[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl[7]
C12N 9/54
C11D 3/386

[12]发明专利说明书

[21] ZL 专利号 94193315.6

[45]授权公告日 2002 年 4 月 10 日

[11]授权公告号 CN 1082544C

[22]申请日 1994.9.2 [24]颁证日 2002.4.10
[21]申请号 94193315.6
[30]优先权
[32]1993.9.9 [33]DK [31]1008/93
[86]国际申请 PCT/DK94/00331 1994.9.2
[87]国际公布 WO95/07350 英 1995.3.16
[85]进入国家阶段日期 1996.3.8
[73]专利权人 诺沃奇梅兹有限公司
地址 丹麦鲍斯韦
[72]发明人 H·奥特普
[56]参考文献

US5118623A	1992. 6. 2	C12N9/56
WO8801293A1	1988. 2.25	C12N9/54
WO9207067A1	1992. 4.30	C12N9/54

审查员 王朋飞

[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 杜京英

权利要求书 2 页 说明书 20 页 附图页数 2 页

[54]发明名称 氧化稳定的蛋白酶

[57]摘要

在含有次氯酸盐或其他氧化剂的溶液中具有改进的稳定性的新 芽胞杆菌蛋白酶。

ISSN1008-4274

权 利 要 求 书

1. 一种蛋白酶，其特征在于它与从芽胞杆菌 DSM8473 得到的蛋白酶具有相同的免疫化学特性，其进一步特征为：

(*a*)用 *SDS—PAGE* 法测得其表观分子量约为 30*KD*；

(*b*)在 *LKB Ampholine PAG* 平板上用等电点聚焦法测得其等电点约为 8.8；

(*c*)以酪蛋白为底物，在 *PH*9.5 测得其达到最高活性时温度范围为 50—60℃，约 60℃左右，及

(*d*) 以酪蛋白为底物，在 25℃测得在 *PH* 值 6—11 范围内，具有 80%以上的活性。

2. 权利要求 1 的蛋白酶，该蛋白酶在 25℃、5*ppm* 次氯酸盐中 60 分钟后可保持至少 80%的活性。

3. 一种芽胞杆菌菌株的生物学纯培养物，其特征在于它可产生权利要求 1 的蛋白酶。

4. 权利要求 3 的培养物，所述菌株为芽胞杆菌 *DSM*8473，或其突变株或变异株。

5. 权利要求 1—2 任一项中的蛋白酶的制备方法，该方法包括在含有碳源和氮源及无机盐的适宜的营养性培养基中培养权利要求 3 或 4 的产蛋白酶的芽胞杆菌菌株，然后回收所需的酶。

6. 权利要求 5 的方法，其中的菌株为芽胞杆菌 *DSM*8473，或其突变株或变异株。

7. 权利要求1或2中的蛋白酶在含有次氯酸盐的水中处理蛋白质的用途。

8. 权利要求7的蛋白酶的用途，其中次氯酸盐浓度为1—10*ppm*。

9. 权利要求1—2任意一项中的蛋白酶在去除含蛋白质污垢中的用途。

10. 一种洗涤剂组合物，它含有权利要求1—2任意一项中的蛋白酶及表面活性剂。

11. 权利要求10的洗涤剂组合物，其还含有一种或多种其他酶，尤其是淀粉酶、脂肪酶、角质酶、纤维素酶和/或氧化还原酶。

12. 一种洗涤剂添加剂，其含有呈非粉尘颗粒、稳定化的液态、浆状或被保护酶形式的权利要求1—2任意一项中的蛋白酶。

说　明　书

氧化稳定的蛋白酶

本发明属于芽胞杆菌菌株衍生的蛋白酶领域。更具体地讲，本发明涉及一种从新芽胞杆菌（*Bacillas sp.*）菌株衍生来的新蛋白酶，其特征在于在含有次氯酸盐和/或其他氧化剂的溶液中可保持稳定。此外，本发明还涉及该蛋白酶的制备方法，及所用水中含有次氯酸盐的工艺中该蛋白酶的应用。

蛋白酶上市已有20多年用于许多不同的目的，最重要是作为洗涤剂成分。

通过分离自然界中发现的蛋白酶而使蛋白酶得到了发展。商业供应最多的蛋白酶是从芽胞杆菌属得到的。目前，在各种特定条件下具有较好的价格/性能比的新型蛋白酶正在进入市场。

