



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 90108693.2

[51] Int.Cl⁵

A61K 7/06

[43] 公开日 1991年5月15日

[22] 申请日 90.10.27

[30] 优先权

[32] 89.10.27 [33] US [31] 428,273

[71] 申请人 普罗格特-甘布尔公司

地址 美国俄亥俄州

[72] 发明人 理查德·谢泼德·卡彭特
安·玛格丽特·沃尔夫

[74] 专利代理机构 中国专利代理有限公司

代理人 姜建成 马崇德

A01N 63/00 A61K 7/16 A61K 37/48

说明书页数: 26 附图页数:

[54] 发明名称 应用某些溶菌酶和糖苷内切酶的方法和组合物

[57] 摘要

提出了一种含有 β -乙酰氨基葡萄糖苷内切酶和/或糖肽内切酶及反胃溶菌酶的抗微生物组合物。还提出了一种通过用这些酶处理来破坏或去除微生物的方法。

权 利 要 求 书

1. 一种抗微生物组合物，其特征在于，它包含反刍类胃溶菌酶和 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶或糖肽内切酶。

2. 权利要求1的抗微生物组合物，其中所述反刍类胃溶菌酶是一种或多种反刍类胃溶菌酶C。

3. 权利要求2的抗微生物组合物，其中所述 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶为内切酶F、内切酶D或内切酶H，所述糖肽内切酶为PNG酶F或PNG酶A。

4. 权利要求3的抗微生物组合物，其中反刍类胃溶菌酶C与 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶或糖肽内切酶的比例约为1:4至4:1。

5. 权利要求3的抗微生物组合物，它包含约1-1000ppm所述反刍类胃溶菌酶C和约1-1200ppm β -N-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶或糖肽内切酶。

6. 权利要求5的抗微生物组合物，它包含牛溶菌酶C2和内切酶H或PNG酶F。

7. 权利要求6的抗微生物组合物，它包含约50-400ppm所述牛溶菌酶和50-400ppm所述内切酶H或PNG酶F。

8. 权利要求7的抗微生物组合物，它包含重组牛溶菌酶C2和内切酶H。

9. 权利要求8的抗微生物组合物，其中所述重组牛溶菌酶与内切酶H的比例约为2:1至1:2。

10. 权利要求9的抗微生物组合物，它包含内切酶H和所述来自*Pichia pastoris*的重组牛溶菌酶各约80-150ppm。

11. 权利要求5的抗微生物组合物，其中所述组合物选自漱口剂、托牙清洗剂、洁牙剂、洗衣去污剂、防腐剂、接触镜片清洗剂、

液体皂、皮肤清洗剂。

12. 权利要求5的抗微生物组合物，它还包含约1-90% (重量) 去污表面活性剂，该表面活性剂选自阴离子型、非离子型、阳离子型、两性型和两性离子型表面活性剂。

13. 权利要求6的抗微生物组合物，其中所述组合物为漱口剂、托牙清洗剂或洁牙剂，其中包含约1-150 ppm 内切酶H或PNG酶F和约1-150 ppm牛溶菌酶C2。

14. 权利要求8的抗微生物组合物，其中所述组合物为液体或颗粒状洗衣去污剂，其中包含内切酶H和重组牛溶菌酶C2各约2-250 ppm，以及约5-50% (重量) 去污表面活性剂，该表面活性剂选自阴离子型、非离子型、阳离子型、两性型和两性离子型表面活性剂。

15. 权利要求7的抗微生物组合物，其中所述组合物为洗发剂或化妆品用的防腐剂。

16. 权利要求7的抗微生物组合物，其中所述组合物为液体洗手皂，其中还包含约10-40% (重量) 去污表面活性剂，该表面活性剂选自阴离子型、非离子型、阳离子型、两性型和两性离子型表面活性剂。

17. 权利要求10的抗微生物组合物，其中所述组合物为皮肤清洗剂。

18. 一种破坏或去除微生物的方法，其特征在于，用反刍类胃溶菌酶和 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶或糖肽内切酶处理。

19. 权利要求18的方法，其中所述处理包括施用一种组合物，该组合物包含反刍类胃溶菌酶C和一种选自内切酶H、内切酶F、内

切酶 D、PNG 酶 A 和 PNG 酶 F 的糖苷内切酶。

20. 权利要求 19 的方法，其中所述反刍类胃溶菌酶 O 与糖苷内切酶在所述组合物中的比例约为 1 : 4 至 4 : 1。

21. 权利要求 20 的方法，其中所述组合物包含牛溶菌酶 O2 和内切酶 H 或 PNG 酶 F。

22. 权利要求 21 的方法，其中所述组合物包含内切酶 H 或 PNG 酶 F 以及来自 Pichia pastoris 的重组牛溶菌酶。

23. 权利要求 22 的方法，它用于破坏或去除细菌，其中所述组合物包含约 1-1200 ppm 内切酶 H 和约 1-1000 ppm 所述重组牛溶菌酶。

24. 权利要求 23 的方法，它用于破坏或去除金黄色葡萄球菌或大肠杆菌，其中所述组合物包含约 50-400 ppm 所述重组牛溶菌酶和内切酶 H。

25. 权利要求 23 的方法，其中所述重组牛溶菌酶与内切酶 H 在所述组合物中的比例为约 1 : 2 至 2 : 1。

26. 权利要求 25 的方法，其中所述组合物包含内切酶 H 和所述重组牛溶菌酶各约 100-150 ppm。

应用某些溶菌酶和
糖苷内切酶的方法和组合物

本发明涉及应用反刍类胃溶菌酶和某些糖苷内切酶的抗微生物组合物和方法。更具体地说本发明涉及某些抗微生物组合物和用这些抗微生物组合物处理以破坏或去除微生物的方法，这些组合物含有反刍类胃溶菌酶和 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶或糖肽内切酶。

溶菌酶是一种粘肽糖水解酶，它水解N-乙酰胞壁酸和N-乙酰葡萄糖胺之间的1,4- β 连键，因而对某些微生物的细胞壁有破坏作用。市售的溶菌酶已应用于许多场合，例如洁牙剂、口香糖及接触镜片清洗剂等。

