



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112189052 A

(43) 申请公布日 2021.01.05

(21) 申请号 201980034653.2

(22) 申请日 2019.06.13

(30) 优先权数据

62/686,763 2018.06.19 US

62/852,320 2019.05.24 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.11.23

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/036888 2019.06.13

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/245838 EN 2019.12.26

(71) 申请人 宝洁公司

地址 美国俄亥俄州

(72) 发明人 弗里茨·格德埃格伯

戴维·亚伦·埃斯特尔

莉莉娅·玛利亚·巴别

泰斯·卡佩尔

维克托·阿列克谢耶夫

西纳·普赖斯里尔斯

海蒂丝·比尔卢尔·恩靳

哈尔姆·扬·穆尔德

桑德·范斯蒂格特-桑斯

E·M·佩雷斯-普拉特比努埃萨

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

公司 11021

代理人 关旭颖 贺卫国

(51) Int.Cl.

G12N 9/54 (2006.01)

G11D 3/386 (2006.01)

权利要求书2页 说明书42页

序列表5页

(54) 发明名称

自动盘碟洗涤剂组合物

(57) 摘要

本发明提供了一种具有新型蛋白酶的自动盘碟洗涤清洁组合物。

1. 一种包含蛋白酶的自动盘碟洗涤清洁组合物,其中所述蛋白酶是与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%同一性的变体,并且所述变体在第39位处具有谷氨酸(E)残基并且还在一个或多个位置处包含一个或多个氨基酸取代,所述一个或多个氨基酸取代选自:

(i) 3V、4T、8V、9A/C/E/G/H/K/M/N/Q/W/Y、10A/K/M/N/Q/W、11A/I/S/T、12A/C/D/G/M/N/R/S/T/V/W、14D、15D/E/F/H/I/K/M/P/Q/V/W/Y、16L/M/S、17C/E/F/G/I/L/N/V/W/Y、18A/C/D/E/F/G/L/M/Q/T、19A/C/D/E/F/H/I/K/L/N/Q/S/T/W/Y、20A/C/D/M/N/T、24A/E、25A/C/D/E/M/N、26A/I、33T、36C/E/I/L/M/Q/T/V、42C/D/E/M/Q、43L、44C/E/F/G/H/I/K/L/N/Q/T/V/W/Y、47I/Y、50I、52A/C/D/H/L/M/N/S/T/Y、54A/C/G/L/M/N/T/V、55A/C/D/E/H/N/S/Y、57D/E/H/M/N/Q/T、59A/C/D/E/M/N/Q/T、60S、69S、76A/D/E/F/H/K/L/M/N/R/T/Y、82A、84D/F/H/Y、95A/N、96M/Q、97E/H/K、101T、102L/M、104A/D/H/M/N/T/V/W/Y、105V、107K/M、110L、113T/V、114V、115E/H/Q、116E/H、118D/E/N、120V、128G、129A/H/N/Y、131A/D/E/I/M/N/P/Q/V、133M、135A/E/F/H/I/K/L/M/S/T/V/W/Y、136M、137L、139E/S、141E/H/N、142A/D/E/H/M/N/Q、143E/H/M/N/V、144E/N、145C、147C、148L/V、150M、156C/D/N/T、157A/C/D/E/N/Q、158A/C/F/L/M/N/Q/V/W/Y、159L、160A/C/D/M/T、161W、164A/K/M/Q/Y、166D/E/I/P/Q/V、167E、170G、174V、176A/C/D/L/M/N/S、177A/C/D/E/G/H/K/L/M/Q/S/W/Y、178D、179A/C/E/F/G/H/I/K/M/Q/S/V/W/Y、180K、182A/C/D/E/G/H/I/K/L/P/Q/T/V/W/Y、186F、188C/D/E/I/L/M/N/Q/S/V/W/Y、189C/D/E、190M、191E、192C/M、193A/M、198D/E、200H/I/K/M/V/Y、207K/L/N/Q/T、209P、210C/D/E/F/G/L/N/P/Q/Y、211E/L/Q/R、212A/C/Q、218C/S、227M/Q、228L、230A/D/L/M/N、231C/E/H/I/L/N/Q/S/T、232F/H/Q/R/W、234A/D/E/M/T/W/Y、236G/S/T、238A/D/E/M/V、239D/E/L/M/N/T、242A、245E、246A/L、247E/Q、249C/D/E/F/I/L/S/Y、250S/T、253E、254P/Y、255A/C/D/E/F/I/M/V/W、256C/F/H/M/W/Y、257C/M、259D/E/M/N、262L、263D/Q、264T、265A/M/N/Q、266L/M/N/Q/R、268A/C/D/E和269H/P/W;

其中所述变体的氨基酸位置通过与SEQ ID NO:1的氨基酸序列的对应关系进行编号。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述变体在一个或多个位置处包含一个或多个氨基酸取代,所述一个或多个氨基酸取代选自:3V;9A/C/E/K;10A/M/N/Q;11A/I;12C/D;14D;15D/E/H/I/M/V/Y;16M;17C/F/I/L/W;18D/E;19A/C/D/E/H/I/L/Q/S/T/W;24A/E;36C/E;42C/D/E;44C/E/W/Y;52A/C/D/H;54L/M;55A/D/H/S;57D/E;59A/C/D/E/N;60S;76E/H/K/L/M/N/T;84H/Y;;95N;96Q;97E;104A/D;107K;110L;116E;129H/N/Y;131D/E;135A/E/H/I/L/M/S/T/V/W/Y;136M;141E;142E;144E;156C/D;157A/C/D/E;158A/C;160A/M;164A/M/Q/Y;166D/E;176C/D;177C/D/M/S/Y;178D;179A/C/E/F/G/H/I/K/M/Q/S/V/W/Y;182D/E;188C/D/E/M;189C/D/E;193A/M;198D/E;200I/Y;207K/L/Q;209P;210D/E/N;238A/D/E/M;239D/E;241C/G/L/Q/T/Y;245E;247E/249C/D/E/Y;253E;255C/D/E;256C/Y;259D/E;262L;268D/E;和269H/W。

3. 根据权利要求1或2中任一项所述的组合物,其中所述蛋白酶是与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少95%同一性的变体。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述组合物不含磷酸盐。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含按所述组合物的重量计10%至50%的有机络合剂体系。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,所述组合物包含按所述组合物的重量计

超过10%的漂白剂。

7. 根据前述权利要求所述的组合物,所述组合物包含漂白活化剂和/或漂白催化剂,优选锰催化剂。

8. 根据权利要求5至7中任一项所述的组合物,其中所述络合剂体系包含选自由柠檬酸、甲基甘氨酸二乙酸、谷氨酸-N,N-二乙酸、亚氨基二琥珀酸、羧甲基菊粉、它们的盐以及它们的混合物组成的组的络合剂,优选甲基甘氨酸二乙酸的盐。

9. 根据权利要求5至8中任一项所述的组合物,其中所述络合剂体系包含优选地重量比为约0.5:1至约2:1的柠檬酸和甲基甘氨酸二乙酸。

10. 根据权利要求5至9中任一项所述的组合物,其中所述漂白剂为过碳酸盐。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述组合物还包含 α 淀粉酶,所述 α 淀粉酶优选地在等同于SEQ ID No.11中的202的位置处具有突变。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含分散剂聚合物,优选羧化/磺化聚合物。

13. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,所述组合物包含:

- i) 按所述组合物的重量计10%至50%的有机络合剂体系;
- ii) 漂白体系,所述漂白体系包含按所述组合物的重量计至少10%的过碳酸盐和任选地漂白活化剂和/或漂白催化剂;
- iii) 非离子表面活性剂;
- iv) 分散剂聚合物;
- v) 淀粉酶;以及
- vi) 任选但优选地玻璃护理剂。

14. 一种在盘碟洗涤机中用软水洗涤脏污盘碟的方法,所述方法包括以下步骤:

- i) 提供所述脏污盘碟;
- ii) 用根据前述权利要求中任一项所述的清洁组合物处理所述盘碟;以及
- iii) 任选地冲洗所述盘碟。

15. 根据权利要求1至12中任一项所述的组合物用于在自动盘碟洗涤中去除焦糖布丁的用途。

自动盘碟洗涤剂组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及洗涤剂领域。具体地，本发明涉及包含特定蛋白酶的自动盘碟洗涤剂。与包含常规蛋白酶的组合物相比，所述组合物提供改善的蛋白质性污垢去除。

背景技术

[0002] 人们一直期望改善自动盘碟洗涤剂组合物的性能及其环境特征。

[0003] 由于环境问题，磷酸盐逐渐被可生物降解的络合剂替代。这些络合剂可具有对金属的强结合能力并且/或者以高含量使用，并且可不利地影响酶的稳定性，具体地，络合剂可通过提取蛋白酶的结构性钙金属离子而不利地影响蛋白酶。蛋白酶可在产品和/或使用中受到影响。虽然具有高含量漂白剂的组合物可提供良好的清洁效果，但是漂白剂也可以损害酶、具体地蛋白酶的性能。高含量的络合剂、高温和长时间循环会加剧这种效果。

[0004] 自动盘碟洗涤剂组合物可被设计成在某些应用条件下具有最佳性能，例如组合物可被设计成在软水循环中具有最佳性能，然而在软水循环中具有最佳性能的组合物在硬水循环中可能不具有最佳性能，反之亦然。

[0005] 本发明的目的是提供一种盘碟洗涤剂组合物，该组合物可更好地去除蛋白质性污垢。优选地，当该组合物用于软水中时，并且优选地在不同的水硬度条件下，所述去除应当是良好的。还期望即使在胁迫条件下，诸如在热的长时间循环中洗涤的重垢负荷下，该组合物也具有改善的稳定性并且提供改善的性能。

发明内容

[0006] 根据本发明的第一方面，提供了包含特定蛋白酶的自动盘碟洗涤剂组合物。该组合物优选地为不含磷酸盐的自动盘碟洗涤清洁组合物。更优选地，该组合物包含络合剂体系，并且更优选地该组合物包含络合剂体系和高含量的漂白体系。该组合物在鸡蛋和/或焦糖布丁去除方面表现出改善的稳定性和/或性能。本发明的组合物可适于在自动盘碟洗涤中使用的软水和/或高温和/或长时间循环。

[0007] 根据本发明的第二方面，提供了使用本发明的组合物进行自动盘碟洗涤的方法。还提供了本发明的组合物用于在自动盘碟洗涤中提供焦糖布丁去除的用途。

[0008] 结合本发明的第一方面描述的本发明的组合物的元素作必要修改之后适用于本发明的其他方面。

具体实施方式

[0009] 本发明涵盖包含特定蛋白酶的自动盘碟洗涤清洁组合物。该组合物优选地不含磷酸盐，并且优选地包含络合剂体系。与包含常规蛋白酶的清洁组合物相比，所述组合物在多种条件下具有改善的稳定性并实现改善的清洁效果。所述组合物提供良好的蛋白质清洁效果，尤其是对于鸡蛋和/或焦糖布丁污垢而言。本发明还涵盖自动盘碟洗涤的方法。本发明的组合物可在热、长时间循环和使用软水时提供良好的清洁效果。

[0010] 所谓“软”水在本文中是指硬度小于约2gpg (34.3ppm) 的水。格令/加仑 (gpg) 是定义为1格令 (64.8毫克) 碳酸钙溶解于1US加仑水 (3.785412L) 中的水硬度单位。它可转换为17.1份每百万份 (ppm)。

[0011] 所谓“热”循环在本文中被理解为其中主循环在高于50℃、优选地高于55℃的温度下执行的盘碟洗涤程序。

[0012] 所谓“长时间”循环在本文中被理解为其中主循环具有至少25分钟、优选地至少30分钟并且更优选地至少35分钟的持续时间的盘碟洗涤程序。

[0013] 本发明的组合物包含变体蛋白酶,该变体蛋白酶相对于参考蛋白酶 (SEQ ID NO:1 的蛋白酶) 具有限定的同一性百分比。

[0014] 本发明的组合物的蛋白酶在本文中有时称为“本发明的蛋白酶”。具有序列ID NO:1的蛋白酶在本文中有时称为“参考蛋白酶”或“亲本蛋白酶”。

[0015] 两个氨基酸序列之间或两个核苷酸序列之间的相关性由参数“序列同一性”描述。

[0016] 术语“变体”是指相对于参考蛋白酶在一个或多个 (例如,若干个) 位置处包含突变 (即,取代、插入和/或缺失) 的蛋白酶。取代是指占据某一位置的氨基酸被另一不同的氨基酸替换;缺失是指占据某一位置的氨基酸的移除;并且插入是指邻近占据某一位置的氨基酸并紧接在该氨基酸之后添加氨基酸。本发明的变体与参考蛋白酶具有至少90%、优选地至少92%、更优选地至少95%并且特别是99%的同一性。

[0017] SEQ ID NO:1对应于具有S039E取代的吉氏芽孢杆菌 (*B.gibsonii*) 枯草杆菌蛋白酶Bgi02446。

[0018] 术语“野生型”蛋白酶是指由天然存在的微生物诸如存在于自然界中的细菌、酵母或丝状真菌表达的蛋白酶。

[0019] 本发明提供了包含变体的组合物,所述变体包含在与SEQ ID NO:1的第39位对应的位置处具有谷氨酸的氨基酸序列并且还包含一个或多个另外的氨基酸取代。当与包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的蛋白酶的组合物相比时,本文提供的变体展示出一种或多种改善的特性,诸如改善的清洁性能、或改善的稳定性、或改善的清洁性能和改善的稳定性两者。

[0020] 酶相关术语

[0021] 氨基酸修饰的命名

[0022] 在描述本文的酶变体时,使用以下命名法以便于参考:原始氨基酸:位置:取代的氨基酸。

[0023] 根据该命名法,例如在第195位用谷氨酸取代甘氨酸被显示为G195E。同一位置处甘氨酸的缺失被示出为G195*,并且另外的氨基酸残基诸如赖氨酸的插入被示出为G195GK。在特定酶与其他酶相比包含“缺失”并在该位置进行插入的情况下,这表示为*36D以在第36位插入天冬氨酸。多个突变由加号分开,即:S99G+V102N,分别表示在第99位和第102位用丝氨酸和缬氨酸取代甘氨酸和天冬酰胺的突变。在某一位置 (例如,102) 的氨基酸可被选自一组氨基酸 (例如由N和I组成的组) 的另一氨基酸取代的情况下,这将由V102N,I表示。

[0024] 在所有情况下,采用公认的IUPAC单字母或三字母氨基酸缩写。

[0025] 蛋白酶氨基酸编号

[0026] 本专利中所用的编号是相对于SEQ ID NO:1的编号。

[0027] 氨基酸同一性

[0028] 两个氨基酸序列之间的相关性由参数“同一性”描述。就本发明目的而言,两个氨基酸序列的比对通过使用来自EMBOSS软件包(<http://emboss.org>),版本2.8.0的Needle程序进行确定。Needle程序执行Needleman,S.B.和Wunsch,C.D.在(1970) J.Mol.Biol.48:443-453中描述的全局比对算法。使用的取代矩阵为BLOSUM62,空位开放罚分为10,并且空位延伸罚分为0.5。

[0029] 本文所用的酶的氨基酸序列(“本发明序列”)与不同氨基酸序列(“外来序列”)之间的同一性程度被计算为两个序列的比对中的精确匹配数除以“本发明序列”的长度或“外来序列”的长度,取最短者。结果以同一性百分比表示。当“本发明序列”和“外来序列”在重叠的相同位置具有相同的氨基酸残基时,发生精确匹配。序列的长度是序列中氨基酸残基的数目。

[0030] 术语“基于琥珀酸盐的化合物”和“基于琥珀酸的化合物”在本文中可互换使用。

[0031] 如本文所用,当用于权利要求中时,冠词诸如“一种”和“一个”被理解为是指一个或多个受权利要求保护或描述的物质。

[0032] 除非另外指明,否则所有组分或组合物水平均是就该组分或组合物的活性部分而言,且不包括可能存在于此类组分或组合物的可商购获得的来源中的杂质,例如残余溶剂或副产物。

[0033] 除非另外指明,否则所有百分比和比率均按重量计算。除非另外指明,否则所有百分比和比率均基于总组合物计算。

[0034] 本发明的蛋白酶

[0035] 本发明的变体与SEQ ID NO:1的蛋白酶具有至少90%、更优选地至少92%、更优选地至少95%并且特别是至少99%的同一性。该变体在第39位处具有谷氨酸(E)残基,并且还在一个或多个位置处包含一个或多个氨基酸取代,所述一个或多个氨基酸取代选自:

[0036] (i) 3V、4T、8V、9A/C/E/G/H/K/M/N/Q/W/Y、10A/K/M/N/Q/W、11A/I/S/T、12A/C/D/G/M/N/R/S/T/V/W、14D、15D/E/F/H/I/K/M/P/Q/V/W/Y、16L/M/S、17C/E/F/G/I/L/N/V/W/Y、18A/C/D/E/F/G/L/M/Q/T、19A/C/D/E/F/H/I/K/L/N/Q/S/T/W/Y、20A/C/D/M/N/T、24A/E/、25A/C/D/E/M/N、26A/I、33T、36C/E/I/L/M/Q/T/V、42C/D/E/M/Q、43L、44C/E/F/G/H/I/K/L/N/Q/T/V/W/Y、47I/Y、50I、52A/C/D/H/L/M/N/S/T/Y、54A/C/G/L/M/N/T/V、55A/C/D/E/H/N/S/Y、57D/E/H/M/N/Q/T、59A/C/D/E/M/N/Q/T、60S、69S、76A/D/E/F/H/K/L/M/N/R/T/Y、82A、84D/F/H/Y、95A/N、96M/Q、97E/H/K、101T、102L/M、104A/D/H/M/N/T/V/W/Y、105V、107K/M、110L、113T/V、114V、115E/H/Q、116E/H、118D/E/N、120V、128G、129A/H/N/Y、131A/D/E/I/M/N/P/Q/V、133M、135A/E/F/H/I/K/L/M/Q/S/T/V/W/Y、136M、137L、139E/S、141E/H/N、142A/D/E/H/M/N/Q、143E/H/M/N/V、144E/N、145C、147C、148L/V、150M、156C/D/N/T、157A/C/D/E/N/Q、158A/C/F/L/M/N/Q/V/W/Y、159L、160A/C/D/M/T、161W、164A/K/M/Q/Y、166D/E/I/P/Q/V、167E、170G、174V、176A/C/D/L/M/N/S、177A/C/D/E/G/H/K/L/M/Q/S/W/Y、178D、179A/C/E/F/G/H/I/K/M/Q/S/V/W/Y、180K、182A/C/D/E/G/H/I/K/L/P/Q/T/V/W/Y、186F、188C/D/E/I/L/M/N/Q/S/V/W/Y、189C/D/E、190M、191E、192C/M、193A/M、198D/E、200H/I/K/M/V/Y、207K/L/N/Q、209P、210C/D/E/F/G/L/N/P/Q/Y、211E/L/Q/R、212A/C/Q、218C/S、227M/Q、228L、230A/D/L/M/N、231C/E/H/I/L/N/Q/S/T、232F/H/Q/R/W、234A/D/E/M/T/W/Y、236G/S/T、238A/D/E/

M/V、239D/E/L/M/N/T、242A、245E、246A/L、247E/Q、249C/D/E/F/I/L/S/Y、250S/T、253E、254P/Y、255A/C/D/E/F/I/M/V/W、256C/F/H/M/W/Y、257C/M、259D/E/M/N、262L、263D/Q、264T、265A/M/N/Q、266L/M/N/Q/R、268A/C/D/E和269H/P/W；

[0037] 其中所述变体的氨基酸位置通过与SEQ ID NO:1的氨基酸序列的对应关系进行编号。

[0038] 该变体与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%的同一性。该变体包含选自以下项组成的组的至少两个、更优选地至少三个、更优选地至少四个氨基酸取代(使用SEQ ID NO:1编号)：

