



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 98100917.4

[45] 授权公告日 2004 年 2 月 18 日

[11] 授权公告号 CN 1138889C

[22] 申请日 1998.3.17 [21] 申请号 98100917.4

[30] 优先权

[32] 1997. 3. 18 [33] US [31] 08/819,091

[71] 专利权人 埃欧金公司

地址 加拿大安大略

[72] 发明人 布莱恩·弗迪 杰弗里·S·托兰

审查员 高德洪

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

权利要求书 3 页 说明书 20 页 附图 1 页

[54] 发明名称 改进的棉织品脱绒球方法和酶混合物

[57] 摘要

本发明提供了一种在最大限度地减少织物强度损失的同时使含棉织品(半成品织物或成品服装)脱绒球以产生平滑表面的方法以及特定的酶混合物。该方法基本上包括用木霉属纤维素酶混合物除去低于约 3.0% 初始织物重量,所说的纤维素酶混合物含低于天然产生量的 CBHI、CBHII、EGI 和 EGIII 蛋白质组分,并且基本上由至少 80% 内切葡聚糖酶 II (EGII) 作为蛋白质组分组成。

1. 在酶促使棉织品脱球的方法中，通过利用木霉属纤维素酶组合物处理物品以创造平滑表面的同时最大限度地减少织物强度损失的改进的方法，所说的纤维素酶组合物实质上包含至少80%内源葡聚糖酶 II (EGII) 的纤维素酶蛋白质内含物。

2. 按照权利要求 1 的改进的方法，其中所说的纤维素酶实质上包含至少 95% EGII 的纤维素酶蛋白质内含物。

3. 按照权利要求 1 的改进的方法，其中所说的纤维素酶实质上包含单一纤维素蛋白质带，该纤维素蛋白质带具有大约在 5.0 和 5.6 之间的等电点。

4. 按照权利要求 3 的改进的方法，其中所说的纤维素酶实质上包含单一纤维素蛋白质带，该纤维素蛋白质带具有大约 5.3 的等电点，同时显示出对羧甲基纤维素的高活性和对滤纸的低活性，所说的棉织品脱球用于除去不到大约 3.0% 的初始棉织品重量。

5. 按照权利要求 1 的方法，其中纤维素酶的量每千克物品约 2000 至约 100000 个 CMC 单位酶。

6. 按照权利要求 1 的方法，其中物品的处理时间为约 15 至约 120 分钟。

7. 按照权利要求 1 的方法，其中物品的处理温度为约 35°C 至约 60°C。

8. 一种用于酶促使棉织品脱球以在所说的物品上创造光滑表面的同时最大限度地减少织物强度损失的木霉属纤维素酶组

合物,该组合物实质上包含至少 80%内源葡聚糖酶 II (EGII)的纤维素酶蛋白质内含物。

9. 按照权利要求 8 的酶组合物,该酶组合物实质上包含至少 95% EGII 的纤维素酶蛋白质内含物。

10. 按照权利要求 8 的酶组合物,其中所说的纤维素酶组合物实质上包含单一纤维素蛋白质带,该纤维素蛋白质带具有大约在 5.0 和 5.6 之间的等电点。

11. 按照权利要求 10 的酶组合物,该酶组合物实质上包含单一纤维素蛋白质带,所说的纤维素蛋白质带具有大约 5.3 的等电点,同时显示出对羧甲基纤维素的高活性和对滤纸的低活性,所说的棉织品脱球用于除去不到大约 3.0%初始棉织品重量。

12. 一种在最大限度地减少织物强度损失的同时处理棉织品以创造平滑表面的方法,该方法实质上包括用木霉属纤维素酶组合物处理物品,所说的纤维素酶组合物具有降低量的天然产生的 CBHI、CBHII、EGI 和 EGIII 蛋白质组分,以形成至少 80%内源葡聚糖酶 II (EGII)的纤维素酶蛋白质内含物。

13. 按照权利要求 12 的方法,其中所说的纤维素酶蛋白质内含物是至少 95%的 EGII。

14. 按照权利要求 12 的方法,其中所说的纤维素酶蛋白质内含物实质上包含单一纤维素蛋白质带,该纤维素蛋白质带具有大约在 5.0 和 5.6 之间的等电点。

15. 按照权利要求 14 的方法,其中所说的纤维素酶蛋白质内含物实质上包含单一纤维素蛋白质带,该纤维素蛋白质带具有大约 5.3 的等电点,同时显示出对羧甲基纤维素的高活性和对滤

纸的低活性，所说的棉织品脱球用于除去不到大约 3.0%初始棉织品重量。

16. 按照权利要求 12 的方法，其中纤维素酶的量每千克物品约 2000 至约 100000 个 CMC 单位酶。

17. 按照权利要求 12 的方法，其中物品的处理时间为约 15 至约 120 分钟。

18. 按照权利要求 12 的方法，其中物品的处理温度为约 35 °C 至约 60 °C。

改进的棉织品脱绒球方法和酶混合物

本发明涉及用纤维素酶脱绒球处理半成品棉织物或成品服装的方法，其中所说的处理能除去低于约 3.0%的初始织物重量。更具体地说，本发明涉及通过使用某些特定的纤维素酶混合物(优选地是基本上由至少 80%的 EGII 的木霉属纤维素酶混合物组成)在脱绒球(depilling)期间减少或阻止织物强度损失的方法。结果发现，使用富含 EGII 的酶混合物，可以比现在使用的标准商业纤维素酶更有效地除去绒球，在酶处理期间织物破坏可以减少大约 88%。

纤维素酶广泛地用于改进含棉织物和服装的外观和柔软度。在本文中所述的术语“棉织品”指由棉花或由棉花与其它纤维混纺制成的成品或半成品织物。

纤维素酶的一个广泛的用途是处理含棉织物如“石磨水洗(stonewash)”牛仔布，其中很大程度上由纤维素酶代替石头以产生消费者需要的柔软、褪色的牛仔布。用于石磨水洗牛仔布的纤维素酶的进一步的细节可在 Nielsen 等，酶应用(工业)，化学技术百科全书，(Kirk-Othmtr 出版社，1993)，9，603-604(本文以后称为 Nielsen 等)中找到。

