[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
C11D 7/54

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 01101601.9

[45] 授权公告日 2004 年 12 月 1 日

[11] 授权公告号 CN 1177921C

[22] 申请日 1994.10.13 [21] 申请号 01101601.9
分案原申请号 94194467.0
[30] 优先权
[32] 1993.10.14 [33] US [31] 136626
[32] 1994. 5. 2 [33] US [31] 237938
[71] 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 M·E·布尔恩斯 C·K·格霍什
D·N·迪基乌利奥 E·E·盖蒂
A·D·威尔利
R·T·哈特什欧尔恩
P·F·布洛德三世
B·L·巴尔奈特 D·N·卢宾赫
审查员 刘俊香
[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 谭明胜

权利要求书 8 页 说明书 89 页 附图 14 页

[54] 发明名称 含有蛋白酶的漂白组合物

[57] 摘要

本发明提供一种含有蛋白酶的漂白粉组合物，这种蛋白酶是一种含有天然界未发现过的氨基酸序列的羰基水解酶变体，它是通过用不同的氨基酸来置换许多前体羰基水解酶中的氨基酸残基而衍生出来的；这里所说的在前体羰基水解酶中被置换的许多氨基酸残基相应于位置＋76 结合一个或多个下列残基：＋99、＋101、＋103、＋104、＋107、＋123、＋27、＋105、＋109、＋126、＋128、＋135、＋156、＋166、＋195、＋197、＋204、＋206、＋210、＋216、＋217、＋218、＋222、＋260、＋265 和/或＋274。这里的数字编号位置相应于来自解淀粉芽孢杆菌(Bacillus amyloliquefaciens)中天然存在的枯草溶菌素中的位置或者相应于在其它羰基水解酶或枯草溶菌素(诸如迟缓芽孢杆菌(Bacillus lentus)枯草溶菌素)中等价的氨基酸残基；组合物中还含有一种漂白剂。

ISSN1008-4274

权　利　要　求　书

1.一种漂白组合物，它含有：

(a)　占洗涤组合物重量的 0.0001%至 10%的蛋白酶，所述蛋白酶是一种具有天然界未发现过的氨基酸序列的羰基水解酶的变体，是用不同的氨基酸在前体羰基水解酶中等价于解淀粉芽孢杆菌溶菌素的+76 的位置，以及一个或多个下列氨基酸残基的位置上置换许多氨基酸残基而衍生出来的；这些位置等价于解淀粉芽孢杆菌溶菌素中的＋99、＋101、＋103、＋104、＋107、＋123、＋27、＋105、＋109、＋126、＋128、＋135、＋156、＋166、＋195、＋197、＋204、＋206、＋210、＋216、＋217、＋218、＋222、＋260、＋265 和/或＋274；条件是：

1) 当所述羰基水解酶变体在等价于＋76 和＋195 的位置包括氨基酸残基的替换时，在一个或多个等价于选自下列的位置也发生氨基酸残基的替换：＋99、＋101、＋103、＋104、＋107、＋123、＋27、＋105、＋109、＋126、＋128、＋135、＋156、＋166、＋197、＋204、＋206、＋210、＋216、＋217、＋218、＋222、＋260、＋265 和/或＋274；

2) 当所述羰基水解酶变体在等价于＋76 和＋104 的位置包括氨基酸残基的替换时，在一个或多个等价于选自下列的位置也发生氨基酸残基的替换：＋99、＋101、＋103、＋107、＋123、＋27、＋105、＋109、+135、＋156、＋195、＋197、＋204、＋210、＋216、＋222、＋260、＋265 和/或＋274；

3) 当所述羰基水解酶变体在等价于＋76 和＋126 的位置包括氨基酸残基的替换时，在一个或多个等价于选自下列的位置也发生氨基酸残基的替换：＋99、＋101、＋103、＋107、＋123、＋27、＋105、＋109、＋135、＋156、＋195、＋197、＋204、＋210、＋216、＋222、＋260、＋265 和/或＋274；

4) 当所述羰基水解酶变体在等价于＋76 和＋128 的位置包括氨基酸残基的替换时，在一个或多个等价于选自下列的位置也发生氨基酸残基的替换：＋99、＋101、＋103、＋107、＋123、＋27、＋105、＋109、＋135、＋156、＋195、＋197、＋204、＋210、＋216、＋222、＋260、＋265 和/或＋274；

5) 当所述羰基水解酶变体在等价于+76 和+166 的位置包括氨基酸残基的替换时，在一个或多个等价于选自下列的位置也发生氨基酸残基的替换：+99、+101、+103、+107、+123、+27、+105、+109、+135、+156、+195、+197、+204、+210、+216、+222、+260、+265 和/或+274；

6) 当所述羰基水解酶变体在等价于位置+76 和+206 包括氨基酸残基的替换时，在一个或多个等价于选自下列的位置也发生氨基酸残基的替换：+99、+101、+103、+107、+123、+27、+105、+109、+135、+156、+195、+197、+204、+210、+216、+222、+260、+265 和/或+274；

7) 当所述羰基水解酶变体在等价于位置+76 和+217 包括氨基酸残基的替换时，在一个或多个等价于选自下列的位置也发生氨基酸残基的替换：+99、+101、+103、+107、+123、+27、+105、+109、+135、+156、+195、+197、+204、+210、+216、+222、+260、+265 和/或+274；

8) 当所述羰基水解酶变体在等价于位置+76 和+218 包括氨基酸残基的替换时，在一个或多个等价于选自下列的位置也发生氨基酸残基的替换：+99、+101、+103、+107、+123、+27、+105、+109、+135、+156、+195、+197、+204、+210、+216、+222、+260、+265 和/或+274；

其中蛋白酶的前体羰基水解酶是一种溶菌素，并且蛋白酶是一种溶菌素变种，它在等价于下列的位置上进行了一系列置换：

76/99, 76/101, 76/103, 76/107, 76/123, 76/99/101, 76/99/103, 76/99/104, 76/101/103, 76/101/104, 76/103/104, 76/104/107, 76/104/123, 76/107/123, 76/99/101/103, 76/99/101/104, 76/99/103/104, 76/101/103/104, 76/103/104/123, 76/104/107/123, 76/99/101/103/104, 76/99/103/104/123, 76/99/101/103/104/123, 76/103/104/126, 76/103/104/135, 76/103/104/197, 76/103/104/222, 76/103/104/260, 76/103/104/265, 76/103/104/126/265, 27/76/104/123/274, 27/76/104/109/123/274, 27/76/104/123/218/274, 27/76/104/123, 27/76/104/107/123, 27/76/104/109/123, 27/76/104/109/123/218/274, 27/76/104/123/197, 27/76/104/123/204, 27/76/104/123/206, 27/76/104/123/216, 27/76/104/123/218, 27/76/104/123/260, 27/76/104/123/195/197, 27/76/104/123/195/218, 27/76/104/123/197/218, 27/76/104/123/204/218, 27/76/104/123/206/218, 27/76/104/123/218/260, 27/76/104/123/195/197/218, 76/103/104/217, 76/103/104/156, 76/103/104/166, 76/103/104/105, 76/101/103/104, 76/103/104/128, 76/103/104/210, 76/103/104/107, 76/103/104/204, 76/103/104/156/166 和 76/103/104/128；

(b) 一种漂白剂，它或者是一种有机过氧酸，或者是一种漂白活化剂和一种能产生过氧化氢的过氧化物的结合物，后者能和活化剂反应并在由这种组合物形成的漂白溶液中就地形成一种有机过氧酸；和

(c) 一种或多种能与蛋白酶以及漂白剂配伍的洗涤剂组合物材料。

2.权利要求 1 的漂白组合物，其中的洗涤剂组合物材料选自表面活性剂、溶剂、缓冲剂、酶、污垢释出剂、除污土剂、分散剂、增白剂、抑泡剂、织物软化剂、泡沫促进剂、酶稳定剂、助剂、染料、香料以及它们的混合物。

3.权利要求 2 的漂白组合物，它被做成含有至少一种表面活性剂的用作织物洗涤组合物的形式。

4.权利要求 3 的漂白组合物，它含有至少 5%的表面活性剂，后者可选自烷基苯磺酸盐、伯烷基硫酸盐、仲烷基硫酸盐、烷基烷氧基硫酸盐、烷基烷氧基羧酸盐、烷基多糖苷和它们相应的硫酸化的多糖苷、α—磺化的脂肪酸酯、烷基和烷基酚烷氧化物、三甲胺乙内酯和磺化的三甲胺乙内酯、胺氧化物、N—甲基葡糖酰胺、非离子性的伯醇乙氧化物、

非离子性的伯醇混合的乙氧/丙氧化物以及它们的混合物。

5.权利要求 4 的漂白组合物，它进一步含有至少 5%的助剂，后者可选自沸石、聚羧酸盐、层状硅酸盐、磷酸盐以及它们的混合物。

6.权利要求 4 的漂白组合物，它被做成含有至少 30%表面活性剂的浓缩颗粒状织物洗涤组合物的形式。

7.权利要求 1 的漂白组合物，其中的洗涤组合物材料含有至少一种酶，它可选自纤维素酶、脂酶、淀粉酶、其他蛋白酶、过氧化物酶以及它们的混合物。

8.权利要求 1 的漂白组合物，它被做成含有至少一种溶剂和至少一种表面活性剂的用作液体织物洗涤组合物的形式。

9.权利要求 8 的漂白组合物，它含有水和至少 5%的表面活性剂。

10. 权利要求 1 的漂白组合物，其中的洗涤组合物材料含有至少一种织物软化剂。

11. 权利要求 1 的漂白组合物，其中的蛋白酶是选自下列的溶菌素的变种：

76/99, 76/101, 76/103, 76/107, 76/123, 76/99/101, 76/99/103, 76/99/104, 76/101/103, 76/101/104, 76/103/104, 76/104/107, 76/104/123, 76/107/123, 76/99/101/103, 76/99/101/104, 76/99/103/104, 76/101/103/104, 76/103/104/123, 76/104/107/123, 76/99/101/103/104, 76/99/103/104/123, 76/99/101/103/104/123, 76/103/104/128; 76/103/104/260; 76/103/104/265; 76/103/104/197; 76/103/104/105; 76/103/104/135; 76/103/104/126; 76/103/104/107; 76/103/104/210; 76/103/104/126/265; 和/或 76/103/104/222。

12. 一种织物洗涤组合物，它含有：

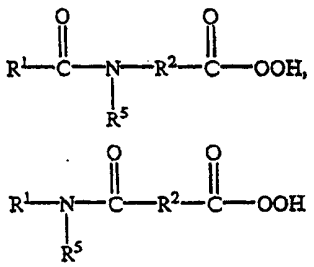
(a) 占织物洗涤组合物重量的 0.0001%至 10%的蛋白酶，它是一种含有天然界未发现过的氨基酸序列的羰基水解酶的变种，是由一种溶菌素前体羰基水解酶衍生而来的，并且其中蛋白酶是选自下列的溶菌素变种：

N76D/S99D; N76D/S101R; N76D/S103A; N76D/V104I; N76D/I107V; N76D/N123S; N76D/S99D/S101R; N76D/S99D/S103A; N76D/S99D/V104I; N76D/S101R/S103A; N76D/S101R/V104I; N76D/S103A/V104I; N76D/V104I/I107V; N76D/V104Y/I107V; N76D/V104I/N123S; N76D/I107V/N123S; N76D/S99D/S101R/S103A; N76D/S99D/S101R/V104I; N76D/S99D/S103A/V104I; N76D/S101R/S103A/V104I; N76D/S103A/V104I/N123S; N76D/V104I/I107V/N123S; N76D/S99D/S101R/S103A/V104I; N76D/S99D/S103A/V104I/N123S; N76D/S99D/S101R/S103A/V104I/N123S; N76D/S103A/V104I/S128G; N76D/S103A/V104I/T260P; N76D/S103A/V104I/S265N; N76D/S103A/V104I/D197E; N76D/S103A/V1041I/S105A; N76D/S103A/V104I/L135I; N76D/S103A/V1041I/L126F; N76D/S103A/V104T/L107T; N76D/S103A/V104I/L126F/S265N, 和 N76D/S103A/V104I/M222A

以及它们的混合物；和

(b) 0.5%至 20%的选自下列的漂白剂：

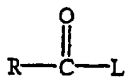
(i) 一种具有下式的有机过氧酸：



其中 R^1 是一个含有 1 至 14 个碳原子的烷基、芳基或烷芳基，R^2 是一个含有 1 至 14 个碳原子的亚烷基、亚芳基或亚烷芳基，R^5 是 H 或一个含有 1 至 10 个碳原子的烷基、芳基或烷芳基，和

(ii) 一种漂白活化剂和一种能产生过氧化氢的过氧化物的结合

物，后者能和活化剂反应并在由这种组合物形成的漂白溶液中就地形成一种有机过氧酸，其中所说的漂白活化剂具有下列通式：



其中 R 是一个含有 5 至 18 个碳原子的烷基，其中由羰基碳原子延伸并包括这羰基碳原子的最长的线型烷基链含有 6 至 10 个碳原子；L 是一个离去基团，它的共轭酸的 pKa 值在 4 至 13 的范围内；和

(c) 一种或多种能与蛋白酶以及漂白剂配伍的洗涤组合物材料，按组合物的重量计算，洗涤组合物材料含有至少 5%的表面活性剂和至少 5%的助剂。

13. 权利要求 12 的织物洗涤组合物，它进一步含有选自下列的洗涤组合物材料：溶剂、缓冲剂、酶、污垢释出剂、除污土剂、分散剂、增白剂、抑泡剂、织物软化剂、泡沫促进剂、酶稳定剂、染料、香料以及它们的混合物。

14. 权利要求 12 的织物洗涤组合物，它进一步含有至少一种酶，后者选自纤维素酶、脂酶、淀粉酶、其他蛋白酶、过氧化物酶以及它们的混合物。

15. 权利要求 12 的织物洗涤组合物，它被做成液体的、颗粒状的或条状的形式。

16. 权利要求 12 的织物洗涤组合物，其中的蛋白酶是一种溶菌素变种，选自：

N76D/S99D, N76D/104I, N76D/S99D/V104I, N76D/S103A/V104I, N76D/V104I/I107V, N76D/V104Y/I107V, N76D/S101R/S103A/V104I, N76D/S99D/S101R/S103A/V104I, N76D/S101R/V104I,

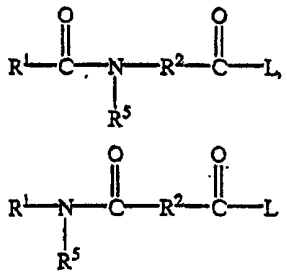
以及它们的混合物。

17. 权利要求 12 的织物洗涤组合物，其中的蛋白酶是选自 N76D/V104I、N76D/S103A/V104I 以及它们的混合物的一种杆菌溶菌素

变种。

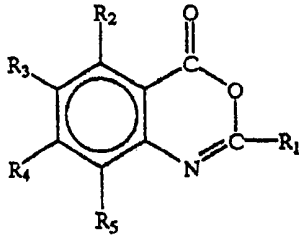
18. 权利要求 12 的织物洗涤组合物，它含有一种漂白剂，其中包含至少 0.1 重量%的能在水溶液中产生过氧化氢的过氧漂白化合物以及至少 0.1 重量%的一种或多种漂白活化剂，其中所说的漂白活化剂选自下列物质：

a)一种具有下列通式的漂白活化剂：



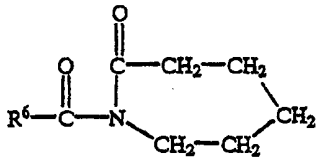
或它们的混合物，其中 R^1 是一个含有 1 至 14 个碳原子的烷基、芳基或烷芳基，R^2 是一个含有 1 至 14 个碳原子的亚烷基、亚芳基或亚烷芳基，R^5 是氢或一个含有 1 至 10 个碳原子的烷基、芳基或烷芳基，L 是一个离去基团，

b)一种具有下式的苯并噁嗪型漂白活化剂：



其中 R_1 是 H、烷基、烷芳基、芳基、芳烷基，并且其中 R_2、R_3、R_4 和 R_5 可以是相同或不同的取代基，选自 H、卤素、烷基、烯基、芳基、羟基、烷氧基、氨基、烷基氨基、$-COOR_6$，其中 R_6 是 H 或一个烷基，和羰基官能基，

c)一种具有下式的 N－酰基己内酰胺型漂白活化剂：



其中 R^6 是 H 或一个含有 1 至 12 个碳原子的烷基、芳基、烷氧基芳基或烷芳基，和

d) a)、b)和 c)的混合物。

19. 权利要求 12 的织物洗涤组合物，其中有机过氧酸漂白剂中相应的羧酸的亲水一亲油平衡值在 3 至 6.5 的范围内。

20. 权利要求 19 的织物洗涤组合物，其中每 100 克组合物中蛋白酶的毫克数对有机过酸理论上的可用 O_2 的 ppm 数的比率是在 1:1 至 20:1 的范围内。

21. 一种洗涤织物的方法，所说的方法包括把需要洗涤的织物与含权利要求 1 的组合物的洗涤溶液接触。

含有蛋白酶的漂白组合物

本申请是申请日为 1994 年 10 月 13 日，申请号为 94194467.0，发明名称为“含有蛋白酶的漂白组合物”的发明专利申请的分案申请。

本申请书是 1993 年 10 月 14 日提出的 U.S. Application Serial NO. 08/136,626 和 1994 年 5 月 2 日提出的 U.S. Application Serial NO. 08/237,938 的部分继续申请，该两项申请在此引入作为参考。

