

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶

C11D 3/386

C11D 7/04



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 92100955.0

[45]授权公告日 1997年2月19日

[11] 授权公告号 CN 1034084C

[22]申请日 92.1.16 [24]颁证日 96.11.23

[21]申请号 92100955.0

[30]优先权

[32]91.1.16 [33]EP[31]91870006.3

[32]91.11.6 [33]EP[31]91202879.2

[73]专利权人 普罗格特·甘布尔公司

地址 美国俄亥俄州

[72]发明人 A·C·贝克

R·A·A·瑟勒曼斯 A·布施

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 齐普度

审查员 刘俊香

权利要求书 10 页 说明书 48 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 具有高活性纤维素酶的浓缩洗涤剂组合物

[57]摘要

本发明涉及含纤维素酶的颗粒状洗涤剂组合物,该组合物为“浓缩”形式,即与普通洗涤剂组合物相比它们具有较高的密度并含有较低量的无机填充盐。在本发明组合物中,该纤维素酶通过本发明所描述的 C14CMC 方法来定义,并且优选包括特定的单组分内葡聚糖酶。

权 利 要 求 书

1. 一种含有表面活性剂、助洗剂和纤维素酶的颗粒状洗涤剂组合物,其特征在于,按照 C14CMC 方法,所说的纤维素酶以 25×10^{-6} % (重量) 的纤维素酶蛋白质存在于洗衣试验溶液中时,提供除去至少 10% 的固定化放射性标记的羧甲基纤维素;所说的纤维素酶化合物基本由同类的内葡聚糖酶组分组成,该同类的内葡聚糖酶组分对于针对部分纯化的约 $\approx 43\text{KD}$ 纤维素酶 (由 Humicola insolens, DSM1800 衍生) 而产生的单克隆抗体具有免疫反应性,或与所说的 $\approx 43\text{KD}$ 内葡聚糖酶同源,所述内葡聚糖酶组分显示的 CMC 内切酶活性为每毫克总蛋白至少约 50CMC 内切酶单位;

所说的颗粒状洗涤剂组合物含有不多于 15% (重量) 的无机填充盐;

所说的颗粒状洗涤剂组合物的密度为每升组合物 550 至 950g。

2. 根据权利要求 1 的洗涤剂组合物,其中所说的纤维素酶的内葡聚糖酶组分的等电点为约 5.1。

3. 根据权利要求 1 或 2 的洗涤剂组合物,其中所说的内葡聚糖酶组分可用如下方法生产,该方法包括,在允许表达内葡聚糖酶组分或其前体的条件下的培养介质中,培养用重组 DNA 载体转化的宿主细胞,该载体携带有编码所述的内葡聚糖酶组分或其前体的 DNA 顺序,以及编码某些功能的 DNA 顺序,这些功能允许表达编码内葡聚糖酶组分或其前体的 DNA 顺序;并从培养物中回收内葡聚糖酶组分。

4. 根据权利要求 1 或 2 的洗涤剂组合物,其中纤维素酶的量是使洗涤溶液中释放的酶蛋白的量为每升洗涤溶液 0.005 至 40mg,优选 0.01 至 10mg。

5. 根据权利要求1的洗涤剂组合物,其中所说的无机填充盐选自碱金属和碱土金属的硫酸盐和氯化物。

6. 根据权利要求1或5的洗涤剂组合物,其中含有不多于10%(重量)的无机填充盐。

7. 根据权利要求6的洗涤剂组合物,其中含有不多于5%(重量)的无机填充盐。

8. 根据权利要求1、2或5的洗涤剂组合物,该组合物的密度为650至850g/L。

9. 根据权利要求1、2或5的洗涤剂组合物,其中基本不含磷酸盐化合物,并且其中所说的助洗剂选自硅铝酸盐离子交换剂、柠檬酸盐、碳酸盐及其混合物。

10. 根据权利要求1的颗粒状洗涤剂组合物,其特征在于纤维素酶化合物是具有列于2号顺序中的氨基酸顺序的内葡聚糖酶,或是其显示内葡聚糖酶活性的同源物

2号顺序

Met Arg Ser Ser Pro Leu Leu Pro Ser Ala Val Val Ala Ala Leu Pro
-21 -20 -15 -10

Val Leu Ala Leu Ala Ala Asp Gly Arg Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys
-5 1 5 10

Cys Lys Pro Ser Cys Gly Trp Ala Lys Lys Ala Pro Val Asn Gln Pro
15 20 25

Val Phe Ser Cys Asn Ala Asn Phe Gln Arg Ile Thr Asp Phe Asp Ala
30 35 40

Lys Ser Gly Cys Glu Pro Gly Gly Val Ala Tyr Ser Cys Ala Asp Gln
45 50 55

Thr Pro Trp Ala Val Asn Asp Asp Phe Ala Leu Gly Phe Ala Ala Thr
60 65 70 75

Ser Ile Ala Gly Ser Asn Glu Ala Gly Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Glu
80 85 90

Leu Thr Phe Thr Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Lys Met Val Val Gln
 95 100 105

Ser Thr Ser Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Asn His Phe Asp Leu Asn
 110 115 120

Ile Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asp Gly Cys Thr Pro Gln Phe
 125 130 135

Gly Gly Leu Pro Gly Gln Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Arg Asn Glu
 140 145 150 155

Cys Asp Arg Phe Pro Asp Ala Leu Lys Pro Gly Cys Tyr Trp Arg Phe
 160 165 170

Asp Trp Phe Lys Asn Ala Asp Asn Pro Ser Phe Ser Phe Arg Gln Val
 175 180 185

Gln Cys Pro Ala Glu Leu Val Ala Arg Thr Gly Cys Arg Arg Asn Asp
 190 195 200

Asp Gly Asn Phe Pro Ala Val Gln Ile Pro Ser Ser Ser Thr Ser Ser
 205 210 215

Pro Val Asn Gln Pro Thr Ser Thr Ser Thr Thr Ser Thr Ser Thr Thr
 220 225 230 235

Ser Ser Pro Pro Val Gln Pro Thr Thr Pro Ser Gly Cys Thr Ala Glu
 240 245 250

Arg Trp Ala Gln Cys Gly Gly Asn Gly Trp Ser Gly Cys Thr Thr Cys
 255 260 265

Val Ala Gly Ser Thr Cys Thr Lys Ile Asn Asp Trp Tyr His Gln Cys
 270 275 280

Leu.

11. 根据权利要求 10 的洗涤剂组合物, 其中所说的内葡聚糖酶可以由腐质霉属物种如 Humicola insolens 来生产。

12. 根据权利要求 1 的颗粒状洗涤剂组合物, 其特征在于, 纤维素酶化合物是具有列于 4 号顺序中的氨基酸顺序的内葡聚糖酶, 或是其显示内葡聚糖酶活性的同源物。

4 号顺序

Met Arg Ser Tyr Thr Leu Leu Ala Leu Ala Gly Pro Leu Ala Val Ser
 1 5 10 15
 Ala Ala Ser Gly Ser Gly His Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys
 20 25 30
 Pro Ser Cys Ser Trp Ser Gly Lys Ala Ala Val Asn Ala Pro Ala Leu
 35 40 45
 Thr Cys Asp Lys Asn Asp Asn Pro Ile Ser Asn Thr Asn Ala Val Asn
 50 55 60
 Gly Cys Glu Gly Gly Gly Ser Ala Tyr Ala Cys Thr Asn Tyr Ser Pro
 65 70 75 80
 Trp Ala Val Asn Asp Glu Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala Thr Lys Ile
 85 90 95
 Ser Gly Gly Ser Glu Ala Ser Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Ala Leu Thr
 100 105 110
 Phe Thr Thr Gly Pro Val Lys Gly Lys Lys Met Ile Val Gln Ser Thr
 115 120 125
 Asn Thr Gly Gly Asp Leu Gly Asp Asn His Phe Asp Leu Met Met Pro
 130 135 140
 Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asp Gly Cys Thr Ser Glu Phe Gly Lys
 145 150 155 160
 Ala Leu Gly Gly Ala Gln Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Arg Ser Glu Cys
 165 170 175
 Asp Ser Tyr Pro Glu Leu Leu Lys Asp Gly Cys His Trp Arg Phe Asp
 180 185 190
 Trp Phe Glu Asn Ala Asp Asn Pro Asp Phe Thr Phe Glu Gln Val Gln
 195 200 205
 Cys Pro Lys Ala Leu Leu Asp Ile Ser Gly Cys Lys Arg Asp Asp Asp
 210 215 220
 Ser Ser Phe Pro Ala Phe Lys Val Asp Thr Ser Ala Ser Lys Pro Gln
 225 230 235 240

Pro Ser Ser Ser Ala Lys Lys Thr Thr Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gln
 245 250 255
 Pro Gln Lys Thr Lys Asp Ser Ala Pro Val Val Gln Lys Ser Ser Thr
 260 265 270
 Lys Pro Ala Ala Gln Pro Glu Pro Thr Lys Pro Ala Asp Lys Pro Gln
 275 280 285
 Thr Asp Lys Pro Val Ala Thr Lys Pro Ala Ala Thr Lys Pro Val Gln
 290 295 300
 Pro Val Asn Lys Pro Lys Thr Thr Gln Lys Val Arg Gly Thr Lys Thr
 305 310 315 320
 Arg Gly Ser Cys Pro Ala Lys Thr Asp Ala Thr Ala Lys Ala Ser Val
 325 330 335
 Val Pro Ala Tyr Tyr Gln Cys Gly Gly Ser Lys Ser Ala Tyr Pro Asn
 340 345 350
 Gly Asn Leu Ala Cys Ala Thr Gly Ser Lys Cys Val Lys Gln Asn Glu
 355 360 365
 Tyr Tyr Ser Gln Cys Val Pro Asn
 370 375

13. 根据权利要求 10 的洗涤剂组合物, 其中所说的内葡聚糖酶可以由镰孢属物种如尖镰孢来生产。

14. 根据权利要求 10-13 的洗涤剂组合物, 其中所说的酶可以由含有编码该酶的 DNA 顺序的 DNA 构建体来生产。

15. 根据权利要求 14 的洗涤剂组合物, 其中的 DNA 顺序是如 1 号顺序或 3 号顺序中所示的 DNA 顺序。

1号顺序

GGATCCAAG	ATG	CGT	TCC	TCC	CCC	CTC	CTC	CCG	TCC	GCC	GTT	GTG	GCC		48	
	Met	Arg	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Pro	Ser	Ala	Val	Val	Ala			
	-21	-20						-15					-10			
GCC	CTG	CCG	GTG	TTG	GCC	CTT	GCC	GCT	GAT	GGC	AGG	TCC	ACC	CGC	TAC	96
Ala	Leu	Pro	Val	Leu	Ala	Leu	Ala	Ala	Asp	Gly	Arg	Ser	Thr	Arg	Tyr	
			-5					1				5				
TGG	GAC	TGC	TGC	AAG	CCT	TCG	TGC	GGC	TGG	GCC	AAG	AAG	GCT	CCC	GTG	144
Trp	Asp	Cys	Cys	Lys	Pro	Ser	Cys	Gly	Trp	Ala	Lys	Lys	Ala	Pro	Val	
	10						15				20					
AAC	CAG	CCT	GTC	TTT	TCC	TGC	AAC	GCC	AAC	TTC	CAG	CGT	ATC	ACG	GAC	192
Asn	Gln	Pro	Val	Phe	Ser	Cys	Asn	Ala	Asn	Phe	Gln	Arg	Ile	Thr	Asp	
	25				30					35					40	
TTC	GAC	GCC	AAG	TCC	GGC	TGC	GAG	CCG	GGC	GGT	GTC	GCC	TAC	TCG	TGC	240
Phe	Asp	Ala	Lys	Ser	Gly	Cys	Glu	Pro	Gly	Gly	Val	Ala	Tyr	Ser	Cys	
				45					50					55		
GCC	GAC	CAG	ACC	CCA	TGG	GCT	GTG	AAC	GAC	GAC	TTC	GCG	CTC	GGT	TTT	288
Ala	Asp	Gln	Thr	Pro	Trp	Ala	Val	Asn	Asp	Asp	Phe	Ala	Leu	Gly	Phe	
			60					65					70			
GCT	GCC	ACC	TCT	ATT	GCC	GGC	AGC	AAT	GAG	GCG	GGC	TGG	TGC	TGC	GCC	336
Ala	Ala	Thr	Ser	Ile	Ala	Gly	Ser	Asn	Glu	Ala	Gly	Trp	Cys	Cys	Ala	
		75					80					85				
TGC	TAC	GAG	CTC	ACC	TTC	ACA	TCC	GGT	CCT	GTT	GCT	GGC	AAG	AAG	ATG	384
Cys	Tyr	Glu	Leu	Thr	Phe	Thr	Ser	Gly	Pro	Val	Ala	Gly	Lys	Lys	Met	
	90					95					100					
GTC	GTC	CAG	TCC	ACC	AGC	ACT	GGC	GGT	GAT	CTT	GGC	AGC	AAC	CAC	TTC	432
Val	Val	Gln	Ser	Thr	Ser	Thr	Gly	Gly	Asp	Leu	Gly	Ser	Asn	His	Phe	
	105				110					115					120	
GAT	CTC	AAC	ATC	CCC	GGC	GGC	GGC	GTC	GGC	ATC	TTC	GAC	GGA	TGC	ACT	480
Asp	Leu	Asn	Ile	Pro	Gly	Gly	Gly	Val	Gly	Ile	Phe	Asp	Gly	Cys	Thr	
				125					130					135		

