

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5497440号  
(P5497440)

(45) 発行日 平成26年5月21日 (2014. 5. 21)

(24) 登録日 平成26年3月14日 (2014. 3. 14)

(51) Int. Cl. F I  
**C 1 1 D 3/386 (2006. 01)** C 1 1 D 3/386  
**C 1 1 D 7/42 (2006. 01)** C 1 1 D 7/42  
**C 1 1 D 17/08 (2006. 01)** C 1 1 D 17/08  
**C 1 2 N 9/96 (2006. 01)** C 1 2 N 9/96

請求項の数 13 (全 26 頁)

(21) 出願番号	特願2009-530902 (P2009-530902)	(73) 特許権者	500586299
(86) (22) 出願日	平成19年10月8日 (2007. 10. 8)		ノボザイムス アクティーゼルスカブ
(65) 公表番号	特表2010-505988 (P2010-505988A)		デンマーク国, デーコー 2 8 8 0 バグ
(43) 公表日	平成22年2月25日 (2010. 2. 25)		スバエルト, クロシェイバイ 3 6
(86) 国際出願番号	PCT/EP2007/060631	(74) 代理人	100099759
(87) 国際公開番号	W02008/040818		弁理士 青木 篤
(87) 国際公開日	平成20年4月10日 (2008. 4. 10)	(74) 代理人	100077517
審査請求日	平成22年10月8日 (2010. 10. 8)		弁理士 石田 敬
(31) 優先権主張番号	PA200601307	(74) 代理人	100087871
(32) 優先日	平成18年10月6日 (2006. 10. 6)		弁理士 福本 積
(33) 優先権主張国	デンマーク (DK)	(74) 代理人	100087413
			弁理士 古賀 哲次
		(74) 代理人	100117019
			弁理士 渡辺 陽一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 洗剤組成物及び当該組成物における酵素の組み合わせ使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

液体又はゲル洗剤組成物であって、サブチリシン K L (subtilisin KL) 又はその変異体と、少なくとも 1 の リパーゼ ; アミラーゼ ; セルラーゼ ; 又は マンナナーゼ との組み合わせを含んでなり、

リパーゼ、アミラーゼ、セルラーゼ又はマンナナーゼの含有量に対する、サブチリシン K L 又はその変異体の含有量の重量比が、0 . 0 0 1 から 1 0 0 である、前記組成物。

【請求項 2】

リパーゼ、アミラーゼ、セルラーゼ又はマンナナーゼの含有量に対する、サブチリシン K L 又はその変異体の含有量の重量比が、0 . 0 1 から 1 0 である、請求項 1 記載の洗剤組成物。

【請求項 3】

リパーゼ、アミラーゼ、セルラーゼ又はマンナナーゼの含有量に対する、サブチリシン K L 又はその変異体の含有量の重量比が、0 . 5 から 5 である、請求項 1 記載の洗剤組成物。

【請求項 4】

リパーゼ、アミラーゼ、セルラーゼ又はマンナナーゼの含有量に対する、サブチリシン K L 又はその変異体の含有量の重量比が、1 から 3 である、請求項 1 記載の洗剤組成物。

【請求項 5】

前記リパーゼが、フミコラ (Humicola) (サーモマイシス (Thermomyces) ) 由来の リ

10

20

パーゼ、シュードモナス (*Pseudomonas*) リパーゼ、バチルス (*Bacillus*) リパーゼ及びこれらの化学的変異体又はタンパク質設計された変異体からなる群から選択される、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項記載の洗剤組成物。

【請求項 6】

前記リパーゼが、*H. ラヌギノサ* (*H. lanuginosa*) (*T. ラヌギノサ* (*T. lanuginosa*)) 又は *H. インソレンス* (*H. insolens*) 由来のリパーゼ、*P. アルカリゲネス* (*P. alcaligenes*)、*P. シュードアルカリゲネス* (*P. pseudoalcaligenes*)、*P. セパシア* (*P. cepacia*)、*P. スツツツェリ* (*P. stutzeri*)、*P. フルオレセンス* (*P. fluorescens*)、*シュードモナス* 種 SD705 株又は *P. ウィスコンシンシス* (*P. wisconsinensis*) 由来のリパーゼ、*B. サブチリス* (*B. subtilis*)、*B. ステアロサーモフィルス* (*B. stearothermophilus*) 又は *B. プミルス* (*B. pumilus*) 由来のリパーゼ及びこれらの化学的変異体又はタンパク質設計された変異体からなる群から選択される、請求項 5 記載の洗剤組成物。

10

【請求項 7】

前記アミラーゼが、*バチルス* (*Bacillus*) 由来のアミラーゼを含んでなる群から選択される、請求項 1 から 6 のいずれか 1 項記載の洗剤組成物。

【請求項 8】

前記アミラーゼが、*B. リケニフォルミス* (*B. licheniformis*) 由来のアミラーゼを含んでなる群から選択される、請求項 7 記載の洗剤組成物。

【請求項 9】

前記セルラーゼが、*バチルス* (*Bacillus*) 属、*シュードモナス* (*Pseudomonas*) 属、*マイセリオフソラ* (*Myceliophthora*) 属、*フミコラ* (*Humicola*) 属、*フザリウム* (*Fusarium*) 属、*チエラビア* (*Thielavia*) 属、*アクレモニウム* (*Acremonium*) 属由来のセルラーゼを含んでなる群から選択される、請求項 1 から 8 のいずれか 1 項記載の洗剤組成物。

20

【請求項 10】

前記セルラーゼが、*フミコラインソレンス* (*Humicola insolens*)、*マイセリオフソラ* *サーモフィラ* (*Myceliophthora thermophila*) 及び *フザリウム* *オキシスポラム* (*Fusarium oxysporum*) 由来のセルラーゼを含んでなる群から選択される、請求項 9 記載の洗剤組成物。

【請求項 11】

*サブチリシン* *KL* 又はその変異体の含有量が 0.001 から 5 重量%であり、リパーゼ、アミラーゼ、セルラーゼ、又はマンナーゼが存在する場合は、各含有量が 0.001 から 5 重量%である、請求項 1 から 10 のいずれか 1 項記載の洗剤組成物。

30

【請求項 12】

*サブチリシン* *KL* 又はその変異体と、少なくとも 1 のリパーゼ、アミラーゼ、セルラーゼ又はマンナーゼとの組み合わせの使用であって、非プロテアーゼ酵素の安定性が向上した、液体又はゲル型の水性洗剤組成物の調製のための使用。

