



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101848985 B

(45) 授权公告日 2014. 12. 03

(21) 申请号 200880114721. 8

(22) 申请日 2008. 11. 03

(30) 优先权数据

60/985, 619 2007. 11. 05 US

61/026, 056 2008. 02. 04 US

61/059, 403 2008. 06. 06 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 05. 05

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2008/012412 2008. 11. 03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/061380 EN 2009. 05. 14

(73) 专利权人 丹尼斯科美国公司

地址 美国加利福尼亚

(72) 发明人 A·肖 S·莱默尔 S·D·鲍尔

C·常 M·埃斯塔布鲁克

B·E·琼斯 C·卓依 M·科尔克曼

C·莱夫朗 C·弗勒门 W·韦勒

K·M·克拉格 M·高由

T·格雷卡尔 V·黄

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 陈迎春

(51) Int. Cl.

C11D 3/386 (2006. 01)

C12N 9/28 (2006. 01)

C12N 15/75 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1118172 A, 1996. 03. 06, 全文.

审查员 王彩虹

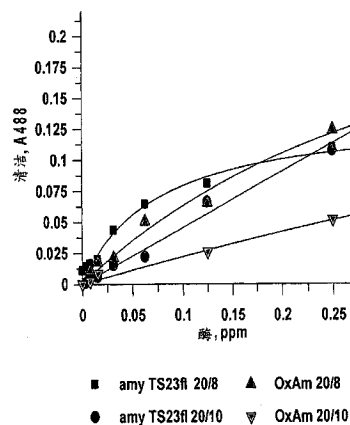
权利要求书3页 说明书75页 附图19页

(54) 发明名称

具有改变性质的杆菌物种 TS-23 的 α -淀粉酶变体

(57) 摘要

杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶的变体呈现提高的酶性能, 包括提高的热稳定性、降低的钙依赖性、提高的洗涤/清洁性能和烘烤能力。包含这些变体的组合物用于淀粉加工、淀粉液化、发酵、淀粉糖化、清洁、洗衣、织物退浆、烘烤和生物膜去除的方法中。



1. 一种亲本杆菌物种 TS-23 α -淀粉酶的变体,其中所述变体与 SEQ ID NO:2 具有至少 90% 的氨基酸序列同一性,其中所述变体具有淀粉酶活性,并且其中所述突变包括至少两个选自 a)、b) 和 c) 的修饰,和可选的 d) 至 k) 中的任意一个或多个修饰,其中每个氨基酸位置对应于 SEQ ID NO:1 中的位置:

a) 从变体 T485 至 c 末端的氨基酸序列平截一个或者多个氨基酸;

b) R180 和 / 或 S181 删除;

c) M201L;

d) Q87 至 E 或 R;

e) N225 至 E 或 R;

f) N272 至 E 或 R;

g) N282 至 E 或 R;

h) T182 删除;

i) G183 删除;

j) Q98R、M201L、S243Q、R309A、Q320R、Q359E 和 K444E ;或

k) S243Q、A、E 或 D。

2. 如权利要求 1 所述的变体,其中所述变体包含 b) 和 c) 的修饰。

3. 如权利要求 1 所述的变体,其中所述变体与 SEQ ID NO:2 具有至少 95% 的序列同一性。

4. 如权利要求 3 所述的变体,其中所述变体与 SEQ ID NO:2 具有至少 98% 的序列同一性。

5. 如权利要求 1 所述的变体,其中所述变体具有如下特征:

a) 酶活性需要少于 60ppm 的钙离子;

b) 与亲本杆菌物种 TS-23 的 α -淀粉酶相比具有提高的氧化稳定性;和 / 或

c) 与亲本杆菌物种 TS-23 α -淀粉酶相比具有提高的热稳定性。

6. 一种编码权利要求 1 的变体的分离的核酸。

7. 一种分离的核酸,包含编码权利要求 1 的变体的核酸序列。

8. 包含权利要求 6 的核酸的载体。

9. 包含权利要求 6 的核酸的分离的宿主细胞。

10. 一种包含权利要求 8 所述载体的分离的宿主细胞,其中所述宿主细胞是原核细胞或真核细胞。

11. 如权利要求 10 所述的分离的宿主细胞,其中所述分离的宿主细胞为细菌或真菌。

12. 如权利要求 11 所述的分离的宿主细胞,其中所述细菌是革兰氏阳性菌,选自下组中:枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、短芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、嗜碱芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、凝固芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、灿烂芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、浅青紫链霉菌和鼠灰链霉菌;或革兰氏阴性细菌,其中所述革兰氏阴性细菌是大肠杆菌和假单胞菌属物种。

13. 包含权利要求 1 所述的变体的洗涤剂添加剂。

14. 如权利要求 13 所述的洗涤剂添加剂,进一步包括选自下组的一种或多种酶:纤维素酶、蛋白酶、氨肽酶、淀粉酶、糖酶、羧肽酶、过氧化氢酶、壳多糖酶、角质酶、环糊精葡聚糖

转移酶、脱氧核糖核酸酶、酯酶、 α -半乳糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、 α -葡糖苷酶、 β -葡糖苷酶、卤代过氧化物酶、转化酶、漆酶、脂肪酶、甘露糖苷酶、氧化酶、果胶分解酶、肽谷氨酰胺酶、过氧化物酶、植酸酶、多酚氧化酶、蛋白水解酶、核糖核酸酶、转谷氨酰胺酶、木聚糖酶、支链淀粉酶、异淀粉酶、角叉菜酶、和其任意组合。

15. 如权利要求 14 所述的洗涤剂添加剂,其为无粉尘颗粒的形式。

16. 如权利要求 14 所述的洗涤剂添加剂,其为微颗粒的形式。

17. 如权利要求 14 所述的洗涤剂添加剂,其为稳定的液体的形式。

18. 如权利要求 14 所述的洗涤剂添加剂,其为受保护的酶的形式。

19. 一种洗涤剂组合物,包含权利要求 14 的洗涤剂添加剂。

20. 一种洗涤剂组合物,包含表面活性剂和权利要求 1 的变体。

21. 如权利要求 20 所述的洗涤剂组合物,其中所述洗涤剂组合物是衣物洗涤剂或餐具洗涤剂。

22. 如权利要求 21 所述的洗涤剂组合物,进一步包括选自由纤维素酶、蛋白酶、氨肽酶、淀粉酶、糖酶、羧肽酶、过氧化氢酶、壳多糖酶、角质酶、环糊精葡聚糖转移酶、脱氧核糖核酸酶、酯酶、 α -半乳糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、 α -葡糖苷酶、 β -葡糖苷酶、卤代过氧化物酶、转化酶、漆酶、脂肪酶、甘露糖苷酶、氧化酶、果胶分解酶、肽谷氨酰胺酶、过氧化物酶、植酸酶、多酚氧化酶、蛋白水解酶、核糖核酸酶、转谷氨酰胺酶、木聚糖酶、支链淀粉酶、异淀粉酶、角叉菜酶及其任意组合组成的组中的一种或多种酶。

23. 权利要求 22 所述的洗涤剂组合物,其中所述洗涤剂组合物是衣物洗涤剂组合物并进一步包括聚合物。

24. 权利要求 22 所述的洗涤剂组合物,其中所述洗涤剂组合物是衣物洗涤剂组合物并进一步包括表面活性剂、络合剂、漂白系统、稳定剂、发泡剂、泡沫抑制剂、防腐蚀剂、污物悬浮剂、染料、杀菌剂、水溶增溶剂、织物调节剂和香味剂中的一种或多种。

25. 权利要求 22 的洗涤剂组合物,其中所述洗涤剂组合物是衣物洗涤剂组合物并进一步包括洗涤剂增效剂、络合剂、稳定剂、发泡剂、泡沫抑制剂、防腐蚀剂、防尘污再沉积剂、染料、杀菌剂、水溶增溶剂、荧光增白剂、织物调节剂和香味剂中的一种或多种。

26. 一种生物膜水解组合物,包括溶液或凝胶中的权利要求 1-5 中任一项所述的变体,并且可选地进一步包括纤维素酶、半纤维素酶、木聚糖酶、脂肪酶、蛋白酶、果胶酶、抗微生物剂或其任意的组合。

27. 一种水解生物膜的方法,包括施用权利要求 26 所述的组合物达足以处理所述生物膜的一段时间。

28. 一种烘烤组合物,包括溶液或凝胶中的权利要求 1 的亲本杆菌物种 TS-23 α -淀粉酶的变体。

29. 一种烘烤的方法,包括施用权利要求 28 所述的烘烤组合物。

30. 权利要求 1 的变体,其中该变体包含 a) 和 b) 的修饰。

31. 权利要求 1 的变体,其中该变体包含 a) 和 c) 的修饰。

32. 权利要求 1 的变体,其中该变体包含 a)、b) 和 c) 的修饰。

33. 权利要求 1 的变体,其中该变体包含 k) 的修饰。

34. 权利要求 33 的变体,其中所述 k) 的修饰是 S243Q。

35. 权利要求 21 的组合物,其中该洗涤剂组合物是餐具洗涤剂。
36. 包含权利要求 1 的变体的清洁组合物。
37. 清洁表面或者物体的方法,包括将表面或者物体与权利要求 36 的清洁组合物相接触。
38. 权利要求 37 的方法,其中该物体是织物。
39. 权利要求 37 的方法,其中该表面是硬表面。
40. 权利要求 39 的方法,其中所述硬表面是餐具的表面。

具有改变性质的杆菌物种 TS-23 的 α -淀粉酶变体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2008 年 2 月 4 日申请的题为“具有改变性质的 TS23 α -淀粉酶变体”系列号为 61/026056 和 2008 年 6 月 6 日申请的题为“具有改变性质的 TS23 α -淀粉酶变体”系列号为 61/059,403 的美国临时专利申请的优先权。

[0003] 序列表

[0004] 还附上包含 SEQ ID NOS :1-18 的序列表,其通过整体引用合并于此。

[0005] 本发明公开了亲本 α -淀粉酶的变体,所述变体具有 α -淀粉酶活性并且与所述亲本 α -淀粉酶相比呈现出下列性质中至少一种性质的改变:

[0006] 底物特异性、底物结合、底物裂解模式、热稳定性、pH 活性谱、pH 稳定性谱、氧化稳定性、 Ca^{2+} 依赖性、降低和升高的 pI 和改善的洗涤性能、比活性、在例如高温和 / 或低 pH 条件特别是低钙浓度条件下的稳定性。此处公开的变体适用于淀粉转化、乙醇生产、衣物洗涤、盘碟洗涤、硬表面清洁、纺织品退浆和 / 或增甜剂生产。

[0007] 淀粉由直链淀粉 (15-30 % w/w) 和支链淀粉 (70-85 % w/w) 的混合物组成。直链淀粉是由 α -1,4 连接的葡萄糖单位的线性链组成,具有分子量 (MW) 从约 60,000 至约 800,000。支链淀粉是分支多聚体,每 24-30 个葡萄糖单位其含有 α -1,6 分支点,其分子量可以高达 1 亿。

[0008] 目前是通过酶催化过程从淀粉产生浓缩的葡萄糖糖浆形式的糖,所述 催化过程涉及:(1) 用 α -淀粉酶将固体淀粉液化 (或稀薄化) 为具有约 7-10 平均聚合度的糊精,和 (2) 用淀粉葡萄糖苷酶 (也称为葡糖淀粉酶或 GA) 对产生的液化淀粉 (即,淀粉水解物) 的糖化作用。产生的糖浆具有高的葡萄糖含量。商业生产的大部分葡萄糖糖浆随后被酶促异构化为右旋葡萄糖 / 果糖混合物,称为异构糖浆 (isosyrup)。

[0009] α -淀粉酶 (α -1,4- 葡聚糖 -4- 葡聚糖水解酶, E. C. 3. 2. 1. 1) 构成一组酶,其通过随机切割内在的 α -1,4- 糖苷键水解淀粉、糖原和有关的多糖。这一组酶具有多种重要的商业应用,例如淀粉液化、纺织品退浆、在纸和纸浆工业中的淀粉修饰、增甜剂 (例如糖) 生产和酿造。这些酶还可以在餐具和洗衣过程中用于去除淀粉污渍。 α -淀粉酶分离自多种细菌、真菌、植物和动物来源。工业上,许多重要的 α -淀粉酶分离自杆菌。

[0010] 淀粉酶可以商业应用于:淀粉加工的初始阶段 (液化);湿玉米碾磨;乙醇生产;用作洗涤剂基质中的清洁剂;纺织工业中用于淀粉退浆;在烘烤应用中作为保鲜剂;在饮料工业中;在油矿中用于钻孔过程;再循环纸的脱墨和用于动物饲料中。

[0011] 最近这些年已经针对诸如淀粉液化、洗涤剂 and 纺织品退浆等特殊应用进行了构造具有改善性质的 α -淀粉酶变体的尝试。

[0012] 在工业中有需要对淀粉酶进行鉴定和优化,这可以用于各种用途,包括餐具和洗衣过程。这些第二代淀粉酶将为工业标准的酶提供改善的制造特性和 / 或性能特性。

[0013] 一种表征过的 α -淀粉酶是嗜碱性的杆菌物种 TS-23 菌株的 α -淀粉酶,该菌株产生至少五类呈现淀粉水解活性的酶。(Lin 等人,1998,“Production and properties of a raw-starch-degrading amylase from the thermophilic and alkaliphilic *Bacillus*

sp. TS-23, "Biotechnol. Appl. Biochem. 28 :61-68).

[0014] 但是,还是需要 α -淀粉酶变体,该变体与相应的亲本淀粉酶相比,即与未突变的 α -淀粉酶相比,具有 α -淀粉酶活性而且相对于所述亲本 α -淀粉酶呈现至少一种上述性质的改变。

[0015] 本发明的一个方面提供 α -变体淀粉酶,所述变体具有 α -淀粉酶活性,而且相对于所述亲本 α -淀粉酶呈现至少一种下述性质的改变:底物特异性、底物结合、底物裂解模式、热稳定性、pH 活性谱、pH 稳定性谱、氧化稳定性、Ca²⁺ 依赖性、比活性和在例如高温和 / 或低 pH 条件特别是低钙浓度 (例如低于大约 60ppm,例如低于 40ppm) 条件下的稳定性。

[0016] 本发明的一方面涉及亲本杆菌物种 TS-23 α -淀粉酶的变体,其中所述变体与 SEQ ID NO :2 具有 90% 的同一性,而且其中所述突变包括下述如 SEQ ID NO :1 中所列出的 a)、b) 或 c) 的至少两个:

[0017] a) C 末端的平截;

[0018] b) R180 和 / 或 S181 删除;

[0019] c) M201L;

[0020] d) Q87 至 E, R;

[0021] e) N225 至 E, R;

[0022] f) N272 至 E 或 R;

[0023] g) N282 至 E 或 R;

[0024] h) T182 删除;

[0025] i) G183 删除;

[0026] j) Q98R、M201L、S243Q、R309A、Q320R、Q359E 和 K444E ;或

[0027] k) S243Q、A、E、D。

[0028] 或者,所述变体可以是具有与 SEQ ID NO :2 至少大约 90% 序列同一性的氨基酸序列的变体,并且在 SEQ ID NO :2 的 180-181 位点具有 Δ RS 删除和 SEQ ID NO :2 的 M201L,以及下列突变中的至少一种:

[0029] a) Q87 至 E, R;

[0030] b) N225 至 E, R;

[0031] c) N272 至 E 或 R;

[0032] d) N282 至 E 或 R;

[0033] e) T182 删除;

[0034] f) G183 删除;

[0035] g) Q98R、M201L、S243Q、R309A、Q320R、Q359E 和 K444E ;或

[0036] h) S243Q、A、E、D。

[0037] 另外的变体涉及那些与 SEQ ID NO :2 具有至少大约 95%、98% 或 99% 序列同一性,而且包括此处所讨论的任何删除、置换或添加的变体。

[0038] 所述变体进一步涉及那些具有上述特征和此处讨论的下列特征的变体:

[0039] a) 酶活性需要少于 60ppm 的钙离子;

[0040] b) 与亲本杆菌物种 TS-23 的 α -淀粉酶相比具有提高的氧化稳定性;和 / 或

[0041] c) 与亲本杆菌物种 TS-23 的 α -淀粉酶相比具有提高的热稳定性。

[0042] 上述讨论的变体的另一种变体包括羧基端 1-100 个氨基酸残基或 1-100 间任意整数个氨基酸残基的平截。

[0043] 本发明的另一方面涉及编码上述变体的核酸。例如编码亲本杆菌物种 TS-23 的 α -淀粉酶变体的分离的核酸,其中所述变体至少包括相应于 SEQID NO:1 的 a)、b) 或 c) :

[0044] a) C 末端的平截 ;

[0045] b) R180 和 / 或 S181 删除 ;

[0046] c) M201L ;

[0047] d) Q87 至 E, R ;

[0048] e) N225 至 E, R ;

[0049] f) N272 至 E 或 R ;

[0050] g) N282 至 E 或 R ;

[0051] h) T182 删除 ;

[0052] i) G183 删除 ;

[0053] j) Q98R、M201L、S243Q、R309A、Q320R、Q359E 和 K444E ;

[0054] k) S243Q、A、E、D ;

[0055] 而且与 SEQ ID NO:1 具有至少大约 90 % 序列同一性,并且其中所述变体呈现 α -淀粉酶活性。

[0056] 本发明还涉及包含上述核酸的载体,以及包含上述核酸的宿主细胞。本发明还涉及包含所述载体的分离的宿主细胞,所述载体包括编码上述任意变体的核酸。这样的分离的宿主细胞包括原核细胞或真核细胞(例如,细菌或真菌)。例如,细菌可以是革兰氏阳性菌,选自下组中:枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*)、迟缓芽孢杆菌 (*B. lentus*)、短芽孢杆菌 (*B. brevis*)、嗜热脂肪芽孢杆菌 (*B. stearothermophilus*)、嗜碱芽孢杆菌 (*B. alkalophilus*)、解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*)、凝固芽孢杆菌 (*B. coagulans*)、环状芽孢杆菌 (*B. circulans*)、灿烂芽孢杆菌 (*B. lautus*)、苏云金芽孢杆菌 (*B. thuringiensis*)、浅青紫链霉菌 (*Streptomyces lividans*) 和鼠灰链霉菌 (*S. murinus*) ;或革兰氏阴性细菌,其中所述革兰氏阴性细菌是大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 物种。

[0057] 本发明还涉及包含一种上述变体的洗涤剂添加剂。所述洗涤剂添加剂可以进一步包括选自下组的一种或多种酶:纤维素酶、蛋白酶、氨肽酶、淀粉酶、糖酶、羧肽酶、过氧化氢酶、壳多糖酶、角质酶 (cutinase)、环糊精葡聚糖转移酶、脱氧核糖核酸酶、酯酶、 α -半乳糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶、卤代过氧化物酶 (haloperoxidase)、转化酶、漆酶、脂肪酶、甘露糖苷酶、氧化酶、果胶分解酶 (pectinolytic enzyme)、肽谷氨酰胺酶、过氧化物酶、植酸酶、多酚氧化酶、蛋白水解酶、核糖核酸酶、转谷氨酰胺酶、木聚糖酶、支链淀粉酶、异淀粉酶、角叉菜酶 (carrageenase)、或其任意组合。所述洗涤剂添加剂可以是无粉尘颗粒、微颗粒、稳定的液体或受保护的酶的形式。

[0058] 本发明还涉及包含任意上述洗涤剂添加剂的洗涤剂组合物。洗涤剂组合物还涉及表面活性剂和此处所讨论的变体。所述洗涤剂组合物可以是衣物洗涤剂或餐具洗涤剂。本发明的洗涤剂组合物可进一步包括选自由纤维素酶、蛋白酶、氨肽酶、淀粉酶、糖酶、羧肽酶、过氧化氢酶、壳多糖酶、角质酶、环糊精葡聚糖转移酶、脱氧核糖核酸酶、酯酶、 α -半乳

糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、 α -葡糖苷酶、 β -葡糖苷酶、卤代过氧化物酶、转化酶、漆酶、脂肪酶、甘露糖苷酶、氧化酶、果胶分解酶、肽谷氨酰胺酶、过氧化物酶、植酸酶、多酚氧化酶、蛋白水解酶、核糖核酸酶、转谷氨酰胺酶、木聚糖酶、支链淀粉酶、异淀粉酶、角叉菜酶及其任意组合组成的组中的一种或多种酶。作为备选,或者作为附加特征,所述洗涤剂组合物可进一步包括表面活性剂、洗涤剂增效剂、络合剂、聚合物、漂白系统、稳定剂、发泡剂、泡沫抑制剂、防腐蚀剂、污物悬浮剂、防尘污再沉积剂、染料、杀菌剂、水溶增溶剂、荧光增白剂、织物调节剂和香味剂中的一种或多种。

[0059] 本发明的另一方面涉及一种生物膜水解组合物,包括溶液或凝胶中的上述或此处描述的任意变体,并且可选地进一步包括纤维素酶、半纤维素酶、木聚糖酶、脂肪酶、蛋白酶、果胶酶、抗微生物剂或其任意的组合。这些生物膜水解组合物可用于水解生物膜的方法中,包括施用权利要求 24 所述的组合物达足以水解该生物膜的时间。

[0060] 本发明另一个方面涉及包含任何上述变体或此处公开的在溶液或凝胶中的变体的烘烤组合物。本发明的另一个方面涉及一种烘烤的方法,包括施用具有此处公开的变体的烘烤组合物。

[0061] 在又一个进一步的方面,涉及包含上述或此处讨论的变体的用于液化淀粉的组合物,其中所述组合物处于溶液中。该组合物可用于液化淀粉的方法中,该方法包括将该组合物施用于经液化的淀粉以足以液化该淀粉的时间。所述组合物可以例如大约 40-60 $\mu\text{g/g}$ 干燥固体的浓度加入到所述经液化的淀粉溶液中。优选的用于液化的淀粉为玉蜀黍淀粉,其可以为经液化的淀粉溶液的形式。液化可发生在大约 85°C 至大约 100°C 下。作为备选或作为附加特征,经液化的淀粉溶液在大约 pH5.0 至大约 pH6.5 液化。该方法可进一步实施为包括发酵步骤,其中发酵所述液化产物来生产乙醇。根据本发明的一个方面,发酵步骤产生至少大约 2.5% v/v 的乙醇。一方面,液化和发酵步骤在同样的反应容器同时进行。另一方面,发酵步骤不需要葡萄糖淀粉酶催化的反应。液化步骤可以在钙含量少于大约 60ppm 的条件下进行。

[0062] 另一个方面涉及一种糖化淀粉的组合物,包括溶液中的上述或此处讨论的变体。进一步涉及糖化淀粉的方法,包括施用糖化组合物达足以糖化所述淀粉的时间。这可以在其中存在少于大约 60ppm 钙的溶液中进行。

[0063] 进一步的实施方式涉及织物退浆组合物,包含水性溶液中的上述或此处描述的变体,且可选地包括另一种酶。还涉及一种退浆织物的方法,包括施用所述退浆组合物达足以退浆该织物的时间。在该退浆溶液中钙可以少于大约 60ppm 的量存在。

[0064] 进一步的方面涉及淀粉加工组合物,包括上述或此处描述的变体。该淀粉加工组合物可进一步包含葡萄糖淀粉酶、异淀粉酶、支链淀粉酶、植酸酶或其任意组合。还涉及加工淀粉的方法,包括施用所述淀粉加工组合物达足以加工所述淀粉的时间。这可以在少于大约 60ppm 的钙存在下进行。

附图说明

[0065] 所附图被并入且构成本说明书的一部分,以说明不同的实施方案。在附图中:

[0066] 图 1:来自杆菌物种 TS-23 的 α -淀粉酶全长、成熟链的多肽序列 (SEQID NO:1)。

[0067] 图 2:来自杆菌物种 TS-23 的 α -淀粉酶成熟链平截的多肽序列 (SEQID NO:2)。

黑体和下划线表示的残基表示 SEQ ID NO :2 位于 R180、S181 和 M201 的氨基酸。

[0068] 图 3 :杆菌物种 TS-23 的 α -淀粉酶基因的最优化核酸序列 (SEQ ID NO :3) (AmyTS23)。

[0069] 图 4 :编码经平截的杆菌物种 TS-23 的 α -淀粉酶的核酸序列 (AmyTS23t) (SEQ ID NO :3),其已经得到最优化 (SEQ ID NO :4) (AmyTS23t)。

[0070] 图 5 :该图说明了针对 AmyTS23 和 AmyTS23t 制备的表达框。

[0071] 图 6 描述了使用 AmyTS23 淀粉酶成熟全长 (amy TS23F1) 和 OxAm 对照 (Danisco US Inc., Genencor 部门) 进行的样品清洁测定的结果。样品在 25mM HEPES pH8 或者 25mM CAPS pH10.3 缓冲液中孵育;以标明的量加入酶。反应在 Eppendorf Thermomix 控温区 (controlled temperature block) 中进行,20℃孵育 60 分钟,同时以 750rpm 振荡。数据表明在两个 pH 条件下, AmyTS23F1 的性能与 OxAm 对照相当,或者优于 OxAm 对照。X-轴单位为百万分之一 (ppm), Y 轴表示在 488nm 波长下测量微样品清洁测定中上清的吸光度读数。

[0072] 图 7 描述了使用 α -淀粉酶 AmyTS23F1 和 OxAm 对照 (Danisco US Inc., Genencor 部门) 进行的样品清洁测定的结果。样品在 25mM HEPES pH8 或者 25mM CAPS pH10.3 缓冲液中孵育;以标明的量加入酶。反应在 Eppendorf Thermomix 控温区中进行,40℃孵育 60 分钟,同时以 750rpm 振荡。数据表明在两个 pH 条件下, amyTS23F1 的性能都优于 OxAm 对照。通过读取 488nm 下微样品清洁测定中上清的吸光度来检测样品清洁度。

[0073] 图 8 描述了用 α -淀粉酶 AmyTS23t (SEQ ID NO :2) 和 OxAm 对照进行的样品清洁测定的结果。样品在 25mM HEPES pH8 或者 25mM CAPS pH10.3 缓冲液中孵育;以标明的量加入酶。反应在 Eppendorf Thermomix 控温区中进行,20℃孵育 60 分钟,同时以 750rpm 振荡。

[0074] (SEQ ID NO :2) 具有比全长成熟 Amy TS23 更好的性能。

[0075] 图 10 描述了在 MOPS 缓冲液和商业衣物洗涤剂中 AmyTS23t α -淀粉酶和 AmyTS23t-RS 删除 (SEQ ID NO :5) 的增加的稳定性研究。酶样品在 37℃下于 MOPS 缓冲液或商业洗涤剂 I 中孵育,在 Megazyme 分析中测定随着时间发展,剩余的酶活性。

[0076] 图 11 描述了 SEQ ID NO :5 所示的杆菌物种 TS-23 α -淀粉酶删除 RS 的平截 α -淀粉酶。

[0077] 图 12 为在两种不同的衣物洗涤剂制剂中 AmyTS23t (SEQ ID NO :2) 和 AmyTS23t Δ RS (SEQ ID NO :5) 的经增加的稳定性研究图。酶样品在 37℃下于灭活的液体汰渍 (Inactivated Liquid Tide) 或标准制剂 A 液体洗涤剂中孵育,在 Megazyme 分析中测定随着时间发展剩余的酶活性。

[0078] 图 13 :该图描述了 AmyTS23t、AmyTS23t Δ RS 和 AmyTS23t (M201L+ Δ RS) 的氧化稳定性。40℃下在含 Ca^{+2} 缓冲液中将酶暴露于各种浓度的过氧乙酸 (PAA) 中 5 分钟后测量酶活性。

[0079] 图 14 :该图描述了 AmyTS23t Δ RS (SEQ ID NO :5) 在液体洗涤剂中对稻米淀粉样品的性能。

[0080] 图 15 :该图描述了 TS23 和变体 PS4 以及结合了变体 PS4 的 TS23 在 US 烤面包片中的硬度效应。

[0081] 图 16 :该图描述了 TS-23 和变体 PS4 以及结合了变体 PS4 的 TS-23 在 US 烤面包

片中的粘性效应。

[0082] 图 17 :该图描述了作为电荷改变的函数的剩余活性。参考实施例 11。

[0083] 图 18 :示出了合成的杆菌物种 TS-23 α -淀粉酶的 DNA(列表 A)(SEQ ID NO :6) 和氨基酸序列(列表 B)(SEQ ID NO :7)。

[0084] 图 19 :用于在枯草芽孢杆菌 SC6.1 中表达 Base(和 Ace)的杆菌表达载体 pHPLT-TS23t。

[0085] 图 20 :利用 PCR 仪的温度梯度在 MOPS 中孵育 1 小时之后 Base 和 Base-S243Q 的残余活性。

[0086] 图 21 :利用 PCR 仪的温度梯度在 MOPS 缓冲液中孵育 1 小时之后

[0087] 图 22 :利用 PCR 仪的温度梯度在 10% Persil color(灭活的)中孵育 30 分钟之后 Base 和 Base-S243Q 的残余活性。

[0088] 图 23 :利用 PCR 仪的温度梯度在 10% Persil color(灭活的)中孵育 1 小时之后 Ace 和 Ace-S243Q 的残余活性。

[0089] 图 24 :利用 PCR 仪的温度梯度在 100% Persil color(灭活的)中孵育 1 小时之后 Base 和 Base-S243Q 的残余活性。

[0090] 图 25 :利用 PCR 仪的温度梯度在 100% Persil color(灭活的)中孵育 1 小时之后 Ace 和 Ace-S243Q 的残余活性。

具体实施方式

[0091] 下文涉及化合物、组合物、制备所述化合物的方法和使用所述化合物和组合物的方法,其中所述化合物为杆菌物种 TS-23 菌株的 α -淀粉酶或其变体。找到了在例如洗衣和餐具测试中具有高性能的杆菌物种 TS-23 菌株的 α -淀粉酶,及其变体。它们可用于此处所述的其他目的。

[0092] 杆菌物种 TS-23 菌株的 α -淀粉酶的最优 pH 为 9,并且在宽 pH 范围内稳定(即, pH4.7-10.8)。该多肽的最优温度为 45°C。该酶在较低温度下也具有活性,例如 15-20°C。

[0093] 在某些方面,此处所述化合物、组合物和方法依赖于遗传工程和分子生物学领域中使用的常规技术和方法。下列资源包括了用于实施使用此处公开材料的方法的一般方法学的描述:Sambrook 等人, MOLECULAR CLONING :A LABORATORY MANUAL(第二版,1989); Kreigler, GENETRANSFER AND EXPRESSION ;A LABORATORY MANUAL(1990) 和 Ausubel 等人编辑, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY(1994)。这些常用参考书提供了本领域公知的定义和方法。但是,此处所公开的实施方式不应限制于其描述的任何特定的方法、方案和试剂,因为这些都可以改变。

[0094] 除非另有定义,否则此处使用的所有技术和科学术语与本领域技术人员所通常理解的含义相同。参见,例如 Singleton 等人, DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, 第二版, John Wiley and Sons, 纽约(1994) 和 Hale & Markham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY, Harper Perennial, 纽约(1991) 为技术人员提供了许多此处使用术语的综合词典。

[0095] 虽然与此处描述的方法和材料相似或等价的任何方法和材料都能够用于实施或者检测此处所公开的化合物、组合物和使用方法,但是在此仍然说明了优选的方法和材料。

[0096] 现在以引用的方式使用下列定义和实施例详细描述示例性实施方式。此处引用的所有专利和公开,包括所有在这些专利和公开中公开的序列都通过引用而明确地合并于此。

[0097] 数值范围包括定义该范围的数值。

[0098] 除非另外说明,核酸分别以 5' 至 3' 的方向从左写到右,氨基酸序列分别以氨基到羧基的方向从左写到右。

[0099] 本文提供的题目并非是对本发明多种方面或实施方式的限制,它们可以通过整体参考说明书而获得。

[0100] 1. 定义和缩写

[0101] 在本详述中,应用下面的缩写和定义。必须注意如本文所使用,除非上下文另有明确指明,否则单数形式“一”、“一个”和“该”涵盖对复数形式的提及。因此,例如,提到“多肽”包括多个此类多肽,而提到“该制剂”包括一个或多个制剂以及本领域技术人员已知的其等价物,等等。

[0102] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有本领域普通技术人员通常所理解的含义。下面提供如下的术语。

[0103] 1.1. 定义

[0104] 如此处所用的术语“淀粉”指包含植物复杂多糖碳水化合物、包含具有通式 $(C_6H_{10}O_5)_x$ (其中 X 可以是任意数) 的直链淀粉和支链淀粉的任何材料。该术语特别涉及包括但不限于谷物、草、块茎类和根的任何植物类材料,更具体地,是指小麦、大麦、玉米、黑麦、稻、高粱、糠、木薯、小米、马铃薯、甜马铃薯和木薯淀粉。

[0105] “淀粉酶”是指包括任何淀粉酶,例如葡糖淀粉酶、 α -淀粉酶、 β -淀粉酶、细菌例如芽孢杆菌属物种(例如地衣芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌)的野生型 α -淀粉酶。“淀粉酶”应指这样的酶,即,其能够催化淀粉的降解等。淀粉酶是断裂淀粉中 α -D-(1 → 4)-糖苷键的水解酶。通常,将 α -淀粉酶 (EC 3.2.1.1; α -D-(1 → 4)-葡聚糖葡聚糖水解酶) 定义为以随机方式切开淀粉分子内 α -D-(1 → 4)-糖苷键的内切酶。与此不同,诸如 β -淀粉酶 (EC 3.2.1.2; α -D-(1 → 4)-葡聚糖麦芽糖水解酶) 等外切淀粉酶和如产麦芽糖 (maltogenic) α -淀粉酶 (EC 3.2.1.133) 的一些产物特异性淀粉酶从底物的非还原末端切割淀粉分子。 β -淀粉酶、 α -葡糖苷酶 (EC 3.2.1.20; α -D-葡糖苷葡聚糖水解酶)、葡糖淀粉酶 (EC 3.2.1.3; α -D-(1 → 4)-葡聚糖葡聚糖水解酶),以及产物特异性淀粉酶可以从淀粉产生特定长度的低聚麦芽糖。

[0106] “杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶”是来源于杆菌物种 TS-23 菌株的 α -淀粉酶。编码该 α -淀粉酶的基因可以是野生型基因或者编码该 α -淀粉酶的密码子优化的多聚核苷酸。“杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶变体”是指野生型杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶的变体,包括对杆菌物种 TS-23 菌株亲本多肽序列的序列置换、添加或删除。杆菌物种 TS-23 菌株全长成熟的 α -淀粉酶为(氨基至羧基方向)(SEQ ID NO:1),且示于图 1 中。

[0107] 如本文所使用,“亲本酶”和“亲本多肽”应指杆菌物种 TS-23 菌株的 α -淀粉酶。“亲本核酸”指编码所述亲本多肽的核酸序列。杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶可进一步包括在亲本多肽的信号序列中的突变,或者在 α -淀粉酶亲本多肽中的突变。因此,杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶可以是含有杂合 α -淀粉酶多肽的融合蛋白的形式。它还可以包括

嵌合体（即，至少两个 α -淀粉酶的组合）。例如，杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶可以包含源于另一个 α -淀粉酶的信号肽，例如本领域公知的地衣芽孢杆菌（LAT）的 α -淀粉酶。

[0108] “平截的 TS-23 α -淀粉酶变体”是指通过从全长成熟的（野生型）多肽序列的羧基端去除一个或多个氨基酸而平截的 TS-23 氨基酸序列。平截可以是至少 99 个氨基酸。

[0109] “平截的 TS-23 α -淀粉酶 RS 删除变体”是指经平截的 TS-23 α -淀粉酶变体，其中删除了 R180 和 S181 位置处的氨基酸。

[0110] 术语“变体”可与术语“突变体”互换使用。“变体”应包括含有及编码杆菌物种 TS-23 α -淀粉酶（即亲本 α -淀粉酶）的附加置换、颠换、插入和删除的多肽和核酸。变体可以包括与能够同本文提到的核苷酸序列杂交的序列之互补序列。例如，变体核酸序列与能够在严紧条件（例如 50°C 和 0.2×SSC {1×SSC = 0.15M NaCl、0.015M 柠檬酸三钠，pH7.0}）下同本文所提到的核苷酸序列杂交的序列互补。术语变体核酸序列包括能够在高严紧条件（例如 65°C 和 0.1×SSC {1×SSC = 0.15M NaCl、0.015M 柠檬酸三钠，pH7.0}）下同本文所提到的核苷酸序列杂交的序列互补的序列。

[0111] 这里所述的 α -淀粉酶变体多肽也可具有突变，所述突变特别是在至少约 55°C 至约 95°C 或更高，尤其在约 80°C 的经升高的温度下，与亲本酶相比将半衰期延伸至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200% 或更多。

[0112] 例如，通过这里所述的外部特异性指数（exo-specificity indices）测量，该 α -淀粉酶变体可以具有外部特异性。 α -淀粉酶变体包括那些通常当在相同条件下测量时具有比衍生其的亲本酶或多肽更高或增加的外部特异性的 α -淀粉酶变体。因此，例如，与其亲本多肽相比， α -淀粉酶变体多肽可以具有至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、500%、1000%、5000%、10,000% 或更高的外部特异性指数。

[0113] 另一方面，由该核酸编码的 α -淀粉酶变体多肽具有与亲本序列相同的 pH 稳定性。另一方面，该变体包含赋予更大 pH 稳定性范围或出于该酶最终商业目的而将 pH 范围转移到期望范围的突变。例如，在一个实施方案中，该变体可以在约 pH5.0 至约 pH10.5 降解淀粉。在相同条件下，该 α -淀粉酶变体多肽与亲本多肽相比，可以具有更长的半衰期或更高的活性（由测定决定），或该 α -淀粉酶变体可以具有与亲本多肽相同的活性。在相同 pH 条件下，与其亲本多肽相比，该 α -淀粉酶变体多肽也可以具有约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200% 或更长的半衰期。可选的，或额外的，在相同 pH 条件下，与其亲本多肽相比，该酶变体可以具有更高的比活性。

[0114] 另一方面，提供与编码这里提出的任意 α -淀粉酶变体的核酸互补的核酸。此外，提供能够杂交于该互补序列的核酸。在另一实施方案中，在这里所述方法和组合物中使用的序列是合成的序列。其包括，但不限于，用对于细菌（特别是工业培养的细菌）宿主生物体中表达最优的密码子制备的序列。

[0115] 在涉及细胞、核酸、蛋白质或载体时使用的术语“重组”，是指该细胞、核酸、蛋白质或载体已经通过引入异源的核酸或蛋白质或改变天然核酸或蛋白质而被修饰，或者指的是该细胞源自这样修饰过的细胞。所以，例如重组细胞表达在天然（非重组的）形式的细胞中未发现的基因，或者表达那些否则会异常表达（下调或者完全不表达）的天然基因。

[0116] 此处术语“回收的”、“分开的”和“分离的”用于指从与其天然相关的和天然存在

的至少一种其它组分中分离出来的化合物、蛋白质、细胞、核酸或氨基酸。

[0117] “纯化的”指物质处于相对纯的状态,例如至少约 90% 纯,至少约 95% 纯,或至少约 98% 纯。

[0118] “热稳定的”指该酶在暴露于升高的温度之后保持活性的能力。酶(例如 α -淀粉酶)的热稳定性通过其半衰期测量。半衰期($t_{1/2}$)是以分钟、小时或天计算的时间,其间在定义条件下损失一半酶活性。半衰期值通过测量残余的 α -淀粉酶活性来计算。

[0119] “熔化温度”是指 50% 多肽样品完全变性的温度。

[0120] “pH 范围”指酶在从酸性到碱性条件(跨越大约 5 个或更多个 pH 单位)下呈现催化活性的能力。

[0121] 此处使用的“pH 稳定的”指在预定时间段内酶在宽 pH 范围下保持活性的能力(例如 15 分钟、30 分钟、1 小时)。

[0122] 在涉及细胞、核酸、蛋白质或载体时使用的术语“重组”,是指该细胞、核酸、蛋白质或载体已经通过引入异源的核酸或蛋白质或改变天然核酸或蛋白质而被修饰,或者指的是该细胞源自这样修饰过的细胞。所以,例如重组细胞表达在天然(非重组的)形式的细胞中未发现的基因,或者表达那些否则会异常表达(例如下调或者完全不表达)的天然基因。

[0123] 如本文所使用,“氨基酸序列”与术语“多肽”和/或术语“蛋白质”同义,可互换使用。一些情况下,术语“氨基酸序列”与术语“肽”同义。一些情况下,术语“氨基酸序列”与术语“酶”同义。此处使用常规的单字母或三字母密码来表示氨基酸残基。

[0124] 术语“核酸”包括 DNA、RNA、单链或双链及其化学修饰形式。此处术语“核酸”和“多核苷酸”可以互换使用。

[0125] 如本文所使用,“核苷酸序列”或“核酸序列”指编码杆菌物种 TS-23 α -淀粉酶多肽或其变体的寡核苷酸序列或多核苷酸序列,以及其片段和衍生物(例如其部分)。核苷酸序列可以是基因组的、合成的或重组的起源,并且可以是双链或单链(代表正义或反义链)。如本文所使用,术语核苷酸序列包括基因组 DNA、cDNA、合成的 DNA 和 RNA。例如,DNA 可以是编码杆菌物种 TS-23 α -淀粉酶或其变体的 cDNA 序列。因为遗传密码是简并性的,多于一个密码子可以用于编码一个特定的氨基酸,所描述的材料包含编码特定氨基酸序列的核苷酸序列。

[0126] “同源物”应指与主题氨基酸序列和主题核苷酸序列具有一定程度同一性的实体。同源序列包括与主题序列具有至少约 75%、80%、85% 或 90% 同一性,特别是具有至少约 95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列。通常,同源物包括与主题氨基酸序列相同的活性位点。与另一序列具有一定百分比(例如至少大约 80%、85%、90%、95% 或 99%) 序列同一性的多核苷酸或多肽是指,当比对时,在比较的两个序列中相同碱基或氨基酸残基所占的百分比。这种比对和百分比同源性或同一性可以使用本领域已知的适宜软件程序来测定,例如记载于 CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel 等人编辑, 1987, 增刊 30, 7. 7. 18 部分) 中的那些。这样的程序可包括 GCG Pileup 程序, FASTA (Pearson 等人 (1988) Proc. Nat'l Acad. Sci USA 85 :2444-2448) 和 BLAST (BLAST Manual, Altschul 等人, Nat'l Cent. Biotechnol. Inf., Nat'l Lib. Med. (NCIB NLM NIH), Bethesda, Md., 和 Altschul 等人, (1997) NAR 25 :3389-3402)。另一个比对程序是 ALIGN Plus (Scientific and Educational Software, PA), 其使用缺省参数。另一个可用的序列软件程序是 TFASTA

数据搜索程序,可源自序列软件包 6.0 版 (Sequence Software Package Version 6.0) (威斯康辛麦迪逊的威斯康辛大学遗传计算机组 (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI))。

[0127] 如本文所使用,“杂交”包括核酸链通过碱基配对与互补链结合的过程,以及如在聚合酶链式反应 (PCR) 技术中进行的扩增过程。 α -淀粉酶或其变体核酸可以以单链或双链 DNA 或 RNA、RNA/DNA 异源双链体或 RNA/DNA 共聚物形式存在。本领域技术人员能够分辨本发明所包含的还通过在严紧杂交条件下与示例性 amyS 序列 (例如 WO 06/002643 的 SEQ IDNO:5) 或杆菌物种 TS-23 成熟的全长 α -淀粉酶杂交的能力来限定的序列。当核酸的单链形式能够与另一条核酸在适宜的温度和溶液离子强度条件下复性时,该核酸为能够与另一条核酸序列杂交。杂交和洗涤条件为本领域所公知 (参见例如上述 Sambrook (1989), 特别是第 9 和 11 章)。在一些实施方式中,严紧条件对应于 T_m 为 65°C 和 0.1×SSC, 0.1% SDS。

