

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

D06M 16/00 (2006.01)

C12N 9/42 (2006.01)



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 98812435.1

[45] 授权公告日 2007 年 4 月 4 日

[11] 授权公告号 CN 1308537C

[22] 申请日 1998.12.17 [21] 申请号 98812435.1

[30] 优先权

[32] 1997.12.19 [33] US [31] 60/068,274

[86] 国际申请 PCT/US1998/026798 1998.12.17

[87] 国际公布 WO1999/032708 英 1999.7.1

[85] 进入国家阶段日期 2000.6.19

[73] 专利权人 诺沃奇梅兹北美公司

地址 美国北卡罗来纳

[72] 发明人 刘继银 B·康登

[56] 参考文献

WO9602551A1 1996.2.1

US5466601A 1995.11.14

审查员 孙红

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利  
商标事务所

代理人 樊卫民

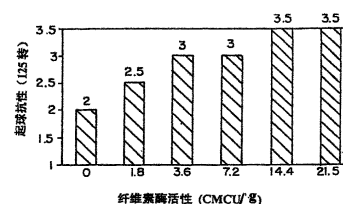
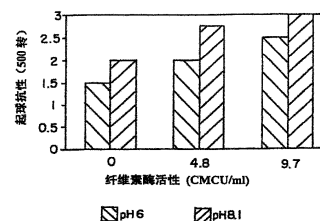
权利要求书 2 页 说明书 19 页 附图 2 页

[54] 发明名称

含纤维素织物的连续生物抛光

[57] 摘要

公开了一种连续生物抛光含纤维素织物的方法。本方法包括(a)用对纤维素具有低亲和力的纤维素酶接触织物,以及(b)将接触过的织物经历高温处理。含纤维素材料的处理可按照一个附加的步骤或与化学预处理、染色、印花和整理相结合的步骤进行。此处理可获得优良的抗起球性能、最小的织物强度和重量损失,以及较好的可湿性。



1. 一种处理含纤维素织物的方法，该方法包括：

(a) 用水本体溶液接触织物，其中所述水本体溶液具有 pH4-pH12 之间的 pH，且含有纤维素酶，所述的纤维素酶不与微晶纤维素 Avicel 结合，以及

(b) 将接触过的织物经历高于 65°C 温度，

其中，所述的接触和经历高温步骤连续进行或同时进行，其中所述的被处理织物与未处理织物相比显示出至少一种改善的抛光特性。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其进一步包括，在步骤 (a) 后将所述接触过的织物从本体溶液中除去。

3. 如权利要求 1 所述的方法，其中含纤维素织物包括选自棉、亚麻、苧麻、大麻、黄麻、人造纤维以及上述的任何一种相互之间或者与非纤维素纤维的组合。

4. 如权利要求 1 所述的方法，其中纤维素酶缺少功能性的纤维素结合结构域。

5. 如权利要求 4 所述的方法，其中纤维素酶来自网球菌属或热球菌属。

6. 如权利要求 5 所述的方法，其中纤维素酶选自示于 SEQ ID NO: 1 中的热球菌纤维素酶和示于 SEQ ID NO: 2 中的网球菌纤维素酶。

7. 如权利要求 1 所述的方法，其中纤维素酶是单组分酶。

8. 如权利要求 1 所述的方法，其中本体溶液含有的纤维素酶之浓度少于 200CMCU/ml。

9. 如权利要求 8 所述的方法，其中本体溶液含有的纤维素酶之浓度少于 100CMCU/ml。

10. 如权利要求 9 所述的方法，其中本体溶液含有的纤维素酶之浓度少于 50CMCU/ml。

11. 如权利要求 1 所述的方法，其中水本体溶液的 pH 值在 5-10

之间。

12. 如权利要求 1 所述的方法，其中高温在 75℃以上。

13. 如权利要求 12 所述的方法，其中高温在 85℃以上。

14. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述的接触步骤包括少于 5 分钟。

15. 如权利要求 14 所述的方法，其中所述的接触步骤包括少于 1 分钟。

16. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述的改善的特性选自起球抗性、手感和外观。

17. 如权利要求 16 所述的方法，其中所述的改善的特性是起球抗性，其中所述的改善是相对于未处理织物的起球抗性，起球抗性增加至少 0.25。

18. 如权利要求 17 所述的方法，其中所述的改善的特性是起球抗性，其中所述的改善是相对于未处理织物的起球抗性，起球抗性增加至少 0.5。

19. 如权利要求 18 所述的方法，其中所述的改善的特性是起球抗性，其中所述的改善是相对于未处理织物的起球抗性，起球抗性增加至少 1.0。

20. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述的本体溶液中还含有选自蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶、果胶消化酶以及半纤维素酶中的酶。

21. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述的本体溶液中还含有一种染料和/或一种助染化合物，其中所述的方法导致所述的织物染色。

22. 如权利要求 3 所述的方法，其中所述人造纤维为 Lyocell。

## 含纤维素织物的连续生物抛光

### 发明领域

本发明涉及处理含纤维素织物以得到较好的织物手感、外观和起球抗性的方法，尤其是采用连续的或半连续的生物抛光工序。

### 发明背景

大多数刚刚生产的含纤维素织物除非经过织物整理处理，都有相当硬的和不易弯曲的手感。另外，由于表面有小的绒毛状突起而显得不够光滑。此外，经过一段较短时间的穿着，织物表面出现起球，给人以不吸引人的、破旧的外观。因此，提高织物的手感、外观和起球抗性是纺织工业的主要目标之一。然而，只取得了部分的成功。

