

[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 97199686.5

C12N 15/56
C12N 9/42 D06M 16/00
C12N 1/14 C11D 3/386
C07K 14/37 D21C 9/00
C12N 15/01
//(C12N9/42, C12R
1:645)

[43]公开日 1999 年 12 月 1 日

[11]公开号 CN 1237207A

[22]申请日 97.9.30 [21]申请号 97199686.5

[30]优先权

[32]96.10.10 [33]US [31]08/731,170

[86]国际申请 PCT/US97/17669 97.9.30

[87]国际公布 WO98/15633 英 98.4.16

[85]进入国家阶段日期 99.5.13

[71]申请人 马克·爱伦·艾玛尔法伯

地址 美国佛罗里达州

[72]发明人 马克·爱伦·艾玛尔法伯

I·V·索洛维约夫 A·本-巴萨特

R·P·柏林盖姆

V·M·切尔诺格拉佐夫

O·N·奥克内夫 P·T·奥尔森

A·P·西尼岑

[74]专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 陈文青

权利要求书 6 页 说明书 48 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 金孢子菌属纤维素酶及其使用方法

[57]摘要

本发明涉及新的中性和/或碱性纤维素酶的组合物；以及从金孢子菌属、尤其是 *Chrysosporium lucknowense* 的培养物获得中性和/或碱性纤维素酶组合物的方法。本发明还提供了能生产中性和/或碱性纤维素酶的金孢子菌属突变株及其制备方法。本发明还涉及编码中性和/或碱性纤维素酶组合物中所含酶的基因。另外，本发明提供了培养金孢子菌属来生产中性和/或碱性纤维素酶的方法。本发明的中性和/或碱性纤维素酶组合物可用于各种过程，它们包括农物的石洗、洗涤剂加工、纸张及纤维浆状物的去油墨、增亮、脱毛、生物漂白以及废液的处理。本发明还涉及有葡聚糖酶和纤维二糖水解酶活性且可用于石洗的纤维素酶的分离和纯化。

ISSN 1000-8427 4

权 利 要 求 书

1. 一种 *Chrysosporium lucknowense* Garg 27K 的分离的培养物, 其登录号为 VKM F-3500D。

5 2. 一种中性和/或碱性纤维素酶组合物, 该组合物通过下述方法获得:

(a)使野生型或突变型金孢子菌属培养物在合适的培养基中生长; 和

(b)从所述金孢子菌属培养物中分离出所述中性和/或碱性纤维素酶组合物。

3. 根据权利要求 2 所述的纤维素酶组合物, 其中所述活性通过 CMC 酶、RBB-CMC 酶、Cellazyme、内粘度或滤纸活性试验来测定。

10 4. 根据权利要求 2 所述的纤维素酶组合物, 当用权利要求 3 所述的试验进行测定时, 该组合物在 40 至 60 °C、pH5.0 至 pH12.0 内有最高活性。

5. 根据权利要求 2 所述的纤维素酶组合物, 当用权利要求 3 所述的试验进行测定时, 该组合物在 pH6.0 至 pH7.0、40 °C 至 60 °C 下有至少 50% 的最高酶活性。

6. 根据权利要求 2 所述的产物, 其中所述金孢子菌属培育物是 *Chrysosporium lucknowense*, *Chrysosporium pannorum*, *Chrysosporium pruinosum*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lobatum*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium guenslandicum* 或 *Chrysosporium tropicum*。

7. 根据权利要求 6 所述的产物, 其中所述金孢子菌属培养物是 *Chrysosporium lucknowense*。

20 8. 根据权利要求 7 所述的产物, 其中所述 *Chrysosporium lucknowense* 培养物是 *Chrysosporium lucknowense* Garg 27K, 登录号为 VKM F-3500D。

9. 根据权利要求 2 所述的产物, 其中所述金孢子菌属培养物是金孢子菌属的突变型菌株。

10. 根据权利要求 9 所述的产物, 其中所述培养物是 *Chrysosporium lucknowense* Garg 27K 的突变株。

11. 根据权利要求 2 所述的产物, 其中所述培养基包含无机盐、复杂的有机营养源或其组合, 以及碳源。

12. 一种生产中性和/或碱性纤维素酶组合物的方法, 所述方法包括:

(a)使野生型或突变型金孢子菌属培养物在合适的培养基中生长; 和

30 (b)从所述金孢子菌属培养物中分离所述中性和/或碱性纤维素酶组合物。

13. 根据权利要求 12 所述的方法, 其中所述金孢子菌属培养物是 *Chrysosporium lucknowense*, *Chrysosporium pannorum*, *Chrysosporium pruinosum*,

Chrysosporium keratinophilum, *Chrysosporium lobatum*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium guenslandicum* 或 *Chrysosporium tropicum*.

14. 根据权利要求 13 所述的方法, 其中所述金孢子菌属培养物是 *Chrysosporium lucknowense* .

5 15. 根据权利要求 14 所述的方法, 其中所述 *Chrysosporium lucknowense* 培养物是 *Chrysosporium lucknowense* Garg 27K .

16. 根据权利要求 12 所述的方法, 其中所述金孢子菌属培养物是金孢子菌属的突变型菌株.

10 17. 根据权利要求 16 所述的方法, 其中所述突变型菌株是 *Chrysosporium lucknowense* Garg 27K 的突变株.

18. 根据权利要求 12 所述的方法, 其中所述培养基包含无机盐、有机营养来源或其组合, 以及碳源.

19. 一种洗衣房用洗涤剂或织物软化组合物, 该组合物包含权利要求 2 所述的中性和/或碱性纤维素酶组合物.

15 20. 一种石洗牛仔裤的方法, 所述方法包括用权利要求 2 所述的中性和/或碱性纤维素酶组合物处理所述牛仔裤.

21. 一种生物抛光、脱毛、漂白、染色、增亮或退浆纺织物的方法, 该方法包括用权利要求 2 所述的中性和/或碱性纤维素酶组合物处理所述织物.

20 22. 一种对纸张或浆状物进行去油墨或生物漂白的的方法, 该方法包括用权利要求 2 所述的中性和/或碱性纤维素酶组合物来处理所述纸张或浆状物.

23. 一种增强含有纤维素或棉的纺织物的柔软度或手感的方法, 该方法包括用权利要求 2 所述的中性和/或碱性纤维素酶组合物来处理所述织物.

24. 一种纯的或部分纯的多肽或蛋白级分, 它含有中性或碱性纤维素酶活性, 它从权利要求 2 所述的中性和/或碱性纤维素酶组合物中获得.

25 25. 一种核酸序列, 该序列编码包含权利要求 2 所述的中性和/或碱性纤维素酶组合物所包含的肽或蛋白.

26. 一种制备金孢子菌属突变株的方法, 该突变株能产生在中性和/或碱性 pH 下有增强活性的纤维素酶组合物, 该方法包括:

(a)金孢子菌属的突变孢子;

30 (b)培育步骤(a)的所述孢子; 和

(c)筛选所述培养物中增强水平的中性和/或碱性纤维素酶活性.

27. 根据权利要求 26 所述的方法, 其中所述突变步骤包括使步骤(a)所述的

孢子暴露在紫外光或化学物质下。

28. 根据权利要求 26 所述的方法, 其中所述化学物质是亚硝酸、N-甲基-N-硝基-N-亚硝基胍或 4-硝基喹啉-N-氧化物。

29. 一种由权利要求 26 所述的突变株产生的中性和/或碱性纤维素酶组合
5 物。

30. 一种通过权利要求 26 所述的方法获得的金孢子菌属突变株。

31. 基本上纯的和分离的肽或蛋白级分, 它从权利要求 29 所述的中性和/或碱性纤维素酶组合物制得。

32. 分离的核酸序列, 该序列编码权利要求 31 所述的肽或蛋白。

10 33. 一种分离编码金孢子菌属纤维素酶的基因的方法, 该方法包括:

(a)从野生型或突变型金孢子菌属产生的中性和/或碱性纤维素酶组合物中分离获得蛋白;

(b)对步骤(a)中分离获得的所述蛋白进行全部或部分测序;

(c)从步骤(b)所述的序列中获得核酸序列探针;

15 (d)用步骤(c)所述核酸探针筛选野生型或突变型金孢子菌属文库;

(e)分离该探针识别的核酸序列; 和

(f)对步骤(c)分离的核酸序列进行测序。

34. 核酸序列, 它用权利要求 33 所述的方法获得。

35. 一种重组表达载体, 该载体包含权利要求 32 或 34 所述的核酸序列。

20 36. 根据权利要求 35 所述的重组表达载体, 其中所述表达载体是真核或原核表达载体。

37. 一种含有权利要求 35 所述的重组表达载体的宿主细胞。

38. 根据权利要求 37 所述的宿主细胞, 其中所述宿主细胞选自酵母细胞、真菌细胞、植物细胞或种子、以及细菌细胞。

25 39. 根据权利要求 38 所述的真菌细胞, 其中所述细胞选自木霉属、曲霉属、腐质霉属、青霉属、金孢子菌属或链孢霉属。

40. 一种组合物, 该组合物包含固体或液体介质, 该介质含有从金孢子菌属中分离或获得的酶, 当所述酶悬浮在中性或碱性 pH 的水性介质中时, 该酶有纤维素酶活性。

30 41. 根据权利要求 40 所述的组合物, 其中水性介质的 pH 至少为 5.5。

42. 根据权利要求 40 所述的组合物, 其中水性介质的 pH 在至少 5.5 至 12 之间。

43. 根据权利要求 40 所述的组合物, 其中纤维素酶活性通过 CMC 酶、 RBB CMC 酶、 cellazyme、 内粘度或滤纸活性试验来测定。

44. 根据权利要求 40 所述的组合物, 其中经权利要求 43 所述的试验方法测得, 当水性介质为 pH5.5 至 7.5、 所述介质温度为 40 °C 至 60 °C 时, 酶有最大的纤维素酶活性。

45. 根据权利要求 40 所述的组合物, 经用权利要求 43 所述的试验方法测得, 酶在 pH 低于 5.5 时有最高纤维素酶活性, 但当水性介质的 pH 在 6.0 至 7.0、 温度为 40 °C 至 60 °C 时用相同试验方法测定时, 酶仍然有至少 50% 的最大纤维素酶活性。

46. 根据权利要求 40 所述的组合物, 其中固体介质是粉末、 颗粒或冻干形式。

47. 根据权利要求 40 所述的组合物, 其中组合物还含有洗涤剂组分和/或软化剂。

48. 根据权利要求 40 所述的组合物, 其中组合物还含有至少一种其它的酶。

49. 根据权利要求 40 所述的组合物, 其中组合物还含有染色物。

50. 根据权利要求 40 所述的组合物, 其中水性介质含有足以促进纤维素酶活性洗涤性能的组分。

51. 根据权利要求 40 所述的组合物, 其中所述金孢子菌属是选自 *Chrysosporium lucknowense*, *Chrysosporium pannorum*, *Chrysosporium pruinatum*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lobatum*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium guenslandicum* 和 *Chrysosporium tropicum* 种。

52. 根据权利要求 40 所述的组合物, 其中金孢子菌属是 *Chrysosporium lucknowense*。

53. 根据权利要求 40 所述的组合物, 其中金孢子菌属是 *Chrysosporium lucknowense* Garg 27K。

54. 一种基本上纯的和分离的蛋白级分, 它在中性和/或碱性 pH 下有纤维素酶活性, 经权利要求 43 所述的试验测定, 在 pH6.0 至 7.0 间有至少 50% 的其最大纤维素酶活性, 它从权利要求 2 所述的金孢子菌属组合物中获得。

55. 一种内切葡聚糖酶, 它从权利要求 54 所述的级分中获得, 分子量为 25kD, pI 为 4。

56. 一种内切葡聚糖酶, 它从权利要求 54 所述的级分中获得, 分子量为 70kD, pI 为 4。

57. 一种内切葡聚糖酶，它从权利要求 54 所述的级分中获得，分子量为 60kD，pI 为 3。

58. 一种内切葡聚糖酶，它从权利要求 54 所述的级分中获得，分子量为 43kD，pI 为 3。

5 59. 一种纤维二糖水解酶，它从权利要求 54 所述的级分中获得，分子量为 60kD，pI 为 4。

60. 一种基本上纯的和分离的中性和/或碱性纤维素酶，它的 pI 在 3 至 5.5 之间。

10 61. 根据权利要求 60 所述的纤维素酶，其中所述纤维素酶表现出内切葡聚糖酶或纤维二糖水解酶活性。

62. 根据权利要求 60 所述的纤维素酶，其中所述纤维素酶在 pH6.0 至 7.0 间时经权利要求 43 所述的试验测得至少保留了 50% 的其最大纤维素酶活性。

63. 根据权利要求 54 所述的蛋白级分，其中纤维素酶活性可用于 pH5.0 至 7.0 间的石洗工艺。

15 64. 一种内切葡聚糖酶，它从权利要求 63 所述的级分获得，它的分子量为 25kD。

65. 一种内切葡聚糖酶，它从权利要求 63 所述的级分获得，它的分子量为 70kD。

20 66. 一种内切葡聚糖酶，它从权利要求 63 所述的级分获得，它的分子量为 43kD。

25 67. 一种石洗粗斜纹布和其它织物的方法，该方法包括用至少一种基本上纯的和分离的纤维素酶来处理所述织物，该酶在中性和/或碱性 pH 下有纤维素酶活性，并且经权利要求 43 所述的试验测得，在 pH6.0 至 7.0 下保留有至少 50% 的最大纤维素酶活性，且所述纤维素酶从权利要求 54 所述的中性和/或碱性纤维素酶活性中获得。

68. 根据权利要求 67 所述的方法，其中一种纤维素酶是权利要求 55 的内切葡聚糖酶。

69. 根据权利要求 67 所述的方法，其中一种纤维素酶是权利要求 56 所述的内切葡聚糖酶。

30 70. 根据权利要求 67 所述的方法，其中一种纤维素酶是权利要求 57 所述的内切葡聚糖酶。

71. 根据权利要求 67 所述的方法，其中纤维素酶是权利要求 58 所述的内切

葡聚糖酶。

72. 根据权利要求 67 所述的方法，其中纤维素酶是权利要求 59 所述的纤维二糖水解酶。

73. 一种洗涤剂组合物，它含有一种或多种从权利要求 54 所述的蛋白级分中分离获得的纯化的酶。

74. 一种织物软化组合物，它含有一种或多种从权利要求 54 所述的蛋白级分中获得的纯化的酶。

75. 一种使织物增亮的方法，该方法包括用至少一种基本上纯的和分离的纤维素酶来处理所述织物，该酶在中性和/或碱性 pH 下有纤维素酶活性，并且经权利要求 43 所述的试验方法测得，在 pH6.0 至 7.0 下保留有至少 50% 的最大纤维素酶活性，且所述纤维素酶从权利要求 54 所述的中性和/或碱性纤维素酶活性中获得。

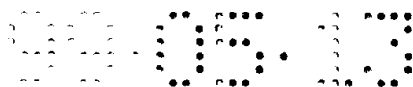
76. 一种软化织物的方法，该方法包括用至少一种基本上纯的和分离的纤维素酶来处理所述织物，该酶在中性和/或碱性 pH 下有纤维素酶活性，并且经权利要求 43 所述的试验方法测得，在 pH6.0 至 7.0 下保留有至少 50% 的最大纤维素酶活性，且所述纤维素酶从权利要求 54 所述的中性和/或碱性纤维素酶活性中获得。

77. 根据权利要求 76 所述的方法，其中织物是含棉织物的纤维素。

78. 一种对织物进行脱毛的方法，该方法包括用至少一种基本上纯的和分离的纤维素酶来处理所述织物，该酶在中性和/或碱性 pH 下有纤维素酶活性，并且经权利要求 43 所述的试验方法测得，在 pH6.0 至 7.0 下保留有至少 50% 的最大纤维素酶活性，且所述纤维素酶从权利要求 54 所述的中性和/或碱性纤维素酶活性中获得。

