

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02825541.0

[51] Int. Cl.

*C12N 15/57 (2006.01)*

*C12N 15/62 (2006.01)*

*C12N 9/54 (2006.01)*

*C12N 5/10 (2006.01)*

*C12N 1/21 (2006.01)*

*C11D 3/386 (2006.01)*

[45] 授权公告日 2008年2月6日

[11] 授权公告号 CN 100366746C

[51] Int. Cl. (续)

*D06M 15/15 (2006.01)*

[22] 申请日 2002.12.12 [21] 申请号 02825541.0

[30] 优先权

[32] 2001.12.22 [33] DE [31] 10163883.3

[86] 国际申请 PCT/EP2002/014129 2002.12.12

[87] 国际公布 WO2003/056017 德 2003.7.10

[85] 进入国家阶段日期 2004.6.18

[73] 专利权人 汉高两合股份公司

地址 德国杜塞尔多夫

[72] 发明人 安格里特·韦伯

安哥拉·黑勒布兰特 苏珊·施米茨

卡尔-海因茨·毛雷尔

贝娅特丽克丝·科特维茨

[56] 参考文献

MOLECULAR AND BIOTECHNOLOGICAL ASPECTS OF MICROBIAL PROTEASE. MALA. B. MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS, Vol. 62 No. 3. 1998

PURIFICATION AND PROPERTIES OF AN ALKALINE PROTEASE FROM ALKALOPHILIC BACILLUS SP. KSM - K16. T. KOBAYASHI. APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, Vol. 43 No. 3. 1995

审查员 王亦然

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任公司

代理人 杨青 樊卫民

权利要求书 3 页 说明书 89 页 附图 3 页

[54] 发明名称

芽孢杆菌种(DSM 14390)的新型碱性蛋白酶以及包含该新型碱性蛋白酶的洗涤产品和清洁产品

[57] 摘要

本发明涉及一种新的来自芽孢杆菌种(DSM 14390)的芽孢杆菌素型碱性蛋白酶及其各种不同的相关蛋白和衍生物。本发明进一步涉及包含此新的枯草杆菌素型碱性蛋白酶及其各种不同的相关蛋白和衍生物的洗涤剂 and 清洗剂, 相应的洗涤和清洁方法, 以及在洗涤剂和清洗剂中的应用, 和其它技术用途。

1. 一种枯草杆菌素型碱性蛋白酶，特征在于其是根据 SEQ ID NO.1 中的氨基酸编号通过点突变氨基酸 224V，250G 和 253N 或 97S，99S，101S，102V，157G，224V，250G 和 253N 而获得的。
2. 权利要求 1 所述的蛋白酶，特征在于其分别具有替换 A224V，S250G 和 S253N 或 D97S，R99S，A101S，I102V，S157G，A224V，S250G 和 S253N。
3. 权利要求 1 所述的蛋白酶，其中枯草杆菌肽酶用作突变的出发分子。
4. 权利要求 3 所述的蛋白酶，其中枯草杆菌素用作突变的出发分子。
5. 权利要求 4 所述的蛋白酶，其中来自迟缓芽孢杆菌（*Bacillus Lentus*）的碱性蛋白酶用作突变的出发分子。
6. 如权利要求 1-5 中任一项所述的蛋白酶，其特征在于其通过偶联低分子量化合物，通过化学转化侧链，通过共价结合双官能团化学化合物和/或大分子，和/或通过伴物质结合而另被衍生化。
7. 如权利要求 1-5 中任一项所述的蛋白酶，其特征在于其通过与聚合物偶联和/或通过点突变而被稳定化。
8. 芽孢杆菌种（*Bacillus sp.*）DSM 14390。
9. 一种编码枯草杆菌素型碱性蛋白酶的核酸，其核苷酸序列与 SEQ ID NO.1 中所示的核苷酸序列具有 100% 的同一性。

10. 一种核酸，其编码权利要求 1-7 所定义的蛋白酶之一。
11. 一种载体，其包括权利要求 10 所定义的核酸区域。
12. 一种如权利要求 11 所述的克隆载体。
13. 一种如权利要求 11 所述的表达载体。
14. 一种细胞，其包含权利要求 10 所述的核酸区域。
15. 权利要求 14 的细胞，其中核酸区域位于权利要求 11-13 任一项所述的载体上。
16. 一种宿主细胞，其通过利用权利要求 13 中所述的表达载体表达或可被诱导表达权利要求 1-7 中任一项所定义的蛋白酶。
17. 如权利要求 16 所述的宿主细胞，其特征在于其是一种将产生的蛋白分泌到周围介质中的细菌。
18. 如权利要求 17 所述的细胞，其特征在于其是一种革兰氏阳性细菌。
19. 如权利要求 18 所述的细胞，其中革兰氏阳性细菌是芽孢杆菌属的一种。
20. 如权利要求 19 所述的细胞，其中芽孢杆菌属的一种选自迟缓芽孢杆菌(*Bacillus lentus*)，地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)，解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)，枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)或亲碱芽孢杆菌(*Bacillus alcalophilus*)。

21. 如权利要求 14 或 16 所述的细胞，其特征在于其是一种翻译后对产生的蛋白进行修饰的真核细胞。

22. 一种生产权利要求 1-7 中所定义的蛋白酶之一的方法，其是利用如权利要求 10 中所述的核酸和/或利用如权利要求 11-13 中任一项所述的载体和/或利用如权利要求 14-21 中任一项所述的细胞。

23. 一种洗涤或清洁去污剂，其特征在于其包括如权利要求 1-7 中任一项所述的蛋白酶。

24. 一种用于改善蛋白酶的性能，与包含此蛋白酶的产品洗涤和/或清洁性能有关的方法，其特征在于根据 SEQ ID NO.1 中的氨基酸编号通过点突变氨基酸 224V, 250G 和 253N 或 97S, 99S, 101S, 102V, 157G, 224V, 250G 和 253N 而获取所述蛋白酶。

25. 如权利要求 24 所述的方法，特征在于替换分别是 A224V, S250G 和 S253N 或 D97S, R99S, A101S, I102V, S157G, A224V, S250G 和 S253N。

26. 如权利要求 24 或 25 所述的方法，特征在于枯草杆菌肽酶用作突变的出发分子。

27. 如权利要求 26 的所述方法，其中枯草杆菌素用作突变的出发分子。

28. 如权利要求 27 的所述方法，其中迟缓芽孢杆菌（*Bacillus Lentus*）的碱性蛋白酶用作突变的出发分子。

芽孢杆菌种(DSM 14390)的新型碱性蛋白酶  
以及包含该新型碱性蛋白酶的洗涤产品和清洁产品

本发明涉及枯草芽孢杆菌种(DSM 14390)的新的枯草杆菌素型碱性蛋白酶及其十分相关的蛋白和衍生物。本发明还涉及含有此枯草芽孢杆菌的新的枯草杆菌素型碱性蛋白酶、十分相关的蛋白及其衍生物的洗涤产品和清洁产品，相应的洗涤和清洁方法以及其在洗涤和清洁产品中的用途，以及可能的其他技术用途。

枯草杆菌素(subtilisin)型蛋白酶(Subtilase, 枯草杆菌肽酶, EC 3.4.21.62), 特别是枯草杆菌素由于催化活性的氨基酸被划归为丝氨酸蛋白酶。其是由微生物, 特别是芽孢杆菌种天然产生和分泌的。它们起着非特异内肽酶的作用, 也就是说它可水解任何位于肽或蛋白质内部的酰胺键。其最适 pH 大多处于明显的碱性范围。有关该家族的综述例如可见 R.Bott 和 C.Betzel 主编, New York, 1996 年出版的“Subtilisin enzymes”第 75-95 页中由 R.Siezen 撰写的文章“Subtilases: 枯草杆菌素样-蛋白酶(Subtilisin-like Proteases)”。枯草杆菌素适合于多种可能的技术应用, 如用作化妆品的组分, 特别是用作洗涤剂或清洗剂的活性成分。

酶是洗涤和清洁产品中已确立的活性成分。在这方面, 蛋白酶分解待清洁材料, 诸如织物或硬表面上的类蛋白质(proteinaceous)污渍。在有利情形下, 在酶和相关产品的其他成分之间存在协同效应。这例如描述在 US 6008178 中。由于它们有利的酶特性, 诸如稳定性或最适合 pH, 枯草蛋白素在洗涤和清洁产品蛋白酶中脱颖而出。最重要的枯草蛋白素及其技术开发方面的最重要对策如下所述。

洗涤产品蛋白酶的开发是基于优选由微生物产生的天然酶。它们

被本身已知的诱变方法，例如点突变、缺失、插入或与其他蛋白或蛋白部分融合，或者通过其他修饰方法而得以优化用于洗涤和清洁产品。

因此，例如，根据申请 WO 93/07276，蛋白酶 164-A1 得自芽孢杆菌种 164-A1，并由 Chemgen Corp., Gaithersburg, MD, USA 和 Vista Chemical Company, Austin, TX, USA 提供，适用于洗涤和清洁产品中。其他例子为来自芽孢杆菌种 PD138 的碱性蛋白酶，Novozymes 的 NCIMB 40338(WO 93/18140)，Kao Corp., Tokyo, Japan 的来自芽孢杆菌种 *ferm.* BP-3376 的蛋白酶 K-16(US 5344770)，以及根据 WO 96/25489(Procter & Gamble, Cincinnati, OH, USA)，来自嗜冷生物体大比目鱼黄杆菌(*Flavobacterium balustinum*)的蛋白酶。其他微生物源、适用于洗涤和清洁产品的蛋白酶从下列专利文献中也是已知的：例如来自假单胞菌(*Pseudomonas*)(WO 00/05352)，来自绿僵菌(*Metarrhizium*)(EP 601005)，来自亲碱芽孢杆菌(*Bacillus alkalophilus*)DMS 6845 或 DSM 5466(DE 4411223)和其他多种微生物(WO 95/07350, EP 1029920, EP 578712, WO 01/00764, US 6197740, WO 01/16285)。

枯草杆菌素 BPN' 分别来自解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)和枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)，已公开在下列文献中：Vasantha 等(1984), *J. Bacteriol.*, 第 159 卷, 第 811-819 页和 J.A. Wells 等(1983), *Nucleic Acids Research*, 第 11 卷, 第 7911-7925 页。枯草杆菌素 BPN' 用作枯草杆菌素的对照酶，尤其有关位置的编号。申请 CA 2049097 公开了这种分子的多种变体，尤其是有关它们在洗涤和清洁产品中的稳定性。变体在该酶的环区中通过点突变而获得，并且同时以水解速率增加的方式与底物结合降低，例如示出在专利申请 WO 95/07991 和 WO 95/30010 中。含有这种 BPN' 变体的洗涤产品例如公开在专利申请 WO 95/29979 中。

蛋白酶枯草杆菌素 Carlsberg 由 E.L. Smith 等人(1968)在 *J. Biol. Chem.*, 第 243 卷, 第 2184-2191 页和由 Jacobs 等人(1985)在 *Nucl. Acids Res.*, 第 13 卷, 第 8913-8926 页的出版物中进行了介绍。其天然来自于地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*), 并分别可从 Genencor International Inc., Rochester, New York, USA 以商品名 Maxatase®以及从丹麦 Novozymes A/S 公司, Bagsvaerd 以商品名 Alcalase®购得。通过点突变所获得的变体在提高水解速率的同时对底物的结合减少, 公开在例如申请 WO 96/28566 A2 中。在这些变体分子的环区中进行了一个或多个的替换。

蛋白酶 PB92 天然产自于亲碱细菌芽孢杆菌新种 92 和以商品名 Maxacal®从荷兰的 Gist-Brocades 公司, Delft 获得。其原始序列已在专利申请 EP 283075 A2 中述及。已通过点突变获得并适用于洗涤剂 and 清洗剂中的所述酶的变体, 例如, 在申请 WO 94/02618 和 EP 328229 中公开。

枯草杆菌蛋白酶 147 和 309 被 Novozymes 公司分别以商品名 Esperase®以及 Savinase®销售。其来源于芽孢杆菌菌株, 在申请 GB 1243784 中作了公开。例如在申请 WO 94/02618(参见上文), WO 89/06279, WO 95/30011 和 WO 99/27082 中公开了通过点突变开发的该酶的变体在洗涤产品和清洗产品中使用的情况。申请 WO 89/06279 旨在获取更高的氧化稳定性, 增加的水解速率以及改善的洗涤性能。该申请揭示了在特点位置上的取代改变了枯草杆菌素 147 或 309 分子的物理或化学特性。申请 WO 95/30011 介绍了在分子环区中具有点突变的枯草杆菌素 309 的变体, 并因此展示对底物的吸附减少, 同时水解速率增加。申请 WO 99/27082 通过例子方式开发了枯草杆菌素 309 的变体, 其洗涤性能通过插入至少一个氨基酸扩大活性环而得以增强。

迟缓芽孢杆菌(*B. lentus*)的碱性蛋白酶为得自于芽孢杆菌种

(*Bacillus species*)的高碱性蛋白酶。野生型酶衍生自亲碱性芽孢杆菌菌株，其自身显示对氧化具有相对高的稳定性和去污剂的作用。根据申请 WO 91/02792(EP 493398 和 US 5352604)，该菌株的保藏号为 DSM 5483。根据同样申请，该酶可在地衣芽孢杆菌宿主中异源表达。其三维结构描述在下列文献中：Goddette 等(1992)，*J. Mol. Biol.*，第 228 卷，第 580-595 页：“迟缓芽孢杆菌碱性蛋白酶枯草杆菌素 BL 的 1.4 Å 分辨率的晶体结构(The crystal structure of the *Bacillus lentus* alkaline protease, Subtilisin BL, at 1.4 Å resolution)”。该酶的变体可通过点突变获得，并适用于洗涤和清洁产品中，公开在 WO 92/21760(US 5340735 ， US 5500364 和 US 5985639) 和 WO 95/23221(US 5691295, US 5801039 和 5855625)。WO 95/23221 中的对策，即精心改变靠近底物结合口袋处的电荷条件，解释在 US 6197589 中。该蛋白酶的其他变体描述在尚未公布的申请 DE 10121463 和 DE 10153792 中。

枯草杆菌素 DY 最初描述在 Nedkov 等 1985, *Biol. Chem Hoppe-Seyler*，第 366 卷，第 421-430 页。根据申请 WO 96/28557，例如，其可通过在活性环中的特异性点突变而得以优化，产生具有吸附减少而水解速率增加的变体，用于洗涤剂 and 清洗剂中。

酶 thermitase 确定为 subtilase，不再确定为枯草杆菌素(参照，R. Siezen, 第 75-95 页，“枯草杆菌素酶(Subtilisin enzymes)”，由 R. Bott 和 C. Betzel 公开，New York, 1996)，并且由普通高温放线菌 (*Thermoactinomyces vulgaris*)天然产生，最初由 Meloun 等(*FEBS Lett.* 1983, 第 195-200 页)描述。例如，申请 WO 96/28558 公开了由环区中的替换产生具有吸附减少和水解速率增加的变体。然而，thermitase 为一种分子，其序列整体上相当大地偏离了其他枯草杆菌素的那些分子。

蛋白酶 K 也是一种例如与迟缓芽孢杆菌(*B. lentus*)碱性蛋白酶具

有相对低的同源性的 subtilase。蛋白酶 K 最初来自微生物林伯氏白色念球菌(*Tritirachium album* Limber)并且已在下列文献中加以描述：K.-D. Jany 和 B. Mayer 1985, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 第 366 卷, 第 485-492 页。申请 WO 96/28556 公开了多种蛋白酶 K 的变体, 这些变体通过点突变获得并具有对底物的吸附降低和水解速率的增加。

最后, WO 88/07581 公开了非常相似的蛋白酶 TW3 和 TW7, 尤其是用于洗涤和清洁产品中。

例如, 申请 EP 199404, EP 251446, WO 91/06637 和 WO 95/10591 描述了其他蛋白酶, 这些蛋白酶适合于技术用途, 尤其用于洗涤剂和清洗剂。申请 EP 199404 的蛋白酶为多种不同的 BPN'变体, 基于专利 EP 130756。EP 251446 公开了许多 BPN'变体, 这些变体通过替换单个氨基酸获得。申请 WO 91/06637 的蛋白酶的特征为 BPN'在位置 123 和/或位置 274 的点突变。WO 95/10591 揭示了主要为迟缓芽孢杆菌蛋白酶的变体, 这些变体在位置 76 发生突变, 并且在其他位置也有突变。

其他已知的蛋白酶例如为可获自 Novozymes 公司的商品名为 Durazym<sup>®</sup>, Release<sup>®</sup>, Everlase<sup>®</sup>, Nafizym, Natalase<sup>®</sup>和 Kannase<sup>®</sup>, Genencor 公司的商品名为 Purafect<sup>®</sup>, Purafect OXP<sup>®</sup>和 Properase<sup>®</sup>, 印度 Advanced Biochemicals Ltd.公司, Thane 的商品名为 Protosol<sup>®</sup>和中国 Wuxi Snyder Bioproducts Ltd.的商品名为 Wuxi<sup>®</sup>的蛋白酶。

一个改善枯草杆菌素洗涤功效的对策为在已知分子中随机或特异性用其他氨基酸替换单个氨基酸以及测试所获得变体对洗涤功效的作用。该对策的获取来自上述各个申请, 例如 EP 130756 中所示的一些其他进展。酶的变应原性(allergenicity)例如根据 WO 99/49056, WO 99/49057 和 WO 01/07575, 采用某些氨基酸替换或缺失而得以提高。

为改善枯草杆菌素的洗涤功效，许多申请运用了将其它氨基酸插入在活性环中的对策，例如除已述的申请 WO 99/27082 外，还有以下述公布号 WO 00/37599, WO 00/37621 至 WO 00/37627 和 WO 00/71683 至 WO 00/71691 所公开的申请。因此，所述对策在原理上应该适用于所有枯草杆菌素，这些枯草杆菌素隶属于亚组 I-S1(真正枯草杆菌素)或 I-S2(高碱性枯草杆菌素)。

另一提高性能的对策为修饰分子的表面电荷和/或等电点，由此改变它们与底物的相互作用。例如在下列文献中公开了这种变化：US 5665587 和申请 EP 405901，EP 945502 A1，WO 91/00334 和 WO 91/00345。WO 92/11348 公开了在分子电荷中减少 pH 依赖性变化的点突变。从该原理中，申请 WO 00/24924 衍生出一种识别变体的方法，这些变体推测适用于洗涤和清洁产品中；所有在此公开的变体具有至少一个在位置 103 的替换，优选多个含有与本申请无关的替换的变体。根据 WO 96/34935，为了提高洗涤和清洁产品的性能，也可能增加分子的疏水性，而这会影响酶的稳定性。

申请 WO 99/20727 公开了如通过申请 WO 00/24924 的方法所得到的枯草杆菌素变体：它们全部包含至少一个在位置 103 的取代，以及多个其他可能的替换。申请 WO 99/20723 和 WO 99/20726 公开了相同的用于洗涤和清洁产品的突变体，这些突变体另含有淀粉酶或漂白剂。

调节蛋白酶效率的另一方法是形成融合蛋白。因此，例如，申请 WO 98/13483 和 WO 00/01831 公开了包括蛋白酶和抑制剂，诸如链霉菌枯草杆菌素抑制剂的融合蛋白。例如，根据 WO 97/28243 或 WO 99/57250，另一可能的的方法是结合到来自纤维素酶的纤维素结合区(CBD)中，从而增加活性酶在底物的直接邻近处中的浓度。根据 WO 99/48918，变应原性或免疫原性通过结合肽接头及其上的聚合物

而得以减少。

例如，在 WO 99/20769 中，揭示了由于随机产生的氨基酸替换和随后的选择，变体的性能改善。例如在申请 WO 97/09446 中，揭示了基于噬菌体展示体系的随机方法，用于开发蛋白酶在洗涤和清洁产品中的应用。

现代的酶发展方向是将已知蛋白的相互有关的元件通过统计方法结合成到新酶中，使其具有迄今未达到的性能。这样的方法也概括地称为指导演化法，并包括例如下述的方法：StEP-法(Zhao 等人(1998), Nat. Biotechnol., 第 16 卷, 第 258-261 页), 随机引发重组法(Shao 等人(1998), Nucleic Acids Res., 第 26 卷, 第 681-683 页), DNA-改组(shuffling)法(Stemmer, W.P.C.(1994), Nature, 第 370 卷, 第 389-391 页)或回归序列重组法(RSR; WO 98/27230, WO 97/20078, WO 95/22625)或 RACHITT(Coco, W.M.等人(2001), Nat. Biotechnol., 第 19 卷, 第 354-359 页)。这些方法的综述提供在下列在先文章中：“Gerichtete Evolution und Biokatalyse”, Powell 等(2001), Angew. Chem., 第 113 卷, 第 4068-4080 页。

另一特别的补充对策为提高所涉及蛋白酶的稳定性和由此增加其作用效能。例如在 US 5230891 中叙述了通过与聚合物结合提高了蛋白酶在化妆品中的稳定性；所述稳定性伴随着皮肤相容性的增强。尤其对洗涤剂 and 清洗剂而言，与其不同，常用的稳定法是借助于点突变。因此按照 US 6087315 和 US 6110884，采用其他氨基酸残基替换特定的酪氨酸残基可使蛋白酶稳定。WO 89/09819 和 WO 89/09830 描述了通过氨基酸替换获得的相对热稳定的 BPN'变体。其他通过点突变来提高稳定性的可能的例子为：

-根据 WO 92/19729，和分别根据 EP 583339 和 US 5858757，以及根据 EP 516200，以脯氨酸替换特定的氨基酸残基；

-按照 EP 525610，EP 995801 和 US 5453372 向分子表面引入更高

极性或较多电荷的基团；

-增强金属离子的结合，特别是通过突变钙结合位点，例如按照申请 WO 88/08028 和 WO 88/08033 的教导；

-通过修饰或突变阻断自消化，例如根据 WO 98/20116 或 US 5543302；

-组合如在申请 EP 398539 A1 中公开的多个稳定对策；

-根据 US 5340735，US 5500364，US 5985639 和 US 6136553，与稳定性相关的位置可通过分析三维结构而找到。

为了增加洗涤或清洁性能，例如文献 EP 755999 和 WO 98/30669 公开了蛋白酶可与 $\alpha$ -淀粉酶和其他洗涤产品用酶一起使用。例如，EP 791046 公开了与脂肪酶组合的可能性。例如，申请 WO 95/10592 揭示了先前在 WO 95/10591 中描述的用于洗涤产品中的变体也适用于漂白剂。例如，US 6121226 公开了同时把蛋白酶和去污剂用于洗涤产品中。

例如，申请 WO 97/07770 公开了一些已确定用于洗涤产品中的蛋白酶也适用于化妆品目的。例如在申请 EP 380362 A1 中描述了蛋白酶其他可能的技术应用。这涉及有机化学合成，并且根据该申请，据说适用于此的枯草杆菌素是那些通过点突变而稳定的枯草杆菌素。

在此以示例方式提出的各种技术领域要求具有不同特性的蛋白酶，所述特性例如涉及反应条件，稳定性或底物特异性。相反，蛋白酶技术应用的可能性例如在洗涤或清洁产品配方的情形下，依赖于其他因素，诸如酶对温度的稳定性，对氧化剂的稳定性，通过表面活性剂的变性，折叠作用或者与其他成分所需的协同效应。

因此，对蛋白酶继续存在大量需求，所述蛋白酶技术上可用，并且由于其众多的应用领域，在整体上覆盖大范围的特性，包括性能上非常细小的差别。

这种需求的基础通过新型蛋白酶而扩大，而新型蛋白酶反过来又能够进一步开发靶向具体的应用领域。

因此，本发明目的是基于发现另一尚未知晓的蛋白酶。预计野生型酶优选的特征在于，当用于合适的产品中时，它至少接近于已确定用于此目的的酶。在这方面，尤其感兴趣的是有助于洗涤或清洁产品性能的提高。

另一次要目的是提供编码此种蛋白酶的核酸，并且提供载体，宿主细胞以及可用来获得此种蛋白酶的制备方法。其进一步的目的是提供相应的产品，尤其是洗涤和清洁产品，相应的洗涤和清洁方法，还有相应的此种蛋白酶的可能用途。最后，旨在限定所发现的蛋白酶的可能技术应用。

目的的实现来自枯草杆菌素型碱性蛋白酶，其氨基酸序列与 SEQ ID NO.2 所示的氨基酸序列具有至少 98.5% 的同一性。

在各种情况下，那些与来自芽孢杆菌种(DSM 14390)的新型碱性蛋白酶的同源性程度提高的酶优选性增加。

因此，在本发明各种内在的方面，其他目的或次要目的的实现包括核酸，所述核酸的序列与 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列或编码本发明蛋白酶的核苷酸序列具有足够的相似性，并且包括合适的载体，细胞或宿主细胞以及制备方法。本发明还提供相应的产品，尤其是洗涤和清洁产品，相应的洗涤和清洁产品，以及相应的此种蛋白酶的可能应用。最后，限定了所发现的蛋白酶的可能技术用途。

根据本申请，蛋白表示由天然氨基酸组成的聚合物，基本上为线性结构，并且通常采用三维结构发挥其功能。本申请是指 19 种生成

蛋白的天然 L-氨基酸，国际上以 1-字和 3-字代码表示。任意这些名称和数字的组合表示特定蛋白在各自位置所携带的氨基酸残基。相同的命名建立在点突变上。除非另有所述，所示的位置是指相关蛋白的各种成熟形式，即无信号肽(参见下文)。

