



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 113473856 B

(45) 授权公告日 2024. 03. 19

(21) 申请号 202080015715.8

(22) 申请日 2020.03.05

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113473856 A

(43) 申请公布日 2021.10.01

(30) 优先权数据
62/814,582 2019.03.06 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.08.20

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/021211 2020.03.05

(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/181099 EN 2020.09.10

(73) 专利权人 居里公司
地址 美国纽约

(72) 发明人 E·米尔泽克 S·科斯塔
W·辛德尔

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

专利代理师 邹宗亮

(51) Int.Cl.
A01N 25/22 (2006.01)
A01N 43/653 (2006.01)
A01N 59/20 (2006.01)

(56) 对比文件
EP 3272864 A1, 2018.01.24
CN 108157582 A, 2018.06.15

JP H09149784 A, 1997.06.10

US 2009285890 A1, 2009.11.19

CN 101600835 A, 2009.12.09

US 3284212 A, 1966.11.08

CN 102762668 A, 2012.10.31

Ayse Dincer等. “Immobilization of tyrosinase on chitosan-clay composite beads”.《International Journal of Biological Macromolecules》.2011,第50卷(第3期),第815-820页.

Jaafar Abdullah等. “Immobilization of tyrosinase in chitosan film for an optical detection of phenol”.《Sensors and Actuators B》.2005,第114卷(第2期),第604-609页.

Patricia Lucas-Elíó等. “The Antimicrobial Activity of Marinocine, Synthesized by Marinomonas mediterranea, Is Due to Hydrogen Peroxide Generated by Its Lysine Oxidase Activity”.《JOURNAL OF BACTERIOLOGY》.2006,第188卷(第7期),第2943-2501页. (续)

审查员 黄荣禄

权利要求书2页 说明书21页 附图9页

(54) 发明名称
防腐剂组合物及其使用方法

(57) 摘要
本文公开了可掺入待防腐产品中的抗微生物防腐剂组合物。所公开的组合物包括固定化的杀生物酶,如交联酶或属于酶原类的活性酶,用于修饰蛋白质上的氨基酸残基或将感兴趣的分

子结合至蛋白质。所述组合物包括固定在聚合物固体载体上的酶,其提高所述酶的保质期并保护所述酶在延长的储存期间免受自交联或其它变质。还公开了通过将有效量的所公开的组合物掺入产品中来增加所述产品,如个人护理产品、家用和工业产品的保质期的方法。

[转续页]

CN 113473856 B

[接上页]

(56) 对比文件

Patricia Lucas-Elío等. “The
Antimicrobial Activity of Marinocine,
Synthesized by *Marinomonas mediterranea*,

Is Due to Hydrogen Peroxide Generated by
Its Lysine Oxidase Activity”.《JOURNAL OF
BACTERIOLOGY》.2006,第188卷(第7期),第2943-
2501页.

1. 一种增加产品保质期的方法,包括将至少一种交联酶以与不含该酶的相同产品相比能有效提供抗微生物活性的量掺入该产品中,其中该交联酶选自微生物转谷氨酰胺酶和酪氨酸酶。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述交联酶被固定在聚合物载体结构上或被封装在聚合物载体结构内。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述聚合物载体包括杀生物聚合物;任选地,其中杀生物聚合物包括甲壳素、壳聚糖、羧甲基壳聚糖、聚赖氨酸、纤维素、季铵纤维素、藻酸盐、果胶、羧基纤维素或其组合。

4. 根据权利要求1到3中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括除所述交联酶之外还掺入至少一种其它抗微生物物质。

5. 交联酶用于保存产品的用途,其中交联酶选自微生物转谷氨酰胺酶和酪氨酸酶。

6. 根据权利要求5所述的用途,其中所述交联酶被固定在聚合物载体结构上或被包封在聚合物载体结构内。

7. 权利要求6的用途,其中所述聚合物载体包含杀生物聚合物;任选地,其中杀生物聚合物包括甲壳素、壳聚糖、羧甲基壳聚糖、聚赖氨酸、纤维素、季铵纤维素、藻酸盐、果胶、羧基纤维素或其组合。

8. 一种包含至少一种交联酶的产品,所述交联酶以与不含该交联酶的相同产品相比能有效提高产品保质期的量存在,其中所述交联酶选自微生物转谷氨酰胺酶、酪氨酸酶和赖氨酰氧化酶,其中所述交联酶被固定在聚合物载体结构上或被包封在聚合物载体结构内。

9. 权利要求8的产品,其中所述聚合物载体包含杀生物聚合物;任选地,其中杀生物聚合物包括甲壳素、壳聚糖、羧甲基壳聚糖、聚赖氨酸、纤维素、季铵纤维素、藻酸盐、果胶、羧基纤维素或其组合。

10. 根据权利要求8到9中任一项所述的产品,其中所述产品除了所述交联酶之外还包含至少一种其它抗微生物物质。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的方法、用途或产品,其中所述产品为个人护理产品、家用产品、工业产品、食品、药品、化妆品、保健品、船舶产品、涂料、能源或农产品。

12. 根据权利要求11所述的方法、用途或产品,其中所述产品选自条皂、液体皂、手部消毒剂、术前皮肤消毒剂、清洁擦拭物、消毒擦拭物、沐浴露、痤疮治疗产品、抗真菌尿布疹霜、抗真菌皮肤霜、洗发剂、调理剂、化妆品除臭剂、抗微生物霜、身体乳液、护手霜、局部霜、须后水、爽肤水、漱口水、牙膏和防晒乳液。

13. 一种防腐剂组合物,其包含一种或多种具有抗微生物活性的交联酶,其中交联酶选自微生物转谷氨酰胺酶、酪氨酸酶和赖氨酰氧化酶,其中所述交联酶被封装在聚合物载体结构内。

14. 权利要求13的防腐剂组合物,其中聚合物载体包括杀生物聚合物;任选地,其中杀生物聚合物包括甲壳素、壳聚糖、羧甲基壳聚糖、聚赖氨酸、纤维素、季铵纤维素、藻酸盐、果胶、羧基纤维素或其组合。

15. 一种延长产品保质期的方法,包括在产品中加入至少一种交联酶,所述交联酶以与不含该交联酶的相同产品相比能有效提供抗微生物活性的量存在,其中所述交联酶是赖氨酰氧化酶,并且其中所述产品为个人护理产品、家用产品、工业产品、食品、药品、化妆品、保

健品、船舶产品、涂料、能源或农产品。

16. 赖氨酰氧化酶用于保存产品的用途,其中所述产品为个人护理产品、家用产品、工业产品、食品、药品、化妆品、保健品、船舶产品、涂料、能源或农产品。

17. 根据权利要求1至11中任一项所述的方法、用途或产品,其中所述产品为油漆或包装产品。

18. 根据权利要求1至11和17中任一项所述的方法、用途或产品,其中所述产品为塑料产品。

19. 根据权利要求15的方法,其中所述产品是油漆或包装产品。

20. 根据权利要求15或19的方法,其中所述产品是塑料产品。

21. 根据权利要求16的用途,其中所述产品是油漆或包装产品。

22. 根据权利要求16或21的用途,其中所述产品是塑料产品。

防腐剂组合物及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2019年3月6日提交的第62/814,582号美国临时申请的权益,其全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及衍生自酶原蛋白质的活性酶及其作为杀生物(例如,交联)剂的用途。这些杀生物酶可以结合至聚合物载体上以形成酶装置,用于增加杀生物酶的保质期。酶装置可用于交联蛋白质或修饰感兴趣的蛋白质,如将分子、蛋白质或肽结合至另一种蛋白质上。更具体地,一种或多种酶可用作新型防腐剂的杀生物剂和用作保健产品、个人护理产品或化妆品配方、食品、药品、包装和船舶应用的抗微生物剂。

背景技术

[0004] 用于保护和保存配方免受细菌或真菌侵袭的防腐剂组合物是本领域已知的,并且在如个人护理产品、家用和工业产品、健康和卫生产品和药品等领域中具有广泛的应用。有许多用作杀生物剂的化学品、小分子和防腐剂。由于通过这些类型的化合物实现的良好细菌和杀真菌特性,因此传统的防腐剂共混物已经包括传统的活性成分,如甲醛释放剂和/或对羟基苯甲酸酯。

[0005] 更常见的杀生物机制之一是蛋白质酰化和随后使用甲醛和戊二醛的蛋白质交联。 γ 辐射是另一种通过交联活性催化细胞分解的方法。 γ 辐照常用于灭菌。

[0006] 除化学品和小分子外,杀生物酶和蛋白质已用作食品(Malhotra等人,《微生物学前沿(Frontiers in Microbiology)》2015,6,611)、医疗保健(Kaplan等人,《牙科研究期刊(Journal of Dental Research)》2010,89,205-218)和船舶(Olsen等人,(2007)生物污染(Biofouling) 23:369-383)产业。这些酶的实例包括:氧化酶和过氧化物酶,其生成用于杀生物活性的氧化物质;裂解酶,如蛋白酶和裂解酶(例如,赛威蛋白酶(savinase)、溶菌酶、溶葡萄球菌素、枯草杆菌蛋白酶),其降解微生物(例如,真菌、病毒、细菌)的表面;乳铁蛋白,其水解核酸,如RNA;和抗微生物肽(例如,乳链菌肽、骨膜蛋白),其被认为通过在细胞壁中产生孔隙而杀死微生物,从而导致细胞破裂和细胞内容物泄漏。

[0007] 已知的杀生物剂通常会对用于防止微生物污染的产品造成损害。例如,第5,326,561号美国专利公开了一种使用甲壳素分解酶、葡聚糖分解酶和纤维素酶(它们是裂解酶)的酶杀真菌剂混合物。然而,裂解酶可破坏含有用作调理剂和增亮剂的酯、蛋白质(例如,角蛋白和肽毛发/皮肤状况)和/或碳水化合物(例如,树胶和其它增稠剂)的消费品配方。此外,生物防腐剂会随着时间的推移而变质,从而缩短产品的保质期。需要具有抗微生物(例如,杀菌和杀真菌)活性的试剂来避免这些问题。

发明内容

[0008] 本发明的一个目的是提供如本文所公开的可掺入待防腐产品中的防腐剂组合物。

[0009] 本发明的另一个目的是提供一种增加产品(如个人护理产品、家用产品、工业产品、食品、药品、化妆品、保健产品和船舶产品)的保质期的方法。

[0010] 本发明的另一个目的是提供具有改善的保质期的产品,如个人护理产品、家用产品、工业产品、食品、药品、化妆品、保健产品和船舶产品。

[0011] 本发明的另一个目的是提供一种从工业过程或反应混合物中去除酶的方法,该方法经由改变由酶催化的反应的pH,通过使工业酶以聚合物结合的形式沉淀,将被工业酶修饰的感兴趣的蛋白质或肽留在溶液中。这有助于从反应性酶中容易地回收和纯化感兴趣的蛋白质或肽。

[0012] 本发明的另一个目的是提供一种通过掺入交联酶制备抗微生物性能装置(如在伤口护理和绷带中发现的那些装置)的方法。

[0013] 本文公开了可掺入待防腐产品中的防腐剂组合物。所公开的组合物包括固定或缀合在聚合物载体结构上的酶,如最初作为酶原分泌的酶。酶原类的酶的实例包括但不限于水解酶、蛋白酶、裂解酶和交联酶。在一个实施例中,组合物包含固定或缀合(例如,共价结合)到聚合物载体的交联酶或另一酶原类的酶,其可在商业上相关的时间范围内提高酶的保质期,例如保持催化活性,和/或在延长的储存期内保护酶免于自交联和/或变质(例如,催化活性降低)。在一个实施例中,酶是交联酶或来自另一类酶原酶的酶。例如,酶可以通过使感兴趣的分子与蛋白质交联或结合(例如,小分子、蛋白质或肽与另一种蛋白质的缀合)来使蛋白质上的氨基酸残基反应。在一个实施例中,交联酶或其它酶原类酶经由连接基共价结合于聚合物载体,例如壳聚糖。在另一实施例中,将交联酶或其它酶原类酶固定在聚合物载体上,例如直接共价结合至聚合物载体上而不使用连接基。在一些实施例中,聚合物是生物聚合物。在一些实施例中,聚合物是杀生物聚合物,例如但不限于壳聚糖或羧甲基壳聚糖。在一些实施例中,组合物包括一种或多种酶,如交联酶、水解酶、蛋白酶和/或裂解酶,其以抑制(减少或消除)待防腐产品中微生物(例如,细菌)生长的有效量固定在本文公开的聚合物载体上。

[0014] 还公开了一种增加产品(如个人护理产品、家用产品、工业产品、食品、药品、化妆品、保健和船舶产品)的保质期的方法,包括将有效量的本文公开的组合物掺入产品或包含产品的配方或组合物中。在一些实施例中,除了本文公开的酶/聚合物组合物之外,产品不包括任何其它防腐剂物质或组合物。在一些实施例中,除了本文公开的酶/聚合物组合物之外,产品还包括至少一种其它防腐剂物质或组合物。在一些实施例中,产物不包括甲醛或戊二醛作为防腐剂。在一些实施例中,除了本文公开的酶/聚合物组合物之外,产品包括至少一种其它防腐剂物质或组合物,其不是甲醛或戊二醛。在一些实施例中,当与不掺入组合物的相同产品相比时,掺入组合物的产品的保质期增加。