[0128] 如此处所使用的,“合成的”应指由体外化学或酶促合成制备的。其包括但不限于,用于宿主生物最优的密码子制备的编码杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶或其变体的核酸,所述宿主生物例如甲基营养酵母 (例如毕赤酵母属 (*Pichia*)、汉逊酵母属 (*Hansenula*) 等) 或丝状真菌 (例如木霉菌属 (*Trichoderma*) (例如里氏木霉 (*T. reesei*))) 等其他表达宿主 (例如杆菌属、链霉菌属 (*Streptomyces*) 等)。

[0129] 如本文所使用,在涉及细胞时的术语“转化的”“稳定转化的”和“转基因的”意思是该细胞具有非天然的 (例如异源的) 核酸序列,该序列整合到细胞基因组中或者作为游离质粒在多次传代中保持。

[0130] 在将核酸序列插入到细胞中的上下文中,术语“引入”意思是“转染”或“转化”或“转导”,并包括将核酸序列合并到真核或原核细胞中,其中该核酸序列可以并入细胞的基因组中 (例如染色体、质粒、质体或线粒体 DNA)、转化为自主复制子或瞬时表达 (例如转染的 mRNA)。

[0131] 如本文所使用,“转化的细胞”包括通过重组 DNA 技术的应用而被遗传改变的细胞。通常通过向细胞插入一个或多条核苷酸序列而发生转化。插入的核苷酸序列可以是异源核苷酸序列,即,对于要被转化的细胞而言并非天然的序列,例如编码融合蛋白的 DNA 序列或非天然的序列。

[0132] “宿主株”或“宿主细胞”意思是指这样的宿主,其对于包含编码本发明的变体 α -淀粉酶的多核苷酸的表达载体或 DNA 构建体适宜。具体来见,宿主株优选细菌细胞。在优选的实施方式中,“宿主细胞”指用微生物株 (特别是杆菌属物种) 细胞制备的细胞和原生质体。

[0133] 术语“选择性标记”指能够在宿主中表达,使含有引入的核酸或载体的宿主容易选择的基因。选择性标记的实例包括但不限于抗生素 (例如潮霉素、博来霉素或氯霉素) 和/或赋予宿主细胞代谢优势的基因,例如营养优势。

[0134] 术语“培养”是指在适宜条件下在液体或固体培养基中生长微生物细胞群。在一个实施方式中,培养是指含有颗粒淀粉的淀粉底物发酵生物转化为终产物 (通常是在容器或反应器中)。

[0135] “发酵”是用微生物酶促和厌氧分解有机底物来产生更简单的有机化合物。虽然在

厌氧条件下发生发酵,但是这并不意味着该术语仅仅限于严格厌氧条件,因为在氧存在的情况下也发生发酵。

[0136] “基因”是指涉及多肽产生的 DNA 片段,包括编码区之前和之后的区域,以及各个编码片段(外显子)之间的间插序列(内含子)。

[0137] “载体”是指设计了用来将核酸引入一种或多种细胞类型的多核苷酸序列。载体包括克隆载体、表达载体、穿梭载体、质粒、噬菌体颗粒、表达盒等。

[0138] 本文使用的“表达载体”指包含有效连接到能够影响其在适宜宿主中表达的适宜控制序列的 DNA 序列的 DNA 构建体。这样的控制序列可包括影响转录的启动子、控制转录的可选操纵子序列、编码 mRNA 上合适核糖体结合位点的序列、增强子和控制转录和翻译终止的序列。

[0139] “启动子”是在 RNA 聚合酶结合以起始基因转录中涉及的调节序列。启动子可以是可诱导的启动子或组成型启动子。本文优选的启动子是地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶(AmyL)。

[0140] 术语“有效连接的”指其中元件处在允许其功能相关的排列中的连接。因此,如本文所使用,“有效连接的”指所述及的组分之间处于允许它们以其预期方式发挥功能的关系中。例如,与编码序列有效连接的调节序列是以如下方式实现连接的,即,所述编码序列能够在与控制序列相容的条件下获得表达。

[0141] “在转录控制下”是本领域公知的术语,描述了多核苷酸序列(通常是 DNA 序列)的转录,依赖于其有效连接到有助于转录起始或促进转录的元件上。

[0142] “在翻译控制下”是本领域公知的术语,描述了发生在 mRNA 已经形成之后的调节过程。

[0143] “信号序列”是指结合到蛋白质的 N 末端部分的氨基酸序列,其有助于该蛋白质的成熟形式向细胞外的分泌。信号序列的定义是功能性定义。成熟形式的细胞外蛋白质缺乏在分泌过程中被切割下来的信号序列。

[0144] 如本文所使用,“生物学活性”应指序列与天然序列相比具有相似的(但不必是相同程度的)结构性功能和/或相似的(但不必是相同程度的)调控功能和/或相似的(但不必是相同程度的)生化功能。

[0145] 本文所使用的“糖化”指淀粉酶促转化为葡萄糖。

[0146] 术语“糊化”指通过烹饪形成粘稠悬浮体的淀粉溶解。

[0147] 术语“液化”是指其中糊化的淀粉水解为低分子量可溶糊精的淀粉转化阶段。

[0148] 术语“聚合度(DP)”指已知糖的无水吡喃葡萄糖单元数量。DP1 的例子是单糖,例如葡萄糖和果糖。DP2 的例子是二糖,例如麦芽糖和蔗糖。DP > 3 表示聚合度大于 3 的聚合物。

[0149] 术语“终产物”或“目的终产物”指从淀粉底物酶促转化来的任何碳源衍生的分子产物。

[0150] 如本文所使用的术语“干固体含量(ds)”指以干重计,料浆中总固体的百分含量(%)。术语“料浆”指含有不溶固体的含水混合物。

[0151] 术语“残余淀粉”指在含淀粉底物发酵或酶促水解之后在组合物中剩余的淀粉(可溶或不可溶)。

[0152] 如本文使用的“再循环步骤”指醪液成分的再循环,醪液中可包括残余淀粉、酶和

/ 或发酵含有淀粉的底物的微生物。

[0153] 术语“醪液”指用于生产发酵产物（例如乙醇）的可发酵碳源（碳水化合物）在水中的混合物。在一些实施方式中，术语“发酵醪”和“醪液”可互换使用。

[0154] 术语“釜馏物”指未发酵的固体和水的混合物，其是从发酵的醪液中除去乙醇之后的残留物。

[0155] 术语“干酒糟 (DDG)”和“具有可溶物的干酒糟 (DDGS)”指谷物发酵的有用副产物。

[0156] 如本文使用的“产乙醇微生物”指能够将糖或寡糖转化为乙醇的微生物。产乙醇微生物由于其能够表达一种或多种酶而能够产乙醇，所述酶可单独或一起将糖转化为乙醇。

[0157] 如本文使用的术语“乙醇生产者”或“产乙醇微生物”指能够从己糖或戊糖产生乙醇的任何有机体或细胞。一般来讲，产乙醇细胞含有乙醇脱氢酶和丙酮酸脱羧酶。产乙醇微生物的实例包括真菌微生物，例如酵母菌。优选的酵母菌包括 *Sacchromyces*，特别是酿酒酵母 (*S. cerevisiae*)。

[0158] 本文中，当描述蛋白质和编码该蛋白质的基因时，基因的术语是斜体的，例如编码 amyL (地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶) 的基因可以记为 amyL。用于蛋白质的术语通常不是斜体，其第一个字母通常大写，例如，amyL 基因编码的蛋白质可以记为 AmyL 或 amyL。相似地，本文提供的杆菌物种 TS-23 菌株淀粉酶基因和蛋白质分别为 amyTS23 和 AmyTS23。

[0159] 术语“接触”指将各自的酶放置到足够靠近各自底物的位置，以使该酶能够转化底物为终产物。本领域技术人员了解混合酶与各自底物的溶液能够有效接触。

[0160] 术语“源自”涵盖了术语“起源于”、“得自”或“可得自”和“分离自”。

[0161] 术语“酶转化”一般指通过酶作用的底物修饰。本文使用该术语指通过酶的作用对淀粉底物的修饰。

[0162] 涉及多核苷酸或蛋白质时术语“异源的”指不是天然发生于宿主细胞中的多核苷酸或蛋白质。在一些实施方式中，该蛋白质是重要的商业工业蛋白质。这意味着，该术语涵盖了天然产生的基因、突变基因和 / 或合成基因编码的蛋白质。

[0163] 涉及多核苷酸或蛋白质时术语“内源的”指天然发生于宿主细胞中的多核苷酸或蛋白质。

[0164] 本文中使用的术语“表达”指基于基因的核酸序列产生多肽的过程。该过程包括转录和翻译。

[0165] 本文使用的术语“比活性”指酶单位，定义为在特定条件下每单位时间被酶制品转化为产物的底物的摩尔数。比活性用单位 (U) /mg 蛋白质表示。

[0166] 术语“产率”指使用本文记载的方法产生的终产物或目的终产物的量。在一些优选的实施方式中，其产率大于用本领域已知的方法产生的产率。在一些实施方式中，该术语指终产物的体积。而在另一些实施方式中，该术语指终产物的浓度。

[0167] “ATCC”指美国标准菌种收藏所，位于维吉尼亚州马纳萨斯 20108 (ATCC)。

[0168] “NRRL”指农业研究服务菌种保藏中心，农业应用研究的国家中心（以前叫 USDA 北方地区研究实验室），在伊利诺州皮奥里亚。

[0169] 本文中使用的术语“包含”及其同义词使用其包含性含义，即等同于术语“包括”及其相应同义词。

[0170] 如本文所使用，“食品”包括制备的食品以及用于食品的成分，例如面粉。如本文所

使用,“食品成分”包括其为或能够被加入功能性食品或食物中的制剂,且包括在需要,例如酸化或乳化的多种产品中以低水平使用的制剂。由用途和 / 或应用的模式和 / 或施用的模式决定,食品成分可以是溶液或固体的形式。

[0171] 如本文所使用,“功能性食品”指不仅能够提供营养作用和 / 或味觉满足,还对消费者有任何其它有益效果的食品。

[0172] 1. 2. 缩写

[0173] 除非另外说明,应用下面的缩写:

[0174] AAPF 丙氨酸 - 丙氨酸 - 脯氨酸 - 苯丙氨酸

[0175] ADW 自动餐具洗涤剂

[0176] AE 醇乙氧基化物

[0177] AEO 醇乙氧基化物

[0178] AEOS 醇乙氧基硫酸盐

[0179] AES 醇乙氧基硫酸盐

[0180] AFAU 酸性真菌 α - 淀粉酶单位

[0181] AGU 葡糖淀粉酶活性单位

[0182] AOS α - 烯烃磺酸盐

[0183] AS 醇硫酸盐

[0184] BAA 解淀粉芽孢杆菌 α - 淀粉酶

[0185] BLA 地衣芽孢杆菌 (或 LAT)

[0186] BSA 牛血清白蛋白

[0187] cDNA 互补 DNA

[0188] CMC 羧甲基纤维素

[0189] DE 葡萄糖当量

[0190] DNA 脱氧核糖核酸

[0191] DP3 三亚基的聚合度

[0192] DPn n 亚基的聚合度

[0193] DS 干燥固体

[0194] DSC 差式扫描量热仪

[0195] DTMPA 二亚乙基三胺五乙酸

[0196] EC 进行酶分类的酶学委员会

[0197] EDTA 乙二胺四乙酸

[0198] EDTMPA 乙二胺四甲叉膦酸 (ethylenediaminetetramethylenephosphonic acid)

[0199] EO 环氧乙烷

[0200] F&HC 织物和家居护理

[0201] FAU 真菌淀粉酶单位

[0202] GA 葡萄糖淀粉酶

[0203] gpg 每加仑颗粒

[0204] HDG 强效颗粒洗衣剂

[0205]	HDL	强效液体洗衣剂
[0206]	HFCS	高果糖玉米糖浆
[0207]	HFSS	基于高果糖淀粉的糖浆
[0208]	HPAEC-PAD	带有脉冲电流计检测的高效阴离子交换色谱
[0209]	IPTG	异丙基- β -D- 硫代半乳糖苷
[0210]	LAS	线性烷基苯磺酸酯
[0211]	LOM	耐洗牢度试验仪 (Launder-O-meter)
[0212]	LU	脂肪酶单位
[0213]	MTP	微量滴定板
[0214]	MES	2-(N- 吗啉代) 乙磺酸
[0215]	MW	分子量
[0216]	NA	北美
[0217]	Nm	纳米
[0218]	NOBS	壬酰基氧基苯磺酸盐
[0219]	NTA	次氨基三乙酸
[0220]	PAA	过乙酸 (paracetic acid)
[0221]	PCR	聚合酶链式反应
[0222]	PEG	聚乙二醇
[0223]	pI	等电点
[0224]	PI	性能指数
[0225]	ppm	百万分之一
[0226]	PVA	聚 (乙烯醇)
[0227]	PVP	聚 (乙烯吡咯烷酮)
[0228]	RAU	参考淀粉酶单位
[0229]	RMS	均方根
[0230]	RNA	核糖核酸
[0231]	rpm	每分钟转数
[0232]	SAS	次级烷烃磺酸盐
[0233]	1X SSC	0. 15M NaCl, 0. 015M 柠檬酸钠, pH7. 0
[0234]	SSF	同时糖化和发酵
[0235]	TAED	四乙酰基乙二胺
[0236]	TCA	三氯乙酸
[0237]	TNBS	三硝基苯磺酸
[0238]	TSB	胰蛋白酶消化豆胨培养基
[0239]	UFC	超滤浓缩
[0240]	WE	西欧
[0241]	w/v	重量 / 体积
[0242]	w/w	重量 / 重量
[0243]	wt	野生型

[0244] μL 微升

[0245] 1.3 命名法

[0246] 本发明的说明书和权利要求书中,使用氨基酸残基的常规单字母和三字母密码。为了便于引用,用下列命名法描述 α -淀粉酶变体:

[0247] 原始氨基酸:位置:替代氨基酸。

[0248] 根据这种命名法,例如,在 242 位置用丙氨酸取代丝氨酸表示为:

[0249] Ser242Ala 或 S242A

[0250] 30 位的丙氨酸删除表示为:

[0251] Ala30 * 或 A30 * 或 Δ A30

[0252] 另外的氨基酸残基的插入,例如赖氨酸的插入,表示为:

[0253] Ala30AlaLys 或 A30AK。

[0254] 连续氨基酸残基片段的删除,例如氨基酸残基 30-33,表示为 (30-33) * 或 Δ (A30-N33) 或 Δ 30-33。连续两个氨基酸的删除,例如氨基酸残基 R180-S181,表示为 Δ RS 或 Δ 180-181。

[0255] 当一个特定的 α -淀粉酶与其他 α -淀粉酶相比时包含“删除”,而且在这一位置进行了一个插入时,表示为:

[0256] * 36Asp 或 * 36D

[0257] 指在 36 位插入天门冬氨酸。

[0258] 多个突变用加号隔开,即:

[0259] Ala30Asp+Glu34Ser 或 A30N+E34S

[0260] 表示在 30 和 34 位分别用丙氨酸和谷氨酸替换天门冬氨酸和丝氨酸。

[0261] 当一个或多个备选氨基酸残基可以插入在指定位置时,表示为:

[0262] A30N, E ;或

[0263] A30N 或 A30E。

[0264] 并且,当适宜于修饰的位点在此处鉴定出但没有指定的任何特定修饰时,应理解为任何氨基酸残基可以替代此位置的氨基酸残基。因此,例如,当提及位点 30 处的丙氨酸的修饰但是并未指明时,应理解为丙氨酸可以被删除或取代为任何其他氨基酸,即下列氨基酸中的任何一个:

[0265] R、N、D、A、C、Q、E、G、H、I、L、K、M、F、P、S、T、W、Y、V。

[0266] 另外,“A30X”指下列替代中的任何一个:

[0267] A30R、A30N、A30D、A30C、A30Q、A30E、A30G、A30H、A30I、A30L、A30K、A30M、A30F、A30P、A30S、A30T、A30W、A30Y 或 A30V;

[0268] 或简写为:A30R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V。

[0269] 如果亲本酶-用于这种编号的-已经含有在其位置指定为替代的氨基酸残基,当例如 N 或 V 之一存在于野生型中的情况下,则用下列命名法:

[0270] “X30N”或“X30N, V”。

[0271] 所以,这意味着其他相关的亲本酶在位点 30 处被替代为“Asn”或“Val”。

[0272] 1.4 氨基酸残基特征

[0273] 带电荷的氨基酸:

[0274] Asp, Glu, Arg, Lys, His

[0275] 带负电荷的氨基酸（从带负电最多的残基开始排列）：

[0276] Asp, Glu

[0277] 带正电荷的氨基酸（从带正电最多的残基开始排列）：

[0278] Arg, Lys, His

[0279] 中性氨基酸：

[0280] Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Met, Cys, Asn, Gln, Ser, Thr, Pro

[0281] 疏水氨基酸残基（最疏水的残基排在最后）：

[0282] Gly, Ala, Val, Pro, Met, Leu, Ile, Tyr, Phe, Trp,

[0283] 亲水氨基酸（最亲水的残基排在最后）：

[0284] Thr, Ser, Cys, His, Glu, Gln, Asn, Asp, Lys, Arg

[0285] 1.5 同源性（同一性）

[0286] 与另一序列具有一定百分比（例如至少大约 80%、83%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99%）序列同一性的多核苷酸或多肽是指，两个序列相比对时，其碱基或氨基酸残基在比较的两条序列中相同的百分比。这种比对和百分比同源性或同一性可以使用本领域已知的任何适宜软件程序来测定，例如记载于 CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel 等人编辑, 1987, 增刊 30, 7.7.18 部分) 中的那些。优选的程序包括 Vector NTI Advance™ 9.0 (Invitrogen Corp. Carlsbad, CA)、GCG Pileup program, FASTA (Pearson 等人 (1988) Proc. Nat'l Acad. Sci USA 85:2444-2448) 和 BLAST (BLAST Manual, Altschul 等人, Nat'l Cent. Biotechnol. Inf., Nat'l Lib. Med. (NCIB NLM NIH), Bethesda, Md., 和 Altschul 等人, (1997) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402)。另一个优选的比对程序是 ALIGN Plus (Scientific and Educational Software, PA), 其优选使用缺省参数。另一个可用的序列软件程序是 TFASTA 数据搜索程序, 可源自序列软件包 6.0 版 (威斯康辛麦迪逊的威斯康辛大学遗传计算机组)。

[0287] 同源性可以测定为两个序列间同一性的程度, 表明第一序列从第二序列衍生而来。同源性适宜利用本领域已知的计算机程序测定, 例如 GCG 程序包中提供的 GAP (如上所述)。因此, 可以以缺省计分矩阵鉴定和下列缺省参数使用 Gap GCG v8: GAP 建立罚分 5.0 和 GAP 延伸罚分 0.3, 分别用于核酸序列比较; GAP 建立罚分 3.0 和 GAP 延伸罚分 0.1 分别用于蛋白质序列比较。GAP 使用 Needleman 和 Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443-453 (1970) 中描述的方法进行比对和计算同一性。

[0288] AmyTS23 (SEQ ID NO:1) 和例如另一种 α -淀粉酶之间的结构性比对可以用于鉴定在其它 α -淀粉酶 (该 α -淀粉酶与 AmyTS23 具有高度同源性, 例如大约 80%、85%、90%、95%、97% 或 99%) 中的等同 / 对应位点。得到这种结构性比对的一种方法是利用来自 GCG 程序包的 Pile Up 程序, 使用差距罚分的缺省值, 即, 差距建立罚分 3.0 和差距延伸罚分 0.1。另一个结构性比对的方法包括疏水簇分析 (Gaboriaud 等人, FEBS Lett. 224:149-155, 1987) 和反向线索 (T. Huber 和 A. E. Torda, Protein Sci. 7(1):142-149 (1998))。

[0289] 1.6 杂交

[0290] 用于表征上述 AmyTS23 的寡核苷酸探针可适当地基于所研究 α -淀粉酶的全长或部分核苷酸或氨基酸序列而制备。

[0291] 检测杂交的适宜条件包括在 $5\times\text{SSC}$ 中预浸润并在 40°C 的如下溶液中预杂交 1 小时： 20% 甲酰胺溶液， $5\times\text{Denhardt' s}$ 溶液， 50mM 磷酸钠， $\text{pH}6.8$ 和 50mg 变性超声处理过的小牛胸腺 DNA。然后在补充了 100mM ATP 的相同溶液在 40°C 下杂交 18 小时。然后用如下条件洗涤该滤膜 (filter) 三次： $2\times\text{SSC}$ ， 0.2% SDS， 40°C ，洗涤 30 分钟 (低严谨条件)；优选在 50°C 下洗涤 (中严谨条件)；更优选在 65°C 下洗涤 (高严谨条件)；进一步优选在 75°C 下洗涤 (非常高严谨条件)。关于杂交方法的更多细节可参见：Sambrook 等人，Molecular Cloning :A Laboratory Manual, 第二版, Cold Spring Harbor, 1989。

[0292] 在本文中，“源自”不仅仅指 α -淀粉酶产自或可产自所讨论的生物体菌株，还指 α -淀粉酶编码自该菌株分离的 DNA 序列，以及由用该 DNA 序列转化的宿主生物体生产。最后，该术语意欲指这样的 α -淀粉酶，该 α -淀粉酶被合成的和 / 或 cDNA 来源的 DNA 序列编码，而且具有与所讨论的 α -淀粉酶一致的性质。该术语还意欲指亲本 α -淀粉酶可以是天然产生的 α -淀粉酶的变体，即，变体，其是天然产生的 α -淀粉酶的一个或多个氨基酸残基修饰 (插入、置换、删除) 的结果。

[0293] 本领域技术人员能够了解，所述序列还可以通过在严谨杂交条件下与示例性的 amyTS23 序列 (例如图 4 所示 SEQ ID NO :4) 杂交的能力来限定。当核酸的单链形式能够与另一条核酸在适宜的温度和溶液离子强度条件下复性时，该核酸为能够与另一条核酸序列杂交。杂交和洗涤条件为本领域所公知 (参见例如上述 Sambrook (1989)，特别是第 9 和 11 章)。在一些实施方式中，严谨条件对应于 T_m 为 65°C 和 $0.1\times\text{SSC}$ ， 0.1% SDS。

[0294] 1.7 亲本 α -淀粉酶

[0295] 如上所述，根据本发明，任何 AmyTS23 α -淀粉酶可以用作亲本 (即主链) α -淀粉酶。在优选的实施方式中，亲本 α -淀粉酶源自杆菌物种 TS-23 菌株，例如上面涉及的物种中的一种，例如具有 SEQ ID NO :1 (见图 1) 中所示氨基酸序列的 TS-23 α -淀粉酶。

[0296] 1.8 改变的性质

[0297] 下面的部分说明了存在于本发明所述变体中的突变体之间的关系，和可能由其产生的理想的性质方面的改变 (与亲本 TS-23 α -淀粉酶相比)。

[0298] 如上所述，本发明的一方面涉及可源自杆菌物种 TS-23 的 α -淀粉酶及其具有改变的性质的变体。

[0299] 具体涉及的亲本 TS-23 α -淀粉酶和具体涉及的改变的性质是上述的亲本 TS-23 α -淀粉酶和包含至少一部分 TS-23 α -淀粉酶的亲本杂种 α -淀粉酶。杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶 (SEQ ID NO :1) 用作起始点，但是具有高度同源性的其他杆菌物种 α -淀粉酶中的相应位点也应理解为此处公开和具体涉及。

[0300] 另一个实施方式涉及具有如上所述改变性质的变体。

[0301] 在第一方面，亲本杆菌物种菌株 α -淀粉酶的变体，包括下列改变中的至少两个：

[0302] (a) C 末端平截 (例如，1-100 个和其间任意整数个氨基酸的去除)；

[0303] (b) 201 位氨基酸的取代，以 SEQ ID NO :1 对氨基酸计数；或

[0304] (c) 选自由 R180, S181, T182 和 G183 组成的组中的至少两个残基的删除 (以 SEQ ID NO :1 计数)，并且其中该变体具有 α -淀粉酶活性。

[0305] 1.8.1 稳定性

[0306] 在本文所述变体的上下文中，对于得到改变的稳定性 (即更高或更低) 重要的突

变（包括氨基酸置换和删除）包括列于“改变的性质”部分的任何突变，该改变的稳定性是指，特别是提高的稳定性，在特定的高温下（即 70–120℃）和 / 或极端 pH（即低或高 pH 值，即分别 pH4–6 或 pH8–11），特别是低于 60ppm 的游离（即未结合的，所以在溶液中的）钙浓度。稳定性可以如下面的“方法”部分所述测定。

[0307] 1.8.2Ca²⁺ 稳定性

[0308] 改变的 Ca²⁺ 稳定性是指酶在 Ca²⁺ 减少的条件下的稳定性得到了提高，即，当前背景中更高或更低的稳定性。当前描述的变体的背景下，对于得到改变的 Ca²⁺ 稳定性重要的突变（包括氨基酸置换和删除）包括列于“改变的性质”部分的任何突变，该改变的 Ca²⁺ 稳定性是指，特别是提高的 Ca²⁺ 稳定性，在特定的高 pH（即 pH8–10.5）下较高或较低的稳定性。

[0309] 1.8.3 比活性

[0310] 在进一步的方面，对于得到呈现比活性改变的变体的重要的突变（包括氨基酸置换和删除）包括列于“改变的性质”部分的任何突变，该改变的比活性是指，特别是升高或降低的比活性，特别是 10–60℃，优选 20–50℃，特别是 30–40℃ 下的比活性。比活性可以如下面的“方法”部分所述测定。

[0311] 1.8.4 氧化稳定性

[0312] 与亲本 α-淀粉酶相比，所述变体也可以具有改变的氧化稳定性，特别是更高的氧化稳定性。例如，在洗涤剂组合物中增加的氧化稳定性是有利的，而在用于淀粉液化的组合物中降低的氧化稳定性是有利的。氧化稳定性可以如下面的“方法”部分所述测定。

[0313] 改变的 pH 谱

[0314] 关于具有 pH 谱改变的得到的变体的重要位置和突变包括位于活性位点残基附近的氨基酸残基的突变，该改变的 pH 谱是指，特别是在特别高的 pH（即 pH8–10.5）或低 pH（即 pH4–6）下的改善的活性。

[0315] 优选的具体突变 / 置换是列于上面“改变的性质”中对于讨论的位置的突变 / 置换。适宜的检测在下面的“方法”部分说明。

[0316] 1.8.6 洗涤性能

[0317] 对于在特别高 pH（即 pH8.5–11）具有洗涤性能改善的得到的变体的重要位置和突变包括列于上面“改变的性质”中对于讨论的位置的具体突变 / 置换。洗涤性能可以如下面的“方法”部分所述测定。

[0318] 2. 制备 α-淀粉酶变体的方法

[0319] 因此，本发明一方面提供了产生重组形式的杆菌物种 TS-23 菌株 α-淀粉酶序列，其包括其他以前确定的氨基酸置换、删除、颠换、插入及其组合，以生产杆菌物种 TS-23 菌株 α-淀粉酶的变体。这些变体可具有附加的产量增加、升高的 pH 稳定性、升高的温度稳定性、降低对 Ca²⁺ 的需求、增加的比活性、增加的餐具洗涤或洗涤性能、增加的溶解度、增加的储存稳定性或其组合。重组产生变体的方法可以用提供的序列和载体执行，或者用其他本领域已知的方式进行。

[0320] 本领域已知几种向基因中引入突变的方法。在简单讨论 α-淀粉酶编码 DNA 序列的克隆之后，将讨论在 α-淀粉酶编码序列内部的特异性位点产生突变的方法。

[0321] 2.1 编码 α-淀粉酶的 DNA 序列的克隆

[0322] 编码亲本 α-淀粉酶的 DNA 序列可从任何产生该 α-淀粉酶的细胞或微生物中以

本领域已知的各种方法分离。首先,应该用产生要研究的 α -淀粉酶的生物的染色体 DNA 或信使 RNA 构建基因组 DNA 和 / 或 cDNA 库。然后,如果已知该 α -淀粉酶的氨基酸序列,可以合成同源、标记的寡核苷酸探针,用于从上述生物制备的基因组库中鉴定编码 α -淀粉酶的克隆。或者,含有与已知 α -淀粉酶基因同源的序列的标记寡核苷酸探针可用作用杂交和低严谨洗涤条件下洗涤的方法鉴定编码 α -淀粉酶克隆的探针。

[0323] 鉴定编码 α -淀粉酶的克隆的另一种方法涉及将基因组 DNA 的片段插入到表达载体中,例如质粒中,用得到的基因组 DNA 库转化 α -淀粉酶阴性的细菌,将转化的细菌平板接种于含 α -淀粉酶底物的琼脂上,从而鉴定表达 α -淀粉酶的克隆。

[0324] 或者,编码该酶的 DNA 序列可以用已建立的标准方法合成制备,例如 S. L. Beaucage 和 M. H. Caruthers, *Tetrahedron Letters* 22:1859-1869 (1981) 描述的亚磷酸酰胺方法,或 Matthes 等人, *EMBO J.* 3:801-895 (1984) 记载的方法。在亚磷酸酰胺方法中,例如在自动 DNA 合成仪上合成寡核苷酸,纯化、退火、连接并克隆到适当的载体中。

[0325] 最后, DNA 序列可以是混合了基因组来源和合成来源的,混合了合成来源的和 cDNA 来源的,或者混合了基因组来源和 cDNA 来源的,并通过以标准技术连接合成的、基因组的或 cDNA 来源的(如适用,则为对应于整个 DNA 序列的各个部分的片段)片段制备。DNA 序列也可利用特定的引物通过聚合酶链式反应 (PCR) 制备,例如美国专利 4,683,202 或 R. K. Saiki 等人, *Science* 239:487-491 (1988) 中所述。

[0326] 2.2 定点诱变

[0327] 一旦分离了编码 α -淀粉酶的 DNA 序列,确定了所需突变的位点,可以用合成的寡核苷酸引入突变。这些寡核苷酸含有侧翼于所需突变位点的核苷酸序列;突变核苷酸在寡核苷酸合成过程中插入。在一个特定方法中,在带有 α -淀粉酶基因的载体中形成桥接 DNA α -淀粉酶-编码序列的单链 DNA 缺口。然后带有所需突变的合成核苷酸退火到该单链 DNA 的同源部位。然后用 DNA 聚合酶 I (Klenow 片段) 将剩余的缺口补齐,用 T4 连接酶连接该构建体。这种方法的具体例子描述于 Morinaga 等人, *Biotechnology* 2:636-639 (1984) 中。美国专利 4,760,025 公开了通过进行表达框的微小改变而引入编码多个突变的寡核苷酸的方法。但是,用 Morinaga 方法可以在任何时间引入更大量的突变,因为可以引入具有各种长度的多个寡核苷酸。

[0328] 向编码 α -淀粉酶的 DNA 序列引入突变的另一个方法记载于 Nelson 和 Long, *Analytical Biochem.* 180:147-151 (1989) 中。其涉及含有需引入的突变的 PCR 片段的三步生成法,该突变用化学合成的 DNA 链作为 PCR 反应的一个引物来引入突变。从该 PCR 产生的片段,带有突变的 DNA 片段可以用限制性内切酶裂解来分离,然后再插入到表达质粒中。

[0329] 提供变体的其他方法包括基因移动 (gene shuffling), 例如,如 W095/22625 (Affymax Technologies N.V.) 或 W0 96/00343 (Novo Nordisk A/S) 所述,或者其他相关的得到包含所讨论突变例如置换和 / 或删除的杂交酶的技术。

[0330] 2.3 α -淀粉酶变体的表达

[0331] 根据一个方面,用上述方法或本领域已知的其他方法产生的编码变体的 DNA 序列,可以用表达载体表达为酶形式,这些表达载体通常包括编码启动子、操纵子、核糖体结合位点、翻译起始信号的调控序列和可选的阻遏基因或各种激活子基因。

[0332] 带有编码本文所述 α -淀粉酶变体的 DNA 序列的重组表达载体可以是任何载体,

其可以方便地进行重组 DNA 过程,载体的选择经常取决于其要引入的宿主细胞。所以,载体可以是自主复制的载体,即作为染色体外实体存在的载体,其复制独立于染色体的复制,例如质粒、噬菌体或染色体外元件、微染色体或人工染色体。或者,该载体可以是当引入宿主细胞时整合到宿主细胞基因组中,并与其整合入的染色体一起复制的载体。

[0333] 在载体中, DNA 序列应有效连接于适当的启动子序列。启动子可以是在选择的宿主细胞中表现出转录活性的任何 DNA 序列,可源自编码与宿主细胞同源或异源的蛋白质的基因。用于指导编码本文所述的 α -淀粉酶变体的 DNA 序列转录(特别是在细菌宿主中)的适宜启动子的实例有:大肠杆菌 lac 操纵子的启动子、天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) 琼脂糖酶基因 dagA 启动子、地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶基因 (amyL) 的启动子、嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*) 产麦芽糖淀粉酶基因 (amyM) 的启动子、解淀粉芽孢杆菌 α -淀粉酶 (amyQ) 的启动子、和枯草芽孢杆菌 xylA 和 xylB 基因的启动子等。对于真菌宿主中的转录,有用的启动子的实例是源自编码米曲霉 (*A. oryzae*) TKA 淀粉酶、米黑根毛霉 (*Rhizomucor miehei*) 天冬氨酸蛋白水解酶、黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 中性 α -淀粉酶、黑曲霉酸稳定性 α -淀粉酶、黑曲霉葡糖淀粉酶、米黑根毛霉脂肪酶、米曲霉碱性蛋白酶、米曲霉磷酸丙糖异构酶或构巢曲霉 (*A. nidulans*) 乙酰胺酶的基因的启动子。

[0334] 表达载体也可包括与编码如本文所述 α -淀粉酶变体的 DNA 序列有效连接的适宜转录终止子以及,在真核生物中,多腺苷酸化序列。终止序列和多腺苷酸化序列可适宜地源自与启动子相同的来源。

[0335] 载体还可包括允许载体在所讨论的宿主细胞中复制的 DNA 序列。该序列的实例是质粒 pUC19、pACYC177、pUB110、pE194、pAMB1 和 pIJ702 的复制起点。

[0336] 载体也可包括选择标记,例如其产物能在宿主细胞中弥补缺陷的基因,例如来自枯草芽孢杆菌或地衣芽孢杆菌的 dal 基因,或者赋予抗生素抗性(例如氨苄青霉素、卡那霉素、氯霉素或四环素抗性)的基因。此外,载体可包括曲霉属 (*Aspergillus*) 选择标记,例如 amdS、argB、niaD 和 sC(产生潮霉素抗性的标记),或者可通过共转化实现选择,参见例如,WO 91/17243。

[0337] 虽然细胞内表达在一些方面可能是有益的,例如当使用某些细菌作为宿主细胞时,但是一般优选细胞外表达。一般,这里提到的杆菌属 α -淀粉酶包括允许表达的蛋白酶分泌到培养基中的前区 (prereion)。如果需要,可由不同的前区或信号序列代替该前区,其可以通过编码各自前区的 DNA 序列的取代而方便地实现。

[0338] 使用的分别连接编码 α -淀粉酶变体的 DNA 构建体、启动子、终止子和其它元素的操作,和用于将它们插入含有复制必需信息的合适载体的操作是本技术领域众所周知的(见,例如, Sambrook 等人, MOLECULAR CLONING :A LABORATORY MANUAL, 第 2 版., Cold Spring Harbor, 1989)。

[0339] 有益地,将包括 DNA 构建体或如上所述的表达载体的细胞用作重组生产本发明所述 α -淀粉酶变体的宿主细胞。可用编码该变体的 DNA 构建体,通过将该 DNA 构建体(以一个或多个拷贝)整合到宿主染色体中而方便地转化细胞。通常认为这一整合是有利的,因为 DNA 序列更有可能稳定地保持在细胞中。可根据常规方法,例如通过同源或异源重组实现 DNA 构建体向宿主染色体的整合。或者,可以用与不同类型的宿主细胞相关的上述表

达载体转化细胞。

[0340] 细胞可以是高级生物的细胞（即真核细胞），例如哺乳动物或昆虫的细胞，但是优选微生物细胞，例如细菌或真菌（包括酵母菌）细胞。

[0341] 适宜细菌的实例为：革兰氏阳性菌，例如枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、短芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌（*Geobacillus stearothermophilus*）、嗜碱芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、凝固芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、灿烂芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌（*Bacillus megaterium*）、苏云金芽孢杆菌、浅青紫链霉菌或鼠灰链霉菌；或革兰氏阴性细菌，例如大肠杆菌。细菌的转化可以用例如原生质体转化进行，或用感受态细胞以已知的方式进行。

[0342] 适宜的酵母生物可以选自：酵母属物种（*Saccharomyces*）或裂殖酵母属（*Schizosaccharomyces*）物种，例如酿酒酵母（*S. cerevisiae*）。丝状真菌可有利地属于曲霉属（*Aspergillus*）物种，例如米曲霉或黑曲霉。真菌细胞可以用包括原生质体形成和原生质体转化的方法进行转化，原生质体转化后以已知的方式进行细胞壁的再生。曲霉宿主细胞的转化的适宜方法记载于例如 EP 238 023 中。

[0343] 在又一个方面中，提供了产生 α -淀粉酶变体的方法，该方法包括在有利于变体生产的条件下培养上述宿主细胞，并从该细胞和 / 或培养基中回收变体。

[0344] 用于培养细胞的培养基可以是任何适于生长所讨论宿主细胞和获得本文所述 α -淀粉酶变体表达的常规培养基。适宜的培养基可获自商品供应商或可根据公开的制剂（例如按美国典型培养物保藏中心（American Type Culture Collection (ATCC)）的目录所述）制备。

[0345] 可通过公知的方法从培养基中方便地回收分泌自宿主细胞的 α -淀粉酶变体，包括通过离心或过滤从培养基中分离细胞，通过诸如硫酸铵的盐沉淀培养基中的蛋白质组分，随后使用诸如离子交换层析、亲和层析等的层析方法。

[0346] 3. 工业应用

[0347] 本发明的 α -淀粉酶变体具有可用于各种工业应用的有价值的性质。特别是，该酶变体可用作洗涤、餐具洗涤和硬表面清洁洗涤剂组合物的成分。

[0348] 具有改变的性质的一个或多个变体可以用于淀粉加工，特别是淀粉转化，尤其是淀粉的液化（参见，例如美国专利 3,912,590、欧洲专利申请 252730 和 63909, WO 99/19467 和 WO 96/28567, 此处所有的参考文献均通过引用而整体合并于此）。还涉及淀粉转化目的的组合物，其除了此处所述的变体，还包括葡萄糖淀粉酶、支链淀粉酶和其他 α -淀粉酶。

[0349] 另外，一种或多种变体还可以用于甜味剂和乙醇的生产中（参见例如通过引用而整体合并于此的美国专利 5,231,017），例如从淀粉或整个谷物生产燃料乙醇、饮用乙醇和工业乙醇。

[0350] 本发明的变体还可以用于纺织品、织物和衣物的退浆（参见例如通过引用而整体合并于此的 WO 95/21247、美国专利 4,643,736 和 EP 119,920）；发酵醪生产或酿造；以及纸浆和纸的生产。

[0351] 3.1 淀粉转化

[0352] 常规的淀粉转化过程，例如液化和糖化过程记载于通过引用而整体合并于此的例如美国专利 3,912,590 和欧洲专利公开 252,730 和 63,909。

[0353] 在一个实施方式中，降解淀粉为较低分子量的碳水化合物成分（如糖或脂肪取代

物)的淀粉转化过程包括脱支化步骤。

[0354] 3.2 淀粉向糖的转化

[0355] 在淀粉向糖的转化的情况下,解聚淀粉。这种解聚过程由预处理步骤和两个或三个连续步骤组成,即液化步骤、糖化步骤,而且取决于目的终点产物的可选的异构化过程。

[0356] 3.3 天然淀粉的预处理

[0357] 天然淀粉由微观颗粒组成,其在室温下不溶于水。当加热水性淀粉料浆时,颗粒溶胀并最终破裂,向溶液中释放淀粉分子。在此“糊化”过程中,粘度会急剧升高。由于在通常的工业过程中,固体水平是 30-40%,因此淀粉不得不薄化或“液化”以使其能够操作。目前这种粘度的降低大部分通过酶促降解来得到。

[0358] 3.4 液化

[0359] 在液化步骤中,长链淀粉被 α -淀粉酶降解成支链和直链的较短单位(麦芽糊精)。液化过程在 105-110°C 进行 5-10 分钟,然后在 95°C 进行 1-2 小时。pH 值在 5.5-6.2 之间。为了在这些条件下保证最优的酶稳定性,加入 1mM 钙(40ppm 游离钙离子)。该处理以后,液化的淀粉会具有 10-15 的“葡萄糖当量”(DE)。

[0360] 3.5 糖化

[0361] 液化步骤后,通过添加葡糖淀粉酶(例如 **OPTIDEX® L-400**)和脱支酶(如异淀粉酶(U.S. Pat. No. 4, 335, 208)或支链淀粉酶,将麦芽糊精转换为葡萄糖。在此步骤之前,将 pH 降低至低于 4.5 的值,维持高温(高于 95°C)以使液化 α -淀粉酶失活,以降低称作“潘糖前体”的短链寡糖的形成,这种短链寡糖不能被分支酶正确水解。

[0362] 使温度降至 60°C,可以加入葡糖淀粉酶和脱支酶。糖化步骤通常进行 24-72 小时。

[0363] 通常,当液化步骤后变性 α -淀粉酶时,大约 0.2-0.5% 的糖化产物是分支的三糖, $\text{Glc p } \alpha 1-6\text{Glc p } \alpha 1-4\text{Glc}$ (潘糖),其不能被支链淀粉酶降解。如果有活性,来自液化步骤的淀粉酶在糖化步骤中存在,即没有变性,这种糖的水平可高至 1-2%,这是非常不想要的结果,因为这会大大降低糖化作用的产率。

[0364] 3.6 异构化

[0365] 当所需的最终糖产品是例如高果糖糖浆时,葡萄糖糖浆可以转化为果糖。糖化过程之后, pH 升高到 6-8 范围内,优选 pH7.5,通过离子交换除去钙。葡萄糖糖浆然后用例如固定化的葡萄糖异构酶(例如 **Gensweet® IGI-HF**)转化为高果糖糖浆。

[0366] 3.7 乙醇生产

[0367] 通常从全谷物生产乙醇可分为如下四步:(1) 研磨;(2) 液化;(3) 糖化和(4) 发酵。

[0368] 3.7.1 研磨

[0369] 碾磨谷粒打开其结构,从而允许进一步加工。可以使用的两种碾磨方法是湿磨法或干磨法。在干磨法中,碾磨整个核和在该方法的剩下部分中使用。湿磨法提供胚芽和粉(淀粉颗粒和蛋白质)的良好分离,并且,除少数例外外,在平行进行糖浆生产时使用这种方法。

[0370] 3.7.2 液化

[0371] 在该液化过程中,通过水解将淀粉颗粒溶解为大部分具有高于 4 的 DP 的麦芽糊精。水解可以通过酸处理或用 α -淀粉酶处理进行。酸水解用于有限的基质上。原料可

