler selülozu, selüloz eterleri, selüloz esterleri, selüloz amitleri ve bunların karışımlarını içerir.
- 10 Uygun selülozik polimerler anyonik modifiye edilmiş selüloz, noniyonik modifiye edilmiş selüloz, katyonik modifiye edilmiş selüloz, zwitteriyonik modifiye edilmiş selüloz ve bunların karışımlarını içerir. Uygun selülozik polimerler metil selüloz, karboksi metil selüloz, etil selüloz, hidroksil etil selüloz, hidroksil propil metil selüloz, ester karboksi metil selüloz ve bunların karışımlarını içerir.
- 15 **Kir Taşıyıcı Maddeler** - Mevcut buluşa ait deterjan bileşimleri, örneğin karboksimetil selüloz (CMC), polivinil alkol (PVA), polivinilpirrolidon (PVP), polioksietilen ve/veya polietilenglikol (PEG), akrilik asit homopolimerleri, akrilik asit ve maleik asit kopolimerleri ve etoksillenmiş polietileniminler gibi bir veya daha fazla kir taşıyıcı madde de içerebilir. Yukarıda leke çıkarıcı polimerler bölümünde açıklanan selüloz bazlı polimerler kir taşıyıcı 20 maddeler işlevini de görebilir.

Diğer Uygun Yardımcı Maddeler, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla çekme önleyici maddeleri, kırışma önleyici maddeleri, bakterisitleri, bağlayıcıları, taşıyıcıları, boyaları, enzim stabilizatörlerini, kumaş yumuşatıcıları, dolgu maddelerini, köpük düzenleyicileri, hidrotropları, parfümleri, pigmentleri, sabun köpüğü bastırıcı maddeleri, sıvı deterjanlara 25 ilişkin çözücüler ve yapılandırıcıları ve/veya yapı elastikleştirme maddelerini içerir.

Sıvı Deterjan Ürünlerin Formu

Buluşa ait sıvı deterjan bileşimi uygun herhangi bir formda, örneğin bir veya daha fazla kısmı olan bir kapsül, bir macun, bir jel veya bildik, kompakt veya konsantre bir sıvı olabilir. Tabakalar (aynı veya farklı fazlar), kapsüller gibi çeşitli deterjan formülasyonu formları ve 30 ayrıca makine dozlama birimi formları vardır.

Kapsüller tek veya çok kısımlı düzenlenebilir. Örneğin suyla temas etmeden önce kapsülden bileşimin açığa çıkmasına izin vermeden bileşimin tutulması için uygun herhangi bir formda,

şekilde ve malzemeden olabilir. Kapsül bir iç hacmi kapatan suda çözünür filminden yapılır. Söz konusu iç hacim kapsül kısımlarına ayrılabilir. Tercih edilen filmler polimerik malzemeler, tercihen bir film veya tabaka şeklinde şekillendirilmiş polimerlerdir. Tercih edilen polimerler, kopolimerler veya bunların türevleri seçili poliakrilatlar ve suda çözünür akrilat kopolimerler, metil selüloz, karboksi metil selüloz, sodyum dekstrin, etil selüloz, hidroksietil selüloz, hidroksipropil metil selüloz, malto dekstrin, poli metakrilatlar, en fazla tercihen polivinil alkol kopolimerler ve hidroksipropil metil selülozdur (HPMC). Tercihen filmdeki, örneğin PVA'daki polimer seviyesi en az yaklaşık %60'tır. Tercih edilen ortalama molekül ağırlığı tipik olarak yaklaşık 20,000 ila yaklaşık 150,000 olacaktır. Filmler hidrolitik olarak bozunabilir ve suda çözünür polimer harmanlarını, örneğin polilaktit ve polivinil alkolü (M8630 ticari referansıyla bilinir ve MonoSol LLC (Indiana, ABD) tarafından satılır) artı gliserol, etilen gliserol, propilen glikol, sorbitol ve bunların karışımları gibi plastikleştiricileri içeren harmanlanmış bileşimler de olabilir. Kapsüller suda çözünür filmle ayrılan bir katı çamaşır temizleme bileşimi veya parça bileşenlerini ve/veya bir sıvı temizleme bileşimi veya parça bileşenlerini içerebilir. Sıvı bileşenlere ilişkin kısım bileşim bakımından katıları içeren kısımlardan farklı olabilir. Ref: (US 2009/0011970 A1).

Deterjan içerik maddeleri suda eriyen kapsüllerde veya tabletlerin farklı katmanlarında kısımlarla birbirlerinden fiziksel olarak ayrı tutulabilir. Bu şekilde bileşenler arasında negatif depolanma etkileşiminin olması önlenir. Her kısmın farklı çözünme profillerinin olması yıkama çözültisinde seçili bileşenlerin geçikmiş çözünmesini de sağlayabilir.

Birim doz halinde olmayan bir sıvı veya jel deterjan sulu olabilir ve tipik olarak ağırlıkça en az %20 ve %95'e kadar su, örneğin yaklaşık %70'e kadar su, yaklaşık %65'e kadar su, yaklaşık %55'e kadar su, yaklaşık %45'e kadar su, yaklaşık %35'e kadar su içerir. Sulu sıvı veya jel içine diğer sıvı türleri, örneğin bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla alkanoller, aminler, dioller, eterler ve polioller eklenebilir. Bir sulu sıvı veya jel deterjan %0-30 organik çözücü içerebilir. Sıvı veya jel deterjan ağırlıkça yaklaşık %5 ila yaklaşık %15 veya %10'un altı kadar su içeren su esaslı olmayan bir deterjan olabilir.

Mevcut buluşa ait sıvı deterjan bileşimi, örneğin lekeli kumaşların önceden işleme tabi tutulması için uygun bir çamaşır katkı maddesi bileşimi ve durulama sırasında eklenen bir kumaş yumuşatıcı bileşim dahil olmak üzere bir elde veya makinede çamaşır yıkama deterjanı bileşimi olarak formüle edilebilir.

Mevcut Buluşta Kullanım İçin Alfa-Amilazların Hazırlanması

Deterjan bileşiminin alfa-amilazları (varyantları) teknikte bilinen herhangi bir mutagenizasyon usulünü, örneğin alana yönlendirilmiş mutagenizasyon, sentetik gen yapımı, yarı sentetik gen yapımı, rastgele mutagenizasyon, karma ve benzerini kullanarak hazırlanabilir. Alana yönlendirilmiş mutagenizasyon, parenti kodlayan bir polinükleotitte bir veya daha fazla tanımlı

5 alana bir veya daha fazla (örneğin birkaç) mutasyonun uygulandığı tekniktir.

Alana yönlendirilmiş mutagenizasyon arzu edilen mutasyonun bulunduğu oligonükleotit primerlerinin kullanılmasını içeren PCR ile *in vitro* gerçekleştirilebilir. Alana yönlendirilmiş mutagenizasyon *in vitro* kaset mutageniziyle de gerçekleştirilebilmekte olup, parenti kodlayan bir polinükleotidi içeren plazmitte bulunan bir alanda bir restriksiyon enzimi ile parçalamayı ve

10 ardından mutasyonu içeren bir oligonükleotidin polinükleotitte bağlanmasını içerir. Genellikle plazmidi ve oligonükleotidi parçalayan restriksiyon enzimi aynıdır, böylece plazmidin yapışkan uçlarının ve eklentinin birbirine bağlanması sağlanır. Bakınız örneğin, Scherer ve Davis, 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4949-4955; ve Barton ve diğerleri, 1990, Nucleic Acids Res. 18: 7349-4966.