[0015] 还公开了产品,如个人护理产品、家用产品、工业食品、药品、化妆品、保健品、船舶、油漆、涂料或能源产品,或包括该产品的配方或组合物,其包括有效量的本文公开的组合物,并且当与不包括另外添加的防腐剂的产品的保质期相比时或当与不包括该组合物的相同产品相比时,其保质期得到改善。

[0016] 在一些实施例中,如本文公开的固定或缀合酶的聚合物可以将感兴趣的分子结合至蛋白质。非限制性实例包括:染料分子与蛋白质(如胶原蛋白、角蛋白或弹性蛋白)的结合;蛋白质或肽与另一种蛋白质(如胶原蛋白、角蛋白或弹性蛋白)的结合;以及药品(药物)

分子与蛋白质的结合,例如,形成抗体药物偶联;物。

[0017] 在一个方面,提供了防腐剂组合物,其包括固定在聚合物载体结构上或封装在聚合物载体结构内的一种或多种酶原类酶。例如,酶可以选自水解酶、蛋白酶、裂解酶和交联酶或其组合。在一个实施例中,酶是交联酶,如转谷氨酰胺酶、漆酶、过氧化物酶、转移酶、赖氨酰氧化酶或酪氨酸酶。在一些实施例中,聚合物载体结构包括杀生物聚合物。在一个实施例中,聚合物是可逆溶解的。酶可以共价结合至聚合物,如经由连接基。在一些实施例中,聚合物是珠的形式,如微珠。在实施例中,聚合物是生物可降解的聚合物珠的形式,如生物可降解的微珠。在一些实施例中,酶被封装在聚合物中。在一些实施例中,聚合物选自甲壳素、壳聚糖、羧甲基壳聚糖、聚赖氨酸、纤维素、季铵纤维素、藻酸盐、果胶和羧基纤维素或其组合。

[0018] 在另一方面,提供了用于增加产品的保质期的方法,其包括将酶原类酶以与不包括酶的相同产品相比有效防止或减少一种或多种微生物生长的量掺入产品中。例如,酶可以选自水解酶、蛋白酶、裂解酶和交联酶或其组合。在一个实施例中,酶是交联酶,如转谷氨酰胺酶、漆酶、过氧化物酶、转移酶、赖氨酰氧化酶或酪氨酸酶。

[0019] 在另一方面,提供了用于增加产品的保质期的方法,其包括将防腐剂组合物以与不包括组合物的相同产品相比有效防止或减少一种或多种微生物生长的量掺入产品中,防腐剂组合物包括固定在如本文描述的聚合物载体结构上或封装在其内的一种或多种酶原类酶。例如,酶可以选自水解酶、蛋白酶、裂解酶和交联酶或其组合。在一个实施例中,酶是交联酶,如转谷氨酰胺酶、漆酶、过氧化物酶、转移酶、赖氨酰氧化酶或酪氨酸酶。在一些实施例中,聚合物载体结构包括杀生物聚合物。在一个实施例中,聚合物是可逆溶解的。酶可以共价结合至聚合物,如经由连接基。在一些实施例中,聚合物是珠的形式,如微珠。在实施例中,聚合物是生物可降解的聚合物珠的形式,如生物可降解的微珠。在一些实施例中,酶被封装在聚合物中。在一些实施例中,聚合物选自甲壳素、壳聚糖、羧甲基壳聚糖、聚赖氨酸、纤维素、季铵纤维素、藻酸盐、果胶和羧基纤维素或其组合。

[0020] 在另一方面,提供了产品,其以与不包含酶的相同产品相比增加产品的保质期的有效量包括酶原类酶。例如,与不包含组合物的相同产品相比,酶的含量可有效防止或减少一种或多种微生物的生长。

[0021] 在一些实施例中,酶选自水解酶、蛋白酶、裂解酶和交联酶或其组合。在一个实施例中,酶是交联酶,如转谷氨酰胺酶、漆酶、过氧化物酶、转移酶、赖氨酰氧化酶或酪氨酸酶。

[0022] 在一些实施例中,聚合物载体结构包括杀生物聚合物。在一个实施例中,聚合物是可逆溶解的。酶可以共价结合至聚合物,如经由连接基。在一些实施例中,聚合物是珠的形式,如微珠。在实施例中,聚合物是生物可降解的聚合物珠的形式,如生物可降解的微珠。在一些实施例中,酶被封装在聚合物中。在一些实施例中,聚合物选自甲壳素、壳聚糖、羧甲基壳聚糖、聚赖氨酸、纤维素、季铵纤维素、藻酸盐、果胶和羧基纤维素或其组合。

[0023] 在一些实施例中,产品是个人护理产品、家用产品、工业产品、食品、药品、化妆品、保健品、船舶、油漆、涂料、能源、塑料、包装或农产品。例如,产品可以是选自条皂、液体皂、手部消毒剂、术前皮肤消毒剂、清洁擦拭物、消毒擦拭物、沐浴露、痤疮治疗产品、抗真菌尿布疹乳膏、抗真菌皮肤乳膏、洗发剂、调理剂、化妆品除臭剂、抗微生物霜、身体乳液、护手霜、局部霜、须后水、爽肤水、漱口水、牙膏和防晒乳液的个人护理产品。例如,产品可以是选

自伤口愈合软膏、乳膏和洗剂、伤口覆盖物、烧伤创面膏、绷带、胶带和消毒条的伤口护理产品。

[0024] 在一些实施例中,在28天的时间段内保持至少约90%的酶活性。在一些实施例中,在约4至约9的pH和约4℃至约40℃的温度下保持酶活性。在一些实施例中,在约pH 4至约pH9和约4℃至约40℃的温度下,微生物生长在28天的时间段内被抑制至少约80%。

[0025] 在一些实施例中,产品不包括任何其它防腐剂物质。在其它实施例中,产品包括至少一种其它防腐剂物质,例如但不限于至少一种石油化学衍生的防腐剂物质。

附图说明

[0026] 并入并构成本说明书一部分的附图绘示了所公开的方法和组合物的几个实施例,并且与描述一起用于解释所公开的方法和组合物的原理。

[0027] 图1示出了结合至聚合物载体的交联(或酰化)酶。所示的聚合物载体是壳聚糖(完全脱乙酰化形式)。

[0028] 图2示出了固定化酶用于经由赖氨酸、酪氨酸和谷氨酰胺氨基酸残基交联蛋白质的用途。

[0029] 图3示出了固定化酶用于经由赖氨酸、酪氨酸和谷氨酰胺氨基酸残基用货物(例如,共价连接货物,如小分子或聚合物)修饰蛋白质的用途。

[0030] 图4示出了如实例3描述的转谷氨酰胺酶—聚合物缀合物的稳定性。

[0031] 图5示出了如实例4描述的用游离单体封装酶的方法。

[0032] 图6A至6B示出了如实例5中描述的羧甲基壳聚糖封装的转谷氨酰胺酶的稳定性。

[0033] 图7示出了如实例6描述的用壳聚糖单体封装后的转谷氨酰胺酶活性。

[0034] 图8A至8B示出了如实例6描述的壳聚糖封装的转谷氨酰胺酶的稳定性。

[0035] 图9A示出了在 312mg L^{-1} (0.03%w/v) Curie Co mTG(黑色实线)存在下对枯草芽孢杆菌(*B.subtilis*)的生长抑制。灰色虚线仅示出培养基中的生长。

[0036] 图9B示出了在 880mg L^{-1} (0.088%w/v) Curie Co mTG(黑色实线)存在下对大肠杆菌(*E.coli*) (DH10b,克隆菌株)的生长抑制。灰色虚线仅示出培养基中的生长。

[0037] 图9C示出了在 880mg L^{-1} (或0.088%w/v) Curie Co mTG(黑色实线)存在下对白色念珠菌(*C.albicans*)的生长抑制。灰色虚线仅示出培养基中的生长。

[0038] 图9D示出了大肠杆菌ATCC 8739培养物在生长16小时后通过BacTiter Glow细胞活力测定(Promega)测定的最终细胞活力。发光信号是群体生存力的指示,因为它与活细胞产生的ATP的量成比例。酶是 440mg L^{-1} (或0.044%w/v) Curie Co mTG。壳聚糖是0.025%w/v。壳聚糖+酶是两者在相同浓度下的组合。

具体实施方式

[0039] 本文描述了杀生物酶、杀生物酶—聚合物缀合物和聚合物封装的杀生物酶。相对于未缀合或未封装的酶,酶—聚合物缀合物和封装的酶在pH 4.5(其是化妆品护肤应用的相关pH值范围)下在数月内表现出优异的稳定性。已经发现杀生物酶和该酶的突变形式表现出抗微生物特性。当将酶与已知的抗微生物聚合物混合时,酶和聚合物的抗微生物活性对抗微生物活性具有增强的效果。在宽范围的pH条件下,聚合物增强了酶的稳定性,从而延

长酶和酶的突变体形式的保质期,并因此增加了其中掺入酶的产品保质期。

[0040] I. 定义

[0041] 除非上下文明确规定,否则“一个/种(a/an)”和“所述(the)”包括复数引用,因此,除非明确相反地指出,否则如本文在说明书和权利要求中所使用的不定冠词“一个/种(a/an)”和“所述(the)”应当理解为是指“至少一个”。

[0042] 如本文在说明书和权利要求中所使用的,短语“和/或”应当理解为是指如此联合的要素中的“任一个或两个”,即,要素在一些情况下共同存在而在其它情况下分离存在。除了用“和/或”短语具体标识的要素,其它要素可以任选地存在,无论是与具体标识的那些要素相关还是不相关,除非明确相反地指出。因此,作为非限制性实例,当与开放式语言,如“包括”结合使用时,对“A和/或B”的引用在一个实施例中可以指代A而没有B(任选地包含除了B之外的要素);在另一个实施例中,指代B而没有A(任选地包含除了A之外的要素);在又一个实施例中,指代A和B两者(任选地包含其它要素);等等。

[0043] 如本文所使用的,术语“组合物”是指两种或更多种物质的组合,包括如本文所述的固定化酶(例如,防腐剂)组合物。

[0044] 如本文所使用的,术语“产品”是指具有特定用途的制剂、组合物或制品,其将用本文所述的固定化酶组合物防腐。

[0045] 如本文所使用的,“防腐剂”是添加到所述产品中以防止(在一段时间内)微生物生长或不良化学反应(如氧化)发生的试剂,化学反应破坏或变质产品,包括一种或多种效用的变质。

[0046] 如本文所使用的“封装”是指酶在基质中的截留或包封。基质可以是单独的聚合物或具有交联剂的聚合物,以将酶共价结合至聚合物或基质的多孔聚合物网络结构或含有酶的半透膜涂层。

[0047] 术语“缀合物”是指共价键、离子键或静电键,如酶与聚合物之间的键。

[0048] “可逆溶解性聚合物”是指可响应于环境中的可控刺激(例如但不限于pH或离子强度)而在溶液中从可溶性材料相转变为不溶性材料的聚合物。该转变过程可以在阶段之间重复循环。

[0049] 如本文所使用的“有效量”是指足以防止或抑制微生物生长的本文公开的防腐剂组合物的量(例如,最小抑制浓度(MIC))。本专利的防腐剂组合物具有抗革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌、酵母和/或霉菌的活性。

[0050] “保质期”是指物品(例如,如本文所述的产品)保持可用、适合消费或可销售的时间长度。

[0051] “家用产品”是除个人护理产品之外的将由个人消费者使用的产品。

[0052] “工业产品”是指在工业中使用的产品。

[0053] “润肤剂”是软化或缓解皮肤的外部施用的试剂,并且通常是本领域已知的并且列于药典中,如《药用辅料手册(Handbook of Pharmaceutical Excipients)》,第4版,医药出版社,2003。

[0054] “乳化剂”是表面活性物质,其促进一种液体在另一种液体中的悬浮并促进疏水和亲水物质(如油)和水的稳定混合物或乳液的形成。

[0055] “表面活性剂”是降低表面张力并由此增加组合物或产品的乳化、发泡、分散、铺展

和/或润湿性质的表面活性剂。

[0056] “珠”是指固体颗粒,其包含如本文描述的聚合物或由其组成。

[0057] “微珠”是指最大尺寸小于一毫米的珠。

[0058] “生物可降解的”是指能够被微生物(例如,细菌)或其它活生物体分解的物质。

[0059] 术语“氨基酸”指代含有与被称为 α -碳的碳结合的胺基和羧基的分子。合适的氨基酸包括但不限于天然存在的氨基酸的D-异构体和L-异构体,以及通过有机合成或其它代谢途径制备的非天然存在的氨基酸。在一些实施例中,单个“氨基酸”可能具有多个侧链部分,如每个延伸的脂肪族或芳香族主链支架可获得的。除非上下文另外明确指示,否则本文所使用的术语氨基酸旨在包含氨基酸类似物。

[0060] 术语“催化剂”是指化学作用剂,如分子或大分子结构,其加速化学反应发生的速度,其中一种或多种反应物转化为一种或多种产物,而催化剂本身不转化为产物,或者在化学反应完成时以其它方式改变或消耗。在催化剂参与一个化学反应后,由于催化剂未变化,所以其可以参与进一步的化学反应,从而作用于另外的反应物以产生另外的产物。为了加速化学反应,催化剂降低反应途径上的活化能垒,从而使所述反应在较冷的温度下发生,或在给定的温度下更快地发生。以这种方式,可以实现系统更快速地接近化学平衡。催化剂包括作为蛋白质催化剂的酶。