【請求項 13】

プロテアーゼと少なくとも 1 の非プロテアーゼ酵素を含んでなる液体又はゲル洗剤組成物において、プロテアーゼ酵素と他の酵素の組み合わせにおける、非プロテアーゼ酵素の安定性を向上させる方法であって、*サブチリシン* *KL* 又はその変異体をプロテアーゼ酵素として用いて液体又はゲル洗剤組成物を調製することを含んでなり、前記少なくとも 1 の非プロテアーゼ酵素が、リパーゼ、アミラーゼ、セルラーゼ又はマンナーゼから選択される、前記方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、特定の酵素の組み合わせを含んでなる、液体及びゲル状の水性洗剤組成物に関するものである。前記洗剤組成物はさらに、ホウ酸又は組成物中でホウ酸を形成できるホウ素化合物と、ポリヒドロキシ化合物、好適にはプロパンジオールと、プロテアーゼ酵素及び他の酵素の選択された組み合わせを安定化する比較的高レベルのカルシウムイオン

50

との組み合わせを含んでなるものであってもよい。本発明は、液体又はゲル状洗剤組成物における他の酵素とプロテアーゼ酵素の組み合わせにおいて、非プロテアーゼ酵素の安定性向上のための方法に関するものでもある。本発明はさらに特定のプロテアーゼ酵素及び洗剤組成物中でのそれらの使用に関するものである。

#### 【背景技術】

##### 【0002】

プロテアーゼは約50年間洗剤組成物に使用されており、当該プロテアーゼの多くが、この過去10年、多数のプロテアーゼ前駆体のタンパク質設計により発展してきた。

市場で成功した前駆体プロテアーゼのほとんどが、サブチリシン309（又はサビナーゼ（サビナーゼ）（登録商標））である。サビナーゼのタンパク質設計は1898年に国際公開第89/06279号において初めて公開された。その後、サビナーゼのタンパク質設計に関連する多数の特許出願が、出願人及び他の企業、例えばジェネンコア・インターナショナル社、プロクター・アンド・ギャンブル、ユニリーバ（Unilever NV）等により出願がなされてきた。また、サビナーゼ変異体も、ノボザイムス社（Novozymes A/S）及びジェネンコア・インターナショナル社により市販されてきた。

改変Y167A+R170S+A194Pを含んでなる特定のサビナーゼ変異体は、国際公開第98/20115号で開示された。本出願では、この変異体をサブチリシンKLと呼ぶ。

##### 【0003】

例えばプロテアーゼ等の酵素を含む液体及びゲル状水性洗剤組成物は当業界では周知である。当該組成物が直面する主要な問題は、組成物における酵素の十分な保存安定性を確保することである。プロテアーゼの存在下でアミラーゼを安定化させるのは特に困難であり、プロテアーゼは液体及びゲル状水性洗剤組成物においてアミラーゼを速やかに分解するが、さらに他の酵素、例えばリパーゼ、セルラーゼ等もプロテアーゼによりしばしば分解される。

##### 【0004】

例えばアルファアミラーゼ等の強アルカリ性アミラーゼは、英国特許第1,296,839号明細書（British Specification No.1,296,839）に記載されている。ホウ酸又はアルカリ金属ホウ酸塩と、カルシウムイオンとの、及び好適にはポリオールとの混合物を含んでなる、酵素安定化系の使用は、Seversonにより米国特許第4,537,706号に記載されている。洗浄及び汚れ除去を改善させる具体的なαアミラーゼは、Baeck等により国際公開第97/32961号で、並びに国際公開第96/23873号及び米国特許第6,093,562号で開示されている。

#### 【発明の概要】

##### 【0005】

本発明は、サブチリシンKL及び/又はその変異体と、少なくとも1の他の酵素、例えばプロテアーゼ、リパーゼ、クチナーゼ、アミラーゼ、カルボヒドラーゼ；セルラーゼ；ペクチナーゼ；ペクチン酸リアーゼ；ヘミセルラーゼ、例えばマンナーゼ、アラビナーゼ、ガラクタナーゼ、キシラナーゼ；オキシダーゼ、例えばラッカーゼ；及び/又はペルオキシダーゼとの組み合わせを含んでなる洗剤組成物に関するものである。

##### 【0006】

本発明の洗剤組成物において使用されるアミラーゼは、B.リケニフォルミス（B. licheniformis）由来のアミラーゼ及び他のアミラーゼであり、例えば国際公開第2001/066712号、国際公開第2006/002643号、国際公開第2000/60060号で開示されたものである。

##### 【0007】

本発明の洗剤組成物において使用されるセルラーゼは、例えば国際公開第1995/024471号、国際公開第91/17244号、国際公開第2002/099091号で開示されたものである。

##### 【0008】

本発明の洗剤組成物において使用されるリパーゼは、例えば国際公開第2000/060063号で開示されたものである。

##### 【0009】

本発明の洗剤組成物において使用されるマンナーゼは、例えば国際公開第99/64619号

10

20

30

40

50

の例えば配列番号 2 で開示されたものである。

【 0 0 1 0 】

本発明の洗剤組成物において使用されるエンドグルカナーゼは、例えば国際公開第91/17244号で開示されたものである。

【 0 0 1 1 】

本発明のサブチリシン K L 変異体は、例えば国際公開第98/20115号に示されており、また特に表 1 に示されるものである：

【表 1】

表 1

10

サブチリシンKLの変異体

なし

\*36D

P14T

N18K

N62D

V83L

A133P

E136Q

E136R

E136K

N140R

N140K

S141E

S141N

S141Y

20

30

## 【表 2】

S141R	
T143R	
T143K	
S153R	
S156R	
A160R	
S162R	10
S162K	
I165R	
I165K	
Y171R	
Y171K	
A172R	
A172K	
A174R	
N173R	20
N173K	
A174K	
N76D	
Y176R	
Y176K	
A187R	
A187K	
S188P	
S190P	
Q191R	30
Y192R	
Y192R	
Q191P	
Y192A	
Y192P	
D197N	
D197R	
D197E	
D197K	40
D197G	
A228V	

## 【表 3】

A230V	
T260R	
T260K	
G264R	
G264K	
S265T	
S265R	10
S265K	
N218S	
M222S	
M222A	
M222G	
M222T	
M222V	
M222S	
N243R	20
V244R	
N248R	
K251R	
N252R	
N261R	
組み合わせ	
S9R+A15T+T22A+N218S+K251R	
S9R+A15T+T22A+V84I+N218S	
V30I+V139L+N218S	
V84I+V139L+N218S	30
N76D+N218S	
N76D+A228V	
N76D+A230V	
N76D+N218S+A230V	
N76D+A228V+A230V	
N218S+R247Q	
N218S+R247H	
N218S+R247E	
N218S+R247K	40
D181N+N218S	
N218S+A230V	

## 【表 4】

K251R+S265K	
P14T+N18K	
T274H+R275H+*275aH+*275bH+*275cH+*275dH=	
T274H+R275HHHHH	
T274H+R275H+*275aH+*275bH+*275cH=T274H+R275HHHH	
S87N+S101G,V104N	
*36D+N76D+H120D+G195E+K235L	10
A133P+M222S	
挿入及びその組み合わせ	
*96aA	
*96aA+A98T	
*96aA+A133P	
*96aA+A98T+A133P	
*96aA+A98T+N218S	
*97aP+A98T+N218S	
*98aT,	20
*98aT+S99N+N218S	
G97D+*98aT+N218S	
*99aE=S99SE	
*99aD=S99SD	
*99aD+M222S=S99SD+M222S	
N76D+s99A+*99aE=N76D+S99AE	
N76D+*99aD+A230V=N76D+S99SD+A230V	
S99A+*99aD=S99AD	
S99A+*99aD+M222S=S99AD+M222S	30
S99A+*99aD+N218S=S99AD+N218S	
S99A+*99aE+A230V=S99AE+A230V	
A228V+A230V	
*130aL+P194A	