本发明涉及漂白组合物，特别是洗衣洗涤剂，以及使用一种或多种属于羧基水解酶变种的蛋白酶和由一种或多种漂白剂，特别是漂白活化剂组成的漂白体系的方法。

长期以来就已习惯于使用各种形式的酶于洗衣用的洗涤剂中，用来帮助从织物上除去某些污渍。这些污渍典型地是和脂类及蛋白质污垢结合在一起的。但是这些酶已经证明对其它类型的污垢和污渍没有什么效果。

长期以来也知道过氧化物漂白剂对于从织物上除去污渍和／或污垢是有效的，不过这类漂白剂的效果与温度有关。当洗衣液的温度在 60℃时，过氧化物漂白剂只是部分有效，当洗衣液温度低于 60℃时，过氧化物漂白剂就变成相对无效了。结果，已经进行了大量工业研究来发展有效的漂白体系。

通过本发明，已经发现把新的属于羧基水解酶变种的蛋白酶与漂白剂、特别是漂白活化剂结合起来，提供了有效地除去污渍和／或清洗脏物的益处。因此本发明的一个目的是提供一种漂白组合物，特别是洗衣洗涤剂组合物。它具有改进的除去污渍和／或清洗

脏物的益处和／或清洗织物的益处和／或改进的漂白性质。

由以下详尽的说明，本发明的这些目的和其它目的将变得很明显。

1987 年 1 月 6 日授予 Burns 等人的美国专利 4,634,551 中公开了酰胺基过氧酸漂白化合物和它们的前体，它被应用于本发明中。也可参看 1989 年 8 月 1 日授予 Burns 等人的美国专利 4,852,989。1991 年 12 月 3 日授予 Lagerwaard 等人的美国专利 5,069,809 中公开了结合使用 NOBS 漂白活化剂和脂酶 Lipolase 的方法。也可参看 1989 年 11 月 15 日颁发给 Lagerwaard 等人的欧洲专利 341,947，其中讨论了脂酶与一些漂白体系的配伍问题。1985 年 10 月 8 日授予 Sanderson 的美国专利 4,545,784 中公开了把活化剂吸附在过硼酸钠一水合物上的方法。

本发明在此提供漂白组合物，它含有:

（a）有效量的蛋白酶，它是一种含有天然界未发现过的氨基酸序列的羰基水解酶的变种，是通过用不同的氨基酸置换前体羰基水解酶的许多氨基酸残基而衍生出来的，其中所说的在前体酶中置换的氨基酸残基相应于位置 + 76 与一种或多种下列残基的组合: + 99、+ 101、+ 103、+ 104、+ 107、+ 123、+ 27、+ 105、+ 109、+ 126、+ 128、+ 135、+ 156、+ 166、+ 195、+ 197、+ 204、+ 206、+ 210、+ 216、+ 217、+ 218、+ 222、+ 260、+ 265 和／或 + 274，这些数字标明的位置相应于天然存在的由解淀粉芽孢杆菌（Bacillus Emyloliquefaciens）析离的枯草溶菌素中的位置，或者其它羰基水解酶或枯草溶菌素（诸如迟缓芽孢杆菌

（Bacillus fentus）的枯草溶菌素）中等价的氨基酸残基的位置;

（b）一种漂白剂，它或者是一种有机过氧酸，或者是一种漂白活化剂和一种过氧化物的结合物，后者产生能和活化剂反应的过氧化氢，并在由这种组合物形成的漂白溶液中就地形成一种有机过氧酸;

（c）一种或多种能与蛋白酶以及漂白剂配伍的洗涤剂组合物材料。

本发明也包括一种清洗织物的方法，它包括把所说的织物，最好是在搅拌条件下，与含有所说的漂白组合物的水溶液接触。这种方法可以在低于大约 60℃ 的温度下进行，不过当然在直到沸腾的洗衣温度下也是很有效的。这种洗衣水溶液最好是含有至少大约 300 ppm 的通常的洗涤剂组分，以及至少大约 25 ppm 的漂白活化剂和至少大约 25 ppm 的漂白化合物。最好是，所说的水溶液中含有大约 900 ppm 至大约 20,000 ppm的通常的洗涤剂组分以及大约 100 ppm 至大约 25,000 ppm 的所说的漂白化合物以及大约 100 ppm 至大约 2,500 ppm 所说的漂白活化剂。

在该方法中所用的通常的洗涤剂组分包含大约 1% 至大约 99.8%、最好是大约 5% 至大约 80% 的洗涤用表面活性剂。供选择地，洗涤组合物中也可含有大约 5%至大约 80%的一种洗涤助剂。其它可供选择的洗涤组分也包括本发明提供的完全配制好的洗涤／漂白组合物。

除非特别说明，所有的百分数、比率和比例都是按重量计算的。所有引证的文献在此引入作为参考。

附图简述

图 1 A～C 描绘的是解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素的 DNA 和氨

基酸序列以及这一基因的部分限制性基因图谱（Seq. ID No.6）。

图 2 描绘的是由解淀粉芽孢杆菌（BPN'）和迟缓芽孢杆菌（野生型）析离的枯草溶菌素中保存的氨基酸残基。

图 3A 和 3B 描绘的是四种枯草溶菌素的氨基酸序列。最上一行代表由解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素（有时也称为枯草溶菌素 BPN'）析离的枯草溶菌素（Seq. ID No.7）的氨基酸序列。第二行描绘由枯草杆菌析离的枯草溶菌素的氨基酸序列（Seq. ID No.8）。第三行描绘由地衣芽孢杆菌（B. Licheniformis）析离的氨基酸序列（Seq. ID No.9）。第四行描绘了由迟缓芽孢杆菌析离的枯草溶菌素的氨基酸序列（在 PCT WO 89/06276 中也被称为枯草溶菌素 309）（Seq. ID No.10）。符号 * 表明与枯草溶菌素 BPN' 比较不存在这一特定的氨基酸残基。

图 4 描绘了质粒 GGA 274 的构造。

图 5 描绘了 GGT 274 的构造，它是为可靠表达用于本申请的质粒的一个中间体。

图 6A 和图 6B 描绘了由迟缓芽孢杆菌析离的枯草溶菌素的 DNA 和氨基酸序列（Seq. ID No.11）。成熟的枯草溶菌素蛋白质是在相应于 Ala 的密码子 GCG（334 ~ 336）处开始通过密码子编码的。

图 7A 和 7B 描绘了本发明经优选的实施方案中的 DNA 和氨基酸序列（N 76D/S103A/V104I）（Seq. ID No.12）。这图中的 DNA 已用在位置 76 的天冬氨酸、在位置 103 的丙氨酸和在位置 104 的异亮氨酸编码时所描述的方法进行修饰。成熟的枯草溶菌素变种蛋白质是在相应于 Ala 的密码子 GCG（334 ~ 336）处开始通过密码子编码的。

图 8 描绘了载体 pBCDAICAT 的构造.

图 9 描绘了载体 pUCCATFNA 的构造.

发明详述

用于本发明的漂白组合物提供了有力的高效的织物清洗剂，它可从织物上除去污渍和／或污垢．漂白体系和蛋白酶相结合对于从织物上除去大多数类型的污垢、包括蛋白质和脂类污垢、脏物以及重污垢负载，尤其是来自亲核的和身体的污垢，是特别有效的.

下面将详尽描述这里使用的蛋白酶、漂白剂（包括过氧酸和漂白体系）以及清洗组合物材料，包括它们经优选的使用浓度.

（1）漂白剂

这里的漂白组合物含有一种漂白剂，它的含量最好是组合物的大约 0.5 至大约 20％（重量）．漂白剂可以是一种基本不溶的、最好是固体的有机过氧酸，也可以是一种由漂白活化剂和过氧漂白化合物组成的能够产生过氧化氢的漂白体系；或者二者的结合．存在于组合物中的过氧酸，或者通过活化剂和过氧化合物的结合而形成的过氧酸，其相应的羧酸最好具有大约 3 至大约 6.5 的亲水性亲油性平衡值（“H.L.B”）．这样，一种能用来鉴定可用于本发明中的经优选的过氧酸的方法，即“H.L.B标度”，如 Davies, J. T 在 Proc. 2nd Internat. Conqr. Surface Activity 1. 426, Butterworths, London（1957）中所描述的那样，在此引入作为参考．这样一种 H.L.B 标度（亲水性亲油性平衡值）已被用在表面活性剂的研究中，作为一种关连表面活性剂在亲水相（与水相似）和亲油相（与油相似）之间分布的方法．以这种方式，H.L.B 值可被用来指示在洗涤液中活性漂白物种的亲油（憎水）特性（即，过氧酸从洗涤液中分离出来并富集在污垢／织物界面的能力）.

在下面表 A 中陈列的是为一些选择出来的过氧酸计算的 H.L.B 值（是过氧酸对应的羧酸的值）。用来计算 H.L.B 值的方程式可表示为:

H.L.B. 值 = 亲水基团数的总和 - 憎水基团数的总和 + 7

亲水基团数的数值为［ - C(O)OH 和 - N(H)C(O) - = 2.1］，憎水基团数的数值为［脂肪 / 芳香碳 = 0.475，极性基团之间的脂肪碳为1/2，烃链上的脂肪碳的值取 (0.475)/2］。作为参照，＞7 的 H.L.B 值指示这种材料将优先溶于水中，而H.L.B. 值＜7 则表明增加的表面活性和憎水性。

表 A

各种过氧酸提供的 H.L.B. 值

活化剂 / 预先形成的过氧酸	缩 写	过 酸	相应羧酸的 H. L. B. 值
四乙酰基乙二胺	TAED	$CH_3C(O)OOH$	8.6
二过氧十二碳烷二羧酸	DPDDA	$HOO(O)C(CH_2)_{10}$--C(O)OOH	6.5
过氧丁二酸的壬基酰胺	NAPSA	$CH_3(CH_2)_8N(H)C(O)$--$(CH_2)_2C(O)OOH$	6.4
苯甲酰氧苯磺酸盐	BOBS	$C_6H_5C(O)OOH$	6.3
过氧已二酸的壬基酰胺	NAPAA	$CH_3(CH_2)_8N(H)C(O)$--$(CH_2)_4C(O)OOH$	6.0
壬酰氧苯磺酸盐	NOBS	$CH_3(CH_2)_7C(O)OOH$	5.3
癸酰氧苯磺酸盐	DOBS	$CH_3(CH_2)_8C(O)OOH$	4.8
过月桂酸	PLA	$CH_3(CH_2)_{10}C(O)OOH$	3.9

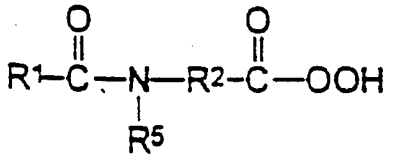
像前面已经提到那样，对应本发明过氧酸的经优选的 H.L.B 值的范围（指相应羧酸的值）（无论是直接加入的还是就地产生的）是在大约 3.0 至大约 6.5 的范围．在本发明中有用的过氧酸的更优选的 H.L.B. 值（无论是直接加入 还是就地产生）范围为大约 4.0 至 6.5（指相应的羧酸）．本发明的过氧酸最优选的 H.L.B. 值范围（指相应的羧酸）（无论是直接加入 还是就地产生）为大约 4.0 至 6.0.

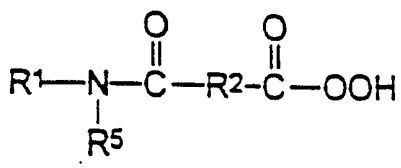
（a）过氧酸

本发明包括洗涤剂组合物，它含有有效量的蛋白酶以及一种漂白体系，后者含有至少大约 0.1%，优选地是大约 0.1% 至大约 50%（重量）的一种基本上不溶解的有机过氧酸．这里使用的过氧酸的含量为组合物的大约 0.5 至大约 20%、更优选是大约 1 至大约 10%，最优选是大约 2 至大约 7%（重量）。

优选的有机过氧酸可选自 4－壬胺基－4－氧代－过氧丁酸；6－（壬胺基）－6－氧代过氧已酸；1,12－二过氧十二碳烷二羧酸；庚基磺酰基过丙酸；癸基磺酰基过丙酸；庚基－、辛基－、壬基－、癸基－磺酰基过丁酸；以及它们的混合物.

在有机过氧酸中，酰胺基过氧酸（酰胺基取代的过氧羧酸）是优选的．适合于在此使用的酰胺基过氧酸包括 1987 年 1 月 6 日和 1987 年 8 月 11 日授予 Burns 等人的美国专利 4,634,551 和 4,686,063 中所描述的那些，二者在此引入作为参考。合适的酰胺基过氧酸具有下列结构式:





其中 R^1 是一个含有大约 1 至大约 14 个碳原子的烷基、芳基或烷基芳基（优选地是 R^1 是含有大约 6 至大约 12 个碳原子的烷基），R^2 是一个含有大约 1 至大约 14 个碳原子的亚烷基、亚芳基或亚烷基芳基（优选地是 R^2 是含有大约 1 至大约 6 个碳原子的亚烷基），R^5 是 H 或一个含有大约 1 至大约 10 个碳原子的烷基、芳基或烷基芳基（优选地 R^5 是 H）。更优选地是，R^1 是含有大约 8 至大约 10 个碳原子的烷基，R^2 是含有大约 2 至大约 4 个碳原子的亚烷基。

过氧富马酸盐在这里也是适用的，它已被描述于 1989 年 8 月 1 日授予 Burns 等人的美国专利 4,852,989 中，在此引入作为参考；还有各自在 1988 年 7 月 19 日、1989 年 4 月 25 日以及 1991 年 4 月 2 日都是授予 Dryoff 等人的美国专利 4,758,369、4,824,591 和 5,004,558 中描述的砜过氧酸（砜过氧羧酸），也都在此引入作为参考。

美国专利 4,686,063 的实例 1 中包含 NAPSA 合成的说明，在第 8 栏第 40 行至第 9 栏第 5 行；还有 NAPAA 的合成说明，在第 9 栏第 15 行至第 9 栏第 65 行。在酰胺基过氧酸合成的末尾，反应用水淬灭、过滤、用水洗以除去某些过量的硫酸（或者其它在制造过氧酸时用的强酸），并且再次过滤。

这样得到的酰胺基过氧酸湿滤饼可用 pH 值在大约 3.5 至 6 之间、优选地是大约 4 和 5 之间的磷酸缓冲溶液，按照 1990 年 3 月 20 日授予 Sadlowski 等人的美国专利 4,909,953 所述的方法处理，在此引入作为参考。

在把酰胺基过氧酸并入最终产物之前，还可往其中加入其它的供贮存稳定或控制放热的试剂。例如，硼酸，它是 1987 年 8 月 11

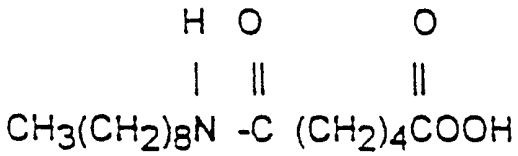
日授予 Burns 的美国专利 4,686,063 公开的一种控制放热剂并已在此引人，可以大约 2：1 的过酸：硼酸的比率与酰胺基过氧酸混合（过氧酸已经在磷酸缓冲液中洗过）．洗涤酰胺基过氧酸的磷酸缓冲液也可以和适量的吡啶二羧酸及焦磷酸四钠盐，一种螯合稳定系统进行混合．可供选择地是在与湿滤饼接触之前就把螯合剂包括在磷酸缓冲液中．

湿滤饼最好是由平均颗粒直径为大约 0.1 至大约 260 微米、优选地是大约 10 至大约 100 微米、最优选地是大约 30 至大约 60 微米的颗粒所组成．这里希望得到的是具有小颗粒大小的 NAPAA 结晶．可参看 1991 年 10 月 8 日授予 Getty 等人的美国专利 5,055,218，在此引人作为参考．

这里的 NAPAA 滤饼最好是在磷酸缓冲液中洗两次．已经发现经过两次相继的磷酸缓冲液洗涤的 NAPAA 具有最佳的稳定性．

具有理论 Avo（可获得的氧）值在大约 3 至大约 12 之间、更优选地是 5 至 7 之间的颗粒状（固体）有机过氧酸是优选的．

这里使用的最优选的过氧酸是 NAPAA．过氧己二酸的壬基酰胺（“NAPAA”）的另一个名称是 6－（壬氨基）－6－氧代过氧己酸．NAPAA 的化学式为：



NAPAA 的分子量为 287.4．

含有 NAPAA 的洗涤剂组合物和漂白组合物为纺织品提供了极为有力和有效的表面漂白作用．污渍和／或污垢被从纺织品上除去．这些组合物在由纺织品上除去脏物方面也是特别有效的．

NAPAA 的极性酰胺或取代的酰胺部分导致这样的过氧酸，它具有很低的蒸气压因而具有很低的气味和很优良的漂白性能。相信是酰胺基的极性导致了过氧酸的蒸气压降低和熔点增高。

NAPAA 可直接用作漂白剂。在用于洗涤衣物时，它具有降低了的蒸气压和良好的气味特性。

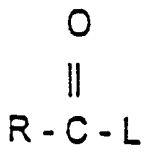
NAPAA 可通过，例如，先使 NAAA（己二酸的单壬基酰胺）、硫酸和过氧化氢进行反应。反应产物通过加入冰水淬灭后接着过滤、用蒸馏水洗涤，最后抽吸过滤以回收湿的滤饼。继续洗涤直到滤液的 pH值为中性为止。

NAPAA pH 值（10% 的固体在水中）在大约 4.2 至 4.8 之间也是优选的。令人惊奇的是这一 pH 值导致对热更为稳定的颗粒。

（b）漂白体系——漂白活化剂和过氧漂白化合物

（i）漂白活化剂

这里漂白体系中有用的漂白活化剂最好是具有以下结构:



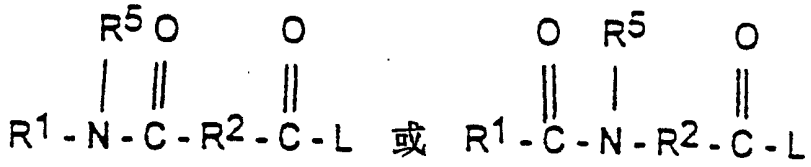
其中 R 是含有大约 5 至大约 18 个碳原子的烷基，其中由羰基碳原子延伸并包括这羰基碳原子的最长的线型烷基链含有大约 6 至大约 10 个碳原子，L 是离去基团，它的共轭酸具有的 pKa 值范围在大约 4 至大约 13 之间，优选地是大约 6 至大约 11 之间，最优选地是大约 8 至大约 11 之间.

