



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102803481 A

(43) 申请公布日 2012. 11. 28

(21) 申请号 201080058676. 6

C12P 19/14 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 10. 19

(30) 优先权数据

61/254, 626 2009. 10. 23 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 06. 21

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/053196 2010. 10. 19

(87) PCT申请的公布数据

W02011/049945 EN 2011. 04. 28

(71) 申请人 丹尼斯科美国公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 V·夏尔马 J·舍蒂 B·斯特罗姆

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 凌立 黄革生

(51) Int. Cl.

C12N 9/28 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 49 页

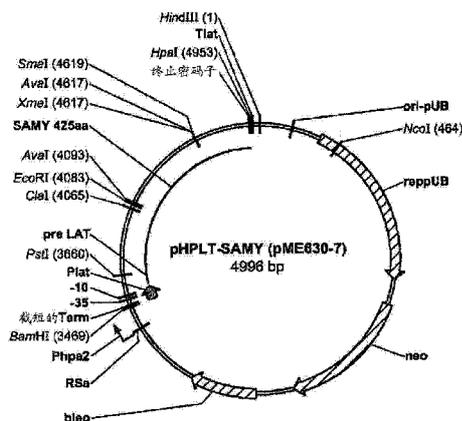
序列表 17 页 附图 13 页

(54) 发明名称

用于减少蓝色糖的方法

(57) 摘要

本发明涉及枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)  $\alpha$ -淀粉酶 (AmyE) 或其变体。AmyE 或其变体可用于消除或减少糖液中存在的碘阳性淀粉。本发明还公开了包含 AmyE 或其变体的组合物和利用 AmyE 或其变体来消除或减少所述碘阳性淀粉的方法。



1. 一种消除或减少碘阳性淀粉的方法,所述方法包括使  $\alpha$ -淀粉酶与含有碘阳性淀粉的糖液接触,其中所述  $\alpha$ -淀粉酶为具有 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)  $\alpha$ -淀粉酶 (AmyE) 或与 SEQ ID NO:1 具有至少约 80% 序列同一性的  $\alpha$ -淀粉酶,并且其中所述  $\alpha$ -淀粉酶可有效消除或减少所述糖液中存在的碘阳性淀粉。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述  $\alpha$ -淀粉酶包含 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15 或 SEQ ID NO:16 中示出的氨基酸序列。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述  $\alpha$ -淀粉酶包含 SEQ ID NO:1。

4. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述  $\alpha$ -淀粉酶由 SEQ ID NO:1 组成。

5. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述  $\alpha$ -淀粉酶为 AmyE 变体。

6. 根据权利要求 2 所述的方法,其中所述 AmyE 变体与具有 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的 AmyE 相比具有一种或多种改变的性质。

7. 根据权利要求 6 所述的方法,其中所述  $\alpha$ -淀粉酶的所述一种或多种改变的性质为:底物特异性、底物结合、底物切割模式、热稳定性、pH/活性曲线、pH/稳定性曲线、对氧化的稳定性、在较低水平的钙离子 ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 下的稳定性、比活或它们的任何组合。

8. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述  $\alpha$ -淀粉酶以约 0.1 至约 0.4mg/克淀粉 (mg/g 淀粉) 的量使用。

9. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述碘阳性淀粉的消除或减少在约 5.0 至约 5.5 的 pH 下进行。

10. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述碘阳性淀粉的消除或减少在约 58°C 至约 62°C 的温度下进行。

11. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述碘阳性淀粉的消除或减少进行约 4 至约 24 小时。

12. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述碘阳性淀粉由温度、pH、酶剂量或它们的任何组合的工艺偏差导致。

13. 根据权利要求 1 所述的方法,所述方法还包括使植酸酶与所述糖液接触。

14. 一种包含  $\alpha$ -淀粉酶的用于消除或减少碘阳性淀粉的组合物,其中所述  $\alpha$ -淀粉酶为具有 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的枯草芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶 (AmyE) 或与 SEQ ID NO:1 具有至少约 80% 序列同一性的  $\alpha$ -淀粉酶,其中其中所述  $\alpha$ -淀粉酶可减少所述糖液中存在的碘阳性淀粉。

15. 根据权利要求 14 所述的组合物,其中所述  $\alpha$ -淀粉酶包含 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15 或 SEQ ID NO:16 中示出的氨基酸序列。

16. 根据权利要求 14 所述的组合物,其中所述  $\alpha$ -淀粉酶包含 SEQ ID NO:1。

17. 根据权利要求 14 所述的组合物,其中所述  $\alpha$ -淀粉酶由 SEQ ID NO:1 组成。

18. 根据权利要求 14 所述的组合物,其中所述  $\alpha$ -淀粉酶为 AmyE 的变体。

19. 根据权利要求 15 所述的组合物,其中所述 AmyE 变体与具有 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的 AmyE 相比具有一种或多种改变的性质。

20. 根据权利要求 19 所述的组合物,其中所述  $\alpha$ -淀粉酶的所述一种或多种改变的性质

质为：底物特异性、底物结合、底物切割模式、热稳定性、pH/ 活性曲线、pH/ 稳定性曲线、对氧化的稳定性、在较低水平的钙离子 ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 下的稳定性、比活或它们的任何组合。

21. 一种消除或减少碘阳性淀粉的方法, 所述方法包括使根据权利要求 14 所述的组合物与含有碘阳性淀粉的糖液接触以减少所述糖液中存在的碘阳性淀粉。

22. 根据权利要求 21 所述的方法, 其中所述  $\alpha$ -淀粉酶以约 0.1 至约 0.4mg/ 克淀粉 (mg/g 淀粉) 的量使用。

23. 根据权利要求 21 所述的方法, 其中所述碘阳性淀粉的消除或减少在约 5.0 至约 5.5 的 pH 下进行。

24. 根据权利要求 21 所述的方法, 其中所述碘阳性淀粉的消除或减少在约 58°C 至约 62°C 的温度下进行。

25. 根据权利要求 21 所述的方法, 其中所述碘阳性淀粉的消除或减少进行约 4 至约 24 小时。

26. 根据权利要求 21 所述的方法, 其中所述碘阳性淀粉由温度、pH、酶剂量或它们的任何组合的工艺偏差导致。

## 用于减少蓝色糖的方法

[0001] 相关专利申请的交叉引用

[0002] 本申请要求提交于 2009 年 10 月 23 日的序列号为 61/254,626 的美国临时专利申请的优先权,将其内容以引用方式全文并入本文。

[0003] 序列列表

[0004] 附上包括 SEQ ID NO :1-24 的序列列表,将其全部内容以引用方式并入本文。

### 技术领域

[0005] 包含枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)  $\alpha$ -淀粉酶 (AmyE) 或其变体的组合物可用于消除例如糖液中的碘阳性淀粉 (IPS)。本发明还提供了使用 AmyE 或其变体来消除例如 IPS 的方法。

### 背景技术

[0006] 植物淀粉例如玉米淀粉广泛用于诸如糖浆和生物燃料之类的产品的工业制造。例如,高果糖玉米糖浆 (HFCS) 是玉米糖浆的加工形式,具有高果糖含量和与糖相当的甜度,从而使得 HFCS 在软饮料和其他加工食品中可用作糖替代品。HFCS 生产目前是十亿美元产业。类似地,从植物淀粉生产乙醇是个快速扩张的产业。乙醇自身作为工业化学品、汽油添加剂或液体燃料具有广泛的应用。乙醇用作燃料或燃料添加剂可在统计上显著地减少空气排放,同时保持或甚至改善发动机性能。另一方面,乙醇是可再生燃料,从而乙醇的使用可减少对有限的化石燃料源的依赖。此外,乙醇的使用可减少二氧化碳在大气中的净积累量。

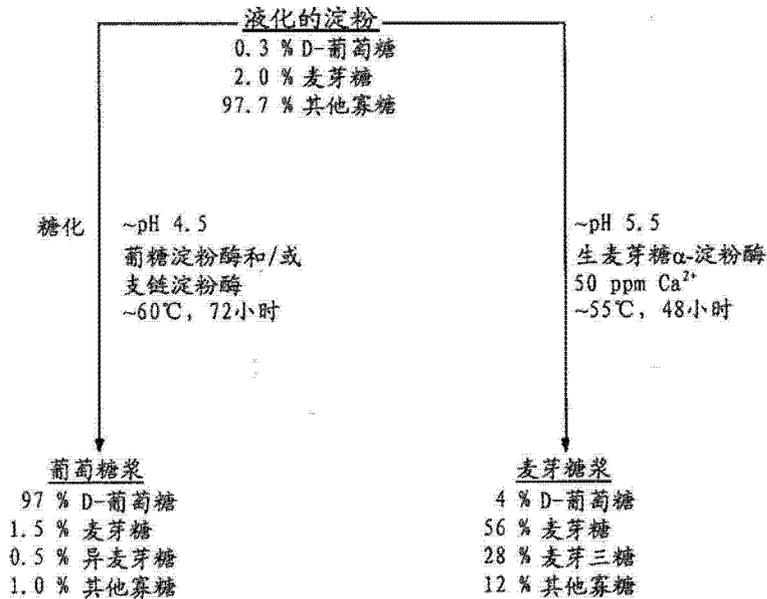
[0007] 糖浆和生物燃料可通过催化淀粉分解成葡萄糖的酶促工艺由淀粉生产。该酶促工艺通常涉及一系列酶催化的反应:

[0008] (1) 液化: $\alpha$ -淀粉酶 (EC 3.2.1.1) 首先催化淀粉悬浮液降解为麦芽糖糊精,所述淀粉悬浮液可含有 30-40% w/w 的干固形物 (ds)。 $\alpha$ -淀粉酶是内切水解酶,可催化内部  $\alpha$ -1,4-D-糖苷键的随机断裂。因为液化通常在高温例如 90-100°C 下进行,所以热稳定性的  $\alpha$ -淀粉酶,如来自芽孢杆菌属物种 (*Bacillus* sp.) 的  $\alpha$ -淀粉酶优选用于该步骤。目前用于该步骤的  $\alpha$ -淀粉酶,例如来自地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*) 的  $\alpha$ -淀粉酶 (AmyL)、解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*) 和嗜热脂肪地芽孢杆菌 (*Geobacillus stearothermophilus*) 的  $\alpha$ -淀粉酶 (AmyS),不产生显著量的葡萄糖。相反,所得到的液化物 (liquefact) 具有低葡萄糖当量 (DE),并且含有麦芽糖和具有高聚合度 (DP<sub>n</sub>) 的糖。

[0009] (2) 糖化:葡糖淀粉酶和/或生麦芽糖  $\alpha$ -淀粉酶可催化在液化后形成的麦芽糖糊精的非还原末端的水解,从而释放 D-葡萄糖、麦芽糖和异麦芽糖。糖化产生富含葡萄糖或高麦芽糖的糖浆。在前一种情况下,葡糖淀粉酶通常在高温酸性条件(例如 60°C, pH 4.3)下催化糖化。在该过程中使用的葡糖淀粉酶通常得自真菌,例如在 Optidex<sup>®</sup> L400 (Danisco US Inc., Genencor Division) 中使用的黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 葡糖淀粉酶或灰腐质霉 (*Humicola grisea*) 葡糖淀粉酶。脱支酶如支链淀粉酶可以帮助糖化。

[0010] 作为另外一种选择生麦芽糖  $\alpha$ -淀粉酶可催化糖化以形成高麦芽糖糖浆。生麦芽

糖  $\alpha$ -淀粉酶通常具有比葡糖淀粉酶更高的最适 pH 和更低的最适温度, 并且生麦芽糖淀粉酶通常需要  $\text{Ca}^{2+}$ 。目前用于这种应用的生麦芽糖  $\alpha$ -淀粉酶包括枯草芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶、植物淀粉酶和来自米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 的  $\alpha$ -淀粉酶 (Clarase<sup>®</sup> L (Danisco US Inc., Genencor Division) 的活性成分)。用于产生多种产物的示例性糖化反应描述如下: [0011]



[0012] (3) 进一步加工: 该工艺的分支点在产生富含葡萄糖的糖浆 (在上面的反应路径的左侧示出) 之后发生。如果最终所需产物是生物燃料, 则酵母可将富含葡萄糖的糖浆发酵为乙醇。另一方面, 如果最终所需产物是富含果糖的糖浆, 则葡萄糖异构酶可催化富含葡萄糖的糖浆转化为果糖。

[0013] 工业淀粉加工设施偶尔会遇到工艺偏移, 例如温度、pH、浆料流速或酶剂量, 它们中的任一者可能会导致糖液中存在大量的碘阳性淀粉 (IPS)。IPS (来自逃脱水解的直链淀粉和 / 或回生淀粉聚合物) 能够与碘反应而产生特征性的蓝色 / 紫色。含有 IPS 的糖液因而称为蓝色糖。糖液中存在 IPS 会不利地影响最终的产品质量, 是下游加工的主要问题。通常, IPS 的存在可通过隔离糖化罐并将内容物以不可检测的水平回混来补救。尽管这种补救能够将 IPS 水平减少至低于消费者可检测的程度, 但不受欢迎的材料仍然存在并会在炭柱和过滤系统中积聚等等。特别是, 没有糖化后的方法来通过选择性降解而有效消除 IPS 或使之最少。因此, 希望开发一种酶溶液, 其使得能在检测糖化后 IPS 时有效消除或减少 IPS。

## 发明内容

[0014] 来自枯草芽孢杆菌的  $\alpha$ -淀粉酶 (AmyE) 显示出不同于 Termamyl 样  $\alpha$ -淀粉酶, 如来自地衣芽孢杆菌和嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*) 的  $\alpha$ -淀粉酶的性质。AmyE 具有以前未被认识到的转葡糖苷酶活性, 并能够由麦芽糖合成麦芽三糖。此外, 已发现 AmyE 可由多种糖底物产生大量的葡萄糖。在糖化中添加 AmyE 或其变体和葡糖淀粉酶, 尤其会导致较高水平的可发酵糖以及低水平的高级糖。此外, 在糖化中使用 AmyE 或其变体, 例如, 可统计意义上显著地改善所得的糖液的质量, 该糖液适于从淀粉生产高果糖玉米糖浆 (HFCS) 或乙醇。

[0015] 本文考虑的实施例提供了用于消除或减少碘阳性淀粉的组合物。该组合物包含可有效消除或减少糖液中存在的碘阳性淀粉的  $\alpha$ -淀粉酶。还提供的是消除或减少碘阳性淀粉的方法。该方法包括使含有碘阳性淀粉的糖液与  $\alpha$ -淀粉酶或所考虑的由  $\alpha$ -淀粉酶组成的组合物接触。可任选地,所述方法可还包括使植酸酶与糖液接触。碘阳性淀粉可因温度、pH、酶剂量或它们的任何组合的工艺偏移所引起。

[0016] 本文所考虑的  $\alpha$ -淀粉酶可为具有 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的枯草芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶 (AmyE) 或与 SEQ ID NO:1 具有至少约 80%、约 85%、约 90%、约 95% 或约 99% 序列同一性的  $\alpha$ -淀粉酶。所述  $\alpha$ -淀粉酶可包含 SEQ ID NO:1 或由 SEQ ID NO:1 组成。可任选地,  $\alpha$ -淀粉酶可包含 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15 或 SEQ ID NO:16 中列出的氨基酸序列。 $\alpha$ -淀粉酶可以是 AmyE 变体,其与具有 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的 AmyE 酶相比具有一种或多种改变的性质。所述  $\alpha$ -淀粉酶的一种或多种改变的性质可包括:底物特异性、底物结合、底物切割模式、热稳定性、pH/活性曲线、pH/稳定性曲线、对氧化的稳定性、在较低水平的钙离子 ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 下的稳定性、比活或它们的任何组合。

[0017] 在一个方面,  $\alpha$ -淀粉酶可在本文所考虑的方法中以约 0.1 至约 0.4mg/克淀粉 (mg/g 淀粉) 的量使用以消除或减少碘阳性淀粉。在另一个方面,可在约 5.0 至约 5.5 的 pH 下执行所考虑的方法。在进一步的方面,可在约 58°C 至约 62°C 的温度下执行所考虑的方法。在又一个方面,可执行所考虑的方法约 4 至约 24 小时。

#### 附图说明

[0018] 将附图并入本说明书中,提供多个实施例的非限制性例证。在附图中:

[0019] 图 1 示出了来自嗜热脂肪地芽孢杆菌的全长  $\alpha$ -淀粉酶 (具有信号序列) 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:7; AmyS; “B. stear”)、地衣芽孢杆菌的全长  $\alpha$ -淀粉酶 (具有信号序列) 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:8; AmyL; “B. lich”) 和枯草芽孢杆菌的全长  $\alpha$ -淀粉酶 (具有信号序列) 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:9; AmyE; “B. sub”) 的氨基酸序列比对。

[0020] 图 2 示出了枯草芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶 (AmyE; Protein Data Bank 登录号 1UA7) 和嗜热脂肪地芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶 (AmyS; Protein Data Bank 登录号 1HVX) 之间的三维结构比较。

[0021] 图 3A 示出了嗜热脂肪地芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶 (AmyS; Protein Data Bank 登录号 1HVX) (灰色色调) 和地衣芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶 (AmyL; Protein Data Bank 登录号 1BLI) (暗色色调) 的叠合结构。左边的分图示出了整体的比较,而右边的分图示出了选择的氨基酸侧链的放大视图。图 3B 示出了嗜热脂肪地芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶 (AmyS; Protein Data Bank 登录号 1HVX) (灰色色调) 和枯草芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶 (AmyE; Protein Data Bank 登录号 1UA7) (暗色色调) 的叠合结构的立体视图。

[0022] 图 4 示出了质粒 pME630-7,其包含编码 AmyE-tr (SEQ ID NO:3) 的多核苷酸 (标记为 “SAM Y 425aa”)。该质粒包含与 SAM Y 基因共框的编码来自地衣芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶的信号序列的多核苷酸 (标记为 “pre LAT”)。

[0023] 图 5 示出了在与麦芽糖温育期间由 AmyE 催化的反应产物的 HPLC 分析。AmyE 介导的麦芽三糖合成通过转葡萄糖苷酶活性催化。

[0024] 图 6 示出了由如下条件催化的液化反应的 DE 发展 (1) **Fuelzyme<sup>®</sup>-LF**, 在 pH 4.6 下, (2) GC 358, 在 pH 5.8、108.5°C 下, 以及 (3) GC 358, 在 pH 5.25、106.7°C 下。第一个和第三个液化反应已知可产生较差的液化物, 该液化物导致正常糖化后的碘阳性淀粉。

[0025] 图 7 示出了在第 112 小时时间点时来自 (1) **Fuelzyme<sup>®</sup>-LP** 液化物、(2) GC 358 (良好蒸煮) 液化物、和 (3) GC 358 (劣质蒸煮) 液化物的糖液的碘测试结果。多种液化物的糖化条件和 AmyE 处理在实例 3 和表 2-3 中描述。

[0026] 图 8 示出了在 136 小时时间点时来自 (1) **Fuelzyme<sup>®</sup>-LF** 液化物、(2) GC 358 (良好蒸煮) 液化物、和 (3) GC 358 (劣质蒸煮) 液化物的糖液的碘测试结果。多种液化物的糖化条件和 AmyE 处理在实例 3 和表 2-3 中描述。

[0027] 图 9 示出了在 136 小时时间点时来自 (1) **Fuelzyme<sup>®</sup>-LF** 液化物、(2) GC 358 (良好蒸煮) 液化物、和 (3) GC 358 (劣质蒸煮) 液化物的糖液的沉降测试结果。多种液化物的糖化条件和 AmyE 处理在实例 3 和表 2-3 中描述。该沉降测试在实例 2 中进行了描述。

[0028] 图 10 示出了用 (1) AmyE、(2) **Clarase<sup>®</sup> L**、和 (3) **G-ZYME<sup>®</sup> G 998** 处理 4、8.5 和 24 小时的含 IPS 糖液的碘测试结果。示出了相对处理时间的 520nm 下的吸光度 (指示 IPS 的相对量)。示例性的液化条件、糖化条件和用多种  $\alpha$ -淀粉酶的处理在实例 4 和表 5 中描述。

[0029] 图 11 示出了用 (1) AmyE、(2) **Clarase<sup>®</sup> L**、和 (3) **G-ZYME<sup>®</sup> G 998** 处理 4 小时的含 IPS 糖液的碘测试结果。示例性的液化条件、糖化条件和多种  $\alpha$ -淀粉酶的处理在实例 4 和表 5 中提供。

[0030] 表 12 示出了用 AmyE 处理 8.5 和 24 小时的含 IPS 糖液的碘测试结果。示例性的液化条件、糖化条件和多种  $\alpha$ -淀粉酶的处理在实例 4 和表 5 中描述。

[0031] 图 13 描述了用 (1) AmyE、(2) **Clarase<sup>®</sup> L**、和 (3) **G-ZYME<sup>®</sup> G 998** 处理的含 IPS 糖液中的 DP1 水平。示例性的液化条件、糖化条件和多种  $\alpha$ -淀粉酶的处理在实例 4 和表 5 中描述。

[0032] 图 14 描述了用 (1) AmyE、(2) **Clarase<sup>®</sup> L**、和 (3) **G-ZYME<sup>®</sup> G 998** 处理的含 IPS 糖液中的 DP2 水平。示例性的液化条件、糖化条件和多种  $\alpha$ -淀粉酶的处理在实例 4 和表 5 中描述。

## 具体实施方式

[0033] 本发明涉及枯草芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶 (AmyE)。AmyE 或其变体可用于消除或减少糖液中存在的碘阳性淀粉 (IPS)。还公开的是包括包含 AmyE 或其变体的组合物以及利用所述 AmyE 或其变体消除或减少碘阳性淀粉的方法。

### [0034] 1. 定义和缩写

[0035] 根据此详细描述, 应用下面的缩写和定义。应该指出的是, 如本文所使用, 除非上下文另有明确指明, 否则单数形式“一个”、“一种”和“该”包括多个指代物。因此, 例如, 提及“一种酶”包括多个此种酶, 而提及“该制剂”包括提及一个或多个制剂以及本领域技术人员已知的其等同物, 等等。

[0036] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有本领域普通技术人员通常所理解的含义。下面提供如下的术语。

[0037] 1.1. 定义

[0038] 如本文所使用,“氨基酸序列”与术语“多肽”和 / 或术语“蛋白质”同义。在某些情况下,术语“氨基酸序列”与术语“肽”同义;在某些情况下,术语“氨基酸序列”与术语“酶”同义。

[0039] 如本文所用,“杂交”包括核酸链通过碱基配对与互补链结合的过程,以及如在聚合酶链反应 (PCR) 技术中进行的扩增过程。杂交的核酸可以单链或双链 DNA 或 RNA、RNA/DNA 异源双链体或 RNA/DNA 共聚物存在。如本文所用,“共聚物”指包含核糖核苷酸和脱氧核糖核苷酸二者的单核酸链。核酸包括可在“高度严格条件”下与本文所公开的核酸杂交的那些。高度严格条件定义为于 50°C 在 0.2×SSC 中或于 65°C 下在 0.1×SSC 中杂交 (1×SSC = 0.15M NaCl, 0.015M 柠檬酸钠, pH 7.0)。

[0040] 如本文所用,“核苷酸序列”或“核酸序列”指基因组、合成或重组起源的序列,且可以是双链的或单链的(不论代表正义链还是反义链)。如本文所用,术语“核酸”可以指基因组 DNA、cDNA、合成 DNA 或 RNA。核酸的残基可含有本领域中通常已知和使用的任何化学修饰。

[0041] “分离的”意指该材料至少基本上不含有至少一种与其天然相关且天然存在的其它组分。

[0042] “纯化的”意指该材料处于相对纯的状态,例如至少约 90% 纯的、至少约 95% 纯的或至少约 98% 纯的。

[0043] “热稳定的”意指酶在暴露于高温后保持活性。 $\alpha$ -淀粉酶的热稳定性由其半衰期 ( $t_{1/2}$ ) 度量,其中到半衰期时半数酶活性丧失。半衰期通过如下方式测量:测定在给定的温度下,特别是在用于具体应用的温度下,酶随时间推移而保留的特异性  $\alpha$ -淀粉酶活性。

[0044] 如本文所用,“食品”包括能够给消费者提供任何有益效果的预制食品以及用于食品的成分,如面粉。“食品成分”包括其为食品或食物或能够被加至食品或食物的制剂,包括在需要例如酸化或乳化的多种产品中以低水平使用的制剂。食品成分可以是溶液形式或作为固体,这取决于用途和 / 或应用模式和 / 或施用模式。

[0045] “寡糖”意指由 3-20 个单糖构成的碳水化合物分子。

[0046] “同源物”意指与主题氨基酸序列或主题核苷酸序列具有某种程度的同一性或“同源性”的实体。“同源序列”以“百分比同一性”的方式使用。其意在包括与主题序列具有至少 85% 序列同一性,例如与主题序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列。通常,同源物将包含与主题氨基酸序列相同的活性位点残基。

[0047] 如本文所用,“转化的细胞”包括已通过使用重组 DNA 技术进行转化的细胞。通常通过向细胞插入一个或多个核苷酸序列而进行转化。所插入的核苷酸序列可以是异源核苷酸序列,即为对于待转化的细胞而言并非天然的序列,如融合蛋白。

[0048] 如本文所用,“有效连接的”意指所述组分之间是允许它们以其预期方式发挥功能的关系。例如,与编码序列有效连接的调控序列是以使得该编码序列可在与该调控序列相容的条件下实现表达的方式连接。

[0049] 如本文所用,“生物学活性”指具有与天然存在的序列相似的结构、调节或生化功

能但不必达到相同程度的序列。

[0050] 如本文所用,“淀粉”指由植物的复杂多糖碳水化合物构成的任何材料,由具有式  $(C_6H_{10}O_5)_x$  (其中“X”可以是任何数字) 的直链淀粉和支链淀粉构成。具体地讲,该术语指任何基于植物的材料,包括但不限于谷物、草、块茎和根,更具体地讲,指小麦、大麦、玉米、黑麦、稻米、高粱、糠、木薯、小米、马铃薯、甘薯和木薯粉。

[0051] 如本文所用,“颗粒淀粉”指未经过糊化的未蒸煮过(生)的淀粉。

[0052] 如本文所用,“淀粉糊化”意指使淀粉分子增溶形成粘性悬浮液。

[0053] 如本文所用,“糊化温度”指淀粉底物发生糊化时的最低温度。确切温度取决于具体的淀粉底物,还可取决于淀粉得自的植物物种的特定品种和生长条件。

[0054] “DE”或“葡萄糖当量”为用于度量总还原糖的浓度的行业标准,计算为已转化为还原糖的总固形物的百分数。尚未被水解的颗粒淀粉的 DE 为约零(0),而 D-葡萄糖的 DE 为约 100。

[0055] 如本文所用,“淀粉底物”指使用精制淀粉、全磨谷粒或分级的谷粒的颗粒淀粉或液化淀粉。

[0056] 如本文所用,“液化淀粉”指已经历过增溶处理,例如常规的淀粉液化处理的淀粉。

[0057] 如本文所用,“葡萄糖糖浆”指含有葡萄糖固形物的含水组合物。葡萄糖糖浆将具有至少约 20 的 DE。在一些实施例中,葡萄糖糖浆可含有不超过约 21% 的水,而以葡萄糖计算含有至少约 25% 的还原糖。在一个实施例中,葡萄糖糖浆可包含至少约 90% 的 D-葡萄糖,在另一个实施例中,葡萄糖糖浆可包含至少约 95% 的 D-葡萄糖。在一些实施例中,术语葡萄糖和葡萄糖糖浆可互换使用。

[0058] 如本文所用,“可发酵糖”指能够在酵母发酵条件下被代谢的糖类。这些糖主要是指葡萄糖、麦芽糖和麦芽三糖(DP1、DP2 和 DP3)。

[0059] 如本文所用,“总糖含量”是指淀粉组合物中存在的总糖含量。

[0060] 如本文所用,“ds”是指溶液中溶解的固形物。

[0061] 如本文所用,“淀粉液化酶”是指催化颗粒淀粉的水解或分解的酶。示例性的淀粉液化酶包括  $\alpha$ -淀粉酶(EC 3.2.1.1)。

[0062] “淀粉酶”意指尤其是能够催化淀粉降解的酶。

[0063] “ $\alpha$ -淀粉酶(EC 3.2.1.1)”是指以随机方式裂解淀粉分子内部的  $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$ 4)-糖苷键的内切作用酶。相反,外切作用淀粉分解酶如  $\beta$ -淀粉酶(EC 3.2.1.2;  $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$ 4)-葡聚糖麦芽糖水解酶)和一些产物特异性淀粉酶如生麦芽糖  $\alpha$ -淀粉酶(EC 3.2.1.133) 从底物的非还原端裂解淀粉分子。这些酶也被描述成在含有 1,4- $\alpha$ -连接的 D-葡萄糖单位的多糖中实现 1,4- $\alpha$ -D-糖苷键的外切水解或内切水解的酶。用于描述这些酶的另一术语是糖原酶。示例性的酶包括  $\alpha$ -1,4-葡聚糖 4-葡聚糖水解酶。

[0064] 如本文所用,“葡糖淀粉酶”是指淀粉葡糖苷酶类的酶(EC 3.2.1.3, 葡糖淀粉酶,  $\alpha$ -1,4-D-葡聚糖葡糖水解酶)。这些酶是从直链淀粉和/或支链淀粉分子的非还原端释放葡萄糖残基的外切作用酶。这些酶也能够水解  $\alpha$ -1,6 和  $\alpha$ -1,3 键,然而速度却比水解  $\alpha$ -1,4 键慢得多。

[0065] 如本文所用, AmyE 或其变体的“转葡糖苷酶活性”的特征在于,在与麦芽糖温育时形成麦芽三糖。具体地讲,该转葡糖苷酶活性是指  $\alpha$ -1,4-葡糖基转移酶活性。

[0066] 一个“改良伍格母单位”(MWU)是指酶例如Fuelzyme<sup>®</sup>-LF的能够在标准反应条件下在30分钟内将1mg可溶淀粉水解为特定糊精的量。还可参见Diversa公司(Diversa Corp.)的网页地址:》[http://www.diversa.com/pdf/Fuelzyme-LF\\_Brochure.pdf](http://www.diversa.com/pdf/Fuelzyme-LF_Brochure.pdf)。《

[0067] 一个“FTU”(植酸酶单位)是指能够在37.2°C、pH 5.5下在一分钟内释放1 μmol的无机磷酸盐的植酸酶的量。

[0068] 如本文所用,“碘阳性糖”或“IPS”是指(1)在液化和糖化后未水解的直链淀粉或(2)回生淀粉聚合物。当用碘对糖化的淀粉或糖液进行测试时,高DP<sub>n</sub>直链淀粉或回生淀粉聚合物会结合碘并产生特征性蓝色。因而该糖液称为“碘阳性糖”、“蓝色糖”或“蓝糖”。IPS在淀粉加工应用中是非常不受欢迎的,因为其存在表明淀粉水解不完全和/或会干扰多种下游应用,例如甜味剂生产。具体地讲,IPS会阻塞或减缓过滤系统,并淤塞用于纯化的炭柱。当IPS达到充分高的水平时,其可能渗漏出炭柱而降低生产效率。另外,在储存时其可能会导致浑浊的终产品,这对终产品质量而言是不可接受的。

[0069] 如本文所用,“回生淀粉”或“淀粉回生”是指淀粉糊中自发出现的变化或老化时的胶凝。其起因于淀粉分子彼此结合随后结晶度增加的内在趋势。由于淀粉分子逐渐缔合成更大的粒子,低浓度的溶液变得愈加浑浊。自发沉淀发生,并且沉淀的淀粉看起来回复至其初始的冷水不溶性状态。较高浓度的糊在冷却时凝固成凝胶,其在老化时由于淀粉分子的不断增加缔合而变得不断更坚实。这因为相邻淀粉分子上的羟基之间有强的形成氢键的趋势而引起。参见J. A. Radley编辑, *S<sub>TARCH</sub> AND ITS D<sub>ERIVATIVES</sub>* (《淀粉及其衍生物》) 194-201 (Chapman和Hall, London(查普曼和霍尔出版社,伦敦)(1968))。

[0070] 如本文所用,“淀粉的水解”是指加入水分子时裂解糖苷键。

[0071] “聚合度(DP)”是指给定糖中脱水吡喃葡萄糖单位的数目(n)。DP1的实例是单糖,如葡萄糖和果糖。DP2的实例是二糖,如麦芽糖和蔗糖。DP4+( > DP4)表示聚合度大于4的聚合物。

[0072] 如本文所用,“接触”或“混合”是指将相应酶放置得足够接近相应底物,以使该酶能够将该底物转化为终产物。本领域技术人员将认识到将酶溶液与相应底物混合可实现接触或混合。

### [0073] 1.2. 缩写

[0074] 除非另有指明,否则应用下述缩写:

[0075]	AE	醇乙氧基化物
[0076]	AEO	醇乙氧基化物
[0077]	AEOS	醇乙氧基硫酸盐
[0078]	AES	醇乙氧基硫酸盐
[0079]	GAU	葡糖淀粉酶活性单位
[0080]	AkAA	白曲霉( <i>Aspergillus kawachii</i> ) α-淀粉酶
[0081]	AmyE	枯草芽孢杆菌 α-淀粉酶
[0082]	AmyE-tr	截短型 AmyE
[0083]	AmyE FL	全长 AmyE
[0084]	AmyL	地衣芽孢杆菌 α-淀粉酶
[0085]	AmyR	<b>SPEZYME<sup>®</sup></b> XTRA 淀粉酶

[0086]	AmyS	嗜热脂肪地芽孢杆菌 $\alpha$ -淀粉酶
[0087]	AS	醇硫酸盐
[0088]	BAA	细菌 $\alpha$ -淀粉酶
[0089]	cDNA	互补 DNA
[0090]	CMC	羧甲基纤维素
[0091]	DE	葡萄糖当量
[0092]	DI	蒸馏的,去离子的
[0093]	DNA	脱氧核糖核酸
[0094]	DP3	具有三个亚单位的聚合度
[0095]	DPn	具有 n 个亚单位的聚合度
[0096]	DS 或 ds	干固形物
[0097]	dss	干固形物淀粉
[0098]	DTMPA	二乙基三胺五乙酸
[0099]	EC	进行酶分类的酶学委员会
[0100]	EDTA	乙二胺四乙酸
[0101]	EDTMPA	乙二胺四亚甲基磷酸
[0102]	EO	环氧乙烷
[0103]	F&HC	织物和家居护理
[0104]	FTU	植酸酶单位
[0105]	g	克
[0106]	gpm	加仑每分钟
[0107]	GAU	葡糖淀粉酶单位
[0108]	HFCS	高果糖玉米糖浆
[0109]	HFSS	基于高果糖淀粉的糖浆
[0110]	HGA	灰腐质霉葡糖淀粉酶
[0111]	HPLC	高压液相色谱法
[0112]	IPS	碘阳性淀粉
[0113]	IPTG	异丙基 $\beta$ -D-硫代半乳糖苷
[0114]	IRS	不溶性残留淀粉
[0115]	kg	千克
[0116]	LA	Lauria 琼脂
[0117]	LB	Lauria 肉汤
[0118]	L1T	1 位的亮氨酸 (L) 残基被苏氨酸 (T) 残基置换,其中氨基酸由本领域
[0119]		通常已知的单字母缩写表示
[0120]	MOPS	3-(N-吗啉代)丙磺酸
[0121]	MT	公吨
[0122]	MW	分子量
[0123]	MWU	改良的伍格母单位
[0124]	NCBI	美国国家生物技术信息中心

