

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶

C12N 9/20



[12] 发明专利申请公开说明书

C12N 9/18 C11D 3/386

[21] 申请号 96196371.9

[43]公开日 1998年9月16日

[11] 公开号 CN 1193346A

[22]申请日 96.7.12

[30]优先权

[32]95.7.14 [33]DK[31]0832 / 95
[32]95.9.13 [33]DK[31]1013 / 95
[32]95.9.29 [33]DK[31]1096 / 95
[32]95.11.21[33]DK[31]1306 / 95
[32]96.2.14 [33]US[31]60 / 011,634
[32]96.4.1 [33]DK[31]0372 / 96
[32]96.5.7 [33]US[31]60 / 020,461

[86]国际申请 PCT / DK96 / 00322 96.7.12

[87]国际公布 WO97 / 04079 英 97.2.6

[85]进入国家阶段日期 98.2.19

[71]申请人 诺沃挪第克公司

地址 丹麦巴格斯瓦德

[72]发明人 C·C·福格桑格 J·S·奥凯尔斯

D·A·彼特森 S·A·帕克卡尔

M·希勒森 J·温德 T·哈尔基尔

S·T·约吉恩森

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标
事务所

代理人 李 瑛

权利要求书 8 页 说明书 169 页 附图页数 9 页

[54]发明名称 一种具有脂解活性的修饰酶

[57]摘要

本发明涉及一种从丝状真菌或细菌回收的具有脂解活性的修饰酶，与亲本酶比较，该修饰酶具有在 N-末端和 / 或 C-末端的一种或多种肽添加物。此外，本发明涉及编码所说的修饰酶的 DNA 序列、包含所说的 DNA 序列的载体、包含所说的 DNA 序列或所说的载体的宿主细胞、以及产生所说的具有脂解活性的修饰酶的方法。

权 利 要 求 书

1. 一种具有脂解活性的修饰酶，与亲本酶比较，该修饰酶具有 i) 在其 C-末端或 N-末端的肽添加物，或 ii) 在其 C-末端和其 N-末端的肽添加物。
2. 按照权利要求 1 的修饰酶，该修饰酶包含在其 N-末端的肽添加物。
3. 按照权利要求 1 或 2 的修饰酶，其中所说的肽添加物选择来增加亲本酶对其底物的亲和性。
4. 按照权利要求 1-3 之任一的修饰的脂解酶，其中所说的肽添加物选择来使修饰的脂解酶具有稳定性。
5. 按照权利要求 4 的修饰的脂解酶，其中所说的肽添加物是这样一种，其能够形成对亲本酶的成熟部分的共价结合。
6. 按照权利要求 1-5 之任一的修饰的脂解酶，该酶包含在肽添加物中的半胱氨酸残基和在亲本酶的成熟部分中的半胱氨酸残基，方式是所说的半胱氨酸残基共同形成半胱氨酸桥。
7. 按照权利要求 6 的修饰的脂解酶，其中所说的亲本酶的成熟部分中的半胱氨酸残基已被插入或者已取代亲本酶的氨基酸残基。
8. 按照权利要求 1-7 之任一的修饰的脂解酶，其中所说的肽添加物是这样一种，其对用于表达所说的修饰的脂解酶的宿主细胞的蛋白分解酶的蛋白分解降解具有低的敏感性。
9. 按照权利要求 8 的修饰的脂解酶，其中所说的肽添加物包含至少一个脯氨酸残基，如两个或三个脯氨酸残基。
10. 按照权利要求 1-9 之任一的修饰的脂解酶，其中肽添加物包括至少一个，如一，两或三个荷正电的或者疏水氨基酸残基。
11. 按照权利要求 1-10 之任一的修饰酶，其中所说的肽添加物的长度为 1 至 500 个氨基酸，优选的为 1 至 200 个氨基酸，较优选的为 2 至 100 个氨基酸，更优选的为 2 至 50 个氨基酸，最优选的为 1 至 15 个氨基酸，如 1 至 10 个或 4 至 10 个氨基酸。
12. 按照权利要求 1-11 之任一的修饰酶，其中所说的肽添加物是下列肽添加物之一：

Arg (R),或 Lys (K),或 Leu (L),或 Ile (I),或
Val (V),或 Trp (W)或 Phe (F),或
Arg-Pro (RP),或
Lys-Lys (KK),或
Arg-Lys (RK),或
Lys-Arg (KR),或
Arg-Arg (RR),或
Arg-Arg-Pro (RRP),或
Arg-Pro-Val-Ser-Gln-Asp (RPVSQD)
Ser-Pro-Ile-Arg-Met (SPIRM),或
Ser-Pro-Ile-Arg-Ala-Arg (SPIRAR),或
Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg (SPIRPR)或
Ser-Pro-Ile-Arg-Glu-Arg (SPIRER),或
Ser-Pro-Ile-Arg-Lys (SPIRK),或
Ser-Pro-Ile-Lys-Lys (SPIKK),或
Ser-Pro-Ile-Arg-Arg-Pro (SPIRRP),或
Ser-Pro-Pro-Arg-Arg (SPPRR),或
Ser-Pro-Iso-Pro-Arg (SPIPR),或
Ser-Pro-Arg-Pro-Arg (SPRPR),或
Ser-Pro-Ile-Arg (SPIR),或
Ser-Pro-Ile-Arg-Arg (SPIRR),或
Ser-Cys-Ile-Asp-Arg, (SCIRR),或
Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro (SPIRPRP),或
Ser-Cys-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro (SCPIRPRP),或
Ser-Pro-Arg-Arg-Pro-Arg-Thr (SPRRPRT),或
Ser-Pro-Phe-Arg-Pro-Lys-Leu (SPFRPKL),或
Ser-Pro-Pro-Arg-Arg-Pro (SPPRRP),或
Ser-Pro-Ile-Arg-Arg-Glu (SPIRRE),或
Ser-Pro-Pro-Arg-Pro-Pro (SPPRPP),或
Ser-Pro-Pro-Arg-Pro-Arg (SPPRPR),或

Ser-Pro-Pro-Trp-Trp-Pro (SPPWWP),或
 Ser-Pro-Pro-TrpArg-Pro (SPPWRP),或
 Ser-Pro-Pro-Arg-TrpPro (SPPRWP),或
 Ser-Pro-Pro-Arg-TrpPro (SPPRWP),或
 Ser-His-Trp-Arg-Arg-Trp (SHWRRW),或
 Ser-His-TrpArg-Lys (SHWRK),或
 Ser-His-Trp-Arg-Arg (SHWRR),或
 Thr-Ala-Ile-Arg-Pro-Arg-Lys (TAIRPRK),
 ser-Thr-Arg-Arg-Pro-Arg-Pro (STRRPRP),
 Gly-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro (GPIRPRP),
 Leu-Pro-Phe-Arg-Glu-Arg-Pro (LPFRQRP),
 Ser-Arg-Ser-Arg-His-AspAia (SRSRHNA),
 Ile-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Arg (IPIRPRR),
 Ser-Thr-Arg-Arg-Pro-Arg-Pro (STRRPRP),
 Thr-Ala-Ile-Arg-Pro-Arg-Lys (TAIRPRK),
 Trp-Ars-Trp-Arg-Trp-Arg (WRWRWR),
 Glu-Pro-Ile-Arg-Arg (QPIRR),
 Ser-His-TrpGlu-Glu (SHWQQ),
 Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro (RPRPRPRP),或
 Ser-Ser-Thr-Arg-Arg-Ala-Ser-Pro-Ile-Lys-Lys (SSTRRASPIKK),或
 Ala-Trp-Trp-Pro-Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro (AWWPSPIRPRP),或
 Ala-Pro-Pro-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro (APPPRPRPRPRP),
 或
 Ala-Pro-Pro-Pro-Arg-Thr-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Ser (APPPRTRPRPRS),
 或
 Ser-Pro-Lys-Arg-Lys-Pro-Arg-Pro (SPKRKPRP),或
 Ser-Gln-Arg-Ile-Lys-Gln-Arg-Ile-Lys (SQRIKQRTK),或
 Ser-Pro-Pro-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro (SPPPRPRP),或
 Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg (SPIRPRPRPR),或
 Ser-Pro-Ile-Arg-Lys-Ala-Trp-Trp-Pro (SPIRKAWWP),或

Ala-Pro-Pro-Pro-Lys-Ala-Ser-Pro-Arg-Gln-Arg-Pro (APPPKASPRQRP),
或
Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro-Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro-
Arg(SPIRPRPSPIRPRP),或
Ser-Pro-Pro-Arg-Trp-Pro-Arg-Arg (SPPRWPRX),或
Ser-Pro-Pro-Arg-Trp-Pro-Arg-Trp (SPPRWPRW),或
Ser-Pro-Pro-Arg-Trp-Pro-Trp-Arg (SPPRWPWR),或
Ser-Pro-Pro-Trp-Arg-Pro-Arg-Arg (SPPWRPRR),或
Ser-Pro-Pro-Trp-Trp-Pro-Arg-Trp (SPPWWPRW),或
Ser-Pro-Pro-Trp-Trp-Pro-Trp-Arg (SPPWWPWR),或
Ser-Pro-Pro-Trp-Trp-Pro-Trp-Trp (SPPWWPWW),或
Ser-Pro-Pro-Trp-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro (SPPWPRPRP).

13. 按照权利要求 1-12 之任一的修饰酶, 除肽添加物之外, 该修饰酶还包含亲本酶的 N-末端和/或 C-末端非结构部分中的突变, 特别是导致除去至少一个荷负电的氨基酸的残基的突变。

14. 按照权利要求 13 的修饰酶, 其中所说的非结构部分的荷负电的氨基酸的残基已被缺失或者被中性的或荷正电的氨基酸残基取代或者被疏水氨基酸残基取代, 或者其中的一个中性氨基酸残基已被一个荷正电的氨基酸残基取代。

15. 一种按照权利要求 1-14 之任一的包含肽添加物的修饰的脂解酶, 所说的肽添加物经以下方法运用:

a) 在成熟形式的亲本酶的编码肽添加物的 DNA 序列部分或者还在其非结构 N-末端或 C-末端部分, 对编码具有肽添加物的亲本酶的 DNA 序列进行随机诱变,

b) 在合适的宿主细胞中表达所产生的突变 DNA 序列, 以产生修饰的脂解酶, 和

c) 筛选在步骤 b) 中形成的修饰的脂解酶, 与亲本酶比较, 该酶具有改进的性能。

16. 按照权利要求 14 的修饰的脂解酶, 其中进行所说的随机诱变是为了将一个或多个荷正电的或者疏水的氨基酸残基引入到亲本酶的肽添加物或

者还进一步地引入到其非结构部分中。

17. 按照权利要求 1-16 之任一的修饰酶，其中所说的酶是微生物来源的。

18. 按照权利要求 17 的修饰酶，其中所说的酶是细菌、酵母或丝状真菌来源的。

19. 按照权利要求 18 的修饰酶，其中所说的酶来源于 *Humicola* sp., 例如来源于 *H. lanuginosa* 或 *H. insolens*。

20. 按照权利要求 19 的修饰的脂解酶，其来源于 *H. lanuginosa* 菌株 DSM 4109，并且具有在图 1 中显示的氨基酸序列。

21. 按照权利要求 20 的修饰酶，其还包含在亲本酶的 C-末端或 N-末端的非结构部分中的突变，优选地是导致除去荷负电氨基酸残基的突变。

22. 按照权利要求 21 的修饰酶，其中所说的肽添加物已替代在成熟亲本酶中位置 1 上的氨基酸残基，即 E1。

23. 按照权利要求 18 的修饰酶，其中所说的酶来源于 *Pseudomonas* sp., 特别是葱头假单胞菌(*Pseudomonas cepacia*)、或门多萨假单胞菌(*Pseudomonas mendocina*)、或产碱假单胞菌(*Pseudomonas alcaligenes*)、或类产碱假单胞菌(*Pseudomonas pseudoalcaligenes*)、或植物假单胞菌(*Pseudomonas plantarii*)、或唐菖蒲假单胞菌(*Pseudomonas gladioli*)、或恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)、或铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、或 *Pseudomonas Glumae*。

24. 按照权利要求 1-23 之任一的修饰酶，其中所说的亲本酶是成熟形式的。

25. 按照权利要求 1-24 之任一的修饰酶，其中所说的亲本酶是天然产生的酶或其变体。

26. 按照权利要求 1-25 之任一的修饰酶，其中所说的肽添加物不同于亲本酶的天然前、原或前原序列。

27. 一种 DNA 序列，在编码肽添加物的 DNA 序列的部分不同于通常与亲本酶的原形式或前原形式相联系的和编码它们的 DNA 序列的情况下，该 DNA 序列编码按照权利要求 1-26 的显示出脂解活性的修饰酶。

28. 一种重组载体或者转化载体，其包含权利要求 27 的 DNA 序列。

29. 按照权利要求 27 和 28 的载体, 其是一种还包含允许所述酶表达的 DNA 序列的表达载体。

30. 一种宿主细胞, 该细胞包含按照权利要求 27 的 DNA 序列或按照权利要求 28 或 29 的载体。

31. 按照权利要求 30 的宿主细胞, 其是微生物细胞, 如丝状真菌、酵母或细菌细胞。

32. 按照权利要求 31 的宿主细胞, 其是 *Aspergillus* sp. 的菌株, 如黑曲霉(*Aspergillus niger*), 米曲霉(*Aspergillus oryzae*)和日本曲霉(*Aspergillus japonicus*), 或 *Fusarium* sp. 的菌株, 如尖镰孢(*Fusarium oxysporum*)或禾谷镰孢(*Fusarium graminearum*)的菌株。

33. 按照权利要求 31 的宿主细胞, 其是革兰氏-阳性细菌菌株的细胞或革兰氏-阴性细菌菌株的细胞, 所述革兰氏-阳性细菌如芽孢杆菌属(如, 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、迟缓芽孢杆菌(*Bacillus lentus*)、短芽孢杆菌(*Bacillus brevis*)、嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)、嗜碱芽孢杆菌(*Bacillus alkalophilus*)、液解化淀粉杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)、凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)、环状芽孢杆菌(*Bacillus circulans*)、灿烂芽孢杆菌(*Bacillus lautus*)、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*))或链霉菌属, 所述革兰氏-阴性细菌如大肠杆菌(*E. coli*)或假单胞菌属。

34. 按照权利要求 30-33 之任一的宿主细胞, 其已被修饰以便与未经修饰的宿主细胞相比具有一种或多种蛋白分解酶的降低的产量, 例如已被修饰得在一种或多种蛋白分解酶上有缺陷的宿主细胞。

35. 一种制备按照权利要求 1-25 之任一的修饰酶的方法, 该方法包括:

a) 在有利于所说修饰酶产生的条件下培养按照权利要求 30-34 之任一的宿主细胞, 和

b) 回收所产生的酶, 或者进一步地纯化该酶。

36. 按照方法权利要求 35, 其中选择所说的宿主细胞、培养条件和/或回收条件, 以使所产生的修饰酶的至少 5% 包含由肽添加物编码的肽添加物。

37. 一种改进亲本脂解酶性质(如增加对脂类底物的亲和性)的方法, 该

方法包括将肽添加物运用于成熟形式的亲本酶的 N-末端或 C-末端。

38. 按照权利要求 37 的方法，其中所说的改进的性质是改进的洗涤性能。

39. 按照权利要求 37 或 38 的方法，其中所说的肽添加物通过以下方法运用于亲本酶上：培养包含编码亲本脂解酶前、原或前原形式的 DNA 序列(所说的 DNA 序列可以也可以不存在于载体上)的宿主细胞，并回收所产生的修饰的脂解酶，选择宿主细胞、培养条件和/或回收条件，以便出现大部分具有前、原或前原形式的亲本酶，导致所产生的修饰的酶分子至少 5% 包含所需的肽添加物，例如完整的原序列或其实质性部分。

40. 按照权利要求 37 或 38 的方法，其中所说的肽添加物通过以下方法运用于亲本酶上：培养包含按照权利要求 27 的 DNA 序列或按照权利要求 28 或 29 的载体的宿主细胞，并回收所形成的修饰的脂解酶，以便所产生的修饰酶的至少 5% 包含由肽添加物编码的肽添加物。

41. 按照权利要求 40 的方法，其中所说的宿主细胞不同于亲本酶所来源的细胞，例如亲本酶所来源的细胞以外的另一个属，或者不同于亲本酶来源的另一中翻译后加工机制。

42. 按照权利要求 41 的方法，其中所说的亲本脂解酶来源于丝状真菌或细菌，所说的宿主细胞是酵母细胞。

43. 按照权利要求 42 的方法，其中所说的亲本脂解酶来源于 *Humicola* sp. 的菌株(如 *H. lanuginosa*)或来源于 *Pseudomonas* sp. 的菌株。

44. 按照权利要求 39-43 之任一的方法，其中所说的宿主细胞是酵母细胞，如 *Saccharomyces* sp. 的菌株，特别是啤酒糖酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)或 *Hansenula* sp. 的菌株。

45. 按照权利要求 39-44 之任一的方法，其中用来将肽添加物运用于亲本脂解酶上的宿主细胞的固有蛋白分解酶产生能力已被降低，例如宿主细胞停止产生一种或多种蛋白分解酶。

46. 按照权利要求 37 的方法，该方法包括：

a) 在亲本酶的编码肽添加物的 DNA 序列部分或者其 N-末端或 C-末端非结构部分，对编码具有肽添加物的亲本脂解酶的 DNA 序列(例如按照权利要求 1-26 之任一的 DNA 序列)进行局部随机诱变。

b) 在宿主细胞中表达步骤 a) 中所产生的突变 DNA 序列, 和

c) 筛选表达突变的脂解酶的宿主细胞, 与亲本脂解酶比较, 所述脂解酶具有改进的性能。

47. 按照权利要求 46 的方法, 其中所说的 DNA 序列是编码原或前原形式的亲本酶的基因或 cDNA 序列。

48. 按照权利要求 37-47 之任一的方法, 该方法还包括在成熟形式的亲本酶的 C-末端或 N-末端的非结构部分引入突变。

49. 按照权利要求 48 的方法, 其中所说的突变包括缺失非结构部分荷负的氨基酸残基或者用中性或荷正电的氨基酸残基取代这些残基或者用疏水氨基酸残基取代这些残基, 或者用荷正电的氨基酸残基取代中性氨基酸残基。

50. 一种酶组合物, 该组合物包含按照权利要求 1-26 之任一的具有脂解活性的修饰酶。

51. 按照权利要求 50 的组合物, 该组合物还包含至少一种选自下组的酶: 淀粉酶、纤维素酶、过氧化物酶、角质酶、淀粉酶和/或脂肪酶。

52. 一种去垢组合物, 该组合物包含按照权利要求 50 或 51 的酶组合物。

53. 按照权利要求 52 的组合物, 每克去垢组合物中含有 0.02 至 200 毫克修饰的脂解酶蛋白质。

54. 按照权利要求 50 和 52 之任一的组合物, 其中多于 5%, 优选地多于 10%, 例如 25%, 较好地是 50 %, 尤其是 75 % 的在组合物中的修饰的脂解酶具有全长肽添加物。

55. 按照权利要求 50-54 之任一的酶组合物在去垢剂(如洗涤粉剂或餐具洗涤组合物)中的用途。

说明书

一种具有脂解活性的修饰酶

发明所属技术领域

本发明涉及一种具有脂解活性的修饰酶、编码所说的修饰酶的 DNA 序列、包含所说的 DNA 序列的载体、包含所说的 DNA 序列或所说的载体的宿主细胞、以及产生所说的具有脂解活性的修饰酶的方法。

此外, 本发明涉及将肽添加物运用于具有脂解活性的亲本酶的方法、包含本发明的具有脂解活性的修饰酶的组合、本发明的修饰酶在去垢组合中的有利的用途、以及用于改进去垢组合物的洗涤性能的方法。

发明背景

在世界范围内, 去垢酶已推向市场 20 多年, 作为粉剂和液态去垢剂的正常去垢组分已很完善。

去垢组合物可以包括许多不同的酶, 其中蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶、脂酶和角质酶是现在最重要的。

脂解酶

脂解酶即按照国际生物化学和分子生物学联合会(IUBMB)的推荐(1992)分类在酶分类号 E.C 3.1.1 下的酶(羧酸酯水解酶), 其是可以从布料和其它纺织品除去脂类或脂肪污垢的一类酶。

各种微生物脂酶曾被建议用作去垢酶。这样的脂酶的例子包括 *Hwnicola lanuginosa* 脂酶(例如在 EP 258 068 和 EP 305 216 中所描述的)、*Rhizomucor miehei* 脂酶(如 EP 238 023 中所描述的)、*Absidia* sp.脂解酶(WO 96/13578)、*Candida* 脂酶(例如 *Candida antarctica* 脂酶, 如在 EP 214 761 中描述的 *Candida antarctica* 脂酶 A 或 B)、假单胞菌属脂酶(如产碱假单胞菌和类产碱假单胞菌脂酶(如 EP 218 272 中描述的)、葱头假单胞菌脂酶(如 EP 331 376 中描述的)、*Pseudomonas* sp.脂酶(如在 WO 95/14783 中描述的)、芽孢杆菌属脂酶(如枯草芽孢杆菌脂酶(Dartois 等, (1993) 生物化

学和生物物理学报, 1131, 253-260)、嗜热脂肪芽孢杆菌脂酶(JP 64/744992)和短小芽孢杆菌脂酶(WO 91/16422)。

此外, 已经描述了大量的克隆脂酶, 包括 Yamaguchi 等, (1991), 基因 103, 61-67)描述的 *Penicillium camembertii* 脂酶, *Geotrichum candidum* 脂酶 (Schimada, Y.等, (1989), 生物化学杂志, 106, 383-388), 和各种根霉属脂酶, 例如 *Rhizopus delemar* 脂酶(Hass, M.J 等, (1991), 基因 109, 117-113), 雪白根霉脂酶(Kugimiya 等, (1992), 生物科学生物技术生物化学, 56, 716-719)和米根霉脂酶。

已被建议作为去垢酶的其它类型脂解酶包括角质酶, 例如在 WO 88/09367 中描述的来源于门多萨假单胞菌的角质酶, 或来源于腐皮镰孢 *pisi* 的角质酶(例如在 WO 90 09446 中描述的)。

最近已尝试了制备修饰的脂解酶, 例如具有就去垢目的而言的改进的性能的变体和突变体。

在大多数情况下, 具有改进的洗涤性能的脂解酶已通过定点诱变(导致基于其类型或其在成熟酶第二或第三结构中选择特定氨基酸残基的取代)构建。

修饰蛋白质和酶的可替的一般方法基于随机诱变, 例如在 US 4,894,331, WO 93/01285, 和 WO 95/22615 中所公开的。

对现有技术的评价

从现有技术经定点诱变修饰脂解酶以获得改进的性能, 特别是脂解酶的洗涤性能。一般使用的概念是插入、缺失或取代在所研究的亲本脂解酶的氨基酸链的结构部分中的氨基酸。采用这种方式已获得了具有良好的改进的洗涤性能的脂解酶。

然而, 需要提供与由这些现有技术的方法制备的脂解酶相比, 具有进一步改进的性能(例如洗涤性能和/或进一步改进的餐具洗涤性能)的脂解酶。

发明概述

这样, 本发明的目的是改进具有脂解活性的酶的性质, 特别这种酶的洗涤性能。

已令人惊奇地发现, 通过将肽添加物用于脂解酶的 N-和/或 C-末端来明

显提高所述酶的洗涤性能是可能的。

因而，本发明的第一方面涉及一种具有脂解活性的修饰酶，与亲本酶比较，该修饰酶具有在其 C-末端和/或 N-末端的一种或多种肽添加物。

在本文中，术语“肽添加物”用来指一种或多种连续氨基酸残基骨架，其已添加到亲本酶的 N-末端和 C-末端之一或两者上，或者插入到亲本酶的 N-末端和/或 C-末端的非结构部分之内。

术语“非结构部分”用来分别指 N-末端和 C-末端部分，其分别在折叠的成熟酶的第一个或最后一个结构单元(如 α -螺旋或 β -片状结构)的外部，在所研究的酶的三维结构或模型中可以容易地鉴别所说的非结构部分。典型地，非结构部分包括构成酶的氨基酸序列的首先的或最后的大约 1-20 个氨基酸残基。

术语“成熟酶”以其通常的含义使用，指在由所讨论的产生生物体表达和翻译后加工(除去原和/或-前序列)后形成的酶的活性形式。当酶是分泌酶时，所说的成熟酶通常是分泌后形成的酶的形式。更具体地说，这意味着前和原肽序列(如果存在的话)已从起始的翻译的酶(即未加工的酶)除去。

术语“亲本”酶用来指按照本发明待修饰的酶。亲本酶可以是天然产生的(或野生型)酶或者可以由任何合适的方法制备的变体。例如，亲本酶可以是天然产生的酶的变体，所述的天然产生的酶由取代、缺失或截短一个或多个氨基酸残基修饰或者由插入一个或多个氨基酸残基到天然产生的酶的氨基酸序列(典型地是在酶的结构部分中)修饰。

在其它方面，本发明涉及编码以上限定的修饰的脂解酶的 DNA 序列、包含本发明的 DNA 序列的重组载体或转化载体、携带本发明的 DNA 序列或本发明的载体的宿主细胞以及通过培养所说的宿主细胞制备修饰的脂解酶的方法。

本发明的修饰的脂解酶可以方便地用作去垢酶，因此，在本发明的最后一个方面，本发明涉及包含本发明的修饰的脂解酶的去垢添加剂或去垢组合物。

附图简要描述

图 1 显示存在于酵母表达载体 pTS037 中的 *Hwnicola lanuginosa* 脂酶基

因编码区的核苷酸和氨基酸的序列。信号序列(第 1 至 17 位氨基酸)来源于 *Hwnicola lanuginosa* 的原信号序列。SPIRR 肽添加物位于第 18 至 22 位氨基酸残基。第 23 位氨基酸残基(E)是在米曲霉中表达的亲本脂酶的第一氨基酸残基。

图 2 显示存在于大肠杆菌表达载体 pJSO215 中的 *Hwnicola lanuginosa* 脂酶基因编码区的核苷酸和氨基酸的序列。信号序列(第 1 至 20 位氨基酸)是 *A. lyticus* 蛋白酶 I 信号(WO 96/17943)。SPIRR 肽在第 20 位氨基酸残基之后添加。第 26 位氨基酸残基(E)是在米曲霉中表达的亲本脂酶的第一氨基酸残基。

图 2 显示存在于大肠杆菌表达载体 pSX581 中的 *Hwnicola lanuginosa* 脂酶基因编码区的核苷酸和氨基酸的序列。信号序列(第 1 至 20 位氨基酸)是 *A. lyticus* 蛋白酶 I 信号(WO 96/17943)。第 21 位氨基酸残基(E)是亲本脂酶的第一氨基酸残基。

图 4 显示 pSX164 的构建;

图 5 显示 pSX578 的构建;

图 6 显示 pSX581 的构建;

图 7 显示质粒 pSX581;

图 8 显示质粒 pJSO37;

图 9 显示曲霉属载体 pCaHj485 的构建

发明详述

肽添加物

如上所述,已经令人惊奇地发现,当合适的肽添加物在成熟酶的 C 末端和/或 N 末端用于所述酶的非结构部分时,可以获得脂解酶洗涤性能的明显改善。

术语“改进的洗涤性能”用来指本发明的修饰的酶在类似洗涤的条件下试验时比未修饰的亲本酶具有更好的除去脂质固体的能力。改进常常在试验“改进因子”(f_{改进})中提及(进一步参考以下的材料和方法部分)。根据肽添加物,已获得了在 1-5,甚至高达 10 的范围内(例如 1-10 的范围内)的改进因子(f_{改进})。现在相信,按照本发明,可以获得更高的改进因子,例如高达

20, 甚至高达 30 或高达 50(例如在 30 和 50 之间)或者更高。

术语“合适的肽添加物”用来指所用的肽添加物是这样的肽添加物, 其能够影响改进的洗涤性能。肽添加物的“适合性”可以通过分别比较分析使用了肽添加物的修饰的酶与相应的亲本酶的洗涤性能来检查。所述的洗涤性能可以通过例如任何合适的技术(在本申请中所描述的任何洗涤性能测定法)来测定。

可以预期通过肽添加物影响的改进的洗涤性能是(至少部分是)由于修饰的脂解酶的对其脂类底物增加的亲和性(虽然这可能不是唯一原因)。

本发明不限于改进亲本脂解酶的洗涤性能。本发明也包括按照本发明可以改进亲本脂解酶的其他性质, 其是通过将合适的肽添加物用于所述酶的 C 末端和/或 N 末端的非结构部分上或其内部完成的。更具体地说, 通过将合适的肽添加物(即能够发挥所需功能的肽添加物)用于所述酶的 C 末端和/或 N 末端的非结构部分上或其内部可以明显改善亲本脂解酶的活性(例如在造纸和纸浆工业中除去树脂、在皮革工业中除去油腻物、在有机合成中用作催化剂等)。与此相关, 相信改进的性能至少部分是由于对所研究的底物的亲和性。

作为改进的活性的结果, 与未修饰的亲本酶所需的剂量比较, 极大地降低给定目的所需的酶的剂量是可能的。

在本发明中, 术语“修饰酶”用来指亲本酶的衍生物或变体, 该衍生物和变体与亲本酶比较包含在亲本酶 C 末端和/或 N 末端的肽添加物(融合进亲本酶的第一个和/或最后一个氨基酸残基)和/或亲本酶 C 末端和/或 N 末端非结构部分内的肽添加物。这样, 例如所述修饰的酶可以包含在亲本脂解酶 N 末端或 C 末端之一或者 N 末端或 C 末端两者上的肽添加物。

目前相信: 肽添加物提供所需作用(例如改进的洗涤性能, 除去油腻上改进的性能等)的能力取决于, 例如, 被修饰的亲本酶的一致性、肽添加物的结构(包括长度)、肽添加物对整个脂解酶结构的冲击力、肽添加物的氨基酸残基的性质或官能度等。肽添加物能够提供所需作用的先决条件当然是包含肽添加物的修饰酶在适合的宿主有机体中是可表达的。下列通常的考虑事项对设计适合的肽添加物是合适的:

肽添加物的长度: 已经发现: 包含不同数目的氨基酸残基的肽添加物能

够提供所需作用，这样，就不可能确定按照本发明使用的肽添加物中存在的氨基酸残基的确切数目。本发明涉及确定氨基酸残基数量的上限，还特别确定肽添加物对产生的修饰酶表达、结构和/或活性的冲击力。相信肽添加物可以包含实质数量的氨基酸残基，然而，表示所有这些氨基酸残基对于所需作用是需要(即使肽添加物包含实质数量的氨基酸残基，仅一小部分氨基酸残基对于提供所需的功能是需要的，这小数量可以称为肽添加物的功能部分)。关于肽添加物的氨基酸残基的数量的更低限制的主要考虑因素通常是数量应该足以提供所需作用。

肽添加物可以包含单个氨基酸残基或氨基酸链，该氨基酸链包含从 2 至 500 个氨基酸(如从 1 至 200，或从 2 至 100)，优选地从 2 至 50(如 3 至 50)，更优选地从 7 至 45，更优选地是 1 至 15(如 1 至 10 或 1 至 7)，尤其是 4 至 10(如 4 至 7 个氨基酸)。

稳定性：应该优选地选择肽添加物以便提供具有可接受的稳定性(例如，结构稳定性和/或表达稳定性)的修饰的脂解酶，或者以便不明显降低亲本酶的结构稳定性。尽管许多肽添加物不被认为对所形成的修饰酶赋予任何实质上的结构不稳定性，但在某些例子中和某些亲本酶时，其与选择自身可以对修饰的脂解酶赋予结构稳定性的肽添加物有关。例如，其自身形成结构单元(如 α -螺旋或 β -折叠)的肽添加物可以稳定形成的修饰酶，这样用于本发明中。能够形成这样的结构的肽序列在本领域中是已知的。另外，可以通过在本发明的修饰的脂解酶中引入半胱氨酸桥提供提高的结构稳定性。例如，如果肽添加物的至少一个氨基酸残基半胱氨酸残基(被定位以能够与酶成熟部分的半胱氨酸残基共价组合)，可以建立在肽添加物与酶的成熟部分之间的半胱氨酸桥。在实施例 19 中说明了引入半胱氨酸桥的正向作用。如果在成熟酶中不存在适合的半胱氨酸，可以方便地通过取代亲本酶的氨基酸(该氨基酸被认为对活性不重要)把半胱氨酸插入到所说的亲本酶的合适位点。

此外，合乎需要的是，选择至少一个肽添加物的氨基酸残基以使肽添加物对用于表达修饰的脂解酶的宿主细胞的解蛋白酶的解蛋白降解敏感性降低。例如，肽添加物可以包含至少一个，优选地至少两个脯氨酸残基。优选地，肽添加物包含 1-5，如 1-4 或 1-3 个或两个或一个脯氨酸残基。脯

氨基酸残基位于解蛋白的裂解位点或其相邻位点。另外，肽添加物可以是对修饰脂酶提供蛋白酶稳定环(如在 EP 407 225 或 WO 93/11254 中所描述的)的肽添加物。

肽添加物的氨基酸残基的性质：如上所述并不限于任何理论，目前相信：改进的性能至少部分是因为通过肽添加物提供的修饰的脂解酶对底物增加的亲和性。特别是有关洗涤性能，人们相信：可以在带负电脂表面和带正电的和/或在修饰酶中存在疏水氨基酸残基之间获得有用的静电相互作用。因此，特别优选的是，本发明的修饰酶包含这样的肽添加物，该肽添加物具有至少一个正电荷，如至少 2、3、4 或更多个正电荷，或不同表达，其中实质量的肽添加物的氨基酸残基是带正电和/或疏水的。

相似地，为了在亲本酶的非结构末端减少负电荷，优选地是从选择的亲本酶的非结构的 N-末端或 C-末端部分除去至少一个(如两个或更多)带负电的氨基酸残基，具体地说是从构建的亲本脂酶的部分除去 1-5 个最前或最后 N-末端或 C-末端的氨基酸残基(如 1-4 或 1-3 或 1-2)。带负电的氨基酸残基也可以被中性的、带正电的或疏水氨基酸残基除去或取代。例如，除去的带负电的氨基酸残基可以是 E 或 D，它们可以被带正电的氨基酸残基 R、K 或 H、中性的氨基酸残基 S、T、G 或 Q 或疏水的氨基酸残基 A、I、W 或 L 取代。同样地，可以取代亲本酶的非结构的 N-末端或 C-末端部分的中性氨基酸残基。

因此，本发明的修饰的脂解酶除了 N-末端和/或 C-末端延伸或替换它们外，还可以在亲本酶的非结构 C-末端和/或 N-末端包含突变，该突变具有缺失或用带正电或中性的氨基酸残基或疏水氨基酸残基取代所说的非结构部分的带负电的氨基酸残基。

如果肽添加物存在于亲本酶的 N-和 C-末端，在每个末端或其之内的肽添加物可以具有相同的或不同的氨基酸序列。

肽添加物的适宜性试验：使用给定的肽添加物(例如，在上述原理基础上设计的)的作用可以通过构建包含肽添加物的修饰的脂解酶和试验形成的酶在实际中或者在与所研究的酶用途十分相关的测定中的所需的酶用途(例如洗涤、树脂去除、皮革脱脂等)的性质来试验。

肽添加物可以以下列方式概述。

第一残基(从外部残基计数)命名为“a”,第二命名为“b”,第三命名为“c”等。这样,在 N-末端添加的情况下,第一个氨基酸残基命名为“a”,在 C-末端添加的情况下,最后一个氨基酸残基命名为“a”。

在本发明的重要实施方案中,肽添加物由 1 至 7 个氨基酸组成。这样的肽添加物(可以运用于亲本酶的 N-和/或 C-末端)可以作为:

a(一个氨基酸肽添加物)

a-b(两个氨基酸肽添加物)

a-b-c(三个氨基酸肽添加物)

a-b-c-d(四个氨基酸肽添加物)

a-b-c-d-e(五个氨基酸肽添加物)

a-b-c-d-e-f(六个氨基酸肽添加物)

a-b-c-d-e-f-g(七个氨基酸肽添加物)

每个字母定义为一个氨基酸残基。

a、b、c、d、e 和 g 可以独立地是任何氨基酸,这些氨基酸包括丙氨酸(A)、缬氨酸(V)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、脯氨酸(P)、苯丙氨酸(F)、色氨酸(W)、甲硫氨酸(M)、甘氨酸(G)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、半胱氨酸(C)、酪氨酸(Y)、天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、天冬氨酸(D)、谷氨酸(E)、赖氨酸(K)、精氨酸(R)和组氨酸(H)。

在特定的实施方案中,a、b、c、d、e、f 和 g 独立地是下列氨基酸之一:

a: Leu, Ile, Val, Trp, Phe, Ser, Arg, Cys 或 Lys,

b: Leu, ne, Val, Trp, Phe Ser, Pro, Arg, Lys, Cys 或 His,

c: Leu, Iie, Val, Trp, Phe, Ser, Pro, Arg, Cys 或 Lys.

d: Leu, Ile, Val, Trp, Phe Ser, Pro, Arg, Cys 或 Lys.

e: Leu, Ile, Val, Trp, Phe, Pro, Arg, Lys, Ala, Glu, Cys 或 Asp,

f: Leu, Ile, Val, Trp, Phe, Pro, Arg, Lys, Ala, Glu, Cys 或 Asp,

g: Leu, Ile, Val, Trp, Phe, Pro, Arg, Lys, Cys 或 Met .

在优选的实施方案中,至少一个(如一个、两个、三个或四个 a、b、c、d、e、f 或 g 是带正电的氨基酸(即 Arg(R)或 Lys(K))或疏水氨基酸(即 Leu、Ile、Val、Trp 或 Phe .

如上所述，依赖于选择的宿主细胞，通常相信重要的是：肽添加物包含至少一个脯氨酸残基。为了在通过选择的宿主细胞加工酶期间保护修饰的脂解酶抗解蛋白降解。合乎需要的是：脯氨酸残基占据肽添加物的位置二(即 b)和/或三(即 c)或临近所述的裂解点的位置(即通过所述的宿主细胞加工发生的位置)。因此，在一个实施方案中，肽添加物的 b 和或者还有 c 是脯氨酸。

在本发明的另一个实施方案中，a-b 是 S-P(Ser-Pro)、A-P 或 Q-P。如果肽添加物包含更多的氨基酸残基(如 4 至 7 个氨基酸)，肽添加物具有通式 SPcd、SPcde、SPcdef、SPcdefg 或 APcd、APcde、APcdef、APcdefg 或 QPcd、QPcde、QPcdef、QPcdefg。在每个这样的通式中，c、d、e、f 和 g 可以是任何氨基酸。然而，优选的是以上提及的氨基酸的组。

在另一个实施方案中，a-b 包含至少一个带正电的氨基酸(即 Arg 和 Lys)或疏水氨基酸残基(即 Leu、Ile、Val、Trp 和 Phe)。

具体地说，运用于亲本脂解酶的肽添加物可以优选地是下列的氨基酸残基或肽之一：

Arg (R)或 Lys (K)或 Leu (L)或 Ile(I)或

Val (V)或 Trp (W)或 Phe (F)或

Arg-Pro (RP)或

Lys-Lys (KK)或

Arg-Lys (RK)或

Lys-Arg (KR)或

Arg-Arg (RR)或

Arg-Arg-Pro (RRP)或

Arg-Pro-Val-Ser-Gln-Asp (RPVSQD)

Ser-Pro-Ile-Arg-Met (SPIRM)或

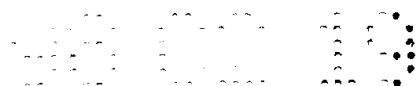
Ser-Pro-Ile-Arg-Ala-Arg (SPIRAR)或

Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg (SPZRPR)或

Ser-Pro-Ile-Arg-Glu-Arg (SPIRER)或

Ser-Pro-Ile-Arg-Lys (SPIRK)或

Ser-Pro-Ile-Lys-Lys (SPIKK)或
 Ser-Pro-Ile-Arg-Arg-Pro (SPIRRP)或
 Ser-Pro-Pro-Arg-Arg (SPPRR)或
 Ser-Pro-Iso-Pro-Arg (SPIPR)或
 Ser-Pro-Arg-Pro-Arg (SPRPR)或
 Ser-Pro-Ile-Arg(SPIR)或
 Ser-Pro-Ile-Arg-Arg (SPIRR)或
 Ser-Cys-Ile-Arg-Arg (SCIRR)或
 Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro (SPIRPRP)或
 Ser-Cys-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro (SCPIRPRP)或
 Ser-Pro-Arg-Arg-Pro-Arg-Thr (SPRRPRT)或
 Ser-Pro-Phe-Arg-Pro-Lys-Leu (SPFRPKL)或
 Ser-Pro-Pro-Arg-Arg-Pro (SPPRRP)或
 Ser-Pro-Ile-Arg-Arg-Glu (SPIRRE)或
 Ser-Pro-Pro-Arg-Pro-Pro (SPPRPP)或
 Ser-Pro-Pro-Arg-Pro-Arg (SPPRPR)或
 Ser-Pro-Pro-Trp-TrpPro (SPPWWP)或
 Ser-Pro-Pro-Trp-Arg-Pro (SPPWRP)或
 Ser-Pro-Pro-Arg-Trp-Pro (SPPRWP)或
 Ser-Pro-Prol-Arg-Trp-Pro (SPPRWP)或
 Ser-His-Trp-Arg-Arg-Trp (SHWRRW)或
 Ser-His-Trp-Arg-Lys (SHWRK)或
 Ser-His-Trp-Arg-Arg (SHWRR)或
 Thr-Ala-Ile-Arg-Pro-Arg-Lys (TAIRPRK),
 Ser-Thr-Ars-Arg-Pro-Arg-Pro (STRRPRP),
 Gly-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro (GPIRPRP)或
 Leu-Pro-Phe-Arg-Glu-Arg-Pro (LPFRQRP)或
 Ser-Arg-Ser-Arg-His-Asp-Ala (SRSRHNA)或
 Ile-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Arg(IRPRR)或
 Ser-Thr-Arg-Arg-Pro-Arg-Pro (STRRPRP)或



Thr-Ala-Ile-Arg-Pro-Arg-Lys (TAIRPRK)或

Trp-Arg-Trp-Arg-Trp-Arg (WRWRWR)或

Glu-Pro-Ile-Arg-Arg (QPIRR)或

Ser-His-Trp-Glu-Glu (SHWQQ)或

Ser-Ala-Leu-Arg-Pro-Arg-Lys (SALRPRK).

