



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106103710 B

(45)授权公告日 2019.08.06

(21)申请号 201580015299.0

O.西蒙森 T.拉斯马森

(22)申请日 2015.03.25

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106103710 A

代理人 张文辉

(43)申请公布日 2016.11.09

(51)Int.Cl.

(30)优先权数据

C12N 9/96(2006.01)

14161543.5 2014.03.25 EP

C11D 3/386(2006.01)

PCT/EP2014/059017 2014.05.02 EP

C11D 17/00(2006.01)

14191322.8 2014.10.31 EP

(56)对比文件

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.09.21

WO 2006048166 A1,2006.05.11,

US 6242405 B1,2001.06.05,

ILAN E等.Lipid-Polyamide-

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2015/056465 2015.03.25

Polyethyleneimine Microcapsules for
Immobilization of Free Cofactors and
Multienzyme System.《Applied Biochemistry
and Biotechnology》.1986,第13卷(第3期),第
221-230页.

(87)PCT国际申请的公布数据
W02015/144784 EN 2015.10.01

审查员 严金波

(73)专利权人 诺维信公司
地址 丹麦鲍斯韦

(72)发明人 A.T.拉斯马森 K.B.安德森
K.拉森 L.E.尼森 M.内尔比

权利要求书1页 说明书35页
序列表4页

(54)发明名称

使用小胺进行的微囊化

(57)摘要

本发明提供了一种通过多支化的多胺和小胺的交联而产生的微囊组合物,将其用于稳定洗涤剂组分。

1. 一种微囊组合物,该微囊组合物包括被截留在由膜形成的隔室中的化合物,该膜通过(a)具有高于800Da分子量的多支化的多胺,和(b)具有少于300Da分子量的脂肪胺或芳香胺的交联而产生;

其中(a)/(b)的重量比在0.1至1000的范围内,其中该化合物是酶,该酶选自下组,该组由以下各项组成:蛋白酶、金属蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶、角质酶、纤维素酶、甘露聚糖酶、果胶酶、黄原胶酶、DNA酶、漆酶、过氧化物酶、卤代过氧化物酶、过水解酶、及其组合。

2. 如权利要求1所述的微囊组合物,其中所述酶是脂肪酶。

3. 如权利要求1或2所述的组合物,其中该多支化的多胺的这些反应性氨基构成该分子量的至少15%。

4. 如权利要求1至3中任一项所述的组合物,其中该隔室的直径是至少50微米。

5. 如权利要求1至4中任一项所述的组合物,其中该隔室包含按总隔室的重量计至少1%活性酶。

6. 如权利要求1至5中任一项所述的组合物,该组合物进一步包括醇。

7. 如权利要求6所述的组合物,其中所述醇是多元醇。

8. 如权利要求1至7中任一项所述的组合物,其中(a)是聚乙烯亚胺。

9. 如权利要求1至8中任一项所述的组合物,其中(b)是亚乙基胺或烷醇胺。

10. 如权利要求1至9中任一项所述的组合物,其中(b)选自下组,该组由以下各项组成:乙二胺、二亚乙基三胺、三亚乙基四胺、双(3-氨基丙基)胺、单乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、六亚甲基二胺、苯二胺、哌嗪、以及四亚乙基五胺。

11. 如权利要求1至10中任一项所述的组合物,其中(b)选自下组,该组由以下各项组成:二亚乙基三胺、三亚乙基四胺、双(3-氨基丙基)胺、单乙醇胺、以及二乙醇胺。

12. 如权利要求1至11中任一项所述的组合物,其中该隔室包括 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、或 Zn^{2+} 离子的来源。

13. 如权利要求12所述的组合物,其中所述 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、或 Zn^{2+} 离子的来源是 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、或 Zn^{2+} 的难溶性盐。

14. 如权利要求1至13中任一项所述的组合物,其中通过使用酰基氯作为交联剂生成该膜。

15. 如权利要求14所述的组合物,其中该酰基氯是间苯二甲酰氯、对苯二甲酰氯、或均苯三甲酰氯。

16. 如权利要求1至15中任一项所述的组合物,其中通过界面聚合来生成该膜。

17. 如权利要求1至16中任一项所述的微囊组合物用于稳定液体洗涤剂组合物中酶的用途。

18. 一种液体洗涤剂组合物,包括表面活性剂和/或洗涤剂助洗剂,和如权利要求1至16中任一项所述的微囊组合物。

19. 如权利要求18所述的组合物,该组合物包括至少两种互不相容的或互相反应的组分,其中这些组分中的一种被截留在该微囊的隔室中,并且其他组分未被截留在该微囊的隔室中。

使用小胺进行的微囊化

[0001] 对序列表的引用

[0002] 本申请包含计算机可读形式的序列表。该计算机可读形式通过引用结合在此。

发明领域

[0003] 本发明涉及用于稳定化洗涤剂组分(如酶)的微囊。

[0004] 背景

[0005] 已知希望的是保护与液体洗涤剂浓缩物中的其他组分存在相容性问题的酶和组分。在文献中已经有许多建议通过提供连续的壳和/或基质(其旨在保护酶免受浓缩物的影响而当洗涤剂浓缩物被加入水中以提供冲洗水时释放它)以保护酶免受浓缩物的连续相和/或水的影响。实例在EP 356,239和WO 92/20771、以及在其中讨论的现有技术中给出。这些、以及其他已知的方法通常涉及通过凝聚形成壳。

[0006] 不幸的是,很难在一方面选择凝聚聚合物及其使用条件,并且在另一方面选择聚合物组合物或其他核心组合物,从而在具有高比表面积颗粒中获得最佳保护和所需的释放性能。通常,要么该壳过于不可透过使得当需要时无法给出有效释放,要么该壳允许过早释放。

[0007] 除了凝聚之外,已知不同的胶囊化技术用于不同目的并且有这样一种已经被用于其他目的的技术是界面缩合(inter facial condensation) (IFC) 聚合。IFC胶囊化技术通常在水包油分散体中进行(这样油相变成了核心),但是还已知在油包水分散体中进行(这样水相变成了核心)进行IFC胶囊化。

[0008] 格伦沃尔德(Grunwald)等人,“用于固定多酶与用于微囊化的右旋糖酐-NAD⁺的连续再循环的可溶的右旋糖酐-NAD⁺的尼龙聚乙烯亚胺微胶囊(Nylon polyethyleneimine microcapsules for immobilizing multienzymes with soluble dextran-NAD⁺for the continuous recycling of the microencapsulated dextran-NAD⁺)”,生物化学和生物物理学研究通讯(Biochem and Biophys Res Comm),第81卷,2(1978),第565-570页,披露了半透尼龙聚乙烯亚胺微囊的制备,其包含一种具有酵母乙醇脱氢酶(EC 1.1.1.1)和苹果酸脱氢酶(EC 1.1.1.37)连同可溶的固定化酶右旋糖酐-NAD⁺的多酶体系。

[0009] 彭色列(Poncelet)等人,“交联的聚乙烯亚胺膜内的微囊化(Microencapsulation within crosslinked polyethyleneimine membranes)”,微囊法杂志(J.Microencapsulation),第11卷,1(1994),第31-40页,披露了一种涉及PEI膜形成的微囊化技术,其特别适用于生物催化剂的固定。

[0010] WO 97/24177描述了一种具有含酶颗粒的液体洗涤剂浓缩物。这些颗粒具有一种从缩聚物形成的聚合物壳,并且含有一种核心聚合物,其引起当该洗涤剂浓缩物在水中稀释后该聚合物壳的伸展。还披露了囊化的沉淀的酶类。

[0011] JP-A-63-137996描述了含有囊化材料的液体洗涤剂,其中该囊化可以通过凝聚或通过IFC聚合进行。JP 63-137996中的目的是将一种水溶性或吸水性聚合物包含在该核心内,当将该洗涤剂放入冲洗水中时该聚合物将充分溶胀以引起囊的破裂,该随之释放该核

心。

[0012] 我们已经发现,使用任何先前所描述用于胶囊化与液体洗涤剂浓缩物中的其他组分存在相容性问题的酶和组分的微囊化程序不可能实现所需结果。在实践中,要么该膜通常过于可透以致于无法阻止相对低分子量的酶通过由该膜提供的高比表面积迁移,要么该膜如此不透而且牢固使得当将该浓缩物加入冲洗水中时不能可靠地释放该酶。这些方法不能简单复制操作以给出所需特性的组合。

[0013] 这些现有技术参考未能认知基于多支化的多胺(例如,PEI)的微囊用于改进洗涤剂中的酶和其他组分储存稳定性,并且同时能够在洗涤剂应用中及时递送微囊内含物的有用性。

[0014] 概述

[0015] 在第一方面,本发明提供了微囊组合物,该微囊组合物包括被截留在由膜形成的隔室中的化合物,该膜通过(a)具有高于800Da分子量的多支化的多胺,和(b)具有少于300Da分子量的脂肪胺或芳香胺的交联而产生;其中(a)/(b)的重量比在0.1至1000的范围内。

[0016] 在一个实施例中,该化合物是酶。

[0017] 在第二方面,本发明提供了洗涤剂组合物,该洗涤剂组合物包括表面活性剂和洗涤剂助洗剂、以及本发明的微囊组合物。

[0018] 在其他方面,本发明提供了用于制备本发明的这些组合物的方法,以及用于使化合物(如酶)稳定化的本发明的这些组合物的方法和用途。

[0019] 本发明的其他方面和实施例在说明书和实例下是显而易见的。

[0020] 详细说明

[0021] 本发明的诸位发明人已经发现,具有通过多支化的多胺和小的脂肪胺或芳香胺的交联而制成的膜的微囊特别有用于囊化和稳定化液体洗涤剂组合物(例如,衣物或(自动)餐具洗涤洗涤剂)中的洗涤剂酶及其他化合物。我们已经发现,该微囊的膜能够改进在液体洗涤剂组合物中的该或这些囊化的酶的储存稳定性(与非囊化的酶相比),如在实例1和实例2中所展示的。通过交联多支化的多胺和小的脂肪胺或芳香胺形成的膜能够将酶或另一种化合物与例如该洗涤剂中的(阴离子)表面活性剂或其他导致不相容性问题的洗涤剂组分分离。

[0022] 当在洗涤剂中使用囊化的酶时,一个至关重要的参数是当该洗涤剂在水中稀释时立即释放该酶的能力,如例如在洗衣或餐具洗涤应用中。本发明的微囊在此方面具有优异性能,并且能够快速释放整个囊化的酶。

[0023] 如描述于本发明的微囊不需要核心聚合物的存在以能够在水中稀释时释放该酶。此外,本发明不需要该酶在微囊的核心中处于一种沉淀的形式用于控制过早释放,如在W0 97/24177中所述的。

[0024] 我们已经发现,将酶或其他化合物囊化在本发明具有半透膜的微囊中,并且在这些囊(在添加至该液体洗涤剂之前)中具有高于该液体洗涤剂中的水活度时,当被添加到该洗涤剂(水正溢出)中时这些囊将经历(部分地)崩溃,因此在这些囊中留下更为浓缩的并且更粘的含酶内部。该膜的崩溃还可导致可透性的降低。这可以通过添加稳定剂/聚合物进一步使用,尤其是不会通过该膜可透的那些。该崩溃和所得黏度增加将降低/妨碍敌对组分

(例如,表面活性剂或螯合剂)扩散进入这些囊中,并且因此增加液体洗涤剂中酶的储存稳定性。该液体洗涤剂中的对该酶敏感的组分(例如,充当该酶底物的组分)还被保护免于受该酶的降解。在洗涤过程中,该液体洗涤剂被水稀释,因此增加了水活度。水现在将扩散进这些囊(渗透作用)中。这些囊将溶胀并且该膜将变得对该酶可透过由此它们可以离开这些囊,或简单地胀裂并且以此方式释放该酶。

[0025] 该概念在稳定化酶对抗液体洗涤剂中的敌对组分方面非常有效,反之亦然还保护液体洗涤剂中酶敏感/不稳定的组分不受酶的影响。

[0026] 由于在许多情况下易于酶降解的组分的高度生物降解性,此类组分被越来越多地用于洗涤剂中。

[0027] 纤维素酶可降解纤维素和纤维素盐,例如羧甲基纤维素CMC(以及Na-CMC)或作为流变改性剂和助洗剂而用于例如抗污垢再沉淀的微晶纤维素。

[0028] 淀粉酶可降解淀粉和淀粉衍生物,例如基于淀粉的表面活性剂或用作助洗剂的羧化淀粉。淀粉也可用作流变改性剂或填充剂。

[0029] 蛋白酶可降解肽/蛋白或具有肽键/酰胺键的组分,例如具有洗涤剂特性的肽(“肽洗剂”)。

[0030] 脂肪酶可降解具有酯键的组分,例如脂类,例如一些类型的基于脂质的或聚酯污物释放聚合物,基于脂质的表面活性剂,基于脂质的结构化剂或流变改性剂(像甘油二酯和甘油三酯结构化剂,例如氢化蓖麻油及衍生物)以及具有酯键的香料等。

[0031] 甘露聚糖酶和黄原胶酶可降解甘露聚糖和黄原胶类型的组分,如瓜尔胶和黄胞胶,其在洗涤剂中被用作流变改性剂。

[0032] 果胶酶(果胶裂解酶或果胶酸裂解酶)可降解果胶和果胶酸盐(果胶多糖),其在洗涤剂中例如可以被用作流变改性剂。

[0033] 脱乙酰壳多糖酶可降解聚葡萄糖胺糖,并且木聚糖酶可降解木聚糖和木聚糖表面活性剂。

[0034] 这些囊化的化合物还可以是酶底物或共底物,其旨在与酶直接或间接反应,但需要在储存液体洗涤剂组合物期间与该酶分开。酶底物或共底物的实例包括但不限于:过氧化氢或过氧化氢前体像过碳酸盐或过硼酸盐(氧化还原酶的底物像过氧化物酶/卤代过氧化物酶)、用于原位过氧化氢生成的糖或多元醇(氧化酶的底物)、酯底物像丙二醇二乙酸酯(过水解酶的底物)、以及漆酶过氧化物酶介质。

[0035] 同样,还可以囊化其他敏感/不稳定的化合物,并且由此对抗反应性的或不相容的化合物而进行分离和稳定化。通常,可以将本发明的微囊用于分离至少两种互相反应的或互不相容的组分/化合物。

[0036] 可以将这些微囊用于分离带有相反电荷的不相容的聚合物和/或不相容的组分,如将阳离子型聚合物或阳离子表面活性剂与阴离子型聚合物或阴离子表面活性剂分离。

[0037] 具体地,通过使用本发明的微囊,可以将液体洗涤剂或洗净剂的敏感的、化学上或物理上不相容的和挥发性的组分封装从而在储存和运输期间使其稳定,并且可以使其在液体洗涤剂或洗净剂中均匀地分散。这样确保了,除了其他事物,消费者在使用该洗涤剂或洗净剂的时候可以获得完全的洗涤剂的和洗净的机能。

[0038] 除了分开特定不相容的组分之外,还可以将本发明的微囊化用于以高于洗涤剂溶

解度所允许的剂量,或当在储存期间存在相分离危险时添加洗涤剂组分。可以将如光学增亮剂、助洗剂、盐、表面活性剂、聚合物等的组分用于以高于它们在洗涤剂中溶解度的浓度添加,或者它们在储存期间可能相分离。其他组分作为乳剂(例如,水包油乳剂)添加是有用的,这些乳剂在储存期间在洗涤剂中可能不稳定-例如止泡剂油或香料/芳香剂的乳剂。通过囊化这些组分或乳剂,溶解度或相分离问题被局限于微囊的内部(核心、内相、隔室)。因此,由于沉淀的固体或相分离,液体洗涤剂组合物的剩余部分将不会受不均性的影响。

[0039] 将这些微囊添加到洗涤剂中可以被用于影响该洗涤剂产品的可视外观,例如不透光效应(小型微囊)或明显可见的颗粒(大型微囊)的效应。这些微囊也可以是着色的。

[0040] 这些微囊可以被用于在处理和加工酶产品期间降低酶尘埃水平。

[0041] 除非另外指明,贯穿本申请所有的百分比指示为重量百分比(%w/w)。

[0042] 微囊

[0043] 典型地,这些微囊通过将水滴形成不可与水混溶的连续体而产生-即典型地通过制备一种油包水乳剂-并且随后通过界面聚合经由添加一种交联剂形成该膜。在最终固化之后,可以收获这些囊并进行进一步清洗并通过本领域已知的方法进行配制。随后将该囊配制品加入该洗涤剂中。

[0044] 有效负载、有待囊化的主膜成分和最终另外的组分是在水相中发现的。在该连续体中发现了稳定化这些水滴趋向凝聚的组分(乳化剂、乳化稳定剂、表面活性剂等),并且还通过该连续体添加该交联剂。

[0045] 可以通过本领域已知的任何方法来制备该乳剂,例如,通过机械搅拌、滴注方法、膜乳化、微流体技术、超声处理等。在一些情况下,这些相的简单混合将自动导致一种乳剂,通常被称为自乳化。方法的使用导致一个窄的粒度分布是有利的。

[0046] 随后典型地将该或这些交联剂加入该乳剂中,这是直接或更典型地通过制备交联剂在一种溶剂中的溶液,该溶剂在连续相中是可溶的。该乳剂和交联剂或其溶液可以通过本领域中常规使用的方法来混合,例如,通过简单混合或通过仔细地控制该乳剂以及该交联剂溶液流动通过一个串联混合器。

