(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118786210 A
(43)申请公布日 2024.10.15

(21)申请号 202380024236.6
(22)申请日 2023.02.28
(30)优先权数据
22160258.4 2022.03.04 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.08.29
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2023/054907 2023.02.28
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/165950 EN 2023.09.07
(71)申请人 诺维信公司
地址 丹麦鲍斯韦
(72)发明人 J·文德 T·H·索伦森 L·L·H·克里斯腾森 P·田 J·K·威斯特尔 J·H·荣
(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
专利代理师 张文辉
(51)Int.Cl.
C12N 9/22(2006.01)

权利要求书6页 说明书57页
序列表（电子公布） 附图1页

(54)发明名称

DNA酶变体和组合物

(57)摘要

本发明涉及相对于亲本DNA酶表现出改变的新颖DNA酶变体,已发现这些变体提供改善的稳定性,例如改善的洗涤剂稳定性。本发明还涉及包含这些DNA酶变体的洗涤剂组合物,用于使用和产生这些DNA酶变体的方法,以及编码这些变体的分离的DNA序列,表达载体和宿主细胞。本发明的变体适合用于在清洁过程和洗涤剂组合物中使用。

CN 118786210 A

1.一种DNA酶变体,该DNA酶变体包含选自由以下组成的组的至少两个取代,如至少三个取代:A111P、D32E、V35I、S69V、Q102E、K105N和G181N,其中位置编号基于SEQ ID NO:1的编号,其中该变体与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的多肽具有至少60%但小于100%的序列同一性,并且其中该变体具有DNA酶活性。

2.如权利要求1所述的变体,其中该变体包含取代A111P。

3.如权利要求2所述的变体,其中该变体进一步包含选自由以下组成的组的两个或更多个取代:S26H、D32E、V35I、K65E、K67A、S69E、S69V、S98R、Q102E、K105N、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、G181N、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V和K212E。

4.如前述权利要求中任一项所述的变体,其中该变体包含:

D32E+V35I,例如D32E+V35I+A111P;和/或

G181N,例如A111P+G181N;和/或

S69V+Q102E。

5.如前述权利要求中任一项所述的变体,其中该变体包含:

D32E+V35I+A111P,以及任选地选自由以下组成的组的一个或多个另外的取代:S26H、K65E、K67A、S69E、S69V、S98R、Q102E、K105N、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、G181N、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V和K212E;

D32E+V35I+A111P+G181N,以及任选地选自由以下组成的组的一个或多个另外的取代:S26H、K65E、K67A、S69E、S69V、S98R、Q102E、K105N、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V和K212E;

D32E+V35I+Q102E+A111P+G181N,以及任选地选自由以下组成的组的一个或多个另外的取代:S26H、K65E、K67A、S69E、S69V、S98R、K105N、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V和K212E;

D32E+V35I+K105N+A111P+G181N,以及任选地选自由以下组成的组的一个或多个另外的取代:S26H、K65E、K67A、S69E、S69V、S98R、Q102E、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V和K212E;

D32E+V35I+S69V+Q102E+A111P,以及任选地选自由以下组成的组的一个或多个另外的取代:S26H、K65E、K67A、S98R、K105N、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、G181N、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V和K212E;

D32E+V35I+S69V+Q102E+A111P+G181N,以及任选地选自由以下组成的组的一个或多个另外的取代:S26H、K65E、K67A、S98R、K105N、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V和K212E;

S69V+Q102E+A111P,以及任选地选自由以下组成的组的一个或多个另外的取代:S26H、D32E、V35I、K65E、K67A、S98R、K105N、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、G181N、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V和K212E;

S69V+Q102E+G181N,以及任选地选自由以下组成的组的一个或多个另外的取代:S26H、D32E、V35I、K65E、K67A、S98R、K105N、A111P、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V和K212E;

S69V+Q102E+A111P+G181N,以及任选地选自由以下组成的组的一个或多个另外的取

代:S26H、D32E、V35I、K65E、K67A、S98R、K105N、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V和K212E;

Q102E+K105N+A111P+G181N,以及任选地选自由以下组成的组的一个或多个另外的取代:S26H、D32E、V35I、K65E、K67A、S69E、S69V、S98R、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V和K212E;

S69V+Q102E+K105N+A111P+G181N,以及任选地选自由以下组成的组的一个或多个另外的取代:S26H、D32E、V35I、K65E、K67A、S98R、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V和K212E;或

D32E+V35I+K105N+A111P,以及任选地选自由以下组成的组的一个或多个另外的取代:S26H、K65E、K67A、S69E、S69V、S98R、Q102E、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、G181N、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V和K212E。

6.如前述权利要求中任一项所述的变体,其中该变体与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的多肽具有至少65%,例如至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%,但小于100%序列同一性。

7.如前述权利要求中任一项所述的变体,其中该变体包含选自由以下组成的组的一组取代:

- S69V+K86E+Q102E+K147N+K155E+A172D+K192A+Q208V;
- G20C+K30C+D32E+V35I+A111P;
- S69V+K86E+Q102E+K147N+K155E+A172D+G181N+K192A+Q208V;
- D32E+V35I+N77E+A111P+G181N+S182V;
- D32E+E34N+V35I+K86E+A111P+G181N;
- S69V+K86E+Q102E+K105T+K147N+K155E+A172D+K192A+Q208V;
- S69V+Q102E+Q157E+T159Q+N214D+N217A;
- S26H+D32E+V35I+A111P+K155L;
- K18S+D32E+V35I+A111P+K185I+K215T;
- D32E+V35I+A111P+K185I+K215T;
- D32E+V35I+K82G+A111P+G181N+S182V;
- D32E+V35I+A111P+K178M+K212T;
- K18S+D32E+V35I+A111P+K178S+K212L;
- S69V+Q102E+V138A+S144R+Q157E+T159Q+A172E+G181N;
- D32E+V35I+A111P+K204L+K215I;
- K18F+D32E+V35I+A111P+K185Q;
- D32E+V35I+A111P+K147N+K204L;
- S69V+K86E+Q102E+K105D+K147N+K155E+A172D+K192A+Q208V;
- D32E+V35I+S69V+K86E+Q102E+A111P+K155E+T159Q+A172D+G181N+K192A+Q208V+N217A;
- D32E+V35I+A111P+K147N;
- S69V+K86E+Q102E+S115T+K147N+K155E+A172D+K192A+Q208V;
- D32E+V35I+S69V+K86E+Q102E+A111P+K147N+K155E+T159Q+A172D+G181N+K192A+

Q208V+N217A;

• D32E+V35I+A111P+N140H;

• D32E+V35I+K65Q+S69V+K86E+Q102E+A111P+K147N+K155E+T159Q+A172D+G181N+K192A+Q208V+N217A;

• D32E+V35I+S69V+K86E+Q102E+A111P+K147N+K155E+T159Q+A172D+K178S+G181N+K192A+Q208V+N217A;

• D32E+V35I+A111P;

• E6D+A101E+Q150E+G181N+Q208V;

• S26H+D32E+V35I+A111P;

• K18Q+D32E+V35I+K105E+A111P+K155F;

• D32E+V35I+A111P+G199E;

• S69V+Q102E+Q157E+T159Q+G181N;

• D32E+V35I+K67A+A111P+P175N+S182V;

• D32E+V35I+A111P+N214D;

• S69V+Q102E+Q157E+T159Q+A172E;

• E6D+A101E+Q150E+G181N+Q208V;

• D32E+V35I+S69E+A111P;

• D32E+V35I+Q85E+A111P;

• K18Q+D32E+V35I+A111P;

• D32E+V35I+A101E+K105T+A111P+G181N+K212E+Y218E;

• D32E+V35I+A111P+G181N+S182V+K185E;

• D32E+V35I+S98R+A111P+G181N+S182Y;

• D32E+V35I+A101E+Q102E+A111P+G181N;

• T19P+D32E+V35I+Q102E+K105E+A111P;

• D32E+V35I+D72V+A111P;

• S69V+K86E+Q102E+F112W+K147N+K155E+A172D+K192A+Q208V;

• S69V+Q102E+A111P+Q157E+T159Q+A172E;

• K67A+S69V+Q102E+K147N+Q157E+T159Q+A172E+D197S;

• S69V+Q102E+S115T+Q157E+T159Q+A172E;

• S69V+K86E+Q102E+G136E+K147N+K155E+A172D+K192A+Q208V;

• D32E+V35I+K67A+A111P+K204G;

• A101E+A111P+Q150E+Q208V;

• D32E+V35I+A101E+K105E+A111P+S182V;

• D32E+V35I+A101E+K105E+A111P+S182V;

• D32E+V35I+A101T+K105N+A111P+K147E+G181N+S182Y;

• D32E+V35I+S69V+Q102E+A111P+Q157E+T159Q+A172E;

• D32E+V35I+Q102E+A111P;

• S26H+S69V+Q102E+A111P+Q157E+T159Q+A172E;

• D32E+V35I+S69V+Q102E+A111P+Q157E+T159Q+A172E;

- D32E+V35I+K67A+K105T+A111P+K178L+K185T;
- K67A+K105T+G181N;
- T19P+D32E+V35I+A101E+K105T+A111P+K160A+G181N;
- D32E+V35I+S69V+Q102E+A111P+Q157E+T159Q+A172E;
- D32E+V35I+Q102E+A111P;
- K18S+D32E+V35I+Q102E+K105E+A111P;
- D32E+V35I+K65E+A101E+K105T+A111P+N217A;
- D32E+V35I+K105T+A111P+G181N+K204W+K215L;
- D32E+V35I+K105T+A111P+K178L+G181N+K212T;
- S26H+S69V+Q102E+A111P+N146H+Q150E+Q157E+T159Q+A172E;
- K18Q+D32E+V35I+K67A+K105T+A111P+K215V;
- D32E+V35I+Q85E+A111P;
- K18S+T19P+D32E+V35I+A101E+K105T+A111P+G181N;
- D32E+V35I+A101E+K105N+A111P;
- K18M+D32E+V35I+K67A+K105T+A111P+K178S;
- D32E+V35I+K105T+A111P+G181N;
- D32E+V35I+K67A+K105T+A111P+K185G+K212M;
- D32E+V35I+A101T+K105N+A111P+G181N+S182Y+N214D;
- T19P+D32E+V35I+A101E+K105T+A111P+K178S+G181N;
- D32E+V35I+K105T+A111P+G181N+K185L+K192V+K204W;
- D32E+V35I+S98R+K105N+A111P+K147N+G181N+S182Y;
- D32E+V35I+K105N+A111P+G181N+S182Y;
- D32E+V35I+K67A+K105T+A111P;
- D32E+V35I+K53F+K105N+A111P+G181N+S182Y+K212E;
- K18S+D32E+V35I+S98R+K105N+A111P+G181N+S182Y;
- D32E+V35I+S98R+K105N+A111P+Q158D+G181N+S182Y;
- D32E+V35I+K67A+K105T+A111P+K190V+K204G;
- N4K+D32E+V35I+S98R+K105N+A111P+G181N+S182Y+K212E;
- D32E+V35I+K67A+K105T+A111P+K147N+K190N;
- D32E+V35I+S98R+K105N+A111P+G181N+S182Y+Q208V;
- D32E+V35I+A101E+K105T+A111P+G181N+K212E+N214D;
- D32E+V35I+K82T+A101E+K105T+A111P+G181N+K212E;
- D32E+V35I+A111P+S115T;
- S26H+S69V+Q102E+A111P+K147N+A149S+Q150E+Q157E+T159Q+A172E;
- K18S+D32E+V35I+K67A+K105T+A111P+K185L+K192F;
- V12L+D32E+V35I+S98R+K105N+A111P+G181N+S182Y;
- D32E+V35I+S69E+K105N+A111P+K147E+G181N+S182Y;
- K18S+D32E+V35I+A101E+K105T+A111P+G181N+K212E;
- D32E+V35I+K65E+K105N+A111P+G181N+S182Y+K212E;

• D32E+V35I+S98R+K105N+A111P+G181N+S182Y+D189N+N214D;

• D32E+V35I+S98R+A101T+K105N+A111P+G181N+S182Y;

• D32E+V35I+K67A+A111P+Q157E+T159Q+G181N+A206G+Q208V;

• D32E+V35I+K67A+S69R+A111P+G181N+K212E;

• D32E+V35I+K67A+A111P+G181N+A206G+Q208V;

• D32E+V35I+A101E+K105T+A111P+G181N;

• D32E+V35I+K67A+A101E+K105D+A111P+N217A;

• D32E+V35I+K67A+A111P+Q157E+G181N+Q208V;

• D32E+V35I+K67A+A111P+Q157E+A172E+G181N+A206G+Q208V;

• S26H+D32E+V35I+K67A+S69R+A111P+G181N+K212E;

• D32E+V35I+S69E+S98R+K105N+A111P+G181N+S182Y;

• D32E+V35I+K67A+K105N+A111P+G181N+S182Y+K212E;

• D32E+V35I+K105D+A111P+S115T;

• D32E+V35I+S69V+K86E+Q102E+K105N+A111P+S115T+K147N+Q150E+K155E+T159Q+G161R+A172D+G181N+V187N+K192A+Q208V+N217A;

• D32E+V35I+K65E+K67A+K105N+A111P+G181N+S182Y;

• S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+V138M+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I;

• D32E+V35I+K67A+S69V+K105T+A111P+Q157E+G181N+A206G+Q208V;

• S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+G161R+G181N+V187N+K192I;

• S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+Q150E+K160T+G161R+G181N+V187N+K192I;

• S69V+D72S+Q102E+K105N+A111P+S115T+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I;

• D32E+V35I+S69V+K86E+Q102E+K105N+A111P+S115T+V127T+G137R+K147N+Q150E+K155E+T159Q+G161R+A172D+G181N+V187N+K192A+Q208V+N217A;

• S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I;

• D32P+S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+S134H+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I;

• D32P+S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+N146H+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I;

• D32P+Q102E+K105N+A111P+S115T+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I;

• D32P+S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+T120H+N146H+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I;

• D32P+S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+Q150E+Q157E+G181N+V187N+K192I;

• D32P+S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+N146H+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I;

• S26H+D32P+S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+N146H+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I;

• K65Q+S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I;

• S69A+Q102E+K105N+A111P+S115T+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I;

• D32P+S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I;

• S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+G137R+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I;

• S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+G137R+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I;

• S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+Q150E+G161R+A172D+G181N+V187N+K192I;

• D32P+S69A+Q102E+K105N+A111P+S115T+N146H+Q150E+G161R+G181N+K192I;

• D32P+S69V+Q102E+K105D+A111P+S115T+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I;以及

• S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+G137R+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I。

8.如权利要求7所述的变体,其中该变体包含具有所述多组取代中的一组的SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3或由其组成。

9.如前述权利要求中任一项所述的变体,其中与SEQ ID NO:1的多肽或具有与无所述取代的变体相同的氨基酸序列的亲本多肽相比,该变体具有改善的稳定性,例如其中该改善的稳定性选自由洗涤剂稳定性和热稳定性组成的组。

10.一种洗涤剂组合物,该洗涤剂组合物包含如权利要求1-9中任一项所述的DNA酶变体和至少一种洗涤剂辅助成分。

11.如权利要求1-9中任一项所述的DNA酶变体或如权利要求10所述的洗涤剂组合物在清洁过程,如洗衣或硬表面清洁如餐具洗涤中的用途。

12.一种清洁物品的方法,该方法包括将该物品暴露于包含如权利要求1-9中任一项所述的DNA酶变体或如权利要求10所述的洗涤剂组合物的洗涤液,例如其中该物品是纺织品或硬表面。

13.一种用于洗涤纺织品的方法,该方法包括:

a)将该纺织品暴露于包含如权利要求1-9中任一项所述的DNA酶变体或如权利要求10所述的洗涤剂组合物的洗涤液;

b)完成至少一个洗涤循环;以及任选地

c)冲洗该物品。

14.一种多核苷酸、一种核酸构建体或表达载体、或一种重组宿主细胞,该多核苷酸编码如权利要求1-9中任一项所述的变体,该核酸构建体或表达载体包含该多核苷酸,该重组宿主细胞用该多核苷酸转化。

15.一种产生DNA酶变体的方法,该方法包括:

a)在适用于表达该变体的条件下培养如权利要求14所述的重组宿主细胞;以及

b)回收该变体。

DNA酶变体和组合物

[0001] 序列表的引用

[0002] 本申请含有计算机可读形式的序列表,将其通过引用并入本文。

发明背景

技术领域

[0004] 本发明涉及相对于亲本DNA酶表现出改变的新颖DNA酶(脱氧核糖核酸酶)变体,已发现这些变体提供改善的稳定性,例如改善的洗涤剂稳定性。本发明还涉及包含这些DNA酶变体的洗涤剂组合物,用于使用和产生这些DNA酶变体的方法,以及编码这些变体的分离的DNA序列,表达载体和宿主细胞。本发明的变体适合用于在清洁过程和洗涤剂组合物(如洗衣组合物和餐具洗涤组合物)中使用。

背景技术

[0005] 在许多自然、工业和医疗环境中,微生物一般附着于表面而生存,由包括生物聚合物和大分子的细胞外物质包裹。所得粘液包囊的微生物层称为生物膜。生物膜是细菌在自然环境中生长的主要模式,并且在生物膜中生长的细菌表现出独特的生理特性。与其浮游生长的对应物相比,生物膜中的细菌对抗生素、UV照射、洗涤剂和宿主免疫应答更具抗性。

[0006] 生物膜可以包括一种或多种微生物,包括革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌、藻类、原生动物、和/或酵母或丝状真菌和病毒和/或噬菌体。有问题的生物膜的实例是牙菌斑、医疗植入物上的感染、以及船体上的初始污垢。生物膜归因于人类许多感染的发病机制,并且就暴露表面的生物污着而言是工业中的一个重大问题,其中生物膜定植可以形成能够破坏和干扰工业方法和组分的局部生态系统的基础组分。

[0007] 当使用衣物(例如T恤和运动衣以及其他衣服)时,物品被暴露于来自使用者的身体和来自物品处于的使用环境中的其余部分的细菌。这些细菌中的一些能够粘附于衣物并且在该物品上形成生物膜。细菌的存在意味着衣物变得粘稠,并且因此污垢粘附于粘稠区域。已经证明这种污垢难以通过可商购的洗涤剂组合物去除,从而导致物品的恶臭以及黄化和灰化等具有挑战性的问题。由细菌产生的恶臭可能难以去除,并且甚至在洗涤后仍可能残留,因为细菌可能粘附于纺织品表面,从而继续成为恶臭的来源。此外,当非常脏的衣物与不太脏的衣物一起洗涤时,洗涤液中存在的污物倾向于粘附至生物膜。因此,衣物在洗涤过程中可能经受污垢的“再沉积”。

[0008] WO 2014/087011披露了细菌DNA酶多肽和用于生物膜破坏和预防的方法。WO 2015/155350披露了包含从真菌来源获得的某些DNA酶多肽的洗涤剂组合物。WO 2017/064269披露了来自米曲霉(Aspergillus oryzae)的真菌DNA酶的变体,这些变体具有改善的稳定性。尽管有这些披露内容,仍然需要进一步改善DNA酶,例如进一步改善酶在洗涤剂组合物中的稳定性。

[0009] 本发明提供了与亲本DNA酶相比具有改善的特性,特别是改善的稳定性的DNA酶变体,这些DNA酶变体通过组合已经由诸位发明人发现是特别有利的某些取代获得。

发明内容

[0010] 本发明涉及SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的分离的DNA酶变体,这些分离的DNA酶变体在位置32、35、69、102、105、111和181中的两个或更多个处具有取代,其中位置编号基于SEQ ID NO:1。

[0011] 本发明还涉及包含本文披露的DNA酶变体的组合物(如洗涤剂组合物)以及编码这些变体的分离的多核苷酸;包含这些多核苷酸的核酸构建体、载体和宿主细胞,以及产生这些变体的方法。本发明进一步涉及使用DNA酶变体和组合物用于清洁(例如用于洗衣)的方法。

附图说明

[0012] 图1是SEQ ID NO:1、2和3的多肽的比对。

[0013] 序列表概述

[0014] SEQ ID NO:1:从米曲霉获得的成熟DNA酶多肽

[0015] SEQ ID NO:2:从米曲霉获得的N-末端截短的成熟DNA酶多肽

[0016] SEQ ID NO:3:从米曲霉获得的N-末端截短的成熟DNA酶多肽定义

[0017] 根据此详细描述,以下定义适用。注意,单数形式“一种/个(a/an)”以及“该/这些(the)”包括复数个指示物,除非上下文中另外明确指明。

[0018] 除非另外定义或由上下文明确指示,否则本文所用的全部技术与科学术语具有如本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。

[0019] DNA酶:术语“DNA酶”意指具有DNA酶(脱氧核糖核酸酶)活性的多肽,该多肽催化DNA中的磷酸二酯键的水解切割,从而降解DNA。DNA酶属于酯酶(EC号3.1),水解酶的亚组。将DNA酶分类为EC 3.1.21。出于本发明的目的,可以根据测定I中描述的程序确定DNA酶活性。术语“DNA酶”和“具有DNA酶活性的多肽”在本申请中可以互换使用。

[0020] DNA酶变体:“DNA酶变体”是SEQ ID NO:1、2或3的DNA酶的变体,该变体具有一个或多个单独的突变,典型地取代或取代的组合。

[0021] 表达:术语“表达”包括涉及变体产生的任何步骤,包括但不限于转录、转录后修饰、翻译、翻译后修饰、以及分泌。

[0022] 表达载体:“表达载体”是指包含编码变体的DNA序列的线性或环状DNA构建体,该编码序列可操作地连接到能够影响DNA在合适宿主中表达的合适控制序列。这样的控制序列可包括影响转录的启动子、控制转录的任选操纵子序列、编码mRNA上合适的核糖体结合位点的序列、增强子以及控制转录和翻译的终止的序列。

[0023] 延伸:术语“延伸”意指在变体的氨基和/或羧基末端添加一个或多个氨基酸,其中该“延伸的”变体具有DNA酶活性。

[0024] 片段:术语“片段”意指在变体的氨基和/或羧基末端缺失一个或多个氨基酸的变体;其中该片段具有DNA酶活性。本发明上下文中的片段包括SEQ ID NO:1在氨基末端缺失一个或多个氨基酸的变体,例如缺失15个N-末端氨基酸的SEQ ID NO:2或缺失17个N-末端氨基酸的SEQ ID NO:3。

[0025] 宿主细胞:“宿主细胞”是指其中已引入表达载体、噬菌体、病毒或其他DNA构建体(包括编码变体的多核苷酸)的生物体。示例性宿主菌株是能够表达目的多肽的微生物细胞

(例如细菌、丝状真菌和酵母)。

[0026] 改善的特性:术语“改善的特性”意指与相对于亲本有所改善的变体相关的特征。这样的改善的特性包括但不限于:催化效率、催化速率、化学稳定性、氧化稳定性、pH活性、pH稳定性、比活性、在储存条件下的稳定性、底物结合、底物切割、底物特异性、底物稳定性、表面特性、热活性、和热稳定性。在本发明的上下文中,改善的特性特别是改善的稳定性,例如改善的储存稳定性(包括洗涤剂组合物中的改善的储存稳定性)、洗涤剂组合物中使用的改善的稳定性和/或改善的热稳定性。另外地,本发明的变体还可以具有其他改善的特性如改善的DNA酶活性,例如改善的比活性和/或改善的洗涤性能。

[0027] 分离的:术语“分离的”意指与至少一种其他材料或组分(包括但不限于其他蛋白质、核酸、细胞等)分离的多肽变体、核酸、细胞或其他指定材料或组分。因此,分离的多肽、核酸、细胞或其他材料呈自然界中不存在的形式。分离的多肽包括但不限于含有在宿主细胞中表达的分泌的变体的培养液。典型地,将使用已知的蛋白质纯化方法将本发明的分离的变体与培养液中的其他组分分离。

[0028] 成熟多肽:术语“成熟多肽”意指在N-末端加工和/或C-末端加工(例如,信号肽的去除)后呈其成熟形式的多肽。

[0029] 在本领域中已知的是,宿主细胞可以产生由相同多核苷酸表达的两种或更多种不同的成熟多肽(即,具有不同的C末端和/或N末端氨基酸)的混合物。还已知的是,不同的宿主细胞以不同的方式对多肽进行加工,并且因此表达多核苷酸的一个宿主细胞与表达相同多核苷酸的另一个宿主细胞相比可以产生不同的成熟多肽(例如,具有不同的C末端和/或N末端氨基酸)。在本发明的上下文中,成熟多肽典型地由宿主细胞进行N-末端加工,使得该成熟多肽可以具有少于SEQ ID NO:1中所示的成熟多肽的221个氨基酸残基,例如如SEQ ID NO:2中所示的206个氨基酸或如SEQ ID NO:3中所示的204个氨基酸。