[0125]	nm	纳米
[0126]	NOBS	壬酰基氧基苯磺酸盐
[0127]	NTA	次氨基三乙酸
[0128]	OD	光密度
[0129]	PCR	聚合酶链反应
[0130]	PEG	聚乙二醇
[0131]	pI	等电点
[0132]	ppm	份每一百万份
[0133]	psi	磅每平方英寸
[0134]	PVA	聚(乙烯醇)
[0135]	PVP	聚(乙烯吡咯烷酮)
[0136]	RAU	参考淀粉酶单位
[0137]	RMSD	均方根偏差
[0138]	RNA	核糖核酸
[0139]	RO	反渗透
[0140]	rpm	转每分钟
[0141]	SAS	仲烷基磺酸盐
[0142]	1×SSC	0.15MNaCl, 0.015M 柠檬酸钠, pH 7.0
[0143]	SSF	同时糖化和发酵
[0144]	SSU	可溶性淀粉单位, 等价于每分钟释放 1mg 葡萄糖的还原力
[0145]	TAED	四乙酰基乙二胺
[0146]	TNBS	三硝基苯磺酸
[0147]	TrGA	里氏木霉 ( <i>Trichoderma reesei</i> ) 葡糖淀粉酶
[0148]	w/v	重量 / 体积
[0149]	w/w	重量 / 重量
[0150]	wt	野生型
[0151]	μ L	微升
[0152]	μ Nm	微牛顿 × 米

## [0153] 2. AmyE 和其他 α - 淀粉酶

### [0154] 2.1. 结构和功能

[0155] α - 淀粉酶构成一组存在于微生物和来自动植物的组织中的酶。它们能够水解糖原、淀粉、相关多糖和一些寡糖的 α -1,4- 糖苷键。尽管所有 α - 淀粉酶都具有相同的催化功能, 但是它们的氨基酸序列有很大差异。不同淀粉酶之间的序列同一性可以是实质上不存在的, 例如落于约 25% 以下。尽管存在相当大的氨基酸序列变异, 但是 α - 淀粉酶具有共同的整体拓扑学模式, 该拓扑模式在测定了来自不同物种的 α - 淀粉酶的三维结构后已得以鉴别。该共同的三维结构揭示了三个结构域: (1) 称为结构域 A 的“TIM”桶, (2) 称为结构域 B 的长环区域, 其插入于结构域 A 中, 和 (3) 称为结构域 C 的接近 C 端的区域, 其含有具有 Greek-key 基序的特征性 β - 结构。

[0156] 结构域 A 的 TIM 桶由沿着肽骨架交替的八个 α - 螺旋和八个平行 β - 链, 即 (β /

$\alpha$ )<sub>8</sub>。按保守的糖酵解酶磷酸丙糖异构酶命名的该结构,已经已知在保守蛋白质折叠中是普遍的。结构域 B 是插入到  $\beta_{A3}$  和  $\alpha_{A3}$ (结构域 A 中第三个  $\beta$ -链和  $\alpha$ -螺旋)之间的环区域。结构域 A 和结构域 B 都与  $\alpha$ -淀粉酶的催化功能直接相关,因为三维结构显示结构域 A 在活性位点的旁侧且结构域从一侧覆盖活性位点。而且,结构域 A 被认为是催化结构域,因为活性位点的氨基酸残基位于连接  $\beta$ -链与邻近的  $\alpha$ -螺旋的环中。结构域 B 据信通过影响底物结合而确定酶的特异性。MacGregor 等人, *Biochim. Biophys. Acta.* (生物化学与生物物理学学报) 1546 :1-20 (2001)。

[0157] “Termamyl 样”  $\alpha$ -淀粉酶是指一组广泛用于淀粉加工产业的  $\alpha$ -淀粉酶。具有美国专利 No. 6, 440, 716 的 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列的地衣芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶可以 Termamyl<sup>®</sup> 商购获得。Termamyl 样  $\alpha$ -淀粉酶通常是指一组由芽孢杆菌属物种 (*Bacillus* spp.) 产生的高度同源的  $\alpha$ -淀粉酶。该组的其它成员包括来自嗜热脂肪地芽孢杆菌 (以前称为嗜热脂肪芽孢杆菌;两种名称在本发明中可互换使用) 和解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*) 的  $\alpha$ -淀粉酶,以及源自芽孢杆菌属物种 NCIB 12289、NCIB 12512、NCIB12513 和 DSM 9375 的那些  $\alpha$ -淀粉酶,所有这些均在美国专利 No. 6, 440, 716 和 WO 95/26397 (将其以引用的方式并入本文) 中详细描述。

[0158] 尽管  $\alpha$ -淀粉酶普遍含有上述的三个结构域,但是一些  $\alpha$ -淀粉酶如来自枯草芽孢杆菌的 AmyE 的三维结构不同于 Termamyl 样  $\alpha$ -淀粉酶。这些酶统称为非 Termamyl 样  $\alpha$ -淀粉酶。图 1 示出了来自嗜热脂肪地芽孢杆菌 (SEQ ID NO :25 ;AmyS)、地衣芽孢杆菌 (SEQ ID NO :26) 和枯草芽孢杆菌 (SEQ ID NO :27 ;AmyE) 的  $\alpha$ -淀粉酶的序列比对。通过 Kalign 2.0 程序 (可得自 <http://www.ebi.ac.uk/Tools/kalign/index.html>;还可参见 Lassmann&Sonnhammer, *BMC Bioinformatics* (BMC 生物信息学) 6 :298 (2005)) 产生该序列比对。Termamyl 样 AmyS 和 AmyL 具有大约 63% 的同一性和大约 77% 的相似性,而 AmyE 与 AmyL 或 AmyS 具有大约 15% 的同一性和低于 25% 的相似性。

[0159] 枯草芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶 (AmyE) 或其截短变体的晶体结构已被测定,其具有其它  $\alpha$ -淀粉酶的共同特征。Fujimoto 等人, *J. Mol. Biol.* (分子生物学杂志) 277 :393-407 (1998) (Protein Data Bank 登录号 1BAG);Kagawa 等人, *J. Bacteriol.* (细菌学杂志) 185 :6981-84 (2001) (Protein Data Bank 登录号 1UA7)。将 AmyE 的晶体结构与那些“Termamyl 样  $\alpha$ -淀粉酶”比较是特别有意义的。如图 2 所示,可通过比较 AmyE 与 AmyS 之间的三维结构而鉴定共同的拓扑模式。两种淀粉酶均显示相似的具有三个结构域的总体结构。分别参见例如 Protein Data Bank 登录号 1UA7 和 1HVX。

[0160] 然而,对 AmyS、AmyL 和 AmyE 的三维结构的仔细检查揭示 AmyE 与 Termamyl 样  $\alpha$ -淀粉酶之间存在相当大的结构差异。当将 AmyS 和 AmyL 叠合在一起时,对于这三个结构域的每一者这两种淀粉酶几乎重叠。显著差异仅存在于氨基酸侧链水平。参见图 3A。另一方面,图 3B 提供了叠合了的 AmyS 和 AmyE 的三维结构。AmyS 与 AmyE 之间存在相当大的结构差异。最引人注目的差异可能位于结构域 B 中。由于通常认为结构域 B 形成催化位点的大部分,所以预期 AmyE 可能会显示不同于 Termamyl 样  $\alpha$ -淀粉酶的酶性质。

[0161] 通过基于给定的三维比对来测定均方根偏差 (RMSD),可以获得结构相似性的更具定量性的量度。参见 Maiorov&Crippen, *J. Mol. Biol.* (分子生物学杂志) 235 :625-634 (1994)。RMSD 是叠合的蛋白质的骨架之间的平均距离的量度,并可计算如下:

$$[0162] \quad RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \delta_i^2}$$

[0163] 其中  $\delta_i$  代表 N 对等价原子 (例如  $\alpha$  碳原子) 中第  $i$  对之间的距离。通常, 可通过在最佳刚体结构叠合后  $\alpha$  碳原子坐标的 RMSD 来度量三维结构的相似性。当 AmyL (Protein Data Bank 登录号 1BLI) 的三维结构与 AmyS (Protein Data Bank 登录号 1HVX) 的三维结构叠合时, 基于 PyMOL (可得自 <http://pymol.org>), 419 个氨基酸残基中 RMSD 为 0.408 埃。然而, AmyE (Protein Data Bank 登录号 1UA7) 与 AmyS (Protein Data Bank 登录号 1HVX) 之间的三维结构比较在 311 个氨基酸残基中产生 8.134 埃的 RMSD。

#### [0164] 2.2. AmyE 和变体

[0165] 本发明提供了 AmyE 酶及其变体, 它们可用于进行本文所公开的应用。还提供了编码 AmyE 及其变体的核酸, 还提供了包含该核酸的载体和宿主细胞。

[0166] 用于本发明目的的“AmyE”意指天然存在的来自枯草芽孢杆菌的  $\alpha$ -淀粉酶 (EC 3.2.1.1; 1,4- $\alpha$ -D-葡聚糖葡聚糖水解酶)。代表性的 AmyE 序列在 SEQ ID NO:1 或 9 中列出。示于 SEQ ID NO:1 中的 AmyE 的氨基酸序列是不含天然信号序列的成熟形式的氨基酸序列。示于 SEQ ID NO:9 中的 AmyE 的氨基酸序列含有 41 个氨基酸残基的信号序列。此 AmyE 的天然信号序列的氨基酸序列示于 SEQ ID NO:17 中。此 AmyE 的成熟形式在本发明的其它地方被称为“全长 AmyE”。使用具有默认比对参数的 BLAST 序列比对算法, 其它 AmyE 序列与 SEQ ID NO:1 的 AmyE 具有至少约 80%、约 85%、约 90%、约 95% 或约 98% 的序列同一性。例如, 在 UniProtKB/TrEMBL 登录号 082953 (SEQ ID NO:5) 中公开的称为 Amy31A 的 AmyE 与 SEQ ID NO:1 的 AmyE 具有 86% 的序列同一性。SEQ ID NO:5 的 N 端 45 个氨基酸残基是 Amy31A 的信号序列。AmyE 酶包括但不限于具有在 NCBI 登录号 ABW75769 中公开的氨基酸序列 (SEQ ID NO:10) 的 AmyE。更多的 AmyE 蛋白质序列包括在 NCBI 登录号 ABK54355 (SEQ ID NO:11)、AAF14358 (SEQ ID NO:12)、AAT01440 (SEQ ID NO:13)、AAZ30064 (SEQ ID NO:14)、AAQ83841 (SEQ ID NO:15) 和 BAA31528 (SEQ ID NO:16) 中公开的那些 AmyE 蛋白质序列。

[0167] AmyE “变体”包含天然存在的 AmyE 序列的氨基酸序列修饰。如本文中所示, 天然存在的 AmyE 也是“亲本酶”、“亲本序列”、“亲本多肽”或“野生型 AmyE”。氨基酸修饰可包括氨基酸置换、添加或缺失。AmyE 变体中的氨基酸修饰可以是天然突变的结果, 或是用本领域中熟知的用于该方法的一种对氨基酸序列进行有意修饰的结果 (下面进一步描述)。代表性的 AmyE 变体在于 2009 年 6 月 5 日提交的美国临时申请 12/479,427 中公开, 将其全部内容以引用的方式全文并入本文。

[0168] 除非另有说明, 否则 AmyE 变体具有至少一个氨基酸修饰, 但该变体仍保留与 SEQ ID NO:1 的 AmyE 的至少约 80%、约 85%、约 90%、约 95% 或约 98% 的氨基酸序列同一性, 所述同一性通过使用默认比对参数的 BLAST 蛋白质序列比对来测量。例如, 与 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列相比, 变体可具有一个、两个、三个、至多五个、至多十个或至多 20 个氨基酸置换。通常, 对生物学功能非必需的氨基酸残基进行修饰。待修饰的氨基酸残基的选择可通过 AmyE 序列之间的序列同源性来指导。一般来说, AmyE 序列中很保守的氨基酸很有可能对生物活性是必需的。相反地, AmyE 序列中变化的氨基酸位置不太可能对生物活性是必需的。

[0169] 变体 AmyE 可与天然存在的 AmyE 在 B 结构域内 (例如 SEQ ID NO:1 的氨基酸残

基 101-151) 显示出显著的结构同一性。在一个实施例中,变体 AmyE 可包含关于天然存在的 AmyE 的 B 结构域的氨基酸残基的 1-3 个氨基酸置换。在另一个实施例中,变体 AmyE 可具有与天然存在的 AmyE 的三维结构重叠(整体或仅 B 结构域重叠)(平均在 2 埃内)的三维结构。

[0170] 在一些实施例中,与亲本酶的性质相比变体 AmyE 可显示一种或多种改变的性质。该改变的性质可导致与其亲本相比改良的变体性能。这些性质可包括底物特异性、底物结合、底物切割模式、热稳定性、pH/ 活性曲线、pH/ 稳定性曲线、针对氧化的稳定性、在较低水平的钙离子 ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 下的稳定性和 / 或比活。

[0171] AmyE 或其变体可作为融合蛋白表达,该融合蛋白在 AmyE 成熟形式的 N 端和 / 或 C 端包含便于表达、检测和 / 或纯化的序列(例如信号序列或 His- 标签)。这类序列包括信号序列,其促进 AmyE 在宿主生物中的分泌与表达。额外的氨基酸残基可在信号序列切除之后从 AmyE 的 N 端切除,如在 Yang 等人,“Nucleotide sequence of the amylase gene from *Bacillus subtilis*,”*Nucleic Acids Res.* (“枯草芽孢杆菌淀粉酶基因的核苷酸序列”,核酸研究) 11:237-49 (1983) 中论述的。AmyE 的“成熟形式”定义为表达的 AmyE 序列的所有此类翻译后修饰的产物。存在于初级翻译产物的 N 端的可以被切除以形成成熟 AmyE 的序列,可以可选择地称作“信号序列”、“前导序列”或“前序列”。

[0172] 该信号序列可以由与 AmyE 相同的基因编码。例如,SEQ ID NO:1 中所示的 AmyE 天然地与具有序列 MFAKRFKTSLPLFAGFLLL FHLVLAGPAAASAETANKSNE (SEQ ID NO:17) 的信号序列和另外的 N 末端氨基酸一起表达。作为另一种选择,信号序列可以是来自不同 AmyE 或甚至不同蛋白质的枯草芽孢杆菌物种信号序列。另外,信号序列可以来自不同物种,例如地衣芽孢杆菌。可以选择信号序列以例如提供 AmyE 或其变体在特定宿主细胞中的最佳表达。可以通过自 N 末端蛋白水解裂解非信号序列的额外序列,而产生成熟 AmyE。例如,来自地衣芽孢杆菌的 31- 氨基酸残基信号序列 (“LAT 前导序列”) 可以与 AmyE 序列在框内融合。

[0173] 与天然存在的 AmyE 相比,用于本发明目的的 AmyE 变体具有至少部分或类似的 1, 4- $\alpha$ -D- 葡聚糖葡聚糖水解酶活性。此外,与具有 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的 AmyE 相比,用于本发明目的的 AmyE 变体还可具有类似水平的转葡萄糖苷酶活性。基于麦芽三糖自麦芽糖的酶促合成可测量该转葡萄糖苷酶活性,如实例 2 中所述。变体可具有与天然存在的 AmyE 相同的活性和性质,或者与具有 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的 AmyE 相比变体可具有改变的性质。该改变的性质可以是改变的(例如高两倍或三倍的)对麦芽七糖和 / 或麦芽三糖底物的比活。作为另外一种选择或除此之外,可以改变蛋白质的热稳定性。例如,变体可以比 AmyE 具有更高热稳定性。作为另外一种选择或除此之外该改变的性质可以是酶活性的最适 pH。例如,变体可具有更酸或更碱的最适 pH。

[0174] “截短型”AmyE (“AmyE-tr”) 意指具有 C 端淀粉结合结构域的全部或部分的序列缺失的 AmyE。例如,在 SEQ ID NO:3 的 AmyE-tr 中,SEQ ID NO:1 的 AmyE 在残基 D425 处被截短。该 AmyE-tr 的 2.5 Å 分辨率晶体结构可得自 Protein Databank 登录号 1BAG,其公开于 Fujimoto 等人,“Crystal structure of a catalytic-site mutant alpha-amylase from *B. subtilis* complexed with maltopentaose,”*J. Mol. Biol.* (“枯草芽孢杆菌与麦芽五糖络合的催化位点突变的  $\alpha$ - 淀粉酶的晶体结构”,分子生物学杂志) 277:393-407 (1998)。AmyE-tr 可在其它位置,例如 SEQ ID NO:1 的 AmyE 的 Y423、P424、D426 或 I427 处被截短,

前提是 C 端淀粉结合结构域的全部或部分被移除。

[0175] 编码 AmyE 或其变体的核酸包括但不限于 SEQ ID NO :2 和 SEQ ID NO :4 中公开的多核苷酸,其分别编码 SEQ ID NO :1 的 AmyE 和 AmyE-tr (SEQ ID NO :3)。更多的代表性多核苷酸包括公开于 SEQ ID NO :6 中的多核苷酸,其编码 Amy31A (SEQ ID NO :5)。NCBI 登录号 ABK54355、AAF14358、AAT01440、AAZ30064、NP\_388186、AAQ83841 和 BAA31528 中公开的 AmyE 同样可以由可公开访问的数据库中公开的多核苷酸编码,将这些多核苷酸序列以引用的方式并入本文。核酸可以是 DNA、mRNA 或 cDNA 序列。核酸还包括任何前述核酸的“简并序列”。简并序列含有至少一个这样的密码子,该密码子与上述核酸序列编码同一氨基酸残基但具有不同的核苷酸序列。例如,核酸包括编码 AmyE 或其变体的任何核酸序列。可设计简并序列,通过使用特定宿主生物偏好的密码子来实现最佳表达。

[0176] 还提供了包含编码 AmyE 或其变体的核酸的载体。提供了包含该载体的宿主细胞。该宿主细胞可表达编码 AmyE 变体的多核苷酸。该宿主可以是芽孢杆菌属物种,例如枯草芽孢杆菌。

### [0177] 2.3. AmyE 变体的表征

[0178] AmyE 变体可以通过其核酸和一级多肽序列、通过 3D 结构建模和 / 或通过其比活来表征。AmyE 变体的另外的特征包括稳定性、Ca<sup>2+</sup> 依赖性、pH 范围、氧化稳定性和热稳定性。在一个方面,AmyE 变体以比野生型 AmyE 更高的水平表达,同时保留了野生型 AmyE 的性能特征。可使用本领域技术人员已知的标准测定法来评估表达和酶活性的水平。在另一方面,相对于野生型酶变体表现出改良的性能特征,如在高温下改良的稳定性或在多种 pH 值 (例如 pH 4.0 至 6.0 或 pH 8.0 至 11.0) 下改良的活性。

[0179] 与 AmyE 相比,AmyE 变体可在宿主细胞中以改变的水平表达。表达通常涉及,经过给定时间,使用本领域已知的标准技术可从发酵液回收的活性变体的量。表达也可以涉及在宿主细胞内产生的或由宿主细胞分泌的变体的量或速率。表达还可涉及编码变体酶的 mRNA 的翻译速率。

[0180] 在又一方面,某些突变呈现改变的稳定性或比活,尤其是在约 60°C (例如约 50 至约 70°C) 左右的温度下,例如以用于消除或减少碘阳性淀粉和 / 或处理蓝色糖。变体可以具有在其它温度下的改变的稳定性或比活,这取决于该变体是否将用于其它应用或组合物。

[0181] 与亲本 AmyE 相比,AmyE 变体还可具有改变的氧化稳定性,特别是更高的氧化稳定性。例如,在洗涤组合物中增加的氧化稳定性是有利的,而在用于淀粉液化的组合物中降低的氧化稳定性是有利的。

[0182] 本文所述的 AmyE 变体也可以具有突变,相对于亲本酶所述突变导致半衰期延长约 10%、约 20%、约 30%、约 40%、约 50%、约 60%、约 70%、约 80%、约 90%、约 100%、约 200% 或更多,特别是在约 55°C 至约 95°C 或更高的高温下,尤其是在约 80°C 下。

[0183] AmyE 变体可具有外切特异性,例如,通过本文所述的外切特异性指数所度量的。AmyE 变体包括,与其所源自的亲本酶或多肽相比,任选当在相同条件下测量时,具有更高或增加的外切特异性的那些变体。因此,例如,与其亲本多肽相比,AmyE 变体多肽可具有约 10%、约 20%、约 30%、约 40%、约 50%、约 60%、约 70%、约 80%、约 90%、约 100%、约 150%、约 200%、约 500%、约 1000%、约 5000%、约 10,000% 或更高的外切特异性指数。

[0184] 在一方面,AmyE 变体具有与亲本序列相同的 pH 稳定性。在另一方面,出于酶的最

终商业目的,变体包含赋予更高的 pH 稳定性范围或将 pH 范围改变至期望区域的突变。例如,在一个实施例中,变体可以在约 pH5.0 至约 pH 10.5 下降解淀粉。在相同条件下与亲本多肽相比 AmyE 变体多肽可具有更长的半衰期或更高的活性(取决于测定法),或 AmyE 变体可具有与亲本多肽相同的活性。在相同 pH 条件下,与其亲本多肽相比, AmyE 变体多肽也可具有约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200% 或更长的半衰期。作为另外一种选择,或此外,在相同 pH 条件下,与亲本多肽相比, AmyE 变体可具有更高的比活。

[0185] 在另一方面,提供与编码任何本文所述 AmyE 变体的核酸互补的核酸。另外,提供了能够与该互补核酸杂交的核酸。在另一个实施例中,用于本文所述的方法和组合物中的序列是合成的序列。其包括但不限于经制备而具有最佳密码子选择以在特定宿主生物中的表达的序列。

### [0186] 3. $\alpha$ -淀粉酶的生产

[0187] 使用通常包括编码合适的启动子、操纵子、核糖体结合位点、翻译起始信号和任选的阻遏基因或多个激活基因的控制序列的表达载体,可以以酶形式表达通过本文所述的方法或通过本领域已知的备选方法制备的编码  $\alpha$ -淀粉酶的 DNA 序列。

#### [0188] 3.1. 载体

[0189] 携带编码  $\alpha$ -淀粉酶的 DNA 序列的重组表达载体可以是能够方便接受重组 DNA 操作的任何载体,载体的选择通常取决于其待引入的宿主细胞。因此,该载体可以是自主复制载体,即作为染色体外实体存在的载体,其复制不依赖于染色体复制,例如,质粒、噬菌体或染色体外元件、微型染色体或人工染色体。或者,载体可以是当其被引入宿主细胞中时被整合进宿主细胞基因组中并与整合其的染色体一起复制的载体。通过使用由抗生素选择或其它选择压力(如必需的调节基因)驱动的或由对必需代谢途径基因的补充而驱动的可扩增构建体,也可以扩增该整合的基因以产生染色体中该基因的多个拷贝。

[0190] 表达载体通常包含克隆载体的组分,例如,在选择的宿主生物中允许载体自主复制的元件和用于选择目的的一个或多个表型可检测标记。表达载体通常包含编码启动子、操纵子、核糖体结合位点、翻译起始信号和任选的阻遏基因或一个或多个激活基因的控制核苷酸序列。在一个方面,使用的全部信号序列将物质靶向至细胞培养基以方便酶收集和任选的纯化。用于分别连接编码所述  $\alpha$ -淀粉酶的 DNA 构建体、启动子、终止子和其它元件的操作,和用于将它们插入含有复制必需信息的合适载体的操作是本领域技术人员众所周知的(参见例如, Sambrook 等人, *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL* (《分子克隆实验室手册》), 第 2 版, Cold Spring Harbor (冷泉港实验室出版社), 1989, 以及第 3 版 2001)。

[0191] 载体中, DNA 序列应该被有效连接于合适的启动子序列。该启动子可以是在选择的宿主细胞中显示转录活性的任何 DNA 序列,并且可以源自编码与宿主细胞同源或异源的蛋白质的基因。适用于引导编码本文所述  $\alpha$ -淀粉酶的 DNA 序列的转录(特别是在细菌宿主中的转录)的启动子包括多种芽孢杆菌属来源的启动子,如源自枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、嗜热脂肪地芽孢杆菌或解淀粉芽孢杆菌的  $\alpha$ -淀粉酶启动子、大肠杆菌的 lac 操纵子的启动子、天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) 琼脂糖酶基因 dagA 或 celA 启动子和枯草芽孢杆菌 xylA 和 xylB 基因的启动子等。对于真菌宿主中的转录,可用的启动子的实例是源自编码米曲霉 TAKA 淀粉酶、米赫根毛霉 (*Rhizomucor miehei*) 天冬氨酸蛋白酶、黑

曲霉中性  $\alpha$ -淀粉酶、黑曲霉酸稳定性  $\alpha$ -淀粉酶、黑曲霉葡萄糖淀粉酶、米赫根毛霉脂肪酶、米曲霉碱性蛋白酶、米曲霉磷酸丙糖异构酶或构巢曲霉 (*A. nidulans*) 乙酰胺酶的基因的启动子。当在诸如大肠杆菌之类的细菌物种中表达编码本文所述  $\alpha$ -淀粉酶的基因时,可以例如从噬菌体启动子(包括 T7 启动子和  $\lambda$  噬菌体启动子)选择合适的启动子。适用于在酵母物种中表达的启动子的实例包括但不限于酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的 Gal 1 和 Gal 10 启动子以及巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 的 AOX1 和 AOX2 启动子。

[0192] 表达载体也可包含与编码  $\alpha$ -淀粉酶变体的 DNA 序列有效连接的合适的转录终止子以及,在真核生物中,多腺苷酸化序列。终止序列和多腺苷酸化序列可适宜地源自与启动子相同的来源。载体还可包含使得载体能在所考虑的宿主细胞中复制的 DNA 序列。这类序列的实例是质粒 pUC19、pACYC177、pUB110、pE194、pAMB1、pICatH 和 pIJ702 的复制起点。

[0193] 载体还可包含选择标记,例如其产物能补足宿主细胞中的缺陷的基因,如来自枯草芽孢杆菌或地衣芽孢杆菌的 *dal* 基因,或者赋予抗生素抗性(例如氨苄青霉素、卡那霉素、氯霉素或四环素抗性)的基因。此外,载体可包含曲霉属 (*Aspergillus*) 选择标记,如 *amdS*、*argB*、*niaD* 和 *xxsC*(产生潮霉素抗性的标记),或者可通过本领域已知的共转化实现选择。参见例如 WO 91/17243。

### [0194] 3.2 变体表达和宿主生物

[0195] 当在宿主细胞中表达时,如果  $\alpha$ -淀粉酶被分泌进培养基中则通常是有利的。为此目的, $\alpha$ -淀粉酶可包含允许所表达的酶分泌进培养基中的信号序列。如果需要,可用不同的信号序列代替初始信号序列,这可以通过编码各自信号序列的 DNA 序列的置换方便地实现。例如,编码 AmyE 的核酸在示于图 4 的表达载体中与地衣芽孢杆菌信号序列有效连接。信号序列在上文更详细地进行了论述。

[0196] 包含 DNA 构建体或表达载体的分离的细胞可在重组生产  $\alpha$ -淀粉酶中用作宿主细胞。可用编码  $\alpha$ -淀粉酶的 DNA 构建体,任选通过将该 DNA 构建体(以一个或多个拷贝)整合进宿主染色体中来转化细胞。通常认为这种整合是有利的,因为 DNA 序列更有可能在细胞中稳定地维持。可根据常规方法,例如通过同源或异源重组,实现 DNA 构建体整合进宿主染色体中。作为另外一种选择,可用与不同类型的宿主细胞有关的上述表达载体对细胞进行转化。

[0197] 合适的细菌宿主生物的实例为革兰氏阳性细菌物种,如芽孢杆菌科 (*Bacillaceae*),包括枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌 (*B. lentus*)、短芽孢杆菌 (*B. brevis*)、嗜热脂肪芽孢杆菌、嗜碱芽孢杆菌 (*B. alkalophilus*)、解淀粉芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌 (*B. coagulans*)、灿烂芽孢杆菌 (*B. lautus*)、巨大芽孢杆菌 (*B. megaterium*) 和苏云金芽孢杆菌 (*B. thuringiensis*);链霉菌属 (*Streptomyces* sp.) 物种,如鼠灰链霉菌 (*S. murinus*);乳酸细菌物种,包括乳球菌属物种 (*Lactococcus* sp.),如乳酸乳球菌 (*L. lactis*);乳杆菌属物种 (*Lactobacillus* sp.),包括罗伊氏乳杆菌 (*L. reuteri*);明串珠菌属物种 (*Leuconostoc* sp.);片球菌属物种 (*Pediococcus* sp.);和链球菌属物种 (*Streptococcus* sp.)。其它可用的宿主包括例如,芽孢杆菌属物种 A 7-7。作为另外一种选择,可以选择属于肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*)(包括大肠杆菌)或者属于假单胞菌科 (*Pseudomonadaceae*) 的革兰氏阴性细菌物种的菌株作为宿主生物。

[0198] 合适的酵母宿主生物可以选自生物技术相关的酵母物种,例如但不限于毕赤酵母属物种 (*Pichia* sp.)、汉逊酵母属物种 (*Hansenula* sp.)、克鲁维酵母属物种 (*Kluyveromyces* sp.)、耶氏酵母属物种 (*Yarrowinia* sp.)、酵母菌属物种 (*Saccharomyces* sp.) (包括酿酒酵母) 或属于裂殖酵母属 (*Schizosaccharomyces*) 的物种 (如粟酒裂殖酵母 (*S. pombe*)。甲基营养酵母物种巴斯德毕赤酵母的菌株可以用作宿主生物。或者,宿主生物可以是汉逊酵母属物种。丝状真菌中合适的宿主生物包括曲霉属的物种,例如黑曲霉、米曲霉、塔宾曲霉 (*Aspergillus tubigenis*)、泡盛曲霉 (*Aspergillus awamori*) 或构巢曲霉。作为另外一种选择,镰孢菌属 (*Fusarium*) 物种,如尖孢镰孢菌 (*Fusarium oxysporum*) 或根毛霉属 (*Rhizomucor*) 物种,如米赫根毛霉,可以用作宿主生物。其他合适的酵母包括嗜热丝孢菌属 (*Thermomyces*) 物种和毛霉属 (*Mucor*) 物种。真菌细胞可以通过涉及原生质体形成和原生质体的转化、接着再生细胞壁的方法以本领域已知的方式进行转化。转化曲霉属宿主细胞的示例性程序描述在例如 EP238023 中。

[0199] 在又一个方面,提供生产  $\alpha$ -淀粉酶的方法,该方法包括在有利于变体生产的条件下培养上述宿主细胞,并从该细胞和 / 或培养基回收变体。用于培养细胞的培养基可以是任何适于培养所考虑的宿主细胞和获得  $\alpha$ -淀粉酶表达的常规培养基。合适的培养基和培养基组分可获自商业供应商或可根据公布的配方 (例如,如在美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 的目录中所述的配方) 制备。示例性的培养基包括但不限于用于在三千升 (3,000L) 搅拌式发酵罐中进行补料分批发酵的那些培养基。在该情况下生长培养基可由作为有机化合物来源的玉米浆固形物和大豆粉连同作为钠、钾、磷酸盐、镁和硫酸盐的来源的无机盐以及痕量元素组成。通常,碳水化合物来源如葡萄糖也是初始培养基的一部分。一旦培养物自身已建立并开始生长,则如本领域已知的那样向罐中定量供应碳水化合物以维持该培养物。定期从发酵罐中移出样品以利用例如比色测定法来测量酶滴定量。根据测量结果,当酶产生速率停止增加时终止发酵过程。

[0200] 可通过公知的程序从培养基中方便地回收分泌自宿主细胞的  $\alpha$ -淀粉酶,所述法包括通过离心或过滤从培养基中分离细胞,以及借助于诸如硫酸铵之类的盐沉淀培养基中的蛋白质组分,随后使用诸如离子交换层析、亲和层析等之类的层析方法。

[0201] 可在允许  $\alpha$ -淀粉酶表达的合适条件下培养宿主细胞。蛋白质的表达可以是组成型的使得它们可以连续生产,或可以是诱导型的,从而需要刺激物来引发表达。在诱导型表达的情况下,例如,可以在需要时通过向培养基中添加诱导物质 (例如地塞米松、IPTG 或 Sepharose) 来引发蛋白质产生。也可以在体外无细胞体系 (如 Tn™ (Promega) 兔网织红细胞体系) 中重组生产多肽。

[0202] 也可以在有氧条件下在适合宿主的培养基中培养用于表达  $\alpha$ -淀粉酶的宿主。可以提供振荡或者搅拌和通风的组合,在适合该宿主的温度例如约 30°C 至约 75°C 下进行生产,这取决于宿主的需要以及生产所需  $\alpha$ -淀粉酶变体的需要。可以培养约 12 至约 100 小时或更长 (以及其间的任何时间值) 或更具体地为约 24 至 72 小时。通常,培养液的 pH 为约 5.5 至约 8.0,这也取决于关于所需  $\alpha$ -淀粉酶的生产宿主细胞所需的培养条件。

[0203] 表达的酶的淀粉分解活性可例如使用马铃薯淀粉作为底物来测定。该方法是基于酶对改性马铃薯淀粉的降解,此反应之后将淀粉 / 酶溶液的样品与碘溶液混合。初始时,形成黑蓝色,但在淀粉降解期间,该蓝色变淡并且逐步变成赤褐色 (与有色玻璃标准相比)。

#### [0204] 4. $\alpha$ -淀粉酶的纯化

[0205] 可以使用常规方法以制备纯化的本文所述  $\alpha$ -淀粉酶。发酵后,获得发酵液,并通过常规分离技术除去微生物细胞和各种悬浮的固形物(包括残留的发酵原料)以获得淀粉酶溶液。通常使用过滤、离心、微滤、转鼓真空过滤、随后进行的超滤、提取或色谱法等。