[0061] 术语“裂解物”是指含有细胞裂解产生的细胞内容物的混合物和/或溶液的液体。在一些实施例中,本文所描述的方法包括纯化细胞裂解物中的化学品或化学品混合物。在一些实施例中,所述方法包括纯化细胞裂解物中的氨基酸和/或蛋白质。

[0062] 术语“裂解”是指质膜和(如果存在的话)细胞的细胞壁的破裂,使得显著量的细胞内物质逃逸到细胞外空间。可以使用电化学、机械、渗透、热化或病毒手段进行裂解。在一些实施例中,本文所描述的方法包括对如本文所述的细胞或微生物进行裂解,以从生物反应器的内容物中分离化学品或化学品的混合物。在一些实施例中,方法包括对本文所述的细胞或微生物进行裂解,以从生物反应器或细胞生长培养基的内容物中分离氨基酸或氨基酸和/或蛋白质的混合物。

[0063] 如本文中在本说明书和权利要求中所使用的,“或”应被理解为具有与如上所定义的“和/或”的含义相同的含义。例如,当将列表中的项目分开时,“或”或“和/或”应被解释为包含性的,即,包含多个要素或要素列表中的至少一个要素、但是还包含多于一个要素,以及任选地其它未列出的项。只有明确地指示相反的用语,如“……中的仅一个”或“……中的恰好一个”或者在权利要求中使用“由……组成”将指代包含多个要素或要素列表中的恰好一个要素。一般而言,当之前有排他性术语,如“任一个”、“……之一”、“……中的仅一个”、或“……中的恰好一个”时,本文中使用的术语“或”应当仅被解释为指示排他性替代品(即,“一个或另一个、而不是两个”)。当在权利要求中使用“基本上由……组成”应当具有如在专利法领域中所使用的普通含义。

[0064] 术语“微生物(microorganism)”和“微生物(microbe)”是指微观的单细胞生命形式。

[0065] 如本文所使用,“多肽”是指由氨基酸组成且被本领域技术人员识别为蛋白质的组合物。本文使用用于氨基酸残基的常规的单字母或三字母代码。术语“多肽”和“蛋白质”在本文中可互换地用于指代任何长度的氨基酸聚合物。聚合物可以是直链或支链的,它可以

包括经修饰的氨基酸,并且它可以被非氨基酸中断。这些术语还涵盖天然地或通过干预修饰的氨基酸聚合物;例如,二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化或任何其它操作或修饰,如与标记组分的缀合。此外,所述定义内还包含的是例如含有一个或多个氨基酸类似物(包含例如非天然氨基酸等)以及本领域已知的其它修饰的多肽。

[0066] “任选的”或“任选地”是指随后描述的事件、情况或材料可以发生或可以不发生或存在,并且该描述包括其中事件、情况或材料发生或存在的情况和其中其不发生或不存在的状况。

[0067] 范围在本文中可表示为从“约”一个特定值,和/或至“约”另一特定值。当表达此类范围时,除非上下文另外明确指出,否则还明确预期和考虑公开了从一个特定值和/或到另一特定值的范围。类似地,当通过使用先行词“约”将值表示为近似值时,应理解,除非上下文另外明确指出,否则特定值形成应被认为公开的另一具体设想的实施例。将进一步理解的是,除非上下文另外明确指出,否则每个范围的端点相对于另一个端点是显著的,并且独立于另一个端点。应当理解,包含在明确公开的范围内的所有单个值和值的子范围也被具体考虑,并且应当被认为是公开的,除非上下文另有明确指示。最后,应当理解的是,所有范围都是指所列举的范围以及从第一端点(包括第一端点)到第二端点(包括第二端点)的单个数字的集合。在后一种状况下,应当理解,可选择任何单个数字作为该范围所涉及的数量、值或特征的一种形式。以此方式,范围描述了从第一端点(包括第一端点)到第二端点(包括第二端点)的一组数字或值,从该第二端点可选择该组的单个成员(即,单个数字)作为该范围所指的数量、值或特征。无论在特定状况下是否明确公开了这些实施例中的一些或全部,上述内容都适用。

[0068] 除非本文另外定义,否则结合本公开使用的科学和技术术语应具有本领域的普通技术人员通常理解的含义。此外,除非上下文另外要求,否则单数术语应包含复数含义并且复数术语应包含单数含义。通常根据本领域熟知的常规方法进行本公开的方法和技术。通常,与本文所述的生物化学、酶学、分子和细胞生物学、微生物学、遗传学和蛋白质和核酸化学和杂交学结合使用的术语表以及其技术是本领域熟知和常用的术语表和技术。除非另外说明,否则通常根据本领域熟知的常规方法以及如在本说明书通篇引用和讨论的各个一般和更具体的参考文献中所描述的方法进行本公开的方法和技术。

[0069] II. 组合物

[0070] 公开了组合物,例如,防腐剂组合物,其可以包括在待防腐的产品中或与其一起(例如,在其中或与之相关联)。所公开的组合物包括固定化酶,例如,交联酶(参见例如图1)。固定化酶可催化蛋白质上的氨基酸残基的反应,从而实现例如蛋白质交联或使感兴趣的分子与蛋白质结合(参见例如图2和3)。在一些实施例中,组合物包含一种或多种酶,例如,包含一种或多种交联酶或由一种或多种交联酶组成,其量可有效抑制待防腐产品中的微生物(例如,细菌)生长,例如,抑制微生物生长的80%至100%,或至少约80%、85%、90%、95%、98%或99%中的任一个。在一些实施例中,将一种或多种酶固定在载体上,该载体包含或由一种或多种聚合物(任选地为杀生物聚合物和/或生物聚合物)组成,任选地经由连接基,如本文所述。在一些实施例中,如本文所述,将一种或多种酶封装在聚合物(例如,杀生物聚合物和/或生物聚合物)中。在一些实施例中,聚合物包含壳聚糖或羧甲基壳聚糖或由壳聚糖或羧甲基壳聚糖组成。在一些实施例中,聚合物载体是珠的形式,例如,生物

可降解的珠,例如微珠。在一些实施例中,珠(例如,生物可降解珠,例如微珠)包含壳聚糖或羧甲基壳聚糖或由壳聚糖或羧甲基壳聚糖组成。

[0071] 防腐剂是添加到产品配方中的抗微生物成分,以通过抑制微生物污染物的生长和减少微生物污染物的量来维持产品的微生物安全性。美国药典公布了化妆品和个人护理产品中防腐剂可接受的微生物存活方案。这些试验包括USP 51 (抗微生物有效性试验)和USP 61 (微生物限度检查) (<https://www.fda.gov/files/about%20fda/published/Pharmaceutical-Microbiology-Manual.pdf>)。

[0072] 本文公开的防腐剂系统的有效性是基于针对多种微生物(例如,大肠杆菌DH10 β 、大肠杆菌ATCC 8739、枯草芽孢杆菌BGSC 1A976、白色念珠菌ATCC 10231,和/或巴西曲霉(*A. brasiliensis*) ATCC 16404)的MIC(最小抑制浓度)确定的。最小抑制浓度(MIC)定义为抑制微生物生长的抗微生物剂的最低浓度。微生物生长可以例如通过分光光度法(600nm处的光密度)或用细胞活力测定法(BacTiter Glo, Promega)测定。

[0073] 在一个实施例中,组合物包括活性酶,如酶原类酶,例如但不限于交联酶,其固定在例如共价结合或封装在聚合物载体上,如杀生物聚合物,例如但不限于壳聚糖或羧甲基壳聚糖,其可以提高酶的保质期,和/或保护酶在延长的储存期内免于自交联和/或变质。任选地,酶可以经由连接基共价结合至载体上。在一个实施例中,酶原类酶,如交联酶,经由连接基共价结合至聚合物载体,例如,生物聚合物,如壳聚糖或羧甲基壳聚糖。在另一实施例中,酶原类酶,如交联酶,共价结合至聚合物载体,例如,生物聚合物,如壳聚糖或羧甲基壳聚糖,而不使用连接基。

[0074] 在一个实施例中,酶是转谷氨酰胺酶(例如,茂原轮枝链霉菌(*Streptomyces mobaraensis*)转谷氨酰胺酶突变体S2P(例如,如Javitt等人(2017)《BMC生物技术(BMC Biotechnol.)》17:23)),其固定在壳聚糖或羧甲基壳聚糖上或封装在壳聚糖或羧甲基壳聚糖中。

[0075] A. 酶

[0076] 在一些实施例中,本文描述的组合物中使用的杀生物酶是最初作为酶原分泌的酶。酶原是无活性的酶前体(酶原),其以必须被切割以提供活性酶的前序列表达。前序列的切割提供了通常对细胞具有高毒性的活性酶。由于相关的酶对细胞的毒性,用可切割的前导序列表达酶原以抑制酶的活性。因此,酶原是一类有用的用作抗微生物剂的酶。成熟的活性酶形式(即,没有前序列)用于所公开的固定在聚合物载体(如壳聚糖或羧甲基壳聚糖)上的组合物中,用于制备杀生物防腐剂组合物。该类别中有用的酶包括但不限于水解酶、蛋白酶、核酸裂解酶和交联酶。

[0077] 交联酶的实例包括但不限于:转谷氨酰胺酶、漆酶、过氧化物酶、转移酶、赖氨酰氧化酶和酪氨酸酶。这些酶已经用于将有机小分子、肽、蛋白质、细胞和其它目的分子共价结合至聚合物或其它生物聚合物(如蛋白质或糖)支架上。

[0078] 优选的交联酶包括转谷氨酰胺酶、赖氨酰氧化酶和酪氨酸酶,它们在活性酶形式中表现出细胞毒性。由于它们的自交联活性,这些交联酶结合至聚合物载体,如壳聚糖或羧甲基壳聚糖上,以防止自毁并提高保质期。在一些实施例中,聚合物具有杀生物活性。壳聚糖和羧甲基壳聚糖具有已知的抗微生物(杀生物)特性。在一些实施例中,与酶或聚合物单独的杀生物作用相比,壳聚糖-酶组合物(例如,固定在壳聚糖上的杀生物酶)或固定在本

文公开的任何杀生物聚合物上的杀生物酶具有增强的抗菌作用。杀生物酶可以是本文公开的任何酶,如酶原类酶,例如交联酶。

[0079] 在不受理理论束缚的情况下,交联酶的使用通过提供额外的抗微生物作用机制来增强壳聚糖或其它杀生物载体的抗微生物特性。例如,壳聚糖使细胞膜破裂并导致细胞内容物溢出。交联酶可以在细胞表面和细胞内交联对细胞功能至关重要的蛋白质。这两种材料的组合减少了所需材料的数量,并且为酶提供了额外的稳定性,从而允许随时间推移的更大活性(更少的壳聚糖和更少的酶),并且减少了可能伴随使用杀生物的壳聚糖的不良影响。在配方中使用较高重量百分比的壳聚糖会导致产品配方呈酸性,因为只有质子化壳聚糖具有抗微生物特性。换言之,壳聚糖的较高重量组成与将多种质子化胺(在壳聚糖主链上)添加到其中添加壳聚糖的产品(例如个人护理产品)中相关。对于感官感觉或与现有产品配方的相容性来说,高度酸性的产品配方可能不是理想的。另外,配方中较高重量百分比的壳聚糖导致粘度增加,这对于产品配方来说也是不合需要的。添加第二杀生物剂,例如交联酶,将允许减少壳聚糖的量,同时仍保持杀生物特性。单独的酶可能足以提供防腐/抗微生物特性,然而,将酶固定在或封装在聚合物载体(如壳聚糖或羧甲基壳聚糖)中,增加了酶的保质期,使得产品配制者可以使用较少的酶来获得所需的防腐特性。

[0080] (i) 转谷氨酰胺酶

[0081] 转谷氨酰胺酶(Tgase)是一种酶,它催化蛋白质的游离氨基与蛋白质或肽结合的谷氨酰胺侧链末端的酰基之间形成异肽键。此类酶被归类为EC 2.3.2.13。转谷氨酰胺酶催化靶蛋白的谷氨酰基与赖氨酰基侧链之间的转酰胺基反应。催化反应通过谷氨酰胺脱氨和在酶的活性位点形成蛋白质—谷氨酰基—硫酯而进行。硫酯中间体羰基部分的第二种蛋白质的赖氨酰ε-氨基亲核攻击生成异肽交联的蛋白质,这些蛋白质在很大程度上抵抗常见肽酶的蛋白水解(Mariniello等人(2007)《农业与食品化学杂志(J Agr Food Chem.)》55:4717-4721.Mariniello L,Giosafatto CV,Di Pierro P,Sorrentino A,Porta R J Agric Food Chem.2007Jun 13;55(12):4717-21)。

[0082] 由Tgase形成的键表现出对蛋白水解降解(蛋白水解)的高抗性。已经在微生物、植物、无脊椎动物、两栖动物、鱼和鸟中发现了具有Tgase活性的蛋白质。已经表征了八种哺乳动物的Tgase.Griffin等人(2002)《生物化学杂志(Biochem J.)》368:377-396综述了在蛋白质水平表征的Tgase的实例。与真核Tgase相反,来自微生物来源的Tgase是钙非依赖性的,这代表了它们实际应用的主要优点。