[0030] 成熟多肽编码序列:术语“成熟多肽编码序列”意指编码具有DNA酶活性的成熟多肽的多核苷酸。

[0031] 突变体:术语“突变体”意指编码变体的多核苷酸。

[0032] 天然:术语“天然”意指天然存在于宿主细胞中的核酸或多肽。

[0033] 核酸:术语“核酸”涵盖DNA、RNA、异源双链体和能够编码变体的合成分子。核酸可以是单链或双链,并且可以是化学修饰。术语“核酸”和“多核苷酸”可互换使用。因为遗传密码是简并的,所以可使用多于一个密码子来编码特定氨基酸,并且本发明组合物和方法涵盖编码特定氨基酸序列的核苷酸序列。除非另有说明,否则核酸序列以5'至3'取向呈现。

[0034] 核酸构建体:术语“核酸构建体”意指分离自天然存在的基因或以原本不存在于自然界中的方式被修饰以含有核酸的区段或是合成的并且包含可操作地连接到核酸序列的一个或多个控制序列的单链或双链核酸分子。

[0035] 可操作地连接:术语“可操作地连接”意指指定组分处于允许它们以预期方式起作用的关系(包括但不限于并置)。例如,调节序列可操作地连接到编码序列,使得编码序列的表达处于调节序列的控制之下。

[0036] 亲本或亲本DNA酶:术语“亲本”或“亲本DNA酶”意指对其进行改变以产生本发明的DNA酶变体的DNA酶多肽。因此,亲本是具有本文披露的变体的相同氨基酸序列但不具有本文披露的指定改变(典型地取代)的DNA酶多肽。

[0037] 在特定实施例中,DNA酶亲本是与具有SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的多肽具有至少60%、至少61%、至少62%、至少63%、至少64%、至少65%、至少66%、至少67%、至少68%、至少69%、至少70%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的DNA酶。

[0038] 亲本DNA酶可以例如从真菌物种,例如曲霉属物种如米曲霉获得。

[0039] 在一个实施例中,亲本DNA酶是具有SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的序列的DNA酶。在优选的实施例中,亲本DNA酶是SEQ ID NO:1的多肽。

[0040] 重组:术语“重组”以其常规含义使用,是指对核酸序列进行操纵(例如,切割和重接)以形成与在自然界中发现的序列群不同的序列群。术语重组是指已从其天然状态修饰的细胞、核酸、变体或载体。因此,例如,重组细胞表达在天然(非重组)形式的细胞内未发现的基因,或与在自然界中发现的相比,以不同水平表达或在不同条件下表达天然基因。术语“重组”与“遗传修饰的”和“转基因的”同义。

[0041] 序列同一性:两个氨基酸序列之间或两个核苷酸序列之间的关联度通过参数“序列同一性”来描述。

[0042] 出于本发明的目的,使用如在EMBOSS软件包(EMBOSS:欧洲分子生物学开放软件套件(The European Molecular Biology Open Software Suite),Rice等人,2000,Trends Genet.[遗传学趋势]16:276-277)(优选6.6.0版本或更新版本)的尼德尔(Needle)程序中所实施的尼德曼-翁施算法(Needleman-Wunsch algorithm)(Needleman和Wunsch,1970,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]48:443-453)来确定两个氨基酸序列之间的序列同一性作为“最长同一性”的输出。使用的参数是空位开放罚分10、空位延伸罚分0.5以及EBLOSUM62(BLOSUM62的EMBOSS版本)取代矩阵。为了使Needle程序报告最长同一性,必须在命令行中指定非简化(-nobrief)选项。Needle标记的“最长同一性”的输出计算如下:

[0043] (相同的残基x 100)/(比对长度-比对中的空位总数)

[0044] 本文可以参考SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3来提及序列同一性百分比。如上所解释,已知宿主细胞可以产生两种或更多种不同的成熟多肽的混合物,并且不同的宿主细胞以不同的方式对多肽进行加工。在SEQ ID NO:1的成熟多肽的情况下,已经发现这可以用不同的N-末端截短表达,例如表达为SEQ ID NO:2(206个氨基酸残基,对应于SEQ ID NO:1的氨基酸16至221)或SEQ ID NO:3(204个氨基酸残基,对应于SEQ ID NO:1的氨基酸18至221)的多肽。由于SEQ ID NO:1、2和3除N-末端处截短外是相同的,因此本文中对与SEQ ID NO:1具有给定百分比序列同一性的多肽的任何提及应理解为也包括与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3具有该百分比序列同一性的多肽。

[0045] 信号肽:“信号肽”是附接到蛋白质的N-末端部分的氨基酸序列,该序列促进蛋白质分泌到细胞外。细胞外蛋白的成熟形式缺乏信号肽,该信号肽在分泌过程中被切割掉。

[0046] 变体:术语“变体”意指具有DNA酶活性的、在一个或多个位置处包含取代、插入(包括延伸)和/或缺失(例如截短)的多肽。取代意指用不同的氨基酸替代占据某一位置的氨基酸;缺失意指去除占据某一位置的氨基酸;并且插入意指与占据某一位置的氨基酸相邻并紧接其后添加1-5个氨基酸(例如,1-3个氨基酸,特别是一个氨基酸)。本发明的变体包括与

本文详细描述的SEQ ID NO:1相比的各种取代。

[0047] 野生型:提及氨基酸序列或核酸序列时,术语“野生型”意指该氨基酸序列或核酸序列是天然或天然存在的序列。如本文所用,术语“天然存在的”是指在自然界中发现的任何物质(例如蛋白质、氨基酸或核酸序列)。相反,术语“非天然存在的”是指在自然界中未发现的任何物质(例如,在实验室中产生的或通过修饰野生型序列产生的重组核酸和蛋白质序列)。

[0048] 生物膜:生物膜是在表面上(如纺织品或餐具或其他硬表面上)细胞彼此粘附在一起的任何群组的微生物。这些粘附细胞通常嵌入细胞外聚合物(EPS)的自生基质中。生物膜EPS是一般由细胞外DNA、蛋白质和多糖组成的聚合物团块。生物膜可以在活的或非活的表面上形成。在生物膜中生长的微生物细胞与同一生物体的浮游细胞(相比之下,浮游细胞是可以在液体介质中漂浮或浮游的单个细胞)在生理上是不同的。生活在生物膜中的细菌通常具有与同一物种的自由漂浮细菌显著不同的特性,因为膜的密集并且受保护的环境允许它们以不同方式协作和相互作用。这种环境的一个益处是增加对洗涤剂和抗生素的抗性,因为密集的细胞外基质和细胞的外层保护群落的内部。关于产生洗衣生物膜的细菌可以在以下物种中找到:不动杆菌属物种(Acinetobacter sp.)、气微菌属物种(Aeromicrobium sp.)、短波单胞菌属物种(Brevundimonas sp.)、微杆菌属物种(Microbacterium sp.)、滕黄微球菌(Micrococcus luteus)、假单胞菌属物种(Pseudomonas sp.)、表皮葡萄球菌(Staphylococcus epidermidis)和寡养单胞菌属物种(Stenotrophomonassp.)。

[0049] 改善的DNA酶活性:术语“改善的DNA酶活性”在本文中被定义为改变的DNA酶活性,例如通过增加地催化DNA中磷酸二酯键的水解切割,DNA酶变体相对于亲本DNA酶活性(如与具有SEQ ID NO:1的DNA酶相比)显示活性改变。改善的活性可以例如是改善的比活性。

[0050] 稳定性:术语“稳定性”包括储存稳定性和使用期间(例如在洗涤过程期间)的稳定性,并且反应了作为时间函数的根据本发明的DNA酶变体的稳定性,例如当DNA酶变体置于特别是洗涤剂溶液中的溶液中时,保留多少活性。稳定性受到许多因素的影响,如pH、温度和洗涤剂组合物,例如助洗剂、表面活性剂等的量。DNA酶稳定性可以如实例中所述进行测量,并且表示为例如与亲本DNA酶或参考序列(如SEQ ID NO:1)相比的解链温度(Tm)或半衰期改善因子(HIF)。术语“改善的稳定性”或“增加的稳定性”在本文中被定义为变体DNA酶显示相对于没有变体中的取代的亲本DNA酶和/或相对于SEQ ID NO:1的稳定性的在溶液中增加的稳定性。术语“改善的稳定性”和“增加的稳定性”包括洗涤剂稳定性。

[0051] 改善的洗涤性能:术语“改善的洗涤性能”可以定义为根据本发明的DNA酶变体与DNA酶亲本或具有SEQ ID NO:1的DNA酶相比的改善的深度清洁效果(其中“深度清洁”是指破坏或去除生物膜或其组分)。DNA酶变体还可以具有改善的恶臭去除。术语“恶臭”意指在清洁物品上不希望的气味。清洁的物品应气味清新并且干净,而没有粘附在该物品上的恶臭。恶臭的一个实例是具有令人不愉快的气味的化合物,这些化合物可以是微生物生产的。另一个实例是由粘附于已经与人类或动物接触的物品的汗味或体味引起的令人不愉快的气味。恶臭的另一个实例可以是来自粘附于物品的香味料的气味,例如气味强烈的咖喱或其他香味料。测量物品粘附恶臭的能力的一种方式是通过使用本文披露的测定II。

[0052] 洗涤性能可以被表示为染污的小块布样的反射值。在洗涤并冲洗之后,将小块布样摊开铺平并且允许在室温下风干过夜。在洗涤的次日评估所有洗涤的小块布样。使用具

有非常小孔径的Macbeth Color Eye 7000反射分光光度计进行小块布样的光反射评估。在入射光中没有UV的条件下进行测量,并提取460nm下的反射值。

[0053] 衣物洗涤:术语“衣物洗涤”涉及家庭衣物洗涤和工业衣物洗涤两者并且意指用例如含有本发明的清洁或洗涤剂组合物的溶液处理纺织品的过程。衣物洗涤过程可以例如使用家庭或工业洗衣机进行,或可以手动进行。

[0054] 洗涤剂组合物:除非另有说明,否则术语“洗涤剂组合物”(或“清洁组合物”)包括任何形式的洗涤剂或清洁组合物。这些包括颗粒或粉末形式的通用或重垢洗涤剂,尤其是清洁洗涤剂;液体、凝胶或糊状形式的通用洗涤剂,尤其是所谓的重垢液体(HDL)类型;具有一个或多个腔室的单个单位剂量(SUD)组合物,如荚状物(pod)、胶囊、片剂等;液体精细织物洗涤剂;手洗餐具洗涤剂或轻垢餐具洗涤剂,尤其是高起泡类型的那些;机洗餐具洗涤剂,包括用于供家庭和公共机构使用的不同的片剂、颗粒、液体和冲洗助剂类型;液体清洁剂和消毒剂,包括抗菌手洗类型、清洁条、皂条、漱口水、义齿清洁剂、汽车或地毯香波、浴室清洁剂;洗发香波和头发冲洗剂;沐浴凝胶、泡沫浴液;金属清洁剂;以及清洁辅剂(如漂白添加剂)和“去污棒(stain-stick)”或预处理型。就旨在用于污物清洁的洗涤介质中的混合物而言,使用术语“洗涤剂组合物”和“洗涤剂配制品”。在一些实施例中,就洗涤织物和/或衣服而言,使用该术语(例如,“衣物洗涤剂”)。在替代性实施例中,该术语是指如用于清洁餐具、刀具等的那些的其他洗涤剂(例如“餐具洗涤洗涤剂”)。并不旨在使本发明限于任何特定的洗涤剂配制品或组合物。术语“洗涤剂组合物”不旨在限于含有表面活性剂的组合物。旨在除根据本发明的变体之外,该术语涵盖了可能含有以下的洗涤剂:例如表面活性剂、助洗剂、螯合剂(chelator)或螯合试剂(chelating agent)、漂白系统或漂白组分、聚合物、织物调理剂、增泡剂、抑泡剂、染料、香料、晦暗抑制剂、光学增亮剂、杀细菌剂、杀真菌剂、污垢悬浮剂、防腐蚀剂、酶抑制剂或稳定剂、酶活化剂、转移酶、水解酶、氧化还原酶、上蓝剂和荧光染料、抗氧化剂、以及增溶剂。

[0055] 织物:术语“织物”涵盖任何纺织材料。因此,其意图是,该术语涵盖衣服,以及织物、纱线、纤维、非编织材料、天然材料、合成材料、以及任何其他纺织材料。

[0056] 纺织品:术语“纺织品”是指编织织物,以及适用于转化为或用作纱线、编织、针织、以及非编织织物的短纤维和长丝。该术语涵盖从天然、以及合成(例如制造的)纤维制成的纱线。术语“纺织材料”是纤维、纱线中间体、纱线、织物、以及从织物制成的产品(例如,衣服以及其他物品)的通用术语。

[0057] 非织物洗涤剂组合物:术语“非织物洗涤剂组合物”包括非纺织品表面洗涤剂组合物,包括但不限于用于硬表面清洁的组合物,如餐具洗涤洗涤剂组合物(包括手动餐具洗涤组合物)、口腔洗涤剂组合物、义齿洗涤剂组合物以及个人清洁组合物。

[0058] 酶的有效量:术语“酶的有效量”是指在特定应用中,例如在定义的洗涤剂组合物中实现所需的酶活性所必需的酶的量。这样的有效量由本领域的普通技术人员容易地确定并且基于许多因素,如使用的特定酶、清洁应用、洗涤剂组合物的特定组成、以及是否需要液体或干燥(例如,颗粒、条)组合物等。术语DNA酶变体的“有效量”是指实现所希望水平的酶活性(例如在定义的洗涤剂组合物中)的前述DNA酶变体的量。

[0059] 相关洗涤条件:本文使用的术语“相关洗涤条件”指示在洗涤剂细分市场中实际用于家庭的条件,特别地洗涤温度、时间、洗涤力学、洗涤剂浓度、洗涤剂类型以及水硬度。

[0060] 洗涤液:术语“洗涤液”(或“洗涤水”)是指包含本发明的DNA酶变体的水溶液。洗涤液是含有水和包含DNA酶变体的洗涤剂组合物的例如洗衣机或洗碗机中的溶液。在洗涤剂组合物与水混合以形成洗涤液之前,洗涤剂组合物可以呈如本文其他地方所述的任何合适的形式,例如液体或粉末。

[0061] 水硬度:如本文所用,术语“水硬度”或“硬度”(degree of hardness)或“dH”或“°dH”是指德国硬度(German degrees of hardness)。一度被定义为10毫克氧化钙/升水。

[0062] 辅助材料:术语“辅助材料”或“辅助成分”意指针对所希望的特定类型的洗涤剂组合物和产品形式(例如,液体、颗粒、粉末、棒、糊、喷雾、片剂、凝胶、或泡沫组合物)选择的任何液体、固体或气体材料,这些材料还优选地与用于该组合物中的DNA酶变体酶相容。下文进一步提供了关于辅助材料的更详细信息。

[0063] 低洗涤剂浓度:术语“低洗涤剂浓度”系统包括其中小于约800ppm的洗涤剂组分存在于洗涤水中的洗涤剂。亚洲(例如,日本)洗涤剂典型地被认为是低洗涤剂浓度系统。

[0064] 中洗涤剂浓度:术语“中洗涤剂浓度”系统包括其中约800ppm与约2000ppm之间的洗涤剂组分存在于洗涤水中的洗涤剂。北美洲洗涤剂一般被认为是中洗涤剂浓度系统。

[0065] 高洗涤剂浓度:术语“高洗涤剂浓度”系统包括其中大于约2000ppm的洗涤剂组分存在于洗涤水中的洗涤剂。欧洲洗涤剂一般被认为是高洗涤剂浓度系统。

[0066] 变体命名惯例

[0067] 出于本发明的目的,使用SEQ ID NO:1中披露的多肽来确定另一种DNA酶中的对应氨基酸位置。将另一种DNA酶的氨基酸序列与SEQ ID NO:1中披露的多肽进行比对,并且基于该比对,使用如在EMBOSS软件包(EMBOSS:欧洲分子生物学开放软件套件(The European Molecular Biology Open Software Suite),Rice等人,2000,Trends Genet.[遗传学趋势]16:276-277)(优选5.0.0版或更新版本)的尼德尔程序中所实施的尼德曼-翁施算法(Needleman和Wunsch,1970,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]48:443-453)来确定与SEQ ID NO:1中披露的多肽中的任何氨基酸残基相对应的氨基酸位置编号。使用的参数是空位开放罚分10、空位延伸罚分0.5以及EBLOSUM62(BLOSUM62的EMBOSS版本)取代矩阵。

[0068] 在描述本发明的变体时,为了便于参考,以下描述的命名法经过了调整。采用了已接受的IUPAC单字母或三字母的氨基酸缩写。

[0069] 取代.对于氨基酸取代,使用以下命名法:原始氨基酸、位置、取代的氨基酸。相应地,将在位置226处的苏氨酸被丙氨酸取代表示为“T226A”(或使用三字母代码的“Thr226Ala”)。多个突变还可以通过加号(“+”)分开,例如“G205R+S411F”,代表在位置205和位置411处甘氨酸(G)和丝氨酸(S)分别被精氨酸(R)和苯丙氨酸(F)取代。可替代地,多个突变可以由空格、逗号或正号(plus sign)指示,例如“G205R S411F”、“G205R,S411F”或“G205R+S411F”。

[0070] 缺失.对于氨基酸缺失,使用以下命名法:原始氨基酸、位置、*。相应地,将在位置195处的甘氨酸的缺失表示为“G195*”。多个缺失通过加号(“+”)分开,例如“G195*+S411*”。

[0071] 插入.对于氨基酸插入,使用以下命名法:原始氨基酸、位置、原始氨基酸、插入的氨基酸。相应地,将在位置195处的甘氨酸之后插入赖氨酸表示为“G195GK”。多个氨基酸的插入被表示为[原始氨基酸、位置、原始氨基酸、插入的氨基酸#1、插入的氨基酸#2;等]。例如,将在位置195处的甘氨酸之后插入赖氨酸和丙氨酸表示为“G195GKA”。

[0072] 在这样的情况下,通过将小写字母添加至在所插入的一个或多个氨基酸残基之前的氨基酸残基的位置编号而对所插入的一个或多个氨基酸残基进行编号。在以上实例中,该序列因此会是:

[0073]

亲本:	变体:
195	195 195a 195b
G	G-K-A

[0074] 多个改变.如上所解释,包含多个改变的变体通过加号("+")分开,例如"R170Y+G195E",代表分别用酪氨酸和谷氨酸取代位置170和195处的精氨酸和甘氨酸。可替代地,如上所述,多个改变可以通过空格或逗号分开。

[0075] 不同改变.在可于一个位置处引入不同改变的情况下,这些不同改变通过逗号分开,例如,"R170Y,E"代表位置170处的精氨酸被酪氨酸或谷氨酸取代。因此,"Y167G,A+R170G,A"代表以下变体:"Y167G+R170G"、"Y167G+R170A"、"Y167A+R170G"和"Y167A+R170A"。

具体实施方式

[0076] 本发明提供了新颖DNA酶变体,特别地从曲霉属(Aspergillus)(包括米曲霉)获得的DNA酶的变体。本发明的DNA酶与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的多肽具有至少60%序列同一性,并且在选自由以下组成的组的位置处包含至少两个取代,如至少三个取代:如本文所述的SEQ ID NO:1中的111、32、35、69、102、105和181。

[0077] 在一个实施例中,本发明提供了在选自由以下组成的组的位置处包含三个或更多个取代的DNA酶变体:26、32、35、65、67、69、98、102、105、111、115、150、157、159、161、172、181、182、185、187、192、206、208和212,其中位置编号基于SEQ ID NO:1的编号,其中该变体与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的多肽具有至少60%但小于100%的序列同一性,并且其中该变体具有DNA酶活性。

[0078] 更特别地,变体可以包含选自由以下组成的组的三个或更多个取代:S26H、D32E、V35I、K65E、K67A、S69E、S69V、S98R、Q102E、K105N、A111P、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、G181N、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V和K212E,其中位置编号基于SEQ ID NO:1的编号,其中该变体与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的多肽具有至少60%但小于100%的序列同一性,并且其中该变体具有DNA酶活性。在一个方面,变体包含选自由以下组成的组的两个或更多个取代,如三个或更多个取代:A111P、D32E、V35I、S69V、Q102E、K105N和G181N,以及任选地以上列出的其他取代中的一个或多个。

[0079] 本发明还提供了包含DNA酶变体的组合物,特别地洗涤剂组合物(如洗衣组合物),以及用于使用这些DNA酶变体的方法。进一步提供了编码变体的分离的DNA序列,表达载体和宿主细胞,以及用于产生这些DNA酶变体的方法。

[0080] 变体

[0081] 如上所述,在一个实施例中,本发明的DNA酶变体在选自由以下组成的组的位置处包含三个或更多个取代:26、32、35、65、67、69、98、102、105、111、115、150、157、159、161、172、181、182、185、187、192、206、208和212,特别地包含选自由以下组成的组的三个或更多个取代:S26H、D32E、V35I、K65E、K67A、S69E、S69V、S98R、Q102E、K105N、A111P、S115T、Q150E、

Q157E、T159Q、G161R、A172E、G181N、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V和K212E,其中编号基于SEQ ID NO:1。在一些实施例中,变体可以包含所述取代中的四个、五个或更多个。

[0082] 更特别地,在一个方面,本发明涉及DNA酶变体,该DNA酶变体在选自由以下组成的组的位置处包含至少两个取代,如至少三个取代:111、32、35、102、105和181,特别地包含选自由以下组成的组的至少两个取代:A111P、D32E、V35I、S69V、Q102E、K105N和G181N,例如所述取代中的至少三个,其中位置编号基于SEQ ID NO:1的编号,其中该变体与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的多肽具有至少60%但小于100%的序列同一性,并且其中该变体具有DNA酶活性。

[0083] 在某些优选的实施例中,变体包含取代A111P。优选地,该实施例的变体包含取代A111P和选自由以下组成的组的两个或更多个取代:S26H、D32E、V35I、K65E、K67A、S69E、S69V、S98R、Q102E、K105N、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、G181N、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V和K212E。

[0084] 在具有取代A111P的这些DNA酶变体中,优选的变体包括还包含取代D32E+V35I和/或取代G181N的那些。具有取代A111P的变体的其他优选实施例包括包含取代S69V和/或Q102E的那些,以及包含取代K105N的那些。

[0085] 在其他实施例中,变体包含取代K105N,优选地与取代A111P组合。该实施例的变体可以进一步包含以上列出的那些中的至少一个另外的取代,即S26H、D32E、V35I、K65E、K67A、S69E、S69V、S98R、Q102E、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、G181N、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V和K212E中的一个或多个,例如所述另外的取代中的两个或更多个。

[0086] 在仍其他实施例中,变体包含取代S69V和/或Q102E,优选地S69V+Q102E。该实施例的变体可以进一步包含以上列出的那些中的至少一个另外的取代,即S26H、D32E、V35I、K65E、K67A、S98R、K105N、A111P、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、G181N、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V和K212E中的一个或多个,例如所述另外的取代中的两个或更多个。

[0087] 在一个优选的实施例中,变体包括取代D32E+V35I+A111P。该实施例的变体可以进一步包含以上列出的那些中的至少一个另外的取代,即S26H、K65E、K67A、S69E、S69V、S98R、Q102E、K105N、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、G181N、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V和K212E中的一个或多个,例如所述另外的取代中的两个或更多个。

[0088] 在另一个优选的实施例中,变体包含取代A111P+G181N。该实施例的变体可以进一步包含以上列出的那些中的至少一个另外的取代,即S26H、D32E、V35I、K65E、K67A、S69E、S69V、S98R、Q102E、K105N、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V和K212E中的一个或多个,例如所述另外的取代中的两个或更多个。

[0089] 在另外的优选的实施例中,变体包含取代D32E+V35I+A111P+G181N。该实施例的变体可以进一步包含以上列出的那些中的至少一个另外的取代,即S26H、K65E、K67A、S69E、S69V、S98R、Q102E、K105N、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、S182Y、S182V、K185E、

V187N、K192I、A206G、Q208V和K212E中的一个或多个。

[0090] 在另一个实施例中,变体包含取代D32E+V35I+Q102E+A111P+G181N,以及任选地选自由以下组成的组的一个或多个另外的取代:S26H、K65E、K67A、S69E、S69V、S98R、K105N、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V和K212E。

[0091] 在另一个实施例中,变体包含取代D32E+V35I+K105N+A111P+G181N,以及任选地选自由以下组成的组的一个或多个另外的取代:S26H、K65E、K67A、S69E、S69V、S98R、Q102E、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V和K212E。

[0092] 在另一个实施例中,变体包含取代D32E+V35I+S69V+Q102E+A111P,以及任选地选自由以下组成的组的一个或多个另外的取代:S26H、K65E、K67A、S98R、K105N、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、G181N、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V和K212E。