CCC CAG TTC GGC GGT CTG CCC GGC CAG CGC TAC GGC GGC ATC TCG TCC Pro Gln Phe Gly Gly Leu Pro Gly Gln Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser 140 145 150	528
CGC AAC GAG TGC GAT CGG TTC CCC GAC GCC CTC AAG CCC GGC TGC TAC Arg Asn Glu Cys Asp Arg Phe Pro Asp Ala Leu Lys Pro Gly Cys Tyr 155 160 165	576
TGG CGC TTC GAC TGG TTC AAG AAC GCC GAC AAT CCG AGC TTC AGC TTC Trp Arg Phe Asp Trp Phe Lys Asn Ala Asp Asn Pro Ser Phe Ser Phe 170 175 180	624
CGT CAG GTC CAG TGC CCA GCC GAG CTC GTC GCT CGC ACC GGA TGC CGC Arg Gln Val Gln Cys Pro Ala Glu Leu Val Ala Arg Thr Gly Cys Arg 185 190 195 200	672
CGC AAC GAC GAC GGC AAC TTC CCT GCC GTC CAG ATC CCC TCC AGC AGC Arg Asn Asp Asp Gly Asn Phe Pro Ala Val Gln Ile Pro Ser Ser Ser 205 210 215	720
ACC AGC TCT CCG GTC AAC CAG CCT ACC AGC ACC AGC ACC ACC TCC ACC Thr Ser Ser Pro Val Asn Gln Pro Thr Ser Thr Ser Thr Thr Ser Thr 220 225 230	768
TCC ACC ACC TCG AGC CCG CCA GTC CAG CCT ACG ACT CCC AGC GGC TGC Ser Thr Thr Ser Ser Pro Pro Val Gln Pro Thr Thr Pro Ser Gly Cys 235 240 245	816
ACT GCT GAG AGG TGG GCT CAG TGC GGC GGC AAT GGC TGG AGC GGC TGC Thr Ala Glu Arg Trp Ala Gln Cys Gly Gly Asn Gly Trp Ser Gly Cys 250 255 260	864
ACC ACC TGC GTC GCT GGC AGC ACT TGC ACG AAG ATT AAT GAC TGG TAC Thr Thr Cys Val Ala Gly Ser Thr Cys Thr Lys Ile Asn Asp Trp Tyr 265 270 275 280	912
CAT CAG TGC CTG TAGACGCAGG GCAGCTTGAG GGCCTTACTG GTGGCCGCAA His Gln Cys Leu 285	964
CGAAATGACA CTCCCAATCA CTGTATTAGT TCTTGACAT AATTCGTCA TCCCTCCAGG	1024
GATTGTCACA TAAATGCAAT GAGGAACAAT GAGTAC	1060

3号顺序

GAATTCGCGG CCGCTCATTC ACTTCATTCA TTCTTTAGAA TTACATACAC TCTCTTTCAA	60
AACAGTCACT CTTTAAACAA AACAACTTTT GCAACA ATG CGA TCT TAC ACT CTT Met Arg Ser Tyr Thr Leu 1 5	114
CTC GCC CTG GCC GGC CCT CTC GCC GTG AGT GCT GCT TCT GGA AGC GGT Leu Ala Leu Ala Gly Pro Leu Ala Val Ser Ala Ala Ser Gly Ser Gly 10 15 20	162
CAC TCT ACT CGA TAC TGG GAT TGC TGC AAG CCT TCT TGC TCT TGG AGC His Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys Ser Trp Ser 25 30 35	210
GGA AAG GCT GCT GTC AAC GCC CCT GCT TTA ACT TGT GAT AAG AAC GAC Gly Lys Ala Ala Val Asn Ala Pro Ala Leu Thr Cys Asp Lys Asn Asp 40 45 50	258
AAC CCC ATT TCC AAC ACC AAT GCT GTC AAC GGT TGT GAG GGT GGT GGT Asn Pro Ile Ser Asn Thr Asn Ala Val Asn Gly Cys Glu Gly Gly Gly 55 60 65 70	306
TCT GCT TAT GCT TGC ACC AAC TAC TCT CCC TGG GCT GTC AAC GAT GAG Ser Ala Tyr Ala Cys Thr Asn Tyr Ser Pro Trp Ala Val Asn Asp Glu 75 80 85	354
CTT GCC TAC GGT TTC GCT GCT ACC AAG ATC TCC GGT GGC TCC GAG GCC Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala Thr Lys Ile Ser Gly Gly Ser Glu Ala 90 95 100	402

AGC TGG TGC TGT GCT TGC TAT GCT TTG ACC TTC ACC ACT GGC CCC GTC	450
Ser Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Ala Leu Thr Phe Thr Thr Gly Pro Val	
105 110 115	
AAG GGC AAG AAG ATG ATC GTC CAG TCC ACC AAC ACT GGA GGT GAT CTC	498
Lys Gly Lys Lys Met Ile Val Gln Ser Thr Asn Thr Gly Gly Asp Leu	
120 125 130	
GGC GAC AAC CAC TTC GAT CTC ATG ATG CCC GGC GGT GGT GTC GGT ATC	546
Gly Asp Asn His Phe Asp Leu Met Met Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile	
135 140 145 150	
TTC GAC GGC TGC ACC TCT GAG TTC GGC AAG GCT CTC GGC GGT GCC CAG	594
Phe Asp Gly Cys Thr Ser Glu Phe Gly Lys Ala Leu Gly Gly Ala Gln	
155 160 165	
TAC GGC GGT ATC TCC TCC CGA AGC GAA TGT GAT AGC TAC CCC GAG CTT	642
Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Arg Ser Glu Cys Asp Ser Tyr Pro Glu Leu	
170 175 180	
CTC AAG GAC GGT TGC CAC TGG CGA TTC GAC TGG TTC GAG AAC GCC GAC	690
Leu Lys Asp Gly Cys His Trp Arg Phe Asp Trp Phe Glu Asn Ala Asp	
185 190 195	
AAC CCT GAC TTC ACC TTT GAG CAG GTT CAG TGC CCC AAG GCT CTC CTC	738
Asn Pro Asp Phe Thr Phe Glu Gln Val Gln Cys Pro Lys Ala Leu Leu	
200 205 210	
GAC ATC AGT GGA TGC AAG CGT GAT GAC GAC TCC AGC TTC CCT GCC TTC	786
Asp Ile Ser Gly Cys Lys Arg Asp Asp Asp Ser Ser Phe Pro Ala Phe	
215 220 225 230	
AAG GTT GAT ACC TCG GCC AGC AAG CCC CAG CCC TCC AGC TCC GCT AAG	834
Lys Val Asp Thr Ser Ala Ser Lys Pro Gln Pro Ser Ser Ser Ala Lys	
235 240 245	
AAG ACC ACC TCC GCT GCT GCT GCC GCT CAG CCC CAG AAG ACC AAG GAT	882
Lys Thr Thr Ser Ala Ala Ala Ala Gln Pro Gln Lys Thr Lys Asp	
250 255 260	
TCC GCT CCT GTT GTC CAG AAG TCC TCC ACC AAG CCT GCC GCT CAG CCC	930
Ser Ala Pro Val Val Gln Lys Ser Ser Thr Lys Pro Ala Ala Gln Pro	
265 270 275	
GAG CCT ACT AAG CCC GCC GAC AAG CCC CAG ACC GAC AAG CCT GTC GCC	978
Glu Pro Thr Lys Pro Ala Asp Lys Pro Gln Thr Asp Lys Pro Val Ala	
280 285 290	
ACC AAG CCT GCT GCT ACC AAG CCC GTC CAA CCT GTC AAC AAG CCC AAG	1026
Thr Lys Pro Ala Ala Thr Lys Pro Val Gln Pro Val Asn Lys Pro Lys	
295 300 305 310	
ACA ACC CAG AAG GTC CGT GGA ACC AAA ACC CGA GGA AGC TGC CCG GCC	1074
Thr Thr Gln Lys Val Arg Gly Thr Lys Thr Arg Gly Ser Cys Pro Ala	
315 320 325	

AAG ACT GAC GCT ACC GCC AAG GCC TCC GTT GTC CCT GCT TAT TAC CAG Lys Thr Asp Ala Thr Ala Lys Ala Ser Val Val Pro Ala Tyr Tyr Gln 330 335 340	1122
TGT GGT GGT TCC AAG TCC GCT TAT CCC AAC GGC AAC CTC GCT TGC GCT Cys Gly Gly Ser Lys Ser Ala Tyr Pro Asn Gly Asn Leu Ala Cys Ala 345 350 355	1170
ACT GGA AGC AAG TGT GTC AAG CAG AAC GAG TAC TAC TCC CAG TGT GTC Thr Gly Ser Lys Cys Val Lys Gln Asn Glu Tyr Tyr Ser Gln Cys Val 360 365 370	1218
CCC AAC TAAATGGTAG ATCCATCGGT TGTGGAAGAG ACTATGCGTC TCAGAAGGGA Pro Asn 375	1274
TCCTCTCATG AGCAGGCTTG TCATTGTATA GCATGGCATC CTGGACCAAG TGTTCGACCC	1334
TTGTTGTACA TAGTATATCT TCATTGTATA TATTTAGACA CATAGATAGC CTCTTGTCAG	1394
CGACAACCTGG CTACAAAAGA CTTGGCAGGC TTGTTCAATA TTGACACAGT TTCCTCCATA	1454
AAAAAAAAA AAAAAAAAAA	1473

16. 根据权利要求 10-13 的洗涤剂组合物, 其中所说的宿主细胞是真菌如 Triclocloderuca 或曲霉的菌株, 或是属于汉逊酵母属或酵母属菌株, 如酿酒酵母菌株的酵母细胞。

17. 根据权利要求 16 的洗涤剂组合物, 其中所说的真菌是米曲霉或黑曲霉。

18. 根据权利要求 10-13 的洗涤剂组合物, 其中所说的宿主细胞是细菌如杆菌、链霉菌或大肠杆菌的菌株。

说明书

具有高活性纤维素酶的 浓缩洗涤剂组合物

本发明涉及含有纤维素酶的颗粒状洗涤剂组合物，该洗涤剂组合物是以浓缩形式存在的。即它们与普通的洗涤剂组合物相比具有较高的密度并含有较少量的无机填充盐。在本发明的洗涤剂组合物中，所说的纤维素酶包括通过本文叙述的 C14 CMC 方法定义的高活性纤维素酶。该纤维素酶最好是一种特定的单一组分的内葡聚糖酶。

在本技术领域，确实非常需要不仅具有良好的清洗性能，而且具有良好的软化织物的性能以及其他织物护理优点的洗涤剂组合物。

对于用于织物的纺织品清洗和降低粗糙度试剂来说，分解纤维素的酶即纤维素酶的功效已经被认识相当长的时间；GB—A—2, 075, 028、GB—A—2, 095, 275 和 GB—A—2, 094, 826 公开了具有用于改进清洗性能的纤维素酶的洗涤剂组合物；GB—A—1, 368, 599 公开了用于降低含棉织物粗糙度的纤维素酶的应用；U. S. 4, 435, 307 叙述了由 *Humicola insolens* 及其馏分衍生的被称作 ACXI 的分解纤维素的酶作为降低粗糙度的洗涤剂添加剂的应用。

EP—A—0 269 168 公开了含有纤维素酶的最佳洗涤剂组合物，该洗涤剂组合物在弱碱性的 PH 值范围内配制，并提供了综合的织物清洗、织物柔软和织物护理性能。

在 WO 89 10 925 9 中已经公开了用于降低含棉织物粗糙度的纤维素酶制剂，该纤维素酶制剂含有对于纤维素具有高内切酶活性和

亲合力的内葡聚糖酶组分。

然而，纤维素酶的实际应用受到这样一个事实的阻碍，即纤维素酶制剂如在上述先有技术文献中公开的那些纤维素酶制剂为复杂的混合物，其中只有一部分在织物护理方面是有效的。因此，难以实现用于洗涤剂工业的纤维素酶的成本可行的工业生产，并且需要应用大量的这类纤维素酶制剂，以便达到所需的作用于织物的效果。