织物的高度柔软和光滑可以通过在纺织中使用精细的、即低-丹尼尔的纱线而达到。然而，最终的花费很高，因为织布机的生产量随着纬线的直径而成比例地减少。

一种不算昂贵而又确保织物柔软和光滑手感的方法是用柔软剂浸透整理过的织物，一般是采用阳离子的，有时也使用硅氧烷基的表面活性化合物。但是，这种处理不能除去起球和绒毛。此外，织物存在有一定程度的油腻手感，不耐洗以及它的水吸收能力往往会有相当大的降低。

一种化学方法是使纤维交联，从而减少原纤维化（Nicolai 等人，1996，纺织研究杂志（Textile Res. J.） 66(9) 575-580）。但是，这种方法导致纤维坚韧度的降低。

另一种已知的使织物柔软光滑的方法是用纤维素酶处理纤维素织物。参见，Bazin 等人在法国牟罗兹（Mulhouse）第 58 次化学家协会和纺织工业大会发表的“纤维素织物酶的生物抛光”（1991 年 10 月 25 日）以及 Asferg 等人“采用纤维素酶处理软化和抛光棉织物” ITB

染色/印花/整理(1990年2月)。织物表面的纤维素酶处理在手感、外观和起球抗性方面提高了织物的质量。最重要的效果是减少绒毛和起球,增加光泽/光亮,改善织物的手感,提高持久的柔软度,增加水吸收能力。这些结果和生物抛光作用是直接相关的。在测定处理效果时,所用的特定条件是重要的。

许多工序要求将织物进行机械搅动以达到令人满意的生物抛光效果。参见,例如,WO9320278; Cavaco-Paulo 等人(1994, 生物催化作用(Biocatalysis) 10: 353-360); 以及 Cavaco-Paulo 等人(1996, 纺织研究杂志 66: 287-294)。但是,在某些条件下,会造成明显的重量和强度的损失。

纤维素酶生物抛光中现有的方法主要是分批工序。因为不能给予高度的机械作用,并且仅仅使用小量的溶液会造成不足的和/或不均匀的生物抛光,因此,常常不采用普通的连续或半连续工序,如浸轧汽蒸染色机/J形箱。例如,不均匀的生物抛光可能是由于使用纤维素酶混合物,其中部分是因为不同的纤维素酶对纤维素的亲和力不同,而造成与织物的不同结合。

因而,本领域需要一种能够在常规连续或半连续工序中使用的有效生物抛光方法。

## 发明概述

本发明提供处理含纤维素织物以改善至少一种抛光织物特性的方法。此方法按照如下步骤施行:

- (a) 用含有纤维素酶的水本体溶液接触织物,其中,纤维素酶对纤维素具有低亲和力,及
- (b) 将接触的织物经历高温处理。

优选地,本方法在连续的或半连续的装置中进行。在这些实施方案中,本方法还包括,在步骤(a)后,将织物中的本体溶液除去。在优选的实施方案中,织物在本体溶液中接触少于约5分钟,最优选地,少于约1分钟。接触和经历高温的步骤可以连续进行或同时进行。

抛光特性可以是起球抗性(pilling note)、手感和外观中的一个或多个。在优选实施方案中，本发明的方法可改善起球抗性至少约 0.25；更优选地，至少约 0.5；最优选地，至少约 1.0。

低亲和力的纤维素酶优选的是显示热稳定纤维素酶活性的酶。一般，本体溶液中含有的纤维素酶活性少于约 200CMCU/ml，优选地少于约 100 CMCU / ml，更优选地，少于约 50 CMCU/ ml。

在其它方面，本发明提供了生物抛光和染色相结合的方法，或生物抛光和煮练(scouring)相结合的方法。在这些实施方案中，和织物相接触的水溶液中，除低亲和力的纤维素酶外，还含有其它适当的成分，例如，染料和辅助性化合物。

### 发明详述

本发明提供了提高纤维素织物质量的生物抛光方法。此方法按照如下进行：(i) 采用至少含有一种显示对纤维素有低亲和力的纤维素酶的本体水溶液，优选地在连续或半连续的装置中，接触纤维素织物，以及(ii)将接触过的纤维素酶的织物经历高温处理。

此处所用的生物抛光涉及直接提高以下一个或多个特性的处理：织物手感、外观以及起球抗性。此方法使得纤维素酶在织物上均匀作用，在一个或多个这些特性上得到可测定的改进，同时将织物重量和/或织物强度的损失减少到最小，排除了对机械搅动的需求。本发明将通过织物吸附造成的水溶液中纤维素酶的损失减到最小，因此使常规半连续或连续纺织工业的设备得到应用。本发明的方法也可将，例如，碱性化学制备、织物染色、印花和整理工序结合起来，从而增强在纺织加工中的适应性。此外，同时使用其它的酶，例如，脂肪酶、蛋白酶、半纤维素酶和/或果胶酶，可同时除去纤维素和非纤维素材料。最后，本发明的方法可以减少根据本发明处理的织物在后续的缝制和家庭洗涤时，棉绒尘埃的形成。

如此处所用的纤维素织物包括由纤维素纤维制得的针织和机织织物，包括但不限于，棉花、亚麻、苧麻、大麻、黄麻、人造纤维/粘胶

纤维、tencel/lyocell 或它们的混合，还有纤维素纤维和其它天然和/或人造的纤维(例如羊毛、丝绸、聚酯、尼龙等)的混合物制得的织物。

此处所用的连续的或半连续的装置不仅限于涉及常规的仪器，例如，浸轧汽蒸染色法洗涤箱或浸轧 J 形箱，在其中通过接触本体溶液将织物润湿，并且一旦通过后，织物就不再直接和本体溶液接触。这种仪器和那些在整个处理过程(分批方法)中，织物和本体溶液持续接触的仪器是有区别的。在分批装置中，液体和织物的比例(每单位重量的织物所用的溶液重量)通常大于大约 400%，相比之下，在连续或半连续装置中纤维吸液率(每单位重量的织物所用的溶液重量)大约在 50%到 150%之间。应当理解，本发明包括任何配置或装置的使用，在装置中，相对于整个处理时间来说，织物只在本体溶液中浸泡短暂的时间，采用或不采用轧染从织物中除去多余的溶液都可。