以是研磨的整粒谷物或淀粉加工的侧流（副产物）。

[0372] 酶促液化通常作为三步热料浆过程进行。料浆加热到 60–95℃，优选 80–85℃，加入酶。然后在 95–140℃，优选 105–125℃喷射蒸煮该料浆，冷却至 60–95℃，加入更多的酶，得到最终水解。液化过程在 pH4.5–6.5 下进行，通常在 5 和 6 之间的 pH 下进行。研磨的和液化的谷物也称作醪液。

[0373] 3.7.3 糖化

[0374] 为了生产可以被酵母菌代谢的低分子糖 DP_{1-3} ，液化中产生的麦芽糊精必须进一步水解。通常，水解通过酶促进行，例如葡萄糖淀粉酶，也可使用备选的 α -糖苷酶或酸性 α -淀粉酶。完全糖化步骤可以持续至多 72 小时，但是，通常仅仅进行一般 40–90 分钟的预糖化，然后在发酵中完全糖化（SSF）。通常在 30–65℃进行糖化，一般为 60℃左右，pH4.5。

[0375] 3.7.4 发酵

[0376] 通常将来自酵母菌属物种的酵母菌加入到醪液中，发酵 24–96 小时，例如通常 35–60 小时。温度在 26–34℃之间，通常约 32℃，pH 为 pH3–6，优选约 pH4–5。

[0377] 注意到，广泛应用的方法是同时糖化和发酵（SSF）的方法，其中没有糖化的保持期，意味着酵母菌和酶一起加入。当进行 SSF 时，通常就在发酵之前在高于 50℃的温度下引入预糖化步骤。

[0378] 3.8 蒸馏

[0379] 发酵之后，蒸馏醪液以提取乙醇。

[0380] 根据该方法得到的乙醇可用作例如燃料乙醇；饮用乙醇，即可饮用中性酒精饮料；或工业乙醇。

[0381] 3.9 副产物

[0382] 发酵剩下的谷物通常以液体或干燥形式用作动物饲料。

[0383] 如何进行液化、糖化、发酵、蒸馏和乙醇回收的进一步的细节为本领域技术人员所公知。

[0384] 根据本文所述的方法，糖化和发酵可以同时或分开进行。

[0385] 3.10 纸浆和纸生产

[0386] 本文所述变体碱性 α -淀粉酶也可用于从淀粉强化的废纸和卡纸板生产木质纤维素材料，例如纸浆、纸和卡纸板，特别是当在 7 以上的 pH 下进行再次制浆时，淀粉酶通过该强化淀粉的降解促进了废料的崩解。 α -淀粉酶特别用于从淀粉涂层的印刷纸制备造纸纸浆的方法。该方法可以如 WO 95/14807 所述进行，包括下列步骤：

[0387] a) 分解纸，生产纸浆；

[0388] b) 在 a) 步骤之前、过程中或之后用淀粉降解酶处理；和

[0389] c) 在 a) 和 b) 步骤之后从纸浆中分离墨水颗粒。

[0390] 本文所述的 α -淀粉酶也可用于改性淀粉，酶促改性的淀粉与碱性填料如碳酸钙、高岭土和粘土用于造纸中。用上述碱性 α -淀粉酶，有可能在填料存在下改性淀粉，从而可以得到更简单的整合方法。

[0391] 3.11 纺织品、织物和衣物的退浆

[0392] α -淀粉酶也可以用于纺织品、织物或衣物的退浆。在纺织品加工工业中， α -淀粉酶通常用作退浆过程中的辅剂，以促进含淀粉浆料的去除，该浆料在纺织过程中作为纱

线上的保护性涂层起作用。纺织以后的浆料涂层的完全去除对于保证后续过程的最优结果非常重要,后续过程中织物被洗涤、漂白和染色。优选酶促淀粉分解,因为这不会对织物材料造成任何有害效果。为了减少加工成本和增加研磨处理量,退浆过程有时候与洗涤和漂白步骤联合进行。在这种情况下,非酶促助剂,如碱或氧化剂通常用来分解淀粉,因为经典的 α -淀粉酶非常不适用于高 pH 值和漂白剂。淀粉浆料的非酶促分解会导致一些纤维破坏,因为使用了更加具有攻击性的化学品。所以,使用 α -淀粉酶变体将是理想的,因为它们可以在碱溶液中具有改善的性能。 α -淀粉酶可以单独使用,或当退浆含纤维素的织物或纺织品时与纤维素酶联合使用。

[0393] 退浆和漂白过程为本领域所公知。例如,该过程记载于 WO 95/21247, U. S. Pat. No. 4, 643, 736 和 EP 119, 920 中,其通过引用而整体合并于此。

[0394] 用于退浆的市售产品包括 Danisco US Inc., Genencor Division 的 **OPTISIZE® FLEX**。

[0395] 本发明还涉及使用一种或多种杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶或其变体处理织物(例如纺织品退浆)的组合物和方法。本领域公知,该酶可用于任何织物处理方法中,参见例如美国专利 6, 077, 316。例如,一方面,用包括将织物与杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶或其变体溶液接触的方法改善织物的手感和外观。一方面,在压力下用该溶液处理织物。

[0396] 一方面,在纺织品纺织过程中或之后,或在退浆阶段,或一个或多个另外的织物加工步骤中使用该酶。在纺织品纺织期间,纺线暴露于相当大的机械张力。在机械织机上纺织之前,经纱通常涂上淀粉或淀粉衍生物浆料,以增加其抗张强度并防止断裂。可以施加这些酶以除去这些淀粉或淀粉衍生物浆料。在纺织品织成之后,织物可以进入退浆阶段。这之后可接着一个或多个其他织物加工步骤。退浆是从纺织品中除去浆料的行为。纺织后必须除去浆料涂层,之后再进一步加工织物,以确保均一和耐洗效果。本文还提供了包括通过杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶或其变体的作用来酶促水解上述浆料的退浆方法。

[0397] 该酶可以单独或与其他退浆化学试剂和/或退浆酶一起用作为洗涤剂添加剂,在例如水性组合物中,使织物(包括含棉织物)退浆。杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶或其变体也可用于在靛蓝染色的粗斜棉布织物和衣服上产生石洗外观的组合物和方法中。为生产衣服,织物可以剪裁并缝纫成衣服或衣物,之后进行整理。特别是,为生产粗斜棉布牛仔服(denim jeans),已研发了不同的酶促整理方法。粗斜棉布衣服的整理通常始于酶促退浆步骤,在此期间淀粉分解酶作用于衣服,以使织物柔软,并使该棉布更易于接受随后的酶促整理步骤。该酶可用于整理粗斜棉布衣服(例如“生物打磨法”(bio-stoning))、酶促退浆及为织物提供柔软度,和/或整理的方法中。淀粉酶的剂量随着方法类型而改变。较小剂量与较大剂量的同样酶相比,会需要更多的时间。然而,退浆淀粉酶存在的量没有上限,而不是受溶液的物理约束控制。因此,酶的限制度可以是能够溶解于溶液中的量。通常,退浆酶,例如 α -淀粉酶,以织物的重量计,以约 0.00001%至约 2%酶蛋白、约 0.0001%至约 1%酶蛋白、约 0.001%至约 0.5%酶蛋白的量加入到处理组合物中,在另一个实施例中,以织物的重量计,可以是约 0.01%至约 0.2%酶蛋白的量。

[0398] 3.12 发酵醪的生产

[0399] 此处提供的变体 α -淀粉酶也可用于发酵醪生产过程中; α -淀粉酶通常在淀粉糖化过程中加入。

[0400] 3.13 洗涤剂组合物

[0401] 本文所述的变体 α -淀粉酶可以加入并由此成为洗涤剂组合物的成分。

[0402] 例如,可以将此处提供的洗涤剂组合物配制成手洗或机洗的衣物洗涤剂组合物,包括适于预处理污染的织物的衣物添加剂组合物和漂洗添加的织物柔软剂组合物,或者配制成用于一般的家居硬表面清洁操作的洗涤剂组合物,或者配制以用于手洗或机洗的餐具洗涤操作。

[0403] 在一个具体的方面,提供了包括本文所述变体酶的“洗涤剂添加剂”。该洗涤剂添加剂和洗涤剂组合物可包含一种或多种其它酶,例如蛋白酶、脂肪酶、过氧化物酶、另一种淀粉分解的酶(例如另一种 α -淀粉酶)、葡萄糖淀粉酶、产麦芽糖淀粉酶、CGT 酶和/或纤维素酶、甘露聚糖酶(如购自 Danisco US Inc., Genencor Division 的 MANNASTAR™)、果胶酶、胶质裂合酶、角质酶和/或漆酶。

[0404] 通常,所选酶的特性应与选择的洗涤剂兼容(即最适 pH、与其他酶和非酶成分的兼容性等),且所述酶应以有效量存在。

[0405] 蛋白酶:适宜的蛋白酶包括动物、植物或微生物来源的那些。优选微生物来源。包括经化学修饰或蛋白质工程改造的突变体。蛋白酶可以是丝氨酸蛋白酶或金属蛋白酶,优选碱性的微生物蛋白酶或胰蛋白酶样的蛋白酶或糜蛋白酶样的蛋白酶。碱性蛋白酶的实例是枯草杆菌蛋白酶,特别是来源于杆菌属的枯草杆菌蛋白酶,例如枯草杆菌蛋白酶 Novo、枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg、枯草杆菌蛋白酶 309、枯草杆菌蛋白酶 147 和枯草杆菌蛋白酶 168(记载于例如 WO 89/06279)。胰蛋白酶样蛋白酶的例子是胰蛋白酶(例如猪或牛来源的),和记载于 WO 89/06270 和 WO 94/25583 中的镰孢菌属蛋白酶。

[0406] 示例性可商购的蛋白酶包括 **ALCALASE®**、**SAVINASE®**、**PRIMASE®**、**DURALASE®**、**ESPERASE®** 和 **KANNASE®**(购自 Novozymes A/S)、**MAXATASE®**、MAXACAL、**MAXAPEM®**、**PROPERASE®**、**PURAFECT®**、**PURAFECT OXP®**、**FN2®**、**FN3®** 和 **FN4®**(Danisco US Inc., Genencor Division)。

[0407] 脂肪酶:适宜的脂肪酶包括细菌或真菌来源的那些。包括经化学修饰或蛋白质工程改造的突变体。有用的脂肪酶的实例包括但不限于来自腐质霉属(Humicola)(与嗜热丝孢菌属(Thermomyces)同义)的脂肪酶,例如来自疏毛腐质霉(H. lanuginosa)(疏棉状嗜热丝孢菌(T. lanuginosus))(参见 EP258068 和 EP 305216)或来自特异腐质霉(H. insolens)(如 WO 96/13580 所述);假单胞菌属(Pseudomonas)脂肪酶(例如来自产碱假单胞菌(P. alcaligenes)或类产碱假单胞菌(P. pseudoalcaligenes)(EP 218 272),洋葱假单胞菌(P. cepacia)(EP 331 376)、斯氏假单胞菌(P. stutzeri)(GB 1,372,034)、荧光假单胞菌(P. fluorescens)、假单胞菌属菌株 SD 705(WO 95/06720 和 WO 96/27002)、P. wisconsinensis(WO 96/12012)的脂肪酶;芽孢杆菌属脂肪酶(例如来自枯草芽孢杆菌(Dartois 等人,(1993),Biochimica et Biophysica Acta,1131:253-360),嗜热脂肪芽孢杆菌(B. stearothermophilus)(JP 64/744992)或短小芽孢杆菌(B. pumilus)(WO 91/16422)的脂肪酶。其他可以考虑在制剂中使用的脂肪酶变体示例包括例如在 WO 92/05249、WO 94/01541、EP 407 225、EP 260 105、WO 95/35381、WO 96/00292、WO 95/30744、WO 94/25578、WO 95/14783、WO 95/22615、WO 97/04079 和 WO 97/07202 中描述的那些。

[0408] 一些市售可得的脂肪酶包括 LIPOLASE™ 和 LIPOLASE ULTRA™ (Novozymes, A/S)

[0409] 聚酯酶:适宜的聚酯酶可以包含在该组合物中。适宜的聚酯酶包括例如 WO 01/34899 和 WO 01/14629 中记载的那些。

[0410] 淀粉酶:也可包括一种或多种其它淀粉酶(除此处所述的淀粉酶变体之外)。适宜的淀粉酶(α 和 / 或 β) 包括那些细菌或真菌来源的淀粉酶。包括经化学修饰或蛋白质工程改造的突变体。淀粉酶包括,例如,来自芽孢杆菌的 α -淀粉酶,例如 GB 1, 296, 839 中更具体描述的地衣芽孢杆菌的特定菌株。有用的 α -淀粉酶的实例是在 WO 94/18314、WO 96/39528、WO94/02597、WO 94/18314、WO 96/23873 和 WO 97/43424 中描述的变体,特别是在下列位点中的一个或多个上有置换的变体:15、23、105、106、124、128、133、154、156、181、188、190、197、202、208、209、243、264、304、305、391、408 和 444。

[0411] 市售可得的 α -淀粉酶是 DURAMYL™、LIQUEZYME™、TERMAMYL™、NATALASE™、STAINZYME™ PLUS、STAINZYME™ ULTRA、FUNGAMYL™ 和 BAN™ (Novozymes A/S)、RAPIDASE™ 和 PURASTAR™ (购自 Danisco US Inc.、Genencor Division)。

[0412] 纤维素酶:可以向组合物中加入纤维素酶。适宜的纤维素酶包括细菌或真菌来源的那些。包括经化学修饰或蛋白质工程改造的突变体。适宜的纤维素酶包括但不限于来自芽孢杆菌属、假单胞菌属、木霉属、腐质霉属、镰孢霉属、梭孢壳属 (Thielavia)、枝顶孢属 (Acremonium) 的纤维素酶,例如如美国专利 No. 4, 435, 307 ;5, 648, 263 ;5, 691, 178 ;5, 776, 757 和 WO89/09259 公开的自特异腐质霉 (*Humicola insolens*)、嗜热毁丝霉 (*Myceliophthora thermophila*) 和尖镰孢 (*Fusarium oxysporum*) 产生的真菌纤维素酶。里氏木霉纤维素酶的实例公开于美国专利 4, 689, 297、5, 814, 501 和 5, 324, 649, 以及 WO 92/06221 和 WO 92/06165 中。示例性芽孢杆菌属纤维素酶公开于美国专利 6, 562, 612 中。

[0413] 市售可得的纤维素酶包括 **CELLUZYME®** 和 **CAREZYME®** (Novozymes A/S), **CLAZINASE®** 和 **PURADAX HA®** (Danisco US Inc., Genencor Division) 和 **KAC-500(B)®** (Kao Corporation)。

[0414] 过氧化物酶 / 氧化酶:适宜的过氧化物酶 / 氧化酶包括植物、细菌或真菌来源的那些。包括经化学修饰或蛋白质工程改造的突变体。有用的过氧化物酶的实例包括描述于 WO 93/24618、WO 95/10602 和 WO 98/15257 中的来自鬼伞属 (*Coprinus*) (例如灰盖鬼伞 (*C. cinereus*)) 的过氧化物酶及其变体。

[0415] 市售可得的过氧化物酶包括 **GUARDZYME®** (Novozymes A/S)。

[0416] 可通过添加含有一种或多种酶的分开的添加剂,或通过添加包括所有这些酶的组合的添加剂而在洗涤剂组合物中包括洗涤剂酶。可以将洗涤剂添加剂,即分开的添加剂或组合的添加剂配成例如颗粒、液体、浆液等。优选洗涤剂添加剂制剂是:颗粒型的,特别是无粉尘颗粒;液体,特别是稳定化的液体;或浆液。

[0417] 可例如按照美国专利 No. 4, 106, 991 和 4, 661, 452 所公开来生产无粉尘颗粒,并且可任选地用本领域已知的方法进行包衣。蜡质包衣材料的实例是平均分子量为 1,000 至 20,000 的聚环氧乙烷产物(聚乙二醇, PEG);具有 16-50 个环氧乙烷单元的乙氧基化壬基酚;乙氧基化脂肪醇,其中醇含有 12-20 个碳原子且其中有 15-80 个环氧乙烷单元;脂肪醇;脂肪酸;以及脂肪酸的单酰甘油和二酰甘油及三酰甘油。例如 GB 1483591 给出了适于通过流化床技术应用的成膜包衣材料的实例。可例如通过加入多元醇诸如丙二醇、糖或糖

醇、乳酸或硼酸,按照已建立的方法来稳定液态酶制品。可按照如 EP 238,216 公开的方法来制备受保护的酶。

[0418] 通常,洗涤剂组合物可以是任何便利的形式,例如棒、片、凝胶、粉末、颗粒、糊或液体。液体洗涤剂可以是水性的,通常含有高达约 70% 的水,和 0% 至约 30% 的有机溶剂。浓缩洗涤剂凝胶含有例如约 30% 或更少的水。

[0419] 洗涤剂组合物可以包括一种或多种表面活性剂,该表面活性剂可以是非离子型,包括半极性和 / 或阴离子型和 / 或阳离子型和 / 或两性离子型。表面活性剂一般按以重量计 0.1% -60% 的水平存在。

[0420] 当包括在洗涤剂中时,洗涤剂通常将含有约 1% 至约 40% 的阴离子表面活性剂,例如线性烷基苯磺酸盐、 α -烯烴磺酸盐、烷基硫酸盐(脂肪醇硫酸盐)、醇乙氧基硫酸盐、仲烷基磺酸盐、 α -磺基脂肪酸甲酯、烷基或烯基琥珀酸或皂。

[0421] 当包括在洗涤剂中时,洗涤剂通常将含有约 0.2% 至约 40% 的非离子表面活性剂,如醇乙氧基化物、壬基酚乙氧基化物、烷基多苷、烷基二甲基胺氧化物、乙氧基化脂肪酸单乙醇酰胺、脂肪酸单乙醇酰胺、多羟基烷基脂肪酸酰胺、或葡糖胺的 N-酰基-N-烷基衍生物(“葡糖酰胺”)。

[0422] 洗涤剂可含有 0% -65% 的洗涤剂增效剂或络合剂(complexing agent),例如沸石、二磷酸盐、三磷酸盐、磷酸盐、碳酸盐、柠檬酸盐、次氨基三乙酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、二亚乙基三胺五乙酸、烷基或烯基琥珀酸、可溶性硅酸盐或层状硅酸盐(例如来自 Hoechst 的 SKS-6)。

[0423] 洗涤剂可包括一种或多种聚合物。实例有羧甲基纤维素(CMC)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、聚乙二醇、聚乙烯醇、聚(乙烯基吡啶-N-氧化物)、聚乙烯基咪唑、聚羧酸酯(如聚丙烯酸酯、马来酸 / 丙烯酸共聚物)和甲基丙烯酸月桂酯 / 丙烯酸共聚物。

[0424] 洗涤剂可含有漂白系统,这可包括 H_2O_2 来源(例如过硼酸盐或过碳酸盐),其可以与形成过酸的漂白活性剂(如四乙酰基乙二胺或壬酰基氧基苯磺酸盐)联用。或者,漂白系统可包括过氧酸(例如酰胺、酰亚胺或矾类过氧酸)。漂白系统也可以是酶促漂白系统。参见例如 WO 05/056782。

[0425] 可使用常规的稳定剂来稳定本发明公开的洗涤剂组合物中的酶,稳定剂例如:多元醇(如丙二醇或甘油)、糖或糖醇、乳酸、硼酸或硼酸衍生物(例如,硼酸芳族酯)、或苯基硼酸衍生物(例如 4-甲酰基苯基硼酸)。可按照 WO 92/19709 和 WO 92/19708 所述配制所述组合物。

[0426] 洗涤剂也可含有其他常规洗涤剂成分,例如织物调理剂,包括粘土、发泡剂、抑泡剂、防腐蚀剂、污垢悬浮剂、防尘污再沉积剂、染料、杀菌剂、荧光增白剂、水溶增溶剂、酶暗抑制剂和 / 或香料(和其任意组合)。

[0427] 目前认为在洗涤剂组合物中,尤其是杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶或其变体可以按相当于每升洗液约 0.01 至约 100mg 酶蛋白质(例如每升洗液约 0.05 至约 5.0mg 酶蛋白质,或每升洗液约 0.1 至约 1.0mg 酶蛋白质)的量加入。

[0428] 本文所记载的变体酶的一种或多种可另外加入到 WO 97/07202 所公开的洗涤剂制剂中,WO 97/07202 通过引用而合并于此。

[0429] 4. 组合物和用途

[0430] 本文所述的一种或多种变体酶也可以用于在洗涤剂（特别是衣物洗涤剂组合物和餐具洗涤剂组合物）、硬表面清洁组合物中、使用 α -淀粉酶的方法中、用于织物、纺织品或衣物退浆组合物中、用于生产纸浆和纸、发酵醪生产、乙醇生产和如上所述的淀粉转化过程中。

[0431] 4.1 衣物洗涤剂组合物和用途

[0432] 根据一种实施方式，通常一种或多种杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶或其变体可为衣物洗涤剂组合物的组分。如此，其可以以无粉尘颗粒、稳定的液体或受保护的酶的形式包括在洗涤剂组合物中。干燥的制剂可以是颗粒或微颗粒的形式。可以例如，按美国专利 No. 4, 106, 991 和 4, 661, 452 所公开的那样来生产无粉尘颗粒，并且可任选地由本领域已知的方法进行包衣。蜡质包衣材料的实例是平均摩尔质量为 1,000 至 20,000 的聚（环氧乙烷）产物（聚乙二醇，PEG）；具有 16-50 个环氧乙烷单元的乙氧基化壬基酚；乙氧基化脂肪醇，其中醇含有 12-20 个碳原子，且其中有 15-80 个环氧乙烷单元；脂肪醇；脂肪酸；以及脂肪酸的单酰甘油和二酰甘油及三酰甘油。例如英国专利 1483591 给出了适于通过流化床技术应用的成膜包衣材料的实例。可例如通过加入多元醇诸如丙二醇、糖或糖醇、乳酸或硼酸，按照已建立的方法来稳定液态酶制品。其他酶稳定剂是本领域公知的。可按照例如欧洲申请 No. 238, 216 公开的方法来制备受保护的酶。长期以来多元醇被公认为蛋白质的稳定剂，和用于提高蛋白质的溶解性。参见，例如 J.K. Kaushik 等人，“Why is trehalose an exceptional protein stabilizer? An analysis of the thermal stability of proteins in the presence of the compatible osmolyte trehalose,” J. Biol. Chem. 278 :26458-65 (2003) 和其中引用的参考文献；以及 Monica Conti 等人，“Capillary isoelectric focusing: the problem of protein solubility,” J. Chromatography 757 : 237-245 (1997)。

[0433] 该组合物可包括杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶或其变体作为主要酶组分，例如单组分组合物。备选地，该组合物可包括多种酶活性，例如氨肽酶、淀粉酶、糖酶、羧肽酶、过氧化氢酶、纤维素酶、壳多糖酶、角质酶、环糊精糖基转移酶、脱氧核糖核酸酶、酯酶、 α -半乳糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、 α -葡糖苷酶、 β -葡糖苷酶、卤代过氧化物酶、转化酶、漆酶、脂肪酶、甘露糖苷酶、氧化酶、果胶分解酶、肽谷氨酰胺酶、过氧化物酶、植酸酶、多酚氧化酶、蛋白水解酶、核糖核酸酶、转谷氨酰胺酶或木聚糖酶，以及下述其他酶。其他酶可通过属于如下属的微生物生产：曲霉属、木霉属、腐质酶属（例如特异腐质霉 (*H. insolens*)）和镰孢菌（霉）属 (*Fusarium*)。曲霉属的示例性成员包括棘孢曲霉 (*Aspergillus aculeatus*)、泡盛曲霉 (*Aspergillus awamori*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 或米曲霉 (*Aspergillus oryzae*)。镰孢霉属的示例性成员包括杆孢状镰孢 (*Fusarium bactridioides*)、*Fusarium cerealis*、*Fusarium crookwellense*、大刀镰孢 (*Fusarium culmorum*)、禾本科镰孢 (*Fusarium graminearum*)、禾赤镰孢 (*Fusarium gramineum*)、异孢镰孢 (*Fusarium heterosporum*)、合欢木镰孢 (*Fusarium negundinis*)、尖镰孢 (*Fusarium oxysporum*)、多枝镰孢 (*Fusarium reticulatum*)、粉红镰孢 (*Fusarium roseum*)、接骨木镰孢 (*Fusarium sambucinum*)、肤色镰孢 (*Fusarium sarcochromum*)、硫色镰孢 (*Fusarium sulphureum*)、*Fusarium torulosum*、拟丝孢镰孢 (*Fusarium trichothecioides*) 或 *Fusarium venenatum*。

[0434] 洗涤剂组合物可以是任何有用的形式,例如粉末、颗粒、糊状或液体。液体洗涤剂可以是水性的,通常含有至多约 70%的水,和 0%至约 30%的有机溶剂。还可以是仅仅包含大约 30%水的浓缩凝胶形式的洗涤剂组合物。酶可以用于与酶的稳定性相容的任何洗涤剂组合物中。通常可以用已知的包囊化形式(例如通过造粒或隔离在水凝胶中)来保护酶免于遭遇有害组分。酶和尤其是 α -淀粉酶不局限于洗衣和餐具洗涤应用,还可以用于表面清洁剂以及用于由淀粉或生物质生产乙醇。

[0435] 洗涤剂组合物可以包括一种或多种表面活性剂,其中每种都可以是阴离子型、非离子型、阳离子型或两性离子型。洗涤剂将通常包含 0%至约 50%的阴离子表面活性剂,例如线性烷基苯磺酸盐(LAS); α -烯烴磺酸盐(AOS);烷基硫酸盐(脂肪醇硫酸盐)(AS);醇乙氧基硫酸盐(AEOS 或 AES);仲烷基磺酸盐(SAS); α -磺基脂肪酸甲酯;烷基或烯基琥珀酸或皂。组合物也可包含 0%至约 40%的非离子表面活性剂,例如醇乙氧基化物(AEO 或 AE)、羧化的醇乙氧基化物、壬基酚乙氧基化物、烷基多苷、烷基二甲基胺氧化物、乙氧基化脂肪酸单乙醇酰胺、脂肪酸单乙醇酰胺、或多羟基烷基脂肪酸酰胺(如例如在 WO 92/06154 中所述)。

[0436] 洗涤剂组合物可另外包括一种或多种其他酶,例如脂肪酶、角质酶、蛋白酶、纤维素酶、过氧化物酶、和/或漆酶的任何组合。如上所述。

[0437] 洗涤剂可任选地含有约 1%至约 65%的洗涤剂增效剂或络合剂,例如沸石、二磷酸盐、三磷酸盐、磷酸酯、柠檬酸盐、次氨基三乙酸(NTA)、乙二胺四乙酸(EDTA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTMPA)、烷基或烯基琥珀酸、可溶性硅酸盐或层状硅酸盐(例如来自 Hoechst 的 SKS-6)。洗涤剂也可以是无增效剂的,即基本上不含洗涤剂增效剂。

[0438] 洗涤剂可任选地包括一种或多种聚合物。实例包括羧甲基纤维素(CMC)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、聚乙二醇(PEG)、聚乙烯醇(PVA)、聚羧酸酯如聚丙烯酸酯、马来酸/丙烯酸共聚物和甲基丙烯酸月桂酯/丙烯酸共聚物。

[0439] 洗涤剂可任选地含有漂白系统,可包括 H_2O_2 来源(例如过硼酸盐或过碳酸盐),其可以与形成过酸的漂白活性剂(如四乙酰基乙二胺(TAED)或壬酰基氧基苯磺酸盐(NOBS))联用。或者,漂白系统可包括过氧酸(例如酰胺、酰亚胺或砜类过氧酸)。漂白系统也可以是酶促漂白系统,其中过水解酶(perhydrolase)活化过氧化物,例如 WO 2005/056783 中所述的那些。

[0440] 可使用常规的稳定剂来稳定洗涤剂组合物中的酶,稳定剂例如:多元醇(如丙二醇或甘油)、糖或糖醇、乳酸、硼酸或硼酸衍生物(例如,硼酸芳族酯)。可按照 WO 92/19709 和 WO 92/19708 所述配制所述组合物。

[0441] 洗涤剂也可含有其他常规洗涤剂成分,例如织物调理剂,包括粘土、发泡剂、抑泡剂、防腐蚀剂、污垢悬浮剂、防尘污再沉积剂、染料、杀菌剂、荧光增白剂或香料。

[0442] pH(在使用浓度下于水性溶液中测量)通常是中性或碱性,例如 pH 约 7.0 至约 11.0。

[0443] 包含杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶或其变体的洗涤剂组合物可配制成的具体形式包括:

[0444] 1) 具有体积密度(bulk density)为至少 600g/L 的颗粒剂形式的洗涤剂组合物,包括约 7%至约 12%的线性烷基苯磺酸盐(按酸计算);约 1%至约 4%的醇乙氧基硫酸盐

(例如 C_{12-18} 醇, 1-2 环氧乙烷 (EO)) 或烷基硫酸盐 (例如 C_{16-18}) ; 约 5% 至约 9% 的醇乙氧基化物 (例如 C_{14-15} 醇, 7EO) ; 约 14% 至约 20% 的碳酸钠 (例如 Na_2CO_3) ; 约 2% 至约 6% 的可溶性硅酸盐 (例如 $Na_2O, 2SiO_2$) ; 约 15% 至约 22% 的沸石 (例如 $NaAlSiO_4$) ; 0% 至约 6% 的硫酸钠 (例如 Na_2SO_4) ; 约 0% 至约 15% 的柠檬酸钠 / 柠檬酸 (例如 $C_6H_5Na_3O_7/C_6H_8O_7$) ; 约 11% 至约 18% 的过硼酸钠 (例如 $NaBO_3H_2O$) ; 约 2% 至约 6% 的 TAED ; 0% 至约 2% 的羧甲基纤维素 (CMC) ; 0-3% 的聚合物 (例如马来酸 / 丙烯酸共聚物, PVP, PEG) ; 0.0001-0.1% 蛋白质的酶 (按纯酶计算) ; 和 0 至约 5% 次要成分 (例如抑泡剂、香料、荧光增白剂、光漂白剂)。

[0445] 2) 具有体积密度为至少 600g/L 的颗粒剂形式的洗涤剂组合物, 包括约 6% 至约 11% 的线性烷基苯磺酸盐 (按酸计算) ; 约 1% 至约 3% 的醇乙氧基 硫酸盐 (例如 C_{12-18} 醇, 1-2EO) 或烷基硫酸盐 (例如 C_{16-18}) ; 约 5% 至约 9% 的醇乙氧基化物 (例如 C_{14-15} 醇, 7EO) ; 约 15% 至约 21% 的碳酸钠 (例如 Na_2CO_3) ; 约 1% 至约 4% 的可溶性硅酸盐 (例如 $Na_2O, 2SiO_2$) ; 约 24% 至约 34% 的沸石 (例如 $NaAlSiO_4$) ; 约 4% 至约 10% 的硫酸钠 (例如 Na_2SO_4) ; 0% 至约 15% 的柠檬酸钠 / 柠檬酸 (例如 $C_6H_5Na_3O_7/C_6H_8O_7$) ; 0% 至约 2% 的羧甲基纤维素 (CMC) ; 1-6% 的聚合物 (例如马来酸 / 丙烯酸共聚物, PVP, PEG) ; 0.0001-0.1% 的酶 (按纯酶蛋白质计算) ; 0 至约 5% 的次要成分 (例如抑泡剂、香料)。

[0446] 3) 具有体积密度为至少 600g/L 的颗粒剂形式的洗涤剂组合物, 包括约 5% 至约 9% 的线性烷基苯磺酸盐 (按酸计算) ; 约 7% 至约 14% 的醇乙氧基化物 (例如 C_{12-15} 醇, 7EO) ; 约 1% 至约 3% 的皂如脂肪酸 (例如 C_{16-22} 脂肪酸) ; 约 10% 至约 17% 的碳酸钠 (如 Na_2CO_3) ; 约 3% 至约 9% 的可溶性硅酸盐 (例如 $Na_2O, 2SiO_2$) ; 约 23% 至约 33% 的沸石 (如 $NaAlSiO_4$) ; 0% 至约 4% 的硫酸钠 (例如 Na_2SO_4) ; 约 8% 至约 16% 的过硼酸钠 (例如 $NaBO_3H_2O$) ; 约 2% 至约 8% 的 TAED ; 0% 至约 1% 的磷酸酯 (例如 EDTMPA) ; 0% 至约 2% 的羧甲基纤维素 (CMC) ; 0-3% 的聚合物 (例如马来酸 / 丙烯酸共聚物, PVP, PEG) ; 0.0001-0.1% 的酶 (按纯酶蛋白质计算) ; 0 至约 5% 的次要成分 (例如抑泡剂、香料、荧光增白剂)。

[0447] 4) 具有体积密度为至少 600g/L 的颗粒剂形式的洗涤剂组合物, 包括约 8% 至约 12% 的线性烷基苯磺酸盐 (按酸计算) ; 约 10% 至约 25% 的醇乙氧基化物 (例如 C_{12-15} 醇, 7EO) ; 约 14% 至约 22% 的碳酸钠 (如 Na_2CO_3) ; 约 1% 至约 5% 的可溶性硅酸盐 (例如 $Na_2O, 2SiO_2$) ; 约 25% 至约 35% 的沸石 (例如 $NaAlSiO_4$) ; 0% 至约 10% 的硫酸钠 (例如 Na_2SO_4) ; 0% 至约 2% 的羧甲基纤维素 (CMC) ; 1-3% 的聚合物 (例如马来酸 / 丙烯酸共聚物, PVP, PEG) ; 0.0001-0.1% 的酶 (按纯酶蛋白质计算) ; 和 0 至约 5% 的次要成分 (例如抑泡剂、香料)。

[0448] 5) 水性液体洗涤剂组合物, 包括约 15% 至约 21% 的线性烷基苯磺酸盐 (按酸计算) ; 约 12% 至约 18% 的醇乙氧基化物 (例如 C_{12-15} 醇, 7EO 或 C_{12-15} 醇, 5EO) ; 约 3% 至约 13% 的皂如脂肪酸 (例如油酸) ; 0% 至约 13% 的烯基琥珀酸 (C_{12-14}) ; 约 8% 至约 18% 的氨基乙醇 ; 约 2% 至约 8% 的柠檬酸 ; 0% 至约 3% 的磷酸酯 ; 0% 至约 3% 的聚合物 (例如 PVP, PEG) ; 0% 至约 2% 的硼酸盐 (例如 B_4O_7) ; 0% 至约 3% 的乙醇 ; 约 8% 至约 14% 的丙二醇 ; 0.0001-0.1% 的酶 (按纯酶蛋白质计算) ; 和 0 至约 5% 的次要成分 (例如分散剂、抑泡剂、香料、荧光增白剂)。

[0449] 6) 水性结构型液体洗涤剂组合物, 包括约 15% 至约 21% 的线性烷基苯磺酸盐 (按

酸计算);3-9%的醇乙氧基化物(例如 C_{12-15} 醇,7EO或 C_{12-15} 醇,5EO);约3%至约10%的皂如脂肪酸(例如油酸);约14%至约22%的沸石(如 $NaAlSiO_4$);约9%至约18%的柠檬酸钾;0%至约2%的硼酸盐(例如 B_4O_7);0%至约2%的羧甲基纤维素(CMC);0%至约3%的聚合物(例如PEG,PVP);0%至约3%的锚定聚合物(anchoring polymer)(例如甲基丙烯酸月桂酯/丙烯酸共聚物;摩尔比25:1,MW 3800);0%至约5%的甘油;0.0001-0.1%的酶(按纯酶蛋白质计算);和0%至约5%的次要成分(例如分散剂、抑泡剂、香料、荧光增白剂)。

[0450] 7) 具有体积密度为至少600g/L的颗粒剂形式的洗涤剂组合物,包括约5%至约10%的脂肪醇硫酸盐;约3%至约9%的乙氧基化脂肪酸单乙醇酰胺;0-3%的皂如脂肪酸;约5%至约10%的碳酸钠(例如 Na_2CO_3);约1%至约4%的可溶性硅酸盐(例如 Na_2O , $2SiO_2$);约20%至约40%的沸石(例如 $NaAlSiO_4$);约2%至约8%的硫酸钠(例如 Na_2SO_4);约12%至约18%的过硼酸钠(例如 $NaBO_3H_2O$);约2%至约7%的TAED;约1%至约5%的聚合物(例如马来酸/丙烯酸共聚物,PEG);0.0001-0.1%的酶(按纯酶蛋白质计算);和0至约5%的次要成分(例如荧光增白剂,抑泡剂、香料)。

[0451] 8) 颗粒剂形式的洗涤剂组合物,包括约8%至约14%的线性烷基苯磺酸盐(按酸计算);约5%至约11%的乙氧基化脂肪酸单乙醇酰胺;0%至约3%的皂如脂肪酸;约4%至约10%的碳酸钠(例如 Na_2CO_3);约1%至约4%的可溶性硅酸盐(Na_2O , $2SiO_2$);约30%至约50%的沸石(例如 $NaAlSiO_4$);约3%至约11%的硫酸钠(例如 Na_2SO_4);约5%至约12%的柠檬酸钠(例如 $C_6H_5Na_3O_7$);约1%至约5%的聚合物(例如PVP,马来酸/丙烯酸共聚物,PEG);0.0001-0.1%的酶(按纯酶蛋白质计算);和0至约5%的次要成分(例如抑泡剂、香料)。

[0452] 9) 颗粒剂形式的洗涤剂组合物,包括约6%至约12%的线性烷基苯磺酸盐(按酸计算);约1%至约4%的非离子表面活性剂;约2%至约6%的皂如脂肪酸;约14%至约22%的碳酸钠(例如 Na_2CO_3);约18%至约32%的沸石(例如, $NaAlSiO_4$);约5%至约20%的硫酸钠(例如 Na_2SO_4);约3%至约8%的柠檬酸钠(例如 $C_6H_5Na_3O_7$);约4%至约9%的过硼酸钠(例如 $NaBO_3H_2O$);约1%至约5%的漂白活性剂(例如NOBS或TAED);0%至约2%的羧甲基纤维素(CMC);约1%至约5%的聚合物(例如聚羧酸酯或PEG);0.0001-0.1%的酶(按纯酶蛋白质计算);和0至约5%的次要成分(例如,荧光增白剂、香料)。

[0453] 10) 水性液体洗涤剂组合物,包括约15%至约23%的线性烷基苯磺酸盐(按酸计算);约8%至约15%的醇乙氧基硫酸盐(例如 C_{12-15} 醇,2-3EO);约3%至约9%的醇乙氧基化物(例如 C_{12-15} 醇,7EO或 C_{12-15} 醇,5EO);0%至约3%的皂如脂肪酸(例如月桂酸);约1%至约5%的氨基乙醇;约5%至约10%的柠檬酸钠;约2%至约6%的水溶增溶剂(例如甲苯磺酸钠);0%至约2%的硼酸盐(例如 B_4O_7);0%至约1%的羧甲基纤维素;约1%至约3%的乙醇;约2%至约5%的丙二醇;0.0001-0.1%的酶(按纯酶蛋白质计算);和0至约5%的次要成分(例如聚合物、分散剂、香料、荧光增白剂)。

[0454] 11) 水性液体洗涤剂组合物,包括约20%至约32%的线性烷基苯磺酸盐(按酸计算);6-12%的醇乙氧基化物(例如 C_{12-15} 醇,7EO或 C_{12-15} 醇,5EO);约2%至约6%的氨基乙醇;约8%至约14%的柠檬酸;约1%至约3%的硼酸盐(例如 B_4O_7);0%至约3%的聚合物(例如马来酸/丙烯酸共聚物,锚定聚合物例如甲基丙烯酸月桂酯/丙烯酸共聚物);约3%

至约 8% 的甘油 ;0.0001-0.1% 的酶 (按纯酶蛋白质计算) ;和 0 至约 5% 的次要成分 (例如水溶增溶剂、分散剂、香料、荧光增白剂)。

[0455] 12) 具有体积密度为至少 600g/L 的颗粒剂形式的洗涤剂组合物,包括 约 25% 至约 40% 的阴离子表面活性剂 (线性烷基苯磺酸盐、烷基硫酸盐、 α -烯烃磺酸盐、 α -磺基脂肪酸甲酯、烷基磺酸盐、皂) ;约 1% 至约 10% 的非离子表面活性剂 (例如醇乙氧基化物) ;约 8% 至约 25% 的碳酸钠 (例如 Na_2CO_3) ;约 5% 至约 15% 的可溶性硅酸盐 (例如 Na_2O , 2SiO_2) ;0% 至约 5% 的硫酸钠 (例如 Na_2SO_4) ;约 15% 至约 28% 的沸石 (NaAlSiO_4) ;0% 至约 20% 的过硼酸钠 (例如 $\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) ;约 0% 至约 5% 的漂白活性剂 (TAED 或 NOBS) ;0.0001-0.1% 的酶 (按纯酶蛋白质计算) ;0 至约 3% 的次要成分 (例如香料、荧光增白剂)。

[0456] 13) 如上面组合物 1)-12) 所述的洗涤剂组合物,其中所有或者部分的线性烷基苯磺酸盐被 (C_{12} - C_{18}) 烷基硫酸盐代替。

[0457] 14) 具有体积密度为至少 600g/L 的颗粒剂形式的洗涤剂组合物,包括约 9% 至约 15% 的 (C_{12} - C_{18}) 烷基硫酸盐 ;约 3% 至约 6% 的醇乙氧基化物 ;约 1% 至约 5% 的多羟基烷基脂肪酸酰胺 ;约 10% 至约 20% 的沸石 (例如 NaAlSiO_4) ;约 10% 至约 20% 的层状焦硅酸盐 (例如来自 Hoechst 的 SK56) ;约 3% 至约 12% 的碳酸钠 (例如 Na_2CO_3) ;0% 至约 6% 的可溶性硅酸盐 (例如 Na_2O , 2SiO_2) ;约 4% 至约 8% 的柠檬酸钠 ;约 13% 至约 22% 的过碳酸钠 ;约 3% 至约 8% 的 TAED ;0% 至约 5% 的聚合物 (例如聚羧酸酯和 PVP) ;0.0001-0.1% 的酶 (按纯酶蛋白质计算) ;和 0 至约 5% 的次要成分 (例如荧光增白剂、光漂白剂、香料、抑泡剂)。

[0458] 15) 具有体积密度为至少 600g/L 的颗粒剂形式的洗涤剂组合物,包括约 4% 至约 8% 的 (C_{12} - C_{18}) 烷基硫酸盐 ;约 11% 至约 15% 的醇乙氧基化物 ;约 1% 至约 4% 的皂 ;约 35% 至约 45% 的沸石 MAP 或沸石 A ;约 2% 至约 8% 的碳酸钠 (如 Na_2CO_3) ;0% 至约 4% 的可溶性硅酸盐 (例如 Na_2O , 2SiO_2) ;约 13% 至约 22% 的过碳酸钠 ;1-8% 的 TAED ;0% 至约 3% 的羧甲基纤维素 (CMC) ;0% 至约 3% 的聚合物 (例如聚羧酸酯和 PVP) ;0.0001-0.1% 的酶 (按纯酶蛋白质计算) ;和 0 至约 3% 的次要成分 (例如荧光增白剂、磷酸盐、香料)。

[0459] (16) 上面 1)-15) 所述的洗涤剂制剂,其含有被稳定化的或囊化的过酸作为额外组分或者作为已经述及的漂白系统的替代物。

[0460] 17) 上面 1)、3)、7)、9) 和 12) 所述的洗涤剂组合物,其中过硼酸盐被过碳酸盐代替。

[0461] 18) 上文 1)、3)、7)、9)、12)、14) 和 15) 所述的洗涤剂组合物,还含有锰催化剂。例如锰催化剂是“Efficient manganese catalysts for low-temperature bleaching”,Nature 369 :637-639 (1994) 中记载的化合物中的一种。

