

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/62

C12N 9/28 C11D 3/386



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02815623.4

[43] 公开日 2004 年 10 月 27 日

[11] 公开号 CN 1541272A

[22] 申请日 2002.7.27 [21] 申请号 02815623.4

[30] 优先权

[32] 2001.8.7 [33] DE [31] 10138753.9

[86] 国际申请 PCT/EP2002/008391 2002.7.27

[87] 国际公布 WO2003/014358 德 2003.2.20

[85] 进入国家阶段日期 2004.2.9

[71] 申请人 汉高两合股份公司

地址 德国杜塞尔多夫

[72] 发明人 贝娅特丽克斯·科特维茨

罗兰德·布雷韦斯

卡尔-海因茨·毛雷尔

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责
任公司

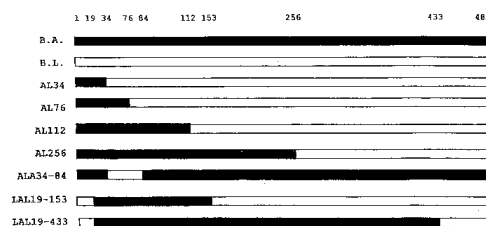
代理人 丁业平 王维玉

权利要求书 7 页 说明书 65 页 序列表 31 页
附图 2 页

[54] 发明名称 含杂合 α -淀粉酶的洗涤剂 and 清洗剂

[57] 摘要

本发明涉及来自地衣芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌菌种的 α -淀粉酶的杂合 α -淀粉酶，其能够加强相应洗涤剂或清洗剂的洗涤或清洗性能。本申请提供了含有这种杂合酶的洗涤剂和清洗剂。此外，本申请还涉及使用这种蛋白或相应的制剂用于清洗织物或硬表面的方法以及涉及这种蛋白或相应的制剂在清洗织物或硬质表面中的用途。此外，本申请还涉及一种用于改进洗涤剂和清洗剂的性能的方法，其中杂合 α -淀粉酶由地衣芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌菌种的 α -淀粉酶构成，并且加入有关制剂。



ISSN 1008-4274

1、一种洗涤剂或清洗剂，其特征在于，其包含解淀粉的杂合蛋白，其氨基酸序列在同源位置分别包含至少一种含多于一个氨基酸的部分序列，该部分序列与来自解淀粉芽孢杆菌 α -淀粉酶的序列具有同一性，以及在同源位置还分别包含至少一种含多于一个氨基酸的部分序列，该部分序列与来自地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶的序列具有同一性。

2、权利要求 1 所述的制剂，其特征在于，杂合淀粉酶的部分序列可追溯到初始分子，其长于 7，优选长于 14，更优选 21 到 462 个氨基酸长度。

3、权利要求 1 和 2 任一项所述的制剂，其特征在于，杂合蛋白由 3 个或 2 个根据初始序列相互之间补充的部分序列组成。

4、权利要求 1 到 3 任一项所述的制剂，其特征在于，杂合淀粉酶的融合点位于一个或多个按 SEQ ID NO.4 编码的位置 17、34、76、108、112、142、147、149、151、163、174、179、185、191、198、207、231、234、244、256、263、276、431、84、99、429、201、19、433 和 153 的上游 10 个氨基酸到下游 10 个氨基酸的区域。

5、权利要求 1 到 4 任一项所述的制剂，其特征在于，杂合淀粉酶的融合点位于一个或多个按 SEQ ID NO.4 编码的位置 17、34、76、108、112、142、147、149、151、163、174、179、185、191、198、207、231、234、244、256、263、276、431、84、99、429、201、19、433 和 153 的上游 5 个氨基酸到下游 5 个氨基酸的区域。

6、权利要求 1 到 5 任一项所述的制剂，其特征在于，杂合淀粉酶的融合点位于一个或多个按 SEQ ID NO.4 编码的位置 17、34、76、108、112、142、147、149、151、163、174、179、185、191、198、

207、231、234、244、256、263、276、431、84、99、429、201、~~19~~、433 和 153。

5 7、权利要求 4 到 6 任一项所述的制剂，其特征在于，其包含下列任一种杂合淀粉酶：AL17、AL108、AL142、AL147、AL149、AL151、AL163、AL174、AL179、AL185、AL191、AL198、AL207、AL231、AL234、AL244、AL263、AL276、AL431、ALA17-151、ALA76-151、ALA99-429、ALA12-151、ALA112-201、LA19 和/或 LA431。

10

8、权利要求 1 到 6 任一项所述的制剂，其特征在于，杂合淀粉酶的融合点位于一个或多个按 SEQ ID NO.4 编码的位置 34、256、84、19 和 153 的上游 10 个氨基酸到下游 10 个氨基酸的区域内，优选位于一个或多个所述位置的上游 5 个氨基酸到下游 5 个氨基酸的区域内，
15 更优选就在一个或多个这些位置上。

9、权利要求 8 所述的制剂，其特征在于，其含有下列任一杂合淀粉酶：AL34(SEQ ID NO.6)、AL256(SEQ ID NO.12)、ALA34-84(SEQ ID NO.14)和/或 LAL19-153(SEQ ID NO.18)。

20

10、权利要求 1 到 6 任一项所述的制剂，其特征在于，杂合淀粉酶的融合点位于一个或多个按 SEQ ID NO.4 编码的位置 19、76、112 和 433 的上游 10 个氨基酸到下游 10 个氨基酸的区域内，优选位于一个或多个所述位置的上游 5 个氨基酸到下游 5 个氨基酸的区域内，更
25 优选就在一个或多个这些位置上。

11、权利要求 10 所述的制剂，其特征在于，杂合淀粉酸含有两部分序列，一部分序列来自解淀粉芽孢杆菌 α -淀粉酶(SEQ ID NO.4)的氨基酸位置 19 到 76 的部分序列，而另一部分序列来自地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶(SEQ ID NO.2)的氨基酸位置 433 到 483 的部分序列。
30

12、权利要求 1 到 11 任一项所述的制剂，其特征在于，杂合蛋白是那些与 AL76(SEQ ID NO.8)具有至少 98%，优选 99%，更优选 100% 的同一性的蛋白。

5

13、权利要求 1 到 11 任一项所述的制剂，其特征在于，杂合蛋白是那些与 AL112(SEQ ID NO.10)具有至少 98%，优选 99%，更优选 100% 的同一性的蛋白。

10

14、权利要求 1 到 11 任一项所述的制剂，其特征在于，杂合蛋白是那些与 LAL19-433(SEQ ID NO.16)具有至少 98%，优选 99%，更优选 100% 的同一性的蛋白。

15

15、一种洗涤剂或清洗剂，其特征在于，其包含一种按权利要求 1 到 14 任一项所述的杂合淀粉酶，所述杂合淀粉酶通过每次不多于 5 个相邻氨基酸，优选每次不超过 3 个相邻氨基酸，更优选每次仅一个氨基酸的缺失或者通过一个氨基酸的取代而得到。

20

16、一种洗涤剂或清洗剂，其特征在于，其包含一种通过插入突变而获得的解淀粉的蛋白或者解淀粉的嵌合蛋白，所述嵌合蛋白至少与一种由权利要求 1 到 14 任一项所述的杂合淀粉酶的一部分是有同一性，所述部分赋予解淀粉活性。

25

17、一种洗涤剂或清洗剂，其特征在于，其包含一种按权利要求 1 到 16 任一项所述的杂合淀粉酶的解淀粉衍生物。

30

18、一种洗涤剂或清洗剂，其特征在于，其包含一种解淀粉蛋白或衍生物，所述蛋白或衍生物与一种权利要求 1 到 17 中所述的蛋白或衍生物享有至少一种由杂合体形成所产生的抗原决定簇。

19、权利要求 1 到 18 任一项所述的制剂，其特征在于，其含有 0.000001wt% 到 5wt%，特别是 0.00001 到 3wt% 的解淀粉蛋白或衍生物。

5 20、权利要求 1 到 19 任一项所述的制剂，其特征在于，其额外包含一种或多种其他的解淀粉蛋白，特别是 α -淀粉酶。

10 21、权利要求 1 到 20 任一项所述的制剂，其特征在于，其额外含有其他酶，特别是一种或多种蛋白酶、脂肪酶、 β -葡聚糖酶和/或纤维素酶。

22、权利要求 1 到 21 任一项所述的制剂，其特征在于，其含有一种以上相。

15 23、权利要求 1 到 22 任一项所述的制剂，其特征在于，该制剂是固体的，以及在总体松散的混合物中存在至少两种不同固体成分，特别是粉末，颗粒或挤出物。

20 24、根据权利要求 1 到 23 任一项所述的制剂，其特征在于至少两个固体相以连接在一起的形式存在，特别在一个共同的压实步骤之后。

25 25、根据权利要求 22 到 24 任一项所述的制剂，其特征在于至少一个相中含有淀粉酶敏感的材料，特别是淀粉，或者被所述材料至少部分包覆或涂层。

30 26、根据权利要求 1 到 22 任一项所述的制剂，其特征在于其总体上处于液体，胶体或膏状形式，并且所含有的蛋白质和/或至少一种所含的酶和/或至少一种所含的其它成分单独或共同和其他成分以胶囊化的形式存在，优选以微胶囊的形式存在，特别优选是存在于由淀粉

分解酶敏感的材料所制成的那些物质中。

5 27、根据权利要求 1 到 26 任一项所述的制剂，其特征在于淀粉分解活性通过制剂的另一种成分来进行改性，特别是进行稳定化和/或提升其在制剂的洗涤或清洁功效方面的作用。

10 28、一种用于清洁纺织品或硬质表面的方法，其特征在于，在至少一个方法步骤中，如权利要求 1 到 18 任一项所述的淀粉分解蛋白质或衍生物变成有活性的。

29、一种用于清洁纺织品或硬质表面的方法，其特征在于，在至少一个方法步骤中，使用了如权利要求 1 到 27 任一项所述的制剂。

15 30、根据权利要求 28 或 29 的方法，其特征在于在相关方法步骤中所使用的淀粉分解蛋白质或其衍生物的每次用量为 0.01mg 到 400mg，优选 0.02mg 到 200mg，特别优选在 0.02 到 100mg。

20 31、根据权利要求 1 到 18 任一项所述的淀粉分解蛋白质或衍生物单独或和至少另一种清洁活性成分或有助清洁作用的活性成分一起在清洁纺织品或硬质表面中的用途。

32、根据权利要求 1 到 27 任一项所述的制剂在清洁纺织品或硬质表面中的用途。

25 33、根据权利要求 31 或 32 的用途，其特征在于每次用量，优选在洗餐具机或洗衣机中的每次用量为 0.01mg 到 400mg，优选为 0.02mg 到 200mg，特别优选为 0.02 到 100mg 的淀粉分解蛋白质或其衍生物。

30 34、根据权利要求 1 到 18 任一项所述的淀粉分解蛋白质或衍生物单独或和至少另一种清洁活性成分或有助清洁效果的活性成分一起

在洗涤剂或清洁剂中的用途，所述洗涤剂或清洁剂含有一个以上相用于活化自身相或其他相。

5 35、根据权利要求 1 到 18 任一项所述的淀粉分解蛋白质或衍生物单独或和至少另一种清洁活性成分或有助清洁效果的活性成分一起在洗涤剂或清洁剂中的用途，所述洗涤剂或清洁剂含有胶囊化的成分，用于从胶囊体内释放成分。

10 36、一种用于改善洗涤或清洁剂的洗涤或清洁效果的方法，其特征在于将分别含有至少一个氨基酸的来自于解淀粉芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌的 α -淀粉酶的序列片段，在同源位置融合，以生成具有淀粉分解活性的杂合淀粉酶，并将所述杂合淀粉酶添加到制剂中去。

15 37、根据权利要求 36 的方法，其特征在于，杂合淀粉酶的部分序列可被追溯到初始分子，其长度大于 7，更优选大于 14，特别优选为 21 到 462 个氨基酸。

20 38、根据权利要求 36 或 37 所述的方法，其特征在于杂合蛋白质由 3 或 2 个根据起始序列相互补充的部分序列所组成。

25 39、根据权利要求 36 到 38 任一项所述的方法，其特征在于，杂合淀粉酶的融合点位于一个或多个根据 SEQ ID NO.4 编码的位置 17、34、76、108、112、142、147、149、151、163、174、179、185、191、198、207、231、234、244、256、263、276、431、84、99、429、201、19、433 和 153 的上游 10 个氨基酸到下游 10 个氨基酸的区域内。

30 40、根据权利要求 36 到 39 任一项所述的方法，其特征在于，杂合淀粉酶的融合点位于一个或多个根据 SEQ ID NO.4 编码的位置 17、34、76、108、112、142、147、149、151、163、174、179、185、191、198、207、231、234、244、256、263、276、431、84、99、429、201、

19、433 和 153 的上游 5 个氨基酸到下游 5 个氨基酸的区域内。

5 41、根据权利要求 36 到 40 任一项所述的方法，其特征在于，杂合淀粉酶的融合点位于一个或多个根据 SEQ ID NO.4 编码的位置 17、34、76、108、112、142、147、149、151、163、174、179、185、191、198、207、231、234、244、256、263、276、431、84、99、429、201、19、433 和 153 上。

10 42、根据权利要求 36 到 41 任一项所述的方法，其特征在于所得到的杂合淀粉酶另外含有一个或多个每次不超过 5 个相邻氨基酸，优选每次不超过 3 个相邻氨基酸，特别优选每次只有一个氨基酸的缺失。

15 43、根据权利要求 36 到 42 任一项所述的方法，其特征在于，所得到的杂合淀粉酶根据 SEQ ID NO.4 的计数另外在位置 132,320 和 412 中的至少一个位置上进行氨基酸替换，逐渐优选在其 1, 2 或 3 个位置上进行氨基酸替换。

20 44、根据权利要求 36 到 43 任一项所述的方法，其特征在于所得到的杂合淀粉酶另外含有插入，或是表示一种淀粉分解嵌合蛋白质。

45、根据权利要求 36 到 44 任一项所述的方法，其特征在于所得到的杂合淀粉酶另被衍生物。

25 46、根据权利要求 36 到 45 任一项所述的方法，其特征在于为生成杂合淀粉酶而使用在相应部分区域内具有在 SEQ ID NO.1 和 SEQ ID NO.3 中所记载的核苷酸序列或与此同义的核苷酸序列的核酸。

含杂合 α -淀粉酶的洗涤剂 and 清洗剂

5 本发明涉及含来自地衣芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌菌种的 α -淀粉酶的杂合 α -淀粉酶的洗涤剂 and 清洗剂，还涉及使用这种蛋白或相应的制剂用于清洗织物或硬表面的方法以及涉及这种蛋白或相应的制剂清洗织物或硬质表面的用途。此外，本发明还涉及一种用于改进洗涤剂和清洗剂的性能的方法，其中杂合 α -淀粉酶由地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)和解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)菌种的 α -淀粉酶
10 构成，并且将其加入到有关的制剂。

α -淀粉酶(E.C. 3.2.1.1)水解淀粉和淀粉样多聚体如直链淀粉、支链淀粉或糖原的内 α -1,4-糖苷键，以形成糊精以及 β -1,6-支链寡糖。它们是最重要的工业用酶之一。原因有两个：第一，它们从微生物释放
15 到外围培养基中，以便通过发酵和纯化在工业规模上可相对容易地从培养基中分离出来。第二，大范围的应用需要淀粉酶。

α -淀粉酶的一个重要工业用途是作为活性成分用于洗涤剂和清洗剂中。其对于有关制剂的洗涤或清洗性能的贡献是分解含淀粉的污渍。水解产物被洗涤剂或清洗剂的其余成分连接、溶解、乳化或悬浮，或者基于其较高的溶解度而被清洗水流冲刷掉，以便在酶与制剂的其余成分之间发生最佳的协同效应。
20 对能够适合添加在洗涤剂和清洗剂中的天然来源的 α -淀粉酶进行了深入的检索。已经证实例如来自脂肪杆菌(*Pimelobacter*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)以及栖热菌(*Thermus*)的淀粉分解酶用于食品生产、化妆品和制药产品(EP 0 636 693)中，来自根瘤菌(*Rhizobium*)、节杆菌(*Arthrobacter*)、短杆菌(*Brevibacterium*)以及微球菌(*Micrococcus*)(EP 0 628 630)，来自火球菌(*Pyrococcus*)(WO 94/19454)以及硫化叶菌

25 对能够适合添加在洗涤剂和清洗剂中的天然来源的 α -淀粉酶进行了深入的检索。已经证实例如来自脂肪杆菌(*Pimelobacter*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)以及栖热菌(*Thermus*)的淀粉分解酶用于食品生产、化妆品和制药产品(EP 0 636 693)中，来自根瘤菌(*Rhizobium*)、节杆菌(*Arthrobacter*)、短杆菌(*Brevibacterium*)以及微球菌(*Micrococcus*)(EP 0 628 630)，来自火球菌(*Pyrococcus*)(WO 94/19454)以及硫化叶菌
30 对能够适合添加在洗涤剂和清洗剂中的天然来源的 α -淀粉酶进行了深入的检索。已经证实例如来自脂肪杆菌(*Pimelobacter*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)以及栖热菌(*Thermus*)的淀粉分解酶用于食品生产、化妆品和制药产品(EP 0 636 693)中，来自根瘤菌(*Rhizobium*)、节杆菌(*Arthrobacter*)、短杆菌(*Brevibacterium*)以及微球菌(*Micrococcus*)(EP 0 628 630)，来自火球菌(*Pyrococcus*)(WO 94/19454)以及硫化叶菌

(*Sulfolobus*)的淀粉分解酶用于高温下或高酸性反应条件下的淀粉液化(EP 0 727 485 和 WO 96/02633)。来自芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)的淀粉酶(WO 95/26397 和 WO 97/00324)已被发现用于碱性 pH 值下。由于它们对洗涤剂的灵敏度低, 来自各种芽孢杆菌的其他淀粉酶(EP 0 670 367)适用于洗涤剂/清洗剂中。来自 *Thermoalcalibacter* 的淀粉酶(WO 98/13481), 其很大程度上不受钙离子的影响, 因此从一开始, 其就具有用于洗涤剂的优选资格。

通常用于洗涤剂/清洗剂中的 α -淀粉酶是一种来自地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)的 α -淀粉酶。丹麦 Novozymes A/S, Bagsvaerd 的对应产品是商业上已知的 Termamyl®; 美国 Genencor Int., Rochester, New York 的是 Purastar®。由解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)产生和例如在 US1 227 374 中通过枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)发酵制得的 α -淀粉酶已被 Novozymes A/S 以 BAN®的名称进行销售。来自地衣芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌的 α -淀粉酶以及来自嗜热脂肪芽孢杆菌(*B. Stearothermophilus*)的 α -淀粉酶的序列例如在申请 WO96/23874 中公开。

这些淀粉酶分子及其密切相关物已在众多发明中, 特别是通过分子生物学修饰被进一步开发, 使这些淀粉酶分子在特殊应用中, 特别在洗涤剂和清洗剂的使用中达到最佳。这些最佳化可涉及例如底物特异性、各种反应条件下酶的稳定性或酶活性自身。

进一步开发的方法是通过点突变而改进其特性。例如申请 WO96/23873 中公开了用于添加在洗涤剂和清洗剂中的从这种 α -淀粉酶所得到的改进的变体, 已知其是野生型酶或源自微生物, 以前被厂商描述为碱性蛋白酶。WO 99/20768 中的诱变方法例如导致 α -淀粉酶变体, 这些变体在洗涤剂成分存在下尤其稳定。在这样的修饰情况下, 个别酶特性的变化几乎总是对特定酶的其他特性和洗涤性能发生效应。以此种途径获得的现已上市的最佳化产品的一个例子是 Duramyl®

(WO 94/02597), 其降低了对氧化的灵敏度(Novozymes; SÖFW-Journal 123, (1997), 第 723-731 页)。

5 其他的例子: WO 99/02702 中的淀粉酶在相对高的温度下比始发分子更稳定。WO 99/23211 中的酶在高 pH 值、有钙离子存在以及较高温度下是稳定的。WO 97/43424 中的 α -淀粉酶对钙离子表现出改进的结合能力, 并因此改进酶特性。

10 所用的另外或者附加的最佳化方法包括例如化学修饰 (DE4013142)。

15 例如, 专利申请 WO99/43793 描述了另外的方法进一步开发已知 α -淀粉酶。借助分子生物学技术, Novamyl®和已知的环糊精葡聚糖转移酶(CGTase)之间的序列相似性被用来重组相对大分子部分并因此建立一组相关分子。这些相关分子关系到具有其他 CGTase 特异的共有序列(框)和功能的 α -淀粉酶, 或与此相反, 关系到具有 α -淀粉酶的其他典型区段和功能的 CGTase 或者关系到两分子的嵌合。

20 专利申请 WO 99/57250 公开了另一种类似的如何提高洗涤酶的洗涤性能的方法, 其中所述原理在于通过非氨基酸连接体将特定酶与细菌起源的纤维素结合区(CBD)共价结合在一起。这确保了酶以更大的活性作用于织物的表面。从这种意义上来讲, WO 99/57252 包括其他可能的连接体, 因为 WO 99/57254 包括其他酶例如糖基转移酶或者酰基转移酶, 它们与纤维素结合区结合以形成嵌合蛋白, 或者通过 WO 25 99/57252 中提到的连接体相结合。

30 这表明在洗涤剂 and 清洗剂中用如由新型开发的物质 (neuentwickelten Inhaltsstoffen)所形成的其他 α -淀粉分解酶来丰富本领域的必要性, 所述新型物质如漂白剂一样影响自己的范围, 并损害这些淀粉分解酶的效能。这种必要性也根据不同的清洗目的并随消费者

需求和习惯的改变而显现，据此例如，对在低温和中等温度的环境下洗涤的洗涤剂就有增长的需求。

5 现有技术已经很好地形成了融合蛋白或杂合蛋白的生产技术。所以，在申请 EP208 491 中描述了生产杂合蛋白的体内方法，此方法基于将 DNA-片段一个接一个克隆到载体中。例如按杂合淀粉蛋白酶来说，其 N-末端区符合来自嗜热脂肪芽孢杆菌的 α -淀粉酶的片段，其 C-末端区符合来自地衣芽孢杆菌的 α -淀粉酶的片段。

10 在申请 WO96/23874 中公开了来自地衣芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌和米曲霉(*Aspergillus oryzae*)的 α -淀粉酶的杂合物。具体来说，其氨基酸 1-300 源自解淀粉芽孢杆菌的 α -淀粉酶和氨基酸 301-483 源自地衣芽孢杆菌的 α -淀粉酶；按本申请(见下文)的术语也可以表示为 AL300。在此也公开了一种变体 AL37。按照该申请的教导，确认 Termamyl 相似的淀粉酶三维结构，可生产出所述的杂
15 合淀粉酶，以便辨认其位置，这对于酶活性很重要。这些位置能够被定点突变有目的地改变并用于特定的用途。相应地，由于酶特性的不同而命名了单独的位置或这些位置的具体代替。在本说明书中没有对非点突变杂合淀粉酶自身有更多可能的工业用途。

20 基于这些发现，WO97/41213 公开了通过点突变得到野生型酶或单独杂合淀粉酶的变体，包括 AL37，并添加在洗涤剂和清洗剂中。

25 申请 WO00/60059 公开了一种变体，其在底物淀粉上培养出了改变的分解模式，并非常适合于淀粉加工；因此长支链寡糖的生成优于短支链寡糖。其中描述了大量的原始 α -淀粉酶或杂合淀粉酶的点突变，如 AL33 和 AL37(其序列是相同的)，其还能在 412 位置(按地衣芽孢杆菌计数)含有突变，优选为 T412A；但是此外还必须在 13、48 到 54、57、107、108、111、168 和 197 位置中的任一个存在至少第二种
30 突变；优选是有更多替代的多重突变体。

上述三个申请没有公开 17、34(对应于按地衣芽孢杆菌编号 36)、76、108、112、142、147、149、151、163、174、179、185、191、198、207、231、234、244、256、263、276、431、84、99、429、201、19、433 或 153 位置按解淀粉芽孢杆菌编号的融合点。同样没有公开在 134 或 320(按地衣芽孢杆菌计数)位置具有序列变体的杂合淀粉酶, 所公开的 412 位置突变形成与其他限定变体的结合以及与酶活性特殊变化的相互联系。