根据本申请，酶是指一种蛋白质，它起着某种生化功能。蛋白酶或者具有蛋白酶解功能的酶例如，通常理解为那些水解蛋白质的酰胺键(特别是那些位于蛋白质内部的键)的蛋白酶或酶，因此它们也被叫做内肽酶。枯草杆菌素蛋白酶就是这样的内肽酶，其由革兰氏阳性菌天然形成并且一般是分泌型的，或者是由其例如通过分子生物方法从后者衍生的，并且经部分区域例如形成结构的或者携带官能团的区域与天然枯草杆菌素蛋白酶成为同系物。它们被指定为 subtilase。例如描述在 R. Siezen 的文章“Subtilases: 枯草杆菌素样-蛋白酶”，《枯草杆菌素酶》(“Subtilisin enzymes”)第 75 至 95 页，由 R. Bott 和 C. Betzel 编辑，New York, 1996。

很多蛋白质，作为所谓的蛋白前体(Praproteine)，与一个信号肽一起形成。在这种情况下，信号肽表示这种蛋白的 N-末端，其功能通常是保证形成的蛋白质从生产细胞释放到胞质或者周围的介质中，和/或保证其正确的折叠。然后信号肽在自然状态下被一种信号肽酶从原始蛋白上切下来，从而使蛋白在初始没有 N 末端氨基酸的情况下具有其真正的催化活性。

由于它们的酶活性，成熟的肽即合成后经处理的酶比起蛋白前体来说在技术应用上更受青睐。

前体蛋白(Pro-Proteine)就是没有活性的蛋白前体。其具有信号序列的前体(Vorlaufer)被称作前体蛋白的前体(Pra-Pro-Proteine)。

根据本申请，核酸是那些天然由核苷酸组成并被称作信息载体的

分子，其用于编码蛋白质或酶中的线性氨基酸序列。它们可能是单链的，也可能是互补于此单链的单链，或者是双链。对于分子生物学工作而言，作为天然永久的信息载体，这些核酸 DNA 更适用于分子生物学工程。相比之下，为了在自然环境中例如在正在表达的细胞中实施本发明，形成 RNA，从而对于本发明有很重要作用的 RNA 分子亦代表本发明的实施方案。反过来，例如通过反转录，(c)DNA 分子可从中得以衍生。

根据本申请，对应于蛋白质的核酸信息单元被称作基因。在 DNA 中，所有三种可能的读码框中的两条互补链的序列都必须考虑到。此外，需要注意的是，不同的密码三联体可编码同一种氨基酸，因此，某种特定氨基酸序列可以从许多不同的并且也许仅有非常低同一性的核苷酸序列(遗传密码子的简并性)得到。除此以外，不同的生物在应用密码子上也存在差异。由于这些原因，不管是氨基酸序列还是核苷酸序列都必须列入保护范围，并且公开的核苷酸序列在每种情况下应只被看作编码某氨基酸序列的举例。

在目前常用方法的帮助下，如化学合成或者聚合酶链式反应(PCR)，结合分子生物学和/或蛋白质化学的标准方法，专业技术人员已经能够根据已知 DNA 和/或氨基酸序列生产完整的基因。这种方法是已知的，例如公开在“生化百科全书(Lexikon der Biochemie)”，Spektrum Akademischer Verlag, Berlin, 1999, 第 1 卷, 第 267-271 页和第 2 卷, 第 227-229 页上。具体而言，如果采用保藏在菌种保藏机构的菌株，这也是可能的。例如，利用基于已知序列合成的 PCR 引物或通过分离的 mRNA 分子，有可能进行合成，克隆以及如果需要进一步加工，例如从这些菌株中突变处理目的基因。

核苷酸序列的变化，诸如那些通过本身已知的分子生物学方法得到的变化被称为突变。根据变化的类型，已知突变分为例如缺失突变、插入突变、替代突变，或者不同的基因或基因的不同部分被相互融合

在一起(“改组”)的突变; 这些就是基因突变。与此相关的生物就称为突变体。从这些突变核酸中得到的蛋白被称为变体。例如, 缺失突变、插入突变、替代突变或者融合导致了基因的缺失突变、插入突变、替代突变或融合, 以及在蛋白质水平上, 导致对应的缺失变体、插入变体或者替代变体或者融合蛋白。

根据本申请, 载体被认为是由核酸组成的元件, 这些元件包括一个目的基因作为特征核酸区。它们能够在物种或细胞系中经若干代或细胞分裂作为稳定的遗传元件建立所述基因, 所述遗传元件能够独立于基因组的其他部分复制。载体是特殊的质粒, 即环形的遗传元件, 尤其是它们被用于细菌的时候。在基因工程中, 用于储存进而进行基因操作的载体(即所谓的克隆载体)与在宿主细胞中生成目的基因即促进特定蛋白表达的载体是有区别的。这些载体都被认为是表达载体。

包括所述载体的细菌细胞和真核生物细胞不管其差异, 都统称为细胞。含有载体, 特别是表达载体并因此可被诱导表达转基因的细胞称为宿主细胞, 因为它们内含相关的基因体系。

同源化是一种核酸或氨基酸序列与已知基因或蛋白的比较。例如, 通过比对进行。同源性的度量为同一性的百分比, 如通过下列文献中所示方法可加以确定: D.J. Lipman 和 W.R. Pearson, *Science* **227** (1985), 第 1435-1441 页。该信息在各种情况下可指完整蛋白或待指定的区域。比同源性概念更宽的是相似性, 也包括保守变异, 即具有相似化学活性的氨基酸, 因为考虑到它们在蛋白内通常具有相似的化学活性。对核酸而言, 仅仅知道同一性的百分比。

通过同源化, 从氨基酸或核苷酸序列中有可能推测出单个序列区域的功能, 以及所涉及的完整酶的活性。不同蛋白之间的同源区域具有可比较的功能, 这些功能在一级氨基酸序列中可被识别为同一性或保守替换。它们包括单个氨基酸, 称作盒的非常小的区域, 其在氨基

酸一级序列中的长度有数个氨基酸，一直至长的区域。因此，同源区的功能理解上也包括由完整蛋白所实施功能的非常小的部分功能，例如单个氢键的形成或底物的络合或者过渡络合物。不参与真正酶法反应的蛋白的其他区域可对它们进行定性或定量修饰。例如，这涉及酶的稳定性，活性，反应条件或底物特异性。

因此，术语蛋白水解酶或蛋白酶表示除催化活性部位的少量氨基酸残基的功能外的所有功能，这些功能是通过其余蛋白质全部或其一部分或大部分对真正的催化活性区域的影响而产生的。根据本发明，这些修饰的功能或部分活性，只要它们有助于蛋白酶解反应，单独也被认为是蛋白酶解活性。辅助功能或者部分活性包括，例如底物的结合、中间产物或者终产物的结合、激活或抑制或介导对水解活性的控制效果。另一种可能的例子是形成远离活性中心的结构单元。对于本发明的水解蛋白质来说，第二个前提条件正是通过真正的活性残基本身的化学行为或者附加地通过修饰部分的作用获得肽键的水解。此外同样可以通过例如本发明蛋白质的一个或多个部分定性或定量地修饰其它蛋白酶的活性。其它因素的影响也被认为是蛋白酶解活性。活性蛋白酶同样也是那些其活性在给定的时间例如通过抑制剂而封闭的酶。它们主要适于进行相应的蛋白酶解反应是至关重要的。

片段是指那些比天然蛋白质或那些对应于完全翻译的基因更短并且例如也可通过合成得到的任何蛋白或者肽。由于它们的氨基酸序列，它们可涉及相应的完整蛋白。例如它们可以具有相同的结构，或可发挥蛋白水解活性或者部分活性。片段及初始蛋白的缺失变体基本上是一样的。然而，片段是相对较小的，缺失变体只是缺失小区域因此仅缺乏个别的部分功能。

根据本申请，嵌合或者杂交蛋白是由那些来自相同或不同生物的不同多肽链天然产生的元件组成的蛋白。这个过程也就是改组或融合突变。融合的目的是例如，在融合部分本发明的蛋白的帮助下生成或

者修饰某种酶的功能。

通过插入突变得到的蛋白被称为是变体，这种变体能够通过本身已知的方法把核酸片段或蛋白片段插入到起始序列中而得到。因为它们的原理相同，应将它们归类为嵌合蛋白中。在这些嵌合蛋白中，区别仅在于蛋白的不变部分与整个蛋白的大小比例不同。在插入突变蛋白中，外源蛋白的比例低于嵌合蛋白。

倒置突变，即部分序列的倒置，被看作一种缺失和插入的特殊形式。同样适用于分子不同部分的重组，这与原始的氨基酸序列相异。这也可以被看作是一种缺失变体，作为原始蛋白的插入变体或者改组变体。

根据本申请，衍生物是指其纯的氨基酸链已经化学修饰的蛋白。这种衍生化作用可通过宿主生物以生物方法结合蛋白合成进行。分子生物学的方法可以用于此目的，例如与确保相关修饰的基因共转化。然而，这些衍生物也可以化学方法来实施，例如将氨基酸的侧链化学转化或者通过共价结合将另一个化合物结合到蛋白上。该化合物可以是如通过双官能化合物与本发明所述的蛋白结合的其他蛋白。当结合的底物是抑制剂时，这种修饰例如可以影响底物的特异性或者与该底物的结合强度，或者导致酶活性的暂时性冻结。例如这对于储存的时间也是有用的。衍生化作用也被认为对大分子支持物的共价结合。

根据本发明，所有的酶、蛋白、片段、融合蛋白及衍生物被集体的冠以上位概念蛋白，除非它们需要清晰的指称。

酶的性能在各种情形下被认为是在所属技术领域里的功效，优选在相应定向的产品的范围。所述性能是基于实际的酶解活性，但是也依赖于其他与这个过程相关的因素。这些因素包括例如稳定性、底物结合、与携底物的物质相互作用或与其他成分相互作用，尤其是协同

作用。

根据本申请，洗涤剂的洗涤或清洁性能是指所涉及的产品对含污物品例如织物或者具有硬表面的物体所发挥的效果。评价这些产品中的单个组分例如单个酶对完整的洗涤或清洁产品的洗涤或清洁性能的作用。毕竟由一种酶的酶解性能不可能轻易地推断出所述酶对产品的洗涤功效的作用。在除去污物时，在这里发挥作用的其它因素例如有稳定性、底物结合、待洗涤物与所述洗涤或清洁产品中的其它成分的结合和相互作用，尤其是协同效应在除去污渍时也起重要作用。

本发明的基础是天然生成的枯草杆菌素型碱性蛋白酶，如从实施例中确认的，可获自菌株芽孢杆菌种(DSM 14390)的培养上清液。

依据 1997 年 4 月 28 日鉴定的布达佩斯条约对微生物保藏机构的国际认可，该菌株于 2001 年 3 月 1 日保藏在德意志微生物保藏中心(the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)(DSMZ) Mascheroder Weg 1b , 38124 Brunswick (<http://www.dsmz.de>)。其名称为 ID 01-191，保藏号为 DSM 14390。有关该生物材料特征的标准信息，如 2001 年 4 月 19 日 DSMZ 对保藏菌株所确定的，编辑在表 1(实施例 1)中。

本专利申请遵循的对策是在天然产地发现一种产蛋白酶的微生物，以及由此发现最大可能地满足所述的要求的一种天然产生的酶。

可发现这样一种酶，如本申请的实施例中所述，其以碱性蛋白酶的形式存在，来自芽孢杆菌种(DSM 14390)。

正如所确立的，超出了由德意志微生物保藏中心(DSMZ)所进行的生化鉴定，并且显示在实施例 1 的表 1 中，该菌株分泌蛋白水解活性。根据本申请的示例性实施方案，这一直加以研究，并可进行如下

描述：根据 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳，其为 26 kD 的蛋白，等电聚焦确定等电点为 11。对底物 AAPF 的比活性为 69 U/mg。在 50°C 确定时，其最适 pH 为 11。

根据本发明，芽孢杆菌种(DSM 14390)的新型碱性蛋白酶的核苷酸序列以 SEQ ID NO.1 示于本申请的序列表中。其包含 1143 bp。从其衍生的氨基酸序列示于 SEQ ID NO.2 中。其包含 380 个氨基酸，后面为终止密码子。前 111 个氨基酸极可能不存在于成熟蛋白中，因此，成熟蛋白的长度预计为 269 个氨基酸。

如实施例 2 中所述，将这些序列与已知蛋白酶序列比较，这些已知序列一般来自可达的数据库 Swiss-Prot(Geneva Bioinformatics (GeneBio) S.A., Geneva, Switzerland; <http://www.genebio.com/sprot.html>) 和 GenBank(National Center for Biotechnology Information NCBI, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)。

通过该途径，在 DNA 水平上，下列 3 种基因被鉴定成最相似的完整基因：(1) 来自亲碱芽孢杆菌 (*Bacillus alkalophilus*)(ID ELYA\_BACAO)的枯草杆菌素 P92 具有 90%的同一性，(2)来自芽孢杆菌 Ya-B(ID ELYA\_BACSP)的碱性弹性酶具有 72%的同一性以及(3)来自仙台芽孢杆菌(*Bacillus Sendai*)(ID Q45522)的仙台枯草杆菌素具有 69%的同一性。

在氨基酸水平，那些鉴定成最相似的完整前体蛋白的前体为：(1) 来自亲碱芽孢杆菌(*Bacillus alkalophilus*)(ID ELYA\_BACAO)的枯草杆菌素 P92 具有 98%的同一性，(2)来自芽孢杆菌 Ya-B(ID ELYA\_BACSP)的碱性弹性酶具有 80%的同一性，以及(3)来自仙台芽孢杆菌(*Bacillus Sendai*)(ID Q45522)的仙台枯草杆菌素具有 73%的同一性。

在氨基酸水平，那些被鉴定成最相似的成熟蛋白为：(1)来自迟缓

芽孢杆菌 (*Bacillus lentus*)(ID SUBS\_BACLE) 的枯草杆菌素 309(Savinase<sup>®</sup>)具有 99%的同一性, 也就是说在成熟蛋白内只有 3 种不同的氨基酸; 接着是亲碱芽孢杆菌 (*Bacillus alkalophilus*)(ID ELYA\_BACAO)的枯草杆菌素 P92 具有 98%的同一性, 或者有 5 个不同的位置, 以及(3)迟缓芽孢杆菌(*Bacillus lentus*)DSM 5483(ID SUBB\_BACLE)的迟缓杆菌碱性蛋白酶具有 97%的同一性, 或者有 8 个氨基酸不同。

其他相似的酶列在实施例 2 中的表 2 中, 并且在图 1 中对成熟蛋白的氨基酸序列与本发明来自芽孢杆菌种(DSM 14390)的碱性蛋白酶进行比对。

在鉴定的一致性以及与其他所示枯草杆菌素的关系基础上, 这种碱性蛋白酶被认为是枯草杆菌素。

因此, 本发明的一个主题为每一种枯草杆菌素型碱性蛋白酶, 其氨基酸序列与 SEQ ID NO.2 中所示的氨基酸序列具有至少 98.5%的同一性。

其中, 愈加优选的是那些酶的氨基酸序列与 SEQ ID NO.2 所示的氨基酸序列分别具有至少 98.6%, 98.7%, 98.75%, 98.8%, 98.9%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 和 100%的同一性。

这是因为, 可以预计其特性与芽孢杆菌种(*B. sp.*)(DSM 14390)的碱性蛋白酶具有增加的相似性。

如上所述, 在比较 N-端序列的基础上, 第 1-111 位氨基酸假设为前导肽, 并且根据 SEQ ID NO.2, 成熟蛋白设想从 112 位延伸到 380 位。因此, 位置 381 被一个终止密码子占据, 由此实际上不对应氨基

酸。然而，由于有关编码区终点的信息可被视为氨基酸序列的重要组成部分，因此，根据本发明，该位置包括在对应于成熟蛋白的区域中。

因此，在这方面，本发明的一个实施方案为每一种枯草杆菌素型碱性蛋白酶，其氨基酸序列在 112 位至 381 位与 SEQ ID NO.2 所示的氨基酸序列具有至少 99.3% 的同一性。

其中，愈加优选的是那些酶的氨基酸序列在 112 位到 381 位与 SEQ ID NO.2 所示的氨基酸序列分别具有至少 99.4%，99.5%，99.6%，99.7%，99.8%，99.9% 和 100% 的同一性。

例如，通过 N-端测序由芽孢杆菌种(DSM 14390)体内释放的酶解蛋白，根据 SEQ ID NO.2，如果出现切割位点不位于的 111 位和 112 位之间，则在此情形下，这些叙述涉及实际的成熟蛋白。

在这方面，本发明的一个实施方案为每一种枯草杆菌素型碱性蛋白酶，其衍生自一种核苷酸序列，所述核苷酸序列与 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列具有至少 92.5% 的同一性，尤其在对应于 SEQ ID NO.2 中所示位置 112 到位置 381 的部分区域上。

其中，愈加优选的是那些酶衍生的核苷酸序列与 SEQ ID NO.1 中所示核苷酸序列分别具有至少 93%，93.5%，94%，94.5%，95%，95.5%，96%，96.5%，97%，97.5%，98%，98.2%，98.4%，98.6%，98.8%，99%，99.2%，99.3%，99.4%，99.5%，99.6%，99.7%，99.8%，99.9% 和 100% 的同一性，尤其是在对应于 SEQ ID NO.2 中所示位置 112 到位置 381 的部分区域上。

这是因为，可以预计，这些核酸编码蛋白，其特性逐渐相似于那些来自芽孢杆菌种(DSM 14390)的碱性蛋白酶，尤其是成熟蛋白。如果出现蛋白的切割位点位于上述位置以外的其他地方，在这种情形下

亦是如此，至于下列所有实施方案，这些叙述涉及实际的成熟蛋白也是真实的。

在这方面，本发明的最优选的实施方案为每一种枯草杆菌素型碱性蛋白酶，其氨基酸序列整体上与 SEQ ID NO.2 所示的氨基酸序列是相同的，优选在其 112 位到 381 位相同，和/或其氨基酸序列整体上与从 SEQ ID NO.1 所示核苷酸序列中衍生的氨基酸序列是相同的，优选在 SEQ ID NO.2 所示的位置 112 到位置 381 中相同。

这是因为，这样一种序列构成了本申请可提供的新发现的芽孢杆菌种(DSM 14390)的碱性蛋白酶。

这种蛋白酶在现有技术中是尚未知晓的。如实施例所述，其可进行分离，制备和使用。同样如实施例中所记载的，它另外的特征为在适当产品的应用中，接近或者在某些情况下甚至超过为此目的建立的酶的性能。

作为微生物天然产生的酶，其可用作出发点，以开发工业用蛋白酶，所述蛋白酶可具体用于洗涤产品中，目的是通过本身已知的突变方法，例如点突变，片段化，缺失，插入或与其他蛋白或蛋白部分融合，或者通过其他修饰方法来优化目的用途。这种优化作用可例如适用于温度效应，pH 变化，氧还条件和/或其他与应用技术领域相关的影响因素。迫切需要的例子是如下改进：对氧化的抗性，对变性剂或蛋白酶降解的稳定性，对高温，酸性或强碱性条件的稳定性，对钙离子或其他辅助因子的灵敏度的变化，以及免疫原性或变应原作用的减少。

为此目的，例如应用 WO 00/36069 的教导，通过靶向的点突变，可改变参与催化或底物结合的表面电荷或环。后者公开在例如 WO 95/30011，WO 99/27082，WO 00/37599，WO 00/37621 至

WO 00/37627 和 WO 00/71683 至 WO 00/71691 中。例如应用申请 WO 92/21760 和 WO 95/23221 的教导，可以进行尤其是通过基因工程方法导入的其他修饰。为此的出发点是本申请中图 1 所示的比对。这使得目的位置成为可能，这些位置描述在所述申请中，因为芽孢杆菌种(DSM 14390)的蛋白酶推导自己知酶，并且通过本身已知的方法适当加以改变。

突变方法是基于 SEQ ID NO.1 中所示的相关核苷酸序列，或者与其足够相似的核苷酸序列，并且在下文描述成本发明的单独主题。适当的分子生物学方法描述在现有技术中，例如 Fritsch, Sambrook 和 Maniatis “分子克隆：实验室手册”，Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1989。

在特别优选的实施方案中，点突变导致在相应蛋白酶的性能中的改善，尤其是导致其对相应产品的洗涤或清洁性能的贡献的改善。本申请的实施例显示，本发明芽孢杆菌种(DSM 14390)的蛋白所显示的性能在某些情况下好于非常相似的 Savinase<sup>®</sup>酶和迟缓芽孢杆菌碱性蛋白酶。正如可从图 1 的比对中推导出的，芽孢杆菌种(DSM 14390)的蛋白酶与 Savinase<sup>®</sup>在 3 个位置上有区别：位置 224(根据本发明蛋白酶的氨基酸编号，如 SEQ ID NO.1 所示)，V 代替 A；位置 250，G 代替 S；以及位置 253，N 代替 S。通过与迟缓芽孢杆菌(DSM 5483)的碱性蛋白酶比较，存在同样的差异。该酶的其他差异为位置 97 的 S 代替 D(根据本发明蛋白酶的氨基酸编号，如 SEQ ID No.1 中所示)，位置 99 的 S 代替 R，位置 101 的 S 代替 A，位置 102 的 V 代替 I，以及位置 157 的 G 代替 S。因此，特别优选落入上述保护范围内的蛋白酶，其具有一个或多个对应于芽孢杆菌种(DSM 14930)的蛋白酶的氨基酸位置。其中，更特别优选的是那些在位置 224，250 和 253 分别具有三种氨基酸 V，G 和/或 N 中的一个或多个的蛋白酶。

本发明的其他实施方案为通过片段化或缺失突变而衍生自上述本

发明枯草杆菌型碱性蛋白酶的所有蛋白或片段，并具有愈加优选的至少 225, 230, 235, 240, 245, 250, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 343, 350 和 360 个氨基酸，它们已经连接在初始分子中，并位于出发氨基酸序列的开始，内部或结束处，或者那些具有愈加优选的 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 343 和 360 个氨基酸，它们已经连接在初始分子中，并且包括根据 SEQ ID NO.1 所示氨基酸编号的位置 224。

从图 1 的比对中显而易见，芽孢杆菌种(DSM 14390)的成熟蛋白酶的氨基酸序列根据 SEQ ID NO.1 中的氨基酸编号直到位置 224 或者根据比对编号直到位置 230 与迟缓芽孢杆菌的蛋白酶(SUBS\_BACLE, Savinase<sup>®</sup>)都是相同的。因此，通过片段化或缺失突变而衍生的本发明的蛋白或片段具有相对大的区域，这些区域与已知蛋白酶是不相同的，或者那些具有此位置适于区分的区域。为此，正如从芽孢杆菌 Ya-B 的弹性酶比较中显而易见，后者的长度必须至少有 40 个氨基酸。这是因为，在比对编号的位置 230 处同样具有 V 的最相似的蛋白酶在总共 39 个位置的该区域中与芽孢杆菌种(DSM 14390)是相同的。

所述片段和/或缺失变体优选对应于 SEQ ID NO.2 的氨基酸 112 到 381 的区域，也就是成熟蛋白。

在各种情形下，有愈加优选的通过片段化或缺失突变而衍生的蛋白或片段，这些蛋白或片段与 SEQ ID NO.2 所示的同源序列分别具有至少 99.3%，99.5%，99.75%和 100%的同一性。

本发明的片段表示所有小于同源蛋白的蛋白或肽，所述同源蛋白对应于 SEQ ID NO.1 或 SEQ ID NO.2，但在适当的部分序列上与它们相一致。这些片段例如可以是单一结构域或区段，所述区段与结构域

不相一致。这样的区段可以以较低成本生产，不再具有某些出发分子可能的不利特性，诸如可能的活性降低调节机制，或展示更有利的活性分布图。这样的蛋白片段也可以以非生物合成的方式但例如通过化学方法生产。例如当合成后需要进行化学修饰时，化学合成是有利的。

通过缺失突变获得的蛋白也被指定为片段，因为它们在原理上是类似的。缺失突变特别值得用来缺失抑制区域。缺失的结果既可与专一化相关，也可与延伸蛋白应用的范围相关。

通过消除 N-端氨基酸从前提蛋白获得的蛋白以及信号肽也可被视为天然形成的片段或缺失突变的蛋白。这样一种切割机制可用来例如借助于被信号肽酶所识别的特定序列区域的帮助，在重组蛋白中规定特异的切割位点。因此，有可能在体外进行本发明蛋白的激活和/或钝化。

本发明的其他实施方案是所有通过插入突变，通过替换突变和/或通过与至少一种其他蛋白或蛋白片段融合而衍生自上述本发明枯草杆菌素型碱性蛋白酶的蛋白。

本发明的嵌合蛋白在最大意义上展示蛋白水解活性。这可通过衍生自本发明蛋白的分子部分实施或修饰。因此，嵌合蛋白也可位于上述区域之外的整个长度上。借助于本发明的蛋白上融合的部分，这样的融合点例如导入或修饰特定功能或部分功能。就此而论，对于本发明的目的而言，它是非实质的，不管这样的嵌合蛋白是否由单个多肽链或多个亚基组成。为了实施上述的替代法，例如，在翻译后或仅在纯化步骤之后通过特异蛋白酶解切割，有可能将单个嵌合多肽链降解成多个亚基。