## 【 0 0 1 2 】

驚くべきことに、サブチリシン K L 及びその変異体は、液体洗剤組成物において使用される他の酵素、例えばリパーゼ、アミラーゼ、セルラーゼ、ペルオキシダーゼ / オキシダーゼ及びヘミセルラーゼとの適合性に優れていることを発見した。かかる特性は、サブチリシン K L 及びその変異体と組み合わせた前記酵素の残存活性を、他のプロテアーゼ存在下での残存活性と比較して、長期保存の後でさえ十分に向上させるという結果をもたらす。結局、その結果、洗剤組成物の機能が改善される。また酵素量を低減しても同様の結果をもたらし得る。

## 【発明を実施するための形態】

## 【 0 0 1 3 】

本発明に従って作成又は意図される、種々のサブチリシン K L 酵素変異体を説明する場合、参照を容易にするため以下の命名及び表記を適用する：参照の枠組みは、はじめに親酵素をサブチリシン B P N' ( B A S B P N ) と配列比較することにより定義する。

配列比較は、G C G パッケージ version 9.1 の G A P ルーティンにより、以下のパラメー

10

20

30

40

50

タを用い変異体に番号をつけることにより得られる。ギャップ生成ペナルティ (gap creation penalty) = 8 及びギャップ延長ペナルティ (gap extension penalty) = 8、並びに他のパラメータを初期値に保つ。

【0014】

他の方法は、サブチラーゼ間における既知の認識された配列、例えば国際公開第91/00345号で示された配列を用いる。ほとんどの場合、その違いは少しも重要ではないだろう。

従って、多くの欠失及び挿入はBASBP N (配列番号1) との関係で定義される。遺伝子操作によるポリペプチドに導入された改変の命名の詳細な説明については、国際公開第00/71691号、7-12ページを引用する。これは参照することにより本明細書に組み込まれる。

10

アミノ酸位置/残基の番号付け - 別途記載しない限り本明細書におけるアミノ酸番号づけは、サブチラーゼBP N' (BASBP N) 配列に対応する。さらなるBP N' 配列の説明は、Siezen等によるProtein Engng. 4 (1991) 719-737を参照されたい。

【0015】

「サビナーゼ (登録商標)」 - サビナーゼ (登録商標) は、ノボザイムス社により市販されている。これはB. レンタス (B. Lentus) 由来のサブチリシン309である。

【0016】

サブチリシンKL 変異体の改変 - 本明細書で使用される「(1又は2以上の) 改変」なる語は、サブチリシンKL をコードするDNAの化学修飾及び遺伝子操作を含むものと定義される。改変には、注目の(1又は2以上の) アミノ酸における側鎖の置換、(1又は2以上の) アミノ酸の置換、欠失、及び/又は挿入があり得る。

20

【0017】

サブチラーゼ変異体 - 本発明において、サブチラーゼ変異体又は変異導入サブチラーゼなる語は、親微生物由来の変異遺伝子を発現する生物により産生されたサブチラーゼを意味する。ここで親微生物とは、元の遺伝子又は親遺伝子を有し、対応する親酵素を産生したものを言う。前記親遺伝子は、適切な宿主で発現された場合に前記変異導入サブチラーゼプロテアーゼを産生する変異遺伝子を産生するよう変異導入される。

【0018】

相同サブチラーゼ配列 - 2つのアミノ酸配列間の相同性は、本明細書においてはパラメータの「同一性」で記載される。2つのサブチラーゼ間の同一度を決定するため、GCG パッケージ9.1版のGAPルーティンが、(以下) 同じ設定を用いて適用される。ルーティンからの出力は、アミノ酸配列比較の他に、2つの配列間の「同一性パーセント」の計算値である。本記載に基づき、当業者が適切な相同サブチラーゼを同定することは定型的な作業であり、かかる相同サブチラーゼは本発明に従って改変可能である。

30

【0019】

単離ポリヌクレオチド - 「単離 (isolated)」なる語をポリヌクレオチドに適用する場合は、当該ポリヌクレオチドは、その天然の遺伝的環境から取り出されたものであり、それ故、他の外来の又は不所望のコード配列がなく、また遺伝的に設計されたタンパク質産生系内での使用に適切な状態にあることを意味する。かかる単離分子は、天然の環境から隔離され、cDNA及びゲノムクローンを含むものである。本発明の単離DNA分子は、それらが通常関連する他の遺伝子はないが、例えばプロモーターやターミネーターなどの天然の5'及び3'の非翻訳領域を含んでもよい。関連領域の同定は当該分野における当業者にとって明らかであろう (例えば、Dynan及びTijan, Nature 316:774-78, 1985を参照されたい)。「単離ポリヌクレオチド」なる語は、「クローンポリヌクレオチド」なる語と言い換えてもよい。

40

【0020】

単離タンパク質 - タンパク質に適用した場合「単離 (isolated)」なる語は、かかるタンパク質がその本来の環境から取り出されたことを示す。好ましい状態としては、単離タンパク質は、実質的に他のタンパク質、特に他の相同タンパク質 (即ち、「相同不純物」 (下記参照)) がいない状態である。単離タンパク質は、SDS PAGEでの決定により

50



、10%超、好ましくは20%超、さらに好ましくは30%超の純度を有する。さらに高精製状態、すなわちSDS PAGEでの決定により40%超、60%超、80%超、さらに好ましくは95%超、最も好ましくは99%超の純度を有するタンパク質を提供することが好ましい。「単離タンパク質」なる語は、「精製タンパク質」なる語と言い換えてもよい。

【0021】

相同不純物 - 「相同不純物」なる語は任意の不純物（例えば、本発明のサブチラーゼでない他のポリペプチド）を意味し、それは本発明のサブチラーゼがもともと得られる（obtained from）同種細胞に由来するものである。

【0022】

得られる（obtained from） - 本明細書で特定の微生物源に関連して使用される「得られる（obtained from）」なる語は、ポリヌクレオチド及び/又はサブチラーゼが、特定の微生物源により、又は当該微生物源由来の遺伝子が挿入された細胞により作成されたことを意味する。

10

【0023】

基質 - 本明細書でプロテアーゼ用の基質に関連して使用される「基質」なる語は、その最も広い形態としてはサブチリシンプロテアーゼにより加水分解を受け易い、少なくとも1つのペプチド（アミド）結合を含む化合物を含んでなるものと解釈されるべきである。

