



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101535481 B

(45) 授权公告日 2013. 11. 13

(21) 申请号 200780041173. 6

C11D 3/386 (2006. 01)

(22) 申请日 2007. 11. 05

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

11/595, 537 2006. 11. 09 US

US 5352594 , 1994. 10. 05, 全文 .

CN 1981035 A, 2007. 06. 13, 全文 .

WO 2005/056782 A2, 2005. 06. 23, 参见说明

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009. 05. 05

书第 3-5 页, 第 26-28 页, 第 31 页, 第 42 页, 第 69 页, 第 217 页, 第 221 页, 第 377 页 .

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2007/023327 2007. 11. 05

审查员 刘俊

(87) PCT申请的公布数据

W02008/063400 EN 2008. 05. 29

(73) 专利权人 丹尼斯科美国公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 N · S · 阿明 R · R · 博特

M · A · 卡文 A · J · 保罗斯

W · 韦勒

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 史文静

(51) Int. Cl.

C12N 15/55 (2006. 01)

C12N 9/16 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书38页

序列表9页

(54) 发明名称

用于生产长链过酸的酶

(57) 摘要

本发明提供了用于清洁和其它应用的方法和组合物, 其包含至少一种过水解酶。在一些实施方案中, 本发明提供了用于产生长链过酸的方法和组合物。本发明的某些实施方案在涉及清洁、漂白和消毒的应用中尤其有用。

1. 分离的过水解酶,其中所述酶过水解长链酰基酯底物,并且其中所述酶包含以下一种突变类型:L12G/G22W、L12G/I194M、F154A/I194M、F154G/I194V、F154E/I194S、F154T/F196I、L12Q/F154V、L12M/F154E、L12G/F154G/I194V,其中所述氨基酸位置在位置上等价于 SEQ ID NO:2 的耻垢分枝杆菌过水解酶中的对应位置,其中所述酶的氨基酸序列是天然存在的过水解酶的氨基酸序列。

2. 根据权利要求 1 的分离的过水解酶,其中所述酶在存在长链酰基酯底物和过氧化物时生产长链过酸。

3. 根据权利要求 1 或 2 的过水解酶,其中所述长链酰基酯底物含有至少 6 个碳原子的链。

4. 根据权利要求 1 或 2 的过水解酶,其中所述长链酰基酯底物含有至少 9 个碳原子的链。

5. 根据权利要求 1 的分离的过水解酶,其中所述酶的氨基酸序列是如 SEQ ID NO:2 中所示的耻垢分枝杆菌野生型过水解酶的氨基酸序列。

6. 根据权利要求 1 的分离的过水解酶,其中:

(a) 所述酶具有大于 1 的过水解与水解的比例;

(b) 所述酶具有比 SEQ ID NO:2 的过酸水解活性率低的过酸水解率。

7. 分离的核酸,其编码权利要求 1-6 中任一项的分离的过水解酶。

8. 重组核酸,其包含:

a) 启动子,和

b) 权利要求 7 的分离的核酸,

其中所述启动子和分离的核酸有效连接。

9. 含有权利要求 8 的重组核酸的宿主细胞或载体。

10. 权利要求 9 的宿主细胞,其中所述重组核酸存在于所述细胞的基因组中,或存在于在所述细胞中自主复制的载体中。

11. 权利要求 10 的宿主细胞,其中所述细胞是细菌或真菌宿主细胞。

12. 制备过水解酶的方法,其包括在适合生产所述过水解酶的条件下维持权利要求 10 或 11 中的宿主细胞。

13. 包含权利要求 1 至 6 中任一项的过水解酶的清洁组合物。

14. 权利要求 13 的清洁组合物,其中所述组合物还包含长链酰基酯底物和过氧化物来源和/或表面活性剂。

15. 权利要求 14 的清洁组合物,其中所述组合物是衣物洗涤剂。

16. 清洁方法,其包括将底物维持于存在权利要求 13 至 15 的任一项的清洁组合物,以清洁所述底物。

17. 分离的过水解酶过水解长链酰基酯底物的用途,其中所述底物包含至少 6 个碳原子的链,并且其中所述酶包含以下一种突变类型:L12G/G22W、L12G/I194M、F154A/I194M、F154G/I194V、F154E/I194S、F154T/F196I、L12Q/F154V、L12M/F154E、L12G/F154G/I194V,其中所述氨基酸位置在位置上等价于 SEQ ID NO:2 的耻垢分枝杆菌过水解酶中的对应位置,其中所述酶的氨基酸序列是天然存在的过水解酶的氨基酸序列。

18. 根据权利要求 17 的用途,其中所述酶的氨基酸序列是如 SEQ ID NO:2 中所示的耻

垢分枝杆菌野生型过水解酶的氨基酸序列。

19. 根据权利要求 17 或 18 的用途,其中所述底物包含至少 9 个碳原子的链。

用于生产长链过酸的酶

[0001] 交叉参考

[0002] 本申请要求 2006 年 11 月 09 日提交的美国专利申请 No. 11/595, 537 的优先权, 所述 No. 11/595, 537 是 2006 年 5 月 30 日提交的未决美国专利申请系列号 No. 10/581, 014 的部分继续申请, 所述申请 No. 10/581, 014 是国际专利申请系列号 No. US04/040438 基于 35U. S. C. § 371 的美国国家阶段提交, 所述申请 No. 10/581, 014 要求 2003 年 12 月 3 日提交、目前被放弃的美国临时专利申请系列号 No. 60/526, 764 的权益。

发明领域

[0003] 本发明提供了用于清洁和其它应用的方法和组合物, 其包含至少一种过水解酶(perhydrolase)。在一些实施方案中, 本发明提供了用于产生长链过酸的方法和组合物。本发明的某些实施方案在涉及清洁、漂白和消毒的应用中尤其有用。

[0004] 发明背景

[0005] 洗涤剂和其它清洁组合物通常含有活性成分的复杂组合。例如, 大部分清洁产品含有表面活性剂体系、用于清洁的酶、漂白剂、助洗剂、抑泡剂、污垢悬浮剂、污垢释放剂(soil-release agent)、光学增白剂、柔软剂、分散剂、染料传递抑制化合物、磨料、杀菌剂和香料。尽管明确洗涤剂多种多样, 但是仍存在许多难以完全去除的污渍。另外常存在残余物积累, 这导致归因于不完全清洁的变色(例如发黄)和减少的美观。这些问题由于低(例如冷水)洗涤温度和更短的洗涤循环的增加的使用而严重。另外, 许多污渍包括纤维性材料(主要包括糖类和糖类衍生物)、纤维, 和细胞壁组分(例如植物材料、木材、基于泥/粘土的污物, 和水果)的复杂混合物。这些污渍为清洁组合物的配制和使用的带来了困难的挑战。

[0006] 另外, 有色的衣物趋向于磨损并显示外观损耗。这样的颜色损耗部分归因于洗烫过程中的磨损, 尤其是在自动洗衣机和烘干机中。另外, 织物拉伸强度的损失似乎是使用、穿着和/或洗涤和干燥引起的机械和化学作用的不可避免的结果。因此需要下述手段, 所述手段能有效率和有效地洗涤有色衣物, 从而将这些外观损耗最小化。

[0007] 包含酯酶、脂肪酶和角质酶(cutinase)的清洁组合物是本领域公知的。然而, 这些酶具有非常低的过水解与水解的比例。这导致大部分酯底物被转化为酸而不是更想要的过酸。这是一个严重的缺陷, 因为配方空间(formula space)和成本考虑使得只能包括有限量的底物。

[0008] 总而言之, 尽管清洁组合物的能力有所改进, 但是本领域仍然存在对下述洗涤剂的需要, 所述洗涤剂去除污渍、维持织物颜色和外观, 并且防止染料转移。另外, 仍然存在对下述洗涤剂和/或织物护理组合物的需要, 其提供和/或重建拉伸强度, 并且对织物提供抗皱、抗起球、和/或抗缩水性质, 并且提供静电控制(static control)、织物柔软性、维持想要的色彩外观, 和织物抗磨损性质和益处。特别地, 仍然存在包括下述组合物的需要, 所述组合物能够去除污渍的有色组分, 所述有色组分常在洗衣后仍附着于织物。另外, 仍然存在对适用于纺织品(textile)漂白的改进的方法和组合物的需要。

[0009] 除了织物和衣物清洁领域以外,漂白通常用于纸浆和造纸工业。在生产纸之前,通常处理纸浆以去除不想要的有色污染物。这提供了与未经处理的纸浆相比适合生产更高品质的纸张的纸浆,所述处理用于去除有色污染物和纸浆中存在的其它不想要的组分。例如,在纸回收工业中,去除墨是必需的。尽管标准的方法适用于将有油或基于水的墨的纸脱墨,但是增加的静电墨使用使得脱墨成为问题,因为这些墨难以去除得多。存在可用于对纸脱墨的多种方法,包括使用酶(见例如美国专利 No. 5, 370, 770)。然而,本领域仍然存在对有效的、有成本收益的方法的需要,所述方法用于处理纸浆以用于生产纸(回收和新的)产品生产。

[0010] 在个人护理市场(例如牙齿增白剂、头发漂白剂等)中漂白也是常用的。尽管个人护理漂白产品在数年中已经改进,但是对用于该环境的温和、易用、有成本收益的漂白方法仍然存在需要。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明提供了用于清洁和其它应用的方法和组合物,其包含至少一种过水解酶。在一些实施方案中,本发明提供了用于产生长链过酸的方法和组合物。本发明的某些实施方案在涉及清洁、漂白和消毒的应用中尤其有用。

[0013] 本发明提供了过水解长链酰基酯底物的分离的过水解酶。在一些实施方案中,该酶在存在长链酰基酯底物和过氧化物时生产长链过酸。在一些优选的实施方案中,长链酰基酯底物含有至少 6 个碳原子的链。在一些尤其优选的实施方案中,长链酰基酯底物含有至少 9 个碳原子的链。

[0014] 在某些实施方案中,主题过水解酶具有与天然存在的过水解酶(即细胞基因组编码的野生型过水解酶)的氨基酸序列至少 80% 同一的氨基酸序列。在一些实施方案中,酶具有与天然存在的耻垢分枝杆菌(*M. smegmatis*)过水解酶(SEQ ID NO :2)至少 80% 同一的氨基酸序列。在一些实施方案中,过水解酶在下述氨基酸位置上包含至少一个取代,所述位置等价于包含 SEQ ID NO :2 中所示的氨基酸序列的耻垢分枝杆菌过水解酶中的位置,其中所述至少一个取代选自位置 12、22、59、153、154、194、196 和 204。在一些尤其优选的实施方案中,酶具有以下氨基酸的任一或组合:位置 12 上的 Gly、Pro 或 Gln,位置 22 上的 Trp,位置 59 上的 Pro,位置 153 上的 Pro,位置 154 上的 Thr、Ser、Val 或 Gln,位置 194 上的 Gly,位置 196 上的 Ser、Gln、Val、Gly、Pro、Ile 或 His,位置 204 上的 Tyr 或 Trp,其中所述氨基酸位置在位置上等价于 SEQ ID NO :2 的耻垢分枝杆菌过水解酶中的位置 12、22、59、153、154、194、196 和 204。在一些实施方案中,酶含有以下的氨基酸:位置 154 上的 Ala 和位置 194 上的 Met,位置 154 上的 Gly 和位置 194 上的 Val,或位置 12 上的 Gly 和位置 194 上的 Met,位置 154 上的 Thr 和位置 196 上的 Ile,位置 12 上的 Gln 和位置 154 上的 Val,位置 12 上的 Met 和位置 154 上的 Glu,位置 12 上的 Gly 和位置 154 上的 Gly,位置 154 上的 Glu 和位置 194 上的 Ser,或位置 12 上的 Gly 和位置 22 上的 Trp,或其任意组合,其中所述氨基酸位置在位置上等价于 SEQ ID NO :2 的耻垢分枝杆菌过水解酶中的位置 12、22、59、153、154、194、196 和 204。在一些优选的实施方案中,本发明的过水解酶具有至少为 1 的过水解:水解比例,和 / 或与 SEQ ID NO :2 相比低的水解率。

[0015] 本发明还提供了分离的过水解酶,其中该酶水解长链酰基酯底物。在一些实施方案中,酶在存在长链酰基酯底物和过氧化物时生产长链过酸。在另外的实施方案中,链酰基

酯底物含有至少 6 个碳原子的链。还在其它实施方案中,长链酰基酯底物含有至少 9 个碳原子的链。

[0016] 本发明还提供了分离的核酸,其编码本发明的分离的过水解酶。在一些优选的实施方案中,重组核酸含有:启动子和分离的核酸,其中所述启动子和分离的核酸有效连接,以提供分离的核酸的转录。

[0017] 本发明还提供了包含本发明的重组核酸的载体。还提供了包含该载体的宿主细胞。如果存在于宿主细胞中,则重组核酸可存在于细胞的基因组中,或存在于在细胞中自主复制的载体中。在特定的实施方案中,重组核酸使得分离的过水解酶蛋白质从宿主细胞分泌。宿主细胞可以是细菌或真菌宿主细胞。提供了含有主题宿主细胞的培养物和培养基。该培养基可含有由细胞分泌的过水解酶蛋白质。

[0018] 本发明还提供了制备本发明的过水解酶的方法。一般而言,该方法包括在适合生产过水解酶的条件下培养主题宿主细胞。在一些优选的实施方案中,从生长培养基中回收过水解酶。在一些尤其优选的实施方案中,将回收的过水解酶与其它试剂组合,产生清洁组合物。

[0019] 本发明还提供了包含至少一种本发明的过水解酶的清洁组合物。在一些优选的实施方案中,清洁组合物还包含长链酰基酯底物和过氧化物来源,其与过水解酶一起生产长链过酸。在某些实施方案中,清洁组合物还含有至少一种表面活性剂。在一些特定的实施方案中,清洁组合物是洗衣洗涤剂。

[0020] 可通过将组合物与底物接触,使用本发明的清洁组合物清洁底物(例如织物)。

[0021] 发明描述

[0022] 本发明提供了用于清洁和其它应用的方法和组合物,其包含至少一种过水解酶。在一些实施方案中,本发明提供了用于产生长链过酸的方法和组合物。本发明的某些实施方案在涉及清洁、漂白和消毒的应用中尤其有用。

[0023] 除非另有说明,本发明的实践涉及分子生物学、微生物学、蛋白质纯化、蛋白质工程、蛋白质和 DNA 测序、重组 DNA、化学、生物化学和酶学领域普遍使用的常规技术,这属于本领域技术人员的技艺。事实上,这类技术是本领域技术人员已知的,并在大量文件和参考工作中描述(见例如 Sambrook 等人,"Molecular Cloning:A Laboratory Manual",第二版(Cold Spring Harbor),[1989]);和 Ausubel 等人,"Current Protocols in Molecular Biology"[1987])。本文(包括上文和下文)提到的所有专利、专利申请、文章和出版物均明确地通过参考并入本文。

[0024] 另外,本文提供的标题并非本发明多个方面或实施方案的限制,本发明所述多个方面或实施方案可通过参照作为整体的说明书而存在。因此,下文紧接着定义的术语参考作为整体的说明书被更全面地定义。但是,为了便于理解本发明,在下文中定义大量术语。

[0025] 定义

[0026] 除非本文另有定义,本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域常规技术人员普遍理解的相同的含义。例如,Singleton 和 Sainsbury, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology,第二版, John Wiley 和 Sons, NY(1994);和 Hale 和 Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology, Harper Perennial, NY(1991) 为本领域技术人员提供了本发明中使用的许多术语的综合字典。尽管与本文所述的相似或等

价的任何方法和材料在本发明的实践中适用,但是本文描述优选的方法和材料。同样,如本文所定义的,除非上下文另外清楚地表明,单数形式“一个”、“一种”和“这个/种”(“a”、“an”和“the”)包括复数参考。因此,下文紧接着定义的术语通过参考作为整体的说明书更全面地被描述。除非另有说明,核酸以从左到右 5' 到 3' 的取向书写;氨基酸序列以从左到右氨基到羧基的取向书写。应当理解本发明不限于所述的特定方法、方案和试剂,因为这些可取决于本领域技术人员使用它们的背景而变化。

[0027] 本说明书通篇给出的每个最大数字界限旨在包括每个更低的数字界限,就好像该更低的数字界限在本文中明确写出一样。本说明书通篇给出的每个最小数字界限应包括每个更高的数字界限,就好像该更高的数字界限在本文中明确写出一样。本说明书通篇给出的每个数字范围应包括落入该更宽的数字范围内的每个更窄的数字范围,就好像该更窄的数字范围在本文中均明确写出一样。

[0028] 本文使用“过酸”是式 $RC(=O)OOH$ 的酸,其中 R 是任何有机部分。

[0029] 本文使用“长链过酸”是式 $RC(=O)OOH$ 的过酸,其中 R 是含有 6 个或更多碳原子的链的任何有机部分。长链过酸可含有 6-10 个碳原子的碳链(即 C_6 - C_{10} 碳链),或至少 11 个碳原子的碳链(即 C_{11+} 碳链)。示范性的长链过酸含有 C_6 、 C_7 、 C_8 、 C_9 、 C_{10} 、 C_{11} 、 C_{12} 、 C_{13} 、 C_{14} 、 C_{15} 、 C_{16} 、 C_{17} 、 C_{18} 、 C_{19} 、 C_{20} 、 C_{21} 或 C_{22} 碳链。示范性的长链过酸包括,但不仅限于过己酸、过辛酸、过壬酸、过癸酸、过十二烷酸、过肉豆蔻酸、过棕榈酸、过硬脂酸和过油酸。

[0030] 本文使用术语“过水解”是指产生过酸的酶反应。在一些实施方案中,过酸由存在过氧化氢(H_2O_2)时式 $R_1C(=O)OR_2$ 的酯底物的过水解产生,其中 R_1 和 R_2 独立地是任何有机部分。

[0031] 本文使用“长链酰基酯”是式 $R_1C(=O)OR_2$ 的酯,其中 R_1 是含有至少 6 个碳原子的链的任何有机部分, R_2 是任何有机部分。长链酰基酯可含有 6-10 个碳原子的碳链(即 C_6 - C_{10} 碳链),或至少 11 个碳原子的碳链(即 C_{11+} 碳链)。示范性的长链酰基酯含有 C_6 、 C_7 、 C_8 、 C_9 、 C_{10} 、 C_{11} 、 C_{12} 、 C_{13} 、 C_{14} 、 C_{15} 、 C_{16} 、 C_{17} 、 C_{18} 、 C_{19} 、 C_{20} 、 C_{21} 或 C_{22} 碳链。示范性的长链酰基酯包括:己酸酯、辛酸酯、壬酸酯、癸酸酯、十二烷酸酯、肉豆蔻酸酯、棕榈酸酯、硬脂酸酯和油酸酯。

[0032] 本文使用术语“过氧化氢来源”包括过氧化氢以及下述体系的组分,所属体系能够自发或通过酶生产过氧化氢作为反应产物。

[0033] 本文使用术语“漂白”是指,在合适的 pH 和温度条件下,处理材料(例如织物、衣物、纸浆等)或任何表面足够长的时间,以使材料增亮(即变白)和/或使材料清洁。适于漂白的化学品的例子包括但不限于 ClO_2 、 H_2O_2 、过酸、 NO_2 等。

[0034] 本文使用术语“消毒”是指从表面去除污染物,以及抑制或杀死物品表面的微生物。不旨在将本发明限制于任何特定的表面、物品或待去除的污染物或微生物。

[0035] 本文使用术语“过水解酶”是指能够催化导致形成足够高量过酸的反应的酶,所述过酸适用于如清洁、漂白和消毒用途。在一些优选的实施方案中,本发明的过水解酶将长链酰基酯过水解产生长链过酸,所述长链过酸适用于宽泛的多种清洁相关的应用。在一些尤其优选的实施方案中,本发明的过水解酶被表征为具有独特的三级结构和一级序列。在一些额外的尤其优选的实施方案中,本发明的过水解酶是耻垢分枝杆菌过水解酶的变体。然而,不旨在将本发明限制于这些特定的过水解酶。

[0036] 本文使用术语“多体 (multimer)”是指共价或非共价结合并作为复合物存在于溶液中的两个或更多个蛋白质或肽。“二体”是含有两个蛋白质或肽的多体;“三体”含有三个蛋白质或肽,等等。本文使用“的八体”是指八个蛋白质或肽的多体。

[0037] 本文使用短语“过水解与水解的比例”是指由过水解酶在确定的条件下确定的时间内酶促产生的过酸量与酶促产生的酸量的比例。在一些实施方案中,本文提供的测定法被用于测定酶生产的过酸和酸的量。