[0047] 在一些情况下,需要固化这些囊来完成膜的形成。固化经常是简单的搅拌这些囊一段时间以允许界面聚合反应结束。在其他情况下,该膜的形成可以通过添加反应淬灭剂来终止。

[0048] 这些囊可以被后修饰,例如通过使组分反应到该膜上以阻碍或减少这些颗粒在如在W0 99/01534中所述的洗涤剂中的絮凝。

[0049] 可以通过本领域中已知的方法分离或浓缩这些产生的囊,例如,通过过滤、离心、蒸馏或倾析该囊分散体。

[0050] 这些所得囊可以被进一步配制,例如,通过添加表面活性剂以赋予产物对于存储、运输和稍后处理以及添加至洗涤剂的所需性质。其他微囊配制剂包括流变改性剂、杀生物剂(例如,Proxel)、用于pH调节的酸/碱(其也将这些微囊内调节)、以及用于调节水活度的水。

[0051] 该囊形成方法可以包括以下步骤:

[0052] -制备初始的一个或多个水相和油相,

[0053] -形成油包水乳剂,

[0054] -通过界面聚合形成膜,

[0055] -任选的后修饰,

[0056] -任选的分选和/或配制,

[0057] -添加至洗涤剂。

[0058] 该方法可以是一个分批法或是一个连续或半连续方法。

[0059] 根据本发明的微囊是小型的水性球体,其周围有一个均匀的膜(由该膜形成的隔室)。该微囊内部(被截留在微囊内)的材料被称为核心、内相、或填充物,而该膜有时被称为壳、包衣、或壁。本发明的这些微囊具有在 $0.5\mu\text{m}$ 和 2mm 之间的直径。优选地,这些微囊的平均直径是在 $1\mu\text{m}$ 至 $1000\mu\text{m}$ 的范围中,更优选地在 $5\mu\text{m}$ 至 $500\mu\text{m}$ 的范围中,甚至更优选地在 $10\mu\text{m}$ 至 $500\mu\text{m}$ 的范围中,甚至更优选地在 $50\mu\text{m}$ 至 $500\mu\text{m}$ 的范围中,并且最优选地在 $50\mu\text{m}$ 至 $200\mu\text{m}$ 的范围中。可替代地,这些微囊的直径是在 $0.5\mu\text{m}$ 至 $30\mu\text{m}$ 的范围中;或在 $1\mu\text{m}$ 至 $25\mu\text{m}$ 的范围中。该微囊的直径是当聚合作用完成之后在油相中测定的。该囊的直径可以根据周围化学环境的水活度改变。

[0060] 酶或其他化合物的微囊化(如本发明中所用的)可以通过界面聚合来进行,其中聚合反应中的这两种反应物在一个界面处相遇并且快速反应。这一方法的基础是多胺和小胺与酸衍生物的反应,通常是酸性卤化物,充当一种交联剂。该多胺优选地是基本上水溶性的(当处于游离碱形式时)。在正确的条件下,柔性薄膜在该界面处快速形成。进行该聚合作用的一种方式是使用该酶和多胺的一种水性溶液,其与一种非水溶剂(以及一种乳化剂)进行乳化,并添加包含该酸衍生物的溶液。该酶溶液中可以存在碱剂以中和在该反应过程中形成的酸。聚合物(聚酰胺)膜在这些乳滴的界面处立即形成。该微囊的聚合物膜典型地具有阳离子性质,并且因此与具有阴离子性质的化合物结合/络合。

[0061] 这些微囊的直径是通过这些乳滴的大小而确定的,乳滴的大小通过例如搅拌速率来控制。

[0062] 乳剂

[0063] 乳剂是一个液相在第二液相内暂时或永久的分散体。该第二液相通常被称为连续相。表面活性剂通常用于帮助乳剂的形成和稳定化。不是所有的表面活性剂都能同样地稳定化乳剂。需要针对最优乳剂效用选择表面活性剂的类型和数量,尤其是对于该乳剂的制备和物理稳定性,以及在稀释或进一步加工过程中的稳定性。物理稳定性是指将乳剂以分散体形式进行维持。例如凝聚、聚合、吸附至容器壁、沉降和乳油化的过程是物理不稳定性的多种形式,并且应被避免。合适的表面活性剂的实例描述于W0 97/24177,第19-21页;以及W0 99/01534中。

[0064] 可以将乳剂进一步分类为简单的乳剂,其中该分散的液相是一种简单的均质液体,或一种更复杂的乳剂,其中该分散的液相是液相或固相的非均质组合,例如双重乳剂或复合型乳剂。例如,可以形成一种油包水双重乳剂或复合型乳剂,其中该水相本身进一步含有乳化的油相;这种类型的乳剂可以被指定为一种油包水包油(o/w/o)乳剂。可替代地,可以形成油包水乳剂,其中该水相含有分散的固相,通常被称为一种悬浮液-乳剂。可以描述其他更复杂的乳剂。因为在描述这类系统方面固有的困难,术语乳剂用于描述简单和更复杂的乳剂两者,不必要限制乳剂的形式或存在的相类型和相数。

[0065] 多胺

[0066] 膜的刚性/柔性和可透性主要受多胺选择的影响。根据本发明的多胺是一种多支化的多胺。每个分支(优选地以一个伯氨基团结束)充当膜网络中的一个系拴点,从而产生本发明的有利性质。根据本发明的多支化的多胺是一种具有多于两个分支点和多于两个反应性氨基的多胺(能够与交联剂反应,即,伯氨基团和仲氨基团)。当制备该乳剂时,该多支化的多胺被用作起始材料-它不是从其他起始材料原位形成的。为了得到本发明引人注目的特性,该多胺的多支化结构必须作为起始材料存在。

[0067] 分支点数目和伯胺数目之间存在密切的关系,由于伯胺将总是位于分支的末端:线性胺只能含有两个伯胺。对于假设地引入这样一种线性二胺的每个分支点将允许一个或多个伯胺引入到该或这些被引入的分支的末端。在本文中,我们将该伯氨基团理解为该分支的一部分,即该分支的端点。例如,我们认为三(2-氨基乙基)胺或1,2,3-丙烷三胺都是具有一个分支点的分子。对于本发明,该多胺具有至少四个伯胺。可以从脂肪族烃链(如在之前所述实例中)或从不饱和的碳键(例如在,例如3,3'-二氨基联苯胺中)、或从叔氨基团(例如在N,N,N',N'-四-(2-氨基乙基)乙二胺)中引入多个分支点。

[0068] 除了分支点的数目之外,我们已经发现,反应性氨基团的紧密度非常重要。例如N,N,N',N'-四-(12-氨基十二基)乙二胺的物质是不适合的。肽或蛋白(例如一种酶)都不适用于膜形成。因此,该多支化的多胺不是肽或蛋白。

[0069] 在一个实施例中,这些反应性氨基团构成该多支化的多胺至少15%的分子量,例如超过20%,或超过25%。优选地,该多支化的多胺的分子量是至少800Da;更优选地至少为1kDa,并且最优选地至少为1.3kDa。

[0070] 在一个优选的实施例中,该多支化的多胺是聚乙烯亚胺(PEI),及其修饰体,具有多于两个分支点和多于两个反应性氨基,其中这些反应性氨基构成该PEI至少15%的分子量,例如超过20%,或超过25%。优选地,该PEI的分子量是至少800Da;更优选地至少为1kDa,并且最优选地至少为1.3kDa。

[0071] 不同的多支化的多胺的组合可以用于制备根据本发明的微囊。

[0072] 小胺

[0073] 本发明的微囊是通过在形成微囊的膜的交联反应中使用一种或多种小的脂肪胺或芳香胺而制成的。这些小的脂肪胺或芳香胺与多支化的多胺被添加到在形成微囊的膜的交联反应中所使用的水溶液中。

[0074] 这些小的脂肪胺或芳香胺具有小于500Da,优选地小于400Da,更优选地小于300Da,并且最优选地小于250Da的分子量。

[0075] 该小的脂肪胺或芳香胺优选地是基本上水溶性的(当处于游离碱形式时)。优选地,该小胺是脂肪胺,更优选地是具有一个或多个氨基的烷基胺,例如亚乙基胺或烷醇胺。

[0076] 该小的脂肪胺或芳香胺可以选自下组,该组由以下各项组成:乙二胺、二亚乙基三胺、三亚乙基四胺、双(3-氨基丙基)胺、单乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、六亚甲基二胺、苯二胺、哌嗪、以及四亚乙基五胺。

[0077] 应该对小胺进行选择,以确保与被截留/囊化在本发明的微囊中的化合物的相容性。

[0078] 在制备本发明的微囊时,可以按小胺和多支化的多胺的总含量重量计以从0.1%至90%、优选地从0.2%至90%、更优选地从0.5%至90%、甚至更优选地从0.5%至50%的

量添加小胺。

[0079] (多支化的多胺)/(小胺)的重量比在0.1至1000的范围内;优选地在0.1至500的范围内;更优选地在0.1至250的范围内;并且最优选地在1至250的范围内。

[0080] 不同的小胺的组合可以用于制备根据本发明的微囊。

[0081] 交联剂

[0082] 如在本发明中所使用的交联剂是一种具有至少两个能够与胺类反应形成共价键的基团/位点的分子。

[0083] 该交联剂优选地是油可溶性的并且可以呈酸酐或酸性卤化物的形式,优选地为酰基氯。例如,它可以是己二酰氯、癸二酰氯、十二烷基二酰氯、邻苯二甲酰氯、对苯二甲酰氯、间苯二甲酰氯、或均苯三甲酰氯,但优选地,该交联剂是间苯二甲酰氯、对苯二甲酰氯或均苯三甲酰氯。

[0084] 一种或多种酶

[0085] 本发明的微囊可以包括一种或多种适合于包含在洗衣或餐具洗涤剂(洗涤剂酶)中的酶,例如,蛋白酶(例如,枯草杆菌蛋白酶或金属蛋白酶)、脂肪酶、角质酶、淀粉酶、糖酶、纤维素酶、果胶酶、甘露聚糖酶、阿拉伯糖酶、半乳聚糖酶、黄原胶酶(EC 4.2.2.12)、木聚糖酶、DNA酶、过水解酶(perhydrolase)、氧化还原酶(例如,漆酶、过氧化物酶、过氧合酶和/或卤代过氧化物酶)。优选的洗涤剂酶是蛋白酶(例如,枯草杆菌蛋白酶或金属蛋白酶)、脂肪酶、淀粉酶、裂合酶、纤维素酶、果胶酶、甘露聚糖酶、DNA酶、过水解酶、和氧化还原酶(例如,漆酶、过氧化物酶、过氧合酶和/或卤代过氧化物酶)或其组合。更优选的洗涤剂酶是蛋白酶(例如,枯草杆菌蛋白酶或金属蛋白酶)、脂肪酶、淀粉酶、纤维素酶、果胶酶、和甘露聚糖酶;或其组合。

[0086] 该微囊可以包括多于0.1%的活性酶蛋白;优选地多于0.25%、更优选地多于0.5%、更优选地多于1%、更优选地多于2.5%、优选地多于5%、更优选地多于7.5%、更优选地多于10%、更优选地多于12.5%、更优选地多于15%、甚至更优选地多于20%、并且最优选地多于25%的活性酶蛋白。

[0087] 蛋白酶:用于在本发明中使用的蛋白酶是丝氨酸蛋白酶,例如枯草杆菌蛋白酶、金属蛋白酶和/或胰蛋白酶样蛋白酶。优选地,这些蛋白酶是枯草杆菌蛋白酶或金属蛋白酶;更优选地,这些蛋白酶是枯草杆菌蛋白酶。

[0088] 丝氨酸蛋白酶是催化肽键水解并且在活性位点处存在一个必需丝氨酸残基的酶(怀特(White)、汉德勒(Handler)和史密斯(Smith),1973,“生物化学原理(Principles of Biochemistry)”,第五版,麦格劳-希尔图书公司(McGraw-Hill Book Company),纽约,第271-272页)。枯草杆菌蛋白酶包括I-S1和I-S2亚组,优选地由其构成,正如西仁(Siezen)等人,蛋白质工程(Protein Engng.)4(1991)719-737;和西仁等人,蛋白质科学(Protein Science)6(1997)501-523所定义。由于丝氨酸蛋白酶的活性位点的结构高度保守,根据本发明的枯草杆菌蛋白酶可以在功能上相当于由西仁(Siezen)等人(同上)提出的指定亚组的枯草杆菌酶(subtilase)。

[0089] 枯草杆菌蛋白酶可以是动物、植物或微生物来源的,包括化学或基因修饰的突变体(蛋白质工程变体),优选为碱性微生物枯草杆菌蛋白酶。枯草杆菌蛋白酶的实例是源自芽胞杆菌属的那些,例如枯草杆菌蛋白酶Novo、枯草杆菌蛋白酶Carlsberg、枯草杆菌蛋白

酶BPN'、枯草杆菌蛋白酶309、枯草杆菌蛋白酶147以及枯草杆菌蛋白酶168(描述于WO 89/06279中)以及蛋白酶PD138(WO 93/18140)。实例描述于WO 98/020115、WO 01/44452、WO 01/58275、WO 01/58276、WO 03/006602以及WO 04/099401中。胰蛋白酶样蛋白酶的实例是胰蛋白酶(例如,猪或牛来源的)以及在WO 89/06270和WO 94/25583中描述的镰孢属蛋白酶。其他实例为在WO 92/19729、WO 88/08028、WO 98/20115、WO 98/20116、WO 98/34946、WO 2000/037599、WO 2011/036263中描述的变体,尤其是在一个或多个以下位置中具有取代的变体:27、36、57、76、87、97、101、104、120、123、167、170、194、206、218、222、224、235以及274。

[0090] 金属蛋白酶可以是动物、植物或微生物来源的,包括化学或基因修饰的突变体(蛋白质工程化变体),优选为碱性微生物金属蛋白酶。实例描述于WO 2007/044993、WO 2012/110562及WO 2008/134343中。

[0091] 可商购的枯草杆菌蛋白酶的实例包括KannaseTM、EverlaseTM、RelaseTM、EsperaseTM、AlcalaseTM、DurazymTM、SavinaseTM、OvozymeTM、LiquanaseTM、CoronaseTM、PolarzymeTM、PyraseTM、Pancreatic Trypsin NOVO (PTN)、Bio-FeedTMPro以及Clear-LensTMPro;Blaze(所有都可从NovozymesA/S(诺维信公司),Bagsvaerd,丹麦获得)。其他可商购的蛋白酶包括NeutraseTM、RonozymeTMPro、MaxataseTM、MaxacalTM、MaxapemTM、OpticleanTM、ProperaseTM、PurafastTM、PurafectTM、Purafect OxTM、Purafact PrimeTM、ExcellaseTM、FN2TM、FN3TM和FN4TM(可从Novozymes(诺维信公司)、Genencor International Inc.(杰能科国际公司)、Gist-Brocades(吉斯特·布罗卡德斯公司)、BASF公司、或DSM公司获得)。其他实例是PrimaseTM和DuralaseTM。可从汉高公司(Henkel)获得的Blap R、Blap S和Blap X也是实例。

[0092] 裂解酶:裂解酶可以是一种果胶酸裂解酶,来源于芽孢杆菌属,尤其是地衣芽孢杆菌或粘琼脂芽孢杆菌(*B. agaradhaerens*),或一种来源于这些来源中任一种的变体,例如,正如在US 6124127、WO 99/027083、WO 99/027084、WO 02/006442、WO 02/092741、WO 03/095638中所述的,可商购的果胶酸裂解酶是XPect;Pectawash和Pectaway(诺维信公司)。

[0093] 甘露聚糖酶:甘露聚糖酶可以是家族5或26的碱性甘露聚糖酶。它可以是一种来自芽孢杆菌属或腐质霉属的野生型,特别是粘琼脂芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、耐盐嗜碱芽孢杆菌(*B. halodurans*)、克劳氏芽孢杆菌(*B. clausii*)或特异腐质霉。适合的甘露聚糖酶描述于WO 99/064619中。一种可商购的甘露聚糖酶是Mannaway(诺维信公司)。

[0094] 纤维素酶:适合的纤维素酶包括细菌或真菌来源的那些。包括化学修饰的或蛋白质工程化的突变体。适合的纤维素酶包括来自芽孢杆菌属、假单胞菌属、腐质霉属、镰孢属、梭孢壳属、枝顶孢霉属的纤维素酶,例如,从在US 4,435,307、US 5,648,263、US 5,691,178、US 5,776,757以及WO 89/09259中披露的特异腐质霉、嗜热毁丝霉和尖镰孢产生的真菌纤维素酶。

[0095] 尤其适合的纤维素酶是具有颜色护理益处的碱性或中性纤维素酶。此类纤维素酶的实例是描述于EP 0 495 257、EP 0 531 372、WO 96/11262、WO 96/29397、WO 98/08940中的纤维素酶。其他实例为纤维素酶变体,例如在WO 94/07998、EP 0 531 315、US 5,457,046、US 5,686,593、US 5,763,254、WO 95/24471、WO 98/12307以及PCT/DK 98/00299中描述的那些。

