[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl[6]
C11D 3/386

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 96191382.7

[43]公开日 1997 年 12 月 17 日

[11] 公开号 CN 1168155A

[22]申请日 96.1.9

[30]优先权

[32]95.1.9 [33]DK[31]0025/95

[86]国际申请 PCT/DK96/00005 96.1.9

[87]国际公布 WO96/21716 英 96.7.18

[85]进入国家阶段日期 97.7.9

[71]申请人 诺沃挪第克公司

地址 丹麦巴格斯瓦德

[72]发明人 M·利克 O·希蒙森

[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 张 闽

权利要求书 1 页 说明书 30 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 液体酶组合物的稳定化

[57]摘要

一种液体含酶组合物，它极适于随后掺入诸如洗衣或洗碟用液体洗涤组合物的多成分组合物中，其包括：(i) 一种用量超过 40μm 的酶；和 (ii) 这种酶的一种可逆抑制剂，其用量能有效提高该酶在多成分组合物中的贮存稳定性，所述液体组合物随后就是被掺入该多成分组合物中。

权 利 要 求 书

1. 一种液体组合物，含有:

(i) 一种含量超过 40μM 的酶；和

(ii) 上述酶的一种可逆抑制剂，其用量能有效提高随后加入这种液体组合物的多成分组合物中所述酶的贮存稳定性。

2. 如权利要求 1 的组合物，其中，所述酶的用量为 500μM - 5mM。

3. 如权利要求 1 或 2 的组合物，其中，所述抑制剂与所述酶的摩尔比至少为 5。

4. 如权利要求 1 - 3 中任一项的组合物，其中，所述$[I]_t/K_i$（如本文所定义的）比至少为 50。

5. 如权利要求 4 的组合物，其中$[I]_t/K_i$之比在 250 - 5000 范围内。

6. 如上述权利要求中任一项的组合物，其中，所述酶选自蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶、脂肪酶和氧化还原酶。

7. 如上述权利要求中任一项的组合物，其中，所述酶是蛋白酶。

8. 如权利要求 7 的组合物，其中，所述抑制剂选自一取代含硼酸、二取代含硼酸及其盐。

9. 一种用于制备一种含酶和酶抑制剂的洗涤组合物的方法，其中，将权利要求 1 - 8 中任一项所述的液体组合物与该洗涤组合物的其余成分混合。

10. 如权利要求 9 的方法，其中，所述洗涤组合物是一种液体组合物。

11. 一种用权利要求 9 或 10 的方法制备的洗涤组合物。

12. 将权利要求 1 - 8 中任一项的液体组合物用于生产洗衣用或洗碟用洗涤组合物的用途。

13. 如权利要求 12 的用途，用于生产一种液体洗涤组合物。

说　　明　　书

液体酶组合物的稳定化

本发明特别涉及液体酶组合物，其含有(i)一种或几种从较高到极高浓度的酶，和(ii)一种或几种合适的酶抑制剂，特别是可逆抑制剂，该抑制剂具有很强的酶抑制特性和/或以能引起强的酶抑制作用的浓度存在。

本发明还涉及:

一种含酶的多成分组合物，例如，以本发明的由抑制剂稳定的液体酶组合物为酶源制备的诸如洗涤组合物之类的清洗组合物的液体组合物;

一种制备诸如清洗组合物，如洗涤组合物之类的含酶多成分组合物的方法，其中，所述的酶是以本发明的由抑制剂稳定的液体酶组合物的形式混入，即：当所述的酶被掺入所述多成分组合物中时，为一种由抑制剂稳定的组合物形式；和

一种通过后一种方法制备的诸如清洗组合物之类的多成分组合物，如洗涤组合物。

本发明还涉及将本发明的液体酶组合物用于制备或生产诸如清洁组合物的含酶多成分组合物的方法，如洗涤组合物。

就含酶的组合物来说，贮存稳定性问题是众所周知的问题。因此，举例来说，含酶液体洗涤剂，如含蛋白酶（肽酶）的液体洗涤剂的主要问题是在贮存期间确保保留适当的酶活性。为了寻找改善含酶组合物，如诸如液体洗涤剂之类的含酶组合物的贮存稳定性的方法，已付出了相当大的努力，例如，向含蛋白酶的组合物中添加蛋白酶抑制剂。

举例而言，该部分的其余内容主要涉及抑制蛋白酶，但这一原理同样可应用于其它类型的酶，如脂肪酶、淀粉酶、纤维素酶和氧化还原酶（如过氧化物酶和氧化酶），而且本发明的各方面并不局限于与用（可逆）蛋白酶抑制剂稳定蛋白酶有关的问题。

举例来说，已知硼酸和一取代含硼酸(boronic acid)能可逆地抑制蛋

白酶。在 Molecular & Cellular Biochemistry 51, 1983, pp. 5-32 中讨论了用含硼酸抑制丝氨酸蛋白酶、枯草蛋白酶的问题。

作为枯草蛋白酶抑制剂，各种一取代含硼酸具有极不相同的能力。仅含有诸如甲基、丁基或 2 - 环己基乙基之类的烷基是不良抑制剂，以甲基含硼酸为最差抑制剂。然而，据报导，具有诸如苯基、4 - 甲氧基苯基或 3，5 - 二氯苯基之类的芳基的一取代含硼酸是极佳的抑制剂，其中，3，5 - 二氯苯基一取代含硼酸为特别有效的一种（参见 Keller 等，Biochem, Biophys. Res. Comm. 176, 1991, pp. 401-405）。

在 WO 92/19707 中还指出，在芳基上相对于硼的 3 - 位上被取代的芳基含硼酸是出人意料的良好可逆蛋白酶抑制剂。因此，例如，在以下的文献中提到的“乙酰氨基苯一取代含硼酸”是蛋白酶的特别有效的抑制剂。

在对可逆酶抑制剂的抑制效果进行定量时，通常把“抑制常数”(K_i)作为衡量抑制酶活性能力的指标，通常，K_i 的定义如下：

$K_i=[E] \cdot [I]/[EI]$

其中〔E〕、〔I〕和〔EI〕分别表示在所述条件下酶的平衡浓度（通常为摩尔浓度）、抑制剂平衡浓度和酶 - 抑制剂复合体平衡浓度。在本说明书及权利要求书中采用 K_i 的后一种定义。因此，较低的 K_i 值表示较有效的抑制剂。

在制备或生产多成分含酶组合物时，理想的是将预先制备的含有酶和适当（可逆的）酶抑制剂的酶组合物用作酶源。尤其常见和有利的是，预先制备的酶组合物中含有极高浓度的至少一种酶，以及可能含有上述类型的几种酶，因为这样一来，可使得大体积或大量的含酶多成分组合物能使用较小体积或较小量的预先制备的酶/抑制剂组合物来制备，而且还具有其它优点。

另外，如果能由以原始预先制备的酶/抑制剂组合物形式和掺入该组合物中的量的用量添加酶的抑制剂就能保证在成品多成分组合物的贮存期间所述酶具有令人满意的稳定性的话，显然是有利的，即：在该多成分组合物（例如，洗涤组合物）中不必含有其它稳定剂（不过，必要时也可加入其它稳定剂）。

而且，在这种预先制备的酶/抑制剂组合物中，在存在其抑制剂的条件下所述酶的稳定性预计很高。因此，预计这种类型的各种预先制备的组合物在生产出来以后能够贮存相当长的时间，而其酶促活性不会明显－或至少没有不可接受的损失。

因此，本发明涉及一种液体组合物，其包括：(i)一种用量超过 40μM 的酶；和（ ii ）一种可逆酶抑制剂，其用量为当该液体组合物随后被掺入一种多成分组合物（如洗涤组合物，象液体洗涤组合物）时能有效提高该酶的贮存稳定性。

举例来说，本发明的液体组合物可以主要是含水组合物，或主要是无水组合物（例如，含有高比例的一种或几种无水、但通常水可混溶的溶剂的组合物，该溶剂一般为有机液体，如醇或二醇等）。本发明的液体组合物本身通常是非洗涤组合物。

除洗涤组合物（如洗衣和洗碟用组合物）之外，与本发明内容相关的，液体组合物形式的其它类型含酶多成分组合物包括：用于清洗牙齿、隐形眼镜或硬表面（如屠宰场或食品加工厂）的组合物；用于皮革工业的组合物（如用于动物生皮的脱毛和/或脱脂）；用于织物退浆的组合物；和用于洗粗斜布织物以获得“石洗”外观的组合物。将这种组合物用于此类目的的用途属于本发明的保护范围。

酶

本发明说明书及权利要求书中所采用的酶分类号（ EC 号）符合国际生物化学和分子生物学委员会推荐的命名法(Recommendation (1992) of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Academic Press Inc., 1992).