此处所用的“高温”是指高于约 65℃，优选地高于约 70℃，最优选地高于约 90℃。

### 纤维素酶

在实施本发明时，纤维素织物和对纤维素具有低亲和力的纤维素酶接触。如此处所用的，纤维素酶或纤维素分解酶，是一种水解纤维素的酶，包括，但不限于，1,4-β-D-葡聚糖纤维二糖水解酶( EC3.2.1.91)，内切-β-1,4 -D-葡聚糖-4-葡聚糖水解酶( EC3.2.1.4)，以及 β-葡萄糖苷酶( EC3.2.1.21)。纤维素酶的活性(表示为葡聚糖内切酶单位或羧甲基纤维素酶单位( CMCU))一般是通过将酶和羧甲基纤维素( CMC)在 pH7.5 时温育 20 分钟来加以测定，然后用对-羟基安息香酸-酰肼(PHBAH)反应( Lever,1972,生物化学分析( Anal. Biochem.) 47: 273-279, 改进之处在于，除 1.5 克 PHBAH 外还添加 5 克酒石酸钠钾)测定还原糖的形成。

对纤维素有低亲和力的酶也就是“低亲和力纤维素酶”，可以采用例如，在下面实施例 4 中所描述的方法来鉴别，包括将酶和微晶纤维素温育使之结合，然后洗脱并检测所结合的酶。一般地，对纤维素具

有低亲和力的酶在本实验中表现出不与微晶纤维素结合。对纤维素具有较高亲和力的酶不利于在连续或半连续的装置中使用。因为它会(a)导致酶对织物的非均匀吸收,以及(b)因为被织物吸收而损失本体溶液中的酶。

对纤维素具有低亲和力的酶一般缺少功能性的纤维素-结合结构域(CBD),即内在的或后天对纤维素酶序列加以修饰的结构域。纤维素-结合结构域是赋予对纤维素的高亲和力的肽序列,包括,但不限于, Peter Tomme 等人在“纤维素-结合结构域:分类和特性”(不溶性碳水化合物酶法降解, John N. Saddler 和 Michael H. Penner (编)美国化学学会系列座谈会(ACS Symposium Series))中所详细说的序列。Tomme 等人将超过 120 个纤维素-结合结构域分为 10 个家族(指定为 I-X),并确定了多种酶中,例如,纤维素酶、木聚糖酶、甘露聚糖酶、阿拉伯呋喃糖苷酶、乙酰酯酶和几丁质酶,以及非水解性的多糖结合蛋白质中的纤维素-结合结构域。根据本发明的低亲和力纤维素酶可以缺失整个纤维素-结合结构域序列,也可含有用缺失、插入和/或一个或多个残基置换,或者通过完整蛋白质的任何化学或酶学修饰方法破坏了其纤维素-结合活性的残留的纤维素-结合结构域序列;这些修饰的序列也即是非功能性的纤维素-结合结构域。

根据本发明,还将已与低亲和力的纤维素酶接触的织物经历高温处理。因此,本发明中所使用的纤维素酶优选是热稳定性的,即在至少约 55℃ 时显示出最佳纤维素酶酶促活性,优选地在至少约 65℃,更优选地在至少约 75℃,最优选地在至少约 85℃。任何低亲和力的纤维素酶,只要在高于约 65℃ 时显示出约 20% 的最大酶促活性,都可在本发明的实施中使用。优选地,在大约 65℃ 时纤维素酶可显示出至少大约 50% 最大活性。

本发明实施中有用的纤维素酶非限制性的实例包括 SEQ ID NO: 1 中所描述序列的来自热球菌属(Pyrococcus)中的纤维素酶,和 SEQ ID NO: 2 中所描述序列的来自网球菌属(Dictyoglomus)中的纤维素酶。其它合适的纤维素酶包括,但不限于,由以下嗜热纤维素酶衍生的纤

纤维素酶，如果必要的话经修饰降低了其对纤维素的亲和力：激烈热球菌(*Pyrococcus furiosus*)(Kengen 等人, 1993, 欧洲生物化学杂志 (Eur. J. Biochem.) 213: 305)产生的  $\beta$ -葡萄糖苷酶；栖热袍菌属的种 (*Thermotoga* sp.)(Ruttersmith 等人, 1991, 生物化学杂志 (Biochem. J.) 277: 887)产生的外切葡聚糖酶；海栖热袍菌 (*Thermotoga maritima*)(Bronnenmeier 等人, 1995, 应用环境微生物 (Appl. Environ. Microbiol.) 61: 1399; 微生物学 (Microbiology) 142: 2553, 1996)产生的纤维素酶；海栖热袍菌(Gabelsberger 等人, 1993, 欧洲微生物学会联盟微生物通讯(FEMS Microbiol. Lett.) 109: 131)产生的  $\beta$ -葡萄糖苷酶；那不勒斯栖热袍菌 (*Thermotoga neapolitania*) (Bok 等人, 1994, 美国化学学会系列座谈会(ACS Symp. Ser.) 566: 54)产生的内切葡聚糖酶 B；古细菌(Archebacteria)产生的内切葡聚糖酶 (WO 97/44361)；解纤维热酸菌 (*Acidothermus cellulolyticus*)产生的内切葡聚糖酶 (WO 96/02551)；海洋红嗜热盐菌 (*Rhodothermus marinus*) (Hreggvidsson 等人, 1996, 环境微生物 (Environ. Microbiol.) 62: 3047)产生的纤维素酶；*Caldocellum saccharolyticum* (Saul, 核酸研究 (Nuc. Acids Res.) 17: 439, 1989)产生的外切纤维素酶/内切纤维素酶。