[0462] 19) 配制成非水性洗涤剂液体的洗涤剂组合物,包括液态非离子表面活性剂,例如,线性烷氧基化伯醇、增效剂体系 (例如磷酸盐)、酶和碱。该洗涤剂也可包括阴离子表面活性剂和 / 或漂白系统。

[0463] 可以以常规用于洗涤剂中的浓度加入杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶。目前考虑在洗涤剂组合物中,可以以每升洗液对应 0.00001-1.0mg (以纯酶蛋白质计算) 酶的量加入杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶或其变体。

[0464] 在另一个实施方案中,可将 2,6- β -D-果聚糖水解酶掺入洗涤剂组合物中并用于

家居和 / 或工业纺织品 / 衣物上存在的生物膜的去除 / 清洁。

[0465] 例如, 可以将洗涤剂组合物配制成本手洗或机洗的衣物洗涤剂组合物, 包括适于预处理污染的织物的衣物添加剂组合物和漂洗添加的织物柔软剂组合物, 或者配制成本用于一般的家居硬表面清洁操作的洗涤剂组合物, 或者配制成本用于手洗或机洗的衣物洗涤操作。

[0466] 一个具体的方面, 洗涤剂组合物可以进一步包括 2,6-β-D- 果聚糖水解酶, 除杆菌物种 TS-23 菌株 α- 淀粉酶或其变体之外的一种或多种 α- 淀粉酶, 和一种或多种其它清洁酶, 例如蛋白酶、脂肪酶、角质酶、糖酶、纤维素酶、果胶酶、甘露聚糖酶、阿拉伯聚糖酶、半乳聚糖酶、木聚糖酶、氧化酶、漆酶和 / 或过氧化物酶和 / 或其组合。

[0467] 通常, 所选酶的特性应与选择的洗涤剂兼容 (例如最适 pH、与其他酶和非酶成分的兼容性等), 且所述酶应以有效量存在。

[0468] 4.2 餐具洗涤剂组合物

[0469] 酶变体也可用于餐具洗涤剂组合物中, 包括下列例子:

[0470] 1) 粉末状自动餐具洗涤组合物

[0471]	非离子表面活性剂	0.4-2.5%
[0472]	硅酸钠	0-20%
[0473]	二硅酸钠	3-20%
[0474]	三磷酸钠	20-40%
[0475]	碳酸钠	0-20%
[0476]	过硼酸钠	2-9%
[0477]	四乙酰基乙二胺 (TAED)	1-4%
[0478]	硫酸钠	5-33%
[0479]	酶	0.0001-0.1%

[0480] 2) 粉末状自动餐具洗涤组合物

[0481]	非离子表面活性剂	1-2%
[0482]	(例如醇乙氧基化物)	
[0483]	二硅酸钠	2-30%
[0484]	碳酸钠	10-50%
[0485]	磷酸钠	0-5%
[0486]	二水合柠檬酸三钠	9-30%
[0487]	醋酸次氨基三钠 (NTA)	0-20%
[0488]	一水合过硼酸钠	5-10%
[0489]	四乙酰基乙二胺 (TAED)	1-2%
[0490]	聚丙烯酸酯聚合物	6-25%
[0491]	(例如马来酸 / 丙烯酸共聚物)	
[0492]	酶	0.0001-0.1%
[0493]	香料	0.1-0.5%
[0494]	水	5-10%

[0495] 3) 粉末状自动餐具洗涤组合物

[0496]	非离子表面活性剂	0.5-2.0%
--------	----------	----------

[0497]	二硅酸钠	25-40%
[0498]	柠檬酸钠	30-55%
[0499]	碳酸钠	0-29%
[0500]	碳酸氢钠	0-20%
[0501]	一水合过硼酸钠	0-15%
[0502]	四乙酰基乙二胺 (TAED)	0-6%
[0503]	马来酸 / 丙烯酸共聚物	0-5%
[0504]	粘土	1-3%
[0505]	聚氨基酸	0-20%
[0506]	聚丙烯酸钠	0-8%
[0507]	酶	0.0001-0.1%
[0508]	4) 粉末状自动餐具洗涤组合物	
[0509]	非离子表面活性剂	1-2%
[0510]	沸石 MAP	15-42%
[0511]	二硅酸钠	30-34%
[0512]	柠檬酸钠	0-12%
[0513]	碳酸钠	0-20%
[0514]	一水合过硼酸钠	7-15%
[0515]	四乙酰基乙烯	0-3%
[0516]	联胺 (TAED) 聚合物	0-4%
[0517]	马来酸 / 丙烯酸共聚物	0-5%
[0518]	有机磷酸酯	0-4%
[0519]	粘土	1-2%
[0520]	酶	0.0001-0.1%
[0521]	5) 粉末状自动餐具洗涤组合物	
[0522]	非离子表面活性剂	1-7%
[0523]	二硅酸钠	18-30%
[0524]	柠檬酸三钠	10-24%
[0525]	碳酸钠	12-20%
[0526]	单过硫酸盐	15-21%
[0527]	($2\text{KHSO}_5 \cdot \text{KHSO}_4 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4$)	
[0528]	漂白稳定剂	0.1-2%
[0529]	马来酸 / 丙烯酸共聚物	0-6%
[0530]	二亚乙基三胺五乙酸盐	0-2.5%
[0531]	五钠盐	
[0532]	酶	0.0001-0.1%
[0533]	硫酸钠, 水	余量
[0534]	6) 具有清洁表面活性剂系统的粉末和液体餐具洗涤组合物	
[0535]	非离子表面活性剂	0-1.5%

[0536]	十八烷基二甲胺 N- 氧化二水合物	0-5%
[0537]	十八烷基二甲胺 N- 氧化二水合物和	
[0538]	十六烷基二甲胺 N- 氧化二水合物的	
[0539]	80 : 20wt. C18/C16 共混物	0-4%
[0540]	十八烷基二(羟乙基)胺 N- 氧化无水合物	
[0541]	与十六烷基二(羟乙基)胺 N- 氧化无水合物的	
[0542]	70 : 30wt. C18/C16 共混物	0-5%
[0543]	平均乙氧基化度为 3 的 C ₁₃ -C ₁₅ 烷基乙氧基硫酸酯	0-10%
[0544]	平均乙氧基化度为 3 的 C ₁₂ -C ₁₅ 烷基乙氧基硫酸酯	0-5%
[0545]	平均乙氧基化度为 12 的 C ₁₃ -C ₁₅ 乙氧基化醇	0-5%
[0546]	平均乙氧基化度为 9 的 C ₁₂ -C ₁₅ 乙氧基化醇共混物	0-6.5%
[0547]	平均乙氧基化度为 30 的 C ₁₃ -C ₁₅ 乙氧基化醇共混物	0-4%
[0548]	二硅酸钠	0-33%
[0549]	三聚磷酸钠	0-46%
[0550]	柠檬酸钠	0-28%
[0551]	柠檬酸	0-29%
[0552]	碳酸钠	0-20%
[0553]	一水合过硼酸钠	0-11.5%
[0554]	四乙酰基乙二胺 (TAED)	0-4%
[0555]	马来酸 / 丙烯酸共聚物	0-7.5%
[0556]	硫酸钠	0-12.5%
[0557]	酶	0.0001-0.1%
[0558]	7) 非水性液体自动餐具洗涤组合物	
[0559]	液体非离子表面活性剂 (例如醇乙氧基化物)	2.0-10.0%
[0560]	碱金属硅酸盐	3.0-15.0%
[0561]	碱金属磷酸盐	20.0-40.0%
[0562]	选自高级乙二醇、聚乙二醇、多氧化物、	25.0-45.0%
[0563]	乙二醇醚的液体载体	
[0564]	稳定剂 (例如磷酸和 C ₁₆ -C ₁₈ 链烷醇的偏酯)	0.5-7.0%
[0565]	抑泡剂 (例如硅酮)	0-1.5%
[0566]	酶	0.0001-0.1%
[0567]	8) 非水性液体餐具洗涤组合物	
[0568]	液体非离子表面活性剂 (例如醇乙氧基化物)	2.0-10.0%
[0569]	硅酸钠	3.0-15.0%
[0570]	碱金属碳酸盐	7.0-20.0%
[0571]	柠檬酸钠	0.0-1.5%
[0572]	稳定化系统 (例如细分的硅酮和低分子量	
[0573]	二烷基聚乙二醇醚的混合物)	0.5-7.0%
[0574]	低分子量聚丙烯酸酯聚合物	5.0-15.0%

[0575]	粘土凝胶增稠剂（如膨润土）	0.0-10.0%
[0576]	羟丙基纤维素聚合物	0.0-0.6%
[0577]	酶	0.0001-0.1%
[0578]	选自高级乙二醇、聚乙二醇、多氧化物、	
[0579]	乙二醇醚的液体载体	余量
[0580]	9) 触变性液体自动餐具洗涤组合物	
[0581]	C ₁₂ -C ₁₄ 脂肪酸	0-0.5%
[0582]	嵌段的共聚物表面活性剂	1.5-15.0%
[0583]	柠檬酸钠	0-12%
[0584]	三聚磷酸钠	0-15%
[0585]	碳酸钠	0-8%
[0586]	三硬酯酸铝	0-0.1%
[0587]	枯烯磺酸钠	0-1.7%
[0588]	聚丙烯酸酯增稠剂	1.32-2.5%
[0589]	聚丙烯酸钠	2.4-6.0%
[0590]	硼酸	0-4.0%
[0591]	甲酸钠	0-0.45%
[0592]	甲酸钙	0-0.2%
[0593]	正癸基联苯氧化物二磺酸钠	0-4.0%
[0594]	单乙醇胺 (MEA)	0-1.86%
[0595]	氢氧化钠 (50%)	1.9-9.3%
[0596]	1,2- 丙二醇	0-9.4%
[0597]	酶	0.0001-0.1%
[0598]	抑泡剂、染料、香料、水	余量
[0599]	10) 液体自动餐具洗涤组合物	
[0600]	醇乙氧基化物	0-20%
[0601]	脂肪酸酯磺酸酯	0-30%
[0602]	十二烷基硫酸钠	0-20%
[0603]	烷基聚糖苷	0-21%
[0604]	油酸	0-10%
[0605]	二硅酸钠一水合物	18-33%
[0606]	柠檬酸钠二水合物	18-33%
[0607]	硬脂酸钠	0-2.5%
[0608]	一水合过硼酸钠	0-13%
[0609]	四乙酰基乙二胺 (TAED)	0-8%
[0610]	马来酸 / 丙烯酸共聚物	4-8%
[0611]	酶	0.0001-0.1%
[0612]	11) 含有保护的漂白颗粒的液体自动餐具洗涤组合物	
[0613]	硅酸钠	5-10%

[0614]	焦磷酸四钾	15-25%
[0615]	三磷酸钠	0-2%
[0616]	碳酸钾	4-8%
[0617]	保护的漂白颗粒,例如氯	5-10%
[0618]	聚合物增稠剂	0.7-1.5%
[0619]	氢氧化钾	0-2%
[0620]	酶	0.0001-0.1%
[0621]	水	余量

[0622] 11) 上面 1)、2)、3)、4)、6) 和 10) 所述的自动餐具洗涤组合物,其中过硼酸盐被过碳酸盐代替。

[0623] 12) 上述 1)-6) 的自动餐具洗涤组合物,进一步包含锰催化剂。该锰催化剂可以是例如“Efficient manganese catalysts for low-temperature bleaching,”Nature 369: 637-639(1994) 中记载的化合物中的一种。

[0624] 4.3 生物膜去除组合物和用途

[0625] 用于除去生物膜的组合物可包括杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶或其变体作为主要酶成分,例如单组分组合物。或者,该组合物可以包括多种酶活性,例如多种淀粉酶,或者包括下列酶任意组合的酶混合物:氨肽酶、淀粉酶(β -或 α -或葡糖淀粉酶)、糖酶、羧肽酶、过氧化氢酶、纤维素酶、壳多糖酶、角质酶、环糊精糖基转移酶、脱氧核糖核酸酶、酯酶、 α -半乳糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、 α -葡糖苷酶、 β -葡糖苷酶、卤代过氧化物酶、转化酶、漆酶、脂肪酶、甘露糖苷酶、氧化酶、果胶分解酶、肽谷氨酰胺酶、过氧化物酶、植酸酶、多酚氧化酶、蛋白水解酶、核糖核酸酶、转谷氨酰胺酶和/或木聚糖酶,或其任意组合,用于去除生物膜。其他酶可通过属于如下属的微生物生产:曲霉属、木霉属、腐质酶属(例如特异腐质霉)和镰孢菌(霉)属。曲霉的示例性实例包括棘孢曲霉、泡盛曲霉、黑曲霉或米曲霉。镰孢霉属的实例包括杆孢状镰孢、*F. cerealis*、*F. crookwellense*、大刀镰孢、禾本科镰孢、禾赤镰孢、异孢镰孢、合欢木镰孢、尖镰孢、多枝镰孢、粉红镰孢、接骨木镰孢、肤色镰孢、硫色镰孢、*F. toruloseum*、拟丝孢镰孢和 *Fusarium venenatum*。

[0626] 包括杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶或其变体的组合物可以按照本领域已知的方法制备,并且可以是液体或干组合物的形式。例如,含杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶或其变体的组合物可以是颗粒或微颗粒的形式。欲包括在组合物中的多肽可以按照本领域已知的方法稳定化。

[0627] 下文给出了多肽组合物用途的实例。含杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶或其变体的组合物的用量及组合物使用的其他条件可以基于本领域已知的方法来确定。

[0628] 还考虑杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶或其变体与 2,6- β -D-果聚糖水解酶或其变体一起用在组合物中。

[0629] 另一方面是瓦解和/或去除生物膜的组合物和方法。如本文所用的术语“瓦解”应理解为水解生物膜基质中的多糖,该多糖在生物膜中将个体微生物细胞连接并结合在一起,由此所述微生物细胞能够从生物膜中释放并除去。生物膜通常存在于表面,故生物膜的瓦解可以通过用含有杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶或其变体或一种或多种其他负责降解生物膜的酶(例如但不限于 2,6- β -D-果聚糖水解酶)的水性介质接触表面(例如通过浸

没、覆盖或喷洒表面) 而实现。组合物可用于水解例如纸浆业和纸业白水中的沉淀。

[0630] 杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶或其变体的存在量可以是 0.0001-10,000mg/L、0.001-1000mg/L、0.01-100mg/L、或是 0.1-10mg/L。其他酶及酶变体可以以相似或更低的量存在。

[0631] 该方法可以适宜地在室温至约 70℃ 的温度进行。适宜的温度范围包括约 30℃ 至约 60℃, 例如约 40℃ 至约 50℃。

[0632] 用于水解生物膜的适宜 pH 处在约 3.5 至约 8.5 的范围内。示例性 pH 范围包括 pH 约 5.5 至约 8, 例如约 6.5 至约 7.5。用于酶有效去除生物膜的接触时间或反应时间可以变化相当大, 这取决于生物膜的特性以及用酶单独或组合其他生物膜降解酶(如 2,6- β -D-果聚糖水解酶)处理表面的频率。示例性的反应时间可包括约 0.25 至约 25 小时内, 以及约 1 至约 10 小时, 例如约 2 小时。

[0633] 可与杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶或其变体和 2,6- β -D-果聚糖水解酶组合的其他生物膜降解酶包括但不限于: 纤维素酶、半纤维素酶、木聚糖酶、其他淀粉酶, 包括其他 α -淀粉酶、脂肪酶、蛋白酶和 / 或果胶酶。

[0634] 杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶或其变体还可以与抗微生物剂组合, 例如酶的或非酶的杀生物剂。酶杀生物剂可以是例如包括氧化还原酶, 例如漆酶或过氧化物酶, 特别是卤代过氧化物酶, 和任选的增强剂, 例如丁香酸烷基酯的组合物, 例如国际 PCT 申请 WO 97/42825 和 DK 97/1273 中所描述的那样。

[0635] 可以去除和 / 或清除生物膜的表面可以是硬表面, 其定义涉及基本上微生物不能透过的任何表面。表面的实例是由金属例如不锈钢合金、塑料 / 合成聚合物、橡胶、板材、玻璃、木材、纸、纺织品、混凝土、岩石、大理石、石膏及陶瓷材料制成的表面, 其任选地以例如油漆、珐琅、聚合物等包覆。从而, 表面可以是支持、运输、处理或接触水性溶液的系统(如供水系统、食品处理系统、冷却系统、化学处理系统或药物处理系统)的构件。该组合物和使用该方法用于木材加工系统(如制浆和 / 或造纸工业)中除去生物膜。因此, 酶和含有酶的组合物可用于常规的就地清洗(C-I-P)系统。表面可以是系统单元(如管道、罐、泵、膜、滤器、热交换器、离心机、蒸发器、混合器、喷雾塔、阀门和反应器)的一部分。表面也可以是医学科学和工业所用的器具(如污染的内窥镜、假体装置或医学内植物)或其部分。

[0636] 用于生物膜去除的组合物也可以考虑用于防止当金属表面例如管道受微生物生物膜攻击时发生的所谓生物腐蚀, 即通过瓦解生物膜, 由此防止生物膜中的微生物细胞建立起腐蚀其所附着的金属表面的生物膜环境。

[0637] 抗生物膜组合物的其他应用包含口腔护理。然而表面也可以是生物来源的, 例如粘膜、皮肤、牙齿、头发、指甲等。

[0638] 因此表面包含具有牙菌斑的牙齿(例如通过将酶加入到牙膏中)和污染的隐形眼镜。因此, 杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶或其变体可用在组合物中和用于制备瓦解人或动物牙齿菌斑的药物的方法中。另一用途是自粘膜瓦解生物膜, 例如患有囊性纤维化的患者肺中的生物膜。

[0639] 因此, 本发明进一步的方面涉及口腔护理组合物, 包含重组的酶, 例如基本不含任何活性污染物的纯化的酶。口腔护理组合物可适当包含一定量的重组酶。

[0640] 用于口腔护理组合物的其他生物膜降解酶包括但不限于口腔护理组合物中的 2, 6- β -D- 果聚糖水解酶活性。考虑的酶活性包括下组酶中的活性：葡聚糖酶；齿斑葡聚糖酶 (mutanase)；氧化酶，例如葡糖氧化酶，L- 氨基酸氧化酶，过氧化物酶，例如 WO 95/10602 中所述的鬼伞属物种 (*Coprinus*) 过氧化物酶或乳过氧化物酶，卤代过氧化物酶，特别是衍生自弯孢霉属物种 (*Curvularia*)、特别是糙壁弯孢 (*C. verruculosa*) 和不等弯孢 (*C. inaequalis*) 的卤代过氧化物酶；漆酶；蛋白酶例如木瓜蛋白酶，酸性蛋白酶 (例如 W095/02044 中所述的酸性蛋白酶)，内切糖苷酶，脂肪酶，淀粉酶，包括淀粉葡糖苷酶，如 AMG (Novo Nordisk A/S)；抗微生物酶，以及它们的混合物。

[0641] 口腔护理组合物可以具有任何适宜的物理形式 (即，粉末、糊、凝胶、液体、膏、片等)。“口腔护理组合物”包括可用于维持或改善人和动物口中口腔卫生的组合物，预防龋齿、预防牙菌斑和牙垢形成、去除牙菌斑和牙垢、预防和 / 或治疗牙科疾病等。口腔护理组合物在本文中至少也包括用于清洁假牙、人工牙齿等的产品。口腔护理组合物的实例包括牙膏、牙霜、凝胶或牙粉、漱牙漱口水、刷牙前后的漱洗制剂、口香糖、锭剂和糖果。牙膏和牙凝胶一般包括磨擦抛光材料、发泡剂、矫味剂、保湿剂、粘合剂、增稠剂、甜味剂、增白剂 / 漂白剂 / 去渍剂、水和任选的另外的酶和酶组合。

[0642] 漱口水，包括菌斑去除液体，一般包括水 / 醇溶液、香料、保湿剂、增甜剂、发泡剂、着色剂和任选的另外的酶或酶组合。

[0643] 磨擦抛光材料也可以掺入到口腔护理组合物例如牙粉中。

[0644] 从而，磨擦抛光材料可以包括氧化铝及其水合物，例如三水合 α -氧化铝 (alpha alumina trihydrate)；三硅酸镁；碳酸镁；高岭土；铝硅酸盐，例如煅烧硅酸铝和硅酸铝；碳酸钙；硅酸锆；还有粉状塑料，例如聚氯乙烯；聚酰胺；聚甲基丙烯酸甲酯；聚苯乙烯；苯酚甲醛树脂；蜜胺甲醛树脂；脲甲醛树脂；环氧树脂；粉状聚乙烯；氧化硅干凝胶；水凝胶和气凝胶等。同样适合作为磨料的有焦磷酸钙；水不溶性碱性偏磷酸盐；磷酸二钙和 / 或其二水合物，正磷酸二钙；磷酸三钙；羟基磷灰石颗粒等。还可以采用这些物质的混合物。

[0645] 根据口腔护理组合物的不同，磨擦产品可以以重量计约 0% 至约 70%，或约 1% 至约 70% 存在。对于牙膏，磨料含量一般处于以最终牙膏重量计 10% -70% 的范围内。

[0646] 采用保湿剂以防止例如牙膏的水分流失。适合用于口腔护理组合物的保湿剂包括如下化合物及其混合物：甘油；多元醇；山梨糖醇；聚乙二醇 (PEG)；丙二醇；1,3- 丙二醇；1,4- 丁二醇；氢化的部分水解多糖等。保湿剂一般以重量计 0% 至约 80%，或约 5% 至约 70% 存在于牙膏中。

[0647] 二氧化硅、淀粉、黄芪胶、黄原胶、爱尔兰苔 (Irish moss) 提取物、藻酸盐、果胶、纤维素衍生物如羟乙基纤维素、羧甲基纤维素钠和羟丙基纤维素钠；聚丙烯酸及其盐、聚乙烯吡咯烷酮是帮助稳定牙粉产品的适合的增稠剂和粘合剂的实例。增稠剂在牙膏乳剂和凝胶中的存在量可以是以终产品重量计约 0.1% 至约 20%，而粘合剂达到约 0.01 至约 10% 的程度。

[0648] 可以使用阴离子、阳离子、非离子、兼性和 / 或两性离子表面活性剂作为发泡剂皂。这些可以以终产品重量计 0% 至约 15%、约 0.1 至约 13% 或约 0.25% 至约 10% 的水平存在。

[0649] 表面活性剂仅在其不对本发明的杆菌物种 TS-23 菌株 α - 淀粉酶或其变体施加失

活效应的程度上是适宜的。表面活性剂包括脂肪醇硫酸盐,磺化单酰甘油或具 10-20 个碳原子的脂肪酸的盐,脂肪酸-清蛋白缩合产物,脂肪酸酰胺和牛磺酸的盐和 / 或脂肪酸羟乙基磺酸酯的盐。

[0650] 适宜的增甜剂包括制剂用糖精。

[0651] 香料例如留兰香通常以低含量存在,例如以重量计约 0.01% 至约 5%,尤其是约 0.1% 至约 5%。增白剂 / 漂白剂包括 H₂O₂,且可以以终产品重量计低于约 5%,或约 0.25% 至约 4% 的量添加。增白剂 / 漂白剂可以是酶,例如氧化还原酶。适宜的牙齿漂白酶的实例为例如 WO 97/06775 中描述的那些。

[0652] 水通常以赋予例如牙膏可流动形式的量添加。

[0653] 也可以包括其它水溶性抗菌剂,例如二葡萄糖酸氯己定,氨己嘧啶 (hexetidine),双胍啶 (alexidine),三氯生 (**Triclosan®**),季铵抗菌化合物,以及水溶性的某些金属离子源,例如锌、铜、银和锡源 (例如,氯化锌、氯化铜和氯化亚锡,以及硝酸银)。

[0654] 也可以加入能够用作为氟化物源、色素 / 着色剂、防腐剂、维生素、pH 调节剂、防龋剂、脱敏剂等化合物。

[0655] 当生物膜降解酶用于清洁口腔时可提供若干益处。蛋白酶降解唾液蛋白质,这些蛋白质吸附在牙齿表面并形成薄膜 (pellicle),即所致菌斑的第一层。蛋白酶连同脂肪酶一起通过裂解构成细菌细胞壁和膜的结构组分的蛋白质和脂质而破坏细菌。

[0656] 葡聚糖酶及其他糖酶如 2,6-β-D-果聚糖水解酶降解细菌所产生的形成细菌粘附基质的有机主链结构。蛋白酶和淀粉酶不仅防止牙菌斑形成,而且还可以通过降解结合钙的糖-蛋白质复合物防止矿化,从而阻止牙垢发展。

[0657] 牙膏一般可以包括如下成分 (以最终牙膏组合物的重量百分比计):磨料至约 70%;保湿剂:0% 至约 80%;增稠剂:约 0.1% 至约 20%;粘合剂:约 0.01% 至约 10%;增甜剂:约 0.1% 至约 5%;发泡剂:0% 至约 15%;增白剂:0% 至约 5%;和酶:约 0.0001% 至约 20%。

[0658] 在一个具体实施方式中,牙膏具有在约 6.0 至约 8.0 范围内的 pH,且包括:a) 约 10% 至约 70% 的磨料;b) 0% 至约 80% 的保湿剂;c) 0.1% 至约 20% 的增稠剂;d) 0.01% 至约 10% 的粘合剂;e) 约 0.1% 至约 5% 的增甜剂;f) 0% 至约 15% 的发泡剂;g) 0% 至约 5% 的增白剂和 i) 约 0.0001% 至约 20% 的酶。

[0659] i) 中涉及的所述酶包括杆菌物种 TS-23 菌株 α-淀粉酶或其变体,单独或组合其他生物膜降解酶如 2,6-β-D-果聚糖水解酶,和任选地已知用于牙膏中的上述其他类型的酶等。

[0660] 漱口剂一般可以包括如下成分 (以最终漱口剂组合物的重量百分比计):0% 至约 20% 的保湿剂;0% 至约 2% 的表面活性剂;0% 至约 5% 的酶;0% 至约 20% 的乙醇;0% 至约 2% 的其他成分 (例如香料,增甜剂活性成分,如氟化物)。组合物还可以含有约 0% 至约 70% 的水。

[0661] 漱口剂组合物可以用适当的缓冲剂进行缓冲,例如 pH 约 6.0 至约 7.5 的柠檬酸钠或磷酸钠。漱口剂可以是非稀释的形式 (即,用前必须稀释)。

[0662] 口腔护理组合物可以利用任何口腔护理领域已知的常规方法来生产。

[0663] 4.4 淀粉加工组合物和用途

[0664] 另一方面,具有所公开的杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶或其变体的组合物可用于淀粉液化或糖化。

[0665] 一方面,涉及组合物和组合物在用淀粉制备增甜剂中的用途。将淀粉转换为果糖果糖糖浆的传统方法通常包括三个连续的酶促步骤:液化步骤,糖化步骤以及异构化步骤。在液化步骤中,在约 5.5 至约 6.2 的 pH 值、约 95°C 至约 160°C 的温度,通过为期约 2 个小时的杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶或其变体作用,使淀粉降解为糊精。为了在这些条件下保证最优的酶稳定性,可加入 1mM 钙(至少 40ppm 游离钙离子)。淀粉加工对生产醇(例如谷物液化为燃料或可饮用的醇、醇的酿造),淀粉液化可用于增甜剂生产、蔗糖加工和其他食品相关的淀粉加工目的。其他条件可用于不同的杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶或其变体。

[0666] 液化步骤后,可以通过添加葡糖淀粉酶(例如 AMG™)和脱支酶(如异淀粉酶或支链淀粉酶(例如 **Promozyne®**)),将糊精转换为右旋糖。在此步骤之前,将 pH 降至低于约 4.5 的值,维持高温(高于 95°C),并使液化杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶或其变体的活性变性。使温度降至 60°C,可以加入葡糖淀粉酶和脱支酶。糖化步骤通常进行约 24 至约 72 小时。

[0667] 糖化步骤之后,将 pH 升至处于约 6.0 至约 8.0 范围的值(例如 pH7.5),并通过离子交换除去钙。然后利用例如固定化的葡萄糖异构酶(如 **Sweetzyme®**)将葡萄糖浆转化为高果糖果糖浆。

[0668] 可以完成该过程中至少一种酶的改良。杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶或其变体具有液化中降低的钙需求。游离的钙的加入是充分确保杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶或其变体的高稳定性所需的;但是游离的钙强烈抑制葡萄糖异构酶的活性,并且需要利用昂贵的单元操作除去钙,达到游离钙的水平降至低于 3-5ppm 的程度。如果能够避免这样的操作,且液化步骤无需添加游离钙离子即能进行,则可以获得费用的节约。

[0669] 例如,可在组合物和操作中利用钙依赖性较小的酶,其在低浓度游离钙(< 40ppm)时稳定且具有高活性。这样的杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶或其变体应当具有位于 pH 范围约 4.5 至约 6.5 中,或者在范围约 4.5 至约 5.5 中的最适 pH。

[0670] 在实验室中和工业设置中,杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶或其变体可用于水解用于各种目的的淀粉或任何含麦芽糊精(maltodextrine)的化合物。这些杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶或其变体可单独使用以提供特异性水解,或者与其他淀粉酶组合提供具有广谱活性的混合物。示例性应用包括从生物样品、食品、动物饲料、药物或工业样品中除去或部分或完全水解淀粉或任何含麦芽糊精的化合物。

[0671] 本发明另一方面涉及在发酵过程中的组合物和使用该组合物的方法,其中淀粉底物在杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶或其变体存在下液化和/或糖化,以产生葡萄糖和/或麦芽糖,其适于由发酵微生物如酵母菌转化为发酵产物。这样的发酵过程包括生成用作燃料的乙醇或饮用乙醇(可饮用乙醇)的过程,生产饮料的过程、生产所需有机化合物(例如柠檬酸、衣康酸、乳酸、葡糖酸、葡糖酸钠、葡糖酸钙、葡糖酸钾、葡糖酸 δ -内酯或异抗坏血酸钠)、酮类、氨基酸(如谷氨酸、谷氨酸单钠)、以及难以合成制备的更复杂的化合物(例如青霉素、四环素等抗生素)、酶、维生素(例如核黄素、维生素 B12、 β -胡萝卜素)和激素)的过程。

[0672] 待加工的淀粉可以具有高度精制的淀粉质量,例如至少 90%、至少 95%、至少

97%或至少 99.5%纯。或者,淀粉可以是较为粗制的含淀粉材料,其含有碾磨过的整个谷粒,包括非淀粉级分如胚残留物和纤维。碾磨原料如整个谷粒以打开其结构,从而允许进一步加工。可以使用两种碾磨方法:湿磨法和干磨法。此外,可以使用玉米渣如碾磨过的玉米渣。

[0673] 干磨的谷粒除淀粉外还将包含显著量的非淀粉糖类化合物。当通过喷射蒸煮加工这样的异质原料时,杆菌物种 TS-23 菌株往往仅能实现淀粉的部分糊化。由于杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶或其变体对未糊化的淀粉具有高活性,该酶应用在包括液化和/或糖化喷射蒸煮的干磨淀粉的方法中具有优势。

[0674] 并且,由于杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶或其变体的优良水解活性,糖化步骤中对葡萄糖淀粉酶的需求也得到了极大降低。这使得糖化可以在非常低水平的葡萄糖淀粉酶活性下进行。葡糖淀粉酶或者不存在,或者如果存在的话,以不超过或甚至低于 0.5AGU/gDS、或不超过或甚至低于 0.4AGU/g DS、或不超过或甚至低于约 0.3AGU/g DS、或者低于 0.1AGU,例如不超过或甚至低于 0.05AGU/g DS 淀粉底物的量存在。“DS”是加入每克干固形底物的酶单位。酶蛋白以 mg 表示,具有葡萄糖淀粉酶活性的酶或者不存在,或者以不超过或甚至低于约 0.5mg EP/g DS,或者不超过或甚至低于约 0.4mg EP/g DS,或者不超过或甚至低于约 0.3mg EP/g DS,或者不超过或甚至低于约 0.1mg EP/g DS(例如不超过或甚至低于约 0.05mg EP/g DS 或者不超过或甚至低于 0.02mg EP/g DS 的淀粉底物)的量存在。葡糖淀粉酶可以源自曲霉属物种、篮状菌属物种(*Talaromyces* sp.)、大纹饰孢属物种(*Pachykytospora* sp.)或栓菌属物种(*Trametes* sp.)的菌株,其中示例性的实例为黑曲霉(*Aspergillus niger*)、埃默森篮状菌(*Talaromyces emersonii*)、瓣环栓菌(*Trametes cingulata*)或纸质大纹饰孢(*Pachykytospora papyracea*)。

[0675] 该方法可包括 a) 将淀粉底物与杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶或其变体接触,其包含具有 α -淀粉酶活性的催化模块和糖结合模块,例如第一方面中所述的多肽;b) 将所述淀粉底物与所述酶在一定温度下孵育一段时间,在此条件下足以将至少 90%、或至少 92%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、至少 99.5% w/w 的所述淀粉底物转化为可发酵的糖;c) 发酵,以产生发酵产物;和 d) 可选地回收发酵产物。在该方法的步骤 b) 和/或 c) 中,具有葡糖淀粉酶活性的酶或者不存在,或者以 0.001-2.0AGU/g DS、0.01-1.5AGU/g DS、0.05-1.0AGU/g DS、0.01-0.5AGU/g DS 的量存在。具有葡糖淀粉酶活性的酶可以或者不存在,或者以不超过或甚至低于 0.5AGU/g DS、或不超过或甚至低于 0.4AGU/gDS、或不超过或甚至低于 0.3AGU/g DS、或者不超过甚至低于 0.1AGU/gDS,例如不超过或甚至低于 0.05AGU/g DS 的淀粉底物的量存在。酶蛋白以 mg 表示,具有葡萄糖淀粉酶活性的酶或者不存在,或者以不超过或甚至低于 0.5mgEP/g DS,或者不超过或甚至低于 0.4mgEP/g DS,或者不超过或甚至低于 0.3mgEP/g DS,或者不超过或甚至低于 0.1mgEP/g DS(例如不超过或甚至低于 0.05mgEP/g DS 或者不超过或甚至低于 0.02mgEP/gDS 的淀粉底物)的量存在。在该方法中,步骤 a)、b)、c) 和/或 d) 可以单独执行或者同时执行。

[0676] 在另一方面,该方法包括:a) 将淀粉底物与转化后表达杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶或其变体的酵母菌细胞接触,所述变体包含具有 α -淀粉酶活性的催化模块和糖结合模块;b) 将所述淀粉底物与所述酵母菌在一定温度下孵育一段时间,在此条件下足

以将至少 90% w/w 的所述淀粉底物转化为可发酵的糖 ;c) 发酵,以产生乙醇 ;和 d) 可选地回收乙醇。在该方法中,步骤 a)、b) 和 c) 可以单独执行或者同时执行。

[0677] 在又一个方面中,该方法包括水解糊化的糖浆或颗粒淀粉,特别是在低于所述颗粒淀粉的初始糊化温度的温度下水解颗粒淀粉为可溶的淀粉水解产物。除了与包含具有 α -淀粉酶活性的催化模块和糖结合模块的多肽接触之外,淀粉还可以与任何一种或多种下述真菌 α -淀粉酶 (EC 3.2.1.1)、以及一种或多种下述 β -淀粉酶 (EC 3.2.1.2) 和葡糖淀粉酶 (EC 3.2.1.3) 的酶接触。在另一方面,可向杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶或其变体中添加其他淀粉水解酶或脱支酶,例如异淀粉酶 (EC 3.2.1.68) 或支链淀粉酶 (EC 3.2.1.41)。

[0678] 在一实施方案中,所述方法在低于初始糊化温度的温度实施。此类方法时常在至少 30°C、至少 31°C、至少 32°C、至少 33°C、至少 34°C、至少 35°C、至少 36°C、至少 37°C、至少 38°C、至少 39°C、至少 40°C、至少 41°C、至少 42°C、至少 43°C、至少 44°C、至少 45°C、至少 46°C、至少 47°C、至少 48°C、至少 49°C、至少 50°C、至少 51°C、至少 52°C、至少 53°C、至少 54°C、至少 55°C、至少 56°C、至少 57°C、至少 58°C、至少 59°C 或至少 60°C 实施。实施所述方法的 pH 可以处于约 3.0 至约 7.0、或约 3.5 至约 6.0、或约 4.0 至约 5.0 的范围。一方面考虑包括发酵的方法,例如,在 32°C 左右 (例如 30-35°C) 的温度,例如利用酵母生产乙醇。

[0679] 另一方面,所述方法包括同时进行的糖化和发酵,例如,在 30-35°C (例如 32°C 左右) 的温度,例如利用酵母生产乙醇或者利用其他适宜的发酵生物 生产期望的有机化合物。

[0680] 在上述发酵方法中,乙醇含量达到至少约 7%、至少约 8%、至少约 9%、至少约 10%、至少约 11%、至少约 12%、至少约 13%、至少约 14%、至少约 15%,例如至少约 16% 乙醇。

[0681] 在上述任何方面中使用的淀粉浆可以具有约 20% 至约 55% 的干固形物颗粒淀粉,约 25% 至约 40% 的干固形物颗粒淀粉,或约 30% 至约 35% 的干固形物颗粒淀粉。在与杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶或其变体接触后,该酶将颗粒淀粉中的可溶性淀粉以至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 的量转化成可溶性淀粉水解物。

[0682] 在另一实施方案中,在用于液化、糖化糊化的淀粉 (例如但不限于通过喷射蒸煮进行的糊化) 的方法中使用杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶或其包含具有 α -淀粉酶活性的催化模块和糖结合模块的变体,例如第一方面中所述的多肽。所述方法可以包括发酵以生产发酵产物例如乙醇。通过发酵由含淀粉原料生产乙醇的此类方法包括:(i) 用包含具有 α -淀粉酶活性的催化模块和糖结合模块的多肽,例如第一方面的多肽液化所述含淀粉原料;(ii) 糖化所得的液化醪液 (mash);和 (iii) 在发酵生物的存在下发酵步骤 (ii) 所得的物质。任选该方法还包括回收乙醇。糖化和发酵的方法可以作为同时糖化和发酵法 (SSF) 实施。在上述发酵期间,乙醇含量达到至少约 7%、至少约 8%、至少约 9%、至少约 10%、例如至少约 11%、至少约 12%、至少约 13%、至少约 14%、至少约 15%,例如至少约 16% 乙醇。

[0683] 在上述方面的方法中待加工的淀粉可以特别地来自块茎、根、茎、豆类、谷物或整

个谷粒。更具体地,颗粒淀粉可以获自玉米、玉米芯、小麦、大麦、黑麦、买罗高粱、西米、木薯、木薯粉、高粱、稻、豌豆、豆、香蕉或马铃薯。还考虑的有蜡质及非蜡质类型的玉米和大麦。

[0684] 上述组合物可用于液化和 / 或糖化糊化或颗粒的淀粉,和部分糊化的淀粉。部分糊化的淀粉是糊化一定程度的淀粉,即,其中部分淀粉被不可逆溶胀和糊化,而部分淀粉仍然以颗粒状态存在。

[0685] 上述组合物可包含以 0.01-10.0AFU/g DS 或 0.1-5.0AFU/g DS 或 0.5-3.0AFU/AGU 或 0.3-2.0AFU/g DS 的量存在的酸性 α -淀粉酶变体。该组合物可用于上述任何淀粉加工中。

[0686] 如本文所用,名词或动词形式的术语“液化”表示将淀粉转化为链长较短且粘性较小的糊精的过程。通常,此过程包括淀粉的糊化,同时或之后添加杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶或其变体。也可以添加其他液化诱导酶。

[0687] 如本文所用,术语“初次液化 (primary liquefaction)”是指浆液温度升至或接近其糊化温度时的液化步骤。继温度升高之后,使浆液传送通过热交换器或喷射器达到温度约 200-300° F,例如 220-235° F。继应用热交换器或喷射器温度之后,使浆液在该温度保持为期 3-10 分钟。这种保持浆液处于 200-300° F 的步骤为初次液化。

[0688] 如本文所用,术语“二次液化”是指继初次液化 (加热至 200-300° F) 之后,当浆液被允许冷却至室温时的液化步骤。此冷却步骤可以是 30 分钟至 180 分钟 (3 小时),例如 90 分钟至 120 分钟 (2 小时)。

[0689] 如本文所用,术语“二次液化的分钟数”是指自二次液化开始时起到测量 DE 的时间止所过去的时间。

[0690] 另一方面考虑在包含杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶或其变体的组合物中额外应用 β -淀粉酶, β -淀粉酶 (EC 3.2.1.2) 是外切产麦芽糖淀粉酶,其催化直链淀粉、支链淀粉以及相关的葡萄糖聚合物中的 1,4- α -糖苷键水解,由此释放麦芽糖。

[0691] 已经从多种植物和微生物中分离到 β -淀粉酶 (w. M. Fogarty 和 C. T. Kelly, PROGRESS IN INDUSTRIAL MICROBIOLOGY, 15 卷, 112-115 页, 1979)。这些 β -淀粉酶的特征在于具有处于 40°C 至 65°C 范围内的最适温度,以及处于约 4.5 至约 7.0 范围内的最适 pH。考虑的 β -淀粉酶包括但不限于:来自大麦 **Spezyme® BBA 1500**、**Spezyme® DBA**、**Optimalt® ME**、**Optimalt® BBA** (Danisco US Inc., Genencor Division) 和 Novozym™ WBA (Novozymes A/S) 的 β -淀粉酶。

[0692] 考虑用于组合物中的另一酶是葡糖淀粉酶 (EC 3.2.1.3)。葡糖淀粉酶来自微生物或植物。示例性葡糖淀粉酶为真菌或细菌来源。示例性细菌葡糖淀粉酶有曲霉属葡糖淀粉酶,特别是黑曲霉 G1 或 G2 葡糖淀粉酶 (Boel 等人, EMBO J. 3(5):1097-1102(1984)) 或其变体,例如 WO 92/00381 和 W000/04136 中所公开的;泡盛曲霉葡糖淀粉酶 (WO 84/02921);米曲霉葡糖淀粉酶 (Agric. Biol. Chem., 55(4):941-949(1991)) 或其变体或片段。

[0693] 其他考虑的曲霉属葡糖淀粉酶变体包括增强热稳定性的变体:G137A 和 G139A (Chen 等人 (1996), Prot. Eng. 9:499-505); D257E 和 D293E/Q (Chen 等人, Prot. Eng. 8:575-582(1995)); N182 (Chen 等人, Biochem. J. 301:275-281(1994)); 二硫键, A246C (Fierobe 等人, Biochemistry, 35:8698-8704(1996)); 和在 A435 和 S436 位引

入 Pro 残基 (Li 等人 ProteinEng. 10 :1199-1204(1997))。其他考虑的葡糖淀粉酶包括篮状菌属葡糖淀粉酶,特别是来源于埃默森篮状菌 (WO 99/28448)、*Talaromyces leycettanus* (美国专利 No. RE 32,153)、杜邦篮状菌 (*Talaromyces duponti*)、嗜热篮状菌 (*Talaromyces thermophilus*) (美国专利 No. 4,587,215)。考虑的细菌葡糖淀粉酶包括来自梭菌属 (*Clostridium*),特别是 *C. thermoamylolyticum* (EP135138) 和 *C. thermohydrosulfuricum* (WO 86/01831) 的葡糖淀粉酶。葡糖淀粉酶的示例包括来源于米曲霉的葡糖淀粉酶。还考虑商业葡糖淀粉酶,例如 AMG 200L、AMG 300L、SANTM SUPER 和 AMGTM E (Novozymes); **OPTIDEX® 300** (Danisco US Inc., Genencor Division); **AMIGASE®** 和 **AMIGASE® PLUS** (DSM); **G-ZYME® G900** (Enzyme Bio-Systems); **G-ZYME® G990 ZR** (黑曲霉葡糖淀粉酶和低蛋白酶含量)。

