[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl[6]
C11D 3/386
C12N 9/08

[12]发明专利说明书

[21] ZL 专利号 92114308.7

[45]授权公告日 1997 年 9 月 17 日

[11] 授权公告号 CN 1035886C

[22]申请日 92.11.6 [24]颁证日 97.6.14
[21]申请号 92114308.7
[30]优先权
[32]91.11.6 [33]EP[31]91202882.6
[73]专利权人 普罗格特-甘布尔公司
地址 美国俄亥俄州
[72]发明人 F·麦科可代尔 A·布什
[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 姜建成
[56]参考文献

EP424398	C12Q1/34
US4077768	D06L3/00
WO89109813	C11D3/386

审查员 刘俊香

权利要求书 10 页 说明书 37 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 抑制染料转移的组合物

[57]摘要

本发明公开了抑制染料转移的组合物，包括一种呈现过氧化酶活性的酶、过氧化氢或过氧化氢母体或能产生过氧化氢的酶催体系，一种另外可氧化的基质和一种纤维素酶，其特征在于，按照C14CMC方法，纤维素蛋白酶为25×10^{-6}%重量的洗涤试验溶液时,纤维素酶至少去除10%的固定放射性标记的羧甲基纤维素。

按照本发明，优选的纤维素酶基本上包括同种的葡聚糖内酶成分，它与单克隆抗体发生免疫反应，该抗体是对由 Humicola insolens DM1800 所衍生的部分纯化的 43kD 纤维素酶所培育的。

权 利 要 求 书

1.一种抑制染料转移组合物，特征是含有:

0.01-100mg/升的一种呈现过氧化酶活性的酶;

0.001-5mM 的一种过氧化氢或过氧化氢母体，或一种能产生过氧化氢的酶体系;

1 μ M - 1mM 的一种另外的可氧化的基质，该可氧化的基质选自金属离子、卤素离子、苯酚或苯酚磺酸盐；和

0.005-40mg 酶蛋白/升的一种纤维素酶，其特征在于，按 C14CMC 方法，在试验液中纤维素酶蛋白为 25×10^{-6} %(重量)时，纤维素酶至少去除 10 % 固定的放射性标记的羧甲基纤维素;并且该纤维素酶由同种葡聚糖内酶成分组成，它与抗体发生免疫反应，该抗体是对由 Humicola insolens, DSM 1800 衍生所得高纯度的 43kD 纤维素酶所培育的，或所述纤维素酶由具有葡聚糖内酶活性的所述葡聚糖内酶的同系物组成。

2.按权利要求 1 的抑制染料转移组合物，其中，所述纤维素酶的葡聚糖内酶成分的等电点为约 5.1 。

3.按权利要求 1 的抑制染料转移组合物，其中所述葡聚糖内酶成分是通过包含在培养基中培养一种用重组 DNA 载体转化的宿主细胞的方法而产生的，该载体带有编码所述葡聚糖内酶成分或所述葡聚糖内酶成分的母体的 DNA 顺序，以及编码功能的 DNA 顺序，该功能可表达编码葡聚糖内酶成分或其母体的 DNA 顺序，上述培养是在可表达葡聚糖内酶或其母体的条件下进行的，并且从培养基中回收葡聚糖内酶成分。

4.按权利要求 1 的抑制染料转移组合物，其中，纤维素酶具有示

于顺序 ID # 2 的氨基酸顺序，或者是其呈现葡聚糖内酶活性的同种，

顺序 ID NO:2:

```
Met Arg Ser Ser Pro Leu Leu Pro Ser Ala Val Val Ala Ala Leu Pro
-21 -20                 -15                 -10

Val Leu Ala Leu Ala Ala Asp Gly Arg Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys
 -5                   1                   5                  10

Cys Lys Pro Ser Cys Gly Trp Ala Lys Lys Ala Pro Val Asn Gln Pro
             15                  20                  25

Val Phe Ser Cys Asn Ala Asn Phe Gln Arg Ile Thr Asp Phe Asp Ala
         30                  35                  40

Lys Ser Gly Cys Glu Pro Gly Gly Val Ala Tyr Ser Cys Ala Asp Gln
     45                  50                  55

Thr Pro Trp Ala Val Asn Asp Asp Phe Ala Leu Gly Phe Ala Ala Thr
 60                  65                  70                  75

Ser Ile Ala Gly Ser Asn Glu Ala Gly Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Glu
                 80                  85                  90

Leu Thr Phe Thr Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Lys Met Val Val Gln
             95                  100                 105

Ser Thr Ser Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Asn His Phe Asp Leu Asn
        110                 115                 120

Ile Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asp Gly Cys Thr Pro Gln Phe
    125                 130                 135

Gly Gly Leu Pro Gly Gln Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Arg Asn Glu
140                 145                 150                 155

Cys Asp Arg Phe Pro Asp Ala Leu Lys Pro Gly Cys Tyr Trp Arg Phe
                160                 165                 170

Asp Trp Phe Lys Asn Ala Asp Asn Pro Ser Phe Ser Phe Arg Gln Val
            175                 180                 185

Gln Cys Pro Ala Glu Leu Val Ala Arg Thr Gly Cys Arg Arg Asn Asp
        190                 195                 200

Asp Gly Asn Phe Pro Ala Val Gln Ile Pro Ser Ser Ser Thr Ser Ser
    205                 210                 215

Pro Val Asn Gln Pro Thr Ser Thr Ser Thr Thr Ser Thr Ser Thr Thr
220                 225                 230                 235

Ser Ser Pro Pro Val Gln Pro Thr Thr Pro Ser Gly Cys Thr Ala Glu
                240                 245                 250

Arg Trp Ala Gln Cys Gly Gly Asn Gly Trp Ser Gly Cys Thr Thr Cys
            255                 260                 265
```

Val Ala Gly Ser Thr Cys Thr Lys Ile Asn Asp Trp Tyr His Gln Cys
270 275 280

Leu 。

5.按权利要求 4 的抑制染料转移组合物，其中，所述纤维素酶可通过腐蚀菌来生产。

6.按权利要求 5 的抑制染料转移组合物，其中所述腐蚀菌为 Humicola insolens 。

7.按权利要求 1 的抑制染料转移组合物，其特征在于纤维素酶化合物是一种具有示于顺序 ID # 4 的氨基酸顺序的葡聚糖内酶或是其呈现葡聚糖内酶活性的同种，

顺序 ID NO:4:

Met Arg Ser Tyr Thr Leu Leu Ala Leu Ala Gly Pro Leu Ala Val Ser
1 5 10 15

Ala Ala Ser Gly Ser Gly His Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys
20 25 30

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

Thr Cys Asp Lys Asn Asp Asn Pro Ile Ser Asn Thr Asn Ala Val Asn
50 55 60

Gly Cys Glu Gly Gly Gly Ser Ala Tyr Ala Cys Thr Asn Tyr Ser Pro
65 70 75 80

Trp Ala Val Asn Asp Glu Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala Thr Lys Ile
85 90 95

Ser Gly Gly Ser Glu Ala Ser Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Ala Leu Thr
100 105 110

Phe Thr Thr Gly Pro Val Lys Gly Lys Lys Met Ile Val Gln Ser Thr
115 120 125

Asn Thr Gly Gly Asp Leu Gly Asp Asn His Phe Asp Leu Met Met Pro
130 135 140

Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asp Gly Cys Thr Ser Glu Phe Gly Lys
145 150 155 160

Ala Leu Gly Gly Ala Gln Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Arg Ser Glu Cys
165 170 175

Asp Ser Tyr Pro Glu Leu Leu Lys Asp Gly Cys His Trp Arg Phe Asp
180 185 190

Trp Phe Glu Asn Ala Asp Asn Pro Asp Phe Thr Phe Glu Gln Val Gln
195 200 205

Cys Pro Lys Ala Leu Leu Asp Ile Ser Gly Cys Lys Arg Asp Asp Asp
210 215 220

Ser Ser Phe Pro Ala Phe Lys Val Asp Thr Ser Ala Ser Lys Pro Gln
225 230 235 240

Pro Ser Ser Ser Ala Lys Lys Thr Thr Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gln
245 250 255