芽胞杆菌蛋白酶商品的例子有 *Alcalase*®、*Esperase*®、*Primase*®、*Savinase*®、和 *Durazyme*®〔*Savinase* 的蛋白工程变体〕，这些都是丹麦 *Novo Nordisk A/S* 的产品。这些酶及从其他厂商得到的类似酶产品在洗涤剂溶液中具有活性，即在 *PH* 值为8—11，并有螯合剂、表面活性剂、及如硼酸钠之类漂白剂存在下具有活性，但当工艺中使用的水中含次氯酸盐时，它们的活性就会下降。这个问题由于工业化国家中越来越多的水被氯化而变得更为突出。

本发明的目的是提供一种在含次氯酸盐的溶液中具有改进了的稳定特性的新蛋白酶。

因此，本发明的首要方面是提供一种与从芽胞杆菌菌株*DSM*8473衍生来的蛋白酶具有相同的免疫化学特性的蛋白酶，该蛋白酶在含次氯酸盐的溶液中可保持稳定。

其次，本发明涉及一种新芽胞杆菌菌株的生物纯培养物。更具体讲，本发明涉及芽胞杆菌菌株*DSM*8473，或其突变株或变异株。

第三，本发明提供该蛋白酶的制备方法，该方法包括在含有碳源和氮源及无机盐的适宜营养性培养基本上培养可产生蛋白酶的新芽胞杆菌菌株，然后回收所需的酶。更具体讲，培养芽胞杆菌菌株*DSM*8473或编码与从芽胞杆菌菌株*DSM*8473衍生来的蛋白酶具有相同免疫化学特性的蛋白酶的突变株或变异株。

第四，在使用含有次氯酸盐的水的工艺中使用该蛋白酶。

本发明可通过附图更好地加以阐明，其中

图1表示温度与本发明的新型蛋白酶的蛋白水解活性之间的关系（根据实施例1方法获得蛋白酶制备物，用2%酪蛋白为底物，*PH*值9.5）。

图2表示*PH*值与本发明的新型蛋白酶的蛋白水解活性之间的关系（根据实施例1的方法获得蛋白酶制备物，在25℃下，用2%酪蛋白为底物，用*Britten—Robinson*缓冲液调节*PH*值至6—11范围内预定的*PH*值）。

微生物

能产生本发明的酶的新微生物以从土壤样品中分离出来的菌株为代表。

该新芽胞杆菌已于1993年8月23日，根据 国际承认用于专利程序的微生物保藏布达佩斯条约保藏于*Deutsche Sammlung*

Von Mikroorganismen u n d Z e l l kulturen GmbH，登记号为 *No. DSM*8473。

本发明的微生物属于芽胞杆菌属的需氧产孢子细菌。其形态学特点为能动的棒状菌，直径 0.6—0.8μm，长度 1—3μm。孢子为圆筒形到椭圆形，不膨胀的孢子囊，居中到偏于一侧。最适生长温度为30—50℃，最适 *PH* 值为 6—8，50℃时生长良好。只有在 37℃生长时，菌落呈黄色，其他情况下无色，在营养性琼脂斜面上为细小菌落，琼脂中无色素扩散。

微生物培养

本发明的微生物可用含有可吸收的碳源、氮源及其他必需营养物质的营养培养基中在有氧条件下进行培养，按本领域已知原则配制培养基。

碳水化合物如蔗糖、葡糖糖、淀粉或含碳水化合物的材料如谷类、麦芽、稻及高粱为适宜的碳源。培养基中碳水化合物浓度的变化范围很广，如，最高可到 25%，最低可到 1—5%，但通常 8—10%是比较适宜的，其百分比按葡萄糖当量来计算。

营养培养基中的氮源可以是天然无机和/或有机物。硝酸盐及铵盐是适宜的无机氮源。有机氮源中有相当一部分常用于细菌培养的发酵过程。例如黄豆粉、棉花籽粉、花生粉、酪蛋白、玉米、玉米浸出液、酵母提取物、尿素和白蛋白。此外，营养性培养基中还应含有常规的微量物质。