【0024】

産物 - プロテアーゼ酵素反応に由来する産物に関連して使われる「産物」なる語は、本発明においては、サブチラーゼプロテアーゼを含む加水分解反応の産物を含むと解釈されるべきである。産物は続く加水分解反応の基質となってもよい。

20

【0025】

洗浄能力 - 本明細書中で「洗浄能力」は、例えば洗浄又は硬表面洗浄の間、洗浄する対象物に存在するタンパク又は有機物による汚れを除去する酵素の能力として使用する。

【0026】

本発明の洗剤組成物は、例えば、手洗濯又は機械洗濯用洗剤組成物として製剤されるものであり、例えばシミが付いた布の適切な事前処置用の洗濯添加組成物、及びリンス添加した布柔軟化組成物がある。又は一般的な家庭用硬表面洗浄操作に使用するための洗剤組成物として、又は手又は機械での食器洗い操作作用に製剤される。

【0027】

30

ある具体的な態様によれば、本発明は、本発明の酵素を含んでなる洗剤添加物を提供するものである。当該洗剤添加物及び洗浄組成物は、少なくとも1つの他の酵素、例えばプロテアーゼ、リパーゼ；クチナーゼ；アミラーゼ；カルボヒドラーゼ；セルラーゼ；ペクチナーゼ；ペクチン酸リアーゼ；ヘミセルラーゼ、例えばマンナーゼ、アラビナーゼ、ガラクタナーゼ、キシラナーゼ；オキシダーゼ、例えばラッカーゼ、及び/又はペルオキシダーゼを含んでなる。

【0028】

一般的に選ばれる酵素の特徴は、選択された洗剤と適合性がある（即ち、最適pHであり、他の酵素及び非酵素成分との適合性がある）べきで、当該酵素は有効量で存在すべきである。

40

【0029】

リパーゼ：適切なリパーゼは、細菌及び真菌起源のものがある。化学修飾又はタンパク質設計された変異（protein engineered mutants）が含まれる。有用なリパーゼの例は、フミコラ（Humicola）（サーモマイス（Thermomyces）と同義）、例えば国際公開第96/13580記載のH.インソレンス（H. insolens）由来、シュードモナスリパーゼ、例えばシュードモナス属SD705株（Pseudomonas sp. strain SD 705）（国際公開第96/13580号及び国際公開第96/27002号）、P.ウィスコンシンシス（P. wisconsinensis）（国際公開第96/12012号）、又は国際公開第2000/060063号記載のパチルスリパーゼが挙げられる。

【0030】

他の例はリパーゼ変異体で、例えば国際公開第92/05249号、国際公開第94/01541号、欧

50

州特許第407225号、欧州特許第260105号、国際公開第95/35381号、国際公開第96/00292号、国際公開第95/30744号、国際公開第94/25578号、国際公開第95/14783号、国際公開第95/22615号、国際公開第97/04079号、国際公開第97/07202号に記載されている。商業的に使用されるリパーゼ酵素、例えばLipolase（登録商標）、Lipolase Ultra（登録商標）、又はLipex（登録商標）（ノボザイムス社）が好ましい。

#### 【0031】

アミラーゼ：適切なアミラーゼ（及び/又は）には、細菌及び真菌起源のものがある。化学修飾又はタンパク質設計による変異が含まれる。アミラーゼは、例えば、パチルス（*Bacillus*）から得られる（obtained from）アミラーゼである。有用なアミラーゼの例としては、国際公開第94/02597号、国際公開第94/18314号、国際公開第96/23873号、国際公開第2000/60060、及び号国際公開第97/43424号に記載される変異体、特に以下の1又は複数の位置（position）における置換を伴う変異：15、23、105、106、124、128、133、154、156、181、188、190、197、202、208、209、243、264、304、305、391、408、及び444が挙げられる。商業的に使用されるアミラーゼはDuramyl（登録商標）、Termamyl（登録商標）、Stainzyme（登録商標）、Stainzyme Plus（登録商標）、Stainzyme ultra（登録商標）、Fungamyl（登録商標）、及びBAN（登録商標）（ノボザイムス社）、Rapidase（商標）、Purastar（商標）、及びPurastar OxAm（商標）（ジェネンコア・インターナショナル社）がある。

#### 【0032】

セルラーゼ：適切なセルラーゼは、細菌及び真菌起源のものがある。化学修飾又はタンパク質設計による変異が含まれる。セルラーゼは、例えば、パチルス（*Bacillus*）、シュードモナス（*Pseudomonas*）、フミコラ（*Humicola*）、チエラビア（*Thielavia*）、アクレモニウム（*Acremonium*）、例えば、フミコラインソレンス（*Humicola insolens*）、マイセリオフソラサーモフィラ（*Myceliophthora thermophila*）、及びフザリウムオキシスポラム（*Fusarium oxysporum*）から産生される。真菌セルラーゼは、米国特許第5,648,263号、米国特許第5,691,178号、米国特許第5,776,757号、及び国際公開第89/09259号で開示されている。特に適切なセルラーゼは、色保護及び白色保持の利点を有するアルカリ性又は中性のセルラーゼである。かかるセルラーゼの例としては、欧州特許第0 531 372号、国際公開第96/11262号、国際公開第96/29397号、国際公開第98/08940号記載のセルラーゼがある。他の例は、セルラーゼ変異体で、国際公開第94/07998号、欧州特許第0 531 315号、米国特許第5,457,046号、米国特許第5,686,593号、米国特許第5,763,254号、国際公開第95/24471号、国際公開第98/12307号、及びPCT/DK98/00299に記載されている。商業的に使用されるセルラーゼは、例えばRenozyme（登録商標）、Celluzyme（登録商標）、Celluclean（登録商標）、Endolase（登録商標）、及びCarezyme（登録商標）（ノボザイムス社）、Clazinase（商標）及びPuradax HA（商標）（ジェネンコア・インターナショナル社）、並びにKAC-500(B)（商標）（花王株式会社）がある。

#### 【0033】

ペルオキシダーゼ/オキシダーゼ：適切なペルオキシダーゼ/オキシダーゼは、植物、細菌、又は真菌起源のものがある。化学修飾又はタンパク質設計による変異が含まれる。有用なペルオキシダーゼの例としては、コプリナス（*Coprinus*）由来、例えばC.シネレウス及びそれらの変異体で、国際公開第93/24618号、国際公開第95/10602号、及び国際公開第98/15257号に記載のペルオキシダーゼがある。商業的に使用されるペルオキシダーゼは、Guardzyme（商標）（ノボザイムス社）がある。

#### 【0034】

ヘミセルラーゼ：適切なヘミセルラーゼは、細菌又は真菌起源のものがある。化学修飾又はタンパク質設計による変異が含まれる。適切なヘミセルラーゼは、マンナーゼ、リケナーゼ（lichenase）、キシラナーゼ、アラビナーゼ、ガラクタナーゼ、アセチルキシランエステラーゼ、グルコリニダーゼ（glucorunidase glucorinidase?）、フェルラ酸エステラーゼ、クマル酸エステラーゼ、及びアルビノフラノシダーゼで、国際公開第95/35362号に記載されている。適切なマンナーゼは、国際公開第99/64619号に記載されてい