[0093] 在另一个实施例中,变体包含取代D32E+V35I+S69V+Q102E+A111P+G181N,以及任选地选自由以下组成的组的一个或多个另外的取代:S26H、K65E、K67A、S98R、K105N、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V和K212E。

[0094] 在另一个实施例中,变体包含取代S69V+Q102E+A111P,以及任选地选自由以下组成的组的一个或多个另外的取代:S26H、D32E、V35I、K65E、K67A、S98R、K105N、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、G181N、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V和K212E。

[0095] 在另一个实施例中,变体包含取代S69V+Q102E+G181N,以及任选地选自由以下组成的组的一个或多个另外的取代:S26H、D32E、V35I、K65E、K67A、S98R、K105N、A111P、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V和K212E。

[0096] 在另一个实施例中,变体包含取代S69V+Q102E+A111P+G181N,以及任选地选自由以下组成的组的一个或多个另外的取代:S26H、D32E、V35I、K65E、K67A、S98R、K105N、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V和K212E。

[0097] 在另一个实施例中,变体包含取代Q102E+K105N+A111P+G181N,以及任选地选自由以下组成的组的一个或多个另外的取代:S26H、D32E、V35I、K65E、K67A、S69E、S69V、S98R、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V和K212E。

[0098] 在另一个实施例中,变体包含取代S69V+Q102E+K105N+A111P+G181N,以及任选地选自由以下组成的组的一个或多个另外的取代:S26H、D32E、V35I、K65E、K67A、S98R、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V和K212E。

[0099] 在另一个实施例中,变体包含取代D32E+V35I+K105N+A111P,以及任选地选自由以下组成的组的一个或多个另外的取代:S26H、K65E、K67A、S69E、S69V、S98R、Q102E、S115T、

Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、G181N、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V和K212E。

[0100] 本发明的优选DNA酶变体的实例包括包含以下多组取代中的一组和任选地本文披露的一个或多个另外的取代的那些：

[0101] • D32E+V35I+A111P

[0102] • D32E+V35I+A111P+G181N

[0103] • D32E+V35I+Q102E+A111P+G181N

[0104] • D32E+V35I+K105N+A111P+G181N

[0105] • D32E+V35I+S69V+Q102E+A111P

[0106] • D32E+V35I+S69V+Q102E+A111P+G181N

[0107] • S69V+Q102E+A111P

[0108] • S69V+Q102E+G181N

[0109] • S69V+Q102E+A111P+G181N

[0110] • Q102E+K105N+A111P+G181N

[0111] • S69V+Q102E+K105N+A111P+G181N

[0112] • D32E+V35I+K105N+A111P

[0113] 变体可以例如包含具有这些多组取代中的一组的SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3或由其组成。

[0114] 在上文或本文其他地方披露的任何实施例中,DNA酶变体可以进一步包含一个或多个另外的改变,例如除上文披露的那些之外的一个或多个另外的取代。这样的另外的取代的非限制性实例包括K18S、T19P、D32P、K86E、A101E、A101T、K105D、K105E、K105T、G137R、N146H、K147N、K155E、A172D、K178S、K192A、N214D和N217A中的任一个或多个。

[0115] 本发明的特定DNA酶变体的实例包括包含选自由以下组成的组的一组取代的变体：

[0116] • S69V+K86E+Q102E+K147N+K155E+A172D+K192A+Q208V；

[0117] • G20C+K30C+D32E+V35I+A111P；

[0118] • S69V+K86E+Q102E+K147N+K155E+A172D+G181N+K192A+Q208V；

[0119] • D32E+V35I+N77E+A111P+G181N+S182V；

[0120] • D32E+E34N+V35I+K86E+A111P+G181N；

[0121] • S69V+K86E+Q102E+K105T+K147N+K155E+A172D+K192A+Q208V；

[0122] • S69V+Q102E+Q157E+T159Q+N214D+N217A；

[0123] • S26H+D32E+V35I+A111P+K155L；

[0124] • K18S+D32E+V35I+A111P+K185I+K215T；

[0125] • D32E+V35I+A111P+K185I+K215T；

[0126] • D32E+V35I+K82G+A111P+G181N+S182V；

[0127] • D32E+V35I+A111P+K178M+K212T；

[0128] • K18S+D32E+V35I+A111P+K178S+K212L；

[0129] • S69V+Q102E+V138A+S144R+Q157E+T159Q+A172E+G181N；

[0130] • D32E+V35I+A111P+K204L+K215I；

[0131] • K18F+D32E+V35I+A111P+K185Q;

[0132] • D32E+V35I+A111P+K147N+K204L;

[0133] • S69V+K86E+Q102E+K105D+K147N+K155E+A172D+K192A+Q208V;

[0134] • D32E+V35I+S69V+K86E+Q102E+A111P+K155E+T159Q+A172D+G181N+K192A+Q208V+N217A;

[0135] • D32E+V35I+A111P+K147N;

[0136] • S69V+K86E+Q102E+S115T+K147N+K155E+A172D+K192A+Q208V;

[0137] • D32E+V35I+S69V+K86E+Q102E+A111P+K147N+K155E+T159Q+A172D+G181N+K192A+Q208V+N217A;

[0138] • D32E+V35I+A111P+N140H;

[0139] • D32E+V35I+K65Q+S69V+K86E+Q102E+A111P+K147N+K155E+T159Q+A172D+G181N+K192A+Q208V+N217A;

[0140] • D32E+V35I+S69V+K86E+Q102E+A111P+K147N+K155E+T159Q+A172D+K178S+G181N+K192A+Q208V+N217A;

[0141] • D32E+V35I+A111P;

[0142] • E6D+A101E+Q150E+G181N+Q208V;

[0143] • S26H+D32E+V35I+A111P;

[0144] • K18Q+D32E+V35I+K105E+A111P+K155F;

[0145] • D32E+V35I+A111P+G199E;

[0146] • S69V+Q102E+Q157E+T159Q+G181N;

[0147] • D32E+V35I+K67A+A111P+P175N+S182V;

[0148] • D32E+V35I+A111P+N214D;

[0149] • S69V+Q102E+Q157E+T159Q+A172E;

[0150] • E6D+A101E+Q150E+G181N+Q208V;

[0151] • D32E+V35I+S69E+A111P;

[0152] • D32E+V35I+Q85E+A111P;

[0153] • K18Q+D32E+V35I+A111P;

[0154] • D32E+V35I+A101E+K105T+A111P+G181N+K212E+Y218E;

[0155] • D32E+V35I+A111P+G181N+S182V+K185E;

[0156] • D32E+V35I+S98R+A111P+G181N+S182Y;

[0157] • D32E+V35I+A101E+Q102E+A111P+G181N;

[0158] • T19P+D32E+V35I+Q102E+K105E+A111P;

[0159] • D32E+V35I+D72V+A111P;

[0160] • S69V+K86E+Q102E+F112W+K147N+K155E+A172D+K192A+Q208 • S69V+Q102E+A111P+Q157E+T159Q+A172E;

[0161] • K67A+S69V+Q102E+K147N+Q157E+T159Q+A172E+D197S;

[0162] • S69V+Q102E+S115T+Q157E+T159Q+A172E;

[0163] • S69V+K86E+Q102E+G136E+K147N+K155E+A172D+K192A+Q208 • D32E+V35I+K67A+A111P+K204G;

[0164] • A101E+A111P+Q150E+Q208V;

[0165] • D32E+V35I+A101E+K105E+A111P+S182V;

[0166] • D32E+V35I+A101E+K105E+A111P+S182V;

[0167] • D32E+V35I+A101T+K105N+A111P+K147E+G181N+S182Y;

[0168] • D32E+V35I+S69V+Q102E+A111P+Q157E+T159Q+A172E;

[0169] • D32E+V35I+Q102E+A111P;

[0170] • S26H+S69V+Q102E+A111P+Q157E+T159Q+A172E;

[0171] • D32E+V35I+S69V+Q102E+A111P+Q157E+T159Q+A172E;

[0172] • D32E+V35I+K67A+K105T+A111P+K178L+K185T;

[0173] • K67A+K105T+G181N;

[0174] • T19P+D32E+V35I+A101E+K105T+A111P+K160A+G181N;

[0175] • D32E+V35I+S69V+Q102E+A111P+Q157E+T159Q+A172E;

[0176] • D32E+V35I+Q102E+A111P;

[0177] • K18S+D32E+V35I+Q102E+K105E+A111P;

[0178] • D32E+V35I+K65E+A101E+K105T+A111P+N217A;

[0179] • D32E+V35I+K105T+A111P+G181N+K204W+K215L;

[0180] • D32E+V35I+K105T+A111P+K178L+G181N+K212T;

[0181] • S26H+S69V+Q102E+A111P+N146H+Q150E+Q157E+T159Q+A172E;• K18Q+D32E+V35I+K67A+K105T+A111P+K215V;

[0182] • D32E+V35I+Q85E+A111P;

[0183] • K18S+T19P+D32E+V35I+A101E+K105T+A111P+G181N;

[0184] • D32E+V35I+A101E+K105N+A111P;

[0185] • K18M+D32E+V35I+K67A+K105T+A111P+K178S;

[0186] • D32E+V35I+K105T+A111P+G181N;

[0187] • D32E+V35I+K67A+K105T+A111P+K185G+K212M;

[0188] • D32E+V35I+A101T+K105N+A111P+G181N+S182Y+N214D;

[0189] • T19P+D32E+V35I+A101E+K105T+A111P+K178S+G181N;

[0190] • D32E+V35I+K105T+A111P+G181N+K185L+K192V+K204W;

[0191] • D32E+V35I+S98R+K105N+A111P+K147N+G181N+S182Y;

[0192] • D32E+V35I+K105N+A111P+G181N+S182Y;

[0193] • D32E+V35I+K67A+K105T+A111P;

[0194] • D32E+V35I+K53F+K105N+A111P+G181N+S182Y+K212E;

[0195] • K18S+D32E+V35I+S98R+K105N+A111P+G181N+S182Y;

[0196] • D32E+V35I+S98R+K105N+A111P+Q158D+G181N+S182Y;

[0197] • D32E+V35I+K67A+K105T+A111P+K190V+K204G;

[0198] • N4K+D32E+V35I+S98R+K105N+A111P+G181N+S182Y+K212E;

[0199] • D32E+V35I+K67A+K105T+A111P+K147N+K190N;

[0200] • D32E+V35I+S98R+K105N+A111P+G181N+S182Y+Q208V;

[0201] • D32E+V35I+A101E+K105T+A111P+G181N+K212E+N214D;

[0202] • D32E+V35I+K82T+A101E+K105T+A111P+G181N+K212E;

[0203] • D32E+V35I+A111P+S115T;

[0204] • S26H+S69V+Q102E+A111P+K147N+A149S+Q150E+Q157E+T159Q+A172E;

[0205] • K18S+D32E+V35I+K67A+K105T+A111P+K185L+K192F;

[0206] • V12L+D32E+V35I+S98R+K105N+A111P+G181N+S182Y;

[0207] • D32E+V35I+S69E+K105N+A111P+K147E+G181N+S182Y;

[0208] • K18S+D32E+V35I+A101E+K105T+A111P+G181N+K212E;

[0209] • D32E+V35I+K65E+K105N+A111P+G181N+S182Y+K212E;

[0210] • D32E+V35I+S98R+K105N+A111P+G181N+S182Y+D189N+N214D;

[0211] • D32E+V35I+S98R+A101T+K105N+A111P+G181N+S182Y;

[0212] • D32E+V35I+K67A+A111P+Q157E+T159Q+G181N+A206G+Q208V;

[0213] • D32E+V35I+K67A+S69R+A111P+G181N+K212E;

[0214] • D32E+V35I+K67A+A111P+G181N+A206G+Q208V;

[0215] • D32E+V35I+A101E+K105T+A111P+G181N;

[0216] • D32E+V35I+K67A+A101E+K105D+A111P+N217A;

[0217] • D32E+V35I+K67A+A111P+Q157E+G181N+Q208V;

[0218] • D32E+V35I+K67A+A111P+Q157E+A172E+G181N+A206G+Q208V;

[0219] • S26H+D32E+V35I+K67A+S69R+A111P+G181N+K212E;

[0220] • D32E+V35I+S69E+S98R+K105N+A111P+G181N+S182Y;

[0221] • D32E+V35I+K67A+K105N+A111P+G181N+S182Y+K212E;

[0222] • D32E+V35I+K105D+A111P+S115T;

[0223] • D32E+V35I+S69V+K86E+Q102E+K105N+A111P+S115T+K147N+Q150E+K155E+T159Q+G161R+A172D+G181N+V187N+K192A+Q208V+N217A;

[0224] • D32E+V35I+K65E+K67A+K105N+A111P+G181N+S182Y;

[0225] • S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+V138M+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I;

[0226] • D32E+V35I+K67A+S69V+K105T+A111P+Q157E+G181N+A206G+Q208V;

[0227] • S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+G161R+G181N+V187N+K192I;

[0228] • S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+Q150E+K160T+G161R+G181N+V187N+K192I;

[0229] • S69V+D72S+Q102E+K105N+A111P+S115T+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I;

[0230] • D32E+V35I+S69V+K86E+Q102E+K105N+A111P+S115T+V127T+G137R+K147N+Q150E+K155E+T159Q+G161R+A172D+G181N+V187N+K192A+Q208V+N217A;

[0231] • S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I;

[0232] • D32P+S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+S134H+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I;

[0233] • D32P+S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+N146H+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I;

[0234] • D32P+Q102E+K105N+A111P+S115T+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I;

[0235] • D32P+S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+T120H+N146H+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I;

[0236] • D32P+S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+Q150E+Q157E+G181N+V187N+K192I;

[0237] • D32P+S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+N146H+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I;

[0238] • S26H+D32P+S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+N146H+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I;

[0239] • K65Q+S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I;

[0240] • S69A+Q102E+K105N+A111P+S115T+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I;

[0241] • D32P+S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I;

[0242] • S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+G137R+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I;

[0243] • S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+G137R+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I;

[0244] • S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+Q150E+G161R+A172D+G181N+V187N+K192I;

[0245] • D32P+S69A+Q102E+K105N+A111P+S115T+N146H+Q150E+G161R+G181N+K192I;

[0246] • D32P+S69V+Q102E+K105D+A111P+S115T+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I;以及

[0247] • S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+G137R+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I。

[0248] 变体可以例如包含具有这些多组取代中的一组的SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3或由其组成。

[0249] 在优选的实施例中,本发明的DNA酶变体包含具有取代D32E+V35I+A111P的SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3或由其组成。

[0250] 在另一个优选的实施例中,本发明的DNA酶变体包含具有取代D32E+V35I+K105N+A111P+G181N+S182Y的SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3或由其组成。

[0251] 在另一个优选的实施例中,本发明的DNA酶变体包含具有取代S26H+S69V+Q102E+A111P+Q157E+T159Q+A172E的SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3或由其组成。

[0252] 在另一个优选的实施例中,本发明的DNA酶变体包含具有取代S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I的SE Q ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3或由其组成。

[0253] 在另一个优选的实施例中,本发明的DNA酶变体包含具有取代D32E+V35I+K67A+A111P+G181N+A206G+Q208V的SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3或由其组成。

[0254] 在另一个优选的实施例中,本发明的DNA酶变体包含具有取代D32E+V35I+A111P+G181N+S182V+K185E的SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3或由其组成。

[0255] 在另一个优选的实施例中,本发明的DNA酶变体包含具有取代S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+G161R+G181N+V187N+K192I的SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3或由其组成。

[0256] 在另一个优选的实施例中,本发明的DNA酶变体包含具有取代D32E+V35I+S69E+S98R+K105N+A111P+G181N+S182Y的SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3或由其组成。

[0257] 在另一个优选的实施例中,本发明的DNA酶变体包含具有取代D32E+V35I+K65E+K105N+A111P+G181N+S182Y+K212E的SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3或由其组成。

[0258] 在另一个优选的实施例中,本发明的DNA酶变体包含具有取代D32E+V35I+K65E+

K67A+K105N+A111P+G181N+S182Y的SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3或由其组成。

[0259] 本文披露的DNA酶变体与没有变体中的取代的亲本DNA酶具有至少60％的序列同一性。DNA酶变体可以例如与亲本DNA酶具有至少65％、至少70％、至少75％或至少80％的序列同一性。DNA酶变体可以例如与亲本DNA酶具有至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％或至少95％,例如至少96％、至少97％或至少98％,但小于100％的序列同一性。

[0260] 特别地,本文披露的DNA酶变体中的任一种与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3具有至少60％的序列同一性。DNA酶变体可以例如与SEQ ID NO:1、2或3中的任一个具有至少65％、至少70％、至少75％或至少80％的序列同一性。DNA酶变体可以例如与SEQ ID NO:1、2或3中的任一个具有至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％或至少95％,例如至少96％、至少97％或至少98％,但小于100％的序列同一性。

[0261] 在一个方面,与SEQ ID NO:1、2或3相比,本发明的变体中改变的数目是1-20个,例如1-10个,如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个改变。

[0262] 本发明的变体可以任选地包含其他氨基酸改变,这些改变可以具有微小性质,如不会显著地影响蛋白质的折叠和/或活性的保守氨基酸取代或插入;典型地为1-30个氨基酸的小缺失;小的氨基末端或羧基末端延伸,如氨基末端的甲硫氨酸残基;多达20-25个残基的小接头肽;或小的延伸,其通过改变净电荷或另一官能(如聚组氨酸尾、抗原表位或结合结构域)来促进纯化。

[0263] 保守取代的实例在下组之内:碱性氨基酸(精氨酸、赖氨酸和组氨酸)、酸性氨基酸(谷氨酸和天冬氨酸)、极性氨基酸(谷氨酰胺和天冬酰胺)、疏水氨基酸(亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸)、芳族氨基酸(苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸)、以及小氨基酸(甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸和甲硫氨酸)。一般不会改变比活性的氨基酸取代是本领域已知的并且例如由H.Neurath和R.L.Hill,1979,于The Proteins[蛋白质],Academic Press[学术出版社],纽约中描述。常见取代为Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Tyr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu、和Asp/Gly。

[0264] 可替代地,这些氨基酸改变具有使多肽的物理化学特性改变的这样一种性质。例如,氨基酸改变可以改善多肽的热稳定性、改变底物特异性、改变最适pH等。

[0265] 可以根据本领域中已知的程序,如定点诱变或丙氨酸扫描诱变(Cunningham和Wells,1989,Science[科学]244:1081-1085)来鉴定多肽中的必需氨基酸。在后一项技术中,在该分子中的每个残基处引入单个丙氨酸突变,并且测试所得分子的DNA酶活性以鉴别对于该分子的活性关键的氨基酸残基。还参见,Hilton等人,1996,J.Biol.Chem.[生物化学杂志]271:4699-4708。酶或其他生物学相互作用的活性位点还可以通过对结构的物理分析来确定,如由如以下技术确定:核磁共振、晶体学(crystallography)、电子衍射、或光亲和标记,连同对推定的接触位点氨基酸进行突变。参见例如,de Vos等人,1992,Science[科学]255:306-312;Smith等人,1992,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]224:899-904;Wlodaver等人,1992,FEBS Lett.[欧洲生化学会联合会快报]309:59-64。必需氨基酸的同一性也可以从与相关多肽的比对推断,和/或从与相关多肽或者多肽或蛋白质家族内与来自共同祖先的多肽/蛋白质(通常具有相似的三维结构、功能和显著的序列相似性)的序列同源性和

保守催化机制推断。另外地或可替代地,蛋白质结构预测工具可以用于蛋白质结构建模以鉴定多肽的必需氨基酸和/或活性位点。参见例如Jumper等人,2021,“Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold[利用α折叠进行高度准确的蛋白结构预测]”,Nature[自然]596:583-589。

[0266] 本发明的变体可以例如由195至230个氨基酸、优选地200至225个氨基酸,如204至221个氨基酸组成。变体可以任选地包含在N-末端和/或C-末端的一个或多个氨基酸的延伸,或在N-末端和/或C-末端的一个或多个氨基酸的截短。例如,变体可以包括与SEQ ID NO:1相比缺失多个N-末端氨基酸的片段,例如SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的变体。

[0267] 在实施例中,与亲本酶相比,变体在洗涤剂组合物中具有改善的稳定性,特别地改善的储存稳定性,即改善的在储存下的稳定性。如上所述,改善的稳定性可以例如通过如本文实例中所述的解链温度(Tm)或半衰期改善因子(HIF)来表示。

[0268] 在实施例中,与亲本DNA酶相比,DNA酶变体具有改善的稳定性(表示为热稳定性)。优选地,变体具有例如如本文实例中所述确定的解链温度(Tm),该解链温度比亲本的解链温度高至少1℃,例如比亲本的Tm高至少2℃、至少3℃或至少4℃。在优选的实施例中,变体可以具有比亲本的Tm高至少5℃、至少6℃、至少7℃、至少8℃、至少9℃或至少10℃的解链温度。

[0269] 在实施例中,与亲本DNA酶相比,DNA酶变体具有改善的稳定性(表示为半衰期改善因子(HIF)),即HIF值大于1。优选地,与亲本相比,变体具有例如如本文实例中所述确定的至少1.2、至少1.3、至少1.4、至少1.5、至少1.6、至少1.7、至少1.8、至少1.9或至少2.0的半衰期改善因子。在优选的实施例中,与亲本相比,变体可以具有至少2.5、至少3.0、至少3.5或至少4.0的半衰期改善因子。

[0270] 使用本领域已知的标准蛋白质纯化方法优选地分离,更优选地纯化本发明的DNA酶变体。

[0271] 变体的制备

[0272] 本发明还涉及用于获得具有DNA酶活性的、具有本文披露的取代的变体的方法。在一个实施例中,该方法包括(a)在选自由以下组成的组的位置处向亲本DNA酶中引入至少两个取代,如至少三个取代:111、32、35、69、102、105和181,其中位置编号基于SEQ ID NO:1的编号,其中该变体与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%,但小于100%的序列同一性,并且其中该变体具有DNA酶活性;以及(b)回收该变体。

[0273] 在另一个实施例中,该方法包括(a)在选自由以下组成的组的位置处向亲本DNA酶中引入三个或更多个取代:26、32、35、65、67、69、98、102、105、111、115、150、157、159、161、172、181、182、185、187、192、206、208和212,其中位置编号基于SEQ ID NO:1的编号,其中该变体与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%,但小于100%的序列同一性,并且其中该变体具有DNA酶活性;以及(b)回收该变体。

[0274] 在另一个实施例中,该方法包括(a)向亲本DNA酶中引入选自由以下组成的组的三个或更多个取代:S26H、D32E、V35I、K65E、K67A、S69E、S69V、S98R、Q102E、K105N、A111P、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、G181N、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、

A206G、Q208V和K212E,其中位置编号基于SEQ ID NO:1的编号,其中该变体与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%,但小于100%的序列同一性,并且其中该变体具有DNA酶活性;以及(b)回收该变体。

[0275] 在另一个实施例中,该方法包括(a)向亲本DNA酶中引入选自由以下组成的组的至少两个取代,如至少三个取代:A111P、D32E、V35I、S69V、Q102E、K105N和G181N,其中位置编号基于SEQ ID NO:1的编号,其中该变体与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%,但小于100%的序列同一性,并且其中该变体具有DNA酶活性;以及(b)回收该变体。

[0276] 在其他实施例中,该方法包括(a)向亲本DNA酶中引入以上在标题"变体"中列出的多组取代中的任一组,其中位置编号基于SEQ ID NO:1的编号,其中该变体与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%,但小于100%的序列同一性,并且其中该变体具有DNA酶活性;以及(b)回收该变体。

[0277] 可以使用本领域已知的任何诱变程序(如定点诱变、合成基因构建、半合成基因构建、随机诱变、DNA改组等)来制备这些变体。

[0278] 多核苷酸

[0279] 本发明还涉及编码本发明的变体的多核苷酸。

[0280] 多核苷酸可以是基因组DNA、cDNA、合成DNA、合成RNA、mRNA或它们的组合。

[0281] 在一方面,多核苷酸是分离的,优选地纯化的。

[0282] 核酸构建体

[0283] 本发明还涉及包含编码本发明的变体的、可操作地连接至一个或多个控制序列的多核苷酸的核酸构建体,该一个或多个控制序列在与控制序列相容的条件下指导编码序列在适合的宿主细胞中的表达。可以使用的控制序列的实例是启动子、终止子、mRNA稳定剂、前导序列、多腺苷酸化序列、信号肽、前肽、调节序列和转录因子,所有这些都是本领域熟知的。

[0284] 可以按多种方式来操纵多核苷酸以提供变体的表达。取决于表达载体,在多核苷酸插入载体之前对其进行操纵可能是理想的或必需的。用于利用重组DNA方法修饰多核苷酸的技术是本领域熟知的。