[0083] 在一些实施例中,转谷氨酰胺酶是微生物转谷氨酰胺酶,例如茂原轮枝链霉菌变体的非Ca²⁺依赖性微生物转谷氨酰胺酶(MTGase)。在一些特别优选的实施例中,Tgase是微生物Tgase,优选地是茂原轮枝链霉菌变体的非Ca²⁺依赖性微生物转谷氨酰胺酶(MTGase)。在一些特别优选的实施例中,Tgase是茂原轮枝链霉菌Tgase的更稳定的突变变体,如S2P-Tgase(Javitt等人(2017)《BMC生物技术(BMC Biotechnol.)》17:23)。明确定义的原核Tgase示于表1中,转载自Zhang等人(2010)《生物技术和基因工程评论(Biotechnol.Genet.Eng.Rev.)》26:205-222,由Steffen等人(2017)《生物化学杂志(J.Biol.)Chem.》292(38):15622-15635补充。

[0084] 表1.明确定义的原核Tgase

年份	菌株	发展重点	收率 (单位/ml) ^a
1989	茂原轮链丝菌	菌株隔离	~2.0
1996	茂原轮链丝菌	底物优化	~1.0
1997	肉桂链霉菌	底物优化	~0.3
1998	茂原轮链丝菌	代谢优化	~1.8
2000	马杜拉放线菌属种 (<i>Actinomadura</i> sp.)	菌株隔离	不适用
2001	茂原轮链丝菌	环境控制策略	3.37
2002	茂原轮链丝菌	环境控制策略	2.94
2002	茂原轮链丝菌	环境控制策略	3.40
2004	拉达卡链轮丝菌 (<i>Streptoverticillium</i> <i>ladakanum</i>)	菌株隔离	0.348
[0085] 2004	茂原轮链丝菌	底物优化	0.725
2005	茂原轮链丝菌	环境控制策略	3.32
2006	环状芽孢杆菌 (<i>Bacillus circulans</i>)	菌株隔离和底物优化	0.306
2007	链霉菌属	菌株隔离和底物优化	1.4
2007	吸水链霉菌 (<i>Streptomyces</i> <i>hygroscopicus</i>)	菌株隔离和环境控制策略	5.04
2008	几种链霉菌属	固体发酵	不适用
2009	吸水链霉菌 (<i>Streptomyces</i> <i>hygroscopicus</i>)	发酵策略	5.79
2017	白色库茨涅尔氏菌 (<i>Kutzneria albida</i>)	底物优化	不适用

[0086] ^an/a=不适用

[0087] 已将公认为安全 (GRAS) 的状态指定给来自 *S.mobaraensis* 的用于海鲜、肉类、乳制品和谷物产品中的蛋白质交联的转谷氨酰胺酶制剂 (FDA/CFSAN 机构答复函件: GRAS 通知号 000004 (1998), 000029 (1999), 000055 (2001), 和 000095 (2002))。市售微生物转谷氨酰胺酶由味之素美国公司 (Ajinomoto US, Inc.) 以商品名 **ACTIVA®** 大规模生产和销售。

[0088] (ii) 赖氨酰氧化酶

[0089] 赖氨酰氧化酶 (LOX) (也称为蛋白质—赖氨酸6—氧化酶) 是将伯胺底物氧化成反应性醛的铜依赖性酶。已经在哺乳动物中鉴定了五种不同的 LOX 酶, LOX 和 LOX 样 (LOXL) 1 至 4, 显示出高度保守的催化羧基末端结构域和在序列的其余部分中更多的差异。另外, 不仅在动物中, 而且在许多其它真核生物中, 以及在细菌和古细菌 (archaea) 中也鉴定出 LOX 蛋白, Grau-Bove 等人在。(2015)《科学报告 (Scientific Report) 5》: 文章编号: 10568 对此进行了综述。

[0090] (iii) 酪氨酸酶

[0091] 酪氨酸酶 (EC 1.14.18.1), 通常被称为负责水果和蔬菜的酶促褐变的酶, 已被证明诱导乳清蛋白 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的交联。已经从多种植物、动物和真菌物种中分离并研究了酪氨酸酶。

[0092] 最熟知和表征的酪氨酸酶是哺乳动物来源的。从结构和功能的观点来看, 最广泛研究的真菌酪氨酸酶来自双孢蘑菇 (*Agaricus bisporus*) (Wichers 等人, 1996) 和粗糙链孢

霉(*Neurospora crassa*) (Lerch, 1983)。还报道了几种细菌酪氨酸酶,其中链霉菌属酪氨酸酶是最彻底表征的(美国专利第5,801,047和5,814,495号)。另外,已经公开了酪氨酸酶,例如来自芽孢杆菌属(*Bacillus*)和漆斑菌属(*Myrothecium*) (EP 919 628)、毛霉属(*Mucor*) (JP61115488)、绿球藻属(*Miriococcum*) (JP 60062980)、曲霉菌属(*Aspergillus*)、毛癣菌属(*Chaetotomastia*)和子囊阴道孢菌属(*Ascovaginospora*) (Abdel-Raheem和Shearer, 2002)和栓菌属(*Trametes*) (Tomsofsky和Homolka, 2004)。

[0093] (iv) 漆酶

[0094] 漆酶是在植物、真菌和细菌中发现的多铜氧化酶,其氧化酚底物,进行单电子氧化,导致交联。通过漆酶交联蛋白质的方法已公开于例如US2002/009770中。来源于豆类、谷类和动物蛋白的植物蛋白,包括奶、蛋、肉、血和腱被列为合适的底物。真菌漆酶公开于US2002/019038中。

[0095] B. 聚合物载体

[0096] 本文描述的组合物包括聚合物载体。如本文描述的杀生物酶固定在载体上,通过或不通过连接基,或封装在聚合物载体内,如可逆溶解性聚合物,包括但不限于壳聚糖、羧甲基壳聚糖或聚赖氨酸。在一些实施例中,聚合物是杀生物聚合物。聚合物载体的非限制性实例包括:甲壳素、壳聚糖、羧甲基壳聚糖、氧化纤维素、季铵纤维素、藻酸盐、果胶和羧基纤维素。优选的载体是杀生物聚合物,其非限制性实例示于表2中。

[0097] 表2. 用于抗微生物应用的杀生物聚合物的实例

	聚合物	靶标	备注
	季铵聚乙烯亚胺	革兰氏阳性和革兰氏阴性菌	<i>n</i> -烷基化聚乙烯亚胺具有有效的抗微生物活性,这取决于疏水性和带正电荷的固定化长聚合物链
	季磷改性环氧化天然橡胶	金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>), 大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)	微生物中度生长抑制
	富精氨酸-色氨酸肽	革兰氏阳性和革兰氏阴性菌	保留抗微生物功能至少 21 天,细胞毒性可忽略不计
[0098]	胍基化聚甲基丙烯酸酯	表皮葡萄球菌 (<i>Staphylococcus epidermidis</i>), 白色念珠菌 (<i>Candida albicans</i>)	胍共聚物与胺类似物相比活性高得多。
	壳聚糖	细菌, 酵母, 真菌	单独或与其它化合物混合的广泛使用的抗微生物剂
	甲基丙烯酸乙基铵均聚物	耐甲氧西林金黄色葡萄球菌, 大肠杆菌	溶血活性很小或没有溶血活性, 对革兰氏阳性菌的抑制作用高于对革兰氏阴性菌的抑制作用
	金属三联吡啶羧甲基纤维素	金黄色葡萄球菌, 嗜热链球菌 (<i>Streptococcus thermophilus</i>), 大肠杆菌, 酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	最小抑制浓度范围为 6 至 8 mg/L, 达到 ≥90%的抑制效果
	聚(<i>n</i> -乙烯基咪唑)改性硅橡胶	铜绿假单胞菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>), 金黄色葡萄球菌	对铜绿假单胞菌的抗菌活性高于对金黄色葡萄球菌的抗菌活性

[0099] 在一个实施例中, 聚合物载体是杀生物的生物聚合物, 如壳聚糖或羧甲基壳聚糖。在一些实施例中, 将酶固定在颗粒上, 例如壳聚糖颗粒, 如珠, 例如壳聚糖珠 (例如, 微珠) 或纳米颗粒。例如, 珠 (例如, 微珠) 可以是生物可降解的。在一些实施例中, 酶可以通过用游离单体 (例如, 壳聚糖或羧甲基壳聚糖单体) 封装来固定, 例如, 利用连接基。

[0100] 壳聚糖是葡萄糖胺和N-乙酰葡萄糖胺单元的线性氨基多糖, 并且通过从甲壳类动物 (如虾和螃蟹) 的外骨骼以及从一些真菌的细胞壁提取的甲壳素的碱性脱乙酰化获得。甲壳素是(1→4)-连接的2-乙酰胺基-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖 (GlcNAc; A-单元) 的线性聚合物, 其不溶于水性溶剂。它还具有与纤维素的许多结构相似性, 如单体的构象和平伏糖苷键。壳聚糖可以被认为是(1→4)-连接的A-单元和2-氨基-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖 (GlcN, D-单元) 的线性二元共聚物家族。

[0101] 羧甲基壳聚糖 (例如, 真菌来源的), 例如, N,O-羧甲基壳聚糖, >80% 被羧基取代。

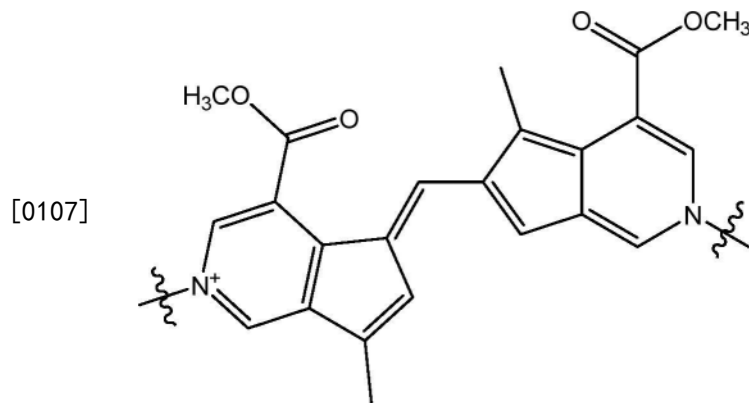
[0102] 含有季铵的生物聚合物, 如壳聚糖及其更乙酰化的形式的甲壳素, 由于它们的抗微生物活性而为人所熟知 (等人, (2010) 《国际食品微生物学杂志 (Int. J. of Food Microbiol.)》144:51-63)。甲壳素、壳聚糖及其衍生物对不同微生物群 (如细菌、酵母和真菌) 的抗微生物活性是已知的。

[0103] 甲壳素、壳聚糖和其它相关聚合物是固定酶的优异支架 (Muzzarelli (1980)《酶与微生物技术 (Enzyme Microb. Technol.)》2:177-184)。已经将酪氨酸酶固定在壳聚糖上用于工业废物的脱酚 (Dinçer 等人, (2012)《国际生物大分子期刊 (Int. J. Biol. Macromol.)》50:815-820) 和用于酚类化合物的光学检测 (Abdullah 等人 (2006)《传感器和致动器B:化学产品 (Sensors and Actuators B: Chemical)》114:604-609)。在这些实例中,酪氨酸酶在没有连接基的情况下直接连接到壳聚糖载体上,或者使用戊二醛作为连接基将酶固定在壳聚糖上。另外,已经探索了酪氨酸酶-壳聚糖生物催化剂用于生产L-DOPA (Carvalho 等人,《应用生物化学及生物技术 (Appl. Biochem. Biotechnol.)》(2000) 84-86:791-800)。已经使用戊二醛作为连接基将微生物转谷氨酰胺酶固定在壳聚糖上,用于食品蛋白质的脱酰胺化 (Nonaka 等人, (1996)《生物科学、生物技术和生物化学 (Biosci, Biotechnol, and Biochem.)》60:532-533),使用壳聚糖的微珠形式Chitopearl 3007作为聚合物载体,戊二醛作为连接基。在美国专利第7,910,344号中公开了可从木霉属 (*Trichoderma*) 获得的细胞外酪氨酸酶以及通过重组技术生产它们的方法。

[0104] 聚合物载体的实例提供于例如Nonaka等人, (1996)《生物科学、生物技术和生物化学 (Biosci, Biotechnol, and Biochem.)》60:532-533和Hayashi, T等人 (1991)《应用聚合物科学杂志 (J Appl Polymer Sci)》42:85-92,其通过引用整体并入本文。

[0105] C. 连接基

[0106] 在一些实施例中,本文公开的酶经由化学连接基固定在聚合物上,例如,杀生物聚合物,如杀生物生物聚合物,例如壳聚糖,化学连接基将酶共价连接至聚合物。在一些实施例中,连接基为亚烷基 (例如,亚甲基)、二亚胺 (1,5-二亚胺)、二胺 (1,5-二胺)、二羰基 (例如,1,4-二羰基)、酰胺键、多肽、烷基连接基,或含有苯基、稠合杂环或芳族基团,如:



[0108] 可用于提供连接基的试剂的实例包括但不限于:甲醛、戊二醛、琥珀酸酐、酚类化合物、京尼平、碳二亚胺试剂、蛋白质或肽 (例如,玉米蛋白、明胶、胶原)。

[0109] 在一些实施例中,连接试剂是京尼平、表氯醇、甲醛或戊二醛。(参见图1) 在优选的实施例中,连接试剂是戊二醛。

[0110] 在一个实施例中,酶共价连接至载体 (聚合物载体),而不使用连接基。

[0111] III. 产品

[0112] 本文公开的产品包括个人护理产品、家用产品、工业食品、药品、化妆品、保健品、船舶、油漆、涂料或能源产品,其包括有效量 (例如,约0.0001%w/v至约5%w/v) 的所公开的酶 (例如,酶原类酶,如交联或裂解酶或本文公开的其它酶,例如杀生物酶) 或组合物 (例如,