Pro Gln Lys Thr Lys Asp Ser Ala Pro Val Val Gln Lys Ser Ser Thr
260 265 270

Lys Pro Ala Ala Gln Pro Glu Pro Thr Lys Pro Ala Asp Lys Pro Gln
275 280 285

Thr Asp Lys Pro Val Ala Thr Lys Pro Ala Ala Thr Lys Pro Val Gln
290 295 300

Pro Val Asn Lys Pro Lys Thr Thr Gln Lys Val Arg Gly Thr Lys Thr
305 310 315 320

Arg Gly Ser Cys Pro Ala Lys Thr Asp Ala Thr Ala Lys Ala Ser Val
325 330 335

Val Pro Ala Tyr Tyr Gln Cys Gly Gly Ser Lys Ser Ala Tyr Pro Asn
340 345 350

Gly Asn Leu Ala Cys Ala Thr Gly Ser Lys Cys Val Lys Gln Asn Glu
355 360 365

Tyr Tyr Ser Gln Cys Val Pro Asn.
370 375

8.按权利要求 7 的抑制染料转移组合物，其中，所述葡聚糖内酶可通过镰孢霉菌来生产。

9.按权利要求 8 的抑制染料转移组合物，其中，所述镰孢霉菌为尖镰孢菌(Fusarium oxysporum)。

10.按权利要求 2 的抑制染料转移组合物，其中，所述酶可通过含有编码酶的 DNA 顺序的 DNA 构建来生产。

11.按权利要求 10 的抑制染料转移组合物，其中。 DNA 顺序如顺序 ID # 1 或 ID # 3 所示，

顺序 ID NO:1:

```
GGATCCAAG ATG CGT TCC TCC CCC CTC CTC CCG TCC GCC GTT GTG GCC          48
          Met Arg Ser Ser Pro Leu Leu Pro Ser Ala Val Val Ala
          -21 -20                -15                 -10

GCC CTG CCG GTG TTG GCC CTT GCC GCT GAT GGC AGG TCC ACC CGC TAC        96
Ala Leu Pro Val Leu Ala Leu Ala Ala Asp Gly Arg Ser Thr Arg Tyr
             -5                  1                   5

TGG GAC TGC TGC AAG CCT TCG TGC GGC TGG GCC AAG AAG GCT CCC GTG        144
Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys Gly Trp Ala Lys Lys Ala Pro Val
     10                  15                  20

AAC CAG CCT GTC TTT TCC TGC AAC GCC AAC TTC CAG CGT ATC ACG GAC        192
Asn Gln Pro Val Phe Ser Cys Asn Ala Asn Phe Gln Arg Ile Thr Asp
 25                  30                  35                  40

TTC GAC GCC AAG TCC GGC TGC GAG CCG GGC GGT GTC GCC TAC TCG TGC        240
Phe Asp Ala Lys Ser Gly Cys Glu Pro Gly Gly Val Ala Tyr Ser Cys
                 45                  50                  55

GCC GAC CAG ACC CCA TGG GCT GTG AAC GAC GAC TTC GCG CTC GGT TTT        288
Ala Asp Gln Thr Pro Trp Ala Val Asn Asp Asp Phe Ala Leu Gly Phe
             60                  65                  70

GCT GCC ACC TCT ATT GCC GGC AGC AAT GAG GCG GGC TGG TGC TGC GCC        336
Ala Ala Thr Ser Ile Ala Gly Ser Asn Glu Ala Gly Trp Cys Cys Ala
         75                  80                  85

TGC TAC GAG CTC ACC TTC ACA TCC GGT CCT GTT GCT GGC AAG AAG ATG        384
Cys Tyr Glu Leu Thr Phe Thr Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Lys Met
     90                  95                  100
```

```
GTC GTC CAG TCC ACC AGC ACT GGC GGT GAT CTT GGC AGC AAC CAC TTC      432
Val Val Gln Ser Thr Ser Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Asn His Phe
105                 110                 115                 120

GAT CTC AAC ATC CCC GGC GGC GGC GTC GGC ATC TTC GAC GGA TGC ACT      480
Asp Leu Asn Ile Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asp Gly Cys Thr
                125                 130                 135


CCC CAG TTC GGC GGT CTG CCC GGC CAG CGC TAC GGC GGC ATC TCG TCC      528
Pro Gln Phe Gly Gly Leu Pro Gly Gln Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser
            140                 145                 150

CGC AAC GAG TGC GAT CGG TTC CCC GAC GCC CTC AAG CCC GGC TGC TAC      576
Arg Asn Glu Cys Asp Arg Phe Pro Asp Ala Leu Lys Pro Gly Cys Tyr
        155                 160                 165

TGG CGC TTC GAC TGG TTC AAG AAC GCC GAC AAT CCG AGC TTC AGC TTC      624
Trp Arg Phe Asp Trp Phe Lys Asn Ala Asp Asn Pro Ser Phe Ser Phe
    170                 175                 180

CGT CAG GTC CAG TGC CCA GCC GAG CTC GTC GCT CGC ACC GGA TGC CGC      672
Arg Gln Val Gln Cys Pro Ala Glu Leu Val Ala Arg Thr Gly Cys Arg
185                 190                 195                 200

CGC AAC GAC GAC GGC AAC TTC CCT GCC GTC CAG ATC CCC TCC AGC AGC      720
Arg Asn Asp Asp Gly Asn Phe Pro Ala Val Gln Ile Pro Ser Ser Ser
                205                 210                 215

ACC AGC TCT CCG GTC AAC CAG CCT ACC AGC ACC AGC ACC ACG TCC ACC      768
Thr Ser Ser Pro Val Asn Gln Pro Thr Ser Thr Ser Thr Thr Ser Thr
            220                 225                 230

TCC ACC ACC TCG AGC CCG CCA GTC CAG CCT ACG ACT CCC AGC GGC TGC      816
Ser Thr Thr Ser Ser Pro Pro Val Gln Pro Thr Thr Pro Ser Gly Cys
        235                 240                 245

ACT GCT GAG AGG TGG GCT CAG TGC GGC GGC AAT GGC TGG AGC GGC TGC      864
Thr Ala Glu Arg Trp Ala Gln Cys Gly Gly Asn Gly Trp Ser Gly Cys
    250                 255                 260

ACC ACC TGC GTC GCT GGC AGC ACT TGC ACG AAG ATT AAT GAC TGG TAC      912
Thr Thr Cys Val Ala Gly Ser Thr Cys Thr Lys Ile Asn Asp Trp Tyr
265                 270                 275                 280

CAT CAG TGC CTG TAGACGCAGG GCAGCTTGAG GGCCTTACTG GTGGCCGCAA          964
His Gln Cys Leu
                285

CGAAATGACA CTCCCAATCA CTGTATTAGT TCTTGTACAT AATTTCGTCA TCCCTCCAGG    1024

GATTGTCACA TAAATGCAAT GAGGAACAAT GAGTAC                              1060
```

顺序 ID NO:3:

```
GAATTCGCGG CCGCTCATTC ACTTCATTCA TTCTTTAGAA TTACATACAC TCTCTTTCAA      60

AACAGTCACT CTTTAAACAA AACAACTTTT GCAACA ATG CGA TCT TAC ACT CTT        114
                                        Met Arg Ser Tyr Thr Leu
                                          1               5

CTC GCC CTG GCC GGC CCT CTC GCC GTG AGT GCT GCT TCT GGA AGC GGT        162
Leu Ala Leu Ala Gly Pro Leu Ala Val Ser Ala Ala Ser Gly Ser Gly
            10                  15                  20

CAC TCT ACT CGA TAC TGG GAT TGC TGC AAG CCT TCT TGC TCT TGG AGC        210
His Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys Ser Trp Ser
        25                  30                  35

GGA AAG GCT GCT GTC AAC GCC CCT GCT TTA ACT TGT GAT AAG AAC GAC        258
Gly Lys Ala Ala Val Asn Ala Pro Ala Leu Thr Cys Asp Lys Asn Asp
    40                  45                  50

AAC CCC ATT TCC AAC ACC AAT GCT GTC AAC GGT TGT GAG GGT GGT GGT        306
Asn Pro Ile Ser Asn Thr Asn Ala Val Asn Gly Cys Glu Gly Gly Gly
55                  60                  65                  70

TCT GCT TAT GCT TGC ACC AAC TAC TCT CCC TGG GCT GTC AAC GAT GAG        354
Ser Ala Tyr Ala Cys Thr Asn Tyr Ser Pro Trp Ala Val Asn Asp Glu
                75                  80                  85

CTT GCC TAC GGT TTC GCT GCT ACC AAG ATC TCC GGT GGC TCC GAG GCC        402
Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala Thr Lys Ile Ser Gly Gly Ser Glu Ala
            90                  95                  100

AGC TGG TGC TGT GCT TGC TAT GCT TTG ACC TTC ACC ACT GGC CCC GTC        450
Ser Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Ala Leu Thr Phe Thr Thr Gly Pro Val
        105                 110                 115

AAG GGC AAG AAG ATG ATC GTC CAG TCC ACC AAC ACT GGA GGT GAT CTC        498
Lys Gly Lys Lys Met Ile Val Gln Ser Thr Asn Thr Gly Gly Asp Leu
    120                 125                 130

GGC GAC AAC CAC TTC GAT CTC ATG ATG CCC GGC GGT GGT GTC GGT ATC        546
Gly Asp Asn His Phe Asp Leu Met Met Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile
135                 140                 145                 150

TTC GAC GGC TGC ACC TCT GAG TTC GGC AAG GCT CTC GGC GGT GCC CAG        594
Phe Asp Gly Cys Thr Ser Glu Phe Gly Lys Ala Leu Gly Gly Ala Gln
                155                 160                 165

TAC GGC GGT ATC TCC TCC CGA AGC GAA TGT GAT AGC TAC CCC GAG CTT        642
Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Arg Ser Glu Cys Asp Ser Tyr Pro Glu Leu
            170                 175                 180
```

```
CTC AAG GAC GGT TGC CAC TGG CGA TTC GAC TGG TTC GAG AAC GCC GAC          690
Leu Lys Asp Gly Cys His Trp Arg Phe Asp Trp Phe Glu Asn Ala Asp
        185                 190                 195

AAC CCT GAC TTC ACC TTT GAG CAG GTT CAG TGC CCC AAG GCT CTC CTC          738
Asn Pro Asp Phe Thr Phe Glu Gln Val Gln Cys Pro Lys Ala Leu Leu
    200                 205                 210

GAC ATC AGT GGA TGC AAG CGT GAT GAC GAC TCC AGC TTC CCT GCC TTC          786
Asp Ile Ser Gly Cys Lys Arg Asp Asp Asp Ser Ser Phe Pro Ala Phe
215                 220                 225                 230

AAG GTT GAT ACC TCG GCC AGC AAG CCC CAG CCC TCC AGC TCC GCT AAG          834
Lys Val Asp Thr Ser Ala Ser Lys Pro Gln Pro Ser Ser Ser Ala Lys
                235                 240                 245

AAG ACC ACC TCC GCT GCT GCT GCC GCT CAG CCC CAG AAG ACC AAG GAT          882
Lys Thr Thr Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gln Pro Gln Lys Thr Lys Asp
            250                 255                 260

TCC GCT CCT GTT GTC CAG AAG TCC TCC ACC AAG CCT GCC GCT CAG CCC          930
Ser Ala Pro Val Val Gln Lys Ser Ser Thr Lys Pro Ala Ala Gln Pro
        265                 270                 275

GAG CCT ACT AAG CCC GCC GAC AAG CCC CAG ACC GAC AAG CCT GTC GCC          978
Glu Pro Thr Lys Pro Ala Asp Lys Pro Gln Thr Asp Lys Pro Val Ala
    280                 285                 290

ACC AAG CCT GCT GCT ACC AAG CCC GTC CAA CCT GTC AAC AAG CCC AAG         1026
Thr Lys Pro Ala Ala Thr Lys Pro Val Gln Pro Val Asn Lys Pro Lys
295                 300                 305                 310

ACA ACC CAG AAG GTC CGT GGA ACC AAA ACC CGA GGA AGC TGC CCG GCC         1074
Thr Thr Gln Lys Val Arg Gly Thr Lys Thr Arg Gly Ser Cys Pro Ala
                315                 320                 325

AAG ACT GAC GCT ACC GCC AAG GCC TCC GTT GTC CCT GCT TAT TAC CAG         1122
Lys Thr Asp Ala Thr Ala Lys Ala Ser Val Val Pro Ala Tyr Tyr Gln
            330                 335                 340

TGT GGT GGT TCC AAG TCC GCT TAT CCC AAC GGC AAC CTC GCT TGC GCT         1170
Cys Gly Gly Ser Lys Ser Ala Tyr Pro Asn Gly Asn Leu Ala Cys Ala
        345                 350                 355

ACT GGA AGC AAG TGT GTC AAG CAG AAC GAG TAC TAC TCC CAG TGT GTC         1218
Thr Gly Ser Lys Cys Val Lys Gln Asn Glu Tyr Tyr Ser Gln Cys Val
    360                 365                 370

CCC AAC TAAATGGTAG ATCCATCGGT TGTGGAAGAG ACTATGCGTC TCAGAAGGGA         1274
Pro Asn
375
```

