[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl[7]
C11D 3/386
A61K 7/48
C12N 15/57

[12]发明专利说明书

[21] ZL 专利号 94194485.9

[45]授权公告日 2002 年 4 月 17 日

[11]授权公告号 CN 1082999C

[22]申请日 1994.10.13 [24]颁证日 2002.4.17
[21]申请号 94194485.9
[30]优先权
[32]1993.10.14 [33]US [31]08/136,797
[32]1994.5.2 [33]US [31]08/237,938
[86]国际申请 PCT/US94/11776 1994.10.13
[87]国际公布 WO95/10591 英 1995.4.20
[85]进入国家阶段日期 1996.6.13
[73]专利权人 普罗格特-甘布尔公司
地址 美国俄亥俄州
[72]发明人 A·贝埃克 C·K·格霍什
T·P·格雷卡 R·R·鲍特
L·J·威尔逊 P·F·布洛德三世 奈特
B·L·巴尔 D·N·卢宾赫
[56]参考文献

EP 398539	1990.11.22	C12N9/54 C11D3/386
EP 405901	1991. 1. 2	C11D3/386

审查员 刘俊香
[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 卢新华 谭明胜

权利要求书 9 页 说明书 84 页 附图页数 20 页

[54]发明名称 含蛋白酶的洗涤组合物

[57]摘要

本发明涉及一种含有蛋白酶的洗涤组合物,这种蛋白酶是具有 在天然界未曾发现过的氨基酸序列的一种枯草水解酶变种,是通过 用不同的氨基酸置换前体枯草水解酶中的多个氨基酸残基而衍生出 来的,其中在前体酶中被置换的所说的多个氨基酸残基相应于位置 +76结合一种或多种下列残基位置:+99、+101、+103、+104、+107、+123、+27、+105、+109、+126、+128、+135、+156、+166、+195、+197、+204、+206、+210、+216、+217、+218、+222、+260、+265 和/或 +274,这里 数字标明的位置相应于天然存在的由解淀粉芽孢杆菌(Bacillus amyloliquefaciens)得到的枯草溶菌素中的位置或相应于在其它枯草 基水解酶或枯草溶菌素(诸如迟缓芽孢杆菌(Bacillus lentus)枯草 溶菌素)中等价的氨基酸残基的位置。

ISSN1008-4274

权　利　要　求　书

1. 一种洗涤组合物，它含有：

（a）　按该洗涤组合物的重量计，0.0001% - 10%的一种蛋白酶，它是一种具有天然界未曾发现过的氨基酸序列的羰基水解酶的变体，是通过用不同的氨基酸置换所述前体羰基水解酶中的多种氨基酸残基而衍生得到的，在所说的前体羰基水解酶中被置换的位置等价于解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素中的+76 位置，并结合选自等价于解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素中的下列的一个或多个氨基酸残基位置：+99、+101、+103、+104、+107、+123、+27、+105、+109、+126、+128、+135、+156、+166、+195、+197、+204、+206、+210、+216、+217、+218、+222、+260、+265 和/或+274，条件是：

1）当所述羰基水解酶变体包括在等价于+76 和+195 位置处的氨基酸残基的置换时，还存在非等价于+99 氨基酸残基位置的一个或多个氨基酸残基位置的氨基酸残基的置换；

2）当所述羰基水解酶变体包括在等价于+76 和+156 位置处的氨基酸残基的置换时，还存在非等价于+99 氨基酸残基位置的一个或多个氨基酸残基位置的氨基酸残基的置换；

3）当所述羰基水解酶变体包括在等价于+76 和+99 位置处的氨基酸残基的置换时，则所述羰基水解酶变体仅包括在等价于+76 和+99 位置的置换，或还存在等价于+104、+27、+105、+109、+126、+128、+135、+166、+197、+204、+206、+210、+216、+217、+218、+222、+260、+265 和/或+274 的一个或多个氨基酸残基位置的氨基酸残基的置换；

4）当所述羰基水解酶变体包括在等价于+76 和+218 位置处的氨基酸残基的置换时，则所述羰基水解酶变体仅包括在等价于+76 和+218 位置的置换，或还存在非等价于+206 和+217 氨基酸残基位置的一个或多个氨基酸残基位置的氨基酸残基的置换；

5）当所述羰基水解酶变体包括在等价于+76 和+217 位置处的氨基酸残基的置换时，则所述羰基水解酶变体仅包括在等价于+76 和+217 位置的置换，或还存在非等价于+206 和+218 氨基酸残基位置的一个或多个氨基酸残基位置的氨基酸残基的置换；

6）当所述羰基水解酶变体包括在等价于+76 和+206 位置处的氨基酸残基的置换时，则所述羰基水解酶变体仅包括在等价于+76 和+206 位置的置换，或还存在非等价于 + 217 和 + 218 氨基酸残基位置的一个或多个氨基酸残基位置的氨基酸残基的置换；

7）当所述羰基水解酶变体包括在等价于+76 和+104 位置处的氨基酸残基的置换时，还存在等价于 + 99、 + 101、 + 103、 + 107、 + 123、 + 27、 + 105、 + 109、 + 126、 + 128、 + 135、 + 156、 + 166、 + 195、 + 197、 + 204、 + 206、 + 210、 + 216、 + 217、 + 218、 + 222、 + 260、 + 265 和／或 + 274 的一个或多个氨基酸残基位置处的氨基酸残基的置换；和

（b）一种或多种可与蛋白酶配伍的洗涤组合物材料。

2. 权利要求 1 的洗涤组合物，其中的洗涤组合物材料选自表面活性剂、溶剂、缓冲剂、酶、污垢解脱剂、除尘土污垢剂、分散剂、增白剂、抑泡剂、织物柔软剂、增泡剂、酶稳定剂、助洗剂、漂白剂、染料、香料及其混合物。

3. 权利要求 1 的洗涤组合物，其中洗涤组合物材料含有占组合物重量至少 1% 的表面活性剂，所说的表面活性剂包括选自以下的材料：烷基苯磺酸盐、伯烷基硫酸盐、仲烷基硫酸盐、烷基烷氧基硫酸盐、烷基烷氧基羧酸盐、烷基多苷和它们相应的硫酸化的多苷、α－磺化的脂肪酸酯、烷基和烷基酚烷氧基化物、甜菜碱和磺基甜菜碱、氧化胺、N－甲基葡糖酰胺、非离子型的伯醇乙氧基化物、非离子型的混合的乙氧基／丙氧基化伯醇、及其混合物。

4. 权利要求 3 的洗涤组合物，它进一步含有至少 5% 的选自沸石、多羧酸盐、层状硅酸盐、磷酸盐及其混合物的助洗剂。

5. 权利要求 1 的洗涤组合物，其中的洗涤组合物材料含有至少一种漂白剂。

6. 权利要求 5 的洗涤组合物，其中的漂白剂选自过碳酸盐、过硼酸盐及其混合物，并任选还含有至少一种漂白活化剂。

7. 权利要求 1 的洗涤组合物，其中的洗涤组合物材料包括至少一种选自纤维素酶、脂酶、淀粉酶、蛋白酶、过氧化物酶及其混合物的酶。

8. 权利要求 1 的洗涤组合物，其中的洗涤组合物材料包括至少一种织物柔软剂.

9. 权利要求 1 的洗涤组合物，其中用于产生蛋白酶的前体羰基水解酶是一种枯草溶菌素，并且该蛋白酶是一种枯草溶菌素变种，其中在等价于下列的位置上进行了一系列置换:

76/99, 76/101, 76/103, 76/107, 76/123, 76/99/104, 76/101/103, 76/101/104, 76/103/104, 76/104/107, 761104/123, 76/107/123, 76/99/101/104, 76/99/103/104, 76/101/103/104, 76/103/104/123, 76/104/107/123, 76/99/101/103/104, 76/99/103/104/123, 76/99/101/103/104/123, 76/103/104/126, 76/103/104/135, 76/103/104/197, 76/103/104/222, 76/103/104/260, 76/103/104/265, 76/103/104/126/265, 27/76/104/123/274, 27/76/104/109/123/274, 27/76/104/123/218/274, 27/76/104/123, 27/76/104/107/123, 27/76/104/109/123, 27/76/104/109/123/218/274, 27/76/104/123/197, 27/76/104/123/204, 27/76/104/123/206, 27/76/104/123/216, 27/76/104/123/218, 27/76/104/123/260, 27/76/104/123/195/197, 27/76/104/123/195/218, 27/76/104/123/197/218, 27/76/104/123/204/218, 27/76/104/123/218/260, 27/76/104/123/195/197/218, 76/103/104/217, 76/103/104/156, 76/103/104/166, 76/103/104/105, 76/101/103/104, 76/103/104/128, 76/103/104/210, 76/103/104/107, 76/103/104/204, 76/217, 76/103/104/156/166 和 76/103/104/128.

10. 权利要求 9 中的洗涤组合物，其中的蛋白酶是选自经下列置换的枯草溶菌素的变种:

76/99, 76/101, 76/103, 76/107, 76/123, 76/99/104, 76/101/103, 76/101/104, 76/103/104, 76/104/107, 76/104/123, 76/107/123, 76/99/101/104, 76/99/103/104, 76/101/103/104, 76/103/104/123, 76/104/107/123, 76/99/101/103/104, 76/99/103/104/123, 76/99/101/103/104/123, 76/103/104/128; 76/103/104/260; 76/103/104/265; 76/103/104/197; 76/103/104/105; 76/103/104/135; 76/103/104/126; 76/103/104/107; 76/103/104/210; 76/103/104/126/265; 和/或 76/103/104/222.

11. 一种织物洗涤组合物，它含有:

(a) 按该织物洗涤组合物的重量计，0.0001% - 10% 的一种蛋白酶，它是一种具有天然界未曾发现过的氨基酸序列的羰基水解酶的

变种，是通过枯草溶菌素前体羧基水解酶衍生而来的，其中的蛋白酶是选自下列枯草溶菌素的变种：

N76D/S99D; N76D/S101R; N76D/S103A; N76D/I107V; N76D/N123S; N76D/S99D/V104I; N76D/S101R/S103A; N76D/S101R/V104I; N76D/S103A/V104I; N76D/V104I/I107V; N76D/V104Y/I107V; N76D/V104I/N123S; N76D/I107V/N123S; N76D/S99D/S101R/V104I; N76D/S99D/S103A/V104I; N76D/S101R/S103A/V104I; N76D/S103A/V104I/N123S; N76D/V104I/I107V/N123S; N76D/S99D/S101R/S103A/V104I; N76D/S99D/S103A/V104I/N123S; N76D/S99D/S101R/S103A/V104I/N123S; N76D/S103A/V104I/S128G; N76D/S103A/V104I/T260P; N76D/S103A/V104I/S265N; N76D/S103A/V104I/D197E; N76D/S103A/V104I/S105A; N76D/S103A/V104I/L135I; N76D/S103A/V104I/L126F; N76D/S103A/V104T/L107T; N76D/S103A/V104I/L126F/S265N 和 N76D/S103A/V104I/M222A

以及它们的混合物；和

（b）一种或多种可与蛋白酶配伍的洗涤组合物材料，它包括基于组合物重量计算至少 5% 的表面活性剂和至少 5% 的助洗剂。

12. 权利要求 11 的织物洗涤组合物，它进一步含有选自以下的洗涤组合物材料：溶剂、缓冲剂、酶、污垢解脱剂、除尘土污垢剂、分散剂、增白剂、抑泡剂、织物柔软剂、增泡剂、酶稳定剂、漂白剂、染料、香料及其混合物。

13. 权利要求 11 的织物洗涤组合物，它进一步含有至少一种漂白剂。

14. 权利要求 11 的织物洗涤组合物，它进一步含有至少一种选自纤维素酶、脂酶、淀粉酶、蛋白酶、过氧化物酶以及它们的混合物的酶。

15. 权利要求 11 的织物洗涤组合物，是以液体、颗粒或条状的形式。

16. 权利要求 11 的织物洗涤组合物，其中的蛋白酶是选自以下的枯草溶菌素变种：

N76D/S99D, N76D/V104I, N76D/S99D/V104I, N76D/S103A/V104I, N76D/V104I/I107V, N76D/V104Y/I107V, N76D/S101R/S103A/V104I, N76D/S99D/S101R/S103A/V104I, N76D/S101R/V104I,

及其混合物.

17. 权利要求 11 的织物洗涤组合物，其中的蛋白酶是选自 N76D / V104I、N76D / S103A / V104I 的枯草芽孢杆菌枯草溶菌素变种及其混合物.

18. 一种洗碗碟组合物，它含有:

（a） 0.0001% 至 10% 的蛋白酶，它是一种具有天然界未曾发现过的氨基酸序列的羰基水解酶的变种，是由枯草溶菌素前体羰基水解酶衍生而来的，其中的蛋白酶是选自下列枯草溶菌素的变种:

N76D/S99D; N76D/S101R; N76D/S103A; N76D/I107V; N76D/N123S; N76D/S99D/V104I; N76D/S101R/S103A; N76D/S101R/V104I; N76D/S103A/V104I; N76D/V104I/I107V; N76D/V104Y/I107V; N76D/V104I/N123S; N76D/I107V/N123S; N76D/S99D/S101R/V104I; N76D/S99D/S103A/V104I; N76D/S101R/S103A/V1041I; N76D/S103A/V104I/N123S; N76D/V104I/I107V/N123S; N76D/S99D/S101R/S103A/V104I; N76D/S99D/S103A/V104I/N123S; N76D/S99D/S101R/S103A/V104I/N123S; N76D/S103A/V104I/S128G; N76D/S103A/V104I/T260P; N76D/S103A/V104I/S265N; N76D/S103A/V104I/D197E; N76D/S103A/V104I/S105A; N76D/S103A/V104I/L135I; N76D/S103A/V104I/L126F; N76D/S103A/V104T/L107T; N76D/S103A/V104I/L126F/S265N, 和 N76D/S103A/V104I/M222A

及其混合物;

（b） 0.1% 至 10% 的表面活性剂; 和

（c）任选地，一种或多种可与蛋白酶配伍的洗涤组合物材料，它们选自溶剂、缓冲剂、酶、分散剂、抑泡剂、酶稳定剂、漂白剂、染料、香料及其混合物.

19. 一种权利要求 18 的洗碗碟组合物，其中的蛋白酶是由迟缓芽孢杆菌枯草溶菌素衍生的 N76D / S103A / V104I 枯草溶菌素变种.

20. 一种人身用的洗涤组合物，它包含:

（a）按洗涤组合物的重量计，0.001%至5%（重量）的蛋白酶，它是一种具有天然界未曾发现过的氨基酸序列的羰基水解酶的变体，是通过用不同的氨基酸置换所述前体羰基水解酶中的多种氨基酸残基而衍生得到的，在所说的前体羰基水解酶中被置换的位置等价于解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素中的+76位置，并结合选自等价于解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素中的下列一个或多个氨基酸残基位置：+99、+101、+103、+104、+107、+123、+27、+105、+109、+126、+128、+135、+156、+166、+195、+197、+204、+206、+210、+216、+217、+218、+222、+260、+265和/或+274，条件是：

1)当所述羰基水解酶变体包括在等价于+76和+195位置处的氨基酸残基的置换时，还存在非等价于+99氨基酸残基位置的一个或多个氨基酸残基位置的氨基酸残基的置换；

2)当所述羰基水解酶变体包括在等价于+76和+156位置处的氨基酸残基的置换时，还存在非等价于+99氨基酸残基位置的一个或多个氨基酸残基位置的氨基酸残基的置换；

3)当所述羰基水解酶变体包括在等价于+76和+99位置处的氨基酸残基的置换时，则所述羰基水解酶变体仅包括在等价于+76和+99位置的置换，或还存在等价于+104、+27、+105、+109、+126、+128、+135、+166、+197、+204、+206、+210、+216、+217、+218、+222、+260、+265和/或+274的一个或多个氨基酸残基位置的氨基酸残基的置换；

4)当所述羰基水解酶变体包括在等价于+76和+218位置处的氨基酸残基的置换时，则所述羰基水解酶变体仅包括在等价于+76和+218位置的置换，或还存在非等价于+206和+217氨基酸残基位置的一个或多个氨基酸残基位置的氨基酸残基的置换；

5)当所述羰基水解酶变体包括在等价于+76和+217位置处的氨基酸残基的置换时，则所述羰基水解酶变体仅包括在等价于+76和+217位置的置换，或还存在非等价于+206和+218氨基酸残基位置的一个或多个氨基酸残基位置的氨基酸残基的置换；

6)当所述羰基水解酶变体包括在等价于+76和+206位置处的氨基酸残基的置换时，则所述羰基水解酶变体仅包括在等价于+76和

+206 位置的置换，或还存在非等价于 + 217 和 + 218 氨基酸残基位置的一个或多个氨基酸残基位置的氨基酸残基的置换；

7) 当所述羰基水解酶变体包括在等价于+76 和+104 位置处的氨基酸残基的置换时，还存在等价于 + 99、 + 101、 + 103、 + 107、 + 123、 + 27、 + 105、 + 109、 + 126、 + 128、 + 135、 + 156、 + 166、 + 195、 + 197、 + 204、 + 206、 + 210、 + 216、 + 217、 + 218、 + 222、 + 260、 + 265 和 / 或 + 274 的一个或多个氨基酸残基位置处的氨基酸残基的置换；（b）按该洗涤组合物的重量计， 0.01% 至 95% 的表面活性剂体系；和

（c）任选地，按该洗涤组合物的重量计， 0.05% 至 50% 的一种酶稳定剂。

21. 权利要求 20 的组合物，其中蛋白酶的含量为 0.001% 至 2%（重量）。

22. 权利要求 21 的组合物，其中蛋白酶的含量为 0.01% 至 0.8%（重量）。

23. 权利要求 20 的组合物，其中的表面活性剂体系含有一种选自阴离子的羧酸盐、氧化胺、烷基葡糖苷、葡糖酰胺、烷基硫酸盐、烷基醚硫酸盐、酰基羟乙磺酸盐、烷基磺化琥珀酸盐、烷基磷酸酯、乙氧化的磷酸酯、烷基甘油醚磺酸盐、或其混合物的表面活性剂。

24. 权利要求 20 的组合物，其中的表面活性剂体系含有一种选自皂、酰基谷氨酸盐、烷基肌氨酸盐、月桂基氧化胺、椰油基氧化胺、椰油酰氨基丙基氧化胺、癸基葡糖苷、月桂基硫酸盐、月桂醚硫酸盐、C12 ~ C18 酰基羟乙磺酸盐、或其混合物的表面活性剂。

25. 权利要求 24 的组合物，其中的表面活性剂是皂，其含量为组合物重量的至少 2%。

26. 权利要求 25 的组合物，其中皂的含量为组合物重量的至少 10%。

27. 权利要求 26 的组合物，其中皂的含量为组合物重量的至少 25%。

28. 权利要求 24 的组合物，其中皂与蛋白酶的比率为 2000 : 1 至 8 : 1。

29. 权利要求 28 的组合物，其中皂与蛋白酶的比率为 400：1 至 40：1。

30. 权利要求 24 的组合物，其中的蛋白酶是一种具有天然界未曾发现过的氨基酸序列的羰基水解酶的变种，是由枯草溶菌素前体羰基水解酶衍生而来的，其中的蛋白酶是选自下列枯草溶菌素的变种：

N76D/S99D; N76D/S101R; N76D/S103A; N76D/I107V; N76D/N123S; N76D/S99D/V104I; N76D/S101R/S103A; N76D/S101R/V104I; N76D/S103A/V104I; N76D/V104I/I107V; N76D/V104Y/I107V; N76D/V104I/N123S; N76D/I107V/N123S; N76D/S99D/S101R/V104I; N76D/S99D/S103A/V104I; N76D/S101R/S103A/V104I; N76D/S103A/V104I/N123S; N76D/V104I/I107V/N123S; N76D/S99D/S101R/S103A/V104I; N76D/S99D/S103A/V104I/N123S; N76D/S99D/S101R/S103A/V104I/N123S; N76D/S103A/V104I/S128G; N76D/S103A/V104I/T260P; N76D/S103A/V104I/S265N; N76D/S103A/V104I/D197E; N76D/S103A/V104I/S105A; N76D/S103A/V104I/L135I; N76D/S103A/V104I/L126F; N76D/S103A/V104T/L107T; N76D/S103A/V104I/L126F/S265N，和 N76D/S103A/V104I/M222A;

及其混合物。

31. 一种供人身洗涤的方法，所说的方法包括使人或较低等动物需要洗涤的身体部分与一种羰基水解酶的变种接触，这种羰基水解酶的变种具有天然界未曾发现过的氨基酸序列，它是由枯草溶菌素前体羰基水解酶衍生而来的，其中的蛋白酶是选自下列的枯草溶菌素变种：

N76D/S99D; N76D/S101R; N76D/S103A; N76D/I107V; N76D/N123S; N76D/S99D/V104I; N76D/S101R/V104I; N76D/S103A104I; N76D/V104I/I107V; N76D/V104Y/I107V; N76D/V104I/N123S; N76D/I107V/N123S; N76D/S99D/S101R/S103A; N76D/S99D/S101R/

V104I; N76D/S99D/S103A/V104I; N76D/S101R/S103A/V104I; N76D/S103A/V104I/N123S; N76D/V104I/I107V/N123S; N76D/S99D/S101R/S103A/V104I; N76D/S99D/S103A/V104I/N123S; N76D/S99D/S101R/S103A/V104I/N123S; N76D/S103A/V104I/S128G; N76D/S103A/V104I/T260P; N76D/S103A/V104I/S265N; N76D/S103A/V104I/D197E; N76D/S103A/V104I/S105A; N76D/S103A/V104I/L135I; N76D/S103A/V104I/L126F; N76D/S103A/V104T/L107T; N76D/S103A/V104I/L126F/S265N 和 N76D/S103A/V104I/M222A;

及其混合物。

说　明　书

含蛋白酶的洗涤组合物

本申请书是1993年10月14日提交的美国申请系列号08/136,797和1994年5月2日提交的美国申请系列号08/237,938的部分继续申请，该两项申请在此引人作为参考。

技术领域

本发明涉及含有新的蛋白酶的多种洗涤组合物，这些蛋白酶是羰基水解酶的变种。

背　景

酶组成最大一类天然存在的蛋白质。每类酶一般催化（加速反应而没有被消耗）一种不同的化学反应。有一类被称为蛋白酶的酶，由于它们具有能够水解（及把一个化合物分解成两个或更多个较简单的化合物，并把水分子的H和OH部分分别吸收在碎裂的化学键的两边）其它蛋白质的能力而为人所知。这种水解蛋白质的能力已被利用来把天然界存在的蛋白酶和经过蛋白质工程加工过的蛋白酶，作为一种添加剂并入到洗衣用的洗涤剂制品之中。许多衣服上的污渍是蛋白质性的，因此广谱蛋白酶能使得除去这类污渍的能力得到重大的改进。

不幸，这些蛋白质在它们的天然的细菌环境中的有效浓度，常常不能被转移到相对非自然的洗涤环境中。特别是，蛋白酶的特性诸如热稳定性、pH稳定性、氧化稳定性和底物专一性等，在酶的自然环境以外不能必然地被优化来加以利用。

蛋白酶的氨基酸序列决定了蛋白酶的特性。蛋白酶氨基酸序列

的变化可能在不同程度上改变酶的性质，甚至可能使酶失活，这取决于在氨基酸序列中变化的位置、性质和／或数值。已经采用了一些方法来改变酶的氨基酸序列，企图改进它们的性质，其目的在于增进蛋白酶在诸如洗衣环境中的洗涤用途时的效率．这些方法包括改变氨基酸序列来增进热稳定性以及在很不相同的条件下改进氧化稳定性。

虽然在本领域中已经叙述过种种方法，但仍然继续需要新的有效的蛋白酶变种来应用于洗涤各种表面．因此本发明的一个目的是提供一种含有蛋白酶的洗涤组合物，这种蛋白酶是具有改进的解蛋白活度、底物专一性、稳定性和／或增进的品质特性的羰基水解酶变种。从以下的详尽描述中，这些目的以及其它目的将很快变得很明显。

发明概要

本发明涉及洗涤组合物，它含有:

（a）有效量的一种蛋白酶，它是一种具有天然界未曾发现过的氨基酸序列的羰基水解酶的变种，是通过用不同的氨基酸置换前体羰基水解酶中的多种氨基酸残基而衍生出来的，其中在前体酶中被置换的多个氨基酸残基位置相应于位置＋76 与一种或多种下列残基位置的结合: ＋99、＋101、＋103、＋104、＋107、＋123、＋27、＋105、＋109、＋126、＋128、＋135、＋156、＋166、＋195、＋197、＋204、＋206、＋210、＋216、＋217、＋218、＋222、＋260、＋265 和／或＋274，这里数字标明的位置相应于天然存在的由解淀粉芽孢杆菌（Bacillus amyloliquefaciens）得到的枯草溶菌素中的位置，或相应于在其它羰基水解酶或枯草溶菌素（诸如迟缓芽孢杆菌（Bacillus lentus）枯草溶菌素）中等价的氨基

酸残基；和

（b）一种或多种可与蛋白酶配伍的洗涤组合物材料。

本发明也涉及洗涤需要洗涤的物品的方法，它是通过使所说的物品与这里描述的是一种羰基水解酶变种的蛋白酶进行接触而完成的。因此本发明包括一种洗涤织物的方法，它包括最好是在搅拌条件下，使所说的织物与含有所说的蛋白酶的水溶液进行接触。这方法可在低于大约60℃以下的温度下进行，但是在直到沸点的洗衣温度下当然也是很有效的。本发明还涉及洗涤碗碟的方法，即把需要洗涤的碗碟与这里描述的蛋白酶接触。本发明的方法也涉及人身洗涤的方法，所说的方法包括把人类或较低等动物身体需要洗涤的部分与这里描述的蛋白酶接触。

附图简述

图1 A～C描绘的是解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素的DNA和氨基酸序列以及这一基因的部分限制基因图谱（Seq. ID No.6）。

