



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106164237 B

(45) 授权公告日 2021.01.05

(21) 申请号 201580018726.0

(22) 申请日 2015.04.10

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106164237 A

(43) 申请公布日 2016.11.23

(30) 优先权数据
14164429.4 2014.04.11 EP
14166844.2 2014.05.02 EP
14172546.5 2014.06.16 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2016.10.09

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2015/057884 2015.04.10

(87) PCT国际申请的公布数据
W02015/155351 EN 2015.10.15

(73) 专利权人 诺维信公司
地址 丹麦鲍斯韦

(72) 发明人 L.E.T.巴尔特森 K.戈里
M.阿莱森-霍尔姆 K.M.施诺尔

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

代理人 张文辉

(51) Int.Cl.
C11D 3/386 (2006.01)
C12N 9/22 (2006.01)
C12N 15/55 (2006.01)

(56) 对比文件
W0 2011098579 A1,2011.08.18
CN 101815783 A,2010.08.25
W0 2010115156 A2,2010.10.07
W0 2009061380 A2,2009.05.14
US 2013052250 A1,2013.02.28
Rushizky等.Preparation and properties
of a new DNase from Aspergillus oryzae.
《Biochemistry》.1977,第3256-3261页.
Josefa Blaya等.Changes induced by
Trichoderma harzianum in suppressive
compost controlling Fusarium wilt.
《Pesticide biochemistry and physiology》
.2013,第112-119页.

审查员 李博

权利要求书1页 说明书74页
序列表4页

(54) 发明名称
洗涤剂组合物

(57) 摘要
本发明涉及包括脱氧核糖核酸酶(DNA酶)的
洗涤剂 and 药物组合物,其中该DNA酶获得自真菌
来源。本发明进一步涉及洗涤方法和DNA酶的用
途。本发明进一步涉及具有DNA酶活性的多肽、连
同生产这些多肽的方法。

1. 一种具有DNA酶活性的多肽,该多肽选自下组,该组由以下各项组成:
 - a. 与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少99%序列一致性的多肽;
 - b. 一种由与SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列或其cDNA序列具有至少99%序列一致性的多核苷酸编码的多肽。
2. 根据权利要求1所述的多肽,该多肽包括SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:2的成熟多肽或者由其组成。
3. 根据权利要求2所述的多肽,其中该成熟多肽是SEQ ID NO:2的氨基酸1至188。
4. 一种编码根据权利要求1-3中任一项所述的多肽的多核苷酸。
5. 一种核酸构建体或表达载体,该核酸构建体或表达载体包括如权利要求4所述的多核苷酸,该多核苷酸可操作地连接至指导多肽在表达宿主内产生的一个或多个控制序列。
6. 一种重组宿主细胞,该重组宿主细胞包括如权利要求4所述的多核苷酸,该多核苷酸可操作地连接至指导多肽的产生的一个或多个控制序列。
7. 一种产生如权利要求1-3中任一项所述的多肽的方法,该方法包括:在有益于产生该多肽的条件下培养一种细胞,该细胞处于其野生型形式时产生该多肽。
8. 如权利要求7所述的方法,该方法进一步包括回收该多肽。
9. 一种产生具有DNA酶活性的多肽的方法,该方法包括:在有益于产生该多肽的条件下培养如权利要求6所述的宿主细胞。
10. 如权利要求9所述的方法,该方法进一步包括回收该多肽。
11. 一种包括如权利要求1-3中任一项所述的多肽的全培养液配制品或细胞培养组合物。
12. 具有DNA酶活性的多肽用于从物品上防止、减少或去除生物膜,或用于防止、减少或去除物品的粘性,或用于预处理物品上的污渍,或用于防止、减少或去除洗涤循环过程中污垢的再沉积,或用于防止、减少或去除污垢在物品上的附着,或用于维持或改进该物品的白度的用途,其中该多肽获得自真菌来源并且该物品是纺织品,其中该多肽是如权利要求1-3任一项所述的多肽。
13. 一种洗涤剂组合物,该洗涤剂组合物包括具有DNA酶活性的多肽和洗涤剂佐剂成分,其中该多肽获得自真菌来源,其中该多肽是如权利要求1-3任一项所述的多肽。
14. 权利要求13所述的洗涤剂组合物,其中该多肽获得自木霉属。
15. 权利要求14所述的洗涤剂组合物,其中该多肽获得自哈茨木霉。

洗涤剂组合物

[0001] 对序列表的引用

[0002] 本申请包括计算机可读形式的序列表,将其通过引用结合在此。

发明领域

[0003] 本发明涉及包括脱氧核糖核酸酶 (DNA酶) 的洗涤剂 and 药物组合物,其中该DNA酶获得自真菌来源。本发明进一步涉及洗涤方法和DNA酶的用途。本发明进一步涉及具有DNA酶活性的多肽、连同生产这些多肽的方法。

[0004] 发明背景

[0005] 在许多自然、工业和医疗环境中,微生物一般附着于表面而生存,由包括生物聚合物和高分子的细胞外物质进行囊化。经粘液囊化的微生物所产生的层被称为生物膜。生物膜是细菌在自然环境中生长的主要模式,并且在生物膜中生长的细菌表现出独特的生理性质。与其浮游生长的对应物相比,生物膜中的细菌更耐受抗生素、紫外光照射、洗涤剂和宿主免疫应答。

[0006] 生物膜可以包括一种或多种微生物,包括革兰氏阳性和革兰氏阴性菌、藻类、原生动物、和/或酵母或丝状真菌和病毒和/或噬菌体。有问题的生物膜的实例是牙菌斑,医学植入物的上的感染,还有船体上的初始污染。生物膜归因于人类许多感染的发病机理,并且就暴露面的生物污着而论在工业中是一个显著问题,其中生物膜定植可以形成能够破坏并且干扰工业方法和组分的局部生态系统的基础组分。

[0007] 当使用衣物 (像T恤或运动衣) 时,它们暴露于来自使用者的身体和来自它们使用的环境的其余部分的细菌。这些细菌中的一些能够粘附于衣物物品并且在该物品上形成生物膜。细菌的存在意味着,衣物物品变得粘稠,并且因此污垢粘附在粘稠区域上。这种污垢已经显示出难以通过可商购的洗涤剂组合物来去除。此外,当非常脏的衣物物品与不太脏的衣物物品一起洗涤时,洗涤液中存在的污物倾向于附着于生物膜上。其结果是,该衣物物品在洗涤后比洗涤前更“脏”。此外,这些细菌是难闻的气味的来源,在对衣物物品使用后产生难闻的气味。难闻的气味难以去除,并且即使在洗涤后仍可存在。这种难闻的气味的的原因是细菌粘附到纺织品表面。由于粘附到纺织品上,即使洗涤后细菌仍可存在,并且继续成为难闻的气味的来源。

[0008] 国际专利申请W0 2011/098579涉及细菌脱氧核糖核酸酶化合物以及用于破坏和预防生物膜的方法。

发明内容

[0009] 本发明涉及包括脱氧核糖核酸酶 (DNA酶) 和洗涤剂佐剂成分的洗涤剂组合物,其中该DNA酶获得自真菌来源。

[0010] 本发明进一步涉及用于清洁或洗涤物品的清洁或洗涤方法,该方法包括以下步骤:

[0011] a. 将一种物品暴露于一种洗涤液,该洗涤液包括真菌DNA酶或包括真菌DNA酶的洗

涤剂组合物;

[0012] b.完成至少一个洗涤循环;以及

[0013] c.任选地冲洗该物品,

[0014] 其中该物品是一种纺织品。

[0015] 此外,要求保护的是DNA酶用于防止、减少或去除物品的生物膜的用途。

[0016] 本发明进一步涉及具有DNA酶活性的多肽以及生产该多肽的方法。

[0017] 本发明还涉及包括DNA酶和医疗装置的药物组合物。

[0018] 定义

[0019] 等位基因变体:术语“等位基因变体”意指占据同一染色体基因座的基因的两种或更多种可替代形式中的任一种。等位基因变异由突变天然产生,并且可以导致群体内多态性。基因突变可以是沉默的(在所编码的多肽中没有改变)或可编码具有改变的氨基酸序列的多肽。多肽的等位基因变体是由基因的等位基因变体编码的多肽。

[0020] 生物膜:生物膜是在表面上,例如纺织品、餐具或硬表面上,细胞彼此粘附在一起的任何群组的微生物。这些粘附细胞经常包埋在胞外高聚物(EPS)的自身产生的基质内。生物膜EPS是一般由细胞外的DNA、蛋白、和多糖组成的聚合物团块。生物膜可以形成在活的或非活的表面上。在生物膜中生长的微生物细胞与同一有机体的浮游细胞(相比之下,浮游细胞是可以在液体培养基中漂浮或浮游的单个细胞)是在生理上不同的。

[0021] 生活在生物膜中的细菌通常具有与同一物种的自由漂浮细菌显著不同的特性,因为被膜的密集并且受保护的环境允许它们以不同方式协作和相互作用。这一环境的一个益处是增加对洗涤剂和抗生素的抗性,因为,密集的细胞外基质和细胞的外层保护群落的内部。

[0022] 在衣物上,会发现产生生物膜的细菌是在以下物种中:不动杆菌属物种、气微菌属物种、短波单胞菌属物种、微杆菌属物种、膝黄微球菌、假单胞菌属物种、表皮葡萄球菌、和寡养单胞菌属物种。

[0023] cDNA:术语“cDNA”意指可以通过从得自真核或原核细胞的成熟的、剪接的mRNA分子进行反转录而制备的DNA分子。cDNA缺乏可以存在于对应基因组DNA中的内含子序列。早先的初始RNA转录本是mRNA的前体,其在呈现为成熟的剪接的mRNA之前要经一系列的步骤进行加工,包括剪接。

[0024] 编码序列:术语“编码序列”意指直接指定多肽的氨基酸序列的多核苷酸。编码序列的边界一般由一个开放阅读框架决定,该开放阅读框架从一个起始密码子(如ATG、GTG或TTG)开始并且以一个终止密码子(如TAA、TAG或TGA)结束。编码序列可以是基因组DNA、cDNA、合成DNA或其组合。

[0025] 色差(L值):Lab色彩空间是针对明度具有尺寸L的色彩对立的空间。L值,L*代表在L*=0下的最暗的黑色,并且为在L*=100下的最亮的白色。在本发明的上下文中,L值还称为色差。

[0026] 控制序列:术语“控制序列”意指对于表达编码本发明的成熟多肽的多核苷酸所必需的核酸序列。各个控制序列可以相对于编码多肽的多核苷酸是天然的(即,来自相同基因)或外源的(即,来自不同基因),或相对于彼此是天然的或外源的。此类控制序列包括但不限于前导子、多腺苷酸化序列、前肽序列、启动子、信号肽序列、以及转录终止子。至少,控

制序列包括启动子,以及转录和翻译终止信号。出于引入有利于将这些控制序列与编码多肽的多核苷酸的编码区连接的特异性限制酶切位点的目的,这些控制序列可以提供有多个接头。

[0027] 关于术语“深度清洁”意指生物膜或生物膜的组分,例如多糖、蛋白、DNA、污垢或生物膜中存在的其他组分的破坏或除去。

[0028] 洗涤剂佐剂成分:洗涤剂佐剂成分不同于本发明的DNA酶。这些额外佐剂组分的精确性质、其掺入水平将取决于组合物的物理形式和将在其中使用组合物的操作的性质。适合的佐剂材料包括,但不限于:以下描述的组分,如表面活性剂、助洗剂、絮凝助剂、螯合剂、染料转移抑制剂、酶、酶稳定剂、酶抑制剂、催化材料、漂白活化剂、过氧化氢、过氧化氢源、预形成的过酸、聚合的分散剂、粘土去污剂/抗再沉淀剂、增白剂、抑泡剂、染料、香料、结构弹力剂、织物柔软剂、载体、助水溶物、助洗剂和共助洗剂、织物调色剂、防沫剂、分散剂、加工助剂、和/或颜料。

[0029] 洗涤剂组合物:术语“洗涤剂组合物”是指用于从有待清洁的物品(例如纺织品)除去不希望的化合物的组合物。该洗涤剂组合物可以用于例如清洁纺织品,用于家用清洁剂和工业清洁二者。这些术语涵盖选择用于希望的具体类型的清洁组合物和产品的形式(例如,液体、凝胶、粉末、颗粒、糊状、或喷雾组合物)的任何材料/化合物,并且包括但不限于洗涤剂组合物(例如,液体和/或固体衣物洗涤剂和精细织物洗涤剂;织物清新剂;织物柔软剂;以及纺织品和衣物预去污剂/预处理)。除了包含本发明的酶之外,该洗涤剂配制品还可以包含一种或多种另外的酶(例如蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶、角质酶、纤维素酶、内切葡聚糖酶、木葡聚糖酶、果胶酶、果胶裂解酶、黄原胶酶、过氧化物酶、卤代过氧合酶、过氧化氢酶以及甘露聚糖酶,或其任何混合物),和/或组分,例如表面活性剂、助洗剂、螯合剂(chelator)或螯合试剂(chelating agent)、漂白系统或漂白组分、聚合物、织物调理剂、增泡剂、抑泡剂、染料、香料、酶暗抑制剂、光学增亮剂、杀细菌剂、杀真菌剂、污垢悬浮剂、防蚀剂、酶抑制剂或稳定剂、酶激活剂、一种或多种转移酶、水解酶、氧化还原酶、上蓝剂和荧光染料、抗氧化剂以及增溶剂。

[0030] DNA酶:术语“DNA酶”意指具有DNA酶活性的多肽,该多肽催化DNA主链中的磷酸二酯键的水解断裂,从而降解DNA。出于本发明的目的,根据测定I中所描述的程序确定DNA酶活性。在一方面,本发明的这些多肽具有SEQ ID NO:2的成熟多肽的至少20%,例如至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少100%的DNA酶活性。在一个实施例中,本发明的多肽具有改进的DNA酶活性,例如,这样使得该多肽的DNA酶活性是关于SEQ ID NO:2的成熟多肽的DNA酶活性的至少105%,例如,至少110%、至少120%、至少130%、至少140%、至少160%、至少170%、至少180%、或至少200%。

[0031] 酶洗涤益处:在此将术语“酶洗涤益处”定义为将一种酶添加至洗涤剂中与不具有该酶的同一洗涤剂相比的有利效果。可以由酶提供的重要的洗涤益处是在洗涤和/或清洁之后没有或有非常少的可见污垢的污渍去除,预防或减少在洗涤过程中释放的污垢的再沉积(一种也被称作抗再沉积的效果),完全或部分恢复纺织品的白度(一种也被称作增白的效果),这些纺织品初始是白色的但是在重复使用和洗涤后获得浅灰色或浅黄色的外观。不直接与污垢的催化去污或其再沉积的预防相关的纺织品护理益处对于酶洗涤益处而言也是重要的。此类纺织品护理益处的实例是预防或减少染料从一织物转移至另一织物或同一

织物的另一部分(一种也被称作染料转移抑制或抗返染的效果),从织物表面去除突出或断裂的纤维以减少起球倾向或去除已经存在的绒球或绒毛(一种也被称作抗起球的效果),改善织物柔软性,织物的颜色澄清以及去除陷在织物或服装的纤维中的微粒状污垢。酶漂白是一种另外的酶洗涤益处,其中通常将催化活性用于催化漂白组分(例如过氧化氢或其他过氧化物)的形成。

[0032] 表达:术语“表达”包括涉及多肽产生的任何步骤,包括但不限于,转录、转录后修饰、翻译、翻译后修饰、以及分泌。

[0033] 表达载体:术语“表达载体”意指线性或环状DNA分子,该分子包含编码多肽的多核苷酸并且该多核苷酸可操作地与提供用于其表达的控制序列相连接。

[0034] 片段:术语“片段”意指具有从成熟多肽或结构域的氨基和/或羧基端缺失的一个或多个(例如,若干个)氨基酸的多肽;其中片段具有DNA酶活性。在一方面,片段包含至少139个氨基酸残基(例如,SEQ ID NO:2的氨基酸50至188)、或至少188个氨基酸残基(例如,SEQ ID NO:2的氨基酸1至188)。

[0035] 真菌的:在本发明的上下文中,术语“真菌的”相对于多肽(如酶,例如,DNA酶)是指由真菌基因组编码并且因此直接从真菌基因组衍生的多肽,其中这种真菌未经过遗传修饰来编码所述多肽,例如,通过重组DNA技术将编码序列引入基因组中。因此,在本发明的上下文中,术语“真菌DNA酶”或“获得自真菌来源的具有DNA酶活性的多肽”是指由真菌基因组编码并且因此直接从真菌基因组衍生的DNA酶,其中该真菌物种未经受通过引入编码所述DNA酶的重组DNA进行的遗传修饰。因此,编码具有DNA酶活性的真菌多肽的核苷酸序列是真菌物种遗传背景中的天然序列。由这种序列编码的具有DNA酶活性的真菌多肽还可以是指野生型DNA酶(或亲本DNA酶)。在另一方面,本发明提供了具有DNA酶活性的多肽,其中所述多肽与真菌DNA酶基本上同源。在本发明的上下文中,术语“基本上同源”表示一种具有DNA酶活性的多肽,该多肽与所选择的真菌DNA酶的氨基酸序列具有至少80%,优选地至少85%,更优选地至少90%,更优选地至少95%,甚至更优选地至少96%、97%、98%,以及最优选地至少99%的一致性。与真菌DNA酶基本上同源的多肽可以被包括于本发明的洗涤剂中,和/或在本发明的方法中使用。

[0036] 宿主细胞:术语“宿主细胞”意指易于用包含本发明的多核苷酸的核酸构建体或表达载体转化、转染、转导等的任何细胞类型。术语“宿主细胞”涵盖由于复制期间发生的突变而与亲本细胞不同的亲本细胞的任何后代。

[0037] 改进的洗涤性能:术语“改进的洗涤性能”在此定义为相对于没有酶的同洗涤剂组合物的洗涤性能,展示出洗涤剂组合物中增加的洗涤性能的酶,例如,通过增加去污或较少的再沉积。术语“改进的洗涤性能”包括在衣物中的洗涤性能。

[0038] 分离的:术语“分离的”是指处于非天然发生的形式或环境中的物质。分离的物质的非限制性实例包括(1)任何非天然存在的物质,(2)包括但不限于任何酶、变体、核酸、蛋白、肽或辅因子的任何物质,该物质至少部分地从与其本质相关的一种或多种或所有天然存在的成分中去除;(3)相对于天然发现的物质通过人工修饰的任何物质;或(4)通过相对于与其天然相关的其他组分,增加物质的量而修饰的任何物质(例如,宿主细胞中的重组产生;编码该物质的基因的多个拷贝;以及比与编码该物质的基因天然相关联的启动子更强的启动子的使用)而修饰的任何物质。分离的物质可以存在于发酵液样品中,例如,可以将

宿主细胞进行遗传修饰来表达本发明多肽。来自宿主细胞的发酵液将包括分离的多肽。

[0039] 洗衣:术语“洗衣”涉及家用洗衣和工业洗衣两者并且意指用包含本发明的清洁或洗涤剂组合物的溶液处理纺织品的过程。洗衣过程可以例如使用例如家用或工业洗衣机进行或可以手动进行。

[0040] 关于术语“恶臭”意指在清洁物品上不希望的气味。清洁的物品应气味清新并且干净,而没有附着在该物品上的恶臭。恶臭的一个实例是具有使人不愉快的气味的化合物,这些化合物可以是微生物产生的。另一实例是令人不愉悦的气味可以是附着至已经与人类或动物接触的物品的汗水或体味。恶臭的另一实例可以是来自香料的气味,其粘附于物品,例如气味强烈的咖喱或其他异国香料。测量物品附着恶臭的能力的一个方式是通过使用在此披露的测定II。

[0041] 成熟多肽:术语“成熟多肽”意指在翻译和任何翻译后修饰如N-末端加工、C-末端截短、糖基化作用、磷酸化作用等之后处于其最终形式的多肽。在一方面,成熟多肽是SEQ ID NO:2的氨基酸1至188,并且SEQ ID NO:2的氨基酸-17至-1是信号肽。在本领域中已知的是,宿主细胞可以产生由相同多核苷酸表达的两种或更多种不同成熟多肽(即,具有一个不同的C-末端和/或N-末端氨基酸)的混合物。本领域还已知,不同的宿主细胞不同地加工多肽,并且因此一个表达一种多核苷酸的宿主细胞当与另一个表达相同多核苷酸的宿主细胞相比时可以产生一种不同的成熟多肽(例如,具有一个不同的C-末端和/或N-末端氨基酸)。在一方面,成熟多肽包含高达139个氨基酸残基(例如,SEQ ID NO:2的氨基酸50至188)、高达188个氨基酸残基(例如,SEQ ID NO:2的氨基酸1至188)。

[0042] 成熟多肽编码序列:术语“成熟多肽编码序列”意指编码具有DNA酶活性的成熟多肽的多核苷酸。在一方面,成熟多肽编码序列是SEQ ID NO:1的核苷酸52至864。在SEQ ID NO:1的序列:76-164、289-362和520-615中预测出三个内含子。分泌信号在位置1-51处。

[0043] 核酸构建体:术语“核酸构建体”意指单链或双链的核酸分子,该核酸分子是从天然存在的基因中分离的,或以本来不存在于自然界中的方式被修饰成含有核酸的区段,或是合成的,该核酸分子包括一个或多个控制序列。

[0044] 可操作地连接:术语“可操作地连接”意指如下的构造,其中,控制序列相对于多核苷酸的编码序列安置在适当位置处,从而使得该控制序列指导该编码序列的表达。

[0045] 药物佐剂成分意指适用于配制药物化合物的任何药物赋形剂。

[0046] 此类赋形剂、载体、运载体等对本领域中技术人员是熟知的,并且描述于如雷明顿药学大全,Mack出版公司,伊斯顿,宾夕法尼亚州,1985的教科书中。

[0047] 适用于片剂配制品中的药学上可接受的赋形剂包括例如惰性稀释剂如碳酸钙、碳酸钠、乳糖、磷酸钙或磷酸钠;制粒剂或崩解剂,例如玉米淀粉或海藻酸;粘合剂,例如淀粉、明胶或阿拉伯胶;以及润滑剂,例如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石粉。片剂可以是未包衣的,或者它们可以通过已知的技术来包衣以延迟在胃肠道中的崩解和吸收,并且由此在一个更长时期提供持久的作用。例如,可以采用延时材料,例如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯。

[0048] 针对硬胶囊配制品,可以将活性成分与惰性固体稀释剂例如碳酸钙、磷酸钙或高岭土混合。针对软胶囊剂配制品,可以将活性成分与水或油介质,例如,花生油、液体石蜡或橄榄油混合。

[0049] 适用于制造水性悬浮液的赋形剂包括助悬剂,例如,羧甲基纤维素钠,甲基纤维素,

羟丙基甲基纤维素,藻酸钠,聚乙烯基吡咯烷酮,黄蓍胶和阿拉伯胶;分散或润湿剂可以是天然磷脂,例如卵磷脂,或烯烃氧化物与脂肪酸的缩合产物,例如聚氧乙烯硬脂酸酯,或环氧乙烷与长链脂族醇的缩合产物,例如,十七亚乙基氧基鲸蜡醇,或环氧乙烷与获得自脂肪酸和己糖醇的偏酯的缩合产物,比如聚氧乙烯山梨醇单油酸酯,或环氧乙烷与获得自脂肪酸和己糖醇脱水物的偏酯的缩合产物,例如聚乙烯脱水山梨醇单油酸酯。

[0050] 水性混悬剂还可包含一或多种防腐剂,例如苯甲酸盐,如对羟基苯甲酸乙酯或对羟基苯甲酸正丙酯;一或多种着色剂;一或多种调味剂;以及一或多种甜味剂,例如蔗糖或糖精。

[0051] 含油悬浮液可以这样配制:将活性成分悬浮于植物油,例如花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油中,或于矿物质油比如液状石蜡中。所述油悬浮液可以含有增稠剂,例如蜂蜡、硬石蜡或十六烷醇。可以添加甜味剂和调味剂。这些组合物可以通过加入抗氧化剂,如抗坏血酸维生素C来保存。

[0052] 序列一致性:用参数“序列一致性”来描述两个氨基酸序列之间或两个核苷酸序列之间的相关性。出于本发明的目的,使用如在EMBOSS包(EMBOSS:欧洲分子生物学开放软件套件,赖斯(Rice)等人,2000,遗传学趋势(Trends Genet.) 16:276-277)(优选5.0.0版或更新版本)的尼德尔程序中所实施的尼德尔曼-翁施算法(尼德尔曼(Needleman)和翁施(Wunsch),1970,分子生物学杂志(J.Mol.Biol.) 48:443-453)来确定两个氨基酸序列之间的序列一致性。使用的参数为空位开放罚分(gap open penalty) 10,缺口延伸罚分(gap extension penalty) 0.5和EBLOSUM62(BLOSUM62的EMBOSS版)取代矩阵。尼德尔标注的“最长的一致性”的输出(使用-非简化选项获得)被用作百分比一致性,并且计算如下:

[0053] $(\text{一致的残基} \times 100) / (\text{比对长度} - \text{比对中的空位总数})$

[0054] 出于本发明的目的,使用如在EMBOSS包(EMBOSS:欧洲分子生物学开放软件套件,赖斯(Rice)等人,2000,见上文)(优选5.0.0版或更新版本)的尼德尔程序中所实施的尼德尔曼-翁施算法(尼德尔曼(Needleman)和翁施(Wunsch),1970,见上文)来确定两个脱氧核糖核苷酸序列之间的序列一致性。所使用的参数是空位开放罚分10,空位延伸罚分0.5,以及EDNAFULL(NCBI NUC4.4的EMBOSS版)取代矩阵。尼德尔标注的“最长的一致性”的输出(使用-非简化选项获得)被用作百分比一致性,并且计算如下:

[0055] $(\text{同样的脱氧核糖核苷酸} \times 100) / (\text{比对长度} - \text{比对中缺口的总数})$

[0056] 严格条件:术语“非常低严格条件”意指对于长度为至少100个核苷酸的探针而言,遵循标准DNA印迹程序,在42℃下在5X SSPE、0.3% SDS、200微克/ml剪切并变性的鲑鱼精子DNA和25%甲酰胺中预杂交和杂交12至24小时。最后在45℃下使用2X SSC、0.2% SDS将载体材料洗涤三次,每次15分钟。

[0057] 术语“低严格条件”意指对于长度为至少100个核苷酸的探针来说,遵循标准DNA印迹程序,在42℃下在5X SSPE、0.3% SDS、200微克/毫升剪切并变性的鲑鱼精子DNA和25%甲酰胺中预杂交和杂交12至24小时。最后在50℃使用2X SSC、0.2% SDS将载体材料洗涤三次,每次15分钟。

[0058] 术语“中严格条件”意指对于长度为至少100个核苷酸的探针来说,遵循标准DNA印迹程序,在42℃下在5X SSPE、0.3% SDS、200微克/毫升剪切并变性的鲑鱼精子DNA和35%甲酰胺中预杂交和杂交12至24小时。最后在55℃下使用2X SSC、0.2% SDS将载体材料洗涤三

次,每次15分钟。

[0059] 术语“中-高严格条件”意指对于长度为至少100个核苷酸的探针来说,遵循标准DNA印迹程序,在42℃下在5X SSPE、0.3%SDS、200微克/毫升剪切并变性的鲑鱼精子DNA和35%甲酰胺中预杂交和杂交12至24小时。最后在60℃使用2X SSC、0.2%SDS将载体材料洗涤三次,每次15分钟。

[0060] 术语“高严格条件”意指对于长度为至少100个核苷酸的探针来说,遵循标准DNA印迹程序,在42℃下在5X SSPE、0.3%SDS、200微克/毫升剪切并变性的鲑鱼精子DNA和50%甲酰胺中预杂交和杂交12至24小时。最后在65℃下使用2X SSC、0.2%SDS将载体材料洗涤三次,每次15分钟。

[0061] 术语“非常高严格条件”意指对于长度为至少100个核苷酸的探针来说,遵循标准DNA印迹程序,在42℃下在5X SSPE、0.3%SDS、200微克/毫升剪切并变性的鲑鱼精子DNA和50%甲酰胺中预杂交和杂交12至24小时。最后在70℃下使用2X SSC、0.2%SDS将载体材料洗涤三次,每次15分钟。

[0062] 子序列:术语“子序列”意指使一个或多个(例如,若干个)核苷酸从成熟多肽编码序列的5'端和/或3'端缺失的多核苷酸;其中该子序列编码具有DNA酶活性的片段。在一方面,子序列包含至少587个核苷酸(例如,SEQ ID NO:1的核苷酸278至864),至少650个核苷酸(例如,SEQ ID NO:1的核苷酸215至864),或至少816个核苷酸(例如,SEQ ID NO:1的核苷酸52至864)。

[0063] 纺织品:术语“纺织品”意指包括纱线、纱线中间体、纤维、非机织物材料、天然材料、合成材料、以及任何其他纺织品材料的任何纺织品材料,这些材料制造的织物和由这些织物制成的产品(例如服装和其他物品)。该纺织品或织物可以处于针织品、机织物、牛仔布、非机织物、毡、纱线、以及毛巾布的形式。这些纺织品可以是纤维素基的,如天然纤维素,包括棉、亚麻/亚麻布、黄麻、苧麻、剑麻或椰壳纤维或者人造纤维素(例如,来源于木浆),包括纤维胶/人造丝、醋酸纤维素纤维(三胞)、莱赛尔纤维(lyocell)或其共混物。纺织品或织物也可以不基于纤维素,如天然聚酰胺,包括羊毛、驼毛、羊绒、马海毛、兔毛和蚕丝或合成聚合物如尼龙、芳族聚酰胺、聚酯、丙烯酸、聚丙烯和氨纶/弹性纤维(spandex/elastane)、或其共混物其以及基于纤维素和不基于纤维素的纤维的共混物。共混物的实例是棉布和/或人造丝/纤维胶与一种或几种伴随材料的共混物,该伴随材料例如是羊毛、合成纤维(例如聚酰胺纤维、丙烯酸纤维、聚酯纤维、聚氯乙烯纤维、聚氨酯纤维、聚脲纤维、芳族聚酰胺纤维)和/或含纤维素的纤维(例如人造丝/纤维胶、苧麻、亚麻/亚麻布、黄麻、醋酸纤维素纤维、莱赛尔纤维)。织物可以是常规的可洗涤衣物,例如沾污的家居衣物。当使用术语织物或服装时,旨在也包括广义术语纺织品。在本发明的上下文中,术语“纺织品”还包括织物。

[0064] 变体:术语“变体”意指在一个或多个(例如,若干个)位置处包括改变(即,取代、插入和/或缺失)的具有DNA酶活性的一个多肽。取代意指占据一个位置的氨基酸替换不同的氨基酸;缺失意指去除占据一个位置的氨基酸;并且插入意指在邻接并且紧随占据一个位置的氨基酸之后添加一个氨基酸。在本发明的上下文中,所鉴别的DNA酶的变体具有亲本的酶活性,即,催化DNA主链中的磷酸二酯键水解断裂的能力(脱氧核糖核酸酶活性)。在一个实施例中,变体的脱氧核糖核酸酶活性关于亲本DNA酶是增加的,例如,SEQ ID NO:2的成熟多肽。

[0065] 洗涤周期:在此将术语“洗涤周期”定义为一个洗涤操作,其中将纺织品浸泡在洗液中,将某种机械作用施加至该纺织品,以释放污物,并且协助洗液流进和流出该纺织品,并且最终去除多余的洗液。在一个或多个洗涤周期后,总体上对该纺织品进行冲洗和干燥。

[0066] 洗液:在此将术语“洗液”定义为任选地包括本发明的酶的水和洗涤剂组合物的溶液或混合物。

[0067] 白度:在此将术语“白度”定义为在不同领域并且针对不同顾客具有不同含义的广义术语。白度的损失可以例如归因于灰化、黄化、或光学增亮剂/调色剂的去除。灰化和黄化可归因于污垢再沉积、身体污垢、来自例如铁和铜离子或染料转移的着色。白度可包括来自以下列表的一个或若干个问题:着色剂或染料作用;不完全污物去除(例如身体污垢、皮脂等);再沉积(物体的灰化、黄化或其他变色)(去除的污垢与纺织品的其他部分(弄脏的或未弄脏的)再关联);在应用过程中纺织品的化学变化;以及颜色的澄清或淡色化。

[0068] 本发明详细说明

[0069] 诸位发明人已经发现,具有脱氧核糖核酸酶(DNA酶)活性并且获得自真菌来源的多肽可以用于防止或去除物品如纺织品和/或织物上的生物膜。当物品上存在微生物并且在物品上粘在一起时,生物膜会在纺织品上发展。一些微生物倾向于粘附至物品(例如纺织品)的表面上。一些微生物粘附在此类表面上并且在表面上形成生物膜。生物膜可以是粘性的并且粘附的微生物和/或生物膜是难以除去的。此外,由于生物膜的粘性性质,生物膜粘附污垢。市场上可获得的商业衣物洗涤剂组合物并不除去此类粘附的微生物或生物膜。

[0070] 本发明涉及具有DNA酶活性的多肽用于从物品上防止、减少或除去生物膜的用途,其中具有DNA酶活性的多肽获得自真菌来源并且其中该物品是纺织品。在本发明的一个实施例中,具有DNA酶活性的多肽用于防止、减少或除去物品的粘性。可以将具有DNA酶活性的多肽进一步用于预处理纺织品或织物上的污渍,如具有附着于纺织品的明显量的生物膜的纺织品或织物。

[0071] 此外,本发明涉及具有DNA酶活性的多肽在洗涤循环过程中用于防止、减少或去除污垢再沉积的用途。当将该多肽用于例如纺织品或织物的洗涤中时,该多肽阻止洗涤液中存在的污垢沉积在纺织品或织物上。

[0072] 此外,本发明涉及具有DNA酶活性的多肽用于防止、减少或去除污垢在物品上的附着。在一个实施例中,该物品是纺织品或织物。当该污垢没有附着于该物品时,该物品显得更干净。因此,本发明进一步涉及具有DNA酶活性的多肽用于维持或改进该物品白度的用途。

[0073] 当使用物品(像T恤或运动衣)时,它们暴露于来自使用者的身体和来自它们使用的环境的其余部分的细菌。这能够引起物品上的恶臭,即使在洗涤该物品后。因此,本发明还涉及纺织品或织物上的恶臭的去除或减少。该恶臭可能由产生具有令人不愉快气味的化合物的细菌引起。此类具有令人不愉快气味的化合物的一个实例是E-2-壬烯醛。该恶臭可以存在于新洗的仍是湿的纺织品或织物上。或者该恶臭可以存在于新洗的基本上已经干了的纺织品或织物上。该恶臭还可以存在于纺织品或织物上,该纺织品在洗涤后储存了一段时间。本发明涉及从湿的或干的纺织品或织物减少或去除恶臭如E-2-壬烯醛。

[0074] 本发明进一步涉及包括具有DNA酶活性的多肽和洗涤剂佐剂成分的洗涤剂组合物,其中该DNA酶获得自真菌来源。本发明的洗涤剂组合物可以用于从物品上防止、减少或

去除生物膜,用于防止、减少或去除物品的粘性,用于预处理物品上的污渍,用于在洗涤循环过程中防止、用于减少或去除污垢在物品上的附着,用于维持或改进物品的白度并且用于防止、减少或去除物品的恶臭。本发明的洗涤剂组合物克服了现有技术的问题。

[0075] 诸位发明人出人意料地发现,当用其他洗涤剂酶进行配制时,获得自真菌来源的具有DNA酶活性的多肽比具有DNA酶活性的细菌多肽更稳定。尤其,诸位发明人已经发现在包括蛋白酶的组合物中配制获得自真菌来源的DNA酶时,真菌DNA酶比获得自细菌来源的细菌DNA酶更稳定。具有DNA酶活性的多肽可以获得自木霉属,例如,哈茨木霉。获得自哈茨木霉的具有DNA酶活性的多肽已经显示出当与蛋白酶一起配制时,比细菌DNA酶和蛋白酶的组合物更稳定。

[0076] 在本发明的一个实施例中,该洗涤剂组合物包括如在此要求保护的具有DNA酶活性的多肽。

[0077] 在本发明的一个实施例中,该洗涤剂佐剂成分选自下组,该组由以下各项组成:表面活性剂、助洗剂、絮凝助剂、螯合剂、染料转移抑制剂、酶、酶稳定剂、酶抑制剂、催化材料、漂白活化剂、过氧化氢、过氧化氢源、预形成的过酸、聚合的分散剂、粘土去污剂/抗再沉淀剂、增白剂、抑泡剂、染料、香料、结构弹力剂、织物柔软剂、载体、助水溶物、助洗剂和共助洗剂、织物调色剂、防沫剂、分散剂、加工助剂、和/或颜料。

