(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115521831 A
(43)申请公布日 2022.12.27

(21)申请号 202210637208.9

(22)申请日 2014.05.13

(30)优先权数据
13167632.2 2013.05.14 EP

(62)分案原申请数据
201480027086.5 2014.05.13

(71)申请人 诺维信公司
地址 丹麦鲍斯韦

(72)发明人 M.马尔滕 K.博尔奇
L.M.迈克尔森 T.A.波尔森
L.厄兰森 H.P.尼尔森 C.H.汉森
A.斯文德森 C.L.盖尔斯托夫
J.文德 C.杰克尔

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
专利代理师 张文辉

(51)Int.Cl.
C11D 3/386(2006.01)
C12N 9/20(2006.01)
D06L 1/12(2006.01)

权利要求书1页 说明书92页
序列表3页

(54)发明名称

洗涤剂组合物

(57)摘要

提供了洗涤剂组合物。本发明涉及包括亲本脂肪酶的变体的洗涤剂组合物，该变体具有脂肪酶活性，与SEQ ID NO:2具有至少60％但少于100％的序列一致性，并且在对应于T231R+N233R和SEQ ID NO:2的D96E、D111A、D254S、G163K、P256T、G91T、和G38A中至少一个或多个(例如，若干个)的位置处包括取代。本发明还涉及这些组合物的用途、产生这些组合物的方法、以及清洁的方法。本发明进一步涉及多种变体和编码这些变体的多核苷酸，包含这些多核苷酸的核酸构建体、载体以及宿主细胞。

CN 115521831 A

1.一种包括SEQ ID NO:2的亲本脂肪酶的变体的洗涤剂组合物,该变体具有脂肪酶活性,并且引入下组的取代之一:

a)D27R G38A D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T;

b)D27R N33Q G38A D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T;

c)D27R G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T;

d)D27R N33Q G38A G91T D96E G163K T231R N233R D254S P256T;

e)D27R G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T;

f)D27R G38A G91T D96E G163K T231R N233R D254S P256T;

g)N33Q G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T;

h)D27R G38A D96E G163K T231R N233R D254S P256T;

i)D27R N33Q G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T;

j)D27R N33Q G38A D96E D111A T231R N233R D254S P256T;

l)D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T;

n)D96E G163K T231R N233R D254S P256T;

o)G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T;

p)N33Q D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T;

其中所述变体与亲本脂肪酶相比具有增加的稳定性。

2.如权利要求1所述的组合物,进一步包括选自以下各项的一种或多种酶:半纤维素酶、过氧化物酶、蛋白酶、纤维素酶、木聚糖酶、脂肪酶、磷脂酶、酯酶、角质酶、果胶酶、甘露聚糖酶、果胶裂解酶、角蛋白酶、还原酶、氧化酶、酚氧化酶、脂加氧酶、木质酶、支链淀粉酶、鞣酸酶、聚戊糖酶、马拉纳酶、β-葡聚糖酶、阿拉伯糖苷酶、透明质酸酶、软骨素酶、漆酶、叶绿素酶、淀粉酶、或其混合物。

3.如权利要求1-2中任一项所述的组合物,该组合物进一步包括至少一种表面活性剂、至少一种表面活性剂系统、至少一种皂、或其任何混合物。

4.如权利要求1-3中任一项所述的组合物,其中该组合物是一种衣物清洁组合物、餐具清洁组合物、硬表面清洁组合物和/或个人护理清洁组合物。

5.如权利要求1-4中任一项所述的组合物,其中该组合物被配制为规则的、压缩的或浓缩的液体;凝胶;膏;皂条;规则的或压缩的粉末;粒状固体;具有两个或更多个层(相同或不同相)的均匀或多层片剂;具有一个或多个室的袋;单个或多个室单位剂型;或其任何组合。

6.一种用于清洁织物的方法,包括使一种存在于待在具有8-10.5的pH的清洁溶液中清洁的织物上的脂质污渍与根据权利要求1-5中任一项所述的组合物接触。

洗涤剂组合物

[0001] 本申请是基于申请日为2014年5月13日,优先权日为2013年5月14日,申 请号为201480027086.5,发明名称为:“洗涤剂组合物”的专利申请的分案申 请。

[0002] 对序列表的引用

[0003] 本申请包含一个计算机可读形式的序列表,将其通过引用结合在此。

技术领域

[0004] 本发明涉及包括脂肪酶变体的组合物、产生和使用所述组合物的方法、脂肪酶变体、编码这些变体的多核苷酸连同产生和使用所述变体的方法。

背景技术

[0005] 脂肪酶是重要的生物催化剂,其已显示可用于各种应用并且大量的不同 脂肪酶已经被鉴定并且许多已被商品化。然而,适合于在适应于当前使用的 条件的不同组合物中使用的新脂肪酶是令人希望的。

[0006] 脂肪酶已经被用于组合物中,从而用于通过水解甘油三酯以产生脂肪酸 来去除脂质污渍。当前洗涤剂、清洁和/或织物护理组合物包括许多活性成 分,这些成分干扰脂肪酶去除脂质污渍的能力,此外,此类组合物在生产后 不立即使用,其结果是这些脂肪酶的稳定性在储存期间可能受影响。因此, 需要在洗涤剂组合物的严苛环境中有活性且稳定的脂肪酶。

发明内容

[0007] 本发明涉及包括亲本脂肪酶的变体的洗涤剂组合物,该变体具有脂肪酶 活性,与SEQ ID NO:2具有至少60%但少于100%的序列一致性,并且在对应 于T231R+N233R和SEQ ID NO:2的D96E、D111A、D254S、G163K、 P256T、G91T、和G38A中至少一个或多个(例如,若干个)的位置处包括取 代。本发明还涉及这些组合物的用途、产生这些组合物的方法、以及清洁的 方法。

[0008] 本发明此外涉及多种变体和编码这些变体的多核苷酸,包含这些多核苷 酸的核酸构建体、载体以及宿主细胞。

[0009] 本发明涉及以下实施方案:

[0010] 1.一种包括亲本脂肪酶的变体的洗涤剂组合物,该变体具有脂肪酶活性, 与SEQ ID NO:2具有至少60%但少于100%的序列一致性,并且在对应于T231R+N233R和SEQ ID NO:2的D96E、D111A、D254S、G163K、P256T、 G91T、和G38A中至少一个或多个(例如,若干个)的位置处包括取代。

[0011] 2.如实施方案1所述的组合物,该组合物在对应于SEQ ID NO:2的D27R 和/或N33Q的位置处进一步包括取代。

[0012] 3.如实施方案1-2中任一项所述的组合物,进一步包括选自以下各项的一 种或多种酶:半纤维素酶、过氧化物酶、蛋白酶、纤维素酶、木聚糖酶、脂 肪酶、磷脂酶、酯酶、角质

酶、果胶酶、甘露聚糖酶、果胶裂解酶、角蛋白 酶、还原酶、氧化酶、酚氧化酶、脂加氧酶、木质酶、支链淀粉酶、鞣酸 酶、聚戊糖酶、马拉纳酶、β-葡聚糖酶、阿拉伯糖苷酶、透明质酸酶、软骨 素酶、漆酶、叶绿素酶、淀粉酶、或其混合物。

[0013] 4.如实施方案1-3中任一项所述的组合物，其中与亲本脂肪酶相比，所述 变体具有增加的稳定性。

[0014] 5.如实施方案4所述的组合物，其中该稳定性是储存条件下稳定性、表面 活性剂存在下稳定性、蛋白酶存在下稳定性、蛋白酶和表面活性剂存在下稳 定性、洗涤剂组分存在下稳定性、化学稳定性、氧化稳定性、pH稳定性、和/ 或热稳定性。

[0015] 6.如实施方案1-5中任一项所述的组合物，其中该变体是选自下组，该组 由以下各项组成：

[0016] a)一种多肽，该多肽与SEQ ID NO:2具有至少60％、至少65％、至 少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％一致性、至 少96％、至少97％、至少98％、或至少99％但少于100％序列一致性；

[0017] b)一种多肽，该多肽是由一种多核苷酸编码的，该多核苷酸在低严格 条件下、中严格条件下、中-高严格条件下、高严格条件下或非常高严格条件 下与(i)SEQ ID NO:1的多肽编码序列或(ii)(i)的全长补体杂交；

[0018] c)一种多肽，该多肽是由一种多核苷酸编码的，该多核苷酸与SEQ ID NO:1具有至少60％、至少65％、至少70％、至少75％、至少80％、至少 85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％但 少于100％序列一致性；和

[0019] d)SEQ ID NO:2的多肽的一个片段。

[0020] 7.如实施方案1-6中任一项所述的组合物，该组合物进一步包括至少一种 表面活性剂、至少一种表面活性剂系统、至少一种皂、或其任何混合物。

[0021] 8.如实施方案1-7中任一项所述的组合物，其中该组合物是一种衣物清洁 组合物、餐具清洁组合物、硬表面清洁组合物和/或个人护理清洁组合物。

[0022] 9.如实施方案1-8中任一项所述的组合物，其中该组合物被配制为规则 的、压缩的或浓缩的液体；凝胶；膏；皂条；规则的或压缩的粉末；粒状固 体；具有两个或更多个层(相同或不同相)的均匀或多层片剂；具有一个或 多个室的袋；单个或多个室单位剂型；或其任何组合。

[0023] 10.一种产生根据实施方案1-9中任一项所述的组合物的方法，该方法包括 添加一种亲本脂肪酶的变体，该变体具有脂肪酶活性，与SEQ ID NO:2具有 至少60％但少于100％的序列一致性，并且在对应于T231R+N233R和SEQ ID NO:2的D96E、D111A、D254S、G163K、P256T、G91T、和G38A中至少 一个或多个(例如，若干个)的位置处包括取代。

[0024] 11.一种用于清洁受试物的方法，包括使一种存在于有待清洁的受试物上的 脂质污渍与根据实施方案1-9中任一项所述的组合物接触。

[0025] 12.如实施方案1-9中任一项所述的组合物在羧酸酯水解中的用途。

[0026] 13.如实施方案1-9中任一项所述的组合物在酯的水解、合成或交换中的用 途。

[0027] 14.如实施方案1-9中任一项所述的组合物用于制造稳定配制品的用途。

[0028] 15.一种亲本脂肪酶的变体，其中该变体具有脂肪酶活性，与SEQ ID NO:2 具有至少60％但少于100％的序列一致性，并且在对应于T231R+N233R和 SEQ ID NO:2的D96E、

D111A、D254S、G163K、P256T、G91T、和G38A 中至少一个或多个(例如,若干个)的位置处包括取代,这些位置选自以下 项的组:

[0029] a)D96E T231R N233R;

[0030] b)N33Q D96E T231R N233R;

[0031] c)N33Q D111A T231R N233R;

[0032] d)N33Q T231R N233R P256T;

[0033] e)N33Q G38A G91T G163K T231R N233R D254S;

[0034] f)N33Q G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T;

[0035] g)D27R N33Q G38A D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T;

[0036] h)D27R N33Q G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R P256T;

[0037] i)D27R N33Q G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S;

[0038] j)D27R G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T;

[0039] k)D96E T231R N233R D254S;

[0040] l)T231R N233R D254S P256T;

[0041] m)G163K T231R N233R D254S;

[0042] n)D27R N33Q G38A G91T D96E G163K T231R N233R D254S P256T;

[0043] o)D27R G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T;

[0044] p)D96E G163K T231R N233R D254S;

[0045] q)D27R G163K T231R N233R D254S;

[0046] r)D27R G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S;

[0047] s)D27R G38A G91T D96E G163K T231R N233R D254S P256T;

[0048] t)D27R G38A D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T:

[0049] u)D27R D96E G163K T231R N233R D254S;

[0050] v)D27R D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T;

[0051] w)D27R G38A D96E G163K T231R N233R D254S P256T

[0052] x)D111A G163K T231R N233R D254S P256T;

[0053] y)D111A T231R N233R;

[0054] z)D111A T231R N233R D254S P256T;

[0055] aa)D27R D96E D111A G163K T231R N233R;

[0056] bb)D27R D96E D111A T231R N233R;

[0057] cc)D27R G38A D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T;

[0058] dd)D27R N33Q G38A D96E D111A T231R N233R D254S P256T;

[0059] ee)D27R G38A D96E D111A G163K E210Q T231R N233R D254S P256T;

[0060] ff)D27R T231R N233R D254S P256T;

[0061] gg)D96E D111A G163K T231R N233R;

[0062] hh)D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T;

[0063] ii)D96E D111A G163K T231R N233R P256T;

[0064] jj)D96E D111A T231R N233R;

[0065] kk)D96E D111A T231R N233R D254S;

[0066] ll)D96E D111A T231R N233R D254S P256T

[0067] mm)D96E D111A T231R N233R P256T;

[0068] nn)D96E G163K T231R N233R D254S P256T;

[0069] oo)D96E T231R N233R D254S P256T;

[0070] pp)D96E T231R N233R P256T;

[0071] qq)G38A D96E D111A T231R N233R;

[0072] rr)G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T;

[0073] ss)G91T D96E D111A T231R N233R;

[0074] tt)G91T D96E T231R N233R;

[0075] uu)G91T T231R N233R D254S P256T;

[0076] vv)N33Q D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T;

[0077] ww)T231R N233R D254S P256T;

[0078] xx)T231R N233R P256T。

[0079] 16.如实施方案15所述的变体,其中与亲本脂肪酶相比,所述变体具有增加 的选自以下项的稳定性:储存条件下稳定性、蛋白酶存在下稳定性、表面活 性剂和蛋白酶存在下稳定性、化学稳定性、氧化稳定性、pH稳定性、和/或热 稳定性。

[0080] 定义

[0081] 脂肪酶:术语“脂肪酶(lipase)”、“脂肪酶(lipase enzyme)”、“脂解酶”、“脂质酯酶”、“脂解多肽”以及“脂解蛋白”是指如酶命名 法所定义的EC3.1.1类中的一种酶。它可以具有脂肪酶活性(三酰基甘油脂肪 酶,EC3.1.1.3)、角质酶活性(EC3.1.1.74)、固醇酯酶活性(EC3.1.1.13) 和/或蜡酯水解酶活性(EC3.1.1.50)。出于本发明的目的,根据实例中所述的 程序确定脂肪酶活性。在一方面,本发明的变体具有SEQ ID NO:2的多肽的 脂肪酶活性的至少20%,例如至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至 少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、 至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或100%。

[0082] 等位基因变体:术语“等位基因变体”意指占据同一染色体基因座的基 因的两种或更多种可替代形式中的任一种。等位基因变异由突变天然产生, 并且可以导致群体内的多态性。基因突变可以是沉默的(在所编码的多肽中 没有改变)或可编码具有改变的氨基酸序列的多肽。多肽的等位基因变体是 由基因的等位基因变体编码的多肽。

[0083] cDNA:术语“cDNA”是指可以通过从得自真核或原核细胞的成熟的、剪接的mRNA分子进行反转录而制备的DNA分子。cDNA缺乏可以存在于对应 基因组DNA中的内含子序列。早先的初始RNA转录本是mRNA的前体,其在 呈现为成熟的剪接的mRNA之前要经一系列的步骤进行加工,包括剪接。

[0084] 编码序列:术语“编码序列”意指直接指明变体的氨基酸序列的多核苷 酸。编码序列的边界一般由一个开放阅读框架决定,该开放阅读框架从一个 起始密码子(如ATG、GTG或TTG)开始并且以一个终止密码子(如TAA、 TAG或TGA)结束。编码序列可以是一种基因组DNA、cDNA、合成DNA或 其组合。

[0085] 控制序列:术语“控制序列”意指对于表达编码本发明的变体的多核苷 酸所必需的核酸序列。每个控制序列对于编码该变体的多核苷酸来说可以是 原生(native)的(即,

来自相同基因)或外源的(即,来自不同基因),或 相对于彼此是原生的或外源的。此类控制序列包括但不限于前导子、聚腺苷 酸化序列、前肽序列、启动子、信号肽序列、以及转录终止子。至少,控制 序列包括启动子,以及转录和翻译终止信号。出于引入有利于将这些控制序 列与编码一种变体的多核苷酸的编码区连接的特异性限制酶切位点的目的, 这些控制序列可以提供有多个接头。

[0086] 表达:术语“表达”包括涉及变体产生的任何步骤,包括但不限于,转 录、转录后修饰、翻译、翻译后修饰以及分泌。

[0087] 表达载体:术语“表达载体”意指线性或环状DNA分子,该分子包括编 码变体的多核苷酸并且该多核苷酸可操作地与提供用于其表达的控制序列相 连接。

[0088] 片段:术语“片段”意指在一种多肽的氨基和/或羧基末端缺失一个或多 个(例如若干个)氨基酸的一种多肽。其中该片段具有脂肪酶活性。在一方 面,一个片段包含SEQ ID NO:2的氨基酸1至369的数目的至少50%、至少 55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至 少90%或至少95%但少于100%。

[0089] 高严格条件:术语“高严格条件”意指对于长度为至少100个核苷酸的 探针而言,遵循标准DNA印迹程序,在42℃下在5X SSPE、0.3%SDS、200微 克/ml剪切并变性的鲑鱼精子DNA和50%甲酰胺中预杂交和杂交12至24小时。 载体材料最终使用2X SSC、0.2%SDS,在65℃下洗涤三次,每次15分钟。

[0090] 宿主细胞:术语“宿主细胞”意指易于用包含本发明的多核苷酸的核酸 构建体或表达载体转化、转染、转导等的任何细胞类型。术语“宿主细胞” 涵盖由于复制期间发生的突变而与亲本细胞不同的亲本细胞的任何后代。

[0091] 改进的特性:术语“改进的特性”意指与变体相关的、与亲本脂肪酶相 比得到改进的特征。这样的改进的性质包括但不限于:洗涤剂稳定性、存在 蛋白酶的洗涤剂中的稳定性、蛋白酶稳定性、化学稳定性、氧化稳定性、pH 稳定性、储存条件下的稳定性、以及热稳定性。

[0092] 分离的:术语“分离的”意指处于自然界中不存在的形式或环境中的物 质。分离的物质的非限制性实例包括(1)任何非天然发生的物质,(2)包括但 不限于任何酶、变体、核酸、蛋白质、肽或辅因子的任何物质,该物质至少 部分地从与其本质相关的一种或多种或所有天然发生的成分中去除;(3)相对 于天然发现的物质通过人工修饰的任何物质;或(4)通过增加该物质相对于与 其本质相关的其他组分的量而修饰的任何物质(例如,编码该物质的基因的 多拷贝;使用比编码该物质的基因本质相关的启动子强的启动子)。一种分 离的物质可以存在于发酵液样品中。

[0093] 低严格条件:术语“低严格条件”意指对于长度为至少100个核苷酸的 探针而言,遵循标准DNA印迹程序,在42℃下在5X SSPE、0.3%SDS、200微 克/ml剪切并变性的鲑鱼精子DNA和25%甲酰胺中预杂交和杂交12至24小时。最后在50℃使用2X SSC、0.2%SDS将载体材料洗涤三次,每次15分钟。

[0094] 成熟多肽:术语“成熟多肽”意指在翻译和任何翻译后修饰如N-末端加 工、C-末端截短、糖基化作用、磷酸化作用等之后处于其最终形式的多肽。在一方面,成熟多肽是SEQ ID NO:2的氨基酸1至269。本领域中已知的是, 一个宿主细胞可以产生由同一多核苷酸表达的两种或更多种不同成熟多肽 (即,具有不同C-末端和/或N-末端氨基酸)的混合物。

[0095] 成熟多肽编码序列:术语“成熟多肽编码序列”意指编码具有脂肪酶活 性的成熟多肽的一种多核苷酸。在一个方面中,成熟多肽编码序列是SEQ ID NO:1的核苷酸1至807。

[0096] 中严格条件:术语“中严格条件”意指对于长度为至少100个核苷酸的 探针而言,遵循标准DNA印迹程序,在42℃下在5X SSPE、0.3%SDS、200微 克/ml剪切并变性的鲑鱼精子DNA和35%甲酰胺中预杂交和杂交12至24小时。最后在55℃使用2X SSC、0.2%SDS将载体材料洗涤三次,每次15分钟。

[0097] 中严格条件:术语“中严格条件”意指对于长度为至少100个核苷酸的 探针而言,遵循标准DNA印迹程序,在42℃下在5X SSPE、0.3%SDS、200微 克/ml剪切并变性的鲑鱼精子DNA和35%甲酰胺中预杂交和杂交12至24小时。最后在60℃使用2X SSC、0.2%SDS将载体材料洗涤三次,每次15分钟。

[0098] 突变体:术语“突变体”意指编码一种变体的多核苷酸。

[0099] 核酸构建体:术语“核酸构建体”意指单链或双链的一种核酸分子,该 核酸分子是从天然存在的基因中分离的,或以一种本来不存在于自然界中的 方式被修饰成含有核酸的区段,或是合成的,该核酸分子包括一个或多个控 制序列。

[0100] 可操作地连接:术语“可操作地连接”意指如下的构造,其中,控制序 列相对于多核苷酸的编码序列安置在适当位置,从而使得该控制序列指导该 编码序列的表达。

[0101] 亲本或亲本脂肪酶:术语“亲本”或“亲本脂肪酶”意指一种脂肪酶, 对该脂肪酶进行一个改变以产生本发明的酶变体。亲本脂肪酶可以是天然存 在的(野生型)多肽或其变体或片段。

[0102] 序列一致性:两个氨基酸序列之间或者两个核苷酸序列之间的关联度通 过参数“序列一致性”来描述。

[0103] 出于本发明的目的,使用如在EMBOSS包(EMBOSS:欧洲分子生物学 开放软件套件(The European Molecular Biology Open Software Suite),赖斯 (Rice)等人,2000,遗传学趋势(Trends Genet)16:276-277)的尼德尔程 序中所实施的尼德曼-温施算法(尼德曼(Needleman)和温施(Wunsch), 1970,分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)48:443-453)确定在两种氨基酸序列 之间的序列一致性,优选5.0.0版或更新版本。所使用的参数是空位开放罚分 10,空位延伸罚分0.5,以及EBLOSUM62(BLOSUM62的EMBOSS版本)取 代矩阵。尼德尔标注的“最长的一致性”的输出(使用-非简化选项获得)被 用作百分比一致性,并且如下计算:

[0104] (一致的残基X 100)/(比对长度-比对中的空位总数)。

[0105] 出于本发明的目的,使用如在EMBOSS包(EMBOSS:欧洲分子生物学 开放软件套件,赖斯(Rice)等人,2000,见上文)(优选5.0.0版或更新版 本)的尼德尔程序中所实施的尼德尔曼-翁施算法(尼德尔曼(Needleman) 和翁施(Wunsch),1970,见上文)来确定两个脱氧核糖核苷酸序列之间的 序列一致性。使用的这些参数是空位开放罚分10、空位延伸罚分0.5以及 EDNAFULL(NCBI NUC4.4的EMBOSS版本)取代矩阵。尼德尔标注的“最 长的一致性”的输出(使用-非简化选项获得)被用作百分比一致性,并且计 算如下:

[0106] (一致的脱氧核糖核苷酸x 100)/(比对长度-比对中的空位总数)。

[0107] 稳定性:一种脂肪酶的稳定性可以表达为所述脂肪酶在存在不同组分 (例如蛋白酶、化学品、和/或氧化性物质(应力条件))的情况下,在不同 温度、不同pH下,暴露于不同

测试条件(例如像储存在洗涤剂组合物中)期 间或之后的残余活性或残余性能。一种变体脂肪酶的稳定性可以相对于一种 亲本脂肪酶的已知活性或性能、或可替代地相对于该变体脂肪酶在最初添加 到任选冷储存或冻存的洗涤剂组合物中时的已知活性或性能、或相对于冷储 存或冻存(无应力条件)的变体脂肪酶进行测量。

[0108] 子序列:术语“子序列”意指使一个或多个(例如,若干个)核苷酸从 成熟多肽编码序列的5'端和/或3'端缺失的多核苷酸;其中该子序列编码具有脂 肪酶活性的片段。在一方面,一个子序列包含SEQ ID NO:1的核苷酸1至807 的数目的至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、 至少80%、至少85%、至少90%或至少95%但少于100%。

[0109] 变体:术语“变体”意指在一个或多个(例如,若干个)位置包括改变(即,取代、插入和/或缺失)的具有脂肪酶活性的一种多肽。取代意指用一 个不同氨基酸置换占用一个位置的氨基酸;缺失意指去除占据一个位置的氨 基酸;并且插入意指在邻接并且紧随占据一个位置的氨基酸之后添加一个氨 基酸。本发明的这些变体具有SEQ ID NO:2的多肽的至少20%,例如至少 40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少100%的脂肪酶活性。

[0110] 非常高严格条件:术语“非常高严格条件”是指对于长度为至少100个 核苷酸的探针而言,遵循标准DNA印迹程序,在42℃下在5X SSPE、0.3% SDS、200微克/ml剪切并变性的鲑鱼精子DNA和50%甲酰胺中预杂交和杂交12 至24小时。最后在70℃使用2X SSC、0.2% SDS将载体材料洗涤三次,每次15 分钟。

[0111] 非常低严格条件:术语“非常低严格条件”是指对于长度为至少100个 核苷酸的探针而言,遵循标准DNA印迹程序,在42℃下在5X SSPE、0.3% SDS、200微克/ml剪切并变性的鲑鱼精子DNA和25%甲酰胺中预杂交和杂交12 至24小时。最后在45℃使用2X SSC、0.2% SDS将载体材料洗涤三次,每次15 分钟。

[0112] 野生型脂肪酶:术语“野生型”脂肪酶意指由天然存在的微生物(如在 自然界中发现的细菌、酵母或丝状真菌)表达的一种脂肪酶。

[0113] 变体命名惯例

[0114] 出于本发明的目的,使用在SEQ ID NO:2中披露的多肽来确定另一种脂 肪酶中的相应的氨基酸残基。将另一种脂肪酶的氨基酸序列与SEQ ID NO:2 进行比对,并且基于该比对,使用如在EMBOSS包(EMBOSS:欧洲分子生 物学开放软件套件,赖斯(Rice)等人,2000,遗传学趋势(Trends Genet.) 16:276-277)(优选5.0.0版或更新版本)的尼德尔程序中所实施的尼德尔曼- 翁施算法(尼德尔曼(Needleman)和翁施(Wunsch),1970,分子生物学 杂志(J.Mol.Biol.)48:443-453)来确定与SEQ ID NO:2中所披露的多肽中的 任何氨基酸残基相对应的氨基酸位置编号。所使用的参数是空位开放罚分 10,空位延伸罚分0.5,以及EBLOSUM62(BLOSUM62的EMBOSS版本)取 代矩阵。

[0115] 另一种脂肪酶中对应的氨基酸残基的鉴别可以通过使用若干计算机程序 使用其对应的缺省参数比对多个多肽序列来确定,这些计算机程序包括但不 限于MUSCLE(通过对数期望值的多序列比较;3.5版或更新版本;埃德加 (Edgar),2004,核酸研究(Nucleic Acids Research)32:1792-1797); MAFFT(6.857版或更新版本;加藤(Katoh)和库玛(Kuma),2002,核酸 研究30:3059-3066;加藤等人,2005,核酸研究33:511-518;加藤和朝都

(Toh),2007,生物信息学(Bioinformatics)23:372-374;加藤等人,2009,分子生物学中的方法(Methods in Molecular Biology)537:39-64;加藤 和朝都,2010,生物信息学26:1899-1900);以及采用ClustalW的EMBOSS EMMA(1.83版或更新版本;汤普森(Thompson)等人,1994,核酸研究22: 4673-4680)。

[0116] 当其他酶与SEQ ID NO:2的多肽相背离使得传统的基于序列的比较方法 不能检测其相互关系时(林达尔(Lindahl)和埃洛弗松(Elofsson),2000, 分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)295:613-615),可应用其他成对序列比较算 法。在基于序列的搜索中的更大灵敏度可以使用搜索程序来获得,这些搜索 程序利用多肽家族的概率表示(谱(profile))来搜索数据库。例如,PSI- BLAST程序通过迭代数据库搜索过程来产生多个谱,并且能够检测远距离同 源物(阿特休尔(Atschul)等人,1997,核酸研究(Nucleic Acids Res.)25: 3389-3402)。如果多肽的家族或超家族在蛋白结构数据库中具有一个或多个 代表,则可以实现甚至更大的灵敏度。程序如GenTHREADER(琼斯 (Jones),1999,分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)287:797-815;麦古芬 (McGuffin)和琼斯,2003,生物信息学(Bioinformatics)19:874-881)利用 来自不同来源(PSI-BLAST、二级结构预测、结构比对谱以及溶剂化势)的 信息作为预测查询序列的结构折叠的神经网络的输入。类似地,高夫(Gough)等人,2000,分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)313:903-919的方法 可以用于比对未知结构的序列与存在于SCOP数据库中的超家族模型。这些比 对进而可以用于产生多肽的同源性模型,并且使用出于该目的而开发的多种 工具可以评定此类模型的准确度。

[0117] 对于已知结构的蛋白,若干工具和资源可用于检索并产生结构比对。例 如,蛋白的SCOP超家族已经在结构上进行比对,并且那些比对是可访问的并 且可下载的。可以使用多种算法如距离比对矩阵(奥尔姆(Holm)和桑德 (Sander),1998,蛋白质(Proteins)33:88-96)或组合延伸(辛迪亚洛夫 (Shindyalov)和伯恩(Bourne),1998,蛋白质工程(Protein Engineering) 11:739-747)比对两种或更多种蛋白质结构,并且这些算法的实施可以另外 用于查询具有感兴趣结构的结构数据库,以便发现可能的结构同源物(例 如,奥尔姆和帕克(Park),2000,生物信息学(Bioinformatics)16:566- 567)。

[0118] 在描述本发明的变体中,以下所述的命名法适于方便参考。使用公认的 IUPAC单字母或三字母氨基酸缩写。

[0119] 取代。对于氨基酸取代,使用以下命名法:初始氨基酸、位置、取代氨 基酸。因此,在位置226处的苏氨酸被丙氨酸取代表示为“Thr226Ala”或者 “T226A”。多个突变由加号(“+”)分开,例如“Gly205Arg+ Ser411Phe”或“G205R+S411F”代表分别在位置205和位置411处甘氨酸(G)被精氨酸(R)取代,并且丝氨酸(S)被苯丙氨酸(F)取代。

[0120] 缺失。对于氨基酸缺失,使用以下命名法:初始氨基酸、位置、*。因 此,在位置195处的甘氨酸缺失表示为“Gly195*”或者“G195*”。多重缺失 通过加号(“+”)分开,例如,“Gly195*+Ser411*”或“G195*+ S411*”。

[0121] 插入。对于氨基酸插入,使用以下命名法:初始氨基酸、位置、初始氨 基酸、插入氨基酸。因此,在位置195处的甘氨酸之后插入赖氨酸被表示为 “Gly195GlyLys”或者“G195GK”。多个氨基酸的插入被表示为[原始氨基 酸、位置、原始氨基酸、插入的氨基酸#1、插入的氨基酸#2;等]。例如,在 位置195处的甘氨酸之后插入赖氨酸和丙氨酸被表示为“Gly195GlyLysAla” 或“G195GKA”。

[0122] 在此类情况下,通过将小写字母添加至在所插入的一个或多个氨基酸残 基之前的氨基酸残基的位置编号中来对所插入的一个或多个氨基酸残基进行 编号。在以上实例中,该序列因此将是:

[0123]

亲本:	变体:
195	195 195a 195b
G	G-K-A

[0124] 多种改变。包含多种改变的变体由加号(“+”)分开,例如 “Arg170Tyr+Gly195Glu”或者“R170Y+G195E”代表在位置170和位置 195处的精氨酸和甘氨酸分别被酪氨酸和谷氨酸取代。

[0125] 不同改变。可以在一个位置上引入不同的改变时,这些不同的改变由一 个逗号分开,例如“Arg170Tyr,Glu”代表在位置170上的精氨酸被酪氨酸或谷 氨酸取代。因此,“Tyr167Gly,Ala+Arg170Gly,Ala”表示以下变体:

[0126] “Tyr167Gly+Arg170Gly”、“Tyr167Gly+Arg170Ala”、“Tyr167Ala+Arg170Gly”、和“Tyr167Ala+Arg170Ala”。

具体实施方式

[0127] 本发明涉及包括脂肪酶变体的组合物,该变体在对应于T231R+N233R和 SEQ ID NO:2的多肽的至少一个或多个(例如,若干个)位置处包括取代, 其中该变体具有脂肪酶活性。

[0128] 变体

[0129] 本发明提供多种脂肪酶变体,其在对应于T231R+N233R和SEQ ID NO:2 的D96E、D111A、D254S、G163K、P256T、G91T、和G38A中至少一个或多 个(例如,若干个)的位置处包括取代,其中该变体具有脂肪酶活性。在一 些方面,这些变体在对应于SEQ ID NO:2的D27R和/或N33Q的位置处进一步 包括取代。

[0130] 在一个方面,该变体与该亲本脂肪酶的氨基酸序列具有至少60%、例如 至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少 91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至 少98%、或至少99%、但小于100%的序列一致性。在另一个方面,该变体与 SEQ ID NO:2具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少 80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%,如至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%、但小于100%的序列 一致性。

[0131] 在一方面,本发明的这些变体中的取代的数目是1-40个,例如1-30、1- 20、1-10和1-5个,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、 31、32、33、34、35、36、37、38、39、或40个取代。

[0132] 在另一个方面,变体在对应于T231R+N233R和SEQ ID NO:2的D96E、 D111A、D254S、G163K、P256T、G91T、和G38A中至少一个或多个(例 如,若干个)的位置处包括取代。在另一个方面,变体在对应于 T231R+N233R的多个位置和对应于SEQ ID NO:2的位置D96E、D111A、D254S、G163K、P256T、G91T、G38A、D27R、以及N33Q中任一个的两个 位置处包括取代。在另一个方面,变体在对应于T231R+N233R的多个位置和 对应于SEQ ID NO:2的位置D96E、D111A、D254S、G163K、P256T、 G91T、G38A、D27R、以及N33Q中任一个的三个位置处包括取代。在另一

个 方面，变体在对应于T231R+N233R的多个位置和对应于SEQ ID NO:2的位置 D96E、D111A、D254S、G163K、P256T、G91T、G38A、D27R、以及N33Q 中任一个的四个位置处包括取代。在另一个方面，变体在对应于 T231R+N233R的多个位置和对应于SEQ ID NO:2的位置D96E、D111A、 D254S、G163K、P256T、G91T、G38A、D27R、以及N33Q中任一个的五个 位置处包括取代。在另一个方面，变体在对应于T231R+N233R的多个位置和 对应于SEQ ID NO:2的位置D96E、D111A、D254S、G163K、P256T、 G91T、G38A、D27R、以及N33Q中任一个的六个位置处包括取代。在另一个 方面，变体在对应于T231R+N233R的多个位置和对应于SEQ ID NO:2的位置D96E、D111A、D254S、G163K、P256T、G91T、G38A、D27R、以及N33Q 中任一个的七个位置处包括取代。在另一个方面，变体在对应于 T231R+N233R的多个位置和对应于SEQ ID NO:2的位置D96E、D111A、 D254S、G163K、P256T、G91T、G38A、D27R、以及N33Q中任一个的八个 位置处包括取代。在另一个方面，变体在对应于T231R+N233R的多个位置和 对应于SEQ ID NO:2的位置D96E、D111A、D254S、G163K、P256T、 G91T、G38A、D27R、以及N33Q中任一个的九个位置处包括取代。

[0133] 在另一个方面，该变体包括在对应于T231R+N233R和位置96的位置处的 取代或由其组成。在另一个方面，在与位置96相对应的位置上的氨基酸被 Glu、Gly、Ser、或Val，优选被Glu取代。在另一个方面，该变体包括SEQ ID NO:2的取代D96E或由其组成。

[0134] 在另一个方面，该变体包括在对应于T231R+N233R和位置111的位置处 的取代或由其组成。在另一方面，在与位置111相对应的一个位置上的氨基酸 被Ala、Gly、Ile、Leu、Met、或Val，优选被Ala取代。在另一个方面，该变 体包括SEQ ID NO:2的取代D111A或由其组成。

[0135] 在另一个方面，该变体包括在对应于T231R+N233R和位置254的位置处 的取代或由其组成。在另一个方面，在与位置254相对应的位置上的氨基酸被 Ser、或Thr，优选被Ser取代。在另一个方面，该变体包括SEQ ID NO:2的取 代D254S或由其组成。

[0136] 在另一个方面，该变体包括在对应于T231R+N233R和位置163的位置处 的取代或由其组成。在另一个方面，在与位置163相对应的位置上的氨基酸被 Asp、Glu、His、或Lys取代。在另一个方面，该变体包括SEQ ID NO:2的取 代G163K或由其组成。

[0137] 在另一个方面，该变体包括在对应于T231R+N233R和位置256的位置处 的取代或由其组成。在另一个方面，在与位置256相对应的位置上的氨基酸被 Lys、Ser、或Thr，优选被Thr取代。在另一个方面，该变体包括SEQ ID NO:2 的取代P256T或由其组成。

[0138] 在另一个方面，该变体包括在对应于T231R+N233R和位置91的位置处的 取代或由其组成。在另一方面，在与位置91相对应的一个位置上的氨基酸被 Ala、Asn、Gln、Glu、Ile、Leu、Ser、Thr、Trp、或Val，优选被Thr取代。在 另一个方面，该变体包括SEQ ID NO:2的取代G91T或由其组成。

[0139] 在另一个方面，该变体包括在对应于T231R+N233R和位置38的位置处的 取代或由其组成。在另一方面，在与位置38相对应的一个位置上的氨基酸被 Ala、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Ile、Leu、Met、或Val，优选被Ala取代。 在另一个方面，该变体包括SEQ ID NO:2的取代G38A或由其组成。

[0140] 在另一个方面，该变体包括在对应于T231R+N233R和位置27的位置处的 取代或由其组成。在另一个方面，在与位置27相对应的位置上的氨基酸被 Arg、His、或Lys，优选被

Arg取代。在另一个方面，该变体包括SEQ ID NO: 2的取代D27R或由其组成。

[0141] 在另一个方面，该变体包括在对应于T231R+N233R和位置33的位置处的 取代或由其组成。在另一个方面，在与位置33相对应的位置上的氨基酸被 Gln、Lys、Ser、或Thr，优选被Gln取代。在另一个方面，该变体包括SEQ ID NO:2的取代N33Q或由其组成。

[0142] 在另一个方面，该变体包括在对应于T231R+N233R和以下项中之一的位 置处的取代或由其组成：27+33；27+38；27+91；27+96；27+111；27+163； 27+254；27+256；33+38；33+91；33+96；33+111；33+163；33+254； 33+256；38+91；38+96；38+111；38+163；38+254；38+256；91+96； 91+111；91+163；91+254；91+256；96+111；96+163；96+254；96+256； 111+163；111+254；111+256；163+254；163+256；或254+256，例如上述的 那些。

[0143] 在另一个方面，该变体包括在对应于T231R+N233R和以下项中之一的位 置处的取代或由其组成：27+33+38；27+33+91；27+33+96；27+33+111； 27+33+163；27+33+254；27+33+256；27+38+91；27+38+96；27+38+111； 27+38+163；27+38+254；27+38+256；27+91+96；27+91+111；27+91+163； 27+91+254；27+91+256；27+96+111；27+96+163；27+96+254；27+96+256； 27+111+163；27+111+254；27+111+256；27+163+254；27+163+256； 27+254+256；33+38+91；33+38+96；33+38+111；33+38+163；33+38+254； 33+38+256；33+91+96；33+91+111；33+91+163；33+91+254；33+91+256； 33+96+111；33+96+163；33+96+254；33+96+256；33+111+163；33+111+254；33+111+256；33+163+254；33+163+256；33+254+256； 38+91+96；38+91+111；38+91+163；38+91+254；38+91+256；38+96+111； 38+96+163；38+96+254；38+96+256；38+111+163；38+111+254； 38+111+256；38+163+254；38+163+256；38+254+256；91+96+111； 91+96+163；91+96+254；91+96+256；91+111+163；91+111+254； 91+111+256；91+163+254；91+163+256；91+254+256；96+111+163； 96+111+254；96+111+256；96+163+254；96+163+256；96+254+256； 111+163+254；111+163+256；111+254+256；或163+254+256，例如上述的那 些。

