

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C12N 9/96

C11D 3/386

[12]发明专利说明书

[21] ZL 专利号 90108804.8

[45]授权公告日 2000 年 12 月 27 日

[11]授权公告号 CN 1059925C

[22]申请日 1990.10.27 [24]颁证日 2000.9.23

[21]申请号 90108804.8

[30]优先权

[32]1989.10.27 [33]US [31]428,361

[73]专利权人 普罗格特-甘布尔公司

地址 美国俄亥俄州

共同专利权人 詹伦卡国际有限公司

[72]发明人 理查德·谢泼德·卡彭特

欧文·约瑟夫·戈尔茨坦

普什卡拉·J·莱德

安·玛格丽特·沃尔夫

[56]参考文献

DE-A-1942236 1969. 8. 1 -

EP-A-179449 1986. 4. 1 C11D3/386

US-A-4521254 1985. 6. 1 -

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 齐曾度

审查员 曾繁辉

权利要求书 3 页 说明书 65 页 附图页数 28 页

[54]发明名称 应用 II 型糖苷内切酶的方法及配制剂

[57]摘要

通过单独用 II 型糖苷内切酶或其与其他酶和(或)洗涤剂的组合处理而从表面除掉含糖苷物质的方法和配制剂。

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1. 一种从一个表面除掉与之结合的物质至少一部分的方法，所述物质有一个结合于所述表面的近部、一个从所述近部向外伸出的远部、以及位于所述近部和远部的连接部位的并与Ⅱ型糖苷内切酶有反应活性的键接，所述方法的特征包括：用一种Ⅱ型糖苷内切酶断开所述的键接，并将所述远部从所述近部释开。

2. 按照权利要求1的方法，其中所述物质是含糖苷物质，所述近部是糖部分，所述远部是糖苷配基部分，所述键接是在所述糖部分和糖苷配基部分连接部位的糖苷键。

3. 按照权利要求1的方法，其中所述物质是含糖苷物质，该含糖苷物质具有至少一个包含糖苷键的第一键接和第二键接，其中所述Ⅱ型糖苷内切酶与第一键接有反应活性，所述方法还包括使所述第二键接和与所述第二键接有反应活性的第二酶接触，以及将所述第二键接用所述第二酶断开。

4. 按照权利要求3的方法，其中所述第二酶是一种枯草杆菌蛋白酶或突变体枯草杆菌蛋白酶。

5. 按照权利要求1的方法，其中所述物质是含糖苷物质，其中所述键接是糖苷键，而且所述方法用于清洁表面。

6. 按照权利要求1的方法，其中所述物质是含糖苷物质，所述键接是糖苷键，所述方法还包括使所述含糖苷物质与洗涤剂接触以释开所述远部。

7. 按照权利要求1的方法，其中所述物质与具有非免疫键的所述表面结合，并且所述物质是Ⅱ型糖苷内切酶反应活性物质。

8. 按照权利要求1、2、3、4、5、6或7的方法，其中

所述物质是一种含糖蛋白质物质。

9. 按照权利要求 1、2、3、4、5、6 或 7 的方法，其中所述 II 型糖苷内切酶将一种糖蛋白的蛋白-糖单元接合部的前三个糖苷键之中至少一个糖苷键断开。

10. 按照权利要求 1、2、3、4、5、6 或 7 的方法，其中所述 II 型糖苷内切酶将一种糖蛋白的蛋白-糖单元接合部的前二个糖苷键之中至少一个糖苷键断开。

11. 按照权利要求 1、2、3、4、5、6 或 7 的方法，其中所述 II 型糖苷内切酶将 N-键接或 O-键接糖蛋白的核心结构中的至少一个糖苷键断开。

12. 按照权利要求 1、2、3、4、5、6 或 7 的方法，其中从所述表面释开的所述物质的该部分与一种洗涤溶液接触，将所述部分从所述洗涤液中的所述表面除掉。

13. 按照权利要求 1、2、3、4、5、6 或 7 的方法，其中从所述表面释开的所述物质的该部分与一种含洗涤剂的液体接触，将所述释开部分从所述液体中的所述表面除掉。

14. 按照权利要求 1、2、3、4、5、6 或 7 的方法，其中所述 II 型糖苷内切酶是选自 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶、 α -N-乙酰氨基半乳糖苷内切酶、 β -N-半乳糖苷内切酶。

15. 按照权利要求 1、2、3、4、5、6 或 7 的方法，其中所述 II 型糖苷内切酶是选自 Endo-D、Endo-H、Endo-L、Endo-C、Endo-C_{II}、Endo-F-Gal 型、Endo-F 以及 PNGase F。

16. 按照权利要求 15 的方法，其中所述 II 型糖苷内切酶是 Endo-H。

17. 按照权利要求 1、2、3、4、5、6 或 7 的方法，进

一步包括将所述物质与一种二硫化物断开剂接触。

18. 按照权利要求1、2、3、4、5、6或7的方法，进一步包括将所述物质与一种表面活性剂接触。

19. 按照权利要求1、2、3、4、5、6或7的方法，其中所述表面是选自织物、生物组织、牙釉质、隐形眼镜、玻璃、瓷、金属、合金、塑料、植物、纤维。

20. 按照权利要求19的方法，其中所述表面包括织物。

应用 II 型糖苷内切酶的方法及配制剂

本发明涉及应用单独的 II 型糖苷内切酶或其与其他酶和 (或) 洗涤剂组合物进行处理, 以从表面上除掉含糖苷物质如糖蛋白的方法及配制剂。

在洗涤剂配方技术领域, 将酶与各种洗涤剂合用以除掉包含蛋白质和 (或) 糖类的污染物已为公知。这类酶配方制剂是设计用于从软表面如布和从硬表面如瓷和金属上除掉各类型污染物。据报道, 例如蛋白酶类如胰蛋白酶、胰酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶已用于洗涤剂配方中以除去蛋白质类污染物并获得不同程度的成效。另方面, 特定的糖苷酶如纤维素酶、溶菌酶、淀粉酶、葡聚糖酶已与不同洗涤剂配制成剂, 用于除去某些糖类污染物。另有洗涤剂配方是蛋白酶与糖苷酶合用于污染物处理。

用于洗涤剂配方的一些糖苷酶如 β -淀粉酶、 α -半乳糖苷酶及 β -半乳糖苷酶都是糖苷外切酶, 它们从一个低聚糖或聚糖上分裂出一个或多个端残基。其他糖苷酶如纤维素酶和 α -淀粉酶都是糖苷内切酶, 它们与低聚糖或聚糖内的特定的内键接有反应活性。这类糖苷内切酶在此称之为 I 型糖苷内切酶。虽然含有一种或多种蛋白酶和 (或) 糖苷酶 (包括 I 型糖苷内切酶) 的洗涤剂配方已使除污物性能大大提高, 但还有许多种污物如血、粪便以及身体污物在处理后又留下残迹。

在隐形眼镜清洗领域中, 已应用类似的酶/洗涤剂配方来清洗和消毒硬式和软式隐形眼镜。在许多场合中, 这些配方已用于使隐形眼镜表面形成的生物膜降解, 该膜是被不同的眼病原体 (如绿脓假单胞菌和表皮葡萄球菌) 所利用而附着于镜片上。例如可参见 Duran, J. A., et al.

(1987), *Arch. Ophthalmol*, 105, 106-109; Stern, G. A., et al. (1987), *Ophthalmolgy*, 94, 115-119(所报道的是用不同的酶如胰酶、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶、唾液酸苷酶来处理被粘蛋白覆盖的镜片, 以抑制假单胞菌的附着); 还有Slucher, M. M, et al. (1987), *Arch. Ophthalmol*, 105, 110-115。

利用生物膜使微生物附着并不限于隐形眼镜的情况。已报道链球菌突变体利用细胞外聚糖而附着在牙的釉质上。EPO 公开号0195672 报道了使用 $\alpha - 1, 3$ 葡聚糖酶或 $\alpha - 1, 6$ 葡聚糖酶来断裂被链球菌突变体利用以附着于牙釉质上的细胞外聚糖。

某些酶对于附着于玻璃表面的细胞的作用已由Danielsson, A. et al. (1977), *Botanica Marina*, 20, 13-17所报道。其中报道了从海水中分离的假单胞菌属附着于玻璃载片上。然后, 将此载片用链霉蛋白酶、胰蛋白酶、 $\alpha -$ 淀粉酶(一种I型糖苷内切酶)或溶菌酶(亦为I型糖苷内切酶)进行处理。在此文中, 用蛋白水解酶即链霉蛋白酶和胰蛋白酶处理使得一部分附着细菌群落被释出, 而细胞降解酶即溶菌酶与蛋白水解酶相比较显示其活性较低。据报道, $\alpha -$ 淀粉酶完全无效。除去在隐形眼镜、牙釉体和玻璃表面会附着微生物外, 还有许多种表面会附着微生物, 例如请见Marrie, T. J., et al. (1984), *J. Clin. Microbiology*, 19, 991-914(细菌附着于心脏起搏器的导线和电源装置); Freimer, N. B., et al. (1978), *Acta. Path. Microbiol. Scand. Sectb.*, 86, 53-57(微生物粘附于巨噬细胞); Mirelman, et al. (1982), *Tokai J. Exp. Clin. Med.*, 7, 77-183(微生物附着于哺乳动物粘膜表面)。已提出了各种不同的机制来解释微生物如细菌对非生物体固体表面的附着。例如请见Fletcher, M. (1987), *Microbiological Sciences*, 4, 133-136; Duddridge, J. E., et al. (1983), *Factors Affecting the Adhesion of Bacteria to Surfaces in Microbial Corrosion*, Delco Printing Co., Ltd., PP. 28

-35。虽然这些参考资料描述了微生物对各种表面的附着以及在附着中可能涉及的因素，但未论及如何防止微生物在这些表面上生长以及如何将它们除掉。

此处所用的II型糖苷内切酶是这样一类糖苷内切酶，它们能够将糖蛋白中特定的糖苷内的键接断开。这些糖苷内切酶可将全部或部分的糖部分从糖蛋白上断下来，这取决于该反应活性糖苷键在该糖蛋白中的位置。其实例包括 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶(Endo-D, Endo-H, Endo-L, Endo-C I, Endo-C II, Endo-F-Gal 型, Endo-F); α -N-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶; 以及 β -N-半乳糖苷内切酶。例如请见Tarentino, A. L., et al. (1985), *Biochem*, 24, 4665-4671; Arakawa, M., et al. (1974), *J. Biochem.*, 76, 307-317; Plummer, T. H., et al. (1984), *J. Biochem*, 259, 10700-10704; Tarentino, A. L., et al. (1975), *Biochem. and Biophys. Res. Comm*, 67, 455-462; Trimble, R. B., et al. (1984), *Anal. Biochem.*, 141, 515-522; "Glycoprotein and Proteoglycan Techniques" (1985) by J. G. Beeley, chapter 6, pp. 153-300, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford。除去具有对糖蛋白的糖苷内键接有特异性之外，至少一种糖苷内切酶(β -N-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶H)还显示与脂类键接低聚糖发生断裂的特异性(Chalifour, R. J., et al. (1983), *Archives of Biochem. and Biophys.*, 229, 386-394), 并且有在低聚糖和糖蛋白中的二-N-乙酰壳二糖键接发生断裂的特异性(Tarentino, A. L., et al. (1974), *J. Biol. Chem.*, 249, 811-817)。

一般而言，此类II型糖苷内切酶已主要用于分析工作，例如测定蛋白质或糖类的顺序和(或)特定糖蛋白的结构和功能。例如请见Hsieh, P., et al. (1982), *J. Biol. Chem.*, 258, 2555-2561, and Geyar, R., et al. (1984), *Eur. J. Biochem.*, 143, 531-539。在最近一篇报道中，应用一种II型糖苷内切酶分析*Leishmania mexicana amazonensis*的糖蛋白抗

原, Chin Shen Chang, et al. (1986), Mol. Biochem. Parasitol 18, 197-210。此种糖蛋白抗原首先以免疫方式结合成免疫珠(immunobead), 当该以免疫方式结合的糖蛋白与分析量的Endo-H结合后, 将免疫珠洗涤并在含1% SDS的缓冲液中煮沸, 以制备供聚丙烯酰胺凝胶电泳法之用。此分析显示由糖类从以免疫方式结合的糖蛋白抗原断裂下来而反映出分子量降低。

然而, 还没有人使用II型糖苷内切酶从织物、隐形眼镜、金属、瓷、细胞、组织等物体表面除掉包括糖蛋白和糖脂之类的物质; 也没有用于在悬浮液中或此等表面上防止微生物生长。

糖苷酶已用于与其他的酶一起来除掉各种物质。在Anderson et al., (1964), Biochem. J., 90, 30 中, β -糖苷酶被描述为糖类代谢酶。在Khorlin et al. (1979), FEBS Letters, 8, 17; Haskell, et al. (1970), J. Med. Chem., 13, 48 中, 认为唾液酸苷酶(N-乙酰神经氨酸糖水解酶)抑制剂是可能的抗病毒、抗菌剂。在Chai et al. (1970), Appl. Microbiol., 20, 421 中, 葡聚糖酶被描述为可将聚糖、葡聚糖(α -1, 6-葡聚糖)细菌催化水解成为异麦芽糖残基。在Chipman, et al. (1969), Science, 165, 454; Montague (1964), Biochem. Biophys. Acta., 86, 588 中, 溶菌酶(胞壁质酶)被描述为多种微生物的粘多糖细胞壁结构中的水解糖苷键。在Neuberger, et al. (1967), Nature, 215, 524 中, 描述了由D-葡萄糖胺衍生物抑制溶菌酶。

然而, 一些II型糖苷内切酶如 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶H、D、F和(或)PNGase(糖肽酶)F, 在此之前尚未与抗菌剂组合成为抗菌组合物。

上述参考文献仅由于其为本案申请日以前所公开者, 并且此中一切内容均非解释为许可这些参考文献为先有技术, 并且本发明者不可以凭借基于较早提交的申请的先前发明或优先权而将此等公开内容的日期提

前。

本发明的目的之一是提供一种方法，该方法应用单独的II型糖苷内切酶或其与其他酶、洗涤剂、表面活性剂和（或）二硫化物断开剂的组合物，以促进从一些物体上除掉包含糖蛋白和糖脂⁶⁵物质，所述物体包括织物、隐形眼镜、金属表面、塑料表面、瓷表面、细胞表面、组织等等。

本发明的进一步目的是提供适用于实施上述方法的含有II型糖苷内切酶的配制剂。

按本发明的目的，提供从一个表面上除掉并非免疫结合的结合于其上的一种物质的至少一部分的方法。所述物质有一个结合于该表面的近部，从该近部伸向外边的远部，以及位于近部与远部连接处的键接，并且该键接与II型糖苷内切酶有反应活性。该方法包括使该结合物质与一种II型糖苷内切酶接触，使该物质的远部从其近部断开，从而使该远部从该表面释开。若此种释开未能使该远部从该表面除掉，则借助使该远部与一种洗涤溶液、包括表面活性剂的洗涤剂配制剂、或含有第二种酶的液体进行接触而促进其除去，所述第二酶如与之不同的糖苷酶、蛋白酶、脂酶、核酸酶或其组合物。

本发明还包括一种方法，该方法是从一个表面上释出结合于其上的含糖苷物质的至少一部分。该方法使该含糖苷物质与至少一种第一酶和一种第二酶相接触，以从该表面释出该含糖苷物质的一个断开的部分。所述第一酶是一种与该物质的糖苷部分中的糖苷键有反应活性的II型糖苷内切酶。所述第二酶是与该含糖苷物质中的第二个键有反应活性，该键不同于与第一酶有反应活性的糖苷键。第二酶可包括糖苷酶（包括第二种II型糖苷内切酶）、蛋白酶、脂酶及其组合物。对于除掉一部分含糖苷物质，可通过将该已断开的含糖苷物质与一种包括表面活性剂的洗涤剂接触而得到促进。

本发明还包括从一个表面上除掉一种含糖苷物质的至少一部分的方法，该物质是含有一个糖类部分、一个糖苷配基部分和在两者之间的连接部位的一个糖苷键，其中该含糖苷物质是通过该糖类部分而结合到一个表面上。该方法包括用一种II型糖苷内切酶来断开该糖苷键，以从该表面释出该含糖苷物质的糖苷配基部分。若需要，可通过第二酶、洗涤剂和（或）表面活性剂处理来促进除掉该含糖苷物质的已断开部分。

在上述每一方法中，可以使用一种二硫化物断开剂而使与该含糖苷物质的蛋白质变性，从而可促进由该II型糖苷内切酶或第二酶的断裂或促进由洗涤剂和（或）表面活性剂将之除掉。

本发明还包括配方制剂。一种组合物包括至少一种第一酶和一种第二酶，其中该第一酶是一种II型糖苷内切酶。第二酶是选自包括蛋白酶、糖苷酶、脂酶及其组合物的酶类。此等配制剂还可包含洗涤剂和（或）表面活性剂，以及二硫化物断开剂。

另一种组合物包括II型糖苷内切酶和洗涤剂和（或）表面活性剂。

图1 是N-键接和O-键接的糖蛋白的一般核心结构。

图2 是不同II型糖苷内切酶的底物和已知的断裂位点。

图3 是图2 的蛋白氨基酸、糖残基和断裂位点的一般表示。

图4 是一种N-键接糖蛋白的核心结构，一种II型糖苷内切酶的断裂位点，以及蛋白质与糖单元及在用II型糖苷内切酶断裂后的糖苷配基与糖部分的关系。

图5A-5E 是各种机制，包括应用单独的II型糖苷内切酶或与第二种酶合用处理后，从表面可释开含糖苷物质、微生物或与II型糖苷内切酶有反应活性的物质。

图6A-6B 是尼龙样片用粪便污染后并且用或不用Endo-H处理之后的电子显微照片(8100X)。

图7A至7H是棉样片用粪便污染后，使用Endo-H和其他糖酶处理效果

的电子显微照片(5000X)。

图8、9、10A、10B 是不同浓度的Endo-H和洗必太(单独和二者组合)对于埃希氏大肠杆菌存活的效果。

图11和12表明含Endo-H的洗涤剂组合物与不含Endo-H的相比,对于从猪皮肤上除掉金黄葡萄球菌则前者效果更高。

图13表明Endo-H与水或一种洗涤剂组合物相比,对于从淋浴帘上除掉霉菌则前者效果更优。中部的照片是该淋浴帘的一部分。另四张照片是中部那张照片的各个四分之一部分的放大照片。

图14表明Endo-H与不同抗菌剂组合后的抗菌效果。

图15A 和15B 与图16A 和16B 表明Endo-H对不同种属酵母菌的效果。

图17和18表明使用含Endo-H的洗涤剂组合物从尿片上除掉粪便效果的提高情况。

在本发明的方法中使用II型糖苷内切酶以及含有这些II型糖苷内切酶的组合物以从表面上除掉和(或)释开与II型糖苷内切酶易反应的物质。这种反应活性的机制尚未能明确。在一些情况下,这些物质是糖苷或含糖苷物质,相信它们具有糖苷键并已知它们是II型糖苷内切酶的断裂位点或与此等断裂位点有密切关系的键接。此处所述的“II型糖苷内切酶”是指这样的酶,它们能够在或靠近一个糖蛋白的蛋白质与糖类单元的连接处断开其键接。优选的是,这类II型糖苷内切酶能够使该蛋白-糖单元连接处(包括含有该蛋白-糖连接处的糖苷键)的约三个糖苷键之中的至少一个糖苷键断开。最优选的是,这些糖苷键是在该蛋白-糖单元连接处的约二个糖苷键之中(见图1、2、3)。

II型糖苷内切酶还由它们对图1的对已知N-键接和O-键接糖蛋白的核心结构所示的特定糖苷键的特异性所定义。这些相应于在氨基酸即丝氨酸、苏氨酸或天冬酰胺与第一个糖残基之间的糖苷键,以及至少第

一、第二和第三糖残基之间的糖苷键。虽然后文中对此核心结构将以存在于已知核心结构中的特定糖苷键进行更详细描述，但些等特定的键接并不能解释为对于II型糖苷内切酶的定义的限定。因此，由所有可能的在这些氨基酸和糖残基之间的糖苷键来定义所用N-和O-键接的糖蛋白的核心结构，用以鉴别II型糖苷内切酶。

II型糖苷内切酶并不是由关于该糖蛋白核心结构以及已知糖苷内切酶对此等核心结构的特异性方面的现有知识所限定，通过对图1中的核心结构与图2中的II型糖苷内切酶的已知底物的比较表明，对于图1的核心结构中每一个可能位点（若存在的话）的II型糖苷内切酶尚未得到鉴别。此外，还可能存在着有其他未曾鉴别的核心结构。对于在那些尚未已知的核心结构中的键接有反应活性的糖苷内切酶也是II型糖苷内切酶。因此，定义II型糖苷内切酶的糖蛋白中的糖苷键并不限于位于最靠近该糖蛋白的蛋白单元的前三个糖苷键的那些，而可能延伸到该核心结构中更远的糖苷键，例如离开该蛋白单元的第四或第五个糖苷键，视乎所鉴别的核心结构而定。

对于糖蛋白的核心结构的特异性提供了方便的对II型糖苷内切酶的定义，并由此与I型糖苷内切酶相区分。I型糖苷内切酶能断开低聚糖或聚糖中特定的键接，但一般不对定义II型糖苷内切酶的糖蛋白中的核心结构糖苷键有反应活性。表I中示出I型糖苷内切酶以及与之有反应活性的键接的实例。