[0078] 该洗涤剂佐剂成分可以是表面活性剂。在包括真菌DNA酶的洗涤剂组合物中包括表面活性剂的一个优势是洗涤性能得以改进。

[0079] 在一个实施例中,该洗涤剂佐剂成分是助洗剂或粘土去污剂/抗再沉淀剂。

[0080] 在一个实施例中,洗涤剂佐剂成分是酶。该洗涤剂组合物可以包括一种或多种酶。该一种或多种酶可以选自下组,该组由以下各项组成:蛋白酶、脂肪酶、角质酶、淀粉酶、糖酶、纤维素酶、果胶酶、甘露聚糖酶、阿拉伯糖酶、半乳聚糖酶、木聚糖酶和氧化酶。

[0081] 诸位发明人已经发现,当与其他酶一起配制时,获得自真菌来源的DNA酶显示出良好的稳定性。当将细菌DNA酶与其他酶如蛋白酶一起配制时,获得自细菌来源的DNA酶已经显示出具有不良的稳定性。诸位发明人已经发现,与获得自细菌来源的DNA酶相比,获得自真菌来源的DNA酶具有增加的稳定性。

[0082] 在本发明的一个实施例中,将本发明的洗涤剂组合物与一种蛋白酶一起配制,该蛋白酶是动物、植物或微生物来源的。将该蛋白酶进行化学修饰或蛋白质工程化。蛋白酶可以是丝氨酸蛋白酶或金属蛋白酶,优选是碱性微生物蛋白酶或胰蛋白酶样蛋白酶。

[0083] 在本发明的一个实施例中,该蛋白酶选自下组,该组由以下各项组成:芽胞杆菌属,例如,枯草杆菌蛋白酶诺和(Novo)、枯草杆菌蛋白酶嘉士伯、枯草杆菌蛋白酶309、枯草杆菌蛋白酶147、枯草杆菌蛋白酶168、牛源胰蛋白酶、猪源的胰蛋白酶和镰孢属蛋白酶。该蛋白酶可以与SEQ ID NO:7具有至少90%,如至少95%序列一致性。在一个实施例中,该蛋白酶与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少90%一致性、或在以下位置中的一个或多个具有取代的其变体:27、36、57、76、87、97、101、104、120、123、167、170、194、206、218、222、224、235、和274,优选地,该变体是与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少90%一致性的碱性蛋白酶,其具有以下取代:M222S或取代N76D+G195E。

[0084] 在一个实施例中,该洗涤剂组合物能够减少选自下组的细菌的附着至表面,该组由以下各项组成:不动杆菌属、气微菌属、短波单胞菌属、微杆菌属、膝黄微球菌、假单胞菌

属、表皮葡萄球菌以及寡养单胞菌属,或能够使细菌从它们粘附至其上的表面释放。

[0085] 在本发明的一个实施例中,该表面是纺织品表面。该纺织品可以由棉、棉/聚酯、聚酯、聚酰胺、聚丙烯和/或丝绸制成。

[0086] 该洗涤剂组合物可以被配制为条、均匀的片剂、具有两个或更多个层的片剂、具有一个或多个室的袋、规则的或压缩的粉末、颗粒、膏、凝胶、或规则的、压缩的或浓缩的液体。该洗涤剂组合物可以是液体洗涤剂、粉状洗涤剂或颗粒洗涤剂。

[0087] 本发明进一步涉及一种液体洗涤剂组合物,包括总浓度按重量计是至少3%的表面活性剂和洗涤剂助洗剂,和含洗涤剂酶的微囊,其中该微囊的膜是通过具有高于1kDa分子量的多支化的多胺的交联而产生。诸位发明人已经发现,将酶包封在本发明具有半透膜的微囊中,并且在这些囊(在添加至该液体洗涤剂之前)中具有高于该液体洗涤剂中的水活度时,当被添加到该洗涤剂(水正溢出)中时这些囊将经历(部分地)崩溃,因此在这些囊中留下更为浓缩的并且更粘的含酶内部。该膜的崩溃还可导致可透性的降低。这可以通过添加稳定剂/聚合物进一步使用,尤其是不会通过该膜可透的那些。该崩溃和所得黏度增加将降低/妨碍敌对组分(例如,表面活性剂或螯合剂)扩散进入这些囊中,并且因此增加液体洗涤剂中酶的储存稳定性。该液体洗涤剂中的对该酶敏感的组分(例如,充当该酶底物的组分)还被保护免于受该酶的降解。在洗涤过程中,该液体洗涤剂被水稀释,因此增加了水活度。水现在将扩散进这些囊(渗透作用)中。这些囊将溶胀并且该膜将变得对该酶可透过由此它们可以离开这些囊,或简单地胀裂并且以此方式释放该酶。该概念在稳定这些酶对抗液体洗涤剂中的敌对组分方面非常有效,反之亦然还保护该液体洗涤剂中酶敏感的组分不受酶的影响。

[0088] 对酶敏感并且可以被酶降解的洗涤剂组分的实例包括(括号中的相关酶):黄原胶(黄原胶酶)、具有酯键的聚合物(脂肪酶)、氢化蓖麻油(脂肪酶)、香料(脂肪酶)、甲酯磺酸盐表面活性剂(脂肪酶)、纤维素和纤维素衍生物(例如,CMC)(纤维素酶)、和糊精和环糊精(淀粉酶)。

[0089] 敏感的洗涤剂成分还可以被囊化,并且由此被稳定化在本发明的微囊中。敏感的洗涤剂成分在储存期间易于降解。这类洗涤剂成分包括漂白化合物、漂白活化剂、香料、聚合物、助洗剂、表面活性剂等。

[0090] 通常,本发明的微囊可以被用于分离洗涤剂中不相容的组分/化合物。

[0091] 将这些微囊添加到洗涤剂中可以被用于影响该洗涤剂产品的可视外观,例如不透光效应(小型微囊)或明显可见的颗粒(大型微囊)的效应。这些微囊也可以是着色的。

[0092] 这些微囊可以被用于在处理和加工酶产品期间降低酶尘埃水平。

[0093] 除非另外指明,贯穿本申请所有的百分比指示为重量百分比(%w/w)。

[0094] 微囊:典型地,这些微囊通过将水滴形成不可与水混溶的连续体而产生-即典型地通过制备一种油包水乳剂-并且随后通过界面聚合经由添加一种交联剂形成该膜。在最终固化之后,可以收获这些囊并进行进一步清洗并通过本领域已知的方法进行配制。随后将该囊配制品加入该洗涤剂中。

[0095] 有效负载、有待囊化的主膜成分和最终另外的组分是在水相中发现的。在该连续体中发现了稳定化这些水滴趋向凝聚的组分(乳化剂、乳化稳定剂、表面活性剂等),并且还通过该连续体添加该交联剂。

[0096] 可以通过本领域中任何方法来制备该乳剂,例如,通过机械搅动、滴注方法、膜乳化、微流体技术、超声处理等。在一些情况下,这些相的简单混合将自动导致一种乳剂,通常被称为自乳化。使用方法导致一个窄的粒度分布是有利的。

[0097] 随后典型地将该或这些交联剂加入该乳剂中,这是直接或更典型地通过制备交联剂在一种溶剂中的溶液,该溶剂在连续相中是可溶的。该乳剂和交联剂或其溶液可以通过本领域中常规使用的方法来混合,例如,通过简单混合或通过仔细地控制该乳剂以及该交联剂溶液流动通过一个串联混合器。

[0098] 在一些情况下,需要固化这些囊来完成膜的形成。固化经常是简单的搅拌这些囊一段时间以允许界面聚合反应结束。在其他情况下,该膜的形成可以通过添加反应淬灭剂来终止。

[0099] 这些囊可以被后修饰,例如通过使组分反应到该膜上以阻碍或减少这些颗粒在如在WO 99/01534中所述的洗涤剂中的絮凝。

[0100] 可以通过本领域中已知的方法分离或浓缩这些产生的囊,例如,通过过滤、离心、蒸馏或倾析该囊分散体。

[0101] 这些所得囊可以被进一步配制,例如,通过添加表面活性剂以赋予产物对于存储、运输和稍后处理以及添加至洗涤剂的所需性质。其他微囊配制剂包括流变改性剂、杀生物剂(例如,Proxel)、用于pH调节的酸/碱(其也将这些微囊内调节)、以及用于调节水活度的水。

[0102] 该囊形成方法可以包括以下步骤:

[0103] -制备初始的一个或多个水相和油相,

[0104] -形成油包水乳剂,

[0105] -通过界面聚合形成膜,

[0106] -任选的后修饰,

[0107] -任选的分选和/或配制,

[0108] -添加至洗涤剂。

[0109] 该方法可以是一个分批法或是一个连续或半连续方法。

[0110] 根据本发明的微囊是小型的水性球体,其周围有一个均匀的膜。该微囊内部的材料被称为核心、内相、或填充物,而该膜有时被称为壳、包衣、或壁。本发明的这些微囊具有在0.5 μm 和2毫米之间的直径。优选地,这些微囊的平均直径是在1 μm 至1000 μm 的范围中,更优选地在5 μm 至500 μm 的范围中,甚至更优选地在10 μm 至500 μm 的范围中,甚至更优选地在50 μm 至500 μm 的范围中,并且最优选地在50 μm 至200 μm 的范围中。可替代地,这些微囊的直径是在0.5 μm 至30 μm 的范围中;或在1 μm 至25 μm 的范围中。该微囊的直径是当聚合作用完成之后在油相中测定的。该囊的直径可以根据周围化学环境的水活度改变。

[0111] 酶的微囊化(如本发明中所用的)可以通过界面聚合来进行,其中聚合反应中的这两种反应物在一个界面处相遇并且快速反应。这一方法的基础是多胺与酸衍生物的反应,通常是酸性卤化物,充当一种交联剂。该多胺优选地是基本上水溶性的(当处于游离碱形式时)。在正确的条件下,柔性薄膜在该界面处快速形成。进行该聚合作用的一种方式是使用该酶和多胺的一种水性溶液,其与一种非水溶剂(以及一种乳化剂)进行乳化,并添加包含该酸衍生物的溶液。该酶溶液中可以存在碱剂以中和在该反应过程中形成的酸。聚合物(聚

酰胺)膜在这些乳滴的界面处立即形成。该微囊的聚合物膜典型地具有阳离子性质,并且因此与具有阴离子性质的化合物结合/络合。

[0112] 这些微囊的直径是通过这些乳滴的大小而确定的,乳滴的大小通过例如搅拌速率来控制。

[0113] 乳剂:乳剂是一个液相在第二液相内暂时或永久的分散体。该第二液相通常被称为连续相。表面活性剂通常用于帮助乳剂的形成和稳定。不是所有的表面活性剂都能同样地稳定乳剂。需要针对最优乳剂效用选择表面活性剂的类型和数量,尤其是对于该乳剂的制备和物理稳定性,以及在稀释或进一步加工过程中的稳定性。物理稳定性是指将乳剂以分散体形式进行维持。例如凝聚、聚合、吸附至容器壁、沉降和乳油化的过程是物理不稳定性的多种形式,并且应被避免。合适的表面活性剂的实例描述于W0 97/24177,第19-21页;以及W0 99/01534中。

[0114] 可以将乳剂进一步分类为简单的乳剂,其中该分散的液相是一种简单的均质液体,或一种更复杂的乳剂,其中该分散的液相是液相或固相的非均质组合,例如双重乳剂或复合型乳剂。例如,可以形成一种油包水双重乳剂或复合型乳剂,其中该水相本身进一步含有乳化的油相;这种类型的乳剂可以被指定为一种油包水包油(o/w/o)乳剂。可替代地,可以形成油包水乳剂,其中该水相含有分散的固相,通常被称为一种悬浮液-乳剂。可以描述其他更复杂的乳剂。因为在描述这类系统方面固有的困难,术语乳剂用于描述简单和更复杂的乳剂两者,不必要限制乳剂的形式或存在的相类型和相数。

[0115] 多胺:膜的刚性/柔性和可透性主要受多胺选择的影响。根据本发明的多胺是一种多支化的多胺。每个分支(优选地以一个伯氨基团结束)充当膜网络中的一个系拴点,从而产生本发明的有利性质。根据本发明的多支化的多胺是一种具有多于两个分支点和多于两个反应性氨基的多胺(能够与交联剂反应,即,伯氨基团和仲氨基团)。当制备该乳剂时,该多支化的多胺被用作起始材料-它不是从其他起始材料原位形成的。为了得到本发明引人注目的特性,该多胺的多支化结构必须作为起始材料存在。

[0116] 分支点数目和伯胺数目之间存在密切的关系,由于伯胺将总是位于分支的末端:一个线性胺只能包含两个伯胺。对于假设地引入这样一种线性二胺的每个分支点将允许一个或多个伯胺引入到该或这些被引入的分支的末端。在本文中,我们将该伯氨基团理解为该分支的一部分,即该分支的端点。例如,我们认为三(2-氨基乙基)胺或1,2,3-丙烷三胺都是具有一个分支点的分子。对于本发明,该多胺具有至少四个伯胺。可以从脂肪族烃链(如在之前所述实例中)或从不饱和的碳键(例如在,例如3,3'-二氨基联苯胺中)、或从叔氨基团(例如在N,N,N',N'-四-(2-氨基乙基)乙二胺)中引入多个分支点。

[0117] 除了分支点的数目之外,我们已经发现,反应性氨基团的紧密度非常重要。例如,N,N,N',N'-四-(12-氨基十二基)乙二胺的物质是不适合的。肽或蛋白(例如一种酶)都不适合用于膜形成。因此,该多支化的多胺不是肽或蛋白。

[0118] 在一个实施例中,这些反应性氨基团构成该多支化的多胺至少15%的分子量,例如超过20%,或超过25%。优选地,该多支化的多胺的分子量是至少为1kDa;更优选地,该多支化的多胺的分子量是至少为1.3kDa。

[0119] 在一个优选的实施例中,该多支化的多胺是聚乙烯亚胺(PEI),及其修饰体,具有多于两个分支点和多于两个反应性氨基,其中这些反应性氨基构成该PEI至少15%的分子

量,例如超过20%,或超过25%。优选地,该PEI的分子量是至少为1kDa。

[0120] 不同的多支化的多胺的组合可以用于制备根据本发明的微囊。

[0121] 可以通过添加一种或多种具有小于1kDa分子量的小胺来改进本发明的微囊的有利特性(例如,酶储存稳定性、降低的酶渗出、降低的洗涤剂成分的入通量)。该小胺优选地是基本上水溶性的(当处于游离碱形式时)并且可以是一种例如乙二胺、六亚甲基二胺、己二胺、二亚乙基四胺、乙四胺、苯二胺、哌嗪、四亚甲基五胺或、优选地二亚乙基三胺(DETA)的物质。在制备本发明的微囊时,可以按小胺和多支化的多胺的总含量重量计高达50%、优选地高达40%、高达30%、高达20%、高达10%、高达5%的量添加这些小胺。

[0122] 交联剂:如在本发明中所使用的交联剂是一种具有至少两个能够与胺类反应形成共价键的基团/位点的分子。

[0123] 该交联剂优选地是油可溶性的并且可以呈酸酐或酸性卤化物的形式,优选地为酰基氯。例如,它可以是己二酰氯、癸二酰氯、十二烷基二酰氯、邻苯二甲酰氯、对苯二甲酰氯、间苯二甲酰氯、或均苯三甲酰氯,但优选地,该交联剂是对苯二甲酰氯或均苯三甲酰氯。

[0124] 本发明进一步涉及用于洗涤物品的方法,该方法包括以下步骤:

[0125] a.将物品暴露于洗涤液,该洗涤液包括具有DNA酶活性的本发明的多肽或或包括该多肽的洗涤剂组合物;

[0126] b.完成至少一个洗涤循环;以及

[0127] c.任选地冲洗该物品,

[0128] 其中该物品是一种纺织品。

[0129] 该洗涤液的pH在7到10的范围内,如在7到9的范围内,在7到8的范围内或在7到7.5的范围内。

[0130] 该洗涤液可以具有在5℃到95℃范围内,或在10℃到80℃范围内,在10℃到70℃范围内,在10℃到60℃范围内,在10℃到50℃范围内,在15℃到40℃范围内或在20℃到30℃范围内的温度。在一个实施例中,该洗涤液的温度是30℃。

[0131] 在本发明的一个实施例中,用于洗涤物品的方法进一步包括在完成洗涤循环后排掉洗涤液或部分洗涤液。然后将洗涤液在后续洗涤循环中或在后续冲洗循环中重复使用。在第一个和任选地第二个或第三个洗涤循环过程中,可以将该物品暴露于洗涤液。在一个实施例中,在暴露于洗涤液后,冲洗该物品。可以将该物品用水或用包括调节剂的水进行冲洗。

[0132] 本发明进一步涉及根据本发明方法洗涤的物品。

[0133] 本发明进一步涉及包括具有DNA酶活性的多肽和药物佐剂成分的药物组合物,其中该具有DNA酶活性的多肽获得自真菌来源。可以将该组合物用于释放或去除生物膜,或者防止生物膜形成。

[0134] 抗寄生虫化合物可以是以下各项中的一种或多种:苯并吡咯,如阿苯达唑、甲苯达唑和噻苯达唑;唑,如甲硝唑和替硝唑;大环,如两性霉素B、利福平和伊维菌素;双羟萘酸噻嘧啶;乙胺嗪;氯硝柳胺;吡喹酮;米拉索普(melarsopro);和依氟鸟氨酸。

[0135] 该抗病毒化合物可以是以下各项中的一种或多种:核苷类逆转录酶抑制剂中,如阿昔洛韦、地达诺新、司他夫定、叠氮胸苷、拉米夫定、阿巴卡韦、恩曲他滨和恩替卡韦;未包衣的抑制剂,如金刚胺、金刚乙胺和普拉康纳利;蛋白酶抑制剂,如沙奎那韦、利托那韦、茚

地那韦、奈非那韦和氨普那韦；扎那米韦；奥塞米韦；和利福平。抗菌化合物可以是以下各项中的一种或多种：氨基糖苷，如庆大霉素、卡那霉素和链霉素； β -内酰胺，如青霉素、氨比西林和亚胺培南；头孢菌素，如头孢他啶、喹啉酮如环丙沙星；大环内酯，如阿奇霉素、克拉霉素、地红霉素、红霉素、罗红霉素和泰利霉素；噁唑烷酮，如利奈唑胺；林霉素，如利福霉素；磺酰胺；四环素，如多西环素；糖肽，如万古霉素；磺胺异噁唑、三甲氧苄二氨嘧啶、新生霉素、达托霉素和利奈唑胺。

[0136] 抗真菌化合物可以是以下各项中的一种或多种：唑，如咪可纳唑、酮康唑、克霉唑、益康唑、奥莫康唑、联苯苄唑、布康唑、芬替康唑、异康唑、舍他康唑、硫康唑、噻康唑、氟康唑、伊曲康唑、艾沙康唑、雷夫康唑、泊沙康唑、伏立康唑、特康唑和阿巴芬净；大环，如纳他霉素、龟裂杀菌素、非律平、制霉菌素、两性霉素B、坎底辛、哈霉素；烯丙基胺，如特比萘芬、萘替芬和布替萘芬；棘球白素，如阿尼芬净、卡泊芬净和米卡芬净；或其他如水蓼二醛、环吡酮、托萘酯、苯甲酸、十一烯酸、氟胞嘧啶和灰黄霉素。

[0137] 本发明还涉及内留置医疗装置，其特征在于将所述装置的病人可接触表面的至少一部分用药物组合物进行涂覆。

[0138] 该装置可以是导管如中央静脉导管、血管内导管、导尿管、希克曼导管、腹膜透析管、气管导管、或其中该装置是机械心脏瓣膜、心脏起搏器、动静脉分流、巩膜扣、人工关节、鼓膜造孔插管、气管造口管、声音假体、阴茎假体、人工尿道括约肌、合成的耻骨阴道吊带、手术用缝线、骨锚、骨螺钉、人工晶状体、接触镜、宫内节育器、主动脉股动脉移植物、血管移植物、针、Luer-Lok连接器、无针连接器或外科器械。

[0139] 该药物组合物可以被配制为液体、洗液、霜剂、喷雾剂、凝胶或软膏。

[0140] 该药物组合物可以用于向动物患者给予。动物患者可以是哺乳动物患者。该哺乳动物患者可以是人类。

[0141] 具有DNA酶活性的多肽可以获得自木霉属，例如，哈茨木霉。在本发明的一个实施例中，具有DNA酶活性的多肽是要求保护的多肽。

[0142] 本发明的一方面涉及与SEQ ID NO:2成熟多肽具有至少60%，例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%序列一致性的分离的多肽，这些分离的多肽具有DNA酶活性。在一方面，这些多肽与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有多达10个（例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个）氨基酸的差异。

[0143] 在一个实施例中，本发明涉及与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少60%序列一致性的具有DNA酶活性的分离多肽，并且将该多肽用于从物品上防止、减少或除去生物膜。

[0144] 在一个实施例中，本发明涉及与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少65%序列一致性的具有DNA酶活性的多肽，并且将该多肽用于从物品上防止、减少或除去生物膜。

[0145] 在一个实施例中，本发明涉及与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少70%序列一致性的具有DNA酶活性的多肽，并且将该多肽用于从物品上防止、减少或除去生物膜。

[0146] 在一个实施例中，本发明涉及与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少75%序列一致性的具有DNA酶活性的多肽，并且将该多肽用于从物品上防止、减少或除去生物膜。

[0147] 在一个实施例中，本发明涉及与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少80%序列一致性的具有DNA酶活性的多肽，并且将该多肽用于从物品上防止、减少或除去生物膜。

[0148] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少85%序列一致性的具有DNA酶活性的多肽,并且将该多肽用于从物品上防止、减少或除去生物膜。

[0149] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少90%序列一致性的具有DNA酶活性的多肽,并且将该多肽用于从物品上防止、减少或除去生物膜。

[0150] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少91%序列一致性的具有DNA酶活性的多肽,并且将该多肽用于从物品上防止、减少或除去生物膜。

[0151] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少92%序列一致性的具有DNA酶活性的多肽,并且将该多肽用于从物品上防止、减少或除去生物膜。

[0152] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少93%序列一致性的具有DNA酶活性的多肽,并且将该多肽用于从物品上防止、减少或除去生物膜。

[0153] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少94%序列一致性的具有DNA酶活性的多肽,并且将该多肽用于从物品上防止、减少或除去生物膜。

[0154] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少95%序列一致性的具有DNA酶活性的多肽,并且将该多肽用于从物品上防止、减少或除去生物膜。

[0155] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少96%序列一致性的具有DNA酶活性的多肽,并且将该多肽用于从物品上防止、减少或除去生物膜。

[0156] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少97%序列一致性的具有DNA酶活性的多肽,并且将该多肽用于从物品上防止、减少或除去生物膜。

[0157] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少98%序列一致性的具有DNA酶活性的多肽,并且将该多肽用于从物品上防止、减少或除去生物膜。

[0158] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少99%序列一致性的具有DNA酶活性的多肽,并且将该多肽用于从物品上防止、减少或除去生物膜。

[0159] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有100%序列一致性的具有DNA酶活性的多肽,并且将该多肽用于从物品上防止、减少或除去生物膜。

[0160] 在一个实施例中,该多肽已经被分离。本发明的多肽优选地包括SEQ ID NO:2的氨基酸序列或其等位基因变体或由其组成;或为其具有DNA酶活性的片段。在另一方面,该多肽包括SEQ ID NO:2的成熟多肽或由其组成。在另一方面,该多肽包括SEQ ID NO:2的氨基酸1至188或由其组成。

[0161] 在另一个实施例中,本发明涉及一种具有DNA酶活性的分离的多肽,该分离的多肽是由在低严格条件下与(i) SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列、(ii) 其cDNA序列、或(iii) (i) 或(ii) 的全长补体杂交的一种多核苷酸所编码(萨姆布鲁克等,1989,分子克隆实验指南,第2版,纽约冷泉港)。在一个实施例中,该多肽已经被分离。

[0162] 在另一个实施例中,本发明涉及一种具有DNA酶活性的分离的多肽,该分离的多肽是由在低-中严格条件下与(i) SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列、(ii) 其cDNA序列、或(iii) (i) 或(ii) 的全长补体杂交的一种多核苷酸所编码。在一个实施例中,该多肽已经被分离。

[0163] 在另一个实施例中,本发明涉及一种具有DNA酶活性的分离的多肽,该分离的多肽是由在中严格条件下与(i) SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列、(ii) 其cDNA序列、或(iii) (i) 或(ii) 的全长补体杂交的一种多核苷酸所编码。在一个实施例中,该多肽已经被分离。

[0164] 在另一个实施例中,本发明涉及一种具有DNA酶活性的分离的多肽,该分离的多肽是由在中-高严格条件下与(i) SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列、(ii) 其cDNA序列、或(iii) (i) 或(ii)的全长补体杂交的一种多核苷酸所编码。在一个实施例中,该多肽已经被分离。

[0165] 在另一个实施例中,本发明涉及一种具有DNA酶活性的分离的多肽,该分离的多肽是由在高严格条件下与(i) SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列、(ii) 其cDNA序列、或(iii) (i) 或(ii)的全长补体杂交的一种多核苷酸所编码。在一个实施例中,该多肽已经被分离。

[0166] 在另一个实施例中,本发明涉及一种具有DNA酶活性的分离的多肽,该分离的多肽是由在非常高严格条件下与(i) SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列、(ii) 其cDNA序列、或(iii) (i) 或(ii)的全长补体杂交的一种多核苷酸所编码。在一个实施例中,该多肽已经被分离。

[0167] 可以使用SEQ ID NO:1的多核苷酸或其子序列、连同SEQ ID NO:2的多肽或其片段来设计核酸探针,以便根据本领域熟知的方法鉴定和克隆编码来自不同属或种的菌株的具有DNA酶活性的多肽的DNA。具体地,可以遵循标准DNA印迹程序,使用此类探针与感兴趣的细胞的基因组DNA或cDNA杂交,以便鉴定和分离其中的对应基因。这样的探针可以大大短于整个序列,但是长度应该为至少15个,例如至少25个、至少35个或至少70个核苷酸。优选地,核酸探针的长度为至少100个核苷酸,例如长度为至少200个核苷酸、至少300个核苷酸、至少400个核苷酸、至少500个核苷酸、至少600个核苷酸、至少700个核苷酸、至少800个核苷酸、或至少900个核苷酸。DNA和RNA探针二者均可使用。典型地将探针进行标记,用于检测相应的基因(例如,用³²P、³H、³⁵S、生物素或抗生物素蛋白)。本发明涵盖此类探针。

[0168] 可以筛选从此类其他菌株制备的基因组DNA或cDNA文库的与上述探针杂交并编码具有DNA酶活性的多肽的DNA。来自此类其他菌株的基因组DNA或其他DNA可以通过琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳、或其他分离技术来分离。来自文库的DNA或分离的DNA可转移到并固定在硝酸纤维素或其他适合的载体材料上。为了鉴定与SEQ ID NO:1或其子序列杂交的克隆或DNA,将载体材料用于DNA印迹中。

[0169] 出于本发明的目的,杂交表示多核苷酸与对应于以下项的标记的核酸探针杂交:(i) SEQ ID NO:1;(ii) SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列;(iii) 其cDNA序列,(iv) 其全长互补体;或(v) 其子序列;在非常低、低严格条件、低-中严格条件、中严格条件、中-高严格条件、高严格条件至非常高严格条件下进行。在这些条件下与该核酸探针杂交的分子可以使用例如X射线薄膜或本领域中已知的任何其他检测手段进行检测。

[0170] 在另一个实施例中,本发明涉及一种由以下多核苷酸编码的具有DNA酶活性的多肽,该多核苷酸与SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列或其cDNA序列具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%序列一致性。在另外的实施例中,该多肽已经被分离。

[0171] 在另一个实施例中,本发明涉及在一个或多个(例如,若干个)位置处包含取代、缺失、和/或插入的SEQ ID NO:2的成熟多肽的变体。在一个实施例中,引入SEQ ID NO:2的成熟多肽中的氨基酸取代、缺失和/或插入的数目多达10个,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个。这些氨基酸变化可以具有微小性质,即,不会显著地影响蛋白的折叠和/或活性的保守氨基

酸取代或插入;典型地1-30个氨基酸的小缺失;小的氨基末端的或羧基末端的延伸,例如氨基末端甲硫氨酸残基;高达20-25个残基的小接头肽;或通过改变净电荷或另一功能有利于纯化的小的延伸,例如聚组氨酸段、抗原表位或结合结构域。

[0172] 保守取代的实例是在下组的范围内:碱性氨基酸(精氨酸、赖氨酸及组氨酸)、酸性氨基酸(谷氨酸和天冬氨酸)、极性氨基酸(谷氨酰胺和天冬酰胺)、疏水性氨基酸(亮氨酸、异亮氨酸及缬氨酸)、芳香族氨基酸(苯丙氨酸、色氨酸及酪氨酸)及小氨基酸(甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸及甲硫氨酸)。一般不会改变比活性的氨基酸取代是本领域已知的并且例如由H. 诺伊拉特(Neurath)和R.L. 希尔(Hill),1979,在蛋白质(The Proteins),学术出版社(Academic Press),纽约中描述。常见取代是Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Tyr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu、以及Asp/Gly。

[0173] 可替代地,氨基酸改变具有这样的性质:改变多肽的物理化学特性。例如,氨基酸改变可以改进多肽的热稳定性、改变底物特异性、改变最适pH等。

[0174] 可以根据本领域中已知的程序,如定点诱变或丙氨酸扫描诱变(坎宁汉(Cunningham)和威尔斯(Wells),1989,科学(Science) 244:1081-1085)来鉴定多肽中的必需氨基酸。在后一项技术中,在该分子中的每个残基处引入单个丙氨酸突变,并且对所得突变体分子的DNA酶活性进行测试以鉴定对于该分子的活性至关重要的氨基酸残基。还参见希尔顿(Hilton)等人,1996,生物化学杂志(J.Biol.Chem.) 271:4699-4708。也可结合假定接触位点氨基酸的突变,如通过以下技术例如核磁共振、结晶学、电子衍射、或光亲和标记进行确定,对结构进行物理学分析,从而确定酶的活性位点或其他生物学相互作用。参见例如德沃斯(de Vos)等人,1992,科学(Science) 255:306-312;史密斯等人,1992,分子生物学杂志(J.Mol.Biol.) 224:899-904;沃德弗(Wlodaver)等人,1992,欧洲生物化学学会联盟简讯(FEBS Lett.) 309:59-64。还可以从与相关多肽的比对推断鉴别必需氨基酸。

[0175] 可以做出单个或多个氨基酸取代、缺失和/或插入并且使用诱变、重组和/或改组的已知方法进行测试,随后进行相关筛选程序,如由里德哈尔-奥尔森(Reidhaar-Olson)和萨奥尔(Sauer),1988,科学(Science) 241:53-57;博维(Bowie)和萨奥尔,1989,美国科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA) 86:2152-2156;WO 95/17413;或WO 95/22625所披露的那些。可以使用的其他方法包括易错PCR、噬菌体展示(例如,洛曼(Lowman)等人,1991,生物化学(Biochemistry) 30:10832-10837;美国专利号5,223,409;WO 92/06204)以及区域定向诱变(德比什尔(Derbyshire)等人,1986,基因(Gene) 46:145;内尔(Ner)等人,1988,DNA 7:127)。

[0176] 可以结合诱变/改组方法与高通量自动化筛选方法来检测由宿主细胞表达的克隆的、诱变的多肽的活性(内斯(Ness)等人,1999,自然生物技术(Nature Biotechnology) 17:893-896)。编码活性多肽的诱变的DNA分子可以回收自宿主细胞,并且使用本领域的标准方法对其进行迅速测序。这些方法允许迅速确定多肽中单个氨基酸残基的重要性。

[0177] 多肽可以是杂合多肽,其中一个多肽的区域融合在另一多肽的区域的N-末端或C-末端。

[0178] 多肽还可以是融合多肽或可切割的融合多肽,其中另一多肽融合在本发明的多肽的N-末端或C-末端。通过将编码另一多肽的多核苷酸融合到本发明的多核苷酸而产生融合

多肽。用于产生融合多肽的技术在本领域是已知的,并且包括连接编码多肽的编码序列,这样使得它们在框内并且使得融合多肽的表达处于相同的一个或多个启动子和终止子的控制下。融合多肽还可以使用内含肽技术来构建,其中融合多肽在翻译后产生(库珀(Cooper)等人,1993,欧洲分子生物学学会杂志(EMBO J.) 12:2575-2583;道森(Dawson)等人,1994,科学(Science) 266:776-779)。

[0179] 融合多肽可以在两种多肽之间进一步包括切割位点。在融合蛋白分泌之时,该位点被切割,从而释放出这两种多肽。切割位点的实例包括但不限于在以下文献中披露的位点:马丁(Martin)等人,2003,工业微生物与生物技术杂志

(J.Ind.Microbiol.Biotechnol.) 3:568-576;斯维特娜(Svetina)等人,2000,生物技术杂志(J.Biotechnol.) 76:245-251;拉斯穆森-威尔逊(Rasmussen-Wilson)等人,1997,应用与环境微生物学(Appl.Environ.Microbiol.) 63:3488-3493;沃德(Ward)等人,1995,生物技术(Biotechnology) 13:498-503;以及孔特雷拉斯(Contreras)等人,1991,生物技术9:378-381;伊顿(Eaton)等人,1986,生物化学(Biochemistry) 25:505-512;柯林斯-拉西(Collins-Racie)等人,1995,生物技术13:982-987;卡特(Carter)等人,1989,蛋白质:结构、功能以及遗传学(Proteins:Structure,Function,and Genetics) 6:240-248;以及史蒂文斯(Stevens),2003,药物发现世界(Drug Discovery World) 4:35-48。

[0180] 多核苷酸

[0181] 本发明还涉及编码如在此描述的多肽的多核苷酸。在一个实施例中,编码本发明的多肽的多核苷酸已经被分离。在另一个实施例中,编码本发明多肽的多核苷酸包括SEQ ID NO:8中所阐释的多核苷酸序列,或由其组成。

[0182] 用于分离或克隆多核苷酸的技术是本领域中已知的并且包括从基因组DNA或cDNA、或其组合进行分离。可以例如通过使用熟知的聚合酶链反应(PCR)或表达文库的抗体筛选来检测具有共有结构特征的克隆DNA片段,实现从基因组DNA克隆多核苷酸。参见例如,伊尼斯(Innis)等人,1990,PCR:方法和应用指南(PCR:A Guide to Methods and Application),学术出版社(Academic Press),纽约。可以使用其他核酸扩增程序例如连接酶链式反应(LCR)、连接激活转录(LAT)和基于多核苷酸的扩增(NASBA)。这些多核苷酸可以由木霉属菌株或相关生物体克隆,并且因此,例如可以是该多核苷酸的多肽编码区的等位基因或种类变体。

[0183] 编码本发明多肽的多核苷酸的修饰对于合成基本上类似于该多肽的多肽可以是必需的。术语“基本上类似”于该多肽是指该多肽的非天然存在的形式。这些多肽在一些工程化方式方面可以不同于从其天然来源分离的多肽,例如具体活性、热稳定性、pH最佳值等方面不同的变体。这些变体可以基于以SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列、或其cDNA序列(例如其子序列)形式呈现的多核苷酸,和/或通过引入不会改变该多肽的氨基酸序列,但对应于预定用于产生该酶的宿主有机体的密码子用法的核苷酸取代,或通过引入可以产生不同氨基酸序列的核苷酸取代来构建。对于核苷酸取代的一般描述,参见例如,福德(Ford)等,1991,蛋白质表达与纯化(Protein Expression and Purification) 2:95-107。因此,在一个实施例中,该多核苷酸包括SEQ ID NO:8中所阐释的多核苷酸序列,或由其组成,其中这些密码子通过核苷酸取代进行修饰,来对应于预定用于产生本发明的多肽的宿主有机体的密码子用法。

[0184] 核酸构建体

[0185] 本发明还涉及核酸构建体,这些核酸构建体包含可操作地连接至一个或多个控制序列的本发明的多核苷酸,在与控制序列相容的条件下,这些控制序列指导编码序列在合适的宿主细胞中的表达。

[0186] 可以用许多方式操作所述多核苷酸以便于多肽的表达。取决于表达载体,在多核苷酸插入载体之前对其进行操纵可以是令人希望的或必需的。用于利用重组DNA方法修饰多核苷酸的技术是本领域熟知的。

[0187] 该控制序列可以是一个启动子,即,被宿主细胞识别以对编码本发明的多肽的多核苷酸进行表达的一种多核苷酸。该启动子包含转录控制序列,这些序列介导该多肽的表达。该启动子可以是在宿主细胞中显示出转录活性的任何多核苷酸,包括突变型、截短型及杂合型启动子,并且可以由编码与该宿主细胞同源或异源的细胞外或细胞内多肽的基因获得。