10

20

30

40

50

る。商業的に使用されるヘミセルラーゼはMannaway（登録商標）（ノボザイムス社）がある。

【 0 0 3 5 】

洗剤組成物への（１又は２以上の）洗剤酵素の導入は、１又は複数の酵素を含有する個別の添加剤を添加することによって行ってもよく、又はこれら全ての酵素を含んでなる組み合わせの添加剤を添加することにより行ってもよい。本発明の洗剤組成物、即ち別々の添加剤又は組み合わせの添加剤は、例えばゲル、液体、スラリー等として製剤することができる。好ましい洗剤添加物の剤型は、液体で、特に安定化された液体又はスラリーである。

【 0 0 3 6 】

液体酵素調製物は、従来手法に従い、例えばポリオール、例えばプロピレングリコール、糖もしくは糖アルコール、乳酸、又はホウ酸の添加により安定化してもよい。保護された酵素は、欧州特許第238,216号に開示された手法に従い調製してもよい。

【 0 0 3 7 】

本発明の洗剤組成物は任意の従来形態、例えばペースト、ゲル、又は液体であってもよい。液体洗剤は水性、典型的には70%以下の水と0 - 30%の有機溶剤を含むものでも、非水性であってもよい。

【 0 0 3 8 】

洗剤組成物は１又は複数の界面活性剤を含んでなり、これは非イオン性（半極性を含む）及び／又はアニオン性及び／又はカチオン性及び／又は双性イオンであってもよい。典型的には、界面活性剤は重量で0.1%から60%のレベルで存在する。

【 0 0 3 9 】

前記組成物中に含まれる場合、洗剤は通常約１%から40%のアニオン性界面活性剤を含み、例としては、直鎖アルキルベンゼンスルホネート、アルファ - オレフィンスルホネート、アルキルスルフェート（脂肪アルコールスルフェート）、アルコールエトキシスルフェート、２級アルカンスルホネート、アルファ - スルホ脂肪酸メチルエステル、アルキルスクシン酸もしくはアルケニルスクシン酸、又はセッケンがある。

【 0 0 4 0 】

前記組成物中に含まれる場合、洗剤は通常約0.2%から40%の非イオン性界面活性剤を含み、例としては、アルコールエトキシレート、ノニルフェノールエトキシレート、アルキルポリグリコシド、アルキルジメチルアミノキシド、エトキシ化脂肪酸モノエタノールアミド、脂肪酸モノエタノールアミド、ポリヒドロキシアリル脂肪酸アミド、又はグルコサミンのN - アシルN - アルキル誘導体（「グルカミド」）がある。

【 0 0 4 1 】

洗剤は、0 - 65%の洗剤原料又は錯化剤を含んでいてもよく、例えばゼオライト、ジホスフェート、トリホスフェート、ホスホネート、カルボネート、シトレート、ニトリロトリ酢酸、エチレンジアミンテトラ酢酸、ジエチレントリアミンペンタ酢酸、アルキルスクシン酸もしくはアルケニルスクシン酸、可溶性シリケート、層状シリケート（例えば、Hoechst製のSKS-6）がある。

【 0 0 4 2 】

洗剤は、１又は複数のポリマーを含んでもよい。例としてはカルボキシメチルセルロース、ポリ（ビニルピロリドン）、ポリ（エチレングリコール）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリ（ビニルピリジン - N - オキシド）、ポリ（ビニルイミダゾール）、ポリカルボキシレート、例えばポリアクリレート、マレイン酸 / アクリル酸共重合体、及びラウリルメタクリレート / アクリル酸共重合体がある。

【 0 0 4 3 】

洗剤は漂白系を含んでもよく、H2O2源（例えば過ホウ酸塩又は過炭酸塩）と、過酸化状態の漂白活性剤（activator）（例えばテトラアセチルエチレンジアミン又はノナノイルオキシベンゼンスルホネート）との組み合わせを含んでもよい。あるいは、漂白系は、例えばアミド、イミド、又はスルホン型の過酸化酸（peroxyacid）を含んでもよい。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 4 】

本発明の洗剤組成物の酵素は、従来の安定化剤、例えばポリオール（例えばプロピレングリコール、ジエチレングリコール、メチルプロパンジオール、又はグリセロール）、糖もしくは糖アルコール、乳酸、ホウ酸、もしくはホウ酸誘導体（例えば芳香族ホウ酸エステル）、もしくはフェニルボロン酸誘導体（例えば4 - フォルミルフェニルボロン酸）又はモノエタノールアミンもしくはトリエタノールアミンを用いて安定化してもよい。また、当該組成物は、国際公開第92/19709号、国際公開第92/19708号、米国特許第5,972,873号又は欧州特許第0832174号に記載の通りに製剤されてもよい。

## 【 0 0 4 5 】

洗剤は、他の従来の洗剤成分を含んでもよく、例えば布仕上げ剤、例えばクレイ（clay）10）、発泡促進剤（foam booster）、泡立ち抑制剤、抗腐食剤、汚懸濁剤、抗汚沈降剤、染料、殺菌剤、蛍光増白剤、ヒドロトロップ（hydrotrope）、色褪せ防止剤、又は香料がある。

## 【 0 0 4 6 】

現在の考えとしては、洗剤組成物において、任意の酵素、特に本発明の酵素は、1 Lの洗浄水当たりの酵素タンパク質として0.01 ~ 100mg、好ましくは0.05 ~ 5 mg、特に0.1 ~ 1 mgに対応する量を添加してもよい。

## 【 0 0 4 7 】

地域及び地方の状況における違い、例えば水の硬度及び洗浄温度により、地域に応じた洗剤組成物が求められる。実施例1の洗剤は、種々の液体洗剤の組成物を提供ものである20。

## 【 0 0 4 8 】

原料と方法

酵素

以下の実施例においては、商業的に利用可能な酵素を使用する。Alcalase（登録商標）とサピナーゼ（登録商標）を比較標準として使用する。

【表 5】

名前	酵素タイプ	由来又は開示
アルカラゼ (登録商標)	プロテアーゼ、 サブチリシン カールスバーグ (subtilisin Carlsberg)	B. リケニフォルミス
サビナーゼ (登録商標)	プロテアーゼ、 サブチリシン 309	B. レンタス
ターマミル (登録商標)	アミラーゼ	B. リケニフォルミス
ノボザイム 342 (登録商標)		H. インソレンス
アミラーゼ A	アミラーゼ	アミラーゼ変異体 D183*+G184*+R118K+N195F+R458K WO 01/66712
マンナン A	マンナナーゼ	WO 99/64619
リパーゼ A	リパーゼ	T. ラノギノサスリパーゼ (T. lanuginosus lipase) の T231R+N233R変異体、 WO 00/60063
セルラーゼ A	セルラーゼ	H. インソレンス、 WO 91/17244