本发明的液体组合物至少含有一种酶。适用的酶包括所有可商购的酶。特别相关的酶包括选自蛋白酶（即肽酶， EC3.4 ）、淀粉酶（分入 EC3.2.1 下）、脂肪酸（包括在 EC3.1.1.3 下面的酶）、纤维素酶（包括 EC3.2.1.4 ）和氧化还原酶（ EC1 ），如过氧化物酶（ EC1.11 ）和氧化酶〔包括 EC1.10.3 下面的酶，如漆酶（ EC1.10.3.2 ）〕的酶，以及上述酶的任意组合物。还包括来自同一分类的酶的混合物（如不同蛋白酶，不同脂肪酶的混合物等）。

液体组合物中酶的量因酶的类型和该液体组合物将来的用途而异。一般，所具有的所有酶的用量都以占液体组合物重量0.2-50 %（ W/W ）为宜（基于纯酶蛋白计算而来），通常为0.5-25 % W/W，如1 - 10 % W/W，例如，占液体组合物的2 - 8 % （ W/W ）。以浓度单位表示，本发明液体组合物中酶的优选浓度范围为约50μM - 约20mM，通常为100μM - 10mM，如500μM - 5mM，例如，750μM - 3mM（以纯酶蛋白的摩尔数计）。

蛋白酶。任何适用于液体组合物中的蛋白酶（蛋白水解酶）均可采用。合适的蛋白酶包括源于动物、植物或微生物的蛋白酶，特别是源于微生物的及化学生产的或蛋白质工程（遗传工程）的突变体（变型），相对这种类型的一种酶的氨基酸序列而言，该突变型中有一个或几个氨基酸被置换，插入和/或缺失，而且具有蛋白水解活性。例如，该蛋白酶可以是丝氨酸肽酶，优选为碱性微生物蛋白酶或类胰蛋白酶。碱性蛋白酶的例子为枯草蛋白酶，特别是源于芽胞杆菌属(Bacillus)的枯草蛋白酶，如枯草蛋白酶Novo、枯草蛋白酶Carlsberg、枯草蛋白酶309、枯草蛋白酶147和枯草蛋白酶168（披露于WO 89/06279中）。商品化芽胞杆菌属枯草蛋白酶的例子有Alcalase™、Savinase™、Esperase™和Durazym™制品，均可自Novo Nordisk A/S购买。若干上述蛋白酶制品如Alcalase™、Esperase™和Savinase™可以液体形式提供（如，Savinase™ 16.0L, Type DX和Type EX），这种形式极适合（见下文）于制备本发明的含蛋白酶液体组合物。

类胰蛋白酶蛋白酶的例子包括胰蛋白酶（如来源于猪或牛的胰蛋白酶）和披露于WO 89/06270中的链孢霉属(Fusarium)蛋白酶。

淀粉酶。任何适用于液体组合物的淀粉酶（淀粉分解酶）均可采用。合适的淀粉酶包括源于细菌和真菌的淀粉酶，以及化学方法生产的或蛋白质工程（遗传工程）的突变体（变型），与这种类型的一种酶的氨基酸序列相比，所述变型中有一个或几个氨基酸被置换、插入和/或缺失，而且具有淀粉分解活性。例如，淀粉酶包括α - 淀粉酶（ EC 3.2.1.1 ），如由地衣型芽胞杆菌(B. Licheniformis)的一个株中获得的α - 淀粉酶，详见英国专利说明书 No. 1,296,839 。一种极为合适的α - 淀粉酶是

Termamyl™，这种酶（尤其是液体产品）可购自 Novo Nordisk A/S。

脂肪酶。任何适用于液体组合物的脂肪酶均可采用。合适的脂肪酶包括源于细菌和真菌的脂肪酶，以及通过化学方法生产的或蛋白质工程（遗传工程）的突变体（变型），相对这种类型的一种酶的氨基酸序列而言，该突变体中有一个或几个氨基酸被置换、插入和/或缺失。一种极为适用的脂肪酶是通过克隆源于疏棉状腐质霉(Humicola lanuginosa)的基因，并在米曲霉(Aspergillus oryzae)中表达该基因而获得的，如在 EP 0 258 068 中所述，这种酶（特别是液体产品）可自 Novo Nordisk A/S 获得，商品名为 Lipolase™。

纤维素酶。任何适用于液体组合物的纤维素酶（纤维素分解酶）均可采用。合适的纤维素酶包括源于细菌和真菌的纤维素酶，以及化学方法生产的或蛋白质工程（遗传工程）的突变体（变型），相对这种类型的一种酶的氨基酸序列而言，所述突变体中的一个或几个氨基酸被置换、插入和/或缺失，而且具有纤维素分解活性。例如，合适的纤维素酶披露于 US 4，435,307 中。一种极为合适的纤维素酶是由 Humicola insolens 的一个菌株产生，可自 Novo Nordisk A/S 购买，其商品名为 Celluzyme™。

过氧化物酶。任何适用于液体组合物，如液体洗涤组合物的过氧化物酶均可采用。在此，合适的过氧化物酶包括源于植物、细菌和真菌的过氧化物酶，以及化学方法生产的或蛋白质工程（遗传工程）的突变体（变型），相对这种类型的一种酶的氨基酸序列而言，所述突变体中有一个或几个氨基酸被置换、插入和/或缺失，并具有过氧化物酶活性。合适的过氧化物酶的例子为源于鬼伞属(Coprinus)（如灰盖鬼伞(C. cinerius)或长根鬼伞(C. macrorhizus)）的一个菌株或源于芽胞杆菌属（短小芽胞杆菌（ B. pumilus ））的一个菌株的过氧化物酶，特别是如 PCT/DK 90/00260 所述的一种过氧化物酶。

氧化酶。任何适用于液体组合物，如液体洗涤组合物的氧化酶均可采用。这里，合适的氧化酶包括源于细菌和真菌的氧化酶，以及用化学方法生产的或蛋白质工程（遗传工程）的突变体（变型），相对这种类型的一种酶的氨基酸序列而言，所述突变体上的一个或几个氨基酸被置

换、插入和/或缺失，而且具有氧化酶活性。合适的氧化酶的例子为源于曲霉属、脉孢霉属（如粗糙脉孢霉(Neurospore crassa)）、栓菌属（如绒毛状栓菌(Trametes villosa)）或毁丝霉属(Myceliophthora)（如嗜热毁丝霉(M. thermophila)）的漆酶。