TCCTCTCATG AGCAGGCTTG TCATTGTATA GCATGGCATC CTGGACCAAG TGTTCGACCC 1334

TTGTTGTACA TAGTATATCT TCATTGTATA TATTTAGACA CATAGATAGC CTCTTGTCAG 1394

CGACAACTGG CTACAAAAGA CTTGGCAGGC TTGTTCAATA TTGACACAGT TTCCTCCATA 1454

AAAAAAAAAA AAAAAAAAA 1473。

12.按权利要求3的抑制染料转移组合物，其中，所述宿主细胞是一种属于木霉属(Trichoderma)或曲霉属(Aspergillus)菌株的真菌，或者属于汉逊酵母属(Hansenula)或酵母属(Saccharomyces)菌株的酵母细胞。

13.按权利要求12的抑制染料转移组合物，其中所述曲霉属菌株是谷曲霉菌(Aspergillus oryzae)或黑曲霉菌(Aspergillus niger)。

14.按权利要求12的抑制染料转移组合物，其中所述酵母属菌株是酿酒酵母(Saccharomyces cerevisae)的菌株。

15.按权利要求3的抑制染料转移组合物，其中，所述宿主细胞是一种属于杆菌、链霉菌或大肠杆菌的细菌菌株。

16.按权利要求1的抑制染料转移组合物，其中，呈现过氧化酶活性的所述酶是由鬼伞属菌(Coprinus)或矮小鬼伞菌(B.purilus)菌株得来的。

17.按权利要求1的抑制染料转移组合物，其中，过氧化氢母体是过硼酸盐或过碳酸盐。

18.按权利要求1的抑制染料转移组合物，其中所述能够产生过氧化氢的酶催体系是一种氧化酶，它选自葡萄糖氧化酶、尿酸氧化酶、半乳糖氧化酶、醇氧化酶、胺氧化酶、氨基酸氧化酶和胆固醇氧化酶。

19.按权利要求1的抑制染料转移组合物，它是呈非尘状颗粒、液体，或一种被保护的酶体系形式的洗涤剂添加剂。

20.按权利要求19的抑制染料转移组合物，其中所述液体是一种稳定的液体。

21.按权利要求1的抑制染料转移组合物，它是颗粒状的，紧密颗

粒状或液体的形式。

说　明　书

抑制染料转移的组合物

本发明是关于在洗涤期间抑制染料从染色织物上转移到其它织物上的酶催组合物。

在现代织物洗涤操作中，出现的最持久和最麻烦的问题之一是一些染色织物有释放染料进入洗涤液中的倾向。然后，染料转移到一起洗涤的其它织物上。

解决这个问题的一个方法，是在洗涤中，易褪色染料与其它织物接触之前，将由染色织物洗出的易褪色染料进行漂白。

悬浮或增溶的染料可通过使用已知的漂白剂，在溶液中氧化到某种程度。

GB 2101167 描述了一种含过氧化氢母体的稳定液体漂白组合物，它在稀释时能被活化而产生过氧化氢。

但是，重要的是，它同时并不漂白实际上残留在织物上的染料，即，不引起颜色褪色。

美国专利 4077768 描述了通过使用氧化性漂白剂和催化性化合物如卟吩铁一起而抑制染料的转移的方法。

美国专利申请 421414 描述了用于氧化有机或无机物质，包括着色的物质的过氧化酶和氧化酶。在 1991 年 10 月 9 日申请的，同时待审中的欧洲专利申请 91202655.6 中公开了一种抑制染料转移的组合物，它包括一种能产生过氧化氢的酶催体系和铁催化剂。

EP 424398—A 描述了一种含有过氧化酶的能起漂白效果

的洗涤添加剂。该添加剂还含有一种或多种酶，特别是脂肪酶、蛋白酶、淀粉酶或纤维素酶。

EP—A—350098 公开了一种 C14CMC—方法，该方法规定了有关洗涤剂应用的纤纺素酶选择标准。已经发现，根据 CMC 方法，在试验溶液中，在 25×10^{-6}%重量的纤维素酶蛋白质时，至少去掉 10%固定的放射性标记的羧甲基纤维素，可提供高活性的纤维素酶。

根据本发明，列入高活性范围的优选纤维素酶已公开于 1990 年 5 月 5 日申请的、同时待审的丹麦专利申请 1159/90。它公开了一种纤维素酶的制剂，它基本上由与单克隆抗体发生免疫反应的同类葡聚糖内酶所组成，这种抗体是对由insolens 腐蚀菌 (Humicola insolens)DM1800 得到的部分纯化的 43kD 纤维素酶所培育的。

现在惊人地发现，在染料转移抑制中，通过使用所说的高活性纤维素酶，更特别地是使用同时等审的丹麦专利申请 1159/90 所公开的特定纤维素酶制剂，可以显著地提高过氧化酶的效能。因此，本发明的一个目的是提供染料转移抑制剂组合物，它通过使用高活性纤维素酶和过氧化酶而在洗涤液中呈现最佳的染料转移抑制。

根据本发明一个方案，提供的染料转移抑制组合物，包括一个成本—效益纤维素酶的制备，例如通过使用重组体 DNA 技术。

根据本发明的另一个方案，也提供了涉及着色的织物的洗涤作业方法。

本发明提供了一种抑制染料转移组合物，它含有一种呈现过氧化酶活性的酶、一种过氧化氢或一种过氧化氢母体或一种

能产生过氧化氢的酶催体系、一种另外的可氧化的基质和一种纤维素酶，其特征在于：根据 C14CMC，在 25×10^{-6}%重量的洗涤试验溶液中，该纤维素提供去掉至少 10%的固定的放射性标记的羧甲基纤维素。

根据本发明，优选的纤维素酶基本上包括同种的葡聚糖内酶成分，它与单克隆抗体进行免疫反应，该抗体是对由腐蚀菌 insolens (Humicola incolens)DM 1800 得到的部分纯化的 43kD 纤维素酶所培育的。

纤维素酶：

酶的活性，特别是纤维素酶的活性，对于不同的应用，可用不同的分析方法来限定。在使用性能中所预期的或至少与在使用性能中相关的测量中，这些方法均试图提供一种符合实际的评价。正如在欧洲专利申请 EP—A—350098 中所述的，许多方法，特别是这些经常被纤维素酶制造者所使用的方法，与洗涤组合物中的纤维素酶的使用性能是不十分相关的，这归因于所拟定的这些活性测量方法中所使用的其它条件各不相同。

在 EP—A—350098 中所述方法已发展成为并具有一种与在洗涤剂组合物中的纤维素酶的活性的等级方面的预言性关系。

因此，本发明使用 EP—A—350098 中所述方法以筛选纤维素酶，以便识别适用于本发明的纤维素酶和不提供本发明目的的那些。筛选方法在后文中称为 C14CMC—方法，它已由 EP—A—350098 中所公开方法采用，它可描述如下：

原理：

用于筛选的 C14CMC—方法的原理是在洗涤溶液的规定的纤维素酶浓度下测定从布基上去除的固定羧甲基纤维素

(CMC)。通过使用C14放射性碳以放射性标记某些CMC而测量所去除的CMC。在用纤维素酶处理前后，简单地计数放射性C14在布基上的量可以测定纤维素酶的活性。

样品的制备：

CMC制备：

根据表1制备放射性CMC原始溶液。放射性CMC可以通过在EP—A—350098中所述方法而制得。

织物基材：织物基材是具有5cm×5cm尺寸的细薄棉布试样。在其中心用0.35ml的放射性标记的CMC原始溶液接种，然后将细棉样布空气干燥。

CMC的固定：

为了在细棉样布上固定放射性标记的CMC，使用德国Original Haunau所制造的Laundero—meter设备"Linitest Original Haunau"。将Laundero—meter的金属瓶注入400ml硬水(4mmol/l Ca^{++}离子)。每个瓶最多能用13块样布。然后将瓶在Laundero—meter设备中，在20～60℃的加热循环中成熟40分钟。在成熟后，样布用自来水冲洗1分钟，挤干、空气干燥至少30分钟。根据EP—A—350098，具有固定放射性CMC的样布也能如没有洗涤的"空白样布"一样测量。

样布的处理：

洗涤试验溶液：按照表II的组合物制备洗涤试验溶液，平衡至pH=7.5。洗涤试验溶液是以加入纤维素酶试验样品为基础的。在已确定要加入的纤维素酶的量以前，当心不要加水稀释洗涤液至100%平衡。在这筛选试验中，所用的纤维素酶的量要加到洗涤试验溶液中有25×10^{-6}重量%的纤维素酶蛋白(14.5℃时，相当于0.25毫克/升)。

洗涤过程：

然后将用放射性标记的CMC这样接种的样布，在洗涤摸拟过程中处理。在由德国Haunau，Original Haunau制造的Laundero—meter型设备"Linitest，Original Haunau"中，摸拟洗涤过程。将一块单独样品放入一个20cm³玻璃瓶中。玻璃瓶中装有10ml洗涤试验溶液，并将液体封紧。每个Laundero—meter罐中最多放入5个玻璃瓶。罐中装满水作为洗涤模拟过程的热传递介质。洗涤模拟过程是以40分钟内由20℃升到60℃作为一加热循环而进行的。

在样品处理后，将玻璃瓶浸入冷水中，接着由瓶中取出每块样布，在烧杯中用软水冲洗、挤干、并在空气中至少干燥30分钟。

测量：

为了测量放射性标记的CMC的去除率，使用一种闪烁计数器，如LKB 1210 uetrabeta闪烁计数器。为了得到最准确的结果，应该按照特定的闪烁计数器最佳操作的操作指南。例如，对于LKB 1210 Ultrabeta闪烁计数器，应按下面步骤进行。将要测量的布样放入装有12ml闪烁剂液体(如，由Packard得到的闪烁剂299)的塑料小瓶中。样品然后稳定至少30分钟，然后将小瓶放入KLB 1210 Ultrabeta闪烁计数器中而得到样品的各个放射性计数。

为了测量仅仅由于纤维素酶而引起的CMC去除，必须测定同时已接种的、但用不含纤维素酶溶液处理的样品。纤维素酶的活性可以用放射性标记的CMC去除百分率来表示。按下式计算这种百分比：

$$\text{放射性 CMC 的去除的\%} = \frac{XO - XC}{XO} \times 100$$

其中，XO 是用不含纤维素酶的洗涤试验溶液处理的样布的放射性闪烁数。

XC 是用含有要评价的纤维素酶的洗涤试验溶液处理的样布的放射性闪烁娄。

统计根据·工艺确定：

为了提供统计学上可靠的结果，使用标准的统计分析法。对于使用 LKB 1210 Ultrabeta 闪烁计数器的给定实例，已发现，对每个放射性闪烁计数，可使用三个样布。