用于处理含棉织物的纤维素酶的第二个广泛应用是除去棉花绒毛并松动织物外或内的表面纤维，这涉及除去小于约 3.0%的初始织物重量，典型地低于 1.0%。这一过程可以用多种术语“脱绒球”、“生物抛光”、“生物整理”以及“重整”表述。术语“脱绒球”在本文中用来指

所有这样的织物处理。在脱绒球中，纤维素酶处理使织物的表面光滑，由此赋予改善的柔软度和外观，进而提高织物的质量与价值。采用纤维素酶的脱绒球处理也有助于阻止纤维绒球的尔后形成(这些绒球使服装看起来比较旧)并通过除去死棉或未成熟棉改进织物的均一性。使用纤维素酶脱绒球的进一步的细节可在 Nielsen 等， 595-604 中进一步中找到。含棉物品的脱绒球是本发明的领域。

在制造服装、重复穿用、洗涤和甩干期间，切变应力作用于棉质衣物，由此破坏表面。微细观察表明存在一些从几微米至毫米大小的原纤维。被破坏的表面散射光线，显示出呆板、灰色的外观并且在不同颜色之间颜色亮度和对比度减小。尘埃微粒也易于粘附到被破坏的区域上，增加了灰色外观。被破坏的纤维也使表面更坚硬，由此降低了手感或柔软度。

纤维素酶水解纤维素中的暴露的 β -1,4 键。这导致了原纤维的除去，这些原纤维构成了织物的绝大部分暴露部分。据信原纤维的除去通过除去粘附到原纤维上的尘土并改善所使用的其它清洁化合物的穿透力而直接改善服装的柔软度并导致更好的颜色和清洁度。最初的原纤维的除去也有助于阻止随后原纤维的形成。

纤维素酶有几个优于用来改善棉织品的光滑度和光泽的常规织物柔软剂的优点。常规柔软剂(主要是粘土或阳离子型表面活性剂)覆盖织物并产生油腻的感觉，而这是不受欢迎的，柔软剂也减少水吸收能力，这对毛巾等是一个缺点。从环境的观点考虑，该酶也是优选的。

在服装制造期间的典型的脱绒球处理步骤中，把织物(通常染色过)、水、缓冲液、洗涤剂以及酶添加至旋转的水平或垂直转鼓式喷气干燥机、洗衣机或其它向织物提供搅拌和剪切的装置。该处理典型

地在 pH 4 - 6.5 于 35 - 60 °C 进行 15 至 120 分钟。液体对织物的重量比通常在 2.5:1 至 6:1 之间。典型地添加的纤维素酶量相当于大约每公斤织物 1,000 至 200,000CMC 单位的纤维素酶活性(基于 Ghose 的纤维素酶测定方法(1987))。处理后,通常将溶液加热至 70 °C 保持 10 分钟破坏该酶。从机器中取下织物、干燥并在辊子中上油(有时在染色后)。有关在制造期间使棉织品脱绒球的常规纤维素酶处理的进一步细节的出版物概述可在美国专利 5,232,851 第 1 栏内找到。

对于在洗衣步骤期间的脱绒球处理,是把纤维素酶和许多其它组分包括在洗涤剂混合物中。其它的组分可以包括其它酶,如蛋白酶、脂酶和纤维素酶,以及表面活性剂、缓冲液、助洗剂、漂白剂、抗沉淀剂、光学增白剂、抗氧化剂以及助溶剂。

包含纤维素酶的一种常规洗涤剂混合物由 Clarkson 等在美国专利 5,290,474 中描述(此后称作“Clarkson'474”)。处理典型地于 pH 7 至 9.5 下在 20 °C 至 70 °C 进行 15 至 60 分钟。液体对织物的重量比通常在 2.5:1 至 10:1 之间。典型地添加的纤维素酶量相当于约每公斤织物 1,000 至 200,000CMC 单位的纤维素酶活性(基于 Ghose 的纤维素酶测定方法(1987))。

纤维素酶用于棉织品以及棉花与人造纤维(包括 lyocell、人造纤维、聚酯、丙烯酸、尼龙以及乙酸纤维素)混纺织物的脱绒球。进一步的细节在 Clarkson'474 第 7 栏内说明。纤维素酶处理在织物上或缝制的服装上进行,这些织物或服装包括由棉花或棉花混纺纱制造的材料(经过或未经树脂整理过)。纤维素酶脱绒球可以在含至少 40% (重量) 棉花的织物上进行。然而,如果棉花含量高于 60% (重量),结果更显著而经济,如果棉花含量超过 75% (重量),可以获得最好的

结果。

得自一种特定的树木腐烂真菌属(木霉属)的纤维素酶经常用于脱绒球应用。木霉属纤维素酶由于对棉花和其它形式的纤维素高强作用因而在纺织品加工和洗衣中是优选的。木霉属纤维素酶产品可从 Iogen 公司, 加拿大安大略省渥太华; Genencor International; Novo Nordisk; 酶开发公司以及其它公司购买。市售的纤维素酶(如 Iogen 纤维素酶)称作“天然”或“完全”纤维素酶, 因为它们包含六种最流行的天然产生的纤维素酶组分中的大部分(如果不是全部的话): 纤维二糖水解酶 I(CBHI); 纤维二糖水解酶 II(CBHII); 内切葡聚糖酶 I(EGI); 内切葡聚糖酶 II (EGII); 内切葡聚糖酶 III(EGIII)和内切葡聚糖酶 V(EGV)。

