

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 94190305.2

[45] 授权公告日 2001 年 3 月 7 日

[11] 授权公告号 CN 1062906C

[22] 申请日 1994.5.19 [24] 颁证日 2001.1.13
[21] 申请号 94190305.2
[30] 优先权
[32] 1993.5.19 [33] JP [31] 117392/1993
[86] 国际申请 PCT/JP94/00805 1994.5.19
[87] 国际公布 WO94/26881 日 1994.11.24
[85] 进入国家阶段日期 1995.1.19
[73] 专利权人 花王株式会社
地址 日本东京
[72] 发明人 荒胜俊 佐伯胜久 五十岚一晓
高岩美喜雄 上村隆明 川合修次
伊藤进 萩原浩 小林敬 田中笃史
星野荣一

[56] 参考文献
JP3290498A 1991.12.20 C11D1/22
JP4058885A 1992.2.25 C12N1/20
JP4500756A 1992.2.13 C08B30/12
JP49124285A 1974.11.28 C11D3/386
[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所
代理人 全 菁
审查员 王朋飞

权利要求书 3 页 说明书 29 页 附图页数 5 页

[54] 发明名称 液化碱性 α -淀粉酶、其制备方法及其含有
它的洗涤剂组合物

[57] 摘要

本发明涉及一种具有下述酶性能的液化碱性 α -淀粉酶:

(1) 作用:

它水解淀粉,直链淀粉,支链淀粉及其部分降解产物中的 α -1,4-糖苷键,并由直链淀粉产生葡萄糖,麦芽糖,麦芽三糖,麦芽四糖,麦芽五糖和麦芽六糖。但它对出芽短梗孢糖不起作用。

(2) 等电点:

用等电电泳测得其等电点高于 8.5。

该酶具有能高度无规降解淀粉和淀粉多聚糖的液化活性,且最佳 pH 值在碱性一侧。由于高等电点,它能轻易被提纯。含有该酶的一种洗涤剂组合物尤其对污渍食品的污点具有优异去污力。

权 利 要 求 书

1. 一种具有如下酶性能的液化碱性 α -淀粉酶:

1)作用:

它水解淀粉, 直链淀粉, 支链淀粉及其部分降解产物中的 α -1, 4-糖苷键, 且由直链淀粉产生葡萄糖(G1), 麦芽糖(G2), 麦芽糖(G3), 麦芽四糖(G4), 麦芽五糖(G5)和麦芽六糖(G6), 但它对出芽短梗孢糖不起作用;

2)等电点:

当用等电聚焦电泳测量时, 其等电点为 8.7-9.7; 和

3)最佳 pH:

最佳 pH 为 8.0-10.0.

2. 一种具有如下酶性能的液化碱性 α -淀粉酶:

1)作用:

它水解淀粉, 直链淀粉, 支链淀粉及其部分降解产物中的 α -1, 4-糖苷键, 并由直链淀粉产生葡萄糖(G1), 麦芽糖(G2), 麦芽三糖(G3), 麦芽四糖(G4), 麦芽五糖(G5)和麦芽六糖(G6), 但它对出芽短梗孢糖不起作用;

2)作用 pH 和最佳 pH:

它在 5.0-11.0 的 pH 范围内起作用, 最佳 pH 为 8.0-9.0;

3)pH 稳定性:

它在 6.5-10.0 的 pH 范围内非常稳定, 且即使在 pH5.0-10.5 范围内, 它在 40℃ 处理 30 分钟后保持至少 50% 的活性;

4)作用温度范围和最佳温度:

在 20℃ - 80℃ 的温度范围内起作用,最佳温度为 45℃ - 55℃;

5)热稳定性:

它在 50℃ 或更低温度下非常稳定(在 pH 为 8.5 的氨基乙酸盐 - 氢氧化钠缓冲液中处理 30 分钟);

6)分子量:

按十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳测得其分子量为 50000 ± 5000;

7)等电点:

当用等电聚焦电泳测量时其等电点在 9.2 左右;

8)金属盐的影响

它对 K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} 和 Al^{3+} 非常稳定;

9)表面活性剂的影响:

其活性基本不受表面活性剂如线形烷基苯磺酸钠, 烷基硫酸酯钠, 聚氧乙烯烷基硫酸酯钠, 烷基磺酸钠, 皂或聚氧乙烯烷基醚的抑制。

3. 根据权利要求 1 或 2 的一种液化碱性 α -淀粉酶, 其特征在于在其 N-端氨基酸区域它具有一个 Asn - Gly - Thr - Met - (Met) - Gln - Tyr - Phe - Glu - Trp 序列。

4. 一种制备权利要求 1 - 3 中任一项所限定的液化碱性 α -淀粉酶的方法, 它包括培养一种属于芽孢杆菌属的液化碱性 α -淀粉酶产生细菌, 并从所得培养物中收集液化碱性 α -淀粉酶。

5. 根据权利要求 4 的一种制备液化碱性 α -淀粉酶的方法,

其特征在於該液化鹼性 α -澱粉酶產生細菌為芽孢桿菌 KSM - AP1378 (FERM BP - 3048)。

6. 一種包含權利要求 1-3 中任一項所限定的液化鹼性 α -澱粉酶的洗滌劑組合物。

7. 根據權利要求 6 的一種洗滌劑組合物，其特徵在於該液化鹼性 α -澱粉酶業已由芽孢桿菌 KSM - AP1378 (FERM BP - 3048) 產生。

8. 根據權利要求 6 或 7 的一種洗滌劑組合物，它進一步包含 0.5 - 60 重量% 量的一種陰離子表面活性劑和/或非離子表面活性劑。

9. 根據權利要求 6 或 7 的一種洗滌劑組合物，其特徵在於就對可溶性澱粉的降解活性而言由 DNS 方法，即 Dansyl 法測量時，液化鹼性 α -澱粉酶的摻入量為 1 - 10000U/g。

说明书

液化碱性 α -淀粉酶、其制备方法及其含

有它的洗涤剂组合物

本发明涉及可用作洗涤剂组分的液化碱性 α -淀粉酶，其制备方法及其含有它们的洗涤剂组合物。

α -淀粉酶是仅水解淀粉多聚糖如淀粉、直链淀粉和支链淀粉分子中的 α -1,4-糖苷键的酶。自从1833年由 *Payen* 和 *Persoz* 从麦芽提取液中发现 α -淀粉酶后，它们业已从如下各种活的生物体中以结晶试样或电泳一致的试样得到：例如主要属于芽孢杆菌属的细菌，如枯草芽孢杆菌，纳豆芽孢杆菌 (*Bacillus Subtilis natto*)，解淀粉芽孢杆菌，地衣芽孢杆菌，蜡状芽孢杆菌，环状芽孢杆菌，浸麻芽孢杆菌，施氏假单胞菌和产气克雷伯氏菌；放线菌属如灰色链霉菌；主要属于曲霉属的霉菌，如米曲霉和黑曲霉；禾本科和豆种植物的种子；以及动物如人和猪的消化腺。