[0285] 表达载体

[0286] 本发明还涉及包含编码本发明的变体的多核苷酸、启动子、以及转录和翻译终止信号的重组表达载体。各种核苷酸和控制序列可以连接在一起以产生重组表达载体,该重组表达载体可以包括一个或多个合宜的限制位点以允许在这样的位点处插入或取代编码变体的多核苷酸。可替代地,可以通过将多核苷酸或包含该多核苷酸的核酸构建体插入用于表达的适当载体中而表达该多核苷酸。在产生表达载体时,编码序列如此位于载体中,使得编码序列与用于表达的适当控制序列可操作地连接。

[0287] 重组表达载体可以是可以方便地经受重组DNA程序并且可以引起多核苷酸表达的任何载体(例如,质粒或病毒)。载体的选择将典型地取决于载体与待引入载体的宿主细胞的相容性。载体可以是直链或闭合环状质粒。适用于重组表达的表达载体是本领域熟知的,

例如用于将它们引入宿主细胞中的方法也是如此。

[0288] 宿主细胞

[0289] 本发明还涉及重组宿主细胞,这些重组宿主细胞包含可操作地连接至指导本发明变体的产生的一个或多个调控序列的本发明的多核苷酸。

[0290] 将包含多核苷酸的构建体或载体引入宿主细胞中,这样使得该构建体或载体作为染色体整合体或作为自主复制的染色体外载体维持,如较早前所述。宿主细胞的选择在很大程度上将取决于编码变体的基因及其来源。重组宿主细胞可包含本发明的多核苷酸的单拷贝或至少两个拷贝,例如三个、四个、五个或更多个拷贝。

[0291] 宿主细胞可以是可用于重组产生本发明的多肽的任何微生物细胞,例如原核细胞或真菌细胞。

[0292] 原核宿主细胞可以是任何革兰氏阳性或革兰氏阴性细菌。革兰氏阳性细菌包括但不限于芽孢杆菌属(Bacillus)、梭菌属(Clostridium)、肠球菌属(Enterococcus)、土芽孢杆菌属(Geobacillus)、乳杆菌属(Lactobacillus)、乳球菌属(Lactococcus)、大洋芽孢杆菌属(Oceanobacillus)、葡萄球菌属(Staphylococcus)、链球菌属(Streptococcus)、以及链霉菌属(Streptomyces)。革兰氏阴性细菌包括但不限于弯曲杆菌属(Campylobacter)、大肠杆菌(E.coli)、黄杆菌属(Flavobacterium)、梭杆菌属(Fusobacterium)、螺杆菌属(Helicobacter)、泥杆菌属(Ilyobacter)、奈瑟氏菌属(Neisseria)、假单胞菌属(Pseudomonas)、沙门氏菌属(Salmonella)、以及脲原体属(Ureaplasma)。

[0293] 细菌宿主细胞可以是任何芽孢杆菌属细胞,包括但不限于嗜碱芽孢杆菌(Bacillus alkalophilus)、解淀粉芽孢杆菌(Bacillus amyloliquefaciens)、短芽孢杆菌(Bacillus brevis)、环状芽孢杆菌(Bacillus circulans)、克劳氏芽孢杆菌(Bacillus clausii)、凝结芽孢杆菌(Bacillus coagulans)、坚硬芽孢杆菌(Bacillus firmus)、灿烂芽孢杆菌(Bacillus lautus)、迟缓芽孢杆菌(Bacillus lentus)、地衣芽孢杆菌(Bacillus licheniformis)、巨大芽孢杆菌(Bacillus megaterium)、短小芽孢杆菌(Bacillus pumilus)、嗜热脂肪芽孢杆菌(Bacillus stearothermophilus)、枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)以及苏云金芽孢杆菌(Bacillus thuringiensis)细胞。

[0294] 真菌宿主细胞可以是酵母细胞或丝状真菌细胞。

[0295] 丝状真菌宿主细胞可以例如是枝顶孢属(Acremonium)、曲霉属(Aspergillus)、短梗霉属(Aureobasidium)、烟管霉属(Bjerkandera)、拟蜡菌属(Ceriporiopsis)、金孢子菌属(Chrysosporium)、鬼伞属(Coprinus)、革盖菌属(Coriolus)、隐球菌属(Cryptococcus)、线黑粉菌科(Filibasidium)、镰孢属(Fusarium)、腐质霉属(Humicola)、梨孢菌属(Magnaporthe)、毛霉属(Mucor)、毁丝霉属(Myceliophthora)、新美鞭菌属(Neocallimastix)、脉孢菌属(Neurospora)、拟青霉属(Paecilomyces)、青霉属(Penicillium)、平革菌属(Phanerochaete)、射脉菌属(Phlebia)、瘤胃壶菌属(Piromyces)、侧耳属(Pleurotus)、裂褶菌属(Schizophyllum)、篮状菌属(Talaromyces)、嗜热子囊菌属(Thermoascus)、梭孢壳属(Thielavia)、弯颈霉属(Tolypocladium)、栓菌属(Trametes)、或木霉属(Trichoderma)细胞。在优选的实施例中,丝状真菌宿主细胞是曲霉属、木霉属或镰孢属细胞。在另外的优选的实施例中,丝状真菌宿主细胞是黑曲霉、米曲霉、里氏木霉或镶片镰孢(Fusarium venenatum)细胞。

[0296] 在一方面,宿主细胞是分离的,优选地纯化的。

[0297] 生产方法

[0298] 本发明还涉及产生本发明的变体的方法,这些方法包括(a)在有益于产生该变体的条件下培养本发明的重组宿主细胞;以及任选地(b)回收该变体。

[0299] 使用本领域已知的方法在适用于产生变体的营养培养基中培养宿主细胞。例如,可以通过摇瓶培养,或者在合适的培养基中并在允许变体表达和/或分离的条件下在实验室或工业发酵罐中进行小规模或大规模发酵(包括连续发酵、分批发酵、分批给料发酵或固态发酵)来培养细胞。合适的培养基可从商业供应商获得或可根据公开的组成(例如,在美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)的目录中)制备。如果变体被分泌到营养培养基中,则变体可以直接从培养基回收。如果变体没有分泌,则它可以从细胞裂解液中回收。

[0300] 可使用本领域已知的对变体特异的方法来检测变体,包括但不限于使用特异性抗体、酶产物形成、酶底物消失或者确定变体的相对活性或比活性的酶测定法。

[0301] 可使用本领域已知的方法从培养基中回收变体,包括但不限于收集、离心、过滤、提取、喷雾干燥、蒸发或沉淀。在一个方面,回收全发酵液。在另一方面,回收包含多肽的无细胞发酵液。

[0302] 变体可以通过本领域已知的多种程序来纯化,以获得基本上纯的变体和/或片段(参见例如,Wingfield,2015,Current Protocols in Protein Science[蛋白质科学的最新方案];80(1):6.1.1-6.1.35;Labrou,2014,Protein Downstream Processing[蛋白质下游加工],1129:3-10)。

[0303] 在可替代的方面,不回收变体。

[0304] 组合物

[0305] 本发明进一步涉及包含至少一种根据本发明的DNA酶变体以及至少一种清洁辅助成分的清洁组合物。该清洁组合物可以用于改善深度清洁效果,包括但不限于深度清洁物品、防止和/或减少物品的粘性、用于预处理物品上的污渍、用于在洗涤循环期间防止和/或减少污垢的再沉积、用于防止和/或减少污垢在物品上的粘附、用于维持或改善物品的白度和用于防止和/或减少物品的恶臭。本发明的DNA酶变体可用于粉末和液体清洁组合物以及例如单个单位剂量组合物。

[0306] 组合物可以含有选自由以下组成的组的一种或多种清洁辅助成分:表面活性剂、助洗剂、絮凝助剂、螯合试剂、染料转移抑制剂、酶、酶稳定剂、酶抑制剂、催化材料、漂白活化剂、过氧化氢、过氧化氢源、预形成过酸、聚合的分散剂、粘土去污剂/抗再沉积剂、增亮剂、抑泡剂、染料、香料、结构弹力剂、织物软化剂、载剂、水溶助剂、助洗剂和共助洗剂、织物调色剂、消泡剂、分散剂、加工助剂、和/或色素。

[0307] 清洁组合物典型地将含有表面活性剂和其他正常清洁辅助成分,如助洗剂或粘土/污垢去除剂/抗再沉积剂。

[0308] 清洁辅助成分可以是除DNA酶以外的一种或多种酶。该一种或多种酶可以例如选自由以下组成的组:蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶、角质酶、纤维素酶、内切葡聚糖酶、木葡聚糖酶、果胶酶、果胶裂解酶、黄原胶酶、过氧化物酶、卤代过氧合酶、过氧化氢酶以及甘露聚糖酶。以下描述了适用于本发明洗涤剂组合物的特定酶。

[0309] 清洁组合物可以被配制为任何合适的形式,如条,均匀的片剂,具有两个或更多个层的片剂,具有一个或多个室的袋,规则的或压缩的粉末,颗粒,膏,凝胶,或规则的、压缩的或浓缩的液体。因此,清洁组合物可以例如是液体洗涤剂或粉末或颗粒洗涤剂,任选地呈"浓缩"或"压缩"形式。它也可以呈单个单位剂量组合物的形式。

[0310] 清洁组合物中DNA酶的量可以根据如组合物的浓度或紧密程度以及洗涤液中所需的DNA酶浓度等因素而变化。DNA酶通常将以高达约10,000ppm、典型地高达约5000ppm或高达约2000ppm的量包括在清洁组合物中。DNA酶可以例如以如下水平包括在清洁组合物中:从1ppm至10,000ppm,如从10ppm至5000ppm、从20ppm至2000ppm、从50ppm至1000ppm、从80ppm至600ppm或从100ppm至500ppm。在此上下文中,单位"ppm"旨在是指mg/l(对于添加到液体组合物(例如液体、凝胶等)中的酶)或mg/kg(对于添加到固体组合物(例如粉末、颗粒、片剂等)中的酶)。

[0311] 在一些方面,洗涤剂组合物是液体或粉末衣物洗涤剂,适用于例如在高温和/或高pH下(如在或高于40℃和/或在或高于pH 8下)的洗涤。在一些方面,洗涤剂组合物是液体或粉末衣物洗涤剂,适用于例如在低温和/或低pH下(如在或低于20℃和/或pH 6下)的洗涤。该洗涤剂还可以被配制成单位剂量洗涤剂和/或任选具有最少的水或无水的致密洗涤剂。该洗涤剂还可以是餐具洗涤洗涤剂。衣物和餐具洗涤洗涤剂可以是无磷的。

[0312] 表面活性剂

[0313] 表面活性剂可以是在如上所述的非离子、阴离子和/或两性离子型表面活性剂中选择的,优选地阴离子或非离子型表面活性剂也可以使用两性离子型表面活性剂。一般而言,优选漂白剂稳定的表面活性剂。优选的阴离子型表面活性剂是硫酸盐表面活性剂以及特别地烷基醚硫酸盐,尤其是C-9-15醇醚硫酸盐、C12-15伯醇乙氧基化物、C8-C16酯硫酸盐和C10-C14酯硫酸盐,如单十二烷基酯硫酸盐。阴离子型表面活性剂的非限制性实例包括硫酸盐和磺酸盐,特别是直链烷基苯磺酸盐(LAS)、LAS的异构体、支链烷基苯磺酸盐(BABS)、苯基链烷磺酸盐、α-烯烃磺酸盐(AOS)、烯烃磺酸盐、链烯烃磺酸盐、链烷-2,3-二基双(硫酸盐)、羟烷基磺酸盐以及二磺酸盐、烷基硫酸盐(AS)(如十二烷基硫酸钠(SDS))、脂肪醇硫酸盐(FAS)、伯醇硫酸盐(PAS)、醇醚硫酸盐(AES或AEOS或FES,也被称为醇乙氧基硫酸盐或脂肪醇醚硫酸盐)、仲链烷磺酸盐(SAS)、石蜡烃磺酸盐(PS)、酯磺酸盐、磺化的脂肪酸甘油酯、α-磺酸基脂肪酸甲酯(α-SFMe或SES)(包括甲酯磺酸盐(MES))、烷基琥珀酸或烯基琥珀酸、十二烯基/十四烯基琥珀酸(DTSA)、氨基酸的脂肪酸衍生物、磺酸基琥珀酸的二酯和单酯或脂肪酸的盐(皂)、及其组合。

[0314] 阴离子型表面活性剂优选地以盐的形式添加至洗涤剂中。在这些盐中的适合阳离子是碱金属离子,如钠、钾和锂以及铵盐,例如(2-羟基乙基)铵、二(2-羟基乙基)铵和三(2-羟基乙基)铵盐。非离子表面活性剂的非限制性实例包括醇乙氧基化物(AE或AEO)、醇丙氧基化物、丙氧基化的脂肪醇(PFA)、烷氧基化的脂肪酸烷基酯(如乙氧基化的和/或丙氧基化的脂肪酸烷基酯)、烷基酚乙氧基化物(APE)、壬基酚乙氧基化物(NPE)、烷基多糖苷(APG)、烷氧基化胺、脂肪酸单乙醇酰胺(FAM)、脂肪酸二乙醇酰胺(FADA)、乙氧基化的脂肪酸单乙醇酰胺(EFAM)、丙氧基化的脂肪酸单乙醇酰胺(PFAM)、多羟基烷基脂肪酸酰胺、或葡萄糖胺的N-酰基N-烷基衍生物(葡糖酰胺(GA)或脂肪酸葡糖酰胺(FAGA))、以及以SPAN和TWEEN商品名可获得的产品、及其组合。可商购的非离子型表面活性剂包括来自巴斯夫公司(BASF)

的Plurafac™、Lutensol™和Pluronic™,来自科宁公司(Cognis)的Dehypon™系列和来自科莱恩特公司(Clariant)的Genapol™系列。

[0315] 助洗剂

[0316] 优选地,助洗剂选自磷酸盐、柠檬酸钠助洗剂、碳酸钠、硅酸钠、铝硅酸钠(沸石)。合适的助洗剂是碱金属或磷酸铵、聚磷酸盐、膦酸盐、聚磷酸盐、碳酸盐、碳酸氢盐、硼酸盐、柠檬酸盐和聚羧酸盐。柠檬酸盐助洗剂,例如柠檬酸及其可溶性盐(特别是钠盐)是聚羧酸盐助洗剂。柠檬酸盐可以与沸石、硅酸盐像BRITESIL类型、和/或层状硅酸盐助洗剂组合使用。助洗剂优选以按重量计约0%-65%(如按重量计约5%至约50%)的量添加。在衣物洗涤剂中,助洗剂的水平典型地为按重量计约40%-65%、特别是按重量计约50%-65%、特别是按重量计从20%至50%。助洗剂和/或共助洗剂可以特别是与Ca和Mg形成水溶性络合物的螯合试剂。可以利用本领域已知的用于在清洁洗涤剂中使用的任何助洗剂和/或共助洗剂。助洗剂的非限制性实例包括沸石、二磷酸盐(焦磷酸盐)、三磷酸盐(如三磷酸钠(STP或STPP))、碳酸盐(如碳酸钠)、可溶性硅酸盐(如偏硅酸钠)、层状硅酸盐(例如来自赫斯特公司(Hoechst)的SKS-6)、和(羧甲基)菊粉(CMI)、及其组合。助洗剂的另外的非限制性实例包括柠檬酸盐;螯合剂,如氨基羧酸盐、氨基聚羧酸盐和膦酸盐;以及烷基琥珀酸或烯基琥珀酸。另外的特定实例包括2,2',2"-次氮基三乙酸(NTA)、乙二胺四乙酸(EDTA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)、亚氨基二琥珀酸(IDS)、乙二胺-N,N'-二琥珀酸(EDDS)、甲基甘氨酸-N,N-二乙酸(MGDA)、谷氨酸-N,N-二乙酸(GLDA)、1-羟基乙烷-1,1-二膦酸、N-(2-羟基乙基)亚氨基二乙酸(EDG)、天冬氨酸-N-单乙酸(ASMA)、天冬氨酸-N,N-二乙酸(ASDA)、天冬氨酸-N-单丙酸(ASMP)、亚氨基二琥珀酸(IDA)、N-(磺甲基)天冬氨酸(SMAS)、N-(2-磺乙基)-天冬氨酸(SEAS)、N-(磺甲基谷氨酸(SMGL)、N-(2-磺乙基)-谷氨酸(SEGL)、N-甲基亚氨基二乙酸(MIDA)、丝氨酸-N,N-二乙酸(SEDA)、异丝氨酸-N,N-二乙酸(ISDA)、苯丙氨酸-N,N-二乙酸(PHDA)、邻氨基苯甲酸-N,N-二乙酸(ANDA)、磺胺酸-N,N-二乙酸(SLDA)、牛磺酸-N,N-二乙酸(TUDA)以及N'-(2-羟基乙基)-亚乙基二胺-N,N,N'-三乙酸(HEDTA)、二乙醇甘氨酸(DEG)、及其组合和盐。适用于本文使用的膦酸酯包括1-羟基乙烷-1,1-二膦酸(HEDP)、乙二胺四(亚甲基膦酸)(EDTMPA)、二亚乙基三胺五(亚甲基膦酸)(DTMPA或DTPMPA或DTPMP)、次氮基三(亚甲基膦酸)(ATMP或NTMP)、2-膦酰基丁烷-1,2,4-三羧酸(PBTC)、六亚甲基二胺四(亚甲基膦酸)(HDTMP)。该组合物还可以含有按重量计0%-50%,如约5%至约30%的洗涤剂共助洗剂。洗涤剂组合物可以包括单独或与助洗剂(例如沸石助洗剂)组合的共助洗剂。共助洗剂的非限制性实例包括聚丙烯酸酯的均聚物或其共聚物,如聚(丙烯酸)(PAA)或共聚(丙烯酸/马来酸)(PAA/PMA)或聚天冬氨酸。另外的示例性助洗剂和/或共助洗剂描述于例如WO 09/102854、US 5977053中。在一些方面,该助洗剂是基于非磷的助洗剂,如柠檬酸和/或甲基甘氨酸-N,N-二乙酸(MGDA)和/或谷氨酸-N,N-二乙酸(GLDA)和/或其盐。在优选的助洗剂包括柠檬酸盐和/或甲基甘氨酸-N,N-二乙酸(MGDA)和/或谷氨酸-N,N-二乙酸(GLDA)和/或其盐的情况下,该液体组合物还可以是无磷酸盐的。

[0317] 漂白组分

[0318] 清洁组合物可以包含按重量计0%-30%(例如,约1%至约20%)的漂白系统。可以利用包含本领域已知的用于在清洁洗涤剂中使用的组分的任何漂白系统。合适的漂白系统组分包括过氧化氢源;过酸源;和漂白催化剂或促进剂。

[0319] 过氧化氢源:合适的过氧化氢源是无机过酸盐,包括碱金属盐(如过碳酸钠和过硼酸钠(通常是一水合物或四水合物)),以及过氧化氢－尿素(1/1)。

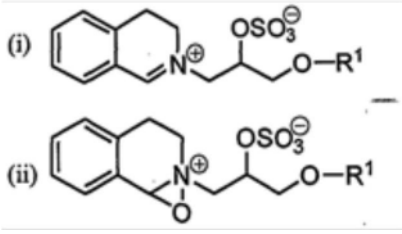
[0320] 过酸源:过酸可以是(a)直接作为预形成过酸掺入,或(b)从过氧化氢和漂白活化剂(过水解)在洗涤液中原位形成,或(c)从过氧化氢和过水解酶和后者合适的底物(例如酯)在洗涤液中原位形成。

[0321] a)合适的预形成过酸包括但不限于过氧羧酸(如过氧苯甲酸)及其环取代的衍生物、过氧-α-萘甲酸、过氧邻苯二甲酸、过氧月桂酸、过氧硬脂酸、ε-邻苯二甲酰亚氨基过氧己酸[邻苯二甲酰亚氨基过氧己酸(PAP)]、和邻-羧基苯甲酰氨基过氧己酸;脂肪族和芳族二过氧二羧酸,如二过氧十二烷二酸,二过氧壬二酸,二过氧癸二酸,二过氧巴西基酸,2-癸基二过氧丁二酸,以及二过氧邻苯二甲酸、-间苯二甲酸和-对苯二甲酸;过亚氨酸(perimidic acid);过氧单硫酸;过氧二硫酸;过氧磷酸;过氧硅酸;以及所述化合物的混合物。应理解的是,在一些情况下,所提及的过酸可能最好是作为合适的盐添加,如碱金属盐(例如Oxone®)或碱土金属盐。

[0322] b)合适的漂白活化剂包括属于酯、酰胺、酰亚胺、腈类或酸酐类别的那些,以及适用时,其盐。合适的实例是四乙酰基乙二胺(TAED)、4-[(3,5,5-三甲基己酰基)氧基]苯-1-磺酸钠(ISONOBS)、4-(十二酰基氧基)苯-1-磺酸钠(LOBS)、4-(癸酰基氧基)苯-1-磺酸钠、4-(癸酰基氧基)苯甲酸(DOBA)、4-(壬酰基氧基)苯-1-磺酸钠(NOBS)和/或披露于WO 98/17767中的那些。目的漂白活化剂的特别家族披露于EP624154中并且在该家族中特别优选的是乙酰柠檬酸三乙酯(ATC)。ATC或短链甘油三酯(像三醋精)具有以下优点:它们是环境友好的。而且,乙酰柠檬酸三乙酯和三醋精在储存时在产品中具有良好的水解稳定性,并且是有效的漂白活化剂。最后,ATC是多功能的,因为在过水解反应中释放的柠檬酸盐可以作为助洗剂起作用。

[0323] 漂白催化剂和增效剂:该漂白系统还可以包括漂白催化剂或促进剂。可以用于本发明的组合物中的漂白催化剂的一些非限制性实例包括草酸锰、乙酸锰、锰胶原、钴-胺催化剂、和锰三氮杂环壬烷(MnTACN)催化剂;特别优选的是锰与1,4,7-三甲基-1,4,7-三氮杂环壬烷(Me3-TACN)或1,2,4,7-四甲基-1,4,7-三氮杂环壬烷(Me4-TACN),特别是Me3-TACN的络合物,如双核锰络合物[(Me3-TACN)Mn(O)3Mn(Me3-TACN)](PF6)2、和[2,2',2"-次氨基三(乙烷-1,2-二基氮烷基亚基-κN-甲基亚基)三酚并-κ30]锰(III)。这些漂白催化剂还可以是其他金属化合物,如铁或钴络合物。其他合适的漂白催化剂是酰腙催化剂,例如披露于US2014/0323381中的那些。

[0324] 在其中过酸的来源包括在内的一些方面,可以使用具有下式之一的有机漂白催化剂或漂白增效剂:

[0325] 

[0326] (iii)及其混合物;其中每个R1独立地是含有从9至24个碳的支链烷基基团或含有从11至24个碳的直链烷基基团,优选地每个R1独立地是含有从9至18个碳的支链烷基基团

或含有从11至18个碳的直链烷基基团,更优选地每个R1独立地选自由以下组成的组:2-丙基庚基、2-丁基辛基、2-戊基壬基、2-己基癸基、十二烷基、十四烷基、十六烷基、十八烷基、异壬基、异癸基、异十三烷基以及异十五烷基。

[0327] 其他示例性漂白系统描述于例如WO 2007/087258、WO 2007/087244、WO 2007/087259、EP 1867708(维生素K)和WO 2007/087242中。合适的光漂白剂可以例如是磺化的酞菁锌或酞菁铝。

[0328] 洗涤剂组分的选择可以包括(用于纺织品护理)有待清洁的纺织品的类型、污垢的类型和/或程度、进行清洁时的温度、以及洗涤剂产品的配制的考虑。尽管根据功能性对以下提到的组分由通用标题进行分类,但这并不被解释为限制,因为如将被普通技术人员所理解,一种组分可以包括另外的功能性,包括以下示出的示例性、非限制性组分。

[0329] 水溶助剂

[0330] 该洗涤剂组合物可以含有按重量计0%-10%,例如按重量计0%-5%,如约0.5%至约5%、或约3%至约5%的水溶助剂。可以利用本领域中已知的用于在洗涤剂中使用的任何水溶助剂。水溶助剂的非限制性实例包括苯磺酸钠、对甲苯磺酸钠(STS)、二甲苯磺酸钠(SXS)、枯烯磺酸钠(SCS)、伞花烃磺酸钠、氧化胺、醇和聚乙二醇醚、羟基萘甲酸钠、羟基萘磺酸钠、乙基己基磺酸钠、及其组合。