[0144] 在另一个方面，该变体包括在对应于T231R+N233R和以下项中之一的位 置处的取代或由其组成：27+33+38+91；27+33+38+96；27+33+38+111； 27+33+38+163；27+33+38+254；27+33+38+256；27+33+91+96； 27+33+91+111；27+33+91+163；27+33+91+254；27+33+91+256； 27+33+96+111；27+33+96+163；27+33+96+254；27+33+96+256； 27+33+111+163；27+33+111+254；27+33+111+256；27+33+163+254； 27+33+163+256；27+33+254+256；27+38+91+96；27+38+91+111； 27+38+91+163；27+38+91+254；27+38+91+256；27+38+96+111； 27+38+96+163；27+38+96+254；27+38+96+256；27+38+111+163； 27+38+111+254；27+38+111+256；27+38+163+254；27+38+163+256； 27+38+254+256；27+91+96+111；27+91+96+163；27+91+96+254；27+91+96+256；27+91+111+163；27+91+111+254；27+91+111+256； 27+91+163+254；27+91+163+256；27+91+254+256；27+96+111+163； 27+96+111+254；27+96+111+256；27+96+163+254；27+96+163+256； 27+96+254+256；27+111+163+254；27+111+163+256；27+111+254+256； 27+163+254+256；33+38+91+96；33+38+91+111；33+38+91+163； 33+38+91+254；33+38+91+256；33+38+96+111；33+38+96+163； 33+38+96+254；33+38+96+256；33+38+111+163；33+38+111+254； 33+38+111+256；33+38+163+254；33+38+163+256；33+38+254+256； 33+91+96+111；33+91+96+163；33+91+96+254；33+91+96+256； 33+91+111+163；33+91+111+254；33+91+111+256；33+91+163+254； 33+91+163+256；33+91+254+256；33+96+111+163；33+96+111+254； 33+96+111+256；33+96+163+254；33+96+163+256；33+96+254+256； 33+111+163+

254;33+111+163+256;33+111+254+256;33+163+254+256; 38+91+96+111;38+91+96+163;38+91+96+254;38+91+96+256; 38+91+111+163;38+91+111+254;38+91+111+256;38+91+163+254; 38+91+163+256;38+91+254+256;38+96+111+163;38+96+111+254; 38+96+111+256;38+96+163+254;38+96+163+256;38+96+254+256; 38+111+163+254;38+111+163+256;38+111+254+256;38+163+254+256; 91+96+111+163;91+96+111+254;91+96+111+256;91+96+163+254; 91+96+163+256;91+96+254+256;91+111+163+254;91+111+163+256; 91+111+254+256;91+163+254+256;96+111+163+254;96+111+163+256; 96+111+254+256;96+163+254+256;或111+163+254+256,例如上述的那 些。

[0145] 在另一个方面,该变体包括在对应于T231R+N233R和以下项中之一的位 置处的取代或由其组成:27+33+38+91+96;27+33+38+91+111; 27+33+38+91+163;27+33+38+91+254;27+33+38+91+256; 27+33+38+96+111;27+33+38+96+163;27+33+38+96+254; 27+33+38+96+256;27+33+38+111+163;27+33+38+111+254; 27+33+38+111+256;27+33+38+163+254;27+33+38+163+256; 27+33+38+254+256;27+33+91+96+111;27+33+91+96+163; 27+33+91+96+254;27+33+91+96+256;27+33+91+111+163; 27+33+91+111+254;27+33+91+111+256;27+33+91+163+254; 27+33+91+163+256;27+33+91+254+256;27+33+96+111+163; 27+33+96+111+254;27+33+96+111+256;27+33+96+163+254; 27+33+96+163+256;27+33+96+254+256;27+33+111+163+254; 27+33+111+163+256;27+33+111+254+256;27+33+163+254+256;27+38+91+96+111;27+38+91+96+163;27+38+91+96+254; 27+38+91+96+256;27+38+91+111+163;27+38+91+111+254; 27+38+91+111+256;27+38+91+163+254;27+38+91+163+256; 27+38+91+254+256;27+38+96+111+163;27+38+96+111+254; 27+38+96+111+256;27+38+96+163+254;27+38+96+163+256; 27+38+96+254+256;27+38+111+163+254;27+38+111+163+256;27+38+111+254+256;27+38+163+254+256;27+91+96+111+163; 27+91+96+111+254;27+91+96+111+256;27+91+96+163+254; 27+91+96+163+256;27+91+96+254+256;27+91+111+163+254; 27+91+111+163+256;27+91+111+254+256;27+91+163+254+256; 27+96+111+163+254;27+96+111+163+256;27+96+111+254+256; 27+96+163+254+256;27+111+163+254+256;33+38+91+96+111; 33+38+91+96+163;33+38+91+96+254;33+38+91+96+256; 33+38+91+111+163;33+38+91+111+254;33+38+91+111+256; 33+38+91+163+254;33+38+91+163+256;33+38+91+254+256; 33+38+96+111+163;33+38+96+111+254;33+38+96+111+256; 33+38+96+163+254;33+38+96+163+256;33+38+96+254+256; 33+38+111+163+254;33+38+111+163+256;33+38+111+254+256; 33+38+163+254+256;33+91+96+111+163;33+91+96+111+254; 33+91+96+111+256;33+91+96+163+254;33+91+96+163+256; 33+91+96+254+256;33+91+111+163+254;33+91+111+163+256; 33+91+111+254+256;33+91+163+254+256;33+96+111+163+254; 33+96+111+163+256;33+96+111+254+256;33+96+163+254+256; 33+111+163+254+256;38+91+96+111+163;38+91+96+111+254; 38+91+96+111+256;38+91+96+163+254;38+91+96+163+256; 38+91+96+254+256;38+91+111+163+254;38+91+111+163+256;38+91+111+254+256;38+91+163+254+256;38+96+111+163+254; 38+96+111+163+256;38+96+111+254+256;38+96+163+254+256; 38+111+163+254+256;91+96+111+163+254;91+96+111+163+256; 91+96+111+254+256;91+96+163+254+256;91+111+163+254+256;或 96+111+163+254+256,例如上述的那些。

[0146] 在另一个方面,该变体包括在对应于T231R+N233R和以下项中之一的位 置处的取代或由其组成:27+33+38+91+96+111;27+33+38+91+96+163; 27+33+38+91+96+254;27+33+38+91+96+256;27+33+38+91+111+163; 27+33+38+91+111+254;27+33+38+91+111+256;27+33+38+91+163+254; 27+33+38+91+163+256;27+33+38+91+254+256;27+33+38+96+111+163;27+33+38+96+111+254;27+33+38+96+111+256;27+33+38+96+163+254; 27+33+38+96+163+256;27+33+38+96+254+256;27+33+38+111+163+254; 27+33+38+111+163+256;27+33+38+111+254+256; 27+33+38+163+254+256;27+33+91+96+111+163;27+33+91+96+111+254;27+33+91+96+111+256;27+33+91+96+163+254;27+33+91+96+163+256; 27+33+91+96+254+256;27+33+91+111+163+254;27+33+91+111+163+256; 27+33+91+111+254+256;27+33+91+163+254+256; 27+33+96+111+163+254;27+33+96+111+163+256; 27+33+96+111+254+256;27+33+96+163+254+256; 27+33+111+163+254+256;27+38+91+96+111+163;27+38+91+96+111+254; 27+38+91+96+111+256;27+38+91+96+163+254;27+38+91+96+163+256; 27+38+91+96+254+256;27+38+91+111+163+254;27+38+91+111+163+256; 27+38+91+111+254+256;27+38+91+163+254+256; 27+38+96+111+163+254;27+38+96+111+163+256; 27+38+96+111+254+256;27+38+96+163+254+256; 27+38+111+163+254+256;27+91+96+111+163+254; 27+91+96+111+163+256;27+91+96+111+254+256; 27+91+96+163+254+256;27+91+111+163+254+256; 27+96+111+163+254+256;33+38+91+96+111+163;33+38+91+96+111+254; 33+38+91+96+111+256;33+38+91+96+163+254;33+38+91+96+163+256; 33+38+91+96+254+256;33+38+91+111+163+254;33+38+91+111+163+256; 33+38+91+111+254+256;33+38+91+163+254+256; 33+38+96+111+163+254;33+38+96+111+163+256; 33+38+96+111+254+256;33+38+96+163+254+256; 33+38+111+163+254+256;33+91+96+111+163+254; 33+91+96+111+163+256;33+91+96+111+254+256; 33+91+96+163+254+256;33+91+111+163+254+256; 33+96+111+163+254+256;38+91+96+111+163+254; 38+91+96+111+163+256;38+91+96+111+254+256; 38+91+96+163+254+256;38+91+111+163+254+256; 38+96+111+163+254+256;或91+96+111+163+254+256,例如上述的那些。

[0147] 在另一个方面,该变体包括在对应于T231R+N233R和以下项中之一的位 置处的取代或由其组成:27+33+38+91+96+111+163; 27+33+38+91+96+111+254;27+33+38+91+96+111+256; 27+33+38+91+96+163+254;27+33+38+91+96+163+256; 27+33+38+91+96+254+256;27+33+38+91+111+163+254;27+33+38+91+111+163+256;27+33+38+91+111+254+256; 27+33+38+91+163+254+256;27+33+38+96+111+163+254; 27+33+38+96+111+163+256;27+33+38+96+111+254+256; 27+33+38+96+163+254+256;27+33+38+111+163+254+256; 27+33+91+96+111+163+254;27+33+91+96+111+163+256; 27+33+91+96+111+254+256;27+33+91+96+163+254+256; 27+33+91+111+163+254+256;27+33+96+111+163+254+256; 27+38+91+96+111+163+254; 27+38+91+96+111+163+256;27+38+91+96+111+254+256; 27+38+91+96+163+254+256; 27+38+91+111+163+254+256;27+38+96+111+163+254+256; 27+91+96+111+163+254+256;33+38+91+96+111+163+254; 33+38+91+96+111+163+256;33+38+91+96+111+254+256; 33+38+91+96+163+254+256;33+38+91+111+163+254+256; 33+38+96+111+163+254+256;33+91+96+111+163+254+256;或 38+91+96+111+163+254+256,例如上述的那些。

[0148] 在另一个方面,该变体包括在对应于T231R+N233R和以下项中之一的位 置处的取

代或由其组成:27+33+38+91+96+111+163+254；27+33+38+91+96+111+163+256;27+33+38+91+96+111+254+256；27+33+38+91+96+163+254+256;27+33+38+91+111+163+254+256；27+33+38+96+111+163+254+256;27+33+91+96+111+163+254+256；27+38+91+96+111+163+254+256;或33+38+91+96+111+163+254+256,例如 上述的那些。

[0149] 在另一个方面,该变体包括在对应于T231R+N233R和位置 27+33+38+91+96+111+163+254+256(例如上述的那些)的位置处的取代或由 其组成。

[0150] 在另一个方面,该变体包括T231R+N233R和选自下组的一个或多个(例 如,若干个)取代或由其组成,该组由以下各项组成:D27R、N33Q、 G38A、G91T、D96E、D111A、G163K、D254S、以及P256T。

[0151] 在另一个方面,该变体包括在对应于T231R+N233R和SEQ ID NO:2的以 下项中之一的位置处的取代或由其组成:D27R+N33Q;D27R+G38A； D27R+G91T;D27R+D96E;D27R+D111A;D27R+G163K;D27R+D254S； D27R+P256T;N33Q+G38A;N33Q+G91T;N33Q+D96E;N33Q+D111A； N33Q+G163K;N33Q+D254S;N33Q+P256T;G38A+G91T;G38A+D96E； G38A+D111A;G38A+G163K;G38A+D254S;G38A+P256T； G91T+D96E;G91T+D111A;G91T+G163K;G91T+D254S;G91T+P256T； D96E+D111A;D96E+G163K;D96E+D254S;D96E+P256T;D111A+G163K;D111A+D254S;D111A+P256T;G163K+D254S； G163K+P256T;或D254S+P256T。

[0152] 在另一个方面,该变体包括在对应于T231R+N233R和SEQ ID NO:2的以 下项中之一的位置处的取代或由其组成:D27R+N33Q+G38A； D27R+N33Q+G91T;D27R+N33Q+D96E;D27R+N33Q+D111A； D27R+N33Q+G163K;D27R+N33Q+D254S;D27R+N33Q+P256T； D27R+G38A+G91T;D27R+G38A+D96E;D27R+G38A+D111A； D27R+G38A+G163K;D27R+G38A+D254S;D27R+G38A+P256T； D27R+G91T+D96E;D27R+G91T+D111A;D27R+G91T+G163K； D27R+G91T+D254S;D27R+G91T+P256T;D27R+D96E+D111A； D27R+D96E+G163K;D27R+D96E+D254S;D27R+D96E+P256T;D27R+D111A+G163K;D27R+D111A+D254S;D27R+D111A+P256T； D27R+G163K+D254S;D27R+G163K+P256T;D27R+D254S+P256T； N33Q+G38A+G91T;N33Q+G38A+D96E;N33Q+G38A+D111A;N33Q+G38A+G163K;N33Q+G38A+D254S;N33Q+G38A+P256T； N33Q+G91T+D96E;N33Q+G91T+D111A;N33Q+G91T+G163K； N33Q+G91T+D254S;N33Q+G91T+P256T;N33Q+D96E+D111A； N33Q+D96E+G163K;N33Q+D96E+D254S;N33Q+D96E+P256T； N33Q+D111A+G163K;N33Q+D111A+D254S;N33Q+D111A+P256T； N33Q+G163K+D254S;N33Q+G163K+P256T;N33Q+D254S+P256T;G38A+G91T+D96E;G38A+G91T+D111A;G38A+G91T+G163K； G38A+G91T+D254S;G38A+G91T+P256T;G38A+D96E+D111A； G38A+D96E+G163K;G38A+D96E+D254S;G38A+D96E+P256T； G38A+D111A+G163K;G38A+D111A+D254S;G38A+D111A+P256T； G38A+G163K+D254S;G38A+G163K+P256T;G38A+D254S+P256T； G91T+D96E+D111A;G91T+D96E+G163K;G91T+D96E+D254S； G91T+D96E+P256T;G91T+D111A+G163K;G91T+D111A+D254S； G91T+D111A+P256T;G91T+G163K+D254S;G91T+G163K+P256T； G91T+D254S+P256T;D96E+D111A+G163K;D96E+D111A+D254S;D96E+D111A+P256T;D96E+G163K+D254S;D96E+G163K+P256T； D96E+D254S+P256T;D111A+G163K+D254S;D111A+G163K+P256T； D111A+D254S+P256T;或G163K+D254S+P256T。

[0153] 在另一个方面,该变体包括在对应于T231R+N233R和SEQ ID NO:2的以 下项中之一的位置处的取代或由其组成:D27R+N33Q+G38A+G91T； D27R+N33Q+G38A+D96E;D27R+N33Q+G38A+D111A； D27R+N33Q+G38A+G163K;D27R+N33Q+G38A+D254S； D27R+N33Q+G38A+P256T;

D27R+N33Q+G91T+D96E；D27R+N33Q+G91T+D111A;D27R+N33Q+G91T+G163K；D27R+N33Q+G91T+D254S;D27R+N33Q+G91T+P256T；D27R+N33Q+D96E+D111A;D27R+N33Q+D96E+G163K；D27R+N33Q+D96E+D254S;D27R+N33Q+D96E+P256T；D27R+N33Q+D111A+G163K;D27R+N33Q+D111A+D254S；D27R+N33Q+D111A+P256T;D27R+N33Q+G163K+D254S；D27R+N33Q+G163K+P256T;D27R+N33Q+D254S+P256T；D27R+G38A+G91T+D96E;D27R+G38A+G91T+D111A；D27R+G38A+G91T+G163K;D27R+G38A+G91T+D254S；D27R+G38A+G91T+P256T;D27R+G38A+D96E+D111A；D27R+G38A+D96E+G163K;D27R+G38A+D96E+D254S；D27R+G38A+D96E+P256T;D27R+G38A+D111A+G163K；D27R+G38A+D111A+D254S;D27R+G38A+D111A+P256T；D27R+G38A+G163K+D254S;D27R+G38A+G163K+P256T；D27R+G38A+D254S+P256T;D27R+G91T+D96E+D111A；D27R+G91T+D96E+G163K;D27R+G91T+D96E+D254S；D27R+G91T+D96E+P256T;D27R+G91T+D111A+G163K；D27R+G91T+D111A+D254S;D27R+G91T+D111A+P256T；D27R+G91T+G163K+D254S;D27R+G91T+G163K+P256T；D27R+G91T+D254S+P256T;D27R+D96E+D111A+G163K；D27R+D96E+D111A+D254S;D27R+D96E+D111A+P256T；D27R+D96E+G163K+D254S；D27R+D96E+G163K+P256T；D27R+D96E+D254S+P256T;D27R+D111A+G163K+D254S；D27R+D111A+G163K+P256T;D27R+D111A+D254S+P256T；D27R+G163K+D254S+P256T;N33Q+G38A+G91T+D96E；N33Q+G38A+G91T+D111A;N33Q+G38A+G91T+G163K；N33Q+G38A+G91T+D254S；N33Q+G38A+G91T+P256T；N33Q+G38A+D96E+D111A;N33Q+G38A+D96E+G163K；N33Q+G38A+D96E+D254S;N33Q+G38A+D96E+P256T；N33Q+G38A+D111A+G163K;N33Q+G38A+D111A+D254S；N33Q+G38A+D111A+P256T;N33Q+G38A+G163K+D254S；N33Q+G38A+G163K+P256T;N33Q+G38A+D254S+P256T；N33Q+G91T+D96E+D111A;N33Q+G91T+D96E+G163K；N33Q+G91T+D96E+D254S；N33Q+G91T+D96E+P256T；N33Q+G91T+D111A+G163K;N33Q+G91T+D111A+D254S;N33Q+G91T+D111A+P256T;N33Q+G91T+G163K+D254S；N33Q+G91T+G163K+P256T;N33Q+G91T+D254S+P256T；N33Q+D96E+D111A+G163K;N33Q+D96E+D111A+D254S；N33Q+D96E+D111A+P256T；N33Q+D96E+G163K+D254S；N33Q+D96E+G163K+P256T;N33Q+D96E+D254S+P256T；N33Q+D111A+G163K+D254S;N33Q+D111A+G163K+P256T；N33Q+D111A+D254S+P256T;N33Q+G163K+D254S+P256T；G38A+G91T+D96E+D111A;G38A+G91T+D96E+G163K；G38A+G91T+D96E+D254S；G38A+G91T+D96E+P256T；G38A+G91T+D111A+G163K;G38A+G91T+D111A+D254S；G38A+G91T+D111A+P256T;G38A+G91T+G163K+D254S；G38A+G91T+G163K+P256T;G38A+G91T+D254S+P256T；G38A+D96E+D111A+G163K;G38A+D96E+D111A+D254S；G38A+D96E+D111A+P256T；G38A+D96E+G163K+D254S；G38A+D96E+G163K+P256T;G38A+D96E+D254S+P256T；G38A+D111A+G163K+D254S;G38A+D111A+G163K+P256T；G38A+D111A+D254S+P256T;G38A+G163K+D254S+P256T；G91T+D96E+D111A+G163K;G91T+D96E+D111A+D254S；G91T+D96E+D111A+P256T;G91T+D96E+G163K+D254S；G91T+D96E+G163K+P256T;G91T+D96E+D254S+P256T；G91T+D111A+G163K+D254S;G91T+D111A+G163K+P256T；G91T+D111A+D254S+P256T;G91T+G163K+D254S+P256T；D96E+D111A+G163K+D254S;D96E+D111A+G163K+P256T；D96E+D111A+D254S+P256T;D96E+G163K+D254S+P256T;或 D111A+G163K+D254S+P256T。

[0154] 在另一个方面,该变体包括在对应于T231R+N233R和SEQ ID NO:2的以 下项中之一的位置处的取代或由其组成:D27R+N33Q+G38A+G91T+D96E；D27R+N33Q+G38A+G91T+D111A;D27R+N33Q+G38A+G91T+G163K；D27R+N33Q+G38A+G91T+D254S;D27R+N33Q+G38A+

G91T+P256T；D27R+N33Q+G38A+D96E+D111A;D27R+N33Q+G38A+D96E+G163K；D27R+N33Q+G38A+D96E+D254S;D27R+N33Q+G38A+D96E+P256T；D27R+N33Q+G38A+D111A+G163K;D27R+N33Q+G38A+D111A+D254S；D27R+N33Q+G38A+D111A+P256T;D27R+N33Q+G38A+G163K+D254S;D27R+N33Q+G38A+G163K+P256T;D27R+N33Q+G38A+D254S+P256T；D27R+N33Q+G91T+D96E+D111A;D27R+N33Q+G91T+D96E+G163K；D27R+N33Q+G91T+D96E+D254S;D27R+N33Q+G91T+D96E+P256T;D27R+N33Q+G91T+D111A+G163K;D27R+N33Q+G91T+D111A+D254S；D27R+N33Q+G91T+D111A+P256T;D27R+N33Q+G91T+G163K+D254S；D27R+N33Q+G91T+G163K+P256T;D27R+N33Q+G91T+D254S+P256T；D27R+N33Q+D96E+D111A+G163K;D27R+N33Q+D96E+D111A+D254S;D27R+N33Q+D96E+D111A+P256T;D27R+N33Q+D96E+G163K+D254S；D27R+N33Q+D96E+G163K+P256T;D27R+N33Q+D96E+D254S+P256T；D27R+N33Q+D111A+G163K+D254S;D27R+N33Q+D111A+G163K+P256T；D27R+N33Q+D111A+D254S+P256T;D27R+N33Q+G163K+D254S+P256T；D27R+G38A+G91T+D96E+D111A;D27R+G38A+G91T+D96E+G163K；D27R+G38A+G91T+D96E+D254S;D27R+G38A+G91T+D96E+P256T；D27R+G38A+G91T+D111A+G163K;D27R+G38A+G91T+D111A+D254S；D27R+G38A+G91T+D111A+P256T;D27R+G38A+G91T+G163K+D254S；D27R+G38A+G91T+G163K+P256T;D27R+G38A+G91T+D254S+P256T；D27R+G38A+D96E+D111A+G163K;D27R+G38A+D96E+D111A+D254S；D27R+G38A+D96E+D111A+P256T;D27R+G38A+D96E+G163K+D254S；D27R+G38A+D96E+G163K+P256T;D27R+G38A+D96E+D254S+P256T；D27R+G38A+D111A+G163K+D254S;D27R+G38A+D111A+G163K+P256T；D27R+G38A+D111A+D254S+P256T;D27R+G38A+G163K+D254S+P256T；D27R+G91T+D96E+D111A+G163K;D27R+G91T+D96E+D111A+D254S;D27R+G91T+D96E+D111A+P256T;D27R+G91T+D96E+G163K+D254S；D27R+G91T+D96E+G163K+P256T;D27R+G91T+D96E+D254S+P256T；D27R+G91T+D111A+G163K+D254S;D27R+G91T+D111A+G163K+P256T；D27R+G91T+D111A+D254S+P256T;D27R+G91T+G163K+D254S+P256T；D27R+D96E+D111A+G163K+D254S;D27R+D96E+D111A+G163K+P256T；D27R+D96E+D111A+D254S+P256T;D27R+D96E+G163K+D254S+P256T；D27R+D111A+G163K+D254S+P256T;N33Q+G38A+G91T+D96E+D111A；N33Q+G38A+G91T+D96E+G163K;N33Q+G38A+G91T+D96E+D254S；N33Q+G38A+G91T+D96E+P256T;N33Q+G38A+G91T+D111A+G163K；N33Q+G38A+G91T+D111A+D254S;N33Q+G38A+G91T+D111A+P256T；N33Q+G38A+G91T+G163K+D254S;N33Q+G38A+G91T+G163K+P256T；N33Q+G38A+G91T+D254S+P256T;N33Q+G38A+D96E+D111A+G163K；N33Q+G38A+D96E+D111A+D254S;N33Q+G38A+D96E+D111A+P256T；N33Q+G38A+D96E+G163K+D254S;N33Q+G38A+D96E+G163K+P256T；N33Q+G38A+D96E+D254S+P256T;N33Q+G38A+D111A+G163K+D254S;N33Q+G38A+D111A+G163K+P256T;N33Q+G38A+D111A+D254S+P256T；N33Q+G38A+G163K+D254S+P256T;N33Q+G91T+D96E+D111A+G163K;N33Q+G91T+D96E+D111A+D254S;N33Q+G91T+D96E+D111A+P256T；N33Q+G91T+D96E+G163K+D254S;N33Q+G91T+D96E+G163K+P256T；N33Q+G91T+D96E+D254S+P256T;N33Q+G91T+D111A+G163K+D254S；N33Q+G91T+D111A+G163K+P256T;N33Q+G91T+D111A+D254S+P256T；N33Q+G91T+G163K+D254S+P256T;N33Q+D96E+D111A+G163K+D254S；N33Q+D96E+D111A+G163K+P256T;N33Q+D96E+D111A+D254S+P256T;N33Q+D96E+G163K+D254S+P256T;N33Q+D111A+G163K+D254S+P256T；G38A+G91T+D96E+D111A+G163K;G38A+G91T+D96E+D111A+D254S；G38A+G91T+D96E+D111A+P256T;G38A+G91T+D96E+G163K+D254S；G38A+G91T+D96E+G163K+P256T;G38A+G91T+D96E+D254S+P256T；G38A

+G91T+D111A+G163K+D254S;G38A+G91T+D111A+G163K+P256T; G38A+G91T+D111A+D254S+P256T;G38A+G91T+G163K+D254S+P256T; G38A+D96E+D111A+G163K+D254S;G38A+D96E+D111A+G163K+P256T; G38A+D96E+D111A+D254S+P256T;G38A+D96E+G163K+D254S+P256T; G38A+D111A+G163K+D254S+P256T;G91T+D96E+D111A+G163K+D254S; G91T+D96E+D111A+G163K+P256T;G91T+D96E+D111A+D254S+P256T; G91T+D96E+G163K+D254S+P256T;G91T+D111A+G163K+D254S+P256T; 或D96E+D111A+G163K+D254S+P256T。

[0155] 在另一个方面,该变体包括在对应于T231R+N233R和SEQ ID NO:2的以 下项中之一的位置处的取代或由其组成:D27R+N33Q+G38A+G91T+D96E+D111A; D27R+N33Q+G38A+G91T+D96E+G163K; D27R+N33Q+G38A+G91T+D96E+D254S; D27R+N33Q+G38A+G91T+D96E+P256T; D27R+N33Q+G38A+G91T+D111A+G163K; D27R+N33Q+G38A+G91T+D111A+D254S; D27R+N33Q+G38A+G91T+D111A+P256T; D27R+N33Q+G38A+G91T+G163K+D254S; D27R+N33Q+G38A+G91T+G163K+P256T; D27R+N33Q+G38A+G91T+D254S+P256T; D27R+N33Q+G38A+D96E+D111A+G163K; D27R+N33Q+G38A+D96E+D111A+D254S; D27R+N33Q+G38A+D96E+D111A+P256T; D27R+N33Q+G38A+D96E+G163K+D254S; D27R+N33Q+G38A+D96E+G163K+P256T; D27R+N33Q+G38A+D96E+D254S+P256T;D27R+N33Q+G38A+D111A+G163K+D254S; D27R+N33Q+G38A+D111A+G163K+P256T; D27R+N33Q+G38A+D111A+D254S+P256T; D27R+N33Q+G38A+G163K+D254S+P256T; D27R+N33Q+G91T+D96E+D111A+G163K; D27R+N33Q+G91T+D96E+D111A+D254S; D27R+N33Q+G91T+D96E+D111A+P256T; D27R+N33Q+G91T+D96E+G163K+D254S; D27R+N33Q+G91T+D96E+G163K+P256T; D27R+N33Q+G91T+D96E+D254S+P256T; D27R+N33Q+G91T+D111A+G163K+D254S; D27R+N33Q+G91T+D111A+G163K+P256T; D27R+N33Q+G91T+D111A+D254S+P256T; D27R+N33Q+G91T+G163K+D254S+P256T; D27R+N33Q+D96E+D111A+G163K+D254S; D27R+N33Q+D96E+D111A+G163K+P256T; D27R+N33Q+D96E+D111A+D254S+P256T; D27R+N33Q+D96E+G163K+D254S+P256T; D27R+N33Q+D111A+G163K+D254S+P256T; D27R+G38A+G91T+D96E+D111A+G163K; D27R+G38A+G91T+D96E+D111A+D254S; D27R+G38A+G91T+D96E+D111A+P256T; D27R+G38A+G91T+D96E+G163K+D254S; D27R+G38A+G91T+D96E+G163K+P256T; D27R+G38A+G91T+D96E+D254S+P256T; D27R+G38A+G91T+D111A+G163K+D254S; D27R+G38A+G91T+D111A+G163K+P256T; D27R+G38A+G91T+D111A+D254S+P256T; D27R+G38A+G91T+G163K+D254S+P256T; D27R+G38A+D96E+D111A+G163K+D254S; D27R+G38A+D96E+D111A+G163K+P256T; D27R+G38A+D96E+D111A+D254S+P256T; D27R+G38A+D96E+G163K+D254S+P256T; D27R+G38A+D111A+G163K+D254S+P256T; D27R+G91T+D96E+D111A+G163K+D254S; D27R+G91T+D96E+D111A+G163K+P256T;D27R+G91T+D96E+D111A+D254S+P256T; D27R+G91T+D96E+G163K+D254S+P256T; D27R+G91T+D111A+G163K+D254S+P256T; D27R+D96E+D111A+G163K+D254S+P256T; N33Q+G38A+G91T+D96E+D111A+G163K; N33Q+G38A+G91T+D96E+D111A+D254S; N33Q+G38A+G91T+D96E+D111A+P256T; N33Q+G38A+G91T+D96E+G163K+D254S; N33Q+G38A+G91T+D96E+G163K+P256T; N33Q+G38A+G91T+D96E+D254S+P256T; N33Q+G38A+G91T+D111A+G163K+D254S; N33Q+G38A+G91T+D111A+G163K+P256T; N33Q+G38A+G91T+D111A+D254S+P256T; N33Q+G38A+G91T+G163K+D254S+P256T; N33Q+G38A+D96E+D111A+G163K+D254S; N33Q+G38A+D96E+D111A+G163K+P256T; N33Q+G38A+D96E+D111A+D254S+P256T; N33Q+G38A+D96E+G163K+D254S+P256T; N33Q+G38A+D111A+G163K+D254S+P256T; N33Q+

G91T+D96E+D111A+G163K+D254S；N33Q+G91T+D96E+D111A+G163K+P256T；N33Q+G91T+D96E+D111A+D254S+P256T；N33Q+G91T+D96E+G163K+D254S+P256T；N33Q+G91T+D111A+G163K+D254S+P256T；N33Q+D96E+D111A+G163K+D254S+P256T；G38A+G91T+D96E+D111A+G163K+D254S；G38A+G91T+D96E+D111A+G163K+P256T；G38A+G91T+D96E+D111A+D254S+P256T；G38A+G91T+D96E+G163K+D254S+P256T；G38A+G91T+D111A+G163K+D254S+P256T；G38A+D96E+D111A+G163K+D254S+P256T;或 G91T+D96E+D111A+G163K+D254S+P256T。

[0156] 在另一个方面,该变体包括在对应于T231R+N233R和SEQ ID NO:2的以 下项中之一的位置处的取代或由其组成：D27R+N33Q+G38A+G91T+D96E+D111A+G163K；D27R+N33Q+G38A+G91T+D96E+D111A+D254S;D27R+N33Q+G38A+G91T+D96E+D111A+P256T；D27R+N33Q+G38A+G91T+D96E+G163K+D254S；D27R+N33Q+G38A+G91T+D96E+G163K+P256T；D27R+N33Q+G38A+G91T+D96E+D254S+P256T；D27R+N33Q+G38A+G91T+D111A+G163K+D254S；D27R+N33Q+G38A+G91T+D111A+G163K+P256T；D27R+N33Q+G38A+G91T+D111A+D254S+P256T；D27R+N33Q+G38A+G91T+G163K+D254S+P256T；D27R+N33Q+G38A+D96E+D111A+G163K+D254S；D27R+N33Q+G38A+D96E+D111A+G163K+P256T；D27R+N33Q+G38A+D96E+D111A+D254S+P256T；D27R+N33Q+G38A+D96E+G163K+D254S+P256T；D27R+N33Q+G38A+D111A+G163K+D254S+P256T；D27R+N33Q+G91T+D96E+D111A+G163K+D254S；D27R+N33Q+G91T+D96E+D111A+G163K+P256T；D27R+N33Q+G91T+D96E+D111A+D254S+P256T；D27R+N33Q+G91T+D96E+G163K+D254S+P256T；D27R+N33Q+G91T+D111A+G163K+D254S+P256T；D27R+N33Q+D96E+D111A+G163K+D254S+P256T；D27R+G38A+G91T+D96E+D111A+G163K+D254S；D27R+G38A+G91T+D96E+D111A+G163K+P256T；D27R+G38A+G91T+D96E+D111A+D254S+P256T；D27R+G38A+G91T+D96E+G163K+D254S+P256T；D27R+G38A+G91T+D111A+G163K+D254S+P256T；D27R+G38A+D96E+D111A+G163K+D254S+P256T；D27R+G91T+D96E+D111A+G163K+D254S+P256T；N33Q+G38A+G91T+D96E+D111A+G163K+D254S；N33Q+G38A+G91T+D96E+D111A+G163K+P256T；N33Q+G38A+G91T+D96E+D111A+D254S+P256T；N33Q+G38A+G91T+D96E+G163K+D254S+P256T；N33Q+G38A+G91T+D111A+G163K+D254S+P256T；N33Q+G38A+D96E+D111A+G163K+D254S+P256T；N33Q+G91T+D96E+D111A+G163K+D254S+P256T;或 G38A+G91T+D96E+D111A+G163K+D254S+P256T。

[0157] 在另一个方面,该变体包括在对应于T231R+N233R和SEQ ID NO:2的以 下项中之一的位置处的取代或由其组成:D27R+N33Q+G38A+G91T+D96E+D111A+G163K+D254S；

[0158] D27R+N33Q+G38A+G91T+D96E+D111A+G163K+P256T；D27R+N33Q+G38A+G91T+D96E+D111A+D254S+P256T；D27R+N33Q+G38A+G91T+D96E+G163K+D254S+P256T；D27R+N33Q+G38A+G91T+D111A+G163K+D254S+P256T；D27R+N33Q+G38A+D96E+D111A+G163K+D254S+P256T；D27R+N33Q+G91T+D96E+D111A+G163K+D254S+P256T；D27R+G38A+G91T+D96E+D111A+G163K+D254S+P256T;或

[0159] N33Q+G38A+G91T+D96E+D111A+G163K+D254S+P256T。

[0160] 在另一个方面,该变体包括在对应于T231R+N233R和SEQ ID NO:2的 D27R+N33Q+G38A+G91T+D96E+D111A+G163K+D254S+P256T的位置处的取 代或由其组成。

[0161] 在另一个方面,这些变体包括在对应于SEQ ID NO:2的以下项的位置处 的取代或由其组成：

[0162]

D96E T231R N233R;
N33Q D96E T231R N233R;
N33Q D111A T231R N233R;
N33Q T231R N233R P256T;
N33Q G38A G91T G163K T231R N233R D254S;
N33Q G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T;
D27R N33Q G38A D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T;
D27R N33Q G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R P256T;
D27R N33Q G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S;
D27R G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T;
D96E T231R N233R D254S;
T231R N233R D254S P256T;
G163K T231R N233R D254S;
D27R N33Q G38A G91T D96E G163K T231R N233R D254S P256T;
D27R G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T;
D96E G163K T231R N233R D254S;
D27R G163K T231R N233R D254S;
D27R G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S;
D27R G38A G91T D96E G163K T231R N233R D254S P256T;
D27R G38A D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T:
D27R D96E G163K T231R N233R D254S;
D27R D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T;

[0163]

D27R G38A D96E G163K T231R N233R D254S P256T;
D27R G38A D96E D111A G163K T231R N233R D254S;
D27R D96E G163K T231R N233R;
D27R D96E G163K T231R N233R D254S P256T;
D27R D96E D111A G163D T231R N233R D254S P256T;
D27R D96E D111A G163K T231R N233R D254S;
D27R D96E D111A G163K T231R N233R P256T;
D27R D111A G163K T231R N233R D254S P256T;
D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T;
D27R G38A D96E D111A G163K T231R N233R P256T;
D27R G38A D96E D111A T231R N233R D254S P256T;
D27R G38A D96E G163K T231R N233R D254S P256T;
D27R D96E G163K T231R N233R D254S P256T;
D27R N33Q G38A G91T D111A G163K T231R N233R D254S P256T;
D27R G38A D111A G163K T231R N233R D254S P256T;
D111A G163K T231R N233R D254S P256T
D111A T231R N233R
D111A T231R N233R D254S P256T
D27R D96E D111A G163K T231R N233R
D27R D96E D111A T231R N233R
D27R G38A D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T
D27R N33Q G38A D96E D111A T231R N233R D254S P256T
D27R G38A D96E D111A G163K E210Q T231R N233R D254S P256T
D27R T231R N233R D254S P256T
D96E D111A G163K T231R N233R
D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T
D96E D111A G163K T231R N233R P256T
D96E D111A T231R N233R
D96E D111A T231R N233R D254S
D96E D111A T231R N233R P256T
D96E G163K T231R N233R D254S P256T
D96E T231R N233R D254S P256T
D96E T231R N233R P256T
G38A D96E D111A T231R N233R
G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T
G91T D96E D111A T231R N233R
G91T D96E T231R N233R
G91T T231R N233R D254S P256T
N33Q D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T
T231R N233R D254S P256T

[0164]

T231R N233R P256T

[0165] 这些变体可以进一步包括在一个或多个(例如若干个)其他位置处的一 个或多个另外的取代。

[0166] 这些氨基酸变化可以具有微小性质,即,不会显著地影响蛋白质的折叠 和/或活性的保守氨基酸取代或插入;小缺失,典型地为1-30个氨基酸;小的 氨基-端的或羧基端的延伸,例如氨基端蛋氨酸残基;高达20-25个残基的小连 接肽;或通过改变净电荷或另一功能,例如聚组氨酸段、抗原表位或结合 域,有利于纯化的小的延伸。

[0167] 保守取代的实例是在下组的范围内:碱性氨基酸(精氨酸、赖氨酸及组 氨酸)、酸性氨基酸(谷氨酸和天冬氨酸)、极性氨基酸(谷氨酰胺和天冬 酰胺)、疏水性氨基酸(亮氨酸、异亮氨酸及缬氨酸)、芳香族氨基酸(苯 丙氨酸、色氨酸及酪氨酸)及小氨基酸(甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸 及甲硫氨酸)。一般不会改变特异性活性的氨基酸取代是本领域已知的并且 例如由H.诺伊拉特(Neurath)和R.L.希尔(Hill),1979在蛋白质(The Proteins),学术出版社(Academic Press),纽约中描述。常见取代是 Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、 Ser/Gly、Tyr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu、 和Asp/Gly。

[0168] 可替代地,氨基酸改变具有这样一种性质:改变多肽的物理化学特性。例 如,氨基酸改变可以提高多肽的热稳定性、改变底物特异性、改变最适pH, 等等。

[0169] 可以根据本领域中已知的程序,如定点诱变或丙氨酸扫描诱变(坎宁汉(Cunningham)和威尔斯(Wells),1989,科学(Science)244:1081- 1085)来鉴定多肽中的必需氨基酸。在后种技术中,在分子中的每个残基处 引入单个丙氨酸突变,并且测试所得突变分子的脂肪酶活性以鉴定对分子的 活性关键的氨基酸残基。还参见,希尔顿(Hilton)等人,1996,生物化学杂 志(J.Biol.Chem.)271:4699-4708。也可结合假定接触位点氨基酸的突变, 如通过以下技术例如核磁共振、结晶学、电子衍射、或光亲和标记进行确定 的对结构进行物理学分析,从而确定酶的活性位点或其他生物学相互作用。参见,例如,德弗斯(de Vos)等人,1992,科学(Science)255:306-312; 史密斯(Smith)等人,1992,分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)224:899-904; 乌乐达维尔(Wlodaver)等人,1992,欧洲生化学会联合会快报(FEBS Lett.)309:59-64。还可以从与相关多肽的比对来推断鉴定必需氨基酸。

[0170] 这些变体可由SEQ ID NO:2的氨基酸数目的至少50%、至少55%、至少 60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至 少95%组成或包含这些。

[0171] 在一个实施例中,与亲本脂肪酶相比,该变体在存在蛋白酶的洗涤剂中 具有改进的稳定性。

[0172] 在一个实施例中,与亲本脂肪酶相比,该变体具有改进的洗涤剂稳定 性。

[0173] 在一个实施例中,与亲本脂肪酶相比,该变体具有改进的蛋白酶稳定 性。

[0174] 在一个实施例中,与亲本脂肪酶相比,该变体具有改进的化学稳定性。

[0175] 在一个实施例中,与亲本脂肪酶相比,该变体具有改进的氧化稳定性。

[0176] 在一个实施例中,与亲本脂肪酶相比,该变体具有改进的pH稳定性。

[0177] 在一个实施例中,与亲本脂肪酶相比,该变体在储存条件下具有改进的 稳定性。

[0178] 在一个实施例中,与亲本脂肪酶相比,该变体具有改进的热稳定性。

[0179] 亲本脂肪酶

[0180] 该亲本脂肪酶可以是(a)与SEQ ID NO:2的多肽具有至少60%序列一致性 的一种

多肽;(b)由在低严格条件下与(i)SEQ ID NO:1的多肽编码序列、(ii) (i)的全长互补体杂交的一种多核苷酸编码的一种多肽;或(c)由与SEQ ID NO: 1的多肽编码序列具有至少60%序列一致性的一种多核苷酸编码的一种多肽。