纤维素酶可以通过原始细胞或已设计好的由异源基因合成纤维素酶的重组生物而获得。优选地，纤维素酶是单组分酶，即，具有确定的酶促活性的单一多肽，而不是作为表现为多种酶促活性的多组分复合物的一部分而合成的。纤维素酶可以通过常规的步骤回收，包括但不限于，离心、过滤、喷雾干燥、蒸发或沉淀。如此处所用的，“纯化的”或“分离的”纤维素酶是经过去除细胞中产生的非纤维素酶物质处理的纤维素酶，非纤维素酶物质在细胞中被合成并干扰纤维素酶的酶促活性。如果纤维素酶分泌到培养基中，纯化可包括通过离心、过滤或沉淀，用常规的方法将生物质与培养基分离。选择性地，纤维素酶可以通过细胞破碎以及和生物质分离，从宿主细胞中释放出来。在一些情况下，进一步的纯化可以通过常规的蛋白质纯化方法而实现，

包括但不限于，硫酸铵沉淀；酸或离液剂(chaotrope)抽提；离子交换、分子筛及疏水色谱，包括快速蛋白质液相色谱(FPLC)和高压液相色谱(HPLC)；制备型等电聚焦；以及制备型聚丙烯酰胺凝胶电泳。选择性地，纯化可通过使用亲和层析，包括免疫亲和层析来实现。例如，可使用能作为亲和“标签”(tag)的具有附加的氨基酸序列的杂合重组纤维素酶，它可有助于使用一种适当的固相介质的纯化。

### 其它成分

在本发明的一些实施例中，含低亲和力纤维素酶的本体溶液中还含有其它的成分，包括但不限于，其它酶，以及一种或多种表面活性剂、漂白剂、防沫剂、增效助剂系统等，以用于加强生物抛光作用和/或增强涉及例如可染性和/或可湿性的优异效果。水溶液中还含有染色试剂。

适用于本发明的酶包括，但不限于：

**果胶消化酶：**合适的果胶消化酶（其中的一些，是根据国际生物化学和分子生物学协会（IUBMB）的建议（1992），通过它们的酶学分类数据而鉴定的）包括但不限于，果胶消化酶，例如，果胶酸裂解酶，果胶裂解酶，果胶甲基酯酶，聚半乳糖醛酸酶（3.2.1.15），和鼠李糖半乳糖醛酸酶（WO 92/19728）。

**半纤维素酶：**合适的半纤维素酶包括但不限于内切阿拉伯聚糖酶（3.2.1.99，Rombouts 等人，糖类聚合物（Carb. Polymers）9: 25, 1988），阿拉伯呋喃糖苷酶，内切- $\beta$ -1,4-半乳聚糖酶、内切-木聚糖酶（3.2.1.8）、甘露聚糖酶、木糖葡聚糖酶。

**淀粉酶：**合适的淀粉酶包括  $\alpha$ -淀粉酶（ $\alpha$ -1,4-葡聚糖-4-葡聚糖水解酶，EC 3.2.1.1），包括但不限于，芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶（在本上下文中是指“透阿米尔样  $\alpha$ -淀粉酶”），包括地衣芽孢杆菌（*B. licheniformis*）、解淀粉芽孢杆菌（*B. amyloliquefaciens*）、嗜热脂肪芽孢杆菌（*B. stearothermophilus*） $\alpha$ -淀粉酶。商业上可利用的透阿米尔样地衣芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶是 Optitherm® 和 Takatherm®（可购自 Solvay），

Maxamyl<sup>®</sup> (可购于 Gistbrocades/Genencor), Spezym AA<sup>®</sup> (可购于 Genencor)和 Keistase<sup>®</sup> (可购于 Daiwa)。非透阿米尔样  $\alpha$ -淀粉酶包括但不限于, 芬加密尔样  $\alpha$ -淀粉酶家族的成员。

蛋白酶: 合适的蛋白酶包括那些动物、蔬菜或微生物来源的, 优选微生物来源的。这些蛋白酶可是丝氨酸蛋白酶或金属蛋白酶, 优选地, 碱性微生物蛋白酶或胰蛋白酶样蛋白酶。蛋白酶的实例包括氨肽酶, 包括脯氨酰基氨肽酶 (3.4.11.5), X-pro 氨肽酶 (3.4.11.9), 细菌亮氨酰基氨肽酶 (3.4.11.10), 嗜热氨肽酶 (3.4.11.12), 赖氨酰基氨肽酶 (3.4.11.15), 色氨酰基氨肽酶 (3.4.11.17), 和甲硫氨酰基氨肽酶 (3.4.11.18); 丝氨酸内肽酶, 包括胰凝乳蛋白酶 (3.4.21.1), 胰蛋白酶 (3.4.21.4), 黄瓜蛋白酶 (cucumisin) (3.4.21.25), brachyurin (3.4.21.32), 酵母酶 (cerevisin) (3.4.21.48), 以及枯草杆菌蛋白酶 (3.4.21.62); 半胱氨酸内肽酶, 包括木瓜蛋白酶 (3.4.22.2), ficain (3.4.22.3), 木瓜凝乳蛋白酶 (3.4.22.6), 萝摩蛋白酶 (3.4.22.7), actinidain (3.4.22.14), caricain (3.4.22.30), 以及 ananain (3.4.22.31); 天冬氨酸内肽酶, 包括胃蛋白酶 A (3.4.23.1), 曲霉胃蛋白酶 I (Aspergillopepsin I) (3.4.23.18), 青霉胃蛋白酶 (Penicillopepsin) (3.4.23.20), 酵母胃蛋白酶 (Saccharopepsin) (3.4.23.25); 和金属内肽酶, 包括杆菌细胞溶素 (Bacillolysin) (3.4.24.28)。