L 基本上可以是任何一种合适的离去基团. 离去基团是任何一个这样的基团，它通过过氢氧负离子对漂白活化剂的亲核进攻而从漂白活化剂中被置换出来。这一过氢氧根水解反应导致过羧酸的形

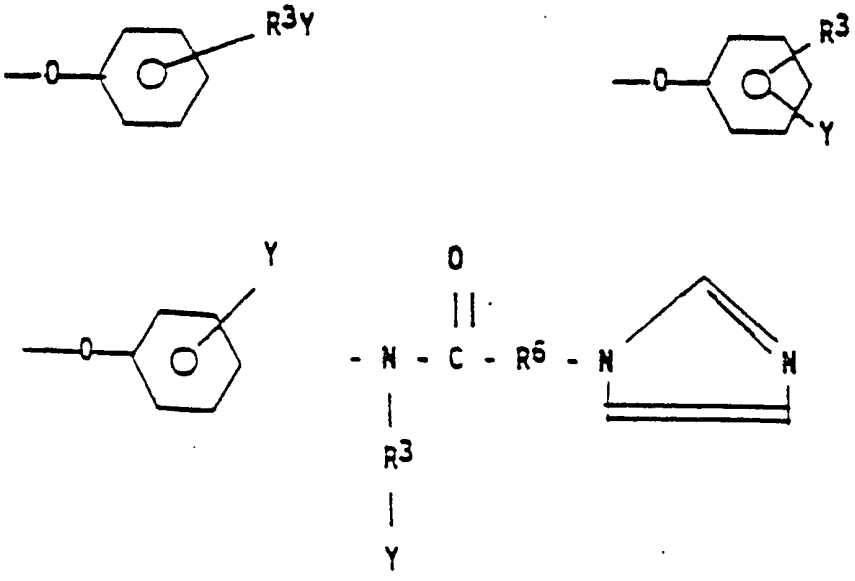
成。一般，对于是合适的离去基团的一个基团，它必须发挥一种吸电子的效应。这一效应有助于过氢氧负离子的亲核进攻。

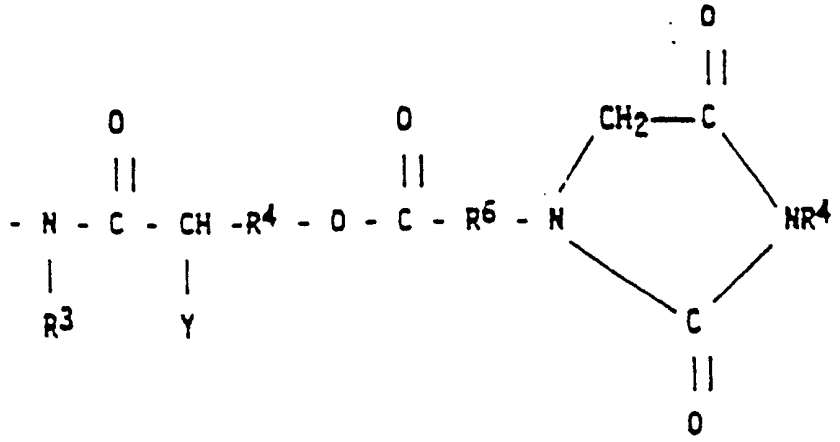
L 基团对于在最佳时间构架内（例如，一次洗涤循环）所发生的反应，必须是有充分反应活性的。但是，L 的反应性如果太强，则这种活化剂就难于使它稳定。这些特性一般地是和离去基团的共轭酸的 pKa 值平行的，虽然也已知有一些例外情形。

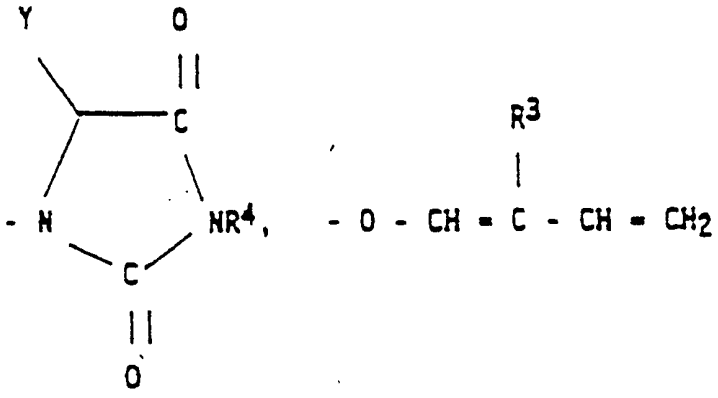
经优选的活化剂是那些具有下列通式的化合物:

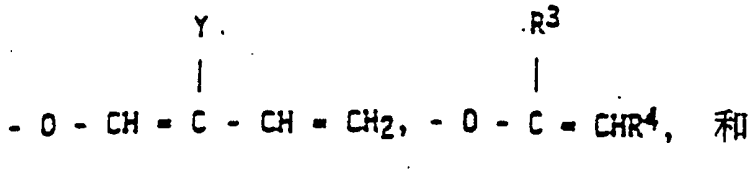


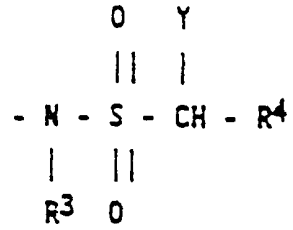
其中 R^1 是含有大约 6 至大约 12 个碳原子的烷基，R^2 是含有 1 至大约 6 个碳原子的亚烷基，R^5 是 H 或含有大约 1 至大约 10 个碳原子的烷基、芳基或烷基芳基，L 可选自下列基团:





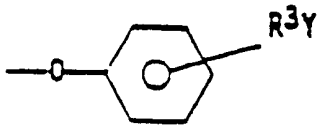






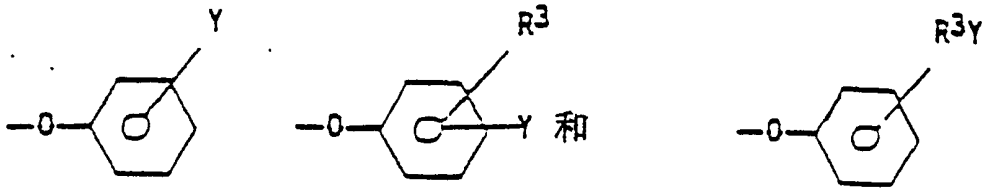
其中 R^6 是含有大约 1 至大约 14 个碳原子的亚烷基、亚芳基或亚烷基芳基，R^3 是含有大约 1 至大约 8 个碳原子的烷基链，R^4 是 H 或 R^3，Y 是 H 或一个加溶基．Y 最好是选自 $-SO_3^-M^+$、$-COO^-M^+$、$-SO_4^-M^+$、$(-N^+R'_3)X^-$ 和 $O\leftarrow N(R'_3)$，其中 R' 是含有大约 1 至大约 4 个碳原子的烷基链，M 是一个阳离子，它给漂白活化剂提供溶解性，X 是一个负离子，它也给漂白活化剂提供溶解性．最好是 M 是一种碱金属、铵或取代铵的阳离子，其中钠和钾是最优选的，X 是选自卤化物、氢氧根、甲基硫酸根和醋酸根等负离子．更优选的是，Y 是 $-SO_3^-M^+$ 和 $-COO^-M^+$．应该注

意，带有不含加溶基团的离去基团的漂白活化剂应被很好地分散于漂白溶液中以便协助它们的溶解。优选的是:



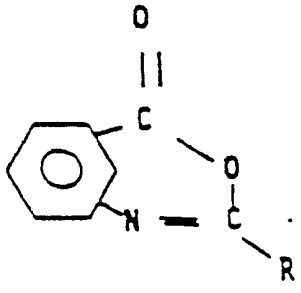
其中 R^3 的定义与前相同，Y 是 $-SO_3^-M^+$ 和 $-COO^-M^+$，其中 M 的定义与前相同。

特别优选的漂白活化剂是那些其中的 R^1 是含有大约 6 至大约 12 个碳原子的线型烷基链，R^2 是含有大约 2 至大约 6 个碳原子的线型亚烷基链，R^5 是 H，并且 L 是选自:



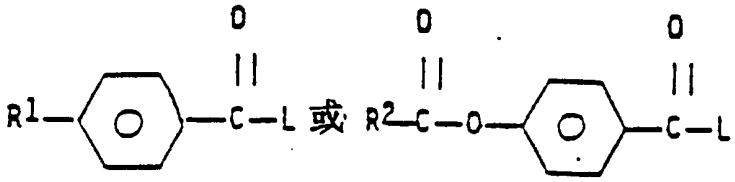
的化合物，其中 R^3 的定义与前相同，Y 是 $-SO_3^-M^+$ 或 $-COO^-M^+$，并且 M 的定义与前相同。

一种经优选的漂白活化剂是:



其中 R 是 H、烷基、芳基或烷基芳基。这化合物已在 Hodge 等人的美国专利 4,966,723 中被描述过，在此引入作为参考。

经优选的漂白活化剂是:

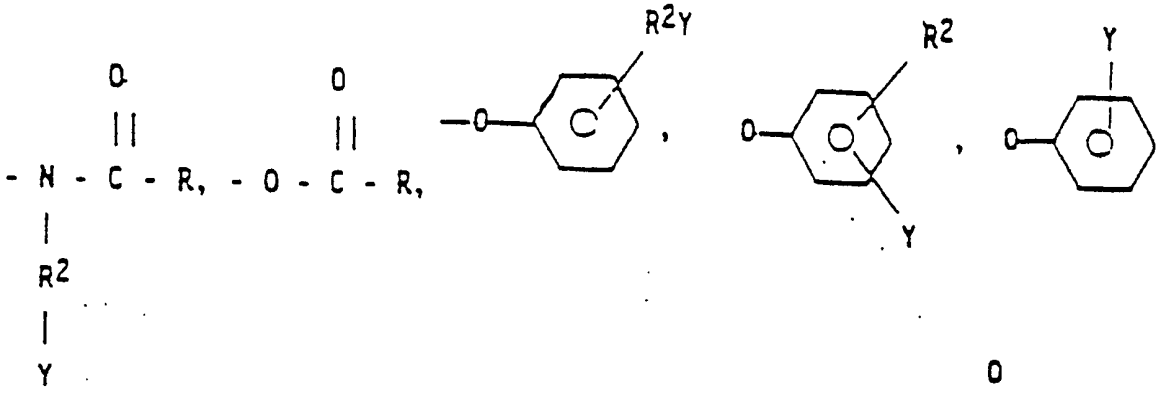


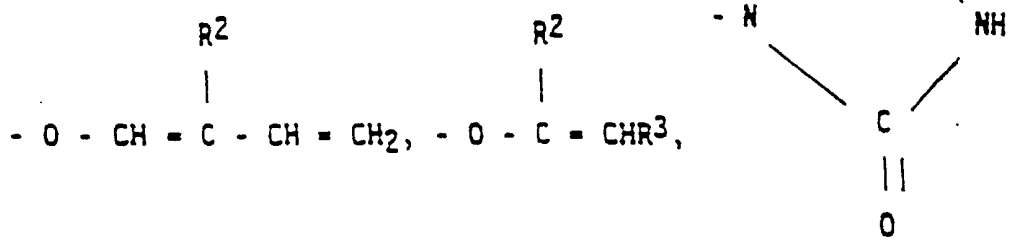
其中 R^1 是 H 或含有大约 1 至大约 6 个碳原子的烷基，R^2 是含有大约 1 至大约 6 个碳原子的烷基，L 的定义与前相同.

优选的漂白活化剂也可以是那些具有上述通式，其中 L 如通式中所定义的那样，R^1 是 H 或是一个含有大约 1 至大约 4 个碳原子的烷基.

具有上述通式，其中 L 如通式中所定义的那样，并且 R^1 是 H 的化合物是甚至更为优选的漂白活化剂.

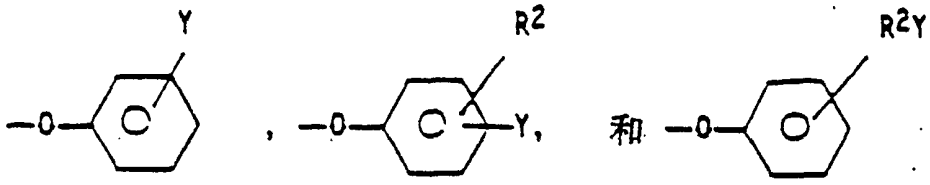
更优选的漂白活化剂是那些具有上述通式、其中 R 是一个含有大约 5 至大约 9 个碳原子的线型烷基链、最好是大约 6 至大约 8 个碳原子的线型烷基链，并且 L 是选自下列基团:





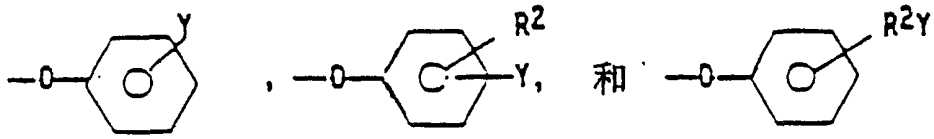
的化合物，其中 R、R^2、R^3 和 Y 的定义与前相同。

特别优选的漂白活化剂是那些具有上述通式、其中 R 是含有大约 5 至大约 12 个碳原子的烷基、其中由羰基的碳延伸并包括这羰基碳的烷基链的最长的线性部分含有大约 6 至大约 10 个碳原子，并且 L 是选自下列基团:



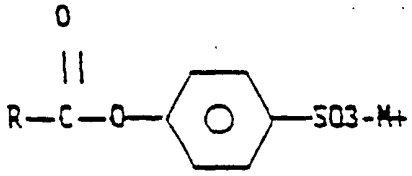
其中 R^2 是一个含有大约 1 至大约 8 个碳原子的烷基链，并且 Y 是 $-SO_3^-M^+$ 或 $-COO^-M^+$，其中 M 是一种碱金属、铵或取代的铵阳离子。

特别优选的漂白活化剂是那些具有上述通式、其中 R 是含有大约 5 至大约 9 个碳原子、最好是含有大约 6 至大约 8 个碳原子的线型烷基链，并且 L 是选自下列基团:



的化合物，其中 R^2 的定义与前相同并且 Y 是 $-SO_3^-M^+$ 或 $-COO^-M^+$，其中 M 的定义与前相同.

最优选的漂白活化剂具有通式:

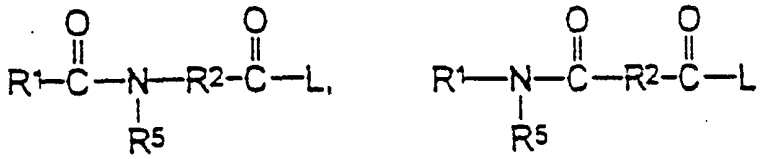


其中 R 是含有大约 5 至大约 9 个碳原子、最好是大约 6 至大约 8 个碳原子的线型烷基链，并且 M 是钠或钾。

最好是，这里的漂白活化剂是壬酰基氧苯磺酸钠（NOBS）或苯甲酰氧苯磺酸钠（BOBS）。

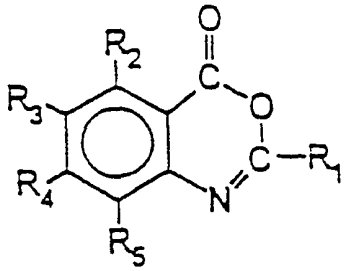
用于本发明的进一步特别优选的漂白组合物是下面的漂白活化剂，它用于具有天然橡胶部件的机器是特别安全的。相信这是由于这些酰胺基酸衍生的漂白活化剂的过氢氧根水解反应不会产生油状二酰基过氧化物（DAP）物种，而是形成不溶性的结晶状固体 DAP 物种的结果。这些固体相信不会形成涂渍的膜从而使天然橡胶部件不会长时间暴露于 DAP 的侵蚀中。这些经优选的漂白活化剂是选自下列成员:

a) 一种具有下列通式的漂白活化剂:



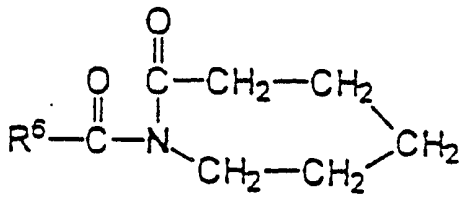
或它们的混合物，其中 R^1 是一个含有大约 1 至大约 14 个碳原子的烷基、芳基或烷基芳基，R^2 是一个含有大约 1 至大约 14 个碳原子的亚烷基、亚芳基或亚烷基芳基，R^5 是 H 或一个含有大约 1 至大约 10 个碳原子的烷基、芳基或烷基芳基，L 是一个离去基团;

b) 具有下列通式的苯并噁嗪型漂白活化剂:



其中 R_1 是 H、烷基、烷基芳基、芳基、芳基烷基，并且其中 R_2、R_3、R_4 和 R_5 可以是相同或不同的取代基，各自选自 H、卤素、烷基、烯基、芳基、羟基、烷氧基、氨基、烷基氨基、$COOR_6$（其中 R_6 是 H 或一个烷基）和羰基功能基;

c) 具有下式的 N－酰基己内酰胺漂白活化剂:



其中 R^6 是 H 或含有 1 至 12 个碳原子的烷基、芳基、烷氧基芳基或烷基芳基;

d) a)、b) 和 c) 的混合物

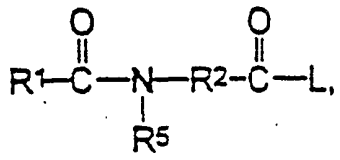
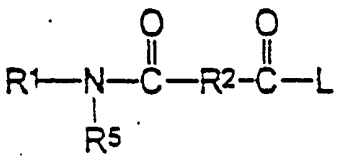
经优选的类型 a) 的漂白活化剂是那些其中的 R^1 是含有大约 6 至大约 12 个碳原子的烷基，R^2 含有大约 1 至大约 8 个碳原子，并且 R^5 是 H 或甲基的化合物，特别优选的漂白活化剂是那些上述通式中 R^1 是含有大约 7 至大约 10 个碳原子的烷基、R^2 含有大约 4 至大约 5 个碳原子的化合物.