[0188] 在细菌宿主细胞中,适合指导本发明的核酸构建体转录的启动子的实例是获得自以下各项的启动子:解淀粉芽孢杆菌 α -淀粉酶基因(amyQ)、地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶基因(amyL)、地衣芽孢杆菌青霉素酶基因(penP)、嗜热脂肪芽孢杆菌麦芽淀粉酶基因(amyM)、枯草芽孢杆菌果聚糖蔗糖酶基因(sacB)、枯草芽孢杆菌xylA和xylB基因、苏云金芽孢杆菌cryIIIA基因(阿盖斯(Agaisse)和里瑞克拉斯(Lereclus),1994,分子微生物学(Molecular Microbiology) 13:97-107)、大肠杆菌lac操纵子、大肠杆菌trc启动子(埃贡(Egon)等人,1988,基因) 69:301-315)、天蓝链霉菌琼脂酶基因(dagA)、和原核 β -内酰胺酶基因(维拉-卡玛诺夫(Villa-Kamaroff)等人,1978,美国国家科学院院刊75:3727-3731)、连同tac启动子(德波尔(DeBoer)等人,1983,美国国家科学院院刊80:21-25)。另外的启动子描述于“来自重组细菌的有用蛋白(Useful proteins from recombinant bacteria)”,吉尔伯特(Gilbert)等人,1980,科学美国人(Scientific American),242:74-94;以及萨姆布鲁克(Sambrook)等人,1989,同上。串联启动子的实例披露在WO 99/43835中。

[0189] 用于指导本发明的核酸构建体在丝状真菌宿主细胞中的转录的合适启动子的实例是从以下各项的基因获得的启动子:构巢曲霉乙酰胺酶、黑曲霉中性 α -淀粉酶、黑曲霉酸性 α -淀粉酶、黑曲霉或泡盛曲霉葡糖淀粉酶(glaA)、米曲霉TAKA淀粉酶、米曲霉碱性蛋白酶、米曲霉丙糖磷酸异构酶、尖孢镰刀菌胰蛋白酶样蛋白酶(WO 96/00787)、镶片镰孢菌淀粉葡糖苷酶(WO 00/56900)、镶片镰孢菌Daria(*Fusarium venenatum* Daria)(WO 00/56900)、镶片镰孢Quinn(*Fusarium venenatum* Quinn)(WO 00/56900)、米黑根毛霉(*Rhizomucor miehei*)脂肪酶、米黑根毛霉天冬氨酸蛋白酶、里氏木霉 β -葡糖苷酶、里氏木霉纤维二糖水解酶I、里氏木霉纤维二糖水解酶II、里氏木霉内切葡聚糖酶I、里氏木霉内切葡聚糖酶II、里氏木霉内切葡聚糖酶III、里氏木霉内切葡聚糖酶V、里氏木霉木聚糖酶I、里氏木霉木聚糖酶II、里氏木霉木聚糖酶III、里氏木霉 β -木糖苷酶,和里氏木霉翻译延伸因子,连同NA2tpi启动子(修饰的启动子,其来自曲霉属中性 α -淀粉酶基因,其中未翻译的前导序列由曲霉属丙糖磷酸异构酶基因的未翻译的前导序列替代;非限制性实例包括修饰的启动子,其来自黑曲霉中性 α -淀粉酶的基因,其中未翻译的前导序列由构巢曲霉或米曲霉丙糖磷酸异构酶基因的未翻译的前导序列替代);以及其突变型启动子、截短型启动子、以及杂合型启动子。其他启动子在美国专利号6,011,147中描述。

[0190] 在酵母宿主中,有用的启动子获得自以下各项的基因:酿酒酵母烯醇酶(ENO-1)、酿酒酵母半乳糖激酶(GAL1)、酿酒酵母醇去氢酶/甘油醛-3-磷酸去氢酶(ADH1、ADH2/GAP)、酿酒酵母丙糖磷酸异构酶(TPI)、酿酒酵母金属硫蛋白(CUP1)、以及酿酒酵母3-磷酸甘油酸激酶。罗马诺斯(Romanos)等人,1992,酵母(Yeast) 8:423-488描述了酵母宿主细胞的其他有用的启动子。

[0191] 控制序列还可以是由宿主细胞识别以终止转录的转录终止子。该终止子可操作地连接到编码该多肽的多核苷酸的3'末端。在该宿主细胞中起作用的任何终止子都可以用于本发明中。

[0192] 用于细菌宿主细胞的优选终止子是从克劳氏芽孢杆菌碱性蛋白酶(aprH)、地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶(amyL)以及大肠杆菌核糖体RNA(rrnB)的基因获得。

[0193] 用于丝状真菌宿主细胞的优选终止子是从以下各项的基因获得:构巢曲霉乙酰胺酶、构巢曲霉邻氨基苯甲酸合酶、黑曲霉葡糖淀粉酶、黑曲霉 α -葡糖苷酶、米曲霉TAKA淀粉酶、尖镰孢胰蛋白酶样蛋白酶、里氏木霉 β -葡糖苷酶、里氏木霉纤维二糖水解酶I、里氏木霉纤维二糖水解酶II、里氏木霉内切葡聚糖酶I、里氏木霉内切葡聚糖酶II、里氏木霉内切葡聚糖酶III、里氏木霉内切葡聚糖酶V、里氏木霉木聚糖酶I、里氏木霉木聚糖酶II、里氏木霉木聚糖酶III、里氏木霉 β -木糖苷酶以及里氏木霉翻译延长因子。

[0194] 用于酵母宿主细胞的优选终止子是从酿酒酵母烯醇化酶、酿酒酵母细胞色素C(CYC1)、以及酿酒酵母甘油醛-3-磷酸脱氢酶的基因获得。罗马诺斯(Romanos)等人,1992,同上,描述了酵母宿主细胞的其他有用的终止子。

[0195] 该控制序列还可以是在启动子下游并且在基因编码序列上游的mRNA稳定子区域,它增加该基因的表达。

[0196] 适合的mRNA稳定子区的实例是从以下获得的:苏云金芽孢杆菌cryIIIA基因(WO 94/25612)和枯草芽孢杆菌SP82基因(化(Hue)等人,1995,细菌学杂志(Journal of Bacteriology) 177:3465-3471)。

[0197] 该控制序列还可以是前导序列,一种对宿主细胞翻译很重要的非翻译mRNA区域。该前导子可操作地连接到编码该多肽的多核苷酸的5'-末端。在宿主细胞中起作用的任何前导子都可以使用。

[0198] 用于丝状真菌宿主细胞的优选前导序列是从米曲霉TAKA淀粉酶和构巢曲霉丙糖磷酸异构酶的基因获得。

[0199] 酵母宿主细胞的适合的前导子是从以下各项的基因中获得的:酿酒酵母烯醇酶(ENO-1)、酿酒酵母3-磷酸甘油酸激酶、酿酒酵母 α -因子、和酿酒酵母醇去氢酶/甘油醛-3-磷酸去氢酶(ADH2/GAP)。

[0200] 控制序列还可以是一种多腺苷酸化序列,可操作地连接至该多核苷酸的3'-末端并且当转录时由宿主细胞识别为将聚腺苷酸残基添加至所转录的mRNA的信号的序列。可以使用在宿主细胞中起作用的任何多腺苷酸化序列。

[0201] 丝状真菌宿主细胞的优选多腺苷酸化序列是从以下各项的基因中获得的:构巢曲霉邻氨基苯甲酸合酶、黑曲霉葡糖淀粉酶、黑曲霉 α -葡萄糖苷酶、米曲霉TAKA淀粉酶以及尖镰孢胰蛋白酶样蛋白酶。

[0202] 对于酵母宿主细胞有用的多腺苷酸化序列在郭(Guo)和谢尔曼(Sherman),1995,

分子细胞生物学 (Mol. Cellular Biol.) 15:5983-5990中得以描述。

[0203] 控制序列还可以是编码连接至多肽的N-末端的信号肽并指导该多肽进入细胞的分泌途径的信号肽编码区域。多核苷酸的编码序列的5'-端本身可包含在翻译阅读框中天然与编码多肽的编码序列区段相连接的信号肽编码序列。可替代地,该编码序列的5'-末端可以包含对于该编码序列来说是外来的信号肽编码序列。在编码序列不天然地包含信号肽编码序列的情况下,可能需要外源信号肽编码序列。可替代地,外源信号肽编码序列可简单地替换天然的信号肽编码序列以便增强该多肽的分泌。然而,可以使用指导所表达多肽进入宿主细胞的分泌通路的任何信号肽编码序列。

[0204] 用于细菌宿主细胞的有效信号肽编码序列是从以下各项的基因获得的信号肽编码序列:芽孢杆菌属NCIB 11837产麦芽糖淀粉酶、地衣芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶、地衣芽孢杆菌 β -内酰胺酶、嗜热脂肪芽孢杆菌 α -淀粉酶、嗜热脂肪芽孢杆菌中性蛋白酶(nprT、nprS、nprM)以及枯草芽孢杆菌prxA。西蒙纳(Simonen)和帕尔瓦(Palva),1993,微生物学评论(Microbiological Reviews) 57:109-137描述了另外的信号肽。

[0205] 用于丝状真菌宿主细胞的有效信号肽编码序列是从以下各项的基因中获得的信号肽编码序列:黑曲霉中性淀粉酶、黑曲霉葡萄糖淀粉酶、米曲霉TAKA淀粉酶、特异腐质霉纤维素酶、特异腐质霉内切葡聚糖酶V、柔毛腐质霉脂肪酶以及米黑毛霉天冬氨酸蛋白酶。

[0206] 对于酵母宿主细胞有用的信号肽获得自以下项的基因:酿酒酵母 α -因子和酿酒酵母转化酶。罗马诺斯(Romanos)等人,1992,同上,描述了其他有用的信号肽编码序列。

[0207] 控制序列还可以是编码位于多肽的N-末端的前肽的前肽编码序列。生成的多肽被称为前体酶(proenzyme)或多肽原(或者在一些情况下被称为酶原(zymogen))。多肽原通常是无活性的并且可以通过从该多肽原上催化切割或自动催化切割前肽而被转化成活性多肽。前肽编码序列可以从以下各项的基因获得:枯草芽孢杆菌碱性蛋白酶(aprE)、枯草芽孢杆菌中性蛋白酶(nprT)、嗜热毁丝霉漆酶(WO 95/33836)、米黑根毛霉天冬氨酸蛋白酶、以及酿酒酵母 α -因子。

[0208] 当信号肽和前肽序列同时存在时,前肽序列的位置紧邻于多肽的N-末端,且信号肽序列的位置紧邻于前肽序列的N-末端。

[0209] 还可以希望添加调节序列,这些调节序列相对于宿主细胞的生长来调节多肽的表达。调节序列的实例是使得基因的表达响应于化学或物理刺激(包括调节化合物的存在)而开启或关闭的那些序列。在原核系统中的调节序列包括lac、tac、以及trp操纵基因系统。在酵母中,可以使用ADH2系统或GAL1系统。在丝状真菌中,可以使用黑曲霉葡萄糖淀粉酶启动子、米曲霉TAKA α -淀粉酶启动子和米曲霉葡萄糖淀粉酶启动子、里氏木霉纤维二糖水解酶I启动子以及里氏木霉纤维二糖水解酶II启动子。调控序列的其他实例是允许基因扩增的那些。在真核系统中,这些调控序列包括在甲氨蝶呤存在下被扩增的二氢叶酸还原酶基因以及用重金属扩增的金属硫蛋白基因。在这些情况中,编码多肽的多核苷酸将与调控序列可操作地连接。

[0210] 表达载体

[0211] 本发明还涉及包含本发明的多核苷酸、启动子、以及转录和翻译终止信号的重组表达载体。不同的核苷酸和控制序列可以连接在一起以产生重组表达载体,该重组表达载体可以包括一个或多个便利的限制酶切位点以允许在这些位点处插入或取代编码该多肽

的多核苷酸。可替代地,该多核苷酸可以通过将该多核苷酸或包括该多核苷酸的核酸构建体插入用于表达的适当载体中来表达。在产生该表达载体时,该编码序列位于该载体中,这样使得该编码序列与该供表达的适当控制序列可操作地连接。在一个实施例中,该表达载体包括SEQ ID NO:8中所阐释的多核苷酸序列,该多核苷酸序列可操作地链接至适当的控制序列用于表达。在另一个实施例中,已经通过核苷酸取代对多核苷酸序列密码子进行修饰,以对应于旨在用于产生本发明的多肽的宿主有机体的密码子使用。

[0212] 重组表达载体可以是任何载体(例如,质粒或病毒),其能够方便地进行重组DNA程序,并且能够引起多核苷酸的表达。载体的选择将典型地取决于该载体与有待引入该载体的宿主细胞的相容性。该载体可以是线性的或闭合的环状质粒。

[0213] 载体可以是自主复制载体,即,作为染色体外实体存在的载体,其复制独立于染色体复制,例如,质粒、染色体外元件、微染色体、或人工染色体。该载体可包含任何用以保证自我复制的要素。可替代地,该载体可以是这样载体,当它被引入该宿主细胞中时,被整合到基因组中并且与其中已整合了它的一个或多个染色体一起复制。此外,可以使用单一载体或质粒或两个或更多个载体或质粒(这些载体或质粒共同含有待引入到宿主细胞的基因组中的总DNA)或转座子。

[0214] 该载体优选包含一个或多个允许方便地选择转化细胞、转染细胞、转导细胞等细胞的选择性标记。选择性标记是这样一种基因,该基因的产物提供了杀生物剂抗性或病毒抗性、重金属抗性、营养缺陷型的原养型等。

[0215] 细菌性选择性标记的实例是地衣芽孢杆菌或枯草芽孢杆菌 dal 基因,或赋予抗生素抗性(例如氨苄青霉素、氯霉素、卡那霉素、新霉素、大观霉素或四环素抗性)的标记。用于酵母宿主细胞的适合的标记包括但不限于 $ADE2$ 、 $HIS3$ 、 $LEU2$ 、 $LYS2$ 、 $MET3$ 、 $TRP1$ 、以及 $URA3$ 。用于在丝状真菌宿主细胞中使用的选择性标记包括但不限于, $adeA$ (磷酸核糖酰氨基咪唑-琥珀胺合酶)、 $adeB$ (磷酸核糖酰-氨基咪唑合酶)、 $amdS$ (乙酰胺酶)、 $argB$ (鸟氨酸氨甲酰基转移酶)、 bar (草丁膦乙酰转移酶)、 hph (潮霉素磷酸转移酶)、 $niaD$ (硝酸还原酶)、 $pyrG$ (乳清酸核苷-5'磷酸脱羧酶)、 sC (硫酸腺苷基转移酶)、以及 $trpC$ (邻氨基苯甲酸合酶)、连同其等效物。优选在曲霉属细胞中使用的是构巢曲霉或米曲霉 $amdS$ 和 $pyrG$ 基因以及吸水链霉菌 bar 基因。优选在木霉细胞中使用的是 $adeA$ 、 $adeB$ 、 $amdS$ 、 hph 、和 $pyrG$ 基因。

[0216] 选择性标记可以是在W0 2010/039889中描述的双选择性标记系统。在一方面,双选择性标记是 hph - tk 双选择性标记系统。

[0217] 载体优选地包含允许该载体整合到宿主细胞的基因组或允许该载体在细胞中独立于基因组而自主复制的一个或多个元件。

[0218] 对于整合到该宿主细胞基因组中,该载体可以依靠编码该多肽的多核苷酸序列或者用于通过同源或非同源重组整合到该基因组中的该载体的任何其他元件。可替代地,该载体可以包含用于指导通过同源重组而整合到宿主细胞基因组中的一个或多个染色体中的一个或多个精确位置处的另外的多核苷酸。为了增加在精确位置整合的可能性,这些整合元件应包含足够数量的核酸,例如100至10,000个碱基对、400至10,000个碱基对、以及800至10,000个碱基对,这些碱基对与对应的靶序列具有高度的序列一致性以提高同源重组的可能性。这些整合元件可以是与宿主细胞的基因组内的靶序列同源的任何序列。此外,这些整合元件可以是非编码多核苷酸或编码多核苷酸。另一方面,该载体可以通过非同源

重组整合到宿主细胞的基因组中。

[0219] 对于自主复制,该载体可以进一步包括使该载体能够在所讨论的宿主细胞中自主复制的复制起点。复制起点可以是在细胞中起作用的介导自主复制的任何质粒复制子。术语“复制起点(origin of replication)”或“质粒复制子(plasmid replicator)”意指使得质粒或载体可在体内复制的多核苷酸。

[0220] 细菌的复制起点的实例是允许在大肠杆菌内进行复制的质粒pBR322、pUC19、pACYC177、以及pACYC184以及允许在芽孢杆菌内进行复制的pUB110、pE194、pTA1060、以及pAM β 1的复制起点。

[0221] 用于在酵母宿主细胞中使用的复制起点的实例是2微米复制起点ARS1、ARS4、ARS1与CEN3的组合、以及ARS4与CEN6的组合。

[0222] 在丝状真菌细胞中有用的复制起点的实例是AMA1和ANS1 (Gems等人,1991,基因(Gene) 98:61-67;卡伦(Cullen)等人,1987,核酸研究(Nucleic Acids Res.) 15:9163-9175;WO 00/24883)。AMA1基因的分离和包括该基因的质粒或载体的构建可以根据披露于WO 00/24883中的方法完成。

[0223] 可以将本发明的多核苷酸的多于一个拷贝插入宿主细胞中以增加多肽的产生。通过将序列的至少一个另外的拷贝整合到宿主细胞基因组中或者通过包含与该多核苷酸一起的可扩增的选择性标记基因可以获得多核苷酸的增加的拷贝数目,其中通过在适当的选择性试剂的存在下培养细胞可以选择包含选择性标记基因的经扩增的拷贝的细胞、以及由此该多核苷酸的另外的拷贝。

[0224] 用于连接上述元件以构建本发明的重组表达载体的程序对于本领域普通技术人员而言是熟知的(参见,例如萨拉布鲁克(Sambrook)等人,1989,同上)。

[0225] 宿主细胞

[0226] 本发明还涉及重组宿主细胞,这些重组宿主细胞包括本发明的多核苷酸,该多核苷酸可操作地连接至一个或多个控制序列,该一个或多个控制序列指导本发明的多肽的产生。将包含多核苷酸的构建体或载体引入到宿主细胞中,这样使得该构建体或载体被维持作为染色体整合体或作为自主复制的染色体外载体,如早前所描述。术语“宿主细胞”涵盖由于复制过程中发生的突变与亲本细胞不同的亲本细胞的任何后代。宿主细胞的选择在很大程度上取决于编码该多肽的基因及其来源。

[0227] 该宿主细胞可以是有用于重组产生本发明的多肽的任何细胞,例如原核细胞或真核细胞。

[0228] 原核宿主细胞可以是任何革兰氏阳性或革兰氏阴性细菌。革兰氏阳性细菌包括,但不限于芽孢杆菌属、梭菌属、肠球菌属、土芽孢杆菌属、乳杆菌属、乳球菌属、大洋芽孢杆菌属(Oceanobacillus)、葡萄球菌属、链球菌属和链霉菌属。革兰氏阴性细菌包括,但不限于弯曲杆菌属、大肠杆菌、黄杆菌属、梭杆菌属、螺杆菌属、泥杆菌属、奈瑟球菌属、假单胞菌属、沙门菌属和脲原体属。

[0229] 细菌宿主细胞可以是任何芽孢杆菌细胞,包括但不限于:嗜碱芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、短芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、克劳氏芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、坚硬芽孢杆菌、灿烂芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌以及苏云金芽孢杆菌细胞。

[0230] 细菌宿主细胞还可以是任何链球菌属细胞,包括但不限于:似马链球菌、酿脓链球菌、乳房链球菌以及马链球菌兽瘟亚种细胞。

[0231] 细菌宿主细胞还可以是任何链霉菌细胞,包括但不限于不产色链霉菌、除虫链霉菌、天蓝链霉菌、灰色链霉菌以及浅青紫链霉菌细胞。

[0232] 将DNA引入芽孢杆菌细胞中可以通过以下方式实现:原生质体转化(参看例如,常(Chang)和柯汗(Cohen),1979,分子和普通遗传学(Mol.Gen.Genet.) 168:111-115)、感受态细胞转化(参看例如,杨(Young)和斯皮宰曾(Spizizen),1961,细菌学杂志81:823-829,或杜布诺(Dubnau)和达维多夫-阿博森(Davidoff-Abelson),1971,分子生物学杂志56:209-221)、电穿孔(参看例如,茂川(Shigekawa)和道维(Dower),1988,生物技术6:742-751)或结合法(参看例如,科勒(Koehler)和斯奥姆(Thome),1987,细菌学杂志169:5271-5278)。将DNA引入大肠杆菌细胞中可通过以下来实现:原生质体转化(参见,例如,哈纳汗(Hanahan),1983,分子生物学杂志(J.Mol.Biol.) 166:557-580)或电穿孔(参见,例如,道尔(Dower)等人,1988,核酸研究(Nucleic Acids Res.) 16:6127-6145)。将DNA引入链霉菌属细胞中可通过以下来实现:原生质体转化、电穿孔(参见例如,贡(Gong)等人,2004,叶线形微生物学(Folia Microbiol.) (布拉格(Praha)) 49:399-405)、接合(参见例如,马佐迪耶(Mazodier)等人,1989,细菌学杂志(J.Bacteriol.) 171:3583-3585)、或转导(参见例如,伯克(Burke)等人,2001,美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA) 98:6289-6294)。将DNA引入假单孢菌属细胞中可通过以下来实现:电穿孔(参见,例如,蔡(Choi)等人,2006,微生物学方法杂志(J.Microbiol.Methods) 64:391-397)或接合(参见,例如,皮内多(Pinedo)和斯梅茨(Smets),2005,应用与环境微生物学(Appl.Environ.Microbiol.) 71:51-57)。将DNA引入链球菌属细胞中可通过以下来实现:天然感受态(参见,例如,佩里(Perry)和藏满(Kuramitsu),1981,感染与免疫(Infect.Immun.) 32:1295-1297)、原生质体转化(参见,例如,凯特(Catt)和乔力克(Jollick),1991,微生物学(Microbios) 68:189-207)、电穿孔(参见,例如,巴克利(Buckley)等人,1999,应用与环境微生物学(Appl.Environ.Microbiol.) 65:3800-3804)、或者接合(参见,例如,克莱威尔(Clewel),1981,微生物学评论(Microbiol.Rev.) 45:409-436)。然而,可以使用本领域已知的用于将DNA引入宿主细胞中的任何方法。

[0233] 宿主细胞还可以是真核细胞,如哺乳动物、昆虫、植物、或真菌细胞。

[0234] 宿主细胞可以是真菌细胞。如在此使用的“真菌”包括子囊菌门(Ascomycota)、担子菌门(Basidiomycota)、壶菌门(Chytridiomycota)、以及接合菌门(Zygomycota)、连同卵菌门(Oomycota)和全部有丝分裂孢子真菌(如由霍克斯沃思(Hawksworth)等人在安斯沃思和拜斯比真菌词典(Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi),第8版,1995,国际应用生物科学中心(CAB International),大学出版社(University Press),英国剑桥(Cambridge,UK)中进行定义的)。

[0235] 该真菌宿主细胞可以是酵母细胞。如在此使用的“酵母”包括产子囊酵母(内孢霉目)、产担子酵母和属于半知菌类(芽孢纲)的酵母。由于酵母的分类在将来可能有变化,出于本发明的目的,酵母应如酵母生物学和活动性(Biology and Activities of Yeast)(斯金纳(Skinner)、帕斯莫尔(Passmore)、以及达文波特(Davenport)编辑,应用细菌学学会讨论会(Soc.App.Bacteriol.Symposium)系列第9期,1980)所述地进行定义。

[0236] 酵母宿主细胞可以是假丝酵母属、汉逊酵母属、克鲁弗酵母属、毕赤酵母属、酵母属、裂殖酵母属、或耶氏酵母属细胞,如乳酸克鲁弗酵母(*Kluyveromyces lactis*)、卡尔酵母、酿酒酵母、糖化酵母、道格拉氏酵母、克鲁弗酵母、诺地酵母、卵形酵母、或解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)细胞。

[0237] 真菌宿主细胞可以是丝状真菌细胞。“丝状真菌”包括真菌门(Eumycota)和卵菌门的亚门(如由霍克斯沃思(Hawksworth)等人,1995,见上文所定义)的所有丝状形式。丝状真菌通常的特征在于由几丁质、纤维素、葡聚糖、壳聚糖、甘露聚糖、以及其他复杂多糖构成的菌丝体壁。营养生长是通过菌丝延伸,而碳分解代谢是专性需氧的。相反,酵母(如酿酒酵母)的营养生长是通过单细胞菌体的出芽(budding),而碳分解代谢可以是发酵的。

[0238] 丝状真菌宿主细胞可以是枝顶孢霉属、曲霉属、短梗霉属、烟管霉属(*Bjerkandera*)、拟腊菌属、金孢子菌属、鬼伞属、革盖菌属(*Coriolus*)、隐球菌属、线黑粉菌科(*Filibasidium*)、镰孢属、腐质霉属、梨孢菌属、毛霉属、毁丝霉属、新美鞭菌属、链孢菌属、拟青霉属、青霉属、平革菌属、射脉菌属(*Phlebia*)、瘤胃壶菌属、侧耳属(*Pleurotus*)、裂褶菌属、篮状菌属、嗜热子囊菌属、梭孢壳属、弯颈霉属、栓菌属(*Trametes*)或木霉属细胞。

[0239] 例如,丝状真菌宿主细胞可以是泡盛曲霉、臭曲霉、烟曲霉、日本曲霉、构巢曲霉、黑曲霉、米曲霉、黑刺烟管菌(*Bjerkandera adusta*)、干拟蜡菌(*Ceriporiopsis aneirina*)、卡内基拟蜡菌(*Ceriporiopsis caregiea*)、浅黄拟蜡孔菌(*Ceriporiopsis gilvescens*)、潘诺希塔拟蜡菌(*Ceriporiopsis pannocinta*)、环带拟蜡菌(*Ceriporiopsis rivulosa*)、微红拟蜡菌(*Ceriporiopsis subrufa*)、虫拟蜡菌(*Ceriporiopsis subvermisporea*)、狭边金孢子菌(*Chrysosporium inops*)、嗜角质金孢子菌、卢克诺文思金孢子菌(*Chrysosporium lucknowense*)、粪状金孢子菌(*Chrysosporium merdarium*)、租金孢子菌、昆士兰金孢子菌(*Chrysosporium queenslandicum*)、热带金孢子菌、褐薄金孢子菌(*Chrysosporium zonatum*)、灰盖鬼伞(*Coprinus cinereus*)、毛革盖菌(*Coriolus hirsutus*)、杆孢状镰孢、谷类镰孢、库威镰孢、大刀镰孢、禾谷镰孢、禾赤镰孢、异孢镰孢、合欢木镰孢、尖镰孢、多枝镰孢、粉红镰孢、接骨木镰孢、肤色镰孢、拟分枝孢镰孢、硫色镰孢、圆镰孢、拟丝孢镰孢、镶片镰孢、特异腐质霉、柔毛腐质霉、米黑毛霉、嗜热毁丝霉、粗糙链孢菌、产紫青霉、黄孢平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)、射脉菌(*Phlebia radiata*)、刺芹侧耳(*Pleurotus eryngii*)、土生梭孢壳霉、长域毛栓菌(*Trametes villosa*)、变色栓菌(*Trametes versicolor*)、哈茨木霉、康宁木霉、长枝木霉、里氏木霉、或绿色木霉细胞。

[0240] 可以将真菌细胞通过涉及原生质体形成、原生质体转化、以及细胞壁再生的方法以本身已知的方式转化。用于转化曲霉属和木霉属宿主细胞的适合程序描述于EP 238023和约尔顿(Yelton)等人,1984,美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA) 81:1470-1474和克里斯滕森(Christensen)等人,1988,生物/技术(Bio/Technology) 6:1419-1422中。用于转化镰孢属物种的适合方法由马拉迪尔(Malardier)等人,1989,基因(Gene) 78:147-156、以及W0 96/00787描述。可以使用由如以下文献描述的程序转化酵母:贝克尔(Becker)和瓜伦特(Guarente),在阿贝尔森(Abelson),J.N.和西蒙(Simon),M.I.编,酵母遗传学与分子生物学指南,酶学方法(Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology,Methods in Enzymology),第194卷,第182-187页,学术出版社有限公司(Academic Press,Inc.),纽约;伊藤(Ito)等人,1983,细菌学杂志(J.Bacteriol.) 153:

163;以及哈尼恩 (Hinnen) 等人,1978,美国国家科学院院刊 (Proc.Natl.Acad.Sci.USA) 75:1920。

[0241] 生产方法

[0242] 本发明还涉及产生本发明的多肽的方法,包含 (a) 在有益于产生该多肽的条件下培养细胞,该细胞以其野生型形式产生该多肽;并且可任选地 (b) 回收该多肽。在一方面,该细胞是一种木霉属细胞。在另一方面,该细胞是一种哈茨木霉细胞。

[0243] 本发明还涉及产生本发明多肽的方法,该方法包括:(a) 在有益于产生该多肽的条件下培养本发明的重组宿主细胞;并且可任选地,(b) 回收该多肽。

[0244] 这些宿主细胞是在适合于使用本领域中已知的方法产生该多肽的营养培养基中培养的。例如,可以通过在适合的培养基中和在允许表达和/或分离该多肽的条件下,进行摇瓶培养,或者在实验室或工业发酵罐中进行小规模或大规模发酵(包括连续,分批,分批补料,或固态发酵)来培养细胞。该培养是使用本领域中已知的程序,在适合的营养培养基中发生,该培养基包含碳源和氮源及无机盐。适合的培养基可从商业供应商获得或可以根据公开的组成(例如,在美国典型培养物保藏中心的目录中)制备。如果多肽分泌到该营养培养基中,那么可直接从培养基中回收多肽。如果多肽不被分泌,那么其可从细胞裂解液中进行回收。

[0245] 可以使用特异性针对这些多肽的本领域已知的方法来检测该多肽。这些检测方法包括但不限于,特异性抗体的使用、酶产物的形成或酶底物的消失。例如,可以使用酶测定来确定该多肽的活性。

[0246] 可以使用本领域已知的方法来回收多肽。例如,该多肽可以通过常规程序,包括但不限于,收集、离心、过滤、提取、喷雾干燥、蒸发或沉淀,从该营养培养基回收。在一方面,回收包含该多肽的发酵液。

[0247] 可以通过本领域中已知的多种程序来纯化该多肽以获得基本上纯的多肽,这些程序包括但不限于:色谱法(例如,离子交换色谱、亲和色谱、疏水作用色谱、色谱聚焦、以及尺寸排阻色谱)、电泳程序(例如,制备型等电点聚焦)、差别溶解度(例如,硫酸铵沉淀)、SDS-PAGE、或提取(参见例如,蛋白纯化 (Protein Purification),詹森 (Janson) 和赖登 (Ryden) 编辑,VCH出版社 (VCH Publishers),纽约,1989)。

[0248] 在一个替代性方面中,该多肽未被回收,而是使用表达该多肽的本发明的宿主细胞作为该多肽来源。

[0249] 在一个实施例中,本发明进一步包括通过培养重组宿主细胞生产该多肽,进一步包括编码感兴趣的第二多肽的多核苷酸;优选地感兴趣的酶;更优选地感兴趣的分泌的酶,甚至更优选地水解酶、异构酶、连接酶、裂解酶、氧化还原酶、或转移酶;并且最优选地该分泌的酶是 α -半乳糖苷酶、 α -葡萄糖苷酶、氨肽酶、淀粉酶、天冬酰胺酶、 β -半乳糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶、 β -木糖苷酶、糖酶、羧肽酶、过氧化氢酶、纤维二糖水解酶、纤维素酶、壳多糖酶、角质酶、环糊精糖基转移酶、脱氧核糖核酸酶、内切葡聚糖酶、酯酶、绿色荧光蛋白、葡聚糖转移酶、葡糖淀粉酶、转化酶、漆酶、脂肪酶、甘露糖苷酶、变聚糖酶、氧化酶、果胶分解酶、过氧化物酶、植酸酶、多酚氧化酶、蛋白水解酶、核糖核酸酶、转谷氨酰胺酶、或木聚糖酶。

[0250] 在一个实施例中,该感兴趣的第二多肽是与宿主细胞异源的或同源的。

[0251] 在一个实施例中,重组宿主细胞是真菌宿主细胞;优选地丝状真菌宿主细胞;更优

选地枝顶孢霉属、曲霉属、短梗霉属、烟管霉属 (*Bjerkandera*)、拟腊菌属、金孢子菌属、鬼伞属、革盖菌属 (*Coriolus*)、隐球菌属、线黑粉菌科 (*Filibasidium*)、镰孢属、腐质霉属、梨孢菌属、毛霉属、毁丝霉属、新美鞭菌属、链孢菌属、拟青霉属、青霉属、平革菌属、射脉菌属 (*Phlebia*)、瘤胃壶菌属、侧耳属 (*Pleurotus*)、裂褶菌属、篮状菌属、嗜热子囊菌属、梭孢壳属、弯颈霉属、栓菌属 (*Trametes*) 或木霉属细胞;最优选地泡盛曲霉、臭曲霉、烟曲霉、日本曲霉、构巢曲霉、黑曲霉、米曲霉、黑刺烟管菌 (*Bjerkandera adusta*)、干拟蜡菌 (*Ceriporiopsis aneirina*)、卡内基拟蜡菌 (*Ceriporiopsis caregiea*)、浅黄拟蜡孔菌 (*Ceriporiopsis gilvescens*)、潘诺希塔拟蜡菌 (*Ceriporiopsis pannocinta*)、环带拟蜡菌 (*Ceriporiopsis rivulosa*)、微红拟蜡菌 (*Ceriporiopsis subrufa*)、虫拟蜡菌 (*Ceriporiopsis subvermisporea*)、狭边金孢子菌 (*Chrysosporium inops*)、嗜角质金孢子菌、卢克诺文思金孢子菌 (*Chrysosporium lucknowense*)、粪状金孢子菌 (*Chrysosporium merdarium*)、租金孢子菌、昆士兰金孢子菌 (*Chrysosporium queenslandicum*)、热带金孢子菌、褐薄金孢子菌 (*Chrysosporium zonatum*)、灰盖鬼伞 (*Coprinus cinereus*)、毛革盖菌 (*Coriolus hirsutus*)、杆孢状镰孢、谷类镰孢、库威镰孢、大刀镰孢、禾谷镰孢、禾赤镰孢、异孢镰孢、合欢木镰孢、尖镰孢、多枝镰孢、粉红镰孢、接骨木镰孢、肤色镰孢、拟分枝孢镰孢、硫色镰孢、圆镰孢、拟丝孢镰孢、镶片镰孢、特异腐质霉、柔毛腐质霉、米黑毛霉、嗜热毁丝霉、粗糙链孢菌、产紫青霉、黄孢平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*)、射脉菌 (*Phlebia radiata*)、刺芹侧耳 (*Pleurotus eryngii*)、土生梭孢壳霉、长域毛栓菌 (*Trametes villosa*)、变色栓菌 (*Trametes versicolor*)、哈茨木霉、康宁木霉、长枝木霉、里氏木霉、或绿色木霉细胞。

[0252] 在一个实施例中,重组宿主细胞是细菌宿主细胞;优选地原核生物宿主细胞;更优选地革兰氏阳性宿主细胞;甚至更优选地芽孢杆菌属、梭状芽孢杆菌、肠球菌属、土芽孢杆菌属、乳杆菌属、乳球菌属、海洋芽孢杆菌属、葡萄球菌属、链球菌属、或链霉菌属宿主细胞;和最优选地嗜碱芽孢杆菌 (*Bacillus alkalophilus*)、解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)、短芽孢杆菌 (*Bacillus brevis*)、环状芽孢杆菌 (*Bacillus circulans*)、克劳氏芽孢杆菌 (*Bacillus clausii*)、凝结芽孢杆菌 (*Bacillus coagulans*)、坚强芽孢杆菌 (*Bacillus firmus*)、灿烂芽孢杆菌 (*Bacillus lautus*)、迟缓芽孢杆菌 (*Bacillus lentus*)、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)、巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)、短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*)、嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、和苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 宿主细胞。

