

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁶

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 97199678.4

C12N 9/42
C12N 1/14 C11D 3/386
C07K 14/37 C12N 15/56
C08B 30/04 D06M 16/00
D21C 5/00 A23K 1/165
//(C12N9/42,C12R
1:885)

[43]公开日 1999年12月1日

[11]公开号 CN 1237204A

[22]申请日 97.10.7 [21]申请号 97199678.4

[30]优先权

[32]96.10.9 [33]US [31]08/728,350

[86]国际申请 PCT/US97/18402 97.10.7

[87]国际公布 WO98/15619 英 98.4.16

[85]进入国家阶段日期 99.5.13

[71]申请人 金克克国际有限公司

地址 美国纽约

[72]发明人 B·S·保尔 K·A·克拉克森

K·D·科利尔 J·T·凯利斯

M·B·凯利 E·A·拉瑞纳斯

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所

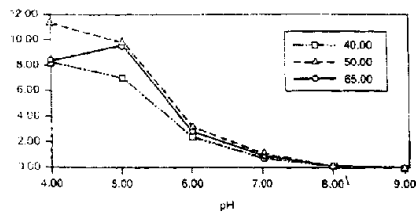
代理人 樊卫民

权利要求书 2 页 说明书 18 页 附图页数 2 页

[54]发明名称 高分子量的木霉纤维素酶

[57]摘要

从长枝木霉 (*Trichoderma longibrachiatum*) 发酵液中分离得到纯化的纤维素酶组合物。SDS-PAGE 测得其分子量约为 95—105kD, 等电聚焦 (IEF) 测得其等电点 (pI) 约为 5.6—6.8, 在 65℃ 时其对 RBB-CMC 的最适 pH 约为 5.0, 而在 40℃ 和 50℃ 时 pH 为 4 或更低。



ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1.一种纯化的纤维素酶组合物,所述纯化的纤维素酶组合物相应于长枝木霉发酵时产生的一种天然发生的纤维素酶,其在SDS-PAGE胶上测得分子量约95-105KD,在等电聚焦胶上测得其等电点约5.6-6.8。

2、根据权利要求1的纯化的纤维素酶组合物,其中该纤维素酶在65℃ pH5时有最佳活性,在50℃及40℃ pH4或更低pH时具有最佳活性。

3、根据权利要求1的纯化的纤维素酶组合物,其中该纯化的纤维素酶由木霉属的菌产生。

4、根据权利要求3的纯化的纤维素酶组合物,其中该纤维素酶由长枝木霉产生。

5、一种制备纯化的纤维素酶组合物的方法,包括步骤:(a)制备一种微生物的发酵液,该微生物产生一种相应于长枝木霉发酵时产生的一种天然发生的纤维素酶的纤维素酶组合物,其在SDS-PAGE胶上测得其分子量约为95-105KD,在等电聚焦胶上测得其等电点约为5.6-6.8;以及

(b)从所述微生物中分离该纤维素酶,以形成纯化的纤维素酶组合物。

6、根据权利要求5的方法,其中该微生物为真菌。

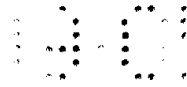
7、根据权利要求6的方法,其中该真菌为丝状真菌。

8、根据权利要求7的方法,其中该丝状真菌为木霉属的菌。

9、根据权利要求8的方法,其中该木霉属的菌为长枝木霉。

10、根据权利要求8的方法,其中该木霉属的菌经遗传操作以使它不能产生相应于长枝木霉中CBH I、CBH II、EG I、EG II或EG III的纤维素酶。

11、一种包含纯化的纤维素酶组合物的去污剂组合物,所述纯化的纤维素酶组合物相应于长枝木霉发酵时产生的一种天然发生的纤维素酶,其在SDS-PAGE胶上测得的分子量约95-105KD,在等电聚焦



胶上测得的等电点约5.6-6.8。

12、根据权利要求11的去污剂组合物，其中该纯化的纤维素酶由长枝木霉产生。

13、一种包含纯化的纤维素酶组合物的石洗组合物，所述纯化的纤维素酶组合物相应于长枝木霉发酵时产生的一种天然发生的纤维素酶，其在SDS-PAGE胶上测得的分子量约95-105KD，在等电聚焦胶上测得的等电点约5.6-6.8。

14、根据权利要求13的石洗组合物，其中该纯化的纤维素酶由长枝木霉产生。

15、一种包含纯化的纤维素酶组合物的动物饲料添加剂，所述纯化的纤维素酶组合物相应于长枝木霉发酵时产生的一种天然发生的纤维素酶，其在SDS-PAGE胶上测得酶的分子量约95-105KD，在等电聚焦胶上测得的等电点约5.6-6.8。

16、一种处理含纤维素织物的方法，包括步骤：

(a)制备含有纯化的纤维素酶组合物的水溶液，所述纯化的纤维素酶组合物相应于长枝木霉发酵时产生的一种天然发生的纤维素酶，其在SDS-PAGE胶上测得的分子量约95-105KD，在等电聚焦胶上测得的等电点约5.6-6.8；

(B)将该含纤维素织物与该水溶液相接触。

17、根据权利要求16的方法，其中所述处理包括含棉靛蓝染色粗斜纹布的石洗。

18、一种处理木纸浆的方法，包括将该木纸浆与含纯化的纤维素酶组合物的水溶液相接触，所说的纯化的纤维素酶组合物相应于长枝木霉发酵时产生的一种天然发生的纤维素酶，其在SDS-PAGE胶上测得的分子量约95-105KD，在等电聚焦胶上测得的等电点约5.6-6.8。

19、一种淀粉加工过程中处理谷物的方法，包括将谷物与纯化的纤维素酶组合物接触，所述纯化的纤维素酶组合物相应于长枝木霉发酵时产生的一种天然发生的纤维素酶，其在SDS-PAGE胶上测得的分子量约95-105KD，在等电聚焦胶上测得的等电点约5.6-6.8。

高分子量的木霉纤维素酶

发明背景

1. 发明领域

本发明涉及经纯化的或经分离的相应于来自木霉属的菌的EG VI的纤维素酶。本发明进一步涉及分离纯化的获自木霉属的菌或经遗传改造的木霉属的菌之EG VI纤维素酶的方法，涉及利用该纤维素酶用于去污剂、纺织品处理、提高动物饲料的价值、处理纸浆和纸、谷物湿磨等的方法和其它本领域熟知的利用纤维素酶的方法。