反刍类胃溶菌酶是有前肠的哺乳动物的胃粘膜所特有的一种溶菌酶。它显然还没有广泛的商业用途。 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶已普遍用作碳水化合物和糖蛋白结构研究的分析工具。我们发现，反刍类胃溶菌酶加上 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶和/或糖肽内切酶的抗微生物效果，比单独用其中任何一种酶的抗微生物效果都要强。

作为抗微生物剂的混合液中采用溶菌酶已在牙用清洗液中受到注意(1982年10月19日授予Rabussay的美国专利4,355,022)。Rabussay公开了一种去除牙斑和牙结石的方法，包括涂用一种含有溶菌酶(0.1ml/mg)的溶液，同时还可视需要而涂用脂酶、磷脂酶、糖酶和/或蛋白酶。Rabussay还公开了一种含有该混合物的牙科治疗剂。糖酶是一大类酶，糖苷内切酶就属于这类酶。

1986年5月1日授予Neesser的澳大利亚专利8548514公开

了一种含有糖肽(I)和/或寡糖的抗菌组合物。其制备方法是,用一种蛋白水解酶消化植物来源的糖蛋白(A),然后视需要用 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶H处理糖肽产物而将其转化成寡糖。接着可用一种 α -甘露糖苷外切酶消化产物,优先切割甘露糖残基间的 α 1-2连键。分离出的糖肽(I)据称对具有I型菌毛的病原菌(如大肠杆菌、克雷伯氏肺炎杆菌、鼠伤寒沙门氏菌或弗氏志贺氏菌)具有抗菌效果。

1987年2月26日公开的日本专利62044180公开了一种 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶(I),该酶能与糖蛋白中与天冬酰胺键接的糖的N,N'-二乙酰壳二糖结构反应,从而水解N-乙酰葡萄糖胺的 β -4位键而从糖蛋白中分离出寡糖。该酶具有底物特异性,使得酶(I)与高甘露糖型或键接天冬酰胺的混合型糖链反应,从而得到复杂的产物。该酶得自刀豆(*Canavalia gladiata* DC),可用于研究糖蛋白中糖链部分的生物活性。但是通过糖苷内切酶的作用来增强反刍类胃溶菌酶的作用尚未述及。

与本专利申请同一天提交的三个共同未决的美国专利申请,描述了包括II型糖苷内切酶的方法和配方,这一组酶中包括本发明的糖苷内切酶。第一个共同未决的专利申请题为“应用II型糖苷内切酶的方法和配方”,其发明人为R.S.Carpenter、A.M.Wolff、P.J.Lad和I.J.Goldstein,该申请描述了用于除去含糖苷物质的II型糖苷内切酶。第二个共同未决的专利申请题为“应用II型糖苷内切酶的方法”,其发明人为R.S.Carpenter、A.M.Wolff和P.J.Lad,该申请描述了用于除去微生物的II型糖苷内切酶。第三个共同未决的专利申请题为“应用II型糖苷内切酶和抗微生物剂的抗微生物方法和配方”,其发明人为R.S.Carpenter、A.M.Wolff

和P.J.Lad, 该申请描述了Ⅱ型糖苷内切酶与抗微生物剂的混合物。本专利申请描述了将反刍类胃溶菌酶与 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶和/或糖肽内切酶混合而获得的典型优点。

本发明提供某些抗微生物组合物, 这些组合物中包含 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶和/或糖肽内切酶及反刍类胃溶菌酶。优选内切酶H、D或F和肽: N-糖苷酶(PNG)F或A。特别优选的溶菌酶是通过基因工程在一种酵母(*Pichia pastoris*)中表达的牛溶菌酶。这些组合物最好含有去污表面活性剂。本发明还包括通过用 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶和/或糖肽内切酶及反刍类胃溶菌酶处理破坏和/或去除微生物的方法。

本发明涉及反刍类胃溶菌酶与某些糖苷内切酶的混合物, 这种混合物具有惊人的抗微生物效果。本发明还包括应用该混合物的抗微生物组合物和方法。

A. 糖苷内切酶

糖苷内切酶属糖水解酶类, 切割底物中的内糖苷键。这里所用的糖苷内切酶来自目前已知的三组主要的糖苷内切酶中的两组。此处优选第一组, 即 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶, 它特异于天冬酰胺(Asn)连接的寡糖链核心部分中的二-N-乙酰壳二糖部分(见Thotakura, NR等人, “糖蛋白的酶促去糖基化”, *Methods in Enzymology*, 138:350-359)。已知的 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶包括来自肺炎双球菌的内切酶D、来自灰色链霉菌的内切酶H、来自脑膜炎毒性黄杆菌的内切酶F。内切酶H还已经在大肠杆菌(Robbins, FW等人, *J. Biol. Chem.* 259:7517, 1984)和芽孢杆菌中克隆。

这里所用的第二组酶是称为N-糖苷酶或糖肽酶或肽N-糖苷酶的糖肽内切酶。这些酶水解N-乙酰氨基葡萄糖基天冬酰胺连键。PNG酶为糖肽内切酶。另一类糖肽内切酶，即肽O-糖苷酶（来自肺炎双球菌的N-乙酰- α -D-氨基半乳糖苷内切酶），切割N-乙酰氨基半乳糖基丝氨酸/苏氨酸连键，它的底物特异性很窄，在这里并不重要。

这里所用的最有用的PNG酶是来自苦杏仁酶的PNG酶A和来自膜脓毒性黄杆菌的PNG酶F。这两种酶最近才被分离出来并作了定性鉴定（见Methods in Enzymology，同上，138:351）。

第三组主要的糖苷内切酶是来自肺炎双球菌的 β -N-半乳糖苷内切酶，它水解多聚（N-乙酰半乳糖胺）型寡糖辅基中的糖苷键（Methods in Enzymology，同上）。这些酶在这里并不重要，糖苷外切酶也不重要，后者切割外糖苷键而非内糖苷键。

β -N-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶和/或糖肽内切酶是本发明组合物的第一个组分。这里优先选用内切酶H、内切酶D、内切酶F、PNG酶A和F。选用内切酶H、F和PNG酶F更优，内切酶H最优。

以下刚刚提到的各种糖苷内切酶的纯品可以从市场上买到，但它们在过去多半是用于学术研究中。 β -乙酰氨基葡萄糖苷内切酶曾用来确定糖蛋白中碳水化合物链的结构特点（Hughes, RO, The Glycoproteins，第24页，1983）。迄今为止实际上一般都不能大量供应，因而尚未用于消费品中。

