



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101297025 B

(45) 授权公告日 2012. 10. 24

(21) 申请号 200680039998. X

(22) 申请日 2006. 09. 01

(30) 优先权数据

PA200501225 2005. 09. 02 DK

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008. 04. 25

(86) PCT申请的申请数据

PCT/DK2006/000473 2006. 09. 01

(87) PCT申请的公布数据

W02007/025549 EN 2007. 03. 08

(73) 专利权人 诺维信公司

地址 丹麦鲍斯韦

(72) 发明人 汉尼·P·尼尔森

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 封新琴 巫肖南

(51) Int. Cl.

C11D 3/386(2006. 01)

C11D 3/16(2006. 01)

C11D 1/72(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1168155 A, 1997. 12. 17,

CN 1168155 A, 1997. 12. 17,

审查员 郑红蕾

权利要求书 2 页 说明书 23 页

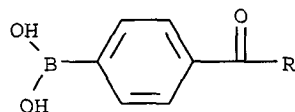
(54) 发明名称

浓缩的液体酶添加剂的稳定化

(57) 摘要

本发明涉及浓缩液体酶添加剂,包括酶、硼酸或其衍生物和表面活性剂,其中酶按大于 1.5g/L 的量存在。该添加剂应用于液体洗涤剂组合物中。

1. 一种浓缩的液体蛋白酶添加剂,其包括蛋白酶、苯基硼酸的衍生物和表面活性剂,其中所述的蛋白酶以至少 5g/L 且少于 100g/L 的量存在,其中所述苯基硼酸的衍生物以 1.5-5% w/w 的量存在且是下式的苯基硼酸衍生的蛋白酶稳定剂:



式中 R 选自下组:氢、羟基、 C_1-C_6 烷基、取代的 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 烯基和取代的 C_1-C_6 烯基,

而且其中所述表面活性剂以 0.25-8% w/w 的量存在且选自下组:

a. $R-O-(CH_2CH_2O)_nH$

式中 R 为具有 8 至 22 碳原子的支链或直链烷基而 n 等于或大于 3,

b. $CH_3(CH_2)_mCH(CH_2)_nCH_3$

|

$O-(CH_2CH_2O)_xH$

式中 $x = 5$, $m+n = 9-11$,

c. $CH_3(CH_2)_mCH(CH_2)_nCH_3$

|

$O-(CH_2CH_2O)_xH$

式中 $x = 9$, $n+m = 9-11$ 。

2. 权利要求 1 的液体蛋白酶添加剂,其中所述蛋白酶以大于 10g/L 且少于 100g/L 的量存在。

3. 权利要求 1 的液体蛋白酶添加剂,其中 pH 为 5 至 10。

4. 权利要求 1 的液体蛋白酶添加剂,其还包括碱性物质以使液体蛋白酶添加剂的 pH 为 7.5 至 10。

5. 权利要求 1 的液体蛋白酶添加剂,其中所述表面活性剂的 HLB 值为至少 9。

6. 权利要求 1 的液体蛋白酶添加剂,其中所述表面活性剂的 HLB 值是 10-20。

7. 权利要求 1 的液体蛋白酶添加剂,其还包括第二种酶。

8. 权利要求 7 的液体蛋白酶添加剂,其中所述第二种酶是淀粉酶、脂肪酶、纤维素酶或氧化还原酶,或它们的任意混合物。

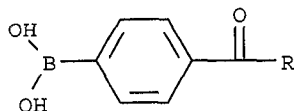
9. 权利要求 1-8 任一项的液体蛋白酶添加剂,其中以总液体添加剂的 0.5 至 5% w/w 的量加入所述表面活性剂。

10. 根据权利要求 1-8 任一项的液体蛋白酶添加剂,其中以总液体添加剂的 1-8% w/w 的量加入所述表面活性剂。

11. 制备权利要求 1 的液体蛋白酶添加剂的方法,其包括步骤:

i) 提供液体蛋白酶制剂;

ii) 将 i) 的液体蛋白酶制剂与表面活性剂和苯基硼酸的衍生物混合,其中所述苯基硼酸的衍生物是下式的苯基硼酸衍生的蛋白酶稳定剂:



式中 R 选自下组：氢、羟基、 C_1-C_6 烷基、取代的 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 烯基和取代的 C_1-C_6 烯基，

而且其中所述表面活性剂选自下组：

a. $R-O-(CH_2CH_2O)_nH$

式中 R 为具有 8 至 22 碳原子的支链或直链烷基而 n 等于或大于 3，

b. $CH_3(CH_2)_mCH(CH_2)_nCH_3$

|

$O-(CH_2CH_2O)_xH$

式中 $x = 5$, $m+n = 9-11$,

c. $CH_3(CH_2)_mCH(CH_2)_nCH_3$

|

$O-(CH_2CH_2O)_xH$

式中 $x = 9$, $n+m = 9-11$ 。

12. 权利要求 11 的方法，其中所述液体蛋白酶添加剂的 pH 为 5 至 10。

13. 权利要求 11 的方法，其还包括加入碱性物质以将液体蛋白酶添加剂的 pH 调节为 7.5 至 10 的步骤。

14. 权利要求 13 的方法，其中在权利要求 11 的步骤 ii) 前加入碱性物质。

15. 权利要求 13 的方法，其中碱性物质为 NaOH。

16. 权利要求 1 至 10 的液体蛋白酶添加剂在液体洗涤剂组合物中的用途。

17. 液体组合物，其包括根据权利要求 1-10 的液体蛋白酶添加剂。

18. 权利要求 17 的液体组合物，其中所述液体组合物是洗涤剂。

19. 权利要求 18 的液体组合物，其中液体蛋白酶添加剂以液体组合物总量的 0.01-20% w/w 的量存在于所述洗涤剂中。

浓缩的液体酶添加剂的稳定化

发明领域

[0001] 本发明涉及浓缩的液体酶添加剂的稳定化以防止沉淀。本发明还涉及制备所述的液体酶添加剂的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 在含酶液体中的存储稳定性问题是众所周知的。特别是在含酶液体洗涤剂中,尤其当洗涤剂含有蛋白酶时,确保随时间稳定的酶活性是个大难题。

[0004] 现有技术广泛涉及到改进存储稳定性,例如通过添加蛋白酶抑制剂改进存储稳定性。

[0005] 已知硼酸 (boric acid) 和硼酸 (boronic acids) 可逆地抑制蛋白水解酶。对一种丝氨酸蛋白水解酶,即枯草杆菌蛋白酶 (subtilisin) 的抑制的讨论在 Molecular & Cellular Biochemistry 51,1983, pp. 5-32 中提供。

[0006] 硼酸作为枯草杆菌蛋白酶抑制剂具有非常不同的能力。只含有烷基如甲基、丁基或 2- 环己基乙基的硼酸是弱抑制剂,其中甲基硼酸作为最弱的抑制剂,而含有芳基如苯基、4- 甲氧基苯基或 3,5- 二氯苯基的硼酸是强抑制剂,其中 3,5- 二氯苯基硼酸作为特别有效的抑制剂 (参见 Keller et al, Biochem. Biophys. Res. Com. 176,1991, pp. 401-405)。

[0007] 据称含有相对于硼在 3- 位具有取代的芳基硼酸是出乎预料好的可逆蛋白酶抑制剂。特别地,据称乙酰氨基苯基硼酸 (acetamidophenyl boronic acid) 为蛋白水解酶的良好抑制剂 (参见 WO 92/19707)。

[0008] 在 EP 0 832 174 中,发现在对位以邻接于苯基硼酸的 $>C=O$ 取代的苯基硼酸衍生物在液体中具有异常好的作为酶稳定剂的能力。

[0009] 然而,当解决酶的稳定化问题时,出现了另一个问题。当在液体酶添加剂中使用硼酸或硼酸衍生物诸如 4- 甲酰基苯基硼酸 (4-FPBA) 以稳定酶时,出现了在制备过程中和储存后形成沉淀,这当然是不需要的副作用。

[0010] 发明概述

[0011] 因此,本发明的一个目的是提供液体酶添加剂,其包括酶和硼酸或硼酸的衍生物,其在制备过程中或存储后不形成沉淀。本发明的另一个目的是提供制备形成沉淀最少的所述液体酶添加剂的方法。

[0012] 令人惊奇地发现,将表面活性剂加入液体酶添加剂显著地降低存储过程中形成的沉淀量。

[0013] 由此在本发明的第一方面中,本发明提供了浓缩的液体酶添加剂,其包括酶、苯基硼酸或其衍生物和表面活性剂,其中所述酶以多于 1.5g/L 的量存在。

[0014] 在第二方面中,本发明提供了用于制备浓缩的液体酶添加剂的方法,其包括下列步骤:

[0015] i) 提供液体酶制剂;

[0016] ii) 将 i) 的液体与硼酸或其衍生物混合;

[0017] iii) 在步骤 ii) 之前或之后或者与硼酸或其衍生物一起,将表面活性剂加入液体

酶添加剂中。

[0018] 本发明还涉及所述浓缩的液体酶添加剂的用途。

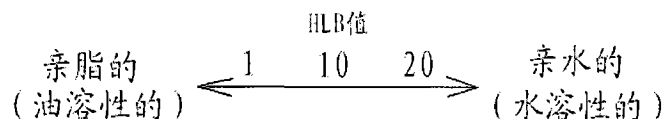
[0019] 发明详述

[0020] 定义

[0021] HLB 值：

[0022] HLB(亲水-亲脂平衡)值是一种标为 1 至 20 的指标(index)。

[0023]



[0024] HLB 系统是预测分子结构将提什么类型的表面活性剂性质的半经验方法。HLB 系统是基于如下观念：一些分子具有亲水基团；另一些分子具有亲脂基团；而一些分子两者兼有。每种基团在分子或混合物中的重量百分比预示了分子结构将显示何种特性(behavior)。油包水乳化剂具有低 HLB 数值，通常为大约 4。增溶剂具有高的 HLB 数值。水包油乳化剂具有中间到高的 HLB 数值。

[0025] HLB 是亲水-亲脂平衡，如 W.C.Griffin, " Calculation of HLB Values of Non-Ionic Surfactants, " Journal of the Society of Cosmetic Chemists 5(1954) : p249 所述。

[0026] 表面活性剂：

[0027] 作为表面活性剂的化学药品。此术语包括起到乳化剂、分散剂、油润湿剂、水润湿剂、起泡剂和消泡剂作用的多种材料。表面活性剂特性的类型，作为乳化剂或分散剂或其它，取决于分子（或分子混合物）上的结构基团。

[0028] pH：

[0029] 在本发明中，使用来自 Radiometer 的 pH 计 PHM93 和 **Ross®**半微量组合 pH 电极(Orion 8103SC) 测量 pH。在使用 pH 电极前，用来自 RadiometerAnalytical 的标准缓冲液(pH 4.005 定购号 S11M002 ;pH 7.000 定购号 S11M004 和 pH 10.012 定购号 S11M007) 校准 pH 电极。pH 在室温 23℃测定。