因此，例如，基于 WO 99/57254，通过肽接头或直接作为与其他蛋白的结合区，例如纤维素结合区的融合蛋白，有可能提供本发明的

蛋白或其部分，从而使得底物的水解更有效。这样的结合区也可源自蛋白酶，例如为了增强本发明的蛋白与蛋白酶底物的结合。这提高了蛋白酶的局部浓度，在个别应用中可能是有利的，例如在原料的处理中。对于本发明的蛋白同样有可能加以连接到例如淀粉酶或纤维素酶，以执行双重功能。

通过插入突变获得的本发明的蛋白由于在原理上是相似的，因此被指定为本发明的嵌合蛋白。这些嵌合蛋白也包括替换变体，也就是说其中分子的单个区域已被其他蛋白的元件所替换的那些变体。

正如在杂交体形成的情况下，插入和替换突变的点是将本发明蛋白的单独特性，功能或部分功能与其他蛋白相结合。这也包括例如通过改组或重组不同蛋白酶的部分序列而获得的变体。以此方式有可能获得以前未曾描述的蛋白。这种技术允许从显著的活性调制到很精细的活性调制的作用。

这种突变优选通过随机方法进行，以指定到定向演化的领域，例如，通过 StEP 方法(Zhao 等(1998), *Nat. Biotechnol.*, 第 16 卷, 第 258-261 页), 随机引发重组(Shao 等(1998), *Nucleic Acids Res.*, 第 26 卷, 第 681-683 页), DNA 改组(Stemmer, W.P.C. (1994), *Nature*, 第 370 卷, 第 389-391 页)或回归序列重组(RSR; WO 98/27230, WO 97/20078, WO 95/22625)或 RACHITT 法(Coco, W.M.等(2001), *Nat. Biotechnol.*, 第 19 卷, 第 354-359 页)。在突变和表达之后，将这些类型的方法便利地与选择方法或筛选方法结合，以鉴定具有所需特性的变体。由于这些技术应用在 DNA 水平上，在各种情形下有关的新生成的基因提供生物技术生产的出发点。

倒置突变，即部分序列倒置，可被视作缺失和插入的特殊形式。这种类型的变体同样可以靶向或随机的方式生产。

优选迄今提到的所有蛋白，蛋白片段或融合蛋白，其特征在于，它们本身能够水解蛋白。

这样的实体根据 IUBMB 官方 1992 年酶命名法被分类为 3.4(肽酶)。其中，优选内肽酶，尤其是组 3.4.21 丝氨酸蛋白酶，3.4.22 半胱氨酸蛋白酶，3.4.23 天冬氨酸蛋白酶和 3.4.24 金属蛋白酶的内肽酶。其中，丝氨酸蛋白酶(3.4.21)是尤其优选的，并且其中又优选 subtilase，而其中最优选枯草杆菌素(参照“Subtilases: 枯草杆菌素-样蛋白酶”，R. Siezen, 第 75-95 页, “枯草杆菌素酶(Subtilisin enzymes)”, R. Bott 和 C. Betzel 编, New York, 1996)。其中，依次优选组 IS-2 枯草杆菌素，其为高碱性枯草杆菌素。

就此而论，活性分子优选失活分子，这是因为，水解的进行例如在下述的应用领域中是尤其重要的。

上述片段在最广意义上也具有酶解活性，例如，为了络合底物，或为了形成对水解所必需的结构元件。当它们自身可用于水解另一蛋白而无需其他蛋白酶组分存在的时候，它们是优选的。这涉及可通过蛋白酶本身进行的活性，同时可能必须存在的缓冲液物质，辅助因子等保留未受此影响。

分子不同部分对蛋白水解的相互影响天然在缺失突变体中存在比在片段中多，尤其是出现在融合蛋白中，更特别是那些由相关蛋白改组而衍生的蛋白。其中这导致维持，修饰，说明或第一达到最广意义上的酶解功能，缺失变体和融合蛋白是本发明的蛋白。其中在这方面，本发明优选的代表是那些本身能够水解蛋白底物而无需存在其他蛋白酶组分的蛋白。

优选的实施方案由迄今所述的所有蛋白，蛋白片段或融合蛋白表示，其特征在于，它们另被衍生化。

衍生物表示那些通过其他修饰而衍生自上述蛋白的蛋白。这样的修饰可影响例如稳定性，底物特异性，或对底物的结合强度或者酶活性。它们也可用于减少蛋白的变应原性和/或免疫原性，从而增加例如其与皮肤的相容性。

这些衍生化作用可例如通过生物学方法发生，例如通过生成的宿主生物体与蛋白生物合成相联系。诸如脂或寡糖的低分子量化合物的偶联应该在此连接中受到特别强调。

然而，衍生化作用也可通过化学方法，例如通过化学转化侧链或通过把另一个例如大分子化合物共价结合到蛋白上而进行。化学修饰描述在例如申请 DE 4013142 中。酶中的胺与羧基偶联改变等电点，例如公开在 WO 95/26398 中。例如，可例如通过双官能团化学化合物，将诸如蛋白质的大分子与本发明蛋白连接起来。因此，例如，有可能通过应用 WO 99/57154 至 WO 99/57159, WO 00/18865 和 WO 00/57155 的教导，通过含有特异结合区的接头来提供本发明的蛋白。这样的衍生物特别适用于洗涤或清洁产品中。也可能以类似于 WO 00/01831 的方式将蛋白酶抑制剂与本发明的蛋白通过接头，尤其是氨基酸接头连接起来。与其他诸如聚乙二醇的大分子化合物的偶联改善了该分子的其他有关特性，诸如稳定性或与皮肤的相容性。这样一种修饰例如描述在美国专利 5230891 中，将蛋白酶用于化妆品中。

本发明蛋白的衍生物也以最广意义表示这些酶的制备物。取决于分离，加工或制备方法，蛋白可以与多种不同的其他物质相结合，例如与来自产蛋白酶的微生物的培养物中的物质相结合。蛋白也可与其他某些物质已经故意混合，例如以增加其储存稳定性。因此，本发明也涉及本发明蛋白的所有制备物。这也独立于此酶活性是否真正展示在特定的制备物中。这是因为，对其来说，期望的是在储存过程中仅具有一点点活性或没有活性，而在使用时展示其酶解功能。例如通过

适当的相伴物质，这可得以控制。蛋白酶与其抑制剂的共同制备物在现有技术(WO 00/01826)中尤其是已知的。

优选的实施方案由迄今所述的所有蛋白，蛋白片段或融合蛋白表示，其特征在于它们另被稳定化。

这增加了它们在储存过程和/或使用过程中的稳定性，例如在洗涤处理中，以便使它们的活性能更持久，并因此活性得以增强。本发明蛋白酶的稳定性可通过例如偶联到聚合物上而得以提高。这种方法描述在例如 US 5230891 中。用前，它需要在适当的试剂中，通过化学偶联步骤，将蛋白连接到这些聚合物上。

优选通过点突变分子本身而获得的可能的稳定化作用，因为它们获得蛋白后不需要任何其他的操作步骤。一些适用于此的点突变是本身已知的现有技术。因此，按照 US 6087315 和 US 6110884，采用其他氨基酸残基替换特定的酪氨酸残基可使蛋白酶稳定。

其他可能性例如为：

- 按照 EP 583339 用脯氨酸替换特定的氨基酸残基；
- 按照 EP 995801 向分子表面引入更高极性的或带更多电荷的基团；
- 改变金属离子的结合，特别是钙结合位点，例如按照申请 WO 88/08028 和 WO 88/08033 的教导。

根据上述第一个文献，参与钙结合的一个或多个氨基酸残基不得被带有负电荷的氨基酸所替换；根据申请 WO 88/08033 的教导，点突变将不得不同时通过钙结合导入两个残基精氨酸/甘氨酸的序列中的至少一个残基中；

-根据 US 5453372，蛋白可受到表面上特定突变的保护，以防止诸如表面活性剂的变性剂的作用。

其他可比较的可能性描述在 US 5340735, US 5500364, US 5985639 和 US 6136553 中。

另一针对高温和表面活性剂作用的稳定化作用的可能性将是应用 WO 92/21760 以及尚未公布的申请 DE 10121463 和 DE 10153792 的教导, 对那些蛋白酶通过交换位于 N 端附近的氨基酸而得以稳定化, 使得通过非共价相互作用与剩余分子接触, 从而有助于维持球形结构。

优选的实施方案是那些其中分子以多种途径被稳定化的蛋白酶。这是因为, 例如, 根据 WO 89/09819, 采用多个稳定突变, 可认为有额外的作用。

优选的实施方案由迄今所述的所有蛋白, 蛋白片段或融合蛋白或衍生物表示, 其特征在于它们与上述本发明的蛋白, 蛋白片段, 融合蛋白或其衍生物之一具有至少一种共同的抗原决定簇。

这是因为, 蛋白的二级结构元件及其三维折叠对酶活性至关重要。因此, 在它们一级结构中彼此有明显区别的结构域可形成在空间上基本一致的结构, 从而使得相同的酶行为成为可能。这种在二级结构中的共同特征通过抗血清或纯的抗体或单克隆抗体, 通常被识别为符合抗原决定簇。彼此相似的蛋白或衍生物因此通过免疫化学交叉反应可被检测和指定。为此, 从它们在一级结构中的同源性水平不可能, 但从它们的免疫化学关系则可能被指定到上述定义的本发明的蛋白, 蛋白片段, 融合蛋白或其衍生物, 也尤其包括在本发明的保护范围内。

优选的实施方案由迄今所述的所有蛋白, 蛋白片段或融合蛋白或衍生物表示, 其特征在于它们可获自天然来源, 尤其是来自微生物。

这些微生物可以例如是单细胞真菌或细菌。这是因为它们通常比多细胞生物或来自多细胞生物的细胞培养物更容易分离和操作; 尽管

后者对特定实施方案而言可代表值得做的选择，并且因此原则上不排除在本发明的主题之外。

虽然天然存在的生产菌能制备本发明的酶，但是酶在初始建立条件下仅有小部分可被表达和/或释放到周围介质中。但是，这不排除在通过实验确立的合适环境条件或其他因素影响下，对它们进行刺激从而经济上值得生产本发明蛋白的可能性。这样一种调节机制可有意用于生物技术生产中。如果后者也是不可能的，则它们仍可用于分离相关基因。

其中，那些来自革兰氏阳性细菌的酶是尤其优选的。

这是因为它们没有外膜，因此将分泌的蛋白直接释放到周围介质中。

那些来自芽孢杆菌属的革兰氏阳性细菌的酶是尤其优选的。

芽孢杆菌蛋白酶从一开始就具有对各种可能的技术用途的有利特性。这些特性包括对高温，氧化剂或变性剂的一定稳定性。此外，利用微生物蛋白酶，对其生物技术生产例如所涉及的构建合适的克隆载体，选择宿主细胞和生长条件或者诸如变应原性的风险的评估，已经获得最多经验。芽孢杆菌还被确立成生产生物体，其在工业处理中具有特别高的生产效率。对这些蛋白酶的制备和应用所获得的知识量的好处还在于促进开发这些酶，例如涉及它们与诸如洗涤或清洁产品成分中的其他化学化合物的相容性。

在那些来自芽孢杆菌种的酶中，又优选那些来自芽孢杆菌种的酶，尤其是来自菌株芽孢杆菌种(DSM 14390)的酶。

这是因为，本发明酶的实施方法最初是从中获得的。其相关序列

示于序列表中，而其酶特性描述在实施例。从该菌株或从相关菌株中具体通过应用诸如 PCR 和/或本身已知的点突变的分子生物学标准方法可制备上述的变体。

本发明的其他目的实现，因而也是本发明的固有方面，由用于实施本发明的核酸所代表。

核酸是蛋白的几乎所有分子生物学研究，开发及其生产的出发点，尤其包括基因测序和衍生相应的氨基酸序列，以及任何一种蛋白的突变(参见上文)和表达。

用于开发具有特定性质的蛋白的突变也称作“蛋白质工程”。将要优化的特性的例子上文已经提及。这样一种突变可以靶向方式或通过随机方法进行，例如采用后续的针对克隆基因上的活性的识别和/或选择方法(筛选和选择)，例如通过与核酸探针杂交，或者针对基因产物蛋白，例如通过其活性。本发明蛋白酶的进一步开发具体也可定位在下列出版物中所提出的理念上：“Protein engineering”，P.N. Bryan(2000)，*Biochim. Biophys. Acta.*，第 1543 卷，第 203-222 页。

因此，本发明的一个主题是每一种编码枯草杆菌素型碱性蛋白酶的核酸，该碱性蛋白酶的核苷酸序列与 SEQ ID NO.1 中所示的核苷酸序列具有至少 92.5% 的同一性，尤其是在位置 334 到位置 1143 的部分区域上。

其中，愈加优选的是那些酶的核苷酸序列与 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列分别具有至少 93%，93.5%，94%，94.5%，95%，95.5%，96%，96.5%，97%，97.5%，98%，98.2%，98.4%，98.6%，98.8%，99%，99.2%，99.3%，99.4%，99.5%，99.6%，99.7%，99.8%，99.9% 和 100% 的同一性，尤其是在位置 334 到位置 1143 的部分区域上。上述同一性相应也适用于成熟蛋白的位置和终止密码子。

这是因为，可以预计这些核酸编码蛋白，其特性与来自芽孢杆菌种(DSM 14390)的碱性蛋白酶逐渐相似。

在这方面，本发明的其他代表是所有核酸，其编码上述本发明的蛋白，蛋白片段，融合蛋白或其衍生物中的一种。

编码上述优选形式的核酸是相应优选的，通过突变获得的核酸也是尤其优选的。

具体而言，编码蛋白片段的核酸专门包括在本发明的保护范围内。采用这种寡核苷酸，所有三种读码框，无论有义还是反义方向，都必须考虑到。这是因为，尤其通过聚合酶链式反应(PCR)，它们可用作合成相关核酸的起始点，例如用作从天然生物体中扩增相关基因的起始点。通过基于 PCR 的改组方法，它们也可用于生产嵌合体。其他改组方法，例如公开在申请 WO 00/09679 中的重组连接反应(RLR)也是基于寡核苷酸，所述寡核苷酸对应于随机或特异性选定的蛋白片段。反义寡核苷酸也可用于例如调节表达。

根据上文所述，在上述的本发明核酸中，下列核酸是愈加优选的：

- 那些特征在于它们获自天然来源，尤其是获自微生物的核酸；
- 其中，那些特征在于微生物是革兰氏阳性细菌的核酸；
- 其中，那些特征在于革兰氏细菌是一种芽孢杆菌属的核酸；以

及

- 其中，那些特征在于芽孢杆菌种是芽孢杆菌，尤其是芽孢杆菌种(DSM 14390)的核酸。

包含上述定义的本发明的一种核酸区域的载体，尤其是包含一种编码上文定义的本发明的蛋白，蛋白片段，融合蛋白或衍生物之一的核酸区域的载体，构成本发明的固有方面。

为了操作与本发明相关的核酸，并且因此特别是为了制备该核酸用于生产本发明的蛋白，将它们方便地连接到载体中。这些载体及其相关的操作方法详细描述在现有技术中。载体可以大量和多种选择从市场上获得，既用于克隆也用于表达。这些载体包括例如，衍生自细菌质粒的载体，衍生自噬菌体的载体，或衍生自病毒的载体，或主要是合成的载体。此外，根据载体能够建立自身的细胞类型的性质，它们可区分成例如革兰氏阴性细菌载体，革兰氏阳性细菌载体，酵母载体或高等真核生物载体。它们是例如合适的分子生物学和生化研究的出发点，也是有关基因表达或者相应蛋白的出发点。

在一个实施方案中，本发明的载体是克隆载体。

克隆载体除了储存，生物学扩增或选择目的基因之外，还适用于其他分子生物学鉴定。同时，它们是要保护保护的核酸的可转运和可储存的形式，并且也是不与细胞连接的分子生物学技术的出发点，所述技术诸如 PCR 或体外突变方法。

优选地，本发明的载体是表达载体。

这种表达载体是在生物生产体系中用于实施相应核酸并由此生产相应蛋白的基础。本发明这种主题的优选实施方案是携带对表达所必需的遗传元件的表达载体，所述遗传元件例如是最初位于所述基因上游的天然启动子或另一生物体的启动子。所述元件可以例如排列成“表达盒”的形式。或选的可能性是在各种情形下，由宿主细胞提供的一种或所有的调节元件。表达载体尤其优选地适用于其他特性，例如对选择表达系统，尤其是宿主细胞的最适拷贝数(参见下文)。

为了得到高表达率，对表达载体而言如果可能仅包含相关基因作为插入物以及没有相对大的 5' 或 3' 非编码区，这是特别有利的。当用

限制性酶随机处理出发菌株的染色体 DNA 所获得的片段在测序之后和整合到表达载体之前经再次故意切割时，可获得这种插入体。

表达载体的一个例子为 pAWA22，其描述在本申请的图 2 中，并且可如在实施例 2 中所公开的那样加以使用。其他载体为专业技术人员从现有技术中可获得，并且可大量从市场上获得。

包含上述定义的本发明的一种核酸区域的细胞，尤其是一种优选在上述本发明的载体之一上包含一种编码上文定义的本发明的蛋白，蛋白片段，融合蛋白或衍生物之一的核酸区域的细胞，构成本发明的固有方面。

这是因为，这些细胞含有合成本发明蛋白的遗传信息。它们使得例如相应基因的扩增，突变处理或转录和翻译成为可能，并且最终也使得相关蛋白通过生物技术生产成为可能。这种遗传信息可存在于染色体外，作为固有的遗传元件，即存在于细菌中位于质粒上，或者被整合到染色体中。挑选合适系统取决于目的，例如基因或者生物体的储存方式和持续时间或者突变或选择的方式。因此，突变和选择方法例如基于噬菌体及其特异宿主细胞，被描述用于开发在现有技术 (WO 97/09446) 中洗涤产品用酶。

优选宿主细胞，其表达或可被诱导表达任何本发明上述的蛋白，蛋白片段，融合蛋白或衍生物，尤其是通过利用上述本发明的核酸区域，更特别是通过利用上述的表达载体。

制备所述蛋白的宿主细胞使得通过生物技术生产该蛋白成为可能。为此目的，它们必须方便地与上述的一种载体一起已经接受了有关基因，并且能够进行转录，翻译以及优选的其他可能的修饰步骤。

蛋白表达的合适的宿主细胞原则上是所有生物体，即原核生物，

真核生物或蓝藻(Cyanophyta)。优选的宿主细胞是那些可容易进行遗传操作，例如有关的表达质粒转化及其稳定建立以及表达调控的细胞，如单细胞的真菌或者细菌。此外，优选的宿主细胞的特征在于良好的微生物和生物技术操作性。这例如涉及易培养性、高生长率、对发酵培养基的低需求、良好的生产率以及外源蛋白质的分泌。尤其优选针对表达的试验菌株。这些菌株可商购，或一般从菌种保藏机构获得。通过这种方法，本发明的任何蛋白质理论上可以从大量宿主生物中得到。必须通过试验，根据现有技术，从可得到的不同系统的丰度中才能确定哪种表达系统对个别情况最适合。

宿主细胞本身是蛋白酶阴性的，因此不会降解产生的蛋白，这是尤其有利的。一种这样的菌株枯草芽孢杆菌 DB 104 用于实施例 2 中。

优选的实施方案是那些宿主细胞，其活性由于存在适当的遗传元件可得以调控，例如，通过控制加入化学化合物，改变培养条件或以特定的细胞密度作为函数。这种可控表达使得非常经济地生产目的蛋白成为可能。方便的是，基因，表达载体和宿主细胞例如对表达所需的遗传元件(核糖体结合位点，启动子，终止子)，或对密码子应用彼此匹配。后者例如可被优化，在基因中通过用特定宿主最常用的那些密码子替换仅被有关宿主翻译较差的那些密码子，而在各种情形下意思相同。

其中优选这些宿主细胞，其特征不在于它们是细菌，尤其是那些将产生的蛋白分泌到周围介质中的细菌。

细菌本身的特征在于短的传代时间，以及对培养条件的低的要求。这使得建立成本效应的方法成为可能。此外，可获得细菌发酵技术中的大量经验。对于在个别情况下有待通过试验确定的多种理由而言，革兰氏阴性或革兰氏阳性细菌可以适用于特定生产，所述理由诸如营养源，产物形成速率，所需时间等。

诸如大肠杆菌(*E.coli*)的革兰氏阴性细菌，例如分泌多种蛋白到胞质空间中。对于特殊应用这可能是有利的。相反，诸如芽孢杆菌的革兰氏阳性细菌，例如立即将分泌的蛋白释放到细胞周围的营养介质中，根据另一优选实施方案，本发明的表达蛋白可从中直接加以纯化。

申请 WO 01/81597 公开了一种方法，根据该方法，表达的蛋白也实现了通过革兰氏阴性细菌的输出。这种系统也适用于生产本发明的蛋白。因此，优选的宿主细胞是大肠杆菌(*Escherichia coli*)或克雷伯氏菌(*Klebsiella*)，尤其是菌株 *E. coli* JM 109, *E. coli* DH 100B, *E. coli* DH 12S 或植生克雷伯氏菌(*Klebsiella planticola*)(参照物)。它们要求在本申请中所述的适当的微生物修饰和/或合适的载体，以便使得产生的蛋白能够释放。

细菌优选作为宿主细胞的特征在于，它们为革兰氏阳性细菌，尤其是它们属于芽孢杆菌属，更特别属于迟缓芽孢杆菌(*Bacillus lentus*)，地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)，解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)，枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)或亲碱芽孢杆菌(*Bacillus alcalophilus*)。

本发明的一个实施方案利用芽孢杆菌种，尤其是芽孢杆菌(DSM 14390)自身，从而(同源性)表达本发明蛋白。然而，另一方面，优选异源表达，为此优选芽孢杆菌属的细菌，因为对生产而言，在革兰氏阳性细菌中它们是被最充分鉴定的。在此具体包括的是地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)，解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)，枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)或其他芽孢杆菌种或亲碱芽孢杆菌(*B. alcalophilus*)菌株。这是因为，例如从申请 WO 91/02792 的教导中，可获得涉及用这些菌种生产蛋白酶的相关经验。该申请还公开了众多可能的表达载体。这些相关菌种另具有相似的密码子用法，并且它们自身能生产可比较的枯草杆菌素，从而蛋白合成系统被天然适当地定向。

另一优点是通过该方法可能获得本发明蛋白与由宿主菌株内源性产生的枯草杆菌素的混合物。这样一种共表达同样公开在申请 WO 91/02792 中。如果这不需要，则天然存在于宿主细胞的蛋白酶基因将需要进行永久性或短暂性失活(参见上文)。

进一步优选宿主细胞，其特征不在于它们是真核细胞，尤其是那些翻译后对产生的蛋白进行修饰的真核细胞。

合适的真核生物的例子为真菌，如放线菌(Actinomyceten)或者酵母如糖酵母(Saccharomyces)或克鲁伯氏酵母(Kluyveromyces)。嗜热真菌表达系统在例如 WO 96/02653 中提出。它们尤其适合于表达耐热的变体。真核系统中进行的修饰，尤其与蛋白合成相连的修饰，包括结合诸如膜锚分子(anchor)或寡糖的低分子化合物。这种寡糖修饰可以是期望的，例如，用于减少变应原性。与由这样的细胞天然产生的酶，如纤维素酶共表达可能也是有利的。

本发明蛋白的制备方法是本发明的单独主题。

因此，利用上述本发明的核酸和/或利用上述本发明的载体和/或利用上述的本发明的一种细胞，每一种生产上述本发明的蛋白，蛋白片段，融合蛋白或衍生物的方法都被要求保护。

这些包括例如化学合成方法，这些方法尤其对较短片段在经济上是值得的。

然而，所有分子生物学，微生物学或生物技术学生产方法的各个方面在上文中已得以提及，并且在现有技术中被确立，其对后者是优选的。因而，根据分子生物学本身已知的方法，例如基于上述的 DNA 和氨基酸序列，如所推导的，例如也来自序列表，优选基于 SEQ ID NO.1

和 2 本身，可合成相应的寡核苷酸和寡肽，直至完整的基因和蛋白。

从已知枯草杆菌素生产微生物出发，例如，遵循本申请中的实施例，可鉴定和分离其他天然的枯草杆菌素产生菌，根据本文所述的条件，来确定它们的枯草杆菌素基因和/或氨基酸序列，并且开发它们。这种细菌菌种利用适当的生产方法也可进行培养。类似地，新的表达载体根据在申请 WO 91/02792 中所公开的载体模型，可进行开发。其中在体外进行蛋白生物合成的不含细胞的表达系统基于相应的核酸序列，也可能是本发明的实施方案。上文已经阐明的任何元件也可被组合生成新的方法，用于制备本发明蛋白。就此而论，对每种本发明的蛋白而言，多种可能的方法步骤组合是可以想象的，从而最适方法针对各个特定的个案必须通过试验才能加以确定。