酶抑制剂（酶稳定剂）

本发明的液体组合物至少含有一种可逆酶抑制剂，通常，这种抑制剂至少是存在于液体组合物中的一种酶的抑制剂。因此，举例来说，本发明的液体组合物除含有一种第一种类型的酶和这种酶的可逆抑制剂之外，还含有第二、第三种…等类型的酶（如上述类型的酶中的一种），其中的一种或几种并不伴随有其相应的可逆抑制剂。

在此应当指出的是，要制备一种含有一种或几种酶的液体酶组合物是完全可行的，其用量如本文所述，但该组合物不是含有上述一种或几种酶的抑制剂，而是含有另一种类型的酶的抑制剂，该液体组合物随后将接触这种类型的酶。其例子之一是含有脂肪酶为唯一酶以及一种蛋白酶抑制剂的液体组合物；该蛋白酶抑制剂可保护所述脂肪酶免受随后将有意或无意间接触到的蛋白酶的降解。

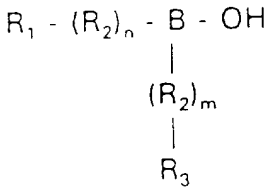
所用抑制剂的性质和用量尤其取决于存在于组合物中的酶的性质和浓度，并取决于设想的该组合物的用途。下面将对此作进一步说明。

关于可与本发明液体组合物中的各种类/型的酶一起使用的可逆抑制剂（及其相关的K_i值），可参考以下文献：H. Zollner，Handbook of Enzyme Inhibitors（A部分和B部分），第2版，VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim,德国，1993，其中列举了大量的抑制剂。其它相关文献包括：S. Patkar 和 F.Bjokling, Lipase inhibitors, 见：Lipases-their Structure, Biochemistry and Application, P. Woolley 和 S.B. Petersen 著，Cambridge University Press, Cambridge 1994。所选择的相关类型的可逆抑制剂的例子如下：

蛋白酶抑制剂。一种特别感兴趣的类型的可逆蛋白酶抑制剂由一取代含硼酸〔R′B（OH）$_2$〕和二取代含硼酸[R′R″B(OH)]组成（其中，R′和R″为有机取代基，如被选择性取代过的芳基或杂环取代基），其中的一些例子已在上文中提及。有关这一类型的化合物的其它例子可以选

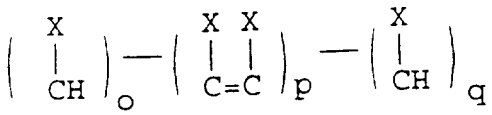
自在 WO 92/19707 、 EP0478050A1 和 EP0511 456A1 中提到过的化合物。

感兴趣的此类化合物可参见披露于 WO 95/02046（该专利在本申请的优先权日时尚未公开）中的化合物，而且包括下列通式的化合物：



其中， R_1 是一个选择性取代的稠合芳族环结构，在该环上含有 14 或 18 个碳原子；或一个选择性取代的单环或稠合芳族杂环结构，在该环上最多含有 17 个碳原子；或一个选择性取代的单环或稠合醌型环结构，在该环上最多含有 18 个碳原子；

R_2 的结构式为：



其中的 X 相同或不同，并选自氢、 C_1 - C_6 烷基、取代的 C_1 - C_6 烷基、芳基、取代芳基、羟基、羟基衍生物、卤素、胺、烷基化胺、胺的衍生物、硝基、硫羟基、硫羟基衍生物、醛、酸、酸式盐、酯、磺酸酯或磷酸酯，而 o 、 p 和 q 可以相同或不同，并可各自为 0 、 1 或 2 ； m 和 n 可以相同或不同，并可各自为 0 或 1 ； R_3 和 R_1 相同或不同，并可选自 R_1 ，或 R_3 是羟基，或 R_1 和 R_3 均为选择性取代的单环或二环芳族环结构。

在上文中，选择性地取代的环结构是这样的：环结构上的取代基可随意选择，但最好选自氢、 C_1 - C_6 烷基、取代的 C_1 - C_6 烷基、芳基、取代芳基、羟基、羟基衍生物、卤素、胺、烷基化胺、胺的衍生物、硝基、硫羟基、硫羟基衍生物、醛、酸、酸式盐、酯、磺酸酯和磷酸酯。

可以用本领域技术人员所熟知的方法制备一取代含硼酸和二取代含硼酸衍生物，例如，采用下述方法之一：

a) 以儿茶酚硼烷（1，3，2－benzodioxaborole）或二氯甲硼烷－二甲硫配合物为硼氢化反应剂对不饱和材料，即烯烃和炔烃进行的硼氢化反应；参见 H.C.Brown, S.K.Gupta, JACS 97, 1975, pp. 5249-5255 和 H.C. Brown, N. Ravindran, S.U. Kuikarni, J. Org. Chem. 45, (1980), p.384。

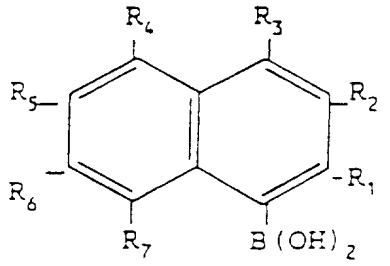
b) Grignard 试剂与硼酸三正丁酯或硼酸三甲酯反应，然后水解由此所产生的一取代含硼酸酯；参见 F.R.Bean, J.R.Johnson, Jaces 54, 1932, pp 4415-4425;和 S.H.Dandegaonher, S.P. Ingleshwar, Journal of Shivasi University 6, 1932, pp. 11-13。溴取代的原料不是商购的，可以用两个步骤方便地合成：用 $LiAlH_4$ 还原相应的羧酸，然后再用 CBr_4 处理。

c) 有机锂试剂与硼酸丁酯反应；参见 S.O. Lauessen, pp. 387-395,Thiophene Chemistry, Part 7; 和 D. Florentin, B. Roques, C.R. Acad. Sci. Paris, t. 270（1970 年 5 月 11 日），pp. 1608-1610。

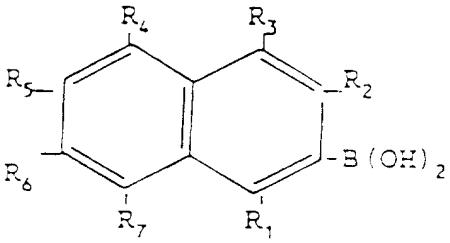
d) 按照上述 b 的方法制备二取代含硼酸衍生物，不同的是，所采用的 Grignard 试剂与硼酸酯的比例为 2：1。

e) 采用本领域技术人员所熟知的标准方法可获得环上取代或官能团的保护作用。

这种类型的其它感兴趣的化合物可选自披露于 WO 95/29223（在本申请的优先权日时尚未公开）中的萘一取代含硼酸，而且包括具有以下通式的化合物：



或



其中，R_1、R_2、R_3、R_4、R_5、R_6和R_7相同或不同，并且选自氢、C_1－C_6烷基、取代的C_1－C_6烷基、芳基、取代芳基、羟基、羟基衍生物、卤素、胺、烷基化胺、胺的衍生物、硝基、硫基、硫基衍生物、醛、酸、酸式盐、酯、磺酸酯和磷酸酯。

萘一取代含硼酸衍生物同样可用本领域技术人员所熟知的方法制备，例如，采用如下所述的 Grignard 制剂：

通过将溶于钠干燥的醚中的合适溴萘原料缓慢滴加到在钠干燥的醚中转动的镁中制备 Grignard 试剂。加入小碘结晶促进上述反应。

将溶于钠干燥的醚中的硼酸三甲酯或硼酸三正丁酯冷却至－ 70 ℃，用 2 小时时间将 Grignard 试剂滴加到上述溶液中，同时将该有机硼溶液保持在－ 70 ℃，并持续搅拌。让反应混合物回温至室温，过夜，同时通过滴加冷的稀硫酸进行水解。分离醚层，并用醚萃取水层。合并含醚的部分，除去溶剂。使残余物是强碱性，并除去由此所产生的一切甲醇或丁醇。将该碱性溶液冷却，并通过过滤除去所得到的目的一取代含硼酸结晶。最好将所有产物从蒸馏水中再结晶出来。