[0253] 在一个实施例中,用于生产感兴趣的第二多肽的方法包括在有益于产生该感兴趣的第二多肽的条件下培养该宿主细胞。

[0254] 在一个实施例中,该方法进一步包括回收该感兴趣的第二多肽。

[0255] 发酵液配制品或细胞组合物

[0256] 本发明还涉及包含本发明的多肽的发酵液配制品或细胞组合物。发酵液产物进一步包括在发酵过程中使用的另外的成分,例如像,细胞(包括含有编码本发明的多肽的基因的宿主细胞,这些宿主细胞被用于产生感兴趣的多肽)、细胞碎片、生物质、发酵介质和/或发酵产物。在一些实施例中,该组合物是含有一种或多种有机酸、杀灭的细胞和/或细胞碎

片以及培养基的细胞杀灭的全培养液。

[0257] 如在此使用的术语“发酵液”是指由细胞发酵产生、不经历或经历最低限的回收和/或纯化的制剂。例如,当微生物培养株在允许蛋白质合成(例如,由宿主细胞的酶表达)并且将蛋白质分泌到细胞培养基中的碳受限的条件下孵育生长到饱和时,产生发酵液。发酵液可以包含在发酵结束时得到的发酵材料的未分级的或分级的内容物。典型地,发酵液是未分级的并且包括在例如通过离心除去微生物细胞(例如,丝状真菌细胞)后存在的耗尽的培养基和细胞碎片。在一些实施例中,发酵液包含用过的细胞培养基、胞外酶、以及有活力的和/或无活力的微生物细胞。

[0258] 在一个实施例中,该发酵液配制品和细胞组合物包括第一有机酸组分(包括至少一种1-5碳的有机酸和/或其盐)以及第二有机酸组分(包括至少一种6碳或更多碳的有机酸和/或其盐)。在一个具体实施例中,该第一有机酸组分是乙酸、甲酸、丙酸、其盐、或两种或更多种前述酸的混合物并且该第二有机酸组分是苯甲酸、环己烷羧酸、4-甲基戊酸、苯乙酸、其盐、或两种或更多种前述酸的混合物。

[0259] 在一方面,该组合物包含一种或多种有机酸,并且任选地进一步包含杀死的细胞和/或细胞碎片。在一个实施例中,从细胞杀灭的全培养液中去除这些杀死的细胞和/或细胞碎片,以提供不含这些组分的组合物。

[0260] 这些发酵液配制品或细胞组合物可以进一步包含一种防腐剂和/或抗微生物(例如抑菌)剂,包括但不限于山梨醇、氯化钠、山梨酸钾、以及本领域中已知的其他试剂。

[0261] 该细胞杀灭的全培养液或组合物可以包含在发酵结束时得到的发酵材料的未分级的内容物。典型地,该细胞杀灭的全培养液或组合物包含用过的培养基以及在微生物细胞(例如,丝状真菌细胞)生长至饱和、在碳限制条件下孵育以允许蛋白合成之后存在的细胞碎片。在一些实施例中,细胞杀灭的全培养液或组合物含有用过的细胞培养基、胞外酶和杀灭的丝状真菌细胞。在一些实施例中,可以使用本领域已知的方法来使细胞杀灭的全培养液或组合物中存在的微生物细胞透性化和/或裂解。

[0262] 如在此描述的全培养液或细胞组合物典型地是液体,但是可以含有不溶性组分,例如杀灭的细胞、细胞碎片、培养基组分和/或一种或多种不溶性酶。在一些实施例中,可以除去不溶性组分以提供澄清的液体组合物。

[0263] 可以通过W0 90/15861或W0 2010/096673所述的方法产生本发明的全培养液配制品和细胞组合物。

[0264] 信号肽

[0265] 本发明还涉及一种编码信号肽的多核苷酸,该信号肽包括SEQ ID NO:2的氨基酸-17到-1或由其组成。本发明还涉及一种编码信号肽的多核苷酸,该信号肽包括SEQ ID NO:2的氨基酸-17到-1或由其组成。这些多核苷酸可以进一步包含一个编码蛋白的基因,该蛋白可操作地连接到该信号肽。该蛋白优选地对于该信号肽来说是外源的。在一方面,编码该信号肽的多核苷酸是SEQ ID NO:1的核苷酸1至51。

[0266] 本发明还涉及包含这些多核苷酸的核酸构建体、表达载体及重组宿主细胞。

[0267] 本发明还涉及产生蛋白质的方法,该方法包括:(a)对包括这种多核苷酸的重组宿主细胞进行培养;并且(b)回收该蛋白质。

[0268] 该蛋白对于宿主细胞而言可以是天然的或异源的。术语“蛋白质”在此不意图是指

特定长度的编码产物,并且因此涵盖肽、寡肽及多肽。术语“蛋白”还涵盖组合形成编码的产物的两个或更多个多肽。这些蛋白还包含杂合多肽和融合多肽。

[0269] 优选地,该蛋白是一种激素、酶、受体或其部分、抗体或其部分,或报告基因。例如,该蛋白质可以是一种水解酶、异构酶、连接酶、裂解酶、氧化还原酶、或转移酶,例如 α -半乳糖苷酶、 α -葡糖苷酶、氨肽酶、淀粉酶、 β -半乳糖苷酶、 β -葡糖苷酶、 β -木糖苷酶、糖酶、羧肽酶、过氧化氢酶、纤维二糖水解酶、纤维素酶、壳多糖酶、角质酶、环糊精糖基转移酶、脱氧核糖核酸酶、内切葡聚糖酶、酯酶、葡糖淀粉酶、转化酶、漆酶、脂肪酶、甘露糖苷酶、变聚糖酶、氧化酶、果胶分解酶、过氧化物酶、植酸酶、多酚氧化酶、蛋白水解酶、核糖核酸酶、转谷氨酰胺酶、或木聚糖酶。

[0270] 该基因可以从任何原核、真核或其他来源获得。

[0271] 本发明的酶-脱氧核糖核酸酶(DNA酶)

[0272] 具有DNA酶活性的多肽或脱氧核糖核酸酶(DNA酶)是催化DNA骨架中的磷酸二酯键的水解切割从而降解DNA的任何酶。可互换地使用两个术语,具有DNA酶活性的多肽和DNA酶。

[0273] 根据本发明,该DNA酶可获得自细菌;具体地而言优选的是可获得自木霉属的DNA酶;具体地而言优选的是可获得自哈茨木霉的DNA酶。在本发明的一个实施例中,具有脱氧核糖核酸酶活性的多肽不是来自米曲霉的S1核酸酶。

[0274] 具有DNA酶活性的多肽可以获得自木霉属,例如,哈茨木霉。在本发明的一个实施例中,具有DNA酶活性的多肽是要求保护的多肽。

[0275] 本发明的一方面涉及与SEQ ID NO:2成熟多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%序列一致性的分离的多肽,这些分离的多肽具有DNA酶活性。在一方面,这些多肽与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有多达10个(例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个)氨基酸的差异。

[0276] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少60%序列一致性的具有DNA酶活性的分离的多肽。

[0277] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少65%序列一致性的具有DNA酶活性的多肽。

[0278] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少70%序列一致性的具有DNA酶活性的多肽。

[0279] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少75%序列一致性的具有DNA酶活性的多肽。

[0280] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少80%序列一致性的具有DNA酶活性的多肽。

[0281] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少85%序列一致性的具有DNA酶活性的多肽。

[0282] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少90%序列一致性的具有DNA酶活性的多肽。

[0283] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少91%序列一致

性的具有DNA酶活性的多肽。

[0284] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少92%序列一致性的具有DNA酶活性的多肽。

[0285] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少93%序列一致性的具有DNA酶活性的多肽。

[0286] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少94%序列一致性的具有DNA酶活性的多肽。

[0287] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少95%序列一致性的具有DNA酶活性的多肽。

[0288] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少96%序列一致性的具有DNA酶活性的多肽。

[0289] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少97%序列一致性的具有DNA酶活性的多肽。

[0290] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少98%序列一致性的具有DNA酶活性的多肽。

[0291] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少99%序列一致性的具有DNA酶活性的多肽。

[0292] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有100%序列一致性的具有DNA酶活性的多肽。

[0293] 在一个实施例中,该多肽已经被分离。本发明的多肽优选地包括SEQ ID NO:2的氨基酸序列或其等位基因变体或由其组成;或为其具有DNA酶活性的片段。在另一方面,该多肽包括SEQ ID NO:2的成熟多肽或由其组成。在另一方面,该多肽包括SEQ ID NO:2的氨基酸1至188或由其组成。

[0294] 在另一个实施例中,本发明涉及一种具有DNA酶活性的分离的多肽,该分离的多肽是由在低严格条件下与(i) SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列、(ii) 其cDNA序列、或(iii) (i) 或(ii) 的全长补体杂交的一种多核苷酸所编码(萨姆布鲁克等,1989,分子克隆实验指南,第2版,纽约冷泉港)。在一个实施例中,该多肽已经被分离。

[0295] 在另一个实施例中,本发明涉及一种具有DNA酶活性的分离的多肽,该分离的多肽是由在低-中严格条件下与(i) SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列、(ii) 其cDNA序列、或(iii) (i) 或(ii) 的全长补体杂交的一种多核苷酸所编码。在一个实施例中,该多肽已经被分离。

[0296] 在另一个实施例中,本发明涉及一种具有DNA酶活性的分离的多肽,该分离的多肽是由在中严格条件下与(i) SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列、(ii) 其cDNA序列、或(iii) (i) 或(ii) 的全长补体杂交的一种多核苷酸所编码。在一个实施例中,该多肽已经被分离。

[0297] 在另一个实施例中,本发明涉及一种具有DNA酶活性的分离的多肽,该分离的多肽是由在中-高严格条件下与(i) SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列、(ii) 其cDNA序列、或(iii) (i) 或(ii) 的全长补体杂交的一种多核苷酸所编码。在一个实施例中,该多肽已经被分离。

[0298] 在另一个实施例中,本发明涉及一种具有DNA酶活性的分离的多肽,该分离的多肽

是由在高严格条件下与(i) SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列、(ii) 其cDNA序列、或(iii) (i) 或(ii)的全长补体杂交的一种多核苷酸所编码。在一个实施例中,该多肽已经被分离。

[0299] 在另一个实施例中,本发明涉及一种具有DNA酶活性的分离的多肽,该分离的多肽是由在非常高严格条件下与(i) SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列、(ii) 其cDNA序列、或(iii) (i) 或(ii)的全长补体杂交的一种多核苷酸所编码。在一个实施例中,该多肽已经被分离。

[0300] SEQ ID NO:1的多核苷酸或其子序列,连同SEQ ID NO:2的多肽或其片段可根据本领域熟知的方法用于设计核酸探针以鉴定和克隆来自不同属或种的株系的、编码具有DNA酶活性的多肽的DNA。具体地,可以遵循标准DNA印迹程序,使用此类探针与感兴趣的细胞的基因组DNA或cDNA杂交,以便鉴定和分离其中的对应基因。这样的探针可以大大短于整个序列,但是长度应该为至少15个,例如至少25个、至少35个或至少70个核苷酸。优选地,核酸探针的长度为至少100个核苷酸,例如长度为至少200个核苷酸、至少300个核苷酸、至少400个核苷酸、至少500个核苷酸、至少600个核苷酸、至少700个核苷酸、至少800个核苷酸、或至少900个核苷酸。DNA和RNA探针二者均可使用。典型地将探针进行标记,用于检测相应的基因(例如,用³²P、³H、³⁵S、生物素或抗生物素蛋白)。本发明涵盖此类探针。

[0301] 可以筛选从此类其他菌株制备的基因组DNA或cDNA文库的与上述探针杂交并编码具有DNA酶活性的多肽的DNA。来自此类其他菌株的基因组DNA或其他DNA可以通过琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳、或其他分离技术来分离。来自文库的DNA或分离的DNA可转移到并固定在硝酸纤维素或其他适合的载体材料上。为了鉴定与SEQ ID NO:1或其子序列杂交的克隆或DNA,将载体材料用于DNA印迹中。

[0302] 出于本发明的目的,杂交表示多核苷酸与对应于以下项的标记的核酸探针杂交:(i) SEQ ID NO:1;(ii) SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列;(iii) 其cDNA序列,(iv) 其全长互补体;或(v) 其子序列;在非常低、低严格条件、低-中严格条件、中严格条件、中-高严格条件、高严格条件至非常高严格条件下进行。在这些条件下与该核酸探针杂交的分子可以使用例如X射线薄膜或本领域中已知的任何其他检测手段进行检测。

[0303] 在另一个实施例中,本发明涉及一种由以下多核苷酸编码的具有DNA酶活性的多肽,该多核苷酸与SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列或其cDNA序列具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%序列一致性。在另外的实施例中,该多肽已经被分离。

[0304] 在另一个实施例中,本发明涉及在一个或多个(例如,若干个)位置处包含取代、缺失、和/或插入的SEQ ID NO:2的成熟多肽的变体。在一个实施例中,引入SEQ ID NO:2的成熟多肽中的氨基酸取代、缺失和/或插入的数目多达10个,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个。这些氨基酸变化可以具有微小性质,即,不会显著地影响蛋白的折叠和/或活性的保守氨基酸取代或插入;典型地1-30个氨基酸的小缺失;小的氨基末端的或羧基末端的延伸,例如氨基末端甲硫氨酸残基;高达20-25个残基的小接头肽;或通过改变净电荷或另一功能有利于纯化的小的延伸,例如聚组氨酸段、抗原表位或结合结构域。本发明中使用的DNA酶包括示为SEQ ID NO:2的氨基酸1至188的SEQ ID NO:2的成熟多肽,其获得自哈茨木霉。

[0305] 该DNA酶可以包括SEQ ID NO:2的氨基酸-37至206所示的氨基酸序列或具有DNA酶

的其片段,如成熟多肽,或由其组成。或者该DNA酶可以包括SEQ ID NO:2的氨基酸-37至206的片段或SEQ ID NO:2的氨基酸1至188,或由其组成,针对该片段从SEQ ID NO:2的氨基和/或羧基末端删除一个或多个氨基酸。

[0306] 本发明还提供了基本上与以上多肽同源的DNA酶多肽及其种类同系物(旁系同源物或直系同源物)。在此使用术语“基本上同源”表示与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少80%、优选至少85%、更优选至少90%、更优选至少95%、甚至更优选至少97%相同,并且最优选至少99%或更多相同的多肽、或其具有DNA酶活性的片段、或其直系同源物或旁系同源物。

[0307] 出于本发明的目的,使用如在EMBOSS包(EMBOSS:欧洲分子生物学开放软件套件,赖斯(Rice)等人,2000,遗传学趋势(Trends Genet.) 16:276-277)(优选5.0.0版或更新版本)的尼德尔程序中所实施的尼德尔曼-翁施算法(尼德尔曼(Needleman)和翁施(Wunsch),1970,分子生物学杂志(J.Mol.Biol.) 48:443-453)来确定两个氨基酸序列之间的序列一致性。使用的参数为空位开放罚分(gap open penalty)10,缺口延伸罚分(gap extension penalty)0.5和EBLOSUM62(BLOSUM62的EMBOSS版)取代矩阵。尼德尔标注的“最长的一致性”的输出(使用-非简化选项获得)被用作百分比一致性,并且计算如下:

[0308] $(\text{一致的残基} \times 100) / (\text{比对长度} - \text{比对中的空位总数})$

[0309] 在另一个实施例中,SEQ ID NO:2的DNA酶在一个或多个(例如,若干个)位置处包括取代、缺失和/或插入。在一个实施例中,引入SEQ ID NO:2的成熟多肽中的氨基酸取代、缺失和/或插入的数目不超过10,例如1、2、3、4、5、6、7、8、或9。这些氨基酸变化可以具有微小性质,即,不会显著地影响蛋白的折叠和/或活性的保守氨基酸取代或插入;典型地1-30个氨基酸的小缺失;小的氨基末端的或羧基末端的延伸,例如氨基末端甲硫氨酸残基;高达20-25个残基的小接头肽;或通过改变净电荷或另一功能有利于纯化的小的延伸,例如聚组氨酸段、抗原表位或结合结构域。

[0310] 保守取代的实例是在下组的范围内:碱性氨基酸(精氨酸、赖氨酸及组氨酸)、酸性氨基酸(谷氨酸和天冬氨酸)、极性氨基酸(谷氨酰胺和天冬酰胺)、疏水性氨基酸(亮氨酸、异亮氨酸及缬氨酸)、芳香族氨基酸(苯丙氨酸、色氨酸及酪氨酸)及小氨基酸(甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸及甲硫氨酸)。一般不会改变比活性的氨基酸取代是本领域已知的并且例如由H. 诺伊拉特(Neurath)和R.L. 希尔(Hill),1979,在蛋白质(The Proteins),学术出版社(Academic Press),纽约中描述。常见取代是Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Tyr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu、以及Asp/Gly。

[0311] 可替代地,氨基酸改变具有这样的性质:改变多肽的物理化学特性。例如,氨基酸改变可以改进多肽的热稳定性、改变底物特异性、改变最适pH等。

[0312] 可以根据本领域中已知的程序,如定点诱变或丙氨酸扫描诱变(坎宁汉(Cunningham)和威尔斯(Wells),1989,科学(Science) 244:1081-1085)来鉴定多肽中的必需氨基酸。在后一项技术中,在该分子中的每个残基处引入单个丙氨酸突变,并且对所得突变体分子的DNA酶活性进行测试以鉴定对于该分子的活性至关重要的氨基酸残基。还参见希尔顿(Hilton)等人,1996,生物化学杂志(J.Biol.Chem.) 271:4699-4708。也可结合假定接触位点氨基酸的突变,如通过以下技术例如核磁共振、结晶学、电子衍射、或光亲和标记

进行确定,对结构进行物理学分析,从而确定酶的活性位点或其他生物学相互作用。参见例如德沃斯(de Vos)等人,1992,科学(Science) 255:306-312;史密斯等人,1992,分子生物学杂志(J.Mol.Biol.) 224:899-904;沃德弗(Wlodaver)等人,1992,欧洲生物化学学会联盟简讯(FEBS Lett.) 309:59-64。还可以从与相关多肽的比对推断鉴别必需氨基酸。

[0313] 可以做出单个或多个氨基酸取代、缺失和/或插入并且使用诱变、重组和/或改组的已知方法进行测试,随后进行相关筛选程序,如由里德哈尔-奥尔森(Reidhaar-Olson)和萨奥尔(Sauer),1988,科学(Science) 241:53-57;博维(Bowie)和萨奥尔,1989,美国科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA) 86:2152-2156;W0 95/17413;或W0 95/22625所披露的那些。可以使用的其他方法包括易错PCR、噬菌体展示(例如,洛曼(Lowman)等人,1991,生物化学(Biochemistry) 30:10832-10837;美国专利号5,223,409;W092/06204)以及区域定向诱变(德比什尔(Derbyshire)等人,1986,基因(Gene) 46:145;内尔(Ner)等人,1988,DNA 7:127)。

[0314] 可以结合诱变/改组方法与高通量自动化筛选方法来检测由宿主细胞表达的克隆的、诱变的多肽的活性(内斯(Ness)等人,1999,自然生物技术(Nature Biotechnology) 17:893-896)。编码活性多肽的诱变的DNA分子可以回收自宿主细胞,并且使用本领域的标准方法对其进行迅速测序。这些方法允许迅速确定多肽中单个氨基酸残基的重要性。

[0315] 该多肽可以是一种杂交多肽,其中一个多肽的一个区域融合在另一个多肽的一个区域的N-末端或C-末端。

[0316] 该多肽可以是一种融合多肽或可裂解的融合多肽,其中另一个多肽是在本发明多肽的N-末端或C-末端处融合。通过将编码另一多肽的多核苷酸融合至本发明的多核苷酸而产生融合多肽。用于产生融合多肽的技术在本领域是已知的,并且包括连接编码多肽的编码序列,这样使得它们在框内并且使得融合多肽的表达处于相同的一个或多个启动子和终止子的控制下。融合多肽还可以使用内含肽技术来构建,其中融合多肽在翻译后产生(库珀(Cooper)等人,1993,欧洲分子生物学学会杂志(EMBO J.) 12:2575-2583;道森(Dawson)等人,1994,科学(Science) 266:776-779)。

[0317] 融合多肽可以在两种多肽之间进一步包括切割位点。在融合蛋白分泌之时,该位点被切割,从而释放出这两种多肽。切割位点的实例包括但不限于在以下文献中披露的位点:马丁(Martin)等人,2003,工业微生物与生物技术杂志

(J.Ind.Microbiol.Biotechnol.) 3:568-576;斯维特娜(Svetina)等人,2000,生物技术杂志(J.Biotechnol.) 76:245-251;拉斯穆森-威尔逊(Rasmussen-Wilson)等人,1997,应用与环境微生物学(Appl.Environ.Microbiol.) 63:3488-3493;沃德(Ward)等人,1995,生物技术(Biotechnology) 13:498-503;以及孔特雷拉斯(Contreras)等人,1991,生物技术9:378-381;伊顿(Eaton)等人,1986,生物化学(Biochemistry) 25:505-512;柯林斯-拉西(Collins-Racie)等人,1995,生物技术13:982-987;卡特(Carter)等人,1989,蛋白质:结构、功能以及遗传学(Proteins:Structure,Function,and Genetics) 6:240-248;以及史蒂文斯(Stevens),2003,药物发现世界(Drug Discovery World) 4:35-48。

[0318] 洗涤液中DNA酶的浓度典型地在以下范围内:0.0004-100ppm酶蛋白,0.001-100ppm酶蛋白,0.01-100ppm酶蛋白,优选0.05-50ppm酶蛋白,更优选0.1-50ppm酶蛋白,更优选0.1-30ppm酶蛋白,更优选0.5-20ppm酶蛋白,并且最优选0.5-10ppm酶蛋白。

[0319] 可以将本发明的DNA酶以对应于以下各项的量添加至洗涤剂组合物中：每升洗涤液至少1mg的DNA酶蛋白，例如至少5mg的蛋白、优选至少10mg的蛋白、更优选至少15mg的蛋白、甚至更优选至少20mg的蛋白、最优选至少30mg的蛋白，并且甚至最优选至少40mg的蛋白。因此，该洗涤剂组合物可以包括至少0.1%DNA酶蛋白，优选至少0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.8%、1.0%、1.2%、1.5%或2.0%的DNA酶蛋白。

[0320] 在一个实施例中，DNA酶的浓度典型地在以下范围内：1-40ppm酶蛋白，优选1-20ppm酶蛋白，更优选1-10ppm酶蛋白。

[0321] 可以使用常规稳定剂稳定本发明的清洁剂组合物的DNA酶，这些常规稳定剂例如是多元醇，例如丙二醇或甘油、糖或糖醇、乳酸、硼酸或硼酸衍生物，例如芳香族硼酸酯，或苯基硼酸衍生物，例如4-甲酰苯基硼酸，并且可以如在例如WO 92/19709和WO 92/19708中所述配置该组合物。

[0322] 本发明的多肽还可以结合到WO 97/07202中所披露的洗涤剂配制品中，通过引用将其结合在此。

[0323] 洗涤剂组合物

[0324] 在一个实施例中，本发明针对洗涤剂组合物，该洗涤剂组合物包含结合一种或多种额外的清洁组合物组分本发明的酶。在一个实施例中，该洗涤剂组合物包括多肽，该多肽包括SEQ ID NO:2的成熟多肽的氨基酸序列，或由其组成。在一个实施例中，该洗涤剂组合物处于固体形式。在另一个实施例中，该洗涤剂组合物处于液体形式。另外的组分的选择在普通技术人员技术内并且包括常规成分，包括以下列出的示例性、非限制性组分。

[0325] 液体洗涤剂组合物

[0326] 该液体洗涤剂组合物可以包括本发明的微囊，并且由此形成处于任何形式的任何洗涤剂组合物的一部分，如液体和粉状洗涤剂，以及皂和洗涤剂条。

[0327] 在一个实施例中，本发明针对液体洗涤剂组合物，这些组合物包含微囊(如上所述)与一种或多种额外的清洁组合物组分组合。

[0328] 该微囊(如上所述)可以按对应于从0.0001%至5% (w/w) 活性酶蛋白(AEP)的量被添加至该液体洗涤剂组合物；优选地从0.001%至5%，更优选地从0.005%至5%，更优选地从0.005%至4%，更优选地从0.005%至3%，更优选地从0.005%至2%，甚至更优选地从0.01%至2%，并且最优选地从0.01%至1% (w/w) 活性酶蛋白。

[0329] 该液体洗涤剂组合物具有一种物理形式，它不是固体(或气体)。它可以是可倾流的液体，糊剂，可倾流的凝胶或不可倾流的凝胶。它可以是各向同性的亦或或结构化的，优选是各向同性的。它可以是一种配制品，用于在自动洗衣机中洗涤或用于手洗。它还可以是个人护理产品，例如个人护理产品洗发水、牙膏、或洗手皂。

[0330] 该液体洗涤剂组合物可以是水性的，典型地包含按重量计至少20%并且高达95%的水，例如高达70%的水、高达50%的水、高达40%的水、高达30%的水、或高达20%的水。包括但不限于链烷醇、胺、二醇、醚以及多元醇的其他类型的液体可以被包括在水性液体洗涤剂中。水性液体洗涤剂可以包含从0%-30%的有机溶剂。液体洗涤剂甚至可以是非水性的，其中水含量低于10%，优选低于5%。

[0331] 洗涤剂成分可以通过水可溶性小袋中的区室彼此物理性地分开。由此可以避免组分之间的负面的储存相互作用。在洗涤溶液中，每个室的不同溶解曲线还可以引起选择的

组分的延迟溶解。

[0332] 该洗涤剂组分可以采用一种单位剂量产物的形式。单位剂量产品是不可重复使用的容器中的单一剂量的包装。它被越来越多的应用在针对衣物洗涤剂中。洗涤剂单位剂量产品是用于单次洗涤的洗涤剂的量的包装(例如,在由水溶性膜制成的袋中)。

[0333] 袋可以具有适合保存该组合物的任何形式、形状和材料,例如在与水接触之前,不允许该组合物从袋中释放出来。袋由封装内体积的水溶性膜制成。可以将所述内体积分具有袋的室。优选的膜是形成膜或片的聚合材料,优选是聚合物。优选的聚合物、共聚物或其衍生物选自聚丙烯酸酯、和水溶性丙烯酸酯共聚物、甲基纤维素、羧甲基纤维素、糊精钠、乙基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、麦芽糊精、聚甲基丙烯酸酯,最优选地是聚乙烯醇共聚物以及羟丙基甲基纤维素(HPMC)。优选地,在膜中的聚合物(例如PVA)的水平是至少约60%。优选的平均分子量将典型地是约20,000至约150,000。薄膜还可以是一种混合物,包括可通过水解可降解的以及水溶性的聚合物混合物,例如聚乳酸和聚乙烯醇(已知在贸易参考(Trade reference)M8630下,由Chris Craft In.Prod.Of Gary,Ind.,US销售),以及增塑剂,像甘油、乙二醇、丙二醇、山梨醇及其混合物。这些袋可以包括固体衣物清洁组合物或部分组分和/或液体清洁组合物或由水溶性膜分开的部分组分。组合物中,液体组分的区室可以与含有固体的区室不同(见例如US2009/0011970)。

[0334] 洗涤剂组分的选择可以包括(用于纺织品保养)有待清洁的纺织品的类型、污物的类型和/或程度、进行清洁时的温度、以及洗涤剂产品的配制的考虑。尽管根据一种具体的功能性对以下提及的组分由通用标题进行分类,但是这并不被解释为限制,因为如将被普通技术人员所理解,一种组分可以包括另外的功能性。

[0335] 另外的组分的选择在普通技术人员技术内并且包括常规成分,包括以下列出的示例性、非限制性组分。

[0336] 表面活性剂

[0337] 洗涤剂组合物可以包括一种或多种表面活性剂,它们可以是阴离子的和/或阳离子的和/或非离子的和/或半极性的和/或兼性离子的或其混合物。在一个具体实施例中,洗涤剂组合物包括一种或多种非离子型表面活性剂和一种或多种阴离子表面活性剂的混合物。这种或这些表面活性剂典型地以按重量计从约0.1%至60%的水平存在,例如约1%至约40%、或约3%至约20%、或约3%至约10%。基于所希望的清洁应用来选择这种或这些表面活性剂,并且这种或这些表面活性剂包括本领域中已知的任何一种或多种常规表面活性剂。

[0338] 当包含在其中时,该洗涤剂通常将会含有按重量计约1%至约40%的阴离子表面活性剂,如约5%至约30%,包括从约5%至约15%,或从约15%至约20%,或从约20%至约25%的阴离子型表面活性剂。阴离子表面活性剂的非限制性实例包括硫酸盐和磺酸盐,具体地说是直链烷基苯磺酸盐(LAS)、LAS的异构体、支链烷基苯磺酸盐(BABS)、苯基链烷磺酸盐、 α -烯烴磺酸盐(AOS)、烯烴磺酸盐、链烯烴磺酸盐、链烷-2,3-二基双(磺酸盐)、羟基链烷磺酸盐以及二磺酸盐、烷基硫酸盐(AS)(如十二烷基硫酸钠(SDS))、脂肪醇硫酸盐(FAS)、伯醇硫酸盐(PAS)、醇醚硫酸盐(AES或AEOS或FES,也被称为醇乙氧基硫酸盐或脂肪醇醚硫酸盐)、仲链烷磺酸盐(SAS)、石蜡烴磺酸盐(PS)、酯磺酸盐、磺化的脂肪酸甘油酯、 α -磺酸盐脂肪酸甲酯(α -SFMe或SES)(包括甲酯磺酸盐(MES))、烷基琥珀酸或烯基琥珀酸、十二烯基/十

四烯基琥珀酸 (DTSA)、氨基酸的脂肪酸衍生物、磺酸基琥珀酸或脂肪酸盐 (皂) 的二酯和单酯及其组合。

[0339] 当被包括在其中时,该洗涤剂将通常包含按重量计从约1%至约40%的阳离子表面活性剂,例如从约0.5%至约30%,特别是从约1%至约20%、从约3%至约10%,如从约3%至约5%、从约8%至约12%或从约10%至约12%。阳离子表面活性剂的非限制性实例包括烷基二甲基乙醇季胺 (ADMEAQ)、十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB)、二甲基二硬脂酰氯化铵 (DSDMAC)、以及烷基苄基二甲基铵、烷基季铵化合物、烷氧基化季铵 (AQA) 化合物、酯季铵及其组合。

[0340] 当被包括在其中时,该洗涤剂将通常包含按重量计从约0.2%至约40%的非离子表面活性剂,例如从约0.5%至约30%,特别是从约1%至约20%、从约3%至约10%,如从约3%至约5%、从约8%至约12%或从约10%至约12%。非离子型表面活性剂的非限制性实例包括醇乙氧基化物 (AE或AEO)、醇丙氧基化物、丙氧基化的脂肪醇 (PFA),烷氧基化的脂肪酸烷基酯 (例如乙氧基化的和/或丙氧基化的脂肪酸烷基酯),烷基酚乙氧基化物 (APE),壬基酚乙氧基化物 (NPE),烷基多糖苷 (APG),烷氧基化胺,脂肪酸单乙醇酰胺 (FAM),脂肪酸二乙醇酰胺 (FADA),乙氧基化的脂肪酸单乙醇酰胺 (EFAM),丙氧基化的脂肪酸单乙醇酰胺 (PFAM),多羟基烷基脂肪酸酰胺,或葡萄糖胺的N-酰基N-烷基衍生物 (葡糖酰胺 (GA),或脂肪酸葡糖酰胺 (FAGA)),连同在SPAN和TWEEN商品名下可获得的产品,及其组合。

[0341] 当被包括在其中时,洗涤剂将通常包含按重量计从约0%至约40%的半极性表面活性剂。半极化表面活性剂的非限制性实例包括氧化胺 (AO),例如烷基二甲胺氧化物、N-(椰油基烷基)-N,N-二甲胺氧化物和N-(牛油-烷基)-N,N-双(2-羟乙基)胺氧化物,及其组合。

[0342] 当被包括在其中时,洗涤剂将通常包含按重量计从约0%至约40%的兼性离子表面活性剂。兼性离子表面活性剂的非限制性实例包括甜菜碱,如烷基二甲基甜菜碱、磺基甜菜碱及其组合。

[0343] 助水溶剂

[0344] 助水溶剂是如下化合物,该化合物在水性溶液中溶解疏水化合物(或相反地,在非极性环境中的极性物质)。一般地,助水溶物具有亲水和疏水两种特征(如由表面活性剂已知的所谓的两亲性质);然而,助水溶物的分子结构一般不利于自发性自聚集,参见例如通过霍奇登(Hodgdon)和卡勒(Kaler)(2007),胶体&界面科学新见(Current Opinion in Colloid&Interface Science)12:121-128的综述。助水溶剂并不显示临界浓度,高于该浓度就会发生如对表面活性剂而言所发现的自聚集以及脂质形成胶束、薄层或其他很好地定义的中间相。很多助水溶剂反而示出连续型聚集过程,其中聚集体的大小随着浓度增加而增长。然而,很多助水溶剂改变了包括极性和非极性特征的物质的系统(包括水、油、表面活性剂、和聚合物的混合物)的相行为、稳定性、和胶体特性。经典地从制药、个人护理、食品跨行业至技术应用使用助水溶剂。助水溶剂在洗涤剂组合物中的使用允许例如更浓的表面活性剂配制品(如在通过除去水而压缩液体洗涤剂的过程中)而不引起不希望的现象,例如相分离或高粘度。

[0345] 洗涤剂可以包含按重量计0-10%,例如按重量计0-5%,例如约0.5%至约5%、或约3%至约5%的助水溶剂。可以利用本领域中已知的用于在洗涤剂中使用的任何助水溶

剂。助水溶剂的非限制性实例包括苯磺酸钠、对甲苯磺酸钠(STS)、二甲苯磺酸钠(SXS)、枯烯磺酸钠(SCS)、伞花炔磺酸钠、氧化胺、醇和聚乙二醇醚、羟基萘甲酸钠、羟基萘磺酸钠、乙基己基磺酸钠及其组合。

[0346] 助洗剂和共助洗剂

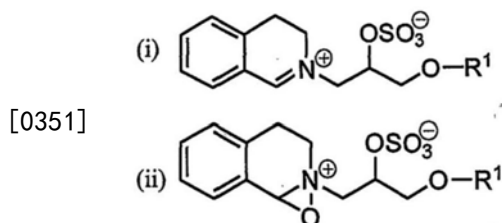
[0347] 洗涤剂组合物可以包含按重量计约0-65%，例如约5%至约50%的洗涤剂助洗剂或共助洗剂或其混合物。助洗剂和/或共助洗剂可以具体是形成具有Ca和Mg的水溶性复合物的螯合剂。可以使用本领域中已知用于在洗涤剂中使用的任何助洗剂和/或共助洗剂。助洗剂的非限制性实例包括沸石、二磷酸盐(焦磷酸盐)、三磷酸盐例如三磷酸钠(STP或STPP)、碳酸盐例如碳酸钠、可溶性硅酸盐例如硅酸钠、层状硅酸盐(例如，来自赫斯特公司(Hoechst)的SKS-6)、乙醇胺例如2-氨基乙-1-醇(MEA)、二乙醇胺(DEA，也称为2,2'-亚氨基二乙-1-醇)、三乙醇胺(TEA，也称为2,2',2''-次氨基三乙-1-醇)、以及羧甲基菊粉(CMI)、及其组合。

[0348] 该洗涤剂组合物还可以包含按重量计0-50%，例如约5%至约30%的洗涤剂共助洗剂。洗涤剂组合物可以单独地包括一种共助洗剂，或与一种助洗剂，例如沸石助洗剂组合。共助洗剂的非限制性实例包括聚丙烯酸酯的均聚物或其共聚物，例如聚(丙烯酸)(PAA)或共聚(丙烯酸/马来酸)(PAA/PMA)。另外的非限制性实例包括柠檬酸盐，螯合剂，例如氨基羧酸盐、氨基多羧酸盐和膦酸盐，以及烷基-或烯基琥珀酸。另外的具体实例包括2,2',2''-次氨基三乙酸(NTA)、乙二胺四乙酸(EDTA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)、亚氨基二丁二酸(IDS)、乙二胺-N,N'-二丁二酸(EDDS)、甲基甘氨酸二乙酸(MGDA)、谷氨酸-N,N-二乙酸(GLDA)、1-羟基乙烷-1,1-二膦酸(HEDP)、乙二胺四(亚甲基膦酸)(EDTMPA)、二亚乙基三胺五(亚甲基膦酸)(DTMPA或DTPMPA)、N-(2-羟乙基)亚氨基二乙酸(EDG)、天冬氨酸-N-单乙酸(ASMA)、天冬氨酸-N,N-二乙酸(ASDA)、天冬氨酸-N-单丙酸(ASMP)、亚氨基二丁二酸(iminodisuccinic acid)(IDA)、N-(2-磺甲基)-天冬氨酸(SMAS)、N-(2-磺乙基)-天冬氨酸(SEAS)、N-(2-磺甲基)-谷氨酸(SMGL)、N-(2-磺乙基)-谷氨酸(SEGL)、N-甲基亚氨基二乙酸(MIDA)、 α -丙氨酸-N,N-二乙酸(α -ALDA)、丝氨酸-N,N-二乙酸(SEDA)、异丝氨酸-N,N-二乙酸(ISDA)、苯丙氨酸-N,N-二乙酸(PHDA)、邻氨基苯甲酸-N,N-二乙酸(ANDA)、磺胺酸-N,N-二乙酸(SLDA)、牛磺酸-N,N-二乙酸(TUDA)以及磺甲基-N,N-二乙酸(SMDA)、N-(2-羟乙基)-亚乙基二胺-N,N',N''-三乙酸盐(HEDTA)、二乙醇甘氨酸(DEG)、二亚乙基三胺五(亚甲基膦酸)(DTPMP)、氨基三(亚甲基膦酸)(ATMP)、及其组合和盐。其他示例性助洗剂和/或共助洗剂描述于例如W0 09/102854、US 5977053中