[0331] 聚合物

[0332] 洗涤剂组合物可以含有按重量计0%-10%(如0.5%-5%、2%-5%、0.5%-2%或0.2%-1%)的聚合物。可以利用本领域中已知的用于在洗涤剂中使用的任何聚合物。聚合物可以作为如以上提到的共助洗剂起作用,或可以提供抗再沉积、纤维保护、污垢释放、染料转移抑制、油污清洁和/或防沫特性。一些聚合物可以具有多于一种的以上提及的特性和/或多于一种的下文提及的基序。示例性聚合物包括(羧甲基)纤维素(CMC)、聚(乙烯醇)(PVA)、聚(乙烯吡咯烷酮)(PVP)、聚(乙二醇)或聚(环氧乙烷)(PEG)、乙氧基化的聚(亚乙基亚胺)、羧甲基菊粉(CMI)、和聚羧酸酯(如PAA、PAA/PMA、聚-天冬氨酸、和甲基丙烯酸月桂酯/丙烯酸共聚物)、疏水修饰的CMC(HM-CMC)和硅酮、对苯二甲酸和低聚乙二醇的共聚物、聚(对苯二甲酸乙二酯)和聚(氧乙烯对苯二甲酸酯)的共聚物(PET-POET)、PVP、聚(乙烯基咪唑)(PVI)、聚(乙烯吡啶-N-氧化物)(PVPO或PVPNO)以及聚乙烯吡咯烷酮-乙烯基咪唑(PVPVI)。另外的示例性聚合物包括磺化的聚羧酸酯、聚环氧乙烷和聚环氧丙烷(PEO-PPO)、以及乙氧基硫酸二季铵盐。其他示例性聚合物披露于例如WO 2006/130575中。还考虑了以上提及的聚合物的盐。

[0333] 织物调色剂

[0334] 本发明的洗涤剂组合物还可以包括织物调色剂,如染料或色素,当配制在洗涤剂组合物中时,当所述织物与洗涤液接触时织物调色剂可以沉积在织物上,该洗涤液包含所述洗涤剂组合物,并且因此通过可见光的吸收/反射改变所述织物的色彩。荧光增白剂发射至少一些可见光。相反,当织物调色剂吸收至少部分可见光谱时,它们改变表面的色彩。合适的织物调色剂包括染料和染料-粘土轭合物,并且还可以包括颜料。合适的染料包括小分子染料和聚合物染料。合适的小分子染料包括选自由落入颜色索引(Colour Index)(C.I.)分类的以下染料组成的组的小分子染料:直接蓝、直接红、直接紫、酸性蓝、酸性红、酸性紫、碱性蓝、碱性紫、和碱性红、或其混合物,例如如WO 2005/03274、WO 2005/03275、WO 2005/

03276以及EP 1876226(通过引用特此并入)中所描述的。洗涤剂组合物优选地包含从约0.00003wt％至约0.2wt％、从约0.00008wt％至约0.05wt％、或甚至从约0.0001wt％至约0.04wt％的织物调色剂。该组合物可以包含从0.0001wt％至0.2wt％的织物调色剂,当该组合物呈单位剂量袋的形式时,这可以是尤其优选的。合适的调色剂还披露于例如WO 2007/087257和WO 2007/087243中。

[0335] 酶

[0336] 洗涤剂组合物可以包含一种或多种另外的酶,如蛋白酶、脂肪酶、角质酶、淀粉酶、糖酶、纤维素酶、果胶酶、甘露聚糖酶、阿拉伯糖酶、半乳聚糖酶、木聚糖酶、氨基己糖苷酶、氧化酶(例如漆酶)、和/或过氧化物酶。

[0337] 通常,选择的一种或多种酶的特性应当与所选择的洗涤剂相容(即,最适pH,与其他酶成分或非酶成分的相容性等),并且该一种或多种酶应当以有效量存在。

[0338] 纤维素酶

[0339] 合适的纤维素酶包括细菌或真菌来源的那些。包括化学修饰的突变体或蛋白质工程化的突变体。合适的纤维素酶包括来自芽孢杆菌属、假单胞菌属、腐质霉属、镰孢属、梭孢壳属、枝顶孢属的纤维素酶,例如披露于US 4,435,307、US 5,648,263、US 5,691,178、US 5,776,757以及WO 89/09259中的由特异腐质霉、嗜热毁丝霉和尖孢镰孢产生的真菌纤维素酶。

[0340] 尤其合适的纤维素酶是具有颜色护理益处的碱性或中性纤维素酶。这样的纤维素酶的实例是描述于EP 0 495 257、EP 0 531 372、WO 96/11262、WO 96/29397、WO 98/08940中的纤维素酶。其他实例是如描述于WO 94/07998、EP 0 531 315、US 5,457,046、US 5,686,593、US 5,763,254、WO 95/24471、WO 98/12307和WO 99/001544中的那些纤维素酶变体。

[0341] 其他纤维素酶是具有与WO 2002/099091的SEQ ID NO:2的位置1至位置773的氨基酸序列具有至少97％同一性的序列的内切-β-1,4-葡聚糖酶或一种家族44木葡聚糖酶,该木葡聚糖酶是一种具有与WO 2001/062903的SEQ ID NO:2的位置40-559具有至少60％同一性的序列的木葡聚糖酶。

[0342] 可商购的纤维素酶包括Celluzyme™和Carezyme™(诺维信公司(Novozymes A/S))、Carezyme Premium™(诺维信公司)、Celluclean™(诺维信公司)、Celluclean Classic™(诺维信公司)、Cellusoft™(诺维信公司)、Whitezyme™(诺维信公司)、Clazinase™和Puradax HA™(杰能科国际有限公司(Genencor International Inc.))以及KAC-500(B)™(花王株式会社(Kao Corporation))。

[0343] 蛋白酶

[0344] 合适的蛋白酶可以是任何来源的,但优选地是细菌或真菌来源的,任选地呈蛋白质工程化的或化学修饰的突变体的形式。蛋白酶可以是碱性蛋白酶,如丝氨酸蛋白酶或金属蛋白酶。丝氨酸蛋白酶可以例如是S1家族的(如胰蛋白酶)或S8家族的(如枯草杆菌蛋白酶)。金属蛋白酶可以例如是嗜热菌蛋白酶,例如来自M4家族的嗜热菌蛋白酶,或另一种金属蛋白酶,如来自M5、M7或M35家族的那些。

[0345] 术语“枯草杆菌酶(subtilase)”是指根据Siezen等人,Protein Eng.[蛋白质工程]4(1991)719-737和Siezen等人,Protein Sci.[蛋白质科学]6(1997)501-523的丝氨酸

蛋白酶的亚组。丝氨酸蛋白酶是特征为在活性位点具有与底物形成共价加合物的丝氨酸的蛋白酶的亚组。枯草杆菌酶可以被划分为六个亚类:枯草杆菌蛋白酶家族、嗜热蛋白酶家族、蛋白酶K家族、羊毛硫氨酸抗生素肽酶家族、Kexin家族和Pyrolysin家族。

[0346] 尽管合适的用于洗涤剂用途的蛋白酶可以从多种生物体(包括如曲霉属等真菌)获得,但洗涤剂蛋白酶一般已从细菌(特别是从芽孢杆菌属)获得。衍生枯草杆菌酶的芽孢杆菌属物种的实例包括迟缓芽孢杆菌(Bacillus lentus)、嗜碱芽孢杆菌(Bacillus alkalophilus)、枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、短小芽孢杆菌和吉氏芽孢杆菌(Bacillus gibsonii)。特别的枯草杆菌蛋白酶包括迟缓枯草杆菌蛋白酶(subtilisin lentus)、枯草杆菌蛋白酶Novo、枯草杆菌蛋白酶Carlsberg、枯草杆菌蛋白酶BPN'、枯草杆菌蛋白酶309、枯草杆菌蛋白酶147和枯草杆菌蛋白酶168、以及例如蛋白酶PD138(描述于WO 93/18140中)。其他有用的蛋白酶是例如在WO 01/16285和WO 02/16547中描述的那些。

[0347] 胰蛋白酶样蛋白酶的实例包括镰孢属蛋白酶(在WO 94/25583和WO 2005/040372中描述),以及衍生自纤维单胞菌(Cellumonas)的糜蛋白酶(在WO 2005/052161和WO 2005/052146中描述)。

[0348] 金属蛋白酶的实例包括在WO 2007/044993中描述的中性金属蛋白酶(如衍生自解淀粉芽孢杆菌的那些),以及例如在WO 2015/158723和WO 2016/075078中描述的金属蛋白酶。

[0349] 有用的蛋白酶的实例是在WO 89/06279、WO 92/19729、WO 96/34946、WO 98/20115、WO 98/20116、WO 99/11768、WO 01/44452、WO 03/006602、WO 2004/003186、WO 2004/041979、WO 2007/006305、WO 2011/036263、WO 2014/207227、WO 2016/087617和WO 2016/174234中描述的蛋白酶变体。优选的蛋白酶变体可以例如包含选自由以下组成的组的一个或多个突变:S3T、V4I、S9R、S9E、A15T、S24G、S24R、K27R、N42R、S55P、G59E、G59D、N60D、N60E、V66A、N74D、S85R、A96S、S97G、S97D、S97A、S97SD、S99E、S99D、S99G、S99M、S99N、S99R、S99H、S101A、V102I、V102Y、V102N、S104A、G116V、G116R、H118D、H118N、A120S、S126L、P127Q、S128A、S154D、A156E、G157D、G157P、S158E、Y161A、R164S、Q176E、N179E、S182E、Q185N、A188P、G189E、V193M、N198D、V199I、Q200L、Y203W、S206G、L211Q、L211D、N212D、N212S、M216S、A226V、K229L、Q230H、Q239R、N246K、S253D、N255W、N255D、N255E、L256E、L256D T268A和R269H,其中位置编号对应于WO 2016/001449的SEQ ID NO:1所示的迟缓芽孢杆菌蛋白酶的位置。具有这些突变中的一个或多个的蛋白酶变体优选是WO 2016/001449的SEQ ID NO:1中所示的迟缓芽孢杆菌蛋白酶(Savinase®,也称为枯草杆菌蛋白酶309)的变体或WO 2016/001449的SEQ ID NO:2中所示的解淀粉芽孢杆菌蛋白酶(BPN')的变体。这样的蛋白酶变体优选地与WO 2016/001449的SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2具有至少80%序列同一性。

[0350] 另一种目的蛋白酶是来自迟缓芽孢杆菌DSM 5483的碱性蛋白酶(如例如在WO 91/02792中所述)及其变体(这些变体例如在WO 92/21760、WO 95/23221、EP 1921147、EP 1921148和WO 2016/096711中描述)。

[0351] 可替代地,蛋白酶可以是具有WO 2004/067737的SEQ ID NO:1的TY145蛋白酶的变体,例如在与WO 2004/067737的SEQ ID NO:1的位置27、109、111、171、173、174、175、180、182、184、198、199和297对应的一个或多个位置处包含取代的变体,其中所述蛋白酶变体与

WO 2004/067737的SEQ ID NO:1具有至少75％但少于100％的序列同一性。目的TY145变体描述于例如WO 2015/014790、WO 2015/014803、WO 2015/014804、WO 2016/097350、WO 2016/097352、WO 2016/097357和WO 2016/097354中。

[0352] 合适的可商购的蛋白酶包括以下列商品名出售的那些：Alcalase®、Duralase™、Durazym™、Relase®、Relase®Ultra、Savinase®、Savinase®Ultra、Primase™、Polarzyme®、Kannase®、Liquanase®、Liquanase®Ultra、Ovozyme®、Coronase®、Coronase®Ultra、Blaze®、Blaze Evity® 100T、Blaze Evity® 125T、Blaze Evity® 150T、Blaze Evity® 200T、Neutrase®、Everlase®、Esperase®、Progress®Uno、Progress® In、Progress®Key和Progress®Excel(诺维信公司),以下列商品名出售的那些:Maxatase™、Maxacal™、Maxapem®、Purafect®Ox、Purafect®OxP、Puramax®、FN2™、FN3™、FN4^{ex}™、Excellase®、Excellenz™ P1000、Excellenz™ P1250、Eraser™、Preferenz®P100、Preferenz®P300、Purafect Prime、Preferenz P110™、Effectenz P1000™、Purafect®、Effectenz P1050™、Purafect®Ox、Effectenz ™ P2000、Purafast™、Properase®、Opticlean™和Optimase®(丹斯尼克公司(Danisco)/杜邦公司(DuPont))、BLAP(在US 5352604的图29中显示的序列)及其变体(汉高公司(Henkel AG))、以及来自花王株式会社(Kao)的KAP(嗜碱芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶)。

[0353] 脂肪酶和角质酶

[0354] 合适的脂肪酶和角质酶包括细菌或真菌来源的那些。包括化学修饰的突变体酶或蛋白质工程化的突变体酶。实例包括来自嗜热丝孢菌属,例如来自如EP 258068和EP 305216中描述的疏绵状嗜热丝孢菌(早先命名为疏棉状腐质霉(Humicola lanuginosa))的脂肪酶;来自腐质霉属,例如特异腐质霉(H.insolens)(WO 96/13580)的角质酶;来自假单胞菌属(Pseudomonas)的菌株(这些中的一些现在改名为伯克霍尔德菌属(Burkholderia)),例如产碱假单胞菌(P.alcaligenes)或类产碱假单胞菌(P.pseudoalcaligenes)(EP 218272)、洋葱假单胞菌(P.cepacia)(EP 331376)、假单胞菌属物种(P.sp.)菌株SD705(WO 95/06720和WO 96/27002)、威斯康星假单胞菌(P.wisconsinensis)(WO 96/12012)的脂肪酶;GDSL-型链霉菌属(Streptomyces)脂肪酶(WO 10/065455);来自稻瘟病菌(Magnaporthe grisea)的角质酶(WO 10/107560);来自门多萨假单胞菌(Pseudomonas mendocina)的角质酶(US 5,389,536);来自褐色嗜热裂孢菌(Thermobifida fusca)的脂肪酶(WO 11/084412);嗜热脂肪土芽孢杆菌(Geobacillus stearothermophilus)脂肪酶(WO 11/084417);来自枯草芽孢杆菌的脂肪酶(WO 11/084599);以及来自灰色链霉菌(Streptomyces griseus)(WO 11/150157)和始旋链霉菌(S.pristinaespiralis)(WO 12/137147)的脂肪酶。

[0355] 其他实例是脂肪酶变体,例如EP 407225、WO 92/05249、WO 94/01541、WO 94/25578、WO 95/14783、WO 95/30744、WO 95/35381、WO 95/22615、WO 96/00292、WO 97/04079、WO 97/07202、WO 00/34450、WO 00/60063、WO 01/92502、WO 07/87508以及WO 09/109500中描述的那些。

[0356] 优选的商业化脂肪酶产品包括Lipolase™、Lipex™、Lipolex™和Lipoclean™(诺维信公司)、Lumafast(最初来自杰能科公司(Genencor))、以及Lipomax(最初来自吉斯特-布罗卡德斯公司(Gist-Brocades))。

[0357] 仍其他实例是有时称为酰基转移酶或过水解酶的脂肪酶,例如与南极假丝酵母(Candida antarctica)脂肪酶A具有同源性的酰基转移酶(WO 10/111143)、来自耻垢分枝杆菌(Mycobacterium smegmatis)的酰基转移酶(WO 05/56782)、来自CE 7家族的过水解酶(WO 09/67279)以及耻垢分枝杆菌过水解酶的变体(特别是来自亨斯迈纺织品染化有限公司(Huntsman Textile Effects Pte Ltd)的商业化产品Gentle Power Bleach中所用的S54V变体)(WO 10/100028)。

[0358] 淀粉酶

[0359] 可以与本发明的DNA酶一起使用的合适的淀粉酶可以是α-淀粉酶或葡糖淀粉酶并且可以是细菌或真菌来源的。包括化学修饰的突变体或蛋白质工程化的突变体。淀粉酶包括例如从芽孢杆菌属,例如地衣芽孢杆菌的特定菌株(更详细地描述于GB 1,296,839中)获得的α-淀粉酶。

[0360] 合适的淀粉酶包括具有WO 95/10603中的SEQ ID NO:2的淀粉酶或其与SEQ ID NO:1具有90%序列同一性的变体。优选的变体描述于WO 94/02597、WO 94/18314、WO 97/43424中以及WO 99/019467的SEQ ID NO:4中,如在以下位置的一个或多个中具有取代的变体:15、23、105、106、124、128、133、154、156、178、179、181、188、190、197、201、202、207、208、209、211、243、264、304、305、391、408和444。

[0361] 不同的合适的淀粉酶包括具有WO 02/010355中的SEQ ID NO:6的淀粉酶或与SEQ ID NO:6具有90%序列同一性的其变体。SEQ ID NO:6的优选的变体是在位置181和182处具有缺失并且在位置193处具有取代的那些。

[0362] 其他合适的淀粉酶是包含WO 2006/066594的SEQ ID NO:6中所示的从解淀粉芽孢杆菌获得的α-淀粉酶的残基1-33和WO 2006/066594的SEQ ID NO:4中所示的地衣芽孢杆菌α-淀粉酶的残基36-483的杂合α-淀粉酶或其具有90%序列同一性的变体。此杂合α-淀粉酶的优选的变体是在以下位置中的一个或多个处具有取代、缺失或插入的那些:G48、T49、G107、H156、A181、N190、M197、I201、A209、和Q264。包含WO 2006/066594的SEQ ID NO:6中所示的从解淀粉芽孢杆菌获得的α-淀粉酶的残基1-33和SEQ ID NO:4的残基36-483的杂合α-淀粉酶的最优选的变体是具有以下取代的那些:

[0363] M197T;

[0364] H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S;或

[0365] G48A+T49I+G107A+H156Y+A181T+N190F+I201F+A209V+Q264S。

[0366] 另外的合适的淀粉酶是具有WO 99/019467中的SEQ ID NO:6的淀粉酶或与SEQ ID NO:6具有90%序列同一性的其变体。SEQ ID NO:6的优选的变体是在以下位置中的一个或多个处具有取代、缺失、或插入的那些:R181、G182、H183、G184、N195、I206、E212、E216和K269。特别优选的淀粉酶是在位置R181和G182、或位置H183和G184中具有缺失的那些。

[0367] 可以使用的另外的淀粉酶是具有WO 96/023873的SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:7的那些,或与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:7具有90%序列同一性的其变体。SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、或SEQ ID

NO:7的优选的变体是在以下位置中的一个或多个处具有取代、缺失或插入的那些:140、181、182、183、184、195、206、212、243、260、269、304和476,使用WO 96/023873的SEQ ID NO:.2进行编号。更优选的变体是在选自181、182、183、和184的两个位置(如181和182、182和183、或位置183和184)中具有缺失的那些。SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、或SEQ ID NO:7的最优选的淀粉酶变体是在位置183和184中具有缺失并且在位置140、195、206、243、260、304、和476中的一个或多个位置处具有取代的那些。

[0368] 可以使用的其他淀粉酶是具有WO 08/153815的SEQ ID NO:2、WO 01/66712中的SEQ ID NO:10,或与WO 08/153815的SEQ ID NO:2具有90%序列同一性的其变体,或与WO 01/66712中的SEQ ID NO:10具有90%序列同一性的其变体的淀粉酶。WO 01/66712中的SEQ ID NO:10的优选的变体是在以下位置中的一个或多个处具有取代、缺失或插入的那些:176、177、178、179、190、201、207、211、和264。

[0369] 另外的合适的淀粉酶是具有WO 09/061380的SEQ ID NO:2的淀粉酶或与SEQ ID NO:2具有90%序列同一性的其变体。SEQ ID NO:2的优选的变体是在以下位置中的一个或多个处具有C-末端截短和/或取代、缺失或插入的那些:Q87、Q98、S125、N128、T131、T165、K178、R180、S181、T182、G183、M201、F202、N225、S243、N272、N282、Y305、R309、D319、Q320、Q359、K444、和G475。SEQ ID NO:2的更优选的变体是在以下位置中的一个或多个处具有取代的那些:Q87E,R、Q98R、S125A、N128C、T131I、T165I、K178L、T182G、M201L、F202Y、N225E,R、N272E,R、S243Q,A,E,D、Y305R、R309A、Q320R、Q359E、K444E、以及G475K,和/或在位置R180和/或S181或T182和/或G183中具有缺失的那些。SEQ ID NO:2的最优选的淀粉酶变体是具有以下取代的那些:

[0370] N128C+K178L+T182G+Y305R+G475K;

[0371] N128C+K178L+T182G+F202Y+Y305R+D319T+G475K;

[0372] S125A+N128C+K178L+T182G+Y305R+G475K;或

[0373] S125A+N128C+T131I+T165I+K178L+T182G+Y305R+G475K,其中这些变体是C-末端截短的,并且任选地进一步包含在位置243处的取代和/或在位置180和/或位置181处的缺失。

[0374] 其他合适的淀粉酶是具有WO 01/66712中的SEQ ID NO:12的α-淀粉酶或与SEQ ID NO:12具有至少90%序列同一性的变体。优选的淀粉酶变体是在WO01/66712中的SEQ ID NO:12的以下位置中的一个或多个处具有取代、缺失或插入的那些:R28、R118、N174;R181、G182、D183、G184、G186、W189、N195、M202、Y298、N299、K302、S303、N306、R310、N314;R320、H324、E345、Y396、R400、W439、R444、N445、K446、Q449、R458、N471、N484。特别优选的淀粉酶包括具有D183和G184的缺失并且具有取代R118K、N195F、R320K和R458K的变体,以及另外在选自下组的一个或多个位置处具有取代的变体:M9、G149、G182、G186、M202、T257、Y295、N299、M323、E345、和A339,最优选的是另外地在所有这些位置处具有取代的变体。

[0375] 其他实例是如描述于WO 2011/098531、WO 2013/001078和WO 2013/001087中的那些淀粉酶变体。

[0376] 可商购的淀粉酶包括Duramyl™、Termamyl™、Fungamyl™、Stainzyme™、Stainzyme Plus™、Natalase™、Liquozyme X和BAN™(来自诺维信公司),以及Rapidase™、Purastar™/Effectenz™、Powerase和Preferenz S100(来自杰能科国际有限公司/杜邦公司)。

[0377] 氨基己糖苷酶

[0378] 包含本发明的DNA酶的洗涤剂组合物还可以包括一种或多种氨基己糖苷酶。术语氨基己糖苷酶包括“分散蛋白”和缩写“Dsp”,其意指例如在生物膜中发现的具有氨基己糖苷酶活性的多肽,EC 3.2.1.-,其催化N-乙酰基-葡糖胺聚合物的β-1,6-糖苷键的水解。术语氨基己糖苷酶包括具有N-乙酰葡糖胺糖苷酶活性和β-N-乙酰葡糖胺糖苷酶活性的多肽。

[0379] 具有氨基己糖苷酶活性的多肽可以从任何属的微生物、特别地从细菌或真菌中获得。优选地,氨基己糖苷酶(例如分散蛋白)从土地芽孢杆菌属(Terribacillus)、短小杆菌属(Curtobacterium)、杆菌属(Aggregatibacter)、嗜血杆菌属(Haemophilus)、或放线杆菌属(Actinobacillus),优选地土地芽孢杆菌属(Actinobacillus)中获得。氨基己糖苷酶也可以是从这些或其他生物体中的任一种中获得的多肽的变体。

[0380] 合适的氨基己糖苷酶包括披露于WO 2017186936、WO 2017186937、WO 2017186943、WO 2017207770、WO 2018184873、WO 2019086520、WO 2019086528、WO 2019086530、WO 2019086532、WO 2019086521、WO 2019086526、WO 2020002604、WO 2020002608、WO 2020007863、WO 2020007875、WO 2020008024、WO 2020070063、WO 2020070249、WO 2020088957、WO 2020088958和WO 2020207944中的那些。