完全纤维素酶普遍用于脱绒球证明了这些酶的有效性。然而, 在脱绒球处理中这样的完全纤维素酶的一个缺点是他们能造成明显的织物强度损失。参见 Clarkson 等, 美国专利 5,246,853(此后称为“Clarkson '853”)。强度损失起因于纤维素酶对织物主体上纤维素的作用, 而不仅是对绒毛或绒球的作用。强度的过度损失可造成对织物的破坏, 如小洞或过度破损区, 并降低织物的有用期。减少强度损失可克服这些问题, 此外, 减少强度损失将使人们在具有比现在达到的更高的强度的织物中达到所要求的外表和柔软度。这将导致用于工业和消费的有价值的新产品。

为了减少木霉属纤维素酶造成的强度损失, 曾致力于研究各个酶的特性, 这些酶包括木霉属纤维素酶。

木霉属天然地产生大约两打不同类型的纤维素酶的混合物, 它们分别被称为各个组分。鉴定并命名了这些组分中最普遍的几个, 包括

纤维二糖水解酶 I(CBHI)、纤维二糖水解酶 II (CBHII)、内切葡聚糖酶 I(EGI)、内切葡聚糖酶 II (EGII)、内切葡聚糖酶 III (EGIII)以及内切葡聚糖酶 V(EGV)。

每一木霉属纤维素酶已分类进 40 个已知的水解酶家族的一个适当的家族。分类基于组成酶的氨基酸序列和三维结构, 如 Claessens 和 Henrissat, “纤维素溶解酶的特异性定位: 分类成通过生物化学分析确认的在结构上有关的蛋白质家族”, 蛋白质科学, 1, 1293-1297(1992)中所述。在表 1 中概述了各种木霉属纤维素酶组分的天然酶的特性、分类、氨基酸序列参考资料、总纤维素酶蛋白的比例。

表 1 木霉属纤维素酶组分

酶	分子量	等电点	家族	参考	浓度(%)
CBHI	63,000	4.3	7	A	50-60
CBHII	58,000	6.0	6	B	1,5-18
EGI	53,000	4.6	7	C	12-15
EGII	50,000	5.3	5	D	9-11
EGIII	25,000	7.4	12	E	0-3
EGV	23,000	3.7	45	F	0-3

参考资料:

A. Shoemaker 等, 源自 *Trichoderma Reesei* 菌株 L27 的外切纤维二糖水解酶 I 的分子克隆, 生物技术, 1, 691-696(1983)。

B. Chen 等, 源自 *Trichoderma Reesei* 的纤维二糖水解酶 II 的核苷酸序列和推导的一级结构, 生物技术, 5, 274-278。

C. Penttila 等, *Trichoderma Reesei* 的纤维素酶基因之间的同源性: 内切葡聚糖酶 I 基因的完整核苷酸序列, 基因, 45, 253-263(1986)。

D. Saloheimo 等, EGIII, 源自 *Trichoderma Reesei* 的新内切葡聚糖酶: 基因和酶的特性, 基因, 63, 11-21(1988)。

E. Ward 等, 美国专利 5,475,101

F. Saloheimo 等, 通过在酵母中表达分离的源自 *Trichoderma Reesei* 的新的小内切葡聚糖酶基因 Eg15, 分子微生物学, 61, 1090-1097。

应该着重指出的是, 在表 1 中使用的术语是目前在本领域使用的

术语并反映了从早期术语的某些变化。例如，在早期的参考文献中，组分“EGII”不正确地和广泛地称作--EGIII--。参见，例如，Stalbrand 等，应用与环境微生物学，61，1090-1097(1995)中的讨论。

现有技术中寻求减少脱绒球处理所致的织物强度损失的一种方法是产生已知为纤维素酶组分的“截短的形式”。

大多数纤维素酶组分包含催化核心区和纤维素结合区，它们通过柔性的接头(由几个氨基酸组成)分隔。曾报道了用于裂解核心区或结合区的技术。也报道了利用具有修饰的 DNA 的木霉属菌株以仅编码纤维素酶的所需部分的技术。参见出版的专利文献 Fowler 等，WO 95/16782(此后称为“Fowler '782”)。也报道了裂解酶的所需部分的蛋白酶的应用。参见 Woodward 等，生物技术应用生物化学，19，141-153(1994)。

这些截短的纤维素酶还没有解决脱绒球中强度损失的问题，如 Kumar 等，“优化纤维素酶在整理纤维素织物中的应用”，1995 AATCC 会议，亚特兰大，238 页中报告(此后称作“Kumar 等”)。该论文比较了标准的全纤维素酶(包含六种主要的纤维素酶组分)和两种新纤维素酶的脱绒球(或该文出现的术语“生物整理”)性能。据称一种新纤维素酶是“修饰的酸性纤维素酶”(即利用 Fowler '782 的方法制备的截短的纤维素酶)，并且在脱绒球期间相对于标准的全纤维素酶不显示任何织物强度的损失。

在脱绒球处理期间减少织物强度损失的第二个方法是选择纤维素酶组分的混合物，该混合物应能提供相对于天然混合物的优点。通过利用熟知的遗传工程或蛋白质加工技术(在 Clarkson'853 中描述)，人们可改变现在的纤维素酶组分的相对量。

Bjork 等, 美国专利 5,120,463(此后称为“Bjork '463”)和出版的专利文件 Clarkson 等, WO 93/22428(此后称为“Clarkson '428”)教导: 富含 CBHI 组分的纤维素酶比现在的具有内切葡聚糖酶的纤维素酶具有更少的强度损失以及在软化和改善棉织品感觉上更好的性能。由 Bjork '463 教导的具有最好性能的酶混合物是 96%CBHI、2%EGI 和 2%EGII(参见实施例 3 的表 3), 并含有 500ppm CBHI 和共 10ppm 的等量 EGI 和 EGII。该混合物也在图 1 中作为“Bjork '463-best”指出。含 45%EGI、45%EGII 和 10%CBHI 的混合物的性能很差, 该混合物(标为 10ppm CBHI 和共 100 ppm 的等量 EGI 和 EGII)也被标明在图 1 上, 本文标为“Bjork '463-poor”。

Bjork '463 的教导也得到了 Cavaco-Paulo 和 Rios 的“纤维素酶处理的织物的机制特性分析”, (1996 AATCC 会议, Nashville), 129 页的教导的支持。