[0038] 本文使用“个人护理产品”是指用于清洁、漂白和 / 或消毒毛发、皮肤、头皮和 / 或牙齿的产品,包括但不限于洗发剂、润肤液、沐浴凝胶、局部湿润剂、牙膏和 / 或其它局部清洁剂。在一些特定的实施方案中,这些产品用于人,而在其它实施方案中,这些产品用于非人动物 (例如用于兽医用途)。

[0039] 本文使用“可药用的”是指下述药物、药品和 / 或惰性成分,其适用于接触人和其它动物组织而没有不恰当的毒性、不相容性、不稳定性、刺激、过敏反应等等,与合理的益处 / 风险比例相称。

[0040] 本文使用术语“清洁组合物”和“清洁制剂”是指可用于从待清洁的物品中去除不想要的化合物的组合物,所述物品如织物、盘碟、隐形眼镜、其它固体底物、毛发 (洗发剂)、皮肤 (肥皂和乳膏)、牙齿 (漱口剂、牙膏) 等。该术语包括针对所需的特定类型的清洁组合物及其产品形式 (例如液体、凝胶、颗粒或喷雾组合物) 而选择的任何材料 / 化合物,只要该组合物与组合物中使用的过水解酶和其它酶相容即可。考虑到待清洁的表面、物品或织物,和针对使用期间的清洁条件所需的组合物形式之后,容易对清洁组合物材料做出特定的选择。

[0041] 该术语还表示适用于清洁、漂白、消毒和 / 或灭菌任何物体和 / 或表面的任何组合物。该术语旨在包括,但不仅限于洗涤剂组合物 (例如液体和 / 或固体衣物洗涤剂、精细织物洗涤剂;硬表面清洁制剂,例如用于玻璃、木、陶瓷和金属台面和窗户;地毯清洁剂;烤箱清洁剂;织物翻新剂 (freshener);织物柔软剂;和纺织品及衣物去渍剂 (pre-spotter),以及盘碟洗涤剂)。

[0042] 事实上,除非另有说明,本文使用的术语“清洁组合物”包括颗粒或粉末形式的通用 (all-purpose) 或强效 (heavy-duty) 清洗剂,特别是清洁洗涤剂;液体、凝胶或糊状形式的通用清洗剂,特别是所谓的强效液体 (HDL) 型;液体精细织物洗涤剂;手工洗碟剂或轻效 (light-duty) 洗碟剂,特别是高泡沫型的那些;用于家用和机构应用的机器洗碟剂,包括多种片状、颗粒、液体和漂清助剂型;液体清洁和消毒剂,包括抗菌洗手液 (hand-wash) 型、清洁棒 (cleaning bar)、漱口剂、牙齿清洁剂、汽车或地毯清洁剂、浴室清洁剂;洗发香波 (hair shampoo) 和洗发水 (hair-rinses);沐浴凝胶和泡沫浴以及金属清洁剂;以及清洁助剂,如漂白剂添加剂和“污渍粘除 (stain-stick)”或预处理型。

[0043] 本文使用术语“洗涤剂组合物”和“洗涤剂制剂”是指旨在用于清洗介质中的混合物方面使用,所述洗涤介质用于清洁脏污的对象。在特定的实施方案中,使用该术语涉及洗涤织物和 / 或衣服 (例如“洗衣洗涤剂”)。在可选的实施方案中,该术语是指其它洗涤剂,例如用于清洁盘碟、刀叉等的洗涤剂 (例如“洗盘碟洗涤剂”)。不旨在将本发明限制于任何特定的洗涤剂制剂或组合物。事实上,除了过水解酶以外,该术语还旨在包括含有表面活性剂、转移酶、水解酶、氧化还原酶、助洗剂、漂白剂、漂白活化剂、上蓝剂和荧光染料、结块

抑制剂、掩蔽剂、酶激活剂、抗氧化剂和增溶剂的洗涤剂。

[0044] 在本文使用时,洗涤剂中“增强的性能”被定义为如在标准的清洗循环后通过通常的评价所确定的,对漂白敏感性污渍(例如草、茶、酒、血、脏物等)的清洁增强。在特定的实施方案中,本发明的过水解酶在有色污渍和污物的氧化和去除中提供了增强的性能。在其它实施方案中,本发明的过水解酶在污渍的去除和/或脱色中提供了增强的性能。还在另外的实施方案中,本发明的过水解酶在基于脂质的污渍和污物的去除中提供了增强的性能。还在其它实施方案中,本发明的过水解酶在从盘碟和其它物品上去除污物和污渍中提供了增强的性能。

[0045] 本文使用术语“硬表面清洁组合物”是指用于清洁硬表面如地板、墙壁、瓷砖、浴室和厨房设备等的洗涤剂组合物。这类组合物以任何形式提供,包括但不限于固体、液体、乳剂等等。

[0046] 本文使用术语“盘碟清洗组合物”是指用于清洁盘碟的组合物的所有形式,包括但不限于颗粒和液体形式。

[0047] 本文使用术语“织物清洁组合物”是指用于清洁织物的所有形式的清洁组合物,包括但不限于颗粒、液体和条棒(bar)形式。

[0048] 本文使用术语“纺织品(textile)”是指机织织物(woven fabric),以及适用于转化为或用作纱、机织织物(woven)、编织用线(knit)和非机织织物的定长纤维(staple fiber)和丝。该术语包括由天然纤维以及合成(例如人造的)纤维制成的纱。

[0049] 本文使用术语“纺织品材料”是表示纤维、纱中间产物、纱、织物和来自织物制备的产物(例如衣物和其它物品)的通用术语。

[0050] 本文使用“织物”包括任何纺织品材料。因此,该术语旨在包括衣物以及织物、纱、纤维、非机织材料、天然材料、合成材料,和任何其它纺织品材料。

[0051] 本文使用术语“相容的”是指清洁组合物材料不会将过水解酶的酶活性降低至下述程度,所述程度使得过水解酶在正常使用的情况下不能如所期望的有效。特定的清洁组合物材料在下文中详细举例。

[0052] 本文使用“有效量的过水解酶”是指达成具体应用(例如个人护理产品、清洁组合物等)中所需酶活性必需的过水解酶量。这类有效量可由本领域常规技术人员容易地确定,并且以许多因素为基础,例如使用的特定酶变体、清洁组合物、清洁组合物的具体组成,和需要液体还是干燥(例如颗粒、条棒)的组合物,等等。

[0053] 本文使用术语“非织物清洁组合物”包括硬表面清洁组合物、盘碟清洗组合物、个人护理清洁组合物(例如口腔清洁组合物、牙齿清洁组合物、个人清洁组合物等)和适用于纸浆和造纸工业的组合物。

[0054] 本文使用“口腔清洁组合物”是指牙粉(dentifrice)、牙膏、牙凝胶、牙粉、漱口剂、口腔喷雾、口腔凝胶、口香糖、锭剂、囊剂、片剂、生物凝胶、预防糊剂(prophylaxis paste)、牙齿治疗溶液等等。适合与本发明的过水解酶组合使用的口腔护理组合物是本领域公知的(见例如美国专利 Nos. 5,601,750、6,379,653 和 5,989,526,其均通过参考并入本文)。

[0055] 本文使用“纸浆处理组合物”是指本发明的过水解酶在适用于造纸用途的组合物中使用。该术语旨在包括适用于处理任何纸浆材料的组合物,所述纸浆材料包括木材料以及非木材料,例如“农业剩余物”和“纤维作物”,包括但不限于小麦秆、稻秆、玉米秆、甘蔗

渣(甘蔗)、黑麦草秆、种子亚麻秆(seed flax straw)、亚麻秆、洋麻、工业大麻、剑麻、纺织平秆(textile flat straw)、hesperaloe等。因此,本发明还包括本发明的过水解酶在纸浆处理方法中的用途。

[0056] 本文使用“氧化化学品”是指具有漂白纸浆或任何其它材料的能力的化学品。氧化化学品以适合漂白的量、pH和温度存在。该术语包括但不限于过氧化氢和过酸。

[0057] 本文使用“酰基”是有机酸基团的通用名称,其为去除-OH基后羧酸的剩余部分(例如乙酰基氯 $\text{CH}_3\text{CO}-\text{Cl}$ 是由冰醋酸 $\text{CH}_3\text{COO}-\text{H}$ 形成的酰基氯)。单个酰基的名称通过用“-基”替换“-酸”形成。

[0058] 本文使用术语“酰化”是指下述化学转化,其将酰基($\text{RCO}-$)取代进分子中,通常取代-OH基的活性氢。

[0059] 本文使用术语“转移酶”是指催化官能化合物到底物范围的转移的酶。

[0060] 本文使用术语“离去基团”是指这样的亲核体,其在被另一亲核体取代后从酰基供体上被切割。

[0061] 本文使用术语“酶转化”是指通过将底物或中间产物与酶接触,将底物修饰为中间产物或将中间产物修饰为终产物。在一些实施方案中,通过将底物或中间产物直接暴露于适当的酶制造接触。在其它实施方案中,接触包括将底物或中间产物暴露于下述生物,所述生物表达和/或分泌酶,和/或将所需的底物和/或中间产物分别代谢为所需的中间产物和/或终产物。

[0062] 本文使用短语“洗涤剂稳定性”是指洗涤剂组合物的稳定性。在一些实施方案中,在使用洗涤剂期间评价稳定性,而在其它实施方案中,该术语是指洗涤组合物在储存期间的稳定性。

[0063] 本文使用短语“对蛋白酶解(proteolysis)的稳定性”是指蛋白质(例如酶)承受蛋白酶解的能力。不旨在将该术语限制于使用任何特定的蛋白酶用于评价蛋白质稳定性。

[0064] 本文使用“氧化稳定性”是指蛋白质在氧化条件下发挥作用的能力。特别地,该术语是指蛋白质在存在多种浓度 H_2O_2 和/或过酸时发挥功能的能力。在多种氧化条件下的稳定性可通过本领域技术人员已知的标准步骤测量和/或通过本文所述方法测量。氧化稳定性的重大改变由以下证明:与无氧化化合物存在时的酶活性相比,酶活性的半衰期提高或降低(在大部分实施方案中,优选地为增加)至少约5%或更大。

[0065] 本文使用“pH稳定性”是指蛋白质在特定pH下发挥作用的稳定性。一般,大部分酶能够作用的pH范围是有限的。除了在中度范围(mid-range)pH(即pH 7左右)下作用的酶以外,存在能够在非常高或非常低pH条件下工作的酶。多种pH下的稳定性可通过本领域技术人员已知的标准步骤测量,和/或通过本文所述的方法测量。pH稳定性的重大改变由以下证明:与酶最适pH下的酶活性相比,酶活性的半衰期增加或减少(在大部分实施方案中,优选地为增加)至少约5%或更大。然而,不旨在将本发明限制于任何pH稳定性水平或pH范围。

[0066] 本文使用“热稳定性”是指蛋白质在特定温度下发挥功能的能力。通常,大部分酶能够发挥功能的温度范围是有限的。除了在中度温度(例如室温)下工作的酶以外,存在能够在非常高或非常低温度下工作的酶。热稳定性可通过已知步骤或通过本文所述方法测量。热稳定性的重大改变通过以下证明:暴露于与酶活性的最适温度不同的温度(例如更

高或更低)下时,突变体催化活性的半衰期增加或减少(在大部分实施方案中,优选地为增加)至少约5%或更大。然而,不旨在将本发明限制于任何温度稳定性水平或温度范围。

[0067] 本文使用术语“化学稳定性”是指蛋白质(例如酶)对于不利地影响其活性的化学品的稳定性。在一些实施方案中,这类化学品包括,但不仅限于过氧化氢、过酸、阴离子洗涤剂、阳离子洗涤剂、非离子洗涤剂、螯合剂等。然而,不旨在将本发明限制于任何特定的化学稳定性水平或化学稳定性范围。

[0068] 本文使用短语“过水解酶活性提高”是指与标准酶相比,过水解酶活性的相对提高。在一些实施方案中,该术语是指提高的过水解产物速率,而在其它实施方案中,该术语包括产生更少水解产物的过水解酶组合物。在另外的实施方案中,该术语是指具有改变的底物特异性的过水解酶组合物。

[0069] 本文使用短语“底物特异性的改变”是指酶的底物特异性的改变。在一些实施方案中,底物特异性的改变被定义为用酶观察到的 K_{cat}/K_m 比例与用酶变体或其它酶组合物观察到的之间的差异。酶底物特异性根据测试的底物而变化。通过比较酶对不同底物展示的催化效率测定酶的底物特异性。这些测定尤其适用于评价突变体酶的效率,因为通常期望产生下述变体酶,其对特定的目的底物显示更大的比例。例如,与目前用于清洁、漂白和消毒应用的酶相比,本发明的过水解酶在从酯底物生产过酸中更加有效。本发明的另一实例是与野生型相比对过酸降解具有更低活性的过水解酶。本发明的另一实例是对比乙酸更疏水的酰基具有更高活性的过水解酶。然而,不旨在将本发明限制于任何特定的底物组成或任何特异的底物特异性。

[0070] 本文使用的“表面性质”是关于蛋白质表面所展示的静电荷以及下述特性使用的,所述特性例如疏水性和/或亲水性。

[0071] 本文使用短语“独立地选自……”表示从所参照的马库什组中选择的部分或元件可以是相同的、可以是不同的或是以下实例中所指的元件的任何混合物:

[0072] 具有3个R基团的分子,其中各R基团独立地选自A、B和C。此处三个R基团可以是:AAA、BBB、CCC、AAB、AAC、BBA、BBC、CCA、CCB或ABC。

[0073] 对化学组合物而言,本文使用术语“取代的”表示该术语所应用的有机组合物或基团:

[0074] (a) 通过消除至少一个元件或基团被制成不饱和的;或

[0075] (b) 用含有一个或多个(i)碳、(ii)氧、(iii)硫、(iv)氮或(v)卤素原子的部分替换化合物或基团中至少一个氢;或

[0076] (c) (a)和(b)二者。

[0077] 可如紧邻的上文(b)中所述替换氢的部分(其仅含有碳和氢原子)是烃部分,其包括但不限于烷基、链烯基、炔基、烷基二烯基(alkyldienyl)、环烷基、苯基、烷基苯基、萘基、蒽基、菲基、茚基、甾类基团,和这些基团彼此和与多价烃基的组合,所述多价烃基例如亚烷基(alkylene)、亚烷基(alkylidene)和alkylidyne基团。可如紧邻的上文(b)中所述替换氢的含有氧原子的部分包括,但不仅限于含有羟基、酰基或酮基、醚、环氧、羧基和酯的基团。可如紧邻的上文(b)中所述替换氢的含有硫原子的部分包括,但不仅限于含硫的酸和酸酯基团、硫醚基、巯基和硫酮基。可如紧邻的上文(b)中所述替换氢的含有氮原子的部分包括,但不仅限于氨基、硝基、偶氮基、铵基、酰胺基、叠氮基、异氰酸基、氰基和腈基。

可如紧邻的上文 (b) 中所述替换氢的含卤素原子的部分包括氯基、溴基、氟基、碘基及前述任何部分,所述部分中的氢或侧烷基被卤素基团取代形成稳定的被取代的部分。

[0078] 应当理解,可如下将从 (b) (i) 到 (b) (v) 的任何上述部分取代为彼此:在单价取代中,或在多价取代中通过丢失氢来形成可替换有机化合物或基团中氢的另一单价部分。

[0079] 本文使用术语“纯化的”和“分离的”是指从样品中去除污染物。例如,通过去除溶液或制品中不是过水解酶的污染蛋白质和其它化合物纯化过水解酶。在一些实施方案中,重组的过水解酶在细菌或真菌宿主细胞中表达,并通过去除其它宿主细胞成分纯化这些重组的过水解酶;因而提高样品中重组的过水解酶多肽的百分比。

[0080] 本文使用“目的蛋白质”是指要被分析、鉴定和/或修饰的蛋白质(例如酶或“目的酶”)。天然存在的以及重组的蛋白质适用于本发明。

[0081] 本文使用“蛋白质”是指包含氨基酸并被本领域技术人员识别为蛋白质的任何复合物。术语“蛋白质”、“肽”和多肽在本文中可互换使用。其中肽是蛋白质的一部分,本领域技术人员理解该术语在上下文中的使用。

[0082] 如本文使用的,功能上和/或结构上类似的蛋白质被认为是“相关蛋白质”。在一些实施方案中,这些蛋白质来自不同的属和/或物种,包括生物类别(例如细菌蛋白质和真菌蛋白质)之间的差异。在一些实施方案中,这些蛋白质源自不同的属和/或物种,包括生物类别(例如细菌酶和真菌酶)之间的差异。在另外的实施方案中,提供来自相同物种的相关蛋白质。事实上,不旨在将本发明限制为来自任何特定来源的相关蛋白质。另外,术语“相关蛋白质”包括三级结构同源物和一级序列同源物(例如本发明的过水解酶)。在其它实施方案中,该术语包括免疫上交叉反应的蛋白质。在一些最尤其优选的实施方案中,本发明的相关蛋白质显示非常高的过水解与水解的比例。

[0083] 本文使用术语“衍生物”是指如下衍生自蛋白质的蛋白质:向 C-端或 N-端之一或二者中添加一个或多个氨基酸,在氨基酸序列中一个或许多不同的位点取代一个或多个氨基酸,和/或在蛋白质的一端或两端或在氨基酸序列中的一个或多个位点上缺失一个或多个氨基酸,和/或在氨基酸序列中的一个或多个位点上插入一个或多个氨基酸。优选如下达成蛋白质衍生物的制备:修饰编码天然蛋白质的 DNA 序列、将该 DNA 序列转化进合适的宿主中,并表达经修饰的 DNA 序列,形成衍生的蛋白质。

[0084] 相关(和衍生)蛋白质包括“变体蛋白质”。在一些优选的实施方案中,变体蛋白质与亲本蛋白质之间以及彼此之间由于小量的氨基酸残基而不同。不同氨基酸残基的数量可以是一个或多个,优选地约 1、2、3、4、5、10、15、20、30、40、50 或更多个氨基酸残基。在一些优选的实施方案中,变体之间不同氨基酸的数量在 1 和 10 之间。在一些尤其优选的实施方案中,相关蛋白质并且尤其是变体蛋白质包含至少约 35%、约 40%、约 45%、约 50%、约 55%、约 60%、约 65%、约 70%、约 75%、约 80%、约 85%、约 90%、约 95%、约 97%、约 98% 或约 99% 的氨基酸序列同一性。另外,如本文中使用的,相关蛋白质或变体蛋白质是指与另一相关蛋白质或亲本蛋白质在显著区域 (prominent region) 的数量上不同的蛋白质。例如,在一些实施方案中,变体蛋白质具有约 1、2、3、4、5 或 10 个与亲本蛋白质不同的相应的显著区域。

[0085] 本领域已知适用于产生本发明的过水解酶变体的若干种方法,包括但不限于位点饱和诱变、扫描诱变、插入诱变、随机诱变、定点诱变和定向进化,以及多种其它重组途

径。

[0086] 在某些实施方案中,同源蛋白质被改造为生产具有想要的活性的酶。在一些尤其优选的实施方案中,被改造的蛋白质包括在蛋白质的 SGNH- 水解酶家族中。在一些实施方案中,被改造的蛋白质包含以下保守残基的至少一个或其组合:L6、W14、W34、L38、R56、D62、L74、L78、H81、P83、M90、K97、G110、L114、L135、F180、G205。在可选的实施方案中,这些被改造的蛋白质包括 GDSE (SEQ ID NO:28) 和 GRTT (SEQ ID NO:29) 和 / 或 ARTT (SEQ ID NO:30) 基序。在一些其它实施方案中,酶是多体,包括但不限于二体、八体和四体。在另外的实施方案中,被改造的蛋白质显示大于 1 的过水解与水解的比例。

[0087] 如果过水解酶的氨基酸残基与耻垢分枝杆菌过水解酶中特异残基或该残基的部分同源(即在一级和 / 或三级结构任一中具有相应的位置)或类似(即具有用于组合、反应和 / 或化学相互作用的相同或类似的功能性能力),则过水解酶的该氨基酸残基等价于耻垢分枝杆菌过水解酶的该残基。

[0088] 在一些实施方案中,为了建立对一级结构的同源性,将过水解酶的氨基酸序列直接与耻垢分枝杆菌过水解酶的一级序列比较,尤其是直接与在有序列已知的过水解酶中已知不变的一组残基比较。比对保守残基后,定义等价于耻垢分枝杆菌过水解酶一级序列中特定氨基酸的残基,所述比对允许为了维持比对进行必要的插入和缺失(即通过任意缺失和插入避免保守残基的消失)。在某些实施方案中,保守残基的比对定义了 100% 的等价残基。然而,大于约 75% 或低至约 50% 的保守残基的比对也足以定义等价残基。在优选的实施方案中,维持催化性丝氨酸和组氨酸残基的保守。