因此, 本发明目的是提供具有新型或者至少在本应用领域内未知的解淀粉酶的洗涤剂 and 清洗剂, 优选比确立的 α -淀粉酶具有显示出较好洗涤能力或清洗能力的解淀粉酶。

第一部分目的是提供清洗织物或硬表面的方法, 其中由于用所述淀粉酶具有增强洗涤或清洗性能的结果。

第二部分目的是指出相关于增强性能的潜在用途。

第三部分目的是指出一种方法, 按此方法, 通过使用新型淀粉酶而提高洗涤剂和清洗剂的性能。

这些目的用准备好的杂合蛋白解决, 此杂合蛋白由来自解淀粉芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌的 α -淀粉酶通过融合适当的匹配部分构成。

方法的独特之处在于甚至单独重组天然的和形成的长链 α -淀粉酶的序列而得到更有效的洗涤剂淀粉酶或清洗剂的淀粉酶。这些杂合淀粉酶可以作为初始点有目的地扩展应用领域。

因此本发明涉及洗涤剂或清洗剂, 其特征在于, 其包含解淀粉的杂合蛋白, 在各同源位置中蛋白的氨基酸序列包括至少一部分含多于

一个氨基酸的序列，其与来自解淀粉芽孢杆菌的 α -淀粉酶序列具有同一性，以及在各同源位置中蛋白的氨基酸序列包括至少一部分含多于一个氨基酸的序列，其与地衣芽孢杆菌的 α -淀粉酶序列具有同一性。其中这样的制剂是优选的，杂合淀粉酶的部分序列在追溯到起始分子上时，多于 7，优选多于 14，更优选为 21 到 462 个氨基酸长度和/或，此制剂的杂合蛋白由 3 或 2 个根据初始序列相互补充的部分序列组配而成。

这些目的的优选由下列制剂实现，其中杂合淀粉酶具有的融合点按解淀粉芽孢杆菌的 α -淀粉酶(SEQ ID NO.4)的编号接近位置 17、34、76、108、112、142、147、149、151、163、174、179、185、191、198、207、231、234、244、256、263、276、431、84、99、429、201、19、433 和 153；或者更确切的说在这些位置上游和下游 10 或 5 个氨基酸范围内，或者恰恰在这些位置上。因此更优选的杂合淀粉酶是 AL17、AL108、AL142、AL147、AL149、AL151、AL163、AL174、AL179、AL185、AL191、AL198、AL207、AL231、AL234、AL244、AL263、AL276、AL431、ALA17-151、ALA76-151、ALA99-429、ALA12-151、ALA112-201、LA19 和 LA431。

这些目的的更优选由下列制剂实现，其中杂合淀粉酶具有的融合点按解淀粉芽孢杆菌的 α -淀粉酶(SEQ ID NO.4)的编号接近位置 34、256、84、19 和 153；或者更确切的说在这些位置上游和下游 10 或 5 个氨基酸范围内，或者恰恰在这些位置上。因此更优选的杂合淀粉酶是 AL34(SEQ ID NO.6)、AL256(SEQ ID NO.12)、ALA34-84(SEQ ID NO.14)和 LAL19-153(SEQ ID NO.18)。

这些目的的最优选由下列制剂实现，其中杂合淀粉酶含有作为部分序列的具有来自解淀粉芽孢杆菌的 α -淀粉酶(SEQ ID NO.4)的氨基酸位置 19 到 76 的部分序列和作为其他部分序列的具有来自地衣芽孢杆菌的 α -淀粉酶(SEQ ID NO.2)的氨基酸位置 433 到 483 的部分序列。因

此更优选的杂合淀粉酶是 AL76(SEQ ID NO.8)、AL112(SEQ ID NO.10) 和 LAL19-433(SEQ ID NO.16), 以及更优选的杂合淀粉酶的分子分别具有至少 98%, 优选 99%, 更优选 100% 的同一性。因此通过点突变例如单个氨基酸取代得到的变体也包括在内。

5

这些目的进一步由下列制剂实现, 其中短的不超过 5 个氨基酸范围的缺失、插入突变或衍生而得到杂合淀粉酶, 或者杂合淀粉酶具有通过杂合形成的带前述蛋白的抗原决定簇。

10

本发明主题是洗涤剂或清洗剂, 优选含有杂合淀粉酶份额按重量计从 0.000001% 比到 5%, 更优选从 0.00001% 到 3% 和/或其他酶; 其以本身已知的显示形式或集合或多相存在, 或者解淀粉活性执行释放制剂的成分功能或是自控的。

15

部分目的的实现以及第二个发明主题是清洗织物和硬表面的方法, 其特征在于最少在其中一个步骤中加入第一个主题的杂合淀粉酶或制剂。杂合淀粉酶在有关方法步骤中的使用量是每次应用 0.01mg 到 400mg, 优选是 0.02mg 到 200mg, 更优选是 0.02mg 到 100mg。

20

第二部分目的的实现以及第三个发明主题是对应的潜在用于清洗织物或硬表面与发明相关的杂合淀粉酶或用于释放对应制剂的成分; 适合的使用量为在洗碗机或洗衣机中每次应用加入 0.01mg 到 400mg, 优选是 0.02mg 到 200mg, 更优选是 0.02mg 到 100mg。

25

第三部分目的的实现以及本发明一个单独的主题是洗涤剂或清洗剂性能的所有增强方法, 这些方法基于开发的杂合淀粉酶, 对此, 将在各同源位置中包含至少多于一个氨基酸的来自解淀粉芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌的 α -淀粉酶的部分序列融合到一种有解淀粉活性的杂合淀粉酶中, 并加入到制剂中。

30

优选的解决方法首先基于所讨论的杂合淀粉酶，最优选基于本发明所述来自解淀粉芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌(SEQ ID NO.3 和 SEQ ID NO.1)天然基因的序列信息。

5 在本发明的意义中，蛋白是指一种由天然氨基酸组配成、基本上线性结构并通常行使其功能的三维构造的聚合物。在本申请中，它们被称作具有 1-和 3-字母代码的 19 种组成蛋白的、天然存在的 L-氨基酸。

10 在本发明的意义中，酶是指一种蛋白质，它起着某种生化功能。淀粉分解蛋白或者具有淀粉分解功能的酶理解为那些水解多糖的 α -1,4-糖苷键(特别是那些位于多糖内部的那些键)的蛋白酶。因此它们也被叫做 α -1,4-淀粉酶(E.C. 3.2.1.1)或简称 α -淀粉酶。

15 很多蛋白质以所谓的蛋白前体(前体蛋白)，即与一个信号肽或引导肽一起形成。在这种情况下，则指这种蛋白的 N-末端部分，其功能通常在于保证形成的蛋白质从生产细胞释放到周质或者周围的介质中，以及/或者保证其正确的折叠。而另一方面，由于它们的酶活性，成熟的肽即合成后经加工的酶比起蛋白前体来说在工业应用上更受青睐，也在本发明的范围内。

20

 在本发明的意义中，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。作为天然永

25 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，要形成 RNA。

 在 DNA 中，所有三个可能读码框中的两条互补链序列都必须考

30 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的同一性的核苷酸序列(遗传密码子的简并性)得到。除此以外，各种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
5 每种情况下应只被看作编码某氨基酸序列的举例。

同样在本发明的意义中，核酸与蛋白对应的信息单元被称作基因。

10 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，专业人员有可能根据已知 DNA 序列和/或氨基酸序列生产对应的核酸直至完整的基因。这种方法例如公开在“Lexikon der Biochemie”，Spektrum Akademischer Verlag, Berlin, 1999, Vol.1, 第 267-271 页和 Vol. 2, 第
15 227-229 页上。

核苷酸序列的变化被称为突变，其可以通过本身已知的分子生物学方法得到。根据变化的类型，突变分为例如缺失突变、插入突变、替代突变，或者各种不同的基因抑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
20 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。本申请中，突变用一般的单字母代码表示。因此点突变 T410A 是在特定蛋白位置 410 上的替换，其中氨基
25 酸苏氨酸被氨基酸丙氨酸所取代。

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。在氨基酸序列的基础上，它们能被设计成特异的完整蛋白。例如它们可以具有相同的结构，
30

或可发挥解淀粉活性或者部分活性，例如底物的络合。片段及初始蛋白的缺失变体原理上是一样的。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。

5 部分序列是在核酸水平上的片段等价物。

在本发明的意义中，嵌合或者杂合蛋白是由那些由相同或不同生物的不同多肽链天然产生的元件所组成的蛋白。这个过程也就是改组或融合突变。融合的目的例如是在融合部分蛋白的帮助下生成或者修
10 饰具体的酶功能，或者获得在某种意义上改进了其性质的酶。

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或蛋白片段插入到起始序列中而得到。因为它们原理相似，它们应归于嵌合蛋白中。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
15 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。同样适用于各种不同分子部分的重组，这与原始的氨基酸序列相
20 异。所述重组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。

在本发明的意义中，衍生物是指其纯的氨基酸链已经化学修饰的蛋白。这种衍生化作用例如可通过宿主生物以生物方法结合蛋白合成
25 进行。分子生物学的方法可以用于此目的。然而，这些衍生物也可以化学方法来实施，例如通过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根据本发明所述的蛋白结合的另一蛋白。同样，衍生化作用也被认为包括对大分子载体的共价结合。

30

与抗血清或某种抗体发生反应的蛋白都被称为免疫相关蛋白。由于它们具有同样的被一种抗体辨别出来的抗原决定簇，因而归为一类。

5 在本发明的意义中，所有的酶、蛋白、片段及衍生物被集体的冠以蛋白的名字，除非它们需要清晰的指称。

10 通过与例如在常用数据库中保存的已知酶相比较，被研究酶的特征分子部分，如结构单元或者酶活，能够从氨基酸及核苷酸序列推导得到。

15 这种比较是通过确定被研究蛋白彼此之间核苷酸或氨基酸序列的相似性来完成的。这就是所谓的同源化。对特定位点的列表称为比对。在对核苷酸序列的分析中，其互补链以及所有可能的三个读码框都必须列入考虑范围，除此以外，还有遗传密码子的简并性和生物特异密码子的利用率。现在，比对是由计算机程序产生的，例如通过 FASTA 或者 BLAST 算法。这个程序例如由 D.J. Lipman 和 W.R. Pearson (1985) 在 *Science*, Vol. 227, 第 1435-1441 页中描述。所有与被比较序列相匹配的位置总汇称为共有序列。

20 这样的比较也为被比较序列之间的相似性或同源性提供了信息。此信息以同一性的百分数来表示，即相同处的位置相同核苷酸或氨基酸残基的比例。同源性的更广泛的定义包括保守氨基酸的替换。这样，同一性百分率就可以变成相似性百分率。这种表述可以针对整个蛋白或者基因，或者单独的一个区域。

25 不同蛋白的同源区一般有相同的结构单元和/或功能，可以通过与一级氨基酸序列相对照而识别出来。在很小区域所谓框中范围可高达完全同一性，这些框仅包含一些氨基酸并且一般对于整个活性发挥至关重要的作用。同源区的功能只代表蛋白整体功能的一小部分，例

如络合底物或过渡复合体中单个氢键桥的形成。

5 在至少两种蛋白之间的同源区的识别是基于将所述蛋白与具有可比功能的融合或杂合蛋白组合。此时至少一个蛋白区被其他蛋白的同源区取代。因此，融合区必须适配，保留全蛋白的主要功能。如果例如融合涉及到双淀粉酶部分序列，当融合产物自身具有所有的解淀粉活性时，则获得了本发明的杂合淀粉酶。

10 酶活性能够被那些不参与实际反应的其他蛋白区域定性或者定量的修饰。这关系到酶的稳定性、活性、反应条件或底物特异性。

因此，根据本发明所述的淀粉分解蛋白的定义不仅适用于实施水解 α -1,4-糖苷键的单一功能，所述键可归功于可能的催化活性中心的数个氨基酸残基。同时它也包括所有支持 α -1,4-糖苷键水解的功能。

15 酶的性能被认为是在所属工业技术领域里的效能。这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。例如，考察一种酶是否适用于洗涤剂或清洗剂也包括此酶对与其他成分制成的洗涤剂或清洗剂的洗涤或清洗性能贡献的判断。

20 将本发明的重要蛋白加到本发明所述洗涤剂或清洗剂中。优选使用那些酶活性有助于改善至少一种洗涤剂或清洗剂配方对位于至少一种表面上的至少一种含淀粉或类似淀粉的污渍有效果的蛋白。更优选那些有助于相关制剂在多于一种清洗问题时的洗涤或清洗性能的蛋白。

30 所涉及的表面是织物或硬表面。因此对于可选条件，如温度、pH-值、离子强度、氧化还原态或机械影响应该针对各清洗问题进行优化，

即关系到污渍和承载材料。洗涤剂和清洗剂的一般温度范围是从手洗制剂的 10℃，超过 40℃和 60℃直到机洗制剂或工业用途的 95℃。优选特定制剂的成分相互协调。

5 作为本发明制剂特征的杂合淀粉酶由来自解淀粉芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌的 α -淀粉酶的部分序列的同源互补组成。也就是说，特定杂合淀粉酶的每个氨基酸存在于至少含两种氨基酸的部分区中，部分区中的同源位置上发现了一种或另外的初始序列。例如依据下文图 2 的比对，可对此加以理解。

10

从开放数据库中通过检索名称 amyA(用于解淀粉芽孢杆菌的 α -淀粉酶)或 amyL(用于地衣芽孢杆菌的 α -淀粉酶)得到这两个初始酶的序列。例如在瑞士蛋白数据库中(Geneva Bioinformatics (GeneBio) S.A. Geneva, 瑞士; <http://www.genebio.com/sprot.html>), 它们以登录号
15 P00692(用于解淀粉芽孢杆菌的 α -淀粉酶 amyA)和 P06278(用于地衣芽孢杆菌的 α -淀粉酶 amyL)表示。此外，它们在本申请中分别示为序列表 SEQ ID NO.4 和 SEQ ID NO.2;并且相应的核苷酸序列分别示为 SEQ ID NO.3 和 SEQ ID NO.1。

20 两个芽孢杆菌菌种在著作中有详细描述并且能从菌种保藏中心得到。解淀粉芽孢杆菌或以名称 DSM7 从德国微生物保藏中心(Deutsche Sammlung Von Mikroorganism und Zellkulturen GmbH), Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig(<http://www.dsmz.de>)中或者以名称 ATCC23350 从美国典型培养物保藏中心(ATCC), 10801 University
25 Boulevard, Manassas, VA 20110-2209,USA(<http://www.atcc.org>)中得到。地衣芽孢杆菌能以名称 DSM13, 或以名称 ATCC14580 分别从上述相同的地方得到。

30 依据本申请的序列表(SEQ ID NO.3 和 SEQ ID NO.1), 利用合成引物, 通过 PCR, 从这些菌株中, 可获得相应的 α -淀粉酶基因。所得

的 PCR-产物能按已知的方法克隆并能以任一方便方式进行进一步加工(见下文)。

5 本发明能定义对应的杂合种类并依据初始序列命名。选择字母 L 代表来自地衣芽孢杆菌的淀粉酶以及字母 A 代表来自解淀粉芽孢杆菌的淀粉酶，所以这种酶属于杂合种类 LA，此酶具有来自地衣芽孢杆菌的 α -淀粉酶序列的 N-末端和具有来自解淀粉芽孢杆菌的 α -淀粉酶序列的 C-末端。相反的组成属于杂合种类 AL，而对应三部分的融合属于 LAL 或 ALA，这取决于起始酶的哪些部分序列已加以组合。

10

附加数字在此明确地表示了融合发生所在位置的分子，即从 C 末端距离融合发生所在氨基酸的分子。如果存有疑问，来自解淀粉芽孢杆菌的 α -淀粉酶(SEQ ID NO.4)的计数是确切的。因此分子 AL76 含有来自解淀粉芽孢杆菌的 α -淀粉酶的 N-末端 76 个氨基酸，接着直到 C-末端是来自地衣芽孢杆菌的 α -淀粉酶的同源氨基酸，即根据地衣芽孢杆菌的 α -淀粉酶的编码，从位置 79 的酪氨酸开始。例如，杂合淀粉酶 LAL19-433，其组成是来自地衣芽孢杆菌的 α -淀粉酶的 N-末端 21 个氨基酸，接着是来自解淀粉芽孢杆菌的 α -淀粉酶的同源区，即此区从组氨酸之后连接的色氨酸开始同源互补直到甘氨酸，甘氨酸对应位置 433，最后是来自地衣芽孢杆菌的 α -淀粉酶的残余氨基酸，这些残余氨基酸的范围是 434 到 483。在图 2 中突出了这些融合点。

20

如果从氨基酸序列的考察出现关于编码的不清楚性，那么就要确定相应的核苷酸序列，就象在序列表中所公开的一样，因为它们合适在相应 DNA 的层次上形成杂合蛋白。融合点的数目由密码子的数目决定，在第一、第二或第三核碱基下游转换到其他 DNA，每个都重新基于解淀粉芽孢杆菌(SEQ ID NO.3)的密码子编码。

25

本申请的优选实施方案描述的杂合淀粉酶在图 1 中表示。其包括至少一种含解淀粉芽孢杆菌的 α -淀粉酶的最少两个氨基酸的序列区和

30

至少一种同样含地衣芽孢杆菌的 α -淀粉酶的最少两个氨基酸的序列区。

5 杂合淀粉酶的部分序列如追溯到起始分子为长于 7，优选长于 14，更优选为 21 到 462 个氨基酸长度。例如由图 1 看出，更优选代表(见下文)的部分序列在 21 和 462 氨基酸长度之间。由这里给出的融合位置的随机结合产生了本发明所述具有至少 8 个(融合 76 和 84 的点)，然后 15 个(融合 19 和 34 的点)，最后介于 21 和 462 个氨基酸长度之间的蛋白。

10

优选杂合蛋白由三个或两个根据起始序列相互互补的部分序列组配而成。也就是说，其具有一个或两个融合位置并且可以排列成杂合种类 AL, LA, LAL 和 ALA 中的任一种。

15

按体内方法生产这样的杂合淀粉酶已经在“混合物解淀粉芽孢杆菌 $\times$ 地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶构建，性质和序列决定簇”(1995)作者 B. Conrad, V. Hoang, A. Polley 和 J. Hofemeister, Eur. J. Biochem., 230, 第 481-490 页中得到广泛描述。通过体内重组而获得产物。例如，有可能将两个基因一个接一个地克隆到相同载体中，并转化到宿主细胞(参看 H. Weber, C. Weissmann(1983): "Formation of genes coding for hybrid proteins by recombination between related, cloned genes in E. coli", Nucleic Acid Res., 11, 第 5661-5669 页, 和 EP208 491)。由此出现了一批杂合淀粉酶，它们不依赖某个限制性切割位点在所述两个基因之间发生重组事件。所得蛋白在图 2 中由 Conrad 等图示说明。

20

25

然而，现有技术中用存在的体外法来保证实施超过一种的融合更有前途。因而，将两个基因融合到已知存在的或后来引入的限制性切割位点可能形成杂合淀粉酶。在两个特定的基因(SEQ ID NO.1 和 3)中引入附加的区分位置，在其上按已知的点诱变方法，如经错配引物，而替换期望的核苷酸。利用遗传编码子的简并性有可能仅仅获得同义

30

5 的密码子，即仅放置那些不影响得出的氨基酸序列的突变。可以自由
选择所得限制区分位置，因为对于这个选择每次都可以调整体外融合
与合适的限制酶相一致；这尤其适用于生成独特的切割位点。或者，
部分序列的 PCR 反应优选利用含区分位置的引物也可实施，以及相互
连接所得产物。

10 其他可以获得这样所述融合蛋白的可能性例如有：(a)经与循环序
列重复可比较的方法随机重组适当的片段，就象在 WO98/05764，
WO97/35966，EP590689 和 EP229046 中所描述的；以及(b)在基于 PCR
方法上随机重组合适的片段；如 StEP 方法，其已经在申请 WO98/42832
中公开。

15 融合的 DNA 分子接着按已知方法克隆、扩增和在宿主细胞中表
达。因此合适的系统，如载体和/或宿主细胞同样在现有技术中已知，
并且大量商业化。对于特定杂合淀粉酶的工业生产，具有高产率的简
单可培养宿主细胞是非常合适的。

20 已知两种初始酶能对相应制剂的洗涤或清洗能力做出贡献，特别
是攻击淀粉的和类似淀粉的污渍。因此，两种原生型分子皆是可购买
的 α -淀粉酶 BAN®或 Termamyl®(制造商：Novozymes A/S, Bagsvaerd,
丹麦)的初始点。但是，它们具有不同的酶特性，特别是某些热稳定性。
来自解淀粉芽孢杆菌的 α -淀粉酶的热稳定性明显低于来自地衣芽孢杆
菌的 α -淀粉酶(Tomazic, S.J., 和 Klibanov, A.M., (1988), J. Biol. Chem.
263, 第 3086-3091 页和第 3092-3096 页)。

25 能以所述方式从两种初始酶获得的杂合淀粉酶，正如依据初始酶
的酶活性和基于 Conrad 等的工作所预料的，应具有解淀粉活性。然
而它们和提高相应制剂对含淀粉和类似淀粉污渍的洗涤或清洗能力不
是无条件等价。例如有可能获得比初始酶基本上不稳定的酶并因此不
30 适合作为洗涤剂或清洗剂成分。然而如果它们在一限定条件下能够增

强至少一种适当浓缩的洗涤剂或清洗剂的洗涤和/或清洗性能，那么它们就优选加以使用。

5 可以通过试验来检查，准备具有或为对比不具有适当的杂合淀粉酶的洗涤剂或清洗剂配方，并检查其洗涤能力，即特别检查其对含淀粉污渍的去除性。在本专利申请的实施例中举出了这样的试验。

10 在本申请图 1 和 Conrad 等所述的图 2 中表示的融合蛋白通过嫁接融合和新型融合在初始基因内的位置上产生，依据来自解淀粉芽孢杆菌的 α -淀粉酶的序列(SEQ ID NO.2)编码，在蛋白层次上对应的位置有：17、34、76、108、112、142、147、149、151、163、174、179、185、191、198、207、231、234、244、256、263、276、431、84、99、429、201、19、433 和 153。这表示，占据了这些位置的氨基酸，它们的每个 C-末端跟着其他的每个序列的氨基酸。本发明的优选实施方案包括这样的杂合蛋白，杂合蛋白的融合位置处于这些位置上游 10 15 个氨基酸到下游 10 个氨基酸的范围内。与这些实施方案相比，优选递增的实施方案，其融合位置处于上游 9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 个氨基酸到下游 9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 个氨基酸的范围内。最优选的是，这些融合位置恰恰在这些位置上，即从 C-末端开始。

20

如上文所述，在杂合蛋白中不同部分序列的同一性以及融合地点也确定了它们的名称。在每种情况下形成的氨基酸序列，可以依据在序列表中编码为 SEQ ID NO.2 和 SEQ ID NO.4 所示的两种初始酶的野生型氨基酸序列以及依据图 2 来理解。

25

对于以下这些特殊的杂合淀粉酶来说，它们的某种解淀粉活性已经在 Conrad 等的出版物中得到检测：AL17、AL108、AL142、AL147、AL149、AL151、AL163、AL174、AL179、AL185、AL191、AL198、AL207、AL231、AL234、AL244、AL263、AL276、AL431、ALA17- 30 151、ALA76-151、ALA99-429、ALA12-151、ALA112-201、LA19 和

LA431。它们代表本发明的优选实施方案。

5 本发明主题的更优选的实施方案是，杂合淀粉酶具有的融合点按 SEQ ID NO.4 编码接近位置 34、256、84、19 和/或 153。其融合位置逐渐优选的处于从这些位置的上游 10、9、8、7、6、5、4、3、2 和 1 个氨基酸到下游 10、9、8、7、6、5、4、3、2 和 1 个氨基酸的范围内。