本发明的单独主题包含产物，其特征在于它们包括上述本发明的蛋白，蛋白片段，融合蛋白或衍生物。

所有类型的产物，尤其是混合物，制剂，溶液等，它们的效用通过加入上述本发明的蛋白而得以改善，在此包括在本发明的保护范围内。取决于应用领域，它们可以是例如固体混合物，例如含有冻干或胶囊化的蛋白的粉剂，或凝胶状产品或液体产品。优选的制剂包括例如缓冲物质，稳定剂，蛋白酶的反应物和/或其他辅助因子和/或与蛋白酶有协同作用的其他成分。这些成分应该理解包括在下文详述的应用领域的特定产品中。其他应用领域从现有技术中也是一目了然的，并且描述在例如手册“工业用酶及其应用(Industrial enzymes and their applications)”，H. Uhlig, Wiley 出版，New York, 1998。

包括在本发明主题中的优选实施方案是洗涤或清洁产品，其特征在于它们包括上述的本发明的蛋白，蛋白片段，融合蛋白或衍生物之一。

这是因为，如在本发明的示例性实施方案中所示，令人惊奇地已经发现，特别优选的芽孢杆菌(DSM 14390)的碱性蛋白酶，也就是说，甚至是野生型酶，其特征在于，在相应的洗涤或清洁产品中使用时，在它们对洗涤或清洁性能的贡献方面，其至少接近为此目的确定的酶，或者在某些情形下事实上超过它们。

所有可能类型的洗涤产品，既包括浓缩物也包括不用稀释加以使用的产品均属于本发明的主题；商业规模的使用，用于洗衣机或用于手洗或手工清洁。对此包括例如用于织物、地毯或天然纤维的洗涤产品，在本发明对此使用术语洗涤产品。它们也包括例如用于洗碗机的洗碗剂或用于硬表面，例如金属、玻璃器皿、瓷器、陶器、瓦片、宝石、涂漆面、塑料、木制品或皮革的手工洗碗剂或清洗剂。对于这些来说，在本发明使用术语清洁产品。任何类型的洗涤或清洁产品都是本发明的实施方案，只要其中加入本发明的蛋白质，蛋白片段，融合蛋白或衍生物。

本发明的实施方案包含任何按照现有技术中确定的和/或适当的本发明洗涤或清洁产品的提供形式。它们包括例如固体、粉末、液体、胶状或膏状剂，如果需要由若干相组成，挤压式或非挤压式；其他例子还包括：包装在大容器内和小份中的压出胶、颗粒、片剂及小袋。

在优选的实施方案中，本发明的洗涤或清洁产品包括上述本发明的蛋白，蛋白片段，融合蛋白或衍生物，其用量每克产品为  $2\ \mu\text{g}$  至  $20\text{mg}$ ，优选  $5\ \mu\text{g}$  至  $17.5\text{mg}$ ，更优选  $20\ \mu\text{g}$  至  $15\text{mg}$ ，尤其更优选  $50\ \mu\text{g}$  至  $10\text{mg}$ 。

这种产品中的蛋白酶活性可以按照在 *Tenside*，第 7 卷(1970)，第 125-132 页中描述的方法测定，并以蛋白酶单位(PE=蛋白酶-单元)给出。

除了本发明的蛋白，蛋白片段，融合蛋白或衍生物之外，如果需要，本发明的洗涤或清洁产品还包含其他成分，例如酶稳定剂，表面活性剂，如非离子、阴离子和/或两性表面活性剂，和/或漂白剂，和/或助洗剂(builder)以及任选下文所列的其他常规成分。

优选的非离子表面活性剂为烷氧基化的，有利的是乙氧基化的，特别优选含有 8-18 个碳原子以及平均每 mol 醇 1-12mol 环氧乙烷(EO)的伯醇，其中醇残基可以是直链的，或优选在位置 2 上被甲基支化的，优选以混合形式含有直链和甲基支链的残基，所以其通常以羰基合成醇残基存在。然而，尤其优选的是包含具有 12-18 碳原子、天然来源的醇的直链残基以及平均每 mol 醇 2-8 EO 的脂肪醇乙氧基化物，例如椰子油醇、棕榈油醇、牛油醇或油醇。优选的乙氧基化醇包括，例如含有 3 或 4 EO 的 C<sub>12-14</sub> 醇、含有 7EO 的 C<sub>9-11</sub> 醇、含有 3EO、5EO、7 EO 或 8EO 的 C<sub>13-15</sub> 醇、含有 3EO、5EO 或 7 EO 的 C<sub>12-18</sub> 醇及其混合物，例如含有 3 EO 的 C<sub>12-14</sub> 醇和含有 5 EO 的 C<sub>12-18</sub> 醇的混合物。上述乙氧化的程度是统计平均值，对于特殊产品来说，这个平均值可能是整数或分数。优选的醇乙氧基化物具有窄的同系物分布(窄范围乙氧基化物，NRE)。除了这些非离子表面活性剂之外，也可以使用高于 12 EO 的脂肪醇。这类脂肪醇的例子是包含 14 EO、25 EO、30 EO 或 40 EO 的牛油醇。

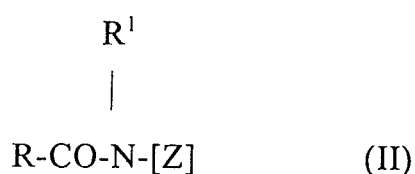
另一类或作为非离子表面活性剂单用或与其他非离子表面活性剂合用的优选非离子表面活性剂是烷氧基化的、优选乙氧基化的、或乙氧基化和丙氧基化的优选包含 1-4 个碳原子的烷基链的脂肪酸烷酯，特别是脂肪酸甲酯。

另一类优选使用的非离子表面活性剂是烷基多葡糖苷(APG)。合适的烷基多葡糖苷对应于通式 RO(G)<sub>z</sub>，其中 R 是直链或支链的，特别是 2-甲基支链的、饱和或不饱和的、含有 8-22 个以及优选 12-18 个碳原子的脂族基，G 是含有 5 或 6 个碳原子的糖单元，优选是葡萄糖。

糖苷化的程度  $z$  介于 1.0-4.0 之间, 优选在 1.0-2.0 之间, 以及更优选在 1.1-1.4 之间。优选使用直链烷基多葡糖苷, 即烷基多葡糖苷, 其中多糖基部分是葡萄糖单元以及烷基部分是正-烷基基团。

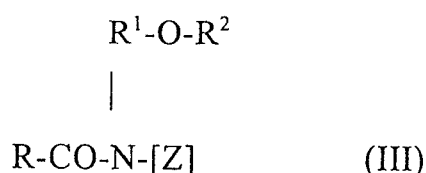
氧化胺类的非离子表面活性剂, 例如 N-椰油烷基-N,N-二甲胺氧化物以及 N-牛油烷基-N,N-二羟乙胺氧化物, 和脂肪酸链烷醇酰胺类也适用。这些非离子表面活性剂的所用量优选不多于乙氧基脂肪醇量, 尤其不多于其量的一半。

其它合适的表面活性剂为多羟基脂肪酸酰胺, 对应于通式(II):



其中  $\text{RCO}$  是包含 6-22 个碳原子的脂族酰基,  $\text{R}^1$  是氢、含有 1-4 个碳原子的烷基或羟烷基基团, 以及  $[\text{Z}]$  是直链或支链的、包含 3-10 个碳原子和 3-10 个羟基的多羟烷基。多羟基脂肪酸酰胺为已知物质, 其通常可通过将还原糖用氨、烷基胺或链烷醇胺加以还原性胺化, 继而用脂肪酸、脂肪酸烷酯或氯代脂肪酸加以酰化而获得。

这组多羟基脂肪酸酰胺还包括对应于式(III)的化合物:



其中  $\text{R}$  是含有 7-12 个碳原子的直链或支链烷基或者链烯基,  $\text{R}^1$  是含有 2-8 个碳原子的直链、支链或环化的烷基基团或者芳香基团, 以及  $\text{R}^2$  是含有 1-8 个碳原子的直链、支链或环化的烷基基团或芳香基

团或者是烷氧基基团，但优选  $C_{1-4}$  的烷基或者苯基基团，以及[Z]是直链的多羟基烷基基团，其烷基链至少被 2 个羟基取代，或者该基团的烷氧基化，优选乙氧基化或丙氧基化的衍生物。

[Z]优选由还原糖例如葡萄糖、果糖、麦芽糖、乳糖、半乳糖、甘露糖或木糖的还原性胺化而获得。然后通过例如以醇盐作为催化剂与脂肪酸甲酯反应，可将 N-烷氧基或 N-芳氧基取代的化合物转化成所需的多羟基脂肪酸酰胺。

合适的阴离子表面活性剂是例如那些磺酸酯和硫酸酯类。合适的磺酸酯类表面活性剂优选是  $C_{9-13}$  的烷基苯磺酸酯、烯烴磺酸酯，即烯烴和羟烷基磺酸酯的混合物，以及例如通过气态三氧化硫的磺酸化接着碱化或酸化磺酸化产物而从带有中间或末端双键的  $C_{12-18}$  单烯烴中获得的二磺酸酯。其它合适的磺酸酯类表面活性剂是例如通过氯磺化作用或磺化氧化作用接着水解或中和而从  $C_{12-18}$  烷烴中获得的链烷磺酸酯。 $\alpha$ -磺基脂肪酸的酯(磺酸酯)，例如氢化椰子油、棕榈核油或牛油脂肪酸的  $\alpha$ -磺酸化甲酯也适用。

其它合适的阴离子表面活性剂有硫酸化脂肪酸甘油酯。本发明上下文中的脂肪酸甘油酯指单酯、二酯和三酯及其混合物，其由单甘油与 1-3 mol 的脂肪酸的酯化作用或者在甘油三酯和 0.3-2 mol 的甘油发生酯交换反应进行生产而得来的。优选的硫酸化脂肪酸甘油酯是含 6-22 个碳原子的饱和脂肪酸的硫酸化产物，例如己酸、辛酸、癸酸、肉豆蔻酸、月桂酸、棕榈酸、硬脂酸或山萣酸。

优选的烷(链烯)基硫酸盐是碱金属盐，以及具体是  $C_{12-18}$  的脂肪醇的硫酸半酯的钠盐，例如椰油脂肪醇、牛油脂肪醇、月桂醇、肉豆蔻醇、鲸蜡醇或硬脂醇或  $C_{10-20}$  的羰基合成醇以及具有同样链长仲醇的对应的半酯。其它优选的烷(链烯)基硫酸盐是那些具有上述链长、含有基于石化产品的合成的、直链烷基链，并且它们的降解行为类似

于基于油化品原料的对应的化合物。 $C_{12-16}$  烷基硫酸酯、 $C_{12-15}$  烷基硫酸酯以及  $C_{14-15}$  烷基硫酸酯从洗涤技术的观点出发而优选。其它合适的阴离子表面活性剂是 2,3-烷基硫酸酯。

用 1-6 mol 的环氧乙烷乙氧基化的直链或者支链  $C_{7-21}$  醇例如含有平均 3.5 mol 环氧乙烷(EO)的 2-甲基支链的  $C_{9-11}$  醇或者是含有 1-4 EO 的  $C_{12-18}$  脂肪醇的硫酸单酯也同样适用。鉴于他们高的发泡能力，他们仅以相对小的量使用，例如按重量计在清洗剂中的量为 1%-5%。

其它合适的阴离子表面活性剂是磺基琥珀酸的盐，其也已知是磺基琥珀酸盐或磺基琥珀酸酯，以及表示磺基琥珀酸与醇，优选脂肪醇，以及特别是乙氧基化的脂肪醇而形成的单酯或/或二酯。优选的磺基琥珀酸酯含有  $C_{8-18}$  脂肪醇残基或其混合物。特别优选的磺基琥珀酸酯含有衍生自乙氧基化的脂肪醇的脂肪醇部分，其在分离中考虑时，代表非离子的表面活性剂(描述参见上文)。在这些磺基琥珀酸盐中，那些衍生自窄范围乙氧基化的脂肪醇的脂肪醇部分尤其优选。在烷(链烯)基链中优选含有 8-18 个碳原子的烷(链烯)基琥珀酸或其盐也同样适用。

其它合适的阴离子表面活性剂尤其是肥皂。合适的肥皂是饱和脂肪酸肥皂，如月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、氢化芥子酸和山萹酸的盐，以及尤其衍生自天然脂肪酸如椰油、棕榈核油或牛油脂肪酸的肥皂混合物。

阴离子表面活性剂包括肥皂可以钠、钾或铵盐及作为有机碱如单-、二-或三乙醇胺的可溶性盐的形式存在。阴离子表面活性剂优选以钠或钾盐的形式存在，更优选的是钠盐形式。

表面活性剂在本发明的清洁或洗涤产品中存在的总量优选 5-50 重量%，特别是 8-30 重量%，以最终产品计。

本发明的洗涤或清洁产品可包含漂白剂。在那些能在水中产生  $H_2O_2$  而充当漂白剂的化合物中，过碳酸钠，过硼酸钠盐四水合物和过硼酸钠一水合物是特别的重要。其它有用的漂白剂有例如过氧焦磷酸盐、柠檬酸的过水合物和产生  $H_2O_2$  的过酸盐或过酸，如过硫酸盐或过硫酸。也可使用脲过氧水合物过尿素，其化学式为  $H_2N-CO-NH_2 \cdot H_2O_2$ 。如果需要，产品中也可含有有机类的漂白剂，特别是用于清洗硬表面，例如在洗碗机中，虽然原则上有机漂白剂也可用于洗衣剂。典型的有机漂白剂是二酰基过氧化物，例如二苯甲酰基过氧化物。其它典型的有机漂白剂是过氧酸，其中烷基过氧酸和芳基过氧酸作为例子特别提及。优选的代表是过氧苯甲酸及其环取代的衍生物，例如烷基过氧苯甲酸，还有过氧- $\alpha$ -萘甲酸和单过邻苯二甲酸镁盐，脂族或取代的脂族过氧酸，例如过氧月桂酸、过氧硬脂酸、 $\epsilon$ -苯二(甲)酰亚氨基过氧己酸(PAP)、*o*-羧基苯甲酰氨基过氧己酸、正壬烯氨基过氧脂肪酸和正壬烯氨基过琥珀酸盐，以及脂族和芳脂族的过氧二羧酸，例如 1,12-二过氧羧酸、1,9-二过氧壬二酸、二过氧癸二酸、二过氧巴西基酸、二过氧苯二甲酸、2-癸基二过氧丁烷-1,4-二酸、N,N-对苯二甲酰-二(6-氨基过氧己酸)。

漂白剂在洗涤或清洁产品中的含量是 1-40 重量%，特别是 10 至 20 重量%，其中有利地使用过硼酸盐一水合物或者过碳酸盐

如果洗涤温度等于或者低于  $60^\circ C$ ，以及特别是对衣物进行预处理，为了提高漂白效果，洗涤剂中可含有漂白活化剂。合适的漂白活化剂是形成脂族过氧羧酸的化合物，所述脂族过氧羧酸优选含有 1-10 个碳原子，以及更优选含有 2-4 个碳原子和/或在过水解条件下任选取代的过苯甲酸。携带具有上述碳原子数的 O-和/或 N-酰基和/或任选取代的苯甲酰基的物质是适用的。优选的漂白活化剂是聚酰化的烷撑二胺，特别是四乙酰基乙烯二胺(TAED)、酰化的三嗪衍生物，特别是 1,5-二乙酰基-2,4-二氧代六氢-1,3,5-三嗪(DADHT)、酰化的甘脲，特别

是 1,3,4,6-四乙酰基甘脲(TAGU)、N-酰基亚胺,特别是正壬酰基琥珀酰亚胺(NOSI)、酰化的苯酚磺酸盐,特别是正壬酰基或者是异壬酰基羟苯磺酸盐(正-或异-NOBS)、酰化羟羧酸,例如三乙基-O-乙酰基柠檬酸盐(TEOC)、羧酸酐,特别是邻苯二甲酸酐、靛红酸酐和/或琥珀酸酐、羧酸酰胺,例如 N-甲基二乙酰胺、乙交酯、酰化多元醇,特别是三醋精、乙二醇二乙酸酯、异丙烯基乙酸酯、2,5-双乙酸基-2,5-二氢呋喃和烯醇酯,它们从德国专利申请 DE 196 16 693 和 DE 196 16 767 中得知,乙酰化的山梨醇和甘露醇及其混合物(SORMAN),它们在欧洲专利申请 EP 0 525 239 中描述,酰化糖衍生物,特别是五乙酰基葡萄糖(PAG)、五乙酰基果糖、四乙酰基木糖和八乙酰基乳糖,以及乙酰化的任选 N-烷基化葡糖胺和葡糖酸内酯、三唑和三唑衍生物和/或粒状的己内酰胺和/或己内酰胺衍生物,优选的是 N-乙酰化内酰胺,例如 N-苯甲酰己内酰胺和 N-乙酰己内酰胺,这些是从国际专利申请 WO 94/27970、WO 94/28102、WO 94/28103、WO 95/00626、WO 95/14759 和 WO 95/17498 中得来。从德国专利申请 DE 196 16 769 中得知的取代的亲水性酰基乙缩醛和在德国专利申请 DE 196 16 770 以及国际专利申请 WO 95/14075 中描述的酰基内酰胺也优选采用。与从德国专利申请 DE 44 43 177 中得知的常规漂白活化剂组合也可采用。脲衍生物,例如氰基吡啶、四脲(Nitrilquats),例如 N-烷基铵乙脲,和/或氨脲衍生物也可使用。优选的漂白活化剂为 4-(辛酰氧基)-苯磺酸钠、正壬酰或异壬酰氧基苯磺酸酯(正或异-NOBS)、十一酰氧基苯磺酸酯(UDOBS)、十二酰氧基苯磺酸钠(DOBS)、十一酰氧基苯甲酸(DOBA, OBC 10)和/或十二酰氧基苯磺酸酯(OBS 12)以及 N-甲基吗啉鎓乙脲(MMA)。这类漂白活化剂常用量占整个组成的 0.01-20 重量%,优选 0.1-15 重量%,以及更优选 1-10 重量%。

除了或代替上述的常规漂白活化剂,所谓的漂白催化剂也可掺入。漂白催化剂是促进漂白的过渡金属盐或者是过渡金属配合物如锰、铁、钴、钕或者钼-Salen 配合物或者羰基配合物。具有含氮的三角配体的锰、铁、钴、钕、钼、钛、钒和铜的配合物,以及钴、铁、

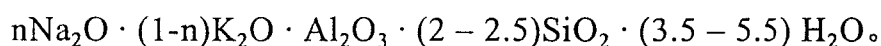
铜、钨-氨合物的复合物体也可以用做漂白催化剂，优选使用在 DE 19709284 A1 中描述的化合物。

本发明的洗涤或清洁产品通常含有一种或多种助洗剂(Builder)，特别是沸石、硅酸盐、碳酸盐、有机共助洗剂以及磷酸盐，假使根据生态环境对使用这些磷酸盐没有反对意见的话。磷在洗碗机洗涤剂中是尤其优选的主要材料。

可在此提及的化合物为晶体层状硅酸钠，对应于通式  $\text{NaMSi}_x\text{O}_{2x+1}\cdot y\text{H}_2\text{O}$ ，其中 M 是钠或者氢，x 是 1.6-4，优选 1.9 至 4.0 之间的数，以及 y 是 0-20 之间的数，x 值优选为 2、3 或 4。这样的晶体层状硅酸盐记载在如欧洲专利申请 EP 164514 中。对应于上述通式的优选的晶体层硅酸盐是其中 M 为钠、x 为 2 或 3 的那些。 $\beta$ -和  $\delta$ -二硅酸钠  $\text{Na}_2\text{Si}_2\text{O}_5\cdot y\text{H}_2\text{O}$  均特别优选。这些化合物可从市场上购得，如 SKS® (Clariant)。因此 SKS-6® 主要是  $\delta$ -二硅酸钠，其化学式为  $\text{Na}_2\text{Si}_2\text{O}_5\cdot y\text{H}_2\text{O}$ ，而 SKS-7® 主要是  $\beta$ -二硅酸钠。通过与酸(例如柠檬酸或碳酸)反应， $\delta$ -二硅酸钠生成 kanemite  $\text{NaHSi}_2\text{O}_5\cdot \text{H}_2\text{O}$ ，其以 SKS-9® 和 SKS-10® (Clariant) 在市场上销售。对这些层状硅酸盐进行化学修饰也有优势。例如，层状硅酸盐的碱度可受到适度的影响。与  $\delta$ -二硅酸钠相比，掺杂磷酸或者碳酸的层状硅酸盐已经修饰了晶体形态，他们溶解更快而且显示出与  $\delta$ -二硅酸钠相关的钙结合能力增加。层状硅酸盐具有一般的经验式  $x\text{Na}_2\text{O}\cdot y\text{H}_2\text{O}\cdot z\text{P}_2\text{O}_5$ ，其中 x 与 y 的比例对应于 0.35-0.6，x 和 z 的比例对应于 1.75-1200，以及 y 和 z 的比例对应于 4-2,800，它们在专利申请 DE 196 01 063 中有记载。层状硅酸盐的溶解度还可通过利用特别精细颗粒的层状硅酸盐来提高。晶体层状硅酸盐和其他成分的化合物也可采用。尤其引人关注的是与纤维素衍生物组成的化合物，其在崩解效果上具有优势，并尤其用于洗涤剂片剂中，以及与聚羧酸如柠檬酸或聚合的聚羧酸组成的化合物，例如丙烯酸的共聚物。

其他有用的助洗剂是无定形硅酸钠盐，其模量( $\text{Na}_2\text{O}:\text{SiO}_2$  比率)为 1:2-1:3.3，优选为 1:2-1:2.8，以及更优选是 1:2-1:2.6，其可以延迟崩解并表现多重洗涤循环特性。与常规的无定形硅酸钠相关的溶解推迟可由多种方法获得，例如表面处理、混合/压实或通过过干燥法。在本发明的上下文中，术语“无定形”同样可理解为包括“X-射线无定形”。换一种说法，硅酸盐并不产生任何强烈的 X-射线反射，这在 X-射线衍射实验中是晶体物质的特征，但最多有一个或多个具有几度衍射角宽的散射 X-辐射的最大值。然而，在电子衍射实验中，当硅酸盐粒子产生弯曲或者甚至尖锐的衍射最大值时，甚至可获得特别好助洗剂特性。这个可解释表示这些产品具有微晶区域，大小介于 10 至数百 nm，优选上限为 50nm 以及更优选上限达 20nm。尤其优选压实的无定型硅酸盐、混合的无定型硅酸盐以及干燥的 X-射线-无定形硅酸盐。

如果需要，本发明可使用的精细晶体、含有结合水的合成沸石优选是沸石 A 和/或沸石 P。沸石 MAP®(Crosfield 公司的销售产品)是尤其优选的 P-型沸石。然而，沸石 X 和 A、X 和/或 P 的混合物也可适用。依照本发明，优选的是使用例如，商业上可得到的沸石 X 和沸石 A 的共晶体化物(约 80 重量%的沸石 X)，其由 CONDEA Augusta S.p.A. 公司以 VEGOBOND AX®商品名销售，并可由下式描述：



适合的沸石的平均粒子尺寸小于  $10 \mu\text{m}$ (体积分布，测量方法：Coulter Counter)，并优选含有 18-22 重量%，以及更优选的 20-22 重量%的结合水。

众所周知的磷酸盐当然也可用作助洗剂，倘若它们的应用对处于生态环境的理由不应避免。在大量市场上可得到的磷酸盐中，碱金属磷酸盐在洗涤剂工业中最为重要，三磷酸五钠和三磷酸五钾(钠和钾的三磷酸盐)尤其优选。

“碱金属磷酸盐”是各种磷酸的碱金属(特别是钠和钾)盐的集合术语,包括偏磷酸( $\text{HPO}_3$ )<sub>n</sub>和正磷酸( $\text{H}_3\text{PO}_4$ )以及更高分子量的代表。磷酸盐兼有各种优点:他们充当碱性载体,阻止石灰沉积在机器零件上以及在织物上石灰结壳,此外,有助于清洁效果。

磷酸二氢钠( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )以二水化合物(密度  $1.91 \text{ gcm}^{-3}$ , 熔点  $60^\circ$ )和一水化合物(密度  $2.04 \text{ gcm}^{-3}$ )存在。这两种盐都是白色非常易溶于水的粉末,加热后失去结晶水,并在  $200^\circ\text{C}$  下转化为弱酸性的二磷酸盐(二磷酸氢二钠,  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ),以及在更高温度时转化为三偏磷酸钠( $\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$ )和长链高分子量偏磷酸钠(Maddrell 盐)(参见下文)。  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  显示酸性反应。用氢氧化钠调整磷酸到 pH 值 4.5,然后喷雾干燥所得“浆”就可形成  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 。磷酸二氢钾(原或者一元磷酸钾、磷酸氢钾、KDP) $\text{KH}_2\text{PO}_4$  是白色盐,其密度为  $2.33 \text{ gcm}^{-3}$ ,熔点  $253^\circ$ (分解形成多磷酸钾( $\text{KPO}_3$ )<sub>x</sub>),并且易溶于水。

硫酸氢二钠(次磷酸钠) $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  是无色、易溶于水的晶体盐。以无水、带 2mol 水(密度  $2.066 \text{ gcm}^{-3}$ ,  $95^\circ\text{C}$  时失水)、带 7mol 水(密度  $1.68 \text{ gcm}^{-3}$ , 熔点  $48^\circ$  时失去 5 水)以及 12mol 水(密度  $1.52 \text{ gcm}^{-3}$ , 熔点  $35^\circ$  失去 5 水)的形式存在,在  $100^\circ$  时变成无水,在急剧加热下,就会转变成二磷酸盐  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 。以酚酞作指示剂,用苏打水中和磷酸就能制备磷酸氢二钠。磷酸氢二钾(次级或者二元磷酸钾) $\text{K}_2\text{HPO}_4$  是无定型的白色盐、易溶于水。