また、プロテアーゼとしてサブチリシン K L 及びその変異体を使用する。

サブチリシン K L はサビナーゼの Y167A+R170S+A194P 変異体 ( B P N ' 番号付けを使用 ) で  
ある。

#### 【 0 0 4 9 】

アッセイ

プロテアーゼ適合性：

酵素のプロテアーゼ適合性は、各実施例に指示される洗剤組成物の調製、及び当該実施例に指示される期間経過後の他の酵素の残存活性の測定から決定する。

酵素活性：

酵素活性は、周知の標準手法を用いて測定する。

#### 【 0 0 5 0 】

洗剤組成物

実施例において用いられる洗剤組成物は、以下に提示する組成物に従うモデル洗剤であるか、又は市販の液体洗濯洗剤のいずれかであり、商業用洗剤の例としては Tide、Era、Gain、Cheer、Wisk、All、Purex、Arm & Hammer、Sun、Great Value、Ariel、Persil、Total、Skip、Dash、Dixan、Ava、又は当該液体洗剤の任意の他のブランド拡充版もしくは用濃縮版が挙げられる。使用する市販の洗濯洗剤が酵素を含む場合は、使用前に 85 で 5 分間電子レンジにて当該洗剤を熱することで不活性化した。モデル洗剤組成物 A は洗剤実施例 1 である。

【表 6】

群	具体的成分名	含有量
界面活性剤		5-60%
	スルホネート	0-30%
	スルフェート	0-15%
	セッケン	0-15%
	非イオン性	0-15%
	カチオン性	0-15%
	アミノオキシド	0-10%
	FAGA	0-10%
溶媒		5-35%
	エタノール	0-10%
	MPG-モノプロピレングリコール	0-20%
	DEG-ジエチレングリコール	0-15%
	MPD-メチルプロパンジオール	0-15%
	MEA-モノエタノールアミン	0-10%
	TEA-トリエタノールアミン	0-10%
	SXS, SCS等のヒドロトロープス	
	クメンスルホン酸ナトリウム	
	キシレンスルホン酸ナトリウム	0-10%
原料	その他の溶媒	0-10%
		0-20%
	クエン酸Na	0-15%
	他の原料	0-15%
その他		0-20%
	ポリマー	0-5%
	酵素	0-10%
	ホウ酸及びその誘導体	0-5%
	泡立ち抑制剤	0-10%
	その他	0-10%

水添加で100%となるよう調整

## 【実施例 1】

## 【0051】

市販の洗濯用液体洗剤に市販のプロテアーゼ、アミラーゼ、リパーゼ、及びセルラーゼを以下の表に示す通りに添加した（洗剤が既に酵素を含む場合は、85℃以下で5分間電子レンジにて当該洗剤を加熱することでこれらを不活性化できる）。サブチリシンKLを市販のプロテアーゼと比較する場合は、同量の活性単位を使用した。

## 【0052】

30℃で1、2及び4週間保存後の残存酵素活性%で決定される酵素の安定性を表2～5に示す。

保存条件：閉鎖ガラス瓶において、30℃で1、2及び4週間

10

20

30

40

【表 7】

表 2 残存アミラーゼ活性

週	1	2	3	4
0.5% アルカラーゼ ウルトラ 2.5L 0.3% ターマミル 300L	93	92	89	87
サブチリシン KL 0.3% ターマミル 300L	96	98	95	92
0.5% アルカラーゼ ウルトラ 2.5L 0.3% アミラーゼ A 12L	34	16	10	7
サブチリシン KL 0.3% アミラーゼ A 12L	90	86	82	78

10

【表 8】

表 3 残存リパーゼ活性

週	1	2	3	4
0.5% アルカラーゼ ウルトラ 2.5L 0.3% リパーゼ A 100L	12	11	8	9
サブチリシン KL 0.3% リパーゼ A 100L	72	54	46	38

20

【表 9】

表 4 残存セルラーゼ活性

週	1	2	3	4
0.5% アルカラーゼ ウルトラ 2.5L 0.3% セルラーゼ A 5000L		85	76	68
サブチリシン KL 0.3% セルラーゼ A 5000L		99	87	88

30

【表 10】

表 5 残存プロテアーゼ活性

週	1	2	3	4
0.5% アルカラーゼ ウルトラ 2.5L 0.3% セルラーゼ A 5000L	86	64	57	50
サブチリシン KL 0.3% セルラーゼ A 5000L	84	74	65	56

40

【0053】

上に示される通り、サブチリシン K L がアルカラーゼ (Alcalase) 2.5 L の代わりのブ

50

ロテアーゼとして選択される場合、本発明の酵素適合性は明らかに改善している。サブチリシンKLがプロテアーゼである場合は、セルラーゼA 5000L、リパーゼA 100L、ターマミル(Termamyl) 300L及びアミラーゼA 12Lの30で1、2、3及び4週間後の酵素安定性は、明らかに向上している。サブチリシンKLプロテアーゼは参照プロテアーゼとして使用されるアルカラーゼ2.5Lとちょうど同じくらい安定である。

【実施例2】

【0054】

実施例1の洗濯用市販の液体洗剤に商業用プロテアーゼ、アミラーゼ、リパーゼ、及びセルラーゼを以下の表に示す通りに添加した(洗剤が既に酵素を含む場合は、85以下で5分間電子レンジにて当該洗剤を熱することでこれらを不活性化できる)。サブチリシンKLを商業用プロテアーゼと比較する場合は、同量の活性単位を使用した。

【0055】

30で1、2及び4週間保存後の残存酵素活性%で決定される酵素の安定性を表6～9に示す。

【表11】

表6 残存アミラーゼ活性

週	1	2	3	4
0.5% アルカラーゼ ウルトラ 2.5L				
0.3% ターマミル 300L	85	78	71	66
サブチリシン KL				
0.3% ターマミル 300L	93	87	83	73
0.5% アルカラーゼ ウルトラ 2.5L				
0.3% アミラーゼ A 12L	10	5	4	4
サブチリシン KL				
0.3% アミラーゼ A 12L	81	74	63	59

【表12】

表7 残存リパーゼ活性

週	1	2	3	4
0.5% アルカラーゼ ウルトラ 2.5L				
0.3% リパーゼ A 100L	9	8	5	6
サブチリシン KL				
0.3% リパーゼ A 100L	35	17	11	6



## 【表 1 3】

表 8 残存セルラーゼ活性

週	1	2	3	4
0.5% アルカラーゼ ウルトラ 2.5L				
0.3% セルラーゼ A 5000L	47	24	16	13
サブチリシン KL				
0.3% セルラーゼ A 5000L	67	66	55	55