酶原类酶,如交联或裂解酶或本文公开的其它酶,例如杀生物酶,其固定在或封装在聚合物(如生物聚合物和/或杀生物聚合物)中)以在产品中充当抗微生物剂,例如防腐剂。

[0113] 在一些实施例中,本文公开的酶或酶/聚合物组合物作为抗微生物剂以至少约0.0001%w/v、0.0005%w/v、0.001%w/v、0.005%w/v、0.01%w/v、0.05%w/v、0.1%w/v、0.5%w/v、1%w/v、1.5%w/v、2%w/v、2.5%w/v、3%w/v、3.5%w/v、4%w/v、4.5%w/v或5%w/v中任一个的浓度包括在本文公开的任何产品中。在一些实施例中,酶或酶/聚合物组合物以约0.0001%w/v至约0.0005%w/v、约0.001%w/v至约0.005%w/v,约0.005%w/v至约0.01%w/v,约0.01%w/v至约0.05%w/v,约0.05%w/v至约0.1%w/v,约0.1%w/v至约0.5%w/v、约0.5%w/v至约1%w/v、约1%w/v至约1.5%w/v、约1.5%w/v至约2%w/v,约2%w/v至约2.5%w/v,约2.5%w/v至约3%w/v,约3%w/v至约3.5%w/v、约3.5%w/v至约4%w/v,约4%w/v至约4.5%w/v、约4.5%w/v至约5%w/v,约0.0001%w/v至约0.001%w/v、约0.001%w/v至约0.01%w/v、约0.01%w/v至约0.1%w/v、约0.1%w/v至约1%w/v、约1%w/v至约2.5%w/v、约2.5%w/v至约5%w/v或约1%w/v至约5%w/v中的任一种的浓度包括。

[0114] 在一些实施例中,其中包括本文描述的酶或酶/聚合物组合物作为抗微生物剂的产品不包括石油化学衍生的防腐剂物质,例如但不限于对羟基苯甲酸酯、甲醛和甲醛释放剂、异噻唑啉酮、苯氧乙醇和/或有机酸(如苯甲酸钠)。在一些实施例中,杀生物酶(例如,交联酶或裂解酶)单独或与杀生物聚合物(例如,壳聚糖)组合是产品中唯一的抗微生物剂(例如,抗菌剂或防腐剂)。在一些实施例中,本文描述的酶(例如,酶原类酶,如交联酶或裂解酶或本文公开的其它酶,例如,杀生物酶)作为抗微生物剂与一种或多种另外的抗微生物剂(例如但不限于,一种或多种石油化学衍生的防腐剂物质)组合包括在内。在一些实施例中,本文描述的组合物(例如,酶原类酶,如交联酶或裂解酶或本文公开的其它酶,例如,杀生物酶,固定在或封装在聚合物(如生物聚合物和/或杀生物聚合物)中,例如但不限于壳聚糖)作为抗微生物剂与一种或多种另外的抗微生物剂(例如但不限于一种或多种石油化学衍生的防腐剂物质)组合包括在内。

[0115] 本文公开的产品还包括工业生物催化产品,其包括有效地从反应混合物(如工业过程)中去除或灭活生物催化剂或生物催化活性的量的公开的组合物(例如,充当用于从工业化学反应中去除酶的纯化手柄)。为了减少生物制造的时间和成本,使用生物催化剂进行化学或生物制造的行业对“智能”生物催化酶固定技术感兴趣。酶固定化平台的特征在于可逆溶解度,其允许催化剂在低pH条件下用于均相催化或中性或高pH条件下进行非均相催化(连续流动)。这允许比目前使用的传统固体载体和固定技术更多的通用性。这些类型的刺激响应性固定化酶被称为“智能生物催化剂”;然而,由于缺乏商业可用性,它们在工业中的应用受到限制。本文描述的酶固定化平台将降低与纯化蛋白质产品相关的成本和时间并促进催化剂的回收。

[0116] 本文描述的组合物提供将酶固定在可逆溶解的聚合物(如可逆溶解的生物聚合物,例如壳聚糖)上的能力,以将生产流水线化为生物制造中的纯化方案。壳聚糖在pH变化时在水中表现出可逆的溶解性(在pH值低于6.5时可溶,在pH值高于6.5时不溶)。固定化酶通常在非均相条件下使用(酶保留在固相中,在反应条件下不溶),因为大多数载体是衍生自石油化学品的不溶性有机树脂。这些反应受到不良传质的困扰,并导致较慢的反应速率和降低的产物产率。本文描述了固定化平台,其可以在均相条件(其中酶可以存在于液相中,

在反应条件下可溶)下使用并且快速沉淀以除去和再循环生物催化剂。具体地,用聚合物“标记”酶以在pH轻微变化时控制溶解度。这允许快速猝灭反应而不使用过量的热或抗溶剂来除去酶,这损害了所需反应产品(例如,蛋白质产品)的完整性并增加废物体积,导致更高的制造费用。

[0117] A. 个人护理产品

[0118] 本文描述的酶或组合物(例如,防腐剂组合物)可掺入任何个人护理产品中。可将所公开的组合物掺入其中的个人护理产品包括但不限于条皂、液体皂(例如,洗手皂)、手部消毒剂(包括洗去型和免洗型醇基和水基手部消毒剂)、术前皮肤消毒剂、清洁擦拭物、消毒擦拭物、沐浴露、痤疮治疗产品、抗真菌尿布疹霜、抗真菌护肤霜、洗发剂、调理剂、化妆品(包括但不限于液体或粉末粉底、液体或固体眼线膏、睫毛膏、乳霜眼影、着色粉末、待干燥或润湿使用的“薄饼”型粉末、卸妆产品等)、除臭剂、抗微生物霜、身体乳液、护手霜、局部霜、须后水、爽肤水、漱口水、牙膏、防晒乳液和婴儿产品,例如但不限于清洁擦拭物、婴儿洗发剂、婴儿肥皂和尿布霜。本主题还可应用于伤口护理物品,例如但不限于伤口愈合软膏、乳膏和洗剂、伤口覆盖物、烧伤创面膏、绷带、胶带和消毒条,以及医疗制品,如医用长袍、帽子、面罩和鞋套、外科滴剂等。另外的个人护理产品包括但不限于口腔产品,如漱口水、牙膏、牙线涂料、兽医和宠物护理产品、防腐剂组合物和表面消毒剂,包括溶液、喷雾剂或擦拭物。

[0119] 个人护理产品配方通常包括添加了本公开的防腐剂组合物的基础配方。基础配方可以含有许多不同的成分,这取决于最终应用。个人护理产品配方例如可以含有溶剂、表面活性剂、乳化剂、稠度因子、调理剂、润肤剂、护肤成分、保湿剂、增稠剂、润滑剂、填充剂、抗氧化剂、其它防腐剂、活性成分,特别是皮肤病学活性成分、香料等,以及其混合物。本文提及的活性成分包括,例如,抗炎剂,和任选地,抗菌剂、抗真菌剂等。特别优选适用于局部施用的活性成分。

[0120] 在一些实施例中,个人护理产品不包含任何另外的防腐剂,如石油化学衍生的防腐剂物质。在一些实施例中,除了本文描述的酶或酶/聚合物组合物之外,个人护理产品还包括一种或多种另外的防腐剂物质,如石油化学衍生的防腐剂。

[0121] 在一些实施例中,个人护理产品不包括通常包括在个人护理产品中的常规抗菌和/或抗真菌“活性剂”。洗手皂中使用的常规抗菌剂包括:氯氟烃、氟柳胺、六氯酚、己基间苯二酚、碘络合物(铵醚硫酸盐和聚氧乙烯脱水山梨醇单月桂酸酯)、碘络合物(烷基芳氧基聚乙二醇的磷酸酯)、壬基苯氧基聚(乙烯氧基)乙醇碘、泊洛沙姆—碘络合物、聚维酮、氯化十一烷基碘络合物、甲基苄索氯铵、苯酚、苯酚16、仲戊基三甲酚、氧氯苯磺酸钠、三溴沙仑、三氯卡班、三氯生和三重染料。在消费产品配方中用作防腐剂的常规抗微生物剂包括:对羟基苯甲酸酯、甲醛和甲醛释放剂、异噻唑啉酮、苯氧乙醇和有机酸(如苯甲酸钠)。

[0122] 在一些实施例中,杀生物酶(例如,酶原类酶,如交联或裂解酶)单独或与聚合物(例如,杀生物聚合物,例如但不限于壳聚糖)组合(例如,固定在其上或封装在其中)是产品中唯一的抗细菌剂、抗真菌剂、抗微生物剂或防腐剂。在一些实施例中,杀生物酶(例如,酶原类酶,如交联或裂解酶)单独或与聚合物(例如,杀生物聚合物,例如但不限于壳聚糖)组合(例如,固定在其上或封装在其中),与一种或多种另外的防腐剂物质(如一种或多种石油化学衍生的防腐剂物质)组合。在一些实施例中,将一种或多种生物基防腐剂(即,如本文公

开的酶或酶/聚合物组合物)与一种或多种合成防腐剂(例如,石油化学衍生的物质)组合,并且在生物基和合成防腐剂之间实现的防腐剂(例如,抗微生物剂)效果是累加的或协同的。在一些实施例中,一种或多种生物基防腐剂(即,如本文所公开的酶或酶/聚合物组合物)与一种或多种另外的防腐剂物质(例如,选自聚赖氨酸、壳聚糖、苯甲酸盐、乳酸链球菌肽、溶菌酶和壳聚糖或其任何组合的杀生物物质)组合,并且在生物基防腐剂与另外的防腐剂物质之间实现的防腐剂(例如,抗微生物剂)效果是累加的或协同的。

[0123] 在一些实施例中,个人护理产品可以包括润肤剂。润肤剂包括但不限于杏仁油、蓖麻油、角豆胶提取物、鲸蜡硬脂酰醇、鲸蜡醇、鲸蜡酯蜡、胆固醇、棉籽油、环甲基硅酮、棕榈酸硬脂酸乙二醇酯、甘油、单硬脂酸甘油酯、单油酸甘油酯、肉豆蔻酸异丙酯、棕榈酸异丙酯、羊毛脂、卵磷脂、轻质矿物油、中链甘油三酯、矿物油和羊毛脂醇、凡士林、矿脂和羊毛脂醇、大豆油、淀粉、硬脂醇、向日葵油、木糖醇及其组合。在一个实施例中,润肤剂是硬脂酸乙基己酯和棕榈酸乙基己酯。

[0124] 常用乳化剂是:金属皂、某些动物和植物油,和各种极性化合物。合适的乳化剂包括阿拉伯胶、阴离子乳化蜡、硬脂酸钙、卡波姆、鲸蜡硬脂醇、鲸蜡醇、胆固醇、二乙醇胺、棕榈硬脂酸乙二醇酯、单硬脂酸甘油酯、单油酸甘油酯、羟丙基纤维素、羟丙甲纤维素、羊毛脂、含水羊毛脂醇、卵磷脂、中链甘油三酯、甲基纤维素、矿物油和羊毛脂醇、磷酸二氢钠、单乙醇胺、非离子乳化蜡、油酸、泊洛沙姆、泊洛沙姆、聚氧乙烯烷基醚、聚氧乙烯蓖麻油衍生物、聚氧乙烯脱水山梨醇脂肪酸酯、聚氧乙烯硬脂酸酯、丙二醇藻酸酯、自乳化单硬脂酸甘油酯、脱水柠檬酸钠、十二烷基硫酸钠、脱水山梨醇酯、硬脂酸、向日葵油、黄芪胶、三乙醇胺、黄原胶及其组合。在一个实施例中,乳化剂是硬脂酸甘油酯。

[0125] 合适的非离子表面活性剂包括乳化蜡、单油酸甘油酯、聚氧乙烯烷基醚、聚氧乙烯蓖麻油衍生物、聚山梨醇酯、脱水山梨醇酯、苜蓿醇、苯甲酸苜蓿酯、环糊精、单硬脂酸甘油酯、泊洛沙姆、聚维酮及其组合。在一个实施例中,非离子表面活性剂是硬脂醇。

[0126] 合适的抗氧化剂包括例如亚硫酸盐(例如,亚硫酸钠)、生育酚或其衍生物、抗坏血酸或其衍生物、柠檬酸、没食子酸丙酯、壳聚糖乙醇酸酯、半胱氨酸、N-乙酰基半胱氨酸加硫酸锌、硫代硫酸盐(例如,硫代硫酸钠)、多酚谷胱甘肽、二硫苏糖醇(DTT)、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶等。

[0127] 还可以包括螯合剂,如乙二胺四乙酸(EDTA)。

[0128] 合适的增稠剂包括例如丙烯酸酯/硬脂基聚氧乙烯醚-20甲基丙烯酸酯共聚物、卡波姆、羧甲基淀粉、白蜂蜡、聚二甲基硅氧烷/乙烯基聚二甲基硅氧烷交联聚合物、藻酸丙二醇酯、羟乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、二氧化硅、二氧化硅二甲基甲硅烷基化物、黄原胶和氢化丁烯/乙烯/苯乙烯共聚物。