可以通过萘的直接锂化和/或溴化物的锂化制备萘一取代含硼酸。

任何环取代或官能团的保护均可用本领域技术人员所熟悉的方法实

现。

在上述类型的化合物中，本发明的内容所涉及的具体一取代含硼酸包括：苯并呋喃－2－一取代含硼酸；苯基一取代含硼酸；4－溴苯基一取代含硼酸；4－甲酰苯基一取代含硼酸；3－乙酰氨基苯基－一取代含硼酸；3，5－二氯苯基－一取代含硼酸；5－氯硫代苯－2－一取代含硼酸；萘－1－一取代含硼酸；萘－2－一取代含硼酸；和6－羟基萘－2－一取代含硼酸。在本文的例2中给出的表（见下文）中，列出了可用于本发明的，这种类型的其它具体化合物。

可以其酸的形式（如溶于适当的水混溶性有机溶剂中，如单丙二醇中），或者，必要的话（如由于可溶性的原因）以盐的形式（如碱金属盐，例如钠盐或钾盐），将一取代含硼酸或二取代含硼酸类型的抑制剂加入或掺入本发明的液体组合物中。

可逆淀粉酶抑制剂。可用于本发明的有关可逆淀粉酶抑制剂，可在被称为“阿卡波糖（ acarbose ）”型的化合物中寻找（即：含有一个acarviosine 部分和一个或几个麦芽糖单元的假寡糖）。作为抑制剂，特别是α－淀粉酶抑制剂的其它化合物包括麦芽糖和麦芽三糖。诸如甲基－α－葡糖苷及环化淀粉的其它化合物，如环己烷和/或环庚烷直链淀粉可用作β－淀粉酶的可逆抑制剂。

可逆纤维素酶抑制剂。可用于本发明的潜在可逆纤维素酶抑制剂包括4－巯基－纤维寡糖〔例如，参见C.Schou 等， Journal of Carbohydrate Chemistry 12(1993) pp. 743-752〕。

可逆脂肪酶抑制剂。可用于本发明的可逆脂肪酶抑制剂包括选自上述和/或下述的一取代含硼酸和二取代含硼酸（如选择性取代的苯基一取代含硼酸）。

酶抑制程度

存在于本发明液体组合物中的酶的理想抑制程度（强度、程度），除其它因素外还取决于该组合物将要应用的目的。一般，对可逆抑制剂与酶的摩尔比的选择是这样的：在相关酶的每个活性位点上至少有一个抑制剂分子，因此，理所当然地要求抑制剂（ I ）与酶（ E ）的摩尔比至少为1： 1。不过，为了某种目的，也可以采用较低的I： E摩尔比，

如约 0.8:1,约 0.7:1, 约 0.6:1, 甚至约 0.5:1。然而，在本发明中，通常要采用的抑制剂与酶的摩尔比至少为 5，如至少为 15。在某些场合，I:E 摩尔比可能至少为 50 或至少为 100，甚至采用更高的摩尔比。

抑制剂与酶的摩尔比可以选择，特别是考虑在基于本发明的液体组合物的多成分含酶组合物的实际应用中所需要的游离（未被抑制）酶的百分比。因此，举例来说，当把一种衣物洗涤组合物用于洗衣时，显然需要在洗涤介质（通常为加入了相关洗涤组合物的水）中有足够高含量的游离酶（如蛋白酶或脂肪酶）。

就此而言，一个重要的参数是一种酶的可逆抑制的抑制常数（定义如上文所述）。因此，举例来说，当本发明的液体组合物被用于洗涤组合物中时，一种酶的可逆抑制剂的抑制常数（K_i）在以常规方式 mol/l (M) 表示时，通常以 $3 \times 10^{-8}M \leq K_i \leq 1.2 \times 10^{-2}M$ 为宜，如 $3 \times 10^{-8}M \leq K_i \leq 1 \times 10^{-2}M$。不过，有关洗涤酶的更理想的“抑制窗(window of inhibition)”通常是这样的：与一种具体酶相关的抑制剂能产生相当于 $3 \times 10^{-7}M \leq K_i \leq 1 \times 10^{-3}M$ 的抑制度，如 $4.3 \times 10^{-7}M \leq K_i \leq 4.5 \times 10^{-4}M$。

通常，优选的本发明含酶液体组合物是这样的：

(a) 存在于该组合物中的可逆酶抑制剂 I 的总摩尔浓度（可表示为〔I〕$_t$）；和

(b) 能由上述抑制剂可逆地抑制的存在于该组合物中的酶的抑制常数(K_i；以 mol/l 表示)之间的比例至少为 50（即 $[I]_t/K_i \geq 50$），如，至少为 100，或通常至少为 250。在本发明的液体组合物中，$[I]_t/K_i$ 比的实际上限通常约为 10000（即 10^4）。在很多场合，$[I]_t/K_i$ 比值在 250 - 5000 范围内，通常在 250 - 2500 范围内为宜。

可以把 $[I]_t/K_i$ 比的值视为本发明液体组合物“抑制能力”的一个指标。例如，通过向液体组合物中加入中等至低浓度的强抑制剂，或加入较高浓度的更弱的抑制剂，可以获得高比值，即高“抑制能力”。

当抑制剂 I 的摩尔数相对被抑制的酶 E 的摩尔数超出较多时，大部分抑制剂通常为游离形式，即：不与酶结合。用〔I〕表示游离（非结合）抑制剂（与 K_i 相关；见上文），在这种条件下 $[I]_t/K_i$ 比大约等于 $[I]/K_i$ 比，即 $[I]_t/K_i \approx [I]/K_i$。

这里要指出的是，本发明的含有酶和可逆酶抑制剂的液体组合物可用适当方法干燥（如冷冻干燥或喷雾干燥）。然后可将干燥的酶/抑制剂产物粉碎（如通过研磨），并以适当浓度悬浮或拌浆于一种非水液体媒介物，如非离子表面活性剂（如购自 BP 的 Softanol™ ）中，以形成一种浆状产物。

洗涤剂

对于洗涤组合物来说，通常的目标是获得对洗涤组合物中选定酶（如蛋白酶）的至少 50 % 的抑制，而且，洗涤介质中游离酶的量相当于总酶量的至少 50 %。

加入了本发明液体组合物的洗涤组合物，除酶和抑制剂外，还包括表面活性剂，而且通常为液体洗涤组合物。例如，该洗涤组合物可以是洗衣洗涤组合物或洗碟洗涤组合物。

液体洗涤组合物可以是含水的，例如通常含有高达 70 % 的水和 0 - 30 % 的有机溶剂，或是基本上无水。

所述洗涤组合物将含有一种或几种表面活性剂，每种表面活性剂可以是阴离子型、非离子型、阳离子型或两性离子型的。该洗涤剂通常含有 0 - 50 % 的阴离子表面活性剂，如直链烷基苯磺酸盐（ LAS ）、α - 烯属磺酸盐（ 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 ）、仲链烷磺酸盐（ SAS ）、α - 磺基脂肪酸甲酯、烷基或烯基琥珀酸或皂。还可以含有 0 - 40 % 的非离子型表面活性剂，如脂肪醇乙氧基化物（ AEO 或 AE ）、脂肪醇丙氧基化物、羧基化脂肪醇乙氧基化物、壬基酚乙氧基化物、烷基聚糖苷、烷基氧化二甲胺、乙氧基化脂肪酸单乙醇酰胺、脂肪酸单乙醇酰胺、或多羟基烷基脂肪酸酰胺（例如，在 WO 92/06154 中所述）。