10 在此，更优选的制剂是具有杂合淀粉酶 AL34(SEQ ID NO.6)、AL256(SEQ ID NO.12)、ALA34-84(SEQ ID NO.14)和/或 LAL19-153(SEQ ID NO.18)的制剂。因为它们能够改善相应配方对含淀粉或类似淀粉的污渍的洗涤或清洗性能。从本申请实施例中可得的，其部分表明了洗涤或清洗能力与现有技术所形成的酶的能力势均力敌。

15 本发明主题的更优选的实施方案是，杂合淀粉酶具有的融合点按 SEQ ID NO.4 编码接近位置 19、76、112 和/或 433。其融合位置逐渐优选的处于从这些位置上游 10、9、8、7、6、5、4、3、2 和 1 个氨基酸到下游 10、9、8、7、6、5、4、3、2 和 1 个氨基酸的范围内。

20 在此，更优选的制剂是具有这样杂合淀粉酶的制剂，此杂合淀粉酶具有来自解淀粉芽孢杆菌 α -淀粉酶(SEQ ID NO.4)的氨基酸位置 19 到 76 的部分序列作为部分序列和来自地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶(SEQ ID NO.2)的氨基酸位置 433 到 483 的部分序列作为其他部分序列。

25 因为就像 Conrad 等所公开的那样，对于全部分子来说，在来自解淀粉芽孢杆菌 α -淀粉酶的位置 34 和 76 之间的部分起到了热稳定性的功能。然而很可能的是，并不是只有此区域负责此特性，而是热稳定性关系到淀粉酶的其他区域的相互作用。所以，此酶同时具有来自解淀粉芽孢杆菌 α -淀粉酶的位置 19 到 76 的部分序列和来自地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶的氨基酸位置 433 到 483 的部分序列，已显示在对应配
30

方的洗涤或清洗性能上做出大的贡献。结果是，在合适条件下(温度、pH 值、离子强度、机械载荷)，某些可能还未知的结构特征赋予所述酶溶解纤维或硬表面上淀粉或类似淀粉污渍的能力。这些在本申请实施例中得以证实。

5

由于这些原因，最优选的制剂含杂合淀粉酶，其与 AL76(SEQ ID NO.8)或与 AL112(SEQ ID NO.10)或与 LAL19-433(SEQ ID NO.16)至少有 98%，逐步优选 98.25%、98.5%、98.75%、99%、99.25%、99.5%、99.75%和 100%的同一性。

10

在实施例中，这些酶已经改进了这里所测试制剂对淀粉或类似淀粉污渍的洗涤或清洗能力。其贡献部分地等同于甚至高于已形成的洗涤剂或清洗剂中的淀粉酶的贡献。

15

酶 AL76、AL112 和 LAL19-433 良好的洗涤或清洗性能提示来自解淀粉芽孢杆菌 α -淀粉酶的位置 19 到 76 的范围与来自地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶的 C-末端区即从位置 433 开始相结合，不仅在有关变体的稳定性方面，而且在洗涤或清洗性能方面具有特别有利的效果。

20

特别优选的酶 AL76(SEQ ID NO.8)、AL112(SEQ ID NO.10)和 LAL19-433(SEQ ID NO.16)同源区的保护范围也包括各种通过点突变从所述酶中衍生的那些。逐步优选的具有 1、2 或 3 个点突变的位置属于此，优选在氨基酸位置中的取代，按来自地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶计数其对应于位置 134、320 和 412，或者，按来自解淀粉芽孢杆菌 α -淀粉酶计数对应于位置 132、320 和 412。

25

其中，特别优选的是 AL-76 变体 R132L、A318S 和/或 T410A(根据 SEQ ID NO.8 的计数)，AL-112 变体 R132L、A318S 和/或 T410A(根据 SEQ ID NO.10 的计数)和 LAL-19-433 变体 Q134L、A322S 和/或 T414A(根据 SEQ ID NO.16 的计数)。因为例如变体 AL76

30

R132L/A318S/T410A，其对应于本申请的实施例 2 到 7，产生了非常积极的效果，与 AL76 有可比性。

在上述逐步优选的各种杂合淀粉酶的其他位置，更多的和/或其他
5 的点突变能够进行。对此，优选单独氨基酸的取代并且最优选的是，其加入到洗涤或清洗剂中增强了淀粉酶的特性。对此的例子有：对氧化条件的稳定性，对特别是 40 到 95℃之间的高温的稳定性，对如表面活性制剂或交联制剂的改性制剂的稳定性，钙结合的改进，pH 最佳化调整，与待水解底物的相互作用或者在清洗物品表面特异性或不
10 特异性结合的改变。

这样变体的制造通过定点突变，如用所谓错配引物完成，其为现有技术
15 的专业人员所熟悉。或者，还有可能使用随机方法(随机突变)结合后续的选择为对应洗涤剂或清洗剂配方的洗涤性能做出贡献。杂合淀粉酶的这种突变方法例如在申请 WO96/23874、WO97/41213 和 WO00/60059 中公开。所得变体的预选在本申请实施例 1 中说明，其他试验按后续实施例进行。

本发明主题的其他实施方案是洗涤剂或清洗剂，其特征在于，其
20 包含一种与本发明相关的杂合淀粉酶，通过每次缺失不超过 5 个相邻氨基酸，并逐步优选为每次不超过 4、3、2，以及特别优选每次仅一个氨基酸缺失。

这种杂合淀粉酶可以这样得到，由上述初始序列的融合或从其上
25 有目的地删去较短的序列区域。所述序列区域可为相对较小的非稳定元件或者由于融合而缺失的单个氨基酸，不会影响洗涤或清洗能力。

本发明主题的其他实施方案是洗涤剂或清洗剂，其特征在于，其
30 包含一种通过插入突变而获得的解淀粉蛋白或者解淀粉的嵌合蛋白作为杂合淀粉酶，所述嵌合蛋白最少与一个由前述杂合淀粉酶的部分具

有同一性，所述部分赋予了解淀粉活性。

5 所以，可将 WO99/57250 的教导用于将这样一种酶偶合到纤维素结合区从而增加与底物的相互作用。在类似的方法中，也可将其他的洗涤或清洗活性酶与本发明相关的杂合淀粉酶相融合。N-或 C-末端是否发生融合或插入在原理上是无关紧要的；重要的是达到目标，即获得性能增强的制剂。

10 本发明主题的其他实施方案是洗涤剂或清洗剂，其特征在于，其包含一种上述杂合淀粉酶的解淀粉衍生物。

15 所述衍生物特别是通过将低分子量化合物或聚合物化学连接而得到的分子。遵循 WO00/22103 的教导，这种修饰的目的按 WO99/58651 可以是变应原作用的减少，酶参数的优化或按 EP1088887 稳定性的提高。如通过应用 WO00/26354 的教导，也可用糖基化来修饰蛋白。

20 本发明主题的其他实施方案是洗涤剂或清洗剂，其特征在于，其包含解淀粉蛋白或衍生物，它们含有最少一种通过杂合构成的带有前述蛋白或衍生物之一的抗原决定簇。

25 因此，本发明相关的从一种部分序列到另一种部分序列的过渡表征了本发明增强了的制剂和与此对应的优选的实施方案。另外，用免疫学的交叉反应很容易地得到了证据表明，在对应的制剂中本发明关键的杂合淀粉酶确实是有活性的。

30 本发明所述制剂包含发明关键的杂合淀粉酶或其衍生物，它们的量按重量计为 0.000001%到 5%，以及逐步优选为 0.00005%到 4%，0.00001%到 3%，0.0001%到 2%，和特别优选为 0.001%到 1%。

所有可能类型的洗涤剂，既包括浓缩物也包括不用稀释加以使用

的制剂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。对此包括例如用于织物、地毯或天然纤维的洗涤剂，按照本发明对此使用术语洗涤剂。它们也包括例如用于洗碗机或手工洗碗的洗涤剂或用于硬表面，例如金属、玻璃器皿、瓷器、陶器、瓦片、宝石、涂漆面、塑料、木制品或皮革的清洗剂。对于这些来说，根据本发明使用术语清洗剂。任何类型的清洗剂都是本发明的实施方案，只要其中加入本发明的蛋白质。

本发明的实施方案包含所有按照现有技术中确定的和/或所有适当的本发明制剂的提供形式。这些包括例如固体、粉末、液体、胶状或膏状制剂，如果需要由若干相组成，挤压式或非挤压式。此外提供形式还包括包装在大容器内和一份中的压出胶、颗粒、片剂及小袋。

除了对本发明必需的酶之外，本发明的洗涤剂任选包含其他成分，例如表面活性剂，如非离子、阴离子和/或两性表面活性剂和/或漂白剂和/或助洗剂以及任选其他常规成分。

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_{12-14} 醇、含有 7EO 的 C_{9-11} 醇、含有 3EO、5EO、7 EO 或 8EO 的 C_{13-15} 醇、含有 3EO、5EO 或 7 EO 的 C_{12-18} 醇及其混合物，例如含有 3 EO 的 C_{12-14} 醇和含有 5 EO 的 C_{12-18} 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。

5 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。

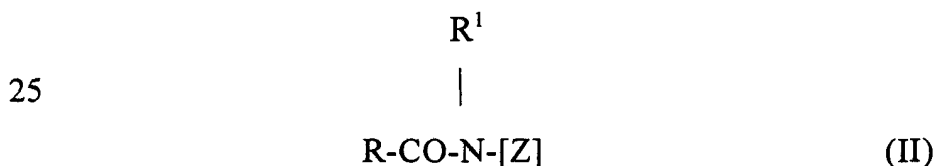
10 另一类优选使用的非离子表面活性剂是烷基多葡萄糖苷(APG)。合适的烷基多葡萄糖苷对应于通式 $RO(G)_z$ ，其中 R 是直链或支链的，特别是 2-甲基支链的、饱和或不饱和的、含有 8-22 个以及优选 12-18 个碳原子的脂族基，G 是含有 5 或 6 个碳原子的糖单元，优选是葡萄糖。糖苷化的程度 z 介于 1.0-4.0 之间，优选在 1.0-2.0 之间，以及更优选在 1.1-1.4 之间。优选使用直链烷基多葡萄糖苷，即烷基多葡萄糖苷，其中多糖基部分是葡萄糖单元以及烷基部分是正-烷基基团。

15

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。

20

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 RCO 是包含 6-22 个碳原子的脂族酰基， R^1 是氢、含有 1-4 个碳原子的烷基或羟烷基基团，以及[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，

30

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、脂肪酸烷酯或脂肪酸氯加以酰化而获得。

这组多羟基脂肪酸酰胺还包括对应于式(III)的化合物：

5



10

其中 R 是含有 7-12 个碳原子的直链或支链烷基或者链烯基，R¹ 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 R² 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 C₁₋₄ 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。

15

[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。

20

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 C₉₋₁₃ 的烷基苯磺酸酯、烯基磺酸酯，即烯基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 C₁₂₋₁₈ 单烯烃中获得的二磺酸酯。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 C₁₂₋₁₈ 烷烃中获得的链烷磺酸酯。α-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 α-磺酸化甲酯也适用。

25

30

其它合适的阴离子表面活性剂有磺基化脂肪酸甘油酯。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。优选的磺基化脂肪酸甘油酯是含 6-22 个碳原子的饱和脂肪酸的磺化产物，例如己酸、辛酸、癸酸、肉豆蔻酸、月桂酸、棕榈酸、硬脂酸或山萘酸。

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} 的羧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烷磺基琥珀酸的盐，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、氢化芥子酸和山萘酸的盐，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洗涤剂中存在的总量优选 5-50 重量%，特别是 8-30 重量%，以最终制剂计。

本发明的制剂可包含漂白剂。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，制剂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- α -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、 ϵ -苯二(甲)酰亚氨基过氧己酸(PAP)、 o -羧基苯甲酰氨基过氧己酸、正壬烯氨基过氧己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。淀粉酶与过碳酸盐的协同使用或淀粉酶与过羧酸的协调使用分别公开在申请 WO 99/63036 和 WO 99/63037 中。

如果洗涤温度等于或者低于 60°C，以及特别是对衣物进行预处理，为了提高漂白效果，制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-2,4-二氧化六氢-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、酞红酸酐和/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-烷基化葡萄糖胺和葡萄糖酸内酯、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，这些是从国际专利公布 WO-A-94/27970、WO-A-94/28102、WO-A-94/28103、WO-A-95/00626、WO-A-95/14759 和 WO-A-95/17498 中得来。从德国专利申请 DE-A-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-A-196

16 770 以及国际专利公布 WO-A-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-A-44 43 177 中得知的常规漂白活化剂组合也可采用。腈衍生物，例如氰基吡啶、四腈(Nitrilquats)，例如 N-烷基铵乙腈，和/或氨腈衍生物也可使用。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-甲基吗啉鎓乙腈(MMA)。这类漂白活化剂常用量以整个制剂计为 0.01-20 重量%，优选 0.1-15 重量%，以及更优选 1-10 重量%。

10

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、钕-氨合物的复合物体也可以用做漂白催化剂，优选使用在 DE 197 09 284 A1 中描述的化合物。依照 WO 99/63038，乙腈的衍生物以及依照 WO 99/63041，漂白活化的过渡金属配合物与淀粉酶组合后也能发生漂白活化的效果。

15

20 本发明的制剂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助洗剂。

25

合适的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-A-0 164 514 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。 β -和 δ -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

30

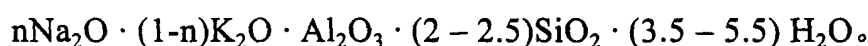
SKS-6®主要是 δ -二硅酸钠，其化学式为 $\text{Na}_2\text{Si}_2\text{O}_5 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ ，而 SKS-7®主要是 β -二硅酸钠。通过与酸(例如柠檬酸或碳酸)反应， δ -二硅酸钠生成 kanemite $\text{NaHSi}_2\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ，其以 SKS-9®和 SKS-10®(Clariant)在市场上销售。对这些层状硅酸盐进行化学修饰也有优势。例如，层状硅酸盐的碱度可受到适度的影响。与 δ -二硅酸钠相比，掺杂磷酸或者碳酸的层状硅酸盐已经修饰了晶体形态，他们溶解更快而且显示出与 δ -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 19601063 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。

根据本发明所用的精细晶体、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：

5



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。

10

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。

15

“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 $(\text{HPO}_3)_n$ 和正磷酸 (H_3PO_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。

20

磷酸二氢钠 $(\text{NaH}_2\text{PO}_4)$ 以二水化合物(密度 1.91 gcm^{-3} ，熔点 60°)和一水化合物(密度 2.04 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°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)。 NaH_2PO_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 NaH_2PO_4 。磷酸二氢钾(原或者一元磷酸钾、磷酸氢钾、KDP) KH_2PO_4 是白色盐，其密度为 2.33 gcm^{-3} ，熔点 253° (分解形成多磷酸钾 $(\text{KPO}_3)_x$)，并且易溶于水。

30

5 磷酸氢二钠(次磷酸钠) Na_2HPO_4 是无色、易溶于水的晶体盐。以无水、带 2mol 水(密度 2.066 gcm^{-3} , 95°C 时失水)、带 7mol 水(密度 1.68 gcm^{-3} , 熔点 48° 时失去 5 水)以及 12mol 水(密度 1.52 gcm^{-3} , 熔点 35° 失去 5 水)的形式存在, 在 100° 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) K_2HPO_4 是无定型的白色盐、易溶于水。

10 磷酸三钠, 叔磷酸钠, Na_3PO_4 , 是无色晶体, 作为十二水合物, 其密度是 1.62 gcm^{-3} , 熔点是 $73-76^\circ\text{C}$ (分解), 作为十水合物, 其熔点为 100°C (对应于 19-20% P_2O_5), 无水形式的密度为 2.536 gcm^{-3} (对应于 39-40% P_2O_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
15 级或者三元磷酸钾) K_3PO_4 是白色易潮解的颗粒粉末, 密度 2.56 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。

20

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 gcm^{-3} , 熔点 988° , 有时是 880°)和十水合物的形式存在(密度 $1.815-1.836 \text{ gcm}^{-3}$, 熔点 94° 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° 以上, 或通过磷酸与苏打以化学计量比反应
25 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 gcm^{-3} , 溶于水, 在 25° 时, 1%溶液 pH 值为 10.4。

30 相对高分子量的磷酸钠和磷酸钾是通过浓缩 NaH_2PO_4 或

KH_2PO_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。

5

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° 时是约 20 克，而在 100° 时大约是 32 克。将这种溶液加热 2 小时到 100° ，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% K_2O)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：

10

15



20

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。

25

本发明的洗涤剂/清洗剂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。

30

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。

5

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制剂中，其量优选不高于 20 重量%，以及特别为 1.2-17 重量%。

10

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。

15

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提到的分子量。

20

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。

25

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。本发明制剂中尤其优选的有机助洗剂是根据 EP 472 042、WO 97/25399 和 EP 755 944 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 / 或含硅酸盐的制剂中使用量为 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。

5 本发明的洗涤剂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%。本发明的洗涤剂的助洗剂含量尤其为 5-50 重量%。在本发明的洗涤剂用于清洁硬表面，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。

15 在液体至凝胶形式的洗涤剂/清洗剂的制剂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，20 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剂/清洗剂中，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%。

25 为了调节粘度，可向本发明制剂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。

30 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、黄蓍胶、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胶醚。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。

以制成的制剂计，增稠剂的用量最高达 5 重量%，优选 0.05-2 重量%，以及特别在 0.1-1.5 重量%。

本发明的洗涤剂/清洗剂可任选含有螯合剂、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%。

5

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 、 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Co}(\text{NO}_3)_3$ 及其混合物。

10

15

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。

20

特别有效并且长期以来已知的污渍释放剂是具有二羧酸、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-OS 2253063 中提到酸性制剂,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-PS 28 57 292、DE-PS 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 涉及制剂,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。

25

30

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 C₁₋₄ 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 C₁₋₄ 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-C₂₋₄-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。国际专利公布 WO 95/32232 涉及酸性芳族污渍释放聚酯。国际专利公布 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。

15

适用于本发明的织物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-(乙烯基吡啶-N-氧化物)和乙烯基吡咯烷酮与乙烯基咪唑的共聚物。

20

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 C₁₈₋₂₄ 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。

25

30

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的。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%。

5 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印象，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观上“特别的和可辨认”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、丙酸甲基苯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、 α -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制剂的 2 重量%。

25 香料可直接掺入到洗涤剂/清洗剂中，同样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 的洗涤剂/清洗剂是优选的，其中所述香料至少部分吸收在沸石上。

5 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，不受制剂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。

10 为了防治微生物，洗涤剂/清洗剂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. Wallhäußer 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
15 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、过氧化物、卤化合物以及上述的任意混合物。
20

25 因此抗微生物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、Dihydracetsäure、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)、Chlorhexidin、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-
30

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_1, N_1' -苯基二胍基- N_5, N_5')-己烷四氢氯化物、1,6-二-(N_1, N_1' -苯基- N_1, N_1' -甲基二胍基- N_5, N_5')-己烷二氢氯化物、1,6-二-(N_1, N_1' -邻-氯苯基二胍基- N_5, N_5')-己烷二氢氯化物、1,6-二-(N_1, N_1' -2,6-二氯苯基二胍基- N_5, N_5')-己烷二氢氯化物、1,6-二- $[N_1 N_1'$ - β -(对-甲氧基苯基)-二胍基- N_5, N_5']-己烷二氢氯化物、1,6-二-($N_1 N_1'$ - α -甲基- β -苯基二胍基- N_5, N_5')-己烷二氢氯化物、1,6-二-(N_1, N_1' -对-硝基苯基二胍基- N_5, N_5')-己烷二氢氯化物、 $\omega:\omega'$ -二-(N_1, N_1' -苯基二胍基- N_5, N_5')-二-正丙基醚二氢氯化物、 $\omega:\omega'$ -二-(N_1, N_1' -对-氯苯基二胍基- N_5, N_5')-二-正丙基醚四氢氯化物、1,6-二-(N_1, N_1' -2,4-二氯苯基二胍基- N_5, N_5')-己烷四氢氯化物、1,6-二-(N_1, N_1' -对-甲基苯基二胍基- N_5, N_5')-己烷二氢氯化物、1,6-二-(N_1, N_1' -2,4,5-三氯苯基二胍基- N_5, N_5')-己烷四氢氯化物、1,6-二- $[N_1, N_1'$ - α -(对-氯苯基)-乙基二胍基- N_5, N_5']-己烷二氢氯化物、 $\omega:\omega'$ -二-(N_1, N_1' -对-氯苯基二胍基- N_5, N_5')-间-二甲苯二氢氯化物、1,12-二-(N_1, N_1' -对-氯苯基二胍基- N_5, N_5')-十二烷二氢氯化物、1,10-二-(N_1, N_1' -苯基二胍基- N_5, N_5')-癸烷四氢氯化物、1,12-二-(N_1, N_1' -苯基二胍基- N_5, N_5')-十二烷四氢氯化物、1,6-二-(N_1, N_1' -邻-氯苯基二胍基- N_5, N_5')-己烷二氢氯化物、1,6-二-(N_1, N_1' -邻-氯苯基二胍基- N_5, N_5')-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、可可碱和茶碱以及香精油如丁子香酚、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、镧、碘鎗或砷鎗基、过氧化合物和氯化合物。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(QAV)具有通式 $(R^1)(R^2)(R^3)(R^4)N^+X^-$ ，其中 R^1-R^4 可以相同或不同，并代表 C_{1-22} 烷基、 C_{7-28} 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，如吡啶鎗或咪唑鎗化合物，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。

QAV 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 QAV 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_{12} -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_{8-18} 烷基的苄基氯化铵, 特别是 C_{12-14} -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。

该抗微生物活性成分的用量在 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, 该洗涤剂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/或其他制剂成分的光稳定性。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而具有作用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-
5 B1 0693471 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)；
10 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
15 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、烷醇铵及其葡萄糖铵盐；二苯甲酮的磺酸衍生物，优选 2-羟基-
20 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
25 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
30 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

5 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。

15 本发明的蛋白质和/或其他蛋白质特别地在储存期间应用稳定剂来保护, 例如避免其变性、分解或失活, 或者通过物理作用、氧化或蛋白酶解来保护。因为大多数微生物分泌各种蛋白酶作为在周围介质中的消化酶, 所以对于从微生物获得的蛋白来说, 解蛋白抑制制剂非常重要。在后续的清洗阶段, 这些蛋白酶会严重危及有益的蛋白。在
20 洗涤剂 and 清洗剂中, 本发明关键的蛋白会和蛋白酶结伴出现, 因此需要特别的保护。

出于这个目的, 本发明的制剂可以包含稳定剂。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。苯脒氢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
25 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。
30

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，用于含蛋白酶的制剂中，而 WO 00/01831 公开了相应的蛋白酶和抑制剂的融合蛋白质。

5

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 C12 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。

10

除了上面所述的多元醇如甘油、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。新申请(EP0965268)中公开了二甘油磷酸酯通过物理作用来保护以防止变形。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。

15

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 C8-18 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制剂中的酶成分，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成也同样适合本发明中所必需的酶。

20

25

30

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)。

5 在很多情况下, 还采用稳定剂的组合, 例如在 WO 96/31589 中多羟基化合物、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/或硼酸衍生物和多羟基化合物的组合来增强, 根据 WO 98/13459, 其还可通过添加钙离子而进一步增强。

10

具有稳定的酶活性的制剂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制剂。

15 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剂 and 清洁剂中的活性组分使用。它们各自对相关制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 and 清洁剂中的常规组分进攻、溶解、乳化或悬浮或者由于其较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。

20

25 除了本发明必需的蛋白以外, 本发明的制剂还可以含有其他淀粉分解酶, 特别是 α -淀粉酶。其中还可以存在用于洗涤和清洁剂目的所形成的酶。那些可购得的淀粉酶有如, BAN®、Termamyl®、Purastar®、Amylase-LT®、Maxamyl®、Duramyl®和/或 Purafect®。使用时这些各种不同的酶能够互为补充。这种补充作用可以以调节手段来实现, 比

30

如通过相互活化或钝化。这种互补作用可以例如通过本发明中必需酶的不同源于已知 α -淀粉酶的至少一部分，对在本发明中不是很重要的淀粉分解活性产生影响而实现。但也是基于不相一致的底物特异性，这种共同的使用才会显得有意义。这两者都是本发明的实施方式。