Alana yönlendirilmiş mutagenizasyon *in vivo* teknikte bilinen usullerle de gerçekleştirilebilir. Bakınız örneğin, 2004/0171154 sayılı ABD Patent Başvurusu Yayını; Storici ve diğerleri, 2001, Nature Biotechnol. 19: 773-776; Kren ve diğerleri, 1998, Nat. Med. 4: 285-290; ve Calissano ve Macino, 1996, Fungal Genet. Newslett. 43: 15-16. Mevcut buluşta herhangi bir alana yönlendirilmiş mutagenizasyon usulü kullanılabilir. Varyantların hazırlanmasında

20 kullanılacak çok sayıda ticari kit mevcuttur. Sentetik gen yapımı, bir ilgili polipeptidi kodlamak için tasarlanmış bir polinükleotit molekülünün *in vitro* sentezini gerektirir. Gen sentezi çeşitli teknikleri, örneğin Tian ve diğerleri (2004, Nature 432: 1050-1054) tarafından açıklanan multipleks mikroçip esaslı teknolojiyi ve oligonükleotitlerin sentezlendiği ve ışıkla programlanabilir mikroakışkan çiplerde toplandığı benzeri teknolojileri kullanarak

25 gerçekleştirilebilir.

Tekli veya çoklu amino asit süstitüsyonları, delesyonları ve/veya insersiyonları bilinen mutagenizasyon, rekombinasyon ve/veya karma usullerini kullanarak yapılabilir ve test edilebilir, ardından bir ilgili tarama usulü, örneğin Reidhaar-Olson ve Sauer, 1988, Science 241: 53-57; Bowie ve Sauer, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. ABD 86: 2152-2156 referanslarında; WO

30 95/17413; veya WO 95/22625'te açıklanan usuller gerçekleştirilebilir. Kullanılacak diğer usuller hataya açık PCR, faj gösterimi (örneğin, Lowman ve diğerleri, 1991, Biochem. 30: 10832-10837; 5,223,409 sayılı ABD patent belgesi; WO 92/06204) ve alana yönlendirilmiş

mutagenezi (Derbyshire ve diğeri, 1986, Gene 46: 145; Ner ve diğeri, 1988, DNA 7: 127) içerir. Mutageniz/karma usulleri konakçı hücreler tarafından eksprese edilen klonlanmış, mutageneze tabi tutulmuş polipeptitlerin etkinliğini tespit eden yüksek verimli, otomatik tarama usulleri ile birleştirilebilir (Ness ve diğeri, 1999, Nature Biotechnology 17: 893-896). Etkin polipeptitleri kodlayan mutageniz uygulanmış DNA molekülleri teknikteki standart usulleri kullanarak konakçı hücrelerden geri kazanılabilir ve hızla dizilebilir. Bu usuller bir polipeptit içindeki münferit amino asit kalıntılarının önemini hızla belirlenmesini sağlarlar. Yarı-sentetik gen yapımı sentetik gen yapımı ve/veya alana yönlendirilmiş mutageniz ve/veya rastgele mutageniz ve/veya karmanın özelliklerinin birleştirilmesiyle gerçekleştirilir. Yarı-sentetik yapımının tipik özelliği PCR teknikleriyle kombinasyon halinde, sentezlenmiş polinükleotit fragmanlarının kullanıldığı bir işlem olmasıdır. Bu şekilde tanımlanmış gen bölgeleri *de novo* sentezlenirken, diğeri bölgeler alana spesifik mutagenik primerleri kullanarak amplifikasyona tabi tutulur, yine başka bölgeler ise hataya açık PCR veya hataya açık olmayan PCR amplifikasyonuna tabi tutulabilir. Daha sonra polinükleotit alt dizileri karılabilir. Parent, mevcut buluşa ait polipeptidin N-terminalinde veya C-terminalinde bir başka polipeptidin füzyon oluşturduğu bir füzyon polipeptidi veya parçalanabilir füzyon polipeptidi olabilir. Bir füzyon polipeptidi bir başka polipeptidi kodlayan bir polinükleotidin mevcut buluşa ait bir polinükleotitle füzyon yapmasıyla üretilir. Füzyon polipeptitlerini üretme yöntemleri teknikte bilinmektedir ve polipeptitleri kodlayan kodlayıcı dizilerin, çerçeve içinde olmalarını ve füzyon polipeptidi ekspresyonunun aynı promotörün(promotörlerin) ve sonlandırıcının kontrolü altında olmasını sağlayacak şekilde bağlanmasını içerir. Füzyon polipeptitleri, söz konusu füzyon polipeptitlerinin translasyon sonrasında yaratıldığı intein teknolojisini kullanarak da yapılabilir (Cooper ve diğeri, 1993, EMBO J. 12: 2575-2583; Dawson ve diğeri, 1994, Science 266: 776-779).

Bir füzyon polipeptidi ayrıca iki polipeptit arasında bir parçalanma alanı içerebilir. Füzyon proteininin salgılanmasıyla söz konusu alan parçalanarak iki polipeptidi açığa çıkarır. Parçalanma alanlarının örnekleri, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla Martin ve diğeri, 2003, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 3: 568-576; Svetina ve diğeri, 2000, J. Biotechnol. 76: 245-251; Rasmussen-Wilson ve diğeri, 1997, Appl. Environ. Microbiol. 63: 3488-3493; Ward ve diğeri, 1995, Biotechnology 13: 498-503; ve Contreras ve diğeri, 1991, Biotechnology 9: 378-381; Eaton ve diğeri, 1986, Biochemistry 25: 505-512; Collins-Racie ve diğeri, 1995, Biotechnology 13: 982-987; Carter ve diğeri, 1989, Proteins: Structure, Function and Genetics 6: 240-248; ve Stevens, 2003, Drug Discovery World 4: 35-48

referanslarında açıklanan alanları içerir.

Parent herhangi bir cinsten mikroorganizmadan elde edilebilir. Mevcut buluşun amaçları dahilinde, verili bir kaynakla bağlantılı olarak burada kullanıldığı şekliyle "...'den elde edilmiştir" ifadesi bir polinükleotit tarafından kodlanan parentin, kaynak veya içine kaynağa ait polinükleotidin eklenmiş olduğu bir suş tarafından üretildiği anlamına gelecektir. Bir yön itibarıyla, parent hücre dışında salgılanır. Parent veya bir başka deyişle DİZİ İD. NO: 1 ile en az %85 dizi özdeşliğine sahip alfa-amilaz bakteriyel bir alfa-amilaz olabilir. Örneğin, alfa-amilaz (parent) Gram-pozitif bir bakteriyel polipeptit, örneğin bir Bacillus, Clostridium, Enterococcus, Geobacillus, Lactobacillus, Lactococcus, Oceanobacillus, Staphylococcus, Streptococcus veya Streptomyces alfa-amilaz veya Gram-negatif bir bakteriyel polipeptit, örneğin bir Campylobacter, E. coli, Flavobacterium, Fusobacterium, Helicobacter, Ilyobacter, Neisseria, Pseudomonas, Salmonella veya Ureaplasma alfa-amilaz olabilir.

Bir yönü itibarıyla, alfa-amilaz (parent) bir Bacillus alkalophilus, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus brevis, Bacillus circulans, Bacillus clausii, Bacillus coagulans, Bacillus firmus, Bacillus lautus, Bacillus lentus, Bacillus licheniformis, Bacillus megaterium, Bacillus pumilus, Bacillus stearothermophilus, Bacillus subtilis veya Bacillus thuringiensis alfa-amilazdır.

Bir başka yönü itibarıyla, alfa-amilaz parent bir yapay alfa-amilaz, örneğin DİZİ İD. NO: 1'e sahip alfa-amilazdır. Yukarıda bahsedilen türler bakımından buluşun, tanındıkları tür isimleri ne olursa olsun hem kusursuz hem kusurlu durumları ve diğer taksonomik eşdeğerlileri, örneğin anamorfları kapsadığı bilinmelidir. Teknikte uzman olanlar uygun eşdeğerlilerin kimliğini kolaylıkla bilecektir.

Bu türlerin suşları Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS) ve Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL) gibi halka açık çeşitli kültür koleksiyonlarından kolaylıkla temin edilir.