经优选的类型 b) 的漂白活化剂是那些其中的 R_2、R_3、R_4 和 R_5 是 H，并且 R_1 是苯基的化合物.

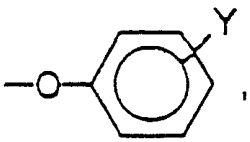
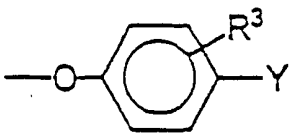
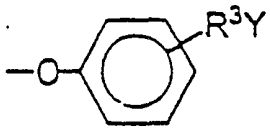
所说的类型 c) 的 N－酰基己内酰胺漂白活化剂中优选的酰基部分具有化学式 R^6-CO-，其中 R^6 是 H 或一个含有 1 至 12 个碳原子，最好是 6 至 12 个碳原子的烷基、芳基、烷氧基芳基或烷基芳基。在高度优选的实施方案中，R^6 是选自苯基、庚基、辛基、壬基、2,4,4－三甲基戊基、癸烯基以及它们的混合物。

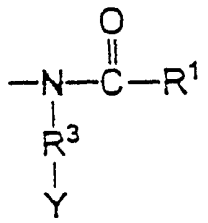
酰胺基衍生的漂白活化剂——用于本发明的类型 a) 的漂白活

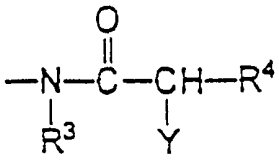
化剂是具有下列通式的酰胺取代的化合物:

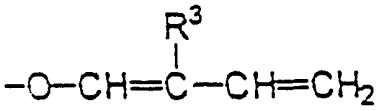
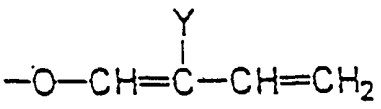



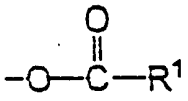
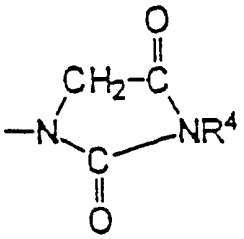
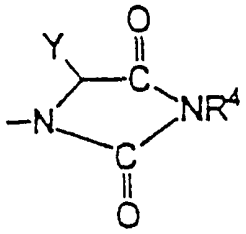
或它们的混合物，其中 R^1、R^2 和 R^5 的定义与前相同，L 可以基本上是任意一种合适的离去基团．经优选的漂白活化剂是那些具有上述通式，其中 R^1、R^2 和 R^5 的定义与在过氧酸中的定义相同，L 可选自下列基团:

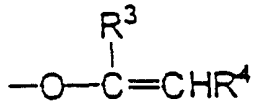
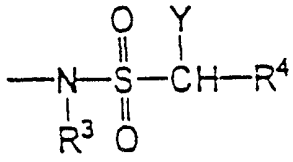


和






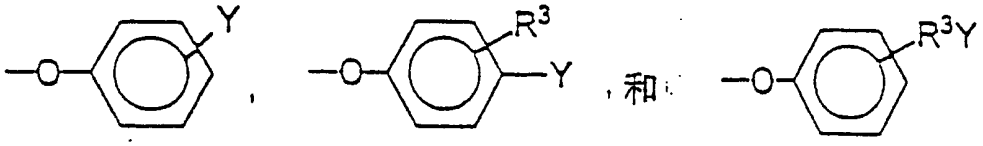





和


以及它们的混合物，其中 R^1 是含有大约 1 至大约 14 个碳原子的烷基、芳基或烷基芳基，R^3 是一个含有 1 至大约 18 个碳原子的烷基链，R^4 是 H 或 R^3，Y 是 H 或一个加溶基团.

优选的加溶基团是 $-SO_3^-M^+$、$-CO_2^-M^+$、$-SO_4^-M^+$、$-N^+(R^3)_4X^-$ 和 $O\leftarrow N(R^3)_3$，最优选的是 $-SO_3^-M^+$ 和 $-CO_2^-M^+$，其中 R^3 是一个含有大约 1 至大约 4 个碳原子的烷基链，M 是一个为漂白活化剂提供溶解性的阳离子，X 是一个为漂白活化剂提供溶解性的阴离子. 最好是，M 是一种碱金属、铵或取代的铵阳离子，最优选的是钠和钾；X 是卤化物、氢氧根、甲基硫酸根或醋酸根负离子. 应该注意对于不含加溶基团的离去基团的漂白活化剂，应使其很好地分散于漂白溶液中以协助它们的溶解.

经优选的漂白活化剂是那些具有上述通式，并且 L 是选自下列基团:

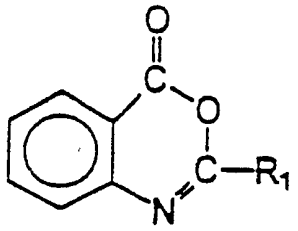


的化合物，其中 R^3 的定义与前相同，并且 Y 是 $-SO_3^-M^+$ 或 $-CO_2^-M^+$，其中 M 的定义与前相同.

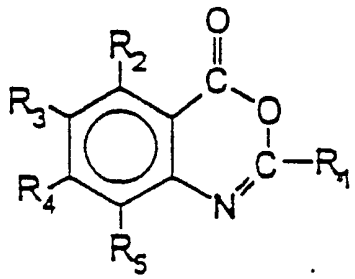
另一类重要的漂白活化剂，包括那些类型 b) 和类型 c) 的，可像在这里描述的那样，由于过氢氧根负离子对环上羰基碳的亲核进攻的结果，发生开环反应而提供有机过酸，例如，在类型 c) 的活化剂中这种开环反应涉及过氧化氢或它的负离子对己内酰胺环上羰基的进攻. 因为酰基己内酰胺被过氧化氢或它的负离子的进攻优先发生在环外羰基上，因此为获得较多部分的开环产物可能需要一种催化剂. 在类型 b) 活化剂中还可找到其它的开环漂白活化剂的实

例，比如已在 1990 年 10 月 30 日授权的 Hodge 等人的美国专利 4,966,723 中所公开的那些.

苯并噁嗪类漂白活化剂——这类已被 Hodge 公开的活化剂化合物包括具有下式的苯并噁嗪类型化合物:

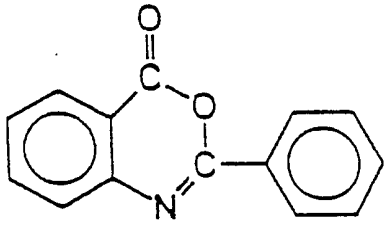


包括取代的苯并噁嗪类型:



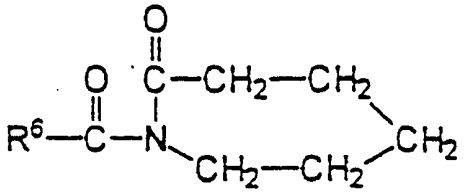
其中 R_1 是 H、烷基、烷基芳基、芳基、芳基烷基，并且其中 R_2、R_3、R_4 和 R_5 可以是相同或不同的取代基，各自可选自 H、卤素、烷基、烯基、芳基、羟基、烷氧基、氨基、烷基氨基、$COOR_6$（其中 R_6 是 H 或烷基）和羰基官能基。

苯并噁嗪类型中经优选的一种活化剂是:



当使用这种活化剂时，为获得最佳表面漂白性能，洗涤溶液的pH值应在大约8.5和10.5之间，最好是在9.5至10.5之间，以便使过氢氧根水解反应容易进行．这样的pH值可用通常被称为缓冲剂的物质来获得，它是这里所用的漂白体系的可供选择的组分。

N－酰基－己内酰胺漂白活化剂——用于本发明的这种类型c)的N－酰基　己内酰胺漂白活化剂具有下式:



其中R^6是H或含有1至12个碳原子的烷基、芳基、烷氧基芳基或烷基芳基。如上面已经提到的，R^6部分含有至少大约6个、最好是6至大约12个碳原子的己内酰胺活化剂提供憎水的漂白作用，它提供亲核的和基底污垢的清洗作用。R^6含有1至大约6个碳原子的己内酰胺活化剂提供亲水的漂白物种，它对于漂白饮料污渍是特别有效的。憎水性的和亲水性的己内酰胺类的混合物，其典型的重量比率为1：5至5：1，最好是1：1，则可在此用来除去混合的污渍。

高度优选的N－酰基己内酰胺是选自苯甲酰基己内酰胺、辛酰基己内酰胺、壬酰基己内酰胺、3,5,5－三甲基己酰基己内酰胺、癸酰基己内酰胺、十一碳烯酰基己内酰胺以及它们的混合物。制备N－酰基己内酰胺的方法在专业内是众所周知的。

与美国专利4,545,784的说法相反，漂白活化剂最好是不要吸附在过氧漂白化合物上。因为这样做当存在其它有机洗涤组分时可能引起安全问题。

类型 a)、b) 或 c) 的漂白活化剂在漂白体系或洗涤剂组合物中的含量，按重量计应至少为 0.1%，优选地是大约 0.1% 至大约 50%，更优选地是大约 1% 至大约 30%，最优选地是大约 3% 至大约 25%。

这里使用的经优选的酰胺衍生的和已内酰胺漂白活化剂，也可以和橡胶安全剂、酶安全剂、亲水活化剂诸如 TAED 结合使用，酰胺衍生的或已内酰胺活化剂：TAED 典型地重量比率在 1：5 至 5：1 的范围内，最好是大约 1：1。

一般而言，漂白机理，特别是表面漂白机理，还没有完全弄清楚。但是一般相信漂白活化剂遭受到过氢氧根负离子的亲核进攻，这负离子是过氧漂白涉及的过氧化氢所产生的，亲核进攻结果形成了过氧化羧酸。这一反应通常被称为过氢氧根水解。

当使用活化剂时，为获得最佳表面漂白性能，洗涤溶液的 pH 值应在大约 8.5 至 10.5 之间，最好是在 9.5 至 10.5 之间，以便使过氢氧根水解反应容易进行。这样的 pH 值可用通常被称为缓冲剂的物质来获得，它是这里所用的漂白体系的可供选择的组分。

（ii）过氧漂白化合物

这里使用的过氧漂白体系是那些在水溶液中能产生过氧化氢的化合物。这些化合物在本专业内是众所周知的，并且包括过氧化氢和碱金属过氧化物、有机过氧化物漂白化合物，诸如脲过氧化物、无机过氧盐漂白化合物，诸如碱金属过硼酸盐、过碳酸盐、过磷酸盐等。如果需要，也可以使用两种或多种这类漂白化合物的混合物。

优选的过氧漂白化合物包括过硼酸钠，市场上可买到的是它的一水、三水和四水合物的形式，焦磷酸钠过氧水合物、脲过氧水合

物、过碳酸钠和过氧化钠，特别优选的是过硼酸钠四水合物、过硼酸钠一水合物和过碳酸钠．过碳酸钠是特别优选的，因为它在贮存过程中非常稳定，而且还能很快地溶解在漂白溶液中．相信这样迅速的溶解可导致形成高浓度的过羧酸，从而增强了表面漂白性能．

高度优选的过碳酸盐可以用它的未涂渍的或涂渍的形式．未涂渍的过碳酸盐的平均颗粒大小在大约 400 至大约 1200 微米范围内，最优选的是大约 400 至大约 600 微米范围内．如果使用涂渍过的过碳酸盐，则优选的涂渍材料包括碳酸盐和硫酸盐、硅酸盐、硼硅酸盐或脂肪羧酸的混合物．

过氧漂白化合物在漂白体系或洗涤剂组合物中的含量按重量计应至少为大约 0.1%，优选地是大约 1% 至大约 75%，更优选地是大约 3% 至大约 40%，最优选地是大约 3% 至大约 25%。

在漂白体系中漂白活化剂对过氧漂白化合物的重量比率典型地是在大约 2：1 至 1：5 的范围内，优选的比率范围为大约 1：1 至大约 1：3。

由过氧漂白化合物产生的过氧化氢对漂白活化剂的摩尔比率应大于 1.0，更优选地是大于大约 1.5，最优选地是大约 2.0 至大约 10．优选地是，这里的漂白组合物的含量为过氧漂白化合物的大约 0.5 至大约 20%，更优选地是大约 1 至大约 10%（重量）。

在这里漂白活化剂／漂白化合物体系本身被用作漂白剂．但是，这类漂白体系在含有各种洗涤辅剂诸如表面活性剂、助剂等的组合物中使用时特别有用。

（2）蛋白酶

本发明包括蛋白酶，它是天然界不存在的羰基水解酶变种，它和它的氨基酸序列与由之衍生的前体羰基水解酶相比，具有不同的

解蛋白活度、稳定性、底物特异性、pH 性能和／或品质特性。前体羰基水解酶可以是一种天然界存在的羰基水解酶或重组体水解酶。具体地说，这类羰基水解酶变种具有在天然界未发现过的氨基酸序列，它是用不同的氨基酸来置换前体羰基水解酶中的许多氨基酸残基而衍生出来的。这许多前体酶中的氨基酸残基相应于位置 + 76 以及一种或多种下列残基的位置： + 99、 + 101、 + 103、 + 104、 + 107、 + 123、 + 27、 + 105、 + 109、 + 126、 + 128、 + 135、 + 156、 + 166、 + 195、 + 197、 + 204、 + 206、 + 210、 + 216、 + 217、 + 218、 + 222、 + 260、 + 265 和／或 + 274，这里数字标示的位置相应于天然界存在的由解淀粉芽孢杆菌析离的枯草溶菌素中的位置或其它羰基水解酶或枯草溶菌素，诸如迟缓芽孢杆菌枯草溶菌素中等价的氨基酸残基的位置。

用于本发明组合物中的羰基水解酶变种是一种蛋白酶，它包括置换 + 76 位置的氨基酸残基并结合一种或多种别的修饰。最好是用于本发明的变种蛋白酶包括置换、删除或插入下列组合的氨基酸残基：

76/99; 76/101; 76/103;
76/104; 76/107; 76/123; 76/99/101; 76/99/103; 76/99/104; 76/101/103;
76/101/104; 76/103/104; 76/104/107; 76/104/123; 76/107/123;
76/99/101/103; 76/99/101/104; 76/99/103/104; 76/101/103/104;
76/103/104/123; 76/104/107/123; 76/99/101/103/104; 76/99/103/104/123;
76/99/101/103/104/123; 76/103/104/128; 76/103/104/260;
76/103/104/265; 76/103/104/197; 76/103/104/105; 76/103/104/135;
76/103/104/126; 76/103/104/107; 76/103/104/210; 76/103/104/126/265;
和/或76/103/104/222.

最优选地是用于本发明的变种酶包括置换、删除或插入下列氨基酸残基的组合，即解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素的 76/99; 76/104; 76/99/104; 76/103/104; 76/104/107; 76/101/103/104; 76/99/101/103/104 和 76/101/104。

编码这类羰基水解酶或枯草溶菌素变种的变种 DNA 序列是由编码天然存在的或重组体前体酶的前体 DNA 序列所衍生的。这种变种 DNA 序列是通过修饰前体 DNA 序列来编码置换一种或多种特定的、被前体 DNA 序列编码的相应于解淀粉芽孢杆菌中下列位置的氨基酸残基或它们的组合而衍生出来的：76、99、101、103、104、107、123、27、105、109、126、128、135、156、166、195、197、204、206、210、216、217、218、222、260、265 和/或 274。虽然这里为修饰而鉴定的氨基酸残基是按照可应用于解淀粉芽孢杆菌（它已成为在所有枯草溶菌素中惯常使用的鉴定残基位置的方法）中的数码标志，但用于本发明的经优选的前体 DNA 序列是如图 6 所示的迟缓芽孢杆菌的 DNA 序列（Seq. ID No. 11）。

这些变种 DNA 序列编码插入或取代氨基酸残基 76 并结合一种或多种另外的修饰。最好是变种 DNA 序列编码取代或插入下列组合的氨基酸残基:76/99; 76/101; 76/103; 76/104; 76/107; 76/123; 76/99/101; 76/99/103; 76/99/104; 76/101/103; 76/101/104; 76/103/104; 76/104/107; 76/104/123; 76/107/123; 76/99/101/103; 76/99/101/104; 76/99/103/104; 76/101/103/104; 76/103/104/123; 76/104/107/123; 76/99/101/103/104; 76/99/103/104/123; 76/99/101/103/104/123; 76/103/104/128; 76/103/104/260; 76/103/104/265; 76/103/104/197; 76/103/104/105; 76/103/104/135; 76/103/104/126; 76/103/104/107; 76/103/104/210; 76/103/104/126/265; 和/或 76/103/104/222.