5

特别是当产生各种不同的化学污渍时，如果在洗涤和清洁剂中将淀粉分解酶和其他具有洗涤和/或清洁活性的酶共同使用，则会非常有益。因此优选的本发明的实施方式是那些特征在于除了本发明的蛋白质以外并另外添加有其他酶的洗涤剂或清洁剂。

10

除了一些淀粉酶外还有例如蛋白酶，以及脂肪酶、角质酶、酯酶、普鲁兰酶、纤维素酶、半纤维素酶和/或木聚糖酶以及它们的混合物。特别优选的是蛋白酶，脂肪酶、 β -葡聚糖酶和/或纤维素酶。由于其各自特殊的酶性能，另加入的酶增强了相应制剂的清洁功效。由于这一点，例如，使用氧化还原酶或过氧化物酶作为酶的漂白体系的成分，例如漆酶(WO00/39306)、 β -葡聚糖酶(WO99/06515 和 WO99/06516)或果胶溶解酶(WO00/42145)，它们特别地被添加到特殊洗涤剂中。

15

20

在本发明制剂中所使用的可购买的酶的例子有如蛋白酶如枯草杆菌蛋白酶 BPN、Properase®、BLAP®、Optimase®、Opticlean®、Maxatase®、Maxacal®、Maxapem®、Alcalase®、Esperase®、Savinase®、Durazym®、Everlase®和/或 Purafect®G 或 Purafect®OxP 和脂肪酶如 Lipolase®、Lipomax®、Lumafast®和/或 Lipozym®。

25

这种制剂的蛋白酶活性可以根据 Tenside，第七卷(1970)，第 125-132 页上记载的方法来进行测定，用 PU(蛋白酶单位)来表示。优选的制剂中蛋白酶活性可高达 1,500,000 蛋白酶单位每克制备物(PU，根据 Tenside，第七卷(1970)，第 125-132 页上记载的方法来确定)。

30

考虑到其生产回收，在这些可使用的酶中，首先考虑使用由微生

物，如细菌或真菌所生产得到的酶，比如由枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)、地衣芽孢杆菌、浅灰链霉菌(*Streptomyces griseus*)、*Humicola lanuginosa*、*Humicola insolens*、类产碱假单胞菌(*Pseudomonas pseudoalcaligenes*)或葱头假单胞菌(*Pseudomonas cepacia*)得到的。特别是从这些菌株中以天然方式形成的酶混合物，或是其它菌株生成的酶的混合物。它们可以以公知的方式，通过发酵过程从合适的微生物中制得，比如在德国专利公开文本 DE1940488 和 DE2121397，美国专利文献 US3623957 和 US4264738，欧洲专利申请 EP006638 以及国际专利申请 WO91/02792 中所记载的微生物。

10

如果必要的话，也可以另外使用一些酶，比如记载在欧洲专利文献 EP0564476 或国际专利申请 WO94/23005 中的酶，将它们附着于载体上和/或封装入包衣材料中，以防止其提前钝化。它们在洗涤剂中的含量为优选不大于 10 重量%，特别优选为 0.2 重量%到 2 重量%，特别又优选使用能抗氧化分解的稳定化的酶，如在国际专利申请 WO94/18314 中所公开的那些酶。

15

为了能将所含有的活性成分从时间或空间上相互独立地释放出来，本发明的制剂可以由多相组成。所述相可以是以不同物质状态存在的相，但特别优选是相同物质状态的两个相。

20

由多个固体成分所组成的本发明的制剂，可以以简单的方式制备。方法是将各种固体成分，优选是具有各种各样的成分和/或不同释放形式的粉末，颗粒或挤出物相互混合成总体松散的混合物。本发明的单相或多相的固体制剂可以以已知的方法进行生产，比如通过喷雾干燥或造粒过程，而同时加入酶和另外的热敏感的成分，比如漂白剂，在必要时要分别在后添加。为生产具有更高容积密度，特别是在 650g/l 到 950g/l 范围内的本发明的制剂，就要优选使用一种在欧洲专利文献 EP0486592 中公开的，具有挤出过程的方法。而在欧洲专利文献 EP0642576 中记载了另一种优选的借助造粒法生产的方法。

25

30

用于固体制剂的蛋白质可以以比如，干燥、粒化、密封或密封且又干燥的形式来使用。可以将它们分开，即以各自的相，或者和别的组分一起加入到同一个相中，经历或不必经历压实的过程。如果以固体形式对微囊化的酶进行加工，则可以用现有技术中已知的方法将水从在加工过程中生成的水溶液中分离除去，比如用喷雾干燥，离心分离或反复溶解的方法。以这种方式得到的颗粒通常具有 50 到 200 μm 的粒度。

为了使酶能不受其他组分，如漂白剂的影响，或是为实现一种控制释放，就可以提供这种胶囊化的形式。根据这些囊的大小，可以分为毫囊，微囊和毫微囊，其中特别优选用于酶的微囊。这种胶囊，例如，公开在专利申请 WO97/24177 和 DE19918267 中。另一种可能的胶囊化方法是将适合用在洗涤或清洁剂中的酶胶囊化，从一种酶溶液和淀粉或淀粉衍生物的溶液或悬浮液所形成的混合物开始封装在淀粉或淀粉衍生物中。这样一种封装方法记载在德国专利申请 DE19956382 中。

本发明固体制剂的另一提供形式是挤压或压实成片剂。这种片剂可以是单相或多相的。因此这种形式也可以提供一种具有两种固体相的本发明固体制剂。为了将本发明的制剂制成可以是单相或多相，单色或多色和/或可以由多层结构组成的片剂，就要优选将所有组分——必要时根据每一层——在混合器中相互混合，并且借助传统的片剂压机，例如偏心压机或回转压机将混合物在约 50 到 100kN/cm²，优选 60 到 70kN/cm² 的范围内的压力下进行压制。特别的，如果是制成多层片剂，那么较为有益的则是预先压制至少一层。该过程优选在 5 到 20kN/cm²，特别优选在 10 到 15kN/cm² 的压力范围内进行。以这种方式制成的片剂优选具有 10g 到 50g 的重量，特别优选是 15g 到 40g。片剂的三维形状是任意的，并且可以是圆形，椭圆形或方形的，同时也可以是中形状。

特别有利的是，在多相制剂中，至少一相含有淀粉酶敏感的材料，特别是淀粉，或者这种相至少部分由所述材料包围或涂层。采用了这种方法，这种相就是机械稳定的，和/或不受外界的影响，并且同时受到一种在洗涤液中有效的酶的作用，由此就能简化内含物质的释放过程。

可以将酶以及在本发明中很重要的且由现有技术获得和制备的蛋白质以在浓缩水溶液或非水溶液，例如以液体、溶液、分散液或乳液，以及凝胶形式或封装形式或干燥的颗粒形式添加到液体、凝胶形式或膏状的本发明制剂中去。以普通溶剂的溶液形式存在的本发明的这种洗涤剂或清洁剂，通常可以通过将内含物质以散装形式或溶液形式加入到自动混合机中进行简单的混合而制得。

本发明的一个实施方式就是这种液体、凝胶体或膏状形式的制剂，其中将本发明中必需的蛋白质和/或另一种所含的蛋白质和/或另一种所含有的成分以微胶囊形式添加到制剂中去。其中特别优选的又是这类带有由对淀粉酶敏感的材料制成的胶囊的物质。这样一种将淀粉酶敏感的材料和本发明中必需的淀粉分解酶共同运用在洗涤或清洁剂中的做法可以显示出协同作用，也即淀粉分解酶会有助微胶囊的分解，并因此控制被封闭的内含物质的释放过程，从而使得这些物质的释放过程不会在储存时和/或在清洁工序开始时，而是在确定的某个时间点才发生。含有不同内含物质和各种封闭胶囊类型的复杂的洗涤和清洁体系，就是基于上述这些机理的，所述体系是本发明尤其优选的实施方案。

如果洗涤或清洁剂的成分分布在至少两个不同的相中，例如片剂形式的洗涤或清洁剂的两个或多个固相相互连接，或是在同一粉末形式的制剂中的不同颗粒，就会产生可比效果。两相或多相清洁剂是现有技术，可以用于洗碗机的喷洗液中也可以用在洗涤剂中。如果它们

为一个淀粉酶敏感的壳或涂层所包覆，或者淀粉敏感材料构成了整个固体相的组分且其中组分被部分或完全水解时破坏了相关的相，则在较早活化的一个相中的淀粉分解酶的活性就决定了较后相的活化作用。因此，本发明的一个优选实施例中就将本发明中必需的酶用于此目的。

洗涤剂或清洁剂的内含物质能够较为合适的相互促进发挥其功效。将淀粉酶和防脱色剂协同使用来提升清洁功效的方法在诸如申请 WO99/63035 中就已经公开了。在申请 WO98/45396 中还公开了，同时能作为助洗剂用的聚合物，诸如烷基聚糖苷能稳定和提升所含酶的活性和稳定性。同样也可以通过一种如上所述的成分来对本发明中必需的淀粉分解活性进行改性，特别是进行稳定化和/或提升该活性。因此本发明的特别优选的实施方式中就描述了用于本发明制剂的适当调节的配方。

根据先前评述，用于清洁纺织品或坚硬表面的方法可以通过如下方案加以改进，即在至少一个方法步骤中，使在本发明中必需的杂合淀粉酶或衍生物变成有活性的。这里就要涉及到本发明的方法。

优选的这种方法其特征在于，在至少一个方法步骤中使用如上所记载的制剂。

特别优选的这种方法其特征在于，在普通家用洗碗机或家用洗衣机中优选使用 0.01mg 到 400mg，更优选 0.02mg 到 200mg，特别优选 0.02mg 到 100mg 的淀粉分解蛋白质或其衍生物。

比较有利的使用浓度值为 0.0005 到 20mg，优选 0.005 到 10mg，特别优选 0.005 到 8mg 的淀粉分解蛋白质每 1 漂洗液。蛋白质浓度可以借助已知的方法来确定，例如 BCA 法(双金鸡纳酸；2,2'-二醌醇基-4,4-双羧酸)或 Biuret 法(A.G.Gornall, C.S. Bardawill 和 M.M. David, J.

Biol. Chem. 177(1948), 第 751-766 页)

5 根据先前评述，本发明的实施方式中也描述了，将一种本发明中必需的杂合淀粉酶或其一种衍生物，单独或共同和至少一种其他的具有清洁活性或有助于清洁效果的活性物质用于清洁纺织品或硬质表面的方法。

优选使用一种本发明的制剂。

10 本发明的制剂或本发明中必需的淀粉分解蛋白质的用量优选在上述的用量范围内，从而能较为有利的在漂洗液中形成上面所述的淀粉分解蛋白质的浓度值。这种添加量可以根据清洁问题、制剂生产者或最后使用者的需求不同而预先设计好。

15 另一种可能的本发明中必需的杂合淀粉酶或其衍生物的使用方式为以能够活化自身或其他相的形式进行使用，条件是当将它们独自或和至少另一种具有清洁活性或有助于清洁效果的活性物质一起用在由含有多于一个相的洗涤或清洁剂中时。

20 另一种可能的本发明中必需的杂合淀粉酶或其衍生物的使用方式为以能从囊体内释放出内含物质的形式进行使用，条件是当将它们独自或和至少另一种具有清洁活性或有助于清洁效果的活性物质一起用在含有被封装在内的成分的洗涤或清洁剂中时。

25 在本发明的另一方面，指出了根据其能够通过开发新型淀粉酶来改善洗涤剂或清洁剂的洗涤或清洁效果的方法。这些方法包括融合部分序列，将包括含有来自于解淀粉芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌的 α -淀粉酶至少一个氨基酸的序列片段，以各个同源位置融合生成具有淀粉分解活性的杂合淀粉酶中，并将它们添加到制剂中去。

30

这种方法本身已为现有技术所公开，并且是基于分子生物学技术，如在 Fritsch、Sambrook 和 Maniatis 编辑的手册“分子克隆：实验室手册(Molecular cloning: a laboratory manual)”，Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1989 年中所公开的，或是在参考书，诸如

5 “Lexikon der Biochemie”，Spektrum Akademischer Verlag, 柏林，1999 中所汇编的那样。它们优选基于如在序列 SEQ ID NO.1 和 3 中所述的初始分子的核苷酸序列。例如在 Conrad 等的专著中(见上)介绍了经由相应基因的体内重组而制得一批分子的构建过程。另一些生产与本发明有关的杂合体的可能方法同样也已在上面所介绍过了。

10

根据上面所作的阐述，优选的各个方法是其中能被追溯到初始分子的杂合淀粉酶的部分序列片段长度为 7，更优选大于 14，特别优选为 21 到 462 个氨基酸。

15

根据上面所作的阐述，优选的各个方法是，其中杂合蛋白质由 3 或 2 个根据起始序列相互互补的部分序列所组成。

20

根据上面所作的阐述，越来越优选的各个方法是，其中杂合淀粉酶的融合点根据 SEQ ID NO.4 的编码位于上游 10、9、8、7、6、5、4、3、2 和 1 位氨基酸到下游 10、9、8、7、6、5、4、3、2 和 1 位氨基酸的范围内，并且特别优选的方案是恰好位于一个或多个下列位置：17、34、76、108、112、142、147、149、151、163、174、179、185、191、198、207、231、234、244、256、263、276、431、84、99、429、201、19、433 和 153 上。

25

根据上面所作的阐述，越来越优选的各个方法是，其中所含的杂合淀粉酶另外得到一个或多个每次不超过 5，4，3 和 2 个相邻氨基酸，特别优选每次只有一个氨基酸的缺失。

30

这种突变可以以本身已公知的分步骤来产生，例如和融合有关的

方法。但是也可以引入其他的位置作为融合位置。

5 根据上面所作的阐述，优选的各方法是，其中所含的杂合淀粉酶另外在至少一个位置上进行氨基酸替换。而在这其中，根据 SEQ ID NO.4 的计数方式，在位置 132，320 和 412 的 1，2 或 3 个取代又是更为优选的方案。

根据上面所作的阐述，优选的各方法是，其中所含的杂合淀粉酶另外得到嵌入物，或表示一种淀粉分解嵌合蛋白质。

10

根据上面所作的阐述，优选的各方法是，其中所含的杂合淀粉酶又是衍生物，比如通过结合另一蛋白质，聚合物或通过其他化学改性而得到。

15

特别优选的这种方法，其特征在于为了生成杂合淀粉酶而使用在相应部分区域内具有在 SEQ ID NO.1 和 SEQ ID NO.3 中所记载的核苷酸序列或与此同义的核苷酸序列的核酸。如上所阐述，如果在保持氨基酸序列的条件下改变核苷酸序列，以引入特定的限制性位点，则具有相同意义的密码子的替换就有着特别的意义。所得到的突变基因可以以本身已知的方法来扩增，克隆，并用于生产相应的变体。

20

实施例

实施例 1

25 杂合淀粉酶 AL34、AL76、AL112、AL256、ALA34-84、LAL19-153 和 LAL19-433 的获得以及酶活性的确定

所有的分子生物学及微生物学步骤均按照标准方法，例如在 Fritsch、Sambrool 和 Maniatis 编辑的手册“分子克隆：实验室手册 (Molecular cloning: a laboratory manual)”，Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1989 年说明。

30

制造相关酶的菌种可以由出版物“杂合解淀粉芽孢杆菌 × 地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶的构建, 性质和序列测定”(1995) 作者 B. Conrad, V. Hoang, A. Polley 和 J. Hofemeister, Eur. J. Biochem., 230, 第 481-490 页中说明。

5

表达杂合淀粉酶 AL34、AL76、AL112、AL256、ALA34-84、LAL19-153 和 LAL19-433 的菌种生长在 250ml 培养液的 1-升摇瓶中, 37°C 和 200 rpm 下培养。所用培养基是: MLBSP(10g/l Casiton; 20g/l 胰蛋白胨, 10 g/l 酵母浸出物, 每个都由 Becton Dickinson, Cockeysville 制造; 5 g/l NaCl; 27 g/l 琥珀酸钠; 100 mg/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 75mg/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0.5 μM MnCl_2 ; 0.5 μM Fe_2SO_4 ; 2%(w/v)) 葡萄糖; 50mM PIPES-缓冲液(由 pH7.2 的 1M 储液制得); 75mM KPO_4 (由 pH7.0 的 1.5M 储液制得)和 5 $\mu\text{g/ml}$ 氯霉素。在同样的培养基中 24 小时-预培养物的 1 % 目标容量作为接种量。

15

64 小时后在 4°C 下通过离心获得上清液。上清液用 50% 的丙二醇稳定, 并由此用 TAU 确定其淀粉酶活性。为此目的, 用 p-硝基苯基- α -D-麦芽七糖苷作底物。其最终的葡萄糖单位用苯亚甲基封闭。它们被淀粉酶裂解为 p-硝基苯基-寡糖, 用助酶葡糖淀粉酶和 α -葡糖苷酶将它们依次转化成葡萄糖和 p-硝基酚。p-硝基酚的释放量与淀粉酶活性成比例。例如, 用 Abbott, Abott Park, Illinois, USA 的 Quick-Start® 检测试剂盒来进行测量。借助光度计, 37°C 超过 3min 时, 在测试混合物中检测出了相对于空白值的吸收增长(405nm)。用一种已知活性的标准酶(例如 Maxamyl®/Purastar®2900, 2900TAU/g)测定校准曲线。每分钟吸收差异 dE(405nm)以标准酶浓度为函数来完成评定。1TAU 指在给定条件下 1 分钟能裂解 1 μmol 底物的酶量。

25

下表 1 中列出了获得的活性数值:

表 1: 挑选的杂合淀粉酶的活性数值

杂合淀粉酶	活性(TAU/ml)
AL34	2.5

AL76	2.2
AL112	4.3
AL256	4.9
ALA34-84	9.5
LAL19-153	2.3
LAL19-433	1.7

实施例 2

利用下列污渍以标准化方式接触棉织物：A 炭黑巧克力甜点；B 带可可的燕麦片；C 土豆淀粉，在这些试验材料上，用耐洗牢度试验仪(laundrometer)检测各种洗涤剂配方的清洗功效。为此目的，调整固液比为 1:12，并将织物在 30°C 下清洗 30 分钟。剂量为每升清洗液中特定洗涤剂为 5.88g。水硬度为 16° 德国制硬度。

对于 A 和 B，具有下列组成的洗涤剂基本配方作为对照洗涤剂(所有值用重量百分比表示)：4%直链烷基苯磺酸钠(钠盐)、4% C₁₂₋₁₈ 脂肪醇硫酸盐(钠盐)、7 EO 的 5.5% C₁₂₋₁₈ 脂肪醇、1%皂钠、11%碳酸钠、2.5%无定型二硅酸钠、20%过硼酸钠四水化物、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、1%粒状蛋白酶，其余为水、荧光增白剂、香精和盐。对于各种测试系列，将各种淀粉酶加入到对照洗涤剂中，以使在每种情况下的最终浓度为每升清洗液中解淀粉酶为 44TAU。

本发明必需的解淀粉酶 AL76、AL112 和 LAL19-433(每个的制造商：Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, 丹麦)可以比照 Teramyl®、Duramyl® 和 BAN®。对于污渍 C 可以使用同样的基本配方，但不含蛋白酶，至于 A 和 B 用作对照，或者掺入淀粉酶。

以 100%作为标准，与之对比，用测量仪 Minolta CR310 在 CIELAB 系统下测量清洗之前和之后的织物白度。对于每项测定，下表 2 中汇总列出了所得数值的差异。所列为各 5 次测量的平均值。它们是所包含的酶对所用洗涤剂的清洗功效起的贡献的直接指标。

表 2

基本洗涤剂含有	A	B	C
AL76	28.7	27.5	11.7
AL112	24.1	24.0	14.3
LAL19-433	26.4	26.3	12.5
Termamyl®	25.9	22.7	12.3
Duramyl®	28.6	23.4	14.3
BAN®	22.5	22.0	13.2
不含淀粉酶的对照组	22.9	22.2	10.0
标准偏差	1.3	0.6	2.2

可以看出，在污渍 A 的情况下，杂合淀粉酶 AL76 至少与三个对照酶中最好的一样；在污渍 B 的情况下，AL76 和 LAL19-433 明显具有优势。在污渍 C 的情况下，AL112 与三个对照酶中最好的一样。剩余的每个所测试的本发明必需的酶显示了洗涤性能，其至少可以比照已形成的酶。结果更加明显，在所有含漂白剂的制剂中和在 A 与 B 中添加蛋白酶，其中所含酶普遍反应敏感。

实施例 3

用污渍 B(带可可的燕麦片)和 D(带可可和少量牛奶的燕麦片)以标准化方式弄脏棉织物。与实施例 2 一样进行耐洗牢度试验仪测试，但是使用不含漂白剂的洗涤剂基本配方，它们每个都以重量百分比计含有：14%烷基苯磺酸钠、6%脂肪醇硫酸钠、6%7-倍乙氧基化的 C₁₂₋₁₈脂肪醇、1%皂、25%沸石 Na-A、10%碳酸钠、5%聚合的聚羧酸盐(Sokalan CP5)、11%三钠柠檬酸盐二水合物、4%柠檬酸、1%颗粒状泡沫抑制剂、1%粒状蛋白酶、5%硫酸钠，其余为水和盐。对于各种测试系列，将不同的淀粉酶加入到基本配方中，以使在每种情况下的最终浓度为每升清洗液中解淀粉酶为 33.5TAU。本发明必需的杂合淀粉酶 AL76、AL112 和 LAL19-433(每个的制造商：Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, 丹麦)可以比照 Teramyl®、Duramyl®和 BAN®。剂量是每升清洗液洗涤剂 4.45g。

清洗之后，象前面的实施例一样，确定所洗织物的白度。每个获得的差异值汇总列在下表 3 中。每个都是 5 次测量的平均值，它们所包含的酶对所用洗涤剂的清洗功效起的贡献的直接指标。

5

表 3

基本洗涤剂含有	B	D
AL76	29.5	17.3
AL112	30.8	17.0
LAL19-433	31.8	18.9
Termamyl®	29.3	15.0
Duramyl®	29.2	16.7
BAN®	28.9	15.6
不含淀粉酶的对照组	28.5	14.5
标准偏差	0.6	1.2

在两个测试情况下，三种本发明必需的酶显示，特别是 LAL19-433 显示，在使用不含漂白剂的洗涤剂配方中，其对于相关制剂的洗涤能力做出贡献，它们好于三个对比酶或至少在误差范围之内，与对比酶势均力敌。

10

实施例 4

用两种不同类型可购买的牛奶可可(E 和 F)以标准化方式弄脏棉织物。与实施例 2 所述的耐洗牢度试验仪进行测试。实施例 3 的洗涤剂基本配方用作对比洗涤剂，但是不加蛋白酶。对于各种测试系列，将不同淀粉酶加入到对照洗涤剂中，并且所用的剂量相同。

15

在清洗之后，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 4 中汇总给出了测试结果，以反射率%表示，即和硫酸钡比较的百分数，表 4 还列出每种情况下的起始值。所示值是 5 次

20

测量的平均值。它们是所包含的酶对所用洗涤剂的清洗功效起的贡献的直接指标。

表 4

基本洗涤剂含有	E	F
AL76	70.8	41.6
AL112	70.3	39.2
LAL19-433	71.4	40.9
Termamyl®	67.3	39.7
Duramyl®	68.3	40.5
BAN®	68.7	39.8
不含淀粉酶的对照组	61.1	31.4
初始值	21.1	25.0
标准偏差	1.0	1.2

5

在污渍 E 的情况下，全部三种所测试的本发明必需的杂合淀粉酶优于三种已形成的酶；在污渍 F 的情况下，它们在误差范围内，与已形成的酶基本上等同。

10 实施例 5

用污渍 G(带番茄酱的土豆浓汤作为显色物质)、H(牛奶可可)、D(带可可和少量牛奶的燕麦片)、E 和 F(两种不同类型可购买的牛奶可可)以标准化方式接触棉织物，并在实施例 2 所述的实验条件下利用耐洗牢度试验仪进行试验。每种所使用洗涤剂的浓度还是 5.88g 每升洗液。