就洗涤剂的应用性而言，在纤维素酶生产方面的改进通常还未成为足以能辨认的。通过在EP—A—350098中公开的C14CMC方法可以规定与纤维素酶的洗涤剂应用相关的纤维素酶选择标准。现已发现，除去10%的固定化放射性标记的羧甲基纤维素之最小值可提供高活性的纤维素酶。在共同未决的丹麦专利申请No. : 1159/90（申请日1990年5月5日）中已经公开了本发明的属于高活性定义的优选的一类纤维素酶，其中披露了基本由同类的内葡聚糖酶组分组成的纤维素酶制剂，该同类的内葡聚糖酶组分对于引起抗部分纯化的43KD纤维素酶（由Humicola insolens DM1800衍生）的单无性繁殖抗体具有免疫反应性。

对于含纤维素物质的处理有利的是这种特定的内葡聚糖酶纤维素酶组分，这一发现使现在有可能成本可行地生产纤维素酶（例如通过使用重组DNA技术），并允许仅用少量的纤维素酶制剂，并达到所需的作用于织物的效果。

另一方面，市场上正在销售新一代洗涤剂组合物，最好称之为“浓缩洗涤剂”，尽管它们已被给出各种商品名称，例如“Ultra”、“Supra”、“Micro”……。这类洗涤剂组合物

的特性是，与普通的洗涤剂组合物相比，它们具有较高的密度，并且通过使用比普通洗涤剂组合物少得多的量的“浓缩”洗涤剂组合物，它们能够达到相同的效果。就其组成而言，通过较少量的无机填充盐便能最好地反映这一特性。这类“浓缩”洗涤剂组合物的效能最好是通过省去预洗循环并使用分散和扩散装置来达到，上述分散和扩散装置在主洗循环开始时被直接放入洗衣机转筒中。

本发明的目的是提供浓缩形式的洗涤剂组合物，该洗涤剂组合物具有较高的密度并含有少量无机填充盐，它显示出最佳的纤维素酶效能。

在EP—A—381397中已揭示了低离子强度对酶的性能，特别是对脂肪酶的性能的作用。

然而，现已惊奇地发现，浓缩基质对本发明选择的酶的作用远远高于由现有技术纤维素酶（如在EP—A—381397中公开的）所预期的作用。

本发明的另一个目的是提供在洗衣机中处理织物的方法，该方法包括将本发明洗涤剂组合物以低浓度用于主洗循环中。

本发明涉及含有表面活性剂、助洗剂和酶，若需要还含有常用的添加剂的颗粒状洗涤剂组合物，其特征在于所说的酶包括纤维素酶制剂，按照C14CMC方法，这种纤维素酶制剂提供除去至少10%的固定化放射性标记的羧甲基纤维素，该制剂以 $25 \times 10^{-6}\%$ （重量）的纤维素酶蛋白质存在于洗衣试验溶液中。

优选地，所说的纤维素酶化合物基本由同类的内葡聚糖酶组分组成，该同类的内葡聚糖酶组分对于引起抗部分纯化的约 ≈ 43 KD纤维素酶（由Humicola insolens，DSM 1800衍生）

的单无性繁殖抗体具有免疫反应性，或是所说的 $\approx 43\text{KD}$ 内葡聚糖酶的同系物。

该洗涤剂组合物为颗粒形式，其特征在于其密度高于普通洗涤剂组合物的密度。在 20°C 下测定时本发明组合物的密度范围为每升组合物 550 至 950g ，优选每升组合物 650 至 850g 。

就组成而言，通过无机填充盐的量便能最好地表示本发明组合物的“浓缩”形式。无机填充盐为粉末形式的洗涤剂组合物的常用成分。在普通的洗涤剂组合物中，该填充盐存在的量相当大，一般为组合物总重量的 $17-35\%$ 。

在本发明组合物中，所说的填充盐存在的量不超过组合物总重量的 15% ，优选不超过 10% ，最优选不超过 5% 。

无机填充盐（如在本发明组合物中所指的）选自碱金属和碱土金属的硫酸盐和氯化物。

优选的填充盐是硫酸钠。

表面活性剂

在本发明洗涤剂组合物中可以使用各种各样的表面活性剂。美国专利 $3,664,961$ （于 1972 年 5 月 23 日颁布给 Norris）中一般列举了阴离子、非离子、两性的和两性离子类，并给出了各种表面活性剂。

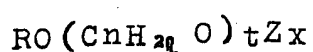
阴离子表面活性剂的混合物特别适合于本发明，特别是磺酸盐和硫酸盐表面活性剂的混合物，其重量比为 $5:1$ 至 $1:2$ ，优选为 $3:1$ 至 $2:3$ ，更优选为 $3:1$ 至 $1:1$ 。优选的磺酸盐包括烷基中具有 9 至 15 ，特别是具有 11 至 13 个碳原子的烷基苯磺酸盐，和 α -磺酸化脂肪酸甲酯，其中脂肪酸是由 $C_{12}-C_{18}$ 脂肪源，

特别是由 C_{12} — C_{18} 脂肪源衍生的。在每个例子中的阳离子是碱金属，最好是钠。优选的硫酸盐表面活性剂是烷基中具有 12 至 18 个碳原子的烷基硫酸盐任意地与乙氧基硫酸盐混合，该乙氧基硫酸盐在其烷基中具有 10 至 20 个碳原子，最好是具有 10 至 16 个碳原子，并且平均乙氧基化度为 1 至 6。本发明优选的烷基硫酸盐的例子是牛脂烷基硫酸盐、椰子烷基硫酸盐和 C_{14} — C_{15} 烷基硫酸盐。在每个例子中的阳离子也是碱金属阳离子，最好是钠。

用于本发明的一类非离子表面活性剂是环氧乙烷与疏水部分的缩合物，它提供了具有平均亲水—亲油平衡 (HLB) 度范围为 8 至 17，优选 9.5 至 13.5，更优选 10 至 12.5 的表面活性剂。所说的疏水 (亲油) 部分就其性质而言可以是脂族的或芳族的，并且它与任何特定的疏水基缩合的聚氧乙烯基的长度可容易地进行调节，以便产生在亲水和疏水部分之间具有所需平衡度的水溶性化合物。

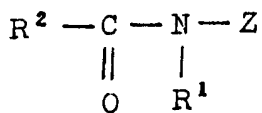
特别优选的这类非离子表面活性剂是每摩尔醇含有 3—8 摩尔环氧乙烷的 C_9 — C_{15} 伯醇乙氧基化物，特别是每摩尔醇含有 6—8 摩尔环氧乙烷的 C_{14} — C_{15} 伯醇和每摩尔醇含有 3—5 摩尔环氧乙烷的 C_{12} — C_{14} 伯醇。

另一类非离子表面活性剂包括下述通式的烷基聚葡萄糖苷化合物



其中，Z 是由葡萄糖得到的部分，R 是含有 12 至 18 个碳原子的饱和的疏水烷基；t 是 0 至 10 和 n 是 2 或 3；x 是 1.3 至 4，该化合物含有小于 10% 的未反应的脂肪醇和小于 50% 的短链烷基聚葡萄糖苷。这类化合物和其在洗涤剂中的应用被公开在 EP—B 0 070 077、0 075 996 和 0 094 118 中。

下式的多羟基脂肪酸酰胺表面活性剂作为非离子表面活性剂也是适合的



其中， R^1 是 H、 C_{1-4} 烷基、2-羟乙基、2-羟丙基，或其混合物， R^2 是 C_{5-31} 烷基，和 Z 是带有直接连到其链上的至少 3 个羟基的直链烷基的多羟基烷基，或其烷氧化衍生物。优选 R^1 是甲基， R^2 是直链 C_{11-15} 烷基或链烯基，如椰子烷基或其混合物，且 Z 是在还原胺化反应中由糖如葡萄糖、果糖、麦芽糖、乳糖还原得到的。

另一类表面活性剂是半极性表面活性剂，例如氧化胺。适合的氧化胺选自单 $\text{C}_8 - \text{C}_{20}$ ，优选 $\text{C}_{10} - \text{C}_{14}$ N-烷基或链烯基氧化胺和二氧化亚丙基-1, 3-二胺，其中保持 N 位置被甲基、羟乙基或羟丙基取代。

还有一类表面活性剂是两性表面活性剂，例如多胺基类表面活性剂。

阳离子表面活性剂也可以在本发明的洗涤剂组合物中使用，并且适合的季铵表面活性剂选自单 $\text{C}_8 - \text{C}_{16}$ ，优选 $\text{C}_{10} - \text{C}_{14}$ N-烷基或链烯基铵表面活性剂，其中保持 N 位置被甲基、羟乙基或羟丙基取代。

优选各类表面活性剂的混合物，更优选的是阴离子-非离子混合物。以及阴离子-非离子-阳离子混合物。特别优选的混合物描述在英国专利 2040987 和欧洲公开申请 0087914 中。洗涤剂

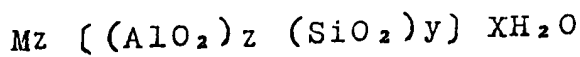
组合物可含有1—70%（重量）的表面活性剂，但通常存在于本发明组合物中的表面活性剂的量为1%至30%，较优选10—25%（重量）。

助洗剂

助洗剂物质一般是以本发明洗涤剂组合物的10至60%存在。本发明的组合物不含或基本不含含磷酸盐的助洗剂（本发明所定义的基本不含是组成量少于总洗涤剂助洗剂体系的1%），并且本发明的助洗剂体系由水溶性助洗剂，水不溶性助洗剂，或其混合物组成。

水不溶性助洗剂可以是无机离子交换物质，一般是无机水合硅铝酸盐物质，更优选的是水合的合成沸石，如水合沸石A、X、B或HS。

优选的硅铝酸盐离子交换物质具有下述的通式的晶胞单元

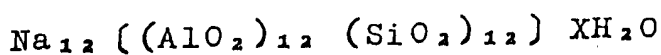


其中M是钙交换的阳离子，z和y至少为6，z与y的摩尔比为1.0至0.5，且x至少为5，优选为7.5至276，更优选1.0至264。所说的硅铝酸盐物质是以水合形式存在的，并且优选的是含有10至28%更优选的是含有18至22%的水的结晶体。

上述硅铝酸盐离子交换物质，其特征在于其粒度直径为0.1至1.0微米，优选为0.2至4微米。本文中的术语“粒度直径”代表所给出的离子交换物质的平均粒度直径，它是通过常规的分析技术，例如利用扫描电子显微镜的显微测定来测定的。所说的硅铝酸盐离子交换物质的另一个特征在于其钙离子交换能力至少为200mg当量CaCO₃水硬度/g硅铝酸盐（以无水基准计算），且通常的范围为300mg当量/g至352mg当量/g。本文的硅铝酸盐离子交

换物质的再一个特征在于其钙离子交换速率，详细描述见G B—1, 429, 143。

在本发明实施中使用的硅铝酸盐离子交换物质是市场上可买到的，并且可以是天然存在的物质，但最好是合成衍生的物质。用于生产硅铝酸盐离子交换物质的方法详述在美国专利3, 985, 669中。用于本发明的优选的合成结晶硅铝酸盐离子交换物质是可买到的称作沸石A、沸石B、沸石X、沸石HS的物质及其混合物。在特别优选的实施方案中，所说的结晶的硅铝酸盐离子交换物质是沸石A，且具有如下通式



其中X为20至30，优选27。具有通式

$\text{Na}_{80} \{ (\text{AlO}_2)_{80} (\text{SiO}_2)_{100} \} 10.276 \text{H}_2\text{O}$ 的沸石X以及具有通式 $\text{Na}_0 \{ (\text{AlO}_2)_0 (\text{SiO}_2)_0 \} 7.5 \text{H}_2\text{O}$ 的沸石HS也是适合的。

另一种适合的水不溶性无机助洗剂物质是层状硅酸盐，例如SKS—6 (Hoechst)。SKS—6是一种由硅酸钠 ($\text{Na}_2\text{Si}_2\text{O}_6$) 组成的层状硅酸盐晶体。高 $\text{Ca}^{++} / \text{Mg}^{++}$ 结合容量主要是阳离子交换机制。在热水中，该物质变得更加可溶。

水溶性助洗剂可以是单体或低聚物羧酸盐螯合剂。

含有一个羧基的适合的羧酸盐包括乳酸、乙醇酸和其醚的衍生物 (公开在比利时专利831, 368、821, 369和821, 370中)。含有两个羧基的多羧酸盐包括琥珀酸、丙二酸、(亚乙二氧基)双乙酸、马来酸、双乙醇酸、酒石酸、羟基丙二酸和富马酸的水溶性盐以及醚羧酸盐 (描述在德国公开说明书2, 446, 686

和 2, 446, 687 及美国专利 3, 935, 257 中), 以及亚硫酸羧酸盐(描述在比利时专利 840, 623 中)。含有三个羧基的多羧酸盐包括, 尤其是水溶性柠檬酸盐、乌头酸盐和柠檬酸盐以及琥珀酸盐的衍生物, 如羧甲氧基琥珀酸盐(描述在英国专利 1, 379, 241 中)、乳氧基琥珀酸盐(描述在荷兰申请 7205873 中)和含氧多羧酸盐物质, 如 2-氧杂-1, 1, 3-丙烷三羧酸盐(描述在英国专利 1, 387, 447 中)。