[0181] 在一个方面,该亲本与SEQ ID NO:2的多肽具有至少60%、例如至少 65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至 少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、 至少99%、或100%的序列一致性,它们具有脂肪酶活性。在一个方面,该亲 本的氨基酸序列与SEQ ID NO:2的多肽相差多达40个氨基酸,例如1、2、3、 4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、 22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、 38、39、或40个氨基酸。

[0182] 在另一个方面,该亲本包括SEQ ID NO:2的氨基酸序列或由其组成。

[0183] 在另一个方面,该亲本是SEQ ID NO:2的多肽的一个片段,包含SEQ ID NO:2的氨基酸数目的至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、 至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、或至少95%。

[0184] 在另一实施例中,该亲本是SEQ ID NO:2的多肽的一个等位基因变体。

[0185] 在另一方面,该亲本由以下多核苷酸编码,该多核苷酸在非常低严格条 件下、低严格条件下、中严格条件下、中-高严格条件下、高严格条件下或非 常高严格条件下与(i)SEQ ID NO:1的多肽编码序列、(ii)(i)的全长互补体杂 交(萨拉布鲁克(Sambrook)等人,1989,分子克隆:实验室手册 (Molecular Cloning:A Laboratory Manual),第二版,冷泉港(Cold Spring Harbor),纽约)。

[0186] 可以使用SEQ ID NO:1的多核苷酸或其子序列、连同SEQ ID NO:2的多 肽或其片段来设计核酸探针以根据本领域熟知的方法来鉴别并克隆对来自不 同属或种的菌株的亲本进行编码的DNA。具体而言,可以根据标准DNA印迹 程序,使用这类探针与感兴趣的细胞的基因组DNA或cDNA杂交,以便鉴定和 分离其中的对应基因。此类探针可以明显短于完整序列,但是长度应为至少 15,例如至少25、至少35、或至少70个核苷酸。优选地,核酸探针的长度为 至少100个核苷酸,例如长度为至少200个核苷酸、至少300个核苷酸、至少 400个核苷酸、至少500个核苷酸、至少600个核苷酸、至少700个核苷酸、至 少800个核苷酸或至少900个核苷酸。DNA和RNA探针两者都可使用。典型地 将探针进行标记(例如,用^{32}P、^{3}H、^{35}S、生物素、或抗生物素蛋白),以检 测相应的基因。本发明涵盖此类探针。

[0187] 可以针对与上文所述的探针杂交并编码一个亲本的DNA来筛选由这类其 他菌株制备的基因组DNA或cDNA文库。来自这类其他菌株的基因组DNA或 其他DNA可以通过琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳,或其他分离技术来分离。来自文库的DNA或分离的DNA可转移到并固定在硝酸纤维素或其他适合的载 体材料上。为了鉴定与SEQ ID NO:1或其子序列杂交的克隆或DNA,将载体 材料用于DNA印迹中。

[0188] 出于本发明的目的,杂交表示多核苷酸与对应于以下项的标记的核酸探 针杂交:(i)SEQ ID NO:1;(ii)SEQ ID NO:1的多肽编码序列;(iii)它们的全 长互补体;或(iv)它们的子序列;杂交是在非常低的至非常高的严格条件下 进行。可以使用例如X-射线胶片或本领域已知的任何其他检测手段来检测在 这些条件下核酸探针杂交的分子。

[0189] 在一个方面,该核酸探针是SEQ ID NO:1的多肽编码序列。在一个方 面,该核酸探针是SEQ ID NO:1的核苷酸数目的至少50%、至少55%、至少 60%、至少65%、至少70%、至

少75％、至少80％、至少85％、至少90％或至 少95％。在另一方面，核酸探针是编码以下项的多核苷酸:SEQ ID NO:2的多 肽;其多肽;或其片段。在另一方面，核酸探针是SEQ ID NO:1。

[0190] 在另一个实施例中，该亲本由一种多核苷酸编码，该多核苷酸与SEQ ID NO:1的多肽编码序列具有至少60％、例如至少65％、至少70％、至少75％、至 少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、 至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、或100％的序列一致 性。

[0191] 该多肽可以是一种杂合多肽，其中一种多肽的一个区域在另一种多肽的 一个区域的N-末端或C-末端处融合。

[0192] 亲本可以是融合多肽或可切割的融合多肽，其中另一种多肽在本发明多 肽的N-末端或C-末端处融合。通过将编码另一多肽的多核苷酸融合到本发明 的多核苷酸而产生融合多肽。用于产生融合多肽的技术在本领域是已知的， 并包括连接编码多肽的编码序列，这样使得它们在框内并且使得融合多肽的 表达处于相同的一个或多个启动子和终止子的控制下。融合多肽还可以使用 内含肽技术来构建，其中融合多肽在翻译后产生(库珀(Cooper)等人， 1993，欧洲分子生物学学会杂志(EMBO J.)12:2575-2583;道森 (Dawson)等人，1994，科学(Science)266:776-779)。

[0193] 融合多肽可以在两个多肽之间进一步包括一个切割位点。在融合蛋白分 泌之时，该位点被切割，从而释放出这两个多肽。切割位点的实例包括但不 限于在以下文献中披露的位点：马丁（Martin）等人，2003，工业微生物与生 物技术杂志(J.Ind.Microbiol.Biotechnol.)3:568-576;斯维特娜(Svetina) 等人，2000，生物技术杂志(J.Biotechnol.)76:245-251;拉斯穆森-威尔逊 (Rasmussen-Wilson)等人，1997，应用与环境微生物学(Appl.Environ. Microbiol.)63:3488-3493;沃德(Ward)等人，1995，生物技术 (Biotechnology)13:498-503;以及孔特雷拉斯(Contreras)等人，1991，生 物技术9:378-381;伊顿(Eaton)等人，1986，生物化学(Biochemistry)25: 505-512;柯林斯-拉西(Collins-Racie)等人，1995，生物技术13:982-987; 卡特(Carter)等人，1989，蛋白质:结构、功能以及遗传学(Proteins: Structure，Function，and Genetics)6:240-248;以及史蒂文斯(Stevens)， 2003，药物发现世界(Drug Discovery World)4:35-48。

[0194] 该亲本可以从任何属类的微生物中获得。出于本发明的目的，如在此结 合一种给定的来源使用的术语“从...中获得”应意指由多核苷酸编码的亲本是 由该来源或由其中已经插入来自该来源的多核苷酸的一种菌株产生的。在一 个方面中，该亲本是胞外分泌的。

[0195] 该亲本可以是一种细菌脂肪酶。例如，该亲本可以是一种革兰氏阳性细 菌多肽，如芽孢杆菌属(Bacillus)、梭菌属(Clostridium)、肠球菌属 (Enterococcus)、土芽孢杆菌属(Geobacillus)、乳杆菌属 (Lactobacillus)、乳球菌属(Lactococcus)、海洋芽孢杆菌属(Oceanobacillus)、葡萄球菌属(Staphylococcus)、链球菌属 (Streptococcus)、链霉菌属(Streptomyces)或嗜热裂孢菌属 (Thermobifida)脂肪酶;或一种革兰氏阴性细菌多肽，如弯曲杆菌属 (Campylobacter)、大肠杆菌(E.coli)、黄杆菌属(Flavobacterium)、梭 杆菌属(Fusobacterium)、螺杆菌属(Helicobacter)、泥杆菌属 (Ilyobacter)、奈瑟氏菌属(Neisseria)、假单胞菌属(Pseudomonas)、沙 门菌属(Salmonella)或脲原体属

(Ureaplasma)脂肪酶。

[0196] 在一方面,该亲本是嗜碱芽孢杆菌(Bacillus alkalophilus)、解淀粉芽孢 杆菌(Bacillus amyloliquefaciens)、短芽孢杆菌(Bacillus brevis)、环状芽孢 杆菌(Bacillus circulans)、克劳氏芽孢杆菌(Bacillus clausii)、凝结芽孢杆 菌(Bacillus coagulans)、坚硬芽孢杆菌(Bacillus firmus)、灿烂芽孢杆菌 (Bacillus lautus)、迟缓芽孢杆菌(Bacillus lentus)、地衣芽孢杆菌 (Bacillus licheniformis)、巨大芽孢杆菌(Bacillus megaterium)、短小芽孢 杆菌(Bacillus pumilus)、嗜热脂肪芽孢杆菌(Bacillus stearothermophilus)、枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)、或苏云金芽孢杆菌 (Bacillus thuringiensis)脂肪酶。

[0197] 在另一个方面,该亲本是一种类马链球菌(Streptococcus equisimilis)、化脓链球菌、乳房链球菌、或马链球菌兽疫亚种(Streptococcus equi subsp. Zooepidemicus)脂肪酶。

[0198] 在另一方面,该亲本是不产色链霉菌(Streptomyces achromogenes)、除 虫链霉菌(Streptomyces avermitilis)、天蓝链霉菌(Streptomyces coelicolor)、灰色链霉菌(Streptomyces griseus)或浅青紫链霉菌 (Streptomyces lividans)脂肪酶。

[0199] 在另一个方面,该亲本是阿尔巴嗜热裂孢菌(Thermobifida alba)或褐色 嗜热裂孢菌(Thermobifida fusca)(之前称为褐色热单孢菌)脂肪酶。

[0200] 该亲本可以是一种真菌脂肪酶。例如,该亲本可以是酵母脂肪酶,如假 丝酵母属(Candida)、克鲁维酵母属(Kluyveromyces)、毕赤酵母属 (Pichia)、酵母属(Saccharomyces)、裂殖酵母(Schizosaccharomyces)或 耶氏酵母属(Yarrowia)脂肪酶;或一种丝状真菌脂肪酶,例如枝顶孢霉属、 伞菌属、链格孢属、曲霉属、短梗霉属、葡萄座腔菌属(Botryospaeria)、拟 蜡菌属、毛喙壳属、金孢子菌属、麦角菌属、旋孢腔菌属、鬼伞属、乳白蚁 属、棒囊壳属、隐丛赤壳菌属、隐球菌属、色二孢属、黑耳属、线黑粉酵母 属(Filibasidium)、镰孢属、赤霉属、全鞭毛虫属、腐质霉属、耙齿菌属、 香菇属(Lentinula)、小腔球菌属(Leptospaeria)、梨孢菌属 (Magnaporthe)、黑果菌属(Melanocarpus)、亚灰树花菌属 (Meripilus)、毛霉属、毁丝霉属、新美鞭菌属、链孢菌属、拟青霉属、青 霉菌属、平革菌属、瘤胃壶菌属、Poitrasia、假黑盘菌属、假披发虫属、根毛 霉菌属、裂褶菌属、柱顶孢属、篮状菌属、嗜热子囊菌属、梭孢壳霉属、弯 颈霉属、木霉属、长毛盘菌属、轮枝孢属、小包脚菇属、或炭角菌属脂肪 酶。

[0201] 在另一方面,该亲本是卡氏酵母(Saccharomyces carlsbergensis)、酿酒 酵母(Saccharomyces cerevisiae)、糖化酵母(Saccharomyces diastaticus)、道格拉氏酵母(Saccharomyces douglasii)、克鲁弗酵母(Saccharomyces kluyveri)、诺地酵母(Saccharomyces norbensis)、或卵形酵母(Saccharomyces oviformis)脂肪酶。

[0202] 在另一个方面,该亲本是解纤维枝顶孢霉(Acremonium cellulolyticus)、棘孢曲霉(Aspergillus aculeatus)、泡盛曲霉(Aspergillus awamori)、臭曲霉(Aspergillus foetidus)、烟曲霉(Aspergillus fumigatus)、日本曲霉(Aspergillus japonicus)、构巢曲霉(Aspergillus nidulans)、黑曲霉(Aspergillus niger)、米曲霉(Aspergillus oryzae)、狭 边金孢子菌(Chrysosporium inops)、嗜角质金孢子菌(Chrysosporium keratinophilum)、拉克淖金孢子菌(Chrysosporium lucknowense)、粪状金孢 子菌

(Chrysosporium merdarium)、毡金孢子菌(Chrysosporium pannicola)、昆士兰金孢子菌(Chrysosporium queenslandicum)、热带金孢 子菌(Chrysosporium tropicum)、带纹金孢子菌(Chrysosporium zonatum)、杆孢状镰孢(Fusarium bactridioides)、禾谷镰孢(Fusarium cerealis)、库威镰孢(Fusarium crookwellense)、黄色镰孢菌(Fusarium culmorum)、禾谷镰孢菌(Fusarium graminearum)、禾赤镰孢(Fusarium graminum)、异孢镰孢(Fusarium heterosporum)、合欢木镰孢(Fusarium negundi)、尖孢镰孢菌(Fusarium oxysporum)、多枝镰孢(Fusarium reticulatum)、粉红镰孢菌(Fusarium roseum)、接骨木镰孢(Fusarium sambucinum)、肤色镰孢(Fusarium sarcochroum)、拟枝孢镰孢菌(Fusarium sporotrichioides)、硫色镰孢菌(Fusarium sulphureum)、圆镰孢 (Fusarium torulosum)、拟丝孢镰孢菌(Fusarium trichothecioides)、镶片镰 孢菌(Fusarium venenatum)、灰腐质霉(Humicola grisea)、特异腐质霉 (Humicola insolens)、疏棉状腐质霉(Humicola lanuginosa)、白囊耙齿菌 (Irpex lacteus)、米黑毛霉(Mucor miehei)、嗜热毁丝霉(Myceliophthora thermophila)、粗糙脉孢菌(Neurospora crassa)、绳状青霉菌(Penicillium funiculosum)、产紫青霉(Penicillium purpurogenum)、黄孢原毛平革菌(Phanerochaete chrysosporium)、无色梭孢壳(Thielavia achromatica)、成 层梭孢壳菌(Thielavia albomyces)、白毛梭孢壳(Thielavia albopilosa)、澳 洲梭孢壳(Thielavia australeinsis)、粪梭孢壳(Thielavia fimeti)、小孢梭孢 壳(Thielavia microspora)、卵孢梭孢壳(Thielavia ovispora)、秘鲁梭孢壳 (Thielavia peruviana)、毛梭孢壳(Thielavia setosa)、瘤孢梭孢壳 (Thielavia spededonium)、耐热梭孢壳(Thielavia subthermophila)、土生梭 孢壳(Thielavia terrestris)、哈茨木霉(Trichoderma harzianum)、康宁木霉 (Trichoderma koningii)、长枝木霉(Trichoderma longibrachiatum)、里氏 木霉(Trichoderma reesei)、或绿色木霉(Trichoderma viride)脂肪酶。

[0203] 在另一方面,该亲本是疏棉状嗜热丝孢菌脂肪酶,例如SEQ ID NO:2的 脂肪酶。

[0204] 将理解的是,对于以上提到的物种而言,本发明涵盖完全状态和不完全 状态(perfect and imperfect states)二者、以及其他分类学等效物,例如无性 型,而不管它们已知的物种名称是什么。本领域的普通技术人员将容易地识 别适当等效物的身份。

[0205] 这些物种的菌株可以容易地在许多培养物保藏中心为公众所获得,如美 国典型培养物保藏中心(ATCC)、德国微生物菌种保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH,DSMZ)、荷兰菌种 保藏中心(Centraalbureau Voor Schimmelcultures,CBS)以及美国农业研究菌 种保藏中心北方地区研究中心(NRRL)。

[0206] 可以使用以上提到的探针从其他来源,包括从自然界(例如,土壤、堆 肥、水等等)分离的微生物或直接从自然材料(例如,土壤、堆肥、水等 等)获得的DNA样品鉴定和获得该亲本。用于从自然生活环境中直接分离微 生物和DNA的技术是本领域熟知的。然后可通过在另一种微生物或混合DNA 样本的基因组DNA或cDNA文库中类似地进行筛选来获得编码亲本的多核苷 酸。一旦用一种或多种探针检测到编码亲本的多核苷酸,就可以通过使用本领域普通技术人员已知的技术分离或克隆该多核苷酸(参见,例如,萨姆布 鲁克等人,1989,见上文)。

[0207] 变体的制备

[0208] 本发明还涉及获得脂肪酶变体的方法，包括(a)在对应于T231R+N233R 和SEQ ID NO:2的D96E、D111A、D254S、G163K、P256T、G91T、 G38A、D27R、以及N33Q中至少一个或多个(例如，若干个)的位置处引入 取代；(b)选择具有脂肪酶活性并且相比于该亲本脂肪酶具有改进的稳定性的 变体；并且(c)回收该变体。

[0209] 可以使用本领域已知的任何诱变程序来制备这些变体，例如定点诱变、合成基因构建、半合成基因构建、随机诱变、改组等。

[0210] 定点诱变是在编码该亲本脂肪酶的多核苷酸中的一个或多个限定位点处 引入一个或多个(例如，若干个)突变的技术。

[0211] 通过使用涉及含有所希望的突变的寡核苷酸引物的PCR可以体外实现定 点诱变。也可以通过盒式诱变进行体外定点诱变，所述盒式诱变涉及由限制 酶在包含编码亲本脂肪酶的多核苷酸的质粒中的位点处切割并且随后将含有 突变的寡核苷酸连接在多核苷酸中。通常，消化该质粒与该寡核苷酸的限制 酶是相同的，以允许该质粒的粘性末端以及插入片段彼此连接。参见，例 如，谢勒(Scherer)和戴维斯(Davis)，1979，美国国家科学院院刊(Proc. Natl.Acad.Sci.USA)76:4949-4955；以及巴顿(Barton)等人，1990，核酸 研究(Nucleic Acids Res.)18:7349-4966。

[0212] 还可以通过本领域已知的方法体内实现定点诱变。参见，例如，US 2004/0171154；斯道瑞希(Storici)等人，2001，自然生物技术(Nature Biotechnol.)19:773-776；卡伦(Kren)等人，1998，自然医学(Nat.Med.) 4:285-290；以及凯利萨诺(Calissano)和马奇诺(Macino)，1996，真菌遗 传学简讯(Fungal Genet.Newslett.)43:15-16。

[0213] 在本发明中可以使用任何定点诱变程序。存在可用于制备变体的很多可 商购的试剂盒。

[0214] 合成基因构建需要体外合成一种设计的多核苷酸分子以编码一种感兴趣 的多肽。基因合成可以利用多种技术来进行，如由田(Tian)等人(2004， 自然(Nature)432:1050-1054)所描述的基于多路微芯片的技术、以及其中 在光可编程的微流芯片上合成并组装寡核苷酸的类似技术。

[0215] 可以做出单个或多个氨基酸取代、缺失和/或插入并且使用诱变、重组和 /或改组的已知方法进行测试，随后进行相关筛选程序，如由里德哈尔-奥尔森 (Reidhaar-Olson)和萨奥尔(Sauer)，1988，科学(Science)241:53-57； 博维(Bowie)和萨奥尔，1989，美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci. USA)86:2152-2156；WO 95/17413；或WO 95/22625披露的那些。可以使用 的其他方法包括易错PCR、噬菌体展示(例如，洛曼(Lowman)等人，1991，生物化学(Biochemistry)30:10832-10837；美国专利号5,223,409； WO 92/06204)以及区域定向诱变(德比什尔(Derbyshire)等人，1986，基 因(Gene)46:145；内尔(Ner)等人，1988，DNA 7:127)。

[0216] 可以结合诱变/改组方法与高通量自动化筛选方法来检测由宿主细胞表达 的克隆的、诱变的多肽的活性(内斯(Ness)等人，1999，自然生物技术 (Nature Biotechnology)17:893-896)。编码活性多肽的诱变的DNA分子可 以回收自宿主细胞，并且使用本领域的标准方法对其进行迅速测序。这些方 法允许迅速确定多肽中单个氨基酸残基的重要性。

[0217] 通过组合合成基因构建、和/或定点诱变、和/或随机诱变、和/或改组的 多个方面

来实现半合成基因构建。半合成构建典型地是,利用合成的多核苷 酸片段的一个过程结合PCR技术。因此,基因的限定的区域可以从头合成, 而其他区域可以使用位点特异性诱变引物来扩增,而还有其他区域可以经受 易错PCR或非易错PCR扩增。然后可以对多核苷酸子序列进行改组。

[0218] 多核苷酸

[0219] 本发明还涉及编码本发明的变体的分离的多核苷酸。在某些方面,本发 明涉及一种包括本发明的多核苷酸的核酸构建体。在某些方面,本发明涉及 一种包括本发明的多核苷酸的表达载体。在某些方面,本发明涉及一种包括 本发明的多核苷酸的宿主细胞。在某些方面,本发明涉及产生脂肪酶变体的 方法,包括:(a)在适于表达该变体的条件下培养本发明的宿主细胞;并且(b) 回收该变体。

[0220] 核酸构建体

[0221] 本发明还涉及包括编码本发明的一种变体的、可操作地连接至一个或多 个控制序列上的一种多核苷酸的核酸构建体,该一个或多个控制序列在与控 制序列相容的条件下指导编码序列在一种适合的宿主细胞中的表达。

[0222] 可以按多种方式来操纵该多核苷酸以提供一种变体的表达。取决于表达 载体,在其插入载体以前操纵多核苷酸可以是希望的或必需的。用于利用重 组DNA方法修饰多核苷酸的技术是本领域熟知的。

[0223] 控制序列可以是一个启动子,即由一个宿主细胞识别用于表达该多核苷 酸的一种多核苷酸。启动子包含介导该变体的表达的转录控制序列。该启动 子可以是在宿主细胞中显示出转录活性的任何多核苷酸,包括突变型、截短 型及杂合型启动子,并且可以是由编码与该宿主细胞同源或异源的细胞外或 细胞内多肽的基因获得。

[0224] 用于在细菌宿主细胞中指导本发明的核酸构建体的转录的合适启动子的 实例是从以下基因中获得的启动子:解淀粉芽孢杆菌α-淀粉酶基因 (amyQ)、地衣芽孢杆菌α-淀粉酶基因(amyL)、地衣芽孢杆菌青霉素酶基 因(penP)、嗜热脂肪芽孢杆菌麦芽糖淀粉酶基因(amyM)、枯草芽孢杆菌 果聚糖蔗糖酶基因(sacB)、枯草芽孢杆菌xylA和xylB基因、苏云金芽孢杆菌 cryIIIA基因(阿盖塞(Agaisse)和勒尔克吕(Lereclus),1994,分子微生物 学(Molecular Microbiology)13:97-107)、大肠杆菌lac操纵子、大肠杆菌trc 启动子(埃贡(Egon)等人,1988,基因(Gene)69:301-315)、天蓝链霉 菌琼脂水解酶基因(dagA)、以及原核β-内酰胺酶基因(维拉-卡马洛夫 (Villa-Kamaroff)等人,1978,美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci. USA)75:3727-3731)、以及tac启动子(德波尔(DeBoer)等人,1983,美 国国家科学院院刊80:21-25)。其他启动子描述在吉尔伯特(Gilbert)等人, 1980,科学美国人(Scientific American)242:74-94的“来自重组细菌的有用 蛋白质(Useful proteins from recombinant bacteria)”;以及在萨姆布鲁克 (Sambrook)等人,1989,见上文。串联启动子的实例披露在WO 99/43835 中。

[0225] 用于指导本发明的核酸构建体在丝状真菌宿主细胞中的转录的合适启动 子的实例是从以下各项的基因获得的启动子:构巢曲霉乙酰胺酶、黑曲霉中 性α-淀粉酶、黑曲霉酸稳定性α-淀粉酶、黑曲霉或泡盛曲霉葡糖淀粉酶 (glaA)、米曲霉TAKA淀粉酶、米曲霉碱性蛋白酶、米曲霉丙糖磷酸异构 酶、尖镰孢胰蛋白酶样蛋白酶(WO 96/00787)、镶片镰孢淀粉葡糖苷酶 (WO 00/56900)、镶片镰孢Daria(Fusarium venenatum Daria)(WO 00/

56900)、镶片镰孢Quinn(Fusarium venenatum Quinn)(WO 00/56900)、米黑根毛霉(Rhizomucor miehei)脂肪酶、米黑根毛霉天冬氨酸 蛋白酶、里氏木霉β-葡糖苷酶、里氏木霉纤维二糖水解酶I、里氏木霉纤维二 糖水解酶II、里氏木霉内切右旋糖酐酶I、里氏木霉内切右旋糖酐酶II、里氏木 霉内切右旋糖酐酶III、里氏木霉内切右旋糖酐酶IV、里氏木霉内切右旋糖酐 酶V、里氏木霉木聚糖酶I、里氏木霉木聚糖酶II、里氏木霉β-木糖苷酶,以及NA2-tpi启动子(一种修饰的启动子,其来自曲霉属中性α-淀粉酶基因,其中 未翻译的前导序列由曲霉属丙糖磷酸异构酶基因的未翻译的前导序列替代; 非限制性实例包括修饰的启动子,其来自黑曲霉中性α-淀粉酶的基因,其中 未翻译的前导序列由构巢曲霉或米曲霉丙糖磷酸异构酶基因的未翻译的前导 序列替代);以及其突变型启动子、截短型启动子、以及杂合型启动子。

[0226] 在酵母宿主中,有用的启动子从以下的基因获得:酿酒酵母烯醇酶 (ENO-1)、酿酒酵母半乳糖激酶(GAL1)、酿酒酵母醇脱氢酶/甘油醛-3- 磷酸脱氢酶(ADH1、ADH2/GAP)、酿酒酵母丙糖磷酸异构酶(TPI)、酿 酒酵母金属硫蛋白(CUP1)、以及酿酒酵母3-磷酸甘油酸激酶。罗马诺斯 (Romanos)等人,1992,酵母(Yeast)8:423-488描述了酵母宿主细胞的其他有用的启动子。

[0227] 控制序列还可以是由宿主细胞识别以终止转录的一种转录终止子。该终 止子序列被可操作地连接至编码该变体的多核苷酸的3'-端。可以使用在宿主 细胞中具有功能的任何终止子。

[0228] 用于细菌宿主细胞的优选终止子是从克劳氏芽孢杆菌碱性蛋白酶 (aprH)、地衣芽孢杆菌α-淀粉酶(amyL)以及大肠杆菌核糖体RNA (rrnB)的基因获得。

[0229] 丝状真菌宿主细胞的优选终止子是从以下各项的基因中获得的:构巢曲 霉邻氨基苯甲酸合酶、黑曲霉葡糖淀粉酶、黑曲霉α-葡萄糖苷酶、米曲霉 TAKA淀粉酶以及尖镰孢胰蛋白酶样蛋白酶。

[0230] 用于酵母宿主细胞的优选终止子从以下各项的基因获得:酿酒酵母烯醇 酶、酿酒酵母细胞色素C(CYC1)、以及酿酒酵母甘油醛-3-磷酸脱氢酶。用 于酵母宿主细胞的其他有用的终止子由罗马诺斯(Romanos)等人,1992,见 上文描述。

[0231] 控制序列还可以是启动子下游和基因的编码序列上游的mRNA稳定子 区,其增加该基因的表达。

[0232] 适合的mRNA稳定子区的实例是从以下获得的:苏云金芽孢杆菌cryIIIA 基因(WO 94/25612)和枯草芽孢杆菌SP82基因(化(Hue)等人,1995,细 菌学杂志(Journal of Bacteriology)177:3465-3471)。

[0233] 该控制序列还可以是一个前导序列,一种对宿主细胞翻译很重要的非翻 译mRNA区域。前导子序列可操作地连接至编码该变体的多核苷酸的5'-端。 可以使用在宿主细胞中具有功能的任何前导序列。

[0234] 用于丝状真菌宿主细胞的优选前导序列是从米曲霉TAKA淀粉酶和构巢 曲霉丙糖磷酸异构酶的基因获得。

[0235] 适用于酵母宿主细胞的前导序列从以下各项的基因获得:酿酒酵母烯醇 酶(ENO-1)、酿酒酵母3-磷酸甘油酸激酶、酿酒酵母α因子、以及酿酒酵母 醇脱氢酶/甘油醛-3-磷酸脱氢酶(ADH2/GAP)。

[0236] 该控制序列还可以是一种多腺苷酸化序列,即被可操作地连接至该变体 编码序列的3'-末端并且当转录时由宿主细胞识别成将多腺苷酸残基添加到所 转录的mRNA上的一个信号的一种序列。可以使用在宿主细胞中起作用的任 何多腺苷酸化序列。

[0237] 用于丝状真菌宿主细胞的优选聚腺苷酸化序列是从以下各项的基因获 得:构巢曲霉邻氨基苯甲酸合酶、黑曲霉葡糖淀粉酶、黑曲霉α-葡糖苷酶、 米曲霉TAKA淀粉酶以及尖镰孢胰蛋白酶样蛋白酶。

[0238] 有用于酵母宿主细胞的多腺苷酸化序列在郭(Guo)和谢尔曼 (Sherman),1995,分子细胞生物学(Mol.Cellular Biol.)15:5983-5990中 描述。

[0239] 该控制序列还可以是信号肽编码区,编码与变体的N-端连接的信号肽, 并且引导该变体进入细胞的分泌通路。多核苷酸的编码序列的5'-端可以固有 地包含信号肽编码序列,该信号肽编码序列在翻译阅读框中与编码该变体的 编码序列的区段天然地连接在一起。可替代地,编码序列5'-端可以包括对于 该编码序列是外源的信号肽编码序列。在编码序列不天然地包含信号肽编码 序列的情况下,可能需要外源信号肽编码序列。可替代地,外源信号肽编码 序列可以简单地置换天然信号肽编码序列,以便增加变体的分泌。然而,可 以使用指导表达的变体进入宿主细胞的分泌途径的任何信号肽编码序列。

[0240] 用于细菌宿主细胞的有效信号肽编码序列是从以下各项的基因获得的信 号肽编码序列:芽孢杆菌属NCIB 11837产麦芽糖淀粉酶、地衣芽孢杆菌枯草 杆菌蛋白酶、地衣芽孢杆菌β-内酰胺酶、嗜热脂肪芽孢杆菌α-淀粉酶、嗜热脂 肪芽孢杆菌中性蛋白酶(nprT、nprS、nprM)以及枯草芽孢杆菌prsA。西蒙 纳(Simonen)和帕尔瓦(Palva),1993,微生物学评论(Microbiological Reviews)57:109-137描述了另外的信号肽。

[0241] 用于丝状真菌宿主细胞的有效信号肽编码序列是获得自以下项的基因的 信号肽编码序列:黑曲霉中性淀粉酶、黑曲霉葡糖淀粉酶、米曲霉TAKA淀粉 酶、特异腐质霉纤维素酶、特异腐质霉内切葡聚糖酶V、柔毛腐质霉脂肪酶以 及米黑根毛霉天冬氨酸蛋白酶。

[0242] 对于酵母宿主细胞有用的信号肽获得自以下项的基因:酿酒酵母α-因子 和酿酒酵母转化酶。见上文,罗马诺斯(Romanos)等人(1992)描述了其他 有用的信号肽编码序列。

[0243] 该控制序列还可以是编码位于变体的N-末端处的前肽的一个前肽编码序 列。生成的多肽被称为前体酶(proenzyme)或多肽原(或在一些情况下被称 为酶原(zymogen))。多肽原通常是无活性的并且可以通过从该多肽原上催 化切割或自动催化切割前肽而被转化成一种活性多肽。前肽编码序列可以从 以下各项的基因获得:枯草芽孢杆菌碱性蛋白酶(aprE)、枯草芽孢杆菌中 性蛋白酶(nprT)、嗜热毁丝霉漆酶(WO 95/33836)、曼赫根毛霉天冬氨酸 蛋白酶、以及酿酒酵母α因子。

[0244] 在信号肽序列和前肽序列二者都存在的情况下,该前肽序列定位成紧邻 该变体的N-末端并且该信号肽序列定位成紧邻该前肽序列的N-末端。

[0245] 还令人希望的可以是添加相对于宿主细胞的生长来调节该变体的表达的 调节序列。调控系统的实例是响应于化学或物理刺激而引起基因的表达开启 或关闭的那些,包括调控化合物的存在。原核系统中的调控序列包括lac、 tac、以及trp操纵子系统。在酵母中,可以使用ADH2系统或GAL1系统。在丝 状真菌中,可以使用黑曲霉葡糖淀粉酶启动子、米曲霉TAKAα-淀粉酶启动 子、以及米曲霉葡糖淀粉酶启动子。调控序列的其他例子是允许基因扩增的 那些。在真核系统中,这些调节序列包括在甲氨蝶呤存在下被扩增的二氢叶 酸还

原酶基因以及用重金属扩增的金属硫蛋白基因。在这些情况下,编码该 变体的多核苷酸将与该调节序列可操作地连接。

[0246] 表达载体

[0247] 本发明还涉及包括编码本发明的变体的多核苷酸、启动子、以及转录和 翻译终止信号的重组表达载体。不同的核苷酸和控制序列可以连接在一起以 产生一个重组表达载体,这一重组表达载体可以包括一个或多个便利的限制 酶切位点以允许在这些位点处插入或取代编码该变体的多核苷酸。可替代 地,该多核苷酸可以通过将该多核苷酸或包含该多核苷酸的核酸构建体插入 用于表达的适当载体中来表达。在产生该表达载体时,该编码序列是位于该 载体中,这样使得该编码序列与该供表达的适当控制序列可操作地连接。

[0248] 重组表达载体可以是任何载体(例如,质粒或病毒),其能够方便地进 行重组DNA程序,并且能够引起多核苷酸的表达。载体的选择将典型地取决 于该载体与有待引入该载体的宿主细胞的相容性。该载体可以是一种线性的 或闭合的环状质粒。

[0249] 载体可以是自主复制载体,即,作为染色体外实体存在的载体,其复制 独立于染色体复制,例如,质粒、染色体外元件、微染色体或人工染色体。 该载体可以包含用于确保自我复制的任何装置。可替代地,该载体可以是这 样一种载体,当被引入该宿主细胞中时,它被整合到基因组中并与其整合的 一个或多个染色体一起复制。此外,可以使用单一载体或质粒或两个或更多 个载体或质粒(这些载体或质粒共同含有待引入到宿主细胞的基因组中的总DNA)或转座子。

[0250] 该载体优选包含允许容易选择转化细胞、转染细胞、转导细胞或类似细 胞的一个或多个选择性标记。选择性标记是一种基因,该基因的产物提供了 杀生物剂抗性或病毒抗性、重金属抗性、营养缺陷型的原养型等。

[0251] 细菌性选择性标记的实例是地衣芽孢杆菌或枯草芽孢杆菌dal基因,或赋 予抗生素抗性(例如氨苄青霉素、氯霉素、卡那霉素、新霉素、大观霉素或 四环素抗性)的标记。用于酵母宿主细胞的适合的标记包括但不限于ADE2、HIS3、LEU2、LYS2、MET3、TRP1、以及URA3。用于在丝状真菌宿主细胞 中使用的选择性标记包含但不限于amdS(乙酰胺酶)、argB(鸟氨酸氨甲酰 基转移酶)、bar(草胺膦乙酰转移酶)、hph(潮霉素磷酸转移酶)、niaD (硝酸还原酶)、pyrG(乳清苷-5'-磷酸脱羧酶)、sC(硫酸腺苷基转移 酶)、以及trpC(邻氨基苯甲酸合酶)、连同其等效物。优选在曲霉属细胞 中使用的是构巢曲霉或米曲霉amdS和pyrG基因以及吸水链霉菌(Streptomyces hygroscopicus)bar基因。

[0252] 载体优选含有允许载体整合到宿主细胞的基因组中或载体在细胞中独立 于基因组自主复制的一个或多个元件。

[0253] 对于整合到该宿主细胞基因组中,该载体可以依靠编码该变体的多核苷 酸序列或者用于通过同源或非同源重组整合到该基因组中的该载体的任何其 他元件。可替代地,该载体可以包含用于指导通过同源重组而整合到宿主细 胞基因组中的一个或多个染色体中的一个或多个精确位置处的另外的多核苷 酸。为了增加在精确位置整合的可能性,这些整合的元件应包含足够数量的 核酸,例如100至10,000个碱基对、400至10,000个碱基对、以及800至10,000个 碱基对,这些碱基对与对应的靶序列具有高度的序列一致性以提高同源重组 的可能性。这些整合元件可以是与宿主细胞的基因组内的靶序列同源的任何 序列。此外,这些整合元件可以是非编码多核苷酸或编码多核苷酸。另一方 面,该载体可以通

过非同源重组整合到宿主细胞的基因组中。

[0254] 对于自主复制,载体可以进一步包括使该载体能够在所讨论的宿主细胞 中自主复制的复制起点。复制起点可以是在细胞中起作用的介导自主复制的 任何质粒复制子。术语“复制起点”或“质粒复制子”意指使质粒或载体能 够在体内复制的多核苷酸。

[0255] 细菌复制起点的实例是允许在大肠杆菌中复制的质粒pBR322、pUC19、 pACYC177、以及pACYC184的复制起点,以及允许在芽孢杆菌中复制的质粒 pUB110、pE194、pTA1060、以及pAMβ1的复制起点。

[0256] 用于在酵母宿主细胞中使用的复制起点的实例是2微米复制起点ARS1、 ARS4、ARS1与CEN3的组合以及ARS4与CEN6的组合。

[0257] 在丝状真菌细胞内有用的复制起点的实例是AMA1和ANS1(格姆斯(Gems)等人, 1991,基因(Gene)98:61-67;卡伦(Cullen)等人, 1987,核酸研究(Nucleic Acids Res.) 15:9163-9175;WO 00/24883)。AMA1基因的分离和包括该基因的质粒或载体的构建可根据 WO 00/24883披露 的方法完成。

[0258] 可以将本发明的多核苷酸的多于一个的拷贝插入到一个宿主细胞中以增 加变体的产生。通过将序列的至少一个另外的拷贝整合到宿主细胞基因组中 或通过包括一个与该多核苷酸一起的可扩增的选择性标记基因可以获得多核 苷酸的增加的拷贝数目,其中通过在适当的选择性试剂的存在下培养细胞可 以选择包含选择性标记基因的经扩增的拷贝的细胞、以及由此该多核苷酸的 另外的拷贝。

[0259] 用于连接以上所描述的元件以构建本发明的重组表达载体的程序是本领 域的普通技术人员熟知的(参见,例如,萨姆布鲁克(Sambrook)等人, 1989,见上文)。

[0260] 宿主细胞

[0261] 本发明还涉及重组宿主细胞,这些重组宿主细胞包括编码本发明的变体 的、可操作地连接至一个或多个控制序列的一种多核苷酸,该一个或多个控 制序列指导本发明的变体的产生。将包含多核苷酸的构建体或载体引入到宿 主细胞中,这样使得该构建体或载体被维持作为染色体整合体或作为自主复 制的染色体外载体,如早前所描述。术语“宿主细胞”涵盖由于复制期间发 生的突变与亲本细胞不同的亲本细胞的任何后代。宿主细胞的选择在很大程 度上将取决于编码该变体的基因及其来源。

[0262] 宿主细胞可以是在重组产生一个变体中有用的任何细胞,例如一个原核 细胞或一个真核细胞。

[0263] 原核宿主细胞可以是任何革兰氏阳性或革兰氏阴性细菌。革兰氏阳性细 菌包括但不限于:芽孢杆菌属、梭菌属、肠球菌属、土芽孢杆菌属、乳杆菌 属、乳球菌属、海洋芽孢杆菌属、葡萄球菌属、链球菌属以及链霉菌属。革 兰氏阴性细菌包括但不限于:弯曲杆菌属、大肠杆菌、黄杆菌菌、梭杆菌 属、螺杆菌属、泥杆菌属、奈瑟氏菌属、假单胞菌属、沙门氏菌属以及脲原 体属。

[0264] 细菌宿主细胞可以是任何芽孢杆菌细胞,包括但不限于:嗜碱芽孢杆 菌、解淀粉芽孢杆菌、短芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、克劳氏芽孢杆菌、凝结 芽孢杆菌、坚强芽孢杆菌、灿烂芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、 巨大芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌以及苏云 金芽孢杆菌细胞。