[0381] 过氧化物酶/氧化酶

[0382] 过氧化物酶可以是包括由国际生物化学与分子生物学联合会(IUBMB)命名委员会陈述的酶分类EC 1.11.1.7,或获得自其中的展示出过氧化物酶活性的任何片段。合适的过氧化物酶包括植物、细菌或真菌来源的那些。包括化学修饰的突变体或蛋白质工程化的突变体。有用的过氧化物酶的实例包括来自拟鬼伞属(Coprinopsis),例如来自灰盖拟鬼伞(C.cinerea)的过氧化物酶(EP 179,486),及其变体,如WO 93/24618、WO 95/10602以及WO 98/15257中所述的那些。过氧化物酶还可以包括卤代过氧化物酶,如氯过氧化物酶、溴过氧化物酶以及展示出氯过氧化物酶或溴过氧化物酶活性的化合物。根据其对卤素离子的特异性将卤代过氧化物酶进行分类。氯过氧化物酶(E.C.1.11.1.10)催化氯离子形成次氯酸盐。在一方面,卤代过氧化物酶是氯过氧化物酶。优选地,卤代过氧化物酶是钒卤代过氧化物酶,即含钒酸盐的卤代过氧化物酶。在优选的方法中,将含钒酸盐的卤代过氧化物酶与氯离子来源组合。已从许多不同真菌,特别是从暗色丝孢菌(dematiaceous hyphomycetes)真菌组中分离出了卤代过氧化物酶,如卡尔黑霉属(Caldariomyces)(例如,煤卡尔黑霉(C.fumago))、链格孢属(Alternaria)、弯孢属(Curvularia)(例如,疣枝弯孢(C.verruculosa)和不等弯孢(C.inaequalis))、内脐蠕孢属(Drechslera)、细基格孢属(Ulocladium)以及葡萄孢属(Botrytis)。还已从细菌如假单胞菌属(例如吡咯假单胞菌(P.pyrrocinia))和链霉菌属(例如,金色链霉菌(S.aureofaciens))中分离出了卤代过氧化物酶。在优选的方面,卤代过氧化物酶可来源于弯孢属物种,特别是疣枝弯孢(Curvularia verruculosa)或不等弯孢,如描述于WO 95/27046中的不等弯孢CBS102.42;或如描述于WO 97/04102中的疣枝弯孢CBS 147.63或疣枝弯孢CBS 444.70;或衍生自如描述于WO 01/79459中的哈特乐比内脐蠕孢(Drechslera hartlebii)、如描述于WO 01/79458中的盐沼小树状霉(Dendryphiella salina)、如描述于WO 01/79461中的Phaeotrichoconis crotalarie、或如描述于WO 01/79460中的Geniculosporium属物种。

[0383] 氧化酶包括由酶分类EC 1.10.3.2包括的任何漆酶、或获得自其中的展示出漆酶

活性的任何片段、或展示出类似活性的化合物,如儿茶酚氧化酶(EC 1.10.3.1)、邻-氨基苯酚氧化酶(EC 1.10.3.4)、或胆红素氧化酶(EC 1.3.3.5)。

[0384] 优选的漆酶是微生物来源的酶。这些酶可以从植物、细菌或真菌(包括丝状真菌和酵母)中获得。

[0385] 来自真菌的适合实例包括可源自以下的菌株的漆酶:芽孢杆菌属、脉孢菌属(例如,粗糙脉孢菌)、柄孢壳菌属、葡萄孢属、金钱菌属(Collybia)、层孔菌属(Fomes)、香菇属、侧耳属、栓菌属(例如,长绒毛栓菌和变色栓菌)、丝核菌属(例如,立枯丝核菌(R.solani))、拟鬼伞属(例如,灰盖拟鬼伞、毛头拟鬼伞(C.comatus)、弗瑞氏拟鬼伞(C.friesii)、和C.plicatilis)、小脆柄菇属(Psathyrella)(例如,白黄小脆柄菇(P.condelleana))、斑褶菇属(例如,蝶形斑褶菇(P.papilionaceus))、毁丝霉属(例如,嗜热毁丝霉)、Schytalidium(例如,S.thermophilum)、多孔菌属(例如,P.pinsitus)、射脉菌属(例如,射脉侧菌(P.radiata))(WO 92/01046)、或革盖菌属(例如,毛革盖菌(C.hirsutus))(JP 2238885)。

[0386] 来自细菌的合适的实例包括可衍生自芽孢杆菌属的菌株的漆酶。

[0387] 优选的是从拟鬼伞属或毁丝霉属获得的漆酶;从灰盖拟鬼伞获得的漆酶,如披露于WO 97/08325中;或来源于嗜热毁丝霉,如披露于WO 95/33836中。

[0388] 一种或多种洗涤剂酶可以通过添加含有一种或多种酶的单独的添加剂,或通过添加包含这些酶的组合添加剂而被包含于洗涤剂组合物中。本发明的洗涤剂添加剂,即单独的添加剂或组合的添加剂,可以配制成例如颗粒、液体、浆液等。优选的洗涤剂添加剂配制品是颗粒(无粉尘颗粒)、液体(稳定化液体)和浆液。

[0389] 无粉尘颗粒例如可以如在US 4,106,991和4,661,452中所披露地产生并且可以任选地通过本领域已知的方法包衣。蜡状包衣材料的实例是具有平均分子量为1000至20000的聚(环氧乙烷)产品(聚乙二醇,PEG);具有16至50个环氧乙烷单元的乙氧基化壬基酚;乙氧基化脂肪醇,其中该醇含有12至20个碳原子,并且其中存在15至80个环氧乙烷单元;脂肪醇;脂肪酸;以及脂肪酸的甘油单酯、和甘油二酯、和甘油三酯。适用于通过流化床技术应用的成膜包衣材料的实例在GB 1483591中给出。液体酶制剂可以例如通过根据已确立的方法添加多元醇(如丙二醇)、糖或糖醇、乳酸或硼酸而稳定化。受保护的酶可以根据EP 238,216中披露的方法来制备。

[0390] 分散剂

[0391] 本发明的洗涤剂组合物还可以含有分散剂。粉末洗涤剂可以包含分散剂。合适的水溶性有机材料包括均聚的或共聚的酸或其盐,其中聚羧酸包含被不多于两个碳原子彼此分开的至少两个羧基。合适的分散剂例如描述于Powdered Detergents[粉末洗涤剂],Surfactant science series[表面活性剂科学系列]第71卷,Marcel Dekker,Inc.[马塞尔德克尔公司]中。

[0392] 染料转移抑制剂

[0393] 本发明的清洁组合物还可以包括一种或多种染料转移抑制剂。合适的聚合物染料转移抑制剂包括但不限于聚乙烯吡咯烷酮聚合物、多胺N-氧化物聚合物、N-乙烯吡咯烷酮和N-乙烯基咪唑的共聚物、聚乙烯噁唑烷酮和聚乙烯基咪唑、或其混合物。当在主题组合物中存在时,染料转移抑制剂可以按该组合物的重量计以从约0.0001%至约10%、从约0.01%至约5%或甚至从约0.1%至约3%的水平存在。

[0394] 荧光增白剂

[0395] 优选地,洗涤剂组合物还可以含有另外的组分,这些组分可以给正在清洁的物品着色,如荧光增白剂或光学增亮剂。当存在时,增亮剂的水平优选为约0.01%至约0.5%。在本发明的组合物中可以使用合适的用于在衣物洗涤剂组合物中使用的任何荧光增白剂。最常用的荧光增白剂是属于以下类别的那些:二氨基芪-磺酸衍生物、二芳基吡唑啉衍生物和二苯基-联苯乙烯基衍生物。荧光增白剂的二氨基芪-磺酸衍生类型的实例包括以下的钠盐:4,4'-双-(2-二乙醇氨基-4-苯胺-s-三嗪-6-基氨基)芪-2,2'-二磺酸盐、4,4'-双-(2,4-二苯胺基-s-三嗪-6-基氨基)芪-2.2'-二磺酸盐、4,4'-双-(2-苯胺基-4-(N-甲基-N-2-羟基-乙基氨基)-s-三嗪-6-基氨基)芪-2,2'-二磺酸盐、4,4'-双-(4-苯基-1,2,3-三唑-2-基)芪-2,2'-二磺酸盐以及5-(2H-萘并[1,2-d][1,2,3]三唑-2-基)-2-[(E)-2-苯基乙烯基]苯磺酸钠。优选的荧光增白剂是可从汽巴-嘉基股份有限公司(Ciba-Geigy AG)(巴塞尔,瑞士)获得的Tinopal DMS和Tinopal CBS。Tinopal DMS是4,4'-双-(2-吗啉代-4-苯胺基-s-三嗪-6-基氨基)芪-2,2'-二磺酸盐的二钠盐。Tinopal CBS是2,2'-双-(苯基-苯乙烯基)-二磺酸盐的二钠盐。还优选的荧光增白剂是可商购的Parawhite KX,由印度孟买的派拉蒙矿物与化学品公司(Paramount Minerals and Chemicals)供应。Tinopal CBS-X是4.4'-双-(磺基苯乙烯基)-联苯基二钠盐,也称作二苯乙烯基联苯基二磺酸二钠盐。适合用于本发明中使用的其他荧光剂包括1-3-二芳基吡唑啉和7-氨烷基香豆素。

[0396] 合适的荧光增亮剂水平包括从约0.01、从0.05、从约0.1或甚至从约0.2wt%的较低水平至0.5或甚至0.75wt%的较高水平。

[0397] 污垢释放聚合物

[0398] 洗涤剂组合物还可以包括一种或多种污垢释放聚合物,这些聚合物帮助从织物(如棉和聚酯基的织物)去除污垢,从聚酯基的织物去除疏水性污垢。污垢释放聚合物可以例如是基于非离子型或阴离子型对苯二甲酸的聚合物、聚乙烯基己内酰胺和相关共聚物、乙烯基接枝共聚物、聚酯聚酰胺,参见例如Powdered Detergents[粉状洗涤剂],Surfactant science series[表面活性剂科学系列]第71卷,第7章,Marcel Dekker,Inc.[马塞尔·德克尔公司]。另一种类型的污垢释放聚合物是包含核芯结构和附接至该核芯结构的多个烷氧基化基团的两亲烷氧基化油脂清洁聚合物。核芯结构可以包含聚烷基亚胺结构或聚烷醇胺结构,如WO 2009/087523中详细所述的(通过引用特此并入)。而且,随机接枝共聚物是合适的污垢释放聚合物。合适的接枝共聚物更详细地描述于WO 2007/138054、WO 2006/108856以及WO 2006/113314中(通过引用特此并入)。其他污垢释放聚合物是取代的多糖结构,尤其是取代的纤维素结构,如修饰的纤维素衍生物,如EP 1867808或WO 2003/040279中所述的那些(二者都通过引用特此并入)。合适的纤维素聚合物包括纤维素、纤维素醚、纤维素酯、纤维素酰胺、及其混合物。合适的纤维素聚合物包括阴离子修饰的纤维素、非离子修饰的纤维素、阳离子修饰的纤维素、兼性离子修饰的纤维素、及其混合物。合适的纤维素聚合物包括甲基纤维素、羧甲基纤维素、乙基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、酯羧甲基纤维素、及其混合物。

[0399] 抗再沉积剂

[0400] 本发明的洗涤剂组合物还可以包括一种或多种抗再沉积剂,如羧甲基纤维素(CMC)、聚乙烯醇(PVA)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、聚氧乙烯和/或聚乙二醇(PEG)、丙烯酸的均

聚物、丙烯酸和马来酸的共聚物、和乙氧基化的聚乙烯亚胺。以上在污垢释放聚合物下所描述的基于纤维素的聚合物还可以作为抗再沉积剂起作用。

[0401] 流变改性剂

[0402] 本发明的洗涤剂组合物还可以包括一种或多种流变改性剂、结构剂或增稠剂，不同于降粘剂。流变改性剂选自由以下组成的组：非聚合物结晶、羟基功能材料、聚合物流变改性剂，它们为液体洗涤剂组合物的水性液体基质赋予剪切稀化特征。可以通过本领域已知的方法修饰和调整洗涤剂的流变学和粘度，例如，如在EP 2169040中所示。

[0403] 其他合适的辅助材料包括但不限于防缩剂、抗皱剂、杀细菌剂、黏合剂、载剂、染料、酶稳定剂、织物软化剂、填料、泡沫调节剂、水溶助剂、香料、颜料、抑泡剂、溶剂、以及用于液体洗涤剂的结构剂和/或结构弹力剂。

[0404] 其他材料

[0405] 还可以利用本领域已知的用于在本发明清洁组合物中使用的任何洗涤剂组分。其他任选的洗涤剂组分包括防腐蚀剂、防缩剂、抗污垢再沉积剂、抗皱剂、杀细菌剂、黏合剂、腐蚀抑制剂、崩解剂/崩解试剂、染料、酶稳定剂(包括原硼酸、硼酸盐、CMC、和/或多元醇，例如丙二醇)、织物调理剂(包括粘土)、填充剂/加工助剂、荧光增白剂/光学增亮剂、增泡剂、泡沫(泡)调节剂、香料、污垢悬浮剂、软化剂、抑泡剂、暗锈抑制剂、以及芯吸剂，单独或组合使用。可以利用本领域已知的用于在洗涤剂中使用的任何成分。这样的成分的选择完全在技术人员的技术范围内。

[0406] 洗涤剂产品的配制

[0407] 该洗涤剂组合物可以处于任何常规形式，例如棒，均匀的片剂，具有两个或更多个层的片剂，规则的或压缩的粉末，颗粒，膏，凝胶，或规则的、压缩的或浓缩的液体。其他洗涤剂配制品形式包括单个单位剂量形式，如分层的形式和袋。

[0408] 袋可以被配置为单一室或多室。它们可以具有适合保存该组合物的任何形式、形状和材料，例如在与水接触之前，不允许该组合物从袋中释放出来。该袋由水溶性膜制成，它包含了一个内部体积，该内部体积可以被分成室。优选的膜是聚合材料，优选地被成型为膜或薄片的聚合物。优选的聚合物、共聚物、或其衍生物选自聚丙烯酸酯和水溶性丙烯酸酯共聚物、甲基纤维素、羧甲基纤维素、糊精钠、乙基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、麦芽糖糊精、聚甲基丙烯酸酯，最优选地是聚乙烯醇共聚物、以及羟丙基甲基纤维素(HPMC)。优选地，聚合物在膜中的水平例如是至少约60％。优选的平均分子量将典型地是约20,000至约150,000。膜还可以是共混组合物，这些共混组合物包含可水解降解的且水溶性的聚合物共混物，如聚乳酸和聚乙烯醇加增塑剂，如甘油、乙二醇、丙二醇、山梨醇及其混合物。袋可以包含固体衣物清洁组合物或部分组分和/或液体清洁组合物或由水溶性膜分开的部分组分。用于液体组分的室在组成上可以与含有固体的室不同；参见例如US2009/0011970 A1。

[0409] 可以由水可溶的袋中的室或以片剂的不同层来将洗涤剂成分物理地彼此分开，从而避免组分间的不良的储存相互作用。在洗涤溶液中，每个室的不同溶解曲线还可以引起所选择的组分的延迟溶解。

[0410] 非单位剂量的液体或凝胶洗涤剂可以是水性的，典型地含有按重量计至少20％并且多达95％的水，如多达约70％的水、多达约65％的水、多达约55％的水、多达约45％的水、

或多达约35％的水。浓缩液体洗涤剂可以具有较低的水含量,例如不超过约30％或不超过约20％,例如在约1％至约20％的范围内,例如约2％至约15％。包括但不限于链烷醇、胺、二元醇、醚、以及多元醇的其他类型的液体可以被包括在水性液体或凝胶中。水性液体或凝胶洗涤剂可以含有从0％-30％的有机溶剂。液体或凝胶洗涤剂可以替代性地是非水性的。

[0411] 可以将液体洗涤剂组合物配制成具有例如约6至约10的温和pH,例如约pH 7、约pH 8或约pH 9,或可以将它们配制成具有例如约10至约12的更高的pH,如约pH 10、约pH 11或约pH 12。

[0412] 除非另有说明,否则如本文所用,术语“液体”应理解为涵盖液体洗涤剂组合物的任何类型,例如浓缩液体、凝胶、或例如具有一个或多个室的袋的液体或凝胶部分。

[0413] 颗粒洗涤剂配制品

[0414] 颗粒(粉末)洗涤剂中通常使用呈颗粒形式的酶,其包含含酶的核芯和任选的一个或多个包衣。用于制备核芯的各种方法在本领域中是众所周知的,并且包括例如a)喷雾干燥含液体酶的溶液,b)产生分层的产品,其中酶被包衣为围绕预形成的惰性核芯颗粒的层,例如使用流化床装置进行,c)将酶吸收到预形成的核芯的表面上和/或其中,d)挤出含酶的糊剂,e)将含酶的粉末悬浮在熔融蜡中并雾化以产生粒状产品,f)通过将含酶的液体添加到制粒组分的干粉末组合物中来进行混合制粒,g)通过研磨或粉碎较大的颗粒、小丸等对含酶的核芯进行粒度减小,以及h)流化床制粒。可以干燥含酶的核芯(例如使用流化床干燥器或用于在进料或酶工业中干燥颗粒的其他已知方法),导致典型地为0.1％-10％w/w水的含水量。

[0415] 含酶的核芯任选地提供有包衣以改善储存稳定性和/或减少粉尘形成。通常用于洗涤剂的酶颗粒的一种包衣是盐包衣,典型地是无机盐包衣,其可以是例如用流体床以盐的溶液施加的。可以使用的其他包衣材料是例如,聚乙二醇(PEG)、甲基羟基-丙基纤维素(MHPC)和聚乙烯醇(PVA)。颗粒可含有多于一个包衣,例如盐包衣,随后是如PEG、MHPC或PVA的材料的另外的包衣。

[0416] 有关酶颗粒及其制备的进一步的信息,参见WO 2013/007594、以及例如WO 2009/092699、EP 1705241、EP 1382668、WO 2007/001262、US 6,472,364、WO 2004/074419和WO 2009/102854。

[0417] 共颗粒中酶的配制

[0418] 该DNA酶可以被配制为颗粒,例如,配制为结合一种或多种酶的共颗粒。然后,每种酶将存在于多种颗粒中,这些颗粒确保酶在洗涤剂中的分布更均匀。这还减少了由于不同的粒度而导致的不同酶的物理隔离。用于生产针对洗涤剂工业的多酶共颗粒的方法披露于IP.com披露内容IPCOM000200739D中。

[0419] 使用共颗粒的酶的配制品的另一个实例披露于WO 2013/188331中,其涉及包含以下的洗涤剂组合物:(a)多酶共颗粒;(b)小于10wt沸石(无水的基础上);和(c)小于10wt磷酸盐(无水基底),其中所述酶共颗粒包含从10wt％至98wt％的水分汇组分,并且该组合物另外包含从20wt％至80wt％的洗涤剂水分汇组分。WO 2013/188331还涉及处理和/或清洁表面(优选地织物表面)的方法,该方法包括以下步骤:(i)使该表面在含水洗涤液中与如在本文要求保护的并且描述的洗涤剂组合物接触,(ii)冲洗和/或干燥该表面。

[0420] 液体配制品

[0421] 本发明还涉及包含本发明的DNA酶变体的液体组合物。该组合物可包含酶稳定剂(该酶稳定剂的实例包括多元醇(如丙二醇或甘油)、糖或糖醇、乳酸、可逆蛋白酶抑制剂、硼酸或硼酸衍生物如芳族硼酸酯、或苯基硼酸衍生物如4-甲酰基苯基硼酸)。

[0422] 在一些实施例中,包括填料或载剂材料以增加这样的组合物的体积。合适的填料或载剂材料包括但不限于硫酸盐、碳酸盐和硅酸盐的各种盐以及滑石、粘土等。用于液体组合物的合适的填料或载剂材料包括但不限于水或低分子量伯醇和仲醇(包括多元醇和二元醇)。这样的醇的实例包括但不限于甲醇、乙醇、丙醇和异丙醇。在一些实施例中,组合物含有从约5%至约90%的这样的材料。

[0423] 在一方面,液体配制品包含20%-80%w/w的多元醇。在一个实施例中,液体配制品包含0.001%-2%w/w防腐剂。

[0424] 在另一个实施例中,本发明涉及液体配制品,其包含:

[0425] (A)0.001%-25%w/w的本发明的变体;

[0426] (B)20%-80%w/w的多元醇;

[0427] (C)任选地0.001%-2%w/w防腐剂;以及

[0428] (D)水。

[0429] 在另一个实施例中,本发明涉及液体配制品,其包含:

[0430] (A)0.001%-25%w/w的本发明的变体;

[0431] (B)0.001%-2%w/w防腐剂;

[0432] (C)任选地20%-80%w/w的多元醇;以及

[0433] (D)水。

[0434] 在另一个实施例中,液体配制品包含一种或多种配制剂,如选自由以下组成的组的配制剂:多元醇、氯化钠、苯甲酸钠、山梨酸钾、硫酸钠、硫酸钾、硫酸镁、硫代硫酸钠、碳酸钙、柠檬酸钠、糊精、葡萄糖、蔗糖、山梨醇、乳糖、淀粉、PVA、乙酸盐和磷酸盐,优选地选自由以下组成的组:硫酸钠、糊精、纤维素、硫代硫酸钠、高岭土和碳酸钙。在一个实施例中,多元醇选自由以下组成的组:甘油、山梨醇、丙二醇(MPG)、乙二醇、二甘醇、三甘醇、1,2-丙二醇或1,3-丙二醇、二丙二醇、平均分子量低于约600的聚乙二醇(PEG)和平均分子量低于约600的聚丙二醇(PPG),更优选地选自由以下组成的组:甘油、山梨醇和丙二醇(MPG)或其任何组合。

[0435] 在另一个实施例中,液体配制品包含20%-80%多元醇(即多元醇的总量),例如25%-75%多元醇、30%-70%多元醇、35%-65%多元醇或40%-60%多元醇。在一个实施例中,液体配制品包含20%-80%多元醇,例如25%-75%多元醇、30%-70%多元醇、35%-65%多元醇或40%-60%多元醇,其中该多元醇选自由以下组成的组:甘油、山梨醇、丙二醇(MPG)、乙二醇、二甘醇、三甘醇、1,2-丙二醇或1,3-丙二醇、二丙二醇、平均分子量低于约600的聚乙二醇(PEG)和平均分子量低于约600的聚丙二醇(PPG)。在一个实施例中,液体配制品包含20%-80%多元醇(即多元醇的总量),例如25%-75%多元醇、30%-70%多元醇、35%-65%多元醇或40%-60%多元醇,其中该多元醇选自由以下组成的组:甘油、山梨醇和丙二醇(MPG)。

[0436] 在另一个实施例中,防腐剂选自由以下组成的组:山梨酸钠、山梨酸钾、苯甲酸钠和苯甲酸钾或其任何组合。在一个实施例中,液体配制品包含0.02%-1.5%w/w防腐剂,例

如0.05％-1％w/w防腐剂或0.1％-0.5％w/w防腐剂。在一个实施例中,液体配制品包含0.001％-2％w/w防腐剂(即防腐剂的总量),例如0.02％-1.5％w/w防腐剂、0.05％-1％w/w防腐剂或0.1％-0.5％w/w防腐剂,其中该防腐剂选自由以下组成的组:山梨酸钠、山梨酸钾、苯甲酸钠和苯甲酸钾或其任何组合。

[0437] 在另一个实施例中,液体配制品进一步包含一种或多种另外的酶,例如如上所述。

[0438] DNA酶变体的用途

[0439] 本发明的DNA酶变体适用于在清洁过程(如洗衣或硬表面清洁)中使用,特别地用于洗衣。因此,本发明的一个方面涉及用于洗涤物品的方法,其中该物品是纺织品,该方法包括:

[0440] a)将物品暴露于包含本发明的DNA酶变体的洗涤液;

[0441] b)完成至少一个洗涤循环;以及任选地

[0442] c)冲洗该物品。

[0443] 液体洗涤液溶液的pH典型地在约5.5至约10的范围内,更典型地在约7至约9的范围内,例如在约7至约8.5或约7至约8的范围内。

[0444] 洗涤液可以具有在5℃至95℃范围内、或在10℃至80℃范围内、在10℃至70℃范围内、在10℃至60℃范围内、在10℃至50℃范围内、在15℃至40℃范围内或在20℃至30℃范围内的温度。

[0445] 洗涤液中DNA酶变体酶的浓度典型地在0.0001mg/l至10mg/l酶蛋白、0.0002mg/l至10mg/l、0.001mg/l至10mg/l、0.002mg/l至10mg/l、0.01mg/l至10mg/l、0.02mg/l至10mg/l、0.1mg/l至10mg/l、0.2mg/l至10mg/l或0.2mg/l至5mg/l的范围内。

[0446] 当使用物品(像T恤或运动衣)时,物品被暴露于来自使用者的身体和来自物品处于的使用环境中的其余部分的细菌。即使在洗涤该物品后,这能够引起物品上的恶臭。因此,本发明还涉及用于去除或减少纺织品上恶臭的方法。该恶臭可能由产生具有令人不愉快的气味的化合物的细菌引起。这样的具有令人不愉快的气味的化合物的一个实例是E-2-壬烯醛。恶臭可以存在于新洗的仍然是湿的纺织品上,或者恶臭可以存在于新洗的基本上已经干了的纺织品上。恶臭还可以存在于洗涤后已经储存了一段时间的纺织品上。因此,本发明还涉及本发明的DNA酶变体用于减少或去除来自湿或干纺织品的恶臭(如E-2-壬烯醛)的用途。

[0447] 在一个实施例中,与亲本或参考DNA酶(如SEQ ID NO:1)相比,本发明的DNA酶变体具有改善的恶臭去除特性,其中如测定II中所述对恶臭进行测量。

[0448] 通过以下实例进一步描述本发明,这些实例不应理解为对本发明的范围进行限制。

[0449] 实例

[0450] 测定和洗涤剂组合物

[0451] 标准洗涤剂A2(液体)