为在发酵罐中培养，需进行人工通气。通气速率与常规罐发酵所用的相似。

发酵完毕后，可通过从发酵液中除去粗糙物，或根据需要，通过

在低温下蒸发或反透析浓缩发酵液来获得液态酶浓液。最后向浓液中加入防腐剂。

用盐(如Na_2SO_4)或水溶性溶剂(如乙醇或丙酮)来沉淀提纯的和/或浓缩的发酵液来制备固体酶制剂。可采用适宜的干燥方法如喷雾干燥法从发酵液中去除水份。

蛋白水解活性测定

以酪蛋白为底物测定蛋白水解活性。酪蛋白蛋白酶单位(*CPU*)定义如下:在标准条件下即在25℃,*PH*9.5的情况下孵育30分钟,每分钟释放1*mM*伯氨基(与丝氨酸标准相比较而测定)所需酶的量。

酶

本发明的酶为新蛋白酶。它们是碱性蛋白酶,可通过在含有碳源和氮源及无机盐的适宜的营养性培养基中培养本发明的微生物而获得,芽胞杆菌*DSM*8473,或其突变株或变异株。也可通过重组*DNA*技术获得这些酶。

以下特征可用来描述本发明的蛋白酶。

物理—化学特征:

用*SDS—PAGE*法测定其分子量为30*KD*。在*LKB Ampholine*®*PAG*平板上用等电点聚焦法测定其等电点约为8.8。

用*PMSF*和土耳其—蛋—白(*Turkey—egg—white*)蛋白酶抑制剂可抑制该蛋白酶活性。*EDTA*和大豆蛋白酶抑制剂对该蛋白酶活性无影响。

用2%酪蛋白为底物,在*PH*9.5时测定温度与活性的关系。使用前述测定蛋白水解活性的方法,但改变孵育温度在15℃—70℃之间。新蛋白酶所得结果如图1所示。从图中可见该酶在15℃—70℃

温度范围内都具有蛋白水解活性，最适温度为50℃－60℃，约60℃左右。

以同样步骤测定蛋白酶活性对*PH*值的依赖性，用缓冲液调节*PH*值至6—11范围内的预定*PH*值，结果如图2所示。从图中可见在此*PH*值范围内(6—11)的所有*PH*值下，该酶均具有蛋白水解活性。

在含次氯酸盐的水中，本发明的蛋白酶具有特殊潜能。实施例2清楚的证明了这一点。在含有5*ppm NaOCl*时，这些酶通常至少可保存45%的活性，优选高于60%，最优选高于80%，在含有10*ppm NaOCl*时，至少可保存10%的活性，优选可保存20%以上的活性。

免疫化学特性

可用免疫学方法交叉反应一致性试验测定其免疫化学特性。可用人们熟知的*Ouchterlony*双向免疫扩散法来进行一致性试验，也可根据*Gower*医学出版社1985年出版的*I. M. Roitt*的《免疫学》一书及*Blackwell*科学出版社1983年出版的*N. H. Axelsen*的《凝胶免疫沉淀技术手册》一书中第5章和第14章的串联(*tandem*)交叉免疫电泳进行一致性试验，同一本书的第5、19及20章还对术语"抗原一致性"及"部分抗原一致性"作了描述。

用本发明的一种精制蛋白酶按上述方法免疫兔子可产生单特异性抗血清。将免疫原与*Freund*氏佐剂混合，每两周给兔子皮下注射一次。在为期8周的免疫周期结束后，可获得抗血清，并可由此按*N. H. Axelsen*（同上)的方法制备免疫球蛋白。

*Ouchterlony*双向免疫扩散的结果显示本发明的蛋白酶与已知的碱性丝氨酸蛋白酶如*Savinase*，*Esperase*，*Durazyme*，*Primase*

(从 *Novo Nordisk A/S* 获得) 及 *Kazusase*™(从 *SHOWA DENKO* 获得)具有免疫化学非同一性。已证明它与从地衣芽胞杆菌得到的 *Alcalase* 具有部分免疫化学同一性。

氧化剂

本发明的蛋白酶对氧化剂如次氯酸盐、过氧化氢、过氧化物前体(如过碳酸盐、过硼酸盐和过氧化羧酸如过乙酸)稳定。

应用

本发明的蛋白酶的典型应用是作为洗涤剂组合物的成分。它们还可用来去除含蛋白质的污垢。

此外，当工艺过程所用的水中含有次氯酸盐，尤其是当其浓度在 1—10*ppm* 之间时，本发明的蛋白酶可用来处理蛋白质。

洗涤剂组合物

本发明的蛋白酶可作为一种成分加入洗涤剂组合物中。因此，它可作为一种洗涤剂添加剂包括在洗涤剂组合物中。洗涤剂组合物和洗涤剂添加剂通常还含有一种或多种其他酶如脂肪酶，淀粉酶、角质酶、纤维素酶和氧化还原酶。