[0089] 使用保守的残基定义其它过水解酶(例如,来自其它分枝杆菌 (*Mycobacterium*) 物种以及任何其它生物的过水解酶)中耻垢分枝杆菌过水解酶的相应等价氨基酸残基。

[0090] 在本发明的一些实施方案中,编码耻垢分枝杆菌过水解酶的 DNA 序列被修饰。在一些实施方案中,以下残基被修饰:Cys7、Asp10、Ser11、Leu12、Thr13、Trp14、Trp16、Pro24、Thr25、Leu53、Ser54、Ala55、Thr64、Asp65、Arg67、Cys77、Thr91、Asn94、Asp95、Tyr99、Val125、Pro138、Leu140、Pro146、Pro148、Trp149、Phe150、Ile153、Phe154、Thr159、Thr186、Ile192、Ile194 和 Phe196。然而,并非旨在将本发明限制于在这些位置上被修饰的序列。事实上,本发明旨在包括多种修饰和修饰的组合。

[0091] 在另外的实施方案中,如下定义等价残基:针对其三级和四级结构已通过 x- 射线晶体学被确定的过水解酶,测定三级和四级结构水平上的同源性。在该上下文中,“等价残基”被定义为下述残基:比对后,羧基水解酶和耻垢分枝杆菌过水解酶的特定氨基酸残基的两个或更多主链原子(N对N, CA对CA, C对C和O对O)的原子坐标在 0.13nm 之内,优选地在 0.1nm 之内。在最佳模型已被定向和定位,以给出所述过水解酶与耻垢分枝杆菌过水解酶的非氢蛋白质原子的原子坐标的最大重叠后,达成比对。如本领域所已知的,最佳模型是在可获得的最分辨率下,针对实验衍射数据给予最低 R 因子的晶体模型。功能上和 / 或结构上与耻垢分枝杆菌过水解酶的特定残基类似的等价残基定义为过水解酶的下述氨基酸,所述氨基酸优先采取使得它们改变、修饰或调控蛋白质结构的构象,从而以下述方式影响底物结合和 / 或催化中的改变,所述方式由耻垢分枝杆菌过水解酶的特定残基确定和导致。另外,它们是过水解酶的下述残基(在已通过 x- 射线晶体学获得三级结构时),所述残基以下述程度占据类似的位置,所述程度为:尽管给定残基的主链原子可能不满足以

占据同源位置为基础的等价标准,但是残基的至少两个侧链原子的原子坐标位于耻垢分枝杆菌过水解酶的相应侧链原子的 0.13nm 之内。耻垢分枝杆菌过水解酶的三维结构坐标在 W005/056782 的实施例 14 中测定并公开,并如上文所述适用于在三级结构水平上确定等价残基。

[0092] 在一些实施方案中,针对取代、插入或缺失鉴定的一些残基是保守残基,而其它的则不是。本发明的过水解酶突变体包括多种突变体,包括由包含信号序列的核酸编码的突变体。在一些实施方案中,由这样的序列编码的过水解酶突变体由表达宿主分泌。在一些另外的实施方案中,由这样的序列编码的过水解酶突变体由表达宿主在细胞质中产生。在一些其它实施方案中,核酸序列包含具有分泌信号的同源物。

[0093] 野生型和突变体蛋白质的表征通过任何合适的手段完成,并优选地基于目的特性的评估。例如,在本发明的一些实施方案中测定 pH 和 / 或温度,以及洗涤剂 and / 或氧化稳定性。事实上,预期可使用在一个或多个这些特征中(例如 pH、温度、蛋白酶解稳定性、洗涤剂稳定性和 / 或氧化稳定性)具有不同稳定性程度的酶。还在其它实施方案中,选择具有低过酸降解活性的过水解酶。还在另外的实施方案中,选择具有更高过酸形成的过水解酶。

[0094] 本文使用“表达载体”是指含有 DNA 序列的 DNA 构建体,所述 DNA 序列与能够影响该 DNA 在合适宿主中表达的合适控制序列有效连接。这类控制序列包括影响转录的启动子、控制这类转录的任选的操纵子序列、编码合适的 mRNA 核糖体结合位点的序列,和控制转录和翻译终止的序列。载体可以是质粒、噬菌体颗粒,或单纯是潜在的基因组插入物。一旦被转化进合适宿主,载体可以独立于宿主的基因组复制和发挥功能,或在一些情况下自身整合进基因组中。本文使用“质粒”、“表达质粒”和“载体”通常可互换使用,因为质粒是目前最常用的载体形式。然而,本发明旨在包括这类其它形式的表达载体,其发挥等价功能,并且是或者成为本领域已知的。

[0095] 在一些优选的实施方案中,过水解酶基因被连接进适宜的表达质粒中。然后使用被克隆的过水解酶基因转化或转染宿主细胞,从而表达该过水解酶基因。在一些实施方案中,该质粒在宿主中复制,在该种情形下其含有质粒复制必需的公知元件,而在其它实施方案中,质粒被设计为整合进宿主染色体中。为了有效的基因表达提供必需的元件(例如与目的基因有效连接的启动子)。在一些实施方案中,这些必需的元件如果被识别(即被宿主转录)则作为基因自身的同源启动子被提供,作为转录终止子(例如用于真核宿主细胞的多聚腺苷酸化区)被提供,所述转录终止子是外源的或由过水解酶基因的内源终止子区提供。在一些实施方案中,还提供了选择基因例如抗微生物剂抗性基因,通过在含抗微生物剂培养基上生长,所述基因使得能够连续培养维持被质粒感染的宿主细胞。

[0096] 在一些实施方案中,以下的盒诱变方法可用于简化本发明的过水解酶变体的构建,尽管其它方法也可用于本发明。

[0097] 首先,如本文所述,获得编码过水解酶的天然存在的基因,并对其整体或部分测序。然后就期望在被编码的过水解酶中制造一个或多个氨基酸突变(例如一个或多个缺失、插入和 / 或取代)的点扫描序列。针对限制性位点的存在评价该点侧翼的序列,所述限制性位点用于用寡核苷酸库替换基因的短区段,所述寡核苷酸库被表达时会编码多种突变体。这类限制性位点优选是蛋白质基因内特有的位点,从而便于替换基因区段。然而,在一些实施方案中,过水解酶基因中不是过度冗余的任何便利的限制性位点是适用的,只要通

过限制性消化产生的基因片段可以以适当的顺序重新装配即可。如果限制性位点并非存在于与所选点具有便利距离的位置上（例如距离 10 个到 15 个核苷酸），则可通过以下述方式取代基因中的核苷酸产生这类位点，所述方式中最终构建体中读码框或编码的氨基酸均未改变。在一些实施方案中，根据普遍已知的方法，通过 M13 引物延伸完成基因的突变，从而将其序列改变为与所需的序列一致。遗传密码子的冗余、基因的限制性酶图谱和大量不同的限制性酶使得下述任务成为常规，所述任务定位合适的侧翼区并评价所需的改变以达成两个便利的限制性位点序列。注意如果可获得便利的侧翼限制性位点，则上述方法需要仅在涉及不含有位点的侧翼区时被使用。

[0098] 一旦克隆了天然存在的 DNA 和 / 或合成的 DNA，用关联的限制性酶消化位置侧翼要被突变的限制性位点，并将大量末端 - 互补的寡核苷酸盒连接在基因中。通过该方法简化诱变，因为可以合成所有的寡核苷酸，使得其具有相同的限制性位点，并且不需要合成的接头来创建限制性位点。

[0099] 本文使用“对应于”是指蛋白质或肽中所列位置上的残基，或与蛋白质或肽中所列残基类似、同源或等价的残基。

[0100] 本文使用“相应的区域”一般是指沿着相关蛋白质或亲本蛋白质的类似位置。

[0101] 术语“编码..... 的核酸分子”、“编码..... 的核酸序列”、“编码..... 的 DNA 序列”和“编码..... 的 DNA”是指沿着脱氧核糖核酸链的脱氧核糖核苷酸的顺序或序列。这些脱氧核糖核苷酸的顺序确定了沿着多肽（蛋白质）链的氨基酸的顺序。DNA 序列因此编码氨基酸序列。

[0102] 本文使用术语“类似序列”是指蛋白质中提供与目的蛋白质（即通常为初始的目的蛋白质）相似的功能、三级结构和 / 或保守残基的序列。例如，在含有 α -螺旋或 β -折叠结构的表位区域中，类似序列中的替换氨基酸优选地维持相同的特异结构。该术语还表示核苷酸序列以及氨基酸序列。在一些实施方案中，开发类似序列使得替换氨基酸导致变体酶，所述变体酶显示相似或改进的功能。在一些优选的实施方案中，目的蛋白质中氨基酸的三级结构和 / 或保守的残基位于目的区段或片段中或其附近。因此，当目的区段或片段含有例如 α -螺旋或 β -折叠结构时，替换氨基酸优选地维持该特异结构。

[0103] 本文使用“同源蛋白质”是指与目的蛋白质（例如来自另一来源的过水解酶）具有相似功能和 / 或结构的蛋白质（例如过水解酶）。不旨在该同源物必须是进化上相关的。因此，该术语旨在包括得自不同物种的相同或相似的酶（即在结构和功能方面）。在一些优选的实施方案中，期望鉴定与目的蛋白质具有相似的四级、三级和 / 或一级结构的同源物，因为用来自同源物的类似区段替换目的蛋白质中的区段或片段会降低改变的破坏性。在一些实施方案中，同源蛋白质诱导与目的蛋白质类似的免疫应答。

[0104] 本文使用“同源基因”是指至少一对来自不同物种的基因，所述基因彼此对应并且彼此相同或非常相似。该术语包括通过物种形成（即新物种的发生）被分离的基因（例如直向同源基因），以及通过遗传重复被分离的基因（例如旁系同源基因）。这些基因编码“同源蛋白质”。

[0105] 本文使用“野生型”、“天然的”和“天然存在的”蛋白质是天然中存在的蛋白质。术语“野生型序列”和“野生型基因”在本文中可互换使用，表示在宿主细胞中是天然或天然存在的序列。在一些实施方案中，野生型序列是指下述目的序列，其为蛋白质工程项目的起

点。可根据本领域技术人员已知的一般方法获得编码天然存在的蛋白质的基因。该方法通常包括合成标记的探针（其具有编码目的蛋白质区域的推定序列）、从表达蛋白质的生物中制备基因组文库，和通过与探针杂交筛选目的基因的文库。然后对阳性杂交克隆作图和测序。

[0106] 本文使用术语“重组 DNA 分子”是指包含 DNA 区段的 DNA 分子，所述 DNA 区段借助于分子生物学技术结合在一起。

[0107] 术语“重组寡核苷酸”是指使用分子生物学操作创建的寡核苷酸，所述分子生物学操作包括但不限于，连接两条或更多通过限制性酶消化多核苷酸序列产生的寡核苷酸序列，合成寡核苷酸（例如合成引物或寡核苷酸）等等。

[0108] 可使用本领域已知的任何合适方法测定序列之间的同源性程度（见例如 Smith 和 Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2:482[1981]; Needleman 和 Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48:443[1970]; Pearson 和 Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444[1988]; 程序如威斯康辛遗传学软件包 (WisconsinGenetics Software Package) 中的 GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA (Genetics Computer Group, Madison, WI); 和 Devereux 等人, *Nucl. Acid Res.*, 12:387-395[1984])。

[0109] 例如，PILEUP 是测定序列同源性水平的有用程序。PILEUP 使用递进的、配对的比对从一组相关序列中创建多重序列比对。其也可以绘制树状图，显示用于创建比对的聚类关系。PILEUP 使用 Feng 和 Doolittle (Feng 和 Doolittle, *J. Mol. Evol.*, 35:351-360[1987]) 的递进比对方法的简化版。该方法与 Higgins 和 Sharp (Higgins 和 Sharp, *CABIOS* 5:151-153[1989]) 所述方法相似。有用的 PILEUP 参数包括 3.00 的默认空位权重、0.10 的默认空位长度权重，和加权的末端空位。有用的算法的另一个实例是 BLAST 算法，其由 Altschul 等人 (Altschul 等人, *J. Mol. Biol.*, 215:403-410, [1990]; 和 Karlin 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787[1993]) 描述。一个尤其有用的 BLAST 程序是 WU-BLAST-2 程序（见 Altschul 等人, *Meth. Enzymol.*, 266:460-480[1996]）。参数“W”、“T”和“X”确定了比对的灵敏度和速度。BLAST 算法使用下述默认值：11 的字长 (W)、BLOSUM62 评分矩阵（见 Henikoff 和 Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915[1989]）、50 的比对 (B)、10 的期望 (E)、M' 5、N' -4 和比较两条链。

[0110] 本文使用的“百分比 (%) 核酸序列同一性”被定义为候选序列中与序列核苷酸残基相同的核苷酸残基的百分比。

[0111] 本文使用术语“杂交”是指下述过程，如本领域所已知的，核酸链通过所述过程经由碱基配对与互补链结合。

[0112] 本文使用短语“杂交条件”是指进行杂交反应的条件。这些条件通常通过在测量杂交的条件“严格性”程度来分类。严格性程度例如可基于核酸结合复合物或探针的退火温度 (T_m)。例如，“最大严格性”通常在约 $T_m - 5^\circ\text{C}$ （低于探针 $T_m - 5^\circ\text{C}$ ）发生；“高严格性”在约低于 $T_m - 10^\circ\text{C}$ ；“中严格性”在约低于探针 $T_m - 10 - 20^\circ\text{C}$ ；“低严格性”在约低于 $T_m - 20 - 25^\circ\text{C}$ 。可选地，或另外地，杂交条件可基于杂交和 / 或一次或多次严格性洗涤的盐或离子强度条件。例如， $6\times\text{SSC}$ = 非常低严格性； $3\times\text{SSC}$ = 低到中严格性； $1\times\text{SSC}$ = 中严格性；且 $0.5\times\text{SSC}$ = 高严格性。功能上地，最大严格性条件可用于鉴定与杂交探针具有严格同一性或接近严格同一性的核酸序列，而高严格性条件用于鉴定与探针具有约 80% 或更多序列

同一性的核酸序列。

[0113] 为了需要高选择性的应用,可期望使用相对严格的条件形成杂交体(例如使用相对低盐和/或高温的条件)。

[0114] 在至少两条核酸或多肽的语境中,短语“基本相似”和“基本同一”通常表示多核苷酸或多肽包含与参考(例如野生型)序列相比具有至少约 40%同一性,更优选至少约 50%同一性,还更优选至少约 60%同一性,优选至少约 75%同一性,更优选至少约 80%同一性,还更优选至少约 90%同一性,仍然更优选约 95%同一性,最优选约 97%同一性,有时多达约 98%和约 99%序列同一性的序列。序列同一性使用已知的程序测定,所述程序如使标准参数的 BLAST、ALIGN 和 CLUSTAL(见例如 Altschul, 等人, J. Mol. Biol. 215 : 403-410[1990];Henikoff 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA89 :10915[1989];Karin 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :5873[1993];和 Higgins 等人, Gene 73 :237-244[1988])。公众可通过国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)获得用于进行 BLAST 分析的软件。还可使用 FASTA(Pearson 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA85 :2444-2448[1988]) 搜索数据库。两条多肽基本同一的一个指征是第一条多肽与第二条多肽是免疫交叉反应性的。通常,由于保守氨基酸取代而有差异的多肽是免疫交叉反应性的。因此,例如当两条肽差异仅为保守取代时,多肽与第二条多肽基本同一。两条核酸序列基本同一的另一指征是两种分子在严格条件(例如在中到高严格性范围内)下彼此杂交。

[0115] 本文使用术语“杂交体过水解酶”和“融合过水解酶”是指从至少两种不同或“亲本”蛋白质改造的蛋白质。在优选的实施方案中,这些亲本蛋白质彼此是同源物。例如在一些实施方案中,优选的杂交体过水解酶或融合蛋白含有蛋白质的 N-端和该蛋白质同源物的 C-端。在一些实施方案中,将两个末端组合,对应于全长活性蛋白质。

[0116] 本文使用术语“调节元件”是指控制核酸序列表达的一些方面的遗传元件。例如,启动子是促进有效连接的编码区的转录起始的调节元件。另外的调节元件包括剪接信号、多聚腺苷酸化信号和终止信号。

[0117] 本文使用“宿主细胞”通常是用载体转化或转染的原核或真核宿主,所述载体使用本领域已知的重组 DNA 技术构建。转化的宿主细胞能够复制编码蛋白质变体的载体或表达期望的蛋白质变体。在编码蛋白质变体的前形式或前原形式的载体的情况下,这类变体被表达时通常从宿主细胞中被分泌至宿主细胞培养基中。

[0118] 在将核酸序列插入细胞中的语境中,术语“引入的”是指例如转化、转导和转染的方法。转化的手段包括原生质体转化、氯化钙沉淀、电穿孔、裸 DNA 等,如本领域所已知的(见 Chang 和 Cohen, Mol. Gen. Genet., 168 :111-115[1979];Smith 等人, Appl. Env. Microbiol., 51 :634[1986];和Ferrari 等人,在Harwood, Bacillus 中, Plenum Publishing Corp., 第 57-72 页 [1989] 的综述文章)。

[0119] 本文使用术语“启动子/增强子”表示下述 DNA 区段,其含有能够提供启动子和增强子两种功能的序列(例如反转录病毒的长末端重复含有启动子和增强子两种功能)。增强子/启动子可以是“内源的”或“外源的”或“异源的”。内源增强子/启动子是基因组中给定基因天然连接的增强子/启动子。外源(异源)增强子/启动子是借助于遗传操作(即分子生物学技术)被置于与基因并列的增强子/启动子。

[0120] 表达载体上“剪接信号”的存在常导致重组转录本更高水平的表达。剪接信号介导从初级 RNA 转录本上去除内含子,并由剪接供体和受体位点组成(见例如 Sambrook 等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York [1989], 第 16.7-16.8 页)。常用的剪接供体和受体位点是来自 SV40 的 16S RNA 的剪接点。

[0121] 术语“稳定转染”或“稳定转染的”是指外来 DNA 进入被转染细胞基因组中的引入和整合。术语“稳定转染子”是指被转染细胞基因组 DNA 中稳定整合了外来或外源 DNA 的细胞。

[0122] 本文使用术语“可选择标记物”或“可选择基因产物”是指编码下述酶活性的基因的使用,所述酶活性赋予表达可选择标记物的细胞对抗生素或药物的抗性。

[0123] 发明详述

[0124] 本发明提供了用于清洁和其它应用的方法和组合物,其包含至少一种过水解酶。在一些实施方案中,本发明提供了用于产生长链过酸的方法和组合物。本发明的某些实施方案在涉及清洁、漂白和消毒的应用中尤其有用。

[0125] 在一些实施方案中,本发明提供了过水解酶,其适用于从酯底物和过氧化氢酶促产生长链过酸。主题过水解酶产生的过酸取决于被主题过水解酶过水解的酯底物。在一些实施方案中,主题过水解酶产生的过酸包括但不限于过己酸、过辛酸、过壬酸、过癸酸、过十二烷酸、过肉豆蔻酸、过棕榈酸、过硬脂酸或过油酸。在另外的实施方案中,多种底物适用于本发明。

[0126] 在一些实施方案中,如下文所更详细描述,长链酯底物为 C_6 到 C_{10} 底物或 C_{11+} 底物(例如 C_{11} - C_{22} 底物),取决于期望的过酸。如下文所更详细描述,多种不同的长链酯底物适用于本发明。在一些尤其优选的实施方案中,酯底物选自以下一种或多种:己酸酯、辛酸酯、壬酸酯、癸酸酯、十二烷酸酯、肉豆蔻酸酯、棕榈酸酯、硬脂酸酯和油酸酯,或其任何饱和或取代的形式。在另外的实施方案中,多种酯适用于本发明。

[0127] 本发明的过水解酶和过酸适用于在广泛的 pH 和温度范围下清洁、漂白和 / 或消毒。在一些实施方案中,这一代中使用的 pH 范围是约 4 到约 12。在一些可选的实施方案中,使用的温度范围在约 5°C 和约 90°C 之间。事实上,本发明的一些实施方案提供了超过目前使用的体系(见例如 EP Appln. 87-304933.9)的优点,因为使用本发明,可能在过酸氧化的最适 pH 下进行漂白,以及在中性 pH、酸性 pH 和低温下提供漂白。长链过酸是低气味或无气味的。同样,本发明过水解酶的使用提供了超过其它体系(例如局限于生产更短链过酸的其它过水解酶,所述更短链过酸具有显著的气味)的某些优点。