为了确定工艺，按 EP—A—350098 所推荐的，用"空白样品"的交互校核、测量和计算。这可以检测并消除错误。

结果分析：

所述的筛选试验提供了一种快速的，独特的和可靠的方法以检定纤维素酶，这些纤维素酶，与不是本发明部分的纤维素酶相比，它能满足本发明的活性指标。

已经发现，按照上述 C14CMC—方法，去除 10%或更多的固定放射性标记的 CMC，表明有关的纤维素酶满足本发明需要。

对本领域的技术人员是显然的，去除百分率高于 10%就表明有关纤维素有较高活性，。因此，预料到在根据 C14CMC—方法的洗涤试验中的蛋白质浓度时，纤维素酶给出约 25%、优选的约 50%的放射性标记 CMC 的去除，则表明用于洗涤剂的纤维素酶具有更好的性能。

也可以预料到，对于 C14CMC—方法，使用更高浓度的纤维素酶可以提供更高的去除百分率。可是在纤维素酶浓度和其所得的去除百分率之间，是不存在线性关系。

表Ⅰ：放射性 C14 标记的 CMC 原始溶液
（全部百分率按总溶液的重量计）

总 CMC* （CMC 是具有取代度约为 0.47～0.7 的洗涤剂级 CMC）	$99.2\times10^{-3}\%$
乙醇	$14985.12\times10^{-3}\%$
去离子水	$84915.68\times10^{-3}\%$
总量：	100%

* 总 CMC 含有非放射性的和放射性的 CMC，给出的放射性足以在所用的闪烁计数计上清楚地阅读。例如，放射性 CMC 有 0.7 毫居里/克的放射性，并与非放射性 CMC 以 1：6.7 之比例混合。

表Ⅱ：洗涤试验溶液
（全部百分比均按总溶液的重量计算）

直链 C_{12}烷基苯磺酸	0.110%
椰子烷基硫酸酯 （TEA 盐）	0.040%
乙氧化的 C_{12-15}醇（E07）	0.100%
椰子脂肪酸	0.100%
油酸	0.050%

柠檬酸	0.010%
三乙醇胺	0.040%
乙醇	0.060%
丙二醇	0.015%
氢氧化钠	0.030%
甲酸钠	0.010%
蛋白酶	0.006%
水(2.5mmol/升 Ca^{++}),pH调节剂(HCl 或 NaOH 溶液)和纤维素酶	平衡到 100%

按照本发明,优选的纤维素酶是描述于丹麦专利申请1159/90中的那些。例如,在发明组合物中可用的纤维素酶制剂、基本上由同类葡聚糖内酶组成,它与抗体发生免疫反应,该抗体是对由 Humicola insolens 衍生的高纯度 43kD 纤维素酶所培育的,或与所述 43kD 葡聚糖内酶是同源的。

必须强调,按照本发明的所有纤维素酶都必须符合上面提及的筛选试验标准,可是在丹麦专利申请 1159/90 中,建立了另外的标准,在与本发明筛选试验相结合时可以确定优选的纤维素酶。

在本发明的组合物中,特别有用的纤维素酶制剂是除了经筛选试验外,葡聚糖内酶组成还在每毫克总蛋白质具有 CMC—内酶活性至少约 50、优选的至少约 60,特别是至少约 90CMC—

内酶单位的那些。特别是，一种优选的葡聚糖内酶成分在每毫克总蛋白有 CMC—内酶活性至少 100CMC—内酶单位。

在本文中，术语"CMC—内酶活性"(cevu)是指葡聚糖内酶成份中的葡聚糖内酶的活性，根据它使纤维素降解成葡萄糖、纤维素二糖和三糖的能力，通过下面详细描述的，在用本发明的纤维素酶制剂接种后羧甲基纤维素(CMC)溶液的粘度降低来测定的。

CMC—内酶(葡聚糖内酶)活性能通过 CMC 粘度的降低来测定，方法如下：

制备一种基质溶液，在 pH 9.0 的 0.1M tris 缓冲液中含有 35g/l CMC(Hercules 7 LED)。将要分析的酶样品溶于同一缓冲溶液中。混合 10ml 基质溶液和 0.5ml 酶溶液并转入粘度计(如 Haake VT181，NV sensor，181rpm)中，在 40℃恒温。在混合后和以后再隔 30 分钟尽快对粘度读数。在这种条件下当粘度降至一半时的酶量被定义为一个单位的 CMC—内酶活性。

按本领域技术人员所熟知的方法，使用标记蛋白质进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS—PAGE)和等电点聚焦法以分别测定本文所用的纤维素酶制剂中的葡聚糖内酶成分的分子量和等电点(PI)。这样，测得的特定葡聚糖内酶成分的分子量是 43kD，测得的该葡聚糖内酶的等电点为约 5.1。

纤维素二糖水解酶活性可定义为对 P—硝基苯基纤维素二糖的活性。该活性定为按在 37℃和 pH=7.0 时每分钟所释放的硝基苯基的微摩尔(μ mole)数。已经发现，本发明的葡聚糖内酶成分基本上没有纤维素二糖水解酶活性。

本文的纤维素酶制剂中，葡聚糖内酶成份最初是通过彻底的纯化过程，即根据 U.S. 4435307，包括将粗制 H. insolens 纤维

素酶混合物的反相 HPLC 纯化来分离的。令人惊奇的是，这种过程导致分离出一种 43kD 葡聚糖内酶的单一组成，这组成由于具有惊人的高葡聚糖内酶活性而具有意想不到的有利性质。

除筛选试验外，本发明组合物中所用的纤维素酶还可以限定为具有葡聚糖内酶活度的酶（在下文中称为"葡聚糖内酶的酶"），这种酶具有示于所附顺序表 ID#2 的氨基酸顺序，或具有葡聚糖内酶活性的其同系物。

在本文中，术语"同系物"是指用 DNA 编码的多肽，它在特定条件下，杂化到同一探针上，如用于具有这种氨基酸顺序的葡聚糖内酶的酶的 DNA 编码（例如，在 5×SSC 中预浸渍并在含有 20%甲醛、5×Denhardt's 溶液、50mM 磷酸钠，pH 6.8、50μg 变性的声处理小牛胸腺 DNA 的溶液中，于 40℃预杂化 1 小时，接着，在添加有 100μM ATP 的相同溶液中，在 40℃杂化 18 小时）。术语包括上述顺序的衍生物，它是通过对天然顺序的 C 端或 N 端中一个或两个端基上加入 1 个或多个氨基酸残基、在天然顺序的一个或多个位点上取代一个或多个氨基酸残基、在天然氨基酸顺序的一端或两端或者在天然顺序内的一个或多个位点删去一个或多个氨基酸残基、或在天然顺序的一个或多个位点插入一个或多个氨基酸残基而制得的。

本文的葡聚糖内酶可以通过腐蚀菌种（Humicola），如 Humicola insolens 例如 DSM1800 菌株，而生产的一种，按照国际承认用于专利程序寄存的微生物保藏布达佩斯条件（布达佩斯条约），该菌株于 1981 年 10 月 1 日，寄存在 Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen, Mascheroder weg 1B, D — 3300 Braunschweig, FRG。

在另一方面，本文所用的纤维素酶可以限定为，除筛选试验

外，作为葡聚糖内酶，它具有示于所附顺序表 ID#4 的氨基酸顺序或具有葡聚糖内酶活性的其同系物(如上文所定义的)。所述的葡聚糖内酶的酶可以通过一种镰孢霉菌(Fusarium)如尖镰孢菌(Fusarium oxysporum)如菌种 DSM 2672，按照布达佩斯条件，它于 1983 年 6 月 6 日寄存于 Deutsche Sammlung ron Mikroorganismen，Mascheroder Weg 1B，D—3300 Braunschweig，FRG。

再者，可预料到，同系的葡聚糖内酶可由产生纤维素的酶的其它微生物中衍生得到，如木霉属(Trichoderma)、坏丝菌属(Myceliophthora)、显毛属(Phanerochaete)、裂褶菌属(Schizophyllum)、青霉属(Penicillium))、曲霉属(Aspergillus)和地丝菌属(Geotricum)。

但是，为工业化生产本发明的纤维素酶制剂，最好使用重组体 DNA 技术或其它包括调节微生物的发酵或突变的技术，以保证过多生产所需的酶催活性。这种方法和技术在现有技术是已知的，本领域的技术人员是易于进行的。

葡聚糖内酶成分可以是通过将用重组体 DNA 载体转化的宿主细胞进行培养的方法而生产的一种，该载体带有编码所述葡聚糖内酶成分或所述葡聚糖内酶母体的 DNA 顺序以及编码功能的 DNA 顺序，该功能可以在培养基中，在使葡聚糖内酶成分或其母体表达的条件下表达编码葡聚糖内酶成分或其母体的 DNA 顺序，并由培养基中回收葡聚糖内酶的成分。

含有一种编码上述的葡聚糖内酶的酶的 DNA 顺序或酶的母体形式的 DNA 构建，包括具有示于所附顺序表 ID#1 或 ID#3 的 DNA 顺序或其变体的 DNA 构建。适宜的 DNA 顺序变体的实例是核苷酸取代物，它不产生葡聚糖内酶的其它氨基酸顺序，但是它与 DNA 构建引入的宿主有机体的密码子应用相适应，或者

核苷酸取代物，它产生不同的氨基酸顺序，因而可能有不同的蛋白质结构，该结构可以产生具有天然酶不同性质的葡聚糖内酶突变体。其它可能的变体实例是在顺序任一端插入一个或多个核苷酸，或在顺序的任一端或在顺序内删去一个或多个核苷酸。

本发明所用的编码葡聚糖内酶的酶的 DNA 构建可以通过已有的标准方法来合成制备，如 S. L. Beaucage 和 M. H. Caruthers, Tetrahedron Letters 22, 1981, pp 1859—1869 中所述的磷酰胺方法或由 Matthes 等人，EMBO Journal 3, 1984, pp 801—805 所描述的方法。按照磷酰胺(phosphoamidite)方法合成寡核苷酸，例如，在一个自动 DNA 合成器中，在适宜的载体中纯化、退火、连接并克隆。