按照本发明也涉及的是包含超过 7 个氨基酸(如 8 至 15 个氨基酸)的添加物。

这样的肽可以概括为:

a-b-c-d-e-f-g-h (8 氨基酸肽)

a-b-c-d-e-f-g-h-i (9 氨基酸肽)

a-b-c-d-e-f-g-h-i-j (10 氨基酸肽)

a-b-c-d-e-f-g-h-i-j-k (11 氨基酸肽)

a-b-c-d-e-f-g-h-i-j-k-l (12 氨基酸肽)

a-b-c-d-e-f-g-h-i-j-k-l-m (13 氨基酸肽)

a-b-c-d-e-f-g-h-i-j-k-l-m-n (14 氨基酸肽)

a-b-c-d-e-f-g-h-i-j-k-l-m-n-o (15 氨基酸肽).

a 至 o 可以是如上所述的二十种氨基酸任一种。

关于包含 1 至 7 个氨基酸残基的肽添加物, a-g 链可以是如上限定的。

以上提及的 h、i、j、k、l、m、n、o 可以是任何氨基酸, 优选地是任何下列氨基酸: Arg、Lys、Ala、Val、Trp、Ile、Phe、Ser 或 Pro。

这样的添加的特定例子列出如下:

Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro (RPRPRPRP)或

Ser-Ser-Thr-Arg-Arg-Ala-Ser-Pro-Ile-Lys(SSTRRASPIKK)或

Ala-Trp-Trp-Pro-Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro (AWWPSPIRPRP)或

**Ala-Pro-Pro-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro (APPPRPRPRPRP)
或**

**Ala-Pro-Pro-Pro-Arg-Thr-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Ser (APPPRTRPRPRS)
或**

Ser-Pro-Lys-Arg-Lys-Pro-Arg-Pro (SPKRKPRP)或

Ser-Gln-Arg-Lle-Lys-Gln-Arg-Ile-Lys (SQRIXQRIK)或
 Ser-Pro-Pro-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro (SPPPRPRP)或
 Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg (SPIRPRPRPR)或
 Ser-Pro-Ile-Arg-Lys-Ala-Trp-Trp-Pro SPIRKAWWP 或
 Ala-Pro-Pro-Pro-Lys-Ala-Ser-Pro-Arg-Gln-Arg-Pro(APPPKASPRQRP)
 或
 Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro-Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg
 (SPIRPRPSPIRPRP)或
 Ser-Pro-Pro-Arg-Trp-Pro-Arg-Arg (SPPRWPRR)或
 Ser-Pro-Pro-Arg-Trp-Pro-Arg-Trp (SPPRWPRW)或
 Ser-Pro-Pro-Arg-Trp-Pro-Trp-Arg (SPPRWPW)或
 Ser-Pro-Pro-Trp-Arg-Pro-Arg-Arg (SPPWRPRR)或
 Ser-Pro-Pro-Trp-Trp-Pro-Arg-Trp (SPPWWPRW 或
 Ser-Pro-Pro-Trp-Trp-Pro-Trp-Arg (SPPWWPW)或
 Ser-Pro-Pro-Trp-Trp-Pro-Trp-Trp (SPPWWPW)或
 Ser-Pro-Pro-Trp-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro (SPPWPRPRP)或
 Ala-Pro-Pro-Pro-Arg-Pro-Arg-Leu-Leu-Pro (APPPRPRLLPIS)或
 Ala-Pro-Pro-Pro-Thr-Arg-Gln-Arg-Gln-Ser-Pro(APPPTRQRQSP)或
 Ala-Pro-Pro-Pro-Arg-Thr-Ile-Pro-Arg-Ser-Ser-Pro(APPPRTIPRSSP)。

在任一上述特定的肽添加物中(不论是否包含 1 至 7 或 1 至 15 个氨基酸残基)(其中位置“a”是 Ser、Ala、Arg、Lys 或 Pro), Ser 可以用 Ala、Arg、Lys 或 Pro 取代, Ala 可以用 Ser、Arg、Lys 或 Pro 取代, Arg、Lys、或 Pro 可以用 Ala 或 Ser 取代。

重点是: 上述的肽添加物可以在 N-末端和/或 C-末端。具有 N-和 C-末端肽添加物的修饰的脂解酶的例子包括上述特定地提到的肽添加物的组合。这样的例子是 N-末端添加物 SPIRPRP 与 C-末端添加物 RRP 或 RR。

如果把肽添加物插入亲本酶的非结构部分, 它可以取代所说的非结构部分的一个或多个氨基酸残基。例如, 肽添加物可以取代一个或多个占据 N-末端前面(如 1-5)的氨基酸残基和/或酶的最后(如 1-5)的氨基酸残基(即 C-末端的 1-5 个氨基酸残基)的氨基酸残基。例如, 肽添加物可以从亲本酶的

任一端取代氨基酸残基 1 和/或 2 和/或 3 和/或 4 和/或 5 等。

当亲本酶是 *H. lanuginosa* 脂酶时, 把上述肽添加物(运用于 N-末端)与亲本第一(1E)氨基酸的缺失组合具有特别的益处。

按照本发明, 本发明也涉及将一个或多个使得修饰酶可以有效纯化的氨基酸应用于修饰酶。进行这种应用的技术是分子生物学领域技术人员熟知的,

把肽添加物运用到亲本脂解酶的方法

尽管本发明的修饰酶可以通过把合成产生的肽添加物添加(融合或插入)到所说的亲本脂解酶中, 但目前优选的是: 本发明的修饰酶通过以下方法制备: i) 修饰编码亲本酶的核苷酸(优选地是 DNA)序列, 以编码运用到亲本酶 N-和/或 C-末端的所需的肽添加物(如通过把编码肽添加物的核酸(优选地是 DNA)序列插入到编码亲本酶的核酸(优选地是 DNA)中的有关位置), ii) 在适合的表达系统中表达形成的修饰核酸(优选地是 DNA)序列, iii) 回收形成的修饰酶。

在本发明的上下文中, 术语“运用到”是指把添加物融合到成熟酶的 N-和/或 C-末端(如融合到最前或最后的氨基酸残基上)或插入到成熟酶的非结构部分中的 N-末端和/或 C-末端上。

许多酶作为“前原(prepro)酶”表达, 即作为由成熟酶、分泌信号肽(即前(pre)肽)和原(pro)肽组成的酶表达。前原酶在胞内加工以分泌进发酵培养基, 从其中可以分离和/或纯化成熟酶。添加至亲本酶的肽可以通过把编码所需的肽添加物上游(N-末端肽添加物)和/或下游(C-末端肽添加物)的核酸序列运用于编码亲本酶的 DNA 序列进行。

插入应该以这样的方法进行, 通过宿主细胞在酶的转录、翻译、加工后表达并分泌所需的修饰酶(即所需的肽添加物)。术语“加工”在上下文中是指除去前与原肽(当然, 除了当原肽与所需的肽添加物相同之外。这一点将在下面进一步说明)。

可以把下游序列(编码 C-末端添加物)插入到编码亲本酶和终止密码子的 DNA 序列之间。然而, 如果未加工的 DNA 序列在 C-末端包含编码原肽的 DNA 序列, 编码肽添加物的 DNA 序列的插入/添加也可以发生在分别编码原肽和成熟酶的 DNA 序列之间。

在大多数情况下,可能通过把编码肽添加物的 DNA 序列插入编码原肽或前肽(如果原序列不存在)的 DNA 序列和编码成熟酶的 DNA 序列之间延伸亲本酶的上游。

编码肽添加物的 DNA 序列的插入/添加可以通过分子生物学领域任何熟练技术人员已知的标准技术进行(参见,如 Sambrook 等, 1989)。这包括,例如,使用特定引物的聚合酶链式反应(PCR),例如在美国专利 4,683,202 或 R.K. Saiki 等.,(1988), 科学, 239, 487-491(1988)中所描述的。如何提供相邻 DNA 序列的表达和分泌描述如下。

在本发明的关联中,现已发现一些宿主细胞很少适宜于产生所需的修饰酶,其中在宿主细胞进行的翻译后或其它加工期间,可以切除肽添加物的部分或整体。因此,术语“合适的表达系统”是下述表达系统(宿主细胞和可有可无的表达载体),该表达系统使得完整的所需的修饰酶的至少一部分可以产生,即不(例如,作为通过选择的宿主细胞的翻译后或其它加工的部分)除去肽添加物的部分或全部(进而产生没有所需的肽添加物的酶)的表达系统。典型地,所利用的表达系统没有表现出不合需要的翻译后加工的一种或多种解蛋白活性。如同将详尽地在下面讨论的,表达系统和宿主细胞的选择取决于要产生的脂解酶。

对必须注意以选择用以产生本发明的修饰酶的合适的表达系统(特别是当修饰的 DNA 序列用于这种产生时),现已发现,按照本发明的修饰的脂解酶可以以下方法获得:在表达系统中表达编码所说的亲本脂解酶的 DNA 序列(所说的表达系统不能以正常方式加工翻译的多肽),进而导致酶的产生(这种酶在其加工前包含部分或整个原肽或与成熟蛋白质相关的类似肽序列)。在这种情况下,原肽或类似的肽序列构成肽添加物。原肽或类似的肽序列对亲本酶可以是异源或同源的,也可以存在于亲本酶的 N-和 C-末端。采用后一种技术产生按照本发明的修饰的脂解酶的方法在以下进一步讨论。

因此,如果已经编码出亲本酶的前原形式的合适的氨基酸链,这种氨基酸链在给定的表达系统的酶加工中被切除,可以通过把表达宿主系统改变成这样的系统应用,在这样的系统中,所说的氨基酸链的所说的加工不发生。在这样的情况下,在分泌期间或其后切除分泌信号前肽,导致由包

含通过相应的 DNA 序列编码的原肽或其部分或类似的肽序列的亲本酶组成的修饰酶的形成，即在其 N-末端或 C-末端伸长的脂解酶。

换句话说，本发明另一方面涉及亲本酶洗涤性能和其它活性的方法，该方法包括：

- a) 将编码亲本脂解酶的 DNA 序列引入到表达载体中，
- b) 将所说的 DNA 序列或表达载体引入到不能或者低效把表达的酶原加工成成熟酶的宿主细胞中，
- c) 在适于产生包含部分完整的原(前)序列的酶的条件下，培养所说的宿主细胞，和
- d) 回收所形成的修饰酶，纯化或者不纯化之。

已发现酵母细胞在将肽添加物(以前肽或其部分的形式)使用于亲本真菌脂解酶上特别有用，特别是 *H. lanuginosa*。

在一个可替的和高度优选的实施方案中，经按照下列原理的随机诱变方法涉及和使用所说的肽添加物：

- a) 使编码具有肽添加物的亲本脂解酶的 DNA 序列在肽添加物或亲本酶 C-末端或 N-末端的非结构部分进行定位的随机诱变，
- b) 在宿主细胞中表达步骤 a) 获得的突变的 DNA 序列，和
- c) 筛选表达突变的脂解酶的宿主细胞，该突变的亲本脂解酶与亲本脂解酶相比具有改进的性能。

采用这一方法已产生了许多高度有利的肽添加物。实质上可以如 WO 95/22615 中的描述完成定位随机诱变。更具体地说，在仅使一个或多个上述区域经历诱变的条件下进行诱变。特别是对诱变大的肽添加物，其与使用 PCR 产生的诱变(例如，按照 Deshler 1992 或 Leung 等 1991 的描述)相关，在所说的 PCR 诱变中，使用一个或多个合适的寡核苷酸探针(其侧翼于待诱变的区)。对于更短的肽添加物的诱变，更优选地是采用掺杂或掺加示踪剂的寡核苷酸完成定位随机诱变。掺杂或掺加示踪剂用于例如避免不需要的氨基酸的密码子或者增加在所需的位置引入特定类型的氨基酸残基的可能性。

在诱变之后，通过使得表达可以发生的条件下培养携带有突变的 DNA 序列的合适宿主细胞来表达所说的 DNA。用于这一目的的所说宿主细胞可

以是已用突变的 DNA 序列(可在可不在载体上)转化的细胞, 或者在诱变处理期间携带有编码亲本酶的 DNA 序列的细胞。合适宿主细胞的例子在下面给出, 并且优选地是能够分泌突变酶(能够易于分泌)的宿主细胞。已发现酵母细胞(例如啤酒糖酵母细胞)是合适的宿主细胞。

步骤 C) 的筛选标准必须不依赖修饰的脂解酶的所需性质选择。如果构建具有改进的洗涤性能的修饰的脂解酶是所需的, 则方便地进行对钙降低的依赖性和/或对去垢剂或去垢组分改进的耐受性的筛选。所说的去垢剂或去垢组分可以是以下去垢组合物部分所提及的任何组分。优选的去垢组分是非离子或阴离子表面活性剂, 如醇乙氧基化物或 LAS。优选的去垢剂是以下材料和方法部分中所描述的去垢剂 PCS。非离子表面活性剂对筛选 *H. lanuginosa* 脂酶(例如真菌脂酶)特别有益。而阴离子离子表面活性剂对假单胞菌属脂酶的筛选特别有益。

步骤 c) 的筛选基于下列原则采用滤膜测定按照常规方法进行:

在适于酶分泌的条件下, 在合适培养基上培养能够表达兴趣修饰的脂解酶的微生物, 培养基由双滤膜供给, 所述滤膜包括第一蛋白质结合滤膜和在其顶上的显示出低的蛋白质结合能力的第二滤膜。微生物位于第二滤膜上。在培养之后, 将包含从微生物分泌的酶的第一滤膜与包含微生物的第二滤膜分离。对第一滤膜就所需酶促活性进行筛选, 并且鉴别存在于第二滤膜上的相应微生物菌落。

用于结合酶促活性的滤膜可以是任何蛋白质结合滤膜, 例如尼龙或硝酸纤维素。携带表达有机体菌落的在上的滤膜可以是任何滤膜, 其对结合蛋白没有或者低的亲和性, 例如醋酸纤维素或 DuraporeTM。所说的滤膜可以用任何用于筛选的条件预处理或者在检测酶促活性期间处理。

酶促活性可以用染色, 荧光, 沉淀, pH 指示剂, IR-吸收或用于酶促活性的检测的任何其它已知技术检测。

检测的化合物可以由任何固定化剂(例如琼脂糖, 琼脂, 明胶, 聚丙烯酰胺, 淀粉, 滤膜, 布)或者固定化剂的任何组合固定化的。

脂酶活性可以通过亮绿、硷性蕊香红 B 或苏丹黑与脂质(例如橄榄油或猪油)结合起来检测。鉴别具有改进的洗涤性能的修饰的脂解酶的标准可以是例如与以上的酶促活性检测剂之一组合的 EGTA, EDTA, 非离子或阴离

子 tensides, 碱性 pH 或任何去垢组合物。

应当理解, 用于本发明的滤膜测定的筛选标准可以被选择, 以便符合待筛选的酶的所需性质或用途。例如, 在造纸和纸浆工业中的特殊用途的脂解酶的筛选中, 其可以是与具有增加的温度稳定性的酸性酶相关的。这可以通过采用具有酸性 pH(例如 pH 4)的缓冲液和/或在测定前或测定时在高温下温育来完成。通常在碱性 pH 下进行去垢酶筛选。

另外, 可以通过分离由步骤 b)产生的突变脂解酶和试验其性能(或任何其它相关的性质)来完成筛选。后面的“体内”试验也可以用于添加到筛选测定中, 以鉴别最好的筛选测定中的突变脂解酶。最后, 所形成的修饰脂解酶的氨基酸序列可以用于证实肽添加物的氨基酸序列。

改进性质的方法

改进以上提及的亲本脂解酶的性质(特别是洗涤性能)也是本发明的目的。由本发明的方法获得的改进的性质被认为是增加对脂类底物的亲和性的结果。

本发明的方法包括把肽添加物运用于成熟形式的亲本酶的 N-末端或 C-末端。在本发明的实施方案中, 可以通过培养包含原或前原-形式的亲本脂解酶的 DNA 序列的宿主细胞将肽添加物运用于亲本酶来实施。所说的 DNA 序列可以存在可以不存在于载体上。选择所形成的修饰的脂解酶的回收方法、宿主细胞、和/或回收条件, 以便出现大多数部分加工的前、原、前原形式的亲本酶, 导致至少 5%, 例如至少 10%, 例如至少 15%, 例如至少 20%, 例如至少 25%, 例如至少 50 %, 例如至少 75%的所产生的修饰酶分子包含所需的肽添加物, 例如完整的原-序列或其实质性部分。

宿主细胞可以与亲本酶的来源不同, 例如亲本酶所来源的属之外的属, 或者可以具有与亲本酶来源不同的翻译后加工机制。

亲本脂解酶优选地来源于丝状真菌, 例如 *Humicola* sp.的菌株(特别是 *Humicola lanuginosa*)或细菌, 例如 *Pseudomonas* sp.的菌株, 并且宿主细胞是酵母细胞, 如 *Saccharomyces* sp.的菌株, 特别是啤酒糖酵母或 *Hansenula* sp.的菌株。

在本发明的实施方案中, 用于将肽添加物使用到亲本脂解酶上的宿主细胞产生固有脂解酶的能力已被降低, 例如通过废除宿主细胞产生一种或多

种蛋白分解酶。

本发明的方法包括以下步骤:

a) 使编码具有肽添加物的亲本脂解酶的 DNA 序列(例如本发明的 DNA 序列)在编码肽添加物的 DNA 序列部分或者在亲本酶 C-末端或 N-末端的非结构部分进行定位的随机诱变,

b) 在宿主细胞中表达步骤 a) 获得的突变的 DNA 序列, 和

c) 筛选表达突变的脂解酶的宿主细胞, 该突变的亲本脂解酶与亲本脂解酶相比具有改进的性能。

在实施方案中, DNA 序列是编码原或前原-形式的亲本酶的基因或 cDNA 序列。

本发明也涉及在成熟形式的亲本酶的 C-末端或 N-末端的非结构部分引入突变, 例如通过缺失带负电的氨基酸残基或者用中性或带正电的氨基酸残基取代它们, 或者带正电的氨基酸残基取代中性氨基酸残基。

亲本脂解酶

本发明的修饰的脂解酶可以从微生物源(优选地是细菌或真菌(即丝状真菌或酵母源)的任何亲本脂解酶构建。

按照本发明, 本发明的酶可以是任何脂解酶, 包括脂酶, 磷脂酶, 酯酶和角质酶(按照习用术语)。

应当理解, 预期将通常在其未加工状态包含原和/或前肽的脂解酶以及不包含这些的酶用作按照本发明的修饰的亲本酶。

有关亲本脂解酶的例子包括从下列微生物来源的酶:

腐质霉属, 例如 *Humicola brevispora*, *Humicola lanuginosa*, *Humicola brevis* var. *thermoidea* 和 *Humicola insolens*(美国 4,810,414)或 WO96/13580;

假单胞菌属, 例如莓实假单胞菌, 施氏假单胞菌, 葱头假单胞菌和荧光假单胞菌(WO 89/04361), 或 *Pseudomonas plantarii* 或 *Pseudomonas gladioli* (US 专利 4,950,417(Solvay 酶))或产碱假单胞菌和类产碱假单胞菌(EP 218 272 或 WO 94/25578)或门多萨假单胞菌(WO 88/09367; US 5,389,536);

镰孢属, 例如尖镰孢(EP 130,064)或腐皮镰孢 *pisi* (WO 90/09446);

毛霉属(也称为根毛霉), 例如米黑毛霉(EP 238 023);

Absidia sp. (WO 96/13578);

色杆菌属(特别是粘稠色杆菌);

曲霉属(特别是黑曲霉);

假丝酵母属, 例如 *Candida cylindracea*(也称为皱落假丝酵母)或 *Candida antarctica*(WO 88102775)或 *Candida antarctica* 酯酶 A 或 B (WO 94/01541 和 WO 89/02916);

Geotricum, 例如 *Geotricum candidum*(Schimada 等, (1989), 生物化学杂志, 106, 383-388);

青霉属, 例如沙门柏干酪青霉(Yamaguchi 等,(1991), 基因 103, 61-67);

根霉属, 例如 *Rhizopus delemar*(Hass et al., (1991), 基因, 109,107-113)或雪白根霉(Kugimiya 等, (1992) 生物科学生物技术生物化学, 56, 716~719)或米根霉, 和

芽孢杆菌属, 例如枯草芽孢杆菌(Dartois 等, (1993) 生物化学生物物理学报, 1131, 253-260)或嗜热脂肪芽孢杆菌(JP 64/7744992)或短小芽孢杆菌(WO 91/16422).

通用名 *Thermomyces lanuginosus* 1899 年由 Tsiklinsky 引入表示一个种, *Thennomyces lanuginosus*。这一物种在形态学和生理学上十分有特色, 没有疑问 Tsiklinsky 的 *Thennomyces lanuginosus* 与后来的工作者(如, Bunce(1961)和 Cooney Emerson(1964))分离和描述的 *Humicola lanuginosa* 相同。

按照植物命名的国际码, 正确的名称是最早提出的那个。这样, *Thennomyces lanuginosus* 应该是正确的名称。然而, 因为 Tsiklinsky 对该物种的不完全的描述, 这一合法性受到许多菌学家的疑问。这样, 分类学上混乱的重要原因涉及对 Tsiklinsky 的描述是否满足有效出版物的需要有不同的观点。

然而, 名称 *Hwnicola lanuginosa* 仍然在文献中可见, 有可能因为流行的 Cooney & Emerson(1964)“嗜热真菌”一书推荐使用名称 *Hwnicola lanuginosa*。

已经进行了 *Thennomyces lanuginosus* 18S 核糖体基因 DNA 编码部分

的测序。在 GenBank 数据库中将所说的 18S 序列与其它 18S 序列进行了比较, 并且进行了采用 parsimony (PAUP, 版本 3.1.1, Smithsonian Institution, 1993) 的种系发生分析。这清楚地将 *Thennomyces lanuginosus* 指定为不整囊菌纲, 很可能为散囊菌科目。按照 NCBI (国立生物技术信息中心) Entrez Browser 所述, *Thennomyces lanuginosus* 与科 *Eremascaceae*、*Monoascaceae*、*Pseudoeuroriaceae* 和 *Trichocomaceae* 相关、后者包括裸胞壳属、曲霉属、青霉属、正青霉属、拟青霉属、*Talaromyces*、嗜热子囊菌属和 *Sclerocleista*。

与 *Pseudomonas* sp. 脂酶相联系, 现已发现下列有机体来源的脂酶具有高度的同源性(因此预料属于相同科的脂酶): 假单胞菌属 ATCC21808, 铜绿假单胞菌 EF2, 铜绿假单胞菌 PAC1R, 铜绿假单胞菌 PAO1, 铜绿假单胞菌 TE3285, *Pseudomonas* sp. 109, 类产碱假单胞菌 M1, *Pseudomonas glumae*, 葱头假单胞菌 DSM3959, 葱头假单胞菌 M-12-33, *Pseudomonas* sp. KWI-56, 恶臭假单胞菌 IFO3458, 恶臭假单胞菌 IFO12049 (Gilbert, E. J., (1993), 假单胞菌脂酶: 生物化学性质和分子克隆, *Enzyme Microb Technol.*, 15, 634 645)。

易于从商业上获得的特定的脂酶(可以是按照本发明修饰的)的例子包括 LipolaseB® 和 Lipolase® Ultra (可从 Novo Nordisk A/S 获得)。

按照本发明预期的脂解酶的例子是 Lumafast® (门多萨假单胞菌脂酶, 来源于 Genencor Int. Inc.); Lipomax® (类产碱假单胞菌脂酶, 来源于 Genencor Int. Inc.); *Fusarium solani* 脂酶(角质酶, 来源于 Unilever); *Bacillus* sp. 脂酶(来源于 Solvay enzyme; 和 Liposame® (门多萨假单胞菌脂酶, 来源于 Showa Denko), 以及在 WO 95/06720 中描述的 *Pseudomonas* sp. 脂酶, 其已被测序, 并发现其具有 SEQ ID NO: 93 所示的氨基酸序列。

所强调的是本发明的修饰酶可以从其构建的亲本脂解酶包括以上提及的脂解酶, 和其任何变体, 修饰体和截短体。

这样的亲本酶的特别受到关注的实例包括在 WO92/05249, WO 94/01541, WO 94/14951, WO 94/25577, WO 95/22615 中描述的酶和如 EP 407 225 中描述的蛋白质工程脂酶变体; 如 US 5,352,594 中所描述的蛋白质

工程门多萨假单胞菌；如 WO 94/14964 中所描述的角质酶变体；如在 EP 专利 167,309 中所描述的青霉素脂解酶变体；和 WO 95/06720 中描述的 *Pseudomonas* sp. 脂酶。

在大多数优选的实施方案中，亲本酶来源于 *Hwnicola* sp. 的菌株，或者来源于 *Pseudomonas* sp. 的菌株，或者来源于被认为属于假单胞菌科的属。

在本发明的特定的实施方案中，编码具有脂解活性的亲本酶(待加工成本发明的修饰酶)的 DNA 序列是编码来源于 EP 305 216 中所描述的丝状真菌 *Humicola lanuginosa* 的具有脂解活性的酶的 DNA 序列。

现在可以预期，如果酶是糖基化的，则本发明的修饰酶的洗涤性能和/或热稳定性可以进一步得到改进。因此，在本发明的实施方案中修饰酶可以是糖基化的。氨基酸序列可以有任何程度的糖基化。

本发明的 DNA 序列

本发明的另一方面涉及编码本发明的具有脂解活性的所说修饰酶的 DNA 序列。

编码本发明的修饰酶的 DNA 序列通常可以用本领域已知的方法(例如采用以上提到的 PCR)经修饰编码所研究的亲本脂解酶的 DNA 序列来制备，但也可以用已经建立的标准方法经合成制备，所说的标准方法例如 Beaucage 和 Caruthers(1981) Tetrahedron Letters 22, 1859-1869 描述的 phosphoamidite 法，或者 Matthes 等(1984)，EMBO J. 3, 801-805 描述的方法。按照 phosphoamidite 法，在自动 DNA 合成仪上合成寡核苷酸，纯化，退火，连接和在合适载体中克隆。

也可以通过使用常规技术获得编码所选择的亲本脂解酶的 DNA 序列。例如，DNA 序列可以从由相关有机体制备的基因组或 DNA 文库分离，或者可以通过表达克隆(如在 WO 93/11249 中所描述的)获得，或者由合成产生。

在一当前优选的实施方案中，编码本发明的修饰的脂解酶的 DNA 序列是从编码来源于 *Humicola lanuginosa* 的和在 EP 305 216 中所描述的 DNA 序列制备的。在另一个优选的实施方案中，DNA 序列来源于 *Pseudomonas* sp. 的菌株，尤其是产碱假单胞菌或类产碱假单胞菌。

编码本发明的修饰的脂解酶的分离的核酸序列可以以各种方法操作以

提供酶的表达。在其插入载体之前，编码修饰酶的核酸序列的操作取决于表达载体可以是合乎需要的或必要的。利用克隆方法修饰核酸序列的技术在本领域是已知的。

术语“控制序列”在本文中定义为包括对核酸序列的编码序列的表达是必要的或有利的所有组分。各控制序列对编码脂解酶的核酸序列可以是天然的或外源的。这样的控制序列包含(但不限于): 前导序列、聚腺苷酸化序列、原肽序列、启动子、信号序列和转录终止子。在最小的程度下，控制序列包含启动子以及转录和翻译终止信号。控制序列可以与接头(其目的在于引入特定的限制位点以促进控制序列与编码修饰的脂解酶的核酸序列的编码区连接)提供。

控制序列可以是合适的启动子序列、表达核酸序列的宿主细胞识别的核酸序列。启动子序列包含转录和翻译控制序列，该序列调节修饰脂解酶的表达。启动子可以是在选择的宿主细胞中显示转录活性的任何核酸序列，并可以从编码对宿主细胞同源或异源的胞外或胞内多肽的基因获得。用于指导本发明的核酸构建体转录的适合启动子的例子(尤其是在细菌宿主细胞中)是从下列基因获得的启动子: 大肠杆菌乳糖操纵子、天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)琼脂酶基因(dagA)、枯草芽孢杆菌蔗糖 6-果糖基转移酶基因(sacB)或碱性蛋白酶基因、地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶基因(amyL)、嗜热脂肪芽孢杆菌生麦淀粉酶基因(mnyM)、液解化淀粉杆菌 α -淀粉酶基因(amyE)、地衣芽孢杆菌青霉素酶基因(penP)、枯草芽孢杆菌 xylA 和 xylB 基因、短小芽孢杆菌木糖苷酶基因和原核生物 β -内酰胺酶或色氨酸基因(Villa-Kamaroff 等, 1978, 美国科学院学报, 75: 3727-3731)以及 tac 基因(DeBoer 等, 1983, 美国科学院学报, 80: 21-25)。其它启动子在科学的美国人, “得自重组细菌的有用蛋白质”, 1980, 242: 74-94 中以及 Sambrook 等, 1989, 同上中描述。用于指导本发明的核酸序列在丝状真菌宿主细胞中转录的适合启动子的例子是获自编码下列酶的基因的启动子“米曲霉 TAKA 淀粉酶、米曲霉磷酸丙糖异构酶、*Rhizomucor miehei* 天冬氨酸蛋白酶、黑曲霉中性 α -淀粉酶、黑曲霉酸稳定性 α -淀粉酶、黑曲霉或泡盛曲霉(*A. awamori*)葡糖淀粉酶(glaA)、*Rhizomucor miehei* 脂酶、米曲霉碱性蛋白酶、米曲霉磷酸丙糖异构酶、构巢曲霉乙酰胺酶、尖镰孢

(*Fusarium oxysporum*)类胰蛋白酶蛋白酶(如在美国专利 4,288,627 中描述的,本文一并参考)或 ADH-3 启动子(McKnight 等, (1985), EMBO 杂志, 4, 2093-3099)及其杂合体。在丝状真菌宿主细胞中使用的尤其优选的启动子是 TAKA 淀粉酶和 glaA 启动子。在酵母宿主中是得自酵母糖解基因(Hitzeman 等, (1980), 生物化学杂志, 255, 12073-12080; Alber 和 Kawasaki, (1982), J. Mol. Appl. Gen. 1, 419-434)或醇脱氢酶基因(Young 等, 产生化学药品的微生物的遗传工程学(Hollaender 等编辑), Plenum 出版社, 纽约, 1982)的启动子或 TPI1(美国专利 4,599,311)或 ADH₂-4c(Russell 等), (1983), 自然 304, 652-654)启动子。有用的启动子获自啤酒糖酵母烯醇酶(ENO-1)基因、啤酒糖酵母半乳糖激酶基因(GAL1)、啤酒糖酵母醇脱氢酶/甘油醛-3-磷酸盐脱氢酶基因(ADH₂/GAP)和啤酒糖酵母 3-二氧磷基甘油酸盐激酶基因。其它酵母宿主细胞有用的启动子由 Romanos 等, 1992, 酵母 8: 423-488 描述。

控制序列也可以是适合的转录终止序列、即被宿主细胞识别以终止转录的序列。终止序列可操作地连接到编码修饰的脂解酶的核酸序列的 3' 末端。终止序列对编码脂解酶的核酸序列可以是天然的或可以从外源来源获得。在选择的宿主细胞中是功能性的任何终止子都可以用于本发明。丝状真菌宿主细胞的优选的终止子从编码下列酶的基因获得: 米曲霉 TAKA 淀粉酶、黑曲霉葡萄糖淀粉酶、构巢曲霉氨基酸合酶、黑曲霉 α -葡萄糖苷酶、尖镰孢类胰蛋白酶蛋白酶。用于酵母宿主细胞的优选的终止子获自编码下列酶的基因: 啤酒糖酵母烯醇酶、啤酒糖酵母细胞色素 C(CYC1)或啤酒糖酵母 3-磷酸盐脱氢酶。其它用于酵母宿主细胞的有用的终止子由 Romanos 等, 1992, 同上描述。

控制序列也可以是适合的前导序列, 对宿主细胞的翻译来说重要的 mRNA 的非翻译区。前导序列可操作地连接到编码脂解酶的核酸序列的 5' 末端。前导序列对编码脂解酶的核酸序列可以是天然的或可以获自外源来源。在选择的宿主细胞中是功能性的任何前导序列都可以用于本发明。丝状真菌宿主细胞的优选的前导序列从编码下列酶的基因获得: 米曲霉 TAKA 淀粉酶、米曲霉丙糖磷酸盐异构酶。对于酵母宿主细胞适合的前导序列获自啤酒糖酵母烯醇酶(ENO-1)基因、啤酒糖酵母 3-二氧磷基甘油酸盐

激酶基因、啤酒糖酵母 α -因子以及啤酒糖酵母醇脱氢酶/甘油醛-3-磷酸盐脱氢酶基因(ADH₂/GAP)。

控制序列也可以是聚腺苷酸化序列，是可操作地连接到核酸序列 3' 末端的序列，当其转录时，被宿主细胞识别为把聚腺苷化残基添加到转录的 mRNA 上的信号。聚腺苷酸化序列可以是天然的或可以获自外源来源。在选择的宿主细胞中是功能性的任何聚腺苷酸化序列都可以用于本发明。丝状真菌宿主细胞的优选的聚腺苷酸化序列从编码下列酶的基因获得：米曲霉 TAKA 淀粉酶、黑曲霉葡糖淀粉酶、构巢曲霉氨基酸合酶以及黑曲霉 α -葡糖苷酶。对于酵母宿主细胞有用的聚腺苷酸化序列由 Guo 和 Sherman, 1995, 分子细胞生物学 15: 5983-5990 描述。聚腺苷酸化序列在哺乳动物宿主细胞领域是已知的。

控制序列也可以是信号肽编码区，该编码区编码连接到修饰酶氨基末端的氨基酸序列，所述修饰的脂解酶氨基末端可以指导表达的修饰的脂解酶进入细胞的分泌途径。信号肽编码区对本发明的修饰的脂解酶可以是天然的或可以获自外源来源。核酸序列的编码序列的 5' 末端可以固有地包含天然地连接在具有编码区片段的翻译读框中的信号肽编码区，该编码区编码分泌的修饰的脂解酶。另外，编码序列的 5' 末端可以包含信号肽编码区，该编码区对于编码分泌的修饰的脂解酶的编码序列是外源的。在编码序列通常不包含信号肽编码区的地方需要外源信号肽编码区。另外，外源信号肽编码区可以简单地取代天然信号肽编码区以获得与编码序列联系的天然信号肽编码区有关的酶的增强的分泌。信号肽编码区可以获自曲霉属物种的葡糖淀粉酶或淀粉酶基因、*Rhizomucor* 物种的脂酶或蛋白酶基因、啤酒糖酵母的 α -因子基因、芽孢杆菌属物种的淀粉酶或蛋白酶基因或小牛前凝乳酶基因。用于细菌宿主细胞的有效信号肽编码区是获自下列基因的信号肽编码区：芽孢杆菌属 NCIB 11837 生麦淀粉酶基因、嗜热脂肪芽孢杆菌 α -淀粉酶基因、地衣芽孢杆菌枯草溶菌素基因、地衣形芽孢杆菌 β -内酰胺酶基因、嗜热脂肪芽孢杆菌中性蛋白酶基因(nprT, nprS, nprM)和枯草芽孢杆菌 PrsA 基因。其它信号肽由 Simonen 和 Palva, 1993, 微生物回顾, 57: 109-137 描述。用于丝状真菌宿主细胞的有效信号肽编码区是获自下列基因的信号肽编码区：米曲霉 TAKA 淀粉酶基因、黑曲霉中性淀粉酶

基因、*Rhizomucor miehei* 天冬氨酸蛋白酶基因、*H. lanuginosa* 纤维素酶基因或 *Rhizomucor miehei* 脂酶基因。用于酵母宿主细胞的有用的信号肽获自啤酒糖酵母 α -因子和啤酒糖酵母蔗糖酶的基因。其它有用的信号肽编码区由 Romanos 等, 1992, 同上描述。然而, 能够指导表达的酶进入选择的宿主细胞的分泌途径的任何信号肽编码区都可以用于本发明。

本发明的核酸构建提也可以包含一种或多种核酸序列, 该核酸序列编码在表达修饰的脂解酶中有利的一种或多种因子, 例如, 活化剂(例如, 顺式活性因子、陪伴分子和加工蛋白酶。编码这些因子中的一个或多个的核酸序列与编码修饰的脂解酶的核酸序列不必是一前一后。活化剂是活化编码修饰的脂解酶的核酸对序列转录的蛋白质(Kudla 等, 1990, EMBO 杂志, 9: 1355-1364; Jarai 和 Burton, 1994, 普通遗传学, 26: 2238-244; Verdier, 1990, 酵母, 6: 271-297)。编码活化剂的核酸序列可以获自编码下列酶的基因: 嗜热脂肪芽孢杆菌 NprA(nprA)、啤酒糖酵母血红素活化剂蛋白质 1(hapl)、啤酒糖酵母半乳糖代谢蛋白质 4(gal4)和构巢曲霉氮调节蛋白质(aerA)。对于其它的例子, 参见 Verdier, 1990, 同上和 MacKenzie 等, 1993, 普通微生物学杂志, 139: 2295-2307。陪伴分子帮助另一种多肽正确折叠的蛋白质(Hartl 等, 1994, TIBS, 19: 20-25; Bergeron 等, 1994, TIBS, 19: 124-128; Demolder 等, 1994, 生物技术杂志, 32: 179-189; Craig, 1993, 科学, 260: 1902-1903; Gething 和 Sambrook, 1992, 自然, 355: 33-45; Puig 与 Gilbert, 1994, 生物化学杂志, 269: 7764-7771; Wang 和 Tsou, 1993, FASEB 杂志, 7: 1515-11157; Robinson 等, 1994, 生物技术, 1: 381-384)。编码陪伴分子的核酸序列可以获自编码下列蛋白质的基因: 枯草芽孢杆菌 GroE 蛋白质、米曲霉蛋白质二硫化物异构酶、啤酒糖酵母钙连接蛋白、啤酒糖酵母 BiP/GRP78 和啤酒糖酵母 Hsp70。对于其它的例子, 参见 Gething 和 Sambrook, 1992, 同上以及 Hartl 等, 1994, 同上。任何在选择的宿主细胞中有功能的因子都可以用于本发明。

添加调节序列也可以是合乎需要的, 该调节序列使得修饰的脂解酶的表达与宿主细胞的生长有关。调节系统的例子是使基因的表达响应化学或物理刺激开关的系统, 它包括调节化合物的存在。在原核细胞系统中的调

节系统包括 lac、tac 和 trp 操纵子系统。在酵母中，可以使用 ADH₂ 系统或 GAL1 系统。在丝状真菌中，TAKA α -淀粉酶启动子、黑曲霉葡萄糖淀粉酶启动子和米曲霉葡萄糖淀粉酶启动子可以用作调节序列。调节序列的其它例子是使得基因扩增的序列。在真核系统中，这些序列包括在氨甲蝶呤存在下扩增的金属硫蛋白还原酶基因以及与重金属扩增的金属硫蛋白基因。在这些情况下，编码修饰的脂解酶的核酸序列与调节序列一前一后放置。

表达载体

本发明也涉及包含本发明的核酸序列、启动子以及转录和翻译终止信号的重组表达载体。上述的各种核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含一个或多个方便的限制位点以使得在这样的位点编码修饰的脂解酶的核酸序列可以进行插入或取代。另外，本发明的核酸序列也可以通过把包含核酸序列或该序列的核酸构建体插入到合适的载体中表达。在创造表达载体时，编码序列位于载体中以便编码序列可操作地与用于表达的合适控制序列连接并有可能分泌。

重组表达载体可以是任何可以方便地进行重组 DNA 方法并可以引起核酸序列表达的载体。载体的选择典型地取决于载体与其所引入的宿主细胞的相容性。载体可以是线性或封闭的环状质粒。载体是可以自动复制的载体，即，作为非染色体性遗传实体存在的载体，其复制不依赖于染色体的复制，例如，质粒、非染色体成分、微型染色体或人工染色体。载体可以包含任何保证自身复制的含义。另外，载体可以是下述载体，即当将其引入宿主细胞时，整合进基因组并与它所整合的染色体一道复制。载体系统可以是单一载体或质粒或两个或多个载体或质粒，它们共同包含引入宿主细胞或转座子的基因组的整个 DNA。

本发明的载体优选地包含一个或多个可选择的标记，该标记使得容易选择转化的细胞。可选择的标记是基因，其产物提供杀虫剂或病毒抗性、对重金属的抗性、对营养缺陷型的矿质寄生等。细菌可选择的标记的例子是得自枯草芽孢杆菌或地衣芽孢杆菌 *dal* 基因或赋予抗生素抗性(如氨苄青霉素、卡那霉素、氯霉素或四环素抗性)的标记。经常利用的哺乳动物标记是二氢叶酸还原酶基因。酵母宿主细胞的适合标记是 ADE2、HIS3、LEU2、LYS2、MET3、TRP1 和 URA3。用于丝状真菌宿主细胞的可

选择的标记可以选自这样的组，该组包括(但不限于): amdS(乙酰胺酶)、argB(鸟氨酸氨基甲酰基转移酶)、bar(phosphinothricin 乙酰转移酶)、hygB(潮霉素磷酸转移酶)、niaD(硝酸盐还原酶)、pyrG(乳清酸核苷-5'-磷酸盐脱羧酶)、sC(硫酸腺苷酰转移酶)、trpC(氨苄青霉素合酶)与 glufosinate 抗性标记以及得自其它物种的相当物。用于曲霉属细胞优选的是构巢曲霉或米曲霉的 amdS 和 pyrG 标记和 *Streptomyces hygroscopicus* 的 bar 标记。进而，选择可以通过共转化完成，例如，在 WO 91/17243 中所描述的，其中可选择的标记在单独的载体上。

本发明的载体优选地包含一种元件，其使得可以把载体稳定地整合进宿主细胞基因组并使载体可以独立于细胞的基因组而在细胞中自主复制。

当引入宿主细胞时，本发明的载体可以整合进宿主细胞基因组。对于整合，载体可以依赖于编码修饰的脂解酶或载体的任何其它元件的核酸序列，这些元件通过同源或非同源重组用于把载体稳定地整合进基因组。另外，载体可以包含其它的核酸序列，这些核酸序列通过同源重组指导整合进宿主细胞的基因组。所述核酸序列能够使载体整合进宿主细胞基因组的染色体中的精确位置。为了提高在精确位置整合的可能性，整合成分应该优选地包含足够数量的核酸(如 100 至 1,500 个碱基对，优选地 400 至 1,500 个碱基对，最优选地是 800 至 1,500 个碱基对)，该核酸与相应的靶序列是高度同源的以提高同源重组的可能性。整合成分可以是与在宿主细胞基因组中的靶序列同源的任何序列。进而，整合成分可以是非编码或编码的核酸序列。另一方面，载体可以通过非同源重组整合进宿主细胞的基因组。这些核酸序列可以是与在宿主细胞基因组中的靶序列同源的任何序列，进而，可以是非编码或编码序列。

对于自主复制，载体还可以包含复制起点，该复制起点使载体能够在所说的宿主细胞中自主复制。细菌的复制起点的例子是质粒 pBR322、pUC19、pACYC177、pACYC184、pUB110、pE194、pTA1060 和 pAMB1 的复制起点。用于酵母宿主细胞的复制起点的例子是复制的 2 微米起点、CEN6 和 ARS4 的重组乙基 CEN3 和 ARS1 的重组。复制起点可以是具有突变的起点，该突变使其在宿主细胞中起温度敏感的作用(参见，例如，Ehrlich, 1978, 美国科学院学报, 75: 1433)。

编码本发明的修饰的脂解酶的一个以上核酸序列可以插入宿主细胞以扩增核酸序列的表达。核酸序列的稳定扩增可以通过利用本领域已知的方法把至少一个拷贝的序列整合进宿主细胞基因组并选择转化体获得。

用于连接上述成分以构建本发明的重组体表达载体的方法是本领域技术人员熟知的(参见, 例如, Sambrook 等, 1989, 同上)。

宿主细胞

本发明涉及重组宿主细胞, 该重组宿主细胞包含本发明的核酸序列, 它在用于重组产生修饰的脂解酶时是有利的。细胞优选地以包含核酸序列的载体转化, 其后把载体整合进宿主染色体。“转化”指把包含本发明的核酸序列的载体引入宿主细胞以使该载体作为染色体整合物或作为自主复制非染色体载体保持。当核酸序列更可能稳定地保持在细胞中时, 一般认为整合是有优点的。把载体整合进宿主染色体可以通过以上所述的同源或非同源重组发生。