[0694] 可以以 0.02-2.0AGU/g DS 或 0.1-1.0AGU/g DS (例如 0.2AGU/g DS) 的量加入葡糖淀粉酶。

[0695] 组合物中可包含其他酶和酶变体。除了杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶或其变体,可以使用一种或多种 α -淀粉酶,或可以进一步包括本文讨论的其他酶。

[0696] 可以任选加入的另一种酶是脱支酶,例如异淀粉酶 (EC 3.2.1.68) 或支链淀粉酶 (EC 3.2.1.41)。异淀粉酶水解支链淀粉和 β -极限糊精中的 α -1,6-D-糖苷分支键,并且通过异淀粉酶不能攻击普鲁分支葡聚糖及其对 α -极限糊精的有限作用而能够与支链淀粉酶区别开来。可以按本领域熟知的有效量加入脱支酶。

[0697] 所述方法的产物的确切组成取决于所应用的酶组合以及所加工的颗粒淀粉的类型。例如,可溶水解产物可以是纯度为至少约 85%、至少约 90%、至少约 95.0%、至少约 95.5%、至少约 96.0%、至少约 96.5%、至少约 97.0%、至少约 97.5%、至少约 98.0%、至少约 98.5%、至少约 99.0% 或至少约 99.5% 的麦芽糖。备选地,可溶淀粉水解产物可以是葡萄糖,或者淀粉水解物具有至少 94.5%、至少 95.0%、至少 95.5%、至少 96.0%、至少 96.5%、至少 97.0%、至少 97.5%、至少 98.0%、至少 98.5%、至少 99.0% 或至少 99.5% 的 DX (葡萄糖占总溶解的干固形物的百分比)。该方法可包括特制糖浆产物,例如用于生产冰淇淋、蛋糕、糖果、水果罐头的包含葡萄糖、麦芽糖、DP3 和 DPn 的混合物的特制糖浆。

[0698] 两种碾磨方法是:湿磨法和干磨法。在干磨法中,碾磨和使用整个谷粒。湿磨法提供胚芽和粉 (淀粉颗粒和蛋白质) 的良好分离,当淀粉水解产物用于糖浆生产时通常使用这种方法。干磨法和湿磨法均为淀粉加工领域公知,且同等地考虑与所公开的组合物和方法一起使用。所述方法可在超滤体系中进行,其中保留物在酶、粗淀粉和水的存在下保持再循环,且其中透过物为可溶淀粉水解产物。同等考虑的是在具有超滤膜的连续膜反应器中进行的方法,其中保留物在酶、粗淀粉和水的存在下保持再循环,且其中透过物为可溶淀粉水解产物。同样考虑的是在具有微过滤膜的连续膜反应器中进行的方法,其中保留物在酶、粗淀粉和水的存在下保持再循环,且其中透过物为可溶淀粉水解产物。

[0699] 一方面,将该方法的可溶淀粉水解产物转化为基于高果糖淀粉的糖浆 (HFSS),例如高果糖玉米糖浆 (HFCS)。这种转化可利用葡萄糖异构酶,以及通过是固定在固相支持物上的固定葡萄糖异构酶实现。所考虑的异构酶包括商品 **Sweetzyme®**, IT (Novozymes A/S); **G-zymer® IMGI** 和 **G-zymer® G993**, **Ketomax®**, **G-zymer® G993** (Rhodia), **G-zymer® G993** 液体和

GenSweet® IGI (Danisco US Inc., Genencor Division)。

[0700] 另一方面,所生产的可溶淀粉水解产物可用于出产燃料或饮用乙醇。在第三方面的方法中,发酵可以与颗粒淀粉浆的水解同时或分开 / 相继进行。当发酵与水解同时进行,温度可以在 30℃ -35℃ 之间,尤其是 31℃ -34℃ 之间。该方法可以在超滤体系中进行,其中保留物在酶、粗淀粉、酵母、酵母营养物和水的存在下保持再循环,且其中透过物为含乙醇的液体。同等考虑的是在具有超滤膜的连续膜反应器中进行的方法,其中保留物在酶、粗淀粉、酵母、酵母营养物和水的存在下保持再循环,且其中透过物为含乙醇的液体。

[0701] 所述方法的可溶淀粉水解产物也可以用于发酵产品的生产,其包括将所处理的淀粉发酵成发酵产品,例如柠檬酸、谷氨酸单钠、葡糖酸、葡糖酸钠、葡糖酸钙、葡糖酸钾、葡糖酸 δ -内酯或异抗坏血酸钠。

[0702] 杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶或其变体的淀粉水解活性例如可以利用马铃薯淀粉作为底物来测定。此方法基于该酶对改性马铃薯淀粉的降解,且反应后接着将淀粉 / 酶溶液样品与碘溶液混合。最初形成黑蓝色,但是在淀粉降解期间,蓝色变弱,逐渐变成红棕色,将其与有色玻璃标准进行比较。

[0703] 4.5 烘烤和食物制备的组合物和方法

[0704] 对于面粉在烘烤和食品生产中的商用和家用而言,重要的是维持面粉中适当水平的 α -淀粉酶活性。太高的活性水平可能产生粘性和 / 或面团似的滞销产品;但是 α -淀粉酶活性不足的面粉可能不含足够的糖用于正常酵母功能,导致干燥易碎的面包。为了增加面粉中内源性 α -淀粉酶活性的水平,可以以杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶或其变体的形式将 α -淀粉酶加入面粉中。因此,确定面粉样品中内源性(天然)和真菌 α -淀粉酶或其他 α -淀粉酶活性水平的能力会有利于食品生产过程,并促进面粉在食品生产中的更有效应用。

[0705] 除了在烘烤中应用谷物及其他植物产品外,诸如大麦、燕麦、小麦等 谷物以及诸如玉米、啤酒花和稻等植物成分还应用于工业酿造以及家庭酿造。酿造中所用的成分可以是未发芽或是发芽的(malted),这意味着部分发芽,从而导致包括 α -淀粉酶在内的酶水平增加。为成功酿造,充足水平的 α -淀粉酶活性是必要的,以确保有适当水平的糖进行发酵。

[0706] 如本文所用,术语“面粉”指研磨或磨碎的粮谷。术语“面粉”还可以表示已经磨碎或捣碎的西米或块茎产品。在一些实施方案中,面粉还可以含有除研磨或捣碎的谷类或植物材料之外的成分。其他成分的一个并非旨在限制的实例是膨松剂。粮谷包括但不限于:小麦、燕麦、黑麦和大麦。块茎产品可包括木薯粉(tapioca flour)、木薯粉(cassava flour)和玉米淀粉。术语“面粉”还包括磨碎的玉米粉、玉米面、米粉、全麦粉、自发粉、木薯粉、木薯粉、米粉(ground rice)、增补营养素的面粉和玉米淀粉。

[0707] 如本文所用,术语“原材料(stock)”表示粉碎或破碎的谷类和植物成分。例如,啤酒生产中所用的大麦是已经被粗磨或粉碎的谷类,以便提供适于产生发酵用醪液的粘稠度。如本文所用,术语“原材料”包括任何前述类型的粉碎或粗磨形式的植物和谷类。本文所述的方法可用于确定面粉以及原材料中的 α -淀粉酶活性水平,所述原材料包括已经粉碎的上述类型的谷物、块茎和其他植物产品。

[0708] 还公开了测量面粉和谷物或块茎产物和原材料中 α -淀粉酶活性的方法。如本文

所使用的,术语“ α -淀粉酶”是指内源性 α -淀粉酶(存在于面粉或原材料中)或已经加入到面粉或原材料中的杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶或其变体。

[0709] 杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶或其变体单独或与其他淀粉酶联合加入以防止陈化。使用的抗陈化淀粉酶可以是有效延缓烘烤产物陈化(面包心硬化)的任何淀粉酶。

[0710] 淀粉酶在淀粉存在下一般具有例如 30-90°C、50-80°C、55-75°C 或 60-70°C 范围内的最适温度。可以在 1% 的可溶淀粉溶液中于 pH5.5 测量最适温度。

[0711] 可以与杆菌物种 TS-3 菌株 α -淀粉酶联合使用的另外的抗陈化淀粉酶 包括内淀粉酶,例如来自杆菌属的细菌内淀粉酶。例如,其他淀粉酶可以是产麦芽糖 α -淀粉酶(EC 3.2.1.133),例如来自杆菌属。**Novamyl®**是来自嗜热脂肪芽孢杆菌菌株 NCIB 11837 的产麦芽糖 α -淀粉酶,并描述在 C. Christophersen 等人,1997 Starch 50(1):39-45 中。

[0712] 抗陈化内淀粉酶的其他实例可包括其他细菌 α -淀粉酶,源自例如芽孢杆菌属,例如地衣芽孢杆菌或解淀粉芽孢杆菌。

[0713] 抗陈化淀粉酶可以是外切淀粉酶,例如 β -淀粉酶,例如来自植物(例如大豆),或来自微生物来源(例如芽孢杆菌属)。

[0714] 可单独地或与其他淀粉酶组合以有效量添加杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶或其变体以延缓烘烤产品的陈化(即面包心硬化)。抗陈化淀粉酶的量一般可在每公斤面粉 0.01-10mg 酶蛋白质的范围内,例如 1-10mg/kg。

[0715] 包括杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶的烘烤组合物还可以包括磷脂酶。磷脂酶可具有 A1 或 A2 活性,以从磷脂中移去脂肪酸并形成溶血磷脂。其可以具有或不具有脂肪酶活性,即对三酰甘油的活性。磷脂酶可具有范围 30-90°C(例如 30-70°C)的最适温度。所添加的磷脂酶可以是动物来源的,例如来自胰腺(例如牛或猪胰腺)、蛇毒液或蜂毒液。或者,磷脂酶可以是微生物来源的,例如来自丝状真菌、酵母或细菌,例如来自如下属或种:曲霉属,黑曲霉;网柄菌属(Dictyostelium),盘基网柄菌(D. discoideum);毛霉属,爪哇毛霉(M. javanicus),大毛霉(M. mucedo),细孢毛霉(M. subtilissimus);脉孢霉属(Neurospora),粗糙脉孢霉(N. crassa);根毛霉属(Rhizomucor),微小根毛霉(R. pusillus);根霉属(Rhizopus),少根根霉(R. arrhizus),日本根霉(R. japonicus),匍枝根霉(R. stolonifer);核盘菌属(Sclerotinia),大豆核盘菌(S. libertiana);发癣菌属(Trichophyton),红色发癣菌(T. rubrum);维氏核盘菌属(Whetzelinia),W. sclerotiorum;芽孢杆菌属,巨大芽孢杆菌(B. megaterium),枯草芽孢杆菌;柠檬酸细菌属(Citrobacter),弗氏柠檬酸细菌(C. freundii);肠杆菌属(Enterobacter),产气肠杆菌(E. aerogenes),阴沟肠杆菌(E. cloacae);爱德华氏菌属(Edwardsiella),迟钝爱德华氏菌(E. tarda);欧文氏菌属(Erwinia),草生欧文氏菌(E. herbicola);埃希氏菌属(Escherichia),大肠杆菌(E. coli);克雷伯氏菌属(Klebsiella),肺炎克雷伯氏菌(K. pneumoniae);变形杆菌属(Proteus),普通变形杆菌(P. vulgaris);普罗威登斯菌属(Providencia),斯氏普罗威登斯菌(P. stuartii);沙门氏菌属(Salmonella),鼠伤寒沙门氏菌(S. typhimurium);沙雷氏菌属(Serratia),液化沙雷氏菌(S. liquefasciens),粘质沙雷氏菌(S. marcescens);志贺氏菌属(Shigella),弗氏志贺氏菌(S. flexneri);链霉菌属(Streptomyces),紫红链霉菌(S. violeceoruber);耶尔森氏菌属(Yersinia),小肠结肠炎耶尔森氏菌(Y. enterocolitica)和镰孢霉属,尖镰孢(例如菌株 DSM 2672)。

[0716] 磷脂酶在烘烤后的初始阶段,特别是头 24 个小时,以改进面包柔软度的量添加。磷脂酶的量通常在每公斤面粉约 0.01-10mg 酶蛋白质的范围内,例如 0.1-5mg/kg,或每公斤面粉 200-5000LEU(例如 500-2000LEU/kg)。具有脂肪酶活性的磷脂酶活性一般以对应于每公斤面粉约 20-1000LU 的脂肪酶活性的量添加,特别是 50-500LU/kg。一个 LU(脂肪酶单位)定义为用阿拉伯树胶为乳化剂、三丁酸甘油酯为底物,在 30℃、pH7.0 下,每分钟释放 1 μmol 丁酸所需的酶量。

[0717] 面团(dough)的组合物通常包括小麦面或小麦粉和/或其他类型的面、粉或淀粉,如玉米粉、玉米淀粉、黑麦面、黑麦粉、燕麦粉、燕麦面、大豆粉、高粱面、高粱粉、马铃薯面、马铃薯粉或马铃薯淀粉。面团可以是新鲜的、冷冻的或是部分烘烤(par-baked)的。

[0718] 面团一般是膨松化的面团或将要被膨松的面团。面团可以以多种方式进行膨松,例如通过添加化学膨松剂(例如小苏打)或通过添加膨松剂(发酵面团)。例如,面团可通过添加适宜的酵母培养物(例如酿酒酵母(面包酵母)培养物,例如商购可得的酿酒酵母菌株)来膨松。

[0719] 面团也可以包括其他常规的面团成分,例如蛋白质,如奶粉、面筋和大豆;蛋(全蛋、蛋黄、或蛋清之一);氧化剂如抗坏血酸、溴酸钾、碘酸钾、偶氮双甲酰胺(ADA)或过硫酸铵;氨基酸如 L-半胱氨酸;糖;盐如氯化钠、乙酸钙、硫酸钠或硫酸钙。

[0720] 面团可以包括脂肪(三酰甘油)如颗粒状脂肪或起酥油。

[0721] 面团可以还包括乳化剂,例如单酰甘油或二酰甘油、单酰甘油或二酰甘油的双乙酰基酒石酸酯、脂肪酸的糖脂、脂肪酸的聚甘油酯、单酰甘油的乳酸酯、单酰甘油的乙酸酯、聚氧乙烯硬脂酸酯或溶血卵磷脂,但是可适用于不加入乳化剂制备的面团(而不是可选的磷脂)。

[0722] 任选地,可与抗陈化淀粉酶和磷脂酶一起使用其他酶。其他酶可以是第二淀粉酶,如淀粉葡萄糖苷酶、 β -淀粉酶、环糊精葡聚糖转移酶;或者其他酶可以是肽酶,特别是外肽酶,转谷氨酰胺酶、脂肪酶、纤维素酶、半纤维素酶,特别是戊聚糖酶如木聚糖酶,蛋白酶,蛋白质二硫键异构酶,例如 WO 95/00636 中所公开的蛋白质二硫键异构酶,糖基转移酶,分支酶(1,4- α -葡聚糖分支酶),4- α -葡聚糖转移酶(糊精糖基转移酶)或氧化还原酶,例如过氧化物酶、漆酶、葡萄糖氧化酶、吡喃糖氧化酶、脂加氧酶、L-氨基酸氧化酶或糖氧化酶。

[0723] 其他酶可以是任何来源的,包括哺乳动物和植物来源,以及是微生物(细菌、酵母或真菌)来源,并可通过本领域常规使用的技术获得。

[0724] 木聚糖酶可以是微生物来源,例如源自细菌或真菌,例如曲霉属菌株,特别是棘孢曲霉、黑曲霉(例如 WO 91/19782)、泡盛曲霉(WO 91/18977)或塔宾曲霉(*A. tubigenis*)(WO 92/01793);源自木霉属菌株,例如里氏木霉,或源自腐质霉属菌株,例如特异腐质霉(WO 92/17573)。**Pentopan®**和**Novozym 384®**为市售的由里氏木霉生产的木聚糖酶制品。

[0725] 淀粉葡萄糖苷酶可以是黑曲霉淀粉葡萄糖苷酶(如**AMG®**)。其他有用的淀粉酶产品包括**Grindamyl® A 1000**或 A 5000(购自 Grindsted Products, 丹麦)和**Amylase® H**或**Amylase® P**(购自 DSM Gist Brocades, 荷兰)。

[0726] 葡萄糖氧化酶可以是真菌葡萄糖氧化酶,特别是黑曲霉葡萄糖氧化酶(如**Gluzyme®**)。

[0727] 示例性蛋白酶有 **Neutrase®** (Novozymes) 和 Protex OxG (Danisco US Inc., Genencor Division)。

[0728] 示例性脂肪酶可来源于嗜热丝孢菌属 (腐质霉属)、根毛霉属、假丝酵母菌属 (Candida)、曲霉属、根霉属 (Rhizopus) 或假单胞菌属的菌株,特别是来自疏棉状嗜热丝孢菌 (*Thermomyces lanuginosus*) (疏毛腐质霉 (*Humicola lanuginosa*))、米黑根毛霉 (*Rhizomucor miehei*)、南极洲假丝酵母 (*Candida antarctica*)、黑曲霉、德氏根霉 (*Rhizopus delemar*) 或少根根霉 (*Rhizopus arrhizus*) 或洋葱假单胞菌 (*Pseudomonas cepacia*)。在具体实施方案中,脂肪酶可以是如 W0 88/02775 中所述来自南极洲假丝酵母的脂肪酶 A 或脂肪酶 B,或者脂肪酶可以如 EP 238,023 中所述源自米黑根毛霉,或如 EP 305,216 中所述源自疏毛腐质霉,或如 EP 214,761 和 W089/01032 中所述源自洋葱假单胞菌。

[0729] 该方法可用于任何类型由面团制备的烘烤产品,具有柔软或松脆特征之一、白色、浅色或深色类型之一。实例是面包 (尤其是白面包、全麦面包或黑麦面包),一般为块或卷的形式,法式长棍型面包、比塔饼、玉米粉圆饼、蛋糕、薄煎饼、饼干、曲奇饼、馅饼皮、酥面包、馒头、比萨等等。

[0730] 在另一个方面涉及中,在包括面粉连同抗陈化淀粉酶、磷脂酶和磷脂的预混物中应用杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶或其变体。预混物可以含有其他改进面团和 / 或改进面包的添加剂,例如上文所述的任何添加剂,包括酶。

[0731] 另一方面提供了一种酶制剂,其包括抗陈化淀粉酶和磷脂酶用作烘烤添加剂。该酶制剂可为颗粒或团聚的粉末的形式。其可具有窄的粒径分布,95% (以重量计) 以上的颗粒处于 25-500 μm 的范围。

[0732] 颗粒和团聚的粉末可通过常规方法制备,例如在流化床制粒机中通过向载体上喷所述淀粉酶。载体可由具有适宜粒径的粒核组成。载体可以是可溶或不可溶的,例如盐 (如 NaCl 或硫酸钠)、糖 (如蔗糖或乳糖)、糖醇 (如山梨糖醇)、淀粉、稻、玉米渣或大豆。

[0733] 另一方面涉及包封杆菌物种 TS-23 菌株 α -淀粉酶。为制备包封的 α -淀粉酶颗粒,使酶与食品级脂质以足以悬浮所有 α -淀粉酶颗粒的量接触,下文详细描述。

[0734] 如本文所使用,食品级脂质可以是任何天然的不溶于水但溶于非极性有机溶剂如烃或乙醚的有机化合物。使用的食品级脂质可包括但不限于饱和或不饱和的脂肪或油形式的三酰甘油。构成所用的饱和三酰甘油的脂肪酸及其组合的实例包括但不限于:丁酸 (来源于乳脂肪)、棕榈酸 (来源于动物及植物脂肪) 和 / 或硬脂酸 (来源于动物及植物脂肪)。构成所用的不饱和三酰甘油的脂肪酸及其组合的实例包括但不限于:棕榈油酸 (来源于动物及植物脂肪)、油酸 (来源于动物及植物脂肪)、亚油酸 (来源于植物油) 和 / 或亚麻酸 (来源于亚麻子油)。其他适宜的食品级脂质包括但不限于:衍生自上文所讨论的三酰甘油的单酰甘油和二酰甘油,磷脂及糖酯。

[0735] 将液体形式的食品级脂质与粉末形式的 α -淀粉酶颗粒以这样的方式接触,使得脂质物质覆盖至少大多数 (例如 100%) α -淀粉酶颗粒的至少一部分表面。因此,各 α -淀粉酶颗粒独立地包封在脂质中。例如,全部或基本上全部的 α -淀粉酶颗粒均被提供有薄层连续的包封脂膜。这可通过首先向容器中倾入一定量的脂质,然后将 α -淀粉酶调成浆液,从而使脂质彻底润湿各 α -淀粉酶颗粒的表面而实现。在短期搅拌之后,回收其表面携

带实质量脂质的包封的 α -淀粉酶颗粒。可通过选择所用脂质的类型,来控制向 α -淀粉酶颗粒如此施加的包衣的厚度,并在期望时通过重复操作以建造较厚的膜。

[0736] 加载的递送载体的储存、处理和掺入可通过包装混合物实现。包装混合物可包括包封的 α -淀粉酶。不过,包装混合物可以还含有生产商或面点师所需的其他成分。在包封的 α -淀粉酶掺入到面团之中后,面点师继续进行产品的常规生产方法。

[0737] 包封 α -淀粉酶的优势有两重。首先,对于热不稳定性酶而言,食品级脂质在烘烤过程中保护酶免受热变性。结果,虽说 α -淀粉酶在醒发和烘烤阶段被稳定化和受保护,其在最终的烘烤产品中从保护性包膜中释放出来,在这里水解多聚葡聚糖中的糖苷键。加载的递送载体也向烘烤品提供持续释放的活性酶。也就是说,继烘烤过程之后,活性 α -淀粉酶从保护性包膜中持续释放,其释放速率抵消并因此减小陈化机制的速率。

[0738] 一般而言,向 α -淀粉酶颗粒施用的脂质的量可从 α -淀粉酶总重的几个百分点到该重量的许多倍进行变动,这取决于脂质的性质、向 α -淀粉酶颗粒施用脂质的方式、待处理面团混合物的组成、以及所涉及的面团混合操作的强度。

[0739] 以有效延长烘烤商品保存限期的量向用于制备烘烤商品的成分中添加加载的递送载体(即,脂质包封的酶)。面点师计算为实现期望抗陈化效果所需的如上文那样制备的包封 α -淀粉酶的量。所需的包封 α -淀粉酶的量基于被包封的酶的浓度以及 α -淀粉酶与指定面粉的比例来计算。虽然已发现广范围的浓度有效,但是正如已经讨论过的那样,抗陈化方面的可见改进与 α -淀粉酶浓度并不线性相关,而是超过一定的最低水平后, α -淀粉酶浓度的大幅增加仅产生很小的额外改进。在特定烘烤生产中实际应用的 α -淀粉酶浓度可能比最低需要量高得多,以便向面点师提供一定的保障以对抗因其无意低估引起的错误。酶浓度的下限由面点师希望达到的最低抗陈化效果决定。

[0740] 根据本方法制备烘烤品的典型方法包括:(a) 制备脂质包覆的 α -淀粉酶颗粒,其中基本上 100% 的 α -淀粉酶颗粒被包覆;(b) 混合含面粉的面团;(c) 在完成混合之前向面团中添加脂质包覆的 α -淀粉酶,在脂质包衣从 α -淀粉酶上去掉之前终止混合;(d) 醒发面团;和(e) 烘烤面团以提供烘烤品,其中 α -淀粉酶在混合、醒发和烘烤阶段无活性,而在烘烤品中有活性。

[0741] 因此,可在接近混合周期结束的时候向面团中添加包封的 α -淀粉酶。该方法的一个特征是在混合阶段中的一个时间点加入包封的 α -淀粉酶允许包封的 α -淀粉酶均匀地遍及整个面团,不过,混合阶段在保护性包膜从 α -淀粉酶颗粒剥落之前终止。根据面团的类型和体积、以及混合器的作用方式和速度不同,可能需要 1-6 分钟或更长的任何时间将包封的 α -淀粉酶混入面团中,但平均为 2-4 分钟。因此,存在可以决定该精确程序的几种变量。第一,包封的 α -淀粉酶的量必须具有足以允许包封的 α -淀粉酶分布于整个面团混合物的总体积。如果包封的 α -淀粉酶制品为高度浓缩的,可能需要在向面团添加包封的 α -淀粉酶之前先向预混物中添加额外的油。烹饪和生产方法可能需要特定的改变。不过,当将面包面团配方中指定的 25% 的油从面团中扣除,而用作为在接近混合周期结束时加入的浓缩的包封 α -淀粉酶的载体时,一般能够达成良好的结果。在烹饪具有极低脂肪含量的面包或其他烘烤品(如法式面包)中,已发现干面粉重量约 1% 的包封 α -淀粉酶混合物足以使包封的 α -淀粉酶与面团彻底地混合,但可以生效的百分比范围非常宽泛,并取决于个体面点师的配方、成品以及生产方法需求而不是任何已知限制。第二,必须在混

合周期中余下足够时间以向混合物中添加包封的 α -淀粉酶悬液,以便完全的混合入面团中,但是不要太早以致于过度的机械作用使保护性脂质包膜从大比例的包封 α -淀粉酶颗粒上剥落下来。

[0742] 在另一实施方案中,将细菌 α -淀粉酶 (BAA) 加入到脂质包覆的酶颗粒。已知 BAA 使面包缩小成为粘团,这是由于其在充分烘烤的面包块中具有过度的热稳定性和保留活性。然而,已发现当在受保护的酶产品中掺入 BAA 时,可以获得相当大的附加抗陈化保护作用,即便以非常低的 BAA 剂量水平也是如此。例如,已发现 150RAU (参考淀粉酶单位)/100 磅面粉的 BAA 剂量是有效的。在一个方面中,向脂质包覆的酶产品添加约 50-2000RAU 的 BAA。此低 BAA 剂量水平,组合保护性包衣能够在充分烘烤的面包块中阻止酶与淀粉自由接触的能力 (除水蒸气随机地将酶自其包衣中释放出来的情况之外),有助于达成非常高水平的抗陈化活性,而没有 BAA 的反面副作用。

[0743] 5. 方法

[0744] 5.1 过滤筛选实验

[0745] 下面讨论的实验可用于筛选与亲本 α -淀粉酶相比,在高或低 pH 和 / 或在 Ca^{2+} 衰竭条件下具有改变的稳定性的 AmyTS23 α -淀粉酶变体。

[0746] 5.2 高 pH 滤膜筛选实验

[0747] 于 37°C,将杆菌属物种库平板接种在含有 10 微克 / 毫升卡那霉素的 TY 琼脂平板上的多层醋酸纤维素 (OE 67, Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) 和硝酸纤维素滤膜 (Protran-Ba 85, Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) 上至少 21 小时。醋酸纤维素层位于 TY 琼脂平板上。

[0748] 平板接种后但是在孵育之前用针特别标记各个滤膜夹层,以便能够在滤膜上定位阳性变体,将带有结合变体的硝酸纤维素滤膜转移到含有甘氨酸 -NaOH 缓冲液, pH8.6-10.6 的容器中并室温 (可在 10-60°C 间变化) 孵育 15 分钟。带有菌落的醋酸纤维素滤膜在室温下储存于 TY 平板上,直至使用。孵育之后,在含有 1% 琼脂糖、0.2% 淀粉的甘氨酸 -NaOH 缓冲液 (pH8.6-10.6) 的平板上检测残余的活性。带有硝酸纤维素滤膜的实验板以与上述滤膜夹层同样的方式标记,并在室温下孵育 2 小时。去除滤膜后,用 10% 复方碘溶液 (Lugol solution) 对实验板染色。在暗蓝色背景下,降解淀粉的变体检测为白色斑点并然后在储存板上鉴定出。在与第一次筛选同样的条件下重新筛选两次阳性变体。

[0749] 5.3 低钙滤膜筛选实验

[0750] 于 37°C,在含有相关抗生素 (例如卡那霉素或氯霉素) 的 TY 琼脂平板上的多层醋酸纤维素 (OE 67, Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) 和硝酸纤维素滤膜 (Protran-Ba 85, Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) 上平板接种杆菌属物种库至少 21 小时。醋酸纤维素层位于 TY 琼脂平板上。

[0751] 平板接种后但是在孵育之前用针特别标记各个滤膜夹层,以便能够在滤膜上定位阳性变体,将带有结合变体的硝酸纤维素滤膜转移到含有碳酸盐 / 碳酸氢盐缓冲液, pH8.5-10, 具有不同 EDTA 浓度 (0.001mM-100mM) 的容器中。将滤膜室温下孵育 1 小时。带有菌落的醋酸纤维素滤膜在室温下储存于 TY 平板上,直至使用。孵育之后,在含有 1% 琼脂糖、0.2% 淀粉的碳酸盐 / 碳酸氢盐缓冲液 (pH8.5-10) 的平板上检测残余的活性。带有硝酸纤维素滤膜的实验板以与上述滤膜夹层同样的方式标记,并在室温下孵育 2 小时。去除

滤膜后,用 10%复方碘溶液 (Lugol solution) 对实验板染色。在暗蓝色背景下,降解淀粉的变体检测为白色斑点并然后在储存板上鉴定出。在与第一次筛选同样的条件下重新筛选两次阳性变体。

[0752] 5.4 低 pH 筛选滤膜实验

[0753] 于 37℃ 在含有 10 微克 / 毫升氯霉素的 TY 琼脂平板上多层醋酸纤维素 (OE 67, Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) 和硝酸纤维素滤膜 (Protran-Ba 85, Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) 上平板接种杆菌属物种库,至少 21 小时。醋酸纤维素层位于 TY 琼脂平板上。

[0754] 在平板接种后但是孵育之前用针特别标记各个滤膜夹层,以便将阳性变体定位在滤膜上,带有结合变体的硝酸纤维素滤膜被转移到含有柠檬酸盐缓冲液, pH4.5 的容器中并 80℃ 孵育 20 分钟 (当在野生型主链中筛选变体时) 或 85℃ 孵育 60 分钟 (当筛选亲本 α -淀粉酶的变体时)。带有菌落的醋酸纤维素滤膜在室温下储存于 TY 平板上,直至使用。孵育之后,在含有 1% 琼脂糖、0.2% 淀粉的柠檬酸盐缓冲液 (pH6.0) 的实验平板上检测残余的活性。带有硝酸纤维素滤膜的实验板以与上述滤膜夹层同样的方式标记,并在 50℃ 下孵育 2 小时。去除滤膜后,用 10% 复方碘溶液对实验板染色。在暗蓝色背景下,降解淀粉的变体检测为白色斑点并然后在储存板上鉴定出。在与第一次筛选同样的条件下重新筛选两次阳性变体。

[0755] 5.5 二次筛选

[0756] 从储存板上挑出重筛选后的阳性转化体并在二次平板筛选中检测。37℃ 下阳性转化体在 5mL 的 LB+ 氯霉素中生长 22 小时。各个阳性转化体和作为对照表达相应主链的克隆的杆菌属培养物在柠檬酸盐缓冲液 (pH4.5) 中于 90℃ 下孵育,在 0、10、20、30、40、60 和 80 分钟时取样。在实验板上点 3 μ L 样品。用 10% 复方碘溶液对实验板染色。改善的变体视为与主链相比具有更高残余活性 (在实验板上检测为晕斑) 的变体。用核苷酸测序来确定该改善的变体。

[0757] 5.6 未纯化变体的稳定性实验

[0758] 变体的稳定性可以用如下方法检测:表达要分析的变体的杆菌属培养物在 10mL LB+ 氯霉素中于 37℃ 下生长 21 小时。800 μ L 培养物与 200 μ L 柠檬酸盐缓冲液 (pH4.5) 混合。对应于样品时间点数量的多个 70 μ L 等分样品在 PCR 管中制备,并于在 PCR 仪中于 70℃ 或 90℃ 孵育不同时间 (通常是 5、10、15、20、25 和 30 分钟)。0 分钟样品不在高温下孵育。通过转移 20 μ L 样品至 200 μ L 的 α -淀粉酶 PNP- G_7 底物 MPR3 (Boehringer Mannheim 目录号 1660730) 中来测定样品活性,如下面“ α -淀粉酶活性测定”部分所述。结果以百分比活性 (相对于 0 分钟时间点的活性) 对时间作图,或者描述为在孵育一定时间之后残余活性百分比。

[0759] 5.7 α -淀粉酶变体的发酵和纯化

[0760] 如下所述发酵和纯化包含相关表达质粒的枯草芽孢杆菌菌株:将从 -80℃ 储存的储液中取出的菌株划线接种于含有 10 微克 / 毫升卡那霉素的 LB 琼脂糖板上,37℃ 下过夜生长。菌落转移至 500mL 摇瓶中的补充有 10 微克 / 毫升氯霉素的 100mL PS-1 培养基中。

[0761] PS-1 培养基的成分

[0762] 颗粒糖 (Pearl sugar) 100g/l

[0763] 大豆粉 40g/l

[0764] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 10g/l

[0765] PluronicTM PE 6100 0.1g/l

[0766] CaCO_3 5g/l

[0767] 培养物在 37℃ 下以 270rpm 振荡培养 5 天。

[0768] 4500rpm 离心 20-25 分钟, 从发酵液中去除细胞和细胞碎片。过滤上清得到完全清澈的溶液。浓缩滤液并在 UF- 过滤器 (10000 截留膜) 上洗涤, 缓冲液换为 20mM 醋酸盐缓冲液, pH5.5。将 UF- 过滤液上样到 S- 琼脂糖 F.F. 上, 用同样缓冲液中的 0.2MNaCl 阶段洗脱。用 10mM Tris, pH9.0 透析洗脱液, 并将洗脱液上样到 Q- 琼脂糖 F.F., 用从 0 到 0.3M 的 NaCl 的线性梯度以 6 个柱体积洗脱。收集含有活性 (用 Phadebas 实验测量) 的级分, 将 pH 调至 pH7.5, 通过 0.5% W/vol. 活性炭处理 5 分钟来去除剩余的颜色。

[0769] 5.8 比活性测定

[0770] 用 **Phadebas®** 实验 (Pharmacia) 测定比活性, 记作“活性 / 毫克酶”。遵循厂商的说明书 (还参加下文“ α -淀粉酶活性测定”)。

[0771] 5.9 等电点测定

[0772] 用等电聚焦法测定 pI (例如 Pharmacia, Ampholine, pH3.5-9.3)。

[0773] 5.10 增加的稳定性测定

[0774] 在 50ml 丙烯管中加入 10ml 目的洗涤剂。对 AmyTS23t 和 AmyTS23t Δ RS 适当稀释, 以使其吸入含有该洗涤剂的各个管中后, 各自以 180ppm 测量。带有各个突变酶的洗涤剂涡旋 30 秒, 然后置于 RotaMix (ATR RKVS Model) 上 10 分钟。吸取 100 微升含有突变酶的洗涤剂, 以 1 : 651 稀释。突变体的初始活性用封闭的 P- 硝基 - 苯基 - 麦芽糖庚糖 (BlockedP-Nitro-Phenyl-Maltoheptaose (封闭的 PBNPG7)) 底物在 Konelab, Model20XT 上检测。然后将洗涤剂样品在设置为 37℃ 的恒温孵育器中孵育。在第 1、2、4、7 和 17 天取出样品, 检测酶活性。

[0775] 5.11 α -淀粉酶活性测定

[0776] 5.11.1 Phadebas 实验

[0777] 以使用 **Phadebas®** 片作为底物的方法测定 α -淀粉酶活性。Phadebas 片 (**Phadebas®** 淀粉酶检测, Pharmacia Diagnostic 提供) 含有交联的不可溶蓝色淀粉聚合物, 其已经与牛血清白蛋白和缓冲物质混合并压片。

[0778] 对于每个单独测量, 在含有 5ml 50mM Britton-Robinson 缓冲液 (50mM 乙酸, 50mM 磷酸, 50mM 硼酸, 0.1mM CaCl_2 , 用 NaOH 调至所需 pH 值) 的管中悬浮一片。该检测在目的温度的水浴中进行。要检测的 α -淀粉酶在 X ml 的 50mM Britton-Robinson 缓冲液中稀释。1ml 该 α -淀粉酶溶液加入到 5ml 50mM Britton-Robinson 缓冲液中。该 α -淀粉酶水解淀粉, 得到可溶的蓝色片段。用分光光度计在 620nm 测量得到的蓝色溶液的吸光度是该 α -淀粉酶活性的函数。

[0779] 重要的是在 10 或 15 分钟 (检测时间) 孵育后测得的 620nm 吸光度处于 620nm 的 0.2-2.0 吸光度单位范围内。在这个吸光度范围内, 在活性和吸光度之间有线形关系 (Lambert-beer 定律)。酶的稀释必须底物和 α -糖苷酶由 Boehringer-Mannheim 生产 (货号 1054635)。

[0780] 为了制备该试剂溶液,按照生产者的建议,10ml 的底物 / 缓冲液加入到 50ml 酶 / 缓冲液中。将 20 微升样品转移至 96 孔微滴定板,在 25℃ 孵育来进行该检测。加入在 25℃ 预平衡的 200 微升试剂溶液。混合溶液,并预孵育 1 分钟,在酶标仪上 4 分钟内每 30 秒在 OD 405nm 测量一次吸光度。

[0781] 时间相关的吸光度曲线的斜率直接与给定条件下所实验的 α -淀粉酶的活性成比例。

[0782] 5.12 洗涤剂组合物中酶性能的测定

[0783] 5.12.1 美国洗衣条件

[0784] 使用 Terg-o-tometer,美国检测中心, Hoboken, 新泽西州——为了模拟美国洗衣条件下的洗涤检测,在 20℃ 下用标准洗涤剂,如不含荧光增白剂的液体 AATCC2003 和 / 或粉末 AATCC1993(美国纺织品化学和色彩协会),测量目的突变酶的剂量效率曲线 (DEC)。然后测定相当的 α -淀粉酶的相应 DEC 来比较本发明的突变酶的污渍去除性能。40℃ 下重复该过程。通常,将 4 个 CS-28 稻米淀粉污染 (荷兰 CFT) 的样品置于 Terg-o-tometer 的钢容器中,其中充满了 1 升去离子水和 1.5g 的液体 AATCC。当使用粉末 AATCC 时,用分析天平 (Model PM4800, Mettler Instrument Corp., Highstown, N. J. 08520) 称取 1.5g 该洗涤剂粉末,然后加入到 Terg-o-tometer。同时重复进行两次检测。除非另外说明,该检测进行 12 分钟,洗涤 3 分钟。洗涤之后,空气干燥该样品,用 Konica Minolta 生产的 Chroma Meter Model CR-410 测定所测试样品的反射比。用适宜的统计分析处理收集的数据。

[0785] 5.12.2 欧洲洗衣条件

[0786] 使用 Launder-O-meter, Atlas 公司制造,乔治亚州亚特兰——为了模拟欧洲洗涤条件下的洗涤测试,在 40℃ 下用标准欧洲测试洗涤剂, IECA 和含漂白剂和过硼酸钠的 IEC A (TAED- 四乙酰基乙二胺乙酸盐),测量目的突变酶的剂量效率曲线 (DEC)。然后测定相当的突变淀粉酶的相应 DEC 曲线来比较本发明的突变酶的污渍去除性能。如果需要,在更高洗涤温度下重复该过程。通常,四个 EMPA 161, 玉米淀粉 (EMPA, 瑞士) 样品置于钢容器中,其中含有 250ml 含有 6.8g/L IEC A 洗涤剂或 8.0g/L 含有漂白剂的 IEC A 洗涤剂的去离子水。同时重复进行两次检测。除非另外说明,该检测进行 45 分钟,洗涤 5 分钟。洗涤之后,空气干燥该样品,用 Chroma Meter Model CR-410 测定所测试样品的反射比。用适宜的统计分析处理收集的数据。

[0787] 5.12.3 评估洗涤剂组合物的微样品方法

[0788] 存在许多种 α -淀粉酶清洁测定法。检测清洁的示例性描述包括如下内容。

[0789] “样品”是一块材料,例如其上施有污渍的织物。该材料可以是例如由棉、聚酯或天然和合成纤维的混合物制成的织物。该样品还可以是纸,例如滤纸或硝化纤维素,或者是一块硬材料,例如陶瓷、金属或玻璃。对于 α -淀粉酶,污渍是基于淀粉的,但是也可以包括血液、乳、墨水、草、茶、酒、菠菜、肉汁、巧克力、蛋、奶酪、粘土、色素、油或这些化合物的混合物。

[0790] “小样品”是自样品上用单孔穿孔装置切下的部分,或者用定制的 96 孔穿孔装置 (该多孔穿孔模式与标准 96 孔微滴定板匹配) 切下的部分,或者是以其它方式自样品上取下的部分。样品可以是纺织品、纸、金属或其他适宜的材料。小样品可以在放入 24 孔、48 孔或 96 孔微滴定板孔之前或之后被污物固着。“小样品”也可以通过向小块材料施加污物

而制成。例如,小样品可以是直径为 5/8"或 0.25"的污染的织物片。定制的穿孔机经设计可以同时将 96 个样品递送至 96 孔板的所有孔中。该装置可以通过简单地向同一 96 孔板多次上样,而向每孔递送一个以上的样品。可以想到将多孔穿孔装置用于向任何格式的板(包括但不限于 24 孔、48 孔和 96 孔板)同时递送样品。另一可想到的方法中,污染的测试平台可以是由金属、塑料、玻璃、陶瓷,或其他适宜材料形成的、被污物底物包覆的珠,其用于测试用于纺织品以外材料的清洁组合物。然后将一个或多个污物包覆的珠放入含有适宜缓冲液和酶的 96 孔、48 孔或 24 孔板的孔中或更大形式的板的孔中。这种情况下,可以通过直接吸光度测量或在二级生色反应后在上清液中检测释放的污物。也可以通过质谱分析来进行释放的污染物的分析。进一步的微筛选测定可以是将样品(例如靛蓝染色的粗斜棉布织物)递送并固定到多孔板的孔中,并加入颗粒,例如沙子或者更大的颗粒,例如筛成包括 6-8 或 9 号规格的石粒,并振荡该多孔板,以使样品被加入的颗粒形成磨损。该测定可用于在石洗应用中的纤维素酶的评价中。酶的有效性可以通过颜色释放到反应缓冲液中(例如释放的靛蓝溶解于二甲基亚砷中,测量 A_{600} 的吸光度)或磨损样品的反射比测定来判定。

[0791] 当例如未处理的 BMI(血液/牛奶/墨水)样品在没有漂白剂的洗涤剂中洗涤时,大比例的墨水即使没有蛋白酶的帮助也会释放。加入蛋白酶导致墨水释放的小量增加,这种增加在大背景下难以定量。本发明的一方面提供了使人可以控制污渍的固着程度的处理方案。结果是,可以产生例如当不存在被检测的酶的情况下进行洗涤时能释放出不等量的污渍的样品。固着的样品使用导致在洗涤试验中信噪比的显著提高。此外,通过改变固着程度,可以产生在不同清洁条件下给出最佳结果的污渍。

[0792] 在多种材料类型上具有已知“强度”的污渍的样品是市售可得的(EMPA, St.Gallen, Switzerland;wfk—Testgewebe GmbH, KrefeldGermany;或 Center for Test Materials, Vlaardingen, The Netherlands)和/或可以由从业者制得(Morris 和 Prato, Textile Research Journal 52(4):280286(1982))。其他检测样品包括但不限于含棉织物上的血液/牛奶/墨水(BMI)污渍,含棉织物上的菠菜污渍,或含棉织物上的草渍,和含棉织物上的巧克力/牛奶/烟灰。

