

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶



[12] 发明专利申请公开说明书

C12N 9/54
C11D 3/386 C14C 1/00

[21] 申请号 95193076.1

[43]公开日 1997年4月23日

[11] 公开号 CN 1148406A

[22]申请日 95.3.27

[30]优先权

[32]94.3.31 [33]DE[31]P4411223.8

[86]国际申请 PCT/EP95/01141 95.3.27

[87]国际公布 WO95/27049 德 95.10.12

[85]进入国家阶段日期 96.11.15

[71]申请人 索维酶有限和两合公司

地址 联邦德国尼恩堡

[72]发明人 A·阿莫利 A·卡利普

G·考尼兹-加得 H·赫尔曼

K·博尼尔

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标
事务所
代理人 樊卫民

权利要求书 2 页 说明书 21 页 附图页数 6 页

[54]发明名称 强碱性蛋白酶及其应用

[57]摘要

本发明涉及新型强碱性蛋白酶，其在工业或日用领域中的应用和用于所述用途的含该蛋白酶的组合物。本发明的蛋白酶选自自由枯草杆菌蛋白酶尤其是“枯草杆菌蛋白酶 309”型的某些蛋白酶前体衍生而来的三重突变体。

(BJ)第 1456 号

权 利 要 求 书

1.强碱性蛋白酶,其特征在于其基本氨基酸顺序具有至少95%,优选98%的图1所示的氨基酸顺序的同源性,并与图1所示氨基酸顺序的不同之处在于在图1的位置42/114/115上或者在三种各与此同源的位置上有三重突变,即位于相应位置上的氨基酸被精氨酸代替。

2.根据权利要求1的强碱性蛋白酶,其特征在于它们具有与图1所示的氨基酸顺序基本相同的基本氨基酸顺序,并与图1所示氨基酸顺序的区别在于在图1的位置42/114/115上有三重突变,即在相应位置上的氨基酸被精氨酸代替。

3.根据权利要求2的强碱性蛋白酶,其特征在于基本氨基酸顺序与图1所示的氨基酸顺序是相同的,或者区别在于在位置85上由天然偏离的天冬酰胺代替丝氨酸或者在下列位置上通过天然偏离的97D/99R/101A/102I/157S或天然偏离的3T/97D/99R/101A/102I/157S区分。

4.根据权利要求1-3之一项的强碱性蛋白酶的用途,用于手工业或工业中。

5.根据权利要求1-3之一项的强碱性蛋白酶的权利要求4的用途,用于清洁手工业或工业装置的表面,尤其是在屠宰场、食品和嗜好品工业、大型厨房和烤肉厂中应用。

6.根据权利要求1-3之一项的强碱性蛋白酶的权利要求5的用途,用于皮革制造工业中,尤其是用于兽皮或毛皮的脱毛工艺中。

7.用于手工业和/或工业用途的组合物,包含权利要求1-3之一项的强碱性蛋白酶和在各种应用中常用的其它配方组分。

8.日用洗涤剂 and 日用清洁剂组合物,包含与一种其它不具有三重突变N42R/N114R/N115R的“枯草杆菌蛋白酶309”型蛋白酶结合使用的权利要求1-3的强碱性蛋白酶。

9.根据权利要求8的日用洗涤剂和日用清洁剂组合物,包含与一种其它蛋白酶结合使用的权利要求1-3之一项的强碱性蛋白酶,其氨基酸顺序具有95%、优选98%的图1所示氨基酸顺序的同源性但其中其它的蛋白酶不具有三重突变N42R/N114R/N115R。

10.根据权利要求9的日用洗涤剂 and 日用清洁剂组合物,包含与一种其它蛋白酶结合使用的权利要求3的强碱性蛋白酶,其氨基酸顺序与图1所示的氨基酸顺序是相同的或者区别仅在于在位置85上由天然偏离的天冬酰胺代替丝氨酸.

强碱性蛋白酶及其应用

本发明涉及一种新型强碱性蛋白酶，其在手工业或工业以及日用领域中的应用以及含这种蛋白酶用于所述应用领域的组合物。

在手工业或工业应用或工艺中，含蛋白酶的组合物的应用是众所周知的。例如，在洗涤剂工业中，例如为了清除由血液污染的医院洗涤剂或肉类加工厂的防护服，长期以来已经使用了蛋白酶。在皮革处理领域，例如在制造皮革时，实际上在兽皮和毛皮脱毛的碱法步骤中，即为脱毛创造条件并引起表皮增溶的灰槽法（“Äscher”）中，总是使用了部分有害的化学物质（例如无机硫化物）。尽管目前有人建议使用酶催化的灰槽法（脱毛方法），尤其是使用胰蛋白酶或真菌蛋白酶或细菌蛋白酶以及部分使用糖酶（Carbohydrolase），但是这种酶催化的脱毛方法几乎只适用于小动物，因此，实际使用中受到了限制。至今为止，酶催化脱毛技术还不能用于大的家畜皮，这首先是由于造成部分不完全的脱毛和由于损坏胶原粒面膜或表皮物质的剧烈分解。人们也尝试了一种在灰槽法中将碱性蛋白酶按比例地与减少量的化学物质（例如硫化物）结合起来使用，以减轻化学物质对环境造成的危害。尽管通过使用酶可明显地降低化学物质组分（例如硫化物）并获得非常好的粒面拉伸小的表面产率，但是由此制备的皮革倾向于形成松面、松散的火焰结构和粗的部分正绒面革。虽然目前蛋白酶已经被应用于皮革制造领域（粗软化法和灰槽法），然而现有技术的这种蛋白酶在高 pH 值（ $\text{pH} = 11 - 13$ ）下总是起很小的作用或者在自来水车间一般的处理温度（ $28 \sim 30^\circ\text{C}$ ）下只有比较低的活性。

基于与日用应用（例如作为日用洗涤剂）相比，在手工业或工业方法中部分苛刻的条件，对这种情况下使用的蛋白酶提出了特别高的要求，尤其是在稳定性，介质相容性（Millieuakzeptanz）和效率方面。该蛋白酶除了在强碱性 pH 值下具有良好的稳定性和活性外，一方面它们

还应具有良好的对温度的稳定性，以便在较低的浓度下尽可能持续较长的时间，在手工业/工业方法中部分高温下为各应用目的提供好的结果，但另一方面，对于某些应用（例如皮革制造），在较低温度（约 30 ℃）下还应具有良好的活性。此外，所使用的碱性蛋白酶对工业方法中常用的化学物质和组分（例如表面活性剂，漂白剂或起消毒作用的物质，化学物质等组分）是不敏感的。因此，还存在对其它适合于手工业或工业应用的碱性蛋白酶，例如适用于纺织品洗涤工艺、表面净化或皮革处理以及皮革制造的碱性蛋白酶的需求。

因此，我们的任务是提供一种新型的，尤其适合于在手工业或工业方法中使用的碱性蛋白酶，这种蛋白酶在日用领域中使用时就具有优点。

目前已经发现在各种工业方法中使用了下文所述的具有较高活性的碱性芽孢杆菌蛋白酶。因此，正如权利要求中所要求和下面详细阐述的，本发明的目的是提供一种碱性蛋白酶及其应用，尤其是在工业方法中以及日用领域使用的组合物中的应用。

因此，本发明涉及强碱性蛋白酶，其特征在于其基本氨基酸顺序具有至少 9.5%，优选至少 98 % 的图 1 所示氨基酸顺序的同源性，并且与图 1 所示氨基酸顺序的区别在于在图 1 的位置 42/114/115 或在三种各与此同源的位置上有三重突变，即位于相应位置上的氨基酸被精氨酸代替。