15

对此，应用在实施例 2 中提供的洗涤剂基本配方，带有漂白剂，但不带其他酶。每升洗液中的 α -淀粉酶浓度为 125TAU。对比三种已知参考酶 Termamyl®、Duramyl®和 BAN®(每个的制造商:Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, 丹麦)，在此测试两种杂合淀粉酶 AL76 和 LAL。

20

如实施例 2 所描述的，用 CIELAB 系统测定对于污渍 G、H 和 D 所获得的织物的白度；对于污渍 E 和 F，如实施例 4 所描述的，与硫酸钡进行比较测量。下表 5 汇总列出了每个 5 次测量的平均值。

表 5

基本洗涤剂含有	G	H	D	E	F
AL76	20.9	27.9	18.6	70.8	46.9
LAL19-433	19.7	24.3	11.8	69.3	44.8
Termamyl®	20.2	22.5	16.3	69.7	46.6
Duramyl®	20.7	22.2	13.2	70.5	45.8
BAN®	20.5	22.7	15.4	68.2	44.7
不含淀粉酶的对照组	9.9	20.8	8.7	55.0	34.6
初始值	-	-	-	21.1	23.5
标准偏差	2.4	0.7	2.2	1.2	1.9

5 对于污渍 G，杂合淀粉酶 AL76 的值在误差棒范围之内，高于三种对比酶的最高值，此值至少看上去是相等的。对于污渍 H 和 D，AL76 远远地显示了最好的值，在 H 情况下，其后是杂合淀粉酶 LAL，只使用所形成的洗涤剂淀粉酶相比较。

10 对于污渍 E 和 F，AL76 与对比酶相比没有显示出较低的值，LAL19-433 的值与三种对比酶相比仅仅稍微有些差。这个例子还表明，杂合淀粉酶 AL76 和 LAL19-433 对于对应的洗涤剂的洗涤能力所起贡献完全可以与已形成的酶相比。

实施例 6

15 有硬质光滑表面的容器用浸泡在水中的燕麦片以标准化方式接触，并在 45°C 下用型号为 Miele® G575 的家用洗碗机按普通程序冲洗。每次冲洗过程使用 20g 冲洗剂；水硬度为 16°德国制硬度。

20 下面的基本配方(所有值都按重量百分比计)作为冲洗剂：55％三聚磷酸钠(以无水形式计算)、4％无定形二硅酸钠(以无水形式计算)、22％碳酸钠、9％过硼酸钠、2％TAED、2％非离子表面活性剂、1.4％粒状蛋白酶，其余为水、颜料、香精。对各种不同的试验，将不同的淀粉酶加入到基本配方中，即 Termamyl®、Duramyl®和 BAN®(每个的

制造商: Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, 丹麦), 或者每个具有本发明必需的解淀粉酶。每种酶的有效量按实施例 2 提供的方法确定, 每个清洗过程加入 150TAU 解淀粉活性。用作本发明必需的杂合淀粉酶举例为 ALA34-84、AL34、AL76、AL112、AL256、LAL19-153、LAL19-433。

5

冲洗之后, 用碘染色, 借助碘-淀粉反应, 污渍的去除以可视的刻度从 0(=未变化, 即很多污渍)到 10(=没有可辨认的污渍)计算。所得结果列汇总在表 6 中。这里提供的是每 9 次测量的平均值。它们所包含的酶对所用洗涤剂的清洗功效起的贡献的直接指标。

10

表 6

基本洗涤剂含有	I
ALA34-84	1.8
AL34	2.1
AL76	2.1
AL112	2.1
AL256	2.0
LAL19-153	1.6
LAL19-433	2.0
Termamyl®	1.8
Duramyl®	2.0
BAN®	1.7
不含淀粉酶的对照组	1.3

对于含淀粉污渍, 三种杂合淀粉酶 AL34、AL76 和 AL112 显示出对制剂的清洗性能的贡献, 其值高于三种参考酶的最好值。仅 α -淀粉酶 LAL19-153 所示值低于参考酶的最差值, 但是高于对照组。因此, 在 45°C 时, 本发明必需的杂合淀粉酶对于本发明的制剂的清洗性能起了贡献, 为此可以与已形成的酶相比, 或者更有优势。

15

实施例 7

20

有硬质光滑表面的容器用下列污渍以标准化方式进行接触: J(DIN 燕麦片), I(在水中浸泡的燕麦片)和 K(淀粉混合物)。

如上文实施例所描述的，利用这些污渍测试了相关解淀粉酶对于餐具冲洗剂配方的贡献。仅有的不同是在 55°C 下进行冲洗。

- 5 在对应方法中试验 AL112、LAL19-433 和 AL76，再次与 α -淀粉酶 Termamyl®、Duramyl®和 BAN®(每个的制造商：Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, 丹麦)作比较。对污渍 J 和 I，如上文实施例所述，以可视刻度从 0 到 10 来进行评价。污渍 K 的去除以重量百分比计算。为此，确定弄脏的和接着冲洗了的容器的重量差以及容器初始重量与未冲洗容器和初始重量的重量差的关系。这些关系以百分比去除率表示。结果列于表 7 中。

表 7

基本洗涤剂含有	J	I	K
AL112	7.0	92.9	79.0
LAL19-433	5.9	92.5	73.0
AL76	7.5	96.9	90.1
Termamyl®	6.7	94.5	53.4
Duramyl®	6.9	95.1	88.7
BAN®	6.2	92.3	77.3
不含淀粉酶的对照组	5.3	70.5	27.2

- 15 在此试验中，在污渍 J 上，AL76 对于相关制剂的洗涤性能做出了明显最大的贡献，接着是 AL112，然后是对比酶。在 55°C 时，AL76 对于清洗污渍 I 的贡献明显超过全部三种参考酶；另外两种所测试的杂合淀粉酶也有可比的值。这同样适合于污渍 K。

20 附图说明

图 1：本发明尤其必需的杂合淀粉酶 AL34、AL76、AL112、AL256、ALA34-84、LAL19-153 和 LAL19-433 的结构图。

黑色所示区域来自解淀粉芽孢杆菌 α -淀粉酶(B.A.；最上端的棒)，而白色所示区域来自地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶(B.L.；第二棒)。在第一棒

上方，融合点以成熟解淀粉芽孢杆菌 α -淀粉酶的氨基酸序列(SEQ ID NO.4)的编号示出。

图 2：地衣芽孢杆菌(B.L.)和解淀粉芽孢杆菌(B.A.)的 α -淀粉酶的前体蛋白(前体)的氨基酸序列的比对。

5 地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶的前导肽含有 29 个氨基酸，而解淀粉芽孢杆菌 α -淀粉酶的前导肽含有 31 个氨基酸。成熟蛋白的长度皆为 483 个氨基酸。

10 粗体突出部分各为成熟蛋白的第一氨基酸以及按解淀粉芽孢杆菌成熟蛋白的计数与位置 19、34、76、84、112、153、256 和 433 相对应的氨基酸。在这些位置中一个和/或两个位置的下游，从一种序列向另一种序列的转换分别表征了本发明特别优选的实施方案。

```

<110> 汉高两合股份公司 (Henkel Kommanditgesellschaft auf Aktien)

<120> 含杂合  $\alpha$ -淀粉酶的洗涤剂 and 清洗剂
      (Wasch- und Reinigungsmittel mit Hybrid-Alpha-Amylasen)

<130> SCT040329-47

<140>
<141>

<150> DE 10138753.9-41
<151> 2001-08-07

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 1452
<212> DNA
<213> 地衣芽孢杆菌 (Bacillus licheniformis)

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1452)

<400> 1
gca aat ctt aat ggg acg ctg atg cag tat ttt gaa tgg tac atg ccc 48
Ala Asn Leu Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Met Pro
   1             5             10             15

aat gac ggc caa cat tgg aag cgc ttg caa aac gac tcg gca tat ttg 96
Asn Asp Gly Gln His Trp Lys Arg Leu Gln Asn Asp Ser Ala Tyr Leu
           20             25             30

gct gaa cac ggt att act gcc gtc tgg att ccc ccg gca tat aag gga 144
Ala Glu His Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly
           35             40             45

acg agc caa gcg gat gtg ggc tac ggt gct tac gac ctt tat gat tta 192
Thr Ser Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu
           50             55             60

ggg gag ttt cat caa aaa ggg acg gtt cgg aca aag tac ggc aca aaa 240
Gly Glu Phe His Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys
           65             70             75             80

gga gag ctg caa tct gcg atc aaa agt ctt cat tcc cgc gac att aac 288
Gly Glu Leu Gln Ser Ala Ile Lys Ser Leu His Ser Arg Asp Ile Asn
           85             90             95

gtt tac ggg gat gtg gtc atc aac cac aaa ggc ggc gct gat gcg acc 336
Val Tyr Gly Asp Val Val Ile Asn His Lys Gly Gly Ala Asp Ala Thr
           100            105            110

gaa gat gta acc gcg gtt gaa gtc gat ccc gct gac cgc aac cgc gta 384
Glu Asp Val Thr Ala Val Glu Val Asp Pro Ala Asp Arg Asn Arg Val
           115            120            125

att tca gga gaa cac cga att aaa gcc tgg aca cat ttt cat ttt ccg 432

```

Ile	Ser	Gly	Glu	His	Arg	Ile	Lys	Ala	Trp	Thr	His	Phe	His	Phe	Pro	
130						135					140					
ggg	cgc	ggc	agc	aca	tac	agc	gat	ttt	aaa	tgg	cat	tgg	tac	cat	ttt	480
Gly	Arg	Gly	Ser	Thr	Tyr	Ser	Asp	Phe	Lys	Trp	His	Trp	Tyr	His	Phe	
145					150					155					160	
gac	gga	acc	gat	tgg	gac	gag	tcc	cga	aag	ctg	aac	cgc	atc	tat	aag	528
Asp	Gly	Thr	Asp	Trp	Asp	Glu	Ser	Arg	Lys	Leu	Asn	Arg	Ile	Tyr	Lys	
					165				170					175		
ttt	caa	gga	aag	gct	tgg	gat	tgg	gaa	gtt	tcc	aat	gaa	aac	ggc	aac	576
Phe	Gln	Gly	Lys	Ala	Trp	Asp	Trp	Glu	Val	Ser	Asn	Glu	Asn	Gly	Asn	
			180					185						190		
tat	gat	tat	ttg	atg	tat	gcc	gac	atc	gat	tat	gac	cat	cct	gat	gtc	624
Tyr	Asp	Tyr	Leu	Met	Tyr	Ala	Asp	Ile	Asp	Tyr	Asp	His	Pro	Asp	Val	
			195				200					205				
gca	gca	gaa	att	aag	aga	tgg	ggc	act	tgg	tat	gcc	aat	gaa	ctg	caa	672
Ala	Ala	Glu	Ile	Lys	Arg	Trp	Gly	Thr	Trp	Tyr	Ala	Asn	Glu	Leu	Gln	
			210				215				220					
ttg	gac	ggt	ttc	cgt	ctt	gat	gct	gtc	aaa	cac	att	aaa	ttt	tct	ttt	720
Leu	Asp	Gly	Phe	Arg	Leu	Asp	Ala	Val	Lys	His	Ile	Lys	Phe	Ser	Phe	
225					230					235					240	
ttg	cgg	gat	tgg	gtt	aat	cat	gtc	agg	gaa	aaa	acg	ggg	aag	gaa	atg	768
Leu	Arg	Asp	Trp	Val	Asn	His	Val	Arg	Glu	Lys	Thr	Gly	Lys	Glu	Met	
				245					250					255		
ttt	acg	gta	gct	gaa	tat	tgg	cag	aat	gac	ttg	ggc	gcg	ctg	gaa	aac	816
Phe	Thr	Val	Ala	Glu	Tyr	Trp	Gln	Asn	Asp	Leu	Gly	Ala	Leu	Glu	Asn	
			260					265					270			
tat	ttg	aac	aaa	aca	aat	ttt	aat	cat	tca	gtg	ttt	gac	gtg	ccg	ctt	864
Tyr	Leu	Asn	Lys	Thr	Asn	Phe	Asn	His	Ser	Val	Phe	Asp	Val	Pro	Leu	
			275				280					285				
cat	tat	cag	ttc	cat	gct	gca	tcg	aca	cag	gga	ggc	ggc	tat	gat	atg	912
His	Tyr	Gln	Phe	His	Ala	Ala	Ser	Thr	Gln	Gly	Gly	Gly	Tyr	Asp	Met	
			290				295				300					
agg	aaa	ttg	ctg	aac	agt	acg	gtc	gtt	tcc	aag	cat	ccg	ttg	aaa	gcg	960
Arg	Lys	Leu	Leu	Asn	Ser	Thr	Val	Val	Ser	Lys	His	Pro	Leu	Lys	Ala	
305					310					315					320	
gtt	aca	ttt	gtc	gat	aac	cat	gat	aca	cag	ccg	ggg	caa	tcg	ctt	gag	1008
Val	Thr	Phe	Val	Asp	Asn	His	Asp	Thr	Gln	Pro	Gly	Gln	Ser	Leu	Glu	
				325					330					335		
tcg	act	gtc	caa	aca	tgg	ttt	aag	ccg	ctt	gct	tac	gct	ttt	att	ctc	1056
Ser	Thr	Val	Gln	Thr	Trp	Phe	Lys	Pro	Leu	Ala	Tyr	Ala	Phe	Ile	Leu	
			340					345					350			
aca	agg	gaa	tct	gga	tac	cct	cag	gtt	ttc	tac	ggg	gat	atg	tac	ggg	1104
Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Tyr	Pro	Gln	Val	Phe	Tyr	Gly	Asp	Met	Tyr	Gly	
			355				360					365				
acg	aaa	gga	gac	tcc	cag	cgc	gaa	att	cct	gcc	ttg	aaa	cac	aaa	att	1152
Thr	Lys	Gly	Asp	Ser	Gln	Arg	Glu	Ile	Pro	Ala	Leu	Lys	His	Lys	Ile	
			370				375				380					

```

gaa ccg atc tta aaa gcg aga aaa cag tat gcg tac gga gca cag cat 1200
Glu Pro Ile Leu Lys Ala Arg Lys Gln Tyr Ala Tyr Gly Ala Gln His
385          390          395          400

gat tat ttc gac cac cat gac att gtc ggc tgg aca agg gaa ggc gac 1248
Asp Tyr Phe Asp His His Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp
          405          410          415

agc tcg gtt gca aat tca ggt ttg gcg gca tta ata aca gac gga ccc 1296
Ser Ser Val Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro
          420          425          430

ggt ggg gca aag cga atg tat gtc ggc cgg caa aac gcc ggt gag aca 1344
Gly Gly Ala Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Glu Thr
          435          440          445

tgg cat gac att acc gga aac cgt tcg gag ccg gtt gtc atc aat tcg 1392
Trp His Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile Asn Ser
          450          455          460

gaa ggc tgg gga gag ttt cac gta aac ggc ggg tcg gtt tca att tat 1440
Glu Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Tyr
465          470          475          480

ggt caa aga tag 1452
Val Gln Arg

```

<210> 2

<211> 483

<212> PRT

<213> 地衣芽孢杆菌 (Bacillus licheniformis)

<400> 2

```

Ala Asn Leu Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Met Pro
 1          5          10          15
Asn Asp Gly Gln His Trp Lys Arg Leu Gln Asn Asp Ser Ala Tyr Leu
          20          25          30
Ala Glu His Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly
          35          40          45
Thr Ser Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu
          50          55          60
Gly Glu Phe His Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys
          65          70          75          80
Gly Glu Leu Gln Ser Ala Ile Lys Ser Leu His Ser Arg Asp Ile Asn
          85          90          95
Val Tyr Gly Asp Val Val Ile Asn His Lys Gly Gly Ala Asp Ala Thr
          100          105          110
Glu Asp Val Thr Ala Val Glu Val Asp Pro Ala Asp Arg Asn Arg Val
          115          120          125
Ile Ser Gly Glu His Arg Ile Lys Ala Trp Thr His Phe His Phe Pro
          130          135          140
Gly Arg Gly Ser Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp His Trp Tyr His Phe
          145          150          155          160
Asp Gly Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg Ile Tyr Lys
          165          170          175
Phe Gln Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Ser Asn Glu Asn Gly Asn
          180          185          190
Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Tyr Asp His Pro Asp Val
          195          200          205
Ala Ala Glu Ile Lys Arg Trp Gly Thr Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Gln
          210          215          220

```

Leu Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys Phe Ser Phe
 225 230 235 240
 Leu Arg Asp Trp Val Asn His Val Arg Glu Lys Thr Gly Lys Glu Met
 245 250 255
 Phe Thr Val Ala Glu Tyr Trp Gln Asn Asp Leu Gly Ala Leu Glu Asn
 260 265 270
 Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Phe Asn His Ser Val Phe Asp Val Pro Leu
 275 280 285
 His Tyr Gln Phe His Ala Ala Ser Thr Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met
 290 295 300
 Arg Lys Leu Leu Asn Ser Thr Val Val Ser Lys His Pro Leu Lys Ala
 305 310 315 320
 Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu
 325 330 335
 Ser Thr Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu
 340 345 350
 Thr Arg Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly
 355 360 365
 Thr Lys Gly Asp Ser Gln Arg Glu Ile Pro Ala Leu Lys His Lys Ile
 370 375 380
 Glu Pro Ile Leu Lys Ala Arg Lys Gln Tyr Ala Tyr Gly Ala Gln His
 385 390 395 400
 Asp Tyr Phe Asp His His Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp
 405 410 415
 Ser Ser Val Ala Asn Ser Gly Leu Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro
 420 425 430
 Gly Gly Ala Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Glu Thr
 435 440 445
 Trp His Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile Asn Ser
 450 455 460
 Glu Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Tyr
 465 470 475 480
 Val Gln Arg

<210> 3

<211> 1452

<212> DNA

<213> 解淀粉芽孢杆菌 (Bacillus amyloliquefaciens)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1452)

<400> 3

gta aat ggc acg ctg atg cag tat ttt gaa tgg tat acg ccg aac gac	48
Val Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Thr Pro Asn Asp	
1 5 10 15	
ggc cag cat tgg aaa cga ttg cag aat gat gcg gaa cat tta tcg gat	96
Gly Gln His Trp Lys Arg Leu Gln Asn Asp Ala Glu His Leu Ser Asp	
20 25 30	
atc gga atc act gcc gtc tgg att cct ccc gca tac aaa gga ttg agc	144
Ile Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly Leu Ser	
35 40 45	
caa tcc gat aac gga tac gga cct tat gat ttg tat gat tta gga gaa	192
Gln Ser Asp Asn Gly Tyr Gly Pro Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Glu	
50 55 60	

ttc cag caa aaa ggg acg gtc aga acg aaa tac ggc aca aaa tca gag	240
Phe Gln Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys Ser Glu	
65 70 75 80	
ctt caa gat gcg atc ggc tca ctg cat tcc cgg aac gtc caa gta tac	288
Leu Gln Asp Ala Ile Gly Ser Leu His Ser Arg Asn Val Gln Val Tyr	
85 90 95	
gga gat gtg gtt ttg aat cat aag gct ggt gct gat gca aca gaa gat	336
Gly Asp Val Val Leu Asn His Lys Ala Gly Ala Asp Ala Thr Glu Asp	
100 105 110	
gta act gcc gtc gaa gtc aat ccg gcc aat aga aat cag gaa act tcg	384
Val Thr Ala Val Glu Val Asn Pro Ala Asn Arg Asn Gln Glu Thr Ser	
115 120 125	
gag gaa tat caa atc aaa gcg tgg acg gat ttt cgt ttt ccg ggc cgt	432
Glu Glu Tyr Gln Ile Lys Ala Trp Thr Asp Phe Arg Phe Pro Gly Arg	
130 135 140	
gga aac acg tac agt gat ttt aaa tgg cat tgg tat cat ttc gac gga	480
Gly Asn Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp His Trp Tyr His Phe Asp Gly	
145 150 155 160	
gcg gac tgg gat gaa tcc cgg aag atc agc cgc atc ttt aag ttt cgt	528
Ala Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Ile Ser Arg Ile Phe Lys Phe Arg	
165 170 175	
ggg gaa gga aaa gcg tgg gat tgg gaa gta tca agt gaa aac ggc aac	576
Gly Glu Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Ser Ser Glu Asn Gly Asn	
180 185 190	
tat gac tat tta atg tat gct gat gtt gac tac gac cac cct gat gtc	624
Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Val Asp Tyr Asp His Pro Asp Val	
195 200 205	
gtg gca gag aca aaa aaa tgg ggt atc tgg tat gcg aat gaa ctg tca	672
Val Ala Glu Thr Lys Lys Trp Gly Ile Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Ser	
210 215 220	
tta gac ggc ttc cgt att gat gcc gcc aaa cat att aaa ttt tca ttt	720
Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Lys Phe Ser Phe	
225 230 235 240	
ctg cgt gat tgg gtt cag gcg gtc aga cag gcg acg gga aaa gaa atg	768
Leu Arg Asp Trp Val Gln Ala Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Glu Met	
245 250 255	
ttt acg gtt gcg gag tat tgg cag aat aat gcc ggg aaa ctc gaa aac	816
Phe Thr Val Ala Glu Tyr Trp Gln Asn Asn Ala Gly Lys Leu Glu Asn	
260 265 270	
tac ttg aat aaa aca agc ttt aat caa tcc gtg ttt gat gtt ccg ctt	864
Tyr Leu Asn Lys Thr Ser Phe Asn Gln Ser Val Phe Asp Val Pro Leu	
275 280 285	
cat ttc aat tta cag gcg gct tcc tca caa gga ggc gga tat gat atg	912
His Phe Asn Leu Gln Ala Ala Ser Ser Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met	
290 295 300	
agg cgt ttg ctg gac ggt acc gtt gtg tcc agg cat ccg gaa aag gcg	960
Arg Arg Leu Leu Asp Gly Thr Val Val Ser Arg His Pro Glu Lys Ala	
305 310 315 320	

```

gtt aca ttt gtt gaa aat cat gac aca cag ccg gga cag tca ttg gaa 1008
Val Thr Phe Val Glu Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu
          325          330          335

tcg aca gtc caa act tgg ttt aaa ccg ctt gca tac gcc ttt att ttg 1056
Ser Thr Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu
          340          345          350

aca aga gaa tcc ggt tat cct cag gtg ttc tat ggg gat atg tac ggg 1104
Thr Arg Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly
          355          360          365

aca aaa ggg aca tcg cca aag gaa att ccc tca ctg aaa gat aat ata 1152
Thr Lys Gly Thr Ser Pro Lys Glu Ile Pro Ser Leu Lys Asp Asn Ile
          370          375          380

gag ccg att tta aaa gcg cgt aag gag tac gca tac ggg ccc cag cac 1200
Glu Pro Ile Leu Lys Ala Arg Lys Glu Tyr Ala Tyr Gly Pro Gln His
          385          390          395          400

gat tat att gac cac ccg gat gtg atc gga tgg acg agg gaa ggt gac 1248
Asp Tyr Ile Asp His Pro Asp Val Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp
          405          410          415

agc tcc gcc gcc aaa tca ggt ttg gcc gct tta atc acg gac gga ccc 1296
Ser Ser Ala Ala Lys Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro
          420          425          430

ggc gga tca aag cgg atg tat gcc ggc ctg aaa aat gcc ggc gag aca 1344
Gly Gly Ser Lys Arg Met Tyr Ala Gly Leu Lys Asn Ala Gly Glu Thr
          435          440          445

tgg tat gac ata acg ggc aac cgt tca gat act gta aaa atc gga tct 1392
Trp Tyr Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Lys Ile Gly Ser
          450          455          460

gac ggc tgg gga gag ttt cat gta aac gat ggg tcc gtc tcc att tat 1440
Asp Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Asp Gly Ser Val Ser Ile Tyr
          465          470          475          480

gtt cag aaa taa 1452
Val Gln Lys

```

<210> 4

<211> 483

<212> PRT

<213> 解淀粉芽孢杆菌 (Bacillus amyloliquefaciens)