通常，该洗涤剂中含有 1 - 65 % 的洗涤助剂，但某些洗碟洗涤剂甚至可含有高达 90 % 的洗涤助剂或配位剂，如沸石、二磷酸盐、三磷酸盐、膦酸盐、柠檬酸盐、次氮基三乙酸（ NTA ）、乙二胺四乙酸（ EDTA ）、二亚乙基三胺五乙酸（ DTMPA ）、烷基或烯基琥珀酸、可溶性硅酸盐或层状硅酸盐（如 SKS - 6，购自 Hoechst ）。

洗涤助剂可分成含磷型和非含磷型。含磷无机碱性洗涤助剂的例子

包括水溶性盐特别是碱金属焦磷酸盐、正磷酸盐、多磷酸盐和膦酸盐。非含磷无机助剂的例子包括水溶性碱金属碳酸盐、硼酸盐和硅酸盐，以及层状二聚硅酸盐和各种类型水不溶性结晶型或非晶型硅铝酸盐，其中以沸石为最著名的代表。

合适有机助剂的例子包括以下酸的碱金属盐、铵盐或取代铵盐：琥珀酸、丙二酸、脂肪酸丙二酸、脂肪酸磺酸、羧基甲氧基琥珀酸、聚乙酸、羧酸、聚羧酸、氨基聚羧酸和聚乙酰基羧酸。该洗涤剂也可以是未复配的，即基本上无洗涤助剂。

该洗涤剂可以含有一种或几种聚合物。其例子有羧甲基纤维素（CMC）、聚（乙烯吡咯烷酮）（PVP）、聚乙二醇（PEG）、聚乙烯醇（PVA）、聚羧酸酯，如聚丙烯酸酯、聚马来酸酯、马来酸/丙烯酸共聚物和甲基丙烯酸月桂基酯/丙烯酸共聚物。

所述洗涤组合物可含有氯/溴型或加氧型漂白剂。漂白剂可以是包衣或包封的。无机氯/溴型漂白剂的例子有次氯酸或次溴酸的锂盐、钠盐或钙盐，以及氯化磷酸三钠。

所述漂白系统还可以含有 H_2O_2 源，如能与诸如四乙酰乙二胺（TAED）或壬酰氧基苯磺酸酯（NOBS）之类的过酸生成漂白活化剂混合的过硼酸盐或过碳酸盐。

有机氯/溴型漂白剂的例子有杂环 N－溴和 N－氯酰亚胺，如三氯异氰尿酸、三溴异氰尿酸、二溴异氰尿酸和二氯异氰尿酸，及其与水溶性阳离子，如钾和钠的盐。乙内酰脲同样适用。所述漂白系统还可含有如酰胺、酰亚胺或砜类的过氧酸。

在洗碟洗涤剂中，优选含氧漂白剂，如无机过酸盐型的漂白剂，最好具有漂白剂前体或为过氧酸化合物。过氧漂白化合物的典型例子为碱金属过硼酸盐的四水合物和一水合物，碱金属过碳酸盐、过硅酸盐和过磷酸盐。优选的活性材料为 TAED 或 NOBS。

如上所述，本发明洗涤组合物的酶是以本发明的液体酶/抑制剂组合物的形式加入所述洗涤组合物中。

如果必要，还可加入其它常见的酶稳定物质，如多元醇，像丙二醇或甘油，糖或糖醇，乳酸，硼酸或硼酸衍生物，如芳族硼酸酯（例如，

参见 WO 92/19709 和 92/19708 ）。

该洗涤剂还可含有其它常见洗涤成分，如织物调理剂，包括粘土、抗絮凝材料、泡沫促进剂/抑泡剂（在洗碟用洗涤剂中为抑泡剂）、抑泡剂、抗腐蚀剂、污垢悬浮剂、抗污垢再沉积剂、染料、脱水剂、杀菌剂、荧光增白剂或香料。

其 pH（在使用浓度下在水溶液中测得）通常为中性或碱性，如在 7 - 11 的范围内。

本发明范围内的洗衣洗涤组合物的具体形式包括:

1) 含水液体洗涤组合物，含有:

直链烷基苯磺酸盐（以酸计算）	15	-21%
脂肪醇乙氧基化物(如 C_{12-15} 脂肪醇， 7EO 或 C_{12-15} 脂肪醇， 5EO)	12	-18%
皂，如脂肪酸（如油酸）	3	-13%
烯基琥珀酸（ C_{12-14} ）	0	-13%
氨基乙醇	8	-18%
柠檬酸	2	-8%
膦酸盐	0	-3%
聚合物（如 PVP 、 PEG ）	0	-3%
硼酸根（如 B_4O_7 ）	0	-2%
乙醇	0	-3%
丙二醇	8	-14%
酶（以纯酶蛋白计）	0.0001	-0.2%
微量成分(如分散剂、抑泡剂、香料、荧光增白剂)	0	-5%

2) 水结构的液体洗涤组合物，含有:

直链烷基苯磺酸盐（以酸计）	15	-21%
脂肪醇乙氧基化物(如 C_{12-15} 脂肪醇，7EO，或 C_{12-15} 脂肪醇，5EO)	3	-9%
皂，如脂肪酸（如油酸）	3	-10%
沸石（如 $NaAlSiO_4$）	14	-22%
柠檬酸钾	9	-18%
硼酸根（如 $B_4O_7^{2-}$）	0	-2%
羧甲基纤维素	0	-2%
聚合物（如 PEG， PVD）	0	-3%
锚定聚合物，如甲基丙烯酸月桂酯/丙烯酸共聚物；摩尔比 25： 1； MW3800	0	-3%
甘油	0	-5%
酶（以纯酶蛋白计）	0.0001	-0.2%
微量成分（如分散剂、抑泡剂、香料、荧光增白剂）	0	-5%

3. 含水液体洗涤组合物，含有:

直链烷基苯磺酸盐（以酸计）	15	-23%
脂肪醇乙氧基硫酸盐(如 C_{12-15} 脂肪醇, 2 – 3EO)	8	-15%
脂肪醇乙氧基化物(如 C_{12-15} 脂肪醇,7EO,或 C_{12-15} 脂肪醇,5EO)	3	-9%
皂，如脂肪酸（如十二烷酸）	0	-3%
氨基乙醇	1	-5%
柠檬酸钠	5	-10%
水溶助长剂（如，甲苯磺酸钠）	2	-6%
硼酸根（如 $B_4O_7^{2-}$）	0	-2%
羧甲基纤维素	0	-1%
乙醇	1	-3%
丙二醇	2	-5%
酶（以纯酶蛋白计）	0.0001	-0.2%
微量成分（如聚合物、分散剂、香料、荧光增白剂）	0	-5%

4. 含水液体洗涤组合物，含有:

直链烷基苯磺酸盐（以酸计）	20	-32%
脂肪醇乙氧基化物(如 C_{12-15} 脂肪醇,7EO,或 C_{12-15} 脂肪醇,5EO)	6	-12%
氨基乙醇	2	-6%
柠檬酸	8	-14%
硼酸根（如 $B_4O_7^{2-}$）	1	-3%
聚合物(如马来酸/丙烯酸共聚物，锚定聚合物，如甲基丙烯酸月桂酯/丙烯酸共聚物)	0	-3%
甘油	3	-8%
酶（以纯酶蛋白计）	0.0001	-0.2%
微量成分(如水溶助长剂、分散剂、香料、荧光增白剂)	0	-5%