所述碱性芽孢杆菌蛋白酶的分子量约为 26000 - 28000g/mol，它们是通过 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳与具有已知分子量的参照蛋白质相比测定的。在分析试验中，由可溶底物试样（Modellsubstraten）确定的 pH 最佳值约为 pH10.5，其中对 pH 最佳值应理解为这样的 pH 范围，即在其中蛋白酶具有最大的蛋白水解活性。在此 pH 活性比原始蛋白酶（按图 1）高；效用最佳值在碱性范围内得到了进一步的延伸，并位于 pH 值 10.5~11.5。所述的本发明碱性芽孢杆菌蛋白酶还具有好的 pH 和温度稳定性。本发明尤其涉及在这样一个 pH 范围内有效的高强碱性蛋白酶。这一 pH 值是目前为止的现有技术的蛋白酶所不能达到的。

所谓与图 1 所示氨基酸顺序具同源性，本文中应理解为所提及的氨

氨基酸顺序与图 1 所示氨基酸顺序结构上同族。为了确定同源性，使图 1 氨基酸顺序和用于比较的氨基酸顺序中结构对应的片段彼此一致，从而使得氨基酸顺序间的结构最大可能地一致，在此考虑到由于单个氨基酸的缺失或插入产生的区别并通过相应的顺序片段的移动使之一致。所比较的顺序中相一致的氨基酸（“同源位置”）的数目与图 1 顺序所包括的氨基酸的总数之比表示了同源性的百分率。顺序的偏离是由于氨基酸的改变、插入或缺失引起的。与此相应不言而喻的是在使用与图 1 相比具有至少 95 % 的同源碱性蛋白酶时，用图 1 说明的氨基酸位置与每次使用的蛋白酶的同源位置有关。与图 1 同源的蛋白酶氨基酸顺序中的缺失或插入可引起氨基酸位置的相对移动，以致在相互同源的氨基酸顺序的同源部分，彼此相一致的氨基酸位置的用数字表示的标记不必相同，也就是说可产生各单个氨基酸位置的编号产生细微数字移动。

本发明的一个优选方案提供了一种强碱性蛋白酶，其特征在于它们具有与图 1 所示氨基酸顺序基本相同的基本氨基酸顺序，并且与图 1 所示氨基酸顺序的区别在于在图 1 位置 42/114/115 中有三重突变，即在相应位置上的氨基酸被精氨酸代替。术语“基本相同的”氨基酸顺序是指除所述三重突变 N42R/N114R/N115R 以外，只有少量其它的即至多 6 个（相当于约 98 % 或更高的同源性）的氨基酸偏离图 1 所示的氨基酸顺序。作为本发明的强碱性蛋白酶基础的氨基酸顺序基本上与称为“枯草杆菌蛋白酶 309”型的这类蛋白酶一致，因为现有技术所述的“枯草杆菌蛋白酶 309”的氨基酸顺序与图 1 所示的氨基酸顺序是相同的。除位置 85 外与图 1 氨基酸顺序一致的、与此几乎相同的一种蛋白酶在现有技术中被称之为新型芽孢杆菌（*Bacillus nov.*）菌种 PB92 的蛋白酶（参见欧洲专利申请 EP 283075）。由芽孢杆菌 PB92 产生的蛋白酶与图 1 所示氨基酸顺序非本质的区别在于在位置 85 上用天然偏离的天冬酰胺代替现存的丝氨酸，因此认为它们是“枯草杆菌蛋白酶 309”型蛋白酶。其它的与“枯草杆菌蛋白酶 309”基本相同的蛋白酶（该蛋白酶除五个位置 97，99，101，102 和 157 外，与图 1 的氨基酸顺序相一致）在现有技术中被称之为由迟缓芽孢杆菌产生的蛋白酶（参见 WO91/02792 和 US5352604）（“BLAP”）。由迟缓芽孢杆菌产生的蛋白酶“BLAP”

与图 1 所示氨基酸顺序非本质的区别仅在于，在五个位置上存在着天然的偏离：97D，99R，101A，102I 和 157S。“BLAP”变异体的额外区别在于第六个天然偏离的苏氨酸代替位置 3 中的丝氨酸（同样在 WO91/02792 和 US5352604 中公开了的碱性蛋白酶）。D 代表 ASP，为天冬氨酸；R 代表 Arg，为精氨酸，A = Ala，为丙氨酸，I = Ile = 异亮氨酸，S = Ser = 丝氨酸。T 代表 Thr，为苏氨酸。“BLAP”和其具有突变 S3T 的变异体与图 1 氨基酸顺序具有约 98% 的同源性，在本发明中也被认为是“枯草杆菌蛋白酶 309”型蛋白酶。优选地，本发明涉及的强碱性蛋白酶具有三重突变 N42R/N114R/N115R，其基本氨基酸顺序与图 1 所示的氨基酸顺序相同，或者它们的区别仅在位置 85 由天然偏离的天冬酰胺替代丝氨酸，或仅在下面的五个位置通过天然偏离 97D/99R/101A/102I/157S 来区分，或是仅在下面六个位置通过天然偏离 3T/97D/99R/101A/102I/157S 来区分。

作为本发明蛋白酶基础的碱性芽孢杆菌蛋白酶可由 1989 年 7 月 28 日保藏的 DSM 号为 5466 的芽孢杆菌菌株获得（具有图 1 的氨基酸顺序），在欧洲专利申请 EP415296 中公开了其它的细节，尤其是对这种菌株的分离。在位置 85 发生偏离的作为本发明蛋白酶突变体基础的蛋白酶的变异体同样可通过培养新型芽孢杆菌种 PB92 获得（如在欧洲专利申请 EP283075 或与此相应的 US5217 878 中公开的）。作为本发明蛋白酶突变体基础的蛋白酶在位置 97/99/101/102/157 或在位置 3/97/99/101/102/157 中发生偏离的变异体同样可通过培养迟缓芽孢杆菌或者在适当的转变后在地衣型芽孢杆菌中获得的（如 WO91/02792 或与此相应的 US5, 352, 604 中公开的）。在位置 85 上的变异体以及变异体“BLAP”也可通过在具有图 1 所示氨基酸顺序的蛋白酶的所述位置上产生相应的点突变制备。本发明具有三重突变体 N42R/N114R/N115R 的强碱性蛋白酶是由上述作为本发明蛋白酶突变体基础的“枯草杆菌蛋白酶 309”型蛋白酶通过在“枯草杆菌蛋白酶 309”型蛋白酶前体的氨基酸顺序中结合的或连续的点突变，按已知的方法制备。欧洲专利申请 EP415296 公开了与单个氨基酸位置有关的进行这类点突变的方法，该文献所述的方法同样可用于产生三重突变，以制备本发明的蛋白酶类似物。上述专利申请，

尤其是 EP415296 (或与此相应的 US5, 352, 603) 的内容引入本文作为参考。

在本发明的一个极优选的变异体中, 本发明具有三重突变 N42R/N114R/N115R 的强碱性蛋白酶是从来自菌株 DSM5466 的、具有与图 1 相同的基本氨基酸顺序的基本碱性芽孢杆菌蛋白酶衍生得到的。在按缩写法所示的突变中, 数字说明涉及氨基酸顺序中的位置(见图 1)。原始氨基酸置于数字说明前面, 通过在氨基酸顺序中的突变在相应位置插入的新的氨基酸置于数字说明后面。选择单字母密码用于说明氨基酸: N 代表天冬酰胺 (ASP) 和 R 代表精氨酸 (Arg)。如上所述, 相应的氨基酸交换可按已知方法通过在氨基酸顺序中的点突变得得到, 如 EP415296 公开的方法。