[0039] (ii) 3V、4T、8V、9A/C/E/G/H/K/M/N/Q/W/Y、10A/K/M/N/Q/W、11A/I/S/T、12A/C/D/G/M/N/R/S/T/V/W、14D、15D/E/F/H/I/K/M/P/Q/V/W/Y、16L/M/S、17C/E/F/G/I/L/N/V/W/Y、18A/C/D/E/F/G/L/M/Q/T、19A/C/D/E/F/H/I/K/L/N/Q/S/T/W/Y、20A/C/D/M/N/T、24A/E/、25A/C/D/E/M/N、26A/I、33T、36C/E/I/L/M/Q/T/V、42C/D/E/M/Q、43L、44C/E/F/G/H/I/K/L/N/Q/T/V/W/Y、47I/Y、50I、52A/C/D/H/L/M/N/S/T/Y、54A/C/G/L/M/N/T/V、55A/C/D/E/H/N/S/Y、57D/E/H/M/N/Q/T、59A/C/D/E/M/N/Q/T、60S、69S、76A/D/E/F/H/K/L/M/N/R/T/Y、82A、84D/F/H/Y、95A/N、96M/Q、97E/H/K、101T、102L/M、104A/D/H/M/N/T/V/W/Y、105V、107K/M、110L、113T/V、114V、115E/H/Q、116E/H、118D/E/N、120V、128G、129A/H/N/Y、131A/D/E/I/M/N/P/Q/V、133M、135A/E/F/H/I/K/L/M/Q/S/T/V/W/Y、136M、137L、139E/S、141E/H/N、142A/D/E/H/M/N/Q、143E/H/M/N/V、144E/N、145C、147C、148L/V、150M、156C/D/N/T、157A/C/D/E/N/Q、158A/C/F/L/M/N/Q/V/W/Y、159L、160A/C/D/M/T、161W、164A/K/M/Q/Y、166D/E/I/P/Q/V、167E、170G、174V、176A/C/D/L/M/N/S、177A/C/D/E/G/H/K/L/M/Q/S/W/Y、178D、179A/C/E/F/G/H/I/K/M/Q/S/V/W/Y、180K、182A/C/D/E/G/H/I/K/L/P/Q/T/V/W/Y、186F、188C/D/E/I/L/M/N/Q/S/V/W/Y、189C/D/E、190M、191E、192C/M、193A/M、198D/E、200H/I/K/M/V/Y、207K/L/N/Q、209P、210C/D/E/F/G/L/N/P/Q/Y、211E/L/Q/R、212A/C/Q、218C/S、227M/Q、228L、230A/D/L/M/N、231C/E/H/I/L/N/Q/S/T、232F/H/Q/R/W、234A/D/E/M/T/W/Y、236G/S/T、238A/D/E/M/V、239D/E/L/M/N/T、242A、245E、246A/L、247E/Q、249C/D/E/F/I/L/S/Y、250S/T、253E、254P/Y、255A/C/D/E/F/I/M/V/W、256C/F/H/M/W/Y、257C/M、259D/E/M/N、262L、263D/Q、264T、265A/M/N/Q、266L/M/N/Q/R、268A/C/D/E和269H/P/W；

[0040] 其中所述变体的氨基酸位置通过与SEQ ID NO:1的氨基酸序列的对应关系进行编号。

[0041] 所述组合物非常有利于去除鸡蛋、焦糖布丁并且/或者呈现出良好的稳定性。

[0042] 在焦糖布丁去除方面，特别优选的组合物包含蛋白酶，其中该蛋白酶是与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%同一性的变体，并且该变体在一个或多个位置处包含一个或多个氨基酸取代，所述一个或多个氨基酸取代选自：3V、9A/C/E/K、10A/M/N/Q、11A/I、12C/D、14D、15D/E/H/I/M/V/Y、16M、17C/F/I/L/W、18D/E、19A/C/D/E/H/I/L/Q/S/T/W、24A/E、36C/E、42C/D/E、44C/E/W/Y、52A/C/D/H、54L/M、55A/D/H/S、57D/E/、59A/C/D/E/N、60S、76E/H/K/L/M/N/T、84H/Y、95N、96Q、97E、104A/D、107K、110L、116E、129H/N/Y、131D/E、135A/E/H/I/L/M/S/T/V/W/Y、136M、141E、142E、144E、156C/D、157A/C/D/E、158A/C、160A/M、164A/M/Q/Y、166D/E、176C/D、177C/D/M/S/Y、178D、179A/C/E/F/G/H/I/K/M/Q/S/V/W/Y、182D/E、188C/D/E/M、189C/D/E、193A/M、198D/E、200I/Y、207K/L/Q、209P、210D/E/N、238A/D/E/M、

239D/E、241C/G/L/Q/T/Y、245E、247E/249C/D/E/Y、253E、255C/D/E、256C/Y、259D/E、262L、268D/E和269H/W。

[0043] 该变体与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%的同一性,并且优选地具有至少三个取代。

[0044] 用于本发明的组合物中的特别优选的变体选自由与氨基酸序列SEQ ID NO:1具有至少90%、更优选地至少92%、更优选地至少95%并且特别是至少99%的同一性的变体组成的组。

[0045] 在一个实施方案中,本文提供的组合物包含蛋白酶,其中该蛋白酶是与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%同一性并且在与SEQ ID NO:1的第39位对应的位置处具有谷氨酸残基(E)的变体,并且还在一个或多个位置处包含一个或多个氨基酸取代,所述一个或多个氨基酸取代选自:

[0046] (iii) 3V、4T、8V、9A/C/E/G/H/K/M/N/Q/W/Y、10A/K/M/N/Q/W、11A/I/S/T、12A/C/D/G/M/N/R/S/T/V/W、14D、15D/E/F/H/I/K/M/P/Q/V/W/Y、16L/M/S、17C/E/F/G/I/L/N/V/W/Y、18A/C/D/E/F/G/L/M/Q/T、19A/C/D/E/F/H/I/K/L/N/Q/S/T/W/Y、20A/C/D/M/N/T、24A/E、25A/C/D/E/M/N、26A/I、33T、36C/E/I/L/M/Q/T/V、42C/D/E/M/Q、43L、44C/E/F/G/H/I/K/L/N/Q/T/V/W/Y、47I/Y、50I、52A/C/D/H/L/M/N/S/T/Y、54A/C/G/L/M/N/T/V、55A/C/D/E/H/N/S/Y、57D/E/H/M/N/Q/T、59A/C/D/E/M/N/Q/T、60S、69S、76A/D/E/F/H/K/L/M/N/R/T/Y、82A、84D/F/H/Y、95A/N、96M/Q、97E/H/K、101T、102L/M、104A/D/H/M/N/T/V/W/Y、105V、107K/M、110L、113T/V、114V、115E/H/Q、116E/H、118D/E/N、120V、128G、129A/H/N/Y、131A/D/E/I/M/N/P/Q/V、133M、135A/E/F/H/I/K/L/M/Q/S/T/V/W/Y、136M、137L、139E/S、141E/H/N、142A/D/E/H/M/N/Q、143E/H/M/N/V、144E/N、145C、147C、148L/V、150M、156C/D/N/T、157A/C/D/E/N/Q、158A/C/F/L/M/N/Q/V/W/Y、159L、160A/C/D/M/T、161W、164A/K/M/Q/Y、166D/E/I/P/Q/V、167E、170G、174V、176A/C/D/L/M/N/S、177A/C/D/E/G/H/K/L/M/Q/S/W/Y、178D、179A/C/E/F/G/H/I/K/M/Q/S/V/W/Y、180K、182A/C/D/E/G/H/I/K/L/P/Q/T/V/W/Y、186F、188C/D/E/I/L/M/N/Q/S/V/W/Y、189C/D/E、190M、191E、192C/M、193A/M、198D/E、200H/I/K/M/V/Y、207K/L/N/Q、209P、210C/D/E/F/G/L/N/P/Q/Y、211E/L/Q/R、212A/C/Q、218C/S、227M/Q、228L、230A/D/L/M/N、231C/E/H/I/L/N/Q/S/T、232F/H/Q/R/W、234A/D/E/M/T/W/Y、236G/S/T、238A/D/E/M/V、239D/E/L/M/N/T、242A、245E、246A/L、247E/Q、249C/D/E/F/I/L/S/Y、250S/T、253E、254P/Y、255A/C/D/E/F/I/M/V/W、256C/F/H/M/W/Y、257C/M、259D/E/M/N、262L、263D/Q、264T、265A/M/N/Q、266L/M/N/Q/R、268A/C/D/E和269H/P/W;

[0047] 其中所述变体的氨基酸位置通过与SEQ ID NO:1的氨基酸序列的对应关系进行编号。在一些实施方案中,与包含SEQ ID NO:1的蛋白酶的组合物相比,所述组合物展示出改善的稳定性和改善的性能,特别是在去除鸡蛋和/或焦糖布丁方面。

[0048] 另一个实施方案涉及包含蛋白酶的组合物,其中该蛋白酶是与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%同一性并且在与SEQ ID NO:1的第39位对应的位置处具有谷氨酸残基(E)的变体,并且还在一个或多个位置处包含一个或多个氨基酸取代,所述一个或多个氨基酸取代选自:

[0049] (iv) 3V、4T、8V、9A/C/E/G/H/K/M/N/Q/W/Y、10A/K/M/N/Q/W、11A/I/S/T、12A/C/D/G/M/N/R/S/T/V/W、14D、15D/E/F/H/I/K/M/P/Q/V/W/Y、16L/M/S、17C/E/F/G/I/L/N/V/W/Y、

18A/C/D/E/F/G/L/M/Q/T、19A/C/D/E/F/H/I/K/L/N/Q/S/T/W/Y、20A/C/D/M/N/T、24A/E/、25A/C/D/E/M/N、26A/I、33T、36C/E/I/L/M/Q/T/V、42C/D/E/M/Q、43L、44C/E/F/G/H/I/K/L/N/Q/T/V/W/Y、47I/Y、50I、52A/C/D/H/L/M/N/S/T/Y、54A/C/G/L/M/N/T/V、55A/C/D/E/H/N/S/Y、57D/E/H/M/N/Q/T、59A/C/D/E/M/N/Q/T、60S、69S、76A/D/E/F/H/K/L/M/N/R/T/Y、82A、84D/F/H/Y、95A/N、96M/Q、97E/H/K、101T、102L/M、104A/D/H/M/N/T/V/W/Y、105V、107K/M、110L、113T/V、114V、115E/H/Q、116E/H、118D/E/N、120V、128G、129A/H/N/Y、131A/D/E/I/M/N/P/Q/V、133M、135A/E/F/H/I/K/L/M/Q/S/T/V/W/Y、136M、137L、139E/S、141E/H/N、142A/D/E/H/M/N/Q、143E/H/M/N/V、144E/N、145C、147C、148L/V、150M、156C/D/N/T、157A/C/D/E/N/Q、158A/C/F/L/M/N/Q/V/W/Y、159L、160A/C/D/M/T、161W、164A/K/M/Q/Y、166D/E/I/P/Q/V、167E、170G、174V、176A/C/D/L/M/N/S、177A/C/D/E/G/H/K/L/M/Q/S/W/Y、178D、179A/C/E/F/G/H/I/K/M/Q/S/V/W/Y、180K、182A/C/D/E/G/H/I/K/L/P/Q/T/V/W/Y、186F、188C/D/E/I/L/M/N/Q/S/V/W/Y、189C/D/E、190M、191E、192C/M、193A/M、198D/E、200H/I/K/M/V/Y、207K/L/N/Q、209P、210C/D/E/F/G/L/N/P/Q/Y、211E/L/Q/R、212A/C/Q、218C/S、227M/Q、228L、230A/D/L/M/N、231C/E/H/I/L/N/Q/S/T、232F/H/Q/R/W、234A/D/E/M/T/W/Y、236G/S/T、238A/D/E/M/V、239D/E/L/M/N/T、242A、245E、246A/L、247E/Q、249C/D/E/F/I/L/S/Y、250S/T、253E、254P/Y、255A/C/D/E/F/I/M/V/W、256C/F/H/M/W/Y、257C/M、259D/E/M/N、262L、263D/Q、264T、265A/M/N/Q、266L/M/N/Q/R、268A/C/D/E和269H/P/W；

[0050] 其中所述变体的氨基酸位置通过与SEQ ID NO:1的氨基酸序列的对应关系进行编号。在一些实施方案中,与包含在与SEQ ID NO:1中的第39位对应的位置处具有谷氨酸的蛋白酶的组合物相比,所述组合物展示出改善的稳定性和性能,特别是在鸡蛋和/或焦糖布丁去除方面。

[0051] 另一个实施方案涉及包含蛋白酶的组合物,其中该蛋白酶是与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%同一性的变体,并且该变体在与SEQ ID NO:1的第39位对应的位置处具有谷氨酸残基(E),并且还在一个或多个位置处包含一个或多个氨基酸取代,所述一个或多个氨基酸取代选自:3V、9A/C/E/K、10A/M/N/Q、11A/I、12C/D、14D、15D/E/H/I/M/V/Y、16M、17C/F/I/L/W、18D/E、19A/C/D/E/H/I/L/Q/S/T/W、24A/E、36C/E、42C/D/E、44C/E/W/Y、52A/C/D/H、54L/M、55A/D/H/S、57D/E/、59A/C/D/E/N、60S、76E/H/K/L/M/N/T、84H/Y、95N、96Q、97E、104A/D、107K、110L、116E、129H/N/Y、131D/E、135A/E/H/I/L/M/S/T/V/W/Y、136M、141E、142E、144E、156C/D、157A/C/D/E、158A/C、160A/M、164A/M/Q/Y、166D/E、176C/D、177C/D/M/S/Y、178D、179A/C/E/F/G/H/I/K/M/Q/S/V/W/Y、182D/E、188C/D/E/M、189C/D/E、193A/M、198D/E、200I/Y、207K/L/Q、209P、210D/E/N、238A/D/E/M、239D/E、241C/G/L/Q/T/Y、245E、247E/249C/D/E/Y、253E、255C/D/E、256C/Y、259D/E、262L、268D/E和269H/W；

[0052] 其中所述变体的氨基酸位置通过与SEQ ID NO:1的氨基酸序列的对应关系进行编号。在一些实施方案中,与包含在与SEQ ID NO:1中的第39位对应的位置处具有谷氨酸的蛋白酶的组合物相比,所述组合物展示出改善的清洁性能,特别是在鸡蛋去除方面。

[0053] 另一个实施方案涉及包含蛋白酶的组合物,其中该蛋白酶是与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%同一性的变体,并且该变体在与SEQ ID NO:1的第39位对应的位置处具有谷氨酸残基(E),并且还在一个或多个位置处包含一个或多个氨基酸取代,所述一个或多个氨基酸取代选自:9A/C/E/M/N/Y、10A/K/M/N/Q/W、11A/T、12A/C/D/M、14D、15D/E/H/

I/M/V/W/Y、16L/M、17C/E、18C/D/E/M、19A/C/D/E/F/H/I/K/L/N/Q/S/T/W/Y、20C/D、24A/E、25A/C/D/E/M/N、26A、36C/E/Q/V、42C/D/E、43L、44C/E/G/H/I/L/N/Q/T、52A/C/D/L/M/N、54A/C/L/M/V、55A/C/D/E、57D/E、59A/C/D/E/M/N/Q/T、60S、76D/E/N、82A、84D、96Q、97E/H、104A/D/H/N/V/Y、115H、116E、129H、131D/E、135A/E/F/H/I/K/L/M/S/T/V/W/Y、139E、141E、142D/E、143E、144E、147C、148L、156C/D/N/T、157C/D/E、158C/L/Q/Y、159L、164A/K/M/Q/Y、166D/E、167E、174V、176A/C/D/N、177C/D、178D、179A/C/E/F/G/H/I/K/M/Q/S/V/W/Y、182C/D/E、188C/D/E、189C/D/E、193A/M、198D/E、207K/L/Q、209P、210C/D/E/L/N/Y、212C、228L、231C/E/L/N/Q、232F、234D/E/T/W/Y、236T、238A/D/E/M/V、239D/E/M/N、241C/G/L/Q/T/Y、245E、246A/L、247E/Q、249C/D/E/L/Y、253E、254Y、255A/C/D/E、256C/Y、257C、259D/E/M/N、262L、263D、268C/D/E和269D/E/E；其中所述变体的氨基酸位置通过与SEQ ID NO:1的氨基酸序列的对应关系进行编号。在一些实施方案中，与包含在与SEQ ID NO:1中的第39位对应的位置处具有谷氨酸的蛋白酶的组合物相比，所述组合物展示出改善的清洁性能，特别是在焦糖布丁去除方面。

[0054] 在另一个实施方案中，提供了包含变体的组合物，该变体与亲本蛋白酶（例如SEQ ID NO:1）相比具有改善的焦糖布丁清洁性能，其中该变体在选自以下的一个或多个位置处包含氨基酸取代：9、10、12、14、15、17、18、19、20、24、25、36、42、44、52、54、55、57、59、76、84、97、104、116、131、135、139、141、142、143、147、156、157、158、164、166、167、176、177、178、179、180、182、188、189、198、207、210、212、231、234、238、239、245、247、249、253、254、255、156、257、259、263、268和269，其中所述位置对应于SEQ ID NO:1进行编号，并且其中所述取代相对于本专利申请中的亲本枯草杆菌蛋白酶引入总体净负电荷。在一些实施方案中，所述变体在一个或多个位置处包含一个或多个带负电的氨基酸取代或在一个或多个位置处替换带正电的氨基酸，选自9C/E/Y、10A/K/M/N/Q/W、12C/D、14D、15D/E/Y、17C/E、18C/D/E、19A/C/D/E/F/H/I/K/L/N/Q/S/T/W/Y、20C/D、24E、25C/D/E、36C/E、42C/D/E、44C/E/G/H/I/L/N/Q/T、52C/D、54C、55C/D/E、57D/E、59C/D/E、76D/E、84D、97E、104D/Y、116E、131D/E、135A/E/F/H/I/K/L/M/S/T/V/W/Y、139E、141E、142D/E、143E、147C、156C/D、157C/D/E、158C/Y、164A/K/M/Q/Y、166D/E、167E、176C/D、177C/D、178D、179A/C/E/F/G/H/I/K/M/Q/S/V/W/Y、180K、182C/D/E、188C/D/E、189C/D/E、198D/E、207K/L/Q、210C/D/E/Y、212C、230D、231C/E/L/N/Q、234D/E/Y、238D/E、239D/E、245E、247E、249C/D/E/Y、253E、254Y、255C/D/E、256C/Y、257C、259D/E、263D、268C/D/E和269H/P/W，其中所述位置对应于SEQ ID NO:1进行编号。

[0055] 另一个实施方案涉及包含蛋白酶的组合物，其中所述蛋白酶是与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%同一性的变体，并且该变体包含在与SEQ ID NO:1的第39位对应的位置处具有谷氨酸残基(E)的氨基酸序列，并且还在一个或多个位置处包含一个或多个氨基酸取代，所述一个或多个氨基酸取代选自9N、11A、12A/M、15I/V、16L/M、19C/K/L/Q、20D、24A、25A/D/N、52D、54A/L/M/V、55A/D、59A/M/N、60S、96Q、129H、157D、158Q、159L、177D、179A/K、182D、207L、210E、232F和256Y；其中所述变体的氨基酸位置通过与SEQ ID NO:1的氨基酸序列的对应关系进行编号。在一些实施方案中，与包含在与SEQ ID NO:1中的第39位对应的位置处具有谷氨酸的蛋白酶的组合物相比，所述变体在鸡蛋和焦糖布丁去除方面展示出改善的清洁性能。

[0056] 另一个实施方案涉及包含蛋白酶的组合物，其中该蛋白酶是与SEQ ID NO:1的氨

氨基酸序列具有至少90%同一性的变体,并且该变体包含在与SEQ ID NO:1的第39位对应的位置处具有谷氨酸残基(E)的氨基酸序列,并且还在一个或多个位置处包含一个或多个氨基酸取代,所述一个或多个氨基酸取代选自:3V、4T、8V、9A/E/G/H/K/N/Q/W/Y、10Q、11A、12A/C/G/M/N/T、15F/H/M/P/Q/W、16S、17C/E/F/I/L/N/V/W/Y、18A/D/E/L/M/Q、19C/D/Y、20C/D/M/N、24A/E、25C/D/N、26I、33T、36C/I/L/M/Q/V、42C/D/E/M/Q、44C/E/F/G/H/I/K/L/N/Q/T/V/W/Y、47I/Y、50I、52A/M/N/S/T/Y、54N/V、55C/D/E/N、57E/H/M/N/Q/T、59N、76A/D/E/F/H/K/L/M/N/R/T/Y、82A、84D/F/H/Y、95A/N、96M、97K、101T、102L/M、104M/N/T/V/W、105V、107M、113V、114V、115Q、116E/H、118D/E、131A/D/E/I/M/N/P/Q/V、133M、135A/H/I/K/L/M/S/T/V/W/Y、136M、142A/D/E/H/M/N/Q、143E/H/M/N、147C、148V、150M、156N/T、157A/C/N、158C/F/L/M/N/Q/V/W/Y、159L、160A/C/M/T、166D/E/P/Q、170G、176C/M、177A/C/D/H/L/M/Q/W/Y、179M/Q、180K、182A/C/E/G/H/I/K/L/P/Q/T/V/W/Y、188C/D/E/I/L/M/N/Q/V/W/Y、189D、192C/M、193M、200H/I/K/M/V/Y、209P、210E/F/P、218C/S、228L、231C/E/H/N/T、232F/H、234D/M、236G/S/T、238A/D/E/M/V、239E/L/M/T、242A、246A/L、249E/F/I/L/S/Y、250S、253E、254P、255C/D/E/F/I/M/V/W、256C/F/H/W/Y、264T、266L/M/N和268C;其中所述变体的氨基酸位置通过与SEQ ID NO:1的氨基酸序列的对应关系进行编号。在一些实施方案中,与包含在与SEQ ID NO:1中的第39位对应的位置处具有谷氨酸的蛋白酶的组合物相比,所述组合物展示出改善的稳定性。