枯草杆菌蛋白酶的非限制性实例包括枯草杆菌蛋白酶 BPN', 枯草杆菌蛋白酶 amylosacchariticus, 枯草杆菌蛋白酶 168, 枯草杆菌蛋白酶肠系膜肽酶 (mesentericopeptidase), 枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg, 枯草杆菌蛋白酶 DY, 枯草杆菌蛋白酶 309, 枯草杆菌蛋白酶 147, thermitase, 水细胞溶素 (aqualysin), 芽孢杆菌 PB92 蛋白酶, 蛋白酶 K, 蛋白酶 TW7, 以及蛋白酶 TW3。

商业上可使用的蛋白酶包括 Alcalase<sup>™</sup>, Savinase<sup>™</sup>, Primase<sup>™</sup>, Duralase<sup>™</sup>, Esperase<sup>™</sup>, 和 Kannase<sup>™</sup> (Novo Nordisk A/S), Maxatase<sup>™</sup>, Maxacal<sup>™</sup>, Maxapem<sup>™</sup>, Properase<sup>™</sup>, Purafect<sup>™</sup>, Purafect OxP<sup>™</sup>, FN2<sup>™</sup> 以及 FN3<sup>™</sup> (Genencor 国际公司)。

预期在本发明中使用的还有蛋白酶变体，例如，EP 130.756(Genentech), EP 214.435(Henkel), WO 87/04461(Amgen), WO 87/05050(Genex) , EP 251.446(Genencor) , EP 260.105(Genencor), Thomas 等人, (1985), 自然 318: 375-376, Thomas 等人, (1987), 分子生物学杂志(J. Mol. Biol.) 193, 803-813 页, Russel 等人, (1987), 自然 328: 496-500, WO 88/08028(Genex), WO 88/08033(Amgen), WO 89/06279(Novo Nordisk A/S), WO 91/00345(Novo Nordisk A/S), EP 525 610(Solvay) 以及 WO 94/02618(Gist-Brocades N.V.) 中所公开的那些。

蛋白酶的活性可以按照“酶学分析方法”(第三版, 1984, Verlag Chemie, Weinheim, 第五卷)中所描述的方法测定。

脂肪酶：合适的脂肪酶(也称为羧基酯水解酶)包括那些细菌和真菌来源的, 包括三酰基甘油脂肪酶(3.1.1.3)和磷脂酶 A<sub>2</sub>(3.1.1.4)。本发明中所使用的脂肪酶包括但不限于, 腐质霉属(*Humicola*)(又称为 *Thermomyces*)产生的脂肪酶, 例如, 如 EP 258 068 和 EP 305 216 中所描述的, 由 *H.lanuginosa* (*T.lanuginosus*) 所产生的或者如 WO 96/13580 中所描述的由 *H.insolens* 所产生的; 假单胞菌属脂肪酶, 例如, 产碱假单胞菌(*P. alcaligenes*)或类产碱假单胞菌(*P. pseudoalcaligenes*)(EP 218 272), 葱头假单胞菌(*P. cepacia*)(EP 331 376), 司徒茨氏假单胞菌(*P. stutzeri*)(GB 1,372,034), 荧光假单胞菌(*P. fluorescens*), 假单胞菌属的株 SD 705 (WO 95/06720 和 WO 96/27002), *P. wisconsinensis* (WO 96/12012) 中所产生的; 芽孢杆菌脂肪酶, 例如枯草芽孢杆菌(Dartois 等人, 生物化学和生物物理学报(Biochem. Biophys. Acta), 1131: 253-360, 1993), 嗜热脂肪芽孢杆菌(JP 64/744992)或短小芽孢杆菌(WO 91/16422)所产生的。脂肪酶变体的其它实施例, 如 WO 92/05249, WO 94/01541, EP 407 225, EP 260 105, WO 95/35381, WO 96/00292, WO 95/30744, WO 94/25578, WO 95/14783, WO 95/22615, WO 97/04079 以及 WO 97/07202 中所描述那些。优选的商业上可使用的脂肪酶包括 Lipolase

<sup>TM</sup>, Lipolase Ultra <sup>TM</sup>, Lipozyme <sup>TM</sup>, Palatase <sup>TM</sup>, Novozym<sup>TM</sup>435, 以及 Lecitase<sup>TM</sup>, (可购于 Novo Nordisk A/S). 脂肪酶的活性可以按照“酶学分析方法”(第三版, 1984, Verlag Chemie, Weinheim, 第四卷)中所描述的方测定。

优选地, 酶来源于嗜碱微生物, 和/或在升高的温度下显示出酶活性。酶可以从原始细胞中分离或者也可重组地产生, 还可进行化学或遗传修饰。一般地, 以约 0.0001%到约 1%酶蛋白(重量百分比)的量, 将酶加入到水溶液中, 优选地, 约 0.001%到 0.5%, 更优选地, 约 0.01% 到 0.2%。应当理解, 可用常规的方法简单地测定与一种特定的纤维素酶联合使用的在本发明的方法中所用每一种另外的酶所具有的酶活单位的数值。