本发明强碱性芽孢杆菌蛋白酶突变体 N42R/N114R/N115R 在工业应用的常规条件下, 如高 pH 值, 高温和应用时间短时, 具有特别好的活性。本发明的蛋白酶突变体对手工业的或工业方法如手工业的织物洗涤法中使用的常用的制剂组分显示出意想不到的高的稳定性。因此本发明强碱性芽孢杆菌蛋白酶突变体可有利地应用于手工业或工业方法中, 如织物洗涤法, 任何形式的手工表面净化、皮革处理、尤其是皮革制造。本发明蛋白酶在织物洗涤业的手工业和工业应用例如由同族德国专利申请 DE4411223 中详细地公开, 因此, 可将本发明的强碱性芽孢杆菌蛋白酶突变体例如应用于大型滚筒洗衣机或完全连续的或间断的逆流洗涤自动线中。特别有利的是将本发明的碱性芽孢杆菌蛋白酶在所述的多步碱液法例如粗洗和清洗过程组成的两步法中, 在粗洗过程中加入到漂洗物中。粗洗是在手工业织物洗涤法中常用的条件下, 例如 30 ~ 70 ℃ 的温度下, 按已知的方法使用该洗涤过程中常用的洗涤剂组分进行的。在清除富含蛋白的污垢, 例如在医院由血液弄脏的洗涤中和大型厨房或肉类加工厂的洗涤中, 必要时将所述的蛋白酶于粗洗之前的预冲洗中与冷水或循环温水和其它具有良好效果的常用洗涤剂组分一起使用。此外, 也可将本发明的碱性芽孢杆菌蛋白酶突变体在其它的手工织物洗涤法, 例如某些由织物和脏物类型所决定的织物洗涤法中, 如在医院织物的消毒洗涤中使用, 详细的描述见 DE 4411223。

本发明其它优选的应用领域包括手工业或工业装置中的（硬）表面的清洗，优选地是食品工业和嗜好品工业中，屠宰场中，大型厨房和烤肉厂等。

制造和进一步加工以及运输中与食品接触的所有表面必须以一定的时间间隔清洗。在各行业中（例如饮料，罐头，糖工业，奶制品、肉类和脂肪加工工业）会出现各种污染。为了清除这些污物，现有技术中有许多品种的洗涤剂可供使用。这些洗涤剂主要是除去蛋白质，脂肪和碳水化合物化合物的污垢。除了有机污垢外，还会产生无机污垢。因此洗涤剂是由各种在洗涤过程中具有一定作用的组分的混合物组成的。它们可作为粉末或液体或很少情况下作为糊剂购得，除了少数例外以外，可用水将其稀释至浓度为 0.5 ~ 2 %（重量）以便使用。作为在表面清洗领域的特定洗涤剂中加入的用于清除含蛋白和淀粉污染的酶，尤其使用蛋白酶和淀粉酶。使用了本发明蛋白酶三重突变体的用于表面净化的这类洗涤剂特别适用于因污染材料的腐蚀敏感性而不允许使用强酸或强碱产品的情况（尤其是在轻金属如铝和其合金的情况下），或者例如用于清洗超过滤装置的膜（反渗透）。

在食品工业中用来清洗表面的这类特定洗涤剂的常用组分（除了上述已提及的酶外）主要是分解脏物的组分，该组分作为这类洗涤剂的主要组分，用来去除脏物，它们大部分是起碱性反应的如氢氧化钠或氢氧化钾，碳酸钠或碳酸钾，正磷酸或其它有机酸的碱式盐，以及钠水玻璃或钾水玻璃，它们具有不同的二氧化硅/碱性氧化物比值（ $\text{SiO}_2:\text{Na}_2\text{O}=0.7\sim 3.3$ ）；其它组分是表面活性物质，尤其是用作清除脂肪污物的表面活性物质（阴离子表面活性剂，例如脂肪醇硫酸盐，烷基苯磺酸盐以及皂；非离子脂肪醇醚和烷基酚乙二醇醚）、防腐剂，尤其是在轻金属如铝和其合金的情况下以避免剥蚀，例如在碱性范围内使用水玻璃和酸性范围内许多特定的对酸和材料起作用的抑制剂；消泡剂，例如石蜡油和硅氧烷，优选特定的乙氧基和丙氧基化产物。

作为在清洗硬质表面领域中使用本发明蛋白酶三重突变体的实例是用于两个特定应用领域的两种洗涤剂组合物，包括：

烤架洗涤剂

1.0% (重量) Walocel HT 30000PFV
0.5 % (重量) Sequinon 40 Na 32
25 % (重量) 氢氧化钾溶液 (50 % 重量)
4 % (重量) Rewoteric AM VSF
3 % (重量) 蛋白酶三重突变体
(活性为 300.000 DU/ml,+/-5%)
66.5% (重量) 的水

高压活性洗涤剂:

5 % (重量) 脂肪醇醚硫酸盐 (28 % 重量)
10 % (重量) Sequinon 40 Na 32
10 % (重量) 氢氧化钠溶液 (50 % 重量)
2 % (重量) 异丙苯硫酸钠 (40 % 重量)
3 % (重量) 蛋白酶三重突变体
(活性为: 300.000 DU/ml,+/-5%)
70 % (重量) 水。

本发明强碱蛋白酶突变体的其它有利的应用领域是皮革处理, 尤其是皮革制造。本发明的蛋白酶突变体尤其可在兽皮或毛皮的脱毛方法中使用, 最好是在粗软化 (Hauptweiche) 和/或灰槽法的方法步骤中使用。

本发明蛋白酶突变体尤其适合于皮革制造。

皮革制造尤其包括以下制备步骤:

- a) 脏物软化, 以除去盐、污垢和粪类;
- b) 粗软化, 以泡胀表皮和溶出可溶于水的蛋白质;
- c) 灰槽法脱毛, 以净皮 (Hautaufschluß) 和进一步的泡胀 (去毛皮革); 本文中的“去毛皮革”是指由此得到无毛发的净表皮;
- d) 脱灰和酸洗, 除去表皮和皮肤剩余物以及降低 pH 值;
- e) 浸酸, 以调整去毛皮革的酸性
- f) 进行铬鞣, 即用铬盐或铝盐或锆盐进行矿物鞣 (Mineralgerbung) 。

在上述步骤之后一般将皮革进行中和, 必要时再鞣, 着色和上油, 以及干燥和研光以制成可售产品。除了干燥和研光之外的上述处理是在

所谓的自来水车间中进行的。在此可使用的容器包括制革划槽，圆桶和根据混凝土混合器和洗衣机原理的机器。在上述加工过程至包括浸酸在内的过程中使用酶。显然在制革化学过程和解脲酶的其它应用（pH3 ~ 12 的范围内）中在各个方法步骤中需要不同的酶，因为每种酶都具有特定的 pH 活性范围。通过混合具有各种 pH 活性范围的酶用于皮革制造方法，用于皮革制造的酶产品的赖于 pH 的作用范围能得到明显的扩大。本发明蛋白酶突变体在皮革制造时，除了必要时的粗软化外，尤其是在脱毛（灰槽法）的方法步骤中使用时有利的。本发明突变体的特征在于，考虑到分解固定毛发的蛋白质方面，在 pH 值直至 pH12 时尤其在脱毛技术中常用的低温（约 28 - 30 °C）下确保了最佳的效果。有利地是，另外通过本发明蛋白酶三重突变体进一步提高的 pH 稳定性可促进脱毛的效果。毛发极易从使用本发明蛋白酶三重突变体处理的兽皮和毛皮中脱去，总的脱除度高（约 99 % 以上）。正如实验室的试样试验所示的，用刮刀脱除毛发没有困难。使用本发明蛋白酶三重突变体能够以切合实际的方式极好地并且无损坏地对大牲畜的毛皮进行酶催化脱毛。此外，若在灰槽法中使用本发明蛋白酶三重突变体，则已基本上不使用对环境有害的化学物质（例如，硫化物）。