最优选地是变种 DNA 序列编码修饰下列残基的组合：76/99; 76/104; 76/99/104; 76/103/104; 76/104/107; 76/101/103/104; 76/99/101/103/104 和 76/101/104。这些重组体 DNA 序列编码具有新的氨基酸序列的羰基水解酶变种，并且一般至少有一种性质是和被前体羰基水解酶 DNA 序列编码的酶的同一性质有实质上的不同。这类性质包括解蛋白活度、底物专一性、稳定性、变化了的 pH 特性和／或增进的品质特性等。

这里有用的蛋白酶包括在指明的氨基酸残基位置上用天然存在的 19 种 L－氨基酸中的任何一种进行置换的产物。这样的置换可以在任何前体枯草溶菌素（原核生物的、真核生物的、哺乳动物的等）中进行。贯穿整个本申请书都是用通常的一个和三个字母代号来表示各个氨基酸的。这样的代号已在 Dale, J. W（1989）所著的 "Molecular Genetics of Bacteria"（细菌的分子遗传学）一书的附录 B 中认定，John Wiley & Sons, Ltd. 出版。

最好是，在每个认定的氨基酸残基位置上进行的置换包括但不仅限于：在位置 76 的置换包括 D、H、E、G、F、K、P 和 N；在位置 99 的置换包括 D、T、N、Q、G 和 S；在位置 101 的置换包括 G、D、K、L、A、E、S 和 R；在位置 103 的置换包括 Q、T、D、E、Y、K、G、R、S 和 A；在位置 104 的置换包括所有 19 种天然界存在的氨基酸；在位置 107 的置换包括 V、L、M、Y、G、E、F、T、S、A、N 和 I；在位置 123 的置换包括 N、T、I、G、A、C 和 S；在位置 27 的置换包括 K、N、C、V 和 T；在位置 105 的置换包括 A、D、G、R 和 N；在位置 107 的置换包括 A、L、V、Y、G、F、T、S 和 A；在位置 109 的置换包括 S、K、R、A、N 和 D；在位置 126 的置换包括 A、F、I、V 和 G；在位

置 128 的置换包括 G、L 和 A；在位置 135 的置换包括 A、F、I、S 和 V；在位置 156 的置换包括 D、E、A、G、Q 和 K；在位置 166 的置换包括所有天然界存在的 19 种氨基酸；在位置 195 的置换包括 E；在位置 197 的置换包括 E；在位置 204 的置换包括 A、G、C、S 和 D；在位置 206 的置换包括 L、Y、N、D 和 E；在位置 210 的置换包括 L、I、S、C 和 F；在位置 216 的置换包括 V、E、T 和 K；在位置 217 的置换包括所有天然界存在的 19 种氨基酸；在位置 218 的置换包括 S、A、G、T 和 V；在位置 222 的置换包括所有天然界存在的 19 种氨基酸；在位置 260 的置换包括 P、N、G、A、S、C、K 和 D；在位置 265 的置换包括 N、G、A、S、C、K、Y 和 H；在位置 274 的置换包括 A 和 S。在每个这样的位置上被置换的特别优选的氨基酸被列出在下面的表 1 中。在表 1 中虽然指明了具体的氨基酸，但应该理解在认定的残基位置上任何一种氨基酸都可被置换。

表 I

氨基酸残基	被置换/插入的经优选的氨基酸
+76	D,H
+99	D,T,N,G
+101	R,G,D,K,L,A,E
+103	A,Q,T,D,E,Y,K,G,R
+104	I,Y,S,L,A,T,G,F,M,W,D,V,N
+107	V,L,Y,G,F,T,S,A,N
+123	S,T,I
+27	K
+105	A,D
+109	S,K,R
+126	A,I,V,F
+128	G,L
+135	I,A,S
+156	E,D,Q
+166	D,G,E,K,N,A,F,I,V,L
+195	E
+197	E
+204	A,G,C
+206	L
+210	I,S,C
+216	V
+217	H,I,Y,C,A,G,F,S,N,E,K
+218	S
+222	A,Q,S,C,I,K
+260	P,A,S,N,G
+265	N,A,G,S
+274	A,S

这些包含在迟缓芽孢杆菌枯草溶菌素的等价于解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素 + 76 氨基酸残基位置上进行过活体外变更的蛋白酶产生出枯草溶菌素变种，它呈现出超过其前体枯草溶菌素的稳定性（例如，经改进的自解蛋白稳定性）（参见表Ⅳ和表Ⅵ）。

同样，在等价于解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素的 + 99、+ 101、+ 103、+ 104、+ 107、+ 123、+ 27、+ 105、+ 109、+ 126、+ 128、+ 135、+ 156、+ 166、+ 195、+ 197、+ 204、+ 206、+ 210、+ 216、+ 217、+ 218、+ 222、+ 260、+ 265 和 / 或 + 274 的残基位置上进行活体外的变更，无论单独地或相互结合并与 + 76 位置的变更作任意组合，都会产生枯草溶菌素变种，它们呈现改变了的解蛋白活度、改变了的热稳定性、改变了的 pH 特性、改变了的底物专一性和 / 或改变了的品质特性。

羰基水解酶是能水解含有



键的化合物的蛋白酶，式中的 X 是氧或氮。它们包括天然界存在的羰基水解酶以及羰基水解酶的重组体。天然界存在的羰基水解酶主要包括水解酶，例如肽水解酶诸如枯草溶菌素或金属蛋白酶。肽水解酶包括 α - 氨基酰基肽水解酶、肽基氨基酸水解酶、酰基氨基水解酶、丝氨酸羧肽酶、金属羧肽酶、硫羟蛋白酶、羧基蛋白酶和金属蛋白酶。丝氨酸、金属、硫羟和羧酸蛋白酶以及内型和外型蛋白酶都被包括在内。

“重组体羰基水解酶”是指这样的羰基水解酶，其中编码天然存在的羰基水解酶的 DNA 序列被修饰以产生一种突变种 DNA 序

列，它编码时在羰基水解酶氨基酸序列中进行置换、插入或删去一种或多种氨基酸．合适的修饰方法已在这里被公开，也已在美国专利 4,760,025（RE 34,606）、美国专利 5,204,015 以及美国专利 5,185,258 中被公开，这些专利的公开内容在此引人作为参考。

枯草溶菌素是细菌或霉菌的羰基水解酶，它一般地作用是断裂蛋白质或多肽的肽键．像这里使用的那样，“枯草溶菌素”意指天然界存在的枯草溶菌素或一种重组体枯草溶菌素．已知有各种微生物物种能产生和常常分泌出一系列的天然存在的枯草溶菌素．这一系列中的成员的氨基酸序列不完全是同源的．但是，在这一系列中的枯草溶菌素呈现出相同或相似的解蛋白活度．这类丝氨酸蛋白酶共享有一种定义催化三单元组的共同的氨基酸序列，以此把它们与糜蛋白酶相关类别的丝氨酸蛋白酶相区别．枯草溶菌素和糜蛋白酶相关的丝氨酸蛋白酶二者都有包含天冬氨酸、组氨酸和丝氨酸的催化三单元组．在枯草溶菌素相关的蛋白酶中，这些氨基酸的相对次序，从氨基端读到羧基端是天冬氨酸－组氨酸－丝氨酸。但是在糜蛋白酶相关的蛋白酶中，这种相对次序是组氨酸－天冬氨酸－丝氨酸。这样，这里的枯草溶菌素是指一种具有枯草溶菌素相关的蛋白酶的催化三单元组的丝氨酸蛋白酶。实例包括但不限于这里的图 3 中所认定的那些枯草溶菌素。

“重组体枯草溶菌素”是指这样一种枯草溶菌素，其中编码这种枯草溶菌素的 DNA 系列被修饰以产生一种变种（或突变种）DNA 系列，它编码时在天然存在的枯草溶菌素氨基酸序列中置换、删去或插入一种或多种氨基酸．产生这类修饰的合适的方法，并且它也可以和这里所公开的方法结合，已被包括在美国专利 4,760,025（RE 34,606）、美国专利 5,204,015 和美国专利

5,185,258 的公开内容中.

“非人类羰基水解酶”以及对它们编码的 DNA，可以由多种原核生物的和真核生物的生物体中得到．原核生物的生物体的合适的实例包括格兰氏阴性生物体诸如大肠杆菌（E. Coli）或假单胞菌属（Pseudomonas）以及格兰氏阳性细菌诸如微球菌属（Micrococcus）或杆菌．真核生物的生物体，从中可以得到羰基水解酶和它们的基因，其实例包括酵母诸如啤酒酵母（Saccharomyces cerevisiae）、霉菌诸如麹菌（Aspergillus sp.），以及非人类哺乳动物来源诸如，例如，牛类（bovine sp.），从中可得到编码羰基水解酶凝乳酶的基因．像用枯草溶菌素那样，从各种有关的物种中可得到一系列的羰基水解酶，这些物种在它们系列的成员之间含有的氨基酸序列不完全是同源的，但却无论如何呈现出相同或相似类型的生物活性．例如，这里使用的非人类的羰基水解酶具有一种功能定义，是专指直接或间接地与原核生物或真核生物源缔合的羰基水解酶.

一种“羰基水解酶变种”具有从“前体羰基水解酶”的氨基酸序列衍生的氨基酸序列．前体羰基水解酶（诸如一种枯草溶菌素）包括天然存在的羰基水解酶（枯草溶菌素）和重组体羰基水解酶（枯草溶菌素）．羰基水解酶变种的氨基酸序列是由前体水解酶的氨基酸序列通过置换、删去或插人一种或多种前体氨基酸序列中的氨基酸而“衍生”出来的．这样的修饰是对前体羰基水解酶（枯草溶菌素）的氨基酸序列编码的“前体 DNA 序列”进行的，而不是修改前体羰基水解酶（枯草溶菌素）的酶本身．这类修改前体 DNA 序列的合适的方法包括这里公开的方法以及本领域的技术人员熟知的方法（参看，例如，EPO 328299、WO 89/06279 以及这

作为参考的美国专利和申请书）。

这里作为变更，认定了相应于解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素的位置 + 76 与一种或多种下列位置组合的具体残基:

+99, +101, +103, +104, +107,
+123, +27, +105, +109, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197,
+204, +206, +210, +216, +217, +218, +222, +260, +265 and/or +274

最好是修饰的残基是选自下列组合:

76/99; 76/101; 76/103; 76/104; 76/107; 76/123;

76/99/101; 76/99/103; 76/99/104; 76/101/103; 76/101/104; 76/103/104;
76/104/107; 76/104/123; 76/107/123; 76/99/101/103; 76/99/101/104;

76/99/103/104; 76/101/103/104; 76/103/104/123; 76/104/107/123;
76/99/101/103/104; 76/99/103/104/123; 76/99/101/103/104/123;
76/103/104/128; 76/103/104/260; 76/103/104/255; 76/103/104/197;
76/103/104/105; 76/103/104/135; 76/103/104/126; 76/103/104/107;
76/103/104/210; 76/103/104/126/265; 和/或76/103/104/222;

最优选的组合是 76/99; 76/104; 76/99/104; 76/103/104; 76/104/107; 76/101/103/104; 76/99/101/103/104; 和 76/101/104。这些氨基酸位置数码是指那些在图 1 中提供的指定给成熟的解淀粉芽孢杆菌的枯草溶菌素的序列。但用于本发明的蛋白酶并不仅限于这一特定的枯草溶菌素的变体，而是扩展为在“等价”于解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素中特别认定的残基位置上含有氨基酸残基的前体羰基水解酶。最好是，前体枯草溶菌素是迟缓芽孢杆菌枯草溶菌素，并且在迟缓芽孢杆菌中相应于上面列出的等价的氨基酸残基位置上进行置换、删去或插入。

前体羰基水解酶的一个残基（氨基酸）等价于解淀粉芽孢杆菌

枯草溶菌素的一个残基，如果它对于解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素中那个具体的残基或残基的部分是同系的（即在一级或三级结构中有位置的对应性）或类似的（即具有相同或相似的对于结合、反应或化学相互作用等的功能能力）。

为确立对一级结构的同系性，前体羰基水解酶的氨基酸序列被直接与解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素的一级序列以及特别是一系列已知是枯草溶菌素中不变更的残基进行比较，这些不变更的残基的序列是已知的。这里的图 2 显示了解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素和迟缓芽孢杆菌枯草溶菌素之间保存的残基。在校准保存的残基并允许进行必要的插入和删去以维持顺序之后（即避免保存的残基经由任意的删去和插入而消除），即定义了等价于解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素的一级序列中特定的氨基酸残基。保存的残基的校准最好应保存 100％的这类残基。但是大于 75％或甚至少至 50％的保存残基的校准也适宜于定义等价残基。应坚持保存催化三单元组 Asp32/His64/Ser221。

例如，在图 3 中校准了来自解淀粉芽孢杆菌、枯草杆菌、地衣芽孢杆菌（carlsbergensis）和迟缓芽孢杆菌的枯草溶菌素的氨基酸序列，以提供氨基酸序列之间最大量的同系现象。比较这些序列显示在每种序列中都含有一些保存的残基。这些保存的残基（如 BPN' 和迟缓芽孢杆菌之间）已在图 2 中被认定。

这样，这些保存的残基即可被用来定义在别的羰基水解酶诸如来自迟缓芽孢杆菌（1989 年 7 月 13 日发布的 PCT Publication No. WO 89/06279）的枯草溶菌素中相应的等价于解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素中的氨基酸残基，这里经优选的枯草溶菌素前体酶，或称作 pB92（EP O 328299）的枯草溶菌素，是和优选的迟缓芽孢杆菌枯

草溶菌素高度同系的。这些枯草溶菌素中有一些的氨基酸序列在图3A和3B中与解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素的序列校准，以产生保存的残基的最大同系现象。像能看到的那样，与解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素比较，迟缓芽孢杆菌的序列中有一些删去。这样，例如，对于在解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素中的Val 165等价氨基酸，在别的枯草溶菌素如迟缓芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌的就是异亮氨酸了。

这样，例如，解淀粉芽孢杆菌和迟缓芽孢杆菌两种枯草溶菌素+76号氨基酸位置上的是天冬酰胺（N）。但是在用于本发明的经优选的枯草溶菌素变种中，等价于解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素中+76号位置的氨基酸则被天冬氨酸置换。为说明的目的，所有这里为置换认定的氨基酸残基与为每个这类位置进行经优选的置换的比较被列于表II中。

表 II

	+76	+99	+101	+103	+104	+107	+123
杆 菌（野生型）	N	D	S	Q	Y	I	N
迟缓芽孢杆菌（野生型）	N	S	S	S	V	I	N
最优选的置换	D	D	R	A	I/Y	V	S

等价残基也可以在三级结构的水平上通过为其三级结构已被X射线晶体衍射法测定的前体蒎基水解酶测定同系物来定义。等价残基被定义为那些经校准后前体蒎基水解酶和解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素的特定氨基酸残基的两个或多个主链原子（在N上的N、CA上的CA、C上的C和O上的O）的原子坐标已在0.13纳米之

内、最好是在 0.1 纳米之内的残基．在最好的模型被定向、并且定位给出研究中的羰基水解酶与解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素的非氢蛋白质原子的原子坐标的最大重叠后，校准即告完成．最好的模型是在可获得的最高分辨率时实验衍射数据给出最低 R 因子的晶体模型．

$$R\ 因子 = \frac{\Sigma_h |Fo(h)| - |Fc(h)|}{\Sigma_h |Fo(h)|}$$

其功能类似于解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素的特定残基的等价残基，被定义为前体羰基水解酶的那些氨基酸，它可采取这样一种构象，使它们或者能改变、修饰或起作用于蛋白质的结构，底物结合，或者以一定的方式催化并归因于解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素的一种特定的残基．进一步，它们是前体羰基水解酶（其三级结构已被 X 射线晶体衍射法测定）的那些残基，它占据一个类似的位置到这种程度，使得虽然给定的残基可能并不满足基于占据同系的位置时等价性的标准，但至少有两个残基的侧链原子的原子坐标是位于解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素相应的侧链原子的 0.13 纳米以内．解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素的三维结构的坐标已陈列于 EPO Publication No. 0251446 中（等价于美国专利申请 SN 08/212,291，它的公开内容在此引入作为参考），并可用来作为上述略图，用来在三级结构的水平上测定等价残基．

有一些为置换、插入或删去而认定的残基是保存的残基，而另外一些则不是．在残基不属于保存残基的情况下，一种或多种氨基酸的置换仅限于这样的置换，即它产生的变种具有与在天然界中发现的不相对应的氨基酸序列．在是保存残基的情况下，这样的置换不应导致一种天然存在的序列．用于本发明的羰基水解酶变种包括