79. 一种对织物进行生物抛光的方法，该方法包括用至少一种基本上纯的和分离的纤维素酶来处理所述织物，该酶在中性和/或碱性 pH 下有纤维素酶活性，并且经权利要求 43 所述的试验方法测得，在 pH6.0 至 7.0 下保留有至少 50% 的最大纤维素酶活性，且所述纤维素酶从权利要求 54 所述的中性和/或碱性纤维素酶活性中获得。

80. 一种对纸张或浆状物去油墨或生物漂白的的方法，该方法包括用至少一种基本上纯的和分离的纤维素酶来处理所述纸张或浆状物，该酶在中性和/或碱性 pH 下有纤维素酶活性，并且经权利要求 43 所述的试验方法测得，在 pH6.0 至 7.0 下保留有至少 50% 的最大纤维素酶活性，且所述纤维素酶从权利要求 54 所述的中性和/或碱性纤维素酶活性中获得。



说明书

金孢子菌属纤维素酶及其使用方法

5

发明领域

本发明涉及中性和/或碱性纤维素酶及制备该纤维素酶的新方法。更具体地，本发明涉及金孢子菌属真菌以及特定的 *Chrysosporium lucknowense* 菌株生产的纤维素酶。本发明还涉及这些中性或碱性纤维素酶以及含纤维素酶组合物的工业应用。

10

发明背景

纤维织物如棉、亚麻、大麻、苧麻、铜纺(cupro)、lyocell、newcell、人造丝、富纤制成的衣物是非常普及的。其中特别令人感兴趣的衣物是棉或棉混合物制成的经靛蓝染色的粗斜纹布织物制成的牛仔裤。这些衣物通常由上浆并裁剪的衣料缝纫制得，由于有浆料组合物的存在，衣物较硬。在其它情况下，纤维或织物料卷在缝制成成品衣物前先用酶进行处理。在穿了一定时间后，衣物会变得较软，整体颜色减退，局部区域的颜色会发生变化。另外，在反复洗涤后，衣物将更为舒适，手感更软，外观更旧。在最近几年，这种舒适感、手感和外观正在逐渐流行。

20

产生这种舒适感、手感和外观的最普遍方法是，使衣物和纤维素酶以及浮石或其它研磨剂一起在大洗衣机中洗涤。浮石有助于软化织物，并能提供与织物穿很长时间后产生的相似褪色表面。然而，用浮石有几个缺点。例如，必须从加工衣物中手工除去浮石，因为浮石容易堆积在口袋内、衣服内面上、折缝中以及褶皱中。另外，浮石会对石洗机中电动机产生过载损坏，并堵塞机器排水通道和排水管路。加工和设备上的这些问题将大大提高制造成本和物品购买价格。

25

鉴于采用浮石时的问题，已经找到了在石洗过程中采用浮石或其它研磨剂的替换方案。一种替换方案涉及采用破坏织物中纤维素的酶处理方法(Geller，美国专利 No. 4,951,366;Olson 美国专利 No. 4,832,864, 4,912,056, Olson 等,专利 No. 5,006,126, 5,122,159 和 5,213,581, Christner 等, 美国专利 No. 4,943,530, Boegh 等, 美国专利 No. 4,788,682)。用水解酶(如纤维素酶)处理含纤维素织物以改善该织物的柔软度或手感的方法是本领域中已知的(Novo Brochure Cellulase SP227; Novo Brochure Cellozyme; Murata 美国专利 No. 4,443,355; Parslow 美国专利 No.

30

4,661,289; Tai 美国专利 No. 4,479,881; Barbesgaard 美国专利 No. 4,435,307; Browning 英国专利 No. 1,368,599)。

本领域中已知的纤维素酶是水解纤维素(β -1,4-葡聚糖键)结果生成葡萄糖、纤维二糖、纤维寡糖等的酶系统。纤维素酶组合物包括几种不同的酶组分，它们包
5 括外切纤维二糖水解酶、内切葡聚糖酶和 β -葡糖苷酶。而且，这类酶还可进一步分成单个的同工酶。

将结晶纤维素有效地转变成葡萄糖需要有完整的纤维素酶系统。通常，如果需要使纤维素底物完全水解，则纤维素酶混合物应含有 β -葡糖苷酶和纤维二糖水解酶以及内切葡聚糖酶。内切葡聚糖酶催化纤维素聚合物中葡萄糖单元间的 β -
10 1,4-糖苷键随机水解。该组分能水解可溶性纤维素衍生物(如羧甲基纤维素)，从而降低该溶液的粘度。该酶组分作用于聚合物的内部区域，导致聚合物平均链长度迅速降低，伴有还原性末端数目缓慢增加。纤维素聚合物的平均链长度迅速降低可从纤维素溶液粘度的降低得到证实。

在生产纤维素酶的菌株中，不同的纤维素酶对底物的特异性以及作用方式各
15 不相同。例如，目前接受的真菌 *Trichoderma reesei* 纤维素酶的作用机理是内切葡聚糖酶活性首先断裂纤维素中低晶性区域中的内部 β -1,4-糖苷键(Ruohonen L.等, "Proceedings of Second Tricel Symposium on Trichoderma Reesei Cellulases and Other Hydrolases", (P. Sudminen 和 T. Reinkainen. 编辑), Foundation for Biotechnology and Industrial Fermentation Research 8; (1993):87-96)。纤维二糖水解
20 酶活性优先结合纤维素非还原末端的晶性区域，释放出初级产物纤维二糖。 β -葡糖苷酶或纤维二糖酶活性则能作用于纤维寡糖如纤维二糖，并生成单一的产物葡萄糖。

纤维素酶产于真菌、细菌和其它微生物体中。真菌通常产生能降解结晶纤维素的完整的纤维素酶系统。例如，*Trichoderma reesei* 能产生并分泌有效降解结晶
25 纤维素所需的所有酶活性，即内切-1,4- β -D-葡聚糖酶、纤维二糖酶(外切-1,4- β -D-葡聚糖酶)和 1,4- β -D-葡聚糖酶或 β -葡糖苷酶。真菌纤维素酶还有一个优点，即真菌内的纤维素酶很容易通过发酵过程来大量生产。

除了石洗方法外，在本领域中已知纤维素酶或其组分还用于各种工业纺织物应用。例如，纤维素酶可用于洗涤剂组合物中目的是提高组合物的清洁能力，用
30 作软化剂，用来增亮、脱毛和其它用途。当这样使用时，纤维素酶会在洗涤时降解一部分纤维材料(如棉织物)，从而有利于清洁和/或软化织物。真菌纤维素酶中的内切葡聚糖酶组分也可用来提高洗涤剂组合物的清洁能力，用作软化剂，用于

可能会中和洗涤缓冲液，但是 pH 增高对中性/碱性纤维素酶的影响不如对酸性纤维素酶那样严重，因为中性/碱性纤维素酶不仅可以在较高的 pH 下工作，而且还可以在较宽的 pH 范围内工作。

纤维素酶或纤维素酶组分(尤其是碱性和/或中性纤维素酶)在工业上的广泛应用提出了明确的需要，即需要能在中性和/或碱性 pH 条件下工作的纤维素酶。本发明提供了一种方法来生产在中性和/或碱性 pH 下有酶活性的中性/碱性纤维素酶以及含有该酶的组合物。

发明概述

本发明总体上涉及中性和/或碱性纤维素酶以及制备该酶的新方法。更具体地，本发明提供了一种从金孢子菌属、尤其是 *Chrysosporium lucknowense* 真菌来生产纤维素酶组合物的方法，其中纤维素酶组合物在中性和/或碱性 pH 下有酶活性。另外还提供了该纤维素酶组合物在工业上的应用。

本发明一方面涉及能生产中性和/或碱性纤维素酶组合物的金孢子菌属野生型和突变型真菌的分离和纯化培养物(尤其是 *Chrysosporium lucknowense*-GARG 27K 菌株及其突变株)。

本发明另一方面提供了从金孢子菌属真菌来生产中性或碱性纤维素酶的培养条件。

在还有一个实例中，本发明提供了通过重组方法来从金孢子菌属真菌生产中性和/或碱性纤维素酶组合物的方法。

在本发明另一个例子中，提供了能产生中性和/或碱性纤维素酶的金孢子菌属真菌突变型菌株的生产和培养方法。

本发明另一个实例涉及编码金孢子菌属或其基因修饰菌株产生的纤维素酶组合物中酶的核酸序列。

另一个实例涉及从金孢子菌属或其基因修饰菌株产成的纤维素酶组合物中纯化和分离酶。

在本发明的还有一个实例中，提供了金孢子菌属产生的碱性和/或中性纤维素酶在纺织物中的应用(如软化、漂白和石洗过程、衣物染色、去原纤维作用或生物抛光(biopolish)、增亮(color brighten)和脱毛)中的使用方法。

本发明的另一个实例涉及洗涤剂中包含了金孢子菌属纤维素酶的洗涤剂组合物。

本发明的另一个实例提供了纤维素酶组合物在农业、林产品、城市固体废物

和其它来源的木质纤维素生物质糖化中的应用方法。

本发明的其它实例包括纤维素酶组合物在生产染料中的应用, 和在生产用于生物漂白木浆和除去回收打印纸上油墨等其它化学物质中的应用。

5

发明详述

本文所用的术语“中性-碱性纤维素酶”指在大约为 5.5 及更高的 pH 值下保留显著酶活性的纤维素酶组合物。在一个较佳的实例中, 本发明的中性和/或碱性纤维素酶组合物在大约 pH5.5-7.5 内、约 40-60 °C 下有酶活性峰值。当酶活性峰值的 pH 低于约 5.5 时, 中性-碱性纤维素酶组合物在 pH 约为 6.0-7.0、约 40-60 °C 下至少有约 50% 的最优酶活性。参照实施例, 该活性可用 RBBCMC 酶、CMC 酶、Cellazyme、内粘度(endoviscometric)或滤纸活性(FPA)来测定。因此, 本发明的纤维素酶组合物在 pH 高于 5.5 下有适用的酶活性, 因而此酶组合物可用于石洗、洗涤、去油墨或需要中性和/或碱性纤维素酶活性的其它应用中。

本发明涉及在中性或碱性 pH 下有高活性的纤维素酶组合物以及制备所述中性和碱性纤维素酶组合物的独特方法。本发明的中性/碱性纤维素酶组合物可从金孢子菌属各种类获得。在一个特别佳的实例中, 本发明的纤维素酶组合物是从 *Chrysosporium lucknowense* Garg 27K(命名为分离物 G1)中分离出来的, 该菌株于 1996 年 8 月 29 日保藏在根据布达佩斯条约规定的国际保藏机构俄国科学院全俄微生物保藏中心(All-Russian Collection of Microorganisms of the Russian Academy of Sciences, Bakhrushina St. 8:Moscow, Russia 113184), 保藏号为 VKMF-3500D。本发明的纤维素酶组合物是非常有利的, 因为它们在中性和/或碱性 pH 下具有酶活性, 从而为工业应用提供了有益的实施性能。

经 CMC 酶、RBBCMC 酶、Cellazyme、内粘度或滤纸活性(FPA)试验测定, 本发明的真菌菌株制得的纤维素酶组合物在大约 pH5.0-12.0、40-60 °C 时表现出活性。在石洗过程的一个较佳实例中, 纤维素酶组合物在 pH5.5-7.0、约 40-60 °C 下有最优活性。已经证明, 本发明的中性和/或碱性纤维素酶在石洗应用试验(中性和碱性 pH(即 6.0, 7.0 和 8.0)下)以及洗涤剂应用试验(pH 为 10.0 或更高)中有良好的工作活性。

培养分解的纤维微生物以制备纤维素酶的发酵过程在该领域中是已知的。例如, 纤维素酶系统可以通过固体或深层培养(包括固态、分批、补料分批和连续流动方法)来生产。从发酵肉汤中收获和纯化纤维素酶系统也可用本领域已知的方法来实现。纤维素酶组合物很容易从真菌培养物中分离获得(例如, 通过离心或过滤

步骤，并通过滤膜或中空纤维超滤设备来浓缩过滤物)。

用来生产本发明的纤维素酶组合物的真菌金孢子菌属菌株可根据本领域中已知的标准方法和条件来培育。在一个较佳的实例中，本发明的纤维素酶组合物是从 C1 菌株获得的。金孢子菌属 C1 菌株可在含无机盐、有机氮源(如蛋白胨、脱脂棉籽粉、玉米浆)、或酵母抽提物和碳源的培养基中生长。碳源例子包括(但不局限于)：葡萄糖、乳糖、蔗糖、纤维素或其它糖类。更佳的，真菌菌株在含有乳糖和蛋白胨或乳糖和酵母抽提物的培养基中生长。例如，发酵培养基可包含约 0.3%-1.0%(较佳的约为 0.5%-0.6%)的乳糖，约 0.3%-1.0%(较佳的约为 0.5%-0.6%)蛋白胨。真菌生长培养基中可采用的本领域已知的其它氮源和糖源包括(但不局限于)甜菜浆、大麦芽、麦糠和本领域中已知的其它物质。例如，可采用的甜菜浆浓缩物的浓度范围是大约 15-30 克/升(g/L)，较佳的是约 20-25 克/升；可采用的大麦芽的浓度范围是大约 10-20 克/升，较佳的是约 14-16 克/升；可采用的麦糠的浓度范围是大约 3-8 克/升，较佳的是约 5-6 克/升。在一个例子中是将 C1 菌株培养在旋转振荡摇瓶中含甜菜浆、大麦芽和麦糠的盐水培养基中。通过离心和超滤浓缩细胞培养液，从在生长培养基中培养约 3 至 7 天的真菌中分离获得纤维素酶组合物。

或者，可用常规发酵手段来大规模培养金孢子菌属培养物供商业应用。在这种情况下，发酵用于泛指任何控制的真菌培养情况。在大规模培养前，通常先培养所述生长培养物的种菌。接种培养基可以含有常规组分，其包括(但不局限于)碳源、有机氮源和无机盐。碳源可包括(但不局限于)葡萄糖、乳糖、甘油、和/或纤维素，其浓度约为 0.5-200 克/升，更佳的约为 5-50 克/升。有机氮源可包括(但不局限于)酵母抽提物、蛋白胨或脱脂棉籽粉，其浓度约为 0.5-30 克/升，更佳的为 5-15 克/升。无机盐可包括(但不局限于)磷酸钾(例如约 0.01-10 克/升)、硫酸镁(例如约 0.01-3.0 克/升)、硫酸亚铁(例如约 0.001-10 毫克/升)。

种菌培养物或起始培养物可通过本领域已知的方法来引发发酵罐的金孢子菌属生长。用于发酵的培养基可包括培养真菌的常规组分，其包括(但不局限于)纤维素、有机氮源、氯化镁和氯化钙。有机氮源的例子包括(但不局限于)蛋白胨或脱脂棉籽粉(如 Pharmamedia)。

例如，培养基可包含约 5-20 克/升的蛋白胨或脱脂棉籽粉、约 10-30 克/升的纤维素、约 0.03-0.06 克/升的七水硫酸镁和约 0.4-0.8 克/升的二水氯化钙。

本领域技术人员应当理解，在发酵时应当维持发酵混合物的温度、加氧、pH 和营养水平。例如，溶氧水平应维持在约为空气饱和度的 10-60%(较佳的为空气

饱和度的 20-40%)。pH 应维持在约 5-8 之间(较佳的约 6.5-7.5, 最佳的为 6.9-7.1), 温度应维持在约 25-40 °C 之间(更佳的约 28-35 °C)。原料液中可包含类似于发酵培养基的组分, 但浓度较高, 以使加入发酵培养基中时稀释最少。