* GlcA是D-葡萄糖醛酸
MurNAc是N-乙酰胞壁酸
↑表示断裂位点

- 9 -

(只包括糖残基之间的糖苷键)，II型糖苷内切酶可能与位于一个糖蛋白的其他区域的相同或相似的糖苷键反应，或者是离开该糖蛋白的蛋白质与糖单元接合点很远之处的糖苷键。

对上述对特定糖蛋白定义的实用是具阐明性的。应用 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶-H(Endo-H)、 α -甘露糖苷酶以及 β -甘露糖苷酶分析了猪甲状腺球蛋白, Tarantino, A. L. et al. (1973), J. Biol. Chem., 218, 5547。Endo-H将两个N-乙酰基-D-葡萄糖胺(其中之一是N-键接到该甲状腺球蛋白的蛋白质单元中的一个天冬酰胺)之间的糖苷键水解。用Endo-H处理后释开的甲状腺球蛋白的低聚糖或糖类部分也用 α -和 β -甘露糖苷酶处理。由于这些酶对于相应于图1、2、3所示的底物都没有特异性，它们都不是II型糖苷内切酶，并可表征为糖苷外切酶或I型糖苷内切酶。该Endo-H的特异性与图2所示Endo-H具有相同的特异性，所以该Endo-H是一种II型糖苷内切酶。这当然只是一种平常的应用。但是，若发现一种新的糖苷内切酶(例如Endo-X)并且也显示出此种特异性或图1、2、3所示一种或多种其他特异性，则Endo-X也将是一种II型糖苷内切酶。

但是，这种基于对糖蛋白的特异性为II型糖苷内切酶所作的定义并不应解释为对于应用II型糖苷内切酶从一个表面释开和(或)除掉一种物质的机制的限定。虽然要假设在某些情况下II型糖苷内切酶是通过与该糖苷中的一个糖苷键反应而从一个表面断裂下一个糖苷的至少一部分，但本发明并非局限于此种断裂，而是将II型糖苷内切酶的作用从功能上定义为它们将与II型糖苷内切酶有反应活性的任何物质的至少一部分从一个表面断裂下来的能力。

本文所述“糖苷内切酶”包括I型和II型糖苷内切酶。

本文所述“糖苷”是指一种聚合物，其中具有一个或多个以糖苷键以共价方式连接到一个“糖苷配基”的“糖类部分”。对于糖苷的此一

定义是来自对糖苷的一般定义，后者指一种在水解后得到一个糖和一个糖苷配基的化合物，该糖苷配基是由于上述水解所得的非糖化合物。如此中所述，一个糖苷在由II型糖苷内切酶断开后，生成一个糖苷配基和一个低聚糖或聚糖的糖类部分。但所述糖苷配基并不局限于一种非糖化合物，因为II型糖苷内切酶可水解一种糖苷而生成一个含一个或多个糖残基的糖苷配基部分，视乎该II型糖苷内切酶的断裂位点而定。此外，所述糖苷配基部分可能十分复杂，因为它可以是肽聚糖的情况，在其中可以发现连接于一个糖类基体中的交联的肽。因此，糖苷包括有糖蛋白、糖脂、肽聚糖等等，它在用II型糖苷内切酶处理后生成一个糖类部分和一个糖苷配基部分，这两个部分是由该II型糖苷内切酶的断裂位点所决定。这样对糖苷的定义从下文即可显而易见。

本文中“糖蛋白”是指一种糖苷，它具有一个或多个以共价方式连接于肽或蛋白质的低聚糖或聚糖。本文中的低聚糖和聚糖有时称为“糖单元”。但这些糖单元可能与糖苷的“糖类部分”有所不同。如图4所示，一个糖单元包括连接于第二类分子的全部低聚糖或聚糖，例如在糖蛋白中连接于蛋白质或肽，或如在糖脂中连接于脂。若该II型糖苷内切酶在该糖类单元与例如蛋白质的连接点处将之断开，则该糖单元与糖苷的糖类部分是同义词。但是，若该II型糖苷内切酶在该糖单元内的一个糖苷键处将该糖单元断开，则由此断裂形成的该糖苷的糖类部分就会小于该整个的糖单元。图4示出其差别，II型糖苷内切酶断裂位点由箭头指出。

糖蛋白的糖单元可以是含有1-10个糖残基的低聚糖，或者通常含有10-25个糖残基的短的聚糖。由较高等的有机体如包括酵母菌和哺乳类细胞的真核生物产生多种糖蛋白。在糖蛋白的糖单元与肽或蛋白质单元之间的键接是一个糖苷键，它是由该蛋白质单元的氨基酸侧链与该糖单元的第一个残基的异头碳之间的缩合反应而成。在哺乳类糖蛋白中的此

种糖苷键可以是N-糖苷键(糖类键接于天冬酰胺的酰氨基上),或者是O-糖苷键(糖类键接于丝氨酸或苏氨酸的羟基氧上)。

糖单元(低聚糖或聚糖)的糖残基可以多种不同方式连接到一起。因此,此等糖单元可以是无支链的直链结构,或是复杂的支链结构。但一般而言,在糖单元中的每个糖残基都是通过糖苷键来连接,其中的一个糖残基的异头碳与另一糖残基的羟基碳相缩合。此种糖苷键可以是 α 的或 β 的,视乎该异头碳的构型而定。一个残基的异头碳可以与其他糖残基中的任何羟基碳结合。因此,许多糖蛋白的复杂性来自于见之于此等分子的糖单元中的许多不同的糖苷键。

许多膜糖蛋白带有天冬酰胺键接的糖单元(通过N-糖苷键使糖单元键接于肽中的天冬酰胺)。此种天冬酰胺键接的糖蛋白的结构可以十分复杂,例如可见Schachter(1984), *Clinical Biochemistry*, 17, 3-14。由不同来源的许多这种天冬酰胺键接的膜糖蛋白的结构,以及由非膜可溶性糖蛋白的结构表明,这两类糖蛋白具有许多共同的结构特征,见同上文献, p. 3。图1和4示出此等天冬酰胺键接的糖蛋白的共同核心结构,其中的GlcNAc是N-乙酰-D-葡萄糖胺,Man是甘露糖。其中的符号 $\alpha 1-3$ 、 $\alpha 1-6$ 和 $\beta 1-4$ 表明在不同糖残基之间的糖苷键类型。这种核心键接构成具有连接于该核心的多个糖残基之中任一的许多糖蛋白的基础,见同上文献, p. 5。O-键接的糖蛋白具有一种核心结构,其中该糖蛋白的蛋白质单元是通过丝氨酸或苏氨酸的羟基而偶接至该糖单元。这种核心结构的一个共同特征是存在有键接至丝氨酸或苏氨酸的N-乙酰-D-半乳糖胺(GalNAc)。此等糖蛋白的其他详情示于图1,其中NeuAc是N-乙酰神经氨酸, Gal是半乳糖, L-Fuc是L-岩藻糖。当Gal是第二糖残基时,在GalNAc与Gal之间的糖苷键通常是 $\beta 1-3$ 。关于对糖蛋白(包括N-和O-键接的糖蛋白)的结构生物合成和功能的述评,请见

Berger, E. G. et al. (1982), *Experimentia*, 38, 1229-1258。

一些较低等有机体如原核生物，例如大肠杆菌、假单胞菌属、芽胞杆菌属等等，会生产肽聚糖而不是糖蛋白。肽聚糖见之于细菌细胞壁中，一般具有交替的N-乙酰葡萄糖胺和N-乙酰胞壁酸的聚糖主链。肽侧链有时与N-乙酰胞壁酸残基相连，并且常有交联的肽桥加之于各肽侧链之间。革兰氏阳性菌的细胞壁一般包含约10%的肽聚糖，而革兰氏阴性菌的细胞壁一般含有约50%的肽聚糖。

然而，肽聚糖并不是糖蛋白，至少在这种程度上糖蛋白中的特定糖苷键是用于定义II型糖苷内切酶的类级。因此，Endo-H是一种II型糖苷内切酶，因为它使两个见之于某些含N-键接低聚糖的糖蛋白中的N-乙酰葡萄糖胺糖残基之间的糖苷键断开，请见图4。然而，Endo-H也可能具有尚未定义的与肽聚糖的反应活性，因为它能够促进从例如布样片表面除去粪便物。已知这类粪便物含有与肠内细菌相关的肽聚糖。溶菌酶是与肽聚糖有反应活性的酶。然而，一些溶菌酶如鸡蛋白溶菌酶、T4溶菌酶以及变溶菌素并不是II型糖苷内切酶(Goodman, et al. (1981), J.

Bacteriol, 146, 755)。这是因为它们与见之于定义II型糖苷内切酶的独有的糖苷键并无显著反应活性。然而，它们与肽聚糖有反应活性，生成N-乙酰葡萄糖胺与含有肽侧链的N-乙酰胞壁酸的二糖。由此，溶菌酶更适于表征为I型糖苷内切酶。因此，即使溶菌酶与Endo-H在与肽聚糖的反应活性方面有所重叠，它们的大部分是相互区别的，其区别在于Endo-H对于定义II型糖苷内切酶的糖蛋白之中的糖苷键有特异性，而溶菌酶与之基本上无反应活性。

本文中所述“含糖苷物质”或“含糖蛋白质”是一种单独的糖苷或糖蛋白，或是糖苷或糖蛋白与其他组分的组合物。因此，含糖苷物质包括糖苷类如糖蛋白酶，例如碱性磷酸酶、菠萝蛋白酶、羧基肽酶-Y；糖蛋白激素例如绒毛膜促性腺激素、促红细胞生成素；卵磷脂例如得自马铃薯和大豆的磷脂；血清糖蛋白如IgG免疫球蛋白、甲状腺球蛋白、

凝血酶原等等；其他糖蛋白如血红蛋白、干扰素；还有复合糖类。糖苷与其他组分组合的实例包括含有膜成分的糖蛋白如人类红细胞所含的糖蛋白、流行性感冒病毒所含的血细胞凝集素、牛视网膜所含的视紫红质以及成纤维细胞所含的胶原。其他含糖苷物质包括病毒核膜糖蛋白以及粪便物，后者含有部分与肠细菌有关的肽聚糖。因此，病毒、成纤维细胞、粪便物等均被认为是含糖苷的物质。

本文所述“微生物”（有时称为含糖苷的微生物）是指结合于一种物质上并能被II型糖苷内切酶从该物质表面断裂下来之物。其实例包括见之于粪便物中的肠细菌，以及通常使隐形眼镜污染的细菌。其他实例包括能被II型糖苷内切酶从表面上断裂下来的真菌和藻类。

本文中所述“活体外”是指本发明方法所实施的环境。它只是用于区别“活体内”一词，后者是指天然II型糖苷内切酶所在的环境，例如在天然产生II型糖苷内切酶的机体内。因此，应用II型糖苷内切酶的活体外方法就是不在自然界发生的方法或过程。但活体外一词并不能解释为局限于“在玻璃瓶中”的方法，或排除在活的机体内或机体上实施此等方法。本发明的方法除在玻璃上实施外，还可在多种表面上实施，包括织物、隐形眼镜、金属表面、瓷表面、细胞表面、塑料表面、组织等等。此外，此等活体外方法例如可在人类口腔中实施，如后文所详述。

表II中示出一些已知的II型糖苷内切酶以及它们的天然生物来源。

图2 示出某些II型糖苷内切酶的断裂位点，见J. G. Beeley,

“Glycoprotein and Proteoglycan Techniques” (1985), Chapter 6, pp. 153-300, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford。在表II中未列出的一种II型糖苷内切酶是糖肽酶F，亦称为PNGase F。PNGase F可从 *Flavobacterium meningosepticum* 获得，Boehringer Mannheim Biochemical (地址美国Indianapolis, Indiana) 有市售品。

表 II

酶	来 源	典型底物
β -N- 乙酰氨基 葡萄糖苷内切酶		
D	<i>Diplococcus pneumoniae</i>	N-键接的复合型 (已除掉周围糖)
H	<i>Streptomyces plicatus</i> (<i>Streptomyces griseus</i>)	N-键接的高甘露糖以及杂混型
L	<i>Streptomyces plicatus</i>	只是N-键接的低分子量物
C _I	<i>Clostridium perfringens</i>	N-键接的复合型 (已除掉周围糖)
C _{II}	<i>Clostridium perfringens</i>	N-键接的高甘露糖型
F-Gal 型	<i>Sporotrichum</i> <i>dimorphosporum</i>	N-键接的复合型 (只是双触角的, 要求末端Gal)
F	<i>Flavobacterium</i> <i>meminogosepticum</i>	N-键接的高甘露糖以及复合型
α -N- 乙酰氨基 葡萄糖苷内切酶	<i>Diplococcus pneumoniae</i>	只是O-键接的Gal- α 1-3 Gal NAcl-
β -N- 半乳糖苷 内切酶	<i>Diplococcus pneumoniae</i>	血型A 和B 的决定子
	<i>Escherichia freundii</i>	硫酸角质和含有R Glc
	<i>Flavobacterium</i>	NAc- β 1-3 Gal- β 1-4
	<i>keratolyticus</i>	GlcNAc (或Glc) 顺序的低聚糖

可以看到, Endo-H、F、D、C_I和Endo-F-Gal型都可以断裂一个糖蛋白中的第二个糖苷键。对于Endo-F-Gal型而言, 此糖苷键是在GlcNAc和Gal之间。对于Endo-H、F、D、C_I而言, 其断裂处是在两个含有GlcNAc的残基之间, 并且特异性是由取代基U、V、W、X、Y、Z所定义。

Endo-H能断裂具高甘露糖含量的N-键接的糖蛋白。所以在图2中, W包含2-150甘露糖残基、Y包含1-2甘露糖残基, X、Z、V和U是H(氢)。Endo-H还能断裂这样的杂混结构, 即其中W包含1-2甘露糖残基, Y和(或)Z包含NeuNAc-Gal-GlcNAc或相似的结构, V包含H或GlcNAc。Endo-H是本发明配制剂和方法所用的优选的II型糖苷内切酶。

Endo-D和Endo-C_I具有相似的反应活性, 但这些酶是得自不相同的来源。Endo-D和Endo-C_I对于糖蛋白的N-键接的低聚糖有活性, 能断裂含多于5个甘露糖糖类残基的高甘露糖结构, 在此场合中, 按图2 X包含通过 α 1-3糖苷键而键接至核心结构的甘露糖, W包含通过 α 1-6糖苷键而键接至核心结构的甘露糖, 其余取代基是H。Endo-D在用糖苷外切酶除掉大部分触角残基之后也能断裂一个复合或杂混结构的核心部分, 在此情况下, 按图2 Y包含H或GlcNAc, U包含H或岩藻糖。

Endo-F对于具高甘露糖含量的N-键接的糖蛋白有活性, 其中按图2 X和Y是一个或多个甘露糖残基, 其余取代基是H。Endo-F还能断裂双触角的杂混结构, 其中X和W包含通过 α 1-3和 α 1-6糖苷键而键接到核心结构的甘露糖, Y包含NeuNAc-Gal-GlcNAc或类似结构, U包含H或岩藻糖。双触角的复合结构也可被Endo-F断裂。此等结构包含图2中Endo-F的底物核心结构, 其中X和Y包含NeuNAc-Gal-GlcNAc或类似结构, U包含H或岩藻糖。

Endo-L对于断裂N-键接的糖蛋白中第二个糖苷键具有类似的活性。特别是对于包含Man-GlcNAc-GlcNAc-Asn的低分子量底物。Endo-C_I显

示出与Endo-H相似的特异性。 α -N-乙酰半乳糖苷内切酶能水解含O-键接至丝氨酸或苏氨酸的低聚糖，并且其中GlcNAc和Gal是首二个糖残基的糖蛋白。图2亦示出 β -N-半乳糖苷内切酶的特异性，其中R可以由之能形成该糖单元中的触角的甘露糖之一。

糖肽酶F(PNGase F)这种II型糖苷内切酶能断裂在N-键接的糖蛋白中天冬酰胺与GlcNAc之间的第一个糖苷键。它可断裂这样的高甘露糖结构，其中W、X、Y包含一个或多个甘露糖残基，V和Z包含H，并且在第一个糖残基GlcNAc不存在岩藻糖。它还能断裂这样的杂混结构，其中W和X包含甘露糖，Y和(或)Z包含NeuNAc-Gal-GlcNAc或类似的结构，V包含H或GlcNAc，并且在第一个糖残基中一般不存在岩藻糖。复合结构也能被糖肽酶F所断裂。此等结构包含图2所示的核心结构，其中W和Y包含NeuNAc-Gal-GlcNAc或类似结构，X和Z包含H、NeuNAc-Gal-GlcNAc或类似结构，V包含H或GlcNAc，并且有时在第一个糖残基GlcNAc中存在有岩藻糖。

已知 β -N-半乳糖苷内切酶能断裂在糖蛋白或糖脂中的低聚糖内的糖苷键。图2示出典型的糖蛋白底物以及其断裂位点，其中 R_2 是蛋白质、脂或糖类， R_1 是糖残基或氢。

当然，本发明并不局限于目前已知的糖苷内切酶的特异性。直至最近，市售的糖苷内切酶由于它们在其天然来源物中的表达含量较低，所以是昂贵的。因此，此等酶的反应活性尚未得到广泛研究。但是，随着分子克隆的发明，已有或将有较大量的糖苷内切酶供应。随着对这些或其他糖苷内切酶的其他反应活性和特异性被发现，此等反应活性亦将落于本发明范围之内。

因此，如本文所述，一种“II型糖苷内切酶反应活性物质”(亦称为“II型反应活性物质”或含有“II型反应活性键”的物质)就是与一种II型糖苷内切酶有反应活性的任何物质。当然，在II型反应活性物质

中包括了含糖苷物质和糖蛋白。然而，还包括的是(1) 其他尚未知的在糖苷键之外的部位与II型糖苷内切酶有反应活性的物质；(2) 含有具II型反应活性键的组分的多组分集合体。

例如微生物类如细菌可通过用Endo-H处理而从表面除掉。目前尚未知如何产生此种结果。一些细菌未知其含有通常与Endo-H有反应活性的键，并且其与表面、其他微生物以及其他物质附着的详情亦未清楚地明了。但已观察到可由Endo-H除掉细菌。

此外，其他污染物可能包含一些物质的复杂集合体，而这些物质有一些或全部是与II型糖苷内切酶有反应活性。II型反应活性物质一词包含所有此等情况。因此，II型糖苷内切酶的用途包括(1) 清洗含有II型反应活性物质的表面；(2) 处理II型反应活性物质以防止其附着于表面；(3) 处理II型反应活性物质如微生物以产生抗菌效果。

应用于本发明的II型糖苷内切酶可按本领域已知的方法从表II所列的微生物制得。表II中所列的某些II型糖苷内切酶如得自*Streptomyces plicatus* (起初分类为*Streptomyces griseus*) 并于*S. plicatus*或*S. lividans*中制成的Endo-H，以及得自*Diplococcus pneumoniae*的Endo-D有市售品：Boehringer Mannheim Biochemical, Indianapolis, IN。除市售制品之外，Endo-H可得自大肠杆菌(*E. Coli*)，后者曾用一种质粒转化，将从*Streptomyces plicatus*的Endo-H基因和来自碱性磷酸盐的启动子参入密码，(Oka, T., et al. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 7212-7216)，所用方法与所报道的将从*Streptomyces plicatus*的Endo-H克隆并表达至*E. Coli*的方法相似(Robbins, et al. (1981), *J. Biol. Chem.*, 256, 10640)。亦可参见Trumbly R.J. et al. (1985), *J. Biol. Chem.* 260, 5638)。Endo-H还可得自*Streptomyces*细胞，以生物工程法表达得自*Streptomyces plicatus*的Endo-H(EPO公开, 0179449; 1986年4月30日)，另一方式，Endo-H可得自任何适当的宿主细胞，如*Bacillus*

subtilis, 可采用本领域公知的技术来完成。由*S. plicatus* (*S. griseus*) 的Endo-H的氨基酸及DNA 顺序已经公开, 见Robbins, P. W., et al. (1984), J. Biol. Chem. 259, 7577-83。

用于以下各实例中的Endo-H是市售品, 或是得自*E. Coli* 或 *B. subtilis* 宿主经转化后表达得自*S. plicatus* 的Endo-H。

一个Endo-H活性单位是在pH5.5、37℃条件下于1分钟内从(³H)-丹磺酰-Asn-(GlcNAc)₄(Man)₆释放1微摩尔(³H)-丹磺酰-Asn-GlcNAc所需要的酶的量, Tarentino, A. et al. (1978), Methods in Enzymology, 50, 574。其他II型糖苷内切酶的活性单位亦是由适当底物按类似定义。

当然, 还可能存在未曾鉴别的II型糖苷内切酶。此等II型糖苷内切酶以及本文所述的那些, 包括此等糖苷内切酶的等位基因变化品种以及基因工程修饰物, 都是在本发明的范围内。

糖苷和含糖苷物质常成为结合到多种表面的状况。因此, 例如糖蛋白类如与血液有关的那些糖蛋白(例如, 糖基化的血红蛋白)可以污染用作布料、亚麻布等的织物表面。这样的污染物在采用洗涤剂处理或用洗涤剂与不包括本发明所用糖苷内切酶在内的酶类的组合物处理时, 很难将之完全除掉。另一类能污染诸如织物表面并且也是用已知技术难于除掉的污染物包括粪便物。此等粪便污染物包含与肠细菌有关的各种糖苷和含糖苷物质(如肽聚糖)、包括糖蛋白的分解代谢分泌物、以及未被吸收的营养分等等。

其他可被糖苷或含糖苷物质结合的表面包括硬式及软式隐形眼镜的表面。软式隐形眼镜一般是亲水性交联的聚合物并具有水凝胶结构, 或是由硅聚合物制成, 见USP 3403393 和2976576。另方面, 硬式隐形眼镜一般是由甲基丙烯酸酯或甲基丙烯酸甲酯的聚合物制成。其他表面还有天然来源的生物膜、心脏起搏器导线和电源装置、蜂窝状及粘膜表