[0349] 漂白系统

[0350] 该洗涤剂可以包含按重量计0-30%，例如约1%至约20%的漂白系统。可以使用本领域中已知用于洗涤剂中的任何漂白系统。适合的漂白系统组分包括漂白催化剂、光漂白剂、漂白活化剂、过氧化氢源如过碳酸钠、过硼酸钠和过氧化氢-尿素(1:1)、预成型过酸及其混合物。适合的预成型过酸包括但不限于过氧羧酸及盐、二过氧二羧酸、过亚氨酸(perimidic acid)及盐、过氧单硫酸及盐(例如过硫酸氢钾(Oxone(R))及其混合物。漂白体系的非限制性例子包括与过酸形成漂白活化剂组合的基于过氧化物的漂白体系，其可以包含例如无机盐，包括碱金属盐例如过硼酸盐的钠盐(通常为单或四水合物)、过碳酸盐、过硫酸盐、过磷酸盐、过硅酸盐。术语漂白活化剂在此意指一种与过氧化氢反应以经由过水解反

应形成过酸的化合物。以此方式形成的过酸构成活化的漂白剂。有待在此使用的适合漂白活化剂包括属于酯、酰胺、酰亚胺或酸酐类别的那些。适合的实例是四乙酰基乙二胺 (TAED)、4-[(3,5,5-三甲基己酰基) 氧基] 苯-1-磺酸钠 (ISONOBS)、4-(十二酰基氧基) 苯-1-磺酸盐 (LOBS)、4-(癸酰基氧基) 苯-1-磺酸盐、4-(癸酰基氧基) 苯甲酸盐 (DOBS或DOBA)、4-(壬酰基氧基) 苯-1-磺酸盐 (NOBS) 和/或披露于W0 98/17767中的那些。感兴趣的漂白活化剂的具体家族披露于EP 624154中并且在那个家族中特别优选的是乙酰柠檬酸三乙酯 (ATC)。ATC或短链甘油三酸酯 (像三醋汀) 具有以下优点,它是环境友好的。此外,乙酰柠檬酸三乙酯和三醋汀在存储时在产品中具有良好的水解稳定性,并且是一种有效的漂白活化剂。最后,ATC是多功能的,因为在过水解反应中释放的柠檬酸盐可以作为助洗剂起作用。可替代地,漂白系统可以包括例如酰胺、酰亚胺、或砜型的过氧酸。漂白系统还可以包括过酸,例如6-(邻苯二甲酰亚胺基) 过氧己酸 (PAP)。漂白系统还可以包括一种漂白催化剂。在一些实施例中,漂白组分可以是选自下组的有机催化剂,该组由以下各项组成:具有下式的有机催化剂:



[0352] (iii) 及其混合物;

[0353] 其中每个 R^1 独立地是含有从9到24个碳的支链烷基或含有从11到24个碳的直链烷基,优选地每个 R^1 独立地是含有从9到18个碳的支链烷基或含有从11到18个碳的直链烷基,更优选地每个 R^1 独立地选自下组,该组由以下各项组成:2-丙基庚基、2-丁基辛基、2-戊基壬基、2-己基癸基、十二烷基、十四烷基、十六烷基、十八烷基、异壬基、异癸基、异十三烷基以及异十五烷基。其他示例性漂白系统描述于例如W0 2007/087258、W0 2007/087244、W0 2007/087259、EP 1867708 (维生素K) 以及W0 2007/087242中。适合的光漂白剂可以例如是磺化的酞菁锌或酞菁铝。

[0354] 优选地,除了漂白催化剂、特别是有机漂白催化剂以外,漂白组分还包括过酸源。过酸源可以选自 (a) 预形成的过酸; (b) 过碳酸盐、过硼酸盐或过硫酸盐 (过氧化氢源), 优选与一种漂白活化剂组合; 和 (c) 过水解酶以及酯, 用于在纺织品或硬表面处理步骤中在水的存在下原位形成过酸。

[0355] 聚合物

[0356] 洗涤剂可以包含按重量计0%-10%, 例如0.5%-5%、2%-5%、0.5%-2%或0.2%-1%的聚合物。可以利用本领域中已知的用于在洗涤剂中使用的任何聚合物。聚合物可以作为如以上提到的共助洗剂起作用,或可以提供抗再沉积、纤维保护、污垢释放、染料转移抑制、油污清洁和/或防沫特性。一些聚合物可以具有多于一种的以上提到的特性和/或多于一种的以下提到的基序(motif)。示例性聚合物包括(羧甲基)纤维素(CMC)、聚(乙烯醇)(PVA)、聚(乙烯吡咯烷酮)(PVP)、聚(乙二醇)或聚(环氧乙烷)(PEG)、乙氧基化的聚(亚乙基亚胺)、羧甲基菊粉(CMI)、和聚羧化物,例如PAA、PAA/PMA、聚-天冬氨酸、和甲基丙烯酸月桂酯/丙烯酸共聚物、疏水改性CMC(HM-CMC)和硅酮、对苯二甲酸和低聚乙二醇的共聚物、

聚(对苯二甲酸乙二酯)和聚(氧乙烯对苯二甲酸乙二酯)的共聚物(PET-POET)、PVP、聚(乙烯基咪唑)(PVI)、聚(乙烯吡啶-N-氧化物)(PVP0或PVPN0)以及聚乙烯吡咯烷酮-乙烯基咪唑(PVPVI)。另外的示例性聚合物包括磺化的聚羧酸酯、聚环氧乙烷和聚环氧丙烷(PEO-PP0)以及乙氧基硫酸二季铵盐。其他示例性聚合物披露于例如W0 2006/130575中。也考虑了以上提到的聚合物的盐。

[0357] 织物调色剂

[0358] 本发明的洗涤剂组合物还可以包括织物调色剂,例如染料或色素,当配制在洗涤剂组合物中时,当所述织物与一种洗涤液接触时织物调色剂可以沉积在织物上,该洗涤液包括所述洗涤剂组合物,并且因此通过可见光的吸收/反射改变所述织物的色彩。荧光增白剂发射至少一些可见光。相比之下,因为它们吸收至少一部分可见光光谱,所以织物调色剂改变表面的色彩。适合的织物调色剂包括染料和染料-粘土轭合物,并且还可以包括色素。适合的染料包括小分子染料和聚合物染料。适合的小分子染料包括选自下组的小分子染料,该组由落入颜色索引(Colour Index)(C.I.)分类的以下染料组成:直接蓝、直接红、直接紫、酸性蓝、酸性红、酸性紫、碱性蓝、碱性紫和碱性红、或其混合物,例如描述于W0 2005/03274、W0 2005/03275、W0 2005/03276和EP 1876226中(将其通过引用而特此结合)。洗涤剂组合物优选包括从约0.00003wt%至约0.2wt%、从约0.00008wt%至约0.05wt%、或甚至从约0.0001wt%至约0.04wt%的织物调色剂。该组合物可以包括从0.0001wt%至0.2wt%的织物调色剂,当该组合物处于单位剂量袋的形式时,这可以是特别优选的。适合的调色剂还披露于例如W0 2007/087257和W0 2007/087243中。

[0359] 酶

[0360] 洗涤剂添加剂连同洗涤剂组合物可以包括一种或多种额外的酶,例如蛋白酶、脂肪酶、角质酶、淀粉酶、糖酶、纤维素酶、果胶酶、甘露聚糖酶、阿拉伯糖酶、半乳聚糖酶、木聚糖酶、氧化酶,例如漆酶、和/或过氧化物酶。

[0361] 一般而言,一种或多种所选酶的特性应与选定的洗涤剂相容(即,最适pH,与其他酶和非酶成分的相容性,等等),并且该一种或多种酶应以有效量存在。在一个优选的实施例中,该洗涤剂添加剂或该洗涤剂组合物包括蛋白酶。

[0362] 纤维素酶

[0363] 适合的纤维素酶包括细菌或真菌来源的那些。包括化学修饰的或蛋白质工程处理的突变体。适合的纤维素酶包括来自芽孢杆菌属、假单胞菌属、腐质霉属、镰孢属、梭孢壳属、枝顶孢属的纤维素酶,例如,从在US 4,435,307、US 5,648,263、US 5,691,178、US 5,776,757以及W0 89/09259中披露的特异腐质霉、嗜热毁丝霉(*Myceliophthora thermophila*)和尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)产生的真菌纤维素酶。

[0364] 特别适合的纤维素酶是具有颜色护理益处的碱性或中性纤维素酶。此类纤维素酶的实例是描述于EP 0 495 257、EP 0 531 372、W0 96/11262、W0 96/29397、W0 98/08940中的纤维素酶。其他实例是例如描述于W0 94/07998、EP 0 531 315、US 5,457,046、US 5,686,593、US 5,763,254、W0 95/24471、W0 98/12307以及W0 99/001544中的那些纤维素酶变体。

[0365] 其他纤维素酶是具有一种序列的内切- β -1,4-葡聚糖酶,该序列与W0 2002/099091的SEQ ID NO:2的位置1至位置773的氨基酸序列具有至少97%一致性,或一种家族

44木葡聚糖酶,该木葡聚糖酶具有一种序列,该序列与WO 2001/062903的SEQ ID NO:2的位置40-559具有至少60%一致性。

[0366] 可商购的纤维素酶包括CelluzymeTM和CarezymeTM(诺维信公司(Novozymes A/S))、Carezyme PremiumTM(诺维信公司)、CellucleanTM(诺维信公司)、Celluclean ClassicTM(诺维信公司)、CellusoftTM(诺维信公司)、WhitezymeTM(诺维信公司)、ClazinaseTM和Puradax HATM(杰能科国际公司(Genencor International Inc.))以及KAC-500(B)TM(花王株式会社(Kao Corporation))。

[0367] 蛋白酶

[0368] 适合的蛋白酶包括细菌、真菌、植物、病毒或动物来源的那些,例如植物或微生物来源。优选微生物来源。包括化学修饰的或蛋白质工程处理的突变体。它可以是碱性蛋白酶,例如丝氨酸蛋白酶或金属蛋白酶。丝氨酸蛋白酶可以例如是S1家族(如胰蛋白酶)或S8家族(如枯草杆菌蛋白酶)。金属蛋白酶可以例如是来自例如家族M4的嗜热菌蛋白酶或其他金属蛋白酶,例如来自M5、M7或M8家族的那些。

[0369] 术语“枯草杆菌酶”是指根据斯艾森(Siezen)等人,蛋白质工程学(Protein Engng.) 4(1991) 719-737和斯艾森等人,蛋白质科学(Protein Science) 6(1997) 501-523的丝氨酸蛋白酶亚组。丝氨酸蛋白酶是特征为在活性位点具有与底物形成共价加合物的丝氨酸的蛋白酶的一个亚组。枯草杆菌酶可以划分为6个亚部,即,枯草杆菌蛋白酶家族、嗜热蛋白酶家族、蛋白酶K家族、羊毛硫抗生素肽酶家族、Kexin家族和Pyrolysin家族。

[0370] 枯草杆菌酶的实例是获得自芽孢杆菌属的那些,例如描述于US 7262042和WO 09/021867中的迟缓芽孢杆菌、嗜碱芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、短小芽孢杆菌和吉氏芽孢杆菌;和描述于WO 89/06279中的枯草杆菌蛋白酶迟缓(lentus)、枯草杆菌蛋白酶诺和(Novo)、枯草杆菌蛋白酶嘉士伯(Carlsberg)、地衣芽孢杆菌、枯草杆菌蛋白酶BPN'、枯草杆菌蛋白酶309、枯草杆菌蛋白酶147和枯草杆菌蛋白酶168以及描述于(WO 93/18140)中的蛋白酶PD138。其他有用的蛋白酶可以是描述于WO 92/175177、WO 01/016285、WO 02/026024以及WO 02/016547中的那些。胰蛋白酶样蛋白酶的实例是胰蛋白酶(例如猪或牛来源的)和镰孢菌蛋白酶(描述于WO 89/06270、WO 94/25583和WO 05/040372中),以及获得自纤维单胞菌(Cellulomonas)的胰凝乳蛋白酶(描述于WO 05/052161和WO 05/052146中)。

[0371] 进一步优选的蛋白酶是来自迟缓芽孢杆菌DSM 5483的碱性蛋白酶(如在例如WO 95/23221中所述)、及其变体(在WO 92/21760、WO 95/23221、EP 1921147以及EP 1921148中描述的)。

[0372] 金属蛋白酶的实例是如描述于WO 07/044993(杰能科国际公司(Genencor Int.))中的中性金属蛋白酶,例如获得自解淀粉芽孢杆菌的那些。

[0373] 有用的蛋白酶的实例是于以下各项中的变体:WO 92/19729、WO 96/034946、WO 98/20115、WO 98/20116、WO 99/011768、WO 01/44452、WO 03/006602、WO 04/03186、WO 04/041979、WO 07/006305、WO 11/036263、WO 11/036264,尤其是在以下位置的一个或多个中具有取代的变体:3、4、9、15、27、36、57、68、76、87、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、106、118、120、123、128、129、130、160、167、170、194、195、199、205、206、217、218、222、224、232、235、236、245、248、252以及274,使用BPN'编号。更优选地,这些枯草杆菌酶变体可以包含以下突变:S3T、V4I、S9R、A15T、K27R、*36D、V68A、N76D、N87S、R、*97E、A98S、S99G、D、A、

S99AD、S101G、M、R S103A、V104I、Y、N、S106A、G118V、R、H120D、N、N123S、S128L、P129Q、S130A、G160D、Y167A、R170S、A194P、G195E、V199M、V205I、L217D、N218D、M222S、A232V、K235L、Q236H、Q245R、N252K、T274A(使用BPN'进行编号)。

[0374] 适合的可商购蛋白酶包括以下列商品名出售的那些: **Alcalase®**、**Duralase™**、**Durazym™**、**Relase®**、**Relase® Ultra**、**Savinase®**、**Savinase® Ultra**、**Primase®**、**Polarzyme®**、**Kannase®**、**Liquanase®**、**Liquanase® Ultra**、**Ovozyme®**、**Coronase®**、**Coronase® Ultra**、**Neutrase®**、**Everlase®**和**Esperase®**(诺维信公司),以下列商品名出售的那些:**Maxatase®**、**Maxacal®**、**Maxapem®**、**Purafect®**、**Purafect Prime®**、**Preferenz™**、**Purafect MA®**、**Purafect Ox®**、**Purafect OxP®**、**Puramax®**、**Properase®**、**Effectenz™**、**FN2®**、**FN3®**、**FN4®**、**Excellase®**、**Opticlean®**以及**Optimase®**(丹尼斯克/杜邦公司(Danisco/DuPont))、**Axapem™**(吉斯特布罗卡德斯公司(Gist-Brocades N.V.))、BLAP(序列示于US 5352604的图29中)及其变体(汉高股份(Henkel AG))以及来自花王株式会社(Kao)的KAP(嗜碱芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶)。

[0375] 脂肪酶和角质酶

[0376] 适合的脂肪酶和角质酶包括细菌或真菌来源的那些。包括化学修饰的或蛋白工程化的突变体酶。实例包括来自嗜热真菌属的脂肪酶,例如如描述于EP 258068和EP 305216中的来自疏绵状嗜热丝孢菌(早先命名为疏棉状腐质霉);来自腐质霉属的角质酶,例如特异腐质霉(WO 96/13580);来自假单胞菌属的菌株的脂肪酶(这些中的一些现在改名为伯克霍尔氏菌属),例如产碱假单胞菌或类产碱假单胞菌(EP 218272)、洋葱假单胞菌(EP 331376)、假单胞菌属菌株SD705(WO 95/06720&WO 96/27002)、威斯康星假单胞菌(*P.wisconsinensis*)(WO 96/12012);GDSL-型链霉菌属脂肪酶(WO 10/065455);来自稻瘟病菌的角质酶(WO 10/107560);来自门多萨假单胞菌的角质酶(US 5,389,536);来自褐色嗜热裂孢菌(*Thermobifida fusca*)的脂肪酶(WO 11/084412);嗜热脂肪土芽孢杆菌脂肪酶(WO 11/084417);来自枯草芽孢杆菌的脂肪酶(WO 11/084599);以及来自灰色链霉菌(WO 11/150157)和始旋链霉菌(*S.pristinaespiralis*)的脂肪酶(WO 12/137147)。

[0377] 其他实例是脂肪酶变体,例如描述于EP 407225、WO 92/05249、WO 94/01541、WO 94/25578、WO 95/14783、WO 95/30744、WO 95/35381、WO 95/22615、WO 96/00292、WO 97/04079、WO 97/07202、WO 00/34450、WO 00/60063、WO 01/92502、WO 07/87508以及WO 09/109500中的那些。

[0378] 优选的商业化脂肪酶产品包括Lipolase™、Lipex™;Lipolex™和Lipoclean™(诺维信公司),Lumafast(最初来自杰能科公司(Genencor))以及Lipomax(最初来自吉斯特-博克德斯公司(Gist-Brocades))。

[0379] 再其他实例是有时称为酰基转移酶或过水解酶的脂肪酶,例如与南极假丝酵母(*Candida antarctica*)脂肪酶A具有同源性的酰基转移酶(WO 10/111143)、来自耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*)的酰基转移酶(WO 05/56782)、来自CE 7家族的过水解酶(WO 09/67279)以及耻垢分枝杆菌过水解酶的变体(特别是来自亨斯迈纺织品染化有限公

司(Huntsman Textile Effects Pte Ltd)的商业产品Gentle Power Bleach中所用的S54V变体)(WO 10/100028)。

[0380] 淀粉酶

[0381] 可以与本发明的酶一起使用的适合的淀粉酶可以是 α -淀粉酶或葡糖淀粉酶并且可以具有细菌或真菌起源。包括化学修饰的或蛋白质工程处理的突变体。淀粉酶包括例如获得自芽孢杆菌属的 α -淀粉酶,例如GB 1,296,839中更详细描述的地衣芽孢杆菌具体株系的 α -淀粉酶。

[0382] 适合的淀粉酶包括具有WO 95/10603中的SEQ ID NO:2的淀粉酶或其与SEQ ID NO:3具有90%序列一致性的变体。优选的变体描述于WO 94/02597、WO 94/18314、WO 97/43424以及WO 99/019467的SEQ ID NO:4中,例如在一个或多个以下位置中具有取代的变体:15、23、105、106、124、128、133、154、156、178、179、181、188、190、197、201、202、207、208、209、211、243、264、304、305、391、408以及444。

[0383] 不同的适合的淀粉酶包括具有WO 02/010355中的SEQ ID NO:6的淀粉酶或其与SEQ ID NO:6具有90%序列一致性的变体。SEQ ID NO:6的优选变体是在位置181和182中具有缺失并且在位置193中具有取代的那些。

[0384] 其他适合的淀粉酶是包括示于WO 2006/066594的SEQ ID NO:6中的获得自解淀粉芽孢杆菌的 α -淀粉酶的残基1-33和示于WO 2006/066594的SEQ ID NO:4中的地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶的残基36-483的杂合 α -淀粉酶或其具有90%序列一致性的变体。这一杂合 α -淀粉酶的优选变体是在以下位置中的一个或多个中具有取代、缺失或插入的那些:G48、T49、G107、H156、A181、N190、M197、I201、A209以及Q264。包括示于WO 2006/066594的SEQ ID NO:6中的获得自解淀粉芽孢杆菌的 α -淀粉酶的残基1-33和SEQ ID NO:4的残基36-483的杂合 α -淀粉酶的最优选变体是具有以下取代的那些:

[0385] M197T;

[0386] H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S;或

[0387] G48A+T49I+G107A+H156Y+A181T+N190F+I201F+A209V+Q264S。

[0388] 适合的另外的淀粉酶是具有WO 99/019467中的SEQ ID NO:6的淀粉酶或其与SEQ ID NO:6具有90%序列一致性的变体。SEQ ID NO:6的优选变体是在以下位置中的一个或多个中具有取代、缺失或插入的那些:R181、G182、H183、G184、N195、I206、E212、E216以及K269。特别优选的淀粉酶是在位置R181和G182或位置H183和G184中具有缺失的那些。

[0389] 可以使用的另外的淀粉酶是具有WO 96/023873的SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:7的那些或其与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:7具有90%序列一致性的变体。使用WO 96/023873的SEQ ID 2用于编号,SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:7的优选变体是在以下位置中的一个或多个中具有取代、缺失或插入的那些:140、181、182、183、184、195、206、212、243、260、269、304以及476。更优选的变体是在选自181、182、183和184的两个位置,例如181和182、182和183、或位置183和184具有缺失的那些。SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:7的最优选的淀粉酶变体是在位置183和184中具有缺失并且在位置140、195、206、243、260、304以及476的一个或多个中具有取代的那些。

[0390] 可以使用的其他淀粉酶是具有WO 08/153815中的SEQ ID NO:2、WO 01/66712中的

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

[0391] 另外的适合的淀粉酶是具有WO 09/061380中的SEQ ID NO:2的淀粉酶或其与SEQ ID NO:2具有90%序列一致性的变体。SEQ ID NO:2的优选变体是在以下位置中的一个或多个中具有C末端的截短和/或取代、缺失或插入的那些:Q87、Q98、S125、N128、T131、T165、K178、R180、S181、T182、G183、M201、F202、N225、S243、N272、N282、Y305、R309、D319、Q320、Q359、K444以及G475。SEQ ID NO:2的更优选变体是在一个或多个以下位置中具有取代的那些:Q87E、R、Q98R、S125A、N128C、T131I、T165I、K178L、T182G、M201L、F202Y、N225E、R、N272E、R、S243Q、A、E、D、Y305R、R309A、Q320R、Q359E、K444E以及G475K和/或位置R180和/或S181或T182和/或G183的缺失。SEQ ID NO:2的最优选的淀粉酶变体是具有以下取代的那些:

[0392] N128C+K178L+T182G+Y305R+G475K;

[0393] N128C+K178L+T182G+F202Y+Y305R+D319T+G475K;

[0394] S125A+N128C+K178L+T182G+Y305R+G475K;或

[0395] S125A+N128C+T131I+T165I+K178L+T182G+Y305R+G475K,其中这些变体是C-末端截短的并且任选地进一步在位置243处包括取代和/或在位置180和/或位置181处包括缺失。

[0396] 其他适合的淀粉酶是具有WO 01/66712中的SEQ ID NO:12的 α -淀粉酶或与SEQ ID NO:12具有至少90%序列一致性的变体。优选的淀粉酶变体是在WO 01/66712中的SEQ ID NO:12的以下位置中的一个或多个中具有取代、缺失或插入的那些:R28、R118、N174、R181、G182、D183、G184、G186、W189、N195、M202、Y298、N299、K302、S303、N306、R310、N314、R320、H324、E345、Y396、R400、W439、R444、N445、K446、Q449、R458、N471、N484。特别优选的淀粉酶包括具有D183和G184的缺失并且具有R118K、N195F、R320K及R458K的取代的变体,以及另外在选自下组的一个或多个位置中具有取代的变体:M9、G149、G182、G186、M202、T257、Y295、N299、M323、E345以及A339,最优选的是另外在所有这些位置中具有取代的变体。

[0397] 其他实例是例如描述于WO 2011/098531、WO 2013/001078及WO 2013/001087中的那些淀粉酶变体。

[0398] 可商购的淀粉酶是DuramylTM、TermamylTM、FungamylTM、StainzymeTM、Stainzyme PlusTM、NatalaseTM、Liquozyme X及BANTM(来自诺维信公司),以及RapidaseTM、PurastarTM/EffectenzTM、Powerase及Preferenz S100(来自杰能科国际有限公司/杜邦公司(Genencor International Inc./DuPont))。

[0399] 过氧化物酶/氧化酶

[0400] 根据本发明的过氧化物酶是由如由国际生物化学与分子生物学联合会命名委员会(IUBMB)陈述的酶分类EC 1.11.1.7包括的过氧化物酶,或获得自其中的展示出过氧化物酶活性的任何片段。

[0401] 适合的过氧化物酶包括植物、细菌或真菌来源的那些。包括化学修饰的或蛋白质工程处理的突变体。有用的过氧化物酶的实例包括来自拟鬼伞属,例如来自灰盖拟鬼伞(*C.cinerea*)的过氧化物酶(EP 179,486),及其变体,如在WO 93/24618、WO 95/10602以及

WO 98/15257中描述的那些。

[0402] 根据本发明的过氧化物酶还包括卤代过氧化物酶,例如氯过氧化物酶、溴过氧化物酶以及展示出氯过氧化物酶或溴过氧化物酶活性的化合物。根据其对卤素离子的特异性将卤代过氧化物酶加以分类。氯过氧化物酶(E.C.1.11.1.10)催化从氯根离子形成次氯酸盐。

[0403] 在一个实施例中,本发明的卤代过氧化物酶是氯过氧化物酶。优选地,该卤代过氧化物酶是钒卤代过氧化物酶,即含钒酸盐的卤代过氧化物酶。在本发明的一个优选方法中,将含钒酸盐的卤代过氧化物酶与氯根离子来源组合。

[0404] 已经从许多不同真菌,特别是从暗色丝孢菌(dematiaceous hyphomycete)真菌组中分离出了卤代过氧化物酶,比如卡尔黑霉属(*Caldariomyces*) (例如煤卡尔黑霉(*C.fumago*))、链格孢属、弯孢属(例如疣枝弯孢(*C.verruculosa*)和不等弯孢(*C.inaequalis*))、内脐蠕孢属、细基格孢属以及葡萄孢属。

[0405] 还已经从细菌,如假单胞菌属(例如,吡咯假单胞菌(*P.pyrrrocinia*))和链霉菌属(例如,金色链霉菌(*S.aureofaciens*))中分离出了卤代过氧化物酶。

[0406] 在一个优选实施例中,该卤代过氧化物酶可源自弯孢属,特别是疣枝弯孢(*Curvularia verruculosa*)或不等弯孢,如如描述于WO 95/27046中的不等弯孢CBS 102.42或描述于WO 97/04102中的疣枝弯孢CBS 147.63或疣枝弯孢CBS 444.70;或可源自如描述于WO 01/79459中的*Drechslera hartlebii*,如描述于WO 01/79458中的盐沼小树状霉(*Dendryphiella salina*)、如描述于WO 01/79461中的*Phaeotrichoconis crotalarie*或如描述于WO 01/79460中的*Geniculosporium*属。

[0407] 根据本发明的氧化酶具体包括由酶分类EC 1.10.3.2囊括的任何漆酶或获得自其中的展示出漆酶活性的片段、或展示出类似活性的化合物,例如儿茶酚氧化酶(EC 1.10.3.1)、邻氨基苯酚氧化酶(EC 1.10.3.4)或胆红素氧化酶(EC 1.3.3.5)。

[0408] 优选的漆酶是微生物来源的酶。这些酶可以获得自植物、细菌或真菌(包括丝状真菌和酵母)。

[0409] 来自真菌适合的实例包括源自以下项的菌株的漆酶:曲霉属(*Aspergillus*),脉孢菌属(*Neurospora*),例如粗糙脉孢菌(*N.crassa*),柄孢壳属(*Podospora*),葡萄孢属(*Botrytis*),金钱菌属(*Collybia*),层孔菌属(*Fomes*),香菇属(*Lentinus*),侧耳属(*Pleurotus*),栓菌属(*Trametes*),例如,长绒毛栓菌和变色栓菌,丝核菌属(*Rhizoctonia*),例如,立枯丝核菌(*R.solani*),鬼伞属(*Coprinus*),例如,灰盖鬼伞(*C.cinereus*)、毛头鬼伞(*C.comatus*)、费赖斯鬼伞(*C.friesii*)、和褶纹鬼伞(*C.plicatilis*),小脆柄菇属(*Psathyrella*),例如,*P.condelleana*,斑褶菇属(*Panaeolus*),例如,蝶形斑褶菇(*P.papilionaceus*),毁丝霉属(*Myceliophthora*),例如,嗜热毁丝霉(*M.thermophila*),柱顶孢属(*Schytalidium*),例如,*S.thermophilum*,多孔菌属(*Polyporus*),例如,匹斯特斯多孔菌(*P.pinsitus*),射脉菌属(*Phlebia*),例如,射脉菌(*P.radita*) (WO 92/01046),或拟革盖菌属(*Coriolus*),例如,毛革盖菌(*C.hirsutus*) (JP 2238885)。

[0410] 来自细菌的适合实例包括可源自芽孢杆菌属的菌株的漆酶。

[0411] 优选的是获得自拟鬼伞属或毁丝霉属的漆酶;特别是获得自灰盖拟鬼伞的漆酶,如披露于WO 97/08325中;或来自嗜热毁丝霉,如披露于WO 95/33836中。

[0412] 该一种或多种洗涤剂酶可以通过添加包含一种或多种酶的单独的添加剂,或通过添加包括所有这些酶的组合添加剂而被包括于洗涤剂组合物中。本发明的洗涤剂添加剂,即独立添加剂或组合添加剂,可以被配制为,例如颗粒、液体、浆料等。优选的洗涤剂添加剂配制品是颗粒,尤其是非尘颗粒;液体,尤其是稳定化的液体;或浆料。

[0413] 非尘颗粒可以例如如在US 4,106,991和4,661,452中所披露而产生,并且可以任选地通过本领域已知的方法进行涂层。蜡状包衣材料的实例是平均分子量为1000至20000的聚(环氧乙烷)产品(聚乙二醇,PEG);具有16到50个环氧乙烷单位的乙氧基化壬基酚(ethoxylatednonylphenol);具有15至80个环氧乙烷单位的乙氧基化脂肪族醇,其中醇含有12至20个碳原子;脂肪醇;脂肪酸;以及脂肪酸的单-和双-和三甘油酯。适用于通过流化床技术应用的成膜包衣材料的实例在GB 1483591中给出。液体酶制剂可以例如通过根据已确立的方法添加多元醇(如丙二醇)、糖或糖醇、乳酸或硼酸而稳定化。受保护的酶可以根据EP 238,216中披露的方法制备。

[0414] 其他材料

[0415] 还可以使用本领域中已知用于洗涤剂中的任何洗涤剂组分。其他任选的洗涤剂组分包括防腐剂、防缩剂、抗污垢再沉积剂、抗皱剂、杀细菌剂、粘合剂、腐蚀抑制剂、崩解剂(disintegrant)/崩解试剂(disintegration agent)、染料、酶稳定剂(包括硼酸、硼酸盐、CMC和/或多元醇如丙二醇)、织物整理剂(包括粘土)、填充剂/加工助剂、荧光增白剂/光学增亮剂、增泡剂、泡沫(泡)调节剂、香料、污垢助悬剂、软化剂、抑泡剂、酶暗抑制剂以及芯吸剂,单独或组合使用。可以使用本领域中已知用于洗涤剂中的任何成分。此类成分的选择完全在普通技术人员的技术内。

[0416] 分散剂

[0417] 本发明的洗涤剂组合物还可以含有分散剂。具体地说,粉状洗涤剂可以包括分散剂。适合的水溶性有机材料包括均聚合或共聚合的酸或其盐,其中聚羧酸包括至少两个羧基,这两个羧基被不超过两个碳原子彼此分开。适合的分散剂例如描述于粉状洗涤剂,表面活性剂科学系列,第71卷中,马塞尔·德克尔公司(Marcel Dekker)。

[0418] 染料转移抑制剂

[0419] 本发明的洗涤剂组合物还可以包括一种或多种染料转移抑制剂。合适的聚合物染料转移抑制剂包括但不限于聚乙烯吡咯烷酮聚合物、多胺N-氧化物聚合物、N-乙烯吡咯烷酮与N-乙烯基咪唑的共聚物、聚乙烯噁唑烷酮以及聚乙烯咪唑或其混合物。当存在于主题组合物中时,染料转移抑制剂可以按组合物重量计的以下水平存在:从约0.0001%至约10%、从约0.01%至约5%或甚至从约0.1%至约3%。

[0420] 荧光增白剂

[0421] 本发明的洗涤剂组合物将优选地还包含另外的组分,这些组分可以给正在清洁的物品着色,例如荧光增白剂或光学增亮剂。其中增亮剂优选以约0.01%至约0.5%的水平存在。在本发明的组合物中可以使用适合用于在衣物洗涤剂组合物中使用的任何荧光增白剂。最常用的荧光增白剂是属于以下类别的那些:二氨基芪-磺酸衍生物、二芳基吡唑啉衍生物和二苯基-联苯乙烯基衍生物。二氨基芪-磺酸衍生物类型的荧光增白剂的实例包括以下的钠盐:4,4'-双-(2-二乙醇氨基-4-苯胺基-均-三嗪-6-基氨基)芪-2,2'-二磺酸盐、4,4'-双-(2,4-二苯胺基-均-三嗪-6-基氨基)芪-2,2'-二磺酸盐、4,4'-双-(2-苯胺基-4-(N-

甲基-N-2-羟基-乙基氨基)-均-三嗪-6-基氨基) 芪-2,2'-二磺酸盐、4,4'-双-(4-苯基-1,2,3-三唑-2-基) 芪-2,2'-二磺酸盐以及5-(2H-萘并[1,2-d][1,2,3]三唑-2-基)-2-[(E)-2-苯基乙烯基]苯磺酸钠。优选的荧光增白剂是可从汽巴-嘉基股份有限公司(Ciba-Geigy AG)(巴塞尔,瑞士)获得的天来宝(Tinopal)DMS和天来宝CBS。天来宝DMS是4,4'-双-(2-吗啉代-4-苯胺基-s-三嗪-6-基氨基) 芪-2,2'-二磺酸盐的二钠盐。天来宝CBS是2,2'-双-(苯基-苯乙烯基)-二磺酸盐的二钠盐。还优选荧光增白剂,是可商购的Parawhite KX,由派拉蒙矿物与化学(Paramount Minerals and Chemicals),孟买,印度供应。适合用于在本发明中使用的其他荧光剂包括1-3-二芳基吡唑啉和7-烷氨基香豆素。

[0422] 适合的荧光增亮剂水平包括从约0.01wt%、从0.05wt%、从约0.1wt%或甚至从约0.2wt%的较低水平至0.5wt%或甚至0.75wt%的较高水平。

[0423] 污物释放聚合物

[0424] 本发明的洗涤剂组合物还可以包括一种或多种污物释放聚合物,这些聚合物帮助从织物(如棉和基于聚酯的织物)移除污物,特别是从基于聚酯的织物移除疏水性污物。污物释放聚合物可以例如是非离子型或阴离子型对苯二甲酸基聚合物、聚乙烯基己内酰胺和相关共聚物、乙烯基接枝共聚物、聚酯聚酰胺,参见例如粉状洗涤剂,表面活性剂科学系列第71卷第7章,马塞尔·德克尔公司(Marcel Dekker, Inc.)。另一种类型的污物释放聚合物是包括一个芯结构和连接至该芯结构的多个烷氧基化基团的两亲性烷氧基化油污清洁聚合物。核心结构可以包括聚烷基亚胺结构或聚烷醇胺结构,如WO 2009/087523中详细描述(将其通过引用而特此结合)。此外,随机接枝共聚物是适合的污物释放聚合物。适合的接枝共聚物更详细地描述于WO 2007/138054、WO 2006/108856和WO 2006/113314中(将其通过引用而特此结合)。其他污物释放聚合物是取代的多糖结构,尤其是取代的纤维素结构,例如改性纤维素衍生物,例如EP 1867808或WO 2003/040279中描述的那些(将二者都通过引用而特此结合)。适合的纤维素聚合物包括纤维素、纤维素醚、纤维素酯、纤维素酰胺及其混合物。适合的纤维素聚合物包括阴离子改性的纤维素、非离子改性的纤维素、阳离子改性的纤维素、两性离子改性的纤维素及其混合物。适合的纤维素聚合物包括甲基纤维素、羧甲基纤维素、乙基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、酯羧甲基纤维素及其混合物。