选择宿主细胞在很大程度上取决于编码修饰的脂解酶的基因及其来源。此外, 宿主细胞的选择经常取决于宿主细胞的解蛋白酶系统及其对本发明的修饰的脂解酶产生的影响。因此, 理想的是利用在一个或多个解蛋白酶或其它酶加工方式缺失的宿主细胞。细菌以及真菌(丝状真菌和酵母)细胞的蛋白酶缺失宿主细胞在本领域中是众所周知的。

宿主细胞可以是单细胞微生物或非单细胞微生物。有用的单细胞是细菌细胞, 如: 革兰氏阳性细菌(包括但不限于芽孢杆菌属细胞, 例如, 枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、嗜碱芽孢杆菌、淀粉裂解化芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、灿烂芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌以及苏云金芽孢杆菌; 或链霉菌属细胞, 例如, *S. lividans* 或 *S. murinus*)或革兰氏阴性细菌(如大肠杆菌和 *Pseudomonas* sp.(尤其当细菌脂解酶(如 *Pseudomonas* sp.酶产生时))。细菌宿主细胞的转化可以, 例如, 通过原生质体转化(参见, 例如, Chang 和 Cohen, 1979, 分子普通遗传学 168: 111-115)、利用感受态的细胞(参见, 例如, Young 和 Spizizin, 1961, 细菌学杂志, 81: 823-829, 或 Dubnar 和 Davidoff-Abelson, 1971, 分子生物学杂志, 56: 209-221)、电穿孔(参见, 例如, Shigekawa 和 Dower, 1988, 生物技术, 6: 742-751)

或通过缀合(参见,例如, Koehler 和 Thorne, 1987, 细菌学杂志, 169: 5771-5278)起作用。

宿主细胞可以是真核生物, 优选的是真菌(即酵母细胞或丝状真菌细胞), 尤其是对于真核来源的修饰的脂解酶的产生。

本文所利用的“酵母”包括产子囊孢子(ascosporogenous)酵母(酵母目)、产担孢子(basidiosporogenous)酵母以及属于不完全菌纲(芽生菌)的酵母。产子囊孢子酵母划分在蚀精霉科和酵母科。后者由四个亚科组成: 裂殖酵母亚科(如裂殖酵母属)、拿逊酵母亚科、油脂酵母亚科和复膜酵母亚科(*Saccharomycoideae*)(例如, 毕赤酵母属、克鲁维酵母属和酵母菌属)。产担孢子酵母包括白冬孢酵母属、*Rhodospiridium*、锁掷酵母属、*Filobasidium* 和 *Filobasidiella*。属于不完全菌纲的酵母划分在两个科: 掷孢酵母科(例如 *Sorbolomyces* 和布勒掷孢酵母属)和隐球酵母科(例如, 假丝酵母属)。因为酵母的分类在未来可能改变, 为了本发明的目的, 将酵母定义为如酵母的生物学和活性(Skinner, F. A., Passmore, S.M.和 Davenport, R.R.编辑, 应用细菌学协会专题研讨系列 9, 1980)中描述的。酵母生物学与酵母遗传学的操作在本领域是熟知的(参见, 例如, 酵母的生物化学和遗传学, Bacil, M., Horecker, B.J.和 Stopani, A. O. M.编辑, 第 2 版, 1987; 酵母, Rose, A. H.和 Harrison, J. S.编辑, 第 2 版, 1987; 酵母的分子生物学, Strathem 等, 编辑, 1981)。在与本发明相关时, 使用酵母细胞(典型地具有另一个蛋白酶处理系统, 例如, 细菌和丝状真菌, 对于制备修饰的脂解酶特别有用, 作为肽添加物, 包含所说的亲本脂解酶的部分或所有天然的原序列)。当真菌宿主细胞是酵母细胞时, 如用于应用肽添加物(以亲本酶的部分整个原序列的形式), 酵母宿主细胞可以是假丝酵母属、克鲁维酵母属、*Schitosaccharomyces*、毕赤酵母属或 *Yarrowia* 的细胞, 如啤酒糖酵母细胞、卡尔酵母(*S. carlsbergensis*)、糖化酵母(*S. diastaticus*)细胞、*S. douglarii* 细胞、克鲁弗酵母(*S. kluyven*)细胞、诺地酵母(*S. norbensis*)细胞或 *S. oviformis* 细胞。

本文所利用的“真菌”包括子囊菌门、担子菌门、壶菌门和接合菌门(如由 Hawksworth 等所限定, In, Ainsworth 和 Bisby 真菌字典, 第 8 版, 1995, CAB 国际, 大学出版社, 剑桥, 英国)以及卵菌门(如在 Hawksworth

等, 1995, 同上, 171 中所引用)与所有的有丝分裂孢子真菌(Hawksworth 等, 1995, 同上)。代表性的子囊菌门组包括, 例如, 脉孢菌属、正青霉属(=青霉属)、*Emricella*(=曲霉属)、散囊菌属(=曲霉属)以及如上所述的真酵母。担子菌门的例子包括蘑菇、锈斑病和黑穗病。代表性的壶菌门组包括, 例如, 异水霉属、小芽枝霉属、雕蚀菌属和水生真菌。代表性的卵菌门组包括, 例如, 水霉菌纲水生真菌(水粘液菌类)如绵霉属。有丝分裂孢子真菌的例子包括曲霉属、青霉属、假丝酵母属和链格孢属。代表性的接合菌门组包括, 例如, 根霉属和毛霉属。

“丝状真菌”包括所有丝状形式的真菌门和卵菌门亚门(如由 Hawksworth 等, 1995, 同上所限定的)。丝状真菌的特征在于: 营养菌丝体由几丁质、纤维素、葡聚糖、脱乙酰壳多糖、甘露聚糖和其它复合多糖类组成。营养生长通过菌丝延长, 碳分解代谢是专性需气的。相对地, 酵母(如啤酒糖酵母)的营养生长通过萌发单细胞叶状体进行, 碳分解代谢可以发酵型的。

在优选的实施方案中, 真菌宿主细胞是丝状真菌细胞。在更优选的实施方案中, 丝状真菌宿主细胞下列属(但不限于)的细胞: 顶孢霉属、曲霉属、*Fusarium*、腐质霉属、毁丝霉属、毛霉属、脉孢菌属、青霉属、梭孢壳属、弯颈霉属和木霉属。在更优选的实施方案中, 丝状真菌宿主细胞是曲霉属细胞。在另一个更优选的实施方案中, 丝状真菌宿主细胞是 *Fusarium* 细胞。在最优选的实施方案中, 丝状真菌宿主细胞是米曲霉细胞、黑曲霉细胞、臭曲霉(*A. foetidus*)细胞或日本曲霉(*A. japonicus*)。在另一个最优选的实施方案中, 丝状真菌宿主细胞是尖镰孢细胞或禾谷镰孢(*F. graminearum*)细胞。

真菌细胞可以一种机方法转化, 该方法包括以本来已知的方式进行原生质体形成、原生质体转化、细胞壁的再生。关于曲霉属宿主细胞转化的适合方法在 EP 238 023 和 Yelton 等, 1984, 美国科学院学报, 81: 1470-1474 中描述。转化 *Fusarium* 物种的适合方法由 Malardier 等, 1989, 基因, 78: 147-156 或在 WO 96/00787 中描述。酵母可以利用下面描述的转化: Becker 和 Guarente, 在 Abelson, J.N 和 Simon, M. I., 编辑, 酵母遗传学和分子生物学指导, 酶学方法, 194 卷, 182-187, 学院

出版社公司, 纽约; Ito 等, 1983, 细菌学杂志, 153: 163; Hinnen 等, 1978, 美国科学院学报, 75: 1920。哺乳动物细胞可以利用 Graham 和 van der Eb 的磷酸钙沉淀法(1978, 病毒学, 52: 546)通过直接摄取转化。

按照本发明使用的宿主细胞可以有利地是蛋白酶缺陷或蛋白酶阴性菌株(或类似物), 例如能够在接近肽添加物(在某些情况下是前肽)的位点裂解修饰的脂解酶的蛋白酶缺陷, 特别是外蛋白酶。尤其相关的宿主细胞是缺乏三肽基氨基肽酶(TPAP)(参见, 例如 Novo Nordisk A/S 的 WO 96/14404), 缺乏三肽基氨基肽酶(DPAP)的宿主细胞, 或者缺乏 Kex2 蛋白酶或类 Kex2 蛋白酶并且因此不能够在二碱性位点(例如 Arg-Arg(RR))裂解的宿主细胞。

其它宿主细胞的例子包括在 EP 429 490(Genencor Inc)中描述的天冬氨酸蛋白酶缺陷宿主细胞, 缺乏蛋白酶的宿主细胞, 例如在 WO 93/00925(Amgen), WO 92/17595(sALK Inst Biotech), EP 341 215, EP 574 347 和 PCT/DK96/00111(Novo Nordisk A/S)中描述的宿主细胞。

在以下的实施例中, 使用了具有缺失的碱性蛋白酶的米曲霉宿主细胞。

产生方法

本发明也涉及产生本发明的修饰的脂解酶的方法, 该方法包括: (a) 在有利于修饰的脂解酶表达的条件下, 培养用编码修饰的脂解酶的 DNA 序列转化的宿主细胞; b) 回收修饰的脂解酶。

宿主细胞可以利用本领域已知的方法在适合于修饰的脂解酶产生的营养培养基中培养。例如, 细胞可以通过摇瓶培养物培养、在适合的培养基中以及使得修饰的脂解酶可以表达和/或分离的条件下于实验室或工业发酵罐小规模或大规模发酵(包括连续的、成批的、流加或固态发酵)。培养利用本领域已知的方法发生于适合的营养培养基中, 营养培养基包含碳和氮来源和无机盐(参见, 例如, 细菌和酵母的参考文献; Bennett, J.W.和 LaSure, L., 编辑, 在真菌中的更多基因操作, 学院出版社, CA, 1991)。适合培养基可从商业供给者得到或可以按照所出版的组分制备(例如, 在美国典型培养物保藏中心的目录中)。如果修饰的脂解酶分泌进营养培养基, 脂解酶可以直接从培养基回收。如果修饰的脂解酶不分泌, 它从细胞溶胞产物中

回收。

形成的修饰的脂解酶可以通过本领域已知的方法回收。例如，修饰的脂解酶可以通过常规方法从营养培养基回收，该方法包括但不限于离心、过滤、提取、喷雾干燥、蒸发或沉淀。回收的修饰的脂解酶可以通过各种色谱方法(例如，离子交换色谱法、凝胶过滤色谱、亲和色谱法等)进一步纯化。

本发明的修饰的脂解酶可以通过本领域已知的各种方法纯化，该方法包括但不限于色谱(例如，离子交换、亲和、疏水、色谱聚焦和大小排斥)、电泳方法(例如，制备型等电点聚焦(TEF)、微分溶解性(例如，硫酸铵沉淀)或提取(参见，例如，蛋白质纯化，J.-C. Janson 和 Lars Ryden，编辑，VCH 出版社，纽约，1989)。

在本发明的一个优选的实施方案中，通过培养包含编码前、原或前原形式的亲本脂解酶的 DNA 序列(可存在或不存在于载体上)并回收所形成的形式的脂解酶来将肽添加物使用于亲本酶。

选择宿主细胞、培养条件和/或回收条件以使亲本酶的前、原或前原形式的部分加工发生以导致产生的修饰的脂解酶分子的至少 5%，如至少 10%，如至少 15%，如至少 20%，如至少 25%，如至少 50%或至少 75% 包含所需的序列，如整个前序列或其实质性部分。

本发明的酶组合物

在本发明的另一个方面涉及包含本发明的具有脂解活性酶的酶组合物。

本文所定义的“实质上的纯化的”酶是指这样的酶，该酶实质上无其它同源沾污物(与修饰的脂解酶来源于相同的源的)，例如，最小大约 20% 纯度，优选地至少大约 40% 纯度，更优选地大约 60% 纯度，更优选地大约 80% 纯化的，最优选地大约 90% 纯度，最优选地大约 95% 纯度(通过 SDS-PAGE 测定)。

在某些情况下，宿主细胞不在相同的裂解位点加工所有由该宿主细胞表达的修饰的脂解酶分子，结果是：修饰的脂解酶产物由具有全长肽添加物的一个部分以及仅具有肽添加物一部分的一个或多个部分组成。本发明人发现这不显著影响洗涤性能。因而，尽管不是所有的本发明的酶组合物

的脂解酶可以保持全长肽添加物，酶组合物仍能够发挥所需的作用。实际上，现已发现：只要包含肽添加物的本发明的修饰的脂解酶总量的至少大约 5% 具有如上所述的完整的肽添加物，就可以发现足以提供所需作用。然后修饰的脂解酶分子的余下部分可以具有短于预定的肽添加物的肽添加物（如，后果是一个或多个氨基酸残基被宿主有机体在酶加工期间切除）。因此，本发明的酶组合物仅需要包含至少大约 5%，优选地至少大约 10%，如最小大约 25%，更好的是至少大约 50%，尤其是至少大约 75% 的具有全长添加物的修饰的脂解酶。

当也作为成分在去垢组合物中正常使用时，所说的酶组合物可以进一步包含选自由蛋白酶、纤维素酶、过氧化物酶、角质酶、淀粉酶和/或脂酶组成的组的酶。

已经发现本发明的修饰的脂解酶作为去垢组合物的组分特别有益，所说的组合物例如以下部分所要详细描述洗涤分泌或者餐具洗涤组合物。此外，由于其改进的性质，预期本发明的修饰的脂解酶可以用于例如烘焙工业中，在有机合成中作为催化剂（酯化、酯交换或酯水解反应），用于造纸工业（例如用于除去树脂），用于皮革、羊毛和相关工业（例如脱底物脂，羊皮或羊毛）以及用于涉及脱脂的其它应用中。

去垢剂说明

表面活性剂系统

按照本发明的去垢组合物包含表面活性剂系统，其中所说的表面活性剂选自非离子的和/或阴离子的和/或阳离子的和/或两性的和/或两性离子的和/或半极性的表面活性剂。

表面活性剂典型地以重量的 0.1% 至 60% 的水平存在。

表面活性剂优选地制成与存在于组合物中的酶组分相容的制剂。在液态或凝胶组合物中，表面活性剂最优选地制成制剂以使其促进（至少不降低）在这些组合物中的酶的稳定性。

按照本发明使用的优选的表面活性剂系统包含作为表面活性剂的、本文描述的一种或多种非离子的和/或阴离子的表面活性剂。

非离子去垢剂表面活性剂通常由水溶性聚烷氧烯或单或二烷醇酰胺基团与有机疏水基团组合组成，有机疏水基团源自，例如，烷基苯酚（其中烷

基基团包含大约 6 至大约 12 个碳原子)、二烷基苯酚(其中每个烷基基团包含 6 至 12 个碳原子伯、仲、叔脂肪醇(或其烷基头衍生物)(优选地具有 8 至 20 个碳原子)、在烷基具有 10 至大约 24 个碳原子的单羧酸以及 polyproxylenes。也常见的脂肪酸是单和二烷醇酰胺,其中脂肪酸基团的烷基基团包含 10 至大约 20 个碳原子以及具有 1 至 3 个碳原子的烷基醇基团。可有可无地,在任何单和二烷醇酰胺衍生物中,有聚氧亚烷组分连接后者基团与分子的疏水部分,在任何包含表面活性剂的聚烷氧烯中,聚烷氧烯组分优选地由 2 至 20 个基团的环氧乙烷或环氧乙烷和环氧丙烷基团组成。

聚乙烯、聚丙烯以及烷基酚的聚丁烯氧化物冷凝物适合于用作本发明的表面活性剂系统的非离子表面活性剂,聚环氧乙烷冷凝物是优选的。这些化合物包括烷基酚的缩合产物,所述烷基酚具有包含大约 6 至大约 14 个碳原子,优选地大约 8 至大约 14 个碳原子的烷基基团,以直链或支链与环氧乙烷缀合。在优选的实施方案中,环氧乙烷以相等于每 moles 烷基酚大约 2 至大约 25moles 的量存在,更优选地是从大约 3 至大约 15moles 的环氧乙烷。市售的这种类型的非离子表面活性剂包括 Igepal™ CO-630(由 GAF 公司出售)与 Triton™ X-45、X-114、X-100 与 X-102(所有均由 Rohm & Naas 公司出售)。这些表面活性剂通常作为烷基酚烷氧盐(例如,烷基酚乙氧基化物)。

具有大约 1 至大约 25moles 的环氧乙烷的伯和仲脂族醇的缩合产物适合于作为本发明的非离子表面活性剂系统的非离子表面活性剂。脂肪醇的烷基链可以是直链或支链,伯或仲,通常包含大约 8 至大约 22 个碳原子。优选的是具有包含大约 8 至大约 20 个碳原子(更优选地是大约 10 至大约 18 个碳原子)的烷基的醇的缩合产物(每 moles 醇含有大约 10moles 环氧乙烷。每 moles 醇大约 2 至大约 7moles 环氧乙烷(最优选地是 2 至 5moles 的环氧乙烷)存在于所说的缩合产物中。市售的这种类型的非离子表面活性剂的例子包括 Tergitol™ 15-S-9(C₁₁-C₁₅ 线性醇与 9moles 环氧乙烷的缩合产物)、Tergitol™ 24-L-6 NMW(C₁₂-C₁₄ 伯醇与 6moles 窄分子量范围的环氧乙烷的缩合产物),上述两种均由联合碳化物公司出售; Neodol™ 45-9(C₁₄-C₁₅ 线性醇与 9moles 环氧乙烷的缩合产物)、Neodol™ 23-3(C₁₂-C₁₃ 线性醇与 3.0moles 环氧乙烷的缩合产物)、Neodol™ 45-7(C₁₄-C₁₅ 线性醇与

7moles 环氧乙烷的缩合产物)、 Neodol™ 45-5(C14-C15 线性醇与 5moles 环氧乙烷的缩合产物)(由 Shell 化学公司出售)、 Kyro™ EOB(C13-C15 醇与 9moles 环氧乙烷的浓缩产物)(由 Procter&Gamble 公司出售)、 Genapol LA 050(C12-C14 醇与 5moles 环氧乙烷的缩合产物)(由 Hoechst 出售)。在这些产物中 HLB 优选的范围是 8-11, 最优选的是 8-10。

本发明去垢组合物可以包含非离子物质, 该非离子物质是包含至少 25 个环氧乙烷基团的烷氧化的脂族醇, 优选地包含至少 50 个环氧乙烷, 更优选地包含至少 80 个环氧乙烷基团。

也可以作为本发明的表面活性剂系统的非离子表面活性剂是在美国专利 4,565,647 中公开的烷基多糖, 该烷基多糖具有包含大约 6 至大约 30 个碳原子(优选地是从大约 10 至大约 16 个碳原子)的疏水基团以及多糖(如聚苷), 疏水基团包含大约 1.3 至大约 10(优选地是从大约 1.3 至大约 3, 更优选地是大约 1.3 至大约 2.7)个糖单位。可以使用任何包含 5 或 6 个碳原子的糖, 例如, 葡萄糖、半乳糖和半乳糖部分可以替代葡糖基部分(可有可无地, 疏水基团连接在 2-, 3-, 4-等位置, 这样产生了相对于葡糖苷或半乳糖苷的葡萄糖或半乳糖)。内糖键可以, 例如, 在其它糖单位的一个位置与上述糖单位的 2-, 3-, 4-和/或 6-位置之间。

另一个有用的非离子表面活性剂是糖醛酸的苷、糖醛酸盐或糖醛酸内脂或聚糖醛酸, 该聚糖醛酸具有直链或支链的、饱和或不饱和的、6 至 24 个碳原子的脂族链, 可有可无地包含芳族的、环脂族的、混合的芳族-脂族或聚烷氧烷基, 如 WO 95/10524 所述。

优选的烷基聚苷具有式



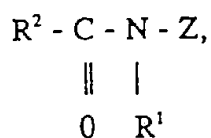
其中 R^2 选自由烷基、苄基、羟烷基、羟烷基及其混合物组成的组, 其中烷基基团包含大约 10 至大约 18、优选地大约 12 至大约 14 个碳原子; n 是 2 或 3, 优选地是 2; t 从 0 至大约 10, 优选地是 0; x 从大约 1.3 至大约 10, 优选地从大约 1.3 至大约 3, 更优选地从大约 1.3 至大约 2.7。糖基优选地源自葡萄糖。要制备这些化合物, 首先形成醇或烷基聚乙氧醇, 然后与葡萄糖或葡萄糖来源进行反应以形成苷(连接在 1-位置)。然后其它的糖基单位可以连接在 1-位置和上述糖基单位 2-, 3-, 4-, 和/或 6-位置之

间, 优选地主要是 2-位置。

通过氧化丙烯与丙二醇浓缩形成的疏水碱基与环氧乙烷的缩合产物也适合作为本发明的其它非离子表面活性剂系统。这些化合物的疏水部分优选地具有大约 1500 至大约 1800 的分子量并表现出水不溶解性。把聚氧乙烯部分添加至这个疏水部分导致提高了该分子作为整体的水溶性, 该产物的液态特征保持在聚氧乙烯含量是缩合产物总重的大约 50%之处, 相应于与大约 40 moles 的环氧乙烷浓缩。这种类型的化合物的例子包括某些市售的 Pluronic™ 表面活性剂(由 BASF 出售)。

也适合于用作本发明的非离子表面活性剂系统的非离子表面活性剂的是环氧乙烷与形成于氧化丙烯和 1,2-乙二胺反应的产物的缩合产物。这些产物的疏水部分由 1,2-乙二胺和过量的氧化丙烯的反应产物组成, 通常具有大约 2500 至大约 3000 的分子量。该疏水部分与环氧乙烷浓缩成至这样的程度, 即缩合产物包含大约 40%至大约 80%重量的聚氧乙烯并具有大约 5,000 至大约 11,000 的分子量。这种类型非离子表面活性剂的例子包括某些市售的 Tetronic™ 化合物的(由 BASF 出售)。

优选地作为本发明的表面活性剂系统的非离子表面活性剂的是烷基酚的聚环氧乙烷缩合物、伯和仲脂族醇与大约 1 至大约 25moles 的环氧乙烷的缩合产物、烷基多糖及其混合物。最优选的是 C₈-C₁₄ 烷基酚乙氧基化物(具有 3 至 15 个乙氧基)和 C₈-C₁₈ 脂肪醇乙氧基化物(优选地是平均为 C₁₀)(具有 2 至 10 个乙氧基)及其混合物。高度优选的非离子表面活性剂是下式的聚羟基脂肪酸酰胺表面活性剂:



其中 R¹ 是 H, 或 R¹ 是 C₁₋₄ 烷基、2-羟乙基、2-羟丙基或其混合物, R² 是 C₅₋₃₁ 烷基, Z 是具有线性烷基链(具有与链直接连接的至少 3 个羟基)的聚羟基烷基或其烷氧化衍生物。优选地, R¹ 是甲基, R² 是直 C₁₁₋₁₅ 烷基或 C₁₆₋₁₈ 烷基或烯基链(如椰子烷基或其混合物), Z 源自还原胺化反应中的还原糖如葡萄糖、果糖、麦芽糖、乳糖。

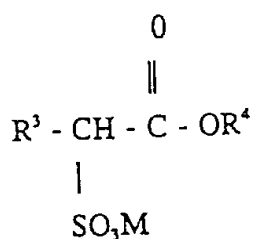
包含烷氧基化的非离子表面活性剂的非离子表面活性剂系统, 所述表

面活性剂具有至少 6 的平均烷基化程度与结构 ANR_1R_2 的二糖醛酰胺, 其中 A 是糖部分, 其是二糖醛酸(除非它不包含通常从醛糖酸上羰基延伸的 OH 基团)。通常可以发现连接在二糖醛酸上的羟基上的 NR_1R_2 。 R_1 与 R_2 可以相同或不同, 是氢原子、脂族烃基团、芳基基团环脂族烃氨基酸酯或醚胺。 R_1 和 R_2 不能都是氢原子(如 WO 95/2770 中所描述的)。

其它所谓的非离子去垢剂化合物包括长链叔胺氧化物、长链叔膦氧化物和二烃基脂族亚砷。

高度优选的阴离子表面活性剂包括烷基烷氧化的硫酸盐表面活性剂, 该表面活性剂是式 $\text{RO(A)}_m\text{SO}_3\text{M}$ 的水溶性的盐或酸, 其中 R 是具有 C_{10} - C_{24} 烷基组分的非取代的 C_{10} - C_{24} 烷基或羟烷基, 优选的是 C_{12} - C_{20} 烷基或羟烷基, 更优选地是 C_{12} - C_{18} 烷基或羟烷基, A 是乙氧基或丙氧基单位, m 大于零, 典型地在大约 0.5 至大约 6 之间, 更优选地在大约 0.5 至大约 3 之间, M 是 H 或阳离子, 可以是, 例如, 金属阳离子(例如, 钠、钾、锂、钙、镁等)、铵或取代铵阳离子。烷基乙氧基化硫酸盐以及烷基丙氧化硫酸盐包括在本文之内。取代的铵阳离子的特定例子包括甲基-、二甲基、三甲基铵阳离子和季铵阳离子, 如四甲基铵和二甲吡啶律阳离子以及源自烷基胺的化合物, 如乙胺、二乙胺、三乙胺及其混合物等。例证性的表面活性剂是 C_{12} - C_{18} 烷基聚乙氧(1.0)硫酸盐(C_{12} - $\text{C}_{18}\text{E}(1.0)\text{M}$)、 C_{12} - C_{18} 烷基聚乙氧(3.0)硫酸盐(C_{12} - $\text{C}_{18}\text{E}(3.0)\text{M}$)、 C_{12} - C_{18} 烷基聚乙氧(2.25)硫酸盐(C_{12} - $\text{C}_{18}\text{E}(2.25)\text{M}$)以及 C_{12} - C_{18} 烷基聚乙氧(4.0)硫酸盐(C_{12} - $\text{C}_{18}\text{E}(4.0)\text{M}$), 其中 M 方便地选自钠和钾。所利用的适合的阴离子表面活性剂是烷基酯硫酸盐表面活性剂(包括 C_8 - C_{20} 羧酸(即脂肪酸)的线性酯), 该阴离子表面活性剂按照“美国石油化学家学会杂志”, 52(1975), 323-329 用气体 SO_3 磺化。适合的开始物质包括天然的脂肪物质, 如源自牛脂、棕榈油等的物质。

优选的烷基酯磺酸盐表面活性剂(具体地说用于洗衣)包含结构式如下的烷基酯磺酸盐表面活性剂:



其中 R^3 是 C8-C20 烃基, 优选地是烷基或其组合, R^4 是 C_1 - C_6 烃基, 优选地是烷基或其组合, M 是与烷基酯磺酸盐形成水溶性盐的阳离子。适合的形成盐的阳离子金属(如钠、钾和锂)与取代或非取代铵阳离子(如一乙醇胺、二乙醇胺和三乙醇胺)。优选地, R^3 是 C_{10} - C_{16} 烷基, R^4 是甲基、乙基或异丙基。尤其优选的是甲酯磺酸盐, 其中 R^3 是 C_{10} - C_{16} 烷基。

其它适合的阴离子表面活性剂包括烷基硫酸盐表面活性剂, 该表面活性剂是式 $ROSO_3M$ 的水溶性盐或酸, 其中 R 优选地是 C_{10} - C_{24} 烃基, 优选地是具有 C_{10} - C_{20} 烷基组分的烷基或羟烷基, 更优选地是 C_{12} - C_{18} 烷基或羟烷基, M 是 H 或阳离子, 例如, 碱金属阳离子(如钠、钾、锂)或铵或取代铵(如甲基-、二甲基-和三甲基铵阳离子)与季铵阳离子(如四甲基铵和二甲基吡啶阳离子以及源自烷基胺的化合物, 如乙胺、二乙胺、三乙胺及其混合物等)。典型地, C_{12} - C_{16} 的烷基链对于较低的洗涤温度(如低于大约 50°C)是优选的, C_{16} - C_{18} 的烷基链对于叫高洗涤温度(如高于 50°C)是优选的。

用于洗涤目的之其它阴离子表面活性剂也可以包括在本发明的洗衣去垢组合物中。这些组合物可以包括肥皂的盐(包括, 例如, 钠、钾、铵以及取代铵盐, 如一-、二-和三乙醇胺盐)、 C_8 - C_{22} 伯或仲烷烃磺酸盐、 C_8 - C_{24} 烯属磺酸酯、磺化聚羧酸(通过碱土金属柠檬酸的吡啶化的产物的磺酸化制备, 例如, 如在 GB 1,082,179 中所描述的)、 C_8 - C_{24} 烷基聚乙二醇酯硫酸盐(包含多达 10moles 的环氧乙烷); 烷基甘油磺酸盐、脂肪酰基甘油磺酸盐、脂肪油酰甘油硫酸盐、烷基酚环氧乙烷醚硫酸盐、石蜡磺酸盐、烷基磷酸盐、羟乙基磺酸盐(如酰基羟乙基磺酸盐、烷氧基羧酸的羟乙基磺酸盐酯(如在 WO 95/14661 中所描述的)、N-酰基 taurates、烷基琥珀酰胺酸酯和磺基琥珀酸酯、磺基琥珀酸酯单酯(尤其是饱和的与不饱和的 C_{12} - C_{18} 单酯)和磺基琥珀酸酯二酯(尤其是饱和的与不饱和的 C_6 - C_{12} 二酯)、酰基肌氨酸盐、油酰肌氨酸盐、烷基多糖硫酸盐(如烷基多葡萄糖苷硫酸盐(下述的非离子非硫酸盐化的化合物)、支链伯烷硫酸盐以及烷基聚乙氧羧酸盐(如式 $RO(CH_2CH_2O)_k-CH_2COO-M^+$ 的羧酸盐, 其中 R 是 C_8 - C_{22} 烷基, k 是 1 至 10 的整数, M 是可溶性成盐阳离子)。树脂酸和氢化树脂酸也是适合的, 如存在于或源自妥尔油的松香、氢化松香以及树脂酸和氢化树脂酸。烷基苯磺酸盐是高度优选的, 尤其是线形烷基苯磺酸盐(LAS), 其中烷基优选地

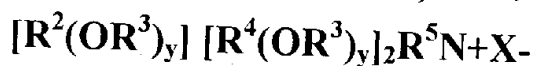
包含 10 至 18 个碳原子。

其它例子在“表面活性剂和洗涤剂”(第 I 和 II 卷, Schwartz、Perry 和 Berch)中描述。各种这样的表面活性剂通常在美国专利 3,929,678(23 列、58 行至 29 列 23 行)中公开。

当包括在其中时,本发明的洗衣去垢组合物典型地包含重量的大约 1% 至大约 40%, 优选地包含大约 3% 至大约 20% 的阴离子表面活性剂。

本发明的洗衣去垢组合物也可以包含阳离子的、两性的、两性离子的和半极性的表面活性剂以及不同于本文已经描述的表面活性剂的非离子和/或阴离子表面活性剂。

适合于本发明的洗衣去垢组合物的阳离子洗涤剂表面活性剂是具有一条长链烷基的表面活性剂。这样的阳离子表面活性剂的例子包括铵表面活性剂(如烷基三甲基铵卤化物)以及具有下式的表面活性剂:



其中 R^2 是在烷基链中具有大约 8 至大约 18 个碳原子的烷基或烷基, 每个 R^3 选自由 $-CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH(CH_3)-$ 、 $-CH_2CH(CH_2OH)-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2-$ 及其混合物组成的组; 每个 R^4 选自由 C_1-C_4 烷基、 C_1-C_4 羟烷基、通过连接两个 R^4 基团所形成的苺基环、 $-CH_2CHOHCHOHCOR^6CHOHCH_2OH$ (其中当 y 不是 0 时, R^6 是具有分子量小于大约 1000 的任何己糖或己糖聚合物以及氢)组成的组; R^5 与 R^4 相同或是烷基链, 其中碳原子的总数或 R^2 加 R^5 大于大约 18; 每个 y 是 0 至大约 10, y 值的总数是 0 至大约 15; X 是任何相容的阴离子。

高度优选的阳离子表面活性剂是在本发明化合物中使用的、具有下式的水溶性季铵化合物:



其中 R_1 是 C_8-C_{16} 烷基, R_2 、 R_3 与 R_4 独立地是 C_1-C_4 烷基、 C_1-C_4 羟烷基、苺基与 $-(C_2H_4)_xH$ (其中 x 值为 2 至 5, 而且 X 是阴离子。 R_2 、 R_3 或 R_4 小于一个应该是苺基。

R_1 优选的烷基链长度是 $C_{12}-C_{15}$, 特别是当烷基是源自椰子或棕榈核脂肪的链长的混合物或合成地源自烯烃增大或 OXO 醇合成时。

R_2R_3 和 R_4 优选的基团是甲基和羟乙基基团, 阴离子 X 可以选自卤化

物、甲氧硫酸盐、醋酸盐和磷酸盐离子。本文使用的适合的式(i)的季铵化合物的例子是:

椰子三甲基氯化或溴化铵;
椰子甲基二羟乙基氯化或溴化铵;
癸基三乙基氯化铵;
癸基二甲羟乙基氯化或溴化铵;
C₁₂₋₁₅ 二甲基羟乙基氯化或溴化铵;
椰子二甲基羟乙基氯化或溴化铵;
肉豆蔻基三甲铵甲基硫酸盐;
月桂基二甲基苄基氯化或溴化铵;
月桂基二甲基(乙烯氧基)₄ 氯化或溴化铵;
胆碱酯(式(i)的化合物, 其中 R₁ 是
-CH₂-CH₂-O-C(=O)-C₁₂₋₁₄ 烷基, R₂R₃R₄ 是甲基)。

二烷基咪唑啉[式(i)的化合物]。

本文使用的其它阳离子表面活性剂也在美国专利 4,228,044 和 EP 000 224 中描述。

当包括在其中时, 本发明的洗衣去垢组合物典型地包含重量的大约 0.2% 至大约 25%, 优选地包含大约 1% 至大约 8% 的阳离子表面活性剂。

两性表面活性剂也适用于本发明的洗衣去垢组合物。这些表面活性剂可以广义地描述为仲或叔胺的脂族衍生物或杂环仲和叔胺的脂族衍生物, 其中脂族基团可以是直链或支链。一个脂族取代基包含至少大约 8 个碳原子, 典型地包含大约 8 至大约 18 个碳原子, 至少一个包含阴离子水增溶基团(如羧基、磺酸盐、硫酸盐)。参见美国专利 3,929,678(19 列, 18-35 行)两性表面活性剂的例子。

当包括在其中时, 本发明的洗衣去垢组合物典型地包含重量的大约 0.2% 至大约 15%, 优选地包含大约 1% 至大约 10% 的两性表面活性剂。

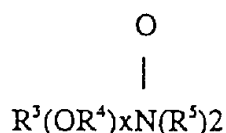
两性离子表面活性剂也适用于本发明的洗衣去垢组合物。这些表面活性剂可以广义地描述为仲或叔胺的衍生物、杂环仲和叔胺的脂族衍生物或季铵、季磷律或叔铈律化合物的衍生物。参见美国专利 3,929,678(19 列,

18-35 行)两性离子表面活性剂的例子。

当包括在其中时, 本发明的洗衣去垢组合物典型地包含重量的大约 0.2% 至大约 15%, 优选地包含大约 1% 至大约 10% 的两性表面活性剂。

半极性非离子表面活性剂是非离子表面活性剂的特定类别, 该类别包括水溶性胺氧化物(该水溶性胺氧化物包含一个从 10 至大约 18 碳原子的烷基部分和 2 个选自由包含大约 1 至大约 3 个碳原子烷基和羟烷基组成的组的部分); 水溶性磷化氢氧化物(该水溶性磷化氢氧化物包含一个从 10 至大约 18 碳原子的烷基部分和 2 个选自由包含大约 1 至大约 3 个碳原子烷基和羟烷基组成的组的部分); 水溶性亚砷(该水溶性亚砷包含一个从 10 至大约 18 碳原子的烷基部分和一个选自由包含大约 1 至大约 3 个碳原子烷基和羟烷基组成的组的部分)。

半极性非离子去垢剂表面活性剂包括具有下式的氧化胺表面活性剂:



其中 R^3 是包含大约 8 至大约 22 碳原子的烷基、羟烷基或烷基苯基或其混合物; R^4 是包含大约 2 至大约 3 个碳原子的亚烷基或羟亚烷基或其混合物; x 是 0 至大约 3; 每个 R^5 是包含大约 1 至大约 3 个碳原子的烷基或羟烷基或包含大约 1 至 3 个环氧乙烷基团的聚环氧乙烷基团。 R^5 基团可以相互连接(例如, 通过氧或氮原子)以形成环状结构。

具体地说这些胺氧化物表面活性剂包括 C_{10} - C_{18} 烷基二甲胺氧化物与 C_8 - C_{12} 烷氧乙基二羟乙基胺氧化物。

当包括在其中时, 本发明的洗衣去垢组合物典型地包含重量的大约 0.2% 至大约 15%, 优选地包含大约 1% 至大约 10% 的两性表面活性剂。

助洗剂系统

按照本发明的组合物还可以包含助洗剂系统。任何常规的助洗剂系统适用于本文, 包括硅铝酸盐物质、硅酸盐、聚羧酸盐和脂肪酸乙基、如亚乙二胺四乙酸盐的物质、金属离子螯合剂(如氨基聚磷酸盐, 具体地说是亚乙二胺四亚甲基膦酸和二亚乙基三胺五亚甲基膦酸。本文也可以利用磷酸

盐助洗剂, 例如, 焦磷酸、正磷酸盐或多磷酸盐。

适合助洗剂可以是无机离子交换物质, 一般是无机水合的硅铝酸盐物质, 更具体地说是水合合成沸石(如水合沸石 A、X、B、HS 或 MAP)。另一个适合的无机助洗剂物质是层硅酸盐, 如 SKS-6(Hoechst)。SKS-6 是由硅酸钠组成的结晶层硅酸盐($\text{Na}_2\text{Si}_2\text{O}_5$)。

包含羧基的适合聚羧酸盐包括乳酸、乙醇酸及其醚衍生物(如在 BE 831,368、BE 821,369 和 BE 521,370 中公开的)。包含两个羧基的聚羧酸盐包括琥珀酸、丙二酸、(亚乙二氧基)双乙酸、马来酸、二乙醇酸、酒石酸、丙醇二酸和富马酸的水溶性盐以及醚羧化物(在 DE 2,446,686、DE 2,446,487、美国专利 3,935,257 中描述)、亚硫酰基羧化物(在 BE 840,623 中描述)。包含三个羧基的聚羧酸盐包括, 具体地说, 水溶性柠檬酸盐、乌头酸盐和柠康酸盐以及琥珀酸衍生物(如在 GB 1,379,241 中所描述的羧甲氧琥珀酸盐、在 NL 申请 7205873 中所描述的乳氧琥珀酸盐和在 GB 1,387,447 中所描述的氧聚羧酸盐物质, 如 2-草酸-1,1,3-丙烷三羧酸盐。

包含四个羧基的聚羧酸盐包括在 GB 1,261,829 中公开的氧二琥珀酸盐, 1,1,2,2-乙烷四羧酸盐、包含硫取代基的 1,1,3,3-丙烷四羧酸盐, 包括在 GB 1,398,421、GB 1,398,422 与美国专利 3,936,448 中公开的硫代琥珀酸盐衍生物以及在 GB 1,082,179 中所描述的磺化热解的柠檬酸, 同时包含磷酸取代基的聚羧酸盐在 GB 1,439,000 中公开。

脂环和杂环聚羧酸盐包括环戊烷-顺、顺-顺-四羧化物、环 pentadienide、五羧化物、2,3,4,5-四氢呋喃-顺、顺, 顺-四羧化物、2,5-四氢呋喃-顺、二羧化物、2, 2, 5, 5-四氢呋喃-四羧化物、1,2,3,4,5,6-己烷-六羧化物以及多羟乙醇(如山梨醇、甘露糖醇和木糖醇)的羧甲基衍生物。芳族聚羧酸盐包括在 GB 1,425,343 中公开的苯六羧酸、均苯四酸、邻苯二甲酸衍生物。在上述物质中, 优选的聚羧酸盐是每分子多达三个羧基的羧酸盐, 更具体地说是柠檬酸。

用于本发明的组合物的优选的助洗剂系统包括水不溶性硅铝酸盐助洗剂(如沸石或层硅酸盐(SKS-6)与水溶性羧酸盐螯合剂(如柠檬酸)的混合物。

包括在按照本发明的去垢组合物中的适合螯合剂是亚乙基二胺-N,N'-

二琥珀酸(EDDS)或其碱金属、土金属、铵或取代铵盐或其混合物。优选的EDDS化合物是游离酸形式及其钠或镁盐。EDDS的这样的优选的钠盐的例子包括 Na_2EDDS 和 Na_4EDDS 。EDDS的这样的优选的镁盐的例子包括 MgEDDS 和 Mg_2EDDS 。镁盐是包括在按照本发明的组合物中最优选的。

优选的助洗剂系统包括水不溶性硅铝酸盐助洗剂(如沸石 A)和水溶羧酸盐螯合剂(如柠檬酸)的混合物。

可以形成用于粒状组合物的助洗剂系统的部分的其它助洗剂物质包括无机物质(如碱金属碳酸盐、碳酸氢盐、硅酸盐)和有机物质(如有机磷酸盐、氨基聚亚烷基磷酸盐和氨基聚羧酸盐)。

其它适合的水溶性有机盐是高-或共聚合酸或其盐,其中聚合羧酸包括至少两个通过不超过两个碳原子相互分离的羧基。

这种类型的聚合物在 GB-A-1,596,756 中公开。这样的盐的例子是 MW 2000-5000 的聚丙烯酸酯及其与马来酐的共聚物,这样的共聚物具有 20,000 至 70,000 的分子量,具体地说是大约 40,000。

去垢助洗剂盐通常以组合物重量的 5%至 80%的量包括。用于液体洗涤剂的助洗剂的优选的水平是 5%至 30%。

酶

优选的去垢组合物除了本发明的酶之外还包含其它酶,这些酶提供了清洁性能和/或织物护理益处。这样的酶包括蛋白酶、脂酶、角质酶、淀粉酶、纤维素酶、过氧化物酶、氧化酶(如漆酶)。

蛋白酶: 可以使用任何在碱性溶液中的蛋白酶。适合的蛋白酶包括动物、织物或微生物来源的蛋白酶。微生物来源是优选的。本发明包括化学或遗传修饰的突变体。蛋白酶可以是丝氨酸蛋白酶,优选地是碱性微生物蛋白酶或类胰蛋白酶蛋白酶。碱性蛋白酶的例子是枯草溶菌素,具体地说是源自芽孢杆菌属的枯草溶菌素,例如,枯草溶菌素 Novo、枯草溶菌素 Carlsberg、枯草溶菌素 309、枯草溶菌素 147 和枯草溶菌素 168(在 WO 89/06279 中描述)。类胰蛋白酶的蛋白酶的例子是在 WO89/06270 中描述的胰蛋白酶(如猪或牛来源)以及新月菌素蛋白酶。优选的市售蛋白酶包括以商品名 Alcalase、Savinase、Primase、Durazym 和 Esperase 由 Novo