[0793] 可以用 0.0003%至 0.3%的过氧化氢将 BMI 污渍固着在棉上。其他组合包括用 0.001%–1%戊二醛固着的草渍或菠菜渍、用 0.001%–1%戊二醛固着的明胶和考马斯亮兰染料、或用 0.001%–1%戊二醛固着的巧克力、牛奶和烟灰。

[0794] 也可以在用酶和/或洗涤剂制剂孵育期间搅拌样品。洗涤性能数据取决于孔中,尤其是在 96 孔板中的样品的取向(水平对垂直)。这表明在孵育期间混合是不充分的。尽管存在许多方式来保证孵育期间充分的搅拌,但可以构建将微滴定板夹在两个铝板之间的板夹。这可以简单地例如在孔上方放置粘性板密封物,然后用任何类型的适合的、市售可得的夹子将两个铝板与 96 孔板夹紧而实现。然后可以将它放到商品化的孵育摇床中。将摇床设定为约 400 转/分钟可以导致非常有效的混合,而板夹有效地阻止了泄漏或交叉污染。

[0795] 可以使用三硝基苯磺酸(TNBS)来量化洗液中的氨基浓度。这可以用作从样品中去除的蛋白质量的量度(参见例如 Cayot 和 Tainturier, Anal. Biochem. 249:184-200(1997))。然而,如果洗涤剂或酶样品导致异乎寻常的小肽片段的形成(例如,因样品中存在肽酶所致),那么人们将获得较大的 TNBS 信号,即更多“噪音”。

[0796] 另一种测定对血液/牛奶/墨水或其他污渍的洗涤性能的方式基于墨水的释放。

样品上蛋白质的蛋白水解导致墨水颗粒的释放,能够通过测量洗液的吸光度来定量。可以在 350 和 800nm 之间的任何波长测量吸光度。测量波长为 410nm 或 620nm。也可以检查洗液以确定对于含有草、菠菜、明胶或考马斯亮兰的污渍的洗涤性能。对于这些污渍,示例性的波长包括对于菠菜污渍或草污渍的 670nm 和对于明胶污渍或考马斯亮兰污渍的 620nm。例如,移出等份试样的洗液(例如,通常来自 96 孔微板的 100–150 μ L)并放到小杯或微孔板中。然后将它放到分光光度计中并在适当的波长读取吸光度。

[0797] 也可以使用该体系,例如通过使用在诸如布、塑料或陶瓷的适宜底物上的血液/乳/墨水污渍,来测定用于餐具洗涤的强化的酶和/或洗涤剂组合物。

[0798] 一方面,通过在 25°C 将 0.3% 过氧化氢施用于 BMI/棉样品 30 分钟,或通过 60°C 将 0.03% 过氧化氢施用于 BMI/棉样品 30 分钟来将 BMI 污渍固定于棉上。从上述 BMI/棉样品切下大约 0.25" 的较小的样品,置于 96 孔微滴定板的孔中。向各孔中放入已知的洗涤剂组合物和酶如变体蛋白质的混合物。向微滴定板顶部放置粘性板密封物后,将微滴定板与铝板夹在一起,并在定轨摇床上以约 250 转/分钟搅拌约 10–60 分钟。这个时间结束后,将上清液转移到新的微滴定板的孔中并测量 620nm 的墨水吸光度。相似地,可以通过在 25°C 对菠菜/棉样品或草/棉样品施用 0.01% 戊二醛 30 分钟来用固着于棉的菠菜污渍或草污渍检测。同样也可以用巧克力、牛奶和/或烟灰污渍来检测。其他血液/牛奶/墨水检测和条件记载于美国专利 7,122,334 中 (Danisco US Inc., Genencor Division)。

[0799] 5.13 LAS 敏感度测定

[0800] 在 40°C 下将变体与不同浓度的 LAS(线性烷基苯磺酸酯;Nansa 1169/P) 孵育 10 分钟。

[0801] 用 **Phadebas®** 测量法或使用 PNP-G₇ 底物的其他方法测定残余活性。

[0802] 在 0.1M, pH7.5 的磷酸盐缓冲液中稀释 LAS。

[0803] 使用下列浓度:500ppm、250ppm、100ppm、50ppm、25ppm 和 10ppm 或无 LAS。

[0804] 在总体积 10ml 中,在不同的 LAS 缓冲液中将变体稀释至 0.01–5mg/l 的浓度,并在温控水浴中孵育 10 分钟。通过转移小等分试样至冷检测缓冲液中来停止孵育。重要的是,在活性测量期间,LAS 浓度低于 1ppm,以免影响该活性测量。

[0805] 然后用上述 **Phadebas®** 测量法或其他方法,测定残余活性,对每样品一式两份测定。

[0806] 减去空白后测定活性。

[0807] 无 LAS 的活性为 100%。

[0808] 为了进一步说明本发明的实施方式及其优势,给出了下列具体实施例。应理解的是,这些实施例仅仅是为了进一步说明本发明而提供,而不应理解为以任何方式对权利要求的限制。

实施例

[0809] 在下面的公开和实验部分中,使用了下列缩写:wt% (重量百分比);°C (摄氏度);H₂O (水);dH₂O 或 DI (去离子水);dIH₂O (去离子水, Milli-Q 过滤);g 或 gm (克); μ g (微克);mg (毫克);kg (千克); μ l 和 μ L (微升);mL 和 ml (毫升);mm (毫米); μ m (微米);M (摩尔每升);mM (毫摩尔每升); μ M (微摩尔每升);U (单位);MW (分子量);

sec(秒);min(s)(分钟);hr(s)(小时);DO(溶解氧);W/V(重量体积比);W/W(重量比);V/V(体积比);Genencor(Danisco US Inc,Genencor 部,加利福尼亚州帕洛阿尔托);Ncm(牛顿厘米)和 ETOH(乙醇);eq(等价物);N(正常的(normal));ds 或 DS(干固体含量)。

[0810] 实施例 1

[0811] AmyTS23 在枯草芽孢杆菌中的表达

[0812] 为了检测 AmyTS23 全长的表达,如图 3 所示的合成 DNA 序列(德国雷根斯堡 Genart 制备)克隆到 pHPLT 载体(参见例如 W02005111203 和 Solingen 等人(2001) Extremophiles 5:333-341)中 LAT(地衣芽孢杆菌 淀粉酶)启动子之后,并以与编码 LAT 信号肽属于相同读码框的方式融合(图 5),并转化到 9 个蛋白酶删除的枯草芽孢杆菌菌株(degU^{tr}32, oppA, Δ spoII3501, amyE::xylRPxylAcomK-ermC, Δ aprE, Δ nprE, Δ epr, Δ ispA, Δ bpr, Δ vpr, Δ wprA, Δ mpr-ybfJ, Δ nprB)(参见 US20050202535A1)中。新霉素(10 μg/ml)抗性转化物分泌 AmyTS23 淀粉酶,这可以通过淀粉板上碘染色后晕斑形成来判断,参见 W02005111203。选择这些淀粉酶阳性的转化物中的一个,命名为 BG6006(pHPLT-AmyTS23)。通常让该菌株的培养物在下列培养基(每升)中于 37 度,250rpm 下生长 60-72 小时:10g 大豆蛋白胨(Soytone),75g 葡萄糖,7.2g 尿素,40mM MOPS,4mM Tricine,3mM 磷酸氢二钾,21.4mMKOH,50mM NaCl,276 μM 硫酸钾,528 μM 氯化镁,50 μM 二水柠檬酸钠,100 μM 二水氯化钙,14 μM 七水硫酸亚铁,5.9 μM 二水硫酸锰,5.7 μM 一水硫酸锌,2.9 μM 二水氯化铜,4.2 μM 六水氯化钴,4.5 μM 二水钼酸钠。对于 1 升体积的培养基,除了大豆蛋白胨之外的所有成分在 500mL 中混合,过滤除菌,然后加入到已经高压灭菌的等部分的 2× 大豆蛋白胨中。痕量金属和柠檬酸盐可以制成 100× 或 1000× 的储存液。缓冲液,氢氧化钾,氯化钠,硫酸钾,氯化镁和痕量金属可以制备成 10× 储存液。混合所有成分后,将 pH 值调至 7.3。该培养液在使用前补充以 20mM 的氯化钙。

[0813] 培养物以两种主要形式表达淀粉酶。在 10% SDS-PAGE 凝胶中观察到高分子量形式在 66kDa 分子量标准处。55kDa 处观察到小分子量形式。

[0814] 用如下方法从培养基中分离高分子量成分:用 10mL 固定体积的 β-环糊精-琼脂糖亲和基质树脂处理 500mL 该培养基(该亲和树脂用标准方案从 β-环糊精(Sigma Aldrich Cat.No.c4767)和环氧活化的琼脂糖-6B(GEHealthcare, N. J. Cat. No. 17-0480-01)合成),温和搅拌下 4℃过夜,收集树脂,用含有 2mM 氯化钙(CaCl₂)的 25mM 双-Tris 丙烷缓冲液(pH8.5)洗涤。用补充有 50mM β-环糊精的同样的缓冲液洗涤该树脂来洗脱该高分子量酶。用 SDS-PAGE 分析各级分,收集含有酶的级分,并透析去除 β-环糊精。以 OxA 淀粉酶(Genencor)作为蛋白质标准,用凝胶光密度法估计酶蛋白浓度。

[0815] 实施例 2

[0816] AmyTS23t 在枯草芽孢杆菌中的表达

[0817] 为了检测遗传平截的 AmyTS23(AmyTS23t)的表达,如实施例 1 所述将图 4 所示的合成 DNA 克隆到 pHPLT 中,并转化到的 9 种蛋白酶删除的枯草芽孢杆菌菌株中。新霉素抗性转化物分泌 AmyTS23t 淀粉酶,这可以通过淀粉板上碘染色后晕斑形成来判断。选择这些淀粉酶阳性的转化物中的一个,命名为 BG6006(pME622.1)。如实施例 1 所述培养该菌株,以生产 AmyTS23t 淀粉酶。用 SDS-PAGE 检测培养上清,结果表明产生了预期的分子量为 55kDa

的产物。

[0818] 向 500mL 培养物中加入 NH_4SO_4 至终浓度为 1M, 以部分纯化淀粉酶蛋白质。然后, 加入 10mL 固定体积的苯-琼脂糖树脂, 4℃ 下温和搅拌所得混合物过夜。收集树脂, 并用含有 1M NH_4SO_4 和 2mM 氯化钙 (CaCl_2) 的 25mM 双 Tris 丙烷缓冲液 (pH8.5) 洗涤。用不含 NH_4SO_4 的相同缓冲液洗脱酶活性。用 SDS-PAGE 分析各级分, 收集含有酶的级分, 并透析去除残余的 NH_4SO_4 。以 OxA 淀粉酶 (Genencor) 作为蛋白质标准, 用凝胶光密度法估计酶蛋白浓度。

[0819] 实施例 3

[0820] AmyTS23 在清洁筛选测定中

[0821] 在 96 孔 CS28 橙色染色的稻米淀粉弄脏的织物样品微应用清洁实验中分析部分纯化的实施例 1 所述全长 AmyTS23 (SEQ ID NO :1)。为进行该实验, 向 96 孔板中装入从在室温水预洗 1 小时并空气干燥的织物上切下的 % 英寸大小的织物样品。该洗涤去除了大量松散结合的污渍。可选地, 这些样品在装入板中后也经过预洗涤。两种方法产生了相似的结果。向板的孔中加入选择的缓冲液, 该板温度平衡至优选的温度。在本实施例中, 在 25mM HEPES (pH8.0) 和 25mM CAPS (pH10.3) 缓冲液中进行该实验, 在 40℃ 下孵育。该温度平衡阶段之后, 加入酶至所需浓度, 继续孵育 30 分钟至 1 小时。通过酶量依赖的颜色向溶液的释放来判断酶的性能。在 488nm 定量分光光度计测量颜色的释放。对于该实验另外的信息, 参见美国专利 7, 122, 334。全长、成熟的酶在 pH8.0 下表现出高效的污渍去除性能, 但是在 pH10.3 也能表现出惊人的污渍去除效果。此实验中该酶的清洁数据示于图 6 (20℃) 和图 7 (40℃) 中。该样品实验可以以几种方式修改以适应不同目的。该 96 孔实验非常适用于在酶与样品孵育之后通过分光光度计法测量吸光度的高通量清洁实验, 而例如用切至适合 24 孔板的样品可用于洗涤较大的样品, 其反射比可以本领域公知的技术测量。上清吸光度和样品反射比这两种测量表现出几乎完全的相关性。

[0822] 洗涤的样品的反射比与上清吸光度的相关性非常高, 其决定系数 r^2 为 0.99。该实验原则上可以规模放大至 384 孔板。该实验可以用任何弄脏的样品进行, 并且, 除了 CS28 样品, 也可以检测 CS26、CS27 和 CS29 样品 (例如分别为玉米淀粉、马铃薯淀粉、木薯淀粉, Testfabrics, Inc., WestPittiston, PA) 来说明如实施例 3 中所述的测量的有效性。该实验也可用于洗涤剂组合物, 并在不同的温度和不同的 pH 值下进行。这些实验改编自美国专利 7, 122, 334, 其整体合并于此。

[0823] 实施例 4

[0824] AmyTS23t 的清洁筛选测定

[0825] 如实施例 3 所述, 在 96 孔 CS28 橙色染色、稻米淀粉弄脏的织物样品微应用清洁实验中分析部分纯化的实施例 2 所述平截的 AmyTS23 (AmyTS23t)。此实验中该酶的清洁数据示于图 8 (20℃) 和图 9 (40℃) 中。数据表明 AmyTS23t 在 pH8.0 和 10.3 表现出比对照淀粉酶 (OxA, 可自 Genencor 商购的淀粉酶) 更优的性能。图 6 和 8 的比较清楚地表明, 平截的 AmyTS23 (SEQ ID NO :2) 在 20℃ 比 AmyTS23 全长成熟分子 (SEQ ID NO :1) 具有更优的性能。

[0826] 实施例 5

[0827] AmyTS23 变体在枯草芽孢杆菌中的表达

[0828] 在该实施例中,说明了表达 AmyTS23t 变体的枯草芽孢杆菌菌株的构建。含有密码子优化的 AmyTS23 基因的合成的 DNA 片段 056426 (GeneartGmbH 生产, Josef-Engert-strasse 11, D-93053 Regensburg, Germany) 用作模板 DNA (图 3)。包含地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶 (LAT) 启动子和用于克隆的 PstI 和 HpaI 限制性酶切位点之前的 LAT 信号肽 (preLAT) 的 pHPLT 载体 (Solingen 等人, Extremophiles 5:333-341, 2001) 用于 AmyTS23t 变体的表达。

[0829] 用如下 DNA 引物通过 PCR 制备三个 DNA 片段:

[0830] 1. 具有 180 位密码子 CGG 和 181 位密码子 AGC 删除的 AmyTS23t (AmyTS23t Δ RS);

[0831] 2. 具有 201 位密码子 ATG 被 CTG 取代的 AmyTS23t (AmyTS23t (M201L));

[0832] 3. 具有 201 位密码子 ATG 被 CTG 取代,而且 180 位密码子 CGG 和 181 位密码子 AGC 删除的 AmyTS23t (AmyTS23t (M201L+ Δ RS))

[0833]

引物名称	DNA 序列
pHPLT-PstI-FW SEQ ID NO: 8	5'-CTCATTCTGCAGCTTCAGCAAATACGGCG
pHPLT-HpaI-RV SEQ ID NO: 9	5'-CTCTGTAACTCATTTGGCGACCCAGATTGAAACG
TS-delRS-FW SEQ ID NO: 10	5'-CTATAAATTTACGGGGCAAAGCATGGGATTGG
TS-delRS-RV SEQ ID NO: 11	5'-TGCTTTGCCCGTAAATTTATAGATCCGGTTCAG
TS-M201L-FW SEQ ID NO: 12	5'-CTATGACTATCTGCTGTTTGCCGATCTG

[0834]

TS-M201L-RV SEQ ID NO: 13	5'-CAGATCGGCAAACAGCAGATAGTCATAG
TS-delRS/M201L-FW SEQ ID NO: 14	5'-GCATGGGATTGGGAAGTCGATACGGAAA ACGGCAACTATGACTATCTGCTGTTTGCCG
TS-delRS/M201L-RV SEQ ID NO: 15	5'-CGTATCGACTTCCCAATCCCATGCTTTGC CCGTAAATTTATAGATCCGGTTC

[0835] 这些 DNA 引物用 Sigma (Sigma-Aldrich Chemie B.V., Postbus 27, 3330AA Zwijndrecht, The Netherlands) 合成和脱盐。

[0836] 对下述所有 PCR 反应,使用终浓度 0.2 μ M 的 DNA 引物 (正向引物和反向引物),和

0.1-10ng 的 DNA 模板 (DNA 片段 056426 或 pDNA pHPLT)。此外,所有的 PCR 反应在 50 μ L 体积中完成,使用 Finnzymes(FinnzymesOY, Keilaranta 16A, 02150Espoo, Finland) 和 Phusion 高保真 DNA 聚合酶 (Cat. no. F-530L)。同时,所有的 PCR 反应混合物含有 10 μ L 的 5 $\times$ PhusionHF 缓冲液,1 μ L 的 10mM dNTP 混合物,0.75 μ L 的 Phusion DNA 聚合酶 (2 单位/ μ L),1 μ L 的 100% DMSO,和补充至终体积 50 μ L 的高压灭菌去离子水。该 PCR 程序使用 MJ Research PTC-200Peltier 热循环仪 (MJResearch, 590 Lincoln Street, Waltham, MA 02451, USA),在如 Finnzymes(厂商说明书)说明书中所述条件下进行:98 $^{\circ}$ C 持续 30 秒,30 个循环 (98 $^{\circ}$ C 持续 10 秒,55 $^{\circ}$ C 持续 20 秒,72 $^{\circ}$ C 每 kb 持续 22 秒),72 $^{\circ}$ C 持续 5 分钟。

[0837] 1. AmyTS23t Δ RS 变体的产生:进行两个 PCR 反应:在合成 DNA 片段 056426 上用引物 TS-de1RS-FW 和 pHPLT-HpaI-RV;以及在合成 DNA 片段 056426 上用引物 TS-de1RS-RV 和 pHPLT-PstI-FW。为了融合产生的这两个 DNA 片段,将两个 PCR 反应中 1 μ L 未纯化的 PCR 混合物加入到第三个 PCR 反应样本中,其中加入了引物 pHPLT-PstI-FW 和 pHPLT-HpaI-RV。

[0838] 纯化扩增的线性 1.5kb DNA 片段(用 **Qiagen**[®] Qiaquick PCR 纯化试剂盒,货号 28106),并用 PstI 和 HpaI 限制性内切酶消化。随后,将 AmyTS23t Δ RS(此处也称为 AmyTS23t Δ RS)DNA 片段和 pHPLT pDNA (50ng/ μ l 范围,并用 PstI 和 HpaI 酶切过)纯化(用 **Qiagen**[®] Qiaquick PCR 纯化试剂盒,货号 28106),然后在 PstI 和 HpaI 消化。反应条件是:

[0839] 4 μ L 纯化的、PstI 和 HpaI 消化的 AmyTS23t Δ RS DNA 片段;2 μ L 纯化的、PstI 和 HpaI 消化的 pHPLT DNA 片段;8 μ L T4DNA 连接酶缓冲液(**Invitrogen**[®] 货号 46300-018);25 μ L 灭菌的蒸馏水和 1 μ L T4DNA 连接酶 1 单位/ μ L(**Invitrogen**[®] 货号 15224-017)。在 20 $^{\circ}$ C 进行连接反应 16-20 小时。

[0840] 然后,将连接混合物转化到枯草芽孢杆菌菌株 (Δ aprE, Δ nprE, Δ epr, Δ ispA, Δ bpr) 和 (degU^{hy}32, oppA, Δ spoIIE3501, amyE::xylRPxylAcomK-ermC, (Δ vpr, Δ wprA, Δ mpr-ybfJ, Δ nprB) 中。向枯草芽孢杆菌中的转化如 WO 02/14490 中所述。在含有 Heart infusion 琼脂 (Difco, 货号 244400) 和 10mg/L 新霉素的琼脂平板上选择该枯草芽孢杆菌转化体。带有 pHPLT-AmyTS23t Δ RS 载体的枯草芽孢杆菌转化体的选择性生长如实施例 1 所述在摇瓶中进行。产生具有淀粉水解活性的分泌的 AmyTS23t Δ RS 淀粉酶,其水解活性可以通过在淀粉琼脂平板上加样培养上清然后碘染色来可视化。

[0841] 2. AmyTS23t (M201L) 的产生除了前两个 PCR 反应之外,与“AmyTS23t Δ RS 的产生”进行同样的实验方案:

[0842] 进行两个 PCR 反应:在合成 DNA 模板 056426 上用引物 TS-M201L-FW 和 pHPLT-HpaI-RV 进行 PCR;和在合成 DNA 模板 056426 上用引物 TS-M201L-RV 和 pHPLT-PstI-FW 进行 PCR。

[0843] 3. AmyTS23t (M201L)-RS 删除的产生:除了前两个 PCR 反应之外,与“AmyTS23t Δ RS 的产生”进行同样的实验方案:

[0844] 进行两个 PCR 反应:在合成 DNA 模板 056426 上用引物 TS-de1RS/M201L-FW 和 pHPLT-HpaI-RV 进行 PCR;和在合成 DNA 模板 056426 上用引物 TS-de1RS/M201L-RV 和 pHPLT-PstI-FW 进行 PCR。

[0845] 实施例 6

[0846] AmyTS23tARS 在洗涤剂中改善的稳定性

[0847] 在增加的稳定性检测中,在 37℃ 下分别在 MOPS 缓冲液、热灭活的汰渍(宝洁公司)和原型洗涤剂(原型制剂 A)中检测 AmyTS23t 和 AmyTS23t Δ RS 的稳定性。结果示于图 12。在两种洗涤剂基础中一种(只有灭活的汰渍或只有原型 A 洗涤剂)存在下,不需任何附加添加剂 AmyTS23t Δ RS 保持稳定(图 10)。如图 12 所示,AmyTS23t 在 37℃ 增加的稳定性检测第一天之后损失了大部分的活性,两天后损失了所有活性。在同样条件下,AmyTS23t Δ RS 是稳定的,而且 17 天之后保持了大约 90% 的原始酶活性。表中“STZ”指 STAINZYME。

[0848] 表 6-1

[0849]

处理	残余酶活性百分比					
	第 0 天	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 7 天	第 17 天
灭活的汰渍 (Tide) + AmyTS23tΔRS	100	106	89.5	94.8	87.5	88.9
灭活的汰渍 + AmyTS23t	100	0				
灭活的汰渍+ STZ	100	100	99.1	100	96.5	88.3
原型制剂 A + AmyTS23tΔRS	100	86.9	86.6	82.8	79.0	79.3
原型制剂 A + AmyTS23t	100	0				
原型制剂 A + STZ	100	86.5	88.7	86.5	77.7	78.2

[0850] 原型 A 洗涤剂包含下列成分：

成分	供应商	DW-AA
[0852] 去离子水 (1)		46.4 份
[0853] 硼砂 (2)		1.6
[0854] 硼酸		1.0
[0855] 丙二醇		10.0
[0856] 乙醇, 70% (3)		7.0
成分	供应商	DW-AA
[0858] Hetoxol LA7 (4)	Global Seven	6.72
[0859] Hetoxol LA4 (4)	Global Seven	1.28
[0860] Nacconol 90G	Stepan	10.0
[0861] Steol CS370	Stepan	6.0
[0862] 总量		90.0 份

[0863] 这些实施例中也可使用其他液体制剂,例如下文所列：

[0864] 优质 HDL：

[0865] Bio-Soft S-101	线性烷基苯磺酸
[0866] Steol CS-330	聚氧乙烯烷基硫酸钠 (sodium laureth sulfate)

- [0867] Bio-soft N25-7 带有 7 摩尔 EO 的线性烷基乙氧基化物
 [0868] Staphanate SXS 二甲苯磺酸钠
 [0869] 超液体洗涤剂：
 [0870] Tinopal CBS-X 荧光增白剂
 [0871] Alpha-step MC-48 α - 磺甲基酯钠 (sulfomethylester)
 [0872] Makon TD-6 三癸醇乙氧基化物 (Tridecylalcohollethoxylate)
 [0873] 优质强效液体 - 含有 LAS/AES/AE- 无 NPE (成分含量以重量百分比计)：
 [0874]

BIO-SOFT® S101 6.43

- [0875] NaOH, 50% 溶液 1.70
 [0876]

STEOL® CS-330 23.81

[0877]

BIO-SOFT® N25-7 6.67

[0878]

STEPHANATE® SXS 7.50

- [0879] 碳酸钠 2.00
 [0880] 氯化钠 0.50
 [0881] 水、香料、染料和防腐剂 补齐至 100.00
 [0882] 混合水、NaOH 和 **STEPHANATE® SXS**。缓慢加入 **BIO-SOFT® S101**。如果需要，加 NaOH 调节 pH。继续混合，并加入碳酸钠。当碳酸钠溶解时，加入 **STEOL® CS-330**。加入 **BIO-SOFT® N25-7**。如果需要，轻微加热以完全溶解 **BIO-SOFT® N25-7**。加入剩下的成分。继续搅拌直至共混物完全混合。

- [0883] 超级液体衣物洗涤剂 (Stepan 的 No. 465) (成分含量以重量百分比计)：
 [0884] 水 54.7
 [0885] 氢氧化钠 (50%) 2.7
 [0886]

BIO-SOFT® S101 10.0

- [0887] Tinopal CBS-X (Ciba Geigy) 0.2
 [0888]

ALPHA-STEP® MC-48 21.0

[0889]

MAKON® 10 11.4

- [0890] 柠檬酸 (25%) 适量
 [0891] 防腐剂、染料和香料 适量
 [0892] 总量 100.0
 [0893] 容器中装入水和氢氧化钠。混合下，加入 **BIO-SOFT® S101**。如果需要，用氢氧化钠和柠檬酸调节 pH 至约 8.5。加入 Tinopal CBS-X (一种荧光增白剂) 并溶解。依次加入 **ALPHA-STEP® MC-48** 和 **MAKON® 10**。混合直至清澈均一。调节 pH 至

8.0-9.0。根据需要加入防腐剂、染料和香料。

[0894] 实施例 7

[0895] AmyTS23 和 AmyTS23 突变体的氧化稳定性

[0896] 当暴露于过乙酸 (PAA) 时淀粉酶会改变。因此,本实施例用来测定 AmyTS23 和 AmyTS23 突变淀粉酶的氧化稳定性。

[0897] 通过在 1mL 旋转脱盐柱 (用 BioRad 的 BioRad P-6residn 填充 VWR 的结核菌素注射器来制备) 上缓冲液交换来在 25mM 硼酸盐缓冲液, pH8.64, 2mM Ca^{+2} 中制备酶稀释液。5 μL 体积的过乙酸加入到 25 μL 酶溶液中得到 0-1mM 过乙酸。样品在 PCR 仪 (DNA Engine, BioRad) 中 40°C 孵育 5 分钟。用 25mM BTP, pH8.5 停止反应。用购自 Megazyme (Wicklow, Ireland) 的标准淀粉酶检测试剂盒测定残余淀粉酶活性。

[0898] TS23t (M201L) 在低 PAA 浓度下具有大于 100% 的稳定性, 然后在高 PAA 浓度时下降。TS23t (M201L+ Δ RS) 在低 PAA 浓度下稳定性升高了 25%, 然后在高 PAA 浓度下降至低于 100%, 最后在高 PAA 浓度保持了氧化稳定性。TS23t、TS23t Δ RS 和 Amy 707 在 PAA 存在下不稳定, 其稳定性在低浓度时下降至基线。参见图 12-13。

[0899] 实施例 8

[0900] 洗涤剂中的清洁性能

[0901] 用本发明第 5.12.1 节中所述的方法生成选定浓度 AmyTS23t Δ RS 的剂量有效性曲线。用 Tergotometer 在 20°C 和 40°C 进行性能评价。在相同条件下生成 Stainzyme 和 Stainzyme Plus 的剂量有效性曲线。由数据可知 (图 14), AmyTS23t Δ RS 在 20°C 下显著优于两种 Stainzyme 产物, 在 40°C 中度优于两种 Stainzyme 产物。该数据表明了 AmyTS23t Δ RS 作为独特的高性能冷水酶的独特益处。

[0902] 实施例 9

[0903] 枯草芽孢杆菌中的淀粉酶生产

[0904] 在该实施例中, 说明了杆菌物种 TS-23t 及其变体在枯草芽孢杆菌中的产生。用本领域已知的方法进行转化 (参见例如 WO 02/14490)。简单地说, 编码亲本淀粉酶的基因克隆到 pHPLT 表达载体中, 该载体中含有 LAT 启动子 (PLAT), 编码 LAT 信号肽的序列 (preLAT), 然后是用于克隆的 PstI 和 HpaI 限制性内切酶位点。

[0905] LAT 信号肽的编码区如下所示:

[0906] atgaaacaacaaaaacggctttacgcccgattgctgacgctgttatttgcgctcatcttcttgctgcctcattctgcagcttcagca (SEQ ID NO:16).

[0907] LAT 信号肽的氨基酸序列如下所示:

[0908] MKQQKRLYARLLTLLFALIFLLPHSAASA (SEQ ID NO:17).

[0909] 成熟 AmyTS-23t 淀粉酶的编码区如图 4 所示。

[0910] 用作制备本文所述变体库的基础的成熟 AmyTS-23t 淀粉酶的氨基酸序列示于图 2 中 (SEQ ID NO:2)。

[0911] 用 Qiagen 的 Qiaquick 柱纯化 PCR 产物, 然后重悬于 50 μL 去离子水中。用 HpaI (Roche) 和 PstI (Roche) 消化 50 μL 纯化的 DNA, 得到的 DNA 重悬于 30 μL 去离子水中。用 PstI 和 HpaI 克隆位点将 10-20ng/ μL 的 DNA 克隆到质粒 pHPLT 中。连接混合物直接转化到感受态枯草芽孢杆菌细胞 (基因型: Δ vpr, Δ wprA, Δ mpr-ybfJ, Δ nprB) 中。该枯草

芽孢杆菌细胞具有感受性基因（即 comK），其位于木糖诱导的启动子的下游，因此，木糖用于诱导 DNA 结合和摄取的感受性（参见 Hahn 等人，Mol. Microbiol.，21：763-775，1996）。

[0912] 质粒 pHPLT-AmyS 的元件包括：pUB110 = 来自质粒 pUB110 的 DNA 片段（McKenzie 等人，Plasmid 15：93-103，1986）。质粒特征包括：ori-pUB110 = pUB110 的复制起点；neo = pUB110 的新霉素抗性基因；Plat = 来自地衣芽孢杆菌的淀粉酶的转录启动子；Pre-LAT = 来自地衣芽孢杆菌的淀粉酶的信号肽；SAMY 425ss = 平截 Amy TS-23 基因序列的编码区（用本研究中表达的各个平截 Amy TS-23 变体编码区取代）；和终止子 = 来自地衣芽孢杆菌的淀粉酶的转录终止子。

[0913] 淀粉酶表达——2mL 规模。含有 AmyTS23t 表达载体的枯草芽孢杆菌克隆用 96 孔钢复制器复制，从甘油储存液转移至 96 孔培养板（BD，353075）（含有 150 μ L 的 LB 培养基和 10 μ g/mL 新霉素）中，在湿盒中，37 $^{\circ}$ C，220rpm 生长过夜。从过夜培养物中取 100 μ L 等分试样，用于接种 5mL 塑料培养管中的 2000 μ L 含 10 μ g/mL 新霉素的确定成分培养基。培养基是基于 MOPS 缓冲液的强化的半确定成分培养基，含有尿素作为主要氮源，葡萄糖作为主要碳源，并补充有 1% 大豆蛋白胨和 5mM 钙用于强壮细胞生长。37 $^{\circ}$ C，250rpm 下孵育培养管 72 小时。孵育之后，3000 $\times$ g，10 分钟离心培养液。上清液移入 15mL 聚丙烯圆锥管中，各个样品取 80 μ L 加入 96 孔板中用于蛋白质定量。

[0914] 杆菌物种 AmyTS23t 组合电荷库（Combinatorial Charge Library）的生成。从存在的库中选择具有感兴趣的多种物理性质的多个蛋白质变体，或通过本领域已知的定点诱变技术产生这些蛋白质变体（参见例如美国专利申请序列号 10/576,331、11/581,102 和 11/583,334）。然后在目的检测中检验这一套探测蛋白质。

[0915] AmyTS23t (SEQ ID NO:2) 是杆菌属 TS-23 α -淀粉酶的平截形式（参见 Lin 等人，1998，Production and properties of a raw-starch-degrading amylase from the thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. TS-23, Biotechnol. Appl. Biochem. 28：61-68）。在实施例 1 和 2 中示出了 AmyTS23t 在多种蛋白酶删除的枯草芽孢杆菌菌株（degU^{hy}32, oppA, Δ spoII3501, amyE::xylRPxylAcomK-ermC, Δ aprE, Δ nprE, Δ epr, Δ ispA, Δ bpr, Δ vpr, Δ wprA, Δ mpr-ybfJ, Δ nprB）（参见例如 US2005/0202535A1）中的表达。分离自转化的枯草芽孢杆菌细胞的 AmyTS23t 质粒 DNA 送至 DNA2.0 公司（Menlo Park, CA）用作 CCL 构建的模板。要求 DNA 2.0 通过引入下列 7 个突变至 AmyTS23t 来制备亲本构建体用于 CCL，其因而称为 AmyTS23t-7mut，这 7 个突变是：Q98R, M201L, S243Q, R309A, Q320R, Q359E 和 K444E。变体作为 96 孔板中的甘油储存液提供。然后要求 DNA2.0 公司在表 9-1 中所示的 AmyTS23t-7mut 淀粉酶中的四个位点的每一个处生成位置库。

[0916] 通过识别 AmyTS23t-7mut 中的下列四个残基设计该 AmyTS23t-7mut 组合电荷库：Gln 87, Asn225, Asn272 和 Asn282。通过形成各个位点的三种可能（野生型、精氨酸或天门冬氨酸）的所有组合，形成四位点、81 成员的 CCL。

[0917] 表 9-1. AmyTS23t-7mut CCL 变体

[0918]

变体 #	Q87	N225	N272	N282	Δ 电荷
亲本 1	-	-	-	-	0
2	Q87E	N225E	N272E	N282E	-4
3	Q87E	N225E	N272E	N282R	-2

4	Q87E	N225E	N272E	—	-3
5	Q87E	N225E	N272R	N282E	-2
6	Q87E	N225E	N272R	N282R	0
7	Q87E	N225E	N272R	—	-1
8	Q87E	N225E	—	N282E	-3
9	Q87E	N225E	—	N282R	-1
10	Q87E	N225E	—	—	-2
11	Q87E	N225R	N272E	N282E	-2
12	Q87E	N225R	N272E	N282R	0
13	Q87E	N225R	N272E	—	-1
14	Q87E	N225R	N272R	N282E	0
15	Q87E	N225R	N272R	N282R	+2
16	Q87E	N225R	N272R	—	+1
17	Q87E	N225R	—	N282E	-1
18	Q87E	N225R	—	N282R	+1
19	Q87E	N225R	—	—	0
20	Q87E	—	N272E	N282E	-3
21	Q87E	—	N272E	N282R	-1
22	Q87E	—	N272E	—	-2
23	Q87E	—	N272R	N282E	-1
24	Q87E	—	N272R	N282R	+1
25	Q87E	—	N272R	—	0
26	Q87E	—	—	N282E	-2
27	Q87E	—	—	N282R	0
28	Q87E	—	—	—	-1
29	Q87R	N225E	N272E	N282E	-2
30	Q87R	N225E	N272E	N282R	0
31	Q87R	N225E	N272E	—	-1
32	Q87R	N225E	N272R	N282E	0
33	Q87R	N225E	N272R	N282R	+2
34	Q87R	N225E	N272R	—	+1
35	Q87R	N225E	—	N282E	-1
36	Q87R	N225E	—	N282R	+1
37	Q87R	N225E	—	—	0
38	Q87R	N225R	N272E	N282E	0
39	Q87R	N225R	N272E	N282R	+2
40	Q87R	N225R	N272E	—	+1
41	Q87R	N225R	N272R	N282E	+2
42	Q87R	N225R	N272R	N282R	+4
43	Q87R	N225R	N272R	—	+3
44	Q87R	N225R	—	N282E	+1
45	Q87R	N225R	—	N282R	+3
46	Q87R	N225R	—	—	+2
47	Q87R	—	N272E	N282E	-1

[0919]

变体 #	Q87	N225	N272	N282	Δ 电荷
48	Q87R	—	N272E	N282R	+1
49	Q87R	—	N272E	—	0
50	Q87R	—	N272R	N282E	+1
51	Q87R	—	N272R	N282R	+3
52	Q87R	—	N272R	—	+2
53	Q87R	—	—	N282E	0

54	Q87R	-	-	N282R	+2
55	Q87R	-	-	-	+1
56	-	N225E	N272E	N282E	-3
57	-	N225E	N272E	N282R	-1
58	-	N225E	N272E	-	-2
59	-	N225E	N272R	N282E	-1
60	-	N225E	N272R	N282R	+1
61	-	N225E	N272R	-	0
62	-	N225E	-	N282E	-2
63	-	N225E	-	N282R	0
64	-	N225E	-	-	-1
65	-	N225R	N272E	N282E	-1
66	-	N225R	N272E	N282R	+1
67	-	N225R	N272E	-	0
68	-	N225R	N272R	N282E	+1
69	-	N225R	N272R	N282R	+3
70	-	N225R	N272R	-	+2
71	-	N225R	-	N282E	0
72	-	N225R	-	N282R	+2
73	-	N225R	-	-	+1
74	-	-	N272E	N282E	-2
75	-	-	N272E	N282R	0
76	-	-	N272E	-	-1
77	-	-	N272R	N282E	0
78	-	-	N272R	N282R	+2
79	-	-	N272R	-	+1
80	-	-	-	N282E	-1
81	-	-	-	N282R	+1

[0920] 实施例 10

[0921] 性能参数

[0922] 稻米微样片检测。如本文其他部分所述制备测试洗涤剂。使用的仪器包括：New Brunswick Innova 4230 摇床 / 培养箱和 SpectraMAX (340 型) 微滴定板 (MTP) 读数器。MTP 购自 Corning (3641 型)。带有橙色色素的陈化稻米淀粉的样片 (CS-28) 来自检测材料中心 (荷兰 Vlaardingen)。先用水洗涤该织物, 然后切为 0.25 英寸的圆形微样片。96 孔微滴定板的每个孔中放入两个微样片。在 20°C (北美) 或 40°C (西欧) 平衡检测洗涤剂。向包含微样片的 MTP 的各个孔中加入 190 μ L 洗涤剂溶液。向该混合物中加入 10 μ L 稀释的酶溶液。用粘合箔密封 MTP, 将其放置于培养箱中, 在所需测试温度下 (通常 20°C 或 40°C) 750rpm 振荡 1 小时。孵育后, 每孔取 150 μ L 溶液, 转移到新的 MTP 中。用 SpectraMax MTP 读数器在 488nm 对该 MTP 读数, 以定量清洁效果。包括空白对照, 以及含有微样片和洗涤剂但没有酶的对照。

[0923] 热灭活洗涤剂。商品洗涤剂制剂的热灭活用来破坏任何蛋白质成分的酶活性, 而保留其非酶成分的性质。因此, 该方法适应于制备用于检测酶变体的商购洗涤剂。对于北美 (NA) 和西欧 (WE) 的强效液体洗衣 (HDL) 洗涤剂, 通过将预称重的液体洗涤剂 (玻璃瓶中) 在 95°C 水浴中放置 2 小时来进行热灭活。北美 (NA) 和日本 (JPN) 强效颗粒洗衣 (HDG) 洗涤剂的热灭活的孵育时间需要 8 小时, 西欧 (WE) HDG 洗涤剂需要大约 5 小时。热灭活 NA 和 WE 自动餐具洗涤剂 (ADW) 的孵育时间是约 8 小时。洗涤剂购自当地超市。通过在 5 分

钟的洗涤剂溶解中检测未热处理和热处理后的洗涤剂来精确测定灭活的百分比。用 1mg/mL AAPF 的 AAPF 实验检测酶活性（即丙氨酸 - 丙氨酸 - 脯氨酸 - 苯丙氨酸底物）。

[0924] 从热灭活的储存液制备洗涤剂工作液用于检测热灭活洗涤剂中的酶活性。向该洗涤剂溶液中加入适量水硬度（6gpg 或 12gpg）和缓冲剂，以满足所需条件（表 10-1）。涡旋或颠倒试剂瓶来混合该溶液。

[0925]

表 10-1.衣物和餐具洗涤条件							
区域	形式	剂量	洗涤剂*	缓冲剂	gpg	pH	T (°C)
衣物洗涤剂 (强效液体和颗粒)							
NA	HDL	0.78 g/l	P&G TIDE® 2X	5mM HEPES	6	8.0	20
WE	HDL	5.0 g/L	Henkel Persil	5 mM HEPES	12	8.2	40
WE	HDL	8.0 g/L	P&G Ariel	2 mM Na ₂ CO ₃	12	10.5	40
JPN	HDL	0.7 g/L	P&G TIDE®	2 mM Na ₂ CO ₃	6	10.0	20

[0926]

表 10-1.衣物和餐具洗涤条件							
区域	形式	剂量	洗涤剂*	缓冲剂	gpg	pH	T (°C)
衣物洗涤剂 (强效液体和颗粒)							
NA	HDL	1.0 g/L	P&G TIDE®	2 mM Na ₂ CO ₃	6	10.0	20
自动餐具洗涤							
WE	ADW	3.0 g/L	RB Calgonit	2 mM Na ₂ CO ₃	21	10.0	40
NA	ADW	3.0 g/L	P&G Cascade	2 mM Na ₂ CO ₃	9	10.0	40

[0927] * 简写:宝洁公司 (P&G);和 Reckitt Benckiser (RB).