面、牙釉质、食品加工中用于除细菌和颗粒物的过滤器；化学品类；空调器过滤网；暴露于有水环境的各种结构组件的表面，如船、码头等等；塑料及复合材料如福米卡；还有金属或合金如钢、铝等等。

正如后文将详述，单独II型糖苷内切酶或与第二种酶如枯草杆菌蛋白酶组合并且带有或不带洗涤剂，可有效地提高除掉布样片上的血或粪便物的效果。这些污染物是如何附着在布片上还不十分清楚。然而，单独II型糖苷内切酶或其他药剂组合来提高从布片上除掉此等物质的效果，启示了至少有一个糖苷键加入到该织物与在用II型糖苷内切酶处理后所释开的污染物的那一部分之间。基于这些结果，下面提出了含糖苷物质结合到一个表面以及由II型糖苷内切酶释开和（或）除掉此等物质的机制。但所提出的这些机制不应作为对本发明范围的限定。

因此，如图5A所示，含糖苷物质可以通过一个免疫键而结合到一个表面上。此中，“免疫键”是存在于一个抗原和一个抗体之间，并且特异于该抗原（多克隆的或单克隆的）。如图5A所示，该含糖苷物质具有一个结合于该表面的近部和从该近部向外伸出的远部。近部和远部是由一个与II型糖苷内切酶有反应活性的糖苷键所连接。仍如图5A所示，当用II型糖苷内切酶处理后，含糖苷物质的远部就从含糖苷物质的近部“释开”而去。这样，该远部就不被其他方式结合到该表面，于是容易从该表面“除掉”而可用液体将之洗去。

按图5B所示的情况，该含糖苷物质是一种含有糖单元和蛋白质单元的糖蛋白，并且结合于一个表面。此含糖苷物质还含有一个糖类部分和一个糖苷配基部分，二者由一个与II型糖苷内切酶有反应活性的糖苷键所连接。在此具体情况下，该含糖苷物质（糖蛋白）是通过其糖类部分结合到该表面。当用II型糖苷内切酶处理后，其糖苷配基部分就从该含糖苷物质的糖类部分释开。于是如图5A所示，该糖苷配基部分不再通过其他方式与该表面结合，该糖苷配基部分也被从该表面除下。

图5C描绘这样的情况，即当一种含糖苷物质通过至少二个附接点而结合到表面上。如图示，在该表面与含糖苷物质之间存在一个第一糖苷键。此外，在该表面与要除去的含糖苷物质的那部分之间还存在第二种酶。若只用II型糖苷内切酶处理，该含糖苷物质的远离第一糖苷键的部分即从该表面释开，至少是把通过第一糖苷键而结合的除去。若有与图示第二个键有反应活性的第二种酶相接触，则该含糖苷物质的远离第一糖苷键和第二个键的部分从该表面释去。对于那些所述远部未与该表面结合的情况，即由其他接触点结合，而这些接触点可以是与其他酶有反应活性或易受洗涤剂 and (或) 表面活性剂作用的，则此远部可以有效地从该表面除去。

图5D示出一种微生物通过所述微生物的至少部分的糖苷部分而结合到一个表面。该糖苷部分含有一个与II型糖苷内切酶有反应活性的糖苷键。在用II型糖苷内切酶处理后，远离该糖苷键的该微生物的被断开部分即从该表面释开。那些未结合到该表面的被断裂部分也从该表面释开。然而，有可能存在与该表面多点接触的情况，这就需要用其他的酶和 (或) 洗涤剂或表面活性剂进一步处理。

图5E所示是结合于一个表面的II型糖苷内切酶反应活性物质。此II型反应活性物质有一个结合于该表面的近部和从该近部向外伸出的远部。近部与远部由一个II型反应活性键连接，即与II型糖苷内切酶有反应活性的键。当用II型糖苷内切酶处理后，该II型反应活性物质的远部即从其近部“释开”而去。不言而喻，II型反应活性物质可以包括可附着于一个表面的分子、微生物或各种组分的集合体。只要该II型反应活性物质的远部不是由其他方式结合于该表面，即可容易地从该表面“除下”，并可用一种液体洗去。

用于产生使该图内规定的物质被除去的效果的II型糖苷内切酶的量从功能上定义为从一个表面除去特定物质的“有效用量”。这个量会因

该物质和要处理的表面而变化。典型用量于后文中结合具体方案更详细披露。

第二酶包括蛋白酶、脂酶、糖苷酶如溶菌酶，以及它们的组合物。可以与II型糖苷内切酶组合使用的蛋白酶包括枯草杆菌蛋白酶、菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胰酶、溶菌酶以及它们的组合物。这些酶可以是天然来源的，如从枯草杆菌(*Bacillus subtilis*) 得到枯草杆菌蛋白酶，或从基因工程所得克隆得到，如枯草杆菌蛋白酶和突变体枯草杆菌蛋白酶，如EPO 公开0130756 所述，亦见于Wells, J. A. et al. (1983), *Nucleic Acids Res.*, 11, 7911-7915; Yang, M. et al., (1984), *J. Bacteriology*, 160, 15-21; Estell, D. A. et al. (1985), *J. Biol. Chem.*, 260, 6518-21。当然，有许多这类的酶可从市场购得。

此外，II型糖苷内切酶可以与脂酶组合，所述脂酶如细菌、哺乳类以及真菌脂酶，以及它们的组合物。

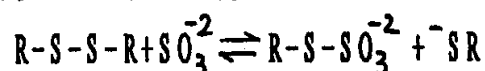
可用作第二酶的糖苷酶包括糖苷外切酶、第二种II型糖苷内切酶，以及I型糖苷内切酶。其实例包括 α -和 β -淀粉酶、纤维素酶、果胶酶、半纤维素酶、葡聚糖酶、各种葡聚糖酶等等，以及它们的组合物。

此外，II型糖苷内切酶可以与多于一种的上述第二酶组合，以促进从表面上除掉含糖苷物质。

当II型糖苷内切酶与一种或多种第二酶组合时，II型糖苷内切酶对第二酶的比率优选为约0.01至100，最好为1对1。

II型糖苷内切酶还可与洗涤剂（单一的或与一种或多种第二酶和（或）二硫化物断开剂组合的）组合使用而成为洗涤剂配方。能够断开二硫化物键的物质各有不同，但一般分为三类：氧化剂、还原剂、以及其他加合基质例如富马酸和亚硫酸钠。适用的氧化剂包括过氧化氢、过甲酸、过硼酸钠以及氧化性漂白剂。有效的还原剂包括二硫苏糖醇（DTT）、 β -巯基乙醇（BME）、氢碘化钠等等。

其他不易分类的二硫化物断开剂包括氯化汞、硝普盐、三丁基磷、以及磷酸硫醇盐(phosphothiolate)。一种特别有用的断开剂是亚硫酸钠。它使二硫化物发生亚硫酸解,其反应式为



应用重金属离子或氧化剂除去该硫醇离子,可使此反应的平衡移动。其氧化能力可得自通气或用氧化剂如 $CuSO_4$ 或过硼酸钠。

前述的能断开二硫化物的物质并非全部,还包括那些有效果但未必适用于工业产品的物质。为能在工业上成功使用,所加入的物质必须较为廉价,并且没有对其终用途不利的性质。例如,虽然使用氯化汞可以实施本发明,但并不适用于工业生产的普通洗涤剂产品。 β -巯基乙醇和DTT在工业上可行,但它们有中度的不良气味。因此工业用配方中最优选的物质是亚硫酸钠(最好与一种氧化剂组合使用)或过氧化氢,它们不昂贵,也较安全。关于适用于断开二硫化物键的物质例如可见于 Chemical Modification of Proteins, Means, G.E. et al. eds(1971), Holden-Day, Inc. San Francisco, CA, Ch 8; Chemical Reagents for Protein Modification, Lundbald, R.L. et al., eds(1984), CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, Ch 7。

一般,单独的II型糖苷内切酶或其与一种或多种第二酶的组合物可占本发明洗涤剂组合物的0.01-3%(重量);并可包括二硫化物断开剂,其量可以占10-40%(重量/重量)。当然,其含量取决于该糖苷内切酶(以及第二酶,若使用时)以及二硫化物断开剂的性质、在洗涤液中该洗涤剂的稀释倍数,以及洗涤条件。然而,上面给出的范围是一般典型。

在本发明的一个方案中,于其上结合有含糖蛋白物质的表面使用一种二硫化物断开剂、一种II型糖苷内切酶、以及一种第二酶的组合(可以同时使用或按序使用),于适当pH、温度来处理适当的时间。当然,

为方便起见这些条件可以变动，而对II型糖苷内切酶、蛋白酶以及二硫化物断开剂的选择在一定程度上取决于这一选择。然而，方便条件常常在pH 5-12 范围。温度 20-55℃特别是约 40-55℃，时间不超过20分钟通常约10-15 分钟是典型和优选的。优选的时间和温度是家用洗衣机、洗衣店和专业洗衣机构常用的条件，因为为使之在工商业上切实可行，需要在使用者常用的条件下进行该过程。

在本发明另一方案中，采用使用市售洗涤剂的常规洗涤程序，并且提供II型糖苷内切酶、第二酶以及二硫化物断开剂的方式是将之分别或一起作为添加剂加入，很象使用漂白剂的方式。因此，可以在洗涤开始时与洗涤剂一起加入，或某个中间阶段如洗涤约一半时间后加入。若采取此方式，并假定固体或液体洗涤剂组合物是稀释500 倍（即1:500）

（每毫升约2 毫克固体物），则可加入任选量的II型糖苷内切酶、第二酶和二硫化物断开剂而不由于稀释而有上限。（若该II型糖苷内切酶、第二酶和二硫化物断开剂是起初加入到洗涤剂组合物中，并且若二硫化物断开剂占该组合物的50%，则最终洗涤溶液中每毫升只有1 毫克。然而，若这些物料是分别加入的，可以选择对于该特定的II型糖苷内切酶、二硫化物断开剂以及第二酶是最有效的加入量。）

关于II型糖苷内切酶和第二酶，通常只需要极小量。一般，它们的加入量使得在洗涤溶液中的最后浓度每种酶都是约1-500 微克/ 毫升。但是，二硫化物断开剂则要求较大量，要比通过洗涤剂稀释所能达到的量为高。例如，应用氢硼化钠断开二硫化物键的方便实施浓度可高达0.2M的该药剂，并同时存在相似量的缓冲剂(Lundbald, R. L. et al., Chemical Reagents for Protein Modification, 同上)。

虽然常规使用此种高含量，但它们并非必需的，较低浓度是可行的。亚硫酸解作用通常可在0.1M亚硫酸钠浓度中进行，但也可使用低达0.01M 或更低的浓度。DTT 在0.02-0.1M 范围是有效的。简言之，所

有二硫化物断开剂的浓度都可在广范围内变化并取得效果。当然，具体应用的优选浓度取决于活性物 and 该药剂的性质，还取决于洗涤程序的条件，包括时间、温度、pH。

在另一种更方便的方式中，将II型糖苷内切酶、第二酶和二硫化物断开剂加入到原始的洗涤剂组合物中，并采用这种改性的洗涤剂以标准洗涤程序来洗涤。在此等情况下，该洗涤剂组合物将相应于上述者，但该组合物用量按洗涤溶液计也可在约0.5-10毫克/毫升或更高的范围内变化，这也是取决于洗涤溶液和程序的条件，也取决于该洗涤剂组分的溶解度。在任何情况下，在该洗涤剂中包含了II型糖苷内切酶、二硫化物断开剂及第二酶，就根据该洗涤剂的稀释程度而限定了这些组分的浓度。因此，即使采用1:100的稀释度（10毫克/毫升），并且该二硫化物断开剂在洗涤剂组合物中限于50%，则在所得洗涤溶液中二硫化物断开剂的上限浓度为5毫克/毫升。当然，一般在洗涤剂中二硫化物断开剂含量会少于50%，所以它在洗涤溶液中的浓度会更低。

本发明的洗涤剂组合物的大部分是洗涤剂活性物质，二硫化物断开剂（若使用）占较小部分，第二酶（若使用）和II型糖苷内切酶占很小部分，由于酶组分的价格，这样小量是特别符合要求的。因此，该制剂一般含60-90%洗涤剂活性物，其中包括常规市售洗涤剂的添加剂如表面活性剂助剂和增白剂；0.01-3% II型糖苷内切酶和第二酶；以及约10-40% 二硫化物断开剂。

当然，也可以只将该三种添加剂之一加入到原始洗涤剂组合物中，而把其他的单独加入到洗涤液中。更具体讲，可将II型糖苷内切酶加入到预洗涤剂中，随后用含有第二酶的该洗涤剂；或者用含有糖苷内切酶的洗涤剂，并在其后或之前用该第二酶处理。

对于用在洗涤组合物中，Endo-D、F 和H 是优选的II型糖苷内切酶，以Endo-H为最优选者。

为了除掉含糖苷物质，此处所述组合物最好含有II型糖苷内切酶的量约为0.1-1200ppm，更优选为约1-1000ppm，最优选为约20-200ppm，并视乎该组合物的类型而定。最好用清洗组合物。此中最适用的是洗衣洗涤剂组合物，II型糖苷内切酶的优选含量为约0.1-1200ppm，更优选是约20-200ppm的Endo-D、F或H，最优选是约50-125ppm的Endo-H。

当用于控制或除掉微生物时，则该组合物含II型糖苷内切酶（最好是Endo-H）优选为约0.1-1200ppm，更优选为约1-1000ppm，最优选为约20-400ppm。清洗组合物为优选方式，并优选含有同上述量的II型糖苷内切酶，优选Endo-H。

下述为建议的含II型糖苷内切酶的组合物类型，用于除掉含糖苷物质和（或）微生物。这些组合物的制备和使用可采取任何不会破坏酶的活性的方法。它们可含有任何不致阻碍酶的活性的成分。这些组合物可以是洗衣洗涤剂、餐具洗涤剂、硬表面清洁剂、牙釉质清洁剂、液体或块状肥皂、防痤疮组合物、防汗剂、洗发液、面膏、果蔬表面防腐剂、织物柔软剂。

此等清洗组合物除可在洗衣机中以普通循环清洁织物之外，还可用于从其他表面除掉含糖苷物质和（或）微生物，所述其他表面如金属与合金，包括外科器械、管道、金属容器等；塑料及复合材料如福米卡，还有船、码头等等的表面。根据具体用途，组合物中可只含有II型糖苷内切酶，或组合有二硫化物断开剂、第二酶和（或）洗涤剂表面活性剂。

II型糖苷内切酶还可配制成用于从“生物表面”除掉含糖苷物质和（或）微生物的组合物，其中包括酵母菌、真菌、藻和细菌，所述生物表面如皮肤、皮肤孔洞、头发、毛囊和组织的表面。因此本领域技术人员包括洗发液配方、调理剂配方、肥皂配方及医药方面的人员可以方便地应用上述关于洗涤剂配方的公开内容而在这些用途中采用II型糖苷内

切酶。按上述配成后，这些组合物即可用于除掉附着在该等表面上的含糖苷物质。

II型糖苷内切酶也可以配制到从植物如果蔬的表面除去含糖苷物质和（或）微生物特别是酵母菌及真菌的组合物中。此等组合物优选含有阴离子表面活性剂。

此外，II型糖苷内切酶可以以本领域已知方式配制到祛臭组合物中，以提供糖苷内切酶活性来除掉产生不良气味的含糖苷物质和（或）微生物。此等应用II型糖苷内切酶的祛臭组合物可包括对本领域熟知的棒状、膏状和气溶液型祛臭剂配方的修改案。

此外，II型糖苷内切酶可以配制成用于处治通常由于发炎引致的痤疮，至少可达到这种程度，即处理涉及发炎的含糖苷物质和（或）微生物并结合到表面的情况。关于上述的配方，本领域技术人员有能力通过修改已知的抗痤疮配方而加入单独的II型糖苷内切酶或其与其他酶、洗涤剂 and（或）表面活性剂的组合物。

在用于处理隐形眼镜时，清洗组合物中的适宜II型糖苷内切酶含量约0.1-20微克/毫升，若使用第二酶如一种蛋白酶，则其含量亦如上述范围。处理时间可由5分钟至15小时，标准方式是处理过夜，即使用者睡眠时将镜片浸泡。有多种适用的方案，特别优选的是单液法，其中含II型糖苷内切酶和第二酶（若使用），在室温处理10分钟至2小时或过夜；或者先在II型糖苷内切酶溶液中处理10分钟至2小时，然后用含第二酶的溶液处理过夜。

用于隐形眼镜用配方的优选通用第二酶包括蛋白酶如木瓜蛋白酶、胰酶以及枯草杆菌蛋白酶。优选的II型糖苷内切酶是得自*Streptomyces plicatus*的Endo-H。可使用单一的第二酶，或组合物中可含有第二酶的混合物。

此外，隐形眼镜用组合物可包括其他能辅助总体酶催降解作用的组

分。其中特别适用的是二硫化物断开剂如2-巯基乙醇、半胱氨酸盐酸盐、二硫苏糖醇、二硫赤藓醇、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、硫脲等等。一般，优选含量为约0.01-5%(重量)，更好是0.05-1%(重量)。此外，此组合物中可含有洗涤剂以辅助镜片与含酶溶液的润湿。适用的洗涤剂包括十二烷基硫酸钠、单月桂酸钠、非离子表面活性剂如醇的乙氧基化物(例如聚乙氧基乙醇)，阴离子表面活性剂如醚的硫酸盐、直链烷基苯磺酸盐、月桂基硫酸钠等等。

也可使用适用于隐形眼镜清洗的缓冲剂和稳定剂，包括柠檬酸钠或钾、柠檬酸、硼酸、EDTA钠、各种混合磷酸盐缓冲剂以及 NaHCO_3 。一般，缓冲剂和稳定剂用量为约0.001-2.5%(重量)，优选为约0.1-1%(重量)。不讲自明，前述各剂含量为溶液中含量百分率(重量/体积)。该配方也可以是一种或多种常见固体剂量形式的，如片剂，以之用于定量的溶剂如水中。该固体剂组合物的含量百分率是在溶于定量的水中后，该溶液应含有前述的组合物百分率。若采取固体剂型，则配方中可含有常规润滑剂、粘结剂以及赋形剂，包括甘油、山梨糖醇、硼酸、丙二醇、聚乙二醇、葡聚糖、甲基纤维素、羟乙基纤维素、羧甲基纤维素的水溶性盐，或天然来源的亲水物质如明胶、藻酸盐、黄蓍胶、果胶、阿拉伯胶以及可溶性淀粉。

用于清洗隐形眼镜的典型组合物和方案包括以下几种：

1. 组合物中含1-100 微克/毫升II型糖苷内切酶，将镜片取下并放入该溶液于22℃接触12小时。将镜片从清洗液中取出并涮洗。

2. 溶液A 含10微克/毫升II型糖苷内切酶；溶液B 含5 微克/毫升枯草杆菌蛋白酶。将镜片于A 溶液于25℃浸30分钟，取出并浸于B 溶液于25℃浸10小时。

3. 清洗溶液中含10微克/毫升蛋白酶即胃蛋白酶，10微克/毫升II型糖苷内切酶。镜片浸于此溶液于20℃经5 小时。

4. 清洗溶液含5 微克/毫升枯草杆菌蛋白酶, 5 微克/毫升II型糖苷内切酶, 10mM的2-巯基乙醇。将镜片浸于此溶液中于30℃经5 小时。

5. 清洗溶液含7 微克/毫升枯草杆菌蛋白酶, 3 微克/毫升II型糖苷内切酶, 10mM 2-巯基乙醇, 2%十二烷基硫酸钠(SDS)。将镜片浸于此溶液中于20℃经3 小时。

6. 清洗溶液含4 微克/毫升枯草杆菌蛋白酶, 2 微克/毫升胰蛋白酶, 10微克/毫升II型糖苷内切酶, 2% SDS。将镜片浸于此溶液中于20℃经7 小时。

7. 溶液A 含4 微克/毫升枯草杆菌蛋白酶, 2 微克/毫升胰蛋白酶及2% SDS; 溶液B 含10微克/毫升II型糖苷内切酶, 10mM 2-巯基乙醇。将镜片浸于B 溶液中于30℃经20分钟, 然后浸于A 溶液中于25℃经6 小时。

在上述所有实例中, 镜片在再次佩戴之前先在生理盐水中充分清洗。

此等组合物可以配制成多种物理形态, 包括液体、凝胶、膏体、固体颗粒以及粉末。此组合物可配制成洗衣洗涤剂, 如USP 4507219、4318818、4605509、4412934 所披露者; 餐具洗涤剂如USP 4714562、3630923、4133779、4316824、4555360 所披露者; 硬表面清洗剂如USP 4414128、3679608、3985668、4005027 所披露者; 织物柔软剂如USP 3944694、4073996、4424134、4661269 所披露者; 块状肥皂如USP 3993722、3070547 所披露者; 洗发液如USP 4345080、4704272、4741855 所披露者; 防汗剂如USP 4725432 所披露者; 防痤疮剂如USP 4318907、4608370 所披露者; 口腔用制剂如USP 4684518 所披露者。以上各专利作为本文的参考文献。

此等组合物的pH值优选为4.~10, 更优选为5-8, 以使酶具有良好性能。

关于除掉微生物的实验室工作表明，为使除掉效果好，有些情况下带有微生物的表面的溶液需要一些物理或化学作用以除掉微生物。所试的微生物包括：

Escherichia coli，包括1型和3型 徽

Staphylococcus aureus

Staphylococcus epidermidis

Serratia marcescens

Streptococcus mutans

Streptococcus sanguis

Bacillus sp.

Candida sp.

Aspergillus sp.