图2描绘的是在由解淀粉芽孢杆菌（BPN'）和迟缓芽孢杆菌（野生型）得来的枯草溶菌素中保存的氨基酸残基。

图3A和3B描绘的是四种枯草溶菌素的氨基酸序列。最上一行代表由解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素（有时也称为枯草溶菌素BPN'）中析离的枯草溶菌素的氨基酸序列（Seq. ID No.7）。第二行描绘由枯草杆菌（Bacillus subtilis）析离的枯草溶菌素的氨基酸序列（Seq. ID No.8）。第三行描绘由地衣芽孢杆菌（B. Licheniformis）析离的氨基酸序列（Seq. ID No.9）。第四行描绘了由迟缓芽孢杆菌（Bacillus lentus）析离的枯草溶菌素（在PCT WO 89/06276中也被称为枯草溶菌素309）的氨基酸序列（Seq. ID No.10）。符号*表明与枯草溶菌素BPN'比较不存在这一特定的

氨基酸残基。

图 4 描绘了质粒 GGA274 的构造。

图 5 描绘了 GGT274 的构造，它是为可靠表达用于本申请的质粒的一个中间体。

图 6A 和图 6B 描绘了由迟缓芽孢杆菌析离的枯草溶菌素的 DNA 和氨基酸序列（Seq. ID No.11）。成熟的枯草溶菌素蛋白质是在相应于 Ala 的密码子 GCG（334～336）处开始通过密码子编码的。

图 7A 和 7B 描绘了本发明经优选的实施方案中的 DNA 和氨基酸序列（N 76D/S103A/V104I）（Seq. ID No.12）。这图中的 DNA 已用在位置 76 的天冬氨酸、在位置 103 的丙氨酸和在位置 104 的异亮氨酸编码时所描述的方法进行修饰。成熟的枯草溶菌素变种蛋白质是在相应于 Ala 的密码子 GCG（334～336）处开始通过密码子编码的。

图 8 描绘了载体 pBCDAICAT 的构造。

图 9 描绘了载体 pUCCATFNA 的构造。

图 10 表明经优选的突变体酶在液体洗涤剂配方中比野生型的有更好的稳定性。

发明详述

（1）蛋白酶

本发明包括蛋白酶，它是天然界不存在的羰基水解酶变种，它和它的氨基酸序列与由之衍生的前体羰基水解酶相比，具有不同的解蛋白活度、稳定性、底物特异性、pH 性能和／或品质特性。前体羰基水解酶可以是一种天然界存在的羰基水解酶或重组体水解酶。具体地说，这类羰基水解酶变种具有在天然界未发现过的氨基

酸序列，它是用不同的氨基酸来置换前体羰基水解酶中的多个氨基酸残基而衍生出来的。这多个前体酶中的氨基酸残基相应于位置 + 76 以及一种或多种下列残基的位置： + 99、 + 101、 + 103、 + 104、 + 107、 + 123、 + 27、 + 105、 + 109、 + 126、 + 128、 + 135、 + 156、 + 166、 + 195、 + 197、 + 204、 + 206、 + 210、 + 216、 + 217、 + 218、 + 222、 + 260、 + 265 和 / 或 + 274，这里数字标示的位置相应于天然界存在的由解淀粉芽孢杆菌析离的枯草溶菌素中的位置或其它羰基水解酶或枯草溶菌素，诸如迟缓芽孢杆菌枯草溶菌素中等价的氨基酸残基的位置。

用于本发明组合物中的羰基水解酶变种是一种蛋白酶，它包括置换 + 76 位置的氨基酸残基并结合一种或多种别的修饰。最好是用于本发明的变种蛋白酶包括置换、删除或插入下列组合的氨基酸残基:

76/99; 76/101; 76/103; 76/104; 76/107; 76/123;
76/99/101; 76/99/103; 76/99/104; 76/101/103; 76/101/104; 76/103/104;
76/104/107; 76/104/123; 76/107/123; 76/99/101/103; 76/99/101/104;
76/99/103/104; 76/101/103/104; 76/103/104/123; 76/104/107/123;
76/99/101/103/104; 76/99/103/104/123; 76/99/101/103/104/123;
76/103/104/128; 76/103/104/260; 76/103/104/265; 76/103/104/197;
76/103/104/105; 76/103/104/135; 76/103/104/126; 76/103/104/107;
76/103/104/210; 76/103/104/126/265; 和/或 76/103/104/222.

最优选地是用于本发明的变种酶包括置换、删除或插入下列氨基酸残基的组合，即解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素的 76/99； 76/104； 76/99/104； 76/103/104； 76/104/107； 76/101/103/104； 76/99/101/103/104 和 76/101/104。

编码这类羰基水解酶或枯草溶菌素变种的变种 DNA 序列是由

编码天然存在的或重组体前体酶的前体 DNA 序列所衍生的。这种变种 DNA 序列是通过修饰前体 DNA 序列来编码置换一种或多种特定的、被前体 DNA 序列编码的相应于解淀粉芽孢杆菌中下列位置的氨基酸残基或它们的组合而衍生出来的：76、99、101、103、104、107、123、27、105、109、126、128、135、156、166、195、197、204、206、210、216、217、218、222、260、265 和/或 274。虽然这里为修饰而鉴定的氨基酸残基是按照可应用于解淀粉芽孢杆菌（它已成为在所有枯草溶菌素中惯常使用的鉴定残基位置的方法）中的数码标志，但用于本发明的经优选的前体 DNA 序列是如图 6 所示的迟缓芽孢杆菌的 DNA 序列（Seq. ID No. 11）。

这些变种 DNA 序列编码插入或取代氨基酸残基 76 并结合一种或多种另外的修饰。最好是变种 DNA 序列编码取代或插入下列组合的氨基酸残基：

76/99; 76/101; 76/103;
76/104; 76/107; 76/123; 76/99/101; 76/99/103; 76/99/104; 76/101/103;
76/101/104; 76/103/104; 76/104/107; 76/104/123; 76/107/123; 76/99/101/103;
76/99/101/104; 76/99/103/104; 76/101/103/104; 76/103/104/123;
76/104/107/123; 76/99/101/103/104; 76/99/103/104/123;
76/99/101/103/104/123; 76/103/104/128; 76/103/104/260; 76/103/104/265;
76/103/104/197; 76/103/104/105; 76/103/104/135; 76/103/104/126;
76/103/104/107; 76/103/104/210; 76/103/104/126/265;和/或 76/103/104/222.

最优选地是变种 DNA 序列编码修饰下列残基的组合：76/99; 76/104; 76/99/104; 76/103/104; 76/104/107; 76/101/103/104; 76/99/101/103/104 和 76/101/104。这些重组体 DNA 序列编码具有新的氨基酸序列的羰基水解酶变种，并且一般至少有一种性质是和被前体羰基水解酶 DNA 序列编码的酶的同一性质有实质上的不

同。这类性质包括解蛋白活度、底物专一性、稳定性、变化了的pH特性和/或增进的品质特性等。

这里有用的蛋白酶包括在指明的氨基酸残基位置上用天然存在的19种L-氨基酸中的任何一种进行置换的产物。这样的置换可以在任何前体枯草溶菌素（原核生物的、真核生物的、哺乳动物的等）中进行。贯穿整个本申请书都是用通常的一个和三个字母代号来表示各个氨基酸的。这样的代号已在Dale, J. W（1989）所著的"Molecular Genetics of Bacteria"（细菌的分子遗传学）一书的附录B中认定，John Wiley & Sons, Ltd. 出版。

最好是，在每个认定的氨基酸残基位置上进行的置换包括但不仅限于：在位置76的置换包括D、H、E、G、F、K、P和N；在位置99的置换包括D、T、N、Q、G和S；在位置101的置换包括G、D、K、L、A、E、S和R；在位置103的置换包括Q、T、D、E、Y、K、G、R、S和A；在位置104的置换包括所有19种天然界存在的氨基酸；在位置107的置换包括V、L、M、Y、G、E、F、T、S、A、N和I；在位置123的置换包括N、T、I、G、A、C和S；在位置27的置换包括K、N、C、V和T；在位置105的置换包括A、D、G、R和N；在位置107的置换包括A、L、V、Y、G、F、T、S和A；在位置109的置换包括S、K、R、A、N和D；在位置126的置换包括A、F、I、V和G；在位置128的置换包括G、L和A；在位置135的置换包括A、F、I、S和V；在位置156的置换包括D、E、A、G、Q和K；在位置166的置换包括所有天然界存在的19种氨基酸；在位置195的置换包括E；在位置197的置换包括E；在位置204的置换包括A、G、C、S和D；在位置206的置换包括L、Y、N、D和E；在位

置 210 的置换包括 L、I、S、C 和 F；在位置 216 的置换包括 V、E、T 和 K；在位置 217 的置换包括所有天然界存在的 19 种氨基酸；在位置 218 的置换包括 S、A、G、T 和 V；在位置 222 的置换包括所有天然界存在的 19 种氨基酸；在位置 260 的置换包括 P、N、G、A、S、C、K 和 D；在位置 265 的置换包括 N、G、A、S、C、K、Y 和 H；在位置 274 的置换包括 A 和 S。在每个这样的位置上被置换的特别优选的氨基酸被列出在下面的表 1 中。在表 1 中虽然指明了具体的氨基酸，但应该理解在认定的残基位置上任何一种氨基酸都可被置换。

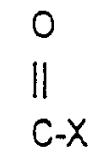
表 I

氨基酸 残 基	被置换 / 插入的 经优选的氨基酸
+76	D,H
+99	D,T,N,G
+101	R,G,D,K,L,A,E
+103	A,Q,T,D,E,Y,K,G,R
+104	I,Y,S,L,A,T,G,F,M,W,D,V,N
+107	V,L,Y,G,F,T,S,A,N
+123	S,T,I
+27	K
+105	A,D
+109	S,K,R
+126	A,I,V,F
+128	G,L
+135	I,A,S
+156	E,D,Q
+166	D,G,E,K,N,A,F,I,V,L
+195	E
+197	E
+204	A,G,C
+206	L
+210	I,S,C
+216	V
+217	H,I,Y,C,A,G,F,S,N,E,K
+218	S
+222	A,Q,S,C,I,K
+260	P,A,S,N,G
+265	N,A,G,S
+274	A,S

这些包含在迟缓芽孢杆菌枯草溶菌素的等价于解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素 + 76 氨基酸残基位置上进行过活体外变更的蛋白酶产生出枯草溶菌素变种，它呈现出超过其前体枯草溶菌素的稳定性（例如，经改进的自解蛋白稳定性）（参见表Ⅳ和表Ⅵ）。

同样，在等价于解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素的 + 99、 + 101、 + 103、 + 104、 + 107、 + 123、 + 27、 + 105、 + 109、 + 126、 + 128、 + 135、 + 156、 + 166、 + 195、 + 197、 + 204、 + 206、 + 210、 + 216、 + 217、 + 218、 + 222、 + 260、 + 265 和 / 或 + 274 的残基位置上进行活体外的变更，无论单独地或相互结合并与 + 76 位置的变更作任意组合，都会产生枯草溶菌素变种，它们呈现改变了的解蛋白活度、改变了的热稳定性、改变了的 pH 特性、改变了的底物专一性和 / 或改变了的品质特性。

羰基水解酶是能水解含有



键的化合物的蛋白酶，式中的 X 是氧或氮。它们包括天然界存在的羰基水解酶以及羰基水解酶的重组体。天然界存在的羰基水解酶主要包括水解酶，例如肽水解酶诸如枯草溶菌素或金属蛋白酶。肽水解酶包括 α - 氨基酰基肽水解酶、肽基氨基酸水解酶、酰基氨基水解酶、丝氨酸羧肽酶、金属羧肽酶、硫羟蛋白酶、羧基蛋白酶和金属蛋白酶。丝氨酸、金属、硫羟和羧酸蛋白酶以及内型和外型蛋白酶都被包括在内。

“重组体羰基水解酶”是指这样的羰基水解酶，其中编码天然存在的羰基水解酶的 DNA 序列被修饰以产生一种突变种 DNA 序

列，它编码时在羰基水解酶氨基酸序列中进行置换、插入或删去一种或多种氨基酸。合适的修饰方法已在这里被公开，也已在美国专利 4,760,025（RE 34,606）、美国专利 5,204,015 以及美国专利 5,185,258 中被公开，这些专利的公开内容在此引入作为参考。

枯草溶菌素是细菌或霉菌的羰基水解酶，它一般地作用是断裂蛋白质或多肽的肽键。像这里使用的那样，“枯草溶菌素”意指天然界存在的枯草溶菌素或一种重组体枯草溶菌素。已知有各种微生物物种能产生和常常分泌出一系列的天然存在的枯草溶菌素。这一系列中的成员的氨基酸序列不完全是同源的。但是，在这一系列中的枯草溶菌素呈现出相同或相似类型的解蛋白活度。这类丝氨酸蛋白酶共享有一种定义催化三单元组的共同的氨基酸序列，以此把它们与糜蛋白酶相关类别的丝氨酸蛋白酶相区别。枯草溶菌素和糜蛋白酶相关的丝氨酸蛋白酶二者都有包含天冬氨酸、组氨酸和丝氨酸的催化三单元组。在枯草溶菌素相关的蛋白酶中，这些氨基酸的相对次序，从氨基端读到羧基端是天冬氨酸－组氨酸－丝氨酸。但是在糜蛋白酶相关的蛋白酶中，这种相对次序是组氨酸－天冬氨酸－丝氨酸。这样，这里的枯草溶菌素是指一种具有枯草溶菌素相关的蛋白酶的催化三单元组的丝氨酸蛋白酶。实例包括但不限于这里的图 3 中所认定的那些枯草溶菌素。

“重组体枯草溶菌素”是指这样一种枯草溶菌素，其中编码这种枯草溶菌素的 DNA 系列被修饰以产生一种变种（或突变种）DNA 系列，它编码时在天然存在的枯草溶菌素氨基酸序列中置换、删去或插入一种或多种氨基酸。产生这类修饰的合适的方法，并且它也可以和这里所公开的方法结合，已被包括在美国专利 4,760,025（RE 34,606）、美国专利 5,204,015 和美国专利

5,185,258 的公开内容中.

“非人类羰基水解酶”以及对它们编码的 DNA，可以由多种原核生物的和真核生物的生物体中得到。原核生物的生物体的合适的实例包括格兰氏阴性生物体诸如大肠杆菌（E. Coli）或假单胞菌属（Pseudomonas）以及格兰氏阳性细菌诸如微球菌属（Micrococcus）或杆菌。真核生物的生物体，从中可以得到羰基水解酶和它们的基因，其实例包括酵母诸如啤酒酵母（Saccharomyces cerevisiae）、霉菌诸如曲霉（Aspergillus sp.），以及非人类哺乳动物来源诸如，例如，小牛（bovine sp.），从中可得到编码羰基水解酶凝乳酶的基因。像用枯草溶菌素那样，从各种有关的物种中可得到一系列的羰基水解酶，这些物种在它们系列的成员之间含有的氨基酸序列不完全是同源的，但却无论如何呈现出相同或相似类型的生物活性。例如，这里使用的非人类的羰基水解酶具有一种功能定义，是专指直接或间接地与原核生物或真核生物源缔合的羰基水解酶。

一种“羰基水解酶变种”具有从“前体羰基水解酶”的氨基酸序列衍生的氨基酸序列。前体羰基水解酶（诸如一种枯草溶菌素）包括天然存在的羰基水解酶（枯草溶菌素）和重组体羰基水解酶（枯草溶菌素）。羰基水解酶变种的氨基酸序列是由前体水解酶的氨基酸序列通过置换、删去或插入一种或多种前体氨基酸序列中的氨基酸而“衍生”出来的。这样的修饰是对前体羰基水解酶（枯草溶菌素）的氨基酸序列编码的“前体 DNA 序列”进行的，而不是修改前体羰基水解酶（枯草溶菌素）的酶本身。这类修改前体 DNA 序列的合适的方法包括这里公开的方法以及本领域的技术人员熟知的方法（参看，例如，EPO 328299、WO 89/06279 以及这

里已引人作为参考的美国专利和申请书）。

这里作为变更，认定了相应于解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素的位置 + 76 与一种或多种下列位置组合的具体残基:

+99, +101, +103, +104, +107, +123, +27, +105,

+109, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197, +204, +206, +210,

+216, +217, +218, +222, +260, +265 and/or +274。

最好是修饰的残基是选自下列组合:

76/99; 76/101; 76/103; 76/104; 76/107;
76/123; 76/99/101; 76/99/103; 76/99/104; 76/101/103; 76/101/104;
76/103/104; 76/104/107; 76/104/123; 76/107/123; 76/99/101/103;
76/99/101/104; 76/99/103/104; 76/101/103/104; 76/103/104/123;
76/104/107/123; 76/99/101/103/104; 76/99/103/104/123;
76/99/101/103/104/123; 76/103/104/128; 76/103/104/260;
76/103/104/265;
76/103/104/197; 76/103/104/105; 76/103/104/135; 76/103/104/126;
76/103/104/107; 76/103/104/210; 76/103/104/126/265; 和 / 或
76/103/104/222;

最优选的组合是 76/99; 76/104; 76/99/104; 76/103/104; 76/104/107; 76/101/103/104; 76/99/101/103/104; 和 76/101/104。这些氨基酸位置数码是指那些在图 1 中提供的指定给成熟的解淀粉芽孢杆菌的枯草溶菌素的序列。但用于本发明的蛋白酶并不仅限于这一特定的枯草溶菌素的突变体，而是扩展为在“等价”于解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素中特别认定的残基位置上含有氨基酸残基的前体羰基水解酶。最好是，前体枯草溶菌素是迟缓芽孢杆菌枯草溶菌素，并且在迟缓芽孢杆菌中相应于上面列出的等价的氨基酸残基位置上进行置换、删去或插人。

前体羰基水解酶的一个残基（氨基酸）等价于解淀粉芽孢杆菌

枯草溶菌素的一个残基，如果它对于解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素中那个具体的残基或残基的部分是同系的（即在一级或三级结构中有位置的对应性）或类似的（即具有相同或相似的对于结合、反应或化学相互作用等的功能能力）。

为确立对一级结构的同系性，前体羰基水解酶的氨基酸序列被直接与解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素的一级序列以及特别是一系列已知是枯草溶菌素中不变更的残基进行比较，这些不变更的残基的序列是已知的。这里的图 2 显示了解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素和迟缓芽孢杆菌枯草溶菌素之间保存的残基。在校准保存的残基并允许进行必要的插入和删去以维持顺序之后（即避免保存的残基经由任意的删去和插入而消除），即定义了等价于解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素的一级序列中特定的氨基酸残基。保存的残基的校准最好应保存 100％的这类残基。但是大于 75％或甚至少至 50％的保存残基的校准也适宜于定义等价残基。应坚持保存催化三单元组 Asp32/His64/Ser221。

例如，在图 3 中校准了来自解淀粉芽孢杆菌、枯草杆菌、地衣芽孢杆菌（carlsbergensis）和迟缓芽孢杆菌的枯草溶菌素的氨基酸序列，以提供氨基酸序列之间最大量的同系现象。比较这些序列显示在每种序列中都含有一些保存的残基。这些保存的残基（如 BPN' 和迟缓芽孢杆菌之间）已在图 2 中被认定。

这样，这些保存的残基即可被用来定义在别的羰基水解酶诸如来自迟缓芽孢杆菌（1989 年 7 月 13 日发布的 PCT Publication No. WO 89/06279）的枯草溶菌素中相应的等价于解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素中的氨基酸残基，这里经优选的枯草溶菌素前体酶，或称作 pB92（EP O 328299）的枯草溶菌素，是和优选的迟缓芽孢杆菌枯

草溶菌素高度同系的。这些枯草溶菌素中有一些的氨基酸序列在图3A和3B中与解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素的序列校准，以产生保存的残基的最大同系现象。像能看到的那样，与解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素比较，迟缓芽孢杆菌的序列中有一些删去。这样，例如，对于在解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素中的Val 165等价氨基酸，在别的枯草溶菌素如迟缓芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌的就是异亮氨酸了。

这样，例如，解淀粉芽孢杆菌和迟缓芽孢杆菌两种枯草溶菌素+76号氨基酸位置上的是天冬酰胺（N）。但是在用于本发明的经优选的枯草溶菌素变种中，等价于解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素中+76号位置的氨基酸则被天冬氨酸置换。为说明的目的，所有这里为置换认定的氨基酸残基与为每个这类位置进行经优选的置换的比较被列于表II中。

表 II

	+76	+99	+101	+103	+104	+107	+123
杆 菌（野生型）	N	D	S	Q	Y	I	N
迟缓芽孢杆菌（野生型）	N	S	S	S	V	I	N
最优选的置换	D	D	R	A	I/Y	V	S

等价残基也可以在三级结构的水平上通过为其三级结构已被X射线晶体衍射法测定的前体羰基水解酶测定同系物来定义。等价残基被定义为那些经校准后前体羰基水解酶和解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素的特定氨基酸残基的两个或多个主链原子（在N上的N、CA上的CA、C上的C和O上的O）的原子坐标已在0.13纳米之

内、最好是在 0.1 纳米之内的残基。在最好的模型被定向、并且定位给出研究中的羰基水解酶与解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素的非氢蛋白质原子的原子坐标的最大重叠后，校准即告完成。最好的模型是在可获得的最高分辨率时实验衍射数据给出最低 R 因子的晶体模型。

$$R_{\text{因子}} = \frac{\Sigma_h |Fo(h)| - |Fc(h)|}{\Sigma_h |Fo(h)|}$$

其功能类似于解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素的特定残基的等价残基，被定义为前体羰基水解酶的那些氨基酸，它可采取这样一种构象，使它们或者能改变、修饰或起作用于蛋白质的结构，底物结合，或者以一定的方式催化并归因于解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素的一种特定的残基。进一步，它们是前体羰基水解酶（其三级结构已被 X 射线晶体衍射法测定）的那些残基，它占据一个类似的位置到这种程度，使得虽然给定残基的主链原子可能并不满足基于占据同系的位置时等价性的标准，但至少有两个残基的侧链原子的原子坐标是位于解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素相应的侧链原子的 0.13 纳米以内。解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素的三维结构的坐标已陈列于 EPO Publication No. 0251446 中（等价于美国专利申请 SN 08/212,291，它的公开内容在此引入作为参考），并可用来作为上述略图，用来在三级结构的水平上测定等价残基。

有一些为置换、插入或删去而认定的残基是保存的残基，而另外一些则不是。在残基不属于保存残基的情况下，一种或多种氨基酸的置换仅限于这样的置换，即它产生的变种具有与在天然界中发现的不相对应的氨基酸序列。在是保存残基的情况下，这样的置换不应导致一种天然存在的序列。用于本发明的羰基水解酶变种包括

羰基水解酶变种的成熟的形式，也包括这类水解酶变种的原型或预原型。预原型是优选的构造，因为它能使羰基水解酶变种的表达、分泌和熟化变得容易。

“原序列”是指连接在羰基水解酶成熟形式的N端部分的氨基酸序列，当除去它时导致出现羰基水解酶的“成熟”形式。许多在天然界发现的蛋白酶是转移酶原的产物，并且在不存在后转移过程时即以这种形式被表达。为生产羰基水解酶变种，具体地说枯草溶菌素变种的一种经优选的原序列是解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素的推定的原序列，虽然其它枯草溶菌素的原序列也可被使用。在实例中，是使用从迟缓芽孢杆菌（ATCC 21536）中得到的枯草溶菌素的推定的原序列。

一种“讯号序列”或“预序列”是指连接在羰基水解酶的N-端部分或原水解酶的N-端部分的任何氨基酸序列，它可能参与水解酶的成熟形式或原型的分泌。讯号序列的这种定义是功能性的，意谓包括所有那些被枯草溶菌素基因的N-端部分或别的在自然条件下参与使枯草溶菌素或别的羰基水解酶奏效的可分泌的羰基水解酶编码的氨基酸序列。用于本发明的蛋白酶利用这样的序列如这里叙述的那样来影响羰基水解酶变种的分泌。在实例中使用的一种经优选的讯号序列包括熔合到从迟缓芽孢杆菌得到的枯草溶菌素（ATCC 21536）讯号序列的其余部分中的解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素讯号序列的头七个氨基酸残基。

一种“预原型”的羰基水解酶变种是由可用来连接在水解酶氨基末端的具有原序列的水解酶的成熟形式以及一种可用来连接在原序列的氨基末端的“预”或“讯号”序列所组成的。

“表达载体”是指含有一个可用来连接在合适的控制序列上的

DNA 序列的 DNA 构造，这控制序列能在一种合适的宿主中影响所说的 DNA 的表达。这样的控制序列包括一种影响转录的始发基因、一种供选择的操纵序列用来控制这类转录、一种用来编码合适的 mRNA 核蛋白体连接位置的序列和控制转录和转译的终止的序列。这种载体可以是一种质粒、一种噬菌体粒子或简单地就是一种潜在的基因组插入物。一旦转移进适当的宿主中，这种载体就可复制并独立地行使宿主基因的功能，或者在某些情况下可以联合到基因本身中去。在本说明书中，“质粒”和“载体”有时被交替使用，因为质粒是目前最常使用的载体形式。但是，这里也包括这类表达载体的其它形式，它起着等价的功能并在本专业中是已知的或将成为已知的。

用于本发明的“宿主细胞”一般是原核生物或真核生物宿主，它们最好是用在美国专利 4,760,025（RE 34,606）中公开的方法处理过，以使它们不能分泌酶活性的内切蛋白酶。一种经优选的为表达枯草溶菌素的宿主细胞是杆菌菌株 BG 2036，它缺乏酶活性的中性蛋白酶和碱性蛋白酶（枯草溶菌素）。菌株 BG 2036 的构造以被美国专利 5,264,366 详尽描述过。别的为表达枯草溶菌素的宿主细胞包括枯草杆菌 I 168（也已在美国专利 4,760,025（RE 34,606）和美国专利 5,264,366 中被描述过，它的公开内容在此引入作为参考），以及任何合适的杆菌菌株诸如地衣芽孢杆菌和迟缓芽孢杆菌等。

宿主细胞可用重组体 DNA 技术构成的载体来进行转化或转染。这类转化的宿主细胞既能复制编码羰基水解酶的载体，也能表达所需的羰基水解酶变种。在编码羰基水解酶变种的预型或预原型的情况下，这类变种当被表达时即典型地被从宿主细胞分泌到宿主