羰基水解酶变种的成熟的形式，也包括这类水解酶变种的原型或预原型。预原型是优选的构造，因为它能使羰基水解酶变种的表达、分泌和熟化变得容易。

“原序列”是指连接在羰基水解酶成熟形式的N端部分的氨基酸序列，当除去它时导致出现羰基水解酶的“成熟”形式。许多在天然界发现的蛋白酶是转移酶原的产物，并且在不存在后转移过程时即以这种形式被表达。为生产羰基水解酶变种，具体地说枯草溶菌素变种的一种经优选的原序列是解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素的推定的原序列，虽然其它枯草溶菌素的原序列也可被使用。在实例中，是使用从迟缓芽孢杆菌（ATCC 21536）中得到的枯草溶菌素的推定的原序列。

一种“讯号序列”或“预序列”是指连接在羰基水解酶的N-端部分或原水解酶的N-端部分的任何氨基酸序列，它可能参与水解酶的成熟形式或原型的分泌。讯号序列的这种定义是功能性的，意谓包括所有那些被枯草溶菌素基因的N-端部分或别的在自然条件下参与使枯草溶菌素或别的羰基水解酶奏效的可分泌的羰基水解酶编码的氨基酸序列。用于本发明的蛋白酶利用这样的序列如这里叙述的那样来影响羰基水解酶变种的分泌。在实例中使用的一种经优选的讯号序列包括熔合到从迟缓芽孢杆菌得到的枯草溶菌素（ATCC 21536）讯号序列的其余部分中的解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素讯号序列的头七个氨基酸残基。

一种“预原型”的羰基水解酶变种是由可用来连接在水解酶氨基末端的具有原序列的水解酶的成熟形式以及一种可用来连接在原序列的氨基末端的“预”或“讯号”序列所组成的。

“表达载体”是指含有一个可用来连接在合适的控制序列上的

DNA 序列的 DNA 构造，这控制序列能在一种合适的宿主中影响所说的 DNA 的表达。这样的控制序列包括一种影响转录的始发基因、一种供选择的操纵序列用来控制这类转录、一种用来编码合适的 mRNA 核蛋白体连接位置的序列和控制转录和转译的终止的序列。这种载体可以是一种质粒、一种噬菌体粒子或简单地就是一种潜在的基因插入物。一旦转移进适当的宿主中，这种载体就可复制并独立地行使宿主基因的功能，或者在某些情况下可以联合到基因本身中去。在本说明书中，“质粒”和“载体”有时被交替使用，因为质粒是目前最常使用的载体形式。但是，这里也包括这类表达载体的其它形式，它起着等价的功能并在本专业中是已知的或将成为已知的。

用于本发明的“宿主细胞”一般是原核生物或真核生物宿主，它们最好是用在美国专利 4,760,025（RE 34,606）中公开的方法处理过，以使它们不能分泌酶活性的内切蛋白酶。一种经优选的为表达枯草溶菌素的宿主细胞是杆菌菌株 BG 2036，它缺乏酶活性的中性蛋白酶和碱性蛋白酶（枯草溶菌素）。菌株 BG 2036 的构造以被美国专利 5,264,366 详尽描述过。别的为表达枯草溶菌素的宿主细胞包括枯草杆菌 I 168（也已在美国专利 4,760,025（RE 34,606）和美国专利 5,264,366 中被描述过，它的公开内容在此引入作为参考），以及任何合适的杆菌菌株诸如地衣芽孢杆菌和迟缓芽孢杆菌等。

宿主细胞可用重组体 DNA 技术构成的载体来进行转化或转染。这类转化的宿主细胞既能复制编码羰基水解酶的载体，也能表达所需的羰基水解酶变种。在编码羰基水解酶变种的预型或预原型的情况下，这类变种当被表达时即典型地被从宿主细胞分泌到宿主

细胞介质中去。

在描述两种 DNA 区域之间关系时所用的术语“可用来连接的”简单地意指它们在功能方面是彼此相关的。例如，一种预序列可用来连接到一种多肽上，如果它的功能是作为讯号序列，参与最可能涉及讯号序列断裂的蛋白质的成熟形式的分泌。一种始发基因可用来连接到编码序列上，如果它控制序列的转录；一种核蛋白体连接位置可用来连接到编码序列上，如果它这样定位可允许进行转译。

编码天然界存在的前体羰基水解酶的基因可以按照本领域的技术人员众所周知的一般方法来得到。这种方法一般包括合成具有编码感兴趣的水解酶区域的推定序列的标记探头、由表达这种水解酶的生物体中制备基因库，并通过杂交到探头上从库中筛选出感兴趣的基因。阳性杂交克隆然后被绘图并序列化。用于实例中的迟缓芽孢杆菌基因可按美国专利 5,185,258 的实例 1 中所描述的方法克隆化，它的公开内容在此引入作为参考。用于实例中的 BPN 基因可按 RE 34,606 中实例 1 中所描述的方法克隆化，它的公开内容在此引入作为参考。

克隆化的羰基水解酶然后被用来转化宿主细胞以用来表达水解酶。水解酶基因然后被连接进高拷贝数质粒中。这种质粒在宿主中在下述意义上复制，即它含有众所周知的为质粒复制所必需的要素：一种可连接到研究中的基因上的始发基因（它可以基因本身的同系始发基因来提供，如果它被宿主识别，即被转录的话）、一个转录终止和多聚腺苷酸化区域（是为稳定由来自某些真核生物宿主细胞中的水解酶基因的宿主转录的MRNA 所必需的）、它是外源的或者可被水解酶基因的内源终止区域提供，合乎需要的是，一种

选择基因诸如一种耐受抗菌素的基因，它通过在含有抗菌素的介质中生长使被质粒感染的宿主细胞得以连续培养维持．高拷贝数的质粒也含有一种为宿主的复制来源，通过它能使大量质粒得以在细胞质中产生而没有染色体的限制。但是，在本发明的范围内也包括把水解酶基因联合多次拷贝到宿主基因组中去．这可通过用对同系重组特别敏感的原核生物和真核生物的生物体而变得容易。

用于本发明实例中的基因是天然的迟缓芽孢杆菌基因和天然的解淀粉芽孢杆菌基因。另外，一种合成的编码天然存在的或突变体的前体羰基水解酶（枯草溶菌素）的基因也可被产生。在这样一种方法中，前体水解酶（枯草溶菌素）的 DNA 和／或氨基酸序列被测定．此后多次、重叠的合成单股 DNA 片段即被合成出来，它经杂交和连接作用而产生一种编码前体水解酶的合成 DNA。合成基因构造的一个实例被发表于美国专利 5,204,015 的实例 3 中，它的公开内容在此引人作为参考。

一旦天然界存在的或合成的前体羰基水解酶基因被克隆化，即可进行一些修饰来增强超出合成天然界存在的前体羰基水解酶范围以外的应用。这类修饰包括生产重组体羰基水解酶，如美国专利 4,760,025（RE 34,606）和 EPO Publication No. 0251446 所公开的内容以及这里描述的生产羰基水解酶变种。

下列盒式突变方法可用来使得用于本发明的羰基水解酶变种的构造和鉴定变得容易，虽然也可使用其它包括位置定向诱变的方法。首先，天然存在的编码这种水解酶的基因被获得并进行全部或部分地序列化。然后，序列在想要进行变更（删去、插人或置换）已编码的酶中一种或多种氨基酸的一点上被校验。评估位于这一点侧面的序列，看是否存在用一个低聚核苷酸池置换一个短的基因片

段的限制性位点，该低聚核苷酸池当被表达后将编码各种突变体。这样的限制性位点最好是在水解酶基因中的独一无二的位置，以使基因片段的置换变得容易。但是，任何在水解酶基因中的不是过分冗长的方便的限制性位点都可以使用，只要是通过限制消化产生的基因碎片能被重新装配在适当的序列中。如果在选择的位点的方便距离内（10 至 15 个核苷酸）不存在限制性位点，可在基因中以这样的方式通过置换核苷酸来产生这样的位点，即在最终的构造中既没有读码的改变，也没有编码氨基酸的改变。为改变它的序列以适合所需要的序列进行的基因改变可按照一般已知的方法通过 M13 引物延伸来完成。确定合适的侧面区域位置以及评估得出两个方便的限制性位点序列所需要的变更的工作，可通过遗传密码的过剩、基因的限制酶略图以及大量不同的限制酶而成为例行的常规工作。注意如果能获得方便的位于限制性位点侧面的位点，则上述方法只需要用来与不含一个位点的侧面区域相连接。

一旦天然存在的 DNA 或合成的 DNA 被克隆化，位于要被变更的位置侧面的限制性位点即用关连限制酶消化，许多末端端基互补的低聚核苷酸盒带即被连接到基因中。诱变作用通过这种方法而被简化，因为所有的低聚核苷酸都可这样来合成使具有同样的限制性位点，并且不必用合成的连接来造成这种限制性位点。

如这里使用的，解蛋白活度被定义为每毫克活性酶中肽键的水解速率。已存在许多众所周知的实验程序可用来测量解蛋白活度（参见 K. M. Kalisz “Microbial Proteinase”，Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology, A. Fiechter ed., 1988）（“微生物蛋白酶，高等生物化学工程 / 生物技术”，A. Fiechter 出版，1988）。除了解蛋白活度以外，或者作为一种替代物来修饰

解蛋白活度，本发明的变种酶还可以有其它的经修饰的特性诸如 Km、Kcat、Kcat / Km 比率和 / 或经修饰的底物专一性和 / 或经修饰的 pH 活性特性。这些酶可以为预期存在的特定的底物而进行剪裁，例如，为诸如洗衣用的水解过程中的底物。

一个目标是保证得到一种与前体蒜基水解酶比较具有改变了的解蛋白活度的变种蒜基水解酶，因为这种活度的增加（数值增大）能更有效地使酶作用于目标底物上。同样感兴趣的是与前体比较，具有改变了的热稳定性和 / 或改变了的底物专一性的变种酶。最好是被变更的蒜基水解酶是一种枯草溶菌素。在枯草溶菌素类型的蒜基水解酶中用来得到这样的结果的具体氨基酸位置，等价于解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素中的 + 76、 + 99、 + 101、 + 103、 + 104、 + 107、 + 123、 + 27、 + 105、 + 109、 + 126、 + 128、 + 135、 + 156、 + 166、 + 195、 + 197、 + 204、 + 206、 + 210、 + 216、 + 217、 + 218、 + 222、 + 260、 + 265 和 / 或 + 274，或者它们的任意组合，这些氨基酸在实例中提供。在一些场合中，可能需要较低的解蛋白活度。相反，在另一些场合中则可能需要变种酶的解蛋白活度比它的前体更高。另外，还可能期望增加或降低（改变）变种的无论是对碱还是对热的稳定性。在 Kcat、Km 或 Kcat / Km 值方面的增加或降低对于用来测定这些动力学参数的底物是专一性的。

同样，已经测定，在枯草溶菌素中等价于 + 76 位置并结合一些其它位置的修饰，对于调制酶的整体稳定性和 / 或解蛋白活度是重要的。例如，像在实例中说明的那样，在经优选的蛋白酶中，在迟缓芽孢杆菌枯草溶菌素的等价于 + 76 的位置上天冬酰胺（N）可用天冬氨酸（D）置换，并结合修饰一种或多种下列氨基酸残基：

+ 99、 + 101、 + 103、 + 104、 + 107、 + 123、 + 27、 + 105、 + 109、 + 126、 + 128、 + 135、 + 156、 + 166、 + 195、 + 197、 + 204、 + 206、 + 210、 + 216、 + 217、 + 218、 + 222、 + 260、 + 265 和 / 或 + 274，以便在得到的变种酶中产生增进了的稳定性和 / 或增进的活性。

用于本发明的最优选的蛋白酶已在实例中被陈述。这些包括以下特定的置换残基的组合：N76D / S99D; N76D / V104I; N76D / S99D / V104I; N76D / S103A / V104I; N76D / V104I / I107V; N76D / V104Y / I107V 以及 N76D / S101R / S103A / V104I。这些置换最好是在迟缓芽孢杆菌（重组体或天然的）枯草溶菌素中进行，虽然置换也可以在任何一种杆菌的枯草溶菌素中进行。

基于用这种和其它变种枯草溶菌素得到的结果，可明显看出解淀粉芽孢杆菌羰基水解酶中等价于位置 + 76、 + 99、 + 101、 + 103、 + 104、 + 107、 + 123、 + 27、 + 105、 + 109、 + 126、 + 128、 + 135、 + 156、 + 166、 + 195、 + 197、 + 204、 + 206、 + 210、 + 216、 + 217、 + 218、 + 222、 + 260、 + 265 和 / 或 + 274 上的残基对于这些酶的解蛋白活度、品质和 / 或稳定性以及这类变种酶的清洗或洗涤品质是重要的。

下面通过实例来提供来提供用于本发明组合物中的蛋白酶的制造方法。

蛋白酶制造实例

为枯草杆菌中 GG36 基因表达的构造

克隆化和为来自迟缓芽孢杆菌的枯草溶菌素基因表达的构造，基本上和美国专利 5,185,258 中描述的相同。质粒 GGA274（描述于这里的图 4 中）进一步用如图 5 所示的方式进行修饰。在构造

GGA274 质粒过程中引人的 PstI 位点通过下面将会描述的低聚核苷酸定向诱变的方法，用一种含有下列序列：5' GAAGCTGCAACTCGTTAAA 3'（Seq. ID No. 1）的低聚核苷酸除去。下面画有一横线的“A”残基消除限制酶 PstI 的认别序列，并在位置 274 上把相应的氨基酸从丙氨酸改变成苏氨酸。在位置 274 上的苏氨酸是原来发现在克隆化的迟缓芽孢杆菌枯草溶菌素基因中的野生型残基。编码枯草溶菌素的 DNA 片段被 EcoRI 和 BamHI 消化产物从质粒 GGA274 或它的衍生物（GGT274 被表示在图 5 中）上切除。这 DNA 碎片再被半克隆化回到用作诱变的基于噬菌体 M13 的载体，诸如 MP19 中。诱变之后，EcoRI 和 HindIII 消化产物，在克隆化之后，即履行工作移动变更过的枯草溶菌素基因回到表达质粒诸如 GGA274 中，以便表达和回收变更过的枯草溶菌素蛋白质。

低聚核苷酸定向的诱变

低聚核苷酸定向诱变是按 Zoller，M. 等人在（1983）Methods Enzymol.，100: 468 ~ 500 中描述的方法来进行的。作为一个实例，一种合成的具有 5' GCTGCTCTAGACAATTCG 3'（Seq. ID No. 2）序列的低聚核苷酸被用来改变位置 76 的氨基酸残基，使它从天冬酰胺（N）变为天冬氨酸（D），或 N76D。下方画横线的“G”和“C”残基指示由野生型基因序列发生的变化。CA 使亮氨酸保留在位置 + 75 上并改变这种氨基酸序列来引人一个 xbal 限制酶（TCTAGA）的 xbal 识别位点，同时在 GAC 处的改变把在 + 76 位置上的天冬酰胺变成天冬氨酸。

为了在位置 99、101、103 和 104 处进行诱变，可依照所需变更的结合来使用不同的低聚核苷酸。例如，具有序列为 5'

GTATTAGGGGCGGACGGTCGAGGCGCCATCAGCTCGATT 3'（Seq. ID No.3）的一种低聚核苷酸被用来同时在一个单一的枯草溶菌素分子中进行下列改变：S99D；S101R；S103A 和 V104I。相似地，一种序列为 5' TCAGGTTCGGTCTCGAGCGTTGCCCAAGGATTG 3'（Seq. ID No. 4）的低聚核苷酸和一种序列为 5' CACGTTGCTAGCTTGAGTTTAG 3'（Seq. ID No. 5）的低聚核苷酸被分别用来产生 I107V 和 N123S。同样，画横线的残基指示由野生型序列发生的变化，它可产生所期望的或者是氨基酸序列的变化、或者是限制酶识别序列的变化。

枯草溶菌素变种的解蛋白活度

按照前述低聚核苷酸定向诱变的方法，制造了列在表Ⅲ上的变种。每一种这样的枯草溶菌素变种的解蛋白活度也列在表Ⅲ上。用 P. Bonneau 等人（1991）在 J. Am. Chem. Soc., Vol. 113, No. 3, P1030 所述的方法测量合成的多肽底物丁二酰基－L－丙氨－L－丙氨－L－脯氨－L－苯丙氨酰对硝基苯胺水解的动力学参数 Kcat、Km 和 Kcat／Km。简而言之，把枯草溶菌素储备溶液的小的等分溶液，加到含有溶解在 pH 值为 8.6 的 0.1 M Tris－HCl 缓冲液中的底物的 1 厘米小池中，并恒温在 25℃。反应进程用分光光度法跟踪，即监测在 410 纳米处反应产物对硝基苯胺的吸光度。通过一种非线性回归算法使每种反应的反应速率和产物浓度符合 Michaelis－Menten 方程，来得到动力学参数。