磷酸三钠,叔磷酸钠,  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , 是无色晶体,作为十二水合物,其密度是  $1.62 \text{ gcm}^{-3}$ ,熔点是  $73-76^\circ\text{C}$ (分解),作为十水合物,其熔点为  $100^\circ\text{C}$ (对应于 19-20%  $\text{P}_2\text{O}_5$ ),无水形式的密度为  $2.536 \text{ gcm}^{-3}$ (对应于 39-40%  $\text{P}_2\text{O}_5$ )。通过碱性反应磷酸三钠易溶于水,其制备方法是通过蒸发浓缩恰好 1mol 磷酸二钠和 1mol 氢氧化钠的溶液。磷酸三钾(三级或者三元磷酸钾) $\text{K}_3\text{PO}_4$  是白色易潮解的颗粒粉末,密度  $2.56 \text{ gcm}^{-3}$ ,

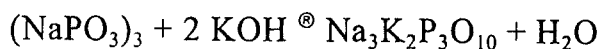
熔点 1340°，通过碱性反应易溶于水。例如如果托马斯(Thomas)矿渣与煤和硫酸钾一起加热，就形成磷酸三钾。尽管价格更高，但由于它们更易溶，所以在洗涤剂工业中，高效磷酸钾通常比相应的钠化合物更受欢迎。

二磷酸四钠(焦磷酸钠) $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  以无水形式(密度  $2.534 \text{ gcm}^{-3}$ ，熔点  $988^\circ\text{C}$ ，有时是  $880^\circ\text{C}$ )和十水合物的形式存在(密度  $1.815\text{-}1.836 \text{ gcm}^{-3}$ ，熔点  $94^\circ\text{C}$ 时失水)。这两个物质都是无色晶体，通过碱性反应溶于水中。当磷酸氢二钠加热到  $200^\circ$ 以上，或通过磷酸与苏打以化学计量比反应并喷雾干燥该溶液就形成焦磷酸钠。十水合物络合重金属盐和硬盐，由此减少了水的硬度。二磷酸钾(焦磷酸钾) $\text{K}_4\text{P}_2\text{O}_7$  以三水合物的形式存在，是一种无色吸湿性粉末，密度  $2.33 \text{ gcm}^{-3}$ ，溶于水，在  $25^\circ$ 时，1%溶液 pH 值为 10.4。

相对高分子量的磷酸钠和磷酸钾是通过浓缩  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  和  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  形成的。它们可划分成环型，即钠和钾的偏磷酸盐，以及链型，即钠和钾的多磷酸盐。特别是链型有很多不同的名称：熔合或煅烧的磷酸盐、格雷姆盐(Graham 盐)、四聚偏磷酸钾(Kurrol 盐)以及 Maddrell 盐。所有更高的钠和钾的磷酸盐都统称为浓缩的磷酸盐。

在工业上有重要用途的三磷酸五钠  $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ (三聚磷酸钠)是非吸湿性白色水溶性盐，其不带水或带 6 个水分子结晶，具有通式  $\text{NaO}[\text{P}(\text{O})(\text{ONa})\text{-O}]_n\text{-Na}$ ，其中  $n=3$ 。在室温条件下，大约 17 克无结晶水的盐溶于 100 克的水中，在  $60^\circ$ 时是约 20 克，而在  $100^\circ$ 时大约是 32 克。将这种溶液加热 2 小时到  $100^\circ$ ，大约 8%的正磷酸盐和 15%的二磷酸通过水解形成。在制备三磷酸五钠时，将磷酸与苏打水溶液或者氢氧化钠以化学计量比反应，并将溶液喷雾干燥。同格雷姆盐和磷酸氢钠相似，三磷酸五钠溶解许多不溶性的金属化合物(包括石灰肥皂等)。市场上的三磷酸五钠  $\text{K}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$  例如按重量计都是 50%溶液(> 23%  $\text{P}_2\text{O}_5$ ，25%  $\text{K}_2\text{O}$ )的形式。多磷酸钾广泛应用于洗涤剂工业中。还存在

三磷酸钾钠，根据本发明，也可使用。例如当三偏磷酸钠用氢氧化钾水解时形成三磷酸钾钠：



根据本发明，它们可以完全相同的方式用作三聚磷酸钠、三聚磷酸钾或者它们的混合物。根据本发明，三聚磷酸钠和三聚磷酸钠钾两者的混合物或者三聚磷酸钾和三聚磷酸钾钠两者的混合物或者三聚磷酸钠和三聚磷酸钾和三聚磷酸钠钾三者的混合物也可使用。

本发明的洗涤和清洁产品中的有机共助洗剂尤其包括多羧酸盐或多羧酸、聚体多羧酸盐、多天冬氨酸、聚乙缩醛、任选氧化糊精、其他有机共助洗剂(参见下文)和磷酸酯。下面描述这些类物质。

有用的有机助洗剂例如为以其钠盐形式使用的多羧酸，其中多羧酸应理解为携带一个以上酸官能团的羧酸。只要对生态是安全的，这些羧酸包括例如柠檬酸、己二酸、丁二酸、戊二酸、苹果酸、酒石酸、马来酸、反丁烯二酸、糖酸、氨基羧酸、次氨基三乙酸(NTA)及其混合物。优选的盐是多羧酸的盐，如柠檬酸、己二酸、丁二酸、戊二酸、酒石酸、糖酸及其混合物。

这些酸本身就可使用。除了它们助洗效应以外，这些酸也通常具有使成分酸化的性质，因此在洗涤剂或清洗剂中用来建立相对较低和适中的 pH 值，除非 pH 值要求通过混合其他成分而得到。在这方面特别提及系统相容性和对环境安全的酸，如柠檬酸、乙酸、酒石酸、苹果酸、乳酸、乙醇酸、丁二酸、戊二酸、己二酸、葡萄糖酸以及它们的任意混合物。然而，无机酸尤其是硫酸，或碱尤其是铵或碱金属的氢氧化物也可用作 pH 调节剂。这些调节剂存在于本发明的产品中，其量优选不高于 20 重量%，以及特别为 1.2-17 重量%。

其他合适的助洗剂有聚合的多羧酸盐，例如是聚丙烯酸或聚甲基

丙烯酸的碱金属盐，例如那些相对分子量为 500-700,000g/mol 的。

本说明书中提及的聚合多羧酸盐的分子量是各自酸形式的重均分子量  $M_w$ ，其主要利用紫外检测仪通过凝胶渗透色谱法(GPC)测定。测定根据聚丙烯酸的外标进行，所述外标依靠其与所研究聚合物的结构相似性而提供实际的分子量值。这些值完全不同于以聚苯乙烯磺酸为标准测定的分子量值。以聚苯乙烯磺酸为标准测定的分子量一般高于本说明书中给出的分子量。

尤其合适的聚合物是聚丙烯酸酯，其优选具有 2,000-20,000g/mol 的分子量。由于具有优良的溶解性，该组优选的代表是短链聚丙烯酸酯，其分子量为 2,000-10,000g/mol，以及特别为 3,000-5,000g/mol。

此外，合适的还有共聚合的聚羧酸酯，特别是丙烯酸与甲基丙烯酸的那些共聚合的聚羧酸酯，以及丙烯酸或甲基丙烯酸与马来酸的那些共聚合的聚羧酸酯。证明含有 50-90 重量%丙烯酸以及 50-10 重量%马来酸的丙烯酸/马来酸共聚物尤其合适。以游离酸计，它们的相对分子量一般为 2,000 to 70,000g/mol，优选在 20,000-50,000g/mol，更优选在 30,000-40,000g/mol。(共)聚合的聚羧酸酯可以粉末形式或者水溶液的形式利用。(共)聚合的聚羧酸酯在清洗剂中所占的含量为 0.5-20 重量%，特别为 1-10 重量%。

为了改善水中的溶解度，这些聚合体也可包含烯丙基磺酸，如烯丙基羟苯磺酸以及甲代烯丙基磺酸作为单体。

特别优选的聚合物是由 2 种以上不同单体单元构成的可生物降解的聚合物，如那些含有丙烯酸和马来酸以及乙烯醇或乙烯醇衍生物作为单体的，或者那些含有以丙烯酸和 2-烷基烯丙基磺酸和糖衍生物作为单体的。

其他优选的共聚物是那些优选含有丙烯醛和丙烯酸 / 丙烯酸盐或丙烯醛和乙烯基醋酸酯作为单体的共聚物。

其他优选的助洗剂是聚合的氨基二元羧酸、其盐或其前体。聚天冬氨酸或者盐及其衍生物是特别优选的。

其他合适的助洗剂是聚缩醛，它们可通过二醛与含有 5-7 个碳原子和至少 3 个羟基的多羟基羧酸反应得到。优选的聚缩醛可从二醛如乙二醛、戊二醛、对苯二醛及其混合物得到，以及从多羟基羧酸如葡萄糖酸和 / 或葡庚糖酸获得。

其他合适的有机助洗剂是糊精，如碳水化合物的低聚物或聚合物，它们可由部分水解淀粉获得。通过常规方法如酸或者酶催化的方法进行水解反应。水解产物优选平均分子量为 400-500,000g/mol。优选具有右旋糖当量(DE)0.5-40，特别为 2-30 的多糖，其中与 DE 为 100 的右旋糖比较，该 DE 是衡量多糖的还原效果的常用尺度。DE 为 3-20 的麦芽糊精和 DE 为 20-37 的干葡萄糖糖浆以及具有相对高的分子量为 2,000-30,000g/mol 的所谓黄、白糊精都可采用。

这些糊精的氧化衍生物是它们与氧化剂的反应产物，所述氧化剂能将糖环的至少一个醇官能团氧化成羧酸官能团。本发明产品中尤其优选的有机助洗剂是根据 EP 472 042、WO 97/25399 和 EP 755944 的氧化淀粉或其衍生物。

其他合适的共助洗剂是羟二琥珀酸盐以及其他二琥珀酸的衍生物，优选二琥珀酸化乙二胺。乙二胺-N,N'-二琥珀酸盐(EDDS)优选以钠盐或者镁盐形式使用。就此而论，丙三醇二琥珀酸酯和丙三醇三琥珀酸酯也是优选对象。在含沸石、碳酸盐和 / 或含硅酸盐的产品中使用量为 3-15 重量%。

其它有用的有机助洗剂是例如乙酰化的羟基羧酸及其盐，其可任选以内酯形式出现并含有至少 4 个碳原子、至少一个羟基和最多 2 个酸性基团。

具有共助洗剂特性的另一类物质是膦酸盐。对此特别是羟基链烷和氨基链烷膦酸盐。在羟基链烷膦酸盐中，1-羟基乙烷-1,1-二膦酸盐(HEDP)作为共助洗剂尤为重要。优选使用钠盐，其中二钠盐显示中性反应，以及四钠盐显示碱性反应(pH 9)。优选的氨基链烷膦酸盐有乙二胺四亚甲基膦酸盐(EDTMP)、二乙基三胺五亚甲基膦酸盐(DTPMP)及其更高的同系物。优选使用中性反应的钠盐形式，如 EDTMP 的六钠盐或者 DTPMP 的七-和十钠盐。在膦酸盐中，HEDP 优选用作助洗剂。另外，氨基链烷膦酸盐具有显著的重金属结合能力。因此，尤其如果洗涤剂里亦含有漂白剂，有益的是可利用氨基链烷膦酸盐，特别为 DTPMP，或者上述膦酸盐的混合物。

另外，任何能与碱土金属离子形成复合物的化合物都可用作共助洗剂。

本发明的洗涤或清洁产品中可任选包含其量高达 90 重量%的助洗剂。其含量优选高达 75 重量%。本发明洗涤剂中的助洗剂含量尤其为 5-50 重量%。在本发明的洗涤剂用于硬表面清洁，特别是用于餐具的机械洗涤时，助洗剂的含量尤其为 5-88 重量%，其中在这种洗涤剂中优选不含水不溶性的助洗剂。在一优选实施方案中，本发明的特别用于洗碗机的洗涤剂包含 20-40 重量%的水溶性有机助洗剂，特别是碱金属柠檬酸盐，含有 5-15 重量%的碱金属碳酸盐以及 20-40 重量%的碱金属二硅酸盐。

在液体至凝胶形式的洗涤和清洁产品的组成中可用的溶剂来源于例如一元醇或者多元醇、烷醇胺或乙二醇醚的基团，条件是在指定的浓度范围内它们能与水混合。这些溶剂优选选自乙醇，正或异丙醇，

丁醇，乙二醇甲醚，乙二醇乙醚，乙二醇丙醚，乙二醇一-正丁醚，二乙二醇甲醚，二乙二醇二乙醚，丙二醇甲基、乙基或丙基醚，二丙二醇单甲基或单乙基醚，二异丙二醇单甲基或单乙基醚，甲氧基、乙氧基或丁氧基三甘醇，1-丁氧基乙氧基-2-丙醇，3-甲基-3-甲氧基丁醇，丙二醇叔-丁醚以及这些溶剂的混合物。

在本发明的液体至凝胶形式的洗涤和清洁产品中，溶剂的含量为0.1-20重量%，优选低于15重量%，以及特别低于10重量%。

为了调节粘度，可向本发明产品中加入一种或者多种增稠剂，例如增稠体系。这些高分子量物质也称为膨胀剂通常吸收大量液体并且在此过程中膨胀，以便最终变成粘滞的纯溶液或胶状溶液。

合适的增稠剂是无机或者聚合的有机化合物。无机增稠剂包括例如聚硅酸、粘土矿物如蒙脱石、沸石、硅石和膨润土。有机增稠剂来源于天然聚合物、改性的天然聚合物和完全合成的聚合物。天然存在的聚合物的例子有琼脂、角叉菜、黄耆胶、阿拉伯胶、藻酸盐、果胶、聚糖、瓜耳胶、刺槐豆胶、淀粉、糊精、明胶以及干酪素。可用作增稠剂的改性天然聚合体主要来源于改性淀粉和纤维素。这里例如是羧甲基纤维素及其他纤维素醚、羟基乙基和羟基丙基纤维素以及树脂醚。完全合成的增稠剂包括聚合物，如聚丙烯和聚甲基丙烯酸化合物、乙烯基聚合物、聚羧酸、聚醚、聚亚胺、聚酰胺和聚氨基甲酸酯。

以最终的产品计，增稠剂的用量最高达5重量%，优选0.05-2重量%，以及特别优选为0.1-1.5重量%。

本发明的洗涤和清洁产品可任选含有螯合剂、电解液和其他助剂，如荧光增白剂、泛灰抑制剂、银腐蚀抑制剂、染料转移抑制剂、泡沫抑制剂、研磨剂、染料和/或香精，以及微生物活性成分和/或紫外吸收剂作为它的补充成分。

本发明的织物洗涤剂可包含二氨基 1,2-二苯乙烯二磺酸的衍生物或其碱金属盐作为荧光增白剂。合适的荧光增白剂有例如 4,4'-双-(2-苯胺基-4-吗啉基-1,3,5-三嗪基-6-氨基)-1,2-二苯乙烯-2,2'-二磺酸的盐或者相似组成的化合物,所述化合物的吗啉基可被二乙醇氨基、甲氨基、苯胺基或者 2-甲氧基乙氨基替代。也可使用取代的二苯基苯乙烯基型的增白剂,如 4,4'-双-(2-磺苯乙烯基)-二苯基、4,4'-双-(4-氯-3-磺苯乙烯基)-二苯基或者 4-(4-氯苯乙烯基)-4'-(2-磺苯乙烯基)-二苯基的碱金属盐。上述荧光增白剂的混合物也可以使用。

泛灰抑制剂的作用是使从织物纤维上溶解出的污物保持悬浮于洗涤液中。合适的泛灰抑制剂是大多数的天然有机物的水溶性胶体,如淀粉、动物胶、明胶、淀粉或纤维素的羧酸乙醚或者磺酸乙醚的盐,也可以是纤维素或淀粉的酸性硫酸酯的盐。包含酸性基团的水溶性聚酰胺也适用此目的。淀粉衍生物除了上面提及的以外,例如还有乙醛淀粉等也都可使用。纤维素乙醚如羧甲基纤维素(钠盐)、甲基纤维素、羟烷基纤维素以及混合醚,如甲基羟乙基纤维素、甲基羟丙基纤维素、甲基羧甲基纤维素及其混合物优选使用,例如以该洗涤剂计,其用量为 0.1-5 重量%。

为了保护银器免遭腐蚀,可以在本发明的洗碗洗涤剂中使用银腐蚀抑制剂。现有技术中,银腐蚀抑制剂是已知的,并包括例如,苯并三唑、氯化铁(III)以及硫酸钴。例如,从欧洲专利 EP 0 736 084 B1 已知,特别适合与酶一起使用的银腐蚀抑制剂有锰、钛、锆、钪、钒、钴或铈盐和/或络合物,在这些络合物中上述金属元素以氧化数 II、II、IV、V 或 VI 的一种形式存在。这些化合物的例子有  $MnSO_4$ 、 $V_2O_5$ 、 $V_2O_4$ 、 $VO_2$ 、 $TiOSO_4$ 、 $K_2TiF_6$ 、 $K_2ZrF_6$ 、 $Co(NO_3)_2$ 、 $Co(NO_3)_3$  及其混合物。

污渍释放剂或污渍驱除剂通常是聚合物,当这些聚合物用于洗涤

剂中时，它们就给洗涤的纤维提供污渍排斥特性和/或支持洗涤剂的其他成分悬浮污渍的能力。在这些聚合物用于硬表面的清洗剂中时，也能观测到可比的效果。

特别有效并且长期以来已知的污渍释放活性剂是具有二羧酸、烷撑二醇以及聚亚烷基二醇单元的共聚酯。例子为聚对苯二甲酸乙二醇酯和聚乙二醇的共聚物或混合聚合物(DT 16 17 141 或 DT 22 00 911)。DE 22 53 063 中提到酸性组合物，其中含有由二碱性羧酸和亚烷基或环亚烷基聚乙二醇组成的共聚物。在 DE 28 57 292、DE 33 24 258 以及 EP 0 253 567 中描述了对苯二甲酸亚乙酯和聚环氧乙烷-对苯二甲酸酯的共聚物和它们在洗涤剂中的应用。欧洲专利 EP 066 944 涉及一种组合物，其含有由乙二醇、聚乙二醇、芳族二羧酸与磺化芳族二羧酸以一定摩尔比构成的共聚酯。欧洲专利 EP 0 185 427 描述了甲基-或乙基-末端的聚酯，其含有对苯二甲酸亚乙酯和/或亚丙酯单元和聚环氧乙烷-对苯二甲酸酯单元，以及描述了含有此种污渍释放聚合物的洗涤剂。欧洲专利 EP 0 241 984 涉及聚酯，这种聚酯除了含有氧乙烯基团和对苯二甲酸单元以外，还包含取代的亚乙基单元和甘油单元。欧洲专利 EP 0 241 985 公开了一种聚酯，其除了含有氧乙烯基团和对苯二甲酸以外，还含有 1,2-亚丙基、1,2-亚丁基和/或 3-甲氧基-1,2-亚丙基和甘油单元，并且其以  $C_{1-4}$  烷基为末端。欧洲专利申请 EP 0 272 033 描述了包含聚对苯二甲酸亚丙酯和聚对苯二甲酸乙二醇酯单元的至少部分以  $C_{1-4}$  烷基或酰基为末端的聚酯。欧洲专利 EP 0 274 907 描述了包含以磺乙基为末端的对苯二甲酸酯的污渍释放聚酯。根据欧洲专利申请 EP 0357 280，包含对苯二甲酸、亚烷基二醇和聚- $C_{2-4}$ -乙二醇单元的污渍释放聚酯可通过不饱和端基的磺化来制备。国际专利申请 WO 95/32232 涉及酸性芳族污渍释放聚酯。国际专利申请 WO 97/31085 描述用于棉织物的未聚合的污渍驱除剂，其含有若干官能团单元：第一单元例如可能是阳离子的，能通过静电相互作用吸附到棉表面，以及第二单元是疏水的，负责遗留在水/棉界面上的活性物质。

适用于本发明的洗衣店用洗涤剂中的染料转移抑制剂尤其包括聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯咪唑、聚合的 N-氧化物，如聚-(乙烷基吡啶-N-氧化物)和乙烷基吡咯烷酮与乙烷基咪唑的共聚物。

在机器清洗过程中使用时，将泡沫抑制剂加入到洗涤剂中会大有好处。合适的泡沫抑制剂例如是具有较高含量的 C<sub>18-24</sub> 脂肪酸的天然或合成来源的皂类。合适的非表面活性剂类的泡沫抑制剂是例如有机聚硅氧烷及其与微细的任选硅烷化的硅酸以及石蜡、蜡、微晶蜡的混合物，以及它们与硅烷化的硅酸或者二-硬脂酰亚乙基二酰胺的混合物。不同泡沫抑制剂的混合物，如硅酮、石蜡和蜡的混合物也可以被有效的利用。泡沫抑制剂，特别是含硅氧烷-和/或含石蜡-的泡沫抑制剂优选固定到粒状水溶性的或水分散的支持物上。尤其优选石蜡和双-硬脂酰亚乙基二酰胺的混合物。

另外，本发明的硬表面清洗剂可含有研磨剂组分，特别是选自石英粉、锯末、塑料粉、白垩和玻璃微珠以及它们的混合物。存在于本发明清洗剂中的研磨剂，其量优选不超过 20 重量%，特别为 5-15 重量%。

将染料和香精加入到本发明的洗涤剂/清洗剂中以改善产品的美学吸引力，并给消费者不仅提供所需要的洗涤和清洁功效而且还提供了视觉和感官上“特别和不易错认”的产品。合适的芳香油或香料包括个别的芳香化合物，如酯、醚、醛、酮、醇和烃类的合成产品。酯类的芳香化合物例如是乙酸苄酯、异丁酸苯氧基乙基酯、乙酸 p-叔丁基环己酯、乙酸芳樟酯、乙酸二甲基苄基原酯、乙酸苯基乙酯、苯甲酸芳樟酯、甲酸苄基酯、氨基乙酸乙基甲基苯酯、丙酸烯丙基环己酯、丙酸甲基苄基原酯和水杨酸苄酯。醚包括例如苄基乙基醚；醛包括例如含有 8-18 个碳原子的直链链烷醛(Alkanale)、柠檬醛、香茅醛、香茅基含氧乙醛、仙客来醛、羟基香茅醛、铃兰醛和 Bourgeonal；酮包括例如紫罗酮、 $\alpha$ -异甲基紫罗酮以及甲基柏木酮；醇包括茴香脑、香

茅醇、丁子香酚、香叶醇、沉香醇、苯乙基醇和松油醇；以及烃最主要包括萜烯，如苧烯和蒎烯。然而，优选使用各种香精的混合物一起产生诱人的香味。象这样的芳香油也可包含天然香精混合物，这些混合物可得自植物源如松树、柑橘属植物、茉莉、绿叶刺蕊草、玫瑰或衣兰衣兰油。还可适用的有鼠尾草油、春黄菊油、丁香油、蜜蜂花油、薄荷油、肉桂叶油、酸橙花油、杜松子油、岩兰油、乳香油、枫子香油和岩蔷薇油，以及橙花油、苦橙油、桔皮油和檀香油。洗涤剂/清洗剂的染料含量通常低于 0.01 重量%，而香料却可占到整个组合物的 2 重量%。

香料可直接掺入到洗涤和清洁产品中，然而，有利地是将香味涂覆到载体上，所述载体能够增强香气在洗涤物上的附着力，并通过缓慢释放香气给处理过的织物特别提供持久的芳香。合适的载体物质例如是环糊精，其中环糊精/香料复合物还可附加地用其它助剂涂覆。另一优选的芳料载体是已描述过的沸石 X，它也能够代替表面活性剂或与表面活性剂混合吸收香气。因此，含有所述沸石 X 的洗涤和清洁产品是优选的，其中所述香料至少部分吸收在沸石上。

专业人员毫无困难地选择的优选的染料具有高的储藏稳定性，不受产品中的其他常规成分和受光的影响，并且对织物纤维不显示显著的直接染色性从而不给它们上色。

为了控制微生物，洗涤或清洁产品可以含有抗菌活性成分。依赖抗菌谱和作用机理，抗菌剂分为细菌抑制剂和杀菌剂、真菌抑制剂和杀真菌剂等。这些组的重要代表是例如苯扎氯胺、烷芳基磺酸盐、卤代苯酚和苯酚醋酸汞化物。在本发明教导的范围中，术语“抗微生物活性”和“抗微生物活性物质”具有本领域的常规意义，如 K.H. Wallhäüßer 在“Praxis der Sterilisation, Desinfektion - Konservierung : Keimidentifizierung - Betriebshygiene” (第 5 版, Stuttgart/New York: Thieme, 1995)中所定义，其中所述的任何具有抗微生物活性的物质均