[0425] 抗再沉淀剂

[0426] 本发明的洗涤剂组合物还可以包括一种或多种抗再沉积剂,例如羧甲基纤维素(CMC)、聚乙烯醇(PVA)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、聚氧乙烯和/或聚乙二醇(PEG)、丙烯酸的均聚物、丙烯酸和马来酸的共聚物、和乙氧基化的聚乙亚胺。以上在污物释放聚合物下描述的纤维素基聚合物还可以用作抗再沉积剂。

[0427] 流变改性剂

[0428] 本发明的洗涤剂组合物还可以包括一种或多种流变改性剂、结构剂或增稠剂,不同于降粘剂。流变改性剂选自下组,该组由以下各项组成:非聚合物结晶、羟基功能材料、聚合物流变改性剂,它们为液体洗涤剂组合物的水性液相基质赋予剪切稀化特征。可以通过本领域已知的方法修饰和调整洗涤剂的流变学和粘度,例如如在EP 2169040中所示。

[0429] 其他适合的辅料包括但不限于防缩剂、抗皱剂、杀细菌剂、粘合剂、载体、染料、酶稳定剂、织物软化剂、填充剂、泡沫调节剂、助水溶剂、香料、色素、抑泡剂、溶剂以及用于液体洗涤剂的结构剂和/或结构弹性剂。

[0430] 洗涤剂产品的配制品

[0431] 本发明的洗涤剂组合物可以处于任何常规形式,例如条、均匀的片剂、具有两个或更多个层的片剂、具有一个或多个室的袋、规则的或压缩的粉末、颗粒、膏、凝胶、或规则的、压缩的或浓缩的液体。

[0432] 袋可以被配置为单个或多个的室。它可以具有适合容纳该组合物的任何形式、形状和材料,例如在与水接触之前,不允许该组合物从袋中释放出来。袋由封装内体积的水溶性膜制成。可以将所述内体积分为具有袋的室。优选的膜是形成膜或片的聚合材料,优选是聚合物。优选的聚合物、共聚物或其衍生物选自聚丙烯酸酯、和水溶性丙烯酸酯共聚物、甲基纤维素、羧甲基纤维素、糊精钠、乙基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、麦芽糊精、聚甲基丙烯酸酯,最优选地是聚乙烯醇共聚物以及羟丙基甲基纤维素(HPMC)。优选地,在膜中的聚合物(例如PVA)的水平是至少约60%。优选的平均分子量将典型地是约20,000至约150,000。膜还可以是共混组合物,该共混组合物包括可水解降解并且水可溶的聚合物共混物,例如聚乳酸和聚乙烯醇(已知在贸易参考M8630下,如由美国印第安纳州的MonoSol LLC公司销售)加增塑剂,像甘油、乙二醇、丙二醇、山梨醇及其混合物。这些袋可以包括固体衣物清洁组合物或部分组分和/或液体清洁组合物或由水溶性膜分开的部分组分。用于液体组分的室在组成上可以与包括固体的室不同:US 2009/0011970 A1。

[0433] 可以由水可溶的袋中或片剂的不同层中的室来将洗涤剂成分物理地彼此分开。由此可以避免组分之间的负面的存储相互作用。在洗涤溶液中,每个室的不同溶解曲线还可以引起选择的组分的延迟溶解。

[0434] 非单位剂量的液体或凝胶洗涤剂可以是水性的,典型地包含按重量计至少20%并且高达95%的水,例如高达约70%的水、高达约65%的水、高达约55%的水、高达约45%的水、高达约35%的水。包括但不限于链烷醇、胺、二醇、醚以及多元醇的其他类型的液体可以被包括在水性液体或凝胶中。含水液体或凝胶洗涤剂可以含有从0-30%的有机溶剂。

[0435] 液体或凝胶洗涤剂可以是非水性的。

[0436] 洗衣皂条

[0437] 本发明的DNA酶可以被添加至洗衣皂条中并且用于手洗洗衣、织物和/或纺织品。术语洗衣皂条包括洗衣条、皂条、组合条(combo bar)、合成洗涤剂条以及洗涤剂条。条的类型通常区别在于它们包含的表面活性剂的类型,并且术语洗衣皂条包括含有来自脂肪酸的皂和/或合成皂的那些。洗衣皂条具有在室温下为固体而非液体、凝胶或粉末的物理形式。术语固体被定义为不随时间推移显著改变的实体形式,即如果将一个固体物件(例如洗衣皂条)放置在一种容器内,那么该固体物件不会改变以填充放置该固体物件的容器。该条是典型地呈条形式但是可以呈其他固体形状、如圆形或卵形的一种固体。

[0438] 洗衣皂条可以包含一种或多种另外的酶,蛋白酶抑制剂例如肽醛类(或次硫酸盐加合物或半缩醛加合物),硼酸,硼酸盐,硼砂和/或苯基硼酸衍生物例如4-甲酰苯基硼酸,一种或多种肥皂或合成表面活性剂,多元醇例如甘油,pH控制化合物例如脂肪酸、柠檬酸、乙酸和/或甲酸,和/或一价阳离子和有机阴离子的盐,其中该一价阳离子可以是例如 Na^+ 、 K^+ 或 NH_4^+ 并且该有机阴离子可以是例如甲酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐或乳酸盐,这样使得一价阳离子和有机阴离子的盐可以是例如甲酸钠。

[0439] 洗衣皂条还可以包含络合剂像EDTA和HEDP,香料和/或不同类型的填充剂,表面活

性剂例如阴离子型合成表面活性剂,助洗剂,聚合的污垢释放剂,洗涤剂螯合剂,稳定剂,填充剂,染料,着色剂,染料转移抑制剂,烷氧基化的聚碳酸酯,抑泡剂,结构剂,粘合剂,浸出剂,漂白活化剂,粘土去污剂,抗再沉积剂,聚合分散剂,增白剂,织物柔软剂,香料和/或本领域已知的其他化合物。

[0440] 洗衣皂条可以在常规的洗衣皂条制造设备中进行加工,例如但不限制于:混合器、压条机例如双级真空压条机、挤出机、切割机、标识压模机 (logo-stamper)、冷却隧道以及包装机。本发明不局限于通过任何单一方法制备洗衣皂条。可以在过程的不同阶段向肥皂中添加本发明的预混料。例如,可以制备包含肥皂、DNA酶、任选地一种或多种另外的酶、蛋白酶抑制剂以及一价阳离子和有机阴离子的盐的预混料并且然后将该混合物压条。可以同时添加作为例如处于液态的蛋白酶抑制剂的DNA酶以及任选的另外的酶。除了混合步骤和压条步骤以外,该工艺还可以进一步包括研磨、挤出、切割、压模、冷却和/或包装的步骤。

[0441] 共颗粒中酶的配制品

[0442] 该DNA酶可以被配制为颗粒,例如,配制为结合一种或多种酶的共颗粒。然后,每种酶将存在于多种颗粒中,这些颗粒确保酶在洗涤剂中的分布更均匀。这还减少了由于不同的粒度,不同酶的物理隔离。用于生产针对洗涤剂工业的多酶共颗粒的方法披露于IP.com公开内容IPCOM000200739D中。

[0443] 通过使用共颗粒的酶的配制品的另一个实例披露于WO 2013/188331中,其涉及包括以下各项的洗涤剂组合物:(a) 多酶共颗粒;(b) 少于10wt沸石(无水基底);和(c) 少于10wt磷酸盐(无水基底),其中所述酶共颗粒包括从10wt%至98wt%的水分汇组分,并且该组合物另外还包括从20wt%至80wt%的洗涤剂水分汇组分。WO 2013/188331还涉及处理和/或清洁表面的方法,优选织物表面,该方法包括以下步骤:(i) 将所述表面与在含水洗涤液中如在此要求保护的并且描述的洗涤剂组合物接触,(ii) 冲洗和/或干燥该表面。

[0444] 该多酶共颗粒可以包括DNA酶和(a) 选自下组的一种或多种酶,该组由以下各项组成:首次洗涤脂肪酶、清洁纤维素酶、木葡聚糖酶、过水解酶、过氧化酶、脂氧合酶、漆酶及其混合物;和(b) 选自下组的一种或多种酶,该组由以下各项组成:半纤维素酶、蛋白酶、护理纤维素酶、纤维二糖脱氢酶、木聚糖酶、磷脂酶、酯酶、角质酶、果胶酶、甘露聚糖酶、果胶酸裂解酶、角蛋白酶、还原酶、氧化酶、酚氧化酶、木质酶、普鲁兰酶、鞣酸酶、戊聚糖酶、地衣聚糖酶、葡聚糖酶、阿拉伯糖苷酶、玻璃酸酶、软骨素酶、淀粉酶、及其混合物。

[0445] 在以下各段中进一步概述本发明:

[0446] 1. 一种具有DNA酶活性的多肽用于从物品上防止、减少或去除生物膜的用途,其中该多肽获得自真菌来源并且该物品是纺织品。

[0447] 2. 根据段落1所述的用途,用于防止、减少或去除物品的粘性。

[0448] 3. 根据段落1或2中任一项所述的用途,用于预处理物品上的污渍。

[0449] 4. 根据段落1-3中任一项所述的用途,用于防止、减少或去除洗涤循环过程中污垢的再沉积。

[0450] 5. 根据段落1-4中任一项所述的用途,用于防止、减少或去除污垢在物品上的附着。

[0451] 6. 根据以上段落中任一项所述的用途,用于维持或改进该物品的白度。

[0452] 7. 根据以上段落中任一项所述的用途,其中该多肽是如段落47-54所述的多肽。

- [0453] 8. 根据以上段落中任一项所述的用途, 其中从该物品减少或去除恶臭。
- [0454] 9. 根据以上段落中任一项所述的用途, 其中该恶臭是由E-2-壬烯醛引起的。
- [0455] 10. 根据以上段落中任一项所述的用途, 其中减少或去除在湿纺织品上存在的E-2-壬烯醛的量。
- [0456] 11. 根据以上段落中任一项所述的用途, 其中减少或去除在干纺织品上存在的E-2-壬烯醛的量。
- [0457] 12. 一种洗涤剂组合物, 该洗涤剂组合物包括具有脱氧核糖核酸酶 (DNA酶) 活性的多肽和洗涤剂佐剂成分, 其中该多肽获得自真菌来源。
- [0458] 13. 根据段落12所述的洗涤剂组合物, 其中该多肽获得自木霉属。
- [0459] 14. 根据以上组合物段落中任一项所述的洗涤剂组合物, 其中该多肽获得自哈茨木霉。
- [0460] 15. 根据以上段落中任一项所述的洗涤剂组合物, 其中该多肽是如段落47-54所述的多肽。
- [0461] 16. 根据以上组合物段落中任一项所述的洗涤剂组合物, 其中该洗涤剂佐剂成分选自下组, 该组由以下各项组成: 表面活性剂、助洗剂、絮凝助剂、螯合剂、染料转移抑制剂、酶、酶稳定剂、酶抑制剂、催化材料、漂白活化剂、过氧化氢、过氧化氢源、预形成的过酸、聚合的分散剂、粘土去污剂/抗再沉淀剂、增白剂、抑泡剂、染料、香料、结构弹力剂、织物柔软剂、载体、助水溶物、助洗剂和共助洗剂、织物调色剂、防沫剂、分散剂、加工助剂、和/或颜料。
- [0462] 17. 根据以上组合物段落中任一项所述的洗涤剂组合物, 其中该组合物进一步包括选自下组的一种或多种酶, 该组由以下各项组成: 蛋白酶、脂肪酶、角质酶、淀粉酶、糖酶、纤维素酶、果胶酶、甘露聚糖酶、阿拉伯糖酶、半乳聚糖酶、木聚糖酶和氧化酶。
- [0463] 18. 根据以上组合物段落中任一项所述的洗涤剂组合物, 其中该酶是动物、植物或微生物来源的蛋白酶。
- [0464] 19. 根据以上组合物段落中任一项所述的洗涤剂组合物, 其中该蛋白酶是化学修饰的或蛋白质工程的。
- [0465] 20. 根据以上组合物段落中任一项所述的洗涤剂组合物, 其中蛋白酶是丝氨酸蛋白酶或金属蛋白酶, 优选碱性微生物蛋白酶或胰蛋白酶样蛋白酶。
- [0466] 21. 根据以上组合物段落中任一项所述的洗涤剂组合物, 其中该蛋白酶选自下组, 该组由以下各项组成: 芽胞杆菌属, 例如, 枯草杆菌蛋白酶诺和、枯草杆菌蛋白酶嘉士伯、枯草杆菌蛋白酶309、枯草杆菌蛋白酶147、枯草杆菌蛋白酶168、牛源胰蛋白酶、猪源的胰蛋白酶和镰孢属蛋白酶。
- [0467] 22. 根据以上组合物段落中任一项所述的洗涤剂组合物, 其中该蛋白酶与SEQ ID NO:7具有至少90%, 如至少95%序列一致性。
- [0468] 23. 根据以上段落中任一项所述的洗涤剂组合物, 其中该蛋白酶与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少90%一致性、或在以下位置中的一个或多个具有取代的其变体: 27、36、57、76、87、97、101、104、120、123、167、170、194、206、218、222、224、235、和274, 优选地, 该变体是与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少90%一致性的碱性蛋白酶, 其具有以下取代: M222S或取代N76D+G195E。

[0469] 24. 根据以上组合物段落中任一项所述的洗涤剂组合物, 其中洗涤剂组合物能够减少选自下组的细菌的附着至表面, 该组由以下各项组成: 不动杆菌属物种、气微菌属物种、短波单胞菌属物种、微杆菌属物种、膝黄微球菌、假单胞菌属物种、表皮葡萄球菌以及寡养单胞菌属物种, 或能够使细菌从它们粘附至其上的表面释放。

[0470] 25. 根据以上组合物段落中任一项所述的洗涤剂组合物, 其中该表面是纺织品表面。

[0471] 26. 根据以上组合物段落中任一项所述的洗涤剂组合物, 其中该纺织品由棉、棉/聚酯、聚酯、聚酰胺、聚丙烯和/或丝绸制成。

[0472] 27. 根据以上组合物段落中任一项所述的洗涤剂组合物, 其中该组合物是棒、均匀的片剂、具有两个或更多个层的片剂、具有一个或多个室的袋、规则的或压缩的粉末、颗粒、膏、凝胶、或规则的、压缩的或浓缩的液体。

[0473] 28. 根据以上组合物段落中任一项所述的洗涤剂组合物, 其中该组合物是液体洗涤剂、粉状洗涤剂或颗粒洗涤剂。

[0474] 29. 一种用于洗涤物品的洗涤方法, 该方法包括以下步骤:

[0475] a. 将一种物品暴露于一种洗涤液, 该洗涤液包括如段落47-54所述的多肽或根据段落12-28中任一项所述的洗涤剂组合物;

[0476] b. 完成至少一个洗涤循环; 以及

[0477] c. 任选地冲洗该物品,

[0478] 其中该物品是一种纺织品。

[0479] 30. 根据段落29所述的方法, 其中该洗涤液的pH在7至10的范围内。

[0480] 31. 根据以上方法段落中任一项所述的方法, 其中该洗涤液的pH在7至9的范围内, 在7至8的范围内或在7至7.5的范围内。

[0481] 32. 根据以上方法段落中任一项所述的方法, 其中该洗涤液的温度在5℃至95℃的范围内、或在10℃至80℃的范围内、在10℃至70℃的范围内、在10℃至60℃的范围内、在10℃至50℃的范围内、在15℃至40℃的范围内、或在20℃至30℃的范围内。

[0482] 33. 根据以上方法段落中任一项所述的方法, 其中该洗涤液的温度是30℃。

[0483] 34. 根据以上方法段落中任一项所述的方法, 其中该方法进一步包括在完成洗涤循环后排掉洗涤液或部分洗涤液。

[0484] 35. 根据以上方法段落中任一项所述的方法, 其中在第一个并且任选地第二个或第三个洗涤循环过程中, 将该物品暴露于该洗涤液。

[0485] 36. 根据以上方法段落中任一项所述的方法, 其中在暴露于该洗涤液后, 冲洗该物品。

[0486] 37. 根据以上方法段落中任一项所述的方法, 其中将该物品用水或用包括调节剂的水进行冲洗。

[0487] 38. 根据以上方法段落中任一项所述的方法, 其中该物品的粘性被减少。

[0488] 39. 根据以上方法段落中任一项所述的方法, 其中将物品上存在的污渍用如段落47-54所述的多肽或根据段落12-28中任一项所述的洗涤剂组合物进行预处理。

[0489] 40. 根据以上方法段落中任一项所述的方法, 其中污垢的再沉积被减少。

[0490] 41. 根据以上方法段落中任一项所述的方法, 其中污垢在物品上的附着被减少或

去除。

[0491] 42. 根据以上方法段落中任一项所述的方法, 其中该物品的白度被维持或改善。

[0492] 43. 根据以上方法段落中任一项所述的方法, 其中从该物品减少或去除恶臭。

[0493] 44. 根据以上方法段落中任一项所述的方法, 其中该恶臭是由E-2-壬烯醛引起的。

[0494] 45. 根据以上方法段落中任一项所述的方法, 其中在湿纺织品上存在的E-2-壬烯醛的量被减少或去除。

[0495] 46. 根据以上方法段落中任一项所述的方法, 其中在干纺织品上存在的E-2-壬烯醛的量被减少或去除。

[0496] 47. 一种具有DNA酶活性的多肽, 该多肽选自下组, 该组由以下各项组成:

[0497] a. 与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少60%序列一致性的多肽;

[0498] b. 由一种多核苷酸编码的一种多肽, 该多核苷酸在低严格条件下与以下各项杂交

[0499] i. SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列,

[0500] ii. 其cDNA序列, 或

[0501] iii. (i) 或(ii) 的全长互补体;

[0502] c. 一种由与SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列或其cDNA序列具有至少60%序列一致性的多核苷酸编码的多肽;

[0503] d. SEQ ID NO:2的成熟多肽的一种变体, 该变体在一个或多个位置处包含取代、缺失、和/或插入; 和

[0504] e. (a)、(b)、(c) 或(d) 的多肽的片段, 该片段具有DNA酶活性。

[0505] 48. 如段落47所述的多肽, 该多肽与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列一致性。

[0506] 49. 根据段落47或48所述的多肽, 该多肽由以下多核苷酸编码, 该多核苷酸在低严格条件、低-中严格条件、中严格条件、中-高严格条件、高严格条件、或非常高严格条件下与以下各项杂交

[0507] i. SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列,

[0508] ii. 其cDNA序列, 或

[0509] iii. (i) 或(ii) 的全长互补体。

[0510] 50. 根据段落47-49中任一项所述的多肽, 该多肽由以下多核苷酸编码, 该多核苷酸与SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列或其cDNA序列具有至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列一致性。

[0511] 51. 根据段落47-50中任一项所述的多肽, 该多肽包括SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:2的成熟多肽或者由其组成。

[0512] 52. 根据段落51所述的多肽, 其中该成熟多肽是SEQ ID NO:2的氨基酸1至188。

[0513] 53. 根据段落47-52中任一项所述的多肽, 该多肽是SEQ ID NO:2的成熟多肽的变体, 该变体在一个或多个位置处包括取代、缺失和/或插入。

[0514] 54. 根据段落53所述的多肽, 该多肽是SEQ ID NO:2的片段, 其中该片段具有DNA酶活性。

- [0515] 55.一种编码根据段落47-54中任一项所述的多肽的多核苷酸。
- [0516] 56.一种核酸构建体或表达载体,该核酸构建体或表达载体包括如段落55所述的多核苷酸,该多核苷酸可操作地连接至指导多肽在表达宿主内产生的一个或多个控制序列。
- [0517] 57.一种重组宿主细胞,该重组宿主细胞包括如段落47-54所述的多核苷酸,该多核苷酸可操作地连接至指导多肽的产生的一个或多个控制序列。
- [0518] 58.一种产生如段落47-54中任一项所述的多肽的方法,该方法包括:在有益于产生该多肽的条件下培养一种细胞,该细胞处于其野生型形式时产生该多肽。
- [0519] 59.如段落58所述的方法,该方法进一步包括回收该多肽。
- [0520] 60.一种产生具有DNA酶活性的多肽的方法,该方法包括:在有益于产生该多肽的条件下培养如段落57所述的宿主细胞。
- [0521] 61.如段落60所述的方法,该方法进一步包括回收该多肽。
- [0522] 62.一种编码信号肽的多核苷酸,该信号肽包括SEQ ID NO:2的氨基酸-17至-1或由其组成。
- [0523] 63.一种核酸构建体或表达载体,该核酸构建体或表达载体包括编码蛋白质的可操作地连接至如段落62所述的多核苷酸的基因,其中该基因对于编码该信号肽的多核苷酸而言是外源的。
- [0524] 64.一种重组宿主细胞,该重组宿主细胞包括编码蛋白质的可操作地连接至如段落62所述的多核苷酸的基因,其中该基因对于编码该信号肽的多核苷酸而言是外源的。
- [0525] 65.一种产生蛋白质的方法,该方法包括:在有益于产生该蛋白质的条件下培养重组宿主细胞,该重组宿主细胞包括编码蛋白质的可操作地连接至如段落62所述的多核苷酸上的基因,其中该基因对于编码该信号肽的多核苷酸而言是外源的。
- [0526] 66.如段落65所述的方法,该方法进一步包括回收该蛋白质。
- [0527] 67.一种核酸构建体或表达载体,该核酸构建体或表达载体包括一个编码蛋白质的可操作地连接至如段落62所述的多核苷酸的基因,其中该基因对于编码该前肽的多核苷酸来说是外源的。
- [0528] 68.一种重组宿主细胞,该重组宿主细胞包括一个编码蛋白质的可操作地连接至如段落62所述的多核苷酸的基因,其中该基因对于编码该前肽的多核苷酸来说是外源的。
- [0529] 69.一种产生蛋白质的方法,该方法包括:在有益于产生该蛋白质的条件下培养该重组宿主细胞,该重组宿主细胞包括编码可操作地连接至如段落62所述的多核苷酸上的蛋白质的基因,其中该基因对于编码该多肽的多核苷酸来说是异源的。
- [0530] 70.如段落69所述的方法,该方法进一步包括回收该蛋白质。
- [0531] 71.一种包括如段落47-54中任一项所述的多肽的全培养液配制品或细胞培养组合物。
- [0532] 72.根据段落29-46中任一项所述的方法洗涤的物品。
- [0533] 73.一种药物组合物,该药物组合物包括具有DNA酶活性的多肽和药物佐剂成分,其中该多肽获得自真菌来源。
- [0534] 74.根据段落73所述的药物组合物,其中具有DNA酶活性的多肽获得自木霉属。
- [0535] 75.根据段落73-74中任一项所述的药物组合物,其中具有DNA酶活性的多肽获得

自哈茨木霉。

[0536] 76. 根据段落73-75中任一项所述的药物组合物,其中该多肽是如段落47-54所述的多肽。

[0537] 77. 根据段落73-76中任一项所述的药物组合物,其中将该组合物配制为牙膏、液体牙膏、漱口剂、含片或牙龈按摩软膏剂。

[0538] 78. 根据段落73-77中任一项所述的药物组合物,该药物组合物进一步包括一种或多种抗微生物化合物,如抗菌化合物、抗寄生虫化合物、抗真菌化合物和抗病毒化合物。

[0539] 79. 一种内留置医疗装置,其特征在于将所述装置的病人可接触表面的至少一部分用如段落73-78中任一项所述药物组合物进行涂覆。

[0540] 80. 根据段落79所述的装置,其中所述装置是导管如中央静脉导管、血管内导管、导尿管、希克曼导管、腹膜透析管、气管导管、或其中该装置是机械心脏瓣膜、心脏起搏器、动静脉分流、巩膜扣、人工关节、鼓膜造孔插管、气管造口管、声音假体、阴茎假体、人工尿道括约肌、合成的耻骨阴道吊带、手术用缝线、骨锚、骨螺钉、人工晶状体、接触镜、宫内节育器、主动脉股动脉移植物、血管移植物、针、Luer-Lok连接器、无针连接器或外科器械。

[0541] 81. 一种产生如段落47-54中任一项所述的多肽的方法,该方法包括:在有益于产生该多肽的条件下培养如段落57所述的宿主细胞。

[0542] 82. 如段落81所述的方法,该方法进一步包括回收该多肽。

[0543] 83. 如段落57所述的重组宿主细胞,进一步包括编码感兴趣的第二多肽的多核苷酸;优选感兴趣的酶;更优选感兴趣的分泌的酶,甚至更优选水解酶、异构酶、连接酶、裂解酶、氧化还原酶、或转移酶;并且最优选该分泌的酶是 α -半乳糖苷酶、 α -葡萄糖苷酶、氨肽酶、淀粉酶、天冬酰胺酶、 β -半乳糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶、 β -木糖苷酶、糖酶、羧肽酶、过氧化氢酶、纤维二糖水解酶、纤维素酶、壳多糖酶、角质酶、环糊精糖基转移酶、脱氧核糖核酸酶、内切葡聚糖酶、酯酶、绿色荧光蛋白、葡聚糖转移酶、葡糖淀粉酶、转化酶、漆酶、脂肪酶、甘露糖苷酶、变聚糖酶、氧化酶、果胶分解酶、过氧化物酶、植酸酶、多酚氧化酶、蛋白水解酶、核糖核酸酶、转谷氨酰胺酶、或木聚糖酶。

[0544] 84. 如段落83的重组宿主细胞,其中该感兴趣的第二多肽是与宿主细胞异源的或同源的。

[0545] 85. 如段落83或84所述的重组宿主细胞,该重组宿主细胞是真菌宿主细胞;优选丝状真菌宿主细胞;更优选枝顶孢霉属、曲霉属、短梗霉属、烟管菌属、拟蜡菌属、金孢子菌属、鬼伞菌属、革盖菌属、隐球菌属、线黑粉酵母属、镰孢属、腐质霉属、梨孢菌属、毛霉属、毁丝霉属、新美鞭菌属、脉孢菌属、拟青霉属、青霉菌属、平革菌属、白腐菌属、瘤胃壶菌属、侧耳属、裂褶菌属、踝节菌属、嗜热子囊菌属、梭孢壳属、弯颈霉属、栓菌属、或木霉属的细胞;最优选泡盛曲霉、臭曲霉、烟曲霉、日本曲霉、构巢曲霉、黑曲霉、米曲霉、黑刺烟管菌(*Bjerkandera adusta*)、干拟蜡菌(*Ceriporiopsis aneirina*)、卡内基拟蜡菌(*Ceriporiopsis caregiea*)、浅黄拟蜡孔菌(*Ceriporiopsis gilvescens*)、潘诺希塔拟蜡菌(*Ceriporiopsis pannocinta*)、环带拟蜡菌(*Ceriporiopsis rivulosa*)、微红拟蜡菌(*Ceriporiopsis subrufa*)、虫拟蜡菌(*Ceriporiopsis subvermisporea*)、狭边金孢子菌(*Chrysosporium inops*)、嗜角质金孢子菌、卢克诺文思金孢子菌(*Chrysosporium lucknowense*)、粪状金孢子菌(*Chrysosporium merdarium*)、租金孢子菌、昆士兰金孢子菌、

热带金孢子菌、褐薄金孢子菌 (*Chrysosporium zonatum*)、灰盖鬼伞 (*Coprinus cinereus*)、毛革盖菌 (*Coriolus hirsutus*)、杆孢状镰孢、谷类镰孢、库威镰孢、大刀镰孢、禾谷镰孢、禾赤镰孢、异孢镰孢、合欢木镰孢、尖镰孢、多枝镰孢、粉红镰孢、接骨木镰孢、肤色镰孢、拟分枝孢镰孢、硫色镰孢、圆镰孢、拟丝孢镰孢、镶片镰孢、特异腐质霉、柔毛腐质霉、米黑毛霉、嗜热毁丝霉、粗糙链孢菌、产紫青霉菌、黄孢原毛平革菌、射脉菌 (*Phlebia radiata*)、刺芹侧耳 (*Pleurotus eryngii*)、土生梭孢壳、长域毛栓菌 (*Trametes villosa*)、变色栓菌 (*Trametes versicolor*)、哈茨木霉、康宁木霉、长枝木霉、里氏木霉或绿色木霉细胞。

[0546] 86. 如段落83或84所述的重组宿主细胞, 该重组宿主细胞是细菌宿主细胞; 优选原核生物宿主细胞; 更优选革兰氏阳性宿主细胞; 甚至更优选芽胞杆菌属、梭状芽孢杆菌、肠球菌属、土芽孢杆菌属、乳杆菌属、乳球菌属、海洋芽孢杆菌属、葡萄球菌属、链球菌属、或链霉菌属宿主细胞; 并且最优选嗜碱芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、短芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、克劳氏芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、坚强芽孢杆菌、灿烂芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、和苏云金芽孢杆菌宿主细胞。

[0547] 87. 一种产生如段落83-84中任一项所定义的第二多肽的方法, 该方法包括: 在有益于产生该感兴趣的第二多肽的条件下培养如段落83-86中任一项所述的宿主细胞。

[0548] 88. 如段落87所述的方法, 该方法进一步包括回收该感兴趣的第二多肽。

[0549] 89. 根据以上组合物段落中任一项所述的洗涤剂组合物, 其中该洗涤剂佐剂成分是表面活性剂。

[0550] 90. 根据以上组合物段落中任一项所述的洗涤剂组合物, 其中该洗涤剂佐剂成分是助洗剂。

[0551] 91. 根据以上组合物段落中任一项所述的洗涤剂组合物, 其中该洗涤剂佐剂成分是粘土去污剂/抗再沉淀剂。

[0552] 92. 根据段落28所述的洗涤剂组合物, 其中该组合物是一种液体洗涤剂组合物, 包括总浓度按重量计是至少3%的表面活性剂和洗涤剂助洗剂, 和含洗涤剂酶的微囊, 其中该微囊的膜是通过具有高于1kDa分子量的多支化的多胺的交联而产生。

[0553] 93. 根据段落92所述的洗涤剂组合物, 其中该多支化的多胺的这些反应性氨基构成该分子量的至少15%。

[0554] 94. 根据段落92-93中任一项所述的洗涤剂组合物, 其中通过使用酰基氯作为交联剂生成该微囊。

[0555] 95. 根据段落92-94中任一项所述的洗涤剂组合物, 其中该微囊的直径是至少50微米, 或大于50微米。

[0556] 96. 根据段落92-95中任一项所述的洗涤剂组合物, 其中该微囊包含按重量计至少1%的活性酶。

[0557] 97. 根据段落92-96中任一项所述的洗涤剂组合物, 该洗涤剂组合物进一步包括醇, 例如多元醇。

[0558] 98. 根据段落92-97中任一项所述的洗涤剂组合物, 其中该表面活性剂是阴离子表面活性剂。

[0559] 99. 根据段落92-98中任一项所述的洗涤剂组合物, 该洗涤剂组合物是液体洗衣组合物。

[0560] 100. 根据段落92-99中任一项所述的洗涤剂组合物, 该洗涤剂组合物包含按重量计少于90%的水。

[0561] 101. 根据段落92-100中任一项所述的洗涤剂组合物, 其中该洗涤剂酶是具有DNA酶活性的多肽、蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶、纤维素酶、甘露聚糖酶、果胶酶、或氧化还原酶。

[0562] 102. 根据段落92-101中任一项所述的洗涤剂组合物, 其中该蛋白酶是金属蛋白酶或碱性丝氨酸蛋白酶, 例如枯草杆菌蛋白酶。

[0563] 103. 根据段落92-101中任一项所述的洗涤剂组合物, 其中具有DNA酶活性的多肽是根据段落47-54中任一项所述的多肽。

[0564] 104. 根据段落92-103中任一项所述的洗涤剂组合物, 其中使用酰基氯作为交联剂通过界面聚合来生成该微囊。

[0565] 105. 根据段落92-104中任一项所述的洗涤剂组合物, 其中该多支化的多胺是聚乙亚胺。

[0566] 106. 根据段落92-105中任一项所述的洗涤剂组合物, 其中该微囊包括 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、或 Zn^{2+} 离子的来源, 如 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、或 Zn^{2+} 的难溶盐。

[0567] 测定和洗涤剂组合物

[0568] 洗涤剂组合物

[0569] 可以将以下提及的洗涤剂组合物结合本发明的酶一起使用。

[0570] Biotex黑(液体)

[0571] 5%-15%的阴离子表面活性剂、<5%非离子表面活性剂、香料、酶、DMDM和乙内酰脲。

[0572] 碧浪灵敏性白色与彩色衣物洗涤剂组合物、液体洗涤剂组合物

[0573] 水、酒精乙氧基硫酸盐、醇乙氧基化物、氨基氧化物、柠檬酸、C12-18拔顶棕榈仁脂肪酸、蛋白酶、糖苷酶、淀粉酶、乙醇、1,2丙二醇、甲酸钠、氯化钙、氢氧化钠、有机硅乳液、跨硫酸EHDQ(这些成分以递减次序列出)。

[0574] WFK IEC-A标准洗涤剂的组合物(粉状)

[0575] 成分: 直链烷基苯磺酸钠8.8%、乙氧基化的脂肪醇C12-18(7E0) 4.7%、钠皂3.2%、消泡剂DC2-4248S 3.9%、硅酸铝钠沸石4A 28.3%、碳酸钠11.6%、丙烯酸和马来酸的共聚物的钠盐(Sokalan CP5) 2.4%、硅酸钠3.0%、羧甲基纤维素1.2%、Dequest 2066 2.8%、光学增白剂0.2%、硫酸钠6.5%、蛋白酶0.4%。

[0576] 标准洗涤剂A组合物(液体)

[0577] 成分: 12%LAS、11%AEO Biosoft N25-7(NI)、7%AEOS(SLES)、6%MPG(丙二醇)、3%乙醇、3%TEA、2.75%可可皂、2.75%大豆皂、2%甘油、2%氢氧化钠、2%柠檬酸钠、1%甲酸钠、0.2%DTMPA和0.2%PCA(所有的百分数都是w/w)

[0578] 碧浪Actilift组合物(液体)

[0579] 成分: 5%-15%阴离子表面活性剂; <5%非离子型表面活性剂、磷酸盐、肥皂; 酶、光学增亮剂、苯并异噻唑啉酮、甲基异噻唑啉酮、香料、 α -异甲基紫罗兰酮、香茅醇、香叶醇、芳樟醇。

[0580] 碧浪Actilift彩色&风格组合物(液体)

[0581] 成分:5%-15%阴离子表面活性剂;<5%非离子型表面活性剂、磷酸盐、肥皂;酶、香料、苯并异噻唑啉酮、甲基异噻唑啉酮、 α -异甲基紫罗兰酮、丁苯基甲基丙醛、香茅醇、香叶醇、芳樟醇。

[0582] 宝莹小&强大洗涤剂组合物(液体)

[0583] 成分:15%-30%阴离子表面活性剂、非离子型表面活性剂、5%-15%皂、<5%聚羧酸酯、香料、磷酸盐、光学增亮剂

[0584] 宝莹2合1与舒适西番莲粉末

[0585] 硫酸钠、碳酸钠、十二烷基苯磺酸钠、膨润土、碳酸钠过氧化物、硅酸钠、沸石、水、柠檬酸、TAED、C12-15Pareth-7、硬脂酸、香精、丙烯酸钠/MA共聚物、纤维素胶、所修饰的玉米淀粉、氯化钠、羟乙磷酸四钠、EDTMP钙钠、苯胺吗啉三嗪基-氨基苯磺酸二钠、碳酸氢钠、苯丙基乙基聚甲基硅氧烷、丁苯基甲基丙醛、甘油硬脂酸酯、碳酸钙、聚丙烯酸钠、 α -异甲基紫罗兰酮、二苯乙烯基联苯基二磺酸二钠、纤维素、蛋白酶、柠檬烯、PEG-75、二氧化钛、糊精、蔗糖、聚芳基磺酸钠、CI 12490、CI 45100、CI 42090、硫代硫酸钠、CI 61585。

[0586] 宝莹生物粉末

[0587] 蔗糖、山梨醇、硅酸铝、聚甲醛三聚氰胺、聚芳基磺酸钠、CI 61585、CI 45100、脂肪酶、淀粉酶、黄胞胶、羟丙基甲基纤维素、CI 12490、二苯乙烯基联苯基二磺酸二钠、硫代硫酸钠、CI 42090、甘露聚糖酶、CI 11680、羟乙磷酸、EDTA四钠。

[0588] 宝莹生物片剂

[0589] 碳酸钠、碳酸钠过氧化物、碳酸氢钠、沸石、水、硅酸钠、月桂基硫酸钠、纤维素、TAED、十二烷基苯磺酸钠、半纤维素、木质素、月桂基葡萄糖苷、丙烯酸钠/MA共聚物、膨润土、氯化钠、香精、羟乙磷酸四钠、硫酸钠、聚丙烯酸钠、二甲硅油、苯胺基吗啉代三嗪基氨基芪磺酸二钠盐、十二烷基苯磺酸、三甲基硅氧基硅酸盐、碳酸钙、纤维素、PEG-75、二氧化钛、糊精、蛋白酶、所修饰的玉米淀粉、蔗糖、CI 12490、聚芳基磺酸钠、硫代硫酸钠、淀粉酶、高岭土。