[0928] 酶性能的计算。用空白值（即，在酶不存在的情况在孵育微样片得到的值）校正得到的吸光度。得到的吸光度是水解活性的量度。结果示于表 10-2 和 10-3 中。用如上所述的热灭活洗涤剂估计酶性能。“胜出者”定义为具有大于 1 的性能指数 (PI) 的那些。PI 是突变体残余活性与野生型残余活性的比值。所有的测试变体都具有大于 1 的 PI。

[0929] 表 10-2 :TS23t-7mut CCL-CS-28 稻米微样片胜出者,汰渍 2x

[0930]

变体 #	87	225	272	282	相对电荷	PI
11	Q87E	N225R	N272E	N282E	-2	1.24
12	Q87E	N225R	N272E	N282R	0	1.20
13	Q87E	N225R	N272E		-1	1.16

14	Q87E	N225R	N272R	N282E	0	1.15
17	Q87E	N225R		N282E	-1	1.34
18	Q87E	N225R		N282R	1	1.26
19	Q87E	N225R			0	1.34
20	Q87E		N272E	N282E	-3	1.17
21	Q87E		N272E	N282R	-1	1.34
22	Q87E		N272E		-2	1.13
27	Q87E			N282R	0	1.22
28	Q87E				-1	1.22
29	Q87R	N225E	N272E	N282E	-2	1.44
30	Q87R	N225E	N272E	N282R	0	1.15
31	Q87R	N225E	N272E		-1	1.36
35	Q87R	N225E		N282E	-1	1.15
40	Q87R	N225R	N272E		1	1.27
44	Q87R	N225R		N282E	1	1.38
45	Q87R	N225R		N282R	3	1.21
47	Q87R		N272E	N282E	-1	1.65

[0931]

变体 #	87	225	272	282	相对电荷	PI
48	Q87R		N272E	N282R	1	1.52
49	Q87R		N272E		0	1.28
50	Q87R		N272R	N282E	1	1.10
53	Q87R			N282E	0	1.47
54	Q87R			N282R	2	1.25
55	Q87R				1	1.51
64		N225E			-1	1.15
65		N225R	N272E	N282E	-1	1.26
66		N225R	N272E	N282R	1	1.22
67		N225R	N272E		0	1.19
74			N272E	N282E	-2	1.21
76			N272E		-1	1.13
80				N282E	-1	1.27
81				N282R	1	1.49

[0932] 表 10-3 :TS-23t-7mut CCL CS-28 稻米淀粉微样片胜出者, Persil

[0933]

变体 #	87	225	272	282	相对电荷	PI
4	Q87E	N225E	N272E	0	-3	1.13
6	Q87E	N225E	N272R	N282R	0	1.11
9	Q87E	N225E		N282R	-1	1.20
10	Q87E	N225E		0	-2	1.17
11	Q87E	N225R	N272E	N282E	-2	1.41
13	Q87E	N225R	N272E	0	-1	1.40
14	Q87E	N225R	N272R	N282E	0	1.28
15	Q87E	N225R	N272R	N282R	2	1.13
16	Q87E	N225R	N272R	0	1	1.17
17	Q87E	N225R		N282E	-1	1.51
18	Q87E	N225R		N282R	1	1.47
19	Q87E	N225R		0	0	1.48
20	Q87E		N272E	N282E	-3	1.46
21	Q87E		N272E	N282R	-1	1.40
22	Q87E		N272E	0	-2	1.42

25	Q87E		N272R	0	0	1.18
26	Q87E			N282E	-2	1.54
27	Q87E			N282R	0	1.47
28	Q87E			0	-1	1.40
29	Q87R	N225E	N272E	N282E	-2	1.46
30	Q87R	N225E	N272E	N282R	0	1.59
31	Q87R	N225E	N272E	0	-1	1.14
34	Q87R	N225E	N272R	0	1	1.29
35	Q87R	N225E		N282E	-1	1.47
36	Q87R	N225E		N282R	1	1.62
37	Q87R	N225E		0	0	1.53
38	Q87R	N225R	N272E	N282E	0	1.13
39	Q87R	N225R	N272E	N282R	2	1.13

[0934]

变体 #	87	225	272	282	相对电荷	PI
40	Q87R	N225R	N272E	0	1	1.17
41	Q87R	N225R	N272R	N282E	2	1.31
44	Q87R	N225R		N282E	1	1.26
47	Q87R		N272E	N282E	-1	1.45
48	Q87R		N272E	N282R	1	1.50
49	Q87R		N272E	0	0	1.17
50	Q87R		N272R	N282E	1	1.16
53	Q87R			N282E	0	1.21
54	Q87R			N282R	2	1.30
55	Q87R			0	1	1.33
56		N225E	N272E	N282E	-3	1.29
57		N225E	N272E	N282R	-1	1.12
58		N225E	N272E	0	-2	1.41
59		N225E	N272R	N282E	-1	1.16
61		N225E	N272R	0	0	1.20
66		N225R	N272E	N282R	1	1.27
67		N225R	N272E	0	0	1.34
71		N225R		N282E	0	1.17
73		N225R		0	1	1.12
74			N272E	N282E	-2	1.29
75			N272E	N282R	0	1.24
76			N272E	0	-1	1.20
78			N272R	N282R	2	1.18
79			N272R	0	1	1.11
80				N282E	-1	1.11
81				N282R	1	1.33

[0935] 实施例 11

[0936] 组合的 LAS/ 螯合剂稳定性

[0937] 本实施例描述了在含有阴离子表面活性剂和螯合剂的反应介质中测定蛋白质电荷与稳定性的关系。将待测淀粉酶在 0.1% LAS(十二烷基苯磺酸钠)和 10mM EDTA 存在下孵育,通过如上所述的 BODIPY 方法测量残余活性来测量 LAS 稳定性。使用 BODIPY- 淀粉实验来测定加压和未加压(stressed and unstressed)样品的 α -淀粉酶活性。加压板的残余 LAS 和 EDTA 不影响 BODIPY- 淀粉实验。

[0938] 使用的试剂包括:对照缓冲液(50mM HEPES, 0.005% Tween-80, pH8.0)和加压

缓冲液 (50mM HEPES, 0.1% (w/v) LAS (十二烷基苯磺酸钠盐, Sigma D-2525), 10mM EDTA, pH8.0)。将酶变体 (20ppm) 以 1 : 20 稀释入含有对照缓冲液或加压缓冲液的 96 孔未结合平底板中, 并混合。对照板在室温孵育, 而加压板则立即放置到 37℃, 30-60 分钟 (取决于待测酶的稳定性)。孵育之后, 以用于淀粉酶的 BODIPY- 淀粉实验测定酶活性。残余或剩余活性的分数等于加压样品的反应速率除以对照样品的反应速率。在对照缓冲液中亲本酶和变体都能够稳定 60 分钟。

[0939] 表 11-1 列出了具有增强的 LAS/EDTA 稳定性的变体的数据, 对于含有 80 个变体的库来说, 这些数据是相对于野生型 TS-23t-7mut 的净电荷改变的函数。根据实施例 2 所述的方法设计和构建这个库, 以涵盖相对于亲本 TS-23t-7mut 分子的几个净电荷。性能指数 (PI) 大于 1 说明变体在这种淀粉底物 (即玉蜀黍淀粉) 上比 S242Q 亲本具有更高的比活性。所有测试变体都具有大于 1.0 的 PI, 有几个变体具有大于 2.0 的 PI。

[0940] 表 11-1 : TS23t-7mut CCL-LAS/EDTA 稳定性胜出者

[0941]

变体 #	87	225	272	282	电荷	突变体残余活性 / 野生型残余活性 (PI)
2	Q87E	N225E	N272E	N282E	-4	1.39
5	Q87E	N225E	N272R	N282E	-2	1.51
8	Q87E	N225E		N282E	-3	1.29
11	Q87E	N225R	N272E	N282E	-2	1.38
14	Q87E	N225R	N272R	N282E	0	1.64
17	Q87E	N225R		N282E	-1	1.39
20	Q87E		N272E	N282E	-3	1.39
23	Q87E		N272R	N282E	-1	1.65
26	Q87E			N282E	-2	1.41
29	Q87R	N225E	N272E	N282E	-2	2.02
31	Q87R	N225E	N272E	0	-1	1.39
32	Q87R	N225E	N272R	N282E	0	2.21
33	Q87R	N225E	N272R	N282R	2	1.29
34	Q87R	N225E	N272R	0	1	1.47
35	Q87R	N225E		N282E	-1	2.08
37	Q87R	N225E		0	0	1.41
38	Q87R	N225R	N272E	N282E	0	1.85
40	Q87R	N225R	N272E	0	1	1.38
41	Q87R	N225R	N272R	N282E	2	2.15
43	Q87R	N225R	N272R	0	3	1.63
44	Q87R	N225R		N282E	1	2.33
46	Q87R	N225R		0	2	1.62
47	Q87R		N272E	N282E	-1	2.38
48	Q87R		N272E	N282R	1	1.24
49	Q87R		N272E	0	0	1.53
50	Q87R		N272R	N282E	1	2.14
51	Q87R		N272R	N282R	3	1.25

[0942]

变体 #	87	225	272	282	电荷	突变体残余活性 / 野生型残余活性 (PI)
52	Q87R		N272R	0	2	1.60
53	Q87R			N282E	0	2.27
54	Q87R			N282R	2	1.34
55	Q87R			0	1	1.62
56	0	N225E	N272E	N282E	-3	1.69
59	0	N225E	N272R	N282E	-1	1.77
62	0	N225E		N282E	-2	1.50

65	0	N225R	N272E	N282E	-1	1.66
67	0	N225R	N272E	0	0	1.24
68	0	N225R	N272R	N282E	1	1.80
70	0	N225R	N272R	0	2	1.25
71	0	N225R		N282E	0	1.48
73	0	N225R		0	1	1.29
74	0		N272E	N282E	-2	1.54
77	0		N272R	N282E	0	1.78
80	0			N282E	-1	1.52

[0943] 对于 ASP(酸性丝氨酸蛋白酶)和 FNA(其他蛋白酶),其 LAS/EDTA 稳定性具有电荷依赖性(参见 PCT/US2008/007103,2008 年 6 月 6 日提交,Genencor Int'l)。加入负电荷增加稳定性。但是,即使比亲本多了一个或两个正电荷,在我们的方法中,也可能发现电荷突变的排列赋予了比亲本更高的稳定性或者与亲本相同的稳定性。对于更大的酶,例如图 17 中所示的 TS23t',该方法也有效,加入正电荷对稳定性的不利影响可以被增加稳定性的优化电荷排列所抵偿掉。

[0944] 实施例 12

[0945] 烘烤组合物

[0946] 本实施例说明 TS-23 在烘烤组合物中的用途。

[0947] 淀粉酶检测。Ceralpha 检测。一个 Ceralpha 单位定义为每分钟降解 0.0351 毫摩尔的 PNP- 偶联的非还原端封闭的麦芽七糖(maltoheptaose)的活性,由此每分钟可以有 0.0351 毫摩尔 PNP 被测试混合物中过量的葡萄糖淀粉酶和 α -糖苷酶释放出来(PNP-对硝基酚)。测试混合物含有 50 μ L 50mM 柠檬酸钠,5mM CaCl_2 , pH6.5, 含有 25 μ L 酶样品和 25 μ L Ceralpha 底物(非还原末端封闭的 Glc7-PNP,葡萄糖淀粉酶和 α -糖苷酶)(购自 Megazyme, Ireland)(1 瓶溶解于 10mL 水中)。40℃ 孵育测试混合物 30 分钟,然后加入 150 μ L 4% Tris 来停止。用酶标仪测定 420nm 的吸光度,用公式:活性 = $A_{420} \times d$ 计算 Ceralpha 活性,单位为 Ceralpha 单位/mL 测试酶样品。

[0948] Betamyl 检测。一个 Betamyl 单位定义为每分钟降解 0.0351 毫摩尔的 PNP- 偶联的麦芽戊糖(maltopentaose)的活性,由此每分钟可以有 0.0351 毫摩尔 PNP 被测试混合物中过量的 α -糖苷酶释放出来。测试混合物含有 50 μ L 50mM 柠檬酸钠,5mM CaCl_2 , pH6.5, 含有 25 μ L 酶样品和 25 μ L Betamyl 底物(Glc5-PNP 和 α -糖苷酶)(购自 Megazyme, Ireland)(1 瓶溶解于 10mL 水中)。40℃ 孵育测试混合物 30 分钟,然后加入 150 μ L 4% Tris 来停止。用酶标仪测定 420nm 的吸光度,用公式:活性 = $A_{420} \times d$ 计算 Betamyl 活性,单位为 Betamyl 单位/mL 测试酶样品。1BMK(千 betamyl 单位)定义为 1000 个 Betamyl 单位。

[0949] 烘烤预实验。用标准白面包发面团和美国烤面包片的生面团配方进行烘烤预实验。用 1600g 面粉(购自 Sisco Mills, USA 的 "All Purpose Classic")、950g 水、40g 大豆油和 32g 干酵母制备发酵的生面团。将该面团在 Hobart 螺旋混合器上以低速混合 1 分钟,然后以速度 2 混合 3 分钟。然后将该发面团在 35℃, 85% RH 下发酵 2.5 小时,然后 5℃ 下 0.5 小时。

[0950] 然后,向该发面团中加入 400g 面粉,4g 干酵母,40g 盐,2,4g 丙酸钙,240g 高果糖谷物糖浆(Isosweet),5g 乳化剂 PANODAN 205,5g 酶活化豆粉,30g 非活化豆粉,220g 水和 30g 抗坏血酸溶液(4g 抗坏血酸溶于 500g 水中制备)。将得到的面团在 Diosna 混合器上以低速混合 1 分钟,然后以速度 2 混合 6 分钟。然后,室温放置面团 5 分钟,然后称取 550g

面团片,放置 5 分钟。然后在 Glimek 切片机上以设置 1 : 4, 2 : 4, 3 : 15, 4 : 12 切片,各边均为 10 切片,然后转入烘烤形式。43℃, 90% RH 下醒发成型 60 分钟后, 218℃烘烤该面团 29 分钟。

[0951] 用 TA-XT 2 结构分析仪(Texture Analyser) 测量硬度和弹性。用购自英国 Stable Micro Systems 的结构分析仪通过质构全貌分析(TextureProfile Analysis) 来分析面包片以测定软度、粘性和弹性。使用下列设置:

[0952] 预实验速度 :2mm/s

[0953] 测试速度 :2mm/s

[0954] 后测试速度 :10mm/s

[0955] 断裂实验距离 :1%

[0956] 距离 :40%

[0957] 力度 :0.098N

[0958] 时间 :5.00 秒

[0959] 数量 :5

[0960] 装料槽 :5kg

[0961] 触发型 :自动 -0.01N

[0962] 烘烤预实验中的硬度和粘性效果。与单独变体 PS4 相比, TS23f1 联合来自嗜糖假单胞菌(*Pseudomonas saccharophila*) 的野生型麦芽四糖水解酶(maltotetraohydrolase(PS4wt)) 变体确实降低了硬度, 而单独 TS23f1 不会显著降低硬度(图 15)。

[0963] 变体 PS4 淀粉酶具有如下序列(SEQ ID NO:18):

[0964] mdqagkspag vryhggdeii lqgfhnvvr eapynwynil rqqastiaad gfsaiwmpvp

[0965] wrdfsswtdg dksgggegyf whdfnkngry gsdaqlrqaa galggagvkv lydvvpnhmn

[0966] rfypdkeinl pagqrfrwnd cpdpngnpnd cddgdrflgg eadlntghpq iygmfrdeft

[0967] nlrsgygagg frfdfvrgya pervdswmsd sadssfcvge lwkepseypp wdwrntaswq

[0968] qiikdwsdra kcpvfdfalk ermngsvad wkhglngnpd prwrevavtf vdnhdtgysp

[0969] gqnggqhkwp lqdgllrqay ayiltspgtp vvywphmydw gygdfirqli qvrntagvra

[0970] dsaisfhsgy sglvatvsgs qqtlvvalns dlanpgqvas gsfseavnas ngqvrwvrs

[0971] sgdgggndgg

[0972] 图 15 和 16 示出了比较带有和不带有成熟全长 TS-23 的面团的烘烤实验结果。与单独变体 PS4 相比, TS-23 联合变体 PS4 确实增加了粘性, 而单独 TS23 不会显著改变粘性(图 16)。总的来说, TS-23 能够用于增强变体 PS4 的降低硬度和提高粘性的效果(图 15 和 16)。

[0973] 实施例 13

[0974] 平截的 TS-23 α -淀粉酶

[0975] 载体构建和转化。用 Genearth 合成杆菌物种 TS23 淀粉酶基因。合成的基因的序列示于图 18A 和 B。使用该序列作为模板, 杆菌物种 TS23 菌株 α -淀粉酶基因在使用引物 pHPLT-PstI-FW 和 pHPLT-HpaI-RV 的标准 PCR 反应中扩增, 不包含其淀粉结合结构域。得到的平截的片段通过 PstI 和 HpaI 限制酶切位点克隆到杆菌表达载体 pHPLT 中。得到的载

体 pHPLT-TS23t (图 19) 转化到枯草芽孢杆菌 SC6.1 (也称为 BG3594comK) (DaprE, DnprE, degU^{Hy}32, oppA, DspoIIE3501, amyE::xylRPxylAcomK-phleo) 中, 在 10mg/L 新霉素上选择转化体。编码的平截 TS23 α -淀粉酶在相关图中进一步称为 Base。

[0976] 制备第二构建体, 除了两个密码子删除 (R¹⁸⁰S¹⁸¹) 之外与 pHPLT-TS23t 一样。在对合成的 TS23 α -淀粉酶基因 (图 1) 的 PCR 中分别使用引物对 pHPLT-PstI-FW 和 TS-delRS-RV, 以及 TS-delRS-FW 和 pHPLT-HpaI-RV (表 13-1), 扩增出两个片段。这两个片段用引物对 pHPLT-PstI-FW 和 pHPLT-HpaI-RV 在 PCR 中融合到一起。然后将得到的片段克隆到 pHPLT 中, 并转化到如上所述的枯草芽孢杆菌 SC6.1 中。在本实施例和相应附图中编码的蛋白质 (Base Δ R¹⁸⁰S¹⁸¹) 也称为 Ace。

[0977] 生长和微滴定板表达。在平底 96 孔微滴定板 (MTP's) (Corning no. 3599) 中, 转化物在 200 μ L 补充有 5mM CaCl₂ 和 10mg/L 新霉素的 Grant'sII 培养基 (附件 I) 中生长。在 37°C, 湿度 80% 和 300rpm 条件下在 Infors 孵育箱中孵育 3 天。离心 MTP's, 并用过滤板过滤培养上清。表达水平达到大约 100mg/L。

[0978] 热稳定性检测。淀粉酶的热稳定性通过在 50mM MOPS 缓冲液, 50mM NaCl, 0.1mM CaCl₂, pH7.15 中稀释培养上清 1000 倍来检测。稀释的样品随后在 Eppendorf Master cycler EP gradient S PCR 仪在不同温度下孵育 1 小时, 然后冷却至 4°C。用淀粉酶 HR (Megazyme) 试剂测量其初始和残余活性。将 25 μ L 样品加入到 25 μ L 的淀粉酶 HR 试剂中, 并充分混合。在 25°C 的 iEMS 保温箱 (Thermo Scientific) 中于 900rpm 下让反应进行 30 分钟。加入 50 μ L 停止缓冲液 (200mM 硼酸, pH10.2) 停止该反应, 用 Spectramax plus 分光光度计 (Molecular Devices) 测定 400nm 处的吸光度。

[0979] 在液体洗涤剂中失活酶活性。为了失活市售的液体 Persil color (Henkel) 中的酶活性, 将该洗涤剂放置在密闭的玻璃瓶中, 在 95°C 水浴中孵育 2 小时。孵育之后, 用上述的淀粉酶 HR 试剂检测该洗涤剂中可能残余的淀粉酶活性。

[0980] 10% 洗涤剂稳定性。通过将 10 μ L 酶样品 (培养上清) 加入到 190 μ L 的 25mM HEPES 缓冲液, 0.005% Tween 80, pH8 中的 10.5% 洗涤剂溶液中, 测定 10% 洗涤剂稳定性。混合物在 Eppendorf Master cycler EP gradient S PCR 仪上不同温度下孵育 30 分钟或 1 小时, 并冷却至 4°C。样品在用 50mM MOPS, 50mM NaCl, 0.005% Tween 80, pH7.15 适当稀释之后, 用淀粉酶 HR 试剂测量初始和残余活性。

[0981] 100% 洗涤剂稳定性。对于 100% 洗涤剂稳定性测定, 5% v/v 酶样品在 100% 灭活的洗涤剂中充分混合。然后在如上所述的热循环器上孵育该样品。用 CS28 稻米淀粉微样片 (CFT, Vlaardingen) 测定其初始和残余活性。平底 MTP's 每孔填充两个 CS28 微样片 (直径 6 毫米)。适当稀释样品, 在 200 μ L 25mM HEPES 缓冲液, 0.1mM CaCl₂, 0.005% Tween 80, pH8 中测定该酶对 CS28 微样片的清洁活性。MTP's 在 32°C 的 iEMS 培养箱中 1150rpm 下孵育 1 小时。孵育后, 100mL 反应液转移到新的 MTP 中。用 Spectramax plus 分光光度计 (Molecular Devices) 在 488nm 测量吸光度。

[0982] 数据分析。用 SlideWrite plus for Windows (Advanced graphics software) 分析得到的数据, 并将其拟合到公式:

[0983] $y = c_0 + c_1 / (1 + (x/c_2)^{c_3})$ 。

[0984] 结果:

[0985] 热稳定性。通过引入 S243Q 突变, Base 的热稳定性 ($t_{50\%}$) 升高大约 2°C (图 20; 表 13-2)。另一方面, 将 Base 变为 Ace 的两个 (2) 氨基酸删除 ($R^{180}S^{181}$), 将酶的热稳定性升高了 20°C (图 21; 表 13-2)。有趣的是, 在 Ace 主链中引入 S243Q 突变 (根据 Base 进行氨基酸计数) 又把 Ace 的热稳定性升高了 3°C (图 21; 表 13-2)。

[0986] 10% 和 100% 洗涤剂稳定性。Base/Ace 淀粉酶的重要应用是衣物洗涤剂。所以, 淀粉酶在液体洗涤剂中的稳定性是一个重要特征。在温度梯度内用 10% 和 100% 的洗涤剂测定酶的稳定性 (图 22-25)。Base 的稳定性在 10% 洗涤剂溶液和 100% 洗涤剂中都由于引入了 S243Q 突变而升高 (表 13-2)。在 10% 洗涤剂中, 稳定性升高了 7.6°C, 而在 100% 洗涤剂中, 升高了大约 5.9°C。同样, 对于 Ace, S243Q 突变对其洗涤剂稳定性也有有益效果。在 10% 洗涤剂中, 稳定性升高了 3.7°C。在 100% 洗涤剂中, 稳定性升高了 3.4°C。

[0987] 表 13-1. 用于构建 Base 和 Ace 表达质粒的引物

[0988]

引物名称	序列	目的
pHPLT-PstI-FW SEQ ID NO: 8	CTCATTCTGCAGCTTCAGCAAATACGGCG	在 pHPLT 表达载体中克隆平截的 TS23
pHPLT-HpaI-RV SEQ ID NO: 9	CTCTGTAACTCATTTGGCGACCCAGATTGAAACG	
TS-delRS-FW SEQ ID NO: 10	CTATAAATTTACGGGCAAAGCATGGGATTGG	在 R180-S181 引入删除
TS-delRS-RV SEQ ID NO: 11	TGCTTTGCCCGTAAATTTATAGATCCGGTTCAG	

[0989] 表 13-2. 在给定条件下灭活 50% 酶所需的温度 (cf. 图 20-25).

[0990]

	T 50%		
	热稳定性	10% 洗涤剂	100% 洗涤剂
Base	62.7 °C	36.9 °C	39.8 °C
Base-S243Q	64.9 °C	44.5 °C	45.7 °C
Ace	84.7 °C	68.2 °C	64.1 °C
Ace-S243Q	87.9 °C	71.9 °C	67.5 °C

[0991] 试剂.

[0992] Grant's II 培养基

[0993] 第 1 部分: 10g 大豆蛋白胨在 500ml 水中制备并高压灭菌。

[0994] 第 2 部分: 3ml 的 1M K_2HPO_4 , 75g 葡萄糖, 3.6g 尿素, 100mL Grant's 10x MOPS, 400ml 总量

[0995] 混合第 1 和第 2 部分, 用 HCl/NaOH 将 pH 调节至 7.3, 体积调至 1 升, 用 0.22 μ m PES 滤膜将该培养基过滤除菌。

[0996] 每升 Grant' s 10x MOPS 含有：

[0997] 83.72g MOPS

[0998] 7.17g Tricine

[0999] 12g KOH

[1000] 29.22g NaCl

[1001] 10ml 0.276M K_2SO_4

[1002] 10ml 0.528M $MgCl_2$

[1003] 100ml Grant' s 微量营养素

[1004] 每升 Grant' s 微量营养素：

[1005] 1.47 二水合柠檬酸三钠

[1006] 1.47g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$

[1007] 0.4g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$

[1008] 0.1g $MnSO_4 \cdot H_2O$

[1009] 0.1g $ZnSO_4 \cdot H_2O$

[1010] 0.05 $CuCl_2 \cdot 2H_2O$

[1011] 0.1g $CoCl_2 \cdot 6H_2O$

[1012] 0.1g $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$

[1013] 上文中提及的所有公开和专利均以其整体引入作为参考而用于所有目的。上述方法和系统的各种不背离本发明的精神和范围的修改和改变对本领域技术人员来说是明显的。虽然已经联系具体优选实施方式说明了本发明，应理解所要求保护的实施方式不应当不适当地限于这些具体实施例。实际上，那些对于本领域技术人员来说显而易见的实施这些实施方式和方面的上述方式的各种修改，都应落入所附权利要求书的范围内。

Ntapinetmmqyfewdlpndgtlwtkvkneaanlssligitalwlppaykgtsqsdvgygydlyd
lgefngkgtirtkygkktqyiqaiqaakaagmqvyadvvfnhkagadgtefvdavevdpsnrnge
tsgtyqiqawtkfdpgrgntyssfkwrwyhfdgtdwdesrklnriykfrstgkawdwevdteng
nydylmfadldmdhpevvtelknwgtwyvnttnidgfrldavkhikysffpdwltvyvrngtgknl
favgefwsydvnlhnyitktngsmldaplhnnfytaskssgyfdmryllnntlmkdqpslav
tlvdnhdtqpgqslqswvepwfkplayafiltrqegypcvfygdyygipkynipglkskidplli
arrdyaygtqrdyidhqdiigwtregidtkpnsglaalitdgpggskwmyvgkhhagkvfydltg
nrsdvtinadgwgefkvnggsvsiwvaktstnvtftvnnatttsgqnvyyvanipelgnwntana
ikmnpssyptwkatialpqqkaiefkfkikkdqagnviwestsnrtytvpfsstgsytaswnvp

(SEQ ID NO: 1)

图 1

Ntapinetmmqyfewdlpndgtlwtkvkneaanlssligitalwlppaykgtsqsdvgygydlyd
lgefngkgtirtkygkktqyiqaiqaakaagmqvyadvvfnhkagadgtefvdavevdpsnrnge
tsgtyqiqawtkfdpgrgntyssfkwrwyhfdgtdwdesrklnriykfrstgkawdwevdteng
nydylmfadldmdhpevvtelknwgtwyvnttnidgfrldavkhikysffpdwltvyvrngtgknl
favgefwsydvnlhnyitktngsmldaplhnnfytaskssgyfdmryllnntlmkdqpslav
tlvdnhdtqpgqslqswvepwfkplayafiltrqegypcvfygdyygipkynipglkskidplli
arrdyaygtqrdyidhqdiigwtregidtkpnsglaalitdgpggskwmyvgkhhagkvfydltg
nrsdvtinadgwgefkvnggsvsiwvak

(SEQ ID NO: 2)

图 2

aatacggcgccgatcaacgaaacgatgatgcagtatTTTTgaatgggatctgccgaatgatggaaac
gctgtggacgaaagtcaaaaacgaagcggcggaatcttagcagcctgggaatcacagcactttggc
ttccgcccgcataataaaggaacgagccaaagcgatgtcggctatggcgtctatgatctgtatgac
ctgggcgaatttaacaaaaaggcacgatccggacgaaatatggcacgaaaacacagtatatcca
agcgatccaggcagcaaaagcagcaggcatgcaagtctatgccgacgtcgtctttaatcataaag
cgggagcggatggcacagaatttgtcgatgccgtcgaagttgatccgagcaacagaaaccaagaa
acgagcggcacgtatcaaatccaagcgtggacgaaatttgattttccgggacagagggaatacgtat
tagcagctttaaatggcgtcgttatcattttgacggcacggattgggatgaaagcagaaaaactga
accggatctataaatttcggagcacgggcaaagcatgggattgggaagtcgatacggaaaacggc
aactatgactatctgatgtttgccgatctggatatggatcatccggaagtgcgtcacggaactgaa
aaattggggcacgtggtatgttaatacgaacacatcgatggctttagactggatgccgtcaaac
atatcaaatatagctttttccggactggctgacgtatgtcagaaaccagacgggcaaaaacctt
tttgccgtcggcgaattttggagctatgacgtcaacaaacttcataactatatcacgaaaacgaa
cggcagcatgagccttttgatgccccgcttcataaacaacttttatacggcgagcaaaagctcag
gctatTTTgatatgagatatctgctgaacaacacgctgatgaaagatcaaccgagcctggcagtc
acactggtcgataaccatgatacacaaccgggccaagccttcaaagctgggtcgaaccgtggtt
taaaccgctggcgtatgcctttatcctgacgagacaagaagggtatccttgctcttttatggcg
actattatggcatcccgaatatataatcccgggctgaaaagcaaaatcgatccgctgctgatc
gccagacgggattatgcctatggcacacagcgggattatatcgaccatcaggacatcatcggctg
gacaagagaaggcatcgatacgaaacggaatagcggactggcagcactgattacagatggaccgg
gcggaagcaaatggatgtatgtcggcaaaaaacatgccggcaagtccttttatgatctgacgggc
aacagaagcgatacggtcacgatcaatgctgatggctggggagaatttaaagtcaatggcggcag
cgtttcaatctgggtcgccaaaacgagcaatgtcacgtttacgggtcaacaatgccacgacaacga
gcggccaaaatgtctatgtcgtcgccaatatcccggaaactgggcaattggaatacggcgaaacgca
atcaaaatgaacccgagcagctatccgacatggaaagcgacaatcgctctgccgcaaggaaaagc
gatcgaatttaaatttatcaaaaaagaccaggcgggcaatgttatTTTgggaaagcacgagcaata
gaacgtatacgggtcccgttttagcagcacaggaagctatacagcgagctggaatgttccgtga

(SEQ ID NO: 3)

图 3

aatacggcgccgatcaacgaaacgatgatgcagtatTTTgaatgggatctgccgaatgatggaac
gctgtggacgaaagtcaaaaacgaagcggcgaatcttagcagcctgggaatcacagcactttggc
ttccgcccggcatataaaaggaacgagccaaagcgatgtcggctatggcgtctatgatctgtatgac
ctgggcgaatttaacccaaaaggcacgatccggacgaaatatggcacgaaaacacagtatatcca
agcgatccaggcagcaaaagcagcaggcatgcaagtctatgccgacgtcgtctttaatcataaag
cgggagcggatggcacagaatttgtcgatgccgtcgaagttgatccgagcaacagaaaccaagaa
acgagcggcacgtatcaaatccaagcgtggacgaaatttgattttccgggcagaggcaatacgtat
tagcagctttaaatggcgctggtatcatTTTgacggcacggattgggatgaaagcagaaaactga
accggatctataaatttcggagcacgggcaaagcatgggatTgggaagtcgatacggaaaacggc
aactatgactatctgatgtttgccgatctggatatggatcatccggaagtcgtcacggaactgaa
aaattgggggcacgtggtatgttaatacgacgaacatcgatggcttttagactggatgccgtcaaac
atatcaaatatagctTTTTTccggactggctgacgtatgtcagaaaccagacggggcaaaaacctt
TTTgccgtcggcgaattTTTggagctatgacgtcaacaaacttcataactatatcacgaaaacgaa
cggcagcatgagcctTTTTgatgccccgcttcataacaactTTTatcggcgagcaaaagctcag
gctatTTTgatatgagatatctgctgaacaacacgctgatgaaagatcaaccgagcctggcagtc
acactggtcgataaccatgatcacaaaccgggccaagccttcaaagctgggtcgaaccgtggtt
taaaccgctggcgtatgcctTTTatcctgacgagacaagaagggtatccttgctctTTTatggcg
actattatggcatccgaaatataatatcccgggcctgaaaagcaaaatcgatccgctgctgatc
gccagacgggattatgcctatggcacacagcgggattatatcgaccatcaggacatcatcggtg
gacaagagaaggcatcgatacgaaccgaatagcggactggcagcactgattacagatggaccgg
gcggaagcaaatggatgtatgtcggcaaaaaacatgccggcaaagtctTTTatgatctgacgggc
aacagaagcgatacggtcacgatcaatgctgatggctggggagaatttaaagtcattggcggcag
cgTTTcaatctgggtcgccaaatga (SEQ ID NO: 4)