对于除掉细菌如大肠杆菌(*E. Coli*)的情况而言，可将与表面结合的微生物用Endo-H处理，然后用化学方法除掉例如用抗菌剂处理，或用物理方法除掉如用水涮洗或用手擦拭。对于液状肥皂、块状肥皂、牙釉质清洗剂、防汗剂、祛臭织物柔软剂以及防痤疮组合物而言，优选在组合物中除含有Endo-H之外，还包含一种抗菌剂例如Irgasan® (Ciba-Geigy 产品) 或洗必太。在准备用物理作用如水涮洗或用手擦拭的情况下（例如硬表面清洗剂），则该组合物中不需要抗菌剂。

此中优选的是洗涤剂清洗组合物，特别是颗粒状和液体的洗衣洗涤剂组合物。它们优选包括约1-90%、更优选为约5-50% (重量) 的洗涤剂表面活性剂、最优选为约10-40% (重量)。

用于此等洗涤剂组合物的表面活性剂包括公知的合成阴离子、非离子、两性离子表面活性剂。其中典型的有洗涤剂领域熟知的烷基苯磺酸盐，烯基磺酸盐，烷氧基化（特别是乙氧基化）的醇和烷基酚，氧化胺，脂肪酸或脂肪酸酯的 α -磺酸盐，烷基甜菜碱等等。一般，这些洗

涤用表面活性剂含有 C_9-C_{18} 范围的烷基。阴离子洗涤剂表面活性剂可以使用它们的钠、钾或三乙醇胺盐；非离子表面活性剂一般可含有约5-17个环氧乙烷单位。 $C_{11}-C_{16}$ 烷基苯磺酸盐、 $C_{12}-C_{18}$ 烷基磺酸盐及烷基硫酸盐是特别优选的。

在本组合物中适用的表面活性剂详列于USP 3936537(Baskerville, 1976年2月3日颁给)，并作为本文的参考文献。此等表面活性剂的商售来源见于McCutcheon's "Emulsifiers and Detergents", North American Ed., 1984, McCutcheon Division, MC Publishing Company, 此资料亦作为本文之参考文献。

此等洗涤剂组合物所用的洗涤剂助剂包括一切惯用的无机和有机水溶性盐助剂，以及各种水不溶性及所谓“加晶种”助剂。此等洗衣洗涤剂组合物优选包括约1-75%，更好是约5-40%，最好是约10-20%（重量）的洗涤剂助剂。这些组合物的优选pH值为约6-10。

关于适用的水溶性无机碱性洗涤剂助剂的非限定性实例包括碱金属的碳酸盐、硼酸盐、磷酸盐、焦磷酸盐、三聚磷酸盐、碳酸氢盐、硅酸盐及硫酸盐。其特选实例包括钠和钾的四硼酸盐、碳酸氢盐、碳酸盐、三聚磷酸盐、焦磷酸盐以及六偏磷酸盐。

适用的有机碱性洗涤剂助剂盐的实例为：(1) 水溶性氨基多乙酸钠如钠及钾的乙二胺四乙酸盐、次氨基三乙酸盐、以及N-(2-羟乙基)次氨基二乙酸盐；(2) 水溶性肌醇六磷酸盐如肌醇六磷酸钾或钠；(3) 水溶性多磷酸盐，包括乙烷-1-羟基-1,1-二磷酸钠、钾和锂盐，以及亚甲基二磷酸钠、钾和锂盐等等。

加晶种助剂包括诸如以碳酸钙或硫酸钡为晶种的碳酸钠或硅酸钠之类的物质。特别优选的是粒度小于5微米的水合的钠沸石A。

关于适用的洗涤剂助剂的详细名单列于USP 3936537，并作为本文的参考文献。优选的助剂为脂肪酸、多羧酸盐、多磷酸盐以及它们的混

合物。

任选的洗涤剂组合物组分包括酶（如蛋白酶和淀粉酶）、过氧漂白剂及漂白活化剂、卤素漂白剂如二氯异氰脲酸钠和钾，污垢释出剂如甲基纤维素，污垢悬浮剂如羧甲基纤维素钠，织物增白剂，酶稳定剂，斑点状色料，增泡沫剂或抑泡沫剂，防腐蚀剂，染料，填料，杀菌剂，pH调节剂，非助剂碱度源等等。

在II型糖苷内切酶中，以 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶H、D、F和（或）PNGase F为优选适用于本发明的配制抗菌组合物和用于抗菌方法。以Endo-H为最优选。

当单独使用II型糖苷内切酶时，则配制成以其浓度提供抗菌效应。当该抗菌组合物包含至少二种不同组分时，即一种II型糖苷内切酶和一种或多种抗菌剂，则每种组分的浓度都要足以产生抗菌效应。在所述组合物中，至少一种组分的含量通常是低于在相同组合物中只单独使用它并产生相同抗菌效应所需的含量。

此中，所述“抗菌效应”包括在与单独的II型糖苷内切酶或其与包含抗菌剂的第二组分的组合物接触后，能使微生物被除掉、杀灭、抑制生长、整体形态变异、原生质体形成和（或）使微生物细胞壁降解。

此中，所述“抗菌方法”是指产生抗菌效果的一种方法。在本发明的一个方面，该抗菌方法引致杀灭微生物，抑制微生物生长和（或）改变该微生物的整体形态。在本发明的另一个方面，该抗菌方法引致将微生物从一个表面上除掉。在从表面除掉微生物的抗菌方法中，优选方式是用抗菌剂和II型糖苷内切酶同时处理该表面，而不是在用II型糖苷内切酶处理后紧接着用抗菌剂进行补充处理。在某应用方式中，可以产生综合的抗菌效果，例如可以达到从表面除掉微生物的同时，亦将之杀灭和（或）抑制生长。

此中，“抗菌组合物”是指至少含二种不同组分的组合物：即一种

II型糖苷内切酶及一种与之不同的含抗菌剂的组分。此种抗菌组合物具有多样而不同的抗菌效果，视乎对II型糖苷内切酶及抗菌剂的选择和用量。所观测的抗菌效果包括杀灭微生物和（或）抑制微生物生长，从表面除掉微生物以及防止微生物附着于表面。

此中，II型糖苷内切酶的“抗菌有效浓度”是指单独使用II型糖苷内切酶并与一种微生物接触并产生抗菌效果的最终用浓度。

此中，“抗菌剂”是抗菌组合物中第二种与之不同的组分。此等抗菌剂一般是抗生素，并包括能杀灭微生物和能抑制微生物生长的药剂。这些抗菌剂的实例包括杀菌剂、杀真菌剂和杀藻剂，它们分别能使细菌、真菌或藻类被杀灭或抑制生长。杀菌剂包括如洗必太、2,4,4'-三氯-2'-羟基二苯基醚、Triclocarban[®]、青霉素、四环素以及Bacitracin[®]。杀真菌剂包括Nystatin[®]、Amphotericin B[®]、Benomyl[®]、Captan[®]、Dichloran[®]。抗菌剂的其他实例包括表面活性剂稳定的抗菌酶如表面活性剂稳定的 β -1,3-葡聚糖酶、溶菌酶、蛋白酶以及壳多糖酶，以及洗涤剂表面活性剂如本领域已知的阴离子、非离子、两性离子、两性以及阳离子表面活性剂。后者的用量应为足以产生抗菌效应的含量。上述的以类别名称或商品名命名的抗菌剂是组合物，并见于Merck Index, 10th Ed. (1983), Merck & Co., Inc., Rahway, N. J.。

与前述抗菌组合物中的第一组分不相同的II型糖苷内切酶也可用作抗菌剂。因此，对于本身也是抗菌剂的II型糖苷内切酶（例如能产生抗菌效应如形态变异或原生质体形成），则可以与另一种不同的II型糖苷内切酶组合起来而成为抗菌组合物。因此，抗菌组合物中可含有一种或多种不同的II型糖苷内切酶，并带有或不带有不属于II型糖苷内切酶的抗菌剂。

应用于此的优选的抗菌剂为洗必太、2,4,4'-三氯-2'-羟基二苯基

醚、Triclocarban、Nystatin、Amphotericin B、抗生的阴离子及非离子洗涤剂表面活性剂。在共同申请的美国专利申请中披露了一种表面活性剂稳定的抗菌溶菌酶，该专利名称为“应用某些溶菌酶和糖苷内切酶的方法及组合物”，申请人为Richard S. Carpenter 及Ann M. Wolff，与本发明申请日同一日申请。其他溶菌酶如鸡蛋白溶菌酶已与Endo-H组合使用以产生抗菌效应，但应用较少并且所得结果各有不同。

本发明的抗菌组合物和方法可对多种微生物产生抗菌效应，包括革兰氏阳性及阴性菌，真菌以及藻类。此等细菌包括*Escherichia coli*，*Streptococcus mutans*，*Staphylococcus epidermidis*，*Staphylococcus aureus*。真菌包括酵母菌如*Candida* 和*Saccharomyces*，以及其种属，以及丝状真菌如*Aspergillus*，*Sporobolomyces*，*Basidiobolus* and *Entomophthora*。

将II型糖苷内切酶（如Endo-H、D、F和（或）PNGase F）与一种抗菌剂相组合的特别优越之处在于可以用较少的抗菌剂来产生抗菌效应。在本发明的某些方面，在与II型糖苷内切酶合用时的抗菌剂所产生的抗菌效应包括将附着在表面上的微生物除掉，或防止微生物附着到此表面。在其他方面，是对微生物的存活或微生物的形态有反效果。

用II型糖苷内切酶和抗菌剂处理表面可以定期实行，从而防止受处理的表面再生长或再附着微生物。

关于II型糖苷内切酶，以Endo-H、D、F和（或）PNGase F为优选。其中Endo-H为最优选。一般，用于与抗菌剂组合的抗菌有效含量的II型糖苷内切酶是约1-1200ppm的Endo-H、D、F和（或）PNGase F，优选为约1-1200ppm的Endo-H，更好是约20-1000ppm的Endo-H，最好是约50-400ppm的Endo-H。所用的量取决于处理的类型和与该表面接触的量或是所要处理的微生物。一般，有效量的抗菌剂视乎所用的是何种，并且是约0.5-1200ppm，优选为2-1200ppm，最好是约5-350ppm的洗必

太或2,4,4'-三氯-2'-羟基二苯基醚,或是0.5-100ppm的Nystatin[®]。

当使用单独的II型糖苷内切酶杀灭和(或)抑制微生物时,一般要求使用较多量的II型糖苷内切酶。例如,使用约100-1000ppm的Endo-H表明可使与此浓度相接触的酵母菌的存活大大下降。但当酵母菌与低于100ppm的Endo-H接触时,未观测到其存活的显著下降。虽然能使酵母菌存活有负面影响的Endo-H浓度下限尚未测定,相信其抗菌效能下限浓度为10-100ppm之间。亦相信需同上浓度的Endo-H去杀灭和(或)抑制其他微生物如藻和真菌。Endo-H和其他II型糖苷内切酶在未与抗菌剂组合使用情况下对于此等微生物及其他微生物如细菌的确切效应还未得到测定。然而,II型糖苷内切酶用于对此等微生物的抗菌有效浓度范围可以按常规方式测定。

本发明的抗菌方法及组合物有广泛用途,并包括个人护理、卫生护理以及家庭及工业清洁的抗菌方法及组合物。所以,此等方法及组合物可用于配制和使用抗菌漱口水、牙粉或牙齿清洁剂,以及抗菌的液体或固体洗手皂或婴儿皂,防痤疮药物,祛臭剂,洗发液和面膏,以及用于清洁伤口或抑制感染的组合物。典型的家用用途包括抗菌清洁产品如液体肥皂,硬表面清洁剂,液体及颗粒洗衣洗涤剂。也可配制工业用的重垢型抗菌洗涤剂组合物。

洗必太是一种有效的口腔抗菌剂,优选使用于口腔制剂中。2,4,4'-三氯-2'-羟基二苯基醚在Ciba-Geigy公司以Irgasan[®]商标出售,是一种广谱抗菌剂,在个人护理及洗衣用途中有效。孟山都的Triclocarban[®]是一种适用于块状肥皂的制菌剂。传统的抗生素在此处也可用作附加的抗菌剂。表面活性剂稳定的抗菌酶可用于口腔制剂中以及用于洗发液及其他含表面活性剂的配制剂的防腐。一种优选的表面活性剂稳定的抗菌酶是前述由Carpenter和Wolff共同申请的专利中所披露的溶菌酶。此处对于抗菌酶的表面活性剂稳定性的量度例如是在代表

性含量的烷基醚硫酸盐或直链烷基苯磺酸盐存在下所能保留的活性。

这里的抗菌组合物可以配制成抗菌的漱口剂、牙粉或托牙清洁剂。对微生物处理以产生抗菌效果(例如在口腔中除掉附着在口腔内的天然或合成软或硬表面上的微生物或防止其附着,或杀灭口腔中的微生物或抑制其生长),于是基本上包括用一种抗菌漱口剂来荡洗、用抗菌牙粉清洁牙齿和(或)用抗菌托牙清洁剂清洁托牙。此中的抗菌漱口剂、牙粉及托牙清洁剂最好包含Endo-H、洗必太和(或)表面活性剂稳定的抗菌酶作为其中的抗菌剂。在使用洗必太的场合,则抗菌漱口剂、牙粉或托牙清洁剂中优选含有约50-1000ppm的Endo-H和约50-350ppm的洗必太。在使用表面活性剂稳定的抗菌酶时,则抗菌漱口剂、牙粉或托牙清洁剂中优选含有50-150ppm的Endo-H和约50-1000ppm的表面活性剂稳定的抗菌酶。

此等抗菌组合物也可配制成抗菌的个人护理产品或家用清洁产品。在此等产品中,Endo-H的优选使用浓度为约1-1200ppm。用于此等产品的抗菌剂优选为洗必太,其最优选浓度为约150-1200ppm,或使用2,4,4'-三氯-2'-羟基二苯基醚,其最优选浓度为约2-500ppm。优选的个人护理或家用清洁产品为液体洗手皂、硬表面清洁剂、洗衣洗涤剂以及洗发液(如下述)。

优选的抗菌液体洗手皂包含约50-400ppm的Endo-H,约5-100ppm,的2,4,4'-三氯-2'-羟基二苯基醚,以及优选约1-40%(重量)的洗涤剂表面活性剂。优选应用约2-20%(重量),最好约3-10%(重量)的洗涤剂表面活性剂,优选选自阴离子、非离子、两性离子、两性以及阳离子表面活性剂。该液体洗手皂还可包含润肤剂(最多可达30%,重量)以及少量的香料、色料、溶剂以及不透明剂。

此中的抗菌硬表面清洁剂可以有玻璃清洁剂、硬表面磨擦清洁剂、擦亮清洁剂以及便盆清洁剂。其中应实质上不含产生次氯酸盐的漂白剂

以及其他与糖苷内切酶不相容的成分。优选的硬表面清洁剂包含约100-1000ppm Endo-H、一种抗菌剂、以及约0.1-20%(重量)的洗涤剂表面活性剂。最好含约2-10%(重量)的洗涤剂表面活性剂,并优选选自阴离子、非离子、两性离子、两性及阳离子表面活性剂。此等抗菌硬表面清洁剂还可任选含有磨擦剂、助剂、稀释剂、溶剂、悬浮剂(如粘土、羧甲基纤维素以及聚丙烯酸酯)、香料和(或)色料。

此中的抗菌洗衣洗涤剂除含有II型糖苷内切酶和抗菌剂之外,优选含有约1-99%(重量),更好约5-60%(重量),最好约10-40%(重量)的洗涤剂表面活性剂,它们优选选自阴离子、非离子、两性离子、两性和阳离子表面活性剂。一种优选的液体或颗粒状抗菌洗衣洗涤剂包含约2-250ppm的Endo-H,约2.5-40ppm的2,4,4'-三氯-2'-羟基二苯基醚,约5-60%(重量)的洗涤剂表面活性剂。此中的抗菌洗衣洗涤剂可任选含有助剂、香料、漂白剂、稀释剂、抑泡沫剂、色料、增白剂、污垢悬浮剂、抗再沉淀助剂、柔软剂和(或)污垢释出剂。

此中的抗菌洗发液优选包含Endo-H、一种抗菌剂、以及约5-60%(重量)的洗涤剂表面活性剂,优选选自月桂基硫酸盐、异乙二磺酸盐、酰基酰氨基甜菜碱、烷基甘油基醚磺酸盐、烷基醚硫酸盐。任选的成分有增泡剂、调理剂、染料、色料、香料和(或)防头皮屑剂。

本发明的抗菌组合物还可以是防腐剂或防治微生物剂的形式,用于处理植物表面。优选的是用于果蔬表面的防腐剂,或应用于作物以防治微生物的抗菌产品。后者优选用溶液形式,以便喷洒到作物上,如玉米、桔柑、小麦、烟草、大豆、番茄、草莓,用以阻止或防止微生物生长。

以下实例仅为举例之目的,并非对本发明范围的限定。

实例1

分别将血和粪便污染的棉布样片在自动式洗衣机中用市售洗涤剂洗

涤, 采用温水 (约37℃) 洗涤循环。然后将样片漂洗并风干。然后将它们在试管中、37℃、pH=7.0 条件分别用不同量和类型的糖苷内切酶 [0.005U的Endo-D(Boehringer Mannheim Biochemical) 或Endo-H (Boehringer Mannheim Biochemical, 得自*S. griseus*, 目录号752967), 以及0.25U 的N-聚糖酶(PNGase F 或肽糖苷内切酶F)(Genzyme, Boston, MA) 在0.75毫升50mM Tris-HCl 中进行培育30分钟。对照组含有缓冲剂, 但无糖苷内切酶。在培育完毕时, 向对照组和含酶样品中加入0.25毫升每毫升中含80微克枯草杆菌蛋白酶BPN' 的洗涤剂溶液 (将不含染料、香料、酶或增白剂的市售液体洗涤剂组合物在7.5pH, 1M Tris-HCl 中稀释1:125 倍), 然后再培育20分钟。在处理完毕时, 将试管离心, 并借助于测定280 毫微米的吸光率以测定上清液中的蛋白质含量。在每次处理中, 准备一个不含试样片的反应空白。从经处理样品的吸光率减去空白数值, 以测定在培育时释出的280 毫微米吸收物质。吸收率较高表示从纤维上释出的蛋白质更多。所得结果列于表III。

表 III

处 理	280 毫微米吸光率	
	血 污	粪便污
对照	0.79	2.07
Endo-D	0.84	2.14
Endo-H	0.83	2.12
N-聚糖酶	0.78	2.10

这些结果表明, 当糖苷内切酶即Endo-H及Endo-D与第二酶即枯草杆菌蛋白酶合用时, 与对照物相比, 可增加从血污染样片上释放于280 毫微米吸光的物质。此外, Endo-D、Endo-H和N-聚糖酶都显示能增加从粪便污染样片上释放于280 毫微米吸光的物质。

实例2

Endo-H对于除掉粪便污染物的效果

本实例与实例1相似，不同之处是使用粪便污染的尼龙织物样片。将样片在洗涤剂溶液中洗涤，漂洗并风干。该洗涤剂为市售液体洗涤剂，并且不含酶、增白剂、染料或香料。将一批样片作为“未处理的对照样”。这些样片与试样的处理方法相同，只是不用Endo-H处理。试样样片在缓冲液(10mM 乙酸钠，pH6.0)中加入0.01U Endo-H(Boehringer Mannheim Biochemical，目录号752967)，于37℃培育15分钟。然后加入0.25毫升洗涤剂溶液(用1.0M，pH7.5 Tris-HCl稀释1:125倍)，再培育15分钟。完毕后，将试管离心，吸出上清液。将样片风干。将该样片的纤维经临界点干燥后用扫描电子显微镜检查。图6A示出用粪便污染的样片经洗涤剂洗涤后的电子显微照片。可以看到，在织物表面可见到有杆状细菌和颗粒物质。图6B所示是经过Endo-H和洗涤剂处理的样片，显示出光滑清洁的织物，表明Endo-H和洗涤剂有利于除掉颗粒物质和细菌碎体。

实例3

Endo-F对于除掉粪便污染物的效果

将用粪便污染的样片(1英寸直径)在洗涤剂溶液中洗涤、漂洗并干燥。将样片四分切成小块，并用于以下的实验中。

A. 将样片在1毫升10mM乙酸钠缓冲液，pH5.5并带有或不带有Endo-F(Boehringer Mannheim Biochemical)(0.15单位)的情况下于37℃培育30分钟。然后将试管离心8分钟。取出上清液并于280毫微米测定吸光率。减去相应的空白值(按实例1)，测得A₂₈₀(280毫微米吸光率)的变化。较高吸光率包括了从样片释出的蛋白质或于280毫微米吸光的物质质量增多。对照组的平均A₂₈₀变化为0.93。而用Endo-F处理的样片其平均A₂₈₀为1.05。这表明Endo-F提高了除掉粪便物的效果。

B. 将样片在0.75毫升10mM乙酸钠缓冲液, pH5.5 并带有或不带有Endo-F(0.15 单位) 的情况下于37℃培育15分钟。在处理完毕时, 加入0.25毫升含有10微克蛋白酶即枯草杆菌蛋白酶BPN' 的洗涤剂溶液 (在0.1M Tris-HCl 中, pH7.5), 并于37℃再培育15分钟。完毕时, 将试管离心, 取出上清液并测定280 毫微米吸光率。对于对照组 (无Endo-F), 平均A280变化为1.08, 而用Endo-F处理的样品的A280变化为1.36。这表明由于存在洗涤剂而提高了Endo-F的效果。

C. 进行与“B”相似的实验, 不同之处是洗涤剂溶液中含10mM的2-巯基乙醇而不含枯草杆菌蛋白酶。对照组的平均A280变化为1.05, 而使用Endo-F的样品其A280变化为1.24。此结果表明在二硫化物断开剂存在下Endo-F除掉粪便污染物的能力。