Nordisk A/S(Denmark)出售的蛋白酶、以商品名 Maxatase、Maxacal、Maxapem 和 Properase 由 Gist-Brocade/Genencor 出售的蛋白酶、以商品名 Purafect 和 Purafect OXP 由国际 Genencor 出售的蛋白酶以及以商品名 Opticlean 和 Optimase 由 Solvay 酶出售的蛋白酶。蛋白酶可以以组合物重量 0.0001% 至 2% 酶蛋白质的水平(具体地说以组合物重量的 0.001% 至 1% 的酶蛋白质的水平)掺入本发明的组合物。

脂酶: 可以使用任何适用于碱性溶液的脂酶。适合的脂酶包括细菌来源或真菌来源的脂酶和化学或遗传修饰的脂酶突变体。

有用的脂酶的例子包括 *Humicola lanuginosa* 脂酶(例如, 在 EP 258 068 和 EP 305 216 中所描述的)及其突变体(在 WO 92/05249、WO 95/22615、WO 94/25577 中描述的)、*Rhizomucor miehei* 脂酶(如在 EP 238 023 中所描述 D)、假丝酵母属脂酶(如 *C. antarctica* 脂酶, 例如在 EP 214 761 中描述的 *C. antarctica* 脂酶 A 或 B)、假单胞菌属脂酶(如产碱假单胞菌以及类产碱假单胞菌脂酶, 例如, 在 EP 218 272 中所描述的)或所说的假单胞菌属脂酶的任何突变体、洋葱伯克霍尔德氏菌脂酶(例如, 在 EP 331 376 中所描述的)、施氏假单胞菌(*P. stutzeri*)脂酶(例如, 在 BP 1,372,034 中公开的)、荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)脂酶、芽孢杆菌属脂酶(例如, 枯草杆菌脂酶(Dartois 等, (1993), Biochemica et Biophysica Acta 1131, 253-256)、嗜热脂肪芽孢杆菌脂酶(JP 64/744992)以及短小芽孢杆菌脂酶(WO 91/16422)。而且, 许多克隆的脂酶的有用的, 包括由 Yamaguchi 等, (1991), 基因 103, 61-67 描述的沙门柏干酪青霉脂酶、白地霉(*Geotricum candidum*)脂酶(Schimada, Y.等, (1989), 生物化学杂志, 106, 383-388)以及各种根霉属脂酶(如 *R. delemar* 脂酶(Hass, M. J 等, (1991), 基因 109, 117-113)、雪白根霉脂酶(Kugimiya 等, (1992), 生物科学生物技术生物化学, 56, 716-719)和米根霉脂酶。

其它类型的脂解酶(如角质酶)也可以是有用的, 例如, 源自门多萨假单胞菌的脂酶(如在 WO 88/09367 中所描述的)、或源自腐皮镰孢的角质酶(如在 WO 90/09446 中所描述的)。尤其适合的脂酶是下述脂酶, 如 M1 LipaseTM、Luma fastTM 和 LipomaxTM(Gist-Broca-des/Genencor)、LipolaseTM 和 Lipolase UltraTM(Novo Nordisk A/S) 以及脂酶

P“Amano”(Amano 药学有限公司)。

脂酶通常以去垢组合物重量 0.0001% 至 2% 酶蛋白质的水平(具体地说以组合物重量的 0.001% 至 1% 的酶蛋白质水平)掺入本发明的组合物。

淀粉酶: 可以使用任何适用于碱性溶液的淀粉酶(a 和/或 b)。适合的淀粉酶包括细菌或真菌来源的淀粉酶。本发明也包括体化学或遗传修饰的突变体。淀粉酶包括, 例如, 获自地衣形芽孢杆菌特定菌株的 α -淀粉酶(在 GB 1,296,839 中更详细地描述)。市售的淀粉酶是 DuramylTM、TermamylTM、FungamylTM 和 BANTM(可从 Novo Nordisk A/S 得到)和 RapidaseTM以及 Maxamyl PTM(可从 Gist-Brocades/Genencor 得到)。

淀粉酶通常以去垢组合物重量 0.0001% 至 2% 酶蛋白质的水平(具体地说以组合物重量的 0.001% 至 1% 的酶蛋白质水平)掺入本发明的组合物。

纤维素酶: 可以使用任何适用于碱性溶液的纤维素酶。适合的纤维素酶包括细菌或真菌来源的纤维素酶。本发明也包括体化学或遗传修饰的突变体。适合的纤维素酶在美国专利 4,435,307 中公开, 它公开了产自 *Humicola insolens* 的真菌纤维素酶。尤其适合的纤维素酶是具有颜色护理益处的纤维素酶。这样的纤维素酶的例子是在出版的欧洲专利申请 0495257 中描述的纤维素酶。市售的纤维素酶是由 *Humicola insolens* 菌株产生的 CelluzymeTM (Novo Nordisk A/S)和 KAC-500(B)TM (Kao 公司)。

所说的纤维素酶通常以去垢组合物重量 0.0001% 至 2% 酶蛋白质的水平(具体地说以组合物重量的 0.001% 至 1% 的酶蛋白质水平)掺入本发明的组合物。

过氧化物酶/氧化酶: 过氧化物酶和/或氧化酶与过氧化氢或氧源(例如过碳酸盐、过硼酸盐、过硫酸盐、过氧化氢、氧等)组合使用。它们用于“溶液漂白”, 即当所说的纺织品在洗液中共同洗涤时, 防止纺织品染料从染色的织物转移到其它织物上, 优选地与在例如, WO 95/01426 和 WO 94/12621 所描述的增强剂一起。这些类型的适合的过氧化物酶/氧化酶包括植物、细菌或真菌来源的酶。本发明也包括化学或遗传修饰的突变体。

所说的过氧化物酶和/或氧化酶通常以去垢组合物重量 0.0001% 至 2% 酶蛋白质的水平(具体地说以组合物重量的 0.001% 至 1% 的酶蛋白质水平)掺入去垢组合物。

以上提及的酶的混合物包括在本文之内，特别是蛋白酶、淀粉酶、脂酶和/或纤维素酶的混合物。

可有可无的去垢剂成分

漂白剂：可以包括在本发明的去垢组合物中的其它可有可无的去垢剂成分包括漂白剂，如 PB1、PB4 和过碳酸盐，其粒子大小为 400-800 微米。这些漂白剂组分可以包括一种或多种氧漂白剂以及一种或多种漂白激活剂（取决于所选择的漂白剂。如果存在，氧漂白化合物典型地以大约 1% 至大约 25% 的水平存在。

这里使用的漂白剂组分可以是对去垢组合物有用的任何漂白剂，包括氧漂白剂以及本领域已知的其它漂白剂。

适于本发明的漂白剂可以是活化的或者非活化的漂白剂。

可被使用的一种类型的盐漂白剂包括过羧酸漂白剂和其盐。这类药剂的适合的例子包括一过氧邻苯二甲酸镁六水合物、间-氯代-过苯甲酸镁盐、4-壬氨基-4-羧基过氧丁酸和二过氧十二烷二酸。这样的漂白剂在美国专利 4,483,781、美国专利 740,446、EP 0 133 354 和美国专利 4,412,934 中公开。高度优选的漂白剂也包括在美国专利 4,634,551 中描述的 6-壬氨基-6-羧基过氧己酸。

另一类漂白剂的包括卤素漂白剂。hypohalite 漂白剂的例子，例如，包括三氯异氰尿酸以及钠和钾二氯异氰尿酸盐、N-氯代和 N-溴代链烷磺胺。这样的物质通常以最终产物重量的 0.5-10% 添加，优选地是重量的 1-5%。

过氧化氢释放剂可以与漂白活化剂（如四乙酰亚乙基二胺(TAED)、壬酰氧苯磺酸盐(NOBS，在美国专利 4,412,934 中描述)、3,5-三甲基己聚糖醇氧苯磺酸盐(ISONOBS，在 EP 120 591 中描述)或五乙酰葡萄糖(PAG))结合使用，所述漂白活化剂被水解形成作为活性漂白种类的过酸，导致提高的漂白效果。另外，十分适合的是漂白活化剂 C8(6-辛酰氨基己酰)氧苯磺酸盐、C9(6-壬二酸酰氨基己酰)氧苯磺酸盐和 C10(6-癸酰氨基己酰)氧苯磺酸盐或其混合物。也适合的活化剂是酰化的柠檬酸酯，如在欧洲专利申请 91870207.7 中公开的。

有用的漂白剂包括过氧酸和漂白系统（包含用于按照本发明的清洁组合

物的漂白活化剂和过氧漂白化合物), 如在申请 USSN 08/136,626 中所描述的。

季亚胺盐可以与过氧原一起用作漂白催化剂, 如在 WO 95/13352 中所描述的。

过氧化氢也可以通过添加酶促系统(即酶及其底物)而存在, 该酶促系统在洗涤和/或冲洗过程开始时或在其期间能够产生过氧化氢。这样的酶促系统在出版的 EP 专利申请 0537381 中公开。

从过氧漂白来源释放过酸可以通过使用本发明的脂酶活化。用于酶促水解系统的必要组分是过酸前体底物: 二酰基过氧化物 $R_1\text{-CO-O-O-CO-R}$, 其中 R 和 R_1 可以是饱和或不饱和的烷基、芳基或烷芳基。在洗涤中脂酶与底物进行反应并释放过酸。

非水液体去垢组合物可以包括过氧酸类物质, 例如包括 WO 95/06104 中所描述的 N,N'-二(4-过羧基苯甲酰基)乙二胺(PCBED)、N,N'-对苯二酰-二(6-氨基过羧基己酸)(TPCAP)、N,N'-二(4-过羧基苯甲酰基)哌嗪(PCBPIP)、N,N'-二(4-过羧基苯甲酰基)-1,4-二氨基环己烷(PCBHEX)、N,N'-二(4-过羧基苯甲酰基)-1,4-丁二胺(PCBBD)、N,N'-二(4-过羧基苯胺)-对苯二酸盐(DPCAT)、N,N,N',N'-1,2,4,5-四羧基苯甲酰基-二(6-氨基过羧基己酸)(DiPAP)、N,N'-二(过羧基-己二酰)苯二胺(DPAPD)、N,N'-琥珀酰基-二(4-过羧基)苯胺(SDPCA)、N,N'-Terephthaloyl-二-(8-氨基过氧辛酸的 C3 类似物(TPOCT)。

不是氧漂白剂的漂白剂在本领域也是已知的。特别有益的一种类型的非氧漂白剂包括光激活的漂白剂, 例如磺化的锌和/或铝酞菁染料。这些物质在洗涤过程中可以沉积在底物上。一旦在氧存在下受到光照射(例如白天将衣物晾干时), 磺化的锌和酞菁染料就被活化, 由此底物被漂白。在 US 4,033,718 中描述了优选的锌酞菁染料和光活化漂白法。典型地, 去垢组合物含有约 0.025%到约 1.25%(重量)的磺化的锌酞菁染料。

漂白剂也可以包括锰催化剂。锰催化剂可以, 例如, 是在“低温漂白有效的锰催化剂”, 自然 369, 1994, 637-639 中所描述的化合物之一。

抑泡剂: 另一个可有可无的组成部分是抑泡剂, 举例来说是有有机硅氧聚合物与硅石-硅氧烷混合物。有机硅氧聚合物通常可以由烷基化的聚硅氧

烷物质代表，而硅石通常以细分形式通过各种类型的硅气凝胶、干凝胶和疏水硅石以例说明。这些物质可以作为微粒掺入，其中抑泡剂优选地可释放地掺入水溶性或水可分散性、实质上非表面活性去垢剂不可通过的载体。另外，可以将抑泡剂溶解或分散在液态载体中，并通过喷雾到一个或多个其它组分上应用。

优选的硅氧烷泡沫控制剂在美国专利 3,933,672 中公开。其它特别有用的抑泡剂是自身乳化的硅氧烷抑泡剂(在 2,646,126 中描述)。这样的化合物的例子是 DC-544，由 Dow Corning 市售，它是硅氧烷-乙二醇共聚物。尤其优选的泡沫控制剂是包含硅氧烷油与 2-烷基-链烷醇的混合物的抑泡剂系统。适合的 2-烷基-链烷醇的 2-丁基-辛醇(以商品名 Isofol 12R 出售)。

这样的抑泡剂系统在出版的欧洲专利申请 0593841 中描述。

特别优选的硅氧烷泡沫控制剂在出版的欧洲专利申请 0573699 中描述。所说的组合物可以包含与烟雾的非多孔硅石 Aerosil^R 结合的硅氧烷/硅石混合物。

以上所述的抑泡剂通常以组合物重量的 0.001% 至 2% 的水平使用，优选地是重量的 0.01% 至 1%。

其它组分：可以使用其它用于去垢组合物的组分，如土悬浮剂、土释放剂、荧光增白剂、研磨剂、杀菌剂、光泽失去抑制剂、着色剂和/或胶囊化的或非胶囊化的香料。

尤其适合的胶囊化物质是水溶性胶囊，该胶囊由在 GB 1,464,616 中描述的多糖和聚羟基化合物的基质组成。

其它适合的水溶性胶囊化物质包括源自取代的二羧酸的未凝胶化的淀粉酸酯的糊精，如在美国专利 3,455,838 中所描述的。这些酸酯糊精优选地制备自这样的淀粉，如蜡状玉米、蜡状高粱、西米、木薯淀粉和马铃薯。所说的胶囊化物质的适合例子包括由 National Starch 制造的 N-Lok。N-Lok 胶囊化物质是由修饰的玉米淀粉和葡萄糖组成。淀粉通过添加单功能的取代基团(如辛烯基琥珀酸酐)修饰。

本文适合的抗再沉积和土壤悬浮剂包括纤维素衍生物如甲基纤维素、羧甲基纤维素和羟乙基纤维素、高-或共-聚合聚羧酸或其盐。这种类型的聚合物包括聚丙烯酸酯和马来酐-丙烯酸共聚物，例如，Sokalan CP5(前面作

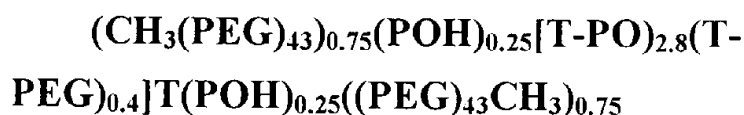
为助洗剂提到)以及乙烯与马来酐的共聚物、甲代乙烯基醚或异丁烯酸、构成至少百分之20mole共聚物的马来酐。这些物质通常以组合物重量的0.5%至10%的水平使用,更优选地的0.75%至8%,最优选地是1%至6%。

优选的荧光增白剂特征是阴离子的,其例子是4,4'-双(2-二醇氨基-4-苯胺-s-三嗪-6-基氨基)二苯乙烯-2:2'二磺酸二钠、4,4'-双(2-吗啉-4-苯胺-s-三嗪-6-基氨基-二苯乙烯-2:2'二磺酸二钠、4,4'-双(2,4-二苯胺-s-三嗪-6-基氨基)二苯乙烯-2:2'二磺酸二钠、4',4''-双(2,4-二苯胺-s-三嗪-6-基氨基)二苯乙烯-2-磺酸单钠、4,4'-双(2-苯胺-4-(N-甲基-N-2-羟乙氨基)-s-三嗪-6-基氨基)二苯乙烯-2,2'二磺酸二钠、4,4'-双(4-苯基-2,1,3-三唑-2-基)-二苯乙烯-2,2'二磺酸二钠、4,4-双(2-苯胺-4-(1-甲基-2-羟乙氨基)-s-三嗪-6-基氨基)二苯乙烯-2,2'二磺酸二钠、2(stilbyl-4''-(萘酰-1',2':4,5)-1,2,3-三唑-2''磺酸钠以及4,4'-双(2-硫代苯乙烯基)联苯。

其它有用的聚合物是聚乙二醇,具体地说是分子量为1000-10000的聚乙二醇,更具体地说是2000至8000,最优选地是4000。这些以重量的0.25%至2.5%的水平利用,更优选地是0.20%至5%。这些聚合物与以前所论及的高-或共-聚合聚羧酸盐用于改进白色保养、织物灰沉积和对粘土、蛋白质和可氧化的土壤(以过渡金属元素杂质存在)清洁性能是有价值的。

也可以利用在WO 95/22593中所描述的接枝聚合物。

在本发明的组合物中有用的土壤释放剂通常是对苯二甲酸与亚乙基二醇和/或聚乙二醇单位以不同形式形成的共聚物或三元共聚物。这样的聚合物的例子在美国专利4,116,885、美国专利4,711,730和EP 0 272 033中公开。按照EP 0 272 033的尤其优选的聚合物具有式:



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

也十分有用的是作为下列物质的随机共聚物的修饰聚酯:二甲基对苯二甲酸盐、二甲基硫代异邻苯二甲酸盐、亚乙基二醇和1-2丙烷二酚、由在第一位的硫代苯甲酸盐和在第二位的亚乙基二醇和/或丙烷二酚的单酯组成的末端基团。目的在于获得在其两个末端由硫代苯甲酸盐基团,“第一位的”盖住的聚合物,在本发明的上下文中,本文所说的大多数共聚物由硫代苯甲

酸盐基团在末端覆盖。然而，某些共聚物不是完全覆盖的，因此其末端基团可以由和/或丙烷 1-2 二酚的单酯组成，其“第二位地”由这样的种类组成。

本文选择的聚酯包含重量的大约 46%的二甲基对苯二甲酸、重量的大约 16%的丙烷的-1,2 二酚、重量的大约 10%的亚乙二醇、重量的大约 13%的二甲基硫代苯甲酸、重量的大约 15%的硫代间苯二甲酸，并具有大约 3,000 的分子量。聚酯及其制备方法在 EP 311 342 中详尽地描述。

软化剂：按照本发明，织物软化剂也可以掺入洗衣去垢组合物中。这些药剂可以是无机或有机的。无机软化剂通过在 GB-A-1 400898 和美国专利 5,019,292 中公开的近晶粘土以例说明。有机织物软化剂包括如在 GB-A1 514 276 和 EP 0 011 340 中公开的水不溶性叔苯胺类及其与在 EP 026 528 中公开的单 C12-C14 季铵盐以及在 EP 0 242 919 中公开的二长链酰胺的组合物。其它有用的织物软化系统的有机成分包括在 EP 0 299 575 和 0 313 146 中公开的高分子量的聚环氧乙烷物质。

近晶粘土的水平通常在 5%至 15%的范围内，更优选地是重量的 8%至 12%，以及作为干燥的混合组分添加至制剂的其余部分的物质。有机织物软化剂(如水不溶性叔苯胺类或二长链酰胺物质)以重量的 0.5%至 5%的水平掺入，通常是重量的 1%至 3%，而高分子量的环氧乙烷物质与水溶性阳离子物质以重量的 0.1%至 2%的水平添加，通常是重量的 0.15%至 1.5%。这些物质通常添加至组合物的喷雾干燥部分，虽然在某些实例中，可以更方便地作为干燥的混合微粒添加它们，或作为熔化的液体喷雾到组合物的其它组分中。

聚合染料转移抑制剂：按照本发明的去垢组合物也可以包含重量的 0.001%至 10%、优选地是 0.01%至 2%、更优选地是 0.05%至 1%的聚合染料转移抑制剂。所说的聚合染料转移抑制剂通常掺入洗涤组合物以抑制染料从彩色织物上转移至所洗涤的织物上。这些洗涤聚合物在染料有机会吸附到洗涤的其它织物前有能力复合或吸附从染色织物洗出的游离染料。

尤其适合的聚合染料转移抑制剂是多胺 N-氧化物聚合物、N-乙烯吡咯烷酮和 N-乙烯咪唑的共聚物、聚乙烯吡咯烷酮聚合物、聚乙烯吡咯烷酮聚合物、聚乙烯卓唑烷酮、聚乙烯咪唑或其混合物。添加这样的聚合物也

提高了按照本发明的酶的性能。

按照本发明的去垢组合物可以是液体、糊状物、凝胶、棒状物或粒状形式。非尘状粒剂可以如在美国专利 4,106,991 和 4,661,452(均属于 Novo Industri A/S) 公开的方法产生并可有无地按照本领域已知的方法包衣。蜡状表面盖覆剂的例子是具有 1000 至 20000 的平均分子量的聚(环氧乙烷)产物(聚乙二醇, PEG); 具有 16 至 50 个环氧乙烷单位的乙氧基化的壬酚; 乙氧基化的脂肪醇(其中所说的醇包含 12 至 20 个碳原子, 其中具有 15 至 18 个环氧乙烷单位); 脂肪乙醇; 脂肪酸; 脂肪酸的单、双和三甘油酯。适合于通过流化床技术的薄膜形式包衣物质的例子在 GB 1483591 中给出。

按照本发明的粒状组合物也可以是“致密形式”, 即它们可以有比常规粒状去垢剂更高的密度, 即 550 至 950g/l; 在这样的情况下, 按照本发明的粒状去垢组合物与常规的粒状洗涤剂相比包含更低量的“无机填料盐”; 典型的填料盐是硫酸盐和氯化物的碱土金属盐, 典型地是硫酸钠; “致密”的去垢剂典型地包含不超过 10% 的填料盐。按照本发明的液态组合物也可以是“浓缩形式”, 在这样的情况下, 按照本发明的液体洗涤剂与常规液体洗涤剂相比包含更低量的水。典型地, 浓缩液体去垢剂的水含量低于去垢组合物重量的 30%, 更优选地是低于 20%, 最优选地是不到 10%。

本发明的组合物可以, 例如制成手工和机械洗衣去垢组合物, 该洗衣去垢组合物包括洗衣添加组合物和适用于染色的织物预处理、冲洗添加的织物软化剂组合物的组合物以及用于一般家庭硬表面清洁操作和餐具洗涤操作的组合物。

本发明的洗衣去垢组合物的特定形式包括:

物包含: 线性烷基苯磺酸盐(以酸计算)	
脂肪醇乙氧基硫酸盐(如 C ₁₂₋₁₈ 醇, 1-2EO)或烷基硫酸盐(如 C ₁₆₋₁₈)	1-4%
脂肪醇乙氧基化物(如 C ₁₄₋₁₅ 醇, 7EO)	5-9%
碳酸钠(以 Na ₂ CO ₃ 计)	14-20%
可溶性硅酸盐(以 Na ₂ O,2SiO ₂ 计)	2-6%
沸石(以 NaAlSiO ₄ 计)	15-22%
硫酸钠(以 Na ₂ SO ₄ 计)	0-6%
柠檬酸钠/柠檬酸(以 C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ /C ₆ H ₈ O ₇ 计)	0-15%
过硼酸钠(以 NaBO ₃ .H ₂ O 计)	11-18%
TAED	2-6%
羧甲基纤维素	0-2%
聚合物(如马来酸/丙烯酸共聚物、PVP、PEG)	0-3%
酶(以纯化的酶蛋白质计算)	0.0001-0.1%
小组分(如抑泡剂、香料、荧光增白剂、光漂白剂)	0-5%

2) 具有至少 600g/l 的堆积密度的制成粒剂的去垢组合物, 该组合物包含:

线性烷基苯磺酸盐(以酸计算)	6-11%
脂肪醇乙氧基硫酸盐(如 C ₁₂₋₁₈ 醇, 1-2EO)或烷基硫酸盐(如 C ₁₆₋₁₈)	1-3%
脂肪醇乙氧基化物(如 C ₁₄₋₁₅ 醇, 7EO)	5-9%
碳酸钠(以 Na ₂ CO ₃ 计)	15-21%
可溶性硅酸盐(以 Na ₂ O,2SiO ₂ 计)	1-4%
沸石(以 NaAlSiO ₄ 计)	24-34%
硫酸钠(以 Na ₂ SO ₄ 计)	4-10%
柠檬酸钠/柠檬酸(以 C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ /C ₆ H ₈ O ₇ 计)	0-15%
羧甲基纤维素	0-2%
聚合物(如马来酸/丙烯酸共聚物、PVP、PEG)	0-3%
酶(以纯化的酶蛋白质计算)	0.0001-0.1%
小组分(如抑泡剂、香料)	0-5%

3) 具有至少 600g/l 的堆积密度的制成粒剂的去垢组合物, 该组合物包含:

线性烷基苯磺酸盐(以酸计算)	5-9%
脂肪醇乙氧基化物(如 C ₁₂₋₁₅ 醇, 7EO)	7-14%
为脂肪酸(如 C ₁₆₋₂₂ 脂肪酸)的肥皂	1-3%
碳酸钠(以 Na ₂ CO ₃ 计)	10-17%
可溶性硅酸盐(以 Na ₂ O, 2SiO ₂ 计)	3-9%
沸石(以 NaAlSiO ₄ 计)	23-33%
硫酸钠(以 Na ₂ SO ₄ 计)	0-4%
过硼酸钠(以 NaBO ₃ ·H ₂ O 计)	8-16%
TAED	2-8%
磷酸盐(如 EDTMPA)	0-1%
羧甲基纤维素	0-2%
聚合物(如马来酸/丙烯酸共聚物、PVP、PEG)	0-3%
酶(以纯化的酶蛋白质计算)	0.0001-0.1%
小组分(如抑泡剂、香料、荧光增白剂)	0-5%

4) 具有至少 600g/l 的堆积密度的制成粒剂的去垢组合物, 该组合物包含:

线性烷基苯磺酸盐(以酸计算)	8-12%
脂肪醇乙氧基化物(如 C ₁₂₋₁₅ 醇, 7EO)	10-25%
碳酸钠(以 Na ₂ CO ₃ 计)	14-22%
可溶性硅酸盐(以 Na ₂ O, 2SiO ₂ 计)	1-5%
沸石(以 NaAlSiO ₄ 计)	25-35%
硫酸钠(以 Na ₂ SO ₄ 计)	0-10%
羧甲基纤维素	0-2%
聚合物(如马来酸/丙烯酸共聚物、PVP、PEG)	1-3%
酶(以纯化的酶蛋白质计算)	0.0001-0.1%
小组分(如抑泡剂、香料)	0-5%

5) 一种含水液体去垢组合物, 该组合物包含:

线性烷基苯磺酸盐(以酸计算)	15-21%
脂肪醇乙氧基化物(如 C ₁₂₋₁₅ 醇, 7EO 或 C ₁₂₋₁₅ 醇, 5EO)	12-18%
为脂肪酸(如油酸)的肥皂	3-13%
烯基琥珀酸	0-13%
氨基乙醇	8-18%
柠檬酸	2-8%
磷酸盐	0-3%
聚合物(如 PVP、PEG)	0-3%
硼酸盐(以 B ₄ O ₇ 计)	0-2%
乙醇	0-3%
丙二醇	8-14%
酶(以纯化的酶蛋白质计算)	0.0001-0.1%
小组分(如分散剂、抑泡剂、香料、荧光增白剂)	0-5%

6) 一种含水液体去垢组合物, 该组合物包含:

线性烷基苯磺酸盐(以酸计算)	15-21%
脂肪醇乙氧基化物(如 C ₁₂₋₁₅ 醇, 7EO 或 C ₁₂₋₁₅ 醇, 5EO)	3-9%
为脂肪酸(如油酸)的肥皂	3-10%
沸石(以 NaAlSiO ₄ 计)	14-22%
柠檬酸钾	9-18%
硼酸盐(以 B ₄ O ₇ 计)	0-2%
羧甲基纤维素	0-2%
聚合物(如 PVP、PEG)	0-3%
锚定聚合物如, 例如 月桂基异丁烯酸/丙烯酸共聚物; 摩尔比率 25:1; MW3800	0-3%
硼酸盐(以 B ₄ O ₇ 计)	0-5%
甘油	0-5%
酶(以纯化的酶蛋白质计算)	0.0001-0.1%
小组分(如分散剂、抑泡剂、香料、荧光增白剂)	0-5%

7) 具有至少 600g/l 的堆积密度的制成粒剂的去垢组合物, 该组合物包含:

脂肪醇硫酸盐	5-10%
乙氧基化的脂肪一乙醇酰胺	3-9%
为脂肪酸的肥皂	0-3%
碳酸钠(以 Na_2CO_3 计)	5-10%
可溶性硅酸盐(以 $\text{Na}_2\text{O}, 2\text{SiO}_2$ 计)	1-4%
沸石(以 NaAlSiO_4 计)	20-40%
硫酸钠(以 Na_2SO_4 计)	2-8%
过硼酸钠(以 $\text{NaBO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 计)	12-18%
TAED	2-7%
聚合物(如马来酸/丙烯酸共聚物、PEG)	1-5%
酶(以纯化的酶蛋白质计算)	0.0001-0.1%
小组分(如荧光增白剂、抑泡剂、香料)	0-5%

8) 制成粒剂的去垢组合物, 该组合物包含:

线性烷基苯磺酸盐(以酸计算)	8-14%
乙氧基化的脂肪一乙醇酰胺	5-11%
为脂肪酸的肥皂	0-3%
碳酸钠(以 Na_2CO_3 计)	4-10%
可溶性硅酸盐(以 $\text{Na}_2\text{O}, 2\text{SiO}_2$ 计)	1-4%
沸石(以 NaAlSiO_4 计)	30-50%
硫酸钠(以 Na_2SO_4 计)	3-11%
柠檬酸钠(以 $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ 计)	5-12%
聚合物(如 PVP、马来酸/丙烯酸共聚物、PEG)	1-5%
酶(以纯化的酶蛋白质计算)	0.0001-0.1%
小组分(如抑泡剂、香料)	0-5%

9) 制成粒剂的去垢组合物

烷基硫酸盐(例如, C ₁₂₋₁₈)	6-12%
肥皂, Na 盐	0-3%
非离子的(例如, 脂肪醇乙氧基化物 C ₁₀₋₁₈ , 2-7EO)	2-8%
烷基葡糖胺(例如, C ₁₆₋₁₈)	2-6%
沸石(以 NaAlSiO ₄ 计)	14-24%
碳酸钠(以 Na ₂ CO ₃ 计)	7-13%
焦硅酸钠(以 Na ₂ O, 2SiO ₂ 计)(例如 SKS6)	10-14%
硫酸钠(以 Na ₂ SO ₄ 计)	5-9%
过硼酸钠	10-16%
TAED	1-5%
CMC	0-3%
聚羧酸盐	1-7%
聚合物(如 PVP、PEG、马来酸/丙烯酸共聚物)	0-2%
包括修饰的脂解酶的酶(以纯化的酶蛋白质计算)	0.0001-0.1%
小组分(如抑泡剂、香料、荧光增白剂、光漂白剂)	0-5%
堆积密度度(g/l)至少	700

10) 制成粒剂的去垢组合物

烷基硫酸盐(例如, C ₁₂₋₁₈)	7-11%
肥皂, Na 盐	0-3%
非离子的(例如, 脂肪醇乙氧基化物 C ₁₀₋₁₈ , 2-7EO)	7-11%
烷基葡糖胺(例如, C ₁₆₋₁₈)	2-6%
沸石(以 NaAlSiO ₄ 计)	19-29%
碳酸钠(以 Na ₂ CO ₃ 计)	12-18%
焦硅酸钠(以 Na ₂ O:2SiO ₂ 计)(例如 SKS6)	7-11%
硫酸钠(以 Na ₂ SO ₄ 计)	5-9%
CMC	0-3%
聚羧酸盐	4-8%
聚合物(如 PVP、PEG、马来酸/丙烯酸共聚物)	1-3%
包括修饰的脂解酶的酶(以纯化的酶蛋白质计算)	0.0001-0.1%
小组分(如抑泡剂、香料、荧光增白剂、光漂白剂)	0-5%
堆积密度度(g/l)至少	700

11) 制成粒剂的去垢组合物

烷基硫酸盐(例如, C_{12-18})	4-10%
非离子的(例如, 脂肪醇乙氧基化物 C_{10-18} , 2-7EO)	2-7%
磷酸盐(以 STPP 计)	17-27%
碳酸钠(以 Na_2CO_3 计)	4-8%
焦硅酸钠(以 $Na_2O, 2SiO_2$ 计)(例如 SKS6)	4-8%
硫酸钠(以 Na_2SO_4 计)	18-26%
过硼酸钠四水合物	13-19%
TAED	1-4%
CMC	0-2%
包括修饰的脂解酶的酶(以纯化的酶蛋白质计算)	0.0001-0.1%
小组分(如抑泡剂、香料、荧光增白剂、光漂白剂)	0-5%
堆积密度度(g/l)至少	600

12) 制成粒剂的去垢组合物

烷基硫酸盐(例如, C_{12-18})	2-9%
肥皂, Na 盐	1-4%
非离子的(例如, 脂肪醇乙氧基化物 C_{10-18} , 2-7EO)	9-15%
沸石($NaAlSiO_4$)	35-45%
碳酸钠(以 Na_2CO_3 计)	3-10%
焦硅酸钠(以 $Na_2O, 2SiO_2$ 计)(例如 SKS6)	0-4%
硫酸钠(以 Na_2SO_4 计)	2-6%
过硼酸钠	14-20%
TAED	2-7%
CMC	0-3%
聚羧酸盐	0-2%
包括修饰的脂解酶的酶(以纯化的酶蛋白质计算)	0.0001-0.1
小组分(如抑泡剂、香料、荧光增白剂、光漂白剂)	0-5%
堆积密度度(g/l)至少	700

13) 制成粒剂的去垢组合物

烷基苯磺酸盐	8-14%
烷基硫酸(例如, C ₁₀₋₁₈)	2-6%
非离子的(例如, 脂肪醇乙氧基化物 C ₁₀₋₁₈ , 2-7EO)	9-13%
沸石(NaAlSiO ₄)(例如沸石 4A)	20-30%
碳酸钠(以 Na ₂ CO ₃ 计)	0-6%
焦硅酸钠(以 Na ₂ O:2SiO ₂ 计)	0-3%
硫酸钠(以 Na ₂ SO ₄ 计)	0-6%
过硼酸钠四水合物	22-28%
TAED	5-9%
CMC	0-2%
聚合物(如马来酸/丙烯酸共聚物)	0-4%
包括修饰的脂解酶的酶(以纯化的酶蛋白质计算)	0.0001-0.1
小组分(如抑泡剂、香料、荧光增白剂、光漂白剂)	0-5%
堆积密度度(g/l)至少	600

14) 制成粒剂的去垢组合物

烷基苯磺酸盐	6-12%
烷基醚硫酸(例如, C ₁₂₋₁₈ 醇, 4-10EO 或烷基硫酸盐(例如 C ₁₂₋₁₈))	2-6%
肥皂, Na 盐	0-2%
非离子的(例如, 脂肪醇乙氧基化物 C ₁₀₋₁₈ , 3-10EO)	9-13%
沸石(NaAlSiO ₄)(例如沸石 4A)	39-49%
碳酸钠(以 Na ₂ CO ₃ 计)	2-8%
焦硅酸钠(以 Na ₂ O:2SiO ₂ 计)	0-3%
硫酸钠(以 Na ₂ SO ₄ 计)	2-8%
CMC	0-3%
聚合物(如马来酸/丙烯酸共聚物)	0-4%
包括修饰的脂解酶的酶(以纯化的酶蛋白质计算)	0.0001-0.1
小组分(如抑泡剂、香料、荧光增白剂、光漂白剂)	0-5%
堆积密度度(g/l)至少	600

15) 制成粒剂的去垢组合物

烷基苯磺酸盐	2-8%
肥皂, Na 盐	0-3%
非离子的(例如, 脂肪醇乙氧基化物 C ₁₂₋₁₆ , 3-10EO)	10-16%
沸石(NaAlSiO ₄)(例如沸石 4A)	47-57%
碳酸钠(以 Na ₂ CO ₃ 计)	15-23%
柠檬酸钠/柠檬酸(C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ /C ₆ H ₈ O ₇)	0-16%
硫酸钠(以 Na ₂ SO ₄ 计)	1-5%
CMC	0-3%
聚羧酸盐	0-2%
聚合物(如 PVP)	0-2%
包括修饰的脂解酶的酶(以纯化的酶蛋白质计算)	0.0001-0.1
小组分(如抑泡剂、香料、荧光增白剂、光漂白剂)	0-5%
堆积密度度(g/l)至少	800

16) 制成粒剂的去垢组合物

烷基苯磺酸盐	0-3%
非离子的(例如, 脂肪醇乙氧基化物 C ₁₂₋₁₈ , 3-10EO)	1-5%
磷酸盐(以 STPP 计)	12-18%
碳酸钠(以 Na ₂ CO ₃ 计)	16-24%
焦硅酸钠(以 Na ₂ O:2SiO ₂ 计)	1-3%
硫酸钠(以 Na ₂ SO ₄ 计)	38-48%
过硼酸钠四水合物	8-14%
TAED	0-3%
CMC	0-3%
包括修饰的脂解酶的酶(以纯化的酶蛋白质计算)	0.0001-0.1
小组分(如抑泡剂、香料、荧光增白剂、光漂白剂)	0-5%
堆积密度度(g/l)至少	500

17) 制成粒剂的去垢组合物

肥皂, Na 盐	1-3%
非离子的(例如, 脂肪醇乙氧基化物 C ₁₂₋₁₈ , 3-10EO)	2-6%
甜菜碱(例如烷基酰胺丙基甜菜碱)	0-3%
磷酸盐(以 STPP 计)	27-37%
碳酸钠(以 Na ₂ CO ₃ 计)	17-23%
焦硅酸钠(以 Na ₂ O:2SiO ₂ 计)	3-7%
硫酸钠(以 Na ₂ SO ₄ 计)	4-11%
过硼酸钠四水合物	15-21%
TAED	1-4%
CMC	1-3%
包括修饰的脂解酶的酶(以纯化的酶蛋白质计算)	0.0001-0.1
小组分(如抑泡剂、香料、荧光增白剂、光漂白剂)	0-5%
堆积密度度(g/l)至少	600

18) 制成粒剂的去垢组合物

烷基苯磺酸盐	5-11%
肥皂, Na 盐	0-3%
非离子的(例如, 脂肪醇乙氧基化物 C ₁₂₋₁₈ , 3-10EO)	3-7%
沸石(NaAlSiO ₄)(例如沸石 4A)	20-30%
碳酸钠(以 Na ₂ CO ₃ 计)	15-23%
柠檬酸钠/柠檬酸(C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ /C ₆ H ₈ O ₇)	0-3%
硫酸钠(以 Na ₂ SO ₄ 计)	4-10%
过硼酸钠	7-13%
TAED	2-6%
CMC	1-3%
包括修饰的脂解酶的酶(以纯化的酶蛋白质计算)	0.0001-0.1
小组分(如抑泡剂、香料、荧光增白剂、光漂白剂)	0-5%
堆积密度度(g/l)至少	600

19) 制成粒剂的去垢组合物

烷基苯磺酸盐	0-4%
肥皂, Na 盐	0-3%
非离子的(例如, 脂肪醇乙氧基化物 C ₁₂₋₁₈ , 3-10EO)	2-6%
沸石(NaAlSiO ₄)(例如沸石 4A)	11-17%
磷酸盐(以 STPP 计)	25-35%
碳酸钠(以 Na ₂ CO ₃ 计)	3-7%
焦硅酸钠(以 Na ₂ O:2SiO ₂ 计)	0-19%
硫酸钠(以 Na ₂ SO ₄ 计)	20-28%
过硼酸钠四水合物	9-13%
TAED	1-5%
CMC	0-2%
包括修饰的脂解酶的酶(以纯化的酶蛋白质计算)	0.0001-0.1
小组分(如抑泡剂、香料、荧光增白剂、光漂白剂)	0-5%
堆积密度度(g/l)至少	600

20) 制成粒剂的去垢组合物

烷基苯磺酸	17-23%
肥皂, Na-盐	0-3%
非离子的(例如, 脂肪醇乙氧基化物 C ₁₂₋₁₈ , 3-10EO)	11-15%
沸石(NaAlSiO ₄)(例如沸石 4A)	60-70%
碳酸钠(Na ₂ CO ₃)	0-3%
硫酸钠(Na ₂ SO ₄)	5-11%
CMC	0-3%
聚合物(例如 PVP, PEG, 马来酸/丙烯酸共聚物)	2-6%
包括修饰的脂解酶的酶(以纯化的酶蛋白质计算)	0.0001-0.1
小组分(如抑泡剂、香料、荧光增白剂、光漂白剂)	0-5%
堆积密度度(g/l)至少	350

21) 制成粒剂的去垢组合物

烷基苯磺酸	16-22%
肥皂, Na-盐	0-2%
非离子的(例如, 脂肪醇乙氧基化物 C ₁₂₋₁₈ , 3-10EO)	3-9%
沸石(NaAlSiO ₄)	25-33%
碳酸钠(Na ₂ CO ₃)	3-7%
焦硅酸钠;(Na ₂ O:SiO ₂)	0-4%
硫酸钠(Na ₂ SO ₄)	5-11%
磷酸盐	0-3%
过硼酸钠单水合物	15-19%
TAED	3-7%
CMC	0-3%
聚合物(例如 PVP, PEG, 马来酸/丙烯酸共聚物)	0-3%
包括修饰的脂解酶的酶(以纯化的酶蛋白质计算)	0.0001-0.1
小组分(如抑泡剂、香料、荧光增白剂、光漂白剂)	0-5%
堆积密度度(g/l)至少	700

22) 制成粒剂的去垢组合物

烷基苯磺酸	4-8%
烷基硫酸盐(例如 C ₁₂₋₁₈)	0-3%
非离子的, (例如, 脂肪醇乙氧基化物 C ₁₂₋₁₈ , 3-10EO)	5-9%
沸石(NaAlSiO ₄)	20-28%
碳酸钠(Na ₂ CO ₃)	9-15%
焦硅酸钠;(Na ₂ O:2SiO ₂)	0-4%
过硼酸钠四水合物	21-31%
TAED	1-5%
CMC	0-3%
聚合物(例如 PVP, PEG, 马来酸/丙烯酸共聚物)	0-3%
包括修饰的脂解酶的酶(以纯化的酶蛋白质计算)	0.0001-0.1
小组分(如抑泡剂、香料、荧光增白剂、光漂白剂)	0-5%
堆积密度度(g/l)至少	600

23) 制成粒剂的去垢组合物

线形烷基苯磺酸盐(以酸计算)	6-12%
非离子表面活性剂	1-4%
以脂肪酸的肥皂	2-6%
碳酸钠(以 Na_2CO_3 计)	14-22%
沸石(以 NaAlSiO_4 计)	18-32%
硫酸钠(以 Na_2SO_4 计)	5-20%
柠檬酸钠(以 $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ 计)	3-8%
过硼酸钠(以 $\text{NaBO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	4-9%
漂白活化剂(例如 NOBS 或 TAED)	1-5%
羧甲基纤维素	0-2%
聚合物(例如聚羧酸盐或 PEG)	1-5%
酶(以纯化的酶蛋白质计算)	0.0001-0.1%
小组分(例如荧光增白剂, 香料)	0-5%

24) 含水液态去垢组合物, 该组合物包含:

线形烷基苯磺酸盐(以酸计算)	15-23%
脂肪醇乙氧硫酸盐(例如 C_{12-15} 醇, 2-3EO)	8-15%
脂肪醇乙氧基化物(例如 C_{12-15} 醇, 7EO 或 C_{12-15} 醇, 5EO)	3-9%
以脂肪酸的肥皂(例如月桂酸)	0-3%
氨基醇	1-5%
柠檬酸钠	5-10%
水溶助剂(例如甲苯磺酸钠)	2-6%
硼酸盐(以 B_4O_7 计)	0-2%
羧甲基纤维素	0-1%
乙醇	1-3%
丙二醇	2-5%
酶(以纯化的酶蛋白质计算)	0.0001-0.1%
小组分(例如聚合物、分散剂、香料、荧光增白剂)	0-5%