在一个特定方面，本发明提供一种洗涤剂添加剂。可通过加入多个含有一种或多种酶的分离式添加剂或加入一种含有所有这些酶的联合式添加剂而将酶加入洗涤剂组合物中。本发明的洗涤剂添加剂，即分离式添加剂或联合式添加剂，可制成如粒状、液态、浆液等。优选的洗涤剂添加剂制品是颗粒状的(尤其是非粉尘颗粒)、液态的(尤其是稳定的液体)、浆状或被保护酶的形式。

可按 *US*4，106，991 及 4,661,452 的方法(均为 *Novo Industri A/S* 专利)生产非粉尘颗粒，并选择性采用本领域中已知的方法对

非粉尘颗粒进行 包被。蜡样包被材料的例子有：平均摩尔分子量为1000至20000的聚(环氧乙烷)产物(聚乙二醇;*PEG*);含有16到50个环氧乙烷单位的乙氧基化壬基酚;含有15到80个环氧乙烷单位的乙氧基化脂肪醇(其中的醇含有12—20个碳原子);脂肪醇;脂肪酸;甘油单—,双—及三脂肪酸酯。专利*GB*1483591中给出了适用于流化床技术的涂膜包被材料的例子。根据已建立的方法在液态酶制剂中加入多羟基化合物如丙二醇、糖或糖醇、乳酸或硼酸可达到稳定作用。本领域的技术人员熟知其他酶稳定剂。可按*EP*238,216的方法制备被保护酶。

本发明的洗涤剂组合物可制成任何方便的形式，如粉状、颗粒状、糊状或液态。液态洗涤剂可以是典型的含高达70%的水及0—30%有机溶剂的水样洗涤剂,也可是非水样的。

该洗涤剂组合物中含一种或多种表面活性剂，它们可以是阴离子、非离子、阳离子或两性离子型。本洗涤剂中通常含有0—50%的阴离子表面活性剂,如线性烷基苯磺酸盐(*LAS*),α—烯属磺酸盐(*AOS*),烷基硫酸盐(脂肪醇硫酸酯)(*AS*),乙氧基化醇硫酸酯(*AEOS*或*AES*),二级烷磺酸盐(*SAS*),α—磺基脂肪酸甲酯,烷基或链烯基琥珀酸或皂。还可以含0—40%的非离子表面活性剂，如醇乙氧基化物(*AEO*或*AE*),羧基化醇的乙氧基化物，壬基酚乙氧基化物,烷基聚甘醇甙,烷基二甲胺氧化物，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(如*WO* 92/06154中所述)。

本洗涤剂组合物中还可含有一种或多种其他酶，如淀粉酶、脂肪酶、角质酶、纤维素酶和氧化还原酶。

本洗涤剂中可含有1—65%的洗涤剂助洗剂或配合剂，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、可溶性硅酸盐或层叠式硅酸盐(如从*Hoechst*得到的*SKS*—6)。本洗涤剂还可以是不带助洗剂的，即基本上不含洗涤剂助洗剂。

本洗涤剂可含一种或多种聚合物。例如，羧甲基纤维素(*CMC*)，聚(乙烯基吡咯烷酮)(*PVP*)、聚乙二醇(*PEG*)，聚(乙烯基醇)(*PVA*)，多羧基化合物如聚丙烯酸 、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。

本洗涤剂可含有漂白系统，其中可包括H_2O_2源如过硼酸盐或过碳酸盐，它们可以和过酸形成型漂白活化剂如四乙酰乙二胺(*TAED*)或壬酰氧基苯磺酸盐结合使用。或者，漂白系统可含有如酰胺、酰亚胺或砜型的过氧酸。

本发明的洗涤剂组合物中的酶可用常规的稳定剂来稳定，如丙二醇或甘油之类的多羟基化合物、糖或糖醇、乳酸、硼酸或硼酸衍生物如硼酸芳酯，此组合物可按*WO*92/19709和*WO*92/19708中所述方法配制。

该洗涤剂中还可含有基他常规洗涤剂组分，如包括粘土的织物调理剂、泡沫促进剂、抑泡剂、抗腐蚀剂、污物悬浮剂、防污物再沉剂、染料、杀菌剂、荧光增白剂或香味剂。

*PH*值(在使用浓度的水溶液中测定)通常为中性或碱性，如7—11。

本发明范围内的特定洗涤剂组合物包括：

1).配制成堆积密度至少为600g/*l*的颗粒状洗涤剂组合物含有：

—线性烷基苯磺酸盐(按酸计) 7—12%

—乙氧基醇硫酸酯(如 C_{12-18} 的醇, 1—4%

1—2*EO*)或烷基硫酸盐(如 C_{16-18})