α -淀粉酶业已广泛使用了很多年，例如用于酿造工业中谷类和土豆的糖化，作为纤维工业中的脱浆剂，作为制药工业中的高效消化剂及在食品工业中用于生产粘稠麦芽糖浆。

本发明人以前发现在碟用洗涤剂或衣用洗涤剂中将此种 α -淀

粉酶与一种脱支酶掺合可制备一种对淀粉污点的去污力得到显著改进的洗涤剂并已就其提交了专利申请(日本专利公开 No. 132192/1990)。

迄今在天然界中业已发现的 α -淀粉酶大都数在中性至酸性范围内表现出最大和稳定的酶活性,换言之,大多数归为中性至酸性 α -淀粉酶,这就导致如下缺点:它们的活性在 pH 处于碱性一侧的含表面活性剂的溶液中变差。另一方面,在碱性范围表现出最大活性或具有抗碱性的 α -淀粉酶,换言之,碱性 α -淀粉酶和抗碱的 α -淀粉酶不具有以上缺点,可用作洗涤剂组分。此类碱性 α -淀粉酶和抗碱的 α -淀粉酶的已知实例仅局限于由芽孢杆菌 A-40-2 菌株产生的酶[*Agric. Biol. Chem.*, 35,1783(1971)],由芽孢杆菌 NRRL

B-3881 菌株产生的酶[*J. Bacteriol.*, 110,992(1972)],由链霉菌 KSM-9 产生的酶(日本专利公开 No. 209588/1986),由芽孢杆菌 H-167 菌株产生的酶(日本专利公开 No. 208278/1987),由 *Bacillus alcalothermophilus* A3-8 菌株产生的酶(日本专利公开 No. 49584/1990)和由 *Natrococcus* sp. Ah-36 菌株产生的酶(日本专利公开 No. 211369/1992)。顺便说说,这里所用的术语“碱性 α -淀粉酶”指一种最佳 pH 在碱性范围的 α -淀粉酶,而“抗碱的 α -淀粉酶”指一种最佳 pH 在中性到酸性范围内,但即使在碱性范围仍然能表现出可与最佳 pH 下的活性相比较的活性并能保持稳定性的 α -淀粉酶。这里所用的术语“中性”指 pH 范围为 6-8,而“碱

性”指 pH 范围高于上一范围。

就本发明人所知，这些碱性和抗碱的酶属于所谓的将淀粉或淀粉多聚糖降解成葡萄糖，麦芽糖或麦芽三糖的糖化 α -淀粉酶。因此它们适于作为生产糖类的酶，但不适于用作洗涤剂的酶。注意到耐表面活性剂，此外能将淀粉或淀粉多聚糖高度无规降解的所谓液化 α -淀粉酶，本发明人继续进行了研究。结果发现传统上已知的碱性 α -淀粉酶仅表现出糖化性能，而完全没有关于液化碱性 α -淀粉酶的报道。

此外，为获得传统的碱性 α -淀粉酶，需要几个步骤的提纯。这一提纯作为酶的工业规模的提纯方法不能令人满意。为了通过使用酶的性能而轻易地得到纯化酶，本发明人注意到一种具有高表面电荷的酶蛋白。结果发现迄今所知的所有碱性 α -淀粉酶的等电点约为 3.0—8.0，而且根本没有关于如本发明中等电点超过 8.5 的碱性 α -淀粉酶的报道。

因此，本发明的一个目的是提供一种具有耐表面活性剂能力，最佳 pH 在碱性范围，为液化型，即高度无规地降解淀粉或淀粉多聚糖并具有高等电点的 α -淀粉酶；还涉及一种含有该 α -淀粉酶的洗涤剂组合物。

在上述情况下，本发明人继续进行了广泛的研究，以期从天然界中发现一种能产生具有上述性能的液化碱性 α -淀粉酶的微生物。结果在属于芽孢杆菌属的微生物培养中发现了一种具有液化型反应

性能的新型碱性 α -淀粉酶,该微生物以前在日本专利公开 No. 108482/1991 中报道为能产生同时具有 α -淀粉酶活性和支链淀粉酶活性且分子量为 200000 ± 5000 的酶的微生物。还发现将该酶掺入洗涤剂中可显著改进对吃饭时溅出的咖喱 (curry) 和蕃茄酱的混合污点的去污力,由此完成了本发明。

因此,本发明提供了一种具有如下酶特性的液化碱性 α -淀粉酶,其制备方法及一种含有它的洗涤剂组合物。

1)作用:

该液化碱性 α -淀粉酶水解淀粉、直链淀粉、支链淀粉及其部分降解产物中的 α -1, 4-糖苷键,并从直链淀粉产生葡萄糖(G1),麦芽糖(G2),麦芽三糖(G3),麦芽四糖(G4),麦芽五糖(G5)和麦芽六糖(G6)。但它对出芽短梗孢糖不起作用。

2)等电点:

当用等电聚焦电泳测量时其等电点高于 8.5。

图 1 图解说明了作为 pH 的函数的本发明的液化碱性 α -淀粉酶的活性。图 2 图解说明了本发明的液化碱性 α -淀粉酶的 pH 稳定性。图 3 图解描述了本发明的液化碱性 α -淀粉酶能起作用的温度范围。图 4 图解描述了本发明的液化碱性 α -淀粉酶的热稳定性。图 5 图解显示了本发明的液化碱性 α -淀粉酶在十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶中的电泳结果(12.5%聚丙烯酰胺凝胶,在 95℃下处理 4 分钟,快速 CBB 染色)。

从 α -淀粉酶作为用于洗涤剂的一个组分来看,最好将本发明的液化碱性 α -淀粉酶的最佳pH控制在8.0—10.0的范围内。

对于产生本发明的液化碱性 α -淀粉酶的微生物没有特别限制,只要它具有产生具有如下性能的 α -淀粉酶的能力:能高度无规地降解淀粉或淀粉多聚糖,最佳pH在碱性范围且具有高等电点。其实例包括属于芽孢杆菌属且公开于日本专利公开 No. 108482/1991 中的芽孢杆菌 KSM—AP1378(FERM BP—3048)。