根据本发明方法制得的纤维素酶组合物可用于需要纤维素酶活性、尤其是中性和/或碱性纤维素酶活性的其它各种场合。在本发明的一个实例中, 中性和/或碱性纤维素酶组合物可用于粗斜纹布牛仔裤的石洗过程。例如, 石洗应用的较佳的 pH 范围为约 5.5-7.5, 最佳的约 6-7。从金孢子菌属分离物中获得的中性和/或碱性纤维素酶组合物在或高于中性或碱性 pH 下有显著的酶活性。与采用酸性纤维素酶(如从 *Trichoderma reesei* 获得的纤维素酶)的传统过程相比, 在中性和/或碱性 pH 下采用中性和/或碱性纤维素酶的石洗过程是特别有利的, 因为它使衣物背染的水平较低, 衣物强度损失较少, 该过程中自然存在的水呈碱性。这些石洗过程使牛仔裤产生了非常希望的手感和外观。例如, 每 135g 粗斜纹布可采用 0.02-10g 本文所述的纤维素酶制品 47.0528。本领域技术人员知道怎样根据诸如纤维素酶活性和洗涤条件(包括但不限于温度和 pH)等因素来调节本发明制得的纤维素酶组合物的量或浓度。

在本发明的还有一个实例中, 本发明的纤维素酶组合物可用来减少或消除纤维素由于加入洗涤剂组合物而产生的织物粗糙度。例如, 较佳的洗涤剂组合物 pH 范围在大约 8-12 之间, 最佳的约为 pH10-11。本发明的纤维素酶组合物可在中性和/或碱性 pH 下用于洗涤剂组合物中。打算和本发明的纤维素酶组合物一起使用的洗涤剂组分包括本领域已知的任何洗涤剂组分。这些组分的例子包括(但不限于): 洗涤剂、缓冲液、表面活性剂、漂白剂、软化剂、溶剂、固体成型剂、磨蚀剂、碱性物质、无机电解质、纤维素酶激活剂、抗氧化剂、助洗剂、硅酸盐、防腐剂 and 稳定剂, 它们是本领域中已知的。本发明的洗涤剂组合物宜采用一种表面活性剂, 包括用于洗涤剂组合物的熟知的阴离子型、非离子型和两性表面活性剂。除了纤维素酶组分和表面活性剂, 本发明的洗涤剂组合物还含有一种或多种下列组分: 酶, 如淀粉酶、纤维素酶、蛋白酶、脂肪酶、氧化还原酶、过氧化酶和其它酶; 阳离子表面活性剂和长链脂肪酸; 助洗剂; 抗再沉积剂; 漂白剂; 蓝化剂和荧光染料; 结块抑制剂; 抑制纤维素酶活性因子的掩蔽剂; 纤维素酶激活剂; 抗氧化剂; 和增溶剂。此外, 如果需要, 本发明的洗涤剂组合物中还可使用香料、防腐剂、染料等。专利 No 4,435,307; 4,443,355; 4,661,289; 4,479,881; 5,120,463 中列举了采用纤维素酶的洗涤剂组合物例子, 它们均纳入本文作参考。

当用于本发明的洗涤剂基料是粉末形式时, 它可以用任何已知制备方法(包

括喷雾干燥法和/或造粒法)制得。造粒法是最佳的，因为与喷雾干燥产品相比，颗粒不会起尘。喷雾干燥方法获得的洗涤剂基料是中空的颗粒，它是通过将耐热组分(如表面活性剂和助洗剂)的水性浆料喷入热空间而获得。颗粒的大小约为50-2000微米。在喷雾干燥后，可以加入香料、酶、漂白剂、和/或无机碱性助洗剂。对于(例如)用喷雾干燥造粒法获得的高密度、颗粒状洗涤剂基料，在制得基料后，还可加入各种组分。当洗涤剂基料是液体时，它可以是均相溶液或非均相溶液。

本发明的纤维素酶组合物最好在碱性或中性 pH 下表现出高水平的活性，但在酸性 pH 下也能表现出酶活性。因此，包含本发明的纤维素酶的洗涤剂组合物可用于从酸性到碱性的较广的 pH 范围。

可采用这些纤维素酶组合物的其它纺织应用包括(但不限于): 衣物染色应用，包括但不限于粘胶丝的酶促丝光处理、生物抛光应用、酶促表面抛光；生物洗涤(织物材料的洗涤或清洗处理)、酶促微纤维化、酶促亚麻布、苧麻和大麻布的“棉布化”；Lyocel 或 Newcell 处理(即来自 Courtaulad 的“TENCEL”)、铜纺和其它纤维素织物或衣物的处理，除去染色的纤维素底物中(如染色的棉布)的染料 (Leisola & Linko-(1976) *Analytical Biochemistry*, v. 70, p. 592, *Determination of The Solubilizing Activity Of A Cellulase Complex With Dyed Substrates*; Blum 和 Stahl- *Enzymic Degradation Of Cellulose Fibers*; Shizuoka Prefectural Hamamatsu Textile Industrial Research Institute 报告 No. 24(1985))、用作漂白剂使新的靛蓝染色的粗斜纹布显得陈旧(Fujikawa-日本专利申请公开号 50-132269)，用来增强漂白剂的漂白作用(Suzuki-英国专利 No. 2 094 826)，以及用于酶促退浆和织物漂白的组合物的加工中(Windbichtler 等，美国专利 No. 2,974,001)。Bhatawadekar(1983 年 5 月) *Journal of the Textile Association* 83-86 页提供了另一个用纤维素酶进行酶促退浆的例子。

在其它工业实例中，纤维素酶组合物可用来糖化来自农业、林业产品、城市固体废物和其它来源的木质纤维素生物物质，通过发酵来生产燃料和其它化学物质，用来生物漂白木浆，以及用来对回收的打印纸脱墨，所有这些均可采用本领域技术人员熟知的方法来进行。

在本发明的其它实例中，可分离获得中性和碱性纤维素酶组合物的各种组分并单独使用。特定组分或富含某种纤维素酶组分的纤维素酶组合物可通过化学和物理方法从突变体中产生或分离获得，或可用基因工程方法来特别制得。纤维素酶系统可用本领域中认同的分离技术来纯化成分开的组分，这些分离技术包括在

合适 pH 条件下的离子交换层析、亲和层析、体积排阻、层析等。例如，在离子交换层析中，可以通过 pH 梯度或盐梯度或两者来洗脱分离纤维素酶组分。这些分离是本领域技术人员从本文提供的说明获益后能够做到的。

一旦分级和分离获得纤维素酶组合物的各个酶组分，就可对蛋白进行部分测序或微测序，以设计出合成的 DNA 或探针来分离编码感兴趣酶蛋白的基因。通常，蛋白的氨基端序列用常规蛋白测序方法或自动测序仪(Ausubel 等, (1987) “ Current Protocols in Molecular Biology ” , John Wiley 和 Sons, New York, New York)来测定。另外，蛋白的其它区域可结合化学断裂或酶促断裂以及蛋白分离技术来进行测序。(Ausubel 等, (1987) “ Current Protocols in Molecular Biology ” , John Wiley 和 Sons, New York, New York)。本领域技术人员应能理解，合成的 DNA 克隆或探针可用于常规克隆技术，以分离出对应于金孢子菌属产生的中性/碱性纤维素酶组合物中的酶的基因。

本领域技术人员应能理解，由于 DNA 序列中的遗传密码变化有简并性，本发明获得的核酸序列在本领域中可以变化，但是仍能形成能编码纤维素酶组合物中酶组分的 DNA 序列。这种 DNA 序列在功能上等价于本发明的核酸序列，它们也被包括在本发明内。另外，与该核酸序列互补的、能在各种条件下与公开的核酸序列杂交的核酸序列也包括在本发明内。

本发明还包括编码本发明纤维素酶组合物中的酶的蛋白、肽或其类似物，那些蛋白或肽有与本发明的酶蛋白或肽基本相同的功能。这些蛋白或多肽包括(但不限于)，蛋白片段或其取代、插入或缺失的突变体。本发明还包括与编码本发明纤维素酶组合物中的酶蛋白质基本上同源的蛋白或肽。术语“类似物”包括氨基酸残基序列基本上与该序列相同的多肽，特别是其中一个或多个残基被功能上类似的残基保守性取代并表现出本文所述蛋白功能的多肽。保守取代的例子包括一个非极性残基(如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸或丙氨酸)被另一个非极性残基取代，一个极性(亲水性)残基被另一个极性残基取代(例如精氨酸和赖氨酸、谷氨酰胺和天冬酰胺、苏氨酸和丝氨酸间的取代)，一个碱性残基(如赖氨酸、精氨酸或组氨酸)被另一个碱性残基取代，或一个酸性残基(如天冬氨酸或谷氨酸)被另一个酸性残基取代。

本发明的蛋白或多肽还包括任何具有一个或多个插入残基和/或缺失残基的多肽，此多肽的序列包括在本发明的蛋白中，只要它们保留了必需的活性。

本发明还提供了一个重组 DNA 分子，该分子包含本发明分离的全部或部分核酸序列以及载体。适用于本发明的表达载体包含至少一个表达控制元件与核酸

序列操作性相连。表达控制元件被插入载体中以控制和调节核酸序列的表达。表达控制元件的例子包括(但不限于): lac 系统、 λ 噬菌体的操纵子和启动子区、酵母或其它真菌启动子。可采用的启动子例子包括(但不限于)葡糖淀粉酶。其它较佳的或所需的操纵元件包括(但不限于): 前导序列、终止密码子、聚腺苷酸化信号, 和核酸序列在宿主系统中适当转录及随后的翻译所需的或较佳的任何其它序列。本领域技术人员应当理解, 所需的或较佳的表达控制元件的正确组合取决于所选的宿主系统。还应理解, 表达载体应含有表达载体(含有核酸序列)在宿主系统中转移和随后复制所必需的其它元件。这些元件的例子包括(但不限于), 复制起点和可选择标记。本领域技术人员还应理解, 这些载体可用常规方法来构建(Ausubel 等, (1987) "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, New York, New York)或可从商业上购得。

本发明的另一方面涉及一种宿主生物, 该宿主中插入了含有全部或部分核酸序列的重组表达载体。用本发明的核酸序列转化的宿主细胞包括真核细胞, 如动物、植物或种子、昆虫或酵母细胞, 以及原核细胞, 如大肠杆菌或其它细菌。真菌宿主细胞的例子包括(但不限于)曲霉属、木霉属、腐质霉属、青霉属或链孢霉属。携带基因载体导入细胞的方式包括(但不限于)转化、显微注射、电穿孔、转导、或用 DEAE-葡聚糖、脂质转染、磷酸钙或其它本领域技术人员已知的方法(Sambrook 等, (1989) "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Press, Plainview, New York)来转染。另外, 可用本发明的核酸序列来转化金孢子菌属细胞, 以通过金孢子菌属来扩增纤维素酶的产生。

在一个较佳的实例中, 采用了在真菌细胞中起作用的表达载体。这些载体的例子包括(但不限于)下述专利中描述的质粒, Ogawa; 日本专利 JP5095787 A 930420, Ozeki; 日本专利 JP7115976 A 950509, Murakami; 日本专利 JP3094690 A 910419, Ishida; 日本专利 JP3251175 A 911108, Uozumi; 日本专利 JP5268953 A 931019 DW9346 C12N-009/34 011pp, Gottschalk; 德国专利 DE3908813 A 900920 DW9039 000pp, Gysler; 欧洲专利 EP-683228 A2 951122 DW9551 C12n-015/60 Eng 041pp。较佳的是, 将重组蛋白表达载体导入真菌细胞中, 以保证对导入蛋白进行合适的加工和修饰。

在另一个实例中, 可获得宿主细胞表达的重组蛋白作为粗制裂解物, 或可通过本领域已知的蛋白纯化标准方法来纯化, 这些标准方法包括示差沉淀、分子筛层析、离子交换层析、等电点聚焦、凝胶电泳、亲和层析和免疫亲和层析等。(Ausubel 等, (1987) "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons,

New York, New York)。在免疫亲和层析场合下，可使其通过一个层析柱来纯化重组蛋白，该柱含有的树脂其上结合了对感兴趣蛋白有特异性的抗体(Ausubel 等, (1987) "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, New York, New York)。

5 本发明的核酸序列全部或部分还可用作探针来分离其它属或株系中的其它同系物。在一个较佳的实例中，该核酸序列可用来筛选金孢子菌属文库；选择阳性克隆并测序。可以合成的基因文库的来源例子包括(但不局限于)金孢子菌属、曲霉属、青霉属、腐质霉属、头孢子菌属、木霉属或细菌如芽胞杆菌属。本领域技术人员能够理解，可采用合适的杂交条件来检测同系物。 Sambrook 等, 10 (eds)(1989) "Molecular Cloning A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Press, Plainview, New York 和 Ausubel 等, (1987) "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, New York, New York 中描述了核酸杂交、文库构建以及克隆技术的常规方法。

本发明还涉及金孢子菌属的突变型菌株，尤其是能产生中性和/或碱性纤维素酶的突变型菌株 *Chrysosporium lucknowense*。DNA 诱变和筛选突变株的方法是 15 本领域技术人员所熟知的，它们包括各种化学和酶方法。这些方法的例子包括(但不局限于)将真菌暴露在紫外光(UV)、亚硝酸、N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(NG)和 4-硝基喹啉-N-氧化物(4NQO)下。(Leninger(1972) Biochemistry, Worth Publishers Inc., NY; Jeffrey H. Miller(1972) "Experiments in Molecular Genetics" 20 Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York)。较佳的方法包括 UV 和 NG。例如，可通过 UV 诱变来获得能产生在中性和/或碱性 pH 下酶活性有所提高的纤维素酶组合物的金孢子菌属突变株。例如，通过使真菌孢子暴露在紫外光下约 10-180 秒(较佳的约 45-90 秒，最佳的约 65-75 秒)，可产生突变株。涉及 NG 的诱变可包括改变 NG 浓度和暴露时间。例如，约 13-400 毫克/升(mg/L) 25 的 NG 可采用约 15-20 分钟的暴露时间。产生突变株的另一种方法包括采用分子生物学领域的技术。这些技术的例子包括(但不局限于)寡核苷酸定向诱变、接头扫描诱变或采用聚合酶链反应的寡核苷酸定向诱变(Ausubel(1987) Current Protocols in Molecular Biology)。

纤维素酶产生有所提高的突变型金孢子菌属克隆的选择或筛选也可采用常 30 规方法。筛选突变株的选择标准包括(但不局限于)真菌克隆破坏纤维素酶的能力(可从生长在含纤维素培养基平板中的真菌使纤维素变澄清来看出)以及真菌克隆在含纤维素培养基中生长速度的提高。例如，在诱变后，用常规方法将真菌样品

接种在含纤维素的琼脂平板上。可选出显示生长和纤维素清除有所提高的菌落(从分离物周围的培养基变澄清来看出)。然而,可采用纤维素变澄清的任何其它试验。一旦分离出突变株,可用常规方法来维持从突变株获得的原种或孢子。用该方法分离获得的突变株可在本文所述的条件下及用于金孢子菌属野生型菌株的条件下培养或发酵。可对突变株产生的纤维素酶组合物的单个酶组分进行部分测序或微测序,以便设计出合成残留来分离编码感兴趣酶蛋白的基因。因此,本发明涉及编码金孢子菌属突变株产生的纤维素酶的核酸序列以及酶本身。在本发明的另一个实例中,可对分离获得的突变株进行进一步诱变,并用本文上述方法筛选。

本发明还涉及具有所需金孢子菌属任何菌种和菌株的内切葡聚糖酶和/或纤维二糖水解酶活性的纤维素酶的生产、分离和纯化方法,其中纯化方法不受生物种类所限制。根据本发明,如此纯化或部分纯化获得的蛋白级分以及从其制得的酶在诸如石洗、增亮、脱毛和软化织物以及本领域熟知的其它应用中是非常有用的。这种纯化获得的酶制品适于用作洗涤剂以及用于此类应用的其它介质中的添加剂。这些以及其它使用方法对本领域技术人员来说是很容易明白的,这里不作详细的描述。然而,在下文实施例中提供了采用这些酶制品的典型方法。

本文中引用的所有书籍、专利或文章均纳入本文作参考。下列实施例描述了本发明的不同方面,但是它们决不是限制了本发明。所有百分数表示是重量百分数,所有溶剂混合物比例用体积比表示,除非另有特指。

材料和方法

酶试验。CMC 酶试验以羧甲基纤维素作为酶底物来测定水解的初始速度,并定量分析根据 Somogyi 和 Nelson 的方法释放出的还原糖。Methods in Enzymology 卷 160A, 102-104 页中描述了该方法。根据 *Bioorganicheskaya khimia* Vol. 6, 1225-1242 页(内粘度试验),用粘度计量法测定内切 1,4- β -葡聚糖酶活性,以可溶性底物 CMC 粘度的降低速度表示。滤纸活性(FPA)或总纤维素活性采用滤纸作为底物,并估计从 50mg 滤纸样品中释放 2 毫克葡萄糖所需的活性。该试验根据生物技术委员会(Comminssion on Biotechnology)(IUPAC)的纤维素酶总活性或纤维素酶真实活性测定方法,其在 Methods in Enzymology, Vol. 160A, 94-97 页中有所描述。通过微晶纤维素水解时还原糖形成初始速度来估计微晶纤维素酶活性(如 Bioresource Technology, Vol. 52, 119-124 页中所述)。纤维二糖酶试验采用纤维二糖作为底物,测定释放的葡萄糖量(如 Methods in Enzymology, Vol.