D. 进行与“B”相似的实验, 不同之处是洗涤剂溶液中含有10mM 2-巯基乙醇和10微克枯草杆菌蛋白酶BPN'。对照组的平均A280变化为1.14, 而用Endo-F处理的试样的A280变化为1.29。此结果表明Endo-F能在洗涤剂、蛋白酶和二硫化物断开剂(2-巯基乙醇) 存在下除掉粪便物。

实例4

Endo-H与其他酶的比较

重复与实例3-B 相似的实验, 使用Endo-H(Boehringer Mannheim Biochemical, 目录号100119) 和其他糖酶, 但不使用蛋白酶如枯草杆菌蛋白酶。监测其A280变化并用扫描电子显微镜检查。观察到应用Endo-H及“溶胞酶”(一种蛋白酶和糖酶的混合物, 得自Sigma Chemical Company) 从织物上除掉颗粒物和细菌碎片。然而, 使用这些酶即溶菌酶、 α -糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶和 β -glucorinadase 则无效或效果很小(结果未示出)。图7A至7H示出上述实验中用或不用上述酶的电子显微照片。图7A是对照组, 未用糖苷内切酶处理。图7B是用溶菌酶处理

的样片的电子显微照片；图7C是用Endo-H处理的样片；图7D是用 α -葡萄糖苷酶处理的样片；图7E是用 β -葡萄糖苷酶处理的样片；图7F是用“溶胞酶”处理的纤维的电子显微照片；图7G是用 β -glucorinadase处理的样片的显微照片；图7H是用壳多糖酶处理的样片的电子显微照片。可以看到，用Endo-H处理的（图7C）样片已将粪便污染物完全清洗掉。用“溶胞酶”处理的样片也得类似结果，见图7F。

实例5

从固体表面除掉细菌

为测试Endo-H从固体表面（玻璃）除掉细菌的效果，采用以下的条件。将取自一个保藏培养物斜面的微生物种属(*Staphylococcus aureus* ATCC culture #6538或*Escherichia coli* ATCC culture #10536) 接种到胰蛋白酶解酪蛋白酱油汤汁(TSB)(10毫升) 中，并于37℃培育过夜。制备约 10^8 细胞/毫升TSB 的悬浮液，并将100 微升此悬浮液置于玻璃载片的侵蚀环中。每个载片于37℃的干燥培养箱中培育5 分钟，然后将过多的微生物溶液排出。然后用100 微升灭菌蒸馏水洗此载片。然后将过多溶液和松散有机体排出。

当细菌附着于玻璃载片后（37℃，2 小时或更久），在各载片上分别加上100 微升下述溶液：(a)10mM 乙酸钠缓冲液，pH5.5；(b)10mM 乙酸钠缓冲液，pH5.5 加上1ppm Endo-H(Boehringer Mannheim Biochemical，目录号100119)；(c) 洗涤剂溶液；(d) 洗涤剂溶液加1ppm Endo-H。将一批载片不用任何溶液处理作为未处理对照组。然后把不是对照组的载片于37℃培育15分钟。培育毕，将溶液排出。然后用100 微升灭菌蒸馏水冲洗载片，并于室温风干。将处理后留下的细菌进行热固定，然后以标准Gram染色方法进行染色。然后用光源显微镜检查这些载片（光亮视野照明，放大125X），并测定有机体数目/视野。对每一载片检查20个视野，计算有机体数目/视野的平均值。

得到以下结果:

A. 对于 *Staphylococcus aureus* (金黄葡萄球菌) :

i) 未处理	>100 有机体 / 视野
ii) 缓冲液	>100 有机体 / 视野
iii) 缓冲液 + Endo-H	<10 有机体 / 视野
iv) 洗涤剂溶液	>100 有机体 / 视野
v) 洗涤剂 + Endo-H	<10 有机体 / 视野

此等结果表明, 含Endo-H的缓冲液本身或Endo-H与洗涤剂组合与单独用缓冲液或洗涤剂相比, 可使保留在玻璃载片上的*S. aureus*细菌数目减少10倍。

B. 对 *Escherichia coli* (大肠杆菌) :

i) 未处理	>100 有机体 / 视野
ii) 缓冲液	>100 有机体 / 视野
iii) 缓冲液 + Endo-H	>100 有机体 / 视野
iv) 洗涤剂	>100 有机体 / 视野
v) 洗涤剂 + Endo-H	<10 有机体 / 视野

此等结果表明, Endo-H与洗涤剂组合, 与单独用洗涤剂相比, 可使保留在玻璃载片上的*E. coli*数目减少10倍。

实施例6

从固体表面除掉细菌

按实例5的相似方式用两种生粘液的*Staphylococcus aureus*培养体(由其结合到聚苯乙烯管上的能力确定)进行实验。将载片改型, 即用指甲锉磨擦形成两个环(直径约1.7厘米)。将有机体的过夜培养体用1%的胨溶液按1:10稀释。将100微升稀释后培养体置于环中。将载片置于150毫米培养皿中于37℃培育。经2小时培育后, 用蒸馏水冲洗载片, 并按实例5方式以三种不同条件处理(A. 乙酸钠缓冲液; B. 洗涤

剂；C. 洗涤剂加1 微克Endo-H/毫升)。所用Endo-H是得自*E. coli* 并经转化，以从*S. plicatus* 产生Endo-H。在15分钟的末尾，用蒸馏水冲洗经培育载片并以Gram法染色。用放大100X显微镜视野计出细菌数目，取20个视野平均，结果如下：

条 件	培养体 I	培养体 II
A. 对照组	23	202
B. 洗涤剂	9	58
C. 洗涤剂+ Endo-H	2	33

实例7

从布表面除掉细菌

为测试Endo-H对于从布表面除去细菌的效果，采用下述条件。将 *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) 和 *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 155) 分别在Luria 汤汁中培养，37℃生长12小时。然后将培养体加入到二个100 毫升摇瓶中，内有30 毫升0.2M柠檬酸钠 pH5.5 缓冲液，达到约 10^3 细胞/毫升。接种后，将12片布样片(0.5×0.5 英寸棉布) 加入瓶中。于37℃以慢速转动(150 转/分) 培育2 小时后，将样片移入灭菌试管中，用缓冲液(含200mM 柠檬酸钠, pH5.5, 预先用0.22微米过滤灭菌) 洗涤3 次。然后将6 个样片加入到摇瓶中(在30 毫升柠檬酸盐缓冲液中含0.5 毫克/毫升Endo-H)，另6 个样片加入到对照摇瓶中(只含柠檬酸盐缓冲液)。此Endo-S是得自*E. coli*，生成*S. plicatus* Endo-H。以慢转动(100 转/分) 于37℃培养1.5 小时后，将样片移至灭菌试管中，并按前述洗涤。然后将样片小心平铺在胰蛋白酶解酪蛋白酱油琼脂板上，然后用足量的液体胰蛋白酶解酪蛋白酱油琼脂将样片覆盖。待板干燥后，于37℃培育18小时，用解剖显微镜对布表面的 *S. aureus* 和 *S. epidermidis* 菌落计数。

得到以下结果:

A. 对于 *Staphylococcus aureus* (金黄葡萄球菌) :

对照组 每一样片 103 ± 24 菌落

Endo-H 每一样片 53 ± 18 菌落

应用Endo-H处理, 使细菌菌落减49% ;

B. 对于 *Staphylococcus epidermidis* (表皮葡萄球菌) :

对照组 每一样片 57 ± 11 菌落

Endo-H 每一样片 16 ± 10 菌落

应用Endo-H处理, 使细菌菌落减少72% 。

这些结果表明, 经Endo-H处理, 使附着于布表面的细菌数目显著减少。

实例8

Endo-H与细菌结合

以下的实验是确定II型糖苷内切酶即Endo-H是否与表面的 *Staphylococcus aureus* 和 *Streptococcus mutans* 细菌部分有相互作用。探查到此种相互作用。虽然此处未能完全表征, 但此相互作用是以前所未知, 并可成为上述Endo-H从表面除掉此等细菌的基础。

从转化的 *E. coli* 所得Endo-H并用 Trimble, R. J. et al. (1985), J. Biol. Chem., 260, 5638-5690 所述方法经修改后进行纯化, 并采用 Updyke, T. V. 和 Nicolson, G. L. (1986), Methods in Enzymology, 121, 717-725 所述方法用生物素进行标记。经如此标记后, 该Endo-H保留了大部分它与糖蛋白卵清蛋白的反应活性。

将 *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) 在Luria 汤汁中生长的过夜培养体与 *Streptococcus mutans* (ATCC 27607) 在Difco 脑心输液介质中生长的过夜培养体经过离心分离并用pH5.5 200mM 柠檬酸钠缓冲液洗涤三次, 然后悬浮于同一缓冲液中至浓度约 10^9 细胞/毫升。将0.5 毫

升的等份置于1.5毫升Eppendorf 管中并以不同温度和时间进行培育。

管	细胞	2% BSA	生物素标记 的Endo-H	pH5.5, 0.2M 柠檬酸钠	培育时间, 分钟
1	0.5 毫升	5 微升	—	0.5 毫升	30
2	0.5 毫升	—	5 微升	0.5 毫升	2
3	0.5 毫升	—	5 微升	0.5 毫升	30

对两者于室温进行培育, 用慢速摇床进行30分钟。使用于Tris缓冲的生理盐水中稀释的BSA(牛血清清蛋白) 作为对照溶液, 以防止任何非特异性蛋白质结合到该等细胞。培育之后, 将各管离心并倾去上清液。用2% BSA溶液进行二次细胞洗涤, 即向细胞加入1.0 毫升BSA, 充分旋流, 离心分离并倾去上清液。在已洗涤的细胞中, 使用0.5 毫升streptavidin-HRP(用streptavidin标记的辣根过氧化酶, Kirkegaard and Perry Laboratories, Inc.), 并于室温培育30分钟。再将试管按前述离心和洗涤。探测Endo-H与细菌细胞的结合是由深测到HRP-streptavidin来确定, 后者将牢固地结合到与细胞结合的由生物素标记的Endo-H上面。HRP 探测是加入0.5 毫升该HRP 底物即OPD(邻苯二胺) 并稀释于含过氧化氢的柠檬酸盐磷酸盐缓冲溶液。在加入OPD 一分钟后, 用2M H_2SO_4 淬止色原的产生。将细胞离心分出, 并对上清液得出在490 毫微米的读数。得到以下结果:

对于*Staphylococcus aureus* :

	OD, 490 毫微米
对照	0.13
Endo-H, 2 分钟	1.89
Endo-H, 30 分钟	1.90

对于*Streptococcus mutans*

	<u>OD, 490毫微米</u>
对照	0.18
Endo-H, 2 分钟	3.76
Endo-H, 30 分钟	3.80

以上结果表明, Endo-H与细菌即*Staphylococcus aureus* 和 *Streptococcus mutans*有结合现象。数据表明, 大部分Endo-H的结合是发生在与细胞接触后的前二分钟或更短时间内。用*Streptococcus mutans*达到较高吸光率, 可能是Endo-H结合量较高。

实例9

本发明的一种重垢型液体洗衣洗涤剂组合物, 其配方如下:

<u>组 分</u>	<u>活性物%, 重量</u>
C ₁₃ 直链烷基苯磺酸	8.00
C ₁₄ -C ₁₅ 烷基聚乙氧基化物(2.25) 磺酸	12.00
1,2-丙二醇	3.50
二乙三胺五乙酸钠	0.30
单乙醇胺	2.00
C ₁₂ -C ₁₃ 醇聚乙氧基化物(6.5) :	5.00
乙醇	8.50
氢氧化钾	1.80
氢氧化钠	3.85
C ₁₂ -C ₁₄ 脂肪酸	10.00
柠檬酸	4.00
甲酸钙	0.12
甲酸钠	0.86
C ₁₂ 烷基三甲基氯化铵	0.50
四乙五胺乙氧基化物(15-18)	2.00

水	35.12
染料	0.08
香料	0.25
蛋白酶***	0.125
Endo-H	2000ppm

注：* 已除掉醇及单乙氧基化的醇。

**毫克活性酶/克（于34毫克活性酶/克贮存物）。

将上列各成分按顺序加入带单一搅拌的混合槽中。在加入蛋白酶之前，加入染料和香料，调节混合物pH值，使得其在水中的10%（重量）溶液于20℃的pH为约8.5。

此组合物提供优越的对含糖类污染物的清洗效果，甚致优于含蛋白酶和（或）含淀粉酶的洗涤剂。

实例10

本发明的一种重垢型液体洗衣洗涤剂组合物如下：

组 分	活性物%, 重量
C ₁₃ 直链烷基苯磺酸	8.00
C ₁₄ -C ₁₅ 烷基聚乙氧基化物(2.25) 磺酸	12.00
1,2-丙二醇	3.50
二乙三胺五乙酸钠	0.30
单乙醇胺	2.00
C ₁₂ -C ₁₃ 醇聚乙氧基化物(6.5) *	5.00
乙醇	8.50
氢氧化钾	1.80
氢氧化钠	3.85
C ₁₂ -C ₁₄ 脂肪酸	10.00
柠檬酸	4.00

甲酸钙	0.12
甲酸钠	0.86
C ₁₂ 烷基三甲基氯化铵	0.50
四乙五胺乙氧基化物(15-18)	2.00
水	37.12
染料	0.08
香料	0.25
蛋白酶***	0.125
Endo-H	125ppm

注：* 已除掉醇及单乙氧基化的醇。

**毫克活性酶/克（于34毫克活性酶/克贮存物）。

将上列各成分按顺序加入带单一搅拌的混合槽中。在加入蛋白酶之前，加入染料和香料，调节混合物pH值，使得其在水中的10%（重量）溶液于20℃的pH为约8.5。

此组合物提供优越的对含糖类污染物的清洗效果，特别是对粪便污染物的清洗效果。

将Endo-H含量降低到0.40毫克/毫升、水含量减至35.72%，并加入1% Irgasan(Ciba-Geigy 的抗菌剂)，得到按本发明的另一组合物。

实例11

本发明的液体肥皂组合物如下：

组 分	活性物%, 重量
月桂基硫酸铵	6.0
月桂基甲氨基乙酸钠	5.7
椰油基酰氨丙基甜菜碱	6.3
椰油脂肪酸	1.0
季胺	0.3

乙二胺四乙酸	0.2
硫酸铵	0.4
香料	0.25
Kathon	5ppm
水	72.0
Endo-H	1000ppm
Triclocarban	1.50

将上列各组分按顺序加入到具有单一搅拌器的混合槽中。

此组合物提供抗菌作用，可除掉普通皮肤菌丛，甚致可与不含糖苷酶的抗菌肥皂相比。

实例12

本发明的硬表面擦净剂如下：

组 分	重量, %
假稠性流体相 (比重1.1)	93.5
Barasum NAS-100(钠滑石粉粘土)	4.25
焦磷酸四钾	6.00
磷酸三钾	2.00
次氯酸钠漂白剂	0.90
月桂基硫酸钠	0.25
染料及香料	0.26
Endo-H	1000ppm
软化水	78.86
磨擦剂 (膨化珍珠岩, 比重2.0 , 平均粒径50微米)	5.0
Hercoflat 135 填料 (粉末状聚丙 烯, 比重0.9 , 平均粒径35微米)	1.50

摩擦剂 / 填料平均粒径比率 = 1.43:1

该组合物的配制是以较高剪切力的搅拌设备将焦磷酸四钾、磷酸三钾、钠滑石粉粘土、染料、香料及去离子水混合到形成假稠性流体相的程度。然后将表面活性剂烷基硫酸盐混入此混合物，然后混入聚丙烯填料。另外配制次氯酸钠和珍珠岩的水中浆液，并在该假稠性流体相在中度剪切搅拌下处于液化态的情况下将浆液混入其中。所得擦净剂组合物是假稠性的，即于其静止状态是凝胶状的，但施加剪切应力时易于流体化。此组合物用于从硬表面除去污染物及污垢特别有效。

实例13

本发明的洗发液组合物如下：

<u>组 分</u>	<u>含量, %</u>
烷基硫酸铵(29%水溶液)	55.25
吡啶硫酮锌晶体	2.0
(按USP 4345080 实例 I)	
椰油单乙醇酰胺	3.0
二硬脂酸乙二醇酯	5.0
柠檬酸钠	0.5
色料溶液	0.1
香料	0.5
Endo-H	1000 ppm
水	适量, 加至 100.00%.

实例14

本发明的防汗棒状剂是由以下组分制成：

组 分	含量
cyclomethicone	42.55
流体AP	4.99
硬脂醇	11.49
蓖麻蜡	4.99
滑石粉	6.99
锆/铝/甘氨酸复合物	26.67
香味遮蔽剂	0.80
C ₂₀ 醇	0.12
吡哆醛磷酸盐	1.00
Endo-H	500 ppm

实例15

本发明的液体肥皂组合物如下:

组 分	活性物%, 重量
月桂基硫酸铵	6.0
烷基甲氨基乙酸钠	5.7
椰油酰氨丙基甜菜碱	6.3
椰油脂肪酸	1.0
乙二胺四乙酸	0.2
硫酸铵	0.4
香料	0.25
染料	5 ppm
水	80.15
Endo-H	50 ppm
2,4,4'-三氯-2'-羟基二苯基醚	100 ppm

将上列各成分按顺序加入带单一搅拌的混合槽中。在加入染料和香

料之前，调节混合物pH值，使得其在水中的10%(重量) 溶液于20℃的pH为约6.5。

此组合物提供抗菌作用，可除掉普通皮肤菌丛。

实例16

本发明的硬表面清洁剂如下：

<u>组 分</u>	<u>活性物%, 重量</u>
月桂基硫酸钠	0.5
烷基硫酸钠	0.5
二乙二醇单丁醚	4.0
碳酸氢钠	0.5
柠檬酸	0.04
甲醛	0.05
香料	0.05
酒石酸单 / 二琥珀酸酯	5.0
Endo-H	1000ppm
水	88.4

将上列各成分按顺序加入带单一搅拌的混合槽中。在加入香料之前，调节混合物pH值，使得其在水中的10%(重量) 溶液于20℃的pH为约7。

此组合物对于从硬表面上除掉皂垢和霉菌有效，并且优于不含该糖苷内切酶的清洁剂。

实例17

用于整的果蔬或其他植物表面清洁和（或）防腐的组合物如下：

组 分	活性物%, 重量
水	96.4
C ₁₂ -C ₁₃ 醇聚乙氧基化物(6.5)	0.1
Endo-H	3500ppm

该组合物的制备是将醇聚乙氧基化物和Endo-H按各自的量混入水中, 并将其最终pH调节至6-7。所得组合物喷洒到植物表面如整的果蔬上, 可以防止在所述表面上生长微生物。

实例18

由Endo-H使抗菌剂增进杀菌效能

将过夜的*Escherichia coli*培养体稀释到新配的营养汤汁中并于37℃生长4小时。离心得到细胞并于pH5.5的0.2M柠檬酸钠缓冲液(SCB)中洗涤。离心后, 将细胞再悬浮于SCB。制备双份以下的试验管:

条 件	1000ppm Endo-H	500ppm洗必太	SCB	水
对照	0微升	0微升	200微升	10微升
洗必太	0	10	200	10
Endo-H	200	0	0	10
Endo-H+ 洗必太	200	10	0	0

所用Endo-H是得自*E. coli*, 生成*S. plicatus* Endo-H。向每一试管中加入790微升细胞悬浮液(最终体积成为1毫升), 并取出10微升样品作为0分钟对照物。在旋转摇床上于37℃培育各试管, 并于1和3小时取出10微升样品。将各个10微升等份与990微升PBS(磷酸盐缓冲的生理盐水)混合(10^{-2} 稀释度), 并进一步在PBS中按1:10稀释(100微升在900微升PBS中)。将每个经稀释溶液取10微升加在Luria-Bertani琼脂板上。这些板于37℃培育过夜, 将菌落计数。按稀释度计算管中形成细菌菌落数目, 并将此数取对数用于作图和计算。

条 件	0分钟	1 小时	3 小时
	对照	(log 杀灭数)	(log 杀灭数)
对照	8.62	8.57(0.05)	8.53(0.09)
200ppm Endo-H	8.64	8.55(0.09)	8.55(0.09)
50ppm 洗必太	8.60	4.42(4.15)	2.44(6.59)
200ppm Endo-H + 洗必太	8.61	2.40(6.17)	2.00(>6.53)

这些结果绘于图8。可以见到, 200ppm的Endo-H可增进50ppm 洗必太的杀菌效果。

采用与此稍不同的洗必太和Endo-H浓度, 并于1 小时测定, 得到类似的结果。这些结果示于图9。可以看到, 140ppm的Endo-H可增进40ppm 洗必太的效能。

为进一步研究此一效应, 进行了类似的实验, 使用20ppm 洗必太(最终浓度) 和不同浓度的Endo-H。结果示于图10A 和10B。这些图表示菌落形成单位(CFU) 的对数值的变化。可以看到, 在一直到280ppm Endo-H范围, 存在着与Endo-H加入量的近于线性关系。进一步增大Endo-H浓度, 在与20ppm 洗必太组合情况下至少在1000ppm Endo-H以前区域增大了对细菌存活性的负面效果。

实例19

单独Endo-H及其与抗菌剂组合对于真菌存活的效果

使Candida albicans的对数相培养体生长并稀释到新配的生长介质中, 在37℃搅拌培育4 小时的同时, 用0、1、10、100 和1000ppm Endo-H(最终浓度) 处理。此Endo-H是得自E.coli经转化而生成S. plicatus Endo-H。制备1、10和100 倍稀释液并成板, 从而进行回收的存活细胞计数。0 至10ppm Endo-H不能显著减少细胞存活, 但其一例中10ppm Endo-H使18小时培育的存活率下降约36%。然而, 100 至1000ppm Endo-H使存活细胞数目与未用Endo-H而处理4 小时的对照组相