可使用。合适的抗微生物活性成分优选选自醇、胺、醛、抗微生物的酸及其盐、羧酸酯、酰胺、苯酚、苯酚衍生物、联苯、联苯基烷、尿素衍生物、氧和氮缩醛和缩甲醛、苄脒、异噻唑啉、邻苯二甲酰亚胺衍生物、吡啶衍生物、抗微生物的表面活性化合物、胍、抗微生物的两性化合物、喹啉、1,2-二溴代-2,4-二氰基丁烷、碘代-2-丙基丁基氨基甲酸酯、碘、碘递体、过氧化合物、卤化合物以及上述的任意混合物。

因此杀菌活性成分可选自乙醇、正丙醇、异丙醇、1,3-丁二醇、苯氧基乙醇、1,2-丙二醇、甘油、十一烯酸、苯甲酸、水杨酸、二氢乙酸(Dihydracetic acid)、邻-苯基酚、N-甲基吗啉乙腈(MMA)、2-苄基-4-氯酚、2,2'-亚甲基-双-(6-溴代-4-氯酚)、4,4'-二氯-2'-羟基联苯乙醚(Dichlosan)、2,4,4'-三氯-2'-羟基二苯基醚(Trichlosan)、Chlorohexidine、N-(4-氯苯基)-N-3,4-二氯苯基)-脲、N,N'-(1,10-癸烷二基-2-1-嘧啶基-4-亚基)-双-(1-辛胺)-二氢氯化物、N,N'-双-(4-氯苯基)-3,12-二亚氨基-2,4,11,13-四氮杂四癸烷二亚氨基酰胺、葡糖鱼精蛋白、抗微生物的表面活性季化合物、胍包括二胍和聚胍，如1,6-双-(2-乙基己基二胍基己烷)-二氢氯化物、1,6-双-(N<sub>1</sub>,N<sub>1</sub>'-苯基二胍基-N<sub>5</sub>,N<sub>5</sub>')-己烷四氢氯化物、1,6-二-(N<sub>1</sub>,N<sub>1</sub>'-苯基-N<sub>1</sub>,N<sub>1</sub>'-甲基二胍基-N<sub>5</sub>,N<sub>5</sub>')-己烷二氢氯化物、1,6-二-(N<sub>1</sub>,N<sub>1</sub>'-邻-氯苯基二胍基-N<sub>5</sub>,N<sub>5</sub>')-己烷二氢氯化物、1,6-二-(N<sub>1</sub>,N<sub>1</sub>'-2,6-二氯苯基二胍基-N<sub>5</sub>,N<sub>5</sub>')-己烷二氢氯化物、1,6-二-[N<sub>1</sub>,N<sub>1</sub>'-β-(对-甲氧基苯基)-二胍基-N<sub>5</sub>,N<sub>5</sub>')-己烷二氢氯化物、1,6-二-(N<sub>1</sub>,N<sub>1</sub>'-α-甲基-β-苯基二胍基-N<sub>5</sub>,N<sub>5</sub>')-己烷二氢氯化物、1,6-二-(N<sub>1</sub>,N<sub>1</sub>'-对-硝基苯基二胍基-N<sub>5</sub>,N<sub>5</sub>')-己烷二氢氯化物、ω:ω'-二-(N<sub>1</sub>,N<sub>1</sub>'-苯基二胍基-N<sub>5</sub>,N<sub>5</sub>')-二-正丙基醚二氢氯化物、ω:ω'-二-(N<sub>1</sub>,N<sub>1</sub>'-对-氯苯基二胍基-N<sub>5</sub>,N<sub>5</sub>')-二-正丙基醚四氢氯化物、1,6-二-(N<sub>1</sub>,N<sub>1</sub>'-2,4-二氯苯基二胍基-N<sub>5</sub>,N<sub>5</sub>')-己烷四氢氯化物、1,6-二-(N<sub>1</sub>,N<sub>1</sub>'-对-甲基苯基二胍基-N<sub>5</sub>,N<sub>5</sub>')-己烷二氢氯化物、1,6-二-(N<sub>1</sub>,N<sub>1</sub>'-2,4,5-三氯苯基二胍基-N<sub>5</sub>,N<sub>5</sub>')-己烷四氢氯化物、1,6-二-[N<sub>1</sub>,N<sub>1</sub>'-α-(对-氯苯基)-乙基二胍基-N<sub>5</sub>,N<sub>5</sub>')-己烷二氢氯化物、ω:ω'-二-(N<sub>1</sub>,N<sub>1</sub>'-对-氯苯基二胍基-N<sub>5</sub>,N<sub>5</sub>')-间-二甲苯二氢氯化物、1,12-二-

(N<sub>1</sub>,N<sub>1</sub>'-对-氯苯基二胍基-N<sub>5</sub>,N<sub>5</sub>')-十二烷二氢氯化物、1,10-二-(N<sub>1</sub>,N<sub>1</sub>'-苯基二胍基-N<sub>5</sub>,N<sub>5</sub>')-癸烷四氢氯化物、1,12-二-(N<sub>1</sub>,N<sub>1</sub>'-苯基二胍基-N<sub>5</sub>,N<sub>5</sub>')-十二烷四氢氯化物、1,6-二-(N<sub>1</sub>,N<sub>1</sub>'-邻-氯苯基二胍基-N<sub>5</sub>,N<sub>5</sub>')-己烷二氢氯化物、1,6-二-(N<sub>1</sub>,N<sub>1</sub>'-邻-氯苯基二胍基-N<sub>5</sub>,N<sub>5</sub>')-己烷四氢氯化物、乙烯-双-(1-甲苯基双缩胍)、乙烯-双-(对-甲苯基双缩胍)、乙烯-双-(3,5-二甲基苯基双缩胍)、乙烯-双-(对-叔戊基苯基双缩胍)、乙烯-双-(壬基苯基双缩胍)、乙烯-双-(苯基双缩胍)、乙烯-双-(正丁基苯基双缩胍)、乙烯-双-(2,5-二乙氧基苯基双缩胍)、乙烯-双-(2,4-二甲基苯基双缩胍)、乙烯-双-(邻-联苯双缩胍)、乙烯-双-(混合-戊基萘基双缩胍)、正丁基乙烯-双-(苯基双缩胍)、三亚甲基-双-(邻-甲苯基双缩胍)、正丁基三亚甲基-双-(苯基双缩胍) 以及相应的盐, 如醋酸盐、葡糖酸盐、氢氯化物、氢溴化物、柠檬酸盐、亚硫酸氢盐、氟化物、聚马来酸盐、正椰油烷基肌氨酸盐、亚磷酸盐、次亚磷酸盐、过氟辛酸盐、硅酸盐、山梨酸盐、水杨酸盐、马来酸盐、酒石酸盐、延胡索酸盐、乙二胺四乙酸盐、亚氨基醋酸盐、肉桂酸盐、硫氰酸盐、精氨酸盐、苯四酸盐、四羧基丁酸盐、安息香酸盐、戊二酸盐、单氟磷酸盐、过氟丙酸盐和它们的混合物。卤化二甲苯和甲酚衍生物, 如对-氯-间-甲酚或对-氯-间-二甲苯, 并且植物起源的天然杀菌剂(如香料和香草)以及动物和微生物起源的天然抗菌剂也是合适的。优选的抗菌剂有抗菌性表面活性的四元化合物、植物起源和/或动物起源的天然抗菌剂, 以及最优选的是至少一个植物起源的抗菌剂, 其来自咖啡因、可可碱和茶碱以及精油如丁子香酚、麝香草酚和香叶醇, 和/或至少一个动物起源的抗菌剂, 其来自酶如牛奶蛋白、溶菌酶以及乳过氧化物酶和/或至少一个抗菌性表面活性的四元化合物, 其包含铵、铈、磷、碘鎘或砷鎘基、过氧化物和氯化物。微生物起源的物质即所谓的“杀菌素”也可以使用。

适合用作抗微生物活性成分的季铵化合物(QAC)具有通式(R<sup>1</sup>)(R<sup>2</sup>)(R<sup>3</sup>)(R<sup>4</sup>)N<sup>+</sup>X<sup>-</sup>, 其中 R<sup>1</sup>-R<sup>4</sup> 可以相同或不同, 并代表 C<sub>1-22</sub> 烷基、C<sub>7-28</sub> 芳烷基或杂环基, 其中两个或在芳香化合物如吡啶的情况下甚至是三个基团与氮原子一起形成杂环基, 如吡啶鎘或咪唑鎘化合物, 以

及 X-代表卤离子、硫酸根离子、氢氧根离子或类似的阴离子。为了达到最佳抗微生物活性，这些取代基中至少一个优选具有 8-18，更优选 12-16 个碳原子的链长。

QAC 可以通过叔胺与烷基化试剂反应得到，所述烷基化试剂如氯代甲烷、苄基氯、硫酸二甲酯、十二烷基溴，以及环氧乙烷。带有一个长烷基链和两个甲基的叔胺的烷基化尤其简单，同样在氯代甲烷的帮助下在温和条件下可以进行含两个长链基团和一个甲基的叔胺的季铵化。含三个长烷基或者羟基取代的烷基的胺缺乏活性，并优选采用硫酸二甲酯来季铵化。

合适的 QAC 是例如苄烷铵氯化物(N-烷基-N,N-二甲基苄基氯化铵，CAS No.8001-54-5)、Benzalkon B(m,p-二氯苄基二甲基-C<sub>12</sub>-烷基氯化铵，CAS No.58390-78-6)、苯佐氯铵(苄基-十二基-双-(2-羟乙基)-氯化铵)、十六烷三甲基溴化铵(N-十六烷基-N,N-三甲基溴化铵，CAS No.57-09-0)、苯索氯铵(N,N-二甲基-N-[2-[2-[对-(1,1,3,3-四甲基丁基)-苯氧基]-乙氧基]-乙基]-苄基氯化铵，CAS No.121-54-0)、二烷基二甲基氯化铵，如二-正癸基二甲基氯化铵(CAS No.7173-51-5-5)、二癸基二甲基溴化铵(CAS No.2390-68-3)、二辛基二甲基氯化铵、1-十六烷基氯化吡啶鎓(CAS No.123-03-5)和噻唑啉碘化物(CAS No.15764-48-1)以及它们的混合物。尤其优选的 QAC 是含有 C<sub>8-18</sub> 烷基的苄烷氯化铵，特别是 C<sub>12-14</sub>-烷基-苄基-二甲基-氯化铵。

苯扎卤铵和/或取代的苯扎卤铵是商业上可获得的，如来自 Lonza 的 Barquat®、来自 Mason 的 Marquat®、来自 Witco/Sherex 的 Variquat® 以及来自 Lonza 的 Hyamine®和来自 Lonza 的 Bardac®。其他商业上可获得的抗微生物活性成分有 N-(3-氯烯丙基)-hexaminium 氯化物，如来自 Dow 的 Dowicide®和 Dowicil®，苄索氯铵，如来自 Rohm & Haas 的 Hyamine®1622，甲基苄索氯铵，如来自 Rohm & Haas 的 Hyamine®10X，十六烷基吡啶鎓氯化物，如来自 Merrell Labs 的氯化十六烷基

吡啶。

该杀菌活性成分的用量在 0.0001-1 重量%的范围内，优选在 0.001-0.8 重量%的范围内，更优选在 0.005-0.3 重量%的范围内，以及最优选在 0.01-0.2 重量%的范围内。

另外，本发明的洗涤或清洁产品可任选含有紫外吸收剂，所述吸收剂可吸附到经处理的织物上，并增强纤维和/或其他组成成分的光稳定性。紫外吸收剂是有机物质(滤光剂)，它们能吸收紫外线并以长波辐射如热的形式释放吸收的能量。

具有这些所需特性的化合物是例如通过无辐射钝化作用而具有所需特性的化合物以及具有位置 2 和/或位置 4 取代基的二苯甲酮的衍生物。此外其他合适的紫外吸收剂是取代的苯并三唑、3-苯基-取代的丙烯酸盐(位置 2 上任选用氰基取代的肉桂酸衍生物)、水杨酸盐、有机 Ni 复合物和天然物质，如伞形酮和内生的尿刊酸。联苯基以及主要是 1,2-二苯乙烯衍生物具有特别的意义，例如在 EP 0728749 A 中所述的商业上以 Tinosorb® FD 和 Tinosorb® FR ex Ciba 可得到的。合适的 UV-B 吸收剂包括 3-苯亚甲基樟脑或 3-苯亚甲基降樟脑和它的衍生物，如在 EP 0693471 B1 中所述的 3-(4-甲基苯亚甲基)-樟脑；4-氨基苯甲酸衍生物，优选 4-(二甲基氨基)-苯甲酸-2-乙基己基酯、4-(二甲基氨基)-苯甲酸-2-辛基酯和 4-(二甲基氨基)-苯甲酸戊基酯；肉桂酸的酯，优选 4-甲氧基肉桂酸-2-乙基己基酯、4-甲氧基肉桂酸丙基酯、4-甲氧基肉桂酸异戊基酯、2-氰基-3,3-苯基肉桂酸-2-乙基己基酯(氰双苯丙烯酸辛酯)；水杨酸的酯，优选水杨酸-2-乙基己基酯、水杨酸-4-异丙基苄基酯、水杨酸高薄荷基酯；二苯甲酮的衍生物，优选 2-羟基-4-甲氧基二苯甲酮、2-羟基-4-甲氧基-4'-甲基二苯甲酮、2,2'-二羟基-4-甲氧基二苯甲酮；亚苄基丙二酸的酯，优选 4-甲氧基亚苄基丙二酸二-2-乙基己基酯；三嗪衍生物，如 2,4,6-三苯胺-(对-羰基-2'-乙基-1'-己氧基)-1,3,5-三嗪和 EP 0818450 A1 中所述的辛基三嗪酮或者二辛基丁氨

基三嗪酮(Uvasorb® HEB); 丙烷-1,3-二酮如 1-(4-叔丁基苯基)-3-(4'-甲氧基苯基)-丙烷-1,3-二酮; 如 EP 0694521 B1 中所述的酮三环(5.2.1.0)癸烷衍生物。其他合适的 UV-B 吸收剂有 2-苯基苯并咪唑-5-磺酸和碱金属、碱土金属、铵、烷基铵、烷醇铵及其葡糖铵盐; 二苯甲酮的磺酸衍生物, 优选 2-羟基-4-甲氧基二苯甲酮-5-磺酸及其盐; 3-苯亚甲基樟脑的磺酸衍生物, 如 4-(2-氧代-3-亚龙脑基甲基)-苯磺酸和 2-甲基-5-(2-氧代-3-亚龙脑基)-磺酸及其盐。

典型的 UV-A 过滤剂具体有苯甲酰甲烷的衍生物, 如 1-(4'-叔丁基苯基)-3-(4'-甲氧基苯基)-丙烷-1,3-二酮、4-叔丁基-4'-甲氧基联苯甲酰甲烷(Parsol 1789)、1-苯基-3-(4'-异丙基苯基)-丙烷-1,3-二酮和 DE 19712033 A1 (BASF)中所述的烯胺化合物。UV-A 和 UV-B 过滤剂当然可以混合物的形式利用。除了上面提到的可溶性物质外, 不溶的光封闭色素, 也就是细分散的优选“毫微化的”金属氧化物或盐也可以用于这种目的。适合的金属氧化物的例子具体有氧化锌、二氧化钛以及铁、锆、硅、镁、铝和铈的氧化物以及它们的混合物。硅酸盐(滑石)、硫酸钡和硬脂酸锌也可作为盐使用。氧化物和盐以色素的形式应用在护肤的乳剂和装饰性化妆品上。颗粒直径平均小于 100nm, 优选在 5-50nm 之间, 以及更优选在 15-30nm 之间。它们一般为球形, 尽管椭圆或其他非球形颗粒也能用。这些色素也可经表面处理, 也就是说亲水性的或疏水性的。典型的例子是包覆的二氧化钛, 如 Titandioxid T 805(Degussa)和 Eusolex® T2000 (Merck)。合适的疏水型包覆材料首要是硅氧烷, 以及其中尤其是三烷氧基辛硅烷或者二甲硅油。微粉化的氧化锌优选使用。其他合适的 UV 过滤剂可以在 P. Finkel, SÖFW-Journal 122, 第 543 页(1996)的综述中找到。

UV 吸收剂的常用量在 0.01-5 重量%的范围内, 以及优选在 0.03-1 重量%的范围内。

通常用于洗涤产品和清洁产品中的成分还包括清洁剂和清洗活性

的酶。

因此，以除上述本发明的蛋白质，蛋白片段，融合蛋白或衍生物之外的其它酶为特征的洗涤产品或清洁产品是本发明优选的实施方案。这些酶尤其包括其它蛋白酶，淀粉酶，纤维素酶，半纤维素酶，诸如 $\beta$ -葡聚糖酶，氧化酶，诸如虫漆酶，角质酶和/或脂肪酶，还有酯酶，以及本应用领域现有技术中所述的其他所有酶。

数十年来，将酶例如蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶或纤维素酶作为洗涤产品和清洁产品中的活性组分使用。它们各自对有关试剂的洗涤或清洁功效的作用是在蛋白酶的情况下降解含蛋白质污物的能力，在淀粉酶的情况下降解含淀粉的污物，在脂肪酶的情况下裂解脂肪的活性。纤维素酶除其去污即基本洗涤和清洁功效外，特别由于其对洗涤剂的二次洗涤功效的作用和由于其对织物的纤维作用优选在洗涤剂中使用。特定的水解产物被洗涤剂和清洁剂中的常规组分损坏、溶解、乳化或悬浮或者由于其高的溶解度被洗液冲洗出，因此获得酶和其他组分之间的协同作用效果。

蛋白酶在天然纤维，特别是棉或丝上具有与纤维素酶对组合物的二次洗涤功效可比的效果。由于它们对织物表面结构的影响，可以对该材料产生柔顺的影响，并因此防止纠结。

其它酶通过它们特殊的酶功效增加相应产品的清洗功效。这些酶的例子包括半纤维素酶，诸如 $\beta$ -葡聚糖酶(WO 99/06515 和 WO 99/06516)，氧化酶，诸如虫漆酶(WO 00/39306)或者果胶溶解酶(WO 00/42145)，这些具体用于特殊的清洗产品中。

在本发明的洗涤或清洁产品中首先考虑使用从微生物例如细菌或真菌获得的酶。他们以本身已知的方法从合适的微生物中通过发酵方法而获得，这些微生物例如在德国公开申请 DE 1940488 和 DE

2121397, 在美国专利 US 3,623,957 和 US 4,264,738, 在欧洲专利申请 EP 006 638 和在国际专利申请 WO 91/02792 中有所描述。

本发明的蛋白质和/或其他蛋白质特别在储存期间可用稳定剂来保护, 例如避免通过物理作用、氧化或蛋白酶解而造成其变性、分解或失活。这适用于本发明所有的产品, 尤其是洗涤和清洁产品。

一组稳定剂是可逆的蛋白酶抑制剂, 它能在洗涤剂稀释之后在洗液中解离。苯脒氯化物和亮抑酶肽就为此目的而确立。硼砂、硼酸或它们的盐或酯也经常用于这种目的, 它们首先包括例如在 WO 95/12655 中由芳香基邻位取代的苯基硼酸、在 WO 92/19707 中由芳香基间位取代的苯基硼酸和在 US 5,972,873 中由芳香基对位取代的苯基硼酸或它们的盐或酯。在 WO 98/13460 和 EP 583 534 中公开了肽醛, 也就是具有还原 C 末端的寡肽, 特别是那些含有 2-50 个单体的, 用于可逆性抑制洗涤剂蛋白酶。肽的可逆性蛋白酶抑制剂尤其包括卵类粘蛋白(WO 93/00418)。例如, WO 00/01826 公开了针对蛋白酶枯草杆菌素的特异性可逆的肽抑制剂, 用于含蛋白酶的组合物中, 而 WO 00/01831 公开了相应的蛋白酶和抑制剂的融合蛋白质。

其他酶的稳定剂有氨基醇, 如单-、二-、三-乙醇-和-丙醇胺和它们的混合物、例如从 EP 0 378 261 和 WO 97/05227 中得知的最多达 C<sub>12</sub> 的脂族羧酸, 如琥珀酸, 其他羧酸或上述酸的盐。德国专利申请 DE 19650537 中为此目的公开了封端的脂肪酸酰胺烷氧酸盐。如 WO 97/18287 中所公开, 某些用作助洗剂的有机酸额外能够稳定存在的酶。

除了多元醇如甘油、乙二醇、丙二醇或山梨醇以外, 低级脂族醇也是其他常用的酶稳定剂。同样可以使用钙盐, 例如醋酸钙和在 EP 0 028 865 中为此目的公开的甲酸钙, 以及例如根据欧洲专利申请 EP 0 378 262 的镁盐也可使用。

聚酰胺寡聚物(WO 99/43780)或者聚合物,例如木质素(WO 97/00932),水溶性乙烯基共聚物(EP 828 762)或者如 EP 702 712 中所公开的纤维素乙醚、丙烯酸聚合物和/或聚酰胺可对酶制剂产生稳定作用,以克服物理影响或者 pH 值的变化。包含了聚胺-N-氧化物的聚合物(EP 587 550 和 EP 581 751)同时担当酶稳定剂和染料转移抑制剂。其它聚合物稳定剂是除了在 WO97/05227 所公开的其他成分以外的直链 C<sub>8-18</sub> 聚氧化烯。如 WO 97/43377 和 WO98/45396 所公开,烷基聚糖苷可稳定本发明产品中的酶成分,甚至提高它们的功效。如 WO 98/17764 所公开,交联的含氮化合物担当着污渍释放剂和酶稳定剂的双重作用。根据 WO 97/32958,疏水性非离子聚合物与其它稳定剂的混合物对纤维素酶有稳定的作用,因此这些或者相似的组分也同样适合本发明中所必需的酶。

如 EP 780 466 所公开,还原剂和抗氧化剂将增加酶对氧化分解的稳定性。含硫的还原剂例如从 EP 0 080 748 和 EP 0 080 223 中得知。其它的例子是亚硫酸钠(EP 533 239)和还原糖类(EP 656 058)。

在很多情况下,还采用稳定剂的组合,例如在 WO 96/31589 中多元醇、硼酸和/或硼砂的组合,在 EP 126 505 中硼酸或硼酸盐、还原盐与丁二酸或其它二羧酸的组合,或者硼酸或硼酸盐与多羟基或多氨基化合物的组合以及与如 EP 080 223 中所披露的还原盐的组合。根据 WO 98/13462,肽/乙醛稳定剂的效果可通过与硼酸和/或硼酸衍生物和多元醇的组合来增强,根据 WO 98/13459,其还可通过添加钙离子而进一步增强。

具有稳定的酶活性的产品代是本发明的优选实施方案。特别优选的是含有以上面提到的几种方法而加以稳定的酶的产品。

因为本发明的产品可以任何可想到的形式提供,所以在任何适合于加入特定产品的配方中的本发明酶,均是本发明的实施方案。其例

子包括液体制剂、固体颗粒或胶囊。

胶囊化形式是保护酶或其它成分免遭其它组分例如漂白剂的影响，或者使缓释成为可能的途径。胶囊按照大小可以划分为毫胶囊、微胶囊或者纳胶囊，其中对于酶来说尤其优选微胶囊。例如，这样的胶囊在专利申请 WO 97/24177 和 DE 19918267 中公开。另一可能的胶囊化方法是从蛋白质溶液与淀粉或淀粉衍生物的溶液或悬浮液的混合物开始，将蛋白质包封在该物质中。申请 WO 01/38471 描述了这样一种胶囊化方法。

在固体产品的情况下，该蛋白质可以以例如干燥的、造粒的和/或胶囊化的形式使用。它们可以单独即作为单相添加，或者与其它组分一起在同相中以压实或未压实形式添加。如果微胶囊化的酶以固态形式生产，则可按照现有技术已知的方法从污迹获得的水溶液中除去水，例如喷雾干燥、离心去除或者再溶解。以这种方式获得的颗粒大小通常为 50-200 $\mu\text{m}$ 。

可以从按照现有技术进行的蛋白质回收和制备开始将酶和本发明必需的蛋白质以浓缩的水或非水溶液、悬浮液或乳液加入本发明的液体、凝胶状或膏状产品中，同样也可以以凝胶状或胶囊化或作为干燥粉末加入。本发明的这种洗涤产品或者清洗产品一般通过简单混合成分来制备，所述成分以固体物质本身或作为溶液加入自动搅拌器中。

除基本洗涤性能外，在洗涤产品中包含的蛋白酶还可以满足通过蛋白酶裂解活化其它酶组分或者在相应的作用时间之后使其失活的功能，例如在申请 WO 94/29426 或 EP 747 471 中所公开的。通过本发明的蛋白也可以获得可比的调节功能。此外，本发明的另一实施方案涉及那些具有由蛋白酶敏感材料制成的胶囊的产品，其例如在预期的时间点被本发明蛋白质水解并释放出其内容物。在其它多相产品的情况下也可以获得可比的效果。

用于处理纺织原料或者织物保养的产品，其特征在于，其仅含有或者除其它活性成分外还包含上述的任何本发明蛋白，蛋白片段，融合蛋白或衍生物。本发明特别优选的实施方案是这种用于纤维或含有天然组分的织物和特别是用于具有羊毛或丝的织物的产品。

特别是天然纤维例如羊毛或丝的特征为其独特的微观表面结构。正如 R. Breier 在其文章“Melliand Textilberichte” 1.4.2000(第 263 页)中用羊毛的实例所说明的，所述表面结构能长期能导致不希望的效果，例如一些纠结。为了避免这种效果，使用本发明的产品处理这些天然原材料，这些产品例如有助于使基于蛋白质结构的鱼鳞状表面结构光滑并因此防止纠结。