为了通过使用以上菌株得到本发明的液化碱性 α -淀粉酶,可将该菌株接种于一培养基上,然后用本领域本身已知的方式培养。最好在培养基中混入适当量的某些可同化的碳源和氮源。尽管对碳源和氮源没有特别限制,但氮源的实例包括有机氮源如玉米谷蛋白粉,黄豆粉,玉米浸渍液,酪蛋白氨基酸,酵母抽提物,pharmamedia,肉羹,胰胨(trypton),soyton,hypro,agipower,大豆粉,棉籽油饼,cultivator,ajipron 和 zest;和无机氮源,如硫酸铵,硝酸铵,磷酸铵,碳酸铵,硝酸钠和乙酸铵。碳源的实例包括可溶性淀粉,不溶性淀粉,支链淀粉,糖元,出芽短梗孢糖和通过它们的部分降解而得到的低聚糖,可同化碳源如葡萄糖,麦芽糖,阿戊糖,木糖,核糖,甘露糖,果糖,半乳糖,麦芽糖,蔗糖,乳糖,海藻糖,甘露糖醇,山梨糖醇和丙三醇及可同化有机酸,如乙酸。此外,诸如磷酸盐,镁盐,钙盐,锰盐,锌盐,钴盐,钠盐和钾盐之类的无机盐,以及必要时还有无机和有机微量源可按需要加入培养基中。

按照酶的常规采样和提纯方法,液化碱性 α -淀粉酶,即目标物质可从如上培养的细胞中采集,然后提纯。即,用常规使用的固-液分离方法如离心分离或过滤将微生物体从培养基中除去,从而可以溶液形式得到相应的粗制酶。粗制酶溶液可以直接使用。它还可以在通过用诸如盐析、溶剂沉淀、超滤或根据需要用凝胶过滤之类的分离方法分离,然后利用其高等电点使已分离的粗制酶通过凝胶等电聚焦电泳,密度梯度等电聚焦电泳,离子交换色谱等提纯和结晶之后以纯化酶使用。

这样得到的本发明的 α -淀粉酶的最佳 pH 在碱性范围,具有高度无规降解性能(这意味着它是液化型的)以及高等电点。因而它具有不同于传统碱性 α -淀粉酶的特有性能。下面将对使用芽孢杆菌 KSM-AP1378(FERM BP-3048)菌株得到的本发明的液化碱性 α -淀粉酶的各种酶性能作一介绍。

顺便说说,酶活性是使用如下缓冲液(各 40mM)按下述方法测定。

pH4-6 乙酸缓冲液

pH6-8 三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液

pH8-11 氨基乙酸盐-氢氧化钠缓冲液

pH11-12 氯化钾-氢氧化钠缓冲液

酶活性的测定方法(用 DNS 法测定淀粉酶活性):

将 0.1ml 酶溶液加到 0.9ml 溶有可溶性淀粉(Wako Pure

Chemical Industries, Ltd. 的产品,在反应体系中的最终浓度:0.5%)的缓冲液中,然后在 40℃下反应 30 分钟。反应后,用 3,5—二硝基水杨酸(DNS)法定量分析还原性糖。具体来说,将 1.0ml DNS 试剂加到 1.0ml 反应混合物中,然后在 100℃下加热 5 分钟显色。冷却后,反应混合物中加入 4.0ml 稀释用去离子水,并在 535nm 波长下进行比色测定。作为酶的滴定率,将在 1 分钟内产生相当于 1 微摩尔葡萄糖的还原性糖的酶的量定义为 1 单位(1U)。

(各种酶性能)

(1)作用

本发明的液化碱性 α -淀粉酶水解淀粉、直链淀粉、支链淀粉及其部分降解产物中的 α -1,4-糖苷键。然而它对出芽短梗孢糖不起作用。

它对各种培养基的作用示于表 1。

表 1

培养基	浓度 (%)	相对活性 (%)
可溶性淀粉(土豆)	0.25	100.0
直链淀粉(玉米)	0.25	92.3
支链淀粉(玉米)	0.25	86.6
支链淀粉(土豆)	0.25	85.1
糖元(牡蛎)	0.25	73.2
糊精	0.25	0.0
葡聚糖	0.25	0.0
出芽短梗孢糖	0.25	0.0

(2)作用 pH 和最佳 pH:

它在约 5.0—11.0 的 pH 范围内起作用,而其最佳 pH 为 8.0—9.0(图 1)。

(3)pH 稳定性

它在 6.5—10 的 pH 范围内非常稳定。即使在 5—10.5 的 pH 范围内,它至少保留约 50% 的活性(图 2)。

(4)作用温度范围和最佳温度

它在 20—80℃ 的宽温度范围起作用,而最佳温度为 45—55℃ (图 3)。

(5)热稳定性

通过在 pH 为 8.5 时改变温度并在各温度下处理 30 分钟来研究本发明的酶的失活条件。结果发现它在 50℃ 以内非常稳定(图 4)。

(6)分子量

用十二烷基硫酸钠—聚丙烯酰胺凝胶电泳测得其分子量为 50000 ± 5000 (图 5)。

(7)等电点

用等电聚焦电泳测得其等电点约为 9.2。

(8)金属盐的影响

分别将其在含有表 2 所示的各种金属盐的各反应体系中于 50℃ 下处理 15 分钟,由此来研究它们的影响。结果发现本发明的酶对自来水中一般含有的金属离子如 K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} 和 Al^{3+} 非常稳定。

表 2

金属盐	浓度 (mM)	残留活性 (%)
KCl	50	112.0
NaCl	50	109.1
CaCl ₂	1	96.8
CuCl ₂	1	102.9
CoCl ₂	1	62.5
MnCl ₂	1	116.9
BaCl ₂	1	108.7
NiCl ₂	1	27.2
CdCl ₂	1	19.5
HgCl ₂	1	0.0
MgCl ₂	1	106.7
FeCl ₂	1	114.4
FeCl ₃	1	93.2
AlCl ₃	1	101.5

(9)表面活性剂的作用

即使在 40℃ 下用诸如线形烷基苯磺酸钠 (LAS), 烷基硫酸酯钠盐 (AS), 聚氧乙烯烷基硫酸酯钠盐 (ES), 烷基磺酸钠 (SAS), 皂和聚氧乙烯烷基醚之类的各种表面活性剂的 0.05% 溶液处理 30 分钟, 其活性几乎不受抑制。

(10)淀粉水解速率

来自土豆的淀粉的降解速率约为 32%。此外, 它能把直链淀粉 (聚合度: 117 个葡萄糖分子) 降解成葡萄糖 (G1), 麦芽糖 (G2), 麦芽三糖 (G3), 麦芽四糖 (G4), 麦芽五糖 (G5) 和麦芽六糖 (G6)。

(11)N-端氨基酸序列的分析

用 Edman 降解测定本发明淀粉酶的 N—端氨基酸序列〔Edman, P., *Acta Chem. Scand.*, 4, 283(1948)〕, 仪器为蛋白定序器(477A 型, ABI 公司产)。结果发现在 N—端基区域具有该液化淀粉酶特有的一般序列(Asn—Gly—Thr—Met—(Met)—Gln—Tyr—Phe—Glu—Trp)。顺便说说, 有关液化 α —淀粉酶的 N—端基区域的文献的例子包括 *J. Biochem.*, 98, 1147—1156(1985) 和 *J. Biochem.*, 98, 95—103(1985)。