表 III

测量迟缓芽孢杆菌枯草溶菌素和变种的

动力学参数 Kcat、Km 和 Kcat / Km

蛋白酶 #	酶变种	k_{cat} (s^{-1})	K_M (M)	k_{cat}/K_M ($s^{-1}M^{-1}$)
-	B. lentus Subtilisin	170	0.00078	$2.18x10^5$
-	N76D	219	0.0008	$2.74x10^5$
1	N76D/S99D	88	0.00061	$1.44x10^5$
2	N76D/S101R	371	0.0013	$2.85x10^5$
3	N76D/S103A	400	0.0014	$2.86x10^5$
4	N76D/V104I	459	0.0011	$4.17x10^5$
5	N76D/I107V	219	0.0011	$1.99x10^5$
6	N76D/N123S	115	0.0018	$6.40x10^4$
7	N76D/S99D/S101R	146	0.00038	$3.84x10^5$
8	N76D/S99D/S103A	157	0.0012	$1.31x10^5$
9	N76D/S99D/V104I	247	0.00097	$2.55x10^5$
10	N76D/S101R/S103A	405	0.00069	$5.90x10^5$
11	N76D/S101R/V104I	540	0.00049	$1.10x10^6$
12	N76D/S103A/V104I	832	0.0016	$5.20x10^5$
13	N76D/V104I/I107V	497	0.00045	$1.10x10^6$
14	N76D/V104Y/I107V	330	0.00017	$1.90x10^6$
15	N76D/V104I/N123S	251	0.0026	$9.65x10^4$
16	N76D/I107V/N123S	147	0.0035	$4.20x10^4$
17	N76D/S99D/S101R/S103A	242	0.00074	$3.27x10^5$
18	N76D/S99D/S101R/V104I	403	0.00072	$5.60x10^5$
19	N76D/S99D/S103A/V104I	420	0.0016	$2.62x10^5$
20	N76D/S101R/S103A/V104I	731	0.00065	$1.12x10^6$
21	N76D/S103A/V104I/N123S	321	0.0026	$1.23x10^5$
22	N76D/V104I/I107V/N123S	231	0.003	$7.70x10^4$
23	N76D/S99D/S101R/S103A/V104I	624	0.00098	$6.37x10^5$
24	N76D/S99D/S103A/V104I/N123S	194	0.0043	$4.51x10^4$
25	N76D/S99D/S101R/S103A/V104I/N123S	311	0.0023	$1.35x10^5$

表III的结果说明，所有试验的枯草溶菌素变种保持着解蛋白活度。进一步，对数据的详尽分析表明，通过在等价于解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素中的76、99、101、103、104、107和123这些氨基酸残基位置上进行各种置换的组合，可以有意义地改变迟缓芽孢杆菌枯草溶菌素的解蛋白活度。

枯草溶菌素的热稳定性

通过上述低聚核苷酸定向诱变方法制得的本发明的迟缓芽孢杆菌枯草溶菌素及其变种的观测到的热稳定性的比较被显示在表IV中。把纯化过的酶在0.1 M甘氨酸0.01% Tween－80 pH10.0缓冲液中的浓度为15微克／毫升的溶液，加有或不加50 mM $CaCl_2$，等分到小试管中并在10℃保温5分钟，10°至60℃保温超过1分钟，在60℃保温20分钟。然后把试管放在冰上10分钟。把试管中的等分溶液加到含有1.2 mM的合成多肽底物丁二酰－L－丙氨－L－丙氨－L－脯氨－L－苯丙氨酰－对硝基苯胺溶解在0.1 M tris－HCl的pH值为8.6的缓冲液中所形成的溶液并恒温在25℃的1厘米小池中，以试验酶的活性。最初的线性反应速率是用分光光度法通过监测反应产物对硝基苯胺在410纳米处的吸光度作为时间的函数来跟踪的。提供的数据为加热前的百分数活度。列于表IV的结果指出在加入50 mM $CaCl_2$的试验条件下许多变种（26个当中的24个）呈现出和迟缓芽孢杆菌差不多的热稳定性。在没有加50 mM $CaCl_2$的试验条件下有许多变种（26个当中的19个）其稳定性明显地要比迟缓芽孢杆菌枯草溶菌素的更好。进一步，在没有加50 mM $CaCl_2$的试验条件下，变种N76D / S99D、N76D / V104I、N76D / S99D / V104I、N76D / S103A / V104I、N76D / V104I / I107V、N76D / V104Y / I107V和N76D / S101R / S103A / V104I

比单一置换的变种 N76D 要明显地更稳定.

表 IV

测量迟缓芽孢杆菌枯草溶菌素及其变种的热稳定性
pH 值 10，60℃，加入或不加入 50 mM $CaCl_2$

酶	初始活性的保留值 % -$CaCl_2$	+$CaCl_2$
迟缓芽孢杆菌枯草溶菌素	2	96
N76D	34	97
N76D/S99D	49	98
N76D/S101R	0	82
N76D/S103A	26	92
N76D/V104I	58	98
N76D/I107V	32	96
N76D/N123S	0	97
N76D/S99D/S101R	30	100
N76D/S99D/S103A	36	100
N76D/S99D/V104I	48	97
N76D/S101R/S103A	26	100
N76D/S101R/V104I	38	100
N76D/S103A/V104I	58	100
N76D/V104I/I107V	60	97
N76D/V104Y/I107V	48	74
N76D/V104I/N123S	0	98
N76D/I107V/N123S	16	100
N76D/S99D/S101R/S103A	38	100
N76D/S99D/S101R/V104I	33	100
N76D/S99D/S103A/V104I	38	98
N76D/S101R/S103A/V104I	40	99
N76D/S103A/V104I/N123S	1	98
N76D/V104I/I107V/N123S	3	99
N76D/S99D/S101R/S103A/V104I	36	99
N76D/S99D/S103A/V104I/N123S	2	95
N76D/S99D/S101R/S103A/V104I/N123S	0	100

用由质粒噬菌体产生的单股 DNA 模板进行低核苷酸定向诱变

A. 迟缓芽孢杆菌变种的构造

诱变的实验程序基本上和前面在低聚核苷酸定向诱变中所描述的相同。为构造产生这种单股 DNA 模板的质粒噬菌体载体，我们首先构造载体 pBCDAICAT。载体构造的流程图被概括于图 8 中。首先，来自 pC194 质粒的编码 CAT 基因的 ClaI 至 ClaI 碎片（参见 Horinouchi, S. 和 Weisblum, B., J. Bacteril., 150: 8～15, 1982）被克隆化进行 pUC19 的多链接区域的 AccI 位点上（New England BioLabs, Beverly, MA）以制造质粒 pUCCHL，并且由 GG36DAI 编码 DNA 5' 端的 EcoRI－DraI 0.6 KB 碎片被克隆化进入 pBSKS 质粒（stratagens. Inc., San diego, CA）的 EcoRI 和 EcoRV 位点，以制造 pBC2SK5。质粒 pBC2SK5 的单一 EcoRI 位点通过 EcoRI 消化而消除，接着被填充到被 T4 催化的 DNA 聚合酶中，并重新连接以产生没有 EcoRI 位点的质粒 pBC2SK－5R。被克隆化进入 pBCSK－5R 中的EcoRI－DraI 碎片以 PstI －HindIII 碎片的形式被析离并克隆化到 pUCCHL（pUC19 多链区的一部分）的 PstI－HindIII 位点以产生质粒 pUCCHL 5R。GG36DAI 的编码序列被切除成为 EcoRI－BamHI 碎片并克隆化到 pUCCHL 5R 的 EcoRI－BamHI 位点上以制造 pUCCAT。然后把 pUCCAT 的大的 EcoRI－HindIII 碎片克隆化到 BS2KS＋的 EcoRI 和 HindIII 位点上以产生质粒 pBCDAIVCAT。

为产生单股DNA，含有 pBCDAICAT 的 E. Coli 用噬菌体 R408（可由 stratagene, San Diego, CA 购得）感染，这可按照 Russel. M., Kidd, S, 和 Kelley, M. R. 在 GENE 45: 333～338,

1986 中所叙述的实验程序来进行．一旦获得单股 DNA 模板，即可实施前面在低聚核苷酸定向诱变中叙述过的标准的诱变方法．一些突变体的构造为说明的目的详述如下:

为构造迟缓芽孢杆菌（GG36）N76D / S103A / V104I / L217H，可将编码 GG36 N76D / S103A / V104I 的 EcoRI - BamHI DNA 碎片用于构造 pUCCAT（参见图 8）以产生质粒 pBCDAICAT，在按上述实验程序制得单股 DNA 模板后，即可用具有下列序列

* *** ** x *C1aI*

5' TAT GCC AGC CAC AAC GGT ACT TCG ATG GCT 3' (Seq. ID No.13)

的诱变引物来制造 L217H．像前面那样，下边画有横线的残基是指明已进行的核苷酸变化，xclaI 是指存在的 claI 位点在诱变后已被消除．诱变的实验程序已在前面低聚核苷酸定向诱变中描述过．诱变以后，质粒 DNA首先被筛选出消除了 ClaI 位点的，并且那些失去 ClaI 位点的克隆被拿去进行 DNA 序列分析以证实在第 217 号氨基酸残基位置上实施了把 L 变为 H 的 DNA 序列．

B. BPN' 变种的构造以及它们在枯草杆菌中的表达

解淀粉芽孢杆菌（BPN'）N76D / Q103A / Y104I / Y217L 的构造除两个连续步骤以外是以相似的方式来进行的．先把 N76D 引入 BPN' Y217L 以制造 BPN' N76D / Y217L，第二次诱变把 BPN' N76D / Y217L 转化成 BPN' N76D / Q103A / Y104I / Y217L．为产生第一次诱变所需的单股 DNA 模板，可用编码 BPN' Y217L 枯草溶菌素的 EcoRI - BamHI 碎片（是由 Y217L 质粒衍生的，已被描述于 Wells, J. 等人在 PNAS, 84, 5167, 1087 发表的论文中）来

构造质粒pUCCATFNA（参见图9）．含有BPN' Y217L的pUCCATFNA质粒被用来构造pBCFNACAT质粒（图9）．像前面叙述的那样就产生单股DNA．为产生BPN' N76D / Y217L，可用一种具有以下序列的低聚核苷酸引物:

* *** ** *XbaI*

5' C ACA GTT GCG GCT CTA GAT AAC TCA ATC GGT G 3'

(Seq. ID No.14)

来产生改变N76D．然后由含有BPN' N76D / Y217L的pBCFNACAT质粒来制备单股DNA（N76D诱变后的pBCFNACAT质粒）并用另一种具有以下序列的低聚核苷酸:

* — — x *PvuII*

5' GCT GAC GGT TCC GGC GCT ATT AGT TGG ATC ATT 3'

(Seq. ID No.15)

诱变而得到BPN' N76D / Q103A / Y104I / Y217L．涉及的克隆化、单股DNA制备、诱变以及突变体的筛选所有这些步骤都如上面叙述过的方法来进行．BPN' 基因以及它的变种的表达可通过直接把质粒DNA（含有不同变种BPN' 基因的pBCFNACAT）连接到枯草杆菌的缺乏蛋白酶的菌株中来完成，如RE 34,606中所描述的那样．

像每个这些蛋白酶制造实例所教授的那样，已制造了许多变种．为这些变种测定了动力学数据和稳定性数据．动力学数据是按前面描述过的方法产生的并被提供于表V中．稳定性数据的产生将在此详述，结果列于表VI中．

热稳定性试验程序

纯化过的酶被缓冲液交换到0.1 M甘氨酸 · pH 10.0、含有

0.01％ Tween－80 的缓冲液中，这可通过把酶加到含有用这种缓冲液平衡过的 Sephadex G－25 的层析柱上，并用同样的缓冲液把酶从柱上洗脱下来而实施。

往含有 0.1 M 甘氨酸、0.01％ Tween，pH 为 10.0 并恒温在 60℃的缓冲液的试管中，加入经缓冲液交换过的酶，使最终酶的浓度为 15 微克／毫升。

在不同时间从 60℃的恒温液中取出等分的试样并立即试验酶的活性，即把它加入一个 1 厘米的小池中，其中含有 1.2 mM 合成肽底物丁二酰基－L－丙氨－L－丙氨－L－脯氨－L－苯丙氨酰对硝基苯胺的溶解在 pH 值为 8.6 并恒温在 25℃的 0.1 M tris－HCl 缓冲溶液中而形成的溶液。最初的线性反应速率可通过监测反应产物对硝基苯胺在 410 纳米处的吸光度作为时间的函数来进行分光光度法跟踪。

半衰期，即 50％的酶失活所需时间的长度，是通过在 60℃恒温溶液的反应速率作为时间函数的一级图形而测出的。

在表Ⅵ中提供的数据是按在相同条件下测定迟缓芽孢杆菌枯草溶菌素（GG36）半衰期的百分数来表示的。

表 V

酶	kcat (s^{-1})	KM (mM)	kcat/KM ($s^{-1}M^{-1}$)
迟缓芽孢杆菌枯草溶菌素	170	0.78	2.20E+05
N76D/S103G/V104I*	380	1.4	2.70E+05
N76D/S103A/V104F	730	0.33	2.20E+06
N76D/S103A/V104N	790	2.8	2.80E+05
N76D/S103A/V104S	170	0.83	2.00E+05
N76D/S103A/V104T	370	1.9	2.00E+05
N76D/S103A/V104W	880	0.31	2.80E+06
N76D/S103A/V104Y	690	0.5	1.40E+06
K27R/N76D/V104Y/N123S	500	1.2	4.20E+05
N76D/S101G/S103A/V104I*	620	1.3	4.80E+05
N76D/S103A/V104I/S105A*	550	1.3	4.20E+05
N76D/S103A/V104I/S105D*	440	1.7	2.60E+05
N76D/S103A/V104T/I107A*	120	5.7	2.10E+04
N76D/S103A/V104T/I107L*	310	3.2	9.70E+04
N76D/S103A/V104I/L126A	90	2.2	4.10E+04
N76D/S103A/V104I/L126F	180	1.9	9.50E+04
N76D/S103A/V104I/L126I	100	2.4	4.20E+04
N76D/S103A/V104I/L126V	64	3.2	2.00E+04
N76D/S103A/V104I/S128G*	560	1.7	3.30E+05
N76D/S103A/V104I/S128L*	430	3.8	1.10E+05
N76D/S103A/V104I/L135A	140	0.76	1.80E+05
N76D/S103A/V104I/L135F	390	0.69	5.70E+05
N76D/S103A/V104I/L135I	110	0.73	1.50E+05
N76D/S103A/V104I/L135V	140	0.86	1.60E+05
N76D/S103A/V104I/S156E*	170	2.6	6.50E+04
N76D/S103A/V104I/S166D*	160	3.5	4.60E+04
N76D/S103A/V104I/D197E	510	1.4	3.60E+05
N76D/S103A/V104I/N204A*	530	1.1	4.80E+05
N76D/S103A/V104I/N204G*	580	1.4	4.10E+05
N76D/S103A/V104I/N204C*	370	1.3	2.90E+05
N76D/S103A/V104I/P210I*	500	1.2	4.20E+05
N76D/S103A/V104I/L217H*	80	0.63	1.30E+05
N76D/S103A/V104I/M222A	70	3.1	2.30E+04
N76D/S103A/V104I/M222S	80	3.1	2.60E+04
N76D/S103A/V104I/T260P	660	1.5	4.40E+05
N76D/S103A/V104I/S265N	590	1.3	4.50E+05
K27R/N76D/V104Y/I107V/N123S	220	1.4	1.60E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/D197E	430	1.1	3.90E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/N204C	400	1.1	3.60E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/Q206L	440	1.2	3.70E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/S216V	440	1.2	3.70E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S	760	0.98	7.80E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/T260P	410	1.2	3.40E+05

K27R/N76D/V104Y/N123S/T274A	390	1	3.90E+05
N76D/S103A/V104I/L126F/S265N	170	2.1	8.10E+04
N76D/S103A/V104I/S156E/S166D*	40	6.3	6.40E+03
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/G197E	410	0.98	4.20E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/N218S	540	0.66	8.20E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/D197E/N218S	770	0.79	9.80E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/N204C/N218S	610	0.99	6.20E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/Q206L/N218S	580	0.78	7.40E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S/T260P	660	1	6.60E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S/T274A	590	0.89	6.60E+05
K27R/N76D/V104Y/Q109S/N123S/N218S/T274A	520	1	5.20E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/D197E/N218S	460	0.65	7.10E+05
解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素（BPN'）	50	0.14	3.60E+05
BPN'-N76D/Y217L*	380	0.46	8.30E+05

* 带星号的这些突变体是用由噬菌体质粒产生的单股 DNA 模板进行低聚核苷酸定向诱变而制出的；所有其它不带星号的则是按前面所叙述的低聚核苷酸定向诱变方法制出的.