2. 现有技术

纤维素酶是能够水解纤维素中 β -D-葡萄糖苷键的酶。纤维素水解酶传统上分为三大类：内切葡聚糖酶，外切葡聚糖酶或纤维二糖水解酶和 β -葡糖苷酶(Knowles, J. 等(1987), TIBTECH 5, 255-261); 并已知由大量细菌、酵母和真菌产生。

有关纤维素水解酶的应用首先是那些涉及分解木材纤维素浆成为糖用于(生物)乙醇生产、纺织品处理如“石洗”和“生物上光”，以及在去污剂组合物中的应用。因此，已知纤维素酶可用于在机械纸浆处理(参考如PCT公开文本WO 92/16687)。另外，已知纤维素酶还可用作饲料添加剂(参考如PCT公开文本WO 91/04673)和用于谷物湿磨中。

然而最重要的是纤维素酶用于纺织品处理，即用于去污剂组合物中以帮助去除灰尘或灰球(grayish cast)(参考如英国申请号2, 075, 028, 2, 095, 275和2, 094, 826, 说明去污剂组合物结合纤维素酶后提高了清洁效果)或者在售前对纺织品进行处理，即改善纺织品的手感和外观。所以，英国申请号1, 358, 599说明纤维素酶在减小含棉织物的粗糙度的去污剂中的应用，并且纤维素酶用于纺织品处理，通过使其颜色更鲜艳而翻新旧织物(参考如The Shizuoka Prefectural Hammamatsu 纺织品工业研究所报告第24卷第54-61页(1986))。例如，



反复洗涤含棉织物导致织物灰球，相信这是由于纤维分裂和混乱所致，有时称作“纤维绒球”，是由机械作用引起。这种灰球在彩色织物上特别明显。因此，纤维素酶去除混乱的纤维上层而改善织物整体外观的能力非常有用。

因为纤维素是在真菌、细菌等中产生(表达)的，所以由某种真菌，尤其是由木霉属的菌(特别是长枝木霉(*Trichoderma longibrachiatum*))产生的纤维素酶，已经引起关注，因为通过发酵过程可以容易地大量生产能够降解结晶形式纤维素的完整的纤维素酶系统。

Wood等在《酶学方法》(*Methods in Enzymology*), 160, 25, 234 页 (1986)中公开了完整的真菌纤维素酶系统包括几个不同的酶种类，包括那些被鉴定为外切纤维二糖水解酶(EC 3.2.1.91) ("CBH"), 内切葡聚糖酶(EC 3.2.1.4) ("EG")和 β -葡糖苷酶(EC 3.2.1.21) ("BG")的酶。CBH、EG和BG 真菌纤维素酶分类可进一步扩展到包括每种类型之中的多重成分。已从多种真菌资源中分离到CBH和EG。美国专利号5, 475, 101(Ward等)公开了从长枝木霉中纯化并分子克隆了EGIII。PCT 公开文本第94/28117号公开了被称为EGV的来自*Trichoderma reesei*的20-25KD的纤维素酶。

尽管在本领域已知涉及具备一些或所有上述特性的许多纤维素酶组合物，但仍然需求具有不同特性的新的纤维素酶，以用于，例如，处理纺织品、作为去污剂组合物中的一个成分、用于处理纸浆和纸以及用于生物量转化。申请人发现了从长枝木霉发酵液中分离到的一种新的纤维素酶，该酶在此前为本领域所未知。

发明概述

本发明的一个目的是提供一种具有新特性的新的纤维素酶，该酶可用于利用纤维素酶的工业过程，例如去污剂、纺织品处理、作为一种动物饲料添加剂、谷物湿磨及纸浆和纸的处理。

根据本发明，提供一种纯化的新纤维素酶组合物，它基本上相应于此处所述的EGVI。EG VI可从长枝木霉发酵液中分离到，在SDS-



PAGE上其分子量约为95-105kD（见图1），在IEF胶上测得其等电点约为5.6-6.8，65℃时测得其对RBB-CMC的最适pH约为5.0，在40℃和50℃时pH为4或更低。

根据本发明的一个实施方案，提供一种从木霉发酵液中纯化或分离一种相应于EGVI的纤维素酶。优选地，该发酵液包括长枝木霉。更优选地，长枝木霉属的菌株已根据例如美国专利第5,328,841的方法经过遗传改造以删除纤维素酶CBHI、CBHII、EGI、EGII、EGIII和EGV。

本发明进一步构思了一种方法，用于处理含纤维素的织物，该方法包括使含纤维素的织物与根据本发明的纯化的纤维素酶相接触。在本发明的一个工艺实施方案中，该方法的结果是产生了石洗效果或改善了织物的手感和/或外观。在本发明另一个工艺实施方案中，含纤维素的织物与含有去污剂组合物的水溶液接触，该去污剂中含有根据本发明的纯化的纤维素酶，而在本发明的另一个工艺实施方案中，本发明的纯化的纤维素酶被用于处理含纤维素材料的木材或纸浆，通过添加纤维素酶促进纸产品的生产。而在本发明的另一个工艺实施方案中，本发明的纯化的纤维素酶被用作添加剂以处理含有纤维素材料的动物饲料，且该方法导致该动物饲料的可消化性或营养值提高。

本发明以及其目的和优点将在下面以更详细地描述。

附图简述

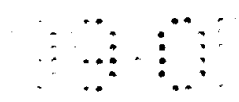
图1表示在SDS-PAGE胶上显示EGVI和其它已知蛋白标记物的相对分子量。纯化的EGVI上样于第4泳道，边上带有分子量标记。

图2表示在等电聚焦胶上活性上层显示EGVI对RBB-CMC的活性。

图3表示在不同的pH和温度下EGVI对RBB-CMC的活性。

发明详述

“含棉织物”是指经缝纫或未经缝纫的由纯棉或棉混纺纱制成的织物、纱线或纤维，包括棉机织物、棉针织物、棉粗斜纹棉布、棉纱



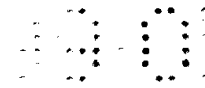
线及类似物。当采用棉混纺纱时，织物中棉的量优选至少约占棉重量的35%。当作为棉混纺纱使用时，织物中采用的伴随材料可包括一或多种非棉纤维包括合成纤维，例如聚酰胺纤维（例如，6号尼龙和66号尼龙）、丙烯酸纤维（例如，聚丙烯腈纤维），以及聚酯纤维（例如，聚对苯二甲酸乙二醇酯）、聚乙烯醇纤维（例如，维尼仑）、聚氯乙烯纤维、聚偏二氯乙烯纤维、聚氨基甲酸乙酯纤维、聚脲纤维和芳族聚酰胺纤维。