含有四个羧基的多羧酸盐包括含氧二琥珀酸盐(公开在英国专利 1, 261, 829 中)、1, 1, 2, 2-乙烷四羧酸盐、1, 1, 3, 3-丙烷四羧酸盐和 1, 1, 2, 3-丙烷四羧酸盐。含有磺基取代基的多羧酸盐包括磺基琥珀酸盐衍生物(公开在英国专利 1, 398, 421 和 1, 398, 422 及美国专利 3, 936, 448 中)和磺化热解柠檬酸(描述在英国专利 1, 082, 179 中)。而含有膦基取代基的多羧酸盐公开在英国专利 1, 439, 000 中。

脂环和杂环多羧酸盐包括环戊烷-顺, 顺, 顺-四羧酸盐、环戊二烯金属化物五羧酸盐、2, 3, 4, 5-四氢咪喃-顺, 顺, 顺-四羧酸盐、2, 5-四氢咪喃-顺-二羧酸盐、2, 2, 5, 5-四氢咪喃-四羧酸盐、1, 2, 3, 4, 5, 6-己烷六羧酸盐和多元醇, 例如山梨糖醇、甘露糖醇和木糖醇的羧甲基衍生物。芳族多羧酸盐包括苯六甲酸、1, 2, 4, 5-苯四酸和苯二甲酸的衍生物(公开在英国专利 1, 425, 343 中)。

在上述多羧酸盐中, 优选的多羧酸盐是每个分子含有多至三个羧基的羟基羧酸盐, 特别是柠檬酸盐。

用于本发明组合物中的优选的助洗剂体系包括水不溶性硅铝酸盐

助洗剂如沸石 A 和水溶性羧酸盐螯合剂如柠檬酸的混合物。

对于本发明来说，能形成助洗剂体系部分的其他助洗剂物质包括无机物质例如碱金属碳酸盐、碳酸氢盐、硅酸盐和有机物质例如有机膦酸盐、氨基聚亚烷基膦酸盐和氨基多羧酸盐。

其他适合的水溶性有机盐是均聚或共聚酸或其盐，其中，多羧酸含有通过不多于两个碳原子而相互分开的至少两个羧基。

这类聚合物公开在 GB—A—1, 596, 756 中。这类盐的例子是分子量为 2000—5000 的多羧酸盐及其与马来酐的共聚物，该共聚物分子量为 20,000 至 70,000，特别是约 40,000。

纤维素酶

已经通过不同的分析方法定义了对于各种应用的酶的活性而且特别是纤维素酶的活性。这些方法均试图提供在使用性能方面所预期的实际评价或至少与使用性能相关的测定。如已详述于欧洲专利申请 EP—A—350098 中。许多方法特别是生产纤维素酶经常使用的这些方法与洗衣洗涤剂组合物中纤维素酶的使用性能没有密切的关系。这是由于各种其他的使用条件造成的，对于上述使用条件来说，这些活性的测定方法已被改进。

在 EP—A—350098 中所述的方法已经被改进，使对于洗衣洗涤剂组合物中的纤维素酶活性的评定成为并具有可预测性的相互关系。

因此，为了鉴别用于本发明的纤维素酶与并不构成本发明目的的纤维素酶，本发明使用在 EP—A—350098 中公开的方法。下文被称为 C14CMC 方法的筛选方法（该方法采用的是由 EP—A

—350098所公开的方法)可叙述如下:

原理:

用于筛选的C14CMC方法的原理是,在规定的纤维素酶浓度下,在洗涤溶液中,测定从织物底物中除去的固定化羧甲基纤维素(CMC)。使用C14放射性碳,通过某些CMC的放射性标记来测定除去的CMC。在纤维素酶处理之前和之后,简单计数在织物底物上的放射性C14的量便能评价纤维素酶的活性。

样品的制备:

CMC的制备:按照表I来制备放射性CMC储液。通过EP—A—350098所述的方法可得到放射性CMC。

织物底物:织物底物是具有5cm×5cm大小的细棉织品布样。在其中心用0.35ml放射性标记的CMC储液接种,然后将该细棉织品污布风干。

CMC的固定:为了在细棉织品布样上固定放射性标记CMC,使用由德国Original Haunau制造的瓶式去污力测试仪“Linitest Original Haunau”。该瓶式去污力测试仪的金属瓶用400ml硬水(4毫摩尔Ca⁺⁺/升)充满,每个瓶可以使用13块布样之最大数目。然后,该瓶在瓶式去污力测试仪中,在从20至60℃的加热循环中保温40分钟。保温后,所说的布样在流动的自来水中漂洗1分钟。将它们挤压并使之风干至少30分钟。

按照EP—A—350098的方法,具有固定化的放射性CMC的布样品在没有洗涤时也可作为“空白样品”来测定。

样品的处理:

洗衣试验溶液:按照表II的组成来制备洗衣试验溶液。将其平

衡至PH为7.5。该洗衣试验溶液是向其添加纤维素酶试验样品的基础物。在测定要添加的纤维素酶的量之前，应小心操作，通过加水达到100%平衡而不稀释该洗衣试验溶液。添加的用于此筛选试验中的纤维素酶的量应当使在洗衣试验溶液中纤维素酶蛋白达到 25×10^{-6} % (重量) (在14.5℃下等于0.25 mg/l)。

洗涤方法：在洗衣模拟方法中，处理用放射性标记CMC如此接种的污布。该洗衣方法是在由德国Original Haunau制造的瓶式去污力测试仪“Linitest Original Haunau”中模拟的。将单块污布放入20 cm³玻璃管形瓶中。该管形瓶用10 ml洗衣试验溶液充满，然后将其密封，使之不漏液体。可将多达5个管形瓶放入每个瓶式去污力测试仪的瓶中。该瓶用水充满，水是用作洗衣模拟的热传递介质。洗衣模拟在20至60℃的加热循环中进行40分钟。

处理样品后，该管形瓶浸在冷水中，接着将每块污布从其管形瓶中取出，在烧杯中用流动的软水漂洗，将其挤压并使之风干至少30分钟。

测定：

为了测定除去的放射性标记CMC，使用闪烁计数器，例如LKB 1210 Ultrabeta 闪烁计数器。为了得到最精确的结果，应该遵循用于该特定的闪烁计数器的最佳操作的手控指令。例如，对于LKB 1210 Ultrabeta 闪烁计数器来说，应当按照下列步骤进行。将要测定的污布放入用12 ml闪烁剂液体（例如得自Packard的闪烁剂299）充满的塑料管形瓶中。然后使污布稳定至少30分钟。然后，将管形瓶放入LKB 1210

Ultrabeta 闪烁计数器中，并得到污布的相应的放射性计数。

为了测定仅仅由于纤维素酶而除去的 C M C 的量，必须测定已被同时接种但在没有纤维素酶存在的洗衣试验溶液中已被处理的污布。于是，可把纤维素酶的活性表示为除去的放射性标记 C M C 的百分数。该百分数通过下式计算：

$$\text{除去的放射性 C M C \%} = \frac{X_0 - X_C}{X_0} \times 100$$

其中：X₀ 是用没有纤维素酶存在的洗衣试验溶液处理的污布的放射性闪烁计数

X_C 是用含有待评价的纤维素酶的洗衣试验溶液处理的污布的放射性闪烁计数

统计依据，方法的确定：

为了提供正确的统计结果，应使用标准的统计分析。对于所给出的实例，由于使用 L K B 1 2 1 0 Ultrabeta 闪烁计数器，现已发现对于每个放射性闪烁计数来说，可使用 3 个污布样品量值。为了通过内部的不同方法相互校核所得结果，推荐使用 E P - A - 3 5 0 0 9 8 的“空白样品”的测定和计算。这将能发现和消除错误。

结果分析：

所述筛选试验确实提供了一种快速、独特并且可靠的方法，用来鉴别满足本发明活性标准的纤维素酶与不是本发明部分的纤维素酶。

现已发现，按照上述的 C 1 4 C M C 方法，除去 1 0 % 或更多的固定的放射性标记 C M C 表明，相应的纤维素酶满足了本发明的需要。

对本技术领域技术熟练的技术人员显而易见的是，除去的百分数

高于10%表明相应的纤维素酶具有较高的活性。因此，可以预期，按照C14CMC方法，在洗衣试验溶液中的蛋白质浓度下，能提供除去高于25%或最好高于50%的放射性标记CMC的纤维素酶将达到此纤维素酶用于洗衣洗涤剂的更好的性能指标。

同样已预期到的是，用于C14CMC方法的较高浓度纤维素酶将会提供较高的除去百分数。然而，在纤维素酶浓度和由此得到的除去百分数之间不存在已经证实的线性关系。

此外还已预期到，对于C14CMC方法，使用较高浓度的纤维素酶将会提供较高的除去百分数。

表I：放射性C14标记CMC储液

(所有百分数都以溶液总重量计)

总的CMC* (CMC应是具有约0.47 至约0.7的取代度的洗涤剂 级CMC)	$99.2 \times 10^{-3} \%$
乙醇	$14985.12 \times 10^{-3} \%$
去离子水	$84915.68 \times 10^{-3} \%$
总计:	100%

* 总的CMC含有非放射性和放射性CMC，而放射性CMC提供了放射性，该放射性足以使在所使用的闪烁计数器上清晰地读数。例如，放射性CMC可具有0.7毫居/g的活性并可被混台。

表 II: 洗衣试验溶液
(所有百分数都以溶液总重量计)

直链 C ₁₂ 烷基苯磺酸	0.110%
椰子烷基硫酸盐 (TEA 盐)	0.040%
C ₁₂₋₁₅ 醇乙氧基化物 (E07)	0.100%
椰子脂肪酸	0.100%
油酸	0.050%
柠檬酸	0.010%
三乙醇胺	0.040%
乙醇	0.060%
丙二醇	0.015%
氢氧化钠	0.030%
甲酸钠	0.010%
蛋白酶	0.006%
水 (2.5 毫摩尔/升 Ca ⁺⁺), PH 调节剂 (HCl 或 NaOH 溶液) 和纤维素酶	平衡至 100%

按照本发明, 优选的纤维素酶是在丹麦专利申请 1159/90 中所述的那些纤维素酶。例如, 用于本发明组合物中的纤维素酶制剂可基本由同类的内葡聚糖酶组分所组成, 该同类的内葡聚糖酶组分对于引起抗高度纯化的 43KD 纤维素酶 (由 Humicola insolens, DSM 1800 衍生) 的抗体具有免疫反应性, 或是所说的 43KD 内葡聚糖酶的同系物。

应该强调的是，本发明的所有纤维素酶必须满足上述筛选试验的标准。然而，在丹麦专利申请 1 1 5 9 / 9 0 中规定了其他标准，将其与本发明的筛选试验结合便能确定优选的纤维素酶。

优选用于本发明组合物中的纤维素酶制剂，除了满足筛选试验外，内葡聚糖酶组分显示的 C M C 内切酶活性为每毫克总蛋白量至少约 5 0、优选至少约 6 0、特别优选至少约 9 0 C M C 内切酶单位。尤其优选的内葡聚糖酶组分显示的 C M C 内切酶活性为每毫克总蛋白量至少 1 0 0 C M C 内切酶单位。

在本文中，术语“CMC内切酶活性”是指以内葡聚糖酶组分能将纤维素降解为葡萄糖、纤维素二糖和三糖的能力来表示的内葡聚糖酶活性，该活性的测定是在用本发明的纤维素酶制剂保温后，通过测定羧甲基纤维素（CMC）溶液粘度的降低来进行的，详述如下。

由 C M C 粘度的降低可测定 C M C 内切酶(内葡聚糖酶)活性，叙述如下：在 P H 值为 9 时，在 0 . 1 M 三羟甲基氨基甲烷缓冲液中制备含有 3 5 g / l 的 C M C (Hercules 7 L F D) 的底物溶液。将待分析的酶样品溶于相同的缓冲液中。1 0 m l 底物溶液与 0 . 5 m l 酶溶液混合，并将其转移到在 4 0 ℃ 下恒温的粘度计(如 Haake V T 1 8 1, N V 传感器, 1 8 1 r p m) 中。混合后并再过 3 0 分钟尽快取粘度读数。在这些条件下使粘度降低至 1 / 2 的酶的量被定义为 1 单位 C M C 内切酶活性。

用本技术领域技术人员已知的方法，使用 S D S 聚丙烯酰胺凝胶电泳(S D S - P A G E) 和用标记蛋白质的等电聚焦来分别测定用于本发明的纤维素酶制剂中的内葡聚糖酶组分的分子量和等电点(P I)。用这种方法测定的特定内葡聚糖酶组分的分子量