160A, pp. 111-112 中所述)。β-葡糖苷酶活性试验用对-硝基苯-β-D-葡糖苷作为底物(Methods in Enzymology, Vol. 160A, 109-1100 页)。用 Lowry 方法测定蛋白(根据 Journal of Biological Chemistry, Vol. 193, 165-175 页)。RBB-CMC 酶试验是测定可溶性底物 RBB-CMC(CMC, 用 Remazolbrilliant Blue 来染色)释放出的染料, 参照的试验可见 Megazyme(Australia)Ltd., Product Information Bulletin, 1995 年 4 月的。内切纤维素酶还可利用 Azurine 交联的 HE 纤维素作为底物的 Cellazyme 试验来测定(见 Megazyme Product Bulletin CEL, 1996 年 1 月)。

实施例 1 C1 菌株的分离

从俄罗斯联邦的 Sola Lake, Far East(俄罗斯太平洋沿岸, 莫斯科以东约 5000 英里)的森林碱性土壤样品中分离出菌株。混合的土壤样品集自 10 处不同的地方。将 1g 每份样品转移到有 100 毫升无菌饮用水的烧瓶中, 用超声分散器超声处理 1 分钟(0.44Amp, 22KHz)。将悬液(1:500 稀释)接种到有含 100 毫克/升链霉素的 Czapek 培养基(pH5.5-6.0)的培养皿中。进行研究, 一式三份。鉴定出不同的颜色形状和大小的菌落, 以便进行第二次分离。在有 Czapek 培养基、麦芽琼脂、马铃薯葡萄糖琼脂或 Getchinson 盐水培养基 pH7.5(表 2)的平板上进一步分离样品。使平板在约 28 °C 下培育数天。在含有表 1 所示组分的纤维素琼脂板上选择纤维素酶产生株。如 Methods in Enzymology 卷 160A 中所述的方法制备非晶性纤维素。

表 1 纤维素琼脂板

组分	克/升
KH ₂ PO ₄	1
KCl	0.1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.3
NaCl	0.1
FeCl ₃	0.01
NaNO ₃	2.5
非晶性纤维素	5
琼脂	15
pH	7.5

将平板培养在 28 °C 下 3-7 天。在菌落周围形成亮而澄清的环表明有纤维素酶

活性。选出具有显著纤维素酶活性的菌株(这里命名为 C1)以作进一步研究。该菌株于 1996 年 8 月 29 日根据布达佩斯条约保藏在俄国科学院全俄微生物保藏中心 (VKM)(英语简称为 RCM, Bakhrushina St. 8: Moscow, Russia, 113184)中, 保藏号为 *Chrysosporium lucknowense* Garg 27K, VKM-F 3500D。

5

实施例 2 C1 菌株的性质鉴定

使 C1 菌株在马铃薯葡萄糖琼脂上生长, 7 天后获得直径为 55-60mm 的菌落。C1 菌落呈乳白色, 表面呈绒毛状, 中央稍稍凸起。菌落边缘平而薄, 且有纤丝。菌落背侧呈亮奶油色。

10 菌丝体透明, 稍稍分枝, 平滑。菌丝壁薄。气生菌丝分开, 形成 2.0-3.0 微米宽的孢子; 基底菌丝无菌。

分生孢子为端生和侧生。未发现间生孢子。大多数孢子通过短茎或短侧枝与菌丝相连。孢子是分开但毗邻的。孢子透明, 壁薄、呈卵形或棒状, 并且是单细胞。它们的大小在直径为 4-10 微米。

15 C1 菌株可以维持在麦芽抽提物琼脂(4 °C)中, 并且每隔 6 个月传代。也可维持在液氮中或冻干。C1 菌株是单倍体, 丝状, 可生长在具有生长抑制剂(如牛胆汁(1.5%))的琼脂板上, 并产生孢子。

实施例 3 C1 菌株的分类

20 根据 Sutton 分类法(Van Dorschot, C.A.N.[1980] "A revision of *Chrysosporium* and allied genera", Studies in Mycology, No. 20, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands, 1-36 页), 本发明的 C1 菌株属于丝状菌目、念珠菌科、金孢子菌属、*Chrysosporium lucknowense* 种 Garg1966。这一分类是根据 C1 菌株下列特征的观察结果来确定的:

25 1. 丝状菌目的特征。在菌丝体上、分开的产孢子细胞上或不同的分生孢子柄上直接产生分生孢子。

2. 念珠菌科的特征。分生孢子和分生孢子柄(如果存在的话)是透明或光亮色; 分生孢子柄是单个或疏松的丛簇。

30 3. 金孢子菌 Corda 133 属的特征。菌落通常通常呈扩散, 白色, 有时带奶油色、淡棕色或黄色、毡状和/或粉末状。菌丝大部分是透明的, 壁光滑, 有不规则、或多或少常位分枝。能育的菌丝表现出较少的或没有分化。分生孢子是端生和侧生的, 体殖产孢的(thallic), 均生长在菌丝上, 无柄或有短突出或侧枝, 亚透明或淡黄色, 壁厚或壁薄, 近球形, 棒形, 梨形, obovoid, 单细胞, 很少有双细

胞，平头。有时有间生孢子，它是单生的，偶尔是链状的，亚透明或淡黄色，较支持菌丝宽，通常是单细胞，两端平头。偶尔也存在厚壁孢子。

4. *Chrysosporium lucknowense* Garg 1966 种的特征。在 Sabouraud 葡萄糖琼脂上 14 天时获得菌落，直径为 55mm，奶油色，毡状和绒毛状；稠密，高 3-5mm；边缘清晰、规则且呈伞状；反面呈淡黄色至奶油色。菌丝透明，光滑，壁薄，分枝少。气生菌丝大多数是能育的，紧密分隔的，宽约 1-3.5mm。深层菌丝不能育，宽约 1-4.5mm，较薄的菌丝通常是扭曲的。分生孢子是端生和侧生的，大多数无柄或较短，通常有锥形突出或短侧枝。分生孢子是单个的，但是相互之间靠得很近，一个菌丝细胞上长有 1-4 个分生孢子，亚透明，壁相当薄且光滑，接近球状，同样呈棒状 orobovoid，单细胞， $2.5-11 \times 1.5-6\mu\text{m}$ ，基痕(basal scar)较宽(1-2mm)。没有间生分生孢子。没有厚壁孢子。

5. C1 菌株的表述。菌落在马铃薯葡萄糖琼脂上 7 天时长至直径为 55-60mm，呈白色-奶油色，毡状，中央高 2-3mm；边缘清晰、规则、伞状；反面呈浅白色，奶油色。菌丝透明，光滑，壁薄，分枝少。气生菌丝能育，分开，宽 2-3mm。深层菌丝不能育。分生孢子是端生和侧生的；无柄或在短侧枝上；没有；呈单个，但是相互之间靠得很近，透明，壁薄而平滑，接近球状，棒状或 orobovoid 状，单细胞，4-10mm，没有厚壁孢子。没有间生分生孢子。

结论。C1 是 *Chrysosporium lucknowense* Garg 1966 的一个菌株。为了方便起见，在本文中，将该菌株制备的纤维素酶称为“C1”或“C1 纤维素酶”。

实施例 4 纤维素酶活性试验

使 C1 菌株在 220rpm 下转动的 800 毫升摇瓶中生长，并在 28℃ 下培育。使 C1 菌株生长在含有 5 克/升不同营养物的盐水 Getchinson 培养基(见表 2)(pH7.5)中，在一些情况下培养基中有 2 克/升微晶纤维素。每个烧瓶中加入 100 毫升培养基。

表 2. 摇瓶中的 Getchinson 培养基

	克/升
KH_2PO_4	1
KCl	0.1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.3
NaCl	0.1
FeCl_3	0.01
NaNO_3	2.5

葡萄糖与微晶纤维素、右旋糖与微晶纤维素、甘油与微晶纤维素、乳糖与微晶纤维素的组合致使生长非常缓慢，形成菌丝体的大聚集物，且没有纤维素酶活性(CMC 酶试验)。结果显示在表 3 中。加入有机氮源(即蛋白胨、玉米浆或酵母抽提物)增强了生长和纤维素酶的产生，但不会产生菌丝体聚集。

- 5 乳糖和酵母抽提物使得 C1 纤维素酶产量最高。当用 25 克/升甜菜浆、15 克/升大麦芽和 5 克/升麦糠代替乳糖和酵母抽提物时，可获得类似结果。

表 3. 碳源和氮源对 C1 的 CMC 酶活(摇瓶结果)的影响

底 物	pH7.0 时的 CMC 酶活(单位/毫升)		
	天数		
	3	5	7
葡萄糖 + 纤维素	0	0	0
右旋糖 + 纤维素	0	0	0
甘油 + 纤维素	0	0	0
乳糖 + 纤维素	0	0	0
乳糖 + 玉米浆	0	0	0.9
乳糖 + 蛋白胨	10.7	7.4	14.8
乳糖 + 酵母抽提物	0	18.5	10.0
纤维素 + 蛋白胨	0.3	1.2	1.6
纤维素 + 玉米浆	1.9	2.8	5.5

实施例 5 石洗试验用纤维素酶的制备

1. 摇瓶制备。使 C1 菌株在 220rpm 下转动的 800 毫升摇瓶中生长，并在 28
- 10 °C 下培育数天。每个摇瓶中有 100 毫升生长培养基，其为含有 25 克/升甜菜浆、15GG 大麦芽和 5 克/升麦糠的盐水 Getchinson 培养基(见表 2)(pH7.5)。离心分离出细胞团块，将无细胞上清液冻干，并保藏以便进行进一步测试。通过这种方式制得 C1 纤维素酶制品#47.1.1 至 47.15.1。用相同方法制得 C1 制品#47.16.1，只是在离心后冻干前用 10kDa 截留膜来对无细胞上清液进行超滤。用相同方法，在
- 15 摇瓶中用 Getchinson 培养基制得 C1 制品#47.18.1 至 47.22.1，只是用乳糖(0.5% w/v)和蛋白胨(0.5% w/v)代替甜菜浆、大麦芽和麦糠。离心分离出细胞团块，将无细胞的上清液冻干并保藏以作进一步测试。用与制品#47.1.1-47.15.1 相同的方法在摇瓶中制得制品#47.1000, 47.1001, 47.2000&47.2001，只是它们用其它金孢子菌属菌株制得。具体的说，47.2001 由 *Chrysosporium pannorum* 产生，47.2000 由

Chrysosporium pruinosum 产生, 47.1001 由 *Chrysosporium keratinophilum* 产生, 47.1000 由 *Chrysosporium queenslandicum* 产生(见实施例 8)。这些 C1 制品的蛋白含量和活性指纹列在表 4 中。

表 4. C1 制品和以及从其它金孢子菌属种类制得的制品#47.1000, 47.1001, 47.2000&47.2001 的蛋白含量和活性指纹(fingerprint)

制品编号#	蛋白%	FPA, FPU/g	CMC 酶, U/g	内切(粘度) U/g	微晶纤维 素酶 U/g	β -葡糖苷 酶 U/g
47.1.1	22	13	170	120	23	135
47.2.1	26	14	137	110	22	190
47.3.1	15	19	140	128	18	198
47.4.1	18	23	150	133	55	220
47.5.1	16	20	179	120	71	185
47.6.1	17	22	224	134	82	280
47.7.1	8	4	78	123	10	22
47.8.1	22	14	168	123	19	124
47.9.1	28	15	204	174	23	151
47.10.1	24	11	181	185	16	147
47.11.1	28	16	234	191	25	269
47.12.1	26	14	167	138	20	178
47.13.1	25	9	137	110	13	141
47.14.1	15	6	39	33	9	59
47.15.1	14	6	95	44	10	75
47.16.1	16	10	146	39	15	107
47.17.1	7	3	100	34	5	29
47.18.1	10	30	120	38	10	42
47.19.1	14	4	28	10	4	11
47.20.1	14	6	17	5	1	9
47.21.1	13	3	34	5	3	9
47.22.1	14	5	35	6	3	10
47.1000	18	4	31	35	6	89
47.1001	18	6	103	38	10	66
47.2000	10	3	78	31	7	67
47.2001	13	3	45	39	7	4
47.0325	50	155	4965	964	184	248
47.0528	67	111	13500	1782	232	423

2. 发酵罐生产。在 10L “ANKUM-1M” 发酵罐中，用 Getchinson 培养基、乳糖(0.5% w/v)、蛋白胨(0.5% w/v)和氯霉素(50mg/mL)生产 C1 纤维素酶。营养培养基最初体积为 7.0L，发酵后的最终体积为 7.3L。控制溶氧浓度(DO)、搅拌速度、通气水平、温度和 pH。发酵采用批料操作。发酵温度控制在 28℃。最初 pH 为 7.5，以后则通过加入 NH₄OH(12% w/v)来维持。通气水平为 4-5 升/分钟，以 400-500rpm 搅拌。维持溶氧高于 50%。每隔 8 小时取样(30ml)分析。在发酵最后，离心(10000g，室温，20 分钟)分离出真菌生物物质，冻干培养过滤物，保藏以便进一步测试。结果列在表 5 中。以同样方法制得纤维素酶制品#47.17.1。表 4 中显示了该 C1 制品的蛋白含量和活性指纹。

表 5.在 10L 发酵罐中生产 C1 纤维素酶

时间(小时)	DO(%)	还原糖(克/升)	CMC 酶(U/mL)
0	100	4.8	0
8	90	4.7	0
16	54	4.4	0
24	66	1.2	4
32	70	0.4	10
40	73	0.3	11.5
48	70	0.1	5
56	70	0	1

3. C1 制品#47.0325 和 47.0528 的生产。用野生型 C1 菌株生产 C1 纤维素酶制品#47.0325，用从野生型 C1 菌株的改进型突变株生产 47.0528。这些制品在如实施例 13 和 15 所述的条件下在发酵罐中生长。制品 47.0325 用批料发酵生产，47.0528 用补料分批发酵程序生产。

4. 腐质霉属野生型制品#14.22.1&14.23.1 的生产。野生型 *Humicola grisea* var. *thermoidea* 制品#14.22.1 用 ATCC 16453 菌株生产，野生型 *Humicola insolens* 制品#14.23.1 用 ATCC 16454 菌株生产。用上述 C1 制品#47.1.1-#47.15.1 的相同方法(摇瓶内的生产方法)，在摇瓶内制备这些腐质霉属野生型制品。

实施例 6 C1 与其它中性纤维素酶的比较

将 C1 酶制品#47.0528 的 FPA、CMC 酶和内切葡聚糖酶活性与商业上出售

的 *Humicola insolens*(Denimax XT)以及野生型 ATCC 腐质霉属(制品#14.22.1 *humicola grisea* var. *thermoidea*(ATCC 16453)& 14.23.1 *Humicola insolens*(ATCC 16454))中性纤维素酶作比较。结果列在表 6 中。C1#47.0528 的总活性明显高于野生型腐质霉属和商业上出售的 *Humicola insolens* 制品的中性纤维素酶。C-1 47.0528 的特异性 CMC 酶和内切葡聚糖酶活性(每克干制品的单位或每克蛋白的单位)高于表 6 中列出的所有的测试腐质霉属制品。C-1#47.0528 的特异性 FPA 高于腐质霉属野生型制品#14.22.1& 14.23 的特异性 FPA，而稍稍低于商售产品 *Humicola insolens*(Denimax XT)的特异性 FPA。C1 纤维素酶的 pH 和热稳定性与 Denimax XT 相似。