[0096] 可商购的纤维素酶包括CelluzymeTM、和CarezymeTM (诺维信公司 (Novozymes A/S))、ClazinaseTM、和Puradax HATM (杰能科国际有限公司 (Genencor International Inc.))、以及KAC-500 (B)TM (花王株式会社 (Kao Corporation))。

[0097] 脂肪酶和角质酶:适合的脂肪酶和角质酶包括细菌或真菌来源的那些。包括化学修饰的或蛋白质工程化的突变体。实例包括来自嗜热真菌属 (Thermomyces) 的脂肪酶,例如来自如在EP 258 068和EP 305 216中描述的疏棉状嗜热丝孢菌 (*T.lanuginosus*) (之前命名为柔毛腐质霉);来自腐质霉属的角质酶,例如在WO 96/13580中描述的特异腐质霉;一种假单胞菌属脂肪酶,例如来自产碱假单胞菌 (*P.alcaligenes*) 或类产碱假单胞菌 (*P.pseudoalcaligenes*) (EP 218 272)、洋葱假单胞菌 (*P.cepacia*) (EP 331376)、斯氏假单胞菌 (*P.stutzeri*) (GB 1,372,034)、萤光假单胞菌 (*P.fluorescens*)、假单胞菌属菌株SD 705 (WO 95/06720和WO 96/27002)、威斯康星假单胞菌 (*P.wisconsinensis*) (WO 96/12012);一种芽孢杆菌属脂肪酶,例如来自枯草芽孢杆菌 (达托斯 (Dartois) 等人,1993,生物化学与生物物理学学报 (*Biochemica et Biophysica Acta*),1131:253-360)、嗜热脂肪芽孢杆菌 (JP 64/744992) 或短小芽孢杆菌 (WO 91/16422)。

[0098] 其他的实例是例如WO 92/05249、WO 94/01541、EP 407 225、EP 260 105、WO 95/35381、WO 96/00292、WO 95/30744、WO 94/25578、WO 95/14783、WO 95/22615、WO 97/04079、WO 97/07202、WO 00/060063、WO 2007/087508以及WO 2009/109500中所描述的那些脂肪酶变体。

[0099] 优选的可商购脂肪酶包括LipolaseTM、Lipolase UltraTM和LipexTM;LecitaseTM、LipolexTM;LipocleanTM、LipoprimeTM (诺维信公司)。其他可商购脂肪酶包括Lumafast (杰能科国际公司);Lipomax (吉斯特-布劳卡德斯公司 (Gist-Brocades)/杰能科国际公司) 和来自苏威公司 (Solvay) 的芽孢杆菌脂肪酶。

[0100] 在本发明的一个实施例中,该脂肪酶的氨基酸序列与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少70%的序列一致性,优选地至少75%,更优选地至少80%,更优选地至少85%,更优选地至少90%,更优选地至少95%,96%,97%,98%,99%,并且最优选地100%的序列一致性。在另一个实施例中,引入进SEQ ID NO:1的氨基酸序列中的氨基酸取代、缺失和/或插入的数目多达10个,例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个;或多达5个,例如1个、2个、3个、4个、或5个。

[0101] 淀粉酶:适合的淀粉酶 (α 和/或 β) 包括细菌或真菌来源的那些。包括化学修饰的或蛋白质工程化的突变体。淀粉酶包括例如从芽孢杆菌属获得的 α -淀粉酶,例如,在GB 1,296,839中更详细描述的地衣芽孢杆菌的特定菌株。

[0102] 适合的淀粉酶的实例包括具有WO 95/10603中的SEQ ID NO:2的淀粉酶或其与SEQ ID NO:3具有90%序列一致性的变体。优选的变体描述于WO 94/02597、WO 94/18314、WO 97/43424以及WO 99/019467的SEQ ID NO:4中,例如在一个或多个以下位置中具有取代的变体:15、23、105、106、124、128、133、154、156、178、179、181、188、190、197、201、202、207、208、209、211、243、264、304、305、391、408以及444。

[0103] 不同的适合的淀粉酶包括具有WO 02/010355中的SEQ ID NO:6的淀粉酶或其与SEQ ID NO:6具有90%序列一致性的变体。SEQ ID NO:6的优选变体是在位置181和182中具有缺失并且在位置193中具有取代的那些。其他适合的淀粉酶是包括示于WO 2006/066594

的SEQ ID NO:6中的来源于解淀粉芽孢杆菌的 α -淀粉酶的残基1-33和示于WO 2006/066594的SEQ ID NO:4中的地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶的残基36-483的杂合 α -淀粉酶或其具有90%序列一致性的变体。这一杂合 α -淀粉酶的优选变体是在以下位置中的一个或多个中具有取代、缺失或插入的那些:G48、T49、G107、H156、A181、N190、M197、I201、A209以及Q264。包括示于WO 2006/066594的SEQ ID NO:6中的来源于解淀粉芽孢杆菌的 α -淀粉酶的残基1-33和SEQ ID NO:4的残基36-483的杂合 α -淀粉酶的最优选变体是具有以下取代的那些:

[0104] M197T;

[0105] H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S;或

[0106] G48A+T49I+G107A+H156Y+A181T+N190F+I201F+A209V+Q264S。

[0107] 适合的另外的淀粉酶是具有WO 99/019467中的SEQ ID NO:6的淀粉酶或其与SEQ ID NO:6具有90%序列一致性的变体。SEQ ID NO:6的优选变体是在以下位置中的一个或多个中具有取代、缺失或插入的那些:R181、G182、H183、G184、N195、I206、E212、E216以及K269。特别优选的淀粉酶是在位置R181和G182或位置H183和G184中具有缺失的那些。

[0108] 可以使用的另外的淀粉酶是具有WO 96/023873的SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:7的那些或其与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:7具有90%序列一致性的变体。SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:7的优选变体是在以下位置中的一个或多个中具有取代、缺失或插入的那些:140、181、182、183、184、195、206、212、243、260、269、304以及476。更优选的变体是在位置181和182或位置183和184中具有缺失的那些。SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:7的最优选的淀粉酶变体是在位置183和184中具有缺失并且在位置140、195、206、243、260、304以及476中的一个或多个中具有取代的那些。

[0109] 可以使用的其他淀粉酶是具有WO 08/153815中的SEQ ID NO:2、WO 01/66712中的SEQ ID NO:10的淀粉酶或其与WO 08/153815的SEQ ID NO:2具有90%序列一致性或与WO 01/66712中的SEQ ID NO:10具有90%序列一致性的变体。WO 01/66712中的SEQ ID NO:10的优选变体是在以下位置中的一个或多个中具有取代、缺失或插入的那些:176、177、178、179、190、201、207、211以及264。

[0110] 另外的适合的淀粉酶是具有WO 09/061380中的SEQ ID NO:2的淀粉酶或其与SEQ ID NO:2具有90%序列一致性的变体。SEQ ID NO:2的优选变体是在以下位置中的一个或多个中具有C-末端的截短和/或取代、缺失或插入的那些:Q87、Q98、S125、N128、T131、T165、K178、R180、S181、T182、G183、M201、F202、N225、S243、N272、N282、Y305、R309、D319、Q320、Q359、K444以及G475。SEQ ID NO:2的更优选变体是在一个或多个以下位置中具有取代的那些:Q87E、R、Q98R、S125A、N128C、T131I、T165I、K178L、T182G、M201L、F202Y、N225E、R、N272E、R、S243Q、A、E、D、Y305R、R309A、Q320R、Q359E、K444E以及G475K和/或位置R180和/或S181或T182和/或G183的缺失。SEQ ID NO:2的最优选的淀粉酶变体是具有以下取代的那些:

[0111] N128C+K178L+T182G+Y305R+G475K;

[0112] N128C+K178L+T182G+F202Y+Y305R+D319T+G475K;

[0113] S125A+N128C+K178L+T182G+Y305R+G475K;或

[0114] S125A+N128C+T131I+T165I+K178L+T182G+Y305R+G475K,其中这些变体是C-末端截短的并且任选地进一步在位置243处包括取代和/或在位置180和/或位置181处包括缺

失。

[0115] 其他适合的淀粉酶是具有WO 01/66712中的SEQ ID NO:12的 α -淀粉酶或与SEQ ID NO:12具有至少90%序列一致性的变体。优选的淀粉酶变体是在WO 01/66712中的SEQ ID NO:12的以下位置中的一个或多个中具有取代、缺失或插入的那些:R28,R118,N174;R181,G182,D183,G184,G186,W189,N195,M202,Y298,N299,K302,S303,N306,R310,N314;R320,H324,E345,Y396,R400,W439,R444,N445,K446,Q449,R458,N471,N484。特别优选的淀粉酶包括具有D183和G184的缺失并且具有R118K、N195F、R320K及R458K的取代的变体,以及另外在选自下组的一个或多个位置中具有取代的变体:M9、G149、G182、G186、M202、T257、Y295、N299、M323、E345以及A339,最优选的是另外在所有这些位置中具有取代的变体。

[0116] 其他实例是例如描述于WO 2011/098531、WO 2013/001078及WO 2013/001087中的那些淀粉酶变体。

[0117] 可商购的淀粉酶是Stainzyme;Stainzyme Plus;DuramylTM、TermamylTM、Termamyl Ultra;Natalase、FungamylTM和BANTM(诺维信公司)、RapidaseTM和PurastarTM/EffectenzTM、Powerase和Preferenz S100(来自杰能科国际公司(Genencor International Inc.)/杜邦公司)。

[0118] 脱氧核糖核酸酶(DNA酶):适合的脱氧核糖核酸酶(DNA酶)是催化DNA骨架中的磷酸二酯键的水解裂解从而降解DNA的任何酶。根据本发明,可获得自细菌的DNA酶是优选的;特别地,可获得自芽孢杆菌属的DNA酶是优选的;特别地,可获得自枯草芽孢杆菌或地衣芽孢杆菌的DNA酶是优选的。此类DNA酶的实例描述于专利申请WO 2011/098579或PCT/EP 2013/075922中。

[0119] 过水解酶:适合的过水解酶能够催化过水解反应,该反应导致在过氧化物源(例如,过氧化氢)的存在下从羧酸酯(酰)底物产生过酸。虽然许多酶以低水平进行该反应,过水解酶展示出高的过水解:水解比率,通常大于1。适合的过水解酶可以是植物、细菌或真菌来源的。包括化学修饰的或蛋白质工程化的突变体。

[0120] 有用的过水解酶的实例包括天然存在的分枝杆菌属过水解酶或其变体。一种示例性酶来源于耻垢分枝杆菌。这种酶,其酶特性、其结构及其变体描述于WO 2005/056782、WO 2008/063400、US 2008/145353以及US 2007167344中。

[0121] 氧化酶/过氧化物酶:适合的氧化酶和过氧化物酶(或氧化还原酶)包括各种糖氧化酶、漆酶、过氧化氢酶以及卤代过氧化物酶。

[0122] 合适的过氧化物酶包括那些由国际生物化学与分子生物学联合会(IUBMB)命名委员会陈述的酶分类EC 1.11.1.7包括的过氧化物酶,或源自其中的展示出过氧化物酶活性的任何片段。

[0123] 适合的过氧化物酶包括植物、细菌或真菌来源的那些。包括化学修饰的或蛋白质工程化的突变体。有用的过氧化物酶的实例包括来自拟鬼伞属,例如来自灰盖拟鬼伞(*C. cinerea*)的过氧化物酶(EP 179,486),及其变体,如在WO 93/24618、WO 95/10602以及WO 98/15257中描述的那些。

[0124] 用于在本发明中使用的过氧化物酶还包括卤代过氧化物酶,例如氯过氧化物酶、溴过氧化物酶以及展示出氯过氧化物酶或溴过氧化物酶活性的化合物。根据其对于卤素离子的特异性将卤代过氧化物酶加以分类。氯过氧化物酶(E.C.1.11.1.10)催化从氯根离子形

成次氯酸盐。

[0125] 在一个实施例中,该卤代过氧化物酶是氯过氧化物酶。优选地,该卤代过氧化物酶是钒卤代过氧化物酶,即含钒酸盐的卤代过氧化物酶。在本发明的一个优选方法中,将含钒酸盐的卤代过氧化物酶与氯根离子来源组合。

[0126] 已经从许多不同真菌,特别是从暗色丝孢菌(dematiaceous hyphomycete)真菌组中分离出了卤代过氧化物酶,比如卡尔黑霉属(*Caldariomyces*) (例如煤卡尔黑霉(*C.fumago*))、链格孢属、弯孢属(例如疣枝弯孢(*C.verruculosa*)和不等弯孢(*C.inaequalis*))、内脐蠕孢属、细基格孢属以及葡萄孢属。

[0127] 还已经从细菌,如假单胞菌属(例如,吡咯假单胞菌(*P.pyrrcocinia*))和链霉菌属(例如,金色链霉菌(*S.aureofaciens*))中分离出了卤代过氧化物酶。

[0128] 在一个优选实施例中,该卤代过氧化物酶可源自弯孢属,特别是疣枝弯孢(*Curvularia verruculosa*)和不等弯孢,例如如描述于W0 95/27046中的不等弯孢CBS 102.42或描述于W0 97/04102中的疣枝弯孢CBS 147.63或疣枝弯孢CBS 444.70;或可源自如描述于W0 01/79459中的*Drechslera hartleibii*,如描述于W0 01/79458中的盐沼小树状霉(*Dendryphiella salina*)、如描述于W0 01/79461中的*Phaeotrichoconis crotalarie*或如描述于W0 01/79460中的*Geniculosporium sp.*。

[0129] 根据本发明的氧化酶具体包括由酶分类EC 1.10.3.2囊括的任何漆酶或源自其中的展示出漆酶活性的片段、或展示出类似活性的化合物,例如儿茶酚氧化酶(EC 1.10.3.1)、邻氨基苯酚氧化酶(EC 1.10.3.4)或胆红素氧化酶(EC 1.3.3.5)。

[0130] 优选的漆酶是微生物来源的酶。这些酶可以源自植物、细菌或真菌(包括丝状真菌和酵母)。

[0131] 来自真菌的适合实例包括可源自以下项的菌株的漆酶:曲霉属,脉孢菌属(例如,粗糙脉孢菌),柄孢壳菌属,葡萄孢属,金钱菌属(*Collybia*),层孔菌属(*Fomes*),香菇属,侧耳属,栓菌属(例如,长绒毛栓菌和变色栓菌),丝核菌属(例如,立枯丝核菌(*R.solani*)),拟鬼伞属(例如,灰盖拟鬼伞、毛头拟鬼伞(*C.comatus*)、弗瑞氏拟鬼伞(*C.friesii*)及*C.plicatilis*),小脆柄菇属(*Psathyrella*) (例如,白黄小脆柄菇(*P.condelleana*)),斑褶菇属(例如,蝶形斑褶菇(*P.papilionaceus*)),毁丝霉属(例如,嗜热毁丝霉),*Schytalidium* (例如,*S.thermophilum*),多孔菌属(例如,*P.pinsitus*),射脉菌属(例如,射脉侧菌(*P.radiata*)) (W0 92/01046)或革盖菌属(例如,毛革盖菌(*C.hirsutus*)) (JP 2238885)。

[0132] 来自细菌的适合实例包括可源自芽孢杆菌属的菌株的漆酶。

[0133] 优选的是源自拟鬼伞属或毁丝霉属的漆酶;特别是源自灰盖拟鬼伞的漆酶,如披露于W0 97/08325中;或源自嗜热毁丝霉,如披露于W0 95/33836中。

[0134] 其他氧化酶的实例包括但不限于氨基酸氧化酶、葡萄糖氧化酶、乳酸盐氧化酶、半乳糖氧化酶、多元醇氧化酶(例如,W0 2008/051491)、以及醛糖氧化酶。氧化酶及其相应的底物可以被用作过氧化氢生成酶系统,由此作为过氧化氢的一个来源。若干种酶,例如过氧化物酶、卤代过氧化物酶以及过水解酶需要一个过氧化氢的来源。通过研究EC 1.1.3._、EC 1.2.3._、EC 1.4.3._、以及EC 1.5.3._或类似类别(在国际生物化学协会下),本领域的普通技术人员容易识别氧化酶和底物的这类组合的其他实例。

[0135] SEQ ID NO:1所示的脂肪酶氨基酸序列(如上提及)中的氨基酸变化可以具有微小

性质,即,不会显著地影响蛋白质的折叠和/或活性的保守氨基酸取代或插入;典型地1-30个氨基酸的小缺失;小的氨基-或羧基-末端延伸,如氨基末端的甲硫氨酸残基;多达20-25个残基的小接头肽;或便于通过改变净电荷或另一种功能来纯化的小延伸,如聚组氨酸段(tract)、抗原表位或结合结构域。

[0136] 保守取代的实例是在下组的范围内:碱性氨基酸(精氨酸、赖氨酸及组氨酸)、酸性氨基酸(谷氨酸和天冬氨酸)、极性氨基酸(谷氨酰胺和天冬酰胺)、疏水性氨基酸(亮氨酸、异亮氨酸及缬氨酸)、芳香族氨基酸(苯丙氨酸、色氨酸及酪氨酸)及小氨基酸(甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸及甲硫氨酸)。一般不会改变比活性的氨基酸取代是本领域已知的并且例如由H. 诺伊拉特(Neurath)和R.L. 希尔(Hill),1979,在蛋白质(The Proteins),学术出版社(Academic Press),纽约中描述。常见的取代是Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Tyr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu、和Asp/Gly。