是 43 K D, 该种内葡聚糖酶的等电点为约 5.1。

纤维素二糖水解酶的活性可以定义为对于纤维素二糖对硝基苯基的活性。该活性是以在 37 °C 下 P H 值为 7.0 时每分钟释放的微摩尔硝基苯基来测定的。已发现本发明的内葡聚糖酶组分基本上没有纤维素二糖水解酶活性。

本发明纤维素酶制剂中的内葡聚糖酶组分最初是通过多种纯化方法分离的, 即包括按照 U. S. 4, 435, 307 进行的粗制 H. insolens 纤维素酶混合物的反相 H P L C 纯化。这种方法已经令人惊奇地导致分离出作为单一组分的 43 K D 内葡聚糖酶, 由于它的特别高的内葡聚糖酶活性而使其具有意想不到的优良性能。

除了筛选试验外, 用于本发明组合物中的纤维素酶还可以进一步定义为具有内葡聚糖酶活性的酶(下文称之为“内葡聚糖酶”), 或具有内葡聚糖酶活性的酶的同系物, 这些酶具有列于附加的顺序表 I D # 2 中的氨基酸顺序。

在本文中, 术语“同系物”是指通过 D N A 编码的多肽, 该 D N A 在某些特定条件下(如在 5 × S S C 中预浸渍, 在 20% 甲酰胺、5 × Denhardt's 溶液、50 m M 磷酸钠、P H 6.8 及 50 μ g 变性声处理的小牛胸腺 D N A 的溶液中在 40 °C 预杂交 1 h, 接着在补加了 100 μ M A T P 的相同溶液中在 40 °C 杂交 18 h) 杂交到与为具有这种氨基酸顺序的内葡聚糖酶编码的 D N A 相同的探查物上。该术语包括上述顺序的衍生物, 得到这些衍生物可通过将一个或多个氨基酸残基加到天然顺序的 C 一和 N 一端的一端或两端, 在天然顺序的一个或多个位点上取代一个或多个氨基酸残基, 在天然氨基酸顺序的一端或两端或在天然顺序中的一个或多个位点上消除一个

或多个氨基酸残基，或在天然顺序中的一个或多个位点上插入一个或多个氨基酸残基。

本发明的内葡聚糖酶的生产可以通过 Humicola 物种如 Humicola insolens，例如菌株 DSM 1800，按照关于用于专利程序目的的微生物保藏的国际承认的布达佩斯协定的条款（布达佩斯协定），于 1981 年 10 月 1 日保藏在 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Mascheroder Weg 1 B, D-3300 Braunschweig, FRG。

另一方面，除了筛选试验外，用于本发明的纤维素酶还可以进一步定义为具有列于附加的顺序表 I D # 4 中的氨基酸顺序的内葡聚糖酶，或显示内葡聚糖酶活性的酶（如上定义的）的同系物。所述内葡聚糖酶的生产可以通过 Fusarium 物种如 Fusarium oxysporum，例如菌株 DSM 2672，按照布达佩斯协定的条款，于 1983 年 6 月 6 日保藏在 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Mascheroder Weg 1 B, D-3300 Braunschweig, FRG。

此外，预期的同系的内葡聚糖酶可以由能产生分解纤维素的酶的其他微生物，例如物种 Trichoderma、Myceliophthora、Phanerochaete、Schizophyllum、Penicillium、Aspergillus 及 Geotricum 衍生而来。

然而，对于本发明纤维素酶制剂的工业生产来说，优选使用重组 DNA 技术或其他技术，包括所涉及的微生物的发酵调整或突变，以确保所需的酶活性的过剩生产。这些方法和技术是本领域已知的，并且可由本领域中熟练的技术人员很容易地实施。

因此，内葡聚糖酶组分可以通过一种方法生产的酶，该方法包括，在允许表达内葡聚糖酶组分或其前体的条件下的培养介质中，培养用重组DNA媒介物转化的宿主细胞，该媒介物携带着编码所述的内葡聚糖酶组分或所述的内葡聚糖酶组分前体的DNA顺序，以及编码功能的DNA顺序，这些功能允许表达编码内葡聚糖酶组分或其前体的DNA顺序，并从培养物中回收内葡聚糖酶组分。

含有由编码如上所述的内葡聚糖酶或酶的前体形式的DNA顺序的DNA组成包括具有列于附加的顺序表ID#1或ID#3中的DNA顺序的DNA组成或其变体。DNA顺序合适的变体的实例是不产生内葡聚糖酶的另一氨基酸顺序的核苷酸取代物，但此核苷酸取代物却对应于引入此DNA组成的宿主生物体的密码子的使用，或者是产生不同的氨基酸顺序的核苷酸取代物，因此该核苷酸取代物可能产生不同的蛋白质结构，这种蛋白质结构可能会产生具有不同性质的内葡聚糖酶突变体而非天然酶。可能的变体的其他实例有在该顺序的一端插入一个或多个核苷酸，或在该顺序的一端或其内消除一个或多个核苷酸。

用于本发明的编码内葡聚糖酶的DNA组成可以通过已经确立的标准方法进行合成制备，例如，由S. L. Beaucage和M. H. Caruthers在Tetrahedron Letters 22, 1981, P P. 1859—1869中所述的磷酰胺方法或由Matthes等人在EMBO Journal 3, 1984, P P. 801—805中所述的方法。按照磷酰胺方法，例如在自动DNA合成仪中合成低聚核苷酸，将其提纯、退火、连接并在合适的媒介物中进行无性繁殖。

编码内葡聚糖酶或其前体的DNA组成的分离可以通过例如建立cDNA或建立产生纤维素酶的微生物(如Humicola insolens, DSM 1800)的基因组库来进行,并通过常规方法筛选阳性无性繁殖,如通过使用低聚核苷酸探查物进行杂交,所用低聚核苷酸探查物是根据标准方法(参考Sambrook等人,Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd. Ed. Cold Spring Harbor, 1989)以内葡聚糖酶的全部或部分氨基酸顺序为基础合成的,或通过选择可表达合适的酶活性(即上面定义的CMC内酶活性)的无性繁殖,或通过选择可产生带有抗天然纤维素酶(内葡聚糖酶)抗体的反应性蛋白质的无性繁殖。

最后, DNA组成可以是混合合成的与基因组的、混合合成的与cDNA或混合基因组的与cDNA的起源物,该起源物可按照标准方法通过连接合成的、基因组的或cDNA起源物(在适当的情况下)的片段进行制备,此片段对应于整个DNA组成的各个部分。DNA组成还可以通过使用特定的引发物进行聚合酶链反应来制备,例如在US 4,683,202中或R. K. Saiki等人在Science 239, 1988, pp. 487-491中所描述的那样。

有上述DNA组成插入的重组表达媒介物包括任何可便于进行重组DNA方法的媒介物,媒介物的选择常常取决于媒介物被引入的宿主细胞。因此,媒介物可以是自动复制媒介物,即以染色体外实体形态存在的媒介物,该媒介物的复制不依赖于染色体的复制,例如质粒。另一方面,该媒介物可以在它被引入宿主细胞时被结合进入宿主细胞基因组中,并与其已被结合进入的染色体一起被复制。

在该媒介物中，编码内葡聚糖酶的DNA顺序应当可行地被连接到合适的启动子和终止密码子顺序上。该启动子可以是在选择的宿主细胞中显示出转录活性的任何DNA顺序，并且可以由编码宿主细胞的同系或异系蛋白质的基因衍生得到。用于连接分别为内葡聚糖酶、启动子和终止密码子的编码的DNA顺序并将其插入合适的媒介物中的方法对于本领域中熟练的技术人员来说是已知的（参见，例如 Sambrook 等人，在所引的书中）。

用上述DNA组成或上述表达媒介物转化的宿主细胞可以属于例如 Aspergillus 物种，最好是 Aspergillus oryzae 或 Aspergillus niger。真菌细胞可以通过一种方法来转化，该方法包括原生质体的形成和转化，接着按自身为已知的方式进行细胞壁的再生。Aspergillus 用作宿主微生物被描述在EP 2 380 23中（Novo Industri A/S的），其内容在此引入作为参考。宿主细胞还可以是酵母细胞，例如 Saccharomyces cerevisiae 菌株。

另一方面，宿主生物可以是细菌，特别是 Streptomyces 和 Bacillus 及 E. coli 菌株。细菌细胞的转化可以按照常规方法进行。例如，正象 Sambrook 等人在 Molecular Cloning: A Laboratory Manual，Cold Spring Harbor, 1989中所描述的。

合适的DNA顺序及媒介物结构的筛选也可以通过标准方法进行（参见Sambrook 等人，在所引的书中）。

用于培养转化的宿主细胞的介质可以是适于所讨论的宿主细胞生长的任何常用介质。被表达的内葡聚糖酶可以便利地被分泌进入培养

介质中，并且可以通过已知方法将其从培养介质中加以回收，这些方法包括通过离心或过滤从介质中分离出细胞，利用盐如硫酸铵沉淀介质的蛋白质组分，接着利用色谱方法如离子交换色谱法、亲和色谱法等。

通过使用如上说明的重组DNA技术、蛋白质提纯技术、发酵和突变技术或其他本领域已知的技术，提供高纯度的内葡聚糖酶是可能的。

在本发明组合中上述纤维素酶的浓度应当是这样的，即释放在洗涤溶液中的酶蛋白质的量为每升洗涤溶液0.005至40mg，优选为每升洗涤溶液0.01至10mg。

任选组分

本发明组合通常将包括任选组分，它们一般构成了洗涤剂组合的一部分。这种任选组分的实例有抗再沉积和污垢悬浮剂，荧光增白剂、漂白剂、漂白活化剂、抑泡剂、抗结块剂、染料和颜料，可以根据需要以各种量将它们加入。

适用于本发明的抗再沉积和污垢悬浮剂包括纤维素衍生物，如甲基纤维素、羧甲基纤维素和羟乙基纤维素以及均聚或共聚的聚羧酸或其盐。这类聚合物包括前面提到的作为助洗剂的聚丙烯酸酯和马来酐-丙烯酸共聚物，以及马来酐与乙烯、甲基乙烯基醚或异丁烯酸的共聚物，其中马来酐占共聚物至少20%（摩尔）。这些物质的用量通常为组合物的0.5%至10%（重量），较优选0.75%至8%（重量），最优选1%至6%（重量）。

优选的荧光增白剂为适当的阴离子，其实例有4,4'-双-(2-二乙醇氨基-4-苯胺基-5-三嗪-6-基氨基)芪-

2 : 2' —二磺酸二钠, 4, 4' —双—(2—吗啉代—4—苯胺基—S—三嗪—6—基氨基) 芪—2 : 2' —二磺酸二钠, 4, 4' —双—(2, 4—二苯胺基—S—三嗪—6—基氨基) 芪—2 : 2' —二磺酸二钠, 4', 4'' —双—(2, 4—二苯胺基—S—三嗪—6—基氨基) 芪—2—磺酸—钠, 4, 4' —双—(2—苯胺基—4—(N—甲基—N—2—羟乙基氨基)—S—三嗪—6—基氨基) 芪—2, 2' —二磺酸二钠, 4, 4' —双—(4—苯基—2, 1, 3—三唑—2—基) 芪—2, 2' —二磺酸二钠, 4, 4' —双—(2—苯胺基—4—(1—甲基—2—羟乙基氨基)—S—三嗪—6—基氨基) 芪—2, 2' —二磺酸二钠和2—芪基—4''—(萘并—1', 2' : 4, 5)—1, 2, 3—三唑—2''—磺酸钠。

可以使用任何颗粒无机过水合物漂白剂, 其用量为组合物的3%至40% (重量), 较优选8%至25% (重量), 最优选12%至20% (重量)。这种漂白剂的优选实例有过硼酸钠—水合物和四水合物, 过碳酸盐, 及其混合物。

另一种优选单独混合的组分是过氧羧酸漂白剂前体, 通常称为漂白活化剂, 它优选以颗粒或结块形式被加入。合适的这类化合物的实例公开在英国专利1586769和2143231中, 它们形成颗粒形式的方法被描述在欧洲公开专利申请0062523中。这类化合物的优选实例为四乙酰乙二胺和3, 5, 5—三甲基己酰氧基苯磺酸钠。

漂白活化剂一般用量为组合物的0.5%至10% (重量), 较优选1%至8% (重量), 最优选2%至6% (重量)。

另一种任选组分是抑泡剂, 以硅氧烷和氧化硅-硅氧烷混合物为例。

硅氧烷通常由烷基化聚硅氧烷物质提供，而硅一般以细碎形式使用，例如硅气凝胶和干凝胶以及各种疏水硅。这些物质可以以颗粒形式被加入，这些颗粒中的抑泡剂是便于释放地被结合在水溶的或水分散的非表面活性洗涤剂基本不渗透的载体中。用另一种方法，可将抑泡剂溶解或分散于液体载体中，并通过喷雾到一种或多种其他组分上而施用。