Parent, örneğin yukarıda bahsedilen problemleri kullanarak doğadan (örneğin, toprak, kompostlar, su, vb.) ayrıştırılmış mikroorganizmaları veya doğrudan doğal malzemelerden (örneğin, toprak, kompostlar, su, vb.) elde edilen DNA numunelerini içeren başka kaynaklardan tanımlanabilir ve elde edilebilir. Mikroorganizmaların ve DNA'nın doğrudan doğal yaşam alanlarından ayrıştırılmasına ilişkin yöntemler teknikte gayet iyi bilinmektedir.

Bir parenti kodlayan bir polinükleotit bir başka mikroorganizmaya veya karışık DNA numunesine ait bir genomik DNA'nın veya cDNA kütüphanesinin benzer şekilde taranmasıyla elde edilebilir. Bir parenti kodlayan bir polinükleotit proba(problarla) tespit edildiğinde, söz konusu polinükleotit teknikte genel bilgi sahibi olanlarca bilinen yöntemleri

5 kullanarak ayrıştırılabilir veya klonlanabilir (bakınız örneğin, Sambrook ve diğerleri, 1989, yukarıda).

Burada açıklanan ve hak talep edilen buluşun kapsamı burada ifşa edilen belli yönlerle sınırlı tutulmamalıdır çünkü bu yönlerin verilmiş amacı buluşun birkaç yönüne örnek teşkil etmektir. Aslında, burada gösterilenlere ve açıklananlara ilaveten buluşta yapılabilecek çeşitli

10 modifikasyonlar yukarıdaki açıklamadan yola çıkarak teknikte uzman olanlarca anlaşılır olacaktır. İhtilaf olması durumunda, tanımlar dahil mevcut açıklama geçerli olacaktır.

Buluş şimdi aşağıdaki sınırlayıcı olmayan örnekler yoluyla daha ayrıntılı açıklanacaktır; burada aksi belirtilmediği sürece paylar ve yüzdeler ağırlık üzerindedir.

İlişikteki Şekillerde:

15 Şekil 1'de numaralandırma için DİZİ İD. NO: 1 kullanıldığında, G46A+T47I+G105A+I199F substitüsyonları olan DİZİ İD. NO: 1'e sahip alfa amilazın pH profili gösterilmektedir.

Malzemeler ve Usuller

Model deterjanların hazırlanması. Çeşitli amilazların test edilmesi için farklı şelatlaştırıcılara sahip model sıvı deterjanlar hazırlandı. İki model deterjanın bileşimleri aşağıda açıklanan

20 şekildedir:

	Model 1	Model 2
Bileşen	% ağı/ağı	% ağı/ağı
LAS	12	12
AEOS	4,9	4,9
Sabun (kakao)	2,75	2,75
Sabun (soya)	2,75	2,75
AEO N25-7	11	11
NaOH	1,75	1,75
Etanol	3	3
MPG	6	6
Gliserol	1,7	1,7
TEA	3,3	3,3

	Model 1	Model 2
Bileşen	% ağı/ağı	% ağı/ağı
Sodyum format	1	1
Sodyum sitrat	2	2
HEDP	0	0,5
PCA (Sokalan CP-5)	0,18	0,18
İyon değişimli su	34,2	34,2
DTMPA	0,2	0

PNP-G7 Amilaz Analizi

Alfa-amilaz etkinliği PNP-G7 substratının kullanıldığı bir usulle belirlenebilir. 4,6-etiliden(G7)-p-nitrofenil(G1)- α , D-maltoheptaozidin kısaltması olan PNP-G7 bir endo-amilazla, örneğin bir alfa-amilazla parçalanabilen bloke edilmiş bir oligosakarittir.

- 5 Parçalanmayı takiben kitede bulunan alfa-Glukozidaz hidrolize olmuş substratı daha da sindirerek bir serbest PNP molekülünü açığa çıkartır, söz konusu molekülün sarı bir rengi vardır ve dolayısıyla $\lambda=405\text{nm}$ 'de (400-420 nm) görünür spektrofotometreyle ölçülebilir. PNP-G7 substratını ve alfa-Glukozidazı içeren kitler Roche (kat. No.11876473) tarafından imal edilmektedir. REAKTİFLER: Bu kitede ait G7-PNP substratı 22 mM 4,6-etiliden-G7-PNP ve 52.4 mM HEPES (2-[4-(2-hidroksietil)-1-piperazinil]-etansülfonik asit), pH 7.0) içerir.
- 10 Alfa-Glukozidaz reaktif 52.4 mM HEPES, 87 mM NaCl, 12.6 mM MgCl₂, 0.075 mM CaCl₂, > 4 kU/L alfa-glukozidaz içerir.

Substrat çalışma çözeltisi 66 mL alfa-Glukozidaz reaktifin 16 mL G7-PNP substratla karıştırılmasıyla yapılır. Bu substrat çalışma çözeltisi kullanımdan hemen önce yapılır.

- 15 Seyreltme tamponu: 30 mM CaCl₂ + %0,0026 BRIJ 35 (Polioksietil en-laurileter)

USUL:

- Analiz 40 μl seyreltik enzim numunesinin 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plakasına aktarılması ve 220 μl substrat çalışma çözeltisinin eklenmesiyle gerçekleştirildi. Çözelti karıştırıldı ve 15 dakika 37 °C'de ön inkübasyon yapıldı ve "Spectra Max 384 Plus" bir Elisa okuyucuda
- 20 (Molecular Devices) OD 405 nm'de 10 dakika boyunca her 20 saniyede bir absorpsiyon ölçümü yapıldı. Zamana bağlı absorpsiyon eğrisinin eğimi (dakikada absorbans) verili koşullar grubu altında söz konusu alfa-amilazın spesifik etkinliğiyle (enzim miligramı başına etkinlik) doğru orantılıdır.

Serbest Kalsiyum İyonları Ölçümü Analizi

Aşağıdaki analiz çözeltide serbest kalsiyum iyonlarının ölçülmesi ve dolayısıyla şelatlaştırıcı maddelerin (şelatlaştırıcılar) serbest kalsiyum iyonları konsantrasyonunu (Ca^{2+}) pH 8'de örneğin 2.0 mM'den 0.10 mM'ye düşürme kapasitesinin belirlenmesi için kullanılabilir.

5 Analiz Prensi:

Çeşitli miktarlarda şelatlaştırıcı 2.0 mM bir Ca^{2+} çözeltilisine eklendi ve sabitlenmiş pH ve sıcaklıkta Kalsiyum İyonu Seçici Elektrot kullanarak serbest Ca^{2+} konsantrasyonu belirlendi. Serbest kalsiyum konsantrasyonunu 2.0 mM'den 0.10 mM'ye düşürmek için gerekli şelatlaştırıcı konsantrasyonu şelatlaştırıcı konsantrasyonuna göre ölçülmüş serbest kalsiyum konsantrasyonu grafiğinden belirlenebilir. Mevcut analizde serbest kalsiyum konsantrasyonunu 2.0 mM'den 0.10 mM'ye düşürmek için gereken şelatlaştırıcı konsantrasyonu potasyum klorür ve 49 mM EPPS içinde pH 8'de ve 21 °C'de ölçüldü.

ÇÖZELTİLER:

- Elektrolit çözeltisi: Ultra saf suda (Milli-Q su) 4 M potasyum klorür. pH 8 tamponu:
- 15 minimum miktarda 1 N sodyum hidroksit kullanarak pH 8.0'a ayarlanmış 50 mM EPPS (4-(2-Hidroksietil)piperazin-1-propansülfonik asit). Kalsiyum stok çözeltisi: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 'dan yapılmış, pH 8 tamponunda 25 mM Ca^{2+} . Şelatlaştırıcı stok çözeltisi: minimum miktarda 1 M NaOH veya 1 M HCl kullanarak yeniden pH 8.0'a ayarlanmış, pH 8 tamponunda 15 mM şelatlaştırıcı (%100 kuru şelatlaştırıcı bazında).
- 20 Tüm tamponların ve çözeltilerin hazırlanmasında ultra saf su (Milli Q su) kullanılmıştır.