此外，本发明涉及用于手工业和/或工业领域的普通组合物，该组合物包含上述本发明的强碱性蛋白酶和对于各种应用目的常用的其它配方组分。对于手工业的和/或工业的表面清洗而言，本发明的组合物例如包含如下典型的组分：碱（例如 NaOH，KOH），阴离子型和非离子型表面活性剂，络合剂，过酸漂白剂，丙二醇等有机溶剂，磷酸盐等助洗剂。在皮革制造中，典型的组合物的配方组分包含常用的硫酸钠，硫酸铵，锯末等组分。这里涉及的是由粉状组分和颗粒的混合物组成的固体产品。

除了在手工业和/或工业应用中本发明强碱性芽孢杆菌蛋白酶突变体具有上述优点之外，本发明蛋白酶突变体在日用洗涤剂和清洁剂组合物中也具有意想不到的优点，该洗涤剂和清洗剂组合物混合包含本发明的强碱性蛋白酶突变体和其它现有技术中常用的“枯草杆菌蛋白酶 309”型蛋白酶（其不含三重突变 N42R/N114R/N115R）。在与日用领域通常

使用的蛋白酶，尤其是“枯草杆菌蛋白酶 309”型蛋白酶的混合物中，本发明的强碱性蛋白酶突变体对日用洗涤剂贮存后的洗涤效果是有利的。通过加入本发明强碱性蛋白酶，在存在通常的清洁剂或洗涤剂配方组分的情况下，明显地改进了日用洗涤剂或清洁剂蛋白酶的贮存稳定性。含现有技术中一般蛋白酶的组合物具有过高的降低洗涤效果的活性损失，而在使用本发明的蛋白酶三重突变体 N42R/N114R/N115R 的情况下在推销过程中的一般的贮藏和出售时间内，在所有日用洗涤剂的条件（pH = 9.5~10.5，洗涤温度为 30 ~ 60 ℃）下具有最佳洗涤活性，这一洗涤活性优于仅包含现有技术中至今已知的蛋白酶的组合物的活性。

因此，本发明还涉及日用洗涤剂和日用清洁剂组合物，它们包含本发明的强碱性蛋白酶突变体和一种其它的不含三重突变 N42R/N114R/N115R 的“枯草杆菌蛋白酶 309”型蛋白酶。优选地，本发明的日用洗涤剂和日用清洁剂组合物包含与另一种蛋白酶结合使用的本发明强碱性蛋白酶突变体，其氨基酸顺序与图 1 所示氨基酸顺序具有 95%，优选 98% 的同源性，但其中该另一种蛋白酶不含三重突变 N42R/N114R/N115R。特别优选的是这样一些含本发明强碱性蛋白酶的日用洗涤剂和清洁剂组合物，其中该强碱性蛋白酶的氨基酸顺序与图 1 所示的氨基酸顺序基本上是相同的。优选的是这样一些本发明的具有突变 N42R/N114R/N115R 的强碱性蛋白酶，其氨基酸顺序与图 1 所示的氨基酸顺序是相同的，或者区别仅在于在位置 85 上用天然偏离的天冬酰胺代替丝氨酸。

优选在本发明的应用和组合物中应加入这样一些本发明的碱性芽孢杆菌蛋白酶制剂，其酶活性为 50.000 ~ 1.000.000DU/g 酶制剂。术语“DU”是指以 Delft 单位表示的酶催化活性，其中 1.000DU 相当于这样的解脲活性，它是在 1ml 体积中溶解了 2%（w/w）酶时，在分解酪脲后得到 0.4000 的消光差（1cm 光路径，275nm；对比空白试验的测定值）。本发明的强碱性芽孢杆菌蛋白酶制剂在手工业或工业方法的一般配方中可单独使用，必要时也可与其它的手工业或工业领域或日用领域中所使用的蛋白酶或其它的常用酶如淀粉酶、脂酶、纤维素酶、果胶酶，核酸酶，氧化还原酶等结合起来使用。按总配制量的干重计，本发

明制剂中的所述芽孢杆菌蛋白酶的优选用量为 0.1 ~ 5 % (重量), 尤其优选 0.2 ~ 2 % (重量)。

对于不同的应用领域, 可将本发明组合物按已知方法制成粉状, 例如颗粒状, 小球或丸片状, 必要时也可进行表面涂层(包膜)。基于本发明所述芽孢杆菌蛋白酶突变体所具有的良好稳定性, 也可将它们以液态形式使用。

在手工业或工业方法的常规条件下, 如强碱性 pH 值, 例如 pH 值超过 11.0, 以及必要时在达 70 °C 的高温下, 本发明的强碱性芽孢杆菌蛋白酶突变体也具有令人惊奇的良好特性。因为与常规日用领域进行比较, 在手工业和/或工业应用中的大部分情况下使用时间比较短, 这一点就更显得出乎预料了。本发明的强碱性芽孢杆菌蛋白酶突变体除了高的温度稳定性外, 在用于手工业或工业组合物或日用领域的常规组分的存在下还具有高的酶稳定性。因此, 对于在手工业或工业领域或日用领域中常用的漂白剂(如用于医院的消毒洗涤剂中或一般的日用洗涤剂中), 本发明的强碱性芽孢杆菌蛋白酶突变体是很稳定的。

图 1:

由嗜碱芽孢杆菌 HA1 (*Bacillus alcalophilus* HA1) (DSM5466) 产生的碱性蛋白酶氨基酸顺序 (SEQ ID NO1) 的顺序记录。

图 2:

在 T = 50 °C 下, 与未突变的原始蛋白酶比较, 蛋白酶突变体的 pH 最佳值。

图 3:

在 pH = 11 下, 与未突变的原始蛋白酶比较, 蛋白酶突变体的温度最佳值。

图 4:

在标准洗涤剂中, 与未突变的原始蛋白酶比较, 蛋白酶突变体的贮存稳定性(密封的纸板盒)。

图 5:

在 pH = 11.4 和 T = 15 ~ 60 °C 时, 与未突变的原始蛋白酶比较蛋白酶突变体的洗涤性能。

在 EP415 296 的实施例 1 - 4 中，公开了通过相应核苷酸顺序的确定来测定嗜碱芽孢杆菌 HA1 (DSM 5466) 产生的碱性蛋白酶的图 1 所示氨基酸顺序。称为嗜碱芽孢杆菌的菌株 HA1 于 1989 年 7 月 28 日被保藏在德国微生物保藏中心 (DSM) 处，保藏号为 DSM5466 (地址为：DMS - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Bundes-republik Deutschland) 。

实施例

下面的实施例用于说明本发明，而不是对本发明范围的限制。

实施例 1

通过突变制备氨基酸顺序改变的碱性蛋白酶

碱性蛋白酶 (它们与图 1 所示来自嗜碱芽孢杆菌 HA1 (DSM5466) 的碱性蛋白酶的氨基酸顺序的区别在于发生了 N42R、N114R 和 N115R 位的氨基酸交换) 的制备是按已知的方法，通过在相应蛋白酶基因的 DNA 部分顺序中进行定位诱变来完成的。在图 1 所示的氨基酸顺序中，用数字说明表示对应的位置，用单字母密码表示的原始氨基酸置于位置说明的前面，而插入的氨基酸置于数字说明后面。对于单个突变来说，在 EP415296 的实施例 5 - 18 中详细公开了定位诱变的方法。对于产生单个突变的处理过程，另外还可参见 EP503 346 中的实施例。