编码葡聚糖内酶的酶或其母体的 DNA 构建，例如可通过建立能产生微生物，如 Humicola insolens, DSM 1800 的纤维素酶的 cDNA 或基因库而进行分离并通过常规方法筛选阳性克隆，常规方法，如按照标准技术（参阅 Sambrook 等人，Molecular Cloning: A Laloratory Manual, 2nd. Ed. Cold Spring Harbor, 1989）通过使用，在葡聚糖内酶的完全或部分氨基酸顺序的基础上进行合成的寡核苷酸探针进行杂化，或通过选择表达合适酶的活性（即上面限定的 CMC—内酶活性）的克隆，或通过选择产生与抗天然纤维素酶抗体反应的蛋白质（葡聚糖内酶）的克隆。

最后，DNA 构建可以是混合的合成源和基因源、混合的合成源和 cDNA 源或混合的基因和 cDNA 源，按照标准方法它们是通过将合成的，基因的或 cDNA 的源（合适的）的碎片连接而制备的，碎片相当于完全 DNA 构建的不同部分。DNA 构建也可以使用特定引物，如描述于 US 4683202 或 R. K. Saiki 等人，Science, 239, 1988, pp, 487～491 中所述的，通过聚合酶的链反应而

制备。

上述 DNA 构建插入的重组体表达载体包括可以方便地进行重组体 DNA 方法的任何载体，而载体的选择将往往取决于要引入的宿主细胞。因此，载体可以是一种自发复制的载体，即以染色体外实体存在的一种载体，其复制不依赖于染色体的复制，例如一种质粒。或者，载体可以一种，当导入宿主细胞时，它并入宿主细胞基因并与已并入的染色体一起复制。

在载体中，编码葡聚糖内酶的 DNA 顺序应当可实行地连结到适宜的启动子和终止区顺序上。启动子可以是在选择的宿主细胞中表示转录活性的任何 DNA 顺序以及可以是从编码对宿主细胞是同系或异系的蛋白质的基因中衍生的。用于连结分别编码葡聚糖内酶、启动子和终止区的 DNA 顺序的方法以及将它们插入合适载体的方法对本领域技术人员是熟知的(参阅，如 Sambrook 等人，上面所引的文献)。

用上述 DNA 构建或上述表达载体转化的宿主细胞，例如可归属于一种曲霉属(Aspergillus)最好的是谷曲霉菌(Aspergillus oryzae)或黑曲霉菌(Aspergillus niger)。真菌细胞可以通过按本质上已知的方法，包括原生质体的形成和原生质体的转化、接着细胞壁再生的方法而转化。使用曲霉属作为宿主微生物描述于 EP 238023(Novo Industri A/S)，其内容列入本文作为参考。宿主细胞也可以是一种酵母细胞，如酿酒酵母(Saccharomyces cerevisioe)的菌种。

或者，宿主有机体可以是一种细菌，特别是链霉菌属(Streptomyces)和杆菌(Bacillus)，以及大肠杆菌(E. coli)。细菌细胞的转化可以按常用方法来进行如描述于 Samlrook 等人，Molecular Cloning: A Laboratory Manual，Cold Spring Harbor，1989，中的。

适宜的 DNA 顺序筛选和载体的构建也可以用标准方法实施，参考 Sambrook 等人（上面所引的文献）。

用于培养转化的宿主细胞的培养基可以是任何适宜所提及的宿主细胞生长的常规培养基。可将表达的葡聚糖内酶方便地分泌入培养基中，并可通过熟知的方法而从此回收，方法包括通过离心或过滤、用盐如硫酸铵沉淀培养基中蛋白质成份、接着用色谱方法如离子交换色谱、亲合色谱等类似法，由培养基中分离细胞。

通过使用上面所述的重组体 DNA 技术，现有技术中熟知的蛋白质纯化的技术、发酵和突变的技术或其它技术可以提供主纯度的葡聚糖内酶。

在本发明的组合物中上述纤维素酶的用量应当使在洗涤溶液中要释放的酶蛋白的量为每升洗涤溶液 0.005～40mg，优选的是每升洗涤溶液 0.01～10mg。

过氧化酶

可用于本发明目的的过氧化酶，可以从植物（如辣根过氧化酶）或从微生物如真菌或细菌中分离和生产的。某些优选的真菌包括属于半知菌亚纲（Deuteromyctina）、丝孢菌亚纲（Hyphomycetes）如镰孢霉属（Fusarium）、腐蚀菌（Humicola）木霉属（Trichoderma）、漆斑菌属（Myrothecium）、轮技孢菌属（Verticillum）、关节霉菌（Arthromyces）、温霉菌属（Caldariomyces）、Ulocladium、没筒子菌（Embellisia）芽枝霉菌属（cladosporium）或 Dreschlera，的菌种，特别是尖镰孢菌（Fusarium oxysporum）（DSM2672）、Humicola insolens、Trichoderma resii、疣孢漆斑菌（Myrothecium Verrucana）（IFO6113）'Verticillum alboatrun、大丽轮技孢菌（Verticillum dahlie、分枝关节霉菌（Arthromyces

ramosus)FERM P—7754)、烟温霉菌(Caldariomyces fumago)、ulocladium chartarum、Embellisia allior、Dreschlera halodes。

其它优选的真菌包括属于担子菌亚纲(Basidiomycotina)担子菌类(Basidiomycetes)的菌种如鬼伞菌(Coprinus)显毛菌(Phanerochaete)革盖菌(Coriolus)或栓菌(Trametes),特别是灰鬼伞菌 f. 小孢子(Coprinus Cinereus f. microsporus)(IFO 8371),大根鬼伞菌(Coprinus macrorhizus)、全孢子显毛菌(Phanerochaete chrysosporium)(如 NA—12)或杂色革盖菌(Coriolus versicolor)(如 PR4 28—A)。

另外优选的真菌包括属于毡霉菌亚纲(Zygomycotina)、Mycoraceae 类的菌株,如,根霉菌(Rhizopus)或毛霉菌(Mucor),特别是冬令毛霉菌(Mucor hiemalis)。

某些优选的细菌包括放线菌目(Actinomycetales)的菌株,如球形链霉菌(Streptomyces spheroides)(ATCC 23965)、热紫链霉菌(Streptomyces thermoviolaceus)(IFO 12382)或链状轮枝孢菌(Streptoverticillum Verticillium ssp,verticillium)。

其它优选的细菌包括矮小杆菌(Bacillus Pumillus)(ATCC—12905),脂肪耐温杆菌(Bacillus Stearothermophilus)、球形红细菌(Rhodobacfer sphaeroides)、沼泽红胞藻(Rhodomonas Palustri)乳链球菌(Streptococcus lactis)、purrocinia 假单胞菌(Pseudomonas purrocinia)(ATCC 15958)或萤光假单胞菌(Pseudomonas fluorescens)(NRRL. B—11)。

其它有用的过氧化酶的潜在源列于 B. C. Saunders 等人,上面所引文献 41～43 页中。

根据本发明,用于生产酶的方法描述于现有技术,参阅如,FEB Letters 1625,173(1),Applied and Environmental Microbioligy,

Feb. 1985, pp. 273—278, Applied Microbiol. Biotechnol. 26, 1987, pp. 158—163, Biotechnology Letters 9(5)1987, pp. 357—360, Nature 326, 2 April 1987, FEBS Letters 4270, 209(2), p 321, EP. 179486, EP. 200565, GB 2167421, EP 171074 和 Agric. Biol. Chem. 50(1), 1986, p 247.

特别优选的过氧化酶是在洗涤液体的常用 pH 下，即 pH 为 6.5～10.5，优选的是 6.5～9.5，最好为 7.5～9.5，下有活性的那些。这种酶酶可以通过对以亲碱微生物所生产的有关酶进行筛选而分离，例如，使用描述于 R. E. Chilols 和 W. G. Bardsleg, Biochem. J. 145, 1975, pp 93—103 中的 ABTS 检测方法。

其它优选的过氧化酶是那些具有良好热稳定性以及对一般使用使用的洗涤剂成分，如非离子的，阳离子的，阴离子的表面活性剂、洗涤剂助剂、磷酸盐等有良好的稳定性的酶。

另一类有用的过氧化酶是卤代过氧化酶，如氯代或溴代过氧化酶。

过氧化酶还可以是一种通过在培养基中对用重组体 DNA 载体转化的宿主细胞进行培养而生产的，该重组体载体带有编码所述酶的 DNA 顺序和编码可表达编码酶的 DNA 顺序的功能的 DNA 顺序，培养是在可使酶表达的条件下进行的，并从培养基中回收酶。

编码酶的 DNA 碎片，例如可以通过建立产生所需酶的微生物的 cDNA 或基因库而分离，这种所需酶是例如上面所提及的有机体中的一种，并通过常规方法筛选阳性克隆，该常规方法如通过在酶的完全或部分氨基酸顺序基础上对合成的寡核苷酸探针进行杂化，或通过选择表达适宜酶活性的克隆、或通过选择生产一种与抗天然酶的抗体反应的蛋白质的克隆。

一旦已选择，DNA 顺序可以插入适宜的可复制的表达载体，该载体包括适宜的促进子、操纵基因和终止区顺序，该顺序可使酶在特定的宿主有机体中表达，以及能使载体在所涉及的宿主有机体中复制的复制源。

然后将得到的表达载体转入适宜的宿主细胞中，例如真菌细胞，优选的实例是曲霉菌，最好的是谷曲霉菌（Aspergillus orgzae）或黑曲霉菌（Aspergillus niger）。真菌细胞可以通过按基本上已知的方法包括原生质体的形成和原生质体的转化，接着细胞壁的再生的方法进行转化。使用曲霉菌作为宿主微生物描述于 EP 238023（Novo Industri A/S），其内容在此参考引入。

或者，宿主有机体可以是细菌、特别是链霉菌和杆菌或大肠杆菌的菌株。细菌细胞的转化可以按照常规方法来进行，如描述于 T. Maniatis 等人的，Molecular Cloning；A Laloratory Manual，Cold spring Harbor，1982。

筛选适当的 DNA 顺序和载体的构建也可以通过标准方法来进行的，参阅 T. Maniatis 等人的，上面所引用的文章。

用于培养转化的宿主细胞的培养基可以是任何适宜于所涉及宿主细胞生长的常用培养基。将表达的酶方便地分泌入培养基中，并可以通过熟知的方法而从此回收，该方法包括通过离心或过滤、用盐如硫酸铵以沉淀培养基的蛋白成分，接着用色谱方法如离子交换色谱、亲合色谱等类似方法而从培养基中分离细胞。

在方法的开始或期间，可以加入 H_2O_2，其量如为 0.001～5mM，特别是 0.01～1mM。当使用鬼伞菌过氧化酶时，选用 0.01～0.25mM H_2O_2，而当使用矮小杆菌过氧化酶时，则选用 0.1～1mM H_2O_2。