如上所述，有用的硅氧烷抑泡剂包括上文指出类型的烷基化硅氧烷和固体氧化硅的混合物。这类混合物是通过将硅氧烷添加到固体氧化硅的表面来制备的。优选的硅氧烷抑泡剂由疏水的硅烷化的（最好是三甲基硅烷化）氧化硅提供，这种硅的粒度在10毫微米至20毫微米范围内，其比表面积大于 $50\text{ m}^2/\text{g}$ ，它与二甲基硅氧烷流体紧密地混合，此硅氧烷的分子量在约500至约200,000范围内且硅氧烷与硅烷化的氧化硅之重量比为约1:1至约1:2。

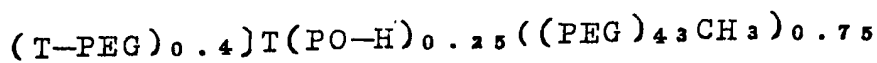
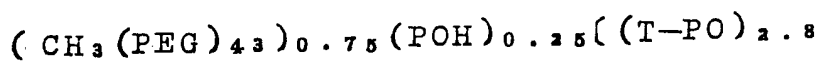
优选的硅氧烷泡沫抑制剂公开在Bartolotta等人的美国专利3,933,672中。其他特别有用的抑泡剂是自乳化硅氧烷抑泡剂，其描述在德国专利申请DTOS 2,646,126（于1977年4月28日公开）中。这种化合物的一个实例是DC-544，市场上可由Dow Corning买到，它是硅氧烷/乙二醇共聚物。

上述抑泡剂一般用量为组合物重量的0.001%至2%（重量），优选0.01%至1%（重量）。泡沫抑制剂最好是以单独的颗粒体形式加入，这便能允许其中含有其他泡沫抑制物质，如C20—C24脂肪酸，微晶石蜡和环氧乙烷与环氧丙烷的高分子量共聚物，而它们对于基质的分散性无不利影响。制备这种泡沫抑制颗粒体的技

术公开在上述Bartolotta等人的美国专利3,933,672中。

其他有用的聚合物是聚乙二醇，优选的是，分子量为1000至10000，较优选2000至8000，最优选约4000的那些聚乙二醇。这些聚合物的用量为0.20%至5%，较优选0.25%至2.5%（重量）。这些聚合物和上述均聚或共聚的聚羧酸酯盐对于改善白度保持性、织物灰分沉积以及改善在过渡金属杂质存在下对泥土、蛋白质污垢和可氧化污垢的清洁性能是很有价值的。

用于本发明组合物的去污剂是常用的对苯二酸与乙二醇和/或丙二醇单元按各种排列的共聚物或三元共聚物。这类聚合物的实例公开在共同转让的美国专利4,116,885和4,711,730以及欧洲专利申请0272033中。根据EP-A-0272033，特别优选的聚合物具有下式：



其中PEG为 $-(\text{OC}_2\text{H}_4)_n-$ ，PO为 $(\text{OC}_3\text{H}_6\text{O})_n$ ，且T为 $(\text{pCOC}_6\text{H}_4\text{CO})_n$ 。

某些聚合物如分子量一般为5000—20000，优选10000—15000的聚乙烯吡咯烷酮也形成有用的试剂，用以阻止洗涤过程中织物之间不稳定染料的转移。

织物柔软剂也可以加入本发明的洗涤剂组合物中。这些试剂可以是无机类型或有机类型的。无机柔软剂以绿土粘土为例，它被公开在GB-A-1,400,898中。有机织物柔软剂包括水不溶性叔胺，如公开在GB-A-1514276和EP-B-0011340

中，这些叔胺与单C12—C14季铵盐的组合被公开在EP—B—0026527和EP—B—0026528中，双长链酰胺公开在EP—B—0242919中。织物柔软体系的其他有用的有机组分包括高分子量的聚环氧乙烷，如公开在EP—A—0299575和0313146中。

绿土粘土的量一般为5%至20%，优选8%至15%（重量），使该物质以干混组分加到制剂的其余部分。有机柔软剂如水不溶性叔胺或双长链酰胺物质加入的量为0.5%至5%（重量），通常为1%至3%（重量），而高分子量的聚环氧乙烷物质和水溶性阳离子物质加入的量为0.1%至2%，通常为0.15%至1.5%（重量）。这些物质一般被加到组合物的喷雾干燥部分，不过在某些实例中，更适宜以干混颗粒将它们加入，或以熔融液体将它们喷雾到组合物的其他固体组分上。

除本发明特定的纤维素酶制剂之外的酶可以存在于本发明组合物中，如蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶。

制备方法

本发明的组合物可以通过各种方法制备，包括干混合、喷雾干燥、附聚和粒化以及这些方法的任意组合。

优选的制备方法

制备本发明组合物的优选方法包括在高速混合机和干混合机中喷雾干燥与附聚相组合。

含有相对不溶的阴离子表面活性剂的第一颗粒状组分被喷雾干燥，在与其余部分再混合之前将部分喷雾干燥产物转移并经过低浓度的非离子表面活性剂喷雾。第二颗粒状组分的制备是用碳酸钠作中和剂，

在连续高速混合机如Lodige KM混合机中通过阴离子表面活性剂酸的干燥中和来进行的。然后将第一和第二组分以及其他干混合组分如羧酸盐螯合剂、无机过氧漂白剂、漂白活化剂、污垢悬浮剂、硅酸盐和酶一起进料到传送带上，由此它们被输送到水平旋转的滚筒，在滚筒内将香料及硅氧烷抑泡剂喷雾到该产物上。在极其优选的组合物中，采用另一滚筒混合步骤，该步骤中引入低浓度（近似为2%）的细碎晶状硅铝酸盐，以增加密度并改善颗粒的流动性能。

洗涤方法

当将远远小于普通洗涤剂组合物的量的本发明组合物用于洗衣机的主洗循环时，本发明的浓缩洗涤剂组合物能够达到相同的效果。

因此，在本发明的另一实施方案中，同时提供了在洗衣机中洗涤织物的方法，其中对于主洗循环，本发明洗涤剂组合物的用量为15至170g。

通常，在欧洲的条件下，用于主洗循环的洗涤剂组合物的建议用量为80至140g，不需要预洗。

本发明的洗涤剂组合物最好直接送入转筒而不是间接地通过洗衣机的外壳。这可以极容易地实现，即通过在袋或贮存器中加入组合物，在洗涤循环开始时，随着搅拌、转筒内洗涤水的温升或浸没组合物，由此将其释放出来。该贮存器与要洗的织物一起放在转筒内。另一方面是，洗衣机本身可以调节以使组合物直接加入转筒，例如通过在入口盖中的悬浮装置。

含有包装在袋或贮存器中的洗涤剂组合物的产品通常以这样的方式进行设计，以便使整个贮存器保持在干燥状态下，以防止干燥时贮存器内东西的外流，但当将其暴露于洗涤环境之中通常是浸没在水溶

液中时，该贮存器又要适宜释放它里面的东西。

贮存器一般是柔韧性的，如袋或盒。袋可以具有涂敷了不透水的保护性物质的纤维状结构，以便保持袋内的东西不变，如在欧洲公开专利申请0018678中所公开的。用另一方法，袋可以由水不溶性合成聚合物制成，并有封边或密封用来隔绝水溶液介质，如在欧洲公开专利申请0011500、0011501、0011502和0011968中所公开的。水易脆密封的一种简易形式包括一道处理的水溶性粘合剂和由不透水聚合物膜如聚乙烯或聚丙烯制成的密封一边的袋。

在各种袋或贮存器产品形式中，可以采用叠层层状产品，其中中心可变形层用组合物浸渍和/或涂敷，然后应用一个或多个外层以产生织物状的美学效果。这些层可以一起密封以便在使用过程中保持连接，或者可以分别与水接触以便促进涂敷或浸渍物质的释放。

另一种叠层形式包括一个模压或变形层用来提供一系列袋状贮存器，将洗涤剂组合物定量沉积到每个袋中，在第一层上覆盖第二层，并密封两层相接触的袋状贮存器之间的那些区域。组分以颗粒、糊或熔融形式沉积，叠层层在其被加入水中之前应当阻止袋状贮存器内的物质外流。这些层可以是独立的或者保持连在一起与水接触，唯一的要求是这种结构应当能够使袋状贮存器内的物质快速释放到溶液中去。每单位面积基体的袋状贮存器的数量是一个选择问题，但通常在每平方米500至25,000之间。

用于本发明的可变形叠层的合适的物质其中包括泡沫材料、纸和纺织与非纺织品。

然而，实施本发明洗涤方法的优选方法包括使用可重复使用的带

有间隔层的配料装置，该装置可透过液体但不能透过固体组合物。

这类装置公开于欧洲专利申请公开号 0 3 4 3 0 6 9 和 0 3 4 4 0 7 0 中。后面一个申请公开了一种装置，它包括从确定漏孔的支承环延展的袋状可变形层，其中的漏孔可以调节以便在洗涤循环中将用于一次洗涤循环的足够的产品导入袋中。一部分洗涤介质由漏孔流入袋内，溶解该产品，然后此溶液通过漏孔向外流出进入洗涤介质。支承环装有遮隔装置以防止浸湿而未溶解的产品的外流，该装置一般包括径向延伸的间隔层，这些间隔层以辐轮形状或类似结构由中心支柱延伸，其中间隔层具有螺旋状形式。

实施例

下列实施例举例说明了本发明并有助于理解本发明。

各个组分的缩写具有下列意义：

L A S：直链十二烷基苯磺酸钠盐

T A S：牛脂醇硫酸钠盐

A S：C 1 4—C 1 5 烷基硫酸钠盐

A O：C 1 2—C 1 4 烷基氧化二甲胺

F A 4 5 E 7：用约 7 摩尔环氧乙烷的乙氧基化的脂肪醇 (C 1 4—C 1 5)

C A T：氯化 C 1 2 烷基三甲基铵

Clay：绿土粘土

Zeolite 4 A：平均粒度在 1—1 0 微米之间的沸石 4 A 钠盐

S K S—6：晶层状硅酸盐 (Hoechst)

Copolymer A A / M A：丙烯酸和马来酸的共聚物

P A A：分子量为 1 0 0 0—1 0 0 0 0 的聚丙烯酸

CMC: 羧甲基纤维素

Phosphonate: 乙二胺四亚甲基磷酸钠盐

EDTA: 乙二胺四乙酸钠盐

PB1: $\text{NaBO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}_2$

PB4: $\text{NaBO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

TAED: 四乙酰乙二胺

NOBS: 壬酰氧基苯磺酸钠

P.A.: 磺化锌酞菁

Silicate (R=n): $\text{SiO}_2 / \text{Na}_2\text{O} = n$

Amylase: Termamyl 60 T (NOVO-Nordisk)

Lipase: Lipolase 100 T (Novo-Nordisk)

Protease: Savinase 4 T (Novo-Nordisk)

SSS: 抑泡体系 (氧化硅—硅氧烷混合物)

实施例 I

权利要求 1 纤维素酶性能参数的临界状态

进行下列试验:

试验条件:

洗涤温度: 60 °C (给循环加热)

洗涤时间: 40 分钟

PH=7.5

水硬度: 4 mmol/L

洗涤剂浓度: 1%

洗涤剂组合物: 参见 EPA 350098 实施例 1

纤维素酶:

- 1) 由 Novo Nordisk 提供的 Celluzyme R = 对照样
- 2) 43KD 内葡聚糖酶—本发明的纤维素酶

试验结果:

通过纤维素酶除去的 C14-CMC%

没有纤维素酶的洗涤剂 (=对照样)	0
洗涤剂 + Celluzyme R	
0.25 mg 蛋白质/L	低于 3
0.9 mg 蛋白质/L	10
1.5 mg 蛋白质/L	12.7
3.0 mg 蛋白质/L	17.7
4.5 mg 蛋白质/L	21.5
洗涤剂 + 43KD 内葡聚糖酶	
0.3 mg 蛋白质/L	20.3
0.25 mg 蛋白质/L	18.5

结果讨论:

上列数据清楚地表明所要求的本发明纤维素酶参数的临界状态超过了市场上可买到的 Celluzyme。

实施例 II

制备下列基体组合物:

组成:

(所有浓度均为重量%)

	浓缩洗涤剂	非浓缩洗涤剂
L A S	9.40	6.27
T A S	3.00	2.00
F A 4 5 E 7	2.65	1.77
柠檬酸钠/柠檬酸	18.50	12.33
Zeolite 4 A	32.65	21.77
Copolymer AA/MA	4.90	3.27
phosphonate	0.19	0.13
碳酸钠	3.00	2.00
Silicate (R=2)	2.90	1.93
Protease	1.62	1.08
硫酸盐	4.50	30.00
S S S	0.40	0.27
次要成分+水	平衡至100%	
密度(g/L, 在 20℃下)	680	415
建议的产品用量 (g/洗涤)	120	180

颜色复原试验:

试验条件:

瓶式去污力测试仪

洗涤温度: 40 °C

洗涤时间: 3 h

洗涤循环的次数: 2

PH = 8.2 非浓缩洗涤剂

8.5 浓缩洗涤剂

水硬度: 15 gr. / US gal.