[0206] 期望浓缩含有表达的本文所述  $\alpha$ -淀粉酶的溶液,因为使用未浓缩的溶液可能需增加温育时间来收集含有纯化酶的沉淀物。用常规技术浓缩溶液直至获得所需的酶水平。可通过上文论述的任何技术实现含酶溶液的浓缩。在一个实施例中,使用旋转真空蒸发和/或超滤。备选地,可使用超滤。

[0207] 用于纯化目的的所谓“沉淀剂”意指有效从溶液沉淀本文所述  $\alpha$ -淀粉酶的化合物,不管该沉淀物性质如何,即晶体、无定形物或两者共混物。可以使用例如金属卤化物沉淀剂进行沉淀。金属卤化物沉淀剂包括:碱金属氯化物、碱金属溴化物和这些金属卤化物中两种或更多种的共混物。金属卤化物可选自氯化钠、氯化钾、溴化钠、溴化钾和这些金属卤化物中两种或更多种的共混物。适合的金属卤化物包含氯化钠和氯化钾,尤其是氯化钠,其还可用作防腐剂。在常规测试后,实现最大回收率的沉淀条件(包括温育时间、pH、温度和本文所述  $\alpha$ -淀粉酶的浓度)的选择对本领域普通技术人员将是显而易见的。

[0208] 一般而言,向浓缩的酶变体溶液添加至少约 5% w/v(重量/体积)至约 25% w/v 的金属卤化物,通常是至少约 8% w/v。一般而言,向浓缩的酶变体溶液添加不超过约 25% w/v 的金属卤化物,通常是不超过约 20% w/v。金属卤化物沉淀剂的最适浓度将取决于尤其是本文所述的具体  $\alpha$ -淀粉酶的性质以及其在溶液中的浓度。

[0209] 实现酶沉淀的另一备选方法是使用有机化合物,可将其添加至浓缩的酶变体溶液。示例性的有机化合物沉淀剂包括:4-羟基苯甲酸、4-羟基苯甲酸的碱金属盐、4-羟基苯甲酸的烷基酯以及这些有机化合物中两种或更多种的共混物。所述有机化合物沉淀剂的添加可以在添加金属卤化物沉淀剂之前、与其同时或在其后发生,并且两种沉淀剂(有机化合物和金属卤化物)的添加可相继进行或同时进行。关于进一步的描述,例如,请参见例如颁给美国丹尼斯克公司杰能科子公司(Danisco US, Inc., Genencor Division)的美国专利 No. 5,281,526。

[0210] 通常,有机化合物沉淀剂选自4-羟基苯甲酸的碱金属盐(如钠或钾盐)和4-羟基苯甲酸的直链或支链烷基酯(其中烷基含有1至12个碳原子)以及这些有机化合物中两种或更多种的共混物。有机化合物沉淀剂可以是例如4-羟基苯甲酸的直链或支链烷基酯(其中烷基含有1至10个碳原子)以及这些有机化合物中两种或更多种的共混物。适合的有机化合物包含4-羟基苯甲酸的直链烷基酯(其中烷基含有1至6个碳原子)以及这些有机化合物中两种或更多种的共混物。也可以使用4-羟基苯甲酸的甲基酯、4-羟基苯甲酸的丙基酯、4-羟基苯甲酸的丁基酯、4-羟基苯甲酸的乙基酯以及这些有机化合物中两种或更多种的共混物。另外的有机化合物还包括但不限于4-羟基苯甲酸甲酯(甲基 PARABEN)和4-羟基苯甲酸丙酯(丙基 PARABEN),它们也是淀粉酶防腐剂。就 pH、温度、酶浓度、沉淀剂浓度和温育时间而言,添加这类有机化合物沉淀剂提供了沉淀条件高度灵活性的优势。通常,向浓缩的酶变体溶液添加至少 0.01% w/v 的有机化合物沉淀剂,通常至少 0.02% w/v。一般而言,向浓缩的酶变体溶液添加不超过 0.3% w/v 的有机化合物沉淀剂,通常不超过 0.2% w/v。

[0211] 可以调节含有金属卤化物沉淀剂和,在一个方面,有机化合物沉淀剂的浓缩酶溶液的 pH,该 pH 可取决于待纯化的酶变体。通常,将 pH 调节至淀粉酶等电点 (pI) 附近的水平。例如,将 pH 调整至处于低于 pI 约 2.5 个 pH 单位至高于 pI 约 2.5 个 pH 单位的范围内。如果变体的 pI 不同于野生型的 pI,则可以相应地调整该 pH。

[0212] 获得纯化的酶沉淀物所需的温育时间取决于具体酶的性质、酶浓度以及具体沉淀剂及其浓度。通常,有效沉淀酶变体的时间介于约 1 至约 30 小时之间;通常不超过约 25 小时。在存在有机化合物沉淀剂的情况下,温育时间还可以减至低于约 10 小时,在大多数情况下甚至是约 6 小时。

[0213] 通常,温育期间的温度介于约 4°C 至约 50°C 之间。通常,在约 10°C 至约 45°C 之间,尤其是在约 20°C 至约 40°C 之间的温度下进行所述方法。用于诱导沉淀的最佳温度根据溶液条件和酶或所用的沉淀剂而变化。

[0214] 通过搅拌包含酶、添加的金属卤化物和添加的有机化合物的溶液来改善纯化的酶沉淀物的总回收率以及该方法的实施效率。在添加金属卤化物和有机化合物期间,以及在随后的温育期期间进行搅拌步骤。合适的搅拌方法包括机械搅拌或振荡、强力通风或任何类似的技术。

[0215] 可以通过常规分离技术,如过滤、离心、微滤、旋转真空过滤、超滤、压滤、交叉膜微滤、交叉流膜微滤等,进一步对纯化的酶进行纯化。交叉膜微滤可以是所用的一种方法。可以通过用水洗涤沉淀物获得对纯化的酶沉淀物的进一步纯化。例如,用含有金属卤化物沉淀剂的水、例如用含有金属卤化物和有机化合物沉淀剂的水来洗涤纯化的酶沉淀物。

[0216] 培养期间,表达的酶可以积聚在培养液中。为了分离和纯化所表达的酶,可将培养液离心或过滤以除去细胞,并可将所得的无细胞液体用于酶的纯化。在一个实施例中,使用约 70% 饱和度的硫酸铵对该无细胞培养液进行盐析;然后将该 70% 饱和度沉淀级分溶解于缓冲液中并施加至诸如 Sephadex G-100 柱之类的柱上,洗脱以回收酶活性级分。为了进一步的纯化,可使用诸如离子交换色谱之类的常规方法。

[0217] 纯化的酶可用于通常利用该酶的所有应用中。例如,它们可用于衣物洗涤剂 and 除渍剂,用于食品工业,用于淀粉加工和烘焙,以及作为消化助剂用于药物组合物。可以将它们制成液体(溶液、浆液)或固体(颗粒、粉末)形式的终产品。

[0218] 作为另外一种选择,可以回收酶产物,并向培养基添加絮凝剂以便通过过滤或离心除去细胞和细胞碎片,而无需进一步对酶进行纯化。

[0219] 通过上述方法生产和纯化的  $\alpha$ -淀粉酶可用在多种有用的工业应用中。该酶具有便于织物和家居护理 (F&HC) 相关应用的有价值的特性。例如,本文所述的  $\alpha$ -淀粉酶可用作洗涤、盘碟洗涤和硬表面清洁洗涤剂组合物中的组分。本文所述的  $\alpha$ -淀粉酶也可用于由淀粉生产甜味剂和乙醇,和 / 或用于纺织品退浆。本文所述的  $\alpha$ -淀粉酶在淀粉转化工艺(包括淀粉液化和 / 或糖化工艺)中尤其有用,如在例如 W0 2005/111203 和于 2006 年 1 月 19 日公布的美国已公布专利申请 No. 2006/0014265 (美国丹尼斯克公司杰能科子公司 (Danisco US, Inc., Genencor Division)) 中所述。下文更详细地描述了所述  $\alpha$ -淀粉酶的这些用途。

[0220] 5.  $\alpha$ -淀粉酶在淀粉加工中的应用

[0221] 5.1. 液化和糖化

[0222] 在一个方面,具有  $\alpha$ -淀粉酶的组合物可用于淀粉加工,例如液化和/或糖化。该工艺可包括在低于颗粒淀粉初始糊化温度的温度下,将糊化的淀粉或颗粒淀粉的浆料,特别是将颗粒淀粉水解成可溶性淀粉水解产物。淀粉加工可用于生产甜味剂、生产用于燃料或饮用的醇(即可饮用醇)、生产饮料、加工蔗糖或生产所需的有机化合物(例如柠檬酸、衣康酸、乳酸、葡糖酸、酮类、氨基酸、抗生素、酶、维生素和激素)。将淀粉转化为果糖糖浆通常由三个连续的酶促处理组成:液化处理、糖化处理以及异构化处理。

[0223] 如本文所用,术语“液化”意指将淀粉转化为粘性较小且链长较短的糊精的过程。一般而言,该过程涉及淀粉的糊化,同时或之后添加本文所述的  $\alpha$ -淀粉酶。如本文所用,术语“初级液化”是指浆料温度升至或接近其糊化温度时的液化步骤。继温度升高之后,使浆料传送通过热交换器或热射流达到温度约 90-150°C,例如约 100-110°C。继应用热交换或射流温度之后,使浆料在该温度下保持约 3-10 分钟的时间。该保持浆料处于约 90-150°C 的步骤称为初级液化。

[0224] 如本文所用,术语“二次液化”是指继初次液化(加热至约 90-150°C)之后的液化步骤,这时让浆料冷却至室温。该冷却步骤可为约 30 分钟至约 180 分钟,例如约 90 分钟至约 120 分钟。如本文所用,术语“二次液化的分钟数”是指自二次液化开始时起至测量葡萄糖当量(DE)时所耗费的时间。

[0225] 液化处理后,通常可通过添加葡糖淀粉酶(例如来自诺维信(Novozymes, A/S)的 AMG™)和任选的脱支酶如异淀粉酶或支链淀粉糖(例如来自诺维信(Novozymes, A/S)的 Promozyme®),将糊精转化为葡萄糖。在该步骤之前,通常将 pH 降至低于约 4.5 的值,同时维持温度在约 95°C 或更高,以使液化  $\alpha$ -淀粉酶变体活性发生变性。然后使温度降至约 60°C,加入葡糖淀粉酶和脱支酶。糖化步骤通常进行约 24 至约 72 小时。

[0226] 本文所述的  $\alpha$ -淀粉酶的一个优势是其催化复杂糖如麦芽糖、麦芽三糖和麦芽七糖降解的能力。为此,糖化可通过 AmyE 或其变体与葡糖淀粉酶来催化。本文所述的  $\alpha$ -淀粉酶的另一个优势是,通过一种或多种本文所述的  $\alpha$ -淀粉酶的作用,可以在与葡糖淀粉酶最适条件相同的反应条件下将糊精转化为葡萄糖。AmyE 及其变体的该有利性质在于 2008 年 6 月 6 日提交的美国临时申请 61/059,618(将其全部内容以引用的方式并入本文)中公开。因为 AmyE 及其变体可以在与葡糖淀粉酶相同的 pH 和温度下操作,所以可在用葡糖淀粉酶进行额外催化之前或之后,或通过 AmyE 或其变体和葡糖淀粉酶的混合物来添加 AmyE 及其变体。由此可避免因调节反应物的 pH 和温度以适应葡糖淀粉酶的使用而必需的迟滞。

[0227] 葡糖淀粉酶当单独用于糖化时,通常以不超过或甚至少于约 0.5 葡糖淀粉酶活性单位(GAU)/g DS(即每克干固形物的葡糖淀粉酶活性单位)的量存在。葡糖淀粉酶可以以约 0.02-2.0GAU/g DS 或约 0.1-1.0GAU/g DS,例如约 0.2GAU/g DS 的量添加。葡糖淀粉酶可以源自微生物或植物。例如,葡糖淀粉酶可以是真菌或细菌来源。示例性的细菌葡糖淀粉酶为曲霉属葡糖淀粉酶,特别是黑曲霉 G1 或 G2 葡糖淀粉酶(Boel 等人 EMBO J. 3(5):1097-1102(1984))或其变体,如 WO 92/00381 和 WO 00/04136 中所公开的;泡盛曲霉葡糖淀粉酶(WO 84/02921);米曲霉葡糖淀粉酶(Hata 等人, Agric. Biol. Chem. (农业与生物化学) 55(4):941-949(1991))或其变体或片段。在一个实施例中,本发明方法还包括使用在 WO 98/22613 中公开的类型的水解化合物结合结构域。其它考虑的曲霉属葡糖淀粉酶变体包括增强热稳定性的变体:G137A 和 G139A(Chen 等人, Prot. Eng. (蛋白

质工程)9:499-505(1996)) ;D257E 和 D293E/Q(Chen 等人, Prot. Eng. (蛋白质工程)8:575-582(1995)) ;N182(Chen 等人, Biochem. J. (生物化学杂志)301:275-281(1994)) ;二硫键, A246C(Fierobe 等人, Biochemistry(生物化学),35:8698-8704(1996)) ;以及在 A435 和 S436 位置中引入 Pro 残基(Li 等人 Protein Eng. (蛋白质工程)10:1199-1204(1997))。其他考虑的葡糖淀粉酶包括踝节菌属(Talaromyces) 葡糖淀粉酶,特别是来源于埃默森踝节菌(T. emersonii)(WO 99/28448)、Talaromyces leycettanus(美国专利 No. RE 32, 153)、Talaromyces duponti 或嗜热踝节菌(T. thermophilus)(美国专利 No. 4, 587, 215) 的葡糖淀粉酶。考虑的细菌葡糖淀粉酶包括来自梭菌属(Clostridium),特别是 C. thermoamylolyticum(EP 135138) 和 C. thermohydrosulfuricum(WO86/01831) 的葡糖淀粉酶。合适的葡糖淀粉酶包括来源于米曲霉的葡糖淀粉酶,如与 WO 00/04136 中的 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列具有约 50%、约 55%、约 60%、约 65%、约 70%、约 75%、约 80%、约 85% 或甚至约 90% 同一性的葡糖淀粉酶。也合适的是商业葡糖淀粉酶,如 AMG 200L ;AMG 300L ;SAN™ SUPER 和 AMG™ E 诺维信(Novozymes) ;OPTIDEX® 300 美国丹尼斯克公司杰能科子公司(Danisco US, Inc., Genencor Division) ;AMIGASE™ 和 AMIGASE™ PLUS 帝斯曼(DSM) ;G-ZYME® G900 酶生物系统公司(Enzyme Bio-Systems) ;和 G-ZYME® G990ZR(黑曲霉葡糖淀粉酶且低蛋白酶含量)。

[0228] 有利地,本文所述的  $\alpha$ -淀粉酶可在用于淀粉加工的组合物中与葡糖淀粉酶组合,例如作为用于糖化的组合物。因为 AmyE 或其变体具有有利的性质,所以低的葡糖淀粉酶量,例如约 50%、约 45%、约 40%、约 35%、约 30%、约 25%、约 20%、约 15% 或约 10%,可有效用于实现与单独使用葡糖淀粉酶时等价的糖化结果。

[0229] 在另一个实施例中,组合其它  $\alpha$ -或  $\beta$ -淀粉酶或其它酶以提供具有广谱活性的“混合物”。例如,可使淀粉与一种或多种选自如下的酶接触:真菌  $\alpha$ -淀粉酶(EC 3.2.1.1)、细菌  $\alpha$ -淀粉酶,例如芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶或非芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶,和/或  $\beta$ -淀粉酶(EC 3.2.1.2)。在一个实施例中,还可以向本文所述的  $\alpha$ -淀粉酶添加另外的淀粉分解酶或脱支酶,如异淀粉酶(EC 3.2.1.68) 或支链淀粉酶(EC 3.2.1.41)。异淀粉酶可水解支链淀粉和  $\beta$ -极限糊精中的  $\alpha$ -1,6-D-糖苷分支键,并且可以因异淀粉酶不能攻击支链淀粉及因异淀粉酶对  $\alpha$ -极限糊精的有限作用而与支链淀粉酶相区分。可以按本领域技术人员众所周知的有效量加入脱支酶。

[0230] 植酸酶可用于本发明,因为它们能够在温育和液化步骤的限定条件下水解植酸。在某些实施例中,植酸酶能够从肌醇六磷酸(植酸)中释放至少一个无机磷酸。根据植酸酶对植酸分子上起始水解的磷酸酯基团的特定位置的偏好性,可以将植酸酶分类(例如,分为 3-植酸酶(EC 3.1.3.8) 或分为 6-植酸酶(EC 3.1.3.26))。植酸酶的一个典型实例是肌醇-六磷酸-3-磷酸水解酶。

[0231] 植酸酶可以得自微生物如真菌和/或细菌生物。这些微生物中的一些包括例如曲霉属(例如,黑曲霉、土曲霉(Aspergillus terreus)、无花果曲霉(Aspergillus flcum) 和烟曲霉(Aspergillus fumigatus))、毁丝霉属(Myceliophthora)(嗜热毁丝霉(Myceliophthora thermophila))、踝节菌属(嗜热踝节菌)、木霉属物种(里氏木霉) 和嗜热丝孢菌属(Thermomyces)(WO 99/49740)。植酸酶也可从青霉属(Penicillium) 物种获得,例如 Penicillium hordei(ATCC 号 22053)、栓状青霉(Penicillium piceum)(ATCC

号 10519) 或短密青霉 (*Penicillium brevi-compactum*) (ATCC 号 48944)。参见例如美国专利 No. 6, 475, 762。此外, 植酸酶可从芽孢杆菌属 (例如, 枯草芽孢杆菌)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、隔孢伏革菌属 (*Peniophora*)、大肠杆菌、柠檬酸杆菌属 (*Citrobacter*)、肠杆菌属 (*Enterbacter*) 和布丘氏菌属 (*Buttiauxella*) 获得 (参见 W02006/043178)。

[0232] 商业植酸酶是可得的, 如 NATUPHOS (BASF)、RONOZYME P (Novozymes A/S)、PHZYME XP (Danisco A/S) 和 FINASE (AB Enzymes)。用于测定微生物植酸酶活性的方法和植酸酶单位的定义已由 Engelen 等人, *J. of AOAC Int.*, 77:760-764 (1994) 公布。植酸酶可以是野生型植酸酶、其变体或片段。

[0233] 在一个实施例中, 植酸酶是源自细菌布丘氏菌属物种的植酸酶。布丘氏菌属物种包括乡间布丘氏菌 (*Buttiauxiella agrestis*)、布里纳氏布丘氏菌 (*Buttiauxiella brennerae*)、费拉格布丘氏菌 (*Buttiauxiella ferragutiase*)、伽瓦尼布丘氏菌 (*Buttiauxiella gaviniae*)、伊查德氏布丘氏菌 (*Buttiauxiella izardii*)、诺基亚布丘氏菌 (*Buttiauxiella noackiae*) 和瓦姆波德布丘氏菌 (*Buttiauxiella warmboldiae*)。布丘氏菌属物种的菌株可从 DSMZ, the German National Resource Center for Biological Material (Inhoffenstrabe 7B, 38124 Braunschweig, Germany) 获得。在登录号 NCIMB 41248 下保藏的布丘氏菌属物种菌株 P1-29 是可以从其中获得植酸酶并根据本发明进行应用的特别有用的菌株实例。在一些实施例中, 植酸酶可以是 BP- 野生型、其变体 (如 BP-11) (如 W0 06/043178 中所公开的) 或如在 2008 年 9 月 11 日公布的 US 2008/0220498 中描述的变体。例如, BP- 野生型及其变体在 W0 06/043178 的表 1 中公开, 其中编号方式参考公布的 PCT 申请的 SEQ ID NO :3。

[0234]  $\beta$ -淀粉酶是外切作用的产麦芽糖淀粉酶, 其催化直链淀粉、支链淀粉和相关葡萄糖聚合物中的 1,4- $\alpha$ -糖苷键水解, 从而释放麦芽糖。已从多种植物和微生物中分离了  $\beta$ -淀粉酶 (Fogarty 等人, *PROGRESS IN INDUSTRIAL MICROBIOLOGY*, 第 15 卷, 第 112-115 页, 1979)。这些  $\beta$ -淀粉酶的特征在于具有在 40°C 至 65°C 的范围内的最适温度, 和在约 4.5 至约 7.0 的范围内的最适 pH。考虑的  $\beta$ -淀粉酶包括但不限于: 来自大麦的  $\beta$ -淀粉酶 **SPEZYME<sup>®</sup>** BBA 1500、**SPEZYME<sup>®</sup>** DBA、Optimalt<sup>™</sup> ME、Optimalt<sup>™</sup> BBA 丹尼斯克公司 (Danisco A/S); 和 Novozym<sup>™</sup> WBA 诺维信公司 (Novozymes A/S)。

[0235] 在糖化步骤后, 葡萄糖糖浆可以例如使用固定化的葡萄糖异构酶 (如 **Sweetzyme<sup>®</sup>**) 转化成高果糖糖浆。在一个方面, 将该处理的可溶性淀粉水解产物转化为高果糖淀粉基糖浆 (HFSS), 如高果糖玉米糖浆 (HFCS)。这种转化可以使用葡萄糖异构酶实现, 特别是在固相载体上固定的葡萄糖异构酶。考虑的异构酶包括商业产品 **Sweetzyme<sup>®</sup>** IT (Novozymes A/S)、**G- ZYME<sup>®</sup>** IMGI 和 **G- ZYME<sup>®</sup>** G993、**Ketomax<sup>®</sup>**、**G- ZYME<sup>®</sup>** G993 液和 **GenSweet<sup>®</sup>** IGI 美国丹尼斯克公司杰能科子公司 (Danisco US Inc., Genencor Division)。

[0236] 尽管通常需要加入 1mM  $Ca^{2+}$  或更多以确保足够高的  $\alpha$ -淀粉酶稳定性, 但游离  $Ca^{2+}$  会强烈抑制葡萄糖异构酶的活性。因此, 通常在异构化之前借助于昂贵的单元操作去除  $Ca^{2+}$ , 以使游离  $Ca^{2+}$  浓度的水平低于 3-5ppm。如果可以避免此类操作, 则可节省成本。

[0237] 有利的是, 本文所述的  $\alpha$ -淀粉酶需要添加很少的  $Ca^{2+}$  或不需要添加  $Ca^{2+}$  用于稳

定性。由此,可以减少或完全消除向液化和 / 或糖化反应添加  $\text{Ca}^{2+}$ 。由此可以避免在反应混合物与葡萄糖异构酶接触之前通过离子交换去除  $\text{Ca}^{2+}$ ,从而节省时间与成本以及提高生产高果糖糖浆工艺的效率。

[0238] 待加工的淀粉可以得自块茎、根、茎、豆科植物、谷物或全谷粒。更具体而言,颗粒淀粉可以得自玉米、玉米穗轴、小麦、大麦、黑麦、蜀黍、西米、木薯、木薯粉、高粱、稻、豌豆、豆、香蕉或马铃薯。所考虑的示例性淀粉是蜡质和非蜡质类型的玉米和大麦。淀粉可以是高度精制的淀粉质量,例如至少 90%、至少 95%、至少 97%或至少 99.5%纯的。作为另外一种选择,淀粉可以是含有磨制全谷粒的较为粗的含淀粉材料,包括非淀粉级分如胚芽残留物和纤维。可以碾磨原料如全谷粒,以打开结构和允许进一步加工。

[0239] 两种磨制方法是合适的:湿磨法和干磨法。在干磨法中,碾磨且使用整个去壳谷粒。湿磨法获得胚芽和粗粉(淀粉颗粒和蛋白质)的良好分离,并且通常在糖浆生产中使用。湿磨和干磨均是淀粉加工领域所熟知的,并且也考虑用于所公开的组合物和方法。该工艺可以在超滤系统中进行,其中保留物在存在酶、生淀粉和水的情况下保持再循环,其中渗透物是可溶性淀粉水解产物。另一方法在带有超滤膜的连续膜反应器中进行的工艺,其中保留物在存在酶、生淀粉和水的情况下保持再循环,并且其中渗透物是可溶性淀粉水解产物还考虑的是在带有微滤膜的连续膜反应器中进行的工艺,其中保留物在存在酶、生淀粉和水的情况下保持再循环,并且其中渗透物是可溶性淀粉水解产物。

[0240] 干磨的谷粒除淀粉外还可包含显著量的非淀粉碳水化合物。当此非均质材料通过喷射蒸煮加工时,常仅实现淀粉的部分糊化。因此,对未糊化淀粉具有高活性的所述  $\alpha$ -淀粉酶可以有利地应用于包括液化和 / 或糖化喷射蒸煮的干磨淀粉的工艺中。

[0241] 待用于任何上述方面中的淀粉浆可具有约 20%至约 55%干固形物的颗粒淀粉、约 25%至约 40%干固形物的颗粒淀粉或约 30%至约 35%干固形物的颗粒淀粉。酶变体可以以至少约 85%、至少约 86%、至少约 87%、至少约 88%、至少约 89%、至少约 90%、至少约 91%、至少约 92%、至少约 93%、至少约 94%、至少约 95%、至少约 96%、至少约 97%、至少约 98%或至少约 99%的量将可溶性淀粉转化为颗粒淀粉的可溶性淀粉水解产物。

[0242] 在另一个实施例中,本文所述的  $\alpha$ -淀粉酶用于还包括发酵以产生发酵产物,例如乙醇的淀粉加工中。通过发酵由含淀粉材料生产乙醇的此类工艺包括:(i) 使含淀粉材料液化;(ii) 使获得的液化醪液糖化;和(iii) 在存在发酵生物的情况下使步骤(ii)中获得的材料发酵。任选地该方法还包括乙醇的回收。在发酵过程中,乙醇含量可达到至少约 7%、至少约 8%、至少约 9%、至少约 10%,如至少约 11%、至少约 12%、至少约 13%、至少约 14%、至少 15%或至少 16%的乙醇。

[0243] 可以以同时糖化和发酵(SSF)工艺执行糖化和发酵步骤。当发酵与水解同时执行时,温度可以是约 30°C至约 35°C,特别是在约 31°C至约 34°C之间。该工艺可以在超滤系统中进行,其中保留物在存在酶、生淀粉、酵母、酵母营养物和水的情况下维持再循环,并且其中渗透物是含乙醇液体。还考虑的是在带有超滤膜的连续膜反应器中进行的工艺,其中保留物在存在酶、生淀粉、酵母、酵母营养物和水的情况下维持再循环,并且其中渗透物是含乙醇液体。

[0244] 该工艺的可溶性淀粉水解产物还可以用于生产发酵产物,包括将所处理的淀粉发酵成发酵产物,如柠檬酸、谷氨酸一钠、葡萄糖酸、葡萄糖酸钠、葡萄糖酸钙、葡萄糖酸钾、葡

葡萄糖酸 d- 内酯或异抗坏血酸钠。

### [0245] 5.2. 从糖液除去 IPS

[0246] 工业淀粉加工设施偶尔会遇到工艺偏移,例如温度、pH 或酶剂量,它们中的任一者可能会导致糖液中存在大量的碘阳性淀粉 (IPS)。另外,糖液中存在 IPS 可能因液化较差引起,在液化中淀粉未被有效水解。IPS (来自逃脱水解的直链淀粉和 / 或回生淀粉聚合物) 能够与碘反应而产生特征性的蓝色 / 紫色。含有 IPS 的糖液因而称为蓝色糖。糖液中存在 IPS 会不利地影响最终的产品质量,是下游加工的主要问题。在糖化中用葡糖淀粉酶补充 AmyE 或其变体已显示可以统计学上显著的方式减少 IPS 的量。作为另一种选择,可在糖化后或鉴定时,通过分离糖化罐和以不可检测的水平使内容物回混来对 IPS 的存在进行补救。尽管这种补救能够将 IPS 水平减少至低于消费者可检测的程度,但不受欢迎的材料仍然存在并会在炭柱和过滤系统中积聚等等。

[0247] 如本文所描述的,可将 AmyE 或其变体添加至糖液以消除或减少 IPS。因此,本发明给出了一种新的酶溶液,其使得能在检测糖化后 IPS 时有效消除或减少 IPS。在另一个实施例中,可用  $\alpha$ -淀粉酶补充植酸酶以消除或减少 IPS。

[0248] 使用的酶可以是 AmyE、其变体或与 SEQ ID NO:1 具有至少约 80%、约 85%、约 90%、约 95%、约 98%、约 99% 或约 99.5% 的氨基酸序列同一性的  $\alpha$ -淀粉酶。在一个实施例中, $\alpha$ -淀粉酶可包含关于天然存在的 AmyE 的 B 结构域的氨基酸残基的 1-3 氨基酸置换。在另一个实施例中,变体 AmyE 可具有与天然存在的 AmyE 的三维结构重叠 (整体或仅 B 结构域重叠) (平均在 2 埃内) 的三维结构。该  $\alpha$ -淀粉酶可显示出转葡糖苷酶活性,活性水平类似于具有 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的 AmyE 的水平。

[0249] 在一个实施例中, $\alpha$ -淀粉酶以在约 0.1 至 0.4mg/克淀粉 (mg/g 淀粉) 的范围内,例如约 0.1、约 0.15、约 0.2、约 0.25、约 0.3、约 0.35 或约 0.4mg/g 淀粉的量使用以消除或移除糖液中的 IPS。处理可在约 5.0 至约 5.5 的范围内,例如约 5.0、约 5.1、约 5.2、约 5.3、约 5.4 或约 5.5 的 pH 下;在约 58-62°C,例如约 60°C 的温度下;进行约 4 至 24 小时,例如约 4、约 5、约 6、约 7、约 8、约 9、约 10、约 11、约 12、约 13、约 14、约 15、约 16、约 17、约 18、约 19、约 20、约 21、约 22、约 23 或约 24 小时。

### [0250] 5.3. 由淀粉生产乙醇

[0251] 通常,由整谷粒生产醇 (乙醇) 大致可分成四个主要步骤:碾磨、液化、糖化和发酵。可在糖化中使用葡糖淀粉酶和本文所述的  $\alpha$ -淀粉酶。

[0252] 碾磨谷粒以打开结构,从而允许进一步加工。通常使用的两种方法是湿磨法或干磨法。在干磨法中,碾磨整个去壳谷粒并用于该工艺的其余部分。湿磨法可提供胚芽和粗粉 (淀粉颗粒和蛋白质) 的良好分离,并且除少数例外情况之外,可以在平行生产糖浆的场所应用。

[0253] 在液化处理中,通过将淀粉颗粒水解成通常 DP 高于 4 的麦芽糖糊精来增溶淀粉颗粒。可通过酸处理或利用  $\alpha$ -淀粉酶的酶法进行水解。酸水解的使用是有限的。原料可以是碾磨的整谷粒或来自淀粉加工的副料流。酶促液化通常以三步骤热浆法进行。加热浆料至约 60-95°C,通常约 80-85°C,并加入酶。然后将浆料在约 95-140°C 之间,通常在约 105-125°C 之间进行喷射蒸煮,冷却至约 60-95°C 并加入更多的酶以完成最终水解。该液化处理在约 pH 4.5-6.5 下,通常在约 5.0 至约 6.0 之间的 pH 下进行。经碾磨和液化的谷粒

也被称为醪液。

[0254] 为生产可由酵母代谢的低分子糖  $DP_{1-3}$ , 必须进一步水解或糖化由液化得到的麦芽糖糊精。通常使用葡糖淀粉酶(备选地,  $\alpha$ -葡糖苷酶或酸性  $\alpha$ -淀粉酶)经酶法进行水解。在一个实施例中, 在糖化中使用葡糖淀粉酶和 AmyE 或其变体。整个糖化步骤可持续多达 72 小时, 然而, 通常仅进行一般 40-90 分钟的预糖化, 然后在发酵 (SSF) 期间进行完全糖化。糖化通常在约 30-65°C (通常约 60°C 左右) 的温度和在约 pH 4.5 下进行。

[0255] 向醪液添加通常来自酵母菌属的酵母, 使发酵进行 24-96 小时, 如通常 35-60 小时。温度为约 26-34°C 之间, 通常为约 32°C; pH 为约 pH 3-6, 通常为约 pH 4-5 左右。注意, 最广泛使用的工艺是同时糖化和发酵 (SSF) 工艺, 其中没有糖化保温阶段, 从而意味着一起加入酵母和酶。当进行 SSF 时, 一般临在发酵之前在高于 50°C 的温度下引入预糖化步骤。

[0256] 发酵后, 蒸馏醪液以提取乙醇。根据本公开的工艺获得的乙醇可用作例如, 燃料乙醇; 饮用乙醇(即可饮用的中性烈酒)或工业乙醇。发酵剩余物是酒糟, 其通常以液体或干燥形式用于动物饲料。关于如何进行液化、糖化、发酵、蒸馏和乙醇回收的进一步细节为技术人员所熟知。根据本发明的工艺, 糖化和发酵可同时或分开地进行。

[0257] 尽管已经参考下面实例详细地描述了本发明组合物、化合物和方法, 但是应理解, 在不背离所述组合物、化合物和方法的情况下可作出多种修改, 并且这些修改对本领域技术人员来说是显而易见的。

#### [0258] 5.4. 清洁和盘碟洗涤剂组合物及用途

[0259] 可以将本文论述的 AmyE 或其变体配制于例如, 用于清洁器皿的洗涤剂组合物中或其他清洁组合物中。这些组合物可以是凝胶、粉末或液体。组合物可包含单独的  $\alpha$ -淀粉酶变体、其他淀粉分解酶、其它清洁酶以及清洁组合物常用的其他组分。

[0260] 因此, 盘碟洗涤剂组合物可包含表面活性剂。表面活性剂可以是阴离子型、非离子型、阳离子型、两性离子型或这些类型的混合物。洗涤剂可含有约 0 重量% 至约 90 重量% 的非离子型表面活性剂, 如低泡沫至不起泡的乙氧基化丙氧基化直链醇。

[0261] 在洗涤剂应用中, 通常将 AmyE 或其变体用于含有丙二醇的液体组合物中。例如, 可通过在含有约 10% 氯化钙的约 25% 体积 / 体积丙二醇溶液中循环, 将 AmyE 或其变体溶解于丙二醇中。

[0262] 盘碟洗涤剂组合物可含有无机和 / 或有机类型的洗涤剂助洗剂盐。洗涤剂助洗剂可细分为含磷和不含磷的类型。洗涤剂组合物通常含有约 1% 至约 90% 的洗涤剂助洗剂。当存在含磷的无机碱性洗涤剂助洗剂时, 其实例包括水溶性盐, 尤其是碱金属焦磷酸盐、正磷酸盐和多磷酸盐。当存在含磷的有机碱性洗涤剂助洗剂时, 其实例包括水溶性膦酸盐。当存在不含磷的无机助洗剂时, 其实例包括水溶性碱金属碳酸盐、硼酸盐和硅酸盐以及多种类型的水不溶性晶体或无定形硅铝酸盐, 其中沸石是最为公知的代表。