EKİPMAN:

Thermo Scientific'ten (kat. No. 9720BNWP) alınan Kalsiyum İyonu Seçici Elektrot Kalsiyum klorür standart çözeltisine kalibre edildi. Elektrot, elektrot kılavuzlarında açıklanan şekilde kalibre edildi.

5 USUL:

Her biri 4 mL kalsiyum stok çözeltisi (nihai konsantrasyon 2.0 mM), 1 mL elektrolit çözeltisi (nihai konsantrasyon 80 mM potasyum klorür), çeşitli miktarlarda şelatlaştırıcı stok çözeltisi (0 - 45 mL) içeren ve toplam hacmi 50 mL'ye getirmek için pH 8 tamponun kullanıldığı bir dizi şişe hazırlandı. Analizde nihai EPPS konsantrasyonu 49 mM'dir. Karıştırma sonrasında serbest Ca²⁺ konsantrasyonu kalsiyum elektrotla ölçüldü. Serbest kalsiyum konsantrasyonu test edilen her şelatlaştırıcı için yeterli bir sayıda farklı şelatlaştırıcı konsantrasyonunda belirlenmelidir, bu şekilde veri grubunun 2.0 mM serbest kalsiyum iyonundan 0.10 mM'nin altındaki bir değere dek tüm aralığı kapsaması veya analizde nihai şelatlaştırıcı konsantrasyonunun 10.0 mM'den daha yüksek olması sağlanmış olacaktır. Uygun bir veri noktası sayısı 8 veya fazlasıdır. Başlangıçtaki 2.0 mM serbest kalsiyum iyonunu 0.10 mM'ye düşürmek için gereken şelatlaştırıcı konsantrasyonu, ara değerlemeye yaparak şelatlaştırıcı konsantrasyonuna göre ölçülü serbest kalsiyum iyonu konsantrasyonu grafiğinden elde edildi. Çözeltiler istenilen sıcaklığa, yani mevcut analizde 21 °C'ye dengelendi.

LogK'nin Belirlenmesi

20 Şelatlaştırıcı maddelerin özellikleri şelatlaştırıcı madde (şelatlaştırıcı) ve kalsiyum iyonları bağlanma sabitiyle de belirlenebilir. Bu sabit AD Nielsen, CC Fuglsang ve P Westh, Analytical Biochemistry Cilt 314 (2003) sayfa 227-234 ve T Wiseman, S Williston, JF Brandts ve L-N Lin, Analytical Biochemistry Cilt 179 (1989) sayfa 131-137 referanslarında açıklanan şekilde ITC'yle (izotermal titrasyon kalorimetresi) belirlenebilir.

25 Kullanılan tüm cam eşyalar ve plastik şişeler %1 (ağ/ağ) bir EDTA çözeltisiyle yıkandı ve ardından Chelex 100 ile işleme tabi tutulmuş ultra saf suda (Milli-Q su) iyice durulandı. Çözeltiler plastik şişelerde saklandı ve kullanıma dek 5 °C'de tutuldu. TAMPONLAR: ultra saf suyla (Milli-Q su) hazırlanmış 20 mM HEPES (2-[4-(2-hidroksietil)-1-piperazinil]-etansülfonik asit) (pH 8); ultra saf suyla hazırlanmış (Milli-Q su) 20 mM glisin (pH 10).

30 CÖZELTİLER:

- 20 mM HEPES içinde 125 µM şelatlaştırıcı (pH 8) veya 20 mM glisin içinde 125 µM

şelatlaştırıcı (pH 10)

- 20 mM HEPES içinde 4 mM CaCl₂ (pH 8) veya 20 mM glisin içinde 4 mM CaCl₂ (pH 10)
- Ultra saf su (Milli-Q su)

5 Tüm tamponlar Chelex 100 kolonlarından (Sigma Aldrich C-7901, matris: %1 çapraz bağlı polistiren; matris aktif grubu: iminodiasetik asit (sodyum formu); matris bağlanması: metil grubuyla aromatik halkalara) geçirilerek kalsiyum iyonları atıldı. Deneylerden önce vakum altında karıştırarak tüm çözeltilerin gazı giderildi. ALET: MCS-ITC (MicroCal Inc., Northampton, MA, ABD)

10 **USUL:**

Referans hücre ultra saf suyla (Milli-Q su) dolduruldu. Numune hücre seçili pH'ta şelatlaştırıcı çözeltiyle dolduruldu ve şırınga seçili pH'ta kalsiyum çözeltisiyle dolduruldu. Çözeltiler istenilen sıcaklığa, örneğin 19 °C'ye dengelendi. Daha sonra numune hücredeki şelatlaştırıcı çözelti 30-40 temsili miktarda 8 µL kalsiyum çözeltisiyle titre edildi.

15 ITC'den elde edilen sinyaller MicroCal Inc.'den temin edilen Origin yazılımını kullanarak bütünleştirildi. Bağlanma izotermelerini elde etmek için aynı yazılım paketini kullanarak regresyon rutinleri yapıldı. Daha sonra bu veriler Origin yazılımına yerleşik rutinleri kullanarak bir modele uyarlandı. Hali hazırda tercih edilen yaygın olarak kullanılan şelatlaştırıcı maddelerin çoğu için en uygunu veren "OneSites" modelidir, yani kalıntılar sıfır

20 etrafında eşit olarak dağılır. K değerinden K değeri logaritması olarak (10 tabanı) log K hesaplanır.

Yıkama Performansını Belirleme Analizleri

Terg-O-tometre (TOM) Yıkama Analizi

Terg-O-Tometre kullanılan yıkama performansı testi orta ölçekli bir çamaşır makinesi

25 modelinde yapılan bir analizdir ve amilazların yıkama performansının değerlendirilmesinde kullanılır. Bir TOM esas olarak 12 kadar açık metal deney kabının içine batırıldığı sıcaklığı kontrollü büyük bir su banyosudur. Her deney kabı bir küçük çamaşır makinesini oluşturur ve bir deney sırasında bunların her biri bir özel deterjan/enzim sistemi çözeltisi ve üzerinde bunun performansının test edildiği lekeli ve lekesiz kumaşlar içerir. Mekanik gerilim, her

30 deney kabı içindeki sıvıyı karıştıran bir döner karıştırma koluyla sağlanır. TOM deney kaplarının kapakları olmadığı için bir TOM deneyi sırasında numunelerin geri alınması ve

yıkama sırasında elektronik bilgi analizinin yapılması mümkündür. 1000 mL'lik deney kaplarının ve dakikada 120 bir sıklıkla her yönde 180° salınımlı dönme hareketi sağlayan bir kanatlı karıştırıcının kullanıldığı TOM yıkama performansı testi aşağıdaki aşamaları içerir: Deney kaplarına 500 mL yıkama çözeltisi (40 mM NaHCO₃ içeren 4:1 bir Ca/Mg oranıyla 15 °dH) eklenir. Yıkama için seçilen sıcaklığa, örneğin 40 °C'ye ulaşıldığında yıkama çözeltisine deterjan ve enzim eklenir. Yıkama sırasında deterjan konsantrasyonu yıkama çözeltisi litresi başına 3.3 g deterjan olmalıdır (örneğin yukarıda açıklanan model deterjan 1 veya 2 için 3.3 g/L). Yıkama sırasında enzim konsantrasyonu 0 ve/veya 0.028 mg enzim proteini/L yıkama çözeltisi olmalıdır. Yıkamayı başlatmak için yıkama çözeltisine 5x5 cm'lik dört pamuklu pirinç nişastası kumaş parçası, örneğin CS-28 (Center For Testmaterials BV, P.O. Box 120, 3133 KT, Vlaardingen, Hollanda) ile birlikte 5*5 cm kesilmiş 10 g önceden yıkanmış balast WFK80A (wfk Testgewebe GmbH, Christenfeld 10; D-41379 Brüggen-Bracht; Almanya) eklendi. Seçilen yıkama süresinden sonra örneğin 20 dakika sonra yıkama sonlandırıldı ve kumaş parçaları hemen soğuk akan musluk suyunda 5 dakika durulandı. Daha sonra durulanan kumaş parçaları karanlıkta kurutuldu. Kurutmanın ardından yıkama performansı aşağıda açıklanan şekilde Color Eye kullanarak 460 nm'de düşen ışık remiyonunun ölçülmesiyle değerlendirildi. 0 mg enzim protein/L ile yapılan test bir delta remiyon değeri elde etmek için kör örnek olarak kullanıldı.