内切酶H、内切酶F、内切酶D和PNG酶F可以从Boehringer Mannheim Biochemicals (Indianapolis, IN) 得到。内切酶H的最适pH为5.0，它水解糖蛋白和糖肽，其糖基特异性很高，即要求四糖 $\text{Man} \alpha 1 \rightarrow 3 \text{Man} \alpha 1 \rightarrow 6 \text{Man} \beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}$ 。

(非还原端的 α -甘露糖残基可在0-2位由其它糖取代),这种糖基特异性比内切酶D要高。它水解组成为N-乙酰葡萄糖胺、N-乙酰氨基葡萄糖醇和GlcNAc并以Asn为配基的糖链,但不能作用于Fuc α 1 $\rightarrow$ 6GlcNAc和Fuc α 1 $\rightarrow$ 6GlcNAc $\rightarrow$ Asn的糖链”

(Biochemical Information, 1987, Boehringer Mannheim, “内切酶H”一节)。还可以买到由变铅青链霉菌克隆的褶皱链霉菌内切酶H,其最适pH为5.0至7.5,其底物特异性与上述内切酶H相同。

内切酶D的最适pH为6.5,“它水解糖蛋白和糖肽,其糖基特异性很高,即要求三糖Man α 1 $\rightarrow$ 3Man β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc(非还原端的 α -甘露糖残基不可被其它糖取代);其糖苷配基特异性很宽,即水解与N-乙酰葡萄糖胺、Fuc α 1 $\rightarrow$ 6GlcNAc、GlcNAc $\rightarrow$ Asn以及Fuc α 1 $\rightarrow$ 6GlcNAc $\rightarrow$ Asn连接的糖链”

(Biochemical Information, 1987, Boehringer Mannheim, “内切酶D”一节)。

内切酶F的最适pH为5.0,“它切割壳二糖内的N-聚糖而在天冬酰胺上留下一个N-乙酰葡萄糖胺分子。它特异地切割‘高甘露糖’型的N-聚糖。它还以低得多的速度切割某些‘杂交的’和复合的双分枝N-聚糖,但不切割复合的三分枝和四分枝N-聚糖”

(Biochemical Information, 1987, Boehringer Mannheim, “内切酶F”一节)。

也有与PNG酶F混合的内切酶F。对这一混合物来说,“酶活性是由pH控制的”。在pH4.0时,只有内切酶F活性“发挥作用,从卵清蛋白中释放出八肽-GlcNAc和寡糖-GlcNAc。pH9.3时,

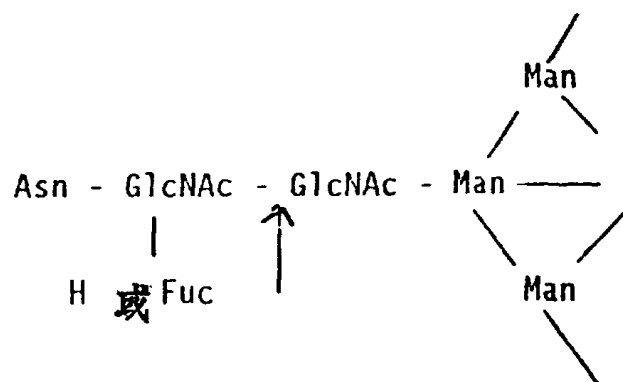
主要由PNG酶F切割糖基胺键，释放出八肽和寡糖-GlcNAc-GlcNAc。这个寡糖接着被内切酶F水解成寡糖-GlcNAc+GlcNAc”（Biochemica Information, 1987, Boehringer Mannheim, “内切酶F”一节）。

PNG酶F的最适PH为5.0-7.0，它水解“多种类型的N-聚糖的天冬酰胺与碳水化合物部分之间的连键，前提是肽键中同时存在有氨基和羧基”（见Biochemica Information, 1987, Boehringer Mannheim, “PNG酶F”一节）。

据Thotakura等人报导(Methods in Enzymology, 138:354-355)，内切酶H、内切酶F和PNG酶A的最适PH为4-5，而PNG酶F的最适pH约为8.5。他们述及柠檬酸能完全抑制PNG酶F的活性；非离子型去污剂能稳定这些糖苷内切酶；PNG酶A和F具有相似的底物特异性，但PNG酶F的活性明显较强。

内切酶H和内切酶F都切割高甘露糖型结构。内切酶F还能以较低的速度切割双分枝复合结构，但不切割带有分枝 β -1,4-N-乙酰葡萄糖胺的寡糖链(Methods in Enzymology, 138:355)。

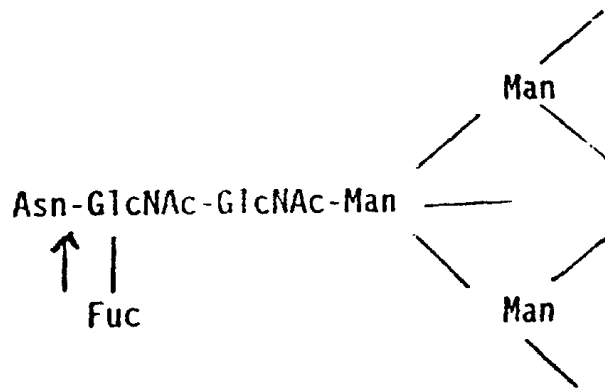
内切酶H和F的底物为：



切割位点用箭头示出。GlcNAc 为 N-乙酰葡萄糖醛酸。

据报导，内切酶H切割连接脂类的寡糖(Chalifour, R.J. 等, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 229:386-394, 1983) 和寡糖及糖蛋白中的二-N-乙酰壳二糖键(Tarenton, A.L. 等, *J. Biol. Chem.* 249:811-817, 1974)。

PNG 酶F的底物为:



切割位点用箭头示出。PNG酶F和A能切割高甘露糖结构或复杂的多分支寡糖链，包括三分枝和四分枝结构，除非这些结构位于氨基或羧基末端(*Methods in Enzymology*, 138:355)。PNG酶F要求至少一个二-N-乙酰壳二糖核(Laemmli, U.K., *Nature* 227:680, 1970)。