—醇乙氧基化物(如 C_{14-15} 的醇,7*EO*) 5—9%

—碳酸钠(按 Na_2CO_3 计) 14—20%

—可溶性硅酸盐(按 $Na_2O \cdot 2SiO_2$ 计) 2—6%

—沸石(按 $NaAlSiO_4$ 计) 15—22%

—硫酸钠(按 Na_2SO_4 计) 0—6%

—柠檬酸钠/柠檬酸 0—15%

(按 $C_6H_5Na_3O_7/C_6H_8O_7$ 计)

—过硼酸钠(按 $NaBO_3H_2O$ 计) 11—18%

—*TAED* 2—6%

—羧甲基纤维素 0—2%

—聚合物(如马来酸/ 0—3%

丙烯酸共聚物,*PVP*,*PEG*)

—酶 0—5%

—小成分(如抑泡剂,香味剂,荧光增白剂,光漂白剂)

0—5%

2). 配制成堆积密度至少为 600g/L 的颗粒状洗涤剂组合物含有:

—线性烷基苯磺酸盐(按酸计) 6—11%

—乙氧基醇硫酸酯(如 C_{12-18} 的醇,1—2*EO*) 1—3%

或烷基硫酸盐(如 C_{16-18})

—醇乙氧基化物(如 C_{14-15} 的醇,7*EO*) 5—9%

－碳酸钠(按 Na_2CO_3 计) 15—21%

－可溶性硅酸盐(按 $Na_2O \cdot 2SiO_2$ 计) 1—4%

－沸石(按 $NaAlSiO_4$ 计) 24—34%

－硫酸钠(按 Na_2SO_4 计) 4—10%

－柠檬酸钠/柠檬酸 0—15%

(按 $C_6H_5Na_3O_7/C_6H_8O_7$ 计)

－羧甲基纤维素 0—2%

－聚合物(如马来酸/丙烯酸共聚物 *PVP*, *PEG*)