适用于本发明实施的表面活性剂包括, 但不限于, 非离子型(美国专利 No.4,565,647); 阴离子型; 阳离子型; 以及两性离子型表面活性剂(美国专利 No.3,929,678); 一般地, 它们的浓度为大约 0.002%到约 3%(重量百分比), 优选的重量百分比为大约 0.02% 到约 2%。阴离子型表面活性剂包括但不限于, 线性烷基苯磺酸盐,  $\alpha$ -烯属磺酸盐, 烷基硫酸盐(脂肪醇硫酸盐), 脂肪醇乙氧基硫酸盐, 仲链烷磺酸盐,  $\alpha$ -硫代脂肪酸甲基酯, 烷基或烯基琥珀酸, 以及皂类。非离子型表面活性剂包括, 但不限于, 脂肪醇乙氧基化物, 壬基酚乙氧基化物, 烷基多苷, 烷基二甲基胺氧化物, 乙氧基脂肪酸单乙醇胺, 脂肪酸单乙醇胺, 多羟烷基脂肪酸胺, 以及葡萄糖胺(“葡糖胺”)的 N-酰基 N-烷基衍生物。

增效助剂系统包括, 但不限于, 硅铝酸盐, 硅酸盐, 聚羧酸酯以及脂肪酸, 螯合剂如乙二胺四乙酸, 氨基聚磷酸酯, 尤其是乙二胺四亚甲基膦酸, 以及二亚乙基三胺环戊烷膦酸, 其浓度的重量百分比大约为 5%到 80%, 优选的重量百分比大约为 5%到 30%。

漂白系统可包括氧化剂如过氧化氢, 过硼酸盐, 过乙酸盐或过碳酸盐, 它们可和形成过酸的漂白激活剂如, 四乙酰基乙二胺或壬酰基氧基苯磺酸盐相结合。可选择地, 漂白系统可包括例如, 酰胺、酰亚胺

或者砷的过氧酸。

防沫剂包括，但不限于，聚硅氧烷类（美国专利 No.3,933,672；DC-544(Dow Corning)），一般其包括的重量百分比浓度为约 0.01% 到约 1%。

组合物可能还含有如本领域众所周知的污垢悬浮剂、污垢释放剂、光学增白剂、研磨剂和/或杀菌剂。

染色剂包括，但不限于，Shore (编辑)，纤维素染色（Cellulosic Dyeing），1995，染色工人和着色师，Alden 出版社，Oxford）中公开的染料。

### 生物抛光方法

本发明提供生物抛光织物的方法，包括(a)接触纤维素织物，优选在连续或半连续装置中进行，其中的水溶液包含至少一种低亲和力的纤维素酶，和(b)将接触过的织物经历高温处理。接触步骤包括将织物在含有酶的本体溶液中浸泡较短的时间（一般，少于 5 分钟），然后将织物轧染除去多余的溶液。这使得纤维吸液率（表示为溶液重量：织物重量 X100）在大约 50 到大约 200%之间，优选地，在大约 50 到 130%之间。接触和经历高温的步骤可以同时进行（即一边加热一边将织物和本体溶液接触）或连续进行（即首先将织物和本体溶液接触；任选地除去多余的溶液，随后将湿的织物经历高温的处理）。

要实现有效的生物抛光，可将水溶液中酶的浓度（CMCU/ml）、织物所升至的温度，以及整个温育温度加以变化，其依据

- (i) 织物的性质；
- (ii) 所使用的特定低亲和力纤维素酶；
- (iii) 溶液的 pH；
- (iv) 织物和本体溶液相接触的持续时间；以及
- (v) 水溶液中其它组分的存在。

所使用的适当酶浓度的测定以及其它变量的最优化可以仅仅用常规实验法，通过建立各种条件的矩阵以及在矩阵中测定不同点而完成。

例如，酶浓度、接触温度、接触时间都可改变，然后评价所得到的纤维或纺织品的 (a) 一个或多个生物抛光特性，例如，织物手感、外观或起球抗性，以及任选的 (b) 织物强度和/或重量的潜在损失。

织物手感和外观可通过检验表，用 1-3 (最差到最好) 的数值来评估。

可使用任何常规的方法测量起球情况，例如，根据美国测试和材料协会的方案 ASTM D 4970-89，使用 Martindale 磨损和起球检测器 (James H. Heal & Co, 英国)。此方法中，起球用在可视水平上分为 1 到 5 的等级来进行估价，其中 1 表示严重的起球，5 表示没有起球。

可使用任何常规的方法来评估织物强度，例如，根据 ASTM 方案 D 3786-87，使用 Mullen 爆破检测器 (C 型, B.F. Perkins, Chicopee 摩洛哥)。

在本发明的实施中，选择条件以使其中一个或多个生物抛光特性，尤其是起球与未处理的对照相比得到改善，而织物的强度损失最小。优选地，可观察到起球抗性改进至少约 0.25，更优选地至少约 0.5，最优选地至少约 1.0。优选地，织物强度的损失少于约 20%，更优选地少于约 10%，最优选地少于约 5%。

一般，本体溶液中含有浓度小于约 200CMCU/毫升的低亲和力的纤维素酶，更优选地，小于约 100CMCU/毫升，最优选地，小于约 50CMCU/毫升；温度至少在约 65℃，优选地至少约 75℃，最优选地至少在约 85℃；pH 在约 4 到 12 之间，优选地在约 5 到 10 之间，最优选地在约 7 到 10 之间。

组合方法：本发明还包括组合方法，其中将生物抛光与煮练和/或染色同时进行。在这些实施例中，水本体溶液还含有其它的成分，包括，但不限于此处所公开的酶，以及其它成分，例如，染料 (包括但不限于活性染料、直接染料、硫化染料以及还原染料) 和染色助促进剂。参见，Shore (编)，纤维素染色，1995 (染色工人和着色师，Alden 出版社，Oxford)。接触过的织物经历高温处理，这导致染色或煮练和生

物抛光同时进行。

下面的实施例是本发明的非限定性的说明。

### 实施例 1: 使用网球菌属的纤维素酶的生物抛光

采用以下的实验来评价在连续装置中, 网球菌属的纤维素酶的生物抛光能力。

#### 方法:

所使用的织物是针织织物 460 (测试织物公司), 它是 100%棉质漂白的双螺纹组织。织物被切成 20X30 厘米的小片, 每片的重量约为 12.5 克。每片的重量是使之处于  $65\pm 2\%$  的相对湿度和  $21\pm 2^{\circ}\text{C}$  ( $70\pm 3^{\circ}\text{F}$ ) 温度给湿至少 24 小时后才测定的。