ColorEye Ölçümü

Yıkama performansı bir delta remiyon değeri (ΔRem) olarak ifade edilir. Kumaş parçalarında ışık remiyonu değerlendirmeleri büyük bir yuvarlak diyafram açıklığı (25 mm çapında) olan bir Macbeth ColorEye 7000 remiyon spektrofotometresi kullanarak yapıldı. Ölçümler UV olmadan düşen ışıkta yapıldı ve 460 nm'de remiyon çıkartıldı. Ölçüm yapılacak kumaş parçası, kumaş parçasını ölçme açıklığına doğru iten pistondan yansımayı azaltmak için ölçüm öncesinde aynı koşullar altında yıkanmış aynı türden diğer üç kumaş parçasının üzerine konuldu. Verili bir yıkama koşulu için delta remiyon değerleri, amilazla yıkanmış (0.028 mg enzim protein/L) kumaş parçalarının remiyon değerinden amilaz ilavesi olmadan yıkanmış (0 mg enzim protein/L) kumaş parçalarının ortalama remiyon değerini çıkartarak hesaplandı.

Çamaşır Yıkamaya İlişkin Otomatik Mekanik Gerilim Analizi (AMSA)

Kullanılabilecek bir başka yıkama performansı testi AMSA'dır. Çamaşırda yıkama performansının değerlendirilmesi için Otomatik Mekanik Gerilim Analizi (AMSA) kullanarak

yıkama deneyleri gerçekleştirilebilir. AMSA ile birçok küçük hacimli enzim-deterjan çözeltisinin yıkama performansı incelenebilir. AMSA plakası test çözeltileri için çeşitli yuvalara ve yıkanacak dokumayı yuva açıklıklarına iyice sıkıştıran bir kapağa sahiptir. Yıkama sırasında plaka, test çözeltileri, dokuma ve kapak hızla çalkalanarak test çözeltisinin dokumayla temas etmesi ve düzenli, periyodik, salınımlı bir tarzda mekanik gerilimin uygulanması sağlanır. Daha fazla açıklama için WO 02/42740'a ve özellikle sayfa 23-24'teki "Özel Usul Düzenlemeleri" paragrafına bakılabilir.

Deterjan dozajı	5 g/L (sıvı deterjan)
Test çözeltisi hacmi	160 mikro L
pH	pH 7 veya pH 6'ya ayarlı (sıvı deterjan)
Yıkama süresi	20 dakika
Sıcaklık	60 °C, 40 °C ve 20 °C veya 15 °C
Su sertliği	15°dH

Model deterjanlar ve test malzemeleri aşağıdaki şekilde olabilir:

Sıvı model çamaşır deterjan	Sodyum alkiletoksi sülfat (C-9-15, 2EO) %6.0 Sodyum dodesil benzen sülfonat %3.0 Sodyum toluen sülfonat %3.0 Oleik asit %2.0 Primer alkol etoksilat (C12-15, 7EO) %3.0 Primer alkol etoksilat (C12-15, 3EO) %2.5 Etanol %0.5 Monopropilen glikol %2.0 Tri-sodyum sitrat dihidrat %4.0 Trietanolamin %0.4
	%100'e dek deiyonize su pH NaOH ile 8.5'e ayarlı
Test Malzemesi	EMPA112 (Pamukluda kakao) PC-05 (Pamukluda/polyesterde kan/süt/mürekkep) WFK10PPM (Pamukluda bitkisel yağ/süt/pigment) C-10 (Pamukluda sıvı yağ/süt/pigment) CS-28 (pamukluda pirinç nişastası)

Test malzemeleri EMPA Testmaterials AG, Mövenstrasse 12, CH-9015 St. Gallen, İsviçre; Center For Testmaterials BV, P.O. Box 120, 3133 KT Vlaardingen, Hollanda ve WFK Testgewebe GmbH, Christenfeld 10, D-41379 Brüggen, Almanya'dan elde edildi. Su sertliği test sistemine CaCl₂, MgCl₂ ve NaHCO₃ (Ca²⁺:Mg²⁺ = 4:1:7.5) ekleyerek 15°dH'ye

5 ayarlandı. Yıkama sonrasında dokumalar musluk suyunda durulandı ve kurutuldu. Yıkama performansı yıkanan dokumanın renginin parlaklığı olarak ölçüldü. Parlaklık, beyaz ışıkla aydınlatıldığında numuneden yansıyan ışığın şiddeti olarak da ifade edilebilir. Numune lekелendiğinde yansıyan ışığın şiddeti temiz bir numuneden yansıyandan daha azdır. Bu nedenle, yansıyan ışığın şiddeti yıkama performansının ölçülmesinde kullanılabilir. Renk

10 ölçümleri, yıkanmış dokumanın bir görüntüsünün yakalanmasında kullanılan profesyonel bir düz yataklı tarayıcı (Kodak iQsmart, Kodak, Midtager 29, DK-2605 Brøndby, Danimarka) kullanarak yapıldı.

Taranan görüntülerden ışık şiddetine ilişkin bir değer çıkarmak için görüntüye ait 24-bit piksel değerleri kırmızı, yeşil ve mavi (RGB) değerlerine çevrildi. Şiddet değeri (Int) RGB

15 değerlerinin birlikte vektörler olarak toplanması ve ardından ortaya çıkan vektörün uzunluğunun alınmasıyla hesaplandı:

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

Örnek 1 - pH Profiline Belirlenmesi

pH Profili numaralandırma için DİZİ İD. NO: 1 kullanıldığında G46A+T47I+G105A+I199F

20 süstitüsyonlarıyla DİZİ İD. NO: 1'e sahip alfa amilaz için belirlendi.

İndirgen Şeker Analizi:

Amilolitik etkinlik (alfa-amilaz etkinliği) ölçümü analizleri.

Alfa-amilaz etkinliği nişasta substrat, örneğin Sigma-Aldrich'ten pirinç nişastasası S7260 kullanılan bir usulle belirlenebilir. Alfa-amilaz substratı parçalar ve amilazın oluşturduğu

25 indirgenmiş uç p-Hidroksibenzoik asit hidrazitle reaksiyonla (indirgen şeker analizi) belirlenir. Bu, 405 nm'de absorbans ölçümüyle tespit edilebilecek hidrazon oluşumunu ortaya çıkartır. Oluşan indirgen uçların sayısı amilaz etkinliğiyle orantılıdır.

Enzim, enzim seyreltme tamponu (10 mM MES, pH7.0, %0.01 TritonX100, 0.100 mM CaCl₂) içinde analizde bir doğrusal doz-yanıt eğrisinin elde edildiği bir enzim

30 konsantrasyonuna seyreltilir. pH etkinliği pH 4-11'e ayarlanmış etkinlik tamponlarını (50 mM MES, 50 mM asetik asit, 50 mM Glisin) kullanarak belirlenir. Substrat (Sigma-Aldrich'ten

S7260) (MilliQ suda 3 mg/ml) 5 dakika pişirilir ve kullanım öncesinde soğutulur. Analiz için 50 µl substrat (3mg/ml) PCR mikrotitrasyon plakasına aktarılır ve 50 µl etkinlik tamponu (50 mM MES, 50 mM asetik asit, 50 mM Glisin, pH4-11) eklenir. 50 µl seyreltik enzim eklenir ve karıştırılır. PCR makinesinde 5 dakika 40 °C’de inkübasyon yapılır, ardından soğutulur.