Clarkson 等, 美国专利 5,525,507 以及 Clarkson'853 都涉及特定的纤维素酶组合物, 该组合物用于处理棉织品以达到提高的触觉、柔软度、增强颜色以及石磨水洗表现, 其教导该特定的酶组合物必须是基本上无 CBHI 型组分(第 2 栏, 第 57 行)。在更优选的实施方案中, 也指出该特定的酶组合物必须无 CBHII 型组分。在第二个优选的实施方案中, 指出该酶必须至少有 10%内切葡聚糖酶组分。在第三个优选的实施方案中, 指出该酶必须至少有 20%内切葡聚糖酶组分。

Clarkson '853 宣称最好的结果是 50%EGI、37%EGII 和 13%EGIII 的混合物, 该混合物在图 1 中作为“Clarkson '853best”标出, 并且由 Clarkson '853 作为“除去 CBHI 和 CBHII”在实施例 16 之内描述。如上所述的在该混合物中内切葡聚糖酶的必要比例如下: 在 Clarkson '853

实施例 13 中，在天然混合物中的纤维素酶组分的比例为：CBHI 45-55%；CBHII 13-15%；EGI 11-13%；EGII 8-11%；EGIII 1-4%。在实施例 16 中，据称优选的酶除去所有的 CBHI 与 CBHII。如果把 CBHI 和 CBHII 从整个混合物中除去，余下的酶的平均浓度标准化为总共 100%，结果将如上所述。

由 Clarkson '853 显示的次最好性能是这样的混合物，该混合物是 37%CBHII、32%EGI、24%EGII 和 7%EGIII。该混合物在图 1 中作为“Clarkson '853 2nd best”标出，并且被“Clarkson '853”描述为“除去 CBHI”。在如上所述的混合物中，酶的比例确定如下：在 Clarkson '853 实施例 13 中，在天然混合物中纤维素酶组分的比例为：CBHI 45-55%；CBHII 13-15%；EGI 11-13%；EGII 8-11%；EGIII 1-3%。在实施例 16 中，据称次最好的酶除去所有的 CBHI。如果从总混合物中除去 CBHI，余下的酶的平均浓度标准化为总共 100%，结果将如上所述。

由 Clarkson '853 显示的性能列第三位的是这样的混合物，该混合物是 68%CBHI、16%EGI、12%EGII 与 4%EGIII。该混合物在图 1 中作为“Clarkson '853 3rd best”标出，并且被“Clarkson '853”描述为“除去 CBHII”。在如上所述的混合物中，酶的比例确定如下：在 Clarkson '853 实施例 13 中，在天然混合物中纤维素酶组分的比例为：CBHI 45-55%；CBHII 13-15%；EGI 11-13%；EGII 8-11%；EGIII 1-4%。在实施例 16 中，据称第三最好的酶除去所有的 CBHII。如果从总混合物中除去 CBHII，余下的酶的平均浓度标准化为总共 100%，结果将如上所述。

由 Clarkson '853 报告的性能最差的是天然纤维素酶混合物，该混

合物也在本文的图 1 中指出。

Clarkson 等, 美国专利 5,290,474(此后称为“Clarkson '474”)要求保护包含至少 40%EGIII 的酶在处理棉花中的应用。在一个优选的实施方案中, 该酶由不超过 5%CBHI 组分以及至少 70%EGIII 组成。Clarkson '474 指出该酶在碱性 pH 下使用时是有优势的(第 3 列, 第 58 行)。没有提示这些酶的混合物可导致比 Clarkson '853 教导的混合物更少的强度损失。

由 Clarkson '474 描述的纤维素酶混合物的唯一实施例是基本上纯的 EGIII。这在图 1 中指出。

专利出版物, Saloheimo 等, WO94/28117 涉及组分 EGV 内切葡聚糖酶的用途。据教导这种酶在碱性 pH 下是活性的并被推荐用于纺织品工业(第 16 页, 第 19 行)。然而, Saloheimo 等既没有公开也没有提示是否这种酶在脱绒球性能方面优于现有技术中描述的其它混合物或组分。

Kumar 等描述了在以标准全纤维素酶脱绒球中所测量的性能, 标准全纤维素酶包含所有主要纤维素酶组分, 并且也描述了两种“新纤维素酶”。据称所指的新纤维素酶之一是“富内切纤维素酶”, 但是没有鉴定存在的或除去的组分。Kumar 等描述“富内切纤维素酶”在脱绒球中比标准的全纤维素酶造成更少的强度损失。然而, 不能推荐在具有高磨损要求(如重棉花与 lyocell)中应用“富内切纤维素酶”, 因为据称需要高剂量和额外的时间(第 243 页, 中间段落)。

本发明的发明人惊奇地发现: 以木霉属纤维素酶混合物(基本上包含至少 80%的 EGII 组分)处理棉织品提供了比其它木霉属纤维素酶混合物更少织物强度损失的优异的脱绒球作用。通过利用本发明的特定

的酶混合物，除去绒球更有效，在酶处理期间，相对于目前处理棉织品的标准商业纤维素酶，织物破坏量减少了88%。由此本发明包括使用特定的纤维素酶混合物处理棉织品的方法。

图1是三角图。木霉属纤维素酶组合物(忽略少量EGV)可以以一个角上的CBHI和CBHI；第二角上的EGI和EGIII；第三个角上的EGII作为三角代表。代表现有技术纤维素酶组合物的数据点和代表本发明的数据点参见说明书注解。对于图1解释的进一步的背景，参照如Judson King在分离方法(McGraw-Hill, 1980)第60页解释的阅读三角形的常规方式。利用那些规定，一种物质的浓度沿标有该物质的角至相对侧的线读出。一种物质的浓度在第一种物质标记的角是100%，并沿任何划自那个点的线线性地减少，直至与相对角或边相交处第一种物质的浓度为零。