[0128] 尽管在本文中大部分完全涉及洗衣和织物护理描述本发明,但是不旨在将本发明限制于这些应用。事实上,本发明适用于多种情况,尤其是其中期望通过过酸和 / 或过氧化氢漂白的情况,包括但不限于洗衣、盘碟清洗、织物处理、纸浆和纸张加工、个人护理应用、硬表面的消毒和清洁。例如,预期本发明的组合物会适用于漂白纸浆,包括在如美国专利 Nos. 6,569,286、5,785,812、6,165,318 和 4,400,237 中公开的方法中使用,所述专利均通过参考并入本文。

[0129] 历史上过硼酸钠和更近期的过碳酸钠均被用作漂白化合物,尤其是在欧洲的洗衣洗涤剂中。这些化合物趋向于在水溶液中快速分解,产生过氧化氢 (H_2O_2),所述过氧化氢是

活性漂白种类。因为过硼酸钠在高于 80℃ 的温度下更有活性,在 40-60℃ (即如在 50 年代已成为最普遍优选的洗涤温度) 的温度范围内活性较低,所以向含有过硼酸钠的洗衣洗涤剂中掺入漂白活化剂。事实上,大部分洗衣洗涤剂含有漂白活化剂。这些活化剂是具有 O- 或 N- 结合的乙酰基的化合物,其能够与强亲核过氧氢阴离子反应,产生过氧乙酸。因为反应种类是过氧氢阴离子,所以碱性 pH 对于将这些活化剂有效转化为过酸是必需的。过氧乙酸在弱碱性介质中分解,形成单线态氧 (见例如 Hofmann 等人, J. Prakt. Chem., 334 : 293-297 [1992])。

[0130] 过氧化氢是在高温 (例如 > 40℃) 和 pH (> 10) 下尤其有效的漂白剂,所述条件在一些情况下通常用于洗涤织物。然而,如上文所示,冷水洗涤开始更普遍地被使用,并导致比使用热水时更不有效的 H₂O₂ 漂白。为了克服该低温缺点,洗涤剂制剂通常包含漂白助促进剂如 TAED (N, N, N' N' - 四乙酰基乙二胺)、NOBS (壬酰氧基苯磺酸盐 (nonanoyloxybenzenesulfonate)) 等。当 NOBS 与 H₂O₂ 组合形成过壬酸时,TAED 与 H₂O₂ 组合形成过乙酸,其为比单独的 H₂O₂ 更有效的过酸种类。尽管其有助于洗涤剂的漂白能力,但是 TAED 反应仅约 50% 有效,因为 TAED 中四个乙酰基中只有两个被转化为过酸。另外,TAED 被过氧化氢转化为过乙酸仅在碱性 pH 和高温下是有效的。因此,TAED 反应未被优化为在所有漂白应用 (例如涉及中性或酸性 pH 和冷水的应用) 中使用。本发明提供了克服 TAED 使用的缺点的手段。例如,本发明的一些尤其优选的实施方案适用于冷水应用,以及涉及中性或酸性 pH 水平的应用。另外,本发明另外的尤其优选的实施方案提供了从过氧化氢产生过酸的手段,具有高的过水解与水解的比例。这类手段提供了超过下述组合物的优点,所述组合物含有具有非常低的过水解与水解比例的酶,如酯酶和脂肪酶。

[0131] 除了在洗涤剂中的应用外,本发明的一些优选的实施方案提供了用于在纺织品漂白和多种其它应用中使用过酸的方法和组合物。在一些实施方案中,本发明提供了用于纺织品加工应用的一步骤方法,包括但不限于一步骤脱浆 (desizing)、擦洗 (scouring) 和漂白过程 (见例如 WO 03/002810、EP 1255888、WO 01/64993 和 US 2002/0007516,其均通过参考并入本文)。如在本文中更详细描述,在一些实施方案中,漂白涉及在将纺织品材料染色之前和 / 或将其掺入纺织品商品 (goods) 之后加工纺织品材料。然而,不旨在将本发明限制于任何特定的使用方案或任何特定的纺织品材料。

[0132] 另外,许多过酸适合用作有效的杀菌剂 (见 Baldry, J. Appl. Bacteriol., 54 : 417-423 [1983])。因此,本发明的某些实施方案提供了用于灭菌 / 消毒多种对象的组合物和方法,所述对象包括但不限于医疗设备、医疗装置、工业装置和发酵罐,以及需要被灭菌和 / 或消毒的任何对象。在另外的实施方案中,本发明提供了适用于生物膜控制 (例如在冷却塔中) 的组合物和方法。

[0133] 如在下文实施例中还更详细描述,本发明提供了用于清洁和 / 或灭菌大范围对象的许多优点。在另外的实施方案中,本发明提供了在洗涤温度和 pH 范围内有效清洁、漂白和消毒的组合物。还在其它实施方案中,本发明适用于通过过水解酶过酸降解活性降解过酸。在一些优选的实施方案中,该活性被用于过酸废物净化应用中。

[0134] 另外,本发明的某些过水解酶对多种酰基供体底物是有活性的,并且在低底物浓度下是有活性的,并且提供了由于高过酸 : 酸比例而有效过水解的手段。事实上,已经认识到更高的过水解与水解的比例对于漂白应用是优选的 (见例如美国专利 No. 5, 352, 594、

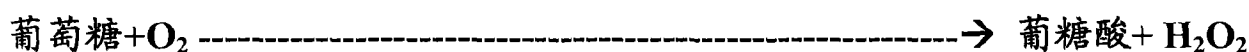
5, 108, 457、5, 030, 240、3974, 082 和 5, 296, 616, 其均通过参考并入本文)。本发明的某些过水解酶提供了大于 1 的过水解与水解的比例。在特定的实施方案中,过水解酶提供了大于 1 的过水解与水解的比例,并且适用于漂白。

[0135] 另外,本发明的过水解酶已显示在常用的洗涤剂制剂(例如 ArielFutur、WOB 等)中是有活性的。因此,主题过水解酶在多种清洁情况下提供了许多优点。

[0136] 如上所述,通过酶促过水解生产过酸的特定组分为酶、酯底物和过氧化氢。在一些实施方案中,过氧化氢直接分批添加,而在其它实施方案中,其持续原位产生。目前的清洗粉末以过碳酸盐或过硼酸盐的形式使用 H_2O_2 的分批添加,所述盐自发分解为 H_2O_2 。本发明的过水解酶也适用于与 H_2O_2 来源相同的清洗粉末分批方法中。然而,这些酶也适合与任何其它合适的 H_2O_2 来源一起使用,包括通过化学、电化学和 / 或酶促手段产生的 H_2O_2 。化学来源的实例包括但不限于上述过碳酸和过硼酸。电化学来源的非限制性例子是充氧和氢气的燃料电池,而酶促实例的非限制性实例包括由葡萄糖和氧与葡糖氧化酶的反应产生 H_2O_2 。以下的方程提供了适用于与本发明一起使用的偶联体系的实例。

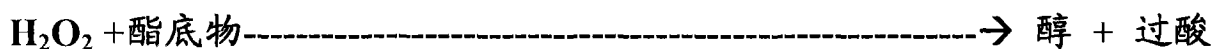
[0137]

葡糖氧化酶



+

过水解酶



[0138] 不旨在将本发明的任何实施方案限制于任何具体的酶,因为与合适的底物产生 H_2O_2 的任何酶均适用于本发明。例如,来自乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 物种的乳酸氧化酶适用于本发明,已知所述酶从乳酸和氧产生 H_2O_2 。事实上,本发明的某些方法的一个优点是酸(例如在上述实例中为葡糖酸)的产生将碱性溶液的 pH 降低至下述 pH 范围,过酸在所述 pH 范围中(即接近 pKa)在漂白中最有效。能够产生过氧化氢的其它酶(例如醇氧化酶、乙二醇氧化酶、甘油氧化酶、氨基酸氧化酶等)也适合与本发明的过水解酶组合与酯底物一起用于产生过酸。

[0139] 如本文中更详细描述,本发明提供了用于清洁和其它应用的包含至少一种过水解酶的方法和组合物。在一些实施方案中,本发明提供了用于产生长链过酸的方法和组合物。本发明的一些优选的实施方案尤其适用于涉及清洁、漂白和消毒的应用。

[0140] 本发明提供了包含过水解酶的组合物及其使用方法,所述过水解酶将长链酰基酯底物过水解,产生长链过酸。在一些实施方案中,本发明尤其适用于包括清洁、漂白和 / 或消毒的应用。

[0141] 如上所述,本申请要求专利申请 W005/056782 的优先权。W005/056782 的完整公开内容通过参考并入本文用于所有的目的,所述公开内容包括但不限于对过水解酶、氨基酸变更、晶体结构、测定方法、使用方法、序列、同源物、直向同源物、序列比对、图、表、清洁组合物等的所有描述。还应注意,在一些尤其优选的实施方案中,本文提供的酶水解以及过水解长链酰基酯底物。

[0142] 过水解酶

[0143] 如上所述,本发明提供了过水解长链酰基酯底物的过水解酶。在一些优选的实施方案中,存在长链酰基酯底物和过氧化氢时,酶产生长链和中链过酸。在一些实施方案中,过水解酶相对于天然存在的过水解酶(例如天然存在的耻垢分枝杆菌(SEQ ID NO:2)过水解酶)具有变更的底物特异性,因为主题过水解酶能够以比对短链酯底物水解速率更高的速率过水解长链乙酯底物。在一些特定的实施方案中,过水解酶能够以下述速率过水解长链酯底物,所述速率比对小链酯底物的过水解速率高至少大约 10%,至少大约 50%,至少大约 100%,至少大约 200%,至少大约 500%或至少大约 10,000%。在一些实施方案中,主题过水解酶的长链酯过水解速率:短链酯水解速率比值是至少约 1,至少约 2,至少约 3,至少约 10,至少约 100 或至少约 10,000,其中短链酯底物包括过乙酸酯和过丁酸酯,长链酯底物包括过辛酸酯。

[0144] 主题过水解酶中的多个氨基酸在本文中根据它们在酶的一级氨基酸序列中的位置命名(例如“主题过水解酶可在 12 位上含有 Gly”)。如上所述,并如本领域技术人员显而易见的,主题过水解酶的氨基酸位置相对于 SEQ ID NO:2 的过水解酶(即野生型耻垢分枝杆菌的过水解酶)的相应位置定义。在优选的实施方案中,相应的氨基酸位置通过结构分析和/或通过将主题过水解酶的一级氨基酸序列与 SEQ ID NO:2 比对鉴定。比对相关酶一级氨基酸序列的方法是公知的(见例如 Upton 和 Buckley, Trends Biochem. Sci., 20: 178[1995])。另外,WO05/056782 中提供了非限制性的比对。

[0145] 在一些优选的实施方案中,本发明的过水解酶具有下述氨基酸序列,其与亲本酶(例如由微生物编码的野生型酶,但是不旨在将本发明限制于野生型酶的变体,因为经改造的酶可用作亲本酶)的氨基酸序列至少约 35% 同一。在一些实施方案中,本发明的过水解酶与微生物基因组编码的野生型酶相关,但不相同。在一些尤其优选的实施方案中,本发明的过水解酶具有下述氨基酸序列,所述氨基酸序列与亲本酶(例如耻垢分枝杆菌的野生型过水解酶,或 WO 05/05678 中所示的过水解酶的变体,或如 WO05/05678 中所示的细菌基因组编码的、天然存在的酰基转移酶相关酶)氨基酸序列至少约 35%,至少约 40%,至少约 45%,至少约 50%,至少约 55%,至少约 60%,至少约 65%,至少约 70%,至少约 75%,至少约 80%,至少约 85%,至少约 90%,至少约 95%,至少约 97%,至少约 98%,或至少约 99%。

[0146] 在一些优选的实施方案中,本发明过水解酶的氨基酸序列与亲本酶差异在于小量的氨基酸残基。差异氨基酸残基的数量可以是约 1 个,约 2 个,约 3 个,约 4 个,约 5 个,至少约 10 个,至少约 15 个,至少约 20 个,至少约 30 个,至少约 40 个,至少约 50 个,或更多个氨基酸残基。在一些实施方案中,变体之间差异氨基酸的数量在约 1 个到约 10 个之间。

[0147] 在一些实施方案中,本发明的过水解酶包含以下氨基酸的任何一个或组合:位置 12 上的 Gly、Pro 或 Gln,位置 22 上的 Trp,位置 59 上的 Pro,位置 153 上的 Pro,位置 154 上的 Thr、Ser、Val 或 Gln,位置 194 上的 Gly,位置 196 上的 Ser、Gln、Val、Gly、Pro、Ile 或 His 和/或位置 204 上的 Tyr 或 Trp。在一些尤其优选的实施方案中,本发明的过水解酶包含:a) 位置 154 上的 Ala 和位置 194 上的 Met, b) 位置 154 上的 Gly 和位置 194 上的 Val, 或:c) 位置 12 上的 Gly 和位置 194 上的 Met, d) 位置 154 上的 Thr 和位置 196 上的 Ile, e) 位置 12 上的 Gln 和位置 154 上的 Val, f) 位置 12 上的 Met 和位置 154 上的 Glu, g) 位置 12 上的 Gly 和位置 154 上的 Gly, h) 位置 154 上的 Glu 和位置 194 上的 Ser, 或 i) 位置

12 上的 Gly 和位置 22 上的 Trp,或其任意组合。

[0148] 尽管不旨在将本发明限制于任何特定的机制,但是这些氨基酸的存在提供了能够水解长链酰基酯产生长链过酸的过水解酶。在一些实施方案中,用上述氨基酸之一取代野生型过水解酶的氨基酸产生与野生型过水解酶相比具有变更的底物特异性的过水解酶。

[0149] 在一些实施方案中,过水解酶过水解长链酰基酯底物,而不含有一个或多个上述氨基酸取代的等价过水解酶并不可检测地过水解相同的底物。在一些其它实施方案中,本发明的过水解酶对长链酰基酯底物具有比短链酰基酯底物更大的特异性。

[0150] 如 WO 05/05678 中所述,详细研究了若干种过水解酶的结构/功能关系,所述酶包括天然存在的耻垢分枝杆菌过水解酶及其数百个活性变体和来自其它物种的同源酶。事实上,预期可对过水解酶进行大范围的氨基酸取代而不消除其活性。另外,可以将上述特异氨基酸取代进任何过水解酶中,产生能够产生长链过酸的过水解酶。

[0151] WO 05/056782 中提供了天然存在的耻垢分枝杆菌过水解酶的氨基酸坐标及其晶体结构的讨论。另外如 WO 05/056782 中所报道的,已对耻垢分枝杆菌过水解酶进行饱和诱变,从而系统地测试酶中每个氨基酸位置上氨基酸取代的作用。在这些实验中,将耻垢分枝杆菌过水解酶的每个氨基酸用其余 19 个氨基酸的每个来取代,并系统地针对多种活性测试每个变体,所述活性包括其水解活性、其过水解 (“PAF”) 活性、过酸降解 (“PAD”) 活性、pH 稳定性、热稳定性、化学稳定性等。WO 05/056782 中显示了数百个氨基酸取代的列表,所述氨基酸取代是某些实施方案所容许并且在某些实施方案中可用于变更耻垢分枝杆菌过水解酶的水解活性、过水解活性、过酸降解活性或稳定性。

[0152] 在本发明的一些实施方案中,赋予过水解长链酯底物的能力的任何氨基酸变更与 WO 05/056782 中所述的任何氨基酸变更组合,产生本文所述蛋白质的变体。在一些实施方案中,氨基酸变更被组合,以产生了过酸水解率提高或降低、和/或过水解/水解比例提高或降低的变体。

[0153] 在一些优选的实施方案中,将提供长链过酸的一个或多个氨基酸变更与提供具有更高的过水解与水解比例(例如大于 1.0 的比例)和更低的过酸水解率(例如与 SEQ ID NO:2 相比少于 0.8 的过酸水解率)的过水解酶的变更组合,以提供有效生产长链过酸的过水解酶。

[0154] 在一些实施方案中,并且没有任何意图将本发明的任何方面限制于任何特定的序列,本发明的过水解酶包含:a) 提供一条或多条上述长链过酸的变更,和 b) 一个或多个变更,其提供与野生型耻垢分枝杆菌过水解酶相比约 0.8 或更少的过酸水解率。在一些这样的实施方案中,提供约 0.8 或更少的过酸水解率的一个或多个变更包含至少一个选自以下的取代:

[0155] A122, A23, A29, A55, D45, D62, D65, E26, E50, F150, F46, G110, G124, G43, L109, L119, L42, L68, L78, L82, L84, N59, P66, R101, R27, R4, R67, S112, S54, S76, T116, T120, T25, V125, V48, W149, Y73, A44, A79, D85, E51, G124, G126, G15, G52, I194, K97, L119, L12, L38, L53, L68, L86, N94, P18, R101, R27, R4, R67, S54, S72, T58, T80, V118, V87, W34, R4, I5, D10, L12, W14, V19, T25, W34, I49, E50, E51, L53, S54, A55, R56, N59, D62, T64, D65, R67, L68, N69, S76, C77, T80, L82, P83, L86, V87, N94, T96, F100, R101, L109, M111, L114, L119, W149, Y1d29, A122, G126, T127, A23, A55, A79, D65, D85, E26, F154, G110, G124, G126, G22,

G36, G43, G52, G70, I49, K97, L109, L114, L119, L12, L38, L42, L53, L68, L86, P104, P83, Q41, R102, R56, R67, S54, T57, V118, V125, W14, W149, Y129, Y73, A122, A23, A79, D45, D65, D85, E26, E47, E51, F150, F196, F28, G110, G124, G36, G43, G52, G70, I107, I5, I60, L109, L119, L53, L6, L68, L82, M111, P104, P66, R102, R67, S11, S112, S121, S54, S72, T25, T35, T57, T58, V118, V125, V19, W149, W16, A108, A122, A23, A29, A79, C7, D106, D21, D45, D62, D65, D85, E50, F150, F28, G124, G126, G22, G36, G52, I107, I194, K97, L105, L109, L114, L119, L38, L68, L78, L82, L84, M111, N69, N94, P104, P63, P66, R102, R27, S11, S112, S54, S72, T116, T120, T127, T13, T25, T57, T80, T96, V113, A122, A29, A71, A79, C7, D106, D21, D61, D65, D85, E47, E50, F150, F196, F28, F46, G124, G126, G15, G36, G70, I49, I5, I60, L105, L109, L12, L38, L42, L53, L84, L86, M111, N59, P146, P24, P66, Q41, R102, R27, R56, S112, S121, S54, S72, T116, T120, T127, T128, T13, T57, T64, V125, V17, V19, W14, W149, W16, Y129, Y99, A108, A122, A23, A29, A44, A55, A71, A79, C77, D45, D61, D65, D85, D95, E47, E51, F150, F196, F46, G110, G126, G36, G43, G52, I107, I194, I49, I5, I60, I89, L114, L42, L53, L68, L78, L84, M111, N59, N94, P146, P24, P30, P63, P66, P83, Q117, R101, R4, S112, S121, S72, T116, T120, T127, T13, T57, T96, V113, V125, V17, V19, V32, V87, W149, Y129, Y73, G190, V191, G193, T197, N201, D203, L208, A209, V212, L215, 和 L216。

[0156] 在一些实施方案中,一个或多个变更提供约 0.1 或更少的过酸水解率,所述变更是至少一个选自以下的取代:R4、L12、G15、P18、R27、W34L38、A44、E51、G52、L53、S54、T58、R67、L68、S72、A79、T80、D85、L86、V87、N94、K97、R101、V118、L119、G124、G126 和 I194。

[0157] 在其它实施方案中,并再次没有任何意图将本发明的任何方面限制于任何特定的序列,本发明的过水解酶包含:a) 提供一条或多条上述长链过酸的变更,和 b) 一个或多个变更,其提供过水解的改变,使得变体过水解酶过水解与野生型过水解酶过水解的比例为至少约 1.2。在一些这样的实施方案中,提供一个或多个变更(其提供过水解改变,使得变体过水解酶过水解与野生型过水解酶过水解的比例为至少约 1.2)的一个或多个变更选自 C7, D10, L12, G15, P18, V19, G22, T25, E26, R27, F28, A29, P30, D31, G36, Q40, Q41, L42, G43, A44, D45, F46, E47, I49, E51, L53, S54, A55, T57, D61, P63, T64, D65, P66, R67, L68, N69, A71, S72, Y73, S76, L78, A79, T80, L82, P83, D85, L86, D95, K97, R101, T103, P104, L105, D106, I107, L109, M111, V113, Q117, V118, S121, G124, V125, G126, T127, P148, F150, I153, F154, 和 F196。