“含纤维素的织物”是指任何经缝纫或未经缝纫的由含棉或不含棉纤维素或者含棉或不含棉纤维素混纺纱制成的织物、纱线或纤维，包括天然纤维素类和人造纤维类（例如黄麻、亚麻、苧麻、人造丝和lyocell）。含人造纤维素的织物类中包括本领域众所周知的再生织物例如人造丝。其它含人造纤维素的织物包括化学改良的纤维素纤维（例如，纤维素的乙酸酯衍生物）和溶纺纤维素纤维（例如，lyocell）。在含纤维素的织物的定义中尤其包括任何由这样的材料制成的纱线或纤维。

“石洗组合物”是指用于石洗含纤维素的织物的制剂。石洗组合物被用于在递呈给消费者售卖前，即，在生产过程中改良含纤维素的织物。与之相反，去污剂组合物意在用于清洁弄脏的衣服。

“石洗”是指用纤维素酶溶液在搅动和冲流条件下，即在滚筒洗衣机中处理含纤维素的织物，以赋予粗斜纹棉布“石洗”外观。根据本发明，纤维素酶溶液将在功能上全部或部分地取代石头在这一领域认可的方法中的应用。美国专利号4,832,864中描述了赋予粗斜纹棉布石洗外观的方法，在此完整地引入作为参考。通常，石洗技术被应用于靛蓝染色的棉粗斜纹棉布。

“去污剂组合物”是指意在用于清洗弄脏的含纤维素织物的清洗介质中使用的混合物。本发明的正文中，这样的组合物除纤维素酶和表面活性剂之外，可包括另加的水解酶、助洗剂、漂白剂、漂白激活剂、上蓝剂和荧光染料、结块抑制剂、掩蔽剂、纤维素酶激活剂、抗氧化剂以及增溶剂。与石洗组合物相反，这样的组合物通常被用于清



洁弄脏的衣服而不用于生产过程中。在例如，Clarkson等，美国专利号5, 290, 474和欧洲公开文本271 004中描述了含有纤维素酶的去污剂组合物，在此引入作为参考。

根据本发明，提供一种纯化的新纤维素酶组合物，它基本上相应于此处所述EG VI。EG VI是生长枝木霉发酵培养过程中产生的纤维素酶，SDS-PAGE上其分子量约为95-105kD（见图1），等电聚焦胶测得其等电点约为5.6-6.8，65℃时测得其对RBB-CMC的最适pH约为5.0，在40℃和50℃时pH为4或更低。EG VI还表现出具有纤维素酶结合活性。

根据本发明的一个工艺实施方案，提供一种从木霉发酵液中纯化或分离一种基本上相应于EG VI的纤维素酶的方法。优选地，该发酵液包括长枝木霉。更优选地，长枝木霉属的菌株根据例如美国专利第5, 328, 841的方法经过遗传改造以删除纤维素酶CBH I、CBH II、EG I、EG II、EG III和EG V。

在本发明的上下文中，创造性的纯化的纤维素酶相应于长枝木霉发酵培养过程中天然产生的纤维素酶，SDS-PAGE测得其分子量约为95-105KD（大约100KD），在等电聚焦胶上估计其等电点约5.6-6.8（大约6.2）。因此此处定义的纯化的纤维素酶可以由任何能够产生类似纤维素酶的微生物产生。本发明纯化的纤维素酶是以部分或全部分离形式纯化的，其浓度与天然发生的或其它已知的木霉属的菌株发酵中发现的浓度不同，或与一些与这种发酵液通常无关的组分的组合。构思基因工程菌可用编码根据本发明的纤维素酶的DNA转化，随后在合适的发酵条件下培养以诱导纤维素酶的产生。相似地，构思根据本发明的纯化纤维素酶可以以基本同源的形式由不同于申请人从中首次分离到EG VI的长枝木霉的生物产生。尤其是构思真菌，包括丝状真菌特别是包括木霉属的菌，如绿色木霉(*T. viride*)，可以产生与EG VI基本相同的纤维素酶。基本相同是指纤维素酶可显示出基本上相同的特性，如分子量、等电点、pH值和/或温度曲线。这些表现基本上相同的纤维素酶在这里认为相应于EG VI。类似地，构思通过一些方法可

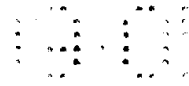


能改造根据本发明的纤维素酶使其具有略微不同的特性，例如通过产生菌的随机诱变、编码根据本发明纤维素酶的基因的定点诱变和/或在表达或分泌后对酶进行化学改造。

通常，含有根据本发明纯化的纤维素酶之组合物可以通过基于本发明的纤维素酶已鉴定的特征和性质的纯化技术得到。特别地，当根据本发明纯化的纤维素酶是由培养的微生物产生的纤维素酶混合物之一部分时，整个纤维素酶混合物（全纤维素酶）可以通过文献发表的公认的分选技术经纯化为基本纯的组分，这些技术包括在合适pH下的离子交换层析、亲和层析、体积排阻层析等等。例如在离子交换层析（即阴离子或阳离子交换层析）中，通过pH梯度、盐梯度、或pH加上盐梯度洗脱，可能分离纤维素酶组分。纯化后，可以重新组合目的组分必需的量。或者，可用基因工程技术以产生纤维素酶混合物，例如通过使用删除了纤维素酶基因的菌株，其中编码根据本发明纤维素酶的基因经转化和/或由其它删除纤维素酶的宿主菌株表达。