在本发明的实施方案中，含有本发明蛋白酶的产品被这样设计，即其一般可以作为保养剂使用，例如通过在洗涤过程中加入，在洗涤之后使用或者其应用不依赖于洗涤。所需的效果是长时间获得光滑的织物表面结构和/或预防和/或减少对织物的损坏。

本发明的一个单独主题是机械清洁织物或硬表面的方法，其特征在于，在洗涤方法的至少一个步骤中使上述本发明的蛋白，蛋白片段，融合蛋白或衍生物活化，其加入量每次应用是 40 $\mu$ g 至 4g，优选 50 $\mu$ g 至 3g，更优选 100 $\mu$ g 至 2g，以及最优选 200 $\mu$ g 至 1g。

这些方法包括手工和机械方法，优选机械方法，因为它们可对例如用量和作用时间更精确加以控制。

织物清洗的方法的特征通常在于若干个方法步骤，所述步骤包括将各种不同的具有清洁活性的物质施用到待清洗物上，并且在作用时间之后漂洗，或者以其它的方式将该待清洗物用清洁剂或该清洁剂的溶液处理。这同样适合于机械清洗其他所有如织物的材料，这些材料

被概括为术语硬表面。这种方法可以在所有可想到的洗涤或清洁方法中的至少一个洗涤步骤中加入本发明的蛋白质，并且这些方法成为本发明的实施方案。

因为本发明优选的酶已经自然具有溶解蛋白质的活性，并且它们也可以在本来不具有清洗力的介质(例如单纯的缓冲液)中显示所述活性，所以这种机械清洗织物的方法中的单个分步骤可由在所需的情况下除稳定的化合物、盐或缓冲物质外加入本发明的酶作为唯一具有清洗活性的组分所组成。这是本发明特别优选的实施方案。

在这种方法的进一步优选的实施方案中，本发明的相关酶提供在本发明产品，尤其是本发明的洗涤或清洁产品的上述一种配方中。

本发明主题的优选实施方案是处理纺织原料或用于纺织品保养的方法，其特征在于，在至少一个方法步骤中，使本发明的蛋白，蛋白片段，融合蛋白或衍生物活化，尤其是对纺织原料，纤维或含有天然组分的纺织品，更尤其是对那些含有羊毛或丝的纺织品。

上述本发明的蛋白，蛋白片段，融合蛋白或衍生物对清洁纺织品或硬表面的应用是本发明的单独主题。

上述浓度范围优选适用于此用途。

根据上述特性和上述方法，本发明的蛋白尤其可用于从纺织品或硬表面上去除类蛋白质(proteinaceous)污渍。实施方案例如由从纺织品或硬表面上手洗或手工去除斑点或者与机械方法相结合的用途来代表。

在此应用的优选实施方案中，本发明的相关酶提供在本发明产品，尤其是洗涤或清洁产品的上述一种配方中。

上述本发明的蛋白，蛋白片段，融合蛋白或衍生物对激活或钝化洗涤或清洁产品中的成分的应用是本发明主题的其他实施方案。

正如所知，洗涤或清洁产品的蛋白组分可由蛋白酶的作用而失活。本发明具体涉及使用这种本来不希望的作用。如上所述，通过蛋白酶解同样可能真正使其它的组分活化，例如当所述组分是一种由真正的酶和其相应的抑制剂组成的杂合蛋白质时，如在申请 WO00/01831 中所公开。这种调节的另一实例是其中的活性组分已包封在一种易受蛋白水解酶攻击的材料中以保护或控制其活性。因此本发明的蛋白质可用于钝化、活化或释放反应，尤其在多相产品中。

尽管有多多样性，将洗涤和清洁问题之外的所有其他技术方法，用途和相应试剂组合在下文本发明的一个主题中，只要其特征为本发明的蛋白。该汇编不应理解成唯一目录，而只是列出了本发明蛋白酶最重要的当前可辨别的可能的应用。其他同样包括的可能应用指示例如由下列手册提供：H.Uhlig, “工业用酶及其应用(Industrial enzymes and their applications)”, Wiley, 纽约, 1998。如果通过利用本发明的蛋白酶，其他应用领域证明能够进一步加以开发，则所述领域也包括在本发明的保护范围之内。

本发明主题的一个实施方案由上述本发明的蛋白，蛋白片段，融合蛋白或衍生物在生化分析或合成低分子量化合物或蛋白中的应用来表示。

该用途优选发生在相应产品或方法的范围内。根据本发明和 Römpp, “Lexikon Chemie”(Version 2.0, Stuttgart/New York: Georg Thieme Verlag, 1999), 酶分析是指利用特定的酶或底物来一方面测定底物身份或其浓度或者另一方面测定酶身份或活性的任何生物化学分析。应用领域是所有与生物化学相关的领域，尤其是与分子生物学和

蛋白质化学相关的领域。该用途优选发生在酶分析方法的范围之内。本发明主题的优选实施方案是在序列分析领域中用于测定端基。

本发明的主题是本发明蛋白，蛋白片段，融合蛋白或衍生物的应用，其用于制备、纯化或合成天然物质或生物价值物质。

该用途优选发生在相应产品或方法的范围内。所以，例如在天然物质或生物价值物质的纯化过程中需要从所述物质中清除蛋白质污染物，其例子为低分子量化合物，任何细胞组分或储存物质或蛋白质。这不但在实验室规模而且在工业规模上，例如在价值物质的生物技术生产后来进行。

例如当计划把蛋白质片段相互结合或者将氨基酸连接到不是主要由蛋白质组成的化合物上时，本发明的蛋白水解酶通过使其天然催化的反应逆向，用于合成蛋白质或其它低分子量化合物。例如根据申请 EP 380362，这种应用是可能的。

本发明主题的其他实施方案由上述本发明的蛋白，蛋白片段，融合蛋白或衍生物在处理天然原料，尤其是对于处理表面，更尤其是在处理皮革的方法中的应用所代表。

该用途优选发生在相应产品或方法的范围内。例如当蛋白污染物一定要从天然原料中去除时，这是必需的。这意思主要是非生物方法获得的原料，例如那些来自农业的原料，但是也可以是通过发酵由生物技术方法生产的物质，如抗生素。

优选的实施方案是用于表面处理，特别是在处理经济上有意义的原料皮革的方法中。因此，在鞣革处理过程中，特别是在碱性柔化步骤中借助于蛋白水解酶从皮革材料中除去水溶性蛋白质(Römpp, "Lexikon Chemie", Version 2.0, Stuttgart/New York: Georg Thieme

Verlag, 1999)。本发明的蛋白质，尤其在碱性条件下和/或采用变性剂时，对此是特别适合的。

本发明主题的另一实施方案是将上述本发明的蛋白，蛋白片段，融合蛋白或衍生物在制造纺织品中用于获得或处理原料或中间体，尤其是用于从织物中去除保护层。

该用途优选发生在相应产品或方法的范围内。在制造纺织品中获取或处理原料的例子是加工棉花，在被称作制浆的步骤中需要从中去除荚组分；另一实例是处理羊毛；类似地也可用于加工粗丝。酶方法或应用，特别对环境相容性而言，优于可比的化学方法。

在优选的实施方案中，本发明的蛋白质用于除去纺织品，特别是中间产品或有价值物质的保护层，或者使其表面光滑，接着在随后的工艺步骤中进行进一步处理。

在本发明主题的其他实施方案由上述本发明的蛋白质，蛋白片段，融合蛋白或衍生物在处理纺织原料或用于纺织品保养，特别是用于处理羊毛或丝或含羊毛或丝的混纺织品中的应用来表示。

该用途优选发生在相应产品或方法的范围内。根据上文所述，相关纺织品原料通过蛋白酶处理后不含污染物；此外，至少部分由蛋白组成的材料得益于蛋白水解酶的表面光滑和保养特性。为此原因，用于保养相关材料的用途也包括在内。因此，尤其要求保护羊毛或丝或含有羊毛或丝的混纺织品的表面处理。这不但适用于这种纺织品的生产而且适用于使用期间的保养，例如在该纺织品清洗时(参见上文)。

本发明主题的另一实施方案是本发明的蛋白，蛋白片段，融合蛋白或衍生物用于处理照相胶片，特别是除去含明胶或类似的保护层。

该用途优选发生在相应产品或方法的范围内。胶片例如 X 线胶片被这样的保护层，特别是由含银盐的明胶乳液制成的保护层涂覆。这些层在背景材料曝光之后必须去除。为此，特别是在碱性或略微变性的反应条件下可以使用本发明的蛋白酶。

本发明主题的另一实施方案是上述本发明的蛋白，蛋白片段，融合蛋白或衍生物在制备食品或动物饲料中的应用。

该用途优选发生在相应产品或方法的范围内。所以，自古以来蛋白酶已经被用于食品生产。对此的实例是凝乳酶用于奶酪或其它奶制品的熟化过程。可以加入本发明的蛋白质或者完全采用本发明的蛋白质进行该过程。用于非营养目的富含碳水化合物的食品或食品原料，例如面粉或糊精，同样可以用合适的蛋白酶处理，以便从其中除去相伴的蛋白质。本发明的蛋白酶也适合于这种应用，尤其当其在碱性或略微变性的条件下进行时。

相应地也适用于动物饲料的生产。这里除完全除去蛋白质外，还感兴趣的是用蛋白酶仅短时间地处理类蛋白质原料或原料混合物，以便使其对于家禽来说更易消化。这样的处理也可用于例如生产培养基成分，例如用于发酵微生物。

在本发明主题的另一实施方案中，上述本发明的蛋白用于化妆品目的。

本发明要求保护的主题是含有上述本发明的蛋白，蛋白片段，融合蛋白或衍生物的化妆品或者掺入上述本发明的蛋白，蛋白片段，融合蛋白或衍生物的化妆用方法，或者上述本发明的蛋白，蛋白片段，融合蛋白或衍生物用于化妆目的，特别是在相应的方法或相应的产品的框架内。

因为蛋白酶在人类皮肤的细胞再生过程中扮演重要的角色(T. Egelrud 等, *Acta Derm. Venerol.*, 第 71 卷(1991), 第 471 至 474 页), 因此蛋白酶也作为生物活性组分被用于护肤产品中以便促进干性皮肤中日益增多的桥粒结构的退化, 例如根据申请 WO95/07688 或 WO 99/18219。例如在 WO97/07770 中描述了枯草杆菌素蛋白酶用于化妆目的。本发明的蛋白酶, 特别是那些例如在突变后或由于添加合适的与其相互作用的物质来控制其活性的蛋白酶同样适合在皮肤或头发洗涤或氧护产品中作为活性组分。特别优选这些酶的制品, 其如上所述, 例如通过连接在大分子支持物上而被稳定(参照 US 5230891)和/或通过在高变应原性位置的点突变而被衍生化, 所以它们与人皮肤的相容性增加。

因此, 本发明的主题还包括这种蛋白水解酶用于化妆目的, 特别是在相应产品中的应用, 例如香波、皂或洗浴液, 或者在以霜的形式提供的护理产品中的应用。同样在脱皮药物或其制剂中的应用也包括在本发明的权利要求中。

如上已解释, 来自芽孢杆菌种(DSM 14390)的本发明蛋白酶与来自迟缓芽孢杆菌(*B. lentus*)(Savinase<sup>®</sup>和迟缓芽孢杆菌(*B. lentus*)碱性蛋白酶)的已确立的蛋白酶差异分别在于氨基酸 224V, 250G 和 253N, 以及 97S, 99S, 101S, 102V, 157G, 224V, 250G 和 253N。正如从实施例中显而易见的, 在一些应用中, 令人惊奇地展示了比这些已确立的蛋白酶具有更好的洗涤或清洁性能。为此, 将一个或多个的这些位置有意导入蛋白酶中, 优选导入 subtilases, 更尤其优选导入枯草杆菌素, 被视为改善其性能的有前途的方法。这尤其涉及对相应产品的洗涤或清洁性能的各自贡献。这种变化可通过现有技术中确立的突变方法来进行。

在来自迟缓芽孢杆菌 DSM 5483 的碱性蛋白酶的情况下, 这样一些替换例如可在野生型酶上进行, 所述野生酶描述在图 1 的比对中,

或可在变体上进行，这些变体就洗涤和清洁产品中的性能，与野生型比较，反过来已得到改善。可能提及的这样一些变体的例子为描述在申请 WO 95/23221 中的那些变体，尤其 M130，M131 和 F49。后者在本申请的实施例中用作对照酶。其他候选对象被视为在尚未公布的申请 DE 10121463 和 DE 10153792 中的变体。

所以，所有改善蛋白酶的性能的方法作为本发明的主题被要求保护，尤其有关相应产品的洗涤和/或清洁性能，其特征在于所述蛋白酶通过点突变根据 SEQ ID NO.1 中的氨基酸编号获取一种或多种的氨基酸 97S，99S，101S，102V，157G，224V，250G 和 253N，也就是说成熟蛋白，优选一种或多种的氨基酸 224V，250G 和 253N。

该保护范围也相应适用于所有蛋白酶，其特征在于它们通过点突变根据 SEQ ID NO.1 中的氨基酸编号已经获取一种或多种的氨基酸 97S，99S，101S，102V，157G，224V，250G 和 253N，优选一种或多种的氨基酸 224V，250G 和 253N。

同样包括在该保护范围内的是相应的单个或多个保守替换，例如疏水性氨基酸而非 V 在位置 102 和 224，碱性氨基酸而非 N 在位置 253，T 在位置 97，99，101 和/或 A 在位置 157 和 250。

## 实施例

所有分子生物学操作步骤遵循如下列手册所述的标准方法，Fritsch, Sambrook 和 Maniatis, “分子克隆：实验室手册”，Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1989，或者可比较的相关著作。根据各个生产商的说明书使用酶和试剂盒。

### 实施例 1

具有蛋白水解活性的细菌菌株的分离和鉴定

将 0.1 g 的土壤样品悬浮在 1 ml 的无菌 0.9% NaCl 溶液中，并涂

铺于含有奶粉的琼脂平板(1.5%琼脂, 0.5% NaCl, 0.1%  $K_2HPO_4$ , 0.1% 酵母提取物, 2%蛋白胨(来自 ICN, Eschwede, 目录号 104808), 1% 奶粉(脱脂乳; 来自 Difco, Heidelberg, 目录号 232100), pH 10)上。在 30°C 保温 72 小时后, 带有透明区的菌落在乳状琼脂中显而易见。从中移出单菌落, 并培养在 Horikoshi 培养基(0.1%  $K_2HPO_4$ , 0.5% 酵母提取物, 1%蛋白胨, 0.02%  $MgSO_4$ , 0.3%  $Na_2CO_3$ , pH 9)的锥形瓶(Erlenmeyer flask)中 37°C 下以 200 rpm 振荡。

这些菌落之一于 2001 年 3 月 1 日保藏在 DSMZ。在此其命名为 ID 01-191, 保藏号为 DSM 14390。有关该生物材料的特征的标准信息, 如 DSMZ 保藏结构于 2001 年 4 月 19 日所确定, 编辑在下表 1 中。

表 1: *Bacillus* sp.(DSM 14390)的微生物特性。

(于 2001 年 4 月 19 日由 DSMZ 所确定)

特性	结果
细胞形状	杆状
宽 [ $\mu\text{m}$ ]	0.6-0.9
长 [ $\mu\text{m}$ ]	2.0-4.0
孢子	未发现
生长, CASO, pH 7	阳性
生长, DSM Med. 31, pH 9.7	阳性
厌氧生长	阴性
VP 反应	阴性
VP 培养基的 pH	6.2
最高温度	
正生长下的温度	45
负生长下的温度	50
生长在	
培养基 pH 5.7	阴性
NaCl 2%	阳性
5%	阳性
7%	阳性
10%	阳性
溶菌酶培养基	阴性
酸来自(ASS)	
D-葡萄糖	弱阳性
L-阿拉伯糖	弱阳性
D-木糖	弱阳性
D-甘露糖糖醇	弱阳性
D-果糖	弱阳性
气体来自葡萄糖	阴性
乳磷脂酶	阴性
水解	
淀粉	阳性
明胶	弱阳性
酪蛋白	阳性
Tween 80	阴性
七叶苷(esculin)	阴性
利用	
柠檬酸盐(Koser)	阳性
丙酸盐	阴性
NO <sub>2</sub> 来自 NO <sub>3</sub>	阳性
吲哚反应	阴性
苯丙氨酸脱氨酶	阴性
精氨酸二水解酶	阴性
碱性测试:	
2%到 12% NaCl	阳性
Tween 40	阴性
Tween 60	阴性
Tween 80	阴性
细胞脂肪酸的形式	典型的芽孢杆菌属
16S rDNA 的部分测序	与 <i>B. clausii</i> 有 98.5%的相似性

## 实施例 2

### 成熟蛋白酶的克隆和测序

将通过标准方法从 *Bacillus sp.*(DSM 14390)制备染色体 DNA, 经限制性酶 *Sau* 3A 处理后, 将得到的片段克隆到载体 pAWA22 中。这是一种衍生自 pBC16 的表达载体, 用于芽孢杆菌种(Bernhard 等(1978), *J. Bacteriol.*, 第 133 卷(2), 第 897-903 页)中。使该载体转化到不含蛋白酶的宿主菌株枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) DB 104 (Kawamura 和 Doi (1984), *J. Bacteriol.*, 第 160 卷 (1), 第 442-444 页)中。

将转化子首先再生在 DM3 培养基(8 g/l 琼脂, 0.5 M 丁二酸, 3.5 g/l  $K_2HPO_4$ , 1.5 g/l  $KH_2PO_4$ , 20 mM  $MgCl_2$ , 5 g/l 酪蛋白氨基酸(casiamino acids), 5 g/l 酵母提取物, 6 g/l 葡萄糖, 0.1 g/l BSA)中, 然而转移到 TBY 脱脂乳平板(10 g/l 蛋白胨, 10 g/l 奶粉(参见上文), 5 g/l 酵母提取物, 5 g/l NaCl, 15 g/l 琼脂)上。含有蛋白酶水解活性的克隆从其裂解区中鉴定出来。从所得的具有蛋白酶水解活性(p/B-5)的菌落中挑选一种, 并通过标准方法分离其质粒, 以及对插入物进行测序。

插入物的大小约为 2.9 kb, 含有 1 kb 左右的可读框。其序列显示在序列表中, 标题为 SEQ ID No.1。它包含 1143 bp。从其衍生的氨基酸序列包括 380 个氨基酸, 后面为终止密码子。其以 SEQ ID NO.2 显示在序列表中。前 111 个氨基酸极有可能不存在于成熟蛋白中, 从而成熟蛋白的长度预计为 269 个氨基酸。

2001 年 8 月, 将这些序列与从通常可达的数据库 Swiss-Prot(Geneva Bioinformatics (GeneBio) S.A., Geneva, Switzerland; <http://www.genebio.com/sprot.html>) 和 GenBank(National Center for Biotechnology Information NCBI, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)中获得的蛋白酶序列进行比较。由此鉴定的最相似的酶总结在下表 2 中。

表 2: *Bacillus* sp. (DSM 14390)的碱性蛋白酶与最相似蛋白和其他代表性蛋白的同源性(百分比数据四舍五入)。

其中的意思为:

ID 数据库 Genbank 和 Swiss-Prot 中的登录号;

Ident. DNA DNA 水平上的同一性%;

Ident. prope. 氨基酸水平上的同一性, 基于前体蛋白的前体, 以%表示;

Ident. mat. prot. 氨基酸水平上的同一性, 基于成熟蛋白, 以%表示;

n. 未示于数据库中。

酶	生物体	ID	Ident. DNA	Ident. prope.	Ident. mat. prot.
枯草杆菌素 309 (Savinase®)	迟缓芽孢杆菌 (Bacillus lentus)	SUBS_BACLE	n.	70	99
枯草杆菌素 P92	亲碱芽孢杆菌 (Bacillus alkalophilus)	ELYA_BACAO	90	98	98
迟缓芽孢杆菌碱性蛋白酶	迟缓芽孢杆菌 (Bacillus lentus) DSM 5483	SUBB_BACLE	n.	69	97
碱性弹性酶	芽孢杆菌 Ya-B	ELYA_BACSP	72	80	83
仙台枯草杆菌素	仙台芽孢杆菌	Q45522	69	73	82
枯草杆菌素 AprQ	芽孢杆菌种 (Bacillus sp.)	Q45523	58	51	63
枯草杆菌素 Carlsberg	地衣芽孢杆菌 (Bacillus licheniformis)	SUBT_BACLI	56	50	61
枯草杆菌素 AprN	枯草芽孢杆菌纳豆变种 (Bacillus subtilis var. natto)	SUBN_BACNA	56	49	60
枯草杆菌素 Novo BPN'	解淀粉芽孢杆菌 (Bacillus amyloliquefaciens)	SUBT_BACAM	n.	49	60
枯草杆菌素	Bacillus amylo-sacchariticus	SUBT_BACSA	56	49	60
枯草杆菌素 J	嗜热脂肪芽孢杆菌 (Geobacillus stearothermo-philus)	SUBT_BACST	56	49	60
枯草杆菌素 E	枯草芽孢杆菌 (Bacillus subtilis)	SUBT_BACSU	52	49	60
枯草杆菌素	短小芽孢杆菌	SUBT_BACPU	n.	42	59
枯草杆菌素 DY	枯草芽孢杆菌 (Bacillus subtilis)DY	SUBT_BACSD	n.	41	58

这些蛋白酶的氨基酸序列在图 1 的比对中也相互进行比较。

### 实施例 3

#### 碱性蛋白酶的纯化和鉴定

将 100 ml 的 Horikoshi 培养基(参见上文)加入到 500 ml 锥形瓶(Erlenmeyer flask), 用实施例 2 中转化的细菌菌株的一个菌落接种, 并且在 37°C 下培养 72 小时直到达到生长的静止期。

通过下列纯化步骤, 可从该培养物的上清液中分离到单个蛋白水解酶: 将上清液对 pH 7.6 的 20 mM HEPES/NaOH 缓冲液透析; 在 Q-Sepharose<sup>®</sup>上进行阴离子交换层析(来自 Pharmacia-Amersham Biotech, Sweden); 在 S-Sepharose<sup>®</sup>上通过阳离子交换层析(来自 Pharmacia-Amersham), 用 pH 为 7.6, 梯度为 0-1 M NaCl 的 HEPES/NaOH 缓冲液洗脱。在 0.2 M NaCl 处洗脱蛋白酶, 然后在 Resource S<sup>®</sup>(来自 Pharmacia-Amersham)上通过阳离子交换层析, 并以 HEPES/NaOH (pH 7.6)为洗脱剂而得以浓缩。

根据 SDS 凝胶电泳和考马斯亮兰染色, 以此方式获得纯的蛋白。

### 实施例 4

#### SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳和等电聚焦

如实施例 2 和 3 中所获得的芽孢杆菌种(DSM 14390)的碱性蛋白酶通过 Pharmacia-Amersham Biotech, Sweden 提供的 PHAST<sup>®</sup>系统在变性 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳条件下所显示的分子量为 26 kD。

根据等电聚焦, 同样通过 Pharmacia-Amersham Biotech, Sweden 提供的 PHAST<sup>®</sup>系统, 芽孢杆菌种(DSM 14390)的碱性蛋白酶的等电点为 11。

## 实施例 5

### 酶特性

#### 比活

如实施例 2 或 3 中所纯化的芽孢杆菌种(DSM 14390)的碱性蛋白的比活利用 Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-对硝基苯胺(AAPF; 来自 Bachem Biochemica GmbH, Heidelberg)底物进行测定。结果显示, 在 pH 8.6 和 25°C 下温育 5 分钟后的活性为 69 U/mg。在此情况下, 1 U 等于每分钟切割 1  $\mu\text{mol}$  的底物。

#### pH 依赖性

芽孢杆菌种(DSM 14390)的碱性蛋白酶的 pH 分布图在 pH 为 6-12 的范围内进行记录。为此, 以酪蛋白为底物, 在 50°C 对各个 pH 整数数值下的活性进行测定。根据该测定, 最适 pH 为 11。在 50°C 温育 15 分钟后的活性分别为: 在 pH 12 时 5%, 在 pH 6 时 17%以及在 pH 9 时 69%。

## 实施例 6

### 对洗涤性能的贡献

织物以标准化的方式已被污渍处理, 并获自 Eidgenössische Material-Prüfungs- und -Versuchsanstalt, St. Gallen, Switzerland (EMPA) 或 Wäschereiforschungsanstalt, Krefeld, Germany, 用于该实施例。使用下列污渍和织物: A(在棉织物上的血迹/牛奶/烟灰)、B(在棉织物上的血迹/牛奶/墨汁)、C(在聚酯-棉-混纺织物上的血迹/牛奶/墨汁)、D(在棉织物上的牛奶/可可饮料)以及 E(在棉织物上的血迹)。

利用耐洗牢度试验仪(launderometer), 将这些试验材料用于检测各种洗涤产品配方的清洗功效。为此目的, 调整清洗液比为 1:12, 并将织物在 40°C 下清洗 30 分钟。剂量为每升清洗液中特定洗涤产品为 5.88g。水硬度为 16° 德国制硬度。