25) 含水液态去垢组合物, 该组合物包含:

线形烷基苯磺酸盐(以酸计算)	20-32%
脂肪醇乙氧基化物(例如 C ₁₂₋₁₅ 醇, 7EO 或 C ₁₂₋₁₅ 醇, 5EO)	6-12%
氨基醇	2-6%
柠檬酸	8-14%
硼酸盐(以 B ₄ O ₇ 计)	1-3%
聚合物(例如马来酸/丙烯酸共聚物, 锚定聚合物如, 例如, 月桂基异丁烯酸盐/丙烯酸共聚物)	0-3%
甘油	3-8%
酶(以纯化的酶蛋白质计算)	0.0001-0.1%
小组分(例如水溶助剂、分散剂、香料、荧光增白剂)	0-5%

26) 制成浓缩液体的去垢组合物

烷基苯磺酸	6-12%
烷基硫酸	0-4%
一乙醇胺	2-6%
非离子的(例如, 脂肪醇乙氧基化物 C ₁₂₋₁₈ , 3-10EO)	9-15%
柠檬酸钠/柠檬酸(C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ /C ₆ H ₈ O ₇)	2-8%
甘油	2-6%
硼酸盐(以 Na ₂ B ₄ O ₇ 计)	0-4%
聚合物(例如 PVP、PEG、马来酸/丙烯酸共聚物))	0-3%
包括修饰的脂解酶的酶(以纯化的酶蛋白质计算)	0.0001-0.1
小组分(如抑泡剂、香料、荧光增白剂、光漂白剂)	0-5%
总水量	40%

27) 制成浓缩液体的去垢组合物

烷基苯磺酸	11-17%
烷基酯硫酸(例如, C_{12-18} 醇, 4-10EO 或烷基硫酸盐(例如, C_{12-18})	0-4%
三乙醇胺	0-3%
非离子的(例如, 脂肪醇乙氧基化物 C_{12-18} , 3-10EO)	6-10%
柠檬酸钠/柠檬酸($C_6H_5Na_3O_7/C_6H_8O_7$)	2-6%
水溶助剂(例如甲苯磺酸钠)	1-5%
甘油	6-12%
MPG	0-5%
乙醇	0-3%
包括修饰的脂解酶的酶(以纯化的酶蛋白质计算)	0.0001-0.1
小组分(如抑泡剂、香料、荧光增白剂、光漂白剂)	0-5%
总水量	55%

28) 具有至少 600g/l 的堆积密度度的制成粒剂的去垢组合物, 该组合物包含:

阴离子表面活性剂(线形烷基苯磺酸盐、烷基硫酸盐、 α -烯烃磺酸盐、 α -硫代脂肪酸甲基酯、烷烃磺酸盐、肥皂)	25-40%
非离子表面活性剂(例如醇乙氧盐)	1-10%
碳酸钠(以 Na_2CO_3)	8-25%
可溶性硅酸盐(以 $Na_2O, 2SiO_2$)	5-15%
沸石(以 $NaAlSiO_4$)	0-5%
过硼酸钠($NaBO_3 \cdot 4H_2O$)	15-28%
漂白活化剂(TAED 或 NOBS)	0-20%
酶(以纯化的酶蛋白质计算)	0.0001-0.1%
小组分(如抑泡剂、香料)	0-3%



29) 制成粒剂的去垢组合物

烷基苯磺酸	25-35%
非离子的(例如, 脂肪醇乙氧基化物 C_{12-18} , 3-10EO)	0-3%
沸石($NaAlSiO_4$)	3-9%
磷酸盐(以 STPP 计)	25-35%
碳酸钠(Na_2CO_3)	0-3%
焦硅酸盐; $(Na_2O:2SiO_2)$	2-8%
硫酸钠(Na_2SO_4)	17-23%
过硼酸钠单水合物	1-5%
TAED	0-3%
CMC	0-3%
包括修饰的脂解酶的酶(以纯化的酶蛋白质计算)	0.0001-0.1
小组分(如抑泡剂、香料、荧光增白剂、光漂白剂)	0-5%
堆积密度度(g/l)至少	600

30) 制成粒剂的去垢组合物

烷基苯磺酸	25-35%
肥皂, 脂肪酸 Na-盐	0-3%
非离子的(例如, 脂肪醇乙氧基化物 C_{13-15} , 7EO)	4-9%
沸石($NaAlSiO_4$)	7-11%
磷酸盐(以 STPP 计)	26-36%
碳酸钠(Na_2CO_3)	6-12%
焦硅酸盐; $(Na_2O:2SiO_2)$	4-10%
硫酸钠(Na_2SO_4)	4-8%
CMC	0-3%
包括修饰的脂解酶的酶(以纯化的酶蛋白质计算)	0.0001-0.1
小组分(如抑泡剂、香料、荧光增白剂、光漂白剂)	0-5%
堆积密度度(g/l)至少	700

下列特定组合物是本发明的例证性组合物，但不限制或以其它方式定义本发明的范围。

在去垢组合物中，简写组分符号具有下列意义：

LAS：线性的 C_{12} 烷基苯磺酸钠

TAS：脂烷基硫酸钠

XYAS： $C_{1X}-C_{1Y}$ 烷基硫酸钠

SS：式 2-丁基辛酸的次要肥皂表面活性剂

25EY：与平均 Y mol 的环氧乙烷缩合的 $C_{12}-C_{15}$ 主要线性伯醇

45EY：与平均 Y mol 的环氧乙烷缩合的 $C_{14}-C_{15}$ 主要线性伯醇

XYEYS：每 mol 与平均 Z mol 环氧乙烷缩合的 $C_{1X}-C_{1Y}$ 烷基硫酸钠

非离子：具有 3.8 的平均乙氧基化程度与 4.5 的平均丙氧基化程度的 $C_{13}-C_{15}$ 混合的乙氧基化的/丙氧基化的脂肪族醇，以商品名 Plurafax LF404 由 BASF GmbH 出售。

CFAA： $C_{12}-C_{14}$ 烷基 N-甲基葡萄糖酰胺

TFAA： $C_{16}-C_{18}$ 烷基 N-甲基葡萄糖酰胺

硅酸盐：无定形硅酸钠($SiO_2:Na_2O$ 比=2.0)

NaSKS-6：式 d 的结晶层状硅酸盐- $Na_2Si_2O_5$

碳酸盐：无水碳酸钠

磷酸盐：三聚磷酸钠

MA/AA：1:4 马来酸/丙烯酸的共聚物，平均分子量大约为 80,000

聚丙烯酸酯：聚丙烯酸酯均聚物，平均分子量为 8,000，以商品名 PA30 由 BASF GmbH 出售

沸石 A：式 $Na_{12}(AlO_2SiO_2)_{12} \cdot 27H_2O$ 的水合物硅酸铝钠，主要粒子大小在 1 至 10 微米的范围

柠檬酸盐：柠檬酸三钠二水合物

柠檬：柠檬酸

过硼酸盐：无水过硼酸钠一水合物漂白剂，实验式为 $NaBO_2 \cdot H_2O_2$

PB4：无水过硼酸钠四水合物

过碳酸盐：无水过碳酸钠漂白剂，实验式为 $2Na_2CO_3 \cdot 3H_2O_2$

TAED：四乙酰乙烯二胺



CMC：羧甲基纤维素钠

DETPMP：二亚乙基三胺五(亚甲基膦酸)，由 Monsanto 以 Dequest 2060 商标出售

PVP：聚乙烯吡咯烷酮

EDDS：乙二胺-N,N-二琥珀酸，为钠盐形式的[S,S]异构体

抑泡剂：25%石蜡 Mpt 50 °C，17%疏水硅石，58%石蜡油

粒状泡沫剂：12%硅氧烷/硅石，18%十八烷醇，粒状形式的 70%淀粉

硫酸盐：无水硫酸钠

HMWPEO：高分子量聚乙烯氧化物

TAE25：脂肪醇乙氧基化物

组合物 1

按照本发明的粒状织物清洁组合物制备如下：

线性 C12 烷基钠	6.5
苯磺酸盐硫酸钠	15.0
沸石 A	3.0
次氨基三乙酸钠	5.0
本发明的酶	0.1
PVP	0.5
TAED	3.0
硼酸	4.0
过硼酸盐	18.0
磺酸酚	0.1
小组分	添加至 100

组合物 2

按照本发明的致密粒状织物清洁组合物(密度 800/l)制备如下：

45AS	8.0
25E3S：	2.0
25E5	3.0

25E3	3.0
TFAA	2.5
沸石 A	17.0
NaSKS-6	12.0
柠檬酸	3.0
碳酸盐	7.0
MA/AA	5.0
CMC	0.4
本发明的酶	0.1
TAED	6.0
过碳酸盐	22.0
EDDS	0.3
粒状抑泡剂	3.5
水/小组分	添加至 100%

组合物 3

按照本发明的粒状织物清洁组合物(该组合物特定地用于彩色织物的洗涤)制备如下:

LAS	10.7	-
TAS	2.4	-
TFAA	-	4.0
45AS	3.1	10.0
45E7	4.0	-
25E3S	-	3.0
68E11	1.8	-
25E5	-	8.0
柠檬酸	15.0	7.0
碳酸盐	-	10
柠檬酸	2.5	3.0
沸石 A	32.1	25.0
Na-SKS-6	-	9.0

MA/AA	5.0	5.0
DETPMP	0.2	0.8
本发明的酶	0.10	0.05
硅酸盐	2.5	-
硫酸盐	5.2	3.0
PVP	0.5	-
聚(4-乙烯基吡啶)-N-氧化物/- 乙烯基咪唑和乙烯基吡咯烷		0.2
过硼酸盐	1.0	-
酚磺酸盐	0.2	-
水/小组分	添加至 100%	

组合物 4

按照本发明的粒状织物清洁组合物(提供“通过洗涤软化”能力)制备如下:

45AS	-	10.0
LAS	7.6	-
68AS	1.3	-
45E7	4.0	-
25E3	-	5.0
可可-烷基-二甲基羟乙基氯化铵	1.4	1.0
柠檬酸盐	5.0	3.0
Na-SKS-6	-	11.0
沸石 A	15.0	15.0
MA/AA	4.0	4.0
DETPMP	0.4	0.4
过硼酸盐	15.0	-
过碳酸盐	-	15.0
TAED	5.0	5.0
近晶粘土	10.0	10.0
HMWPEO	-	0.1

本发明的酶	0.10	0.05
硅酸盐	3.0	5.0
碳酸盐	10.0	10.0
粒状抑泡剂	1.0	4.0
CMC	0.2	0.1
水/小组分	添加至 100%	

组合物 5

按照本发明的重垢液态织物清洁组合物制备如下:

	I	II
LAS 酸形式	-	25.0
柠檬酸	5.0	2.0
25AS 酸形式	8.0	-
25AE2S 酸形式	3.0	-
25AE7	8.0	-
CFAA	5	-
DETPMP	1.0	1.0
脂肪酸	8	-
油酸	-	1.0
乙醇	4.0	6.0
丙二醇	2.0	6.0
本发明的酶	0.10	0.05
可-烷基二甲基羟乙基氯化铵	-	3.0
近晶粘土	-	5.0
PVP	2.0	-
水/小组分	添加至 100%	

组合物 6

制成粒剂的去垢组合物

脂肪醇乙氧基化物 C ₁₂₋₁₈ , 5-7EO	6	4
烷基苯磺酸盐; C ₁₁₋₁₃	5	20
线形烷基硫酸盐; C ₁₆₋₁₈ (例如 Sulfopon)	5	0
肥皂	1	4
碳酸钠	10	0
Zeolith Na-A	25	35
焦硅酸钠; Na ₂ O:SiO ₂ =3	2	2
硫酸钠(Na ₂ SO ₄)	1	20
聚羧酸盐(Sokalan-CP5)	5	5
羧酸(Sokaian DCS)	0	4
过硼酸钠四水合物	20	0
TAED	6	0
抑泡剂	5	0
包括修饰的脂解酶的酶(以纯化的酶蛋白质计算)	0.0001-0.1	0.0001-0.1

组合物 7

制成粒剂的包含漂白剂的去垢组合物

伯醇硫酸盐(CocoPAS)	5	6
Nonion3EO(例如脂肪醇乙氧基化物 C ₁₂₋₁₅ ; 3EO)	5	0
Nonion7EO(脂肪醇乙氧基化物 C ₁₂₋₁₅ ; 7EO)	8	14
Sokalan HP22*	0,7	0,8
肥皂	1,3	0
沸石 MAP	39	39
柠檬酸钠	4	5
碳酸钠	3,3	1
水/盐	0,4	0,5
止泡剂/荧光剂/香料	4	5
TAED	5	5
Mn-催化剂	1,7	1,7
过硼酸钠	21	21
EDTMP	0,4	0,4
包括修饰的脂解酶的酶(以纯化的酶蛋白质计算)	0.0001-0.1	0.0001-0.1

* 如 WO 95/22593 所述的接枝聚合物

组合物 8

制成粒剂的非漂白去垢组合物

伯醇硫酸盐(CocoPAS)	6	6	11	9	6	6
Nonion3EO(例如脂肪醇乙氧基化物 C ₁₂₋₁₅ ; 3EO)	6	0	4	4	6	0
Nonion7EO(例如脂肪醇乙氧基化物 C ₁₂₋₁₅ ; 7EO)	6	14	6	6	9	15
Sokalan HP22*	0,7	0,7	0,6	0,7	0,5	0,5
肥皂	2	2	2	2	2	2
沸石 MAP	39	39	30	32	40	40
柠檬酸钠	25	25	30	32	22	22
碳酸钠	1	1	2	2	1	1
CMC 钠	0	0	0	0	0,7	0,7
水/盐	5	6	5	6	6	6
止泡剂/PVP/香料	3	3	4	4	3	3
EDTMP	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
包括修饰的脂解酶的酶(以纯化的酶蛋白质计算)	0.0001-0.1					

* 如 WO 95622593 所述的接枝聚合物

组合物 9

制成粒剂的去垢组合物

脂肪醇乙氧基化物 C ₁₂₋₁₈ , 5EO	0,5	0	0
烷基苷, C ₁₂₋₁₄ , 聚合度: 1,4	5	5	10
线形烷基硫酸盐 C ₁₆₋₁₈ (例如 Sulfo pon, Henkel)	10	18	15
肥皂	1	6	6
碳酸钠	12	0	0
ZeolithNa-A	23	50	33
硅酸钠(SiO ₂ :Na ₂ O=3,0)	5	0	3
聚羧酸盐(SokalanCP5)	6	0	0
羧酸(SokaianDCS)	0	4	0
过碳酸钠	0	0	15
TAED	6	0	5
抑泡剂	6	6	6
包括修饰的脂解酶的酶(以纯化的酶蛋白质计算)	0.0001-0.1		
水	加至 100		

组合物 10

制成粒剂的去垢组合物

沸石 A	38	38	0	0	0
焦硅酸钠(例如 SKS-6, Hoechst)	0	0	25	30	30
无定形硅酸钠 $\text{Na}_2\text{O}:\text{SiO}_2=1:2.0$	5.5	5.5	0	0	0
碳酸钠	3	3	3	5	0
聚羧酸盐(Sokaian CP5)	0	2	6	5	5
80%脂肪醇乙氧基化物 C_{12-18} , 5EO 与 20%脂肪醇乙氧基化物 C_{12-14} , 3EO (Dehydol LST80/20)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
脂肪醇乙氧基化物 C_{16-18} ; 14EO(例如 Dehydol TA14)	2	2	2	2	2
烷基苯磺酸钠; C_{12}	0	0	2	0	0
烷基硫酸盐; C_{16-18}	7.5	7.5	5.5	7.5	7.5
过硼酸盐四水合物	25	25	25	25	25
TAED	2	2	2	2	2
包括修饰的脂解酶的酶(以纯化的酶蛋白质计算)	0.0001-0.1				
水、香料、抑泡剂等	加至 100				

组合物 11

制成粒剂的去垢组合物

线形烷基苯磺酸盐	9
非离子的(脂肪醇乙氧基化物 7EO-(例如 Synperonic A7)	2
非离子的脂肪醇乙氧基化物, 超离子 A3&A7(3/7EO 基团)的 1:1 混合物	5
沸石 4A	29
聚羧酸盐(例如 SokaianCP5)	4
碳酸钠	7
粒状硅酸钠	4
TAED	8
过硼酸钠单水合物	16
EDTMP(乙烯二胺四亚甲基膦酸)	0.4
包含至少 25EO 基团的非离子物质(例如 LutensolAT-BASF 与 BRU-ICI)	0-1
小成分(荧光剂、CMC、盐止泡剂颗粒、香料)	4
包括修饰的脂解酶的酶(以纯化的酶蛋白质计算)	0.0001-0.1
水分	加至 100

组合物 12

制成粒剂的去垢组合物

伯烷基硫酸钠(PAS)	6
非离子脂肪醇乙氧基化物 3EO-(例如 Synperonic A3)	7
非离子脂肪醇乙氧基化物 7EO-(例如 Synperonic A7)	6
沸石 MAP	36
硬脂酸	2
牛脂 80EO	0.2
硅酸钠	3
TAED	5
锰催化剂	2
过碳酸钠	21
Dequest 2047	0,4
小组分(荧光剂、CMC、盐止泡剂离子、香料)	4
包括修饰的脂解酶的酶(以纯化的酶蛋白质计算)	0.0001-0.1
水分	加至 100

组合物 13

制成粒剂的去垢组合物

Decylidene 或 dodecylidene 二甘油	17	0
Decylidene 或 dodecylidene 三甘油	0	9
C12-5EO7 乙氧基化物		9
沸石	32	32
碳酸钠	2	2
碱性硅酸钠	1	1
脂肪酸肥皂	2	2
羧甲基纤维素钠	1	1
过硼酸钠单水合物	15	15
TAED	7	7
漂白稳定剂(EDTMP)	0.4	0.4
硅氧烷抑泡剂	0.4	0.4
荧光剂/香料	1	1
包括修饰的脂解酶的酶(以纯化的酶蛋白质计算)	0.0001-0.1	
水分	加至 100	

组合物 14

制成粒剂的去垢组合物

烷基苯磺酸盐 C ₁₀₋₁₃	18	13	15	11	15	3
线形烷基硫酸盐; C ₁₆₋₁₈ (例如 Sulfopon)		3		3	4	14
脂肪醇乙氧基化物; C ₁₆₋₁₈ ; 5EO	1.5	0.5		0.5		
十六基/十八碳烯醇 5EO	1.5	1		0.7	1.4	
十六基/十八碳烯醇 10EO	1.5	1		0.7	1.4	
脂肪醇乙氧基化物 C ₁₄₋₁₅ ; 7EO (Dobanol 45-7)			2			0.5
脂肪醇乙氧基化物 C ₁₄₋₁₅ ; 4EO (Dobanol 45-4)			6			0.5
Zeolith Na-A	50	15	42	15	51	42
硅酸钠			5			5
碳酸钠			12			12
硫酸钠	1	45	1	42		
聚羧酸盐(Sokalan CP5)	5	3	5	2	5	4
硫酸氢钠		3				
有机酸(Sokalan DCS)	3	1,5				
水	14.5	11.8	10.1	14.5	16.0	13.1
肥皂; C ₁₂₋₁₈	3	3	1	3	4	3
包括修饰的脂解酶的酶(以纯化的酶蛋白质计算)	0.0001-0.1					

组合物 15

粉状去垢组合物

烷基苯磺酸钠 C ₁₁₋₁₃	11	11.5	7	11	15	
脂肪醇乙氧基硫酸盐(硫酸化 Alfonic1412-70)		5.5				
伯醇硫酸盐	10			9	5	
脂肪醇乙氧基化物(例如 Neodol25- 9)		3		2	3	10
肥皂	1				1	
三聚磷酸钠					25	
硅铝酸盐, 例如沸石 4A	10-35	0-15	5-20	0-12		
聚羧酸盐(例如 CP5)	0-3					
MA/AA/疏水的三元共聚物	2-25	2-25	2-25	2-25	5	2-20
碱性硅酸盐	2-5	20	5	3-20	15	15
碳酸钠	18	18	15	30	20	40
季胺			2.4			
乙氧基化胺(例如 aronicU202)			2			
膨松粘土			10			
荧光剂(TinopalAMS)	0.15	0.2	0.25	0.15	1.5	1.5
香料	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1
包括修饰的脂解酶的酶(以纯化的 酶蛋白质计算)	0.0001-0.1					
硫酸钠	余量					

* 如在 US 5,308,530 中描述的

组合物 16

含水液态洗涤剂

烷基苯磺酸盐; C ₁₀₋₁₃ ; 一乙醇胺盐	0	0	0	0	9	17	0	0	0
烷基醚硫酸盐, C ₁₂₋₁₄ ; 2EO	16	10	10	21	11	0	14	38	21
十二烷基硫酸钠	0	5	5	0	0	0	4	0	0
肥皂(C ₁₂₋₁₈ -脂肪酸)	5	5	5	5	5	5	5	5	5
脂肪醇乙氧基化物 C ₁₀₋₁₃ ; 7EO	22	30	30	30	30	30	20	25	30
烷基苷, C ₈₋₁₀ -低聚度: 1,6	15	0	7	0	0	0	0	0	0
烷基苷, C ₁₂₋₁₆ -低聚度: 1,4	0	5	0	5	5	5	10	0	5
1,2-丙二醇	15	15	15	15	15	15	15	15	15
乙醇	5	5	5	5	5	5	5	5	5
包括修饰的脂解酶的酶(以纯化的酶蛋白质计算)	0.0001-0.1								
水	加至 100								

组合物 17

液态去垢组合物

脂肪酸甘油单酯(例如 Cutina AGS, Henkel)	0.5
C ₁₂₋₁₈ 脂肪酸(例如 Edenor K12-18, Henkel)	5
脂肪醇乙氧基化物, C ₁₂₋₁₄ ; 7EO	20
烷基苷, C ₁₂₋₁₄ , 聚合度: 1,4	20
烷基硫酸盐 C ₁₆₋₁₈ (例如 Sulfopon K35 Henkel)	5
乙醇	5
1,2 丙二醇	8
包括修饰的脂解酶的酶(以纯化的酶蛋白质计算)	0.0001-0.1
水	加至 100

组合物 18

制成非含水液态去垢组合物

脂肪醇乙氧基化物 C ₁₀₋₁₂ ; 7EO	28
脂肪醇乙氧基化物 C ₁₀₋₁₂ ; 3EO	23
三乙酸甘油	6
硅氧烷止泡剂	1.5
烷基苯磺酸	7
碳酸钠	20
方解石	7
抗接种聚合物	2
二氧化硅	4
羧甲基纤维素	2
过酸*	0-1
增白剂	0,2
香料	0.6
包括修饰的脂解酶的酶(以纯化的酶蛋白质计算)	0.0001-0.1

*如在 WO 95/06104 中描述的

组合物 19

制成非含水液态去垢组合物

Decylidene 或 dodecylidene 二甘油	25
C ₁₀₋₁₅ EO7 乙氧基化物	25
碳酸钠	17
过硼酸钠单水合物	11
烷基苯磺酸	6
碳酸钙	6
二氧化硅(分散剂)	4
硅氧烷抑泡剂	3
荧光剂/抗灰化聚合物/抗再沉积聚合物	3
包括修饰的脂解酶的酶(以纯化的酶蛋白质计算)	0.0001-0.1

组合物 20

制成含水液态去垢剂的去垢组合物

Decyl-或 dodecylidene 三甘油	25	0
Decyl-或 dodecylidene 二甘油	0	12.5
C ₁₀₋₁₅ , EO7, 乙氧基化物	0	12.5
脂肪酸	4.5	4.5
氢氧化钾	10	10
沸石	15	15
柠檬酸	8	8
甘油	2	2
硼砂	1.5	1.5
聚合物	1	1
硅油	0.3	0.3
香料	0.5	0.5
包括修饰的脂解酶的酶(作为纯化的酶蛋白质计算)	0.0001-0.1	
水	加至 100	

组合物 21

液态去垢组合物，该组合物包含：

C11-C15 烷基苯磺酸钠	8	17	10			7
脂肪醇乙氧基硫酸盐(C ₁₂₋₁₄ ， 60%重量的环氧乙烷)	12		6			1
脂肪醇乙氧基化物(12-14C 醇)乙氧基化物	8	7	8	16	8	4
烷基聚苷					16	15
三柠檬酸钠	0-15	0-15	0-10	0-20	10	10
肥皂	0-10	0-15			5	4
羧聚乙烯氧丁二酸三钠					10	0-20
氧丁二酸四钠						6
MA/AA/疏水三元共聚物*	5-15	2-20	2-15	1-10	5	2-15
一乙醇胺	1	2	2	0-4		2
三乙醇胺			2		4	4
碳酸钠						1
五水合硼			3,5		4	4
甘油			4		6	5
丙二醇	10			10	2	5
甲酸	1			1		1
氯化钙	1		1	1	1	1
季铵				2		
乙氧基化胺	1			2	1	
烷基二甲胺氧化物				1,5		
二甲苯磺酸钠	3	6	3	2		3
乙醇	10		2	8	3	3
荧光剂	0.25	0.2	0.25	0.25	0.2	0.15
香料	0.2	0.15	0.1-0.3	0.2	0.25	0.1-0.25
包括修饰的脂解酶的酶(以纯化的酶蛋白质计算)	0.0001-0.1					
硫酸钠	余量					

* 如在发明 US 5,308,530 中描述的

组合物 22

含水液态去垢组合物

硅止泡剂	0.3
柠檬酸	8
甘油	2
硼砂	2
KOH	10
沸石 4A	8
聚合物: 抗絮凝聚合物 w.如在 EP 346,995 中的聚合物 A11 的化学结构	1.0
QCC 200: 膨润粘土	8
油酸	5
LAS-酸	17
Synperonic A3	5
Synperonic A7	5
PVP	0.3
香料	0.5
包括修饰的脂解酶的酶(以纯化的酶蛋白质计算)	0.0001-0.1
水	加至 100

餐具洗涤组合物

餐具洗涤去垢组合物包含这样的表面活性剂, 该表面活性剂可以是阴离子的、非离子的、阳离子的、两性的或这些类型的混合物。去垢剂包含 0-90% 的非离子型表面活性剂(如少至不形成泡沫的乙氧基化的丙氧基化直链醇。

去垢组合物可以包含无机和/或有机类型的去垢剂助洗剂盐。去垢剂助洗剂可以细分成含磷和不含磷类型。去垢组合物通常包含 1-90% 的去垢剂

助洗剂。

含磷无机碱性去垢助洗剂的例子(当存在时)包括水溶性盐,尤其是碱金属焦磷酸盐、正磷酸盐、聚磷酸盐以及磷酸盐。不含磷的无机助洗剂的例子(当存在时)包含水溶性碱金属碳酸盐、硼酸盐和硅酸盐以及各种类型的水不溶性结晶或无定形的矾土硅酸盐,其中沸石是熟知的代表。

适合的有机助洗剂的例子包括碱金属、铵和取代铵的柠檬酸盐、琥珀酸盐、丙二酸盐、脂肪酸磺酸盐、羧甲氧琥珀酸盐、铵聚乙酸盐、羧酸盐、聚羧酸盐、氨基聚羧酸盐、聚乙酰羧酸盐和聚羟磺酸盐。

其它适合的有机助洗剂包括更高分子量聚合物以及已知具有助洗剂性质的共聚物,例如合适的聚丙烯酸、聚马来酸和聚丙烯酸/聚马来酸的共聚物及其盐。

餐具洗涤去垢组合物可以包含氯/溴型或氧型的漂白剂。无机氯/溴型漂白剂的例子是锂、钠或钙的次氯酸盐和次溴酸盐以及氯化磷酸三钠。有机氯/溴型漂白剂的例子是杂环 N-溴代和 N-氯代酰亚胺,如三氯雷尿酸、三溴雷尿酸、二溴雷尿酸和二氯雷尿酸及其与水增溶性阳离子(如钾和钠)的盐。海因化合物也是适合的。

氧漂白剂是优选的,例如无机过酸盐的形式,优选地含有漂白前体或作为过氧酸化合物。适合的过氧漂白化合物的典型例子是碱金属过硼酸盐(四水合物与一水合物)、碱金属过碳酸盐、过硅酸盐和过磷酸盐。优选的活化剂物质是 TAED 和甘油三乙酸酯。

本发明的餐具洗涤去垢组合物可以利用通常用于酶的稳定剂(例如,多元醇,如丙醇、糖或糖醇、乳酸、硼酸或硼酸衍生物,如芳族硼酸酯)稳定。

餐具洗涤去垢组合物也可以包含其它酶,具体地说是淀粉酶、蛋白酶和/或纤维素酶。

本发明的餐具洗涤去垢组合物也可以包含其它常规的去垢剂成分,如抗絮凝剂物质、填充物质、抑泡剂、防腐蚀剂、土壤悬浮剂、螯合剂、抗土壤再沉积剂、脱水剂、染色剂、杀菌剂、荧光剂、增稠剂和芳香剂。

本发明的修饰的脂解酶可以以通常在组合物中使用的浓度掺入。在本发明的去垢剂中,本发明包括:脂解酶可以以相应于每升洗液 0.00001-1mg(作为纯化的酶蛋白质计算)脂解酶的量添加。

下面，以例说明了特定优选的餐具洗涤组合物：

1) 粉状自动餐具洗涤组合物

非离子表面活性剂	0.4-2.5%
正硅酸钠	0-20%
硅酸钠	3-20%
三磷酸钠	20-40%
碳酸钠	0-20%
过硼酸钠	2-9%
四乙酰乙烯二胺(TAED)	1-4%
硫酸钠	5-33%
酶	0.0001-0.1%

2) 粉状自动餐具洗涤组合物

非离子表面活性剂(例如脂肪醇乙氧基化物)	1-2%
硅酸钠	2-30%
碳酸钠	10-50%
磷酸钠	0-5%
三柠檬酸钠二水合物	9-30%
次氨基乙酸三钠(NTA)	0-20%
过硼酸钠一水合物	5-10%
四乙酰乙烯二胺(TAED)	1-2%
聚丙烯酸酯聚合物(例如马来酸/丙烯酸共聚物)	6-25%
酶	0.0001-0.1%
香料	0.1-0.5%
水	5-10

3) 粉状自动餐具洗涤组合物

非离子表面活性剂	0.5-2.0%
硅酸钠	25-40%
柠檬酸钠	30-55%
碳酸钠	0-29%
碳酸氢钠	0-20%
过硼酸钠单水合物	0-15%
四乙酰乙烯二胺(TAED)	0-6%
马来酸/丙烯酸共聚物	0-5%
粘土	1-3%
聚氨基酸	0-20%
聚丙烯酸钠	0-8%
酶	0.0001-0.1%

4) 粉状自动餐具洗涤组合物

非离子表面活性剂	1-2%
沸石 MAP	15-42%
硅酸钠	30-34%
柠檬酸钠	0-12%
碳酸钠	0-20%
过硼酸钠单水合物	7-15%
四乙酰乙烯二胺(TAED)	0-3%
聚合物	0-4%
马来酸/丙烯酸共聚物	0-5%
有机磷酸盐	0-4%
粘土	1-2%
酶	0.0001-0.1%
硫酸钠	余量

5) 粉状自动餐具洗涤组合物

非离子表面活性剂	1-7%
硅酸钠	18-30%
三柠檬酸钠	10-24%
碳酸钠	12-20%
单过硫酸盐($2\text{KHSO}_5 \cdot \text{KHSO}_4 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4$)	15-21%
漂白剂稳定剂	0.1-2%
马来酸/丙烯酸共聚物	0-6%
二亚乙基三胺五乙酸盐, 五钠盐	0-2.5%
酶	0.0001-0.1%
硫酸钠, 水	余量

6) 具有清洁表面活性剂系统的粉剂和液态餐具洗涤组合物

非离子表面活性剂	0-1.5%
十八基二甲胺 N-氧化物二水合物	0-5%
80:20 重量 C18/C16 十八基二甲胺 N-氧化物二水合物和十六基二甲胺 N-氧化物二水合物的混合物	0-4%
70:30 重量 C18/C16 无水十八基二(羟乙基)胺 N-氧化物和无水十六基二(羟乙基)胺 N-氧化物的混合物	0-5%
具有平均为 3 的乙氧基化度的 C13-C15 烷乙氧基硫酸盐	0-10%
具有平均为 3 的乙氧基化度的 C12-C15 烷乙氧基硫酸盐	0-5%
具有平均为 12 的乙氧基化度的 C13-C15 乙氧基化的醇	0-5%
具有平均为 9 的乙氧基化度的 C12-C15 乙氧基化的醇的混合物	0-6.5%
具有平均为 30 的乙氧基化度的 C13-C15 乙氧基化的醇的混合物	0-4%
硅酸钠	0-33%
三聚磷酸钠	0-46%
柠檬酸钠	0-28%
柠檬酸	0-29%
碳酸钠	0-20%
过硼酸钠单水合物	0-11.5%
四乙酰乙烯二胺(TAED)	0-4%
马来酸/丙烯酸共聚物	0-7.5%
硫酸钠	0-12.5%
酶	0.0001-0.1%

7) 非含水液态自动餐具洗涤组合物

液态非离子表面活性剂(例如脂肪醇乙氧基化物)	2.0-10.0%
碱金属硅酸盐	3.0-15.0%
碱金属磷酸盐	20.0-40.0%
选自高级多元醇、聚乙二醇、聚氧化物、乙二醇酯的液态载体	25.0-45.0%
稳定剂(例如磷酸与 C16-C18 烷醇的部分酯)	0.5-7.0%
抑泡剂(例如硅氧烷)	0-1.5%
酶	0.0001-0.1%

8) 非水液态餐具洗涤组合物

液态非离子表面活性剂(例如脂肪醇乙氧基化物)	2.0-10.0%
硅酸钠	3.0-15.0%
碱金属碳酸盐	7.0-20.0%
柠檬酸钠	0.0-1.5%
稳定剂系统(例如精细分离的硅氧烷与低分子量的二烷基多元醇酯的混合物)	0.5-7.0%
低分子量聚丙烯酸盐聚合物	5.0-15.0%
粘土凝胶增稠剂(例如膨润土)	0.0-10.0%
羟丙基纤维素聚合物	0.0-0.6%
酶	0.0001-0.1%
选自高级多元醇、聚乙二醇、聚氧化物、乙二醇酯的液态载体	余量

9) 触变性液体自动的餐具洗涤组合物

C12-C14 脂肪酸	0-0.5%
Block 共聚物表面活性剂	0.5-15.0%
柠檬酸钠	0-12%
三聚磷酸钠	0-15%
碳酸钠	0-8%
三硬脂酸盐铝	0-0.1%
异丙基苯磺酸钠	0-1.7%
聚丙烯酸盐增稠剂	1.32-2.5%
聚丙烯酸钠	2.4-6.0%
硼酸	0-4.0%
甲酸钠	0-0.45%
甲酸钙	0-0.2%
n-癸二苯基氧化物二磺酸钠	0-4.0%
一乙醇胺(MEA)	0-1.86%
氢氧化钠(50%)	1.9-9.3%
1,2-丙二醇	0-9.4%
酶	0.0001-0.1%
抑泡剂、染料、香料、水	余量

10) 液态自动餐具洗涤组合物

脂肪醇乙氧基化物	0-20%
脂肪酸酯磺酸盐	0-30%
十二烷基硫酸钠	0-20%
烷基聚苷	0-21%
油酸	0-10%
硅酸钠一水合物	18-33%
柠檬酸钠二水合物	18-33%
硬脂酸钠	0-2.5%
过硼酸钠单水合物	0-13%
四乙酰乙烯二胺(TAED)	0-8%
马来酸/丙烯酸共聚物	4-8%
酶	0.0001-0.1%

11) 包含受保护的漂白颗粒的液态自动餐具洗涤组合物

硅酸钠	5-10%
焦磷酸四钾	15-25%
三磷酸钠	0-2%
碳酸钾	4-8%
受保护的漂白剂颗粒, 例如氯	5-10%
聚合增稠剂	0.7-1.5%
氢氧化钾	0-2%
酶	0.0001-0.1%
水	余量

11) 如 1)、2)、3)、4)、6)和 10)中所描述的自动餐具洗涤组合物, 其中过硼酸盐由过碳酸盐取代。

12) 如 1)-6)中描述的自动餐具洗涤组合物, 该自动餐具洗涤组合物还包含锰催化剂。锰催化剂可以, 例如, 是在“低温漂白的有效锰催化剂”, 自然 369, 1994, 637-539 中描述的化合物之一。

进而，本发明的修饰的脂解酶可以用于软化组合物：

本发明的脂解酶可以用作织物软化剂，如在表面活性剂和消费产品，J. Falbe 编辑，1987，295/296；表面活性剂洗涤剂，30 (1993)，6，394-399；JAOCs，第 61 卷 (1984)，2，367-376；EP 517 762；EP 123 400；WO 92/19714；WO 93/19147；US 5,082,578；EP 494 769；EP 544 493；EP 543 562；US 5,235,082；EP 568 297；EP 570 237 中所描述的。

最后，本发明涉及采用本发明的组合物洗涤或清洁不同洗涤对象的方法。通过利用所说的组合物，更有效地从洗涤对象(如衣服，纺织品或盘子)除去脂质沉淀是可能的。

降低必须在去垢组合物中存在的脂解酶的量，而获得与包含亲本脂解酶的去垢组合物相同的洗涤性能也是可能的。

在本发明的实施方案中，所说的方法包括下列步骤：

- a) 在含水介质中浸透洗涤对象，
- b) 在步骤 a) 期间或之后，将洗涤对象与事先已经溶解在含水介质中的包含本发明的具有脂解酶活性之修饰酶的去垢组合物接触一段时间，
- c) 冲洗洗涤对象，
- d) 从洗涤对象除去冲洗的水。

材料和方法

材料

质粒：

pYES 2.0(英国 Invitrogen 公司)

p960 A. 稻属(*oryzae*)表达质粒(Novo Nordisk A/S 的 EP 305 216 描述了它)

pSX581(大肠杆菌表达质粒)(参见图 7)

pJSO37(啤酒糖酵母表达质粒)(Okkels J.S., 纽约科学院年鉴(在出版中 1995)(参见图 8)

pSX167(参见图 4)

pSX92(WO 89/06279)

pUC19(Yanish-Perron 等(1985)基因 33, 103-119)

pHD414(曲霉属表达载体是 EP 238 023 中描述的质粒 p775 的衍生

物)。在 WO 93/11249 中还描述了 pHD414 的构建)。

PJVi245(参见图 9)

pCaHj383(参见图 9)

pCaHj385(参见图 9)

pAHE2: Hobson, A. H., Buckley, C. M., Aamand, J. L., Jørgensen, S. T., Diderichsen, B., and McConnell, D. J.(1993). 伴侣蛋白对细菌脂酶的激活, 美国科学院学报, 90, p. 5682-5686).

微生物:

米曲霉 IFO 4177

米曲霉 JaL 125:从大阪的发酵研究所得到的米曲霉 IFO 4177; 17-25 Juso Hammachi 2-Chome Yodogawa-ku, 大阪, 日本, 使用米曲霉 pyrG 基因作为标记物, 通过一步的基因取代方法使命名为"alp"的碱性蛋白酶基因(Murakami K 等描述, (1991), 农业生物化学, 55, p. 2807-2811)缺失(G. May 在"丝状真菌的应用分子遗传学"中有所描述(1992), p. 1-25. J. R. Kinghorn 和 G.Turner 编辑; Blackie Academic and Professional).

大肠杆菌 W3110 lacI^q大肠杆菌 W3110 是一种早期分离物, 作为 K-12 菌株的原始贮存物的(Bachman(1972), 细菌学综述 36)。W3110 菌株被制成为 lacI^q以便过量产生 Lac 阻遏物, 更完全地关闭 plac 的表达。

大肠杆菌 SJ6 : Diderichsen, B., Wedsted, U., Hedegaard, L., Jensen, B. R., Sjaholm, C.,(1990), 编码 α -乙酰乳酸脱羧酶(*Bacillus brevis*.胞外酶)的 aldB 的克隆, 细菌学杂志 172, p. 4315-4321).

菌株 SJ1503 是含有质粒 pAHE2 的大肠杆菌 JA221:

Hobson, A. H., Buckley, C. M., Aamand, J. L., Jørgensen, S. T., Diderichsen, B., and McConnell, D. J.(1993). 伴侣蛋白对细菌脂酶的激活, 美国科学院学报, 90, p. 5682-5686).

有机供体:

Humicola lanuginosa DSM 4109(EP 305,216)

Humicola insolens DSM 1800(WO 96/13580)

在 WO 89/01032 中描述的洋葱伯克霍尔德氏菌(*Pseudomonas cepacia*)SB10, DSM 3959

酶:

牛胰蛋白酶(Boehringer 曼海姆)

以下的脂酶是 *Humicola lanuginosa* DSM 4109 脂酶的变体(EP 305 216), 其可以作为本发明的亲本酶或根据本发明作为修饰酶。

表 M1

脂酶变体	肽添加物	突变
HLv1s	SPIRR	D57G, N94K, D96L, L97M
HLv1	-	D57G, N94K, D96L, L97M
HLv2s	SPIRR	D137G, D167G, E210V, W221L
HLv2	-	D137G, D167G, E210V, W221L
HLv3s	SPIRR	N94K, F95L, D96H, N101S, F181L, D234Y, I252L, P256T, G263A, L264Q
HLv3	-	N94K, F95L, D96H, N101S, F181L, D234Y, I252L, P256T, G263A, L264Q
HLv4s	SPIRR	I90F, D96L, E99K, V187A
HLv4	-	I90F, D96L, E99K, V187A
HLv5s	SPIRR	N94K, D96A, Q249R
HLv5	-	N94K, D96A, Q249R
HLv7s	SPIRR	D57G, G59V, N94K, D96L, L97M, S116P, S170P, Q249R
HLv7	-	D57G, G59V, N94K, D96L, L97M, S116P, S170P, Q249R
HLv8s	SPIRR	A49P, D167G, E210V
HLv8	-	A49P, D167G, E210V
HLv9s	SPIRPRP	D57G N94K, D96L, Q249R
HLv9	-	D57G N94K, D96L, Q249R
HLv10s1	GPIRPRP	D57G, N94K, D96L, L97M, Q249R
HLv10s2	SHSRHNA	D57G, N94K, D96L, L97M, Q249R
HLv10s3	TAIRPRK	D57G, N94K, D96L, L97M, Q249R
HLv10s4	SALRRRP	D57G, N94K, D96L, L97M, Q249R
HLv10s5	STRRPRP	D57G, N94K, D96L, L97M, Q249R
HLv10s6	SPRRPRT	D57G, N94K, D96L, L97M, Q249R

HLv10s7	SPIPPGP	D57G, N94K, D96L, L97M, Q249R
HLv10s8	LPFRQRP	D57G, N94K, D96L, L97M, Q249R
HLv10s9	SPFRPKL	D57G, N94K, D96L, L97M, Q249R
HLv10s10	SALRRP	D57G, N94K, D96L, L97M, Q249R
HLv10s11	SPIRK	D57G, N94K, D96L, L97M, Q249R
HLv10s12	SPIR	D57G, N94K, D96L, L97M, Q249R
HLv10	-	D57G, N94K, D96L, L97M, Q249R
HLv11s	SPIRP	E1P, D57G, N94K, D96L, L97M, Q249R

以下的脂酶是洋葱伯克霍尔德氏菌脂酶的变体，按照本发明在此脂酶中有 N-末端的添加物。

表 M2

脂酶变体	肽添加物
SJ3708	SPIRR
SJ3717	SPIRPRP
SJ3718	SPIRPRP
SJ3719	TAIRPRK
SJ3720	STRRPRP
SJ3720	STRRPRP
SJ3721	GPIRPRP

以下的脂酶是 *Humicola insolens* DSM 1800 脂解酶的变体。

表 M3

脂酶变体	肽添加物
HTLv1s	SPPRRP
HILV2s	SPPRP
HILv3s	SPIRK
HILv4s	PPRRRPR

酶抑制剂

大豆胰蛋白酶抑制剂(Boehringer 曼海姆)

培养基:

YPD: 10g 酵母提取物, 20g 胨, 加水至 810ml, 高压灭菌, 加入 90ml

20%葡萄糖(无菌过滤)。

LB-培养基: 在 1 升水中含有 10g Bacto-胰蛋白胨, 5g Bacto 酵母提取物, 10gNaCl。

FG4 培养基: 3%大豆粉, 3%麦芽糖糊精, 1%胨, 用 4 MNaOH 把 pH 调到 7.0。

Litex 琼脂糖 HSB 200(产品号: F90472)

BG-试剂: 4 毫克/毫升亮绿(BG)溶解在水中
底物 1:

10 ml 橄榄油(Sigma 产品号 0-1500)

20ml 2%聚乙烯醇(PVA)

把底物匀化 15-20 分钟。

PCS 去垢剂

10g/l:

SDS 0.52 g

Dobanol 25-30.60 g

Dobanol 25-70.58 g

NaBO₃H₂O 1.50 g

加入 1 升 0.1 M Tris 缓冲液(pH 9), 另外用 Tris 缓冲液将 PCS 平板上的浓度稀释到所需浓度的 2 倍。

PCS 平板:

制作 PCS 平板的溶液

亮绿(BG-试剂)10ml

底物 1 24ml

PCS 去垢剂 500ml

2%琼脂糖(溶解在 Tris 缓冲液中)500 ml

脂酶底物(Sigma 产品号 800-1)

亮绿(Merck, 产品号 1.01310)

布:

用猪油/苏丹红染色的 3.5 × 3.5 cm 和 9 × 9 cm 棉布(样式 # 400 TestFabrics 公司(新泽西))。

猪油:

用 0.75 毫克苏丹红/克猪油染色的猪油。

去垢剂 I:

1.17g/l LAS(Nansa 1169/P, 30% a.m.)