[0137] 可以根据本领域中已知的程序,如定点诱变或丙氨酸扫描诱变(坎宁汉(Cunningham)和威尔斯(Wells),1989,科学(Science)244:1081-1085)来鉴定多肽中的必需氨基酸。在后一项技术中,在该分子中的每个残基处引入单个丙氨酸突变,并且对所得突变体分子的酶活性进行测试以鉴定对于该分子的活性至关重要的氨基酸残基。还参见,希尔顿(Hilton)等人,1996,生物化学杂志(J.Biol.Chem.)271:4699-4708。也可结合假定接触位点氨基酸的突变,如通过以下技术例如核磁共振、结晶学、电子衍射、或光亲和标记进行确定的对结构进行物理学分析,从而确定酶的活性位点或其他生物学相互作用。参见,例如德沃斯(de Vos)等人,1992,科学(Science)255:306-312;史密斯(Smith)等人,1992,分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)224:899-904;乌乐达维尔(Wlodaver)等人,1992,欧洲生物化学学会联盟通讯(FEBS Lett.)309:59-64。还可以从与相关多肽的比对推断鉴定必需氨基酸。

[0138] 可以做出单个或多个氨基酸取代、缺失和/或插入并且使用诱变、重组和/或改组的已知方法进行测试,随后进行相关筛选程序,如由里德哈尔-奥尔森(Reidhaar-Olson)和萨奥尔(Sauer),1988,科学(Science)241:53-57;博维(Bowie)和萨奥尔,1989,美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)86:2152-2156;WO 95/17413;或WO 95/22625披露的那些。可以使用的其他方法包括易错PCR、噬菌体展示(例如,洛曼(Lowman)等人,1991,生物化学(Biochemistry)30:10832-10837;美国专利号5,223,409;WO 92/06204)以及区域定向诱变(德比什尔(Derbyshire)等人,1986,基因(Gene)46:145;内尔(Ner)等人,1988,DNA 7:127)。

[0139] 两个氨基酸序列之间的关联度通过参数“序列一致性”来描述。出于本发明的目的,使用如在EMBOSS包(EMBOSS:欧洲分子生物学开放软件套件(The European Molecular Biology Open Software Suite),赖斯(Rice)等人,2000,遗传学趋势(Trends Genet.)16:276-277)(优选5.0.0版或更新版本)的尼德尔(Needle)程序中所实施的尼德尔曼-翁施(Needleman-Wunsch)算法(Needleman(尼德尔曼)和Wunsch(翁施),1970,分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)48:443-453)来确定两个氨基酸序列之间的序列一致性。所使用的参数是空位开放罚分10、空位延伸罚分0.5,和EBLOSUM62(BLOSUM62的EMBOSS版本)取代矩阵。尼德尔标注的“最长的一致性”的输出(使用-非简化选项获得)被用作百分比一致性,并且计算如

下:

[0140] (相同的残基x100) / (比对的长度-比对中的缺口总数)

[0141] 酶稳定剂和/或流变改性剂

[0142] 这些微囊还可以含有如本领域中已知的酶稳定剂,例如,多元醇、聚合物、可逆性酶抑制剂、二价阳离子、酶底物、抗氧化剂等。水溶性稳定剂是优选的。

[0143] 添加缓慢溶解的稳定剂可以用于在该囊内部产生一个局部环境,该局部环境对该囊化的酶/化合物更“友好”,由此在储存期间提高稳定性。

[0144] 可逆性蛋白酶抑制剂的实例是硼酸、肽醛及其衍生物以及高分子的蛋白型抑制剂(像BASI/RASI抑制剂,见WO 2009/095425)。金属蛋白酶抑制剂的一个实例描述于WO 2008/134343中。下面在“蛋白酶抑制剂”的标题下更加详细地描述了蛋白酶抑制剂。

[0145] 稳定化聚合物可以基于,例如聚乙烯吡咯烷酮、聚乙酸乙烯酯、聚乙烯醇及其共聚物。稳定化多元醇可以是像甘油、山梨糖醇、丙二醇等的更小分子,但也可以是像聚乙二醇、多糖等的更大分子。

[0146] 稳定化二价阳离子 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Zn^{2+} 在本领域中是熟知的。因此,在一个实施例中,本发明的这些微囊包括 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 或 Zn^{2+} 离子的来源。优选地, Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 或 Zn^{2+} 离子的来源是 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 或 Zn^{2+} 的一种难溶性(缓慢溶解)盐。难溶性意味着在20°C下在纯水中的溶解度低于5g/l、2g/l、1g/l、0.5g/l、0.2g/l、0.1g/l、或0.05g/l。 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 或 Zn^{2+} 的优选的盐是碳酸钙、碳酸镁、碳酸锌、硫酸钙、亚硫酸钙、亚硫酸镁、亚硫酸锌、磷酸钙、磷酸氢钙、磷酸镁、磷酸锌、柠檬酸钙、柠檬酸镁、柠檬酸锌、草酸钙、草酸镁、草酸锌、酒石酸钙、酒石酸镁、或酒石酸锌。

[0147] 缓慢溶解的酸或碱还可以用于在该微囊内部产生一个局部pH,该局部pH对该囊化的酶/化合物更“友好”。

[0148] 在大多情况下,通过添加它们的底物(例如,对于蛋白酶是蛋白,对于淀粉酶是淀粉)来稳定化这些酶。抗氧化剂或还原剂可以用于减少酶的氧化,例如硫代硫酸盐、抗坏血酸盐等。每克洗涤剂所需的这些稳定剂的净剂量相比于将这些稳定剂添加至该连续的洗涤剂相要低得多,因为他们在该内囊相中是浓缩的,并且在许多情况下在储存期间将不会扩散出去,或者取决于该稳定剂的结构和分子量仅仅缓慢扩散出去。特别地,高分子量稳定剂(例如,高于1kDa,或高于2kDa更优选高于5kDa)将给出改进的净效率。因此优选的是高分子量抑制剂、聚合物、多元醇、阳离子、酶底物和抗氧化剂。

[0149] 可以通过添加一种“牺牲剂”蛋白来保护该酶。使酶不稳定的组分通过反应到蛋白上的氨基酸基团(例如,氨基)上由此可以与所添加的牺牲剂或牺牲蛋白反应。优选的是具有足够大分子量以停留在这些囊内部的牺牲剂蛋白。

[0150] 一种在某种程度上有所不同的用以改进酶稳定性的方式是添加流变修饰组分,这些组分增加该内囊相的黏性。增加的内部黏性将减慢酶去稳定剂扩散进入这些囊(和/或减慢酶稳定剂扩散出该囊)中并且因此延长该酶的生命期。这类黏度调节剂的实例是聚合物,比如聚乙二醇(PEG)、聚环氧乙烷(PEO)、亲水性聚氨酯、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)和PVP醋酸乙烯共聚物、淀粉、透明质酸、水溶性纤维素衍生物(像羧甲基纤维素)、水溶性树胶(像阿拉伯树胶、槐树豆胶、瓜尔胶或黄胞胶等)及其组合或共聚物。最优选的是非离子型高分子量聚合物,具有高于1kDa,或高于2kDa,更优选高于5kDa的分子量。优选非离子型聚合物是因为

它们在大多数情况下比离子型聚合物与该反应性膜聚合物更为相容。

[0151] 可通过使用一个高黏度水相生成这些囊、或-更复杂的-当在生成该乳剂/这些囊后黏度增加首次发生时生成囊来实现高黏度。这一“触发的”黏度增加是优选的,因为制备具有高黏度水相的乳剂可能很困难。当通过具有高于添加至其中的洗涤剂的水活度的内囊相添加至该洗涤剂时,触发的黏度增加可以原位完成,因此水将从这些囊(但不是流变改性剂)中扩散出去由此在添加至洗涤剂后增加该内相的黏度。这还可以使用盐或其他低分子组分的扩散而运用,例如,通过具有一种当盐浓度通过添加至洗涤剂而降低时使黏性增加的组分(例如,一种聚合物,其在初始盐含量高的情况下沉淀,但当盐浓度由于添加至洗涤剂时盐的扩散而降低时是可溶的)。触发黏度的另一种方式是使用其黏性取决于pH的组分。对于一些界面聚合方法(例如,胺-酸卤反应),在胶囊化过程中该内相的pH将改变,在胺-酸卤的情况下,在该界面聚合过程中pH将降低。这可以用于触发黏度的增加。许多流变改性剂(像聚丙烯酸酯)在特别pH或pH范围下表现出黏性极大值。流变改性剂的实例是来自路博润(Lubrizol)的Carbopol 934和来自斯高特巴德(Scott-Bader)的Texipol 63-258,其中当将pH从11降低至8或将pH从4升高至8时,黏性显著增高。在低pH下和在高pH下具有不同黏性的另一聚合物类型是部分水解的聚丙烯酰胺。又另一种可能是使用温度依赖性的流变改性剂,由此在一个温度下达成乳化/胶囊化,并且随后改变温度以增加黏性。还可以使用光诱导或超声诱导的黏性。又另一种方法是使用剪切稀化流变改性剂,如此当形成该乳剂时该黏度在高剪切下是低的而当剪切降低时黏度是高的。

[0152] 另一稳定化技术是保证在储存期间该酶在这些囊中沉淀,例如通过添加沉淀剂(像盐或聚乙二醇(PEG))。可以使用与如上所述相同的“触发稳定化”,例如,通过添加PEG,其在添加至洗涤剂后通过水扩散至该酶将沉淀的程度而浓缩。以这种方式,该酶在这些囊加工的过程中可以在溶液中,但当添加至洗涤剂时沉淀。

[0153] 在制备这些微囊时,还可以沉淀的形式或晶体形式使用酶。

[0154] 液体洗涤剂组合物

[0155] 本发明的微囊可以被添加至处于任何形式的任何洗涤剂组合物,并且由此形成其一部分,例如液体或粉状洗涤剂、以及皂和洗涤剂条(例如,合成洗涤剂条)。

[0156] 在一个实施例中,本发明针对液体洗涤剂组合物,这些组合物包含微囊(如上所述)与一种或多种另外的清洁组合物组分组合。

[0157] 该微囊(如上所述)可以按对应于从0.0001%至5% (w/w) 活性酶蛋白(AEP)的量被添加至该液体洗涤剂组合物;优选地从0.001%至5%,更优选地从0.005%至5%,更优选地从0.005%至4%,更优选地从0.005%至3%,更优选地从0.005%至2%,甚至更优选地从0.01%至2%,并且最优选地从0.01%至1% (w/w) 活性酶蛋白。

[0158] 该液体洗涤剂组合物具有一种物理形式,它不是固体(或气体)。它可以是可倾流的液体,糊剂,可倾流的凝胶或不可倾流的凝胶。它可以是各向同性的亦或或结构化的,优选是各向同性的。它可以是一种配制品,用于在自动洗衣机中洗涤或用于手洗、或用于(自动)餐具洗涤。它还可以是个人护理产品,例如个人护理产品洗发水、牙膏、或洗手皂。

[0159] 该液体洗涤剂组合物可以是水性的,典型地包含按重量计至少20%并且高达95%的水,例如高达70%的水、高达50%的水、高达40%的水、高达30%的水、或高达20%的水。包括但不限于链烷醇、胺、二醇、醚以及多元醇的其他类型的液体可以被包括在水性液体洗

涤剂中。水性液体洗涤剂可以包含从0%-30%的有机溶剂。液体洗涤剂甚至可以是非水性的,其中水含量低于10%,优选低于5%。

[0160] 洗涤剂成分可以通过水可溶性袋中的室彼此物理性地分开。由此可以避免组分之间的负面的储存相互作用。在洗涤溶液中,每个室的不同溶解曲线还可以引起选择的组分的延迟溶解。

[0161] 该洗涤剂组分可以采用一种单位剂量产物的形式。单位剂量产品是不可重复使用的容器中的单一剂量的包装。它被越来越多地用于洗衣和餐具洗涤的洗涤剂中。一个洗涤剂单位剂量产品是在单次洗涤中所用的洗涤剂量值的包装(例如,在由一种水溶性薄膜制得的一个袋中)。

[0162] 袋可以是适于保存该组合物的任意形式、任何形状、和任何材料,例如不允许该组合物在与水接触之前从该袋中释放出。袋由封装内体积的水溶性膜制成。可以将所述内体积分为具有袋的室。优选的膜是形成膜或片的聚合材料,优选是聚合物。优选的聚合物、共聚物或其衍生物选自聚丙烯酸酯、和水溶性丙烯酸酯共聚物、甲基纤维素、羧甲基纤维素、糊精钠、乙基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、麦芽糊精、聚甲基丙烯酸酯,最优选地是聚乙烯醇共聚物以及羟丙基甲基纤维素(HPMC)。优选地,在膜中的聚合物(例如PVA)的水平是至少约60%。优选的平均分子量将典型地是约20,000至约150,000。薄膜还可以是一种混合组合物,包括可通过水解可降解的以及水溶性的聚合物混合物,例如聚乳酸和聚乙烯醇(已知在贸易参考(Trade reference)M8630下,由Chris Craft In.Prod.Of Gary, Ind., US销售),以及增塑剂,像甘油、乙二醇、丙二醇、山梨醇及其混合物。这些袋可以包括固体衣物清洁组合物或部分组分和/或液体清洁组合物或由水溶性膜分开的部分组分。组合物中,液体组分的室可以与含有固体的室不同(见例如US 2009/0011970)。

[0163] 洗涤剂组分的选择可以包括(用于纺织品保养)有待清洁的纺织品的类型、污物的类型和/或程度、进行清洁时的温度、以及洗涤剂产品的配制的考虑。尽管根据一种具体的功能性对以下提及的组分由通用标题进行分类,但是这并不被解释为限制,因为如将被普通技术人员所理解,一种组分可以包括另外的功能性。

[0164] 另外的组分的选择在普通技术人员技术内并且包括常规成分,包括以下列出的示例性、非限制性组分。

[0165] 表面活性剂

[0166] 洗涤剂组合物可以包括一种或多种表面活性剂,它们可以是阴离子的和/或阳离子的和/或非离子的和/或半极性的和/或兼性离子的或其混合物。在一个具体实施例中,洗涤剂组合物包括一种或多种非离子型表面活性剂和一种或多种阴离子表面活性剂的混合物。这种或这些表面活性剂典型地以按重量计从约0.1%至60%的水平存在,例如约1%至约40%、或约3%至约20%、或约3%至约10%。基于所希望的清洁应用来选择这种或这些表面活性剂,并且这种或这些表面活性剂包括本领域中已知的任何一种或多种常规表面活性剂。可以利用本领域中已知的用于在洗涤剂中使用的任何表面活性剂。

[0167] 当被包括在其中时,洗涤剂将通常包含按重量计从约1%至约40%,例如从约5%至约30%(包括从约5%至约15%)、或从约20%至约25%的阴离子表面活性剂。阴离子表面活性剂的非限制性实例包括硫酸盐和磺酸盐,具体地,直链烷基苯磺酸盐(LAS),LAS的异构体,支链烷基苯磺酸盐(BABS),苯基链烷磺酸盐, α -烯炔磺酸盐(AOS),烯炔磺酸盐,链烯炔

磺酸盐,链烷-2,3-二基双(硫酸盐),羟基链烷磺酸盐以及二磺酸盐,烷基硫酸盐(AS)(例如十二烷基硫酸钠(SDS)),脂肪醇硫酸盐(FAS),伯醇硫酸盐(PAS),醇醚硫酸盐(AES或AEOS或FES,也被称为醇乙氧基硫酸盐或脂肪醇醚硫酸盐),仲链烷磺酸盐(SAS),石蜡烃磺酸盐(PS),酯磺酸盐,磺化的脂肪酸甘油酯, α -磺酸基脂肪酸甲酯(α -SFMe或SES)(包括甲酯磺酸盐(MES)),烷基琥珀酸或烯基琥珀酸,十二烯基/十四烯基琥珀酸(DTSA),氨基酸的脂肪酸衍生物,磺酸基琥珀酸或皂的二酯和单酯,以及它们的组合。

[0168] 当被包括在其中时,洗涤剂将通常包含按重量计从约0.1%至约10%的阳离子表面活性剂。阳离子表面活性剂的非限制性实例包括烷基二甲基乙醇季胺(ADMEAQ)、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、二甲基二硬脂酰氯化铵(DSDMAC)、以及烷基苄基二甲基铵、烷基季铵化合物、烷氧基化季铵(AQA)化合物及其组合。

[0169] 当被包括在其中时,洗涤剂将通常包含按重量计从约0.2%至约40%的非离子型表面活性剂,例如从约0.5%至约30%,特别是从约1%至约20%、从约3%至约10%,例如从约3%至约5%、或从约8%至约12%。非离子型表面活性剂的非限制性实例包括醇乙氧基化物(AE或AEO)、醇丙氧基化物、丙氧基化的脂肪醇(PFA),烷氧基化的脂肪酸烷基酯(例如乙氧基化的和/或丙氧基化的脂肪酸烷基酯),烷基酚乙氧基化物(APE),壬基酚乙氧基化物(NPE),烷基多糖苷(APG),烷氧基化胺,脂肪酸单乙醇酰胺(FAM),脂肪酸二乙醇酰胺(FADA),乙氧基化的脂肪酸单乙醇酰胺(EFAM),丙氧基化的脂肪酸单乙醇酰胺(PFAM),多羟基烷基脂肪酸酰胺,或葡萄糖胺的N-酰基N-烷基衍生物(葡糖酰胺(GA),或脂肪酸葡糖酰胺(FAGA)),连同在SPAN和TWEEN商品名下可获得的产品及其组合。