1—6%

－酶 0—5%

－小成分(如抑泡剂、香味剂) 0—5%

3). 配制成堆积密度至少为 600g/L 的颗粒状洗涤剂组合物含有：

－线性烷基苯磺酸盐(按酸计) 5—9%

－醇乙氧基化物(如 C_{12-15} 的醇,7*EO*) 7—14%

－作为脂肪酸的皂类(如 C_{16-22}) 1—3%

－碳酸钠(按 Na_2CO_3 计) 10—17%

－可溶性硅酸盐(按 $Na_2O \cdot 2SiO_2$ 计) 3—9%

－沸石(按 $NaAlSiO_4$ 计) 23—33%

－硫酸钠(按 Na_2SO_4 计) 0—4%

－过硼酸钠(按 $NaBO_3 \cdot H_2O$ 计) 8—16%

－*TAED* 2—8%

－膦酸盐(如 *EDTMPA*) 0—1%

－羧甲基纤维素 0—2%

－聚合物(如马来酸/丙烯酸 0—3%

共聚物，*PVP*，*PEG*）

—酶　　0—5%

—小成分（如抑泡剂，香味剂，荧光增白剂）　　0—5%

4）. 配制成堆积密度至少为 600g/L 的颗粒状洗涤剂组合物含有：

—线性烷基苯磺酸盐（按酸计）　　8—12%

—醇乙氧基化物（如 C_{12-15} 的醇，7*EO*）　　10—25%

—碳酸钠（按 Na_2CO_3 计）　　14—22%

—溶性硅酸盐（按 $Na_2O \cdot 2SiO_2$ 计）　　1—5%

—沸石（按 $NaAlSiO_4$ 计）　　25—35%

—硫酸钠（按 Na_2SO_4 计）　　0—10%

—羧甲基纤维素　　0—2%

—聚合物（如马来酸/丙烯酸共聚物，　　1—3%

PVP，*PEG*）

—酶　　0—5%

—小成分（如抑泡剂，香味剂）　　0—5%

5）. 水样液态洗涤剂组合物含有：

—线性烷基苯磺酸盐（按酸计）　　15—21%

—醇乙氧基化物　　12—18%

（如 C_{12-15} 的醇，7*EO* 或 C_{12-15} 的醇，5*EO*）

—作为脂肪酸的皂（如油酸）　　3—13%

—链烯基琥珀酸（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%

—硼酸盐(按 B_4O_7 计) 0—2%

—乙醇 0—3%

—丙二醇 8—14%

—酶 0—5%

—小成分(如分散剂，抑泡剂，香味剂，荧光增白剂) 0—5%

6). 水样结构化液态洗涤剂组合物含有：

—线性烷基苯磺酸盐(按酸计) 15—21%

—醇乙氧基化物 3—9%

(如 C_{12-15} 的醇，7*EO* 或 C_{12-15} 的醇，5*EO*)

—作为脂肪酸的皂(如油酸) 3—10%

—沸石(按 $NaAlSiO_4$ 计) 14—22%

—柠檬酸钾 9—18%

—硼酸盐(按 B_4O_7 计) 0—2%

—羧甲基纤维素 0—2%

—聚合物(如 *PVP*, *PEG*) 0—3%

—结合聚合物(如甲基丙烯酸月桂基酯/丙烯酸共聚物，摩尔比 25:1，分子量 3800) 0—3%

—甘油 0—5%

—酶 0—5%

—小成分(如分散剂，抑泡剂，香味剂，荧光增白剂) 0—5%

7). 配制成堆积密度至少为 600g/L 的颗粒状洗涤剂组合物含有：

—脂肪醇硫酸酯 5—10%

—乙氧基化脂肪酸单乙醇酰胺 3—9%

—作为脂肪酸的皂 0—3%

—碳酸钠(按 Na_2CO_3 计) 5—10%

—可溶性硅酸盐(按 $Na_2O \cdot 2SiO_2$ 计) 1—4%

—沸石(按 $NaAlSiO_4$ 计) 20—40%

—硫酸钠(按 Na_2SO_4 计) 2—8%

—过硼酸钠(按 $NaBO_3 \cdot H_2O$ 计) 12—18%

—*TAEP* 2—7%

—聚合物(如马来酸/丙烯酸共聚物，*PEG*) 1—5%

—酶 0—5%

—小成分(如荧光增白剂，抑泡剂，香味剂) 0—5%

8). 配制成颗粒状的洗涤剂组合物含有：

—线性烷基苯磺酸盐(按酸计) 8—14%

—乙氧基化脂肪酸单乙醇酰胺 5—11%

—作为脂肪酸的皂 0—3%

—碳酸钠(按 Na_2CO_3 计) 4—10%

—可溶性硅酸盐(按 $Na_2O \cdot 2SiO_2$ 计) 1—4%

—沸石(按 $NaAlSiO_4$ 计) 30—50%

—硫酸钠(按 Na_2SO_4 计) 3—11%

—柠檬酸钠(按 $C_6H_5Na_3O_7$ 计) 5—12%

—聚合物(如 *PVP*，马来酸/丙烯酸共聚物，*PEG*) 1—5%

—酶 0—5%

—小成分(如抑泡剂，香味剂) 0—5%

9). 配制成颗粒状的洗涤剂组合物含有：

—线性烷基苯磺酸盐(按酸计)	6—12%
—非离子表面活性剂	1—4%
—作为脂肪酸的皂	2—6%
—碳酸钠(按 Na_2CO_3 计)	14—22%
—沸石(按 $NaAlSiO_4$ 计)	18—32%
—硫酸钠(按 Na_2SO_4 计)	5—20%
—柠檬酸钠(按 $C_6H_5Na_3O_7$ 计)	3—8%
—过硼酸钠(按 $NaBO_3 \cdot H_2O$ 计)	4—9%
—漂白活化剂(如 *NOBS* 或 *TAED*)	1—5%
—羧甲基纤维素	0—2%
—聚合物(如多羧基化合物或 *PEG*)	1—5%
—酶	0—5%
—小成分(如荧光增白剂，香味剂)	0—5%

10). 水样液态洗涤剂组合物含有：

—线性烷基苯磺酸盐(按酸计)	15—23%
—乙氧基醇硫酸酯(如 C_{12-15} 的醇，2—3*EO*)	8—15%
—醇乙氧基化物 (如 C_{12-15} 的醇，7*EO* 或 C_{12-15} 的醇，5*EO*)	3—9%
—作为脂肪酸的皂(如油酸)	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%
—硼酸盐(按 B_4O_7 计)	0—2%