发生去糖基化作用所需的糖苷内切酶浓度及保温时间取决于底物的类型。

最近证明，本发明的糖苷内切酶能除去含糖苷物质并破坏和/或除去各种表面上的微生物，特别是真菌，并给其它抗微生物剂带来意

外的好处。

糖苷内切酶是当前的一个研究课题，因此可以预计，将会发现并克隆出与上述酶具有相同或相似活性的新糖苷内切酶。与这里所述的反刍类胃溶菌酶一起起作用的糖苷内切酶打算包括在本发明内。

B. 反刍类胃溶菌酶

本发明组合物中的第二个组分是来自反刍类的胃溶菌酶，包括牛溶菌酶。反刍类动物是一种有瘤胃（前肠）的反刍食团的哺乳动物。前肠起无氧发酵室的作用，其中有一些消化纤维素的微生物

(Vaughan, T. A., *Mammalogy*, 第二版, WB Saunders Co., Philadelphia, 1978)。这些微生物中有许多进入胃而在胃中被消化。有一种以高水平存在于反刍类胃粘膜中的特殊类型的酶是溶菌酶C，它能帮助消化这些微生物(Dobson, DE等, “反刍类的胃溶菌酶”, *J. Biol. Chem.*, 259:11607-11625, 1984, 该文献列入本文)。溶菌酶C对胃蛋白酶的失活作用具有不寻常的耐受性，而且据说与其它非反刍类溶菌酶相比它能在更低的pH下起作用(*J. Biol. Chem.*, 259:11607, 11617)。有证据表明，这些反刍类胃溶菌酶C与通常的哺乳动物溶菌酶C明显不同，这可能是在特化的反刍类胃环境中演化的结果(*J. Biol. Chem.*, 259:11608)。

在这里优先使用反刍类胃溶菌酶C。选用从母牛胃粘膜中分离出的三种密切相关的溶菌酶C(1、2和3)更优(*J. Biol. Chem.*, 259:11619-11625, 包括补充材料, 该文献并入本文)。这些溶菌酶C与已知氨基酸组成的溶菌酶C有相似之处，即有8个半胱氨酸残基，色氨酸比例高，但这些溶菌酶C的精氨酸含量低，这与其它已

知溶菌酶C不同(J.Biol.Chem.,259:11625 及补充材料)。
这三种密切相关的母牛胃溶菌酶C中,有一种称为C2的酶已测定了其129个氨基酸的氨基酸顺序。它的39-60位氨基酸残基与其它已知的溶菌酶C不同,其中包括缺失一个氨基酸(J.Biol.Chem.,259:11617)。在这三种母牛胃溶菌酶中,以母牛胃溶菌酶C2最优。母牛或一般牛溶菌酶C2的分子量为14,398(J.Biol.Chem.,259:11626 及补充材料)。

牛胃溶菌酶C2比鸡卵清溶菌酶对蛋白酶的耐受性更高,并具有更接近酸性的狭窄pH范围(J.Biol.Chem.,259:11607)。牛(母牛胃)溶菌酶目前虽然尚未广泛商业化使用,但已被建议作为酸性pH下的抗菌剂或作为动物饲料添加剂(Digan,ME等,“通过由酵母Pichia pastoris分泌而连续生产一种新的溶菌酶”,*Biotechnology*,7:160-164,1989,该文献列入本文)。

最近,牛溶菌酶C2已借基因工程在酵母Pichia pastoris中表达。加利福尼亚州LaJolla的一家公司(Salk Institute Biotechnology/Industrial Associates,Inc.)通过遗传工程制备这种酶,作法是克隆牛溶菌酶C2的cDNA,并通过用其固有的信号顺序在Pichia pastoris中进行分泌而表达其蛋白产物(*Biotechnology*,7:160)。据说重组产物的生物活性得到了保留,并预计会生产出成本低的大批量产物(*Biotechnology*,7:160,163)。

重组牛溶菌酶,特别是来自酵母Pichia pastoris的重组牛溶菌酶,在这里最优先被选用。由Pichia pastoris基因工程生产的牛溶菌酶C2应用特别广泛,因为它对表面活性剂稳定。本

发明还考虑到可能被发现和/或克隆的其它反刍类胃溶菌酶，只要它们在与 β -N-乙酰氨基糖苷内切酶或糖肽内切酶混合时能带来好处。

据说革兰氏阳性菌比革兰氏阴性菌对溶菌酶的作用更敏感。金黄色葡萄球菌虽然是一种革兰氏阳性菌，但它对溶菌酶较不敏感，这可能是因为它的细胞壁糖肽中有不同的糖类(Davis 等,《微生物学和免疫学原理》, Harper & Row, New York, 118-119 页, 1968)。在本发明中, β -N-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶和/或糖肽内切酶(优选内切酶H)与反刍类胃溶菌酶(优选来自 Pichia pastoris 的重组牛溶菌酶的混合物) 确能严重破坏金黄色葡萄球菌(见实施例)。此外, 上述混合物意外地显著减少大肠杆菌(一种普通的革兰氏阴性菌) 菌落, 而这些酶单独存在时没有这种作用。甚至对革兰氏阳性菌表皮葡萄球菌, 单独的溶菌酶或(内切酶)H 有不利影响, 这两种酶的混合物比任何一种酶单独用的不利影响都更强。除细菌外, 本发明的组合物还对真菌和酵母有效, 但相信这与糖苷内切酶尤其是内切酶H 的作用有关, 而不仅仅是由于糖苷内切酶与溶菌酶的混合物的作用。

C. 组合物

本发明包括含有反刍类胃溶菌酶、 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶和/或糖肽内切酶的抗微生物组合物。优先选用反刍类胃溶菌酶C 和下列酶中的一种或多种: 内切酶H、内切酶F、内切酶D、PNG酶A、PNG酶F。以牛溶菌酶C2 和内切酶H 或 PNG酶F 更优。来自 Pichia pastoris 的重组牛溶菌酶和内切酶H 最优。

反刍类胃溶菌酶与 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶或糖肽内切酶的重量比约以1:4 至4:1 为好, 约以2:1 至1:2 更好。对内切酶H