[0030] 酶浓缩物：

[0031] 酶浓缩物是已经除去液体和 / 或除去不需要的材料的酶发酵液。

[0032] 浓缩的液体酶添加剂：

[0033] 浓缩的液体酶添加剂是在成品诸如洗涤剂的制备中用作原料或预混合料(premix) 的产品。浓缩的液体酶添加剂在下文中称为液体酶添加剂或浓缩的液体酶添加剂。

[0034] 概述

[0035] 已显示在液体洗涤剂中使用硼酸和其衍生物作为蛋白酶稳定剂会引起问题。当制备含所述蛋白酶稳定剂的液体酶添加剂时和存储所述的液体酶添加剂后，看到可形成沉淀。洗涤剂制造要求待加至它们的产品中的液体是澄清的液体。使用不澄清的液体在心理上给终端用户洗涤剂被污染了的印象。因此理想的是：液体洗涤剂是澄清的，且由此其包含的原料是澄清的。此外，更容易泵送 (pump) 不含沉淀的液体。

[0036] 在所述液体酶添加剂的制造中的一个问题是存储后形成沉淀。我们出乎意料地发现将表面活性剂加入液体酶添加剂中能防止沉淀的形成。

[0037] 此外,可看到在液体酶添加剂的制备过程中形成沉淀。在找到避免形成此沉淀的方法的研究中,出乎预料地发现:如果在加入稳定剂前调节液体酶添加剂的 pH,则液体酶添加剂中 pH 的调节防止大部分沉淀的形成,而如果在加入稳定剂后调节液体酶添加剂的 pH 则溶解大部分沉淀。

[0038] 液体酶添加剂

[0039] 本发明的液体酶添加剂包括酶、硼酸或其衍生物和表面活性剂。

[0040] 在本发明的具体实施方式中,液体酶添加剂具有 5.5 至 10 的 pH。在本发明更具体的实施方式中,该 pH 是 7.5 至 10。

[0041] 在本发明的另一具体实施方式中,液体酶添加剂还包括碱性物质使得液体酶添加剂具有由碱性物质提供的 7.5 至 10 的 pH。

[0042] 液体酶添加剂可包括其它的材料。

[0043] 在本发明的具体实施方式中,液体酶添加剂不包括螯合剂(chelant)。在本发明的更优选的实施方式中,液体酶添加剂不包括乙醇胺。在本发明的还更优选的实施方式中,液体酶添加剂不包括膦酸酯(phosphonates)。在本发明的最优选的实施方式中,液体酶添加剂不包括香料(perfume)。

[0044] 酶

[0045] 液体酶添加剂是待加入液体洗涤剂的浓缩产品。因此液体酶添加剂中所用的酶量是非常大的。在本发明具体的实施方式中,存在于液体酶添加剂中的酶量是至少 1.5g/L。在本发明更具体的实施方式中,酶量是至少 5g/L。在本发明还更具体的实施方式中,存在的酶量是至少 10g/L。在本发明最具体的实施方式中,存在的酶量是至少 20g/L,如甚至高于 25g/L。在本发明具体的实施方式中,酶量不超过 200g/L。在本发明更具体的实施方式中,酶量不超过 150g/L。在本发明最具体的实施方式中,存在于液体酶添加剂中的酶量少于 100g/L。

[0046] 在本发明的具体实施方式中,液体酶添加剂包括按重量计 4% 以上的酶蛋白。在本发明的更具体实施方式中,液体酶添加剂包括按重量计至少 5% 的酶蛋白。在本发明的最具体实施方式中,液体酶添加剂包括按重量计至少 7.5% 的酶蛋白。

[0047] 酶通常是由细菌或真菌的发酵产生,并随后通过本领域已知的方法回收。通常的回收方法可由下列步骤组成:通过离心或过滤除去细胞和其它固体并通过超滤和/或减压蒸发来浓缩。可在即将浓缩步骤之前、浓缩步骤之中或浓缩步骤不久之后加入多元醇,诸如 1,2-丙二醇、山梨醇、简单碳水化合物(simple carbohydrate)或甘油,以使酶稳定。也可使用多元醇的组合。回收方法可包括其它步骤,取决于最终产品的规格。为了增加过程中的稳定性,例如减少蛋白质水解包括蛋白质自水解(autoproteolysis),通常在酶稳定且它们活性低的 pH(例如在 pH 4.0-6.5)进行所述过程。增加稳定性(包括减少蛋白质水解)的另一方式是在低温(例如 10℃ 以下)进行所述过程。但是,有时在较高温度进行是有利的,例如为了增加通过膜的流量而在较高温度进行过滤。

[0048] 根据本发明,液体组合物含有至少一种酶。该酶可以是任何商业上可得到的酶,特别是选自下组的酶:蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶、纤维素酶、裂合酶、氧化还原酶和它们的任意

混合物。也包括同类酶（例如蛋白酶）的混合物。

[0049] 根据本发明，优选含蛋白酶的液体组合物。在具体的实施方式中，优选含两种或两种以上的酶的液体组合物，其中第一种酶是蛋白酶，而第二种酶选自下组：淀粉酶、脂肪酶、纤维素酶、裂合酶和氧化还原酶。在更具体的实施方式中，第二种酶是脂肪酶。

[0050] 应当理解的是酶变体（例如通过重组技术产生的）包括在术语“酶”的含义中。这样的酶变体的例子公开于如 EP 251, 446 (Genencor)、WO 91/00345 (Novo Nordisk)、EP 525, 610 (Solvay) 和 WO 94/02618 (Gist-Brocades NV) 中。

[0051] 可将酶基于来自 NC-IUBMB 的酶命名手册 (1992) 进行分类，也参见在因特网上的 ENZYME 站点：<http://www.expasy.ch/enzyme/>。ENZYME 是与酶命名有关的信息储存库。其主要是以生物化学和分子生物学国际联合会 (IUB-MB) 命名委员会的建议 (Academic Press, Inc., 1992) 为基础，描述了已提供其 EC (酶学委员会) 号的每种已表征的酶 (Bairoch A. The ENZYME database, 2000, Nucleic Acids Res 28 :304-305)。该 IUB-MB 酶命名法是以它们的底物特异性以及有时以它们的分子机制为基础的；这样的分类不反映这些酶的结构特征。

[0052] 几年前，已提出另一种基于氨基酸序列相似性以家族进行的某些糖苷水解酶，例如内切葡聚糖酶、木聚糖酶、半乳聚糖酶、甘露聚糖酶、葡聚糖酶和 α -半乳糖苷酶的分类。它们目前分为 90 个不同的家族：参见 CAZy (Mod0) 因特网站点 (Coutinho, P. M. & Henrissat, B. (1999) Carbohydrate-Active Enzymes 服务器，在 URL：<http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html> (相应的文件：Coutinho, P. M. & Henrissat, B. (1999) Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. 在 “Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering” 中，H. J. Gilbert, G. Davies, B. Henrissat 和 B. Svensson 编，The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 3-12; Coutinho, P. M. & Henrissat, B. (1999) The modular structure of cellulases and other carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. 在 “Genetics, Biochemistry and Ecology of Cellulose Degradation” 中，K. Ohmiya, K. Hayashi, K. Sakka, Y. Kobayashi, S. Karita 和 T. Kimura 编，Uni Publishers Co., Tokyo, pp. 15-23)。

[0053] 液体酶添加剂优选包括蛋白酶，诸如丝氨酸蛋白酶。

[0054] 蛋白酶：合适的蛋白酶包括动物、植物或微生物来源的蛋白酶。微生物来源为优选。包括化学或遗传修饰的变体。蛋白酶可以是丝氨酸蛋白酶，优选碱性微生物蛋白酶或胰蛋白酶-样蛋白酶。碱性蛋白酶的例子是枯草杆菌蛋白酶，特别是源自芽孢杆菌属的那些，如枯草杆菌蛋白酶 Novo、枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg、枯草杆菌蛋白酶 309、枯草杆菌蛋白酶 147 和枯草杆菌蛋白酶 168 (描述于 WO 89/06279)。胰蛋白酶-样蛋白酶的实例是胰蛋白酶（例如，猪或牛来源的）和描述于 WO 89/06270 中的镰孢属蛋白酶。在本发明的具体实施方式中，蛋白酶是丝氨酸蛋白酶。丝氨酸蛋白酶或丝氨酸内肽酶（更新的名称）是一类肽酶，其特征存在于酶的活性中心存在丝氨酸残基。

[0055] 丝氨酸蛋白酶：丝氨酸蛋白酶是一种催化肽键水解且在活性位点存在必需的丝氨酸残基的酶。(White, Handler 和 Smith, 1973 "Principles of Biochemistry," 第五版, McGraw-Hill Book Company, NY, pp. 271-272)。

[0056] 细菌丝氨酸蛋白酶具有 20,000 至 45,000 道尔顿的分子量。它们受二异丙基氟磷

酸抑制。它们水解普通末端酯 (simple terminal ester) 且在活性上与同为丝氨酸蛋白酶的真核胰凝乳蛋白酶相似。更窄的术语,碱性蛋白酶,其包含了一个亚组,反映出某些丝氨酸蛋白酶高的最适 pH, pH 9.0 至 11.0 (关于综述,参见 Priest(1977) *Bacteriological Rev.* 41 711-753)。

[0057] 枯草蛋白酶:由 Siezen 等, *Protein Eng.* 4(1991)719-737 提出的暂时定名为枯草蛋白酶的丝氨酸蛋白酶的亚组。它们通过对先前称作枯草杆菌蛋白酶-样 (subtilisin-like) 蛋白酶的丝氨酸蛋白酶的超过 40 个氨基酸序列的同源性分析来定义。先前将枯草杆菌蛋白酶 (subtilisin) 定义为由革兰氏阳性细菌或真菌产生的丝氨酸蛋白酶,而根据 Siezen 等目前是枯草蛋白酶的亚组。已鉴定出多种枯草杆菌蛋白酶,并且已经测定许多枯草杆菌蛋白酶的氨基酸序列。这些包括源自芽孢杆菌属菌株的多于六种的枯草杆菌蛋白酶,即枯草杆菌蛋白酶 168、枯草杆菌蛋白酶 BPN'、枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg、枯草杆菌蛋白酶 Y、枯草杆菌蛋白酶 amylosacchariticus、和肠系膜肽酶 (mesentericopeptidase) (Kurihara et al. (1972) *J. Biol. Chem.* 2475629-5631; Wells et al. (1983) *Nucleic Acids Res.* 117911-7925; Stahl and Ferrari (1984) *J. Bacteriol.* 159 811-819; Jacobs et al. (1985) *Nucl. Acids Res.* 138913-8926; Nedkov et al. (1985) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 366421-430; Svendsen et al. (1986) *FEBS Lett.* 196228-232), 源自放线菌目 (actinomycetales) 的一种枯草杆菌蛋白酶、源自普通热放线菌 (*thermoactinomycesvulgaris*) 的热酶 (thermitase) (Meloun et al. (1985) *FEBS Lett.* 198195-200)、和一种真菌枯草杆菌蛋白酶、源自白麦轴霉 (*Tritirachium album*) 的蛋白酶 K (Jany and Mayer (1985) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 366 584-492)。以下复制来自 Siezen 等的表 I 以便进一步参考。