[0263] 合适的有机助洗剂的实例包括碱金属; 铵和取代的铵; 柠檬酸盐; 琥珀酸盐; 丙二酸盐; 脂肪酸磺酸盐; 羧基甲氧基琥珀酸盐; 聚乙酸铵; 羧酸盐; 聚羧酸盐; 氨基聚羧酸盐; 聚乙酰基羧酸盐; 和聚羟基磺酸盐。

[0264] 其他合适的有机助洗剂包括已知具有助洗剂性质的较高分子量的聚合物和共聚物, 例如适当的聚丙烯酸、聚马来酸和聚丙烯酸 / 聚马来酸共聚物, 以及它们的盐。

[0265] 清洁组合物可含有氯 / 溴类型或氧类型的漂白剂。无机氯 / 溴类型漂白剂的实例

是锂、钠或钙的次氯酸盐和次溴酸盐,以及氯化磷酸三钠。有机氯/溴类型的漂白剂的实例是杂环 N- 溴酰亚胺类和 N- 氯酰亚胺类,如三氯异氰尿酸、三溴异氰尿酸、二溴异氰尿酸和二氯异氰尿酸,及其与水增溶性阳离子(如钾和钠)形成的盐。乙内酰脲化合物也是合适的。

[0266] 清洁组合物可含有氧漂白剂,例如以无机过酸盐的形式,任选与漂白前体一起,或以过氧化化合物的形式。合适的过氧漂白化合物的典型实例是碱金属过硼酸盐(四水合物和一水合物二者)、碱金属过碳酸盐、碱金属过硅酸盐和碱金属过磷酸盐。合适的活化剂材料包括四乙酰乙二胺(TAED)和三乙酸甘油酯。还可以存在酶促漂白活化体系,如过硼酸盐或过碳酸盐、三乙酸甘油酯和过水解酶,例如,如 WO 2005/056783 中所公开的。

[0267] 可使用酶的常规稳定剂来稳定清洁组合物,该稳定剂为例如多元醇(例如丙二醇)、糖或糖醇、乳酸、硼酸或硼酸衍生物(例如芳族硼酸酯)。清洁组合物也可含有其它常规洗涤剂成分,例如反絮凝剂材料、填充剂材料、消泡剂、防腐剂、悬浮剂、多价螯合剂、防污垢再沉积剂、脱水剂、染料、杀菌剂、荧光剂、增稠剂和香料。

[0268] 最后, AmyE 或其变体可用于常规的盘碟洗涤剂中,例如用于任何如下专利公布中描述的洗涤剂中,考虑本文所公开的 AmyE 或其变体用于替代如下列出的专利和公布的专利申请中的任何  $\alpha$ -淀粉酶或其变体或于这些  $\alpha$ -淀粉酶或其变体之外额外地使用: CA 2006687、GB 2200132、GB 2234980、GB 2228945、DE 3741617、DE 3727911、DE 4212166、DE 4137470、DE 3833047、DE 4205071、WO 93/25651、WO 93/18129、WO 93/04153、WO 92/06157、WO 92/08777、WO 93/21299、WO 93/17089、WO 93/03129、EP 481547、EP 530870、EP 533239、EP 554943、EP 429124、EP 346137、EP 561452、EP 318204、EP 318279、EP 271155、EP 271156、EP 346136、EP 518719、EP 518720、EP 518721、EP 516553、EP 561446、EP 516554、EP 516555、EP 530635、EP 414197 和美国专利 No. 5, 112, 518、No. 5, 141, 664 及 No. 5, 240, 632。

#### [0269] 5.5. 衣物洗涤剂组合物及用途

[0270] 根据该实施例,一种或多种 AmyE 或其变体可为洗涤剂组合物的组分。照此,其可以以无粉尘颗粒、稳定化液体或受保护的酶的形式包括在洗涤剂组合物中。可以例如,如美国专利 No. 4, 106, 991 和 No. 4, 661, 452 所公开的那样来生产无粉尘颗粒,并且可任选地通过本领域已知的方法进行包衣。示例性的蜡质包衣材料是平均分子量为 1,000 至 20,000 的聚(环氧乙烷)产品(聚乙二醇,PEG);具有 16 至 50 个环氧乙烷单元的乙氧基化壬基酚;乙氧基化脂肪醇,其中醇含有 12 至 20 个碳原子,且其中有 15 至 80 个环氧乙烷单元;脂肪醇;脂肪酸;以及脂肪酸的甘油单酯和甘油二酯及甘油三酯。例如英国专利 No. 1, 483, 591 给出了适于通过流化床技术施加的成膜包衣材料的实例。可例如通过加入多元醇(如丙二醇)、糖或糖醇、乳酸或硼酸,根据已确立的方法来稳定液态酶制备物。其他酶稳定剂是本领域所熟知的。可按照例如 US 5, 879, 920 丹尼斯克公司(Danisco A/S)或 EP 238216 公开的方法来制备受保护的酶。长期以来多元醇被公认为蛋白质的稳定剂,和用于改善蛋白质的溶解性。参见例如 Kaushik 等人, J. Biol. Chem. (生物化学杂志) 278:26458-65(2003) 及其中引用的参考文献;和 M. Conti 等人, J. Chromatography (色谱杂志) 757:237-245(1997)。

[0271] 洗涤剂组合物可以是任何便利的形式,例如凝胶、粉末、颗粒、糊料或液体。液体洗涤剂可以是水性的,通常含有高达约 70% 的水和 0% 至约 30% 的有机溶剂,其也可以是只

含有约 30% 水的致密凝胶类型的形式。

[0272] 洗涤剂组合物可包括一种或多种表面活性剂,其中每种都可以是阴离子型、非离子型、阳离子型或两性离子型。洗涤剂将通常含有 0% 至约 50% 的阴离子表面活性剂,如直链烷基苯磺酸盐 (LAS);  $\alpha$ -烯烴磺酸盐;烷基硫酸盐(脂肪醇硫酸盐)(AS);醇乙氧基硫酸盐(AEOS 或 AES);仲烷基磺酸盐(SAS); $\alpha$ -磺基脂肪酸甲酯;烷基或烯基琥珀酸;或皂。组合物也可含有 0% 至约 40% 的非离子表面活性剂,如醇乙氧基化物(AEO 或 AE)、羧化的醇乙氧基化物、壬基酚乙氧基化物、烷基多苷、烷基二甲基胺氧化物、乙氧基化脂肪酸单乙醇酰胺、脂肪酸单乙醇酰胺或多羟基烷基脂肪酸酰胺,如例如在 WO 92/06154 中所述的。

[0273] 洗涤剂组合物可另外包含一种或多种其他酶,如脂肪酶、角质酶、蛋白酶、纤维素酶、过氧化物酶和 / 或漆酶的任何组合。

[0274] 洗涤剂可含有约 1% 到约 65% 的洗涤剂助洗剂或络合剂,如沸石、二磷酸盐、三磷酸盐、膦酸盐、柠檬酸盐、次氨基三乙酸(NTA)、乙二胺四乙酸(EDTA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTMPA)、烷基或烯基琥珀酸、可溶性硅酸盐或层状硅酸盐(例如来自 Hoechst 的 SKS-6)。洗涤剂也可以是无助洗剂的,即基本上不含洗涤剂助洗剂。可以在与酶的稳定性相容的任何组合物中使用酶。通常可以用已知的封装形式(例如通过造粒或隔离在水凝胶中)来保护酶免于遭遇通常有害的组分影响。酶且尤其是  $\alpha$ -淀粉酶(具有或不具有淀粉结合结构域)不限于洗衣和盘碟洗涤应用,而是可用于表面清洁剂以及用于由淀粉或生物质生产乙醇。

[0275] 洗涤剂可包含一种或多种聚合物。实例包括羧甲基纤维素(CMC)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、聚乙二醇(PEG)、聚乙烯醇(PVA)、聚羧酸酯如聚丙烯酸酯、马来酸 / 丙烯酸共聚物和甲基丙烯酸月桂酯 / 丙烯酸共聚物。

[0276] 洗涤剂可含有漂白系统,其可包含任选与形成过酸的漂白活化剂如 TAED 或壬酰基氧基苯磺酸盐(NOBS)联用的  $H_2O_2$  来源(如过硼酸盐或过碳酸盐)。或者,漂白系统可包例如酰胺、酰亚胺或砒类型的过氧酸。漂白系统也可以是酶促漂白系统,其中过水解酶可活化过氧化物,如 WO 2005/056783 中所述的那些。

[0277] 可使用常规的稳定剂来稳定洗涤剂组合物的酶,所述稳定剂为例如多元醇,如丙二醇或甘油;糖或糖醇;乳酸;硼酸或硼酸衍生物,如硼酸芳族酯;并且可按例如 WO 92/19709 和 WO 92/19708 中所述配制该组合物。

[0278] 洗涤剂也可含有其它常规的洗涤剂成分,如织物调理剂,包括例如粘土、增泡剂、抑泡剂、防腐蚀剂、悬污剂、抗污垢再沉积剂、染料、杀细菌剂、荧光增白剂或香料。pH(在使用浓度下于水溶液中测量)通常是中性或碱性,例如 pH 约 7.0 至约 11.0。

[0279]  $\alpha$ -淀粉酶变体可以按常规用于洗涤剂中的浓度掺入。目前考虑的是,在洗涤剂组合物中,可以相当于每升洗涤液体 0.00001-1.0mg(按纯酶蛋白质计算) $\alpha$ -淀粉酶变体的量添加  $\alpha$ -淀粉酶变体。包含  $\alpha$ -淀粉酶变体的洗涤剂组合物可以配制成具体形式,包括:

[0280] (1) 配制为具有至少 600g/L 堆密度的颗粒形式的洗涤剂组合物,包含约 7% 至约 12% 的直链烷基苯磺酸盐(按酸计算);约 1% 至约 4% 的醇乙氧基硫酸盐(例如  $C_{12-18}$  醇, 1-2 环氧乙烷(EO))或烷基硫酸盐(例如  $C_{16-18}$ );约 5% 至约 9% 的醇乙氧基化物(例如  $C_{14-15}$  醇, 7EO);约 14% 至约 20% 的碳酸钠(例如  $Na_2CO_3$ );约 2 至约 6% 的可溶性硅酸盐;

约 15% 至约 22% 的沸石 (例如  $\text{NaAlSiO}_4$ ) ; 0% 至约 6% 的硫酸钠 (例如  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) ; 约 0% 至约 15% 的柠檬酸钠 / 柠檬酸 (例如  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7/\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ) ; 约 11% 至约 18% 的过硼酸钠 (例如  $\text{NaBO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) ; 约 2% 至约 6% 的 TAED ; 0% 至约 2% 的羧甲基纤维素 (CMC) ; 0-3% 的聚合物 (例如马来酸 / 丙烯酸共聚物, PVP, PEG) ; 0.0001-0.1% 的蛋白质酶 (按纯酶计算) ; 和 0-5% 的次要成分 (例如抑泡剂、香料、荧光增白剂、光漂白剂)。

[0281] (2) 配制为具有至少 600g/L 堆密度的颗粒形式的洗涤剂组合物, 包含约 6% 至约 11% 的直链烷基苯磺酸盐 (按酸计算) ; 约 1% 至约 3% 的醇乙氧基硫酸盐 (例如  $\text{C}_{12-18}$  醇, 1-2EO) 或烷基硫酸盐 (例如  $\text{C}_{16-18}$ ) ; 约 5% 至约 9% 的醇乙氧基化物 (例如  $\text{C}_{14-15}$  醇, 7EO) ; 约 15% 至约 21% 的碳酸钠 (例如  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ; 约 1% 至约 4% 的可溶性硅酸盐 ; 约 24% 至约 34% 的沸石 (例如  $\text{NaAlSiO}_4$ ) ; 约 4% 至约 10% 的硫酸钠 (例如  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) ; 0% 至约 15% 的柠檬酸钠 / 柠檬酸 (例如  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7/\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ) ; 0% 至约 2% 的羧甲基纤维素 (CMC) ; 1-6% 的聚合物 (例如马来酸 / 丙烯酸共聚物, PVP, PEG) ; 0.0001-0.1% 的酶 (按纯酶蛋白质计算) ; 0-5% 的次要成分 (例如抑泡剂、香料)。

[0282] (3) 配制为具有至少 600g/L 堆密度的颗粒形式的洗涤剂组合物, 包含约 5% 至约 9% 的直链烷基苯磺酸盐 (按酸计算) ; 约 7% 至约 14% 的醇乙氧基化物 (例如  $\text{C}_{12-15}$  醇, 7EO) ; 约 1 至约 3% 的皂如脂肪酸 (例如  $\text{C}_{16-22}$  脂肪酸) ; 约 10% 至约 17% 的碳酸钠 (如  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ; 约 3% 至约 9% 的可溶性硅酸盐 ; 约 23% 至约 33% 的沸石 (如  $\text{NaAlSiO}_4$ ) ; 0% 至约 4% 的硫酸钠 (例如  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) ; 约 8% 至约 16% 的过硼酸钠 (例如  $\text{NaBO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) ; 约 2% 至约 8% 的 TAED ; 0% 至约 1% 的膦酸盐 (例如 EDTMPA) ; 0% 至约 2% 的羧甲基纤维素 (CMC) ; 0-3% 的聚合物 (例如马来酸 / 丙烯酸共聚物, PVP, PEG) ; 0.0001-0.1% 的酶 (按纯酶蛋白质计算) ; 0-5% 的次要成分 (例如抑泡剂、香料、荧光增白剂)。

[0283] (4) 配制为具有至少 600g/L 堆密度的颗粒形式的洗涤剂组合物, 包含约 8% 至约 12% 的直链烷基苯磺酸盐 (按酸计算) ; 约 10% 至约 25% 的醇乙氧基化物 (例如  $\text{C}_{12-15}$  醇, 7EO) ; 约 14% 至约 22% 的碳酸钠 (如  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ; 约 1% 至约 5% 的可溶性硅酸盐 ; 约 25% 至约 35% 的沸石 (例如  $\text{NaAlSiO}_4$ ) ; 0% 至约 10% 的硫酸钠 (例如  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) ; 0% 至约 2% 的羧甲基纤维素 (CMC) ; 1-3% 的聚合物 (例如马来酸 / 丙烯酸共聚物, PVP, PEG) ; 0.0001-0.1% 的酶 (按纯酶蛋白质计算) ; 和 0-5% 的次要成分 (例如抑泡剂、香料)。

[0284] (5) 水性液体洗涤剂组合物, 包含约 15% 至约 21% 的直链烷基苯磺酸盐 (按酸计算) ; 约 12% 至约 18% 的醇乙氧基化物 (例如  $\text{C}_{12-15}$  醇, 7EO 或  $\text{C}_{12-15}$  醇, 5EO) ; 约 3% 至约 13% 的皂如脂肪酸 (例如油酸) ; 0% 至约 13% 的烯基琥珀酸 ( $\text{C}_{12-14}$ ) ; 约 8% 至约 18% 的氨基乙醇 ; 约 2% 至约 8% 的柠檬酸 ; 0% 至约 3% 的膦酸盐 ; 0% 至约 3% 的聚合物 (例如 PVP, PEG) ; 0% 至约 2% 的硼酸盐 (例如  $\text{B}_4\text{O}_7$ ) ; 0% 至约 3% 的乙醇 ; 约 8% 至约 14% 的丙二醇 ; 0.0001-0.1% 的酶 (按纯酶蛋白质计算) ; 和 0-5% 的次要成分 (例如分散剂、抑泡剂、香料、荧光增白剂)。

[0285] (6) 水性结构化液体洗涤剂组合物, 包含约 15% 至约 21% 的直链烷基苯磺酸盐 (按酸计算) ; 3-9% 的醇乙氧基化物 (例如  $\text{C}_{12-15}$  醇, 7EO 或  $\text{C}_{12-15}$  醇, 5EO) ; 约 3% 至约 10% 的皂如脂肪酸 (例如油酸) ; 约 14% 至约 22% 的沸石 (如  $\text{NaAlSiO}_4$ ) ; 约 9% 至约 18% 的柠檬酸钾 ; 0% 至约 2% 的硼酸盐 (例如  $\text{B}_4\text{O}_7$ ) ; 0% 至约 2% 的羧甲基纤维素 (CMC) ; 0% 至约 3% 的聚合物 (例如 PEG, PVP) ; 0% 至约 3% 的锚定聚合物 (例如甲基丙烯酸月桂酯 / 丙烯

酸共聚物);摩尔比为 25 : 1, MW 3800);0%至约 5%的甘油;0.0001-0.1%的酶(按纯酶蛋白质计算);和 0-5%的次要成分(例如分散剂、抑泡剂、香料、荧光增白剂)。

[0286] (7) 配制为具有至少 600g/L 堆密度的颗粒形式的洗涤剂组合物,包括约 5%至约 10%的脂肪醇硫酸盐;约 3%至约 9%的乙氧基化脂肪酸单乙醇酰胺;0-3%的皂如脂肪酸;约 5%至约 10%的碳酸钠(例如  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ );约 1%至约 4%的可溶性硅酸盐;约 20%至约 40%的沸石(例如  $\text{NaAlSiO}_4$ );约 2%至约 8%的硫酸钠(例如  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ );约 12%至约 18%的过硼酸钠(例如  $\text{NaBO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ );约 2%至约 7%的 TAED;约 1%至约 5%的聚合物(例如马来酸/丙烯酸共聚物, PEG);0.0001-0.1%的酶(按纯酶蛋白质计算);和 0-5%的次要成分(例如荧光增白剂、抑泡剂、香料)。

[0287] (8) 配制为颗粒形式的洗涤剂组合物,包含约 8%至约 14%的直链烷基苯磺酸盐(按酸计算);约 5%至约 11%的乙氧基化脂肪酸单乙醇酰胺;0%至约 3%的皂如脂肪酸;约 4%至约 10%的碳酸钠(例如  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ );约 1%至约 4%的可溶性硅酸盐;约 30%至约 50%的沸石(例如  $\text{NaAlSiO}_4$ );约 3%至约 11%的硫酸钠(例如  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ );约 5%至约 12%的柠檬酸钠(例如  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ );约 1%至约 5%的聚合物(例如 PVP, 马来酸/丙烯酸共聚物, PEG);0.0001-0.1%的酶(按纯酶蛋白质计算);和 0-5%的次要成分(例如抑泡剂、香料)。

[0288] (9) 配制为颗粒形式的洗涤剂组合物,包含约 6%至约 12%的直链烷基苯磺酸盐(按酸计算);约 1%至约 4%的非离子型表面活性剂;约 2%至约 6%的皂如脂肪酸;约 14%至约 22%的碳酸钠(例如  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ );约 18%至约 32%的沸石(例如  $\text{NaAlSiO}_4$ );约 5%至约 20%的硫酸钠(例如  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ );约 3%至约 8%的柠檬酸钠(例如  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ );约 4%至约 9%的过硼酸钠(例如  $\text{NaBO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ );约 1%至约 5%的漂白活化剂(例如 NOBS 或 TAED);0%至约 2%的羧甲基纤维素(CMC);约 1%至约 5%的聚合物(例如聚羧酸盐或 PEG);0.0001-0.1%的酶(按纯酶蛋白质计算);和 0-5%的次要成分(例如荧光增白剂、香料)。

[0289] (10) 水性液体洗涤剂组合物,包含约 15%至约 23%的直链烷基苯磺酸盐(按酸计算);约 8%至约 15%的醇乙氧基硫酸盐(例如  $\text{C}_{12-15}$  醇, 2-3EO);约 3%至约 9%的醇乙氧基化物(例如  $\text{C}_{12-15}$  醇, 7EO 或  $\text{C}_{12-15}$  醇, 5EO);0%至约 3%的皂如脂肪酸(例如月桂酸);约 1%至约 5%的氨基乙醇;约 5%至约 10%的柠檬酸钠;约 2%至约 6%的助水溶物(例如甲苯磺酸钠);0%至约 2%的硼酸盐(例如  $\text{B}_4\text{O}_7$ );0%至约 1%的羧甲基纤维素;约 1%至约 3%的乙醇;约 2%至约 5%的丙二醇;0.0001-0.1%的酶(按纯酶蛋白质计算);和 0-5%的次要成分(例如聚合物、分散剂、香料、荧光增白剂)。

[0290] (11) 水性液体洗涤剂组合物,包含约 20%至约 32%的直链烷基苯磺酸盐(按酸计算);6-12%的醇乙氧基化物(例如  $\text{C}_{12-15}$  醇, 7EO 或  $\text{C}_{12-15}$  醇, 5EO);约 2%至约 6%的氨基乙醇;约 8%至约 14%的柠檬酸;约 1%至约 3%的硼酸盐(例如  $\text{B}_4\text{O}_7$ );0%至约 3%的聚合物(例如马来酸/丙烯酸共聚物, 锚定聚合物, 如甲基丙烯酸月桂酯/丙烯酸共聚物);约 3%至约 8%的甘油;0.0001-0.1%的酶(按纯酶蛋白质计算);和 0-5%的次要成分(例如助水溶物、分散剂、香料、荧光增白剂)。

[0291] (12) 配制为具有至少 600g/L 堆密度的颗粒形式的洗涤剂组合物,包含约 25%至约 40%的阴离子型表面活性剂(直链烷基苯磺酸盐、烷基硫酸盐、 $\alpha$ -烯炔磺酸盐、 $\alpha$ -烷基脂肪酸甲酯、烷基磺酸盐、皂);约 1%至约 10%的非离子型表面活性剂(例如醇乙氧基化物);约 8%至约 25%的碳酸钠(例如  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ );约 5%至约 15%的可溶性硅酸盐;0%至

约 5% 的硫酸钠 (例如  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) ; 约 15% 至约 28% 的沸石 ( $\text{NaAlSiO}_4$ ) ; 0% 至约 20% 的过硼酸钠 (例如  $\text{NaBO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) ; 约 0% 至约 5% 的漂白活化剂 (TAED 或 NOBS) ; 0.0001-0.1% 的酶 (按纯酶蛋白质计算) ; 0-3% 的次要成分 (例如香料、荧光增白剂)。

[0292] (13) 如上述组合物 1)-12) 中所述的洗涤剂组合物, 其中所述直链烷基苯磺酸盐中的所有或部分被 ( $\text{C}_{12}$ - $\text{C}_{18}$ ) 烷基硫酸盐代替。

[0293] (14) 配制为具有至少 600g/L 堆密度的颗粒剂形式的洗涤剂组合物, 包含约 9% 至约 15% 的 ( $\text{C}_{12}$ - $\text{C}_{18}$ ) 烷基硫酸盐 ; 约 3% 至约 6% 的醇乙氧基化物 ; 约 1% 至约 5% 的多羟基烷基脂肪酸酰胺 ; 约 10% 至约 20% 的沸石 (例如  $\text{NaAlSiO}_4$ ) ; 约 10% 至约 20% 的层状焦硅酸盐 (例如来自 Hoechst 的 SK56) ; 约 3% 至约 12% 的碳酸钠 (例如  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ; 0% 至约 6% 的可溶性硅酸盐 ; 约 4% 至约 8% 的柠檬酸钠 ; 约 13% 至约 22% 的过碳酸钠 ; 约 3% 至约 8% 的 TAED ; 0% 至约 5% 的聚合物 (例如聚羧酸盐和 PVP) ; 0.0001-0.1% 的酶 (按纯酶蛋白质计算) ; 和 0-5% 的次要成分 (例如荧光增白剂、光漂白剂、香料、抑泡剂)。

[0294] (15) 配制为具有至少 600g/L 堆密度的颗粒剂形式的洗涤剂组合物, 包含约 4% 至约 8% 的 ( $\text{C}_{12}$ - $\text{C}_{18}$ ) 烷基硫酸盐 ; 约 11% 至约 15% 的醇乙氧基化物 ; 约 1% 至约 4% 的皂 ; 约 35% 至约 45% 的沸石 MAP 或沸石 A ; 约 2% 至约 8% 的碳酸钠 (如  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ; 0% 至约 4% 的可溶性硅酸盐 ; 约 13% 至约 22% 的过碳酸钠 ; 1-8% 的 TAED ; 0% 至约 3% 的羧甲基纤维素 (CMC) ; 0% 至约 3% 的聚合物 (例如聚羧酸盐和 PVP) ; 0.0001-0.1% 的酶 (按纯酶蛋白质计算) ; 和 0-3% 的次要成分 (例如荧光增白剂、膦酸盐、香料)。

[0295] (16) 上面 1)-15) 中所述的洗涤剂制剂, 其含有稳定化的或包封的过酸作为额外组分或作为已经述及的漂白系统的替代物。

[0296] (17) 上面 1)、3)、7)、9) 和 12) 中所述的洗涤剂组合物, 其中过硼酸盐被过碳酸盐代替。

[0297] (18) 上面 1)、3)、7)、9)、12)、14) 和 15) 中所述的洗涤剂组合物, 还额外含有锰催化剂。

[0298] (19) 配制为非水性洗涤剂液体的洗涤剂组合物, 包含液态非离子型表面活性剂, 如直链烷氧基化伯醇、助洗剂体系 (例如磷酸盐)、酶和碱。该洗涤剂还可包含阴离子型表面活性剂和 / 或漂白系统。

[0299] 在另一个实施例中, 可将 2,6- $\beta$ -D- 果聚糖水解酶掺入洗涤剂组合物中并用于家居和 / 或工业织物 / 衣物上存在的生物膜的去除 / 清洁。

[0300] 例如, 可以将洗涤剂组合物配制成手洗或机洗的衣物洗涤剂组合物, 包含适于预处理玷污的织物的洗衣添加剂组合物和漂洗添加的织物软化剂组合物, 或者可配制成用于一般的家居硬表面清洁操作的洗涤剂组合物, 或者配制以用于手洗或机洗的盘碟洗涤操作。

[0301] 在一个具体的方面, 洗涤剂组合物可包含 2,6- $\beta$ -D- 果聚糖水解酶、一种或多种  $\alpha$ -淀粉酶变体以及一种或多种其它清洁酶, 如蛋白酶、脂肪酶、角质酶、糖酶、纤维素酶、果胶酶、甘露聚糖酶、阿拉伯聚糖酶、半乳聚糖酶、木聚糖酶、氧化酶、漆酶和 / 或过氧化物酶, 和 / 或它们的组合。通常, 所选酶的特性应与所选的洗涤剂相容 (例如最适 pH、与其他酶和非酶成分的相容性等), 且所述酶应以有效量存在。

[0302] 蛋白酶: 合适的蛋白酶包括动物、植物或微生物来源的那些。经化学修饰或蛋白质

工程改造的突变体也是合适的。蛋白酶可以是丝氨酸蛋白酶或金属蛋白酶、例如碱性微生物蛋白酶或胰蛋白酶样蛋白酶。碱性蛋白酶的实例是枯草杆菌蛋白酶,尤其是源自芽孢杆菌属物种的那些,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 309(参见例如美国专利 No. 6, 287, 841)、枯草杆菌蛋白酶 147 和枯草杆菌蛋白酶 168(参见例如 WO 89/06279)。胰蛋白酶样蛋白酶的实例是胰蛋白酶(例如猪或牛起源)和镰孢菌属蛋白酶(参见例如 WO 89/06270 和 WO 94/25583)。可用的蛋白酶的实例也包括但不限于 WO 92/19729 和 WO 98/20115 中所述的变体。合适的可商购获得的蛋白酶包括 **Alcalase<sup>®</sup>**、**Savinase<sup>®</sup>**、**Primase<sup>™</sup>**、**Duralase<sup>™</sup>**、**Esperase<sup>®</sup>** 和 **Kannase<sup>™</sup>** 诺和诺德公司 (Novo Nordisk A/S)、**Maxatase<sup>®</sup>**、**Maxacal<sup>™</sup>**、**Maxapem<sup>™</sup>**、**Properase<sup>™</sup>**、**Purafect<sup>®</sup>**、**Purafect OxP<sup>™</sup>**、**FN2<sup>™</sup>** 和 **FN3<sup>™</sup>** 丹尼斯克公司 (Danisco A/S)。

[0303] 脂肪酶:合适的脂肪酶包括细菌或真菌来源的那些。包括经化学修饰或蛋白质工程改造的突变体。可用的脂肪酶的实例包括但不限于来自腐质霉属(与嗜热丝孢菌属同义)的脂肪酶,例如来自疏毛腐质霉 (*Humicola lanuginosa*) (疏棉状嗜热丝孢菌 (*Thermomyces lanuginosus*)) (参见例如, EP 258068 和 EP 305216)、来自特异腐质霉 (*Humicola insolens*) (参见例如 W096/13580);假单胞菌属脂肪酶(例如来自产碱假单胞菌 (*Pseudomonas alcaligenes*) 或类产碱假单胞菌 (*Pseudomonas pseudoalcaligenes*);例如参见 EP 218272)、洋葱假单胞菌 (*Pseudomonas cepacia*) (参见例如 EP 331376)、斯氏假单胞菌 (*Pseudomonas stutzeri*) (参见例如 GB 1,372,034)、荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*)、假单胞菌属物种菌株 SD 705(参见例如, W095/06720 和 W096/27002)、*Pseudomonas wisconsinensis* (参见例如, W096/12012) 的脂肪酶;芽孢杆菌属脂肪酶(例如来自枯草芽孢杆菌;参见例如, Dartois 等人, *Biochemica Biophysica Acta*, 1131:253-360(1993))、嗜热脂肪芽孢杆菌(参见例如, JP 64/744992) 或短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) (参见例如 W091/16422) 的脂肪酶。考虑在制剂中使用的另外的脂肪酶变体包括例如在:W092/05249、W094/01541、W095/35381、W096/00292、W095/30744、W094/25578、W095/14783、W095/22615、W097/04079、W097/07202、EP 407225 和 EP 260105 中描述的那些。一些可商购获得的脂肪酶包括 **Lipolase<sup>®</sup>** 和 **Lipolase<sup>®</sup> Ultra** 诺和诺德公司 (Novo Nordisk A/S)。

[0304] 聚酯酶:合适的聚酯酶包括但不限于 W001/34899 (Danisco A/S) 和 W001/14629 (Danisco A/S) 中描述的那些,并且可以与本文论述的其他酶包括于任何组合中。

[0305] 淀粉酶:所述组合物可与其他  $\alpha$ -淀粉酶组合,如非变体  $\alpha$ -淀粉酶。这些酶可包含市售的淀粉酶,例如但不限于 **Duramyl<sup>®</sup>**、**Termamyl<sup>™</sup>**、**Fungamyl<sup>®</sup>** 和 **BAN<sup>™</sup>** 诺和诺德公司 (Novo Nordisk A/S)、**Rapidase<sup>®</sup>** 和 **Purastar<sup>®</sup>** 丹尼斯克公司 (Danisco A/S)。

[0306] 纤维素酶:可向组合物添加纤维素酶。合适的纤维素酶包括细菌或真菌来源的那些。包括经化学修饰或蛋白质工程改造的突变体。合适的纤维素酶包括来自芽孢杆菌属、假单胞菌属、腐质霉属、镰孢菌属、梭孢壳属 (*Thielavia*)、枝顶孢属 (*Acremonium*) 的纤维素酶,例如美国专利 No. 4,435,307、No. 5,648,263;No. 5,691,178;No. 5,776,757 和 W089/09259 中公开的由特异腐质霉 (*Humicola insolens*)、嗜热毁丝

霉 (*Myceliophthora thermophila*) 和尖孢镰孢菌产生的真菌纤维素酶。可以考虑使用的示例性纤维素酶为对于纺织物具有颜色护理益处的那些。此类纤维素酶的实例是描述于例如 EP0495257、EP 531372、WO 99/25846 (Danisco A/S)、WO 96/34108 (Danisco A/S)、WO 96/11262、WO 96/29397 和 WO 98/08940 中的纤维素酶。其他示例性纤维素酶变体包括描述于 WO 94/07998、WO 98/12307、WO95/24471、PCT/DK98/00299、EP 531315、美国专利 No. 5, 457, 046、No. 5, 686, 593 和 No. 5, 763, 254 中的那些。市售的纤维素酶包括 **Celluzyme<sup>®</sup>** 和 **Carezyme<sup>®</sup>** 诺和诺德公司 (Novo Nordisk A/S) ; **Clazinase<sup>™</sup>** 和 **Puradax<sup>®</sup>** HA 丹尼斯克公司 (Danisco A/S) ; 以及 **KAC-500(B)<sup>™</sup>** 花王公司 (Kao Corporation)。

[0307] 过氧化物酶 / 氧化酶 : 考虑用于组合物中的合适过氧化物酶 / 氧化酶包括植物、细菌或真菌来源的那些。包括经化学修饰或蛋白质工程改造的突变体。可用的过氧化物酶的实例包括描述于 WO 93/24618、WO95/10602 和 WO 98/15257 中的来自鬼伞属 (*Coprinus*) (例如来自灰盖鬼伞 (*C. cinereus*)) 的过氧化物酶及其变体。可商购获得的过氧化物酶例如包括 **Guardzyme<sup>™</sup>** 诺和诺德公司 (Novo Nordisk A/S)。

[0308] 可通过添加含有一种或多种酶的单独的添加剂, 或通过添加包含所有这些酶的组合添加剂而在洗涤剂组合物中包括洗涤剂酶。可以将洗涤添加剂, 即单独的添加剂或组合的添加剂配制成颗粒、液体、浆液等。合适的颗粒洗涤添加剂制剂包括无粉尘颗粒。

[0309] 可以例如, 如美国专利 No. 4, 106, 991 和 No. 4, 661, 452 所公开的那样来生产无粉尘颗粒, 并且可任选地通过本领域已知的方法进行包衣。蜡质包衣材料的实例是平均分子量为 1, 000 至 20, 000 的聚环氧乙烷产品 (例如, 聚乙二醇, PEG) ; 具有 16 至 50 个环氧乙烷单元的乙氧基化壬基酚 ; 乙氧基化脂肪醇, 其中醇含有 12 至 20 个碳原子且其中有 15 至 80 个环氧乙烷单元 ; 脂肪醇 ; 脂肪酸 ; 以及脂肪酸的甘油单酯和甘油二酯及甘油三酯。例如, GB 1483591 给出了适于通过流化床技术施加的成膜包衣材料的实例。可例如通过加入多元醇 (如丙二醇)、糖或糖醇、乳酸或硼酸, 根据已确立的方法来稳定液态酶制备物。可根据 EP 238, 216 中公开的方法来制备受保护的酶。

[0310] 洗涤剂组合物可以是任何便利的形式, 例如棒、片、凝胶、粉末、颗粒、糊料或液体。液体洗涤剂可以是水性的, 通常含有高达约 70% 的水, 和 0% 至约 30% 的有机溶剂。还考虑含有约 30% 或更少水的紧致洗涤剂凝胶。洗涤剂组合物包含一种或多种表面活性剂, 所述表面活性剂可以是非离子型 (包括半极性)、阴离子型、阳离子型或两性离子型或它们的任何组合。表面活性剂通常以约 0.1 重量% 至 60 重量% 的水平存在。