过氧化氢可按过氧化氢或其母体形式加入，优选的为过硼酸盐或过碳酸盐。能使用的过氧化氢母体的量取决于所选择的过氧化酶的特定性质，如鬼伞菌过氧化酶将用于含有少于5%过硼酸盐的洗涤组合物中。

在本发明的方法中，使用一种用于形成过氧化氢的酶催方法是理想的。这样，根据本发明的方法还可以包括在洗涤或/和漂洗的开始或期间加入一种能产生过氧化氢的酶催体系(即一种酶和一种基质)。

一个这种的过氧化氢产生体系，包括一种能将分子氧和有机或无机基质分别转变为过氧化氢和氧化的基质的酶。这些酶仅能产生少量的过氧化氢，但是在本发明方法中使用，它们可以有很大的优点，因为当过氧化酶存在时，能确保有效地利用所产生的过氧化氢。

较好的过氧化氢产生酶是那些在低廉和容易得到的基质上作用的酶，而该基质可以方便地包含在洗涤剂组合物中。这种基质的实例是葡萄糖，它可借助于葡萄糖氧化酶而用于产生过氧化氢。适宜的氧化酶包括能在芳香族化合物，如苯酚和有关的物质上作用的氧化酶，如邻苯二酚氧化酶、虫漆酶。其它适宜的氧化酶是尿酸氧化酶、半乳糖氧化酶、醇氧化酶、胺氧化酶、氨基酸氧化酶、淀粉糖苷酶和胆固醇氧化酶。

优选的酶催体系是醇和醛氧化酶。

对于颗粒状洗涤剂应用的更优选的体系有固体醇，如葡萄糖，其氧化作用是通过葡萄糖氧化酶的催化而成为具有过氧化氢形成的葡萄糖酸。

对于液体洗涤剂应用的更优选的体系将包括液体醇，它也能起例如溶剂的作用，实例是乙醇/乙醇氧化酶。

按照本发明的组合物中所使用的氧化酶的量至少要在洗涤中足以提供恒定发生 0.01～10ppm AVO/分钟的量。例如，用葡萄糖氧化酶，在室温和 pH 6～11 时，优选的为 7～9 时，用 50～5000u/l 葡萄糖氧化酶、0.005～0.5%葡萄糖，在恒定的通风条件下可以达到。

在洗涤和/或漂洗过程的开始或期间，对过氧化酶，加入另外的可氧化的基质，则可提高所用过氧化酶的染料转移抑制的效果。可认为这归因于形成短寿命的基团或这种基质的其它氧化态，它参与了漂白或着色物质的其它变化。这种可氧化的基质实例是金属离子，如 Mn^{++}、卤素离子、如氯或溴离子，或有机化合物，如苯酚、如 P—羟基肉桂酸或 2,4—二氯苯酚。其它可用于本发明目的的苯酚类化合物的实例是在 M. Kato 和 S. Shimizu, Plant Cell Physiol. 26(7), 1985, pp. 1291—1301(尤其参阅表 1)或 B. C. Saunders 等人，上面所引用的文献 P. 141 中所提出的那些。要加入的可氧化的基质的量，适宜的是在约 1μm～1mM 之间。

在本发明方法中，过氧化酶一般可作为洗涤剂组合物的成分加入，其加入量为每升洗涤液的 0.01～100mg 酶。就这一点而论，它可以按非尘状颗粒、液态，特别是一种稳定的液态或一种被护酶形式包含在洗涤剂组合物，非尘状颗粒可以，例如按在 US 4106991 和 4661452(两者都属 Novo Industri A/S)中所公开的进行生产，并可用现有技术的已知方法进行任意地涂层。根据已有的方法，通过加入多元醇，如丙二醇、糖或糖醇、乳酸或硼酸而稳定液体酶制剂。其它酶稳定剂在现有技术中是已知的。按照在 EP 238216 中公开的方法可以制备被护酶。洗涤组合物也可以包括一种或多种用于过氧化酶的基质。通常，本发明的洗涤组合物溶液的 pH 优选的是约 7～12，特别是约 7.5～9.5。洗涤

的 pH 取决于所选择的过氧化酶，如在洗涤中使用鬼伞菌过氧化酶，pH 应低于 9.5。

洗涤剂添加剂

本发明组合物能含有常规量的这种洗涤剂组合物的通用成分。因此，可以有有机表同活性剂、阴离子的、非离子的、两性的或两性离子的或者通常较少使用的阳离子及其混合物。适宜的表面活性剂在现有技术中熟知的并在美国专利 No 3717630 和在美国专利申请序号 No 589116 中给出了这些化合物的详尽的表。

用于本发明的洗涤组合物含有约 1～95%、优选的是 5～40%的非离子的、阴离子的、两性离子的或其混合物。洗涤剂的助剂，不管是无机的或有机的，磷酸盐的或不是的，水溶性的或不溶的和其它水溶性盐都可以用。适宜助剂的描述公开于美国专利 No 3936537 和美国专利申请序号 589116 中。洗涤剂助剂的存在量为 0～50%，优选的为 5～40%。

用于洗涤剂组合物的其它成分也可以用，如增泡剂或消泡剂、酶和稳定剂或活化剂、污物悬浮剂、污物释放剂、萤光增白剂、磨料、杀菌剂、晦暗抑制剂、着色剂和香料。

这些成分，特别是酶、萤光增白剂、着色剂和香料应当优选地这样选择以便使它们和组合物的漂白成分相容。

按照本发明的洗涤剂组合物可以呈液状，膏状或颗泣状。酶可以配制成任何的常规形式，如粉末或液体。在液态中，通过加入酶稳定剂来稳定酶。液体液涤剂还可以包括稳定的过氧化氢母体。根据本发明的颗粒状组合物，也可以是"紧密的形式"的，即它们可以有比常规颗粒状洗涤剂更高的密度，即 550～950g/l，在这种情况下，按照本发明的颗粒洗涤剂组合物与一般颗粒

洗涤剂比较含有较少量的"无机填料盐"。通常的填料盐是硫酸或盐酸的碱土金属盐，典型的是硫酸钠，"紧密的"洗涤剂通常包括不大于10%的填料盐。

本发明也涉及一种抑制染料转移的方法，该转移是将在织物洗涤操作，包括着色织物过程中所遇到的可溶的和悬浮的染料由一个织物转移到另一个织物。

该方法包括将织物与按前面所述的洗涤溶液相接触。

本发明的方法在洗涤过程中是易于实施的。洗涤过程优选地是在5℃～75℃下，特别是在20℃～60℃下进行。处理溶液的pH优选的是7～12，特别是7～9.5。

本发明的方法和组合物也能在洗涤工序期间用作添加剂。

下在的实施例说明本发明，并由此得到意想不到的优质色泽的维护效益。

实施例 I

权利要求1的纤维素酶性能参数的临界状态

进行了下列试验：

试验条件：

洗涤温度：60℃（加热循环）

洗涤时间：40分

pH＝7.5

水持硬度：4毫摩/升

洗涤剂浓度：1%

洗涤剂组合物：参阅EPA 350098实施例1

纤维素酶：

1）由Novo Nordisk提供的Celluzyme ^{R}＝对照

2）43KD葡聚糖内酶＝按本发明的纤维素酶

试验结果：

	由纤维素酶去除C14—CMC的%
无纤维素酶的洗涤剂(=对照)	0
洗涤剂+Celluzyme ^{R}	
1.5mg 蛋白质/L(150×10^{-6}%)	12.7
3.0mg 蛋白质/L(300×10^{-6}%)	17.7
4.5mg 蛋白质/L(450×10^{-6}%)	21.5
洗涤剂+43kD 葡聚糖内酶	
0.3mg 蛋白质/L(30×10^{-6}%)	20.3

结果讨论：

上述试验数据清楚地表明本发明纤维素酶所要求的参数临界状态优于商购的 Celluzyme。

实施例 II

制备两组，每组四个类型的洗涤剂组合物，全部都基于紧密颗粒。

这种紧密颗粒洗涤剂组合物一般含有下列成分：

链状烷基苯磺酸盐(LAS)	11%
烷基硫酸盐	5%
非离子的	6%
柠檬酸三钠	15%
沸石	32%
柠檬酸	6%
聚合物	4%
螯合物	0.2%
硫酸钠	5%

硅酸钠	2%
过硼酸盐	0.5%
苯酚磺酸盐	0.1%

上述洗涤剂组合物按下面所指出的进行添加：

第一组：用 43kD 葡聚糖内酶

A)无 43kD 葡聚糖内酶和过氧化酶＝对照

B)有 43kD 葡聚糖内酶

C)有过氧化酶

D)有 43kD 葡聚糖内酶和过氧化酶

第二组：用 Celluzyme ^{R}

A)无 Celluzyme ^{R}和过氧化酶

B)有 Celluzyme ^{R}

C)有过氧化酶

D)有 Celluzyme ^{R}和过氧化酶

每一组洗涤剂组合物的第一种类型均不含任何纤维素酶和过氧化酶(对照组合物：A)

在第一组洗涤剂组合物中，加入的 43kD 葡聚糖内酶的量是 2mg 酶蛋白/升洗涤液(55cevu/升)。

在第二组洗涤剂组合物中，加入的 Celluzyme ^{R}量是 76mg 酶蛋白/升洗涤液(55cevu/升)。

试验条件：

在 Miele 洗涤机中试验

棉织物、低水量(18l)、短循环

4 循环

40℃温度

洗涤物组成：

1)1kg 清洁物：

150g 棉织物(毛圈织物)

150g 针织棉(内衣)

200g 机织棉

300g 涤棉织物

200g 纯涤织物

2)用于白度评级：3 件白的、脏的、样品(每件重复 4 次)

3)在尼龙织物上有 10×5cm 的酸性红 151 染料：以产生一种低的染料转移量。

4)制备的污迹，以提供典型的洗涤污迹源

硬水(15 克/加仑)

洗涤剂浓度＝0.6%

试验步骤：

试验的设计是要在要试验的组合物和对照组合物之间，比较累计洗涤 4 次的纺织样品的白度。对该试验使用了三块沾污的样品，对一个样品的每次处理都重复四次。将要测试的样品展开在一平的、中等色泽级的、与光源平行的表面上。使用荧光灯作为光源：27Philips"冷"色 TL 40/57，产生 1080 瓦光，该光设计为与真正的日光(D65)相等。颜色 T°是 7400°K，色泽反射是优良的(94)，光输出是 46LM/W。

在记录板单元(PSU)记录差别，正的表示优于对照处理的实施。

等级范围(PSU 等级)