根据本发明的纺织品的处理方法考虑用含纤维素酶的组合物进行纺织品加工或清洁。这样的处理方法包括但不限于石洗，修饰含纤维素的织物结构、手感和/或外观，或其它在生产或清洁/重整含纤维素的织物的过程中使用的其它技术。另外，本发明正文中的处理方法考虑从纤维素织物或纤维中去除“不成熟”或“死亡”的棉，即比成熟棉更加无定形的不成熟棉。已知死亡棉能导致染色不均因而是不要的。因而，本发明中构思的组合物包括意在清洗弄脏的、生产出来的含纤维素的织物所使用的纤维素酶组分。例如，纤维素酶可被使用于清洗衣服的去污剂组合物中。根据本发明的有用的去污剂组合物包括专用制剂，例如预洗、预浸和家用的色彩还原组合物。这样的处理组合物，如此处所描述，可以采用需要稀释的浓缩物的形式，或采用稀释溶液的形式，或采用能直接应用于含纤维素的织物的形式。在例如欧洲专利公开文本220 016和英国申请号1, 368, 599和2, 095, 275中描述了用于纺织品之纤维素酶处理的本领域中已知的常用处理技术。

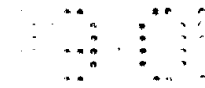
根据本发明的优选实施方案，上述的纤维素酶组合物可被用作



石洗组合物。优选地，根据本发明的石洗包括制备含有效量的纤维素酶连同可选成分的水溶液，可选成分包括例如缓冲液、表面活性剂和擦洗剂。有效量的纤维素酶组合物具有满足其构思目的之纤维素酶浓度。因此根据本发明的石洗组合物中纤维素酶的“有效量”是指能提供所需的处理(例如石洗)的量。采用的纤维素酶的量也依赖于所采用设备、所采用的工艺参数(纤维素酶处理液的温度、暴露于纤维素酶溶液的时间等)和纤维素酶的活性(例如，特定的溶液将需要较低的纤维素酶浓度，如此处采用了较高活性纤维素酶组合物而不是较低活性的纤维素酶组合物)。其中将加入被石洗之织物的处理水溶液中的纤维素酶之确切浓度能被熟练技术人员很容易地依据以上因素以及所需结果确定。优选地，纤维素酶采用从1到5,000ppm总蛋白质的浓度，最优选从10到200ppm。

可以选择地，缓冲液被用于石洗组合物中，以使缓冲液的浓度足够维持溶液pH在所采用的纤维素酶能表现活性的范围内，而此pH则依赖于所采用的纤维素酶的性质。所采用的缓冲液的确切浓度依赖于熟练技术人员能很容易考虑到的一些因素。例如，在一优选实施方案中，选择缓冲液和缓冲液的浓度以维持最终纤维素酶溶液的pH在最佳纤维素酶活性所要求的范围内。

除纤维素酶和缓冲液外，石洗组合物可任选地含有表面活性剂。合适的表面活性剂包括任何与纤维素酶和织物相适合的表面活性剂，包括例如阴离子、非离子和两性表面活性剂。此处使用的合适的阴离子表面活性剂包括线性或有分支的烷基苯磺酸盐；含线性或分支烷基基团或链烯基基团的烷基或链烯基硫酸酯；烷基或链烯基硫酸盐；烯属磺酸盐；烷基磺酸盐等。对于阴离子来说合适的配对离子包括碱性金属离子例如钠和钾；碱土金属离子例如钙和镁；铵离子；以及含1到3个碳原子数为2或3的烷醇基团的链烷醇胺。两性表面活性剂包括季铵盐磺酸酯和甜菜碱型两性表面活性剂。这样的两性表面活性剂在同一分子中有正和负电荷基团。非离子表面活性剂通常包含聚氧乙醚，以及高级脂肪酸烷醇酰胺或其氧化烯加成化合物和脂肪酸甘油单



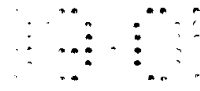
酯。也能按照本领域的技术人员已知的方法采用表面活性剂的混合物。

在优选的实施方案中，可制备浓缩的石洗组合物以用于此处描述的各种方法。这样的浓缩物含有浓缩量的上述纤维素酶组合物、缓冲液和表面活性剂，优选在水溶液中。当如此配制时，石洗浓缩物可以很容易地用水稀释以快速并准确地制备根据本发明的石洗组合物，并且具有这些添加物所需的浓度。当配制水性浓缩物时，这些浓缩物能被稀释以达到如上指出的纤维素酶溶液中的组分所需的浓度。因此显而易见，这样的石洗浓缩物将使纤维素酶溶液易于配制，并且使此浓缩物易于运输到其所使用的地点。此石洗浓缩物可以采用本领域认可的任何形式，例如，液体、乳液、凝胶或糊剂。这样的形式为本领域的技术人员周知。

当采用固态石洗浓缩物时，纤维素酶组合物可为颗粒剂、粉末、团块或固体片。当使用颗粒剂时，颗粒剂优选地进行配制以含有纤维素酶保护剂。参见例如，美国系列号07/642, 669(在1991年1月17日提交，代理卷号No.010055-073，题目为“含有酶和酶保护剂的颗粒剂以及含有此颗粒剂的去污剂组合物”)，该申请在此完整引入作为参考。类似地，颗粒剂可以如此进行配制以使其含有能降低颗粒剂在清洗介质中的溶解速率的物质。美国专利号5, 254, 283公开了这样的物质和颗粒剂，在此完整引入作为参考。

其它物质也能按需要与本发明的石洗组合物合用或放置于其中，包括石头、浮石、填料、溶剂、酶激活剂和抗再沉积剂。

通过混合处理组合物与石洗组合物，使含纤维素的织物与含有效量纤维素酶的石洗组合物接触，因而将纤维素酶带到织物周围。随后，搅动含纤维素酶的水溶液和织物。如果处理组合物是水溶液，则可直接将织物浸于溶液中。相似地，在石洗组合物是浓缩物的情况下，浓缩物在有含纤维素的织物的水中被稀释。当石洗组合物为固体形式时，例如预洗凝胶或固体棒，可通过直接将组合物应用于织物或清洗液中使织物接触石洗组合物。随后，搅动含纤维素酶和织物的水溶液。



在有效地允许酶发挥作用以赋予含纤维素的织物石洗外观的条件下将含纤维素的织物与石洗组合物一起温育。例如，在石洗过程中，可将pH、液体比率、温度和反应时间调整到使石洗组合物起作用的最佳条件。“有效条件”指允许纤维素酶与含纤维素的织物进行有效反应的pH、液体比率和温度。本发明的石洗组合物的有效反应条件基本上类似于众所周知的现有技术中的纤维素酶组合物的使用方法。因此，利用本领域范围内的技术可以将使用根据本发明的石洗组合物的条件扩大到最大限度。