和来自 *Plethia pastoris* 的牛溶菌酶来说，最优的比例是 1:1。

这里优选的组合含有约 1-1000 ppm (优选约 50-400 ppm) 的反刍类胃溶菌酶和约 1-1200 ppm (优选约 50-400 ppm) 的 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶或糖肽内切酶。这里最优选的组合含有约 80-150 ppm 内切酶 H 和约 80-150 ppm 重组牛溶菌酶。

这里的抗微生物组合物的形式优选漱口剂、托牙清洗剂、洁牙剂、洗衣去污剂、防腐剂、液体皂、接触镜片清洗剂或皮肤清洗剂。这些将在下面更详细地叙述。这些组合物的形式更优选的是托牙清洗剂、洁牙剂、漱口剂、防腐剂、液体皂或洗衣去污剂，最优选的是洗衣去污剂，特别是重垢型液体洗衣去污剂。

这里的抗微生物组合物最好含有约 0.1-60% (重量) 的去污表面活性剂。去污表面活性剂可为阴离子型、非离子型、阳离子型、两性型和/或两性离子型表面活性剂，优选非离子型和/或阴离子型表面活性剂。最优选的是非离子型表面活性剂。

本发明的组合物可以配制成：洗衣去污剂，如美国专利 4,507,219、4,318,818、4,605,509 和 4,412,934 所公开的洗衣去污剂；硬表面清洗剂，如美国专利 4,414,128、3,679,608、3,985,668 和 4,005,027 所公开的硬表面清洗剂；条皂，如美国专利 3,993,772 和 3,070,574 所公开的条皂；洗发剂，例如美国专利 4,345,080、4,704,272 和 4,741,855 所公开的洗发剂；抗痤疮产品，如美国专利 4,318,907 和 4,608,370 所公开的产品；口服组合物，如美国专利 4,684,518 所公开的口服组合物。这些专利在此列为参考。

如果抗微生物组合物是一种优选的漱口剂、托牙清洗剂或洁牙剂，

它最好含有内切酶H或PNG酶F和牛溶菌酶C2 各1-150ppm。这同样适用于抗微生物组合物为接触镜片清洗剂的情形。

如果抗微生物组合物是一种液态或颗粒状洗衣去污剂，它最好含有内切酶H和重组牛溶菌酶C2 各约2-250ppm，以及1-90%（重量）的去污表面活性剂，该表面活性剂选自阴离子型、非离子型、阳离子型、两性型和两性离子型表面活性剂。优选的洗衣去污剂组合物中优选含有约5-50%（重量）的上述去污表面活性剂，最优选的是含有10-40%（重量）。

可用于这里的去污剂组合物的表面活性剂，包括熟知的阴离子型、非离子型、阳离子型、两性型和两性离子型合成表面活性剂。其中典型的有，烷基苯磺酸盐、烷基硫酸盐和烷基醚硫酸盐、石蜡磺酸盐、烯烃磺酸盐、烷氧基化的（尤其是乙氧基化的）醇类和烷基酚类、氧化胺、脂肪酸和脂肪酸酯的 α -磺酸盐、烷基内铵盐等，这些都是去污剂领域内熟知的。这些去污表面活性剂一般含有C₉-C₁₈范围的烷基。阴离子型去污表面活性剂可以以其钠盐、钾盐或三乙醇铵盐的形式使用；非离子型则一般含有约5-17个氧化乙烯基团。含有约0-4个氧化乙烯单位的C₁₁-C₁₆烷基苯磺酸盐、C₁₂-C₁₈石蜡磺酸盐和C₁₀-C₁₆烷基硫酸盐，在本类型的组合物中是特别优选的。

适用于这里的组合物的表面活性剂的详细目录可在1976年2月3日授予Baskerville的美国专利3,936,537中查找，该专利在此列为参考。这些表面活性剂的商业来源可在McCutcheon的《乳化剂和去污剂》一书中查找（North American Edition, 1984, McCutcheon Division, MC Publishing Company），这本书也在此列为参考。

可用于去污剂组合物的助洗剂包括任何常规的无机和有机水溶性盐类助洗剂，以及各种水溶性的所谓“接种”助洗剂。本发明的洗衣去污剂组合物的助洗剂含量，按重量计优选为约1-75%，更优选的是约5-40%，最优选的是约10-20%。

适用的水溶性无机碱性盐类助洗剂的非限制性实例包括：碱金属碳酸盐、硼酸盐、磷酸盐、多磷酸盐、三聚磷酸盐、碳酸氢盐、硅酸盐、硫酸盐。这类盐的具体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、六偏磷酸盐。

适用的有机碱性盐类助洗剂的实例有：(1)水溶性氨基多乙酸盐，例如钠和钾的乙二胺四乙酸盐、次氨基三乙酸盐、N-(2-羟乙基)次氨基二乙酸盐；(2)肌醇六磷酸的水溶性盐，如肌醇六磷酸的钠盐和钾盐；(3)水溶性多膦酸盐，包括乙烷-1-羟基-1,1-二膦酸的钠盐、钾盐和锂盐以及亚甲基二膦酸的钠盐、钾盐和锂盐，等等。

接种助洗剂包括象用碳酸钙或硫酸钡接种的碳酸钠或硅酸钠这样一些物质。粒度小于约5微米的水合钠沸石A特别理想。

适用助洗剂的详细目录可在美国专利3,936,537中查找，该专利在此列为参考。优选的助洗剂为脂肪酸、多碳酸盐、多磷酸盐以及它们的混合物。

酌情使用的去污剂组合物组分包括酶类(如蛋白酶和淀粉酶)、过氧化物漂白剂和漂白剂激活剂、卤素漂白剂(如二氯异氰尿酸的钠盐和钾盐)、污垢释出剂(如甲基纤维素)、污垢悬浮剂(如羧甲基纤维素钠)、织物增亮剂、酶稳定剂、色斑、增泡剂或抑泡剂、防腐蚀剂、染料、填料、杀菌剂、pH调节剂、非助洗剂碱性源等。