[0311] 当包括在洗涤剂中时, 洗涤剂通常将含有约 1% 至约 40% 的阴离子型表面活性剂, 如直链烷基苯磺酸盐、 $\alpha$ -烯炔磺酸盐、烷基硫酸盐 (脂肪醇硫酸盐)、醇乙氧基硫酸盐、仲烷基磺酸盐、 $\alpha$ -磺基脂肪酸甲酯、烷基琥珀酸或烯基琥珀酸或皂。

[0312] 当包括在洗涤剂中时, 洗涤剂通常将含有约 0.2% 至约 40% 的非离子型表面活性剂, 如醇乙氧基化物、壬基酚乙氧基化物、烷基多苷、烷基二甲基胺氧化物、乙氧基化脂肪醇单乙醇酰胺、脂肪酸单乙醇酰胺、多羟基烷基脂肪酸酰胺或葡糖胺的 N- 酰基 -N- 烷基衍生物 (“葡糖酰胺”)。

[0313] 洗涤剂可含有 0% 至约 65% 的洗涤剂助洗剂或络合剂, 如沸石、二磷酸盐、三磷酸盐、膦酸盐、碳酸盐、柠檬酸盐、次氨基三乙酸、乙二胺四乙酸 (EDTA)、二亚乙基三胺五乙酸、烷基或烯基琥珀酸、可溶性硅酸盐或层状硅酸盐 (例如来自赫斯特 (Hoechst) 的 SKS-6)。

[0314] 洗涤剂可包含一种或多种聚合物。实例有羧甲基纤维素 (CMC)、聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)、聚乙二醇 (PEG)、聚乙烯醇 (PVA)、聚(乙烯基吡啶-N-氧化物)、聚乙烯咪唑、聚羧酸酯(如聚丙烯酸酯)、马来酸/丙烯酸共聚物和甲基丙烯酸月桂酯/丙烯酸共聚物。

[0315] 洗涤剂可含有漂白系统,该漂白系统可包含  $H_2O_2$  来源(如过硼酸盐或过碳酸盐),其可以与形成过酸的漂白活化剂(如四乙酰基乙二胺或壬酰基氧基苯磺酸盐)联用。或者,漂白系统可包含过氧酸(例如酰胺、酰亚胺或砒类过氧酸)。漂白系统也可以是酶促漂白系统。

[0316] 可使用常规的稳定剂来稳定洗涤剂组合物的酶,所述稳定剂为例如多元醇(如丙二醇或甘油)、糖或糖醇、乳酸、硼酸或硼酸衍生物(例如硼酸芳族酯)或苯基硼酸衍生物(例如4-甲酰基苯基硼酸)。可如 W092/19709 和 W0 92/19708 中所述配制所述组合物。

[0317] 洗涤剂也可含有其他常规洗涤剂成分,例如织物调理剂,包括粘土、增泡剂、抑泡剂、防腐蚀剂、悬污剂、抗污垢再沉积剂、染料、杀细菌剂、荧光增白剂、助水溶物、酶暗抑制剂或香料。

[0318] 考虑在洗涤剂组合物中,酶变体可以按相当于每升洗液约 0.01 至约 100mg 酶蛋白质(特别是每升洗液约 0.05 至约 5.0mg 酶蛋白质,尤其是每升洗液约 0.1 至约 1.0mg 酶蛋白质)的量加入。

[0319] 可用于测试包含 AmyE 或其变体的清洁组合物的效力的代表性测定法包括样片 (swatch) 测试。“样片”是其上施有污渍的一块材料如织物。该材料可以是例如由棉、聚酯或天然纤维与合成纤维的混合物制成的织物。作为另外一种选择,该材料可以是纸,如滤纸或硝化纤维素,或者是一块硬质材料,如陶瓷、金属或玻璃。对于  $\alpha$ -淀粉酶,污渍是基于淀粉的,但是也可以包括血液、乳、墨、草、茶、酒、菠菜、肉汁、巧克力、蛋、奶酪、粘土、色素、油或这些化合物的混合物。在一个实施例中,在 BMI(血液/乳/墨)测定法中测试 AmyE 或其变体。

[0320] “小样片”是自样片上用单孔打孔装置切下的部分,或者用定制的 96 孔打孔装置(其中该多孔打孔模式与标准 96 孔微量滴定板匹配)切下的部分,或者是以其它方式自样片上取下的部分。样片可以是纺织物、纸、金属或其他合适的材料。小样片可以在放入 24 孔、48 孔或 96 孔微量滴定板孔之前或之后具有固着的污渍。“小样片”也可以通过向小块材料施加污渍而制成。例如,小样片可以是直径为 5/8" 或 0.25" 的具有污渍的织物片。定制的打孔器可以以使得其同时将 96 个样片递送至 96 孔板的所有孔中的方式设计。该装置可以通过简单地向同一 96 孔板多次上样,而向每孔递送不止一个样片。可以设想将多孔打孔装置用于向任何格式的板(包括但不限于 24 孔、48 孔和 96 孔板)同时递送多个样片。在另一个可设想的方法中,染污的测试平台可以由金属、塑料、玻璃、陶瓷或其他合适材料制成的、被污物载污体包覆的珠。然后将一个或多个包覆的珠置于装有合适缓冲液和酶的 96 孔、48 孔或 24 孔板或更大版式的板的孔中。这种情况下,可以通过直接吸光度测量或在二级生色反应后在上清液中检测释放的污物。也可以通过质谱分析来进行对所释放的污物的分析。

[0321] 在一个实施例中,处理方案提供对污渍固着程度的控制。因此,产生例如当在不存在被测试的酶的情况下进行洗涤时能释放出不等量的污渍的样片是可能的。固着的样片的使用导致在洗涤测定中信噪比显著改善。此外,通过改变固着程度,可以产生在多种清洁条

件下给出最佳结果的污渍。

[0322] 在多种材料类型上具有已知“强度”的污渍的样片是可商购获得的(瑞士 EMPA 实验室 (EMPA, St.Gallen, Switzerland); 德国 wfk 公司 (wfk--Testgewebe GmbH, Krefeld Germany); 或荷兰材料测试中心 (Center for Test Materials, Vlaardingen, The Netherlands) 和 / 或可以由从业者制得 (Morris 和 Prato, Textile Research Journal (纺织研究杂志) 52 (4) :280-286 (1982))。样片可包含例如含有由血液 / 乳 / 墨 (BMI)、菠菜、草或巧克力 / 乳 / 烟灰形成的污渍的含棉织物。例如可以用 0.0003% 至 0.3% 的过氧化氢将 BMI 污渍固着在棉上。其他组合包括用 0.001% 至 1% 戊二醛固着的草或菠菜、用 0.001% 至 1% 戊二醛固着的明胶和考马斯染料, 或用 0.001% 至 1% 戊二醛固着的巧克力、乳和烟灰。

[0323] 也可以在用酶和 / 或洗涤剂制剂温育期间搅拌样片。洗涤性能数据取决于样片在孔中 (尤其是在 96 孔板中) 的取向 (水平对垂直)。这将表明在温育期间混合是不充分的。尽管存在许多方式来确保温育期间充分的搅拌, 但可以构造其中微量滴定板夹在两个铝板之间的板夹持器。这可以简单地例如在孔上方放置粘性板密封物, 然后用任何类型的适合的、可商购获得的夹子将两个铝板与 96 孔板夹紧而实现。然后可以将它放到商业培养箱摇床中。将摇床设定为约 400rpm 可导致非常有效的混合, 而板夹持器有效地阻止了泄漏或交叉污染。

[0324] 可以使用三硝基苯磺酸 (TNBS) 来定量洗涤液体中的氨基基团的浓度。这可以用作从样片中移出的蛋白质的量的量度 (参见例如 Cayot 和 Tainturier, Anal. Biochem. (分析生物化学) 249 :184-200 (1997))。然而, 如果洗涤剂或酶样品导致形成异乎寻常小的肽片段 (例如, 因样品中存在肽酶所致), 那么人们将获得较大的 TNBS 信号, 即更多“噪音”。

[0325] 另一用于测量对血液 / 乳 / 墨的洗涤性能的手段是基于墨的释放, 这可以通过测量洗涤液体的吸光度来定量。可以在 350 至 800nm 之间的任何波长下测量吸光度。在一个实施例中, 可以在 410nm 或 620nm 下测量波长。也可以检查洗涤液体以确定对于含有草、菠菜、明胶或考马斯染料的污渍的洗涤性能。适用于这些污渍的波长包括对于菠菜或草的 670nm 和对于明胶或考马斯染料的 620nm。例如, 移出等份试样的洗涤液体 (例如, 通常来自 96 孔微板的 100-150mL) 并置于比色皿或多孔微量滴定板中。然后将其置于分光光度计中并在适当的波长下读取吸光度。该系统也可用于确定适用盘碟洗涤的酶和 / 或洗涤剂组合物, 例如利用在诸如布、塑料或陶瓷之类的合适载污体上的血液 / 乳 / 墨水污渍。

[0326] 在一个方面, 可以通过在 25°C 下将 0.3% 过氧化氢施加到 BMI / 棉样片上 30 分钟或通过在 60°C 下将 0.03% 过氧化氢施加到 BMI / 棉样片上 30 分钟, 使 BMI 污渍固着在棉上。从 BMI / 棉样片上切下大约 0.25" 的小样片并置于 96 孔微量滴定板的孔中。向各孔中放入洗涤剂组合物与酶如变体蛋白质的已知混合物。向微量滴定板顶部放置粘性板密封物后, 将微量滴定板与铝板夹在一起, 并在定轨摇床上以大约 250rpm 搅拌约 10 至 60 分钟。这个时间结束后, 将上清液转移至新微量滴定板的孔中并测量 620nm 下的墨水吸光度。这可以类似地用通过在 25°C 下向菠菜 / 棉样片或草 / 棉样片施加 0.01% 戊二醛 30 分钟而固着在棉上的菠菜污渍或草污渍来进行测试。这也可以用巧克力、乳和 / 或烟灰污渍来进行。

[0327] 5.6. 纺织物退浆组合物及用途

[0328] 还考虑使用一种或多种 AmyE 或其变体处理织物 (例如, 使纺织品退浆) 的组合物

和方法。AmyE 或其变体可以用于本领域所熟知的任何织物处理方法（参见例如，美国专利 No. 6, 077, 316）中。例如，在一个方面，可通过包括将织物与酶变体在溶液中接触的方法来改善该织物的触感和外观。在一个方面，织物可以用该溶液在压力下进行处理。

[0329] 在一个方面，可以在纺织物纺织期间或之后，或在退浆阶段或者一个或多个额外的织物处理步骤的过程中施加酶。在纺织物纺织期间，纺线暴露于相当大的机械张力。在机械织机上纺织之前，经纱通常涂上淀粉或淀粉衍生物浆料以增加其抗张强度以及防止断裂。可以施加 AmyE 或其变体以除去这些淀粉或淀粉衍生物浆料。在纺织物织成之后，织物可以进入退浆阶段。这之后可接着一个或多个额外的织物处理步骤。退浆是从纺织品中除去浆料的行为。纺织后，应除去浆料涂层，之后再进一步处理织物，以便确保均一和耐洗效果。本文还提供了包括通过酶变体的作用来酶促水解浆料的退浆方法。

[0330] AmyE 或其变体可以单独或与其他退浆化学试剂和 / 或退浆酶一起用作洗涤添加剂（例如在水性组合物中）使织物（包括含棉织物）退浆。AmyE 或其变体也可用于在靛蓝染色的粗料棉布织物和衣物上产生石洗外观的组合物和方法中。为生产衣服，可将织物进行剪裁并缝制成衣服或衣物，之后进行整理。特别是，为生产粗料棉布牛仔服，已开发了不同的酶促整理方法。粗料棉布衣物的整理通常始于酶促退浆步骤，在此期间淀粉分解酶作用于衣服以使织物柔软并使该棉布更易于接受随后的酶促整理步骤。 $\alpha$ -淀粉酶变体可用于整理粗料棉布衣物（例如“生物打磨法”）、酶促退浆及赋予织物柔软性和 / 或整理工艺的方法中。

[0331] 对于本领域技术人员显而易见的是，可以对组合物及其使用方法进行多种修改和变更而不偏离预期用途的精神或范围。因此，所述修改和变更落在所附权利要求书及其等同部分的范围内。

[0332] 实例

[0333] 实例 1

[0334] 质粒构建

[0335] 将编码 SEQ ID NO :1 的 AmyE 或 C 末端截短的 AmyE 变体 AmyE-tr (SEQ ID NO :3) 的核酸克隆进美国专利 No. 5, 024, 943 中公开的枯草芽孢杆菌 pHPLT 表达载体中。图 4 示出了包含编码 AmyE-tr 的核酸的载体。

[0336] 参考图 4，pHPLT 载体含有地衣芽孢杆菌 LAT 启动子（“Plat”）、编码 LAT 信号肽的序列（“preLAT”）、随后的用于克隆的 PstI 和 HpaI 限制性位点。另外的质粒元件来自 McKenzie 等人, Plasmid 15(2) :93-103(1986) 中公开的质粒 pUB110：“ori-pUB”是来自 pUB110 的复制起点；“reppUB”是来自 pUB110 的复制酶基因，“neo”是来自 pUB110 的新霉素 / 卡那霉素抗性基因；“bleo”是博来霉素抗性标记，“Tlat”是来自地衣芽孢杆菌淀粉酶的转录终止子。

[0337] 使用由 Yang 等人, “Nucleotide sequence of the amylase gene from *Bacillus subtilis*,” Nucleic Acids Res. (“枯草芽孢杆菌淀粉酶基因的核苷酸序列”，核酸研究) 11(2) :237-49(1983) 描述的 AmyE 编码序列，装配用于表达 AmyE 和 AmyE-tr 的质粒构建体。质粒 pME629.5 含有编码 SEQ ID NO :1 的全长 AmyE 的核酸。与由 Yang 等人描述的序列比较，该基因在编码淀粉结合结构域的序列中具有 3 碱基缺失。

[0338] 质粒 pME630.7 含有截短的 AmyE 序列（即 AmyE-tr），并在图 4 中示出。AmyE-tr 在

SEQ ID NO :1 的 D425 处截短。AmyE-tr 基于缺少淀粉结合结构域的 AmyE 变体的晶体结构设计,如 Fujimoto 等人,“Crystal structure of a catalytic-site mutant alpha-amylase from *Bacillus subtilis* complexed with maltopentaose,” *J. Mol. Biol.* 的 (“枯草芽孢杆菌与麦芽五糖络合的催化位点突变的  $\alpha$ -淀粉酶的晶体结构”, *分子生物学杂志*) 277 : 393-407 (1998) 中所公开的。参见 RCSB Protein Data Bank<sup>®</sup> 登录号 1BAG, “Alpha-Amylase From *Bacillus Subtilis* Complexed With Maltopentaose” 的 (“枯草芽孢杆菌与麦芽五糖络合的  $\alpha$ -淀粉酶”)。

[0339] 对于表达质粒构建体,使用 **Herculase<sup>®</sup>** 的 (加利福尼亚州 Stratagene 公司 (Stratagene, California)) PCR 扩增编码 AmyE 的核酸。PCR 产物使用 Qiagen QIAquik<sup>™</sup> PCR 纯化试剂盒 (加利福尼亚州凯杰公司 (Qiagen, Valencia, California)) 中提供的柱来纯化,并重悬浮于 50mL Milli-Q<sup>™</sup> 纯化水中。用 HpaI (罗氏 (Roche)) 和 PstI (罗氏 (Roche)) 顺次消化 50mL 纯化的 DNA,并使所得的 DNA 重悬浮于 30mL Milli-Q<sup>™</sup> 纯化水中。利用 PstI 和 HpaI 克隆位点,将 10-20ng/mL DNA 克隆进质粒 pHPLT 中。将连接混合物直接转化进感受态枯草芽孢杆菌细胞 (基因型 :DaprE, DnprE, degUHy32 oppA, DspoIIE3501, amyE::xyIRPxyIAcomK-phleo) 中。SC6.1 枯草芽孢杆菌细胞具有处于木糖诱导型启动子控制下的感受态基因 (comK)。通过添加木糖诱导关于 DNA 结合和摄取的感受态。因为亲本质粒中的 amyE 基因具有两个 PstI 位点,所以进行 PCR 融合反应以在克隆前移除这些位点。在两个单独的 PCR 反应后完成 PCR 融合。为了使用 HpaI 和 PstI 位点制备 pHPLT 构建体,使用了下述引物 :

[0340] SEQ ID NO :18 :引物 PSTAMYE-F 5'

[0341] CTTCTTGCTGCCTCATTCTGCAGCTTCAGCACTTACAGCACCGTCGATCAAAAAGCGGAAC 3'

[0342] SEQ ID NO :19 :引物 AMYENOPST-R 5'

[0343] CTGGAGGCACTATCCTGAAGGATTTCTCCGTATTGGAACTCTGCTGATGTATTTGTG 3'

[0344] SEQ ID NO :20 :引物 AMYENOPST-F 5'

[0345] CACAAATACATCAGCAGAGTTCCAATACGGAGAAATCCTTCAGGATAGTGCCTCCAG 3'

[0346] SEQ ID NO :21 :引物 HPAIAMYE-R 5'

[0347] CAGGAAATCCGTCCTCTGTAACTCAATGGGGAAGAGAACCGCTTAAGCCCGAGTC 3'

[0348] SEQ ID NO :22 :引物 HPAIAMYE466-R 5'

[0349] CAGGAAATCCGTCCTCTGTAACTCAATCAGGATAAAGCACAGCTACAGACCTGG 3'

[0350] SEQ ID NO :23 :引物 AMYE SEQ-F1 5'

[0351] TACACAAGTACAGTCCTATCTG 3'

[0352] SEQ ID NO :24 :引物 AMYE SEQ-F2 5'

[0353] CATCCTCTGTCTCTATCAATAC 3'

[0354] 质粒 pME629.5 和 pME630.7 表达具有 31 残基信号序列的 AmyE,所述信号序列在翻译后被切除。随后按 Yang 等人 (1983) (出处同上) 所述,分开地对随后的 10 个 N 端氨基酸进行加工。

[0355] 蛋白质表达

[0356] 在具有 10mg/mL 新霉素、1% 不溶性淀粉的 LA 上选择 AmyE 全长克隆和截短克隆的转化体,并且在 37°C 下温育过夜。选择在菌落周围显示透明 (或晕圈) 的转化体,制备小

瓶用于进一步研究。在具有 10  $\mu$ g/mL 新霉素的 LB 中培养转化体的预培养物 8 小时。将 30  $\mu$ L 该预培养物加入装有 30mL 培养基（下文描述）的 250mL 烧瓶内，所述培养基补充有 10  $\mu$ g/mL 新霉素和 5mM  $\text{CaCl}_2$ 。该培养基是基于 MOPS 缓冲液的富集的半成分确定的培养基，具有尿素作为主要氮源，葡萄糖作为主要碳源，并且补充有 1% 大豆脲用于茁壮的细胞生长。摇瓶在约 37°C 和 250rpm 混合下温育 60–65 小时。通过在锥形管中 5000rpm 下离心 20 分钟来收获培养物。因为 AmyE 全长和 AmyE 截短蛋白质两者都以高水平表达，所以培养上清液用于测定法而无需进一步纯化。

#### [0357] 实例 2

[0358] 下述测定法用于下文描述的实例中。与下文提供的方案的任何偏离均在实例中指出。在这些实验中，分光光度计用于测量反应完成后形成的产物的吸光度。

#### [0359] 96 孔微量滴定板中用于蛋白质含量测定的 Bradford 测定法

[0360] 使用 Bradford QuickStart™ 染料试剂（加利福尼亚州伯乐公司 (Bio-Rad, California)）测定样品上清液中的蛋白质浓度。通过过滤来自培养物的肉汤获得样品，所述培养物在 280rpm 振荡和增湿通气下于约 37°C 在微量滴定板 (MTP) 中生长了 3 天。使 10  $\mu$ L 培养物滤液样品与 200  $\mu$ L Bradford QuickStart™ 染料试剂在第二块 MTP 的孔中合并。在充分混合后，将 MTP 在室温下温育至少 10 分钟。去除气泡并且在 595nm 下测量 OD（光密度）。为了测定蛋白质浓度，从样品读数中扣除本底读数（来自未接种的孔）。

#### [0361] 喷射操作方法

[0362] 本文描述的喷射操作方法是关于使用配备有容纳有 0.09” 直径混合管的 M-101HydroHeater（威斯康星州 Hydrothermal 公司 (Hydrothermal, Waukesha, WI)）的 HYDRYTERMAL 喷射机（也称为 ATTEC 蒸煮系统）。该系统由带搅拌器的供应罐、正位移泵 (Moyno)（俄亥俄州莫依诺公司 (Moyno Inc., Springfield OH)）、M-101HydroHeater 牌蒸汽注入蒸煮器、蒸汽供应源、温度传感器、压力指示器、多种长度的保持环、出口处的止回阀（允许在高于环境压力下蒸煮）和闪蒸罐组成。

[0363] 可将该系统用于模拟大规模生产工厂所用的蒸汽注入系统的操作，通常称为第一阶段或初级液化。典型的工艺变量包括酶剂量、射流温度、初级保持时间、pH、钙和钠水平、来自制粉厂的淀粉质量和干物质。一般而言，所产生的液化物的质量不能单凭 DE 发展来确定而必须在糖化后利用如下所述的沉降测试、过滤测试和淀粉阳性（碘）检测测试来评价。将淀粉装进辅助罐中至接近 ds 目标，然后通过滤过 100 目筛网以排除任何大得足以阻塞小混合管的颗粒状物质而转移至喷射机上的罐。

[0364] 喷射操作由三个主要阶段组成：喷射启动、淀粉蒸煮和关闭。如下步骤在喷射启动阶段进行：

[0365] • 通过给 Moyno 入口的顶部提供足够的流量至溢流至排水管来使水开始通过系统。

[0366] • 以 0.5gpm 启动 Moyno（如果该系统中存在足量空气的话，流量计可能不会检测流量，系统可能会确定其是干的，泵会停止；为了解决该问题，通过按下泵停止按钮并重启来从系统清除空气）；

[0367] • 使该系统充满水并将止回阀设定为约 16–20psi；

[0368] • 观察接缝的泄漏情况；

- [0369] • 在系统充满水后,打开主蒸汽阀至少几分钟让管道中的冷凝物排出分水器;
- [0370] • 打开空气供应阀;
- [0371] • 将温度选择器切换至打开,从而蒸汽被加至该系统;
- [0372] • 使用测微计调节射流的蒸汽供应量以实现电阻温度检测器 (RTD) 的温度读数为约 108.9–110°C;
- [0373] • 以 0.5gpm 流量的水调节混合管以达到约 40psi 的进料压力;以及
- [0374] • 让系统运转约一小时,预热所有的管道、接缝、管锚等等。
- [0375] 在该启动阶段结束时,系统应被彻底加热,热电偶应该读出整个系统有不到 1.7°C 温差。

[0376] 接着,添加淀粉浆料并蒸煮。此前已经确定 35–40kg 浆料是可提供合适样品的最小量。这还取决于所要求的保持时间。采用大约 6 分钟的保持时间,35–40kg 浆料 (一 3 加仑环管;29–34 升或 7.7–9 加仑) 将会提供 15–18 分钟的料流。据信由于密度差异淀粉浆料将推动来自系统的水,追赶淀粉的水将由于密度而会导致贯穿该系统的沟道。因此,在假设该系统将会很快平衡的情况下将淀粉浆料以最小量使用。当在非最佳条件下工作时,可使用更多浆料以允许更多时间来达到稳定。

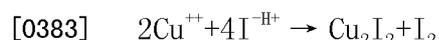
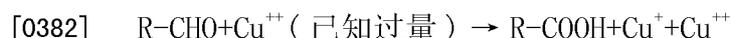
[0377] 首先将淀粉浆料添加至供料罐,其中对 pH 进行调节并添加所有试剂 (例如酶)。将温度降低至在 RTD 处的温度为 98.9°C。由于淀粉浆料每体积含有较少水而需要较少的来自蒸汽的热量来实现目标温度,该降低设计用于防止温度过冲。当自添加酶后已过去至少一分钟时,在关闭水的同时打开供料罐向 Moyno 的供应。同时启动计时器。如果进料压力不稳定在约 100psi,则调节混合管以获得所需的压力。淀粉的前面部分应该以所计算的时间离开闪蒸罐。由于蒸汽加入和停留时间、管转弯等 (这些因素均未包括在初始计算内),时间应长约 10–15%。如果温度是稳定的,则可早在两个保持环管时间提取样品。

[0378] 通常,蒸煮温度是入口环管和出口环管温度的平均值,这两个温度应该彼此相差不超过 1.1°C。在进行极端操作测试和 / 或不规律地操作喷射的情况中,出口温度用作样品的蒸煮温度。

[0379] 在淀粉蒸煮阶段后,通过转回至打开水同时保持蒸汽打开来关闭系统。温度应该上升而供料压力应该降低至初始值。将该系统用热水冲洗直至流出的水变干净。然后关闭蒸汽,通过用冷水操作来冷却系统。为了除去可能藏在接缝、泵和阀中的残留量的淀粉,可将次氯酸盐溶液(CHLOROX<sup>®</sup>)冲洗用于减少重启时的臭气。作为另一种选择,可每周冲洗系统一次以在系统未使用时控制臭味。

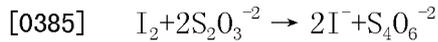
#### [0380] DE 测定

[0381] 通过如下偶联反应测定给定样品的 DE 值。首先,将样品与已知过量的铜 (II) 离子 (Cu<sup>++</sup>) 混合。在存在还原糖 (R-CHO) 的情况下,Copper (II) 被按化学计量地还原为铜 (I) (Cu<sup>+</sup>)。接着,将让剩余的铜 (II) 离子在酸性介质 (H<sup>+</sup>) 中还原碘离子 (I<sup>-</sup>) 以形成碘三离子 (I<sub>3</sub><sup>-</sup>)。然后用标准化的硫代硫酸盐溶液 (S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>-2</sup>) 滴定该碘三离子。



[0384]





[0386] 参见 Schoorl, N., Zurjodometrischen Zukerbestimmung mittles Fehlingscher Losung., Zeitschr. F. agnew. Chem. (“菲林氏间接碘量法测定糖含量”, 应用化学学报), 12, 633(1899); Hodge, J. E. & Davis, H. A. Selected Methods for Determining Reducing Sugars, United States Department of Agriculture Technical Bulletin (“选定的测定还原糖的方法”, 美国农业部技术专刊) A1C333(1952); 和 Schenck, F. W. & Hebeda, R. E., Starch Hydrolysis Products, Worldwide Technology Production and Applications(《淀粉水解产品, 全球技术生产和应用》), 第 379 页, VCH 出版公司 (VCH Publishers) (1992)。

[0387] 在 10ml 等份试样中制备含有大约 47-67mg 葡萄糖当量的样品稀释液。当将该工艺用于淀粉液化时, 将液化的材料称量进配衡的装有 6 滴 4N HCl 的 50ml 容量瓶中。为了实现目标葡萄糖, 将 6-8g 大约 35% 干物质的浆料用于 10ml 测试样品。对于整谷粒液化, 难以处理碾磨的粒状糊料。为了实现整谷粒液化的目标滴定度差异, 所用的重量应为 1.3-1.8g 大约 30% 干物质的浆料, 其中在添加费林溶液 A(见下文)之前添加 25ml 去离子 (DI) 水。

[0388] 为了开始该测试法, 将 10ml 样品转移进 250ml 锥形瓶中。以如下顺序添加如下试剂:

[0389] • 15ml 蒸馏 (DI) 水;

[0390] • 10ml 费林溶液 A(将 69.3g 分析级硫酸铜五水合物 ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ) 溶解于 1L DI 水中); 以及

[0391] • 10ml 费林溶液 B(346.0g 酒石酸钠钾四水合物 ( $KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$ ) (罗谢尔氏盐) 和 100g 分析级氢氧化钠溶解于 1L DI 水中)。

[0392] 可添加沸腾珠 (Boiling bead) 或沸腾石以使过热程度最小。使烧瓶中的内容物充分混合, 将该烧瓶置于变阻器控制电热器上。将该加热器进行预调整以使得 3 分钟  $\pm$  15 秒后混合物达到沸腾。使样品保持沸腾另外两分钟。因而总加热时间为大约 5 分钟。随后, 将烧瓶从加热器移开并立刻在自来水下冷却至室温。可任选地, 可使用水浴或冰浴。在将混合物冷却后, 以如下顺序添加如下试剂:

[0393] • 10ml 30% 碘化钾溶液; 和

[0394] • 10ml 26% 硫酸溶液。

[0395] 将该混合物立即用标准化的 0.1N 硫代硫酸钠滴定直至溶液变成浅黄色。在添加 2ml 淀粉指示剂 (1% w/v) 后, 继续滴定。停止滴定直至蓝色的淀粉碘复合物消失。最终的滴定颜色应该是浅粉红色。

[0396] 为了计算 DE 值, 通过滴定 25ml 的 DI 水来确定水空白。另外, 通过吸取 5ml 1% 葡萄糖标准品和 5ml DI 水进反应烧瓶中来确定标准葡萄糖滴定度 ( $T_s$ )。DE 值计算如下:

[0397] 
$$DE = \frac{(T_{wb} - T_u) \times 0.05 \times 100 \times 100\%}{(T_{wb} - T_s) \times W \times \% DS}$$

[0398] 其中:

[0399]  $T_{wb}$  = 水空白的滴定度;

[0400]  $T_u$  = 未知样的滴定度;

- [0401] Ts = 葡萄糖标准品的滴定度；
- [0402] 0.05 = 0.05g 葡萄糖；
- [0403] W = 未知样的重量 (g)；
- [0404] 100 = 将干固形物淀粉百分数转化为干固形物淀粉；
- [0405] 100% = 将葡萄糖当量转化为百分数；以及
- [0406] % DS = 样品中的干固形物百分比。
- [0407] 下面给出了示例计算：
- [0408] 8.000g 的液化物添加至 50ml 容量瓶；
- [0409] 取 10ml 用于分析 (1.600g 液化物)；
- [0410] 34.0% 干物质；
- [0411] Twb = 27.2；
- [0412] Ts = 12.73；以及
- [0413] Tu = 11.00。

$$[0414] \quad DE = \frac{(27.2 - 12.73) \times 0.05 \times 100 \times 100}{(27.2 - 11.00) \times 1.600 \times 34} = 8.78$$

#### [0415] 碘测试

[0416] 对于糖液碘测试,用 10ml 去 DI 水或 RO 水稀释 0.2ml 糖液。将稀释的糖液煮沸 10 分钟,然后在冰浴中冷却。将 0.5ml 碘溶液 (0.02M) 添加至该冷却的糖液样品。让样品静置至少 10 分钟,然后读数。

#### [0417] 沉降测试

[0418] 所有的淀粉 (特别是基于谷粒的淀粉) 含有除葡萄糖聚合物之外的衡量组分,如细纤维、蛋白质、脂肪和灰分,这些组分是在水解期间释放的。淀粉蒸煮参数和操作设备如蒸汽喷射蒸煮器对该物质的量有影响。小量的淀粉-脂复合物以及在正确的条件下,部分糊化的和 / 或全淀粉颗粒可能会通过液化系统。由于液化系统中水解不完全,测试这些组分的最可靠位置是在完全糖化后。接受来自磨粉机的经良好洗涤的淀粉的运行良好的液化系统应该通过该方法以 < 1.5% 沉降物测试。存在着可稳定递送 < 1% 的系统。操作历史已显示,高于 2.5% 的沉降水平将导致下游过滤困难,因而导致在预涂介质和 / 或微过滤器方面的费用。

[0419] 本文描述的该方法可用于具有 > 90% 葡萄糖的所有葡萄糖基质。这也可用于麦芽糖液以及液化的低 DE 产物。由于最终的糖化干物质 > 5% 引起的粘度和浮力问题,已知高于该值的液体应该在测试前进行稀释。

[0420] 将糖液的样品在 60℃ 水浴中温育 10-30 分钟,以使它们达到恒温。然而,温育不应超过一小时。如有必要,在测试之前将 ds 值调整至 35% ± 0.5%。对于每份样品,将 15ml 糖液在磁力搅拌器上充分混合,并用注射器转移至离心管。将样品以 2,500rpm (1,350 × g) 离心 10 分钟。如有沉降物,则其可见于离心管的底部。

#### [0421] 糖化淀粉的滤液测试

[0422] 该测试是基于在受控温度和真空下透过受控深度的助滤剂 (硅藻土) 的滤过速率。该测试可鉴别在糖化后液化酶和工艺的差异。该测试适于模拟工业旋转真空预涂过滤系统。其可用于多种液化和糖化酶以及工艺的测定和证实。另外,滤液可提供清洁的材料

用于进一步评价,如用碘反应测定可溶性淀粉。

[0423] 将柱套保持在 60°C。插入两个滤纸圆片并用旋紧在配件中直至紧靠 O 形环垫圈。在配衡的 250ml 真空烧瓶就位时,添加 100ml 水至出口塞紧的该柱。打开真空泵直至实现 23-24 英寸的稳定真空。打开管出口,启动计时器。100ml 可耗费约 1 分钟 10 秒至 1 分钟 30 秒来滤过该系统。如果不是,则检查滤纸以确保它们是否紧密。在将滤纸抽吸至干燥后,夹紧出口管。在从出口管移除夹具后让泵运行。将烧瓶替换为配衡的 250ml 滤瓶。将大约 2.0g 助滤剂与 100g 测试液在 250ml 烧杯中混合。在将样品于磁力板上搅拌的同时,用注射器移出目标量的样品。上皿天平可用于该步骤。在保持颗粒处于悬浮的同时,借助于漏斗将全部量快速转移至柱子。打开出口管,启动计时器。进行收集直至液体到达滤床的顶部并记录时间。整个多次测试的滤液量可用于判断液化或糖化的操作差别。作为另一种选择,可以每平方米滤床的重量或体积计算滤过速率。

[0424] 例如,在 15 分钟内收集 60g 滤液。滤床表面的面积计算为  $\pi r^2$ ,在这种情况下计算为  $3.141593 \times 0.75 \times 0.75 = 1.767 \text{cm}^2$  (柱子具有 0.75cm 的内径)。另外,60g 的滤液等价于 52ml 具有 35% DS,密度为 1.151g/mL 的样品。因而,滤液速率为  $52 \text{ml} / 1.767 \text{cm}^2 / 15 \text{min} = 1.96 \text{ml} / \text{cm}^2 / \text{min}$ 。