[0158] 在一些优选的实施方案中,一个或多个变更提供过水解改变,使得变体过水解酶过水解与野生型过水解酶过水解的比例为至少约 2,所述变更选自 A44、C7、D10、D85、D95、E26、E47、I107、L12、L42、P104、P148、S54、Q40、Q117、D203、V206、E210、K97、L12、P104、V125、D85、L53 和 L78。

[0159] 在一些可选的优选的实施方案中,并再次没有任何意图将本发明的任何方面限制于任何特定的序列,本发明的过水解酶包含一个或多个提供上述长链的变更,以及提供下述过水解酶的氨基酸取代,所述过水解酶显示与野生型过水解酶相比至少约 1.2 的过水解活性比例,和约 0.8 或更少的过酸水解活性比例。在一些这样的实施方案中,取代选自 A29、A44、A55、A71、A79、C7、D10、D106、D31、D85、E26、E47、F150、F154、F196、F28、G124、G126、G36、G43、I153、L109、L42、L53、L109、L42、L53、L109、L42、L53、L68、L82、L86、M111、N69、

P104、P148、P18、P63、P66、P83、Q117、Q40、R101、R67、S54、S121、S72、S76、T25、T64、V115 和 V19。在一些优选的实施方案中,使用以下的氨基酸取代:L12I 和 S54V;L12M 和 S54T;L12T 和 S54V;L12Q、T25S 和 S54V;L53H 和 S54V;S54P 和 V125R;S54V 和 V125G;S54V 和 F196G;S54V、K97R 和 V125G;以及 A55G、R67T、K97R 和 V125G,如 WO 05/056782 中所述。

[0160] 主题过水解酶活性必需的氨基酸描述于 WO 05/056782 中,如过水解酶中适合变更而不消除其活性的氨基酸。WO 05/056782 还描述了来自除耻垢分枝杆菌以外的物种的若干过水解酶,以及在该过水解酶家族中保守的结构域,包括但不限于发根土壤杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) (Q9KWA6)、发根土壤杆菌 (*A. rhizogenes*) (Q9KWB1)、根癌农杆菌 (*A. tumefaciens*) (Q8UFG4)、根癌农杆菌 (Q8UAC0)、根癌农杆菌 (Q9ZIO9)、根癌农杆菌 (ACA)、*Prosth eobacter dejongei* (RVM04532)、百脉根根瘤菌 (*Rhizobium loti*) (Q98MY5)、苜蓿根瘤菌 (*R. meliloti*) (Q92XZ1)、苜蓿根瘤菌 (Q9EV56)、毛根根瘤菌 (*R. rhizogenes*) (NF006)、毛根根瘤菌 (NF00602875)、*R. solanacearum* (Q8XQIO)、苜蓿中华根瘤菌 (*Sinorhizobium meliloti*) (RSM02162)、苜蓿中华根瘤菌 (RSM05666)、百脉根中慢生根瘤菌 (*Mesorhizobium loti*) (RML000301)、发根土壤杆菌 (Q9KWA6)、发根土壤杆菌 (Q9KWB1)、根癌农杆菌 (AAD02335)、百脉根中慢生根瘤菌 (Q98MY5)、百脉根中慢生根瘤菌 (ZP00197751)、茄科雷尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*) (Q8XQIO)、富养产碱菌 (*Ralstonia eutropha*) (ZP00166901)、牛莫拉菌 (*Moraxella bovis*) (AAK53448)、洋葱伯克氏菌 (*Burkholderia cepacia*) (ZP00216984)、紫色色杆菌 (*Chromobacterium violaceum*) (Q7NRP5)、小小梨形菌属物种 (*Pirellula sp.*) (NP_865746)、创伤弧菌 (*Vibrio vulnificus*) (AA007232)、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) (AAC38796)、苜蓿中华根瘤菌 (SMA1993)、苜蓿中华根瘤菌 (Q92XZ1) 和苜蓿中华根瘤菌 (Q9EV56)。这些蛋白质的氨基酸序列、序列比对和涉及上文的所有其它信息从 WO 05/056782 中通过参考并入本文用于所有的目的。

[0161] 在一些尤其优选的实施方案中,过水解酶是 GDSL-GRTT/ARTT 或 SGNH 水解酶,如 WO 05/056782 中所述。在一些实施方案中,该酶包含至少一个以下的保守残基或其组合:L6、W14、W34、L38、R56、D62、L74、L78、H81、P83、M90、K97、G110、L114、L135、F180 和 G205。

[0162] 如 WO 05/056782 中所述,多种方法适用于测定过水解酶的活性。然而,不旨在将本发明限制于任何特定的测定方法。

[0163] 用于确定过水解酶是否能够使用长链乙基底物的合适的报告子底物包括,但不限于至少含有 C₆ 碳链的对硝基苯基酯(例如对硝基苯基己酸酯、对硝基苯基辛酸酯、对硝基苯基壬酸酯、对硝基苯基癸酸酯、对硝基苯基十二烷酸酯、对硝基苯基肉豆蔻酸酯、对硝基苯基棕榈酸酯、对硝基苯基硬脂酸酯和对硝基苯基油酸酯)。适用的其它长链酯底物包括,但不限于:己酸酯、庚酸酯、辛酸酯、壬酸酯和更高级羧酸如 C10 到 C18 或更高的酯。

[0164] 过水解酶生产

[0165] 野生型耻垢分枝杆菌过水解酶在其天然宿主中是细胞内蛋白质。在一些实施方案中,本发明的过水解酶在非天然的宿主中细胞内生产。在一些实施方案中,对过水解酶添加信号序列,所述信号序列通过分泌进入周质(即在革兰氏阴性生物如大肠杆菌中)或进入细胞外空间(即在革兰氏阳性生物如芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 和放线菌属 (*Actinomyces*) 中)或真菌宿主(例如木霉属 (*Trichoderma*)、曲霉属 (*Aspergillus*)、酵母

属 (*Saccharomyces*) 和毕赤酵母属 (*Pichia*) 而帮助过水解酶的表达。不旨在将本发明限制于这些具体的宿主, 因为多种其它生物, 包括其它原核生物和真核生物适合用作本发明中的表达宿主。

[0166] 多种可商业获得的表达体系, 包括但不限于 pBAD、plac、T7, 适用于过水解酶在革兰氏阴性宿主 (例如大肠杆菌) 中的表达。在一些实施方案中, 相同类型的启动子适用于另一革兰氏阴性宿主柠檬泛菌 (*Pantoea citrea*)。

[0167] 芽孢杆菌属物种是公知的用于表达细胞外蛋白质 (例如蛋白酶) 的合适宿主。蛋白质的细胞内表达较不公开。在一些实施方案中, 在基因 5' 末端无信号序列时, 使用下述任何多种启动子完成过水解酶蛋白质在枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 中的细胞内表达, 所述启动子包括但不限于 pVeg、pSPAC、pAprE 或 pAmyE。在一些实施方案中, 从复制质粒 (高或低拷贝数) 达成表达, 而在可选的实施方案中, 通过将想要的构建体整合进染色体中达成表达。整合可在任何基因座上完成, 包括但不限于 aprE、amyE 或 pps 基因座。在一些实施方案中, 过水解酶由被整合的构建体的一个或多个拷贝表达。在可选的实施方案中, 通过整合能够扩增的构建体 (例如与抗微生物剂盒连接, 且侧翼是直接重复的序列) 获得多重整合的拷贝, 或通过将多拷贝连接并随后整合进染色体中获得多重整合的拷贝。在一些实施方案中, 使用 pNB 活性测定 (本文所述) 在适宜的培养物中监测用复制质粒或整合构建体对过水解酶的表达。

[0168] 如使用芽孢杆菌时一样, 在一些实施方案中, 使用复制质粒完成过水解酶在链霉菌属 (*Streptomyces*) 中的表达, 而在其它实施方案中, 通过将载体整合进链霉菌属基因组中完成过水解酶的表达。能够在链霉菌属中被识别的任何启动子适用于驱动过水解酶基因的转录 (例如葡萄糖异构酶启动子, 或 A4 启动子)。复制质粒也适用于本发明中用于表达, 无论其为穿梭载体或仅为链霉菌属载体 (例如 pSECGT)。

[0169] 在一些优选的实施方案中, 本发明的过水解酶从宿主细胞中分泌, 从而过水解酶可从培养宿主细胞的培养基中被回收。

[0170] 清洁组合物

[0171] 如上所述, 本发明提供了包含本发明的长链过水解酶的清洁组合物。在一些实施方案中, 清洁组合物包含至少一种本发明的过水解酶、至少一种长链酯底物, 和至少一种过氧化氢来源。在一些优选的实施方案中, 长链酯底物具有式 $R_1C(=O)OR_2$, 其中 R_1 包含至少 5 个碳原子的取代或未取代的碳链, 且 R_2 是任何有机部分。酯底物和过氧化氢来源在本文中更详细描述。还在许多实施方案中, 本发明的清洁组合物中存在多种其它化合物。

[0172] 在一些实施方案中, 本发明的清洁组合物适用于洗衣应用、硬表面清洁和 / 或自动盘碟清洗应用, 以及个人护理 / 美容应用 (例如用于清洁假牙、牙齿、毛发和皮肤)。然而, 由于它们的下述特有性质, 本发明的过水解酶理想地适用于洗衣应用 (例如织物的漂白), 所述特有性质是在更低温度溶液中提高的有效性和良好的色彩安全模式 (superior color-safety profile)。另外, 本发明的酶适用于颗粒和 / 或液体组合物, 包括凝胶和乳剂。

[0173] 本发明的过水解酶还适用于清洁添加剂产品。在一些优选的实施方案中, 清洁添加剂产品理想地适合于包含在需要额外的漂白作用的清洗过程中。这类状况包括但不限于低温溶液清洁应用。在一些实施方案中, 添加剂产品最简单的形式是本发明的一种或多

种酶。在一些实施方案中,添加剂被包装为用于添加至清洁过程中的剂型,所述清洁过程中使用过氧 (peroxygen) 来源并需要提高的漂白效果。这类单一剂型包括,但不仅限于丸剂、片剂、软胶囊或其它单一剂量单位 (例如预先测量的粉末或液体)。在一些实施方案中,包含至少一种填料和 / 或运载体材料,从而增加清洁组合物的体积。合适的填料和 / 或运载体材料包括但不限于多种硫酸盐、碳酸盐和硅酸盐,以及滑石、粘土等。在一些实施方案中,用于液体组合物的填料和 / 或运载体材料包括水或低分子量伯醇和仲醇,包括多元醇和二元醇。这类醇的实例包括但不限于甲醇、乙醇、丙醇和异丙醇。在一些实施方案中,组合物含有从约 5% 到约 90% 的这类材料。还在其它实施方案中,使用酸性填料降低 pH。在一些可选的实施方案中,清洁添加剂包括活性过氧来源,例如醇的酯、二元醇的酯或多元醇的酯。还在另外的实施方案中,清洁添加剂包含一种或多种辅助成分。

[0174] 本发明的清洁组合物和清洁添加剂需要有效量的本发明所提供的酶。在一些尤其优选的实施方案中,本发明的清洁组合物包含至少 0.0001 重量百分比,从约 0.0001 到约 1、从约 0.001 到约 0.5 或甚至从约 0.01 到约 0.1 重量百分比的至少一种本发明的过水解酶。

[0175] 除了典型的清洁组合物以外,容易理解本发明的过水解酶变体适用于在使用天然或野生型酶的任何目的中用途。因此,这类变体适用于例如条棒和液体皂应用、盘碟护理应用 (dishcare formulation)、表面清洁应用、隐形眼镜清洁溶液和 / 或产品、废物处理、织物应用、纸浆漂白、消毒剂、皮肤护理、口腔护理、毛发护理等等。事实上,不旨在将本发明的过水解酶的任何变体限制于任何特定的用途。例如在一些实施方案中,本发明的变体过水解酶除了包含降低的变应原性外,还在洗涤剂组合物中具有增强的性能 (与野生型或未经修饰的过水解酶相比)。

[0176] 过氧化氢来源

[0177] 在一些实施方案中,本发明的清洁组合物包含过氧化氢来源,其可以是过氧化氢自身或是作为反应产物生产过氧化氢的组合物。作为反应产物生产过氧化氢的合适过氧化氢来源包括,但不仅限于选自以下的过氧来源:

[0178] (i) 从约 0.01 到约 50、从约 0.1 到约 20、或从约 1 到 10 重量百分比的过酸盐、有机过氧酸、脲过氧化氢及其混合物;

[0179] (ii) 从约 0.01 到约 50、从约 0.1 到约 20、或从约 1 到 10 重量百分比的糖类和从约 0.0001 到约 1、或从约 0.001 到约 0.5、从约 0.01 到约 0.1 重量百分比的糖类氧化酶;和

[0180] (iii) 其混合物。

[0181] 合适的过酸盐包括但不限于选自碱金属过硼酸盐、碱金属过碳酸盐、碱金属过磷酸盐、碱金属过硫酸盐及其混合物的那些。

[0182] 在一些优选的实施方案中,糖类选自单-糖类、二-糖类、三-糖类、寡-糖类及其混合物。合适的糖类包括选自以下的糖类: D- 阿拉伯糖、L- 阿拉伯糖、D- 纤维二糖、2- 脱氧-D- 半乳糖、2- 脱氧-D- 核糖、D- 果糖、L- 岩藻糖、D- 半乳糖、D- 葡萄糖、D- 甘油-D- 古洛-庚糖 (D-glycero-D-gulo-heptose)、D- 乳糖、D- 来苏糖、L- 来苏糖、D- 麦芽糖、D- 甘露糖、松三糖、L- 蜜二糖、帕拉金糖 (palatinose)、D- 棉子糖、L- 鼠李糖、D- 核糖、L- 山梨糖、水苏糖、蔗糖、D- 海藻糖、D- 木糖、L- 木糖及其混合物。事实上,不旨在将本发明限制于任何特定的糖类,因为多种糖类适用于本发明。

[0183] 合适的糖类氧化酶包括,但不仅限于选自以下的糖类氧化酶: 醛糖氧化酶 (IUPAC

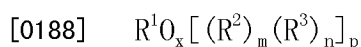
分类 EC1.1.3.9)、半乳糖氧化酶 (IUPAC 分类 EC1.1.3.9)、纤维二糖氧化酶 (IUPAC 分类 EC1.1.3.25)、吡喃糖氧化酶 (IUPAC 分类 EC1.1.3.10)、山梨糖氧化酶 (IUPAC 分类 EC1.1.3.11) 和 / 或己糖氧化酶 (IUPAC 分类 EC1.1.3.5)、葡糖氧化酶 (IUPAC 分类 EC1.1.3.4) 及其混合物。

[0184] 酯底物

[0185] 在一些实施方案中,与至少一种本发明的过水解酶一起利用了至少一种酯底物,所述酯底物包含脂族羧酸和 / 或芳香族羧酸和醇。在一些实施方案中,底物选自以下一种或多种:己酸酯、辛酸酯、壬酸酯、癸酸酯、十二烷酸酯、肉豆蔻酸酯、棕榈酸酯、硬脂酸酯和油酸酯,以及更长链的酯底物。

[0186] 在一些优选的实施方案中,酯底物以下述量存在,所述量为清洁组合物重量的约 0.01% 到约 99.9%,从约 0.01% 到约 50%,从约 0.1% 到 20%,或从约 1% 到约 15%。

[0187] 在一些实施方案中,包含酯部分的合适分子具有式



[0189] 其中 R^1 是选自以下的部分: H 或取代或未取代的烷基、杂烷基、链烯基、炔基、芳基、烷基芳基、烷基杂芳基和杂芳基;在本发明的一些实施方案中, R^1 包含 1 到 50,000 个碳原子, 1 到 10,000 个碳原子或 2 到 100 个碳原子;

[0190] 各个 R^2 是被任选地取代的烷氧基化物部分,在本发明的一些实施方案中,各个 R^2 独立地为乙氧基化物、丙氧基化物或丁氧基化物部分;

[0191] R^3 是具有式 $R^4 CO-$ 的酯-形成部分;

[0192] 所述式 $R^4 CO-$ 中,在本发明的一些实施方案中, R^4 选自 H, 取代或未取代的烷基、链烯基、炔基、芳基、烷基芳基、烷基杂芳基和杂芳基;而在其它实施方案中, R^4 是包含 5 到 22 个或更多个碳原子的取代或未取代的直链或支链烷基、链烯基或炔基部分,包含 5 到 12 个或更多个碳原子的芳基、烷基芳基、烷基杂芳基、或杂芳基部分,或 R^4 是取代或未取代的 C_5-C_{10} 或更长的烷基部分,或 R^4 是取代或未取代的 $C_{11}-C_{22}$ 或更长的烷基部分;

[0193] 当 R^1 是 H 时 x 是 1;当 R^1 不是 H 时 x 是等于或小于 R^1 中碳数量的整数,

[0194] p 是等于或小于 x 的整数,

[0195] m 是从 0 到 50 的整数,从 0 到 18 的整数,或从 0 到 12 的整数,且 n 至少是 1。

[0196] 在本发明的一些实施方案中,包含酯部分的分子是具有式 $R^1 O_x [(R^2)_m (R^3)_n]_p$ 的烷基乙氧基化物或丙氧基化物,其中:

[0197] R^1 是 C_2-C_{32} 的取代或未取代烷基或杂烷基部分;

[0198] 各个 R^2 独立地是乙氧基化物或丙氧基化物部分;

[0199] R^3 是具有式 $R^4 CO-$ 的酯-形成部分,

[0200] 所述式 $R^4 CO-$ 中,在本发明的一些实施方案中, R^4 选自 H, 取代或未取代的烷基、链烯基、炔基、芳基、烷基芳基、烷基杂芳基和杂芳基;而在其它实施方案中, R^4 选自包含 5 到 22 个或更多个碳原子的取代或未取代的直链或支链烷基、链烯基或炔基部分,包含 5 到 12 个或更长原子的取代或未取代的芳基、烷基芳基、烷基杂芳基、或杂芳基部分,或 R^4 是取代或未取代的 C_5-C_{10} 或更长的烷基部分,或 R^4 是取代或未取代的 C_5-C_{22} 或更长的烷基部分;

[0201] x 是等于或小于 R^1 中碳数量的整数,

[0202] p 是等于或小于 x 的整数,

[0203] m 是从 1 到 12 的整数,且

[0204] n 至少是 1。

[0205] 在本发明的一些实施方案中,包含酯部分的分子具有式

[0206] $R^1O_x[(R^2)_m(R^3)_n]_p$

[0207] 其中 R^1 是 H 或包含伯胺、仲胺、叔胺或季胺部分的部分,包含胺部分的所述 R^1 部分选自取代或未取代的烷基、杂烷基、链烯基、炔基、芳基、烷基芳基、烷基杂芳基和杂芳基;在一些实施方案中, R^1 包含 1 到 50,000 个碳原子,1 到 10,000 个碳原子或 2 到 100 个碳原子;

[0208] 各个 R^2 是烷氧基化物部分,在本发明的一些实施方案中,各个 R^2 独立地是乙氧基化物、丙氧基化物或丁氧基化物部分;

[0209] R^3 是具有式 R^4CO- 的酯-形成部分,

[0210] 所述式 R^4CO- 中,在本发明的一些实施方案中, R^4 选自 H,取代或未取代的烷基、链烯基、炔基、芳基、烷基芳基、烷基杂芳基和杂芳基;在其它实施方案中, R^4 选自包含 5 到 22 个碳原子的取代或未取代的直链或支链烷基、链烯基或炔基部分,包含 9 到 12 个或更多个碳原子的取代或未取代的芳基、烷基芳基、烷基杂芳基、或杂芳基部分,或 R^4 是取代或未取代的 C_5-C_{10} 或更长的烷基部分,或 R^4 是取代或未取代的 $C_{11}-C_{22}$ 或更长的烷基部分;

[0211] 当 R^1 是 H 时 x 是 1;当 R^1 不是 H 时 x 是等于或小于 R^1 中碳数量的整数,

[0212] p 是等于或小于 x 的整数,

[0213] m 是从 0 到 12 或甚至从 1 到 12 的整数,且

[0214] n 至少是 1。

[0215] 在本发明的任何上述实施方案中,包含酯部分的分子可具有下述重均分子量,所述重均分子量少于 600,000 道尔顿,少于 300,000 道尔顿,少于 100,000 道尔顿或甚至少于 60,000 道尔顿。