5) 如 1)-4)所述的洗涤组合物，其中，全部或部分直链烷基苯磺酸盐被（C_{12} – C_{18}）烷基硫酸盐所取代。

6) 如 1)-5)所述的洗涤组合物，其含有稳定化的或包膜的过酸，或作为另外一种成分或用于代替上述漂白系统。

7) 一种被配制成无水洗涤液体的洗涤组合物，含有一种液态非离子表面活性剂，如直链烷氧基化伯醇、一个助剂系统（如磷酸盐）、酶和碱。该洗涤剂还可以含有阴离子表面活性剂和/或漂白系统。

洗碟用和其它多成分含酶组合物

这种类型组合物的有关例子包括:

1) 具有洗涤表面活性剂系统的液体洗碟组合物，含有:

非离子表面活性剂	0	-1.5%
十八烷基 N－氧化二甲胺二水合物	0	-5%
十八烷基 N-氧化二甲胺二水合物与十六烷基 N-氧化二甲胺二水合物的 80:20wt. C18/C16 混合物	0	-4%
无水十八烷基 N-氧化双(羟乙基)胺与无水十六烷基 N-氧化双(羟乙基)胺的 70:30wt. C18/C16 混合物	0	-5 %
平均乙氧基化度为 3 的 C_{13}-C_{15} 烷基乙氧基硫酸盐	0	-10%
平均乙氧基化度为 3 的 C_{12}-C_{15} 烷基乙氧基硫酸盐	0	-5%
平均乙氧基化度为 12 的 C_{13}-C_{15} 乙氧基化脂肪醇	0	-5%
平均乙氧基化度为 9 的 C_{12}-C_{15} 乙氧基化脂肪醇混合物	0	-6.5%
平均乙氧基化度为 30 的 C_{13}-C_{15} 乙氧基化脂肪醇混合物	0	-4%
二硅酸钠	0	-33%
三磷酸钠	0	-46%
柠檬酸盐	0	-28%
柠檬酸	0	-29%
碳酸钠	0	-20%
过硼酸钠一水合物	0	-11.5%
四乙酰乙胺（ TAED ）	0	-4%
马来酸/丙烯酸共聚物	0	-7.5%
硫酸钠	0	-12.5%
酶	0.0001	-0.2%

2) 无水液体自动洗碟组合物，包括:

液体非离子表面活性剂(如脂肪醇乙氧基化物)	2.0	-10.0%
碱金属硅酸盐	3.0	-15.0%
碱金属磷酸盐	20.0	-40.0%
液体载体，选自高级二元醇、聚乙二醇、多氧化物、乙二醇醚	25.0	-45.0%
稳定剂（如磷酸和 C_{16}-C_{18} 链烷醇的部分酯）	0.5	-7.0%
抑泡剂（如硅氧烷）	0	-1.5%
酶	0.0001	-0.2%

3) 无水液体洗碟组合物，含有:

液体非离子表面活性剂(如脂肪醇乙氧基化物)	2.0	-10.0%
硅酸钠	3.0	-15.0%
碱金属碳酸盐	7.0	-20.0%
柠檬酸钠	0.0	-1.5%
稳定系统(如细碎硅氧烷与低分子量二烷基聚乙二醇醚的混合物)	0.5	-7.0%
低分子量聚丙烯酸聚合物	5.0	-15.0%
粘土凝胶增稠剂（如膨润土）	0.0	-10.0%
羟丙基纤维素聚合物	0.0	-0.6%
酶	0.0001	-0.2%
液体载体，选自高级二元醇、聚乙二醇、多氧化物和乙二醇醚	平衡	

4) 触变性液体自动洗碟组合物，包括：

C_{12}-C_{14}脂肪酸	0	-0.5%
嵌段共聚物表面活性剂	1.5	-15.0%
柠檬酸钠	0	-12%
三磷酸钠	0	-15%
碳酸钠	0	-8%
三硬脂酸铝	0	-0.1%
枯烯磺酸钠	0	-1.7%
聚丙烯酸增稠剂	1.32	-2.5%
聚丙烯酸钠	2.4	-6.0%
硼酸	0	-4.0%
甲酸钠	0	-0.45%
甲酸钙	0	-0.2%
氧化 n - 癸基二苯基二磺酸钠	0	-4.0%
单乙醇胺（ MEA ）	0	-1.86%
氢氧化钠（ 50 % ）	1.9	-9.3%
1,2 - 丙二醇	0	-9.4%
酶	0.0001	-0.2%
抑泡剂、染料、香料、水	平衡	

5) 液体自动洗碟组合物，包括:

脂肪醇乙氧基化物	0	-20%
磺酸脂肪酸酯	0	-30%
十二烷基硫酸钠	0	-20%
烷基聚糖苷	0	-21%
油酸	0	-10%
二硅酸钠一水合物	18	-33%
柠檬酸钠二水合物	18	-33%
硬脂酸钠	0	-2.5%
过硼酸钠一水合物	0	-13%
四乙酰乙二胺（ TAED ）	0	-8%
马来酸/丙烯酸共聚物	4	-8%
酶	0.0001	-0.2%

6) 含保护漂白颗粒的液体自动洗碟组合物，含有:

硅酸钠	5	-10%
焦磷酸四钾	15	-25%
三磷酸钠	0	-2%
碳酸钾	4	-8%
保护漂白颗粒，如氯	5	-10%
聚合增稠剂	0.7	-1.5%
氢氧化钾	0	-2%
酶	0.0001	-0.2%
水	平衡	

7) 如 1)和 5)所述的自动洗碟组合物，其中，过硼酸被过碳酸取代。

8)如 1)的自动洗碟组合物，其还含有一种锰催化剂。例如，锰催化剂可以是披露于 “Efficient manganese catalysts for low-temperature bleaching” (Nature 369, 1994, pp. 637-639)中的化合物之一。

上述组合物的“酶”含量可以包括所存在的酶抑制剂含量。如果必要，属于上述类型之一的一种具体组合物可以含有一种并非针对上述类

型配方的有机溶剂，但它可以作为被加入所述特定组合物中的本发明液体酶/抑制剂组合物中抑制剂的溶剂。

可将本发明的液体酶/抑制剂组合物加入洗涤组合物中，以产生一种常采用于洗涤剂中的酶浓度。对于本发明的洗涤组合物来说，可以加入本发明的液体酶/抑制剂组合物，例如，其加入量相对存在于该酶/抑制剂组合物中的特定酶来说，相当于每升洗涤液中有 0.00001-1mg （以纯酶蛋白计）酶。

稳定剂检验

可以各种方式检验抑制剂的抑制效果，通过以下两种用于检验蛋白酶/蛋白酶抑制剂的方法加以说明:

a) 在液体洗涤剂中进行贮存稳定性试验: 将液体酶/抑制剂组合物加入在明确限定条件下贮存的液体洗涤组合物中。以时间的函数形式测定每种酶的酶活性（例如，在 1， 3 和 7 天后测定）。

为了由贮存稳定性数据计算抑制效率，提出了一种反应机制。以下反应提出了一种较简单、合理的用于含有蛋白酶（ P ）、脂肪酶（ L ）和抑制剂（ I ）的液体洗涤剂的机理:

I ）蛋白酶的自身消化:

$P + P \rightarrow D_P + P$

II) 蛋白酶的变性:

$P \rightarrow D_P$

III) 蛋白酶的抑制:

$P + I \quad PI$

IV) 受抑制酶的蛋白酶消化

$P + PI \rightarrow P + D_P + I$

V) 受抑制酶的变性:

$PI \rightarrow D_P + I$

VI) 脂肪酶的蛋白酶消化:

$P + L \rightarrow P + D_L$

VII) 脂肪酶的变性

$L \rightarrow D_L$

其中 D_P 和 D_L 为变性（即无活性的）的蛋白酶和脂肪酶。

由以上反应得到 3 个表示 D、L 和 PI 失活的偶合微分方程。用参数估算法（由 Levenberg 改进的 Gauss Newton 法）由贮存稳定性数据计算反应速度常数。贮存稳定性数据以时间的函数形式给出（P + PI）和 L 的浓度。

反应 III 远快于其它反应，并在计算中假定平衡。反应 IV 被排除在该反应之外，以减少参数数目，以便仅用一个反应速度常数（获自方程 V）描述受抑制酶的稳定性。

当存在大量剩余抑制剂分子（相对于蛋白酶分子）时，可以假定抑制剂的浓度接近一个合理的常数。

反应速度常数的具体值在一定程度上对数据微小的变化敏感，但相对于硼酸的结果来说，这种敏感性显著下降。将硼酸（以及密切相关的物质或等同物，如碱金属硼酸盐(如硼砂)和氧化硼）用于抑制目的，特别是抑制蛋白酶是众所周知的（例如，参见 EP 0451 924 A2），但这种物质的低抑制强度及总体上相当差的可溶性（在以下的实施例中将结合硼酸对其做进一步说明；见下文），使其基本上不适合用于本发明中（其中，存在于本发明液体组合物中的抑制剂和/或其用量应当为：当以一种多成分组合物的一种成分形式加入所述液体组合物时，仍然能产生良好的酶稳定性）。因此，诸如硼酸、碱金属硼酸盐（如硼砂）和氧化硼之类的化合物基本上不能作为本发明的抑制剂。

“改善系数”的定义如下：

$$IFi=\frac{Ki\ (\text{硼酸})}{Ki\ (\text{抑制剂})}$$

以上述方法定义 IFi，可以提供衡量一种特定抑制剂相对硼酸的抑制效果的参数。

b) 测定 K_i：可以用标准方法测定抑制常数 K_i；参见 Keller 等，Biochem. Biophys. Res. Comm. 176, 1991,pp. 401-405; J. Bieth, Bayer-Symposium “Proteinase Inhibitors”, pp. 463-469, Springer-Verlag, 1974, 和 Lone kierstein Hansen, “Determination of Specific Activities of Selected Detergent Protease Using Protease Activity, Molecular Weight,

Kinetic Parameters and Inhibition Kinetics", 博士论文, Novo Novdisk A/S and University of Copenhagen, 1991。如果需要的话，该测定可以在存在洗涤组合物的非酶成分（表面活性剂等）的条件下进行。

通常用一个缓冲系统获得适于测定酶抑制的 K_i 值的条件，所述缓冲系统能产生合适的 pH 并且不会与相关的酶或抑制剂反应或形成配合物。例如，用于许多酶/抑制剂相互作用的缓冲系统是甘氨酰－甘氨酸缓冲液，其 pH 为弱碱性，如 pH 8.6，温度为环境温度（一般为 25 ℃）。

实验部分

以下实施例将对本发明作进一步说明和验证，但这些实施例并不是要从任何角度来限定如权利要求书所述的本发明的范围。

例 1

以下方法是对合成多种类型一取代含硼酸和二取代含硼酸的合适方法的典范:

制备噻吩－ 3 －一取代含硼酸: 将溶于钠干燥的醚(100ml)中的 3 －溴噻吩（ 0.043m ）冷却至－ 60 ℃。迅速加入丁锂(30ml, 浓度 1M)。然后搅拌该混合物 3 分钟，再加入溶于钠干燥的醚(25ml)中的硼酸三正丁酯(0.043m)或硼酸三甲酯(0.043m)。搅拌该混合物 4 小时，并使其升温至室温。然后用氢氯酸（ 1M ）处理反应混合物，并分离醚层。用乙醚萃取水层（ 2 次， 25ml ）。用氢氧化钠（ 1M ）萃取合并的醚层。用氢氯酸（ 10 % ）酸化碱性溶液，从而使想要的一取代含硼酸沉淀。分离一取代含硼酸，然后再从水/乙醇中再结晶，并让其在空气中干燥。

$C_4H_5BO_2S$, mpt. 163-164 ℃。

制备二苯基二取代含硼酸: 用上述方法制备这种物质。由溴代苯和镁碎片制备 Grignard 试剂。不过，每摩尔硼酸三正丁酯使用 2 摩尔 Grignard 试剂。通过与乙醇胺反应分离由此所形成的二取代含硼酸，由此产生二苯基二取代含硼酸和乙醇胺配合物 (($C_6H_5)_2BO \cdot CH_2CH_2NH_2$)，这种产物更易于处理。 Mpt. 192-194 ℃。

制备 4 －甲酰苯基一取代含硼酸: 可以用披露于 Chem. Ber. 123 (1990), pp. 1841-1843 中 的方法制备这种化合物。让 4 －溴代苯醛二乙基乙缩醛与镁碎片在四氢呋喃中反应，然后加入溶于乙醚中的硼酸三丁

酯，并用硫酸处理该混合物。

例 2

测定 K_i

用标准方法，在以下条件下测定抑制蛋白酶 Savinase™ 的抑制常数 K_i。

底物：琥珀酰－丙氨酸－丙氨酸－脯氨酸－苯丙氨酸－对－硝基－酰苯胺＝ $SAAPF_pNA$（购自 Sigma 公司，分类号 S－7388）。

缓冲液：0.1M 甘氨酰－甘氨酸 pH 8.6；每升 1.5ml 15 % Brig™35；25 ℃（甘氨酰甘氨酸购自 Sigma 公司，分类号 G－3028）。

试验中酶的浓度：

Savinase™：$1 \times 10^{-10} - 3 \times 10^{-10}$M

用一台 Cobas Fara 自动分光光度计测 0.01-2mM 范围内的 9 种底物浓度的底物水解起始速度。用 ENZFITTER（一种非线性回归数据分析程序）测定动力学参数 V_{max} 和 K_m。由方程 $V_{max}=k_{cat} \times [E_o]$ 计算 k_{cat}。通过用极强的结合蛋白类蛋白酶抑制剂进行活性位点滴定测定活性酶〔E_o〕的浓度。由 K_m/k_{cat} 曲线以抑制剂浓度函数的形式计算抑制常数 K_i。假定抑制剂的纯度为 100 %，由称得的重量和分子量测定摩尔浓度。

下面列出了一系列试验过的一取代含硼酸酶稳定剂（抑制剂）的抑制常数，以及上述某些抑制剂的 $[I]_t/K_i$ 值。

表 1

用不同的一取代含硼酸衍生物抑制 Savinase™ 的抑制常数和 $[I]_t/K_i$ 值。为了比较，也包括硼酸。

抑制剂	$10^3 \times K_i$(K_i 用 mol/l 表示)	$[I]_t/K_i$ 2% -1.5%*
硼酸	10	
苯基一取代含硼酸	0.11	1490
3 - 乙酰氨基苯基一取代含硼酸	0.09	1240 930
苯并呋喃 - 2 一取代含硼酸	0.03	4115
4 - 甲酰苯基一取代含硼酸	0.03	4445 3335
噻吩 - 2 一取代含硼酸	0.14	
噻吩 - 3 一取代含硼酸	0.17	
萘 - 1 一取代含硼酸	0.13	
2 - 甲酰苯基一取代含硼酸	0.2	
3 - 甲酰苯基一取代含硼酸	0.07	