[0452] 成分:12％ LAS、12％ AEO、4％ AEOS/SLES、2％ MPG(单丙二醇)、3％乙醇、2％TEA、3％皂、0.5％ NaOH、3.9％柠檬酸钠、1.5％ DTMPANa7、0.5％苯氧乙醇、和水至100％(所有的百分比为w/w);用NaOH将pH调节至8.4

[0453] 测定I:DNA酶活性的测试

[0454] 可以在具有甲基绿(BD公司,富兰克林湖(Franklin Lakes),新泽西州(NJ),美国)的DNA酶测试琼脂上确定DNA酶活性,其根据供应商的手册制备。简言之,将21g琼脂溶解于500ml水中,并且然后在121℃下高压灭菌15min。将高压灭菌的琼脂在水浴中调温至48℃,并且将20ml的琼脂倒入皮氏培养皿并允许在室温下通过孵育过夜来固化。在固化的琼脂板上,添加5μl的酶溶液,并且DNA酶活性被观察为斑点酶溶液周围的无色区域。

[0455] 测定II:使用电子鼻分析纺织品上的E-2-壬烯醛。

[0456] 测试纺织品上恶臭的存在的一种方式是通过使用作为恶臭的标记的E-2-壬烯醛,因为该化合物引起衣物上的恶臭。将E-2-壬烯醛的溶液添加至5cm x 5cm纺织品小块布样上,并将该小块布样放入20mL玻璃小瓶中用于气相色谱(GC)分析,并且将该小瓶加盖。在40℃孵育20分钟后,在来自法国阿尔法莫斯公司(Alpha M.O.S.)的Heracles II电子鼻(具有2个FID的双柱气相色谱仪,柱1:MXT5并且柱2:MXT1701)中分析来自加盖小瓶的5mL顶空。

[0457] 方法

[0458] 核苷酸的PCR、克隆、连接等的一般方法是本领域技术人员熟知的,并且可以例如在以下文献中发现:“Molecular cloning:Alaboratory manual[分子克隆:实验室手册]”,Sambrook等人(1989),Cold Spring Harbor lab.[冷泉港实验室],冷泉港,纽约州;Ausubel,F.M.等人(编辑);“Current protocols in Molecular Biology[分子生物学现代方法]”,John Wiley and Sons[约翰威利父子出版公司],(1995);Harwood,C.R.和Cutting,S.M.(编辑);“DNACloning:APractical Approach,Volumes I and II[DNA克隆:实用方法,第I和II卷]”,D.N.Glover编辑(1985);“Oligonucleotide Synthesis[寡核苷酸合成]”,M.J.Gait编辑(1984);“Nucleic Acid Hybridization[核酸杂交]”,B.D.Hames和S.J.Higgins编辑(1985);“APractical Guide To Molecular Cloning[分子克隆实用指南]”,B.Perbal,(1984)。

[0459] 实例1:DNA酶变体的制备和初始筛选

[0460] 使用含有所希望的新突变的特异性引物生成SEQ ID NO:1的DNA酶的定点变体。所选择的新的密码子是米曲霉中特定氨基酸的天然丰度最高的密码子。使用PCR制备转化底物:

[0461] 1)相对于突变位点,分别扩增N-末端片段和C-末端片段。

[0462] 使用通用正向引物和位置特异性反向引物扩增N-末端片段。使用突变特异性正向引物和通用反向引物扩增C-末端片段。两种通用引物都与曲霉属基因组中同源整合所必需的序列互补。

[0463] 2)在细胞中通过体内重组组装N-末端片段和C-末端片段。

[0464] 将所得转化底物转化到米曲霉中,并且通过在作为唯一氮源的硝酸盐上生长来选择转化体。将每种类型的三个单菌落挑取到微量滴定板中,并在30℃下在对曲霉属特异的肉汤中生长4天。

[0465] 将上清液用于初始稳定性筛选。基于初始筛选,将目的取代组合为含有多个取代的新变体,如下所述对这些变体进行纯化并进行进一步稳定性测试。

[0466] 实例2:DNA酶变体的纯化

[0467] 通过CaptoMMC如下进行与SEQ ID NO:1相比含有多个取代的米曲霉DNA酶培养上清液的纯化:将培养液通过Nalgene 0.2μm过滤单元过滤以去除宿主细胞。将过滤的上清液

上样到25mL CaptoMMC柱(思拓凡公司(Cytiva)),该柱在20mM MES(2-(N-吗啉代)乙磺酸),pH 6.0中平衡。使用20mM MES,pH 6.0缓冲液作为稀释剂,以1:3在线稀释上样上清液。将柱用20mM MES,pH 6.0洗涤,然后用至100%50mM Tris、1M NaCl,pH 9.0的分步梯度洗脱,保持五个柱体积。将级分通过SDS-PAGE分析,并根据纯度合并,以用作纯化的酶制剂用于进一步实验。

[0468] 实例3:通过nDSF确定纯化的DNA酶变体的解链温度(Tm)

[0469] 将纯化的DNA酶变体用0.01% Triton X-100稀释至0.6mg/ml,由280nm处的吸光度计算浓度。将40μl稀释的样品与40μl缓冲液(0.2M Hepes、20mM $MgCl_2$,pH 8.5)或40μl 20%标准洗涤剂A2混合。

[0470] 使用Prometheus NT.48或NT.Plex仪器(NanoTemper技术股份有限公司(NanoTemper Technologies GmbH),德国),通过差示扫描荧光法(nanoDSF或nDSF)估计纯化的DNA酶变体的热稳定性,该差示扫描荧光法测量由于温度增加(20℃-95℃,升温速率3.3℃/min)时的解折叠而引起的固有色氨酸和酪氨酸荧光的变化。使用一阶导数和二阶导数由解链曲线中的拐点计算解链温度。通常一式三份测试变体。

[0471] 实例4:纯化的DNA酶变体的储存稳定性测定

[0472] 使用加速储存稳定性测定确定与SEQ ID NO:1相比具有多个取代的本发明纯化的DNA酶变体的储存稳定性,其中将这些变体在40℃或45℃的升高的温度下在洗涤剂组合物中储存7天。在不同孵育时间后确定残留的DNA酶活性,并将结果与在相同温度下储存的SEQ ID NO:1的野生型DNA酶的结果进行比较。

[0473] 将纯化的DNA酶变体用0.01% Triton X-100稀释至最终反应中浓度范围从10ppm至150ppm,由280nm处的吸光度计算酶浓度。将15μl稀释的DNA酶样品与285μl浓缩的标准洗涤剂A2和0.5%的蛋白酶(Progress Uno101L,诺维信公司)混合,并且使用磁力棒添加到微量滴定板(洗涤剂板,Nunc U96 PP 0.5ml)的孔中。混合后,将洗涤剂板在40℃或45℃下在Biosan PST-100HL热混合器中孵育。

[0474] 在不同孵育时间(例如0、3、24、96和168小时)后,测量残留的DNA酶活性。将来自洗涤剂板的5μl与195μl DNA底物溶液(3.3mg DNA(西格玛公司(Sigma)D1626),在50mM Tris pH 7、20mM $MgCl_2$、20mM $CaCl_2$、1.3mM EDTA中)混合。用Hamilton Microlab STAR在吸液期间使用压力传感测量粘度,每分钟一次,持续30分钟,并且由测量的粘度降低计算活性。在两种不同酶浓度中的每一种下一式两份测试每种变体。

[0475] 在用洗涤剂孵育期间的活性下降被假定为指数式的。从Log(活性)对孵育时间的线性回归发现半衰期(T1/2),并且将半衰期改善因子(HIF或T1/2IF)计算为DNA酶变体的半衰期相对于参考(在这种情况下是SEQ ID NO:1的DNA酶)的半衰期。将在40℃或45℃下测定的变体与在相同温度下测定的SEQ ID NO:1的DNA酶进行比较,其中SEQ ID NO:1的DNA酶的HIF值定义为1。

[0476] 实例5:解链温度和储存稳定性结果

[0477] 下表1和2提供了如上所述确定的本发明DNA酶变体的解链温度(Tm)和半衰期改善因子(HIF)的结果。在表1中,提供了如实例3中所述的在缓冲液和标准洗涤剂A2两者中通过nDSF确定的解链温度(Tm)的数据。在表2中,提供了如实例4中所述的在指定温度下在标准洗涤剂A2中确定的与SEQ ID NO:1的DNA酶相比的半衰期改善因子(HIF)的数据。

[0478] 表1:SEQ ID NO:1的变体的解链温度(Tm)

与 SEQ ID NO: 1 相比的取代	Tm 缓冲液	Tm 标准洗涤剂 A2
野生型（SEQ ID NO: 1）	76.0	64.0
D32E V35I A111P	80.7	70.2
D32E V35I Q102E A111P	82.7	73.6
D32E V35I A111P S115T	83.9	74.9
D32E V35I Q85E A111P	81.4	72.6
D32E V35I A111P N214D	80.9	72.6
K18Q D32E V35I A111P	81.4	72.2
D32E V35I A111P G199E	80.7	
D32E V35I D72V A111P	82.0	
S69V K86E Q102E S115T K147N K155E A172D K192A Q208V	79.9	70.4
[0479] S69V K86E Q102E K105T K147N K155E A172D K192A Q208V	78.9	70.9
S69V K86E Q102E K105D K147N K155E A172D K192A Q208V	79.8	72.0
S69V K86E Q102E K147N K155E A172D G181N K192A Q208V	78.1	69.0
G20C K30C D32E V35I A111P	77.5	67.2
S69V Q102E Q157E T159Q G181N	80.8	70.2
A101E K105N N146H V148I N214D Y218E	77.1	71.3
D32E V35I A111P K147N	79.9	68.5
S26H D32E V35I A111P	80.5	69.1
D32E V35I S69E A111P	81.4	70.6
D32E V35I K105D A111P S115T	85.8	71.9
D32E V35I A101E K105T A111P G181N	84.6	74.6
D32E V35I K105N A111P G181N S182Y	83.5	72.4
S69V K86E Q102E F112W K147N K155E A172D	82.1	73.6

[0480]

与 SEQ ID NO: 1 相比的取代	Tm 缓冲液	Tm 标准洗涤剂 A2
K192A Q208V		
S69V K86E Q102E G136E K147N K155E A172D K192A Q208V	82.3	72.7
A101E A111P Q150E Q208V	82.3	68.2
S69V Q102E A111P Q157E T159Q A172E	82.1	70.0
S69V Q102E S115T Q157E T159Q A172E	82.2	69.9
D32E V35I K105T A111P G181N	82.3	68.1
D32E V35I A101E K105N A111P	82.4	68.1
S26H S69V Q102E A111P Q157E T159Q A172E	82.7	70.2
D32E V35I S69V Q102E A111P Q157E T159Q A172E	82.4	70.3
S69V Q102E K105N A111P S115T Q150E G161R A172D G181N V187N K192I	91.4	80.9
D32P S69V Q102E K105N A111P S115T Q150E G161R G181N V187N K192I	91.0	76.7
S69V Q102E K105N A111P S115T Q150E K160T G161R G181N V187N K192I	89.6	80.3
K65Q S69V Q102E K105N A111P S115T Q150E G161R G181N V187N K192I	90.9	80.9
S69V Q102E K105N A111P S115T V138M Q150E G161R G181N V187N K192I	87.3	74.6
S26H D32E V35I A111P K155L	79.0	67.4
D32E V35I K82G A111P G181N S182V	79.3	63.3
D32E V35I N77E A111P G181N S182V	78.2	63.1
K18S D32E V35I Q102E K105E A111P	82.8	70.5
T19P D32E V35I Q102E K105E A111P	82.0	66.3
K67A S69V Q102E K147N Q157E T159Q A172E	82.1	71.3

[0481]

与 SEQ ID NO: 1 相比的取代	Tm 缓冲液	Tm 标准洗涤剂 A2
D197S		
S69V Q102E V138A S144R Q157E T159Q A172E G181N	79.6	64.7
S69V Q102E K105N A111P S115T Q150E G161R G181N V187N K192I	90.6	75.2
E6D A101E Q150E G181N Q208V	80.2	70.5
S69V Q102E K105N A111P S115T G137R Q150E G161R G181N V187N K192I	90.1	75.7
D32E V35I S69V K86E Q102E K105N A111P S115T V127T G137R K147N Q150E K155E T159Q G161R A172D G181N V187N K192A Q208V N217A	89.8	78.8
D32E V35I S69V K86E Q102E K105N A111P S115T K147N Q150E K155E T159Q G161R A172D G181N V187N K192A Q208V N217A	86.3	79.8
D32E V35I A111P N140H	80.0	69.5
D32E V35I A111P G181N S182V K185E	81.6	69.9
D32E E34N V35I K86E A111P G181N	78.7	67.6
D32E V35I K67A S69R A111P G181N K212E	84.4	69.1
D32E V35I K67A A111P P175N S182V	80.9	64.4
D32E V35I K67A A111P G181N A206G Q208V	84.5	69.9
D32E V35I A101E Q102E A111P G181N	81.8	68.5
D32E V35I S69V K86E Q102E A111P K147N K155E T159Q A172D K178S G181N K192A Q208V N217A	80.0	68.6
D32E V35I K65Q S69V K86E Q102E A111P K147N K155E T159Q A172D G181N K192A Q208V N217A	80.0	70.5
D32E V35I S69V K86E Q102E A111P K155E T159Q A172D G181N K192A Q208V N217A	79.8	69.0

[0482]

与 SEQ ID NO: 1 相比的取代	Tm 缓冲液	Tm 标准洗涤剂 A2
D32E V35I S69V K86E Q102E A111P K147N K155E T159Q A172D G181N K192A Q208V N217A	79.9	68.8
S69V Q102E K105N A111P S115T G161R G181N V187N K192I	89.3	73.0
S69A Q102E K105N A111P S115T Q150E G161R G181N V187N K192I	91.0	76.0
S69V D72S Q102E K105N A111P S115T Q150E G161R G181N V187N K192I	89.6	74.0
N4K D32E V35I S98R K105N A111P G181N S182Y K212E	83.7	70.4
D32E V35I S98R A111P G181N S182Y	81.7	66.8
D32E V35I S98R K105N A111P Q158D G181N S182Y	83.7	69.9
D32E V35I S69E S98R K105N A111P G181N S182Y	85.2	72.6
K18S D32E V35I S98R K105N A111P G181N S182Y	83.6	69.9
D32E V35I S98R A101T K105N A111P G181N S182Y	84.2	70.1
D32E V35I S98R K105N A111P G181N S182Y D189N N214D	84.2	70.1
D32E V35I S98R K105N A111P K147N G181N S182Y	83.5	69.6
V12L D32E V35I S98R K105N A111P G181N S182Y	83.9	69.7
D32E V35I S98R K105N A111P G181N S182Y Q208V	83.8	71.4
D32P S69V Q102E K105D A111P S115T Q150E G161R G181N V187N K192I	91.6	77.4
D32E V35I K67A A101E K105D A111P N217A	84.8	72.7

[0483]

与 SEQ ID NO: 1 相比的取代	Tm 缓冲液	Tm 标准洗涤剂 A2
D32E V35I K65E A101E K105T A111P N217A	82.8	72.9
D32E V35I A101T K105N A111P K147E G181N S182Y	82.4	72.1
D32E V35I S69E K105N A111P K147E G181N S182Y	83.9	75.9
D32E V35I K65E K105N A111P G181N S182Y K212E	84.1	74.3
D32E V35I K67A K105N A111P G181N S182Y K212E	85.6	73.3
D32E V35I K65E K67A K105N A111P G181N S182Y	87.2	78.3
D32E V35I A101T K105N A111P G181N S182Y N214D	83.3	71.1
T19P D32E V35I A101E K105T A111P K160A G181N	82.6	71.5
T19P D32E V35I A101E K105T A111P K178S G181N	83.4	70.6
K18S T19P D32E V35I A101E K105T A111P G181N	83.1	69.9
K18S D32E V35I A101E K105T A111P G181N K212E	84.0	72.8
D32E V35I A101E K105T A111P G181N K212E N214D	83.8	71.5
D32P S69V Q102E K105N A111P S115T N146H Q150E G161R G181N V187N K192I	90.8	75.4
D32P S69V Q102E K105N A111P S115T S134H Q150E G161R G181N V187N K192I	90.3	72.7
S26H S69V Q102E A111P K147N A149S Q150E Q157E T159Q A172E	83.9	74.0
S26H S69V Q102E A111P N146H Q150E Q157E	83.0	71.2

[0484]

与 SEQ ID NO: 1 相比的取代	Tm 缓冲液	Tm 标准洗涤剂 A2
T159Q A172E		
D32P S69A Q102E K105N A111P S115T N146H Q150E G161R G181N K192I	91.4	77.5
D32E V35I K53F K105N A111P G181N S182Y K212E	83.6	72.6
K18Q D32E V35I K105E A111P K155F	80.5	67.6
D32E V35I A101E K105T A111P G181N K212E Y218E	81.5	70.0
D32E V35I K82T A101E K105T A111P G181N K212E	83.8	72.4
D32E V35I A111P K147N K204L	79.8	70.2
D32E V35I A111P K185I K215T	79.2	69.3
K18F D32E V35I A111P K185Q	79.8	68.7
D32E V35I A111P K204L K215I	79.6	69.4
D32E V35I K67A A111P K204G	82.3	70.1
D32E V35I A111P K178M K212T	79.5	68.7
D32E V35I K67A K105T A111P K185G K212M	83.3	71.0
D32E V35I K67A K105T A111P K147N K190N	83.8	72.7
D32E V35I K67A K105T A111P K178L K185T	82.6	72.1
D32E V35I K67A K105T A111P K190V K204G	83.7	70.6
K18M D32E V35I K67A K105T A111P K178S	83.2	71.2
K18Q D32E V35I K67A K105T A111P K215V	83.0	70.4
S26H D32P S69V Q102E K105N A111P S115T N146H Q150E G161R G181N V187N K192I	90.9	78.7
D32P S69V Q102E K105N A111P S115T T120H N146H Q150E G161R G181N V187N K192I	90.5	78.7
D32P Q102E K105N A111P S115T Q150E G161R	90.5	77.2

[0485]

与 SEQ ID NO: 1 相比的取代	Tm 缓冲液	Tm 标准洗涤剂 A2
G181N V187N K192I		
D32P S69V Q102E K105N A111P S115T Q150E Q157E G181N V187N K192I	90.8	82.6
D32E V35I K67A S69V K105T A111P Q157E G181N A206G Q208V	87.4	75.7
D32E V35I K105T A111P G181N K204W K215L	83.0	72.4
D32E V35I K105T A111P G181N K185L K192V K204W	83.5	72.7
D32E V35I K105T A111P K178L G181N K212T	83.0	72.1
S26H D32E V35I K67A S69R A111P G181N K212E	85.1	73.0
D32E V35I K67A A111P Q157E G181N Q208V	85.0	72.8
D32E V35I K67A A111P Q157E A172E G181N A206G Q208V	85.1	71.4
K18S D32E V35I K67A K105T A111P K185L K192F	83.9	76.6
K18S D32E V35I A111P K178S K212L	79.5	69.4
D32E V35I K67A A111P Q157E T159Q G181N A206G Q208V	84.4	70.8
K18S D32E V35I A111P K185I K215T	79.0	69.5

[0486] 表2:SEQ ID NO:1的变体的储存稳定性(半衰期改善因子,HIF)

[0487]

与 SEQ ID NO: 1 相比的取代	HIF 平均值	应力温度°C
野生型（SEQ ID NO: 1）	1.0	40/45
D32E V35I A111P	2.0	40
D32E V35I Q102E A111P	1.6	40
D32E V35I A111P S115T	1.5	40
D32E V35I Q85E A111P	1.5	40

[0488]

与 SEQ ID NO: 1 相比的取代	HIF 平均值	应力温度°C
D32E V35I A111P N214D	1.4	40
K18Q D32E V35I A111P	1.4	40
D32E V35I A111P G199E	1.4	40
D32E V35I D72V A111P	2.4	40
G20C K30C D32E V35I A111P	1.4	40
D32E V35I A111P K147N	1.8	40
S26H D32E V35I A111P	3.4	40
D32E V35I S69E A111P	2.8	40
D32E V35I K105D A111P S115T	1.6	40
D32E V35I A101E K105T A111P G181N	2.3	40
D32E V35I K105N A111P G181N S182Y	2.2	40
A101E A111P Q150E Q208V	1.3	40
S69V Q102E A111P Q157E T159Q A172E	1.3	40
D32E V35I A101E K105E A111P S182V	1.7	40
D32E V35I K67A K105T A111P	3.8	40
D32E V35I K105T A111P G181N	2.9	40
D32E V35I A101E K105N A111P	1.9	40
S26H S69V Q102E A111P Q157E T159Q A172E	2.3	45
D32E V35I S69V Q102E A111P Q157E T159Q A172E	1.2	40
S26H D32E V35I A111P K155L	1.2	40
D32E V35I K82G A111P G181N S182V	2.3	40
D32E V35I N77E A111P G181N S182V	2.5	40
K18S D32E V35I Q102E K105E A111P	1.7	40
T19P D32E V35I Q102E K105E A111P	2.2	40
K67A S69V Q102E K147N Q157E T159Q A172E D197S	1.2	40
S69V Q102E V138A S144R Q157E T159Q A172E G181N	1.6	40

[0489]

与 SEQ ID NO: 1 相比的取代	HIF 平均值	应力温度°C
S69V Q102E K105N A111P S115T Q150E G161R G181N V187N K192I	3.6	40
S69V Q102E K105N A111P S115T G137R Q150E G161R G181N V187N K192I	3.5	40
D32E V35I A111P N140H	2.6	40
D32E V35I A111P G181N S182V K185E	2.1	40
D32E E34N V35I K86E A111P G181N	1.6	40
D32E V35I K67A S69R A111P G181N K212E	3.1	40
D32E V35I K67A A111P P175N S182V	2.9	40
D32E V35I K67A A111P G181N A206G Q208V	3.0	40
D32E V35I A101E Q102E A111P G181N	1.7	40
S69V Q102E K105N A111P S115T G161R G181N V187N K192I	4.8	45
S69A Q102E K105N A111P S115T Q150E G161R G181N V187N K192I	5.2	40
S69V D72S Q102E K105N A111P S115T Q150E G161R G181N V187N K192I	4.3	40
N4K D32E V35I S98R K105N A111P G181N S182Y K212E	2.5	40
D32E V35I S98R A111P G181N S182Y	2.3	40
D32E V35I S98R K105N A111P Q158D G181N S182Y	2.4	40
D32E V35I S69E S98R K105N A111P G181N S182Y	2.4	40
K18S D32E V35I S98R K105N A111P G181N S182Y	2.1	40
D32E V35I S98R A101T K105N A111P G181N S182Y	2.5	40
D32E V35I S98R K105N A111P G181N S182Y D189N N214D	2.4	40
D32E V35I S98R K105N A111P K147N G181N S182Y	2.4	40
V12L D32E V35I S98R K105N A111P G181N S182Y	2.3	40

[0490]

与 SEQ ID NO: 1 相比的取代	HIF 平均值	应力温度°C
D32E V35I S98R K105N A111P G181N S182Y Q208V	2.4	40
D32P S69V Q102E K105D A111P S115T Q150E G161R G181N V187N K192I	1.5	45
D32E V35I K67A A101E K105D A111P N217A	2.6	45
D32E V35I K65E A101E K105T A111P N217A	1.8	45
D32E V35I A101T K105N A111P K147E G181N S182Y	2.4	45
D32E V35I S69E K105N A111P K147E G181N S182Y	2.5	45
D32E V35I K65E K105N A111P G181N S182Y K212E	2.5	45
D32E V35I K67A K105N A111P G181N S182Y K212E	3.2	45
D32E V35I K65E K67A K105N A111P G181N S182Y	3.1	45
D32E V35I A101T K105N A111P G181N S182Y N214D	2.7	45
T19P D32E V35I A101E K105T A111P K160A G181N	1.2	45
T19P D32E V35I A101E K105T A111P K178S G181N	2.1	45
K18S T19P D32E V35I A101E K105T A111P G181N	1.9	45
K18S D32E V35I A101E K105T A111P G181N K212E	1.9	45
D32E V35I A101E K105T A111P G181N K212E N214D	2.3	45
D32P S69V Q102E K105N A111P S115T N146H Q150E G161R G181N V187N K192I	4.5	45
S26H S69V Q102E A111P K147N A149S Q150E Q157E T159Q A172E	3.5	45
S26H S69V Q102E A111P N146H Q150E Q157E T159Q A172E	1.8	45
D32P S69A Q102E K105N A111P S115T N146H Q150E G161R G181N K192I	4.5	45
D32E V35I K53F K105N A111P G181N S182Y K212E	2.7	45
K18Q D32E V35I K105E A111P K155F	1.2	45
D32E V35I A101E K105T A111P G181N K212E Y218E	2.2	45
D32E V35I K82T A101E K105T A111P G181N K212E	2.3	45