[0129] 合适的保湿剂包括例如丁二醇、鲸蜡醇、二甲聚硅氧烷、酒石酸二肉豆蔻酯、葡萄糖甘油酯-26、甘油、硬脂酸甘油酯、水解乳蛋白、乳酸、乳糖和其它糖、月桂醇聚醚-8、卵磷脂、辛氧基甘油、PEG-12、PEG 135、PEG-150、PEG-20、PEG-8、戊二醇、己二醇、植烷三醇、聚季铵盐-39PPG-20甲基葡萄糖醚、丙二醇、透明质酸钠、乳酸钠、PCA钠、山梨醇、琥珀酰聚糖、合成蜂蜡、柠檬酸三-C14-15烷基酯和淀粉。

[0130] B.家用/工业产品

[0131] 可掺入所公开的酶或酶/聚合物组合物作为防腐剂物质(单独或与一种或多种另

外的防腐剂物质(如一种或多种石油化学衍生的防腐剂物质)组合)的家用/工业产品的非限制性实施例包括但不限于家用清洁剂,如浓缩液体清洁剂和喷雾清洁剂、清洁擦拭物、餐具洗涤液、餐具清洁剂、喷雾—摩丝液、家具上光剂、室内油漆、室外油漆、喷粉喷雾、衣物洗涤剂、织物软化剂、地毯/织物清洁剂、窗户和玻璃清洁剂、抽水马桶清洁剂、液体/乳膏清洁剂等。在具体实施例中,本文描述的组合物可用于食品洗涤产品,例如设计成在食用前清洁水果和蔬菜。“家用产品”是除个人护理产品外,可供个人消费者使用的产品。“工业产品”是指在工业中使用的产品。

[0132] 在一些实施例中,杀生物酶(例如酶原类酶,如交联或裂解酶)单独或与聚合物(例如,杀生物聚合物,例如但不限于壳聚糖)组合(例如,固定在其上或封装在其中),与一种或多种另外的防腐剂物质(如一种或多种石油化学衍生的防腐剂物质)组合。在一些实施例中,将一种或多种生物基防腐剂(即,如本文公开的酶或酶/聚合物组合物)与一种或多种合成防腐剂(例如,石油化学衍生的物质)组合,并且在生物基和合成防腐剂之间实现的防腐剂(例如,抗微生物剂)效果是累加的或协同的。在一些实施例中,一种或多种生物基防腐剂(即,如本文所公开的酶或酶/聚合物组合物)与一种或多种另外的防腐剂物质(例如,选自聚赖氨酸、壳聚糖、苯甲酸盐、乳酸链球菌肽、溶菌酶和壳聚糖或其任何组合的杀生物物质)组合,并且在生物基防腐剂与另外的防腐剂物质之间实现的防腐剂(例如,抗微生物剂)效果是累加的或协同的。

[0133] C. 其它产品

[0134] 可掺入本文所公开的酶或酶—聚合物组合物的其它产品包括但不限于食品、药品、化妆品、保健品、船舶、油漆、涂料、能源(例如,压裂液)、塑料、包装和农产品。在一些实施例中,本文所公开的酶或酶—聚合物组合物可并入HVAC系统、冷却池、水净化系统中,或可用于工业应用,例如但不限于纸浆和纸加工。

[0135] 在一些实施例中,杀生物酶(例如,酶原类酶,如交联或裂解酶)单独或与聚合物(例如,杀生物聚合物,例如但不限于壳聚糖)组合(例如,固定在其上或封装在其中),与一种或多种另外的防腐剂物质(如一种或多种石油化学衍生的防腐剂物质)组合。在一些实施例中,一种或多种生物基防腐剂(即,如本文公开的酶或酶/聚合物组合物)与一种或多种合成防腐剂(例如,石油化学衍生的物质)组合,并且在生物基和合成防腐剂之间实现的防腐剂(例如,抗微生物剂)效果是累加的或协同的。

[0136] IV. 使用方法

[0137] 所公开的酶和酶/聚合物组合物可以在需要防腐剂的各種应用(例如,个人护理产品、家用产品、工业产品、食品、药品、化妆品、保健、船舶、油漆、涂料、能源、塑料、包装和农产品)中或在本文所公开的任何产品或系统中用作替代物或除常规防腐剂(例如但不限于对羟基苯甲酸酯、甲醛和戊二醛)和常规杀生物剂(例如本文所公开的那些)之外,包括银(用于伤口护理产品中)。所公开的酶和组合物用作抗微生物(例如,防腐剂)成分,其抑制潜在有害的细菌、真菌和/或其它微生物的生长,并且因此以抑制这些产品中的细菌、真菌和/或微生物生长的有效量添加到待防腐的产品中。在一些实施例中,实现了USP<51>通过标准,即对于类别2产品:细菌:与14天的初始计算计数相比,减少不少于2.0log,与28天的14天计数相比,没有增加;对于酵母和霉菌:第14天和第28天的初始计算计数无增加。在一些实施例中,酶和酶—生物聚合物共制剂的抗微生物行为通过针对革兰氏阳性和革兰氏阴性

细菌以及真菌的MIC (最小抑制浓度) 进行表征,其导致微生物生长减少约80%至100%,或微生物生长减少至少约80%、85%、90%、95%、98%或99%中的任一个。

[0138] 当与如本文描述的产品,例如个人护理产品、家用产品、工业产品、食品、药品、化妆品、保健产品、船舶产品、油漆、涂料、能源、塑料、包装或农产品组合时,或在本文所公开的任何产品或系统中,例如在配方中或作为防腐剂并入产品或系统中时,组合物可在宽pH范围内具有有效的广谱防腐活性。

[0139] 在一些实施例中,方法包括将如本文描述的防腐剂组合物(例如,酶原类酶,如交联或裂解酶或本文公开的其它酶,例如杀生物酶)或组合物(例如,酶原类酶,如交联或裂解酶或本文公开的其它酶,例如杀生物酶,固定在或封装在聚合物(如生物聚合物和/或杀生物聚合物)中)添加到产品或系统中,如个人护理产品、家用产品、工业产品、食品、药品、化妆品、保健、船舶、油漆、涂料、能源、塑料、包装或农产品,或添加到本文公开的任何产品或系统中,例如在配方中或并入产品或系统中,其中与不含防腐剂组合物的相同产品相比,微生物生长减少和/或产品的保质期增加。在一些实施例中,酶是酶原类酶,如选自水解酶、蛋白酶、裂解酶、交联酶及其组合的酶。在一些实施例中,酶是交联酶,如转谷氨酰胺酶、漆酶、过氧化物酶、转移酶、赖氨酰氧化酶或酪氨酸酶,或其组合。在一些实施例中,聚合物载体是杀生物聚合物,如壳聚糖或羧甲基壳聚糖。在一些实施例中,酶经由连接基固定在载体上。在一些实施例中,产品组合物中不包含其它防腐剂,例如但不限于甲醛和/或戊二醛。

[0140] 在一些实施例中,提供了一种用于提高产品组合物(如个人护理产品、家用或工业产品)的保质期、完整性或无微生物(例如,无细菌和/或真菌)状态的方法,其中方法包括将有效量的如本文描述的防腐剂组合物(例如,固定在聚合物载体(例如,杀生物聚合物)上的杀生物酶)掺入产品(例如,个人护理产品、家用或工业产品)中。在一些实施例中,有效量可以是指MIC (最小抑制浓度) 的量,其导致微生物生长减少约80至100%,或如本文描述的微生物生长减少至少约80%、85%、90%、95%、98%或99%中的任一个。

[0141] 在本文描述的方法或组合物的一些实施例中,可以以约0.01%w/v至约5%w/v,或至少约0.01%w/v,0.05%w/v,0.1%w/v,0.5%w/v,1%w/v,1.5%w/v,2%w/v,2.5%w/v,3%w/v,3.5%w/v,4%w/v,4.5%w/v或5%w/v中的任一个,或约0.01%w/v至约0.05%w/v,约0.1%w/v至约0.5%w/v,约1%w/v至约1.5%w/v,约1.5%w/v至约2%w/v,约2%w/v至约2.5%w/v,约2.5%w/v至约3%w/v、约3%w/v至约3.5%w/v、约3.5%w/v至约4%w/v、约4%w/v至约4.5%w/v、约4.5%w/v至约5%w/v、约0.01%w/v至约0.1%w/v、约0.1%w/v至约1%w/v、约1%w/v至约5%w/v、约0.05%w/v至约0.5%w/v、约0.5%w/v至约5%w/v、约1%w/v至约2.5%w/v或约2.5%w/v至约5%w/v中的任一个的浓度包括酶(例如,酶原类酶,如本文公开的交联或裂解酶或其它酶,例如,杀生物酶)。

[0142] 在本文描述的方法或组合物的一个实施例中,可以以约0.04%w/v酶和约0.025%w/v聚合物(例如但不限于壳聚糖)的浓度包括酶/聚合物组合物,如酶原类酶,如交联或裂解酶或本文公开的其它酶,例如,杀生物酶,其固定在或封装在聚合物(例如生物聚合物和/或杀生物聚合物)中。

[0143] 可利用所公开的组合物个人护理产品的实例包括条皂、液体皂(例如,洗手皂)、手部消毒剂(包括洗去型和免洗型醇基和水基手部消毒剂)、术前皮肤消毒剂、清洁擦拭物、消毒擦拭物、沐浴露、痤疮治疗产品、抗真菌尿布疹膏、抗真菌护肤霜、洗发剂、调理剂、化妆

品(包括但不限于液体或粉末粉底、液体或固体眼线膏、睫毛膏、霜眼影、着色粉末、待干燥或润湿使用的“薄饼”型粉末、卸妆产品等)除臭剂、抗微生物霜、身体乳液、护手霜、局部霜、须后水、爽肤水、漱口水、牙膏、防晒乳液,以及婴儿产品,例如但不限于清洁擦拭物、婴儿洗发剂、婴儿肥皂和尿布霜。本主题还可应用于伤口护理物品,例如但不限于伤口愈合软膏、乳膏和洗剂、伤口覆盖物、烧伤创面膏、绷带、胶带和消毒条,以及医疗制品,例如医用长袍、帽子、面罩和鞋套、外科滴剂等。另外的产品包括但不限于口腔产品,例如漱口水、牙膏和牙线涂料、兽医和宠物护理产品、防腐剂组合物,以及表面消毒剂,包括溶液、喷雾剂或擦拭物。

[0144] 可掺入所公开的组合物的家用/工业产品的非限制性实例包括家用清洁剂,如浓缩液体清洁剂和喷雾清洁剂、清洁擦拭物、餐具洗涤剂、餐具清洁剂、喷雾—摩丝液体、家具上光剂、室内油漆、室外油漆、喷粉喷雾、衣物洗涤剂、织物软化剂、地毯/织物清洁剂、窗户和玻璃清洁剂、抽水马桶清洁剂、液体/霜清洁剂等。在具体实施例中,本发明主题的组合物的可用于食品洗涤产品中,其设计用于在食用、包装和食品涂层之前清洁水果和蔬菜。

[0145] 以下实例旨在说明而非限制本发明。

[0146] 实例

[0147] 实例1.转谷氨酰胺酶活性测定

[0148] 以下测定用于评估实例中描述的组合物中的转谷氨酰胺酶活性。

[0149] 使用标准比色异羟肟酸盐活性测定来测定可溶性酶和酶—聚合物缀合物的残余活性,以确定活性酶的比活性或单位(Folk和Cole,《生物化学杂志》1965)。所有测定均在37℃下进行,反应温育时间从10分钟到2小时不等。

[0150] 为了定量可溶性酶对酶—聚合物缀合物的转化百分比和生产率,使用基于HPLC的定量。简言之,在37℃下测定二肽底物Cbz-Gln-Gly和荧光素尸胺的酶催化偶联16小时。过滤反应物以除去酶(或酶—聚合物缀合物)并通过HPLC分析以比较转化百分比。

[0151] 酶制剂:

[0152] 从味之素(Ajinimoto)获得市售野生型茂原轮枝链霉菌转谷氨酰胺酶(TI配方)。TGase可从味之素美国公司以商品名Activa-TI获得。该产品以99%麦芽糊精和1%微生物酶的固体制剂形式出售。味之素报道酶活性为81至135U/g。该Activa-TI按原样使用,并通过透析从麦芽糖糊精中纯化以浓缩酶。

[0153] 通过文献方法使用六组氨酸标签制备茂原轮枝链霉菌转谷氨酰胺酶的S2P突变形式以帮助纯化(Javitt等人(2017)《BMC生物科技》17:23)。细胞在摇瓶中生长,通过均质化裂解,通过离心从细胞碎片中分离S2P—TG。通过光谱在SDS-PAGE凝胶上比较所得半纯化的酶(澄清的裂解物)和活性酶浓度的活性。S2P—TG在MIC测定之前在Ni-IMAC树脂上通过亲和柱进一步纯化。将含有S2P—TG的澄清裂解物与组氨酸标签纯化的S2P—TG进行比较以用于聚合物缀合研究,并且发现表现相似。组氨酸标签纯化的S2P—TG用于MIC研究。

[0154] 实例2.壳聚糖微珠固定化转谷氨酰胺酶

[0155] 壳聚糖微珠合成:在搅拌下将壳聚糖溶液(1%v/v乙酸中的1wt%)滴加到40%v/v橄榄油、60%v/v十六烷和1%v/v吐温—80的溶液中。然后用3%w/v戊二醛交联所得乳液。通过过滤收集微珠并用己烷、乙醇和水洗涤。