就对来自土豆的可溶性淀粉的降解活性而言, 本发明的各洗涤剂组合物可含有上述液化碱性 α —淀粉酶的量 1—10000U/g, 更优选 5—5000U/g, 最优选 10—1000U/g。

本发明的各洗涤剂组合物可进一步含有已知洗涤剂组分, 这将例举如下。

(1) 表面活性剂

表面活性剂的实例包括阴离子表面活性剂, 如平均来说各含有至少一个 C_{10} — C_{16} 烷基的线形烷基苯磺酸盐, 平均来说各含有至少一个 C_{10} — C_{20} 线形或支化烷基且每分子加有 0.5—8 摩尔环氧乙烷的烷基乙氧基硫酸盐, 平均来说各含有至少一个 C_{10} — C_{20} 烷基的烷基硫酸盐, 平均每分子含 10—20 个碳原子的链烯磺酸盐, 平均每分子含 10—20 个碳原子的烷烃磺酸盐, 平均每分子含有 10—20 个碳原子的 α —磺基脂肪酸的甲酯及乙酯, 平均含有 8—20 个碳原子的高级脂肪酸盐以及平均来说各含有一个 C_{10} — C_{20} 线形或支化烷基

且每分子加有 0.5—8 摩尔环氧乙烷的烷基醚羧酸盐；非离子表面活性剂，如平均来说各含有至少一个 C_{10} — C_{20} 烷基且加有 1—20 摩尔环氧乙烷的聚氧乙烯烷基醚，高级脂肪酸链烷醇酰胺及其烯化氧加合物，以及公知为“Pullulonic”的环氧丙烷—丙二醇缩合物的环氧乙烷加合物；甜菜碱型两性表面活性剂；磺酸型两性表面活性剂；磷酸酯型表面活性剂；氨基酸型表面活性剂；及阳离子表面活性剂。

这些表面活性剂加到洗涤剂组合物中的量为 0.5—60 重量%（以后仅称“%”）。具体而言，在粉末洗涤剂组合物情况下其加入量为 10—45%，而在液态洗涤剂组合物情况下其加入量为 20—50%。当本发明的洗涤剂组合物为漂白洗涤剂或用于自动洗碟机的洗涤剂时，这些表面活性剂的加入量一般为 1—10%，优选 1—5%。

(2) 二价金属离子净化剂

二价金属离子净化剂的实例包括缩合磷酸盐，如三聚磷酸盐，焦磷酸盐和正磷酸盐；硅铝酸盐，如沸石；层状合成晶状硅酸盐；次氨基三乙酸盐，乙二胺四乙酸盐，柠檬酸盐，异柠檬酸盐和聚缩醛羧酸盐。

这些二价金属离子净化剂的加入量可为 0—50%，优选 5—40%。更希望使用无磷二价金属离子净化剂。

(3) 碱性试剂和无机盐

这些物质的实例包括硅酸盐，碳酸盐，倍半碳酸盐，硫酸盐及链烷醇胺。

它们的加入量可为 0—80%，优选 1—40%。

(4)再染污防止剂

再染污防止剂的实例包括聚乙二醇，聚丙烯酸盐，聚丙烯酸共聚物，聚乙烯醇，聚乙烯吡咯烷酮和羧甲基纤维素。某些再染污防止剂还起二价金属离子净化剂的作用。

它们的加入量可为 0—10%，优选 1—5%。

(5)酶

酶的实例包括纤维素酶，液化碱性 α -淀粉酶以外的淀粉酶，脂酶，半纤维素酶， β -糖苷酶，葡萄糖氧化酶，胆甾醇氧化酶和蛋白酶。

(6)自来水中存在的氯气的净化剂或还原剂

存在的氯气的净化剂的实例包括硫酸铵，脲，盐酸脲，碳酸脲，氨基磷酸脲，二氧化硫脲，一乙醇胺，二乙醇胺，三乙醇胺，以氨基乙酸和谷氨酸钠为代表的氨基酸，蛋白质如牛血清清蛋白和酪蛋白，蛋白质水解产物，肉羹及鱼肉羹。

还原剂的实例包括碱金属盐和碱土金属盐，如硫代硫酸盐，亚硫酸盐和连二亚硫酸盐。*Rongalit C. Sulfites* 是特别优选的，因为它们能稳定洗涤液中的酶。

(7)漂白剂

漂白剂的实例包括过碳酸盐，过硼酸盐，磺化酞菁锌或磺化酞菁铝及过氧化氢。对于漂白剂，过碳酸钠是特别有效的。这些漂白剂的加入量可为 1—95 重量%，更优选为 5—95 重量%，特别是 20—95 重

量%。

(8) 荧光染料

在洗涤剂中普遍使用的荧光染料。

(9) 加溶剂

对于液态洗涤剂,可使用例举如下的加溶剂:

低级醇如乙醇;低级烷基苯磺酸盐如苯磺酸盐和对甲苯磺酸盐;
及多元醇如丙二醇。

(10) 其他添加剂

此外,本发明的各洗涤剂组合物可按需要含有一种或多种通用洗涤剂组分,如传统已知的香料,防粘结剂,酶活化剂,抗氧化剂,防腐剂,着色剂,上蓝剂,漂白活化剂,酶稳定剂和状态调节剂(*phase adjusters*)。

本发明的各洗涤剂组合物可通过组合使用液化碱性 α -淀粉酶和一种或多种上述已知洗涤剂组分按本领域本身已知的方法制备。洗涤剂的形式可根据应用目的来选择。形式的实例包括液体,粉末和颗粒。本发明的洗涤剂组合物可用作家用洗涤剂,漂白洗涤剂,自动洗碟洗涤剂,排水管道清洁剂,人造牙洗涤剂等。它特别适于用作家用洗涤剂,漂白洗涤剂或自动洗碟洗涤剂。

实施例

下面将通过如下实施例来更详细地介绍本发明。但应当记住本发明决不局限于这些实施例或受其限制。

实施例 1

在一个含有 1% 可溶性淀粉(来自土豆), 1.0% 胨(pepton)(商标名: polypepton), 0.5% 酵母抽提物, 0.1% KH_2PO_4 , 0.25% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.02% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.001% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0001% $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 和 1.0% Na_2CO_3 的培养基上, 在振荡下于 30℃ 有氧培养日本专利公开 No. 108482/1991 实施例 1 中所描述的芽孢杆菌 KSM-AP1378 菌株 3 天。从培养基中取出细胞, 由此得到一上层清液。然后加硫酸铵到上层清液中得到 20% 饱和度, 接着在 5℃ 下搅拌 2 小时以沉淀蛋白质。离心除去沉淀的蛋白质。再加硫酸铵到所得上层清液中得到 40% 饱和度, 接着在 5℃ 下搅拌 12 小时以沉淀蛋白质。离心收集沉淀物并将其悬浮于 10mM 三羟甲基氨基甲烷—盐酸缓冲液(pH8)中, 然后对缓冲液渗析 24 小时。然后在高效液相色谱上通过凝胶过滤(TSK-G3000SW 柱)使残留物(retentate)分级, 由此收集活性级分并混合。使用超滤膜浓缩混合的活性级分, 接着对 10mM 三羟甲基氨基甲烷—盐酸缓冲液(pH8)渗析一夜。十二烷基磺酸钠(SDS)—聚丙烯酰胺凝胶电泳(凝胶浓度: 7.5%)的结果是以单一带得到纯化酶。活性级分的收率为约 6.4%。