—羧甲基纤维素 0—1%

—乙醇 1—3%

—丙二醇 2—5%

—酶 0—5%

—小成分(如聚合物,分散剂,香味剂, 0—5%
荧光增白剂)

11). 水样液态洗涤剂组合物含有:

—线性烷基苯磺酸盐(按酸计) 20—32%

—醇乙氧基化物 6—12%
(如 C_{12-15} 的醇,7*EO* 或 C_{12-15} 的醇,5*EO*)

—氨基乙醇 2—6%

—柠檬酸 8—14%

—硼酸盐(按 B_4O_7 计) 1—3%

—聚合物 0—3%
(如马来酸/丙烯酸共聚物,结合聚合物
如甲基丙烯酸月桂基酯/丙烯酸共聚物和 *CMC*)

—甘油 3—8%

—酶 0—5%

—小成分(如水溶助长剂, 0—5%
分散剂,香味剂,荧光增白剂)

12). 配制成堆积密度至少为 600g/*L* 的颗粒状洗涤剂组合物含有:

—阴离子表面活性剂 25—40%
(如线性烷基苯磺酸盐,烷基硫酸盐,α—烯属磺酸盐,
α—磺基脂肪酸甲酯,烷磺酸盐,皂)

—非离子表面活性剂(如醇乙氧基化物) 1—10%

—碳酸钠(按 Na_2CO_3 计) 8—25%

—可溶性硅酸盐(按 $Na_2O \cdot 2SiO_2$ 计) 5—15%

—硫酸钠(Na_2SO_4 计) 0—5%

—沸石(按 $NaAlSiO_4$ 计) 15—28%

—过硼酸钠(按 $NaBO_3 \cdot 4H_2O$ 计) 0—20%

—漂白活化剂(*TAED* 或 *NOBs*) 0—5%

—酶 0—5%

—小成分(如香味剂,荧光增白剂) 0—3%

13). 如 1)—12)中所述洗涤剂配方,其中的线性烷基苯磺酸盐—或其一部分—被烷基硫酸盐(C_{12-18})所取代。

14). 如 1)—13)中所述洗涤剂配方,其中含有作为附加成分或已指定的漂白系统取代物的稳定化的或包囊的过酸。

15). 如 1)、3)、7)、9)及 12)中描述的洗涤剂组合物,其中的过硼酸盐被过碳酸盐所取代。

16). 如 1)、3)、7)、9)、及 12)中所述洗涤剂组合物,其另外含有锰催化剂,如可为 *Nature*, 369, 1994, *pp.* 637—639 中的文章《低温漂白的高效锰催化剂》中所述化合物的一种。

17. 配制成含有液态非离子表面活性剂(如线性烷氧基化伯醇)、助洗系统(如磷酸盐)、酶及碱的非水样洗涤液的洗涤剂组合物。该洗涤剂中还可含有阴离子表面活性剂和/或漂白系统。

在以下实施例中进一步说明本发明,但无意对所要求的本发明范围进行任何限制。

实施例 1.

在含 100*ml* 培养基的 500*ml* 加塞锥形瓶内 37℃摇床(300*rpm*)培养芽胞杆菌 *DSM*8473,培养基的组成如下(每升):

马铃薯淀粉	100g
矮大麦	50g
大豆粉	20g
$Na_2HPO_4\times12H_2O$	9g
Pluronic(R)	0.1g
酪蛋白钠盐	10g

用 α—淀粉酶液化培养基中的淀粉,将培养基加热至 120℃,45 分钟进行消毒。

孵育 3 天后,用上述方法测定培养物的蛋白水解活性。

培养后,培养液中酶活度为 120*CPU/L*。

分离出固体成分后,用常规色谱方法提纯蛋白酶并冻干。冻干制剂的活性为 7.4*CPU/g*。

根据本例制备的制剂的特征在本说明书的前一部分已经提到,在此处作为参考。

实施例 2:

稳定性

在 25℃,将 1.1*g/l* 的市售美国粉状洗涤剂溶于含有不同浓度次氯酸钠的约 6°*dH*(德国硬度)的水中,保持恒温 60 分钟进行稳定性试验,蛋白酶浓度为 0.3*CPU/L*。

表 1 显示了试验结果:

表 1

	0 ppm NaOCl	5 ppm NaOCl	10 ppm NaOCl
Alcalase	100%	10%	0%
Primase	100%	5%	0%
Esperase	55%	0%	0%
Savinase	100%	0%	0%
Durazyme	100%	40%	0%
新蛋白酶	100%	100%	30%