洗涤剂浓度: 非浓缩洗涤剂为 0.75 %

浓缩洗涤剂为 0.66 %

试验织物: 旧的兰色睡衣裤棉织品

(90 / 10 棉 / 聚酯)

纤维素酶: 1) 由 Novo Nordisk 提供的 Celluzyme^R =
对照样

2) 43KD 内葡聚糖酶 = 本发明的纤维素酶

洗涤试验: 将 8 g 旧的兰色睡衣裤织物的污布用不同的洗涤溶液处理。在转筒里转动干燥后, 通过直接比较具有相等的纤维素酶浓度的两种不同的洗涤剂基体, 对织物的颜色清洁效果进行分级。最好是通过专家评价用 0 至 4 的等级作视觉分级。(0 代表无差异, 4 代表很大差异。)

试验结果:

I) 非浓缩洗涤剂

	<u>P S U</u>	<u>mg 蛋白质 / P S U</u>
无纤维素酶	0	
Celluzyme		
138 mg 蛋白质 / L	+2.3	60
43 KD 内葡聚糖酶		
18.6 mg 蛋白质 / L	+2.2	8.5

II) 浓缩洗涤剂

	<u>P S U</u>	<u>mg 蛋白质 / P S U</u>
无纤维素酶	0	
Celluzyme		
165 mg 蛋白质 / L	+3.8	43
43 KD 内葡聚糖酶		
3.4 mg 蛋白质 / L	+3.4	1.0
LSD (最小有效差值) = 0.5 P S U		

由 mg 蛋白质 / P S U 结果计算下列效率系数:

43 KD 内葡聚糖酶与 Celluzyme 比值的效率系数:

在非浓缩洗涤剂中

$$60 / 8.5 = 7$$

在浓缩洗涤剂中

$$43 / 1.0 = 43$$

在浓缩洗涤剂中与在非浓缩洗涤剂中比值的效率系数:

Celluzyme 的

$$60 / 43 = 1.4$$

43 KD 内葡聚糖的

$$8.5 / 1 = 8.5$$

结论:

上述结果表明,在所要求的浓缩基体中所选择的本发明的纤维素酶的效率比现有技术纤维素酶的效率高4.3倍。此外,上述结果表明,由所要求的加有选择的纤维素酶的浓缩基体而获得的性能增强意想不到地高于用现有技术的纤维素酶所得到的性能增强。

实施例 II

除去污垢试验:

纤维素酶在从织物中除去污垢方面也是非常有效的。这种特殊的性能特征由在实施例 II 中所给出的两种洗涤剂组合物中的 4.3 K D 内葡聚糖酶已得到验证。

条件:

Linitest 仪器

60 °C 洗涤 (给循环加热)

洗涤时间: 40 分钟

水硬度: 布鲁塞尔城市水

洗涤剂浓度: 浓缩洗涤剂为 0.66 %

非浓缩洗涤剂为 1.0 %

纤维素酶浓度: 1.55、3.10、4.65 和 6.2 mg

酶蛋白质 / L 洗涤液

洗涤试验:

将细棉织物用两个不同地区 (US、UK) 的天然得到的粘土弄污。通过比较在两种不同的洗涤剂组合物中以相等的纤维素酶浓度洗涤的粘土污垢来评价纤维素酶的性能。仍然优选在实施例 II 中所用的视觉分级等级。

结果:

<u>纤维素酶浓度</u> (mg 酶蛋白质 / L 洗涤液)	<u>1.55</u>	<u>3.1</u>	<u>4.7</u>	<u>6.2</u>
浓缩洗涤剂				
U S 粘土	+1.50	+2.50	+2.00	+1.50
U K 粘土	+0.50	+1.00	+1.50	+2.50
非浓缩洗涤剂 (=对照样)	0	0	0	0

L S D (最小有效差值) = 0.42 以 95% 的置信度

在本发明浓缩洗涤剂组合物中本发明所选择的纤维素酶除去粘土污垢的性能远远高于在普通的非浓缩洗涤剂组合物中相同纤维素酶的性能。

实施例 I V — X I

还制备了下列浓缩洗涤剂组合物:

浓缩洗涤剂组合物：(所有浓度均以重量%计)

实施例	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
L A S	9.40	12.50	11.00	—	7.58	7.58	8.20	6.50	—
T A S	3.00	—	—	—	2.43	2.43	2.65	3.25	3.90
A S	—	—	4.80	12.00	—	—	—	—	—
F A 4 5 E 7	2.65	2.00	4.00	1.00	5.11	5.11	3.15	2.20	6.00
C A T	—	—	—	—	—	—	—	—	2.45
椰子葡萄糖酰胺	—	11.00	—	—	—	—	—	—	—
牛脂葡萄糖酰胺	—	—	—	10.00	—	—	—	—	—
柠檬酸钠/柠檬酸	20.50	29.50	18.00	18.00	—	5.00	23.50	12.00	15.00
Zeolite 4 A	33.65	—	32.00	32.50	23.80	15.65	—	16.00	20.00
S K S—6	—	—	—	—	—	12.50	—	—	—
Copolymer	—	—	—	—	—	—	—	—	—
A A / M A	4.90	—	4.10	5.00	5.60	2.90	3.50	3.45	3.45
P A A	—	5.70	—	—	—	—	1.50	—	—

实施例	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Phosphonate	0.19	0.23	0.19	1.00	0.57	0.43	0.30	—	—
EDTA	—	—	—	—	0.25	—	—	0.32	0.32
碳酸钠/碳酸氢盐	2.00	12.00	3.28	2.50	17.30	8.00	2.50	9.90	9.90
Silicate									
(R=2)	3.00	4.20	3.00	2.00	2.00	2.50	2.30	2.50	2.50
CMC	—	0.15	—	—	0.48	0.34	0.25	—	—
Clay	—	—	—	—	—	—	12.00	8.60	8.60
PB1	—	—	—	—	13.12	13.12	11.47	11.50	—
PB4	—	—	—	—	—	—	3.55	—	—
过碳酸盐	—	—	—	—	—	—	—	—	12.00
T A E D	—	—	—	—	5.70	5.70	2.47	3.20	—
N O B S	—	—	—	—	—	—	2.00	—	—
P. A.	—	—	—	—	0.002	0.002	—	0.003	0.003

—
∞
—

实例例	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Protease	1.62	1.30	1.20	1.60	1.35	1.35	1.06	1.40	1.40
Lipolase	—	—	0.40	0.30	—	0.20	—	0.30	0.30
Amylase	0.15	—	0.20	0.30	—	0.10	—	—	—
硫酸盐	2.54	3.79	2.38	2.45	1.50	1.50	2.23	3.45	3.45
增白剂	—	0.27	0.27	0.27	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24
SSS	0.40	0.40	0.40	0.40	0.65	0.65	0.50	0.50	0.50

次要成分十水 平衡至100%

纤维素酶 以能够给出 $0.01 < X < 10$ mg 酶蛋白质 / 洗涤液的浓度

顺序说明: SEQ ID NO: 1:

GGATCCAAG ATG CGT TCC TCC CCC CTC CTC CCG TCC GCC GTT GTG GCC 48
 Met Arg Ser Ser Pro Leu Leu Pro Ser Ala Val Val Ala
 -21 -20 -15 -10

GCC CTG CCG GTG TTG GCC CTT GCC GCT GAT GGC AGG TCC ACC CGC TAC 96
 Ala Leu Pro Val Leu Ala Leu Ala Ala Asp Gly Arg Ser Thr Arg Tyr
 -5 1 5

TGG GAC TGC TGC AAG CCT TCG TGC GGC TGG GCC AAG AAG GCT CCC GTG 144
 Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys Gly Trp Ala Lys Lys Ala Pro Val
 10 15 20

AAC CAG CCT GTC TTT TCC TGC AAC GCC AAC TTC CAG CGT ATC ACG GAC 192
 Asn Gln Pro Val Phe Ser Cys Asn Ala Asn Phe Gln Arg Ile Thr Asp
 25 30 35 40

TTC GAC GCC AAG TCC GGC TGC GAG CCG GGC GGT GTC GCC TAC TCG TGC 240
 Phe Asp Ala Lys Ser Gly Cys Glu Pro Gly Gly Val Ala Tyr Ser Cys
 45 50 55

GCC GAC CAG ACC CCA TGG GCT GTG AAC GAC GAC TTC GCG CTC GGT TTT 288
 Ala Asp Gln Thr Pro Trp Ala Val Asn Asp Asp Phe Ala Leu Gly Phe
 60 65 70

GCT GCC ACC TCT ATT GCC GGC AGC AAT GAG GCG GGC TGG TGC TGC GCC 336
 Ala Ala Thr Ser Ile Ala Gly Ser Asn Glu Ala Gly Trp Cys Cys Ala
 75 80 85

TGC TAC GAG CTC ACC TTC ACA TCC GGT CCT GTT GCT GGC AAG AAG ATG 384
 Cys Tyr Glu Leu Thr Phe Thr Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Lys Met
 90 95 100

GTC GTC CAG TCC ACC AGC ACT GGC GGT GAT CTT GGC AGC AAC CAC TTC 432
 Val Val Gln Ser Thr Ser Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Asn His Phe
 105 110 115 120

GAT CTC AAC ATC CCC GGC GGC GGC GTC GGC ATC TTC GAC GGA TGC ACT 480
 Asp Leu Asn Ile Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asp Gly Cys Thr
 125 130 135

CCC	CAG	TTC	GGC	GGT	CTG	CCC	GGC	CAG	CGC	TAC	GGC	GGC	ATC	TCG	TCC	528
Pro	Gln	Phe	Gly	Gly	Leu	Pro	Gly	Gln	Arg	Tyr	Gly	Gly	Ile	Ser	Ser	
			140					145					150			
CGC	AAC	GAG	TGC	GAT	CGG	TTC	CCC	GAC	GCC	CTC	AAG	CCC	GGC	TGC	TAC	576
Arg	Asn	Glu	Cys	Asp	Arg	Phe	Pro	Asp	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Cys	Tyr	
		155					160					165				
TGG	CGC	TTC	GAC	TGG	TTC	AAG	AAC	GCC	GAC	AAT	CCG	AGC	TTC	AGC	TTC	624
Trp	Arg	Phe	Asp	Trp	Phe	Lys	Asn	Ala	Asp	Asn	Pro	Ser	Phe	Ser	Phe	
	170					175					180					
CGT	CAG	GTC	CAG	TGC	CCA	GCC	GAG	CTC	GTC	GCT	CGC	ACC	GGA	TGC	CGC	672
Arg	Gln	Val	Gln	Cys	Pro	Ala	Glu	Leu	Val	Ala	Arg	Thr	Gly	Cys	Arg	
185					190					195					200	
CGC	AAC	GAC	GAC	GGC	AAC	TTC	CCT	GCC	GTC	CAG	ATC	CCC	TCC	AGC	AGC	720
Arg	Asn	Asp	Asp	Gly	Asn	Phe	Pro	Ala	Val	Gln	Ile	Pro	Ser	Ser	Ser	
				205					210					215		
ACC	AGC	TCT	CCG	GTC	AAC	CAG	CCT	ACC	AGC	ACC	AGC	ACC	ACG	TCC	ACC	768
Thr	Ser	Ser	Pro	Val	Asn	Gln	Pro	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	Thr	
			220					225					230			
TCC	ACC	ACC	TCG	AGC	CCG	CCA	GTC	CAG	CCT	ACG	ACT	CCC	AGC	GGC	TGC	816
Ser	Thr	Thr	Ser	Ser	Pro	Pro	Val	Gln	Pro	Thr	Thr	Pro	Ser	Gly	Cys	
		235					240					245				
ACT	GCT	GAG	AGG	TGG	GCT	CAG	TGC	GGC	GGC	AAT	GGC	TGG	AGC	GGC	TGC	864
Thr	Ala	Glu	Arg	Trp	Ala	Gln	Cys	Gly	Gly	Asn	Gly	Trp	Ser	Gly	Cys	
	250					255					260					
ACC	ACC	TGC	GTC	GCT	GGC	AGC	ACT	TGC	ACG	AAG	ATT	AAT	GAC	TGG	TAC	912
Thr	Thr	Cys	Val	Ala	Gly	Ser	Thr	Cys	Thr	Lys	Ile	Asn	Asp	Trp	Tyr	
265					270					275					280	
CAT	CAG	TGC	CTG	TAGACGCAGG	GCAGCTTGAG	GGCCTTACTG	GTGGCCGCAA									964
His	Gln	Cys	Leu													
				285												
CGAAATGACA	CTCCCAATCA	CTGTATTAGT	TCTTGACAT	AATTCGTCA	TCCCTCCAGG											1024
GATTGTCACA	TAAATGCAAT	GAGGAACAAT	GAGTAC													1060