这样得到的酶具有上述酶性能。

实施例 2

比较一种含有本发明的液化碱性 α -淀粉酶的洗涤剂 and 一种含

有具有 α -淀粉酶活性的常规酶的洗涤剂的去污力。顺便说说,后面将提到的 DNS 试剂制备方法,酶活性测定及计算方法,染污织物制备方法 & 去污力测定方法将描述如下。

[DNS 试剂的制备方法]

将 16g 氢氧化钠溶于 200ml 去离子水中。将 DNS(5g) 逐渐加入并溶于所得溶液中。DNS 完全溶解后,加入 300g 酒石酸钠钾。在它们完全溶解后加入一定体积的去离子水使总体积达 1000ml。

[对可溶性淀粉降解活性的测定方法(待加 α -淀粉酶量的测定)]

(1) 培养基

来自土豆的可溶性淀粉(Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 的产品)的 0.5% 水溶液。

(2) 培养基溶液的制备

将 1.0g 来自土豆的可溶性淀粉(Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 的产品)溶于 100ml 去离子水中。

(3) 酶测定

将 0.5ml 培养基溶液加入一个试管中,然后加入 0.4ml 50mM 磷酸盐缓冲液(pH7.0)和 0.1ml 适当稀释的酶溶液。反应混合物在 40℃ 下培养 30 分钟。反应完成后,将 1ml DNS 试剂加入反应混合物中,然后在沸水中正好显色 5 分钟。显色后立即将反应混合物在冰-水浴中冷却,然后加入 4ml 去离子水。将其彻底混合并在 535nm 下迅速测量试样的吸收度。

(4)空白样的制备

将 0.5ml 培养基溶液加入一个试管中,然后加入 0.4ml50mM 磷酸盐缓冲液(pH7.0)和 1ml DNS 试剂。使所得混合物在沸水中正好显色 5 分钟。显色后立即将反应混合物在冰—水浴中冷却,然后加入 4ml 去离子水。将其彻底混合并在 535nm 下迅速测定空白样的吸收度。

(5)校准曲线的制备

将 0.5ml 培养基溶液加入一试管中,然后加入 0.4ml50mM 磷酸盐缓冲液(pH7.0)。往所得溶液中加入 0.1ml 校正曲线用葡萄糖溶液,使葡萄糖浓度为 260—1500 μ M。往所得溶液中加入 1ml DNS 试剂,然后在沸水中正好显色 5 分钟。显色后立即将溶液在冰—水浴中冷却。往冷却后所得溶液中加入 4ml 去离子水,然后彻底混合。然后迅速在 535nm 下测量溶液的吸收度。在曲线图上将葡萄糖浓度绘作横坐标,而吸收度作纵坐标,由此测定这些线形曲线的斜率。按下式计算转换因子(F):

$$F=[1/\text{斜率}]\times[1/15]\times[1/0.1]$$

按下式计算对直链淀粉的降解活性:

$$\text{活性}(U/\text{升})=\delta\text{吸收度}\times F\times\text{稀释率}$$

$$(\delta\text{吸收度}=\text{试样吸收度}-\text{空白样吸收度})$$

[用咖喱人工染污的织物的制备方法]

在混合器中切碎咖喱(“Bon Curry Gold, medium hot”,

商标名, OTSUKA SHOKUHIN CO., LTD 的产品)。将一棉织物与切碎的咖喱接触, 然后刷除多余的咖喱。从织物上切出 10cm×10cm 测试片。

[去污力评价方法]

用自记录比色计(Shimadzu 公司产)测量棉织物染污前的 460nm 反射度及染污片在洗涤前后的 460nm 反射度, 并从按下式计算的去污率(%)来评价去污力:

$$\text{去污率}(\%) = \frac{(\text{洗涤后反射度} - \text{洗涤前反射度})}{(\text{未染污棉织物反射度} - \text{洗涤前反射度})} \times 100$$

[液态洗涤剂的制备]

制备浓度为表 3 所示组合物的五倍的溶液, 然后用 1N 盐酸将 pH 调到 7.0。用去离子水稀释已调 pH 的溶液, 得到表 3 所示的浓度, 由此得到 pH7.0 的液态洗涤剂。

表 3

组分	加入量(重量%)
非离子表面活性剂 * 1	20
阴离子表面活性剂 * 2	20
柠檬酸	5
一乙醇胺	5
聚乙二醇 (平均分子量=约 10,000)	1
乙醇	5.0
水	余量
总计	100

* 1: (线形)烷基中碳原子平均数目为 12,而加入的环氧乙烷摩尔数为 7 的聚氧乙烯烷基醚。

* 2: 具有线形 C_{12-14} 烷基和平均加有 2.5 摩尔环氧乙烷的聚氧乙烯烷基硫酸钠。

将 1.3ml 这样得到的液态洗涤剂加到各 1l 4°DH 水中。分别将各种 α -淀粉酶加到 pH 为 7 的所得溶液中,得到的酶浓度为 150U/l(注:忽略加入各酶溶液引起的溶液体积升高,因为加入的酶溶液量实际上少至 1ml 或更少)。将用咖喱人工染污的各织物浸入已调至 30°C 的 1l 洗涤剂溶液之一中。将该洗涤剂溶液和浸入其中的织物放置 30 分钟,然后原样移到不锈钢烧杯(1l)中,用涤垢仪测去污力。在涤垢仪上于 20°C 和 100rpm 下将它们搅拌 10 分钟。用流水彻底漂洗织物并熨平后,测量其反射度,由此确定出该洗涤剂的去污百分率。结果示于表 4。从表 4 可明显看出,即使具有相同活性,含有本发明的液化碱性 α -淀粉酶的洗涤剂的去污力比分别加有传统 α -淀粉酶的洗涤剂要好。

表 4

	α -淀粉酶 *	最佳 PH	等电点	反应特性	去污率 (%)
发明产品 1	(1)	8.5	9.2	液化	80
对照产品 1	(2)	6.1	5.4	液化	60
对照产品 2	(3)	10.0	4.9	糖化	70
对照产品 3	(4)	5.2	3.7	糖化	55
对照产品 4	(5)	7.0	6.5	糖化	55
对照产品 5	(6)	5.6	7.2	液化	55
对照产品 6	未添加	-	-	-	50