- 5 p-Hidroksibenzoik asit hidrazidin (Sigma H-9882) Ka-Na-tartarat/NaOH çözeltisinde (1 Litre için: 50 g K-Na-tartarat (Merck 8087) ve 20 g NaOH eklenir) çözündürülmesiyle sonlandırma çözeltisi 15 mg/ml yapılır. 75 µl sonlandırma çözeltisi eklenir ve incubate at in PCR makinesinde 95 °C’de 10 dakika inkübasyon yapılır. 150 µl yeni 96-Mikrotitrasyon plakasına eklenir ve 405 nm’de absorbans ölçülür. Enzim, verili pH’ta etkinlik analizinin doğrusal aralığı içinde olacak şekilde seyreltilmelidir. Amilaz etkinliği maksimum etkinliğe normalleştirilir.

- Numaralandırma için DİZİ İD. NO: 1 kullanıldığında G46A+T47I+G105A+I199F sübstütüsyonlarıyla DİZİ İD. NO: 1’e sahip alfa amilazın pH profili belirlendi ve sonuç Şekil 1’de gösterilmektedir. Maksimum etkinliğe pH 6 ve 7 arasında ulaşıldığı ve etkinliğin alkali bölgede bariz ölçüde düştüğü görülebilmektedir, dolayısıyla enzim alkali sıvı deterjanlarda kullanım için pek cazip gibi durmamaktadır. Mevcut buluşu yapanlar alfa-amilaz enzimin olağanüstü stabilitesinin (bakınız aşağısı) alkali pH değerlerine sahip sıvı deterjanlardaki düşük etkinliği fazlasıyla telafi ettiğini bulmuşlardır.

Takip eden örneklerde kısaltılmış bileşen tanımları aşağıda verilen anlamlara sahiptir:

- 20 MPG, mono propilen glikoldür;
TEA, trietanolamindir;
MEA, Monoetanolamindir;
NaOH, %47 sodyum hidroksit çözeltisidir;
NI 7EO C12-15, alkol etoksilat 7EO noniyonik Neodol® 25-7’dir (Shell Chemicals);
25 LAS asidi, C12-14 doğrusal alkilbenzen sülfonik asittir;
Prifac® 5908, doymuş laurik yağ asididir (Croda);
SLES 3EO, 3 mol EO’lu sodyum lauril eter sülfattır;
SLES 1EO, 1 mol EO’lu sodyum lauril eter sülfattır;
EPEI Sokalan HP20, - etoksillenmiş polietilen imin temizleyici polimer: PEI(600)
30 20EO’dur (BASF)

Parfüm, serbest yağlı parfümdür;

Dequest®2010, HEDP'dir (1-Hidroksietiliden-1,1,-difosfonik asit);

Koruyucu madde, Proxel GXL antimikrobiyal koruyucu madde, yani dipropilen glikol ve su içinde %20'lik bir 1,2 benzizotiazolin-3-on çözeltisidir (Arch Biocides);

5 Floreser, Tinopal™ CBS-X'tir (Ciba);

Stainzyme™, Termamyl Ultra™, Savinase Ultra XL™, Mannaway™ (Novozymes) ticari enzimlerdir.

Örnek 2: Sıvı Deterjanlarda Amilazın Depolanma Stabilitesi

Önceki tekniğe ait amilazlarla (Stainzyme ve Termamyl Ultra) ve

- 10 G46A+T47I+G105A+I199F süstitüsyonları olan DİZİ İD. NO: 1'e sahip amilazla (DİZİ İD. NO: 2 amilaz) bir dizi sıvı deterjan bileşimi formüle edildi. Kullanılan bileşimler Tablo 1'de verilmektedir. Deterjan enzim numuneleri cam şişelere konuldu ve daha sonra cam şişeler kapatıldı. Deterjan enzim numuneleri 2 ve 4 hafta 37 °C'de veya 45 °C'de inkübe edildi ve
- 15 taze numuneleri temsil etmesi için benzer bir numune grubu donduruldu. Depolamadayı takiben PNP-G7 amilaz etkinliği analizini kullanarak kalıntı amilaz etkinliği ölçüldü. Test edilen amilazlar Termamyl Ultra, Stainzyme (Novozymes A/S; Krogshoejvej 36; 2880 Bagsvaerd; Danimarka) ve DİZİ İD. NO:2'ye sahip amilazdır.

Tablo 1 - Sıvı Deterjan Bileşimleri

İçerik Madde	Bileşimler %100 Olarak Ağ. %						
	%AD	A	B	C	D	E	F
Demin. su	100	denge	denge	denge	denge	denge	denge
MPG	100	5	5	5	5	1,1	0
Gliserol	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
NI7EO	100	3,92	3,92	1,16	1,16	3,31	1,16
LAS Asidi	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

İçerik Madde	Bileşimler %100 Olarak Ağ. %						
	%AD	A	B	C	D	E	F
Dequest 2010	60	0	0,7	0	0,7	0	0
Sitrik asit	50	1,17	1,17	2	2	1,25	2
Sodyum Sülfid	98	0,12	0,12	0	0	0	0
Koruyucu madde	20	0,02	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03
Floreser	100	0,12	0,12	0,1	0,1	0,09	0,03
Parfüm	100	0,65	0,65	0,34	0,34	0,98	0,34
Amilaz DİZİ İD. NO: 2 (14.6 mg etkin/g)	100	0 - 0.2	0 - 0.2	0 - 0.2	0 - 0.2	0 - 0.3	0 - 0.11
Stainzyme (13.7 mg etkin/g)	100	0 - 0.2	0 - 0.2	0 - 0.2	0 - 0.2	0 - 0.3	0 - 0.11
Termamyl Ultra (24.8 mg etkin/g)	100	0 - 0.2	0 - 0.2	0 - 0.2	0 - 0.2	0	0
Savinase Ultra XL (48 mg etkin/g)	100	0	0	0	0	1	0,35
Mannaway (4.4 mg etkin/g)	100	0	0	0	0	0,3	0,11
Toplam	100	100	100	100	100	100	100
25 °C'de pH		8,5	8,5	8,5	8,5	8,2	8,2

Tablo 2

	Kalıntı Etkinlik, 37 °C					
	Amilaz DİZİ İD. NO:2		Termamyl Ultra		Stainzyme	
	2 Hafta	4 Hafta	2 Hafta	4 Hafta	2 Hafta	4 Hafta
Deterjan A	82	69	29	10	5	1
Deterjan B	90	80	83	61	50	25
Deterjan C	89	83	38	16	7	1
Deterjan D	92	78	71	46	37	15

Tablo 3

	Kalıntı Etkinlik, 45 °C					
	Amilaz DİZİ İD. NO:2		Termamyl Ultra		Stainzyme	
	2 Hafta	4 Hafta	2 Hafta	4 Hafta	2 Hafta	4 Hafta
Deterjan A	60	40	0	0	0	0
Deterjan B	79	69	36	17	4	1
Deterjan C	70	53	2	0	0	0
Deterjan D	77	72	21	5	2	1

Tablo 4

	Kalıntı Etkinlik, 37 °C				Kalıntı Etkinlik, 45 °C			
	Amilaz DİZİ İD.NO:2		Stainzyme		Amilaz DİZİ İD.NO:2		Stainzyme	
	2 Hafta	4 Hafta	2 Hafta	4 Hafta	2 Hafta	4 Hafta	2 Hafta	4 Hafta
Deterjan E	100	100	82	69	99	96	49	30
Deterjan F	96	96	66	36	89	82	10	0

Test edilen koşullar altında G46A+T47I+G105A+I199F süstitüsyonları olan DİZİ İD. NO: 1'e ait amilazın (DİZİ İD. NO: 2'ye ait amilaz) tüm deterjan numunelerinde Termamyl Ultra™ ve Stainzyme™'den anlamlı ölçüde daha stabil olduğu açıktır.