细胞介质中去。

在描述两种 DNA 区域之间关系时所用的术语“可用来连接的”简单地意指它们在功能方面是彼此相关的。例如，一种预序列可用来连接到一种多肽上，如果它的功能是作为讯号序列，参与最可能涉及讯号序列断裂的蛋白质的成熟形式的分泌。一种始发基因可用来连接到编码序列上，如果它控制序列的转录；一种核蛋白体连接位置可用来连接到编码序列上，如果它这样定位可允许进行转译。

编码天然界存在的前体羰基水解酶的基因可以按照本领域的技术人员众所周知的一般方法来得到。这种方法一般包括合成具有编码感兴趣的水解酶区域的推定序列的标记探头、由表达这种水解酶的生物体中制备基因库，并通过杂交到探头上从库中筛选出感兴趣的基因。阳性杂交克隆然后被绘图并序列化。用于实例中的迟缓芽孢杆菌基因可按美国专利 5,185,258 的实例 1 中所描述的方法克隆化，它的公开内容在此引入作为参考。用于实例中的 BPN 基因可按 RE 34,606 中实例 1 中所描述的方法克隆化，它的公开内容在此引入作为参考。

克隆化的羰基水解酶然后被用来转化宿主细胞以用来表达水解酶。水解酶基因然后被连接进高拷贝数质粒中。这种质粒在宿主中在下述意义上复制，即它含有众所周知的为质粒复制所必需的要素：一种可连接到研究中的基因上的始发基因（它可以基因本身的同系始发基因来提供，如果它被宿主识别，即被转录的话）、一个转录终止和多聚腺苷酸化区域（是为由来自某些真核生物宿主细胞中的水解酶基因的宿主转录的 MRNA 的稳定性所必需的）、它是外源的或者可被水解酶基因的内源终止区域提供，合乎需要的是，

一种选择基因诸如一种耐受抗菌素的基因，它通过在含有抗菌素的介质中生长使被质粒感染的宿主细胞得以连续培养维持．高拷贝数的质粒也含有一种为宿主的复制来源，通过它能使大量质粒得以在细胞质中产生而没有染色体的限制。但是，在本发明的范围内也包括把水解酶基因联合多次拷贝到宿主基因组中去。这可通过用对同系重组特别敏感的原核生物和真核生物的生物体而变得容易。

用于本发明实例中的基因是天然的迟缓芽孢杆菌基因和天然的解淀粉芽孢杆菌基因。另外，一种合成的编码天然存在的或突变体的前体羰基水解酶（枯草溶菌素）的基因也可被产生。在这样一种方法中，前体水解酶（枯草溶菌素）的 DNA 和／或氨基酸序列被测定。此后多次、重叠的合成单股 DNA 片段即被合成出来，它经杂交和连接作用而产生一种编码前体水解酶的合成 DNA。合成基因构造的一个实例被发表于美国专利 5,204,015 的实例 3 中，它的公开内容在此引入作为参考。

一旦天然界存在的或合成的前体羰基水解酶基因被克隆化，即可进行一些修饰来增强超出合成天然界存在的前体羰基水解酶范围以外的应用．这类修饰包括生产重组体羰基水解酶，如美国专利 4,760,025（RE 34,606）和 EPO Publication No. 0251446 所公开的内容以及这里描述的生产羰基水解酶变种。

下列盒式突变方法可用来使得用于本发明的羰基水解酶变种的构造和鉴定变得容易，虽然也可使用其它包括位置定向诱变的方法．首先，天然存在的编码这种水解酶的基因被获得并进行全部或部分地序列化。然后，序列在想要进行变更（删去、插入或置换）已编码的酶中一种或多种氨基酸的一点上被校验．评估位于这一点侧面的序列，看是否存在用一个低聚核苷酸池置换一个短的基因片

段的限制性位点，该低聚核苷酸池当被表达后将编码各种突变体。这样的限制性位点最好是在水解酶基因中的独一无二的位置，以使基因片段的置换变得容易。但是，任何在水解酶基因中的不是过分冗长的方便的限制性位点都可以使用，只要是通过限制消化产生的基因碎片能被重新装配在适当的序列中。如果在选择的位点的方便距离内（10 至 15 个核苷酸）不存在限制性位点，可在基因中以这样的方式通过置换核苷酸来产生这样的位点，即在最终的构造中既没有读码的改变，也没有编码氨基酸的改变。为改变它的序列以适合所需要的序列进行的基因改变可按照一般已知的方法通过 M13 引物延伸来完成。确定合适的侧面区域位置以及评估得出两个方便的限制性位点序列所需要的变更的工作，可通过遗传密码的过剩、基因的限制酶略图以及大量不同的限制酶而成为例行的常规工作。注意如果能获得方便的位于限制性位点侧面的位点，则上述方法只需要用来与不含一个位点的侧面区域相连接。

一旦天然存在的 DNA 或合成的 DNA 被克隆化，位于要被变更的位置侧面的限制性位点即用关连限制酶消化，许多末端端基互补的低聚核苷酸盒带即被连接到基因中。诱变作用通过这种方法而被简化，因为所有的低聚核苷酸都可这样来合成使具有同样的限制性位点，并且不必用合成的连接来造成这种限制性位点。

如这里使用的，解蛋白活度被定义为每毫克活性酶中肽键的水解速率。已存在许多众所周知的实验程序可用来测量解蛋白活度（参见 K. M. Kalisz “Microbial Proteinase”，Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology，A. Fiechter ed.，1988）（“微生物蛋白酶，高等生物化学工程 / 生物技术”，A. Fiechter 出版，1988）。除了解蛋白活度以外，或者作为一种替代物来修饰

解蛋白活度，本发明的变种酶还可以有其它的经修饰的特性诸如 Km、Kcat、Kcat / Km 比率和 / 或经修饰的底物专一性和 / 或经修饰的 pH 活性特性。这些酶可以为预期存在的特定的底物而进行剪裁，例如，为诸如洗衣用的水解过程中的底物。

一个目标是保证得到一种与前体羰基水解酶比较具有改变了的解蛋白活度的变种羰基水解酶，因为这种活度的增加（数值增大）能更有效地使酶作用于目标底物上。同样感兴趣的是与前体比较，具有改变了的热稳定性和 / 或改变了的底物专一性的变种酶。最好是被变更的羰基水解酶是一种枯草溶菌素。在枯草溶菌素类型的羰基水解酶中用来得到这样的结果的具体氨基酸位置，等价于解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素中的 + 76、 + 99、 + 101、 + 103、 + 104、 + 107、 + 123、 + 27、 + 105、 + 109、 + 126、 + 128、 + 135、 + 156、 + 166、 + 195、 + 197、 + 204、 + 206、 + 210、 + 216、 + 217、 + 218、 + 222、 + 260、 + 265 和 / 或 + 274，或者它们的任意组合，这些氨基酸在实例中提供。在一些场合中，可能需要较低的解蛋白活度。相反，在另一些场合中则可能需要变种酶的解蛋白活度比它的前体更高。另外，还可能期望增加或降低（改变）变种的无论是对碱还是对热的稳定性。在 Kcat、Km 或 Kcat / Km 值方面的增加或降低对于用来测定这些动力学参数的底物是专一性的。

同样，已经测定，在枯草溶菌素中等价于 + 76 位置并结合一些其它位置的修饰，对于调制酶的整体稳定性和 / 或解蛋白活度是重要的。例如，像在实例中说明的那样，在经优选的蛋白酶中，在迟缓芽孢杆菌枯草溶菌素的等价于 + 76 的位置上天冬酰胺（N）可用天冬氨酸（D）置换，并结合修饰一种或多种下列氨基酸残基:

+ 99、 + 101、 + 103、 + 104、 + 107、 + 123、 + 27、 + 105、 + 109、 + 126、 + 128、 + 135、 + 156、 + 166、 + 195、 + 197、 + 204、 + 206、 + 210、 + 216、 + 217、 + 218、 + 222、 + 260、 + 265 和 / 或 + 274，以便在得到的变种酶中产生增进了的稳定性和 / 或增进的活性。

用于本发明的最优选的蛋白酶已在实例中被陈述。这些包括以下特定的置换残基的组合：N76D / S99D; N76D / V104I; N76D / S99D / V104I; N76D / S103A / V104I; N76D / V104I / I107V; N76D / V104Y / I107V 以及 N76D / S101R / S103A / V104I。这些置换最好是在迟缓芽孢杆菌（重组体或天然的）枯草溶菌素中进行，虽然置换也可以在任何一种杆菌的枯草溶菌素中进行。

基于用这种和其它变种枯草溶菌素得到的结果，可明显看出解淀粉芽孢杆菌羰基水解酶中等价于位置 + 76、 + 99、 + 101、 + 103、 + 104、 + 107、 + 123、 + 27、 + 105、 + 109、 + 126、 + 128、 + 135、 + 156、 + 166、 + 195、 + 197、 + 204、 + 206、 + 210、 + 216、 + 217、 + 218、 + 222、 + 260、 + 265 和 / 或 + 274 上的残基对于这些酶的解蛋白活度、品质和 / 或稳定性以及这类变种酶的清洗或洗涤品质是重要的。

下面通过实例来提供来提供用于本发明组合物中的蛋白酶的制造方法。

蛋白酶制造实例

为枯草杆菌中 GG36 基因表达的构造

克隆化和为来自迟缓芽孢杆菌的枯草溶菌素基因表达的构造，基本上和美国专利 5,185,258 中描述的相同。质粒 GGA274（描述于这里的图 4 中）进一步用如图 5 所示的方式进行修饰。在构造

GGA274 质粒过程中引入的 PstI 位点通过下面将会描述的低聚核苷酸定向诱变的方法，用一种含有下列序列：5' GAAGCTGCAACTCGTTAAA 3'（Seq. ID No. 1）的低聚核苷酸除去。下面画有一横线的“A”残基消除限制酶 PstI 的认别序列，并在位置 274 上把相应的氨基酸从丙氨酸改变成苏氨酸。在位置 274 上的苏氨酸是原来发现在克隆化的迟缓芽孢杆菌枯草溶菌素基因中的野生型残基。编码枯草溶菌素的 DNA 片段被 EcoRI 和 BamHI 消化产物从质粒 GGA274 或它的衍生物（GGT274 被表示在图 5 中）上切除。这 DNA 碎片再被半克隆化回到用作诱变的基于噬菌体 M13 的载体，诸如 MP19 中。诱变之后，EcoRI 和 HindIII 消化产物，在克隆化之后，即履行工作移动变更过的枯草溶菌素基因回到表达质粒诸如 GGA274 中，以便表达和回收变更过的枯草溶菌素蛋白质。

低聚核苷酸定向的诱变

低聚核苷酸定向诱变是按 Zoller，M. 等人在（1983）Methods Enzymol.，100：468～500 中描述的方法来进行的。作为一个实例，一种合成的具有 5' GCTGCTCTAGACAATTCG 3'（Seq. ID No. 2）序列的低聚核苷酸被用来改变位置 76 的氨基酸残基，使它从天冬酰胺（N）变为天冬氨酸（D），或 N76D。下方画横线的“G”和“C”残基指示由野生型基因序列发生的变化。CA 使亮氨酸保留在位置 + 75 上并改变这种氨基酸序列来引入一个 xbal 限制酶（TCTAGA）的 xbal 识别位点，同时在 GAC 处的改变把在 + 76 位置上的天冬酰胺变成天冬氨酸。

为了在位置 99、101、103 和 104 处进行诱变，可依照所需变更的结合来使用不同的低聚核苷酸。例如，具有序列为 5'

GTATTAGGGGCGGACGGTCGAGGCGCCATCAGCTCGATT 3'（Seq. ID No.3）的一种低聚核苷酸被用来同时在一个单一的枯草溶菌素分子中进行下列改变：S99D；S101R；S103A 和 V104I。相似地，一种序列为 5' TCAGGTTCGGTCTCGAGCGTTGCCCAAGGATTG 3'（Seq. ID No. 4）的低聚核苷酸和一种序列为 5' CACGTTGCTAGCTTGAGTTTAG 3'（Seq. ID No. 5）的低聚核苷酸被分别用来产生 I107V 和 N123S。同样，画横线的残基指示由野生型序列发生的变化，它可产生所期望的或者是氨基酸序列的变化、或者是限制酶识别序列的变化。

枯草溶菌素变种的解蛋白活度

按照前述低聚核苷酸定向诱变的方法，制造了列在表Ⅲ上的变种。每一种这样的枯草溶菌素变种的解蛋白活度也列在表Ⅲ上。用 P. Bonneau 等人（1991）在 J. Am. Chem. Soc., Vol. 113, No. 3, P1030 所述的方法测量合成的多肽底物丁二酰基－L－丙氨－L－丙氨－L－脯氨－L－苯丙氨酰对硝基苯胺水解的动力学参数 Kcat、Km 和 Kcat / Km。简而言之，把枯草溶菌素储备溶液的小的等分溶液，加到含有溶解在 pH 值为 8.6 的 0.1 M Tris－HCl 缓冲液中的底物的 1 厘米比色池中，并恒温在 25℃。反应进程用分光光度法跟踪，即监测在 410 纳米处反应产物对硝基苯胺的吸光度。通过一种非线性回归算法使每种反应的反应速率和产物浓度符合 Michaelis－Menten 方程，来得到动力学参数。

表 III

测量迟缓芽孢杆菌枯草溶菌素和变种的

动力学参数 Kcat、Km 和 Kcat / Km

蛋白酶 #	酶变种	k_{cat} (s^{-1})	K_M (M)	k_{cat}/K_M ($s^{-1}M^{-1}$)
-	迟缓芽孢杆菌枯草溶菌素	170	0.00078	2.18×10^5
-	N76D	219	0.0008	2.74×10^5
1	N76D/S99D	88	0.00061	1.44×10^5
2	N76D/S101R	371	0.0013	2.85×10^5
3	N76D/S103A	400	0.0014	2.86×10^5
4	N76D/V104I	459	0.0011	4.17×10^5
5	N76D/I107V	219	0.0011	1.99×10^5
6	N76D/N123S	115	0.0018	6.40×10^4
7	N76D/S99D/S101R	146	0.00038	3.84×10^5
8	N76D/S99D/S103A	157	0.0012	1.31×10^5
9	N76D/S99D/V104I	247	0.00097	2.55×10^5
10	N76D/S101R/S103A	405	0.00069	5.90×10^5
11	N76D/S101R/V104I	540	0.00049	1.10×10^6
12	N76D/S103A/V104I	832	0.0016	5.20×10^5
13	N76D/V104I/I107V	497	0.00045	1.10×10^6
14	N76D/V104Y/I107V	330	0.00017	1.90×10^6
15	N76D/V104I/N123S	251	0.0026	9.65×10^4
16	N76D/I107V/N123S	147	0.0035	4.20×10^4
17	N76D/S99D/S101R/S103A	242	0.00074	3.27×10^5
18	N76D/S99D/S101R/V104I	403	0.00072	5.60×10^5
19	N76D/S99D/S103A/V104I	420	0.0016	2.62×10^5
20	N76D/S101R/S103A/V104I	731	0.00065	1.12×10^6
21	N76D/S103A/V104I/N123S	321	0.0026	1.23×10^5
22	N76D/V104I/I107V/N123S	231	0.003	7.70×10^4
23	N76D/S99D/S101R/S103A/V104I	624	0.00098	6.37×10^5
24	N76D/S99D/S103A/V104I/N123S	194	0.0043	4.51×10^4
25	N76D/S99D/S101R/S103A/V104I/N123S	311	0.0023	1.35×10^5

列于表Ⅲ的结果说明，所有试验的枯草溶菌素变种保持着解蛋白活度。进一步，对数据的详尽分析表明，通过在等价于解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素中的 76、99、101、103、104、107 和 123 这些氨基酸残基位置上进行各种置换的组合，可以有意义地改变迟缓芽孢杆菌枯草溶菌素的解蛋白活度。

枯草溶菌素的热稳定性

通过上述低聚核苷酸定向诱变方法制得的本发明的迟缓芽孢杆菌枯草溶菌素及其变种的观测到的热稳定性的比较被显示在表Ⅳ中。把纯化过的酶在 0.1 M 甘氨酸 0.01% Tween－80 pH10.0 缓冲液中的浓度为 15微克／毫升的溶液，加有或不加 50 mM $CaCl_2$，等分到小试管中并在 10℃保温 5 分钟，10° 至 60℃保温超过 1 分钟，在 60℃保温 20 分钟。然后把试管放在冰上 10 分钟。把试管中的等分溶液加到含有 1.2 mM 的合成多肽底物丁二酰－L－丙氨－L－丙氨－L－脯氨－L－苯丙氨酰－对硝基苯胺溶解在 0.1 M tris－HCl 的 pH 值为 8.6 的缓冲液中所形成的溶液并恒温在 25℃的 1 厘米比色池中，以试验酶的活性。最初的线性反应速率是用分光光度法通过监测反应产物对硝基苯胺在 410 纳米处的吸光度作为时间的函数来跟踪的。提供的数据为加热前的百分数活度。列于表Ⅳ的结果指出在加入 50 mM $CaCl_2$ 的试验条件下许多变种（26 个当中的 24 个）呈现出和迟缓芽孢杆菌差不多的热稳定性。在没有加 50 mM $CaCl_2$ 的试验条件下有许多变种（26 个当中的 19 个）其稳定性明显地要比迟缓芽孢杆菌枯草溶菌素的更好。进一步，在没有加 50 mM $CaCl_2$ 的试验条件下，变种 N76D / S99D、N76D / V104I、N76D / S99D / V104I、N76D / S103A / V104I、N76D / V104I / I107V、N76D / V104Y / I107V 和 N76D / S101R / S103A / V104I

比单一置换的变种 N76D 要明显地更稳定.

表 IV

测量迟缓芽孢杆菌枯草溶菌素及其变种的热稳定性
pH 值 10，60℃，加入或不加入 50 mM $CaCl_2$

酶	初始活性的保留值%	
	-$CaCl_2$	+$CaCl_2$
迟缓芽孢杆菌枯草溶菌素	2	96
N76D	34	97
N76D/S99D	49	98
N76D/S101R	0	82
N76D/S103A	26	92
N76D/V104I	58	98
N76D/I107V	32	96
N76D/N123S	0	97
N76D/S99D/S101R	30	100
N76D/S99D/S103A	36	100
N76D/S99D/V104I	48	97
N76D/S101R/S103A	26	100
N76D/S101R/V104I	38	100
N76D/S103A/V104I	58	100
N76D/V104I/I107V	60	97
N76D/V104Y/I107V	48	74
N76D/V104I/N123S	0	98
N76D/I107V/N123S	16	100
N76D/S99D/S101R/S103A	38	100
N76D/S99D/S101R/V104I	33	100
N76D/S99D/S103A/V104I	38	98
N76D/S101R/S103A/V104I	40	99
N76D/S103A/V104I/N123S	1	98
N76D/V104I/I107V/N123S	3	99
N76D/S99D/S101R/S103A/V104I	36	99
N76D/S99D/S103A/V104I/N123S	2	95
N76D/S99D/S101R/S103A/V104I/N123S	0	100

用由质粒噬菌体产生的单股 DNA 模板进行低核苷酸定向诱变

A. 迟缓芽孢杆菌变种的构造

诱变的实验程序基本上和前面在低聚核苷酸定向诱变中所描述的相同。单股 DNA 模板是通过质粒噬菌体方法来产生的。为构造产生这种单股 DNA 模板的质粒噬菌体载体，我们首先构造载体 pBCDAICAT。载体构造的流程图被概括于图 8 中。首先，来自 pC194 质粒的编码 CAT 基因的 ClaI 至 ClaI 碎片（参见 Horinouchi，S. 和 Weisblum，B.，J. Bacteril.，150：8～15，1982）被克隆化进行 pUC19 的多链接区域的 AccI 位点上（New England BioLabs, Beverly, MA）以制造质粒 pUCCHL，并且由 GG36DAI 编码 DNA 5' 端的 EcoRI－DraI 0.6 KB 碎片被克隆化进入 pBSKS 质粒（stratagene. Inc., San diego, CA）的 EcoRI 和 EcoRV 位点，以制造 pBC2SK5。质粒 pBC2SK5 的单一 EcoRI 位点通过 EcoRI 消化而消除，接着被填充到被 T4 催化的 DNA 聚合酶中，并重新连接以产生没有 EcoRI 位点的质粒 pBC2SK－5R。被克隆化进入 pBCSK－5R 中的EcoRI－DraI 碎片以 PstI －HindIII 碎片的形式被析离并克隆化到 pUCCHL（pUC19 多链区的一部分）的 PstI－HindIII 位点以产生质粒 pUCCHL 5R。GG36DAI 的编码序列被切除成为 EcoRI－BamHI 碎片并克隆化到 pUCCHL 5R 的 EcoRI－BamHI 位点上以制造 pUCCAT。然后把 pUCCAT 的大的 EcoRI－HindIII 碎片克隆化到 BS2KS＋的 EcoRI 和 HindIII 位点上以产生质粒 pBCDAIVCAT。

为产生单股 DNA，含有 pBCDAICAT 的大肠杆菌用噬菌体 R408（可由 stratagene, San Diego, CA 购得）感染，这可按照 Russel. M., Kidd, S, 和 Kelley, M. R. 在 GENE 45：　333～　338，

1986 中所叙述的实验程序来进行。一旦获得单股 DNA 模板，即可实施前面在低聚核苷酸定向诱变中叙述过的标准的诱变方法。一些突变体的构造为说明的目的详述如下:

为构造迟缓芽孢杆菌（GG36）N76D / S103A / V104I / L217H，可将编码 GG36 N76D / S103A / V104I 的 EcoRI - BamHI DNA 碎片用于构造 pUCCAT（参见图 8）以产生质粒 pBCDAICAT，在按上述实验程序制得单股 DNA 模板后，即可用具有下列序列

* *** ** x *C1aI*

5' TAT GCC AGC CAC AAC GGT ACT TCG ATG GCT 3' (Seq. ID No.13)

的诱变引物来制造 L217H。像前面那样，下边画有横线的残基是指明已进行的核苷酸变化，xclal 是指存在的 clal 位点在诱变后已被消除。诱变的实验程序已在前面低聚核苷酸定向诱变中描述过。诱变以后，质粒 DNA首先被筛选出消除了 Clal 位点的，并且那些失去 Clal 位点的克隆被拿去进行 DNA 序列分析以证实在第 217 号氨基酸残基位置上实施了把 L 变为 H 的 DNA 序列。

B. BPN' 变种的构造以及它们在枯草杆菌中的表达

解淀粉芽孢杆菌（BPN'）N76D / Q103A / Y104I / Y217L 的构造除两个连续步骤以外是以相似的方式来进行的。先把 N76D 引入 BPN' Y217L 以制造 BPN' N76D / Y217L，第二次诱变把 BPN' N76D / Y217L 转化成 BPN' N76D / Q103A / Y104I / Y217L。为产生第一次诱变所需的单股 DNA 模板，可用编码 BPN' Y217L 枯草溶菌素的 EcoRI - BamHI 碎片（是由 Y217L 质粒衍生的，已被描述于 Wells, J. 等人在 PNAS, 84, 5167, 1087 发表的论文中）来构

造质粒pUCCATFNA（参见图9）。含有BPN' Y217L的pUCCATFNA质粒被用来构造pBCFNACAT质粒（图9）。像前面叙述的那样就产生单股DNA。为产生BPN' N76D / Y217L，可用一种具有以下序列的低聚核苷酸引物:

* *** ** *XbaI*

5' C ACA GTT GCG GCT CTA GAT AAC TCA ATC GGT G 3'
(Seq. ID No.14)

来产生改变N76D。然后由含有BPN' N76D / Y217L的pBCFNACAT质粒来制备单股DNA（N76D诱变后的pBCFNACAT质粒）并用另一种具有以下序列的低聚核苷酸:

* *** ** x *PvuII*

5' GCT GAC GGT TCC GGC GCT ATT AGT TGG ATC ATT 3'
(Seq. ID No.15)

诱变而得到BPN' N76D / Q103A / Y104I / Y217L。涉及的克隆化、单股DNA制备、诱变以及突变体的筛选所有这些步骤都如上面叙述过的方法来进行。BPN' 基因以及它的变种的表达可通过直接把质粒DNA（含有不同变种BPN' 基因的pBCFNACAT）连接到枯草杆菌的缺乏蛋白酶的菌株中来完成，如RE 34,606中所描述的那样。

像每个这些蛋白酶制造实例所教授的那样，已制造了许多变种。为这些变种测定了动力学数据和稳定性数据。动力学数据是按前面描述过的方法产生的并被提供于表V中。稳定性数据的产生将在此详述，结果列于表VI中。

热稳定性试验程序

纯化过的酶被缓冲液交换到0.1 M甘氨酸 · pH 10.0、含有

0.01％ Tween－80 的缓冲液中，这可通过把酶加到含有用这种缓冲液平衡过的 Sephadex G－25 的层析柱上，并用同样的缓冲液把酶从柱上洗脱下来而实施。

往含有 0.1 M 甘氨酸、0.01％ Tween，pH 为 10.0 并恒温在 60℃的缓冲液的试管中，加入经缓冲液交换过的酶，使最终酶的浓度为 15 微克／毫升。

在不同时间从 60℃的恒温液中取出等分的试样并立即试验酶的活性，即把它加入一个 1 厘米的比色池中，其中含有 1.2 mM 合成肽底物丁二酰基－L－丙氨－L－丙氨－L－脯氨－L－苯丙氨酰对硝基苯胺的溶解在 pH 值为 8.6 并恒温在 25℃的 0.1 M tris－HCl 缓冲溶液中而形成的溶液。最初的线性反应速率可通过监测反应产物对硝基苯胺在 410 纳米处的吸光度作为时间的函数来进行分光光度法跟踪。

半衰期，即 50％的酶失活所需时间的长度，是通过在 60℃恒温溶液的反应速率作为时间函数的一级图形而测出的。

在表Ⅵ中提供的数据是按在相同条件下测定迟缓芽孢杆菌枯草溶菌素（GG36）半衰期的百分数来表示的。

表 V

酶	kcat (s^{-1})	KM (mM)	kcat/KM ($s^{-1}M^{-1}$)
迟缓芽孢杆菌枯草溶菌素			
N76D/S103G/V104I*	170	0.78	2.20E+05
N76D/S103A/V104F	380	1.4	2.70E+05
N76D/S103A/V104N	730	0.33	2.20E+06
N76D/S103A/V104S	790	2.8	2.80E+05
N76D/S103A/V104T	170	0.83	2.00E+05
N76D/S103A/V104W	370	1.9	2.00E+05
N76D/S103A/V104Y	880	0.31	2.80E+06
K27R/N76D/V104Y/N123S	690	0.5	1.40E+06
N76D/S101G/S103A/V104I*	500	1.2	4.20E+05
N76D/S103A/V104I/S105A*	620	1.3	4.80E+05
N76D/S103A/V104I/S105D*	550	1.3	4.20E+05
N76D/S103A/V104T/I107A*	440	1.7	2.60E+05
N76D/S103A/V104T/I107L*	120	5.7	2.10E+04
N76D/S103A/V104I/L126A	310	3.2	9.70E+04
N76D/S103A/V104I/L126F	90	2.2	4.10E+04
N76D/S103A/V104I/L126I	180	1.9	9.50E+04
N76D/S103A/V104I/L126V	100	2.4	4.20E+04
N76D/S103A/V104I/S128G*	64	3.2	2.00E+04
N76D/S103A/V104I/S128L*	560	1.7	3.30E+05
N76D/S103A/V104I/L135A	430	3.8	1.10E+05
N76D/S103A/V104I/L135F	140	0.76	1.80E+05
N76D/S103A/V104I/L135I	390	0.69	5.70E+05
N76D/S103A/V104I/L135V	110	0.73	1.50E+05
N76D/S103A/V104I/S156E*	140	0.86	1.60E+05
N76D/S103A/V104I/S166D*	170	2.6	6.50E+04
N76D/S103A/V104I/D197E	160	3.5	4.60E+04
N76D/S103A/V104I/N204A*	510	1.4	3.60E+05
N76D/S103A/V104I/N204G*	530	1.1	4.80E+05
N76D/S103A/V104I/N204C*	580	1.4	4.10E+05
N76D/S103A/V104I/P210I*	370	1.3	2.90E+05
N76D/S103A/V104I/L217H*	500	1.2	4.20E+05
N76D/S103A/V104I/M222A	80	0.63	1.30E+05
N76D/S103A/V104I/M222S	70	3.1	2.30E+04
N76D/S103A/V104I/T260P	80	3.1	2.60E+04
N76D/S103A/V104I/S265N	660	1.5	4.40E+05
K27R/N76D/V104Y/I107V/N123S	590	1.3	4.50E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/D197E	220	1.4	1.60E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/N204C	430	1.1	3.90E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/Q206L	400	1.1	3.60E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/S216V	440	1.2	3.70E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S	440	1.2	3.70E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/T260P	760	0.98	7.80E+05
	410	1.2	3.40E+05

K27R/N76D/V104Y/N123S/T274A	390	1	3.90E+05
N76D/S103A/V104I/L126F/S265N	170	2.1	8.10E+04
N76D/S103A/V104I/S156E/S166D*	40	6.3	6.40E+03
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/G197E	410	0.98	4.20E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/N218S	540	0.66	8.20E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/D197E/N218S	770	0.79	9.80E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/N204C/N218S	610	0.99	6.20E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/Q206L/N218S	580	0.78	7.40E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S/T260P	660	1	6.60E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S/T274A	590	0.89	6.60E+05
K27R/N76D/V104Y/Q109S/N123S/N218S/T274A	520	1	5.20E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/D197E/N218S	460	0.65	7.10E+05
解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素（BPN'）	50	0.14	3.60E+05
BPN'-N76D/Y217L*	380	0.46	8.30E+05

* 带星号的这些突变体是用由噬菌体质粒产生的单股 DNA 模板进行低聚核苷酸定向诱变而制出的；所有其它不带星号的则是按前面所叙述的低聚核苷酸定向诱变方法制出的.