用 15mM 的磷酸钠配制包括网球菌属纤维素酶催化结构域的纤维素酶 (它的序列如 SEQ ID NO: 2 中所示)。pH 和酶浓度如下面的表 1 中所示。

布样和酶溶液接触至少 45 秒钟, 然后用垫板轧染, 而后称重, 立即悬挂于 Mathis 蒸汽多用铁灶 (steam range) (PSA-HTF 型) (Werner Mathis 美国公司 Concord, NC) 中。织物上溶液的百分比 (% 纤维吸液率) 和对织物的纤维素酶活性的比例如表 1 所示。在  $90^{\circ}\text{C}$  和 100%相对湿度下处理织物布样 90 分钟。接下来将全部布样转移, 在去离子水中冲洗至少 5 分钟, 然后风干。最后, 使织物处于  $65\pm 2\%$  相对湿度和  $21\pm 2^{\circ}\text{C}$  ( $70\pm 3^{\circ}\text{F}$ ) 温度给湿至少 24 小时后再给予评价。

可根据美国测试和材料协会方案 D3786-87: 纺织品水压爆破试验的标准测试方法以及无纺布-薄膜爆破强度检测方法, 使用 C 型 Mullen 爆破检测器测定织物的强度。这个结果代表至少 8 个测定平均值。起球抗性根据美国测试和材料协会方案 D 4970-89: 有关纺织织物起球抗性和其它相关表面改变的标准测试方法 (Martindale 压力测试器方法) 而进行。经过 500 次旋转, 织物上的起球可用可视水平上分为 1 到 5 的等级来评价, 其中 1 表示非常严重的起球, 5 表示没有起球。这个结

果代表至少两次测定结果的平均值。

### 结果:

结果如下面表 1 和图 1 所示。随着酶浓度的升高,起球抗性也相应地上升。pH8.1 时起球抗性的增加比 pH6.0 时要大。在所示的酶浓度和 pH 条件下,本发明的方法将导致最小的强度损失 (pH6.0 时损失少于 5%, pH8.1 时几乎检测不到损失)。表面上均匀的起球也表明织物和纤维素酶均匀接触。

这些结果证明用网球菌属的纤维素酶对棉织物进行生物抛光,在检测不到强度损失的情况下大大地提高了织物的抗起球能力。

表 1

| # | 溶液<br>pH | 纤维素酶溶液<br>(CMCU/毫升) | 纤维吸液率<br>(%W/W) | 纤维素酶活性<br>(CMCU/克织物) | 强度损失<br>(%) | 起球抗性<br>(500 转) |
|---|----------|---------------------|-----------------|----------------------|-------------|-----------------|
| 1 | 6        | 0                   | 125             | 0                    | 0           | 1.5             |
| 3 | 6        | 4.8                 | 130             | 6.2                  | 2.4         | 2               |
| 5 | 6        | 9.7                 | 137             | 13.3                 | 3.5         | 2.5             |
| 2 | 8.1      | 0                   | 128             | 0                    | 0           | 2               |
| 4 | 8.1      | 4.8                 | 131             | 6.3                  | 0           | 2.75            |
| 6 | 8.1      | 9.7                 | 137             | 13.3                 | 0           | 3               |

### 实施例 2: 使用热球菌属纤维素酶的生物抛光

采用以下的实验来评价在连续装置中,热球菌属纤维素酶的生物抛光能力。

除所使用的缓冲液是在 2.5 升去离子水中溶解 9.53 克十水合四硼酸钠,并将 pH 值调至 9.2 外,基本上按照实施例 1 中所描述的进行生物抛光,纤维素酶由热球菌属产生(它的序列如 SEQ ID NO: 1 中所示)。

### 方法:

布样按照实施例 1 中所描述的进行轧染和处理。织物纤维吸液率为 94%。将织物在 pH9.2, 90℃, 相对湿度 100%条件下处理 90 分钟。除起球抗性在 125 转后评估外,冲洗、干燥、评估方法都与实施例 1

相同。

### 结果:

与不接触酶的对照相比,所有纤维素酶处理的布样都没有出现统计学上显著的强度损失。另一方面,起球抗性随酶活性的增加而增加(图2)。这些结果表明,热球菌属的纤维素酶对生物抛光是适用的,在浸轧汽蒸染色机装置中,几乎不引起织物强度的损失。同时能够得到较好的外观和织物手感。

### 实施例 3: 联合处理

采用以下的实验来进行本发明方法联合煮练和生物抛光的评估。

### 方法:

所用织物为织物 4600,是一种没有煮练和漂白的 100%棉织物。织物的预处理和缓冲液与以上实施例 2 中所描述的相同。

本体溶液含有:(a)实施例 2 中所描述的热球菌属的纤维素酶,浓度为 6.12CMCU/ml,和 4.9CMCU/g 织物;以及(b)浓度为 1.93 微摩尔/毫升/分钟的热稳定的果胶酸裂解酶。布样按照实施例 1 中所描述的进行轧染和处理。织物纤维吸液率为 80%。处理条件为 pH9.2, 90℃,相对湿度(RH)100%,处理时间为 90 分钟。

冲洗、干燥、评估方法与实施例 1 所述相同。依据 AATCC 测试方法估价吸湿速度。让从 1 厘米高滴定管滴下来的水滴落到拉紧的织物样品的表面。水在织物表面的消失的时间被记为吸水时间。每一个样品进行八次测定,并取其平均值。