石洗中此处采用的液体比率，即石洗组合物溶液的重量（即，清洗液）与织物重量的比率，通常是足够获得所需的粗斜纹棉布织物石洗效果的量，并且取决于所采用工艺。优选地，液体比率从约4:1到约50:1；更优选地从5:1到约20:1；最优选地从约10:1到约15:1。

用本石洗组合物进行石洗过程中的反应温度由两个竞争因素支配。第一，较高的温度通常相应于反应动力学增强，即更快的反应，与较低反应温度下所需的反应时间相比它容许较少的反应时间。因此，反应温度通常是至少约10℃和更高。第二，纤维素酶是当超过给定反应温度时则失去活性的蛋白质，此温度依赖于所用纤维素酶的性质。因而，如果容许反应温度太高，纤维素酶变性的结果导致丧失了纤维素分解活性。

反应时间依赖于进行石洗的特定条件。例如，pH、温度和纤维素酶的浓度都将影响最佳反应时间。通常，反应时间是从约5分钟到约5小时，优选从约10分钟到约3小时，更优选从约20分钟到约1小时。

根据本发明另一优选实施方案，上述纤维素酶组合物可被用于去污剂组合物中。根据本发明的去污剂组合物可用作预洗组合物、预浸组合物或用于常规清洗或漂洗循环中的清洁。优选地，本发明的去污剂组合物包含有效量的纤维素酶、表面活性剂以及任选地包括下述的其它成分。

本发明去污剂组合物中采用的纤维素酶的有效量，是足够由纤维素酶赋予含纤维素的织物所需效果的量。优选地，去污剂组合物中采

用的纤维素酶浓度为去污剂的约10ppm到约20,000ppm。

优选地选择去污剂中采用的纤维素酶的浓度，是使其在清洗介质中稀释时，纤维素酶浓度在约0.01到约1000ppm总蛋白质的范围内，优选从约0.02ppm到约500ppm，最优选从约0.5ppm到约250ppm总蛋白质。去污剂组合物中采用的纤维素酶的量将依赖于去污剂加入到水中以形成清洗液的稀释程度。

本发明的去污剂组合物可采用本领域认可的任何形式，例如，液态稀释剂，颗粒剂、乳液、凝胶或糊剂。这样的形式为熟练技术人员周知。采用固态去污剂组合物时，纤维素酶优选配制成颗粒剂。优选地，配制此颗粒剂以使其另外含有纤维素酶保护剂。参见，例如，美国序列号07/642,669(在1991年1月17日提交，代理卷号010055-073，题目为“含有酶和酶保护剂的颗粒剂以及含有此颗粒剂的去污剂组合物”)，在此完整引入该申请作为参考。类似地，颗粒剂可以如此进行配制以使其含有能降低颗粒剂在清洗介质中的溶解速率的物质。美国专利号5,254,283公开了这样的物质和颗粒剂，在此完整引入作为参考。

本发明的去污剂组合物采用了表面激活剂，即表面活性剂，包括用于去污剂组合物中的众所周知的阴离子、非离子和两性表面活性剂。

用于本发明的去污剂中的合适的阴离子表面活性剂包括线性或分支的烷基苯磺酸盐；含线性或分支烷基基团或链烯基基团的烷基或链烯基硫酸酯；烷基或链烯基硫酸盐；烯属磺酸盐；和烷基磺酸盐等。阴离子的合适的配对离子包括碱性金属离子例如钠和钾；碱土金属离子例如钙和镁；铵离子；以及含1到3个碳原子数为2或3的烷醇基团的链烷醇胺。

两性表面活性剂包括季铵盐磺酸酯和甜菜碱型两性表面活性剂。这样的两性表面活性剂在同一分子中有正和负电荷基团。

非离子表面活性剂通常包含聚氧乙烯醚，以及高级脂肪酸烷醇酰胺或其氧化烯加成化合物、脂肪酸甘油单酯等。

在英国专利号2 094 826 A中公开了本发明中适用的表面活性剂，此处引入公开内容作为参考。

也可以采用这样的表面活性剂的混合物。

表面活性剂或表面活性剂的混合物通常用于本发明的去污剂组合物中，其用量从占总去污剂组合物的约1个重量百分比到约95个重量百分比，优选从占总去污剂组合物的约5个重量百分比到约45个重量百分比。

除纤维素酶组合物和表面活性剂之外，本发明的去污剂组合物可以任选地含有一种或多种下列组分：

除纤维素酶外的水解酶

合适的水解酶包括作用于酯键的羧酸酯水解酶、硫酯水解酶、磷酸单酯水解酶和磷酸二酯水解酶；作用于糖基化合物的葡萄糖苷水解酶；水解N-糖基化合物的酶；作用于醚键的硫醚水解酶；以及作用于肽键的 α -氨酰肽水解酶、肽酰基氨基酸水解酶、酰基氨基酸水解酶、二肽水解酶和肽酰基肽水解酶。它们中优选的有羧酸酯水解酶、葡萄糖苷水解酶和肽酰基肽水解酶。合适的水解酶包括（1）属于肽酰基肽水解酶的蛋白酶例如胃蛋白酶、胃蛋白酶B、肾素、胰蛋白酶、糜蛋白酶A、糜蛋白酶B、弹性蛋白酶、肠激酶、组织蛋白酶C、木瓜蛋白酶、木瓜凝乳蛋白酶、无花果蛋白酶、凝血酶、纤维蛋白溶酶、肾素、枯草杆菌蛋白酶、曲霉菌肽酶A、胶原酶、梭菌肽酶B、激肽释放酶、胃泌素、组织蛋白酶D、菠萝蛋白酶、角蛋白酶、糜蛋白酶C、胃蛋白酶C、曲霉菌肽酶B、尿激酶、羧肽酶A和B以及氨肽酶；（2）葡萄糖苷水解酶（从此组中排除了作为必需成分的纤维素酶） α -淀粉酶、 β -淀粉酶、葡糖淀粉酶、转化酶、溶菌酶、果胶酶、壳多糖酶和葡聚糖酶。它们中优选的是 α -淀粉酶和 β -淀粉酶。它们在酸性至中性体系中能发挥作用，但是获自细菌的一种水解酶在碱性体系中显示了高活性；（3）羧酸酯水解酶包括羧酸酯酶、脂肪酶、果胶酯酶和叶绿素酶。它们中特别有效的是脂肪酶。