表 6. C1 与腐质霉属纤维素酶的比较

	蛋白%	FPA	CMC 酶	内切(粘度)	FPA	CMC 酶	内切(粘度)
		单位/每克干制品			单位/每克蛋白		
C1(47.0528)	67	111	13,500	1782	165	20,115	2,655
腐质霉属	10	2	28	30	20	280	300
(#14.23.1)							
腐质霉属	10	1	11	19	10	110	190
(#14.23.1)							
Denimax XT	13	25	450	99	192	3,460	761
(商售)							

(*)活性在 pH5.0、50℃ 下测得。

实施例 7 pH 和温度对 C1 FPA 的活性与稳定性以及 CMC 酶活性的影响

C1 的 FPA 和 CMC 酶活性在约 pH6-7、约 50-60℃ 时表现出最优的稳定性和活性；对于 CMC 酶活性，最优 pH 约为 6.5，最优温度约为 55℃ (见表 8，9)。在 pH8.0(50℃)时，CMC 酶具有 80% 的活性，FPA 有 78% 的活性；在 pH9.0(50℃)时，CMC 酶具有 65% 的活性，FPA 有 52% 的活性(见表 7)。

表 7. 50 ℃ 时 pH 对 C1 纤维素酶(#47.19.1)的 FPA 和 CMC 酶活性的影响

pH(50 ℃)	FPA(%)	CMC 酶(%)
4.0	50	60
4.5	68	70
5.0	75	78
5.5	80	80
6.0	92	90
6.5	100	100
7.0	95	95
7.5	90	92
8.0	78	80
8.5	60	75
9.0	52	65

FPA 试验的培育时间为 60 分钟，CMC 酶试验的培育时间为 5 分钟。

表 8. pH7.0 时温度对 C1 纤维素酶(#47.19.1)的 FPA 和 CMC 酶活性的影响

温度(℃)	FPA(%)	CMC 酶(%)
40	45	50
45	60	55
50	70	65
55	100	400
60	70	60
65	40	30
70	20	25

FPA 试验的培育时间为 60 分钟，CMC 酶试验的培育时间为 5 分钟。

表 9. 50 °C 时 C1 纤维素酶(#47.19.1)的 CMC 酶稳定性

时间(小时)	残留的 CMC 酶活性(%)			
	pH5.1	pH7.2	pH7.7	pH8.5
0	100	100	100	100
0.5	100	98	95	85
1	100	95	93	55
2	100	82	78	32
3	100	78	65	25
5	100	75	45	15

C1 的 CMC 酶在最优 pH 和温度下表现出较高的稳定性: 例如, 在 pH7.2 和 50 °C 下, CMC 酶在 1 小时后有 95%的活性, 在 5 小时后有 75%的活性; 在 pH7.7 和 50 °C 下, CMC 酶在 1 小时后有 93%的活性, 在 5 小时后有 45%的活性(见表 5 9)。

实施例 8 在金孢子菌属同属其它菌株中证实有中性和或碱性纤维素酶活性/性能

测试金孢子菌属中各菌株生产纤维素酶的情况。这些菌株的全名和来源如下。

从美国典型培养物保藏中心(ATCC , Rockville, Maryland)获得的菌株包括:

1. ATCC 44006 *Chrysosporium lucknowense*

2. ATCC 34151 *Chrysosporium pannorum*

3. ATCC 24782 *Chrysosporium pruinosum*

从俄国微生物保藏中心(VKM)获得的菌株包括:

1. VKMF-2119 *Chrysosporium keratinophilum*

2. VKMF-2875 *Chrysosporium keratinophilum*

3. VKMF-2120 *Chrysosporium lobatum*

4. VKMF-2121 *Chrysosporium merdarium*

5. VKMF-2116 *Chrysosporium guenslandicum*

6. VKMF-2117 *Chrysosporium guenslandicum*

7. VKMF-2877 *Chrysosporium tropicum*

在该研究中采用了两类生长培养基：培养基 A-有甜菜浆、大麦芽和麦糠的 Getchinson 培养基；培养基 B-有蛋白胨和乳糖的 Getchinson 培养基。培养基组成如表 11 所述。

表 11 摇瓶研究用培养基

培养基 A	克/升	培养基 B	克/升
K ₂ HPO ₄	1	K ₂ HPO ₄	1
KCl	0.1	KCl	0.1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.3	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.3
NaCl	0.1	NaCl	0.1
FeCl ₃	0.01	FeCl ₃	0.01
NaNO ₃	2.5	NaNO ₃	2.5
甜菜浆	25	乳糖	5
大麦芽	15	蛋白胨	5
麦糠	5	pH	7.5
pH	7.5		

- 5 使菌株在 220rpm、28℃ 下的摇瓶中生长。生长在培养基 A 中的每一菌株样品在培养 6-7 天后取出分析。生长在培养基 B 中的菌株样品在 5 天后取出。所有样品均在 pH5 和 7 下测定 CMC 酶活性。CMC 酶试验的结果列于表 12 中。

表 12. 金孢子菌属不同菌株的纤维素酶产量

菌株	培养基 A(6 天)			培养基 A(7 天)			培养基 B(5 天)		
	RS	CMC 酶		RS	CMC 酶		RS	CMC 酶	
		pH5	pH7		pH5	pH7		pH5	pH7
1. VKMF 2117	2.7	0	0.46	2.6	0.00	0.00	2.3	0.21	0.09
2. VKMF 2116	1.1	0.22	0.04	0.2	0.38	0.61	4.0	0.58	0.59
3. VKMF 2121	1.9	0	0.57	1.1	0.25	0.10	2.5	0.25	0.09
4. ATCC 24782	3.4	0.33	1.40	1.9	1.85	0.11	3.0	1.10	0.06
5. ATCC 34151	1.0	1.54	0.90	0.9	0.17	0.20	4.3	0.81	0.90
6. ATCC 44006	4.4	0.21	0.49	2.0	0.68	0.34	2.5	1.29	0.06
7. VKMF 2119	4.1	0	0.08	2.7	0.29	0.00	3.8	0.95	0.04
8. VKMF 2120	4.5	0	0.17	2.3	0.23	0.00	2.3	0.12	0.00
9. VKMF 2875	1.6	0	1.01	1.7	0.00	0.00	3.8	1.95	0.05
10. VKMF 2877	2.4	0	0.03	0.8	0.22	0.00	5.0	0.43	0.00
11. C1(VKMF 3500D)	2.9	1.70	1.65	nt	nt	nt	0.1	0.89	0.80

RS=发酵最后发酵培养基中的还原糖浓度，克/升(Nelson-Somogi 法)

pH5， pH7 = 测定发酵肉汤 CMC 酶活性的 pH 值

CMC 酶活性用 U/ml 表示。

nt=未测试

- 5 在菌株 ATCC 34151 *Chrysosporium pannorum*、ATCC 24782 *Chrysosporium pruinosum*、VKMF-2875 *Chrysosporium keratinophilum*、VKMF 2116 *Chrysosporium guenslandicum* 例中，离心除去细胞团块，用 10kDa 截留膜将无细胞上清液从 5 升超滤浓缩成 0.5 升。然后冻干超滤浓缩物保藏以备测试。

采用下列编号#的纤维素酶干制品：

- 10 47.2001-ATCC 34151 *Chrysosporium pannorum*
47.2000-ATCC 24782 *Chrysosporium pruinosum*
47.1001-VKMF-2875 *Chrysosporium keratinophilum*
47.1000-VKMF 2116 *Chrysosporium guenslaandicum*
这些制品的蛋白含量和活性指纹列在表 4 中。

15

实施例 9 石洗测试

A. 用 2L 专用洗衣机测试。该系统评价了仅用少量酶获得的关于磨蚀和背染的石洗性能。

- 20 退浆。在家用洗衣机中，60℃、pH 约 5 至 6 下，对 40 片粗斜纹布织物(每片 30 克，25×20cm)退浆 20 分钟，采用 1：6 的织物：液体比(7.2L)和 0.5 克/升(3.6g)Sandoclean PC 液(以平均有 6 摩尔环氧乙烷的乙氧基化脂肪醇为基的非离子型洗涤剂 and 润湿剂)，1 克/升(7.2g)Sirrix 2UD(酸性缓冲多价螯合剂)和 1 克/升(7.2g)Bactosol TK 液(高温稳定α淀粉酶)。20 分钟后，排出液体，用液体比为 1:10 的冷水(14L)洗涤织物片 5 分钟。在 40℃下干燥织物片，并用作测定纤维素酶活性的可比较样品原料。

- 25 衣物片的纤维素酶处理在一洗衣机中进行，该洗衣机由直径为 29cm 的内筒组成，筒总体积为 10.6 升(筒以 20rpm 旋转，向左转 5 圈，再向右转 5 圈)。在纤维素酶处理前，用 4 个橡皮塞将每片织物缝在一起形成一个衣物袋，以确保机械作用主要发生在衣服的较深色外侧上。每个筒内装有一个袋子和额外的 10 个橡皮塞。

- 30 通常的洗涤条件是：30g 退浆的粗斜纹布牛仔织物，纤维素酶在 0.02M 柠檬酸缓冲液中，50℃，60 分钟，衣物：液体比为 1:4。在纤维素酶处理后，用热

水(50 ℃)洗涤袋 5 分钟(衣物: 液体比为 1: 20), 并干燥以作评价。

- 用各种 C1 纤维素酶制品、从金孢子菌属不同种类制得的其它纤维素酶制品、以及商用 Novo Nordisk 中性纤维素酶产品 Denimax XT(美国专利 4,435,307)和 Ultra MG(WPO 91/17243)来进行应用试验。建立这些应用试验用来评价 C-1 以及其它金孢子菌属种类的纤维素酶相对于 Novo 商售中性纤维素酶的石洗性能。该试验在中性和碱性 pH 条件(6.5, 6.7, 7.0 和 8.0)下进行。结果列于表 13 中。结果表明, 用各种 C1 和其它金孢子菌属纤维素酶制品处理衣物的洗涤性能特点与商售中性纤维素酶 Denimax XT 和 Denimax Ultra MG 相似。当在中性和碱性 pH 条件下运作时, C1 和其它金孢子菌属纤维素酶制品表现出优良的软化效果、优良的漂白/总体暗度减少、优良的磨蚀水平以及较低的后染值。数据颜色(Datacolor)测定根据样品的亮度(反射性)。将样品暴露在白光(2 个脉冲闪光灯)下, 用 16 个二极管检测 400-700 纳米之间的减少量。布前侧的反射数值越高则磨蚀越多。背侧的反射数值越高则后染程度越高。

表 13. 用专用 2 升洗衣机的酶洗涤(每次运行洗 135g 粗斜纹布)

酶	量 g	%OW G	CMC 酶		内切(粘度)		℃	液体比	pH	时间 (分钟)	缓冲液	数据颜 色磨蚀	数据颜 色背染
C-1 47.11.1	1.995	1.5	234	474	191	381	50	1:11	7.2	60	0.02MP	13.1	1.8
Denimax XT	0.133	0.10	450	60	99	13	50	1:11	7.0	60	0.02MP	13.1	2.4
C-1 47.12.1	2.100	1.5	167	338	138	290	50	1:11	6.7	60	0.02MP	14.2	1.8
Denimax XT	0.420	0.30	450	182	99	42	50	1:11	6.6	60	0.02MP	14.0	2.3
C-1 47.9.1	3.29	2.44	204	671	174	572	50	1:11	6.7	60	0.02MP	17.1	1.8
C-1 47.16.1U	2.3	1.7	146	336	39	90	50	1:11	6.7	60	0.02MP	16.2	2.3
47/1000.1	7.0	5.19	48	336	14	98	50	1:11	6.5	60	0.02MP	12.9	2.1
47/2001.1	7.15	5.30	47	336	20	143	50	1:11	6.5	60	0.02MP	14.7	1.7
Denimax UltraMG	0.132	0.10	134	18	243	32	50	1:11	7.3	60	0.02MP	14.1	3.5
C-1 47.19.1	7.14	5.29	28	200	9	64	50	1:11	6.5	60	0.02MP	14.7	1.9
C-1 47.0325	0.068	0.05	4965	338	964	66	50	1:11	7.0	60	0.02MP	15.1	2.3
Denimax XT	1.0	0.74	450	450	99	99	50	1:11	6.5	60	0.02MP	19.1	2.8
C-1 47.0528	0.08	0.05	4800	384	1782	143	50	1:11	6.5	60	0.02MP	18.5	3.0
C-1 47.0325	0.136	0.10	4965	675	964	131	50	1:11	6.0	60	0.02MP	18.3	3.8
C-1 47.0325	0.136	0.10	4965	675	964	131	50	1:11	7.0	60	0.02MP	18.9	3.2
C-1 47.0325	0.136	0.10	4965	675	964	131	50	1:11	8.0	60	0.02MP	16.7	2.5
腐质霉属 14.22.1	9.18	6.80	28	257	30	275	50	1:11	6.7	60	0.02MP	14.9	1.3
腐质霉属 14.23.1	9.18	6.80	11	101	19	174	50	1:11	6.7	60	0.02MP	12.5	1.5
T. reesei CP	0.30	0.22	9190	2737	2000	600	50	1:11	4.8	60	0.02CA	17.5	8.0
空白	0.00	0.00	0	0	0	0	50	1:11	6.5	60	0.02MP	9.1	n/a

0.02MP=磷酸盐缓冲系统

0.01CA=柠檬酸缓冲系统

T. reesei CP=产自 *Trichoderma reesei* 的酸性纤维素酶商业产品

5 数据颜色磨蚀=前面反射值, 数值越高, 磨蚀越多, 空白值为 9.1

数据颜色背染=背面反射值, 数值越低, 背染程度越低

%OWG=例如 1%OWG 指 100 英镑衣物用 1 英镑酶

B. 35 磅洗衣机测试。应用试验在 35 磅洗衣机上进行，35 磅洗衣机牌号为 Milnor，洗衣机 RPM 为 30。载荷量为 2400 克(3 件衣物)，所用衣物为 Levi 505 牛仔裤。纤维素酶浴的水量为 15 升，液体比为 6.25:1(低)。其它纤维素酶浴的水量均为 24 升，液体比为 10:1(适中)。在纤维素酶浴时，采用的缓冲系统是 MAP(磷酸二氢铵)和 DAP(磷酸氢二铵)，以维持 pH 为 6.7。试验 4、5、6 和 7，在纤维素酶浴中加入非离子洗涤剂，已知在纤维素酶浴中加入洗涤剂有助于减少衣物上的背染。Zeke 是退浆产品。SSCE 是 Superscour，一种非离子洗涤剂(Zeke 和 Super Scour, CPN International, Ltd., Inc of Jupiter, Florida 提供的专用于纺织物的商售化学产品)。这些试验中采用的洗涤配方的一个例子是下述试验 2。

10

洗涤配方-试验 2
(C-1 47.0528)

	载荷(克)	2400(3 件衣物)	织物:	粗斜纹布	配制时间:	1:30		
	洗衣机:	35#Milnor	重量:	14.5 盎司	开发者:			
步骤	操作	时间(分钟)	程度	温度(F)	化学物质	量	%OWG	pH
1	退浆	10	中等	150	Zeke	48 克	2	
2	排水平衡							
3	漂洗	2	中等	140				
4	排水平衡							
5	漂洗	2	中等	130				
6	排水平衡							
7	磨蚀	75	低(15 升)	125	MAP	29 克	缓冲液	6.7
					DAP	10 克		
					C-1	1.2 克	0.05	
8	排水平衡							
9	洗涤	10	中等	160	SSCE	24 克	1	
10	排水平衡							
11	漂洗	3	中等	120				
12	排水平衡							
13	漂洗	3	中等	100				
14	排水平衡							
15	漂洗	3	中等	100				
16	排水平衡							
17	脱水	2						