[0590] 宝莹色彩护理生物粉末

[0591] 枯草杆菌蛋白酶、咪唑啉酮、己基肉桂醛、蔗糖、山梨醇、硅酸铝、聚甲醛三聚氰胺、CI 61585、CI 45100、脂肪酶、淀粉酶、黄胞胶、羟丙基甲基纤维素、CI 12490、二苯乙烯基联苯基二磺酸二钠、硫代硫酸钠、CI 42090、甘露聚糖酶、CI 11680、羟乙磷酸、EDTA四钠。

[0592] 宝莹色彩护理生物片剂

[0593] 碳酸氢钠、碳酸钠、沸石、水、硅酸钠、十二烷基硫酸钠、纤维素胶、十二烷基苯磺酸钠、月桂基葡萄糖苷、氯化钠、丙烯酸钠/MA共聚物、香精、硫代乙酸钠、PVP、硫酸钠、羟乙磷酸四钠、聚丙烯酸钠、二甲硅油、膨润土、十二烷基苯磺酸、三甲基硅氧基硅酸盐、碳酸钙、纤维素、PEG-75、二氧化钛、糊精、蛋白酶、所修饰的玉米淀粉、蔗糖、硫代硫酸钠、淀粉酶、CI 74160、高岭土。

[0594] 宝莹双效胶囊生物制品

[0595] MEA-十二烷基苯磺酸、MEA-氢化椰油酸、C12-15 Pareth-7、二丙二醇、水、羟乙磷酸四钠、聚乙烯醇、甘油、氮丙啶、乙氧基化的均聚物、丙二醇、香精、二亚乙基三胺五亚甲基磷酸钠、山梨醇、MEA-硫酸、乙醇胺、枯草杆菌蛋白酶、乙二醇、丁苯基甲基丙醛、硼酸、(4-甲

酰苯基)、己基肉桂醛、柠檬烯、芳樟醇、二苯乙烯基联苯基二磺酸二钠、 α -异甲基紫罗兰酮、香叶醇、淀粉酶、聚合的蓝色着色剂、聚合的黄色着色剂、滑石粉、氯化钠、苯并异噻唑啉酮、甘露聚糖酶、苯酸苄铵酰胺。

[0596] 宝莹2合1与舒适晴天粉末

[0597] 硫酸钠、碳酸钠、十二烷基苯磺酸钠、膨润土、碳酸钠过氧化物、硅酸钠、沸石、水、柠檬酸、TAED、C12-15Pareth-7、香精、硬脂酸、丙烯酸钠/MA共聚物、纤维素胶、所修饰的玉米淀粉、氯化钠、羟乙磷酸四钠、EDTMP钙钠、苯胺吗啉三嗪基-氨基苯磺酸二钠、碳酸氢钠、苯丙基乙基聚甲基硅氧烷、丁苯基甲基丙醛、甘油硬脂酸酯、碳酸钙、聚丙烯酸钠、香叶醇、二苯乙烯基联苯基二磺酸二钠、纤维素、蛋白酶、PEG-75、二氧化钛、糊精、蔗糖、聚芳基磺酸钠、CI 12490、CI 45100、CI 42090、硫代硫酸钠、CI 61585。

[0598] 宝莹小&强大2合1余舒适晴天

[0599] 水、C12-15 Pareth-7、十二烷基苯磺酸钠、丙二醇、氢化椰油酸钠、三乙醇胺、甘油、TEA-氢化椰油酸酯、香精、氯化钠、聚季铵盐-10、PVP、聚合的粉色着色剂、硫酸钠、二苯乙烯基联苯基二磺酸二钠、丁苯基甲基丙醛、苯乙烯/丙烯酸酯共聚物、己基肉桂醛、香茅醇、丁子香酚、聚乙烯醇、乙酸钠、异丙醇、聚合的黄色着色剂、十二烷基硫酸钠。

[0600] 宝莹小&强大生物制品

[0601] 水、MEA-十二烷基苯磺酸、丙二醇、月桂醇醚硫酸钠、C12-15 Pareth-7、TEA-氢化椰油酸酯、MEA-柠檬酸、氮丙啶、乙氧基化的均聚物、MEA-羟乙磷酸、三乙醇胺、香精、丙烯酸酯共聚物、山梨醇、MEA-硫酸、亚硫酸钠、二苯乙烯基联苯基二磺酸二钠、丁苯基甲基丙醛、苯乙烯/丙烯酸酯共聚物、香茅醇、硫酸钠、肽、盐、来自发酵(工艺)的糖、枯草杆菌蛋白酶、甘油、硼酸、(4-甲酰苯基)、香叶醇、果胶裂解酶、淀粉酶、十二烷基硫酸钠、甘露聚糖酶、CI 42051。

[0602] 宝莹小&强大胶囊生物制品

[0603] MEA-十二烷基苯磺酸、MEA-氢化椰油酸、C12-15 Pareth-7、二丙二醇、水、甘油、聚乙烯醇、香精、氮丙啶、乙氧基化的均聚物、二亚乙基三胺五亚甲基磷酸钠、丙二醇、山梨醇、MEA-硫酸、乙醇胺、枯草杆菌蛋白酶、乙二醇、丁苯基甲基丙醛、己基肉桂醛、淀粉、硼酸、(4-甲酰苯基)、柠檬烯、芳樟醇、二苯乙烯基联苯基二磺酸二钠、 α -异甲基紫罗兰酮、香叶醇、淀粉酶、滑石粉、聚合的蓝色着色剂、氯化钠、苯并异噻唑啉酮、苯酸苄铵酰胺、聚合的黄色着色剂、甘露聚糖酶。

[0604] 宝莹小&强大胶囊色彩护理

[0605] MEA-十二烷基苯磺酸、MEA-氢化椰油酸、C12-15 Pareth-7、二丙二醇、水、甘油、聚乙烯醇、香精、氮丙啶、乙氧基化的均聚物、二亚乙基三胺五亚甲基磷酸钠、丙二醇、MEA-硫酸、乙醇胺、PVP、山梨醇、丁苯基甲基丙醛、枯草杆菌蛋白酶、己基肉桂醛、淀粉、柠檬烯、芳樟醇、硼酸、(4-甲酰苯基)、 α -异甲基紫罗兰酮、香叶醇、滑石粉、聚合的蓝色着色剂、苯酸苄铵酰胺、聚合的黄色着色剂。

[0606] 宝莹小&强大色彩护理

[0607] 水、MEA-十二烷基苯磺酸、丙二醇、月桂醇醚硫酸钠、C12-15 Pareth-7、TEA-氢化椰油酸酯、MEA-柠檬酸、氮丙啶、乙氧基化的均聚物、MEA-羟乙磷酸、三乙醇胺、香精、丙烯酸酯共聚物、山梨醇、MEA-硫酸、亚硫酸钠、甘油、丁苯基甲基丙醛、香茅醇、硫酸钠、肽、盐、来

自发酵(工艺)的糖,苯乙烯/丙烯酸酯共聚物、枯草杆菌蛋白酶、硼酸、(4-甲酰苯基)、香叶醇、果胶裂解酶、淀粉酶、十二烷基硫酸钠、甘露聚糖酶、CI 61585、CI 45100。

[0608] Fairy非生物制品组合物(液体)

[0609] 成分:15%-30%阴离子表面活性剂、5%-15%非离子表面活性剂、肥皂、苯并异噻唑啉酮、甲基异噻唑啉酮、香料

[0610] 标准洗涤剂T组合物(粉末)

[0611] 成分:11%LAS、2%AS/AEOS、2%肥皂、3%AE0、15.15%碳酸钠、3%硅酸钠、18.75%沸石、0.15%螯合剂、2%柠檬酸钠、1.65%AA/MA共聚物、2.5%CMC和0.5%SRP(所有的百分数都是w/w)。

[0612] 标准洗涤剂X组合物(粉末)

[0613] 成分:16.5%LAS、15%沸石、12%二硅酸钠、20%碳酸钠、1% sokalan、35.5%硫酸钠(所有的百分数都是w/w)。

[0614] 碧浪Actilift彩色&风格组合物(粉末)

[0615] 成分:15%-30%阴离子表面活性剂、<5%非离子表面活性剂、磷酸盐、聚羧酸盐、沸石;酶、香料、己基肉桂醛。

[0616] 碧浪Actilif组合物(粉末)

[0617] 成分:5%-15%阴离子表面活性剂、基于氧的漂白剂、<5%非离子表面活性剂、磷酸盐、聚羧酸盐、沸石、光学增亮剂、酶、香料、丁苯基甲基丙醛、香豆素、己基肉桂醛

[0618] 宝莹Megaperls组合物(粉末)

[0619] 成分:以下的15%-30%:阴离子表面活性剂、基于氧的漂白剂和沸石,以下的少于5%:非离子表面活性剂、磷酸盐、聚羧酸盐、肥皂、另外成分:香料、己基肉桂醛、水杨酸苄酯、芳樟醇、光学增亮剂、酶和香茅醇。

[0620] 汰渍液体,原版:线形烷基苯磺酸酯、丙二醇、柠檬酸、氢氧化钠、硼砂、乙醇胺、乙醇、醇硫酸盐、聚乙烯亚胺乙氧基化物、脂肪酸钠、乙氧基硫酸二季铵盐、蛋白酶、二乙二醇、月桂醇聚醚-9、烷基二甲胺氧化物、香味、淀粉酶、二氨基二苯乙烯二磺酸钠、DTPA、甲酸钠、甲酸钙、聚乙二醇4000、甘露聚糖酶、Liquitint™蓝、二甲硅油。

[0621] 液体汰渍,自由和温和型:水、醇乙氧基硫酸钠、丙二醇、硼砂、乙醇、线形烷基苯磺酸钠、盐、聚乙烯亚胺乙氧基化物、二乙二醇、反式硫酸化和乙氧基化的六亚甲基二胺、醇乙氧化物、线形烷基苯磺酸酯、MEA盐、甲酸钠、烷基硫酸钠、DTPA、氧化胺、甲酸钙、二氨基二苯乙烯二钠、二磺酸盐、淀粉酶、蛋白酶、二甲硅油、苯并异噻唑啉酮

[0622] 汰渍冷水液体,清香型:水、醇乙氧基硫酸酯、线形烷基苯磺酸酯、二乙二醇、丙二醇、乙醇胺、柠檬酸、硼砂、醇硫酸盐、氢氧化钠、聚乙烯亚胺、乙氧基化物、脂肪酸钠、乙醇、蛋白酶、月桂醇聚醚-9、乙氧基硫酸二季铵盐、月桂基胺氧化物、异丙苯钠、磺酸盐、香味、DTPA、淀粉酶、二钠、二氨基二苯乙烯、二磺酸盐、甲酸钠、二苯乙烯基联苯基二磺酸钠、甲酸钙、聚乙二醇4000、甘露聚糖酶、果胶酶、Liquitint™蓝、二甲硅油

[0623] 汰渍TOTALCARE™液体,冷棉:水、醇乙氧基硫酸酯、丙二醇、脂肪酸钠、月桂基三甲基氯化铵、乙醇、氢氧化钠、异丙基苯磺酸钠、柠檬酸、乙醇胺、二甘醇、聚醚硅氧烷、硼砂、香味、聚乙烯亚胺、乙氧基化物、蛋白酶、月桂醇聚醚-9、DTPA、聚丙烯酰胺季铵盐氯化物、二氨基二苯乙烯二磺酸钠、甲酸钠、Liquitint™橙、二丙基乙四胺、二甲硅油、纤维素。

[0624] 液体汰渍加漂白剂Alternative™,生动白和鲜艳、最初以及清洁微风:水、醇乙氧基硫酸钠、烷基硫酸钠、MEA柠檬酸、线形烷基苯磺酸酯、MEA盐、丙二醇、二乙二醇、聚乙烯亚胺乙氧基化物、乙醇、脂肪酸钠、乙醇胺、月桂基胺氧化物、硼砂、月桂醇聚醚-9、DTPA、枯烯磺酸钠、甲酸钠、甲酸钙、线形烷基苯磺酸酯、钠盐、醇硫酸盐、氢氧化钠、乙氧基硫酸二季铵盐、香味、淀粉酶、蛋白酶、甘露聚糖酶、果胶酶、二氨基二苯乙烯二磺酸钠、苯并异噻唑啉酮、Liquitint™蓝、二甲硅油、二丙基乙四胺。

[0625] 液体汰渍HE,原味:水、醇乙氧基硫酸钠、MEA柠檬酸、烷基硫酸钠、醇乙氧化物、线形烷基苯磺酸酯、MEA盐、脂肪酸钠、聚乙烯亚胺乙氧基化物、二乙二醇、丙二醇、乙氧基硫酸二季铵盐、硼砂、聚乙烯亚胺、乙氧基化物丙氧基化物、乙醇、枯烯磺酸钠、香味、DTPA、二氨基二苯乙烯二磺酸钠、甘露聚糖酶、纤维素酶、淀粉酶、甲酸钠、甲酸钙、月桂基胺氧化物、Liquitint™蓝、二甲硅油/聚二甲基硅酮。

[0626] 汰渍TOTALCARE HE液体,新生雨润(renewing Rain):水、醇乙氧基硫酸酯、线形烷基苯磺酸酯、醇乙氧化物、柠檬酸、乙醇胺、脂肪酸钠、二乙二醇、丙二醇、氢氧化钠、硼砂、聚乙烯亚胺乙氧基化物、聚醚硅氧烷、乙醇、蛋白酶、枯烯磺酸钠、乙氧基硫酸二季铵盐、月桂醇聚醚-9、香味、淀粉酶、DTPA、二氨基二苯乙烯二磺酸钠、二苯乙烯基联苯基二磺酸二钠、甲酸钠、甲酸钙、甘露聚糖酶、Liquitint™橙、二甲硅油、聚丙烯酰胺季铵盐氯化物、纤维素酶、二丙基乙四胺。

[0627] 汰渍液体HE自由:水、醇乙氧基硫酸酯、二乙二醇、单乙醇胺柠檬酸、甲酸钠、丙二醇、线形烷基苯磺酸酯、乙醇胺、乙醇、聚乙烯亚胺乙氧基化物、淀粉酶、苯并异噻唑啉、硼砂、甲酸钙、柠檬酸、乙二烯三胺五乙酸钠、二甲硅油、乙氧基硫酸二季铵盐、二氨基二苯乙烯二磺酸钠、月桂醇聚醚-9、甘露聚糖酶、蛋白酶、枯烯磺酸钠、脂肪酸钠。

[0628] 汰渍冷水HE液体,清香型:水、醇乙氧基硫酸酯、MEA柠檬酸、醇硫酸盐、醇乙氧化物、线形烷基苯磺酸酯MEA、脂肪酸钠、聚乙烯亚胺乙氧基化物、二乙二醇、丙二醇、乙氧基硫酸二季铵盐、硼砂、聚乙烯亚胺乙氧基化物丙氧基化物、乙醇、枯烯磺酸钠、香味、DTPA、二氨基二苯乙烯二磺酸钠、蛋白酶、甘露聚糖酶、纤维素酶、淀粉酶、甲酸钠、甲酸钙、月桂基胺氧化物、Liquitint™蓝、二甲硅油。

[0629] 汰渍冷水HE自由液体:水、醇乙氧基硫酸钠、MEA柠檬酸、线形烷基苯磺酸酯:钠盐、醇乙氧化物、线形烷基苯磺酸酯:MEA盐、脂肪酸钠、聚乙烯亚胺乙氧基化物、二乙二醇、丙二醇、乙氧基硫酸二季铵盐、硼砂、蛋白酶、聚乙烯亚胺乙氧基化物丙氧基化物、乙醇、枯烯磺酸钠、淀粉酶、柠檬酸、DTPA、二氨基二苯乙烯二磺酸钠、甲酸钠、甲酸钙、二甲硅油。

[0630] 汰渍简单洁净与清新:水、醇乙氧化物硫酸盐、线形烷基苯磺酸钠/Mea盐、丙二醇、二乙二醇、甲酸钠、乙醇、硼砂、脂肪酸钠、香味、月桂基胺氧化物、DTPA、聚乙烯胺乙氧基化物、甲酸钙、二氨基二苯乙烯二磺酸钠、二甲硅油、四胺、Liquitint™蓝。

[0631] 汰渍舱,海雾,神秘森林,春天牧场:线形烷基苯磺酸酯、C12-16Pareth-9、丙二醇、醇乙氧基硫酸酯、水、聚乙烯亚胺乙氧基化物、甘油、脂肪酸盐、PEG-136聚乙酸乙烯酯、乙二胺琥珀酸盐、单乙醇胺柠檬酸、亚硫酸氢钠、乙二烯三胺五乙酸钠、二苯乙烯基联苯基二磺酸二钠、甲酸钙、甘露聚糖酶、木葡聚糖酶、甲酸钠、氢化蓖麻油、natalase、染料、termamyl、枯草杆菌蛋白酶、苯并异噻唑啉、香料。

[0632] 汰渍去污笔(Tide to Go):去离子水、二丙二醇丁基醚、烷基硫酸钠、过氧化氢、乙

醇、硫酸镁、烷基二甲基氧化胺、柠檬酸、氢氧化钠、三甲氧基苯甲酸、香味。

[0633] 汰渍污渍释放液体：水、烷基乙氧基化物、直链烷基苯磺酸盐、过氧化氢、乙氧基硫酸二季铵盐、乙醇胺、二苯乙烯基联苯基二磺酸二钠、四丁基乙叉基双酚、F&DC黄3、香味。

[0634] 汰渍污渍释放粉末：过碳酸钠、硫酸钠、碳酸钠、铝硅酸钠、壬酰氧基苯磺酸盐、聚丙烯酸钠、水、烷基苯磺酸钠、DTPA、聚乙二醇、棕榈酸钠、淀粉酶、蛋白酶、修饰的淀粉、FD&C蓝1、香味。

[0635] 汰渍污渍释放，预处理器喷雾：水、烷基乙氧基化物、MEA硼酸盐、直链烷基苯磺酸盐、丙二醇、乙氧基硫酸二季铵盐、氯化钙酶、蛋白酶、乙醇胺、苯并异噻唑啉酮、淀粉酶、柠檬酸钠、氢氧化钠、香味。

[0636] 汰渍去污渍橡皮擦：水、烷基氧化胺、二丙二醇苯基醚、过氧化氢、柠檬酸、乙二胺二琥珀酸钠盐、烷基硫酸钠、香味。

[0637] 汰渍氧化加强：碳酸氢钠、碳酸钠、过碳酸钠、醇乙氧化物、氯化钠、马来酸/丙烯酸共聚物、壬酰氧基苯磺酸盐、硫酸钠、着色剂、乙二烯三胺五乙酸钠盐、水合硅铝酸盐（沸石）、聚乙二醇、烷基苯磺酸钠、棕榈酸钠、淀粉、水、香味。

[0638] 汰渍污渍释放加强双重Pac：聚乙烯醇袋膜，其中有被包装的液体部分和粉末部分。

[0639] 液体成分：二丙二醇、乙氧基硫酸二季铵盐、水、甘油、Liquitint™橙、粉末成分：过碳酸钠、壬酰氧基苯磺酸盐、碳酸钠、硫酸钠、铝硅酸钠、聚丙烯酸钠、烷基苯磺酸钠、马来酸/丙烯酸共聚物、水、淀粉酶、聚乙二醇、棕榈酸钠、修饰的淀粉、蛋白酶、甘油、DTPA、香味。

[0640] 汰渍超级污渍释放：水、醇乙氧基硫酸钠、直链烷基苯磺酸盐、钠/MEA盐、MEA柠檬酸、丙二醇、聚乙烯亚胺乙氧基化物、乙醇、二乙二醇、聚乙烯亚胺丙氧基乙氧基化物、脂肪酸钠、蛋白酶、硼砂、枯烯磺酸钠、DTPA、香味、淀粉酶、二氨基二苯乙烯二磺酸钠、甲酸钙、甲酸钠、葡聚糖酶、二甲硅油、Liquitint™蓝、甘露聚糖酶。

[0641] 具有少许Downy®粉状洗涤剂的超级汰渍，四月清新/清洁微风/四月精华：碳酸钠、铝硅酸钠、硫酸钠、线形烷基苯磺酸酯、膨润土、水、过碳酸钠、聚丙烯酸钠、硅酸盐、烷基硫酸盐、壬酰氧基苯酚酯磺酸、DTPA、聚乙二醇4000、硅胶、乙氧基化物、香味、聚氧化乙烯、棕榈酸、二氨基二苯乙烯二磺酸钠、蛋白酶、Liquitint™红、FD&C蓝1、纤维素酶。

[0642] 具有少许Downy清洁微风的超级汰渍：水、醇乙氧基硫酸钠、MEA柠檬酸、直链烷基苯磺酸盐：钠/MEA盐s、丙二醇、聚乙烯亚胺乙氧基化物、乙醇、二乙二醇、聚乙烯亚胺、丙氧基乙氧基化物、乙氧基硫酸二季铵盐、醇硫酸盐、二甲硅油、香味、硼砂、脂肪酸钠、DTPA、蛋白酶、亚硫酸氢钠、二氨基二苯乙烯二磺酸钠、淀粉酶、葡聚糖酶、蓖麻油、甲酸钙、MEA、苯乙烯丙烯酯共聚物、甲酸钠、Liquitint™蓝。

[0643] 具有Downy阳花的超级汰渍：水、醇乙氧基硫酸钠、MEA柠檬酸、直链烷基苯磺酸盐：钠/MEA盐、丙二醇、乙醇、二乙二醇、聚乙烯亚胺丙氧基乙氧基化物、聚乙烯亚胺乙氧基化物、醇硫酸盐、二甲硅油、香味、硼砂、脂肪酸钠、DTPA、蛋白酶、亚硫酸氢钠、二氨基二苯乙烯二磺酸钠、淀粉酶、蓖麻油、甲酸钙、MEA、苯乙烯丙烯酯共聚物、丙胺丙酰胺、葡聚糖酶、甲酸钠、Liquitint™蓝。

[0644] 具有Downy四月清新/甜蜜梦境的超级汰渍：水、醇乙氧基硫酸钠、MEA柠檬酸、直链烷基苯磺酸盐：钠/MEA盐、丙二醇、聚乙烯亚胺乙氧基化物、乙醇、二乙二醇、聚亚乙基亚胺

丙氧基乙氧基化物、乙氧基硫酸二季铵盐、醇硫酸盐、二甲硅油、香味、硼砂、脂肪酸钠、DTPA、蛋白酶、亚硫酸氢钠、二氨基二苯乙烯二磺酸钠、淀粉酶、葡聚糖酶、蓖麻油、甲酸钙、MEA、苯乙烯丙烯酯共聚物、丙铵丙酰胺、甲酸钠、Liquitint™蓝。

[0645] 超级汰渍自由粉状洗涤剂：碳酸钠、铝硅酸钠、烷基硫酸盐、硫酸钠、线形烷基苯磺酸酯、水、聚丙烯酸钠、硅酸盐、乙氧基化物、过碳酸钠、聚乙二醇4000、蛋白酶、二氨基二苯乙烯二磺酸钠、硅胶、纤维素酶。

[0646] 超级汰渍粉状洗涤剂，清洁微风/春日薰衣草/森林泉：碳酸钠、铝硅酸钠、硫酸钠、线形烷基苯磺酸酯、烷基硫酸盐、过碳酸钠、水、聚丙烯酸钠、硅酸盐、壬酰氧基苯酚酯磺酸、乙氧基化物、聚乙二醇4000、香味、DTPA、二氨基二苯乙烯二磺酸钠、棕榈酸、蛋白酶、硅胶、纤维素酶。

[0647] 超级汰渍HE（高效率）粉状洗涤剂，清洁微风：碳酸钠、铝硅酸钠、硫酸钠、线形烷基苯磺酸酯、水、壬酰氧基苯酚酯磺酸、烷基硫酸盐、聚丙烯酸钠、硅酸盐、过碳酸钠、乙氧基化物、聚乙二醇4000、香味、DTPA、棕榈酸、二氨基二苯乙烯二磺酸钠、蛋白酶、硅胶、纤维素酶。

[0648] 超级汰渍冷水粉状洗涤剂，清香型：碳酸钠、铝硅酸钠、硫酸钠、过碳酸钠、烷基硫酸盐、线形烷基苯磺酸酯、水、壬酰氧基苯酚酯磺酸、聚丙烯酸钠、硅酸盐、乙氧基化物、聚乙二醇4000、DTPA、香味、Natalase、棕榈酸、蛋白酶、二钠、二氨基二苯乙烯二磺酸盐、FD&C蓝1、硅胶、纤维素酶、烷基醚硫酸盐。

[0649] 具有漂白剂粉状洗涤剂的超级汰渍，清洁微风：碳酸钠、铝硅酸钠、硫酸钠、线形烷基苯磺酸酯、过碳酸钠、壬酰氧基苯酚酯磺酸、烷基硫酸盐、水、硅酸盐、聚丙烯酸钠乙氧基化物、聚乙二醇4000、香味、DTPA、棕榈酸、蛋白酶、二氨基二苯乙烯二磺酸钠、硅胶、FD&C蓝1、纤维素酶、烷基醚硫酸盐。

[0650] 具有Febreeze Freshness™粉状洗涤剂的超级汰渍，春日新生：

[0651] 碳酸钠、铝硅酸钠、硫酸钠、线形烷基苯磺酸酯、过碳酸钠、烷基硫酸盐、水、聚丙烯酸钠、硅酸盐、壬酰氧基苯酚酯磺酸、乙氧基化物、聚乙二醇4000、DTPA、香味、纤维素酶、蛋白酶、二氨基二苯乙烯二磺酸钠、硅胶、FD&C蓝1。

[0652] 具有Febreeze Freshness的液体汰渍加-运动HE活跃新鲜：

[0653] 水、醇乙氧基硫酸钠、MEA柠檬酸、线形烷基苯磺酸酯、钠盐、线形烷基苯磺酸酯：MEA盐、醇乙氧化物、脂肪酸钠、丙二醇、二乙二醇、聚乙烯亚胺乙氧基化物丙氧基化物、乙氧基硫酸二季铵盐、乙醇、枯烯磺酸钠、硼砂、香味、DTPA、硫酸氢钠、二氨基二苯乙烯二磺酸钠、甘露聚糖酶、纤维素酶、淀粉酶、甲酸钠、甲酸钙、月桂基胺氧化物、Liquitint™蓝、二甲硅油/聚二甲基硅酮。

[0654] 汰渍加Febreeze Freshness春日新生：

[0655] 水、醇乙氧基硫酸钠、直链烷基苯磺酸盐：钠/MEA盐、MEA柠檬酸、丙二醇、聚乙烯亚胺乙氧基化物、香味、乙醇、二乙二醇、聚乙烯亚胺丙氧基乙氧基化物、蛋白酶、醇硫酸盐、硼砂、脂肪酸钠、DTPA、二氨基二苯乙烯二磺酸钠、MEA、甘露聚糖酶、葡聚糖酶、甲酸钠、二甲硅油、Liquitint™蓝、四胺。

[0656] 具有Febreeze Freshness的液体汰渍加，运动HE胜利新鲜：水、醇乙氧基硫酸钠、MEA柠檬酸、线形烷基苯磺酸酯、钠盐、线形烷基苯磺酸酯：MEA盐、醇乙氧化物、脂肪酸钠、丙二醇、二乙二醇、聚乙烯亚胺乙氧基化物丙氧基化物、乙氧基硫酸二季铵盐、乙醇、枯烯磺酸

钠、硼砂、香味、DTPA、硫酸氢钠、二氨基二苯乙烯二磺酸钠、甘露聚糖酶、纤维素酶、淀粉酶、甲酸钠、甲酸钙、月桂基胺氧化物、Liquitint™蓝、二甲硅油/聚二甲基硅酮。

[0657] 汰渍生动白+鲜艳, 原版:

[0658] 碳酸钠、铝硅酸钠、硫酸钠、线形烷基苯磺酸酯、过碳酸钠、壬酰氧基苯酚酯磺酸、烷基硫酸盐、水、硅酸盐、聚丙烯酸钠乙氧基化物、聚乙二醇4000、香味、DTPA、棕榈酸、蛋白酶、二氨基二苯乙烯二磺酸钠、硅胶、FD&C蓝1、纤维素酶、烷基醚硫酸盐。

[0659]

成分	量 (按wt %)
阴离子去污表面活性 (如烷基苯磺酸盐、烷基乙氧基化硫酸盐及其	从 8 wt% 至 15 wt%的混合物)
非离子去污表面活性剂 (如烷基乙氧基化醇)	从 0.5 wt% 至 4 wt%
阳离子去污表面活性剂 (如季铵化合物)	从0至4 wt%
其他去污表面活性剂 (如两性离子去污表面活性剂、两性表面活性剂及其混合物)	从0 wt%至4 wt%
羧酸酯聚合物 (如马来酸和丙烯酸的共聚物)	从1 wt%至4 wt%
聚乙二醇聚合物 (如包括聚乙酸乙烯酯侧链的聚乙二醇聚	从 0.5 wt% 至 4

[0660]

合物)	wt%
聚酯污垢释放聚合物 (如Repel-o-tex和/或Texcare聚合物)	0.1 wt%至2 wt%
纤维素聚合物 (如羧甲基纤维素、甲基纤维素及其组合)	从 0.5 wt% 至 2 wt%
其他聚合物 (如胺聚合物、染料转印抑制剂聚合物、六亚甲基二胺衍生物聚合物、及其混合物)	从0 wt%至4 wt%
沸石助洗剂和磷酸盐助洗剂 (如沸石4A和/或三聚磷酸钠)	从0 wt%至4 wt%
其他助洗剂 (如柠檬酸钠和/或柠檬酸)	从0 wt%至3 wt%
碳酸盐 (如碳酸钠和/或碳酸氢钠)	从 15 wt% 至 30 wt%
硅酸盐 (如硅酸钠)	从 0 wt% 至 10 wt%
填料 (如硫酸钠和/或生物填料)	从 10 wt% 至 40 wt%
可用氧的来源 (如过碳酸钠)	从 10 wt% 至 20 wt%
漂白活化剂 (如四乙酰基乙二胺 (TAED) 和/或壬酰基羟苯磺酸盐 (NOBS))	从2 wt%至8 wt%
漂白催化剂 (如基于氧氮环丙烷的漂白催化剂和/或过渡金属漂白催化剂)	从 0 wt% 至 0.1 wt%
其他漂白剂 (如还原漂白剂和/或预形成的过酸)	从 0 wt% 至 10 wt%
螯合剂 (如乙二胺-N'N'-琥珀酸 (EDDS) 和/或羟乙基二磷酸 (HEDP))	从 0.2 wt% 至 1 wt%
光漂白剂 (如磺化的酞菁锌和/或铝)	从 0 wt% 至 0.1 wt%
调色剂 (如直接紫99、酸性红52、酸性蓝80、直接紫9、溶剂紫13及其任何组合)	从0 wt%至1 wt%
增亮剂 (如增亮剂15和/或增亮剂49)	从 0.1 wt% 至 0.4 wt%
蛋白酶 (如Savinase, Savinase Ultra, Purafect, FN3, FN4及其任何组合)	从 0.1 wt% 至 0.4 wt%
淀粉酶 (如Termamyl、Termamyl ultra Natalase、Optisize、Stainzyme、Stainzyme Plus、及其任何组合)	从0.05 wt%至0.2 wt%
纤维素酶 (如Carezyme和/或Celluclean)	从0.05 wt%至0.2 wt%
脂肪酶 (如Lipex、Lipolex、Lipoclean及其任何组合)	从 0.2 wt% 至 1 wt%

[0661]

其他酶（如木葡聚糖酶、角质酶、果胶酸裂解酶、甘露聚糖酶、漂白酶）	从0 wt%至2 wt%
织物柔软剂（如蒙脱石粘土和/或聚二甲基硅氧烷（PDMS））	从0 wt%至4 wt%
絮凝剂（如聚氧化乙烯）	从0 wt%至1 wt%
抑泡剂（如硅酮和/或脂肪酸）	从 0 wt% 至 0.1 wt%
香料（如香料微囊、喷雾香料、淀粉封装的香料accord、装载香料的沸石、及其组合物）	从 0.1 wt% 至 1 wt%
美学（如彩色肥皂环和/或彩色斑点/条）	从0 wt%至1 wt%
其他	平衡物

[0662]

成分	量
包含羧基基团的聚合物（按质量计包括从约60%至约70%的基于丙烯酸单体（A）；并且按质量计包括从约30%至约40%的包含磺酸基基团的单体（B））；并且其中该平均分子量是从约23,000至约50,000，优选地在从约25,000至约38,000的范围内，如WO 2014032269中所描述的。	从 约 0.5 wt% 至 约 1.5 wt%
淀粉酶（Stainzyme Plus（R），具有14 mg活性酶/g的酶活性）	从 约 0.1 wt% 至 约 0.5 wt%
阴离子去污表面活性剂（如烷基苯磺酸盐、烷基乙氧基化硫酸盐及其混合物）	从 约 8 wt% 至 约 15 wt%
非离子去污表面活性剂（如烷基乙氧基化醇）	从 约 0.5 wt% 至 4 wt%
阳离子去污表面活性剂（如季铵化合物）	从 约 0 wt%至约4 wt%
其他去污表面活性剂（如两性离子去污表面活性剂、两性表面活性剂及其混合物）	从 约 0 wt% 至 4 wt%
羧酸酯聚合物（如马来酸和丙烯酸的共聚物）	从 约 1 wt%至约4 wt%
聚乙二醇聚合物（如包括聚乙酸乙烯酯侧链的聚乙二醇聚合物）	从 约 0

[0663]

	wt%至约4 wt%
聚酯污垢释放聚合物（如Repel-O- Tex（R）和/或Texcare（R）聚合物）	从 约 0.1 wt%至约2 wt%
纤维素聚合物（如羧甲基纤维素、甲基纤维素及其组合）	从 约 0.5 wt%至约2 wt%
其他聚合物（如胺聚合物、染料转印抑制剂聚合物、六亚甲基二胺衍生物聚合物、及其混合物）	从 约 0 wt%至约4 wt%
沸石助洗剂和磷酸盐助洗剂（如沸石4A和/或三聚磷酸钠）	从 约 0 wt%至约4 wt%
其他助洗剂（如柠檬酸钠和/或柠檬酸）	从 约 0 wt%至约3 wt%
碳酸盐（如碳酸钠和/或碳酸氢钠）	从约15 t%至 约 30 wt%
硅酸盐（如硅酸钠）	从 约 0 wt%至约10 wt%
填料（如硫酸钠和/或生物填料）	从 约 10 wt%至约40 wt%
可用氧的来源（如过碳酸钠）	从 约 10 wt%至约20 wt%
漂白活化剂（如四乙酰基乙二胺（TAED）和/或壬酰基羟苯磺酸盐（NOBS））	从 约 2 wt%至约8 wt%
漂白催化剂（如基于氧氮环丙烷的漂白催化剂和/或过渡金属漂白催化剂）	从 约 0 wt%至约0.1 wt%
其他漂白剂（如还原漂白剂和/或预形成的过酸）	从 约 0 wt%至约10 wt%

[0664]	螯合剂（如乙二胺-N'N'-琥珀酸（EDDS）和/或羟乙基二磷酸（HEDP））	从约 0.2 wt% 至约 1 wt%
	光漂白剂（如磺化的酞菁锌和/或铝）	从约 0 wt% 至约 0.1 wt%
	调色剂（如直接紫99、酸性红52、酸性蓝80、直接紫9、溶剂紫13及其任何组合）	从约 0 wt% 至约 0.5 wt%
	增亮剂（如增亮剂15和/或增亮剂49）	从约 0.1 wt% 至约 0.4 wt%
	蛋白酶（如Savinase、Polarzyme、Purafect、FN3、FN4及其任何组合，典型地具有从约20 mg至约100 mg活性酶/g的酶活性）	从约 0.1 wt% 至约 1.5 wt%
	淀粉酶（如Termamyl(R)、Termamyl Ultra(R)、Natalase(R)、Optisize HT Plus(R)、Powerase(R)、Stainzyme(R)及其任何组合，典型地具有从约10 mg至约50 mg活性酶/g的酶活性）	从约 0.05 wt% 至约 0.2 wt%
	纤维素酶（如Carezyme(R)、Celluzyme(R)和/或Celluclean(R)、典型地具有约从10 mg至50 mg活性酶/g的酶活性）	从约 0.05 wt% 至 0.5 wt%
	脂肪酶（如Lipex(R)、Lipolex(R)、Lipoclean(R)及其任何组合，典型地具有从约10 mg至约50 mg活性酶/g的酶活性）	从约 0.2 wt% 至约 1 wt%
	其他酶（如木葡聚糖酶（例如，Whitezyme(R)）、角质酶、果胶酸裂解酶、甘露聚糖酶、漂白酶，典型地具有从约10 mg至约50 mg活性酶/g的酶活性）	从 0 wt% 至 2 wt%
	织物柔软剂（如蒙脱石粘土和/或聚二甲基硅氧烷（PDMS））	从 0 wt% 至 15 wt%
	絮凝剂（如聚氧化乙烯）	从 0 wt% 至 1 wt%
	抑泡剂（如硅酮和/或脂肪酸）	从 0 wt% 至 0.1 wt%
	香料（如香料微囊、喷雾香料、淀粉封装的香料accord、装载香料的沸石、及其任何组合）	从 0.1 wt% 至 1 wt%
	美学（如彩色肥皂环和/或彩色斑点/条）	从 0 wt% 至 1 wt%
[0665]	其他	平衡物