原则上，该方法包括以下已知的方法步骤：

按 Saito 等人的方法 (1963 , Biochim.Biophys.Acta 72 ,619-629)，从天然分离的嗜碱芽孢杆菌 HA1 (DSM5466) 中分离出染色体 DNA，并用限制性核酸内切酶 Sau 3A 进行部分水解。通过电泳分离限制性片段，分离出大小为 3 ~ 8 千碱基的片段。将经分离和选择了大小的由嗜碱芽孢杆菌 HA1 产生的 DNA 片段按已知的方法与已知的质粒 pUB110 的载体 DNA 在体外重新结合。按 S.Chang 和 N.Cohen(1979,Mol.Gen.Genet. 168,111-115) 所述的方法，用在体外重新结合获得的 DNA 转化枯草芽孢杆菌菌株 (BD224) (Bacillus Genetic Stock Center 1A46) 的原生质体。在平板上用新霉素选择转化体。按

Maniatis 等人的手册中方法 (Maniatis 等人: T.Maniatis, E.F.Fritsch, J.Sambrook,Molecular Cloning,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,1982), 由一个克隆中分离出质粒 DNA。在该质粒上包含的由嗜碱芽孢杆菌 DNA 产生的片段具有的大小为 4.1KB, 并且含有由嗜碱芽孢杆菌 HA1 (DSM5466) 产生的强碱性蛋白酶的完整的 DNA 顺序 (EP415296 的对比实施例 1 和 2)。

用 *Ava*I 裂解包含由嗜碱芽孢杆菌 HA1 (DSM5466) 产生的强碱性蛋白酶的完整 DNA 顺序的质粒。按已知的方法 (Maniatis 等人, S.114), 将凸出的末端填补成 DNA 双链。在用 *Xba*I 进行随后的限制性切割该 DNA 后, 分离全部 1.618BPN 端的片段, 并按已知的方法克隆到载体 pBS 中。得到的载体包含用于编码图 1 构建的氨基酸顺序的 DNA 的 N 末端端部 (EP415296 的对比例 5)。

按类似的方法制备载体, 该载体包含用于编码相应蛋白酶的 C 末端的 DNA 的整个 658BP 片段。为此, 用限制性核苷酸内切酶 *Xba*I 和 *Asp*718 切割包含该整个 DNA 顺序的质粒, 并克隆到已知载体 pBS 的对应的切割点上 (EP415296 的对比实施例 7)。

在包含 C 末端或 N 末端端部的 DNA 部分顺序上, 用 Kunkel,T.A.(1985,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82 ,488-492) 所述的“引物延伸”技术进行定位突变。首先用已知的方法将相应的载体转化为其尿嘧啶化的单链类似物, 其中将它与两种载体转化的大肠杆菌 CJ236 细菌进行培养, 再用助噬菌体 M13 K07 (由 Bio-Rad 实验室, Richmond,Kalifornien 提供) 感染。大肠杆菌 CJ236 是一种已知的尿嘧啶 - N - 糖基化酶营养缺乏性突变体, 在复制载体时, 它将核苷酸尿嘧啶而不是胸苷构建入载体的 DNA 顺序中。最好按已知的方法将尿嘧啶化的载体用于在体外与定位诱变剂进行反应, 在反应结束后, 用作模板 (Matritze) 产生突变的 DNA 链的含尿嘧啶的 DNA 单链可通过用尿嘧啶 - N - 糖基化酶处理消除。为合成外壳蛋白必需使用所述的辅助噬菌体代替构建好的尿嘧啶化的单链载体 DNA。经外壳包被的尿嘧啶化的单链载体 DNA 从经转化的宿主大肠杆菌 CJ 236 中溶解出来, 接着从培养基中分离出来。

将分离的尿嘧啶化的 C 末端或 N 末端端部的 DNA 单链载体与合成的低聚核苷酸杂交，该低聚核苷酸包含突变位点，同时作为引物用于随后补充成带突变的完整的 DNA 双链。所使用的合成低聚核苷酸可按已知的方式用 Beaucage,S.L.和 Caruthers,M.H.(1981,Tetrahedron Letters 22, 1859 - 1862)的方法制备。按已知的方法，借助 T4 - DNA - 聚合酶并随后用 T4 - DNA - 连接酶连接合成第二条 DNA 链（Kunkel 等人，1987，Methods in Enzymol.154,367-382）。将所形成的双链 - 载体 - DNA 转化入大肠杆菌 MC 1061，并通过检测对应单位的限制性核苷酸内切酶识别点来识别经突变的载体，限制性核酸内切酶的识别点是用合成的低聚核苷酸引入或除去的。

为了在蛋白酶 DNA 的 N 末端或 C 末端部分产生两种突变，按照类似于引起第一种突变的方法，使用其它的合成低聚核苷酸引起第二种突变。

制备在蛋白酶 - DNA 顺序的 C 末端部分或 N 末端部分突变的表达载体，其中用限制性核酸内切酶切割通过定位诱变获得的 DNA 顺序，并与包含 DNA 顺序的另外对应末端以及所有用于表达所必需的元素的一种载体 DNA 连接。获得的载体代表了具有用以表达对应的经突变的蛋白酶的合适的阅读框架（Leseraster）的完整的表达载体，制备这种表达载体的方法与 EP415296 的实施例 16 中详细描述的方法类似。为了下面的三重突变体，类似地制备表达载体 DSM 5466 Mut.N42R/N114R/N115R。

三重突变的强碱性蛋白酶是用上述的表达载体按已知的方法转化和培养枯草芽孢杆菌 BD224 来制备的。按已知的方法从转化和培养菌株的培养上清液中分离出三重突变的强碱性蛋白酶。

在 EP415 296 的实施例 16 和 18 中详尽地介绍了突变蛋白酶的分离方法，本发明是按该方法进行类似处理的。

在实施例 2 - 4 描述的试验中使用了通过在氨基酸顺序中进行三重突变得到的基于嗜碱芽孢杆菌 HA1（DSM5466）的经变异的碱性蛋白酶。

在同族的作为优先权基础的德国专利申请 DE 4411 223 的实施例中

详细地描述了本发明三重突变体在手工业织物洗涤领域中的应用和优点，该文献引入本文仅供参考。

本发明蛋白酶突变体的其它特性示于实施例 5 中。

实施例 2

测定本发明蛋白酶三重突变体的脱毛特性

预清洁

在含 0.1% Marlipal 013/939 的双倍水量（基于牛皮量）中，于约 28 - 30 °C 的温度下浸泡牛皮 1 小时。然后将牛皮切成约 20 × 60cm 的皮块并在 - 20 °C 下贮藏。将贮藏牛皮块切成约 20 × 7cm 的试验块，将其控干并用纸巾擦干。将它们置于 0.5% 的苏打溶液中搅拌 120 分钟，再置于 0.1 % 的苏打溶液中搅拌 15 分钟。记录增加的重量。

A. 预清洁表皮的膨胀性（吸水性）

温育溶液： 0.5% 碳酸钠、 0.1% Marlipal（基于表皮的量）、
双倍的水量（基于表皮的量）

温育时间： 120 分钟

温育温度： 28 °C

酶： Optimase L660

温育后的重量 温育前的重量

试验	酶剂量		温育后重量 [g]	温育前重量 [g]	重量增加值	
	[g/100kg 皮]	[AADU/kg]			[g]	[%]
1	6.08	37470	729.53	701.59	27.940	4.0

B. 脱毛

温育溶液： 7.1g/l Ca(OH)₂（基于牛皮的 200 %）

温育时间： 24 小时

温育温度: 30 ℃
 混合: 温育开始时在 Linitest 机器中持续 2 小时, 结束时持续 3.5 小时
 pH 值: 起始: 12.48 结束: 12.45