5 Örnek 3: Sıvı Deterjanlarda Depolanma Stabilitesi.

Test edilen amilazlar 0,084 mg EP/g bir nihai final protein konsantrasyonuna ulaşmak üzere deterjanlara eklendi. Söz konusu amilaza sahip 5 gram deterjan numunesi 40 °C'de 1 hafta veya 37 °C'de 2 hafta için kapalı cam şişelere konuldu. Amilaz etkinliği yukarıda açıklanan PNP-G7 amilaz analizine göre ölçüldü. Amilazların kalıntı etkinlikleri 1 ve 2 hafta -18 °C'de depolanan bir referans numunesi ile karşılaştırarak hesaplandı.

Tablo 5

40 °C'de 1 hafta	DİZİ NO1: G46A+T47I+G105A+I199F	DİZİ NO1:	Termamyl
Model 1	%96	%100	%30
Model 2	%94	%84	%16

Tablo 6

37 °C'de 2 hafta	DİZİ NO1: G46A+T47I+G105A+I199F	DİZİ NO1:	Termamyl
Model 1	%93	%95	%38
Model 2	%93	%85	%18

Bu örnekte DİZİ İD. NO: 1'e ait amilazın Model 1'de iyi depolama stabilitesine sahip olduğu ancak 40 °C'de bir haftalık depolamadan sonra deterjan modeli 2'de hemen anlamlı ölçüde etkinlik kaybına uğradığı açıktır. G46A+T47I+G105A+I199F süstitüsyonlarına sahip DİZİ İD. NO: 1'e ait amilazın deterjan modeli 1 ve 2'nin her ikisinde yüksek stabilite gösterdiği de açıktır. Dolayısıyla, G46A+T47I+G105A+I199F süstitüsyonlarına sahip DİZİ İD. NO: 1'e

ait bu amilaz model 1 ile karşılaştırıldığında daha yüksek bir konsantrasyonda şelatlaştırıcı madde içeren model 2’de stabildir. Termamyl bu iki deterjan modelinde stabil değildir.

Örnek 4: Deterjanda Depolama Sonrası Kalıntı Amilaz Yıkama Performansı

Deterjan Enzimi Numunesinin Hazırlanması

- 5 0.084 mg amilaz enzimi proteini/g deterjan içeren deterjan enzimi numuneleri, örneğin deterjan modeli 1 veya 2 cam şişelere konuldu ve ardından cam şişeler kapatıldı. Deterjan enzim numuneleri 1 hafta 40 °C’de veya 2 hafta 37 °C’de inkübe edildi ve taze numuneleri temsil etmesi için benzer bir numune grubu donduruldu. Depolamadayı takiben hem donmuş hem inkübe edilmiş numunelerde Terg-O-Tometrede yıkama performansı belirlendi. Test
- 10 edilen amilazlar Termamyl (Novozymes A/S; Krogshoejvej 36; 2880 Bagsvaerd; Danimarka), DİZİ İD. NO: 1’e sahip amilaz ve G46A+T47I+G105A+I199F süstitüsyonlarının olduğu DİZİ İD. NO: 1’e sahip amilazdır.

Terg-O-Tometrede Yıkama Performansı Testi

- 15 Depolama sonrasında Termamyl, DİZİ İD. NO: 1’e ait amilaz ve G46A+T47I+G105A+I199F süstitüsyonları olan DİZİ İD. NO: 1’e ait amilazın yıkama performansı aşağıda açıklanan deney koşulları altında Terg-O-Tometrede incelendi:

Tablo 7

Yıkama sırasında deterjan konsantrasyonu	3.3 g/L
Yıkama sıcaklığı	40 °C
Yıkama süresi	20 dakika
Yıkama çözeltisinin su sertliği	15°dH (40 mM NaHCO ₃ ile 4:1 Ca/Mg oranı)
Dakikada salınım	120
pH	Olduğu gibi
Test çözeltisinde enzim konsantrasyonu	0; 0.028 mg EP/L
Test çözeltisi hacmi	500 mL
Deney kabı başına dokuma	4 pirinç nişastalı pamuklu kumaş parçası (CS-28, 5*5 cm) ve 10 g pamuklu balast (WFK 80A, 5*5 cm)

- 20 Yıkama çözeltisi litresi başına nihai 3.3 g deterjan elde etmek için 1.485 g deterjan (örneğin Model 1 veya 2) 15°dH bir su sertliğindeki 500 mL yıkama çözeltisine eklendi, ardından yıkama performansı bakımından incelenecek olan 0.165 g amilaz/deterjan numunesi eklendi.

Deterjan konsantrasyonu artık yıkama çözeltisi litresi başına 3.3 g deterjan ve amilaz konsantrasyonu yıkama çözeltisi litresi başına 0.028 mg enzim proteindir.

Yıkamayı başlatmak için yıkama çözeltisine 5x5 cm'lik dört CS-28 kumaş parçasıyla (Center For Testmaterials BV, P.O. Box 120, 3133 KT, Vlaardingen, Hollanda) birlikte 5*5 cm kesilmiş 10 g önceden yıkanmış balast WFK80A (wfk Testgewebe GmbH, Christenfeld 10; D-41379 Brüggen-Bracht; Almanya) eklendi. 40 °C'de 20 dakika yıkama sonrasında yıkama sonlandırıldı ve hemen CS-28 kumaş parçaları 5 dakika akan soğuk musluk suyunda durulandı. Kurutma sonrasında Macbeth Color Eye 7000 remiyon spektrofotometresi kullanarak CS-28 kumaş parçalarının remiyon değerleri ölçüldü. İnkübasyon sonrasında yıkama performansı (Δ Rem) elde edildi ve Termamyl, DİZİ İD. NO:1'e ait amilaz ve G46A+T47I+G105A+I199F süstitüsyonları olan DİZİ İD. NO:1'e ait amilazın yıkama performansı arasındaki bir oran olarak gösterilen kalıntı yıkama performansının hesaplanmasında kullanıldı. DİZİ İD. NO:1'e ait amilazın inkübasyon sonrasındaki yıkama performansı (Δ Rem) %100 olarak alındı (Tablo 2.1 & 2.2). İlaveten ayrı ayrı her amilazın kalıntı yıkama performansı depolanmış numunenin ortalama yıkama performansının (Δ Rem) özdeş donmuş numunenin ortalama yıkama performansına (Δ Rem) bölünmesiyle hesaplandı (Tablo 8 & 9).

Tablo 8: Termamyl, DİZİ İD. NO:1'e ait amilaz ve G46A+T47I+G105A+I199F süstitüsyonları olan DİZİ İD. NO:1'e ait amilaz için 40 °C'de 1 hafta depolama sonrasında kalıntı yıkama performansı oranı. DİZİ İD. NO:1'e ait amilazın kalıntı yıkama performansı her deterjanda %100 olarak alındı.