#### [0425] 测量糖组成的 HPLC 方法

[0426] 糖化产物的组成通过 HPLC 系统 (贝克曼公司 (Beckman) System Gold32Karat Fullerton, CA) 测量。维持在 50°C 下的该系统配备有 Rezex 8u8% H 单糖柱和折射率 (RI) 检测器 (ERC-7515A, Anspec 公司 (Anspec Company, Inc.))。以 0.6ml/min 的流速施加稀硫酸 (0.01N) 作为流动相。将 20  $\mu$ l 的 4.0% 反应混合物溶液注射到柱子上。经 45 分钟得到洗脱曲线。由以前运行的标准品,确定了糖的分布和各糖的量。

#### [0427] AmyE 的转葡萄糖苷酶活性

[0428] 据观察, AmyE (SEQ ID NO :1) 能够催化由麦芽糖形成三糖。该催化活性可能是由于 AmyE 的转葡萄糖苷酶活性。图 5 示出了在用麦芽糖温育 AmyE 后对三糖的 HPLC 检测。具体而言,将 0.1ml AmyE 的等份样品添加至 5ml 的磷酸盐缓冲液 (pH 4.5) 中的 30% 麦芽糖,在 60°C 下温育 60 分钟。通过将样品放入沸水浴中 10 分钟而终止反应。然后将反应混合物进行 HPLC 分析。

#### [0429] 实例 3

[0430] 如美国专利申请 No. 12/478, 368 (2009 年 6 月 4 日提交) 所公开的,由葡萄糖淀粉酶和 AmyE 催化的糖化反应会导致特别是高水平的可发酵糖以及相伴随的低水平的高级糖。此外,在糖化中补充 AmyE 以统计显著的方式减少了糖液中存在的 IPS 的量,从而使其更适于甜味剂应用。因此,很值得去研究 AmyE 可用作发现在糖化后质量较差且含有高水平 IPS 的糖液的补救措施的可行性。目前,没有糖化后方法来通过选择性酶促降解来有效消除或减少 IPS。

#### [0431] 具有较差质量的液化物的产生

[0432] 已知 Fuelzyme<sup>®</sup>-LF 和直链嗜热脂肪地芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶 (AmyS) 二者均可产生液化物,该液化物在进入糖化约 24 小时时开始显示碘阳性聚合物。另外,已知在实验性喷射蒸煮中降低 pH 或温度可能会导致劣质的液化,即使二次液化会导致约 10 的 DE 值。因此,有意地在上述已知条件下处理淀粉,在未冷却至低于糖化温度的情况下对液化的淀粉

进行糖化。

[0433] 以 38% ds 制备一批次 45 升和一批次 90 升的玉米淀粉浆料。添加亚硫酸以提供 100ppm 的 SO<sub>2</sub>。将第一批用 20% 碳酸钠溶液调节至 pH4.5 并以 50MWU/g 干物质淀粉 (dss) 添加 **Fuelzyme<sup>®</sup>-LF** α-淀粉酶 (维莱尼姆公司 (Verenium Corp.))。用实验性喷射蒸煮器液化淀粉 (如实例 2 中所述)。蒸煮温度为约 109.3°C, 保持时间为约 6.5 至 7 分钟。将一升的样品置于约 95°C 水浴中进行二次液化。

[0434] 将第二批次的 90 升调节至 pH 5.8, 以 1.2AAU/g dss 添加 GC 358 α-淀粉酶 (美国丹尼斯克公司杰能科子公司 (Danisco US Inc., Genencor Division))。使浆料开始通过约 108.5°C 的蒸煮器。在约 15 分钟取一升样品用于二次液化 (“良好蒸煮”)。用 HCl 将剩余的浆料调节至约 pH5.25, 将温度调节至约 106.7°C 的目标温度 (“较差蒸煮”) 在较低温度, 例如约 106.7°C 下, 喷射操作变得不稳定。从平均温度约 105.9°C 的蒸煮管移出样品。图 6 示出了上面三种液化的 DE 发展。目标是在 DE 值为约 10 时停止二次液化。通过用 HCl 降低 pH 至约 3 并将样品保持在二次糖化温度另外 20 分钟来实现终止处理。由于 **Fuelzyme<sup>®</sup>-LF** 在较低 pH 条件下保持稳定, 未对 **Fuelzyme<sup>®</sup>-LF** 催化的液化进行终止处理。表 1 中也给出了液化结果。据估计, 50MWU/g dss 的 **Fuelzyme<sup>®</sup>-LF** (1) 在初级阶段产生了约 4.7 的 DE, 以及 (2) 在第二次液化中显示出典型的 DE 发展速率, 在十分短的时间内达到 10DE。对于 GC 358, 以相当的速率达到 10DE, 即使是在已知的 “较差蒸煮” 下进行的液化也一样。因而, 单单 DE 发展不是液化质量的可靠量度。

[0435] 表 1. 液化结果

[0436]

酶	pH	温度(°C)	斜率	截距	相关性	达到 10DE 时的时间 (分钟)
<b>Fuelzyme<sup>®</sup>-LF</b>	4.6	109.3	0.072	4.691	0.994	73
GC 358	5.8	108.5	0.099	0.728	1.000	94
GC 358	5.2	106.7	0.088	0.899	1.000	104

[0437] 通过 AmyE 消除 / 或减少 IPS 的初步表征

[0438] 将上面的液化样品冷却至约 60°C 并进行根据表 2 的糖化。将来自各液化物的 200g 样品置于七个瓶中。该剂量设计是为了涵盖如下情况: (1) AmyE 用作 **OPTIMAX<sup>®</sup>** 4060VHP (美国丹尼斯克公司杰能科子公司 (Danisco US Inc., Genencor Division)) 添加剂的测试 2 和 3, (2) 在 24 小时时发现糖罐有问题时的测试 4 和 5, 以及 3) 模拟在第 48 小时时间点时发现阳性淀粉的测试 6 和 7。

[0439] 表 2. 糖化和 AmyE 处理的初始方案

[0440]

	测试号	剂量 GAU/g	AmyE mg/g	添加 AmyE Hr
Fuelzyme®-LF	1	0.16	0	
	2	0.16	0.05	0
	3	0.16	0.01	0
	4	0.16	0.05	24
	5	0.16	0.01	24
	6	0.16	0.05	48
	7	0.16	0.01	48
GC 358 良好蒸煮	1	0.16	0	
	2	0.16	0.05	0
	3	0.16	0.01	0
	4	0.16	0.05	24
	5	0.16	0.01	24
	6	0.16	0.05	48
	7	0.16	0.01	48
GC 358 劣质蒸煮	1	0.16	0	
	2	0.16	0.05	0
	3	0.16	0.01	0
	4	0.16	0.05	24
	5	0.16	0.01	24
	6	0.16	0.05	48
	7	0.16	0.01	48

[0441] 由于第 48 小时时间点的样品 2-5 完全缺少任何显著的碘颜色减少, 在第 48 小时时间点改变上述设计。将 AmyE 剂量调整为 0.2 或 0.8mg/g。另外, 给每个系列的样品 1 添加 0.2mg/g AmyE 并置于 32°C 水浴中。在 120 小时时, 用碳酸钠将各系列中的样品 4 和 5 的 pH 值调节为 5.2。给各系列中的样品 4 再次以 0.8mg/g 添加 AmyE; 而给各系列中的样品 5 再次以 0.8mg/g 添加 AmyE 和以 1FTU/g 添加植酸酶 BP-17。关于调整的汇总在表 3 中示出。

[0442] 表 3. AmyE 处理的修改方案

测试号	AmyE 剂量(mg/g dss)和时间选择			
	0 小时	24 小时	48 小时	120 小时
1			0.2 / 32°C	
2	0.05			
3	0.01			
4		0.05		0.8 / pH 5.2
5		0.01		0.8 / 1 FTU/g / pH 5.2
6			0.2	
7			0.8	

[0443]

[0444] 在多个时间点对样品进行碘颜色测试。可基于颜色对 IPS 的移除进行视觉检测。在第 112 小时时间点的碘颜色测试的结果在图 7 中示出。在该时间点没有样品会被视为是阴性的,但来自 **Fuelzyme<sup>®</sup>-LF** 液化物的样品看起来相对较好且更清澈。然而,先前的实验表明,不添加 AmyE 时 **Fuelzyme<sup>®</sup>-LF** 液化物可能更差。另外,注意到由于在较低 pH 条件下 **Fuelzyme<sup>®</sup>-LF** 是稳定的,所以其未被失活。因此, **Fuelzyme<sup>®</sup>-LF** 可能在糖化和随后的处理期间保持活性,从而导致相对改善的颜色。

[0445] 在约第 136 小时时间点的碘颜色测试的结果在图 8 中示出。在各系列中管 1 是在第 48 小时时间点继续添加 0.2mg/g AmyE 并在 32°C 下保持。各系列中管 4 和 5 已在 60°C、pH 5.2 下用 0.8mg/g AmyE 处理约 16 小时。显然,如果 pH 保持在约 4 至约 4.5 之间则剂量为 0.8mg/g 的 AmyE 不能除去碘阳性淀粉。然而,一旦 pH 增加至约 5.2,完全除去碘阳性淀粉是可能的。

[0446] 此外,对于所有样品在第 136 小时时间点进行了沉降测试(如实例 2 中所述)。结果在图 9 中给出。尽管来自 **Fuelzyme<sup>®</sup>-LF** 液化物的样品展示出比来自 GC 358 液化物更好的碘颜色,但在来自 **Fuelzyme<sup>®</sup>-LF** 液化物的样品中仍有大量的沉降物。各系列中的管 4 和 5 中的沉降物减少达统计显著的量,从而表明 AmyE 处理几乎导致沉降物的消除。在 pH 5.2 下高剂量的 AmyE (0.8mg/g) 减少沉降物在所有系列中是最显著的,即 (1) 对于 **Fuelzyme<sup>®</sup>-LF** 液化物的样品,从约 7% 减少至几乎为 0%, (2) 对于 GC 358 (良好蒸煮) 的样品,从约 8% 减少至几乎为 0%,以及 (3) 对于 GC 358 (劣质蒸煮) 的样品,从约 17% 减少至几乎为 0%。在糖化 pH 即 4.0-4.5 下,0.8mg/g AmyE 处理导致碘颜色和沉降物水平二者有轻微的(但明显的)减少。另外,尽管在所有系列中管 1 (保持在 32°C 下进行 AmyE 处理) 展示出减少的碘颜色,但其仍具有相同量的沉淀物,从而表明碘阳性淀粉的减少不一定与沉降物减少相关。

[0447] 如实例 2 中所述对各系列中的测试 2 和 4 测定了滤过速率。比较表明,AmyE 处理能够改善由较差液化淀粉产生的糖液的滤过。对于来自 **Fuelzyme<sup>®</sup>-LF** 液化物的样品,滤过速率从 48 提高至 60g,代表了 25% 的改善。对于来自 GC 358 液化物(良好蒸煮),观察到从 35 提高至 47g,即改善约 34%。对于来自 GC 358 液化物(良好蒸煮)的样品观察到最显著的改善,滤过速率从 18 提高至 55g,反应了滤过速率显著增加约 200%。

[0448] 对于作为可用于补救蓝色糖的酶的 AmyE,糖液中的糖组成不应该因为 AmyE 处理而显著改变。因此,对于所有样品在第 24 小时和第 48 小时时间点测定了糖组成并在表 4

中给出。通过如实例 2 中所述的 HPLC 方法实现了寡糖的测定。

[0449] 表 4 糖分布

[0450]

AmyE 添加, 单位: mg 蛋白 /mg ds		系列 A LF 液化													
	小时	DP1	DP2	DP3	DP4	DP5	DP6	DP7	DP8	DP9	DP10	DP10 +	发酵	DP4+	
对照	1	24	86.05	3.69	3.95	1.97	0.77	0.78	0.64	0.64	1.51			93.70	6.30
		48	92.89	2.18	2.62	0.54	0.26	0.31	0.26		0.94			97.69	2.31
+ 0.05 在 0 时	2	24	84.02	3.74	4.01	2.02	0.88	1.29	1.61	1.01	1.42			91.77	8.23
		48	94.93	2.63	1.83				0.25			0.36		99.39	0.62
+ 0.01 在 0 时	3	24	83.83	3.91	4.37	2.40	1.16	1.06	0.81	0.86	1.61			92.11	7.90
		48	93.85	2.52	2.74			0.09			0.43			99.11	0.52
+ 0.05 在 24 小时	4	24	86.16	3.77	3.95	1.96	0.79	0.79	0.61	0.61	1.36			93.87	6.13
		48	93.69	2.31	2.48	0.30		0.16	0.18		0.89			98.48	1.52

[0451]

+0.01 在 24 小时	5	24	85.8 4	3.76	4.08	2.08	0.78	0.75	0.66	0.85	1.21			93.67	6.33
		48	93.3 2	2.27	2.58	0.32	0.10	0.22	0.22		0.97			98.17	1.83
+0.2 在 48 小时	6	24	84.6 2	4.51	4.55	2.22	0.93	0.88	0.66	0.69	0.94			93.67	6.33
		48	94.6 6	2.54	1.34			0.11	0.20		0.89			98.54	1.20
+0.8 在 48 小时	7	24	85.9 7	3.66	3.94	1.97	0.74	0.80	0.69	0.73	1.51			93.57	6.43
		48	93.5 6	2.15	2.46		0.12	0.23	0.22		0.93			98.17	1.50
系列 B OC 358 “良好”															
对照	1	24	87.2 8	2.80	0.58	0.40	0.43	0.65	0.74	0.82	0.63	0.41	5.28	90.65	9.35
		48	95.5 3	1.91	0.46			0.13	0.52	1.34				97.89	1.99
+0.05 在 0 时	2	24	86.3 9	7.41	1.58	1.25	1.07	0.34	0.37	1.47			0.14	95.37	4.63
		48	92.8 3	4.64	0.84	0.11		0.14	0.30	1.13				98.32	1.68
+0.01 在 0 时	3	24	85.3 6	7.04	1.48	1.03	1.62	0.39	0.40	1.59			1.10	93.87	6.13
		48	94.0 1	3.45	0.73			0.12	0.30	1.25			0.14	98.20	1.80
+0.05 在 24 小时	4	24	87.1 8	2.85	0.60	0.43	0.46	0.68	0.73	0.72	0.71	0.44	4.92	90.63	9.08
		48	95.5 0	2.32	0.51				0.35	1.19				98.33	1.53
+0.01 在 24 小时	5	24	89.7 7	3.15	0.59	0.39	0.41	0.45	0.35	0.31	0.25	0.13	4.20	93.52	6.43
		48	95.8 0	2.22	0.50			0.11	0.32	1.26				98.31	1.69
+0.2 在 48 小时	6	24	86.8 6	2.85	0.59	0.42	0.47	0.73	0.79	0.76	0.74	0.84	4.96	90.30	9.70
		48	95.5 1	2.22	0.45			0.11	0.36	1.26			0.10	98.17	1.83
+0.8 在 48 小时	7	24	82.8 8	2.59	0.63	0.45	0.48	0.69	0.76	0.96	0.90	1.48	8.40	85.89	14.11
		48	95.3 6	2.14	0.62			0.12	0.33	1.27				98.13	1.72
系列 C OC 358 “劣质”															
对照	1	24	90.7 3	2.66	0.60	0.40	0.39	0.45	0.37	0.34	0.31	0.12	3.62	34.00	6.003
		48	95.5 7	2.17	0.45			0.13	0.38	1.30				98.19	1.81
+0.05 在 0 时	2	24	85.5 6	7.09	1.76	1.31	1.12	0.42	2.55				0.20	94.41	5.59
		48	93.3 2	4.18	0.85			0.14	0.26	1.14				98.36	1.54

[0452]

+ 0.01 在 0 时	3	24	87.0 2	6.36	2.15	0.85	1.34		0.25		0.26	1.04	0.75	95.52	4.48
		48	94.8 5	2.84	0.71			0.13	0.26	1.20				98.41	1.60
+ 0.05 在 24 小时	4	24	90.7 2	2.66	0.86	0.42	0.39		0.37		0.43	0.32	3.85	34.23	5.77
		48	95.4 6	2.25	0.47			0.11	0.35	1.26			0.10	98.19	1.82
+ 0.01 在 24 小时	5	24	87.9 1	2.53	0.64	0.37	0.48	0.70	0.76	0.72	0.76	0.93	4.20	91.09	8.92
		48	95.6 1	2.24	0.46			0.11	0.33	1.25				98.31	1.69
+ 0.2 在 48 小时	6	24	87.9 3	2.66	0.59	0.45	0.49	0.68	0.74	0.70	0.73	0.74	4.30	91.18	8.81
		48	95.3 6	2.80	0.39				0.27		1.05		0.14	98.55	1.46
+ 0.8 在 48 小时	7	24	91.7 7	1.70	0.25	0.30	0.66	0.45	0.60	0.61	0.42		2.85	33.72	5.90
		48	95.3 0	2.84	0.38			0.10	0.28		0.99		0.11	98.52	1.48

[0453] 在表 4 中, 测试 1、6 和 7 事实上是重复的, 因为测试 6 和 7 是在取样后在第 48 小时时间点添加额外的 AmyE。对于来自 AmyE 与葡糖淀粉酶同时添加 (第 0 小时时间点) 的 GC 358 液化物的样品, DP2 与 DP3 二者均较高, 而 DP1 较低。然而, 当在 24 小时糖化后添加 AmyE 时看上去不是这种情况, 因为 DP1 处于约 87% 或更高的水平。表 4 还示出了将 **Fuelzyme®-LF** 用于液化和随后的高糖产生的影响: DP1 低, DP2 接近正常, 而 DP3 比来自 GC 358 液化物的样品绝对高约 2%。所观察到的差异可能归因于这样一个事实: 降低 pH 使 GC 358 失活, 而 **Fuelzyme®-LF** 保持活性。总体上, 在 0 时间时添加 AmyE 产生了最高水平的可发酵糖 (DP1、DP2 和 DP3 全部)。

#### [0454] 实例 4

[0455] 在实例 3 中观察到, AmyE 可有效用于完全除去碘阳性淀粉, 当 (1) AmyE 以高水平添加时, 以及 (2) 在糖化结束时将 pH 从约 4.1 调节至约 5.0-5.2。另外, 高剂量的 AmyE 也能够除去大量的沉降物并改善滤过速率。然而, 如实例 3 中所观察到的, 碘阳性淀粉的除去不完全, 糖分布稍受影响。有必要对 AmyE 介导的 IPS 移除进行进一步优化。

[0456] 将在 109°C 和 pH 5.8 下用 GC 358 (直链嗜热脂肪地芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶) 液化的淀粉冷冻保存。使其升温至室温, 用碳酸钠将 pH 调节至 4.5。以 0.16 GAU/g 干物质将 **OPTIMAX® 4060VHP** 添加至液化物。干物质为约 34.5%。已知 GC 358 实验性喷射蒸煮液化淀粉将含有在约 24 小时糖化后会变得可检测的碘阳性聚合物, 并且在糖化结束时将具有高水平的沉降物。另外, 该液化物含有回生淀粉, 因为其被冷冻然后解冻。

[0457] 在 60°C 下 42 小时糖化后, 用碳酸钠将用于用 AmyE 或 **Clarase® L** (来自 Danisco US Inc. (Genencor Division) 的  $\alpha$ -淀粉酶) 进行另外的糖化的部分调节至约 pH 5.3。将用于用 **G-ZYME® G 998** (来自美国丹尼斯克公司杰能科子公司 (Danisco US Inc. (Genencor Division)) 的耐酸淀粉酶) 进行另外的糖化的部分保持在约 pH 4.2 下而不调

整。将每份 100g 等分试样置于 250ml 瓶中并如表 5 中所示加料。

[0458] 表 5. 糖化和随后的  $\alpha$ -淀粉酶处理的方案

测试号	剂量 GAU/g	A	B	C
		AmyE mg/g	Clarase kg/mt	G 998 kg/mt
1	0.16	0.4	1	2
2	0.16	0.1	0.3	0.5
3	0.16	0.05	0.1	0.1
4	0.16	0.01	0.05	0.05
5	0.16	0	0	0

[0459]

[0460] 将样品置于 60°C 水浴中并在 4 小时收集样品用于糖分布分析和碘颜色测试, 在 8.5 小时收集样品用于碘颜色测试, 以及在 24 小时收集样品用于糖分布分析和碘颜色测试。碘颜色的结果在收集于表 6 中并在图 10-12 中示出。

[0461] 表 6. 多种处理样品的 OD<sub>520nm</sub> 读数

样品		4 小时	8.5 小时	24 小时
0.4mg/g AmyE	A1	0.197	0.082	0.130
0.1mg/g AmyE	A2	0.475	0.395	0.223
0.05mg/g AmyE	A3	0.515	0.505	0.446
0.01mg/g AmyE	A4	0.713	0.757	0.755
1kg/mt Clarase	B1	0.715	0.802	0.736
0.3kg/mt Clarase	B2	0.739	0.794	0.806
0.1kg/mt Clarase	B3	0.760	0.750	0.875
0.05kg/mt Clarase	B4	0.750	0.873	0.859
对照	B5	0.718	0.747	0.840
2kg/mt G 998	C1	0.697	0.741	0.770
0.5kg/mt G 998	C2	0.700	0.698	0.783
0.1kg/mt G 998	C3	0.708	0.703	0.762
0.05kg/mt G 998	C4	0.708	0.731	0.731

[0462]

[0463]

[0464] 无另外的酶的对照即 B5 显示出随时间推移不断增加的碘显色。该观察结果与已知的观点一致, 即随着糖化继续碘颜色保持不断显色。仅含有 AmyE 的样品观察到任何碘颜色的改善, 即使是以高的剂量, Clarase<sup>®</sup> L 或 G-ZYME<sup>®</sup> G 998 二者均不能减少碘颜色。碘颜色的减少表明 AmyE 可有效减少负责与碘结合的聚合物。注意到, 在样品来自全糖液时其含有残留的颗粒。这可能可解释样品 A-1 的 24 小时读数, 该读数指示“假 (false)”增加, 而图 11 中所示的颜色保持黄色。如图 11 所示, 0.4mg/g AmyE 处理 4 小时导致除去大部分 (如果不是全部的话) 将会被碘染成蓝色的淀粉聚合物。在 4 小时 A1 (0.4mg/g AmyE) 的颜色在湿磨工厂中可判定为是轻微阳性的。在第 8.5 小时时间点 A1 (0.4mg/g AmyE) 的

颜色为完全黄色,在任何工厂中有可能被判定为阴性。在第 8.5 小时时间点 A2(0.1mg/g AmyE) 的颜色指示了显著量 IPS 的移除,尽管其仍为阳性。在 24 小时时,A2(0.1mg/g AmyE) 的颜色指示了大部分淀粉聚合物的移除。在第 24 小时时间点 A3(0.05mg/g AmyE) 的颜色明显改善,但其 IPS 移除率对于工业应用而言可能是不实用的。

[0465] 碘阳性淀粉的消除 / 减少的其中一个问题是在酶介导的移除过程中有可能主要损失葡萄糖。可能的缩合产物,特别是来自葡糖淀粉酶回复反应的异麦芽糖总是一个问题。如实例 2 和图 5 中所示, AmyE 由于其转葡糖苷酶活性能够从麦芽糖合成麦芽三糖。期望 AmyE 处理可导致麦芽糖水平降低, DP3 和 DP4 水平增加, DP1 水平稍增加。表 7 和图 13-14 中示出了糖分布数据。

[0466] 如图 13-14 中所示,以多种剂量进行 AmyE 处理导致 DP1 水平有十分小的改变或损失。然而,图 14 中所示的对 DP2 的影响表明,在第 4 小时时间点 DP2 水平显著增加,有可能是由于高级糖的减少。随后,DP2 水平几乎保持恒定并仅稍低于仅含有 OPTIMAX<sup>®</sup> 4060VHP 而无任何淀粉酶的对照的 DP2 水平。

[0467] 与对照相比, Clarase<sup>®</sup> L 处理的样品显示出减少的 DP1 损失,其可能是因为 pH 偏移引起。来自 Clarase<sup>®</sup> L 处理的样品的 DP2 与对照的 DP2 处于相似水平。对于 G-ZYME<sup>®</sup> G 998 处理的样品,高剂量 (2Kg/mt) 显示在 4 小时时 DP1 增加,然后在第 24 小时时间点有损失。然而,低剂量 (0.5、0.1 和 0.01kg/mt) 的 G-ZYME<sup>®</sup> G 998 处理表明,DP1 水平实际上稍微增加。另外, G-ZYME<sup>®</sup> G 998 处理导致 DP2 增加,特别是当 G-ZYME<sup>®</sup> G 998 以高水平,例如 2Kg/mt 添加时。看起来 G-ZYME<sup>®</sup> G 998 从剩余的高级糖主要产生 DP2。尽管对于任何这些测试所有的 G-ZYME<sup>®</sup> G 998 测试具有最低水平的 DP4+,但 G-ZYME<sup>®</sup> G 998 处理显示对碘阳性聚合物的移除没有影响。

[0468] 上面测试中所用的液化物已知含有碘阳性聚合物以及回生淀粉。在这些测试中未定量被碘染成蓝色的直链淀粉 (DP > 40) 的量。有可能的是,相对于被 AmyE 水解的聚合物的量存在剂量响应。如果是这种情况,则实际应用该补救措施可能需要较低剂量的 AmyE。

[0469]

表 7. 糖分布。

处理	总时间 (小时)										DP10	>DP10
	24	42	46	46	46	46	46	46	46	46		
对照	94.18	96.29	96.10	96.02	96.48	96.24	96.13	96.13	96.13	96.13	0.54	0.54
对照	96.29	96.29	96.10	96.02	96.48	96.24	96.13	96.13	96.13	96.13	0.17	0.17
AmyE 0.4	96.10	96.10	96.10	96.02	96.48	96.24	96.13	96.13	96.13	96.13	0.17	0.17
AmyE 0.1	96.02	96.02	96.10	96.02	96.48	96.24	96.13	96.13	96.13	96.13	0.15	0.15
AmyE 0.05	96.48	96.48	96.10	96.02	96.48	96.24	96.13	96.13	96.13	96.13	0.20	0.20
AmyE 0.01	96.24	96.24	96.10	96.02	96.48	96.24	96.13	96.13	96.13	96.13	0.17	0.17
Clarase 1kg/mt	96.13	96.13	96.10	96.02	96.48	96.24	96.13	96.13	96.13	96.13	0.15	0.15
Clarase 0.3kg/mt	96.40	96.40	96.10	96.02	96.48	96.24	96.13	96.13	96.13	96.13	0.18	0.18
Clarase 0.1kg/mt	96.10	96.10	96.10	96.02	96.48	96.24	96.13	96.13	96.13	96.13	0.14	0.14
Clarase 0.05kg/mt	96.22	96.22	96.10	96.02	96.48	96.24	96.13	96.13	96.13	96.13	0.17	0.17
对照	96.28	96.28	96.10	96.02	96.48	96.24	96.13	96.13	96.13	96.13	0.15	0.15
G 998 2kg/mt	96.55	96.55	96.10	96.02	96.48	96.24	96.13	96.13	96.13	96.13	0.17	0.17
G 998 0.5kg/mt	96.07	96.07	96.10	96.02	96.48	96.24	96.13	96.13	96.13	96.13	0.18	0.18
G 998 0.1kg/mt	96.44	96.44	96.10	96.02	96.48	96.24	96.13	96.13	96.13	96.13	0.16	0.16
G 998 0.05kg/mt	95.57	95.57	96.10	96.02	96.48	96.24	96.13	96.13	96.13	96.13	0.17	0.17
AmyE 0.4	96.28	96.28	96.10	96.02	96.48	96.24	96.13	96.13	96.13	96.13	0.24	0.24
AmyE 0.1	96.05	96.05	96.10	96.02	96.48	96.24	96.13	96.13	96.13	96.13	0.22	0.22
AmyE 0.05	95.92	95.92	96.10	96.02	96.48	96.24	96.13	96.13	96.13	96.13	0.18	0.18
AmyE 0.01	96.11	96.11	96.10	96.02	96.48	96.24	96.13	96.13	96.13	96.13	0.17	0.17
Clarase 1kg/mt	96.29	96.29	96.10	96.02	96.48	96.24	96.13	96.13	96.13	96.13	0.21	0.21
Clarase 0.3kg/mt	95.80	95.80	96.10	96.02	96.48	96.24	96.13	96.13	96.13	96.13	0.22	0.22
Clarase 0.1kg/mt	96.39	96.39	96.10	96.02	96.48	96.24	96.13	96.13	96.13	96.13	0.16	0.16
Clarase 0.05kg/mt	96.19	96.19	96.10	96.02	96.48	96.24	96.13	96.13	96.13	96.13	0.20	0.20
对照	95.98	95.98	96.10	96.02	96.48	96.24	96.13	96.13	96.13	96.13	0.19	0.19
G 998 2kg/mt	95.95	95.95	96.10	96.02	96.48	96.24	96.13	96.13	96.13	96.13	0.21	0.21
G 998 0.5kg/mt	96.23	96.23	96.10	96.02	96.48	96.24	96.13	96.13	96.13	96.13	0.15	0.15
G 998 0.1kg/mt	96.40	96.40	96.10	96.02	96.48	96.24	96.13	96.13	96.13	96.13	0.19	0.19
G 998 0.05kg/mt	96.31	96.31	96.10	96.02	96.48	96.24	96.13	96.13	96.13	96.13	0.17	0.17

[0001]

序列表

SEQ ID NO: 1: 全长枯草芽孢杆菌 AmyE 氨基酸序列。天然的信号序列未示出。

```

1  LTAPSIKSGT  ILHAWNWSFN  TLKHNMKDIH  DAGYTAIQTS
PINQVKEGNQ
51  GDKSMSNWWY  LYQPTSYQIG  NRYLGTEQEF  KEMCAAEEY
GIKVIVDAVI
101 NHTTSDYAAI  SNEVKSIPNW  THGNTQIKNW  SDRWDVTQNS
LLGLYDWNTQ
151 NTQVQSYLKR  FLDRALNDGA  DGFRFDAAKH  IELPDDGSYG
SQFWPNITNT
201 SAEFQYGEIL  QDSASRDAAY  ANYMDVTASN  YGHSIRSALK
NRNLGVSNIS
251 HYASDVSADK  LVTWVESHDT  YANDDEESTW  MSDDDIRLGW
AVIASRSGST
301 PLFFSRPEGG  GNGVRFPGKS  QIGDRGSALF  EDQAITAVNR
FHNVMAGQPE
351 ELSNPNGNNQ  IFMNQRGSHG  VVLANAGSSS  VSINTATKLP
DGRYDNKAGA
401 GSFQVNDGKL  TGTINARVA  VLYPDDIAKA  PHVFLENYKT
GVTHSFNDQL
451 TITLRADANT  TKAVYQINNG  PETAFKDGDQ  FTIGKGD PFG
KTYTIMLKGT
501 NSDGVTRTEK  YSFVKRDPAS  AKTIGYQNP  HWSQVNAYIY
KHDGSRVIEL
551 TGSWPGKPM  KNADGIYTLT  LPADTDTTNA  KVIFNNGSAQ
VPGQNQPGFD
601 YVLNGLYNDS  GLSGSLPH

```

SEQ ID NO: 2: 编码 SEQ ID NO: 1 的 AmyE 的核苷酸序列。

```

CTTACAGCACCGTCGATCAAAAGCGGAACCATTCTTCATGCATGGAAT
TGGTCGTTCAATACGTTAAAACACAATATGAAGGATATTCATGATGCA

```

[0002]

GGATATACAGCCATTCAGACATCTCCGATTAACCAAGTAAAGGAAGG  
GAATCAAGGAGATAAAAGCATGTCGAACTGGTACTGGCTGTATCAGC  
CGACATCGTATCAAATTGGCAACCGTACTTAGGTACTGAACAAGAAT  
TTAAAGAAATGTGTGCAGCCGCTGAAGAATATGGCATAAAGGTCATT  
GTTGACGCGGTCATCAATCATAACCACCAGTGATTATGCCGCGATTTC  
AATGAGGTTAAGAGTATTCCAAACTGGACACATGGAAACACACAAAT  
TAAAACTGGTCTGATCGATGGGATGTCACGCAGAATTCATTGCTCGG  
GCTGTATGACTGGAATACACAAAATACACAAGTACAGTCCTATCTGA  
AACGGTTCCTTAGACAGGGCATTGAATGACGGGGCAGACGGTTTTTCGAT  
TTGATGCCGCCAAACATATAGAGCTTCCAGATGATGGCAGTTACGGCA  
GTCAATTTTGGCCGAATATCACAAATACATCAGCAGAGTTCCAATACG  
GAGAAATCCTTCAGGATAGTGCCTCCAGAGATGCTGCATATGCGAATT  
ATATGGATGTGACAGCGTCTAACTATGGGCATTCCATAAGGTCCGCTT  
TAAAGAATCGTAATCTGGGCGTGTCGAATATCTCCCACTATGCATCTG  
ATGTGTCTGCGGACAAGCTAGTGACATGGGTAGAGTCGCATGATACGT  
ATGCCAATGATGATGAAGAGTCGACATGGATGAGCGATGATGATATC  
CGTTTAGGCTGGGCGGTGATAGCTTCTCGTTCAGGCAGTACGCCTCTT  
TTCTTTTCCAGACCTGAGGGAGGCGGAAATGGTGTGAGGTTCCCGGGG  
AAAAGCCAAATAGGCGATCGCGGGAGTGCTTTATTTGAAGATCAGGC  
TATCACTGCGGTCAATAGATTTCACAATGTGATGGCTGGACAGCCTGA  
GGA ACTCTCGAACCCGAATGGAAACAACCAGATATTTATGAATCAGC  
GCGGCTCACATGGCGTTGTGCTGGCAAATGCAGGTTATCCTCTGTCT  
CTATCAATACGGCAACAAAATTGCCTGATGGCAGGTATGACAATAAA  
GCTGGAGCGGGTTCATTTCAAGTGAACGATGGTAAACTGACAGGCAC  
GATCAATGCCAGGTCTGTAGCTGTGCTTTATCCTGATGATATTGCAA  
AGCGCCTCATGTTTTCTTGAGAATTACAAAACAGGTGTAACACATTC  
TTTCAATGATCAACTGACGATTACCTTGCGTGCAGATGCGAATACAAC  
AAAAGCCGTTTATCAAATCAATAATGGACCAGAGACGGCGTTTAAGG  
ATGGAGATCAATTCACAATCGGAAAAGGAGATCCATTTGGCAAACA  
TACACCATCATGTTAAAAGGAACGAACAGTGATGGTGTAAACGAGGAC

[0003]