10

## 【表 1 4】

表 9 残存プロテアーゼ活性

週	1	2	3	4
0.5% アルカラーゼ ウルトラ 2.5L	57	36	29	21
サブチリシン KL	55	36	24	16

20

## 【0 0 5 6】

上に示される通り、サブチリシン K L がアルカラーゼ (Alcalase) 2.5 L の代わりのプロテアーゼとして選択される場合、本発明の酵素適合性は明らかに改善している。サブチリシン K L がプロテアーゼである場合は、セルラーゼ A 5000 L、リパーゼ A 100 L、ターマミル (Termamyl) 300 L 及びアミラーゼ A 12 L の30 で1、2、3及び4週間後の酵素安定性は、明らかに向上している。サブチリシン K L プロテアーゼは参照プロテアーゼとして使用されるアルカラーゼ2.5 L とちょうど同じくらい安定である。

## 【実施例 3】

## 【0 0 5 7】

市販の洗濯用液体洗剤に市販のプロテアーゼ、アミラーゼ、及びリパーゼを以下の表に示す通りに添加した(洗剤が既に酵素を含む場合は、85 以下で5分間電子レンジにて当該洗剤を熱することでこれらを不活性化できる)。サブチリシン K L を市販のプロテアーゼと比較する場合は、同量の活性単位を使用した。

30

## 【0 0 5 8】

30 で1、2、4及び8週間保存後の残存酵素活性%で決定される酵素の安定性を表10～11に示す。

## 【表 1 5】

表10 残存アミラーゼ活性

週	1	2	3	4
0.4% アルカラーゼ 2.5L				
0.4% アミラーゼ A 12L	42	36	19	9
0.4% サビナーゼ 16L				
0.4% アミラーゼ A 12L	48	41	24	9
サブチリシン KL				
0.4% アミラーゼ A	77	73	63	42
0.4% アミラーゼ A 12L (プロテアーゼなし)	88	89	82	62

10

## 【表 1 6】

表11 残存リパーゼ活性

週	1	2
0.4% アルカラーゼ 2.5L		
0.4% リパーゼ A 100L	9	8
サブチリシン KL		
0.4% リパーゼ A 100L	33	22
0.4% リパーゼ A 100L (プロテアーゼなし)	86	81

20

## 【0059】

上に示される通り、サブチリシンKLがサビナーゼ 16L及びアルカラーゼ (Alcalase) 2.5Lの代わりのプロテアーゼとして選択される場合、本発明の酵素適合性は明らかに改善している。サブチリシンKLが好ましい酵素として選択される場合は、リパーゼ A 100L及びアミラーゼ A 12Lの、2及び8週後の酵素安定性は、顕著に向上している。

30

## 【実施例 4】

## 【0060】

表 1 3 に示す以下の組成での液体洗剤を調製する。

## 【表 17】

表13 洗剤製剤

具体的成分名	含有量
塩化カルシウム	0.1%
LAS - ナトリウム塩	11.81%
ダイズセバシン酸 - ナトリウム塩	5.94%
プロピレングリコール	5.05%
C - 13 - オキシアルコールエトキシレート, 8EO	9.45%
ホスホネート	1.00%
ココナッツセバシン酸 - トリエタノールアミン塩	6.50%
クエン酸ナトリウム	1.00%
エタノール	4.63%
乳白剤	0.12%
香料	0.35%
色素	-
水 (100%に調整)	

10

20

## 【表 18】

## 使用した酵素

プロテアーゼ：   サビナーゼ 16L  
                   アルカラーゼ 2.5L  
                   サブチリシン KL  
                   サブチリシン KL M222S  
                   サブチリシン KL \*36D  
                   サブチリシン KL N76D+S99SE+A230V  
                   サブチリシン KL S162R  
                   サブチリシン KL S99SE+N76D  
                   サブチリシン KL N76D  
                   サブチリシン KL A228V  
                   サブチリシン KL A230V  
                   サブチリシン KL A228V+A230V  
  
 リパーゼ：       リパーゼ A 100L  
 アミラーゼ：     ターマミル 300L  
 マンナーゼ：     マンナン A 4.0L

30

40

## 【表 19】

## 実験方法 I

酵素添加： I) サビナーゼ 16L (0.17mg EP/g)  
 II) サブチリシン KL (0.17mg EP/g)  
 III) アルカラーゼ 2.5L (0.17mg EP/g)  
 アミラーゼ： ターマミル 300L (0.4%)  
 プロテアーゼ量はグラム当たりの酵素タンパク質 (活性) で示す [EP/g].

10

## 【0061】

洗剤組成物は30 で2及び4週間、閉鎖ガラス瓶にて保存する。保存後の残存プロテアーゼ及びアミラーゼ活性を決定する。

## 【表 20】

表14 残存プロテアーゼ活性 (%)

週	2	4
0.17mg サビナーゼ 16L+ 0.4% ターマミル 300L	21	15
0.17mg アルカラーゼ 2.5L+ 0.4% ターマミル 300L	23	16
0.17mg サブチリシン KL+ 0.4% ターマミル 300L	16	10

20

## 【表 21】

表15 残存アミラーゼ活性 (%)

週	2	4
0.17mg サビナーゼ 16L+ 0.4% ターマミル 300L	90	92
0.17mg アルカラーゼ 2.5L+ 0.4% ターマミル 300L	94	95
0.17mg サブチリシン KL+ 0.4% ターマミル 300L	97	97

30

40

## 【表 2 2】

## 実験方法 II

酵素添加： I) サビナーゼ 16L (0.07mg EP/g)  
 II) サブチリシン KL (0.07mg EP/g)  
 III) アルカラーゼ 2.5L (0.07mg EP/g)  
 IV) サブチリシン 2.5KL M222S (0.07mg EP/g)  
 V) サブチリシン 2.5KL \*36D (0.07mg EP/g)  
 VI) サブチリシン KL N76D+S99SE, A230V

リパーゼ： リパーゼ A 100L (0.2%)  
 アミラーゼ： ターマミル 300L (0.2%)  
 マンナーゼ： マンナン A 4.0L (0.2%)

10

## 【0062】

洗剤組成物は30 で2及び4週間、閉鎖ガラス瓶にて保存する。保存後の残存プロテアーゼ、リパーゼ (Lip.)、マンナーゼ (Man.) 及びアミラーゼ (Ter.) 活性を決定する。

## 【表 2 3】

20

表16 残存プロテアーゼ活性 (%)

週	2	4
0.07mg サビナーゼ 16L 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	21	13
0.07mg アルカラーゼ 2.5L 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	24	22
0.07mg サブチリシン KL 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	18	13
0.07mg サブチリシン KL M222S 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	50	50
0.07mg サブチリシン KL *36D 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	59	19
0.07mg サブチリシン KL N76D+S99SE+A230V 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	84	77

30

【表 2 4】

表17 残存アミラーゼ活性 (%)

週	2	4
0.07mg サビナーゼ 16L 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	97	96
0.07mg アルカラーゼ 2.5L 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	87	89
0.07mg サブチリシン KL 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	97	97
0.07mg サブチリシン KL M222S 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	98	101
0.07mg サブチリシン KL '36D 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	97	98
0.07mg サブチリシン KL N76D+S99SE+A230V 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	98	98