* : (1) 来源于芽孢杆菌 KSM-AP1378, 且分子量约为 50000 (本发
明的淀粉酶)。

(2) 来源于枯草芽孢杆菌 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 的产品)。

(3) 来源于芽孢杆菌 KSM-AP1378, 且分子量约为 200000 (日本专利公开 No. 108482/1991 公开的酶, 且同时具有支链淀粉酶活性和 α -淀粉酶活性)。

(4) 来源于米曲霉 (Sigma Chemical Co., Ltd. 的产品)。

(5) 来源于猪胰脏 (Sigma Chemical Co., Ltd. 的产品)。

(6) 来源于地衣芽孢杆菌 ("Termamyl", Novo Industry A/S 的产品)。

实施例 3

将按下述方式制备的洗涤剂颗粒与碱性 α -淀粉酶的粒化产品干混合, 由此分别制备出具有表 5 所示组成的粒状洗涤剂。评价它们的去污力。

[洗涤剂的生产方法]

(1) 制备一种水含量为 50% 且由除 10% 沸石 4A, 荧光增白剂和香料外的表 5 所示的组分 (α -淀粉酶除外) 组成的淤浆混合物, 并喷雾干燥, 由此得到预成型洗涤剂颗粒。将这些颗粒置入高速混合器中, 然后粒化, 接着加入剩余组分, 由此得到一种粒状洗涤剂 (发明

产品 3 和 6 除外)。

(2) 制备一种水含量为 50% 且由除 10% 沸石 4A, 吸油载体, 荧光增白剂和香料外的表 5 所示发明产品 3 的组分 (α -淀粉酶除外) 组成的淤浆混合物, 并喷雾干燥, 由此得到预成型洗涤剂颗粒。将这些颗粒置入高速混合器中, 然后粒化, 接着加入剩余组分, 由此得到一种粒状洗涤剂(发明产品 3)。

(3) 在 Redige 混合器中搅拌除非离子表面活性剂, 10% 沸石 4A, 荧光增白剂和香料以外的表 5 所示发明产品 6 的组分 (α -淀粉酶除外) 的同时, 逐步加入非离子表面活性剂。加完后加入剩余组分, 由此得到一种粒状洗涤剂(发明产品 6)。

(4) 将实施例 1 得到的液化碱性 α -淀粉酶与硫酸钠和少量聚乙二醇粒化。将这样得到的颗粒分别与上面(1)–(3)得到的粒状洗涤剂干混合, 由此得到具有表 5 所示组成的粒状洗涤剂。

顺便说说, 这样得到的各粒状洗涤剂的平均粒径和堆积密度示如下。

发明产品 2, 4, 5, 7–9, 对照产品 7–9:

平均粒径: $400-500\mu\text{m}$,

堆积密度: $750-780\text{g}/\text{cm}^3$

发明产品 3:

平均粒径: $400\mu\text{m}$,

堆积密度: $770\text{g}/\text{cm}^3$

发明产品 6:

平均粒径: $450\mu\text{m}$,

堆积密度: $800\text{g}/\text{cm}^3$

[评价方法]

将得到的各粒状洗涤剂加到 4°DH 水中, 由此制得 0.833% 洗涤剂水溶液。将按实施例 2 用咖喱人工染污的织物浸入 1l 控制在 30°C 的洗涤剂溶液中。放置浸有织物的洗涤剂溶液, 然后将其原样移到不锈钢烧杯(1l) 中, 用涤垢仪测去污力。在涤垢仪上于 20°C 和 100rpm 下将它们搅拌 10 分钟。用流水彻底漂洗织物, 然后熨平。用类似于实施例 2 的方法测量织物的反射度, 由此确定出该洗涤剂的去污百分率。结果示于表 5。

表 5

组分(重量%)	发明产品									对照产品		
	2	3	4	5	6	7	8	9		7	8	9
碱性 α -淀粉酶*1	2	2	5	6	6	2	5	6		0	0	0
牛脂皂*2	0	0	0	0	1.5	0.5	0	0		0.5	0	0
碳酸钠	12	12	12	12	12	12	12	12		12	12	12
碳酸钾	0	5	0	0	0	0	0	3		0	0	0
JIS 2号硅酸钠	10	10	10	10	0	10	10	10		0	0	0
沸石 4A*3	30	20	30	30	30	20	20	20		30	30	30
非离子表面活性剂*4	0	10	0	0	20	3	3	3		0	0	0
阴离子表面活性剂a*5	20	10	18	18	0	20	20	20		20	20	20
阴离子表面活性剂b*6	20	10	20	20	0	10	10	10		20	20	20
聚乙二醇*7	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1
聚丙烯酸钠*8	2	2	2	2	2	2	2	2		2	2	2
吸油载体*9	0	5	0	0	10	0	0	0		0	0	0
荧光增白剂*10	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3		0.3	0.3	0.3
香料	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2		0.2	0.2	0.2
硫酸钠					余量						余量	
总计	100	100	100	100	100	100	100	100		100	100	100
去污率(%)	74	72	77	81	82	75	80	81		60	61	61

* 1: 来源于芽孢杆菌 KSM-AP1378, 且分子量约为 50000(液化碱性 α -淀粉酶), 比活性为 3000U/g。

* 2: 具有 12-14 个碳原子, 且中和率为 100%。

* 3: 平均粒径为 $0.9\mu\text{m}$ 。

* 4: 聚氧乙烯烷基醚

(EO 加入的平均摩尔数=8, 烷基碳原子数=12)

* 5: 线形烷基苯磺酸钠

(烷基碳原子数=12-16)

* 6: 烷基硫酸钠

(烷基碳原子数=12-14)

* 7: 平均分子量约 8000。加入量不包括 α -淀粉酶颗粒中的聚乙二醇。

* 8: 平均分子量约为 13000。

* 9: "Tokuseal NR"(商标名, Tokuyama Soda Co., Ltd. 的产品)

* 10: "Chinopearl CBS"[商标名, CIBA-GEIGY(日本), Ltd. 的产品]

实施例 4

分别制备具有表 6 所示的组分的液态洗涤剂。以类似于实施例 2 的方法进行洗涤试验以测定各洗涤剂的去污百分率。结果示于表 6。

表 6

组分(重量%)	发明产品			对照产品	
	10	11	12	10	11
碱性 α -淀粉酶*1	2	5	5	0	0
柠檬酸	2	2	2	2	2
非离子表面活性剂*2	20	15	20	20	15
阴离子表面活性剂a*3	20	10	15	20	20
聚乙二醇*4	1	1	1	1	1
一乙醇胺	3	3	3	3	3
荧光增白剂*5	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
乙醇	5	5	5	5	5
水	余量			余量	
总计	100	100	100	100	100
去污率(%)	70	68	71	50	52