[0156] 酶固定化:将壳聚糖微珠在室温下预活化0.1%至5%v/v戊二醛5小时。用水洗涤

两次除去过量的戊二醛。以总蛋白浓度0.2至0.4mg/mL添加半纯化的酶(澄清的裂解物)并在4℃下孵育16小时。通过用水洗涤两次除去未结合的酶。还包括仅含有壳聚糖微珠和戊二醛或仅含有壳聚糖微珠和澄清裂解物的阴性对照。使用比色异羟肟酸盐测定和基于HPLC的测定测定样品的活性。

[0157] 实例3.转谷氨酰胺酶—珠缀合物的稳定性

[0158] 评价固定在壳聚糖微珠上的转谷氨酰胺酶(如实例2的转谷氨酰胺酶在4℃下的pH 7.4缓冲液中45天的稳定性。固定化后,洗涤珠以除去过量的未结合的酶,并重悬于pH 7.4的缓冲液中,并储存在4℃。以规则的间隔进行异羟肟酸盐测定,以通过取出用于测定的等分试样评估酶结合珠的活性。样品包括与酶(澄清的裂解物)和戊二醛组合的那些珠,与单独的酶组合的对照珠,和单独用戊二醛处理的对照珠。

[0159] 结果示于图4。与第一天的活性相比,壳聚糖—S2P—TG微珠在21天时保持92%的活性,在45天时保持35%的活性,在68天时保持23%的活性。

[0160] 由于该样品类型的非均质性,在测量中观察到一些可变性,这导致在第21天样品活性的明显“增加”。因为这些样品作为固体珠在液体中的悬浮液处理,所以相同体积的每个样品不一定含有相同数目的珠。样品体积太低而不能按重量计进行样品制备和加工。

[0161] 实例4.用游离壳聚糖单体封装转谷氨酰胺酶

[0162] 将1%乙酸中的1%w/v游离壳聚糖(甲壳动物(虾)壳聚糖(在酸性pH下可溶)或真菌(蘑菇)羧甲基壳聚糖(在中性pH下可溶))与1X磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的含有转谷氨酰胺酶的澄清裂解物和连接基组合并在室温下孵育16小时。固定化后,淬灭反应并通过稀释到含有伯胺的碱性缓冲液(通常为50mM三羟甲基氨基甲烷,pH 8.0)中升高混合物的pH并添加1N NaOH直至观察到可见沉淀。然后将混合物离心以收集沉淀的壳聚糖,有效地洗涤保留在上清液中的游离的、未结合的酶的该相。除去上清液,然后通过调节pH值重新溶解所得颗粒,通常在酸性溶液或缓冲液中(1%乙酸或10mM三羟甲基氨基甲烷,pH 4.3)使用异羟肟酸盐测定法测定由该方法得到的标记为“R”(反应)、“S”(上清液)和“P”(颗粒)的三个样品的活性。

[0163] 在图5中示意性地示出了封装方法。

[0164] 实例5.羧甲基壳聚糖封装转谷氨酰胺酶的稳定性

[0165] 如实例4所述,通过用游离羧甲基壳聚糖单体封装来固定转谷氨酰胺酶。连接基是1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)连接基。如实例4所述,R、S和P样品的酶活性在酶封装后第1天和第75天使用异羟肟酸盐试验测定。还对在不存在酶、连接基和羧甲基壳聚糖的情况下制备的样品进行对照反应。

[0166] 结果如图6A和6B所示。羧甲基壳聚糖-S2P-TG颗粒状缀合物在75天时保持65%的活性。保留在溶液(未沉淀)中的羧甲基壳聚糖-S2P-TG缀合物在75天时保留45%的活性。在不存在羧甲基壳聚糖的情况下,S2P-TG在75天时保留不到8%的初始活性。S2P-TG和羧甲基壳聚糖在有和没有EDC的情况下的缀合反应的结果。

[0167] 实例6.壳聚糖封装转谷氨酰胺酶的稳定性

[0168] 如实例4所述,通过用游离壳聚糖单体封装来固定转谷氨酰胺酶。连接基是EDC。如实例4所述,在第一天测定R、S和P样品的酶活性。还对在不存在酶和连接基的情况下制备的样品进行对照反应。结果示于图7。第一天,通过离心除去过量的未结合的酶并除去上清液。

含有EDC、S2P-TG和壳聚糖的再溶解颗粒(P)是唯一显示酶活性的反应(保留总酶活性的大约82%)。在不存在EDC的情况下,在上清液中除去酶,并且所得颗粒具有小于9%的初始信号,其在该测定的背景内,如通过白色条所见,其显示由不存在酶或EDC的单独壳聚糖贡献的信号。

[0169] 使用异羟肟酸盐测定法跟踪S和P样品的酶活性120天,并通过基于HPLC的活性测定法进行确认。结果如图8A和8B所示。HPLC测定用于证实60天和120天后的活性结果,并且与羟乙酸酯测定活性保留趋势非常一致。含有EDC、S2P-TG和壳聚糖的再溶解颗粒(P)是唯一在沉淀后显示并保留酶活性的实验。该样品在pH 4.5下保持活性4个月。壳聚糖沉淀后,分离含有未结合的酶的上清液(S)。还在120天内监测上清液(S)。这些样品显示出残留酶活性的快速下降,在30天后剩余大约15%的酶活性。

[0170] 实例7.MIC测定

[0171] 为了进行最小抑制浓度(MIC)测试,通过从冷冻甘油原液刮擦接种具有4mL培养基的培养物,并在30℃下对白色念珠菌进行培养过夜,或在37℃下对大肠杆菌或枯草杆菌进行培养过夜。然后将过夜培养物稀释至 OD_{600} 为 $6.4E-03$,并将2 μ L稀释的培养物接种到含有100 μ L培养基和适当体积的测试处理条件(酶、壳聚糖或两者)的96孔板的各孔中。然后在板阅读器(Biotek Synergy H1)中,在用于测试菌株的适当温度下振荡温育板,并且在测定过程中(9至18小时)每10分钟记录600nm处的光密度。为了在实验结束时测定细胞活力,根据制造商的说明书,用25 μ L的每种培养物和25 μ L的BacTiter Glo测定试剂在黑壁96孔半区板(Promega)中进行BacTiter Glo测定。在室温下振荡温育测定5分钟,然后定量发光信号强度。

[0172] 结果如图9A至9D所示。

[0173] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与所公开的方法和组合物所属领域的技术人员通常理解的相同的含义。尽管在本方法和组合物的实践或测试中可以使用与本文所述的那些相似或等效的任何方法和材料,但特别有用的方法、装置和材料如所述。本文引用的出版物及其引用的材料特此通过引用并入。本文中的任何内容都不应被解释为承认本发明由于在先发明而无权先于此类公开。不承认任何参考文献构成现有技术。参考文献的讨论陈述了其作者所声称的内容,并且申请人保留挑战所引用文献的准确性和相关性的权利。应当清楚地理解,尽管本文引用了许多出版物,但此类引用并不构成承认这些文献中的任何一个形成本领域公知常识的一部分。

[0174] 本领域技术人员将认识到或仅使用常规实验就能够确定本文所述的方法和组合物的具体实施方案的许多等同物。此类等同物旨在涵盖在以下权利要求中。

[0175] 尽管为了清楚理解的目的已经借助于说明和实施例详细地描述了前述发明,但是对于所属领域技术人员显而易见的是,可以在不脱离本发明的精神和范围的情况下实施某些改变和修改。因此,以上说明不应该被解释为限制本发明的范围。