[0265] 细菌宿主细胞还可以是任何链球菌细胞,包括但不限于:似马链球菌、 酿脓链球

菌、乳房链球菌以及马链球菌兽瘟亚种细胞。

[0266] 细菌宿主细胞还可以是任何链霉菌属细胞，包括但不限于：不产色链霉 菌、除虫链霉菌、天蓝链霉菌、灰色链霉菌以及浅青紫链霉菌细胞。

[0267] 将DNA引入芽孢杆菌属细胞中可通过以下来实现：原生质体转化(参见 例如，张(Chang)和科恩(Cohen)，1979，分子遗传学与基因组学(Mol. Gen.Genet.)168:111-115)、感受态细胞转化(参见，例如，杨格 (Young)和斯皮宰曾(Spizizen)，1961，细菌学杂志(J.Bacteriol.)81: 823-829；或杜拜努(Dubnau)以及大卫杜夫-阿贝尔森(Davidoff-Abelson)，1971，分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)56:209-221)、电穿孔 (参见，例如，茂川(Shigekawa)和道尔(Dower)，1988，生物技术 (Biotechniques)6:742-751)、或者接合(参见，例如克勒(Koehler)和索 恩(Thorne)，1987，细菌学杂志169:5271-5278)。将DNA引入大肠杆菌细 胞中可通过以下来实现：原生质体转化(参见例如，哈纳汗(Hanahan)， 1983，分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)166:557-580)或电穿孔(参见例如， 道尔(Dower)等人，1988，核酸研究(Nucleic Acids Res.)16:6127- 6145)。将DNA引入链霉菌属细胞中可通过以下来实现：原生质体转化、电 穿孔(参见例如，贡(Gong)等人，2004，叶线形微生物学(Folia Microbiol.)(Praha(布拉格))49:399-405)、接合(参见例如，马佐迪耶 (Mazodier)等人，1989，细菌学杂志(J.Bacteriol.)171:3583-3585)、或 转导(参见例如，伯克(Burke)等人，2001，美国国家科学院院刊(Proc. Natl.Acad.Sci.USA)98:6289-6294)。将DNA引入假单孢菌属细胞中可通过 以下来实现：电穿孔(参见例如，蔡(Choi)等人，2006，微生物学方法杂志(J.Microbiol.Methods)64:391-397)或接合(参见例如，皮内多 (Pinedo)和斯梅茨(Smets)，2005，应用与环境微生物学(Appl.Environ. Microbiol.)71:51-57)。将DNA引入链球菌属细胞中可通过以下来实现：天 然感受态(参见例如，佩里(Perry)和藏满(Kuramitsu)，1981，感染与免 疫(Infect.Immun.)32:1295-1297)、原生质体转化(参见，例如，凯特 (Catt)和乔力克(Jollick)，1991，微生物学(Microbios)68:189-207)、电穿孔(参见，例如，巴克利(Buckley)等人，1999，应用与环境微生物学(Appl.Environ.Microbiol.)65:3800-3804)、或者接合(参见，例如，克莱 威尔(Clewell)，1981，微生物学评论(Microbiol.Rev.)45:409-436)。然 而，可以使用本领域已知的用于将DNA引入宿主细胞中的任何方法。

[0268] 宿主细胞还可以是真核细胞，如哺乳动物、昆虫、植物、或真菌细胞。

[0269] 宿主细胞可以是真菌细胞。如在此使用的“真菌”包括子囊菌门 (Ascomycota)、担子菌门(Basidiomycota)、壶菌门(Chytridiomycota)、 以及接合菌门(Zygomycota)、连同卵菌门(Oomycota)和全部有丝分裂孢 子真菌(如由霍克斯沃思(Hawksworth)等人在安斯沃思和拜斯比真菌词典(Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi)，第8版，1995，国际应用生 物科学中心(CAB International)，大学出版社(University Press)，英国剑 桥(Cambridge,UK)中进行定义的)。

[0270] 该真菌宿主细胞可以是酵母细胞。如在此使用的“酵母”包括产子囊酵 母(内孢霉目)、产担子酵母和属于半知菌类(芽孢纲)的酵母。由于酵母 的分类在未来可能改变，因此出于本发明的目的，酵母应如酵母的生物学和 活性(Biology and Activities of Yeast)(斯金纳(Skinner)、帕斯莫尔 (Passmore)、以及达文波特(Davenport)编辑，应用细菌学学会讨论会系 列号9(Soc.App.Bacteriol.Symposium Series No.9)，1980)中所描述来定

义。

[0271] 酵母宿主细胞可以是假丝酵母属、汉逊酵母属、克鲁弗酵母属、毕赤酵 母属、酵母属、裂殖酵母属、或耶氏酵母属细胞，如乳酸克鲁弗酵母 (Kluyveromyces lactis)、卡尔酵母、酿酒酵母、糖化酵母、道格拉氏酵母、 克鲁弗酵母、诺地酵母、卵形酵母、或解脂耶氏酵母(Yarrowia lipolytica)细 胞。

[0272] 真菌宿主细胞可以是丝状真菌细胞。“丝状真菌”包括真菌门 (Eumycota)和卵菌门的亚门(如由霍克斯沃思等人，1995，见上文所定 义)的所有丝状形式。丝状真菌通常的特征在于由壳多糖、纤维素、右旋糖 酐、壳聚糖、甘露聚糖、以及其他复杂多糖构成的菌丝体壁。营养生长是通 过菌丝延长，而碳分解代谢是专性需氧的。相反，酵母(如酿酒酵母)的营 养生长是通过单细胞菌体的出芽(budding)，而碳分解代谢可以是发酵的。

[0273] 丝状真菌宿主细胞可以是枝顶孢霉属、曲霉属、短梗霉属、烟管霉属(Bjerkandera)、拟腊菌属、金孢子菌属、鬼伞属、革盖菌属(Coriolus)、 隐球菌属、线黑粉菌科(Filibasidium)、镰孢属、腐质霉属、梨孢菌属、毛 霉属、毁丝霉属、新美鞭菌属、链孢菌属、拟青霉属、青霉属、平革菌属、 射脉菌属(Phlebia)、瘤胃壶菌属、侧耳属(Pleurotus)、裂褶菌属、篮状 菌属、嗜热子囊菌属、梭孢壳属、弯颈霉属、栓菌属(Trametes)或木霉属细 胞。

[0274] 例如，丝状真菌宿主细胞可以是泡盛曲霉、臭曲霉、烟曲霉、日本曲 霉、构巢曲霉、黑曲霉、米曲霉、黑刺烟管菌(Bjerkandera adusta)、干拟 蜡菌(Ceriporiopsis aneirina)、卡内基拟蜡菌(Ceriporiopsis caregiea)、浅 黄拟蜡孔菌(Ceriporiopsis gilvescens)、潘诺希塔拟蜡菌(Ceriporiopsis pannocinta)、环带拟蜡菌(Ceriporiopsis rivulosa)、微红拟蜡菌 (Ceriporiopsis subrufa)、虫拟蜡菌(Ceriporiopsis subvermispora)、狭边金 孢子菌(Chrysosporium inops)、嗜角质金孢子菌、卢克诺文思金孢子菌 (Chrysosporium lucknowense)、粪状金孢子菌(Chrysosporium merdarium)、租金孢子菌、女王杜香金孢子菌(Chrysosporium queenslandicum)、热带金孢子菌、褐薄金孢子菌(Chrysosporium zonatum)、灰盖鬼伞(Coprinus cinereus)、毛革盖菌(Coriolus hirsutus)、 杆孢状镰孢、谷类镰孢、库威镰孢、大刀镰孢、禾谷镰孢、禾赤镰孢、异孢 镰孢、合欢木镰孢、尖镰孢、多枝镰孢、粉红镰孢、接骨木镰孢、肤色镰 孢、拟分枝孢镰孢、硫色镰孢、圆镰孢、拟丝孢镰孢、镶片镰孢、特异腐质 霉、柔毛腐质霉、米黑毛霉、嗜热毁丝霉、粗糙链孢菌、产紫青霉、黄孢平 革菌(Phanerochaete chrysosporium)、射脉菌(Phlebia radiata)、刺芹侧耳 (Pleurotus eryngii)、土生梭孢壳霉、长域毛栓菌(Trametes villosa)、变色 栓菌(Trametes versicolor)、哈茨木霉、康宁木霉、长枝木霉、里氏木霉、或绿色木霉细胞。

[0275] 可以将真菌细胞通过涉及原生质体形成、原生质体转化、以及细胞壁再 生的方法以本身已知的方式转化。用于转化曲霉属和木霉属宿主细胞的适合 程序在EP 238023和约尔顿(Yelton)等人，1984，美国国家科学院院刊 (Proc.Natl.Acad.Sci.USA)81:1470-1474、以及克里斯滕森(Christensen) 等人，1988，生物/技术(Bio/Technology)6:1419-1422中描述。用于转化镰 孢属物种的适合方法由马拉迪尔(Malardier)等人，1989，基因(Gene)78: 147-156、以及WO 96/00787描述。可以使用由如以下文献描述的程序转化酵母：贝克尔(Becker)和瓜伦特(Guarente)，在阿贝尔森(Abelson)，J.N. 和西蒙(Simon)，

M.I.编,酵母遗传学与分子生物学指南,酶学方法(Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology,Methods in Enzymology),第194卷, 第182-187页,学术出版社有限公司(Academic Press,Inc.),纽约;伊藤 (Ito)等人,1983,细菌学杂志(J.Bacteriol.)153:163;以及哈尼恩 (Hinnen)等人,1978,美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)75: 1920。

[0276] 产生方法

[0277] 本发明还涉及产生变体的方法,这些方法包括:(a)在适于表达该变体的 条件下培养本发明的宿主细胞;并且(b)回收该变体。

[0278] 使用本领域已知的方法在适合于产生该变体的一种营养培养基中培养这 些宿主细胞。例如,可以通过摇瓶培养,或者在一种适合的培养基中并在允 许该变体表达和/或分离的条件下在实验室或工业发酵罐中进行小规模或大规 模发酵(包括连续发酵、分批发酵、分批给料发酵或固态发酵)来培养该细 胞。该培养是使用本领域中已知的程序,在一种适合营养培养基中发生,该 培养基包括碳和氮来源及无机盐。适合的培养基可从商业供应商获得或可以 根据公开的组成(例如,在美国典型培养物保藏中心的目录中)制备。如果该变体被分泌到该营养培养基中,则该变体可直接从该培养基中回收。如果 该变体没有分泌,则它可从细胞裂解液中回收。

[0279] 使用本领域已知的对这些变体特异的方法可以检测该变体。这些检测方 法包括但不限于,特异性抗体的使用、酶产物的形成或酶底物的消失。例 如,可以使用一种酶测定来确定该变体的活性(例如实例中所述的那些)。

[0280] 可以使用本领域已知的方法来回收该变体。例如,可以通过多种常规程 序从该营养培养基中回收该变体,这些常规程序包括但不局限于收集、离 心、过滤、萃取、喷雾干燥、蒸发、或沉淀。

[0281] 可以通过本领域中已知的多种程序来纯化变体以获得基本上纯的变体, 这些程序包括但不限于:色谱法(例如,离子交换色谱、亲和色谱、疏水作 用色谱、色谱聚焦、以及尺寸排阻色谱)、电泳程序(例如,制备型等电点 聚焦)、差别溶解度(例如,硫酸铵沉淀)、SDS-PAGE、或萃取(参见,例 如,蛋白质纯化(Protein Purification),詹森(Janson)和赖登(Ryden)编 辑,VCH出版社(VCH Publishers),纽约,1989)。

[0282] 在一个替代方面,没有回收该变体,而是将表达该变体的本发明的宿主 细胞用作该变体的一个来源。

[0283] 组合物

[0284] 考虑了包括本发明的多肽的组合物。

[0285] 在某些方面,本发明涉及包括一种亲本脂肪酶的变体的洗涤剂组合物, 该变体具有脂肪酶活性,与SEQ ID NO:2具有至少60%但少于100%的序列 一致性,并且在对应于T231R+N233R和SEQ ID NO:2的D96E、D111A、 D254S、G163K、P256T、G91T、和G38A中至少一个或多个(例如,若干 个)的位置处包括取代。在某些方面,该组合物在对应于SEQ ID NO:2的D27R和/或N33Q的位置处进一步包括取代。

[0286] 在某些方面,与亲本脂肪酶相比,所述变体具有增加的稳定性。在某些 方面,该稳定性是储存条件下稳定性、表面活性剂存在下稳定性、蛋白酶存 在下稳定性、蛋白酶和表面活性剂存在下稳定性、洗涤剂组分存在下稳定 性、化学稳定性、氧化稳定性、pH稳定性、

和/或热稳定性。该增加的稳定性 可以表示为如在实例1中所述的超过1的半衰期改进系数(HIF)。在某些方 面,该变体具有如下的HIF:超过1.0;超过1.5;超过2.0;超过2.5;超过3.0;超过3.5;超过4.0;超过4.5;超过5.0;超过5.5;或超过6.0。

[0287] 下文阐述的组合物组分的非限制性列表适合用于这些组合物中,并且在 此的方法可以合宜地并入本发明的某些实施例中,例如用以辅助或增强清洁 性能,用于处理有待清洁的底物,或用以在与香料、着色剂、染料或类似物 一起的情况下修饰该组合物的美感。掺入任何组合物中的任何此类组分的水 平是除了先前引用的用于掺入的任何材料之外的。这些另外的组分的精确性 质及其掺入水平将取决于组合物的物理形式和将在其中使用组合物的清洁操 作的性质。尽管根据一种具体的功能性对以下提及的组分由通用标题进行分 类,但是这并不被解释为限制,因为如将被普通技术人员所理解,一种组分 可以包括另外的功能性。

[0288] 除非另外表明,以百分比计的量是按该组合物的重量计(wt%)。适合 的组分材料包括但不限于表面活性剂、助洗剂、螯合剂、染料转移抑制剂、 分散剂、酶、以及酶稳定剂、催化材料、漂白活化剂、过氧化氢、过氧化氢 源、预形成的过酸、聚合物分散剂、粘土去除/抗再沉积剂、增亮剂、泡沫抑 制剂、染料、调色染料、香料、香料递送系统、结构弹力剂、织物软化剂、 载体、助水溶物、加工助剂、溶剂和/或颜料。除了以下披露,此类其他组分 的适合实例以及使用水平发现于US 5576282、US 6306812、和US 6326348 中,通过引用将这些文献特此结合。

[0289] 因此,在某些实施例中,本发明不包含以下附属材料的一种或多种:表 面活性剂、皂、助洗剂、螯合剂、染料转移抑制剂、分散剂、另外的酶、酶 稳定剂、催化材料、漂白活化剂、过氧化氢、过氧化氢源、预形成的过酸、 聚合物分散剂、粘土去除/抗再沉积剂、增亮剂、泡沫抑制剂、染料、香料、 香料递送系统、结构弹力剂、织物软化剂、载体、助水溶物、加工助剂、溶 剂和/或颜料。然而,当一种或多种组分存在时,这样的一种或多种组分可以 是如下文详述地存在的:

[0290] 表面活性剂-根据本发明的组合物可以包括表面活性剂或表面活性剂系 统,其中该表面活性剂可以选自非离子型表面活性剂、阴离子表面活性剂、 阳离子表面活性剂、两性表面活性剂、兼性离子表面活性剂、半极性非离子 表面活性剂、及其混合物。当存在时,表面活性剂典型地以从0.1wt%至60 wt%、从0.2wt%到40wt%、从0.5wt%至30wt%、从1wt%至50wt%、从1 wt%至40wt%、从1wt%至30wt%、从1wt%至20wt%、从3wt%至10wt%、 从3wt%至5wt%、从5wt%至40wt%、从5wt%至30wt%、从5wt%至15 wt%、从3wt%至20wt%、从3wt%至10wt%、从8wt%至12wt%、从10wt% 至12wt%、从20wt%至25wt%或从25wt%-60wt%的水平存在。

[0291] 适合的阴离子去污表面活性剂包括硫酸盐和磺酸盐去污表面活性剂。

[0292] 适合的磺酸盐去污表面活性剂包括烷基苯磺酸盐,在一方面为C_{10-13}烷基 苯磺酸盐。适合的烷基苯磺酸盐(LAS)可以通过磺化可商购的直链烷基苯 (LAB)来获得;适合的LAB包括低碳2-苯基LAB,如Isochem®或 Petrelab®,其他适合的LAB包括高碳2-苯基LAB,如Hyblene®。一种适合的 阴离子洗涤剂表面活性剂是通过DETAL催化工艺获得的烷基苯磺酸盐,但其 他合成途径(如HF)也可以是适合的。在一方面,使用LAS的镁盐。

[0293] 适合的硫酸盐去污表面活性剂包括烷基硫酸盐,在一方面,为C_{8-18}烷基 硫酸盐,

或主要为C_{12}烷基硫酸盐。

[0294] 另外的适合的硫酸盐去污表面活性剂是烷基烷氧基化硫酸盐，在一方面 为烷基乙氧基化硫酸盐，在一方面为C_{8-18}烷基烷氧基化硫酸盐，在另一方面 为C_{8-18}烷基乙氧基化硫酸盐，典型地烷基烷氧基化硫酸盐具有从0.5至20或从 0.5至10的平均烷氧基化度，典型地烷基烷氧基化硫酸盐是C_{8-18}烷基乙氧基化 硫酸盐，具有0.5至10、从0.5至7、从0.5至5或从0.5至3的平均乙氧基化度。

[0295] 烷基硫酸盐、烷基烷氧基化硫酸盐和烷基苯磺酸盐可以是直链或支链 的、取代或未取代的。

[0296] 去污表面活性剂可以是中链分支的去污表面活性剂，在一方面为中链分 支的阴离子去污表面活性剂，在一方面为中链分支的烷基硫酸盐和/或中链分 支的烷基苯磺酸盐，例如中链分支的烷基硫酸盐。在一方面，中链分支是C_{1-4}烷基，典型地为甲基和/或乙基。

[0297] 阴离子表面活性剂的非限制性实例包括硫酸盐和磺酸盐，具体地说是直 链烷基苯磺酸盐(LAS)、LAS的异构体、支链烷基苯磺酸盐(BABS)、苯 基链烷磺酸盐、α-烯烃磺酸盐(AOS)、烯烃磺酸盐、链烯烃磺酸盐、链烷- 2,3-二基双(硫酸盐)、羟基链烷磺酸盐以及二磺酸盐、烷基硫酸盐(AS)(如 十二烷基硫酸钠(SDS))、脂肪醇硫酸盐(FAS)、伯醇硫酸盐(PAS)、 醇醚硫酸盐(AES或AEOS或FES，也被称为醇乙氧基硫酸盐或脂肪醇醚硫酸 盐)、仲链烷磺酸盐(SAS)、石蜡烃磺酸盐(PS)、酯磺酸盐、磺化的脂肪 酸甘油酯、α-磺酸基脂肪酸甲酯(α-SFMe或SES)(包括甲酯磺酸盐 (MES))、烷基琥珀酸或烯基琥珀酸、十二烯基/十四烯基琥珀酸 (DTSA)、氨基酸的脂肪酸衍生物、磺酸基琥珀酸或皂的二酯和单酯、及其 组合。

[0298] 适合的非离子去污表面活性剂选自下组，该组由以下各项组成：C_8-C_{18}烷基乙氧基化物，如NEODOL®；C_6-C_{12}烷基苯酚烷氧基化物，其中该烷氧基 化物单元可以是乙烯氧基单元，丙烯氧基单元或其混合物；C_{12}-C_{18}醇和C_6-C_{12}烷基苯酚与环氧乙烷/环氧丙烷嵌段聚合物的缩合物，如普朗尼克(Pluronic)®；C_{14}-C_{22}中链分支的醇；C_{14}-C_{22}中链分支的烷基烷氧基化物，典型地具有从 1至30的平均烷氧基化度；烷基多糖，在一方面为烷基多糖苷；多羟基脂肪酸 酰胺；醚封端的聚(烷氧基化)醇表面活性剂；及其混合物。

[0299] 适合的非离子去污表面活性剂包括烷基多糖苷和/或烷基烷氧基化醇。

[0300] 在一方面，非离子去污表面活性剂包括烷基烷氧基化醇，在一方面为C_{8-18}烷基烷氧基化醇，例如C_{8-18}烷基乙氧基化醇，该烷基烷氧基化醇可以具有从 1至50、从1至30、从1至20、或从1至10的平均烷氧基化度。在一方面，烷基 烷氧基化醇可以是C_{8-18}烷基乙氧基化醇，具有从1至10、从1至7，更多是从1 至5或从3至7的平均乙氧基化度。烷基烷氧基化醇可以是直链或支链的、以及 取代或未取代的。适合的非离子表面活性剂包括Lutensol®。

[0301] 非离子型表面活性剂的非限制性实例包括醇乙氧基化物(AE或AEO)、醇丙氧基化物、丙氧基化的脂肪醇(PFA)，烷氧基化的脂肪酸烷基酯(例如 乙氧基化的和/或丙氧基化的脂肪酸烷基酯)，烷基酚乙氧基化物(APE)，壬 基酚乙氧基化物(NPE)，烷基多糖苷(APG)，烷氧基化胺，脂肪酸单乙醇 酰胺(FAM)，脂肪酸二乙醇酰胺(FADA)，乙氧基化的脂肪酸单乙醇酰胺 (EFAM)，丙氧基化的脂肪酸单乙醇酰胺(PFAM)，多羟基烷基脂肪酸酰 胺，或葡萄糖胺的N-酰基N-烷基衍生物(葡糖酰胺(GA)，或脂肪酸葡糖酰 胺(FAGA))，连同在SPAN和

TWEEN商品名下可获得的产品，及其组合。

[0302] 适合的阳离子去污表面活性剂包括烷基吡啶鎓化合物、烷基季铵化合 物、烷基季鏻化合物、烷基三锍化合物、及其混合物。

[0303] 适合的阳离子去污表面活性剂是具有以下通式的季铵化合物：(R)(R$_1$)(R$_2$)(R$_3$)N$^+$X$^-$，其中R是直链或支链的、取代或未取代的C$_{6-18}$烷基或烯 基部分，R$_1$和R$_2$独立地选自甲基或乙基部分，R$_3$是羟基、羟甲基或羟乙基部 分，X是提供电荷中性的阴离子，适合的阴离子包括卤化物，例如氯化物；硫 酸盐；以及磺酸盐。适合的阳离子去污表面活性剂是单-C$_{6-18}$烷基单-羟乙基二 甲基季铵氯化物。高度合适的阳离子去污表面活性剂是单-C$_{8-10}$烷基单-羟乙基 二甲基季铵氯化物、单-C$_{10-12}$烷基单-羟乙基二甲基季铵氯化物以及单-C$_{10}$烷基单-羟乙基二甲基季铵氯化物。

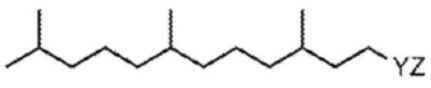
[0304] 阳离子表面活性剂的非限制性实例包括烷基二甲基乙醇季胺 (ADMEAQ)、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、二甲基二硬脂酰氯化铵 (DSDMAC)、以及烷基苄基二甲基铵、烷基季铵化合物、烷氧基化季铵 (AQA)化合物、酯季铵及其组合。

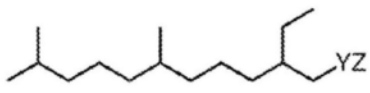
[0305] 适合的两性表面活性剂/兼性离子表面活性剂包括氧化胺和甜菜碱(如烷 基二甲基甜菜碱、磺基甜菜碱)、或其组合。本发明的胺中和的阴离子表面 活性剂-阴离子表面活性剂以及附属的阴离子共表面活性剂可以按酸形式存 在，并且所述酸形式可以被中和以形成希望用于本发明洗涤剂组合物的表面 活性剂盐。典型的用于中和的试剂包括金属反离子碱，例如氢氧化物，如 NaOH或KOH。用于中和本发明的阴离子表面活性剂和处于其酸形式的附属阴 离子表面活性剂或共表面活性剂的另外优选的试剂包括氨、胺、或烷醇胺。优选烷醇胺。适合的非限制性实例包括单乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、以 及其他本领域中已知的直链或支链的烷醇胺；例如，高度优选的烷醇胺包括 2-氨基-1-丙醇、1-氨基丙醇、单异丙醇胺、或1-氨基-3-丙醇。胺中和可以进 行到完全或部分的程度，例如，阴离子表面活性剂混合物的部分可以被钠或 钾中和，并且阴离子表面活性剂混合物的部分可以被胺或烷醇胺中和。

[0306] 半极性表面活性剂的非限制性实例包括氧化胺(AO)，如烷基二甲胺氧 化物

[0307] 包含一种或多种阴离子表面活性剂以及另外一种或多种非离子表面活性 剂、并可任选地与另外的表面活性剂例如阳离子表面活性剂的混合物的表面 活性剂系统可以是优选的。优选的阴离子与非离子表面活性剂的重量比是至 少2:1、或至少1:1至1:10。

[0308] 在一个方面，表面活性剂系统可包括由化学式A以及化学式B代表的类异 戊二烯表面活性剂的一种混合物：

[0309] 

(A)


(B)

[0310] 其中Y是CH$_2$或空，并且Z可如此选择以使得所得到的表面活性剂是选 自以下的表面活性剂：烷基羧酸酯表面活性剂、烷基多烷氧基表面活性剂、 烷基阴离子型多烷氧基硫酸酯表面活性剂、烷基甘油酯磺酸酯表面活性剂、 烷基二甲基氧化胺表面活性剂、基于烷基多羟基的表面活性剂、烷基磷酸酯 表面活性剂、烷基甘油磺酸酯表面活性剂、烷基多葡糖酸酯表面活性剂、烷 基多磷酸酯表面活性剂、烷基膦酸酯表面活性剂、烷基多糖苷表面活性剂、 烷基单糖苷表面活性剂、烷基二糖苷表面活性剂、烷基磺基琥珀酸酯表面活 性剂、烷基二硫酸酯表面活性剂、烷基二磺酸酯表面活性剂、烷基磺化琥珀 酰胺酸酯表面活

性剂、烷基葡萄糖酰胺表面活性剂、烷基牛磺酸酯表面活性 剂、烷基肌氨酸酯表面活性剂、烷基甘氨酸酯表面活性剂、烷基羟乙基磺酸 酯表面活性剂、烷基二链烷醇酰胺表面活性剂、烷基单链烷醇酰胺表面活性 剂、烷基单链烷醇酰胺硫酸酯表面活性剂、烷基二羟基乙酰胺表面活性剂、 烷基二羟基乙酰胺硫酸酯表面活性剂、烷基甘油酯表面活性剂、烷基甘油酯 硫酸酯表面活性剂、烷基甘油醚表面活性剂、烷基甘油醚硫酸酯表面活性 剂、烷基甲基酯磺酸酯表面活性剂、烷基多甘油醚表面活性剂、烷基多甘油 醚硫酸酯表面活性剂、烷基山梨聚糖酯表面活性剂、烷基氨基烷烃磺酸酯表 面活性剂、烷基酰胺丙基甜菜碱表面活性剂、基于烷基烯丙基化季盐(alkyl allylated quat)的表面活性剂、基于烷基单羟基烷基-二-烷基化季盐(alkylated quat)的表面活性剂、基于烷基二-羟基烷基单烷基季盐(monoalkyl quat)的 表面活性剂、烷基化季盐(alkylated quat)表面活性剂、烷基三甲基铵季盐 (trimethylammonium quat)表面活性剂、基于烷基多羟基烷基氧基丙基季盐(oxypropyl quat)的表面活性剂、烷基甘油酯季盐(alkyl glycerol ester quat) 表面活性剂、烷基乙二醇胺季盐(alkyl glycol amine quat)表面活性剂、烷基 单甲基二羟基乙基季铵表面活性剂、烷基二甲基单羟基乙基季铵表面活性 剂、烷基三甲基铵表面活性剂、基于烷基咪唑啉的表面活性剂、烯烃-2-基-琥 珀酸酯表面活性剂、烷基a-磺化羧酸表面活性剂、烷基a-磺化羧酸烷基酯表 面活性剂、α烯烃磺酸酯表面活性剂、烷基苯酚乙氧基化物表面活性剂、烷基 苯磺酸酯表面活性剂、烷基磺基甜菜碱表面活性剂、烷基羟基磺基甜菜碱表 面活性剂、烷基铵基羧酸甜菜碱表面活性剂、烷基蔗糖酯表面活性剂、烷基 烷醇酰胺表面活性剂、烷基二(聚氧化乙烯)单烷基铵表面活性剂、烷基单(聚 氧化乙烯)二烷基铵表面活性剂、烷基苄基二甲基铵表面活性剂、烷基氨基丙 酸酯表面活性剂、烷基酰胺丙基二甲胺表面活性剂、或其一种混合物;并且 如果Z是带电部分时,Z通过一种适合的金属或有机反离子被电荷平衡。适 合的反离子包括金属反离子、胺、或烷醇胺,例如C1-C6烷醇铵。更确切地 说,适合的反离子包括Na+、Ca+、Li+、K+、Mg+,例如单乙醇胺 (MEA)、二乙醇胺(DEA)、三乙醇胺(TEA)、2-氨基-1-丙醇、1-氨基 丙醇、甲基二乙醇胺、二甲基乙醇胺、单异丙醇胺、三异丙醇胺、1-氨基-3-丙 醇、或其混合物。在一个实施例中,该组合物包含从5%至97%的一种或多种 非类异戊二烯表面活性剂;以及一种或多种辅助清洁添加剂;其中具有化学 式A的表面活性剂与具有化学式B的表面活性剂的重量比是从50:50至95: 5。

[0311] 皂-在此的组合物可以包含皂。不受理论的限制,可令人希望的是包括 皂,因为它部分充当表面活性剂并且部分充当助洗剂,并且可用于抑制泡 沫,并且此外,可以有利地与组合物的多种阳离子化合物相互作用以增强用 本发明组合物处理的纺织品织物的柔软性。可以利用本领域中已知的用于在 衣物洗涤剂中使用的任何皂。在一个实施例中,这些组合物包含从0wt%至20 wt%、从0.5wt%至20wt%、从4wt%至10wt%、或从4wt%至7wt%的皂。

[0312] 在此有用的皂的实例包括油酸皂、棕榈酸皂、棕榈仁脂肪酸皂、及其混 合物。典型的皂处于具有不同链长和取代度的脂肪酸皂混合物的形式。一种 这样的混合物是拔顶棕榈仁脂肪酸。

[0313] 在一个实施例中,该皂选自游离脂肪酸。合适的脂肪酸是饱和和/或不饱 和的并且可以从天然来源如植物或动物酯(例如,棕榈仁油、棕榈油、椰子 油、巴巴苏油、红花油、妥尔油、蓖麻油、牛油和鱼油、油脂、及其混合 物)中获得,或合成地制备(例如,经由石油的

氧化或者经由费托法(Fisher Tropsch process)氢化一氧化碳)。

[0314] 用于在本发明组合物中使用的适合的饱和脂肪酸的实例包括癸酸、月桂 酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、花生酸和山萮酸。合适的不饱和脂肪酸种 类包括:棕榈油酸、油酸、亚油酸、亚麻酸和蓖麻油酸。优选的脂肪酸的实 例是饱和Cn脂肪酸、饱和Ci_2-Ci_4脂肪酸、和饱和或不饱和的Cn至Ci_8脂肪酸、及其混合物。

[0315] 当存在时,织物软化阳离子辅助表面活性剂与脂肪酸的重量比优选地是 从约1:3至约3:1,更优选地从约1:1.5至约1.5:1,最优选地约1:1。

[0316] 在此的皂和非皂阴离子表面活性剂的水平是以酸式基础指定的按洗涤剂 组合物的重量计的百分比。然而,正如本领域中通常理解的,在实践中使用 钠、钾或链烷醇铵碱如氢氧化钠或单乙醇胺中和阴离子表面活性剂和皂。

[0317] 助水溶剂-本发明的组合物可以包括一种或多种助水溶剂。助水溶剂是一 种化合物,该化合物在水性溶液中溶解疏水化合物(或相反地,在非极性环 境中的极性物质)。典型地,助水溶剂同时具有亲水的和疏水的特征(如从 表面活性剂已知的所谓两亲特性);然而助水溶剂的分子结构一般并不有利 于自发自聚集,参见例如霍奇登(Hodgdon)和卡勒(Kaler)的综述 (2007),胶体&界面科学新见(Current Opinion in Colloid&Interface Science),12:121-128。助水溶剂并不显示一个临界浓度,高于该浓度就会 发生如对表面活性剂而言所发现的自聚集以及脂质形成胶束、薄层或其他很 好地定义的中间相。很多助水溶剂反而示出一个连续型聚集过程,其中聚集 体的大小随着浓度增加而增长。然而,很多助水溶剂改变了包括极性和非极 性特征的物质的系统(包括水、油、表面活性剂、和聚合物的混合物)的相 行为、稳定性、和胶体特性。经典地从制药、个人护理、食品跨行业至技术应用使用助水溶剂。助水溶剂在洗涤剂组合物中的使用允许例如更浓的表面 活性剂配制品(如在通过除去水而压缩液体洗涤剂的过程中)而不引起不希 望的现象,例如相分离或高粘度。

[0318] 洗涤剂可以包含从0至10wt%,如从0至5wt%、0.5wt%至5wt%、或 从3wt%至5wt%的助水溶剂。可以利用本领域中已知的用于在洗涤剂中使用 的任何助水溶剂。助水溶剂的非限制性实例包括苯磺酸钠、对甲苯磺酸钠 (STS)、二甲苯磺酸钠(SXS)、枯烯磺酸钠(SCS)、伞花烃磺酸钠、氧 化胺、醇和聚乙二醇醚、羟基萘甲酸钠、羟基萘磺酸钠、乙基己基磺酸钠及其 组合。

[0319] 助洗剂-本发明的组合物可以包括一种或多种助洗剂、共助洗剂、助洗剂 系统或其混合物。当使用助洗剂时,清洁组合物将典型地包括从0至65wt%、 至少1wt%、从2wt%至60wt%或从5wt%至10wt%的助洗剂。在洗涤餐具清 洁组合物中,助洗剂的水平典型地是40wt%至65wt%或50wt%至65wt%。该 组合物可以是基本上不含助洗剂;基本上不含意思为“没有有意添加的”沸 石和/或磷酸盐。典型的沸石助洗剂包括沸石A、沸石P和沸石MAP。典型的磷 酸盐助洗剂是三聚磷酸钠。

[0320] 助洗剂和/或共助洗剂可以具体是形成具有Ca和Mg的水溶性复合物的螯合 剂。可以使用本领域中已知用于在洗涤剂中使用的任何助洗剂和/或共助洗 剂。助洗剂的非限制性实例包括沸石、二磷酸盐(焦磷酸盐)、三磷酸盐例如 三磷酸钠(STP或STPP)、碳酸盐例如碳酸钠、可溶性硅酸盐例如偏硅酸钠、层状硅酸盐(例如来自赫斯特公司的SKS-6)、乙醇胺例如2-氨基乙-1-醇 (MEA)、亚氨基二乙醇(DEA)和2,2',2”-次氮基三乙醇(TEA)、以及羧甲

基菊粉(CMI)、及其组合。

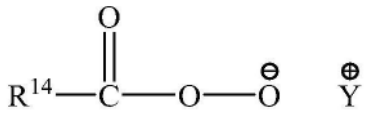
[0321] 清洁组合物可以单独地包括一种共助洗剂,或与一种助洗剂,例如沸石 助洗剂组合。共助洗剂的非限制性实例包括聚丙烯酸酯的均聚物或其共聚物, 例如聚(丙烯酸)(PAA)或共聚(丙烯酸/马来酸)(PAA/PMA)。另外的非限制 性实例包括柠檬酸盐,螯合剂,例如氨基羧酸盐、氨基多羧酸盐和膦酸盐,以 及烷基-或烯基琥珀酸。另外的具体实例包括2,2',2"-次氨基三乙酸(NTA)、 乙二胺四乙酸(EDTA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)、亚氨二琥珀酸 (IDS)、乙二胺-N,N'-二琥珀酸(EDDS)、甲基甘氨酸二乙酸(MGDA)、 谷氨酸-N,N-二乙酸(GLDA)、1-羟乙烷-1,1-二基双(膦酸)(HEDP)、乙二胺 四(亚甲基)四(膦酸)(EDTMPA)、二亚乙基三胺五(亚甲基)五(膦酸) (DTPMPA)、N-(2-羟乙基)亚氨基二乙酸(EDG)、天冬氨酸-N-单乙酸 (ASMA)、天冬氨酸-N,N-二乙酸(ASDA)、天冬氨酸-N-单丙酸 (ASMP)、亚氨二琥珀酸(IDA)、N-(2-磺甲基)天冬氨酸(SMAS)、N-(2- 磺乙基)天冬氨酸(SEAS)、N-(2-磺甲基)谷氨酸(SMGL)、N-(2-磺乙基)谷 氨酸(SEGL)、N-甲基亚氨基二乙酸(MIDA)、α-丙氨酸-N,N-二乙酸(α- ALDA)、丝氨酸-N,N-二乙酸(SEDA)、异丝氨酸-N,N-二乙酸(ISDA)、 苯丙氨酸-N,N-二乙酸(PHDA)、邻氨基苯甲酸-N,N-二乙酸(ANDA)、对 氨基苯磺酸-N、N-二乙酸(SLDA)、氨基乙磺酸-N、N-二乙酸(TUDA)和 磺甲基-N,N-二乙酸(SMDA)、N-(羟乙基)-亚乙基二胺三乙酸(HEDTA)、 二乙醇甘氨酸(DEG)、二亚乙基三胺五(亚甲基膦酸)(DTPMP)、氨基三 (亚甲基膦酸)(ATMP)、及其组合和盐。另外的示例性助洗剂和/或共助洗剂 描述于例如WO 09/102854、US 5977053中。

[0322] 螯合剂和晶体生长抑制剂-在此的组合物可以包含螯合剂和/或晶体生长 抑制剂。适合的分子包括铜、离子和/或锰螯合剂及其混合物。适合的分子包 括DTPA(二亚乙基三胺五乙酸)、HEDP(羟基乙烷二膦酸)、DTPMP(二 亚乙基三胺五(亚甲基膦酸))、1,2-二羟基苯-3,5-二磺酸二钠盐氢氧化物、乙 二胺、二亚乙基三胺、乙二胺二琥珀酸(EDDS)、N-羟基乙基乙二胺三乙酸 (HEDTA)、三亚乙基四胺六乙酸(TTHA)、N-羟基乙基亚氨基二乙酸(HEIDA)、二羟基乙基甘氨酸(DHEG)、亚乙基二胺四丙酸(EDTP)、 羧甲基菊粉以及2-膦羧基丁烷1,2,4-三羧酸(Bayhibit®AM)及其衍生物。典 型地,该组合物可以包括从0.005wt%至15wt%或从3.0wt%至10wt%的螯合 剂或晶体生长抑制剂。

[0323] 漂白组分-适合用于掺入本发明的方法和组合物中的漂白组分包括多于一 种漂白组分中的一种或混合物。适合的漂白组分包括漂白催化剂、光漂白 剂、漂白活化剂、过氧化氢、过氧化氢源、预形成的过酸及其混合物。通 常,当使用一种漂白组分时,本发明的组合物可以包括从0至30wt%、从 0.00001wt%至90wt%、0.0001wt%至50wt%、从0.001wt%至25wt%或从1 wt%至20wt%。适合的漂白组分的实例包括:

[0324] (1)预形成的过酸:适合的预形成的过酸包括但不限于选自下组的化合 物,该组由预先形成的过氧酸或其盐组成,典型地是过氧羧酸或其盐或过氧 硫酸或其盐。

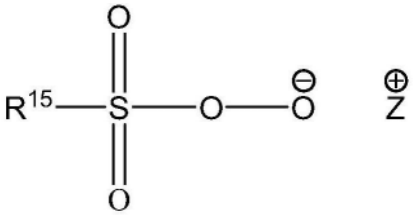
[0325] 预形成的过氧酸或其盐优选是一种过氧羧酸或其盐,典型地具有对应于 以下化学式的化学结构:

[0326] 

[0327] 其中:R^{14}选自烷基、芳烷基、环烷基、芳基或杂环基团;R^{14}基团可以 是直链或支链

的、取代或未取代的;并且Y是达到电荷中性的任何适合的反离 子,优选地Y选自氢、钠或钾。优选地,R^{14}是直链或支链的、取代或未取代 的C_{6-9}烷基。优选地,过氧酸或其盐选自过氧己酸、过氧庚酸、过氧辛酸、过 氧壬酸、过氧癸酸、及其盐,或其任何组合。特别优选的过氧酸是邻苯二甲 酰亚胺基-过氧基-链烷酸,特别是ε-邻苯二甲酰亚胺基过氧基己酸(PAP)。优选地,过氧酸或其盐具有处于从30℃至60℃的范围内的熔点。

[0328] 预形成的过氧酸或其盐还可以是一种过氧硫酸或其盐,典型地具有对应 于以下化学式的化学结构:

[0329] 