[0216] 包含酯部分的合适分子包括但不限于包含酯部分的多聚糖类。

[0217] **辅助材料**

[0218] 尽管不是本发明的用途所必需的,但是下文阐述的辅料 (adjunct) 的非限制性列表适用于本发明的清洁组合物中。在一些实施方案中,掺入这些材料以帮助或增强清洁性能,用于处理待清洁的底物,或根据情况例如用香料、着色剂、染料等等修饰清洁组合物的美观。应当理解这类辅料是除本发明的酶、过氧化氢来源和酯底物之外的。这些额外组分的精确性质及其掺入水平应取决于组合物的物理形式和要使用所述组合物的清洁操作的性质。合适的辅助材料包括但不限于表面活性剂、助洗剂、螯合剂、染料转移抑制剂、沉积助剂、分散剂、额外的酶和酶稳定剂、催化材料、漂白活化剂、漂白助促进剂、预形成的过酸、聚合物分散剂、粘土污物去除 / 抗再沉积剂、增亮剂、抑泡剂、染料、香料、结构增弹剂、织物柔软剂、运载体、水溶助长剂、操作助剂和 / 或色素。除了下文的公开以外,这类其它辅料的合适实例和使用水平参见美国专利 Nos. 5,576,282、6,306,812 和 6,326,348,其通过参考并入本文。在一些实施方案中,上述辅助成分构成本发明的清洁组合物的平衡。

[0219] 表面活性剂 - 在一些实施方案中,本发明提供的清洁组合物包含至少一种表面活性剂或表面活性剂体系,其中所述表面活性剂选自非离子型表面活性剂、阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、两性表面活性剂 (ampholytic surfactant)、两性离子表面活性剂

(zwitterionic surfactant)、半极性非离子表面活性剂及其混合物。

[0220] 在一些优选的实施方案中,表面活性剂通常以占主题清洁组合物重量从约 0.1% 到约 60%、从约 1% 到约 50%,或甚至从约 5% 到约 40% 的水平存在。

[0221] 大量已知的化合物是适用于包含本发明的过水解酶的组合物中的合适表面活性剂。这些包括非离子的、阴离子的、阳离子的、阴离子的或两性离子的洗涤剂(见例如美国专利 Nos. 4, 404, 128 和 4, 261, 868)。合适的洗涤剂制剂是美国专利 No. 5, 204, 015(通过参考并入)中所述的。本领域技术人员熟悉可用作清洁组合物的不同制剂。

[0222] 如上文所述,在一些优选的实施方案中,本发明的洗涤剂组合物使用由于其在洗涤剂组合物中的用途而公知的表面活性剂(surface active agent)(即表面活性剂(surfactant)),包括阴离子的、非离子的和两性表面活性剂。适合在本发明中使用的一些表面活性剂描述于英国专利申请 No. 2094826A 中,其通过参考并入本文。在一些实施方案中,本发明中使用表面活性剂的混合物。

[0223] 本发明的洗涤剂组合物中使用的合适的阴离子表面活性剂包括但不限于线性或分支的烷基苯磺酸盐;具有线性或分支烷基或链烯基的烷基或链烯基醚硫酸盐;烷基或链烯基硫酸盐;烯烴磺酸盐;链烷磺酸盐等等。阴离子表面活性剂的合适抗衡离子包括但不限于碱金属离子如钠和钾;碱土金属离子如钙和镁;铵离子;和具有 1 到 3 个碳数量为 2 或 3 的链烷醇基的链烷醇胺。

[0224] 适用于本发明的两性表面活性剂包括但不限于磺酸季铵盐,甜菜碱型两性表面活性剂等等。这类两性表面活性剂在相同的分子中既具有正电荷基团又具有负电荷基团。

[0225] 适用于本发明的非离子型表面活性剂通常包括聚氧化烯醚,以及高级脂肪酸链烷醇酰胺或其烯化氧加合物,脂肪酸甘油单酯等等。

[0226] 在一些优选的实施方案中,本发明的洗涤剂组合物中包含的表面活性剂或表面活性剂混合物以下述量提供,所述量为总洗涤剂组合物的从约 1 重量百分比到约 95 重量百分比,并优选为总洗涤剂组合物的从约 5 重量百分比到约 45 重量百分比。如本文所述,在本发明的多个实施方案中,本发明的组合物中包含大量其它组分。然而,不旨在将本发明限于这些具体的实例。事实上,预期额外的化合物会适用于本发明。下文的描述仅用于阐述一些任选的组分。

[0227] 蛋白质,尤其是本发明的过水解酶可以以按重量计约 0.001% 到约 5% (优选 0.1% 到 0.5%) 的水平被配制进已知的粉末和液体洗涤剂中,所述洗涤剂具有 3 和 12.0 之间的 pH。在一些实施方案中,这些洗涤剂清洁组合物还包含其它酶,例如蛋白酶、淀粉酶、甘露聚糖酶、过氧化物酶、氧化还原酶、纤维素酶、脂肪酶、角质酶、果胶酶、胶质裂合酶、木聚糖酶和 / 或内切糖苷酶以及助洗剂和稳定剂。

[0228] 向常规清洁组合物中添加蛋白质不创造任何特殊的使用限制。换言之,适用于洗涤剂的任何温度和 pH 也适用于本组合物,只要该 pH 在酶具有活性的范围内,并且温度低于所述蛋白质的变性温度即可。另外,本发明的蛋白质适用于不含洗涤剂的清洁、漂白和消毒组合物,所述蛋白质还是单独的或与过氧化氢来源、酯底物(例如添加至使用的体系中或是使用的体系中固有的,例如含有酯的染色剂,含有酯的纸浆等)、其它酶、表面活性剂、助洗剂、稳定剂等组合。事实上不旨在将本发明限于任何具体的配制或应用。

[0229] 助洗剂 - 本发明的清洁组合物可含有一种或多种洗涤剂助洗剂或助洗剂体系。使

用助洗剂时,清洁组合物通常包含按清洁组合物的重量计至少约 1%,从约 3%到约 60%,或从约 5%到约 40%的助洗剂。

[0230] 助洗剂包括但不限于多聚磷酸的碱金属盐、铵盐和链烷醇铵盐,碱金属硅酸盐,碱土金属和碱金属碳酸盐,硅铝酸盐助洗剂聚羧酸盐化合物,醚羟基聚羧酸盐,马来酐与乙烯或乙烯基·甲基醚的共聚物,1,3,5-三羟基苯-2,4,6-三磺酸,和羧甲基氧琥珀酸,多聚乙酸如乙二胺四乙酸和氨三乙酸的多种碱金属盐、铵盐和取代的铵盐,以及聚羧酸如苯六甲酸、琥珀酸、柠檬酸、氧基二琥珀酸、多聚马来酸、苯 1,3,5-三羧酸、羧甲基氧琥珀酸及其可溶盐。

[0231] 螯合剂 - 在一些实施方案中,本文提供的清洁组合物含有至少一种螯合剂。合适的螯合剂包括但不限于铜、铁和 / 或锰螯合剂及其混合物。

[0232] 使用螯合剂时,清洁组合物通常包含按主题清洁组合物的重量计从约 0.1%到约 15%,或从约 3.0%到约 10%的螯合剂。

[0233] 沉积助剂 - 在一些实施方案中,本文提供的清洁组合物还包含至少一种沉积助剂。合适的沉积助剂包括但不限于聚乙二醇,聚丙二醇,聚羧酸酯,污物释放聚合物如聚对苯二甲酸,粘土如高岭土、蒙脱土、凹凸棒土 (atapulgitite)、伊利石、膨润土、多水高岭土及其混合物。

[0234] 染料转移抑制剂 - 还在一些其它的实施方案中,本发明的清洁组合物还包含一种或多种染料转移抑制剂。合适的聚合物染料转移抑制剂包括但不限于聚乙烯吡咯烷酮聚合物、聚胺 N-氧化物聚合物、N-乙烯基吡咯烷酮和 N-乙烯基咪唑的共聚物、聚乙烯基噁唑烷酮和聚乙烯基咪唑或其混合物。

[0235] 存在于主题清洁组合物中时,染料转移抑制剂通常以按清洁组合物重量计从约 0.0001%到约 10%、从约 0.01%到约 5%、或从约 0.1%到约 3%的水平存在。

[0236] 分散剂 - 在一些另外的实施方案中,本发明的清洁组合物包含分散剂。合适的水溶性有机材料包括但不限于均聚酸或共聚酸或其盐,其中多聚羧酸包含至少两个羧基,其被不多于两个碳原子彼此隔开。

[0237] 酶 - 在一些其它的实施方案中,本发明的清洁组合物包含一种或多种洗涤剂酶,所述酶提供清洁性能和 / 或织物护理益处。合适的酶的实例包括但不限于半纤维素酶、过氧化物酶、蛋白酶、纤维素酶、木聚糖酶、脂肪酶、磷脂酶、酯酶、角质酶、果胶酶、角蛋白酶、还原酶、氧化酶、酚氧化酶、脂氧合酶、木质酶 (ligninase)、支链淀粉酶、鞣酶、戊聚糖酶 (pentosanase)、malanases、 β -葡聚糖酶、阿拉伯糖苷酶、透明质酸酶、软骨素酶、漆酶和淀粉酶,或其混合物。典型地组合是常规可应用的酶如蛋白酶、脂肪酶、角质酶和 / 或纤维素酶与淀粉酶组合的混合物。

[0238] 酶稳定剂 - 可通过多种技术稳定用于洗涤剂中的酶。本文中使用的酶可通过制成的组合物中水溶性钙和 / 或镁离子来源的存在来稳定,所述组合物对所述酶提供这类离子。预期酶稳定剂会适用于本文提供的清洁组合物的一些实施方案中。

[0239] 催化金属复合物 - 在一些实施方案中,本发明的清洁组合物包含催化金属复合物。一种类型的含金属漂白催化剂是下述催化剂体系,其包含具有确定的漂白催化活性的过渡金属 (transition metal) 阳离子例如铜、铁、钛、钆、钨、钼或锰阳离子,具有很少或不具有漂白催化活性的辅助金属 (auxiliary metal) 阳离子如锌或铝阳离子,和对催化和辅

助金属阳离子具有确定的稳定性常数的多价螯合剂 (sequesterant), 尤其是乙二胺四乙酸、乙二胺四 (亚甲基膦酸) 及其水溶性盐。这些催化剂的实例描述于 U. S. 4, 430, 243 中, 其通过参考并入本文。

[0240] 在一些实施方案中, 借助于锰化合物催化本文提供的组合物。这类化合物和使用水平是本领域公知的, 并包括例如 U. S. 5, 576, 282 中公开的基于锰的催化剂, 其通过参考并入本文。

[0241] 本文适用的钴漂白催化剂是已知的, 并例如描述于 U. S. 5, 597, 936 和 U. S. 5, 595, 967 中, 二者均通过参考并入本文。通过已知的步骤容易地制备这类钴催化剂, 所述步骤例如在 U. S. 5, 597, 936 和 U. S. 5, 595, 967 中教导。

[0242] 在一些实施方案中, 本文提供的组合物还包含巨大多环刚性配体 (macropolycyclic rigid ligand, “MRL”) 的至少一种过渡金属复合物。就实践而言, 并非用于限制, 在一些实施方案中调节本文提供的组合物和清洁过程, 以在水性清洗介质中提供大约每亿活性 MRL 种中的至少一部分, 并在洗液中优选地提供从约 0.005ppm 到约 25ppm, 更优选地从约 0.05ppm 到约 10ppm, 最优选地从约 0.1ppm 到约 5ppm 的 MRL。

[0243] 即时过渡金属漂白催化剂中优选的过渡金属包括锰、铁和铬。本文中优选的 MRL 是特异类型的超刚性 (ultra-rigid) 配体, 其为交联的 (cross-bridged), 例如 5,12-二乙基-1,5,8,12-四氮二环 [6.6.2] 十六烷 (5,12-diethyl-1,5,8,12-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecane)。

[0244] 通过已知步骤容易地制备合适的过渡金属 MRL, 所述已知步骤例如在 WO 00/332601 中, 和 U. S. 6, 225, 464 教导, 二者均通过参考并入本文。

[0245] 清洁和洗涤制剂

[0246] 本发明的洗涤剂组合物以任何合适的形式提供, 包括但不限于液体、颗粒、乳剂、凝胶和糊剂。使用固体洗涤剂组合物时, 优选地将洗涤剂配制为颗粒的形式。优选地, 将颗粒配制为额外含有保护剂 (见例如 1991 年 1 月 17 日提交的美国申请系列 No. 07/642, 669, 其通过参考并入本文)。类似地, 在一些实施方案中, 颗粒被配制为含有下述材料, 所述材料降低颗粒溶解进入清洗介质中的速率 (见例如美国专利号 No. 5, 254, 283, 通过参考并入本文)。另外, 本发明的过水解酶适用于下述制剂, 其中底物和酶存在于相同颗粒中。因此, 在一些实施方案中, 通过提供酶和底物的高局部浓度来提高酶的功效 (见例如美国专利申请公开号 US 2003/0191033, 通过参考并入本文)。

[0247] 本发明的清洁组合物被配制为任何合适的形式, 并通过设计选择的任何工艺制备, 所述工艺的非限制性实例描述于美国专利 No. 5, 879, 584、美国专利 No. 5, 691, 297、美国专利 No. 5, 574, 005、美国专利 No. 5, 569, 645、美国专利 No. 5, 565, 422、美国专利 No. 5, 516, 448、美国专利 No. 5, 489, 392 和美国专利 No. 5, 486, 303 中; 其均通过参考并入本文。

[0248] 本文提供的清洁组合物通常被配制为在含水清洁操作中使用, 清洗水会具有从约 5.0 到约 11.5, 或从约 7.5 到约 10.5 的 pH。液体产品制剂通常被配制为具有从约 3.0 到约 9.0 的 pH。颗粒洗衣产品通常被配制为具有从约 9 到约 11 的 pH。用于在推荐的使用水平上控制 pH 的技术包括使用缓冲液、碱、酸等, 并且是本领域技术人员公知的。

[0249] 在颗粒组合物或液体中使用本发明的酶时, 有时需要酶是被包封的颗粒形式, 从

而保护该酶在储存过程中免于接触颗粒组合物的其它组分。另外,包封也是控制清洁过程中酶的有效性的手段,并可增强酶的性能。就这点而言,用本领域已知的任何合适的包封材料包封酶。

[0250] 包封材料通常包封至少部分酶。通常,包封材料是水溶性的和/或水分散性的。包封材料可具有 0°C 或更高的玻璃化转变温度 (T_g) (见例如 W097/11151,其通过参考并入本文)。

[0251] 在一些实施方案中,包封剂 (encapsulating) 选自糖类、天然或合成的树胶、甲壳质和脱乙酰壳多糖、纤维素和纤维素衍生物、硅酸盐、磷酸盐、硼酸盐、聚乙烯醇、聚乙二醇、石蜡及其组合。当包封材料是糖类时,其通常选自单糖、寡糖、多糖及其组合。通常,包封材料是淀粉。合适的淀粉描述于 EP 0 922 499、美国专利 No. 4, 977, 252、美国专利 No. 5, 354, 559 和美国专利 No. 5, 935, 826 中,其各通过参考并入本文。

[0252] 在一些实施方案中,包封材料是由塑料(例如热塑塑料、丙烯腈、甲基丙烯腈、聚丙烯腈、聚甲基丙烯腈及其混合物)制成的微球体。有用的可商业获得的微球体包括但不限于由伊盘瑟公司 (Expancel) (Stockviksverken, 瑞典) 在商标 EXPANCEL® 下提供的微球体,和由 PQ 公司 (PQ Corp.) (Valley Forge, PA) 在商品名 PM 6545、PM 6550、PM 7220、PM 7228、EXTENDOSPHERES®、LUXSIL®、Q-CEL® 和 SPHERICEL® 下提供的微球体。

[0253] 除了上文所述的成分外,香料、缓冲剂、防腐剂、染料等等也可用于本发明。这些组分以本领域人员已知的浓度和形式提供。

[0254] 在一些实施方案中,通过任何已知的制备方法制备本发明的粉末状洗涤剂基质,所述方法包括喷雾干燥方法和成粒方法。尤其优选通过喷雾干燥方法和/或喷雾干燥成粒方法获得的洗涤剂基质。通过喷雾干燥方法获得的洗涤剂基质不受制备条件的限制。通过喷雾干燥方法获得的洗涤剂基质是空心颗粒的形式,其通过将抗热成分的含水浆喷雾进入热的空间中获得,所述抗热成分例如表面活性剂和助洗剂。需要时,在喷雾干燥后添加香料、酶、漂白剂、无机碱性助洗剂。对例如通过喷雾干燥成粒方法获得的高密度、颗粒状洗涤剂基质而言,也可在制备基质后添加多种成分。

[0255] 在包含液体洗涤剂基质的一些实施方案中,该基质是同质的溶液,而在其它实施方案中,其为非同质的分散体。

[0256] 在一些实施方案中,在工业和家居用途中,在这些环境中常规使用的温度、反应时间和液比例下,将本发明的洗涤剂组合物与这些用途中的织物(例如污织物)一起孵育。孵育条件(即对于用根据本发明的洗涤剂组合物处理材料有效的条件)可由本领域技术人员容易地确认。因此,对用本发明洗涤剂处理时有效的适宜条件对应于包含野生型过水解酶的类似洗涤剂组合物的使用条件。

[0257] 如上所述,在一些实施方案中,本发明提供的洗涤剂在适当的溶液中于中度 pH 下被配制为预洗物 (pre-wash),其中存在足以提供下述想要的改进的活性,所述改进是柔软、去毛球、防止起球、表面纤维去除或清洁中的改进。当洗涤剂组合物是预浸渍(例如预洗或预处理)组合物时,通常使用以预浸渍或预处理组合物的总重为基础从约 0.00001% 到约 5% 重量百分比的过水解酶,所述组合物为液体、喷雾、凝胶或糊剂组合物任一。在这样的组合物中可任选地使用表面活性剂,使用表面活性剂时,其通常以下述浓度存在,所述浓度是以预浸渍物总重为基础从约 0.0005 到约 1 的重量百分比。组合物的剩余部分包含预浸渍

物 (pre-soak) 中使用的常规组分 (例如稀释剂、缓冲剂、其它酶 (蛋白酶) 等), 它们的浓度为其常规浓度。

[0258] 在一些实施方案中, 本发明提供的清洁组合物可用于清洁部位 (situs) (例如表面或织物)。通常该部位的至少一部分与至少一种本文提供的清洁组合物 (纯的形式或在洗液中稀释) 接触, 然后任选地清洗和 / 或冲洗该部位。就本发明的目的而言, 清洗包括但不限于擦洗和机械搅动。织物包括能够在正常消费者使用条件下被洗涤的大部分任何织物。本文提供的清洁组合物通常在从约 500ppm 到约 15,000ppm 的浓度在溶液中使用。当清洗溶剂是水时, 水温范围通常从约 5℃ 到约 90℃, 当部位包含织物时, 水与织物的质量比通常从约 1 : 1 到约 30 : 1。

[0259] 实验

[0260] 以下的实施例被提供用于证明和进一步阐述本发明的某些优选的实施方案和方面, 并且不应被解释为限制其范围。

[0261] PCT 公开 W005/056782 提供了过水解酶的鉴定和使用方法。该公开中的各个实施例单独地通过参考并入本文, 用于公开其中公开的所有方法, 包括但不限于下述公开: 过水解酶的制备方法, 鉴定过水解酶的方法, 测试过水解酶、过水解酶多核苷酸和多肽序列的方法, 使用过水解酶和其中可使用过水解酶的组合物方法。