<400> 4

```

Val Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Thr Pro Asn Asp
  1          5          10          15
Gly Gln His Trp Lys Arg Leu Gln Asn Asp Ala Glu His Leu Ser Asp
          20          25          30
Ile Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly Leu Ser
          35          40          45
Gln Ser Asp Asn Gly Tyr Gly Pro Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Glu
          50          55          60
Phe Gln Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys Ser Glu
          65          70          75          80
Leu Gln Asp Ala Ile Gly Ser Leu His Ser Arg Asn Val Gln Val Tyr

```


<221> CDS

<222> (1) .. (1446)

<400> 5

gta aat ggc acg ctg atg cag tat ttt gaa tgg tat acg ccg aac gac	48
Val Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Thr Pro Asn Asp	
1 5 10 15	
ggc cag cat tgg aaa cga ttg cag aat gat gcg gaa cat tta tcg gat	96
Gly Gln His Trp Lys Arg Leu Gln Asn Asp Ala Glu His Leu Ser Asp	
20 25 30	
atc ggt att act gcc gtc tgg att ccc ccg gca tat aag gga acg agc	144
Ile Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly Thr Ser	
35 40 45	
caa gcg gat gtg ggc tac ggt gct tac gac ctt tat gat tta ggg gag	192
Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Glu	
50 55 60	
ttt cat caa aaa ggg acg gtt cgg aca aag tac ggc aca aaa gga gag	240
Phe His Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys Gly Glu	
65 70 75 80	
ctg caa tct gcg atc aaa agt ctt cat tcc cgc gac att aac gtt tac	288
Leu Gln Ser Ala Ile Lys Ser Leu His Ser Arg Asp Ile Asn Val Tyr	
85 90 95	
ggg gat gtg gtc atc aac cac aaa ggc ggc gct gat gcg acc gaa gat	336
Gly Asp Val Val Ile Asn His Lys Gly Gly Ala Asp Ala Thr Glu Asp	
100 105 110	
gta acc gcg gtt gaa gtc gat ccc gct gac cgc aac cgc gta att tca	384
Val Thr Ala Val Glu Val Asp Pro Ala Asp Arg Asn Arg Val Ile Ser	
115 120 125	
gga gaa cac cga att aaa gcc tgg aca cat ttt cat ttt ccg ggg cgc	432
Gly Glu His Arg Ile Lys Ala Trp Thr His Phe His Phe Pro Gly Arg	
130 135 140	
ggc agc aca tac agc gat ttt aaa tgg cat tgg tac cat ttt gac gga	480
Gly Ser Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp His Trp Tyr His Phe Asp Gly	
145 150 155 160	
acc gat tgg gac gag tcc cga aag ctg aac cgc atc tat aag ttt caa	528
Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg Ile Tyr Lys Phe Gln	
165 170 175	
gga aag gct tgg gat tgg gaa gtt tcc aat gaa aac ggc aac tat gat	576
Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Ser Asn Glu Asn Gly Asn Tyr Asp	
180 185 190	
tat ttg atg tat gcc gac atc gat tat gac cat cct gat gtc gca gca	624
Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Tyr Asp His Pro Asp Val Ala Ala	
195 200 205	
gaa att aag aga tgg ggc act tgg tat gcc aat gaa ctg caa ttg gac	672
Glu Ile Lys Arg Trp Gly Thr Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Gln Leu Asp	
210 215 220	
ggt ttc cgt ctt gat gct gtc aaa cac att aaa ttt tct ttt ttg cgg	720
Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys Phe Ser Phe Leu Arg	
225 230 235 240	

gat tgg gtt aat cat gtc agg gaa aaa acg ggg aag gaa atg ttt acg	768
Asp Trp Val Asn His Val Arg Glu Lys Thr Gly Lys Glu Met Phe Thr	
245 250 255	
gta gct gaa tat tgg cag aat gac ttg ggc gcg ctg gaa aac tat ttg	816
Val Ala Glu Tyr Trp Gln Asn Asp Leu Gly Ala Leu Glu Asn Tyr Leu	
260 265 270	
aac aaa aca aat ttt aat cat tca gtg ttt gac gtg ccg ctt cat tat	864
Asn Lys Thr Asn Phe Asn His Ser Val Phe Asp Val Pro Leu His Tyr	
275 280 285	
cag ttc cat gct gca tcg aca cag gga ggc ggc tat gat atg agg aaa	912
Gln Phe His Ala Ala Ser Thr Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met Arg Lys	
290 295 300	
ttg ctg aac agt acg gtc gtt tcc aag cat ccg ttg aaa gcg gtt aca	960
Leu Leu Asn Ser Thr Val Val Ser Lys His Pro Leu Lys Ala Val Thr	
305 310 315 320	
ttt gtc gat aac cat gat aca cag ccg ggg caa tcg ctt gag tcg act	1008
Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu Ser Thr	
325 330 335	
gtc caa aca tgg ttt aag ccg ctt gct tac gct ttt att ctc aca agg	1056
Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu Thr Arg	
340 345 350	
gaa tct gga tac cct cag gtt ttc tac ggg gat atg tac ggg acg aaa	1104
Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly Thr Lys	
355 360 365	
gga gac tcc cag cgc gaa att cct gcc ttg aaa cac aaa att gaa ccg	1152
Gly Asp Ser Gln Arg Glu Ile Pro Ala Leu Lys His Lys Ile Glu Pro	
370 375 380	
atc tta aaa gcg aga aaa cag tat gcg tac gga gca cag cat gat tat	1200
Ile Leu Lys Ala Arg Lys Gln Tyr Ala Tyr Gly Ala Gln His Asp Tyr	
385 390 395 400	
ttc gac cac cat gac att gtc ggc tgg aca agg gaa ggc gac agc tcg	1248
Phe Asp His His Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp Ser Ser	
405 410 415	
gtt gca aat tca ggt ttg gcg gca tta ata aca gac gga ccc ggt ggg	1296
Val Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro Gly Gly	
420 425 430	
gca aag cga atg tat gtc ggc cgg caa aac gcc ggt gag aca tgg cat	1344
Ala Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Glu Thr Trp His	
435 440 445	
gac att acc gga aac cgt tcg gag ccg gtt gtc atc aat tcg gaa ggc	1392
Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile Asn Ser Glu Gly	
450 455 460	
tgg gga gag ttt cac gta aac ggc ggg tcg gtt tca att tat gtt caa	1440
Trp Gly Glu Phe His Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Tyr Val Gln	
465 470 475 480	
aga tag	1446
Arg	

<210> 6

<211> 481

<212> PRT

<213> 人工序列

<223> 人工序列描述: 地衣芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌 (AL34) 的 α -淀粉酶基因的融合

<400> 6

```

Val Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Thr Pro Asn Asp
 1          5          10          15
Gly Gln His Trp Lys Arg Leu Gln Asn Asp Ala Glu His Leu Ser Asp
          20          25          30
Ile Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly Thr Ser
          35          40          45
Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Glu
          50          55          60
Phe His Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys Gly Glu
          65          70          75          80
Leu Gln Ser Ala Ile Lys Ser Leu His Ser Arg Asp Ile Asn Val Tyr
          85          90          95
Gly Asp Val Val Ile Asn His Lys Gly Ala Asp Ala Thr Glu Asp
          100          105          110
Val Thr Ala Val Glu Val Asp Pro Ala Asp Arg Asn Arg Val Ile Ser
          115          120          125
Gly Glu His Arg Ile Lys Ala Trp Thr His Phe His Phe Pro Gly Arg
          130          135          140
Gly Ser Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp His Trp Tyr His Phe Asp Gly
          145          150          155          160
Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg Ile Tyr Lys Phe Gln
          165          170          175
Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Ser Asn Glu Asn Gly Asn Tyr Asp
          180          185          190
Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Tyr Asp His Pro Asp Val Ala Ala
          195          200          205
Glu Ile Lys Arg Trp Gly Thr Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Gln Leu Asp
          210          215          220
Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys Phe Ser Phe Leu Arg
          225          230          235          240
Asp Trp Val Asn His Val Arg Glu Lys Thr Gly Lys Glu Met Phe Thr
          245          250          255
Val Ala Glu Tyr Trp Gln Asn Asp Leu Gly Ala Leu Glu Asn Tyr Leu
          260          265          270
Asn Lys Thr Asn Phe Asn His Ser Val Phe Asp Val Pro Leu His Tyr
          275          280          285
Gln Phe His Ala Ala Ser Thr Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met Arg Lys
          290          295          300
Leu Leu Asn Ser Thr Val Val Ser Lys His Pro Leu Lys Ala Val Thr
          305          310          315          320
Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu Ser Thr
          325          330          335
Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu Thr Arg
          340          345          350
Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly Thr Lys
          355          360          365
Gly Asp Ser Gln Arg Glu Ile Pro Ala Leu Lys His Lys Ile Glu Pro
          370          375          380
Ile Leu Lys Ala Arg Lys Gln Tyr Ala Tyr Gly Ala Gln His Asp Tyr
          385          390          395          400
Phe Asp His His Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp Ser Ser
          405          410          415
Val Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro Gly Gly

```

```

          420          425          430
Ala Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Glu Thr Trp His
          435          440          445
Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile Asn Ser Glu Gly
          450          455          460
Trp Gly Glu Phe His Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Tyr Val Gln
465          470          475          480
Arg

```

<210> 7

<211> 1446

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 地衣芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌 (AL76) 的 α -淀粉酶基因的融合

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1446)

<400> 7

```

gta aat ggc acg ctg atg cag tat ttt gaa tgg tat acg ccg aac gac      48
Val Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Thr Pro Asn Asp
   1              5              10              15

ggc cag cat tgg aaa cga ttg cag aat gat gcg gaa cat tta tcg gat      96
Gly Gln His Trp Lys Arg Leu Gln Asn Asp Ala Glu His Leu Ser Asp
              20              25              30

atc gga atc act gcc gtc tgg att cct ccc gca tac aaa gga ttg agc     144
Ile Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly Leu Ser
              35              40              45

caa tcc gat aac gga tac gga cct tat gat ttg tat gat tta gga gaa     192
Gln Ser Asp Asn Gly Tyr Gly Pro Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Glu
              50              55              60

ttc cag caa aaa ggg acg gtc aga acg aaa tac ggc aca aaa gga gag     240
Phe Gln Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys Gly Glu
              65              70              75              80

ctg caa tct gcg atc aaa agt ctt cat tcc cgc gac att aac gtt tac     288
Leu Gln Ser Ala Ile Lys Ser Leu His Ser Arg Asp Ile Asn Val Tyr
              85              90              95

ggg gat gtg gtc atc aac cac aaa ggc ggc gct gat gcg acc gaa gat     336
Gly Asp Val Val Ile Asn His Lys Gly Gly Ala Asp Ala Thr Glu Asp
              100              105              110

gta acc gcg gtt gaa gtc gat ccc gct gac cgc aac cgc gta att tca     384
Val Thr Ala Val Glu Val Asp Pro Ala Asp Arg Asn Arg Val Ile Ser
              115              120              125

gga gaa cac cga att aaa gcc tgg aca cat ttt cat ttt ccg ggg cgc     432
Gly Glu His Arg Ile Lys Ala Trp Thr His Phe His Phe Pro Gly Arg
              130              135              140

ggc agc aca tac agc gat ttt aaa tgg cat tgg tac cat ttt gac gga     480
Gly Ser Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp His Trp Tyr His Phe Asp Gly

```

145	150	155	160	
acc gat tgg gac gag tcc cga aag ctg aac cgc atc tat aag ttt caa				528
Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg Ile Tyr Lys Phe Gln				
	165	170	175	
gga aag gct tgg gat tgg gaa gtt tcc aat gaa aac ggc aac tat gat				576
Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Ser Asn Glu Asn Gly Asn Tyr Asp				
	180	185	190	
tat ttg atg tat gcc gac atc gat tat gac cat cct gat gtc gca gca				624
Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Tyr Asp His Pro Asp Val Ala Ala				
	195	200	205	
gaa att aag aga tgg ggc act tgg tat gcc aat gaa ctg caa ttg gac				672
Glu Ile Lys Arg Trp Gly Thr Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Gln Leu Asp				
	210	215	220	
ggt ttc cgt ctt gat gct gtc aaa cac att aaa ttt tct ttt ttg cgg				720
Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys Phe Ser Phe Leu Arg				
	225	230	235	240
gat tgg gtt aat cat gtc agg gaa aaa acg ggg aag gaa atg ttt acg				768
Asp Trp Val Asn His Val Arg Glu Lys Thr Gly Lys Glu Met Phe Thr				
	245	250	255	
gta gct gaa tat tgg cag aat gac ttg ggc gcg ctg gaa aac tat ttg				816
Val Ala Glu Tyr Trp Gln Asn Asp Leu Gly Ala Leu Glu Asn Tyr Leu				
	260	265	270	
aac aaa aca aat ttt aat cat tca gtg ttt gac gtg ccg ctt cat tat				864
Asn Lys Thr Asn Phe Asn His Ser Val Phe Asp Val Pro Leu His Tyr				
	275	280	285	
cag ttc cat gct gca tcg aca cag gga ggc ggc tat gat atg agg aaa				912
Gln Phe His Ala Ala Ser Thr Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met Arg Lys				
	290	295	300	
ttg ctg aac agt acg gtc gtt tcc aag cat ccg ttg aaa gcg gtt aca				960
Leu Leu Asn Ser Thr Val Val Ser Lys His Pro Leu Lys Ala Val Thr				
	305	310	315	320
ttt gtc gat aac cat gat aca cag ccg ggg caa tcg ctt gag tcg act				1008
Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu Ser Thr				
	325	330	335	
gtc caa aca tgg ttt aag ccg ctt gct tac gct ttt att ctc aca agg				1056
Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu Thr Arg				
	340	345	350	
gaa tct gga tac cct cag gtt ttc tac ggg gat atg tac ggg acg aaa				1104
Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly Thr Lys				
	355	360	365	
gga gac tcc cag cgc gaa att cct gcc ttg aaa cac aaa att gaa ccg				1152
Gly Asp Ser Gln Arg Glu Ile Pro Ala Leu Lys His Lys Ile Glu Pro				
	370	375	380	
atc tta aaa gcg aga aaa cag tat gcg tac gga gca cag cat gat tat				1200
Ile Leu Lys Ala Arg Lys Gln Tyr Ala Tyr Gly Ala Gln His Asp Tyr				
	385	390	395	400
ttc gac cac cat gac att gtc ggc tgg aca agg gaa ggc gac agc tcg				1248

```

Phe Asp His His Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp Ser Ser
      405      410      415

ggt gca aat tca ggt ttg gcg gca tta ata aca gac gga ccc ggt ggg 1296
Val Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro Gly Gly
      420      425      430

gca aag cga atg tat gtc ggc cgg caa aac gcc ggt gag aca tgg cat 1344
Ala Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Glu Thr Trp His
      435      440      445

gac att acc gga aac cgt tcg gag ccg gtt gtc atc aat tcg gaa ggc 1392
Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile Asn Ser Glu Gly
      450      455      460

tgg gga gag ttt cac gta aac ggc ggg tcg gtt tca att tat gtt caa 1440
Trp Gly Glu Phe His Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Tyr Val Gln
      465      470      475      480

aga tag 1446
Arg

```

<210> 8

<211> 481

<212> PRT

<213> 人工序列

<223> 人工序列描述: 地衣芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌 (AL76) 的 α -淀粉酶基因的融合

<400> 8

```

Val Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Thr Pro Asn Asp
 1      5      10      15
Gly Gln His Trp Lys Arg Leu Gln Asn Asp Ala Glu His Leu Ser Asp
      20      25      30
Ile Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly Leu Ser
      35      40      45
Gln Ser Asp Asn Gly Tyr Gly Pro Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Glu
      50      55      60
Phe Gln Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys Gly Glu
      65      70      75      80
Leu Gln Ser Ala Ile Lys Ser Leu His Ser Arg Asp Ile Asn Val Tyr
      85      90      95
Gly Asp Val Val Ile Asn His Lys Gly Ala Asp Ala Thr Glu Asp
      100      105      110
Val Thr Ala Val Glu Val Asp Pro Ala Asp Arg Asn Arg Val Ile Ser
      115      120      125
Gly Glu His Arg Ile Lys Ala Trp Thr His Phe His Phe Pro Gly Arg
      130      135      140
Gly Ser Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp His Trp Tyr His Phe Asp Gly
      145      150      155      160
Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg Ile Tyr Lys Phe Gln
      165      170      175
Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Ser Asn Glu Asn Gly Asn Tyr Asp
      180      185      190
Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Tyr Asp His Pro Asp Val Ala Ala
      195      200      205
Glu Ile Lys Arg Trp Gly Thr Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Gln Leu Asp
      210      215      220
Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys Phe Ser Phe Leu Arg
      225      230      235      240
Asp Trp Val Asn His Val Arg Glu Lys Thr Gly Lys Glu Met Phe Thr
      245      250      255

```

```

Val Ala Glu Tyr Trp Gln Asn Asp Leu Gly Ala Leu Glu Asn Tyr Leu
      260                      265                      270
Asn Lys Thr Asn Phe Asn His Ser Val Phe Asp Val Pro Leu His Tyr
      275                      280                      285
Gln Phe His Ala Ala Ser Thr Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met Arg Lys
      290                      295                      300
Leu Leu Asn Ser Thr Val Val Ser Lys His Pro Leu Lys Ala Val Thr
      305                      310                      315                      320
Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu Ser Thr
      325                      330                      335
Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu Thr Arg
      340                      345                      350
Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly Thr Lys
      355                      360                      365
Gly Asp Ser Gln Arg Glu Ile Pro Ala Leu Lys His Lys Ile Glu Pro
      370                      375                      380
Ile Leu Lys Ala Arg Lys Gln Tyr Ala Tyr Gly Ala Gln His Asp Tyr
      385                      390                      395                      400
Phe Asp His His Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp Ser Ser
      405                      410                      415
Val Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro Gly Gly
      420                      425                      430
Ala Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Glu Thr Trp His
      435                      440                      445
Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile Asn Ser Glu Gly
      450                      455                      460
Trp Gly Glu Phe His Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Tyr Val Gln
      465                      470                      475                      480
Arg

```

<210> 9

<211> 1446

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 地衣芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌 (AL112) 的 α -淀粉酶基因的融合

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1446)

<400> 9

```

gta aat ggc acg ctg atg cag tat ttt gaa tgg tat acg ccg aac gac      48
Val Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Thr Pro Asn Asp
      1                      5                      10                      15

ggc cag cat tgg aaa cga ttg cag aat gat gcg gaa cat tta tcg gat      96
Gly Gln His Trp Lys Arg Leu Gln Asn Asp Ala Glu His Leu Ser Asp
      20                      25                      30

atc gga atc act gcc gtc tgg att cct ccc gca tac aaa gga ttg agc      144
Ile Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly Leu Ser
      35                      40                      45

caa tcc gat aac gga tac gga cct tat gat ttg tat gat tta gga gaa      192
Gln Ser Asp Asn Gly Tyr Gly Pro Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Glu
      50                      55                      60

ttc cag caa aaa ggg acg gtc aga acg aaa tac ggc aca aaa tca gag      240

```

Phe 65	Gln	Gln	Lys	Gly	Thr 70	Val	Arg	Thr	Lys	Tyr 75	Gly	Thr	Lys	Ser	Glu 80	
ctt	caa	gat	gcg	atc	ggc	tca	ctg	cat	tcc	cgg	aac	gtc	caa	gta	tac	288
Leu	Gln	Asp	Ala	Ile	Gly	Ser	Leu	His	Ser	Arg	Asn	Val	Gln	Val	Tyr	
				85					90					95		
gga	gat	gtg	gtt	ttg	aat	cat	aag	gct	ggg	gct	gat	gca	aca	gaa	gat	336
Gly	Asp	Val	Val	Leu	Asn	His	Lys	Ala	Gly	Ala	Asp	Ala	Thr	Glu	Asp	
			100					105					110			
gta	acc	gcg	gtt	gaa	gtc	gat	ccc	gct	gac	cgc	aac	cgc	gta	att	tca	384
Val	Thr	Ala	Val	Glu	Val	Asp	Pro	Ala	Asp	Arg	Asn	Arg	Val	Ile	Ser	
		115					120					125				
gga	gaa	cac	cga	att	aaa	gcc	tgg	aca	cat	ttt	cat	ttt	ccg	ggg	cgc	432
Gly	Glu	His	Arg	Ile	Lys	Ala	Trp	Thr	His	Phe	His	Phe	Pro	Gly	Arg	
	130					135					140					
ggc	agc	aca	tac	agc	gat	ttt	aaa	tgg	cat	tgg	tac	cat	ttt	gac	gga	480
Gly	Ser	Thr	Tyr	Ser	Asp	Phe	Lys	Trp	His	Trp	Tyr	His	Phe	Asp	Gly	
145					150					155					160	
acc	gat	tgg	gac	gag	tcc	cga	aag	ctg	aac	cgc	atc	tat	aag	ttt	caa	528
Thr	Asp	Trp	Asp	Glu	Ser	Arg	Lys	Leu	Asn	Arg	Ile	Tyr	Lys	Phe	Gln	
				165					170					175		
gga	aag	gct	tgg	gat	tgg	gaa	gtt	tcc	aat	gaa	aac	ggc	aac	tat	gat	576
Gly	Lys	Ala	Trp	Asp	Trp	Glu	Val	Ser	Asn	Glu	Asn	Gly	Asn	Tyr	Asp	
			180					185					190			
tat	ttg	atg	tat	gcc	gac	atc	gat	tat	gac	cat	cct	gat	gtc	gca	gca	624
Tyr	Leu	Met	Tyr	Ala	Asp	Ile	Asp	Tyr	Asp	His	Pro	Asp	Val	Ala	Ala	
		195					200					205				
gaa	att	aag	aga	tgg	ggc	act	tgg	tat	gcc	aat	gaa	ctg	caa	ttg	gac	672
Glu	Ile	Lys	Arg	Trp	Gly	Thr	Trp	Tyr	Ala	Asn	Glu	Leu	Gln	Leu	Asp	
	210					215					220					
ggg	ttc	cgt	ctt	gat	gct	gtc	aaa	cac	att	aaa	ttt	tct	ttt	ttg	cgg	720
Gly	Phe	Arg	Leu	Asp	Ala	Val	Lys	His	Ile	Lys	Phe	Ser	Phe	Leu	Arg	
225					230					235					240	
gat	tgg	gtt	aat	cat	gtc	agg	gaa	aaa	acg	ggg	aag	gaa	atg	ttt	acg	768
Asp	Trp	Val	Asn	His	Val	Arg	Glu	Lys	Thr	Gly	Lys	Glu	Met	Phe	Thr	
				245					250					255		
gta	gct	gaa	tat	tgg	cag	aat	gac	ttg	ggc	gcg	ctg	gaa	aac	tat	ttg	816
Val	Ala	Glu	Tyr	Trp	Gln	Asn	Asp	Leu	Gly	Ala	Leu	Glu	Asn	Tyr	Leu	
			260					265					270			
aac	aaa	aca	aat	ttt	aat	cat	tca	gtg	ttt	gac	gtg	ccg	ctt	cat	tat	864
Asn	Lys	Thr	Asn	Phe	Asn	His	Ser	Val	Phe	Asp	Val	Pro	Leu	His	Tyr	
		275					280					285				
cag	ttc	cat	gct	gca	tcg	aca	cag	gga	ggc	ggc	tat	gat	atg	agg	aaa	912
Gln	Phe	His	Ala	Ala	Ser	Thr	Gln	Gly	Gly	Gly	Tyr	Asp	Met	Arg	Lys	
	290					295					300					
ttg	ctg	aac	agt	acg	gtc	gtt	tcc	aag	cat	ccg	ttg	aaa	gcg	gtt	aca	960
Leu	Leu	Asn	Ser	Thr	Val	Val	Ser	Lys	His	Pro	Leu	Lys	Ala	Val	Thr	
305					310					315					320	


```

    ttt gtc gat aac cat gat aca cag ccg ggg caa tcg ctt gag tcg act   1008
    Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu Ser Thr
                325                330                335

    gtc caa aca tgg ttt aag ccg ctt gct tac gct ttt att ctc aca agg   1056
    Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu Thr Arg
                340                345                350

    gaa tct gga tac cct cag gtt ttc tac ggg gat atg tac ggg acg aaa   1104
    Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly Thr Lys
                355                360                365

    gga gac tcc cag cgc gaa att cct gcc ttg aaa cac aaa att gaa ccg   1152
    Gly Asp Ser Gln Arg Glu Ile Pro Ala Leu Lys His Lys Ile Glu Pro
                370                375                380

    atc tta aaa gcg aga aaa cag tat gcg tac gga gca cag cat gat tat   1200
    Ile Leu Lys Ala Arg Lys Gln Tyr Ala Tyr Gly Ala Gln His Asp Tyr
    385                390                395                400

    ttc gac cac cat gac att gtc ggc tgg aca agg gaa ggc gac agc tcg   1248
    Phe Asp His His Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp Ser Ser
                405                410                415

    gtt gca aat tca ggt ttg gcg gca tta ata aca gac gga ccc ggt ggg   1296
    Val Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro Gly Gly
                420                425                430

    gca aag cga atg tat gtc ggc cgg caa aac gcc ggt gag aca tgg cat   1344
    Ala Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Glu Thr Trp His
                435                440                445

    gac att acc gga aac cgt tcg gag ccg gtt gtc atc aat tcg gaa ggc   1392
    Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile Asn Ser Glu Gly
    450                455                460

    tgg gga gag ttt cac gta aac ggc ggg tcg gtt tca att tat gtt caa   1440
    Trp Gly Glu Phe His Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Tyr Val Gln
    465                470                475                480

    aga tag
    Arg