抗微生物组合物还可以是一种防腐剂，例如洗发剂或化妆品(如

面霜)或食品或饮料中的防腐剂。它最好以牛溶菌酶02和内切酶H(优选)或PNG酶F各约50-400ppm的量用于化妆品或洗发剂。

本发明的组合物可以是洗发剂的形式。这些洗发剂一般含有约5-60%(重量)的合成表面活性剂,其余为水。适用的表面活性剂包括月桂基硫酸铵、劳瑞基(laureth)硫酸铵、月桂基硫酸三乙胺盐、月桂基硫酸三乙醇胺盐、劳瑞基硫酸三乙醇胺盐、月桂基硫酸单乙醇胺盐、劳瑞基硫酸单乙醇胺盐、月桂基硫酸二乙醇胺盐、劳瑞基硫酸二乙醇胺盐、甘油单月桂酸酯硫酸钠、月桂基硫酸钠、劳瑞基硫酸钠、月桂基硫酸钾、劳瑞基硫酸钾、月桂基肌氨酸、可可基(coco)肌氨酸、可可基硫酸铵、月桂酰硫酸铵、可可基硫酸钠、月桂酰硫酸钠、可可基硫酸钾、月桂酰硫酸钾、月桂酰硫酸三乙胺盐、月桂酰硫酸三乙醇胺盐、可可基硫酸单乙醇胺盐、月桂酰硫酸单乙醇胺盐、十三烷基苯磺酸钠、十二烷基苯磺酸钠。

这些洗发剂可以含有各种酌情添加的组分。这些常规的组分是本领域专业人员熟知的,例如:防腐剂,如苜醇、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯和咪唑烷基脲;阳离子型表面活性剂,如十六烷基三甲基氯化铵、月桂基三甲基氯化铵、三(十六烷基)甲基氯化铵、十八烷基二甲基苜基氯化铵、二(部分氢化脂)二甲基氯化铵;增稠剂和粘度调节剂,如长链脂肪酸的二乙醇酰胺(如PRG 3月桂酰胺)、环氧乙烷与环氧丙烷的嵌段共聚物、氯化钠、硫酸钠、聚乙烯醇、乙醇及水溶性聚合物(如咕吨胶、羧乙基纤维素、古尔胶和淀粉);

pH调节剂,如柠檬酸、琥珀酸、磷酸、氢氧化钠、碳酸钠;香料;染料;和/或螯合剂,如乙二胺四乙酸二钠。这些试剂各自的用量按组合物重量计一般约为0.01-10%,优选约0.5-5.0%。

如果抗微生物组合物是一种液体洗手皂，则它含有内切酶H或PNG酶F和牛溶菌酶C2各约50-400 ppm，以及约10-40% (重量) 的去污表面活性剂(如前面对去污剂组合物所述)。

抗微生物组合物可以是一种皮肤清洗剂，其中最好含有内切酶H和来自Pichia pastoris的重组牛溶菌酶各约80-150 ppm。

不应使用与这些酶不相容的其它成分。这些组合物的pH优选为5-8，更优选为5.5-7，最优选的是6.5-7.5。这些酶应当以不致失活的方式加到组合物中。

D. 方法

破坏或除去微生物的方法与抗微生物组合物一起包括在本发明中。这些方法包括用反刍类胃溶菌酶和 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶和/或糖肽内切酶处理，最好是施用含有这些酶的组合物。优选反刍类胃溶菌酶C和选自内切酶H、内切酶F、内切酶D、PNG酶A和PNG酶F的糖苷内切酶。处理组合物最好含有牛溶菌酶C2及内切酶H和/或PNG酶F。最优选的是来自Pichia pastoris的重组牛溶菌酶和内切酶H。优选的处理方法包括施用一种组合物，该组合物中含有内切酶H和/或PNG酶F以及来自Pichia pastoris的重组牛溶菌酶。

这些酶应以足以产生抗微生物效果的浓度使用。该处理中糖苷内切酶或溶菌酶的量通常少于该酶单独使用时产生同样抗微生物效果所需的量。虽然不想受理论的束缚，但据信这两种类型的酶之间有某种协同作用，即，这里的糖苷内切酶和溶菌酶，特别是内切酶H和重组牛溶菌酶C2的效果，比这二者效果的加和要强。

本方法优选用于破坏或去除细菌，最优选革兰氏阳性菌。该方法

最好采用一组合物，其中含有约 1-1200 ppm(优选约 50-400 ppm) β -N- 乙酰氨基葡萄糖苷内切酶或糖肽内切酶(最优选的是内切酶 H)、以及约 1-1000 ppm(优选约 50-400 ppm) 反刍类胃溶菌酶 C (最优选的是来自 Pichia pastoris 的重组牛溶菌酶)。预计本方法也对真菌和酵母有效，但这可能是由于内切酶 H 的作用而不是与溶菌酶的混合物的作用。

反刍类胃溶菌酶与 β -N- 乙酰氨基葡萄糖苷内切酶/糖肽内切酶的比例约为 1 : 4 至 4 : 1，优选约 1 : 2 至 2 : 1，最优选的是约 1 : 1。

本方法(和组合物) 最优选的是用于破坏金黄色葡萄球菌和/或大肠杆菌，并且最好是用一种组合物，其中含有内切酶 H 和重组牛溶菌酶各约 50-400 ppm，最优选的是约 100-150 ppm。

该方法最好是用含有反刍类胃溶菌酶和 β -N- 乙酰氨基葡萄糖苷内切酶和/或糖肽内切酶的组合物洗涤或冲洗含微生物的表面。根据表面的类型和所采用的处理方法，可以接着用水冲洗或用手象用布一样擦拭。带微生物的表面可以是例如牙齿或托牙、口腔、织物、皮肤或接触镜片。组合物优选为漱口剂、托牙清洗剂、洁牙剂、洗衣去污剂、防腐剂、接触镜片清洗剂、液体皂或皮肤清洗剂(见上)，更优选的是托牙清洗剂、漱口剂、防腐剂、液体皂或洗衣去污剂，最优选的是洗衣去污剂、特别是液体重垢洗衣去污剂。该组合物的去污表面活性剂含量优选为约 1-90 % (重量)，更优选的是约 5-50 %，最优选的是 10-40%。该表面活性剂选自阴离子型、非离子型、阳离子型、两性型和两性离子型表面活性剂，优选阴离子型和/或非离子型表面活性剂。该方法应以不使酶失活的方式进行。

这里的组合物还可以定期用于除去或防止微生物生长，例如每天使用这里的漱口剂组合物。可能较为理想的是，使这里的抗微生物组合物在施用后在所处理的部位停留一定的时间，例如用这里的漱口剂组合物冲洗30秒。