图 4

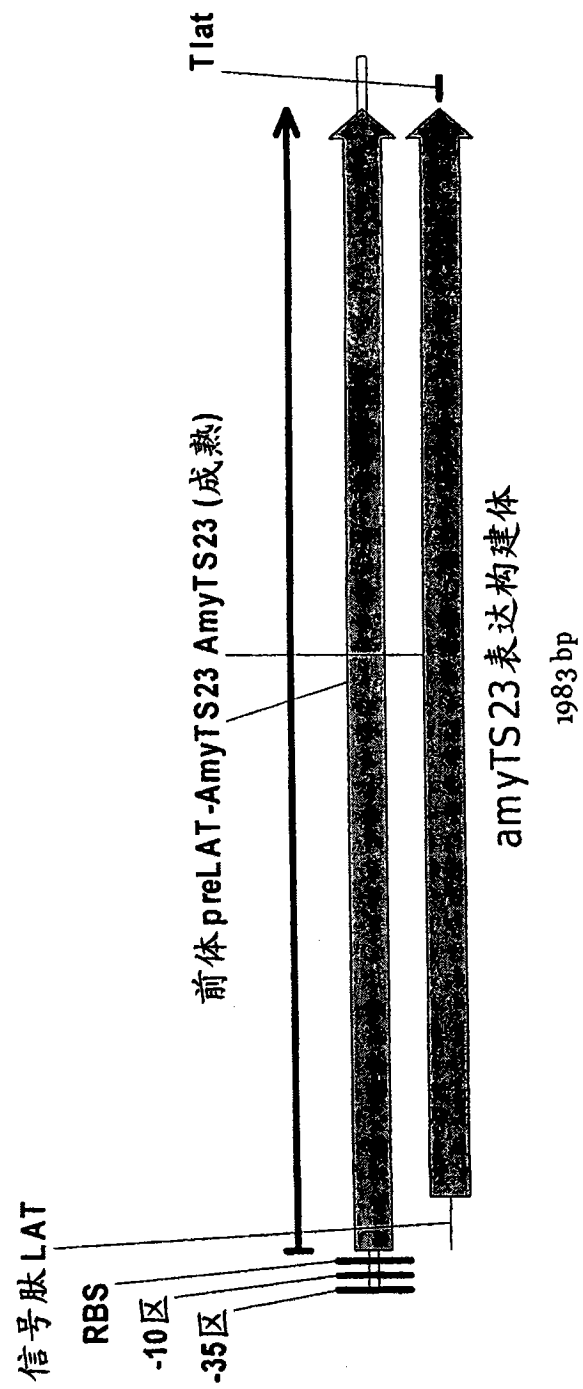


图 5

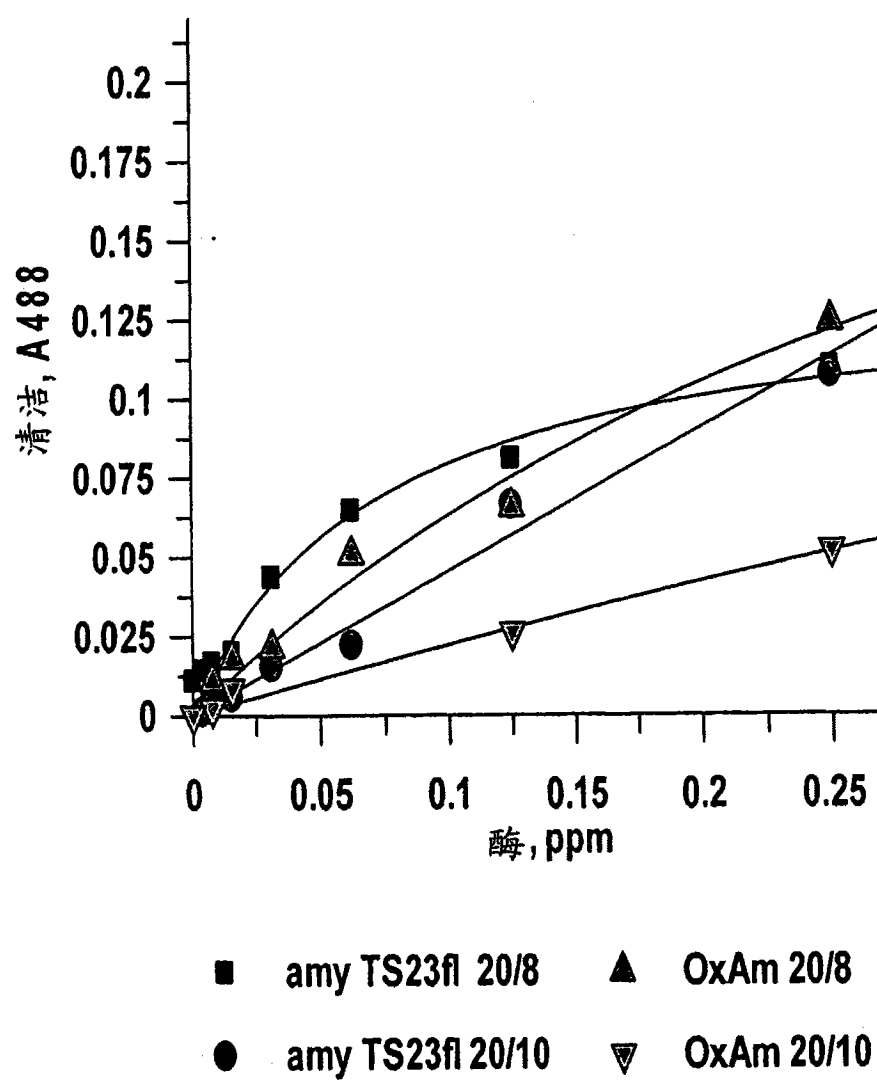


图 6

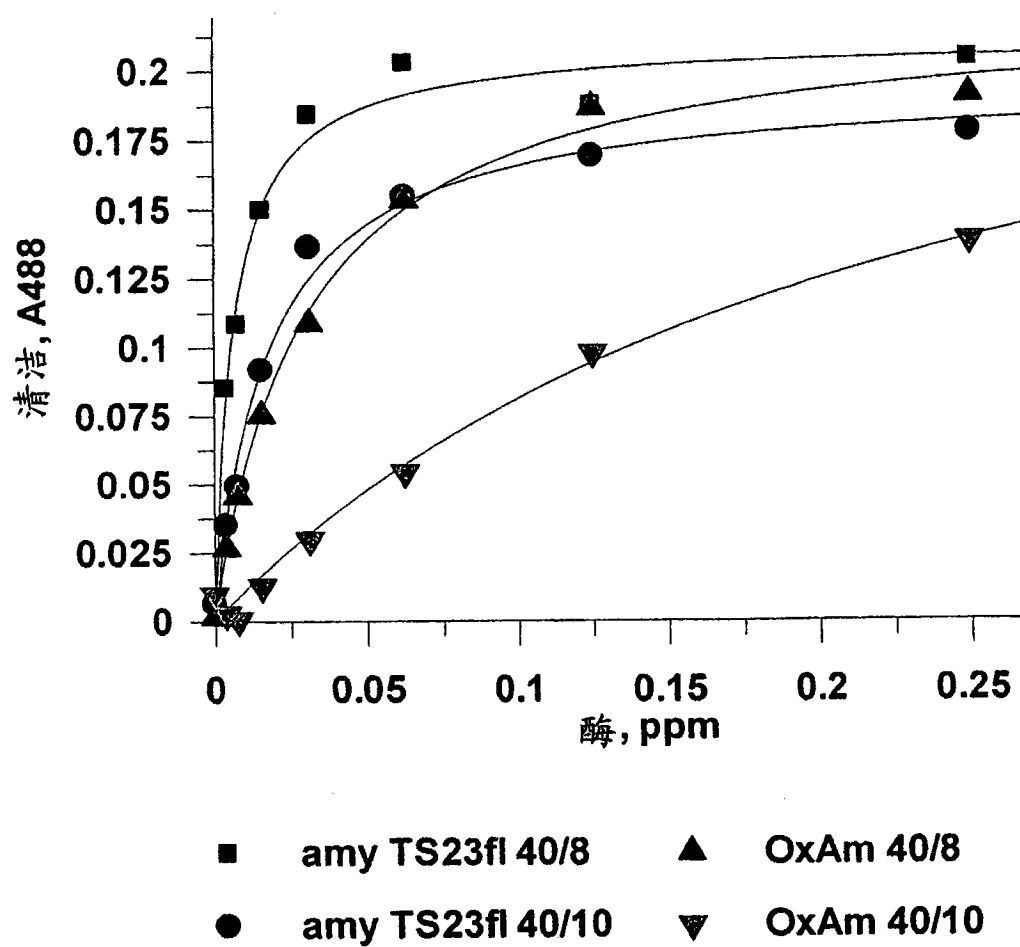


图 7

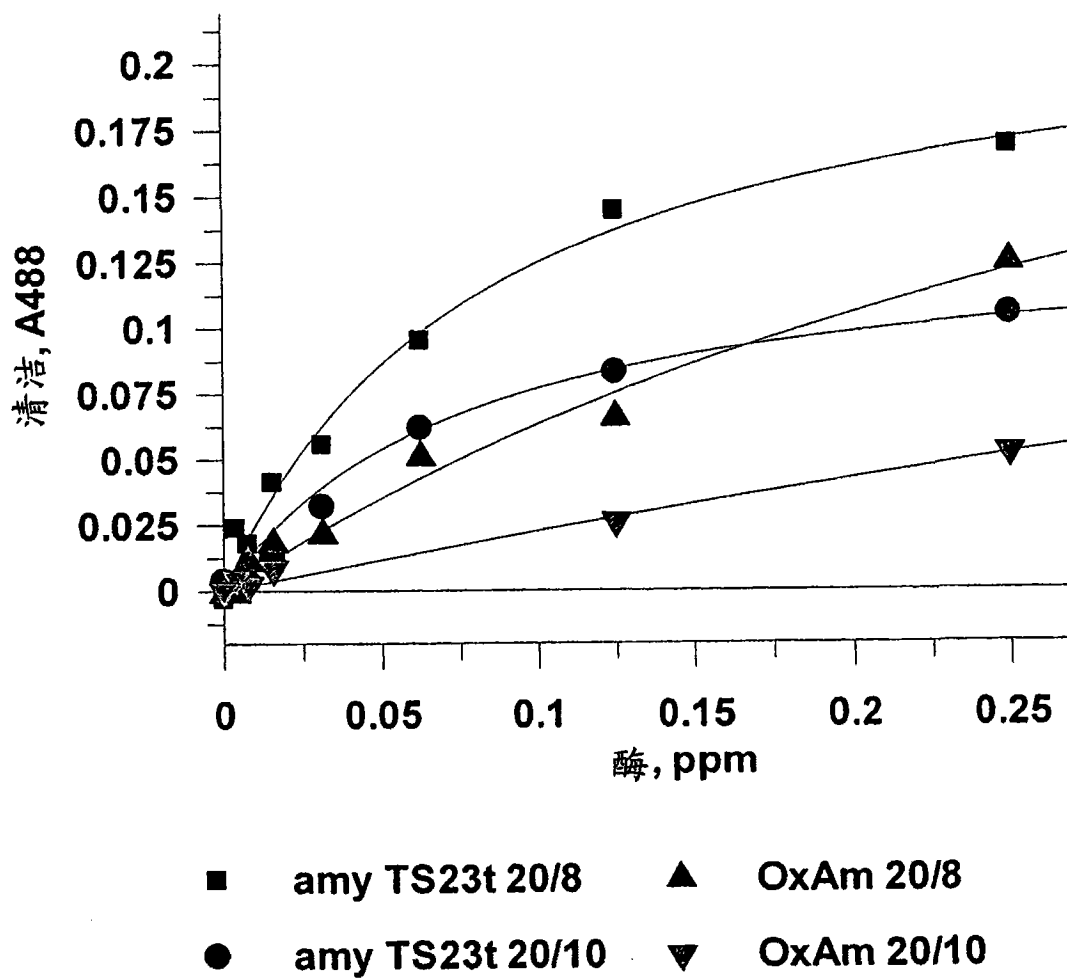


图 8

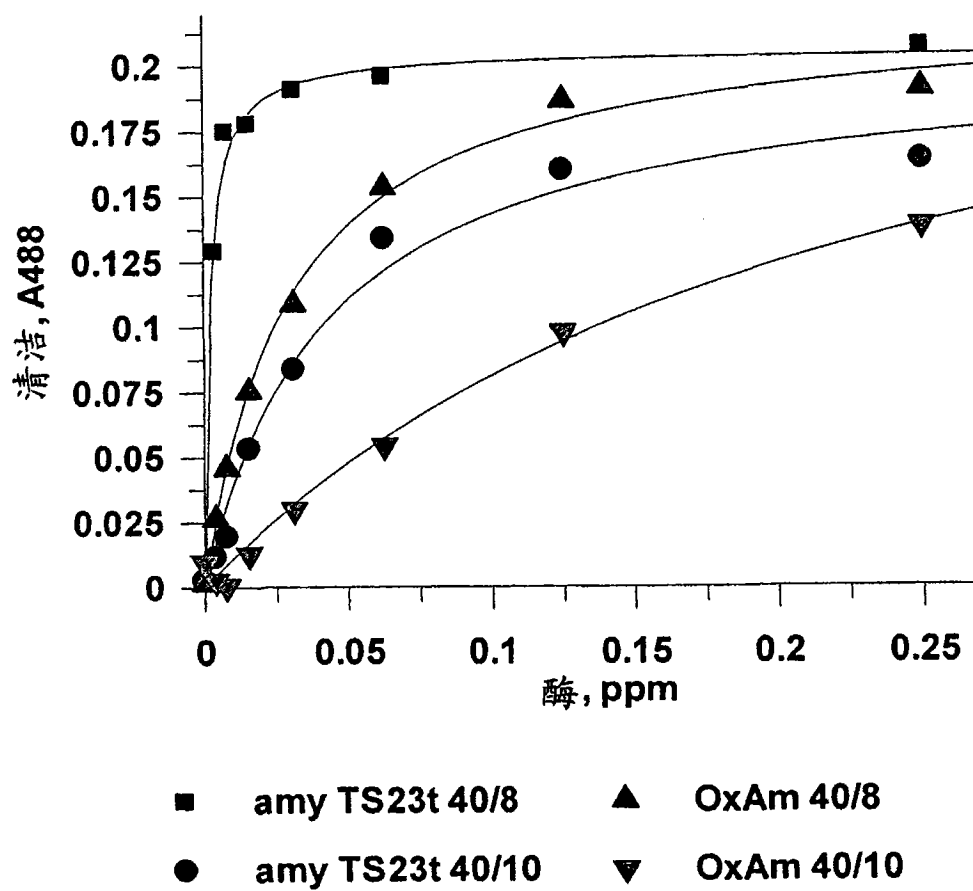


图 9

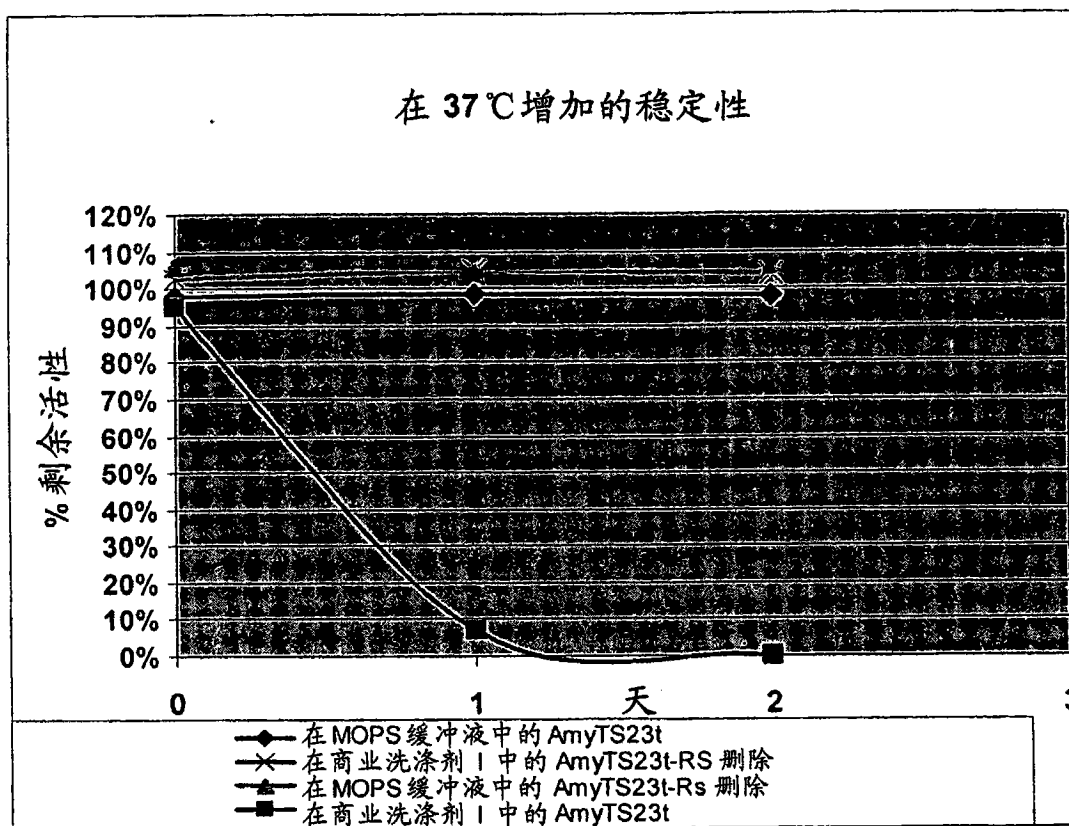


图 10

ntapinetmmqyfewdlpndgtlwtkvkneaanlsslgitalwlppaykgtsqsdvggygydlyd
 lgefngkgtirtkygkktqyiqaiqaakaagmqvyadvvfnhkagadgtefvdavevdpsnrnqe
 tsgtyqiqawtkfdfpgrgntyssfkwrwyhfdgtdwdesrklnriykftgkawdwevdtengny
 dylmfadldmdhpevvtelknwgtwyvnttnidgfrldavkhikysffpdwltyvrnqtgknlf
 vgefwsydvknlnhyitktngsmlfdaplhnnytaskssgyfdmryllnntlmkdqpslavtl
 vdnhdtqpgqslqswvepwfkplayafiltrqegypcvfygdyygipkynipglkskidplliar
 rdyaygtqrdyidhqdiigwtregidtkpns glaalitdgp ggskwmyvgk khagkvfydltgnr
 sdtvtinadgwggefkvnggsvsivak

(SEQ ID NO: 5)

图 11

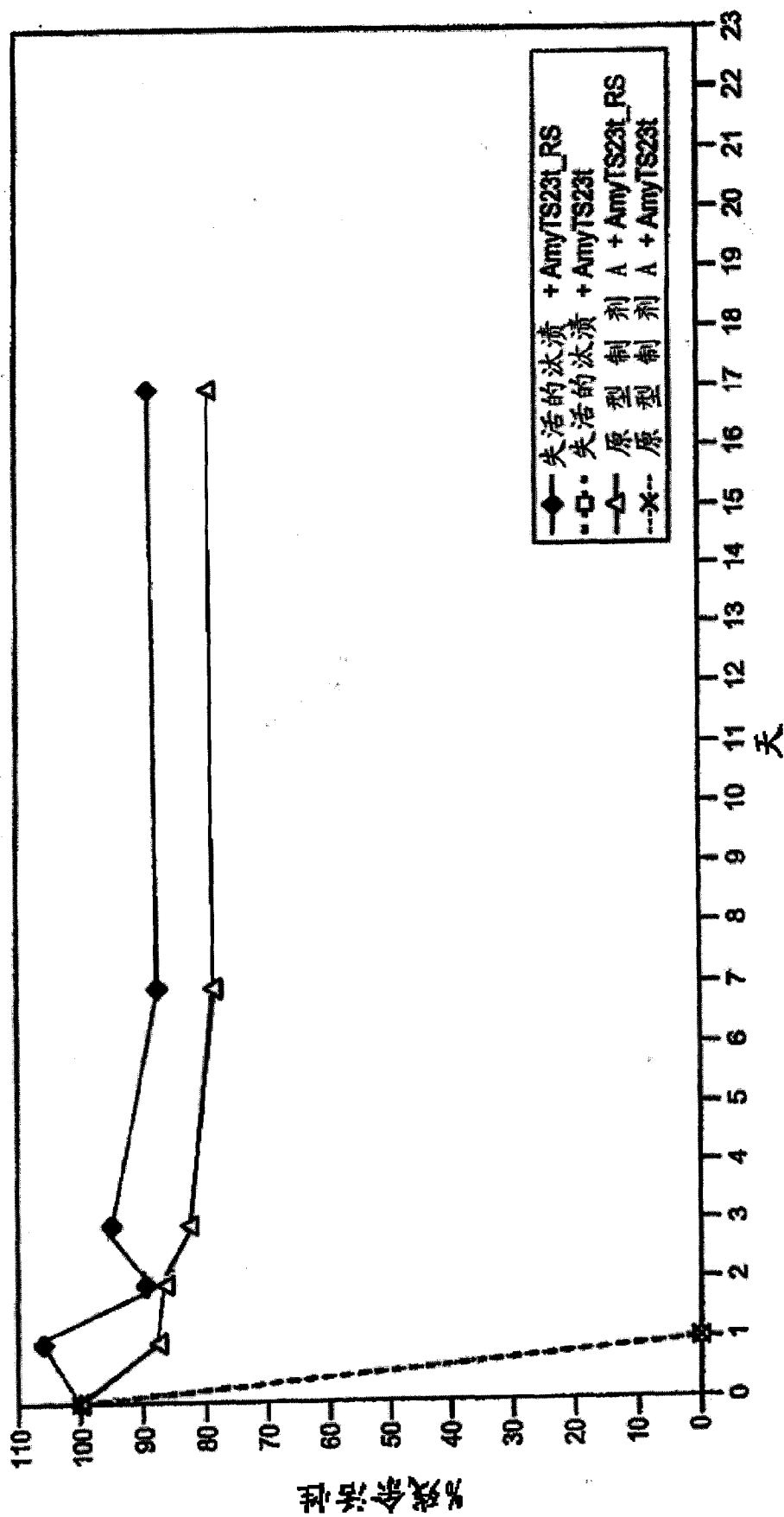


图 12

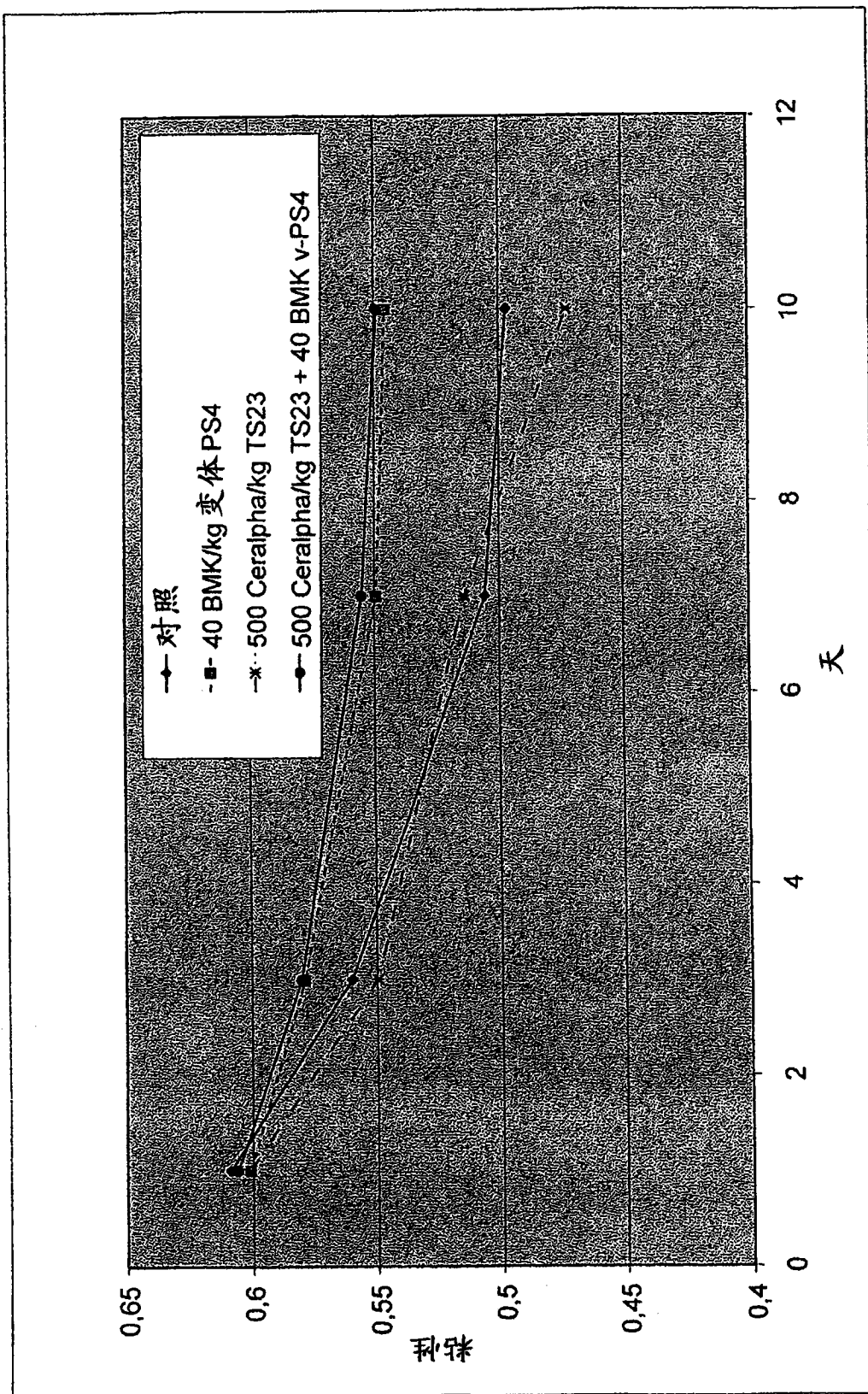


图 13

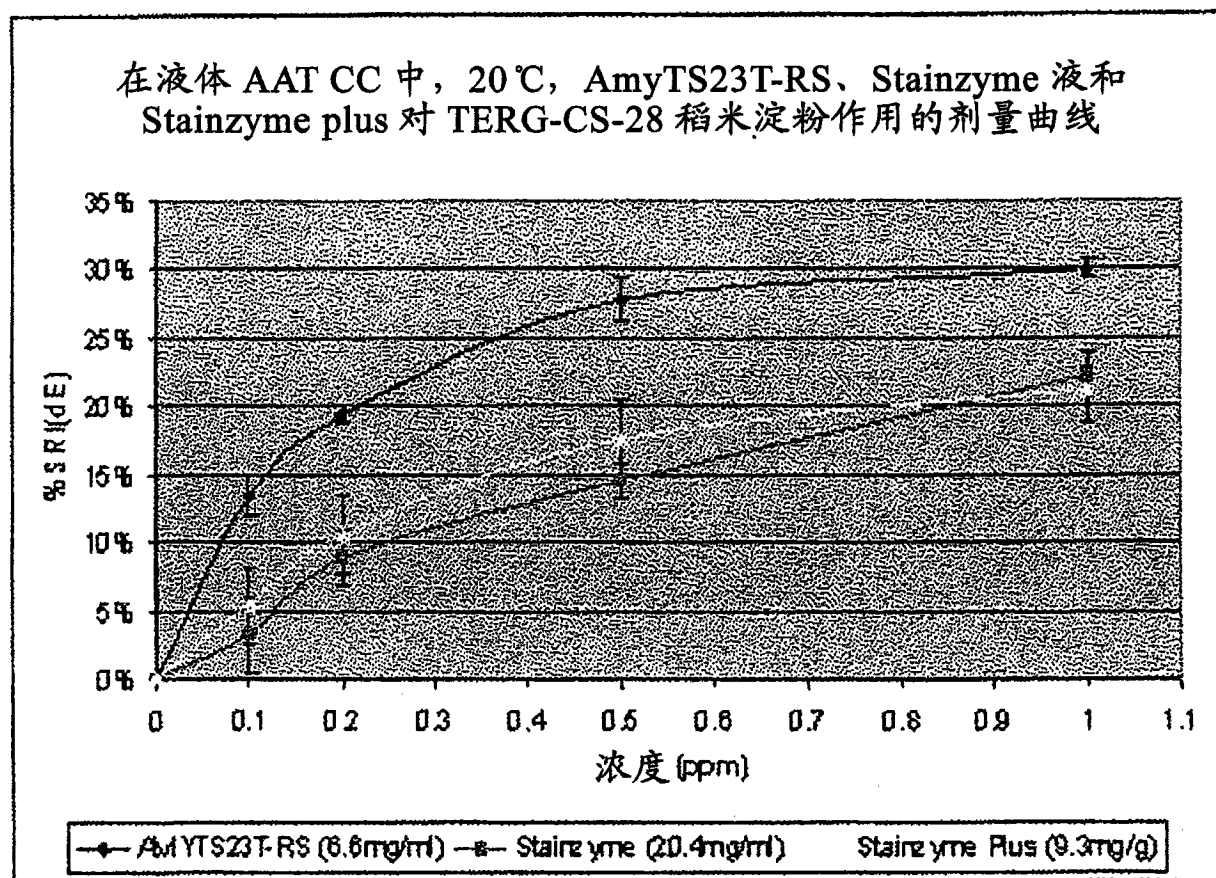


图 14

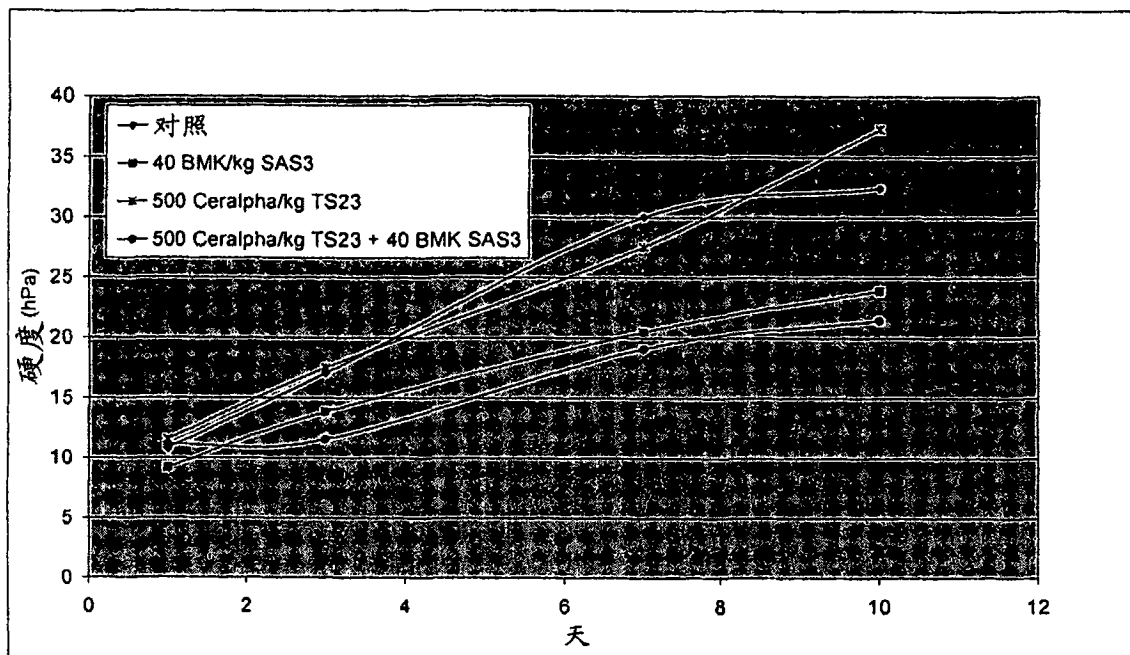


图 15

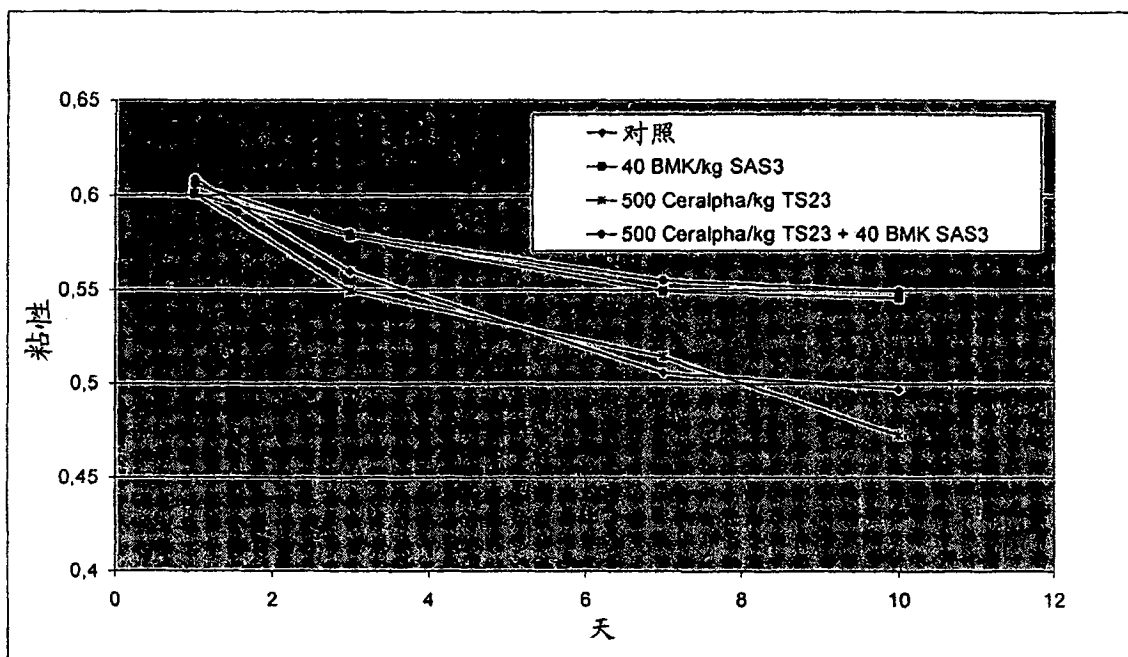


图 16

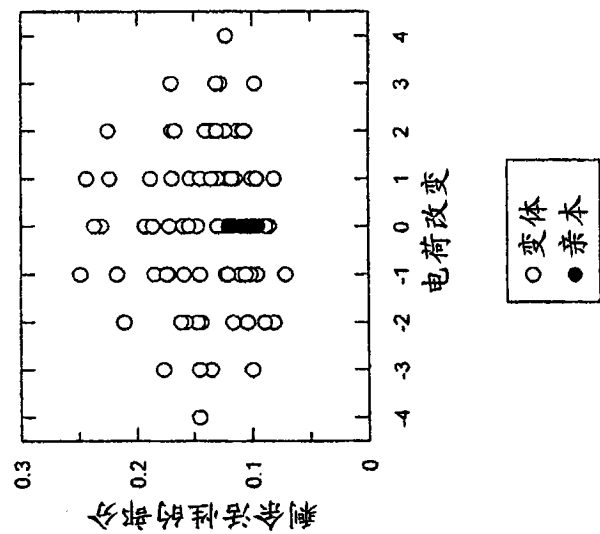


图 17

对于 ASP 和 FNA，存在针对 LAS/EDTA 稳定性的电荷依赖性。加入负电荷增加了稳定性。但是，根据我们的方法，甚至当比亲本多一个或者两个正电荷时，发现赋予相等或者高于亲本的稳定性的电荷突变排列是可能的。该方法在较大的酶（例如 TS23t'）中也是有效的，其中添加的正电荷对稳定性的有害影响可以通过增加稳定性的优化电荷排列所补偿。

aaaattcgggaatatttatacaatatcatatgtttcacattgaaagggaggagaatcatgaaacaacaaaaacggctt
tacgccccgattgctgacgctgttatttgcgctcatcttcttgcctcatcttgcagcttcagcaaatacggcgccg
atcaacgaaacgatgatgcagatatttgaatgggatctgcgcaatgatggaaacgctgtggacgaaagtcaaaaacgaa
gcggcgaatcttagcagcctgggaatcacagcactttggcttcgcccggcatataaaggaaacgagccaaagcgatgtc
ggctatggcgtctatgatctgtatgacctgggcgaatttaacccaaaaaggcacgatccggacgaaatatggcacgaaa
acacagtatatccaagcgatccaggcagcaaaagcagcaggcatgcaagtctatgccgacgtcgtctttaatcataaa
gcgggagcggtatggcacagaatttgcgatgccgtcgaagttgatccgagcaacagaaaccaaagaaacgagcgggcacg
tatcaaatccaagcgtggacgaaatttgattttccgggcagaggcaatacgtatagcagctttaaatggcgctggtat
cattttgacggcacggattgggatgaaagcagaaaactgaaccggatctataaatttcggagcacgggcaagcatgg
gattgggaagtcgatacggaaaacggcaactatgactatctgatgtttgccgatctggatattggatcatccggaagtc
gtcacggaaactgaaaaattggggcacgtggtatgttaatacgcagcaacatcgatggcttttagactggatgccgtcaaa
catatcaaatatagctttttccggactggctgacgtatgtcagaaaccagacgggcaaaaacctttttgccgtcggc
gaattttggagctatgacgtcaacaaacttcataactatatcagaaaacgaacgggcagcatgagcctttttgatgcc
ccgcttcataacaactttttatacggcgagcaaaaagctcaggctattttgatatgagatatctgctgaacaacacgctg
atgaaagatcaaccgagcctggcagtcacactggctcgataaccatgatacacaaacggggccaaagccttcaaagctgg
gtcgaaccgtgggtttaaacgcgtggcgatgcctttatcctgacgagacaagaagggtatccttgctcttttatggc
gactattatggcatcccgaaatataatatcccgggcctgaaaagcaaaatcgatccgctgctgatcgccagacgggat
tatgcctatggcacacagcgggatttatcgaccatcaggacatcatcggtggacaagagaaggcatcgatacga
ccgaatagcggactggcagcactgattacagatggaccgggcggaagcaaatggatgtatgtcggcaaaaaacatgcc
ggcaaaagtcttttatgatctgacgggcaacagaagcgatacggtcacgatcaatgctgatggctggggagaatttaaa
gtcaatggcggcagcgtttcaatctgggtcgccaaaacgagcaatgtcacgtttacggtcaacaatgccacgacaacg
agcggccaaaatgtctatgtcgtcgccaatatcccggaactgggcaattggaatacggcgaacgcaatcaaatgaac
ccgagcagctatccgacatggaaagcgacaatcgctctgccgcaaggaaaagcgatcgaatttaaatatcaaaaaa
gaccaggcgggcaatgttatttgggaaagcagagcaatagaacgtatacgggtcccggttagcagcacaggaagctat
acagcgagctggaatgttccgtgagttaacagaggacggatttctgaaggaaatccggtttttttattttaagcttg
agacaagggtaaaggataaaaacctcgag

图 18A

ntapinetmmqyfewdlpndgtlwtkvkneaanlssligitalwlpaykgtsqsdvgygyvdyldlgefngkgtirtk
ygtktqyiqaiqaakaagmqvyadvfnhkagadgtefvdavevdpnsnrnqetsgtyqiqawtkfdpgrgntyssfk
wrwyhfdgtdwdesrklrnykfrstgkawdewdtenngnydylmfadldmdhpevvvtelknwgtwyvntnidgfrl
davkhikysffpdwltyvrnqtgknlfavgefwsydvknlnhyitktngsmslfdaplhnnfytaskssgyfdmryll
nntlmkdqpslavtlvdnhdtpggqslqswvepwfkplayafiltrqegypcvfygdygipkynipglkskidplli
arrdyaygtqrdyidhqdiigwtregidtkpns glaalitdpggskwmyvgkhhagkvfydltgnrsdtvtinadgw
gefkvnngsvsiwvak

图 18B

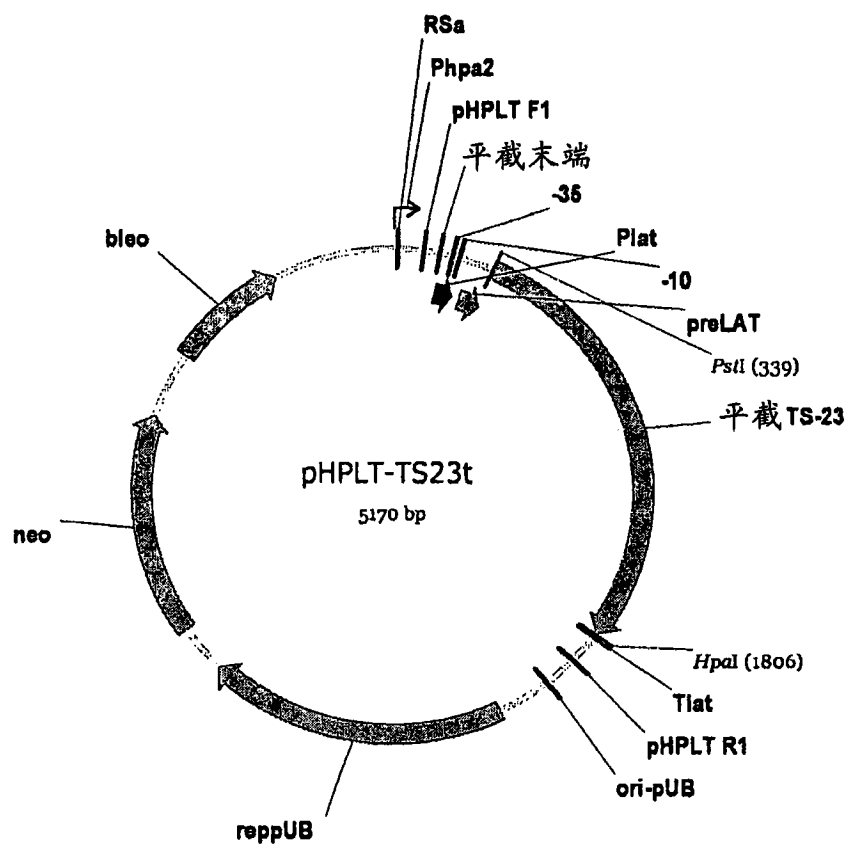


图 19

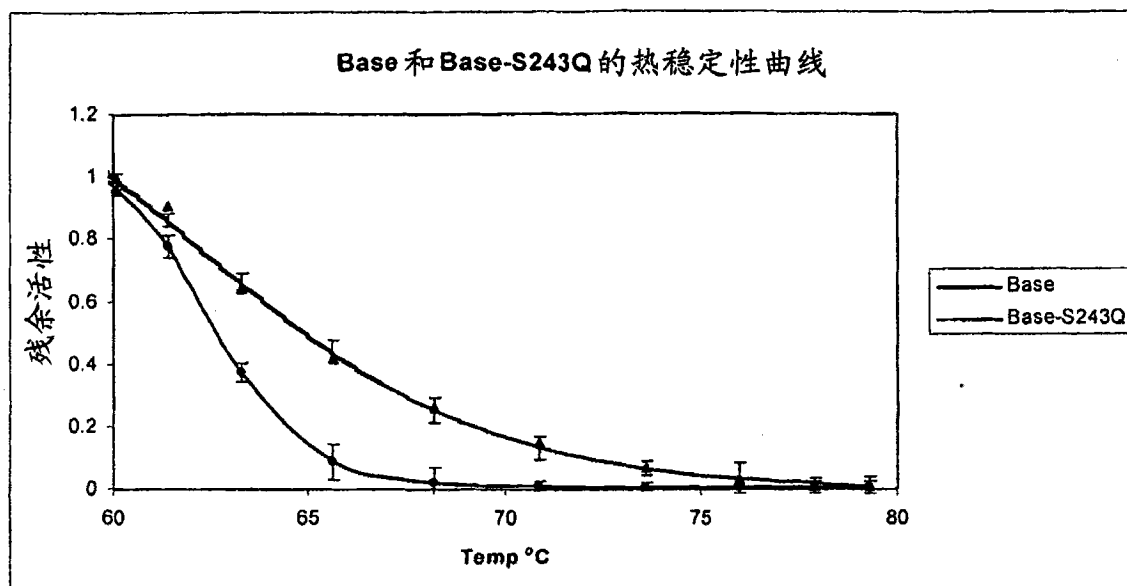


图 20

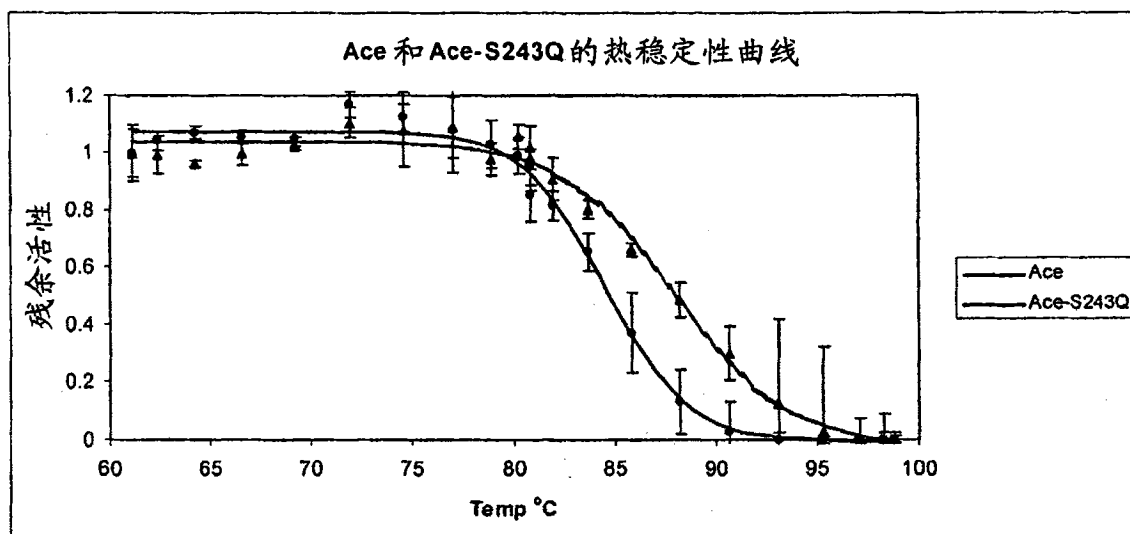


图 21

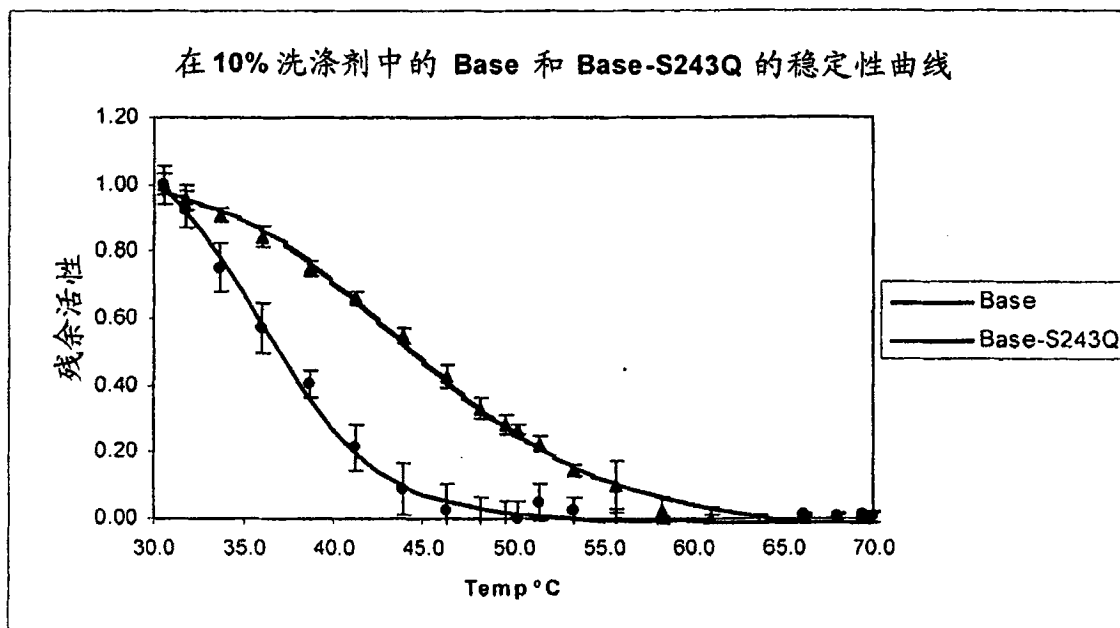


图 22

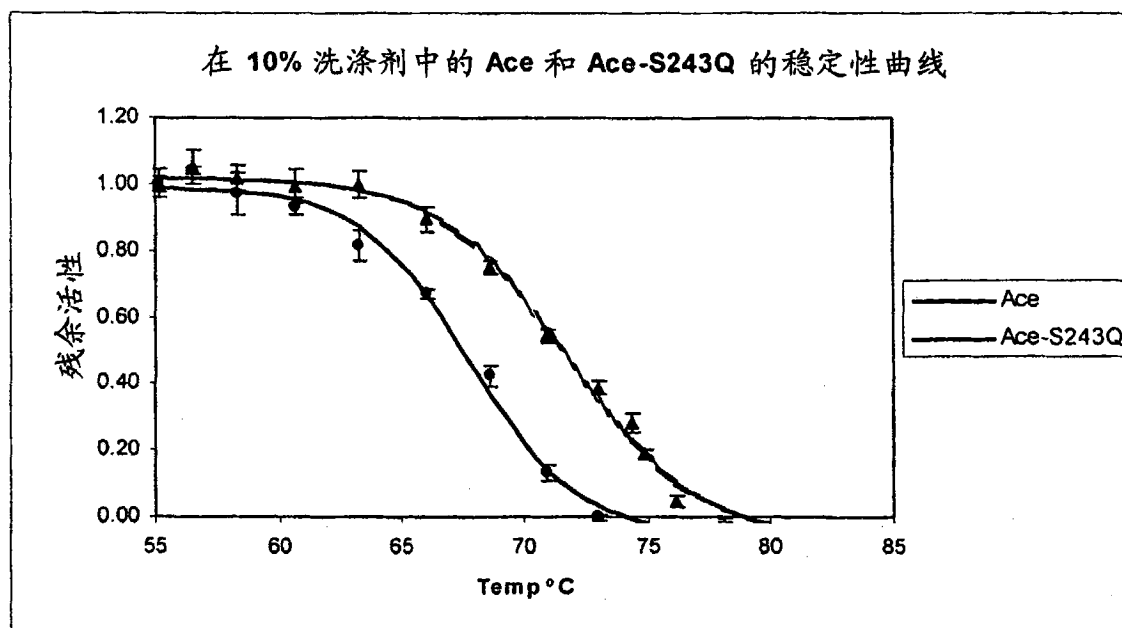


图 23

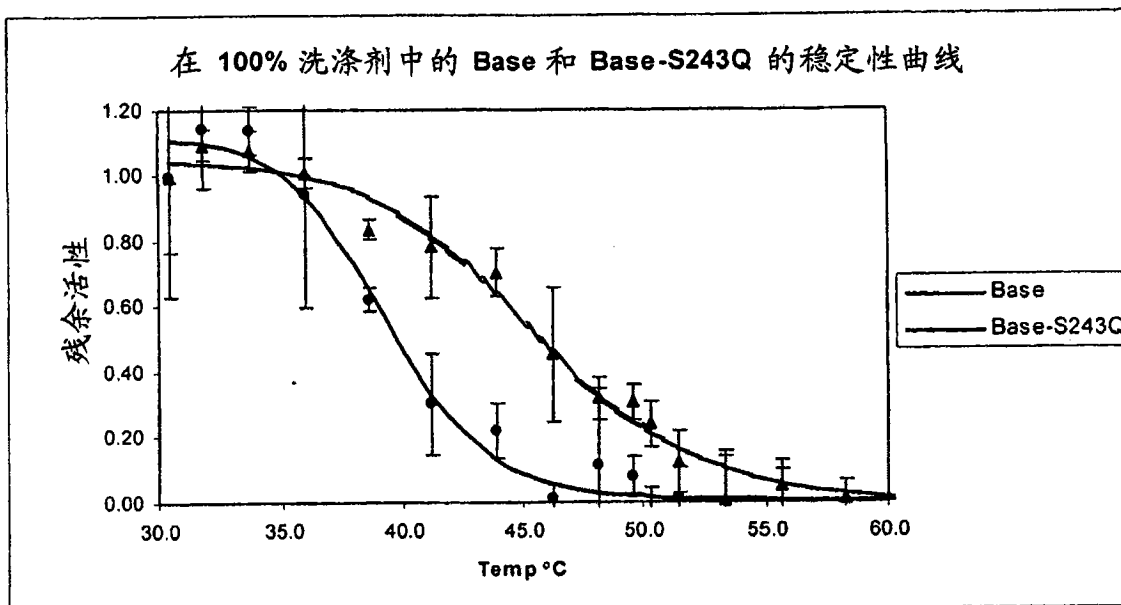


图 24

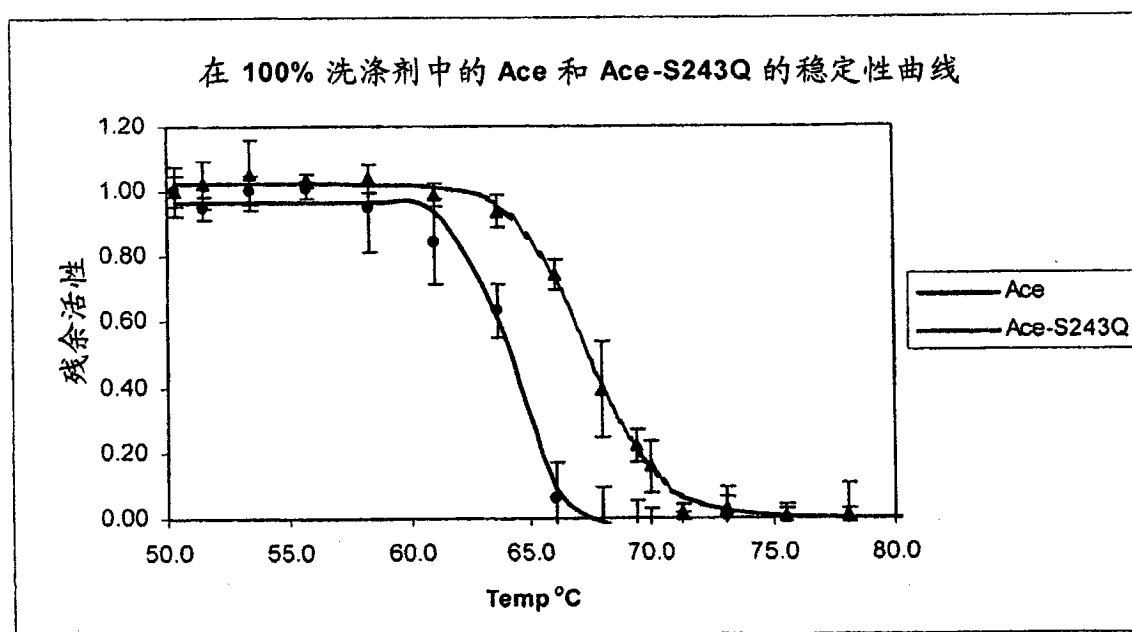


图 25