具有下列组成的洗涤产品基本配方作为对照洗涤产品(用重量百分比表示): 4%直链烷基苯磺酸盐(钠盐)、4% C<sub>12-18</sub> 脂肪醇硫酸盐(钠盐)、5.5% C<sub>12-18</sub> 脂肪醇 X7 EO、1%皂钠、11%碳酸钠、2.5%无定型二硅酸钠(sodium disilicate)、20%过硼酸钠四水合物、5.5%TAED、25%沸石 A、4.5%聚羧酸酯、0.5%膦酸盐、2.5%粒状泡沫抑制剂、5%硫酸钠, 其余为水、荧光增白剂和盐。对于各种测试系列, 将下列的蛋白酶加入到对照洗涤产品中, 从而在每升清洗液中蛋白酶解活性的最终浓度分别为 2.250 PE: 迟缓芽孢杆菌碱性蛋白酶 F49(WO 95/23221; 制造商: Biozym, Kundl, Australia)、Savinase® (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark)以及本发明来自芽孢杆菌种(DSM 14390)的蛋白酶。

清洗后, 以硫酸钡的白度作为标准 100%, 与之对比测出洗过织物的白度。测量用的是 Datacolor SF500-2 分光光度计, 测试条件为 460nm(紫外阻挡滤光片 3)、孔径 30mm、无光泽面、光源类型 D65、10°、d/8°。下表 3 中给出了测试结果, 以反射率%表示, 即和硫酸钡比较的百分数, 表 3 还列出各自的起始值。所示值分别是 4 次测量的平均值。它们是其中包含的酶对所用洗涤产品的清洗功效贡献的直接指标。

表 3:

基本洗涤产品含有	A	B	C	D	E
初始值	15.8	14.3	11.8	34.8	27.7
无蛋白酶的对照	21.7	22.2	14.7	57.8	72.9
本发明芽孢杆菌种(DSM 14390)的蛋白酶	30.7	33.4	32.8	67.1	78.2
迟缓芽孢杆菌碱性蛋白酶 F49	29.3	30.2	25.2	66.4	78.1
Savinase®	30.0	32.1	29.1	69.3	75.9
标准偏差	1.0	1.1	1.2	2.1	0.9

数据显示, 本发明的芽孢杆菌种(DSM 14390)的蛋白酶与确定的

蛋白酶迟缓芽胞杆菌碱性蛋白酶 F49 和 Savinase®相比在所有测试的污渍上均表现出明显更好的性能，或者至少与它们接近。

### 实施例 7

当使用低活性时，对洗涤性能的贡献

在标准化条件下将具有硬的光滑表面的容器与混合淀粉(F 和 G)以及与肉末(H)混合，并采用市售的家用洗碗机洗涤。样品 F 和 H 在 45°C 下用 Miele® G 676 型洗碗机的正常操作程序清洗，而样品 G 在 55°C 下用 Bosch® SGS 4002 型洗碗机的正常程序清洗。洗碗剂的用量每一洗碗循环为 20g；水的硬度为 16° 德国制硬度。

下列基本配方用于洗碗剂(所有值按重量百分比计)：55%三聚磷酸钠(以无水计算)、4%无定型二硅酸钠(以无水计算)、22%碳酸钠、9%过硼酸钠、2% TAED、2%非离子表面活性剂，其余为水、染料和香精。对于各种测试，将各种蛋白酶酶，即迟缓芽胞杆菌碱性蛋白酶 F49、Properase®以及本发明芽胞杆菌种(DSM 14390)的蛋白酶以相同活性加入到基本配方中，每一洗碗循环活性分别为 10000PE。这相当于每克洗涤产品浓缩物中有约 0.1 毫克的蛋白酶。

清洗后，对测试 F 和 G，污渍的除去按重量测定，以%表示。为此，受污后然后清洗的容器的重量与所述容器的初始重量之间的差异和未清洗的容器与其初始重量之间的差异有关。这种关系可看成是去除百分率。对污渍 H，在清洗之后按照 0(=不变，即十分严重的污渍)到 10(=无可辨别的污渍)等级进行目测评估。下表 4 列出了所获得的结果。这里给出的是 8 次测量的平均值。它们是包含的酶对所用洗涤产品的清洗功效贡献的直接指标。

表 4:

基本洗碗剂含有	F	G	H
本发明芽孢杆菌种(DSM 14390)的蛋白酶	58.9	98.9	5.7
迟缓芽孢杆菌碱性蛋白酶 F49	60.6	96.3	5.3
Properase®	56.5	99.7	5.7

这些结果显示, 本发明芽孢杆菌种(DSM 14390)的蛋白酶在机洗碗剂中的性能至少等于其他测试蛋白酶的性能, 甚至在使用相对低活性下也是如此。

#### 实施例 8

当使用较高活性时, 对洗涤性能的贡献

如实施例 7 所述, 以标准化方式, 将容器用牛奶(I)和肉末(J)进行污渍处理, 并分别以相同的清洗产品配方和方式清洗。将它们在 45°C 下利用 Miele® G676 型洗碗机的标准程序进行洗涤。与实施例 7 的唯一区别在于, 在每种情况下蛋白酶各自的用量是 20000PE。这相当于在每种情况下洗涤产品浓缩物中含有约 0.2 毫克的蛋白酶。

在清洗之后, 以与实施例 7 中的同样方式, 按照 0(=不变, 即十分严重的污渍)到 10(=无可辨别的污渍)等级进行目测评估。下表 5 列出了所获得的结果。这里给出的是 8 次测量的平均值。

表 5:

基本洗碗剂含有	I	J
本发明芽孢杆菌种(DSM 14390)的蛋白酶	6.6	7.0
迟缓芽孢杆菌碱性蛋白酶 F49	6.1	6.3
Properase®	6.1	6.2

当所用的蛋白酶活性较高时, 显而易见, 本发明的蛋白酶对相关产品的总体清洁性能的贡献与对机洗碗产品来说确立的迟缓芽孢杆菌

碱性蛋白酶 F49 和蛋白酶 Properase<sup>®</sup>相比，是更高或者至少可比的。

### 附图描述

图 1：来自芽孢杆菌种(DSM 14390)的本发明蛋白酶的氨基酸序列与表 2 中所列的相似和最重要的已知枯草杆菌素分别在成熟即加工形式下的比对。

下列数字代表下列蛋白酶(括号分别为数据库进入的 ID；也参照实施例 2 中的表 2)：

1	本发明蛋白酶	来自芽孢杆菌种(DSM 14390)
2	Savinase <sup>®</sup> (SUBS_BACLE)	来自迟缓芽孢杆菌(B. lentus)
3	枯草杆菌素 P92 (ELYA_BACAO)	来自亲碱芽孢杆菌(B. alkalophilus)
4	枯草杆菌素 BL (SUBB_BACLE)	来自迟缓芽孢杆菌(B. lentus)
5	碱性弹性酶 (ELYA_BACSP)	来自芽孢杆菌 Ya-B
6	仙台枯草杆菌素 AprS (Q45522)	来自芽孢杆菌种
7	枯草杆菌素 AprQ (Q45523)	来自芽孢杆菌种
8	枯草杆菌素 Carlsberg (SUBT_BACLI)	来自地衣芽孢杆菌(B. licheniformis)
9	AprN (SUBN_BACNA)	来自枯草芽孢杆菌(B. subtilis)纳豆变种
10	枯草杆菌素 Novo BPN' (SUBT_BACAM)	来自解淀粉芽孢杆菌(B. amyloliquefaciens)
11	枯草杆菌素 (SUBT_BACSA)	来自 B. amylosacchariticus

- 
- |    |                          |  |
|----|--------------------------|--|
| 12 | 枯草杆菌素 J<br>(SUBT_BACST)  | 来自嗜热脂肪芽孢杆菌( <i>Geobacillus stearothermo-philus</i> ) |
| 13 | 枯草杆菌素 E<br>(SUBT_BACSU)  | 来自枯草芽孢杆菌( <i>B. subtilis</i> )                       |
| 14 | 枯草杆菌素<br>(SUBT_BACPU)    | 来自短小芽孢杆菌( <i>B. pumilus</i> )                        |
| 15 | 枯草杆菌素 DY<br>(SUBT_BACSD) | 来自枯草芽孢杆菌( <i>B. subtilis</i> ) DY                    |

图 2: 表达载体 pAWA22, 其衍生自 pBC16 并具有地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*)(PromPLi)的启动子及其下游, Bcl I 限制性切割位点 (参照实施例 2 和 Bernhard 等 (1978), *J. Bacteriol.*, 133 (2), 第 897-903 页)。

## 有关保藏的微生物或其它生物材料的说明

(PCT 细则 13 之二)

A. 下列标注是关于本说明书第 <u>15</u> 页第 <u>14-20</u> 行和第 <u>74</u> 页第 <u>9-11</u> 行中所指的 已保藏的微生物或其它生物材料	
B. 保藏物的识别	另外的保藏物在另外的纸页上标明 <input type="checkbox"/>
保藏单位的名称 德意志微生物保藏中心(DSMZ)	
保藏单位的地址(包括邮编和国别) Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig 德国	
保藏日	保藏编号
2001 年 3 月 1 日	DSM 14390 (DSM ID 01-191)
C. 其它说明(如不适用, 则为空白)	此项信息接续在另附的纸页上 <input type="checkbox"/>
D. 所做说明针对的指定国(如果所做的说明并不是针对所有指定国的话)	
EP, AU, CA	
E. 说明的另外附送(如不适用, 则为空白)	
下列说明将随后提交给国际局(请具体指出所述说明的一般性质, 例如, “保藏编号”)	

仅供受理局使用

 此页随国际申请一同收到

签字官员:

仅供国际局使用

 此页由国际局于      日收到

签字官员:

表 PCT/RO/134(1992 年 7 月)

## 序列表

- <110> 汉高两合股份公司 (Henkel Kommanditgesellschaft auf Aktien)
- <120> 芽孢杆菌种 (DSM 14390) 的新型碱性蛋白酶以及  
包含该新型碱性蛋白酶的洗涤产品和清洁产品  
(Neue Alkalische Protease aus Bacillus sp. (DSM 14390)  
und Wasch- und Reinigungsmittel enthaltend diese neue  
Alkalische Protease)
- <130> SCT041997-47
- <140>
- <141>
- <150> DE 10163883.3
- <151> 2001-12-22
- <160> 2
- <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
- <211> 1143
- <212> DNA
- <213> 芽孢杆菌种 (DSM 14390)
- <220>
- <221> CDS
- <222> (1).. (1143)
- <220>
- <221> mat\_肽
- <222> (334).. (1143)
- <400> 1
- |   |     |
|---|-----|
| atg aag aaa ccg ttg ggg aaa att gtc gca agc acc gca cta ctc att | 48  |
| Met Lys Lys Pro Leu Gly Lys Ile Val Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ile |     |
| -110 -105 -100  |     |
| tct ggt gct ttt agt tca tcg atc gca tcg gct gct gag gaa gca aaa | 96  |
| Ser Gly Ala Phe Ser Ser Ser Ile Ala Ser Ala Ala Glu Glu Ala Lys |     |
| -95 -90 -85 -80   |     |
| gaa aaa tat tta att ggc ttt aat gag cag gaa gca gtt agt gag ttt | 144 |
| Glu Lys Tyr Leu Ile Gly Phe Asn Glu Gln Glu Ala Val Ser Glu Phe |     |
| -75 -70 -65   |     |
| gta gag caa ata gag gca aat gac gat gtc gcg att ctc tct gag gaa | 192 |



130	135	140	145	
ctt gtc gta gca gca tct ggt aat tca ggt gca ggc tca atc agc tat				816
Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Gly Ala Gly Ser Ile Ser Tyr				
	150	155	160	
ccg gcc cgt tat gcg aac gca atg gca gtc ggg gcc act gac caa aac				864
Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln Asn				
	165	170	175	
aac aac cgc gct agc ttt tca cag tat gga gct ggg ctt gac att gtc				912
Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Ala Gly Leu Asp Ile Val				
	180	185	190	
gcg cca ggt gtc aat gtg cag agc aca tac cca ggt tca aca tat gcc				960
Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Ser Thr Tyr Ala				
	195	200	205	
agc tta aac ggt aca tcg atg gct act cct cat gtt gca ggt gta gca				1008
Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Val Ala				
210	215	220	225	
gcc ctt gtt aaa caa aag aat cca tct tgg tcc aat gta caa atc cgc				1056
Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile Arg				
	230	235	240	
aat cat cta aag aat acg gca acg ggt tta gga aac acg aac ttg tat				1104
Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Gly Leu Gly Asn Thr Asn Leu Tyr				
	245	250	255	
gga agc ggg ctt gtc aat gca gaa gcg gca aca cgc taa				1143
Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg				
	260	265	270	

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 380

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 芽孢杆菌种(DSM 14390)

&lt;400&gt; 2

Met Lys Lys Pro Leu Gly Lys Ile Val Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ile			
1	5	10	15
Ser Gly Ala Phe Ser Ser Ser Ile Ala Ser Ala Ala Glu Glu Ala Lys			
	20	25	30
Glu Lys Tyr Leu Ile Gly Phe Asn Glu Gln Glu Ala Val Ser Glu Phe			
	35	40	45
Val Glu Gln Ile Glu Ala Asn Asp Asp Val Ala Ile Leu Ser Glu Glu			
50	55	60	

Glu Glu Val Glu Ile Glu Leu Leu His Glu Phe Glu Thr Ile Pro Val  
 65 70 75 80  
 Leu Ser Val Glu Leu Ser Pro Glu Asp Val Asp Glu Leu Glu Leu Asp  
 85 90 95  
 Pro Thr Ile Ser Tyr Ile Glu Glu Asp Ala Glu Val Thr Thr Met Ala  
 100 105 110  
 Gln Ser Val Pro Trp Gly Ile Ser Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala His  
 115 120 125  
 Asn Arg Gly Leu Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp Thr  
 130 135 140  
 Gly Ile Ser Thr His Pro Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser Phe  
 145 150 155 160  
 Val Pro Gly Glu Pro Ser Thr Gln Asp Gly Asn Gly His Gly Thr His  
 165 170 175  
 Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu Gly  
 180 185 190  
 Val Ala Pro Ser Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala Ser  
 195 200 205  
 Gly Ser Gly Ser Val Ser Ser Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala Gly  
 210 215 220  
 Asn Asn Gly Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Pro Ser Pro  
 225 230 235 240  
 Ser Ala Thr Leu Glu Gln Ala Val Asn Ser Ala Thr Ser Arg Gly Val  
 245 250 255  
 Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Gly Ala Gly Ser Ile Ser Tyr  
 260 265 270  
 Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln Asn  
 275 280 285  
 Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Ala Gly Leu Asp Ile Val  
 290 295 300  
 Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Ser Thr Tyr Ala  
 305 310 315 320  
 Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Val Ala  
 325 330 335  
 Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile Arg  
 340 345 350  
 Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Gly Leu Gly Asn Thr Asn Leu Tyr  
 355 360 365  
 Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg  
 370 375 380

图1/第1部分

1	AQSVPWGISR	VQAPAAHNRG	LTGSGVKVAV	LDTGIST.HP	DLNIRGGASF	VPGEPS.TQD	GNGHGTHVAG	70
2	AQSVPWGISR	VQAPAAHNRG	LTGSGVKVAV	LDTGIST.HP	DLNIRGGASF	VPGEPS.TQD	GNGHGTHVAG	
3	.QSVPWGISR	VQAPAAHNRG	LTGSGVKVAV	LDTGIST.HP	DLNIRGGASF	VPGEPS.TQD	GNGHGTHVAG	
4	AQSVPWGISR	VQAPAAHNRG	LTGSGVKVAV	LDTGIST.HP	DLNIRGGASF	VPGEPS.TQD	GNGHGTHVAG	
5	.QTVPWGINR	VQAPIAQSRG	FTGTGVRVAV	LDTGISN.HA	DLRIRGGASF	VPGEPN.ISD	GNGHGTHVAG	
6	.QVTPWGITR	VQAPTAWTRG	YTGTVRVRVAV	LDTGIST.HP	DLNIRGGVSE	VPGEPS.YQD	GNGHGTHVAG	
7	.QTVPWGIPY	IYSDVVHRQG	YFNGVGVKAV	LDTGVP.HP	DLHIRGGVSE	ISTENT.YVD	YNGHGTHVAG	
8	AQTVPYGIPL	IKADKVQAQG	EKGANVKVAV	LDTGIQASHP	DLNVVGGASF	VAGEAY.NTD	GNGHGTHVAG	
9	AQSVPYGISQ	IKAPALHSQG	YTGSNVKVAV	IDSGIDSSHP	DLNVRGGASF	VPSETNPYQD	GSSHGTHVAG	
10	AQSVPYGVSQ	IKAPALHSQG	YTGSNVKVAV	IDSGIDSSHP	DLKVVAGGASM	VPSETNPFQD	NNSHGTHVAG	
11	AQSVPYGISQ	IKAPALHSQG	YTGSNVKVAV	IDSGIDSSHP	DLNVRGGASF	VPSETNPYQD	GSSHGTHVAG	
12	AQSVPYGISQ	IKAPALHSQG	YTGSNVKVAV	IDSGIDSSHP	DLNVRGGASF	VPSETNPYQD	GSSHGTHVAG	
13	AQSVPYGISQ	IKAPALHSQG	YTGSNVKVAV	IDSGIDSSHP	DLNVRGGASF	VPSETNPYQD	GSSHGTHVAG	
14	AQSVPYGISQ	IKAPALHSQG	YTGSNVKVAV	IDSGIDSSHP	DLNVRGGASF	VPSETNPYQD	GSSHGTHVAG	
15	AQTVPYGIPL	IKADKVQAQG	YKGANVKVGI	IDTGIAASHT	DLKVVVGGASF	VSGESY.NTD	GNGHGTHVAG	
71	TIAALNNSIG	VLGVAPSAEL	YAVKVLGASG	SGSVSSIAQG	LEWAGNNGMH	VANLSLGSPS	PSATLEQAVN	140
1	TIAALNNSIG	VLGVAPSAEL	YAVKVLGASG	SGSVSSIAQG	LEWAGNNGMH	VANLSLGSPS	PSATLEQAVN	
2	TIAALNNSIG	VLGVAPSAEL	YAVKVLGASG	SGSVSSIAQG	LEWAGNNGMH	VANLSLGSPS	PSATLEQAVN	
3	TIAALNNSIG	VLGVAPSAEL	YAVKVLGASG	SGSVSSIAQG	LEWAGNNGMH	VANLSLGSPS	PSATLEQAVN	
4	TIAALNNSIG	VLGVAPSAEL	YAVKVLGADG	RGAISSIAQG	LEWAGNNGMH	VANLSLGSPS	PSATLEQAVN	
5	TIAALNNSIG	VLGVAPNVDL	YGVKVLGASG	SGSISGIAQG	LQWAANNNGMH	IANMSLGSSA	GSATMEQAVN	
6	TIAALNNSIG	VGVAPNAEL	YAVKVLGANG	SGSVSSIAQG	LQWTAQNNIH	VANLSLGSPV	GSQTLELAVN	
7	TVAALNNSYG	VLGVAPGAEL	YAVKVLDRNG	SGSHASIAQG	IEWAMNNGMD	IANMSLGSPS	GSTTLQLAAD	
8	TVAALDNTTG	VLGVAPSVSL	YAVKVLNSSG	SGTYSGIVSG	IEWATNNGMD	VINMSLGGPS	GSTAMKQAVD	
9	TIAALNNSIG	VLGVAPSAEL	YAVKVLDDTG	SGQYSWIING	IEWAIANNND	VINMSLGGPT	GSTALKTVVD	
10	TVAALNNSIG	VLGVAPSAEL	YAVKVLGADG	SGQYSWIING	IEWAIANNND	VINMSLGGPS	GSAALKAAVD	
11	TIAALNNSIG	VLGVSPSASL	YAVKVLDDTG	SGQYSWIING	IEWAIANNND	VINMSLGGPS	GSTALKTVVD	
12	TIAALNNSIG	VLGVSPSASL	YAVKVLDDTG	SGQYSWIING	IEWAIANNND	VINMSLGGPS	GSTALKTVVD	
13	TIAALNNSIG	VLGVSPSASL	YAVKVLDDTG	SGQYSWIING	IEWAIANNND	VINMSLGGPT	GSTALKTVVD	
14	TIAALNNSIG	VLGVAPSSAL	YAVKVLDDTG	SGQYSWIING	IEWAIANNND	VINMSLGGPT	GSTALKTVVD	
15	TVAALDNTTG	VLGVAPNVSL	YAIKVLNSSG	SGTYSAIVSG	IEWATQNGLD	VINMSLGGPS	GSTALKQAVD	

图1/第2部分

141	210
1 SATSRGVLVV AASGNSG... .AGSISYPAR YANAMAVGAT DQNNRASFS QYGAGLDIVA PGVNVQSTYP	1 GSTRASLNGT SMATPHVAGV AALVKQKNPS WSNVQIRNHL KNTATGLGNT NLYGSGLVNA EAATR.
2 SATSRGVLVV AASGNSG... .AGSISYPAR YANAMAVGAT DQNNRASFS QYGAGLDIVA PGVNVQSTYP	2 GSTRASLNGT SMATPHVAGA AALVKQKNPS WSNVQIRNHL KNTATSLGST NLYGSGLVNA EAATR.
3 SATSRGVLVV AASGNSG... .AGSISYPAR YANAMAVGAT DQNNRASFS QYGAGLDIVA PGVNVQSTYP	3 GSTRASLNGT SMATPHVAGA AALVKQKNPS WSNVQIRNHL KNTATSLGST NLYGSGLVNA EAATR.
4 SATSRGVLVV AASGNSG... .ASSISYPAR YANAMAVGAT DQNNRASFS QYGAGLDIVA PGVNVQSTYP	4 GSTRASLNGT SMATPHVAGA AALVKQKNPS WSNVQIRNHL KNTATSLGST NLYGSGLVNA EAATR.
5 QATASGVLVV AASGNSG... .AGNVGEPAR YANAMAVGAT DQNNRATFS QYGAGLDIVA PGVGVQSTVP	5 GNGYASFNGT SMATPHVAGV AALVKQKNPS WSNVQIRNHL KNTATNLGNT TQFGSGLVNA EAATR.
6 QATNAGVLVV AATGNNG... .SGTVSYPAR YANALAVGAT DQNNRASFS QYGTGLNIVA PGVGIQSTYP	6 GNRYSLSLNGT SMATPHVAGV AALVKQKHPH LTAQAQIRNRM NQTAIPLGNS TTYGNGLVDA EYAAQ.
7 RARNAGVLLI GAAGNSGQQG GSNMGGYPAR YASVMVAVGAV DQNGNRANFS SYGSELEIMA PGVININSTYL	7 NNGYRSLNGT SMASPHVAGV AALILSKHPN LSASQVRNRL SSTATYLGSS FYYGKGLINV EAAAQ.
8 NAYARGVVVV AAAGNSGSSG NNTIGYPAK YDSVIAVGAV DSNSNRASFS SVGAELEVMA PGAGVYSTYP	8 TSTYATLNGT SMASPHVAGA AALILSKHPT WTNAQVRDRL ESTATYLGNS FYYGKGLINV QAAAQ.
9 KAVSSGIVVA AAAGNEGSSG STSTVGYPK YPSTIAVGAV NSSNQASFS SVGSELDVMA PGVSIQSTLP	9 GNGYAYNGT SMASPHVAGA AALILSKHPN WTNTQVRSSL ENTITKLGDS FYYGKGLINV QAAAQ.
10 KAVAGVVVV AAAGNEGTSG SSSTVGYPK YPSVIAVGAV DSSNQASFS SVGPELDVMA PGVSIQSTLP	10 GNGYAYNGT SMATPHVAGA AALILSKHPT WTNAQVRDRL ESTATYLGNS FYYGKGLINV QAAAQ.
11 KAVSSGIVVA AAAGNEGSSG SSSTVGYPK YPSTIAVGAV NSSNQASFS SAGSELDVMA PGVSIQSTLP	11 GGYGAYNGT SMATPHVAGA AALILSKHPT WTNAQVRDRL ESTATYLGNS FYYGKGLINV QAAAQ.
12 KAVSSGIVVA AAAGNEGSSG SSSTVGYPK YPSTIAVGAV NSSNQASFS SAGSELDVMA PGVSIQSTLP	12 GGYGAYNGT SMATPHVAGA AALILSKHPT WTNAQVRDRL ESTATYLGNS FYYGKGLINV QAAAQ.
13 KAVSSGIVVA AAAGNEGSSG STSTVGYPK YPSTIAVGAV NSSNQASFS SAGSELDVMA PGVSIQSTLP	13 GGYGAYNGT SMATPHVAGA AALILSKHPT WTNAQVRDRL ESTATYLGNS FYYGKGLINV QAAAQ.
14 KAVSSGIVVA AAAGNEGSSG STSTVGYPK YPSTIAVGAV NSANQRASFS SAGSELDVMA PGVSIQSTLP	14 GGYGAYNGT SMATPHVAGA AALILSKHPT WTNAQVRDRL ESTATYLGSS FYYGKGLINV QAAAQ.
15 KAYASGIVVV AAAGNSGSSG SQNTIGYPAK YDSVIAVGAV DSNKNRASFS SVGAELEVMA PGVSVYSTYP	15 SNTYTSLNGT SMASPHVAGA AALILSKYPT LSASOVRNRL SSTATNLGDS FYYGKGLINV EAAAQ.
	276

图2