[0666] 所有酶水平表达为rug活性酶蛋白/100g洗涤剂组合物。表面活性剂成分获得自巴

斯夫公司 (BASF)、路德维希港、德国 (Lutensol (R)) ; 壳牌化学公司 (Shell Chemicals), 伦敦, 英国; 斯泰潘公司 (Stepan), 诺思菲尔德, III, 美国; 亨斯曼公司 (Huntsman), 盐湖城, 犹他州, 美国; 科莱恩公司 (Clariant), 苏尔茨巴赫市, 德国 (Praepagen (R))。

[0667] 三聚磷酸钠可以获得自罗地亚公司 (Rhodia)、巴黎、法国。沸石可以获得自工业沸石 (英国) 有限公司, 格雷士, 艾塞克斯, 英国。柠檬酸和柠檬酸钠可以获得自永本兹劳尔公司 (Jungbunzlauer), 巴塞尔, 瑞士。NOBS 是壬酰基羟苯磺酸钠, 由伊士曼公司 (Eastman), 贝茨维尔, 阿肯色州, 美国。TAED 是四乙酰乙二胺, 在科莱恩有限公司 (Clariant GmbH), 祖尔茨巴赫, 德国的 Peractive (R) 品牌下提供。

[0668] 碳酸钠和碳酸氢钠可以获得自索尔维公司 (Solvay), 布鲁塞尔, 比利时。

[0669] 聚丙烯酸酯、聚丙烯酸酯/马来酸酯共聚物可以获得自巴斯夫公司、路德维希港、德国。

[0670] Repel-0-Tex (R) 可以获得自罗地亚公司 (Rhodia)、巴黎、法国。Texcare (R) 可以获得自科莱恩公司, 祖尔茨巴赫, 德国。过碳酸钠和碳酸钠可以获得自索尔维公司, 休斯顿, 德克萨斯州, 美国。

[0671] 乙二胺-N,N'-二琥珀酸的 Na 盐, (S,S) 异构体 (EDDS) 是通过联合奥泰公司 (Octel), 埃尔斯米尔港, 英国提供。

[0672] 羟基乙醇二磷酸盐 (HEDP) 是由美国陶氏化学公司 (Dow Chemical), 米德兰, 密歇根州, 美国提供。

[0673] 酶 Savinase (R)、Savinase (R) Ultra、Stainzyme (R) Plus、Lipex (R)、Lipolex (R)、Lipoclean (R)、Celluclean (R)、Carezyme (R)、Natalase (R)、Stainzyme (R)、Stainzyme (R) Plus、Termamyl (R)、Termamyl (R) ultra、和 Mannaway (R) 可以获得自诺维信公司 (Novozymes), 巴格斯瓦德, 丹麦。

[0674] 酶 Purafect (R)、FN3、FN4 和 Optisize 可以获得自杰能科国际公司 (Genencor International Inc.) 帕洛阿尔托, 加利福尼亚州, 美国。

[0675] 直接紫 9 和 99 可以获得自巴斯夫公司、路德维希港、德国。溶剂紫 13 可以获得自宁波立兴化工有限公司 (Ningbo Lixing Chemical Co., Ltd.), 宁波, 浙江, 中国。增亮剂可以获得自汽巴精化有限公司, 巴塞尔, 瑞士。除非另外指明, 所有百分比和比率都是按重量计算。除非另外指明, 所有百分比和比率都是基于总组合物计算。

[0676] 应当理解的是贯穿本说明书给出的每一最大数值限度包括每一较低的数值限度, 如同此类较低数值限度在此被明确写出。贯穿本说明书给出的每一最小数值限度将包括每一较高的数值限度, 如同此类较高数值限度在此被明确写出。本说明书中所给出的每个数值范围将包括落入在这样更宽泛数值范围内的每一狭小的范围, 好像这样狭小的数值范围都在这里被书面表达了。

[0677] 洗涤测定

[0678] Launder-0-Meter (LOM) 模式洗涤系统

[0679] Launder-0-Meter (LOM) 是中等规模标准洗涤系统, 它可以应用于同时测试多达 20 种不同洗涤条件。LOM 基本上是大型的具有 20 个封闭金属烧杯在其中旋转的温度受控的水浴。每个烧杯构成一个小的洗衣机并且在一次实验过程中, 每个试管将包含一种具有特定的有待测试的洗涤剂/酶系统连同在关于其进行测试的弄脏的和未弄脏的织物。机械压力

由在水浴中旋转的烧杯并且由包括在烧杯中的金属球实现。

[0680] LOM标准洗涤系统主要用于清洁剂和酶的中等规模测试,在例如欧洲洗涤条件下。在一个LOM实验中,如压载物与污物的比率和织物与洗涤液的比率的因素可以变化。因此,LOM提供了在小规模实验(如AMSA和微型洗涤)与在前面加载型洗涤机中的更费时的全规模实验之间的联系。

[0681] 迷你Launder-O-Meter (迷你LOM) 模式洗涤系统

[0682] 迷你LOM是Launder-O-Meter (LOM) 的修饰的迷你洗涤系统,其是中等规模标准洗涤系统,它可以应用于同时测试多达20种不同洗涤条件。LOM基本上是大型的具有20个封闭金属烧杯在其中旋转的温度受控的水浴。每个烧杯构成一个小的洗衣机并且在一次实验过程中,每个试管将包含一种具有特定的有待测试的洗涤剂/酶系统连同在关于其进行测试的弄脏的和未弄脏的织物。机械压力由在水浴中旋转的烧杯并且由包括在烧杯中的金属球实现。

[0683] LOM标准洗涤系统主要用于清洁剂和酶的中等规模测试,在例如欧洲洗涤条件下。在一个LOM实验中,如压载物与污物的比率和织物与洗涤液的比率的因素可以变化。因此,LOM提供了在小规模实验(如AMSA和微型洗涤)与在前面加载型洗涤机中的更费时的全规模实验之间的联系。

[0684] 在迷你LOM中,洗涤是在置于斯图尔特 (Stuart) 旋转器中的50ml试管中进行的。

[0685] 酶测定

[0686] 测定I:DNA酶活性测试

[0687] 在具有甲基绿(BD公司,富兰克林湖,新泽西州,美国)的DNA酶测试琼脂上确定DNA酶活性。简言之,将21g琼脂溶于500ml水中,并且然后在121℃下高压灭菌15分钟。将高压蒸汽处理的琼脂在水浴中温和至48℃,并且将20ml的琼脂倒入培养皿并且允许在室温下通过孵育来固化。在固化的琼脂平板上,添加5μl的酶溶液,并且DNA酶活性被观察为斑点酶溶液周围的无色区域。

[0688] 测定II

[0689] 使用电子鼻分析纺织品上的E-2-壬烯醛

[0690] 测试纺织品上的恶臭的存在的一种方式是通过使用作为恶臭的标志物的E-2-壬烯醛,因为此化合物引起衣物上的恶臭。

[0691] 将E-2-壬烯醛的溶液添加至5cm x 5cm纺织品小块布样上并且将该小块布样放入20mL玻璃小瓶中用于GC分析并且盖住该小瓶。在40℃下孵育20分钟后,在来自法国阿尔法M.O.S. (Alpha M.O.S.) 的Heracles II电子鼻中分析来自加帽小瓶的5mL顶部空间(具有2个FID的双柱气相色谱仪,柱1:MXT5并且柱2:MXT1701)。

[0692] 实例

[0693] 方法

[0694] PCR、克隆、连接核苷酸等的一般方法是本领域普通技术人员熟知的并且可以例如发现于“分子克隆:实验室手册(Molecular cloning:A laboratory manual)”,萨拉布鲁克(Sambrook)等人(1989),冷泉港实验室(Cold Spring Harbor lab.),冷泉港,纽约;奥苏贝尔(Ausubel),F·M等人(编辑);“分子生物学实验指南(Current protocols in Molecular Biology)”,约翰威立父子公司(John Wiley and Sons), (1995);哈伍德(Harwood),C·R和

卡廷 (Cutting), S·M (编辑); “DNA 克隆: 实用方法 (DNA Cloning: A Practical Approach), I 和 II 卷”, D.N. 格洛弗 (Glover) 编辑 (1985); “寡核苷酸合成” (Oligonucleotide Synthesis), M.J. 盖特 (Gait) 编辑 (1984); “核酸杂交 (Nucleic Acid Hybridization)”, B.D. 黑姆斯 (Hames) & S.J. 希金斯 (Higgins) 编辑 (1985); “分子克隆实用指南 (A Practical Guide To Molecular Cloning)”, B. 帕柏尔 (Perbal) (1984)。

[0695] 菌株

[0696] 哈茨木霉 04 是已知生产许多分泌酶的菌株。将分离物用作 DUF1524 多肽的来源 (<http://pfam.sanger.ac.uk/>)。将在编号 CBS223.93 下保藏的哈茨木霉在 PDA 板上, 在 20℃ 下进行繁殖。

[0697] 培养基和溶液

[0698] YP+2% 葡萄糖培养基由 1% 酵母提取物、2% 蛋白胨以及 2% 葡萄糖构成。

[0699] LB 培养基由 10g 的胰蛋白胨、5g 的酵母提取物、5g 的氯化钠、以及加至 1 升的去离子水构成。

[0700] LB 琼脂板由 LB 培养基和每升 15g 的细菌用琼脂构成。

[0701] PDA 板由马铃薯浸出液组成, 该马铃薯浸出液是通过将 300g 切片的马铃薯 (洗涤但未削皮) 在水中煮沸 30 分钟, 并且然后将该培养液倾析或滤过粗滤布而制成。然后添加蒸馏水, 直到悬浮液的总体积为一升, 随后添加 20g (w/v) 的右旋糖和 20g (w/v) 的琼脂粉。该培养基通过在 15psi 下高压杀菌 15 分钟来进行灭菌 (细菌学分析手册 (Bacteriological Analytical Manual), 第 8 版, 修订 A, 1998)。

[0702] Dap-4C 介质由以下构成: 20g 右旋糖、10g 麦芽糖、11g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1g KH_2PO_4 、2g 柠檬酸、5.2g $\text{K}_3\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、0.5g 酵母提取物 (Difco)、1ml Dowfax 63N10 (陶氏化学公司 (Dow Chemical Company))、0.5ml KU6 痕量金属溶液、2.5g CaCO_3 、以及补足到 1 升的去离子水。该培养基通过在 15psi 下高压杀菌 15 分钟来进行灭菌 (细菌学分析手册 (Bacteriological Analytical Manual), 第 8 版, 修订 A, 1998)。使用之前, Dap-4C 培养基中添加 3.5ml 无菌的 50% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 和 5ml 无菌的 20% 乳酸/150ml 培养基。

[0703] KU6 痕量金属溶液由以下各项构成: 0.13g NiCl_2 、2.5g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、13.9g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、8.45g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、6.8g ZnCl_2 、3g 柠檬酸、以及去离子水补足至 1 升。

[0704] COVE 蔗糖选择板由以下构成: 342g 的蔗糖、20g 的琼脂粉、20ml 的 COVE 盐溶液及补足至 1 升的去离子水。该培养基通过在 15psi 下高压杀菌 15 分钟来进行灭菌 (细菌学分析手册 (Bacteriological Analytical Manual), 第 8 版, 修订 A, 1998)。将该培养基冷却至 60℃ 并且然后添加 10mM、以及 TRITON® X-100 (50μl/500ml)。

[0705] COVE 顶层琼脂糖: 342.3g/L 蔗糖、20ml/L COVE 盐溶液、10mM 乙酰胺、15mM CsCl 、6g/L GTG 琼脂糖 (目录号 50070, SeaKem, 美国)

[0706] 用于分离的 COVE-2: 30g/L 蔗糖、20ml/L COVE 盐溶液、10mM 乙酰胺、30g/L 诺布尔琼脂

[0707] COVE 盐溶液由 26g 的 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、26g 的 KCl 、26g 的 KH_2PO_4 、50ml 的 COVE 痕量金属溶液及补足到 1 升的去离子水组成。

[0708] COVE 痕量金属溶液由 0.04g 的 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 、0.4g 的 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、1.2g 的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.7g 的 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、0.8g 的 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、10g 的 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 及补足到 1 升的去离子水

组成。

[0709] PEG:60%是由以下各项组成:60% (W/V) PEG 4000 (BDH)、10mM CaCl₂、10mM Tris-HCl pH 7.5。将该溶液对0.22μm PES膜进行过滤用于灭菌(PES膜(HPWP14250,密理博公司(Millipore Corp.)))。在过滤灭菌后,可以将该PEG 60%以等分试样在-20℃下储存直至需要。

[0710] 实例1

[0711] 从哈茨木霉04克隆P34A9E DUF1524多肽编码序列

[0712] 通过PCR,从哈茨木霉04DNA克隆P34A9E DUF1524多肽编码序列。

[0713] 在20℃下,在1000ml锥形摇瓶中的100ml的YP+2%葡萄糖介质中培养哈茨木霉04 5天。通过由衬有MIRACLOTH® (EMD密理博,比勒利卡,MA,USA)的布氏真空漏斗对培养基进行过滤从这些瓶中收获菌丝。将菌丝冷冻于液氮中并在-80℃储存直至进一步使用。根据制造商的说明书,使用DNEASY®植物大提试剂盒(Plant Maxi Kit)(凯杰公司(QIAGEN GMBH),希尔登,德国)分离基因组DNA。

[0714] 通过Illumina MySeq (Illumina公司,圣迭哥,加利福尼亚州)生产基因组序列信息。根据制造商说明书,将5μg的分离的哈茨木霉基因组DNA用于文库制备和分析。采用300bp配对端策略,文库插入尺寸为200-500bp。针对总计4,300,311,407 300bp的所获得的原始读数,使用一个HiSeq运行的一半。随后将该读数分级为25%,随后修正(提取最长的、具有10或更多Phred-得分的子序列)。

[0715] 使用Idba版本0.18集合这些读数。丢弃短于200bp的叠连群,得到39,391,155bp, N=50为167,714。使用GeneMark.hmm ES版本2.3c调用基因,并且使用由Pfam提供的“DUF1524”隐马尔可夫模型(Hidden Markov Model)进行该催化结构域的鉴别。使用以下描述的引物(SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4)通过PCR,从哈茨木霉04基因组DNA,克隆整个编码区的多肽编码序列。

[0716] 5'-ACACAACTGGGATCCACCATGAAGCTGTCCATCTCTGTCG-3' (SEQ ID NO:3)

[0717] 5'-AGATCTCGAGAAAGCTTACTAGCAAGTATCTAACATGCTGCT-3' (SEQ ID NO:4)

[0718] 粗体字母表示哈茨木霉酶编码序列。限制位点是已加下划线的。这些限制位点左方的序列与pDau109的插入位点是同源的(WO 2005/042735)。

[0719] In-FusionTM优越PCR克隆试剂盒目录号639620

[0720] 根据制造商说明书(赛墨科技公司)用以下终浓度进行扩增反应(50μl)

[0721] 1X Phusion HC缓冲液

[0722] 200μM dNTP

[0723] 2.0mM MgCl₂

[0724] 0.5μM的每种引物(KKSC0370-F和KKSC0370-R)

[0725] 10ng的哈茨木霉04基因组DNA

[0726] 将PCR反应在DYAD® Dual-Block热循环仪(DYAD® Dual-Block Thermal Cycler)(伯乐公司(BioRad),美国)中进行孵育,编程为98℃持续2分钟,1个循环;98℃持续10秒钟和72℃持续2分钟,30个循环;以及72℃持续6分钟,1个循环。在去除之前将样品冷却

至10℃并且进一步处理。

[0727] 使用40mM Tris碱、20mM乙酸钠、1mM EDTA二钠(TAE)缓冲液,通过1%琼脂糖凝胶电泳分析5μl的PCR反应。观察到一个约1.1bp的主带。根据制造商说明书,直接使用ILLUSTRA™ GFX™ PCR DNA和凝胶带纯化试剂盒(ILLUSTRA™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit) (GE医疗公司,皮斯卡塔韦(Piscataway),新泽西州,美国)纯化剩余的PCR反应。

[0728] 将2μg的质粒pDau109用Bam HI和Hind III进行消化,并且在1%琼脂糖凝胶上使用50mM Tris碱-50mM硼酸-1mM EDTA二钠(TBE)缓冲液运行该消化的质粒,以从该限制质粒去除填充片段。通过添加SYBR®安全DNA凝胶染液(Safe DNA gel stain) (生命技术公司(Life Technologies Corporation),格兰德岛(Grand Island),新泽西州,美国)并且使用470nm波长透照仪将条带可视化。将对应于该限制质粒的条带切下,并且使用ILLUSTRA™ GFX™ PCR DNA和凝胶条带纯化试剂盒进行纯化。将该质粒洗脱到10mM Tris pH 8.0中,并将其浓度调节至20ng/μl。使用IN-FUSION® PCR克隆试剂盒(克罗泰克实验室有限公司(Clontech Laboratories, Inc.),山景城(Mountain View),加利福尼亚州,美国)以将该1170bp PCR片段克隆到用Bam HI和Hind III (20ng) 消化的pDau109中。该IN-FUSION®总反应体积是10μl。该IN-FUSION®总反应体积是10μl。根据制造商的方案,将该IN-FUSION®反应转化进FUSION-BLUE™大肠杆菌细胞(克罗泰克实验室有限公司,山景城,加利福尼亚州,美国)中,并且将其铺板在补充有50μg的氨苄西林/ml的LB琼脂板上。在37℃下孵育过夜之后,观察到转化菌落在这些补充有50μg氨苄西林/ml的LB板上在选择下生长。

[0729] 选择若干菌落用于通过菌落PCR使用以下所述的pDau222载体引物进行分析。用黄色的接种针(能肯公司(Nunc) A/S,丹麦)从该补充有50μg的氨苄西林/ml的LB板上将四个菌落转移到补充有50μg的氨苄西林/ml的新的LB板上,并在37℃孵育过夜。

[0730] 引物8653:5' -GCAAGGGATGCCATGCTTGG-3' (SEQ ID NO:5)

[0731] 引物8654:5' -CATATAACCAATTGCCCTC-3' (SEQ ID NO:6)

[0732] 将这三个菌落中的每个直接转移到200μl PCR管中,该PCR管中由5μl的2X赛墨科技公司Dream Taq™ PCR Master Mix(赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific),罗克福德(Rockford),伊利诺伊州,美国)、0.5μl的引物8653(10pm/μl)、0.5μl的引物8654(10pm/μl)、以及4μl的去离子水构成。每个菌落PCR在DYAD® Dual-Block热循环仪中进行孵育,编程为:在94℃下持续60秒钟,1个循环;在95℃下持续30秒钟,60℃持续45秒钟,72℃持续60秒钟,68℃持续10分钟,和10℃持续10分钟,30个循环。

[0733] 将4μl的每个完成的PCR反应使用TAE缓冲液提交到1%琼脂糖凝胶电泳。四个大肠杆菌转化体都显示900bp的PCR条带。使用QIAprep质粒小提试剂盒(Spin Miniprep Kit) (凯杰公司,希尔登,德国)从这四个菌落的每个中分离质粒DNA。将所得质粒DNA使用一种应用生物系统模型3730自动DNA测序仪使用3.1版BIG-DYE™终止子化学(应用生物系统公司(Applied Biosystems, Inc.),福斯特市(Foster City),加利福尼亚州,美国),用引物8653和8654进行测序。一个命名为pKKSC0370-1的质粒

[0734] 选择质粒pKKSC0370-1,用于转化米曲霉MT3568。米曲霉MT3568是米曲霉JaL355的amdS(乙酰胺酶)破坏的基因衍生物(WO 2002/40694),其中通过钝化米曲霉amdS基因来修

复pyrG营养缺陷型。根据欧洲专利EP0238023,第14-15页中所描述的方法制备米曲霉MT3568原生质体。

[0735] 根据制造商说明书(Genomed),使包含pKKSC0370-1的大肠杆菌3701生长过夜,并且根据制造商说明书使用质粒Midi试剂盒(Genomed JETquick试剂盒,目录号400250, Genomed有限公司,德国)分离pKKSC0370-1的质粒DNA。将纯化的质粒DNA转化进米曲霉MT3568中。根据克里斯滕森等人,1988,生物/技术(Bio/Technology) 6:1419-1422中所描述的方法制备米曲霉MT3568原生质体。选择版由以下各项组成:COVE蔗糖与+10mM乙酰胺+15mM CsCl+TRITON® X-100 (50μl/500ml)。在37℃下孵育这些平板。简而言之,将代表3μg的DNA的8μl的质粒DNA添加到100μl的MT3568原生质体中。添加250μl的60%PEG溶液,并且将这些管轻轻地混合,并且在37℃下孵育30分钟。将混合物添加到10ml的预熔化的Cove顶层琼脂糖中(该顶层琼脂糖融化并且然后在被添加到原生质体混合物之前在热水浴中温度平衡至40℃)。然后将合并的混合物涂布于具有10mM乙酰胺的两个Cove-蔗糖选择皮氏平板上。在37℃下孵育这些平板4天。

[0736] 通过在作为碳源的选择乙酰胺上生长来鉴别单个曲霉属转化菌落。将四种米曲霉转化体中的每个接种到96深孔板中补充有2%葡萄糖的750μl的YP培养基和补充有2%麦芽糊精的750μl的YP培养基和补充有DAP4C的750μl的YP培养基中,并在37℃静止孵育4天。同时,将四种转化体再划痕到COVE-2蔗糖琼脂培养基上。

[0737] 然后根据制造商,使用NUPAGE® 10%Bis-Tris SDS凝胶(英杰公司,卡尔斯巴德,加利福尼亚州,美国)通过SDS-PAGE,针对P34A9E DUF1524多肽的产生,对来自米曲霉转化体的培养液进行分析。对于这些米曲霉转化体中每个,在大约30kDa观察到一个条带。将产生P34A9E多肽的一个米曲霉转化体指定为米曲霉EXP09484。

[0738] 将米曲霉EXP09484在26℃下在包含100ml的DAP4C培养基的1000ml锥形摇瓶中在85rpm搅拌下培养4天。

[0739] 实例2

[0740] 来自哈茨木霉04的P34A9E DUF1524多肽编码序列的表征

[0741] 哈茨木霉04P34A9E DUF1524多肽基因组编码序列的基因组DNA序列和推导的氨基酸序列分别在SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2中示出。该编码序列是867bp,包括终止密码子,并且分别在位置76-154、289-362和521-615处观察到了三个内含子。编码的预测的蛋白为205个氨基酸。使用SignalP程序(尼尔森等人,1997,同上)预测出17个残基的信号肽。预测的成熟蛋白包含188个氨基酸,具有20kDa的预测分子量和5.9的预测等电点。在预测的分子量和由SDS凝胶分析(30kDa)预测的分子量之间的差异最有可能是肽糖基化的结果。

[0742] 使用尼德曼和翁施算法(尼德曼和翁施,1970,同上)确定氨基酸序列的比较性成对地总体比对,使用空位开放罚分10、空位延伸罚分0.5以及EBLOSUM62矩阵。比对显示,哈茨木霉04P34A9E DUF1524多肽的推导的氨基酸序列与来自绿色木霉菌SWISSPROT_G9MNM6的DUF1524多肽的推导的氨基酸序列具有96.1%一致性(排除空位)。

[0743] 实例3

[0744] 在液体和粉末标准洗涤剂中哈茨木霉DNA酶的深层清洁性能

[0745] 分离衣物特定细菌菌株

[0746] 在本实例中使用一种分离自衣物的短波单胞菌属的菌株。在30℃下,使短波单胞

菌属物种在胰酪胨琼脂 (TSA) (pH 7.3) (CM0131;Oxoid有限公司, 贝辛斯托克, 英国) 上预生长2-5天。将来自单菌落的满环物 (loop-full) 转移至10mL的TSB中并且伴随振荡 (240rpm) 于30℃下孵育16小时。繁殖后, 通过离心 (西格玛实验室离心机 (Sigma Laboratory Centrifuge) 6K15) (3000g, 在21℃下, 7min) 沉淀短波单胞菌属并且将其重悬于10mL用milliQ水稀释两次的TSB中。使用分光计 (POLARstar Omega (BMG莱伯泰科 (BMG Labtech), 奥滕贝格 (Ortenberg), 德国)) 测量600nm处的光密度 (OD)。将用milliQ水稀释两次的新鲜TSB接种至0.03的OD_{600nm}, 并且将1.6mL添加到12孔的聚苯乙烯平底微板的各孔 (3512; 康宁公司 (Corning Incorporated), 康宁 (Corning), 纽约州 (NY), 美国), 在该微板中放置无菌聚酯WFK30A的圆形小块布样 (直径2cm)。伴随振荡 (100rpm) 在15℃下孵育24h后, 将小块布样用0.9% (w/v) NaCl冲洗两次。

[0747] 为了检测深层作用, 将具有短波单胞菌属的五个冲洗的小块布样与五个无菌的聚酯WFK30A小块布样在50mL试管中混合并添加10mL的洗涤剂洗涤溶液, 该洗涤溶液包含0.7g/L污垢 (Pigmentschmutz, 09V, wfk, 克雷费尔德 (Krefeld), 德国) 和哈茨木霉DNA酶 (0.04ppm) (SEQ ID NO:2)。在30℃下, 将试管放入斯图尔特 (Stuart) 旋转器中, 持续1小时。将小块布样用自来水冲洗两次并且在滤纸上干燥过夜。作为对照, 平行进行不添加哈茨木霉DNA酶的洗涤。使用Color Eye (Macbeth Color Eye 7000反射分光光度计) 测量色差 (L值)。在入射光中没有UV的情况下进行测量并且从CIE Lab色空间中提取L值。数据表示为ΔL值, 意指用DNA酶洗涤的小块布样的L值减去不用DNA酶洗涤的小块布样的L值。在一个液体标准洗涤剂 (标准洗涤剂A) 中以及在一个粉末标准洗涤剂 (标准洗涤剂T) 中调研哈茨木霉DNA酶的深层清洁作用。通过添加3.3g到1L硬度15°dH的水 (Ca:Mg:NaHCO₃ 4:1:1.5) 中来制备标准洗涤剂A的洗涤溶液。通过添加5.3g到1L硬度15°dH的水 (Ca:Mg:NaHCO₃ 4:1:1.5) 中来制备标准洗涤剂T的洗涤溶液。

[0748] 本实例示出, 哈茨木霉DNA酶防止污垢沉积 (抗再沉积) 到与细菌预生长的聚酯小块布样, 并且改进了与细菌预生长的聚酯小块布样的白度。在pH 8.0液体洗涤剂中, 还在pH 10的粉状洗涤中都观察到了污垢沉积的预防, 尽管在液体洗涤剂中观察到了最显着的深层清洁效果。

[0749] 表1. 哈茨木霉DNA酶 (SEQ ID NO:2) 的深层清洁作用。

	洗涤剂	区域	pH	色差 (ΔL)
	液体洗涤剂:			
[0750]	标准洗涤剂 A	欧洲	7.7	6.6
	粉状洗涤剂:			
	标准洗涤剂 T	欧洲	10.3	2.3

[0751] 实例4

[0752] 在米曲霉中表达的核酸酶哈茨木霉 (SEQ ID NO:2) 的纯化

[0753] 通过具有0.22μm截留的Fast PES Bottle top过滤器过滤具有半乳聚糖酶的发酵上清液。将100ml过滤的上清液用400ml MQ水进行稀释并且将该pH用1M HCl调整到4.5。

[0754] 在预处理后, 通过在XK26柱中的大约30ml的S-琼脂糖 (S-Sepharose) 上的阳离子

交换色谱法纯化该500ml包核酸酶的溶液,使用50mM乙酸钠(pH 4.5)作为缓冲液A并且使用50mM乙酸钠+1M NaCl(pH 4.5)作为缓冲液B。基于色谱图(在280nm和254nm处的吸收)和SDS-PAGE分析将来自该柱的部分进行池化。

[0755] 如从SDS-PAGE中估算的分子量大约为30kDa并且纯度>95%。通过凝胶内消化随后将产生的肽进行质谱分析,该纯化的核酸酶的氨基酸序列证实为SEQ ID NO:2。

序列表

<110> 诺维信公司
 <120> 洗涤剂组合物
 <130> 12896-W0-PCT
 <160> 8
 <170> PatentIn 3.5版
 <210> 1
 <211> 868
 <212> DNA
 <213> 哈茨木霉

<220>
 <221> 外显子
 <222> (1).. (75)

<220>
 <221> 内含子
 <222> (76).. (154)

<220>
 <221> 外显子
 <222> (155).. (288)

<220>
 <221> 内含子
 <222> (289).. (362)

<220>
 <221> 外显子
 <222> (363).. (519)

<220>
 <221> 内含子
 <222> (520).. (615)

[0001]

<220>
 <221> 外显子
 <222> (616).. (867)

<400> 1
 atg aag ctg tcc atc tct gtc gct ctt act tcg gcc atc gcg gtt ctc 48
 Met Lys Leu Ser Ile Ser Val Ala Leu Thr Ser Ala Ile Ala Val Leu
 1 5 10 15
 gcc gcc ccg gct cct atg cct aca ccg gtatgtagca tcaatgcaac 95
 Ala Ala Pro Ala Pro Met Pro Thr Pro
 20 25
 atgacataac ttgtatctcg actatatatc agactggcta atgcttcaac tcattacag 154
 ccc ggt att ccc acg gaa agc agc gcc aga acc caa ctt gcc ggc ctg 202
 Pro Gly Ile Pro Thr Glu Ser Ser Ala Arg Thr Gln Leu Ala Gly Leu
 30 35 40
 act gtt gcc gtt gct ggc tct gga act ggt tac tcc cgc gac ctg ttt 250
 Thr Val Ala Val Ala Gly Ser Gly Thr Gly Tyr Ser Arg Asp Leu Phe
 45 50 55
 ccc act tgg gat gcc atc tct ggt aac tgc aac gct cg gtatgataac 298
 Pro Thr Trp Asp Ala Ile Ser Gly Asn Cys Asn Ala Arg
 60 65 70
 atcctaggac ctttcaagct tcggaatac aacacaaagg ctaacaaagt ggatgtgcaa 358
 atag c gaa tat gtg ttg aag cga gat ggt gaa ggt gtc caa gtc aac 405
 Glu Tyr Val Leu Lys Arg Asp Gly Glu Gly Val Gln Val Asn
 75 80
 aat gct tgt gaa tct cag tcc ggc acc tgg atc aga tcc tta tga caa 453
 Asn Ala Cys Glu Ser Gln Ser Gly Thr Trp Ile Arg Ser Leu Gln
 85 90 95
 cgc cag ttt cac aaa tgc atc cag ctt gga tat tga cca cat ggt gcc 501
 Arg Gln Phe His Lys Cys Ile Gln Leu Gly Tyr Pro His Gly Ala
 100 105 110
 tct aaa gaa tgc ctg gat cgtgagtttt ctcttttttc actgcgtatc 549

	Ser Lys Glu Cys Leu Asp 115 120	
	tccgttcctt acccttttgc gatactatat catgccacat cactaatatg gacaaatttc	609
	tcgccca gtc cgg tgc ctc aag ctg gac cac agc cca acg tga agc cct Val Arg Cys Leu Lys Leu Asp His Ser Pro Thr Ser Pro 125 130	657
	cgc caa cga cgt ctc ccg tcc cca act ctg ggc cgt ctc cgc aag cgc Arg Gln Arg Arg Leu Pro Ser Pro Thr Leu Gly Arg Leu Arg Lys Arg 135 140 145	705
	aaa ccg ctc caa ggg cga ccg cag ccc aga cca gtg gaa gcc tcc tct Lys Pro Leu Gln Gly Arg Pro Gln Pro Arg Pro Val Glu Ala Ser Ser 150 155 160 165	753
	gac cag ctt cta ctg cac cta cgc caa gtc gtg gat cga tgt caa gag Asp Gln Leu Leu Leu His Leu Arg Gln Val Val Asp Arg Cys Gln Glu 170 175 180	801
	ctt cta taa gct gac aat cac cag tgc cga gaa gac agc tct gag cag Leu Leu Ala Asp Asn His Gln Cys Arg Glu Asp Ser Ser Glu Gln 185 190 195	849
	cat gtt aga tac ttg cta g His Val Arg Tyr Leu Leu 200	868
	<210> 2 <211> 205 <212> PRT <213> 哈茨木霉	
	<220> <221> 信号 <222> (1).. (17)	
[0002]	<220> <221> 成熟肽 <222> (18).. (205)	
	<400> 2	
	Met Lys Leu Ser Ile Ser Val Ala Leu Thr Ser Ala Ile Ala Val Leu -15 -10 -5	
	Ala Ala Pro Ala Pro Met Pro Thr Pro Pro Gly Ile Pro Thr Glu Ser -1 1 5 10 15	
	Ser Ala Arg Thr Gln Leu Ala Gly Leu Thr Val Ala Val Ala Gly Ser 20 25 30	
	Gly Thr Gly Tyr Ser Arg Asp Leu Phe Pro Thr Trp Asp Ala Ile Ser 35 40 45	
	Gly Asn Cys Asn Ala Arg Glu Tyr Val Leu Lys Arg Asp Gly Glu Gly 50 55 60	
	Val Gln Val Asn Asn Ala Cys Glu Ser Gln Ser Gly Thr Trp Ile Ser 65 70 75	
	Pro Tyr Asp Asn Ala Ser Phe Thr Asn Ala Ser Ser Leu Asp Ile Asp 80 85 90 95	
	His Met Val Pro Leu Lys Asn Ala Trp Ile Ser Gly Ala Ser Ser Trp 100 105 110	
	Thr Thr Ala Gln Arg Glu Ala Leu Ala Asn Asp Val Ser Arg Pro Gln 115 120 125	
	Leu Trp Ala Val Ser Ala Ser Ala Asn Arg Ser Lys Gly Asp Arg Ser 130 135 140	

[0003]

Pro Asp Gln Trp Lys Pro Pro Leu Thr Ser Phe Tyr Cys Thr Tyr Ala
145 150 155

Lys Ser Trp Ile Asp Val Lys Ser Phe Tyr Lys Leu Thr Ile Thr Ser
160 165 170 175

Ala Glu Lys Thr Ala Leu Ser Ser Met Leu Asp Thr Cys
180 185

<210> 3
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 3
acacaactgg ggatccacca tgaagctgtc catctctgtc g 41

<210> 4
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 4
agatctcgag aagcttacta gcaagtatct aacatgctgc t 41

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 5
gcaagggatg ccatgcttgg 20

<210> 6
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 6
catataacca attgccctc 19

<210> 7
<211> 269
<212> PRT
<213> 枯草杆菌蛋白酶309

<400> 7

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

[0004]

<210> 8
 <211> 618
 <212> DNA
 <213> 哈茨木霉
 <400> 8
 atgaagctgt ccattctctgt cgtcttact tcggccatcg cggttctcgc cgccccggct 60
 cctatgccta caacgcccgg tatteccacg gaaagcagcg ccagaaccca acttgccggc 120
 ctgactgttg ccgttgctgg ctctggaact ggttactccc gcgacctgtt tcccacttgg 180
 gatgccatct ctggtaactg caacgctcgc gaatatgtgt tgaagcgaga tggtagaggt 240
 gtccaagtca acaatgcttg tgaatctcag tccggcacct ggatcagtc ttatgacaac 300
 gccagtttca caaatgcac cagcttgat attgaccaca tggtagcctt aaagaatgcc 360
 tggatctcgc gtgcctcaag ctggaccaca gcccaacgtg aagccctcgc caacgacgtc 420
 tcccgtcccc aactctgggc cgtctccgca agcgcaaacc gtcceaagg cgaccgcagc 480
 ccagaccagt ggaagcctcc tctgaccagc ttctactgca cctacgcaa gtcgtggatc 540
 gatgtcaaga gcttctataa gctgacaatc accagtgcg agaagacagc tctgagcagc 600
 atgttagata cttgctag 618