[0170] 当被包括在其中时,洗涤剂将通常包含按重量计从约0.1%至约20%的半极性表面活性剂。半极性表面活性剂的非限制性实例包括氧化胺(AO),例如烷基二甲基氧化胺、N-(椰油基烷基)-N,N-二甲基氧化胺和N-(牛油-烷基)-N,N-双(2-羟乙基)氧化胺、脂肪酸链烷醇酰胺和乙氧基化的脂肪酸链烷醇酰胺及其组合。

[0171] 当被包括在其中时,洗涤剂将通常包含按重量计从约0.1%至约10%的兼性离子表面活性剂。兼性离子表面活性剂的非限制性实例包括甜菜碱、烷基二甲基甜菜碱、磺基甜菜碱及其组合。

[0172] 助水溶剂

[0173] 助水溶剂是如下化合物,该化合物在水性溶液中溶解疏水化合物(或相反地,在非极性环境中的极性物质)。一般地,助水溶物具有亲水和疏水两种特征(如由表面活性剂已知的所谓的两亲性质);然而,助水溶物的分子结构一般不利于自发性自聚集,参见例如由霍奇登(Hodgdon)和卡勒(Kaler)(2007),胶体&界面科学新见(Current Opinion in Colloid&Interface Science)12:121-128的综述。助水溶剂并不显示临界浓度,高于该浓度就会发生如对表面活性剂而言所发现的自聚集以及脂质形成胶束、薄层或其他很好地定义的中间相。相反,许多助水溶物显示连续类型的聚集过程,其中聚集物的大小随着浓度增加而增长。然而,很多助水溶剂改变了包括极性和非极性特征的物质的系统(包括水、油、表面活性剂、和聚合物的混合物)的相行为、稳定性、和胶体特性。经典地从制药、个人护理、食品跨行业至技术应用使用助水溶剂。助水溶剂在洗涤剂组合物中的使用允许例如更浓的表面活性剂配制品(如在通过除去水而压缩液体洗涤剂的过程中)而不引起不希望的现象,例如相分离或高粘度。

[0174] 洗涤剂可以包含按重量计0-5%，例如约0.5%至约5%、或约3%至约5%的助水溶剂。可以利用本领域中已知的用于在洗涤剂中使用的任何助水溶剂。助水溶剂的非限制性实例包括苯磺酸钠、对甲苯磺酸钠(STS)、二甲苯磺酸钠(SXS)、枯烯磺酸钠(SCS)、伞花炔磺酸钠、氧化胺、醇和聚乙二醇醚、羟基萘甲酸钠、羟基萘磺酸钠、乙基己基磺酸钠及其组合。

[0175] 助洗剂和共助洗剂

[0176] 洗涤剂组合物可以包含按重量计约0-65%，例如约5%至约50%的洗涤剂助洗剂或共助洗剂或其混合物。在洗涤餐具洗涤剂中，助洗剂的水平典型地是40%-65%，特别是50%-65%。助洗剂和/或共助洗剂可以具体是形成具有Ca和Mg离子的水溶性复合物的螯合剂。可以利用本领域中已知的用于在衣物洗涤剂中使用的任何助洗剂和/或共助洗剂。助洗剂的非限制性实例包括柠檬酸盐、沸石、二磷酸盐(焦磷酸盐)、三磷酸盐例如三磷酸钠(STP或STPP)、碳酸盐例如碳酸钠、可溶性硅酸盐例如硅酸钠、层状硅酸盐(例如来自赫斯特公司(Hoechst)的SKS-6)、乙醇胺例如2-氨基乙-1-醇(MEA)、二乙醇胺(DEA,也称为亚氨基二乙醇)、三乙醇胺(TEA,也称为2,2',2''-次氨基三乙醇)、以及羧甲基菊粉(CMI)及其组合。

[0177] 洗涤剂组合物还可以包含按重量计0-50%，例如约5%至约30%的洗涤剂共助洗剂或其混合物。洗涤剂组合物可以单独地包括一种共助洗剂，或与一种助洗剂，例如柠檬酸助洗剂组合。共助洗剂的非限制性实例包括聚丙烯酸酯的均聚物或其共聚物，例如聚(丙烯酸)(PAA)或共聚(丙烯酸/马来酸)(PAA/PMA)。另外的非限制性实例包括柠檬酸盐，螯合剂，例如氨基羧酸盐、氨基多羧酸盐和膦酸盐，以及烷基-或烯基琥珀酸。另外的具体实例包括2,2',2''-次氨基三乙酸(NTA)、乙二胺四乙酸(EDTA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)、亚氨基二丁二酸(iminodisuccinic acid)(IDS)、乙二胺-N,N'-二丁二酸(EDDS)、甲基甘氨酸二乙酸(MGDA)、谷氨酸-N,N-二乙酸(GLDA)、1-羟基乙烷-1,1-二膦酸(HEDP)、乙二胺四-(亚甲基膦酸)(EDTMPA)、二亚乙基三胺五(亚甲基膦酸)(DTMPA或DTPMPA)、N-(2-羟乙基)亚氨基二乙酸(EDG)、天冬氨酸-N-单乙酸(ASMA)、天冬氨酸-N,N-二乙酸(ASDA)、天冬氨酸-N-单丙酸(ASMP)、亚氨基二丁二酸(iminodisuccinic acid)(IDA)、N-(2-磺甲基)-天冬氨酸(SMAS)、N-(2-磺乙基)-天冬氨酸(SEAS)、N-(2-磺甲基)-谷氨酸(SMGL)、N-(2-磺乙基)-谷氨酸(SEGL)、N-甲基亚氨基二乙酸(MIDA)、 α -丙氨酸-N,N-二乙酸(α -ALDA)、丝氨酸-N,N-二乙酸(SEDA)、异丝氨酸-N,N-二乙酸(ISDA)、苯丙氨酸-N,N-二乙酸(PHDA)、邻氨基苯甲酸-N,N-二乙酸(ANDA)、磺胺酸-N,N-二乙酸(SLDA)、牛磺酸-N,N-二乙酸(TUDA)以及磺甲基-N,N-二乙酸(SMDA)、N-(2-羟乙基)-亚乙基二胺-N,N',N''-三乙酸盐(HEDTA)、二乙醇甘氨酸(DEG)、二亚乙基三胺五(亚甲基膦酸)(DTPMP)、氨基三(亚甲基膦酸)(ATMP)及其组合和盐。其他示例性助洗剂和/或共助洗剂描述于例如WO 09/102854、US 5977053中。

[0178] 聚合物

[0179] 该洗涤剂可以包含按重量计0-10%，例如0.5%-5%、2%-5%、0.5%-2%或0.2%-1%的聚合物。可以利用本领域中已知的用于在洗涤剂中使用的任何聚合物。聚合物可以作为如以上提到的共助洗剂起作用，或可以提供抗再沉积、纤维保护、污垢释放、染料转移抑制、油污清洁和/或防沫特性。一些聚合物可以具有多于一种的以上提到的特性和/或多于一种的以下提到的基序(motif)。示例性聚合物包括(羧甲基)纤维素(CMC)、聚(乙烯醇)(PVA)、聚(乙烯吡咯烷酮)(PVP)、聚(乙二醇)或聚(环氧乙烷)(PEG)、乙氧基化的聚(亚乙基亚胺)、羧甲基菊粉(CMI)、和聚羧化物，例如PAA、PAA/PMA、聚-天冬氨酸、和甲基丙烯酸

月桂酯/丙烯酸共聚物、疏水改性CMC (HM-CMC) 和硅酮、对苯二甲酸和低聚乙二醇的共聚物、聚(对苯二甲酸乙二酯) 和聚(氧乙烯对苯二甲酸乙二酯) 的共聚物 (PET-POET)、PVP、聚(乙烯基咪唑) (PVI)、聚(乙烯吡啶-N-氧化物) (PVPO或PVPNO) 以及聚乙烯吡咯烷酮-乙烯基咪唑 (PVPVI)。另外的示例性聚合物包括磺化的聚羧酸酯、聚环氧乙烷和聚环氧丙烷 (PEO-PPO) 以及乙氧基硫酸二季铵盐。其他示例性聚合物披露于例如WO 2006/130575以及US 5,955,415中。也考虑了以上提到的聚合物的盐。

[0180] 织物调色剂

[0181] 本发明的洗涤剂组合物还可以包括织物调色剂,例如染料或色素,当配制在洗涤剂组合物中时,当所述织物与一种洗涤液接触时织物调色剂可以沉积在织物上,该洗涤液包括所述洗涤剂组合物,并且因此通过可见光的吸收/反射改变所述织物的色彩。荧光增白剂发射至少一些可见光。相比之下,因为它们吸收至少一部分可见光光谱,所以织物调色剂改变表面的色彩。适合的织物调色剂包括染料和染料-粘土混合物,并且还可以包括色素。适合的染料包括小分子染料和聚合物染料。适合的小分子染料包括选自下组的小分子染料,该组由落入颜色索引 (Colour Index) (C.I.) 分类的以下染料组成:直接蓝、直接红、直接紫、酸性蓝、酸性红、酸性紫、碱性蓝、碱性紫和碱性红或其混合物,例如如描述于WO 2005/03274、WO 2005/03275、WO 2005/03276以及EP 1876226 (通过引用而特此结合) 中。洗涤剂组合物优选包括从约0.00003wt%至约0.2wt%、从约0.00008wt%至约0.05wt%、或甚至从约0.0001wt%至约0.04wt%的织物调色剂。该组合物可以包括从0.0001wt%至0.2wt%的织物调色剂,当该组合物处于单位剂量袋的形式时,这可以是特别优选的。适合的调色剂还披露于例如WO 2007/087257和WO 2007/087243中。

[0182] (另外的) 酶

[0183] 可以在该洗涤剂组合物中包括而不包含在微囊中的这种或这些酶包括一种或多种酶,例如蛋白酶、脂肪酶、角质酶、淀粉酶、糖酶、纤维素酶、果胶酶、甘露聚糖酶、阿拉伯糖酶、半乳聚糖酶、黄原胶酶、木聚糖酶、DNA酶、过水解酶、和/或氧化还原酶(例如,漆酶、过氧化物酶、过氧合酶和/或卤代过氧化物酶)。

[0184] 可以使用常规稳定剂使这样一种或多种酶稳定化,这些稳定剂例如为多元醇(如丙二醇或甘油)、糖或糖醇、乳酸、硼酸、或硼酸衍生物(例如,芳族硼酸酯、或苯基硼酸衍生物(如4-甲酰苯基硼酸)),并且该组合物可以如(例如)WO 92/19709和WO 92/19708中所述进行配制。可以添加如本领域已知的其他稳定剂和抑制剂(见下文)。这类酶的实例与如上所示可以在微囊中囊化的那些相同。

[0185] 当本发明的微囊用于囊化有害于洗涤剂组分(例如,黄原胶、具有酯键的聚合物、氢化蓖麻油、香料、甲酯磺酸盐表面活性剂、纤维素和纤维素衍生物、和糊精和环糊精)稳定性的一种或多种酶时,可以有用的是将组分添加至使任意一种或多种从这些微囊中渗漏出的酶失活的液体洗涤剂中。这可以通过例如将一种蛋白酶添加至该洗涤剂组合物来完成。如果这些微囊泄漏了少量囊化的酶,那么该蛋白酶可以用作一种牺牲剂以降解从这些微囊中泄漏的酶,并且由此避免敏感洗涤剂组分的降解。

[0186] 该一种或多种洗涤剂酶可以通过添加包含一种或多种酶的单独的添加剂,或通过添加包括所有这些酶的组合添加剂而被包括于洗涤剂组合物中。本发明的洗涤剂添加剂,即独立添加剂或组合添加剂,可以被配制为,例如液体、浆料,或甚至颗粒等。

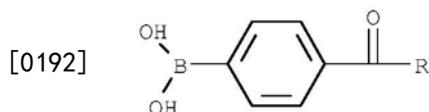
[0187] 蛋白酶抑制剂

[0188] 该洗涤剂组合物可以包括蛋白酶抑制剂,该蛋白酶抑制剂是一种具有蛋白酶活性(例如丝氨酸蛋白酶活性)的可逆抑制剂。优选地,该蛋白酶抑制剂是一种(可逆的)枯草杆菌蛋白酶抑制剂。特别地,该蛋白酶抑制剂可以是肽醛、原硼酸(boric acid)或硼酸(boronic acid);或这些中的任一种的衍生物。

[0189] 该蛋白酶抑制剂对丝氨酸蛋白酶的抑制常数 K_i (mol/L)可以从 $1E-12$ 至 $1E-03$;更优选从 $1E-11$ 至 $1E-04$;甚至更优选从 $1E-10$ 至 $1E-05$;甚至更优选从 $1E-10$ 至 $1E-06$;并且最优选从 $1E-09$ 至 $1E-07$ 。

[0190] 该蛋白酶抑制剂可以是硼酸或其衍生物;优选地,苯硼酸或其衍生物。

[0191] 在本发明的一个实施例中,该苯基硼酸衍生物具有以下化学式:



[0193] 其中R选自下组,该组由以下各项组成:氢、羟基、 C_1-C_6 烷基、取代的 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 烯基以及取代的 C_1-C_6 烯基。优选地,R是氢、 CH_3 、 CH_3CH_2 或 $CH_3CH_2CH_2$ 。

[0194] 在一个优选实施例中,该蛋白酶抑制剂(苯基硼酸衍生物)为4-甲酰基-苯基-硼酸(4-FPBA)。

[0195] 在另一个具体实施例中,该蛋白酶抑制剂选自下组,该组由以下各项组成:

[0196] 噻吩-2硼酸、噻吩-3硼酸、乙酰胺苯基硼酸、苯并呋喃-2硼酸、萘-1硼酸、萘-2硼酸、2-FPBA、3-FBPA、4-FPBA、1-噻萘硼酸、4-二苯并呋喃硼酸、5-甲基噻吩-2硼酸、硫茛硼酸(thionaphthene boronic acid)、呋喃-2硼酸、呋喃-3硼酸、4,4联苯-二硼酸(4,4biphenyl-diboronic acid)、6-羟基-2-萘(6-hydroxy-2-naphtalene)、4-(甲硫基)苯基硼酸、4(三甲基-甲硅烷基)苯基硼酸、3-溴代噻吩硼酸、4-甲基噻吩硼酸、2-萘基硼酸、5-溴代噻吩硼酸(5-bromothiophene boronic acid)、5-氯代噻吩硼酸、二甲基噻吩硼酸、2-溴代苯基硼酸、3-氯代苯基硼酸、3-甲氧基-2-噻吩、对-甲基-苯乙基硼酸、2-噻萘硼酸、二苯并噻吩硼酸、4-羧基苯基硼酸、9-萘基硼酸、3,5二氯苯基硼酸、二苯基硼酸酐、邻-氯代苯基硼酸、对-氯代苯基硼酸、间-溴代苯基硼酸、对-溴代苯基硼酸、对-氟代苯基硼酸、对-甲苯基硼酸、邻-甲苯基硼酸、辛基硼酸、1,3,5三甲基苯基硼酸、3-氯代-4-氟代苯基硼酸、3-氨基苯基硼酸、3,5-二-(三氟甲基)苯基硼酸、2,4二氯代苯基硼酸、4-甲氧基苯基硼酸。

[0197] 适于作为洗涤剂组合物中的蛋白酶抑制剂的其他硼酸衍生物描述于US 4,963,655、US 5,159,060、WO 95/12655、WO 95/29223、WO 92/19707、WO 94/04653、WO 94/04654、US 5442100、US 5488157以及US 5472628中。

[0198] 该蛋白酶抑制剂还可以是一种具有化学式 $X-B^1-B^0-H$ 的肽醛,其中这些基团具有以下意义:

[0199] a) H是氢;

[0200] b) B^0 是单个氨基酸残基,具有L-或D-构型并且具有化学式: $NH-CHR'-CO$;

[0201] c) B^1 是单个氨基酸残基;并且

[0202] d) X由一个或多个氨基酸残基构成(优选一个或两个),任选地包括一种N-端保护基团。

[0203] $\text{NH-CHR}'-\text{CO}(\text{B}^0)$ 是L-或D-氨基酸残基,其中R'可以是一种脂肪族或芳香族侧链,例如芳烷基,如苄基,其中R'可以是任选取代的。更特别地, B^0 残基可能是庞大的、中性的、极性的、疏水性的和/或芳香族的。

[0204] 实例是D-或L-型的Tyr(对酪氨酸)、间酪氨酸、3,4-二羟基苯丙氨酸、Phe、Val、Met、正缬氨酸(Nva)、Leu、Ile或正亮氨酸(Nle)。

[0205] 在上式 $\text{X-B}^1-\text{B}^0-\text{H}$ 中, B^1 残基可以是特别小的、脂肪族的、疏水性的和/或中性的。实例是丙氨酸(Ala)、半胱氨酸(Cys)、甘氨酸(Gly)、脯氨酸(Pro)、丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)、缬氨酸(Val)、正缬氨酸(Nva)和正亮氨酸(Nle),特别是丙氨酸、甘氨酸或缬氨酸。