已发现用木霉属纤维素酶混合物(基本上含至少80%的EGII组分)处理的棉织品表现出平滑的外表和柔软的感觉，比利用其它木霉属纤维素酶制剂处理的物品更少的织物强度损失。本发明的木霉属纤维素酶混合物提供了更优的脱绒球性能，比其它木霉属纤维素混合物具有更低的织物强度损失。

本发明的纤维素酶混合物优选的组合物也在图1中显示。要更好地理解本发明的范围，并且为了能实施本发明，现在解释(更具体地是定义)某些术语。

本文利用的术语“棉织品”指片状制品形式的织物或缝成服装形式的织物，包括棉花或棉花混纺纱，在染色前或染色后，经过树脂整理或未经树脂整理。因此，术语“棉织品”比通常成衣工业所用的“棉织物”更广，指缝纫之前的材料或片状物品。术语“织品”应视为“织物或

服装、成品或半成品”的缩写，并不是指本发明的优选实施的优先选择。

在优选的实施方案中，棉织品是由棉花或棉花与非棉花纤维(如尼龙、丙烯酸、聚酯、人造纤维或 lyocell) 的混纺纱组成，这样的织物的棉花含量超过 40% (重量)。更优选的是，棉花含量大于 60% (重量)。更优选的是，棉花含量大于 75% (重量)。

术语“处理”指在制造过程或在尔后的洗衣过程中进行的脱绒球处理。在任一种情况下，处理是把棉织品添加至旋转的水平或垂直转鼓喷气干燥机、洗衣机或其它包含织物、水、缓冲液、洗涤剂以及纤维素酶的装置中，并向织物提供搅拌和剪切。处理通常后接水漂洗程序以从织物中除去用过的化学药品和织物碎片，包括松动的原纤维。在处理之后，从机器中取出织物并干燥。

在下列实施例中使用的处理条件被认为与通常用于脱绒球的那些条件是一致的。当脱绒球发生于典型的制造过程中时，处理时间大约是 15 至 120 分钟；处理温度是大约 35 °C 至大约 60 °C，液体对织物的重量比在大约 2.5:1 至大约 10:1 之间，pH 是大约 4.0 至大约 6.0。当脱绒球发生于典型的洗衣中时，处理时间是大约 10 至 60 分钟，处理温度是大约 20 °C 至大约 70 °C，液体对织物的重量比在大约 2.5:1 至大约 10:1 之间，pH 是大约 7.0 至大约 9.5。

用于脱绒球的纤维素酶混合物的量取决于纤维素混合物中活性蛋白质的浓度、所处理的棉织品的量、脱绒球效果所需的量、处理时间和其它本领域技术人员熟知的参数。当在典型的制造过程中用于脱绒球时，优选的木霉属纤维素酶混合物的量通常在每千克织物大约 2,000 至大约 100,000 个 CMC 单位酶之间，更优选地在每千克织物大

约 10,000 至大约 40,000 个 CMC 单位酶之间。当用于典型的洗衣中的脱绒球时, 优选的木霉属纤维素酶混合物的量通常在每千克织物大约 200 至大约 40,000 个 CMC 单位酶之间, 更优选地在每千克织物大约 1,000 至大约 10,000 个 CMC 单位酶之间。

控制该酶作用的一种选择(该选择是推荐性的而不是必需的)是在处理之后通过将溶液加热至大约 70 °C 保持 10 分钟、通过添加破坏酶活性的化学药品或通过立即干燥织物破坏酶。

术语“CBHI”、“CBHII”、“EGI”、“EGII”、“EGIII”和“EGV”指已知由木霉属天然产生的最通常的蛋白质组分, 并且如上文描述的在表 1 内分类。

应理解的是本发明的修饰的木霉属纤维素酶混合物也可以利用通常已知的技术(如由 Bjork '463 和 Clarkson '853 所建议的), 从一种通常被遗传修饰以过量产生、过少产生或不产生一种或多种 CBH 或 EG 组分的木霉获得的纤维素酶混合物产生。

因此, 这些内切葡聚糖酶和纤维二糖水解酶不仅可以包括是天然的木霉属纤维素酶混合物的一部分的酶, 而且可以包括这样的修饰纤维素酶混合物, 如截短的纤维素酶蛋白质, 该截短的纤维素酶蛋白质包含 CBH 或 EG 的结合区或核心区或其部分或衍生物。通常参见 Fowler '782。

其它的产生修饰的纤维素酶混合物的技术可以包括改变糖基化程度或在纤维素酶或截短纤维素酶的一级结构上的氨基酸的取代。应理解的是木霉属纤维素酶的任何天然或修饰的组分(如上面概述的)应被认为是木霉属纤维素酶组分, 即使它们是在遗传修饰的宿主微生物而非木霉属中产生。

术语“总纤维素酶蛋白质”指 CBHI、CBHII、EGI、EGII、EGIII、EGV 以及其它活性的木霉属纤维素酶蛋白质组分的总和。该术语意味着排除非纤维素酶，如淀粉酶、蛋白酶、半纤维素酶以及脂酶。该术语也意味着排除这样的纤维素酶蛋白质，该纤维素酶蛋白质仍然存在，但是通过热、化学或其它方式失活。

术语“天然纤维素酶制剂”指木霉属纤维素酶组合物，该木霉属纤维素酶组合物典型地在浸没培养中由真菌木霉属产生。它们产生与回收的方法在文献中记载很多并为本领域技术人员所熟知。这些酶的商业来源包括 Iogen 公司、Genencor 国际公司、Novo Nordisk、Sigma 化学药品公司以及酶开发公司。

在实施本发明时，在纤维素酶混合物中的至少 80% 的总纤维素酶蛋白质是 EGII 组分。在优选的实施方案中，至少 90% 的总纤维素酶蛋白质是 EGII 组分。在更优选的实施方案中，至少 95% 的总纤维素酶蛋白质是 EGII 组分。

在文献中所描述的几个方法可用于产生本发明的纤维素酶混合物。例如，在理论上，木霉属菌株可以通过遗传修饰以消除 CBHI、CBHII、EGI、EGIII 以及 EGV 组分的产生。参见 Clarkson '474 和 Clarkson '428。另外，可以通过使用离子层析从天然纤维素酶制剂分离或纯化该组分以产生所需的混合物。最新技术在实施例 1 和 2 中特别说明。