[0058] 在物理上和化学上很好表征了枯草杆菌蛋白酶。除这些酶的一级结构 (氨基酸序列) 的知识外,已确定了枯草杆菌蛋白酶的超过 50 种高分辨的 X- 射线结构,其描绘了底物、过渡态、产物、至少三种不同的蛋白酶抑制剂的结合,并描述了天然变体的结构后果 (Kraut (1977) *Ann. Rev. Biochem.* 46331-358)。

[0059] 枯草蛋白酶的一个亚组 I-S1,包括“典型的”枯草杆菌蛋白酶,诸如枯草杆菌蛋白酶 168,枯草杆菌蛋白酶 BPN', 枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg (**ALCALASE®**, Novozymes A/S), 和枯草杆菌蛋白酶 DY。

[0060] Siezen 等 (见前文) 识别出枯草蛋白酶的另一个亚组 I-S2。亚组 I-S2 蛋白酶被描述为高碱性枯草杆菌蛋白酶,并且包括酶诸如枯草杆菌蛋白酶 PB92 (**MAXACAL®**, Gist-Brocades NV)、枯草杆菌蛋白酶 309 (**SAVINASE®**, Novozymes A/S)、枯草杆菌蛋白酶 147 (**ESPERASE®**, Novozymes A/S) 和碱性弹性蛋白酶 YaB。

[0061] 枯草蛋白酶基因的随机和定点突变都产生于对该酶的物理和化学性质和涉及枯草蛋白酶的催化活性、底物特异性、三级结构等的辅助信息知识 (Wells et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84 1219-1223; Wells et al. (1986) *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A.* 317 415-423; Hwang and Warshel (1987) *Biochem.* 26 2669-2673; Rao et al., (1987) *Nature* 328 551-554)。

[0062] 更多涉及此领域的近期出版物有: Carter et al. (1989) *Proteins* 6 240-248, 其涉及在底物中切割特异靶序列 (24 位和 64 位) 的变体的设计; Graycar et al. (1992)

Annals of the New York Academy of Sciences 672 71-79,其讨论了大量的先前发表的结果 ;和 Takagi (1993) Int. J. Biochem. 25 307-312,其也综述了先前的结果。

[0063] 商业上可得到的蛋白酶(肽酶)的实例包括 :KannaseTM、EverlaseTM、EsperaseTM、AlcalaseTM、NeutraseTM、DurazymTM、SavinaseTM、OvozymeTM、PyraseTM、Pancreatic Trypsin NOV0 (PTN)、Bio-FeedTM Pro 和 Clear-LensTM Pro(都可从 Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark 获得)。其它优选的蛋白酶包括在 W0 01/58275 和 W0 01/58276 中所述的那些。

[0064] 其它商业上可得到的蛋白酶包括 RonozymeTM Pro、MaxataseTM、MaxacalTM、MaxapemTM、OpticleanTM、PropeaseTM、PurafectTM 和 Purafect OxTM (可从 Genencor International Inc.、Gist-Brocades、BASF 或 DSM Nutritional Products 获得)。

[0065] 脂肪酶:合适的脂肪酶包括细菌或真菌来源的那些脂肪酶。包括化学或遗传修饰的突变体。有用的脂肪酶的实例包括疏棉状腐质霉 (*Humicolalanuginosa*) 脂肪酶(例如 EP 258 068 和 EP 305 216 所述),曼赫根毛霉 (*Rhizomucor miehei*) 脂肪酶(例如 EP 238 023 所述),念珠菌属 (*Candida*) 脂肪酶,诸如南极念珠菌 (*C. antarctica*) 脂肪酶,例如 EP 214 761 所述的南极念珠菌脂肪酶 A 或 B,假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 脂肪酶,诸如类产碱假单胞菌 (*P. pseudoalcaligenes*) 和产碱假单胞菌 (*P. alcaligenes*) 脂肪酶(例如 EP 218 272 所述),葱头假单胞菌 (*P. cepacia*) 脂肪酶(例如 EP 331 376 所述),施氏假单胞菌 (*P. stutzeri*) 脂肪酶(例如 BP 1, 372, 034 所述),荧光假单胞菌脂肪酶,芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 脂肪酶,例如枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 脂肪酶 (Dar-tois et al., (1993), *Biochemica et Biophysica acta* 1131, 253-260),嗜热脂肪芽孢杆菌 (*B. stearothermophilus*) 脂肪酶 (JP 64/744992) 和短小芽孢杆菌 (*B. pumilus*) 脂肪酶 (W0 91/16422)。

[0066] 而且,许多克隆的脂肪酶可以是有用的,包括沙门柏干酪青霉 (*Penicillium camembertii*) 脂肪酶 (Yamaguchi 等所述, (1991), *Gene* 103, 61-67),白地霉 (*Geotricum candidum*) 脂肪酶 (Schimada, Y. 等, (1989), *J. Biochem.*, 106, 383-388) 和各种根霉属 (*Rhizopus*) 脂肪酶诸如德列马根霉 (*R. delemar*) 脂肪酶 (Hass, M. J 等, (1991), *Gene* 109, 117-113),雪白根霉 (*R. niveus*) 脂肪酶 (Kugimiya 等, (1992), *Biosci. Biotech. Biochem.* 56, 716-719) 和米根霉 (*R. oryzae*) 脂肪酶。

[0067] 其它种类的脂解酶诸如角质酶也可以是有用的,源自门多萨假单胞菌 (*Pseudomonas mendocina*) 的角质酶(如 W0 88/09367 所述),或源自豌豆腐皮镰孢 (*Fusarium solani pisi*) 的角质酶(例如 W0 90/09446 中所述)。

[0068] 商业上可得到脂肪酶的例子包括 LipexTM、LipoprimeTM、LipopanTM、LipolaseTM、LipolaseTM Ultra、LipozymeTM、PalataseTM、ResinaseTM、NovozymTM 435 和 LecitaseTM (所有都可从 Novozymes A/S 获得)。

[0069] 其它商业上可得到脂肪酶包括 LumafastTM (来自 Genencor International Inc. 的门多萨假单胞菌脂肪酶); LipomaxTM (来自 Gist-Brocades/Genencor Int. Inc. 的类产碱假单胞菌脂肪酶);和来自 Solvay enzymes 的芽孢杆菌属菌种的脂肪酶。更多的脂肪酶可由其它供应商获得诸如 Lipase P" Amano" (Amano Pharmaceutical Co. Ltd.)。

[0070] 淀粉酶:合适的淀粉酶(α 和/或 β) 包括细菌或真菌来源的那些淀粉酶。包括化学或遗传修饰的突变体。淀粉酶包括,例如,由地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*) 的特殊菌

株获得的 α -淀粉酶,在英国专利说明书号 1,296,839 中有更详细的描述。商业上可得到的淀粉酶是 DuramylTM、TermamylTM、FungamylTM 和 BANTM (产自 Novozymes A/S) 以及 RapidaseTM 和 Maxamyl PTM (产自 Gist-Brocades)。

[0071] 纤维素酶:合适的纤维素酶包括细菌或真菌来源的那些纤维素酶。包括化学或遗传修饰的突变体。在 US 4,435,307 公开了合适的纤维素酶,其公开了产自特异腐质霉 (*Humicola insolens*) 的真菌纤维素酶。尤其合适的纤维素酶是具有颜色保护 (color care) 益处的纤维素酶。这些纤维素酶的实例是在欧洲专利申请号 0 495 257 中所述的纤维素酶。

[0072] 氧化还原酶:本文可使用适用于液体组合物的任何氧化还原酶,例如过氧化物酶或氧化酶诸如漆酶。本文合适的过氧化物酶包括植物、细菌或真菌来源的那些,包括化学或遗传修饰的突变体。合适的过氧化物酶的实例是那些源自鬼伞属 (*Coprinus*) 菌株例如灰盖鬼伞 (*C. cinerius*) 或长根鬼伞 (*C. macrorrhizus*),或源自芽孢杆菌属菌株,例如短小芽孢杆菌的过氧化物酶,尤其是根据 WO 91/05858 的过氧化物酶。本文合适的漆酶包括细菌或真菌来源的那些,包括化学或遗传修饰的突变体。合适的漆酶的实例是可从如下菌株获得的那些漆酶:栓菌属 (*Trametes*) 的菌株,例如绒毛栓菌 (*T. villosa*) 或变色栓菌 (*T. versicolor*),或者鬼伞属的菌株,例如灰盖鬼伞,或者毁丝霉属 (*Myceliophthora*) 的菌株,例如嗜热毁丝霉 (*M. thermophila*)。

[0073] 可存在于本发明的液体中的酶类包括氧化还原酶 (EC 1.-.-.-)、转移酶 (EC 2.-.-.-)、水解酶 (EC 3.-.-.-)、裂合酶 (EC 4.-.-.-)、异构酶 (EC 5.-.-.-) 和连接酶 (EC 6.-.-.-)。

[0074] 本发明上下文中特定的氧化还原酶是过氧化物酶 (EC 1.11.1)、漆酶 (EC 1.10.3.2) 和葡萄糖氧化酶 (EC 1.1.3.4)。商业上可得到的氧化还原酶 (EC 1.-.-.-) 的实例是 GluzymeTM (该酶可从 Novozyme A/S 获得)。更多的氧化还原酶可从其他供应商获得。优选的转移酶是以下任何一种亚类的转移酶:

[0075] a 转移一碳基团的转移酶 (EC 2.1);

[0076] b 转移醛基或酮基的转移酶 (EC 2.2); 酰基转移酶 (EC 2.3);

[0077] c 糖基转移酶 (EC 2.4);

[0078] d 转移脂族烃基 (alkyl) 或芳基,不包括甲基的转移酶 (EC 2.5); 和

[0079] e 转移含氮基团的转移酶 (EC 2.6)。

[0080] 本发明上下文中最优选的转移酶类型是转谷氨酰胺酶 (蛋白质-谷氨酰胺 γ -谷氨酰基转移酶; EC 2.3.2.13)。

[0081] 合适的谷氨酰胺转移酶的例子在 WO96/06931 中描述 (Novo Nordisk A/S)。

[0082] 本发明上下文中优选的水解酶是:羧酸酯水解酶 (EC 3.1.1.-) 如脂肪酶 (EC 3.1.1.3); 肌醇六磷酸酶 (phytase) (EC 3.1.3.-), 如 3-肌醇六磷酸酶 (EC 3.1.3.8) 和 6-肌醇六磷酸酶 (EC 3.1.3.26); 糖苷酶 (EC 3.2, 它落入本文“糖酶”表示的组中), 如 α -淀粉酶 (EC 3.2.1.1); 肽酶 (EC 3.4, 也称作蛋白酶); 以及其它羰基水解酶。商业上可得到的肌醇六磷酸酶的例子包括 Bio-FeedTM Phytase (Novozymes)、RonozymeTM P (DSM Nutritional Products)、NatuphosTM (BASF)、FinaseTM (AB Enzymes) 以及 PhyzymeTM 产品系列 (Danisco)。其它优选的肌醇六磷酸酶包括 WO 98/28408, WO 00/43503, 和 WO 03/066847