[0330] 其中:R^{15}选自烷基、芳烷基、环烷基、芳基或杂环基团;R^{15}基团可以 是直链或支链的、取代或未取代的;并且Z是达到电荷中性的任何适合的反离 子,优选地Z选自氢、钠或钾。优选地,R^{15}是直链或支链的、取代或未取代 的C_{6-9}烷基。优选地,此类漂白组分可以按从0.01wt%至50wt%或从0.1wt%至 20wt%的量存在于本发明的组合物中。

[0331] (2)过氧化氢源包括例如无机过氧化氢合物盐,包括碱金属盐,如过硼酸 盐(通常是一水合物或四水合物),过碳酸盐,过硫酸盐,过磷酸盐,过硅 酸盐的钠盐及其混合物。在本发明的一个方面,无机过氧化氢合物盐是例如 选自下组的那些,该组由以下各项组成:过硼酸盐、过碳酸盐的钠盐及其混 合物。当使用时,无机过氧化氢合物盐典型地以整体组合物的0.05wt%至40 wt%或1wt%至30wt%的量存在并且典型地被掺入此类组合物中作为可以被包 衣的结晶固体。适合的包衣包括:无机盐,例如碱金属硅酸盐、碳酸盐或硼 酸盐或其混合物,或有机材料,例如水溶性或水分散性聚合物、蜡、油或脂 肪皂。优选地,此类漂白组分可以按0.01wt%至50wt%或0.1wt%至20wt%的 量存在于本发明的组合物中。

[0332] (3)术语漂白活化剂在此意指一种与过氧化氢反应以经由过水解反应形成 过酸的化合物。以此方式形成的过酸构成活化的漂白剂。有待在此使用的适 合漂白活化剂包括属于酯、酰胺、酰亚胺或酸酐类别的那些。适合的漂白活 化剂是具有R-(C=O)-L的那些,其中R是烷基(优选是支链的),当该漂白活 化剂是疏水的时候,具有从6个至14个碳原子或从8个至12个碳原子,并且当 该漂白活化剂是亲水的时候,具有少于6个碳原子或少于4个碳原子;并且是L 离去基团。适合的离去基团的实例是苯甲酸及其衍生物-尤其是苯磺酸盐。适 合的漂白活化剂包括十二酰氧基苯磺酸盐、癸酰氧基苯磺酸盐、癸酰氧基苯 甲酸或其盐、3,5,5-三甲基己酰氧基苯磺酸盐、四乙酰基乙二胺(TAED)、4-[(3,5,5-三甲基己酰基)氧基]苯-1-磺酸钠(ISONOBS)、4-(十二酰基氧基)苯- 1-磺酸盐(LOBS)、4-(癸酰基氧基)苯-1-磺酸盐、4-(癸酰基氧基)苯甲酸盐 (DOBS或DOBA)、4-(壬酰基氧基)苯-1-磺酸盐(NOBS))、和/或披露于 WO 98/17767中的那些。漂白活化剂的家族披露于EP 624154中并且在那个家 族中特别优选的是乙酰柠檬酸三乙酯(ATC)。ATC或短链甘油三酸酯(像 三醋汀)具有以下优点,它是环境友好的。此外,乙酰柠檬酸三乙酯和三醋 汀在存储时在产品中具有良好的水解稳定性,并且是有效的漂白活化剂。最 后,ATC是多功能的,因为在过水解反应中释放的柠檬酸盐可以作为助洗剂 起作用。可替代地,漂白系统可以包括例如酰胺、酰

亚胺或砜型的过氧酸。漂白系统还可以包括过酸,例如6-(苯二甲酰亚氨基)过己酸(PAP)。适合的 漂白活化剂还披露于WO 98/17767中。尽管可以使用任何适合的漂白活化剂,但是在本发明的一个方面,主题清洁组合物可以包括NOBS、TAED或其混合 物。当存在时,基于织物及家居护理组合物,过酸和/或漂白活化剂通常以0.1 wt%至60wt%、0.5wt%至40wt%或0.6wt%至10wt%的量存在于组合物中。可 以将一种或多种疏水性过酸或其前体与一种或多种亲水性过酸或其前体组合 使用。优选地,此类漂白组分可以按0.01wt%至50wt%或0.1wt%至20wt%的 量存在于本发明的组合物中。

[0333] 可以对过氧化氢源和过酸或漂白活化剂的量进行选择,以使得可用氧 (来自过氧化物源)与过酸的摩尔比是从1:1至35:1,或甚至2:1至10:1。

[0334] (4)二酰基过氧化物-优选的二酰基过氧化物漂白种类包括选自具有以下 通式的二酰基过氧化物的那些:R^1-C(O)-OO-(O)C-R^2,其中R^1表示一个C_6-C_{18}烷基,优选地是包含具有至少5个碳原子的直链并且任选地包含一个或多个取 代基(例如-$N^+(CH_3)_3$、-COOH或-CN)和/或一个或多个在烷基的相邻碳原子 之间插入的中断部分(例如-CONH-或-CH=CH-)的C_6-C_{12}烷基基团,并且R^2表示一个与过氧化物部分可相容的脂肪族基团,以使得R^1和R^2一起包含总共8 个至30个碳原子。在一个优选方面,R^1和R^2是直链的未取代的C_6-C_{12}烷基链。最优选地,R^1和R^2是相同的。二酰基过氧化物(其中R^1和R^2均是C_6-C_{12}烷基基 团)是特别优选的。优选地,R基团(R_1或R_2)中的至少一个、最优选地仅有 一个在α位不包含分枝的或下垂的环,或优选在α位或β位都不包含分枝的或下 垂的环,或最优选在α位或β位或γ位都不包含分枝的或下垂的环。在一个进一 步优选的实施例中,DAP可以是不对称的,以使得优选地R1酰基基团的水解 是迅速的以产生过酸,但是R2酰基基团的水解是缓慢的。

[0335] 四酰基过氧化物漂白种类优选选自具有以下通式的四酰基过氧化物:R^3- C(O)-OO-C(O)-(CH_2)n-C(O)-OO-C(O)-R^3,其中R^3表示C_1-C_9烷基,或C_3-C_7基 团,并且n表示从2至12或4至10(包括端值)的整数。

[0336] 优选地,二酰基和/或四酰基过氧化物漂白种类以足够提供按重量计至少0.5ppm、至少10ppm、或至少50ppm的洗涤液的量存在。在一个优选实施例 中,这些漂白种类以足够提供按重量计从0.5ppm至300ppm、从30ppm至150 ppm的洗涤液的量存在。

[0337] 优选地,漂白组分包括一种漂白催化剂(5和6)。

[0338] (5)优选的是有机(非金属)漂白催化剂,包括能够接受来自过氧酸和/ 或其盐的氧原子并且将该氧原子转移至可氧化的底物的漂白催化剂。适合的 漂白催化剂包括但不限于:亚胺鎓(iminium)阳离子及聚离子;亚胺鎓兼性 离子;改性的胺;改性的氧化胺;N-磺酰基亚胺;N-膦酰基亚胺;N-酰基亚 胺;噻二唑二氧化物;全氟亚胺;环状糖酮及其混合物。

[0339] 适合的亚胺鎓阳离子及聚离子包括但不限于,N-甲基-3,4-二氢异喹啉鎓 四氟硼酸盐,如四面体(Tetrahedron)(1992),49(2),423-38所述的进行制备 (例如化合物4,第433页);N-甲基-3,4-二氢异喹啉鎓对-甲苯磺酸盐,如US 5360569所述的进行制备(例如第11栏,实例1);以及正辛基-3,4-二氢异喹 啉鎓对-甲苯磺酸盐,如US 5360568所述的进行制备(例如第10栏,实例 3)。

[0340] 适合的亚胺鎓兼性离子包括但不限于,N-(3-磺丙基)-3,4-二氢异喹啉鎓, 内盐,如US 5576282所述的进行制备(例如第31栏,实例II);N-[2-(磺氧基) 十二烷基]-3,4-二氢异喹啉鎓,内盐,如US 5817614所述的进行制备(例如第 32栏,实例V);2-[3-[(2-乙基己

基)氧基]-2-(磺氧基)丙基]-3,4-二氢异喹啉 鎓,内盐,如WO 05/047264所述的进行制备(例如第18页,实例8),以及2- [3-[(2-丁基辛基)氧基]-2-(磺氧基)丙基]-3,4-二氢异喹啉鎓,内盐。

[0341] 适合的改性胺氧传递催化剂包括但不限于可以根据四面体通讯 (Tetrahedron Letters)(1987),28(48),6061-6064中描述的程序制造的1,2,3,4- 四氢-2-甲基-1-异喹啉醇。适合的改性氧化胺氧传递催化剂包括但不限于1-羟 基-N-氧基-N-[2-(磺氧基)癸基]-1,2,3,4-四氢异喹啉钠。

[0342] 适合的N-磺酰基亚胺氧传递催化剂包括但不限于根据有机化学杂志 (Journal of Organic Chemistry)(1990),55(4),1254-61中描述的程序制备的3-甲基-1,2-苯并异噻唑1,1-二氧化物。

[0343] 适合的N-膦酰基亚胺氧传递催化剂包括但不限于可以根据化学学会杂 志,化学通讯(Journal of the Chemical Society,Chemical Communications) (1994),(22),2569-70中描述的程序制造的[R-(E)]-N-[(2-氯-5-硝基苯基)亚甲 基]-P-苯基-P-(2,4,6-三甲基苯基)-次膦酰胺。

[0344] 适合的N-酰基亚胺氧传递催化剂包括但不限于可以根据波兰化学杂志 (Polish Journal of Chemistry)(2003),77(5),577-590中描述的程序制造的 [N(E)]-N-(苯基亚甲基)乙酰胺。

[0345] 适合的噻二唑二氧化物氧传递催化剂包括但不限于可以根据US 5753599 (第9栏,实例2)中所述的程序制造的3-甲基-4-苯基-1,2,5-噻二唑1,1-二氧化 物。

[0346] 适合的全氟亚胺氧传递催化剂包括但不限于可以根据四面体通讯 (Tetrahedron Letters)(1994),35(34),6329-30中所述的程序制造的(Z)- 2,2,3,3,4,4,4-七氟-N-(九氟丁基)丁亚胺酰基氟化物。

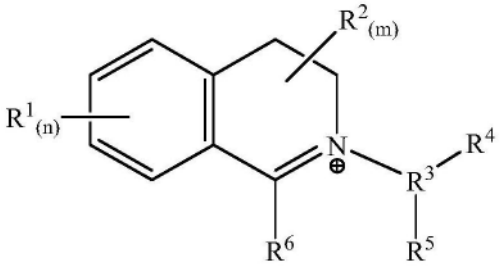
[0347] 适合的环状糖酮氧传递催化剂包括但不限于如在US 6649085(第12栏, 实例1)中制备的1,2:4,5-二-O-异亚丙基-D-赤-2,3-己二酮(hexodiuro)-2,6-吡喃 糖。

[0348] 优选地,漂白催化剂包括亚胺鎓和/或羰基官能团并且典型地在接受氧原 子时,尤其是在接受来自过氧酸和/或其盐的氧原子时能够形成过氧亚胺正离 子(oxaziridinium)和/或双环氧乙烷官能团。优选地,漂白催化剂包括过氧 亚胺正离子官能团和/或在接受氧原子时,尤其是在接受来自过氧酸和/或其盐 的氧原子时能够形成过氧亚胺正离子官能团。优选地,漂白催化剂包括一个 环状亚胺鎓官能团,优选其中该环状部分具有从五个至八个原子(包括氮原 子)、优选六个原子的环尺寸。优选地,漂白催化剂包括一个芳基亚胺鎓官 能团,优选二环芳基亚胺官能团,优选是3,4-二氢异喹啉鎓官能团。典型地, 亚胺官能团是一个季亚胺官能团并且典型地在接受氧原子时,尤其是在接受 来自过氧酸和/或其盐的氧原子时能够形成季过氧亚胺正离子官能团。在另一 方面,洗涤剂组合物包括一种具有不大于0、不大于-0.5、不大于-1.0、不大于 -1.5、不大于-2.0、不大于-2.5、不大于-3.0、或不大于-3.5的$\log P_{o/w}$的漂白组 分。下面更加详细地描述用于确定$\log P_{o/w}$的方法。

[0349] 典型地,漂白成分能够产生具有从0.01至0.30、从0.05至0.25或从0.10至 0.20的X_{SO}的漂白种类。下面更加详细地描述用于确定X_{SO}的方法。例如,具 有异喹啉鎓结构的漂白成分能够产生具有过氧亚胺正离子结构的漂白种类。在这一实例中,X_{SO}是过氧亚胺正离子

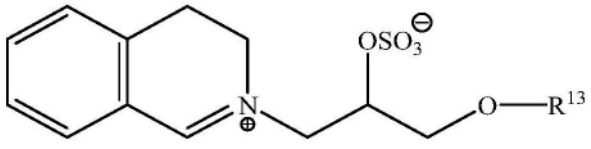
漂白种类的X_{SO}。

[0350] 优选地，漂白催化剂具有对应于以下化学式的化学结构：

[0351] 

[0352] 其中：n和m独立地是从0至4，优选n和m均是0；每个R^1独立地选自取代 的或未取代的选自下组的基团，该组由以下各项组成：氢、烷基、环烷基、 芳基、稠合芳基、杂环、稠合杂环、硝基、卤基、氰基、磺酸根、烷氧基、 酮基、羧基以及烷氧羰基；并且任何两个连位的R^1取代基可以合并以形成稠 合芳基、稠合碳环或稠合杂环；每个R^2独立地选自取代的或未取代的独立地 选自下组的基团，该组由以下各项组成：氢、羟基、烷基、环烷基、烷芳 基、芳基、芳烷基、亚烷基、杂环、烷氧基、芳基羰基、羧基烷基以及酰胺 基团；任何R^2可以与任何其他的R^2结合在一起以形成常见环的一部分；任何 偕R^2可以合并以形成一个羰基；并且任何两个R^2可以合并以形成一个取代的 或未取代的稠合的不饱和部分；R^3是C_1至C_{20}取代的或未取代的烷基；R^4是氢 或Q_t-A部分，其中：Q是分支或未分支的烯烃，t＝0或1，并且A是选自下组的 阴离子基团，该组由以下各项组成：OSO_3^-、SO_3^-、CO_2^-、OCO_2^-、OPO_3^{2-}、 OPO_3H^-和OPO_2^-；R^5是氢或$-CR^{11}R^{12}-Y-G_b-Y_c-[(CR^9R^{10})_y-O]_k-R^8$部分，其中： 每个Y独立地选自下组，该组由以下各项组成：O、S、N-H、或$N-R^8$；并且 每个R^8独立地选自下组，该组由以下各项组成：烷基、芳基和杂芳基，所述 部分是取代或未取代的，并且是取代还是未取代的所述部分具有小于21个碳；每个G独立地选自下组，该组由以下各项组成：CO、SO_2、SO、PO和 PO_2；R^9和R^{10}独立地选自下组，该组由以下各项组成：H和C_1-C_4烷基；R^{11}和 R^{12}独立地选自下组，该组由以下各项组成：H和烷基，或者当放一起时可以 结合形成羰基；b＝0或1；c可以＝0或1，但如果b＝0，c必须＝0；y是一个从 1至6的整数；k是一个从0至20的整数；R^6是H、或烷基、芳基或杂芳基部分； 所述部分是取代或未取代的；并且X，如果存在的话，是适合的电荷平衡反离 子，优选地当R^4是氢时X是存在的，适合的X包括但不限于：氯化物、溴化 物、硫酸盐、甲氧硫酸盐(methosulphate)、磺酸盐、对甲苯磺酸盐、硼四 氟化物以及磷酸盐。

[0353] 在本发明的一个实施例中，漂白催化剂具有对应于以下通式的结构：

[0354] 

[0355] 其中R^{13}是一个包含从三个至24个碳原子的支链烷基(包括分支的碳原 子)或一个包含从一个至24个碳原子的直链烷基；优选地，R^{13}是一个包含从 八个至18个碳原子的支链烷基或包含从八个至十八个碳原子的直链烷基；优 选地，R^{13}选自下组，该组由以下各项组成：2-丙基庚基、2-丁基辛基、2-戊 基壬基、2-己基癸基、正十二烷基、正十四烷基、正十六烷基、正十八烷 基、异壬基、异癸基、异十三烷基以及异十五烷基；优选地，R^{13}选自下组， 该组由以下各项组成：2-丁基辛基、2-戊基壬基、2-己基癸基、异十三烷基以 及异十五烷基。

[0356] 优选地，除了漂白催化剂、特别是有机漂白催化剂以外，漂白组分还包 括过酸源。

过酸源可以选自(a)预形成的过酸;(b)过碳酸盐、过硼酸盐或过 碳酸盐(过氧化氢源),优选与一种漂白活化剂组合;以及(c)过水解酶以及 酯,用于在纺织品或硬表面处理步骤中在水的存在下原位形成过酸。

[0357] 当存在时,基于该组合物,过酸和/或漂白活化剂通常以从0.1wt%至60 wt%、从0.5wt%至40wt%或从0.6wt%至10wt%的量存在于组合物中。可以将 一种或多种疏水性过酸或其前体与一种或多种亲水性过酸或其前体组合使 用。

[0358] 可以对过氧化氢源和过酸或漂白活化剂的量进行选择,以使得可用氧 (来自过氧化物源)与过酸的摩尔比是从1:1至35:1,或2:1至10:1。

[0359] (6)包含金属的漂白催化剂-可以由催化金属络合物提供漂白组分。一种 类型的包含金属的漂白催化剂是以下催化系统,该催化系统包括一种具有限 定的漂白催化活性的过渡金属阳离子(例如铜、铁、钛、钌、钨、钼或锰阳 离子),一种具有很少或不具有漂白催化活性的辅助金属阳离子(例如锌或 铝阳离子),以及一种对于催化性和辅助性金属阳离子具有限定的稳定性常 数的隔离物,特别是乙二胺四乙酸、乙二胺四(亚甲基膦酸)及其水溶性盐。此 类催化剂披露于US 4430243中。优选的催化剂描述于WO 09/839406、US 6218351和WO 00/012667中。特别优选的是过渡金属催化剂或因此作为跨桥 (cross-bridged)多齿N-供体配体的配体。

[0360] 如果希望的话,可以借助一种锰化合物催化在此的组合物。此类化合物 以及使用水平在本领域中是熟知的并且包括例如披露于US 5576282中的基于 锰的催化剂。

[0361] 在此有用的钴漂白催化剂是已知的并且例如描述于US 5597936;US 5595967中。通过已知的程序可容易地制备此类钴催化剂,例如像US 5597936 和US 5595967中传授的程序。

[0362] 在此的组合物还可以适合地包括配体的过渡金属络合物,例如双哌啶酮(bispidone)(US 7501389)和/或大多环刚性配体-缩写为“MRL”。作为一 个实际问题而并不作为限制之用,可以调整在此的组合物和方法,以在水性 洗涤介质中提供大约至少一亿分之一的活性MRL种类,并且将典型地在洗涤 液中提供从0.005ppm至25ppm、从0.05ppm至10ppm、或从0.1ppm至5ppm 的MRL。

[0363] 即成的过渡金属漂白催化剂中的适合的过渡金属包括例如锰、铁和铬。 适合的MRL包括5,12-二乙基-1,5,8,12-四氮杂二环[6.6.2]十六烷。通过已知的 程序可容易地制备适合的过渡金属MRL,例如像US 6225464和WO 00/32601 中传授的程序。

[0364] (7)光漂白剂-适合的光漂白剂包括例如磺化的酞菁锌、磺化的酞菁铝、咕吨染料及其混合物。用于在本发明的这些组合物中使用的优选漂白组分包 括过氧化氢源、漂白活化剂和/或有机过氧酸,任选地通过过氧化氢源和漂白 活化剂与一种漂白催化剂相组合的反应而原位产生。优选的漂白组分包括漂 白催化剂,优选以上所述的有机漂白催化剂。

[0365] 特别优选的漂白组分是漂白催化剂,特别是有机漂白催化剂。

[0366] 示例性漂白系统还描述于例如WO 2007/087258、WO 2007/087244、WO 2007/087259以及WO 2007/087242中。

[0367] 织物调色剂-该组合物可以包括织物调色剂。适合的织物调色剂包括染 料、染料-粘土轭合物、以及颜料。适合的染料包括小分子染料和聚合物染 料。适合的小分子染料包括选自下组的小分子染料,该组由以下各项组成:属于以下比色指数(C.I.)分类的染料:

直接蓝、直接红、直接紫、酸性蓝、 酸性红、酸性紫、碱性蓝、碱性紫和碱性红或其混合物。

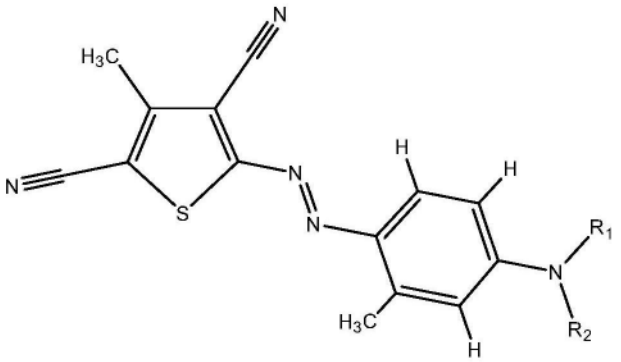
[0368] 在另一方面，适合的小分子染料包括选自下组的小分子染料，该组由以 下各项组成：比色指数(染工和着色师学会(Society of Dyers and Colorists)，布拉德福德，英国)编号直接紫9、直接紫35、直接紫48、直接 紫51、直接紫66、直接紫99、直接蓝1、直接蓝71、直接蓝80、直接蓝279、 酸性红17、酸性红73、酸性红88、酸性红150、酸性紫15、酸性紫17、酸性紫 24、酸性紫43、酸性红52、酸性紫49、酸性紫50、酸性蓝15、酸性蓝17、酸 性蓝25、酸性蓝29、酸性蓝40、酸性蓝45、酸性蓝75、酸性蓝80、酸性蓝 83、酸性蓝90和酸性蓝113、酸性黑1、碱性紫1、碱性紫3、碱性紫4、碱性紫 10、碱性紫35、碱性蓝3、碱性蓝16、碱性蓝22、碱性蓝47、碱性蓝66、碱性 蓝75、碱性蓝159及其混合物。在另一方面，适合的小分子染料包括选自下组 的小分子染料，该组由以下各项组成：比色指数(染工和着色师学会，布拉 德福德，英国)编号酸性紫17、酸性紫43、酸性红52、酸性红73、酸性红 88、酸性红150、酸性蓝25、酸性蓝29、酸性蓝45、酸性蓝113、酸性黑1、直 接蓝1、直接蓝71、直接紫51及其混合物。在另一方面，适合的小分子染料包 括选自下组的小分子染料，该组由以下各项组成：比色指数(染工和着色师 学会，布拉德福德，英国)编号酸性紫17、直接蓝71、直接紫51、直接蓝1、 酸性红88、酸性红150、酸性蓝29、酸性蓝113或其混合物。

[0369] 适合的聚合物染料包括选自下组的聚合物染料，该组由以下各项组成： 包含轭合色原体的聚合物(染料-聚合物轭合物)以及与色原体共聚合进聚合 物主链中的聚合物，及其混合物。

[0370] 在另一方面，适合的聚合物染料包括选自下组的聚合物染料，该组由以 下各项组成：在Liquitint®(美利肯(Milliken))名称之下的织物实质性着色 剂，从至少一种反应性染料和选自下组的聚合物形成的染料-聚合物轭合物， 该组由以下各项组成：包含选自由羟基部分、一级胺部分、二级胺部分、硫 醇部分及其混合物组成的组的部分的聚合物。在再另一方面，适合的聚合物 染料包括选自下组的聚合物染料，该组由以下各项组成：Liquitint®紫色CT， 与活性蓝、活性紫或活性红染料轭合的羧甲基纤维素(CMC)，如与C.I.反应 性蓝19(由麦格酶(Megazyme)，威克洛，爱尔兰，以产品名AZO-C- CELLULOSE，产品代码S-ACMC下售卖)轭合的CMC、烷氧基化的三苯基- 甲烷聚合物着色剂，烷氧基化的噻吩聚合物着色剂、及其混合物。

[0371] 优选的调色染料包括发现于WO 08/87497中的增白剂。这些增白剂可以 由以下结构(I)表征：

[0372]



(I)

[0373] 其中R_1和R_2可以独立地选自：

[0374] a)$[(CH_2CR'HO)_x(CH_2CR''HO)_yH]$

[0375] 其中R'选自下组，该组由以下各项组成：H、CH_3、$CH_2O(CH_2CH_2O)_zH$、及其混合物；其中R"选自下组，该组由以下各项组成：H、$CH_2O(CH_2CH_2O)_zH$、及其混合物；其中$x+y\leq5$；其中$y\geq1$；并且其中z =0至5；

[0376] b)R_1=烷基、芳基或芳基烷基，并且R_2= $[(CH_2CR'HO)_x(CH_2CR''HO)_yH]$

[0377] 其中R'选自下组，该组由以下各项组成：H、CH_3、$CH_2O(CH_2CH_2O)_zH$、及其混合物；其中R"选自下组，该组由以下各项组成：H、$CH_2O(CH_2CH_2O)_zH$、及其混合物；其中$x+y\leq10$；其中$y\geq1$；并且其中z =0至5；

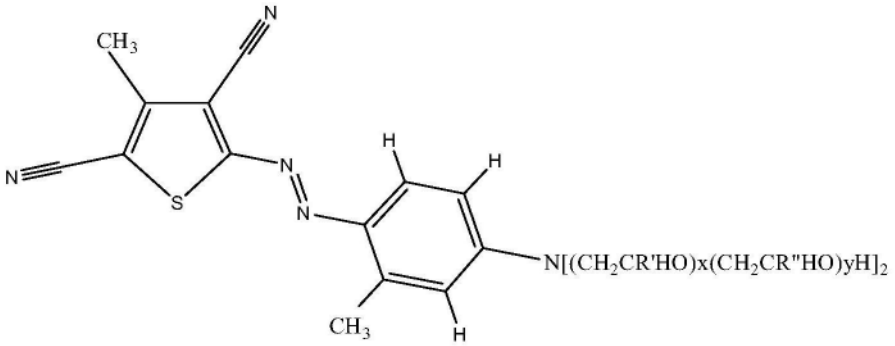
[0378] c)$R_1=[CH_2CH_2(OR_3)CH_2OR_4]$并且$R_2=[CH_2CH_2(OR_3)CH_2OR_4]$

[0379] 其中R_3选自下组，该组由以下各项组成：H、$(CH_2CH_2O)_zH$、及其混合 物；并且其中z =0至10；

[0380] 其中R_4选自下组，该组由以下各项组成：(C_1-C_{16})烷基、芳基、及其混合 物；并且

[0381] d)其中R1和R2可以独立地选自氧化苯乙烯、缩水甘油甲醚、异丁基 缩水甘油醚、异丙基缩水甘油醚、叔丁基缩水甘油醚、2-乙基己基缩水甘油 醚、以及缩水甘油十六烷基醚的氨基加成产物，随后为从1至10个环氧烷单位 的加成。

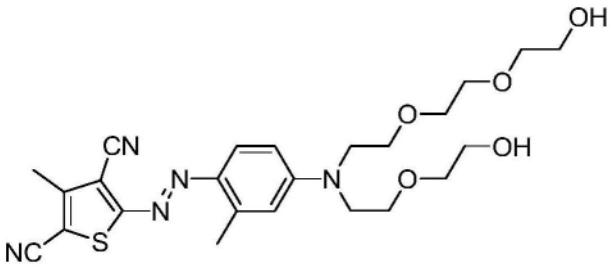
[0382] 本发明的优选增白剂可以由以下结构(II)表征：

[0383] 

(II)

[0384] 其中R'选自下组，该组由以下各项组成：H、CH_3、$CH_2O(CH_2CH_2O)_zH$、及其混合物；其中R"选自下组，该组由以下各项组成：H、$CH_2O(CH_2CH_2O)_zH$、及其混合物；其中$x+y\leq5$；其中$y\geq1$；并且其中z =0至5。

[0385] 本发明的另外优选的增白剂可以由以下结构(III)表征：

[0386] 

(III)

[0387] 典型地包括具有一共5个EO基团的混合物。适合的优选分子是处于结构I 的具有以下上文中“部分a”中的下垂基团的那些。

[0388] 表1

[0389]

	R1				R2			
	R’	R”	X	y	R’	R”	x	y
A	H	H	3	1	H	H	0	1
B	H	H	2	1	H	H	1	1
c＝b	H	H	1	1	H	H	2	1
d＝a	H	H	0	1	H	H	3	1

另外的使用的增白剂包括描述于US 2008/34511(联合利华 (Unilever))中的那些。优选的试剂是“紫色13”。

[0390] 适合的染料粘土轭合物包括选自下组的染料粘土轭合物,该组包括至少 一种阳离子/碱性染料和绿土、及其混合物。在另一方面,适合的染料粘土轭 合物包括选自下组的染料粘土轭合物,该组由一种阳离子/碱性染料和一种粘 土组成,该阳离子/碱性染料选自下组,该组由以下各项组成:C.I.碱性黄1至 108、C.I.碱性橙1至69、C.I.碱性红1至118、C.I.碱性紫1至51、C.I.碱性蓝1至 164、C.I.碱性绿1至14、C.I.碱性棕色1至23、CI碱性黑1至11,并且该粘土选 自下组,该组由以下各项组成:蒙脱石粘土、水辉石粘土、皂石粘土及其混 合物。在再另一方面,适合的染料粘土轭合物包括选自下组的染料粘土轭合 物,该组由以下各项组成:蒙脱石碱性蓝B7 C.I.42595轭合物、蒙脱石碱性蓝 B9 C.I.52015轭合物、蒙脱石碱性紫V3 C.I.42555轭合物、蒙脱石碱性绿G1 C.I.42040轭合物、蒙脱石碱性红R1 C.I.45160轭合物、蒙脱石C.I.碱性黑2轭 合物、水辉石碱性蓝B7 C.I.42595轭合物、水辉石碱性蓝B9 C.I.52015轭合 物、水辉石碱性紫V3 C.I.42555轭合物、水辉石碱性绿G1 C.I.42040轭合物、 水辉石碱性红R1 C.I.45160轭合物、水辉石C.I.碱性黑2轭合物、皂石碱性蓝 B7 C.I.42595轭合物、皂石碱性蓝B9 C.I.52015轭合物、皂石碱性紫V3 C.I.42555轭合物、皂石碱性绿G1 C.I.42040轭合物、皂石碱性红R1 C.I.45160轭 合物、皂石C.I.碱性黑2轭合物及其混合物。

[0391] 适合的颜料包括选自下组的颜料,该组由以下各项组成:黄士酮、阴丹 酮、包含1至4个氯原子的含氯阴丹酮、皮蒽酮、二氯皮蒽酮、单溴二氯皮蒽 酮、二溴二氯皮蒽酮、四溴皮蒽酮、二萘嵌苯-3,4,9,10-四羧酸二酰亚胺(其 中该酰亚胺基团可以是未取代的或被C1-C3-烷基或苯基或杂环基团取代的，并且其中该苯基和杂环基团可以另外地带有不赋予在水中的溶解性的取代 基)、蒽素嘧啶羧酸酰胺、蒽酮紫、异蒽酮紫、二噁嗪颜料、每个分子可以 包含高达2个氯原子的酞菁铜、多氯-酞菁铜或每个分子包含高达14个溴原子 的多溴氯-酞菁铜,及其混合物。

[0392] 在另一方面,适合的颜料包括选自下组的颜料,该组由以下各项组成：群青(C.I.颜料蓝29)、群青紫(C.I.颜料紫15)及其混合物。

[0393] 上述织物调色剂可以组合使用(可以使用织物调色剂的任何混合物)。适合的调色剂更详细地描述于US 7208459中。染料在本发明的组合物中的优 选水平是0.00001wt％至0.5wt％、或0.0001wt％至0.25wt％。优选在水中用于 处理和/或清洁步骤的染料的浓度是从1ppb至5ppm、10ppb至5ppm或20ppb 至5ppm。在优选的组合物中,表面活性剂的浓度将是从0.2至3g/l。

[0394] 胶囊化物-该组合物可以包含一种胶囊化物。在一方面,胶囊化物包括一 个核心,

具有内表面和外表面的包壳,所述包壳胶囊化所述核心。

[0395] 在所述胶囊化物的一个方面,所述核心可以包括一种选自下组的材料,该组由以下各项组成:香料;增亮剂;染料;驱虫剂;硅酮;蜡;调味剂;维生素;织物软化剂;护肤剂,在一个方面是石蜡;酶;抗菌剂;漂白剂;感受剂(sensate);及其混合物;并且所述包壳可以包括一种选自下组的材料,该组由以下各项组成:聚乙烯;聚酰胺;聚乙烯醇,可任选地包含其他共聚单体;聚苯乙烯;聚异戊二烯;聚碳酸酯;聚酯;聚丙烯酸酯;氨基塑料,在一方面,所述氨基塑料可以包括聚脲、聚氨酯和/或聚脲聚氨酯(polyureaurethane),在一方面,所述聚脲可以包括聚氧基亚甲基脲和/或三聚氰胺甲醛;聚烯烃;多糖,在一方面,所述多糖可以包括海藻酸盐和/或壳聚糖;明胶;虫胶;环氧树脂;乙烯基聚合物水不溶性无机物;硅酮;及其混合物。

[0396] 在所述胶囊化物的一个方面,所述核心可以包括香料。

[0397] 在所述胶囊化物的一个方面,所述包壳可以包括三聚氰胺甲醛和/或交联的三聚氰胺甲醛。

[0398] 在一方面,披露了适合的胶囊化物可以包括核心材料和包壳,所述包壳至少部分地包围所述核心材料。所述胶囊化物的至少75%、85%或90%可以具有从0.2MPa至10MPa、从0.4MPa至5MPa、从0.6MPa至3.5MPa、或从0.7 MPa至3MPa的抗断强度;并且具有从0至30%、从0至20%、或从0至5%的有益试剂泄露。

[0399] 在一方面,所述胶囊化物的至少75%、85%或90%可以具有从1至80微米、从5至60微米、从10至50微米、或从15至40微米的粒度。

[0400] 在一方面,所述胶囊化物的至少75%、85%或90%可以具有从30至250 nm、从80至180nm、或从100至160nm的颗粒壁厚。

[0401] 在一方面,所述胶囊化物的核心材料可以包括选自下组的一种材料,该组由以下各项组成:一种香料原料和/或任选地选自下组的一种材料,该组由以下各项组成:植物油,包括未搀水的和/或共混的植物油(包括蓖麻油、椰子油、棉籽油、葡萄油、油菜籽、大豆油、玉米油、棕榈油、亚麻籽油、红花油、橄榄油、花生油、椰子油、棕榈仁油、蓖麻油、柠檬油及其混合物);植物油酯、酯,包括己二酸二丁酯、邻苯二甲酸二丁酯、己二酸苄丁酯、己二酸苄辛酯、磷酸三甲苯酯、磷酸三辛酯及其混合物;直链或支链烃,包括那些沸点高于约80℃的直链或支链烃;部分氢化的三联苯、邻苯二甲酸二烷基酯、烷基联苯,包括单异丙基联苯、烷化萘(包括二丙基萘)、汽油(包括煤油)、矿物油及其混合物;芳香族溶剂,包括苯、甲苯及其混合物;硅油;及其混合物。

[0402] 在一方面,所述胶囊化物的壁材料可以包括适合的树脂,该树脂包括醛和胺的反应产物,适合的醛包括甲醛。适合的胺包括三聚氰胺、脲、苯并胍胺、甘脲、及其混合物。适合的三聚氰胺包括羟甲基三聚氰胺、甲基化的羟甲基三聚氰胺、亚氨基三聚氰胺及其混合物。适合的脲包括二羟甲基脲、甲基化的二羟甲基脲、脲-间苯二酚、及其混合物。

[0403] 在一方面,在将胶囊化物添加至一种组合物之前、期间或之后,适合的甲醛清除剂可以与例如处于胶囊浆料中的胶囊化物一起使用和/或添加至这种组合物中。适合的胶囊可以是通过US 2008/0305982;和/或US 2009/0247449 的以下传授来制成。

[0404] 在一个优选方面,该组合物还可以包括一种沉积酸,优选由下组组成,该组包括阳离子或非离子聚合物。适合的聚合物包括阳离子淀粉、阳离子羟基乙基纤维素、聚乙烯

甲醛、槐树豆胶、甘露聚糖、木葡聚糖、罗望子胶、聚乙烯对苯二酸盐，以及包含二甲基氨乙基甲基丙烯酸酯的且任选具有一种 或多种选自下组的单体的聚合物，该组包括丙烯酸和丙烯酰胺。

[0405] 香料-在一方面，该组合物包括含有选自下组的一种或多种香料原料的香 料，该组由以下各项组成:1,1'-氧基双-2-丙醇;1,4-环己烷二羧酸，二乙基 酯;(乙氧基甲氧基)环十二烷;1,3-壬二醇，单乙酸酯;(3-甲基丁氧基)乙酸， 2-丙烯基酯;β-甲基环十二烷乙醇;2-甲基-3-[(1,7,7-三甲基二环[2.2.1]庚-2-基) 氧基]-1-丙醇;氧杂环十六-2-酮;α-甲基-苯甲醇乙酸盐;反式-3-乙氧基-1,1,5- 三甲基环己烷;4-(1,1-二甲基乙基)环己醇乙酸酯;十二氢-3a,6,6,9a-四甲基萘 并[2,1-b]呋喃;β-甲基苯丙醛;β-甲基-3-(1-甲基乙基)苯丙醛;4-苯基-2-丁 酮;2-甲基丁酸，乙基酯;苯甲醛;2-甲基丁酸，1-甲基乙基酯;二氢-5-戊基 -2(3H)呋喃酮;(2E)-1-(2,6,6-三甲基-2-环己烯-1-基)-2-丁烯-1-酮;十二醛;十 一醛;2-乙基-α,α-二甲基苯丙醛;癸醛;α,α-二甲基苯乙醇乙酸酯;2-(苯基亚 甲基)辛醛;2-[[3-[4-(1,1-二甲基乙基)苯基]-2-甲基亚丙基]氨基]苯甲酸，甲基 酯;1-(2,6,6-三甲基-3-环己烯-1-基)-2-丁烯-1-酮;2-戊基环戊酮;3-氧代-2-戊 基环戊烷乙酸，甲基酯;4-羟基-3-甲氧基苯甲醛;3-乙氧基-4-羟基苯甲醛; 2-庚基环戊酮;1-(4-甲基苯基)乙酮;(3E)-4-(2,6,6-三甲基-1-环己烯-1-基)-3-丁 烯-2-酮;(3E)-4-(2,6,6-三甲基-2-环己烯-1-基)-3-丁烯-2-酮;苯乙醇;2H-1-苯 并吡喃-2-酮;4-甲氧基苯甲醛;10-十一烯醛;丙酸，苯基甲基酯;β-甲基苯 戊醇;1,1-二乙氧基-3,7-二甲基-2,6-辛二烯;α,α-二甲基苯乙醇;(2E)-1-(2,6,6- 三甲基-1-环己烯-1-基)-2-丁烯-1-酮;乙酸，苯基甲基酯;环己烷丙酸，2-丙 烯基酯;己酸，2-丙烯基酯;1,2-二甲氧基-4-(2-丙烯基)苯;1,5-二甲基-二环 [3.2.1]辛-8-酮肟;4-(4-羟基-4-甲基戊烷基)-3-环己烯-1-甲醛;3-丁烯-2-醇;2- [[[2,4(或3,5)-二甲基-3-环己烯基-1-基]亚甲基]氨基]苯甲酸，甲基酯;8-环十六-1-酮;甲基紫罗酮;2,6-二甲基-7-辛烯-2-醇;2-甲氧基-4-(2-丙烯基)苯酚; (2E)-3,7-二甲基-2,6-辛二烯-1-醇;2-羟基-苯甲酸，(3Z)-3-己烯基酯;2-十三烯 腈;4-(2,2-二甲基-6-亚甲基环己基)-3-甲基-3-丁烯-2-酮;四氢-4-甲基-2-(2-甲 基-1-丙烯基)-2H-吡喃;乙酸，(2-甲基丁氧基)-，2-丙烯基酯;苯甲酸，2-羟 基-，3-甲基丁基酯;2-丁烯-1-酮，1-(2,6,6-三甲基-1-环己烯-1-基)-，(Z)-;环 戊烷羧酸，2-己基-3-氧代-，甲基酯;苯丙醛，4-乙基-α,α-二甲基-;3-环己烯- 1-甲醛，3-(4-羟基-4-甲基戊基)-;乙酮，1-(2,3,4,7,8,8a-六氢-3,6,8,8-四甲基- 1H-3a,7-甲醇甘菊蓝-5-基)-，[3R-(3.α.,3a.β.,7.β.,8a.α.)]-;十一醛，2-甲基-2H- 吡喃-2-酮，6-丁基四氢-;苯丙醛、4-(1,1-二甲基乙基)-.α.-甲基-;2(3H)-呋喃 酮、5-庚基二氢-;苯甲酸，2-[(7-羟基-3,7-二甲基亚辛基)氨基]-、甲基;苯甲 酸，2-羟基-，苯基甲基酯;萘，2-甲氧基-;2-环戊烯-1-酮，2-己基-;2(3H)- 呋喃酮、5-己基二氢-;氧杂环丙烷羧酸，3-甲基-3-苯基-，乙基酯;2-氧杂二 环[2.2.2]辛烷，1,3,3-三甲基-;苯戊醇，.γ.-甲基-;3-辛醇，3,7-二甲基-;3,7- 二甲基-2,6-辛二烯腈;3,7-二甲基-6-辛烯-1-醇;萜品醇乙酸酯;2-甲基-6-亚 甲基-7-辛烯-2-醇，二氢衍生物;3a,4,5,6,7,7a-六氢-4,7-甲醇-1H-茚-6-酚丙酸 酯;3-甲基-2-丁烯-1-醇乙酸酯;(Z)-3-己烯-1-醇乙酸酯;2-乙基-4-(2,2,3-三甲 基-3-环戊烯-1-基)-2-丁烯-1-醇;4-(八氢-4,7-甲醇-5H-亚茚-5-基)-丁醛;3-2,4- 二甲基-环己烯-1-甲醛;1-(1,2,3,4,5,6,7,8-八氢-2,3,8,8-四甲基-2-萘基)-乙酮; 2-羟基-苯甲酸，甲基酯;2-羟基-苯甲酸，己基酯;2-苯氧