表 VI

酶	热稳定性（天然酶的半衰期%）
迟缓芽孢杆菌枯草溶菌素	100
N76D	590
N76D/S99D	840
N76D/S103A	390
N76D/V104I	660
N76D/I107V	710
N76D/N123S	70
N76D/S99D/S101R	610
N76D/S99D/S103A	590
N76D/S99D/V104I	910
N76D/S101R/S103A	930
N76D/S101R/V104I	500
N76D/S103A/V104I	460
N76D/S103G/V104I*	370
N76D/S103A/V104F	480
N76D/S103A/V104N	230
N76D/S103A/V104S	230

N76D/S103A/V104T	370
N76D/S103A/V104W	280
N76D/S103A/V104Y	400
N76D/V104I/I107V	940
N76D/V104Y/I107V	820
N76D/V104I/N123S	80
N76D/I107V/N123S	150
K27R/N76D/V104Y/N123S	100
N76D/S99D/S101R/S103A	570
N76D/S99D/S101R/V104I	1000
N76D/S99D/S103A/V104I	680
N76D/S101G/S103A/V104I*	390
N76D/S101R/S103A/V104I	470
N76D/S103A/V104I/S105A*	360
N76D/S103A/V104I/S105D*	370
N76D/S103A/V104T/I107A*	270
N76D/S103A/V104T/I107L*	230
N76D/S103A/V104I/N123S	110
N76D/V104I/I107V/N123S	220
N76D/S103A/V104I/L126A	270
N76D/S103A/V104I/L126F	950
N76D/S103A/V104I/L126I	410
N76D/S103A/V104I/L126V	320
N76D/S103A/V104I/S128G*	640
N76D/S103A/V104I/S128L*	760
N76D/S103A/V104I/L135A	230
N76D/S103A/V104I/L135F	200
N76D/S103A/V104I/L135I	510
N76D/S103A/V104I/L135V	500
N76D/S103A/V104I/S156E*	120
N76D/S103A/V104I/S166D*	590
N76D/S103A/V104I/D197E	460
N76D/S103A/V104I/N204A*	230
N76D/S103A/V104I/N204G*	240
N76D/S103A/V104I/N204C*	500
N76D/S103A/V104I/P210I*	1370
N76D/S103A/V104I/L217H*	60
N76D/S103A/V104I/M222A	520
N76D/S103A/V104I/M222S	490
N76D/S103A/V104I/T260P	490
N76D/S103A/V104I/S265N	360
K27R/N76D/V104Y/I107V/N123S	210
K27R/N76D/V104Y/N123S/D197E	120
K27R/N76D/V104Y/N123S/N204C	110

K27R/N76D/V104Y/N123S/Q206L	380
K27R/N76D/V104Y/N123S/S216V	140
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S	270
K27R/N76D/V104Y/N123S/T260P	40
K27R/N76D/V104Y/N123S/T274A	60
N76D/S99D/S101R/S103A/V104I	590
N76D/S99D/S103A/V104I/N123S	110
N76D/S103A/V104I/L126F/S265N	810
N76D/S103A/V104I/S156E/S166D*	220
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/G197E	90
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/N218S	250
K27R/N76D/V104Y/N123S/D197E/N218S	270
K27R/N76D/V104Y/N123S/N204C/N218S	460
K27R/N76D/V104Y/N123S/Q206L/N218S	1400
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S/T260P	310
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S/T274A	180
N76D/S99D/S101R/S103A/V104I/N123S	90
K27R/N76D/V104Y/Q109S/N123S/N218S/T274	230
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/D197E/N21	240
解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素（BPN'）	100
BPN'-N76D/Y217L*	420

* 带星号的这些突变体是用由噬菌体质粒产生的单股 DNA 模板进行低聚核苷酸定向诱变而制出的；所有其它不带星号的则是按前面所叙述的低聚核苷酸定向诱变方法制出的.

（3）洗涤组合物材料

本发明的清洗组合物除前面叙述的漂白剂和蛋白酶以外，也包括一种或多种可以和蛋白酶配伍的清洗组合物材料。术语“清洗组合物材料”，像这里使用的，意指任何选自特定类型所需的清洗组合物以及产物形式（例如液体、颗粒、喷雾组合物）的液体、固体或气体材料，这些材料也可以和用于组合物中的蛋白酶配伍。清洗组合物材料的具体选择可通过考虑被清洗的表面、物件或织物以及所需的在使用过程的清洗条件下组合物的形式（例如通过洗涤剂使

用）而容易地做出决定。术语“可配伍的”，像这里使用的，是指洗涤组合物材料不致降低蛋白酶的解蛋白活度到这种程度，以致在正常使用的情形下不再像期望那样有效。具体的洗涤组合物材料将在后面举例详尽说明。

有效量的一种或多种上述蛋白酶被包括在组合物中，用来洗涤许多需要除去蛋白质污渍的表面。这样的洗涤组合物包括为洗涤硬表面的形式不限（例如，液体或颗粒状）的洗涤剂组合物；为洗涤织物的形式不限（例如，颗粒状、液体和棒状配方）的洗涤剂组合物；洗碟用组合物（形式不限）；口腔洗涤组合物，形式不限（例如，牙粉，牙膏和漱口剂配方）；以及假牙洗涤组合物，形式不限（例如，液体、片状）。像这里所用的，“有效量的蛋白酶”是指为必须达到的酶活性在具体的洗涤组合物中所需的前面叙述的蛋白酶的量。这样的有效量能容易地为本领域的技术人员所确定，并且它基于许多因素，诸如使用的特定的酶的变种、洗涤施用情况、洗涤组合物的具体组分，以及所需的组合物是液体还是干的（例如颗粒或条状）等等。

优选地是本发明的洗涤组合物中含有由大约 0.0001％至大约 10％的一种或多种蛋白酶，更优选地是含有大约 0.001％至大约 1％、还更优选地是含有大约 0.001％至大约 0.1％。下面将进一步详尽讨论可能使用蛋白酶的各种洗涤组合物的一些实例。这里使用的所有份数、百分数和比率除非特别说明都是以重量计算的。

如这里所使用的，“非织物洗涤组合物”包括硬表面洗涤组合物、洗碟组合物、口腔用洗涤组合物、假牙洗涤组合物以及人身洗涤组合物等。

A. 用于硬表面、碗碟和织物的洗涤组合物

蛋白酶可用于任何需要有高度起泡性和／或良好的除去不溶性底物的洗涤剂组合物中．这样，蛋白酶可以和各种通常的组分一起使用来提供充分配制好的硬表面洗涤剂、洗碗碟组合物、织物洗涤组合物等。这样的组合物可做成液体、颗粒、条棒等形式、这样的组合物可被配制成近代“浓缩”的洗涤剂，其中含有多达30％～60％的表面活性剂。

这种洗涤组合物可任选地，并且优选地，含有各种阴离子的、非离子的、两性离子的等类型的表面活性剂。这类表面活性剂存在的典型浓度为组合物的大约0.1％至大约60％、优选地是大约1％至大约35％。

这里使用的表面活性剂的非限制性的实例包括通常的C_{11}～C_{18}烷基苯磺酸盐、一级和任意的烷基硫酸盐、C_{10}～C_{18}二级（2,3）烷基硫酸盐，其通式为$CH_3(CH_2)_x(CHOSO_3)^-M^+)CH_3$和$CH_3(CH_2)_y(CHOSO_3^-M^+)CH_2CH_3$，其中x和（y+1）是至少为大约7的整数，最好是至少为大约9的整数，M是一种水溶性的阳离子，特别是钠，C_{10}～C_{18}烷基烷氧基硫酸酯（特别是EO 1～7乙氧基硫酸酯）、C_{10}～C_{18}烷基烷氧基羧酸酯（特别是EO 1～7乙氧基羧酸酯）、C_{10}～C_{18}烷基聚糖苷以及它们相应的硫酸化的聚糖苷、C_{12}～C_{18} α－磺化的脂肪酸酯、C_{12}～C_{18}烷基和烷基酚烷氧化物（特别是乙氧化物和混合的乙氧化／丙氧化物）、C_{12}～C_{18}三甲铵乙内酯以及磺化的三甲铵乙内酯（“sultaines”）、C_{10}～C_{18}胺氧化物、C_8～C_{24}肌氨酸盐（特别是油酰基肌氨酸盐）、等等。在这里烷基烷氧基硫酸酯（AES）和烷基烷氧基羧酸酯（AEC）是优选的。（使用这类表面活性剂结合前面说过的胺氧化

物和／或三甲铵乙内酯或磺化的三甲铵乙内酯表面活性剂也是优选的，这取决于配方师的需要）。其它通常使用的表面活性剂已被列出在标准的教科书中。特别有用的表面活性剂包括 C_{10} ~ C_{18} N－甲基葡糖酰胺，它已被公开于 1993 年 3 月 16 日授予 Connor 等人的美国专利 5,194,639 中，在此引人作为参考。

特别有用的是非离子性表面活性剂一类，它是环氧乙烷与一个憎水部分的缩合产物，它提供一种其平均的亲水亲油平衡值（HLB）在 5 至 17、优选地是 6 至 14、更优选地是 7 至 12 范围内的表面活性剂。憎水（亲油）部分在性质上可以是脂肪的或芳香的，并且与任何特定的憎水基团缩合的聚氧乙烯基的长度可被容易地调节，以产生一种水溶性的化合物，它在亲水和憎水元素之间具有所期望的平衡程度。特别优选的是每摩尔醇含有 3 ~ 8 摩尔环氧乙烷的 C_9 ~ C_{15} 一级醇乙氧化物（或混合的乙氧化／丙氧化物）、尤其是每摩尔醇含有 6 ~ 8 摩尔环氧乙烷的 C_{14} ~ C_{15} 一级醇乙氧化物、每摩尔醇含有 3 ~ 5 摩尔环氧乙烷的 C_{12} ~ C_{15} 一级醇乙氧化物、以及它们的混合物。

多个其它用于洗涤剂洗涤组合物中的组分也可包括在这里的组合物中，包括其它活性组分、载体、水溶助长剂、操作助剂、染料或颜料、液体配方的溶剂等。如果希望额外增强起泡作用，可往组合物中加入促泡剂诸如 C_{10} ~ C_{16} 醇酰胺，使用的典型浓度为大约 1％至大约 10％。这类促泡剂的典型类别有一乙醇和二乙醇酰胺。把这类促泡剂与高度起泡的辅助表面活性剂诸如前面提到的胺氧化物、三甲铵乙内酯和磺化的三甲铵乙内酯一起使用是有益处的。如果需要，可溶性的镁盐诸如 $MgCl_2$、$MgSO_4$ 等也可被加入，其浓度典型地是在大约 0.1％至大约 2％之间，以提供额外的起泡作

用。

这里的液体洗涤剂组合物可含有水和别的溶剂作为载体。低分子量的一级或二级醇例如甲醇、乙醇、丙醇和异丙醇都是合适的溶剂。为溶解表面活性剂、一元醇是优选的，但是也可以使用那些含有大约 2 至大约 6 个碳原子以及大约 2 至大约 6 个羟基的多元醇（例如 1,3 - 丙二醇、乙二醇、甘油和 1,2 - 丙二醇）。组合物中可含有大约 5% 至大约 90%、典型地是大约 10% 至大约 50% 的这类载体。

这里的洗涤剂组合物最好是这样来配制，即在水溶液洗涤操作过程中使洗涤水的 pH 值在大约 6.8 至大约 11.0 之间。这样做成的产品典型地是在这一范围内配制的。在推荐使用的浓度控制 pH 的技术包括使用缓冲剂、碱、酸等，对本领域的技术人员这是众所周知的。

当配制本发明的硬表面洗涤组合物和织物洗涤组合物使，配方师可能愿意使用浓度为大约 5% 至大约 50%（重量）的各种增效剂。典型的增效剂包括 1 ~ 10 微米的沸石、聚羧酸盐诸如柠檬酸盐和氧联二丁二酸盐、层状硅酸盐、磷酸盐等。其它通常的增效剂已被列举在标准的配方中。

同样，配方师可能愿意在这样的组合物中使用各种其它的酶，诸如纤维素酶、脂酶、淀粉酶、过氧化物酶以及蛋白酶，典型地使用浓度为大约 0.001% 至大约 1%（重量）。在洗衣洗涤剂领域中各种照顾到洗涤和织物的酶是众所周知的。

各种漂白化合物，诸如过碳酸盐、过硼酸盐等也可被用于这类组合物中，典型的使用浓度为大约 1% 至大约 15%（重量）。如果需要，这类组合物也可含有漂白活化剂诸如四乙酰基乙二胺、壬酰

氧基苯磺酸盐等，它们在本领域中也是已知的。使用的浓度典型地是在大约 1％至大约 10％（重量）范围内。

各种污垢释出剂，特别是阴离子低聚酯类、各种螯合剂、特别是氨基膦酸盐和乙二胺二丁二酸盐、各种除尘土污垢剂、特别是乙氧化的四亚乙基五胺、各种分散剂、特别是聚丙烯酸酯和聚天冬氨酸酯、各种增白剂、特别是阴离子增白剂、各种染料转移抑制剂、诸如聚乙烯基吡咯烷酮、各种抑泡剂、特别是聚硅氧烷和二级醇、各种织物软化剂、特别是绿土和粘土絮凝聚合物（例如聚（氧乙烯））等也可被用于这类组合物中，使用的浓度范围在大约 1％至大约 35％（重量）之间。标准的配方和已公开的专利包含多种这类常用材料的详尽描述。

酶稳定剂也可用于本发明的洗涤组合物中。这类酶稳定剂包括丙二醇（含量最好在大约 1％至大约 10％）、甲酸钠（含量最好在大约 0.1％至大约 1％）以及甲酸钙（含量最好在大约 0.1％至大约 1％）。

1. 硬表面洗涤组合物

像这里使用的“硬表面洗涤组合物”一词是指用来洗涤硬表面诸如地板、墙壁、浴室瓷砖等的液体和颗粒状洗涤剂组合物。本发明的硬表面洗涤组合物含有有效量的一种或多种蛋白酶，其含量优选地为组合物中活性蛋白酶的大约 0.0001％至大约 10％，更优选地是大约 0.001％至大约 5％，最优选地是大约 0.001％至大约 1％。除含有一种或多种蛋白酶以外，这类硬表面洗涤组合物典型地含有一种表面活性剂和一种水溶性的多价螯合增效剂。但是，在一些特型产物诸如喷雾洗窗剂中有时不用表面活性剂，因为它们可能在玻璃表面产生薄雾／条纹状残迹。

表面活性剂组分在存在时的含量，可以小至这里的组合物的0.1%，但典型地是在组合物中含有大约0.25%至大约10%，更优选地是含有大约1%至大约5%的表面活性剂。

典型地，这种组合物中含有大约0.5%至大约50%的洗涤增效剂，最好含有大约1%至大约10%。最好是pH值是在大约8至12范围内。通常的pH调节剂诸如氢氧化钠、碳酸钠或盐酸都可使用，如果调节是必需的话。

溶剂可被包括在组合物中。有用的溶剂包括、但不限于，乙二醇醚诸如二乙二醇单己醚、二乙二醇单丁醚、乙二醇单丁醚、乙二醇单己醚、丙二醇单丁醚、二丙二醇单丁醚，以及二醇类诸如2,2,4－三甲基－1,3－戊二醇和2－乙基－1,3－己二醇。当使用时，这类溶剂典型地存在浓度为大约0.5%至大约15%，优选地是大约3%至大约11%。

另外，高度挥发性的溶剂诸如异丙醇或乙醇也可用于本发明组合物中，使得当“全强度”施用这种组合物于表面后，表面仍未被洗净时能让组合物从表面较快地挥发变得容易。当使用时，挥发性溶剂在组合物中典型存在的浓度为大约2%至大约12%。

本发明的硬表面洗涤组合物实施方案将通过以下非限制性的实例来阐明。（在下面的实例中，在实例中给“蛋白酶”标上的号码是指用于本发明组合物中具有前面表Ⅲ中给出的编号的变种）。

实例 1～6

液体硬表面洗涤组合物

组　分	实例编号 1	2	3	4	5	6
蛋白酶 # 12	0.05	0.02	0.02	0.03	0.10	0.03
蛋白酶 # 4	-	-	-	-	0.02	0.02
EDTA**	-	-	2.90	2.90	-	-
柠檬酸钠	-	-	-	-	2.90	2.90
C_{12} 烷基苯磺酸钠	1.95	-	1.95	-	1.95	-
C_{12} 烷基硫酸钠	-	2.20	-	2.20	-	2.20
C_{12}（乙氧基）硫酸钠***	-	2.20	-	2.20	-	2.20
C_{12} 二甲胺氧化物	-	0.50	-	0.50	-	0.50
异丙基苯磺酸钠	1.30	-	1.30	-	1.30	-
已基卡必醇***	6.30	6.30	6.30	6.30	6.30	6.30
水****	平衡到 100%					

注 ** 乙二胺四醋酸四钠盐

*** 二乙二醇单已醚

**** 整个配方调节到 pH 值为 7。

在实例 1～4 中，曾用列举在表Ⅲ中的蛋白酶 1～11 号和13～25 号、包括其它被描述于表Ⅴ和表Ⅵ中的用于本发明的蛋白酶来代替 12 号蛋白酶，得到基本上类似的结果。

在实例 5 和 6 中，也曾用表Ⅲ、Ⅴ和Ⅵ中列举的用于本发明的蛋白酶当中的任意组合物来代替 12 号和 4 号蛋白酶，也得到基本类似的结果。

实例 7 ~ 12

洗涤硬表面和除去家具霉菌的喷雾组合物

组　分	实例编号 7	8	9	10	11	12
蛋白酶 # 12	0.20	0.05	0.10	0.30	0.20	0.30
蛋白酶 # 4	-	-	-	-	0.30	0.10
辛基硫酸钠	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
十二碳烷基硫酸钠	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
氢氧化钠	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
硅酸盐（Na）	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
香料	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35
水	平衡到 100%					

产物 pH 值为大约 7。

在实例 7 ~ 10 中，曾用列举在表Ⅲ中的蛋白酶 1 ~ 11 号和 13 ~ 25 号，包括其它被描述于表Ⅴ和表Ⅵ中的用于本发明的蛋白酶来代替 12 号蛋白酶，得到基本类似的结果。

在实例 11 和 12 中，也曾用表Ⅲ、Ⅴ和Ⅵ中列出的用于本发明的蛋白酶当中的任意组合物来代替 12 号和 4 号蛋白酶，也得到基本类似的结果。

2. 洗碗碟组合物

在本发明的另一个实施方案中，洗碗碟组合物含有一种或多种蛋白酶。像这里所使用的，“洗碗碟组合物”一词是指所有形式的洗涤碗碟的组合物，包括但不限于，颗粒状的和液体形式的。本发明的洗碗碟组合物的实施方案可用下面的实例来阐明。

实例 13－18

洗碗碟组合物

组　分	实例编号 13	14	15	16	17	18
蛋白酶＃12	0.05	0.50	0.02	0.40	0.10	0.03
蛋白酶＃4	－	－	－	－	0.40	0.02
C_{12}－C_{14} N－甲基葡糖酰胺	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90
C_{12} 乙氧（1）硫酸盐	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00
2－甲基－十一碳酸	4.50	4.50	－	4.50	4.50	－
C_{12} 乙氧（2）羧酸盐	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50
C_{12} 醇乙氧化物（4）	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
C_{12} 胺氧化物	3.00	.3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
异丙基苯磺酸钠	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
乙醇	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
Mg^{++}（以 $MgCl_2$ 的形式）	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Ca^{++}（以 $CaCl_2$ 的形式）	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
水	平衡到 100％					

产物 pH 值被调节至 7。

在实例 13～16 中，曾用列举在表Ⅲ中的蛋白酶 1～11 号和 13～25 号，包括其它被描述于表Ⅴ和表Ⅵ中的用于本发明的蛋白酶来代替 12 号蛋白酶，得到基本类似的结果。

在实例 17 和 18 中，也曾用表Ⅲ、Ⅴ和Ⅵ中列出的用于本发明的蛋白酶当中的任意组合物来代替 12 号和 4 号蛋白酶，也得到基本类似的结果。

实例 19

颗粒状自动洗碗碟组合物

组　分	A	B	C
柠檬酸	15.0	-	-
柠檬酸盐	4.0	29.0	15.0
丙烯酸酯／甲基丙烯酸酯共聚物	6.0	-	6.0
丙烯酸马来酸共聚物	-	3.7	-
干燥的添加碳酸盐	9.0	-	20.0
碱金属硅酸盐	8.5	17.0	9.0
石蜡	-	0.5	-
苯并二唑	-	0.3	-
Termamyl 60 T	1.5	1.5	1.0
蛋白酶＃12（4.6％金属小球）	1.6	1.6	1.6
过碳酸盐（AvO）	1.5	-	-
过硼酸盐—水合物	-	0.3	1.5
过硼酸盐四水合物	-	0.9	-
四乙酰基乙二胺	3.8	4.4	-
二亚乙基三胺五甲基膦酸（Mg盐）	0.13	0.13	0.13
烷基乙氧基硫酸盐－3 倍乙氧化的	3.0	-	-

烷基乙氧丙氧基非离子型表面活性剂	-	1.5	-
抑泡剂	2.0	-	-
Olin SLF 18 非离子型表面活性剂	-	-	2.0
硫酸盐	平衡至 100%		

在实例 19 A ~ C 中，曾用列举在表Ⅲ中的蛋白酶 1 ~ 11 号和 13 ~ 25 号，包括其它被描述于表 V 和表Ⅵ中的用于本发明的蛋白酶来代替 12 号蛋白酶，得到基本类似的结果。在实例 19 A ~ C 中，也曾用表Ⅲ、V 和Ⅵ中列出的用于本发明的蛋白酶当中的任意组合物来代替 12 号蛋白酶，也得到基本类似的结果。

3. 织物洗涤组合物

在本发明的另一个实施方案中，织物洗涤组合物含有一种或多种蛋白酶。像这里所使用的，“织物洗涤组合物”是指所有形式的用来洗涤织物的洗涤剂组合物，包括但不限于颗粒状的、液体的和条棒状的。

a. 颗粒状的织物洗涤组合物

本发明的颗粒状织物洗涤组合物包含有效量的一种或多种蛋白酶，其含量最好是组合物中活性酶的重量的大约 0.001% 至大约 10%，更优选地是大约 0.005% 至大约 5%，还更优选地是大约 0.01% 至大约 1%。除了一种或多种蛋白酶以外，这种颗粒状织物洗涤组合物中典型地还含有至少一种表面活性剂、一种或多种增效剂以及，在某些情况下，一种漂白剂。