10

【表 2 5】

20

表18 残存リパーゼ活性 (%)

週	2	4
0.07mg サビナーゼ 16L 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	5	5
0.07mg アルカラーゼ 2.5L 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	5	5
0.07mg サブチリシン KL 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	4	4
0.07mg サブチリシン KL M222S 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	20	15
0.07mg サブチリシン KL '36D 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	6	6
0.07mg サブチリシン KL N76D+S99SE+A230V 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	22	17

30

## 【表 2 6】

表19 残存マンナナーゼ活性 (%)

週	2	4
0.07mg サビナーゼ 16L 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	38	25
0.07mg アルカラーゼ 2.5L 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	14	13
0.07mg サブチリシン KL 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	62	48
0.07mg サブチリシン KL M222S 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	89	84
0.07mg サブチリシン KL '36D 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	63	54
0.07mg サブチリシン KL N76D+S99SE+A230V 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	99	95

10

## 【表 2 7】

20

## 実験方法 III

酵素添加：

- I) サビナーゼ 16L (0.05mg EP/g det.)
- II) サブチリシン KL (0.05mg EP/g det.)
- III) アルカラーゼ 2.5L (0.05mg EP/g det.)
- VII) サブチリシン 2.5KL S162R (0.05mg EP/g det.)
- VIII) サブチリシン KL S99SE+N76D (0.05mg EP/g det.)
- IX) サブチリシン KL N76D (0.05mg EP/g det.)
- X) サブチリシン KL A228V (0.05mg EP/g det.)
- XI) サブチリシン KL A230V (0.05mg EP/g det.)
- XII) サブチリシン KL A228V, A230V (0.05mg EP/g det.)

30

EP ≡ 酵素タンパク質  
det ≡ 洗剤

リパーゼ： リパーゼ A 100L (0.2%)  
 アミラーゼ： ターミル 300L (0.2%)  
 マンナーゼ： マンナン A 4.0L (0.2%)

40

## 【0063】

洗剤組成物は30 で1、2及び3週間、閉鎖ガラス瓶にて保存する。保存後の残存プロテアーゼ、リパーゼ (Lip.)、マンナーゼ (Man.) 及びアミラーゼ (Ter.) 活性を決定する。

【表 2 8】

表20 残存プロテアーゼ活性 (%)

週	1	2	3
0.05mg サビナーゼ 16L 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	89	20	12
0.05mg アルカラーゼ 2.5L 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	85	37	37
0.05mg サブチリシン KL 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	70	17	17
0.05mg サブチリシン KL S162R 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	45	12	12
0.05mg サブチリシン KL S99SE+N76D 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	100	75	77
0.05mg サブチリシン KL N76D 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	94	95	89
0.05mg サブチリシン KL A228V 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	85	83	78
0.05mg サブチリシン KL A230V 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	99	87	80
0.05mg サブチリシン KL A228V+A230V 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	100	98	89

【表 2 9】

表21 残存アミラーゼ活性 (%)

週	1	2	3
0.05mg サビナーゼ 16L 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	100	98	96
0.05mg アルカラーゼ 2.5L 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	100	96	97
0.05mg サブチリシン KL 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	100	98	97
0.05mg サブチリシン KL S162R 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	99	97	97
0.05mg サブチリシン KL S99SE+N76D 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	99	98	98
0.05mg サブチリシン KL N76D 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	100	100	100
0.05mg サブチリシン KL A228V 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	100	100	100
0.05mg サブチリシン KL A230V 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	100	100	100
0.05mg サブチリシン KL A228V+A230V 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	100	100	100



【表 3 0】

表22 残存リパーゼ活性 (%)

週	1	2	3
0.05mg サビナーゼ 16L 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	30	5	5
0.05mg アルカラーゼ 2.5L 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	10	6	6
0.05mg サブチリシン KL 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	59	8	5
0.05mg サブチリシン KL S162R 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	82	14	6
0.05mg サブチリシン KL S99SE+N76D 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	81	15	20
0.05mg サブチリシン KL N76D 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	49	49	57
0.05mg サブチリシン KL A228V 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	53	52	47
0.05mg サブチリシン KL A230V 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	65	59	52
0.05mg サブチリシン KL A228V+A230V 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	61	55	48

10

20

【表 3 1】

表23 残存マンナーゼ活性 (%)

週	1	2	3
0.05mg サビナーゼ 16L 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	93	44	27
0.05mg アルカラーゼ 2.5L 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	81	29	24
0.05mg サブチリシン KL 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	98	71	58
0.05mg サブチリシン KL S162R 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	105	77	73
0.05mg サブチリシン KL S99SE+N76D 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	98	98	100
0.05mg サブチリシン KL N76D 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	89	96	90
0.05mg サブチリシン KL A228V 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	95	96	92
0.05mg サブチリシン KL A230V 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	107	90	89
0.05mg サブチリシン KL A228V+A230V 0.2% Ter., 0.2% Lip. 及び0.2% Man.	97	88	74

30

40

---

 フロントページの続き

- (74)代理人 100108903  
弁理士 中村 和広
- (74)代理人 100141977  
弁理士 中島 勝
- (72)発明者 ミケルセン, ミカエル  
デンマーク国, デーコー - 2 7 6 5 スメルム, バルムエヘーベン 4 4
- (72)発明者 リュオム, ニエルス ムンク  
デンマーク国, デーコー - 2 9 2 0 シャルロットテルン, ヨハンネバイ 2 7 エステー .
- (72)発明者 ラデフォゲド, クラウス  
デンマーク国, デーコー - 2 9 7 0 ヘルスホルム, フルエアヘイ 2 9
- (72)発明者 フリース - イェンセン, サンドラ  
デンマーク国, デーコー - 2 9 2 0 シャルロットテルン, 4 . テーホー . , オルドルブバイ 9  
8 デー

審査官 古妻 泰一

- (56)参考文献 特開 2 0 0 2 - 2 7 2 4 8 8 ( J P , A )  
特表 2 0 0 2 - 5 1 0 1 9 1 ( J P , A )  
特開平 0 5 - 1 4 0 5 8 8 ( J P , A )  
特開 2 0 0 2 - 3 1 5 5 9 1 ( J P , A )  
特開 2 0 0 3 - 2 8 9 8 9 1 ( J P , A )  
特表平 1 1 - 5 0 5 2 7 5 ( J P , A )  
特表 2 0 0 6 - 5 2 4 9 9 8 ( J P , A )  
特表 2 0 0 6 - 5 0 5 2 8 5 ( J P , A )  
特表 2 0 0 2 - 5 0 8 9 2 6 ( J P , A )

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C 1 1 D 3 / 3 8 6  
C 1 1 D 7 / 4 2  
C 1 1 D 1 7 / 0 8  
C 1 2 N 9 / 9 6