下列实施例说明本发明的组合物和方法。这些实施例不应误认为是对本发明范围的限制。所有份数、百分比和比例均按重量计，除非另外指出。

实 施 例 1

牛溶菌酶和内切酶H对大肠 杆菌的效果

从已培养4小时的大肠杆菌液体培养物中取几个样品，用下列试剂处理2小时：

- 1) 0.2M柠檬酸钠缓冲液 (pH 7.0)；
- 2) 0.2M柠檬酸钠缓冲液 (pH 7.0) 加牛溶菌酶和内切酶H (pH 7.0) 各200ppm；
- 3) #1 加200ppm牛溶菌酶 (pH 7.0)；
- 4) #1 加200ppm内切酶H (pH 5.5)。

牛溶菌酶为来自 *Pichia pastoris* 的重组牛溶菌酶。据信这种牛溶菌酶单独存在或与内切酶H混合时起作用的最适pH为7.0。内切酶H为来自大肠杆菌的重组内切酶H。据信内切酶H单独存在而起作用时的最适pH为5.5。

取连续稀释的处理样品铺平板，于37℃下保温过夜，然后计数菌落。

这些处理的最终菌落计数如下：

- | | |
|--------------|-----------------------|
| 1) 单独缓冲液 | 1.5×10^6 个菌落 |
| 2) 牛溶菌酶/内切酶H | 5.2×10^4 个菌落 |
| 3) 单独牛溶菌酶 | 1.8×10^6 个菌落 |
| 4) 单独内切酶H | 1.2×10^6 个菌落 |

将# 2 中的牛溶菌酶和内切酶H 各变为 100 ppm 重复上述实验。

- 1) 0.2M 柠檬酸钠缓冲液 (pH 7.0) ;
- 2) 0.2M 柠檬酸钠缓冲液 (pH 7.0) 加牛溶菌酶和内切酶H (pH 7.0) 各 100 ppm ;
- 3) # 1 加 200 ppm 牛溶菌酶 (pH 7.0) ;
- 4) # 1 加 200 ppm 内切酶H (pH 5.5) 。

这些处理的最终菌落计数如下:

- | | |
|--------------|-----------------------|
| 1) 单独缓冲液 | 0.3×10^6 个菌落 |
| 2) 牛溶菌酶/内切酶H | 3.8×10^3 个菌落 |
| 3) 单独牛溶菌酶 | 6.6×10^5 个菌落 |
| 4) 单独内切酶H | 8.7×10^5 个菌落 |

总之,牛溶菌酶和内切酶H 对大肠杆菌的效果比单独的牛溶菌酶或单独的内切酶H 都显著增强。该混合物比单独的任一种酶或缓冲液使细菌减少二至三个数量级。该混合物在不同的保温时间(如 30 分至 7 小时)都显示效果。

实 施 例 2

牛溶菌酶和内切酶H 对表皮

葡萄球菌的效果

从已培养 4 小时的表皮葡萄球菌液体培养物中取几个样品,用下列试剂处理 6 小时,

- 1) 0.2M柠檬酸钠缓冲液 (pH 7.0) ;
- 2) 0.2M柠檬酸钠缓冲液 (pH 7.0) 加牛溶菌酶和内切酶H (pH 7.0) 各 100 ppm ;
- 3) # 1 加 100 ppm 牛溶菌酶 (pH 7.0) ;
- 4) # 1 加 100 ppm 内切酶H (pH 5.5) 。

牛溶菌酶为来自 Pichia pastoris 的重组牛溶菌酶。据信这种牛溶菌酶单独存在或与内切酶H混合时起作用的最适 pH 为 7.0 。内切酶H为来自大肠杆菌的重组内切酶H。据信内切酶H单独存在而起作用时的最适 pH 为 5.5 。

取连续稀释的处理样品铺平板，于 37℃ 下保温过夜，然后计数菌落。

这些处理的最终菌落计数如下：

1) 单独缓冲液	1.1×10^5 个菌落
2) 牛溶菌酶/内切酶H	5.8×10^5 个菌落
3) 单独牛溶菌酶	1.0×10^4 个菌落
4) 单独内切酶H	3.9×10^4 个菌落

总之，牛溶菌酶和内切酶H (各 100 ppm) 对表皮葡萄球菌的效果比单独的牛溶菌酶 (100 ppm) 或单独的内切酶H (100 ppm) 都显著增强。该混合物还在不同的保温时间 (如 30 分至 7 小时) 都显示效果。

实 施 例 3

内切酶H/牛溶菌酶对金黄色葡萄球菌形态的影响

将已培养 4 小时的金黄色葡萄球菌 (ATCC # 6341) 液体培养物

分开，用下列活性物质在 37℃ 下处理 2 小时：

- 1) 0.2M 柠檬酸钠缓冲液 (pH 7.0)；
- 2) # 1 加 200 ppm 牛溶菌酶和 200 ppm 内切酶 H (pH 7.0)；
- 3) # 1 加 400 ppm 牛溶菌酶 (pH 7.0)；
- 4) # 1 加 400 ppm 内切酶 H (pH 7.0)。

处理后，把这些样品放在涂有聚乙烯醇缩甲醛树脂的铜网上，用透射电子显微镜检查。显微照片表明，缓冲液对照和任一种单独的酶都没有破坏金黄色葡萄球菌。但当这两种酶混合后，经过处理的微生物严重凝聚和/或被破坏。

实 施 例 4

牛溶菌酶/内切酶 H 相对其它溶 菌酶/内切酶 H 的效果

将大肠杆菌 (083 K.H.81) 的对数期培养物分开，用不同的溶菌酶/内切酶 H 混合物于 37℃ 下处理 2 和 4 小时。

处理结束后，从每个样品各取若干等份试样连续稀释到磷酸缓冲盐水中，并铺在胰酶解酪蛋白大豆琼脂上。将培养皿在 37℃ 下保温过夜，并计算菌落数。

结果，

处 理	时 间	菌落计数
a) 0.2M 柠檬酸钠缓冲液 (pH 7.0)	2 小时	1.8×10^6
b) 0.2M 柠檬酸钠缓冲液 + 200 ppm 牛溶菌酶 (pH 7.0)	2 小时	1.9×10^6
c) 0.2M 柠檬酸钠缓冲液 + 200 ppm	2 小时	2.3×10^8