为了确定每种纤维素酶组分在纤维素酶混合物中的相对量，最常利用的方法是进行标准等电点聚焦(IEF)凝胶电泳并将蛋白质曲线与各组分的纯化标准品比较，该方法的描述可在实施例 2 中找到。该方法足以进行纤维素酶制剂的常规分析，但是不能无误地鉴定蛋白质。

本文所教导的优选的 95%EGII 混合物显示出单一纤维素酶蛋白质带，其等电点在大约 5.0 和 5.6 之间，取决于测量装置的精度，其等电点典型地为 5.3。

明确的方法是确定每种蛋白质的氨基酸序列以检验它们与以前出版的完整或截短的木霉属纤维素酶组分(如表 1 参考文献所列出的)是否匹配。氨基酸序列的确定由本领域技术人员熟悉的几个参考文献描述，包括 P. Matsudaira，得自在聚偏氟乙烯膜上的蛋白质电印迹的皮摩尔量的序列，生物化学杂志，262，10035-10038(1987)，以及 K.L. Stone 和 K.R. Williams，在亚纳摩尔范围内的高效液相层析肽谱和氨基酸分析，层析杂志，359，203-212(1986)。

本发明的纤维素酶混合物可以与各种本领域技术人员已知的助剂结合。例如，可以使用与这些纤维素酶组分相容的表面活性剂(阴离子型或非离子型)。可与这些纤维素酶混合物一起应用的其它材料包括填充剂、溶剂、缓冲液、酶稳定剂、pH 控制剂、酶活化剂、助洗剂、其它抗沉淀剂等。

酶组合物可以制成固体产品，其中所说的固体可以是粒状的、喷雾干燥的或聚结的。另外，酶组合物可以制成液体、凝胶或糊状产品。本文中液态制剂是优选的。

上述详细描述公开了本发明的组合物，其制备方法和该组合物在织物服装“脱绒球”中的应用方法。基于本文的教导，其它洗涤条件(如浓度、测量、pH、温度等)的选择对本领域技术人员是明显的。下列具体实施例进一步说明了本发明的益处和优点。

实施例 1：从木霉属纤维素酶组合物中富集 EGII

将大约 10 升已知是 Iogen 纤维素酶的市售木霉属纤维素酶制剂

(购自 Iogen 公司, 加拿大安大略渥太华)以氢氧化钠调整到 pH 7, 对 Amicon 10,000 分子量截流膜透析至 580 微西门子的传导率, 并稀释成 8mg/ml、pH 7 的蛋白质浓度。把纤维素酶添加进 3 升 Q-Sepharose 阴离子交换树脂柱中(由 Pharmacia Biotech, Uppsala, 瑞典购得)。总共向柱中添加 9 升的材料。在这些条件下, 那些具有低等电点的组分(包括 CBHI、EGI 和 EGV)比其它组分更紧地结合到柱上。因此, CBHI 和 EGI 是最主要的结合的组分。在这时, 以 9 升 2mM 磷酸钠缓冲液、pH 7、传导率 370 微西门子洗涤柱。收集洗脱液, 以盐酸调整至 pH 4, 对 Amicon 10,000 分子量截流膜透析至 200 微西门子传导率。

产生的溶液从最初的纤维素酶混合物除去了大部分 CBHI 与 EGI, 这通过这些带在 IEF 凝胶上的强度降低证明。EGV 也可能被除去, 虽然 EGV 的浓度在初始的纤维素酶混合物中很低以致使其浓度的定量测定是困难的。

在这时, 把透析的洗脱液(10g/L 蛋白质)添加至 60ml 的 S-Sepharose 阳离子交换树脂柱中(从 Pharmacia Biotech 购得)。向柱添加总共 60ml 的材料, 其后以 180ml 的 2mM 乙酸钠缓冲液(pH 4)洗涤。该树脂最紧密地结合具有更低的等电点的组分, 这包括 EGII。弃去主要包含 CBHII 和 EGIII 的洗涤洗脱液。

然后把 pH 4 的 10mM 乙酸钠缓冲液添加到柱中以解吸 EGII。以 10ml 组分收集相应于这次添加的前面 300 ml 洗脱液, 然后透析以通过实施例 2 的步骤确定存在的确切组分。

实施例 2: 通过 IEF 分析和鉴定纤维素酶组分

使用标准的聚丙烯酰胺凝胶等电点聚焦(IEF)技术分析纤维素酶

组分组合物，该方法在《等电点聚焦原理和方法》(Pharmacia 精细化学, 1982)中描述。凝胶是 5%聚丙烯酰胺并在 pH3 至 10 下电泳。蛋白质以考马斯蓝染色，以甲醇和醋酸的混合物脱色。

分析的样品包括在实施例 1 的洗脱液中收集的 10ml 组分的等分试样，把这些等分试样稀释成 2 至 5mg/ml 的蛋白质。对 50ml Iogen 纤维素酶的样品也进行了分析，还分析了富含 CBHI、CBHII、EGI 和 EGII 的样品以及在几个等电点的等电点标准参照物。

Iogen 纤维素酶具有相应于所有的单个组分的蛋白质带加几个其它蛋白质。得自实施例 1 的洗脱液的组分缺乏 CBHI、CBHII、EGI、EGIII 以及 EGV，这由对应于分别在等电点 4.3、6.0、7.7、3.7 的这些蛋白质的带的缺乏说明。在得自实施例 1 的洗脱液的组分中，仅在 5.3 的等电点上可以见到一条蛋白质带，该带对应于 EGII，这由等电点和随后的针对羧甲基纤维素的高活性与对滤纸的低活性的观察说明。