[0206] 特别地,X可以是一个或两个氨基酸残基,带有一种任意的N-端保护基团(即该化合物是一种三-或四肽醛,具有或没有保护基团)。因此,X可以是 B^2 、 B^3-B^2 、 $\text{Z}-\text{B}^2$ 或 $\text{Z}-\text{B}^3-\text{B}^2$,其中 B^3 和 B^2 各自代表一个氨基酸残基,并且Z是一种N-端保护基团。 B^2 残基可以是特别小的、脂肪族的和/或中性的,例如Ala、Gly、Thr、Arg、Leu、Phe或Val。特别地, B^3 残基可以是庞大的、疏水性的、中性的和/或芳香族的,例如Phe、Tyr、Trp、苄基甘氨酸、Leu、Val、Nva、Nle或Ile。

[0207] N-端保护基团Z(如果存在的话)可以选自甲酰基、乙酰基、苯甲酰基、三氟乙酰基、氟甲氧基羰基、甲氧基琥珀酰基、芳香族的和脂肪族的尿烷保护基团、苄氧基羰基(Cbz)、叔丁氧羰基、金刚烷基氧基羰基、对甲氧苄基羰基(MOZ)、苄基(Bn)、对甲氧苄基(PMB)或对甲氧苄基(PMP)、甲氧羰基(Moc);甲氧基乙酰基(Mac);氨基甲酸甲酯或甲基氨基羰基/甲基脲基团。在具有一种保护基团的三肽醛(即 $\text{X}=\text{Z}-\text{B}^2$)的情况下,Z优选是一种小的脂肪族基团,例如甲酰基、乙酰基、氟甲氧基羰基、叔丁氧羰基、甲氧羰基(Moc);甲氧基乙酰基(Mac);氨基甲酸甲酯或甲基氨基羰基/甲基脲基团。在具有一种保护基团的三肽醛(即 $\text{X}=\text{Z}-\text{B}^3-\text{B}^2$)的情况下,Z优选是一种庞大的芳香族基团,例如苯甲酰基、苄氧基羰基、对甲氧苄基羰基(MOZ)、苄基(Bn)、对甲氧苄基(PMB)或对甲氧苄基(PMP)。

[0208] 合适的肽醛描述于WO 94/04651、WO 95/25791、WO 98/13458、WO 98/13459、WO 98/13460、WO 98/13461、WO 98/13461、WO 98/13462、WO 2007/141736、2007/145963、WO 2009/118375、WO 2010/055052以及WO 2011/036153中。更特别地,该肽醛可以是Cbz-RAY-H、Ac-GAY-H、Cbz-GAY-H、Cbz-GAL-H、Cbz-VAL-H、Cbz-GAF-H、Cbz-GAV-H、Cbz-GGY-H、Cbz-GGF-H、Cbz-RVY-H、Cbz-LVY-H、Ac-LGAY-H、Ac-FGAY-H、Ac-YGAY-H、Ac-FGAL-H、Ac-FGAF-H、Ac-FGVY-H、Ac-FGAM-H、Ac-WLVY-H、MeO-CO-VAL-H、MeNCO-VAL-H、MeO-CO-FGAL-H、MeO-CO-FGAF-H、MeSO₂-FGAL-H、MeSO₂-VAL-H、PhCH₂O(OH)(O)P-VAL-H、EtSO₂-FGAL-H、PhCH₂SO₂-VAL-H、PhCH₂O(OH)(O)P-LAL-H、PhCH₂O(OH)(O)P-FAL-H、或MeO(OH)(O)P-LGAL-H。此处,Cbz是苄氧基羰基,Me是甲基,Et是乙基,Ac是乙酰基,H是氢,并且其他字母代表由标准单个字母通知所指代的氨基酸残基(例如,F=Phe,Y=Tyr,L=Leu)。

[0209] 可替代地,该肽醛可以具有WO 2011/036153中所描述的化学式:

[0210] $\text{P-O}-(\text{A}_i-\text{X}')_n-\text{A}_{n+1}-\text{Q}$

[0211] 其中Q是氢、 CH_3 、 CX''_3 、 CHX''_2 、或 $\text{CH}_2\text{X}''$,其中X''是卤素原子;

[0212] 其中一个X'是“双N-封端基团”CO、CO-CO、CS、CS-CS或CS-CO,最优选是urido(CO),并且其他X'为空,

[0213] 其中 $n=1-10$,优选2-5,最优选2,

[0214] 其中 A_i 和 A_{n+1} 各自是具有以下结构的氨基酸残基:

[0215] 对于至X' =-CO-的右侧的残基而言,是-NH-CR"-CO-,或

[0216] 对于至X' =-CO-的左侧的残基而言,是-CO-CR"-NH-

[0217] 其中R"是H-或可任选地取代的烷基或烷芳基基团,该烷芳基基团能可任选地包括杂原子并且能可任选地被连接至N原子,并且

[0218] 其中P是氢或任何C-端保护基团。

[0219] 此类肽醛的实例包括 α -MAPI、 β -MAPI、F-脲-RVY-H、F-脲-GGY-H、F-脲-GAF-H、F-脲-GAY-H、F-脲-GAL-H、F-脲-GA-Nva-H、F-脲-GA-Nle-H、Y-脲-RVY-H、Y-脲-GAY-H、F-CS-RVF-H、F-CS-RVY-H、F-CS-GAY-H、抗痛素、GE20372A、GE20372B、糜蛋白酶抑素A、糜蛋白酶抑素B以及糜蛋白酶抑素C。肽醛的其他实例在WO 2010/055052和WO 2009/118375、WO 94/04651、WO 98/13459、WO 98/13461、WO 98/13462、WO 2007/145963中披露,将其通过引用而特此结合。

[0220] 对于肽醛,可替代地是,该蛋白酶抑制剂可以是一种具有式X-B¹-NH-CHR-CHOH-SO₃M的亚硫酸氢盐加合物,其中X、B¹和R如以上定义,并且M是H或一种碱性金属,优选Na或K。

[0221] 该肽醛可以通过与亚硫酸氢钠的反应被转化成一种水溶性亚硫酸氢盐加合物,如在教科书,例如马奇, J. (March, J.) 高等有机化学 (Advanced Organic Chemistry), 第四版, 威利国际科学出版社 (Wiley-Interscience), 美国1992, 第895页中所描述。

[0222] 该亚硫酸氢盐加合物的一种水溶液可以通过使对应的肽醛与亚硫酸氢钠 (sodium bisulfite/sodium hydrogen sulfite, NaHSO₃)、亚硫酸氢钾 (KHSO₃) 的水溶液通过已知方法进行反应来制备,例如在WO 98/47523; US 6,500,802; US 5,436,229; 美国化学学会杂志 (J. Am. Chem. Soc.) (1978) 100,1228; 有机合成文集 (Org. Synth., Coll.) 第7卷:361中所描述。

[0223] 上述肽醛 (或亚硫酸氢盐加合物) 与该蛋白酶的摩尔比可以是至少1:1或1.5:1,并且它可以小于1000:1,更优选小于500:1,甚至更优选从100:1至2:1或从20:1至2:1,或最优选,摩尔比是从10:1至2:1。

[0224] 甲酸盐 (例如,甲酸钠) 和甲酸也示出了作为蛋白酶活性抑制剂的良好作用。甲酸盐可以与上述蛋白酶抑制剂协同使用,如在WO 2013/004635中所示。甲酸盐以至少0.1%w/w或0.5%w/w,例如至少1.0%、至少1.2%或至少1.5%的量存在于该洗涤剂组合物中。该盐的量值典型地低于5%w/w、低于4%或低于3%。

[0225] 在一个实施例中,该蛋白酶为一种金属蛋白酶而该抑制剂为一种金属蛋白酶抑制剂,例如,一种基于蛋白质水解物的抑制剂 (例如,如在WO 2008/134343中所描述的)。

[0226] 辅料

[0227] 还可以利用本领域中已知的用于在衣物洗涤剂中使用的任何洗涤剂组分。其他任选的洗涤剂组分包括防腐剂、防缩剂、抗污垢再沉积剂、抗皱剂、杀细菌剂、粘合剂、腐蚀抑制剂、崩解剂 (disintegrant) / 崩解试剂 (disintegration agent)、染料、酶稳定剂 (包括硼酸、硼酸盐、CMC和/或多元醇如丙二醇)、织物整理剂 (包括粘土)、填充剂/加工助剂、荧光增白剂/光学增亮剂、增泡剂、泡沫 (泡) 调节剂、香料、污垢助悬剂、软化剂、抑泡剂、酶暗抑制剂以及芯吸剂,单独或组合使用。可以利用本领域中已知的用于在衣物洗涤剂中使用的任何成分。此类成分的选择完全在普通技术人员的技术内。

[0228] 分散剂-本发明的洗涤剂组合物还可以包含分散剂。具体地说,粉状洗涤剂可以包

括分散剂。适合的水溶性有机材料包括均聚合或共聚合的酸或其盐,其中聚羧酸包括至少两个羧基,这两个羧基被不超过两个碳原子彼此分开。适合的分散剂例如描述于粉状洗涤剂,表面活性剂科学系列,第71卷中,马塞尔·德克尔公司(Marcel Dekker)。

[0229] 染料转移抑制剂-本发明的洗涤剂组合物还可以包括一种或多种染料转移抑制剂。适合的聚合物染料转移抑制剂包括但不限于聚乙烯吡咯烷酮聚合物、多胺N-氧化物聚合物、N-乙烯吡咯烷酮与N-乙烯基咪唑的共聚合物、聚乙烯噁唑烷酮以及聚乙烯咪唑或其混合物。当存在于主题组合物中时,染料转移抑制剂可以按组合物重量计的以下水平存在:从约0.0001%至约10%、从约0.01%至约5%或甚至从约0.1%至约3%。

[0230] 荧光增白剂-本发明的洗涤剂组合物还将优选地包含另外的组分,这些组分可以给正清洁的物品着色,例如荧光增白剂或光学增亮剂。其中增亮剂优选以约0.01%至约0.5%的水平存在。在本发明的组合物中可以使用适合用于在衣物洗涤剂组合物中使用的任何荧光增白剂。最常用的荧光增白剂是属于以下类别的那些:二氨基芪-磺酸衍生物、二芳基吡唑啉衍生物和二苯基-联苯乙烯基衍生物。二氨基芪-磺酸衍生物类型的荧光增白剂的实例包括以下的钠盐:4,4'-双-(2-二乙醇氨基-4-苯胺基-s-三嗪-6-基氨基)芪-2,2'-二磺酸盐、4,4'-双-(2,4-二苯胺基-s-三嗪-6-基氨基)芪-2,2'-二磺酸盐、4,4'-双-(2-苯胺基-4-(N-甲基-N-2-羟基-乙基氨基)-s-三嗪-6-基氨基)芪-2,2'-二磺酸盐、4,4'-双-(4-苯基-1,2,3-三唑-2-基)芪-2,2'-二磺酸盐以及5-(2H-萘并[1,2-d][1,2,3]三唑-2-基)-2-[(E)-2-苯基乙烯基]苯磺酸钠。优选的荧光增白剂是可从汽巴-嘉基股份有限公司(Ciba-Geigy AG)(巴塞尔,瑞士)获得的天来宝(Tinopal)DMS和天来宝CBS。天来宝DMS是4,4'-双-(2-吗啉代-4-苯胺基-s-三嗪-6-基氨基)芪-2,2'-二磺酸盐的二钠盐。天来宝CBS是2,2'-双-(苯基-苯乙烯基)-二磺酸盐的二钠盐。还优选荧光增白剂,是可商购的Parawhite KX,由派拉蒙矿物与化学(Paramount Minerals and Chemicals),孟买,印度供应。适合用于在本发明中使用的其他荧光剂包括1-3-二芳基吡唑啉和7-烷氨基香豆素。

[0231] 适合的荧光增亮剂水平包括从约0.01wt%、从0.05wt%、从约0.1wt%或甚至从约0.2wt%的较低水平至0.5wt%或甚至0.75wt%的较高水平。

[0232] 污物释放聚合物-本发明的洗涤剂组合物还可以包括一种或多种污物释放聚合物,这些污物释放聚合物帮助从织物,例如棉或聚酯基织物上除去污垢,特别是从聚酯基织物上除去疏水污垢。污物释放聚合物可以例如是非离子型或阴离子型对苯二甲酸基聚合物、聚乙烯基己内酰胺和相关共聚合物、乙烯基接枝共聚合物、聚酯聚酰胺,参见例如粉状洗涤剂,表面活性剂科学系列第71卷第7章,马塞尔·德克尔公司(Marcel Dekker, Inc.)。另一种类型的污物释放聚合物是包括核心结构和连接至该核心结构的多个烷氧基化基团的两亲性烷氧基化油污清洁聚合物。核心结构可以包括聚烷基亚胺结构或聚烷醇胺结构,如W0 2009/087523中详细描述(将其通过引用而特此结合)。此外,随机接枝共聚合物是适合的污物释放聚合物。适合的接枝共聚合物更详细地描述于W0 2007/138054、W0 2006/108856和W0 2006/113314中(将其通过引用而特此结合)。其他污物释放聚合物是取代的多糖结构,尤其是取代的纤维素结构,例如改性纤维素衍生物,例如EP 1867808或W0 2003/040279中描述的那些(将二者都通过引用而特此结合)。适合的纤维素聚合物包括纤维素、纤维素醚、纤维素酯、纤维素酰胺及其混合物。适合的纤维素聚合物包括阴离子改性的纤维素、非离子改性的纤维素、阳离子改性的纤维素、两性离子改性的纤维素及其混合物。适合的纤维素聚合物

包括甲基纤维素、羧甲基纤维素、乙基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、酯羧甲基纤维素及其混合物。

[0233] 抗再沉积剂—本发明的洗涤剂组合物还可以包括一种或多种抗再沉积剂，例如羧甲基纤维素 (CMC)、聚乙烯醇 (PVA)、聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)、聚环氧乙烷和/或聚乙二醇 (PEG)、丙烯酸的均聚物、丙烯酸与马来酸的共聚物以及乙氧基化聚乙亚胺。以上在污垢释放聚合物下描述的纤维素基聚合物还可以用作抗再沉积剂。

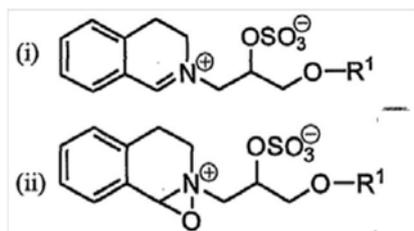
[0234] 流变改性剂是结构剂或增稠剂，不同于降粘剂。流变改性剂选自下组，该组由以下各项组成：非聚合物结晶、羟基功能材料、聚物流变改性剂，它们为组合物的水性液相基质赋予剪切稀化特征。可以通过本领域已知的方法修饰和调整洗涤剂的流变学和粘度，例如如在EP 2169040中所示。

[0235] 其他适合的辅料包括但不限于防缩剂、抗皱剂、杀细菌剂、粘合剂、载体、染料、酶稳定剂、织物软化剂、填充剂、泡沫调节剂、助水溶剂、香料、色素、抑泡剂、溶剂以及用于液体洗涤剂的结构剂和/或结构弹性剂。

[0236] 漂白系统

[0237] 由于这些组分的不相容性，仍然有少数结合漂白剂和酶的液体洗涤剂的实例 (例如, US 5,275,753或WO 99/00478)。在本发明中所述的酶微囊可以用于将液体洗涤剂中的漂白剂和酶物理上相互分离。洗涤剂可以包含0-50%的漂白系统。可以利用本领域中已知的用于在衣物洗涤剂中使用的任何漂白系统。适合的漂白系统组分包括漂白催化剂、光漂白剂、漂白活化剂、过氧化氢源如过碳酸钠和过硼酸钠、预成型过酸及其混合物。适合的预成型过酸包括但不限于：过氧羧酸及盐，过碳酸及盐，过亚氨酸 (perimidic acid) 及盐，过氧单硫酸及盐 (例如过硫酸氢钾 (Oxone (R))，及其混合物。漂白系统的非限制性实例包括基于过氧化物的漂白系统，这些系统可以包括例如与过酸形成漂白活化剂组合的无机盐，包括碱金属盐，例如过硼酸盐 (通常是单水合物或四水合物)、过碳酸盐、过硫酸盐、过磷酸盐、过硅酸盐的钠盐。术语漂白活化剂在此意指一种与过氧化物漂白剂 (像过氧化氢) 反应以形成过酸的化合物。以此方式形成的过酸构成活化的漂白剂。有待在此使用的适合漂白活化剂包括属于酯酰胺、酰亚胺或酸酐类别的那些。适合的实例是四乙酰基乙二胺 (TAED)、4-[(3,5,5-三甲基己酰) 氧基] 苯磺酸钠 (ISONOBS)、二过氧月桂酸、4-(十二酰基氧基) 苯磺酸盐 (LOBS)、4-(癸酰基氧基) 苯磺酸盐、4-(癸酰基氧基) 苯甲酸盐 (DOBS)、4-(壬酰基氧基)-苯磺酸盐 (NOBS) 和/或披露于WO 98/17767中的那些。感兴趣的漂白活化剂的具体家族披露于EP 624154中并且在那个家族中特别优选的是乙酰柠檬酸三乙酯 (ATC)。ATC或短链甘油三酸酯 (像三醋汀) 具有以下优点，它是环境友好的，因为它最终降解为柠檬酸和醇。此外，乙酰柠檬酸三乙酯和三醋汀在储存时在产品中具有良好的水解稳定性，并且它是一种有效的漂白活化剂。最后，ATC为洗衣添加剂提供一种良好的助洗能力。可替代地，漂白系统可以包括例如酰胺、酰亚胺或矾型的过氧酸。漂白系统还可以包括过酸，例如6-(邻苯二甲酰亚胺基) 过氧己酸 (PAP)。漂白系统还可以包括漂白催化剂。在一些实施例中，漂白组分可以是选自下组的有机催化剂，该组由以下各项组成：具有下式的有机催化剂：