中描述的那些。

[0083] 在本上下文中,术语“糖酶”不仅用来表示能够打断糖链(如淀粉或纤维素),特别是五元或六元环结构的糖链的酶(即糖苷酶,EC 3.2),还表示能够使糖异构化的酶,比如将六元环结构诸如D-葡萄糖异构化为五元环结构诸如D-果糖。

[0084] 相关的糖酶包括下列物质(圆括号内为EC号): α -淀粉酶(EC 3.2.1.1)、 β -淀粉酶(EC 3.2.1.2)、葡聚糖 1,4- α -糖苷酶(EC 3.2.1.3)、内-1,4- β -葡聚糖酶(纤维素酶,EC 3.2.1.4)、内-1,3(4)- β -葡聚糖酶(EC 3.2.1.6)、内-1,4-[β]-木聚糖酶(EC 3.2.1.8)、葡聚糖酶(EC 3.2.1.11)、几丁质酶(EC 3.2.1.14)、多聚半乳糖醛酸酶(EC 3.2.1.15)、溶菌酶(EC 3.2.1.17)、 β -糖苷酶(EC 3.2.1.21)、 α -半乳糖苷酶(EC 3.2.1.22)、 β -半乳糖苷酶(EC 3.2.1.23)、淀粉-1,6-糖苷酶(EC 3.2.1.33)、木聚糖 1,4- β -木糖苷酶(EC 3.2.1.37)、葡聚糖内-1,3- β -D-糖苷酶(EC 3.2.1.39)、 α -糊精内-1,6- α -糖苷酶(EC 3.2.1.41)、蔗糖 α -糖苷酶(EC 3.2.1.48)、葡聚糖内-1,3- α -糖苷酶(EC 3.2.1.59)、葡聚糖 1,4- β -糖苷酶(EC 3.2.1.74)、葡聚糖内-1,6- β -糖苷酶(EC 3.2.1.75)、半乳糖酶(EC 3.2.1.89)、阿拉伯聚糖内-1,5- α -L-阿拉伯糖苷酶(EC 3.2.1.99)、乳糖酶(EC 3.2.1.108)、壳聚糖酶(chitosanases)(EC 3.2.1.132)和木糖异构酶(EC 5.3.1.5)。

[0085] 商业上可得到的糖酶的实例包括 Alpha-GalTM、Bio-FeedTM Alpha、Bio-FeedTM Beta、Bio-FeedTM Plus、Bio-FeedTM Wheat、Bio-FeedTM Z、NovozymeTM 188、CarezymeTM、CelluclastTM、CellusoftTM、CelluzymeTM、CeremylTM、CitrozymTM、DenimaxTM、DezymeTM、DextrozymeTM、DuramylTM、EnergexTM、FinizymTM、FungamylTM、GamanaseTM、GlucanexTM、LactozymTM、LiquezymeTM、MaltogenaseTM、NatalaseTM、PentopanTM、PectinexTM、PromozymeTM、PulpzymeTM、NovamylTM、TermamylTM、AMGTM (Amyloglucosidase Novo)、MaltogenaseTM、SweetzymeTM 和 AquazymTM (都可自 Novozymes A/S 获得)。更多的糖酶可从其它供应商获得,诸如 RoxazymeTM 及 RonozymeTM 产品系列(DSM Nutritional Products)、AvizymeTM、PorzymeTM 及 GrindazymeTM 产品系列(Danisco, Finnfeeds)、NatugrainTM (BASF)、PurastarTM 及 PurastarTM OxAm (Genencor)。

[0086] 其它商业上可得到的酶包括 MannawayTM、PectawayTM、StainzymeTM 和 RenozymeTM。

[0087] 表面活性剂

[0088] 在液体酶添加剂中避免沉淀的合适的表面活性剂可以是任何表面活性剂。本发明的表面活性剂可以是阴离子的、非离子的、阳离子的或两性的(amphoteric)(两性离子的(zwitterionic))。

[0089] 已发现具有大于8的HLB值的表面活性剂是尤其合适的。在本发明的具体的实施方式中,HLB值是至少9诸如是至少10。在本发明的更具体的实施方式中,HLB值为10-20。在本发明的更具体的实施方式中,该表面活性剂的HLB值是11-15。

[0090] 在本发明的具体的实施方式中,该表面活性剂在0至40℃的温度范围内可溶于酶液体添加剂且未发生相分离。在本发明的更具体的实施方式中,可将表面活性剂作为两种或多种表面活性剂的混合物加入。

[0091] 加入的表面活性剂的量特定地是全部液体添加剂的0.1至10% w/w,更特定地是0.25至8% w/w,诸如甚至更特定的是0.5至5% w/w。

[0092] 在本发明的具体的实施方式中,该表面活性剂的量少于全部液体酶添加剂的 1% w/w。在本发明的具体的实施方式中,该表面活性剂的量少于全部液体酶添加剂的 0.7% w/w。

[0093] 在本发明的具体的实施方式中,加至酶液体添加剂的表面活性剂的量是至少 0.1% w/w。在本发明的更具体的实施方式中,加至液体酶添加剂的表面活性剂是至少 0.25% w/w。在本发明的还更具体的实施方式中,加至液体酶添加剂的表面活性剂是至少 0.5% w/w。在本发明的最具体的实施方式中,加至液体酶添加剂的表面活性剂是至少 1% w/w。

[0094] 在本发明的具体的实施方式中,加至酶液体添加剂的表面活性剂的量是少于 20% w/w。在本发明的更具体的实施方式中,加至酶液体添加剂的表面活性剂的量是少于 15% w/w。在本发明还更具体的实施方式中,加至酶液体添加剂的表面活性剂的量是少于 10% w/w。在本发明的最具体的实施方式中,加至酶液体添加剂的表面活性剂的量是少于 5% w/w。

[0095] 在本发明的具体的实施方式中,该表面活性剂是非离子表面活性剂。

[0096] 非离子表面活性剂包括醇乙氧基化物 (alcohol ethoxylate) (AE0 或 AE)、醇丙氧基化物 (alcohol propoxylate)、羧化的醇乙氧基化物 (carboxylated alcoholethoxylates)、壬基酚乙氧基化物 (nonylphenol ethoxylate)、烷基多聚糖苷 (alkylpolyglycoside)、烷基二甲基氧化胺 (alkyldimethylamine oxide)、乙氧基化脂肪酸单乙醇酰胺 (ethoxylated fatty acid monoethanolamide)、脂肪酸单乙醇酰胺 (fatty acid monoethanolamide)、或多羟基烷基脂肪酸酰胺 (polyhydroxy alkyl fatty acid amide) (例如 W0 92/06154 中所述)。

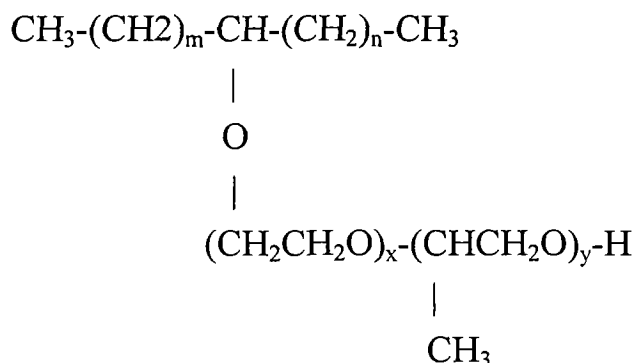
[0097] 烷基酚的聚环氧乙烷、聚环氧丙烷和聚环氧丁烷缩合物。这些化合物包括烷基酚与烯化氧 (alkylene oxide) 的缩合产物,所述烷基酚具有以直链或支链构型含约 6 至 14 个碳原子,优选约 8 至 14 个碳原子的烷基。在优选实施方案中,环氧乙烷以等于每摩尔烷基酚约 2 至约 25 摩尔,更优选每摩尔烷基酚约 3 至约 15 摩尔环氧乙烷的量存在。商业上可得到的这类非离子表面活性剂包括 Igepal™ CO-630 (由 GAF Corporation 销售),及 Triton™ X-45、X-114、X-100 和 X-102 (均由 Rohm & Hass Company 销售)。这些表面活性剂一般称为烷基酚烷氧基化物 (例如烷基酚乙氧基化物)。

[0098] 优选将伯和仲脂族醇与约 1 至约 25 摩尔环氧乙烷的缩合产物作为非离子表面活性剂。脂族醇的烷基链可以是直链或支链,伯或仲,并通常含有约 8 至约 22 个碳原子。优选的是具有烷基的醇与每摩尔醇约 3 摩尔环氧乙烷的缩合产物。所述烷基含有约 8 至约 20 个碳原子,更优选约 10 至约 18 个碳原子。商业上可得到的这类非离子表面活性剂的实例包括 Tergitol™ 15-S-9 (C₁₁-C₁₅ 直链醇与 9 摩尔环氧乙烷的缩合产物), Tergitol™ 24-L-6 NNW (C₁₂-C₁₄ 伯醇与 6 摩尔环氧乙烷的具有窄的分子量分布的缩合产物),上述两者均由 Union Carbide Corporation 销售; Neodol™ 45-9 (C₁₄-C₁₅ 直链醇与 9 摩尔环氧乙烷的缩合产物), Neodol™ 23-3 (C₁₂-C₁₃ 直链醇与 3.0 摩尔环氧乙烷的缩合产物), Neodol™ 45-7 (C₁₄-C₁₅ 直链醇与 7 摩尔环氧乙烷的缩合产物), Neodol™ 45-5 (C₁₄-C₁₅ 直链醇与 5 摩尔环氧乙烷的缩合产物),它们均由 Shell Chemical Company 销售; Kyro™ OB (C₁₃-C₁₅ 醇与 9 摩尔环氧乙烷的缩合产物),由 Procter & Gamble Company 销售; 以及 Genapol LA

050 (C₁₂-C₁₄ 醇与 5 摩尔环氧乙烷的缩合产物) 由 Hoechst 销售。Lutensol® AN、AT、A0 和 T0 型由 BASF 销售。这些产品的 HLB 的优选范围为 8-20, 最优选为 8-18。

[0099] 尤其是优选具有下列通式的表面活性剂:

[0100]



[0101] 其中 $n+m = 9-11$, x 表示环氧乙烷基团的平均数而 y 表示环氧丙烷基团的平均数。商业上可得到的这类非离子表面活性剂的实例包括来自 IneosOxide, Belgium 的 Softanol®。