顺序说明: SEQ ID NO: 2:

Met Arg Ser Ser Pro Leu Leu Pro Ser Ala Val Val Ala Ala Leu Pro
 -21 -20 -15 -10

Val Leu Ala Leu Ala Ala Asp Gly Arg Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys
 -5 1 5 10

Cys Lys Pro Ser Cys Gly Trp Ala Lys Lys Ala Pro Val Asn Gln Pro
 15 20 25

Val Phe Ser Cys Asn Ala Asn Phe Gln Arg Ile Thr Asp Phe Asp Ala
 30 35 40

Lys Ser Gly Cys Glu Pro Gly Gly Val Ala Tyr Ser Cys Ala Asp Gln
 45 50 55

Thr Pro Trp Ala Val Asn Asp Asp Phe Ala Leu Gly Phe Ala Ala Thr
 60 65 70 75

Ser Ile Ala Gly Ser Asn Glu Ala Gly Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Glu
 80 85 90

Leu Thr Phe Thr Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Lys Met Val Val Gln
 95 100 105

Ser Thr Ser Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Asn His Phe Asp Leu Asn
 110 115 120

Ile Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asp Gly Cys Thr Pro Gln Phe
 125 130 135

Gly Gly Leu Pro Gly Gln Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Arg Asn Glu
 140 145 150 155

Cys Asp Arg Phe Pro Asp Ala Leu Lys Pro Gly Cys Tyr Trp Arg Phe
 160 165 170

Asp Trp Phe Lys Asn Ala Asp Asn Pro Ser Phe Ser Phe Arg Gln Val
 175 180 185

Gln Cys Pro Ala Glu Leu Val Ala Arg Thr Gly Cys Arg Arg Asn Asp
 190 195 200

Asp Gly Asn Phe Pro Ala Val Gln Ile Pro Ser Ser Ser Thr Ser Ser
 205 210 215

Pro Val Asn Gln Pro Thr Ser Thr Ser Thr Thr Ser Thr Ser Thr Thr
220 225 230 235

Ser Ser Pro Pro Val Gln Pro Thr Thr Pro Ser Gly Cys Thr Ala Glu
240 245 250

Arg Trp Ala Gln Cys Gly Gly Asn Gly Trp Ser Gly Cys Thr Thr Cys
255 260 265

Val Ala Gly Ser Thr Cys Thr Lys Ile Asn Asp Trp Tyr His Gln Cys
270 275 280

Leu

顺序说明: SEQ ID NO: 3:

GAATTCGCGG	CCGCTCATT	CTTCATTCA	TTCTTTAGAA	TTACATACAC	TCTCTTTCAA	60										
AACAGTCACT	CTTTAAACAA	AACAACCTTT	GCAACA	ATG	CGA	TCT	TAC	ACT	CTT	114						
				Met	Arg	Ser	Tyr	Thr	Leu							
				1					5							
CTC	GCC	CTG	GCC	GGC	CCT	CTC	GCC	GTG	AGT	GCT	GCT	TCT	GGA	AGC	GGT	162
Leu	Ala	Leu	Ala	Gly	Pro	Leu	Ala	Val	Ser	Ala	Ala	Ser	Gly	Ser	Gly	
			10					15					20			
CAC	TCT	ACT	CGA	TAC	TGG	GAT	TGC	TGC	AAG	CCT	TCT	TGC	TCT	TGG	AGC	210
His	Ser	Thr	Arg	Tyr	Trp	Asp	Cys	Cys	Lys	Pro	Ser	Cys	Ser	Trp	Ser	
		25					30					35				
GGA	AAG	GCT	GCT	GTC	AAC	GCC	CCT	GCT	TTA	ACT	TGT	GAT	AAG	AAC	GAC	258
Gly	Lys	Ala	Ala	Val	Asn	Ala	Pro	Ala	Leu	Thr	Cys	Asp	Lys	Asn	Asp	
	40					45					50					
AAC	CCC	ATT	TCC	AAC	ACC	AAT	GCT	GTC	AAC	GGT	TGT	GAG	GGT	GGT	GGT	306
Asn	Pro	Ile	Ser	Asn	Thr	Asn	Ala	Val	Asn	Gly	Cys	Glu	Gly	Gly	Gly	
	55				60					65					70	
TCT	GCT	TAT	GCT	TGC	ACC	AAC	TAC	TCT	CCC	TGG	GCT	GTC	AAC	GAT	GAG	354
Ser	Ala	Tyr	Ala	Cys	Thr	Asn	Tyr	Ser	Pro	Trp	Ala	Val	Asn	Asp	Glu	
				75					80					85		
CTT	GCC	TAC	GGT	TTC	GCT	GCT	ACC	AAG	ATC	TCC	GGT	GGC	TCC	GAG	GCC	402
Leu	Ala	Tyr	Gly	Phe	Ala	Ala	Thr	Lys	Ile	Ser	Gly	Gly	Ser	Glu	Ala	
			90					95						100		

AGC TGG TGC TGT GCT TGC TAT GCT TTG ACC TTC ACC ACT GGC CCC GTC 450
 Ser Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Ala Leu Thr Phe Thr Thr Gly Pro Val
 105 110 115

AAG GGC AAG AAG ATG ATC GTC CAG TCC ACC AAC ACT GGA GGT GAT CTC 498
 Lys Gly Lys Lys Met Ile Val Gln Ser Thr Asn Thr Gly Gly Asp Leu
 120 125 130

GGC GAC AAC CAC TTC GAT CTC ATG ATG CCC GGC GGT GGT GTC GGT ATC 546
 Gly Asp Asn His Phe Asp Leu Met Met Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile
 135 140 145 150

TTC GAC GGC TGC ACC TCT GAG TTC GGC AAG GCT CTC GGC GGT GCC CAG 594
 Phe Asp Gly Cys Thr Ser Glu Phe Gly Lys Ala Leu Gly Gly Ala Gln
 155 160 165

TAC GGC GGT ATC TCC TCC CGA AGC GAA TGT GAT AGC TAC CCC GAG CTT 642
 Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Arg Ser Glu Cys Asp Ser Tyr Pro Glu Leu
 170 175 180

CTC AAG GAC GGT TGC CAC TGG CGA TTC GAC TGG TTC GAG AAC GCC GAC 690
 Leu Lys Asp Gly Cys His Trp Arg Phe Asp Trp Phe Glu Asn Ala Asp
 185 190 195

AAC CCT GAC TTC ACC TTT GAG CAG GTT CAG TGC CCC AAG GCT CTC CTC 738
 Asn Pro Asp Phe Thr Phe Glu Gln Val Gln Cys Pro Lys Ala Leu Leu
 200 205 210

GAC ATC AGT GGA TGC AAG CGT GAT GAC GAC TCC AGC TTC CCT GCC TTC 786
 Asp Ile Ser Gly Cys Lys Arg Asp Asp Asp Ser Ser Phe Pro Ala Phe
 215 220 225 230

AAG GTT GAT ACC TCG GCC AGC AAG CCC CAG CCC TCC AGC TCC GCT AAG 834
 Lys Val Asp Thr Ser Ala Ser Lys Pro Gln Pro Ser Ser Ser Ala Lys
 235 240 245

AAG ACC ACC TCC GCT GCT GCT GCC GCT CAG CCC CAG AAG ACC AAG GAT 882
 Lys Thr Thr Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gln Pro Gln Lys Thr Lys Asp
 250 255 260

TCC GCT CCT GTT GTC CAG AAG TCC TCC ACC AAG CCT GCC GCT CAG CCC 930
 Ser Ala Pro Val Val Gln Lys Ser Ser Thr Lys Pro Ala Ala Gln Pro
 265 270 275

GAG CCT ACT AAG CCC GCC GAC AAG CCC CAG ACC GAC AAG CCT GTC GCC 978
 Glu Pro Thr Lys Pro Ala Asp Lys Pro Gln Thr Asp Lys Pro Val Ala
 280 285 290

ACC AAG ECT GCT GCT ACC AAG CCC GTC CAA CCT GTC AAC AAG CCC AAG	1026
Thr Lys Pro Ala Ala Thr Lys Pro Val Gln Pro Val Asn Lys Pro Lys	
295 300 305 310	
ACA ACC CAG AAG GTC CGT GGA ACC AAA ACC CGA GGA AGC TGC CCG GCC	1074
Thr Thr Gln Lys Val Arg Gly Thr Lys Thr Arg Gly Ser Cys Pro Ala	
315 320 325	
AAG ACT GAC GCT ACC GCC AAG GCC TCC GTT GTC CCT GCT TAT TAC CAG	1122
Lys Thr Asp Ala Thr Ala Lys Ala Ser Val Val Pro Ala Tyr Tyr Gln	
330 335 340	
TGT GGT GGT TCC AAG TCC GCT TAT CCC AAC GGC AAC CTC GCT TGC GCT	1170
Cys Gly Gly Ser Lys Ser Ala Tyr Pro Asn Gly Asn Leu Ala Cys Ala	
345 350 355	
ACT GGA AGC AAG TGT GTC AAG CAG AAC GAG TAC TAC TCC CAG TGT GTC	1218
Thr Gly Ser Lys Cys Val Lys Gln Asn Glu Tyr Tyr Ser Gln Cys Val	
360 365 370	
CCC AAC TAAATGGTAG ATCCATCGGT TGTGGAAGAG ACTATGCGTC TCAGAAGGGA	1274
Pro Asn	
375	
TCCTCTCATG AGCAGGCTTG TCATTGTATA GCATGGCATC CTGGACCAAG TGTTGACCC	1334
TTGTTGTACA TAGTATATCT TCATTGTATA TATTTAGACA CATAGATAGC CTCTTGTCAG	1394
CGACAACCTGG CTACAAAAGA CTTGGCAGGC TTGTTCAATA TTGACACAGT TTCCTCCATA	1454
AAAAAAAAA AAAAAAAAAA	1473

顺序说明: SEQ ID NO: 4:

Met Arg Ser Tyr Thr Leu Leu Ala Leu Ala Gly Pro Leu Ala Val Ser
1 5 10 15
Ala Ala Ser Gly Ser Gly His Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys
20 25 30
Pro Ser Cys Ser Trp Ser Gly Lys Ala Ala Val Asn Ala Pro Ala Leu
35 40 45
Thr Cys Asp Lys Asn Asp Asn Pro Ile Ser Asn Thr Asn Ala Val Asn
50 55 60
Gly Cys Glu Gly Gly Gly Ser Ala Tyr Ala Cys Thr Asn Tyr Ser Pro
65 70 75 80
Trp Ala Val Asn Asp Glu Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala Thr Lys Ile
85 90 95
Ser Gly Gly Ser Glu Ala Ser Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Ala Leu Thr
100 105 110
Phe Thr Thr Gly Pro Val Lys Gly Lys Lys Met Ile Val Gln Ser Thr
115 120 125
Asn Thr Gly Gly Asp Leu Gly Asp Asn His Phe Asp Leu Met Met Pro
130 135 140
Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asp Gly Cys Thr Ser Glu Phe Gly Lys
145 150 155 160
Ala Leu Gly Gly Ala Gln Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Arg Ser Glu Cys
165 170 175
Asp Ser Tyr Pro Glu Leu Leu Lys Asp Gly Cys His Trp Arg Phe Asp
180 185 190
Trp Phe Glu Asn Ala Asp Asn Pro Asp Phe Thr Phe Glu Gln Val Gln
195 200 205
Cys Pro Lys Ala Leu Leu Asp Ile Ser Gly Cys Lys Arg Asp Asp Asp
210 215 220
Ser Ser Phe Pro Ala Phe Lys Val Asp Thr Ser Ala Ser Lys Pro Gln
225 230 235 240

Pro Ser Ser Ser Ala Lys Lys Thr Thr Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gln
 245 250 255
 Pro Gln Lys Thr Lys Asp Ser Ala Pro Val Val Gln Lys Ser Ser Thr
 260 265 270
 Lys Pro Ala Ala Gln Pro Glu Pro Thr Lys Pro Ala Asp Lys Pro Gln
 275 280 285
 Thr Asp Lys Pro Val Ala Thr Lys Pro Ala Ala Thr Lys Pro Val Gln
 290 295 300
 Pro Val Asn Lys Pro Lys Thr Thr Gln Lys Val Arg Gly Thr Lys Thr
 305 310 315 320
 Arg Gly Ser Cys Pro Ala Lys Thr Asp Ala Thr Ala Lys Ala Ser Val
 325 330 335
 Val Pro Ala Tyr Tyr Gln Cys Gly Gly Ser Lys Ser Ala Tyr Pro Asn
 340 345 350
 Gly Asn Leu Ala Cys Ala Thr Gly Ser Lys Cys Val Lys Gln Asn Glu
 355 360 365
 Tyr Tyr Ser Gln Cys Val Pro Asn
 370 375