烧杯号	蛋白酶	酶剂量		皮的脱毛*
		[g/100kg 皮]	[AADU/kg 皮]	
1	空白试验	--	--	3
2	空白试验	--	--	3
3	突变体	310.81	925188	1
4	突变体	310.81	925188	1

突变体: 使用活性为 300.000 DU/ml(+/-5%) 的蛋白酶三重突变体 N42R/N114R/115R

*1: 容易且完全脱毛

2: 几乎完全脱毛, 但在表皮上还有小块的残留物

3: 仅有少量至甚至没有毛发从表皮上脱落

注释: 在处理步骤 A 后, 试验块变软, 成海绵状,
 在处理步骤 B 后, 试验块变成橡胶状的硬块。

实施例 3

试验块的来源: 母牛, 背部

预先清洁:

在含 0.1% Marlipal 013/939 的双倍水量 (基于牛皮量) 中, 于约 28 - 30 ℃ 的温度下浸泡牛皮 1 小时。然后将牛皮切成约 20 × 60cm 的块并在 - 20 ℃ 下贮藏。将贮藏块切成约 20 × 7cm 的试验块, 将它们控干并用纸巾擦干。将该试验块置于 0.5% 的苏打溶液中搅拌 120 分钟, 再置于 0.1 % 的苏打溶液中搅拌 15 分钟。记录

增加的重量。

在下述条件下进行3次试验。

A: 预先清洁的表皮的膨胀性(吸水性)

温育溶液: 0.5%碳酸钠, 0.1% Marlipal (基于表皮)、双倍水量(基于表皮)

温育时间: 120分钟

温育温度: 28℃

酶: Optimase L660

试验	酶剂量		温育后重量 [g]	温育前重量 [g]	重量增加值	
	[g/100kg 皮]	[AADU/kg]			[g]	[%]
1**	15.89	20060	715.98	732.58	-16.60	-2.3
2	3.26	20122	905.27	866.22	39.05	4.5
3	3.32	20476	338.39	342.25	-3.86	-1.1

**在步骤 A 和 B 之间, 将试验块置于冰箱中 1.5 小时。

B. 脱毛

温育溶液: 7.1g/l Ca(OH)₂ (基于表皮的 200%)

温育时间: 24 小时

温育温度: 30℃

混合: 温育开始时在 Linitest 机器中持续 2 小时, 结束时再持续 3.5 小时。

pH 值:	起始	结束
试验 1	12.48	12.46
试验 2	12.55	12.53
试验 3	12.5	12.5

实验 1 的结果:

所使用的蛋白酶: 活性为 300.000DU/ml(+/-5%) 的突变体 N42R/N114R/N115R

烧杯号	酶剂量		皮的脱毛*
	[g/100kg 皮]	[AADU/kg 皮]	
1	--	--	3
2	--	--	3
3	31.2	92745	1.4
4	31.2	92745	1.2

注释: 长的毛发均匀脱落, 但约 1 - 3mm 的毛茬仍留在上面。

试验 2 结果:

所使用的蛋白酶: 活性为 300.000DU/ml(+/-5%) 的突变体 N42R/N114R/N115R

烧杯号	酶剂量		皮的脱毛*
	[g/100kg 皮]	[AADU/kg 皮]	
1	10.1	29969	2.2
2	50.3	149844	1.8
3	100.7	299688	2.0**
4	151.0	449531	1.4**

**具有较坚硬的致密毛发的颈部

试验结果 3:

所使用的蛋白酶: 活性为 300.000DU/ml(+/-5%) 的突变体 N42R/N114R/N115R

烧杯号	酶剂量		皮的脱毛*
	[g/100kg 皮]	[AADU/kg 皮]	
1	151.3	450294	1.2
2	100.9	300196	1.4
3	50.4	150098	1.6

*试验 1 - 3 的说明

- 1: 容易且完全脱毛
- 2: 几乎完全脱毛, 但在表皮上还有小块的残留物
3. 仅有少量至甚至没有毛发从表皮上脱落

实施例 4

A. 粗软化

牛皮 (重量): 1886.25(g) (如实施例 2 和 3 所示预先清洁)

身体部位: 腹部

添加物: 水 3772.50(g)
 Na_2CO_3 9.43(g)
 表面活性剂 1.89(g) Marlipal
 酶 0.3046(g) Optimase L660
 对应值 99582(AADU/kg 牛皮)

反应 4 小时后的重量 2039.5(g)

重量增加 8.1 (% 重量)

反应 4 小时后的 pH 值 10.21

B. 脱毛

水 3059.25(g)
 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 20.40(g)
 酶 6.9352(g) 活性为 150.000DU/ml(+/- 5%)的蛋白酶突变体
 对应值: 539878 (AADU/kg 牛皮)

温育 17.25 小时后的 pH 值: 12.75

脱毛的外观评定:

毛发可很容易地除去, 在从滚筒中取出试验块时, 通过接触开孔边缘毛发已被除去。在 2 - 3 个位置各有约 2cm^2 的毛发用刮刀没有任何困难就被除去。

实施例 5

下面详述本发明三重突变体的一些主要特征。

a) 与未突变的原始蛋白酶相比, 取决于 pH 值的本发明三重突变体的活性是按下述条件测定的: 底物: 乙酰酪蛋白, T 为 $50\text{ }^\circ\text{C}$, 转变时间为 10 分钟, 磷酸盐 - 硼酸盐缓冲剂。测得的与 pH 值有关的相对活性 (以 % 计) (在 $\text{pH} = 8.5$ 时的活性定义作 100 %) 示于图 2 中。与原始蛋白酶的活性相比, 本发明的三重突变体在 pH 为 10 ~ 12 的较高 pH 范围内具有明显高的活性。

b) 与未突变的原始蛋白酶相比, 取决于温度的本发明三重突变体的活性是按下述条件测定的: 底物: 乙酰酪蛋白, pH 为 11。测得的与温度有关的相对活性 (以 % 计) (在 $\text{pH} = 8.5$ 和 $T = 50\text{ }^\circ\text{C}$ 时的活性定义为 100 %) 示于图 3 中。其中表明在 $45\text{ }^\circ\text{C}$ ~ $58\text{ }^\circ\text{C}$ 的温度下, 与原始蛋白酶相比, 本发明的三重突变体在所选择的高 pH 值下的具有明显改善的活性。

c) 与未突变的原始蛋白酶相比, 取决于贮藏时间的本发明三重突变体的贮存稳定性 (贮存期限) 是通过贮存在标准的全洗涤剂中, 在下述条件下测定的: $T = 30\text{ }^\circ\text{C}$, 相对湿度为 60 % (r.H. 表示相对湿度), 在封闭的纸板箱中。贮存后测得以百分比计的剩余活性 (基于起始活性 100 %) 表明与原始蛋白酶相比, 本发明三重突变体的剩余活性得到了明显的提高, 同时改进了稳定性。结果示于图 4 中。

d) 为了证明本发明三重突变体的良好的清洁效果 (表面清洁), 在各种酶浓度时与原始蛋白酶相比的洗涤效率是按下述条件测定的: 基于标准洗涤剂: $\text{pH} = 11.4(6\text{g/l})$: 试验织物为 EMPA 117, $T = 60\text{ }^\circ\text{C}$ 。取决于所使用的酶量 (mg/l) 的实验结果 (δ

反射度) 示于图 5 中, 该图示出了本发明蛋白酶在较高 pH 和较高温度下的优越性。

e) 为了表明本发明三重突变体与现有技术的洗涤剂蛋白酶(本发明中为“枯草杆菌蛋白酶 309”型原始蛋白酶) 结合使用的优点, 进行具有所述结果的下述试验。

试验 1

本发明三重突变体与未突变的原始蛋白酶(各具有涂层) 相比, 在日用领域的普通全洗涤剂中贮存前后的相对洗涤效率。它们涉及在活性相同的剂量时对 2 个试验织物的平均洗涤效率。