[0057] 另一个实施方案涉及包含蛋白酶的组合物,其中该蛋白酶是与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%同一性的变体,并且该变体包含在与SEQ ID NO:1的第39位对应的位置处具有谷氨酸残基(E)的氨基酸序列,并且还在一个或多个位置处包含一个或多个氨基酸取代,所述一个或多个氨基酸取代选自:9A/E/H/K/N/W/Y、10Q、11A、12A/C/M/N、15F/H/M/W、17C/E/F/I/L/N/V/W、18D/E/M、19C/D/Y、20C/D/M/N、24A/E、25C/D/N、36C/L/Q/V、42C/D/E、44C/E/G/H/I/L/N/Q/T、52A/M/N、54V、55C/D/E、57E/S、59N、76D/E/K/L/N、82A、84D、95N、97K、102L/M、104N/V、116E、118D、131D/E/M/N/P、135A/H/I/K/L/M/S/T/V/W/Y、136M、142D/E、143E/N、147C、156N/T、157A/C、158C/L/Q/Y、159L、160M、166D/E、170G、176C、177A/C/D/L/M/Y、179M/Q、180K、182A/C/E/Y、188C/D/E/M、189D、193M、209P、210E、218S、228L、231C/E/N、232F、234D、236T、238A/D/E/M/V、239E/M、246A/L、249E/L/Y、253E、255C/D/E、256C/Y和268C;其中所述变体的氨基酸位置通过与SEQ ID NO:1的氨基酸序列的对应关系进行编号。在一些实施方案中,所述组合物展示出改善的清洁性能,特别是在鸡蛋或焦糖布丁去除方面。与包含在与SEQ ID NO:1中的第39位对应的位置处具有谷氨酸的蛋白酶的组合物相比,所述组合物还呈现出改善的稳定性。

[0058] 在一些实施方案中,所述亲本蛋白酶或变体还包含选自以下的至少一个、两个、三个或更多个另外的取代:Q012E、Q037E、N060D、N097D、Q107E、N115D、N154D、N167D、Q176E、Q185E、Q200E、N205D、Q230E、N236D、N242D、N250D、N253D、Q256E、N253D-Q256E、G025R-M117I-H118N、A149S、R044P-D175N-Y208N-Q230H、L041F-G078D-P084A、S101G-T174A、I021V-N177I、I021V-S142G-T188A、I021V-M122L-A222S、Q012L-I021V-M122L-A222S、I021V-M122L-N253D、I021V-N177V-V228I、I021V-S039T-M122L-N177E、I021V-V079L-D087E-A209N-A222S、I021V-M122L-A222S-T247N、I021V-M122L-S039E-N074D-D087E、N253P、S039E-N074D-D087E-N253D、I021V-S039E-N074D-D087E-N253D、S039E-N074D-

D087E-M122L-N253D、I021V-S039E-N074D-D087E-M122L-N253D、I021V、M122L、M211S、P212N、Q012L、N177V、A222S、V228I、T274N、R099E、N097D-R099E、S097D、S099E、I043V、M122L-N145S-T156A、M211N-P212D、M211L-P212D、G160S、D127P-M211L-P212D、P212H、Q012L-M122L-A222S、D127P、N145S、T156A、M211N和P212D。

[0059] 本公开包括在表面暴露的氨基酸处具有一种或多种修饰的变体。酶变体中的表面改性可通过具有洗涤性能的最低性能指数、酶在洗涤剂组合物中的稳定性和酶的热稳定性,同时具有与亲本枯草杆菌蛋白酶相比改善的这些特性中的至少一种而用于洗涤剂组合物中。在一些实施方案中,表面改性改变了该位置处氨基酸的疏水性和/或电荷。疏水性可使用本领域中已知的技术来测定,诸如White和Wimley (White, S.H. 和Wimley, W.C, (1999) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 28:319-65) 中所述的那些。感兴趣的pH下的氨基酸的净电荷可使用氨基酸中可滴定化学基团的pK_a值进行计算,诸如Hass和Mulder (Hass, M.A.S 和Mulder, F.A.A (2015) *Annu. Rev. Biophys.* 44:53-75) 中所述的那些。

[0060] 如本文所用,“表面性质”可用于指静电荷,以及蛋白质表面所表现出的诸如疏水性和亲水性的性质。

[0061] 本文提供的变体具有至少一种表面改性作为合适的改性,所述变体包括第76位、第84位、第97位、第104位、第116位、第131位、第135位、第139位、第141位、第142位、第143位、第157位,其中所述变体的氨基酸位置通过与SEQ ID NO:1中的氨基酸序列的对应关系进行编号。

[0062] 在氧化、螯合剂、变性剂、表面活性剂、热和/或pH稳定的蛋白酶的上下文中,术语“增强的稳定性”或“改善的稳定性”是指与参考蛋白酶例如野生型蛋白酶或亲本蛋白酶相比,随时间推移保持更高的蛋白水解活性。

[0063] 另一个实施方案涉及清洁焦糖布丁污渍的方法,该方法包括使需要清洁的表面或物品与包含一种或多种蛋白酶的组合物接触,其中所述蛋白酶是与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%同一性的变体,并且该变体包含在与SEQ ID NO:1的第39位相对应的位置处具有谷氨酸的氨基酸序列,并且还在与SEQ ID NO:1位置对应的一个或多个位置处包含一个或多个取代,所述一个或多个取代选自:9A/C/E/M/N/Y、10A/K/M/N/Q/W、11A/T、12A/C/D/E/M、14D、15D/E/H/I/M/V/W/Y、16L/M、17C/E、18C/D/E/M、19A/C/D/E/F/H/I/K/L/N/Q/S/T/W/Y、20C/D、24A/E、25A/C/D/E/M/N、26A、27K、36C/E/Q/V、42C/D/E、43L、44C/E/G/H/I/L/N/Q/S/T、52A/C/D/L/M/N、54A/C/L/M/V、55A/C/D/E/M、57D/E、59A/C/D/E/M/N/Q/T、60S、76D/E/N、82A、84D、96Q、97E/H、104A/D/H/N/V/Y、115H、116E、129H、131D/E、135A/E/F/H/I/K/L/M/S/T/V/W/Y、139E、141E、142D/E、143E、144E、147C、148L、154D、156A/C/D/N/T、157C/D/E、158C/L/Q/T/Y、159L、164A/K/M/Q/Y、166D/E、167E、169L、174V、176A/C/D/E/N、177C/D/E、178D、179A/C/E/F/G/H/I/K/M/Q/S/V/W/Y、180K、182C/D/E、188C/D/E、189C/D/E、193A/M、198D/E、206D、207K/L/Q、209P、210C/D/E/L/N/Y、211K/L、212C、228L、230A/D/E/H/M/N、231C/E/L/N/Q、232F、234D/E/T/W/Y、236D/T、238A/D/E/M/V、239D/E/M/N、245E、246A/L、247E/Q、249C/D/E/L/Y、250D、252A/Q、253D/E/P、254Y、255A/C/D/E、256C/E/Y、257C、259D/E/M/N、262L、263D、268C/D/E和269H/P/W,以及它们的组合。其中所述变体的氨基酸位置通过与SEQ ID NO:1的氨基酸序列的对应关系进行编号。又一个实施方案涉及清洁焦糖布丁污渍的方法,该方法包括使需要清洁的表面或物品与包含一种或多种变体的组合物接触,

其中所述变体包含在与SEQ ID NO:1的第39位对应的位置处具有谷氨酸的氨基酸序列,并且还在与SEQ ID NO:1位置对应的一个或多个位置处包含一个或多个取代,所述一个或多个取代选自:9A/C/E/M/N/Y、10A/K/M/N/Q/W、11A/T、12A/C/D/E/M、14D、15D/E/H/I/M/V/W/Y、16L/M、17C/E、18C/D/E/M、19A/C/D/E/F/H/I/K/L/N/Q/S/T/W/Y、20C/D、24A/E、25A/C/D/E/M/N、26A、27K、36C/E/Q/V、42C/D/E、43L、44C/E/G/H/I/L/N/Q/S/T、52A/C/D/L/M/N、54A/C/L/M/V、55A/C/D/E/M、57D/E、59A/C/D/E/M/N/Q/T、60S、76D/E/N、82A、84D、96Q、97E/H、104A/D/H/N/V/Y、115H、116E、129H、131D/E、135A/E/F/H/I/K/L/M/S/T/V/W/Y、139E、141E、142D/E、143E、144E、147C、148L、154D、156A/C/D/N/T、157C/D/E、158C/L/Q/T/Y、159L、164A/K/M/Q/Y、166D/E、167E、169L、174V、176A/C/D/E/N、177C/D/E、178D、179A/C/E/F/G/H/I/K/M/Q/S/V/W/Y、180K、182C/D/E、188C/D/E、189C/D/E、193A/M、198D/E、207K/L/Q、209P、210C/D/E/L/N/Y、211K/L、212C、228L、231C/E/L/N/Q、232F、234D/E/T/W/Y、236D/T、238A/D/E/M/V、239D/E/M/N、245E、246A/L、247E/Q、249C/D/E/L/Y、250D、253D/E/P、254Y、255A/C/D/E、256C/E/Y、257C、259D/E/M/N、262L、263D、268C/D/E和269H/P/W,以及它们的组合;其中所述变体的氨基酸位置通过与SEQ ID NO:1的氨基酸序列的对应关系进行编号。

[0064] 另一个实施方案涉及清洁鸡蛋污渍的方法,该方法包括使需要清洁的表面或物品与包含一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体的组合物接触,其中所述变体在与SEQ ID NO:1位置对应的一个或多个位置处具有一个或多个取代,所述一个或多个取代选自:9H/K/N/W、11A/I、12A/M/N/R/S/V、15F/I/K/V、16L/M、17F/G/I/L/N/V/W、18F、19C/K/L/Q、20A/D/M/N/T、24A、25A/D/N、36L、52D/H、54A/G/L/M/V、55A/D/H/S/Y、57S、59A/M/N、60S、69S、76K/L、95N、96Q、97K、102L/M、107K、110L、113T、118D、120V、129A/H/N/Y、131M/N/P、136M、143N、144N、145C、157A/D、158Q、159L、160M、166I、170G、176L、177A/D/G/K/L/M/S/Y、179A/K、182A/D/Y、188M、191E、207L、210E/G/Q、211R、218S、227M、232F/W、256Y、263Q、265A/M/Q和268A,以及它们的组合;其中所述变体的氨基酸位置通过与SEQ ID NO:1的氨基酸序列的对应关系进行编号。又一个实施方案涉及清洁鸡蛋污渍的方法,该方法包括使需要清洁的表面或物品与包含一种或多种变体的组合物接触,其中所述变体包含在与SEQ ID NO:1的第39位对应的位置处具有谷氨酸的氨基酸序列,并且还在与SEQ ID NO:1位置对应的一个或多个位置处包含一个或多个取代,所述一个或多个取代选自:9H/K/N/W、11A/I、12A/M/N/R/S/V、15F/I/K/V、16L/M、17F/G/I/L/N/V/W、18F、19C/K/L/Q、20A/D/M/N/T、24A、25A/D/N、36L、52D/H、54A/G/L/M/V、55A/D/H/S/Y、59A/M/N、60S、69S、76K/L、95N、96Q、97K、102L/M、107K、110L、113T、118D、120V、129A/H/N/Y、131M/N/P、136M、143N、144N、145C、157A/D、158Q、159L、160M、166I、170G、176L、177A/D/G/K/L/M/S/Y、179A/K、182A/D/Y、188M、191E、207L、210E/G/Q、211R、218S、227M、232F/W、256Y、263Q、265A/M/Q和268A,以及它们的组合;其中所述变体的氨基酸位置通过与SEQ ID NO:1的氨基酸序列的对应关系进行编号。

[0065] 即使当组合物用于软水中时,本发明的蛋白酶在不含磷酸盐的组合物中也表现非常好。

[0066] 本发明的组合物中蛋白酶的优选含量包括每克组合物约0.04mg至约5mg、更优选地约0.05mg至约2mg活性蛋白酶。

[0067] 自动盘碟洗涤清洁组合物

[0068] 自动盘碟洗涤清洁组合物可为任何物理形式。它可以是散粉、凝胶或以单位剂型

存在。优选地，它是单位剂型，单位剂型包括压片和水溶性包装。本发明的自动盘碟洗涤清洁组合物优选地以单位剂型存在，并且它可以是任何物理形式，包括固体、液体和凝胶形式。本发明的组合物非常适于以多隔室包装的形式存在，更具体地以包含具有不同物理形式的组合物的隔室的多隔室包装的形式存在，例如一个隔室包含固体形式的组合物并且另一个隔室包含液体形式的组合物。所述组合物优选地被水溶性薄膜如聚乙烯醇包封。特别优选的是被封装在聚乙烯醇膜中的单位剂型的组合物，所述聚乙烯醇膜具有小于100 μm 、优选地为20 μm 至90 μm 的厚度。本发明的洗涤剂组合物的重量为约8克至约25克，优选地为约10克至约20克。该重量范围与盘碟洗涤机的分配器十分契合。虽然该范围相当于少量洗涤剂，但洗涤剂也以提供上文提及的全部有益效果的方式配制。

[0069] 所述组合物优选地不含磷酸盐。所谓“不含磷酸盐”在本文中被理解为所述组合物包含按所述组合物的重量计少于1%、优选地少于0.1%的磷酸盐。

[0070] 本发明的组合物优选地不含磷酸盐，并且包含络合剂体系。

[0071] 络合剂体系

[0072] 出于本发明的目的，“络合剂”是能够结合多价离子诸如钙、镁、铅、铜、锌、镉、汞、锰、铁、铝和其他阳离子多价离子以形成水溶性络合物的化合物。所述络合剂对于 Ca^{2+} 具有至少3的对数稳定常数($[\log K]$)。该稳定常数 $\log K$ 在25 $^{\circ}\text{C}$ 的温度下、在离子强度为0.1的溶液中测定。

[0073] 本发明的组合物包含按所述组合物的重量计10%至50%的络合剂体系。优选地，该组合物包含络合剂，该络合剂选自柠檬酸、甲基甘氨酸二乙酸(MGDA)、谷氨酸-N,N-二乙酸(GLDA)、亚氨基二琥珀酸(IDS)、羧甲基菊粉、L-天冬氨酸N,N-二乙酸四钠盐(ASDA)以及它们的混合物组成的组。出于本发明的目的，当提及络合剂时，术语“酸”包括酸及其盐。

[0074] 在一个优选的实施方案中，所述组合物包含按本发明组合物的重量计15%至40%的MGDA，更优选MGDA的三钠盐。包含这种高含量MGDA的组合物在硬水的存在下以及在长时间和/或热循环中表现良好。

[0075] 在一个优选的实施方案中，所述组合物包含按本发明组合物的重量计15%至28%的柠檬酸，更优选柠檬酸钠。包含柠檬酸的组合物在软水的存在下表现良好。

[0076] 在一个优选的实施方案中，络合剂体系包含重量比优选地为约0.5:1至约2:1、更优选地为约0.5:1至约2.5:1的柠檬酸和MGDA。

[0077] 分散剂聚合物

[0078] 分散剂聚合物可以按所述组合物的重量计约0.1%至约20%、优选地0.2%至约15%、更优选地0.3%至%的任意合适的量使用。

[0079] 分散剂聚合物能够在自动盘碟洗涤过程中混悬钙或碳酸钙。

[0080] 在25 $^{\circ}\text{C}$ 下，分散剂聚合物具有介于30至250mg Ca/g分散剂聚合物、优选地介于35至200mg Ca/g分散剂聚合物、更优选地40至150mg Ca/g分散剂聚合物范围内的钙结合能力。为了确定聚合物是否为本发明意义上的分散剂聚合物，根据以下说明进行以下钙结合能力测定：

[0081] 钙结合能力测试方法

[0082] 本文提及的钙结合能力经由滴定、使用pH/离子计如Mettler Toledo SevenMultiTM台式计和PerfectIONTM复合钙离子电极来测定。为了测量结合能力，将适用于

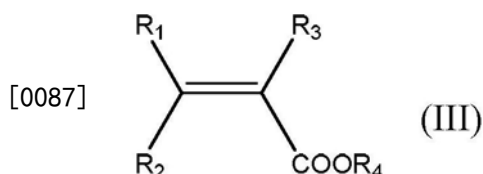
烧杯或洗涤仪罐的加热搅拌装置设定为25℃,并且根据制造商说明书校准具有仪表的离子电极。电极校准的标准浓度应包括测试浓度,并且应在25℃下测量。通过将3.67g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 添加到1L去离子水中来制备1000mg/g Ca的原液,然后进行稀释以制备三种各100mL的工作溶液,分别包含100mg/g、10mg/g和1mg/g浓度的钙。将100mg Ca/g工作溶液用作在25℃下进行的滴定期间的初始浓度。通过向每种工作溶液中添加2.5g/L NaCl来调节每种工作溶液的离子强度。将100mL的100mg Ca/g工作溶液加热并搅拌,直至其达到25℃。在溶液达到25℃时,使用离子电极进行钙离子浓度的初始读数。然后将测试聚合物逐渐地添加到钙工作溶液中(以0.01g/L的间隔),并且在每次增量添加后搅拌5分钟后再测量。当溶液达到1mg/g钙时,停止滴定。使用剩余的两种钙浓度工作溶液重复滴定过程。测试聚合物的结合能力被计算为相对于所添加的测试聚合物的克/L所测量的钙浓度的线性斜率。

[0083] 当溶解于pH大于6的水性溶液中时,分散剂聚合物优选地具有净负电荷。

[0084] 分散剂聚合物还可具有磺化羧酸酯或酰胺,以在较低pH下增加负电荷,并且改善它们在硬水中的分散特性。优选的分散剂聚合物为磺化/羧化聚合物,即包含磺化单体和羧化单体的聚合物。

[0085] 优选地,所述分散剂聚合物为多元羧酸的磺化衍生物,并且可包含两种、三种、四种或更多种不同的单体单元。优选的共聚物包含:

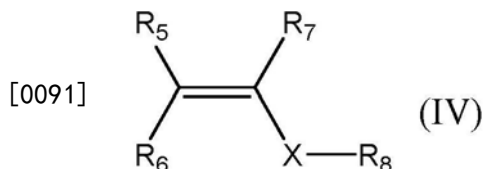
[0086] 至少一个衍生自具有通式(III)的羧酸单体的结构单元:



[0088] 其中 R_1 至 R_3 独立地选自氢、甲基、具有2至12个碳原子的直链或支链的饱和烷基基团、具有2至12个碳原子的直链或支链的单不饱和或多不饱和的烯基基团、如前述被 $-\text{NH}_2$ 或 $-\text{OH}$ 、或 $-\text{COOH}$ 、或 COOR_4 取代的烷基或烯基基团,其中 R_4 选自氢、碱金属或具有2至12个碳的直链或支链的、饱和或不饱和的烷基或烯基基团;

[0089] 优选的羧酸单体包括下列中的一种或多种:丙烯酸、马来酸、马来酸酐、衣康酸、柠康酸、2-苯基丙烯酸、肉桂酸、巴豆酸、富马酸、甲基丙烯酸、2-乙基丙烯酸、亚甲基丙二酸或山梨酸。丙烯酸和甲基丙烯酸是更优选的。

[0090] 任选地,一个或多个衍生自至少一种具有通式(IV)的非离子单体的结构单元:

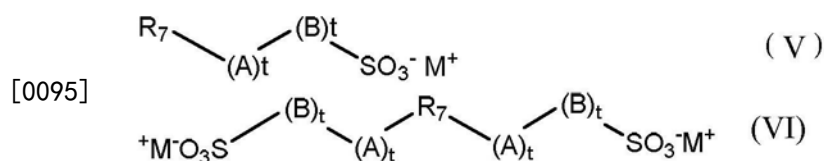


[0092] 其中 R_5 至 R_7 独立地选自氢、甲基、苯基或含有1至6个碳原子的羟烷基基团,并且可以是环状结构的一部分,X为选自 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{COO}-$ 、 $-\text{CONH}-$ 或 $-\text{CONR}_8-$ 的任选地存在的间隔基团,并且 R_8 选自具有1至22个碳原子的直链或支链的饱和烷基基团或具有6至22个碳原子的不饱和、优选芳族的基团。

[0093] 优选的非离子单体包括下列中的一种或多种:丁烯、异丁烯、戊烯、2-甲基戊-1-烯、3-甲基戊-1-烯、2,4,4-三甲基戊-1-烯、2,4,4-三甲基戊-2-烯、环戊烯、甲基环戊烯、2-

甲基-3-甲基-环戊烯、己烯、2,3-二甲基己-1-烯、2,4-二甲基己-1-烯、2,5-二甲基己-1-烯、3,5-二甲基己-1-烯、4,4-二甲基己-1-烯、环己烯、甲基环己烯、环庚烯、具有10个或更多个碳原子的 α -烯烃诸如癸-1-烯、十二碳-1-烯、十六碳-1-烯、十八碳-1-烯和二十二碳-1-烯,优选的芳族单体为苯乙烯、 α -甲基苯乙烯、3-甲基苯乙烯、4-十二烷基苯乙烯、2-乙基-4-苄基苯乙烯、4-环己基苯乙烯、4-丙基苯乙烯、1-乙烯基萘、2-乙烯基萘;优选的羧酸酯单体为(甲基)丙烯酸甲酯、(甲基)丙烯酸乙酯、(甲基)丙烯酸丙酯、(甲基)丙烯酸叔丁酯、(甲基)丙烯酸戊酯、(甲基)丙烯酸己酯、(甲基)丙烯酸2-乙基己酯、(甲基)丙烯酸辛酯、(甲基)丙烯酸月桂酯、(甲基)丙烯酸硬脂酯和(甲基)丙烯酸二十二烷基酯;优选的酰胺为N-甲基丙烯酰胺、N-乙基丙烯酰胺、N-叔丁基丙烯酰胺、N-2-乙基己基丙烯酰胺、N-辛基丙烯酰胺、N-月桂基丙烯酰胺、N-硬脂基丙烯酰胺、N-二十二烷基丙烯酰胺。

[0094] 以及至少一个衍生自至少一种具有通式(V)和(VI)的磺酸单体的结构单元:



[0096] 其中 R_7 为包含至少一个 sp^2 键的基团,A为O、N、P、S、酰胺基或酯键,B为单环或多环芳族基团或脂族基团,每个 t 独立地为0或1,并且 M^+ 为阳离子。在一个方面, R_7 为 C_2 至 C_6 烯烃。在另一方面, R_7 为乙烯、丁烯或丙烯。

[0097] 优选的磺化单体包括下列中的一种或多种:1-丙烯酰胺-1-丙磺酸、2-丙烯酰胺-2-丙磺酸、2-丙烯酰胺-2-甲基-1-丙磺酸、2-甲基丙烯酰胺-2-甲基-1-丙磺酸、3-甲基丙烯酰胺-2-羟基-丙磺酸、烯丙基磺酸、甲基烯丙基磺酸、烯丙氧基苯磺酸、甲基烯丙氧基苯磺酸、2-羟基-3-(2-丙烯氧基)丙磺酸、2-甲基-2-丙烯-1-磺酸、苯乙烯磺酸、乙烯基磺酸、3-磺基丙基、甲基丙烯酸3-磺基丙酯、磺基甲基丙烯酰胺、磺基甲基甲基丙烯酰胺以及所述酸的混合物或它们的水溶性盐。

[0098] 优选地,所述聚合物包含以下含量的单体:按所述聚合物的重量计约40%至约90%、优选地约60%至约90%的一种或多种羧酸单体;按所述聚合物的重量计约5%至约50%、优选地约10%至约40%的一种或多种磺酸单体;以及任选地按所述聚合物的重量计约1%至约30%、优选地约2%至约20%的一种或多种非离子单体。特别优选的聚合物包含按所述聚合物的重量计约70%至约80%的至少一种羧酸单体,以及按所述聚合物的重量计约20%至约30%的至少一种磺酸单体。

[0099] 在所述聚合物中,羧酸基团或磺酸基团中的全部或一些可以中和形式存在,即,一些或全部酸基团中的羧酸基团和/或磺酸基团的酸性氢原子可用金属离子、优选地碱金属离子并且具体地用钠离子替代。

[0100] 羧酸优选地为(甲基)丙烯酸。磺酸单体优选地为2-丙烯酰胺-2-丙磺酸(AMPS)。

[0101] 优选的可商购获得的聚合物包括:由Alco Chemical提供的Alcosperse 240、Aquatreat AR 540和Aquatreat MPS;由Rohm&Haas提供的Acumer 3100、Acumer 2000、Acusol 587G和Acusol 588G;由BF Goodrich提供的Goodrich K-798、K-775和K-797;以及由ISP technologies Inc提供的ACP 1042。特别优选的聚合物是由Rohm&Haas提供的Acusol 587G和Acusol 588G。

[0102] 合适的分散剂聚合物包括低分子量的阴离子羧酸聚合物。它们可以是重均分子量小于或等于约200000g/mol、或小于或等于约75000g/mol、或小于或等于约50000g/mol、或约3000g/mol至约50000g/mol、优选地约5000g/mol至约45000g/mol的均聚物或共聚物。分散剂聚合物可以是聚丙烯酸酯的低分子量均聚物，其平均分子量为1000至20000，具体地2000至10000，并且具体地优选3000至5000。

[0103] 分散剂聚合物可以是分子量小于70000的丙烯酸与甲基丙烯酸的共聚物、丙烯酸和/或甲基丙烯酸与马来酸的共聚物以及丙烯酸和/或甲基丙烯酸与富马酸的共聚物。其分子量在2000g/mol至80000g/mol并且更优选地20000g/mol至50000g/mol并且具体地30000g/mol至40000g/mol的范围内，并且(甲基)丙烯酸酯与马来酸酯或延胡索酸酯链段的比率为30:1至1:2。

[0104] 分散剂聚合物可以是分子量为3000至100000或者4000至20000的丙烯酰胺和丙烯酸酯的共聚物，并且也可使用按分散剂聚合物的重量计小于50%或者小于20%的丙烯酰胺含量。另选地，此类分散剂聚合物可具有按所述聚合物的重量计4000至20000的分子量和0%至15%的丙烯酰胺含量。

[0105] 适用于本文的分散剂聚合物还包括衣康酸均聚物和共聚物。

[0106] 另选地，分散剂聚合物可选自由烷氧基化聚亚烷基胺、烷氧基化聚羧酸酯、聚乙二醇、苯乙烯共聚物、硫酸纤维素酯、羧化多糖、两亲性接枝共聚物以及它们的混合物组成的组。

[0107] 漂白体系

[0108] 本发明的组合物包含漂白体系，该漂白体系包含高含量的漂白剂，优选过碳酸盐与漂白活化剂或漂白催化剂或两者的组合。优选地，所述漂白活化剂为TAED，并且所述漂白催化剂为锰漂白催化剂。

[0109] 漂白剂

[0110] 本发明的组合物优选地包含按所述组合物的重量计约10%至约20%、更优选地约12%至约18%的漂白剂，优选过碳酸盐。

[0111] 无机漂白剂和有机漂白剂适用于本文。无机漂白剂包括过氧化氢合物盐，诸如过硼酸盐、过碳酸盐、过磷酸盐、过硫酸盐和过硅酸盐。无机过氧化氢合物盐通常为碱金属盐。无机过氧化氢合物盐可作为结晶固体包含在内，而无需另外的保护。另选地，盐可为经涂覆的。合适的涂料包含硫酸钠、碳酸钠、硅酸钠以及它们的混合物。所述涂料可作为混合物施加到表面或依次施加成层。

[0112] 碱金属过碳酸盐、具体地过碳酸钠是优选用于本文的漂白剂。过碳酸盐最优选地以涂覆形式掺入到产品中，这提供了产品内的稳定性。

[0113] 过氧单过硫酸钾是可用于本文的另一种无机过氧化氢合物盐。

[0114] 典型的有机漂白剂是有机过氧酸，尤其是十二烷二过氧酸、十四烷二过氧酸和十六烷二过氧酸。单过壬二酸和二过壬二酸、单过十三烷二酸和二过十三烷二酸也适用于本文。二酰基和四酰基过氧化物例如过氧化二苯甲酰和过氧化二月桂酰是可用于本发明上下文的其他有机过氧化物。

[0115] 其他典型的有机漂白剂包括过氧酸，具体示例是烷基过氧酸和芳基过氧酸。优选的代表是(a)过氧苯甲酸及其环取代的衍生物，诸如烷基过氧苯甲酸，以及过氧- α -萘甲酸

和单过邻苯二甲酸镁, (b) 脂族或取代的脂族过氧酸, 诸如过氧月桂酸、过氧硬脂酸、 ϵ -邻苯二甲酰亚胺过氧己酸[邻苯二甲酰亚氨基过氧己酸(PAP)]、邻羧基苯甲酰胺基过氧己酸、N-壬烯酰胺基过己二酸和N-壬烯酰胺基过琥珀酸盐, 以及(c) 脂族和芳脂族过氧二羧酸, 诸如1,12-二过氧羧酸、1,9-二过氧壬二酸、二过氧癸二酸、二过氧十三烷二酸、二过氧邻苯二甲酸、2-癸基二过氧丁烷-1,4-二酸、N,N-对苯二甲酰二(6-氨基过己酸)。

[0116] 漂白活化剂

[0117] 漂白活化剂通常是能在60°C和更低的温度下在清洁过程中增强漂白作用的有机过酸前体。适用于本文的漂白活化剂包括在过水解条件下提供优选具有1至12个碳原子、具体地2至10个碳原子的脂族过氧羧酸和/或任选取代的过苯甲酸的化合物。合适的物质具有指定碳原子数的O-酰基和/或N-酰基基团和/或任选取代的苯甲酰基基团。优选的是聚酰化亚烷基二胺、具体地四乙酰基乙二胺(TAED), 酰化三嗪衍生物、具体地1,5-二乙酰基-2,4-二氧化六氢-1,3,5-三嗪(DADHT), 酰化甘脲、具体地四乙酰基甘脲(TAGU), N-酰基酰亚胺、具体地N-壬酰基琥珀酰亚胺(NOSI), 酰化酚磺酸盐、具体地正壬酰基或异壬酰基氧基苯磺酸盐(正-或异-NOBS)、癸酰氧基苯甲酸(DOBA), 羧酸酐具体地邻苯二甲酸酐, 酰化多元醇、具体地甘油三乙酸酯、乙二醇二乙酸酯和2,5-二乙酰氧基-2,5-二氢呋喃, 以及乙酰柠檬酸三乙酯(TEAC)。如果存在的话, 本发明的组合物包含按所述组合物的重量计0.01%至5%、优选地0.2%至2%的漂白活化剂, 优选TAED。

[0118] 漂白催化剂

[0119] 本文的组合物优选地包含漂白催化剂, 优选含金属的漂白催化剂。更优选地, 所述含金属的漂白催化剂是含过渡金属的漂白催化剂, 尤其是含锰或钴的漂白催化剂。

[0120] 优选用于本文的漂白催化剂包括锰三氮杂环壬烷及相关络合物; Co、Cu、Mn和Fe联吡啶胺及相关络合物; 以及五胺乙酸钴(III)及相关络合物。可用于本文的特别优选的漂白催化剂是1,4,7-三甲基-1,4,7-三氮杂环壬烷(Me-TACN)和1,2,4,7-四甲基-1,4,7-三氮杂环壬烷(Me/Me-TACN)。

[0121] 优选地, 本发明的组合物包含按所述组合物的重量计0.001%至0.5%、更优选地0.002%至0.05%、更优选地0.005%至0.075%的漂白催化剂。优选地, 所述漂白催化剂为锰漂白催化剂。

[0122] 无机助洗剂

[0123] 本发明的组合物优选地包含无机助洗剂。合适的无机助洗剂选自由碳酸盐、硅酸盐以及它们的混合物组成的组。特别优选用于本文的是碳酸钠。优选地, 本发明的组合物包含按所述组合物的重量计5%至60%、更优选地10%至50%并且特别是15%至45%的碳酸钠。

[0124] 表面活性剂

[0125] 适用于本文的表面活性剂包括非离子表面活性剂, 优选地, 所述组合物不含任何其他表面活性剂。传统上, 非离子表面活性剂已在自动盘碟洗涤中被用于表面改性目的, 具体地用于片材, 以避免成膜和斑染并改善光泽度。据发现, 非离子表面活性剂还可有助于防止污垢再沉积。

[0126] 优选地, 本发明的组合物包含非离子表面活性剂或非离子表面活性剂体系, 更优选地, 所述非离子表面活性剂或非离子表面活性剂体系具有介于40°C和70°C之间、优选地

介于45℃和65℃之间的相转化温度,如在蒸馏水中以1%的浓度测得。所谓“非离子表面活性剂体系”在本文中是指两种或更多种非离子表面活性剂的混合物。优选用于本文的是非离子表面活性剂体系。与单一非离子表面活性剂相比,非离子表面活性剂体系似乎具有改善的清洁和修整特性以及在产品中更好的稳定性。

[0127] 相转化温度是这样的温度,在低于该温度时,表面活性剂或其混合物作为油溶胀的胶束优先分配到水相中,并且在高于该温度时,则作为水溶胀的反相胶束优先分配到油相中。相转化温度可通过识别在哪个温度下发生浑浊而目视确定。

[0128] 非离子表面活性剂或体系的相转化温度可如下测定:制备在蒸馏水中包含按所述溶液的重量计1%的对应表面活性剂或混合物的溶液。在相转化温度分析之前轻轻搅拌溶液,以确保该过程在化学平衡下发生。通过在75mm密封玻璃试管中浸入溶液,在热稳定浴中获取相转化温度。为了确保不存在渗漏,在相转化温度测量之前和之后称量试管的重量。温度以小于1℃/分钟的速率逐渐升高,直到温度达到低于预估的相转化温度几度。相转化温度在第一浊度标志下目视确定。

[0129] 合适的非离子表面活性剂包括:i) 乙氧基化非离子表面活性剂,其通过具有6至20个碳原子的一羟基链烷醇或烷基酚与优选每摩尔醇或烷基酚至少12摩尔、尤其优选至少16摩尔并且还更优选至少20摩尔的环氧乙烷的反应制备;ii) 具有6至20个碳原子和至少一个乙氧基和丙氧基基团的醇烷氧基化表面活性剂。优选可用于本文的是表面活性剂i) 和ii) 的混合物。

[0130] 另一种合适的非离子表面活性剂是由下式表示的环氧封端的聚(烷氧基化)醇:

[0131] $R1O[CH_2CH(CH_3)O]_x[CH_2CH_2O]_y[CH_2CH(OH)R_2]$ (I)

[0132] 其中R1为具有4至18个碳原子的直链或支链的脂族烃基;R2为具有2至26个碳原子的直链或支链的脂族烃基;x为平均值为0.5至1.5、更优选地约1的整数;并且y为值为至少15、更优选地至少20的整数。

[0133] 优选地,式I的表面活性剂在末端环氧化物单元 $[CH_2CH(OH)R_2]$ 中具有至少约10个碳原子。根据本发明,式I的合适表面活性剂是Olin Corporation的POLY-TERGENT® SLF-18B非离子表面活性剂,如1994年10月13日由Olin Corporation公布的W0 94/22800中所述。

[0134] 酶

[0135] 其他蛋白酶

[0136] 除本发明的蛋白酶之外,本发明的组合物还可包含蛋白酶。两种或更多种蛋白酶的混合物可有助于在较宽的温度、循环持续时间和/或底物范围内增强清洁,并且提供优异的光泽有益效果,尤其是当与抗再沉积剂和/或磺化聚合物结合使用时。

[0137] 与本发明的变体蛋白酶组合使用的合适蛋白酶包括金属蛋白酶和丝氨酸蛋白酶,所述丝氨酸蛋白酶包括中性或碱性微生物丝氨酸蛋白酶,诸如枯草杆菌蛋白酶(EC 3.4.21.62)。合适的蛋白酶包括动物源、植物源或微生物源的那些。在一个方面,此类合适的蛋白酶可为微生物源。合适的蛋白酶包括前述合适蛋白酶的经化学修饰或基因修饰的突变体。在一个方面,合适的蛋白酶可为丝氨酸蛋白酶,诸如碱性微生物蛋白酶或/和胰蛋白酶型蛋白酶。合适的中性或碱性蛋白酶的示例包括:

[0138] (a) 枯草杆菌蛋白酶(EC 3.4.21.62),特别是W02004067737、W02015091989、

W02015091990、W02015024739、W02015143360、US 6,312,936B1、US 5,679,630、US 4,760,025、DE102006022216A1、DE102006022224A1、W02015089447、W02015089441、W02016066756、W02016066757、W02016069557、W02016069563、W02016069569中描述的来源于芽孢杆菌(诸如芽孢杆菌属、迟缓芽孢杆菌(*B. lentus*)、嗜碱芽孢杆菌(*B. alkalophilus*)、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)、解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)、短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)、吉氏芽孢杆菌(*B. gibsonii*)和秋叶氏芽孢杆菌(*B. akibaii*))的那些。

[0139] (b) 胰蛋白酶型或胰凝乳蛋白酶型蛋白酶,诸如胰蛋白酶(例如源自猪或牛的胰蛋白酶),包括W0 89/06270中所述的镰孢菌蛋白酶和W0 05/052161和W0 05/052146中所述的来源于纤维单胞菌属(*Cellulomonas*)的胰凝乳蛋白酶。

[0140] (c) 金属蛋白酶,特别是W0 07/044993A2中所述的来源于解淀粉芽孢杆菌的那些;W02014194032、W02014194054和W02014194117中所述的来源于芽孢杆菌属、短芽孢杆菌属(*Brevibacillus*)、热放线菌属(*Thermoactinomyces*)、杆菌属(*Geobacillus*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、赖氨酸芽孢杆菌属(*Lysinibacillus*)或链霉菌属菌种的那些;W02015193488中所述的来源于*Kribella alluminosa*的那些;以及W02016075078中所述的来源于链霉菌属和溶杆菌属(*Lysobacter*)的那些。

[0141] (d) 与在W092/17577 (Novozymes A/S) 中所述的来自芽孢杆菌属TY145, NCIMB 40339的枯草杆菌酶具有至少90%的同一性的蛋白酶,包括W02015024739和W02016066757中所述的该芽孢杆菌TY145枯草杆菌酶的变体。

[0142] 用于本发明的洗涤剂的特别优选的蛋白酶是与来自迟缓芽孢杆菌的野生型酶具有至少90%、优选至少95%、更优选至少98%、甚至更优选至少99%、特别是100%的同一性的多肽,使用如W000/37627(其以引用方式并入本文)中所示的BPN'编号系统和氨基酸缩写,所述多肽在下列一个或多个、优选两个或更多个、更优选三个或更多个位置包含突变:V68A、N76D、N87S、S99D、S99SD、S99A、S101G、S101M、S103A、V104N/I、G118V、G118R、S128L、P129Q、S130A、Y167A、R170S、A194P、V205I、Q206L/D/E、Y209W和/或M222S。

[0143] 最优选地,蛋白酶选自相对于PB92野生型(W0 08/010925中的SEQ ID NO:2)或枯草杆菌蛋白酶309野生型(按照PB92主链的序列,不同的是包含自然变异N87S)包含下列突变(BPN'编号系统)的组。

[0144] (i) G118V+S128L+P129Q+S130A

[0145] (ii) S101M+G118V+S128L+P129Q+S130A

[0146] (iii) N76D+N87R+G118R+S128L+P129Q+S130A+S188D+N248R

[0147] (iv) N76D+N87R+G118R+S128L+P129Q+S130A+S188D+V244R

[0148] (v) N76D+N87R+G118R+S128L+P129Q+S130A

[0149] (vi) V68A+N87S+S101G+V104N

[0150] (vii) S99AD

[0151] 合适的可商购获得的另外的蛋白酶包括以商品名 *Alcalase*[®]、*Savinase*[®]、*Primase*[®]、*Durazym*[®]、*Polarzyme*[®]、*Kannase*[®]、*Liquanase*[®]、*Liquanase Ultra*[®]、*Savinase Ultra*[®]、*Ovozyme*[®]、*Neutrase*[®]、*Everlase*[®]、*Coronase*[®]、*Blaze*[®]、*Blaze Ultra*[®]和*Esperase*[®]由Novozymes A/S (Denmark) 出售的那