* 1: 来源于芽孢杆菌 KSM-AP1378, 且分子量约为 50000(液化碱性 α -淀粉酶), 比活性为 3000U/g。

* 2: 聚氧乙烯烷基醚

(EO 加入的平均摩尔数=7, 烷基碳原子数=12-14)

* 3: 聚氧乙烯烷基硫酸钠

(EO 加入的平均摩尔数=2.5, 烷基碳原子数=12-14)

* 4: 平均分子量约 8000。

* 5: "Chinoparl CBS" [商标名, CIBA-GEIGY(日本), Ltd. 的产品]

实施例 5

在表 7 所示组分中, 在搅拌和混合过碳酸钠和苏打灰(重灰)的

同时加入 40%聚丙烯酸钠水溶液,和线形烷基苯磺酸钠或非离子表面活性剂。往所得混合物中加入实施例 3 得到的液化碱性 α -淀粉酶的颗粒,并搅拌至所得溶液完全均匀,由此得到表 7 所示的一种漂白洗涤剂。

在实施例 3 的条件下测定漂白洗涤剂的去污百分率,不同的是制备 0.05%水溶液并在 40℃下搅拌 30 分钟。结果也示于表 7 中。

表 7

(重量%)

	发明产品			对照产品
	13	14	15	12
过碳酸钠 * 1	80.0	80.0	80.0	80.0
碳酸钠 (重灰)	16.5	16.0	16.5	17.0
阴离子表面活性剂 * 2	2.0	2.0	-	2.0
非离子表面活性剂 * 3	-	-	2.0	-
聚丙烯酸钠 * 4	1.0	1.0	1.0	1.0
淀粉酶(颗粒)	0.5	1.0	0.5	0
去污率(%)	55	58	54	48

* 1:粒径:500—700 μ m

* 2:线形烷基苯磺酸钠(具有 12—14 个碳原子)

* 3:聚氧乙烯烷基醚

(烷基碳原子数=12—14,EO 加入的平均摩尔数=12)

* 4:平均分子量约 8000。

实施例 6

按与实施例 5 相类似的方式分别制备具有表 8 所示组成的自动洗碟洗涤剂。

表 8

(重量%)

	发明产品			
	16	17	18	19
"Pullulonic L-61"* 1	4	-	4	4
"Softanol EP-7085"* 2	-	4	-	-
柠檬酸三钠	30	30	-	-
EDTA	-	-	30	-
三聚磷酸钠	-	-	-	30
过碳酸钠	20	20	20	20
碳酸钠	20	20	20	20
1 号硅酸钠	10	10	10	10
聚丙烯酸钠* 3	4	4	4	4
硫酸钠	余量			
淀粉酶(颗粒)	3	3	3	3

* 1: 聚氧乙烯—聚氧丙烯共聚物(平均分子量:2000, Asahi

Denka Kogyo K.K. 的产品)

* 2: C_{12-14} 仲醇的 7 摩尔环氧乙烷/8.5 摩尔环氧丙烷加合物

(Nippon Shokubai Co., Ltd. 的产品)

* 3: 平均分子量约 8000。

在下述条件下评价得到的各自动洗碟洗涤剂的去污力。结果发现各洗涤剂均表现出优异的洗碟效果, 因而比不含淀粉酶的洗涤剂好。

[染污碟的制备]

将新近煮熟的粘性米饭在室温下放置 30 分钟，然后将 3g 米饭在加压下铺在直径 25 厘米的瓷碟上。将该碟在室温下晾干 24 小时。按这种方法制备 6 个碟用于下述测试。

[对煮熟的米饭污物的去污力的评价方法]

将洗涤后剩余的且含米饭的洗涤液进行碘—淀粉反应，由此宏观测定去污力。

[去污力测试方法]

洗涤条件：

使用的洗涤机：全自动洗碟机“NP—720”（商标名，Matsushita Electric Industries Co., Ltd. 产），其中由旋转喷嘴喷射洗涤剂水溶液以洗涤置于其喷射流送管所限定的上表面的碟类等。

洗涤温度：从 5℃ 逐渐升至 55℃。

使用的水：硬度为 3.5°DH 的水。

洗涤剂浓度：0.2 重量%。

洗涤时间：洗涤 20 分钟，然后漂洗 20 分钟。

洗涤时的循环水量：2.5l。

工业应用性

本发明的液化碱性 α -淀粉酶具有液化活性，这使得它比传统碱性 α -淀粉酶能高度无规地降解培养基，如淀粉和淀粉多聚糖。其最佳 pH 在碱性一侧（8.0—10.0），此外它在更宽的 pH 范围内非常稳定。其最佳温度为 45℃—55℃，使得它在 50℃ 以内保持优异的热

稳定性。此外，其活性几乎不被其他洗涤剂组分如表面活性剂抑制。通常已知的碱性 α -淀粉酶的等电点约为3.0—8.0，而本发明的液化碱性 α -淀粉酶具有格外高的等电点，超过8.5(8.7—9.7，具体在9.2左右)。利用该酶的这一特性，它可轻易地通过凝胶等电聚焦电泳，密度梯度等电点，离子交换色谱等以纯化形式得到。因此它具有极大的工业意义。

含有本发明的液化碱性 α -淀粉酶的洗涤剂组合物尤其对污漬食品的污物具有优异去污力。

本发明的液化碱性 α -淀粉酶的去污力比传统淀粉酶好被认为是由于除液化型特性，即高度无规降解之外的高等电点影响之故。具体而言，纤维在水中一般呈负电性。当洗涤液pH高时，如果酶的等电点低，则酶也呈负电性。结果，纤维和酶相互排斥。然而，本发明的液化碱性 α -淀粉酶具有高等电点，因而它在洗涤液中不呈负电性。因此降低了酶和纤维表面上的污物之间的排斥，从而很可能促使去污力得到提高。