牛溶菌酶+200 ppm 内切酶H (pH 7.0)		
d)	0.2M 柠檬酸钠缓冲液+200 ppm 变溶菌素+200 ppm 内切酶H (pH 7.0)	2 小时 2.6×10^6
e)	0.2M 柠檬酸钠缓冲液+200 ppm 鸡卵清溶菌酶+200 ppm 内切酶H (pH 7.0)	2 小时 1.0×10^6
f)	0.2M 柠檬酸钠缓冲液 (pH 7.0)	4 小时 1.5×10^6
g)	0.2M 柠檬酸钠缓冲液+200 ppm 牛溶菌酶 (pH 7.0)	4 小时 1.8×10^6
h)	0.2M 柠檬酸钠缓冲液+200 ppm 牛溶菌酶+200 ppm 内切酶H (pH 7.0)	4 小时 5.2×10^6
i)	0.2M 柠檬酸钠缓冲液+200 ppm 变溶菌素+200 内切酶H (pH 7.0)	4 小时 2.5×10^6
j)	0.2M 柠檬酸钠缓冲液+200 ppm 鸡卵清溶菌酶+200 ppm 内切酶H (pH 7.0)	4 小时 1.0×10^6

这些结果表明，牛溶菌酶和内切酶H的混合物使细菌明显减少。这种减少远远大于任何一种所试验的其它溶菌酶/内切酶H混合物。

将对照浓度加倍，例如单独用400 ppm 的各种溶菌酶，重复该实验，这时牛溶菌酶和内切酶H的混合物仍使细菌减少。

实 施 例 5

含有内切酶H和牛溶菌酶的洗衣去污剂

本发明的液体重垢洗衣去污剂组合物如下：

组 分	活性物重量%
C ₁₃ 直链烷基苯磺酸	8.0
聚乙氧基化(2.25) C ₁₄₋₁₅ 烷基磺酸	12.0
1,2-丙二醇	3.5
二亚乙基三胺五乙酸钠	0.3
单乙醇胺	2.0
聚乙氧基化(6.5) C ₁₂₋₁₃ 醇	5.0
乙醇	8.5
氢氧化钠	3.85
氢氧化钾	1.8
C ₂₂₋₂₄ 脂肪酸	10.0
柠檬酸	4.0
甲酸钙	0.12
C ₁₂ 烷基三甲基氯化铵	0.5
四亚乙基五胺乙氧化物(15-18)	2.0
水	37.12
染料	0.08
香料	0.25
蛋白酶*	0.125
内切酶H	125 ppm
牛溶菌酶**	125 ppm

* mg 活性酶 / g (34 mg 活性酶 / g 贮液)

** 4.0单位 / 微克 ± 25%

将以上列出的各成分加到带有单一搅拌器的混合罐中。在加入酶、

染料和香料之前调节混合物的 pH，使 10% (重量) 水溶液在 20℃ 下的 pH 为 ~8.5。

该组合物在生产出之后立即进行测试时，能除去和防止衣物污垢中所带的微生物，特别是细菌。这种去除和防止作用比不含内切酶 H/牛溶菌酶的液体重垢去污剂要好。

实 施 例 6 含 防 腐 剂 的 洗 发 剂

组 分	含 量
烷基硫酸铵 (29% 水溶液)	55.25%
美国专利 4,345,080 实施例 1 的万亩定锌晶体	2.0
椰子单乙醇酰胺	3.0
乙二醇二硬脂酸酯	5.0
柠檬酸钠	0.5
柠檬酸	0.2
颜料溶液	0.1
香料	0.5
内切酶 H	100 ppm
牛溶菌酶 **	100 ppm
二羟甲基二甲基乙内酰胺	0.05%
水	加至 100%

**4.0 单位/微克 ± 25%

这种去头屑洗发剂组合物保持无细菌或真菌污染的程度和时间比不含内切酶 H/牛溶菌酶的配方更高、更长。

实 施 例 7

液 体 皂

本发明的一种液体皂组合物如下：

组 分	活性物重量%
月桂基硫酸铵	6.0
烷基肌氨酸钠	5.7
可可酰胺基丙基内铵盐	6.3
椰子脂肪酸	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
内切酶 _H	50 ppm
牛溶菌酶**	50 ppm

** 4.0单位/微克 $\pm 25\%$

将以上列出的各成分以上列顺序加入带有单一搅拌器的混合罐中。在加入酶、染料和香料前，调整混合物的pH使10%（重量）水溶液在20℃下的pH为约6.5。

这种组合物产生去除普通皮肤菌丛的抗微生物作用。

实 施 例 8

片 状 托 牙 清 洗 剂

在60-65℃下，分别将以下物质在热空气床中流化30分钟制成颗粒：碳酸氢钠、过硼酸钠单水合物、酒石酸、三聚磷酸钠、氨基

磺酸、聚乙二醇(20M)和乙二胺四乙酸。然后把这些颗粒与其它成分转鼓混合,制出“第一层”混合物和“第二层”混合物,其中“第一层”混合物的组成如下:

	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(20M)	2.60
硫酸钠	2.00
薄荷粉	1.50
二氧化硅	1.30
十二烷基苯磺酸钠	0.50

“第二层”混合物的组成如下:

	重量%
过硼酸钠单水合物	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/颜料	4.00
氨基酸配合剂B	3.00
碳酸钠	3.00

聚乙二醇(20M)	2.50
二氧化硅	2.00
薄荷粉	1.50
Wasag酯	1.40
硬化甘油三酯	0.50
十二烷基苯磺酸钠	0.40
琥珀酸盐去污剂	0.30
染料	0.06
内切酶H	100 ppm
牛溶菌酶**	100 ppm

****4.0 单位/微克 ± 25%**

在39冲HORN 旋转压片机中压制成片剂。压制过程分两步进行。先将“第二层”蓝色混合物用填充法压至很低的压力(每片10千牛)。然后将“第一层”白色混合物灌入并压至每片70千牛。这样制得一个4克的片剂,其中含有2.7克蓝色混合物和1.3克白色混合物。

片剂由消费者溶于水中,把托牙放入含有该托牙清洗剂的水中进行清洗,然后冲洗。

对上述优选实施方案所作的对本领域普通技术人员来说显而易见的修改,将属本发明的范围之内。