比, 减少约50-88%。

在另一次实验中, 使*Candida albicans* 生长并稀释到新配介质中, 除用0、1、10、100、1000ppm Endo-H (最终浓度) 外还用2.5 微克/毫升Nystatin[®] 处理, 历时18小时同时于37℃搅拌培育。制备1、10、100 和1000倍稀释液并成板, 从而进行存活细胞计数。与单独用Nystatin[®] 相比, Endo-H使回收的存活细胞数目减少如下:

ppm Endo-H	减少%
0	0
1 ppm	69
10 ppm	93
100 ppm	99

可以看到, 少至1ppm的Endo-H可使Nystatin[®] 的杀真菌效能显著提高, 而10和100ppm的Endo-H可使Nystatin[®] 杀灭几乎全部真菌。

应用Amphotericin B[®] 进行类似实验, 采用0.5 微克/毫升浓度, 进行3 小时。结果如下:

ppm Endo-H	存活率下降百分率, %
0	0
1	17
10	5
100	96
1000	94

可以见到, 100ppm的Endo-H可以增进Amphotericin B[®] 的杀真菌效果。

实例20

单独Endo-H或与一种溶菌酶组合的抗菌效应

将*E. coli* (ATCC 31617) 的48小时分培养体用于测试单独的溶菌酶变

溶菌素(Sigma Chemical Co.)或与洗涤剂 and (或)Endo-H 组合物的效果。该Endo-H是得自*E. coli* 经转化而生成*S. plicatus* Endo-H。经过于37℃处理2 小时后得以下结果:

变溶菌素	柠檬酸钠pH		洗衣粉	Endo-H	结 果
	5.5	7.0			
1. 对照					緻, 紧密细胞壁
2. 200ppm	+				緻, 紧密细胞壁
3. 200ppm		+			緻, 紧密细胞壁
4. 200ppm	+		+		緻, 紧密细胞壁
5. 200ppm		+	+		緻, 细胞凝聚
6. 200ppm	+			+	失去緻
7. 200ppm		+		+	少量细胞, 一些空壳, 细胞壁支解
8. 200ppm	+		+	+	一些緻
9. 200ppm		+	+	+	细胞形态不良(凝聚) 但仍存在

可以见到, 细胞在不同pH与带或不带洗涤剂的Endo-H和变溶菌素接触后, 其整体形态显著变化。在pH7 单独使用Endo-H或与洗涤剂合用时产生最大效果。然而, 细胞生存性显然未受影响。Endo-H和变溶菌素在成板实验中与缓冲剂对照物比较, 并未使所得菌落数目减少。

实例21

用Endo-H和PNGase F从玻璃表面除掉细菌

用*Escherichia coli* (ATCC 31617) 和 *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 155) 接种于玻璃载片。每一载片上有二个腐蚀的圆圈, 每一个用*E. coli* 或 *S. epidermidis* 接种。将细菌于37℃培育2 小时。

载片用蒸馏水冲洗后, 用下述之一处理: (1) PBS 缓冲剂; (2) Endo-

H(100ppm, 在PBS 缓冲液中) ; (3)PNGase F(100ppm, 在PBS 缓冲液中) 。该Endo-H是得自E.coli, 生成S.plicatus Endo-H 。于37℃经30分钟后, 将载片于蒸馏水中冲洗。经Gram法染色后, 用光源显微镜为载片的光亮视野读数。

在缓冲液对照组的情况下, 留在载片上的细菌数目超过每个视野100 。用Endo-H处理过的载片含少得多的细菌。对于S.epidermidis 的情况, 每个视野只见到约1-3 个细菌。对于E.coli的情况, 每个视野见到5-10个。对于用PNGase F处理过的载片, 两种细菌都见到中等数目 (每个视野约20个) 。

这些结果表明, PNGase F虽然不如Endo-H效能高, 但能从玻璃表面除掉细菌。

实例22

用Endo-H的托牙清洁片剂

在热空气(60-65℃) 流化床中, 以30分钟将以下物料分别造粒: 碳酸氢钠、过硼酸钠一水合物、酒石酸、三聚磷酸钠、氨基磺酸、聚乙二醇 (分子量20000)、乙二胺四乙酸盐。将这些颗粒与其他成分用滚筒混合以形成“第一层”混合物及“第二层”混合物, 第一层混合物组成如下:

组 分	% 重量
碳酸氢钠	30.00
酒石酸	23.00
单过硫酸钾	16.00
氨基磺酸	11.00
焦磷酸二钠	8.20
碳酸钠	3.90
聚乙二醇	12.60

硫酸钠	2.00
薄荷粉末	2.50
二氧化硅	1.30
十二烷基苯磺酸钠	0.50

第二层的组成如下:

组 分	% 重量
过硼酸钠一水合物	30.00
单过硫酸钾	28.00
碳酸氢钠	13.34
三聚磷酸钠	10.00
碳酸氢钠 / 色料	4.00
Trilon B	3.00
碳酸钠	3.00
聚乙二醇	2.50
二氧化硅	2.00
薄荷粉末	1.50
Wasag 酯7	0.70
Wasag 酯15	0.70
硬化的三甘油酯	0.50
十二烷基苯磺酸钠	0.40
琥珀酸酯洗涤剂	0.30
湖蓝, 1 号	0.06
Endo-H	100 ppm

在39工位的HORN旋转式压片机中制成片剂。压片分二个阶段: 先以压印法以很小压力 (每片10千牛顿) 将蓝色第二层混合物压片, 然后灌注白色第一层混合物压片, 达到每片70千牛顿。如此得到每片4克的产

品, 其中蓝色物2.7 克, 白色物1.3 克。

由使用者将片剂溶解于水, 用于清洗置于水中的托牙。

实例23

含Endo-H的防晒膏

由以下成分制成水包油型防日晒乳剂基料, 它们是化学名称或化妆品、卫生用品及香料协会(CTFA)名称:

成 分	重量, %
<u>水相:</u>	
对羟苯甲酸甲酯 (防腐剂)	0.20
泛硫乙胺 (保湿剂)	0.10
Carbomer 934 (稠厚剂)	0.08
氢氧化钠, 10%(中和剂)	1.00
Endo-H	100 ppm
纯化水, 适量, 加至	100%
<u>油相:</u>	
重质矿物油	4.00
二压硬脂酸 (阴离子乳化剂)	1.00
十六醇 (辅助乳化剂)	1.80
蓖麻油 (润肤剂)	1.00
棕榈酸十六烷基酯 (润肤剂)	1.20
辛基二甲基PABA (紫外线吸收剂)	1.40
对羟苯甲酸丙酯 (防腐剂)	0.10

将水和水相中除氢氧化钠及Endo-H水溶液之外的各组分加入到带机械搅拌的混合槽中, 然后混合加热至约 75-80℃, 形成均匀的水中分散液。然后加入氢氧化钠并与水相混合以中和Carbomer稠厚剂。

将矿物油及油相成分加入另一混合槽中, 加热至约 80-82℃进行混

合，成为均匀油相。将热的油相慢速加入到热的水相中，同时使用高速机械分散装置。继续混合直至得到均质的水包油乳液。将乳液冷却至室温。若需要，可任选加入色料如水溶性染料，最好在约 45-50℃混入该乳液中，香料油则最好在约 35-40℃混入。Endo-H在约 35-40℃混入该乳液。

实例24

从猪皮肤上除掉*S. aureus*

在猪皮肤上接种*S. aureus*，该培养体(1.2×10^7 菌落/毫升)0.1毫升抹在其皮肤表面。令该微生物于室温在该皮肤上停留2小时。然后用下列物料双份的皮肤片：

- (1) 未处理，对照组，
- (2) 单独用水，
- (3) 10% 肥皂溶液
- (4) (3) + Endo-H(20ppm)
- (5) 20ppm Endo-H在缓冲液中

所用Endo-H是得自*E. coli*经转化成为*S. plicatus* Endo-H。处理之后，将试栏用蒸馏水冲洗并置于2%四氧化钬中，然后于Ryter-Kellenberger固定剂进行固定。然后把试样交替在钬及缩氨基硫脲中处理。在临界点干燥后，将全部试样用扫描电子显微镜检查。摄下照片。

在未处理、水处理、单用肥皂处理的试样上发现大量的*S. aureus*菌落。例如图11即为用液体洗手皂处理的效果。用Endo-H处理的试样上显示微生物大量消失。图12即为用液体洗手皂加Endo-H处理猪皮肤后对*S. aureus*除掉的情况。

实例25

从淋浴帘上除掉霉菌

将塑料淋浴帘用自来水打湿并置于暗处3星期。其后，将该帘的小

片带霉菌样品用以下物料处理:

- (1) 蒸馏水
- (2) + 2000ppm Joy 洗涤剂
- (3) + 1000ppm Endo-H
- (4) 未处理

所用Endo-H是得自*E. coli*经转化以生成*S. plicatus* Endo-H。处理条件为室温10-15 秒。处理后, 将淋浴帘用棉拭签擦净。

图13为所得结果。未处理的对照物(右下方照片- 中央照片的右下部) 显示有大量霉菌和霉物颗粒, 宏观和显微观都见到。

用蒸馏水的对照物(右上方照片- 中央照片的右上部) 显示较少的微生物, 但仍留下那些颗粒, 变色也很明显。

用Joy 处理的对照物(左下方照片- 中央照片的左下部) 显示比用水处理的样片更少的微生物, 但变色仍明显。

用Endo-H处理的样品(左上方照片- 中央照片的左上部分) 没有微生物, 也没有变色。

实例26

从织物上除掉细菌

将织物切成培养皿大小的样片。另加入一些未接种的织物使织物加入量达5%。样片在15磅、121℃的压热器中灭菌15分钟。每种处理需一片织物。在250 毫升锥形瓶中放入40克玻璃珠和100 毫升0.2M pH7.0柠檬酸盐缓冲液, 用橡胶塞和铝箔塞住, 并于压热器中灭菌。将*E. coli*培养体分入新配的营养汤汁中, 并于37℃培育48小时。准备半强度胰蛋白酶解酪蛋白酱油琼脂板(10克/500 毫升) 并将之灭菌。冷却后, 加入四唑鎓(1 毫升/升)。

琼脂板按下述接种:

- (1) 从48小时培养体制备系列稀释液(1:10 , 以及用另外三个试管

的在胨水中的10倍稀释液)；

(2) 然后每一样片用2 毫升最后稀释液(10^4) 接种；

(3) 然后将样片于37℃培育2 小时(二个样片/每次处理)。培育之后，样片按如下方式洗涤：

洗涤

在250 毫升已灭菌锥形瓶中加入100 毫升灭菌的0.2M pH7.0 柠檬酸盐缓冲液+ 40克玻璃珠+ 图14所述的处理(其中AWA 是得自*E. coli*的Endo-H，转化以生成*S. plicatus* Endo-H)。由二个接种后样片+ 灭菌的织物构成5%织物量，于95 °F 振摇洗涤12分钟。

漂洗

洗涤之后，将样片漂洗，向250 毫升灭菌锥形瓶中加入100 毫升灭菌的双蒸馏或去离子水+ 40克玻璃珠，于室温振摇2 分钟。

然后将织物样片置于培养皿中并用3 毫升二分之一强度胰蛋白酶解酪蛋白酱油琼脂及四唑鎓覆盖。培育48小时后，将菌落计数。

图15中示出结果，表明2% Irgasan加上液体Tide (洗涤剂) 与单独的洗涤剂相比，使细菌生长下降二个对数值。然而，加入40ppm Endo-H后，使细菌生长再下降一个对数值。

实例27

Endo-H对酵母菌的效应

将*Candida albicans*和*Saccharomyces cerevisiae* 的18小时汤汁培养体用以下物料处理：

(1) 0.2M柠檬酸钠缓冲液，pH5.5 ；

(2) 上述(1) 加上200ppm Endo-H(得自*E. coli*，生成*S. plicatus* Endo-H) 。

于37℃处理2 小时。

处理之后，将每个等份量置于由formvar 覆层的200 网目铜网上，

并用透射电子显微镜检查。图15、16是其显微照片。

从图15A 可见, 单独用缓冲液处理的Candida 处于良好形态状况。从图15B 可见, 用Endo-H处理的Candida 快速漏泄出物质并失去结构整体性。

从图16A 可见, 单独用缓冲液处理的Sacchromyces处于良好形态状况。从图16B 可见, 用Endo-H处理后, 所余下的都是极有限的膜物质的屑片。

实例28

Endo-H及溶菌酶对于E.coli 存活的影响

在Laurie 汤汁(LB) 中生长过夜的E.coli K12培养体在LB中按1:1000 稀释并于37℃再生长4 小时。离心分出细胞, 洗涤, 再悬浮于0.1M乙酸钠(NA) 缓冲液(pH5.5) 中。按下述装入8 个试管:

管 编 号	1, 2	3, 4	5, 6	7, 8
微升细胞	800	800	800	800
微升NA缓冲液	200	—	—	200
微升Endo-H (1 毫克/毫升)	—	200	200	—

该Endo-H是得自B.subtilis, 经转化生成S.plicatus Endo-H。各试管于37℃培育1 小时。离心, 洗涤并且再悬浮于8.00微升含0.1M EDTA的0.1M磷酸钠(NP) pH7.2 缓冲液中。按下列向试管中加入缓冲液或鸡蛋白溶菌酶溶液:

试管 编 号	1, 2	3, 4	5, 6	7, 8
微升NP缓冲液	200	200	—	—
微升溶菌酶 (1 毫克/毫升)	—	—	200	200

然后取出等份试样, 测定菌落形成单位(CFU) (A栏)。于37℃培育1 小时后, 将等份样用于测定CFU (B栏)。计算菌落形成单位的对数值。由A 减去B 得到log CFU 的减小值, 结果如下示:

条 件	log CFU		log CFU 变化
	A	B	
对照组	7.89	7.90	+0.01
Endo-H(200ppm)	8.21	7.92	-0.29
溶菌酶(200ppm)	7.87	7.68	-0.19
Endo-H+ 溶菌酶	8.17	7.53	-0.64

以上结果表明, Endo-H与溶菌酶组合与单独用Endo-H或溶菌酶相比, 前者更能降低E. coli 的存活。

实例29

Endo-H对于E. coli 存活与T-4 或鸡蛋白溶菌酶的比较

将E. coli 细胞洗涤并悬浮于0.1M乙酸钠pH5.5 缓冲液中。将细胞等份(10 毫升) 加入二个试管中。一个试管只加入缓冲液 (对照组), 另一试管加入Endo-H (处理的)。所用Endo-H是得自B. subtilis, 经转化生成S. plicatus Endo-H。于37℃将细胞培育1 小时。将细胞离心, 洗涤并且再悬浮于0.1M磷酸钠pH7.2 缓冲液中。将细胞分成等份与缓冲液或与溶菌酶培育。在此实验中比较了鸡蛋白(HL)和T-4(TL) 溶菌酶。将试管培育1.5 小时。将样品稀释并成板, 供测定(A) 培育之前和(B) 培育之后的CFU。计算log CFU, 结果如下列:

培育条件		log CFU		log CFU 变化
第 一	第 二	A	B	
Endo-H(3000ppm)	—	7.60	7.23	-0.37
—	HEWL(445ppm)	6.69	6.73	-0.23
Endo-H(300ppm)	HEWL(445ppm)	7.41	6.81	-0.60
—	TL(445ppm)	4.98	4.53	-0.45
Endo-H(300ppm)	TL(445ppm)	5.27	4.30	-0.93

以上结果表明, T-4 溶菌酶与Endo-H组合使用时, 对于减小E. coli 存活亦是有效的。

实例30

用Endo-H处理污染的尿布

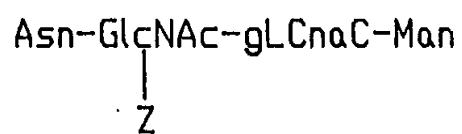
从一块污染的尿布得取试样。将每一试样分切。样品的左半在2000ppm Tide洗涤剂 and 1ppm BPN' (得自Bacillus amyloliquifaciens的枯草杆菌蛋白酶) 中洗涤。右半在2000ppm Tide洗涤剂、1ppm BPN' 和40ppm Endo-H(Boehringer Mannheim Biochemical, 目录号100119) 中洗涤。每一样品于95 °F 洗涤12分钟。图17和18示出两次实验的结果。可以见到, 图17、18中尿片右半与Tide洗涤剂-蛋白酶处理的左半相比, 含粪便污染物要少得多。

经过以本发明的优选实施方案的说明, 本领域技术人员可明显见到, 可以作出各种修改案, 而这些修改案亦是属于本发明范围之内。以Endo-F或Endo-D或PNGase F替代各例中的Endo-H, 亦可得到按本发明的另一些组合物。

本文中所引述的一切参考资料均作为本文的参考文献。

说明书附图

N-键接的核心结构



O-键接的核心结构

Ser- 或
Thr-

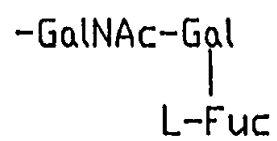
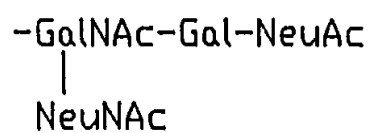
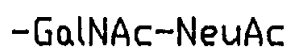


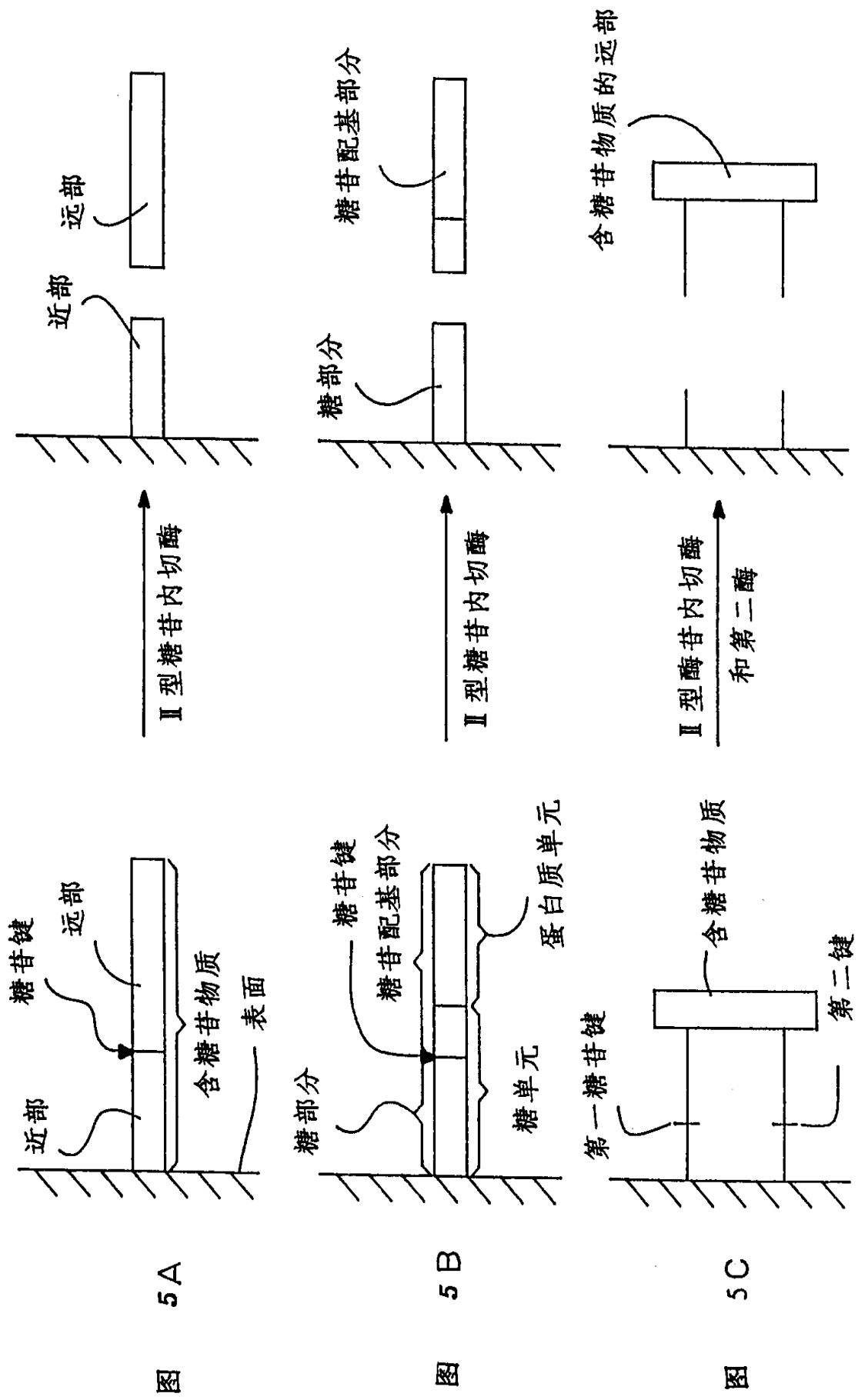
图 1

Ⅱ型糖苷内切酶	底物
糖肽酶-F (PNGaseF)	
Endo-H, F, D, C _I	
Endo-F-gal 型	
α -N- 乙酰氨基半乳糖苷内切酶	
β -N- 半乳糖苷内切酶	

图 2

蛋白氨基酸	糖残基	糖残基	糖残基
Asn, Ser Thr	GlcNAc 或 GalNAc	GlcNAc 或 Gal	GlcNAc 或 甘露糖
糖苷键 1	糖苷键 2	糖苷键 3	