根据目的所要求的尽可能将除纤维素酶以外的水解酶引入去污剂组合物中。以纯化蛋白质而言，应当优选的引入量为0.001到5个重量百分比，更优选为0.02到3个重量百分比。此酶应当以由粗品酶单独制成的或与其与去污剂组合物中的其它组分共同制成的颗粒的形式被使用。粗品酶颗粒以纯化酶占颗粒中0.001到50的重量百分比这样的量被使用。颗粒以0.002到20的重量百分比的量被使用，优选为0.1到10的重量百分比。和应用纤维素酶一样，这些颗粒可以如此进行配制以使其含有酶保护剂和溶解延缓剂物质。

阳离子表面活性剂和长链脂肪酸盐

该阳离子表面活性剂和长链脂肪酸盐包括饱和或不饱和脂肪酸盐、烷基或链烯基醚羧酸盐、 α -磺基脂肪酸盐或酯、氨基酸型表面活性剂、磷酸酯表面活性剂、包括含3到4个烷基取代基和被最多1个苯基取代的烷基取代基的季铵盐。在英国专利申请号2 094 826 A中公开了合适的阳离子表面活性剂和长链脂肪酸盐，在此引入其公开内容作为参考。组合物可含有从约1到约20的重量百分比的该阳离子表面活性剂和长链脂肪酸盐。

助洗剂

A. 二价螯合剂

此组合物可含有从约0到约50的重量百分比的一种或多种助洗剂组分，此组分选自下列化合物的碱性金属盐和烷醇胺盐：磷酸、膦酸、膦酰羧酸酯、氨基酸盐、氨基多乙酸盐高分子电解质、非解离聚合物、二羧酸盐和硅铝酸盐。在英国专利申请号2 094 826 A中公开了合适的二价螯合剂，在此引入其公开内容作为参考。

B. 碱性或无机电解质

此组合物可含有从约1到约50重量百分比的，优选从约5到约30重量百分比的，基于一或多种碱性金属盐成分的下列碱性或无机电解质

化合物：硅酸盐、碳酸盐和硫酸盐以及有机碱，例如三乙醇胺、二乙醇胺、单乙醇胺和三异丙醇胺。

抗再沉积剂

此组合物可含有从约0.1到约5重量百分比的一或多种下列抗再沉积剂化合物：聚乙二醇、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮和羧甲基纤维素。

在它们之中，羧甲基纤维素和/或聚乙二醇与本发明的纤维素酶组合物合用可提供一种特别有用的去垢组合物。

漂白剂

本发明的纤维素酶与漂白剂例如过碳酸钠、过硼酸钠、硫酸钠/过氧化氢加成化合物和氯化钠/过氧化氢加成化合物或/和光敏感漂白剂例如磺化酞菁染料的锌盐或铝盐一起使用，进一步提高去污效果。

上蓝剂和荧光染料

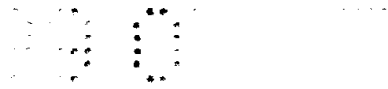
如果需要，可在组合物中引入各种上蓝剂和荧光染料。在英国专利申请号2 094 826 A中公开了合适的上蓝剂和荧光染料，此处引入其公开内容作为参考。

结块抑制剂

可在粉末去污剂中引入下列结块抑制剂：对甲苯磺酸盐、二甲苯磺酸盐、乙酸盐、硫代琥珀酸盐、滑石粉、磨成微细粉末的二氧化硅、粘土、硅酸钙（例如Johns Manville公司的MicroCell）、碳酸钙和氧化镁。

抑制纤维素酶活性因素的掩蔽剂

本发明的纤维素酶组合物在一些有铜、锌、铬、汞、铅、镁或银离子或它们的化合物存在的情况下失活。多种金属络合剂和金属沉淀剂有效地抵抗这些抑制剂。它们包括，例如上面关于可选择性添加物



项中列出的二价金属离子螯合剂以及硅酸镁和硫酸镁。

纤维二糖、葡萄糖和葡萄糖酸内酯有时起抑制剂作用。优选地尽可能避免这些糖类与纤维素酶共存。万一共存不可避免时，必须通过例如包被它们的方法来避免糖类与纤维素酶直接接触。

在一些情况下长链脂肪酸盐和阳离子表面活性剂起抑制剂作用。然而，如果通过一些方法例如制锭或包被来阻止它们的直接接触，那么这些物质与纤维素酶的共存是允许的。

如果需要，在本发明中可采用上述掩蔽剂和方法。

纤维素酶激活剂

激活剂依赖纤维素酶不同而不同。在有蛋白质、钴及其盐、镁及其盐以及钙及其盐、钾及其盐、钠及其盐或单糖例如甘露糖和木糖存在时，纤维素酶被激活并且它们的去污能力显著提高。

抗氧化剂

抗氧化剂包括，例如，叔丁基羟甲苯、4, 4'-亚丁基双(6-叔丁基-3-甲基酚)、2, 2'-亚丁基双(6-叔丁基-4-甲基酚)、单苯乙烯甲酚、二苯乙烯甲酚、单苯乙烯酚、二苯乙烯酚和1, 1-双(4-羟苯基)环己烷。

增溶剂

增溶剂包括，例如，低级醇例如乙醇、苯磺酸盐、低级烷基苯磺酸盐例如对甲苯磺酸盐、二元醇例如丙二醇、乙酰苯基磺酸盐、乙酰胺、吡啶二羧酸酰胺、苯甲酸盐和尿素。

本发明的去污剂组合物能被使用于从酸到碱性pH的宽pH范围内。在一优选实施方案中，本发明的去污剂组合物能被使用于有从pH 5以上到不超过约pH 11的微酸、中性或碱性去污剂清洗介质中。