0＝相当

1＝我认为这种好些

2=我认为这种略微好些

3=这种很好

4=这种全面很好

PSU 等级数据是统计复算的，取 4 次重复的平均值，在表 I 和 II 提到 LSD(最小值公差)。

表 I：

试验结果：过氧化酶/Celluzyme ®

	B vs. A	C vs. A	D vs. A	LSD
2 循环 AV	0.28	1.67s	1.80s	0.61
3 循环 AV	0.22	2.02s	2.26s	0.50
4 循环 AV	0.68	2.48s	2.66s	0.76

表 II：

试验结果：过氧化酶/43kD 葡聚糖内酶

	B vs. A	C vs. A	D vs. A	LSD
2 循环 AV	−0.10	1.38s	1.97s	0.40
3 循环 AV	−0.30	2.25s	2.51s	0.46
4 循环 AV	0.07	2.44s	2.97s	0.29

结论：

上面的结果清楚地表明与两种成分单独作用的总和相比，本发明的过氧化酶/43kD 组合得到了统计上值得注意地更好的性能。

实施例III至VIII

制备如下组合物。

a)紧密的颗粒状洗涤剂：实施例II至IV

实施例	III	IV
链状烷基苯磺酸盐	11.4	10.70
牛脂烷基硫酸盐	1.80	2.40
C_{45}烷基硫酸盐	3.00	3.10
7次乙氧基化的C_{45}醇	4.00	4.00
11次乙氧基化的牛脂醇	1.80	1.80
分散剂	0.07	0.1
硅氧烷流体	0.80	0.80
柠檬酸三钠	14.00	15.00
柠檬酸	3.00	2.50
沸石	32.50	32.10
马来酸丙烯酸共聚体	5.00	5.00
DETMPA	1.00	0.20
纤维素酶 43kD 葡聚糖内酶	0.03	0.025
碱酶(Alkalase)	0.60	0.60
脂肪酶	0.36	0.40
淀粉酶	0.30	0.30
硅酸钠	2.00	2.50
硫酸钠	3.50	5.20
PVP	0.30	0.50
过硼酸盐	0.5	1
苯酚磺酸盐	0.1	0.2
过氧化酶	0.1	0.1

次要成分	至 100

b)普通的颗粒状洗涤剂：实施例Ⅴ和Ⅵ：

实施例	Ⅴ	Ⅵ
链状 C_{12}烷基磺酸钠	6.5	8.0
硫酸钠	15.0	18.0
沸石 A	26.0	22.0
次氮基三乙酸钠	5.0	5.0
纤维素酶 43kD 葡聚糖内酶	0.02	0.03
PVP	0.5	0.7
TAED	3.0	3.0
硼酸	4.0	—
过硼酸盐	0.5	1
苯酚磺酸盐	0.1	0.2
过氧化酶	0.1	0.2
次要成分	至 100	

c)液体洗涤剂：实施例Ⅶ和Ⅷ

实施例	Ⅶ	Ⅷ
C_{12}—C_{14} 链烯基琥珀酸	3.0	8.0
柠檬酸一水合物	10.0	15.0
C_{12}—C_{15}烷基硫酸钠	8.0	8.0
2 次乙氧基化的 C_{12-15}醇的硫酸钠	—	3.0
7 次乙氧基化的 C_{12-15}醇	—	8.0
5 次乙氧基化的 C_{12-15}醇	8.0	—
二亚乙基三胺五(亚甲基膦酸)	0.2	—

油酸	1.8	—
乙醇	4.0	4.0
丙二醇	2.0	2.0
蛋白酶	0.2	0.2
纤维素酶 43kD 葡聚糖内酶	0.2	0.05
PVP	1.0	2.0
消泡剂	0.15	0.15
NaOH		至 pH 7.5
过硼酸盐	0.5	1
苯酚磺酸盐	0.1	0.2
过氧化酶	0.4	0.1
水和次要成分		至 100 份

顺序说明顺序 ID NO:1:

```
GGATCCAAG ATG CGT TCC TCC CCC CTC CTC CCG TCC GCC GTT GTG GCC          48
          Met Arg Ser Ser Pro Leu Leu Pro Ser Ala Val Val Ala
          -21 -20                 -15                 -10

GCC CTG CCG GTG TTG GCC CTT GCC GCT GAT GGC AGG TCC ACC CGC TAC        96
Ala Leu Pro Val Leu Ala Leu Ala Ala Asp Gly Arg Ser Thr Arg Tyr
             -5                  1               5

TGG GAC TGC TGC AAG CCT TCG TGC GGC TGG GCC AAG AAG GCT CCC GTG        144
Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys Gly Trp Ala Lys Lys Ala Pro Val
     10                  15                  20

AAC CAG CCT GTC TTT TCC TGC AAC GCC AAC TTC CAG CGT ATC ACG GAC        192
Asn Gln Pro Val Phe Ser Cys Asn Ala Asn Phe Gln Arg Ile Thr Asp
 25                  30                  35                  40

TTC GAC GCC AAG TCC GGC TGC GAG CCG GGC GGT GTC GCC TAC TCG TGC        240
Phe Asp Ala Lys Ser Gly Cys Glu Pro Gly Gly Val Ala Tyr Ser Cys
                 45                  50                  55

GCC GAC CAG ACC CCA TGG GCT GTG AAC GAC GAC TTC GCG CTC GGT TTT        288
Ala Asp Gln Thr Pro Trp Ala Val Asn Asp Asp Phe Ala Leu Gly Phe
             60                  65                  70

GCT GCC ACC TCT ATT GCC GGC AGC AAT GAG GCG GGC TGG TGC TGC GCC        336
Ala Ala Thr Ser Ile Ala Gly Ser Asn Glu Ala Gly Trp Cys Cys Ala
         75                  80                  85

TGC TAC GAG CTC ACC TTC ACA TCC GGT CCT GTT GCT GGC AAG AAG ATG        384
Cys Tyr Glu Leu Thr Phe Thr Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Lys Met
     90                  95                  100

GTC GTC CAG TCC ACC AGC ACT GGC GGT GAT CTT GGC AGC AAC CAC TTC        432
Val Val Gln Ser Thr Ser Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Asn His Phe
105                 110                 115                 120

GAT CTC AAC ATC CCC GGC GGC GGC GTC GGC ATC TTC GAC GGA TGC ACT        480
Asp Leu Asn Ile Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asp Gly Cys Thr
                125                 130                 135
```

```
CCC CAG TTC GGC GGT CTG CCC GGC CAG CGC TAC GGC GGC ATC TCG TCC      528
Pro Gln Phe Gly Gly Leu Pro Gly Gln Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser
            140                 145                 150

CGC AAC GAG TGC GAT CGG TTC CCC GAC GCC CTC AAG CCC GGC TGC TAC      576
Arg Asn Glu Cys Asp Arg Phe Pro Asp Ala Leu Lys Pro Gly Cys Tyr
        155                 160                 165

TGG CGC TTC GAC TGG TTC AAG AAC GCC GAC AAT CCG AGC TTC AGC TTC      624
Trp Arg Phe Asp Trp Phe Lys Asn Ala Asp Asn Pro Ser Phe Ser Phe
    170                 175                 180

CGT CAG GTC CAG TGC CCA GCC GAG CTC GTC GCT CGC ACC GGA TGC CGC      672
Arg Gln Val Gln Cys Pro Ala Glu Leu Val Ala Arg Thr Gly Cys Arg
185                 190                 195                 200

CGC AAC GAC GAC GGC AAC TTC CCT GCC GTC CAG ATC CCC TCC AGC AGC      720
Arg Asn Asp Asp Gly Asn Phe Pro Ala Val Gln Ile Pro Ser Ser Ser
                205                 210                 215

ACC AGC TCT CCG GTC AAC CAG CCT ACC AGC ACC AGC ACC ACG TCC ACC      768
Thr Ser Ser Pro Val Asn Gln Pro Thr Ser Thr Ser Thr Thr Ser Thr
            220                 225                 230

TCC ACC ACC TCG AGC CCG CCA GTC CAG CCT ACG ACT CCC AGC GGC TGC      816
Ser Thr Thr Ser Ser Pro Pro Val Gln Pro Thr Thr Pro Ser Gly Cys
        235                 240                 245

ACT GCT GAG AGG TGG GCT CAG TGC GGC GGC AAT GGC TGG AGC GGC TGC      864
Thr Ala Glu Arg Trp Ala Gln Cys Gly Gly Asn Gly Trp Ser Gly Cys
    250                 255                 260

ACC ACC TGC GTC GCT GGC AGC ACT TGC ACG AAG ATT AAT GAC TGG TAC      912
Thr Thr Cys Val Ala Gly Ser Thr Cys Thr Lys Ile Asn Asp Trp Tyr
265                 270                 275                 280

CAT CAG TGC CTG TAGACGCAGG GCAGCTTGAG GGCCTTACTG GTGGCCGCAA          964
His Gln Cys Leu
                285

CGAAATGACA CTCCCAATCA CTGTATTAGT TCTTGTACAT AATTTCGTCA TCCCTCCAGG   1024

GATTGTCACA TAAATGCAAT GAGGAACAAT GAGTAC                             1060
```

顺序说明顺序 ID NO:2:

```
Met Arg Ser Ser Pro Leu Leu Pro Ser Ala Val Val Ala Ala Leu Pro
-21 -20                 -15                 -10

Val Leu Ala Leu Ala Ala Asp Gly Arg Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys
 -5                   1                   5                  10

Cys Lys Pro Ser Cys Gly Trp Ala Lys Lys Ala Pro Val Asn Gln Pro
                15                  20                  25

Val Phe Ser Cys Asn Ala Asn Phe Gln Arg Ile Thr Asp Phe Asp Ala
            30                  35                  40

Lys Ser Gly Cys Glu Pro Gly Gly Val Ala Tyr Ser Cys Ala Asp Gln
        45                  50                  55

Thr Pro Trp Ala Val Asn Asp Asp Phe Ala Leu Gly Phe Ala Ala Thr
    60                  65                  70                  75

Ser Ile Ala Gly Ser Asn Glu Ala Gly Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Glu
                80                  85                  90

Leu Thr Phe Thr Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Lys Met Val Val Gln
            95                  100                 105

Ser Thr Ser Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Asn His Phe Asp Leu Asn
        110                 115                 120

Ile Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asp Gly Cys Thr Pro Gln Phe
    125                 130                 135

Gly Gly Leu Pro Gly Gln Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Arg Asn Glu
140                 145                 150                 155

Cys Asp Arg Phe Pro Asp Ala Leu Lys Pro Gly Cys Tyr Trp Arg Phe
                160                 165                 170

Asp Trp Phe Lys Asn Ala Asp Asn Pro Ser Phe Ser Phe Arg Gln Val
            175                 180                 185

Gln Cys Pro Ala Glu Leu Val Ala Arg Thr Gly Cys Arg Arg Asn Asp
        190                 195                 200

Asp Gly Asn Phe Pro Ala Val Gln Ile Pro Ser Ser Ser Thr Ser Ser
    205                 210                 215
```

```
Pro Val Asn Gln Pro Thr Ser Thr Ser Thr Thr Ser Thr Ser Thr Thr
220                 225                 230                 235

Ser Ser Pro Pro Val Gln Pro Thr Thr Pro Ser Gly Cys Thr Ala Glu
                240                 245                 250

Arg Trp Ala Gln Cys Gly Gly Asn Gly Trp Ser Gly Cys Thr Thr Cys
            255                 260                 265

Val Ala Gly Ser Thr Cys Thr Lys Ile Asn Asp Trp Tyr His Gln Cys
        270                 275                 280

Leu
```