[0238]



[0239] 及其混合物；其中每个R¹独立地是包含从9至24个碳的支链烷基基团或包含从11至24个碳的直链烷基基团，优选地，每个R¹独立地是包含从9至18个碳的支链烷基基团或包含从11至18个碳的直链烷基基团，更优选地，每个R¹独立地选自下组，该组由以下各项组成：2-丙基庚基、2-丁基辛基、2-戊基壬基、2-己基癸基、正-十二烷基、正-十四烷基、正-十六烷基、正-十八烷基、异-壬基、异-癸基、异-十三基和异-十五烷基。其他示例性漂白系统描述于例如WO 2007/087258、WO 2007/087244、WO 2007/087259以及WO 2007/087242中。适合的光漂白剂可以例如是磺化的酞菁锌。

[0240] 洗涤剂产品的配制品

[0241] 本发明的液体洗涤剂组合物可以是任何方便的形式，例如，具有一个或多个室的袋、凝胶、或规则的、压缩的或浓缩的液体洗涤剂（参见，例如，WO 2009/098660或WO 2010/141301）

[0242] 袋可以被配置为单个或多个的室。它可以具有适合保存该组合物的任何形式、形状和材料，例如在与水接触之前，不允许该组合物从袋中释放出来。袋由封装内体积的水溶性膜制成。可以将所述内体积分为具有袋的室。优选的膜是形成膜或片的聚合材料，优选是聚合物。优选的聚合物、共聚物或其衍生物选自聚丙烯酸酯、和水溶性丙烯酸酯共聚物、甲基纤维素、羧甲基纤维素、糊精钠、乙基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、麦芽糊精、聚甲基丙烯酸酯，最优选地是聚乙烯醇共聚物以及羟丙基甲基纤维素（HPMC）。优选地，在膜中的聚合物（例如PVA）的水平是至少约60%。优选的平均分子量将典型地是约20,000至约150,000。膜还可以是共混组合物，该共混组合物包括可水解降解并且水可溶的聚合物共混物，例如聚乳酸和聚乙烯醇（已知在贸易参考M8630下，如由美国印第安纳州的MonoSol LLC公司销售）加增塑剂，像甘油、乙二醇、丙二醇、山梨醇及其混合物。这些袋可以包括固体衣物清洁组合物或部分组分和/或液体清洁组合物或由水溶性膜分开的部分组分。用于液体组分的室在构成上可以与包含固体的室不同。

[0243] 洗涤剂成分可以通过水可溶性袋中的室彼此物理性地分开。由此可以避免组分之间的负面的储存相互作用。在洗涤溶液中，每个室的不同溶解曲线还可以引起选择的组分的延迟溶解。

[0244] 组合物、方法以及用途

[0245] 在第一方面，本发明提供了微囊组合物，该微囊组合物包括被截留在由膜形成的隔室中的化合物（如酶），该膜通过（a）具有高于800Da分子量的多支化的多胺，和（b）具有少于300Da分子量的脂肪胺或芳香胺的交联而产生；其中（a）/（b）的重量比在0.1至1000的范围内。

[0246] 在一个实施例中，该化合物是洗涤剂组分。优选地，该洗涤剂组分与其他洗涤剂组分具有反应性（如酶底物或共底物）或互不相容。

[0247] 在一个实施例中，该化合物是选自下组的酶，该组由以下各项组成：蛋白酶、金属

蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶、角质酶、纤维素酶、甘露聚糖酶、果胶酶、黄原胶酶、DNA酶、漆酶、过氧化物酶、卤代过氧化物酶、过水解酶、及其组合；优选地，该酶是脂肪酶。

[0248] 酶底物或共底物的实例包括但不限于：过氧化氢或过氧化氢前体像过碳酸盐或过硼酸盐（氧化还原酶的底物像过氧化物酶/卤代过氧化物酶）、用于原位过氧化氢生成的糖或多元醇（氧化酶的底物）、酯底物像丙二醇二乙酸酯（过水解酶的底物）、以及漆酶过氧化物酶介质。

[0249] 在一个实施例中，该多支化的多胺的这些反应性氨基构成该分子量的至少15%。

[0250] 在一个实施例中，由该微囊的膜形成的隔室的直径是至少50微米。

[0251] 在一个实施例中，该隔室包含按总隔室的重量计至少1%活性酶。

[0252] 在一个实施例中，该微囊组合物进一步包括醇，例如多元醇。

[0253] 在一个实施例中，该多支化的多胺，(a)，的分子量至少为1kDa。

[0254] 在一个实施例中，该多支化的多胺，(a)，是聚乙烯亚胺。

[0255] 在一个实施例中，该脂肪胺或芳香胺，(b)，的分子量小于250Da。

[0256] 在一个实施例中，该多支化的多胺，(a)，和该脂肪胺或芳香胺，(b)，的重量比：(多支化的多胺)/(脂肪胺或芳香胺)在0.1至500的范围内；优选地在0.1至250的范围内；更优选地在1至250的范围内。

[0257] 在一个实施例中，该脂肪胺或芳香胺，(b)，是脂肪胺；优选地(b)是具有一个或多个氨基的烷基胺；更优选地(b)是亚乙基胺或烷醇胺；并且最优选地(b)选自下组，该组由以下各项组成：乙二胺、二亚乙基三胺、三亚乙基四胺、双(3-氨基丙基)胺、六亚甲基二胺、单乙醇胺、二乙醇胺、以及三乙醇胺。

[0258] 在一个实施例中，由该微囊的膜形成的隔室包括 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、或 Zn^{2+} 离子的来源，例如 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、或 Zn^{2+} 的难溶性盐。

[0259] 在一个实施例中，通过使用酰基氯作为交联剂生成该微囊的膜；优选地是己二酰氯、癸二酰氯、十二烷基二酰氯、邻苯二甲酰氯、对苯二甲酰氯、间苯二甲酰氯、或均苯三甲酰氯；并且更优选地是间苯二甲酰氯、对苯二甲酰氯或均苯三甲酰氯。

[0260] 在一个实施例中，通过界面聚合来生成该膜。

[0261] 在一个实施例中，在浓缩的液体洗涤剂中存储过夜之后，并且随后在纯水中稀释(1:1000)，该微囊组合物能够在5分钟之内释放至少50%的被截留/囊化的化合物(如酶)。

[0262] 在第二方面，本发明提供了液体洗涤剂组合物，该液体洗涤剂组合物包括表面活性剂和/或洗涤剂助洗剂、以及如以上所描述的微囊组合物，其包括所有实施例。优选地，该表面活性剂是阴离子表面活性剂。

[0263] 在一个实施例中，该液体洗涤剂组合物包括至少两种互不相容的或互相反应的组分，其中这些组分中的一种被截留在该微囊的隔室中(位于内部)，并且另一种组分未被截留在该微囊的隔室中(位于外部)。

[0264] 在其他方面，本发明还提供了本发明这些组合物(如以上所描述的)用于衣物洗涤或自动餐具洗涤中的用途。这些组合物还可用于改进被囊化(截留)在微囊(隔室)中的化合物的稳定性。具体而言，本发明提供了这些组合物用于改进囊化的酶的储存稳定性的用途。

[0265] 本发明还提供了一种用于制备本发明所述微囊组合物的方法，该方法包括将化合

物(如酶)截留在由膜形成的隔室中,该膜通过(a)具有高于800Da分子量的多支化的多胺,和(b)具有少于300Da分子量的脂肪胺或芳香胺的交联而产生;其中(a)/(b)的重量比在0.1至1000的范围内。

[0266] 根据本发明的方法和用途的实施例与如上所描述的本发明这些组合物的实施例相同。

[0267] 本发明的这些微囊可以用于具有高或低储备碱度的洗涤剂组合物中(参见W0 2006/090335)。这些微囊还与具有高或低水平的沸石、磷酸盐或其他用于与钙和镁离子相互作用的强或弱助洗剂(螯合剂、螯合剂、沉淀剂)的组合物相容。

[0268] 根据本发明在衣物洗涤或自动餐具洗涤中的用途可以在以下温度下进行:从5至90摄氏度,优选从5至70摄氏度,更优选从5至60摄氏度,甚至更优选从5至50摄氏度,甚至更优选从5至40摄氏度,最优选从5至30摄氏度,并且特别是从10至30摄氏度。

[0269] 进一步通过以下实例来描述本发明,所述实例不应理解为限制了本发明的范围。

[0270] 实例

[0271] 用作缓冲液和底物的化学品是至少试剂级的商业产品。脂肪酶1具有SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列(还描述于国际专利申请号PCT/EP 2014/059701中)。

[0272] 一种可商购的无酶液体洗涤剂,“宝莹少量且有利型非生物液(Persil Small and Mighty Non-biological)”于2014年六月购于英国。这种洗涤剂称为“洗涤剂B”。

[0273] 实例1

[0274] 通过添加小的脂肪胺而改进的酶稳定性

[0275] 根据表3中所示的实验装置,通过将脂肪酶1的水溶液(120mg活性酶/克)与来自表1中的多支化的多胺和来自表2中的小的脂肪胺混合来制备水相溶液I至VII。

[0276] 表1.一些小的脂肪胺(烷醇胺和亚乙基胺类)的特性。

[0277]

小胺	缩写	CAS编号	Mw
单乙醇胺	MEA	141-43-5	61.08
二乙醇胺	DEA	111-42-2	105.14
乙二胺	EDA	107-15-3	116.90
二亚乙基三胺	DETA	111-40-0	206.70
直链三亚乙基四胺	L-TETA	112-24-3	146.23
双(3-氨基丙基)胺	DPTA	56-18-8	131.22
六亚甲基二胺	HMDA	124-09-4	116.24

[0278] 表2.一些多支化的多胺的特性。

[0279]

多支化的多胺	分子量 (kDa)	伯胺/仲胺/叔胺的比率
Lupasol G20	1.3	39%/36%/25%
Lupasol G100	5.0	36%/37%/27%
Epomin SP-012	1.2	25%/50%/25%
Epomin SP-200	10.0	35%/35%/30%

[0280] 表3.实验装置。

[0281]

水相中的组分	I (g)	II (g)	III (g)	IV (g)	V (g)	VI (g)	VII (g)
脂肪酶1溶液, 120 mg/g	25	25	25	25	25	25	25
Lupasol G100 (50%在水中)	8	8	0	0	0	0	0

[0282]

Epomin SP-012 (99+%在水中)	0	0	3	3	3	3	0
Epomin SP-200 (99+%在水中)	0	0	0	0	0	0	3
DETA	0	0.5	0	0.5	0	0	0.5
MEA	0	0	0	0	0.5	0	0
L-TETA	0	0	0	0	0	0.5	0
水	至50 g						

[0283] 通过将1000mL的石蜡油(由Statoil提供的Whiteway 15)与苯乙烯、甲基丙烯酸十八烷基酯以及马来酸酐三元共聚物乳化剂在石蜡油中的高MW水解共聚物的60g 20%溶液通过搅拌混合制备一个油相(参见WO 99/01534,实例5)。

[0284] 在搅拌下,将这些水相中的每个添加至100mL油相以形成具有50 μ m和150 μ m之间的平均液滴尺寸的油包水乳剂。

[0285] 通过将49g的间苯二甲酰氯(来自西格玛奥德里奇(Sigma Aldrich))用加至700g的石蜡油溶解并且在连续磁性搅拌下加热至85 $^{\circ}$ C来制备一个反应物油相。

[0286] 向每个油包水乳剂中添加50mL热反应物油相来引发界面聚合反应和囊形成。允许在搅拌下1小时完成该反应。

[0287] 然后,允许囊沉降大约5分钟,弃去上清液并且用石蜡油(来自Statoil的Whiteway 15;或来自埃克森美孚(ExxonMobil)的Isopar M)冲洗这些囊。尽可能多的排出最终的囊产品中的油。

[0288] 用100mL洗涤剂B与每一批囊混合。

[0289] 通过将0.2g的脂肪酶1溶液(120mg活性酶/克)与125g洗涤剂B在磁搅拌下混合来制备参照。

[0290] 将参照和囊批次分装入密闭小瓶,每一瓶中大约7g并在5 $^{\circ}$ C或40 $^{\circ}$ C下储存2周(加速条件)。

[0291] 在储存之后,通过使用标准酶分析方法(在37 $^{\circ}$ C下,pH=8.0水解对硝基苯基棕榈酸酯),在脱矿质水中初始1:100稀释(以便促进酶从囊中释放)之后测量活性。相对于在5 $^{\circ}$ C下储存的样品计算残余活性。结果示于表4中。相对于非囊化的参照来计算稳定性改进。

[0292] 表4. 存储后,囊化的脂肪酶的残余活性。

[0293]

组分	残余活性 (在40°C下2周)	稳定性改进
I: Lupasol G100	2%	4
II: Lupasol G100 + DETA	55%	110
III: Epomin SP-012	5%	10
IV: Epomin SP-012 + DETA	54%	108

[0294]

V: Epomin SP-012 + MEA	9%	18
VI: Epomin SP-012 + L-TETA	62%	124
VII: Epomin SP-200 + DETA	56%	112
非囊化参照	0.5%	1

[0295] 这些结果证明小胺可以被添加到不同聚合物中并且改进衣物洗涤剂的酶稳定性。

[0296] 实例2

[0297] 通过以不同浓度添加小胺而改进的酶稳定性

[0298] 根据表5中所示的实验装置,通过将脂肪酶1的水溶液(120mg活性酶/克)与来自表1中的多支化的多胺和来自表2中的小胺混合来制备水相溶液I至VI。

[0299] 表5.实验装置。

[0300]

水相中的组分	I (g)	II (g)	III (g)	IV (g)	V (g)	VI (g)
脂肪酶1溶液, 120 mg/g	25	25	25	25	25	25
Lupasol G100 (50%在水中)	4	4	4	4	4	4
DETA	0	0.015	0.25	0.5	0.75	1.5
水	至50 g					

[0301] 通过将1000mL的石蜡油(由Statoil提供的Whiteway 15)与苯乙烯、甲基丙烯酸十八烷基酯以及马来酸酐三元共聚物乳化剂在石蜡油中的高MW水解共聚物的60g 20%溶液通过搅拌混合制备一个油相(参见WO 99/01534,实例5)。

[0302] 在搅拌下,将这些水相中的每个添加至100mL油相以形成具有50 μ m和150 μ m之间的平均液滴尺寸的油包水乳剂。

[0303] 通过将49g的间苯二甲酰氯(来自西格玛奥德里奇(Sigma Aldrich))用加至700g的石蜡油溶解并且在连续磁性搅拌下加热至85°C来制备一个反应物油相。

[0304] 向每个油包水乳剂中添加50mL热反应物油相来引发界面聚合反应和囊形成。允许在搅拌下1小时完成该反应。

[0305] 然后,允许囊沉降大约5分钟,弃去上清液并且用石蜡油(来自Statoil的Whiteway 15;或来自埃克森美孚(ExxonMobil)的Isopar M)冲洗这些囊。尽可能多的排出最终的囊产品中的油。

[0306] 用100mL洗涤剂B与每一批囊混合。

[0307] 通过将0.2g的脂肪酶1溶液(120mg活性酶/克)与125g洗涤剂B在磁搅拌下混合来制备参照。

[0308] 将参照和囊批次分装入密闭小瓶,每一瓶中大约7g并在5°C或40°C下储存2周(加速条件)。

[0309] 在储存之后,通过使用标准酶分析方法(在37°C下,pH=8.0水解对硝基苯基棕榈酸酯),在脱矿质水中初始1:100稀释(以便促进酶从囊中释放)之后测量活性。相对于在5°C下储存的样品计算残余活性。结果示于表6中。相对于非囊化的参照来计算稳定性改进。

[0310] 表6. 存储后,囊化的脂肪酶的残余活性。

[0311]

组分	Lupasol G100/DETA 的重量比	残余活性 (2周, 40°C)	稳定性改进
I: Lupasol G100	-	2%	4
II: Lupasol G100 + 0.03% DETA	133.3	27%	54
III: Lupasol G100 + 0.5% DETA	8	54%	108
IV: Lupasol G100 + 1% DETA	4	52%	104
V: Lupasol G100 + 1.5% DETA	2.7	55%	110
VI: Lupasol G100 + 3% DETA	1.3	54%	108
非囊化参照	-	0.5%	1.0