0.15g/l AEO(Dobanol 25-7)

1.25g/l 三磷酸钠

1.00g/l 硫酸钠

0.45g/l 纯碱

0.15g/l 硅酸钠

pH 调至 10

灭活 Ariel Futur(Procter 和 Gamble)(可以买到, 批号 4279 B23: 35):
通过加热将去垢剂中的酶灭活(85 °C 下在微型炉中处理 4 分钟)。

水: 3.2 mM Ca^{2+} / Mg^{2+} (5: 1)

Chameleon 双链定点诱变试剂盒(产品号 200509)(Stratagene,
Lajolle, CA)

仪器:

473A 蛋白质测序仪(应用生物系统)

Toyopearl 丁基柱(XK 16/10)(Pharmacia, 瑞典)

Q-琼脂糖柱(HPQ XK 26/10)(Pharmacia, 瑞典)

MonoQ 柱(1ml)(Pharmacia, 瑞典)

高效 Q 琼脂糖 ϕ (Pharmacia, 瑞典)

Spin100 柱(Clontech 实验室公司, CA, USA)

方法:

杂交条件

严格条件的介质

预浸在 $5 \times \text{SSC}$ 中, 大约 40 °C 下在含有 20% 甲酰胺、5X Denhardt 溶液、50 mM 磷酸钠(pH 6.8)和 50mg 变性的超声处理的小牛胸腺 DNA 溶液中预杂交 1 小时; 之后在添加有 100 mM ATP 的同样溶液中杂交 18 小时, 然后大约 45 °C 下在 $0.4 \times \text{SSC}$ 中洗涤。

酵母表达载体的构建

表达质粒 pJSO37 来自 pYES 2.0。pYES 2.0 的诱导型 GAL1-启动子由啤酒糖酵母的组成型表达的 TPI(磷酸丙糖异构酶)-启动子代替(Albert 和 Karwasaki,(1982), 分子应用遗传学杂志, 1, 419-434), URA3 启动子已缺失。pJSO37 的限制性图谱如图 8 所示。

构建脂解酶变体的方法

通过定点诱变或者随机诱变在亲本脂解酶的非结构性 N-末端和/或 C-末端完成肽的添加和/或突变, 以便构建改进的本发明的脂解酶。

定点诱变

为了构建 *H. lanuginosa* 脂解酶的变体, 按照厂商的说明使用商业试剂盒(Chameleon 双链定点诱变试剂盒)。

将编码正在讨论的脂解酶的基因插入到质粒 pHD414 中。按照厂商的说明通过使用下列引物将 pHD414 的氨苄青霉素基因的 ScaI 位点转换成 MluI 位点:

引物 3: AGAAATCGGGTATCCTTTTCAG(SEQ ID NO: 6)

然后将包含正在讨论的脂解酶基因的 pHD414 载体用作 DNA 聚合酶和寡核苷酸 7258 和 7770 的模板。通过加入合适的包含所需要的突变的寡核苷酸将所需要的突变(如在脂解酶基因的 N-末端)导入正在讨论的脂解酶基因中。

按照厂商的说明进行 PCR 反应。

随机诱变

实质上可以如 WO 95/22615 的描述进行随机诱变。更具体地说, 为了完成一段短的 DNA 序列的随机诱变(如肽的添加), 可以通过使用掺入或掺加(spiked)寡核苷酸探针完成所说的随机诱变。为了完成较大 DNA 序列的随机诱变, 可以使用产生诱变的 PCR。

低钙滤膜测定

方法

1) 提供具有第一蛋白质结合滤膜(尼龙膜)和在上部的第二低的蛋白质结合滤膜(乙酸纤维素)的 SC Ura 复制平板(用于选择携带表达载体的菌株)。

2) 将包含亲本脂解酶基因或所说的突变脂解酶的酵母细胞散布在双滤

膜上并在 30 ℃ 下培养 2 或 3 天。

3) 通过把上部滤膜转移到新板上把菌落保持在顶部滤膜上。

4) 把蛋白质结合滤膜移到空的陪替氏培养皿中。

5) 把包含橄榄油乳胶(2%P.V.A.:橄榄油=3:1), 亮绿(指示剂, 0.004%)、100mM tris 缓冲液 pH 9 和 EGTA(最终浓度为 5mM)的琼脂糖溶液倒入底部滤膜上以鉴别蓝绿色形式的表达脂解活性的菌落。

6) 鉴别在步骤 5)发现的菌落, 该菌落与亲本脂解酶相比具有降低的对钙依赖性。

Dobanol®25-7 滤膜测定

由于对去垢剂组分的提高的耐受性的筛选通过使用滤膜测定进行, 该滤膜测定除了在步骤 5)的溶液再包含 0.02%Dobanol®25-7 外如上所述。替代的筛选测定如下

1) 提供具有第一蛋白质结合滤膜(如尼龙)和在上部的非蛋白质结合滤膜(乙酸纤维素)的 SC Ura 平板(用于选择携带表达载体的菌株)。

2) 将包含亲本脂酶基因或所说的突变的脂酶的酵母细胞散布在双滤膜上并在 30 ℃ 下培养 3 或 4 天。

3) 通过把上部滤膜转移到新板上把菌落保持在顶部滤膜上。

4) 把蛋白质结合滤膜移到空的陪替氏培养皿中, 该陪替氏培养皿包含:

含有橄榄油乳胶(2%P.V.A.:橄榄油=2:1)、亮绿(指示剂, 0.004%)、100mM tris 缓冲液 pH 10 与去垢剂或去垢剂组分的琼脂糖溶液, 例如, PCS 板。

5) 鉴别在步骤 4)中发现的蓝绿色形式的表达脂解活性的菌落。

酵母的发酵

用啤酒糖酵母接种 10 ml 的 SC-ura 培养基, 并在 30 ℃ 下生长 2 天。将所得的 10ml 培养物用于接种含有 300 ml 的 SC-ura 培养基(30 ℃ 下生长 3 天)的摇瓶。用此 300ml 的培养基接种 5 升下列 G-底物:

400g Amicase

6.7g 酵母提取物(Difco)

12.5g L-亮氨酸(Fluka)

6.7g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

10g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

17g K_2SO_4

10 ml 微量元素化合物

5 ml 维生素溶液

6.7ml H_3PO_4

25ml 20% Pluronic(泡沫抑制剂)

在 500ml 的总体积中:

将酵母细胞在 30 °C 下发酵 5 天。开始使用的葡萄糖剂量为 100 ml 70% 的葡萄糖, 每天加入 400 ml 的 70% 的葡萄糖。通过加入 10% NH_3 溶液, 将 pH 保持在 5.0。在最初的 22 小时以 300 rpm 搅拌, 在以后的发酵过程中以 900 rpm 搅拌。在最初的 22 小时以 11/升/分钟给气, 在以后的发酵过程中以 1.5/升/分钟给气。

微量元素化合物: 6.8 g 的 ZnCl_2 、54.0 g 的 $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、19.1 g 的 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、2.2 g 的 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、2.58g 的 CaCl_2 、0.62g 的 H_3BO_3 、0.024g 的 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、0.2 g 的 KI、100 ml 的 HCl(浓缩的), 总体积 1 l。

维生素溶液: 250 mg 的生物素、3 g 的硫胺、10 g 的 D-Calciumpanthetionate、100 g 的肌醇、50g 的盐酸胆碱、1.6 g 的吡哆辛(pyridoxin)、1.2 g 的烟酰胺、0.4g 的叶酸、0.4g 的核黄素。总体积为 1 升。

米曲霉的转化(一般方法)

用米曲霉的孢子接种 100ml 的 YPD(Sherman 等, (1981), 酵母遗传学方法, 冷泉港实验室), 振荡培养大约 24 小时。经纱布过滤收获菌丝体, 并用 200 ml 0.6 M 的 Mg 洗涤。在 15ml 含有 1.2 M MgSO_4 和 10mM NaH_2PO_4 (pH5)溶液中悬浮菌丝体。在冰上冷却悬浮液, 加入 1ml 含有 120 mg Novozym 234(批号 1687)的缓冲液。5 分钟后, 加入 1ml 的 12mg/毫升 BSA(Sigma H25 型)并且在 37 °C 用连续的温和振荡培养 1.5-2.5 小时, 直到在显微镜下检查样品可以看见大量的原生质体。

使用纱布过滤悬浮液, 把过滤物转移到无菌试管中, 并且加入 5ml 0.6M

山梨醇和 100 mM Tris-HCl(pH 为 7.0)。在 1000 g 下进行 15 分钟离心。从上部的 MgSO_4 收集原生质体。把 2 体积的 STC(1.2 M 山梨醇, 10mM Tris-HCl(pH 为 7.5), 10mM CaCl_2)加入到原生质体悬浮液中并且在 1000g 下把混合物离心 5 分钟。将原生质体沉淀物悬浮在 3ml 的 STC 中, 使之沉淀。重复上一步。最后, 把原生质体悬浮在 0.2-1ml 的 STC 中。

将 100 μl 的原生质体悬浮液与溶解在 10 μl 的 STC 中的 5-25 μg 的 p3SR2(Hynes 等(分子和细胞生物学”, 第 3 卷, No.8, 1430-1439, 1983. 8)描述的携带质粒的构巢曲霉 amdS 基因)混合。将此混合物在室温下放置 25 分钟。加入 0.2 ml 的 60% PEG 4000(BDH 29576)、10mM CaCl_2 和 10mM Tris-HCl(pH7.5), 认真混合(两次), 最后加入 0.85 ml 同样的溶液并认真混合。混合物在室温下放置 25 分钟, 以 2,500g 离心 15 分钟, 将沉淀悬浮在 2ml 1.2M 的山梨醇中。几次沉淀后, 将所得到的原生质体涂布在含有 1.0 M 蔗糖(pH7.0)、10mM 乙酰胺(作为氮源)、20mM CsCl(抑制背景生长)的基本培养基上((Cove, (1966), 生物化学和生物物理学报 113, 51-56)。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 4-7 天后收集孢子, 将其悬浮在无菌水中, 长成单个的菌落。重复这个过程, 在第二次分离之后以规定的转化体储存单个菌落的孢子。

流加发酵

流加发酵(Fed batch fermentation)在包含麦芽糖糊精作为碳源、尿素作为氮源以及酵母提取物的培养基中进行。流加发酵通过把所说的米曲霉宿主细胞的摇瓶培养物接种于包含 3.5%碳源与 0.5%氮源的培养基中进行的。在 pH 5.0 和 34 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 24 小时后, 开始添加另外的碳和氮源。将碳源保持为限制因子并保证氧气过量存在。流加培养继续 4 天, 其后酶可以通过离心、超滤、澄清过滤和细菌过滤回收。进一步的纯化可以通过本领域已知的阴离子交换色谱方法完成。

脂酶活性(LU-脂酶单位)

使用甘油三丁酸酯作为底物和阿拉伯树胶作为乳化剂测定脂酶活性。1LU(脂酶单位)是 30 $^{\circ}\text{C}$ 下 pH 为 7.0 时每分钟释放 1 μmol 可滴定的丁酸的酶量。通过 pH-stat 使用 Radiometer 滴定计 VTT90(Radiometer, Copenhagen)测定脂酶活性。

在布上使用猪油

将 6ml 加热到 70 ℃ 的猪油加入到每块布的样品(canter)上。加入猪油后将布用炉子于 75 ℃ 下加热 25 分钟，第一次洗涤前室温下过夜储存。

三次循环的洗涤性能

和亲本脂解酶相比，以此酶的剂量(每升中蛋白质的毫克数(或 LU))为基础评价了本发明的修饰的脂解酶的三次循环的洗涤性能。于放置在热水浴中的 150 ml 烧杯中进行洗涤实验。用三角形磁棒搅拌烧杯。

实验条件如下：

方法：三次循环，循环之间过夜干燥

洗涤液：每烧杯 100ml

布：每烧杯中 6 块布(3.5 × 3.5 cm，用猪油弄脏，每克猪油用 0.75 毫克的苏丹红染色)

去垢剂：去垢剂 I，pH 调到 10.2

酶含量：每升溶液中含有 0.075、0.188、0.375、0.75 和 2.5 mg 的脂酶蛋白

时间：20 分钟

温度：30 ℃

冲洗：用流动的自来水冲洗 15 分钟

干燥：室温(20，30-50%RH)下过夜干燥

评价：在第三次洗涤后，在 460 nm 测量反射比

洗涤结果的评价

比较修饰的脂解酶和亲本脂解酶的剂量反应曲线。通过在下列方程式中应用测量的数据计算所说的剂量反应曲线。

$$DR = DR_{\max} \frac{C^{0.5}}{K + C^{0.5}} \quad (I)$$

其中

DR 是以反射比单位表达的效果

C 是酶浓度(mg/l)

DR_{max} 是表达最好效果的常数

K 是常数；K² 表示获得 1/2 最好效果的酶浓度。

基于每种修饰的脂解酶以及亲本脂解酶中所发现的特征常量 DR_{max} 和 K , 计算改进因子。用下式表示:

$$f_{改进} = C_{亲本}/C \quad (II)$$

此式表示出为获得和用 0.25 mg/l 的参照亲本蛋白($C_{亲本}$)相同效果所需的修饰脂酶蛋白的量。

这样, 计算改进因子的方法如下:

1)通过方程(I)计算在 0.25mg/l 时亲本蛋白($DR_{亲本}$)的效果

2)通过下列方程式计算与 0.25mg/l 亲本酶获得相同效果的修饰的脂解酶的浓度。

$$C = \left(K_{(修饰)} \frac{DR_{(亲本)}}{DR_{max(修饰)} - DR_{(亲本)}} \right)^2 \quad (III)$$

3)通过方程(II)计算改进因子。

第一次循环的洗涤性能

在恒温的 Terg-O-to-Meter(TOM)中进行第一次循环的洗涤实验。

方法: 第一次洗涤, 之后凉干

洗涤液: 每烧杯 1000ml

布: 7 块布(9 × 9 cm, 用猪油弄脏, 每克猪油用 0.75 毫克的苏丹红染色)

水: 3.2mM Ca^{2+}/Mg^{2+} (5:1)

去垢剂: 5g/l 灭活的 Ariel Futur^{TX}, 天然 pH 为大约 10.3(可买到的批号为 4279 B 23:35)

酶含量: 0、1250、12500LU/l

时间: 20 分钟

温度: 30 °C

冲洗: 用流动的自来水冲洗 15 分钟

干燥: 室温(20, 30-50%RH)下过夜干燥

评价: 使用索克斯累特氏方法提取脂类物质, 通过重量分析方法确定脂类物质的量。

实 施 例

实施例 1

野生型 *Humicola lanuginosa* 在酵母中的产生

为了在酵母(啤酒糖酵母 YNG318)中表达 *Humicola lanuginosa* 脂酶, 如上文的材料和方法部分的描述构建酵母表达载体 pJSO37(参见图 8)。pJSO37 包含编码所说的亲本脂酶的 DNA 序列, 同时包含编码所说的单肽和原肽(propeptide)的 DNA 序列(参见图 1), 通过标准的方法用所说的质粒转化这种酵母(参见 Sambrooks 等(1989), 分子克隆: 实验室手册, 第二版, 冷泉港实验室)。如上文的材料和方法部分的描述培养这种酵母。

在啤酒糖酵母中表达的 *Humicola lanuginosa* 脂酶的纯化

向发酵肉汤(1400ml)中加入醋酸铵(92g)以得到 0.8M 的醋酸溶液。将此溶液加入到 Toyopcarl 丁基柱(XK 16/10)中, 用 0.8M 的醋酸铵洗涤此柱, 用水以 5ml/分钟的流速洗脱脂酶。收集 10ml 的组分, 根据标准的脂酶滴定测定中的活性将包含脂酶的组分合并。将含有脂酶的合并物过滤, 并将 pH 调节到 7.6, 加入到 Q-琼脂糖柱(HPQ XK 26/10)中。用 200ml 0.1M Tris-HCl(pH7.25)以 5ml/分钟的流速洗涤此柱。收集 10ml 的组分, 根据标准的脂酶滴定测定中的活性将包含脂酶的组分合并。用水稀释包含脂酶的合并物, 并以 1ml/分钟的流速加入到 1ml MonoQ 柱上。用 30 毫升的水洗涤此柱, 以 40ml 0-0.25M NaCl 线性梯度洗脱脂酶。根据 280nm 的吸收率人工收集所说的脂酶。

在酵母中表达的 *H. lanuginosa* 脂酶的 N-末端氨基酸测序

按照厂商的说明使用 473 A 蛋白测序仪对啤酒糖酵母表达的脂酶进行 N-末端氨基酸测序。

比较啤酒糖酵母表达的脂酶的 N-末端氨基酸的序列和米曲酶中表达的同样脂酶的 N-末端氨基酸的序列(如 EP 305 216 中所描述), 所观察到的不同点是啤酒糖酵母表达的酶的主要部分在 N-末端包含 5 个额外的氨基酸残基(SPIRR-)(参见表 E1), 这些氨基酸序列包含米曲酶表达的脂酶的相应信息。

表 E1

表达系统	含有 SPIRR-EVSQ...的组分	包含 EVSQ...的组分
啤酒糖酵母	75%	25%
米曲酶	0%	100%

从上表可以看出,啤酒糖酵母表达的分泌脂酶的主要部分已由上述的 5 个氨基酸(来自原肽)SPIRR 扩展。可以从氨基酸测序中的 PTH-氨基酸的测序确定含有额外氨基酸残基的酶的相对量。

实施例 2

从在啤酒糖酵母中表达的 *H. lanuginosa* 脂酶的 N-末端除去 SPIRR 肽

把上述纯化的改进的(含有"SPIRR")在啤酒糖酵母中表达的 4.5 mg 脂酶加入到 50mg 牛胰蛋白酶(测序等级),把混合物在 37 °C 培养 1 小时。在培养后,加入多于 50mg 的大豆胰蛋白酶抑制剂阻止胰蛋白酶的消化。

通过 N-末端氨基酸测序观察 N-末端 SPIRR 肽的添加物的除去,其中含有 SPIRR 的组分从 75%减少到 13%(见表 E2)。

表 E2

处理	含有 SPIRR-EVSQ...的组分	包含 EVSQ...的组分
未处理(如修饰脂酶)	75%	25%
胰蛋白酶处理	13%	87%

当通过氨基酸测序不能观察到内部氨基酸序列时,温和的胰蛋白酶处理没有产生内部的解离。而且把未处理的脂酶的比活性和胰蛋白酶处理的脂酶的比活性相比较表明在标准的测定中胰蛋白酶处理没有影响酶活性(参见表 E3)。

表 E3

样品	A ₂₈₀	A ₂₈₀ /A ₂₆₀	活性(LU/ml)	比活性(LU/A ₂₈₀)
未处理(如修饰脂酶)	2.5	1.8	9725	3890

酶)				
胰蛋白酶处理	2.2	1.8	9163	4127

实施例 3

在米曲酶中产生野生型 *H. lanuginosa* 脂酶

在 EP 305,216 中描述了 *Humicola lanuginosa* 脂酶的克隆, 也描述了通过使用表达质粒 p960 在米曲酶中表达和鉴定脂酶。所说的质粒包含 *Humicola lanuginosa* 脂酶的编码基因和编码 SPIRR 肽添加物的 DNA 序列(其是编码部分原肽的部分脂酶基因)。使用表达质粒(和 p960(参见 W.O95/22615)相比被轻微地修饰过)实质上如 WO 95/22615 中的所述在米曲酶(IFO 4177 菌株)中表达野生型脂酶。

在米曲酶中表达的野生型 *Humicola lanuginosa* 脂酶的纯化

将米曲酶 IFO4177 的发酵上清液离心, 除去细胞碎片。将上清液经 0.45 m 的微孔滤膜过滤。

然后用 60%饱和的硫酸铵沉淀上清液。将所得的沉淀溶解在水中, 加入乙酸铵, 使之最终浓度为 0.8 M。将此溶液加入到用 0.8 M 乙酸铵预平衡的丁基 Toyopearl 柱上。以水和 50%乙醇作为洗脱液通过梯度洗脱来洗脱结合的酶。

然后合并含有酶活性的组分, 调节导电性使之低于 5mSi, 并将 pH 调到 7.5。

然后将含有活性的合并液加入到已用 25mM Tris-醋酸盐缓冲液预平衡的阴离子交换柱(如高效 Q 琼脂糖®, pH 7.5)上。使用同样的缓冲液和 0.5 M 氯化钠通过线性盐梯度洗脱结合的活性。

实施例 4

亲本 *Humicola lanuginosa* 脂酶表达载体的构建和在大肠杆菌中的表达

用 Hind III 切割 pSX92(参见图 4), 用 Klenow 聚合酶将平端补齐, 然后用 ClaI 切割。分离大的片段(A)。用 BamH1 切割 pHLL(参见 EP 305,216 的图 3 和 4)(包含编码亲本脂酶的 DNA 序列), 将平端补齐, 然后用 XhoII

切割。分离含有修饰脂酶基因的成熟部分的片段(B)。

用编码融合到此成熟脂酶的前 4 氨基酸中的枯草溶菌素的最后 5 个氨基酸的合成接头将 A 和 B 连接在一起。上面一条链中的“A”将成熟脂酶基因中的 XhoII 位点转变成 Bgl II 位点。

合成接头:

KFN 575/576: 5'-CGATCGCATCGGCTGCTGAGGTCTCGCAA-3'

3'-TAGCGTAGCCGACGACTCCAGAGGCTTCTAG-5'

所得的质粒(pSX167)包含编码成熟脂酶的 DNA 序列。用 Pme I 和 Bam H1 切割 pSX167, 分离含有枯草溶菌素 309 信号序列-脂酶融合部分和 5S 终止子的片段(1769 bp)。将此片段连接到 Hinc II-Bam H1 切割的 pUC19 上而产生 pSX578。

使用 PCR 技术“通过重叠序列的剪接”将 Bst XI 下游的编码成熟脂酶的 DNA(来自 pSX167, 654 bp)与 Sph I 的 *Achromobacter lyticus* 蛋白酶 I 信号序列(参见图 3)融合在一起(Horton 等(1989), 基因)。

用 Sph I 和 Bst XI 切割质粒(pSX578)(参见图 5), 并插入如上所述的 PCR DNA(图 6)中。用所得的质粒 pSX581(参见图 7)转化大肠杆菌 W3110 lacI^q。30 °C 下在摇床上于含有 0.4% 乳糖的 LB 培养基中生长 72 小时时, 所得的菌株产生非糖基化的脂酶, 这种脂酶与正常的糖基化的亲本脂酶具有相同的比活性。

实施例 5

在大肠杆菌中构建带有肽添加物的 *Humicola lanuginosa* 脂酶

用 BglIII/HindIII 消化 pSX581 质粒(图 7), 使用标准方法在琼脂糖凝胶上纯化载体片段。

使用 pSX581 作为模板以下列引物完成 PCR 反应:

SPIRR 引物: 引物 1(SEQ ID NO 3):

5'-AA CAG ATC TTG CGA GAC CTC TCT ACG TAT AGG GCT
AGC GAG CGC GGC GCT GAT CG-3'(55-聚体)

PCR 引物: 引物 2(SEQ ID NO 4):

GTTGTGTGGAATTGTGAGCGG(21-聚体)

所得的 300 bp 片段在 Spin100 柱上纯化, 用 BglIII/HindIII 消化, 再在 spin100 上纯化。将此片段与上述的载体片段连接。所得的质粒命名为 pJSO215, 用于转化大肠杆菌 W3110 lacI^q。从转化体制备质粒制剂, 并进行 DNA 测序以确认 SPIRR 肽添加物的导入。

实施例6

米曲霉JaL125中修饰的*H.lanuginosa* 脂解酶(HLv9s)的构建和表达

把一个N-末端肽的附加物运用于分别具有氨基酸和DNA序列的亲本*H.lanuginosa*(DSM 4109)脂酶, 此酶明显的不同于EP 305 216, 此外, 在DNA序列(EP 305 216)的成熟部分(由常规定点诱变)携带下列的突变D57G, N94K, D96L, Q249R。肽附加物SPIRPRP运用于亲本酶的N-末端如下:

pIVI220的构建:

根据所描述的方案, 使用来自Stratagene的Chameleon双链的定点诱变试剂盒构建质粒。

pHL296用作质粒模板。所说的质粒包含编码具有以上提及的克隆进入pHD464中的突变(D57G, N94K, D96L, Q249R)的*H.lanuginosa*脂解酶的基因。

引物no.7258用作选择引物。

7258: 5' p gaa tga ctt ggt tga cgc gtc acc agt cac 3' (SEQ ID NO: 79) (这样改变氨变青霉素抗性基因中发现的并用于切割MluI位点的ScaI位点)。

引物no.7770用作选择引物。

7770: 5' p tct agc cca gaa tac tgg atc aaa tc 3' (SEQ ID NO: 80) (变化没有改变氨基酸序列的*H.lanuginosa*脂酶基因中发现的ScaI位点)。

引物no.8479用作突变基因引物。

8479: 5' p gcg tgg acg gcc ttg gct agc cct cga ccg gtc tcg cag gat ctg 3'(SEQ ID NO: 81)

(取代前肽和亲本*H.lanigosa*酶(通过SPIRPRP的SPIRRE)的N-末端E1)。

pIV1245的构建:

根据所描述的方案,使用来自Stratagene(cat no.20059)的Chameleon双链的定点诱变试剂盒构建质粒

pIVI220用作质粒模板,引物no.7887用作选择引物(改变引入的氯变青霉素抗性基因中发现的并用于切割ScaI位点的MluI位点)。7887: 5' p-gaa tga ctt ggt tga gta ctc acc agt cac 3' (SEQ ID NO: 77)。

引物no.8932用作诱变引物(8932: 5' p-g aac tgg ata gga aat ttg aagttc ctg ttg aaa gaaata aat gac 3' (SEQ ID NO: 78) (这样把M97作为野生型变回到L97并保留了两个突变N94K和D96L))。

2.米曲霉表达质粒pCaHj483的构建

在图8中描述了pCaHj483。它从下列片段构建:

a)载体pToC65v(WO91/17243)用EcoRI和XbaI切割。

b) 一个携带amdS基因的来自*A.nidulans*的2.7kb的XbaI片段(C.M.Corrick等, (1987), 基因53, p.63-71)。amdS基因在真菌转化中用作选择性标记。amdS基因已经修饰因此通常在基因中存在的BamHI位点已被破坏。这个过程是通过使用引物3: AGAAATCGGGTATCCTTTCAG(SEQ ID No.6)引入沉默的点突变完成的。

c) 一个携带融合到编码构巢曲霉tpi基因的mRNA5' 未翻译的末端的序列60bp DNA片段的黑曲霉NA2引物。把NA2引物从质粒pNA2(EP 383 779)中分离, 并通过PCR融合到60bp tpi序列。编码60bp tpi的引物(引物4 SEQ ID No.14)序列有下列序列:

5'- GCTCCTCATGGTGGATCCCCAGTTGTGTATATAGAGGATTGAGGAAGGAAGAG
AAGTGTGGATAGAGGTAAATTGAGTTGGAACTCCAAGCATGGCATCCTTGC -
3'



d)一个携带黑曲霉葡萄糖淀粉酶转录终止子的675 bp XbaI片段。

把片段从质粒pICAMG/Term(EP 238 023)中分离。

把片段c)的BamHI位点通过pIC19R接头(BamHI至XbaI)连接到片段d)上转录终止子之前的XbaI位点。

HLv9s表达质粒pCaHj485的构建

把质粒pJVi245以BamH I和Sal I消化，并把产生的编码HLv9s脂酶的904bp片段分离。把pCaHj 483用BamH I和Sal I消化，把大的载体片段(6757)和HLv9s片段连接。连接混合物用于转化大肠杆菌DH5a细胞，并携带所期待的质粒的转化体分离。把质粒称为pCaHj485。

3.pCaHj 485进入JaL 125的转化

把米曲霉JaL 125是缺失碱性蛋白酶的米曲霉IFO 4177，如专利EP 0 531 372中所述的在乙酰胺上利用选择以pCaHj 485转化。转化体是两次再分离的孢子。来自第二次再分离的每个转化体孢子用于在96孔的微型滴定盘中接种200 μ l YPM(1%酵母提取物，2%胨，2%麦芽糖)。YPM培养物在34℃生长4天，并利用对硝基苯基丁酸盐测定选择产率最高的：

贮存溶液：把18 μ l P硝基苯基丁酸溶于1ml异丙醇。

工作溶液：把0.1ml贮存溶液和10ml 50mM Tris/HCl pH7.5; 10mM CaCl₂混合。

测定：把1 μ l的YPM上清液和200 μ l工作溶液在96孔微滴定盘中混合，使用ELISA读数仪在450nm下测量显色。

选择一个转化体用于大罐发酵。

4. JaL 125/pCaHj485的大罐发酵

发酵使用34℃的恒定培养温度和1.2升的开始体积作为流加发酵进行。培养基的初始pH置于6.5。一旦pH增加至7.0，通过添加10% H_3PO_4 保持该体积。在培养基中溶解氧的水平利用每分钟每升培养基1.0升空气的固定充气速率通过改变搅拌速率控制。在完全流加期间流加以恒定的水平保持。

流加培养基包含麦芽糖糖浆作为碳源，尿素和酵母作为氮源以及痕量金属和盐的混合物。在流加阶段继续添加的流加包含麦芽糖糖浆作为碳源，而添加酵母提取物和尿素以保证氮的足够供应。

5. 修饰的脂解酶的纯化

1) 发酵上清液通过milipore滤纸Cat. No. AP2504700滤纸AP25型过滤。

2) 发酵上清液通过得自Millipore膜GS型0.22微米的无菌滤纸过滤一次以上。

3) 然后通过添加固体醋酸铵将发酵上清液调整至0.8M乙酸铵。

4) 在TSK凝胶丁基-Toyopearl 650上的疏水色谱。用丁基-Toyopearl基质装入50ml柱。洗涤柱并以0.8M乙酸铵平衡。然后将以醋酸铵调整的一升发酵上清液应用到丁基柱中。柱以0.8 M乙酸铵洗涤直到洗出所有未结合的物质。然后依次用水和乙醇洗脱50%结合的物质。利用标准的LU测定收集组分并分析脂酶活性。收集包含脂酶活性的组分并稀释以将组分的电导率调整至4mSi以下，pH调整至8.5。

5) 在高效Q琼脂糖凝胶上的阴离子交换色谱(Pharmacia, 编号17-1014-01)。装入50ml柱并以50mM硼酸盐缓冲液pH 8.5洗涤。然后将包含脂酶活性的样品应用到高效Q琼脂糖柱中。用硼酸盐缓冲液pH 8.5洗涤未结合的物质。然后利用包含1M氯化钠的硼酸盐缓冲液pH 8.5用线性梯度洗脱。

收集组分并用于分析脂酶活性。收集具有在A280和A260UV吸光度比率超过1.7的包含脂酶活性的组分。

实施例 7

带有肽添加物的 *Humicola lanuginosa* 脂酶的三次循环的洗涤性能使用三次循环的洗涤性能实验(已在上文的材料和方法部分描述)在用

红色猪油污染的棉布上,以 30 ℃和常温 20 分钟下的模型洗涤系统实验 EP 305 216 中描述的 *Humicola lanuginosa* 脂酶和其变体的洗涤性能。实验以每升 0、0.075、0.188、0.375、0.750、2.500 毫克酶蛋白的脂酶浓度进行。

此实验也试验了 4.2g/l 的欧洲型粉末去垢组合物(如上所述)。在加入改进的本发明脂酶之前,去垢剂不含有任何酶。将去垢剂溶解在大约 18°dH(德国硬度)的水中。洗涤液的 pH 为大约 10。在 100 ml 的洗涤液中洗涤 6 块布。洗涤后,将这些布在流动的自来水中冲洗 15 分钟,然后在室温下过夜空气干燥。

在每次循环之间进行过夜干燥,如此进行三次洗涤循环。

在第三次洗涤循环后,评价本发明的修饰脂酶和在米曲酶中表达的亲本脂酶的性能。如上所述通过计算改进因子(*fimprove*)完成评价。

下表 E4 显示出这些试验的结果。

表 E4

脂酶	N-末端 +/- SPIRR	3 次循环的 f _改 进 (改进因子)
亲本脂酶(在米曲酶中表达)	-	1.0(参考)
修饰脂酶(在酵母中表达)	+	2.2
修饰脂酶(在酵母中表达)(用胰蛋白酶处理)	-	0.6
亲本脂酶的变体(HLvls)(在酵母中表达)	+	9.3
亲本脂酶的变体(HLvls)(在米曲酶中表达)	-	1.8
亲本脂酶(在大肠杆菌中表达)	-	1.0
修饰脂酶(在大肠杆菌中表达)(+SPIRR)	+	2.0
修饰脂酶(在汉逊酵母属中表达)	+	2.1

从上表 E4 可以看出, 在亲本 *Humicola lanuginosa* 脂酶的 N-末端加入肽添加物(即 SPIRR)至少成倍地改进了洗涤性能。

实施例 8

含有添加物的改进的 *H. lanuginosa* 脂酶的一次循环洗涤性能

进行了表 M1 的 *Humicola lanuginosa* 脂酶变体(在 5g/灭活的酶 Ariel™ Futur(Procter 和 Samble)中含有或不含有 SPIRR 肽添加物)一次循环洗涤性能试验(在以上材料和方法部分所述的)。试验是在 0、1250、12500 LU/l 的脂酶浓度下进行的。

把去垢剂溶解在大约 18°dH(德国硬度)的水中。洗涤也的 pH 大约为 10.3。

索克斯累特氏提取的纺织品中的脂类物质的量如下表所示。两两列出了具有或不具有肽添加物的相应的脂酶变体。

表 M5

脂酶变体	+/- SPIRR	低剂量	%除去的猪油	高剂量	%除去的猪油
HLv2s	SPIRR	1250 LU/l	12.5	12500 LU/l	nd
HLv2	-	1250 LU/l	1.7	12500 LU/l	6.0
HLv3s	SPIRR	1250 LU/l	8.9	12500 LU/l	33.9
HLv3	-	1250 LU/l	4.6	12500 LU/l	6.9
HLv4s	SPIRR	2500 LU/l	26.5	12500 LU/l	47.6
HLv4	-	0.25 mg/l	1	12500 LU/l	26
HLv1s	SPIRR	1250 LU/l	12.8	12500 LU/l	45
HLv1	-	1250 LU/l	1.8	12500 LU/l	7.2
HLv5s	SPIRR	1250 LU/l	11.4	12500 LU/l	36.5
HLv5	-	1250 LU/l	1	12500 LU/l	10.6
HLv8s	SPIRR	1250 LU/l	4.5	12500 LU/l	nd
HLv8	-	1250 LU/l	0	12500 LU/l	1

nd : 没有确定

以上的结果清楚地表明: 和相应的不具有肽添加物的脂酶变体相比

较，具有肽添加物的脂酶变体具有明显的改进的一次循环洗涤性能。

实施例 9

H. lanuginosa 脂酶的 N-末端添加物的定点诱变

使用以上材料和方法部分所述的方法进行具有 SPIRR N-末端添加物的 *Humicola lanuginosa* 脂酶的突变。

首先把编码脂酶的基因插入到质粒 pHD414 中。然后 pHD414 的氨苄青霉素基因的 ScaI 位点变化为 MluI 位点。因此除去了存在于脂酶基因中的唯一的 ScaI 位点。

通过加入以下的包含所需突变的寡核苷酸，把所需突变(即 SPIRR)引入到脂酶基因的 N-末端。

寡核苷酸 8479(SEQ ID NO 5)

5'-P GCG TGG ACG GCC TTG GCT AGC CCT ATT CGT CCT
CGA CCG GTC TCG CAG GAT CTG-3'

这就产生了具有 SPIRR N-末端添加物的 *H. lanuginosa* 脂酶基因。

实施例 10

通过随机突变构建 N-末端附加物

把编码加入到成熟 *H. lanuginosa* 脂解酶(从 DSM4109 获得)的第一个氨基酸残基上的 N-末端附加物 SPIRPRP，并且在其成熟部分含有下列突变的部分 DNA 序列进行随机诱变：D57G + N94K + D96L + L97M + Q249R。通过 PCR 驱动的定点诱变利用合适的引物序列和 WO 95/26215 中所描述的方法进行亲本脂解酶的成熟部分的突变。如实施例 9 的描述加入肽添加物 SPIRPRP。

SPIRPRP 密码子的核苷酸掺入方案如下：

寡核苷酸 1: 5'-GCG TGG ACG GCC TTG GCC
86(T/A)66(A/T)58(T/A)67(T/A)66(T/A)575 66C(T/A)GAG GTC TCG
CAG GAT CTG-3'(57 聚体)(SEQ ID No.82)。将使用下列各种核苷酸
瓶 5:80%A;6.66%C;6.66%G og6.66%T。
瓶 6:80%C;6.66%A;6.66%G og6.66%T。
瓶 7:80%G;6.66%A;6.66%C og6.66%T。

瓶 8:80%T;6.66%A;6.66%C og6.66%G。

使用了两步 PCR 反应方案: 使用 pHL296 作为质粒模板实施以上述引物作为 5'引物, 引物 2056(5'gca cgt aat gtt tgt acc 3')作为 3'引物第一步。使用同样的模板将第一个 PCR 循环的产物用在新的 PCR 中, 此 PCR 以 4699(5'cgg tac ccg ggg atc cac 3')作为 5'引物(以导入 BamHI 位点和第一部分编码序列), 以此 PCR 产物作为 3'引物。在 Spin 100(来自克隆技术实验室, 公司)上纯化所得的产物, 并用 BamHI 和 PvuII 切割。在带有 SpinX(Costar)的琼脂糖凝胶上纯化所得的 DNA 片段, 并把它作为 BamHI 和 PvuII 切割的 BamHI-XbaI 片段, 连接到含有 *H. lanuginosa* 脂解酶基因的衍生于 pHL296 cloed 的酵母表达载体 pJSO37 上。使用常规技术将所得的 DNA 电转化到 DH10/ DH12 大肠杆菌细胞(Gibco BRG 生命技术公司)。

在转化大肠杆菌并扩增后, 纯化这些质粒并用其转化酿酒酵母 YNG318。在另外含有去垢剂(3g/l 的 PCS)脂酶滤纸测定中筛选性能较好的酿酒酵母细胞。对表现为阳性的进行测序, 发现其含有在材料和方法部分的表 1 中的肽添加物(鉴别为 HLv10sl-10)。

在 30℃下使用 5g/l 灭活的 Ariel Futur 作为去垢剂按照上文材料和方法部分的描述(一个周期洗涤性能), 分别实验 HL10s1-6 的一次循环的洗涤表现。每一种改进的酶除去的脂肪物的量如下:

脂酶变体	低剂量	除去的猪油%	高剂量	除去的猪油%
HLv10s1	1250 LU/l	26	12500 LU/l	54
HLv10s2	1250 LU/l	22	12500 LU/l	53
HLv10s3	1250 LU/l	34	12500 LU/l	55
HLv10s4	1250 LU/l	33	12500 LU/l	55
HLv10s5	1250 LU/l	23	12500 LU/l	47
HLv10s6	1250 LU/l	30	12500 LU/l	53
HLv10s11	1250 LU/l	5	12500 LU/l	27



HLv10s12	-	-	12500 LU/l	15.8
HLv11s	1250 LU/l	21	12500 LU/l	51

趋势为：在 N-末端添加物具有更多的带正电的氨基酸表现出最好的洗涤性能。

类似地，也进行了加入到 *H. lanuginosa* 脂酶变体的 E1*, D57G, N94K, D96L, L97M, Q249R+其它变体上的 N-末端添加物 RPRPRPRP 的随机诱变。

RPRPRPRP 密码子的核苷酸掺入方案如下：

寡核苷酸 2:5'-GTC TCT GCG TGG ACG GCC TIG GCG GCG CCA
CCT CCA
67(T/A)66(T/A)57566(T/A)67(T/A)66(T/A)57566(T/A)(6/7)(7/8)(C/G)57(C/
G)C57(5/7)5(C/G)CTG TIT AAC CAG TTC AAT CTC-3' (93 聚体)(SEQ
ID NO: 82)

瓶 5:80%A;6.66%C;6.66%G og6.66%T。

瓶 6:80%C;6.66%A;6.66%G og6.66%T。

瓶 7:80%G;6.66%A;6.66%C og6.66%T。

瓶 8:80%T;6.66%A;6.66%C og6.66%G。

将 APPP 加入到随机诱变的 RPRPRPRP 的 N-末端，并使之在信号肽之前，目的是防止 N-末端添加物的蛋白降解。也可以不需要这一步。为了除去一个带负电的氨基酸，使 E1 缺失。对位于成熟 *H. lanuginosa* 脂酶序列 2-5 位的氨基酸也进行了诱变，目的是为了在此酶的非结构部分发现改进的变体。另外，所用的方法与上文所述的用于 SPIRPRP 随机诱变的方法相同。