图 3



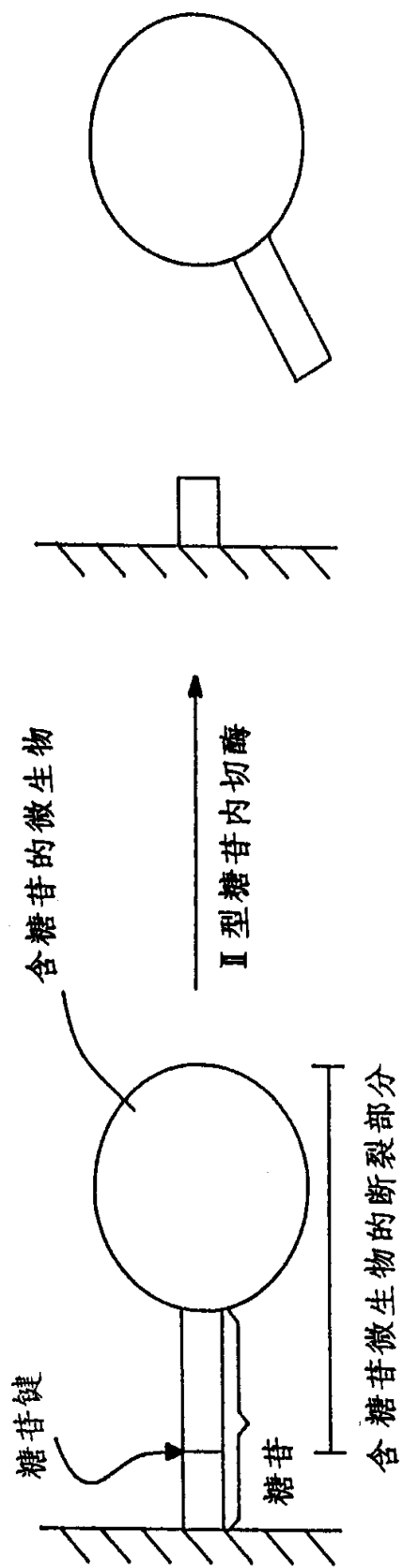


图 5D

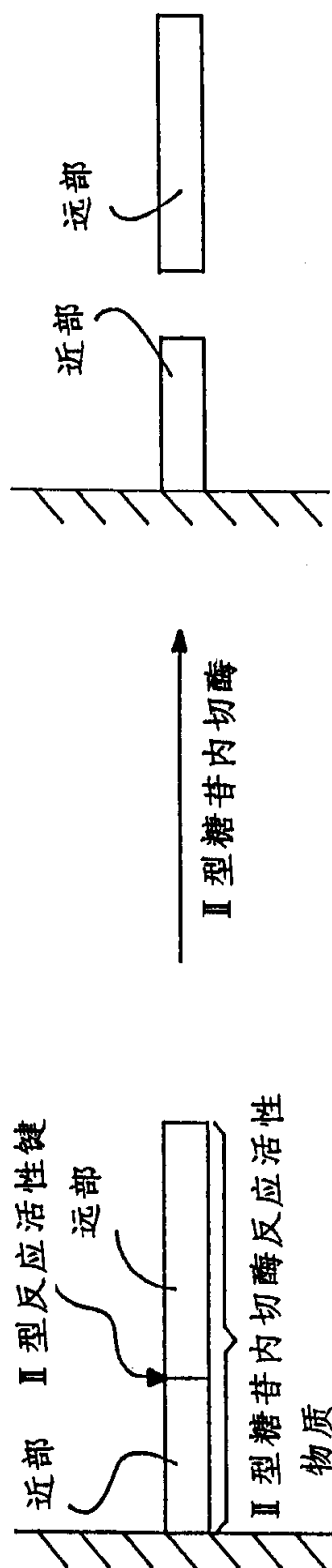


图 5E

图 6A

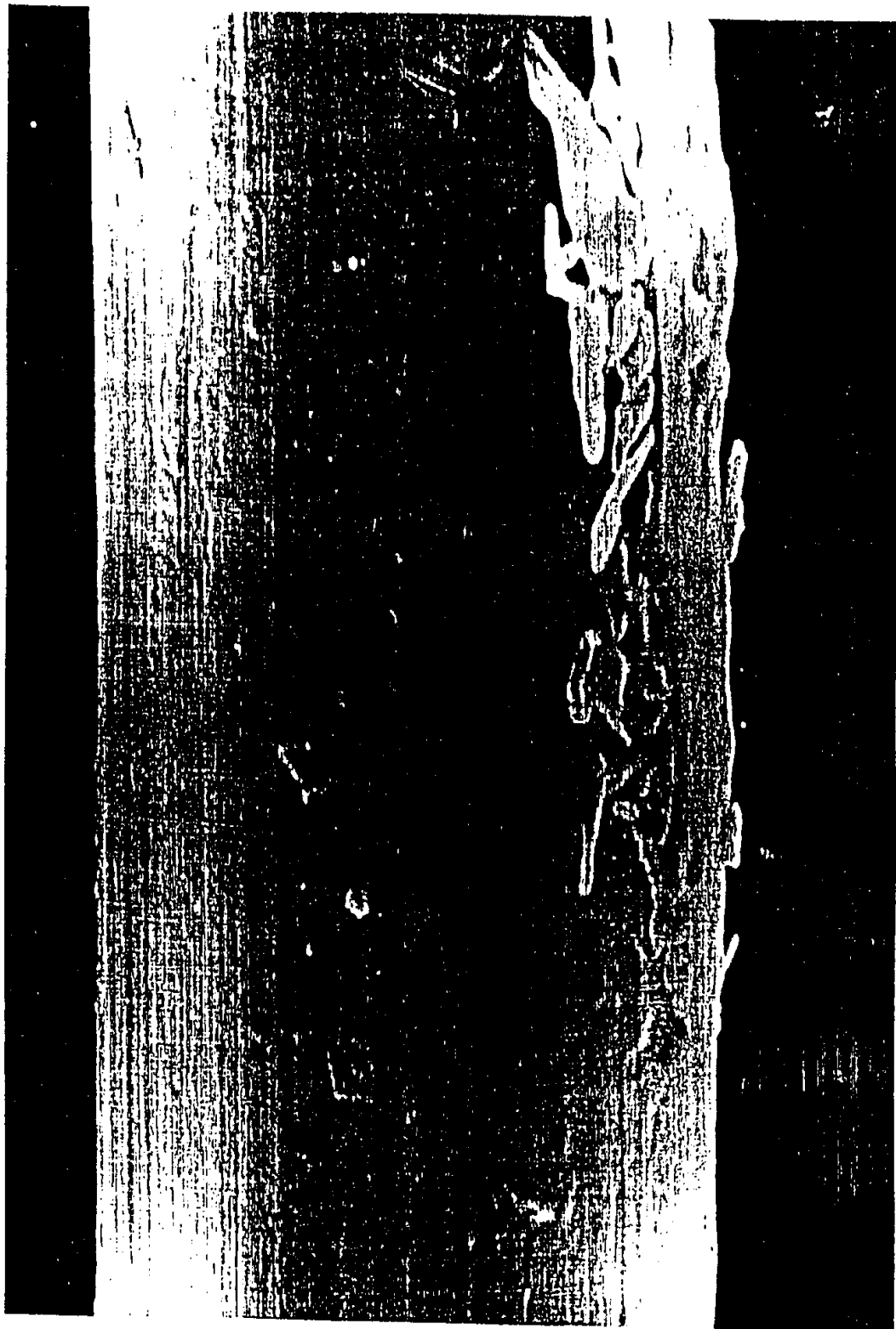


图 6B

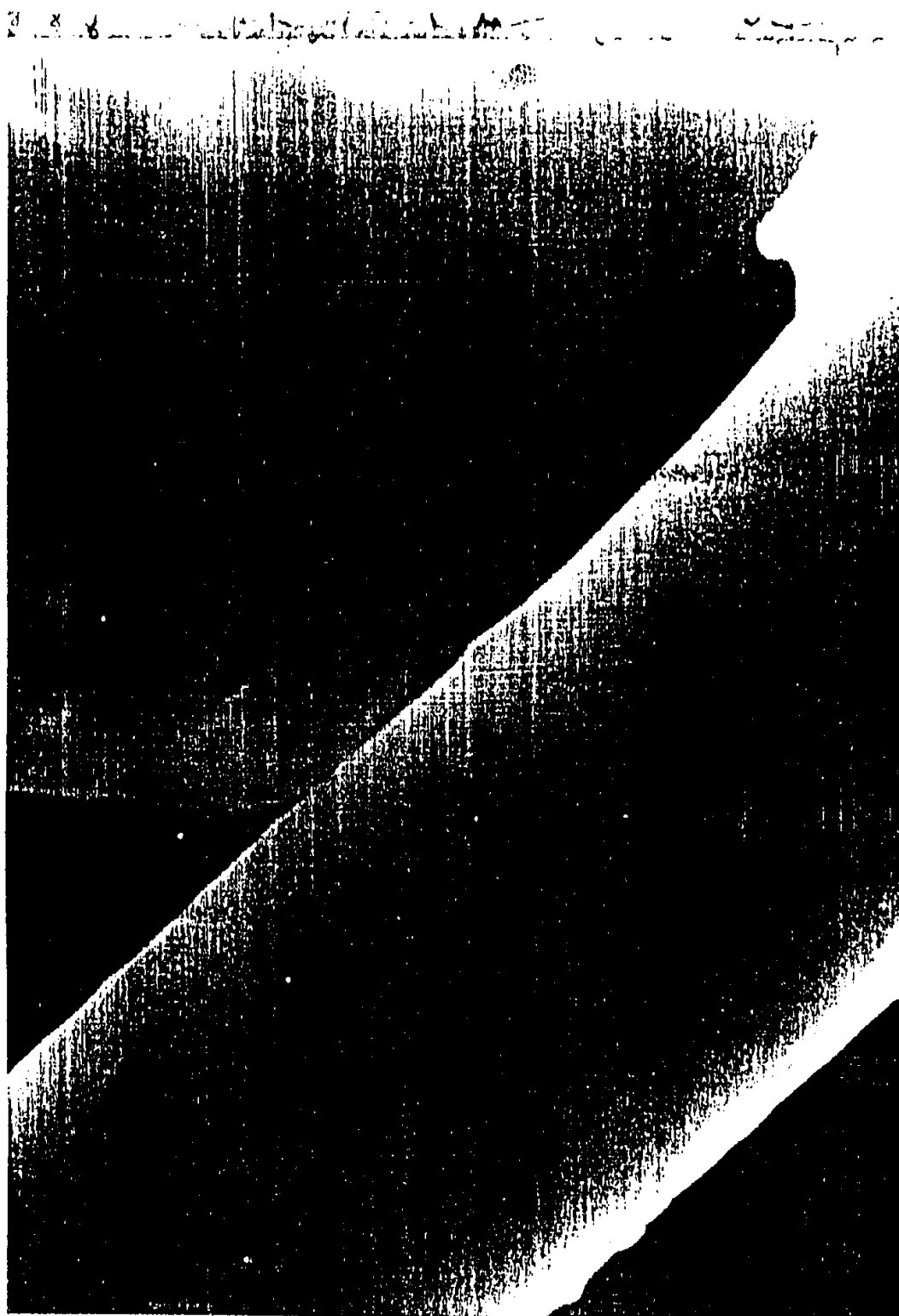


图 7A



图 7B



图 7C



图 7D



7E

7E



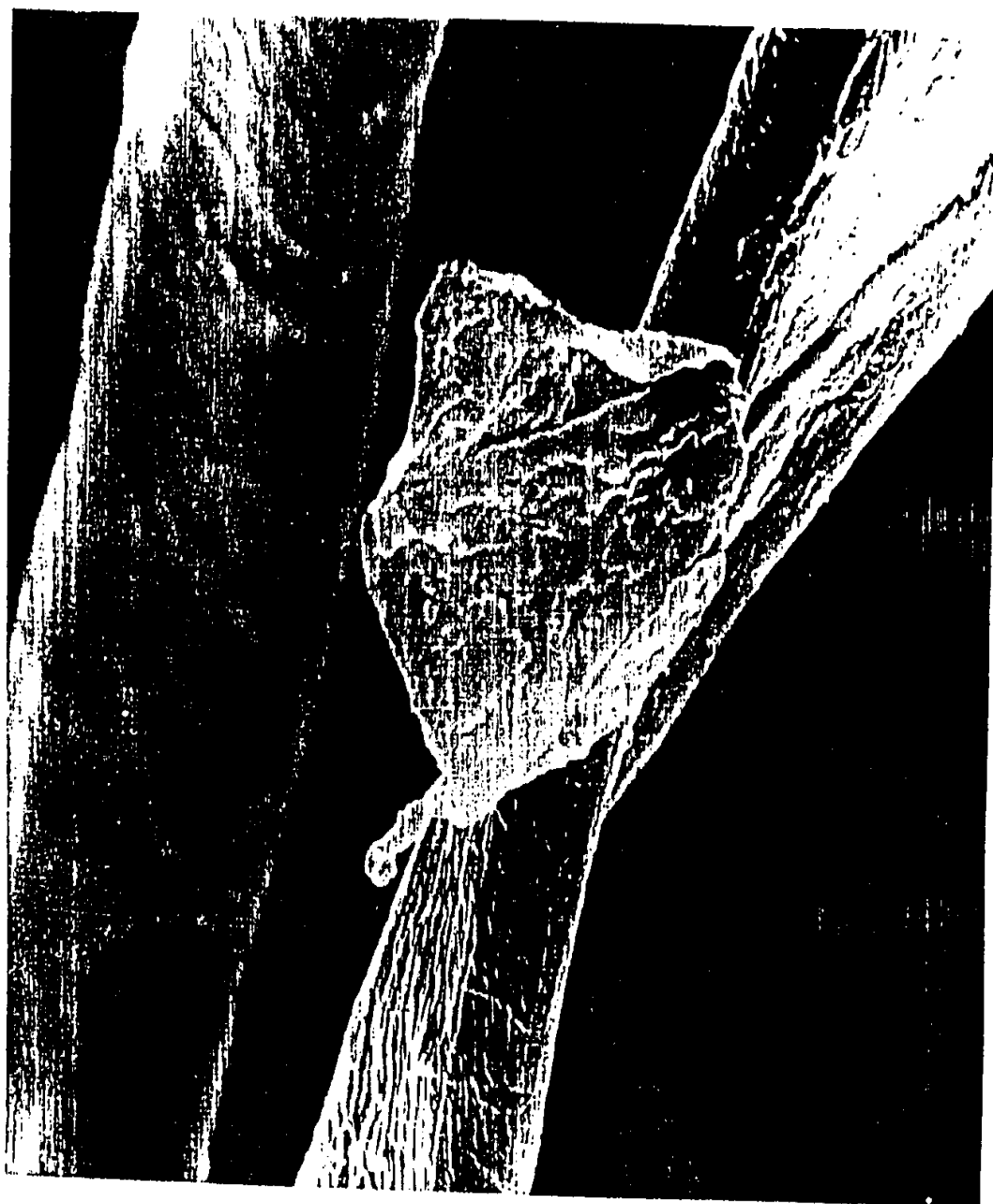
图 7F



图 7G



图 7H



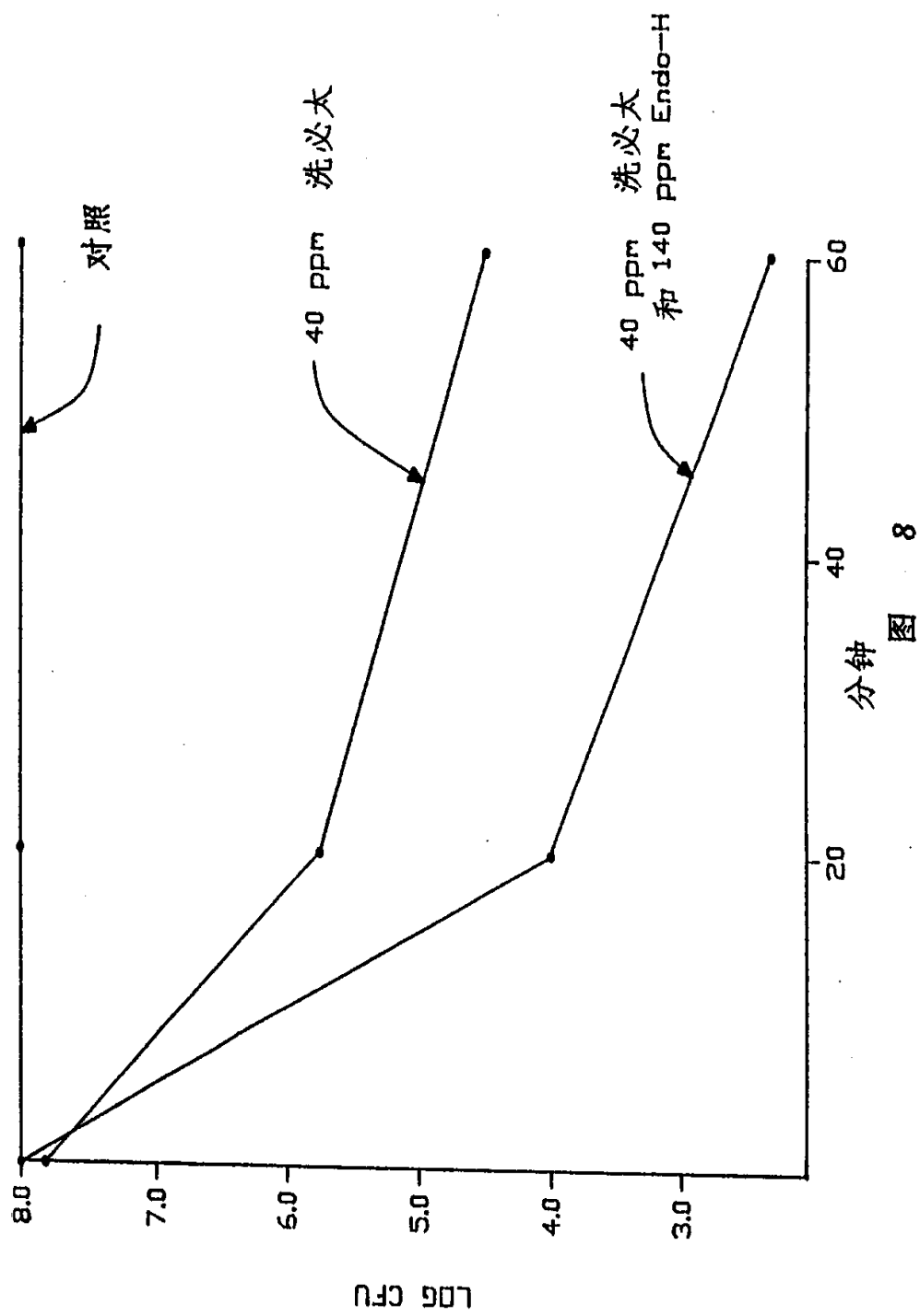


图 8

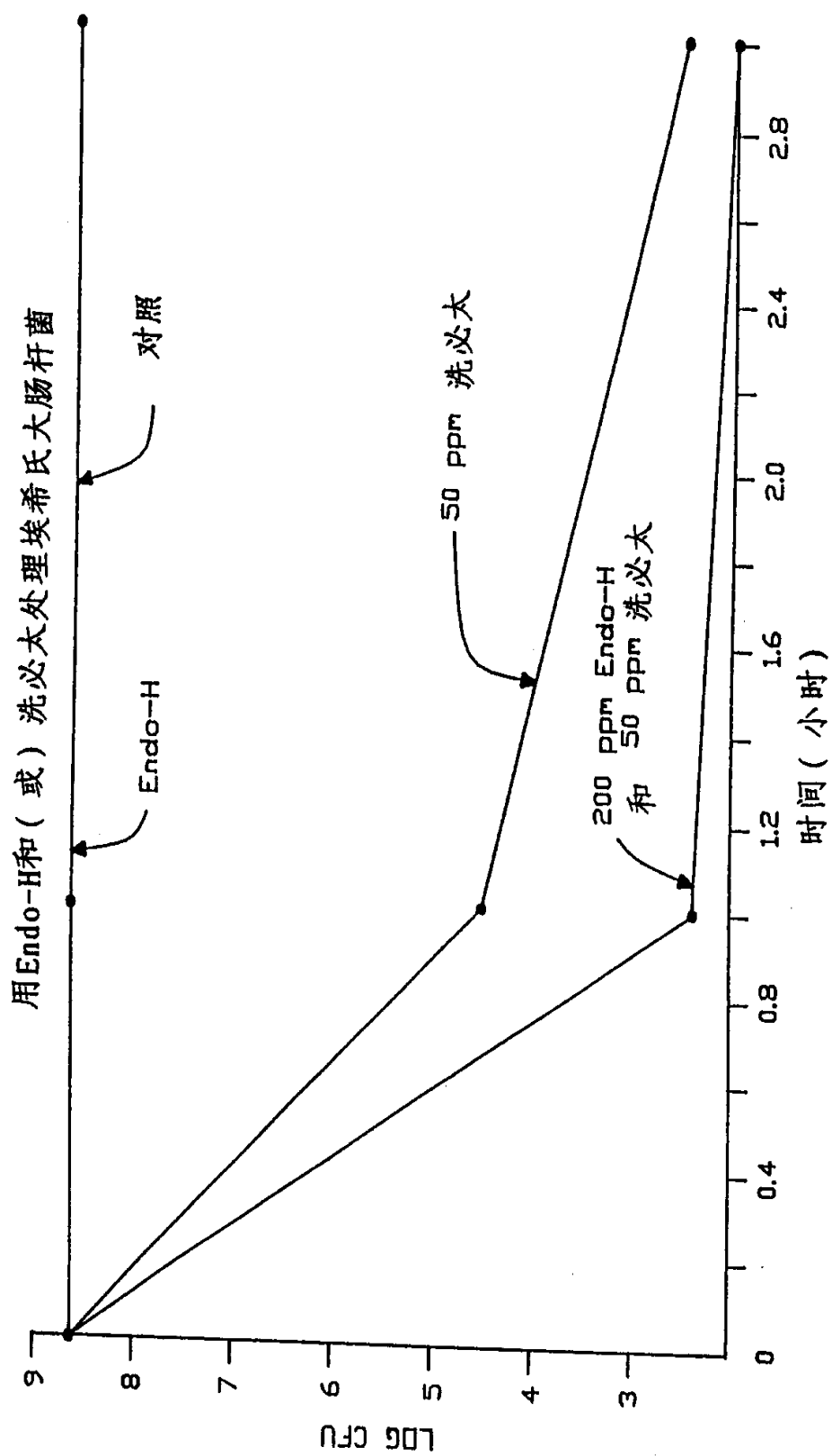
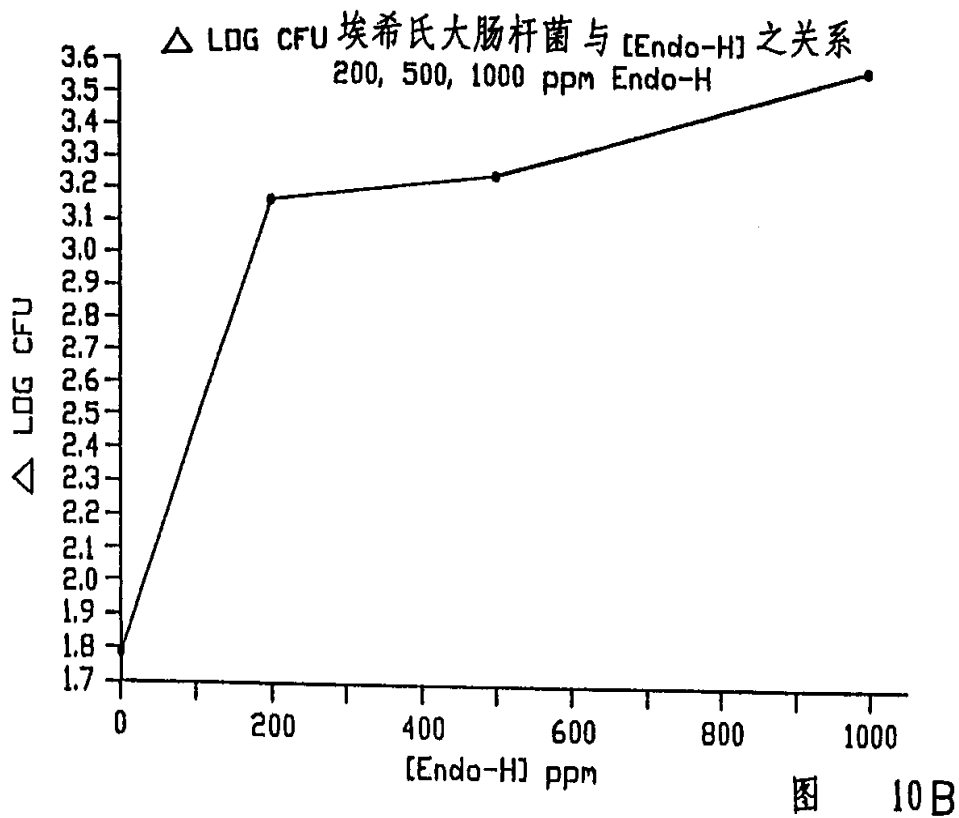
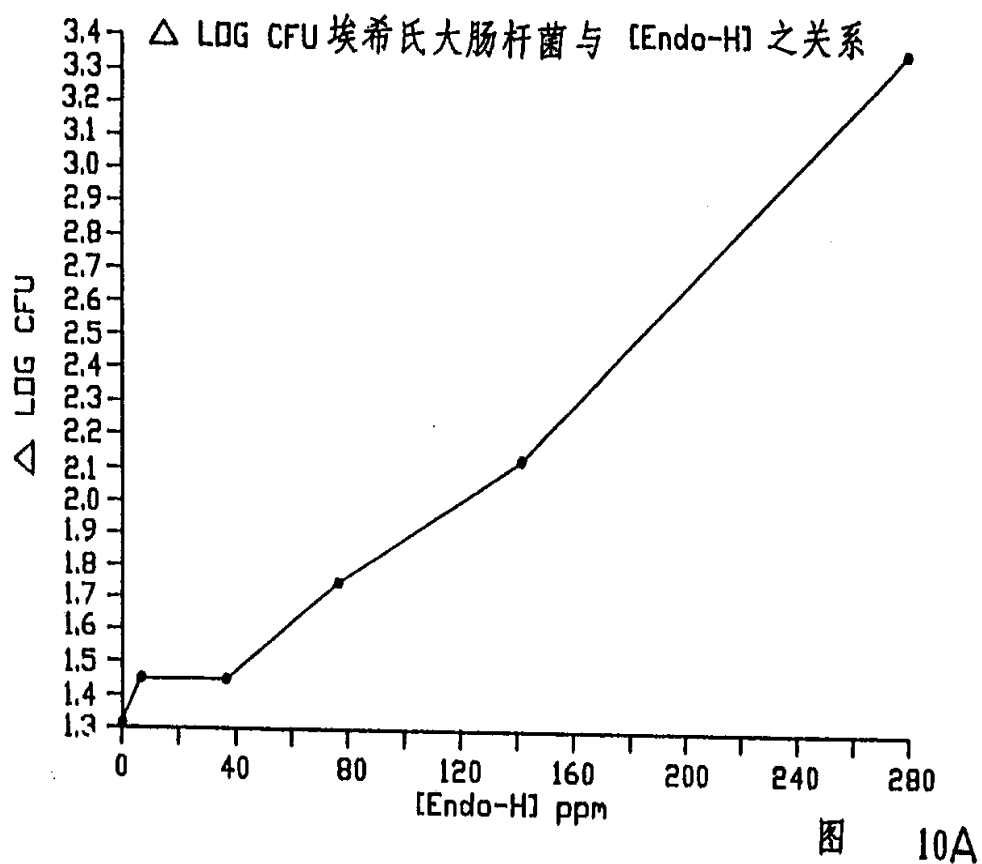
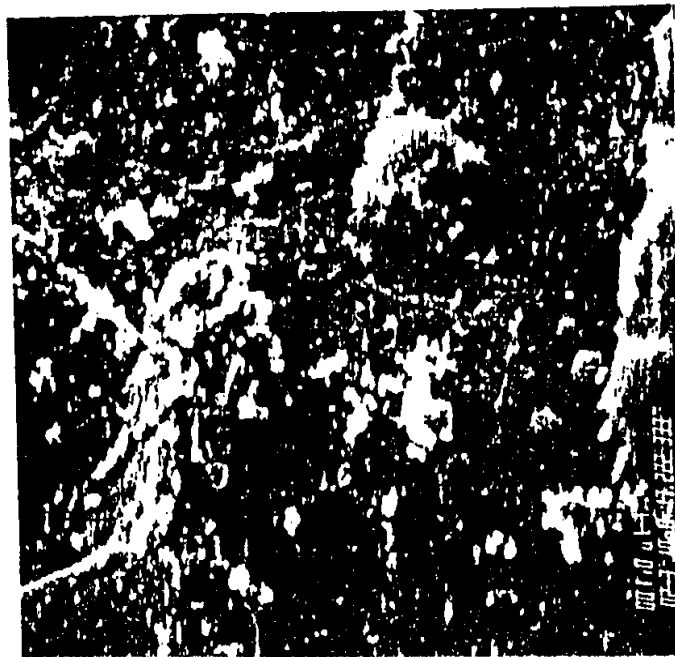


图 9





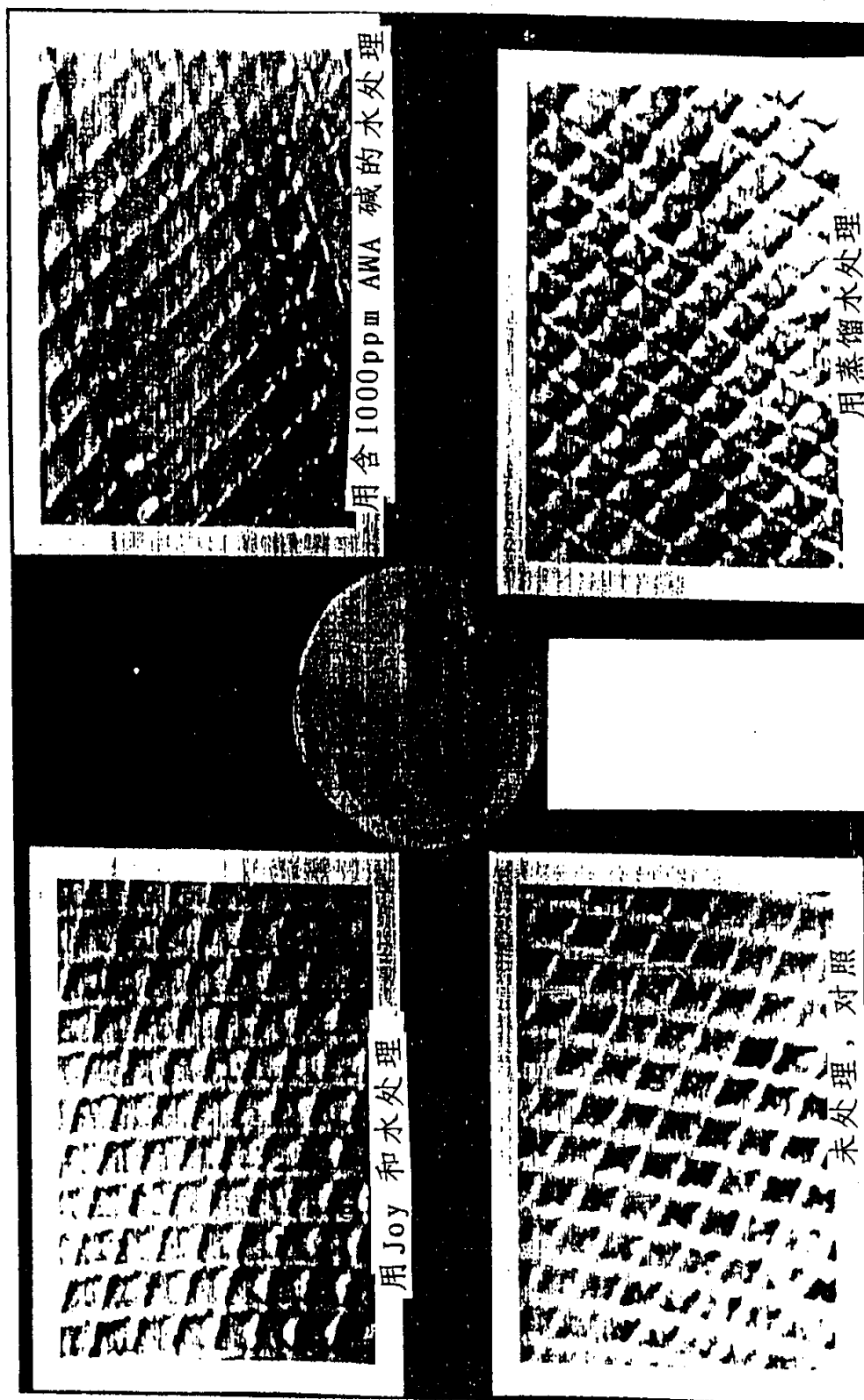
接种金黄色葡萄球菌的猪皮肤，用液体洗手皂处理， 2000X.

图 11

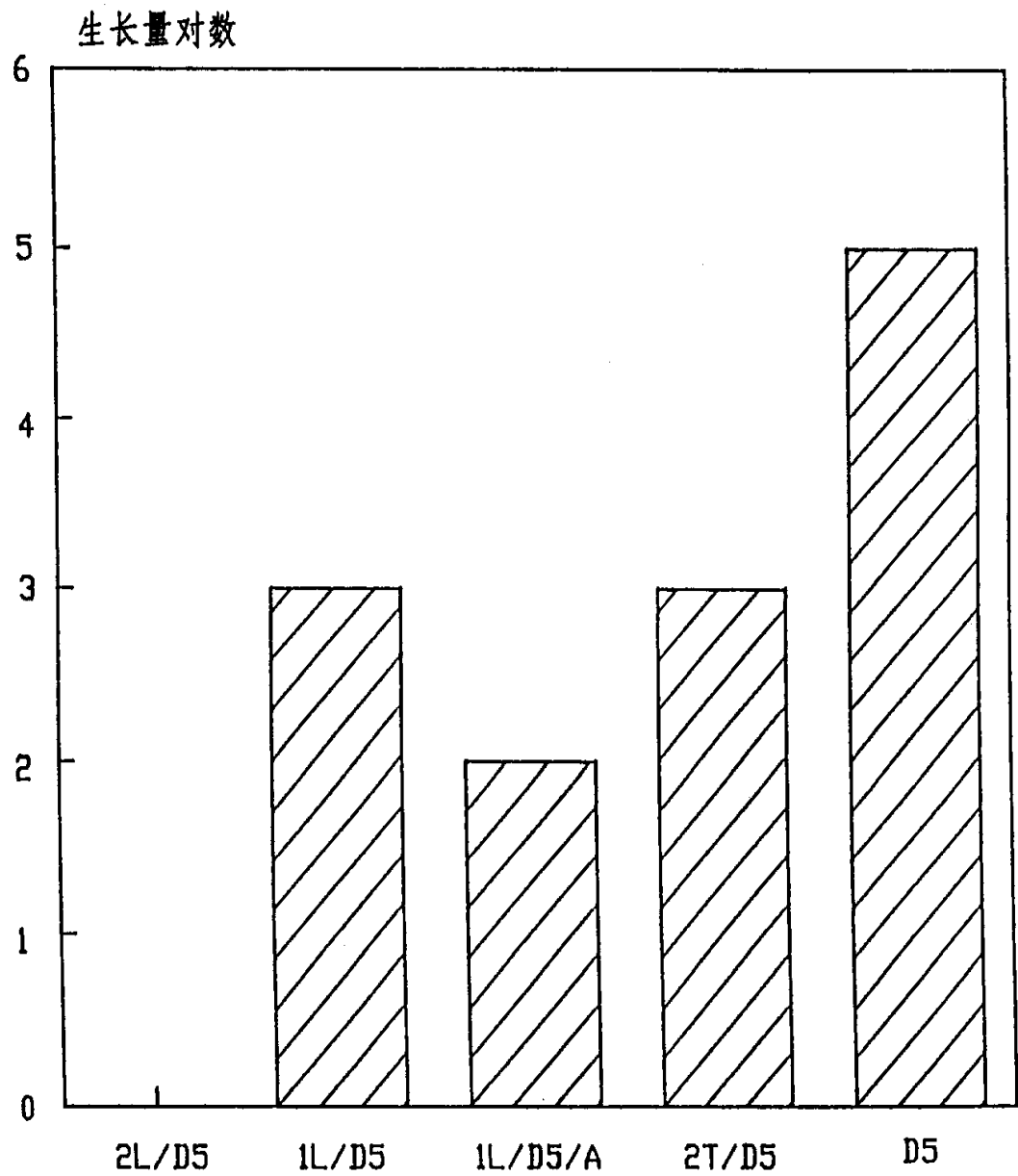