CGAGAAATACAGTTTTGTTAAAAGAGATCCAGCGTCGGCCAAAACCA  
 TCGGCTATCAAATCCGAATCATTGGAGCCAGGTAAATGCTTATATCT  
 ATAAACATGATGGGAGCCGAGTAATTGAATTGACCGGATCTTGGCCTG  
 GAAAACCAATGACTAAAAATGCAGACGGAATTTACACGCTGACGCTG  
 CCTGCGGACACGGATAACAACCAACGCAAAAAGTGATTTTTAATAATGG  
 CAGCGCCCAAGTGCCCGGTCAGAATCAGCCTGGCTTTGATTACGTGCT  
 AAATGGTTTATATAATGACTCGGGCTTAAGCGGTTCTCTTCCCCAT

SEQ ID NO: 3: 截短的枯草芽孢杆菌 AmyE (AmyE-tr)的氨基酸序列。  
 天然的信号序列未示出。

1 LTAPSIKSGT ILHAWNWSFN TLKHNMKDIH DAGYTAIQTS  
 PINQVKEGNQ  
 51 GDKSMSNWWY LYQPTSYQIG NRYLGTEQEF KEMCAAABEY  
 GIKVIVDAVI  
 101 NHTTSDYAAI SNEVKSIPNW THGNTQIKNW SDRWDVTQNS  
 LLGLYDWNTQ  
 151 NTQVQSYLKR FLDRALNDGA DGFRFDAAKH IELPDDGSYG  
 SQFWPNITNT  
 201 SAEFQYGEIL QDSASRDAAY ANYMDVTASN YGHSIRSALK  
 NRNLGVSNIS  
 251 HYASDVSADK LVTWVESHDT YANDDEESTW MSDDDIRLGW  
 AVIASRSGST  
 301 PLFFSRPEGG GNGVRFPGKS QIGDRGSALF EDQAITAVNR  
 FHNVMAGQPE  
 351 ELSNPNGNNQ IFMNQRGSHG VVLANAGSSS VSINTATKLP  
 DGRYDNKAGA  
 401 GSFQVNDGKL TGTINARVA VLYPD

SEQ ID NO: 4: 编码 AmyE-tr (SEQ ID NO: 2)的核苷酸序列。

CTTACAGCACCGTCGATCAAAGCGGAACCATTCTTCATGCATGGAAT  
 TGGTCGTTCAATACGTTAAAACACAATATGAAGGATATTCATGATGCA  
 GGATATACAGCCATTCAGACATCTCCGATTAACCAAGTAAAGGAAGG

[0004]

GAATCAAGGAGATAAAAGCATGTTCGAACTGGTACTGGCTGTATCAGC  
 CGACATCGTATCAAATTGGCAACCGTTACTTAGGTACTGAACAAGAAT  
 TTAAAGAAATGTGTGCAGCCGCTGAAGAATATGGCATAAAGGTCATT  
 GTTGACGCGGTCATCAATCATAACCACCAGTGATTATGCCGCGATTTCC  
 AATGAGGTTAAGAGTATTCCAAACTGGACACATGGAAACACACAAAT  
 TAAAACTGGTCTGATCGATGGGATGTCACGCAGAATTCATTGCTCGG  
 GCTGTATGACTGGAATACACAAAATACACAAGTACAGTCCTATCTGA  
 AACGGTTCTTAGACAGGGCATTGAATGACGGGGCAGACGGTTTTTCGAT  
 TTGATGCCGCCAAACATATAGAGCTTCCAGATGATGGCAGTTACGGCA  
 GTCAATTTTGGCCGAATATCACAAATACATCAGCAGAGTTCCAATACG  
 GAGAAATCCTTCAGGATAGTGCCTCCAGAGATGCTGCATATGCGAATT  
 ATATGGATGTGACAGCGTCTAACTATGGGCATTCCATAAGGTCCGCTT  
 TAAAGAATCGTAATCTGGGCGTGTCGAATATCTCCCACTATGCATCTG  
 ATGTGTCTGCGGACAAGCTAGTGACATGGGTAGAGTCGCATGATACGT  
 ATGCCAATGATGATGAAGAGTCGACATGGATGAGCGATGATGATATC  
 CGTTTAGGCTGGGCGGTGATAGCTTCTCGTTCAGGCAGTACGCCTCTT  
 TTCTTTTCCAGACCTGAGGGAGGCGGAAATGGTGTGAGGTTCCCGGGG  
 AAAAGCCAAATAGGCGATCGCGGGAGTGCTTTATTTGAAGATCAGGC  
 TATCACTGCGGTCAATAGATTTTACAATGTGATGGCTGGACAGCCTGA  
 GGAECTCTCGAACCCGAATGGAAACAACCAGATATTTATGAATCAGC  
 GCGGCTCACATGGCGTTGTGCTGGCAAATGCAGGTTTCATCCTCTGTCT  
 CTATCAATACGGCAACAAAATTGCCTGATGGCAGGTATGACAATAAA  
 GCTGGAGCGGGTTCATTTCAAGTGAACGATGGTAAACTGACAGGCAC  
 GATCAATGCCAGGTCTGTAGCTGTGCTTTATCCTGAT

SEQ ID NO: 5: 枯草芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶变体 Amy31A 的氨基酸序列  
 (UniProtKB/TrEMBL 登录号 O82953)。天然的信号序列以粗体显示。

1 MFEKRFKTSL LPLFAGFLLL FHLVLSGPAA ANAETANKSN  
 KVTASSVKNQ  
 51 TILHAWNWSF NTLTQNMKDI RDAGYAAIQT SPINQVKEGN  
 QGDKSMSNWY

[0005]

101 WLYQPTSYQI GNRYLGTEQE FKDMCAAEEK YGVKVIIVDAV  
 VNHTTSDYGA  
 151 ISDEIKRIPN WTHGNTQIKN WSDRWDITQN ALLGLYDWNT  
 QNTEVQAYLK  
 201 GFLERALNDG ADGFRYDAAK HIELPDDGNY GSQFWPNITN  
 TSAEFQYGEI  
 251 LQDSASRDTA YANYMNVTAS NYGHSIRSAL KNRILSVSNI  
 SHYASDVSAD  
 301 KLVTWVESH D TYANDDEEST WMSDDDIRLG WAVIGSRSGS  
 TPLFFSRPEG  
 351 GGNGVRFP GK SQIGDRGSAL FKDQAITAVN QFHNEMAGQP  
 EELSNPNGNN  
 401 QIFMNQRGSK GVVLANAGSS SVTINTSTKL PDGRYDNRAG  
 AGSFQVANGK  
 451 LTGTINARSA AVLYPDDIGN APHVFL ENYQ TEAVHSFNDQ  
 LTVTLRANAK  
 501 TTKAVYQINN GQETAFKDGD RLTIGKEDPI GTTYNVKLTG  
 TNGEGASRTQ  
 551 EYTFVKKDPS QTNIIGYQNP DHWGNVNAYI YKHDGGGAIE  
 LTGSWPGKAM  
 601 TKNADGIYTL TLPANADTAD AKVIFNNGSA QVPGQNHPGF  
 DYVQNGLYNN  
 651 SGLNGYLP H

SEQ ID NO: 6: 编码枯草芽孢杆菌 Amy31A 的核苷酸序列(SEQ ID NO: 3)。

TCTGT TAAAAACGGCACTATTCTGCATGCATGGAACTGGAGCTTTAAC  
 ACGCTGACCCAGAACATGAAAGATATTCGTGACGCGGGCTATGCTGC  
 GATCCAAACCAGCCCTATCAACCAGGTCAAAGAAGGCAACCAAGGCG  
 ACAAATCCATGTCCA ACTGGTACTGGCTGTATCAACCGACGTCCTATC  
 AGATTGGCAACCGTTATCTGGGCACGGAGCAAGAGTTCAAAGACATG

[0006]

TGTGCTGCGGCTGAGAAATATGGTGTGAAAGTTATCGTGGACGCTGTG  
GTAAACCACACGACCTCTGATTATGGTGCTATTAGCGACGAGATTA  
CGTATTCCAAATTGGACCCATGGTAATACCCAGATCAAAAATTGGAGC  
GACCGCTGGGACATTACCCAGAATGCGCTGCTGGGTCTGTATGACTGG  
AACACGCAAAACACCGAAGTACAGGCATATCTGAAGGGCTTCCTGGA  
ACGCGCTCTGAACGATGGTGCTGATGGTTTTTCGCTACGACGCCGCAA  
GCATATTGAGCTGCCGGATGACGGCAACTACGGTTCCCAATTCTGGCC  
GAACATCACCAACACCTCTGCCGAATTCCAGTACGGCGAGATCCTGCA  
AGACTCCGCGAGCCGTGACACCGCTTATGCCAACTATATGAACGTAAC  
TGCCTCTAACTATGGCCATTCCATTCGTTCTGCGCTGAAAAATCGTATC  
CTGTCCGTGTCCAATATCTCCCCTATGCATCCGACGTTTCTGCTGACA  
AACTGGTAACTTGGGTTCGAGTCTCACGACACCTATGCAAATGATGACG  
AGGAGAGCACCTGGATGAGCGATGATGATATTCGTCTGGGTGGGCG  
GTTATTGGTTCTCGCTCTGGTCTACTCCGCTGTTCTTTAGCCGTCCGG  
AAGGTGGCGGCAATGGCGTTCGTTTCCCGGGTAAATCTCAAATTGGTG  
ATCGTGGCTCTGCACTGTTTAAAGATCAAGCTATTACGGCGGTGAATC  
AGTTCCATAATGAGATGGCAGGTCAACCTGAAGAAGTGTCCAATCCA  
AACGGTAACAACCAAATCTTCATGAACCAGCGTGGCAGCAAAGGCGT  
CGTCCTGGCGAACGCCGGTAGCTCTTCTGTTACCATCAACACGTCTAC  
CAAAGTCCAGACGGCCGCTATGATAACCGTGCGGGTGCTGGTTCCTT  
TCAGGTAGCCAACGGCAAGCTGACGGGCACCATCAACGCTCGTTCTG  
CTGCTGTTCTGTACCCGGACGACATTGGCAACGCTCCGCACGTGTTCC  
TGGAGAATTACCAGACCGAAGCGGTACATAGCTTTAATGACCAGCTG  
ACCGTCACTCTGCGTGCCAACGCAAAAACCACGAAAGCAGTCTATCA  
GATCAATAATGGTCAAGAACTGCTTTCAAGGATGGCGACCGTCTGA  
CTATTGGTAAGGAGGACCCGATTGGCACCCTTATAACGTTAAACTGA  
CTGGCACCAATGGCGAGGGCGCTAGCCGCACTCAAGAGTATACGTT  
GTAAAGAAAGACCCGTCTCAAACCAACATCATCGGTTACCAGAATCC  
TGACCACTGGGGTAATGTGAACGCTTACATCTATAACATGATGGTGG  
CGGTGCTATCGAACTGACCGGCTCTTGGCCAGGTAAAGCCATGACGA

[0007]

AAAACGCGGATGGCATCTATACCCTGACCCTGCCGGCCAATGCGGAT  
ACCGCAGATGCGAAGGTTATCTTCAATAACGGCTCCGCGCAGGTTCCG  
GGCCAAAACCATCCGGGCTTTGACTACGTACAAAATGGTCTGTATAAC  
AACTCTGGCCTGAACGGTTACCTGCCGCAC

SEQ ID NO: 7: 全长嗜热脂肪地芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶(AmyS; P06279)的蛋白质序列。信号序列以粗体显示。

1 MLTFHRIIRK GWMFLLAFLL TALLFCPTGQ PAKAAAPFNG  
TMMQYFEWYL  
51 PDDGTLWTKV ANEANNLSSL GITALWLPPA YKGTSRSDVG  
YGVYDLYDLG  
101 EFNQKGAVRT KYGTKAQYLQ AIQAAHAAGM QVYADVVDH  
KGGADGTEWV  
151 DAVEVNPSDR NQEISGTYQI QAWTKFDFPG RGNTYSSFKW  
RWYHFDGVDW  
201 DESRKLSRIY KFRGIGKAWD WEVDTENGNY DYLMYADLDM  
DHPEVVTELK  
251 SWGKWYVNTT NIDGFRLDAV KHIKFSFFPD WLSDVRSQTG  
KPLFTVGEYW  
301 SYDINKLHNY IMKTNGTMSL FDAPLHNKFY TASKSGGTFD  
MRTLMTNTLM  
351 KDQPTLAVTF VDNHDTEPGQ ALQSWVDPWF KPLAYAFILT  
RQEGYPCVFY  
401 GDYYGIPQYN IPSLKSKIDP LLIARRDYAY GTQHDYLDHS  
DIIGWTREGV  
451 TEKPGSGLAA LITDGPGGSK WMYVGKQHAG KVFYDLTGNR  
SDTVTINSDG  
501 WGEFKVNGGS VSVWVPRKTT VSTIAWSITT RPWTDEFVRW  
TEPRLVAWP

SEQ ID NO: 8: 全长地衣芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶(AmyL; P06278)的蛋白质序列。信号序列以粗体显示。

[0008]

1 MKQOKRLYAR LLTLLFALIF LLPHSAAAAA NLNGTLMQYF  
 EWYMPNDGQH  
 51 WKRLQNDSAY LAEHGITAVW IPPAYKGTSQ ADVGYGAYDL  
 YDLGEFHQKG  
 101 TVRTKYGTKG ELQSAIKSLH SRDINVYGDV VINHKGGADA  
 TEDVTAVEVD  
 151 PADRNRRVISG EHRIKAWTHF HFPGRGSTYS DFKWHWYHFD  
 GTDWDESRLK  
 201 NRIYKFQGKA WDWEVSNENG NYDYLMYADI DYDHPDVAEE  
 IKRWGTWYAN  
 251 ELQLDGFRLD AVKHIKFSFL RDWVNHVREK TGKEMFTVAE  
 YWQNDLGALE  
 301 NYLNKTNFNH SVFDVPLHYQ FHAASTQGGG YDMRKLLNST  
 VVSKHPLKAV  
 351 TFVDNHDTQP GQSLESTVQT WFKPLAYAFI LTRESGYPQV  
 FYGDMYGTKG  
 401 DSQREIPALK HKIEPILKAR KQYAYGAQHD YFDHHDIVGW  
 TREGDSSVAN  
 451 SGLAALITDG PGGAKRMYVG RQNAGETWHD ITGNRSEPVV  
 INSEGWGEFH  
 501 VNGGSVSIYV QR

SEQ ID NO: 9: 全长枯草芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶(AmyE; NP\_388186)。信号序列以粗体显示。

1 MFAKRFK**TSL** LPLFAGFLLL FHLVLAGPAA ASAETANKSN  
 ELTAP**SIKSG**  
 51 TILHAWN**WSF** NTLKHN**MKDI** HDAGYTA**IQT** SPINQVKEGN  
 QGDKS**MSNWY**  
 101 WLYQPT**SYQI** GNRYLG**TEQE** FKEMCAA**AEE** YGIKVIV**DAV**  
 INHTTSD**YAA**

[0009]

151 ISNEVKSIPN WTHGNTQIKN WSDRWDVTQN SLLGLYDWNT  
 QNTQVQSYLK  
 201 RFLDRALNDG ADGFRFDAAK HIPLPDDGSY GSQFWPNITN  
 TSAEFQYGEI  
 251 LQDSASRDAA YANYMDVTAS NYGHSIRSAL KNRNLGVSNI  
 SHYASDVSAD  
 301 KLVTWVESH D TYANDDEEST WMSDDDIRLG WAVIASRSGS  
 TPLFFSRPEG  
 351 GGNGVRFPGK SQIGDRGSAL FEDQAITAVN RFHNVMAGQP  
 EELSNPNGNN  
 401 QIFMNQRGSH GVVLANAGSS SVSINTATKL PDGRYDNKAG  
 AGSFQVNDGK  
 451 LTGTINARSV AVLYPDDIAK APHVFL ENYK TGVTHSFNDQ  
 LTITLRADAN  
 501 TTKAVYQINN GPDDRRLRME INSQSEKEIQ FGKTYTIMLK  
 GTNSDGVTRT  
 551 EKYSFVKRDP ASAKTIGYQN PNHWSQVNAY IYKHDGSRVI  
 ELTGSWPGKP  
 601 MTKNADGIYT LTLPADTDTT NAKVIFNNGS AQVPGQNQPG  
 FDYVLNGLYN  
 651 DSGLSGSLPH

SEQ ID NO: 10: 全长枯草芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶 (AmyE; NCBI 登录号 ABW75769)

1 MFAKRFKTS L LPLFAGFLLL FHLVLAGPAA ASAETANKSN  
 ELTAPSIKSG  
 51 TILHAWNWSF NTLKHNMKDI HDAGYTAIQT SPINQVKEGN  
 QGNKSMSNWY  
 101 WLYQPTSYQI GNRYLGTEQE FKEMCAA AEE YGIKVIVDAV  
 INHTTSDYAA

[0010]

151 ISNEIKSIPN WTHGNTQIKN WSDRWDVTQN SLLGLYDWNT  
 QNTQVQSYLK  
 201 RFLERALNDG ADGFRFDAAK HIELPDDGSY GSQFWPNITN  
 TSAEFQYGEI  
 251 LQDSASRDAA YANYMNVTAS NYGHSIRSAL KNRNLGVSNI  
 SHYASDVSAD  
 301 KLVTWVESH D TYANDDEEST WMSDDDIRLG WAVIASRSGS  
 TPLFFSRPEG  
 351 GGNGVRFP GK SQIGDRGSAL FEDQAITAVN RFHNVMAGQP  
 EELSNPNGNN  
 401 QIFMNQRGSH GVVLANAGSS SVSINTPTKL PDGRYDNKAG  
 AGSFQVNDGK  
 451 LTGTINAR SV AVLYPDDIAK APHVFL ENYK TGVTHSFNDQ  
 LTITLRADAN  
 501 TTKAVYQINN GPETA FKDGD QFTIGKGDPF GKTYTIMLKG  
 TNSNGVTKAE  
 551 EYSFVKRDPA SAKTIGYQNP NHWSQVNAYI YKHDGSRAIE  
 LTGSWPGKPM  
 601 TKNADGIYTL TLPADTDTTN AKVIFNNGSA QVPGQNQPGF  
 DYVQNGLYND  
 651 SGLSGSLPH

SEQ ID NO: 11: 全长枯草芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶 (AmyE; NCBI 登录号 ABK54355)

1 MFAKRFKTSL LPLFAGFLLL FHLVLAGPAA ASAETANKSN  
 ELTAPSIKSG  
 51 TILHAWNWSF NTLKHNMKDI HDAGYTAIQT SPINQVKEGN  
 QGDKSMSNWY  
 101 WLYQPTS YQI GNRYLGTEQE FKEMCAA AEE YGIKVIVDAV  
 INHTTSDYAA

[0011]

151 ISNEIKSIPN WTHGNTQIKN WSDRWDVTQN SLLGLYDWNT  
 QNTQVQSYLK  
 201 RFLERALNDG ADGFRFDAAK HIEPDDGSY GSQFWPTITN  
 TSAEFQYGEI  
 251 LQDSASRDA YANYMDVTAS NYGHSIRSAL KNRNLGVSNL  
 SHYASDVSAD  
 301 KLVTWVESH TYANDDEEST WMSDDDIRLG WAVIASRSGS  
 TPLFFSRPEG  
 351 GGNGVRFPGK SQIGDRGSAL FEDQAITAVN RFHNVMAGQP  
 EELSNPNGNN  
 401 QIFMNQRGSH GVVLANAGSS SVSINTATKL PDGRYDNKAG  
 AGSFQVNDGK  
 451 LTGTINARSV AVLYPDDIAK APHVFLFENYK TGVTHSFNDQ  
 LTITLRADAN  
 501 TTKAVYQINN GPETAFAKDGD QFTIGKGDPF GKTYTIMLKG  
 TNSDGVTRAE  
 551 EYSFVKRDPA SAKTIGYQNP NHWSQVNAYI YKHDGGRAIE  
 LTGSWPGKPM  
 601 TKNADGIYTL TLPADTDTTN AKVIFNNGSA QVPGQNQPGF  
 DYVQNGLYND  
 651 SGLSGSLPH

SEQ ID NO: 12: 全长枯草芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶 (AmyE; NCBI 登录号 AAF14358)

1 MFAKRFKTS LPLFAGFLLL FHLVLAGPAA ASAETANKSN  
 ELTAPSIKSG  
 51 TILHAWNWSF NTLKHNMKDI HDAGYTAIQT SPINQVKEGN  
 QGDKSMSNWY  
 101 WLYQPTSYQI GNRYLGTEQE FKEMCAAEE YGIKVIVDAV  
 INHTTSDYAA

[0012]

151 ISNEIKSIPN WTHGNTQIKN WSDRWDVTQN SLLGLYDWNT  
 QNTQVQSYLK  
 201 RFLERALNDG ADGFRFDAAK HIELPDDGSY GSQFWPTITN  
 TSAEFQYGEI  
 251 LQDSASRDAA YANYMDVTAS NYGHSIRSAL KNRNLGVSNL  
 SHYASDVSAD  
 301 KLVTWVESH D TYANDDEEST WMSDDDIRLG WAVIASRSGS  
 TPLFFSRPEG  
 351 GGNGVRFPGK SQIGDRGSAL FEDQAITAVN RFHNVMAGQP  
 EELSNPNGNN  
 401 QIFMNQRGSH GVVLANAGSS SVSINTATKL PDGRYDNKAG  
 AGSFQVNDGK  
 451 LTGTINARSV AVLYPDDIAK APHVFL ENYK TGVTHSFNDQ  
 LTITLRADAN  
 501 TTKAVYQINN GPETA FKDGD QFTIGKGD PF GKTYTIMLKG  
 TNSDGVTRAE  
 551 EYSFVKRDPA SAKTIGYQNP NHWSQVNAYI YKHDGGRAIE  
 LTGSWPGKPM  
 601 TKNADGIYTL TLPADTDTTN AKVIFNNGSA QVPGQNQPGF  
 DYVQNGLYND  
 651 SGLSGSLPH

SEQ ID NO: 13: 全长枯草芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶 (AmyE; NCBI 登录号 AAT01440)

1 MFAKRFKTSL LPLFAGFLLL FHLVLAGPAA ASAETANKSN  
 ELTAPSIKSG  
 51 TILHAWNWSF NTLKHNMKDI HDAGYTAIQT SPINQVKEGN  
 QGDKSMSNWY  
 101 WLYQPTSYQI GNRYLGTEQE FKEMCAA AEE YGIKVIVDAV  
 INHTTSDYAA

[0013]

151 ISNEVKSIPN WTHGNTQIKN WSDRWDVTQN SLLGLYDWNT  
 QNTQVQSYLK  
 201 RFLERALNDG ADGFRFDAAK HIELPDDGSY GSQFWPNITN  
 TSAEFQYGEI  
 251 LQDSASRDAA YANYMDVTAS NYGHSIRSAL KNRNLGVSNI  
 SHYASDVSAD  
 301 KLVTWVESH D TYANDDEEST WMSDDDIRLG WAVIASRSGS  
 TPLFFSRPEG  
 351 GGNGVRFPGK SQIGDRGSAL FEDQAITAVN RFHNVMAGQP  
 EELSNPNGNN  
 401 QIFMNQRGSH GVVLANAGSS SVSINTPTKL PDGRYDNKAG  
 AGSFQVNDGK  
 451 LTGTINARSV AVLYPDDIAQ APHVFLFENYK TGVTHSFNDQ  
 LTITLRADAN  
 501 TTKAVYQINN GPETAFKDGD QFTIGKGDPF GKTYTIMLKG  
 TNSDGVTRTE  
 551 EYSFIKRDPA SAKTIGYQNP NHWSQVNAYI YKHDGGQAIE  
 LTGSWPGKPM  
 601 TKNADGIYTL TLPADTDTTN AKVIFNNGSA QVPGQNQPGF  
 DYVQNGLYND  
 651 SGLSGSLPY

SEQ ID NO: 14: 全长枯草芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶 (AmyE; NCBI 登录号 AAZ30064)

1 MFAKRFKTSL LPLFAGFLLL FHLVLAGPNA ANAETANKSN  
 ELTAPSIKSG  
 51 TILHAWNWSF NTLKHNMKDI HDAGYTAIQT SPINQVKEGN  
 QGNKSMLNWX  
 101 WLYQPTSQI GNRYLGTEQE FKEMCAAEE YGIKVIIVDAV  
 INHTTSDYAA

[0014]

151 ISNEIKSIPN WTHGNTQIKN WSDRWDVTQN SLLGLYDWNT  
 QNTQVQSYLK  
 201 RFLERALNDG ADGFRFDAAK HIPLPDDGSY GSQFWPNITN  
 TSAEFQYGEI  
 251 LQDSASRDAS YANYMNVTAS NYGHSIRSAL KNRNLGVSNI  
 SHYASDVPAD  
 301 KLVTWVESH D TYANDDEEST WMSDDDIRLG WAVIASRSGS  
 TPLFFSRPEG  
 351 GGNGVRFPGK SQIGDRGSAL FEDQAITAVN RFHNVMAGQP  
 EELSNPNGNN  
 401 QIFMNQRGSH GVVLANAGSS SVSINTPTKL PDGRYDNKAG  
 AGSFQVNDGK  
 451 LTGTINARSV AVLYPDDIAK APHVFL ENYK TGVTHSFNDQ  
 LTITMRADAK  
 501 TTKAVYQINN GPETA FKDGD QFTIGKGD PF GKTYTIMLKG  
 TNSDGVTRTE  
 551 EYSFIKRDPA SAKTIGYQNP NHWSQVNAYI YKHDGGQAIE  
 LTGSWPGKPM  
 601 TKNADGIYTL TLPADTDTN AKVIFNNGSA QVPGQNQPGF  
 DYVQNGLYND  
 651 SGLSGSLPH

SEQ ID NO: 15: 全长枯草芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶 (AmyE: NCBI 登录号 AAQ83841)

1 MFAKRFKTSL LPLFAGFLLL FYLVLAGPAA ASAETANKSI  
 ELTAPSIKSG  
 51 TILHAWNWSF NTLKHNMKDI HDAGYTAIQT SPINQVKEGN  
 QGDKSMSNWY  
 101 WLYQPTSYQI GNRYLGTEQE FKEMCAA AEE YGIKVIVDAV  
 INHTTSDYAA

[0015]

151 ISNEVKSIPN WTHGNTQIKN WSDRWDVTQN SLLGLYDWNT  
 QNTQVQSYLK  
 201 RFLDRALNDG ADGFRFDAAK HIEPDDGSY GSQFWPNITN  
 TSAEFQYGEI  
 251 LQDSASRDAA YANYMDVTAS NYGHSIRSAL KNRNLGVSNI  
 SHYASDVSAD  
 301 KLVTWVESH D TYANDDEEST WMSDDDIRLG WAVIASRSGS  
 TPLFFSRPEG  
 351 GGNGVRFPGK SQIGDRGSAL FEDQAITAVN RFHNVMAGQP  
 EELSNPNGNN  
 401 QIFMNQRISH GVVLANAGSS SVSINTATKL PDGRYDNKAG  
 AGSFQVNDGK  
 451 LTGTINARSV AVLYPDDIAK APHVFL ENYK TGVTHSFNDQ  
 LTITLRADAN  
 501 TFIKSIMDQI NXRXRRLRME INSQSEKEIQ FGKTYTIMLK  
 GTNSDGVTRX  
 551 EKYS LPKRDP ASAKTIGYQN PNHWSQVNAY IYKHDGSREI  
 ELTG SWPGKP  
 601 MTKNADGIYT LTLPADTDTT NAKVIFNNGY AQVPGQNQPG  
 FDYVLNGLY

SEQ ID NO: 16: 全长枯草芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶 (AmyE; NCBI 登录号 BAA31528)

1 MFEKRFKTSL LPLFAGFLLL FHLVLSGPAA ANAETANKSN  
 KVTASSVKNG  
 51 TILHAWNWSF NTLTQNMKDI RDAGYAAIQT SPINQVKEGN  
 QGDKSMSNWY  
 101 WLYQP TSYQI GNRYLGTEQE FKDMCAA AEK YGVKVI VDAV  
 VNHTTSDYGA  
 151 ISDEIKRIPN WTHGNTQIKN WSDRWDITQN ALLGLYDWNT  
 QNTEVQAYLK

[0016]

201 GFLERALNDG ADGFRYDAAK HIPLPDDGNY GSQFWPNITN  
 TSAEFQYGEI  
 251 LQDSASRDTA YANYMNVTAS NYGHSIRSAL KNRILSVSNI  
 SHYASDVSAD  
 301 KLVTWVESH D TYANDDEEST WMSDDDIRLG WAVIGSRSGS  
 TPLFFSRPEG  
 351 GGNGVRFP GK SQIGDRGSAL FKDQAITAVN QFHNEMAGQP  
 EELSNPNGNN  
 401 QIFMNQRGSK GVVLANAGSS SVTINTSTKL PDGRYDNRAG  
 AGSFQVANGK  
 451 LTGTINARSA AVLYPDDIGN APHVFL ENYQ TEAVHSFNDQ  
 LTVTLRANAK  
 501 TTKAVYQINN GQETAFKDGD RLTIGKEDPI GTTYNVKLTG  
 TNGEGASRTQ  
 551 EYTFVKKDPS QTNIIGYQNP DHWGNVNAYI YKHDGGGAIE  
 LTGSWPGKAM  
 601 TKNADGIYTL TLPANADTAD AKVIFNNGSA QVPGQNHPGF  
 DYVQNGLYNN  
 651 SGLNGYLP H

SEQ ID NO: 17: SEQ ID NO: 1 的 AmyE 的天然信号序列。

MFAKRFKTSLLPLFAGFLLLFHLVLAGPAAASAETANKSNE

SEQ ID NO: 18: 引物 PSTAMYE-F

CTTCTTGCTGCCTCATTCTGCAGCTTCAGCACTTACAGCACCGTCGATC  
 AAAAGCGGAAC

SEQ ID NO: 19: 引物 AMYENOPST-R

CTGGAGGCACTATCCTGAAGGATTTCTCCGTATTGGA ACTCTGCTGAT  
 GTATTTGTG

SEQ ID NO: 20: 引物 AMYENOPST-F

CACAAATACATCAGCAGAGTTCCAATACGGAGAAATCCTTCAGGATA  
 GTGCCTCCAG

[0017]

SEQ ID NO: 21: 引物 HPAIAMYE-R

CAGGAAATCCGTCCTCTGTAACTCAATGGGGAAGAGAACCGCTTAA  
GCCCGAGTC

SEQ ID NO: 22: 引物 HPAIAMYE466-R

CAGGAAATCCGTCCTCTGTAACTCAATCAGGATAAAGCACAGCTACA  
GACCTGG

SEQ ID NO: 23: 引物 AMYE SEQ-F1

TACACAAGTACAGTCCTATCTG

SEQ ID NO: 24: 引物 AMYE SEQ-F2

CATCCTCTGTCTCTATCAATAC

**B. stear** MLTFHRIIRKGMFLLA---FLLTALLFCPTGQPAKAAAPFN-----GTMMQYFEW  
**B. lich** MKQQRLYAR----LLT---LLFALIFLLP--HSAAAAANLN-----GTLMQYFEW  
**B. sub** --MFAKRPKTSLPLFAGFLLFHLVLAGPAAASAETANKSNELTAPSIKSGTILHAWN

**B. stear** YLPDDGTLWTKVANEANLSSLGITALLWLPAYK---GTSRSDVGYGVYDLYDLGEPNQK  
**B. lich** YMPNDGQHWKRLQNDAYSALAEHGITAVWIPPAYK---GTSQADVGYGAYDLYDLGEPHQK  
**B. sub** -----SFNTLKHNMKDIHDAGYTAIQTSPINQVKEGNQGDKSMNWWYLYQPTSQY--

**B. stear** GAVRTKY-GTKAQYLQAIQAHAAGMQVYADVVDHKGADGTEWVDAVEVNPSTRNQEI  
**B. lich** GTVRTKY-GTKGELQSAIKSLHSRDINVYGDVVINHKGGADATEDVTAVEVDPADRNRVI  
**B. sub** --IGNRYLGTREQEFKEMCAAEEYGIKVIIVDAVINH-----TTSDYAAIS

**B. stear** SGTYQIQAWTKFDFPGRGNTYSSFKWRWYHFDGVDWDESRLKSRIYKFRGIGKAWDWEVD  
**B. lich** SGEHRKAWTHFHFPGRGSTYSDFKWHWYHFDGTDWDESRLKNRIYKFGQ--KAWDWEVS  
**B. sub** NEVKSIPNWT-----GNTQIK-----NWSDR-----WDVTQN

**B. stear** TENGNYDYLMYADLMDHPEVVTTELKSWGKWYVNTTIDGFRLDVAVKHIF---SFPFD  
**B. lich** NENGNYDYLMYADIDYDHPDVAEEIKRWGTWYANELQDGFRLDAVAVKHIF---SPLRD  
**B. sub** SLLGLYDW-----NTQNTQVQSYLKRFLDRALND-GADGFRFDDAKHIELPDDGSGYSQ

**B. stear** WLSDVRSQTKPLFTVGEYWSYDINKLHNYIMKTNGTMSLFDAPLHNKFTASKSGGTFD  
**B. lich** WVNHVRETKGEMFTVAEYWQNDLGALENYLNKTNFNHSVFDVPLHYQFHAASTQGGGYD  
**B. sub** FWPNTNTSAE--FQYGEILQDSASRDAAYANYMDVTASNYPGHSIRSAL--KRNRLGVSN

**B. stear** MRTLMNTLMKQPTLAVTFVDNHDTEPGQALQSWVDPWFKP----LAYAFILTRQEGYP  
**B. lich** MRKLLNSTVSKHPLKAVTFVDNHDTPGQSLESTVQTFWFKP----LAYAFILTRQEGYP  
**B. sub** ISHYASDVSAK----LVTWVESHDTYANDDEES---TWMSDDDIRLGWAVIASRSGSTP

**B. stear** CVFYGDYYGI---PQYNIPSLKSKIDPLLIARDYAYGTQHDYLDHSDIIGWTRREGVTEK  
**B. lich** QVPYGDMYGTGKDSQREIPALKHKIEPILKARKQYAYGAQHDFDHHDIVGWTRREGDSSV  
**B. sub** -LFFSRPEG--GGNGVRFPGKSQIGDRGSALFEDQAITAVNRF--HNVMAGQPEELSNP

**B. stear** PGSGLAALITDGGPGSKWYVKGQHAG-KVfyDLTGNRSDTVTINSDGWGEFVNGGSSVS  
**B. lich** ANSGLAALITDGGPGAKRMYVGRQAG-ETWHDITGNRSEPVVINSEGWGEFVNGGSSVS  
**B. sub** NGNNQIFMNQRGSHGVVLANAGSSSVSINTATKLPDGRYD---NKAGAGSFQVNDGKLT