### 结果:

不论是用纤维素酶处理还是用纤维素酶和果胶酶联合处理都可提高织物的起球抗性(表 2)。此外,与没有用酶处理的对照相比,平均吸湿时间也大大减少(表 3)。这些结果表明,本发明的方法可用

于联合的生物抛光和煮练。

表 2

|          | 起球抗性 (125 转) |
|----------|--------------|
| 无酶       | 2            |
| 纤维素酶     | 2.5          |
| 果胶酶      | 2            |
| 纤维素酶+果胶酶 | 2.5          |

表 3

|          | 吸湿时间 (秒) |    |     |     |      |      |      |      |      |      |
|----------|----------|----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|
|          | 1        | 2  | 3   | 4   | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 平均   |
| 无酶       | 7        | 50 | 115 | 249 | >300 | >300 | >300 | >300 | >300 | >300 |
| 纤维素酶     | 64       | 40 | 40  | 46  | 164  | 124  | 214  | 182  |      | 109  |
| 果胶酶      | 61       | 70 | 65  | 64  | 94   | 96   | 95   | 64   | 104  | 79   |
| 纤维素酶+果胶酶 | 37       | 40 | 39  | 30  | 28   | 22   | 28   | 28   |      | 32   |

#### 实施例 4: 低亲和力纤维素酶的鉴定

为了鉴定低亲和力的纤维素酶,使用以下的方法来测定多肽对纤维素的亲和力。

将 200 微升 1 毫克/毫升的酶溶液与 200 微升的 10% (重量/体积) 微晶纤维素 Avicel 悬浮液混合,微晶纤维素 Avicel 悬浮液是用 0.1M 的磷酸缓冲液 (pH7.5) 配制的,混合 15 分钟。混合物在 4℃温育 1 小时,然后在微量离心管中 5000 转/分离心 5 分钟。去除上清,用 1 毫升缓冲液洗涤微晶纤维素 Avicel,再次沉淀。最后,将微晶纤维素 Avicel 沉淀悬浮于 SDS-PAGE 的上样缓冲液,95℃温育 2 分钟。5000 转/分离心 5 分钟后,回收上清,上样于 4-20%梯度丙烯酰胺 SDS 凝胶 (Novex),电泳在 Xcell minicell 中进行 (Novex)。电泳和染色按照生产商的使用说明进行。

使用本方法鉴定了低亲和力的纤维素酶,即:使用考马斯蓝染色在 SDS-PAGE 中不出现可检测条带的纤维素酶。

此处引用所涉及的所有专利、专利申请和参考文献的整体内容均引入作为参考。

本领域技术人员可依据以上的详细描述进行本发明的许多变更。这些显而易见的变更包含在附加的权利要求书的整个预期范围之内。

## 序列表

<110> Liu, Jiyin  
Condon, Brian

<120> 用嗜热性纤维素酶的含纤维素织物的连续生物抛光

<130> 5464.204-WO

<150> 60/068,274

<151> 1997-12-19

<160> 2

<170> FastSEQ 之 Windows 3.0 版

<210> 1

<211> 319

<212> PRT

<213> 热球菌属

<400> 1

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

<210> 2

&lt;211&gt; 288

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 网球菌属的种

&lt;400&gt; 2

```

Met Lys Lys Ser Leu Leu Ser Leu Ile Leu Ile Leu Leu Leu Ile Thr
 1          5          10          15
Leu Ser Phe Ser Gln Thr Pro Lys Tyr Lys Asp Ala Phe Ile Leu Lys
          20          25          30
Ala Pro Ser Ser Gly Asp Val Thr Thr Lys Asn Leu Pro Leu Thr Leu
          35          40          45
Glu Leu Asn Phe Trp Asn Ile Ala Asn Tyr Glu Gly Asn Thr Trp Met
          50          55          60
Ala Phe Tyr Lys Glu Glu Asp Thr Val Glu Tyr Tyr Ala Asp Ile Lys
          65          70          75          80
Asn Ile Val Leu Lys Asp Lys Asn Ser Trp Val His Gly Tyr Pro Glu
          85          90          95
Val Tyr Tyr Gly Tyr Lys Pro Trp Ala Gly His Gly Asn Ser Ile Glu
          100          105          110
Lys Leu Ala Leu Pro Lys Lys Val Ser Glu Phe Pro Asp Val Leu Phe
          115          120          125
Asn Leu Lys Tyr Asn Ile Trp Tyr Glu Lys Asn Leu Pro Ile Asn Phe
          130          135          140
Ala Met Glu Thr Trp Ile Thr Lys Glu Pro Tyr Gln Lys Thr Val Thr
          145          150          155          160
Ser Gly Asp Ile Glu Met Met Val Trp Leu Tyr Ala Asn Arg Leu Ser
          165          170          175
Pro Ala Gly Arg Lys Val Gly Glu Val Lys Ile Pro Ile Ile Leu Asn
          180          185          190
Gly Asn Gln Lys Asp Ile Ile Trp Glu Val Tyr Leu Ser Pro Met Ser
          195          200          205
Trp Asp Tyr Val Ala Tyr Lys Ser Lys Glu Asn Ile Leu Gln Gly Gln
          210          215          220
Val Lys Ile Pro Ile Asn Glu Phe Leu Lys His Leu Arg Thr Ile Leu
          225          230          235          240
Ala Asn Asn Pro Ser Arg Ile Thr Pro Glu Lys Phe Asp Gln Met Tyr
          245          250          255
Val Thr Val Trp Glu Ile Gly Thr Glu Phe Gly Asp Pro Tyr Thr Thr
          260          265          270
Glu Ala Lys Phe Gly Trp Thr Phe Ser Asn Phe Asp Ile Glu Leu Lys
          275          280          285

```

图 1