接种金黄色葡萄球菌的猪皮肤，用液体洗手皂加Endo-H处理。 2000X.

图 12



通过洗涤的抗菌效果



D5 = 洗涤剂

L = IRGASAN

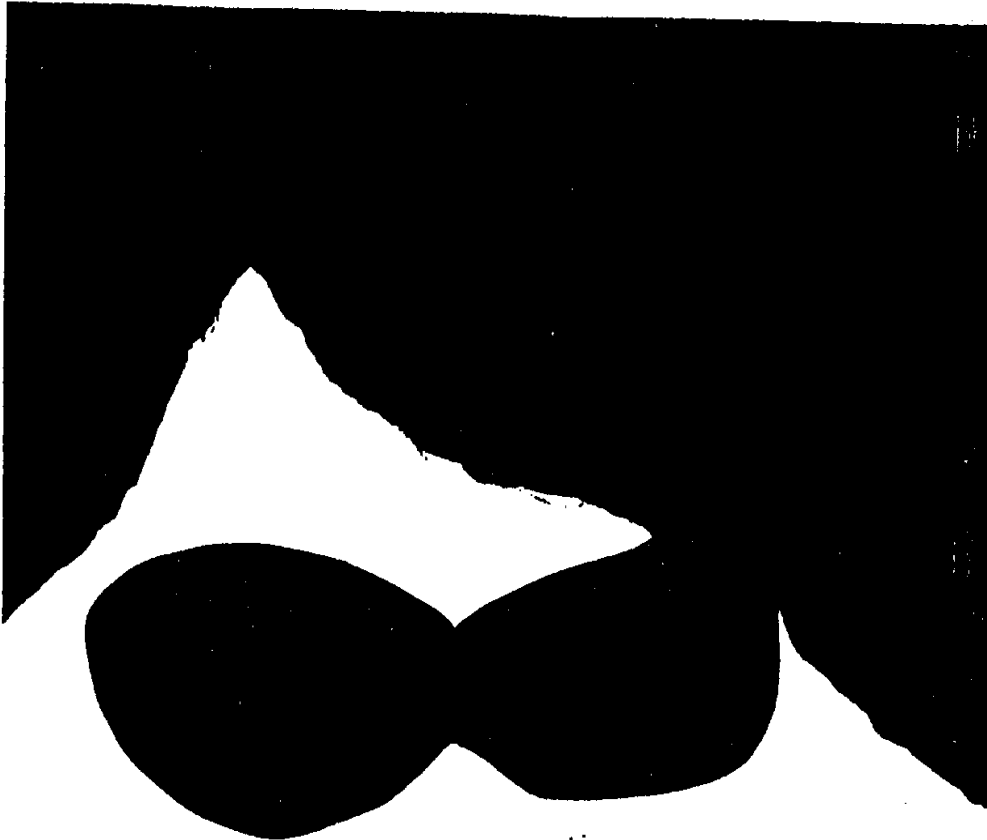
T = 三氯二苯脲

A = Endo-H

2 或 1 = 分别为2%或1%

图 14

图 15A



用缓冲液于pH5.5 处理后, *Candida albicans* 的TEM, 5400 X。

图 1 5 B



用AMW 于pH5.5 处理后, *Candida albicans*的TEM,
可见到从机体中有物质漏出, 5400X。

图 1 6A



用缓冲液于pH5.5 处理后, *Sacchchromyces cerevisiae* 的TEM, 5400X。

图 16B



用AWA 于pH5.5 处理后, *Sacchromyces cerevisiae* 的TEM, 该有机体的余留物全部是膜的小碎片, 在显微图的中部可见到, 5400X。

图 17A



粪便沾污的织物，左边是在蛋白酶洗涤剂中洗涤，右边是在蛋白酶洗涤剂加AWA 碱中洗涤,125X。

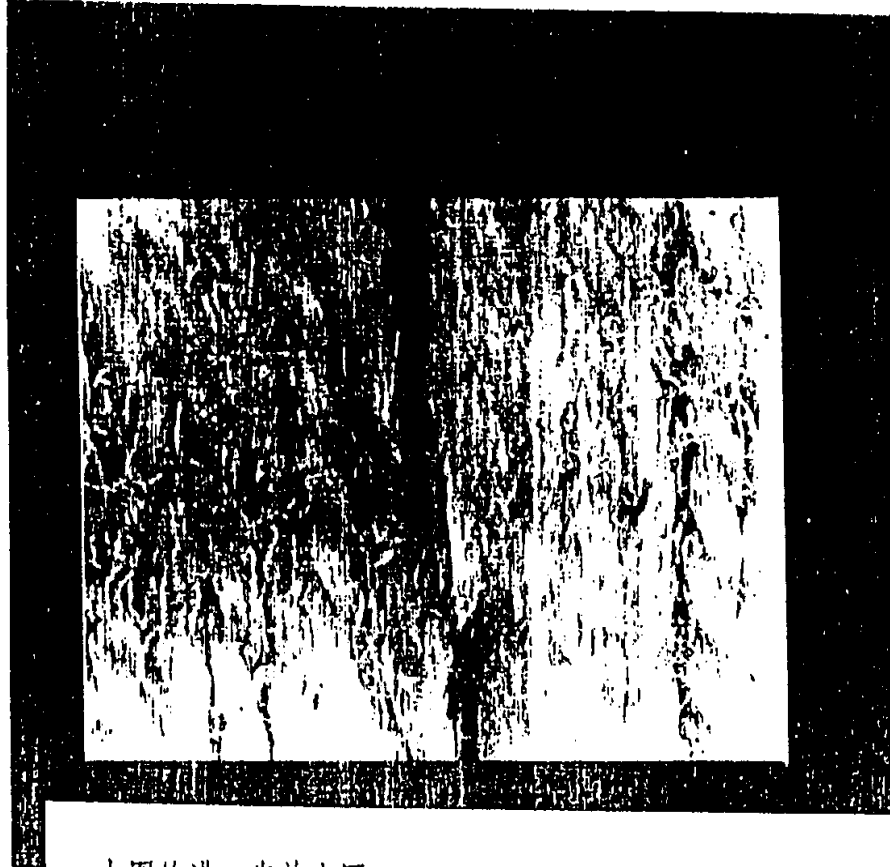


上图的进一步放大图，250X。

图 18



粪便沾污的织物，另一样片，左边是在蛋白酶洗涤剂中洗涤，右边是在蛋白酶洗涤剂加碱中洗涤，125X。



上图的进一步放大图