EGII 是在这些组分中可以见到的唯一的主要带，占 95%的总纤维素酶蛋白质，余量由 CBHI、CBHII、EGI 和 EGIII 组成。蛋白质浓度的量化通过扫描激光光密度法进行，如通过使用带有 ImageMaster 软件的 Sharp JX 330 扫描仪(由 Pharmacia Biotech 购得)进行。

合并主要由 EGII 组成的 10ml 组分，并通过超滤浓缩至 6.5g/L，然后冷冻保存。该酶被称为“富 EGII”并用于进一步实验。

实施例 3：通过富 EGII 改善细绒除去

在脱绒球应用中如下评价四种木霉属纤维素酶制剂的性能：

1. 实施例 2 的富 EGII 纤维素酶。
2. 50%EGI、37%EGII 和 13%EGIII 的纤维素酶制剂，该制剂无

CBHI。该制剂与图 1 中指出的 Clarkson '853 的最好混合物匹配。如下确定在该混合物中的内切葡聚糖酶的比例：在 Clarkson '853 的实施例 13 中，在天然混合物中的纤维素酶组分的比例为 CBHI 45-55%；CBHII 13-15%；EGI 11-13%；EGII 8-11%；ECIII 1-4%。在实施例 16 中，据称最好的和优选的酶去除了所有的 CBHI 与 CBHII。如果从总混合物中除去 CBHI 和 CBHII，余下的酶的平均浓度标准化至总共 100%，结果将如上所述。

3. 含有 96%CBHI、2%EGI 和 2%EGII 的纤维素酶制剂，该制剂与由 Bjork '463 报告的最好混合物相匹配。确定在该混合物中的酶的比例如下：在 Bjork 的 '463 实施例 3 的表 III 中，教导了酶的最好混合物是 500ppm CBHI 和 20ppmEGII 加 EGI，它们的量是相等的(参见第 45 行)。这样的 500ppm CBHI、10ppm EGI 和 10ppm EGII 的混合物具有如上所述的比例。

4. Iogen 纤维素酶，具有在表 1 所述的和图 1 中所示的比例的天然组纤维素酶的市售纤维素酶产品。

这四种组合物的评价阶段是由两种测量标准组成：(1) 从织物中除去细绒，这是希望的，(2)织物的破坏，这是不希望的。实施例 3 讨论了除去细绒，实施例 4 讨论了对织物的破坏。

如下进行脱绒球评价。织物由 60%Tencel® 和 40%棉花的未染色的混纺纱组成。Tencel 是 Courtaulds 有限公司 lyocell 织物品牌的商标。织物表面以这样的织物制造中间阶段中典型的方式产生很多绒球。织物圆片的直径为 7.8cm，重 1 克，将其置于 250ml Erlenmeyer 平底瓶的底面。将直径 4.76mm 的总共 145 个钢球(总重 63g)放置在织物上面。将酶在 50mM 柠檬酸盐缓冲液(pH 4.8)中稀释，7.5mg 蛋

白质添加至 6 克缓冲液中。将酶/缓冲液在水浴中预热至 50 °C，然后添加至织物中。培养瓶在 New Brunswick 旋转震荡器中以 225RPM 震荡 1 小时，在这时，在预先称重的玻璃微纤维滤纸上过滤培养瓶的内容物。取出钢球，以去离子水洗涤培养瓶和滤纸三次，然后滤纸在干燥箱中于 100 °C 下干燥 90 分钟。所收集的细绒的量通过从最终的重量减去滤纸的初始重量确定，然后以占织物初始重量的百分比表达结果。

结果在表 2 中显示。富 EGII 的纤维素酶与 Clarkson'853 、 Clarkson'428 或 Iogen 市售酶的纤维素酶相比从织物释放出更多的细绒。通过富 EGII 除去细绒比通过其它酶除去细绒更优越这一点从织物的视觉检查中也是明显的。通过从织物除去更多的细绒，富 EGII 比所测试的其它酶产生更平滑、更可接受的表现。另外，可以以比其它酶量少的富 EGII 达到除去细绒的给定水平，这可以导致更经济的脱绒球处理。

表 2：通过富 EGII 和其它酶的脱绒球结果

酶 (7.5mg/g 织物)	除去的细绒 (%初始织物重量)
富 EGII(95%EGII)	0.80
Clarkson '853(50%EGI 、 37%EGII 、 13%EGIII)	0.45
Clarkson '428(90%CBHI 、 5%EGI 、 5%EGII)	0.05
Iogen 纤维素酶(45-55%CBHI; 13-15%CBHII; 11-13%EGI; 8-11%EGII; 1-4%EGIII)	0.65

实施例 4：通过富 EGII 纤维素酶减少纤维破坏

酶评价的第二部分是在脱绒球期间测量织物破坏。该评价如下进行，即对于四种试验酶混合物的每种，使用能达到除去“全部”细绒(通

常是初始织物重量的大约 0.6% (重量) 量的酶(mg/每克织物), 然后测量产生的葡萄糖的量以推断多少织物纤维也被破坏。理想地是, 除去初始织物重量的 0.6% 相应于仅除去不希望的细绒, 非常少量(如果有的话)的织物结构内部的纤维被破坏。

本实施例利用与实施例 3 相同的酶。除了选择每种酶的剂量以在检查时显示除去了所有的细绒(在试验样品中大约是初始织物重量的 0.6%)外, 脱绒球处理与滤液收集利用如同在实施例 3 中相同的技术进行。

除了细绒也被破坏成葡萄糖的织物的量如下测定。向滤液中添加至每升 20 克的浓度的硫酸并在蒸汽高压灭菌器中加热至 121 °C 保持 1 小时。将培养瓶冷却至室温并用柠檬酸钠缓冲液调整至 pH 5, 然后在 Dionex 脉冲电流 HPLC(Dionex 公司, San Jose, 加利福尼亚)测定滤液的葡萄糖浓度。将葡萄糖浓度与织物的初始重量相关以测定转换成葡萄糖的百分数。