```

<210> 10

<211> 481

<212> PRT

<213> 人工序列

<223> 人工序列描述: 地衣芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌 (AL112) 的 α -淀粉酶基因的融合

<400> 10

```

Val Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Thr Pro Asn Asp
  1                5                10                15
Gly Gln His Trp Lys Arg Leu Gln Asn Asp Ala Glu His Leu Ser Asp
                20                25                30
Ile Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly Leu Ser
                35                40                45
Gln Ser Asp Asn Gly Tyr Gly Pro Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Glu
                50                55                60
Phe Gln Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys Ser Glu
                65                70                75                80
Leu Gln Asp Ala Ile Gly Ser Leu His Ser Arg Asn Val Gln Val Tyr

```


<221> CDS

<222> (1)..(1452)

<400> 11

gta aat ggc acg ctg atg cag tat ttt gaa tgg tat acg ccg aac gac	48
Val Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Thr Pro Asn Asp	
1 5 10 15	
ggc cag cat tgg aaa cga ttg cag aat gat gcg gaa cat tta tcg gat	96
Gly Gln His Trp Lys Arg Leu Gln Asn Asp Ala Glu His Leu Ser Asp	
20 25 30	
atc gga atc act gcc gtc tgg att cct ccc gca tac aaa gga ttg agc	144
Ile Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly Leu Ser	
35 40 45	
caa tcc gat aac gga tac gga cct tat gat ttg tat gat tta gga gaa	192
Gln Ser Asp Asn Gly Tyr Gly Pro Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Glu	
50 55 60	
ttc cag caa aaa ggg acg gtc aga acg aaa tac ggc aca aaa tca gag	240
Phe Gln Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys Ser Glu	
65 70 75 80	
ctt caa gat gcg atc ggc tca ctg cat tcc cgg aac gtc caa gta tac	288
Leu Gln Asp Ala Ile Gly Ser Leu His Ser Arg Asn Val Gln Val Tyr	
85 90 95	
gga gat gtg gtt ttg aat cat aag gct ggt gct gat gca aca gaa gat	336
Gly Asp Val Val Leu Asn His Lys Ala Gly Ala Asp Ala Thr Glu Asp	
100 105 110	
gta act gcc gtc gaa gtc aat ccg gcc aat aga aat cag gaa act tcg	384
Val Thr Ala Val Glu Val Asn Pro Ala Asn Arg Asn Gln Glu Thr Ser	
115 120 125	
gag gaa tat caa atc aaa gcg tgg acg gat ttt cgt ttt ccg ggc cgt	432
Glu Glu Tyr Gln Ile Lys Ala Trp Thr Asp Phe Arg Phe Pro Gly Arg	
130 135 140	
gga aac acg tac agt gat ttt aaa tgg cat tgg tat cat ttc gac gga	480
Gly Asn Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp His Trp Tyr His Phe Asp Gly	
145 150 155 160	
gcg gac tgg gat gaa tcc cgg aag atc agc cgc atc ttt aag ttt cgt	528
Ala Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Ile Ser Arg Ile Phe Lys Phe Arg	
165 170 175	
ggg gaa gga aaa gcg tgg gat tgg gaa gta tca agt gaa aac ggc aac	576
Gly Glu Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Ser Ser Glu Asn Gly Asn	
180 185 190	
tat gac tat tta atg tat gct gat gtt gac tac gac cac cct gat gtc	624
Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Val Asp Tyr Asp His Pro Asp Val	
195 200 205	
gtg gca gag aca aaa aaa tgg ggt atc tgg tat gcg aat gaa ctg tca	672
Val Ala Glu Thr Lys Lys Trp Gly Ile Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Ser	
210 215 220	
tta gac ggc ttc cgt att gat gcc gcc aaa cat att aaa ttt tca ttt	720
Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Lys Phe Ser Phe	
225 230 235 240	

ctg cgt gat tgg gtt cag gcg gtc aga cag gcg acg gga aaa gaa atg	768
Leu Arg Asp Trp Val Gln Ala Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Glu Met	
245 250 255	
ttt acg gta gct gaa tat tgg cag aat gac ttg ggc gcg ctg gaa aac	816
Phe Thr Val Ala Glu Tyr Trp Gln Asn Asp Leu Gly Ala Leu Glu Asn	
260 265 270	
tat ttg aac aaa aca aat ttt aat cat tca gtg ttt gac gtg ccg ctt	864
Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Phe Asn His Ser Val Phe Asp Val Pro Leu	
275 280 285	
cat tat cag ttc cat gct gca tcg aca cag gga ggc ggc tat gat atg	912
His Tyr Gln Phe His Ala Ala Ser Thr Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met	
290 295 300	
agg aaa ttg ctg aac agt acg gtc gtt tcc aag cat ccg ttg aaa gcg	960
Arg Lys Leu Leu Asn Ser Thr Val Val Ser Lys His Pro Leu Lys Ala	
305 310 315 320	
gtt aca ttt gtc gat aac cat gat aca cag ccg ggg caa tcg ctt gag	1008
Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu	
325 330 335	
tcg act gtc caa aca tgg ttt aag ccg ctt gct tac gct ttt att ctc	1056
Ser Thr Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu	
340 345 350	
aca agg gaa tct gga tac cct cag gtt ttc tac ggg gat atg tac ggg	1104
Thr Arg Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly	
355 360 365	
acg aaa gga gac tcc cag cgc gaa att cct gcc ttg aaa cac aaa att	1152
Thr Lys Gly Asp Ser Gln Arg Glu Ile Pro Ala Leu Lys His Lys Ile	
370 375 380	
gaa ccg atc tta aaa gcg aga aaa cag tat gcg tac gga gca cag cat	1200
Glu Pro Ile Leu Lys Ala Arg Lys Gln Tyr Ala Tyr Gly Ala Gln His	
385 390 395 400	
gat tat ttc gac cac cat gac att gtc ggc ttg aca agg gaa ggc gac	1248
Asp Tyr Phe Asp His His Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp	
405 410 415	
agc tcg gtt gca aat tca ggt ttg gcg gca tta ata aca gac gga ccc	1296
Ser Ser Val Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro	
420 425 430	
ggt ggg gca aag cga atg tat gtc ggc ccg caa aac gcc ggt gag aca	1344
Gly Gly Ala Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Glu Thr	
435 440 445	
tgg cat gac att acc gga aac cgt tcg gag ccg gtt gtc atc aat tcg	1392
Trp His Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile Asn Ser	
450 455 460	
gaa ggc ttg gga gag ttt cac gta aac ggc ggg tcg gtt tca att tat	1440
Glu Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Tyr	
465 470 475 480	
gtt caa aga tag	1452
Val Gln Arg	

<210> 12
 <211> 483
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <223> 人工序列描述: 地衣芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌 (AL256) 的 α -淀粉酶基因的融合

```

<400> 12
Val Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Thr Pro Asn Asp
 1           5           10          15
Gly Gln His Trp Lys Arg Leu Gln Asn Asp Ala Glu His Leu Ser Asp
          20          25          30
Ile Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly Leu Ser
          35          40          45
Gln Ser Asp Asn Gly Tyr Gly Pro Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Glu
          50          55          60
Phe Gln Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys Ser Glu
          65          70          75          80
Leu Gln Asp Ala Ile Gly Ser Leu His Ser Arg Asn Val Gln Val Tyr
          85          90          95
Gly Asp Val Val Leu Asn His Lys Ala Gly Ala Asp Ala Thr Glu Asp
          100         105         110
Val Thr Ala Val Glu Val Asn Pro Ala Asn Arg Asn Gln Glu Thr Ser
          115         120         125
Glu Glu Tyr Gln Ile Lys Ala Trp Thr Asp Phe Arg Phe Pro Gly Arg
          130         135         140
Gly Asn Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp His Trp Tyr His Phe Asp Gly
          145         150         155         160
Ala Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Ile Ser Arg Ile Phe Lys Phe Arg
          165         170         175
Gly Glu Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Ser Ser Glu Asn Gly Asn
          180         185         190
Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Val Asp Tyr Asp His Pro Asp Val
          195         200         205
Val Ala Glu Thr Lys Lys Trp Gly Ile Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Ser
          210         215         220
Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Lys Phe Ser Phe
          225         230         235         240
Leu Arg Asp Trp Val Gln Ala Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Glu Met
          245         250         255
Phe Thr Val Ala Glu Tyr Trp Gln Asn Asp Leu Gly Ala Leu Glu Asn
          260         265         270
Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Phe Asn His Ser Val Phe Asp Val Pro Leu
          275         280         285
His Tyr Gln Phe His Ala Ala Ser Thr Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met
          290         295         300
Arg Lys Leu Leu Asn Ser Thr Val Val Ser Lys His Pro Leu Lys Ala
          305         310         315         320
Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu
          325         330         335
Ser Thr Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu
          340         345         350
Thr Arg Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly
          355         360         365
Thr Lys Gly Asp Ser Gln Arg Glu Ile Pro Ala Leu Lys His Lys Ile
          370         375         380
Glu Pro Ile Leu Lys Ala Arg Lys Gln Tyr Ala Tyr Gly Ala Gln His
          385         390         395         400
Asp Tyr Phe Asp His His Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp
          405         410         415
Ser Ser Val Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro
  
```

```

          420          425          430
Gly Gly Ala Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Glu Thr
          435          440          445
Trp His Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile Asn Ser
          450          455          460
Glu Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Tyr
465          470          475          480
Val Gln Arg

```

<210> 13

<211> 1452

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 地衣芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌 (ALA34-84) 的 α -淀粉酶基因的融合

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1452)

<400> 13

```

gta aat ggc acg ctg atg cag tat ttt gaa tgg tat acg ccg aac gac      48
Val Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Thr Pro Asn Asp
   1              5              10              15

ggc cag cat tgg aaa cga ttg cag aat gat gcg gaa cat tta tcg gat      96
Gly Gln His Trp Lys Arg Leu Gln Asn Asp Ala Glu His Leu Ser Asp
              20              25              30

atc ggt att act gcc gtc tgg att ccc ccg gca tat aag gga acg agc      144
Ile Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly Thr Ser
              35              40              45

caa gcg gat gtg ggc tac ggt gct tac gac ctt tat gat tta ggg gag      192
Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Glu
   50              55              60

ttt cat caa aaa ggg acg gtt cgg aca aag tac ggc aca aaa gga gag      240
Phe His Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys Gly Glu
   65              70              75              80

ctg caa tct gcg atc ggc tca ctg cat tcc ccg aac gtc caa gta tac      288
Leu Gln Ser Ala Ile Gly Ser Leu His Ser Arg Asn Val Gln Val Tyr
              85              90              95

gga gat gtg gtt ttg aat cat aag gct ggt gct gat gca aca gaa gat      336
Gly Asp Val Val Leu Asn His Lys Ala Gly Ala Asp Ala Thr Glu Asp
              100              105              110

gta act gcc gtc gaa gtc aat ccg gcc aat aga aat cag gaa act tcg      384
Val Thr Ala Val Glu Val Asn Pro Ala Asn Arg Asn Gln Glu Thr Ser
              115              120              125

gag gaa tat caa atc aaa gcg tgg acg gat ttt cgt ttt ccg ggc cgt      432
Glu Glu Tyr Gln Ile Lys Ala Trp Thr Asp Phe Arg Phe Pro Gly Arg
              130              135              140

gga aac acg tac agt gat ttt aaa tgg cat tgg tat cat ttc gac gga      480
Gly Asn Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp His Trp Tyr His Phe Asp Gly

```

145	150	155	160	
gcg gac tgg gat gaa tcc cgg aag atc agc cgc atc ttt aag ttt cgt	528			
Ala Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Ile Ser Arg Ile Phe Lys Phe Arg				
165	170	175		
ggg gaa gga aaa gcg tgg gat tgg gaa gta tca agt gaa aac ggc aac	576			
Gly Glu Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Ser Ser Glu Asn Gly Asn				
180	185	190		
tat gac tat tta atg tat gct gat gtt gac tac gac cac cct gat gtc	624			
Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Val Asp Tyr Asp His Pro Asp Val				
195	200	205		
gtg gca gag aca aaa aaa tgg ggt atc tgg tat gcg aat gaa ctg tca	672			
Val Ala Glu Thr Lys Lys Trp Gly Ile Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Ser				
210	215	220		
tta gac ggc ttc cgt att gat gcc gcc aaa cat att aaa ttt tca ttt	720			
Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Lys Phe Ser Phe				
225	230	235	240	
ctg cgt gat tgg gtt cag gcg gtc aga cag gcg acg gga aaa gaa atg	768			
Leu Arg Asp Trp Val Gln Ala Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Glu Met				
245	250	255		
ttt acg gtt gcg gag tat tgg cag aat aat gcc ggg aaa ctc gaa aac	816			
Phe Thr Val Ala Glu Tyr Trp Gln Asn Asn Ala Gly Lys Leu Glu Asn				
260	265	270		
tac ttg aat aaa aca agc ttt aat caa tcc gtg ttt gat gtt ccg ctt	864			
Tyr Leu Asn Lys Thr Ser Phe Asn Gln Ser Val Phe Asp Val Pro Leu				
275	280	285		
cat ttc aat tta cag gcg gct tcc tca caa gga ggc gga tat gat atg	912			
His Phe Asn Leu Gln Ala Ala Ser Ser Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met				
290	295	300		
agg cgt ttg ctg gac ggt acc gtt gtg tcc agg cat ccg gaa aag gcg	960			
Arg Arg Leu Leu Asp Gly Thr Val Val Ser Arg His Pro Glu Lys Ala				
305	310	315	320	
gtt aca ttt gtt gaa aat cat gac aca cag ccg gga cag tca ttg gaa	1008			
Val Thr Phe Val Glu Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu				
325	330	335		
tcg aca gtc caa act tgg ttt aaa ccg ctt gca tac gcc ttt att ttg	1056			
Ser Thr Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu				
340	345	350		
aca aga gaa tcc ggt tat cct cag gtg ttc tat ggg gat atg tac ggg	1104			
Thr Arg Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly				
355	360	365		
aca aaa ggg aca tcg cca aag gaa att ccc tca ctg aaa gat aat ata	1152			
Thr Lys Gly Thr Ser Pro Lys Glu Ile Pro Ser Leu Lys Asp Asn Ile				
370	375	380		
gag ccg att tta aaa gcg cgt aag gag tac gca tac ggg ccc cag cac	1200			
Glu Pro Ile Leu Lys Ala Arg Lys Glu Tyr Ala Tyr Gly Pro Gln His				
385	390	395	400	
gat tat att gac cac ccg gat gtg atc gga tgg acg agg gaa ggt gac	1248			

```

Asp Tyr Ile Asp His Pro Asp Val Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp
      405      410      415
agc tcc gcc gcc aaa tca ggt ttg gcc gct tta atc acg gac gga ccc 1296
Ser Ser Ala Ala Lys Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro
      420      425      430
ggc gga tca aag cgg atg tat gcc ggc ctg aaa aat gcc ggc gag aca 1344
Gly Gly Ser Lys Arg Met Tyr Ala Gly Leu Lys Asn Ala Gly Glu Thr
      435      440      445
tgg tat gac ata acg ggc aac cgt tca gat act gta aaa atc gga tct 1392
Trp Tyr Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Lys Ile Gly Ser
      450      455      460
gac ggc tgg gga gag ttt cat gta aac gat ggg tcc gtc tcc att tat 1440
Asp Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Asp Gly Ser Val Ser Ile Tyr
      465      470      475      480
gtt cag aaa taa 1452
Val Gln Lys

```

<210> 14

<211> 483

<212> PRT

<213> 人工序列

<223> 人工序列描述: 地衣芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌 (ALA34-84) 的 α -淀粉酶基因的融合

<400> 14

```

Val Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Thr Pro Asn Asp
 1      5      10      15
Gly Gln His Trp Lys Arg Leu Gln Asn Asp Ala Glu His Leu Ser Asp
      20      25      30
Ile Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly Thr Ser
      35      40      45
Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Glu
      50      55      60
Phe His Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys Gly Glu
      65      70      75      80
Leu Gln Ser Ala Ile Gly Ser Leu His Ser Arg Asn Val Gln Val Tyr
      85      90      95
Gly Asp Val Val Leu Asn His Lys Ala Gly Ala Asp Ala Thr Glu Asp
      100      105      110
Val Thr Ala Val Glu Val Asn Pro Ala Asn Arg Asn Gln Glu Thr Ser
      115      120      125
Glu Glu Tyr Gln Ile Lys Ala Trp Thr Asp Phe Arg Phe Pro Gly Arg
      130      135      140
Gly Asn Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp His Trp Tyr His Phe Asp Gly
      145      150      155      160
Ala Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Ile Ser Arg Ile Phe Lys Phe Arg
      165      170      175
Gly Glu Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Ser Ser Glu Asn Gly Asn
      180      185      190
Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Val Asp Tyr Asp His Pro Asp Val
      195      200      205
Val Ala Glu Thr Lys Lys Trp Gly Ile Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Ser
      210      215      220
Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Lys Phe Ser Phe
      225      230      235      240
Leu Arg Asp Trp Val Gln Ala Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Glu Met
      245      250      255

```



```

Phe Thr Val Ala Glu Tyr Trp Gln Asn Asn Ala Gly Lys Leu Glu Asn
      260      265      270
Tyr Leu Asn Lys Thr Ser Phe Asn Gln Ser Val Phe Asp Val Pro Leu
      275      280      285
His Phe Asn Leu Gln Ala Ala Ser Ser Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met
      290      295      300
Arg Arg Leu Leu Asp Gly Thr Val Val Ser Arg His Pro Glu Lys Ala
      305      310      315      320
Val Thr Phe Val Glu Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu
      325      330      335
Ser Thr Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu
      340      345      350
Thr Arg Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly
      355      360      365
Thr Lys Gly Thr Ser Pro Lys Glu Ile Pro Ser Leu Lys Asp Asn Ile
      370      375      380
Glu Pro Ile Leu Lys Ala Arg Lys Glu Tyr Ala Tyr Gly Pro Gln His
      385      390      395      400
Asp Tyr Ile Asp His Pro Asp Val Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp
      405      410      415
Ser Ser Ala Ala Lys Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro
      420      425      430
Gly Gly Ser Lys Arg Met Tyr Ala Gly Leu Lys Asn Ala Gly Glu Thr
      435      440      445
Trp Tyr Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Lys Ile Gly Ser
      450      455      460
Asp Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Asp Gly Ser Val Ser Ile Tyr
      465      470      475      480
Val Gln Lys

```

<210> 15

<211> 1458

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 地衣芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌 (LAL19-433) 的 α -淀粉酶基因的融合

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1458)

<400> 15

```

gca aat ctt aat ggg acg ctg atg cag tat ttt gaa tgg tac atg ccc      48
Ala Asn Leu Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Met Pro
  1              5              10              15

```

```

aat gac ggc cag cat tgg aaa cga ttg cag aat gat gcg gaa cat tta      96
Asn Asp Gly Gln His Trp Lys Arg Leu Gln Asn Asp Ala Glu His Leu
      20              25              30

```

```

tcg gat atc gga atc act gcc gtc tgg att cct ccc gca tac aaa gga      144
Ser Asp Ile Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly
      35              40              45

```

```

ttg agc caa tcc gat aac gga tac gga cct tat gat ttg tat gat tta      192
Leu Ser Gln Ser Asp Asn Gly Tyr Gly Pro Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu
      50              55              60

```

```

gga gaa ttc cag caa aaa ggg acg gtc aga acg aaa tac ggc aca aaa      240

```

Gly 65	Glu	Phe	Gln	Gln	Lys 70	Gly	Thr	Val	Arg	Thr 75	Lys	Tyr	Gly	Thr	Lys 80	
tca	gag	ctt	caa	gat	gcg	atc	ggc	tca	ctg	cat	tcc	cgg	aac	gtc	caa	288
Ser	Glu	Leu	Gln	Asp	Ala	Ile	Gly	Ser	Leu	His	Ser	Arg	Asn	Val	Gln	
				85					90					95		
gta	tac	gga	gat	gtg	gtt	ttg	aat	cat	aag	gct	ggc	gct	gat	gca	aca	336
Val	Tyr	Gly	Asp	Val	Val	Leu	Asn	His	Lys	Ala	Gly	Ala	Asp	Ala	Thr	
			100					105					110			
gaa	gat	gta	act	gcc	gtc	gaa	gtc	aat	ccg	gcc	aat	aga	aat	cag	gaa	384
Glu	Asp	Val	Thr	Ala	Val	Glu	Val	Asn	Pro	Ala	Asn	Arg	Asn	Gln	Glu	
		115					120					125				
act	tgc	gag	gaa	tat	caa	atc	aaa	gcg	tgg	acg	gat	ttt	cgt	ttt	ccg	432
Thr	Ser	Glu	Glu	Tyr	Gln	Ile	Lys	Ala	Trp	Thr	Asp	Phe	Arg	Phe	Pro	
	130					135					140					
ggc	cgt	gga	aac	acg	tac	agt	gat	ttt	aaa	tgg	cat	tgg	tat	cat	ttc	480
Gly	Arg	Gly	Asn	Thr	Tyr	Ser	Asp	Phe	Lys	Trp	His	Trp	Tyr	His	Phe	
145				150					155						160	
gac	gga	gcg	gac	tgg	gat	gaa	tcc	cgg	aag	atc	agc	cgc	atc	ttt	aag	528
Asp	Gly	Ala	Asp	Trp	Asp	Glu	Ser	Arg	Lys	Ile	Ser	Arg	Ile	Phe	Lys	
			165					170						175		
ttt	cgt	ggg	gaa	gga	aaa	gcg	tgg	gat	tgg	gaa	gta	tca	agt	gaa	aac	576
Phe	Arg	Gly	Glu	Gly	Lys	Ala	Trp	Asp	Trp	Glu	Val	Ser	Ser	Glu	Asn	
		180					185						190			
ggc	aac	tat	gac	tat	tta	atg	tat	gct	gat	gtt	gac	tac	gac	cac	cct	624
Gly	Asn	Tyr	Asp	Tyr	Leu	Met	Tyr	Ala	Asp	Val	Asp	Tyr	Asp	His	Pro	
	195					200					205					
gat	gtc	gtg	gca	gag	aca	aaa	aaa	tgg	ggc	atc	tgg	tat	gcg	aat	gaa	672
Asp	Val	Val	Ala	Glu	Thr	Lys	Lys	Trp	Gly	Ile	Trp	Tyr	Ala	Asn	Glu	
	210					215				220						
ctg	tca	tta	gac	ggc	ttc	cgt	att	gat	gcc	gcc	aaa	cat	att	aaa	ttt	720
Leu	Ser	Leu	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Ala	Ala	Lys	His	Ile	Lys	Phe	
225				230					235						240	
tca	ttt	ctg	cgt	gat	tgg	gtt	cag	gcg	gtc	aga	cag	gcg	acg	gga	aaa	768
Ser	Phe	Leu	Arg	Asp	Trp	Val	Gln	Ala	Val	Arg	Gln	Ala	Thr	Gly	Lys	
			245				250						255			
gaa	atg	ttt	acg	gtt	gcg	gag	tat	tgg	cag	aat	aat	gcc	ggg	aaa	ctc	816
Glu	Met	Phe	Thr	Val	Ala	Glu	Tyr	Trp	Gln	Asn	Asn	Ala	Gly	Lys	Leu	
		260					265					270				
gaa	aac	tac	ttg	aat	aaa	aca	agc	ttt	aat	caa	tcc	gtg	ttt	gat	gtt	864
Glu	Asn	Tyr	Leu	Asn	Lys	Thr	Ser	Phe	Asn	Gln	Ser	Val	Phe	Asp	Val	
	275					280						285				
ccg	ctt	cat	ttc	aat	tta	cag	gcg	gct	tcc	tca	caa	gga	ggc	gga	tat	912
Pro	Leu	His	Phe	Asn	Leu	Gln	Ala	Ala	Ser	Ser	Gln	Gly	Gly	Gly	Tyr	
	290				295				300							
gat	atg	agg	cgt	ttg	ctg	gac	ggc	acc	gtt	gtg	tcc	agg	cat	ccg	gaa	960
Asp	Met	Arg	Arg	Leu	Leu	Asp	Gly	Thr	Val	Val	Ser	Arg	His	Pro	Glu	
305				310				315							320	

```

aag gcg gtt aca ttt gtt gaa aat cat gac aca cag ccg gga cag tca 1008
Lys Ala Val Thr Phe Val Glu Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser
325 330 335

ttg gaa tcg aca gtc caa act tgg ttt aaa ccg ctt gca tac gcc ttt 1056
Leu Glu Ser Thr Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe
340 345 350

att ttg aca aga gaa tcc ggt tat cct cag gtg ttc tat ggg gat atg 1104
Ile Leu Thr Arg Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met
355 360 365

tac ggg aca aaa ggg aca tcg cca aag gaa att ccc tca ctg aaa gat 1152
Tyr Gly Thr Lys Gly Thr Ser Pro Lys Glu Ile Pro Ser Leu Lys Asp
370 375 380

aat ata gag ccg att tta aaa gcg cgt aag gag tac gca tac ggg ccc 1200
Asn Ile Glu Pro Ile Leu Lys Ala Arg Lys Glu Tyr Ala Tyr Gly Pro
385 390 395 400

cag cac gat tat att gac cac ccg gat gtg atc gga tgg acg agg gaa 1248
Gln His Asp Tyr Ile Asp His Pro Asp Val Ile Gly Trp Thr Arg Glu
405 410 415

ggt gac agc tcc gcc gcc aaa tca ggt ttg gcc gct tta atc acg gac 1296
Gly Asp Ser Ser Ala Ala Lys Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp
420 425 430

gga ccc ggt ggg gca aag cga atg tat gtc ggc cgg caa aac gcc ggt 1344
Gly Pro Gly Gly Ala Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly
435 440 445

gag aca tgg cat gac att acc gga aac cgt tcg gag ccg gtt gtc atc 1392
Glu Thr Trp His Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile
450 455 460

aat tcg gaa ggc tgg gga gag ttt cac gta aac ggc ggg tcg gtt tca 1440
Asn Ser Glu Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Gly Gly Ser Val Ser
465 470 475 480

att tat gtt caa aga tag 1458
Ile Tyr Val Gln Arg
485