些;以商品名 Maxatase[®]、Maxacal[®]、Maxapem[®]、Properase[®]、Purafect[®]、Purafect Prime[®]、Purafect Ox[®]、FN3[®]、FN4[®]、Excellase[®]、Ultimase[®]和 Purafect OXP[®]由Dupont出售的那些;以商品名 Opticlean[®]和 Optimase[®]由Solvay Enzymes出售的那些;以及可从Henkel/Kemira获得的那些,即BLAP(序列示于US 5,352,604的图29中,具有下列突变S99D+S101 R+S103A+V104I+G159S,下文称为BLAP)、BLAP R(具有S3T+V4I+V199M+V205I+L217D的BLAP)、BLAP X(具有S3T+V4I+V205I的BLAP)和BLAP F49(具有S3T+V4I+A194P+V199M+V205I+L217D的BLAP);以及来自Kao的KAP(具有突变A230V+S256G+S259N的嗜碱芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶)。

[0152] 特别优选用于本文与本发明的变体蛋白酶组合的是选自由以下项组成的组的商业蛋白酶: Properase[®]、Blaze[®]、Ultimase[®]、Everlase[®]、Savinase[®]、Excellase[®]、BlazeUltra[®]、BLAP和BLAP变体。

[0153] 本发明产品中蛋白酶的优选含量包括约0.05mg至约10mg、更优选地约0.5mg至约7mg并且特别是约1mg至约6mg活性蛋白酶/g组合物。

[0154] 淀粉酶

[0155] 优选地,本发明的组合物可包含淀粉酶。合适的 α -淀粉酶包括源自细菌或真菌的那些。包括经化学修饰或基因修饰的突变体(变体)。优选的碱性 α -淀粉酶来源于芽孢杆菌(Bacillus)的菌株,诸如地衣芽孢杆菌(Bacillus licheniformis)、解淀粉芽孢杆菌(Bacillus amyloliquefaciens)、嗜热脂肪芽孢杆菌(Bacillus stearothermophilus)、枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)或其他芽孢杆菌属(Bacillus sp.),诸如芽孢杆菌属NCBI 12289、NCBI 12512、NCBI 12513、DSM 9375(USP 7,153,818)DSM 12368、DSMZ号12649、KSM AP1378(WO 97/00324)、KSM K36或KSM K38(EP 1,022,334)。优选的淀粉酶包括:

[0156] (a) 在WO 96/23873、W000/60060、W006/002643和W02017/192657中描述的变体,特别是相对于SEQ ID NO.11在下列位置具有一个或多个取代的变体:26、30、33、82、37、106、118、128、133、149、150、160、178、182、186、193、202、214、231、246、256、257、258、269、270、272、283、295、296、298、299、303、304、305、311、314、315、318、319、339、345、361、378、383、419、421、437、441、444、445、446、447、450、461、471、482、484,这些变体优选地还包含D183*和G184*缺失。

[0157] (b) 表现出与W006/002643中的SEQ ID No.4表现出至少90%同一性的变体,来自芽孢杆菌属SP722的野生型酶,特别是在第183和184位具有缺失的变体,以及W0 00/60060、W02011/100410和W02013/003659中描述的变体,所述文献以引用方式并入本文。

[0158] (c) 表现出与来自芽孢杆菌属707的野生型酶(US 6,093,562中的SEQ ID NO:7)具有至少95%同一性的变体,特别是包含以下突变中的一个或多个突变的那些:M202、M208、S255、R172和/或M261。优选地,所述淀粉酶包含M202L、M202V、M202S、M202T、M202I、M202Q、M202W、S255N和/或R172Q中的一个或多个。尤其优选的是包含M202L或M202T突变的那些。

[0159] (d) 在WO 09/149130中描述的变体,优选表现出与WO 09/149130中的SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2(来自嗜热脂肪芽孢杆菌(Geobacillus Stearothermophilus)的野生型酶

或其截短型式)至少90%的同一性的那些。

[0160] (e)表现出与W02016091688中的SEQ ID NO:1具有至少89%同一性的变体,特别是在位置H183+G184处包含缺失并且还在第405位、第421位、第422位和/或第428位处包含一个或多个突变的那些。

[0161] (f)表现出与来自解凝乳类芽孢杆菌YK9的“PcuAmy1 α -淀粉酶”(W02014099523中的SEQ ID NO:3)具有至少60%的氨基酸序列同一性的变体。

[0162] (g)表现出与来自噬细胞菌属(*Cytophaga* sp.)的“CspAmy2淀粉酶”(W02014164777中的SEQ ID NO:1)具有至少60%的氨基酸序列同一性的变体。

[0163] (h)表现出与来自枯草芽孢杆菌的AmyE(W02009149271中的SEQ ID NO:1)具有至少85%同一性的变体。

[0164] (i)表现出与来自芽孢杆菌属KSM-K38的野生型淀粉酶(登录号AB051102)具有至少90%同一性的变体。

[0165] (j)表现出与来自芽孢杆菌属的AAI10(W02016180748中的SEQ ID NO:7)的成熟氨基酸序列具有至少80%同一性的变体。

[0166] (k)表现出与脂环酸芽孢杆菌属(*Alicyclobacillus* sp.)淀粉酶(W02016180748中的SEQ ID NO:8)的成熟氨基酸序列具有至少80%同一性的变体。

[0167] 优选地,淀粉酶为工程化酶,其中易于漂白氧化的氨基酸中的一个或多个已被不太易于氧化的氨基酸取代。具体地,优选的是甲硫氨酸残基被任何其他氨基酸取代。具体地,优选的是最易于氧化的甲硫氨酸被取代。优选地,SEQ ID NO:2中等同于202的位置处的甲硫氨酸被取代。优选地,该位置处的甲硫氨酸被苏氨酸或亮氨酸、优选亮氨酸取代。

[0168] 合适的可商购获得的 α -淀粉酶包括DURAMYL[®]、LIQUEZYME[®]、TERMAMYL[®]、TERMAMYL ULTRA[®]、NATALASE[®]、SUPRAMYL[®]、STAINZYME[®]、STAINZYME PLUS[®]、FUNGAMYL[®]、ATLANTIC[®]、INTENSA[®]和BAN[®](Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark)、KEMZYM[®] AT 9000Biozym Biotech Trading GmbH Wehlistrasse 27b A-1200Wien Austria、RAPIDASE[®]、PURASTAR[®]、ENZYSIZE[®]、OPTISIZE HT PLUS[®]、POWERASE[®]、PREFERENZ S[®]系列(包括PREFERENZ S1000[®]和PREFERENZ S2000[®])、PURASTAR OXAM[®](DuPont., Palo Alto, California)和KAM[®](Kao, 14-10Nihonbashi Kayabacho, 1-chome, Chuo-ku Tokyo 103-8210, Japan)。在一个方面,合适的淀粉酶包括ATLANTIC[®]、STAINZYME[®]、POWERASE[®]、INTENSA[®]和STAINZYME PLUS[®]以及它们的混合物。

[0169] 优选地,本发明的产品包含至少0.01mg、优选地约0.05mg至约10mg、更优选地约0.1mg至约6mg、特别是约0.2mg至约5mg活性淀粉酶/g组合物。

[0170] 优选地,本发明组合物的蛋白酶和/或淀粉酶为颗粒形式,所述颗粒包含按所述颗粒的重量计大于29%的硫酸钠,并且/或者硫酸钠和活性酶(蛋白酶和/或淀粉酶)的重量比介于3:1和100:1之间,或优选地介于4:1和30:1之间,或更优选地介于5:1和20:1之间。

[0171] 晶体生长抑制剂

[0172] 晶体生长抑制剂是可与碳酸钙晶体结合并防止物质(诸如霰石和方解石)进一步生长的材料。

[0173] 有效的晶体生长抑制剂的示例包括膦酸盐、聚膦酸盐、菊粉衍生物、聚衣康酸均聚物和环状聚羧酸盐。

[0174] 合适的晶体生长抑制剂可选自HEDP(1-羟基亚乙基1,1-二膦酸)、羧甲基菊粉(CMI)、三羧酸和环状羧酸盐。出于本发明的目的,术语羧酸盐涵盖阴离子形式和质子化羧酸形式两者。

[0175] 环状羧酸盐包含至少两个,优选三个或优选至少四个羧酸根基团,并且环状结构基于单环或双环烷烃或杂环。合适的环状结构包括环丙烷、环丁烷、环己烷或环戊烷或环庚烷、双环庚烷或双环辛烷和/或四氢呋喃。一种优选的晶体生长抑制剂是环戊烷四羧酸盐。

[0176] 在环的3D结构的同一侧或“顺式”位置上具有至少75%,优选100%羧酸根基团的环状羧酸盐优选地用于本文中。

[0177] 优选的是,位于环的同一侧的两个羧酸根基团在直接相邻或“邻位”的位置。

[0178] 优选的晶体生长抑制剂包括HEDP、三羧酸、四氢呋喃四羧酸(THFTCA)和环戊烷四羧酸(CPTCA)。THFTCA优选地为2c,3t,4t,5c-构型,并且CPTCA为顺式,顺式,顺式,顺式-构型。可用于本文的尤其优选的晶体生长抑制剂是HEDP。

[0179] 还优选用于本文的是部分脱羧的聚衣康酸均聚物,其优选具有在50摩尔%至90摩尔%范围内的脱羧水平。可用于本文的尤其优选的聚合物为由Itaconix提供的Itaconix TSI[®]。

[0180] 晶体生长抑制剂的量按组合物的重量计优选为约0.01%至约10%,具体地为约0.02%至约5%,并且具体地为0.05%至3%。

[0181] 金属护理剂

[0182] 金属护理剂可防止或减少金属(包括铝、不锈钢和有色金属,诸如银和铜)的失泽、腐蚀或氧化。优选地,本发明的组合物包含按产品的重量计0.1%至5%、更优选0.2%至4%并且尤其是0.3%至3%的金属护理剂,优选地,该金属护理剂为苯并三唑(BTA)。

[0183] 玻璃护理剂

[0184] 玻璃护理剂可在盘碟洗涤过程中保护玻璃物品的外观。优选地,本发明的组合物包含按组合物的重量计0.1%至5%、更优选0.2%至4%并且尤其是0.3%至3%的金属护理剂,优选地,该玻璃护理剂为含锌材料,尤其是水锌矿。其他合适的玻璃护理剂为聚乙烯亚胺(PEI)。尤其优选的PEI为由BASF提供的Lupasol[®] FG。

[0185] 本发明的自动盘碟洗涤组合物优选具有在20℃下以1%重量/体积水溶液在蒸馏水中测得的约9至约12、更优选约10至小于约11.5并且尤其是约10.5至约11.5的pH。

[0186] 本发明的自动盘碟洗涤组合物在pH为9.5下优选具有约10至约20、更优选约12至约18的储备碱度,如在20℃下以100克产品在NaOH中测得的。

[0187] 本发明的优选的自动盘碟洗涤组合物包含:

[0188] i) 按组合物的重量计10%至20%的过碳酸钠;

[0189] ii) 按组合物的重量计10%至50%的有机络合剂体系,优选地所述络合剂体系包

含MGDA;

[0190] iii) TAED;

[0191] iv) 淀粉酶;

[0192] v) 任选但优选按组合物的重量计5%至50%的无机助洗剂, 优选碳酸钠;

[0193] vi) 任选但优选按组合物的重量计2%至10%的非离子表面活性剂;

[0194] vii) 其他任选成分, 包括: 晶体生长抑制剂 (优选HEDP) 和玻璃护理剂。

[0195] 本发明的优选的自动盘碟洗涤组合物包含:

[0196] i) 按组合物的重量计10%至20%的漂白剂, 优选过碳酸钠;

[0197] ii) 按组合物的重量计10%至50%的有机络合剂体系。

[0198] iii) 锰漂白催化剂和任选的TAED;

[0199] iv) 淀粉酶;

[0200] v) 任选但优选按组合物的重量计5%至50%的无机助洗剂, 优选碳酸钠;

[0201] vi) 任选但优选按组合物的重量计2%至10%的非离子表面活性剂;

[0202] vii) 任选但优选的玻璃护理剂。

[0203] 本文所公开的量纲和值不应理解为严格限于所引用的精确数值。相反, 除非另外指明, 否则每个此类量纲旨在表示所述值以及围绕该值功能上等同的范围。例如, 公开为“40mm”的量纲旨在表示“约40mm”。

[0204] 实施例

[0205] 使用表1中所示的组合物。将3g的每种组合物溶解于一升去离子水中以产生具有11的pH的清洁溶液。将本发明的蛋白酶以0.25ppm至0.75ppm之间的水平添加到清洁溶液中。获得了良好的焦糖布丁去除。

[0206] 表1: 自动盘碟洗涤组合物

	成分 (活性物质重量%)	ADW 配方 A		
		ADW 配方 B		
		ADW 配方 C		
[0207]	固体成分			
	碳酸钠	41.7	41.7	41.7
	硫酸钠	0.00	1.68	2.03
	MGDA	21.0	0.00	10.1
	柠檬酸钠	0.00	19.2	10.1
	TAED	1.68	1.68	1.68
	过碳酸钠	12.6	12.6	12.6
	磺化聚合物	2.5	2.5	2.5
	漂白催化剂	1.2	1.2	1.2
	淀粉酶	0.11	0.11	0.11
	液体成分			
	Lutensol TO7	19.3	19.3	19.3

[0208] 表1: 自动盘碟洗涤 (ADW) 组合物

[0209]	淀粉酶	由 Novozymes 提供的 Stainzyme® Plus
	TAED	四乙酰基乙二胺
	MGDA	由 BASF 提供的三-甲基甘氨酸二乙酸三钠
	漂白催化剂	MnTACN (1,4,7-三氮杂环壬烷锰)
	磺化聚合物	由 Dow Chemicals 提供的 Acusol 588
	Lutensol TO7	由 BASF 提供的非离子表面活性剂

[0210] 在洗涤剂中的清洁性能

[0211] 蛋黄污渍

[0212] 相对于具有 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的参考蛋白酶,使用蛋黄 (PAS-38, Center for Testmaterials BV, Vlaardingen, Netherlands) 微样本和 GSM-B 洗涤剂 (参见下表1) 在 pH 10.5 下以及在微量滴定板 (MTP) 中测试本文所述的蛋白酶变体的自动盘碟洗涤 (ADW) 清洁性能。在该测定中,使用预穿孔的 PAS-38 (以贴合在 MTP 上) 冲洗和未冲洗的样本。通过将 180μL 10mM CAPS 缓冲液 (pH 11) 添加至含有 PAS-38 微样本的 MTP 并在 60°C 和 1100rpm 下振荡 30 分钟来制备冲洗的样本。温育后,移除缓冲液,用去离子水冲洗样本以移除任何残余的缓冲液,并在用于测定之前将 MTP 风干。在添加酶之前,用调节至 374ppm 水硬度的 3g/l 的 GSM-B 洗涤剂填充所有微样本板。在 40°C 下用洗涤剂和酶温育 PAS-38 样本 30 分钟后,用 SpectraMax 读板机读取 405nm 处的吸光度。通过从每个样品值减去空白对照 (无酶) 的值获得吸光度结果 (下文称为“减去了空白的吸光度”)。对于每种条件和变体,通过将减去了空白的吸光度除以相同浓度下的参考蛋白酶的吸光度来计算性能指数 (PI)。参考蛋白酶的值由参考蛋白酶的标准曲线确定,该标准曲线包括在测试中并且视情况拟合到朗缪尔拟合 (Langmuir fit) 或希尔 S 曲线拟合 (Hill Sigmoidal fit)。

[0213] 焦糖布丁污渍

[0214] 通过使用如本文所述由 CFT, Vlaardingen, Netherlands 制造并标记为 DM10c 的定制三聚氰胺盘碟洗涤剂监测器 (瓷砖), 测试变体对焦糖布丁污渍的清洁性能。该研究中使用的 DM10c 瓷砖使用 2.7g 与用于制备可商购获得的 DM10 监测器 (焦糖布丁 Debic.com 产品) 的材料相同的材料制备,但是在 140°C 而不是 150°C 下烘焙 2 小时。将三聚氰胺瓷砖用作封盖,并紧紧压在微量滴定板 (MTP) 上。将 3g/L 的 GSMB 或 MGDA 洗涤剂 (分别为表 1 和表 2) 调节至 374ppm 的水硬度,并将每个酶样品添加至 MTP,然后将三聚氰胺瓷砖封盖附接到 MTP。MTP 的体积容量以及因此添加到其中的溶液的体积可以变化,其中应将最小体积的溶液添加到 MTP 中,使得溶液和污渍表面之间能够在温育条件下接触。在该实施例中,将 300μL 体积的含洗涤剂的酶添加到铝 96 孔 MTP 的每个孔中。将 MTP 在 Infors 热振荡器中在 40°C 下以 250rpm 温育 45 分钟。温育后,将瓷砖从 MTP 取走并风干。

[0215] 通过拍摄板的照片并使用定制软件测量每个污渍区域的 RGB 值来定量污渍去除。通过将 RGB 值用于下式来计算经洗涤的瓷砖的污垢去除百分比 (%SRI) 值:

[0216] $\%SRI = (\Delta E / \Delta E_{\text{初始}}) * 100$

[0217] 其中 $\Delta E = \text{SQR}((R_{\text{后}} - R_{\text{前}})^2 + (G_{\text{后}} - G_{\text{前}})^2 + (B_{\text{后}} - B_{\text{前}})^2)$

[0218] 其中 $\Delta E_{\text{初始}} = \text{SQR}((R_{\text{白}} - R_{\text{前}})^2 + (G_{\text{白}} - G_{\text{前}})^2 + (B_{\text{白}} - B_{\text{前}})^2)$

[0219] 通过从每个样品值减去空白对照 (无酶) 的值获得清洁性能 (下文称为“减去了空白的清洁”)。对于每种条件和变体,通过将减去了空白的清洁除以相同浓度下的参考蛋白

酶(具有氨基酸SEQ ID NO:1)的减去了空白的清洁来计算性能指数(PI)。亲本蛋白酶PI的值由亲本蛋白酶的标准曲线确定,该标准曲线包括在测试中并且视情况拟合到朗缪尔拟合或希尔S曲线拟合。

[0220]

表 1: GSM-B pH 10.5 无磷酸盐的 ADW 洗涤剂成分	
组分	重量%
脱水柠檬酸钠	30.0
马来酸/丙烯酸共聚物钠盐 (SOKALAN [®] CP5; BASF)	12.0
过硼酸钠一水合物	5.0
TAED	2.0
二硅酸钠: Prottil A (Cognis)	25.0
直链脂肪醇乙氧基化物	2.0
无水碳酸钠	加至 100

[0221]

表 2: MGDA pH 10.5 ADW 洗涤剂成分	
组分	重量%
MGDA	64.6
Plurafac SLF 18-45D	4.4
柠檬酸铋	0.4
膦酸盐 (Bayhibit S)	0.4
Acusol 420/Acosul 587	1.6
PEG6000	2.4
PEG1500	5.9
过碳酸钠	16.1
TAED	4.1

[0222] AAPF活性测定

[0223] 通过测量N-suc-AAPF-pNA的水解来测试参考蛋白酶(具有氨基酸SEQ ID NO:1)及其变体的蛋白酶活性。用于AAPF水解测定的试剂溶液是:100mM Tris/HCl pH 8.6,其含有0.005% TWEEN[®]-80 (Tris稀释缓冲液);100mM Tris缓冲液pH 8.6,其包含10mM CaCl₂和0.005% TWEEN[®]-80 (Tris/Ca缓冲液);以及溶于DMSO中的160mM suc-AAPF-pNA (suc-AAPF-pNA储备溶液) (Sigma:S-7388)。通过将1mL suc-AAPF-pNA储备溶液添加至100mL Tris/Ca缓冲液并充分混合来制备底物工作溶液。将酶样品添加至含有1mg/suc-AAPF-pNA工作溶液的MTP (Greiner 781101),用SpectraMax读板机在室温(RT)下以动力学模式在405nm处测定3分钟内的活性。从每个样品读数减去不含蛋白酶的空白的吸光度。蛋白酶活性以mOD • min⁻¹表示。