得到下列 N-末端肽添加物物： Ala-Pro-Pro-Pro-Arg-Pro-Arg-Leu-Leu-Pro-Ile-Ser(APPPRPRLLPIS)(除了缺失的 E1 残基外，此变体在成熟酶的非结构性 N-末端部分中携带所说的附加突变 D5E)。

Ala-Pro-Pro-Pro-Thr-Arg-Gln-Arg-Gln-Ser-Pro(APPPTRQRQSP)(除了缺失的 E1 残基外，此变体在成熟酶的非结构性 N-末端部分中携带所说的附加突变 V2L、S3T、D5V)。

Ala-Pro-Pro-Pro-Arg-Thr-Ile-Pro-Arg-Ser-Ser-Pro(APPPRTIPRSSP)(除了缺失的 E1 残基外, 此变体在成熟酶的非结构性 N-末端部分中携带所说的附加突变 V2L、S3R、D5E)。

Ala-Pro-Pro-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro(APPPRPRPRRP)(除了缺失的 E1 残基外, 此变体在成熟酶的非结构性 N-末端部分中携带所说的附加突变 V2G、D5E)。

Ala-Pro-Pro-Pro-Arg-Thr-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Ser (APPPRTRPRPRS)(除了缺失的 E1 残基外, 此变体在成熟酶的非结构性 N-末端部分中携带所说的附加突变 V2GL、S3T、Q4P、D5E)。

Ala-Pro-Pro-Pro-Lys-Ala-Ser-Pro-Arg-Gln-Arg-Pro(APPPKASPRQRP)(除了缺失的 E1 残基外, 此变体在成熟酶的非结构性 N-末端部分中携带所说的附加突变 V2GL、D5Q、L6M)。

实施例 11

含有肽添加物的洋葱伯克霍尔德氏菌脂酶变体的构建

克隆了在 WO 89/01032(来自 Novo Nordisk A/S)中所述的洋葱伯克霍尔德氏菌 SB10、DSM3959(最近又重新被分类为洋葱伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia cepacia*))的脂酶基因, 并且使用质粒 pAHE2 获得了在大肠杆菌中的脂酶的温度诱导型表达。菌株 SJ1503 是包含 pAHE2 的大肠杆菌 JA221。

为了构建表达具有 N-末端序列的变体脂酶的载体, 使用了存在于 pAHE2 中的两个单一限制性位点, 一个单一的 BstXI 位点在脂酶信号肽编码序列中大约有 9 个密码子, 另一个单一的 MluI 位点在加工位点的下游(即在成熟脂酶的序列开始区)大约有 7 个密码子。

设计 PCR 引物以便使扩增能覆盖此区, 所说的引物从 MluI 位点的上游阅读, 包含编码 N-末端序列的序列。所有的引物在它们的 5' 末端结合到 EcoRI 位点上。

选择了以下的序列来编码 N-末端序列:

1)SPIRPRP

AGC CCG ATC CGC CCG CGC CCG

2)TAIRPRK



ACG GCG ATC CGC CCG CGC AAG

3)STRRPRP

TCG ACG CGC CGT CCG CGC CCG

4)GPIRPRP

GGC CCG ATC CGC CCG CGC CCG

5)SPIRR

AGC CCG ATC CGC CGG

6)RPRPRPRP

CGC CCG CGT CCC AGG CCG CGT CCG

使用了下列引物:

LWN9476(SEQ ID No.7)(从 BstXI 位点的下游阅读):

5'-CGAATTCGATGCGTTCCAGGGTGGTGGCAGG-3'

LWN9472(SEQ ID No. 8)(从 MluI 的上游阅读, 目的是与 SPIRPRP 结合):

5'-

CGAATTCACGCGTCGCCGCGTAGCCAGCGGCCGGGCCGGGGCGG
AT

CGGGCTGGGGCGCGGTGGCCGCCATTGCC-3'

LWN9473(SEQ ID No. 9)(从 MluI 的上游阅读, 目的是与 TAIRPRK 结合):

5-GAATTCACGCGTCGCCGCGTAGCCAGCGGCCTTGCGCGGG
CGGATCGCCGTGGGGCGCGGTGGCCGCCATTGCC-3'

LWN9471'(SEQ ID No. 10)(从 MluI 的上游阅读, 目的是与 STRRPRP 结合):

5'-

CGAATTCACGCGTCGCCGCGTAGCCAGCGGCCGGGGCGCGGACG
GCG

CGTCGAGGGCGCGGTGGCCGCCATTGCC-3'

LWN9474(SEQ ID No. 11)(从 MluI 的上游阅读, 目的是与 GPIRPRP 结合):

5'-CGAATTCACGCGTCGCCGCGTAGCCAGCGGCCGGGGCGCGGG
CGGATCGGGCCGGGGCGCGGTGGCCGCCATTGCC-3'

LWN9475(SEQ ID No. 12)(从 MluI 的上游阅读, 目的是与 SPIRR 结合):
5'-

CGAATTCACGCGTCGCCGCGTAGCCAGCGGCCCGGCGGATCGG
GCT

GGGCGCGGTGGCCGCCATTGCC-3'

LWN9470(SEQ ID No. 13)(从 MluI 的上游阅读, 目的是与 RPRPRRP 结合):
5'-

CGAATTCACGCGTCGCCGCGTAGCCAGCGGCCCGGACGCGGCCT
GGGACGCGGGCGGGGCGCGGTGGCCGCCATTGCC-3'

在 PCR 扩增中, 以 pAHE2 作为模板, 引物 LWN9476 用于和 LWN9470-LWN9475 的每个引物结合。退火温度是 70 °C, 反应是在 2%DMSO 的存在下进行的; 另外使用标准的条件和 TaqTM 聚合酶。

使用 2% 琼脂糖凝胶纯化扩增的片段, 用 BstXI 和 MluI 消化, 并连接到从 pAHE2 获得的 7.1 kb BstXI-MluI 片段, 通过电穿孔把连接混合物转化到具有氯霉素抗性的大肠杆菌 SJ6 中, 在 30 °C 把转化体接种在含有氯霉素(200 mg/ml)LB 平板上。

通过影印铺板, 把菌落转移到脂酶筛选平板(每升琼脂中含有 20ml Sigma 脂酶底物(产品号 800-1))上, 把它和 44ml 的 1% 亮绿(Merck, 产品号 1.01310)溶液在 42 °C 下培养。最后, 在每个转化体混合物的一些菌落周围产生绿色色晕, 表明脂酶具有活性。

重新分离脂酶阳性菌落, 提取质粒, 对 BstXI-MluI 区的 DNA 进行测序。保存以下的菌株:

SJ3606(SJ6/pSJ3606); 含有 SPIRRP 编码添加物, 而且具有第二个天然密码子, 成熟酶的缬氨酸变成丙氨酸。

SJ3608(SJ6/pSJ3608); 含有 SPRP 编码添加物(插入 DNA 序列: TCT CCG CGC CCG)。得到变体, 以产生编码添加物的 STRRPRP。

SJ3708(SJ6/pSJ3708); 含有编码添加物的 SPIRR

SJ3717(SJ6/pSJ3717); 含有编码添加物的 SPIRRP

SJ3718(SJ6/pSJ3718); 含有编码添加物的 SPIRRP

SJ3719(SJ6/pSJ3719);含有编码添加物的 TAIRPRK
 SJ3720(SJ6/pSJ3720);含有编码添加物的 STRRPRP
 SJ3721(SJ6/pSJ3721);含有编码添加物的 GPIRPRP

实施例 12

洋葱伯克霍尔德氏菌脂酶变体的摇瓶发酵

使实施例 11 得到的培养物在 TY-氨苄青霉素平板上生长, 并且接种在含有 100 ml 双倍浓缩的 TY-培养基(含有 100 mg/ml 氨苄青霉素, pH 为 7)的摇瓶中。通过在指示平板上划线检查接种物的脂酶生产力(如在材料和方法部分所述): 发现所有的细胞都为脂酶阳性(平板在 30 °C 培养两天, 然后转移到 40 °C 培养 1 天)。

在 30 °C 275 rpm 把摇瓶在摇床上培养 6 小时, 直到培养物出现 2.8 至 5.3 的光密度(578 nm)。然后在 40 °C 把培养物培养 17 小时。

在洋葱伯克霍尔德氏菌培养物中检查脂酶的产生

收集培养物, 离心(9000 rpm), 除去上清液, 把沉淀在 NaCl(0.5 ml 0.9%NaCl)和并进行超声波处理(在冰上连续处理 2 分钟)。以甘油三丁酸酯作为底物通过滴定方法在 pH7.0 时使用超声波处理的沉淀测量脂酶单位(LU)。

除了菌株 1(SJ3720)之外, 所有的 8 个菌株显示出如下表所示的脂酶活性。

菌株	时间(小时)	OD=578	AmpR: 细胞 #	OOBGamp 细胞#	LU/ml□
SJ1503wt	t0=0h	0.010			
	t1=6hs	2.89	7	7	
	t2=17hs	7.45	0	0	230.5
SJ3606	t0=0h	0.006			
	t1=6hs	5.24	43	43	
	t2=17hs	9.15	0	0	244.45
SJ3608	t0=0h	0.015			
	t1=6hs	4.40	67	65	
	t2=17hs	9.2	0	0	298.6
SJ3708	t0=0h	0.028			

	t1=6hs	4.69	32	32	
	t2=17hs	11.05	0	0	142.2
SJ3717	t0=0h	0.007			
	t1=6hs	4.03	28	28	
	t2=17hs	11.2	15	15	163.8
SJ3719	t0=0h	0.001			
	t1=6hs	4.49	13	13	
	t2=17hs	11.7	0	0	33.55
SJ3720	t0=0h	0.004			
	t1=6hs	3.70	20	20	
	t2=17hs	10.5	0	0	0
SJ3721	t0=0h	0.016			
	t1=6hs	4.20	12	12	
	t2=17hs	11.35	0	0	125.75

实施例 13

洋葱伯克霍尔德氏菌脂酶变体的鉴定

在去垢剂存在的情况下,使用 PCS 平板筛选测定方法确定了实施例 11 中所描述的菌株产生的脂酶的活性。从菌株 SJ1503、SJ3606 和 SJ3608 中制备一套样品,这些菌株如上所述的方法获得,收获细胞,通过超声处理裂解以释放脂酶。把包含大约 230 LU/ml 的 15 ml 样品注入到不含去垢剂或者分别含有 1.5 和 3.5 克/升去垢剂的筛选平板上的孔中。将平板在 37 °C 下培养过夜,测量孔周围形成的绿色区域的直径。得到了下面的结果。

菌株			
	SJ1503	SJ3606	SJ3608
去垢剂			
无	17mm	15mm	16mm
1.5 克/l	7mm	13mm	10mm
3.5 克/l	0mm	8mm	6mm

在较高浓度的去垢剂周围没有观察到绿色区域。

通过以下的过程制备另一套样品: 在乙酸纤维素滤膜(每个滤膜包含所有 7 种菌株)上接种菌株 SJ1503、SJ3708 和 SJ3717-SJ3721, 把这些菌株接种在含有氨苄青霉素(200 mg/ml)的 LB 平板上, 平板在 37 °C 下过夜, 然后在 42 °C 时把带有滤膜的平板培养 5 小时, 之后把滤膜转移(菌落一面向上)

到筛选平板上，然后在 37℃ 过夜培养。

在不含去垢剂的平板上的所有菌落产生明显的绿色区域； SJ3720 产生的区域明显地比其它的菌株产生的小，可能是由于脂酶的表达减少。

也观察到在含有 1.5 克/升去垢剂的平板上所有菌落产生了绿色区域；然而，和其它菌株产生的区域相比 SJ1503(产生天然的未修饰的脂酶)产生的区域明显减小。

在包含 3.5 克/升去垢剂的平板上， SJ1503 没有产生绿色，然而，一些表达修饰的 *B. cepacia* 脂酶的菌株产生的呈绿色的污点仍然能看得清，特别是 SJ3717、 SJ3718 和 SJ3721 的。

因此，如上所述，编码天然成熟脂酶的 N-末端添加物的 *B. cepacia* 脂酶基因的修饰，使得能够在去垢剂存在下产生较天然的脂酶具有提高的活性的脂酶。

实施例 14

在 10 升罐中发酵 SJ1503 和 SJ3717

将所描述的摇瓶方法用于在 10 升容器中发酵。所使用的培养基是 Bacto 胰蛋白胨 400g、 Bacto 酵母提取物 200g、 葡萄糖 $\times 2H_2O$ 500g、 氮苄青霉素 1g、 Pluronic 1ml。 pH 保持在 7.1； 温度为在 30℃ 保持 7 小时，然后调节到 40℃。 16 小时后通过离心收集细胞，使用高压均化器(800 巴)打开细胞。

在大肠杆菌中表达的 *B. cepacia* 的纯化

离心 10 升 SJ1503 和 SJ3717 的发酵肉汤中的大肠杆菌细胞，除去上清液。使用 rannie 均化器在 800 巴的压力下把细胞打开。以 $350 \times g$ 将均化的细胞离心 60 分钟。弃去细胞上清液。

1. 盐沉淀

通过在室温下加入固体硫酸铵至 35% 的饱和程度来沉淀含有活性成分的上清液。室温下沉淀 2 小时，再以 $350 \times g$ 离心 1 小时。倾析并除去上清液。将包含活性成分的沉淀溶解在 30% 乙醇中，以避免脂酶活性成分与不溶物质的疏水性结合。

为了从溶解在 30% 乙醇中的物质中除去不溶的物质，将上述的溶液离心。回收作为上清液的脂酶活性成分，除去不溶的物质。浓缩含有活性成

分的上清液，并使用 10kDa 截断的 Amicon 膜通过超过滤对 25mM Tris-醋酸盐(pH 8)进行透析。然后为了减少含有活性成分的上清液中任何残留的乙醇，将浓缩的样品稀释 5 倍。

2. 疏水层析

通过加入固体乙酸铵将上述包含活性成分的样品中的乙酸铵调节至 0.8 M。填充 50 ml Toyopearl 丁基柱(Tosho Hass, 日本)，并用 0.8 M 乙酸铵平衡。将上一步中含有脂酶活性成分的样品中的乙酸铵调节至 0.8 M。所有的活性成分都与这种基质结合。用 0.8 M 乙酸铵洗涤未结合的物质，直到洗脱液在 280nm 下的紫外吸收低于 0.05。用含有 50%乙醇的 25mM Tris-醋酸盐缓冲液洗脱结合的活性成分。合并含有脂酶活性的组分，并对 25 mM Tris-醋酸盐缓冲液(pH8.5)进行透析。

3. 阴离子交换色谱

以阴离子交换剂高效 Q-琼脂糖凝胶(Pharmacia)装载 50 ml 柱。洗涤此柱，并用 25 mM Tris-醋酸盐缓冲液(pH8.5)平衡。然后将透析的样品装在此柱上。通过使用 Tris-缓冲液将未结合活性成分洗脱下来。在 Tris-缓冲液(pH8)中以 0-0.5 M NaCl 的线性盐梯度洗脱结合的活性成分。流速为 2ml/分钟，用以洗脱的缓冲液总体积是柱体积的 10 倍。合并含有脂酶活性的组分，并在 PCS 平板测定中测定其性能。

更具体地说，将每次回收的 3 LU 修饰脂酶加入到 PCS 平板的孔中(参见下文的实施例 15)，并在 37 °C 下过夜培养。18 小时后得到下列结果：

菌株		
	SJ1503	SJ3717
去垢剂		
无	17mm	13mm
0.5 g/l	6mm	10mm
1.0 g/l	4mm	7mm

因此，从以上数据可以看到肽添加物的存在使得到的洗涤性能明显提高。

实施例 15

带有 N-末端肽添加物的改进的 *H. insolens* 脂解酶的构建

从实质上如 WO 96/13580 中描述的 *H. insolens* DSM1800 中分离编码亲本脂解酶的基因, 使用质粒 pIV11303 作为质粒模板将 3 种不同的肽添加物加入到成熟酶的 N-末端。

pIVI303 的构建(编码 *H. insolens* 脂解酶的变体, 这种脂解酶的变体在 ATG 下游的 304-369 碱基对区存在突变, 同时氨基酸序列没有发生变化, 并且除去了可能阻止 Chameleon 双链试剂盒的使用的可能的 DNA 二级结构。按照已描述的方案使用 Stratagene 的 Chameleon 双链定点诱变试剂盒(产品号 200509)构建所说的质粒。

pIVI296 作为质粒模板, 引物 7258 作为选择引物。

7258: 5'p gaa tga ctt ggt tga cgc gtc acc agt cac 3'

(这样就把在氨苄青霉素抗性基因发现的并用于切割的 ScaI 位点转变成 MluI 位点)。

引物 9349 用作为诱变引物:

9349: 5'p gag tcc cac atc cga aac atc tgg ata caa gga gta gga gga cct tac gac gcc gcg 3'

1. 变体: 包含下列突变的 HILv4s : PPRRPR(代替了天然 *H. insolens* 原肽中的 PELVAR)

pIVI335 的构建:

按照已描述的方案使用 Stratagene 的 Chameleon 双链定点诱变试剂盒(产品号 200509)构建所说的质粒。 pIVI303 作为质粒模板。

引物 7887 用作为选择引物:

7887: :5'p-gaa tga ctt ggt tga gta ctc acc agt cac 3'

(这样就把在氨苄青霉素抗性基因发现的并用于切割的 MluI 位点转变成 ScaI 位点)。

引物 19473 用作为诱变引物:

19473: 5'p ac cat acc ccg gcc gct cct cct agg cgt cct cgg cag ctg gga gcc 3

2. 变体: 包含下列突变的 HILv1s : SPRRRP(代替了天然 *H. insolens* 原肽中的 ELVARQ)

pIVI1359 的构建:

按照已描述的方案使用 Stratagene 的 Chameleon 双链定点诱变试剂盒 (产品号 200509) 构建所说的质粒。pIVI303 作为质粒模板。引物 7887 (参见上文) 用作为选择引物。引物 21992 用作为诱变引物:

21992: 5'p ac cat acc ccg gcc gct cct agc cct ccg cgg cgg ccg ctg gga gcc atc gag aac ggc3'

3. 变体: 包含下列突变的 HILv2s : SPPRP (代替了天然 *H. insolens* 原肽中的 ELVARQ)

pIVI360 的构建:

按照已描述的方案使用 Stratagene 的 Chameleon 双链定点诱变试剂盒 (产品号 200509) 构建所说的质粒。pIVI303 作为质粒模板。引物 7887 用作为选择引物。下列引物用作为选择引物:

5'p ac cat acc ccg gcc gct cct agc cct ccg cgg ccg ctg gga gcc atc gag aac ggc 3

4. 变体: 包含下列突变的 HILv3s : SPIRK (代替了天然 *H. insolens* 原肽中的 ELVARQ)

pIVI361 的构建:

按照已描述的方案使用 Stratagene 的 Chameleon 双链定点诱变试剂盒 (产品号 200509) 构建所说的质粒。pIVI303 作为质粒模板。引物 7887 用作为选择引物。引物 21994 用作为诱变引物:

21994: 5'p ac cat acc ccg gcc gct cct agc cct ata cgt aag ctg gga gcc atc gag aac ggc 3

5. 米曲酶表达载体的构建

pIVI296 :

在 WO 96/13580 的实施例 2 中描述了 pA2L79。此质粒包含插入到米曲酶表达质粒 pD414 的 *H. insolens* 脂解酶的 cDNA 序列。用限制性内切酶 HindIII 和 XhoI 切割 PA2L79。用琼脂糖凝胶纯化含有编码脂解酶的 cDNA 序列 (1088 bp) 的片段。用限制性内切酶 HindIII 和 XhoI 切割 pHD414, 并在琼脂糖凝胶上纯化载体。

将纯化的载体片段 (pHD414) 和含有脂酶的片段连接, 产生了 pIVI296。

通过使用在上文的材料和方法部分公开的一般转化方法，用上述的每一个表达载体转化米曲酶 IFO 4177。分别分离每一种类型的一个转化体作为 HILv1-4s。在 30 °C 下 500 ml YPM 培养基(10g/l bacto 酵母提取物、20g/l bacto 胨、20g/l 麦芽糖)中用摇床将 *H. insolens* 转化体培养 3 天。

按照用于改进的 *H. lanuginosa* 脂解酶的方法过滤发酵上清液。

纯化步骤 1：-将 1 升发酵上清液的 pH 调节到 8，并将其稀释使此上清液的导电率低于 4mSi。

步骤 1：在阴离子交换剂 DEAE A50 上处理发酵上清液。

使用适当孔大小的 Scintared 玻璃漏斗用 25 mM Tris-醋酸盐缓冲液 (pH8)洗涤并平衡 Pharmacia 的 DEAE-Sephadex A50。然后使用 Scintared 玻璃漏斗将发酵上清液装入到 DEAE-Sephadex A50 中。在 pH 为 8 时，*H.insolence* 的脂解活性不与阴离子交换剂结合，收集 DEAE-Sephadex A50 上的洗脱液。

步骤 2：通过加入稀释的醋酸 DEAE-Sephadex 中的流出物的 pH 调节至 4.5。通过加入水把电导率调节到 4 mSi 以下。

在 SP-琼脂糖凝胶上进行阳离子交换层析

用 Pharmacia 的 Sepharose Fast Flow Code 号 17-0729-01 装载 50 ml 柱。然后用 25mM 乙酸钠缓冲液(pH4.5)洗涤并平衡此柱。

将含有脂解酶活性的样品的 pH 调节到 4.5，导电率调节到 4 mSi 以下。然后用含有 1M NaCl 的 25mM 醋酸盐缓冲液(pH4.5)以线性盐梯度洗脱结合到 SP-琼脂糖凝胶上的脂解酶活性。将含有脂解酶活性并在 A280 /A260 下的紫外吸收比高于 1.8 的组分合并。在 SDS-PAGE 上检查样品的纯度。

N-末端肽添加物的鉴定

确定 HILvls 脂解酶的 N-末端氨基酸的序列(即为原肽中的最后 5 个氨基酸残基和成熟酶(ELVARQ)的第一个氨基酸残基已由 SPPRRP 替代的变体)。

发现的 N-末端氨基酸的序列为 Arg-Arg-Pro-Leu-Gly-Ala-Ile-，相当于替代序列的最后三个氨基酸残基和替代处后面的前 4 个氨基酸残基。

也确定了 HILv2s 脂解酶的 N-末端氨基酸的序列(即为原肽中的最后 5

个氨基酸残基和成熟酶(ELVARQ)的第一个氨基酸残基已由 SPPRP 替代的变体)。

发现的 N-末端氨基酸的序列为 Arg-Pro-Leu-Gly-Ala-Ile-Glu-Asn，相当于替代序列的最后 2 个氨基酸残基和替代处后面的前 6 个氨基酸残基。

实施例 16

改进的 *Humicola insolens* 脂解酶的鉴定

在含有 0.5g/l、1.0g/l 和 1.5g/l PCS-去垢剂的 PCS-平板上鉴定分别由菌株 HILv1s、HILv2s、HILv3s(实施例 21 中所描述的)和野生型菌株 HIL 产生的含有肽添加物的改进的 *Humicola insolens* 脂解酶的脂酶活性。

用吸管(4mm)将 25 μ l(相当于 5LU)纯化的改进的 HILv1s、HILv2s、HILv3s 和野生型菌株 HIL 脂酶加入到 PCS-平板上的孔中，分别培养 3 小时和 6 小时。

所得的结果列于下表：

变体	0.5 g/l PCS-去垢剂	1.0 g/l PCS-去垢剂	1.5 g/l PCS-去垢剂
HIL(野生型)	4mm	4mm(弱)	0mm
HILv1s	6mm	5mm	4mm(弱)
HILv2s	5mm	4mm	0mm
HILv3s	6mm	6mm	5mm

在含有 FY-去垢剂的 PCS-平板上培养 3 小时。

变体	0.5 g/l PCS-去垢剂	1.0 g/l PCS-去垢剂	1.5 g/l PCS-去垢剂
HIL(野生型)	4mm	4mm(弱)	0mm
HILv1s	7mm	5mm	4mm(弱)
HILv2s	5mm	5mm(弱)	4mm(弱)
HILv3s	6mm	6mm	4mm(弱)

在含有 PCS-去垢剂的 PCS-平板上培养 6 小时。



从上表的数据可以看出，与野生型脂酶相比，修饰脂酶变体(即由 HILv1s、HILv2s、HILv3s 产生的脂酶)在 PCS-去垢剂存在的情况下通常具有较高的脂酶活性。

实施例 17

带有 C-末端序列的修饰的 *H. lanuginosa* 脂解酶的构建

将 C-末端肽添加物加入到包含 N-末端肽添加物 SPIRRRP 和内部突变 D57G、N94K、D96L、Q249R 的 *H. lanuginosa* 脂解酶中。

1. 变体 HLv13s(带有 C-末端肽添加物的 HLv12s : 270R,271R,272P, 终止)

质粒 pS 14-1 的构建:

按照已描述的方案使用 Stratagene 的 Chameleon 双链定点诱变试剂盒 (产品号 200509) 构建所说的质粒。

pIVI245 作为质粒模板(在实施例 6 中描述了 pIVI245 的构建), 引物 7258 用作为选择引物:

#7258: 5'p gaa tga ctt ggt tga cgc gtc acc agt cac 3'(这样就把在氨苄青霉素抗性基因发现的并用于切割的 ScaI 位点转变成 MluI 位点)。

引物 20694 用作为诱变引物:

20694: 5'p-gg gac atg tct tcg acg acc gta gcg gct ggg tcg act c 3'.

2. 变体 HLv14s(带有突变 HLv12s : 270R,271R,终止)

质粒 pS 20-2 的构建:

按照已描述的方案使用 Stratagene 的 Chameleon 双链定点诱变试剂盒 (产品号 200509) 构建所说的质粒。

pIVI245 作为质粒模板(在实施例 6 中描述了 pIVI245 的构建), 引物 7258 用作为选择引物:

7258: 5'p-gaa tga ctt ggt tga cgc gtc acc agt cac 3'(这样就把在氨苄青霉素抗性基因发现的并用于切割的 ScaI 位点转变成 MluI 位点)。

引物 20695 用作为诱变引物:

20695: 5'p-gg gac atg tct tcg gcg gta ggc gcg gct ggg tcg ac 3'

产生酶变体

以与实施例 6 所描述的类似的方式，在共转化步骤使用质粒 pToC202 和使用米曲酶 JAL125 作为宿主细胞产生酶变体。

HLvl2s 中存在 C-末端序列的检验

使用标准方法，含有 C-末端序列 Arg-Arg-Pro 的 A 1mg HLvl2s 样品在降解之前用赖氨酰-特异性的蛋白酶进行 S-卡波克斯合金酰胺甲基化作用。使用反相 HPLC 分离生成的肽，对收集的组分进行辅助基质的激光解吸电离 time-of-flight 质谱法分析。发现了包含带有 3906.7 Da 试验质量的肽的 A 组分。在实验误差范围内，此质量与含有 RRP 序列的 HLvl2s 的 C-末端肽的理论质量(为 3906.4 Da)相同。

在此组分中确定了此肽的氨基酸序列为 HLvl2s 的 C-末端肽的正确氨基酸序列，并且其含有 C-末端序列 Arg-Arg-Pro：

Ile-Glu-Gly-Ile-Asp-Ala-Thr-Gly-Gly-Asn-Asn-Arg-Pro-Asn-Ile-Pro-Asp-Ile-Pro-Ala-His-Leu-Trp-Tyr-Phe-Gly-Leu-Ile-Gly-Thr-Cys-Leu-Arg-Arg-Pro

C-末端序列：

洗涤结果： 5g/l 灭活的 Ariel Futur， 20 分钟， 1 个周期 TOM， 30℃， 18°dH。以每升洗涤液中酶蛋白的毫克数计量所说的酶。

HLvl3s: SPIRPR + D57G, N94K, D96L, Q249R, 270R, 271R, 272R

HLvl4s: SPIRPR + D57G, N94K, D96L, Q249R, 270R, 271R

变体	dR(0.25 mgEP/l)	dR(1 mgEP/l)
HLvl2s	5	9
HLvl3s	1	3
HLvl4s	5	9.5

实施例 18

通过与 Clostripain(EC 3.4.22.8; Sigma 产品号 C-0888)一起延长培养，来切除部分 HLvl5s(含有 N-末端肽添加物 SPIRPR，并在 *H. lanuginosa* 脂解酶的成熟部分包含下列突变的 HLvl5s： EP,D57G, N94K, D96L, L97M, Q249R)的 N-末端序列。

培养混合物包含：溶解在包含 2.5 mM DTT 和 1mM 氯化钙的 25mM 磷酸钠(pH 7.4)中的 HLv15s(1mg/ml)和 Clostripain(20μg/ml)。

在与 Clostripain 一道培养之前，60%的脂酶携带完整的原肽(N-末端氨基酸序列 SPIRPRP)，而 10%的脂酶已经失去了第一个丝氨酸残基(N-末端氨基酸序列 PIRPRPV)，30%的脂酶失去了原肽的前 5 个氨基酸残基(N-末端氨基酸序列 RPVSQDL)。

在环境温度下培养 62 小时后(形成 HLv15s-C)，60%的脂酶已经失去了原肽的 4 个氨基酸残基(形成下列肽序列 PRPVSQ)；20%脂酶失去了 5 个氨基酸残基(于是具有肽序列 RPVSQD)；而 20%具有 6 个氨基酸残基(于是具有肽序列 PVSQDL)。

通过 N-末端氨基酸序列的测定来确定原肽加工，应该注意到所给出的百分数为概数。

变体	肽添加物	
HLv15s	60 % SPIRPRPVSQD 10 % PIRPRPVSQD 30 % RPVSQD	D57G, N94K, D96L, L97M, Q249R
HLv15s-C	60 % PRPVSQ 20 % RPVSQ 20 % PVSQDL	D57G, N94K, D96L, L97M, Q249R

用 clostripain 处理的修饰的脂解酶的一次循环的洗涤性能

对用 clostripain 处理的 *H. lanuginosa* 脂酶变体 HLv15s 进行一次循环的洗涤性能实验(在上文的材料和方法部分已描述)。对 clostripain 处理的样品和 clostripain 未处理的样品进行洗涤实验。所说的洗涤实验在 5g/l 酶灭活的 Ariel Futur 中进行(Procter 和 Gamble)。在 30 °C 下将猪油弄脏的布洗涤 20 分钟。实验的脂酶浓度为 0、5000 LU/l 和 12500 LU/l。

将去垢剂溶解在大约 18° dH(德国硬度)的水中。洗涤液的 pH 为大约 10.3。在 1000ml 的洗涤液中洗涤 7 块布。洗涤后，将这些布在流动的自来水中冲洗 15 分钟，然后室温下过夜空气干燥。

评价：在 460 nm 下测定这些布样的反射率，脂酶的性能(R)计算如下：

$$R = \frac{\text{反射率} = R_{\text{在含有脂酶的去垢剂中洗涤的布}} - R_{\text{在不含脂酶的去垢剂中洗涤的布}}}{\text{酶的突变和添加物描述如上。}}$$

酶的突变和添加物描述如上。

下表列出了 $_R$ 值。

变体	+/- 用 clostripain 处理	低剂量	$_R$	高剂量	$_R$
HLv15s	没有 clostripain 处理	5000LU/l	10	12500LU /l	13
HLv15s -C	+ clostripain 处理	5000LU/l	6	12500LU /l	7

所得的结果表明，完整的肽添加物的存在产生最好的洗涤性能。减少的(但没有完全除去)肽能改进洗涤性能，特别是带正电的氨基酸残基存在于此添加物中时。

实施例 19

含有半胱氨酸桥(HLv16s)的改进的 *H. lanuginosa* 脂解酶

含有下列突变的改进的 *H. lanuginosa* 脂解酶 HLv16s： N94K、D96L、E239C 和 Q249R 和肽添加物 SCIRR。

亲本酶 HLv16 包含下列突变： N94K、D96L 和 Q249R。

HLv16s 的构建如下：

1. 在野生型 *H. lanuginosa* 脂解酶中构建 N94K 和 D96L 突变

pIVI290 的构建：

按照已描述的方案使用 Stratagene 的 Chameleon 双链定点诱变试剂盒构建所说的质粒，使用 pAHL(参见 WO 92/05249 的图 6)作为质粒模板，引物 7258 和 7770 作为选择引物。

7258: 5'p gaa tga ctt ggt tga cgc gtc acc agt cac 3'(这样就把在氨苄青霉素抗性基因发现的 ScaI 位点转变成 MluI 位点)(ScaI 用于切割)。

7770: 序列: 5'p tct agc cca gaa tac tgg atc aaa tc 3(改变了在野生型 *H. lanuginosa* 脂酶基因中发现的 ScaI 位点)。

引物 8932 用作诱变引物。

8932: 5'pgaac tgg ata gga aat ttg aag ttc ctg ttg aaa gaa ata aat gac 3'(导入 N94K, D96L)

2. HLv16s 的构建(SCIRR、N94K、D96L、E239C、Q249R)

pIVI319 的构建:

按照已描述的方案使用 Stratagene 的 Chameleon 双链定点诱变试剂盒 (产品号 200509) 构建所说的质粒, 使用 pIVI290 作为质粒模板, 引物 7887 作为选择引物。

7887: 5'-p-gaa tga ctt ggt tga gta ctc acc agt cac 3' (将在氨苄青霉素抗性基因中发现的导入 MluI 位点转变成 ScaI 位点)(MluI 用于切割)

引物 8829, 9639 and 9646 用作诱变引物。

8829: 5'-p-ggc ggc aat aac cgg ccg aac att ccg gat atc cc 3' (导入 Q249R)

9639: 5'-p-at atc gtg aag ata tgc ggc att gat gcc acc 3' (导入 E239C)

9646: 5'-p-cg gcc ttg gct agc tgt att cgt cga gag gtc 3' (将原肽的 SPIRR 改变成 SCIRR)

HLv16s 和 HLV16 酶的产生

将米曲酶 JAL 125 作为宿主细胞以实施例 6 描述的相似方式产生此酶。接下来, 将此酶进行 1 个循环的洗涤性能实验(使用灭活的 Ariel Future 作为去垢剂, 分别使用 0.25 mg 酶蛋白/升和 1.0mg 酶蛋白/升的酶量)。

得到下列的结果:

	dR(0.25 mg EP/l)	dR(1.0 mg EP/l)
HLv16s	3	7
HLV16	1	2

从以上数据可以看出, 在所说的肽添加物和此酶的成熟部分中间含有半胱氨酸桥的 HLv16s 的洗涤性能明显得到改进。

•

(2) SEQ ID NO: 2 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 26 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: desc = "合成 DNA"

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 2:

TCTAGCCCAG AATACTGGAT CAAATC

26

(2)SEQ ID NO: 3 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 55 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: /desc = "引物 1"

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 3:

AACAGATCTT GCGAGACCTC TCTACGTATA GGGCTAGCGA
GCGCGGCGCT GATCG

55

(2)SEQ ID NO: 4 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 21 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: /dese = "引物 2"

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 4:
GTTGTGTGGA ATTGTGAGCG G

21

(2)SEQ ID NO: 5 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 54 个碱基对

(B)型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: /desc = "寡 8479"

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 5:
GCGTGGACGG CCTTGGCTAG CCCTATTCGT CCTCGACCGG
TCTCGCAGGA TCTG

54

(2)SEQ ID NO: 6 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 21 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: /dese = "引物 3"

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 6:
AGAAATCGGG TATCCTTTCA G

21

(2)SEQ ID NO: 7 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 21 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: /desc="引物 LWN9476"

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 7:

CGAATTCGAT GCGTTCCAGG GTGGTGGCAG G 21

(2)SEQ ID NO: 8 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 74 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: /desc="引物 LWN9472"

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 8:

CGAATTCACG CGTCGCCGCG TAGCCAGCGG CCGGGCGCGG
GCGGATCGGG CTGGGCGCGG TGGCCGCCAT TGCC 74

(2)SEQ ID NO: 9 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 74 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: /desc="引物 LWN9473"

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 9:

CGAATTCACG CGTCGCCGCG TAGCCAGCGG CCTTGCGCGG
GCGGATCGCC GTGGGCGCGG TGGCCGCCAT TGCC

(2)SEQ ID NO: 10 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 74 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: /dese =“引物 LWN9471”

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 10:

CGAATTCACG CGTCGCCGCG TAGCCAGCGG CCGGGCGCGG
ACGGCGCGTC GAGGGCGCGG TGGCCGCCAT TGCC 74

(2)SEQ ID NO: 11 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 74 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: /desc =“引物 LWN9474”

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 11:

CGAATTCACG CGTCGCCGCG TAGCCAGCGG CCGGGCGCGG
GCGGATCGGG CCGGGCGCGG TGGCCGCCAT TGCC 74

(2)SEQ ID NO: 12 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 68 个碱基对

∴

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: /desc =“引物 LWN9475”

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 12:

CGAATTCACG CGTCGCCGCG TAGCCAGCGG CCCGGCGGAT
CGGGCTGGGC GCGGTGGCCGC CCATTGCC 68

(2)SEQ ID NO: 13 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 21 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: /desc =“引物 LWN9470”

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 13:

CGAATTCACG QGTCGCCGCG TAGCCAGCGG CCGGACGCGG
CCTGGGACGC GGGCGGGGCG CCGTGGCCGC CATTGCC
77

(2)SEQ ID NO: 14 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 105 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: /desc =“引物 4”



(xi)序列描述: SEQ ID NO: 14:

GCTCCTCATG GTGGATCCCC AGTTGTGTAT ATAGAGGATT
GAGGAAGGAA GAGAAGTGTG GATAGAGGTA AATTGAGTTG
GAAACTCCAA GCATGGCATC CTTGC

105

(2)SEQ ID NO: 15 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 876 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: DNA(基因组)

(vi)原始来源:

(B)菌株: *H. lanuginosa* DSM 4109

(ix)特征:

(A)名称/关键词: CDS

(B)位置: 1..876

(ix)特征:

(A)名称/关键词: sig_肽

(B)位置: 1..66

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 15:

ATG AGG AGC TCC CTT GTG CTG TTC TTT GTC TCT GCG TGG ACG GCC TTG	48
Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu	
1 5 10 15	
GCC AGT CCT ATT CGT CGA GAG GTC TCG CAG GAT CTG TTT AAC CAG TTC	96
Ala Ser Pro Ile Arg Arg Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe	
20 25 30	
AAT CTC TTT GCA CAG TAT TCT GCA GCC GCA TAC TGC GGA AAA AAC AAT	144
Asn Leu Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn	
35 40 45	
GAT GCC CCA GCT GGT ACA AAC ATT ACG TGC ACG GGA AAT GCC TGC CCC	192
Asp Ala Pro Ala Gly Thr Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro	
50 55 60	

GAG GTA GAG AAG GCG GAT GCA ACG TTT CTC TAC TCG TTT GAA GAC TCT 240
 Glu Val Glu Lys Ala Asp Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser
 65 70 75 80

GGA GTG GGC GAT GTC ACC GGC TTC CTT GCT CTC GAC AAC ACG AAC AAA 288
 Gly Val Gly Asp Val Thr Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys
 85 90 95

TTG ATC GTC CTC TCT TTC CGT GGC TCT CGT TCC ATA GAG AAC TGG ATC 336
 Leu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile
 100 105 110

GGG AAT CTT AAC TTC GAC TTG AAA GAA ATA AAT GAC ATT TGC TCC GGC 384
 Gly Asn Leu Asn Phe Asp Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly
 115 120 125

TGC AGG GGA CAT GAC GGC TTC ACT TCG TCC TGG AGG TCT GTA GCC GAT 432
 Cys Arg Gly His Asp Gly Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp
 130 135 140

ACG TTA AGG CAG AAG GTG GAG GAT GCT GTC AGG GAG CAT CCC GAC TAT 480
 Thr Leu Arg Gln Lys Val Glu Asp Ala Val Arg Glu His Asp Tyr
 145 150 155 160

CGC GTG GTG TTT ACC GGA CAT AGC TTG GGT GGT GCA TTG GCA ACT GTT 528
 Arg Val Val Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val
 165 170 175

GCC GGA GCA GAC CTG CGT GGA AAT GGG TAT GAT ATC GAC GTG TTT TCA 576
 Ala Gly Ala Asp Leu Arg Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser
 180 185 190

TAT GGC GCC CCC CGA GTC GGA AAC AGG GCT TTT GCA GAA TTC CTG ACC 624
 Tyr Gly Ala Pro Arg Val Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr
 195 200 205

GTA CAG ACC GGC GGA ACA CTC TAC CGC ATT ACC CAC ACC AAT GAT ATT 672
 Val Gln Thr Gly Gly Thr Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile
 210 215 220

GTC CCT AGA CTC CCG CCG CGC GAA TTC GGT TAC AGC CAT TCT AGC CCA 720
 Val Pro Arg Leu Pro Pro Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro
 225 230 235 240

GAG TAC TGG ATC AAA TCT GGA ACC CTT GTC CCC GTC ACC CGA AAC GAT 768
 Glu Tyr Trp Ile Lys Ser Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Arg Asn Asp
 245 250 255

ATC GTG AAG ATA GAA GGC ATC GAT GCC ACC GGC GGC AAT AAC CAG CCT 816
 Ile Val Lys Ile Glu Gly Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro
 260 265 270

AAC ATT CCG GAT ATC CCT GCG CAC CTA TGG TAC TTC GGG TTA ATT GGG 864
 Asn Ile Pro Asp Ile Pro Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly
 275 280 285

ACA TGT CTT TAG 876
 Thr Cys Leu *
 290

(2)SEQ ID NO: 16 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 292 个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 蛋白质

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 16:

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



Val Gln Thr Gly Gly Thr Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile
210 215 220

Val Pro Arg Leu Pro Pro Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro
225 230 235 240

Glu Tyr Trp Ile Lys Ser Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Arg Asn Asp
245 250 255

Ile Val Lys Ile Glu Gly Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro
260 265 270

Asn Ile Pro Asp Ile Pro Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly
275 280 285

Thr Cys Leu *
290



(2)SEQ ID NO: 17 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 6 个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 肽添加物

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 17:

Arg-Pro-Val-Ser-Gln-Asp

(2)SEQ ID NO: 18 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 5 个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 肽添加物

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 18:

Ser-Pro-Ile-Arg-Met

5

(2)SEQ ID NO: 19 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 6 个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 肽添加物

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 19:

Ser-Pro-Ile-Arg-Ala-Arg

5

(2)SEQ ID NO: 20 的信息:



(i)序列特征:

(A)长度: 6 个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子链型: 肽添加物

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 20:

Ser-Pro-Ile-Pro-Arg

5

(2)SEQ ID NO: 21 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 6 个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 肽添加物

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 21:

Ser-Pro-Ile-Arg-Glu-Arg

5

(2)SEQ ID NO: 22 的信息:

(i) 序列特征:

(A)长度: 5 个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 肽添加物

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 22:

Ser-Pro-Ile-Arg-Lys

5

(2)SEQ ID NO: 23 的信息:



(i)序列特征:

(A)长度: 5 个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 肽添加物

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 23:

Ser-Pro-Ile-Lys-Lys

5

(2)SEQ ID NO: 24 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 6 个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 肽添加物

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 24:

Ser-Pro-Ile-Arg-Arg-Pro

5

(2)SEQ ID NO: 25 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 5 个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(D)拓扑结构: 线性