*在溶液中抑制剂的% W/W。

例 3

在液体洗涤剂里的贮存稳定性试验

以下内容涉及 KNPU ("Kilo Novo Protease Units")与 Savinase™ 制剂相关），和 KLU ("Kilo Lipase Units")与 Lipolase™ 制剂相关。1 个 KNPU 相当于 2.53mg （约 9.4×10^{-5}mmol ）纯酶蛋白。关于 Savinase™ 活性的测定参见一本小册子， AF 220/1-GB （可以向 Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Denmark 索取）。

一个脂肪酶单位(LU)被定义为在标准条件下（ 30.0℃， pH 7.0; 以 Gum Arabic 为乳化剂，以三丁精为底物）每分钟释放出 1μ mol 可滴定的丁酸的酶量。一本更详细地讲述该分析方法的小册子（ AF 95/5 ）可以向 Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Denmark 索取。 1 KLU 相当于 0.2mg （约 6.7×10^{-6}mmol)纯酶蛋白。

用上述方法，在下面归纳的条件下，在液体洗涤剂中的贮存稳定性（保留的酶活性）检验中检验各种蛋白酶抑制剂。在单丙二醇（ MPG ）中制备多种抑制剂（除硼酸外）的 4 % W/W 溶液。硼酸在相关介质中的可溶性较差，因此被溶于成品洗涤组合物中（产生 1 % W/W 的硼酸

浓度），而不是液体酶/抑制剂组合物中。

第一检验系列：在第一检验系列中，将等重量份的抑制剂溶液和 Savinase™ 16.0L, Type EX （每克中含有 16KNPU 蛋白酶的液体蛋白酶制剂； Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Denmark)混合，得到各自含有 2 % W/W 抑制剂的 Savinase™ 8L EX 制剂。各自含有 1 % W/W 这种 Savinase™/抑制剂制剂、98 % W/W "洗涤剂基 1"（见下文）和 1 % W/W Lipolase™ 100L, Type EX （每克中含有 100KLU 脂肪酶的液体脂肪酶制剂； Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Denmark ）的洗涤组合物的贮存稳定性结果如下：

% 残余 Lipolaste™ 活性（在 30 ℃下贮存）：

抑制剂	贮存时间（天）		
	1	3	7
无	34	6	0
1 % 硼酸	82	52	21
苯基一取代含硼酸	79	46	17
苯并呋喃－ 2 一取代含硼酸	83	54	24
4 －甲酰苯基一取代含硼酸	86	64	41
无 Savinase™ 或抑制剂	88	72	55

% 残余 Savinase™ 活性（在 30 ℃下贮存 7 天）

抑制剂	活性%
无	10
1 % 硼酸	74
苯基一取代含硼酸	67
苯并呋喃－ 2 一取代含硼酸	76
4 －甲酰苯基一取代含硼酸	85

以上结果特别表明，所述抑制剂的存在能明显改善洗涤组合物中 Lipolase™ 和 Savinase™ 活性的保存。

第二检验系列：在第二检验系列中，分别以 50： 37.5:12.5 的重量比混合 Savinase™ 16.0 L EX, 4% W/W 溶于 MPG 中的抑制剂和纯

MPG，得到各自含有 1.5% W/W 抑制剂的 Savinase™8L EX 制剂。各自含有 1 % W/W 这种 Savinase™/抑制剂制剂、98 % W/W "洗涤剂基 II"（见下文）和 1 % W/W Lipolase™ 100L， Type EX 的洗涤组合物的贮存稳定性结果如下:

% 残余 Lipolase™ 活性（在 30 ℃下贮存）:

抑制剂	贮存时间（天）			
	1	5	9	12
无	53	8	0	
4 - 甲酰苯基一取代含硼酸		58	41	28
3 - 乙酰氨基苯基一取代含硼酸		24	9	5
无 Savinase™ 或抑制剂		76	67	55

第三检验系列: 以与上述第二检验系列相同的方式制备各自含有 1.5% W/W 抑制剂的 Savinase™ 8L EX 制剂。各自含有 1 % W/W 这种 Savinase™/抑制剂制剂、98 % W/W "失活" OMO™ Micro（见下文）和 1 % W/W Lipolase™ 100L， Type EX 的洗涤组合物的贮存稳定性结果如下:

% 残余 Lipolase™ 活性（在 35 ℃下贮存）:

抑制剂	贮存时间（天）		
	5	7	14
无	90	88	85
4 - 甲酰苯基一取代含硼酸	98	99	99
无 Savinase™ 或抑制剂	99	99	99

第四检验系列: 基本上与上述第三系列相同，所不同的是采用的贮存温度为 30 ℃，并用"洗涤剂基 III"（见下文）代替失活的 OMO™ Micro。

% 残余 Lipolase™ 活性（在 30 ℃下储存）：

抑制剂	贮存时间（天）			
	1	5	9	12
无	45	19		
4 - 甲酰苯基一取代含硼酸		32	20	17
无 Savinase™ 或抑制剂		39	28	24

以上结果表明，上述抑制剂的存在能显著改善在各种洗涤组合物中 Lipolase™ 活性的保存。

洗涤剂基 I 配方（美国型）

成分	% W/W(纯成分)
Nansa™ 1169/p	10.3（直链烷基苯磺酸盐，LAS）
Berol™ 452	3.5（烷基醚硫酸盐，AES）
油酸	0.5
花生脂肪酸	0.5
Dobanol™ 25-7	6.4（脂肪醇乙氧基化物，AEO）
二甲苯磺酸钠	5.1
乙醇	0.7
MPG	2.7
甘油	0.5
硫酸钠	0.4
碳酸钠	2.7
柠檬酸钠	4.4
柠檬酸	1.5
用水平衡	

洗涤剂基 II 配方:

成分	% W/W
Nansa™ 1169/p	10.30
Sulfatol™ NA/25	1.40
油酸	7.05
花生脂肪酸	7.05
Dobanol™ 25-7	13.10
三乙醇胺	5.50
NaOH, 40%	2.00
二甲苯磺酸钠	1.00
乙醇	4.90
MPG	2.70
硫酸钠	0.20
柠檬酸钠	1.40
Dequest™ 2060 S	0.40
用水平衡	

洗涤剂基 III 配方:

成分	% W/W(纯成分)
Nansa™ 1169/p	7.00
油酸	0.45
花生脂肪酸	0.45
Lutensol™ A04	3.80
MPG	0.50
甘油	4.60
$Na_5P_3O_{10} \cdot H_2O$	22.60
$Na_2SiO_3 \cdot 5H_2O$	1.70
碳酸钠	1.43
用水平衡	

OMO™ Micro 是可从丹麦的超市上购得的零售商品。通过在微波炉中处理（85℃，5分钟）使其中的酶成分失活。

例 4

液体酶/抑制剂组合物的例子

本发明液体酶/抑制剂组合物的例子如下（所有组合物均为具有可接受外观的溶液）：

1) 0.1g 4-溴苯基一取代含硼酸 + 10g Savinase 16.0L, Type EX: 该组合物的抑制剂: 酶（I: E）摩尔比约为 33。

2) 0.2g 3,5-二氯苯基一取代含硼酸 + 40g Savinase 16.0L, Type EX:该组合物的 I: E 摩尔比约为 17。

3) 0.1g 5-氯代噻吩－2－一取代含硼酸 + 10g Savinase 16.0L, TypeEX:该组合物的 I: E 摩尔比约为 40。

4) 0.1g 苯基一取代含硼酸 + 10g Savinase 16.0L, Type EX: 该组合物的 I: E 摩尔比约为 54。

5) 0.2g 苯基一取代含硼酸 + 10g Savinase 16.0L, Type EX:该组合物的 I: E 摩尔比约为 108。