[0312] 这些结果证明了,在制备该微囊时,即使将少量的小胺添加到水相中也能改进洗涤剂组合物中囊化的酶的稳定性。

[0313] 实例3

[0314] 通过添加不同的小胺而改进的酶稳定性

[0315] 根据表7中所示的实验装置,通过将脂肪酶1的水溶液(120mg活性酶/克)与来自表1中的多支化的多胺和来自表2中的小胺混合来制备水相溶液I至VI。

[0316] 表7. 实验装置。

[0317]

水相中的组分	I (g)	II (g)	III (g)	IV (g)	V (g)	VI (g)
脂肪酶1溶液, 120 mg/g	41	41	41	41	41	41
Lupasol G100 (50%在水中)	8	8	8	8	8	8
DETA	0	0.5	0	0	0	0
MEA	0	0	0.5	0	0	0
DEA	0	0	0	0.5	0	0
L-TETA	0	0	0	0	0.5	0
DPTA	0	0	0	0	0	0.5
水	至50 g					

[0318] 通过将1000mL的石蜡油(由Statoil提供的Whiteway 15)与苯乙烯、甲基丙烯酸十八烷基酯以及马来酸酐三元共聚物乳化剂在石蜡油中的高MW水解共聚物的60g 20%溶液通过搅拌混合制备一个油相(参见WO 99/01534,实例5)。

[0319] 在搅拌下,将这些水相中的每个添加至100mL油相以形成具有50 μ m和150 μ m之间的平均液滴尺寸的油包水乳剂。

[0320] 通过将28g的间苯二甲酰氯(来自西格玛奥德里奇(Sigma Aldrich))用加至700g的石蜡油溶解并且在连续磁性搅拌下加热至85 $^{\circ}$ C来制备一个反应物油相。

[0321] 向每个油包水乳剂中添加50mL热反应物油相来引发界面聚合反应和囊形成。允许在搅拌下1小时完成该反应。

[0322] 然后,允许囊沉降大约5分钟,弃去上清液并且用石蜡油(来自Statoil的Whiteway 15;或来自埃克森美孚(ExxonMobil)的Isopar M)冲洗这些囊。尽可能多的排出最终的囊产品中的油。

[0323] 用100mL洗涤剂B与每一批囊混合。

[0324] 通过将0.2g的脂肪酶1溶液(120mg活性酶/克)与125g洗涤剂B在磁搅拌下混合来制备参照。

[0325] 将参照和囊批次分装入密闭小瓶,每一瓶中大约7g并在5 $^{\circ}$ C或37 $^{\circ}$ C下储存2周(加速条件)。

[0326] 在储存之后,通过使用标准酶分析方法(在37 $^{\circ}$ C下,pH=8.0水解对硝基苯基棕榈酸酯),在脱矿质水中初始1:100稀释(以便促进酶从囊中释放)之后测量活性。相对于在5 $^{\circ}$ C下储存的样品计算残余活性。结果示于表8中。相对于非囊化的参照来计算稳定性改进。

[0327] 表8. 存储后,囊化的脂肪酶的残余活性。

[0328]

组分	残余活性 (2周, 37 $^{\circ}$ C)	稳定性改进
I: Lupasol G100	26%	3
II: Lupasol G100 + 1% DETA	71%	9
III: Lupasol G100 + 1% MEA	45%	6
IV: Lupasol G100 + 1% DEA	92%	12
V: Lupasol G100 + 1% L-TETA	70%	9
VI: Lupasol G100 + 1% DPTA	40%	5
非囊化参照	8%	1.0

[0329] 表8中的这些结果证明可以添加小胺来改进衣物洗涤剂的酶稳定性。

[0330] 实例4

[0331] 通过添加不同的小胺而改进的长期酶稳定性

[0332] 根据表9中所示的实验装置,通过将脂肪酶1的水溶液(120mg活性酶/克)与来自表1中的多支化的多胺和来自表2中的小胺混合来制备水相溶液I至V。

[0333] 表9. 实验装置。

水相中的组分	I (g)	II (g)	III (g)	IV (g)	V (g)
脂肪酶I溶液, 120 mg/g	41	41	41	41	41
Lupasol G100 (50%在水中)	8	8	8	8	8
[0334] DETA	0.5	0	0	0	0
MEA	0	0.5	0	0	0
DEA	0	0	0.5	0	0
L-TETA	0	0	0	0.5	0
水	至50 g				

[0335] 通过将1000mL的石蜡油(由Statoil提供的Whiteway 15)与苯乙烯、甲基丙烯酸十八烷基酯以及马来酸酐三元共聚物乳化剂在石蜡油中的高MW水解共聚物的60g 20%溶液通过搅拌混合制备一个油相(参见WO 99/01534,实例5)。

[0336] 在搅拌下,将这些水相中的每个添加至100mL油相以形成具有50 μ m和150 μ m之间的平均液滴尺寸的油包水乳剂。

[0337] 通过将28g的间苯二甲酰氯(来自西格玛奥德里奇(Sigma Aldrich))用加至700g的石蜡油溶解并且在连续磁性搅拌下加热至85 $^{\circ}$ C来制备一个反应物油相。

[0338] 向每个油包水乳剂中添加50mL热反应物油相来引发界面聚合反应和囊形成。允许在搅拌下1小时完成该反应。

[0339] 然后,允许囊沉降大约5分钟,弃去上清液并且用石蜡油(来自Statoil的Whiteway 15;或来自埃克森美孚(ExxonMobil)的Isopar M)冲洗这些囊。尽可能多的排出最终的囊产品中的油。

[0340] 用100mL洗涤剂B与每一批囊混合。

[0341] 通过将0.2g的脂肪酶I溶液(120mg活性酶/克)与125g洗涤剂B在磁搅拌下混合来制备参照。

[0342] 将参照和囊批次分装入密闭小瓶,每一瓶中大约7g并在5 $^{\circ}$ C或30 $^{\circ}$ C下储存12周(长期条件)。

[0343] 在储存之后,通过使用标准酶分析方法(在37 $^{\circ}$ C下,pH=8.0水解对硝基苯基棕榈酸酯),在脱矿质水中初始1:100稀释(以便促进酶从囊中释放)之后测量活性。相对于在5 $^{\circ}$ C下储存的样品计算残余活性。结果示于表10中。相对于非囊化的参照来计算稳定性改进。

[0344] 表10. 存储后,囊化的脂肪酶的残余活性。

[0345]

组分	残余活性 (在30°C下12周)	稳定性改进
I: Lupasol G100 + 1% DETA	55%	32
II: Lupasol G100 + 1% MEA	36%	21
III: Lupasol G100 + 1% DEA	51%	30
IV: Lupasol G100 + 1% L-TETA	55%	32
V: Lupasol G100	3%	2
非囊化参照	2%	1.0

[0346] 表10中的这些结果证明小胺可以被添加到不同聚合物中并且改进衣物洗涤剂
的长期酶稳定性

[0347] 实例5

[0348] 与具有Lupasol G100的单一组分相比,通过组合不同的小胺和多支化的多胺而改进的酶稳定性

[0349] 根据表11中所示的实验装置,通过将脂肪酶1的水溶液(120mg活性酶/克)与来自表1中的多支化的多胺和来自表2中的小胺混合来制备水相溶液I至V。

[0350] 表11. 实验装置。

水相中的组分	I (g)	II (g)	III (g)	IV (g)	V (g)
脂肪酶1溶液, 120 mg/g	25	25	25	25	25
Lupasol G100 (50%在水中)	0	2	4	6	8
DETA	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
水	至50 g				

[0351] 通过将1000mL的石蜡油(由Statoil提供的Whiteway 15)与苯乙烯、甲基丙烯酸十八烷基酯以及马来酸酐三元共聚物乳化剂在石蜡油中的高MW水解共聚物的60g 20%溶液通过搅拌混合制备一个油相(参见WO 99/01534,实例5)。

[0352] 在搅拌下,将这些水相中的每个添加至100mL油相以形成具有50 μ m和150 μ m之间的平均液滴尺寸的油包水乳剂。

[0353] 通过将28g的间苯二甲酰氯(来自西格玛奥德里奇(Sigma Aldrich))用加至700g的石蜡油溶解并且在连续磁性搅拌下加热至85°C来制备一个反应物油相。

[0354] 向每个油包水乳剂中添加50mL热反应物油相来引发界面聚合反应和囊形成。允许在搅拌下1小时完成该反应。

[0355] 然后,允许囊沉降大约5分钟,弃去上清液并且用石蜡油(来自Statoil的Whiteway 15;或来自埃克森美孚(ExxonMobil)的Isopar M)冲洗这些囊。尽可能多的排出最终的囊产品中的油。

[0356] 用100mL洗涤剂B与每一批囊混合。

[0358] 通过将0.2g的脂肪酶1溶液(120mg活性酶/克)与125g洗涤剂B在磁搅拌下混合来制备参照。

[0359] 将参照和囊批次分装入密闭小瓶,每一瓶中大约7g并在5°C或37°C下储存8周。

[0360] 在储存之后,通过使用标准酶分析方法(在37°C下,pH=8.0水解对硝基苯基棕榈酸酯),在脱矿质水中初始1:100稀释(以便促进酶从囊中释放)之后测量活性。相对于在5°C下储存的样品计算残余活性。结果示于表12中。相对于非囊化的参照来计算稳定性改进。

[0361] 表12. 存储后,囊化的脂肪酶的残余活性。

[0362]

组分	Lupasol G100/DETA 的重量比	残余活性 (8 周, 37°C)	稳定性改进
I: 1% DETA	0	0.6%	1.2
II: 2% Lupasol G100 + 1% DETA	2	9%	18
III: 4% Lupasol G100 + 1% DETA	4	39%	78
IV: 6% Lupasol G100 + 1% DETA	6	47%	94
V: 8% Lupasol G100 + 1% DETA	8	44%	88
非囊化参照	-	0.5%	1.0

[0363] 这些结果证明了,小胺和多支化的PEI的组合比单独的小胺产生更好地稳定性。并且进一步地,对于固定量的小胺,增加多支化的PEI水平改进了稳定性;优选地高于0%PEI,更优选地高于2%,更优选地高于4%。

[0364] 实例6

[0365] 与具有Epomin SP-012的单一组分相比,通过组合不同的小胺和多支化的多胺而改进的酶稳定性

[0366] 根据表13中所示的实验装置,通过将脂肪酶1的水溶液(120mg活性酶/克)与来自表1中的多支化的多胺和来自表2中的小胺混合来制备水相溶液I至VII。

[0367] 表13. 实验装置。

[0368]

水相中的组分	I (g)	II (g)	III (g)	IV (g)	V (g)	VI (g)	VII (g)
脂肪酶1溶液, 120 mg/g	25	25	25	25	25	25	25

[0369]

Epomin SP-012 (99+% 在水中)	0	2	3	4	3	3	3
DETA	0.5	0	0	0	0.5	0	0
MEA	0	0	0	0	0	0.5	0
L-TETA	0	0	0	0	0	0	0.5
水	至50 g						

[0370] 通过将1000mL的石蜡油(由Statoil提供的Whiteway 15)与苯乙烯、甲基丙烯酸十八烷基酯以及马来酸酐三元共聚物乳化剂在石蜡油中的高MW水解共聚物的60g 20%溶液通过搅拌混合制备一个油相(参见WO 99/01534,实例5)。

[0371] 在搅拌下,将这些水相中的每个添加至100mL油相以形成具有50 μ m和150 μ m之间的平均液滴尺寸的油包水乳剂。

[0372] 通过将28g的间苯二甲酰氯(来自西格玛奥德里奇(Sigma Aldrich))用加至700g的石蜡油溶解并且在连续磁性搅拌下加热至85 $^{\circ}$ C来制备一个反应物油相。

[0373] 向每个油包水乳剂中添加50mL热反应物油相来引发界面聚合反应和囊形成。允许在搅拌下1小时完成该反应。

[0374] 然后,允许囊沉降大约5分钟,弃去上清液并且用石蜡油(来自Statoil的Whiteway 15;或来自埃克森美孚(ExxonMobil)的Isopar M)冲洗这些囊。尽可能多的排出最终的囊产品中的油。

[0375] 用100mL洗涤剂B与每一批囊混合。

[0376] 通过将0.2g的脂肪酶1溶液(120mg活性酶/克)与125g洗涤剂B在磁搅拌下混合来制备参照。

[0377] 将参照和囊批次分装入密闭小瓶,每一瓶中大约7g并在5 $^{\circ}$ C或37 $^{\circ}$ C下储存2周(加速条件)。

[0378] 在储存之后,通过使用标准酶分析方法(在37 $^{\circ}$ C下,pH=8.0水解对硝基苯基棕榈酸酯),在脱矿质水中初始1:100稀释(以便促进酶从囊中释放)之后测量活性。相对于在5 $^{\circ}$ C下储存的样品计算残余活性。结果示于表14中。相对于非囊化的参照来计算稳定性改进。

[0379] 表14. 存储后,囊化的脂肪酶的残余活性。

[0380]

组分:	残余活性 (2周, 40 $^{\circ}$ C)	稳定性改进
I: 1% DETA	2%	0.9
II: 2% Epomin SP-012	6%	2
III: 4% Epomin SP-012	6%	2
IV: 6% Epomin SP-012	6%	2

[0381]

V: 6% Epomin SP-012 + 1% DETA	65%	23
VI: 6% Epomin SP-012 + 1% MEA	25%	9
VII: 6% Epomin SP-012 + 1% L-TETA	73%	24
非囊化参照	3%	1.0

[0382] 这些结果证明了,小胺和多支化的PEI的组合比单独的小胺以及单独的多支化的PEI产生更好地稳定性。

序列表

<110> 诺维信公司 (Novozymes A/S)
 <120> 使用小胺进行的微囊化
 <130> 13026-WO-PCT
 <160> 10
 <170> PatentIn 版本 3.5
 <210> 1
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 疏棉状嗜热丝孢菌脂肪酶变体
 <400> 1
 Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe Asn Leu Phe Ala Gln Tyr
 1 5 10 15
 Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn Arg Ala Pro Ala Gly Thr
 20 25 30
 Asn Ile Thr Cys Thr Ala Asn Ala Cys Pro Glu Val Glu Lys Ala Asp
 35 40 45
 Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser Gly Val Gly Asp Val Thr
 50 55 60
 Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys Leu Ile Val Leu Ser Phe
 65 70 75 80
 [0001] Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile Gly Asn Leu Asn Phe Glu
 85 90 95
 Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly Cys Arg Gly His Ala Gly
 100 105 110
 Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp Thr Leu Arg Gln Lys Val
 115 120 125
 Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr Arg Val Val Phe Thr Gly
 130 135 140
 His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val Ala Gly Ala Asp Leu Arg
 145 150 155 160
 Gly Asn Lys Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser Tyr Gly Ala Pro Arg Val
 165 170 175
 Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr Val Gln Thr Gly Gly Thr
 180 185 190
 Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile Val Pro Arg Leu Pro Pro
 195 200 205
 Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Lys Ser
 210 215 220
 Gly Thr Leu Val Pro Val Arg Arg Arg Asp Ile Val Lys Ile Glu Gly
 225 230 235 240
 Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro Asn Ile Pro Ser Ile Thr
 245 250 255

Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly Thr Cys Leu
260 265

<210> 2
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 枯草杆菌蛋白酶抑制剂

<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1)..(1)
<223> Acetyl-Leu

<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (4)..(4)
<223> Tyr-H

<400> 2

Leu Gly Ala Tyr
1

<210> 3
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 枯草杆菌蛋白酶抑制剂

[0002]

<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1)..(1)
<223> Acetyl-Phe

<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (4)..(4)
<223> Tyr-H

<400> 3

Phe Gly Ala Tyr
1

<210> 4
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 枯草杆菌蛋白酶抑制剂

<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1)..(1)
<223> Acetyl-Tyr

<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (4)..(4)
<223> Tyr-H

<400> 4

Tyr Gly Ala Tyr
1

<210> 5
<211> 4
<212> PRT

- <213> 人工的
 <220>
 <223> 枯草杆菌蛋白酶抑制剂

 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1)..(1)
 <223> Acetyl-Phe; MeO-CO-Phe; MeSO₂-Phe; 或 EtSO₂-Phe

 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (4)..(4)
 <223> Leu-H

 <400> 5
 Phe Gly Ala Leu
 1

 <210> 6
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 枯草杆菌蛋白酶抑制剂

 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1)..(1)
 <223> Acetyl-Phe或MeO-CO-Phe

 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (4)..(4)
 <223> Tyr-H

 [0003] <400> 6
 Phe Gly Ala Phe
 1

 <210> 7
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 枯草杆菌蛋白酶抑制剂

 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1)..(1)
 <223> Acetyl-Phe

 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (4)..(4)
 <223> Tyr-H

 <400> 7
 Phe Gly Val Tyr
 1

 <210> 8
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 枯草杆菌蛋白酶抑制剂

 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1)..(1)

<223> Acetyl-Phe
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (4)..(4)
 <223> Met-H

 <400> 8

 Phe Gly Ala Met
 1

 <210> 9
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 枯草杆菌蛋白酶抑制剂

 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1)..(1)
 <223> Acetyl-Trp

 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (4)..(4)
 <223> Tyr-H

 <400> 9

 Trp Leu Val Tyr
 1

 <210> 10
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 枯草杆菌蛋白酶抑制剂

 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1)..(1)
 <223> MeO-P(OH)(O)-Leu

 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (4)..(4)
 <223> Leu-H

 <400> 10

 Leu Gly Ala Leu
 1

[0004]