表 1 显示在含有次氯酸钠的溶液中，新蛋白酶的稳定性比已知蛋白酶高得多：在含 10*ppm NaOCl* 的洗涤剂溶液中，新蛋白酶仍可保存 30%的活性，而在相同条件下已知蛋白酶已绝对无活性。

实施例 3：

在 25℃，将 1.1g/L 的市售美国粉状洗涤剂溶于含 1% *Proxan*（39.5% CH_3COOOH，4.5% H_2O_2，44%CH_3COOH，11.3% H_2O，0.7%H_2SO_4）的约 6°*dH*（德国硬度）的水中并保持恒温 60 分钟来进行稳定性试验，蛋白酶活性为 0.3CPU/L。

表 2 显示了该试验的结果。

表 2

酶	残留活性
Alcalase	25%
Primase	20%
Esperase	20%
Savinase	25%
Durazyme	85%
新蛋白酶	100%

表 2 显示在含 *Proxan* 的溶液中，新蛋白酶较已知蛋白酶具有更高的稳定性。

实施例 4：

洗涤性能

20℃下，恒温 10 分钟洗涤被草污染的棉布来完成洗涤性能试验。

试验中所用酶浓度分别为 0.0025，0.005，0.010，0.050，0.1，0.2 及 0.5*CPU/L*。

将 2.0g/*L* 的市售美国粉状洗涤剂溶于约 6°*dH*（德国硬度）的水中，并将 *PH* 值调到 9.5。织物/洗液比率为每升洗涤液中有 6g 织物。

洗涤后，用自来水冲洗衣物并晾干。在 460*nm* 处测定其反射率（%*R*）。

用加酶洗涤后的反射率减去不加酶洗涤后的反射率，得到反射率差△*R*，用来衡量洗涤性能。

表 3 显示了该试验的结果（两个试验的均数）：

表 3

新蛋白酶浓度 CPU/l	R
0.0025	3.8
0.005	6.6
0.010	6.4
0.050	11.8
0.1	12.9
0.2	13.6
0.5	13.1

表 3 显示新蛋白酶适于作为洗涤剂酶。

说 明 书 附 图

图 1

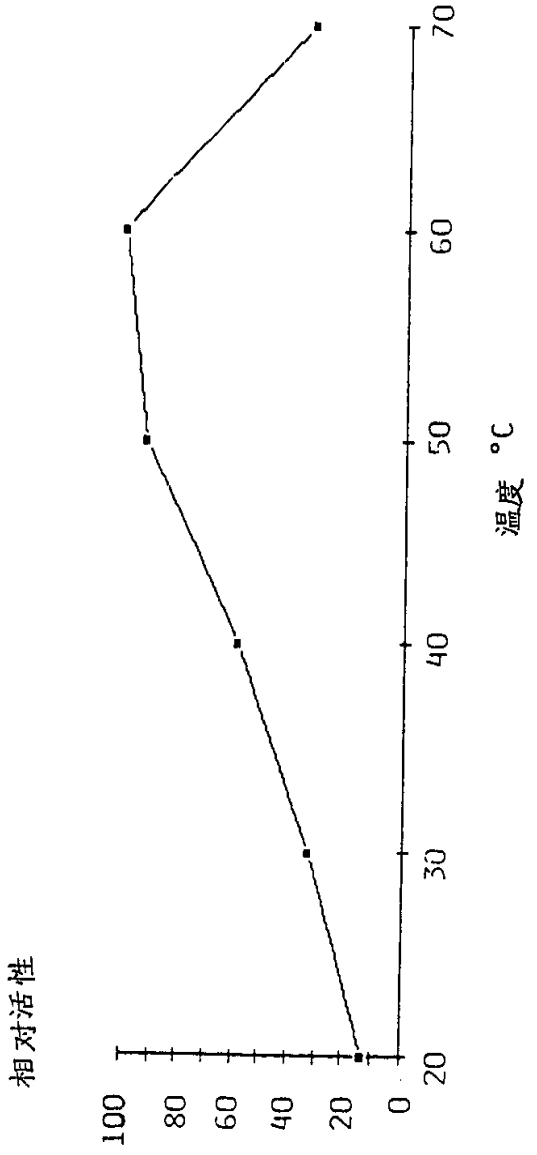


图 2