图 1

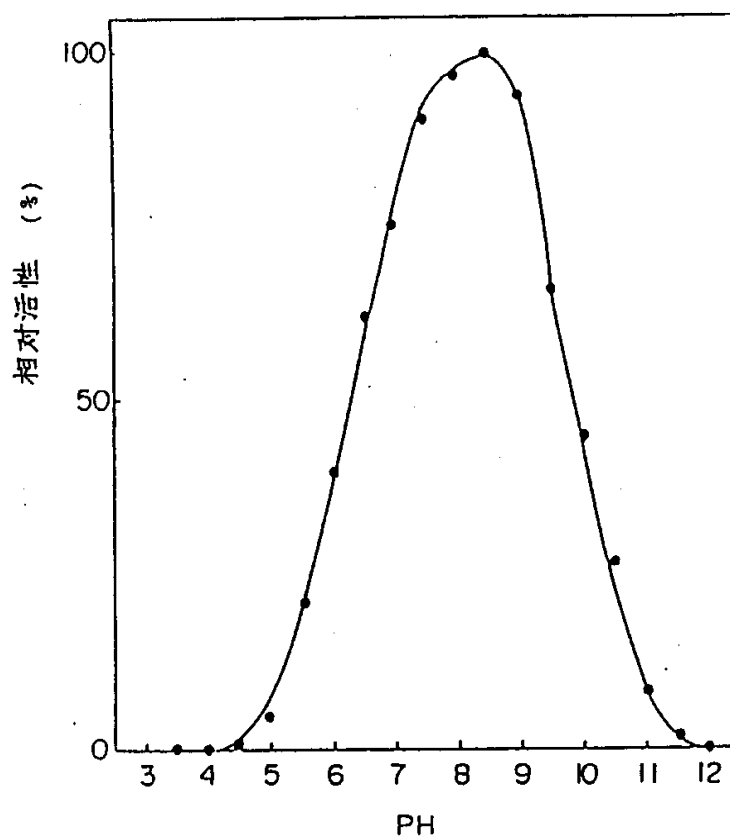


图. 2

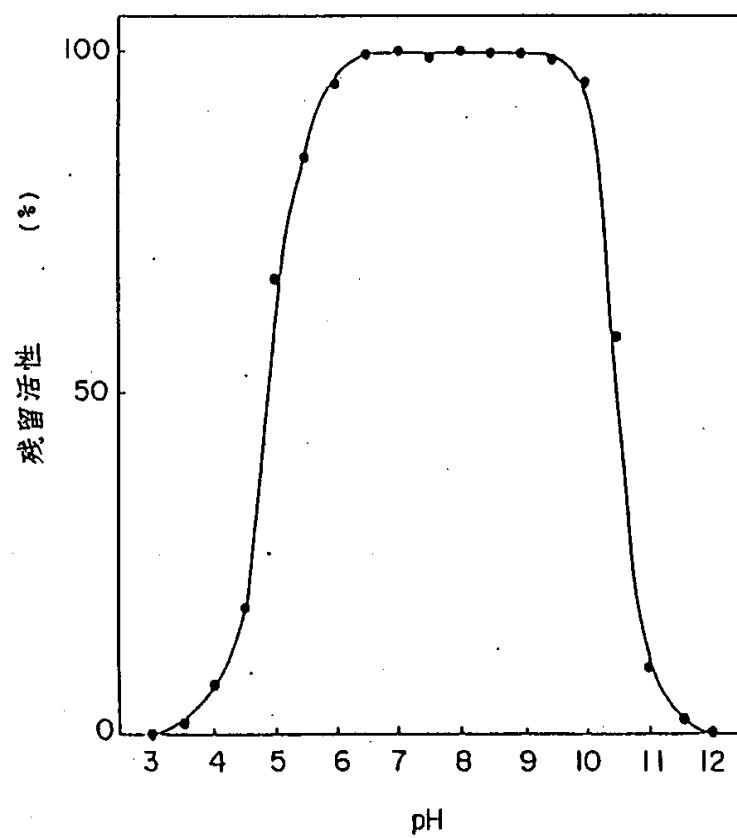


图 3

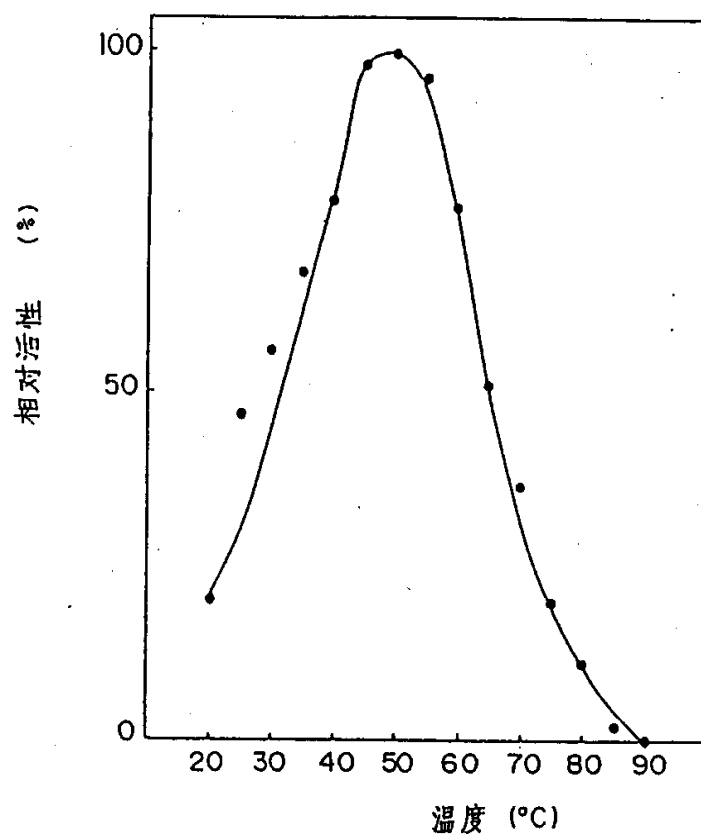


图 4

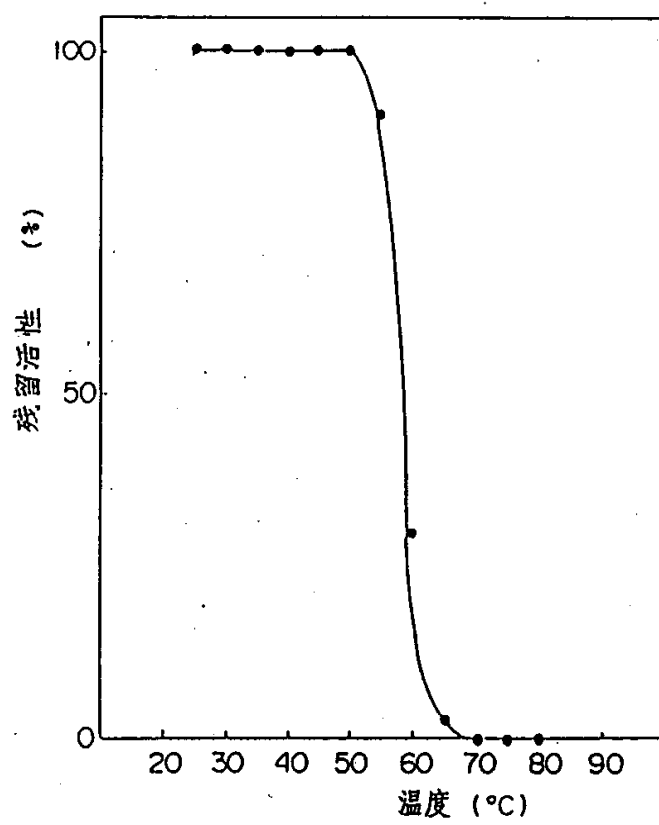


图 5