[0224] 稳定性测定

[0225] 通过在应力缓冲液中稀释变体并且在热温育步骤之前和之后使用上述AAPF测定测量变体的蛋白水解活性来测量本文所述变体的稳定性。选择热温育步骤的温度和持续时间,使得参考蛋白酶显示出大约30%-45%的残余活性。将样品在384孔热循环仪中在56℃下温育5min。在Tris-EDTA (50mM Tris pH9;5mM EDTA;0.005%吐温80)缓冲条件下测量稳定性。通过将变体的残余活性除以参考蛋白酶的残余活性来获得稳定性PI。

[0226] 变体在碟应用中的性能

[0227] 在以下清洁测定中评估参考蛋白酶 (具有氨基酸序列SEQ ID NO:1) 及其变体的清洁性能: 使用GSM-B洗涤剂清洁PAS-38技术污渍, 使用GSM-B或MGDA洗涤剂清洁焦糖布丁污渍, 以及上文所述的稳定性测定。这些对参考蛋白酶及其变体的评估的结果被报告为相对于参考蛋白酶计算的性能指数 (PI) 值, 示于表4中。

[0228]

具有以下氨基酸取代 的 SEQ ID NO:1	在 EDTA 中相对于参 考蛋白酶 (SEQ ID NO:1) 的稳定性	相对于 SEQ ID NO:1 的 ADW 鸡蛋 去除性能		相对于 SEQ ID NO:1 的焦糖布丁去除性能	
		经 ADW 冲洗的鸡 蛋污渍	未经 ADW 冲 洗的鸡蛋 污渍	GSM-B 洗 涤剂	MGDA 洗 涤剂
T003V	1.4	0.9	1.0	1.0	1.0
V004T	1.2	1.0	1.0	0.9	0.9
I008V	1.2	1.0	1.0	1.0	1.1
T009A	1.3	1.0	1.0	1.2	1.1
T009C	1.0	1.0	0.9	1.5	1.7
T009E	1.2	< 0.9	0.9	1.3	1.5
T009G	1.1	< 0.9	0.9	0.9	1.0
T009H	1.2	1.1	1.1	1.0	1.1
T009K	1.1	1.1	1.2	< 0.9	< 0.9
T009M	1.0	1.0	1.0	1.3	1.2
T009N	1.1	0.9	1.1	1.2	1.3
T009Q	1.2	0.9	1.0	1.1	1.1

[0229]

具有以下氨基酸取代 的 SEQ ID NO:1	在 EDTA 中相对于参 考蛋白酶 (SEQ ID NO:1) 的稳定性	相对于 SEQ ID NO:1 的 ADW 鸡蛋 去除性能		相对于 SEQ ID NO:1 的焦糖布丁去除性能	
		经 ADW 冲洗的鸡 蛋污渍	未经 ADW 冲 洗的鸡 蛋污渍	GSM-B 洗 涤剂	MGDA 洗 涤剂
T009S	1.2	1.0	1.0	1.0	1.1
T009W	1.2	1.1	1.1	1.0	1.1
T009Y	1.2	1.0	1.0	1.2	1.1
R010A	1.0	1.0	0.9	1.8	1.7
R010K	0.9	0.9	1.0	1.2	1.0
R010M	1.0	0.9	1.0	2.1	1.8
R010N	1.0	0.9	< 0.9	1.7	1.8
R010Q	1.1	< 0.9	< 0.9	1.5	1.6
R010W	1.0	< 0.9	< 0.9	1.1	1.2
V011A	1.1	1.0	1.1	1.3	1.4
V011I	1.0	1.0	1.2	1.1	1.1
V011S	1.0	1.0	1.1	1.0	1.0
V011T	1.0	1.0	1.0	1.1	1.0
Q012A	1.1	1.0	1.1	1.1	1.2
Q012C	1.1	0.9	0.9	1.4	1.6
Q012D	1.0	0.9	0.9	1.5	1.6
Q012E	1.0	0.9	0.9	1.3	1.4
Q012G	1.1	1.0	1.1	0.9	1.0
Q012M	1.1	0.9	1.1	1.1	1.1
Q012N	1.2	0.9	1.1	1.1	1.1
Q012R	1.0	0.9	1.1	< 0.9	< 0.9
Q012S	1.0	0.9	1.1	0.9	< 0.9
Q012T	1.1	1.0	0.9	< 0.9	0.9
Q012V	1.0	0.9	1.1	< 0.9	< 0.9
Q012W	0.9	1.0	1.1	< 0.9	< 0.9
P014D	1.0	1.0	0.9	1.2	1.4
A015D	1.0	1.0	1.0	1.2	1.4
A015E	1.0	1.0	0.9	0.9	1.4
A015F	1.1	1.1	1.1	< 0.9	1.0
A015H	1.1	1.0	1.0	1.4	1.0
A015I	1.0	1.1	1.1	1.4	1.0
A015K	1.0	1.0	1.1	1.0	< 0.9
A015M	1.1	0.9	1.1	1.8	1.2
A015P	1.1	1.0	1.0	< 0.9	1.0
A015Q	1.1	1.0	1.0	0.9	1.0
A015V	1.0	1.1	1.0	1.6	1.1

[0230]

具有以下氨基酸取代 的 SEQ ID NO:1	在 EDTA 中相对于参 考蛋白酶 (SEQ ID NO:1) 的稳定性	相对于 SEQ ID NO:1 的 ADW 鸡蛋 去除性能		相对于 SEQ ID NO:1 的焦糖布丁去除性能	
		经 ADW 冲洗的鸡 蛋污渍	未经 ADW 冲 洗的鸡 蛋污渍	GSM-B 洗 涤剂	MGDA 洗 涤剂
A015W	1.1	1.0	0.9	1.3	1.0
A015Y	1.0	1.0	0.9	1.7	1.1
V016L	1.0	1.0	1.1	1.1	0.9
V016M	1.0	1.0	1.1	1.6	1.0
V016S	1.1	0.9	0.9	0.9	0.9
H017C	1.3	1.0	0.9	1.2	1.3
H017E	1.2	< 0.9	0.9	1.2	1.0
H017F	1.3	1.1	1.1	0.9	< 0.9
H017G	1.0	1.1	1.0	< 0.9	0.9
H017I	1.4	1.1	1.1	< 0.9	< 0.9
H017L	1.4	1.1	1.1	< 0.9	< 0.9
H017N	1.1	0.9	1.1	1.0	0.9
H017V	1.2	1.1	1.0	< 0.9	< 0.9
H017W	1.3	1.1	1.0	< 0.9	< 0.9
H017Y	1.1	0.9	1.1	< 0.9	< 0.9
N018A	1.1	1.0	1.0	1.0	1.2
N018C	1.0	0.9	0.9	1.3	1.2
N018D	1.1	1.0	0.9	1.3	1.5
N018E	1.1	ND	< 0.9	1.2	1.4
N018F	1.0	1.1	1.0	1.0	1.1
N018G	1.0	1.0	1.0	1.0	1.2
N018L	1.1	0.9	1.1	1.0	1.1
N018M	1.1	1.0	1.1	1.0	1.3
N018Q	1.1	1.0	1.0	1.0	1.2
N018T	1.0	1.0	1.0	1.0	1.1
R019A	1.0	1.0	0.9	1.3	1.5
R019C	1.1	1.1	< 0.9	1.3	1.4
R019D	1.1	ND	0.9	1.6	1.7
R019E	1.0	0.9	< 0.9	1.6	1.7
R019F	1.0	0.9	0.9	1.5	1.6
R019H	1.0	0.9	0.9	1.2	1.4
R019I	1.0	1.0	0.9	1.3	1.3
R019K	1.0	1.1	1.0	1.1	1.0
R019L	1.0	1.0	1.1	1.4	1.3
R019N	1.0	ND	1.0	1.3	1.3
R019Q	1.0	1.1	0.9	1.2	1.4

[0231]

具有以下氨基酸取代 的 SEQ ID NO:1	在 EDTA 中相对于参 考蛋白酶 (SEQ ID NO:1) 的稳定性	相对于 SEQ ID NO:1 的 ADW 鸡蛋 去除性能		相对于 SEQ ID NO:1 的焦糖布丁去除性能	
		经 ADW 冲洗的鸡 蛋污渍	未经 ADW 冲 洗的鸡 蛋污渍	GSM-B 洗 涤剂	MGDA 洗 涤剂
R019S	1.0	1.0	0.9	1.3	1.5
R019T	1.0	ND	1.0	1.3	1.4
R019W	1.0	1.0	1.0	1.2	1.4
R019Y	1.1	0.9	1.0	1.2	1.3
G020A	1.0	1.1	1.1	1.0	1.0
G020C	1.1	1.0	1.0	1.2	1.1
G020D	1.1	1.1	1.0	1.1	1.0
G020M	1.1	1.0	1.1	0.9	< 0.9
G020N	1.1	1.0	1.1	0.9	0.9
G020T	1.0	1.1	1.0	< 0.9	< 0.9
S024A	1.1	0.9	1.2	1.3	1.0
S024E	1.3	1.0	1.0	1.2	1.2
G025A	1.0	1.1	1.1	1.3	1.0
G025C	1.1	0.9	0.9	1.2	1.1
G025D	1.1	1.1	0.9	1.3	1.1
G025E	1.0	1.0	0.9	1.2	1.1
G025M	1.0	1.0	1.0	1.2	0.9
G025N	1.1	1.0	1.1	1.2	1.0
V026A	1.0	0.9	< 0.9	1.1	1.0
V026I	1.1	1.0	1.1	1.0	1.1
R027K	1.1	1.0	1.0	1.1	1.3
S033T	1.1	0.9	< 0.9	< 0.9	< 0.9
S036A	1.1	1.1	1.1	0.9	0.9
S036C	1.1	1.0	1.0	1.4	1.4
S036E	1.0	1.0	0.9	1.5	1.7
S036I	1.1	1.0	0.9	< 0.9	1.1
S036L	1.1	1.1	0.9	0.9	1.0
S036M	1.2	1.0	0.9	1.0	1.1
S036Q	1.1	1.0	1.0	1.1	1.1
S036T	1.0	1.0	1.1	1.1	1.1
S036V	1.1	0.9	< 0.9	1.0	1.2
N042C	1.4	1.0	0.9	1.2	1.4
N042D	1.2	1.0	1.0	1.1	1.5
N042E	1.5	1.0	1.0	1.0	1.4
N042M	1.2	1.0	0.9	1.0	1.0
N042Q	1.1	1.0	0.9	0.9	1.1

[0232]

具有以下氨基酸取代 的 SEQ ID NO:1	在 EDTA 中相对于参 考蛋白酶 (SEQ ID NO:1) 的稳定性	相对于 SEQ ID NO:1 的 ADW 鸡蛋 去除性能		相对于 SEQ ID NO:1 的焦糖布丁去除性能	
		经 ADW 冲洗的鸡 蛋污渍	未经 ADW 冲 洗的鸡 蛋污渍	GSM-B 洗 涤剂	MGDA 洗 涤剂
I043L	1.0	1.0	1.0	1.2	1.3
R044C	1.3	1.0	1.1	1.6	1.7
R044E	1.3	1.0	< 0.9	1.3	1.5
R044F	1.2	0.9	< 0.9	< 0.9	1.0
R044G	1.1	1.0	0.9	1.1	1.3
R044H	1.2	1.0	1.1	1.1	1.3
R044I	1.2	0.9	< 0.9	0.9	1.2
R044K	1.1	1.0	1.1	1.0	1.1
R044L	1.2	0.9	< 0.9	1.0	1.2
R044N	1.2	1.0	ND	1.3	1.3
R044Q	1.2	0.9	1.0	1.2	1.3
R044S	1.2	0.9	0.9	1.0	1.3
R044T	1.2	0.9	< 0.9	1.1	1.2
R044V	1.2	0.9	0.9	0.9	1.2
R044W	1.3	0.9	< 0.9	0.9	0.9
R044Y	1.3	0.9	< 0.9	0.9	0.9
A047I	1.1	1.0	1.0	0.9	1.0
A047Y	1.1	0.9	1.0	< 0.9	1.0
V050I	1.1	1.0	1.0	< 0.9	1.0
G052A	1.1	0.9	1.1	1.3	1.5
G052C	1.0	< 0.9	< 0.9	1.2	1.5
G052D	1.0	1.1	1.0	1.5	1.7
G052H	1.0	1.0	1.2	< 0.9	1.2
G052L	1.0	< 0.9	< 0.9	0.9	1.3
G052M	1.1	0.9	1.1	1.2	1.6
G052N	1.2	0.9	1.0	1.1	1.2
G052S	1.1	0.9	1.0	0.9	1.0
G052T	1.1	0.9	1.0	< 0.9	1.1
G052Y	1.1	< 0.9	0.9	< 0.9	1.0
P054A	1.0	1.0	1.1	1.5	1.4
P054C	1.0	1.0	0.9	1.3	1.4
P054G	1.0	1.1	< 0.9	0.9	< 0.9
P054L	1.0	1.0	1.2	0.9	1.5
P054M	1.0	0.9	1.3	1.8	2.1
P054N	1.1	0.9	1.1	1.0	1.0
P054T	1.0	1.0	1.0	< 0.9	< 0.9

[0233]

具有以下氨基酸取代 的 SEQ ID NO:1	在 EDTA 中相对于参 考蛋白酶 (SEQ ID NO:1) 的稳定性	相对于 SEQ ID NO:1 的 ADW 鸡蛋 去除性能		相对于 SEQ ID NO:1 的焦糖布丁去除性能	
		经 ADW 冲洗的鸡 蛋污渍	未经 ADW 冲 洗的鸡蛋 污渍	GSM-B 洗 涤剂	MGDA 洗 涤剂
P054V	1.1	1.0	1.1	1.1	1.6
T055A	1.0	0.9	1.2	1.3	1.2
T055C	1.1	0.9	0.9	1.1	1.1
T055D	1.1	1.0	1.2	1.5	1.4
T055E	1.1	0.9	1.0	1.3	1.4
T055H	1.0	0.9	1.2	< 0.9	0.9
T055M	1.0	0.9	1.1	1.2	0.9
T055N	1.1	0.9	1.1	0.9	0.9
T055S	1.0	0.9	1.2	< 0.9	0.9
T055Y	1.0	< 0.9	1.1	< 0.9	< 0.9
A057D	1.0	1.0	1.0	1.4	1.6
A057E	1.1	1.0	1.0	1.3	1.4
A057H	1.2	1.0	1.0	0.9	1.0
A057M	1.2	1.0	1.1	1.1	1.1
A057N	1.1	0.9	0.9	1.0	0.9
A057Q	1.1	0.9	1.0	0.9	1.0
A057T	1.1	1.0	1.0	< 0.9	< 0.9
L059A	1.0	1.1	0.9	1.5	1.2
L059C	1.0	0.9	< 0.9	1.7	1.3
L059D	0.9	1.0	1.0	1.9	1.6
L059E	1.0	1.0	1.0	1.6	1.4
L059M	1.0	1.1	ND	1.3	1.1
L059N	1.1	1.1	1.0	1.4	1.1
L059Q	1.0	ND	1.0	1.2	1.0
L059T	1.0	1.0	0.9	1.2	1.2
N060S	1.0	1.0	1.2	1.4	1.4
T069S	1.0	1.1	1.1	< 0.9	0.9
S076A	1.2	0.9	1.0	0.9	1.0
S076D	1.2	1.0	1.1	1.2	1.3
S076E	1.4	1.0	1.0	1.2	1.2
S076F	1.2	0.9	1.0	1.0	1.1
S076H	1.5	1.0	1.0	0.9	0.9
S076K	1.3	1.0	1.1	< 0.9	< 0.9
S076L	1.3	< 0.9	1.1	1.0	1.0
S076M	1.5	1.0	1.0	1.0	1.1
S076N	1.4	1.0	1.1	1.1	1.0

[0234]

具有以下氨基酸取代 的 SEQ ID NO:1	在 EDTA 中相对于参 考蛋白酶 (SEQ ID NO:1) 的稳定性	相对于 SEQ ID NO:1 的 ADW 鸡蛋 去除性能		相对于 SEQ ID NO:1 的焦糖布丁去除性能	
		经 ADW 冲洗的鸡 蛋污渍	未经 ADW 冲 洗的鸡 蛋污渍	GSM-B 洗 涤剂	MGDA 洗 涤剂
S076R	1.2	1.0	1.0	< 0.9	< 0.9
S076T	1.4	0.9	1.0	1.0	1.0
S076Y	1.2	0.9	0.9	0.9	< 0.9
V082A	1.1	1.0	1.1	1.2	1.0
P084D	1.2	1.0	< 0.9	1.2	1.2
P084F	1.1	1.0	1.0	1.0	1.0
P084H	1.4	1.0	0.9	< 0.9	< 0.9
P084Y	1.3	0.9	1.0	< 0.9	< 0.9
N085S	1.1	0.9	1.0	0.9	1.0
G095A	1.1	1.0	1.0	< 0.9	1.1
G095N	1.1	1.0	1.2	< 0.9	< 0.9
A096M	1.1	ND	< 0.9	1.1	1.1
A096Q	1.0	0.9	1.2	1.1	1.0
N097E	0.9	1.0	1.1	1.4	1.6
N097H	1.0	0.9	< 0.9	1.0	1.3
N097K	1.1	1.0	1.1	< 0.9	0.9
S101T	1.1	1.0	0.9	< 0.9	< 0.9
V102L	1.1	1.1	1.0	< 0.9	0.9
V102M	1.2	1.1	0.9	< 0.9	1.1
G104A	1.0	0.9	< 0.9	1.0	1.7
G104D	1.0	< 0.9	< 0.9	1.4	2.4
G104H	1.0	1.0	< 0.9	1.2	1.2
G104M	1.1	1.0	1.0	< 0.9	1.0
G104N	1.1	1.0	1.0	1.2	1.4
G104T	1.1	0.9	0.9	0.9	0.9
G104V	1.1	1.0	< 0.9	1.1	1.5
G104W	1.1	1.0	< 0.9	< 0.9	0.9
G104Y	1.0	< 0.9	< 0.9	1.0	1.2
I105V	1.1	0.9	< 0.9	0.9	ND
Q107K	1.0	1.0	1.2	< 0.9	0.9
Q107M	1.1	1.0	1.0	1.0	1.1
E110L	1.0	< 0.9	1.4	< 0.9	< 0.9
A113T	1.0	1.1	0.9	1.0	ND
A113V	1.1	1.0	0.9	1.0	ND
T114V	1.1	1.0	1.0	< 0.9	1.0
N115E	1.0	ND	< 0.9	1.0	ND

[0235]

具有以下氨基酸取代 的 SEQ ID NO:1	在 EDTA 中相对于参 考蛋白酶 (SEQ ID NO:1) 的稳定性	相对于 SEQ ID NO:1 的 ADW 鸡蛋 去除性能		相对于 SEQ ID NO:1 的焦糖布丁去除性能	
		经 ADW 冲洗的鸡 蛋污渍	未经 ADW 冲 洗的鸡 蛋污渍	GSM-B 洗 涤剂	MGDA 洗 涤剂
N115H	1.0	0.9	1.0	1.2	ND
N115Q	1.1	1.0	< 0.9	0.9	ND
N116E	1.1	1.0	< 0.9	1.1	1.4
N116H	1.1	0.9	0.9	1.0	1.1
H118D	1.1	1.1	1.0	1.0	1.1
H118E	1.2	ND	< 0.9	0.9	1.0
H118N	1.1	1.0	1.0	0.9	0.9
A120V	1.0	1.1	1.1	< 0.9	1.1
M122L	1.0	1.0	1.3	< 0.9	1.0
F128G	0.8	1.1	1.1	2.0	1.9
P129A	1.0	1.1	1.1	0.9	ND
P129H	1.0	1.1	1.3	1.1	ND
P129N	1.0	0.9	1.2	< 0.9	ND
P129Y	1.0	< 0.9	1.2	< 0.9	ND
S131A	1.2	0.9	1.1	0.9	0.9
S131D	1.1	0.9	0.9	1.6	1.7
S131E	1.1	< 0.9	1.0	1.6	1.7
S131I	1.1	1.0	1.0	< 0.9	< 0.9
S131M	1.1	0.9	1.2	< 0.9	1.0
S131N	1.1	0.9	1.1	0.9	0.9
S131P	1.1	< 0.9	1.1	0.9	< 0.9
S131Q	1.1	0.9	1.1	0.9	< 0.9
S131T	1.1	0.9	1.1	0.9	0.9
S131V	1.1	0.9	1.0	< 0.9	< 0.9
L133M	1.1	1.0	0.9	1.0	< 0.9
R135A	1.2	0.9	< 0.9	1.6	1.3
R135E	1.0	< 0.9	< 0.9	1.3	1.3
R135F	1.0	< 0.9	< 0.9	1.3	1.0
R135H	1.1	1.0	< 0.9	1.6	1.4
R135I	1.1	0.9	< 0.9	1.6	1.2
R135K	1.1	1.0	0.9	1.3	0.9
R135L	1.1	0.9	1.0	2.2	1.2
R135M	1.2	0.9	1.0	1.6	1.2
R135S	1.1	0.9	0.9	1.7	1.4
R135T	1.1	1.0	< 0.9	1.5	1.3
R135V	1.1	< 0.9	< 0.9	1.6	1.0