该方法以几种水平的纤维素酶进行以建立从四种织物样品除去细绒所需的水平, 每种样品都被测得具有约 0.6% 的初始织物重量的细绒。富 EGII 所需要的水平是每克织物仅 6.0 mg 酶, Clarkson '853 的酶需要 9.0 mg/克, Clarkson '428 的酶需要 45.0 mg/克, Iogen 纤维素酶需要 7.2 mg/克。一旦确定了用于完全脱绒球的纤维素酶水平, 也就可以得到通过这种水平的纤维素酶把织物破坏成葡萄糖的量, 因为在每次试验中仅细绒破坏产生的葡萄糖是常量。结果在表 3 中显示。

在完全脱绒球试验中, 富 EGII 纤维素酶引起比其它所评价的三种酶试验混合物的任何一种都要小得多的不希望织物破坏: 这三种

酶是市售纤维素酶、Clarkson '853 的酶以及 Clarkson '428 的酶。利用富 EGII 纤维素酶能减少织物破坏这一事实表明：以富 EGII 处理比以任何其它已知的混合物处理能得到更结实的织物。

对于所给定的脱绒球处理，富 EGII 纤维素酶比 Clarkson '853 所教导的纤维素酶混合物造成的织物破坏少 63%。

对于所给定的脱绒球处理，富 EGII 纤维素酶比 Clarkson '428 所教导的纤维素酶混合物造成的织物破坏少 80%。

对于所给定的脱绒球处理，富 EGII 纤维素酶比用于商业脱绒球处理的标准纤维素酶混合物造成的织物破坏少 88%。

表 3：除尽纤维素酶和其它酶的脱绒球结果

酶	纤维素酶水平 (mg/克织物)	织物破坏* (%初始织物重量)
富 EGII(95%EGII)	6.0	0.30
Clarkson'853 (50%EGI、37%EGII、13%EGIII)	9.0	0.80
Clarkson'428 (90%CBHI、5%EGI、5%EGII)	45.0	1.50
logen 纤维素酶	7.2	2.50

* 除去所有细绒后(大约 0.6%的初始织物重量)

尽管已示出并描述了本发明的优选实施方案，但本发明仅由所附的权利要求的范围定义，每一个所列举的权利要求的任何等价物是普通技术人员能够想到的并且未被现有技术所提示过的。

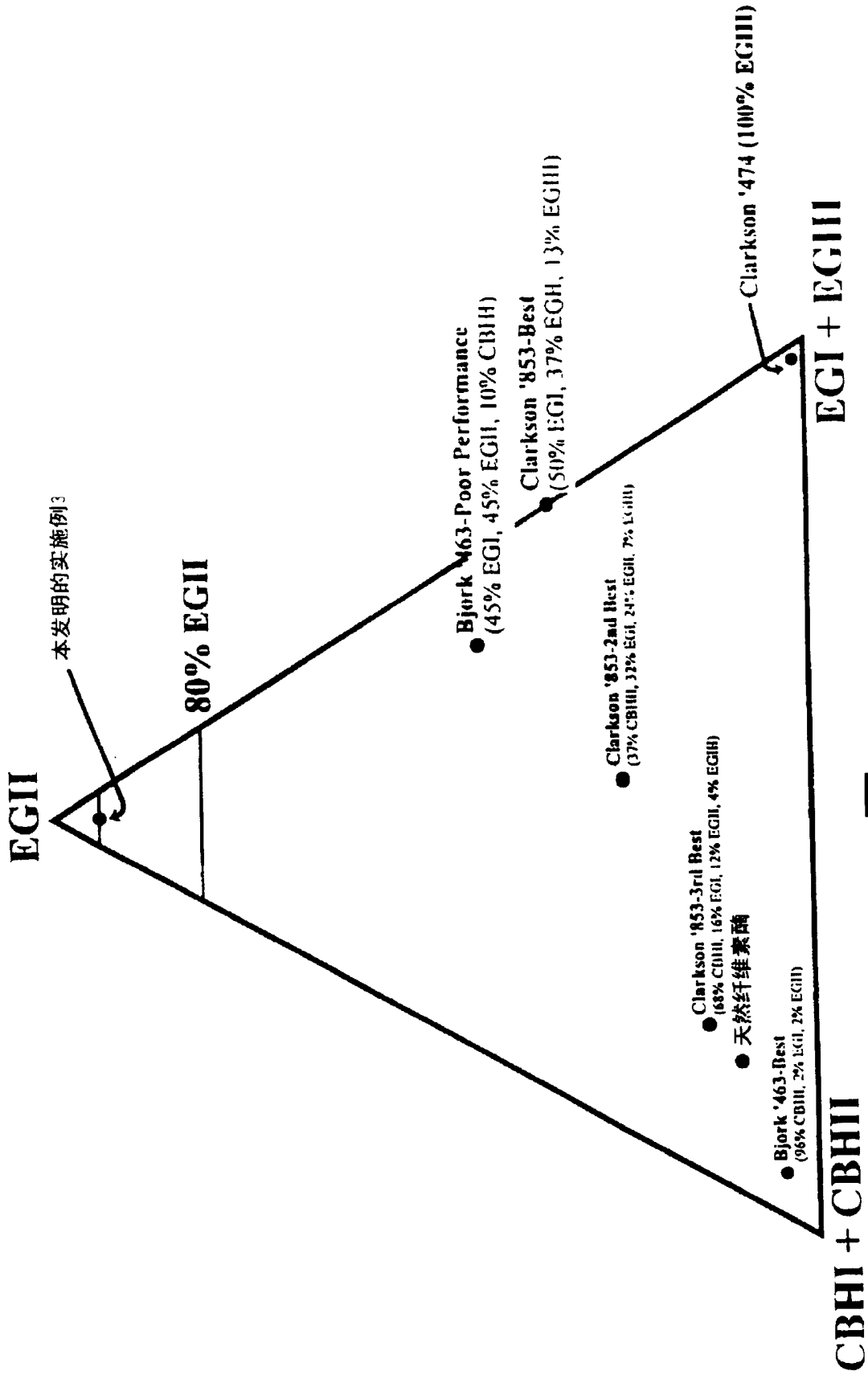


图1