蛋白酶	贮存前	在 35 °C/80 % 湿度下贮存 6 周后
原始蛋白酶	97.15	28.15
三重突变体	66.22	50.72
N42R/N114R/N115R	61.60	50.79

试验 2

本发明的三重突变体或原始蛋白酶在粉末洗涤剂中, 于 30 °C 和 60 % r.H. (r.H. 为相对湿度) 贮存后的剩余活性和剩余洗涤效率, 洗涤前的 pH 值各为 10.2。

贮存时间	A	B	C	D
0 周	100.0	24.50	100.0	22.99
1 周	92.4	--	100.0	--
2 周	86.9	--	94.6	--
4 周	75.1	--	86.0	--
6 周	60.9	14.98	70.8	21.63

试验织物：血/奶/墨汁（EMPA117）

% dR：试验织物（含酶洗涤剂）的反射（Reflektion）与用无酶基质洗涤的试验织物反射相比的差异

酶剂量：活性相同

A = 剩余活性（%），原始蛋白酶

B = 洗涤效率（% dR），原始蛋白酶

C = 剩余活性（%），三重突变体

D = 洗涤效率（% dR），三重突变体

定义：

Optimase L660=由地衣芽孢杆菌产生的碱性蛋白酶

Marlipal：聚乙二醇-异十三烷基醚

Walocel：2-羟乙基-纤维素醚

Sequinon：[[双[2-双(膦酰基甲基)氨基]-乙基]氨基]甲基]-膦酸，钠盐

Rewoteric：咪唑啉基的两性电解质

AADU：自动分析器 Delf 单位（Delf Units）

EMPA117：具有血/奶/墨汁污垢的聚酯/棉制品试验织物（Eidgenössische Materialprüfungsanstalt, Schweiz）

说 明 书 附 图

图.1

顺序记录

SEQ ID NO: 1 的信息

顺序特征

长度: 380 氨基酸

类型: 氨基酸

拓扑结构: 线型 :

分子的种类: 蛋白质

最初来源 :

生物体: 嗜碱芽孢杆菌 *Bacillus alcalophilus*
菌株 HA1, DSM 5466

特征:

名称/SCHLUESSEL: 成熟的肽

位置: 1..269

序列描述: SEQ ID NO: 1:

```

Met Lys Lys Pro Leu Gly Lys Ile Val Ala Ser Thr Ala Leu Leu
-110                               -105                               -100

Ile Ser Val Ala Phe Ser Ser Ser Ile Ala Ser Ala Ala Glu Glu
-95                               -90                               -85

Ala Lys Glu Lys Tyr Leu Ile Gly Phe Asn Glu Gln Glu Ala Val
-80                               -75                               -70

Ser Glu Phe Val Glu Gln Val Glu Ala Asn Asp Glu Val Ala Ile
-65                               -60                               -55

Leu Ser Glu Glu Glu Glu Val Glu Ile Glu Leu Leu His Glu Phe
-50                               -45                               -40

Glu Thr Ile Pro Val Leu Ser Val Glu Leu Ser Pro Glu Asp Val
-35                               -30                               -25

Asp Ala Leu Glu Leu Asp Pro Ala Ile Ser Tyr Ile Glu Glu Asp
-20                               -15                               -10

Ala Glu Val Thr Thr Met Ala Gln Ser Val Pro Trp Gly Ile Ser
-5                               1                               5

Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala His Asn Arg Gly Leu Thr Gly Ser
10                               15                               20

Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp Thr Gly Ile Ser Thr His Pro
25                               30                               35

Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser Phe Val Pro Gly Glu Pro
40                               45                               50
    
```

Ser Thr Gln Asp Gly Asn Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Thr
 55 60 65
 Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu Gly Val Ala Pro
 70 75 80
 Ser Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala Ser Gly Ser
 85 90 95
 Gly Ser Val Ser Ser Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala Gly Asn
 100 105 110
 Asn Gly Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Pro Ser Pro
 115 120 125
 Ser Ala Thr Leu Glu Gln Ala Val Asn Ser Ala Thr Ser Arg Gly
 130 135 140
 Val Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Gly Ala Gly Ser Ile
 145 150 155
 Ser Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr
 160 165 170
 Asp Gln Asn Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Ala Gly
 175 180 185
 Leu Asp Ile Val Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro
 190 195 200
 Gly Ser Thr Tyr Ala Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro
 205 210 215
 His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser
 220 225 230
 Trp Ser Asn Val Gln Ile Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr
 235 240 245
 Ser Leu Gly Ser Thr Asn Leu Tyr Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala
 250 255 260
 Glu Ala Ala Thr Arg
 265 269