```

<210> 16

<211> 485

<212> PRT

<213> 人工序列

<223> 人工序列描述: 地衣芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌(LAL19-433)的 α -淀粉酶基因的融合

<400> 16

```

Ala Asn Leu Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Met Pro
1 5 10 15
Asn Asp Gly Gln His Trp Lys Arg Leu Gln Asn Asp Ala Glu His Leu
20 25 30
Ser Asp Ile Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly
35 40 45
Leu Ser Gln Ser Asp Asn Gly Tyr Gly Pro Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu
50 55 60
Gly Glu Phe Gln Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys
65 70 75 80

```

```

Ser Glu Leu Gln Asp Ala Ile Gly Ser Leu His Ser Arg Asn Val Gln
      85                      90                      95
Val Tyr Gly Asp Val Val Leu Asn His Lys Ala Gly Ala Asp Ala Thr
      100                    105                    110
Glu Asp Val Thr Ala Val Glu Val Asn Pro Ala Asn Arg Asn Gln Glu
      115                    120                    125
Thr Ser Glu Glu Tyr Gln Ile Lys Ala Trp Thr Asp Phe Arg Phe Pro
      130                    135                    140
Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp His Trp Tyr His Phe
      145                    150                    155                    160
Asp Gly Ala Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Ile Ser Arg Ile Phe Lys
      165                    170                    175
Phe Arg Gly Glu Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Ser Ser Glu Asn
      180                    185                    190
Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Val Asp Tyr Asp His Pro
      195                    200                    205
Asp Val Val Ala Glu Thr Lys Lys Trp Gly Ile Trp Tyr Ala Asn Glu
      210                    215                    220
Leu Ser Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Lys Phe
      225                    230                    235                    240
Ser Phe Leu Arg Asp Trp Val Gln Ala Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys
      245                    250                    255
Glu Met Phe Thr Val Ala Glu Tyr Trp Gln Asn Asn Ala Gly Lys Leu
      260                    265                    270
Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Ser Phe Asn Gln Ser Val Phe Asp Val
      275                    280                    285
Pro Leu His Phe Asn Leu Gln Ala Ala Ser Ser Gln Gly Gly Gly Tyr
      290                    295                    300
Asp Met Arg Arg Leu Leu Asp Gly Thr Val Val Ser Arg His Pro Glu
      305                    310                    315                    320
Lys Ala Val Thr Phe Val Glu Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser
      325                    330                    335
Leu Glu Ser Thr Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe
      340                    345                    350
Ile Leu Thr Arg Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met
      355                    360                    365
Tyr Gly Thr Lys Gly Thr Ser Pro Lys Glu Ile Pro Ser Leu Lys Asp
      370                    375                    380
Asn Ile Glu Pro Ile Leu Lys Ala Arg Lys Glu Tyr Ala Tyr Gly Pro
      385                    390                    395                    400
Gln His Asp Tyr Ile Asp His Pro Asp Val Ile Gly Trp Thr Arg Glu
      405                    410                    415
Gly Asp Ser Ser Ala Ala Lys Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp
      420                    425                    430
Gly Pro Gly Gly Ala Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly
      435                    440                    445
Glu Thr Trp His Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile
      450                    455                    460
Asn Ser Glu Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Gly Gly Ser Val Ser
      465                    470                    475                    480
Ile Tyr Val Gln Arg
      485

```

<210> 17

<211> 1452

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 地衣芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌(LAL19-153)的 α -淀粉酶基因的融合

```

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1452)

<400> 17
gca aat ctt aat ggg acg ctg atg cag tat ttt gaa tgg tac atg ccc 48
Ala Asn Leu Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Met Pro
1 5 10 15

aat gac ggc cag cat tgg aaa cga ttg cag aat gat gcg gaa cat tta 96
Asn Asp Gly Gln His Trp Lys Arg Leu Gln Asn Asp Ala Glu His Leu
20 25 30

tcg gat atc gga atc act gcc gtc tgg att cct ccc gca tac aaa gga 144
Ser Asp Ile Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly
35 40 45

ttg agc caa tcc gat aac gga tac gga cct tat gat ttg tat gat tta 192
Leu Ser Gln Ser Asp Asn Gly Tyr Gly Pro Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu
50 55 60

gga gaa ttc cag caa aaa ggg acg gtc aga acg aaa tac ggc aca aaa 240
Gly Glu Phe Gln Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys
65 70 75 80

tca gag ctt caa gat gcg atc ggc tca ctg cat tcc cgg aac gtc caa 288
Ser Glu Leu Gln Asp Ala Ile Gly Ser Leu His Ser Arg Asn Val Gln
85 90 95

gta tac gga gat gtg gtt ttg aat cat aag gct ggt gct gat gca aca 336
Val Tyr Gly Asp Val Val Leu Asn His Lys Ala Gly Ala Asp Ala Thr
100 105 110

gaa gat gta act gcc gtc gaa gtc aat ccg gcc aat aga aat cag gaa 384
Glu Asp Val Thr Ala Val Glu Val Asn Pro Ala Asn Arg Asn Gln Glu
115 120 125

act tcg gag gaa tat caa atc aaa gcg tgg acg gat ttt cgt ttt ccg 432
Thr Ser Glu Glu Tyr Gln Ile Lys Ala Trp Thr Asp Phe Arg Phe Pro
130 135 140

ggc cgt gga aac acg tac agt gat ttt aaa tgg cat tgg tac cat ttt 480
Gly Arg Gly Asn Thr Ser Asp Phe Lys Trp His Trp Tyr His Phe
145 150 155 160

gac gga acc gat tgg gac gag tcc cga aag ctg aac cgc atc tat aag 528
Asp Gly Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg Ile Tyr Lys
165 170 175

ttt caa gga aag gct tgg gat tgg gaa gtt tcc aat gaa aac ggc aac 576
Phe Gln Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Ser Asn Glu Asn Gly Asn
180 185 190

tat gat tat ttg atg tat gcc gac atc gat tat gac cat cct gat gtc 624
Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Tyr Asp His Pro Asp Val
195 200 205

gca gca gaa att aag aga tgg ggc act tgg tat gcc aat gaa ctg caa 672
Ala Ala Glu Ile Lys Arg Trp Gly Thr Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Gln
210 215 220

ttg gac ggt ttc cgt ctt gat gct gtc aaa cac att aaa ttt tct ttt 720

```

Leu Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys Phe Ser Phe 225 230 235 240	
ttg cgg gat tgg gtt aat cat gtc agg gaa aaa acg ggg aag gaa atg Leu Arg Asp Trp Val Asn His Val Arg Glu Lys Thr Gly Lys Glu Met 245 250 255	768
ttt acg gta gct gaa tat tgg cag aat gac ttg ggc gcg ctg gaa aac Phe Thr Val Ala Glu Tyr Trp Gln Asn Asp Leu Gly Ala Leu Glu Asn 260 265 270	816
tat ttg aac aaa aca aat ttt aat cat tca gtg ttt gac gtg ccg ctt Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Phe Asn His Ser Val Phe Asp Val Pro Leu 275 280 285	864
cat tat cag ttc cat gct gca tcg aca cag gga ggc ggc tat gat atg His Tyr Gln Phe His Ala Ala Ser Thr Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met 290 295 300	912
agg aaa ttg ctg aac agt acg gtc gtt tcc aag cat ccg ttg aaa gcg Arg Lys Leu Leu Asn Ser Thr Val Val Ser Lys His Pro Leu Lys Ala 305 310 315 320	960
gtt aca ttt gtc gat aac cat gat aca cag ccg ggg caa tcg ctt gag Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu 325 330 335	1008
tcg act gtc caa aca tgg ttt aag ccg ctt gct tac gct ttt att ctc Ser Thr Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu 340 345 350	1056
aca agg gaa tct gga tac cct cag gtt ttc tac ggg gat atg tac ggg Thr Arg Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly 355 360 365	1104
acg aaa gga gac tcc cag cgc gaa att cct gcc ttg aaa cac aaa att Thr Lys Gly Asp Ser Gln Arg Glu Ile Pro Ala Leu Lys His Lys Ile 370 375 380	1152
gaa ccg atc tta aaa gcg aga aaa cag tat gcg tac gga gca cag cat Glu Pro Ile Leu Lys Ala Arg Lys Gln Tyr Ala Tyr Gly Ala Gln His 385 390 395 400	1200
gat tat ttc gac cac cat gac att gtc ggc tgg aca agg gaa ggc gac Asp Tyr Phe Asp His His Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp 405 410 415	1248
agc tcg gtt gca aat tca ggt ttg gcg gca tta ata aca gac gga ccc Ser Ser Val Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro 420 425 430	1296
ggt ggg gca aag cga atg tat gtc ggc cgg caa aac gcc ggt gag aca Gly Gly Ala Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Glu Thr 435 440 445	1344
tgg cat gac att acc gga aac cgt tcg gag ccg gtt gtc atc aat tcg Trp His Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile Asn Ser 450 455 460	1392
gaa ggc tgg gga gag ttt cac gta aac ggc ggg tcg gtt tca att tat Glu Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Tyr 465 470 475 480	1440

gtt caa aga tag
Val Gln Arg

<210> 18

<211> 483

<212> PRT

<213> 人工序列

<223> 人工序列描述: 地衣芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌 (LAL19-153) 的 α -淀粉酶基因的融合

<400> 18

Ala	Asn	Leu	Asn	Gly	Thr	Leu	Met	Gln	Tyr	Phe	Glu	Trp	Tyr	Met	Pro
1			5						10					15	
Asn	Asp	Gly	Gln	His	Trp	Lys	Arg	Leu	Gln	Asn	Asp	Ala	Glu	His	Leu
		20						25					30		
Ser	Asp	Ile	Gly	Ile	Thr	Ala	Val	Trp	Ile	Pro	Pro	Ala	Tyr	Lys	Gly
		35					40						45		
Leu	Ser	Gln	Ser	Asp	Asn	Gly	Tyr	Gly	Pro	Tyr	Asp	Leu	Tyr	Asp	Leu
	50					55					60				
Gly	Glu	Phe	Gln	Gln	Lys	Gly	Thr	Val	Arg	Thr	Lys	Tyr	Gly	Thr	Lys
65					70				75						80
Ser	Glu	Leu	Gln	Asp	Ala	Ile	Gly	Ser	Leu	His	Ser	Arg	Asn	Val	Gln
				85					90					95	
Val	Tyr	Gly	Asp	Val	Val	Leu	Asn	His	Lys	Ala	Gly	Ala	Asp	Ala	Thr
			100					105					110		
Glu	Asp	Val	Thr	Ala	Val	Glu	Val	Asn	Pro	Ala	Asn	Arg	Asn	Gln	Glu
	115						120					125			
Thr	Ser	Glu	Glu	Tyr	Gln	Ile	Lys	Ala	Trp	Thr	Asp	Phe	Arg	Phe	Pro
130						135					140				
Gly	Arg	Gly	Asn	Thr	Tyr	Ser	Asp	Phe	Lys	Trp	His	Trp	Tyr	His	Phe
145					150				155						160
Asp	Gly	Thr	Asp	Trp	Asp	Glu	Ser	Arg	Lys	Leu	Asn	Arg	Ile	Tyr	Lys
			165						170					175	
Phe	Gln	Gly	Lys	Ala	Trp	Asp	Trp	Glu	Val	Ser	Asn	Glu	Asn	Gly	Asn
			180					185					190		
Tyr	Asp	Tyr	Leu	Met	Tyr	Ala	Asp	Ile	Asp	Tyr	Asp	His	Pro	Asp	Val
	195					200						205			
Ala	Ala	Glu	Ile	Lys	Arg	Trp	Gly	Thr	Trp	Tyr	Ala	Asn	Glu	Leu	Gln
	210					215					220				
Leu	Asp	Gly	Phe	Arg	Leu	Asp	Ala	Val	Lys	His	Ile	Lys	Phe	Ser	Phe
225					230				235						240
Leu	Arg	Asp	Trp	Val	Asn	His	Val	Arg	Glu	Lys	Thr	Gly	Lys	Glu	Met
			245						250					255	
Phe	Thr	Val	Ala	Glu	Tyr	Trp	Gln	Asn	Asp	Leu	Gly	Ala	Leu	Glu	Asn
		260						265					270		
Tyr	Leu	Asn	Lys	Thr	Asn	Phe	Asn	His	Ser	Val	Phe	Asp	Val	Pro	Leu
	275					280						285			
His	Tyr	Gln	Phe	His	Ala	Ala	Ser	Thr	Gln	Gly	Gly	Gly	Tyr	Asp	Met
	290					295					300				
Arg	Lys	Leu	Leu	Asn	Ser	Thr	Val	Val	Ser	Lys	His	Pro	Leu	Lys	Ala
305				310						315					320
Val	Thr	Phe	Val	Asp	Asn	His	Asp	Thr	Gln	Pro	Gly	Gln	Ser	Leu	Glu
			325						330					335	
Ser	Thr	Val	Gln	Thr	Trp	Phe	Lys	Pro	Leu	Ala	Tyr	Ala	Phe	Ile	Leu
		340						345					350		
Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Tyr	Pro	Gln	Val	Phe	Tyr	Gly	Asp	Met	Tyr	Gly
	355					360						365			
Thr	Lys	Gly	Asp	Ser	Gln	Arg	Glu	Ile	Pro	Ala	Leu	Lys	His	Lys	Ile
	370					375					380				
Glu	Pro	Ile	Leu	Lys	Ala	Arg	Lys	Gln	Tyr	Ala	Tyr	Gly	Ala	Gln	His
385				390					395						400
Asp	Tyr	Phe	Asp	His	His	Asp	Ile	Val	Gly	Trp	Thr	Arg	Glu	Gly	Asp

				405					410					415			
Ser	Ser	Val	Ala	Asn	Ser	Gly	Leu	Ala	Ala	Leu	Ile	Thr	Asp	Gly	Pro		
			420					425					430				
Gly	Gly	Ala	Lys	Arg	Met	Tyr	Val	Gly	Arg	Gln	Asn	Ala	Gly	Glu	Thr		
		435					440					445					
Trp	His	Asp	Ile	Thr	Gly	Asn	Arg	Ser	Glu	Pro	Val	Val	Ile	Asn	Ser		
	450					455					460						
Glu	Gly	Trp	Gly	Glu	Phe	His	Val	Asn	Gly	Gly	Ser	Val	Ser	Ile	Tyr		
465					470					475					480		
Val	Gln	Arg															

图1

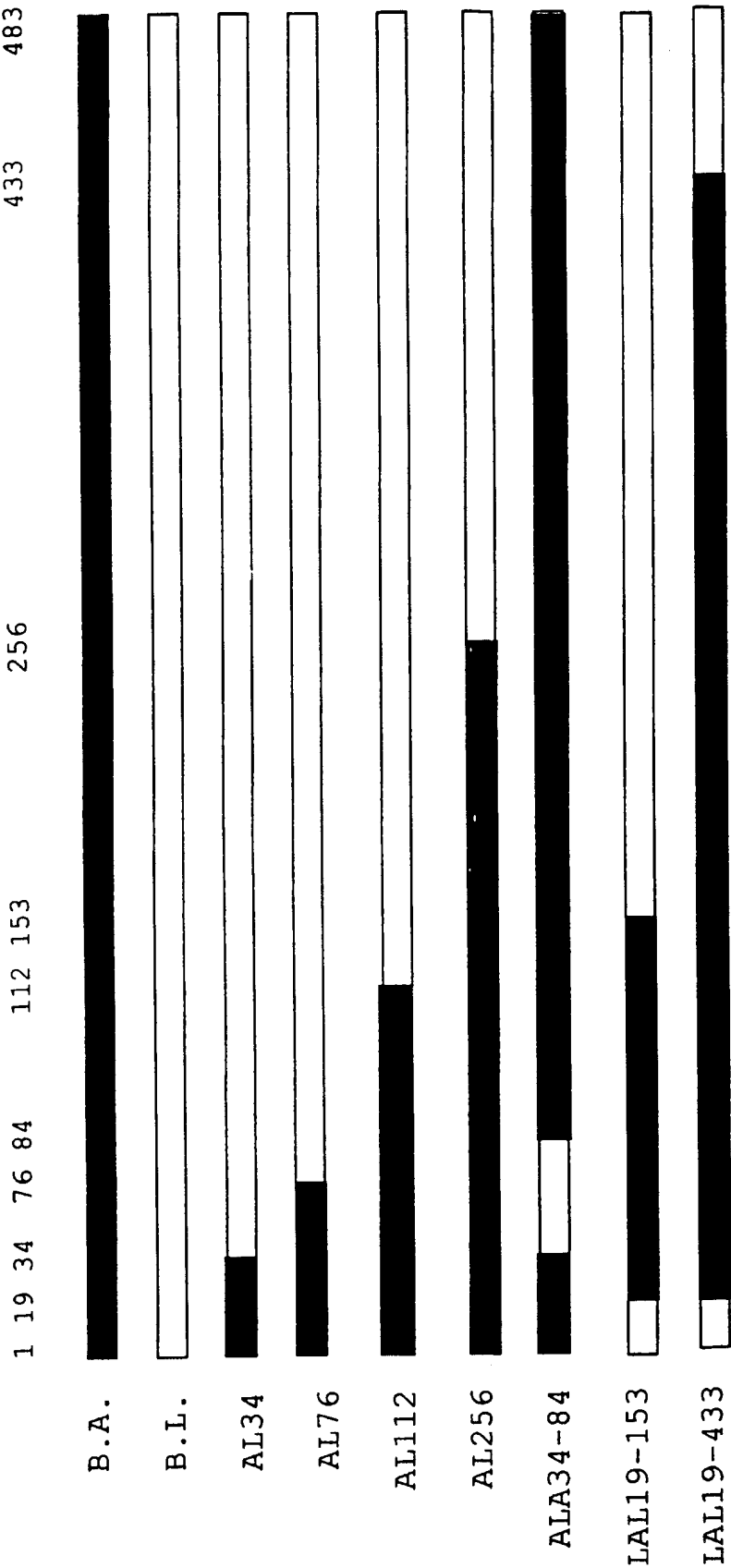


图2

B.L.	MKQOKRLYARL-LTLLFALI---FLLPHSAAAA---- AN LNGTLMQYFEW	42
B.A.	MIQKRKRTVSFRLVLMCTLL---FV-SLPITKTS-----VNGTLMQYFEW	42
B.L.	YMPNDGQ HW KRLQNDSAYLAEHGITAVWIPPAYKGT SQ ADVGYGAYDLYD	92
B.A.	YTPNDGQ HW KRLQNDAEHLSDIGITAVWIPPAYKGL SQ SDNGYGPYDLYD	92
B.L.	LGEFHQKGTVRTKY GTK GELQ SA IKSLHSRDINVYGDVVINHKGGADATE	142
B.A.	LGEFQQKGTVRTKY GTK SELQ DA IGSLHSRNVQVYGDVVLNHKAGADATE	142
B.L.	DVTAVEVDPADNRNVISGEHRIKAWTHFHFPGRGSTYSDFK WH WHYHFDGT	192
B.A.	DVTAVEVNPANRNQETSEEYQIKAWTDFRFPGRGNTYSDFK WH WHYHFDGA	192
B.L.	DWDESRKL-NRIYKF--QGKAWDWEVSNENGNYDYL MY ADIDYDHPDVAA	239
B.A.	DWDESRKI-SRIFKFRGEGKAWDWEVSSENGNYDYL MY ADVDYDHPDVVA	241
B.L.	EIKRWGTWYANELQLDGFRLDAVKHIKFSFLRDWVNHVREKTG KEM FTVA	289
B.A.	ETKKWGIWYANELSLDGFRI DA AKHIKFSFLRDWVQAVRQATG KEM FTVA	291
B.L.	EYWQNDLGALENYLNKTNFNHSVFDVPLHYQFHA ASTQ GGGYDMRKLLNS	339
B.A.	EYWQNNAGKLENYLNKTSFNQSVFDVPLHFNLQA ASSQ GGGYDMRRLLDG	341
B.L.	TVVSKHPLKAVTFVDNHDTQPGQSLESTVQ TF WKPLAYAFILTRESGY PQ	389
B.A.	TVVSRHPEKAVTFVENHDTQPGQSLESTVQ TF WKPLAYAFILTRESGY PQ	391
B.L.	VFYGDMYGT KG DSQREIPALKHKIEPILKARKQYAYGAQH DY FDHHDIVG	439
B.A.	VFYGDMYGT KG TSPKEIPSLKDNIEPILKARKEYAYGPQH DY IDHPDVIG	441
B.L.	WTREGDSSVANSGLAALITDG PGG AKRMVGRQNAGET WHD ITGNRSEPV	489
B.A.	WTREGDSSAAKSGLAALITDG PGG SKRMVAGLKNAGET WYD ITGNRSDTV	491
B.L.	VINSEG WGE FHVNGGSVSIYVQR	512
B.A.	KIGSD WGE FHVNDGSVSIYVQK	514