**B. stear** VWVPRKTTVSTIAWSITTRPWTDEFVWTEPRLVAMP-----  
**B. lich** IYVQR-----  
**B. sub** GTINA-RSVAVL-----YPDDIAKAPHVLENYKTGVTHSFNDQLTITLRADANTTK

**B. stear** -----  
**B. lich** -----  
**B. sub** AVYQINNGPDDRRLRMEINSQSEKEIQFGKTYTIMLKGTNSDGVTRTEKYSFVKRDPASA

**B. stear** -----  
**B. lich** -----  
**B. sub** KTIGYQNPNHWSQVNAYIYKHGSRVIELTGSWPGKPMTKNADGIYTLTLPADTDTTNAK

**B. stear** -----  
**B. lich** -----  
**B. sub** VIFNNGSAQVPGQNPQGFVYVNLNGLYNDSSGLSGSLPH

图 1

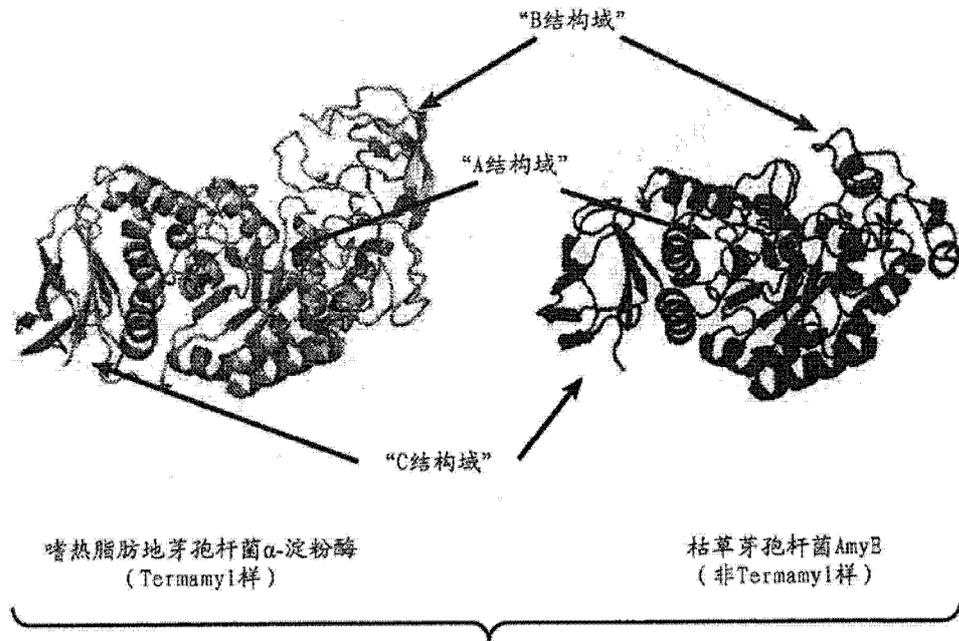


图 2



图 3A

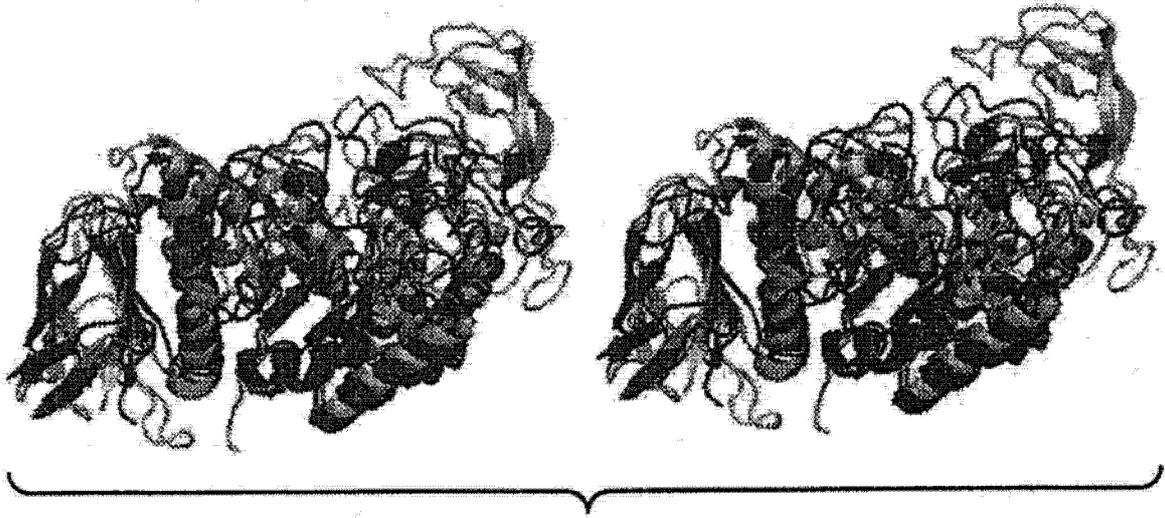


图 3B

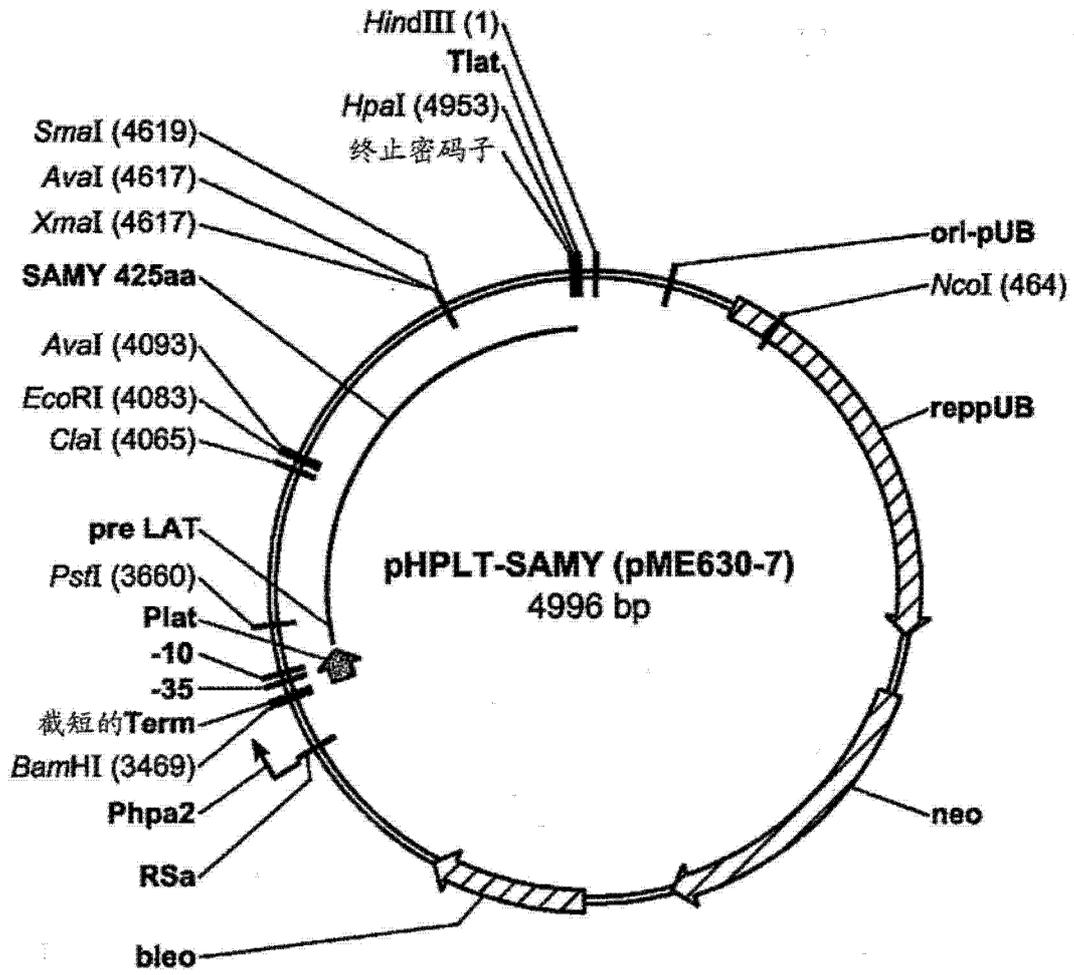


图 4

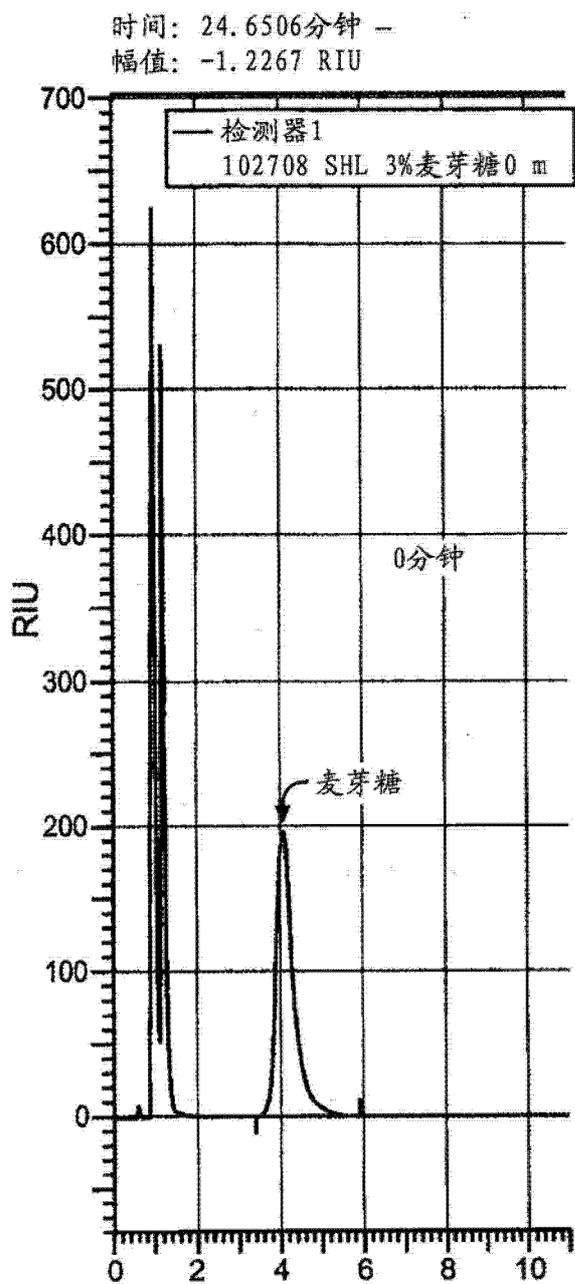


图 5A

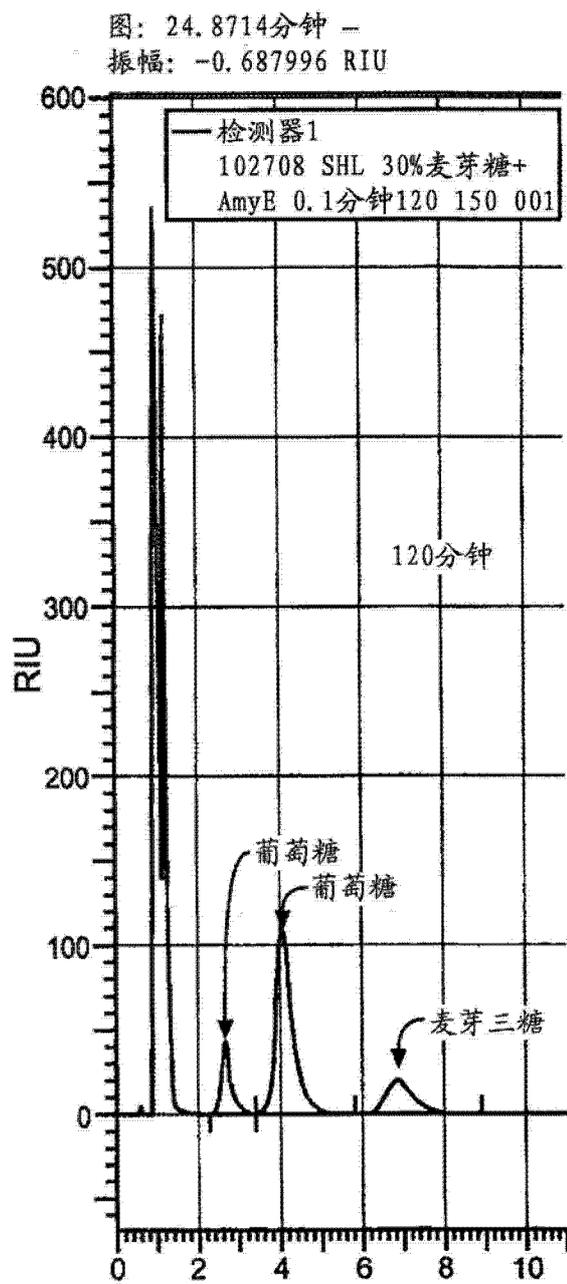


图 5B

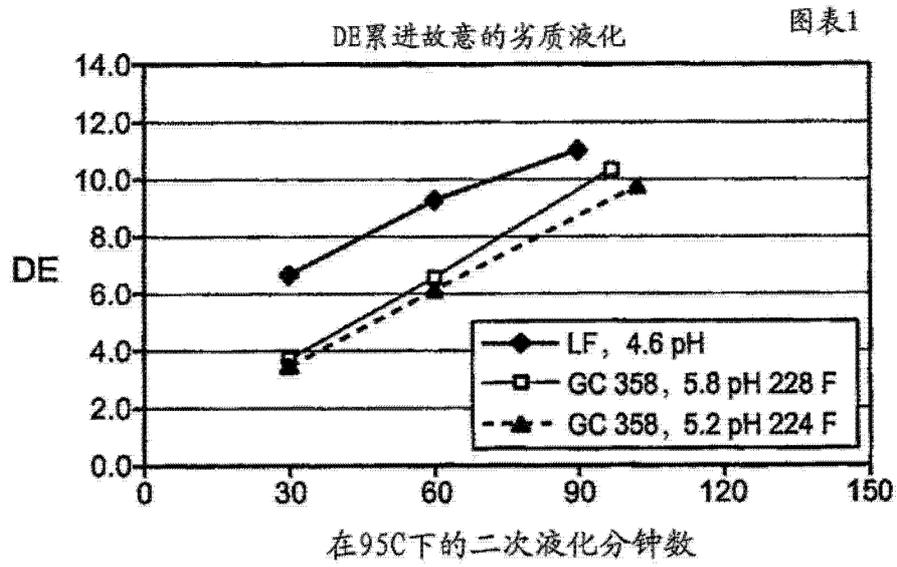


图 6

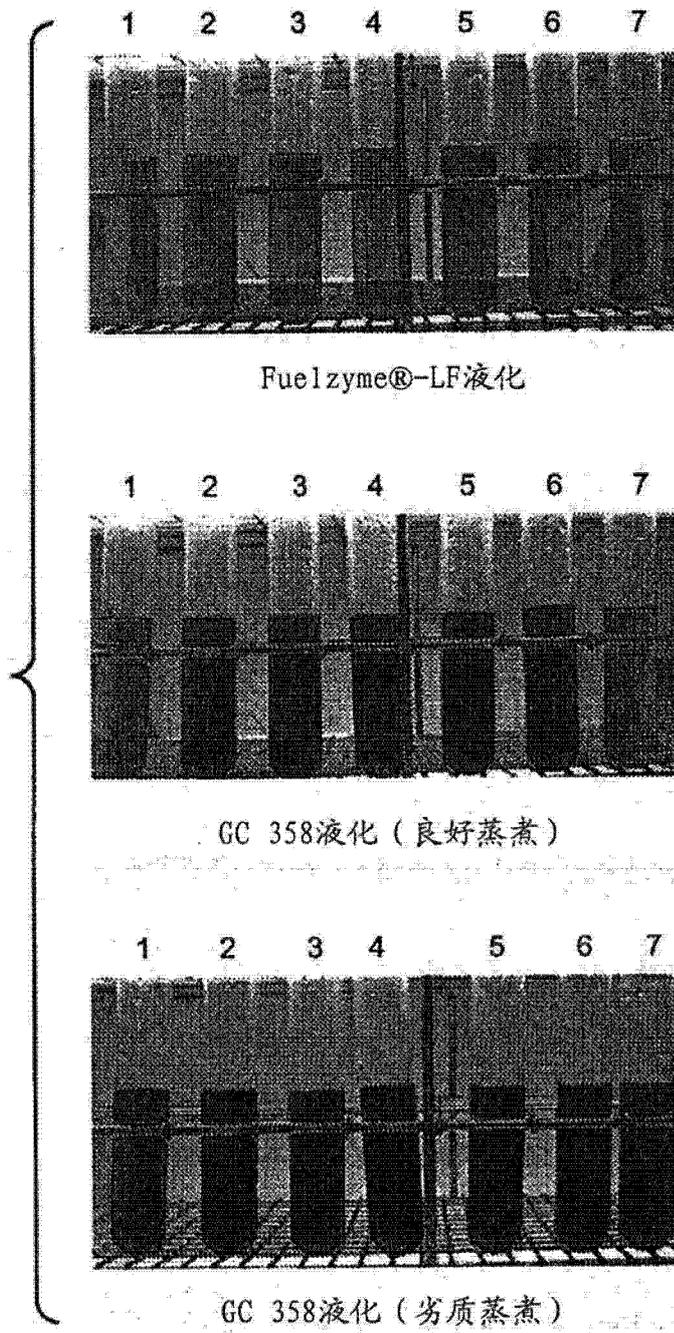
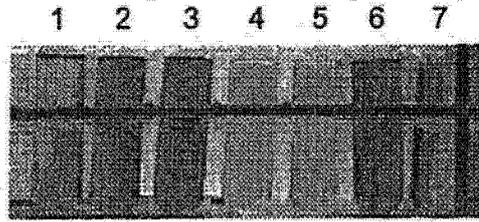
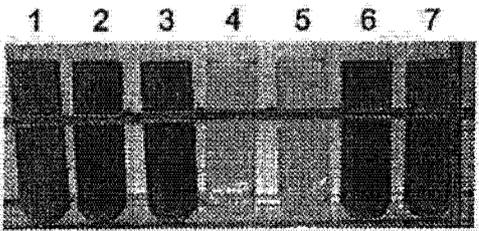


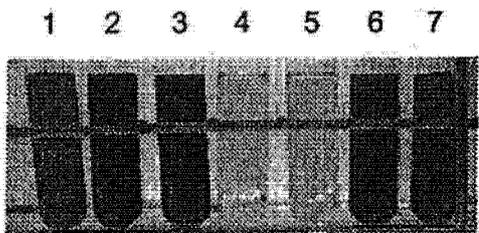
图 7



Fuelzyme®-LF液化



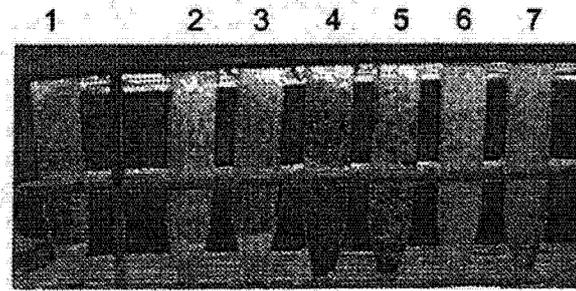
GC 358液化 (良好蒸煮)



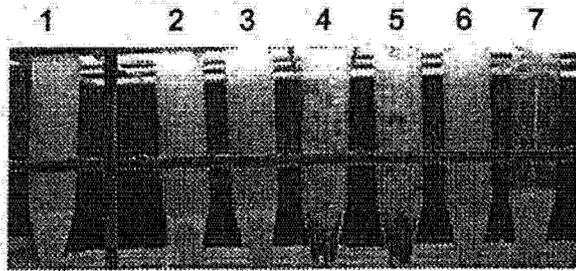
GC 358液化 (劣质蒸煮)



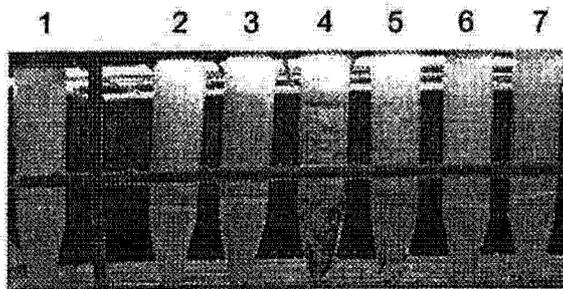
图 8



Fuelzyme®-LF液化



GC 358液化 (良好蒸煮)



GC 358液化 (劣质蒸煮)



图 9

图表1

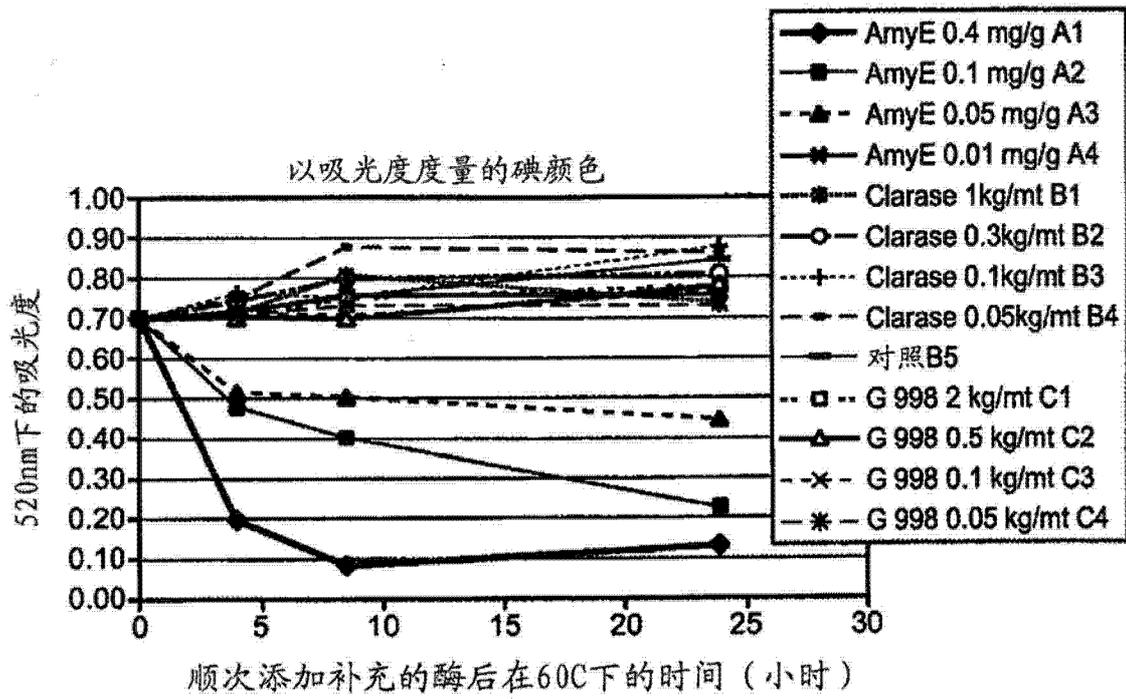


图 10

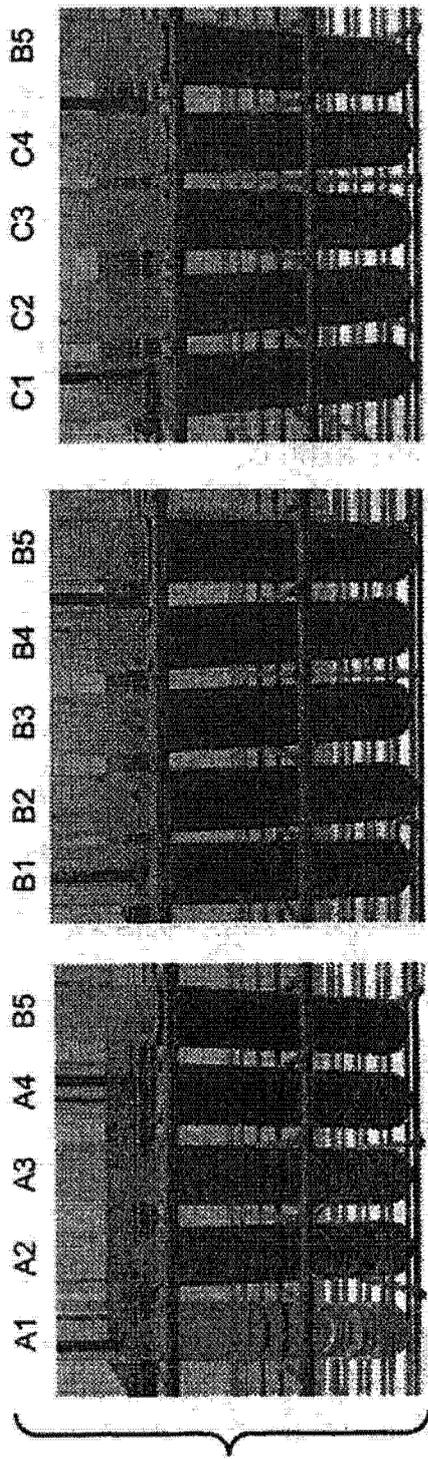


图 11

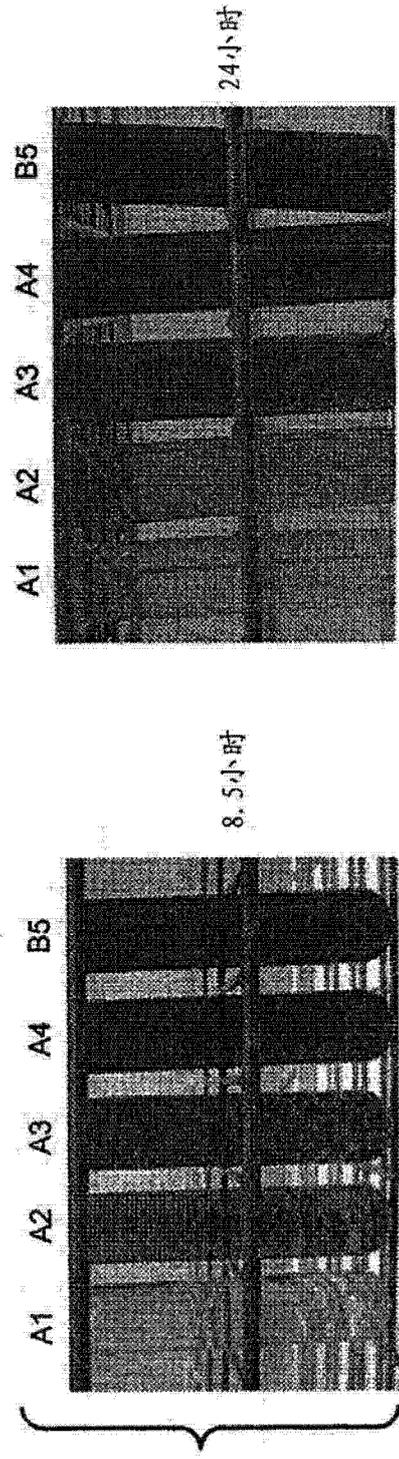


图 12

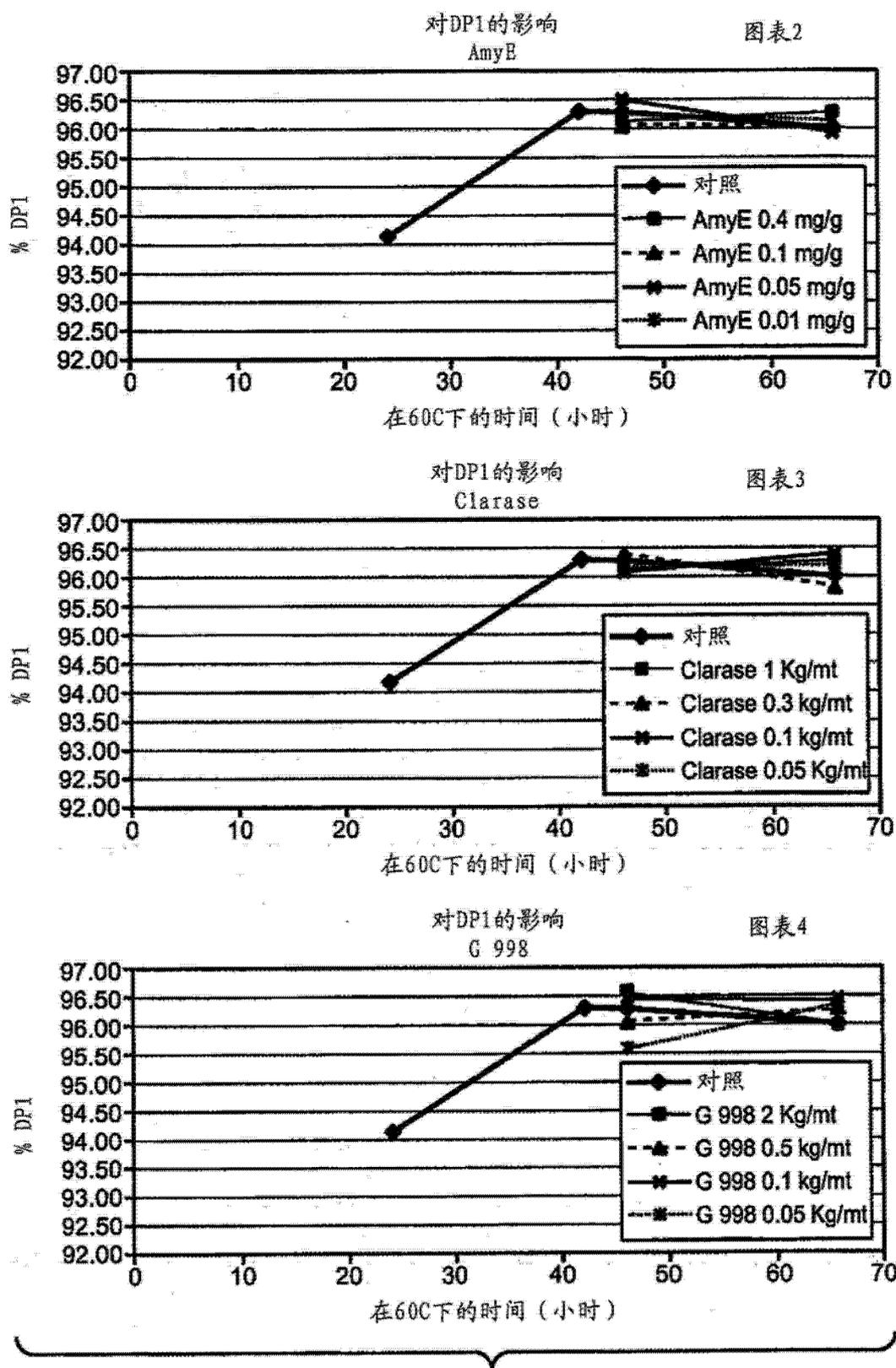


图 13

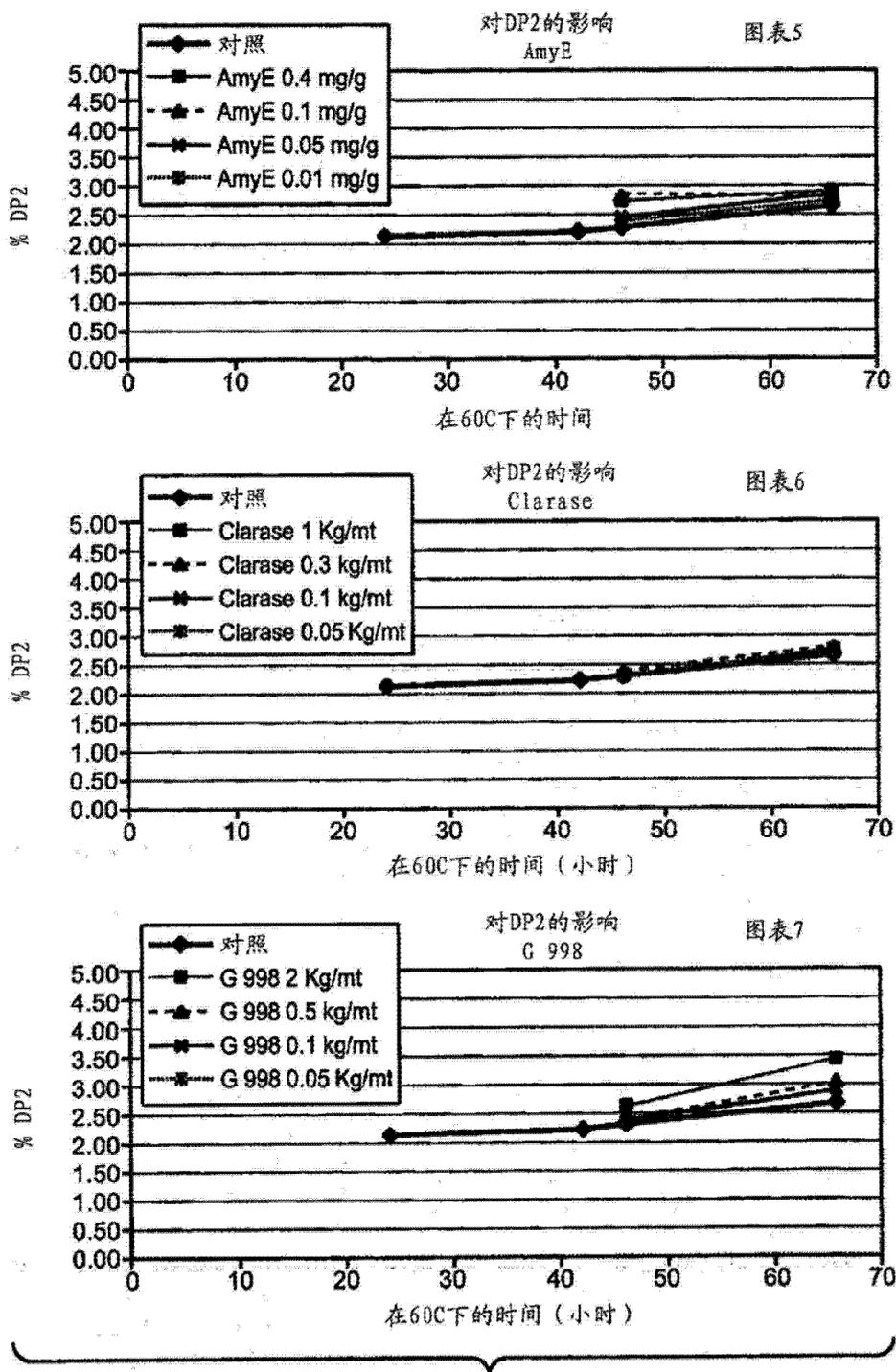


图 14