本发明的颗粒状织物洗涤组合物的实施方案可通过以下实例来阐明。

实例 20～23

颗粒状织物洗涤组合物

组　分	实例编号 20	21	22	23
蛋白酶＃12（4％小球）	0.10	0.20	0.03	0.05
蛋白酶＃4（4％小球）	-	-	0.02	0.05
C_{13} 线型烷基苯磺酸盐	22.00	22.00	22.00	22.00
磷酸盐（以三聚磷酸钠的形式）	23.00	23.00	23.00	23.00
碳酸钠	23.00	23.00	23.00	23.00
硅酸钠	14.00	14.00	14.00	14.00
沸石	8.20	8.20	8.20	8.20
螯合剂（二乙二三胺五乙酸）	0.40	0.40	0.40	0.40
硫酸钠	5.50	5.50	5.50	5.50
水	平衡到 100％			

在实例 20～21 中，曾用列举在表Ⅲ中的蛋白酶 1～11 号和 13～25 号，包括其它被描述于表Ⅴ和表Ⅵ中的用于本发明的蛋白酶来代替 12 号蛋白酶，得到基本类似的结果。

在实例 22 和 23 中，也曾用表Ⅲ、Ⅴ和Ⅵ中列出的用于本发明的蛋白酶当中的任意组合物来代替 12 号和 4 号蛋白酶，也得到基本类似的结果。

实例 24 ~ 27

颗粒状织物洗涤组合物

组　分	实例编号 24	25	26	27
蛋白酶 # 12（4% 小球）	0.10	0.20	0.03	0.05
蛋白酶 # 4（4% 小球）	-	-	0.02	0.05
C_{12} 烷基苯磺酸盐	12.00	12.00	12.00	12.00
沸石 A（1 ~ 10 微米）	26.00	26.00	26.00	26.00
2 - 丁基辛酸	4.00	4.00	4.00	4.00
C_{12} ~ C_{14} 二级（2,3）烷基硫酸盐（钠盐）	5.00	5.00	5.00	5.00
柠檬酸钠	5.00	5.00	5.00	5.00
荧光增白剂	0.10	0.10	0.10	0.10
硫酸钠	17.00	17.00	17.00	17.00
填料，水，次要组分	平衡到 100%			

在实例 24 和 25 中，曾用列举在表Ⅲ中的蛋白酶 1 ~ 11 号和 13 ~ 25 号，包括其它被描述于表Ⅴ和表Ⅵ中的用于本发明的蛋白酶来代替 12 号蛋白酶，得到基本上类似的结果。

在实例 26 和 27 中，也曾用表Ⅲ、Ⅴ和Ⅵ中列出的用于本发明的蛋白酶当中的任意组合物来代替 12 号和 4 号蛋白酶，也得到基本类似的结果。

实例 28 和 29

颗粒状织物洗涤组合物

组　分	实例编号 28	29
线型烷基苯磺酸盐	11.4	10.70
牛脂烷基硫酸盐	1.80	2.40
C_{14} ~ C_{15} 烷基硫酸盐	3.00	3.10
C_{14} ~ C_{15} 醇 7 倍乙氧化物	4.00	4.00
牛脂醇 11 倍乙氧化物	1.80	1.80
分散剂	0.07	0.1
聚硅氧烷流体	0.80	0.80
柠檬酸三钠	14.00	15.00
柠檬酸	3.00	2.50
沸石	32.5	32.10
马来酸丙烯酸共聚物	5.00	5.00
二亚乙基三胺五亚甲基膦酸	1.00	0.20
蛋白酶 # 12（4% 小球）	0.30	0.30
脂酶	0.36	0.40
淀粉酶	0.30	0.30
硅酸钠	2.00	2.50
硫酸钠	3.50	5.20
聚乙烯基吡咯烷酮	0.30	0.50
过硼酸盐	0.50	1.0
酚磺酸盐	0.1	0.2
过氧化物酶	0.1	0.1
次要组分	加到 100%	

实例 30 和 31

颗粒状织物洗涤组合物

组　分	实例编号 30	31
线型 C_{12} 烷基苯磺酸钠	6.5	8.0
硫酸钠	15.0	18.0
沸石 A	26.0	22.0
次氮基三乙酸钠	5.0	5.0
聚乙烯基吡咯烷酮	0.5	0.7
四乙酰基乙二胺	3.0	3.0
硼酸	4.0	-
过硼酸	0.5	1.0
酚磺酸盐	0.1	0.2
蛋白酶 # 12（4% 小球）	0.4	0.4
填充剂（例如硅酸盐、碳酸盐、香料、水）	加到 100	

实例 32

紧密的颗粒状织物洗涤组合物

组　分	重量%
烷基硫酸盐	8.0
烷基乙氧基硫酸盐	2.0
C_{25} 和 C_{45} 醇 3 倍和 7 倍乙氧化物的混合物	6.0
聚羟基脂肪酸酰胺	2.5

沸石	17.0
层状硅酸盐／柠檬酸盐	16.0
碳酸盐	7.0
马来酸丙烯酸共聚物	5.0
污垢释出聚合物	0.4
羧甲基纤维素	0.4
聚（4－乙烯基吡啶）－N－氧化物	0.1
乙烯基咪唑和乙烯基吡咯烷酮的共聚物	0.1
PEG 2000	0.2
蛋白酶＃12（4％小球）	0.5
脂酶	0.2
纤维素酶	0.2
四乙酰基乙二胺	6.0
过碳酸盐	22.0
乙二胺二丁二酸	0.3
抑泡剂	3.5
4,4'－双（2－吗啉基－4－苯胺基－s－三嗪－6－基氨基）二苯乙烯－2,2'－二磺酸二钠盐	0.25
4.4'－双（2－磺酸基肉桂基）联苯二钠盐	0.05
水、香料和次要组分	加到 100

实例 33

颗粒状织物洗涤组合物

组　分	重量%
线型烷基苯磺酸盐	7.6
C_{16}－C_{18} 烷基硫酸盐	1.3
C_{14-15} 醇 7 倍乙氧化物	4.0
椰－烷基－二甲基羟乙基氯化铵	1.4
分散剂	0.07
聚硅氧烷流体	0.8
柠檬酸三钠	5.0
沸石 4A	15.0
马来酸丙烯酸共聚物	4.0
二亚乙基三胺五亚甲基膦酸	0.4
过硼酸盐	15.0
四乙酰基乙二胺	5.0
绿土	10.0
聚（氧乙烯）（分子量 300,000）	0.3
蛋白酶 # 12（4% 小球）	0.4
脂酶	0.2
淀粉酶	0.3
纤维素酶	0.2
硅酸钠	3.0
碳酸钠	10.0
羧甲基纤维素	0.2
增白剂	0.2
水、香料和次要组分	加到 100

实例 34

颗粒状织物洗涤组合物

组　分	重量%
线型烷基苯磺酸盐	6.92
牛脂烷基硫酸盐	2.05
C_{14-15} 醇 7 倍乙氧化物	4.4
C_{12-15} 烷基乙氧硫酸盐－3 倍乙氧化物	0.16
沸石	20.2
柠檬酸盐	5.5
碳酸盐	15.4
硅酸盐	3.0
马来酸丙烯酸共聚物	4.0
羧甲基纤维素	0.31
污垢释出聚合物	0.30
蛋白酶 # 12（4％小球）	0.2
脂酶	0.36
纤维素酶	0.13
过硼酸盐四水合物	11.64
过硼酸盐一水合物	8.7
四乙酰基乙二胺	5.0
二亚乙基三胺五亚甲基膦酸	0.38
硫酸镁	0.40
增白剂	0.19
香料、聚硅氧烷、抑泡剂	0.85
次要组分	加到 100

在这里的实例 28～34 的每个实例中，曾用列举在表Ⅲ中的蛋白酶 1～11 号和 13～25 号，包括其它被描述于表Ⅴ和表Ⅵ中的用于本发明的蛋白酶来代替 12 号蛋白酶，得到基本类似的结果。也曾在实例 28～34 中用表Ⅲ、Ⅴ和Ⅵ中列出的用于本发明的蛋白酶当中的任意组合物来代替 12 号蛋白酶，也得到基本类似的结果。

b. 液体织物洗涤组合物

本发明的液体织物洗涤组合物包含有效量的一种或多种蛋白酶，其含量优选地是组合物的活性蛋白酶重量的大约 0.0001％至大约 10％，更优选地是大约 0.001％至大约 1％，最优选地是大约 0.001％至大约 0.1％。这样的液体织物洗涤组合物典型地还另外包含一种阴离子表面活性剂、一种脂肪酸、一种水溶性的洗涤增效剂以及水。

本发明的液体织物洗涤组合物的实施方案将通过以下的实例来阐明。

实例 35～39

液体织物洗涤组合物

	实例编号				
组　分	35	36	37	38	39
蛋白酶＃12	0.05	0.03	0.30	0.03	0.10
蛋白酶＃4	-	-	-	0.01	0.20
C_{12}～C_{14} 烷基硫酸钠	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
2－丁基辛酸	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
柠檬酸钠	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
C_{10} 醇乙氧化物（3）	13.00	13.00	13.00	13.00	13.00

一乙醇胺	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50
水／丙二醇／乙醇（100：1：1）	平衡到100%				

在实例35～37中，曾用列举在表Ⅲ中的蛋白酶1～11号和13～25号，包括其它被描述于表Ⅴ和表Ⅵ中的用于本发明的蛋白酶来代替12号蛋白酶，得到基本类似的结果。

在实例38～39中，也曾用表Ⅲ、Ⅴ和Ⅵ中列出的用于本发明的蛋白酶当中的任意组合物来代替12号和4号蛋白酶，也得到基本类似的结果。

实例40～41

液体织物洗涤组合物

	实例编号	
组　分	40	41
C_{12-14} 烯基丁二酸	3.0	8.0
柠檬酸一水合物	10.0	15.0
C_{12-15} 烷基硫酸钠	8.0	8.0
C_{12-15} 醇2倍乙氧化物的硫酸钠盐	-	3.0
C_{12-15} 醇7倍乙氧化物	-	8.0
C_{12-15} 醇5倍乙氧化物	8.0	-
二亚乙基三胺五（亚甲基膦酸）	0.2	-
油酸	1.8	-
乙醇	4.0	4.0
丙二醇	2.0	2.0
蛋白酶#12	0.2	0.2

聚乙烯基吡咯烷酮	1.0	2.0
抑泡剂	0.15	0.15
NaOH	调到 pH 值为 7.5	
过硼酸盐	0.5	1.0
酚磺酸盐	0.1	0.2
过氧化物酶	0.4	0.1
水和次要组分	加到 100 份	

在这里的实例 40 和 41 的每个实例中，曾用列举在表Ⅲ中的蛋白酶 1～11 号和 13～25 号，包括其它被描述于表Ⅴ和表Ⅵ中的用于本发明的蛋白酶来代替 12 号蛋白酶，得到基本类似的结果。也曾在实例 40 和 41 中，用表Ⅲ、Ⅴ和Ⅵ中列出的用于本发明的蛋白酶当中的任意组合物来代替 12 号蛋白酶，也得到基本类似的结果。

c. 条棒状织物洗涤组合物

适合于手洗污垢织物的本发明的条棒状织物洗涤组合物包含有效量的一种或多种蛋白酶，其含量最好是组合物重量的大约 0.001％至大约 10％，更优选地是大约 0.01％至大约 1％。

本发明的条棒状织物洗涤组合物的实施方案可通过以下的实例来阐明。

实例 42～45

条棒状织物洗涤组合物

组　分	实例编号 42	43	44	45
蛋白酶 # 12	0.3	-	0.1	0.02
蛋白酶 # 4	-	-	0.4	0.03
C_{12}～C_{16} 烷基硫酸钠	20.0	20.0	20.0	20.00
C_{12}～C_{14} N－甲基葡糖酰胺	5.0	5.0	5.0	5.00
C_{11}～C_{13} 烷基苯磺酸钠	10.0	10.0	10.0	10.00
碳酸钠	25.0	25.0	25.0	25.00
焦磷酸钠	7.0	7.0	7.0	7.00
三聚磷酸钠	7.0	7.0	7.0	7.00
沸石 A（0.1μ～10μ）	5.0	5.0	5.0	5.00
羧甲基纤维素	0.2	0.2	0.2	0.20
聚丙烯酸酯（MW 1400）	0.2	0.2	0.2	0.20
椰脂酸－乙醇胺酰胺	5.0	5.0	5.0	5.00
增白剂、香料	0.2	0.2	0.2	0.2
$CaSO_4$	1.0	1.0	1.0	1.00
$MgSO_4$	1.0	1.0	1.0	1.00
水	4.0	4.0	4.0	4.00
填充剂*	平衡到 100%			

注* 可选自方便的材料诸如 $CaCO_3$、滑石、粘土、硅酸盐等。

在实例 42 和 43 中，曾用列举在表Ⅲ中的蛋白酶 1～11 号和 13～25 号，包括其它被描述于表Ⅴ和表Ⅵ中的用于本发明的蛋白酶来代替 12 号蛋白酶，得到基本类似的结果。

在实例 44 和 45 中，也曾用表Ⅲ、Ⅴ和Ⅵ中列出的用于本发明的蛋白酶当中的任意组合物来代替 12 号和 4 号蛋白酶，也得到基本类似的结果。

B. 其它的洗涤组合物

除了上面讨论过的硬表面洗涤、碗碟洗涤和织物洗涤组合物以外，一种或多种蛋白酶也可加入各种其它的需要水解一种不溶性底物的洗涤组合物中去。这类其它的洗涤组合物包括但不限于，口腔用洗涤组合物、假牙洗涤组合物以及触点镜头洗涤组合物等。

1. 口腔用洗涤组合物

在本发明的另一个实施方案中，药物上可接受量的一种或多种蛋白酶被包括在组合物中，用来从牙齿或假牙上除去蛋白质性的污渍。像这里所使用的，“口腔用洗涤组合物”是指洗牙水、牙膏、牙胶、牙粉、漱口剂、口腔喷雾剂、口腔胶、口香糖、糖锭、香粉、药片、生物胶、预防膏、牙科用溶液等。优选地是，本发明的口腔洗涤组合物含有组合物重量的大约 0.0001％至大约 20％的一种或多种蛋白酶、更优选地是大约 0.001％至大约 10％，还更优选地是大约 0.01％至大约 5％的蛋白酶，以及一种药物上可接受的载体。像这里所使用的，“药物上可接受的”意指这一术语所描述的药物、药剂或惰性组分是适宜于用来和人类和较低等动物的组织相接触，而没有不应有的毒性、不相容性、不稳定性、刺激性、过敏性反应等，并有相称的合理的受益／风险比率。

典型地，这种口腔洗涤组合物的口腔洗涤组分的药物上可接受

的口腔洗涤载体组分通常含量为组合物重量的大约50%至大约99.99%，优选地是大约65%至大约99.99%，更优选地是大约65%至大约99%。

可被包括在本发明的口腔洗涤组合物中的药物上可接受的载体组分和供选择的组分，对于本领域的技术人员是众所周知的。有许多用于口腔洗涤组合物的组合物类型、载体组分和供选择的组分已被公开于1992年3月17日授权的Seibel的美国专利5,096,700、1991年7月2日授权的Sampathkumar的美国专利5,028,414、1991年7月2日授权的Benedict、Bush和Sunberg的美国专利5,028,415中，所有这些专利都在此引入作为参考。

本发明的口腔洗涤组合物的实施方案将通过以下的实例来阐明。

实例46～49

洗牙水组合物

组　分	实例编号 46	47	48	49
蛋白酶#12	2.000	3.500	1.500	2.000
山梨醇（70%水溶液）	35.000	35.000	35.000	35.000
PEG-6*	1.000	1.000	1.000	1.000
硅石牙科磨蚀剂**	20.000	20.000	20.000	20.000
氟化钠	0.243	0.243	0.243	0.243
二氧化钛	0.500	0.500	0.500	0.500
糖精钠	0.286	0.286	0.286	0.286
烷基硫酸钠（27.9%水溶液）	4.000	4.000	4.000	4.000
调味剂	1.040	1.040	1.040	1.040

羧乙烯基聚合物****	0.300	0.300	0.300	0.300
Carrageenan*****	0.800	0.800	0.800	0.800
水		平衡到 100%		

注 * PEG－6＝分子量为 600 的聚乙二醇

** 沉淀的硅石被鉴定为 J.M. Huber 提供的 Zeodent 119

*** B. F. Goodrich 化学公司提供的 Carbopol

**** Hercules 化学公司提供的 Iota Carrageenan。

在实例 46～49 中，曾用列举在表Ⅲ中的蛋白酶 1～11 号和 13～25 号，包括其它被描述于表Ⅴ和表Ⅵ中的用于本发明的蛋白酶来代替 12 号蛋白酶，得到基本类似的结果．在实例 46～49 中，也曾用表Ⅲ、Ⅴ和Ⅵ中列出的用于本发明的蛋白酶当中的任意组合物来代替 12 号蛋白酶，也得到基本类似的结果。

实例 50～53

漱口剂组合物

	实例编号			
组　分	50	51	52	53
蛋白酶＃12	3.00	7.50	1.00	5.00
SDA 40 醇	8.00	8.00	8.00	8.00
调味剂	0.08	0.08	0.08	0.08
乳化剂	0.08	0.08	0.08	0.08
氟化钠	0.05	0.05	0.05	0.05
甘油	10.00	10.00	10.00	10.00
增香剂	0.02	0.02	0.02	0.02
苯甲酸	0.05	0.05	0.05	0.05
氢氧化钠	0.20	0.20	0.20	0.20

染料	0.04	0.04	0.04	0.04
水	平衡到 100%			

在实例 50～53 中，曾用列举在表Ⅲ中的蛋白酶 1～11 号和 13～25 号，包括其它被描述于表Ⅴ和表Ⅵ中的用于本发明的蛋白酶来代替 12 号蛋白酶，得到基本类似的结果。在实例 50～53 中，也曾用表Ⅲ、Ⅴ和Ⅵ中列出的用于本发明的蛋白酶当中的任意组合物来代替 12 号蛋白酶，也得到基本类似的结果。

实例 54～57

糖锭组合物

	实例编号			
组　分	54	55	56	57
蛋白酶＃12	0.01	0.03	0.10	0.02
山梨糖醇	17.50	17.50	17.50	17.50
甘露糖醇	17.50	17.50	17.50	17.50
淀粉	13.60	13.60	13.60	13.60
增香剂	1.20	1.20	1.20	1.20
调味剂	11.70	11.70	11.70	11.70
颜料	0.10	0.10	0.10	0.10
玉米糖浆	平衡到 100%			

在实例 54～57 中，曾用列举在表Ⅲ中的蛋白酶 1～11 号和 13～25 号、包括其它被描述于表Ⅴ和表Ⅵ中的用于本发明的蛋白酶来代替 12 号蛋白酶，得到基本类似的结果。在实例 54～57 中，也曾用表Ⅲ、Ⅴ和Ⅵ中列出的用于本发明的蛋白酶当中的任意组合

物来代替 12 号蛋白酶，也得到基本类似的结果。

实例 58 ~ 61

口香糖组合物

组　分	实例编号 58	59	60	61
蛋白酶 # 12	0.03	0.02	0.10	0.05
山梨糖醇晶体	38.44	38.40	38.40	38.40
Paloja 胶基*	20.00	20.00	20.00	20.00
山梨糖醇（70% 水溶液）	22.00	22.00	22.00	22.00
甘露糖醇	10.00	10.00	10.00	10.00
甘油	7.56	7.56	7.56	7.56
调味剂	1.00	1.00	1.00	1.00

注* L. A. Dreyfus 公司提供。

在实例 58 ~ 61 中，曾用列举在表Ⅲ中的蛋白酶 1 ~ 11 号和 13 ~ 25 号，包括其它被描述于表Ⅴ和表Ⅵ中的用于本发明的蛋白酶来代替 12 号蛋白酶，得到基本类似的结果。在实例 58 ~ 61 中，也曾用表Ⅲ、Ⅴ和Ⅵ中列出的用于本发明的蛋白酶当中的任意组合物来代替 12 号蛋白酶，也得到基本类似的结果。

2. 假牙洗涤组合物

在本发明的另一个实施方案中，为在口腔外洗涤假牙的假牙洗涤组合物含有一种或多种蛋白酶。这种假牙洗涤组合物包含有效量的一种或多种蛋白酶，其含量优选地是组合物重量的大约 0.0001% 至大约 50% 的一种或多种蛋白酶、更优选地是大约 0.001% 至大约 35%、还更优选地是大约 0.01% 至大约 20%，以及一种假牙洗涤载体。各种假牙洗涤组合物形式诸如起泡沫的药片等在本领域内是

众所周知的（参看例如 Young 的美国专利 5,055,305，在此引入作为参考），并且为从假牙上除去蛋白质性的污渍而并入一种或多种蛋白酶一般也是合适的。

本发明的假牙洗涤组合物的实施方案将通过下面的实例来阐明。

实例 62～65

双层起泡假牙洗涤药片

组　分	实例编号 62	63	64	65
酸性层				
蛋白酶＃12	1.0	1.5	0.01	0.05
酒石酸	24.0	24.0	24.00	24.00
碳酸钠	4.0	4.0	4.00	4.00
氨基磺酸	10.0	10.0	10.00	10.00
PEG 20,000	4.0	4.0	4.00	4.00
碳酸氢钠	24.5	24.5	24.50	24.50
过硫酸钾	15.0	15.0	15.00	15.00
酸性焦磷酸钠	7.0	7.0	7.00	7.00
焦化硅石	2.0	2.0	2.00	2.00
四乙酰基乙二胺	7.0	7.0	7.00	7.00
蓖麻油酰基磺化丁二酸盐	0.5	0.5	0.50	0.50
调味剂	1.0	1.0	1.00	1.00
碱性层				
过硼酸钠一水合物	32.0	32.0	32.00	32.00
碳酸氢钠	19.0	19.0	19.00	19.00

EDTA	3.0	3.0	3.00	3.00
三聚磷酸钠	12.0	12.0	12.00	12.00
PEG 20,000	2.0	2.0	2.00	2.00
过硫酸钾	26.0	26.0	26.00	26.00
碳酸钠	2.0	2.0	2.00	2.00
焦化硅石	2.0	2.0	2.00	2.00
染料／调味剂	2.0	2.0	2.00	2.00

在实例 62～65 中，曾用列举在表Ⅲ中的蛋白酶 1～11 号和 13～25 号，包括其它被描述于表Ⅴ和表Ⅵ中的用于本发明的蛋白酶来代替 12 号蛋白酶，得到基本类似的结果。在实例 62～65 中，也曾用表Ⅲ、Ⅴ和Ⅵ中列出的用于本发明的蛋白酶当中的任意组合物来代替 12 号蛋白酶，也得到基本类似的结果。

3. 人身洗涤组合物

在本发明的另一个实施方案中，为洗涤皮肤（以液体和条棒的形式）的人身洗涤组合物包含一种或多种蛋白酶。这类组合物中蛋白酶的含量典型地是组合物重量的大约 0.001％至大约 5％，优选地是大约 0.005％至大约 2％，最优选地是大约 0.01％至大约 0.8％。像这里描述的其中包含有蛋白酶的经优选的人身洗涤组合物已在美国专利申请 SN 08/121,623 和 SN 08/121,624 中讲授过，这两项专利都是 Visscher 等人在 1993 年 9 月 14 日提出申请的，它们的公开说明书在此全部引入作为参考。这类组合物将通过以下实例来阐明。

实例 66

含肥皂的液体人身洗涤组合物

组　分	重量%
肥皂（钾或钠）	15.00
30% 月桂酸酯	
30% 肉豆蔻酸酯	
25% 软脂酸酯	
15% 硬脂酸酯	
脂肪酸（按上述比率）	4.50
月桂基肌氨酸钠	6.00
Laureth－3 硫酸钠	0.66
椰油酰胺基丙基三甲铵乙内酯	1.33
甘油	15.00
丙二醇	9.00
Polyquaternium 10	0.80
乙二醇二硬脂酸酯（EDTA）	1.50
对羟基苯甲酸丙酯	0.10
对羟基苯甲酸甲酯	0.20
蛋白酶 # 12	0.10
KOH 或 NaOH	如果必需用来调节 pH 值
硫酸钙	3
醋酸	3
水	平衡到 100

实例 67

人身洗涤条状组合物

组　分	重量%
椰脂酰基羟乙磺酸钠	47.20
鲸蜡酰基硫酸钠	9.14
石蜡	9.05
钠肥皂（就地形成）	3.67
羟乙磺酸钠	5.51
氯化钠	0.45
二氧化钛	0.4
EDTA 三钠盐	0.1
Trisodium Etidronate	0.1
香料	1.20
Na_2SO_4	0.87
蛋白酶 # 12	0.10
水 / 次要组分	平衡到 100

在实例 66 ~ 67 中，曾用列举在表Ⅲ中的蛋白酶 1 ~ 11 号和 13 ~ 25 号，包括其它被描述于表Ⅴ和表Ⅵ中的用于本发明的蛋白酶来代替 12 号蛋白酶，得到基本类似的结果。在实例 66 ~ 67 中，也曾用表Ⅲ、Ⅴ和Ⅵ中列出的用于本发明的蛋白酶当中的任意组合物来代替 12 号和 4 号蛋白酶，也得到基本类似的结果。

实例 68

洗涤品质试验

用于本发明组合物中的蛋白酶变种的洗涤性能，是通过测量除去 EMPA 116 棉布小块布样上的污渍（血液 / 奶 / 炭黑在棉布上）

（Testfabrics, Inc., Middlesex, NJ07030）来评价的。

把 6 块剪成 3 × 4-1/2 英寸带锯齿边的 EMPA 116 布样放在含有 1000 毫升硬度为 15 gpg（Ca^{++} : Mg^{++} 为 3 : 1 重量 : 重量）的水、7 克洗涤剂和合适的酶的 7243S Terg-O-Tometer 型洗涤机（United States Testing Co., Inc., Hoboken, NJ 出品）的每个罐中。所用洗涤剂是德国 wfk-Testgewebe GmbH, Adlerstrasse 42, Postfach 130762, D-47759 Krefeld, 生产的 WFK1 洗涤剂:

组　分	最终配方中的%
沸石 A	25　%
硫酸钠	25　%
苏打灰	10　%
线型烷基苯磺酸盐	8.8　%
醇乙氧化物（7 ~ 8 EO）	4.5　%
钠肥皂	3　%
硅酸钠（SiO_2 : Na_2O 为 3.3 : 1）	3　%

往这基础洗涤剂中加入以下组分:

组　分	最终配方中的%
过硼酸钠一水合物	13　%
共聚物（Sokalan CP5）	4　%
TAED（Mykon ATC Green）	3　%
酶	0.5　%
增白剂（Tinopal AMS-GX）	0.2　%

过硼酸钠一水合物是从 Degussa Corporation, Ridgefield-Park, NJ 07660 买来的。Sokalan CP5 是从 BASF Corporation, Parsippany, NJ 07054 买来的。Mykon ATC Green（TAED, 四乙酰基乙二胺）

是从英国 Warwick International, Limited, Mostyn, Holywell, Clwyd CH8 9HE 买来的。Tinopal AMS GX 是从 Ciba-Geigy Corporation, Greensboro, NC 27419 买来的。

6 块 EMPA 116 布样在 60℃ 在含有酶的洗涤剂中洗涤 30 分钟，接着在 1000 毫升水漂洗两次，每次 5 分钟。为做标准曲线，所加酶的最终浓度为 0.05 至 1 ppm；为日常分析用，酶的浓度为 0.25 ppm。布样被干燥和挤压后，用 CR 200 型 Minolta Chroma Meter（Minolta Corporation 的产品，Ramsey, NJ 07446）基于 $L^*a^*b^*$ 标度的 L 值测量布样的反射度。品质用迟缓芽孢杆菌（GG36）蛋白酶品质的百分数来报告，它是通过用需要达到同样除污品质的变种蛋白酶的量来除迟缓芽孢杆菌（GG36）蛋白酶的量，再乘 100 计算出来的。数据被列于表Ⅶ中。

表 VII

酶	洗涤品质
迟缓芽孢杆菌枯草溶菌素	100
N76D	310
N76D/S103A	230
N76D/V104I	130
N76D/V107V	160
N76D/S99D/S101R	370
N76D/S99D/S103A	290
N76D/S101R/S103A	130
N76D/S101R/V104I	300
N76D/S103A/V104I	320
N76D/S103G/V104I	160
N76D/S103A/V104F	210
N76D/S103A/V104N	110
N76D/S103A/V104T	170
N76D/V104I/I107V	210
N76D/S99D/S101R/S103A	220
N76D/S99D/S101R/V104I	140
N76D/S101G/S103A/V104I	170
N76D/S101R/S103A/V104I	150
N76D/S103A/V104I/S105A	170
N76D/S103A/V104T/I107A	120
N76D/S103A/V104T/I107L	110
N76D/S103A/V104I/L126F	110
N76D/S103A/V104I/S128G	280
N76D/S103A/V104I/L135I	160
N76D/S103A/V104I/L135V	160
N76D/S103A/V104I/D197E	170
N76D/S103A/V104I/N204A	160
N76D/S103A/V104I/N204G	150
N76D/S103A/V104I/P210I	470
N76D/S103A/V104I/M222A	100
N76D/S103A/V104I/T260P	280
N76D/S103A/V104I/S265N	190

实例 69

在液体洗涤剂配方中蛋白酶的稳定性

在液体洗涤剂配方中对蛋白酶失活稳定性的比较试验，是按照这里概括的实验程序对迟缓芽孢杆菌枯草溶菌素和它的变种酶 N76D / S103A / V104I 进行的。为研究所用的洗涤剂配方，是从市场买来的由 The Procter & Gamble 公司在美国制造的瓶装 Tide Ultra 液体洗衣洗涤剂。洗涤剂配方必须先经热处理以使其中就地形成的酶失活。这可通过把这种洗涤剂在 96℃ 保温 4.5 小时来完成。把浓度范围在 20克 / 立升酶的迟缓芽孢杆菌枯草溶菌素和 N76D / S103A / V104I 变种酶的浓缩制品加到在室温的、已经过热处理的 Tide Ultra 中，使酶在洗涤剂配方中的最终浓度为 0.3克 / 立升酶。然后把这种带有酶的、经热处理的洗涤剂在恒温 50℃ 的水浴中保温。在 0、24、46、76、和 112 小时的时间间隔分别从恒温试管中取出等分的试样，并通过把试样加到恒温于 25℃ 的 1 厘米比色池中来试验酶的活性，比色池中含有 1.2 mM 溶解在 0.1 M tris-HCl 缓冲液中的 pH 值为 8.6 的合成肽底物丁二酰 - 丙氨 - 丙氨 - 脯氨 - 苯丙氨酰对硝基苯胺。最初的线性反应速率是通过监测反应产物对 - 硝基苯胺在 410 nm 处的吸收率作为时间的函数来进行分光光度法跟踪的。如图 10 所示，可观察到变种酶 N76D / S103A / V104I 比天然的迟缓芽孢杆菌酶具有明显更大的对失活的稳定性。在特定的试验条件下，在 Tide Ultra 洗涤剂配方中对两种酶估算的失活半衰期，对迟缓芽孢杆菌枯草溶菌素为 45 小时，对 N76D / S103A / V104I 变种酶为 125 小时。

虽然已经描述了本主题发明的具体实施方案，但显然本领域的技术人员在不偏离本发明的精神和范围下仍能对本主题发明进行各

种变化和修改。在所附的权利要求中，函盖了想要的所有在本发明范围内的这类修改。

序 列 表

(1) 一般讯息:

(i) 申请人: Baeck, Andre (NMN)

Ghosh, Chanchal K.

Graycar, Thomas P.

Bott, Richard R.

Wilson, Lori J.

Brode, Philip F., III

Barnett, Bobby L.

Rubingh, Donn N.

(ii) 发明名称: 含蛋白酶的洗涤组合物

(iii) 序列数目: 15

(iv) 通信地址:

(A) 地址: The Procter & Gamble Company

(B) 街道: 11810 East River Road

(C) 城市: 辛辛那提 (Cincinnati)

(D) 州: 奥克拉荷马 (OH)

(E) 国家: 美国 (USA)

(F) 邮政编码: 45253 - 8707

(v) 可读出的计算机:

(A) 介质类型: 硬盘

(B) 计算机: IBM PC 兼容的

(C) 操作系统: PC-DOS / MS-DOS

(D) 软件: Patentin Release #1.0, 版本#1.25

(vi) 现行申请日期:

(A) 申请号:

(B) 申请日期: 1994 年 10 月 13 日

(C) 分类:

(viii) 代理人 / 代理商信息:

(A) 姓名: Zerby, Kim William

(B) 登记号: 32,323

(C) 参考 / 摘要: 5040R

(ix) 电讯信息:

(A) 电话: (513) 627-2885

(B) 电传: (513) 627-0318

(2) SEQ ID NO:1 的讯息:

(i) 序列特性:

(A) 长度: 19 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 股: 单股

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: DNA (基因组)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:1:

GAAGCTGCAA CTCGTTAAA 19

(2) SEQ ID NO:2 的讯息:

(i) 序列特性:

(A) 长度: 18 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 股: 单股

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: DNA（基因组）

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:2:

GCTGCTCTAG ACAATTCG 18

(2) SEQ ID NO:3 的讯息:

(i) 序列特性:

(A) 长度: 39 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 股: 单股

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: DNA（基因组）

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:3:

GTATTAGGGG CGGACGGTCG AGGCGCCATC AGCTCGATT 39

(2) SEQ ID NO:4 的讯息:

(i) 序列特性:

(A) 长度: 33 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 股: 单股

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: DNA（基因组）

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:4:

TCAGGTTCGG TCTCGAGCGT TGCCCAAGGA TTG 33

(2) SEQ ID NO:5 的讯息:

(i) 序列特性:

(A) 长度: 22 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 股: 单股

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: DNA（基因组）

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:5:

CACGTTGCTA GCTTGAGTTT AG 22

(2) SEQ ID NO:6 的讯息:

(i) 序列特性:

(A) 长度: 1497 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 股: 单股

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: DNA（基因组）

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:6:

GGTCTACTAA AATATTATTC CATACTATAC AATTAATACA CAGAATAATC TGTCTATTGG 60

TTATTCTGCA AATGAAAAAA AGGAGAGGAT AAAGAGTGAG AGGCAAAAAA GTATGGATCA 120

GTTTGCTGTT TGCTTTAGCG TTAATCTTTA CGATGGCGTT CGGCAGCACA TCCTCTGCCC 180

AGGCGGCAGG GAAATCAAAC GGGGAAAAGA AATATATTGT CGGGTTTAAA CAGACAATGA 240

GCACGATGAG CGCCGCTAAG AAGAAAGATG TCATTTCTGA AAAAGGCGGG AAAGTGCAAA 300

AGCAATTCAA ATATGTAGAC GCAGCTTCAG TCACATTAAA CGAAAAAGCT GTAAAAGAAT 360

TGAAAAAAGA CCCGAGCGTC GCTTACGTTG AAGAAGATCA CGTAGCACAT GCGTACGCGC 420

AGTCCGTGCC TTACGGCGTA TCACAAATTA AAGCCCCTGC TCTGCACTCT CAAGGCTACA 480

CTGGATCAAA TGTTAAAGTA GCGGTTATCG ACAGCGGTAT CGATTCTTCT CATCCTGATT 540

TAAAGGTAGC AAGCGGAGCC AGCATGGTTC CTTCTGAAAC AAATCCTTTC CAAGACAACA 600

ACTCTCACGG AACTCACGTT GCCGGCACAG TTGCGGCTCT TAATAACTCA ATCGGTGTAT 660

TAGGCGTTGC GCCAAGCGCA TCACTTTACG CTGTAAAAGT TCTCGGTGCT GACGGTTCCG 720

GCCAATACAG CTGGATCATT AACGGAATCG AGTGGGCGAT CGCAAACAAT ATGGACGTTA 780

TTAACATGAG CCTCGGCGGA CCTTCTGGTT CTGCTGCTTT AAAAGCGGCA GTTGATAAAG 840

CCGTTGCATC CGGCGTCGTA GTCGTTGCGG CAGCCGGTAA CGAAGGCACT TCCGGCAGCT 900

CAAGCACAGT GGGCTACCCT GGTAAATACC CTTCTGTCAT TGCAGTAGGC GCTGTTGACA 960

GCAGCAACCA AAGAGCATCT TTCTCAAGCG TAGGACCTGA GCTTGATGTC ATGGCACCTG 1020

GCGTATCTAT CCAAAGCACG CTTCCTGGAA ACAAATACGG GGCGTACAAC GGTACGTCAA 1080

TGGCATCTCC GCACGTTGCC GGAGCGGCTG CTTTGATTCT TTCTAAGCAC CCGAACTGGA 1140

CAAACACTCA AGTCCGCAGC AGTTTAGAAA ACACCACTAC AAAACTTGGT GATTCTTTGT 1200

ACTATGGAAA AGGGCTGATC AACGTACAAG CGGCAGCTCA GTAAAACATA AAAAACCGGC 1260

CTTGGCCCCG CCGGTTTTTT ATTATTTTTC TTCCTCCGCA TGTTCAATCC GCTCCATAAT 1320

CGACGGATGG CTCCCTCTGA AAATTTTAAC GAGAAACGGC GGGTTGACCC GGCTCAGTCC 1380

CGTAACGGCC AACTCCTGAA ACGTCTCAAT CGCCGCTTCC CGGTTTCCGG TCAGCTCAAT 1440

GCCATAACGG TCGGCGGCGT TTTCCTGATA CCGGGAGACG GCATTCGTAA TCGGATC 1497

(2) SEQ ID NO:7 的讯息:

(i) 序列特性:

(A) 长度: 275 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 股: 单股

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:7:

Ala Gln Ser Val Pro Tyr Gly Val Ser Gln Ile Lys Ala Pro Ala Leu
1 5 10 15

His Ser Gln Gly Tyr Thr Gly Ser Asn Val Lys Val Ala Val Ile Asp
20 25 30

Ser Gly Ile Asp Ser Ser His Pro Asp Leu Lys Val Ala Gly Gly Ala
35 40 45

Ser Mer Val Pro Ser Glu Thr Asn Pro Phe Gln Asp Asn Asn Ser His
50 55 60

Gly Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly
65 70 75 80

Val Leu Gly Val Ala Pro Ser Ala Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu
85 90 95

Gly Ala Asp Gly Ser Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Asn Gly Ile Glu
100 105 110
Trp Ala Ile Ala Asn Asn Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly
115 120 12 5
Pro Ser Gly Ser Ala Ala Leu Lys Ala Ala Val Asp Lys Ala Val Ala
130 135 140
Ser Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Glu Gly Thr Ser Gly
145 150 155 160
Ser Ser Ser Thr Val Gly Tyr Pro Gly Lys Tyr Pro Ser Val Ile Ala
165 170 175
Val Gly Ala Val Asp Ser Ser Asn Gln Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val
180 185 190
Gly Pro Gly Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr
195 200 205
Leu Pro Gly Asn Lys Tyr Gly Ala Tyr Asn Gly Thr Ser Met Ala Ser
210 215 220
Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn
225 230 235 240
Trp Thr Asn Thr Gln Val Arg Ser Ser Leu Glu Asn Thr Thr Thr Lys
245 250 255
Leu Gly Asp Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Gln Ala
260 265 270
Ala Ala Gln
275

(2) SEQ ID NO:8 的讯息:

(i) 序列特性:

(A) 长度: 275 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 股: 单股

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:8:

Ala Gln Ser Val Pro Tyr Gly Ile Ser Gln Ile Lys Ala Pro Ala Leu
1 5 10 15
His Ser Gln Gly Tyr Thr Gly Ser Asn Val Lys Val Ala Val Ile Asp
20 25 30

Ser Gly Ile Asp Ser Ser His Pro Asp Leu Asn Val Arg Gly Gly Ala
35 40 45
Ser Phe Val Pro Ser Glu Thr Asn Pro Tyr Gln Asp Gly Ser Ser His
50 55 60
Gly Thr His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly
65 70 75 80
Val Leu Gly Val Ser Pro Ser Ala Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu
85 90 95
Asp Ser Thr Gly Ser Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Asn Gly Ile Glu
100 105 110
Trp Ala Ile Ser Asn Asn Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly
115 120 125
Pro Thr Gly Ser Thr Ala Leu Lys Thr Val Val Asp Lys Ala Val Ser
130 135 140
Ser Gly Ile Val Val Ala Ala Ala Ala Gly Asn Glu Gly Ser Ser Gly
145 150 155 160
Ser Thr Ser Thr Val Gly Tyr Pro Ala Lys Tyr Pro Ser Thr Ile Ala
165 170 175
Val Gly Ala Val Asn Ser Ser Asn Gln Arg Ala Ser Phe Ser Ser Ala
180 185 190
Gly Ser Glu Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr
195 200 205
Leu Pro Gly Gly Thr Tyr Gly Ala Tyr Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr
210 215 220
Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Thr
225 230 235 240
Trp Thr Asn Ala Gln Val Arg Asp Arg Leu Glu Ser Thr Ala Thr Tyr
245 250 255
Leu Gly Asn Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Gln Ala
260 265 270
Ala Ala Gln
275

(2) SEQ ID NO:9 的讯息:

(i) 序列特性:

(A) 长度: 274 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 股: 单股

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:9:

Ala Gln Thr Val Pro Tyr Gly Ile Pro Leu Ile Lys Ala Asp Lys Val
1 5 10 15
Gln Ala Gln Gly Phe Lys Gly Ala Asn Val Lys Val Ala Val Leu Asp
20 25 30
Thr Gly Ile Gln Ala Ser His Pro Asp Leu Asn Val Val Gly Gly Ala
35 40 45
Ser Phe Val Ala Gly Glu Ala Tyr Asn Thr Asp Gly Asn Gly His Gly
50 55 60
Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asp Asn Thr Thr Gly Val
65 70 75 80
Leu Gly Val Ala Pro Ser Val Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Asn
85 90 95
Ser Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Ser Gly Ile Val Ser Gly Ile Glu Trp
100 105 110
Ala Thr Thr Asn Gly Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Ala
115 120 125
Ser Gly Ser Thr Ala Met Lys Gln Ala Val Asp Asn Ala Tyr Ala Arg
130 135 140
Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Ser Gly Asn Ser Gly Ser
145 150 155 160
Thr Asn Thr Ile Gly Tyr Pro Ala Lys Tyr Asp Ser Val Ile Ala Val
165 170 175
Gly Ala Val Asp Ser Asn Ser Asn Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val Gly
180 185 190
Ala Glu Leu Glu Val Met Ala Pro Gly Ala Gly Val Tyr Ser Thr Tyr
195 200 205
Pro Thr Asn Thr Tyr Ala Thr Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Ser Pro
210 215 220
His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn Leu
225 230 235 240
Ser Ala Ser Gln Val Arg Asn Arg Leu Ser Ser Thr Ala Thr Tyr Leu
245 250 255
Gly Ser Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Glu Ala Ala
260 265 270
Ala Gln

(2) SEQ ID NO:10 的讯息:

(i) 序列特性:

(A) 长度: 269 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 股: 单股

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:10:

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

Val Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Ser Thr Tyr
195 200 205
Ala Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala
210 215 220
Ala Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile
225 230 235 240
Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Ser Leu Gly Ser Thr Asn Leu
245 250 255
Tyr Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
260 265

(2) SEQ ID NO:11 的讯息:

(i) 序列特性:

(A) 长度: 1140 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 股: 单股

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: DNA (基因组)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:11:

ATGAAGAAAC CGTTGGGGAA AATTGTCGCA AGCACCGCAC TACTCATTTC TGTTGCTTTT 60
AGTTCATCGA TCGCATCGGC TGCTGAAGAA GCAAAAGAAA AATATTTAAT TGGCTTTAAT 120
GAGCAGGAAG CTGTCAGTGA GTTTGTAGAA CAAGTAGAGG CAAATGACGA GGTCGCCATT 180
CTCTCTGAGG AAGAGGAAGT CGAAATTGAA TTGCTTCATG AATTTGAAAC GATTCCTGTT 240
TTATCCGTTG AGTTAAGCCC AGAAGATGTG GACGCGCTTG AACTCGATCC AGCGATTTCT 300
TATATTGAAG AGGATGCAGA AGTAACGACA ATGGCGCAAT CAGTGCCATG GGGAATTAGC 360
CGTGTGCAAG CCCCAGCTGC CCATAACCGT GGATTGACAG GTTCTGGTGT AAAAGTTGCT 420
GTCCTCGATA CAGGTATTTC CACTCATCCA GACTTAAATA TTCGTGGTGG CGCTAGCTTT 480
GTACCAGGGG AACCATCCAC TCAAGATGGG AATGGGCATG GCACGCATGT GGCCGGGACG 540
ATTGCTGCTT TAAACAATTC GATTGGCGTT CTTGGCGTAG CGCCGAGCGC GGAACTATAC 600
GCTGTTAAAG TATTAGGGGC GAGCGGTTCA GGTTCGGTCA GCTCGATTGC CCAAGGATTG 660
GAATGGGCAG GGAACAATGG CATGCACGTT GCTAATTTGA GTTTAGGAAG CCCTTCGCCA 720
AGTGCCACAC TTGAGCAAGC TGTTAATAGC GCGACTTCTA GAGGCGTTCT TGTTGTAGCG 780
GCATCTGGGA ATTCAGGTGC AGGCTCAATC AGCTATCCGG CCCGTTATGC GAACGCAATG 840
GCAGTCGGAG CTACTGACCA AAACAACAAC CGCGCCAGCT TTTCACAGTA TGGCGCAGGG 900
CTTGACATTG TCGCACCAGG TGTAAACGTG CAGAGCACAT ACCCAGGTTC AACGTATGCC 960
AGCTTAAACG GTACATCGAT GGCTACTCCT CATGTTGCAG GTGCAGCAGC CCTTGTTAAA 1020
CAAAAGAACC CATCTTGGTC CAATGTACAA ATCCGCAATC ATCTAAAGAA TACGGCAACG 1080
AGCTTAGGAA GCACGAACTT GTATGGAAGC GGACTTGTCA ATGCAGAAGC GGCAACACGC 1140

(2) SEQ ID NO:12 的讯息:

(i) 序列特性:

(A) 长度: 1140 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 股: 单股

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: DNA (基因组)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:12:

```
ATGAAGAAAC CGTTGGGGAA AATTGTCGCA AGCACCGCAC TACTCATTTC TGTTGCTTTT      60
AGTTCATCGA TCGCATCGGC TGCTGAAGAA GCAAAAGAAA AATATTTAAT TGGCTTTAAT     120
GAGCAGGAAG CTGTCAGTGA GTTTGTAGAA CAAGTAGAGG CAAATGACGA GGTCGCCATT     180
CTCTCTGAGG AAGAGGAAGT CGAAATTGAA TTGCTTCATG AATTTGAAAC GATTCCTGTT     240
TTATCCGTTG AGTTAAGCCC AGAAGATGTG GACGCGCTTG AACTCGATCC AGCGATTTCT     300
TATATTGAAG AGGATGCAGA AGTAACGACA ATGGCGCAAT CAGTGCCATG GGGAATTAGC     360
CGTGTGCAAG CCCCAGCTGC CCATAACCGT GGATTGACAG GTTCTGGTGT AAAAGTTGCT     420
GTCCTCGATA CAGGTATTTC CACTCATCCA GACTTAAATA TTCGTGGTGG CGCTAGCTTT     480
GTACCAGGGG AACCATCCAC TCAAGATGGG AATGGGCATG GCACGCATGT GGCCGGGACG     540
ATTGCTGCTT TAGACAACTC GATTGGCGTT CTTGGCGTAG CGCCGAGCGC GGAACTATAC     600
GCTGTTAAAG TATTAGGGGC GAGCGGTTCA GGCGCCATCA GCTCGATTGC CCAAGGATTG     660
GAATGGGCAG GGAACAATGG CATGCACGTT GCTAATTTGA GTTTAGGAAG CCCTTCGCCA     720
AGTGCCACAC TTGAGCAAGC TGTTAATAGC GCGACTTCTA GAGGCGTTCT TGTTGTAGCG     780
GCATCTGGGA ATTCAGGTGC AGGCTCAATC AGCTATCCGG CCCGTTATGC GAACGCAATG     840
GCAGTCGGAG CTACTGACCA AAACAACAAC CGCGCCAGCT TTTCACAGTA TGGCGCAGGG     900
CTTGACATTG TCGCACCAGG TGTAAACGTG CAGAGCACAT ACCCAGGTTC AACGTATGCC     960
AGCTTAAACG GTACATCGAT GGCTACTCCT CATGTTGCAG GTGCAGCAGC CCTTGTTAAA    1020
CAAAAGAACC CATCTTGGTC CAATGTACAA ATCCGCAATC ATCTAAAGAA TACGGCAACG    1080
AGCTTAGGAA GCACGAACTT GTATGGAAGC GGACTTGTCA ATGCAGAAGC GGCAACACGC    1140
```

(2) SEQ ID NO:13 的讯息:

(i) 序列特性:

(A) 长度: 30 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 股: 单股

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: DNA (基因组)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:13:

TATGCCAGCC ACAACGGTAC TTCGATGGCT 30

(2) SEQ ID NO:14 的讯息:

(i) 序列特性:

(A) 长度: 31 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 股: 单股

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: DNA (基因组)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:14:

CACAGTTGCG GCTCTAGATA ACTCAATCGG T 31

(2) SEQ ID NO:15 的讯息:

(i) 序列特性:

(A) 长度: 33 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 股: 单股

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: DNA (基因组)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:15:

GCTGACGGTT CCGGCGCTAT TAGTTGGATC ATT 33

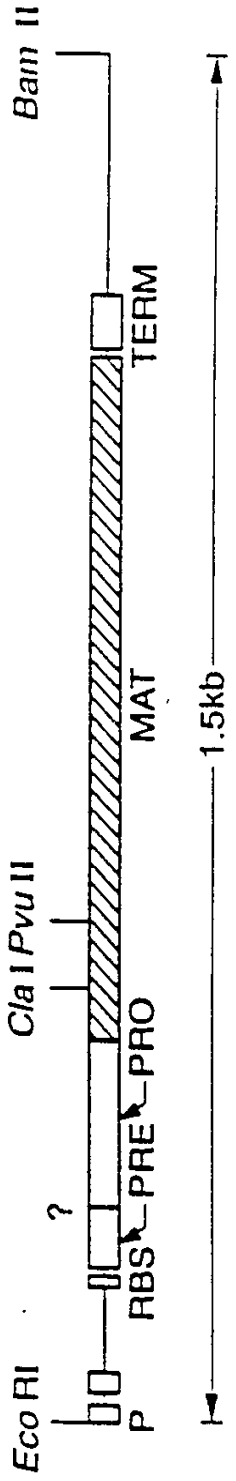


图_1A

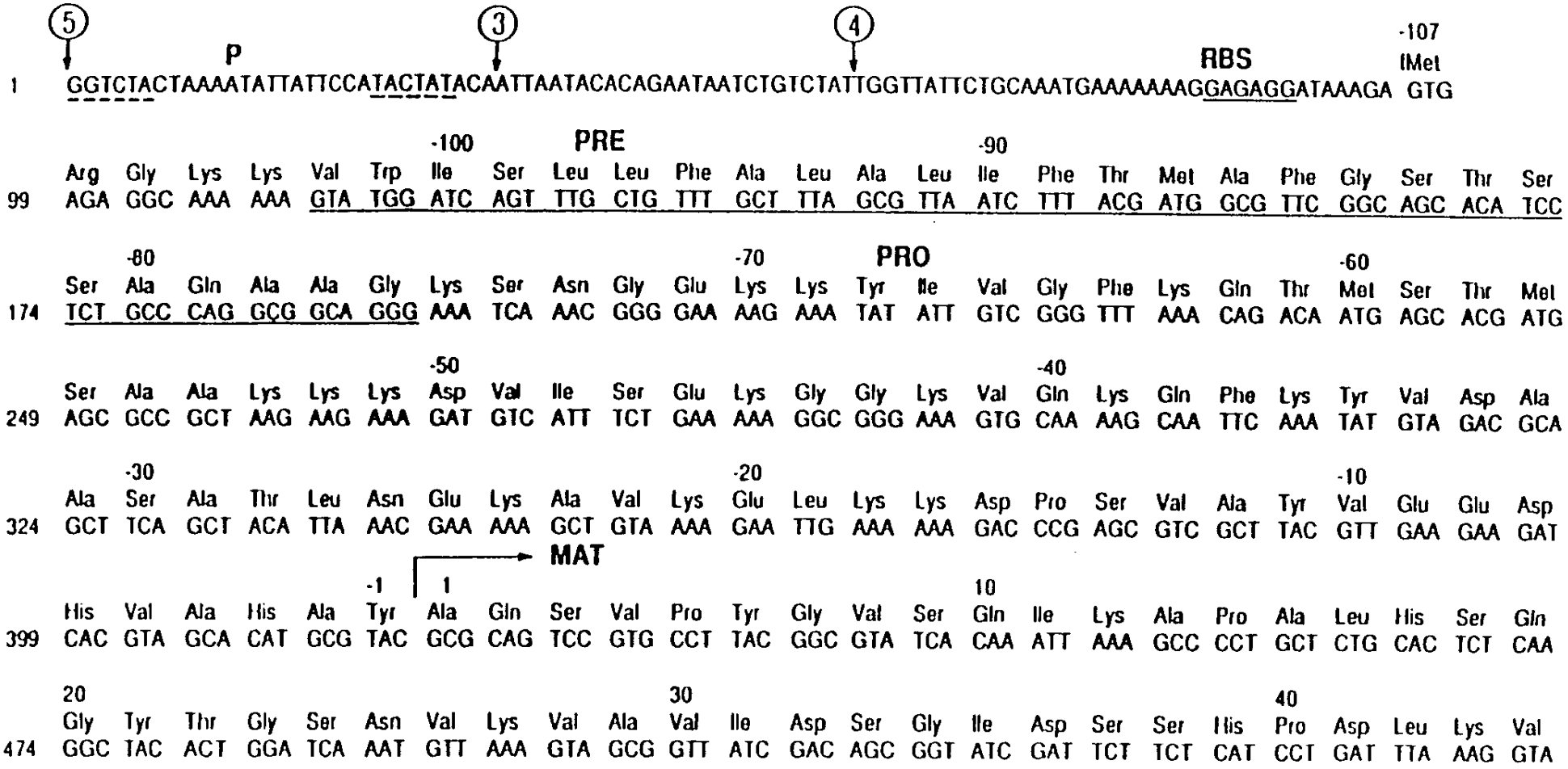

⑤
P
③
④
-107
RBS
1 GGTCTACTAAAATATTATTCCATACTATACAATTAATACACAGAATAATCTGTCTATTGGTTATTCTGCAAATGAAAAAAAGGAGAGGATAAAGA GTG
PRE
-100
-90
Arg Gly Lys Lys Val Trp Ile Ser Leu Leu Phe Ala Leu Ala Leu Ile Phe Thr Met Ala Phe Gly Ser Thr Ser
99 AGA GGC AAA AAA GTA TGG ATC AGT TTG CTG TTT GCT TTA GCG TTA ATC TTT ACG ATG GCG TTC GGC AGC ACA TCC
PRO
-80
-70
-60
Ser Ala Gln Ala Ala Gly Lys Ser Asn Gly Glu Lys Lys Tyr Ile Val Gly Phe Lys Gln Thr Met Ser Thr Met
174 TCT GCC CAG GCG GCA GGG AAA TCA AAC GGG GAA AAG AAA TAT ATT GTC GGG TTT AAA CAG ACA ATG AGC ACG ATG
-50
-40
Ser Ala Ala Lys Lys Lys Asp Val Ile Ser Glu Lys Gly Gly Lys Val Gln Lys Gln Phe Lys Tyr Val Asp Ala
249 AGC GCC GCT AAG AAG AAA GAT GTC ATT TCT GAA AAA GGC GGG AAA GTG CAA AAG CAA TTC AAA TAT GTA GAC GCA
-30
-20
-10
Ala Ser Ala Thr Leu Asn Glu Lys Ala Val Lys Glu Leu Lys Lys Asp Pro Ser Val Ala Tyr Val Glu Glu Asp
324 GCT TCA GCT ACA TTA AAC GAA AAA GCT GTA AAA GAA TTG AAA AAA GAC CCG AGC GTC GCT TAC GTT GAA GAA GAT
MAT
-1
1
10
His Val Ala His Ala Tyr Ala Gln Ser Val Pro Tyr Gly Val Ser Gln Ile Lys Ala Pro Ala Leu His Ser Gln
399 CAC GTA GCA CAT GCG TAC GCG CAG TCC GTG CCT TAC GGC GTA TCA CAA ATT AAA GCC CCT GCT CTG CAC TCT CAA
20
30
40
Gly Tyr Thr Gly Ser Asn Val Lys Val Ala Val Ile Asp Ser Gly Ile Asp Ser Ser His Pro Asp Leu Lys Val
474 GGC TAC ACT GGA TCA AAT GTT AAA GTA GCG GTT ATC GAC AGC GGT ATC GAT TCT TCT CAT CCT GAT TTA AAG GTA

图_1B - 1

						50						Pro	Asn			60	Asp							
	Ala	Gly	Gly	Ala	Ser	Met	Val	Pro	Ser	Glu	Thr	Asn	Pro	Phe	Gln	Asp	Asn	Asn	Ser	His	Gly	Thr	His	Val	Ala
549	GCA	GGC	GGA	GCC	AGC	ATG	GTT	CCT	TCT	GAA	ACA	AAT	CCT	TTC	CAA	GAC	AAC	AAC	TCT	CAC	GGA	ACT	CAC	GTT	GCC

	70										80								Ser	Ala	90				
	Gly	Thr	Val	Ala	Ala	Leu	Asn	Asn	Ser	Ile	Gly	Val	Leu	Gly	Val	Ala	Pro	Ser	Ala	Ser	Leu	Tyr	Ala	Val	Lys
624	GGC	ACA	GTT	GCG	GCT	CTT	AAT	AAC	TCA	ATC	GGT	GTA	TTA	GGC	GTT	GCG	CCA	AGC	GCA	TCA	CTT	TAC	GCT	GTA	AAA

				Asp	Ala	100										110									
	Val	Leu	Gly	Ala	Asp	Gly	Ser	Gly	Gln	Tyr	Ser	Trp	Ile	Ile	Asn	Gly	Ile	Glu	Trp	Ala	Ile	Ala	Asn	Asn	Met
699	GTT	CTC	GGT	GCT	GAC	GGT	TCC	GGC	CAA	TAC	AGC	TGG	ATC	ATT	AAC	GGA	ATC	GAG	TGG	GCG	ATC	GCA	AAC	AAT	ATG

	120									130									140					
	Asp	Val	Ile	Asn	Met	Ser	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Gly	Ser	Ala	Ala	Leu	Lys	Ala	Ala	Val	Asp	Lys	Ala	Val	Ala
774	GAC	GTT	ATT	AAC	ATG	AGC	CTC	GGC	GGA	CCT	TCT	GGT	TCT	GCT	GCT	TTA	AAA	GCG	GCA	GTT	GAT	AAA	GCC	GTT	GCA

						150								Ser	Thr	160								
	Ser	Gly	Val	Val	Val	Val	Ala	Ala	Ala	Gly	Asn	Glu	Gly	Thr	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Thr	Val	Gly	Tyr	Pro	Gly
849	TCC	GGC	GTC	GTA	GTC	GTT	GCG	GCA	GCC	GGT	AAC	GAA	GGC	ACT	TCC	GGC	AGC	TCA	AGC	ACA	GTG	GGC	TAC	CCT	GGT

	170										180								190					
	Lys	Tyr	Pro	Ser	Val	Ile	Ala	Val	Gly	Ala	Val	Asp	Ser	Ser	Asn	Gln	Arg	Ala	Ser	Phe	Ser	Ser	Val	Gly	Pro
924	AAA	TAC	CCT	TCT	GTC	ATT	GCA	GTA	GGC	GCT	GTT	GAC	AGC	AGC	AAC	CAA	AGA	GCA	TCT	TTC	TCA	AGC	GTA	GGA	CCT

						200										210								
	Glu	Leu	Asp	Val	Met	Ala	Pro	Gly	Val	Ser	Ile	Gln	Ser	Thr	Leu	Pro	Gly	Asn	Lys	Tyr	Gly	Ala	Tyr	Asn	Gly
999	GAG	CTT	GAT	GTC	ATG	GCA	CCT	GGC	GTA	TCT	ATC	CAA	AGC	ACG	CTT	CCT	GGA	AAC	AAA	TAC	GGG	GCG	TAC	AAC	GGT

	220										230									240				
	Thr	Ser	Met	Ala	Ser	Pro	His	Val	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	Leu	Ile	Leu	Ser	Lys	His	Pro	Asn	Trp	Thr	Asn	Thr
1074	ACG	TCA	ATG	GCA	TCT	CCG	CAC	GTT	GCC	GGA	GCG	GCT	GCT	TTG	ATT	CTT	TCT	AAG	CAC	CCG	AAC	TGG	ACA	AAC	ACT

图_1B-2

```
                                 250  Gln                                                  260
    Gln  Val  Arg  Ser  Ser  Leu  Glu  Asn  Thr  Thr  Thr  Lys  Leu  Gly  Asp  Ser  Phe  Tyr  Tyr  Gly  Lys  Gly  Leu  Ile  Asn
149 CAA  GTC  CGC  AGC  AGT  TTA  GAA  AAC  ACC  ACT  ACA  AAA  CTT  GGT  GAT  TCT  TTC  TAC  TAT  GGA  AAA  GGG  CTG  ATC  AAC

    270                      275
    Val  Gln  Ala  Ala  Ala  Gln  OC                    TERM
224 GTA  CAG  GCG  GCA  GCT  CAG  TAA  AACATAAAAAACCGGCCTTGGCCCCGCCGGTTTTTTATTTTTCTTCCTCCGCATGTTCAATCCGCTCC

316 ATAATCGACGGATGGCTCCCTCTGAAAATTTTAACGAGAAACGGCGGGTTGACCCGGCTCAGTCCCGTAACGGCCAAGTCCTGAAACGTCTCAATCGCCG

416 CTTCCCGGTTTCCGGTCAGCTCAATGCCGTAACGGTCGGCGGCGTTTTCCTGATACCGGGAGACGGCATTCGTAATCGGATC
```

图_1B - 3

图_1B

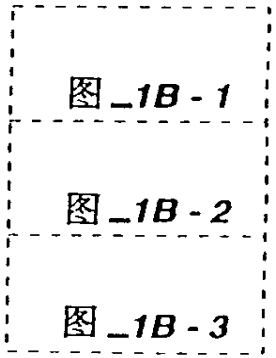


图_1B - 1

图_1B - 2

图_1B - 3

在由解淀粉芽孢杆菌得到的
枯草溶菌素中保存的残基

```
1                   10                  20
A Q S V P . G . . . . . A P A . H . . G

21                  30                  40
. T G S . V K V A V . D . G . . . . H P

41                  50                  60
D L . . . G G A S . V P . . . . . Q D

61                  70                  80
. N . H G T H V A G T . A A L N N S I G

81                  90                 100
V L G V A P S A . L Y A V K V L G A . G

101                 110                120
S G . . S . L . . G . E W A . N . . . .

121                 130                140
V . N . S L G . P S . S . . . . . A . .

141                 150                160
. . . . . G V . V V A A . G N . G . . .

161                 170                180
. . . . . Y P . . Y . . . . A V G A .

181                 190                200
D . . N . . A S F S . . G . . L D . . A

201                 210                220
P G V . . Q S T . P G . . Y . . . N G T

221                 230                240
S M A . P H V A G A A A L . . . K . . .

241                 250                260
W . . . Q . R . . L . N T . . . L G . .

261                 270
. . Y G . G L . N . . A A . .
```

图_2

来自解淀粉芽孢杆菌（B. amyloliquefaciens）
枯草杆菌（B. subtilis）
地衣芽孢杆菌（B. licheniformis）
迟缓芽孢杆菌（B. lentus）
中的枯草溶菌素序列的比较

```
01                  10                  20                  30
A Q S V P Y G V S Q I K A P A L H S Q G Y T G S N V K V A V I D S G I D S S H P
A Q S V P Y G I S Q I K A P A L H S Q G Y T G S N V K V A V I D S G I D S S H P
A Q T V P Y G I P L I K A D K V Q A Q G F K G A N V K V A V L D T G I Q A S H P
A Q S V P W G I S R V Q A P A A H N R G L T G S G V K V A V L D T G I S T * H P

41                  50                  60                  70
D L K V A G G A S M V P S E T N P F Q D N N S H G T H V A G T V A A L N N S I G
D L N V R G G A S F V P S E T N P Y Q D G S S H G T H V A G T I A A L N N S I G
D L N V V G G A S F V A G E A Y N * T D G N G H G T H V A G T V A A L D N T T G
D L N I R G G A S F V P G E * P S T Q D G N G H G T H V A G T I A A L N N S I G

81                  90                  100                 110
V L G V A P S A S L Y A V K V L G A D G S G Q Y S W I I N G I E W A I A N N M D
V L G V S P S A S L Y A V K V L D S T G S G Q Y S W I I N G I E W A I S N N M D
V L G V A P S V S L Y A V K V L N S S G S G S Y S G I V S G I E W A T T N G M D
V L G V A P S A E L Y A V K V L G A S G S G S V S S I A Q G L E W A G N N G M H

121                 130                 140                 150
V I N M S L G G P S G S A A L K A A V D K A V A S G V V V V A A A G N E G T S G
V I N M S L G G P T G S T A L K T V V D K A V S S G I V V A A A A G N E G S S G
V I N M S L G G A S G S T A M K Q A V D N A Y A R G V V V V A A A G N S G N S G
V A N L S L G S P S P S A T L E Q A V N S A T S R G V L V V A A S G N S G A G S
```

图_3A

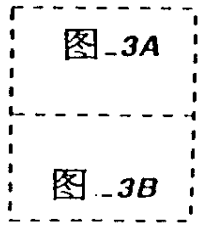
```
161                 170                 180                 190
S S S T V G Y P G K Y P S V I A V G A V D S S N Q R A S F S S V G P E L D V M A
S T S T V G Y P A K Y P S T I A V G A V N S S N Q R A S F S S A G S E L D V M A
S T N T I G Y P A K Y D S V I A V G A V D S N S N R A S F S S V G A E L E V M A
* * * * I S Y P A R Y A N A M A V G A T D Q N N N R A S F S Q Y G A G L D I V A

201                 210                 220                 230
P G V S I Q S T L P G N K Y G A Y N G T S M A S P H V A G A A A L I L S K H P N
P G V S I Q S T L P G G T Y G A Y N G T S M A T P H V A G A A A L I L S K H P T
P G A G V Y S T Y P T N T Y A T L N G T S M A S P H V A G A A A L I L S K H P N
P G V N V Q S T Y P G S T Y A S L N G T S M A T P H V A G A A A L V K Q K N P S

241                 250                 260                 270
W T N T Q V R S S L E N T T T K L G D S F Y Y G K G L I N V Q A A A Q
W T N A Q V R D R L E S T A T Y L G N S F Y Y G K G L I N V Q A A A Q
L S A S Q V R N R L S S T A T Y L G S S F Y Y G K G L I N V E A A A Q
W S N V Q I R N H L K N T A T S L G S T N L Y G S G L V N A E A A T R
```

图_3B

图_3



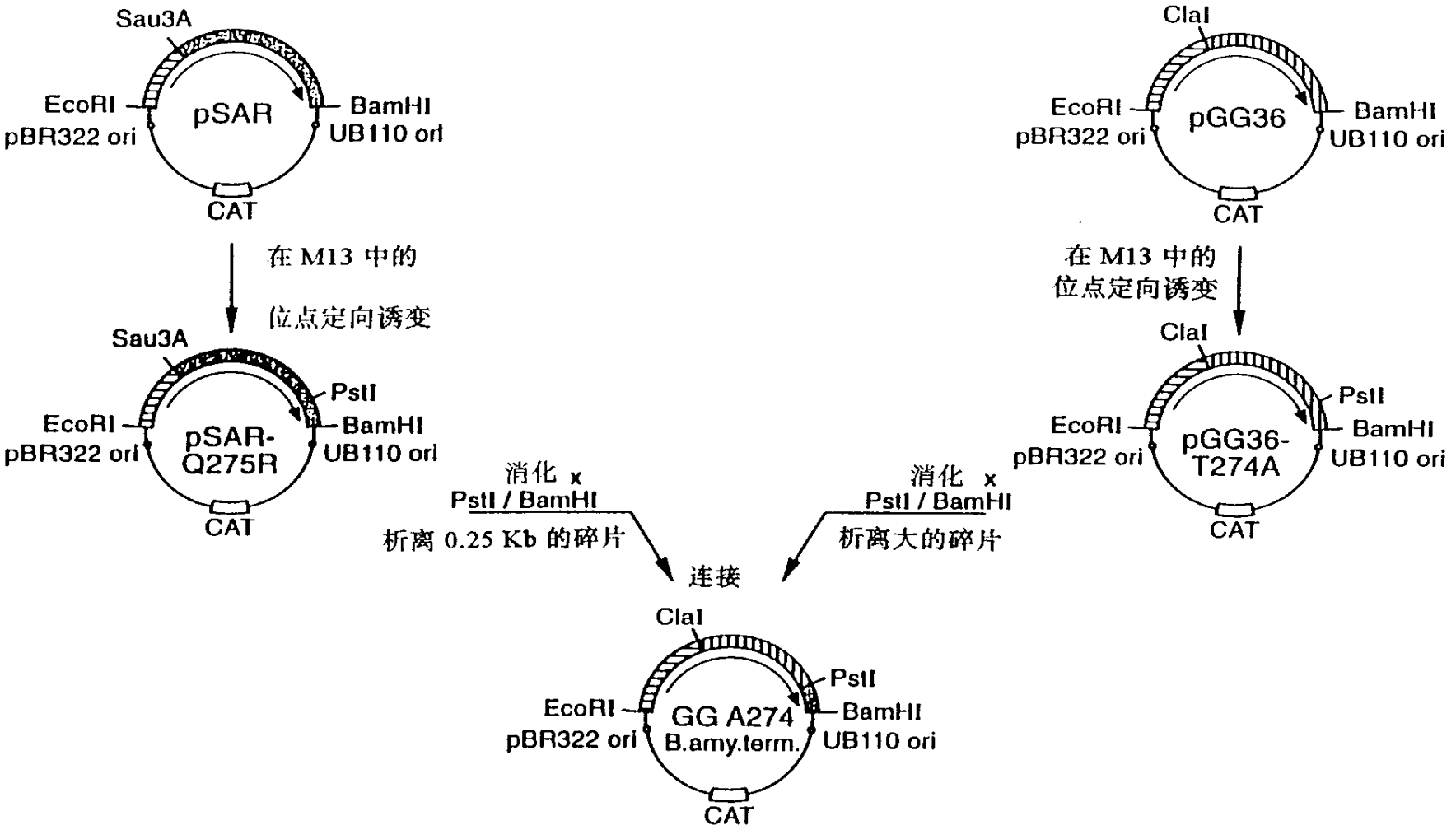

Sau3A
EcoRI
pBR322 ori
pSAR
BamHI
UB110 ori
CAT
在 M13 中的
位点定向诱变
Sau3A
PstI
EcoRI
pBR322 ori
pSAR-
Q275R
BamHI
UB110 ori
CAT
ClaI
EcoRI
pBR322 ori
pGG36
BamHI
UB110 ori
CAT
在 M13 中的
位点定向诱变
ClaI
PstI
EcoRI
pBR322 ori
pGG36-
T274A
BamHI
UB110 ori
CAT
消化 x
PstI / BamHI
析离 0.25 Kb 的碎片
消化 x
PstI / BamHI
析离大的碎片
连接
ClaI
PstI
EcoRI
pBR322 ori
GG A274
B.amy.term.
BamHI
UB110 ori
CAT

图_4

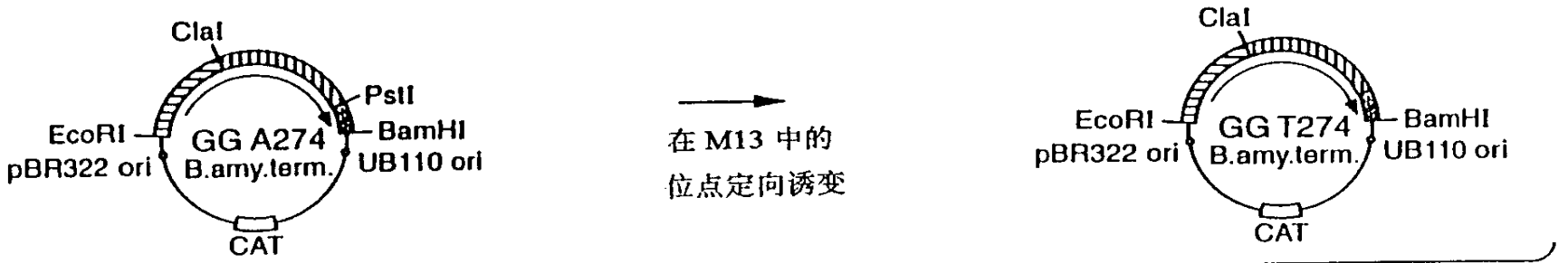

ClaI
PstI
EcoRI
BamHI
GG A274
pBR322 ori
B.amy.term.
UB110 ori
CAT
在 M13 中的
位点定向诱变
ClaI
EcoRI
BamHI
GG T274
pBR322 ori
B.amy.term.
UB110 ori
CAT

图 _5

```
        10                  30                  50
ATGAAGAAACCGTTGGGGAAAATTGTCGCAAGCACCGCACTACTCATTTCTGTTGCTTTT
MetLysLysProLeuGlyLysIleValAlaSerThrAlaLeuLeuIleSerValAlaPhe

        70                  90                  110
AGTTCATCGATCGCATCGGCTGCTGAAGAAGCAAAAGAAAAATATTTAATTGGCTTTAAT
SerSerSerIleAlaSerAlaAlaGluGluAlaLysGluLysTyrLeuIleGlyPheAsn

        130                 150                 170
GAGCAGGAAGCTGTCAGTGAGTTTGTAGAACAAGTAGAGGCAAATGACGAGGTCGCCATT
GluGlnGluAlaValSerGluPheValGluGlnValGluAlaAsnAspGluValAlaIle

        190                 210                 230
CTCTCTGAGGAAGAGGAAGTCGAAATTGAATTGCTTCATGAATTTGAAACGATTCCTGTT
LeuSerGluGluGluGluValGluIleGluLeuLeuHisGluPheGluThrIleProVal

        250                 270                 290
TTATCCGTTGAGTTAAGCCCAGAAGATGTGGACGCGCTTGAACTCGATCCAGCGATTTCT
LeuSerValGluLeuSerProGluAspValAspAlaLeuGluLeuAspProAlaIleSer

        310                 330                 350
TATATTGAAGAGGATGCAGAAGTAACGACAATGGCGCAATCAGTGCCATGGGGAATTAGC
TyrIleGluGluAspAlaGluValThrThrMetAlaGlnSerValProTrpGlyIleSer

        370                 390                 410
CGTGTGCAAGCCCCAGCTGCCCATAACCGTGGATTGACAGGTTCTGGTGTAAAAGTTGCT
ArgValGlnAlaProAlaAlaHisAsnArgGlyLeuThrGlySerGlyValLysValAla
```

图 _6A

```
        430                       450                       470
GTCCTCGATACAGGTATTTCCACTCATCCAGACTTAAATATTCGTGGTGGCGCTAGCTTT
ValLeuAspThrGlyIleSerThrHisProAspLeuAsnIleArgGlyGlyAlaSerPhe

        490                       510                       530
GTACCAGGGGAACCATCCACTCAAGATGGGAATGGGCATGGCACGCATGTGGCCGGGACG
ValProGlyGluProSerThrGlnAspGlyAsnGlyHisGlyThrHisValAlaGlyThr

        550                       570                       590
ATTGCTGCTTTAAACAATTCGATTGGCGTTCTTGGCGTAGCGCCGAGCGCGGAACTATAC
IleAlaAlaLeuAsnAsnSerIleGlyValLeuGlyValAlaProSerAlaGluLeuTyr

        610                       630                       650
GCTGTTAAAGTATTAGGGGCGAGCGGTTCAGGTTCGGTCAGCTCGATTGCCCAAGGATTG
AlaValLysValLeuGlyAlaSerGlySerGlySerValSerSerIleAlaGlnGlyLeu

        670                       690                       710
GAATGGGCAGGGAACAATGGCATGCACGTTGCTAATTTGAGTTTAGGAAGCCCTTCGCCA
GluTrpAlaGlyAsnAsnGlyMetHisValAlaAsnLeuSerLeuGlySerProSerPro

        730                       750                       770
AGTGCCACACTTGAGCAAGCTGTTAATAGCGCGACTTCTAGAGGCGTTCTTGTTGTAGCG
SerAlaThrLeuGluGlnAlaValAsnSerAlaThrSerArgGlyValLeuValValAla

        790                       810                       830
GCATCTGGGAATTCAGGTGCAGGCTCAATCAGCTATCCGGCCCGTTATGCGAACGCAATG
AlaSerGlyAsnSerGlyAlaGlySerIleSerTyrProAlaArgTyrAlaAsnAlaMet
```

图 _6B

```
        850                       870                       890
GCAGTCGGAGCTACTGACCAAAACAACAACCGCGCCAGCTTTTCACAGTATGGCGCAGGG
AlaValGlyAlaThrAspGlnAsnAsnAsnArgAlaSerPheSerGlnTyrGlyAlaGly

        910                       930                       950
CTTGACATTGTCGCACCAGGTGTAAACGTGCAGAGCACATACCCAGGTTCAACGTATGCC
LeuAspIleValAlaProGlyValAsnValGlnSerThrTyrProGlySerThrTyrAla

        970                       990                      1010
AGCTTAAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTGCAGGTGCAGCAGCCCTTGTTAAA
SerLeuAsnGlyThrSerMetAlaThrProHisValAlaGlyAlaAlaAlaLeuValLys

       1030                      1050                      1070
CAAAAGAACCCATCTTGGTCCAATGTACAAATCCGCAATCATCTAAAGAATACGGCAACG
GlnLysAsnProSerTrpSerAsnValGlnIleArgAsnHisLeuLysAsnThrAlaThr

       1090                      1110                      1130
AGCTTAGGAAGCACGAACTTGTATGGAAGCGGACTTGTCAATGCAGAAGCGGCAACACGC
SerLeuGlySerThrAsnLeuTyrGlySerGlyLeuValAsnAlaGluAlaAlaThrArg
```