[0102] 公开于 US 4,566,647 中的烷基多糖也可用作本发明的非离子表面活性剂,它具有疏水基团和多糖(例如多聚糖苷)亲水基团,所述疏水基团含约 6 至约 30 个碳原子,优选约 10 至约 16 个碳原子;而所述亲水基团含有约 1.3 至约 10,优选约 1.3 至约 3,最优选约 1.3 至约 2.7 个糖单元。可以使用含有 5 或 6 个碳原子的任何还原糖(reducing saccharide),例如葡萄糖、半乳糖,并且可用半乳糖基部分代替葡萄糖基部分(任选地将疏水基团连接在 2-、3-、4- 等位置,因此得到与葡糖苷或半乳糖苷不同的(as opposed to)葡萄糖或半乳糖)。糖间的键可以处于,例如在附加糖单元的一个位置和在前面的糖单元上的 2-、3-、4- 和 / 或 6- 位之间。

[0103] 优选的烷基多聚糖苷具有下式:



[0105] 其中 R^2 选自下组:烷基、烷基苯基、羟基烷基、羟基烷基苯基及它们的混合物,其中烷基含有约 10 至约 18,优选约 12 至约 14 个碳原子; n 为 2 或 3,优选 2; t 为 0 至约 10,优选 0; x 为约 1.3 至约 10,优选约 1.3 至约 3,最优选约 1.3 至约 2.7。糖基优选源自葡萄糖。为制备这些化合物,首先形成醇或烷基聚乙氧基醇,然后将其与葡萄糖或葡萄糖源反应形成葡糖苷(连在 1 位)。于是可将附加糖基单元连在其 1 位和在前的糖基单元 2-、3-、4- 和 / 或 6- 位(优选主要为 2 位)之间。

[0106] 环氧乙烷与疏水碱的缩合产物也是合适的表面活性剂,其中疏水碱是由环氧丙烷与丙二醇缩合而形成的。这些化合物的疏水部分将优选具有约 1500 至约 1800 的分子量,并且将显示水不溶性。将聚氧乙烯(polyoxyethylene)部分加到这种疏水部分往往会增加分子作为整体的水溶性,且产物的液体特性被保持在这样的程度,以使聚氧乙烯含量是缩合产物总重量的约 50%,这相当于与多至约 40 摩尔环氧乙烷缩合。这类化合物的实例包括某些商业上可得到的 Pluronic™ 表面活性剂,由 BASF 销售。

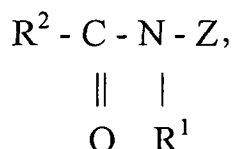
[0107] 环氧乙烷与由环氧丙烷和乙二胺反应所得产物的缩合产物也是适合用作本发明的非离子表面活性剂体系的非离子表面活性剂。这些产物的疏水部分由乙二胺和过量环氧

丙烷的反应产物组成,通常具有约 2500 至约 3000 的分子量。该疏水部分与环氧乙烷缩合达到一定程度,以使缩合产物含有按重量计约 40%至约 80%的聚氧乙烯,并具有约 5,000 至约 11,000 的分子量。这类非离子表面活性剂的实例包括某些商业上可得到的 Tetronic™ 化合物,由 BASF 销售。

[0108] 其它合适的表面活性剂可以是烷基酚的聚环氧乙烷缩合物,伯和仲脂族醇与约 1 至约 25 摩尔环氧乙烷的缩合产物,烷基多糖以及它们的混合物。最优选的是具有 3 至 15 个乙氧基的 C₈-C₁₄ 烷基酚乙氧基化物。

[0109] 其它合适的非离子表面活性剂可以是下式的多羟基脂肪酸酰胺表面活性剂:

[0110]



[0111] 其中 R¹ 为 H,或 R¹ 为 C₁₋₄ 烷基、2-羟乙基、2-羟丙基、或其混合物,R² 为 C₅₋₃₁ 烷基,且 Z 为具有直链烷基链及至少 3 个直接连在该链上的羟基的多羟基烷基,或其烷氧基化衍生物。优选 R¹ 为甲基,R² 为直链 C₁₁₋₁₅ 烷基或 C₁₆₋₁₈ 的烷基或烯基链如椰子烷基 (coconut alkyl) 或它们的混合物,且 Z 在还原胺化反应中衍生自还原糖 (诸如葡萄糖、果糖、麦芽糖或乳糖)。

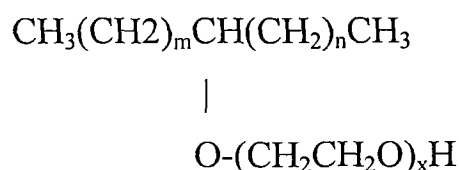
[0112] 在本发明的具体实施方式中,表面活性剂选自下组:

[0113] R-O-(CH₂CH₂O)_nH

[0114] 其中 R 为具有 8 至 22 个碳原子的支链或直链烷基 (alkane),且 n 等于或大于 3。在具体实施方式中 n 等于或大于 4,在更具体实施方式中 n 等于或大于 5。n 可以是但不限于 3、7、8、15 和 80。

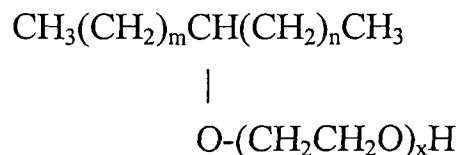
[0115] 在具体实施方式中,平均链长为 C12 至 C18,在更优选的实施方式中平均链长为 C13 至 C16,在更具体的实施方式中平均链长为 C13 至 C15。

[0116]



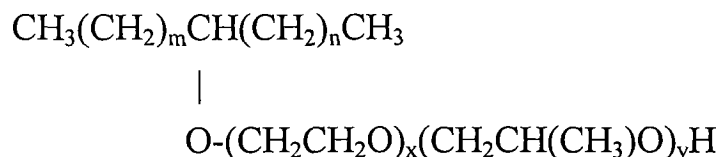
[0117] 式中 x = 5, m+n = 9-11,

[0118]



[0119] 式中 x = 9, n+m = 9-11,

[0120]



[0121] 式中 $m+n = 12-14$, $x = 7$, $y = 2.5$,

[0122] 在本发明的另一具体实施方式中,表面活性剂选自下组: CAS. No. 68131-40-8, 其包括具有下列类似物 (synonym) 的一组化合物: C11-15-仲-烷基- ω -羟基多(氧-1,2-联二甲基) (C11-15-sec-alkyl- ω -hydroxypoly(oxy-1,2-ethanediyl)); C11-15-仲醇, 乙氧基化物 (C11-15-secondary alcohols, ethoxylated); 乙氧基化仲醇 (Ethoxylated Secondary Alcohols); SM-9; Tergitol15-S-9 以及 CAS. No. 69227-20-9, 其包括乙氧基化醇-(C16-C22),

[0123] 在具体的实施方式中,表面活性剂选自下组:

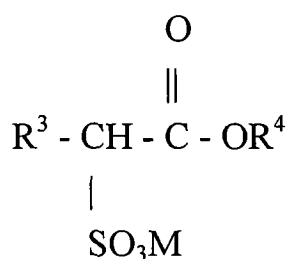
[0124] 表面活性剂也可以是胺、酰胺和酸的乙氧基化物。而且,表面活性剂可以是乙氧基化物和丙氧基化物的共聚物,包括但不限于醇、胺、酰胺和酸的乙氧-丙氧嵌段共聚物 (ethoxy-propoxy block co-polymers)。

[0125] 合适的阴离子表面活性剂包括烷基烷氧基化硫酸盐表面活性剂。其实例是式 $RO(A)_mSO_3M$ 的水溶性盐或酸, 式中 R 为未取代的 $C_{10}-C_{24}$ 烷基或具有 $C_{10}-C_{24}$ 烷基部分的羟基烷基, 优选 $C_{12}-C_{20}$ 烷基或羟基烷基, 更优选 $C_{12}-C_{18}$ 烷基或羟基烷基, A 为乙氧基或丙氧基单元, m 大于 0, 通常为约 0.5 至约 6, 更优选约 0.5 至约 3, 且 M 为 H 或阳离子, 所述阳离子可以是例如金属阳离子 (如钠、钾、锂、钙、镁等), 铵或取代的铵阳离子。烷基乙氧基化的硫酸盐以及烷基丙氧基化硫酸盐包括在本文中。取代的铵阳离子的具体实例包括甲基、二甲基、三甲基铵阳离子和季铵阳离子, 如四甲基铵、二甲基哌啶鎓阳离子 (dimethyl piperdinium cation), 及由烷基胺如乙胺、二乙胺和三乙胺及其混合物等得到的那些阳离子。例示的表面活性剂是 $C_{12}-C_{18}$ 烷基多乙氧基化物 (1.0) 硫酸盐 ($C_{12}-C_{18}E(1.0)M$), $C_{12}-C_{18}$ 烷基多乙氧基化物 (2.25) 硫酸盐 ($C_{12}-C_{18}(2.25)M$), $C_{12}-C_{18}$ 烷基多乙氧基化物 (3.0) 硫酸盐 ($C_{12}-C_{18}E(3.0)M$), 及 $C_{12}-C_{18}$ 烷基多乙氧基化物 (4.0) 硫酸盐 ($C_{12}-C_{18}E(4.0)M$), 其中 M 方便地选自 钠和钾。

[0126] 其它合适的待使用的阴离子表面活性剂可以是烷基苯磺酸盐 (LAS)、 α -烯烃磺酸盐 (AOS)、烷基硫酸盐 (脂肪醇硫酸盐) (AS)、脂肪醇乙氧基硫酸盐 (AEOS 或 AES)、仲烷基磺酸盐 (SAS)、 α -磺基脂肪酸甲酯、烷基-或烯基-琥珀酸、二甲苯磺酸盐或肥皂、烷基酯磺酸盐表面活性剂, 所述烷基酯磺酸盐表面活性剂包括 C_8-C_{20} 羧酸 (即脂肪酸) 的直链酯, 将所述直链酯根据 "The Journal of the American Oil Chemists Society", 52(1975), pp. 323-329 用气体 SO_3 磺化。合适的起始原料将包括如由动物脂 (tallow)、棕榈油等得到的天然脂肪物质。一种优选的阴离子表面活性剂是二甲苯磺酸的钠、钾或铵盐, 例如 $(CH_3)_2C_6H_3SO_3Na$ 。

[0127] 合适的烷基酯磺酸盐表面活性剂包括如下结构式的烷基酯磺酸盐表面活性剂:

[0128]



[0129] 其中 R^3 为 C_8-C_{20} 烃基, 优选烷基, 或其组合, R^4 为 C_1-C_6 烃基, 优选烷基, 或其组合,

且 M 为与烷基酯磺酸盐形成水溶性盐的阳离子。合适的成盐阳离子包括金属如钠、钾及锂，和取代或未取代的铵阳离子，如单乙醇胺、二乙醇胺和三乙醇胺。优选 R^3 为 C_{10} - C_{16} 烷基，而 R^4 为甲基、乙基或异丙基。特别优选的是甲基酯磺酸盐其中 R^3 为 C_{10} - C_{16} 烷基。