基-乙醇;2-羟基-苯 甲酸,戊基酯;2,3-庚烷二酮;2-己烯-1-醇;6-辛烯-2-醇、2,6-二甲基-;突厥 酮(α,β,γ或δ或其混合物),4,7-甲醇-1H-茚-6-酚,3a,4,5,6,7,7a-六氢-,乙酸酯;9-十一烯醛;8-十一烯醛;异环柠檬醛;乙酮,1-(1,2,3,5,6,7,8,8a-八氢- 2,3,8,8-四甲基-2-萘基)-;3-环己烯-1-甲醛,3,5-二甲基-;3-环己烯-1-甲醛, 2,4-二甲基-;1,6-辛二烯-3-醇,3,7-二甲基-;1,6-辛二烯-3-醇,3,7-二甲基-, 乙酸酯;铃兰醛(p-t-Bucinal),以及环戊酮、2-[2-(4-甲基-3-环己烯-1-基)丙 基]-以及1-甲基-4-(1-甲基乙烯基)环己烯及其混合物。

[0406] 在一方面,该组合物可以包括胶囊化的香料颗粒,该颗粒包含水溶性羟 基化合物或三聚氰胺-甲醛或改性的聚乙烯醇。在一方面,胶囊化物包括(a) 至少部分水溶的固体基质,包含一种或多种水溶性羟基化合物,优选淀粉; 以及(b)由该固体基质包封的香料油。

[0407] 在另一方面,该香料可以是与多胺(优选聚乙烯亚胺)预复合的,以形 成席夫碱(Schiff base)。

[0408] 聚合物-该组合物可以包括一种或多种聚合物。实例为羧甲基纤维素、聚 (乙烯基-吡咯烷酮)、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、以及甲 基丙烯酸月桂酯/丙烯酸共聚物。

[0409] 该组合物可以包括一种或多种两亲清洁聚合物,例如具有以下一般结构 的化合物:双((C2H5O)(C2H4O)n)(CH3)-N+-CxH2x-N+-(CH3)-双 ((C2H5O)(C2H4O)n),其中n=从20至30,并且x=从3至8,或其硫酸化的或磺 化的变体。

[0410] 该组合物可以包括两亲烷氧基化油脂清洁聚合物,这些聚合物具有平衡 的亲水和疏水特性,使得它们从织物和表面去除油脂颗粒。本发明的两亲烷 氧基化油脂清洁聚合物的具体实施例包括一个核心结构和与那个核心结构连 接的多个烷氧基化基团。这些可以包括烷氧基化的聚烯属烃亚胺 (polyalkylenimine),优选具有内聚环氧乙烷嵌段和外聚环氧丙烷嵌段。

[0411] 在此,烷氧基化的聚羧酸酯(例如从聚丙烯酸酯制备的那些)可用于提 供另外的油脂去除性能。此类材料描述于WO 91/08281和PCT 90/01815中。化 学上地,这些材料包括聚丙烯酸酯,每7-8个丙烯酸脂单位具有一个乙氧基侧 链。侧链具有化学式-(CH2CH2O)m(CH2)nCH3,其中m是2-3并且n是6-12。侧链 是酯连接至聚丙烯酸酯"主链",以提供"梳子状"聚合物类型结构。分子 量可以不同,但典型地处于2000至50,000的范围内。此类烷氧基化的聚羧酸酯 可以包括在此的组合物的从0.05wt%至10wt%。

[0412] 本发明的类异戊二烯衍生的表面活性剂,以及与其他辅助表面活性剂和 其他佐剂成分一起形成的混合物特别适合与两亲接枝共聚物使用,优选地该 两亲接枝共聚物包括(i)聚乙二醇主链;以及(ii)和至少一种下垂物部分,选 自聚乙酸乙烯酯、聚乙烯醇及其混合物。优选的两亲接枝共聚物是由巴斯夫 (BASF)供应的Sokalan HP22。适合的聚合物包括随机接枝共聚物,优选聚 乙酸乙烯酯接枝的聚环氧乙烷共聚物,具有聚环氧乙烷主链和多重聚乙酸乙 烯酯侧链。聚环氧乙烷主链的分子量优选是6000,并且聚环氧乙烷与聚乙酸乙烯酯的重量比是40比60,并且每50个环氧乙烷单位有不多于1个接枝点。

[0413] 羧酸酯聚合物-本发明的组合物还包括一种或多种羧酸酯聚合物,例如马 来酸酯/丙烯酸酯随机共聚物或聚丙烯酸酯均聚物。在一方面,该羧酸酯聚合 物是一种具有从4,000Da至9,000Da或从6,000Da至9,000Da的分子量的聚丙烯 酸酯均聚物。

[0414] 污物释放聚合物-本发明的组合物还可以包括一种或多种污物释放聚合 物,这些聚合物具有如由以下结构(I)、(II)或(III)之一所定义的结构:

[0415] (I)-[(OCHR^1-CHR^2)$_a$-O-OC-Ar-CO-]$_d$

[0416] (II)-[(OCHR^3-CHR^4)$_b$-O-OC-sAr-CO-]$_e$

[0417] (III)-[(OCHR^5-CHR^6)$_c$-OR^7]$_f$

[0418] 其中:

[0419] a、b和c是从1至200;

[0420] d、e和f是从1至50;

[0421] Ar是1,4-取代的亚苯基;

[0422] sAr是1,3-取代的亚苯基,该亚苯基在5位上被SO$_3$Me取代;

[0423] Me是Li,K,Mg/2,Ca/2,Al/3,铵,单-、二-、三-、或四烷基铵,其 中烷基是C$_1$-C$_{18}$烷基或C$_2$-C$_{10}$羟基烷基,或其混合物;

[0424] R^1、R^2、R^3、R^4、R^{5}和R^{6}独立地选自H或C$_1$-C$_{18}$正-或异-烷基;并且

[0425] R^{7}是直链或支链的C$_1$-C$_{18}$烷基,或直链或支链的C$_2$-C$_{30}$烯基,或具有5至9 个碳原子的环烷基,或C$_8$-C$_{30}$芳基,或C$_6$-C$_{30}$芳基烷基。

[0426] 适合的去污聚合物是聚酯去污聚合物,例如Repel-o-tex聚合物,包括 Repel-o-tex、SF-2和SRP6,由罗地亚(Rhodia)供应。其他适合的去污聚合 物包括Texcare聚合物,包括Texcare SRA100、SRA300、SRN100、SRN170、 SRN240、SRN300和SRN325,由科莱恩(Clariant)供应。其他适合的去污聚 合物是Marloquest聚合物,例如Marloquest SL,由萨索尔(Sasol)供应。

[0427] 纤维素聚合物-本发明的组合物还包括一种或多种纤维素聚合物,包括选 自烷基纤维素、烷基烷氧基烷基纤维素、羧基烷基纤维素、烷基羧基烷基纤 维素的那些。在一方面,纤维素聚合物选自下组,该组包括羧甲基纤维素、 甲基纤维素、甲基羟基乙基纤维素、甲基羧甲基纤维素、及其混合物。在一 方面,羧甲基纤维素具有从0.5至0.9的羧甲基取代度以及从100,000Da至 300,000Da的分子量。

[0428] 酶-该组合物可以包括提供清洁性能和/或织物护理益处的一种或多种 酶。适合的酶的实例包括但不限于半纤维素酶、过氧化物酶、蛋白酶、纤维 素酶、木聚糖酶、脂肪酶、磷脂酶、酯酶、角质酶、果胶酶、甘露聚糖酶、 果胶裂解酶、角蛋白酶、还原酶、氧化酶、酚氧化酶、脂加氧酶、木质素 酶、支链淀粉酶、鞣酸酶、聚戊糖酶、马拉纳酶(malanase)、β-葡聚糖酶、 阿拉伯糖苷酶、透明质酸酶、软骨素酶、漆酶、叶绿素酶、淀粉酶、或其混 合物。典型的组合是酶混合物,可以包含例如蛋白酶和脂肪酶连同淀粉酶。 当存在于组合物中时,前述另外的酶可以按组合物的重量计以从0.00001wt% 至2wt%、从0.0001wt%至1wt%或从0.001wt%至0.5wt%酶蛋白的水平存在。

[0429] 一般而言,一种或多种所选酶的性质应与选定的洗涤剂相容(即,最适 pH,与其他酶和非酶成分的相容性,等等),并且该一种或多种酶应以有效 量存在。

[0430] 在一方面,优选的酶将包括一种纤维素酶。适合的纤维素酶包括细菌或 真菌来源的那些。包括化学修饰的或蛋白质工程化的突变体。适合的纤维素 酶包括来自以下属的纤维素酶:芽孢杆菌属、假单胞菌属、腐质霉属、镰孢 菌属、梭孢壳属、枝顶孢霉属,例如US 4435307、US 5648263、US 5691178、US 5776757以及WO 89/09259中披露的由特异腐质霉、

嗜热毁丝霉 以及尖孢镰孢菌产生的真菌纤维素酶。

[0431] 特别适合的纤维素酶是具有颜色护理益处的碱性或中性纤维素酶。这样 的纤维素酶的实例是EP 0495257、EP 0531372、WO 96/11262、WO 96/29397、WO 98/08940中所述的纤维素酶。其他实例是纤维素酶变体，如 WO 94/07998、EP 0531315、US 5457046、US 5686593、US 5763254、WO 95/24471、WO 98/12307以及PCT/DK 98/00299中所述的那些。

[0432] 可商购的纤维素酶包括Celluzyme™、和Carezyme™(诺维信公司 (Novozymes A/S))、Clazinase™、和Puradax HA™(杰能科国际有限公司 (Genencor International Inc.))、以及KAC-500(B)™(花王株式会社(Kao Corporation))。

[0433] 在一方面，优选的酶将包括一种蛋白酶。适合的蛋白酶包括细菌、真 菌、植物、病毒或动物起源的那些，例如植物或微生物起源。优选微生物来 源。包括化学修饰的或蛋白质工程化的突变体。它可以是一种碱性蛋白酶， 例如丝氨酸蛋白酶或金属蛋白酶。丝氨酸蛋白酶可以例如是S1家族(如胰蛋 白酶)或S8家族(如枯草杆菌蛋白酶)。金属蛋白酶可以例如是来自例如家 族M4的嗜热菌蛋白酶或其他金属蛋白酶，例如来自M5、M7或M8家族的那些。

[0434] 术语“枯草杆菌酶”是指根据斯艾森(Siezen)等人，蛋白质工程学 (Protein Engng.)4(1991)719-737和斯艾森等人，蛋白质科学(Protein Science)6(1997)501-523的丝氨酸蛋白酶亚组。丝氨酸蛋白酶是特征为在活 性位点具有与底物形成共价加合物的丝氨酸的蛋白酶的一个亚类。枯草杆菌 酶可以划分为6个亚部，即，枯草杆菌蛋白酶家族、嗜热蛋白酶 (Thermitase)家族、蛋白酶K家族、羊毛硫抗生素肽酶家族、Kexin家族和Pyrolysin家族。

[0435] 枯草杆菌酶的实例是来源于芽孢杆菌属的那些，例如描述于US 7262042 和WO 09/021867中的迟缓芽孢杆菌、嗜碱芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、解淀粉 芽孢杆菌、短小芽孢杆菌和吉氏芽孢杆菌；和描述于WO 89/06279中的枯草杆 菌蛋白酶迟缓(lentus)、枯草杆菌蛋白酶诺和(Novo)、枯草杆菌蛋白酶嘉 士伯(Carlsberg)、地衣芽孢杆菌、枯草杆菌蛋白酶BPN’、枯草杆菌蛋白酶 309、枯草杆菌蛋白酶147和枯草杆菌蛋白酶168以及描述于(WO 93/18140) 中的蛋白酶PD138。其他有用的蛋白酶可以是描述于WO 92/175177、WO 01/016285、WO 02/026024以及WO 02/016547中的那些。胰蛋白酶样蛋白酶的 实例是胰蛋白酶(例如猪或牛来源的)和镰孢属蛋白酶(描述于WO 89/06270、WO 94/25583和WO 05/040372中)，以及来源于纤维单胞菌属 (Cellumonas)的胰凝乳蛋白酶(描述于WO 05/052161和WO 05/052146 中)。

[0436] 进一步优选的蛋白酶是来自迟缓芽孢杆菌DSM 5483的碱性蛋白酶(如在 例如WO 95/23221中所述)、及其变体(在WO 92/21760、WO 95/23221、EP 1921147以及EP 1921148中描述的)。

[0437] 金属蛋白酶的实例是如描述于WO 07/044993(杰能科国际公司 (Genencor Int.))中的中性金属蛋白酶，例如衍生自解淀粉芽孢杆菌的那 些。

[0438] 有用的蛋白酶的实例是于以下各项中的变体：WO 92/19729、WO 96/034946、WO 98/20115、WO 98/20116、WO 99/011768、WO 01/44452、 WO 03/006602、WO 04/03186、WO 04/041979、WO 07/006305、WO 11/036263、WO 11/036264，尤其是在以下位置的一个或多个中具有取代的变 体：3、4、9、15、27、36、57、68、76、87、95、96、97、98、99、100、 101、102、103、

104、106、118、120、123、128、129、130、160、167、 170、194、195、199、205、206、217、218、222、224、232、235、236、 245、248、252以及274，使用BPN’编号。更优选地，这些枯草杆菌酶变体可 以包含以下突变：S3T、V4I、S9R、A15T、K27R、*36D、V68A、N76D、 N87S,R、*97E、A98S、S99G,D,A、S99AD、S101G,M,R S103A、 V104I,Y,N、S106A、G118V,R、H120D,N、N123S、S128L、P129Q、S130A、G160D、Y167A、R170S、A194P、G195E、V199M、V205I、 L217D、N218D、M222S、A232V、K235L、Q236H、Q245R、N252K、 T274A(使用BPN’编号)。

[0439] 适合的可商购蛋白酶包括以商品名Alcalase®、 Blaze®、Duralase™、Durazym™、Relase® 、 Relase® Ultra、Savinase® 、 Savinase® Ultra、Primase® 、 Polarzyme® 、 Kannase® 、 Liquanase® 、 Liquanase® Ultra 、Ovozyme® 、 Coronase® 、 Coronase® Ultra 、Neutrase® 、 Everlase® 以 及Esperase®出售的那些，所有这些能以Ultra®或Evity®(诺维信公司 (Novozymes A/S))出售；以下列商品名出售的那些：Maxatase®、Maxacal®、 Maxapem®、 Purafect®、Purafect Prime®、Preferenz™、Purafect MA® 、Purafect Ox® 、Purafect OxP® 、 Puramax® 、 Properase® 、Effectenz™、

FN2®、FN3®、FN4®、Excellase®、Opticlean®以及Optimase® (丹尼斯克/杜邦公司(Danisco/DuPont))、Axapem™(吉斯特布罗卡德斯 公司(Gist-Brocases N.V.))、BLAP(序列示于US 5352604的图29中)及其 变体(汉高股份(Henkel AG))以及来自花王株式会社(Kao)的KAP(嗜 碱芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶)。

[0440] 在一方面，优选的酶将包括一种淀粉酶。适合的淀粉酶可以是α-淀粉酶 或葡糖淀粉酶并且可以是细菌或真菌来源的。包括化学修饰的或蛋白质工程 化的突变体。淀粉酶包括例如获得自芽孢杆菌属的α-淀粉酶，例如GB 1296839中更详细描述的地衣芽孢杆菌具体株系的α-淀粉酶。

[0441] 适合的淀粉酶包括具有WO 95/10603中的SEQ ID NO:3的淀粉酶或其与 SEQ ID NO:3具有90％序列一致性的变体。优选的变体描述于WO 94/02597、WO 94/18314、WO 97/43424以及WO 99/019467的SEQ ID NO:4中，例如在一 个或多个以下位置中具有取代的变体：15、23、105、106、124、128、133、154、156、178、179、181、188、190、197、201、202、207、208、209、 211、243、264、304、305、391、408以及444。

[0442] 不同的适合的淀粉酶包括具有WO 02/010355中的SEQ ID NO:6的淀粉酶 或其与SEQ ID NO:6具有90％序列一致性的变体。SEQ ID NO:6的优选变体是 在位置181和182中具有一个缺失并且在位置193中具有一个取代的那些。

[0443] 其他适合的淀粉酶是包括示于WO 2006/066594的SEQ ID NO:6中的来源 于解淀粉芽孢杆菌的α-淀粉酶的残基1-33和示于WO 2006/066594的SEQ ID NO: 4中的地衣芽孢杆菌α-淀粉酶的残基36-483的杂合α-淀粉酶或其具有90％序列 一致性的变体。这一杂合α-淀粉酶的优选变体是在以下位置中的一个或多个 中具有取代、缺失或插入的那些：G48、T49、G107、H156、A181、N190、 M197、I201、A209以及Q264。包括示于WO 2006/066594的SEQ ID NO:6中的 来源于解淀粉芽孢杆菌的α-淀粉酶的残基1-33和SEQ ID NO:4的残基36-483的 杂合α-淀粉酶的最优选变体是具有以下取代的那些：

[0444] M197T;

[0445] H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S;或

[0446] G48A+T49I+G107A+H156Y+A181T+N190F+I201F+A209V+Q264S。

[0447] 适合的另外的淀粉酶是具有WO 99/019467中的SEQ ID NO:6的淀粉酶或 其与SEQ ID NO:6具有90％序列一致性的变体。SEQ ID NO:6的优选变体是在 以下位置中的一个或多个中具有取代、缺失或插入的那些:R181、G182、 H183、G184、N195、I206、E212、E216以及K269。特别优选的淀粉酶是在 位置R181和G182或位置H183和G184中具有缺失的那些。

[0448] 可以使用的另外的淀粉酶是具有WO 96/023873的SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:7的那些或其与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:7具有90％序列一致性的变体。SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:7的优选变体是在以下位 置中的一个或多个中具有取代、缺失或插入的那些:140、181、182、183、 184、195、206、212、243、260、269、304以及476。更优选的变体是在位置 181和182或位置183和184中具有缺失的那些。SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 或SEQ ID NO:7的最优选的淀粉酶变体是在位置183和184中具有缺失并且在 位置140、195、206、243、260、304以及476中的一个或多个中具有取代的那 些。

[0449] 可以使用的其他淀粉酶是具有WO 08/153815中的SEQ ID NO:2、WO 01/66712中的SEQ ID NO:10的淀粉酶或其与WO 08/153815的SEQ ID NO:2具 有90％序列一致性或与WO 01/66712中的SEQ ID NO:10具有90％序列一致性的 变体。WO 01/66712中的SEQ ID NO:10的优选变体是在以下位置中的一个或 多个中具有取代、缺失或插入的那些:176、177、178、179、190、201、207、211以及264。

[0450] 另外的适合的淀粉酶是具有WO 09/061380中的SEQ ID NO:2的淀粉酶或 其与SEQ ID NO:2具有90％序列一致性的变体。SEQ ID NO:2的优选变体是在 以下位置中的一个或多个中具有C末端的截短和/或取代、缺失或插入的那 些:Q87、Q98、S125、N128、T131、T165、K178、R180、S181、T182、 G183、M201、F202、N225、S243、N272、N282、Y305、R309、D319、 Q320、Q359、K444以及G475。SEQ ID NO:2的更优选变体是在一个或多个以 下位置中具有取代的那些:Q87E,R、Q98R、S125A、N128C、T131I、 T165I、K178L、T182G、M201L、F202Y、N225E,R、N272E,R、 S243Q,A,E,D、Y305R、R309A、Q320R、Q359E、K444E以及G475K和/或位 置R180和/或S181或T182和/或G183的缺失。SEQ ID NO:2的最优选的淀粉酶 变体是具有以下取代的那些:

[0451] N128C+K178L+T182G+Y305R+G475K;

[0452] N128C+K178L+T182G+F202Y+Y305R+D319T+G475K;

[0453] S125A+N128C+K178L+T182G+Y305R+G475K;或

[0454] S125A+N128C+T131I+T165I+K178L+T182G+Y305R+G475K,其中这些 变体是C-末端截短的并且任选地进一步在位置243处包括取代和/或在位置180 和/或位置181处包括缺失。

[0455] 其他适合的淀粉酶是具有WO 01/66712中的SEQ ID NO:12的α-淀粉酶或 与SEQ ID NO:12具有至少90％序列一致性的变体。优选的淀粉酶变体是在 WO 01/66712中的SEQ ID NO:12的以下位置中的一个或多个中具有取代、缺 失或插入的那些:R28,R118,N174;R181,G182,D183,G184,G186, W189,N195,M202,Y298,N299,K302,S303,N306,R310,N314;

R320,H324,E345,Y396,R400,W439,R444,N445,K446,Q449, R458,N471,N484。特别优选的淀粉酶包括具有D183和G184的缺失并且具 有R118K、N195F、R320K及R458K的取代的变体，以及另外在选自下组的一 个或多个位置中具有取代的变体:M9、G149、G182、G186、M202、T257、 Y295、N299、M323、E345以及A339,最优选的是另外在所有这些位置中具 有取代的变体。

[0456] 其他实例是例如描述于WO 2011/098531、WO 2013/001078及WO 2013/001087中的那些淀粉酶变体。

[0457] 可商购的淀粉酶是Duramyl™、Termamyl™、Termamyl Ultra™、 Fungamyl™、Ban™、Stainzyme™、Stainzyme Plus™、Amplify® 、 Supramyl™、Natalase™、Liquozyme X和BAN™(来自诺维信公司 (Novozymes A/S))、KEMZYM® AT 9000Biozym Biotech Trading GmbH Wehlistrasse 27b A-1200Wien Austria、和Rapidase™、Purastar™/Effectenz™、Powerase、Preferenz S100、Preferenx S110、ENZYSIZE®、OPTISIZE HT PLUS® 、以及PURASTAR OXAM®(丹尼斯克/杜邦公司 (Danisco/DuPont))以及KAM®(花王株式会社(Kao))。

[0458] 适合的脂肪酶和角质酶包括细菌或真菌来源的那些。包括化学修饰的或 蛋白工程化的突变体酶。实例包括来自嗜热真菌属的脂肪酶,例如如描述于 EP 258068和EP 305216中的来自疏绵状嗜热丝孢菌(早先命名为疏棉状腐质 霉);来自腐质霉属的角质酶,例如特异腐质霉(WO 96/13580);来自假单 胞菌属的菌株的脂肪酶(这些中的一些现在改名为伯克霍尔氏菌属),例如 产碱假单胞菌或类产碱假单胞菌(EP 218272)、洋葱假单胞菌(EP 331376)、假单胞菌属菌株SD705(WO 95/06720&WO 96/27002)、威斯康 星假单胞菌(P.wisconsinensis)(WO 96/12012);GDSL-型链霉菌属脂肪酶 (WO 10/065455);来自稻瘟病菌的角质酶(WO 10/107560);来自门多萨 假单胞菌的角质酶(US 5,389,536);来自褐色嗜热裂孢菌(Thermobifida fusca)的脂肪酶(WO 11/084412,WO 13/033318);嗜热脂肪土芽孢杆菌脂 肪酶(WO 11/084417);来自枯草芽孢杆菌的脂肪酶(WO 11/084599);以 及来自灰色链霉菌(WO 11/150157)和始旋链霉菌(S.pristinaespiralis)的脂 肪酶(WO 12/137147)。

[0459] 其他实例是脂肪酶变体,例如描述于EP 407225、WO 92/05249、WO 94/01541、WO 94/25578、WO 95/14783、WO 95/30744、WO 95/35381、WO 95/22615、WO 96/00292、WO 97/04079、WO 97/07202、WO 00/34450、WO 00/60063、WO 01/92502、WO 07/87508以及WO 09/109500中的那些。

[0460] 优选的商业化脂肪酶产品包括Lipolase™、Lipex™;Lipolex™和 Lipoclean™(诺维信公司),Lumafast(来自杰能科公司(Genencor))以及 Lipomax(来自吉斯特-博克德斯公司(Gist-Brocades))。

[0461] 再其他实例是有时称为酰基转移酶或过水解酶的脂肪酶,例如与南极假 丝酵母(Candida antarctica)脂肪酶A具有同源性的酰基转移酶(WO 10/111143)、来自耻垢分枝杆菌(Mycobacterium smegmatis)的酰基转移酶 (WO 05/56782)、来自CE 7家族的过水解酶(WO 09/67279)以及耻垢分枝 杆菌过水解酶的变体(特别是来自亨斯迈纺织品染化有限公司(Huntsman Textile Effects Pte Ltd)的商业产品Gentle Power Bleach中所用的

S54V变体) (WO 10/100028)。

[0462] 在一方面,其他优选的酶包括微生物衍生的展现出内切-β-1,4-葡聚糖酶 活性的内切葡聚糖酶(EC3.2.1.4),包括对于芽孢杆菌属的成员而言内源的 细菌多肽,具有与US 7141403中的氨基酸序列SEQ ID NO:2至少90%、94%、97%或99%一致性的序列,以及其混合物。适合的内切葡聚糖酶是在商标名Celluclean®和Whitezyme®(诺维信公司)下售卖的。

[0463] 其他优选的酶包括在商标名Pectawash®、Pectaway®、Xpect®下售卖的 果胶裂解酶,以及在商标名Mannaway®下售卖的甘露聚糖酶(诺维信公 司),以及Purabrite®(丹尼斯克/杜邦公司(Danisco/DuPont))。

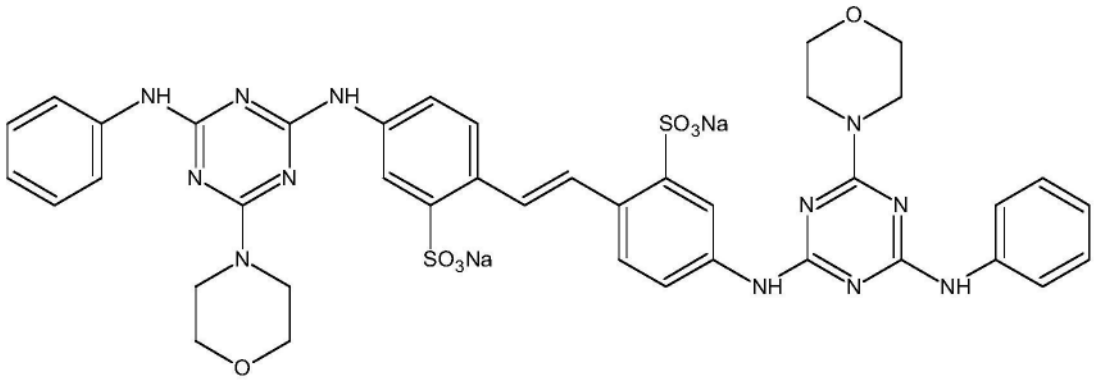
[0464] 该一种或多种洗涤剂酶可以通过添加包含一种或多种酶的单独的添加 剂,或通过添加包括所有这些酶的组合添加剂而被包括于洗涤剂组合物中。本 发明的洗涤剂添加剂,即单独添加剂或组合添加剂,可以被配制为,例如颗 粒、液体、浆体等。优选的洗涤剂添加剂配制品是颗粒,尤其是非尘颗粒;液 体,尤其是稳定化的液体;或浆体。

[0465] 非尘颗粒可以例如如US 4106991和US 4661452中所披露来制造,并且可 以任选地通过本领域中已知的方法来涂布。蜡状包衣材料的实例是平均分子量 为1000至20000的聚(环氧乙烷)产品(聚乙二醇,PEG);具有16-50个环氧乙 烷单元的乙氧基化壬基酚;具有15至80个环氧乙烷单位的乙氧基化脂肪族醇, 其中醇含有12至20个碳原子;脂肪醇;脂肪酸;以及脂肪酸的单-和双-和三甘 油酯。适用于通过流化床技术应用的成膜包衣材料的实例在GB 1483591中给 出。液体酶制剂可以例如通过根据已确立的方法添加多元醇(如丙二醇)、糖 或糖醇、乳酸或硼酸而稳定化。受保护的酶可以根据EP 238216中披露的方法 来制备。

[0466] 染料转移抑制剂-本发明的组合物还可以包括一种或多种染料转移抑制 剂。合适的聚合物染料转移抑制剂包括但不限于聚乙烯吡咯烷酮聚合物、多 胺N-氧化物聚合物、N-乙烯吡咯烷酮与N-乙烯基咪唑的共聚物、聚乙烯噁唑 烷酮以及聚乙烯咪唑或其混合物。当存在于组合物中时,染料转移抑制剂可 以按从0.0001wt%至10wt%、从0.01wt%至5wt%或从0.1wt%至3wt%的水平 存在。

[0467] 增亮剂-本发明的组合物还可包含另外的组分,这些组分可以给正清洁的 物品着色,例如荧光增亮剂。

[0468] 该组合物可以包括C.I.荧光增亮剂260,处于具有以下结构的α-晶体形 式:

[0469] 

[0470] 在一方面,增亮剂是一种冷水可溶增亮剂,例如处于α-晶体形式的C.I.荧 光增亮

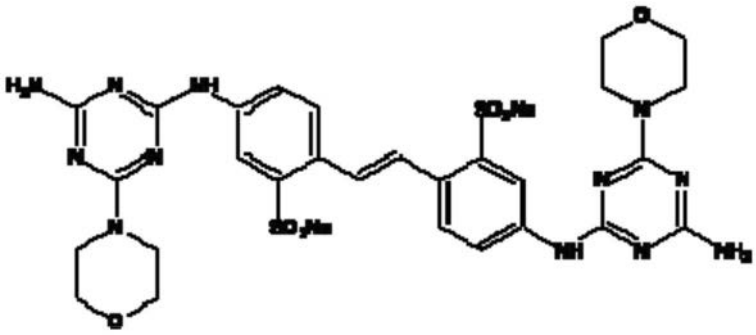
剂260。在一方面，增亮剂主要处于α-晶体形式，这意味着典型地至少50wt％、至少75wt％、至少90wt％、至少99wt％、或甚至基本上全部的C.I. 荧光增亮剂260是处于α-晶体形式。

[0471] 增亮剂典型地是处于微粒化微粒形式，具有从3至30微米、从3微米至20 微米、或从3至10微米的加权平均初级粒度。

[0472] 该组合物可以包括处于β-晶体形式的C.I.荧光增亮剂260，并且(i)处于α- 晶体形式的C.I.荧光增亮剂260与(ii)处于β-晶体形式的C.I.荧光增亮剂260的重 量比可以是至少0.1或至少0.6。BE 680847涉及用于制得处于α-晶体形式的C.I. 荧光增亮剂260的方法。

[0473] 可以用于本发明中的商业光学增亮剂可以划分为多个亚组，这些亚组包 括但不是必须限制于：二苯乙烯、吡唑啉、香豆素、羧酸、次甲基菁、二苯 并噻吩-5,5-二氧化物、唑、5和6元环杂环的衍生物以及其他混杂剂。此类增 亮剂的实例披露于“荧光增亮剂的生产和应用”，M.佐赫劳德尼克 (Zahradnik)，由约翰威利父子公司(John Wiley&Sons)，纽约(1982) 出版。可以用于本发明组合物的光学增亮剂的具体非限制性实例是在US 4790856和US 3646015中鉴定的那些。

[0474] 另外适合的增亮剂具有以下结构：

[0475] 

[0476] 适合的荧光增亮剂水平包括从0.01wt％、从0.05wt％、从0.1wt％或从0.2 wt％的较低水平至0.5wt％或0.75wt％的较高水平。

[0477] 在一方面，增亮剂可以装载在粘土上以形成颗粒。硅酸盐-本发明的组合 物还可以包含硅酸盐，例如硅酸钠或钾。该组合物可以包括从0wt％至小于10 wt％硅酸盐，至9wt％、或至8wt％、或至7wt％、或至6wt％、或至5wt％、或 至4wt％、或至3wt％、或甚至至2wt％，并且从高于0wt％、或从0.5wt％、或 从1wt％的硅酸盐。适合的硅酸盐是硅酸钠。

[0478] 分散剂-本发明的组合物还可以包含分散剂。适合的水溶性有机材料包括 均聚合或共聚合的酸或其盐，其中聚羧酸包括至少两个羧基，这两个羧基被 不超过两个碳原子彼此分开。

[0479] 酶稳定剂-用于在组合物中使用的酶可以通过各种技术来稳定。在此使用 的酶可以通过钙和/或镁离子的水溶性来源的存在来稳定。常规稳定剂的实例 是例如多元醇(如丙二醇或甘油)、糖或糖醇、肽醛、乳酸、硼酸或硼酸衍 生物(例如芳香族硼酸酯)、或苯基硼酸衍生物(如4-甲酰苯基硼酸)，并 且该组合物可以如在例如WO 92/19709和WO 92/19708中所描述的来配制。在 包含蛋白酶的水性组合物的情况下，可以添加可逆蛋白酶抑制剂，例如包括 硼酸盐、4-甲酰基苯基硼酸、苯基硼酸及其衍生物的硼化合物，或例如甲酸 钙、甲酸钠和1,2-丙二醇的化合物，以进一步改进稳定性。该肽醛可以具有化 学式B_2-B_1-B_0-R其中：R是氢、CH_3、CX_3、CHX_2或CH_2X，其中X是卤素原 子；B_0是在对位和/或在间位具有一个OH

取代基的苯丙氨酸残基;B_1是单个氨 基酸残基;并且B_2由一个或多个氨基酸残基组成,可任选地包括一种N端保护 基团。优选的肽醛包括但不限于Z-RAY-H、Ac-GAY-H、Z-GAY-H、Z-GAL- H、Z-GAF-H、Z-GAV-H、Z-RVY-H、Z-LVY-H、Ac-LGAY-H、Ac-FGAY- H、Ac-YGAY-H、Ac-FGVY-H或Ac-WLVY-H,其中Z是苄氧基羰基并且Ac是 乙酰基。

[0480] 溶剂-适合的溶剂包括水和其他溶剂,例如亲脂性流体。适合的亲脂性流 体的实例包括硅氧烷、其他硅酮、烃、乙二醇醚、甘油衍生物(例如甘油 醚)、全氟化的胺、全氟化的和氢氟醚溶剂、低挥发性非氟化的有机溶剂、 二醇溶剂、其他环境友好型溶剂及其混合物。

[0481] 结构化剂/增稠剂-结构化液体可以从内部结构化,由此结构由初级成分 (例如,表面活性剂材料)形成,和/或通过使用次级成分(例如,聚合物、 粘土和/或硅酸盐材料)提供三维基质结构而从外部结构化。该组合物可以包 括从0.01wt%至5wt%、或从0.1wt%至2.0wt%的结构化剂。该结构化剂典型 地选自下组,该组由以下各项组成:甘油二酯和甘油三酯、硬脂酸乙二醇双 酯、微晶纤维素、基于纤维素的材料、微纤维纤维素、疏水改性的碱性可膨 胀的乳液(例如Polygel W30(3VSigma))、生物聚合物,黄原胶、吉兰糖 胶、及其混合物。适合的结构化剂包括氢化的蓖麻油及其非乙氧基化的衍生 物。适合的结构化剂披露于US 6855680中。此类结构化剂具有螺纹样结构化 系统,该系统具有一系列纵横比。其他适合的结构化剂和用于制得它们的方 法描述于WO 10/034736中。

[0482] 调节剂-本发明的组合物可以包括高熔点脂肪化合物。在此有用的高熔点 脂肪化合物具有25℃或更高的熔点,并且选自下组,该组由以下各项组成: 脂肪醇、脂肪酸、脂肪醇衍生物、脂肪酸衍生物、及其混合物。此类具有低 熔点的化合物并非旨在被包括在此部分中。高熔点化合物的非限制性实例发 现于国际化妆品成分词典,第五版,1993,以及CTFA化妆品成分手册,第二 版,1992中。

[0483] 鉴于提供改进的调节益处(如在施用至湿发的过程中的湿滑感、柔和以 及对干发的保湿感),高熔点脂肪化合物被以从0.1wt%至40wt%、从1wt% 至30wt%、从1.5wt%至16wt%、从1.5wt%至8wt%的水平包括在该组合物 中。

[0484] 本发明的组合物可以包含阳离子聚合物。在组合物中阳离子聚合物的浓 度典型地范围为从0.05wt%至3wt%、从0.075wt%至2.0wt%、或从0.1wt%至 1.0wt%。在预期使用该组合物的pH下,适合的阳离子聚合物将具有至少0.5 meq/gm、至少0.9meq/gm、至少1.2meq/gm、至少1.5meq/gm、或小于7 meq/gm、以及小于5meq/gm的阳离子电荷密度,该pH的范围将大体上是从pH 3至pH 9、或在pH 4与pH 8之间。在此,聚合物的“阳离子电荷密度”是指聚 合物上的正电荷数目与聚合物的分子量之比。此类适合的阳离子聚合物的平 均分子量将大体上是在10,000与1000万之间、在50,000与500万之间、或在 100,000与300万之间。

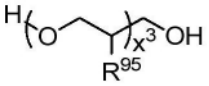
[0485] 用于在本发明的组合物中使用的适合的阳离子聚合物包含阳离子含氮部 分,例如季铵或阳离子质子化的氨基部分。可以将任何阴离子反离子与阳离 子聚合物关联使用,只要聚合物保持溶解于水中、组合物中、或组合物的凝 聚相中,并且只要反离子在物理和化学上与组合物的主要成分相容或以另外 的方式不会不适当地损害组合物性能、稳定性或美感。此类反离子的非限制 性实例包括卤化物(例如,氯化物、氟化物、溴化物、碘化物)、硫酸盐和 甲基硫酸盐。

[0486] 此类聚合物的非限制性实例描述于CTFA化妆品成分词典,第三版,埃 斯特林(Estrin)、克罗斯利(Crosley)、和海恩斯(Haynes)编写(化妆 品、化妆用具以及香水联合

公司(The Cosmetic,Toiletry,and Fragrance Association,Inc.),华盛顿(1982))。

[0487] 用于在该组合物中使用的其他适合的阳离子聚合物包括多糖聚合物,阳 离子瓜尔豆胶衍生物,含四价氮的纤维素醚,合成聚合物,醚化纤维素、瓜 尔豆胶和淀粉的共聚物。当使用的时候,在此的阳离子聚合物可溶解于组合 物中或可溶解于组合物中的复合凝聚相中,该凝聚相是由上文所述的阳离子 聚合物和阴离子、两性和/或兼性离子表面活性剂组分形成。阳离子聚合物的 复合凝聚物还可以与组合物中其他带电荷的材料形成。适合的阳离子聚合 物描述于US 3962418;US 3958581;和US 2007/0207109中。

[0488] 本发明的组合物可以包括作为调节剂的非离子聚合物。在此具有大于 1000的分子量的聚二醇(polyalkylene glycol)是有用的。具有以下通式的那 些是有用的:

[0489] 

[0490] 其中R^{95}选自下组,该组由以下各项组成:H、甲基及其混合物。调节 剂,并且特别是硅酮,可以被包括在组合物中。用于本发明的组合物中的调 节剂典型地包括形成乳化液体颗粒的水不溶性、水分散性、非挥发性的液 体。用于在该组合物中使用的适合的调节剂是通常表征为以下项的那些调节 剂:硅酮(例如,硅酮油、阳离子硅酮、硅酮胶、高折射性硅酮、以及硅酮 树脂)、有机调节油(例如,烃油、聚烯烃、以及脂肪酯)或其组合,或者 以另外方式在于此的水性表面活性剂基质中形成液体分散颗粒的那些调节 剂。此类调节剂应该在物理和化学上是与组合物的主要组分相容的,并且不 应该以另外的方式不适当地损害组合物稳定性、美感或性能。