[0236]

具有以下氨基酸取代 的 SEQ ID NO:1	在 EDTA 中相对于参 考蛋白酶 (SEQ ID NO:1) 的稳定性	相对于 SEQ ID NO:1 的 ADW 鸡蛋 去除性能		相对于 SEQ ID NO:1 的焦糖布丁去除性能	
		经 ADW 冲洗的鸡 蛋污渍	未经 ADW 冲 洗的鸡蛋 污渍	GSM-B 洗 涤剂	MGDA 洗 涤剂
R135W	1.1	0.9	0.9	1.7	1.0
R135Y	1.1	< 0.9	< 0.9	1.7	0.9
A136M	1.1	1.0	1.2	< 0.9	< 0.9
V137L	1.0	0.9	1.0	< 0.9	ND
Y139E	1.0	0.9	1.0	1.3	ND
Y139S	1.0	1.0	0.9	1.0	ND
T141E	1.0	< 0.9	0.9	1.3	1.6
T141H	1.0	0.9	0.9	0.9	1.0
T141N	1.0	< 0.9	1.0	0.9	1.1
S142A	1.1	0.9	1.0	1.0	1.0
S142D	1.1	0.9	< 0.9	1.2	1.3
S142E	1.1	1.0	0.9	1.3	1.3
S142H	1.2	1.0	< 0.9	< 0.9	< 0.9
S142M	1.2	0.9	1.0	1.0	< 0.9
S142N	1.1	1.0	1.1	1.1	0.9
S142Q	1.1	1.0	1.1	0.9	0.9
R143E	1.1	0.9	< 0.9	0.9	1.2
R143H	1.1	1.0	0.9	1.1	0.9
R143M	1.1	1.0	1.1	< 0.9	< 0.9
R143N	1.1	0.9	1.1	< 0.9	< 0.9
R143Q	1.1	1.0	0.9	1.0	1.1
R143V	1.0	1.0	< 0.9	0.9	0.9
D144E	1.0	ND	0.9	0.9	1.4
D144N	1.0	1.1	1.1	< 0.9	0.9
V145C	1.0	1.1	1.0	1.0	1.1
V147C	1.1	< 0.9	< 0.9	1.0	1.2
I148L	1.0	1.0	0.9	1.0	1.2
I148V	1.1	1.0	< 0.9	1.0	1.1
A150M	1.2	< 0.9	< 0.9	< 0.9	< 0.9
N154D	1.0	1.0	0.9	1.4	2.1
S156A	1.0	0.9	1.0	1.1	1.3
S156C	1.0	< 0.9	0.9	1.3	1.8
S156D	0.9	0.9	< 0.9	1.5	2.1
S156N	1.1	0.9	0.9	1.1	1.1
S156T	1.1	1.0	0.9	1.1	1.0
G157A	1.1	1.0	1.2	0.9	0.9

[0237]

具有以下氨基酸取代 的 SEQ ID NO:1	在 EDTA 中相对于参 考蛋白酶 (SEQ ID NO:1) 的稳定性	相对于 SEQ ID NO:1 的 ADW 鸡蛋 去除性能		相对于 SEQ ID NO:1 的焦糖布丁去除性能	
		经 ADW 冲洗的鸡 蛋污渍	未经 ADW 冲 洗的鸡 蛋污渍	GSM-B 洗 涤剂	MGDA 洗 涤剂
G157C	1.1	ND	1.0	1.2	2.0
G157D	1.0	0.9	1.1	1.4	1.9
G157E	1.0	ND	0.9	1.6	2.1
G157N	1.1	1.0	1.0	1.0	1.1
G157Q	1.0	0.9	0.9	1.1	1.1
S158A	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
S158C	1.1	0.9	0.9	1.4	1.8
S158F	1.1	0.9	0.9	< 0.9	< 0.9
S158L	1.1	1.0	0.9	< 0.9	1.3
S158M	1.1	1.0	1.0	1.0	0.9
S158N	1.1	1.0	< 0.9	1.0	1.0
S158Q	1.1	1.0	1.1	1.2	1.2
S158T	1.1	1.1	1.3	1.3	1.2
S158V	1.1	0.9	0.9	0.9	1.1
S158W	1.1	0.9	< 0.9	< 0.9	< 0.9
S158Y	1.2	1.0	1.0	< 0.9	1.4
V159L	1.1	1.1	0.9	1.2	1.4
G160A	1.3	1.0	1.0	< 0.9	1.0
G160C	1.1	ND	1.0	< 0.9	1.1
G160D	0.7	1.2	1.5	< 0.9	< 0.9
G160M	1.1	0.9	1.2	< 0.9	< 0.9
G160S	1.2	ND	1.2	0.9	< 0.9
G160T	1.1	ND	< 0.9	0.9	0.9
Y161W	1.0	1.0	1.0	< 0.9	1.1
R164A	1.0	< 0.9	0.9	1.6	2.6
R164K	1.0	1.0	0.9	1.2	1.3
R164M	1.0	< 0.9	< 0.9	1.4	2.3
R164Q	1.0	0.9	< 0.9	1.4	2.0
R164Y	1.0	0.9	< 0.9	1.7	2.2
A166D	1.2	0.9	1.1	1.4	ND
A166E	1.1	1.0	1.0	1.3	ND
A166I	1.0	1.0	1.1	0.9	ND
A166P	1.1	1.0	1.1	< 0.9	ND
A166Q	1.1	0.9	1.0	1.0	ND
A166V	1.0	0.9	0.9	1.0	ND
N167E	1.0	0.9	< 0.9	1.1	ND

[0238]

具有以下氨基酸取代 的 SEQ ID NO:1	在 EDTA 中相对于参 考蛋白酶 (SEQ ID NO:1) 的稳定性	相对于 SEQ ID NO:1 的 ADW 鸡蛋 去除性能		相对于 SEQ ID NO:1 的焦糖布丁去除性能	
		经 ADW 冲洗的鸡 蛋污渍	未经 ADW 冲 洗的鸡 蛋污渍	GSM-B 洗 涤剂	MGDA 洗 涤剂
M169L	1.0	1.0	1.1	1.2	0.9
A170G	1.1	1.1	1.0	1.1	0.9
T174V	1.0	1.0	1.1	1.1	< 0.9
Q176A	1.0	1.0	1.0	1.1	1.1
Q176C	1.1	0.9	< 0.9	1.2	1.6
Q176D	1.0	0.9	1.0	2.1	1.4
Q176E	1.0	0.9	1.0	2.0	1.8
Q176L	1.0	1.1	1.0	0.9	1.1
Q176M	1.1	1.0	1.0	1.0	1.1
Q176N	1.0	0.9	1.0	1.3	1.1
Q176S	1.0	0.9	1.0	1.0	1.0
N177A	1.1	0.9	1.1	0.9	1.0
N177C	1.1	< 0.9	1.0	1.1	1.5
N177D	1.1	1.1	0.9	1.4	1.6
N177E	1.0	< 0.9	1.0	1.5	1.7
N177G	1.0	1.1	1.0	0.9	0.9
N177H	1.1	1.0	1.0	0.9	< 0.9
N177K	1.0	1.0	1.1	< 0.9	< 0.9
N177L	1.1	1.0	1.1	0.9	< 0.9
N177M	1.2	< 0.9	1.2	0.9	0.9
N177Q	1.1	0.9	1.1	1.0	0.9
N177S	1.0	1.1	1.2	0.9	< 0.9
N177W	1.1	0.9	1.0	< 0.9	< 0.9
N177Y	1.1	< 0.9	1.2	1.0	< 0.9
N178D	1.0	1.0	0.9	1.5	1.8
R179A	1.0	< 0.9	1.1	1.9	1.5
R179C	1.0	< 0.9	0.9	1.9	1.6
R179E	1.0	< 0.9	1.0	2.0	2.0
R179F	1.0	ND	0.9	1.5	1.7
R179G	1.0	0.9	1.1	1.7	1.7
R179H	1.0	< 0.9	1.0	1.6	1.6
R179I	1.0	< 0.9	1.1	1.9	1.8
R179K	1.0	< 0.9	1.2	1.4	1.3
R179M	1.1	< 0.9	0.9	1.5	1.4
R179Q	1.1	1.0	1.0	1.8	1.7
R179S	1.0	ND	1.0	1.8	1.6

[0239]

具有以下氨基酸取代 的 SEQ ID NO:1	在 EDTA 中相对于参 考蛋白酶 (SEQ ID NO:1) 的稳定性	相对于 SEQ ID NO:1 的 ADW 鸡蛋 去除性能		相对于 SEQ ID NO:1 的焦糖布丁去除性能	
		经 ADW 冲洗的鸡 蛋污渍	未经 ADW 冲 洗的鸡 蛋污渍	GSM-B 洗 涤剂	MGDA 洗 涤剂
R179V	1.0	1.0	1.0	1.9	1.9
R179W	1.0	0.9	ND	1.5	1.5
R179Y	1.0	< 0.9	1.0	1.9	1.8
R180K	1.1	0.9	1.0	1.2	0.9
N182A	1.1	0.9	1.1	0.9	< 0.9
N182C	1.1	< 0.9	1.0	< 0.9	1.3
N182D	1.0	1.0	1.2	1.7	1.5
N182E	1.1	1.0	1.0	1.5	1.6
N182G	1.1	1.0	1.0	1.0	1.1
N182H	1.1	0.9	< 0.9	< 0.9	0.9
N182I	1.1	1.0	1.0	< 0.9	0.9
N182K	1.1	1.0	1.0	< 0.9	< 0.9
N182L	1.1	< 0.9	1.1	< 0.9	1.0
N182P	1.2	1.0	0.9	< 0.9	1.0
N182Q	1.1	1.0	0.9	1.0	1.1
N182S	1.2	1.1	0.9	1.0	1.1
N182T	1.1	0.9	< 0.9	1.0	1.1
N182V	1.1	1.0	0.9	< 0.9	1.0
N182W	1.2	0.9	< 0.9	< 0.9	< 0.9
N182Y	1.2	1.1	1.0	< 0.9	1.1
Y186F	1.0	1.0	0.9	1.0	1.1
T188A	1.1	0.9	1.0	< 0.9	0.9
T188C	1.1	0.9	0.9	1.2	1.5
T188D	1.1	1.0	0.9	1.4	1.3
T188E	1.2	1.0	0.9	1.4	1.4
T188I	1.1	0.9	1.0	0.9	< 0.9
T188L	1.1	0.9	1.0	0.9	< 0.9
T188M	1.1	0.9	1.2	0.9	0.9
T188N	1.1	1.0	1.1	0.9	0.9
T188Q	1.1	1.0	1.0	0.9	0.9
T188S	1.0	0.9	1.1	0.9	< 0.9
T188V	1.1	1.0	1.0	0.9	< 0.9
T188W	1.1	0.9	1.0	< 0.9	< 0.9
T188Y	1.1	< 0.9	ND	0.9	< 0.9
G189C	1.0	< 0.9	< 0.9	1.4	1.4
G189D	1.1	0.9	< 0.9	1.3	1.5

[0240]

具有以下氨基酸取代 的 SEQ ID NO:1	在 EDTA 中相对于参 考蛋白酶 (SEQ ID NO:1) 的稳定性	相对于 SEQ ID NO:1 的 ADW 鸡蛋 去除性能		相对于 SEQ ID NO:1 的焦糖布丁去除性能	
		经 ADW 冲洗的鸡 蛋污渍	未经 ADW 冲 洗的鸡蛋 污渍	GSM-B 洗 涤剂	MGDA 洗 涤剂
G189E	1.0	0.9	0.9	1.3	1.8
I190M	1.0	0.9	1.0	0.9	0.9
D191E	1.0	1.1	0.9	0.9	1.1
I192C	1.1	1.0	1.0	0.9	1.1
I192M	1.1	1.0	1.0	0.9	1.1
V193A	1.0	1.0	1.0	1.5	1.3
V193M	1.1	0.9	1.1	1.2	1.4
N198D	1.0	1.0	1.1	1.9	1.7
N198E	1.0	0.9	< 0.9	1.8	1.6
Q200H	1.1	0.9	0.9	0.9	1.0
Q200I	1.3	0.9	< 0.9	0.9	0.9
Q200K	1.2	0.9	1.0	< 0.9	< 0.9
Q200M	1.2	0.9	1.0	1.0	1.1
Q200V	1.1	1.0	0.9	0.9	0.9
Q200Y	1.3	1.0	0.9	1.0	1.1
R207K	1.0	ND	0.9	1.1	1.3
R207L	1.0	1.1	1.0	1.5	1.9
R207N	0.9	1.0	0.9	1.8	1.6
R207Q	0.9	1.0	0.9	1.7	1.6
R207T	0.6	1.0	0.9	1.6	1.7
V209P	1.1	1.0	0.9	1.4	1.2
S210C	1.0	0.9	< 0.9	1.0	1.3
S210D	0.9	ND	0.9	1.8	1.6
S210E	1.1	1.2	0.9	1.7	1.7
S210F	1.2	1.0	0.9	< 0.9	0.9
S210G	1.0	1.1	1.0	< 0.9	1.0
S210L	1.0	1.0	1.0	0.9	1.2
S210N	0.9	1.0	1.0	1.2	1.4
S210P	1.2	1.0	1.0	0.9	0.9
S210Q	1.0	1.1	0.9	0.9	1.1
S210Y	1.0	0.9	1.0	0.9	1.2
M211E	0.6	1.1	1.4	1.7	1.6
M211K	1.1	1.0	< 0.9	0.9	1.3
M211L	1.0	1.0	0.9	1.1	1.9
M211Q	0.9	1.2	1.1	1.3	1.3
M211R	1.0	1.1	1.1	< 0.9	< 0.9

[0241]

具有以下氨基酸取代 的 SEQ ID NO:1	在 EDTA 中相对于参 考蛋白酶 (SEQ ID NO:1) 的稳定性	相对于 SEQ ID NO:1 的 ADW 鸡蛋 去除性能		相对于 SEQ ID NO:1 的焦糖布丁去除性能	
		经 ADW 冲洗的鸡 蛋污渍	未经 ADW 冲 洗的鸡 蛋污渍	GSM-B 洗 涤剂	MGDA 洗 涤剂
N212A	1.0	< 0.9	0.9	< 0.9	1.0
N212C	1.0	< 0.9	< 0.9	< 0.9	1.3
N212Q	0.9	1.0	< 0.8	1.2	1.2
N212S	1.2	0.9	0.9	< 0.9	1.0
T218C	1.1	1.0	1.0	0.9	0.9
T218S	1.2	1.0	1.1	< 0.9	< 0.9
A224V	1.0	1.0	1.0	0.9	0.9
L227M	1.0	1.0	1.1	1.0	0.9
L227Q	1.0	0.9	1.0	0.9	0.9
V228L	1.1	0.9	ND	1.0	1.2
Q230E	1.2	0.9	1.1	1.2	1.2
R231C	1.1	0.9	< 0.9	1.2	1.2
R231E	1.1	0.9	< 0.9	1.1	1.3
R231H	1.1	0.9	< 0.9	1.1	1.1
R231I	1.0	1.0	< 0.9	1.0	1.0
R231L	1.0	0.9	1.0	1.1	1.2
R231N	1.1	< 0.9	1.0	1.1	1.2
R231Q	1.0	0.9	1.0	1.0	1.2
R231S	1.0	< 0.9	1.0	1.0	1.1
R231T	1.1	0.9	0.9	0.9	1.0
Y232F	1.1	1.1	0.9	1.0	1.2
Y232H	1.1	1.0	1.0	0.9	1.0
Y232Q	1.0	1.0	< 0.9	0.9	1.0
Y232R	1.0	1.0	< 0.9	< 0.9	< 0.9
Y232W	1.0	1.1	< 0.9	0.9	1.0
S234A	1.0	1.0	0.9	< 0.9	1.1
S234D	1.1	0.9	0.9	0.9	1.2
S234E	1.0	0.9	1.0	1.0	1.2
S234M	1.1	1.0	1.0	< 0.9	1.1
S234T	1.0	1.0	0.9	< 0.9	1.2
S234W	1.0	1.0	0.9	< 0.9	1.2
S234Y	1.0	0.9	0.9	< 0.9	1.3
N236D	1.1	0.9	ND	1.2	1.2
N236G	1.0	0.9	ND	1.0	1.1
N236S	1.0	1.0	ND	1.0	1.1
N236T	1.0	0.9	ND	1.1	1.1

[0242]

具有以下氨基酸取代 的 SEQ ID NO:1	在 EDTA 中相对于参 考蛋白酶 (SEQ ID NO:1) 的稳定性	相对于 SEQ ID NO:1 的 ADW 鸡蛋 去除性能		相对于 SEQ ID NO:1 的焦糖布丁去除性能	
		经 ADW 冲洗的鸡 蛋污渍	未经 ADW 冲 洗的鸡 蛋污渍	GSM-B 洗 涤剂	MGDA 洗 涤剂
T238A	1.1	1.0	0.9	0.9	1.5
T238D	1.1	1.0	0.9	1.2	1.7
T238E	1.1	0.9	0.9	1.4	1.4
T238M	1.1	1.0	1.0	1.0	1.4
T238V	1.1	1.0	1.0	1.1	1.2
Q239D	1.0	< 0.9	< 0.9	1.2	1.6
Q239E	1.1	< 0.9	< 0.9	1.1	1.5
Q239L	1.1	1.0	< 0.9	0.9	1.1
Q239M	1.1	0.9	1.0	1.2	1.3
Q239N	1.0	1.0	< 0.9	1.0	1.2
Q239T	1.1	0.9	< 0.9	1.0	1.0
N242A	1.1	1.0	1.0	< 0.9	1.0
K245E	1.0	0.9	< 0.9	1.4	1.7
N246A	1.1	1.0	0.9	1.0	1.3
N246L	1.1	ND	0.9	1.3	1.1
N246S	1.1	0.9	0.9	0.9	1.0
T247E	1.0	< 0.9	ND	1.1	1.4
T247Q	1.0	1.0	< 0.9	0.9	1.2
T249C	1.0	1.0	< 0.9	1.0	1.6
T249D	1.0	0.9	< 0.9	1.2	1.5
T249E	1.1	0.9	< 0.9	1.3	1.4
T249F	1.1	1.0	0.9	1.0	< 0.9
T249I	1.1	1.0	1.0	< 0.9	1.0
T249L	1.1	1.0	0.9	1.0	1.2
T249S	1.1	1.0	1.0	0.9	0.9
T249Y	1.1	ND	0.9	1.0	1.4
N250D	1.1	0.9	0.9	1.3	1.6
N250S	1.1	1.0	0.9	1.1	1.2
N250T	1.0	1.0	0.9	0.9	1.1
N253D	1.2	0.9	1.1	1.5	1.7
N253E	1.1	1.0	0.9	1.5	1.7
N253P	1.0	1.0	1.0	1.1	1.1
S254P	1.1	1.0	1.1	1.0	0.9
S254Y	1.0	ND	0.9	1.2	< 0.9
S255A	1.0	0.9	1.0	1.1	1.2
S255C	1.2	1.0	1.0	1.2	2.0

[0243]