[0130] 其它合适的阴离子表面活性剂包括烷基硫酸盐表面活性剂，其是式 $ROSO_3M$ 的水溶性盐或酸，式中 R 优选为 C_{10} - C_{24} 烷基，优选具有 C_{10} - C_{20} 烷基部分的烷基或羟基烷基，更优选 C_{12} - C_{18} 烷基或羟基烷基，且 M 为 H 或阳离子，例如碱金属阳离子（如钠、钾、锂），或铵或取代的铵（例如甲基、二甲基和三甲基铵阳离子及季铵阳离子，诸如四甲基铵和二甲基哌啶鎓阳离子，以及由烷基胺如乙胺、二乙胺、三乙胺及其混合物得到的季铵阳离子，等等）。通常，对于较低洗涤温度（如低于约 50°C ），优选 C_{12} - C_{16} 烷基链，而对于较高洗涤温度（如高于约 50°C ），优选 C_{16} - C_{18} 烷基链。

[0131] 其它阴离子表面活性剂可以包括肥皂的盐（包括例如钠、钾、铵及取代的 铵盐如单、二和三乙醇胺盐）， C_8 - C_{22} 伯或仲烷基磺酸盐， C_8 - C_{24} 烯属磺酸盐，通过碱土金属柠檬酸盐的热解产物的磺化所制备的磺化多羧酸（例如在英国专利说明书 1,082,179 号中所述）， C_8 - C_{24} 烷基聚乙二醇醚硫酸盐（含多至 10 摩尔的环氧乙烷），烷基甘油磺酸盐，脂肪酰基甘油磺酸盐，脂肪油基甘油硫酸盐，烷基酚环氧乙烷醚硫酸盐，链烷（paraffin）磺酸盐，烷基磷酸盐；羟乙基磺酸盐（isethionate）诸如酰基羟乙基磺酸盐，N-酰基牛磺酸盐，烷基琥珀酰胺酸盐和磺基琥珀酸盐，磺基琥珀酸盐的单酯（特别是饱和与不饱和的 C_{12} - C_{18} 单酯），磺基琥珀酸盐的二酯（特别是饱和与不饱和的 C_6 - C_{12} 二酯），酰基肌氨酸盐（sarcosinates），烷基多糖的硫酸盐如烷基多聚糖苷的硫酸盐（下面描述的非离子未硫酸化的化合物），支链化的伯烷基硫酸盐，和烷基聚乙氧基羧酸盐如式 $RO(CH_2CH_2O)_k-CH_2COO^-M^+$ 的那些羧酸盐，式中 R 为 C_8 - C_{22} 烷基，k 为 0 至 10 的整数，M 为可溶性成盐阳离子。树脂酸和氢化树脂酸也是合适的，如松香（rosin）、氢化松香、存在于或由妥尔油（tall oil）得到的树脂酸和氢化树脂酸。

[0132] 烷基苯磺酸盐可为合适的。尤其是线性直链烷基苯磺酸盐（LAS），其中烷基优选含有 10 至 18 个碳原子。

[0133] 另外一些实例在“Surface Active Agents and Detergents（表面活性剂和洗涤剂）”（Vol. I 和 II，由 Schwartz, Perry 和 Berch 著）中描述。多种这样的表面活性剂还一般公开在美国专利 3,929,678 中（第 23 栏 58 行至第 29 栏 23 行中，引入本文作为参考）。

[0134] 合适的阳离子表面活性剂是具有一个长链烷基的那些。此类阳离子表面活性剂的实例包括铵盐表面活性剂诸如烷基三甲基卤化铵，和具有下式的那些表面活性剂：



[0136] 式中 R^2 为在烷基链中具有约 8 至约 18 个碳原子的烷基或烷基苄基；每个 R^3 选自下组： $-CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH(CH_3)-$ 、 $-CH_2CH(CH_2OH)-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2-$ 、及它们的混合物；每个 R^4 选自下组： C_1 - C_4 烷基， C_1 - C_4 羟基烷基，通过连接两个 R^4 基团而形成的苄基环结构， $-CH_2CHOHCHOHCO^R^6CHOHCH_2OH$ （式中 R^6 为任意己糖或具有小于约 1000 的分子量的己糖聚合物），和氢（当 y 不是 0 时）； R^5 与 R^4 相同或是烷基链，其中 R^2 和 R^5 的碳原子总数不超过约 18；每个 y 是 0 至约 10，且各 y 值的总和是 0 至约 15；而 X 是任何相容的阴离子。

[0137] 合适的阳离子表面活性剂可以是适用于本组合物的具有下式的水溶性季铵盐化合物：

[0138] $R^1R^2R^3R^4N^+X^-(i)$

[0139] 式中 R^1 为 C_8-C_{16} 烷基, 每个 R^2 、 R^3 和 R^4 是独立的 C_1-C_4 烷基, C_1-C_4 羟基烷基, 苄基, 及 $-(C_2H_4O)_xH$, 其中 x 值为 2 至 5, 且 X 是阴离子。 R^2 、 R^3 或 R^4 中不超过一个应是苄基。

[0140] 优选 R^1 的烷基链长为 $C_{12}-C_{15}$, 尤其其中烷基是源自椰子或棕榈仁脂肪的链长的混合物或者通过烯烃增长 (olefin build up) 或 OXO 醇合成而合成得到的。

[0141] 优选的 R^2 、 R^3 和 R^4 基团是甲基和羟基乙基, 而 X 阴离子可选自卤素、甲基硫酸盐、醋酸盐和磷酸盐离子。

[0142] 本文所用式 (i) 的合适的季铵化合物的实例为:

[0143] 椰子三甲基氯化铵或椰子三甲基溴化铵 (coconut trimethyl ammonium chloride or bromide);

[0144] 椰子甲基二羟基乙基氯化铵或椰子甲基二羟基乙基溴化铵 (coconut methyl dihydroxyethyl ammonium chloride or bromide);

[0145] 癸基三乙基氯化铵 (decyl triethyl ammonium chloride);

[0146] 癸基二甲基羟基乙基氯化铵或癸基二甲基羟基乙基溴化铵 (decyl dimethyl hydroxyethyl ammonium chloride or bromide);

[0147] C_{12-15} 二甲基羟基乙基氯化铵或溴化铵 (C_{12-15} dimethyl hydroxyethyl ammonium chloride or bromide);

[0148] 椰子二甲基羟基乙基氯化铵或椰子二甲基羟基乙基溴化铵 (coconut dimethyl hydroxyethyl ammonium chloride or bromide);

[0149] 十四烷基三甲基甲基硫酸铵 (myristyl trimethyl ammonium methyl sulphate);

[0150] 十二烷基二甲基苄基氯化铵或十二烷基二甲基苄基溴化铵 (lauryl dimethyl benzyl ammonium chloride or bromide);

[0151] 十二烷基二甲基 (乙烯氧基)₄ 氯化铵或十二烷基二甲基 (乙烯氧基)₄ 溴化铵 (lauryl dimethyl (ethenoxy)₄ ammonium chloride or bromide);

[0152] 胆碱酯 (式 (i) 的化合物, 式中 R^1 为

[0153]

$CH_2-CH_2-O-C-C_{12-14}$ 烷基而 $R^2R^3R^4$ 为甲基)。



[0154] 二-烷基咪唑啉 (di-alkyl imidazolines) [式 (i) 的化合物]。

[0155] 本文中有用的其它阳离子表面活性剂也在 US 4, 228, 044 和 EP 000 224 中描述。

[0156] 两性表面活性剂也可以是合适的。可将这些表面活性剂广泛地描述为仲胺或叔胺的脂族衍生物, 或杂环仲胺和叔胺的脂族衍生物, 其中的脂族基 (aliphatic radical) 可以是直链或支链的。脂族取代基之一含有至少约 8 个碳原子, 通常约 8 至约 18 个碳原子, 且至少一个脂族取代基含有阴离子水溶性基团, 例如羧基、磺酸基、硫酸基。两性表面活性剂的实例参见 US 3, 929, 678 (第 19 栏, 第 18-35 行)。

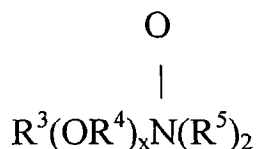
[0157] 两性离子表面活性剂也可以是合适的。可将这些表面活性剂广泛地描述为仲胺或叔胺的衍生物, 杂环仲胺和叔胺的衍生物, 或季铵、季磷鎓 (quaternary phosphonium) 或叔磺 (tertiary sulfonium) 化合物的衍生物。两性离子表面活性剂的实例参见 US

3, 929, 678(第 19 栏, 第 38 行至第 22 栏, 第 48 行)。

[0158] 半极性非离子表面活性剂是非离子表面活性剂中的特殊的一类, 其包括水溶性氧化胺、水溶性氧化膦 (phosphine oxide) 和水溶性亚砷 (sulfoxide), 所述水溶性氧化胺含有约 10 至约 18 个碳原子的一个烷基部分和选自含有约 1 至约 3 个碳原子的烷基和羟基烷基的两个部分, 所述水溶性氧化膦含有约 10 至约 18 个碳原子的一个烷基部分和选自含有约 1 至约 3 个碳原子的烷基和羟基烷基的两个部分, 而所述水溶性亚砷含有约 10 至约 18 个碳原子的一个烷基部分和选自含有约 1 至约 3 个碳原子的烷基和羟基烷基的部分。

[0159] 半极性非离子表面活性剂包括具有下式的氧化胺表面活性剂:

[0160]



[0161] 式中 R^3 为含有约 8 至约 22 个碳原子的烷基、羟基烷基、或烷基苯基或它们的混合物; R^4 为含有约 2 至约 3 个碳原子的亚烷基或羟基亚烷基或者它们的混合物; x 为 0 至约 3; 且每个 R^5 是含有约 1 至约 3 个碳原子的烷基或羟基烷基, 或者含有约 1 至约 3 个环氧乙烷基团的多环氧乙烷基。 R^5 基团可以相互连接, 例如通过氧或氮原子相互连接, 形成环形结构。

[0162] 这些氧化胺表面活性剂尤其包括 C_{10} - C_{18} 烷基二甲基氧化胺和 C_8 - C_{12} 烷氧基乙基二羟基乙基氧化胺。

[0163] 酶稳定剂:

[0164] 本发明的酶稳定剂是硼酸和 / 或其衍生物。

[0165] 在本发明的具体实施方式中, 稳定剂是苯基硼酸和 / 或其衍生物。

[0166] 本发明包括含硼酸或其衍生物的液体酶添加剂。在具体实施方式中, 本发明包括含苯基硼酸或其衍生物的液体酶添加剂。

[0167] 在本发明的具体实施方式中, 稳定剂是萘硼酸衍生物。

[0168] 存在于液体酶添加剂中的稳定剂的量取决于存在于液体酶添加剂中的酶量。

[0169] 加入的稳定剂量具体为总液体添加剂的 0.1 至 20% (w/w), 更具体为 0.5 至 8% (w/w), 如甚至更具体为 1 至 5% (w/w)。

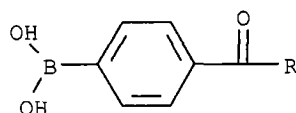
[0170] 在本发明的具体实施方式中, 稳定剂量大于总液体添加剂的 1% (w/w)。在本发明的更具体实施方式中, 稳定剂量大于总液体添加剂的 1.5% (w/w)。在本发明的最具体实施方式中, 稳定剂量大于总液体添加剂的 2% (w/w)。