顺序说明顺序 ID NO:3:

```
GAATTCGCGG CCGCTCATTC ACTTCATTCA TTCTTTAGAA TTACATACAC TCTCTTTCAA      60

AACAGTCACT CTTTAAACAA AACAACTTTT GCAACA ATG CGA TCT TAC ACT CTT       114
                                        Met Arg Ser Tyr Thr Leu
                                          1               5

CTC GCC CTG GCC GGC CCT CTC GCC GTG AGT GCT GCT TCT GGA AGC GGT       162
Leu Ala Leu Ala Gly Pro Leu Ala Val Ser Ala Ala Ser Gly Ser Gly
            10                  15                  20

CAC TCT ACT CGA TAC TGG GAT TGC TGC AAG CCT TCT TGC TCT TGG AGC       210
His Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys Ser Trp Ser
        25                  30                  35

GGA AAG GCT GCT GTC AAC GCC CCT GCT TTA ACT TGT GAT AAG AAC GAC       258
Gly Lys Ala Ala Val Asn Ala Pro Ala Leu Thr Cys Asp Lys Asn Asp
    40                  45                  50

AAC CCC ATT TCC AAC ACC AAT GCT GTC AAC GGT TGT GAG GGT GGT GGT       306
Asn Pro Ile Ser Asn Thr Asn Ala Val Asn Gly Cys Glu Gly Gly Gly
55                  60                  65                  70

TCT GCT TAT GCT TGC ACC AAC TAC TCT CCC TGG GCT GTC AAC GAT GAG       354
Ser Ala Tyr Ala Cys Thr Asn Tyr Ser Pro Trp Ala Val Asn Asp Glu
                75                  80                  85

CTT GCC TAC GGT TTC GCT GCT ACC AAG ATC TCC GGT GGC TCC GAG GCC       402
Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala Thr Lys Ile Ser Gly Gly Ser Glu Ala
            90                  95                  100
```

```
AGC TGG TGC TGT GCT TGC TAT GCT TTG ACC TTC ACC ACT GGC CCC GTC      450
Ser Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Ala Leu Thr Phe Thr Thr Gly Pro Val
        105                 110                 115

AAG GGC AAG AAG ATG ATC GTC CAG TCC ACC AAC ACT GGA GGT GAT CTC      498
Lys Gly Lys Lys Met Ile Val Gln Ser Thr Asn Thr Gly Gly Asp Leu
    120                 125                 130

GGC GAC AAC CAC TTC GAT CTC ATG ATG CCC GGC GGT GGT GTC GGT ATC      546
Gly Asp Asn His Phe Asp Leu Met Met Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile
135                 140                 145                 150

TTC GAC GGC TGC ACC TCT GAG TTC GGC AAG GCT CTC GGC GGT GCC CAG      594
Phe Asp Gly Cys Thr Ser Glu Phe Gly Lys Ala Leu Gly Gly Ala Gln
                155                 160                 165

TAC GGC GGT ATC TCC TCC CGA AGC GAA TGT GAT AGC TAC CCC GAG CTT      642
Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Arg Ser Glu Cys Asp Ser Tyr Pro Glu Leu
            170                 175                 180

CTC AAG GAC GGT TGC CAC TGG CGA TTC GAC TGG TTC GAG AAC GCC GAC      690
Leu Lys Asp Gly Cys His Trp Arg Phe Asp Trp Phe Glu Asn Ala Asp
        185                 190                 195

AAC CCT GAC TTC ACC TTT GAG CAG GTT CAG TGC CCC AAG GCT CTC CTC      738
Asn Pro Asp Phe Thr Phe Glu Gln Val Gln Cys Pro Lys Ala Leu Leu
    200                 205                 210

GAC ATC AGT GGA TGC AAG CGT GAT GAC GAC TCC AGC TTC CCT GCC TTC      786
Asp Ile Ser Gly Cys Lys Arg Asp Asp Asp Ser Ser Phe Pro Ala Phe
215                 220                 225                 230

AAG GTT GAT ACC TCG GCC AGC AAG CCC CAG CCC TCC AGC TCC GCT AAG      834
Lys Val Asp Thr Ser Ala Ser Lys Pro Gln Pro Ser Ser Ser Ala Lys
                235                 240                 245

AAG ACC ACC TCC GCT GCT GCT GCC GCT CAG CCC CAG AAG ACC AAG GAT      882
Lys Thr Thr Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gln Pro Gln Lys Thr Lys Asp
            250                 255                 260

TCC GCT CCT GTT GTC CAG AAG TCC TCC ACC AAG CCT GCC GCT CAG CCC      930
Ser Ala Pro Val Val Gln Lys Ser Ser Thr Lys Pro Ala Ala Gln Pro
        265                 270                 275

GAG CCT ACT AAG CCC GCC GAC AAG CCC CAG ACC GAC AAG CCT GTC GCC      978
Glu Pro Thr Lys Pro Ala Asp Lys Pro Gln Thr Asp Lys Pro Val Ala
    280                 285                 290

ACC AAG CCT GCT GCT ACC AAG CCC GTC CAA CCT GTC AAC AAG CCC AAG     1026
Thr Lys Pro Ala Ala Thr Lys Pro Val Gln Pro Val Asn Lys Pro Lys
295                 300                 305                 310

ACA ACC CAG AAG GTC CGT GGA ACC AAA ACC CGA GGA AGC TGC CCG GCC     1074
Thr Thr Gln Lys Val Arg Gly Thr Lys Thr Arg Gly Ser Cys Pro Ala
                315                 320                 325
```

```
AAG ACT GAC GCT ACC GCC AAG GCC TCC GTT GTC CCT GCT TAT TAC CAG      1122
Lys Thr Asp Ala Thr Ala Lys Ala Ser Val Val Pro Ala Tyr Tyr Gln
            330                 335                 340

TGT GGT GGT TCC AAG TCC GCT TAT CCC AAC GGC AAC CTC GCT TGC GCT      1170
Cys Gly Gly Ser Lys Ser Ala Tyr Pro Asn Gly Asn Leu Ala Cys Ala
        345                 350                 355

ACT GGA AGC AAG TGT GTC AAG CAG AAC GAG TAC TAC TCC CAG TGT GTC      1218
Thr Gly Ser Lys Cys Val Lys Gln Asn Glu Tyr Tyr Ser Gln Cys Val
    360                 365                 370

CCC AAC TAAATGGTAG ATCCATCGGT TGTGGAAGAG ACTATGCGTC TCAGAAGGGA      1274
Pro Asn
375

TCCTCTCATG AGCAGGCTTG TCATTGTATA GCATGGCATC CTGGACCAAG TGTTCGACCC   1334

TTGTTGTACA TAGTATATCT TCATTGTATA TATTTAGACA CATAGATAGC CTCTTGTCAG   1394

CGACAACTGG CTACAAAAGA CTTGGCAGGC TTGTTCAATA TTGACACAGT TTCCTCCATA   1454

AAAAAAAAAA AAAAAAAAA                                                1473
```

顺序说明顺序 ID NO:4:

```
Met Arg Ser Tyr Thr Leu Leu Ala Leu Ala Gly Pro Leu Ala Val Ser
 1               5                  10                  15

Ala Ala Ser Gly Ser Gly His Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys
            20                  25                  30

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

Thr Cys Asp Lys Asn Asp Asn Pro Ile Ser Asn Thr Asn Ala Val Asn
    50                  55                  60

Gly Cys Glu Gly Gly Gly Ser Ala Tyr Ala Cys Thr Asn Tyr Ser Pro
65                  70                  75                  80

Trp Ala Val Asn Asp Glu Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala Thr Lys Ile
                85                  90                  95

Ser Gly Gly Ser Glu Ala Ser Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Ala Leu Thr
            100                 105                 110

Phe Thr Thr Gly Pro Val Lys Gly Lys Lys Met Ile Val Gln Ser Thr
        115                 120                 125

Asn Thr Gly Gly Asp Leu Gly Asp Asn His Phe Asp Leu Met Met Pro
    130                 135                 140

Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asp Gly Cys Thr Ser Glu Phe Gly Lys
145                 150                 155                 160

Ala Leu Gly Gly Ala Gln Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Arg Ser Glu Cys
                165                 170                 175

Asp Ser Tyr Pro Glu Leu Leu Lys Asp Gly Cys His Trp Arg Phe Asp
            180                 185                 190

Trp Phe Glu Asn Ala Asp Asn Pro Asp Phe Thr Phe Glu Gln Val Gln
        195                 200                 205

Cys Pro Lys Ala Leu Leu Asp Ile Ser Gly Cys Lys Arg Asp Asp Asp
    210                 215                 220

Ser Ser Phe Pro Ala Phe Lys Val Asp Thr Ser Ala Ser Lys Pro Gln
225                 230                 235                 240
```

Pro Ser Ser Ser Ala Lys Lys Thr Thr Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gln
245 250 255

Pro Gln Lys Thr Lys Asp Ser Ala Pro Val Val Gln Lys Ser Ser Thr
260 265 270

Lys Pro Ala Ala Gln Pro Glu Pro Thr Lys Pro Ala Asp Lys Pro Gln
275 280 285

Thr Asp Lys Pro Val Ala Thr Lys Pro Ala Ala Thr Lys Pro Val Gln
290 295 300

Pro Val Asn Lys Pro Lys Thr Thr Gln Lys Val Arg Gly Thr Lys Thr
305 310 315 320

Arg Gly Ser Cys Pro Ala Lys Thr Asp Ala Thr Ala Lys Ala Ser Val
325 330 335

Val Pro Ala Tyr Tyr Gln Cys Gly Gly Ser Lys Ser Ala Tyr Pro Asn
340 345 350

Gly Asn Leu Ala Cys Ala Thr Gly Ser Lys Cys Val Lys Gln Asn Glu
355 360 365

Tyr Tyr Ser Gln Cys Val Pro Asn
370 375