在上述实施例以及商业应用中，本领域技术人员知道，在石洗过程中采用浮石可提高对衣物的总体石洗效果。

5 表 14 中的结果表明，C1 纤维素酶制品 #47.0325 和 #47.0528 在衣物磨蚀总体水平上的效果更佳，并且在测试的其它商售中性纤维素酶产品的背染水平范围内。

表 14. C-1 纤维素酶制品 47.0325&47.0528 与商售中性纤维素酶 Denimax XT & BTU 202-318(含有 Denimax XT)的比较

试验 编号	纤维素酶	%OWG	重量(g)	洗涤剂	T(°F)	pH	时间(分钟)
1	Denimax XT	0.50	12.0	无	130	6.7	75
2	C-1 47.0528	0.05	1.2	无	125	6.7	75
3	C-1 47.0325	0.10	2.4	无	125	6.7	75
4	Denimax XT	0.50	12.0	有	130	6.7	75
5	C-1 47.0528	0.05	1.2	有	125	6.7	75
6	C-1 47.0325	0.10	2.4	有	125	6.7	75
7	BTU 202-318	2.50	60.0	有	130	SB	75

磨损
(最大到最小)

试验 5
试验 6
试验 2
试验 3
试验 4
试验 1
试验 7

背染
(最小到最大)

试验 4
试验 5
试验 6
试验 3
试验 1
试验 2
试验 7

10 表 14 的符号说明 在 1.0%OWG、160°F 下，用 Super Scour(非离子洗涤剂)清洗表 14 中所有试验 5 分钟。SB=自缓冲—商业产品“ROCKSOFT”BTU 202-318，它含有 Denimax XT、洗涤剂和缓冲系统以及其它添加剂，以有助于增强该商业产品的石洗性能。

C. 60 升专用洗衣机测试。如 2 升洗衣机测试中所述的那样，对全部粗斜纹布衣物进行退浆。每一洗涤试验用一条牛仔裤(700 克)和 2.8 升液体(织物：液体比为 1:4)。所有的牛仔裤来自同一染色批。它们预先用氧化方法洗涤 15 分钟，然后干燥。用配制的 C1 纤维素酶制品 47.0325(每个试验用 2.4 克)和 47.0528 (一个试验中用 1.5 克，第二个试验中用 1.0 克)在中性 pH 下洗涤蓝色牛仔裤，将其与用 Denimax XT(每个试验用 12 克)相似配方、以及其它两种商售中性纤维素酶 Bactosol JE(用 2.0%OWG)和 BTU202-318(用 2.0%OWG)(Bactosol JE 和 BTU202-318 含有 Denimax XT，缓冲液，洗涤剂和其它添加剂以增强它们的洗涤性能)在中性 pH 条件下洗涤的蓝牛仔裤直接比较。表 15 表明，所有三个 C-1 试验的蓝牛仔裤在获得的磨蚀程度以及衣物总体褪色上比三种商售中性纤维素酶产品更佳。6 个试验中的蓝牛仔裤背染水平均非常佳，它们彼此非常相似，接近采用 Novo 中性纤维素酶 Denimax XT 时预计和观察到的效果。所有这三个 C-1 试验的背染水平均在表 13 所示的背染值范围内。在盲研究(blind study)中，由独立的四组人(每组有三人或三人以上)来评定这些试验，上表 14 中示出了这些试验成品衣物以及试验的评定结果。每组中的人员均是石洗领域专业技术人员。他们被要求按照下列次序来排列衣物：(1)按照整体磨损和褪色程度从最高到最低排列；和(2)按照背染程度从最低到最高排列(见表 15)。

表 15

试验	酶	剂量	缓冲液	洗涤剂	磨损/褪色	背染
试验 A	C-1 47.0528	1.5 克	磷酸盐	有	++++++	5
试验 B	C-1 47.0528	1.0 克	磷酸盐	有	+++++	2
试验 C	C-1 47.0325	2.4 克	磷酸盐	有	+++++	4
试验 D	Denimax XT	12.0 克	磷酸盐	有	++++	3
试验 E	BTU 202-318	2.0%OWG	磷酸盐	有	+++	6
试验 F	Bactosol JE	2.0%OWG	柠檬酸盐	有	+++	1

表 15 符号说明：

磨损/褪色-++++++(6 个+)最佳，(大于等于++++(4 个+)被认为是好的，与商售中性纤维素酶(如 Denimax XT)相当)

背染-数字越小越好(判定所有牛仔裤均在用 Novo 的 Denimax TX 时所见背染程度的范围内)。与传统的酸性纤维素酶(如木霉属纤维素酶(见实施例 13))相比，中性纤维素酶明显减少了背染。

%OWG-衣物重量的%，例如对于 100 英镑的干重牛仔裤， 1%OWG 指用 1 英镑酶。

- 5 D. 光反射性。 评价背染的另一个试验是测定经处理过的织物的光反射性。在洗涤处理的最后，用反射仪在两个不同的波长下分析牛仔裤样品：(1)680nm 下检测到的信号越高(检测牛仔裤外部)，背染就越少；和(2)在 420nm 检测的信号越高(检测牛仔裤内部)，背染就越少。表 16 比较了粗斜纹布牛仔裤在用 Novo Nordisk 和 Genencor International 的商售纤维素酶和 C-1 制品#47.6.1 处理后的反射值。

表 16

酶	680nm	420nm
Denimax L(中性纤维素酶, Novo)	23	20
Primafast 100(酸性纤维素酶, Genencor)	20	13
C1 47.6.1(中性/碱性纤维素酶)	22	18

- 10 C1 纤维素酶在 680nm 和 420nm 下的光反射值与 Novo Nordisk 的商业产品 Denimax L(一种中性纤维素酶)相似，且明显优于 Genencor 的商业产品 Primafast 100(一种酸性纤维素酶)。

E. 半工业洗衣机中的试验

试验#1

2 条牛仔裤，重 1343 克
 水比例为 6： 1
 pH5.5
 温度 54 ℃
 酶： C1(制品#47.6.1)12 克
 (0.9%)
 磨蚀时间 90 分钟
 升降浴(drop bath)
 用 1%非离子洗涤剂 66 ℃漂洗 5 分钟
 升降浴
 漂洗冷却
 升降浴
 用阳离子软化剂 49 ℃软化 5 分钟
 离心脱水并干燥

试验#2. 进行上述试验#1 的相同步骤, 只是采用 Denimax 700T(2% OWG 28.9 克)酶, 洗涤条件为 pH7.0, 54 °C。

将 C1 纤维素酶与 Denimax 700T(Novo 生产的一种中性纤维素酶商业产品) 作比较。所有的牛仔裤来自同一染色批量。它们预先用氧化方法预洗 15 分钟, 然后干燥。

与经 Denimax 700T 纤维素酶处理过的牛仔裤相比, 经 C1 纤维素酶制品 #47.6.1 处理的牛仔裤表现出稍低的磨损和较少的背染。

实施例 10 C1 纤维素酶作为洗衣房用洗涤剂的添加剂

A. 棉花释放的污渍

用洗涤性能程序(wash-performance procedure)PW 9406(Solvay)测试 C1 纤维素酶制品#47.9.1 的洗涤性能。通过 Delta 反射%来测试从棉织物中释放出的污渍(油墨)。在有和没有碱性蛋白酶 Opticlean L500 的存在下, 进行洗涤试验, 比较 C1 纤维素酶制品(#47.9.1)与 Novo Nordisk 的纤维素酶 0.7T。该试验的结果列于表 17 中。

C1 纤维素酶和 *Humicola insolens* 的纤维素酶一样, 在中性 pH 下颜色型洗涤剂中具有从油墨污染的棉中释放出污渍的性能。

表 17. 采用 C1 纤维素酶(*)的洗涤剂洗涤试验

测试的酶(pH7.0)	CMC 酶 剂量(U/升)	反射值(%)	
		1	2
纤维素酶 0.7T	200	3.68	4.75
纤维素酶 0.7T	500	2.68	4.07
纤维素酶 0.7T+5000DU/l(**)	200	2.07	3.13
纤维素酶 0.7T+5000DU/l(**)	500	2.08	3.22
C1 #47.9.1	200	2.18	2.88
C1 #47.9.1	500	2.77	3.72
C1 #47.9.1+5000DU/l(**)	200	1.15	1.91
C1 #47.9.1+5000DU/l(**)	500	2.81	3.30
无(对照)	无	0	0

AADU=Du=Delft 单位, Du/l=Defft 单位/升

(*)40 °C 下 45 分钟, 在 68 °C 干燥 75 分钟

(**)碱性磷酸酶 Opticlean L500

B. C1 纤维素酶与丝氨酸蛋白酶在一起的稳定性

采用胰蛋白酶(3.2 μ M, 来自牛胰腺, 活性为 10000-13000 N-苄基-L-精氨酸乙酯(BAEE)/mg, Sigma T-8253)和 α 胰凝乳蛋白酶(8 μ M, 来自牛胰腺, 40-60U/mg, Sigma C-4129)作为丝氨酸蛋白酶。

- 5 使蛋白酶与 C1 纤维素酶在 20 $^{\circ}$ C、pH7.0 下培育。胰凝乳蛋白酶在 12 小时内不减少 C1 活性, 而胰蛋白酶则使 C1 活性稍稍降低(约 20%), 见表 18。

胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶在 pH4.5 和 7.0、50 $^{\circ}$ C 和 57 $^{\circ}$ C 下不会明显改变 C1 CMC 酶的稳定性, 见表 18。

表 18. 蛋白酶对 C1 纤维素酶(#47.9.1)的 CMC 酶活性的影响

蛋白酶	温度($^{\circ}$ C)	pH	培育时间(小时)	保留的 CMC 酶活性(%)
无(对照)	20	7.0	12	70
+胰凝乳蛋白酶	20	7.0	12	70
+胰蛋白酶	20	7.0	12	50
无(对照)	50	4.5	3	100
+胰凝乳蛋白酶	50	4.5	3	100
+胰蛋白酶	50	4.5	3	100
无(对照)	50	7.0	3	78
+胰凝乳蛋白酶	50	7.0	3	60
+胰蛋白酶	50	7.0	3	68
无(对照)	57	4.5	3	62
+胰凝乳蛋白酶	57	4.5	3	60
+胰蛋白酶	57	4.5	3	62
无(对照)	57	7.0	3	30
+胰凝乳蛋白酶	57	7.0	3	30
+胰蛋白酶	57	7.0	3	30

10 C. 柠檬酸盐、EDTA、吐温-80 和过硫酸盐对 CMC 酶活性的影响

从乙酸盐变为柠檬酸盐缓冲液(一种螯合剂)对 C1 CMC 酶活性没有影响(缓冲液摩尔浓度-0.1M, pH4.5, 50 和 57 $^{\circ}$ C), 见表 19。

- 螯合剂 EDTA(乙二胺四乙酸)(5mM)在 pH4.5 和 50 $^{\circ}$ C 下不改变 CMC 酶活性。在 pH4.5(57 $^{\circ}$ C)和 pH7.0(50 $^{\circ}$ C)下时, 它使 CMC 酶活性稍稍降低。在 pH7.0 和 57 $^{\circ}$ C 下时, 它使 CMC 酶活性稍有提高, 见表 19。
- 15

非离子洗涤剂吐温-80(3 克/升, 聚氧乙烯山梨聚糖醇单油酸酯)在 pH4.5 和 7.0、 50 ℃ 和 57 ℃ 下不会改变 C1 CMC 酶的活性, 见表 19。

氧化剂过硫酸盐(3 克/升)在 pH4.5 和 7.0、 50 ℃ 和 57 ℃ 下不会改变 C1 的 CMC 酶活性, 见表 19。

- 5 C1 CMC 酶能耐受丝氨酸蛋白酶(胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶)、螯合剂(EDTA、柠檬酸盐)、非离子洗涤剂(吐温-80)和氧化剂(过硫酸盐)。

表 19. 柠檬酸盐、EDTA、吐温-80 和过硫酸盐对 C1 纤维素酶(#47.9.1)活性的影响。培育时间-3 小时。

影响物	浓度	温度(℃)	pH	保留的 CMC 酶活性(%)
无(对照)	---	50	4.5	100
柠檬酸盐	0.1M	50	4.5	100
EDTA	5mM	50	4.5	100
吐温-80	3 克/升	50	4.5	100
过硫酸盐	3 克/升	50	4.5	97
无(对照)	---	57	4.5	62
柠檬酸盐	0.1M	57	4.5	65
EDTA	5mM	57	4.5	60
吐温-80	3 克/升	57	4.5	68
过硫酸盐	3 克/升	57	4.5	65
无(对照)	---	50	7.0	78
EDTA	5mM	50	7.0	50
吐温-80	3 克/升	50	7.0	52
过硫酸盐	3 克/升	50	7.0	50
无(对照)	---	57	7.0	30
EDTA	5mM	57	7.0	38
吐温-80	3 克/升	57	7.0	25
过硫酸盐	3 克/升	57	7.0	30

实施例 11 金孢子菌属不同株系产生的纤维素酶样品的石洗试验

- 10 金孢子菌属不同株系产生的制品#47.1000、47.1001、47.2000 和 47.2001 用于洗涤试验, 在 2L 专用洗衣机中 pH6.5、50 ℃ 下洗涤 135 克退浆的粗斜纹布

牛仔裤织物 60 分钟。每次试验的 CMC 酶活性总量恒定在 336U/次。干燥后，用数据颜色测定方法来评价衣物的磨损和背染。结果列于表 20 中。结果表明，金孢子菌属不同株系产生的纤维素酶在中性 pH 下的洗涤性能(磨损与背染水平)与 C-1 种 *Chrysosporium lucknowense* Garg1966 产生的纤维素酶相似。

表 20. 金孢子菌属不同株系的纤维素酶制品的石洗活性

制品#	磨损(*)	背染(**)
47.1000	12.3	1.6
47.1001	12.1	1.6
47.2000	14.2	1.7
47.2001	14.6	1.6

- 5 (*)-布前面反射值，数值越高，磨损程度越高，空白值为 9.1
 (**)-背面反射值，数值越高，背染程度越高

实施例 12 纤维素酶组分的纯化

- 10 1. 选择 C1 样品以便纯化。鉴于 C1 纤维素酶制品 47.11.1 具有(i)较高的蛋白含量、(ii)高的 FPA 和 CMC 酶活性(见表 4)，选择#47.11.1 以进一步纯化。

- 15 2. C1 复合物组分的分离和纯化。第一步纯化步骤包括在 DEAE-Toyopearl 柱 (TosoHaas, Japan)上进行离子交换层析。将干的 C1 纤维素酶制品(1.5g)溶解在 15 毫升 0.01M 钠-磷酸盐缓冲液(pH7)中。离心此溶液，用 Acrylex P-2 柱使上清液脱盐。然后使脱盐的样品在 0.03M 磷酸盐缓冲液(pH4.7)中上 DEAE-Toyopearl 柱
 15 (1.5×30cm)，吸附蛋白用流速为 1 毫升/分钟的 0-0.2M NaCl 梯度液洗脱。获得三组合并的级分—非结合(NB)级分在起始缓冲液中洗脱出来，级分 I 和级分 II 在 0-0.2 M NaCl 梯度中洗脱出来。所有级分均具有分解纤维的活性。

- 20 3. 蛋白级分的 SDS-PAGE：在十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后，NB 级分包括分子量从 30 到 70kD 的蛋白。级分 I 包括分子量从 25 到 100kD 的蛋白，级分 II 含有分子量从 35 到 100kD 的蛋白。SDS-PAGE 采用变性条件、10%的分离凝胶(100×80×0.75mm)。试剂与试剂盒购自 Bio-Rad(USA)。用 25%三氯乙酸配的考马斯亮蓝 R-250 液进行蛋白质染色。

- 25 4. 蛋白级分的 IEF。在等电点聚焦(IEF)后，NB 级分包括等电点(pI)为 4.6-8.0 的蛋白。级分 I 含有 pI 值为 3.2-5.5 的蛋白，级分 II 含有 pI 值为 3.0-5.5 的蛋白。在 mini-IEF Model 111(购自 Bio-Rad)中用 7%PAAG 进行等电点聚焦。试剂和试剂盒购自 Bio-Rad(USA)。用 25%三氯乙酸配的考马斯亮蓝 R-250 液进行蛋白质