[0171] 在本发明的具体实施方式中, 加至酶液体添加剂的稳定剂量是至少 0.1% (w/w)。在本发明更具体的实施方式中, 加至液体酶添加剂的稳定剂是至少 0.5% (w/w)。在本发明还更具体的实施方式中, 加至液体酶添加剂的稳定剂是至少 1% (w/w)。在本发明最具体的实施方式中, 加至液体酶添加剂的稳定剂是至少 1.5% (w/w)。

[0172] 在本发明的具体实施方式中, 加至酶液体添加剂的稳定剂量小于 20% (w/w)。在本发明更具体的实施方式中, 加至酶液体添加剂的稳定剂量小于 15% (w/w)。在本发明还更具体的实施方式中, 加至酶液体添加剂的稳定剂量小于 10% (w/w)。在本发明最具体的实施方式中, 加至酶液体添加剂的稳定剂量小于 5% (w/w)。

[0173] 在本发明的具体实施方式中,苯基硼酸衍生物具有下式:

[0174]



[0175] 式中R选自下组:氢、羟基、 C_1 - C_6 烷基、取代的 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_6 烯基和取代的 C_1 - C_6 烯基。

[0176] 本发明的优选实施方式提供液体组合物,其含有酶和上式的苯基硼酸衍生物酶稳定剂,式中R为 C_1 - C_6 烷基,尤其是其中R为 CH_3 、 CH_3CH_2 或 $CH_3CH_2CH_2$,或者其中R是氢。在本发明的具体实施方式中,酶的稳定剂是4-甲酰-苯基-硼酸(4-FPBA)。

[0177] 在本发明的另一个具体实施方式中,稳定剂选自下组:噻吩-2硼酸(thiophene-2 boronic acid),噻吩-3硼酸(thiophene-3 boronic acid),乙酰氨基苯基硼酸,苯并呋喃-2硼酸(benzofuran-2 boronic acid),萘-1硼酸(naphtalene-1boronic acid),萘-2硼酸(naphtalene-2 boronic acid),2-FPBA,3-FBPA,4-FPBA,1-噻蒎硼酸(1-thianthrene boronic acid),4-氧蒎硼酸(4-dibenzofuran boronic acid),5-甲基噻吩-2硼酸,硫蒎硼酸(thionaphtrene boronic acid),呋喃-2硼酸,呋喃-3硼酸,4,4联苯-二硼酸,6-羟基-2-萘(6-hydroxy-2-naphtalene),4-(甲硫基)苯基硼酸(4-(methylthio)phenyl boronic acid),4(三甲基-甲硅烷基)苯基硼酸(4(trimethyl-silyl)phenyl boronic acid),3-溴噻吩硼酸,4-甲基噻吩硼酸,2-萘基硼酸(2-naphtyl boronic acid),5-溴噻吩硼酸,5-氯噻吩硼酸,二甲基噻吩硼酸,2-溴苯基硼酸,3-氯苯基硼酸,3-甲氧基-2-噻吩,对-甲基-苯基乙基硼酸,2-噻蒎硼酸,二-苯并噻吩硼酸,4-羰基苯基硼酸,9-蒎基硼酸,3,5二氯苯基硼酸,联苯基硼酸酐,邻-氯苯基硼酸,对-氯苯基硼酸,间-溴苯基硼酸,对-溴苯基硼酸,对-氟苯基硼酸,对-甲苯基硼酸,邻-甲苯基硼酸,辛基硼酸,1,3,5三甲基苯基硼酸,3-氯-4-氟苯基硼酸,3-氨基苯基硼酸,3,5-双-(三氟甲基)苯基硼酸,2,4二氯苯基硼酸,4-甲氧基苯基硼酸。

[0178] 更多的适合作为稳定剂的合适的硼酸衍生物描述于US 4,963,655,US5,159,060,WO 95/12655,WO 95/29223,WO 92/19707,WO 94/04653,WO94/04654,US 5442100,US 5488157和US 5472628中。

[0179] 碱性化合物

[0180] 将提供大于7的pH的任何化合物加至液体酶添加剂时,可将其用于调节该含酶混合物的pH。合适的化合物可以是碱,例如氢氧化钠、氢氧化钾或碱性缓冲盐。

[0181] 合适的缓冲盐可以是碳酸氢钾、碳酸钾、焦磷酸四钾、三聚磷酸钾、碳酸氢钠和碳酸钠。可使用能提供碱性pH的其它合适的盐或化合物。

[0182] 制造液体酶添加剂的方法

[0183] 本发明还涉及液体酶添加剂的制备。

[0184] 该液体酶添加剂包括酶、硼酸或其衍生物和表面活性剂。可按随机次序或全部同时混合这些化合物。

[0185] 在本发明的具体的实施方式中,本发明的方法包括步骤:

[0186] i) 提供液体酶制剂;

[0187] ii) 将i)的液体酶制剂与表面活性剂和硼酸或其衍生物混合;

[0188] 在本发明的更具体的实施方式中,本发明的方法包括步骤:

[0189] i) 提供液体酶制剂;

[0190] ii) 将 i) 的液体酶制剂和硼酸或其衍生物混合;以及

[0191] iii) 在加入硼酸或其衍生物同时、之前或之后,将表面活性剂加入液体酶添加剂。

[0192] 在本发明的更具体的实施方式中,在加入硼酸或其衍生物前,将表面活性剂与液体酶制剂混合。

[0193] 在本发明的具体的实施方式中,制造含 1.5g/L 酶的浓缩的液体酶添加剂的方法包括步骤:

[0194] i) 提供液体酶制剂;

[0195] ii) 将 i) 的液体酶制剂和硼酸或其衍生物混合;以及

[0196] iii) 在加入硼酸或其衍生物之前或之后,将表面活性剂加入液体酶添加剂。

[0197] 在加入硼酸或其衍生物之前,可将表面活性剂加至发酵液、无细胞的发酵液、或含一种或多种酶的浓缩物。

[0198] 在本发明的具体的实施方式中,将表面活性剂加至发酵液。在本发明的更具体的实施方式中,将表面活性剂加至无细胞的发酵液。在本发明的最优选的实施方式中,将表面活性剂加至酶浓缩物。

[0199] 我们还发现在一些情况下液体酶添加剂制备方法可对添加剂的稳定性有影响,从而对其中沉淀的形成有影响。

[0200] 在本发明的具体实施方式中,酶添加剂的 pH 为 4.5 至 11。在本发明更具体的实施方式中,酶添加剂的 pH 为 5.5 至 10。

[0201] 我们发现调节 pH 和该调节发生的时间对液体酶添加剂中沉淀的形成有影响。

[0202] 我们发现可将含酶液体的 pH 调节到 pH 7.5 至 10 以避免沉淀,更具体为 8 至 9。

[0203] 优选在混合含酶液体与硼酸或其衍生物之前调节 pH 由此避免形成沉淀。也可在混合含酶液体与硼酸或其衍生物之后进行调节由此将形成的沉淀溶解。

[0204] 在本发明的具体实施方式中,本发明的方法包括步骤:

[0205] i) 提供液体酶制剂;

[0206] ii) 将 i) 的液体酶制剂和硼酸或其衍生物混合;在加入硼酸或其衍生物之前或之后,将液体的 pH 调节到 7.5 至 10。

[0207] 因此在本发明的具体实施方式中,本发明的方法包括步骤:

[0208] i) 提供液体酶制剂;

[0209] ii) 将 i) 的液体酶制剂和硼酸或其衍生物混合;在加入硼酸或其衍生物之前或之后,将液体的 pH 调节到 7.5 至 10,和在加入硼酸或其衍生物之前或之后,将表面活性剂加入该液体。

[0210] 可用任何合适的碱性物质调节 pH。在具体的实施方式中,用 NaOH 调节 pH。

[0211] 在具体的实施方式中,制造液体酶添加剂的方法包括如下步骤:

[0212] i) 提供含有一种或多种酶的液体酶制剂;

[0213] ii) 将 i) 的液体酶制剂与表面活性剂混合;

[0214] iii) 将 ii) 的液体酶制剂的 pH 调节到 7.5 至 10;

[0215] iv) 将 ii) 的液体组合物与硼酸或其衍生物混合。

[0216] 或者

[0217] i) 提供含有一种或多种酶的液体酶制剂；

[0218] ii) 将 i) 的液体酶制剂的 pH 调节到 7.5 至 10；

[0219] iii) 将 ii) 的液体酶制剂与表面活性剂混合；

[0220] iv) 将 ii) 的液体组合物与硼酸或其衍生物混合。

[0221] 在更具体的实施方式中,制造液体酶添加剂的方法包括下列步骤：

[0222] i) 提供含有一种或多种酶的液体酶制剂；

[0223] ii) 将 i) 的液体酶制剂与表面活性剂混合；

[0224] iii) 将 ii) 的液体酶制剂的 pH 调节到 7.5 至 10；

[0225] iv) 将 ii) 的液体组合物与苯基硼酸或其衍生物混合。

[0226] 或者

[0227] i) 提供含有一种或多种酶的液体酶制剂；

[0228] ii) 将 i) 的液体酶制剂的 pH 调节到 7.5 至 10；

[0229] iii) 将 ii) 的液体酶制剂与表面活性剂混合；

[0230] iv) 将 ii) 的液体组合物与苯基硼酸或其衍生物混合。

[0231] 可将硼酸或其衍生物作为固体或作为以部分溶解或完全溶解的形式含有硼酸或其衍生物的液体加至液体酶制剂。在本发明的具体实施方式中,硼酸或其衍生物溶解于甘油或 1,2-丙二醇中,其在添加前用氢氧化钠或氢氧化钾调节至 pH 8.5-10。

[0232] 含本发明的液体酶添加剂的组合物

[0233] 本发明也涉及含本发明的液体酶添加剂的组合物。该组合物可以是任何组合物,但特别合适的组合物是洗涤组合物 (cleaning composition)、个人护理组合物、织物处理组合物例如漂白组合物、药物组合物、皮革处理组合物、纸浆或纸处理组合物、食物及饮料组合物和动物饲料组合物。

[0234] 在本发明的具体实施方式中,将液体酶添加剂用作液体洗涤剂 (例如洗衣洗涤剂) 中的原材料。

[0235] 本发明还涉及液体酶添加剂在液体洗涤剂组合物中的用途。

[0236] 根据本发明,含液体酶添加剂的液体组合物 (例如液体洗涤剂) 中,液体酶添加剂可以 0.01-20% w/w 的浓度存在,优选该组合物可含有 0.05-10% w/w 的液体酶添加剂,更优选该液体组合物可含有 0.1-5% w/w 的液体酶添加剂,最优选该液体组合物可含有 0.1-3% w/w 的液体酶添加剂。

[0237] 将本发明的液体酶添加剂用于液体组合物 (诸如洗涤剂) 时,每种酶量以纯酶蛋白计算通常为 1-1000mg/L,具体为 5-750mg/L,尤其为 10-500mg/L。