[0491]

与 SEQ ID NO: 1 相比的取代	HIF 平均值	应力温度°C
D32E V35I A111P K147N K204L	2.2	45
D32E V35I A111P K185I K215T	2.3	45
K18F D32E V35I A111P K185Q	1.2	45
D32E V35I A111P K204L K215I	2.1	45
D32E V35I K67A A111P K204G	2.8	45
D32E V35I A111P K178M K212T	2.1	45
D32E V35I K67A K105T A111P K185G K212M	2.8	45
D32E V35I K67A K105T A111P K147N K190N	2.8	45
D32E V35I K67A K105T A111P K178L K185T	4.6	45
D32E V35I K67A K105T A111P K190V K204G	3.0	45
K18M D32E V35I K67A K105T A111P K178S	1.8	45
K18Q D32E V35I K67A K105T A111P K215V	2.0	45
S26H D32P S69V Q102E K105N A111P S115T N146H Q150E G161R G181N V187N K192I	4.8	45
D32P S69V Q102E K105N A111P S115T T120H N146H Q150E G161R G181N V187N K192I	5.2	45
D32P Q102E K105N A111P S115T Q150E G161R G181N V187N K192I	5.1	45
D32P S69V Q102E K105N A111P S115T Q150E Q157E G181N V187N K192I	3.8	45
D32E V35I K67A S69V K105T A111P Q157E G181N A206G Q208V	4.6	45
D32E V35I K105T A111P G181N K204W K215L	2.3	45
D32E V35I K105T A111P G181N K185L K192V K204W	2.9	45
D32E V35I K105T A111P K178L G181N K212T	2.8	45
S26H D32E V35I K67A S69R A111P G181N K212E	5.8	45
D32E V35I K67A A111P Q157E G181N Q208V	4.4	45

[0492]

与 SEQ ID NO: 1 相比的取代	HIF 平均值	应力温度°C
D32E V35I K67A A111P Q157E A172E G181N A206G Q208V	4.0	45
K18S D32E V35I K67A K105T A111P K185L K192F	2.5	45
K18S D32E V35I A111P K178S K212L	1.9	45
D32E V35I K67A A111P Q157E T159Q G181N A206G Q208V	2.7	45
K18S D32E V35I A111P K185I K215T	2.1	45

[0493] 本文描述和要求保护的本发明不限于本文披露的特定方面的范围,因为这些方面旨在作为本发明几个方面的说明。任何等同方面旨在处于本发明的范围之内。实际上,除了本文所示和描述的那些之外,本发明的各种修改因前述描述而对本领域的技术人员变得显而易见。这样的修改也旨在落入所附权利要求书的范围内。在冲突的情况下,以包括定义的本披露为准。

[0494] 通过以下编号的段落进一步定义本发明:

[0495] 1.一种DNA酶变体,该DNA酶变体在选自由以下组成的组的位置处包含至少两个取代,如至少三个取代:111、32、35、69、102、105和181,其中位置编号基于SEQ ID NO:1的编号,其中该变体与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的多肽具有至少60%但小于100%的序列同一性,并且其中该变体具有DNA酶活性。

[0496] 2.一种DNA酶变体,该DNA酶变体在选自由以下组成的组的位置处包含三个或更多个取代:26、32、35、65、67、69、98、102、105、111、115、150、157、159、161、172、181、182、185、187、192、206、208和212,其中位置编号基于SEQ ID NO:1的编号,其中该变体与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的多肽具有至少60%但小于100%的序列同一性,并且其中该变体具有DNA酶活性。

[0497] 3.一种DNA酶变体,该DNA酶变体包含选自由以下组成的组的三个或更多个取代:S26H、D32E、V35I、K65E、K67A、S69E、S69V、S98R、Q102E、K105N、A111P、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、G181N、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V和K212E,其中位置编号基于SEQ ID NO:1的编号,其中该变体与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的多肽具有至少60%但小于100%的序列同一性,并且其中该变体具有DNA酶活性。

[0498] 4.一种DNA酶变体,该DNA酶变体包含选自由以下组成的组的至少两个取代,如至少三个取代:A111P、D32E、V35I、S69V、Q102E、K105N和G181N,其中位置编号基于SEQ ID NO:1的编号,其中该变体与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的多肽具有至少60%但小于100%的序列同一性,并且其中该变体具有DNA酶活性。

[0499] 5.如前述段落中任一项所述的变体,其中该变体包含取代A111P。

[0500] 6.如段落5所述的变体,其中该变体包含选自由以下组成的组的两个或更多个取代:S26H、D32E、V35I、K65E、K67A、S69E、S69V、S98R、Q102E、K105N、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、G181N、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V和K212E。

[0501] 7.如前述段落中任一项所述的变体,其中该变体包含取代D32E+V35I和/或取代G181N。

[0502] 8.如前述段落中任一项所述的变体,其中该变体包含取代D32E+V35I+A111P。

[0503] 9.如前述段落中任一项所述的变体,其中该变体包含取代A111P+G181N。

[0504] 10.如前述段落中任一项所述的变体,其中该变体包含取代S69V和/或Q102E。

[0505] 11.如前述段落中任一项所述的变体,其中该变体包含取代K105N。

[0506] 12.如前述段落中任一项所述的变体,其中该变体包含取代D32E+V35I+A111P,以及任选地选自由以下组成的组的一个或多个另外的取代:S26H、K65E、K67A、S69E、S69V、S98R、Q102E、K105N、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、G181N、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V和K212E。

[0507] 13.如前述段落中任一项所述的变体,其中该变体包含取代D32E+V35I+A111P+G181N,以及任选地选自由以下组成的组的一个或多个另外的取代:S26H、K65E、K67A、S69E、S69V、S98R、Q102E、K105N、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V和K212E。

[0508] 14.如前述段落中任一项所述的变体,其中该变体包含取代D32E+V35I+Q102E+A111P+G181N,以及任选地选自由以下组成的组的一个或多个另外的取代:S26H、K65E、K67A、S69E、S69V、S98R、K105N、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V和K212E。

[0509] 15.如前述段落中任一项所述的变体,其中该变体包含取代D32E+V35I+K105N+A111P+G181N,以及任选地选自由以下组成的组的一个或多个另外的取代:S26H、K65E、K67A、S69E、S69V、S98R、Q102E、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V和K212E。

[0510] 16.如前述段落中任一项所述的变体,其中该变体包含取代D32E+V35I+S69V+Q102E+A111P,以及任选地选自由以下组成的组的一个或多个另外的取代:S26H、K65E、K67A、S98R、K105N、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、G181N、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V和K212E。

[0511] 17.如前述段落中任一项所述的变体,其中该变体包含取代D32E+V35I+S69V+Q102E+A111P+G181N,以及任选地选自由以下组成的组的一个或多个另外的取代:S26H、K65E、K67A、S98R、K105N、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V和K212E。

[0512] 18.如前述段落中任一项所述的变体,其中该变体包含取代S69V+Q102E+A111P,以及任选地选自由以下组成的组的一个或多个另外的取代:S26H、D32E、V35I、K65E、K67A、S98R、K105N、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、G181N、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V和K212E。

[0513] 19.如前述段落中任一项所述的变体,其中该变体包含取代S69V+Q102E+G181N,以及任选地选自由以下组成的组的一个或多个另外的取代:S26H、D32E、V35I、K65E、K67A、S98R、K105N、A111P、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V和K212E。

[0514] 20.如前述段落中任一项所述的变体,其中该变体包含取代S69V+Q102E+A111P+

G181N,以及任选地选自由以下组成的组的一个或多个另外的取代:S26H、D32E、V35I、K65E、K67A、S98R、K105N、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V和K212E。

[0515] 21.如前述段落中任一项所述的变体,其中该变体包含取代Q102E+K105N+A111P+G181N,以及任选地选自由以下组成的组的一个或多个另外的取代:S26H、D32E、V35I、K65E、K67A、S69E、S69V、S98R、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V和K212E。

[0516] 22.如前述段落中任一项所述的变体,其中该变体包含取代S69V+Q102E+K105N+A111P+G181N,以及任选地选自由以下组成的组的一个或多个另外的取代:S26H、D32E、V35I、K65E、K67A、S98R、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V和K212E。

[0517] 23.如前述段落中任一项所述的变体,其中该变体包含取代D32E+V35I+K105N+A111P,以及任选地选自由以下组成的组的一个或多个另外的取代:S26H、K65E、K67A、S69E、S69V、S98R、Q102E、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、G181N、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V和K212E。

[0518] 24.如前述段落中任一项所述的变体,其中该变体包含选自由以下组成的组的至少一种另外的取代:K18S、T19P、D32P、K86E、A101E、A101T、K105D、K105E、K105T、G137R、N146H、K147N、K155E、A172D、K178S、K192A、N214D和N217A。

[0519] 25.如前述段落中任一项所述的变体,其中该变体与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的多肽具有至少65%,例如至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%,但小于100%序列同一性。

[0520] 26.如前述段落中任一项所述的变体,其中取代的数目为1-20个,例如1-10或1-5个,如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个取代。

[0521] 27.如前述段落中任一项所述的变体,其中该变体由195至230个氨基酸、优选地200至225个氨基酸,如204至221个氨基酸组成。

[0522] 28.如前述段落中任一项所述的变体,其中该变体包含选自由以下组成的组的一组取代:

[0523] • S69V+K86E+Q102E+K147N+K155E+A172D+K192A+Q208V;

[0524] • G20C+K30C+D32E+V35I+A111P;

[0525] • S69V+K86E+Q102E+K147N+K155E+A172D+G181N+K192A+Q208V;

[0526] • D32E+V35I+N77E+A111P+G181N+S182V;

[0527] • D32E+E34N+V35I+K86E+A111P+G181N;

[0528] • S69V+K86E+Q102E+K105T+K147N+K155E+A172D+K192A+Q208V;

[0529] • S69V+Q102E+Q157E+T159Q+N214D+N217A;

[0530] • S26H+D32E+V35I+A111P+K155L;

[0531] • K18S+D32E+V35I+A111P+K185I+K215T;

[0532] • D32E+V35I+A111P+K185I+K215T;

[0533] • D32E+V35I+K82G+A111P+G181N+S182V;

[0534] • D32E+V35I+A111P+K178M+K212T;

[0535] • K18S+D32E+V35I+A111P+K178S+K212L;

[0536] • S69V+Q102E+V138A+S144R+Q157E+T159Q+A172E+G181N;

[0537] • D32E+V35I+A111P+K204L+K215I;

[0538] • K18F+D32E+V35I+A111P+K185Q;

[0539] • D32E+V35I+A111P+K147N+K204L;

[0540] • S69V+K86E+Q102E+K105D+K147N+K155E+A172D+K192A+Q208V;

[0541] • D32E+V35I+S69V+K86E+Q102E+A111P+K155E+T159Q+A172D+G181N+K192A+Q208V+N217A;

[0542] • D32E+V35I+A111P+K147N;

[0543] • S69V+K86E+Q102E+S115T+K147N+K155E+A172D+K192A+Q208V;

[0544] • D32E+V35I+S69V+K86E+Q102E+A111P+K147N+K155E+T159Q+A172D+G181N+K192A+Q208V+N217A;

[0545] • D32E+V35I+A111P+N140H;

[0546] • D32E+V35I+K65Q+S69V+K86E+Q102E+A111P+K147N+K155E+T159Q+A172D+G181N+K192A+Q208V+N217A;

[0547] • D32E+V35I+S69V+K86E+Q102E+A111P+K147N+K155E+T159Q+A172D+K178S+G181N+K192A+Q208V+N217A;

[0548] • D32E+V35I+A111P;

[0549] • E6D+A101E+Q150E+G181N+Q208V;

[0550] • S26H+D32E+V35I+A111P;

[0551] • K18Q+D32E+V35I+K105E+A111P+K155F;

[0552] • D32E+V35I+A111P+G199E;

[0553] • S69V+Q102E+Q157E+T159Q+G181N;

[0554] • D32E+V35I+K67A+A111P+P175N+S182V;

[0555] • D32E+V35I+A111P+N214D;

[0556] • S69V+Q102E+Q157E+T159Q+A172E;

[0557] • E6D+A101E+Q150E+G181N+Q208V;

[0558] • D32E+V35I+S69E+A111P;

[0559] • D32E+V35I+Q85E+A111P;

[0560] • K18Q+D32E+V35I+A111P;

[0561] • D32E+V35I+A101E+K105T+A111P+G181N+K212E+Y218E;

[0562] • D32E+V35I+A111P+G181N+S182V+K185E;

[0563] • D32E+V35I+S98R+A111P+G181N+S182Y;

[0564] • D32E+V35I+A101E+Q102E+A111P+G181N;

[0565] • T19P+D32E+V35I+Q102E+K105E+A111P;

[0566] • D32E+V35I+D72V+A111P;

[0567] • S69V+K86E+Q102E+F112W+K147N+K155E+A172D+K192A+Q208V;

[0568] • S69V+Q102E+A111P+Q157E+T159Q+A172E;

[0569] • K67A+S69V+Q102E+K147N+Q157E+T159Q+A172E+D197S;

[0570] • S69V+Q102E+S115T+Q157E+T159Q+A172E;

[0571] • S69V+K86E+Q102E+G136E+K147N+K155E+A172D+K192A+Q208V;

[0572] • D32E+V35I+K67A+A111P+K204G;

[0573] • A101E+A111P+Q150E+Q208V;

[0574] • D32E+V35I+A101E+K105E+A111P+S182V;

[0575] • D32E+V35I+A101E+K105E+A111P+S182V;

[0576] • D32E+V35I+A101T+K105N+A111P+K147E+G181N+S182Y;

[0577] • D32E+V35I+S69V+Q102E+A111P+Q157E+T159Q+A172E;

[0578] • D32E+V35I+Q102E+A111P;

[0579] • S26H+S69V+Q102E+A111P+Q157E+T159Q+A172E;

[0580] • D32E+V35I+S69V+Q102E+A111P+Q157E+T159Q+A172E;

[0581] • D32E+V35I+K67A+K105T+A111P+K178L+K185T;

[0582] • K67A+K105T+G181N;

[0583] • T19P+D32E+V35I+A101E+K105T+A111P+K160A+G181N;

[0584] • D32E+V35I+S69V+Q102E+A111P+Q157E+T159Q+A172E;

[0585] • D32E+V35I+Q102E+A111P;

[0586] • K18S+D32E+V35I+Q102E+K105E+A111P;

[0587] • D32E+V35I+K65E+A101E+K105T+A111P+N217A;

[0588] • D32E+V35I+K105T+A111P+G181N+K204W+K215L;

[0589] • D32E+V35I+K105T+A111P+K178L+G181N+K212T;

[0590] • S26H+S69V+Q102E+A111P+N146H+Q150E+Q157E+T159Q+A172E;• K18Q+D32E+V35I+K67A+K105T+A111P+K215V;

[0591] • D32E+V35I+Q85E+A111P;

[0592] • K18S+T19P+D32E+V35I+A101E+K105T+A111P+G181N;

[0593] • D32E+V35I+A101E+K105N+A111P;

[0594] • K18M+D32E+V35I+K67A+K105T+A111P+K178S;

[0595] • D32E+V35I+K105T+A111P+G181N;

[0596] • D32E+V35I+K67A+K105T+A111P+K185G+K212M;

[0597] • D32E+V35I+A101T+K105N+A111P+G181N+S182Y+N214D;

[0598] • T19P+D32E+V35I+A101E+K105T+A111P+K178S+G181N;

[0599] • D32E+V35I+K105T+A111P+G181N+K185L+K192V+K204W;

[0600] • D32E+V35I+S98R+K105N+A111P+K147N+G181N+S182Y;

[0601] • D32E+V35I+K105N+A111P+G181N+S182Y;

[0602] • D32E+V35I+K67A+K105T+A111P;

[0603] • D32E+V35I+K53F+K105N+A111P+G181N+S182Y+K212E;

[0604] • K18S+D32E+V35I+S98R+K105N+A111P+G181N+S182Y;

[0605] • D32E+V35I+S98R+K105N+A111P+Q158D+G181N+S182Y;

[0606] • D32E+V35I+K67A+K105T+A111P+K190V+K204G;

[0607] • N4K+D32E+V35I+S98R+K105N+A111P+G181N+S182Y+K212E;

[0608] • D32E+V35I+K67A+K105T+A111P+K147N+K190N;

[0609] • D32E+V35I+S98R+K105N+A111P+G181N+S182Y+Q208V;

[0610] • D32E+V35I+A101E+K105T+A111P+G181N+K212E+N214D;

[0611] • D32E+V35I+K82T+A101E+K105T+A111P+G181N+K212E;

[0612] • D32E+V35I+A111P+S115T;

[0613] • S26H+S69V+Q102E+A111P+K147N+A149S+Q150E+Q157E+T159Q+A172E;

[0614] • K18S+D32E+V35I+K67A+K105T+A111P+K185L+K192F;

[0615] • V12L+D32E+V35I+S98R+K105N+A111P+G181N+S182Y;

[0616] • D32E+V35I+S69E+K105N+A111P+K147E+G181N+S182Y;

[0617] • K18S+D32E+V35I+A101E+K105T+A111P+G181N+K212E;

[0618] • D32E+V35I+K65E+K105N+A111P+G181N+S182Y+K212E;

[0619] • D32E+V35I+S98R+K105N+A111P+G181N+S182Y+D189N+N214D;

[0620] • D32E+V35I+S98R+A101T+K105N+A111P+G181N+S182Y;

[0621] • D32E+V35I+K67A+A111P+Q157E+T159Q+G181N+A206G+Q208V;

[0622] • D32E+V35I+K67A+S69R+A111P+G181N+K212E;

[0623] • D32E+V35I+K67A+A111P+G181N+A206G+Q208V;

[0624] • D32E+V35I+A101E+K105T+A111P+G181N;

[0625] • D32E+V35I+K67A+A101E+K105D+A111P+N217A;

[0626] • D32E+V35I+K67A+A111P+Q157E+G181N+Q208V;

[0627] • D32E+V35I+K67A+A111P+Q157E+A172E+G181N+A206G+Q208V;

[0628] • S26H+D32E+V35I+K67A+S69R+A111P+G181N+K212E;

[0629] • D32E+V35I+S69E+S98R+K105N+A111P+G181N+S182Y;

[0630] • D32E+V35I+K67A+K105N+A111P+G181N+S182Y+K212E;

[0631] • D32E+V35I+K105D+A111P+S115T;

[0632] • D32E+V35I+S69V+K86E+Q102E+K105N+A111P+S115T+K147N+Q150E+K155E+T159Q+G161R+A172D+G181N+V187N+K192A+Q208V+N217A;

[0633] • D32E+V35I+K65E+K67A+K105N+A111P+G181N+S182Y;

[0634] • S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+V138M+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I;

[0635] • D32E+V35I+K67A+S69V+K105T+A111P+Q157E+G181N+A206G+Q208V;

[0636] • S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+G161R+G181N+V187N+K192I;

[0637] • S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+Q150E+K160T+G161R+G181N+V187N+K192I;

[0638] • S69V+D72S+Q102E+K105N+A111P+S115T+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I;

[0639] • D32E+V35I+S69V+K86E+Q102E+K105N+A111P+S115T+V127T+G137R+K147N+Q150E+K155E+T159Q+G161R+A172D+G181N+V187N+K192A+Q208V+N217A;

[0640] • S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I;

[0641] • D32P+S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+S134H+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I;

[0642] • D32P+S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+N146H+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I;

[0643] • D32P+Q102E+K105N+A111P+S115T+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I;

[0644] • D32P+S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+T120H+N146H+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I;

[0645] • D32P+S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+Q150E+Q157E+G181N+V187N+K192I;

[0646] • D32P+S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+N146H+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I;

[0647] • S26H+D32P+S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+N146H+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I;

[0648] • K65Q+S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I;

[0649] • S69A+Q102E+K105N+A111P+S115T+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I;

[0650] • D32P+S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I;

[0651] • S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+G137R+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I;

[0652] • S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+G137R+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I;

[0653] • S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+Q150E+G161R+A172D+G181N+V187N+K192I;

[0654] • D32P+S69A+Q102E+K105N+A111P+S115T+N146H+Q150E+G161R+G181N+K192I;

[0655] • D32P+S69V+Q102E+K105D+A111P+S115T+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I;以及

[0656] • S69V+Q102E+K105N+A111P+S115T+G137R+Q150E+G161R+G181N+V187N+K192I。

[0657] 29.如段落28所述的变体,其中该变体包含具有所述多组取代中的一组的SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3或由其组成。

[0658] 30.如前述段落中任一项所述的变体,其中与SEQ ID NO:1的多肽或具有与无所述取代的变体相同的氨基酸序列的亲本多肽相比,该变体具有改善的稳定性。

[0659] 31.如段落30所述的变体,其中该改善的稳定性选自由洗涤剂稳定性和热稳定性组成的组。

[0660] 32.一种洗涤剂组合物,该洗涤剂组合物包含如段落1-31中任一项所述的DNA酶变体和至少一种洗涤剂辅助成分。

[0661] 33.如段落1-31中任一项所述的DNA酶变体或如段落32所述的洗涤剂组合物在清洁过程,如洗衣或硬表面清洁如餐具洗涤中的用途。

[0662] 34.一种清洁物品的方法,该方法包括将该物品暴露于包含如段落1-31中任一项所述的DNA酶变体或如段落32所述的洗涤剂组合物的洗涤液。

[0663] 35.如段落34所述的方法,其中该物品是纺织品或硬表面,例如餐具或表面如桌面、墙壁或地板或机器如洗衣机或洗碗机的内表面。

[0664] 36.一种用于洗涤纺织品的方法,该方法包括:

[0665] a)将该纺织品暴露于包含如段落1-31中任一项所述的DNA酶变体或如段落32所述的洗涤剂组合物的洗涤液;

[0666] b)完成至少一个洗涤循环;以及任选地

[0667] c)冲洗该物品。

[0668] 37.一种颗粒,该颗粒包含:

[0669] (a)含有如段落1-31中任一项所述的DNA酶变体的核心,和任选地

[0670] (b)由包围该核心的一个或多个层组成的包衣。

[0671] 38.一种液体组合物,该液体组合物包含如段落1-31中任一项所述的DNA酶变体和酶稳定剂,例如多元醇如丙二醇或甘油、糖或糖醇、乳酸、可逆蛋白酶抑制剂、硼酸或硼酸衍生物,例如芳族硼酸酯或苯基硼酸衍生物如4-甲酰基苯基硼酸。

[0672] 39.一种多核苷酸、一种核酸构建体或表达载体、或一种重组宿主细胞,该多核苷酸编码如段落1-31中任一项所述的DNA酶变体,该核酸构建体或表达载体包含该多核苷酸,该重组宿主细胞用该多核苷酸转化。

[0673] 40.一种产生DNA酶变体的方法,该方法包括:

[0674] a.在适用于表达该变体的条件下培养如段落39所述的重组宿主细胞;以及

[0675] b.回收该变体。

```
SEQ1   VPVNPEPDATSVENVALKTGSGDSQSDPIKADLEVKGQSALPFDVDCWAILCKGAPNVLQ
SEQ2   ---------------ALKTGSGDSQSDPIKADLEVKGQSALPFDVDCWAILCKGAPNVLQ
SEQ3   -----------------KTGSGDSQSDPIKADLEVKGQSALPFDVDCWAILCKGAPNVLQ
                        ****************************************

SEQ1   RVNEKTKNSNRDRSGANKGPFKDPQKWGIKALPPKNPSWSAQDFKSPEEYAFASSLQGGT
SEQ2   RVNEKTKNSNRDRSGANKGPFKDPQKWGIKALPPKNPSWSAQDFKSPEEYAFASSLQGGT
SEQ3   RVNEKTKNSNRDRSGANKGPFKDPQKWGIKALPPKNPSWSAQDFKSPEEYAFASSLQGGT
       ************************************************************

SEQ1   NAILAPVNLASQNSQGGVLNGFYSANKVAQFDPSKPQQTKGTWFQITKFTGAAGPYCKAL
SEQ2   NAILAPVNLASQNSQGGVLNGFYSANKVAQFDPSKPQQTKGTWFQITKFTGAAGPYCKAL
SEQ3   NAILAPVNLASQNSQGGVLNGFYSANKVAQFDPSKPQQTKGTWFQITKFTGAAGPYCKAL
       ************************************************************

SEQ1   GSNDKSVCDKNKNIAGDWGFDPAKWAYQYDEKNNKFNYVGK
SEQ2   GSNDKSVCDKNKNIAGDWGFDPAKWAYQYDEKNNKFNYVGK
SEQ3   GSNDKSVCDKNKNIAGDWGFDPAKWAYQYDEKNNKFNYVGK
       ****************************************
```

图1