染色。

5. 蛋白级分的 CMC 酶活性的 pH 依赖性。表 21 表示 C1 纤维素酶的级分 NB、I 和 II 的 CMC 酶和 RBB-CMC 酶活性的 pH 依赖性。采用下列缓冲系统：乙酸盐缓冲液(pH4-5)、磷酸盐缓冲液(pH6-8)和碳酸盐缓冲液(pH8.5-10)。另外，还用了通用的缓冲体系，它由乙酸盐、硼酸盐和磷酸盐组成(pH4-10)。

表 21. pH 对 C1 蛋白级分的 CMC 酶和 RBB-CMC 酶活性的影响

pH	CMC 酶活性, 50 °C (%)		
	NB 级分	级分 I	级分 II
4.0	85	70	95
4.5	95	85	100
5.0	100	90	95
5.5	90	100	90
6.0	80	90	80
6.5	70	85	80
7.0	65	85	80
7.5	60	35	75
8.0	50	60	60
8.5	45	50	50
9.0	30	45	40
9.5	10	40	32

pH	RBB-CMC 酶活性, 50 °C (%)		
	NB 级分	级分 I	级分 II
4.5	65	95	100
5.0	100	100	95
5.5	95	100	90
6.0	95	95	90
6.5	80	87	90
7.0	80	85	87
7.5	60	65	85
8.0	50	60	70
8.5	45	60	60
9.0	30	50	40
9.5	10	40	32

在 DEAE-Toyopearl 离子交换层析后, 级分 NB、I 和 II 的 CMC 酶和 RBB-CMC 酶活性呈不对称的钟型 pH 曲线。级分 NB 的 CMC 酶活性在 pH4.5-5.5 处最高, 在 pH8.0 处为最高活性的 50%。级分 NB 的 RBB-CMC 酶活性在 pH5.0-6.0 处最高, 在 pH8.0 处为最高活性的 50%。级分 I 的 CMC 酶活性在 pH5.0-6.0 处最高, 在 pH8.5 处为最高活性的 50%。级分 I 的 RBB-CMC 酶活性在 pH4.5-7.0 处最高, 在 pH8.5 处为最高活性的 50%。级分 II 的 CMC 酶活性在 pH4.0-5.5 处最高, 在 pH8.5 处为最高活性的 50%。级分 II 的 RBB-CMC 酶活性在 pH4.5-7.5 处最高, 在 pH8.5 处为最高活性的 50%。

6. DEAE-Toyopearl 层析后蛋白级分 I 的 CMC 酶的稳定性。表 22 示出了 DEAE-Toyopearl 离子交换层析后在不同 pH(5.2-8.7)、50 ℃ 下, 级分 I 暂时的 CMC 酶活性曲线。级分 I 的 CMC 酶活性在 pH5.2-7.2 处最稳定(3 小时后丧失约 30%-45%的活性)。在 pH7.7 下, 约 1 小时后丧失 60%的活性, 而在 pH8.3 和 8.7 下时, 约 0.5 小时后丧失 50%的活性。在 pH8.3 下, 3 小时后丧失 100%的 CMC 酶活性, 在 pH8.7 下, 2 小时后丧失 100%的活性。

表 22. DEAE-Toyopearl 层析后蛋白级分 I 在 50 ℃ 下的 CMC 酶活稳定性

时间 (小时)	残余的 CMC 酶活性(%)				
	pH5.2	pH7.2	pH7.7	pH8.3	pH8.7
0	100	100	100	100	100
0.5	97	75	65	50	50
1	90	55	40	25	15
2	40	50	35	10	0
3	30	45	45	0	0

7. DEAE-Toyopearl 离子交换层析后各级分的性能。用微晶纤维素作为底物的吸附试验表明, 级分 I 和 II 不与结晶纤维素结合, 而 NB 级分与微晶纤维素结合, 分配系数为 0.2L/g。表 23 中列出了级分 NB、I 和 II 对不同底物的特异性活性。所有这三个级分均有 CMC 酶、内切葡聚糖酶、微晶纤维素酶、 β -葡聚糖酶和木聚糖酶活性, 但是级分 NB 与级分 I 和 II 不同, 它没有 β -葡糖苷酶活性。级分 NB、I 和 II 微量粗斜纹布洗涤测试表明, 在 pH7 下级分 I 和 II 具有大致相等的活性, 而级分 NB 的活性较低(根据微量粗斜纹布洗涤试验(Micro Denim Wash test))。

表 23. DEAE-Toyopearl 离子交换层析后各级分的特异性活性

特异性活性, U/mg 蛋白							
级分	CMC 酶	内切葡聚糖酶	微晶纤维素酶	β -葡糖苷酶	β -葡聚糖酶	木聚糖酶	微量粗斜纹布洗涤试验
NB	9.9	6.2	1.8	0.0	11.0	5.3	+
I	3.7	2.3	0.02	3.6	1.9	0.7	++
II	0.8	0.2	0.02	0.02	1.2	0.04	++

8. 微量粗斜纹布洗涤试验。进行该试验采用 20 毫升有预定 CMC 酶活性水平的酶的缓冲溶液。在 50 ℃、过度机械应力(磨损)条件下处理真实靛蓝粗斜纹布染色样布 60 分钟。根据样品干燥后的褪色程度的一组评分来评价纤维素酶性能。

5 还可使用测定颜色的工具和软件。“+”号越多表示磨损越好。

9.在 DEAE-Toyopreal 离子交换层析后的级分 I 蛋白的进一步纯化。对脱盐的级分 I(25ml, 0.8 克/升蛋白)进行 Macro Prep Q 离子交换层析。MacroPrep Q 柱(1.5×10cm)用 0.03M, pH4.7 的乙酸缓冲液平衡, 用 0-0.1M NaCl 浓度梯度洗脱吸附的蛋白。收集三级分 I.1, I.2 和 I.3。级分 I.2 在 pH7 下表现出最高的微量粗斜纹布洗涤活性, 而级分 I.3 活性最低。SDS-PAGE 结果显示, 级分 I.1 和 I.2 的不同在于级分 I.2 中有低分子量的蛋白(25kD), 而它可能有石洗活性。IEF 测定表明, 级分 I.1 的 pI 为 4.2。级分 I.1 和 I.3 的蛋白浓度非常低, 不能作进一步的研究。因此, 对级分 I.2 进行进一步纯化。

15 下一步纯化涉及在 Mono P 柱上的层析聚焦。级分 I.2 用 0.03M, pH6.8 的咪唑缓冲液平衡, 然后上柱。用多缓冲液 74(Polybuffer 74)(1:8, pH4.0)洗脱吸附的蛋白, 发现其中蛋白和活性曲线有 2 个主要的峰。第一峰(称为峰 A)显示出 CMC 酶特异性活性(2.5 单位/毫克)低于峰 B(3.6 单位/毫克)。非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳表明峰 A 中有 2 个蛋白条带存在, 较高分子量的蛋白条带对刚果红染色的 CMC 有活性。在非变性条件下发现峰 B 中有一条活性蛋白条带。SDS-PAGE 数据显
20 示, 峰 A 包括 2 种主要蛋白(60kD 和 70kD), 峰 B 含有一种主要蛋白(25kD)和一种次要蛋白(27kD)。峰 B 中收集的级分称为 25kD-内切 C1, 对其作进一步研究。表 24 示出了 25kD-内切 C1 对不同底物的特异性活性。25kD-内切 C1 有 CMC 酶、RBB-CMC 酶、内切葡聚糖酶、FPA、微晶纤维素酶、 β -葡聚糖酶和木聚糖酶活性, 但是它不呈现 β -葡糖苷酶活性。这种不同活性的组合表明 25kD-内切 C1 是内
25 切葡聚糖酶。CMC 酶和 RBB-CMC 酶活性最适 pH 约为 6.0(表 24)。25kD-内切 C1 具有高的石洗活性(根据采用棉布样片的微量粗斜纹布洗涤试验)(见表 24)。

在从 Mono P 柱上洗脱峰 A 时, 回收得到许多 60kD 比 70kD 蛋白比例不同的级分, 尤其是主要包括 60kD 蛋白的级分(称为 70(60)kD-C1)和主要为 70kD 蛋白的级分(称为 70kD-内切 C1)。表 24 中列出了这些级分对不同底物的特异性活性。从中可以看出, 与 70kD-内切 C1 级分(内切葡聚糖酶活性为 2.8U/mg, 微晶纤维素酶活性为 0.18U/mg)相比, 70(60)kD-C1 级分具有较低的内切葡聚糖酶特异性活性(0.5U/mg)和较高的微晶纤维素酶特异性活性(0.31U/mg), 并且有非常低的 β -葡糖苷酶活性。对 FP、 β -葡聚糖和木聚糖的特异性活性低(见表 24), 且只形成了微晶纤维素水解产物纤维二糖。70(60)kD-C1 级分的石洗活性(根据采用棉布样片的微量粗斜纹布洗涤试验)低(见表 24)。这些数据表明 DEAE-Toyopearl 离子交换层析后级分 I 的 60kD 蛋白可称作一种纤维二糖水解酶。70(60)kD-C1(对于 CMC 和 RBB-CMC)的最适 pH 约为 5.0(表 24)。

70kD-内切 C1 有高的 CMC 酶、RBB-CMC 酶、内切葡聚糖酶、FPA、 β -葡聚糖酶和木聚糖酶特异性活性(表 24)。70kD-内切 C1 也有相当高的石洗活性(根据采用棉布样片的微量粗斜纹布洗涤试验)(见表 24)。DEAE-Toyopearl 离子交换层析后的 70kD-内切 C1 看来是一种内切葡聚糖酶。从表 24 中可以看出, 70kD-内切 C1 的 CMC 酶和 RBB-CMC 酶活性的最适 pH 约为 6.0。

10. DEAE-Toyopearl 离子交换层析级分 II 蛋白的进一步纯化。在 DEAE-Toyopearl 柱上用较长的 0-0.2M NaCl 梯度(时间为 8 小时以上)将 DEAE 层析获得的级分 II 分成 3 个级分(分别为级分 II.1、II.2 和 II.3)。SDS-PAGE 的结果显示, 级分 II.1 包括分子量为 60kD 和 100 kD 的 2 种主要蛋白, 级分 II.2 包括 35 kD、60 kD 和 100 kD 的 3 种主要蛋白, 级分 II.3 包括 43 kD 和 60 kD 的 2 种主要蛋白。级分 II.3 显示出最高的 CMC 酶活性(10 单位/毫克蛋白), 但是洗涤活性低(用亚微量粗斜纹布试验(sub-Micro denim Wash test)), CMC 特异性活性为 1 单位/毫克。级分 II.2 没有表现出任何洗涤活性(但是 CMC 酶活性为 0.7 单位/毫克)。因此, 对级分 II.1 和 II.3 作进一步纯化。

表 24. C1 酶的性能

pH	25 kD 内 切	70(60) kD 切	70 kD 内 切(II.1)	60 kD 内 切(II.1)	100 kD(II.1)	43 kD 内 切(II.3)	60 kD 内 切(II.3)
CMC 酶活性(单位/毫克)							
5.0	4.6	1.10	3.	0.70	0.03	1.02	1.32
6.0	5.0	0.83	3.8	0.52	0	1.01	1.07
7.0	3.9	0.65	3.0	0.45	0	0.90	1.03
RBB-CMC 酶(单位/毫克)							
5.0	8.2	0.12	1.5	0.90	0	0.82	1.21
6.0	8.8	0.10	2.7	0.84	0	0.75	1.14
7.0	6.6	0.07	2.4	0.68	0	0.73	1.12
FPA(单位/毫克)							
5.0	1.0	0.17	0.61	0.31	0	0.45	0.52
内切葡聚糖酶(粘度测定)(单位/毫克)							
5.0	2.26	0.50	2.8	0.21	0	0.15	0.27
微晶纤维素酶(单位/毫克)							
5.0	0.16	0.31	0.18	0.03	0	0.01	0.01
β -葡糖苷酶(单位/毫克)							
5.0	0	0.02	0.16	0.02	0	0.02	0
β -葡聚糖酶(单位/毫克)							
5.0	0.66	0.07	2.4	1.3	0	3.9	4.4
木聚糖酶(单位/毫克)							
5.0	0.40	0.16	0.50	0.06	0.01	0.07	0.01
微量粗斜纹布洗涤活性							
5.0	+++	-	++	nd	nd	nd	nd
7.0	+++	-	++	nd	nd	nd	nd
亚微量粗斜纹布洗涤活性							
5.0	nd	nd	nd	+++	-	+	+
7.0	nd	nd	nd	+++	-	+++	++

nd=未测定

11. 亚微量粗斜纹布洗涤试验。在过度机械应力、50℃下，用2毫升缓冲酶溶液(2单位CMC酶活性)对真实靛蓝染色粗斜纹布进行该试验2小时。根据样品干燥后的褪色，用一组评分来评价纤维素酶的性能水平。

12. 级分II.1的纯化。将级分II.1施加到用0.03M, pH4.75乙酸盐缓冲液平衡的Macro prep Q柱上，用NaCl梯度(0-0.3M)洗脱吸附的蛋白。获得两个蛋白峰，但只有第一个显示CMC酶活性。对第一峰物质进行SDS-PAGE，显示出60kD和100kD两个蛋白以均一状态分离。根据IEF数据，60kD和100kD蛋白具有约为3的酸性pI。表24中显示了60kD和100kD蛋白对不同底物的活性。发现60kD蛋白(称为60kD(II.1)-内切C1)在pH5下具有内切葡聚糖酶、CMC酶、RBB-CMC酶、FPA和β-葡聚糖酶活性(如表24所示，分别为0.2, 0.7, 0.9, 0.3和1.3单位/毫克蛋白)。微晶纤维素酶、β-葡糖苷酶和木聚糖酶活性相当低。这些活性的组合表明60kD(II.1)-内切C1是内切葡聚糖酶。60kD(II.1)-内切C1在pH5和pH7下也具有较高的洗涤活性(通过亚微量粗斜纹布洗涤试验)(见表24)。该蛋白的CMC酶和RBB-CMC酶活性的pH依赖性在pH4.0-4.5时有最高活性，pH6时保留了50%的最高CMC活性和85%的最高RBB-CMC活性，在pH9和10时两种活性均保留15-20%(见表25)。

级分II.1的100kD蛋白(称为100kD(II.1)蛋白)几乎没有纤维素酶活性(表24)。该蛋白仅仅有非常低的CMC酶(0.03单位/毫克)和木聚糖酶(0.008单位/毫克)活性，因此不能确定是溶纤维素的酶。根据亚微量粗斜纹布洗涤试验，100kD(II.1)蛋白没有表现出任何石洗活性(表24)，并且在pH5或pH7下均没有蛋白酶活性。

13. 级分II.3的纯化。用Macro Prep Q层析还对级分II.3进行了纯化。吸附的蛋白用0.2-0.6M NaCl梯度洗脱(起始缓冲液是0.03M乙酸盐，pH4.75)。在Macro Prep Q层析后对获得的级分进行SDS-PAGE，结果表明获得了均质形式的43kD和60kD蛋白。对这些蛋白进行等电点聚焦，显示出43kD和60kD蛋白的pI值约为3。43kD和60kD蛋白分别称为43kD(II.3)-内切C1和60(kD)-内切C1。这些酶对不同底物的活性(见表24)表明它们有相似的CMC酶、FPA、微晶纤维素酶和木聚糖酶特异性活性。60kD(II.3)-内切C1具有更高的特异性的RBB-CMC酶、内切葡聚糖酶和FPA活性(表24)。同时应强调的是，43kD(II.3)-内切C1和60kD(II.3)-内切C1在pH5下均只有非常小的石洗活性(采用亚微量粗斜纹布洗涤试验)。然而，43kD(II.3)-内切C1和60kD(II.3)-内切C1在pH7下有显著的石洗活性，同时，43kD(II.3)-内切C1的石洗活性比60kD(II.3)-内切C1更高。从表25中的pH依赖性可以看出，43kD(II.3)-内切C1的CMC酶和