图.2

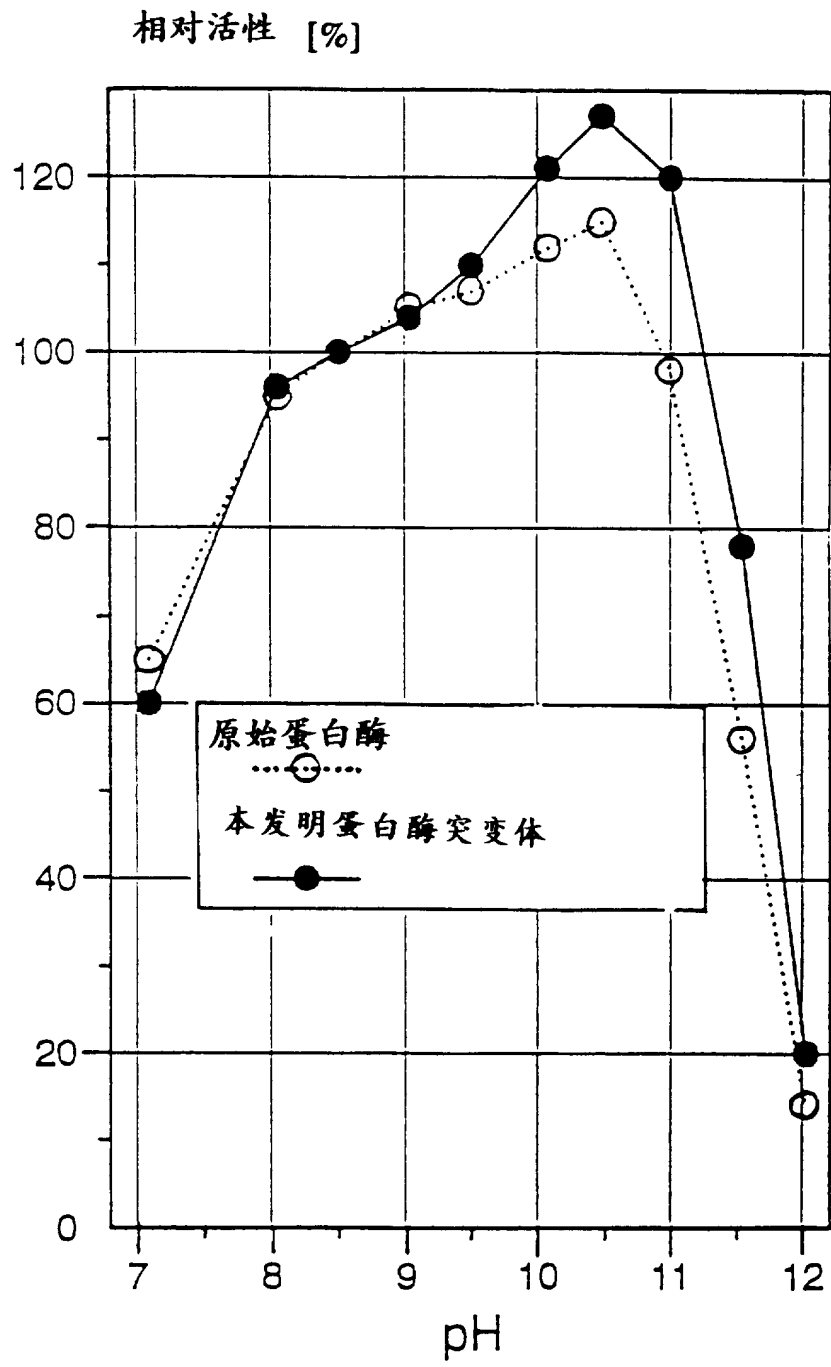


图.3

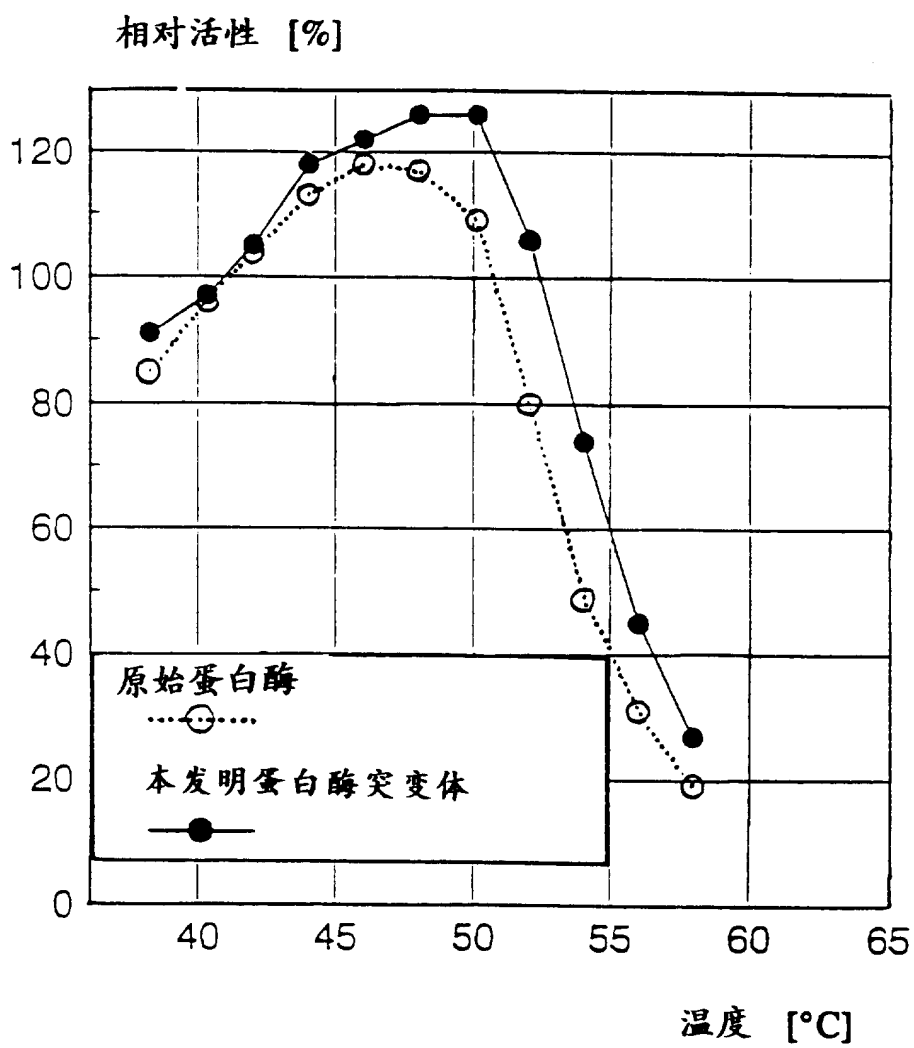


图.4

剩余活性 [%]

δ 反射度 [%]

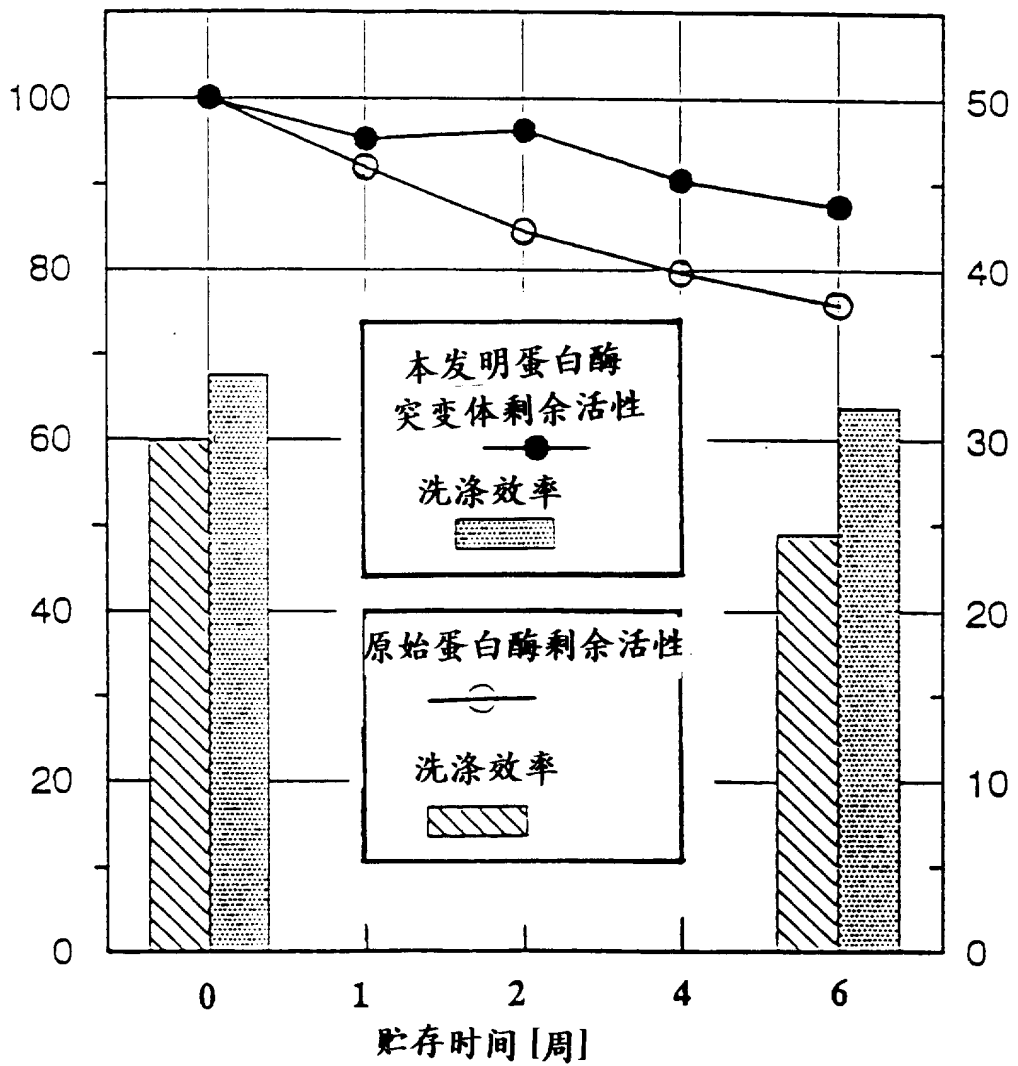


图.5