除上面的成分以外，如果需要，香料、缓冲液、防腐剂、染料等能和本发明的去污剂组合物共用。这些组分常规地采用本领域中在此

以前使用的量。

当本发明中使用的去污剂基质为粉剂形式，它可以是通过任何已知的制备方法包括喷雾干燥法和制粒法来制备的。优选尤其通过喷雾干燥法、聚集法、干混合法或非塔路径法得到的去污剂基质。至于制备条件，通过喷雾干燥法得到的去污剂基质没有限制。通过喷雾干燥法得到的去污剂基质是通过将耐热成分例如表面活性剂和助洗剂的水浆喷进热空间而得到的中空颗粒。喷雾干燥后，可加入香料、酶、漂白剂、无机碱助洗剂。在基质制备后，各种成分也可与通过例如喷雾干燥制粒法或聚集法得到的高密度的颗粒状去污剂基质共同加入。

当去污剂基质为液体时，它可以是匀浆溶液或非匀浆分散剂。为了去除去污剂中纤维素酶对羧甲基纤维素的分解作用，期望羧甲基纤维素在引入组合物中之前被制成颗粒或被包被。

本发明的去污剂组合物在工业和家庭使用时可与含纤维素的织物，例如弄脏的织物在这些环境中常规采用的温度、反应时间和液体比率下共同温育。温育条件，即用根据本发明的去污剂组合物处理含纤维素的织物的有效条件，对本领域的技术人员很容易确定。因此，用该去污剂进行处理的合适的有效条件相应于使用类似的含已知纤维素酶的去污剂组合物时的那些条件。

如上所示，根据本发明的去污剂还可在中间pH下于合适的溶液中制成预洗剂，其存在足够的活性以提供所需的改善效果如软化、去球、阻止起球、去除表面纤维或清洁。当去污剂组合物是作为液体、喷雾、凝胶或糊剂组合物的预浸（例如，预洗或预处理）组合物时，通常采用占预浸或预处理组合物总重量的从约0.0001到约1重量百分比之纤维素酶。在这样的组合物中，可选择性地采用表面活性剂并且当其被采用时，通常以占预浸剂总重量的从约0.005到约20的重量百分比的浓度存在。组分的其它部分包括以其常规浓度用于预浸剂中的常规组分，即：稀释剂、缓冲液、其它酶（蛋白酶）等。

考虑后认为，此处描述的含纤维素酶的组合物能作为单独使用的适合于使褪色织物颜色复原的组合物用于家庭用途（参见，例如，美

国专利号4, 738, 682, 此处完整引入作为参考)以及用于斑点去除剂。

根据本发明的纤维素酶可以特别有效地用于饲料添加剂和纸浆和纸的加工。例如, PCT公开文本95/16360和芬兰授权专利号87372中分别描述了这些另外的工业应用。

为了进一步阐明本发明及其优点, 给出以下具体实施例以阐明本发明, 并且任何情况下其都不应当认为限制本发明的范围。

实施例

实施例1

EGV I 的生产和纯化

按照已知的生产缺失型菌株的方法, 经遗传操作得到不能产生CBH I、CBH II、EG I、EG II和EG III的长枝木霉属的菌株, 并在合适条件下发酵以诱导纤维素酶产生(参考如美国专利5, 328, 841、5, 472, 864和5, 475, 101中提供的方法)。经过下述两步柱进行纯化。

第一柱: Mono-Q柱(Pharmacia HR 5/5, 5 × 50毫米, 柱床体积1毫升)

缓冲液A: 10mM组氨酸, pH6.0

缓冲液B: 10mM组氨酸, pH6.0+1.0M氯化钠

流速: 1毫升/分钟

梯度: 在20分钟内0-40%缓冲液B

- 1、将5毫克/毫升蛋白质的UF浓缩物(1毫升)在用缓冲液A平衡的NAP-10柱(Pharmacia)上脱盐。终体积1.5毫升。
- 2、将全部样品(5毫克)加入用缓冲液A平衡的Mono-Q柱。
- 3、当有流出物被洗脱后, 启动梯度。
- 4、含EGV I的物质在约25%缓冲液B时被洗出, 将其收集。

第二柱: Mono-S柱(Pharmacia HR 5/5, 5 × 50毫米, 柱床体积1毫升)

缓冲液A: 10mM醋酸钠, pH5.0

缓冲液B: 10mM醋酸钠, pH5.0+1.0M氯化钠

流速: 1毫升/分钟

梯度： 在20分钟内0-40%缓冲液B

- 1、 Mono-Q柱的洗脱液在用缓冲液A平衡的PD-10柱(Pharmacia)上脱盐。终体积3.5毫升。
- 2、全部样品(约2毫克)加入用缓冲液A平衡的Mono-S柱。
- 3、当有流出物被洗脱后,启动梯度。EG VI在约15%缓冲液B时被洗出,将其收集。

实施例2

纯化的EGVI的性质

EG VI的比活力按下述在pH4、5、6、7、8和9于40℃、50℃和65℃下进行测定。加入5到20微升的酶溶液,其浓度足够提供在最终溶液中所需的酶量。将250微升2个重量百分比的RBB-CMC(Remazol Brilliant Blue R-羧甲基纤维素,可购自MegaZyme, 6Altona Place, North Rocks, N.S.W.2151, 澳大利亚)加入到0.05M柠檬酸/磷酸盐缓冲液中,pH为4、5、6、7、8和9。将组合物搅动并在40℃、50℃或60℃温育30分钟,然后在冰浴中冷却5-10分钟,加入1000微升含0.3M醋酸钠和0.02M的醋酸锌的乙醇,混合物离心,上清液倾入比色杯中。在590纳米处测量光密度。较高的光密度值对应于较高的酶活力水平。结果示于图3。

如图2中所示,EG VI在pH5, 65℃时表现出活力最佳值,而活力最高值是在较低pH和较低温度下,说明一般酸性pH最佳值是在pH4以下。

通过SDS-PAGE测得EG VI的分子量大约为100KD,从等电聚焦胶上估计等电点约为6.2。将RBB-CMC覆盖物置于等电聚焦胶上以证实纤维素水解酶活力的存在。结果示于图2。如图2所示,对应于EG VI的带清晰地显示出纤维素水解活力。