[0176] 本文引用的所有出版物、专利和专利申请均在此通过引用整体并入,并且达到如同每个独立的出版物、专利或专利申请被专门且单独地指示通过引用并入的相同程度。



图1

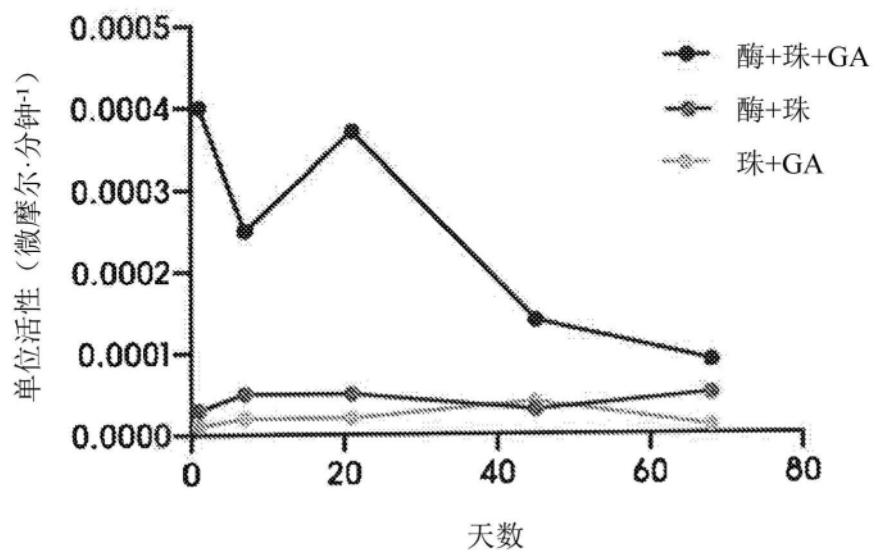


图4

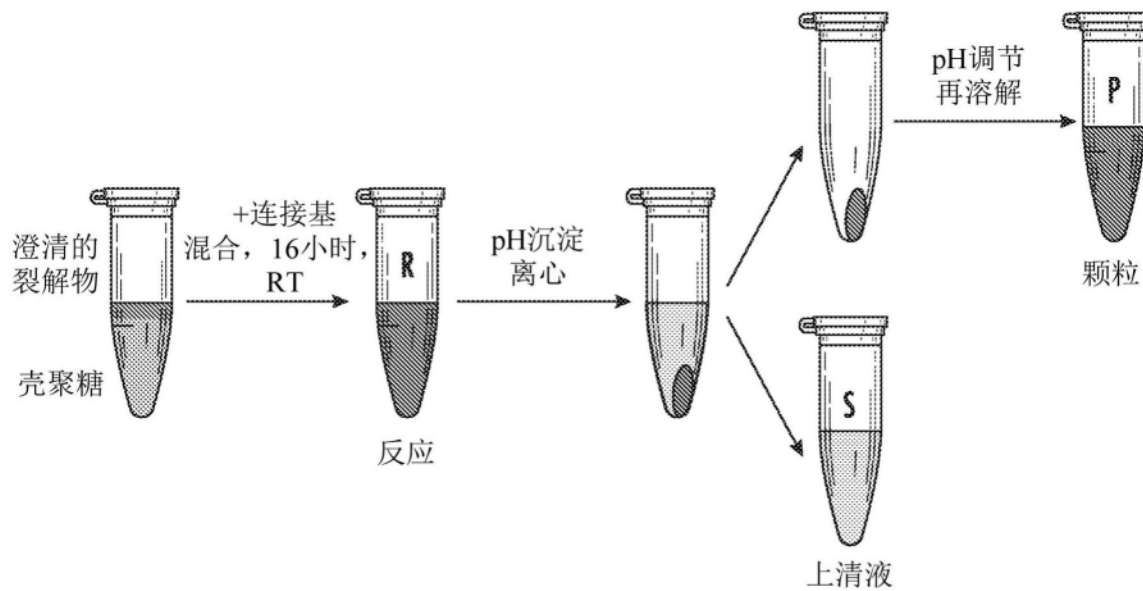


图5

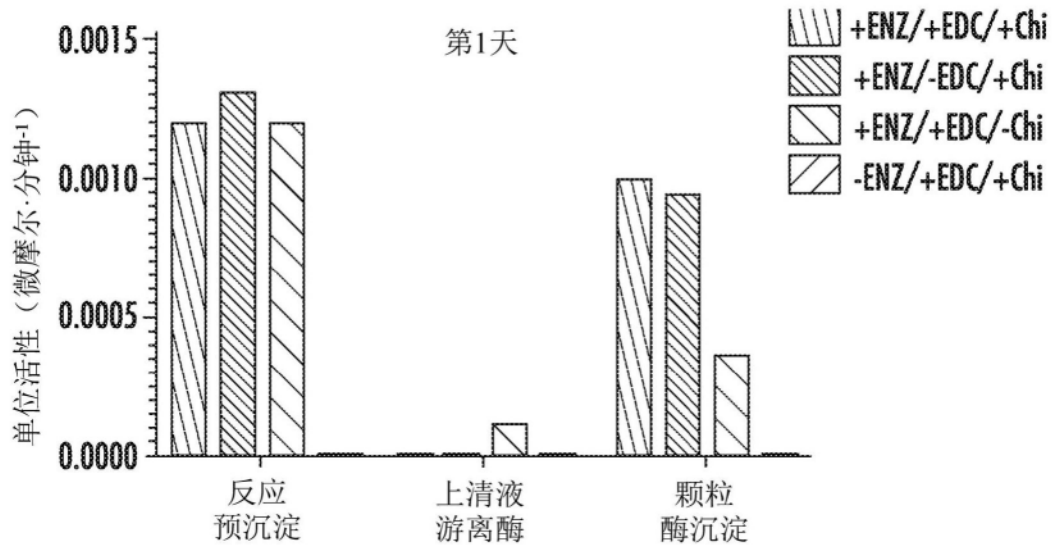


图6A

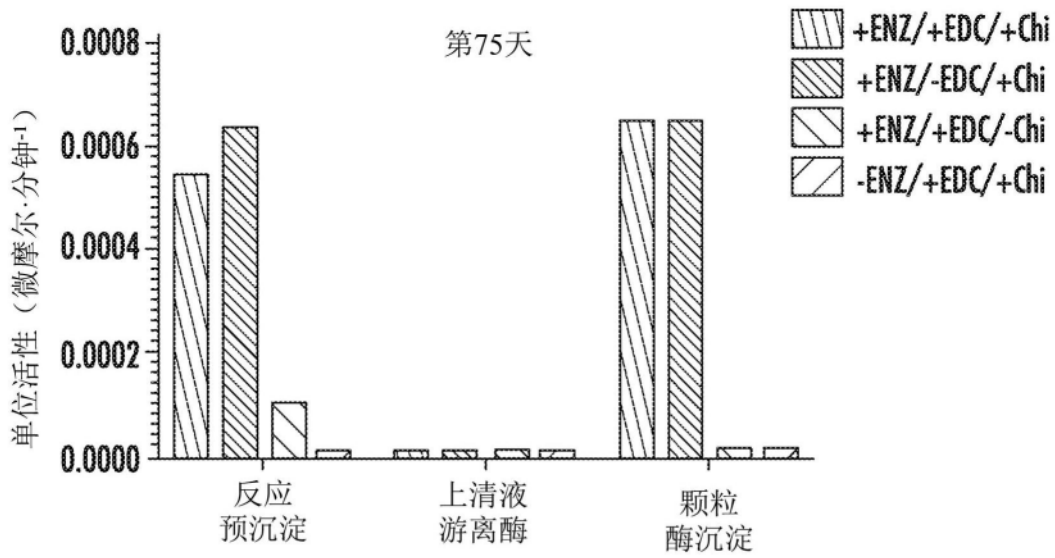


图6B

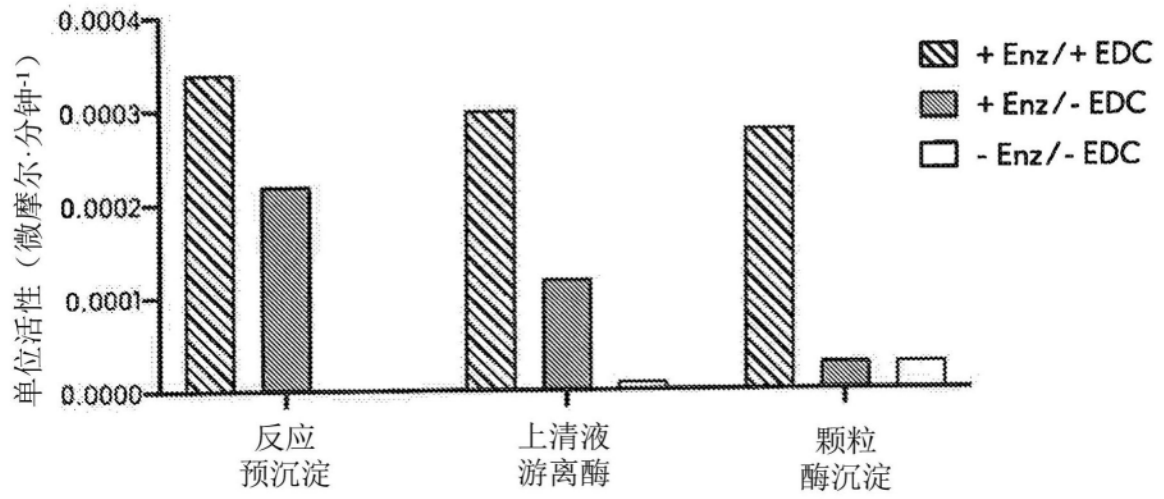


图7

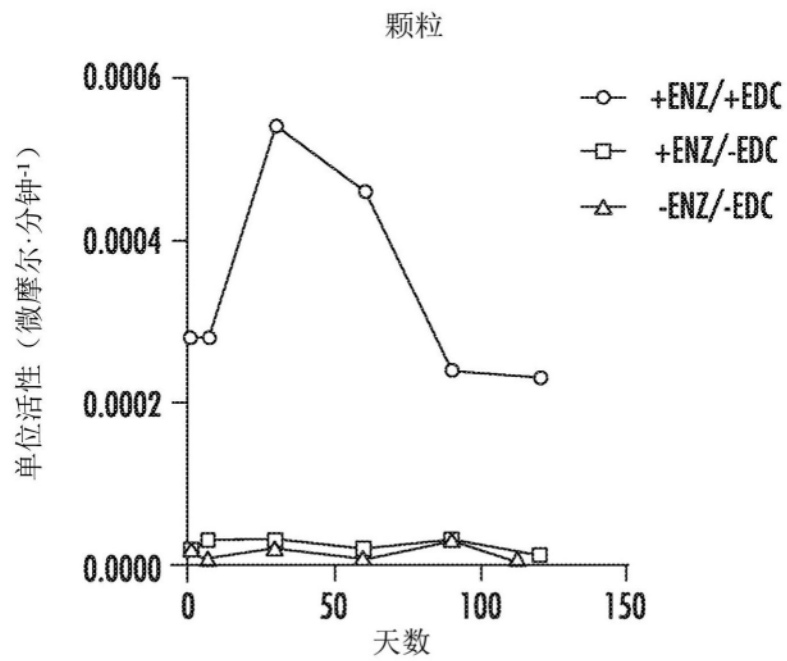


图8A

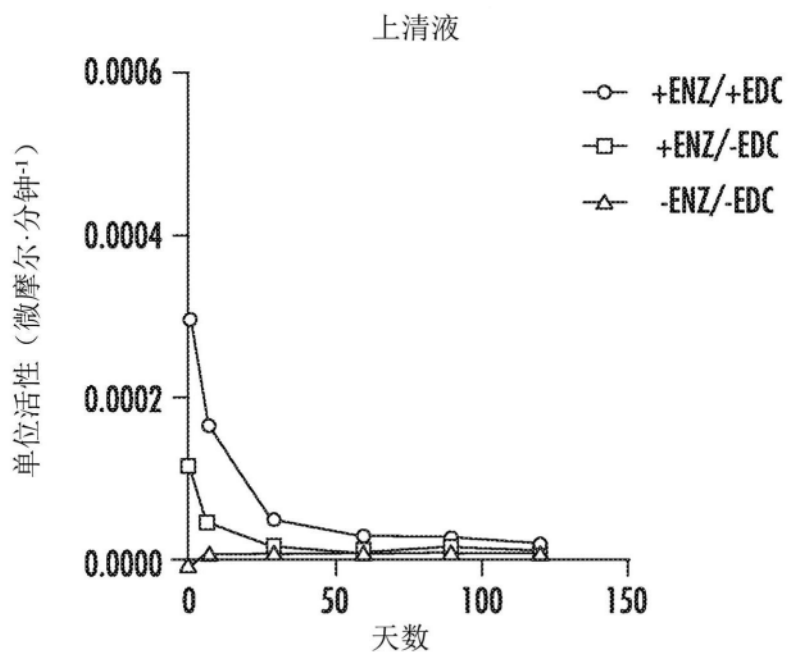


图8B

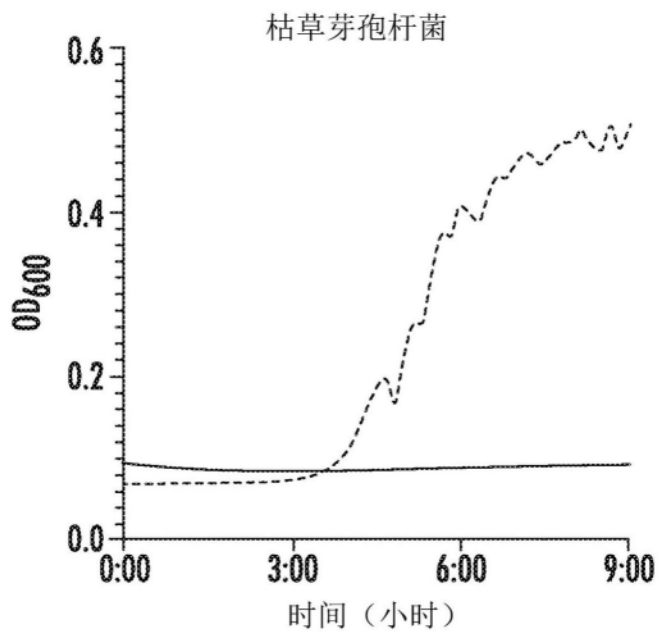


图9A

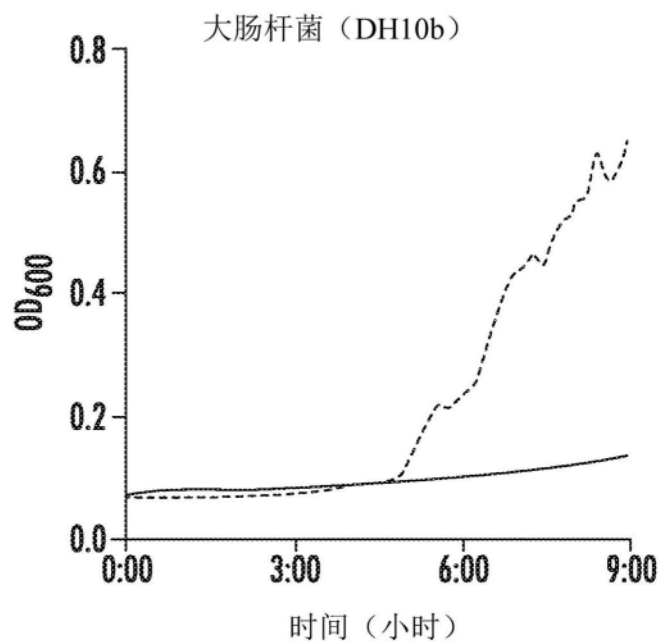


图9B

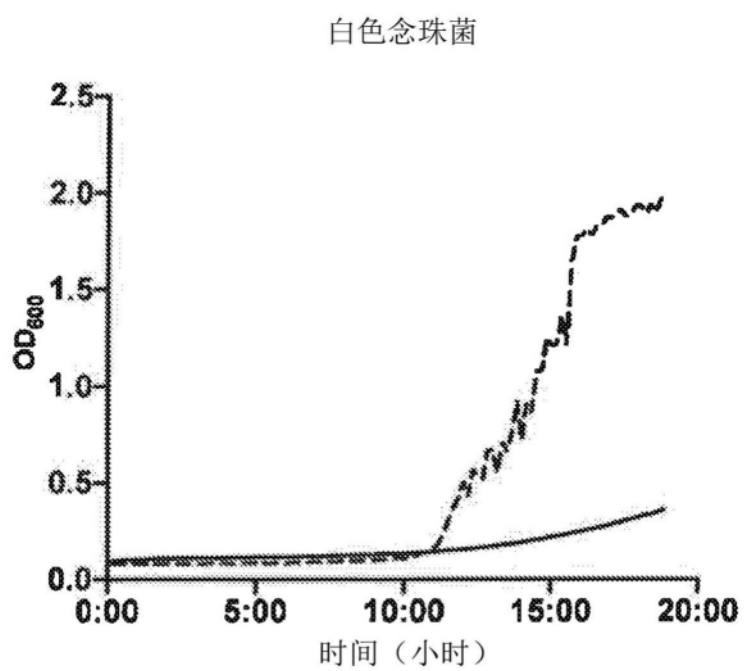


图9C

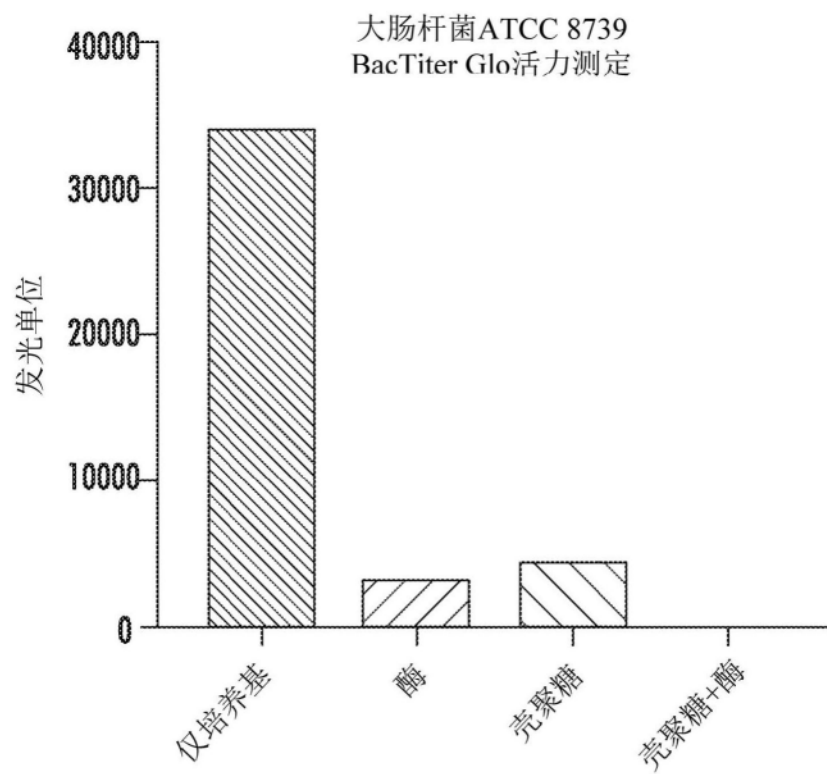


图9D