[0238] 根据本发明,含液体酶添加剂的液体组合物 (例如液体洗涤剂) 中,液体组合物可含有 0.001-7.5% w/w 的硼酸或其衍生物,优选组合物可含有 0.005-4% w/w 的硼酸或其衍生物,更优选组合物可含有 0.005-1.2% w/w 的硼酸或其衍生物,最优选组合物可含有 0.01-0.15% w/w 的硼酸或其衍生物。硼酸或其衍生物可以是酸或所述酸的碱金属盐。

[0239] 本发明通过下列的实施例进行进一步描述,不应理解为限定本发明的范围。

[0240] 实施例

[0241] 实施例 1

- [0242] 用 4-FPBA 和表面活性剂配制蛋白酶。
- [0243] 蛋白酶为含约 40g 酶蛋白 /L 和 55% 的 1,2- 丙二醇, pH 5.5 的浓缩的 Savinase 溶液。
- [0244] 在实施例中试验的表面活性剂参见表 1。
- [0245] 表 1。
- [0246]

	化学结构	HLB*
表面活性剂 A	$\text{RO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{H}$ $\text{R} = \text{C}_{16-22} \text{ 烷基}, m=80$	18.7
表面活性剂 B	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m\text{CH}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ $ $ $\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_x\text{H}$ $X=5, m+n=9-11$	10.5
表面活性剂 C	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m\text{CH}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ $ $ $\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_x\text{H}$ $X=9, n+m=9-11$	13.3

- [0247] * 亲水 - 亲脂 - 平衡
- [0248] 将表面活性剂加入蛋白酶中 (在最终组合物中 2% w/w)。
- [0249] 混合后用 10M NaOH 将 pH 调节至 8.7。
- [0250] 使用产自 Radiometer 的 pH 计 PHM93 和 **Ross®** 半微量组合 pH 电极 (Orion8103SC) 测量 pH。使用前, 使用来自 Radiometer analytical 的标准缓冲液 (pH4.005 定购号 :S11M002 ;pH 7.000 定购号 :S11M004 和 pH 10.012 定购号 :S11M007) 校准 pH 电极。在室温测定 pH。
- [0251] 将用 10M NaOH 调节至 pH 9.6 的 30% 4-FPBA 的 1,2- 丙二醇溶液加入酶 / 表面活性剂混合物中直到 4-FPBA 的最终浓度为 1.6% w/w。
- [0252] 最终酶浓度是 36mg/ml。
- [0253] 然后将样品转移至两小瓶中, 密封后分别在 5° 和 40℃ 温育 4 星期。
- [0254] 储藏后, 通过目测确定样品的物理稳定性。
- [0255] 作为对照, 按同样的方法制备样品, 只是没有加入表面活性剂。
- [0256] 目测的结果参见表 3。
- [0257] 表 3
- [0258]

蛋白酶	表面活性剂	储藏后的物理外观*	
		在 5°C 4 星期	在 40°C 4 星期
Savinase	对照	轻微浑浊	沉淀(~1% v/v)
	表面活性剂 A	澄清	细小沉淀(<1% v/v)
	表面活性剂 B	澄清	澄清
	表面活性剂 C	澄清	澄清

[0259] *:澄清:未出现可见固体;浑浊:出现的固体悬浮于液体中;沉淀:出现的固体沉淀在小瓶的底部。

[0260] 实施例 2

[0261] 用 4-FPBA 和表面活性剂配制蛋白酶。试验了与实施例 1 所用相同的三种表面活性剂。

[0262] 蛋白酶为含 44g 酶/L 和 30% 的 1,2-丙二醇, pH 5.2 的浓缩的 Alcalase® 溶液。

[0263] 将表面活性剂加入蛋白酶(在最终组合物中 2% w/w)。

[0264] 混合后用 10M NaOH 将 pH 调节至 8.7。

[0265] 将用 10M NaOH 调节至 pH 9.6 的 30% 4-FPBA 的 1,2-丙二醇溶液加入酶/表面活性剂混合物直到最终浓度为 1.6% w/w。

[0266] 最终酶浓度是 40mg/ml。

[0267] 然后将样品转移至两小瓶中,密封后分别在 5° 和 40°C 温育 4 星期。

[0268] 储藏后,通过目测确定样品的物理稳定性。

[0269] 作为对照,按同样的方法制备样品,只是没有加入表面活性剂。

[0270] 目测结果参见表 4。

[0271] 表 4

[0272]

蛋白酶	表面活性剂	储藏后的物理外观*	
		在 5°C 4 星期	在 40°C 4 星期
Alcalase	对照	浑浊	浑浊
	表面活性剂 A	澄清	澄清
	表面活性剂 B	浑浊	浑浊
	表面活性剂 C	澄清	澄清

[0273] *:澄清:未出现可见固体;浑浊:出现的固体悬浮于液体中;沉淀:出现的固体沉淀在小瓶的底部。

[0274] 实施例 3

[0275] 按实施例 1 和 2 所概述的进行本实验,只是改变表面活性剂的浓度。结果显示于表 5。

[0276] 表 5

[0277]

蛋白酶	表面活性剂	储藏后的物理外观*	
		在 5°C 4 星期	在 40°C 4 星期
Savinase	0 %	浑浊	浑浊
	0.5% (w/w)	轻微浑浊	轻微浑浊
	1% (w/w)	轻微浑浊	轻微浑浊
	2% (w/w)	澄清	澄清
Alcalase	0 %	浑浊	浑浊
	0.5% (w/w)	澄清	两液相
	1% (w/w)	澄清	澄清
	2% (w/w)	澄清	澄清

[0278] *:最终浓度

[0279] 结论是不同的蛋白酶需要加入不同量的表面活性剂以完全防止沉淀。

[0280] 实施例 4

[0281] 使用下列方法用 4-FPBA 配制蛋白酶（与实施例 1 中相同）：

[0282] 1) 将表面活性剂加入液体蛋白酶样品中至最终浓度为 2% w/w（参见表 1）。

[0283] 2) 混合后,用 10M NaOH 将 pH 调节至 8.7。

[0284] 3) 然后加入 4-FPBA 至最终浓度为 1.6% w/w。

[0285] 4) 然后将样品转移至两小瓶中,密封后分别在 5° 和 40°C 温育 4 星期。

[0286] 5) 储藏后,通过目测确定样品的物理稳定性。

[0287] 作为对照,按步骤 1-5 制备样品,只是没有加入表面活性剂。

[0288] 成份：

[0289] 4-FPBA 溶液：

[0290] 用 10M NaOH 将 30% 4-FPBA 的 1,2- 丙二醇溶液调节至 pH 9.6

[0291] 含有约 40g 酶蛋白 /L 和 55% 的 1,2- 丙二醇, pH 5.5 的浓缩的 Savinase 溶液

[0292] 用 10M NaOH 将 30% 4-FPBA 的 1,2- 丙二醇溶液调节至 pH 9.6

[0293] 表面活性剂 C（来自实施例 1）

[0294] 表面活性剂 D： $R-O-(CH_2CH_2O)_nH$, 两种表面活性剂的混合物, 式中 R 是平均链长为 13-15 个碳原子的烷烃且 $n = 3$

[0295] 表面活性剂 E：如表面活性剂 D, 只是 $n = 7$

[0296] 表面活性剂 F：如表面活性剂 D, 只是 R 是平均链长为 13 个碳原子的烷烃且 $n = 8$

[0297] 表面活性剂 G：如表面活性剂 F, 只是 $n = 15$

[0298] 表面活性剂 H： $R-O-(CH_2CH_2O)_nH$, 两种表面活性剂的混合物, 式中 R 是平均链长为 13 个碳原子的烷烃且 $n = 3$ 和 8

[0299] 试验结果显示于表 6

[0300] 表 6.

[0301]

蛋白酶	表面活性剂	HLB 值**	储藏后的物理外观*		
			在 5°C 4 星期	在 25°C 4 星期	在 40°C 4 星期
Savinase	对照		轻微浑浊	沉淀(~1% v/v)	沉淀(~1% v/v)
	表面活性剂 C	13.3	澄清	澄清 沉淀<1%	澄清
	表面活性剂 D	8	浑浊, 两液相	浑浊, 两液相	浑浊, 两液相
	表面活性剂 E	12	澄清	澄清	细小沉淀 (<1% v/v)
	表面活性剂 F	13	澄清	澄清	澄清
	表面活性剂 G	15.5	澄清	澄清 沉淀<1%	澄清
	表面活性剂 H	12	澄清	澄清	澄清

[0302] *:澄清:未出现可见固体;浑浊:出现的固体或油相悬浮于液体中;沉淀:出现的固体沉淀在小瓶的底部。

[0303] **:HLB 值依据 W. C. Griffin

[0304] 试验显示 HLB 值低于 9 的表面活性剂不起作用。

[0305] 酶蛋白测定:

[0306] 可通过许多方法可确定酶溶液的酶蛋白浓度。如果已知酶的比活性,可通过如下方法测定酶蛋白浓度:首先在选定的一组条件下测定酶活性(以单位/g 原料表示),并除以该比活性(以单位/mg 酶蛋白表示)。通过如下方法测定酶的比活性:首先使用本领域已知的方法将酶纯化至同质(homogeneity),然后在与用于测量酶蛋白浓缩物中的酶活性相同的一组条件下测定纯化的样品中的酶活性。也测定了纯化的样品中的总蛋白质浓度,然后用纯化的样品的酶活性除以蛋白质浓度而得到比活性。可通过本领域熟知的多种总蛋白质测定的一种来测定总蛋白浓度(不同的比色蛋白质测定的综述由 Christine V. Sapan, Roger L. Lundblad and Nicholas C. Price in Biotechnol. Appl. Biochem. (1999) 29, p99-108 给出)。如果含酶溶液只含有活性形式的目的蛋白,则可通过测量总蛋白质浓度来直接测定酶蛋白浓度。

[0307] 本发明所用的方法是基于 N,N-二甲基酪蛋白(DMC)水解的试验。简单地,在 8 分钟的预温育期之后通过分光光度法在 420nm 监测蛋白酶活性 10 分钟。试验在 pH 8.3 和 37°C 进行。将下列溶液用于试验:

[0308] DMC-底物:0.4% N,N-二甲基酪蛋白在 90mM 四硼酸钠、120mM 磷酸钠、0.2% Brij 35 中,调节至 pH 8.0。

[0309] TNBS 溶液:1.73mM 的 2,4,6-三硝基苯磺酸水溶液。

[0310] 稀释缓冲液:0.15M KCl,0.05M 硼酸,0.16M 亚硫酸钠,0.2% Brij 35,调节至 pH 9.0。

[0311] 对于试验,将 80 μL TNBS 溶液与 45 μL 样品或标准物(稀释于稀释缓冲液中)混合,并通过加入 160 μL DMC-底物开始反应。

[0312] 总蛋白质测定:

[0313] 参考文献:M. Matsushita, T. Irino, T. Komoda and Y. Sakagishi “Determination of proteins by a reverse biuret method combined with the copper-bathocuproine chelate reaction”, Clinica Chimica Acta, 216 (1993), p103-111。