Tablo 8

40 °C'de 1 hafta	Model Deterjan 1	Model Deterjan 2
Termamyl	%24	%20
DİZİ İD. NO:1 amilaz	%100	%100
G46A+T47I+G105A+I199F'li DİZİ İD. NO:1 amilaz	%83	%119

Bu sonuçlarda, model deterjan 2 kullanıldığında 1 hafta depolama sonrasında G46A+T47I+G105A+I199F süstitüsyonları olan DİZİ İD. NO:1'e ait amilazın kalıntı yıkama performansının DİZİ İD. NO:1'e ait amilazla karşılaştırıldığında daha iyi olduğu açık olarak görülmektedir. Model deterjan 1 kullanıldığında DİZİ İD. NO:1'e ait amilaz en yüksek depolama sonrası kalıntı yıkama performansına sahiptir. Bu farkın şelatlaştırıcı madde

konsantrasyonunun model 1'e göre model 2'de daha yüksek olmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Sonuç olarak, G46A+T47I+G105A+I199F sübstitüsyonları olan DİZİ İD. NO:1'e ait amilaz yüksek miktarlarda şelatlaştırıcı madde içeren deterjanlarda iyi düzeyde depolama sonrası yıkama performansına sahiptir.

- 5 Tablo 9: Termamyl, DİZİ İD. NO:1'e ait amilaz ve G46A+T47I+G105A+I199F sübstitüsyonları olan DİZİ İD. NO:1'e ait amilaz için 37 °C'de 2 hafta depolama sonrasında kalıntı yıkama performansı oranı. DİZİ İD. NO:1'e ait amilazın kalıntı yıkama performansı %100 olarak alındı.

Tablo 9

37 °C'de 2 hafta	Model Deterjan 1	Model Deterjan 2
Termamyl	%34	%3
DİZİ İD. NO:1 Amilaz	%100	%100
G46A+T47I+G105A+I199F'li DİZİ İD. NO:1 amilaz	%103	%138

- 10 37 °C'de 2 hafta depolama sonrasında elde edilen bu sonuçlar 1 hafta depolama sonrasında elde edilen sonuçları teyit etmektedir.

Tablo 10: Termamyl, DİZİ İD. NO:1'e ait amilaz ve G46A+T47I+G105A+I199F sübstitüsyonları olan DİZİ İD. NO:1'e ait amilaz için 40 °C'de 1 hafta depolama sonrasında ayrı ayrı kalıntı yıkama performansı.

15

Tablo 10

40 °C'de 1 hafta	Model Deterjan 1	Model Deterjan 2
Termamyl	%47	%34
DİZİ İD. NO:1 amilaz	%96	%71
G46A+T47I+G105A+I199F'li DİZİ İD. NO:1 amilaz	%107	%108

Bu sonuçlar donmuş amilaz numuneleriyle karşılaştırıldığında iki deterjanda amilazların yıkama performansını göstermektedir. Donmuş numuneler %100 olarak alındı. Buradan DİZİ İD. NO:1'e ait amilazın model 2'de yıkama performansı kaybı gösterdiği, G46A+T47I+G105A+I199F sübstitüsyonları olan DİZİ İD. NO:1'e ait amilaz için ise bunun söz konusu olmadığı görülebilmektedir.

20

Tablo 11: Termamyl, DİZİ İD. NO:1'e ait amilaz ve G46A+T47I+G105A+I199F

sübstitüsyonları olan DİZİ İD. NO:1'e ait amilaz için 37 °C'de 2 hafta depolama sonrasında ayrı ayrı kalıntı yıkama performansı.

Tablo 11

37 °C'de 2 hafta	Model Deterjan 1	Model Deterjan 2
Termamyl	%67	%5
DİZİ İD. NO:1 amilaz	%75	%61
G46A+T47I+G105A+I199F'li DİZİ İD. NO:1 amilaz	%90	%102

5 Test edilen koşullar altında DİZİ İD. NO:1'e ait amilazın Termamyl'den daha stabil olduğu ve model deterjan 2'de sübstitüsyonların (G46A+T47I+G105A+I199F) DİZİ İD. NO:1'e ait amilazda gelişmiş stabilite ve gelişmiş yıkama performansı sağladığı açıktır.

Örnek 5: Şelatlaştırıcı Maddelerin Özelliklerinin Belirlenmesi

Örnek 5a - Serbest Kalsiyum İyonları Ölçümü

10 Şelatlaştırıcı maddeler (şelatlaştırıcılar) M.K.Nagarajan ve diğerleri, JAOCS, Cilt 61, No. 9 (Eylül 1984), s. 1475-1478 referansında açıklanan bir usulle geliştirildiği üzere pH 8'de serbest kalsiyum iyonları konsantrasyonunu (Ca²⁺) 2.0 mM'den 0.10 mM'ye düşürme kapasitelerine göre sınıflandırılabilir. Serbest kalsiyum iyonlarının ölçümü için yukarıda "Malzemeler ve Usuller" bölümünde açıklanan analiz kullanıldı. Dolayısıyla, su sertliğini 2.0 mM'den 0.10 mM'ye düşürmek için gereken şelatlaştırıcı konsantrasyonu yukarıda açıklanan 15 şekilde belirlendi. Deney pH 8 tamponda 21 °C'de gerçekleştirildi. Kullanılan nihai şelatlaştırıcı konsantrasyonları ve ölçülen serbest Ca²⁺ konsantrasyonu aşağıda Tablo 3.1'de gösterilmektedir.

Tablo 12.1: pH 8'de 2.0 mM Ca²⁺ ve Çeşitli Miktarlarda Şelatlaştırıcı Madde İçeren Bir Karışımda Belirlenen Serbest Ca²⁺ Konsantrasyonu

Kalsiyum Stok Çözeltisi (mL)	Elektrolit Çözeltisi (mL)	pH 8 Tampon (mL)	Şelatlaştırıcı (mL)	Nihai Şelatlaştırıcı Konsantrasyonu (mM)
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

Kalsiyum Stok Çözeltisi (mL)	Elektrolit Çözeltisi (mL)	pH 8 Tampon (mL)	Şelatlaştırıcı (mL)	Nihai Şelatlaştırıcı Konsantrasyonu (mM)
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

Bu verilerden yola çıkarak ara değerlendirme yoluyla serbest Ca^{2+} konsantrasyonunu 2.0 mM'den 0.10 mM'nin altına düşürmek için gereken şelatlaştırıcı madde konsantrasyonu belirlendi. Bu analizi kullanarak çeşitli şelatlaştırıcılar tanımlandı ve 49 mM EPPS tampon ve 80 mM potasyum klorür içinde pH 8.0'da serbest kalsiyum iyonları konsantrasyonunu 2.0 mM'den 0.10 mM'ye düşürmek için gerekli olan şelatlaştırıcı konsantrasyonları aşağıda Tablo 12.2'de gösterilmektedir. Dolayısıyla bu tablo şelatlaştırıcı maddelerin serbest kalsiyum iyonları konsantrasyonunu düşürme kapasitelerinin karşılaştırılması için de kullanılabilir.

Tablo 12.2

	mM	Sitrata Göre
Sitrat	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

Örnek 5b - Log K'nin Belirlenmesi

Alternatif olarak, şelatlaştırıcı maddeler şelatlaştırıcı madde (şelatlaştırıcı) ve kalsiyum iyonlarının bağlanma sabitiyle de tanımlanabilmektedir. Bu sabit AD Nielsen, CC Fuglsang ve P Westh, Analytical Biochemistry Cilt 314 (2003) sayfa 227-234 ve T Wiseman, S

- 5 Williston, JF Brandts ve L-N Lin, Analytical Biochemistry Cilt 179 (1989) sayfa 131-137 referanslarında açıklanan şekilde ITC (izotermal titrasyon kalorimetresi) ile belirlenebilir. Log K'nin belirlenmesine ilişkin usul yukarıda "Malzemeler ve Usuller" bölümü altında ayrıntılı olarak açıklanmaktadır. Log K'nin belirlenmesi için bu usulü kullanarak pH 10'da çeşitli şelatlaştırıcı maddelere ilişkin aşağıdaki log K değerleri belirlenmiştir (Tablo 12.3).

10

Tablo 12.3

	Log K	Sitrat Log K'sine Göre Log K
Sitrat	3	1.00
EGTA	9	3.0
EDTA	8	2.7
HEDP	6	2.0
DTPA	7	2.7
MGDA	2.56	0.33

ŞEKİL 1