图 _6C

图 _6

```
          10                  30                  50
ATGAAGAAACCGTTGGGGAAAATTGTCGCAAGCACCGCACTACTCATTTCTGTTGCTTTT
MetLysLysProLeuGlyLysIleValAlaSerThrAlaLeuLeuIleSerValAlaPhe

          70                  90                  110
AGTTCATCGATCGCATCGGCTGCTGAAGAAGCAAAAGAAAAATATTTAATTGGCTTTAAT
SerSerSerIleAlaSerAlaAlaGluGluAlaLysGluLysTyrLeuIleGlyPheAsn

         130                 150                 170
GAGCAGGAAGCTGTCAGTGAGTTTGTAGAACAAGTAGAGGCAAATGACGAGGTCGCCATT
GluGlnGluAlaValSerGluPheValGluGlnValGluAlaAsnAspGluValAlaIle

         190                 210                 230
CTCTCTGAGGAAGAGGAAGTCGAAATTGAATTGCTTCATGAATTTGAAACGATTCCTGTT
LeuSerGluGluGluGluValGluIleGluLeuLeuHisGluPheGluThrIleProVal

         250                 270                 290
TTATCCGTTGAGTTAAGCCCAGAAGATGTGGACGCGCTTGAACTCGATCCAGCGATTTCT
LeuSerValGluLeuSerProGluAspValAspAlaLeuGluLeuAspProAlaIleSer

         310                 330                 350
TATATTGAAGAGGATGCAGAAGTAACGACAATGGCGCAATCAGTGCCATGGGGAATTAGC
TyrIleGluGluAspAlaGluValThrThrMetAlaGlnSerValProTrpGlyIleSer

         370                 390                 410
CGTGTGCAAGCCCCAGCTGCCCATAACCGTGGATTGACAGGTTCTGGTGTAAAAGTTGCT
ArgValGlnAlaProAlaAlaHisAsnArgGlyLeuThrGlySerGlyValLysValAla
```

图_7A

```
        430                       450                       470
GTCCTCGATACAGGTATTTCCACTCATCCAGACTTAAATATTCGTGGTGGCGCTAGCTTT
ValLeuAspThrGlyIleSerThrHisProAspLeuAsnIleArgGlyGlyAlaSerPhe

        490                       510                       530
GTACCAGGGGAACCATCCACTCAAGATGGGAATGGGCATGGCACGCATGTGGCCGGGACG
ValProGlyGluProSerThrGlnAspGlyAsnGlyHisGlyThrHisValAlaGlyThr

        550                       570                       590
ATTGCTGCTTTAGACAACTCGATTGGCGTTCTTGGCGTAGCGCCGAGCGCGGAACTATAC
IleAlaAlaLeuAspAsnSerIleGlyValLeuGlyValAlaProSerAlaGluLeuTyr

        610                       630                       650
GCTGTTAAAGTATTAGGGGCGAGCGGTTCAGGCGCCATCAGCTCGATTGCCCAAGGATTG
AlaValLysValLeuGlyAlaSerGlySerGlyAlaIleSerSerIleAlaGlnGlyLeu

        670                       690                       710
GAATGGGCAGGGAACAATGGCATGCACGTTGCTAATTTGAGTTTAGGAAGCCCTTCGCCA
GluTrpAlaGlyAsnAsnGlyMetHisValAlaAsnLeuSerLeuGlySerProSerPro

        730                       750                       770
AGTGCCACACTTGAGCAAGCTGTTAATAGCGCGACTTCTAGAGGCGTTCTTGTTGTAGCG
SerAlaThrLeuGluGlnAlaValAsnSerAlaThrSerArgGlyValLeuValValAla

        790                       810                       830
GCATCTGGGAATTCAGGTGCAGGCTCAATCAGCTATCCGGCCCGTTATGCGAACGCAATG
AlaSerGlyAsnSerGlyAlaGlySerIleSerTyrProAlaArgTyrAlaAsnAlaMet
```

图 _7B

```
        850                       870                       890
GCAGTCGGAGCTACTGACCAAAACAACAACCGCGCCAGCTTTTCACAGTATGGCGCAGGG
AlaValGlyAlaThrAspGlnAsnAsnAsnArgAlaSerPheSerGlnTyrGlyAlaGly

        910                       930                       950
CTTGACATTGTCGCACCAGGTGTAAACGTGCAGAGCACATACCCAGGTTCAACGTATGCC
LeuAspIleValAlaProGlyValAsnValGlnSerThrTyrProGlySerThrTyrAla

        970                       990                      1010
AGCTTAAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTGCAGGTGCAGCAGCCCTTGTTAAA
SerLeuAsnGlyThrSerMetAlaThrProHisValAlaGlyAlaAlaAlaLeuValLys

       1030                      1050                      1070
CAAAAGAACCCATCTTGGTCCAATGTACAAATCCGCAATCATCTAAAGAATACGGCAACG
GlnLysAsnProSerTrpSerAsnValGlnIleArgAsnHisLeuLysAsnThrAlaThr

       1090                      1110                      1130
AGCTTAGGAAGCACGAACTTGTATGGAAGCGGACTTGTCAATGCAGAAGCGGCAACACGC
SerLeuGlySerThrAsnLeuTyrGlySerGlyLeuValAsnAlaGluAlaAlaThrArg
```

图_7C

图_7

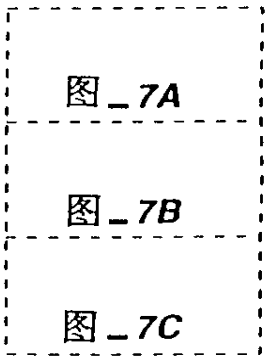
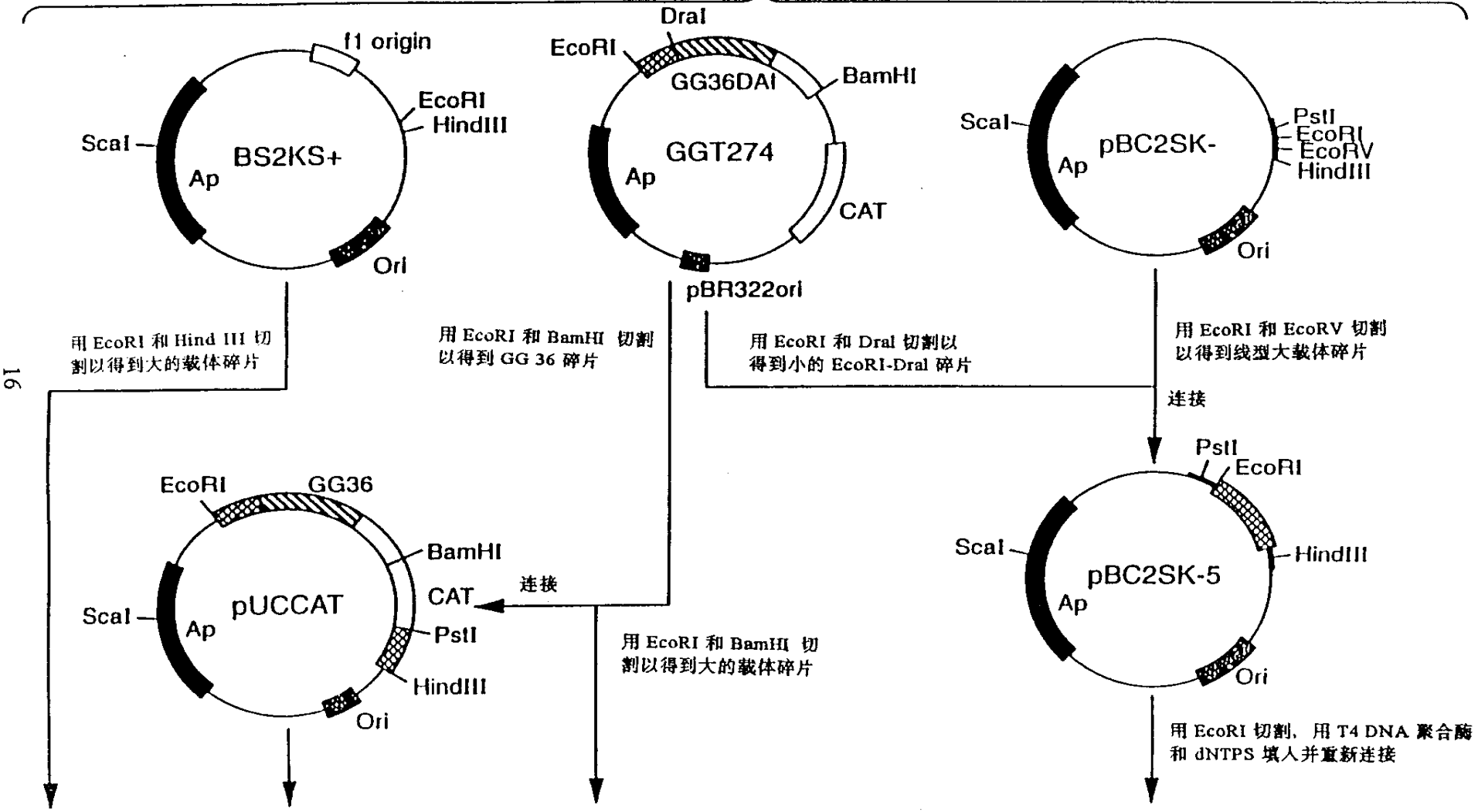


图 _8A


f1 origin
EcoRI
HindIII
ScaI
Ap
BS2KS+
Ori
DraI
EcoRI
GG36DAI
BamHI
GGT274
Ap
CAT
pBR322ori
ScaI
pBC2SK-
PstI
EcoRI
EcoRV
HindIII
Ap
Ori
用 EcoRI 和 Hind III 切割以得到大的载体碎片
用 EcoRI 和 BamHI 切割以得到 GG 36 碎片
用 EcoRI 和 DraI 切割以得到小的 EcoRI-DraI 碎片
用 EcoRI 和 EcoRV 切割以得到线型大载体碎片
连接
EcoRI
GG36
BamHI
CAT
ScaI
Ap
pUCCAT
PstI
HindIII
Ori
连接
用 EcoRI 和 BamHI 切割以得到大的载体碎片
PstI
EcoRI
ScaI
HindIII
pBC2SK-5
Ap
Ori
用 EcoRI 切割，用 T4 DNA 聚合酶和 dNTPS 填入并重新连接

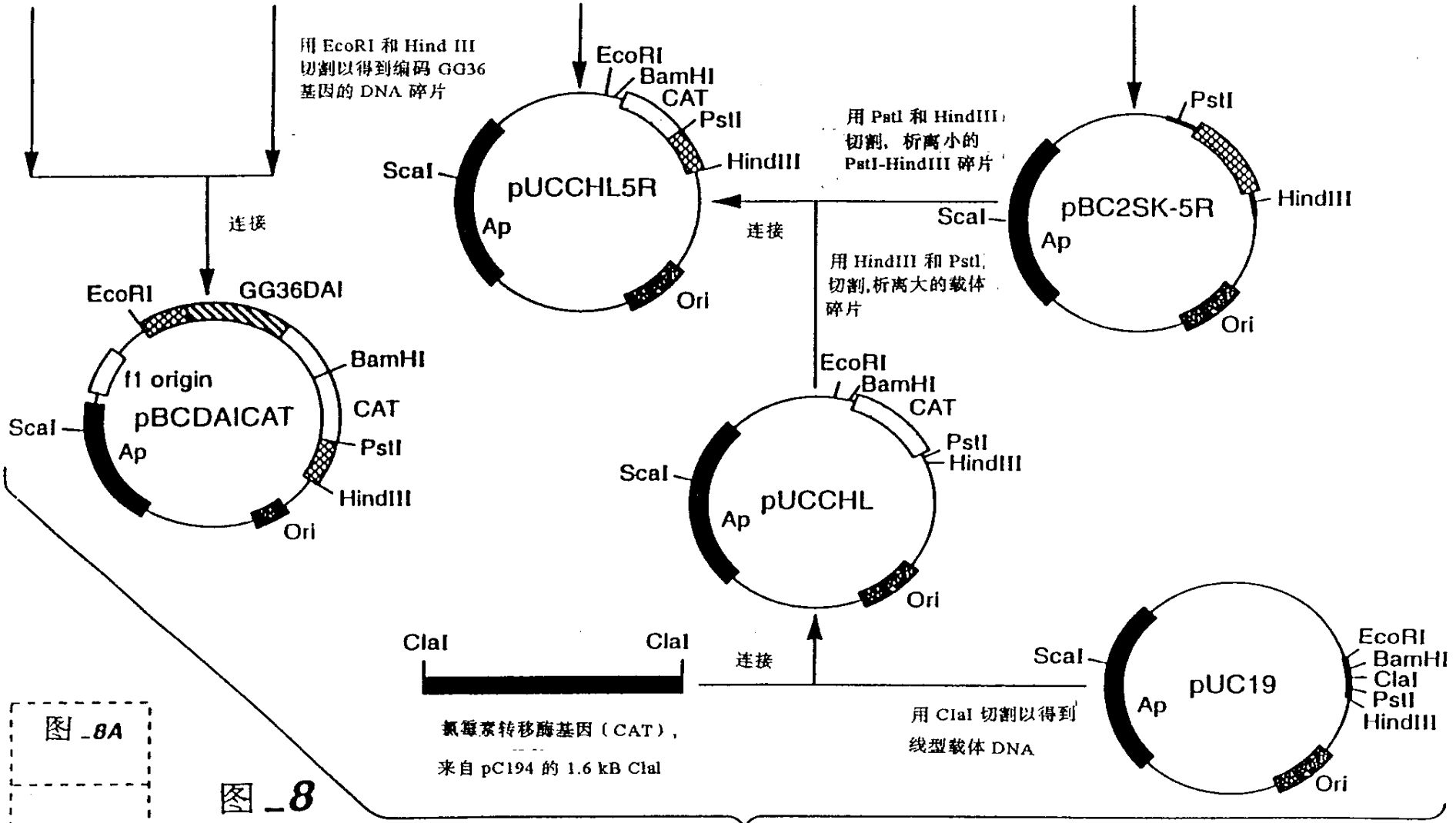


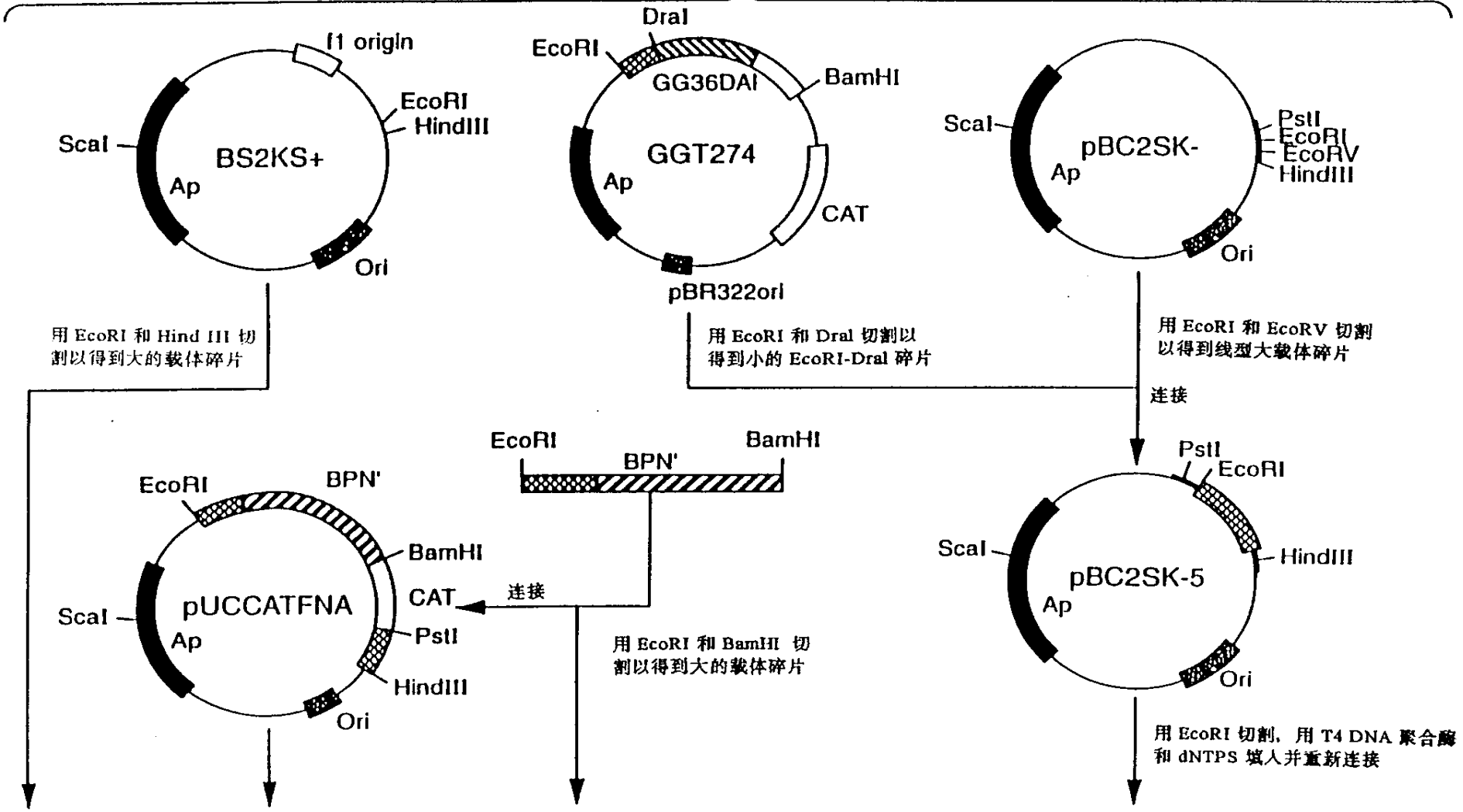
图_8A

图_8B

图_8

图_8B

图_9A


f1 origin
EcoRI
HindIII
ScaI
BS2KS+
Ap
Ori
DraI
EcoRI
GG36DAI
BamHI
GGT274
Ap
CAT
pBR322ori
ScaI
pBC2SK-
Ap
PstI
EcoRI
EcoRV
HindIII
Ori
用 EcoRI 和 Hind III 切割以得到大的载体碎片
用 EcoRI 和 DraI 切割以得到小的 EcoRI-DraI 碎片
用 EcoRI 和 EcoRV 切割以得到线型大载体碎片
连接
EcoRI
BPN'
BamHI
EcoRI
BPN'
BamHI
CAT
ScaI
pUCCATFNA
Ap
PstI
HindIII
Ori
连接
用 EcoRI 和 BamHI 切割以得到大的载体碎片
PstI
EcoRI
ScaI
pBC2SK-5
Ap
HindIII
Ori
用 EcoRI 切割，用 T4 DNA 聚合酶和 dNTPS 填入并重新连接

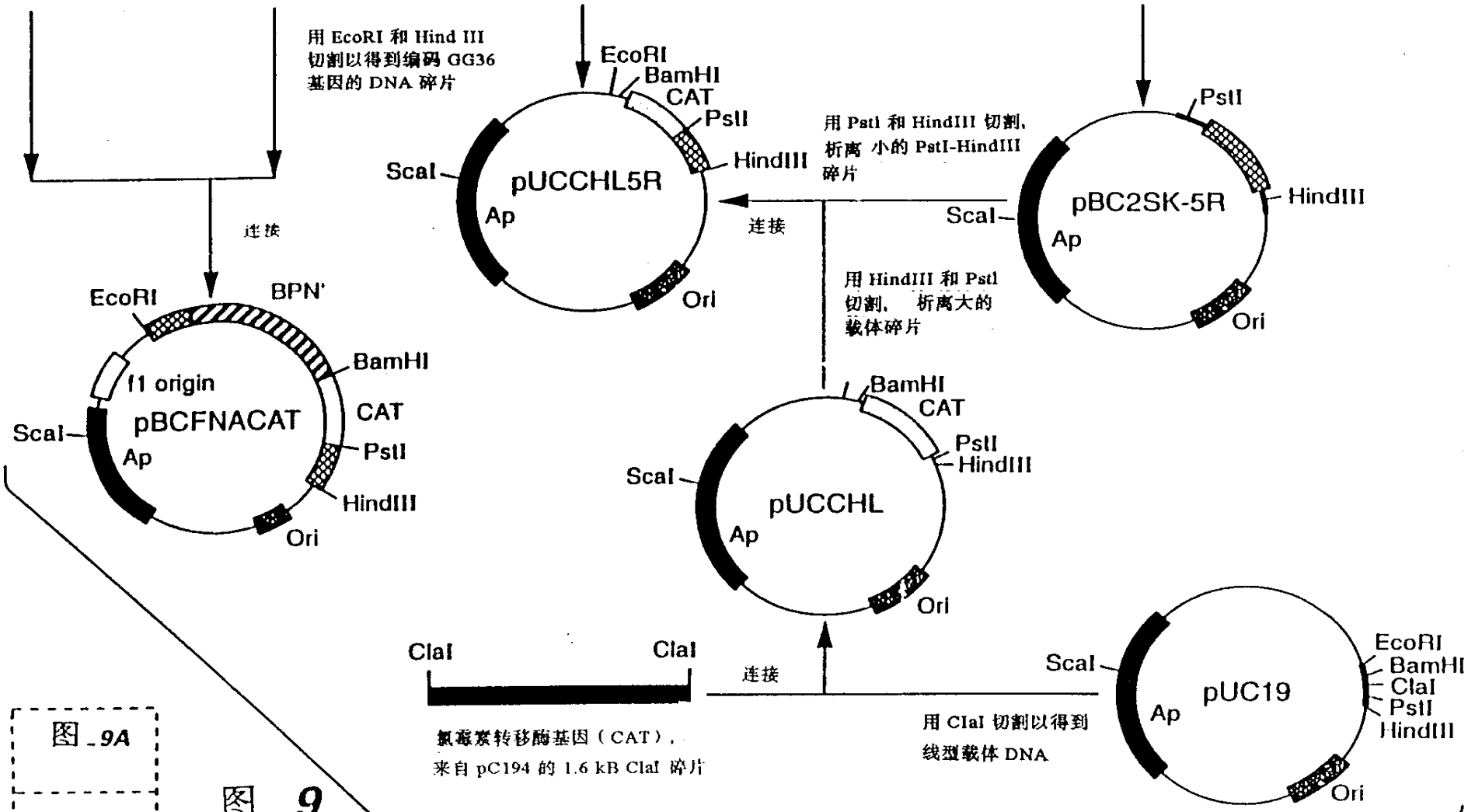


图_9A

图_9B

图_9

图_9B

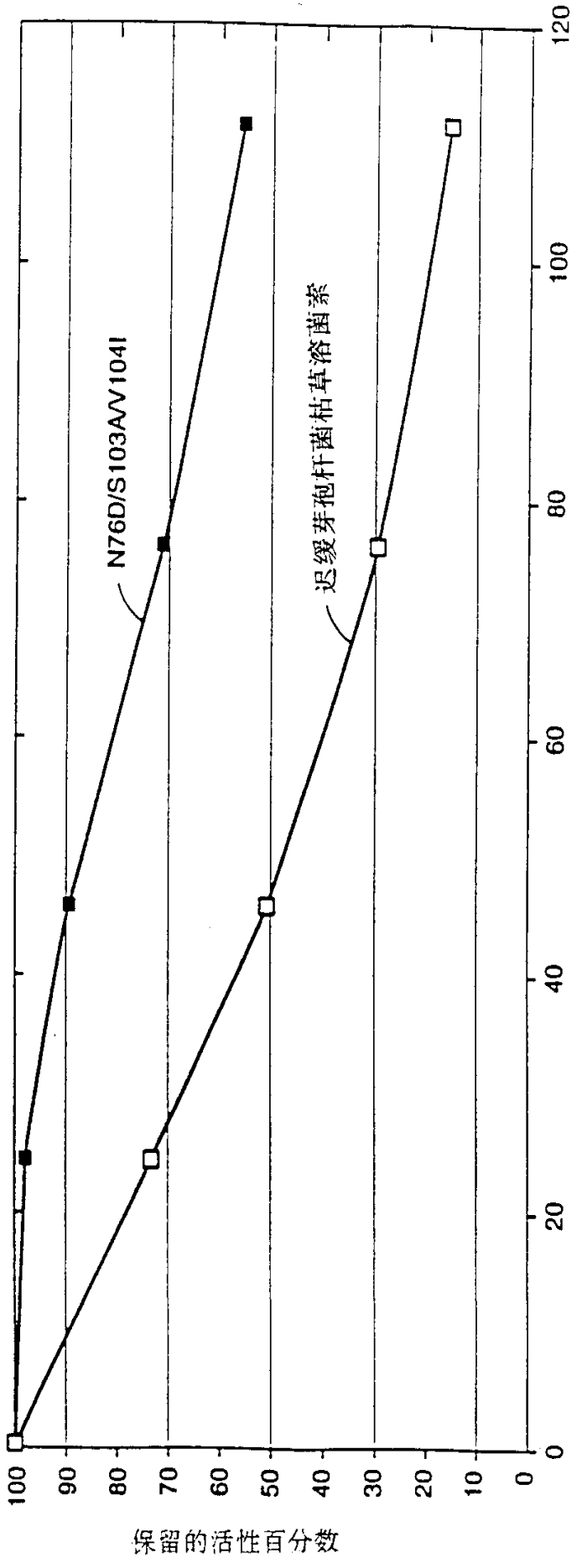

保留的活性百分数
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
20
40
60
80
100
120
时间（小时）
N76D/S103A/V104I
迟缓芽孢杆菌枯草溶菌素

图_10