具有以下氨基酸取代 的 SEQ ID NO:1	在 EDTA 中相对于参 考蛋白酶 (SEQ ID NO:1) 的稳定性	相对于 SEQ ID NO:1 的 ADW 鸡蛋 去除性能		相对于 SEQ ID NO:1 的焦糖布丁去除性能	
		经 ADW 冲洗的鸡 蛋污渍	未经 ADW 冲 洗的鸡 蛋污渍	GSM-B 洗 涤剂	MGDA 洗 涤剂
S255D	1.1	0.9	0.9	1.3	1.9
S255E	1.2	0.9	1.0	1.3	1.8
S255F	1.1	0.9	0.9	< 0.9	0.9
S255I	1.1	0.9	0.9	0.9	1.0
S255M	1.1	0.9	1.1	1.0	1.1
S255N	1.0	1.0	0.9	0.9	1.0
S255V	1.1	1.0	0.9	1.1	1.0
S255W	1.1	< 0.9	0.9	< 0.9	< 0.9
Q256C	1.1	ND	0.9	1.4	1.8
Q256E	1.1	1.0	0.9	1.4	1.8
Q256F	1.1	0.9	1.0	< 0.9	1.0
Q256H	1.1	1.0	1.0	1.0	1.1
Q256L	1.0	0.9	1.2	1.1	0.9
Q256M	1.0	1.0	1.1	< 0.9	1.0
Q256W	1.1	0.9	1.0	1.0	0.9
Q256Y	1.1	0.9	1.2	1.4	< 0.9
F257C	1.0	< 0.9	< 0.9	1.2	1.5
F257M	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
S259D	1.0	1.0	< 0.9	1.3	1.5
S259E	0.9	0.9	< 0.9	1.3	1.4
S259M	1.0	1.0	1.0	1.1	1.1
S259N	1.0	1.0	1.0	1.1	1.1
V262L	1.0	1.0	1.0	1.4	1.1
N263D	1.0	1.0	0.9	1.2	1.1
N263Q	1.0	0.9	1.1	< 0.9	0.9
A264T	1.1	0.9	1.0	1.1	0.9
E265A	1.0	1.0	1.1	< 0.9	< 0.9
E265M	1.0	0.9	1.1	< 0.9	< 0.9
E265N	1.0	< 0.9	1.0	< 0.9	< 0.9
E265Q	1.0	0.9	1.1	< 0.9	< 0.9
A266L	1.1	1.0	1.0	0.9	< 0.9
A266M	1.1	1.0	1.0	< 0.9	1.1
A266N	1.1	< 0.9	0.9	0.9	< 0.9
A266Q	1.0	0.9	0.9	< 0.9	< 0.9
A266R	1.0	0.9	0.9	< 0.9	< 0.9
T268A	1.0	0.9	1.1	1.0	1.2

[0244]

具有以下氨基酸取代 的 SEQ ID NO:1	在 EDTA 中相对于参 考蛋白酶 (SEQ ID NO:1) 的稳定性	相对于 SEQ ID NO:1 的 ADW 鸡蛋 去除性能		相对于 SEQ ID NO:1 的焦糖布丁去除性能	
		经 ADW 冲洗的鸡 蛋污渍	未经 ADW 冲 洗的鸡蛋 污渍	GSM-B 洗 涤剂	MGDA 洗 涤剂
T268C	1.1	1.0	1.0	1.0	1.2
T268D	1.0	0.9	< 0.9	1.0	1.4
T268E	0.9	0.9	< 0.9	1.1	1.4
R269H	1.0	0.9	< 0.9	1.2	1.5
R269P	1.0	0.9	< 0.9	1.1	1.3
R269W	1.0	< 0.9	< 0.9	0.9	1.4

[0245] 对于包括BMI HDL清洁、BMI HDD清洁、PAS-38ADW清洁、焦糖布丁ADW清洁或在Tris-EDTA缓冲液中的稳定性在内的测定中的一种测定,与参考蛋白酶相比,以下变体显示出改善的性能指数(PI值 ≥ 1.1):T003V、V004T、I008V、T009A/C/E/G/H/K/M/N/Q/S/W/Y、R010A/K/M/N/Q/W、V011A/I/S/T、Q012A/C/D/E/G/M/N/R/S/T/V/W、P014D、A015D/E/F/H/I/K/M/P/Q/V/W/Y、V016L/M/S、H017C/E/F/G/I/L/N/V/W/Y、N018A/C/D/E/F/G/L/M/Q/T、R019A/C/D/E/F/H/I/K/L/N/Q/S/T/W/Y、G020A/C/D/M/N/T、S024A/E、G025A/C/D/E/M/N、V026A/I、R027K、S033T、S036A/C/E/I/L/M/Q/T/V、N042C/D/E/M/Q、I043L、R044C/E/F/G/H/I/K/L/N/Q/S/T/V/W/Y、A047I/Y、V050I、G052A/C/D/H/L/M/N/S/T/Y、P054A/C/G/L/M/N/T/V、T055A/C/D/E/H/M/N/S/Y、A057D/E/H/M/N/Q/T、L059A/C/D/E/M/N/Q/T、N060S、T069S、S076A/D/E/F/H/K/L/M/N/R/T/Y、V082A、P084D/F/H/Y、N085S、G095A/N、A096M/Q、N097E/H/K、S101T、V102L/M、G104A/D/H/M/N/T/V/W/Y、I105V、Q107K/M、E110L、A113T/V、T114V、N115E/H/Q、N116E/H、H118D/E/N、A120V、M122L、F128G、P129A/H/N/Y、S131A/D/E/I/M/N/P/Q/T/V、L133M、R135A/E/F/H/I/K/L/M/S/T/V/W/Y、A136M、V137L、Y139E/S、T141E/H/N、S142A/D/E/H/M/N/Q、R143E/H/M/N/Q/V、D144E/N、V145C、V147C、I148L/V、A150M、N154D、S156A/C/D/N/T、G157A/C/D/E/N/Q、S158A/C/F/L/M/N/Q/T/V/W/Y、V159L、G160A/C/D/M/S/T、Y161W、R164A/K/M/Q/Y、A166D/E/I/P/Q/V、N167E、M169L、A170G、T174V、Q176A/C/D/E/L/M/N/S、N177A/C/D/E/G/H/K/L/M/Q/S/W/Y、N178D、R179A/C/E/F/G/H/I/K/M/Q/S/V/W/Y、R180K、N182A/C/D/E/G/H/I/K/L/P/Q/S/T/V/W/Y、Y186F、T188A/C/D/E/I/L/M/N/Q/S/V/W/Y、G189C/D/E、I190M、D191E、I192C/M、V193A/M、N198D/E、Q200H/I/K/M/V/Y、R207K/L/N/Q/T、V209P、S210C/D/E/F/G/L/N/P/Q/Y、M211E/K/L/Q/R、N212A/C/Q/S、T218C/S、A224V、L227M/Q、V228L、Q230E、R231C/E/H/I/L/N/Q/S/T、Y232F/H/Q/R/W、S234A/D/E/M/T/W/Y、N236D/G/S/T、T238A/D/E/M/V、Q239D/E/L/M/N/T、N242A、K245E、N246A/L/S、T247E/Q、T249C/D/E/F/I/L/S/Y、N250D/S/T、N253D/E/P、S254P/Y、S255A/C/D/E/F/I/M/N/V/W、Q256C/E/F/H/L/M/W/Y、F257C/M、S259D/E/M/N、V262L、N263D/Q、A264T、E265A/M/N/Q、A266L/M/N/Q/R、T268A/C/D/E和R269H/P/W。

[0246] 对于PAS-38测定中的一种,与参考蛋白酶相比,以下变体显示出改善的ADW清洁性能指数(PI值 ≥ 1.1):T009H/K/N/W、V011A/I、Q012A/M/N/R/S/V、A015F/I/K/V、V016L/M、

H017F/G/I/L/N/V/W、N018F、R019C/K/L/Q、G020A/D/M/N/T、S024A、G025A/D/N、S036A/L、G052D/H、P054A/G/L/M/V、T055A/D/H/S/Y、L059A/M/N、N060S、T069S、S076K/L、G095N、A096Q、N097K、V102L/M、Q107K、E110L、A113T、H118D、A120V、M122L、F128G、P129A/H/N/Y、S131M/N/P、A136M、R143N、D144N、V145C、G157A/D、S158Q/T、V159L、G160D/M/S、A166I、A170G、Q176L、N177A/D/G/K/L/M/S/Y、R179A/K、N182A/D/S/Y、T188M、D191E、R207L、S210E/G/Q、M211E/Q/R、T218S、L227M、Y232F/W、Q256L/Y、N263Q、E265A/M/Q和T268A。

[0247] 对于焦糖布丁测定中的一种,与参考蛋白酶相比,以下变体显示出改善的ADW清洁性能指数(PI值 ≥ 1.1):T009A/C/E/M/N/Y、R010A/K/M/N/Q/W、V011A/T、Q012A/C/D/E/M、P014D、A015D/E/H/I/M/V/W/Y、V016L/M、H017C/E、N018C/D/E/M、R019A/C/D/E/F/H/I/K/L/N/Q/S/T/W/Y、G020C/D、S024A/E、G025A/C/D/E/M/N、V026A、R027K、S036C/E/Q/V、N042C/D/E、I043L、R044C/E/G/H/I/L/N/Q/S/T、G052A/C/D/L/M/N、P054A/C/L/M/V、T055A/C/D/E/M、A057D/E、L059A/C/D/E/M/N/Q/T、N060S、S076D/E/N、V082A、P084D、A096Q、N097E/H、G104A/D/H/N/V/Y、N115H、N116E、F128G、P129H、S131D/E、R135A/E/F/H/I/K/L/M/S/T/V/W/Y、Y139E、T141E、S142D/E、R143E、D144E、V147C、I148L、N154D、S156A/C/D/N/T、G157C/D/E、S158C/L/Q/T/Y、V159L、R164A/K/M/Q/Y、A166D/E、N167E、M169L、T174V、Q176A/C/D/E/N、N177C/D/E、N178D、R179A/C/E/F/G/H/I/K/M/Q/S/V/W/Y、R180K、N182C/D/E、T188C/D/E、G189C/D/E、V193A/M、N198D/E、R207K/L/N/Q/T、V209P、S210C/D/E/L/N/Y、M211E/K/L/Q、N212C/Q、V228L、Q230E、R231C/E/L/N/Q、Y232F、S234D/E/T/W/Y、N236D/T、T238A/D/E/M/V、Q239D/E/M/N、K245E、N246A/L、T247E/Q、T249C/D/E/L/Y、N250D、N253D/E/P、S254Y、S255A/C/D/E、Q256C/E/Y、F257C、S259D/E/M/N、V262L、N263D、T268C/D/E和R269H/P/W。

[0248] 对于至少一种PAS-38测定和至少一种焦糖布丁测定,与参考蛋白酶相比,以下变体显示出改善的清洁性能指数(PI值 ≥ 1.1):T009N、V011A、Q012A/M、A015I/V、V016L/M、R019C/K/L/Q、G020D、S024A、G025A/D/N、G052D、P054A/L/M/V、T055A/D、L059A/M/N、N060S、A096Q、F128G、P129H、G157D、S158Q/T、V159L、N177D、R179A/K、N182D、R207L、S210E、M211E/Q、Y232F和Q256Y。

[0249] 与参考蛋白酶相比,以下变体在Tris-EDTA缓冲液中显示出改善的稳定性(PI值 ≥ 1.1):T003V、V004T、I008V、T009A/E/G/H/K/N/Q/S/W/Y、R010Q、V011A、Q012A/C/G/M/N/T、A015F/H/M/P/Q/W、V016S、H017C/E/F/I/L/N/V/W/Y、N018A/D/E/L/M/Q、R019C/D/Y、G020C/D/M/N、S024A/E、G025C/D/N、V026I、R027K、S033T、S036A/C/I/L/M/Q/V、N042C/D/E/M/Q、R044C/E/F/G/H/I/K/L/N/Q/S/T/V/W/Y、A047I/Y、V050I、G052A/M/N/S/T/Y、P054N/V、T055C/D/E/N、A057E/H/M/N/Q/T、L059N、S076A/D/E/F/H/K/L/M/N/R/T/Y、V082A、P084D/F/H/Y、N085S、G095A/N、A096M、N097K、S101T、V102L/M、G104M/N/T/V/W、I105V、Q107M、A113V、T114V、N115Q、N116E/H、H118D/E/N、S131A/D/E/I/M/N/P/Q/T/V、L133M、R135A/H/I/K/L/M/S/T/V/W/Y、A136M、S142A/D/E/H/M/N/Q、R143E/H/M/N/Q、V147C、I148V、A150M、S156N/T、G157A/C/N、S158C/F/L/M/N/Q/T/V/W/Y、V159L、G160A/C/M/S/T、A166D/E/P/Q、A170G、Q176C/M、N177A/C/D/H/L/M/Q/W/Y、R179M/Q、R180K、N182A/C/E/G/H/I/K/L/P/Q/S/T/V/W/Y、T188A/C/D/E/I/L/M/N/Q/V/W/Y、G189D、I192C/M、V193M、Q200H/I/K/M/V/Y、V209P、S210E/F/P、M211K、N212S、T218C/S、V228L、Q230E、R231C/E/H/N/T、Y232F/H、S234D/M、N236D/G/S/T、T238A/D/E/M/V、Q239E/L/M/T、N242A、N246A/L/S、T249E/F/I/L/S/Y、N250D/

S、N253D/E、S254P、S255C/D/E/F/I/M/V/W、Q256C/E/F/H/W/Y、A264T、A266L/M/N和T268C。

[0250] 对于至少一种PAS-38测定或至少一种焦糖布丁测定,与参考蛋白酶相比,以下变体显示出在ADW清洁中改善的性能指数(PI值 ≥ 1.1)以及在Tris-EDTA缓冲液中改善的稳定性(PI值 ≥ 1.1):T009A/E/H/K/N/W/Y、R010Q、V011A、Q012A/C/M/N、A015F/H/M/W、H017C/E/F/I/L/N/V/W、N018D/E/M、R019C/D/Y、G020C/D/M/N、S024A/E、G025C/D/N、R027K、S036A/C/L/Q/V、N042C/D/E、R044C/E/G/H/I/L/N/Q/S/T、G052A/M/N、P054V、T055C/D/E、A057E、L059N、S076D/E/K/L/N、V082A、P084D、G095N、N097K、V102L/M、G104N/V、N116E、H118D、S131D/E/M/N/P、R135A/H/I/K/L/M/S/T/V/W/Y、A136M、S142D/E、R143E/N、V147C、S156N/T、G157A/C、S158C/L/Q/T/Y、V159L、G160M/S、A166D/E、A170G、Q176C、N177A/C/D/L/M/Y、R179M/Q、R180K、N182A/C/E/S/Y、T188C/D/E/M、G189D、V193M、V209P、S210E、M211K、T218S、V228L、Q230E、R231C/E/N、Y232F、S234D、N236D/T、T238A/D/E/M/V、Q239E/M、N246A/L、T249E/L/Y、N250D、N253D/E、S255C/D/E、Q256C/E/Y和T268C。

[0251] 在焦糖布丁测定的至少一种中,与参考蛋白酶相比,具有负电荷变化的以下变体显示出改善的性能指数(PI值 ≥ 1.1):T009C/E/Y、R010A/K/M/N/Q/W、Q012C/D/E、P014D、A015D/E/Y、H017C/E、N018C/D/E、R019A/C/D/E/F/H/I/K/L/N/Q/S/T/W/Y、G020C/D、S024E、G025C/D/E、R027K、S036C/E、N042C/D/E、R044C/E/G/H/I/L/N/Q/S/T、G052C/D、P054C、T055C/D/E、A057D/E、L059C/D/E、S076D/E、P084D、N097E、G104D/Y、N116E、S131D/E、R135A/E/F/H/I/K/L/M/S/T/V/W/Y、Y139E、T141E、S142D/E、R143E、V147C、N154D、S156C/D、G157C/D/E、S158C/Y、R164A/K/M/Q/Y、A166D/E、N167E、Q176C/D/E、N177C/D/E、N178D、R179A/C/E/F/G/H/I/K/M/Q/S/V/W/Y、R180K、N182C/D/E、T188C/D/E、G189C/D/E、N198D/E、R207K/L/N/Q/T、S210C/D/E/Y、M211E、N212C、Q230E、R231C/E/L/N/Q、S234D/E/Y、N236D、T238D/E、Q239D/E、K245E、T247E、T249C/D/E/Y、N250D、N253D/E、S254Y、S255C/D/E、Q256C/E/Y、F257C、S259D/E、N263D、T268C/D/E和R269H/P/W。

[0252] 本文所公开的量纲和值不应理解为严格限于所引用的精确数值。相反,除非另外指明,否则每个此类量纲旨在表示所述值以及围绕该值功能上等同的范围。例如,公开为“40mm”的量纲旨在表示“约40mm”。

序列表

<110> 宝洁公司(THE PROCTOR & GAMBLE COMPANY)

<120> 自动盘碟洗涤剂组合物

<130> CM04995M

<160> 2

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 269

<212> PRT

<213> 吉氏芽孢杆菌 (Bacillus gibsonii)

<400> 1

Gln Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Thr Arg Val Gln Ala Pro Ala Val
1 5 10 15

[0001]

His Asn Arg Gly Ile Thr Gly Ser Gly Val Arg Val Ala Ile Leu Asp
20 25 30

Ser Gly Ile Ser Ala His Glu Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser
35 40 45

Phe Val Pro Gly Glu Pro Thr Thr Ala Asp Leu Asn Gly His Gly Thr
50 55 60

His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Ile
65 70 75 80

Gly Val Ala Pro Asn Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala
85 90 95

Asn Gly Ser Gly Ser Val Ser Gly Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala
100 105 110

Ala Thr Asn Asn Met His Ile Ala Asn Met Ser Leu Gly Ser Asp Phe
115 120 125

Pro Ser Ser Thr Leu Glu Arg Ala Val Asn Tyr Ala Thr Ser Arg Asp
130 135 140

Val Leu Val Ile Ala Ala Thr Gly Asn Asn Gly Ser Gly Ser Val Gly
145 150 155 160

Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln
165 170 175

Asn Asn Arg Arg Ala Asn Phe Ser Gln Tyr Gly Thr Gly Ile Asp Ile
180 185 190

[0002] Val Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Asn Arg Tyr
195 200 205

Val Ser Met Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala
210 215 220

Ala Ala Leu Val Lys Gln Arg Tyr Pro Ser Trp Asn Ala Thr Gln Ile
225 230 235 240

Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Asn Leu Gly Asn Ser Ser Gln
245 250 255

Phe Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
260 265

<210> 2

<211> 485

<212> PRT

<213> 芽孢杆菌属(Bacillus sp.)

<400> 2

His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr
1 5 10 15

Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Ser Asp Ala Ser
20 25 30

Asn Leu Lys Asp Lys Gly Ile Ser Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Trp
35 40 45

Lys Gly Ala Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr
50 55 60

Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Ile Arg Thr Lys Tyr Gly
65 70 75 80

[0003]

Thr Arg Asn Gln Leu Gln Ala Ala Val Asn Ala Leu Lys Ser Asn Gly
85 90 95

Ile Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp
100 105 110

Ala Thr Glu Met Val Arg Ala Val Glu Val Asn Pro Asn Asn Arg Asn
115 120 125

Gln Glu Val Ser Gly Glu Tyr Thr Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp
130 135 140

Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr His Ser Asn Phe Lys Trp Arg Trp Tyr
145 150 155 160

His Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Gln Ser Arg Lys Leu Asn Asn Arg

165 170 175

Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Asp Gly Lys Gly Trp Asp Trp Glu Val Asp
180 185 190

Thr Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Met
195 200 205

Asp His Pro Glu Val Val Asn Glu Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp Tyr
210 215 220

Thr Asn Thr Leu Gly Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His
225 230 235 240

Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Ile Asn His Val Arg Ser Ala
245 250 255

[0004]

Thr Gly Lys Asn Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu
260 265 270

Gly Ala Ile Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Trp Asn His Ser Val
275 280 285

Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Lys Ser Gly
290 295 300

Gly Asn Tyr Asp Met Arg Gln Ile Phe Asn Gly Thr Val Val Gln Arg
305 310 315 320

His Pro Met His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro
325 330 335

Glu Glu Ala Leu Glu Ser Phe Val Glu Glu Trp Phe Lys Pro Leu Ala
340 345 350

Tyr Ala Leu Thr Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr
355 360 365

Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Gly Val Pro Ala Met Lys Ser
370 375 380

Lys Ile Asp Pro Ile Leu Glu Ala Arg Gln Lys Tyr Ala Tyr Gly Arg
385 390 395 400

Gln Asn Asp Tyr Leu Asp His His Asn Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu
405 410 415

[0005] Gly Asn Thr Ala His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp
420 425 430

Gly Ala Gly Gly Asn Lys Trp Met Phe Val Gly Arg Asn Lys Ala Gly
435 440 445

Gln Val Trp Thr Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ala Gly Thr Val Thr Ile
450 455 460

Asn Ala Asp Gly Trp Gly Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser
465 470 475 480

Ile Trp Val Asn Lys
485