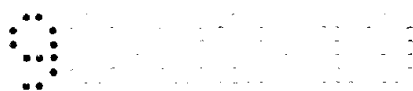
(ii)分子类型: 肽添加物

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 25:

Ser-Pro-Pro-Arg-Arg

5

(2) SEQ ID NO: 26 的信息:



(i)序列特征:

(A)长度: 5 个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 肽添加物

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 26:

Ser-Pro-Iso-Pro-Arg

5

(2)SEQ ID NO: 27 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 5 个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 肽添加物

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 27:

Ser-Pro-Arg-Pro-Arg

5

(2)SEQ ID NO: 28 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 4 个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 肽添加物

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 28:

Ser-Pro-Ile-Arg

(2)SEQ ID NO: 29 的信息:

(i)序列特征:



(A)长度: 5 个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 肽添加物

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 29:

Ser-Pro-Ile-Arg-Arg

5

(2)SEQ ID NO: 30 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 4 个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 肽添加物

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 30:

Ser-Cys-Ile-Arg-Arg

5

(2)SEQ ID NO: 31 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 7 个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 肽添加物

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 31:

Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro

5

(2)SEQ ID NO: 32 的信息:

(i)序列特征:



(A)长度: 7 个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 肽添加物

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 32:

Ser-Cys-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro

5

(2)SEQ ID NO: 33 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 7 个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 肽添加物

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 33:

Ser-Pro-Arg-Pro-Arg-Thr

5

(2) SEQ ID NO: 34 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 7 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽添加物

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 34:

Ser-Pro-Phe-Arg-Pro-Lys-Leu

5

2) SEQ ID NO: 35 的信息:

(i) 序列特征:



(A) 长度: 6 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽添加物

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 35:

Ser-Pro-Pro-Arg-Arg-Pro

5

2) SEQ ID NO: 36 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 6 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽添加物

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 36:

Ser-Pro-Ile-Arg-Arg-Glu

5

(2) SEQ ID NO: 37 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 6 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽添加物

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 37:

Ser-Pro-Pro-Arg-Pro-Pro

5

(i) SEQ ID NO: 38 的信息:

(i) 序列特征:



(A) 长度: 6 个氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(D) 拓扑结构: 线性
(ii) 分子类型: 肽添加物
(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 38:
Ser-Pro-Pro-Arg-Pro-Arg
5

(2) SEQ ID NO: 39:
(i) 序列特征:
(A) 长度: 6 个氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(D) 拓扑结构: 线性
(ii) 分子类型: 肽添加物
(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 39:
Ser-Pro-Pro-Trp-Trp-Pro
5

(2) SEQ ID NO: 40 的信息:
(i) 序列特征:
(A) 长度: 6 个氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(D) 拓扑结构: 线性
(ii) 分子类型: 肽添加物
(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 40:
Ser-Pro-Pro-Trp-Arg-Pro
5

(2) SEQ ID NO: 41 的信息:
(i) 序列特征:



(A) 长度: 6 个氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(D) 拓扑结构: 线性
(ii) 分子类型: 肽添加物
(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 41:
Ser-Pro-Pro-Arg-Trp-Pro
5

(2) SEQ ID NO: 42 的信息:
(i) 序列特征:
(A) 长度: 6 个氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(D) 拓扑结构: 线性
(ii) 分子类型: 肽添加物
(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 42:
Ser-Pro-Pro-Arg-Trp-Pro
5

(2) SEQ ID NO: 43 的信息:
(i) 序列特征:
(A) 长度: 6 个氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(D) 拓扑结构: 线性
(ii) 分子类型: 肽添加物
(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 43:
Ser-His-TrpArg-Arg-Trp
5

(2) SEQ ID NO: 44 的信息:
(i) 序列特征:



- (A) 长度: 5 个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (D) 拓扑结构: 线性
- (ii) 分子类型: 肽添加物
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 44:

Ser-His-Trp-Arg-Lys

5

(2) SEQ ID NO: 45 的信息:

- (i) 序列特征:
 - (A) 长度: 5 个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (D) 拓扑结构: 线性
- (ii) 分子类型: 肽添加物
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 45:

Ser-His-Trp-Arg-Arg

5

(2) SEQ ID NO: 46 的信息:

- (i) 序列特征:
 - (A) 长度: 7 个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (D) 拓扑结构: 线性
- (ii) 分子类型: 肽添加物
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 46:

Thr-Ala-Ile-Arg-Pro-Arg-Lys

5

(2) SEQ ID NO: 47 的信息:

- (i) 序列特征:



(A) 长度: 7 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽添加物

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 47:

Ser-Thr-Arg-Arg-Pro-Arg-Pro

5

(2) SEQ ID NO: 48 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 7 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽添加物

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 48:

Gly-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro

5

(2) SEQ ID NO: 49 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 7 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽添加物

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 49:

Leu-Pro-Phe-Arg-Glu-Arg-Pro

5

(2) SEQ ID NO: 50 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 7 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽添加物

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 50:

Ser-Arg-Ser-Arg-His-Asp-Ala

5

(2) SEQ ID NO: 51 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 7 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽添加物

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 51:

Ile-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Arg

5

(2) SEQ ID NO: 52 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 7 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽添加物

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 52:

Ser-Thr-Arg-Arg-Pro-Arg-Pro

5

(2) SEQ ID NO: 53 的信息:

(i) 序列特征:



(A) 长度: 7 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽添加物

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 53:

Thr-Ala-Ile-Arg-Pro-Arg-Lys

5

(2) SEQ ID NO: 54 的信息:

(i) 序列特征

(A) 长度: 6 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽添加物

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 54:

TrpArg-Trp-Arg-Trp-Arg

5

(2) SEQ ID NO: 55 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 5 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽添加物

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 55:

Glu-Pro-Ile-Arg-Arg

5

(2) SEQ ID NO: 56 的信息:

(i) 序列特征:



(A) 长度: 5 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽添加物

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 56:

Ser-His-Trp-Glu-Glu

5

(2) SEQ ID NO: 57 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 8 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽添加物

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 57:

Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro

5

(2) SEQ ID NO: 58 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 11 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽添加物

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 58:

Ser-Ser-Thr-Arg-Arg-Ala-Ser-Pro-Ile-Lys-Lys

5

10

(2) SEQ ID NO: 59 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 11 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽添加物

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 59:

Ala-Trp-Trp-Pro-Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro

5

10

(2) SEQ ID NO: 60 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 12 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽添加物

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 60:

Ala-Pro-Pro-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro

5

10

(2) SEQ ID NO: 61 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 12 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽添加物

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 61:

Ala-Pro-Pro-Pro-Arg-Thr-Arg-Pro-Arg-Pro-Ser

5

10

(2) SEQ ID NO: 62 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 8 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽添加物

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 62:

Ser-Pro-Lys-Arg-Lys-Pro-Arg-Pro

5

(2) SEQ ID NO: 63 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 9 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽添加物

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 63:

Ser-Gln-Arg-Ile-Lys-Gln-Arg-Ile-Lys

5

(2) SEQ ID NO: 64 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 8 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽添加物

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 64:

Ser-Pro-Pro-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro

5

(2) SEQ ID NO: 65 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 10 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽添加物

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 65:

Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg

5

10

(2) SEQ ID NO: 66 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 9 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽添加物

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 66:

Ser-Pro-Ile-Arg-Lys-Ala-Trp-Trp-Pro

5

(2) SEQ ID NO: 67 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 12 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽添加物

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 67:

Ala-Pro-Pro-Pro-Lys-Ala-Szr-Pro-Arg-Gln-Arg-Pro

5

10

(2) SEQ ID NO:68 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 15 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽添加物

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 68:

Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro-Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg

5

10

15

(2) SEQ ID NO: 69 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 8 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽添加物

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 69:

Ser-Pro-Pro-Arg-Trp-Pro-Arg-Arg

5

(2) SEQ ID NO: 70 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 8 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽添加物

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 70:

Ser-Pro-Pro-Arg-Trp-Pro-Arg-Trp

5

(2) SEQ ID NO: 71 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 8 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽添加物

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 71:

Ser-Pro-Pro-Arg-Trp-Pro-Trp-Arg

5

(2) SEQ ID NO: 72 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 8 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽添加物

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 72:

Ser-Pro-Pro-Trp-Arg-Pro-Arg-Arg:

5

(2) SEQ ID NO: 73 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 8 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽添加物

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 73:

Ser-Pro-Pro-Trp-Trp-Pro-Arg-Trp

5

(2) SEQ ID NO: 74 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 8 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽添加物

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 74:

Ser-Pro-Pro-Trp-Trp-Pro-Trp-Arg

(2) SEQ ID NO: 75 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 8 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽添加物

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 75:

Ser-Pro-Pro-Trp-Trp-Pro-Trp-Trp

5

(2) SEQ ID NO: 76 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 8 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽添加物

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 76:

Ser-Pro-Pro-Trp-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro

5

(2) SEQ ID NO: 77 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 30 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: other 核酸

(A) 描述: /desc = "引物 7887"

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 77:

gaatgacttg gttgagtact caccagtcac

30

(2) SEQ ID NO: 78:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 46 base pairs

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 描述: /dese = "引物 8932"

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 78:

gaactggata ggaaatttga agttcctgtt gaaagaaata aatgac 46

(2) SEQ ID NO: 79 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 30 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A)描述: /dese = "引物 7258"

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 79:

gaatgacttg gttgacgcgt caccagtcac

30

(2) SEQ ID NO: 80 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 26 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 描述: /dese = "引物 7770"

(xi) 序列描述: SEQ IDNO: 80:

tctagcccag aatactggat caaatc

26

(2) SEQ ID NO: 81 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 54 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 描述: /desc = "引物 8479"

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 81:

gcgtggacgg ccttggctag ccctattcgt cctcgaccgg tctcgcagtla tctg 54

(2) SEQ ID NO: 82 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 57 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 描述: /dese = "寡 1"

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 82:

GCGTGGACGG CCTTGGCC86(T/A) 66(A/T) 58(T/A) 67(T/A) 66(T/A) 575 66(T/A) GAGGTC TCG
CAGGATC TG

(2) SEQ ID NO: 83 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 93 个碱基对;

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A)描述: /desc = "寡 2"

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 83:

GTCTCTGCGT GGACGGCCTT GGCGGCGCCA CCTCCA67(T/A) 66(T/A) 575 66(T/A) 67(T/A)
66(T/A) 575 66(T/A) (6/7)(7/8)(C/G) 57(C/G) C57 (5/7)5(C/G) CTGT TTAACCAGTT CAATCTC

(2) SEQ ID NO: 84 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 30 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 描述: /desc = "引物 7887"

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 84:

gaatgacttg gttgagtact caccagtcac

30

(2) SEQ ID NO: 85 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 47 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 描述: /desc = "引物 19473"

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 85:

accatacccc ggccgctcct cctaggcgctc ctcggcagct eggagcc 47

(2) SEQ ID NO: 86:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 59 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 描述: /desc = "引物 21992"

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 86:

accatacccc ggccgctcct agccctccgc ggccggccgct gggagccatc gagaacggc 59

(2) SEQ ID NO: 87 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 21 个碱基对;

(B) 类型: 核酸

(C) SI?ZANDEDNESS: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 描述: /desc = "引物 21994"

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 87:

accataccce ggccgctcct agccctatac gtaagctggg agccatcgag aacggc 56

(2) SEQ ID NO: 88 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 56 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 描述: /desc = "引物 9349"

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 88:

gagtccaca tccgaaacat ctggatacaa ggagtaggag gaccttacgac gccgcg
56

(2) SEQ ID NO: 89 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 7 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽添加物

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 89:

Ser-Ala-Leu-Arg-Pro-Arg-Lys

5

(2) SEQ ID NO: 90 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 12 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽添加物

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 90:

Ala-Pro-Pro-Pro-Arg-Pro-Arg-Leu-Leu-Pro-Ile-Ser

5

10

(2) SEQ ID NO: 91:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 11 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽添加物

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 91:

Ala-Pro-Pro-Pro-Thr-Arg-Gln-Arg-Gln-Ser-Pro

5

10

(2) SEQ ID NO: 92 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 12 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽添加物

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 92:

Ala-Pro-Pro-Pro-Arg-Thr-Ile-Pro-Arg-Ser-Ser-Pro

5

10

(2) SEQ ID NO: 93 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 288 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(vi) 原始来源:

(B) 菌株: *Pseudomonas* sp.

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 93:

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

Arg Leu Gly Met Val Ile Arg Asp Asn Tyr Arg Met Asn His Leu Asp
 245 250 255

Glu Val Asn Gln Thr Phe Gly Leu Thr Ser Ile Phe Glu Thr Ser Pro
 260 265 270

Val Ser Val Tyr Arg Gln Gln Ala Asn Arg Leu Lys Asn Ala Gly Leu
 275 280 285

说明书附图

```

1   ATGAGGAGCTCCCTTGTGCTGTTCTTTGTCTCTGCGTGGACGGCCTTGGCCAGTCCTATT -
    M R S S L V L F F V S A W T A L A S P I -
21  CGTCGAGAGGTCTCGCAGGATCTGTTTAACCAAGTTCAATCTCTTTGCACAGTATTCTGCA -
    R R E V S Q D L F N Q F N L F A Q Y S A -
41  GCCGCATACTGCGGAAAAACAATGATGCCCCAGCTGGTACAAACATTACGTGCACGGGA -
    A A Y C G K N N D A P A G T N I T C T G -
61  AATGCCTGCCCCGAGGTAGAGAAGGCGGATGCAACGTTTCTCTACTCGTTTGAAGACTCT -
    N A C P E V E K A D A T F L Y S F E D S -
81  GGAGTGGGCGATGTCACCGGCTTCCTTGCTCTCGACAACACGAACAAATTGATCGTCCTC -
    G V G D V T G F L A L D N T N K L I V L -
101 TCTTTCCGTGGCTCTCGTTCCATAGAGAACTGGATCGGGAATCTTAACTTCGACTTGAAA -
    S F R G S R S I E N W I G N L N F D L K -
121 GAAATAAATGACATTTGCTCCGGCTGCAGGGGACATGACGGCTTCACTTCGTCTCTGGAGG -
    E I N D I C S G C R G H D G F T S S W R -
141 TCTGTAGCCGATACGTTAAGGCAGAAGGTGGAGGATGCTGTGAGGGAGCATCCCCACTAT -
    S V A D T L R Q K V E D A V R E H P D Y -
161 CGCGTGGTGTTTACCGGACATAGCTTGGGTGGTGCAATTGGCAACTGTTGCCGGAGCAGAC -
    R V V F T G H S L G G A L A T V A G A D -
181 CTGCGTGGAAATGGGTATGATATCGACGTGTTTTTCATATGGCGCCCCCGAGTCGGAAAC -
    L R G N G Y D I D V F S Y G A P R V G N -
201 AGGGCTTTTGCAGAATTCCTGACCGTACAGACCGGCGGAACACTCTACCGCATTACCCAC -
    R A F A E F L T V Q T G G T L Y R I T H -
221 ACCAATGATATTGTCCCTAGACTCCCGCCGCGGAATTTCGGTTACAGCCATTCTAGCCCA -
    T N D I V P R L P P R E F G Y S H S S P -
241 GAGTACTGGATCAAATCTGGAACCCCTTGTCCTCCGTCACCCGAAACGATATCGTGAAGATA -
    E Y W I K S G T L V P V T R N D I V K I -
261 GAAGGCATCGATGCCACCGCGGCAATAACCAGCCTAACATTCCGGATATCCCTGCGCAC -
    E G I D A T G G N N Q P N I P D I P A H -
281 CTATGGTACTTCGGGTTAATTGGGACATGTCTTTAG -
    L W Y F G L I G T C L *

```

图 1

1 ATGAAACGCATTTGTGGTTCCTGCTGTTGCTCGGTTTGTGATCAGCGCCGCGCTCGCT
 M K R I C G S L L L L G L S I S A A L A
 21 AGCCCTATACGTAGAGAGGTCTCGCAGGATCTGTTTAAACCAGTTCAATCTCTTTGCACAGTATTCTGCA
 S P I R R E V S Q D L F N Q F N L F A Q Y S A
 44 GCCGCATACTGCCGAAAAACAATGATGCCCCAGCTGGTACAAACATTACGTGCACGGGA
 A A Y C G K N N D A P A G T N I T C T G -
 64 AATGCCTGCCCCGAGGTAGAGAAGGCGGATGCAACGTTTCTCTACTCGTTTGAAGACTCT
 N A C P E V E K A D A T F L Y S F E D S -
 84 GGAGTGGGCGATGTCACCGGCTTCCTTGCTCTCGACAACACGAACAAATTGATCGTCTCTC
 G V G D V T G F L A L D N T N K L I V L -
 104 TCTTTCCGTGGCTCTCGTTCCATAGAGAACTGGATCGGGAATCTTAACTTCGACTTGAAA
 S F R G S R S I E N W I G N L N F D L K -
 124 GAAATAAATGACATTTGCTCCGGCTGCAGGGGACATGACGGCTTCACTTCGTCTCTGGAGG
 E I N D I C S G C R G H D G F T S S W R -
 144 TCTGTAGCCGATACGTTAAGGCAGAAGGTGGAGGATGCTGTGAGGGAGCATCCCCACTAT
 S V A D T L R Q K V E D A V R E H P D Y -
 164 CGCGTGGTGTTTACCGGACATAGCTTGGGTGGTGCATTGGCAACTGTTGCCGGAGCAGAC
 R V V F T G H S L G G A L A T V A G A D -
 184 CTGCGTGGAAATGGGTATGATATCGACGTGTTTTTCATATGGCGCCCCCGAGTCGGAAAC
 L R G N G Y D I D V F S Y G A P R V G N -
 204 AGGGCTTTTGCAGAATTCCTGACCGTACAGACCGGCGGAACACTCTACCGCATTACCCAC
 R A F A E F L T V Q T G G T L Y R I T H -
 224 ACCAATGATATTGTCCCTAGACTCCCGCCGCGGAATTTCGGTTACAGCCATTCTAGCCCA
 T N D I V P R L P P R E F G Y S H S S P -
 244 GAGTACTGGATCAAATCTGGAACCTTGTCCCCGTACCCGAAACGATATCGTGAAGATA
 E Y W I K S G T L V P V T R N D I V K I -
 264 GAAGGCATCGATGCCACCGGCGGCAATAACCAGCCTAACATTCCGGATATCCCTGCGCAC
 E G I D A T G G N N Q P N I P D I P A H -
 284 CTATGGTACTTCGGGTAAATTGGGACATGTCTTTAG
 L W Y F G L I G T C L *

图 2

1 ATGAAACGCATTGTGGTTCCCTGCTGTTGCTCGGTTTGTGCGATCAGCGCCGCGCTCGCC
M K R I C G S L L L L G L S I S A A L A

21 GAGGTCTCGCAGGATCTGTTTAACCAGTTCAATCTCTTTGCACAGTATTCTGCA
E V S Q D L F N Q F N L F A Q Y S A

39 GCCGCATACTGCGGAAAAACAATGATGCCCCAGCTGGTACAAACATTACGTGCACGGGA
A A Y C G K N N D A P A G T N I T C T G -

59 AATGCCTGCCCCGAGGTAGAGAAGGCGGATGCAACGTTTCTCTACTCGTTTGAAGACTCT
N A C P E V E K A D A T F L Y S F E D S -

79 GGAGTGGGCGATGTCACCGGCTTCCTTGCTCTCGACAACACGAACAAATTGATCGTCCTC
G V G D V T G F L A L D N T N K L I V L -

99 TCTTTCCGTGGCTCTCGTTCCATAGAGAACTGGATCGGGAATCTTAACCTCGACTTGAAA
S F R G S R S I E N W I G N L N F D L K -

119 GAAATAAATGACATTTGCTCCGGCTGCAGGGGACATGACGGCTTCACTTCGTCCTGGAGG
E I N D I C S G C R G H D G F T S S W R -

139 TCTGTAGCCGATACGTTAAGGCAGAAGGTGGAGGATGCTGTGAGGGAGCATCCCGACTAT
S V A D T L R Q K V E D A V R E H P D Y -

159 CGCGTGGTGTTTACCGGACATAGCTTGGGTGGTGCATTGGCAACTGTTGCCGGAGCAGAC
R V V F T G H S L G G A L A T V A G A D -

179 CTGCGTGGAAATGGGTATGATATCGACGTGTTTTTCATATGGCGCCCCCGAGTCGGAAAC
L R G N G Y D I D V F S Y G A P R V G N -

199 AGGGCTTTTGCAGAATTCCTGACCGTACAGACCGGCGGAACACTCTACCGCATTACCCAC
R A F A E F L T V Q T G G T L Y R I T H -..

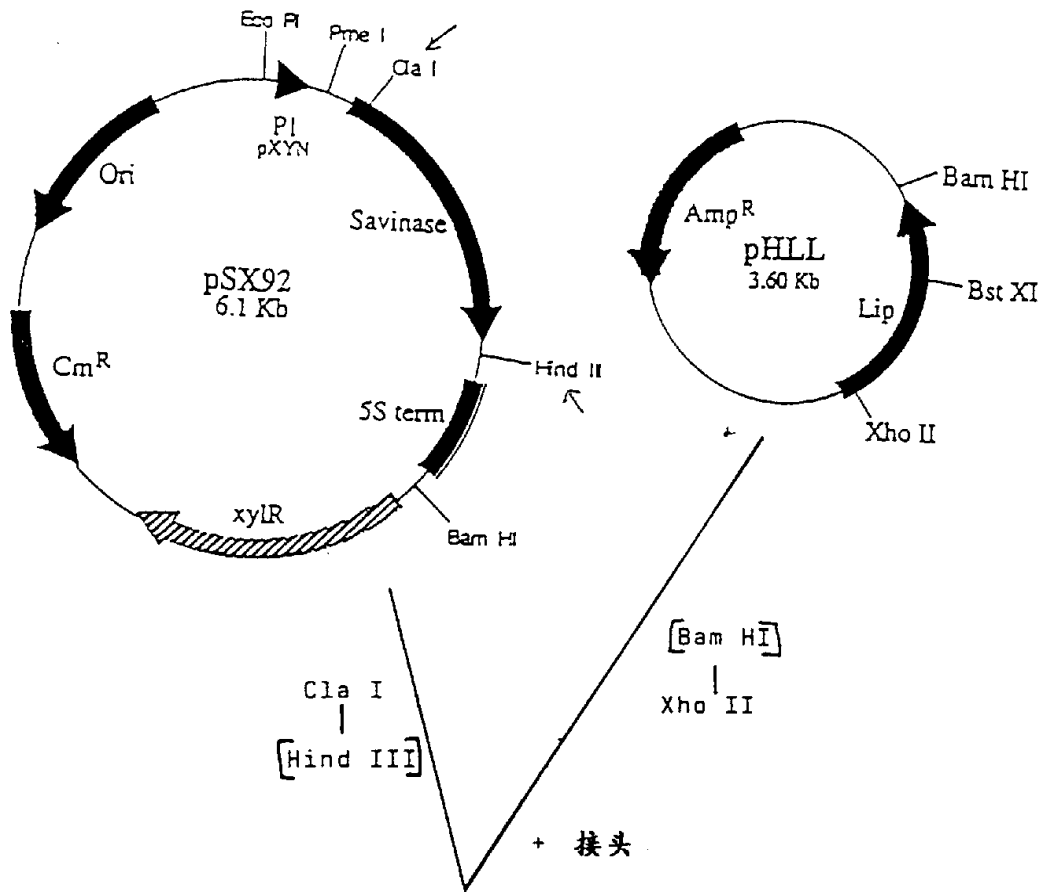
219 ACCAATGATATTGTCCCTAGACTCCCGCCGCGCGAATTTCGGTTACAGCCATTCTAGCCCA
T N D I V P R L P P R E F G Y S H S S P -

239 GAGTACTGGATCAAATCTGGAACCCCTTGTCCCCGTCACCCGAAACGATATCGTGAAGATA
E Y W I K S G T L V P V T R N D I V K I -

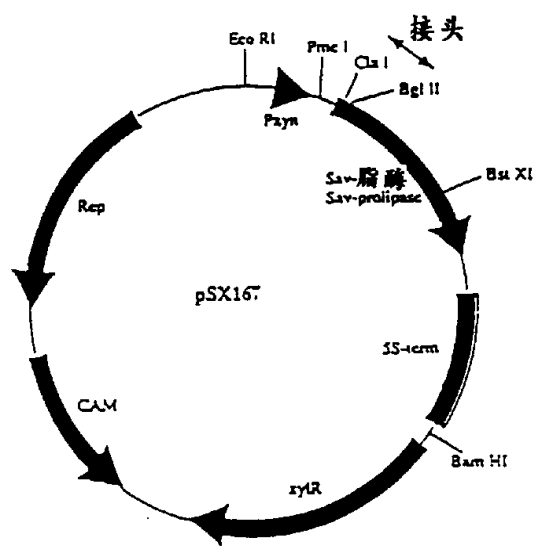
259 GAAGGCATCGATGCCACCGGCGGCAATAACCAGCCTAACATTCCGGATATCCCTGCGCAC
E G I D A T G G N N Q P N I P D I P A H -

279 CTATGGTACTTCGGGTTAATTGGGACATGTCTTTAG
L W Y F G L I G T C L *

图 3



pSX167 的构建



接头 pSX167: KFN 575/576

图 4

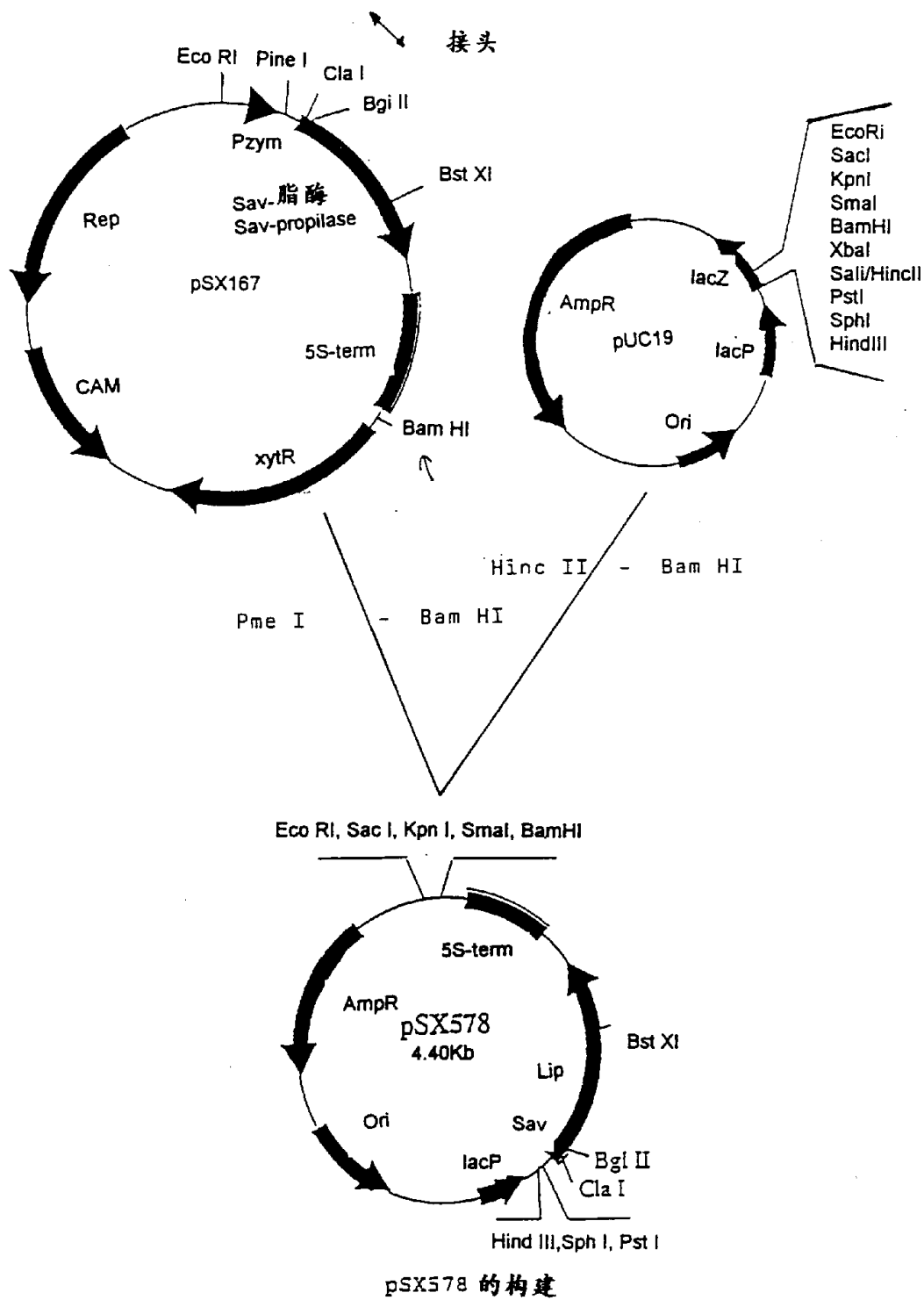


图 5

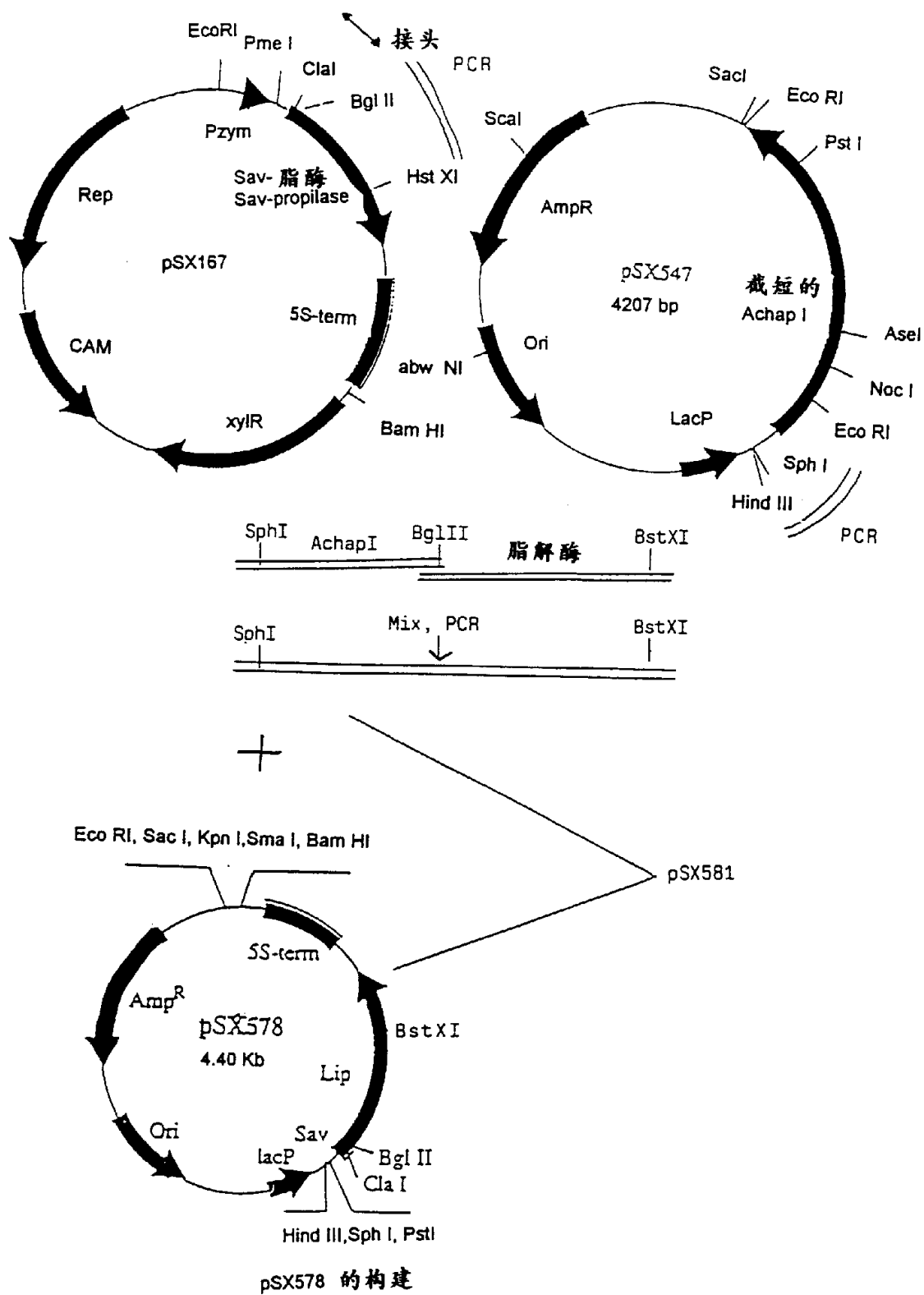
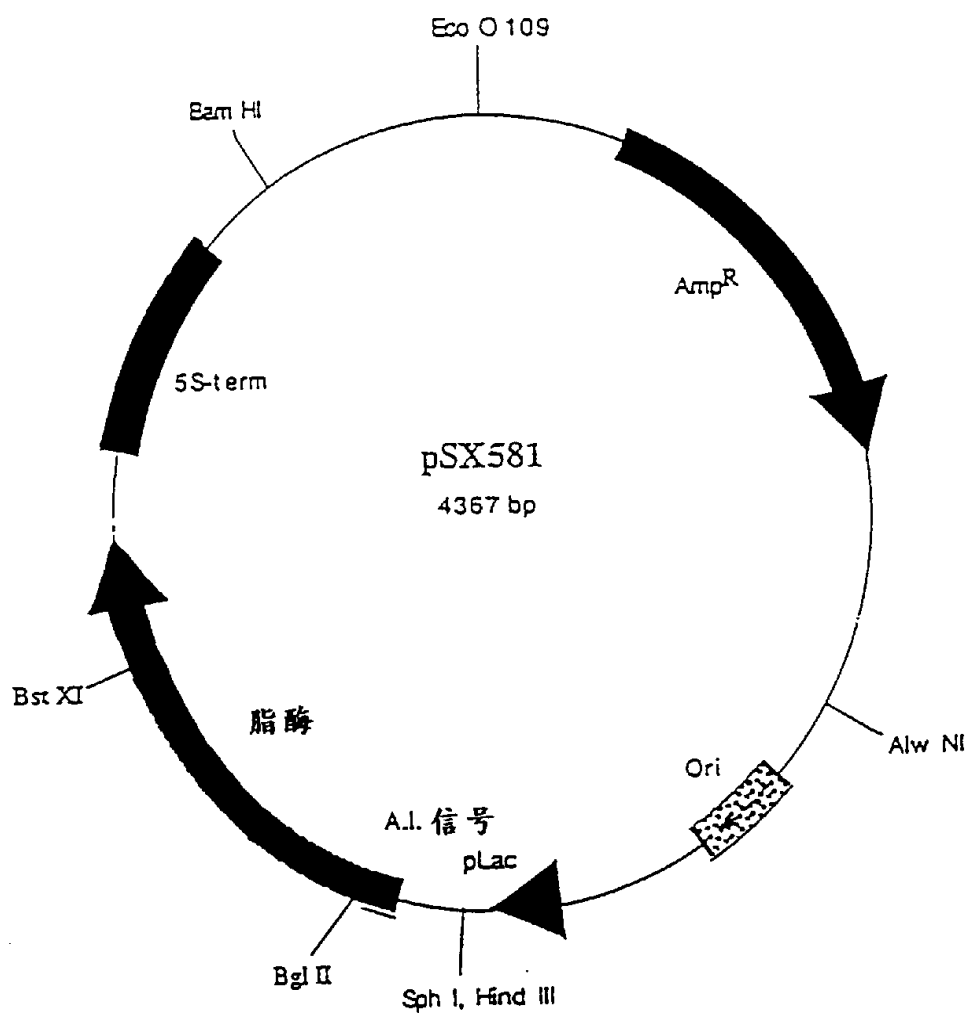
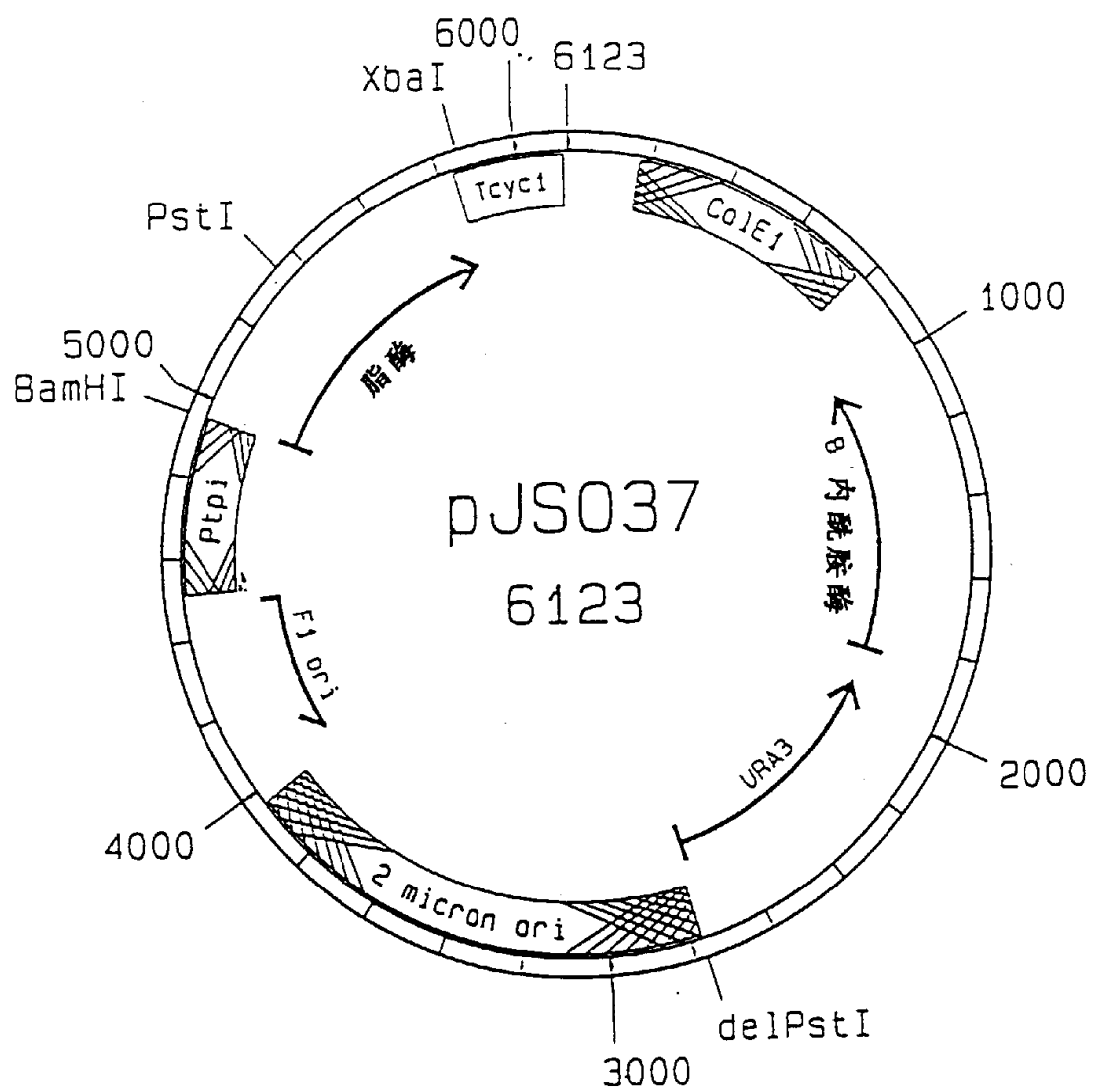


图 6



pSX581

图 7



pJS037

图 8

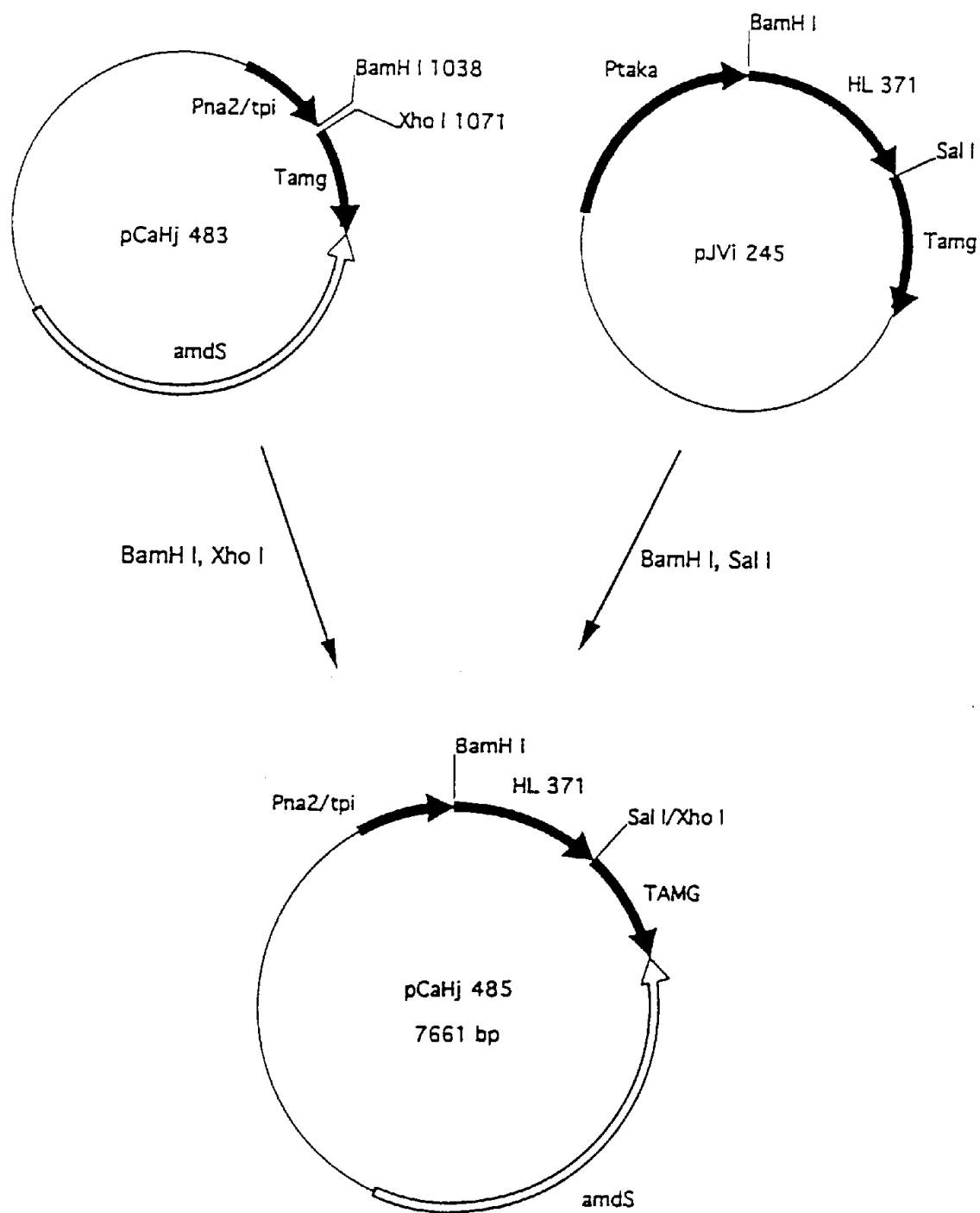


图 9