[0491] 在组合物中调节剂的浓度应该足以提供所希望的调节益处。这种浓度可 以随着调节剂、所希望的调节性能、调节剂颗粒的平均大小、其他组分的类 型和浓度以及其他类似因素而变化。

[0492] 硅酮调节剂的浓度范围典型地是从0.01wt%至10wt%。适合的硅酮调节 剂以及对于硅酮的任选的悬浮剂的非限制性实例描述于美国再公告专利号 34,584;US 5104646;US 5106609;US 4152416;US 2826551;US 3964500;US 4364837;US 6607717;US 6482969;US 5807956;US 5981681;US 6207782;US 7465439;US 7041767;US 7217777;US 2007/0286837A1;US 2005/0048549 A1;US 2007/0041929 A1;GB 849433; DE 10036533中,将所有文献通过引用结合于此;硅酮的化学与技术 (Chemistry and Technology of Silicones),纽约:学术出版社(1968);通 用电气硅酮橡胶产品数据列表SE 30、SE 33、SE 54和SE 76;硅酮化合物 (Silicon Compounds),彼特拉克系统公司(Petrarch Systems,Inc.) (1984);以及聚合物科学与工程化百科全书(Encyclopedia of Polymer Science and Engineering),第15卷,第2版,第204-308页,约翰威利父子公司 (John Wiley&Sons,Inc.)(1989)中。

[0493] 本发明的组合物还可以包括从0.05wt%至3wt%的至少一种有机调节油作 为调节剂,单独或与其他调节剂例如硅酮(在此所述的)组合。适合的调节 油包括烃油、聚烯烃、以及脂肪酯。还适合用于在此的组合物中的是在US 5674478和US 5750122或在US 4529586;US 4507280;US 4663158;US 4197865;US 4217914;US 4381919;以及US 4422853中所描述的调节剂。

[0494] 卫生学与恶味-本发明的组合物还可以包括蓖麻酸锌、百里酚、季铵盐 (例如

Bardac®)、聚乙烯亚胺(例如来自巴斯夫的Lupasol®)及其锌复合 物、银和银化合物(尤其是被设计为缓慢释放Ag^+或纳米银分散体的那些)中 的一种或多种。

[0495] 益生素-这些组合物可以包括益生素,如描述于WO 09/043709中的那 些。

[0496] 增泡剂-如果高的起泡是希望的,增泡剂(例如C_{10}-C_{16}烷醇酰胺或C_{10}-C_{14}烷基硫酸酯)可以典型地以1wt%至10wt%的水平掺入组合物中。C_{10}-C_{14}单乙 醇和二乙醇酰胺阐述了此类增泡剂的典型的类别。此类增泡剂与高的起泡佐 剂表面活性剂(例如,以上提及的氧化胺、甜菜碱、以及磺基甜菜碱(sultaine))一起使用也是有利的。如果希望的话,水溶性镁和/或钙盐(例 如$MgCl_2$、$MgSO_4$、$CaCl_2$、$CaSO_4$等)可以典型地以0.1wt%至2wt%的水平添加,以提供另外的泡沫并且以增强油脂去除性能。

[0497] 泡沫抑制剂-用于减少或抑制泡沫形成的化合物可以掺入本发明的组合物 中。泡沫抑制在如在US 4489455和US 4489574中描述的所谓“高浓度清洁工 艺”中以及在前载式(front-loading-style)洗涤机中可能是特别重要的。多种 多样的材料可以用作泡沫抑制剂,并且泡沫抑制剂对于本领域的技术人员而 言是熟知的。参见,例如柯克·奥思默化工百科全书(Kirk Othmer Encyclopedia of Chemical Technology),第三版,第7卷,第430-447页(约翰 威利父子公司,1979)。泡沫抑制剂的实例包括单羧基脂肪酸以及其中的可 溶盐,高分子量烃例如石蜡,脂肪酸酯(例如,脂肪酸甘油三酯),单价醇 的脂肪酸酯,脂肪族C_{18}-C_{40}酮(例如硬脂酮),N-烷基化的氨基三嗪,优选 具有约100℃之下的熔点的蜡烃,硅酮泡沫抑制剂,以及二级醇。泡沫抑制剂 描述于US 2954347;US 4265779;US 4265779;US 3455839;US 3933672; US 4652392;US 4978471;US 4983316;US 5288431;US 4639489;US 4749740;US 4798679;US 4075118;EP 89307851.9;EP 150872;以及DOS 2,124,526中。

[0498] 对于有待用于自动洗衣机中的任何洗涤剂组合物,泡沫不应该形成到它 们溢出洗涤机的程度。当使用时,泡沫抑制剂优选是以“泡沫抑制量”存在 的。“泡沫抑制量”意指组合物的配制者可以选择这种泡沫控制剂的量,这 个量将充分地控制泡沫以导致用于自动洗衣机中的低起泡衣物洗涤剂。

[0499] 在此的组合物将通常包括从0至10wt%的泡沫抑制剂。当用作泡沫抑制 剂时,单羧基脂肪酸以及其中的盐将典型地以高至5wt%的量存在。优选地, 使用从0.5wt%至3wt%的脂肪单羧酸酯泡沫抑制剂。典型地以高至2.0wt%的 量使用硅酮泡沫抑制剂,虽然可以使用更高的量。通常以从0.1wt%至2wt% 的范围的量使用单硬脂酰磷酸酯泡沫抑制剂。典型地以从0.01wt%至5wt%的 范围的量使用烃泡沫抑制剂,虽然可以使用更高的水平。典型地以0.2wt%至 3wt%使用醇泡沫抑制剂。

[0500] 在此的组合物可以在宽的pH范围内具有清洁活性。在某些实施例中,这 些组合物具有从pH 4至pH 11.5的清洁活性。在其他实施例中,这些组合物从 pH 6至pH 11、从pH 7至pH 11、从pH 8至pH 11、从pH 9至pH 11、或从pH 10 至pH 11.5具有活性。

[0501] 在此的组合物可以在宽范围的温度(例如从10℃或更低至90℃)内具有 清洁活性。优选地,该温度将是低于50℃或40℃或甚至30℃。在某些实施例 中,对于这些组合物来说的最适温度范围是从10℃至20℃、从15℃至25℃、 从15℃至30℃、从20℃至30℃、从25℃至35℃、从30℃至40℃、从35℃至45℃、或从40℃至50℃。

[0502] 组合物的形式

[0503] 在此描述的组合物被有利地用在例如洗衣应用、硬表面清洁、餐具洗涤 应用,连

同化妆品应用(如义齿、牙齿、头发和皮肤)中。本发明的组合物 具体是固体或液体清洁和/或处理组合物。在一方面,本发明涉及一种组合 物,其中该组合物的形式选自下组,该组由以下各项组成:规则的、压缩的 或浓缩的液体;凝胶;膏;皂条;规则的或压缩的粉末;粒状固体;具有两 个或更多个层(相同或不同相)的均匀或多层片剂;具有一个或多个室的 袋;单个或多个室单位剂型;或其任何组合。

[0504] 该组合物的形式可以将多个室(例如像可水溶的袋)中或片剂的不同层 中的组分物理地彼此分离。由此可以避免组分之间的负面的存储相互作用。在 洗涤溶液中,每个室的不同溶解曲线还可以引起选择的组分的延迟溶解。

[0505] 袋可以被配置为单个或多个的室。它可以具有适合容持该组合物的任何 形式、形状和材料,例如在与水接触之前,不允许该组合物从袋中释放出来。 袋由封装内体积的水溶性膜制成。可以将所述内体积分为袋的室。优选的膜是 形成膜或片的聚合材料,优选是聚合物。优选的聚合物、共聚物或其衍生物选 自聚丙烯酸酯、和水溶性丙烯酸酯共聚物、甲基纤维素、羧甲基纤维素、糊精 钠、乙基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、麦芽糊精、聚甲基丙烯 酸酯,最优选地是聚乙烯醇共聚物以及,羟丙基甲基纤维素(HPMC)。优选地,在膜中的聚合物(例如PVA)的水平是至少约60%。优选的平均分子量将 典型地是约20,000至约150,000。膜还可以是共混组合物,该共混组合物包括可 水解降解并且水可溶的聚合物共混物,例如聚乳酸和聚乙烯醇(已知在贸易参 考M8630下,如由美国印第安纳州的MonoSol LLC公司销售)加增塑剂,像甘 油、乙二醇、丙二醇、山梨醇及其混合物。这些袋可以包括固体衣物清洁组合 物或部分组分和/或液体清洁组合物或由水溶性膜分开的部分组分。用于液体 组分的室在组成上可以与包括固体的室不同(US 2009/0011970 A1)。

[0506] 水溶性膜-本发明的组合物还可以被包封于水溶性膜之内。优选地,优选 的膜材料是聚合物材料。膜材料可以是例如通过聚合物材料的铸造、吹塑、 挤出或吹胀挤塑来获得,如本领域中已知的。适合用于用作袋材料的优选的 聚合物、共聚物或其衍生物选自聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚环氧烷、丙 烯酰胺、丙烯酸、纤维素、纤维素醚、纤维素酯、纤维素酰胺、聚乙烯乙酸 酯、聚羧酸和盐、聚氨基酸或肽、聚酰胺、聚丙烯酰胺、马来酸/丙烯酸的共 聚物、多糖(包括淀粉和明胶)、天然胶(例如黄原胶和卡拉胶 (carragum))。更优选的聚合物选自聚丙烯酸酯和水溶性丙烯酸脂共聚物、 甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、糊精、乙基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基 甲基纤维素、麦芽糊精、聚甲基丙烯酸酯,并且最优选地选自聚乙烯醇、聚 乙烯醇共聚物和羟丙基甲基纤维素(HPMC)、及其组合。优选地,聚合物在袋材料(例如,PVA聚合物)中的水平是至少60wt%。聚合物可以具有任 何重均分子量,优选是从约1.000至1.000.000、从约10.000至300.000、从约 20.000至150.000。聚合物的混合物还可以用作袋材料。

[0507] 天然地,不同的膜材料和/或不同厚度的膜可以用于制作本发明的室。在 选择不同的膜中的益处是所得的室可以展现不同溶解度或释放特征。

[0508] 优选的膜材料是在MonoSol贸易参考M8630、M8900、H8779下已知的 PVA膜,以及描述于US 6166117和US 678751中的那些,以及具有相应溶解度 和变形特征的PVA膜。

[0509] 在此的膜材料还可以包括一种或多种添加剂成分。例如,可以有益的是 添加增塑剂,例如甘油、乙二醇、二乙二醇、丙二醇、山梨醇及其混合物。 其他添加剂包括有待被递送至洗涤用水的功能性洗涤剂添加剂,例如有机聚 合物分散剂等。

[0510] 制造组合物的方法

[0511] 本发明的组合物可以被配制为任何适合的形式，并且可通过由配制者所 选择的任何方法来制备，这些方法的非限制性实例描述于申请人的实例中以 及US 4990280;US 20030087791 A1;US 20030087790 A1;US 20050003983A1;US 20040048764 A1;US 4762636;US 6291412;US 20050227891A1;EP 1070115 A2;US 5879584;US 5691297;US 5574005; US 5569645;US 5565422;US 5516448;US 5489392;US 5486303中，将所 有文献通过应用结合于此。本发明的组合物或根据本发明制备的组合物包括 清洁和/或处理组合物，包括但不限于用于在织物和家居护理领域中处理织 物、硬表面和任何其他表面的组合物，包括：空气护理(包括空气清新剂和 气味递送系统)、汽车护理、洗碗、织物调节(包括软化和/或清新)、洗衣 去垢、洗衣和漂洗添加剂和/或护理、硬表面清洁和/或处理(包括地板和马桶 清洁剂)、颗粒或粉末形式通用型或“重负荷”洗涤剂，尤其是清洁洗涤 剂；液体、胶或膏形式通用型洗涤剂，尤其是所谓的重负荷液体类型；液体 精细-织物洗涤剂；手工洗碗剂或轻负荷洗碗剂，尤其是高起泡类型的那些； 机器洗碗剂，包括用于供家庭和公共机构使用的不同的片剂、颗粒、液体和 漂洗助剂类型：汽车或地毯香波，浴室清洁剂(包括马桶清洁剂)；以及清 洁辅助剂，例如漂白添加剂以及“去污棒(stain-stick)”或预处理类型、装 载基质的组合物(例如添加干燥剂的片层)。优选的是用于清洁和/或处理纺 织品和/或硬表面(最优选为纺织品)的组合物和方法。组合物优选地是在洗 涤过程的预处理步骤中或主要洗涤步骤中(最优选用于纺织品洗涤步骤)使 用的组合物。

[0512] 如在此使用的，术语“织物和/或硬表面清洁和/或处理组合物”是清洁 和处理组合物的子集，除非另外指出，该子集包括颗粒或粉末形式通用型或 “重负荷”洗涤剂，尤其是清洁洗涤剂；液体、胶或膏形式的通用型洗涤 剂，尤其是所谓的重负荷液体类型；液体精细织物洗涤剂；手工洗碗剂或轻 负荷洗碗剂，尤其是高起泡类型的那些；机器洗碗剂，包括用于供家庭和公 共机构使用的不同的片剂、颗粒、液体和漂洗助剂类型；液体清洁和消毒剂，汽车或地毯香波，浴室清洁剂(包括马桶清洁剂)；织物调节组合物 (包括软化和/或清新)，可以处于液体、固体和/或干燥剂片层形式；连同清 洁辅助剂，例如漂白添加剂和“去污棒”或预处理类型、装载基质的组合物 (例如添加干燥剂的片层)。所有的可应用的此类组合物可以是处于标准 的、浓缩的或甚至高度浓缩的形式，甚至到此类组合物可以在某些方面呈非 水性的程度。

[0513] 使用方法

[0514] 本发明包括一种在织物和/或家居护理领域中用于清洁任何表面(包括处 理纺织品或硬表面或其他表面)的方法。考虑了如所述的清洁可以处于小规 模(例如家庭家务(family house hold))连同大规模(如处于例如工业和专 业设置)两者。在本发明的一个方面，该方法包括在洗涤过程的预处理步骤 或主要洗涤步骤(最优选用于在纺织品洗涤步骤中使用或可替代地用于在餐 具洗涤(包括手动以及自动/机械餐具洗涤两者)中使用)中接触有待处理的 表面的步骤。在本发明的一个实施例中，将脂肪酶变体和其他组分顺序地添 加到用于清洁和/或处理表面的方法中。可替代地，同时地添加脂肪酶变体和 其他组分。

[0515] 如在此使用的，洗涤包括但不限于擦洗和机械搅拌。洗涤可以用泡沫组 合物进行(如在WO 08/101958中所述)，和/或通过施加交变压力(压力/真 空)作为擦洗和机械搅拌

的附加方法或替代方式来进行。对此类表面或织物 进行干燥可以通过在家庭或工业环境中采用的通用手段的任一种来完成。本 发明的清洁组合物理想地适用于在洗衣以及餐具洗涤应用中使用。因此，本 发明包括一种用于清洁物体(包括但不限于织物、餐具、刀具以及厨具)的 方法。该方法包括使有待清洁的物体与所述清洁组合物接触的步骤，该清洁 组合物包括申请人的清洁组合物、清洁添加剂或其混合物中的至少一个实施 例。织物可以包括能够在常规消费者或公共机构使用条件下被洗涤的大多数 任何织物。该溶液可以具有从8至10.5的pH。可以在溶液中以从500ppm至 15.000ppm的浓度使用组合物。水温范围典型地是从5℃至90℃。水与织物之 比典型地是从1:1至30:1。

[0516] 在一方面，本发明涉及一种使用与SEQ ID NO:2具有至少60％一致性的 多肽产生一种组合物的方法。在一方面，本发明涉及该组合物用于清洁物体 的用途。

[0517] 在一方面，本发明涉及一种产生该组合物的方法，该方法包括添加一种 与SEQ ID NO:2具有至少60％一致性的多肽、以及一种表面活性剂。在一方 面，本发明涉及一种用于清洁表面的方法，该方法包括使待清洁的表面上存 在的脂质污渍与该清洁组合物接触。在一方面，本发明涉及一种用于水解存 在于表面上的污物和/或污渍中的脂质的方法，该方法包括使污物和/或污渍与 清洁组合物接触。在一方面，本发明涉及该组合物在羧酸酯水解中的用途。 在一方面，本发明涉及该组合物在酯的水解、合成或交换中的用途。在一方面，本发明涉及该组合物用于制造稳定配制品的用途。

[0518] 植物

[0519] 本发明还涉及植物，例如转基因植物、植物部分或植物细胞，其包括本 发明的多核苷酸，以便以可回收的量表达和产生该变体。该变体可以从植物 或植物部分回收。可替代地，可以按原样将含有该变体的植物或植物部分用 于改善食品或饲料的质量，例如，改善营养价值、可口性、以及流变性质， 或用以破坏抗营养因子。

[0520] 转基因植物可以是双子叶的(双子叶植物)或单子叶的(单子叶植 物)。单子叶植物的实例是草，如草甸草(蓝草，早熟禾属)；饲草，如羊 茅属(Festuca)、黑麦草属(Lolium)；温带草，如翦股颖属(Agrostis)； 以及谷类，例如小麦、燕麦、黑麦、大麦、稻、高粱、以及玉蜀黍(玉 米)。

[0521] 双子叶植物的实例是烟草、豆类(如羽扇豆(lupins)、马铃薯、糖甜菜 (sugar beet)、豌豆、豆(bean)和大豆(soybean))、以及十字花科植物 (十字花科(family Brassicaceae))(如花椰菜、油菜籽、以及紧密相关的 模式生物拟南芥)。

[0522] 植物部分的实例是茎、愈伤组织、叶、根、果实、种子、以及块茎、以 及包括这些部分的独立组织，例如，表皮、叶肉、薄壁组织 (parenchyme)、维管组织、分生组织。特定植物细胞区室，如叶绿体、质 外体(apoplast)、线粒体、液泡、过氧化物酶体以及细胞质也被认为是植物 部分。此外，任何植物细胞，无论是何种组织来源，都被认为是植物部分。 同样地，植物部分，如分离以有助于本发明的利用的特定组织和细胞也被认 为是植物部分，例如胚、胚乳、糊粉和种皮。

[0523] 同样包括于本发明范围内的是此类植物、植物部分以及植物细胞的子 代。

[0524] 表达变体的转基因植物或植物细胞可以根据本领域已知的方法来构建。简而言之，通过如下方法构建该植物或植物细胞：将编码变体的一个或多个 表达构建体并入到植物宿主基因组或叶绿体基因组中，并且使所得的修饰植 物或植物细胞繁殖为转基因植物

或植物细胞。

[0525] 表达构建体宜为包括编码变体的多核苷酸的核酸构建体，该多核苷酸与 在选择的植物或植物部分中表达该多核苷酸所需的适当的调节序列可操作地 连接。而且，表达构建体可包括用于鉴定整合了此表达构建体的植物细胞的 选择性标记，和将此构建体引入所讨论的植物所必需的DNA序列(后者取决 于所用的引入DNA的方法)。

[0526] 例如，基于希望在何时、何处、以及如何表达该变体来确定对调节序列 如启动子和终止子序列和任选的信号或转运序列的选择。例如，编码变体的 基因的表达可以是组成型的或诱导型的，或可以是发育、阶段或组织特异性 的，并且可以使基因产物靶向特定组织或植物部分，如种子或叶。调节序列 由例如塔格(Tague)等人，1988，植物生理学(Plant Physiology)86:506描 述。

[0527] 对于组成型表达，可以使用35S-CaMV、玉米泛素1、或稻肌动蛋白1启 动子(弗兰克(Franck)等人，1980，细胞(Cell)21:285-294；克里斯滕森 (Christensen)等人，1992，植物分子生物学(Plant Mol.Biol.)18:675- 689；张(Zhang)等人，1991，植物细胞(Plant Cell)3:1155-1165)。器官 特异性启动子可以是以下各项的启动子，例如来自贮藏库组织(例如种子、马铃薯块茎、和果实)(爱德华兹(Edwards)和科鲁兹(Coruzzi)，1990，遗传学年鉴(Ann.Rev.Genet.)24:275-303)，或来自代谢库组织(例如分生 组织)(伊藤(Ito)等人，1994，植物分子生物学(Plant Mol.Biol.)24: 863-878)的启动子，种子特异性启动子，例如来自稻的谷蛋白、醇溶谷蛋 白、球蛋白或白蛋白启动子(吴(Wu)等人，1998，植物与细胞生理学 (Plant Cell Physiol.)39:885-889)，来自豆球蛋白B4的蚕豆启动子和来自蚕豆的未知种子蛋白基因(康拉德(Conrad)等人，1998，植物生理学杂志(J. Plant Physiol.)152:708-711)，来自种子油体蛋白的启动子(陈(Chen)等 人，1998，植物与细胞生理学(Plant Cell Physiol.)39:935-941)，来自欧洲 油菜的贮藏蛋白napA启动子，或本领域已知的任何其他种子特异性启动子， 例如，如在WO 91/14772中所描述的。此外，启动子可以是叶特异性启动子， 如来自稻或番茄的rbcs启动子(京冢(Kyozuka)等人，1993，植物生理学 (Plant Physiol.)102:991-1000)、小球藻病毒腺嘌呤甲基转移酶基因启动子(麦卓(Mitra)和希金斯(Higgins)，1994，植物分子生物学26:85-93)、来自稻的aldP基因启动子(加贺屋(Kagaya)等人，1995，分子遗传学与基 因组学(Mol.Gen.Genet.)248:668-674)、或伤口诱导型启动子(如马铃薯 pin2启动子)(许(Xu)等人，1993，植物分子生物学22:573-588)。同样 地，启动子可以通过非生物处理来诱导，如温度、干旱、或盐度变化，或通 过外源施加的激活该启动子的物质来诱导，例如乙醇、雌激素、植物激素 (如乙烯、脱落酸和赤霉酸)、以及重金属。

[0528] 启动子增强子元件也可以用于实现变体在植物中的较高表达。例如，启 动子增强子元件可以是置于启动子与编码变体的多核苷酸之间的内含子。例 如，许(Xu)等人，1993，见上文，披露了使用稻肌动蛋白1基因的第一内含 子以增强表达。

[0529] 该选择性标记基因及该表达构建体的任何其他部分可以选自本领域中可 用的那些。

[0530] 可以根据本领域中已知的常规技术将核酸构建体结合到植物基因组中，这些常规技术包括土壤杆菌介导的转化、病毒介导的转化、微注射、粒子轰 击、生物射弹转化、以及电穿孔(加塞尔(Gasser)等人，1990，科学 (Science)244:1293；波特里库斯(Potrykus)，

1990,生物/技术 (Bio/Technology)8:535;岛本(Shimamoto)等人,1989,自然(Nature)338:274)。

[0531] 目前根癌土壤杆菌介导的基因转移是一种用于产生转基因双子叶植物 (关于综述,请参见霍伊卡(Hooykas)和施尔伯鲁特(Schilperoort), 1992,植物分子生物学(Plant Mol.Biol.)19:15-38)并且用于转化单子叶植 物的方法,但对于这些植物还常常使用其他的转化方法。用于产生转基因单 子叶植物的方法是粒子(涂覆有转化DNA的微观金或钨粒子)轰击胚愈伤组 织或发育中的胚(克里斯托(Christou),1992,植物杂志(Plant J.)2:275- 281;岛本,1994,生物技术当前述评(Curr.Opin.Biotechnol.)5:158-162; 瓦西尔(Vasil)等人,1992,生物/技术10:667-674)。用于转化单子叶植物 的替代方法是基于原生质体转化,如由奥米儒勒(Omirulleh)等人,1993, 植物分子生物学(Plant Mol.Biol.)21:415-428所描述。另外的转化方法包括 US 6395966和US 7151204(两者都通过引用以其全文结合于此)中所描述的 那些。

[0532] 在转化后,根据本领域熟知的方法选出已掺入表达构建体的转化体,并 使其再生成为完整植物。通常设计转化程序用于通过如下方法在再生期间或 在后续世代中选择性消除选择基因:例如,使用带有两个独立的T-DNA构建 体的共转化或利用特异性重组酶位点特异性地切除选择基因。

[0533] 除用本发明的构建体直接转化特定植物基因型外,还可以通过使具有该 构建体的植物与缺乏该构建体的第二植物进行杂交来产生转基因植物。例 如,可以通过杂交将编码变体的构建体引入特定植物品种中,无需总是直接 地转化该给定品种的植物。因此,本发明不仅涵盖了从根据本发明已经转化 的细胞直接再生的植物,而且还涵盖了此类植物的后代。如在此使用的,后 代可以是指根据本发明制备的亲本植物的任何代的后代。此类后代可以包括 根据本发明制备的DNA构建体。杂交导致通过供体植物系与起始系交叉授粉,将转基因引入植物系。此类步骤的非限制性实例描述于US 7151204中。

[0534] 植物可以通过回交转化方法生成。例如,植物包括被称为回交转化的基 因型、种系、近交体、或杂交体的植物。

[0535] 可以使用遗传标记以协助本发明的一种或多种转基因从一个遗传背景渗 入到另一个。标记协助的选择提供了相对于常规育种的优势,在于其可以用 于避免由表型变异导致的错误。另外,遗传标记可以在具体杂交的个别后代 中提供有关良种种质相对程度的数据。例如,当具有所希望性状并且另外具 有非农艺学所希望的遗传背景的植物与良种亲本杂交时,可以使用遗传标记 来选择不仅具有感兴趣的性状,还具有相对较大比例所希望种质的后代。以 此方式,使一种或多种性状渗入特定遗传背景所需的世代数得以最小化。

[0536] 本发明还涉及产生本发明的变体的方法,包括:(a)在有助于产生该变 体的条件下培养包含编码该变体的多核苷酸的转基因植物或植物细胞;并且 (b)回收该变体。

[0537] 通过以下实例进一步描述本发明,这些实例不应当解释为限制本发明的 范围。

[0538] 实施例

[0539] 实例1:实时储存稳定性测定

[0540] 方案A:洗涤剂

[0541] 活性位点滴定后,将纯化的脂肪酶变体用一种缓冲液(10mM琥珀酸+2 mM CaCl2+0.02%Brij 35,调节至pH 6.5)稀释至特定浓度。添加10uL的100 ppm脂肪酶溶液到90uL洗

涤剂组合物中，搅拌5分钟，并且密封。将样品在 4℃储存于洗涤剂D002(无应力)并且在47℃储存于洗涤剂D001或D002中 (具应力)。储存时间是335.5小时。

[0542] 在储存之后，将可能的冷凝液体通过离心收集。向100uL具应力或无应 力样品中添加235uL的缓冲液(0.1M Tris-HCl，9mM CaCl2，0.0225％Brij- 30，pH 8.0+0.85％4-FBPA(31.5g/l))，这对应于3.35倍稀释。10分钟搅拌 之后，将5uL样品等分试样进一步用相同的缓冲液稀释60倍。然后将一份的 此脂肪酶稀释物与四份的0.5mM pNP-棕榈酸盐、1mM氯化钙、100mM Tris (pH 8.0)、6.5mM脱氧胆酸盐、1.4g/L AOS混合，并且持续30分钟光谱光 度计地测量pNP生色团的释放。这被用以通过该反应的初始线性斜率确定活 性。

[0543] 将残余活性计算为具应力样品相较于无应力样品的测量的速度比。基于 四个重复计算残余活性的中值，并且将其通过伴随每个实验设定运行一个脂 肪酶变体参考来标准化。

[0544] 基于下式计算半衰期($T_{1/2}$)：

[0545] 半衰期＝应力时间*ln(0,5)/ln(残余活性)

[0546] 通过将该脂肪酶变体的半衰期除以亲本脂肪酶的半衰期来计算特定突变 的半衰期改进因子(HIF)。

[0547] 在相同条件下在23.25h的孵化时间测定Lipex的半衰期。在D001中残余 活性是6％并且在D002中是20％，分别得到6和10小时的半衰期。

[0548] 方案B:具有蛋白酶的洗涤剂

[0549] 活性位点滴定后，将纯化的脂肪酶变体用一种缓冲液(10mM琥珀酸+ 2mM CaCl2+0.02％Brij 35，调节至pH 6.5)稀释至特定浓度。添加10uL的 100ppm脂肪酶溶液到70uL洗涤剂组合物中，搅拌5分钟，并且密封。将样品 在4℃储存于不具有蛋白酶的洗涤剂D001(无应力)中并且在30℃储存于具 有1.35％赛威蛋白酶(Savinase)16L的洗涤剂D001(具应力)中。储存时间 是160小时。

[0550] 在储存之后，将可能的冷凝液体通过离心收集。向100uL具应力或无应 力样品中添加230uL的缓冲液(0.1M Tris-HCl，9mM CaCl2，0.0225％Brij- 30，pH 8.0+0.85％4-FBPA(31.5g/l))，这对应于3.3倍稀释。5分钟搅拌之 后，将5uL样品等分试样进一步用相同的缓冲液稀释60倍。然后将一份的此 脂肪酶稀释物与四份的0.5mM pNP-棕榈酸盐、1mM氯化钙、100mM Tris (pH8.0)、6.5mM脱氧胆酸盐、1.4g/L AOS混合，并且持续30分钟光谱光度计地测量pNP生色团的释放。这被用以通过该反应的初始线性斜率确定活性。

[0551] 将残余活性计算为具应力样品相较于无应力样品的测量的速度比。基于 四个重复计算残余活性的中值，并且将其通过伴随每个实验设定运行一个脂 肪酶变体参考来标准化。

[0552] 基于下式计算半衰期($T_{1/2}$)：

[0553] 半衰期＝应力时间*ln(0,5)/ln(残余活性)

[0554] 通过将该脂肪酶变体的半衰期除以亲本脂肪酶的半衰期来计算特定突变 的半衰期改进因子(HIF)。

[0555] 在相同条件下在23.25h的孵化时间测定Lipex的半衰期。在具有1.35％赛 威蛋白酶的D001中残余活性是15％，得到8.5小时的半衰期。

[0556] 方案C:具有蛋白酶的洗涤剂

[0557] 基本上按针对方案B所述的进行该方案,除了应力孵化是在25℃下持续 164小时。在这些条件下Lipex具有4%的残余活性和35小时的半衰期。

[0558] 方案D:洗涤剂

[0559] 活性位点滴定后,将纯化的脂肪酶变体用一种缓冲液(10mM琥珀酸+2 mM CaCl2+0.02%Brij 35,调节至pH 6.5)稀释至特定浓度。添加10uL的100 ppm脂肪酶溶液到90uL洗涤剂组合物中,搅拌5分钟,并且密封。将样品在 4℃储存于洗涤剂D002(无应力)并且在47℃储存于洗涤剂D001或D002中 (具应力)。储存时间是13.33小时。

[0560] 在储存之后,将可能的冷凝液体通过离心收集。向100uL具应力或无应 力样品中添加235uL的缓冲液(0.1M Tris-HCl,9mM CaCl2,0.0225%Brij- 30,pH 8.0+0.85%4-FBPA(31.5g/l)),这对应于3.35倍稀释。10分钟搅拌 之后,将5uL样品等分试样进一步用相同的缓冲液稀释60倍。然后将一份的 此脂肪酶稀释物与四份的0.5mM pNP-棕榈酸盐、1mM氯化钙、100mM Tris (pH 8.0)、6.5mM脱氧胆酸盐、1.4g/L AOS混合,并且持续30分钟光谱光 度计地测量pNP生色团的释放。这被用以通过该反应的初始线性斜率确定活 性。

[0561] 将残余活性计算为具应力样品相较于无应力样品的测量的速度比。基于 四个重复计算残余活性的中值,并且将其通过伴随每个实验设定运行一个脂 肪酶变体参考来标准化。

[0562] 基于下式计算半衰期($T_{1/2}$):

[0563] 半衰期=应力时间*ln(0,5)/ln(残余活性)

[0564] 通过将该脂肪酶变体的半衰期除以亲本脂肪酶的半衰期来计算特定突变 的半衰期改进因子(HIF)。

[0565] 方案E:具有蛋白酶的洗涤剂

[0566] 活性位点滴定后,将纯化的脂肪酶变体用一种缓冲液(10mM琥珀酸+2 mM CaCl2+0.02%Brij 35,调节至pH 6.5)稀释至特定浓度。添加10uL的100 ppm脂肪酶溶液到90uL洗涤剂组合物中,搅拌5分钟,并且密封。将样品在 4℃储存于不具有蛋白酶的洗涤剂D001(无应力)中并且在30℃储存于具有 1.35%赛威蛋白酶16L的洗涤剂D001(具应力)中。储存时间是13.33小时。

[0567] 在储存之后,将可能的冷凝液体通过离心收集。向100uL具应力或无应 力样品中添加235ul的缓冲液(0.1M Tris-HCl,9mM CaCl2,0.0225%Brij- 30,pH 8.0+0.85%4-FBPA(31.5g/l)),这对应于3.35倍稀释。5分钟搅拌 之后,将5uL样品等分试样进一步用相同的缓冲液稀释60倍。然后将一份的 此脂肪酶稀释物与四份的0.5mM pNP-棕榈酸盐、1mM氯化钙、100mM Tris (pH 8.0)、6.5mM脱氧胆酸盐、1.4g/L AOS混合,并且持续30分钟光谱光 度计地测量pNP生色团的释放。这被用以通过该反应的初始线性斜率确定活 性。

[0568] 将残余活性计算为具应力样品相较于无应力样品的测量的速度比。基于 四个重复计算残余活性的中值,并且将其通过伴随每个实验设定运行一个脂 肪酶变体参考来标准化。

[0569] 基于下式计算半衰期($T_{1/2}$):

[0570] 半衰期=应力时间*ln(0,5)/ln(残余活性)

[0571] 通过将该脂肪酶变体的半衰期除以亲本脂肪酶的半衰期来计算特定突变 的半衰期改进因子(HIF)。

[0572] 方案F:具有产生的酶变体的培养液在洗涤剂中孵化

[0573] 使产生该脂肪酶变体的米曲霉菌株在37℃在具有2%麦芽糖的2xSC培养 基中不进行摇荡地生长5天。2xSC培养基是15g的不具有氨基酸的酵母氮源 (Difco 291920)、22,6g琥珀酸(默克(Merck)822260)、13,6g氢氧化钠 (默克(Merck)106498)、11,2g酪蛋氨基酸(维生素测定,Difco 228830) 以及0,2g L-色氨酸(默克(Merck)108374),溶解于1L去离子水中。

[0574] 添加10uL的该培养液到90uL洗涤剂组合物中,搅拌5分钟,并且密封。将样品在-20℃储存于洗涤剂D001(无应力)并且在47℃储存于洗涤剂D001 中(具应力)。储存时间示于数据表中。

[0575] 在储存之后,将可能的冷凝液体通过离心收集。向100uL具应力或无应 力样品中添加230uL的缓冲液(0.1M Tris-HCl,9mM CaCl2,0.0225%Brij- 30,pH 8.0+0.85%4-FBPA(31.5g/l)),这对应于3.3倍稀释。10分钟搅拌 之后,将5uL样品等分试样进一步用相同的缓冲液稀释60倍。然后将一份的此 脂肪酶稀释物与四份的0.5mM pNP-棕榈酸盐、1mM氯化钙、100mM Tris (pH8.0)、6.5mM脱氧胆酸盐、1.4g/L AOS混合,并且持续30分钟光谱光度 计地测量pNP生色团的释放。这被用以通过该反应的初始线性斜率确定活性。

[0576] 将残余活性计算为具应力样品相较于无应力样品的测量的速度比。基于 下式计算半衰期($T_{1/2}$):

[0577] 半衰期=应力时间*ln(0,5)/ln(残余活性)

[0578] 基于四个重复计算残余活性的中值和半衰期。

[0579] 通过将该脂肪酶变体的半衰期除以亲本脂肪酶的半衰期来计算特定突变 的半衰期改进因子(HIF)。

[0580] 方案G:具有产生的酶变体的培养液在具有蛋白酶的洗涤剂中孵化

[0581] 添加10uL的来自方案F的培养液到90uL洗涤剂组合物中,搅拌5分钟, 并且密封。将样品在-20℃储存于不具有蛋白酶的洗涤剂D001(无应力)中并 且在30℃储存于具有1.35%赛威蛋白酶(Savinase)16L的洗涤剂D001(具应 力)中。储存时间示于数据表中。

[0582] 在储存之后,将可能的冷凝液体通过离心收集。向100uL具应力或无应 力样品中添加230uL的缓冲液(0.1M Tris-HCl,9mM CaCl2,0.0225%Brij- 30,pH 8.0+0.85%4-FBPA(31.5g/l)),这对应于3.3倍稀释。10分钟搅拌 之后,将5uL样品等分试样进一步用相同的缓冲液稀释60倍。然后将一份的 此脂肪酶稀释物与四份的0.5mM pNP-棕榈酸盐、1mM氯化钙、100mM Tris (pH 8.0)、6.5mM脱氧胆酸盐、1.4g/L AOS混合,并且持续30分钟光谱光 度计地测量pNP生色团的释放。这被用以通过该反应的初始线性斜率确定活 性。

[0583] 将残余活性计算为具应力样品相较于无应力样品的测量的速度比。基于 下式计算半衰期($T_{1/2}$):

[0584] 半衰期=应力时间*ln(0,5)/ln(残余活性)

[0585] 基于四个重复计算残余活性的中值和半衰期。

[0586] 通过将该脂肪酶变体的半衰期除以亲本脂肪酶的半衰期来计算特定突变 的半衰期改进因子(HIF)。

[0587] 表1A:D001的组成

[0588]

组分： （*量基于实际干物质含量）	**wt%**
软水	49.0
NaOH，球粒	3.0
直链烷基磺酸（LAS）	12.0
大豆脂肪酸（埃德诺尔SJ（Edenor SJ））	6.0
可可脂肪酸（Radiacid 0631）	5.0
烷基乙氧基化物C13AE8EO；（90%*）	10.0
三乙醇胺（99/90%*）	2.0
柠檬酸钠（Na-citrate），脱水物	1.0
DTPMPA；二亚乙基三胺五(亚甲基膦酸)（Dequest 2066 C2）	3.0
丙二醇	5.0
EtOH（99,9%*）	5.0
着色剂	添加
遮光剂（Syntran 5909，35 w%*）	0.1
pH	8.4

[0589] 表1B:D002的组成

[0590]

组分： （成分中活性组分的含量）	**wt%**
软水	34.14
NaOH，球粒（>99%）	1.75
直链烷基苯磺酸（LAS）（97%）	12.00
月桂醇醚硫酸钠（SLES）（28%）	17.63
大豆脂肪酸（>90%）	2.75
可可脂肪酸（>90%）	2.75

[0591]

AEO；具有8 mol EO的醇乙氧基化物；Lutensol TO 8（约100%）	11.00
三乙醇胺（100%）	3.33
柠檬酸钠，二水合物（100%）	2.00
DTMPA；二亚乙基三胺五(亚甲基)五(膦酸)，七钠盐（Dequest 2066 C）（约42%为Na7盐）	0.48
MPG（>98%）	6.00
EtOH，丙-2-醇（90/10%）	3.00
甘油（>99.5）	1.71
甲酸钠（>95%）	1.00
PCA（40%为钠盐）	0.46

[0592] 实例2:D27R的稳定作用

[0593] 显示了针对D27R的作用,该变体及其参考脂肪酶以小时计的半衰期（$T_{1/2}$）和得到的半衰期改进因子(HIF)。

[0594] 表2A:根据方案A测定储存稳定性。

[0595]

突变	D001 $T_{1/2}$ (h)	D001 HIF	D002 $T_{1/2}$ (h)	D002 HIF
N33Q G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	370	1.7	123	1.6
D27R N33Q G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	617		192	

[0596] 表2B:根据方案B测定储存稳定性。

[0597]

突变	$T_{1/2}$ (h)	HIF
N33Q G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	64	1.7
D27R N33Q G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	110	

[0598] 表2D:根据方案D测定储存稳定性。

[0599]

突变	D001 $T_{1/2}$ (h)	D001 HIF	D002 $T_{1/2}$ (h)	D002 HIF
T231R N233R	3.3	1.1	13.3	1.4

[0600]

D27R T231R N233R	3.6		18.3	

[0601] 表2E:根据方案E测定储存稳定性。

[0602]

突变	$T_{1/2}$ (h)	HIF
N33Q G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	17.5	1.5
D27R N33Q G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	26.2	

[0603] 表2F-1:根据方案F以63h的储存时间测定储存稳定性。

[0604]

突变	D001 T1/2 (h)	D001 HIF
D96E D111A G163K T231R N233R	7	2.0
D27R D96E D111A G163K T231R N233R	13	

[0605] 表2F-2:根据方案F以331h的储存时间测定储存稳定性。

[0606]