[0262] 在下文的实验公开中, 应用以下的缩写: °C (摄氏度); rpm (每分钟转数); H₂O (水); HCl (盐酸); aa (氨基酸); bp (碱基对); kb (千碱基对); kD (千道尔顿); gm (克); μg 和 ug (微克); mg (毫克); ng (纳克); μl 和 ul (微升); ml (毫升); mm (毫米); nm (纳米); μm 和 um (微米); M (摩尔); mM (毫摩尔); μM 和 uM (微摩尔); U (单位); V (伏特); MW (分子量); sec (秒); min(s) (分钟); hr(s) (小时); MgCl₂ (氯化镁); NaCl (氯化钠); OD₂₈₀ (280nm 下的光密度); OD₆₀₀ (600nm 下的光密度); PAGE (聚丙烯酰胺凝胶电泳); EtOH (乙醇); PBS (磷酸缓冲盐溶液 [150mM NaCl、10mM 磷酸钠缓冲液, pH 7.2]); SDS (十二烷基硫酸钠); Tris (三 (羟甲基) 氨基甲烷); TAED (N, N, N' N' - 四乙酰基乙二胺); w/v (重量比体积); v/v (体积比体积); Per (过水解酶); per (过水解酶基因); Ms (耻垢分枝杆菌); MS (质谱法); AATCC (美国纺织品和有色化学家联合会 (American Association of Textile and Coloring Chemists)); WFK (wfk 泰斯特韦博公司 (wfk Testgewebe GmbH), Bruggen-Bracht, 德国); Amersham (阿默海姆生命科学公司 (Amersham Life Science, Inc.) Arlington Heights, IL); Pierce (皮尔斯生物技术公司 (Pierce Biotechnology), Rockford, IL); Amicon (艾米肯公司 (Amicon, Inc.), Beverly, MA); ATCC (美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA); Amersham (阿默海姆生物科学公司 (Amersham Biosciences, Inc.), Piscataway, NJ); Becton Dickinson (百科顿 - 迪克森公司 (Becton Dickinson Labware), Lincoln Park, NJ); BioRad (博奥雷德公司 (BioRad), Richmond, CA); Clontech (克隆技术实验室公司 (CLONTECH Laboratories), Palo Alto, CA); Difco (蒂夫科实验室公司 (Difco Laboratories), Detroit, MI); GIBCO BRL 或 Gibco BRL (生命技术公司 (Life Technologies, Inc.), Gaithersburg, MD); Novagen (诺华公司 (Novagen, Inc.), Madison, WI); Qiagen (强基因公司 (Qiagen, Inc.), Valencia, CA); Invitrogen (英杰生命科学公司 (Invitrogen Corp.), Carlsbad, CA); Dionex (迪奥耐克斯公司 (Dionex Corp.), Sunnyvale, CA); Sigma-Aldrich (西格玛 - 阿尔德里克化学品

公司 (Sigma-Aldrich Chemical Co.), St. Louis, MO); Sorvall (索沃仪器公司 (Sorvall Instruments), 杜邦公司 (DuPont Co.) 的子公司, 生物技术系统 (Biotechnology Systems) Wilmington, DE); Stratagene (斯莱特因克隆系统公司 (Stratagene Cloning Systems), La Jolla, CA); Roche (霍夫曼-拉-罗切公司 (Hoffmann La Roche, Inc.), Nutley, NJ); Molecular Devices (分子设备公司 (Molecular Devices, Corp), Sunnyvale, CA); 和 Agilent (安捷伦技术公司 (Agilent Technologies), Palo Alto, CA)。

[0263] 实施例 1

[0264] 鉴定水解对硝基苯基己酸酯 (pNC6) 的过水解酶

[0265] 如 PCT 公开 W005/056782 中所述, 克隆了耻垢分枝杆菌过水解酶基因的过水解酶基因。耻垢分枝杆菌过水解酶基因的过水解酶基因核苷酸序列为:

[0266] ATGGCCAAGCGAATTCTGTGTTTCGGTGATTCCCTGACCTGGGGCTGGGTCCCCGTCGA

[0267] AGACGGGGCACCCACCGAGCGGTTTCGCCCCGACGTGCGCTGGACCGGTGTGCTGGCCC

[0268] AGCAGCTCGGAGCGGACTTCGAGGTGATCGAGGAGGGACTGAGCGCGCGACCAACCAAC

[0269] ATCGACGACCCACCGATCCGCGGCTCAACGGCGCGAGCTACCTGCCGTCGTGCCCTCGC

[0270] GACGCACCTGCCGCTCGACCTGGTGATCATCATGCTGGGCACCAACGACACCAAGGCCT

[0271] ACTTCCGGCGCACCCCGCTCGACATCGCGCTGGGCATGTGCGGTGCTCGTCACGCAGGTG

[0272] CTCACCAGCGCGGGCGGCGTCGGCACCACTACCCGGCACCCAAGGTGCTGGTGGTCTC

[0273] GCCGCCACCGCTGGCGCCCATGCCGACCCCTGGTTCCAGTTGATCTTCGAGGGCGGCG

[0274] AGCAGAAGACCACTGAGCTCGCCCGGTGTACAGCGCGCTCGCGTCGTTTATGAAGGTG

[0275] CCGTTCTTCGACGCGGGTTCGGTGATCAGCACCGACGGCGTCGACGGAATCCACTTCAC

[0276] CGAGGCCAACAAATCGCGATCTCGGGGTGGCCCTCGCGGAACAGGTGCGGAGCCTGCTGT

[0277] AA (SEQ ID NO :1)

[0278] 耻垢分枝杆菌过水解酶的氨基酸序列为:

[0279] MAKRILCFGDSL TWGWVPVEDGAPTERFAPDVRWTGVLAQQ LGADFEVIEEGLSARTTN

[0280] IDDPTDPR L NGASYLP SCLATHLPLDLVI IMLGTNDTKAYFRRTPLDIALGMSVLVTQV

[0281] LTSAGGVGTTYPAPKVLVVSPPLAPMPHPWFQLIFEGGEQKTTELARVYSALASFMKV

[0282] PFFDAGSVISTDGV DGIHFTEANNRDLGVALAEQVRSLL (SEQ ID NO :2).

[0283] 还如 PCT 公开 W005/056782 中所述, 将耻垢分枝杆菌过水解酶的各个和每个氨基酸位置突变为其余 19 个氨基酸的每一个, 产生位点饱和文库。使用如 PCT 公开 W005/056782 的实施例 2 中所述的方法, 对野生型过水解酶和位点饱和文库中的各个过水解酶变体测试其水解 C₆ 酰基酯底物——对硝基苯基己酸酯的能力。

[0284] 野生型过水解酶不能够水解 pNC6。以下的过水解酶变体被鉴定为具有水解 pNC6 的能力:

[0285] 表 1. 能够水解 pNC6 的过水解酶变体

[0286]

野生型残基 / 位置	氨基酸变体
L12	G, P, Q

G22	W
N59	P
I153	P
F154	Q, S, T, V
I194	G
F196	S, Q, V, G, P, I, H
L204	Y, W

[0287] 实施例 2

[0288] 生产和筛选组合文库

[0289] 使用野生型过水解酶 (SEQ ID NO :2) 和 L12G 变体作为亲本分子, 将表 1 中鉴定的突变组合在一起, 产生四种不同的文库 NSAL1、NSAL2、NSAL3 和 NSAL4。用于制备组合文库的引物如下, 其中“NNS”序列代表编码所有 20 个氨基酸的简并密码子 NNG/C(N = G、A、T 或 C) 和一个终止密码子:

[0290] 表 2. 用于组合文库的突变和引物

[0291]

突变	引物序列
L12G	GTGTTTCGGTGATTCCGGCACCTGGGGCTGGGTCC (SEQ ID NO :3)
L12P	GTGTTTCGGTGATTCCCCGACCTGGGGCTGGGTCCC (SEQ ID NO :4)
L12Q	GTGTTTCGGTGATTCCCAGACCTGGGGCTGGGTCCC (SEQ ID NO :5)
L12NNS	GTGTTTCGGTGATTCCNNSACCTGGGGCTGGGTCC (SEQ ID NO :6)
I194G	GACGGCGTCGACGGAGGCCACTTCACCGAGGCCAAC (SEQ ID NO :7)
I194NNS	GACGGCGTCGACGGANNSCACTTCACCGAGGCCAAC (SEQ ID NO :8)
F154T	TGGTTCCAGTTGATCACCAGGGCGGCGAGCAGAAG (SEQ ID NO :9)
F154S	TGGTTCCAGTTGATCAGCGAGGGCGGCGAGCAGAAG (SEQ ID NO :10)
F154NNS	TGGTTCCAGTTGATCNNSGAGGGCGGCGAGCAGAAG (SEQ ID NO :11)
F196S	GCGTCGACGAATCCACAGACCGAGGCCAACAAATCG (SEQ ID NO :12)
F196Q	GCGTCGACGAATCCACCAGACCGAGGCCAACAAATCG (SEQ ID NO :13)

F196V	GCGTCGACGGAATCCACGTTACCGAGGCCAACAAATCG (SEQ ID NO :14)
F196G	GCGTCGACGGAATCCACGGTACCGAGGCCAACAAATCG (SEQ ID NO :15)
F196P	GCGTCGACGGAATCCACCCGACCGAGGCCAACAAATCG (SEQ ID NO :16)
F196I	GCGTCGACGGAATCCACATCACCGAGGCCAACAAATCG (SEQ ID NO :17)
F196NNS	GCGTCGACGGAATCCACNNSACCGAGGCCAACAAATCG (SEQ ID NO :18)
F154V	TGGTTCCAGTTGATCGTTGAGGGCGGCGAGCAGAAG (SEQ ID NO :19)
F196H	GCGTCGACGGAATCCACCATACCGAGGCCAACAAATCG (SEQ ID NO :20)
F154Q	TGGTTCCAGTTGATCCAGGAGGGCGGCGAGCAGAAG (SEQ ID NO :21)
N59P	AGCGCGCGCACCACCCCGATCGACGACCCACCGATC (SEQ ID NO :22)
L204Y	GCCAACAATCGCGATTATGGGGTGGCCCTCGCGGAAC (SEQ ID NO :23)
L204W	GCCAACAATCGCGATTGGGGGTGGCCCTCGCGGAAC (SEQ ID NO :24)
L204NNS	GCCAACAATCGCGATNNSGGGGTGGCCCTCGCGGAAC (SEQ ID NO :25)
I1S3P	CCCTGGTTCCAGTTGCCGTTGAGGGCGGCGAGCAG (SEQ ID NO :26)
G22W	GTCCCCGTCGAAGACTGGGCACCCACCGAGCGGTTC (SEQ ID NO :27)

[0292] 使用 WO 05/056782 中所述方法,使用 QuikChange 多位点定向诱变 (QCMS) 创建组合文库 NSAL1-NSAL4。QCMS 反应由以下组成:16.5 μ L 无菌蒸馏 H_2O 、2.5 μ L 来自试剂盒的 10x 缓冲液、1 μ L 来自试剂盒的 dNTP、3 μ L 的 20 引物混合物 (提前将各 10 μ L 的 100ng/ μ L 的引物混合在一起)、1 μ L 作为模板的 pMSAT-NcoI 小量制备 DNA ($\sim$ 50ng) 和 1 μ L 来自试剂盒的酶掺合物,总计 25 μ L。循环条件为 95 $^{\circ}C$ 1 分钟一次,95 $^{\circ}C$ 1 分钟,55 $^{\circ}C$ 1 分钟,65 $^{\circ}C$ 10 分钟进行 30 个循环。接着将先后用 1 或 0.5 μ L 酶 (QCMS 试剂盒) 在 37 $^{\circ}C$ 下进行 4 小时的 DpnI 消化两次。根据制造商的说明将 2 μ L 反应物转化进 BL21 (DE3) pLysS 感受态细胞 (Novagen) 中。将转化涂布在 LB 平板上,所述平板含有 100ppm 羧苄青霉素、0.1mM IPTG 和 0.25% 己酸甘油酯 (通过超声处理混合在培养基中的 C_6 酰基链底物)。

[0293] 将平板在 37 $^{\circ}C$ 孵育 24 小时然后在室温下孵育 2 天后,将大部分形成晕圈的菌落在 96-孔板中于 37 $^{\circ}C$ 下过夜培养,所述 96-孔板含有含 100ppm 羧苄青霉素的 LB。为了再评估晕圈形成者 (halo-former),将培养物影印 (replica-stamped) 在大琼脂平板上,所述琼脂平板含有 LB、100ppm 羧苄青霉素、0.1mM IPTG 和 0.25% 己酸甘油酯。

[0294] 表 3 描述了组合文库及其筛选的进一步细节。

[0295] 表 3. 文库和被筛选的菌落的描述

[0296]

文库	使用的引物	亲本分子	筛选的菌落	带有晕圈的菌落 * *
NSAL1	L12NNS, F154NNS, F196NNS, I194NNS, L204NNS	野生型	182	21
NSAL2	L12NNS, F154NNS, F196NNS, I194NNS, L204NNS	L12G	169	40
NSAL3	表 1 中所有引物, NNS 密 码子引物除外	野生型	~ 1200 *	4
NSAL4	表 1 中所有引物, NNS 密 码子引物除外	L12G	~ 1000 *	~ 100-200 *

[0297] *该数值是近似值。未测定菌落的精确数量。

[0298] **一些形成晕圈的菌落在再测试时未形成晕圈。NSAL2 和 NSAL4 中晕圈形成者的数量比 NSAL1 和 NSAL3 中更高, 归因于 25% 的 NSAL2 和 NSAL4 文库中存在的 L12G 亲本。

[0299] 对下述多核苷酸测序以确定何种突变有助于晕圈形成, 所述多核苷酸编码形成晕圈的菌落的过水解酶 (表 4)。

[0300] 表 4. 形成晕圈的菌落的序列*

[0301]

文库	序列
NSAL1	I194G (3 个克隆)
NSAL3	I194G
NSAL4	L12G G22W
NSAL2	L12G I194M
NSAL1	F154A I194M (2 个克隆)
NSAL1	F154A
NSAL1	F154G I194V
NSAL1	F154E I194S (3 个克隆)
NSAL1	F154E

NSAL3	F154T F196I (2 个克隆)
NSAL3	F154V
NSAL3	L12Q F154V
NSAL3	L12M F154E
NSAL3	L12G F154G I194V

[0302] *生产晕圈的 L12G 克隆未列于表中, 因为已知该突变在己酸甘油酯平板上产生晕圈。

[0303] 实施例 3

[0304] 形成晕圈的变体的生物化学表征

[0305] 使用 PCT 公开 W0 05/056782 的实施例 2 中所述方法, 在 100mMTris/HCl pH 8、0.1% Triton-X100 和 1mM pNC6 或 pNC8 中, 测试在己酸甘油酯平板上形成晕圈的变体水解对对硝基苯基己酸酯 (pNC6) 和对硝基苯基辛酸酯 (pNC8) 的能力, 所述变体具有与亲本序列不同的氨基酸序列。

[0306] 针对各个形成晕圈的变体记录对硝基苯酚的出现率。野生型酶显示不水解 pNC6 或 pNC8。pNC6/pNC8 水解的比例显示于下表 5 中。

[0307] 表 5. 具有 pNC6/pNC8 水解活性的变体

[0308]

序列	pNC6 水解 : pNC8 水解的比例
F154A I194M	1.13
F154G I194V	0.34
L12G	0.79
L12G I194M	0.65

[0309] 变体 F154T F196I、L12Q F154V、L12M F154E、L12G F154G、F154EI194S 和 L12G G22W 具有水解己酸甘油酯的能力, 但是不水解 pNC6 或 pNC8。

[0310] 数据显示耻垢分枝杆菌过水解酶的特异变体能够使用培养基和长链酰基酯作为底物。

[0311] 实施例 4

[0312] 酶分析

[0313] 在该实施例中, 描述了适用于评价酶纯度和活性的方法。然而, 本发明不旨在受这些具体方法的限制, 因为其它合适的方法也适用。

[0314] 酶活性测定 (pNB 测定)

[0315] 通过水解对硝基苯基丁酸酯或其它长链对硝基苯基化合物测量该活性。通过向含有 0.1% Triton X-100 的 990ml100mM Tris-HCl 缓冲液, pH8.0 中添加 10ul 二甲基亚砷中

100mM 对硝基苯基丁酸酯,制备反应混合物。在添加酶之前于 410nm 处测量背景水解率。通过向 990ml 反应中添加 10ul 酶起始反应,并在室温下 ($\sim 23^{\circ}\text{C}$) 测量 410nm 处的吸光度改变。将经背景校正过的结果表述为 $\delta A_{410}/\text{min/ml}$ 或 $\delta A_{410}/\text{min/mg}$ 蛋白质。

[0316] 酯交换

[0317] 在缓冲的含水反应中通过产品 GC 分离测量酯交换。用丙醇测量乙酸乙酯酯交换的反应在 1ml 50mM KPO_4 , pH 7.0 中含有 200mM 乙酸乙酯、200mM 1-丙醇和酶。用新戊二醇 (NPG) 测量乙酸乙酯酯交换的反应在 1ml 50mM KPO_4 , pH 7.0 中含有 303mM 乙酸乙酯、100mM NPG 和酶。将反应在指定的温度下孵育指定的时间。使用 30M FFAP 柱 (Phenomenex) 进行分离。入口分流比约为 1 : 25, 进样器为 250°C , 压头 (head pressure) 为 10psiHe, 并通过 FID 在 250°C 检测。色谱程序被设置为在 40°C 起始 4 分钟, 然后以 $15^{\circ}\text{C} / \text{分钟}$ 的梯度达到 180°C 。组分按照以下的顺序被洗脱并且未定量; 乙酸乙酯、乙醇、乙酸丙酯、丙醇、乙酸、NPG 双乙酸酯、NPG 单乙酸酯, 和 NPG。

[0318] 制备底物

[0319] 如本文所述制备底物。在想要的缓冲液中将乙酸乙酯 (EtOAc) 或其它水溶性酯稀释至 10mM 酯的浓度。通过制造底物布样 (swatch) 制备三丁精和其它不溶于水的底物。使用 5/8 英寸冲压机从未染色的聚酯织物 (Polycotton, PCW 22) 上切下聚酯布样, 并置于 24-孔微量滴定板 (Costar, Cell Culture Plate) 中。在己烷中将不溶的酯稀释至 1.03M。然后将 $10\mu\text{L}$ 不溶酯溶液吸附在聚酯布样上。

[0320] 水解的测定 (GC 测定)

[0321] 下文描述的水解测定适用于测定底物水解的量。在该测定中, 测定溶液在 0.99ml 的总体积中包含 50mM 磷酸钾 pH 7.5、10mM 酯底物、29mM 过氧化氢和 20mM 氯化钾, 以及在 25°C 下每分钟会生产 20 纳摩尔乙酸的酶量。

[0322] 为了测量不溶于水的酯水解, 将反应混合物添加至不溶的酯织物布样。布样如上文所述制备 (“制备底物”)。除了排除其它酯底物以外, 测定的所有其它条件相同。

[0323] 通过使用与火焰离子化检测偶联的气相层析监测酶从酰基供体底物产生的酸的增加来测量水解活性。如下进行测定: 首先将含有除酶以外所有组分的 $50\mu\text{L}$ 测定溶液移液进入 200L 甲醇 (HPLC 级别) 中, 以测定 0 时间时测定溶液中酸的量。然后向测定溶液中添加 $10\mu\text{L}$ 的酶至想要的终浓度, 所述终浓度每分钟生产约 20 纳摩尔的酸。打开计时器, 在添加酶后不同的时间 (通常为 2、5、10、15、25、40 和 60 分钟) 从测定溶液中取出 $50\mu\text{L}$ 等分式样并添加进 $200\mu\text{L}$ 甲醇中。

[0324] 然后将这些用甲醇猝灭的样品注射进与火焰离子检测器 (Agilent6890N) 偶联的气相层析中, 并分析水解组分、乙酸和丁酸等。使用经硝基对苯二酸修饰的聚乙二醇柱 (Zebron FFAP; 具有尺寸: 30m 长、250um 直径、250nm 膜厚度) 进行气相层析。在 1.0mL/分钟的恒定氢流下, 通过无分流注射将 $3\mu\text{L}$ 样品等分式样上样在柱上。将入口维持 250°C 的温度, 并在 2 分钟后清除任何剩余的样品组分。分析乙酸时, 将柱温度在注射后维持为 75°C 1 分钟, 以 $25^{\circ}\text{C} / \text{分钟}$ 提高至 100°C , 然后以 $15^{\circ}\text{C} / \text{分钟}$ 提高至 200°C 。

[0325] 分析丁酸时, 如上所述控制柱的温度, 例外是将温度额外地以 $25^{\circ}\text{C} / \text{分钟}$ 提高至 225°C 并在 225°C 下保持 1 分钟。层析中火焰离子检测器始终维持在 250°C 并处于 25mL/分钟的恒定氢流、200mL/分钟的恒定气流、和 30mL/分钟复合的柱和补充氢流下。然后如下测

定样品中被水解的酸量：累计层析中的酸峰得到总离子计数，并使用标准曲线从离子计数计算酸，所述标准曲线在上述条件下针对测定溶液（无酶）中不同浓度的乙酸和丁酸产生。

[0326] 过水解的测定（OPD 测定）

[0327] 下文所述的过水解活性测定适用于测定反应中形成的过酸量。在这些测定中，溶液包含 50mM 磷酸钾 pH 7.5、10mM 酯底物、29mM 过氧化氢、20mM 氯化钾和 10mM 邻苯二胺。