实施例3

测定EGVI的纤维素结合

通过将含EG VI的样品和固体纤维素底物温育一段给定的时间，并通过等电聚焦胶电泳分析上清液中EG VI的消失情况，来试验EG VI结合纤维素类化合物的能力。

含有EG VI的UF浓缩物通过首先在10mM醋酸钠缓冲液(pH5)中脱盐制成2.5毫克/毫升总蛋白的浓度。将1毫升酶溶液加入250毫克不同的纤维素样品。然后将这些样品混合1小时。然后将样品离心，收集上清液用于等电聚焦胶分析。通过EG VI带的消失所测得的样品中EG VI的缺失，暗示纤维素被EG VI结合。进行这种分析说明纤维素被EG VI和下列底物结合：Avicel(FMC pH-101型)和Sigma 50型、101型、101F型以及阿尔法纤维素(Cat#S-5504, S-6790, S-6195, C-8002)。因此结论是EG VI具有纤维素结合活力。

说明书附图



图1

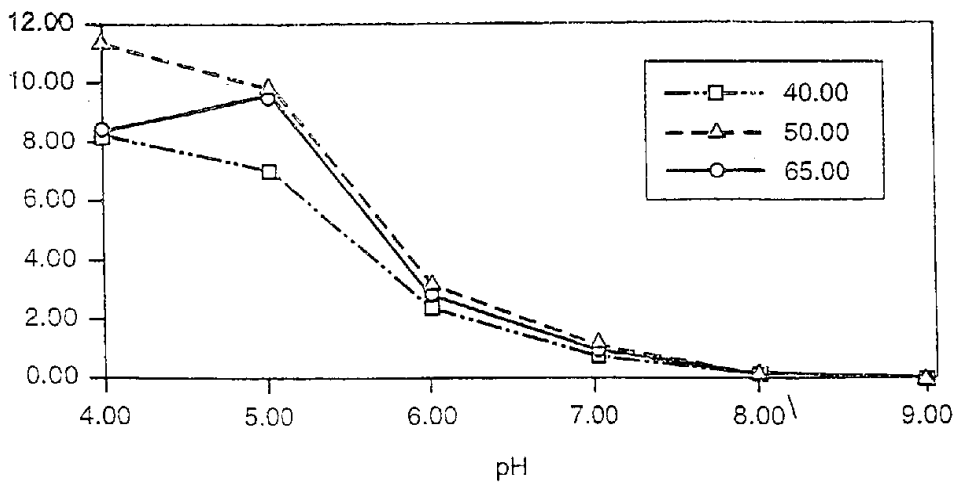


图3

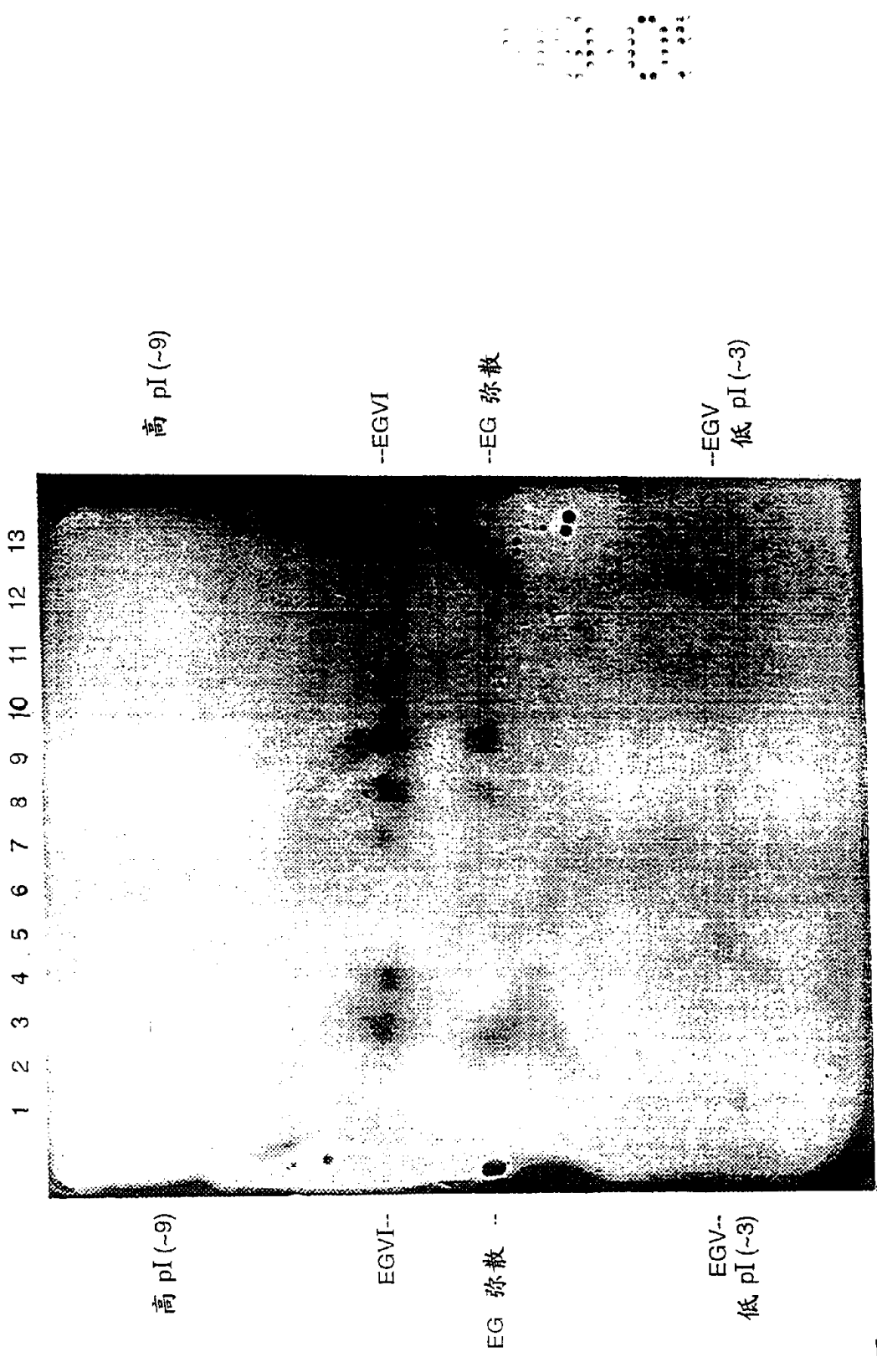


图2