RBB-CMC 酶活性有较宽的最适 pH(从 pH4.5 到 8)。43 kD(II.3)-内切 C1 在 pH9 下有 50%的最高 CMC 酶活性和 70%的最高 RBB-CMC 酶活性, 在 pH10 下有 20%的最高 CMC 酶和 RBB-CMC 酶活性。相反, 60 kD(II.3)-内切 C1 的 CMC 酶活性有较窄的最适 pH(pH4-4.5), 而 RBB-CMC 酶活性有较宽的最适 pH(从 pH4 到 8), 在 pH9 时保留了 30%的 RBB-CMC 酶活性。

应当注意, 在本文公开的所有纯化蛋白例子中, 分子量通过凝胶电泳(尤其是 SDS-PAGE)来测定, 用作标准品的是已知分子量的参照蛋白。由于所有分析采用这种方法, 因此结果只是近似的, 由于不同技术人员使用不同系列分子量标准品作为参照物采用不同的凝胶跑电泳, 观察的分子量可能会有所变化。

这种经纯化和部分纯化的酶制品非常适于用作洗涤剂、织物软化、脱毛、增亮和石洗组合物的组分。因此, 根据本发明, 上述分离和纯化的酶制品可用于这些应用。因此, 在本文提及的石洗、织物软化、脱毛、增亮和清洁方法、以及在文献中已有描述的实现这些应用的典型方法中, 很容易通过采用这些纯化的或部分纯化的酶制品和含有该酶制品作为主要组分或添加剂的组合物来实现这些过程的目的。在许多商用酶的文献中, 可以知道在这些应用中采用其它或不同的经纯化或部分纯化的酶制品。

表 25. pH 对 C1 纤维素酶的 CMC 酶和 RBB-CMC 酶活性的影响

CMC 酶活性, 50 °C (%)			
pH	60 kD(II.1)-内切	43 kD(II.3)-内切	kD(II.3)-内切
3.5	85	80	85
4.0	100	100	100
5.0	65	100	85
6.0	50	100	70
7.0	45	90	65
8.0	25	70	45
9.0	17	30	30
10.0	15	20	10
11.0	15	5	5

RBB-CMC 酶活性, 40 °C (%)			
pH	60 kD(II.1)-内切	43 kD(II.3)-内切	kD(II.3)-内切
3.5	85	85	80
4.0	100	100	100
5.0	90	100	100
6.0	85	95	95
7.0	70	90	90
8.0	50	80	85
9.0	20	70	70
10.0	15	20	30
11.0	15	15	15

应当理解, 根据测定活性时所用底物的化学结构以及用来测定活性的具体测定方法, 本文所述的中性和/或碱性纤维素酶可以有不同的酶活性。因此, 经纯化或部分纯化的中性和/或碱性纤维素酶将取决于所用的测定方法和底物而表现出不同的 pH/活性。为了不混淆本实施例方法制得的基本上纯的纤维素酶的性能与活性天然特征, 下面描述纯化级分的纤维素酶所测得的活性和性能。

在采用合适的底物时, 本文制得的纯化或部分纯化的纤维素酶表现出内切葡聚糖酶和/或纤维二糖水解酶活性。因此, 表现出有内切葡聚糖酶活性的纤维素酶制品均有约 3-4.5 的 pI。更具体地, 这些级分包括分子量和 pI 值如下的纤维素酶

(内切葡聚糖酶): MW 约 25kD(pI 约 4.0)、MW 约 70kD(pI 约 4.2)、MW 约 60kD(pI 约 3.0)和 MW 约 43kD(pI 约 3.1)。这些纤维素酶级分还含有表现出纤维二糖水解酶活性的蛋白。更具体地, 后者的 MW 约为 60kD, pI 约为 4.2。

采用根据本发明的组合物和纯化酶的方法已公开在文献中, 其中包括许多专利, 这些公开内容均纳入本文作参考。它们中包括 Clarkson(美国专利 5,290,474), 它公开了纤维素酶以及包括表面活性剂和其它添加剂的含纤维素酶组合物的用途, 它用于水洗介质、洗涤剂组合物、设计用以增强颜色保留和/或复原的介质, 以及用来赋予(尤其对含棉织物)改善的柔软度和手感。本发明的纤维素酶和含纤维素酶组合物也可用于同一应用中, 关于其具体描述在许多(如果不是全部)引用的文献中均有描述。另外, 在 Barbesgaard 等(美国专利 4,435,307)中也指出了纤维素酶和组合物在减少粗糙度或织物软化中的用途, 该专利具体公开的是真菌纤维素酶(而不是金孢子菌属)在碱性 pH 范围内的用途, 它包括各种添加剂, 诸如与本发明的新纤维素酶和纤维素酶组合物结合使用来减少粗糙度或软化织物的那些添加剂, 且用洗涤作为单一操作。本发明的纤维素酶和纤维素酶组合物同样使用, Barbesgaard 关于这些应用的说明被特别结合入本文。另外, Boegh(欧洲专利 0220016)具体公开了纤维素酶和纤维素酶组合物(非本发明的新的纤维素酶和纤维素酶组合物)在颜色增亮中的应用, 该说明被特别结合入本文。

当然, 本领域技术人员应能理解, 本发明的新的纤维素酶和纤维素酶组合物非常适用于前述文献所公开的相同用途, 因此不必再对这些用途作更详细地描述。然而, 这些经纯化或部分纯化的酶以及含酶组合物还可用于纸或纸浆材料的去油墨和生物漂白, 本领域技术人员很容易想到这些方法, 尤其在他们回顾了本文的说明后。

实施例 13. 60 升批料发酵罐中的 C-1 纤维素酶生产

25 1. 接种制品

批料发酵的接种制品或起始培养物的制备如下。将 1 毫升 C-1 孢子培养物接种到两个烧瓶的每一个中, 获得总共为 2 升的接种物。起始培养物在 150rpm、30 °C 下培育 56 小时。

接种制品的培养基*

K_2HPO_4	0.5	克/升
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.15	
KCl	0.05	
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.007	
酵母抽提物(ohly KAT)	1.0	
蛋白胨(Hormel PSR 5)	10.0	
乳糖	10.0	
葡萄糖	10.0	

*用 NaOH 将接种培养基调至 pH 7.0，然后在 121 °C 下对培养基高压蒸汽灭菌 35 分钟，两个 6 升挡板式烧瓶中各自含有 1 升培养基。

2. 60 升批料发酵罐中的纤维素酶生产(制品 47.0325)

- 5 将如上制得的 2 升摇瓶接种培养物接种到 60 升发酵罐中的 40 升培养基中。
发酵用培养基如下：

发酵培养基*

K_2HPO_4	0.22	克/升
KH_2PO_4	0.08	克/升
$(NH_4)_2SO_4$	4.0	克/升
二水合柠檬酸三钠	4.0	克/升
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.03	克/升
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.4	克/升
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	毫克/升
$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	毫克/升
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2	毫克/升
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.24	毫克/升
乳糖	5.0	克/升
酵母抽提物(ohly KAT)	0.05	克/升
脱脂棉籽粉(Pharmamedia)	5.0	克/升
纤维素(Signmacell 50)	20.0	克/升
pH	7.0	

*40 升培养基以去离子水配制，并经 121 °C 灭菌 45 分钟。

在接种到发酵培养基中后，通过加入 NH_3 和 H_2SO_4 使 pH 维持高于 6.9 并低

于 7.1。搅拌并按需通气，维持溶氧大于 30% 的饱和度，发酵罐培育 64 小时。

3. 纤维素酶活性的回收

在大的布氏漏斗上用 Whatman 54 号滤纸、以 10 克/升硅藻土 503 作为助滤剂，过滤除去发酵培养液中的悬浮固体。收集滤液，用 10000MW 截留中空纤维滤膜超滤浓缩纤维素酶。将浓缩物冻干。该干的浓缩物称为纤维素酶制品 47.0325。该制品的活性列在表 4 中。

实施例 14. 用来产生 C-1 突变株的突变过程

用含有菌株 C1 孢芽形成培养基的 Pridham 琼脂板(4 克/升酵母抽提物、10 克/升麦芽抽提物、10 克/升葡萄糖、15 克/升琼脂)来制备孢子悬浮液。板中加入 10 毫升 0.05% 吐温 80。将悬浮液转移到无菌螺帽盖试管中并高速旋涡振荡 1 分钟。然后使悬浮液过滤通过一个柱，除去菌丝体。对孢子计数，并稀释成每毫升水中有 7×10^5 个孢子。将 10 毫升孢子悬液转移到标准玻璃培养皿中。用 $720 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 的 Pen-Ray UV 灯照射孢子 75 秒。在照射时，用无菌纸夹作为磁力搅拌棒轻微搅动孢子悬液。照射后，将孢子悬液转移到箔包裹的试管中，用水稀释，并置于暗处的下述 NH_4 基本培养基中。在 30°C 下培育 20 天后，鉴定出菌落周围有大的纤维素澄清带的大菌落。

NH_4 基本培养基，pH7.5

1 克/升 K_2HPO_4
0.1 克/升 KCl
0.3 克/升 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0.1 克/升 NaCl
16 毫克/升 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
1.92 克/升 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
15 克/升 Difco Noble 琼脂
2.5 克/升酸性膨胀纤维素(在高压蒸汽灭菌后以 1.25% 原料液加入)
0.5 克/升 脱氧胆酸钠(高压蒸汽灭菌后加入)

实施例 15. C-1 突变型纤维素酶在 60 升批次发酵罐中的生产(47.0528 的制备)

1. 接种物制备

如实施例 13(部分 1)所述制备用于补料批次发酵的起始培养物。

2. 60 升批次发酵的纤维素酶生产

将 2 升接种物接种到 40 升下述发酵培养基中:

发酵培养基*

K_2HPO_4	0.44	克/升
KH_2PO_4	0.16	克/升
$(NH_4)_2SO_4$	3.0	克/升
二水合柠檬酸二钠	4.0	克/升
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.06	克/升
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.8	克/升
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1	毫克/升
$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.04	毫克/升
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.04	毫克/升
$CoSO_4 \cdot 6H_2O$	0.048	毫克/升
乳糖	5.0	克/升
酵母抽提物(ohly KAT)	0.1	克/升
脱脂棉籽粉(Pharmamedia)	10.0	克/升
纤维素(Signmacell 50)	20.0	克/升

*40 升培养基以去离子水配制, 并经 121 °C 灭菌 45 分钟。

5 3. 发酵条件

将 pH 维持在大约 7.0 左右, 并通过加入 NH_3 和 H_2SO_4 控制 pH 高于 6.9 并低于 7.1。培育 87 小时, 搅拌并按需通气, 维持溶氧大于 30% 的饱和度。40 小时时, 以每 5 分钟 5.0 毫升的速度加入 3.0 升下述补料。

发酵用的补料液

K_2HPO_4	0.88	克/升
KH_2PO_4	0.32	克/升
$(NH_4)_2SO_4$	4.0	克/升
二水合柠檬酸二钠	4.0	克/升
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.12	克/升
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.16	克/升
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2	毫克/升
$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.08	毫克/升
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.08	毫克/升
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.096	毫克/升
乳糖	20.0	克/升
酵母抽提物(ohly KAT)	0.2	克/升
Pharmamedia 脱脂棉籽粉	20.0	克/升
纤维素(Signmacell 50)	20.0	克/升

4. 纤维素酶活性的回收

- 在大的布氏漏斗上用 Whatman 54 号滤纸、以 10 克/升 硅藻土 503 作为助滤剂，过滤除去悬浮的固体。收集滤液，用 10000MW 截留中空纤维滤膜超滤浓缩纤维素酶。将浓缩物冻干。该干的浓缩物称为纤维素酶制品 47.0528(活性列在表 4 中)。

实施例 16 用 Cellazyme 测定方法测定纤维素酶活性

- 用购自 Megazyme(Aust)Pty. Ltd., Sydney, NSW2101, Australia 的 Cellazyme C 片剂和试剂盒来进行该试验。所用的底物 cellazyme C 片剂是商业上提供的 Azurine 交联的 HE-纤维素(AZCL-纤维素)，它很容易使用。简言之，在玻璃试管(16×122mm)中，将 0.025M 乙酸盐缓冲液(pH4.5)中的酶制品 0.5 毫升等份(如果需要可稀释)平衡至 40 ℃ 5 分钟。然后加入 Cellazyme C 片剂(不搅拌)，开始测试反应。在 40 ℃ 下放置整整 10 分钟后，加入 Trizma Base 溶液(10.0mL, 2%w/v，购自 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)终止反应，然后旋涡振荡。使试管在室温下静置约 5 分钟，再次搅拌悬液，使其通过 Whatman No. 1(9cm)滤纸圈过滤，测定滤液在 590nm 下的吸光度。读取相对于空白的吸光度，该空白含有底物和酶，但是在加入 cellazyme C 片剂前先加 Trizma Base 到酶溶液中而制得。该悬液置于

室温下而不是 40 ℃ 下。各组测定采用一个空白，用该空白来对分光光度计调零。

在该试验中，一个单位酶活定义为在所定义的试验条件下每分钟释放 1 微摩尔葡萄糖还原糖等价物所需的酶量。然后参照标准曲线(样品曲线由试剂盒提供，但是很容易在试验室中制作，对于给定的一组实验如果采用不同的特定酶、酶稀

5 释度和条件的话)，确定内切纤维素酶活性。

用该试验来测定我们自己的中性/碱性酶活性，我们发现内切纤维素酶活性(以 pH7 时的活性为 100%计)为 92.4%(pH6)、 75.6%(pH5.0)、 69.7%(pH4.0)。

实施例 17 脱毛和增亮(抗褪色)的洗涤剂洗涤试验

10 根据 AATCC 专题论文 “ Standardization of Home Laundry Test Conditions ” (AATCC Technical Manual, 1997(1995 修订)), 用正规的 Kenmore 家用顶装式洗衣机和 Kenmore 家用转笼烘干机来进行试验。用三种不同的成人型红色短袜(88% 棉、 10% 聚酯、 2% 莱克拉)作为试验用衣物(平罗纹编织、粗罗纹编织和蜂窝编

15 织)。将短袜分为 3 组，每个种类在每组中的数量相同，将各类未洗涤衣物作为参

照。每组的大致重量为 1 公斤。

在每次洗涤前准备下述洗涤剂样品： a)Cheer Triple Guard(在美国可以购得，通常在碱性 pH 下)用来证明 Cheer 中原来存在的纤维素酶的脱毛和保色性能， b)Cheer 样品的热处理，使原来存在于洗涤剂中的所有酶灭活(以将 Cheer 的性能局限于其组分而不是酶的性能)。对于热灭活，将 40 克 Cheer 样品悬浮于 200

20 毫升水中，并在家用微波炉内高温(1000 瓦)加热 5 分钟，最后温度达到 95 ℃。然后，重复上述相同步骤(a)和(b)，但是在制品中加入 5 克 C1(酶)。

每组的洗涤/干燥循环进行 25 次。在整个 25 次洗涤循环中，每组的洗涤采用 1 公斤衣物比 20 升洗涤液(洗衣机中的水面较低)，以及 40 克的上述一种洗涤剂制品。温度设定在热-热档，洗涤时间为 30 分钟，然后进行正规的高速离心。干燥

25 机温度设定成高温，干燥周期持续 45 分钟。在 25 次洗涤后结束试验，由几组不同的本领域技术人员来评价衣物的脱毛和增亮情况。

过程概要如下：

制品	原来 Cheer 中的酶的灭活	加入 AARL 的酶
a. Cheer(完全)	无	无
b. Cheer(没有酶)	有	无
c. Cheer+C1	有	有(5 克 C1)

每一洗涤组的评价结果如下(其中所有 3 类短袜的评定相同)：

	Cheer(完全)	Cheer(酶灭活)	Cheer+Cl
脱毛	+++++	-	+++
增亮	++	-	+++++

应当理解，本文所述的实施例和举例只是为了便于描述，本领域技术人员很容易根据这些描述来作各种改动或变化，这些变化也应视为包括在本发明的精神和权限以及所附权利要求的范围内。