[0328] 使用不溶于水的酯作为酰基供体时，使用如上所述制备的吸附了酯的织物布样作为底物（“制备底物”）。

[0329] 通过监测被酶产生的过酸氧化的邻苯二胺（OPD）在 458nm 处的吸光度提高，测量过水解活性。用与水解活性测定溶液相同的方式制备过水解活性测定溶液，例外是向测定溶液中添加 OPD 至 10mM 的终浓度。在进行测定之前即刻如下制备 OPD 溶液：将 72mg OPD (Sigma-Aldrich, 二盐酸化物) 溶于 19.94mL 相同的缓冲液中，并通过缓慢添加 60pL 13.5M 氢氧化钾调节 pH。测量 pH，并在需要时添加小量的氢氧化钾，从而将 pH 回复至缓冲液的初始 pH。然后将 495 μ L 该 OPD 溶液与另一测定组分一起添加达到 0.990mL 的最终测定体积。还通过将 36mg OPD 溶于 20mL 100mM 柠檬酸和 70% 乙醇中制备测定猝灭溶液。

[0330] 测定通常在 25°C 下进行。如下开始测定：移液 100 μ L 测定溶液，然后向 200 μ L 猝灭溶液中添加酶，以测定 0 时间时测定溶液中过水解组分的量和背景吸光度。然后向测定溶液中添加 10 μ L 酶至想要的终浓度，所述酶每分钟生产约 10 纳摩尔的过酸。打开计时器，在添加酶后不同的时间（通常为 2、5、10、15、25、40 和 60 分钟）从测定溶液中取出 100 μ L 等分式样并添加进 200 μ L 猝灭溶液中。将猝灭测定溶液孵育 30 分钟，允许任何剩余的过酸氧化 OPD。然后将各 100 μ L 被猝灭的测定溶液转移至 96-孔微量滴定板 (Costar)，并通过分光光度计测量平板读数器 (Molecular Devices, SpectraMAX 250) 在 458nm 处测量溶液的吸光度。使用标准曲线计算各被猝灭的样品中过酸的量，所述标准曲线在上述条件下用测定溶液（无酶）中不同浓度的过酸产生。

[0331] 过水解 / 水解比例：

[0332] 过水解 / 水解比例 = 在过水解测定中测量的过水解 / (水解测定中检测的总酸 - 过水解测定中测量的过水解)

[0333] 过水解酶过酸产生测定

[0334] 为了过水解测量，将酶在选择的缓冲液中于明确的温度下在存在过氧化氢时与底物酯孵育。测量中等链或长链酯过水解的典型底物包括己酸、庚酸、辛酸、壬酸的甲酯或乙酯，或 C10-C22 或更长的脂肪酸酯，及其它。另外，发现野生型酶能够水解短链酸的确基苯基酯。后者是测量酶浓度的便利底物。在一些实施方案中，通过 ABTS 或 HPLC 测定测量过酸和乙酸。还在下文中描述了硝基苯基酯水解。

[0335] ABTS 测定 (1 毫升)：

[0336] 该测定提供了测定过水解酶生产的过酸。该方案从 Karst 等人 (Karst 等人, Analyst, 122 :567-571 [1997]) 改编而来。简言之，将待分析溶液的 100 μ L 等分式样添加至 1mL 125mM 柠檬酸钾, pH 5、1mM ABTS、50 μ M KI 中。在 420nm 处用最高灵敏度测量吸光度。然而，有时使用 ABTS 宽吸收光谱上的多个额外的波长。基于已知的过酸浓度系列构建校准曲线。

[0337] HPLC (Model-Agilent 1100) 测定过水解酶反应产物：

[0338] 为了测定过水解酶反应中过水解与水解的比例,通过酸化至 0.24% 甲磺酸终浓度来猝灭过水解酶反应样品,并通过反相 HPLC 在 Dionex 0A 柱 (cat#062903 ;Dionex) 上分离产物。流动相为 30℃ 下在等度条件下运行的 100mM NaPO_4 , pH 3.9 (通过用甲磺酸将 100mM Na_2PO_4 滴定至 pH 3.9 制备缓冲液)。在 210nm 处检测。通过将累计的峰面积与校准标准进行比较,计算产物浓度。

[0339] 硝基苯基酯水解动力学测定

[0340] 在 100mM Tris/HCl pH 8.0 (或 50mM B(OH)_3 pH 9.5 或另一缓冲液) 中孵育酶和底物。监测 402nm 处的吸光度。在一些实验中,测定在标准的 1mL 比色杯中进行,而在其它实验中,使用微量滴定板孔。使用后一方法筛选突变体文库。通过与相同反应条件下获得的标准曲线进行比较,测定酶浓度。

[0341] 对硝基苯基己酸酯水解测定

[0342] 通过将 1mM pNC6 (100mM 储存溶液)、1ml DMSO、19ml 100mM 磷酸盐 (pH8) 和甘油混合至 10% 的终浓度,制备 pNC6 底物溶液。为了测定样品,将 10 μL 细胞裂解物添加至 190 μL 底物溶液中,并在分光光度计中在 405nm 处测定 15 分钟。结果表示为两次实验的平均。

[0343] 对硝基苯基乙酸酯 (pNA) 水解测定

[0344] 将裂解细胞上清液的等分式样在 100mM 磷酸盐缓冲液 (pH 8) 中 1-100 稀释。为了测定样品,向微量滴定板的每个孔中放置 5 μL 1-100 稀释的细胞上清液。然后添加 195 μL 反应缓冲液 / 底物混合物 (1mM pNA、100mM 磷酸盐, pH 8, 10% 甘油), 并在 3 分钟期间测量 405nm 处的吸光度 (动力学程序, 微量滴定板读数器)。结果表示为两次实验的平均。

[0345] 本说明书中提及的所有专利和出版物指出了本发明所属技术领域的技术人员的水平。所有专利和出版物通过参考并入本文至这样的程度,即好像每个单独的出版物都表示为明确地分别通过参考并入本文。

[0346] 尽管已经描述了本发明的优选实施方案,对本领域普通技术人员显而易见的是,可以对公开的实施方案进行各种修改,而且此种修改旨在被包括在本发明的范围内。

[0347] 本领域技术人员容易认识到,本发明完全可以进行调整以实现目标并获得所提及的以及固有的结果和优势。本文中描述的组合物和方法,代表了优选的实施方案,是示范性的,而不意图成为对本发明范围的限制。对本领域技术人员显而易见的是,可以对本文中公开的发明进行各种置换和修改,而不脱离本发明的精神和范围。

[0348] 本文中例证地描述的本发明可以在缺少本文中未具体公开的任一元素或许多元素、限定或许多限定的情况下适宜地实施。已被使用的术语和表述,是被用作描述性术语的,而不是限定性的,并且本发明的意图不是在使用这些术语和表述时排除显示和描述的特征或其部分的等价物,应认识到在要求保护的发明范围内各种修改是可能的。因此,应该理解,尽管本发明通过优选的实施方案和可选的特征被具体地公开,但本领域技术人员可以重新对本文公开的概念进行修改和变化,而这些修改和变化被认为包含在如附带的权利要求限定的本发明的范围之内。

[0349] 在本文中,本发明已以宽泛的和一般性的方式被描述。落入该概括性公开内容中的每一较窄的种类和亚类也形成本发明的一部分。这包括发明的这样的概括性描述,其带有附加条件或从该类中除去任何主题的负限定,不论删除的该物质是否在本文中被具体地详述。

[0001]	序列表	
[0002]	<110> 美国丹尼斯克有限公司杰能科子公司 (DANISCO US INC., GENENCOR DIVISION)	
[0003]	<120> 用于生产长链过酸的酶	
[0004]	<130> GC936-PCT	
[0005]	<140> PCT/US2007/023327	
[0006]	<141> 2007-11-05	
[0007]	<150> US 11/595, 537	
[0008]	<151> 2006-11-09	
[0009]	<160> 31	
[0010]	<170> PatentIn 版本 3.3	
[0011]	<210> 1	
[0012]	<211> 651	
[0013]	<212> DNA	
[0014]	<213> 耻垢分枝杆菌 (<i>Mycobacterium smegmatis</i>)	
[0015]	<400> 1	
[0016]	atggccaagc gaattctgtg tttecggtgat tccctgacct ggggctgggt ccccgtcgaa	60
[0017]	gacggggcac ccaccgagcg gttegccecc gacgtgcgt ggaccggtgt gctggcccag	120
[0018]	cagctcggag cggacttcga ggtgatcgag gagggactga gcgcgcgcac caccaacatc	180
[0019]	gacgacccca ccgatccgcg gctcaacggc gcgagctacc tgccgtcgtg cctcgcgacg	240
[0020]	cacctgccgc tcgacctggt gatcatcatg ctgggcacca acgacaccaa ggcctacttc	300
[0021]	cggcgcaccc cgctcgacat cgcgctgggc atgtcggtgc tcgtcacgca ggtgctcacc	360
[0022]	agcgcgggcg gcgtcggcac cacgtacccg gcaccaagg tgctggtggt ctcgccgcca	420
[0023]	ccgctggcgc ccatgccga cccctgggtc cagttgatct tcgagggcgg cgagcagaag	480
[0024]	accactgagc tcgcccgcgt gtacagcgcg ctcgcgtcgt tcatgaagg ggcgttcttc	540
[0025]	gacgcgggtt cggtgatcag caccgacggc gtcgacggaa tccacttcac cgaggccaac	600
[0026]	aatcgcgatc tcggggtggc cctcgcggaa caggtgcgga gcctgctgta a	651
[0027]	<210> 2	
[0028]	<211> 216	
[0029]	<212> PRT	
[0030]	<213> 耻垢分枝杆菌	
[0031]	<400> 2	
[0032]	Met Ala Lys Arg Ile Leu Cys Phe Gly Asp Ser Leu Thr Trp Gly Trp	
[0033]	1 5 10 15	
[0034]	Val Pro Val Glu Asp Gly Ala Pro Thr Glu Arg Phe Ala Pro Asp Val	
[0035]	20 25 30	
[0036]	Arg Trp Thr Gly Val Leu Ala Gln Gln Leu Gly Ala Asp Phe Glu Val	
[0037]	35 40 45	

[0038]	Ile Glu Glu Gly Leu Ser Ala Arg Thr Thr Asn Ile Asp Asp Pro Thr	
[0039]	50 55 60	
[0040]	Asp Pro Arg Leu Asn Gly Ala Ser Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Ala Thr	
[0041]	65 70 75 80	
[0042]	His Leu Pro Leu Asp Leu Val Ile Ile Met Leu Gly Thr Asn Asp Thr	
[0043]	85 90 95	
[0044]	Lys Ala Tyr Phe Arg Arg Thr Pro Leu Asp Ile Ala Leu Gly Met Ser	
[0045]	100 105 110	
[0046]	Val Leu Val Thr Gln Val Leu Thr Ser Ala Gly Gly Val Gly Thr Thr	
[0047]	115 120 125	
[0048]	Tyr Pro Ala Pro Lys Val Leu Val Val Ser Pro Pro Pro Leu Ala Pro	
[0049]	130 135 140	
[0050]	Met Pro His Pro Trp Phe Gln Leu Ile Phe Glu Gly Gly Glu Gln Lys	
[0051]	145 150 155 160	
[0052]	Thr Thr Glu Leu Ala Arg Val Tyr Ser Ala Leu Ala Ser Phe Met Lys	
[0053]	165 170 175	
[0054]	Val Pro Phe Phe Asp Ala Gly Ser Val Ile Ser Thr Asp Gly Val Asp	
[0055]	180 185 190	
[0056]	Gly Ile His Phe Thr Glu Ala Asn Asn Arg Asp Leu Gly Val Ala Leu	
[0057]	195 200 205	
[0058]	Ala Glu Gln Val Arg Ser Leu Leu	
[0059]	210 215	
[0060]	<210>3	
[0061]	<211>35	
[0062]	<212>DNA	
[0063]	<213> 人工序列	
[0064]	<220>	
[0065]	<223> 引物	
[0066]	<400>3	
[0067]	gtgttttcggt gattccggca cctggggctg ggtcc	35
[0068]	<210>4	
[0069]	<211>36	
[0070]	<212>DNA	
[0071]	<213> 人工序列	
[0072]	<220>	
[0073]	<223> 引物	
[0074]	<400>4	
[0075]	gtgttttcggt gattccccga cctggggctg ggtccc	36
[0076]	<210>5	

[0077]	<211>36	
[0078]	<212>DNA	
[0079]	<213> 人工序列	
[0080]	<220>	
[0081]	<223> 引物	
[0082]	<400>5	
[0083]	gtgtttcggg gattcccaga cctggggctg ggtccc	36
[0084]	<210>6	
[0085]	<211>35	
[0086]	<212>DNA	
[0087]	<213> 人工序列	
[0088]	<220>	
[0089]	<223> 引物	
[0090]	<220>	
[0091]	<221>misc_feature	
[0092]	<222>(17)..(18)	
[0093]	<223>n 是 a、c、g 或 t	
[0094]	<400>6	
[0095]	gtgtttcggg gattccnnsa cctggggctg ggtcc	35
[0096]	<210>7	
[0097]	<211>36	
[0098]	<212>DNA	
[0099]	<213> 人工序列	
[0100]	<220>	
[0101]	<223> 引物	
[0102]	<400>7	
[0103]	gacggcgctcg acggaggcca cttcaccgag gccaac	36
[0104]	<210>8	
[0105]	<211>36	
[0106]	<212>DNA	
[0107]	<213> 人工序列	
[0108]	<220>	
[0109]	<223> 引物	
[0110]	<220>	
[0111]	<221>misc_feature	
[0112]	<222>(16)..(17)	
[0113]	<223>n 是 a、c、g 或 t	
[0114]	<400>8	
[0115]	gacggcgctcg acggannsca cttcaccgag gccaac	36

[0116]	<210>9	
[0117]	<211>36	
[0118]	<212>DNA	
[0119]	<213> 人工序列	
[0120]	<220>	
[0121]	<223> 引物	
[0122]	<400>9	
[0123]	tggtttccagt tgatcaccga gggcggcgag cagaag	36
[0124]	<210>10	
[0125]	<211>36	
[0126]	<212>DNA	
[0127]	<213> 人工序列	
[0128]	<220>	
[0129]	<223> 引物	
[0130]	<400>10	
[0131]	tggtttccagt tgatcagcga gggcggcgag cagaag	36
[0132]	<210>11	
[0133]	<211>36	
[0134]	<212>DNA	
[0135]	<213> 人工序列	
[0136]	<220>	
[0137]	<223> 引物	
[0138]	<220>	
[0139]	<221>misc_feature	
[0140]	<222>(16).. (17)	
[0141]	<223>n 是 a、c、g 或 t	
[0142]	<400>11	
[0143]	tggtttccagt tgatcnmsga gggcggcgag cagaag	36
[0144]	<210>12	
[0145]	<211>37	
[0146]	<212>DNA	
[0147]	<213> 人工序列	
[0148]	<220>	
[0149]	<223> 引物	
[0150]	<400>12	
[0151]	gcgtcgacgg aatccacagc accgaggcca acaatcg	37
[0152]	<210>13	
[0153]	<211>37	
[0154]	<212>DNA	

[0155]	<213> 人工序列	
[0156]	<220>	
[0157]	<223> 引物	
[0158]	<400>13	
[0159]	gcgtcgacgg aatccaccag accgaggcca acaatcg	37
[0160]	<210>14	
[0161]	<211>37	
[0162]	<212>DNA	
[0163]	<213> 人工序列	
[0164]	<220>	
[0165]	<223> 引物	
[0166]	<400>14	
[0167]	gcgtcgacgg aatccacggt accgaggcca acaatcg	37
[0168]	<210>15	
[0169]	<211>37	
[0170]	<212>DNA	
[0171]	<213> 人工序列	
[0172]	<220>	
[0173]	<223> 引物	
[0174]	<400>15	
[0175]	gcgtcgacgg aatccacggt accgaggcca acaatcg	37
[0176]	<210>16	
[0177]	<211>37	
[0178]	<212>DNA	
[0179]	<213> 人工序列	
[0180]	<220>	
[0181]	<223> 引物	
[0182]	<400>16	
[0183]	gcgtcgacgg aatccacccg accgaggcca acaatcg	37
[0184]	<210>17	
[0185]	<211>37	
[0186]	<212>DNA	
[0187]	<213> 人工序列	
[0188]	<220>	
[0189]	<223> 引物	
[0190]	<400>17	
[0191]	gcgtcgacgg aatccacatc accgaggcca acaatcg	37
[0192]	<210>18	
[0193]	<211>37	

[0194]	<212>DNA	
[0195]	<213> 人工序列	
[0196]	<220>	
[0197]	<223> 引物	
[0198]	<220>	
[0199]	<221>misc_feature	
[0200]	<222>(18)..(19)	
[0201]	<223>n 是 a、c、g 或 t	
[0202]	<400>18	
[0203]	gcgtcgacgg aatccacnns accgaggcca acaatcg	37
[0204]	<210>19	
[0205]	<211>36	
[0206]	<212>DNA	
[0207]	<213> 人工序列	
[0208]	<220>	
[0209]	<223> 引物	
[0210]	<400>19	
[0211]	tggttccagt tgatcgttga gggcggcgag cagaag	36
[0212]	<210>20	
[0213]	<211>37	
[0214]	<212>DNA	
[0215]	<213> 人工序列	
[0216]	<220>	
[0217]	<223> 引物	
[0218]	<400>20	
[0219]	gcgtcgacgg aatccaccat accgaggcca acaatcg	37
[0220]	<210>21	
[0221]	<211>36	
[0222]	<212>DNA	
[0223]	<213> 人工序列	
[0224]	<220>	
[0225]	<223> 引物	
[0226]	<400>21	
[0227]	tggttccagt tgatccagga gggcggcgag cagaag	36
[0228]	<210>22	
[0229]	<211>37	
[0230]	<212>DNA	
[0231]	<213> 人工序列	
[0232]	<220>	

[0233]	<223> 引物	
[0234]	<400>22	
[0235]	agcgcgcgca ccaccccgat cgacgacccc accgatac	37
[0236]	<210>23	
[0237]	<211>37	
[0238]	<212>DNA	
[0239]	<213> 人工序列	
[0240]	<220>	
[0241]	<223> 引物	
[0242]	<400>23	
[0243]	gccacaatac gcgattatgg ggtggccctc gcggaac	37
[0244]	<210>24	
[0245]	<211>37	
[0246]	<212>DNA	
[0247]	<213> 人工序列	
[0248]	<220>	
[0249]	<223> 引物	
[0250]	<400>24	
[0251]	gccacaatac gcgattgggg ggtggccctc gcggaac	37
[0252]	<210>25	
[0253]	<211>37	
[0254]	<212>DNA	
[0255]	<213> 人工序列	
[0256]	<220>	
[0257]	<223> 引物	
[0258]	<220>	
[0259]	<221>misc_feature	
[0260]	<222>(16).. (17)	
[0261]	<223>n 是 a、c、g 或 t	
[0262]	<400>25	
[0263]	gccacaatac gcgatnnsgg ggtggccctc gcggaac	37
[0264]	<210>26	
[0265]	<211>36	
[0266]	<212>DNA	
[0267]	<213> 人工序列	
[0268]	<220>	
[0269]	<223> 引物	
[0270]	<400>26	
[0271]	ccctggttcc agttgccgtt cgaggcgggc gagcag	36

[0272]	<210>27	
[0273]	<211>36	
[0274]	<212>DNA	
[0275]	<213> 人工序列	
[0276]	<220>	
[0277]	<223> 引物	
[0278]	<400>27	
[0279]	gtccccgtcg aagactgggc acccaccgag cggttc	36
[0280]	<210>28	
[0281]	<211>4	
[0282]	<212>PRT	
[0283]	<213> 人工序列	
[0284]	<220>	
[0285]	<223> 经改造的肽	
[0286]	<400>28	
[0287]	Gly Asp Ser Leu	
[0288]	1	
[0289]	<210>29	
[0290]	<211>4	
[0291]	<212>PRT	
[0292]	<213> 人工序列	
[0293]	<220>	
[0294]	<223> 经改造的肽	
[0295]	<400>29	
[0296]	Gly Arg Thr Thr	
[0297]	1	
[0298]	<210>30	
[0299]	<211>4	
[0300]	<212>PRT	
[0301]	<213> 人工序列	
[0302]	<220>	
[0303]	<223> 经改造的肽	
[0304]	<400>30	
[0305]	Ala Arg Thr Thr	
[0306]	1	
[0307]	<210>31	
[0308]	<211>4	
[0309]	<212>PRT	
[0310]	<213> 人工序列	

-
- [0311] <220>
[0312] <223> 经改造的肽
[0313] <400>31
[0314] Ser Gly Asn His
[0315] 1