突变	D001 T1/2 (h)	D001 HIF
T231R N233R D254S P256T	189	1.7
D27R T231R N233R D254S P256T	318	

[0607] 表2G:根据方案G以63h的储存时间测定储存稳定性。

[0608]

突变	D001 T1/2 (h)	D001 HIF
D96E D111A T231R N233R	30	1.7
D27R D96E D111A T231R N233R	53*	
D96E D111A G163K T231R N233R	32	11.1
D27R D96E D111A G163K T231R N233R	352	

[0609] *测定自一个重复

[0610] 实例3:N33Q的稳定作用

[0611] 显示了针对N33Q的作用,该变体及其参考脂肪酶以小时计的半衰期 ($T_{1/2}$)和得到的半衰期改进因子(HIF)。

[0612] 表3A:根据方案A测定储存稳定性。

[0613]

突变	D001 $T_{1/2}$ (h)	D001 HIF	D002 $T_{1/2}$ (h)	D002 HIF
D27R G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	503	1.2	178	1.1
D27R **N33Q** G38A G91T D96E D111A G163K	617		192	

[0614]

T231R N233R D254S P256T				

[0615] 表3B:根据方案B测定储存稳定性。

[0616]

突变	$T_{1/2}$ (h)	HIF
D27R G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S	94	1.3
D27R **N33Q** G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S	126	

[0617] 表3C:根据方案C测定储存稳定性。

[0618]

突变	$T_{1/2}$ (h)	HIF
D27R G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	202	3.6
D27R **N33Q** G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	731	

[0619] 表3E:根据方案E测定储存稳定性。

[0620]

突变	$T_{1/2}$ (h)	HIF
D27R G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S	24.0	1.4
D27R **N33Q** G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S	33.3	

[0621] 实例4:G38A的稳定作用

[0622] 显示了针对G38A的作用,该变体及其参考脂肪酶以小时计的半衰期 ($T_{1/2}$) 和得到的半衰期改进因子(HIF)。

[0623] 表4A:根据方案A测定储存稳定性。

[0624]

突变	D001 $T_{1/2}$ (h)	D001 HIF	D002 $T_{1/2}$ (h)	D002 HIF
D27R N33Q G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	29	21.4	43	4.5
D27R N33Q **G38A** G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	617		192	

[0625] 表4B:根据方案B测定储存稳定性。

[0626]

突变	$T_{1/2}$ (h)	HIF
D27R N33Q G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	30	3.6
D27R N33Q **G38A** G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	110	

[0627] 表4D:根据方案D测定储存稳定性。

[0628]

突变	D001 $T_{1/2}$ (h)	D001 HIF	D002 $T_{1/2}$ (h)	D002 HIF
D27R N33Q G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	4.7	**> 8.7**	19.4	**> 2.1**
D27R N33Q **G38A** G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	> 41		> 41	

[0629] 表4E:根据方案E测定储存稳定性。

[0630]

突变	$T_{1/2}$ (h)	HIF
D27R N33Q G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	8.5	3.1
D27R N33Q **G38A** G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	26.2	

[0631] 实例5:G91T的稳定作用

[0632] 显示了针对G91T的作用,该变体及其参考脂肪酶以小时计的半衰期 ($T_{1/2}$)和得到的半衰期改进因子(HIF)。

[0633] 表5A:根据方案A测定储存稳定性。

[0634]

突变	D001 $T_{1/2}$ (h)	D001 HIF	D002 $T_{1/2}$ (h)	D002 HIF
D27R N33Q G38A D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	428	1.4	142	1.3
D27R N33Q G38A **G91T** D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	617		192	
D27R G38A D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	362	1.4	144	1.2
D27R G38A **G91T** D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	503		178	
D27R D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	410	1.5	152	1.3
D27R **G91T** D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	597		196	
D27R G38A D96E G163K T231R N233R D254S P256T	387	1.4	131	1.3
D27R G38A **G91T** D96E G163K T231R N233R D254S P256T	530		172	
D27R G38A D96E D111A G163K T231R N233R D254S	239	1.8	81	1.4

[0635]

D27R G38A **G91T** D96E D111A G163K T231R N233R D254S	421		110	

[0636] 表5D:根据方案D测定储存稳定性。

[0637]

突变	D001 $T_{1/2}$ (h)	D001 HIF	D002 $T_{1/2}$ (h)	D002 HIF
N33Q T231R N233R	3.8	1.3	14.3	1.3
N33Q **G91T** T231R N233R	5.1		18.8	

[0638] 此外,在基本上根据方案A用洗涤剂进行的实验中连同在基本上根据方 案B用具有蛋白酶的洗涤剂进行的实验中观察到取代G91I、G91N、以及G91V 测定为HIF>1的稳定作用。

[0639] 表5F-1:根据方案F以63h的储存时间测定储存稳定性。

[0640]

突变	D001 T1/2 (h)	D001 HIF
D96E D111A T231R N233R	21	1.1
G91T D96E D111A T231R N233R	24	

[0641] 表5F-2:根据方案F以331h的储存时间测定储存稳定性。

[0642]

突变	D001 T1/2 (h)	D001 HIF
T231R N233R D254S P256T	189	3.1
G91T T231R N233R D254S P256T	584	

[0643] 表5G-1:根据方案G以18h的储存时间测定储存稳定性。

[0644]

突变	D001 T1/2 (h)	D001 HIF
T231R N233R D254S P256T	10	1.3
G91T T231R N233R D254S P256T	13	

[0645] 表5G-2:根据方案G以63h的储存时间测定储存稳定性。

[0646]

突变	D001 T1/2 (h)	D001 HIF
D96E D111A T231R N233R	30	1.4
G91T D96E D111A T231R N233R	44	

[0647] 实例6:D96E的稳定作用

[0648] 显示了针对D96E的作用,该脂肪酶变体及其参考脂肪酶以小时计的半衰 期($T_{1/2}$)和得到的半衰期改进因子(HIF)。

[0649] 表6B:根据方案B测定储存稳定性。

[0650]

突变	$T_{1/2}$ (h)	HIF
D27R N33Q G38A G91T D111A G163K T231R N233R D254S P256T	< 21	> 5.2
D27R N33Q G38A G91T **D96E** D111A G163K T231R N233R D254S P256T	110	
D27R G38A D111A G163K T231R N233R D254S P256T	34	3.6
D27R G38A **D96E** D111A G163K T231R N233R D254S P256T	125	
D27R D111A G163K T231R N233R D254S P256T	47	2.6
D27R **D96E** D111A G163K T231R N233R D254S P256T	124	

[0651] 表6C:根据方案C测定储存稳定性。

[0652]

突变	$T_{1/2}$ (h)	HIF
D27R G163K T231R N233R D254S	40	2.4
D27R **D96E** G163K T231R N233R D254S	96	
G163K T231R N233R D254S	35	2.1
D96E G163K T231R N233R D254S	75	
T231R N233R	39	1.6
D96E T231R N233R	64	
T231R N233R D254S	30	2.4
D96E T231R N233R D254S	70	

[0653] 表6D:根据方案D测定储存稳定性。

[0654]

突变	D001 $T_{1/2}$ (h)	D001 HIF	D002 $T_{1/2}$ (h)	D002 HIF
D27R G38A D111A G163K T231R N233R D254S P256T	-	-	22.4	> 1.8
D27R G38A **D96E** D111A G163K T231R N233R D254S P256T	-		> 41	
D27R D111A G163K T231R N233R D254S P256T	4.4	> 9.3	24.6	> 1.7
D27R **D96E** D111A G163K T231R N233R D254S P256T	> 41		> 41	
N33Q T231R N233R	3.8	1.1	14.3	1.7
N33Q **D96E** T231R N233R	4.1		24.9	

[0655] 表6E:根据方案E测定储存稳定性。

[0656]

突变	$T_{1/2}$ (h)	HIF
D27R N33Q G38A G91T D111A G163K T231R N233R D254S P256T	8.8	3.0
D27R N33Q G38A G91T **D96E** D111A G163K T231R N233R D254S P256T	26.2	
D27R G38A D111A G163K T231R N233R D254S P256T	10.8	> 3.8
D27R G38A **D96E** D111A G163K T231R N233R D254S P256T	> 41	
D27R D111A G163K T231R N233R D254S P256T	10.7	3.5
D27R **D96E** D111A G163K T231R N233R D254S P256T	37.2	
N33Q T231R N233R	5.5	1.8
N33Q **D96E** T231R N233R	9.7	

[0657]

[0658] 表6F-1:根据方案F以63h的储存时间测定储存稳定性。

[0659]

突变	D001 T1/2 (h)	D001 HIF
T231R N233R	7	6.6
D96E T231R N233R	49	
D111A T231R N233R	13	1.7
D96E D111A T231R N233R	21	

[0660] 表6F-2:根据方案F以331h的储存时间测定储存稳定性。

[0661]

突变	D001 T1/2 (h)	D001 HIF
T231R N233R D254S P256T	189	1.5
D96E T231R N233R D254S P256T	285	

[0662] 表6G-1:根据方案G以18h的储存时间测定储存稳定性。

[0663]

突变	D001 T1/2 (h)	D001 HIF
T231R N233R D254S P256T	10	3.5
D96E T231R N233R D254S P256T	34	

[0664] 表6G-2:根据方案G以63h的储存时间测定储存稳定性。

[0665]

突变	D001 T1/2 (h)	D001 HIF
T231R N233R	12	2.0
D96E T231R N233R	24	
D111A T231R N233R	15	2.0
D96E D111A T231R N233R	30	
D111A G163K T231R N233R D254S P256T	14	5.4
D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	74	

[0666] 实例7:D111A的稳定作用

[0667] 显示了针对D111A的作用,该变体及其参考脂肪酶以小时计的半衰期 ($T_{1/2}$) 和得到的半衰期改进因子(HIF)。

[0668] 表7A:根据方案A测定储存稳定性。

[0669]

突变	D001 $T_{1/2}$ (h)	D001 HIF	D002 $T_{1/2}$ (h)	D002 HIF
D27R N33Q G38A G91T D96E G163K T231R N233R D254S P256T	513	1.2	163	1.2
D27R N33Q G38A G91T D96E **D111A** G163K T231R N233R D254S P256T	617		192	

[0670] 表7B:根据方案B测定储存稳定性。

[0671]

突变	$T_{1/2}$ (h)	HIF
D27R N33Q G38A G91T D96E G163K T231R N233R D254S P256T	65	1.7
D27R N33Q G38A G91T D96E **D111A** G163K T231R N233R D254S P256T	110	
D27R G38A G91T D96E G163K T231R N233R D254S P256T	63	1.8
D27R G38A G91T D96E **D111A** G163K T231R N233R D254S P256T	116	
D27R G38A D96E G163K T231R N233R D254S P256T	62	2.0
D27R G38A D96E **D111A** G163K T231R N233R D254S P256T	125	
D27R D96E G163K T231R N233R D254S P256T	87	1.4
D27R D96E **D111A** G163K T231R N233R D254S P256T	124	

[0672] 表7C:根据方案C测定储存稳定性。

[0673]

突变	$T_{1/2}$ (h)	HIF
D27R G38A D96E G163K T231R N233R D254S P256T	111	4.1
D27R G38A D96E **D111A** G163K T231R N233R D254S P256T	452	
D27R G38A G91T D96E G163K T231R N233R D254S P256T	133	1.3
D27R G38A G91T D96E **D111A** G163K T231R N233R D254S P256T	168	

[0674] 表7E:根据方案E测定储存稳定性。

[0675]

突变	$T_{1/2}$ (h)	HIF
D27R N33Q G38A G91T D96E G163K T231R N233R D254S P256T	20.7	1.3
D27R N33Q G38A G91T D96E **D111A** G163K T231R N233R D254S P256T	26.2	

[0676]

D27R G38A G91T D96E G163K T231R N233R D254S P256T	27.9	> 1.5
D27R G38A G91T D96E **D111A** G163K T231R N233R D254S P256T	> 41	
D27R G38A D96E G163K T231R N233R D254S P256T	24.8	> 1.7
D27R G38A D96E **D111A** G163K T231R N233R D254S P256T	> 41	
D27R D96E G163K T231R N233R D254S P256T	21.2	1.8
D27R D96E **D111A** G163K T231R N233R D254S P256T	37.2	
N33Q T231R N233R	5.5	1.3
N33Q **D111A** T231R N233R	7.2	

[0677] 表7F-1:根据方案F以63h的储存时间测定储存稳定性。

[0678]

突变	D001 T1/2 (h)	D001 HIF
T231R N233R	7	1.7
D111A T231R N233R	13	

[0679] 表7F-2:根据方案F以331h的储存时间测定储存稳定性。

[0680]

突变	D001 T1/2 (h)	D001 HIF
T231R N233R D254S P256T	189	2.0
D111A T231R N233R D254S P256T	379	
D96E G163K T231R N233R D254S P256T	206*	1.3
D96E **D111A** G163K T231R N233R D254S P256T	264	

[0681] *测定自两个重复

[0682] 表7G-1:根据方案G以18h的储存时间测定储存稳定性。

[0683]

突变	D001 T1/2 (h)	D001 HIF
T231R N233R D254S P256T	10	1.8
D111A T231R N233R D254S P256T	17	

[0684] 表7G-2:根据方案G以63h的储存时间测定储存稳定性。

[0685]

突变	D001 T1/2 (h)	D001 HIF
T231R N233R	12	1.3
D111A T231R N233R	15	
D96E T231R N233R	24	1.3
D96E **D111A** T231R N233R	30	
D96E G163K T231R N233R D254S P256T	25*	3.0

[0686]

D96E **D111A** G163K T231R N233R D254S P256T	74	

[0687] *测定自两个重复

[0688] 实例8:G163K的稳定作用

[0689] 表8A:根据方案A测定储存稳定性。

[0690]

突变	D001 $T_{1/2}$ (h)	D001 HIF	D002 $T_{1/2}$ (h)	D002 HIF
D27R N33Q G38A G91T D96E D111A T231R N233R D254S P256T	114	5.4	78	2.5
D27R N33Q G38A G91T D96E D111A **G163K** T231R N233R D254S P256T	617		192	

[0691] 表8B:根据方案B测定储存稳定性。

[0692]

突变	$T_{1/2}$ (h)	HIF
D27R N33Q G38A G91T D96E D111A T231R N233R D254S P256T	54	2.0
D27R N33Q G38A G91T D96E D111A **G163K** T231R N233R D254S P256T	110	

[0693] 表8D:根据方案D测定储存稳定性。

[0694]

突变	D001 $T_{1/2}$ (h)	D001 HIF	D002 $T_{1/2}$ (h)	D002 HIF
D27R N33Q G38A G91T D96E D111A T231R N233R D254S P256T	6.9	> 6.0	21.8	> 1.9
D27R N33Q G38A G91T D96E D111A **G163K** T231R N233R D254S P256T	> 41		> 41	

[0695] 表8E:根据方案E测定储存稳定性。

[0696]

突变	$T_{1/2}$ (h)	HIF
D27R N33Q G38A G91T D96E D111A T231R N233R D254S P256T	10.4	2.5
D27R N33Q G38A G91T D96E D111A **G163K** T231R N233R D254S P256T	26.2	
D27R G38A D96E D111A T231R N233R D254S P256T	32.6	1.3
D27R G38A D96E D111A **G163K** T231R N233R D254S P256T	> 41	

[0697] 实例9:D254S的稳定作用

[0698] 显示了针对D254S的作用,该变体及其参考脂肪酶以小时计的半衰期 ($T_{1/2}$) 和得到的半衰期改进因子(HIF)。

[0699] 表9A:根据方案A测定储存稳定性。

[0700]

突变	D001 $T_{1/2}$ (h)	D001 HIF	D002 $T_{1/2}$ (h)	D002 HIF
D27R N33Q G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R P256T	143	4.3	91	2.1
D27R N33Q G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R **D254S** P256T	617		192	
D27R G38A D96E D111A G163K T231R N233R P256T	62	5.8	< 41	> 3.5
D27R G38A D96E D111A G163K T231R N233R **D254S** P256T	362		144	
D27R D96E D111A G163K T231R N233R P256T	87	4.7	53	2.8
D27R D96E D111A G163K T231R N233R **D254S** P256T	410		152	
T231R N233R	3.3	32.7	13.3	3.8
T231R N233R **D254S**	108		50	

[0701] 表9B:根据方案B测定储存稳定性。

[0702]

突变	$T_{1/2}$ (h)	HIF
D27R N33Q G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R P256T	79	1.4
D27R N33Q G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R **D254S** P256T	110	
D27R G38A D96E D111A G163K T231R N233R P256T	66	1.9
D27R G38A D96E D111A G163K T231R N233R **D254S** P256T	125	
D27R D96E D111A G163K T231R N233R P256T	107	1.2
D27R D96E D111A G163K T231R N233R **D254S** P256T	124	

[0703] 表9D:根据方案D测定储存稳定性。

[0704]

突变	D001 $T_{1/2}$ (h)	D001 HIF
D27R N33Q G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R P256T	14.3	> 2.9
D27R N33Q G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R **D254S** P256T	> 41	
D27R G38A D96E D111A G163K T231R N233R P256T	6.5	> 6.3
D27R G38A D96E D111A G163K T231R N233R **D254S** P256T	> 41	
D27R D96E D111A G163K T231R N233R P256T	7.6	> 5.4
D27R D96E D111A G163K T231R N233R **D254S** P256T	> 41	
T231R N233R	3.3	3.6
T231R N233R **D254S**	11.8	

[0705] 表9E:根据方案E测定储存稳定性。

[0706]

突变	T1/2 (h)	HIF
D27R G38A D96E D111A G163K T231R N233R P256T	27.1	> 1.5
D27R G38A D96E D111A G163K T231R N233R **D254S** P256T	> 41	
D27R D96E D111A G163K T231R N233R P256T	24.0	1.6
D27R D96E D111A G163K T231R N233R **D254S** P256T	37.2	

[0707] 表9F:根据方案F以63h的储存时间测定储存稳定性。

[0708]

突变	D001 T1/2 (h)	D001 HIF
D96E D111A T231R N233R	21	1.5
D96E D111A T231R N233R **D254S**	32	
T231R N233R	7	4.8
T231R N233R **D254S**	35	
T231R N233R P256T	32	6.0
T231R N233R **D254S** P256T	189*	
D96E D111A G163K T231R N233R P256T	17	15.9
D96E D111A G163K T231R N233R **D254S** P256T	264*	

[0709] *储存时间331小时

[0710] 表9G-1:根据方案G以18h的储存时间测定储存稳定性。

[0711]

突变	D001 T1/2 (h)	D001 HIF
T231R N233R	10	1.8
T231R N233R **D254S**	17	

[0712] 表9G-2:根据方案G以63h的储存时间测定储存稳定性。

[0713]

突变	D001 T1/2 (h)	D001 HIF
D96E D111A T231R N233R	30	3.5
D96E D111A T231R N233R **D254S**	105	
D96E D111A G163K T231R N233R P256T	30	2.4
D96E D111A G163K T231R N233R **D254S** P256T	74	

[0714] 实例10:P256T的稳定作用

[0715] 显示了针对P256T的作用,该脂肪酶变体及其参考脂肪酶以小时计的半 衰期($T_{1/2}$)和得到的半衰期改进因子(HIF)。

[0716] 表10A:根据方案A测定储存稳定性。

[0717]

突变	D001 $T_{1/2}$ (h)	D001 HIF	D002 $T_{1/2}$ (h)	D002 HIF
D27R G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S	421	1.2	110	1.6
D27R G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S **P256T**	503		178	
D27R G38A D96E D111A G163K T231R N233R D254S	239	1.5	81	1.8
D27R G38A D96E D111A G163K T231R N233R D254S **P256T**	362		144	
D27R N33Q G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S	315	2.0	89	2.2
D27R N33Q G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S **P256T**	617		192	
T231R N233R D254S	108	3.1	50	2.4
T231R N233R D254S **P256T**	339		120	

[0718] 表10B:根据方案B测定储存稳定性。

[0719]

突变	$T_{1/2}$ (h)	HIF
D27R G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S	94	1.2
D27R G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S **P256T**	116	
D27R G38A D96E D111A G163K T231R N233R D254S	97	1.3
D27R G38A D96E D111A G163K T231R N233R D254S **P256T**	125	
D27R D96E D111A G163K T231R N233R D254S	116	1.1
D27R D96E D111A G163K T231R N233R D254S **P256T**	124	

[0720] 表10D:根据方案D测定储存稳定性。

[0721]

突变	D001 $T_{1/2}$ (h)	D001 HIF	D002 $T_{1/2}$ (h)	D002 HIF
D27R G38A D96E D111A G163K T231R N233R D254S	30.2	> 1.4	-	-
D27R G38A D96E D111A G163K T231R N233R D254S **P256T**	> 41		-	
D27R N33Q G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S	27.8	> 1.5	-	-
D27R N33Q G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S **P256T**	> 41		-	
T231R N233R D254S	11.8	3.0	14.0	1.2
T231R N233R D254S **P256T**	34.9		16.6	

[0722] 表10E:根据方案E测定储存稳定性。

[0723]

突变	$T_{1/2}$ (h)	HIF
D27R G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S	24.0	> 1.8
D27R G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S **P256T**	> 41	
T231R N233R D254S	5.7	1.3
T231R N233R D254S **P256T**	7.3	

[0724] 表10F:根据方案F以63h的储存时间测定储存稳定性。

[0725]

突变	D001 T1/2 (h)	D001 HIF
T231R N233R	7	4.3
T231R N233R **P256T**	32	
T231R N233R D254S	35	2.4
T231R N233R D254S **P256T**	86	
D96E D111A G163K T231R N233R	7	2.4
D96E D111A G163K T231R N233R **P256T**	17	

[0726] 表10G-1:根据方案G以18h的储存时间测定储存稳定性。

[0727]

突变	D001 T1/2 (h)	D001 HIF
T231R N233R	10	4.2
T231R N233R **P256T**	41	

[0728] 表10G-2:根据方案G以63h的储存时间测定储存稳定性。

[0729]

突变	D001 T1/2 (h)	D001 HIF
D96E D111A T231R N233R	30	2.6
D96E D111A T231R N233R **P256T**	81	

[0730] 实例11:D254S和P256T的稳定作用

[0731] 显示了针对D254S和P256T的作用,该变体及其参考脂肪酶以小时计的半 衰期

($T_{1/2}$)和得到的半衰期改进因子(HIF)。

[0732] 表11A:根据方案A测定储存稳定性。

[0733]

突变	D001 $T_{1/2}$ (h)	D001 HIF	D002 $T_{1/2}$ (h)	D002 HIF
D27R D96E G163K T231R N233R	< 29	> 14.6	< 37	> 3.8
D27R D96E G163K T231R N233R **D254S P256T**	417		141	

[0734]

T231R N233R	3.3	102.7	13,3	9.0
T231R N233R **D254S P256T**	339		120	

[0735] 表11D:根据方案D测定储存稳定性。

[0736]

突变	D001 $T_{1/2}$ (h)	D001 HIF
D27R D96E G163K T231R N233R	3.3	> 12.5
D27R D96E G163K T231R N233R D254S P256T	> 41	

[0737] 表11F:根据方案F以指定的储存时间测定储存稳定性。

[0738]

突变	D001 T1/2 (h)	D001 HIF	应力时间 (h)
D96E D111A G163K T231R N233R	7	38.8	63
D96E D111A G163K T231R N233R **D254S P256T**	264		331
T231R N233R	7	28.0	63
T231R N233R **D254S P256T**	206		331
D96E T231R N233R	49	5.9	63
D96E T231R N233R **D254S P256T**	285		331
D111A T231R N233R	13	30.3	63
D111A T231R N233R **D254S P256T**	379		331

[0739] 实例12:相较于T231R N233R改进的稳定性

[0740] 显示了该脂肪酶变体以小时计的半衰期($T_{1/2}$)和得到的针对具有T231R N233R突变的脂肪酶变体的半衰期改进因子(HIF)。

[0741] 表12A:根据方案A测定储存稳定性。

[0742]

突变	D001 $T_{1/2}$ (h)	D001 HIF	D002 $T_{1/2}$ (h)	D002 HIF
D27R G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	597	181	196	14.7
D27R N33Q G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	617	187	192	14.4
D27R N33Q G38A G91T D111A G163K T231R N233R D254S P256T	580	176	184	13.8
D27R G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	503	152	178	13.4
D27R G38A G91T D96E G163K T231R N233R D254S P256T	530	161	172	12.9
D27R N33Q G38A G91T D96E G163K T231R N233R D254S P256T	513	155	163	12.3
D27R D96E D111A G163D T231R N233R D254S	465	141	157	11.8

	P256T				
	D27R D96E D111A G163K T231R N233R D254S	437	132	157	11.8
	D27R D111A G163K T231R N233R D254S P256T	474	144	150	11.3
	D27R D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	410	124	152	11.4
	D27R G38A D111A G163K T231R N233R D254S P256T	439	133	150	11.3
	D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	409	124	148	11.1
	D27R N33Q G38A D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	428	130	142	10.7
	D27R D96E G163K T231R N233R D254S P256T	417	126	141	10.6
	D27R G38A D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	362	110	144	10.8
	D27R G38A D96E D111A T231R N233R D254S P256T	380	115	139	10.5
	T231R N233R D254S P256T	339	103	120	9.0
[0743]	D27R G38A D96E G163K T231R N233R D254S P256T	387	117	131	9.8
	N33Q G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	370	112	123	9.2
	D27R G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S	421	128	110	8.3
	D27R N33Q G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S	315	95	89	6.7
	D27R G38A D96E D111A G163K T231R N233R D254S	239	72	81	6.1
	G163K T231R N233R D254S	122	37	54	4.1
	N33Q G38A G91T G163K T231R N233R D254S	107	32	55	4.1
	D27R N33Q G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R P256T	143	43	91	6.8
	T231R N233R D254S	108	33	50	3.8
	D27R N33Q G38A G91T D96E D111A T231R N233R D254S P256T	114	35	78	5.9
	T231R N233R	3.3	1	13.3	1

[0744] 表12B:根据方案B测定储存稳定性。

[0745]	**突变**	**$T_{1/2}$ (h)**	**HIF**
	D27R G38A D96E D111A T231R N233R D254S P256T	137	24.5
	D27R D96E D111A G163D T231R N233R D254S P256T	128	22.9
	D27R N33Q G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S	126	22.5
	D27R G38A D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	125	22.3
	D27R D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	124	22.1

[0746]

D27R N33Q G38A D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	119	21.3
D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	118	21.1
D27R G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	116	20.7
D27R G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	116	20.7
D27R D96E D111A G163K T231R N233R D254S	116	20.7
D27R N33Q G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	110	19.6
D27R D96E D111A G163K T231R N233R P256T	107	19.1
D27R G38A D96E D111A G163K T231R N233R D254S	97	17.3
D27R G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S	94	16.8
D27R D96E G163K T231R N233R D254S P256T	87	15.5
D27R N33Q G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R P256T	79	14.1
D27R D96E G163K T231R N233R	74	13.2
D27R G38A D96E D111A G163K T231R N233R P256T	66	11.8
D27R N33Q G38A G91T D96E G163K T231R N233R D254S P256T	65	11.6
N33Q G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	64	11.4
D27R G38A G91T D96E G163K T231R N233R D254S P256T	63	11.3
D27R G38A D96E G163K T231R N233R D254S P256T	62	11.1
D27R N33Q G38A G91T D96E D111A T231R N233R D254S P256T	54	9.6
D27R D111A G163K T231R N233R D254S P256T	47	8.4
N33Q D96E T231R N233R	44	7.9
D27R G38A D111A G163K T231R N233R D254S P256T	34	6.1
T231R N233R D254S P256T	33	5.9
T231R N233R	5.6	1.0

[0747] 表12D:根据方案D测定储存稳定性。

[0748]

突变	D001 $T_{1/2}$ (h)	D001 HIF	D002 $T_{1/2}$ (h)	D002 HIF
D27R G38A D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	> 41	> 12.4	> 41	> 3.1
D27R D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	> 41	> 12.4	> 41	> 3.1
D27R G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	> 41	> 12.4	> 41	> 3.1
D27R D96E D111A G163D T231R N233R D254S P256T	37.2	11.3	> 41	> 3.1
D27R G91T D96E D111A G163K T231R N233R	> 41	> 12.4	> 41	> 3.1

[0749]

D254S P256T				
D27R N33Q G38A D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	> 41	> 12.4	> 41	> 3.1
D27R G38A D96E D111A G163K T231R N233R D254S	30.2	9.2	> 41	> 3.1
D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	> 41	> 12.4	> 41	> 3.1
D27R N33Q G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S	27.8	8.4	> 41	> 3.1
D27R G38A D96E D111A T231R N233R D254S P256T	> 41	> 12.4	> 41	> 3.1
D27R D96E D111A G163K T231R N233R D254S	> 41	> 12.4	> 41	> 3.1
D27R D96E D111A G163K T231R N233R P256T	7.6	2.3	> 41	> 3.1
D27R D96E G163K T231R N233R D254S P256T	> 41	> 12.4	> 41	> 3.1
D27R N33Q G38A G91T D96E G163K T231R N233R D254S P256T	> 41	> 12.4	> 41	> 3.1
D27R G38A D96E D111A G163K T231R N233R P256T	6.5	2.0	> 41	> 3.1
D27R G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S	38.4	11.6	> 41	> 3.1
D27R G38A D96E G163K T231R N233R D254S P256T	40.6	12.3	> 41	> 3.1
D27R N33Q G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R P256T	14.3	4.3	> 41	> 3.1
D27R G38A G91T D96E G163K T231R N233R D254S P256T	> 41	> 12.4	> 41	> 3.1
D27R N33Q G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	> 41	> 12.4	> 41	> 3.1
D27R D96E G163K T231R N233R	3.3	1.0	> 41	> 3.1
N33Q G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	> 41	> 12.4	> 41	> 3.1
N33Q D96E T231R N233R	4.1	1.2	24.9	1.9
D27R D111A G163K T231R N233R D254S P256T	4.4	1.3	24.6	1.9
D27R N33Q G38A G91T D111A G163K T231R N233R D254S P256T	> 41	> 12.4	23.9	1.8
D27R G38A D111A G163K T231R N233R D254S P256T	> 41	> 12.4	22.4	1.7
D27R N33Q G38A G91T D96E D111A T231R N233R D254S P256T	6.9	2.1	21.8	1.6
D27R N33Q G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	4.7	1.4	19.4	1.5
N33Q G91T T231R N233R	5.1	1.5	18.8	1.4
D27R T231R N233R	3.6	1.1	18.3	1.4
N33Q D111A T231R N233R	4.0	1.2	17.2	1.3
N33Q G38A G91T G163K T231R N233R D254S	8.1	2.4	17.0	1.3
T231R N233R D254S P256T	34.9	10.6	16.6	1.2

	G163K T231R N233R D254S	12.4	3.8	15.4	1.2
	N33Q T231R N233R P256T	4.3	1.3	14.4	1.1
[0750]	N33Q T231R N233R	3.8	1.2	14.3	1.1
	T231R N233R D254S	11.8	3.6	14.0	1.1
	T231R N233R	3.3	1.0	13.3	1.0

[0751] 表12E:根据方案E测定储存稳定性。

突变	$T_{1/2}$ (h)	HIF
D27R G38A D96E D111A G163K T231R N233R D254S	> 41	> 7.3
D27R N33Q G38A D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	> 41	> 7.3
D27R G38A D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	> 41	> 7.3
D27R G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	> 41	> 7.3
D27R D96E D111A G163K T231R N233R D254S	40.0	7.2
D27R G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	37.3	6.7
D27R D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	37.2	6.6
D27R D96E D111A G163D T231R N233R D254S P256T	33.9	6.0
D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	33.6	6.0
D27R N33Q G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S	33.3	6.0
D27R G38A D96E D111A T231R N233R D254S P256T	32.6	5.8
D27R G38A G91T D96E G163K T231R N233R D254S P256T	27.9	5.0
D27R G38A D96E D111A G163K T231R N233R P256T	27.1	4.8
[0752] D27R N33Q G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R P256T	26.3	4.7
D27R N33Q G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	26.2	4.7
D27R G38A D96E G163K T231R N233R D254S P256T	24.8	4.4
D27R G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S	24.0	4.3
D27R D96E D111A G163K T231R N233R P256T	24.0	4.3
D27R D96E G163K T231R N233R D254S P256T	21.2	3.8
D27R N33Q G38A G91T D96E G163K T231R N233R D254S P256T	20.7	3.7
D27R D96E G163K T231R N233R	19.3	3.5
D27R D96E G163K T231R N233R D254S P256T	17.9	3.2
N33Q G38A G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	17.5	3.1
D27R G38A D111A G163K T231R N233R D254S P256T	10.8	1.9
D27R D111A G163K T231R N233R D254S P256T	10.7	1.9
D27R N33Q G38A G91T D96E D111A T231R N233R D254S P256T	10.4	1.9
N33Q D96E T231R N233R	9.7	1.7

[0753]

D27R N33Q G38A G91T D111A G163K T231R N233R D254S P256T	8.8	1.6
D27R N33Q G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	8.5	1.5
T231R N233R D254S P256T	7.3	1.3
N33Q D111A T231R N233R	7.2	1.3
D27R T231R N233R	6.6	1.2
N33Q T231R N233R P256T	6.5	1.2
T231R N233R D254S	5.7	1.0
T231R N233R	5.6	1.0

[0754] 表12F:根据方案F以指定的储存时间测定储存稳定性。

[0755]

突变	D001 T1/2 (h)	D001 HIF	应力时间 (h)
G91T T231R N233R D254S P256T	584	79.3	331
D111A G163K T231R N233R D254S P256T	381	51.7	331
D111A T231R N233R D254S P256T	379	51.4	331
D27R N33Q G38A D96E D111A T231R N233R D254S P256T	372	50.5	331
D27R T231R N233R D254S P256T	318	43.1	331
D96E T231R N233R D254S P256T	285	38.6	331
D27R G38A D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	284	38.5	331
D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	264	35.8	331
G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	262	35.6	331
N33Q D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	248	33.7	331
D96E G163K T231R N233R D254S P256T	206	27.9	331
T231R N233R D254S P256T	189	25.7	331
G163K T231R N233R D254S	88	12.0	331
D96E T231R N233R	49	6.6	63
T231R N233R D254S	35	4.8	63
D96E D111A T231R N233R D254S	32	4.4	63
T231R N233R P256T	32	4.3	63
G91T D96E D111A T231R N233R	24	3.2	63
D96E D111A T231R N233R	21	2.9	63
D96E D111A G163K T231R N233R P256T	17	2.2	63
D27R D96E D111A G163K T231R N233R	13	1.8	63
D111A T231R N233R	13	1.7	63
T231R N233R	7	1.0	63

[0756] 表12G:根据方案F以指定的储存时间测定储存稳定性。选择以63h储存时间 测定的具有T231R N233R突变的脂肪酶变体的半衰期。

[0757]

突变	D001 T1/2 (h)	D001 HIF	应力时间 (h)
D27R N33Q G38A D96E D111A T231R N233R D254S P256T	384	33.0	162
D27R D96E D111A G163K T231R N233R	352	30.2	63
D27R G38A D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	324	27.8	63
D96E D111A T231R N233R D254S	105	9.0	63
D96E D111A T231R N233R P256T	81	6.9	63
D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	74	6.3	63
D27R D96E D111A T231R N233R	53*	4.6	63
G91T D96E D111A T231R N233R	44	3.7	63
T231R N233R P256T	41	3.5	18
G91T D96E T231R N233R	38	3.3	63
N33Q D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	35	3.0	63
D96E T231R N233R D254S P256T	34	2.9	18
G91T D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T	33	2.9	63
D96E D111A G163K T231R N233R	32	2.7	63
D96E D111A T231R N233R	30	2.6	63
D96E D111A G163K T231R N233R P256T	30	2.6	63
D96E T231R N233R P256T	27	2.3	63
D96E G163K T231R N233R D254S P256T	25**	2.1	63
G38A D96E D111A T231R N233R	24	2.1	63
D96E T231R N233R	24	2.0	63
T231R N233R D254S	17	1.5	18
D111A T231R N233R D254S P256T	17	1.5	18
D111A T231R N233R	15	1.3	63
D111A G163K T231R N233R D254S P256T	14	1.2	63
G91T T231R N233R D254S P256T	13	1.1	18
T231R N233R	12	1.0	63
T231R N233R	10	0.8	18

[0758] *测定自一个重复,**测定自两个重复

[0759] 实例13:D96E和D111A的稳定作用

[0760] 显示了针对D96E和D111A的作用,该变体及其参考脂肪酶以小时计的半 衰期($T_{1/2}$)和得到的半衰期改进因子(HIF)。

[0761] 表13G:根据方案G以指定的储存时间测定储存稳定性。

[0762]

突变	D001 T1/2 (h)	D001 HIF	应力时间 (h)

[0763]

T231R N233R	12	2.6	63
D96E D111A T231R N233R	30		63
T231R N233R D254S	17	6.1	18
D96E D111A T231R N233R D254S	105		63
T231R N233R P256T	41	2.0	18
D96E D111A T231R N233R P256T	81		63

[0764] 在此描述并且要求的本发明不限于在此披露的具体方面的范围,因为这 些方面意图作为本发明若干方面的说明。预期任何等效方面都处于本发明的 范围内。实际上,除在此所示和描述的那些之外,本发明的不同修改对于本 领域普通技术人员而言从前述描述将变得清楚。此类修改也旨在落入所附权 利要求书的范围内。在有冲突的情况下,以包括定义的本披露为准。

序列表

<110> 诺维信公司(Novozymes A/S)

<120> 洗涤剂组合物

<130> 12500-WO-PCT

<160> 2

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 807

<212> DNA

<213> 疏棉状嗜热丝孢菌

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(807)

<220>

<221> 成熟肽

<222> (1)..(807)

<400> 1

```
gag gtc tcg cag gat ctg ttt aac cag ttc aat ctc ttt gca cag tat 48
Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe Asn Leu Phe Ala Gln Tyr
1               5                  10                  15
tct gca gcc gca tac tgc gga aaa aac aat gat gcc cca gct ggt aca 96
Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn Asp Ala Pro Ala Gly Thr
            20                  25                  30
aac att acg tgc acg gga aat gcc tgc ccc gag gta gag aag gcg gat 144
Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro Glu Val Glu Lys Ala Asp
        35                  40                  45
gca acg ttt ctc tac tcg ttt gaa gac tct gga gtg ggc gat gtc acc 192
Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser Gly Val Gly Asp Val Thr
    50                  55                  60
ggc ttc ctt gct ctc gac aac acg aac aaa ttg atc gtc ctc tct ttc 240
Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys Leu Ile Val Leu Ser Phe
65                  70                  75                  80
cgt ggc tct cgt tcc ata gag aac tgg atc ggg aat ctt aac ttc gac 288
Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile Gly Asn Leu Asn Phe Asp
                85                  90                  95
ttg aaa gaa ata aat gac att tgc tcc ggc tgc agg gga cat gac ggc 336
Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly Cys Arg Gly His Asp Gly
            100                 105                 110
```

ttc act tcg tcc tgg agg tct gta gcc gat acg tta agg cag aag gtg 384
Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp Thr Leu Arg Gln Lys Val
115 120 125
gag gat gct gtg agg gag cat ccc gac tat cgc gtg gtg ttt acc gga 432
Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr Arg Val Val Phe Thr Gly
130 135 140
cat agc ttg ggt ggt gca ttg gca act gtt gcc gga gca gac ctg cgt 480
His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val Ala Gly Ala Asp Leu Arg
145 150 155 160
gga aat ggg tat gat atc gac gtg ttt tca tat ggc gcc ccc cga gtc 528
Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser Tyr Gly Ala Pro Arg Val
165 170 175
gga aac agg gct ttt gca gaa ttc ctg acc gta cag acc ggc gga aca 576
Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr Val Gln Thr Gly Gly Thr
180 185 190
ctc tac cgc att acc cac acc aat gat att gtc cct aga ctc ccg ccg 624
Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile Val Pro Arg Leu Pro Pro
195 200 205
cgc gaa ttc ggt tac agc cat tct agc cca gag tac tgg atc aaa tct 672
Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Lys Ser
210 215 220
gga acc ctt gtc ccc gtc acc cga aac gat atc gtg aag ata gaa ggc 720
Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Arg Asn Asp Ile Val Lys Ile Glu Gly
225 230 235 240
atc gat gcc acc ggc ggc aat aac cag cct aac att ccg gat atc cct 768
Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro Asn Ile Pro Asp Ile Pro
245 250 255
gcg cac cta tgg tac ttc ggg tta att ggg aca tgt ctt 807
Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly Thr Cys Leu
260 265

<210> 2
<211> 269
<212> PRT
<213> 疏棉状嗜热丝孢菌
<400> 2

Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe Asn Leu Phe Ala Gln Tyr
1 5 10 15
Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn Asp Ala Pro Ala Gly Thr
20 25 30

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