表 VI

酶	热稳定性（天然酶半衰期的%）
迟缓芽孢杆菌枯草溶菌素	100
N76D	590
N76D/S99D	840
N76D/S103A	390
N76D/V104I	660
N76D/I107V	710
N76D/N123S	70
N76D/S99D/S101R	610
N76D/S99D/S103A	590
N76D/S99D/V104I	910
N76D/S101R/S103A	930
N76D/S101R/V104I	500
N76D/S103A/V104I	460
N76D/S103G/V104I*	370
N76D/S103A/V104F	480
N76D/S103A/V104N	230
N76D/S103A/V104S	230

N76D/S103A/V104T	370
N76D/S103A/V104W	280
N76D/S103A/V104Y	400
N76D/V104I/I107V	940
N76D/V104Y/I107V	820
N76D/V104I/N123S	80
N76D/I107V/N123S	150
K27R/N76D/V104Y/N123S	100
N76D/S99D/S101R/S103A	570
N76D/S99D/S101R/V104I	1000
N76D/S99D/S103A/V104I	680
N76D/S101G/S103A/V104I*	390
N76D/S101R/S103A/V104I	470
N76D/S103A/V104I/S105A*	360
N76D/S103A/V104I/S105D*	370
N76D/S103A/V104T/I107A*	270
N76D/S103A/V104T/I107L*	230
N76D/S103A/V104I/N123S	110
N76D/V104I/I107V/N123S	220
N76D/S103A/V104I/L126A	270
N76D/S103A/V104I/L126F	950
N76D/S103A/V104I/L126I	410
N76D/S103A/V104I/L126V	320
N76D/S103A/V104I/S128G*	640
N76D/S103A/V104I/S128L*	760
N76D/S103A/V104I/L135A	230
N76D/S103A/V104I/L135F	200
N76D/S103A/V104I/L135I	510
N76D/S103A/V104I/L135V	500
N76D/S103A/V104I/S156E*	120
N76D/S103A/V104I/S166D*	590
N76D/S103A/V104I/D197E	460
N76D/S103A/V104I/N204A*	230
N76D/S103A/V104I/N204G*	240
N76D/S103A/V104I/N204C*	500
N76D/S103A/V104I/P210I*	1370
N76D/S103A/V104I/L217H*	60
N76D/S103A/V104I/M222A	520
N76D/S103A/V104I/M222S	490
N76D/S103A/V104I/T260P	490
N76D/S103A/V104I/S265N	360
K27R/N76D/V104Y/I107V/N123S	210
K27R/N76D/V104Y/N123S/D197E	120
K27R/N76D/V104Y/N123S/N204C	110

K27R/N76D/V104Y/N123S/Q206L	380
K27R/N76D/V104Y/N123S/S216V	140
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S	270
K27R/N76D/V104Y/N123S/T260P	40
K27R/N76D/V104Y/N123S/T274A	60
N76D/S99D/S101R/S103A/V104I	590
N76D/S99D/S103A/V104I/N123S	110
N76D/S103A/V104I/L126F/S265N	810
N76D/S103A/V104I/S156E/S166D*	220
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/G197E	90
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/N218S	250
K27R/N76D/V104Y/N123S/D197E/N218S	270
K27R/N76D/V104Y/N123S/N204C/N218S	460
K27R/N76D/V104Y/N123S/Q206L/N218S	1400
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S/T260P	310
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S/T274A	180
N76D/S99D/S101R/S103A/V104I/N123S	90
K27R/N76D/V104Y/Q109S/N123S/N218S/T274	230
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/D197E/N21	240
解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素（BPN'）	100
BPN'-N76D/Y217L*	420

* 带星号的这些突变体是用由噬菌体质粒产生的单股 DNA 模板进行低聚核苷酸定向诱变而制出的；所有其它不带星号的则是按前面所叙述的低聚核苷酸定向诱变方法制出的.

（3）清洗组合物材料

本发明的清洗组合物除前面叙述的漂白剂和蛋白酶以外，也包括一种或多种可以和蛋白酶配伍的清洗组合物材料。术语“清洗组合物材料”，像这里使用的，意指任何选自特定类型所需的清洗组合物以及产物形式（例如液体、颗粒、喷雾组合物）的液体、固体或气体材料，这些材料也可以和用于组合物中的蛋白酶配伍。清洗组合物材料的具体选择可通过考虑被清洗的表面、物件或织物以及所需的在使用过程的清洗条件下组合物的形式（例如通过洗涤剂使

用）而容易地做出决定。术语“可配伍的”，像这里使用的，是指清洗组合物材料不致降低蛋白酶的解蛋白活度到这种程度，以致在正常使用的情形下不再像期望那样有效。具体的清洗组合物材料将在后面举例详尽说明。

有效量的一种或多种上述蛋白酶被包括在组合物中，用来清洗许多需要除去蛋白质污渍的表面。这样的清洗组合物包括为清洗硬表面的形式不限（例如，液体或颗粒状）的洗涤剂组合物；为清洗织物的形式不限（例如，颗粒状、液体和棒状配方）的洗涤剂组合物；洗碟用组合物（形式不限）；口腔洗涤组合物，形式不限（例如，牙粉，牙膏和漱口剂配方）；以及假牙清洗组合物，形式不限（例如，液体、片状）。像这里所用的，“有效量的蛋白酶”是指为必须达到的酶活性在具体的清洗组合物中所需的前面叙述的蛋白酶的量。这样的有效量能容易地为本领域的技术人员所确定，并且它基于许多因素，诸如使用的特定的酶的变种、清洗施用情况、清洗组合物的具体组分，以及所需的组合物是液体还是干的（例如颗粒或条状）等等。

优选地是本发明的清洗组合物中含有由大约 0.0001％至大约 10％的一种或多种蛋白酶，更优选地是含有大约 0.001％至大约 1％、还更优选地是含有大约 0.001％至大约 0.1％。同样优选地是存在于组合物中的蛋白酶的量，可充分提供每 100 克组合物中所含活性蛋白酶的毫克数对理论上可从洗涤液中的过氧酸得到的 O_2（“AvO_2”）的比率值、这里称为酶对漂白剂之比（E／B 比），在大约 1：1 至大约 20：1 的范围内。下面将进一步详尽讨论可应用蛋白酶的各种清洗组合物的一些实例。除非特别说明，所有的份数、百分数和比率在这里都是基于重量计算的。

（i）供选择的洗涤剂酶

除了指定的蛋白酶以外，这里的组合物和方法在用所有样式的洗涤剂酶时也是有效的。用于本发明的供选择的洗涤剂酶被包括在种类繁多的织物洗涤目的中，包括除去基于蛋白质的、基于碳水化合物的或基于三酸甘油酯的污渍，例如，还包括防止短效染料的转移。被并入的酶包括其他蛋白酶、淀粉酶、脂酶、纤维素酶、过氧化物酶以及它们的混合物。也可以包括其它类型的酶。它们可来自任何合适的来源，诸如植物、动物、细菌、霉菌和酵母源等。但是，它们的选择被一些因素所控制，诸如 pH 活性和／或稳定性最优值、热稳定性、对活性洗涤、增效剂等的稳定性等。在这方面细菌或霉菌的酶是优选的，诸如细菌淀粉酶和蛋白酶以及霉菌纤维素酶等。

通常并入的酶的浓度为按重量计每克洗涤组合物中应能充分提供大约 50 毫克、更典型地是大约 0.01毫克至大约 10 毫克的活性酶。换言之，用于本发明中的有效量的供选择的酶，按洗涤组合物的重量计算其含量为至少大约 0.001％，优选地是大约 0.001％至大约 5％，更优选地是大约 0.001％至大约 1％，最优选地是大约 0.01％至大约 1％。

供选择的蛋白酶的合适的实例有从枯草杆菌和地衣芽孢杆菌的特定菌株中得来的枯草溶菌素。其它合适的蛋白酶有从枯草杆菌和地衣芽孢杆菌中得到的一种经修饰的细菌丝氨酸蛋白酶，它在整个 8～12 pH 范围内都具有最大的活性，被 NOVO Industries 开发并在注册商标名称 ESPERASE 下出售。这种酶和类似的酶的制备已被描述于 NOVO 的英国专利说明书 No. 1,243,784 中。其它可买到的解蛋白酶有 NOVO Industries A/S（丹麦）的商品名为 ALCALASE

和 SAVINASE、及 Bio-Synthetics, Inc.（荷兰）的商品名为 MAXATASE 的酶。还有的其它蛋白酶包括蛋白酶 A（参看 1985 年 1 月 9 日发布的欧洲专利申请 130,756）以及蛋白酶 B（参看 1987 年 4 月 28 日提出申请的欧洲专利申请 Serial No. 87303761.8 以及 1985 年 1 月 9 日发布的 Bott 等人的欧洲专利申请 130,756），和在这里被称为“蛋白酶 C”的酶，它是从杆菌得到的碱性丝氨酸蛋白酶的三重变种，其中位置 104 的酪氨酸被缬氨酸所置换，位置 123 的丝氨酸被天冬氨酸置换、位置 274 的丙氨酸被苏氨酸置换。蛋白酶 C 被描述于 1991 年 5 月 16 日发布的 EP 90915958.4 中，相应于 WO 91/06637，它在此引入作为参考。经遗传学修饰的变种，特别是蛋白酶 C 的变种，也包括在这里。

淀粉酶包括，例如，英国专利说明书 No. 1,296,839（NOVO）中描述的 α - 淀粉酶，International Bio-Synthetics, Inc. 的 RAPIDASE 以及 NOVO Industries 的 TERMAMYL 等。

用于本发明的纤维素酶包括细菌或霉菌的纤维素酶。最好是，它们所具有的 pH 最佳值在 5 和 9.5 之间。合适的纤维素酶已在 1984 年 3 月 6 日授权的 Barbesgoard 等人的美国专利 4,435,307 中被公开、其中公开了由 Humicola insolens 和 Humicola 菌株 DSM 1800 中产生的霉菌纤维素酶或属于气单胞菌属的产生纤维素酶 212 的霉菌，以及从一种海洋软体动物（Dolabella Auricula Solander）的肝胰腺中提取出来的纤维素酶。合适的纤维素酶也被公开于 GB - A - 2.075.028; GB - A - 2.095.275 和 DE - OS-2.247.832 中。

为洗涤剂用的合适的脂酶包括那些假单胞菌属的微生物、诸如在英国专利 1,372,034 中被公开的施氏假单胞菌 stutzeri ATCC 19.154 所产生的脂酶。也可参看 1978 年 2 月 24 日对公共检验公

开的日本专利申请53－20487中的脂酶．这种脂酶可从日本Nagoya的Amano药物公司买到，其商品名称为脂酶P“Amano”，此后就称它为“Amano P”．其它可买到的脂酶包括Amano－CES、日本Tagata的Toyo Jozo公司的脂酶ex Chromobacter Viscosum，例如Chromobacter Viscosum Var. lipolyticum NRRLB 3673，美国Biochemical Corp.和荷兰Disoynth Co.生产的Chromobacter Viscosum脂酶以及脂酶ex Pseudomonas gladioli．由Humicola lanuqinosa衍生、并作为主体在Aspergillus Oryzae中表达的酶LIPOLASE可从Novo公司买到（也可参见E. P.专利341,947），是这里使用的优选的脂酶．

过氧化物酶是和氧源结合使用的，例如和过碳酸盐、过硼酸盐、过硫酸盐、过氧化氢等结合使用．它们被用于溶液漂白，即在洗涤操作过程中防止染料或颜料从一种底物转移到洗涤溶液中的其它底物上去．过氧化物酶在本领域内是已知的，并且包括，例如，辣根过氧化酶、木质素酶、以及卤代过氧化酶诸如氯和溴代过氧化酶．含有过氧化酶的洗涤剂组合物已在，例如，授权给Novo Industries A/S的O-Kirk于1989年10月19日发布的PCT国际专利申请WO 89/099813中被公开．

范围广泛的酶材料以及把它们并入合成的洗涤剂颗粒中去的方法已在1971年1月5日授权给McCarty等人的美国专利3,553,139中被公开．酶被进一步公开于1978年7月18日授权的Place等人的美国专利4,101,457和1985年3月26日授权的Hughes的美国专利4,507,219两项专利中．用于液体洗涤剂配方的酶材料以及把它们并入这类配方中去的方法已在1981年4月14日授权的Hora等人的美国专利4,261,868中被公开．用于洗涤剂

中的酶可用各种技术使之稳定化．酶稳定化技术已被公开并示例于1981年4月14日授权给Hora等人的美国专利4,261,868、1971年8月17日授权给Gedge等人的美国专利3,600,319以及Venegas 1986年10月29日发布的欧洲专利申请公开No. 0199405，公开No. 86200586.5中．酶稳定化系统也已被描述于，例如，美国专利4,261,868、3,600,319以及3,519,570中．

（ii）酶稳定剂

这里使用的酶可通过在做成的组合物中存在有给酶提供钙离子的水溶性的钙离子源而被稳定化．存在各种其它本领域中已公开的稳定剂，特别是硼酸盐类，可提供进一步的稳定性：参看上文所引证的Severson的美国专利4,537,706．典型的洗涤剂，特别是液体的，在每立升做成的组合物中将含有大约1至大约30、优选地是大约2至大约20、更优选地是大约5至大约15、最优选地是大约8至大约12毫摩尔钙离子．依赖于所存在的酶的数量和它对钙离子的响应，可以稍有变化．钙离子的浓度应该这样来选择，即对于酶来说，在钙与增效剂、脂肪酸等络合之后，在组合物中总还会有某种最低浓度的钙离子可以得到．任何水溶性的钙盐都能用作钙离子源，包括、但不仅限于、氯化钙、硫酸钙、苹果酸钙、氢氧化钙、甲酸钙和醋酸钙．小量钙离子，一般为大约0.05至大约0.4每升毫摩尔，也常常存在于组合物中，这是由于酶浆和配制用的水中的钙离子．在固体洗涤剂组合物中，配方可包括充分量的一种水溶性钙离子源来为洗衣液提供这样数量的钙离子．作为代替，天然硬水中的钙离子可能就足够了．

这里的组合物也可供选择地，但是优选地，含有各种其它的稳定剂，包括硅酸盐涂料、特别是硼酸盐类型的稳定剂．典型地，这

类稳定剂在组合物中使用的浓度，基于在组合物中硼酸的重量或别的能形成硼酸的硼酸盐化合物的重量（换算成硼酸）来计算为大约0.25％至大约10％、优选地是0.5％至大约5％、更优选地是大约0.75％至大约3％。最好是用硼酸，虽然其它化合物诸如氧化硼、硼砂、以及其它碱金属硼酸盐（例如，原硼酸钠、偏硼酸钠、焦硼酸钠和五硼酸钠）也是合适的。取代的硼酸（例如，苯基硼酸、丁烷硼酸和对溴苯基硼酸）也可被用来代替硼酸。

（iii）洗涤表面活性剂

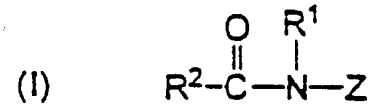
在由本发明提供的完整配制好的洗涤剂组合物中所包括的洗涤表面活性剂的量，依赖于具体使用的表面活性剂和所期望的效果，可从大约1％至大约99.8％。最好是，洗涤表面活性剂的含量基于洗涤剂组分的重量计为大约5％至大约80％。

洗涤表面活性剂可以是非离子的、阴离子的、两性的、两性离子的或阳离子的。也可使用这些表面活性剂的混合物。经优选的洗涤剂组合物中含有阴离子洗涤表面活性剂或阴离子表面活性剂与别的表面活性剂、特别是非离子表面活性剂的混合物。

这里使用的表面活性剂的非限制性的实例包括通常的C_{11}~C_{18}烷基苯磺酸盐以及伯、仲和任意的烷基硫酸盐、C_{10}~C_{18}烷基烷氧基硫酸盐、C_{10}~C_{18}烷基聚糖苷和它们相应的硫酸化的聚糖苷、C_{12}~C_{18} α－磺酸化的脂肪酸酯、C_{12}~C_{18}烷基和烷基酚烷氧化物（特别是乙氧化物和混合的乙氧／丙氧化物）、C_{12}~C_{18}三甲铵乙内酯和磺基三甲铵乙内酯（“sultaines”）、C_{10}~C_{18}胺氧化物、C_8~C_{24}肌氨酸盐（特别是油酰基肌氨酸盐）等。其它通常有用的表面活性剂已被列举在标准的教科书中。

在这里特别有用的一类具体的附加的非离子性表面活性剂包括

具有下式的多羟基脂肪酸酰胺:



(I)

其中 R^1 是 H、C_1～C_8 烃基、2－羟乙基、2－羟丙基或它们的混合物，优选地是 C_1～C_4 烷基，更优选地是 C_1 或 C_2 烷基，最优选地是 C_1 烷基（即甲基）；R^2 是 C_5～C_{32} 烃基部分，优选地是直链 C_7～C_{19} 烷基或烯基，更优选地是直链 C_9～C_{17} 烷基或烯基，最优选地是直链 C_{11}～C_{19} 烷基或烯基，或它们的混合物；Z 是一个含有线型烃基链的多羟基烃基部分，在它的链上直接连接着至少两个羟基（在甘油醛的情况下）或至少 3 个羟基（在其它还原糖的情况下），或是它的一种烷氧化（最好是乙氧化或丙氧化）的衍生物。Z 最好是在还原胺化反应中由还原糖衍生；更优选地是 Z 是一个糖醇基。合适的还原糖包括葡萄糖、果糖、麦芽糖、乳糖、半乳糖、甘露糖和木糖，以及甘油醛。作为原料，也可以用高右旋糖玉米糖浆、高果糖玉米糖浆以及高麦芽糖玉米糖浆来代替上面列举的那些糖。这些玉米糖浆将产生混合的糖组分在基团 Z 中。应当理解这里决不想排除其它合适的原料。Z 最好是选自－CH_2－$(CHOH)_n$－CH_2OH、－$CH(CH_2OH)$－$(CHOH)_{n-1}$－CH_2OH、－CH_2－$(CHOH)_2(CHOR')(CHOH)$－CH_2OH，其中 n 是 1 至 5 的一个整数，包括 1 和 5，R' 是 H 或一个环状的单糖或多糖以及它们的烷氧化的衍生物。更优选地是这样的糖醇基，其中的 n 值为 4，特别是－CH_2－$(CHOH)_4CH_2OH$。

在式（1）中，R^1 可以是，例如，N－甲基、N－乙基、N－丙基、N－异丙基、N－丁基、N－异丁基、N－2－羟基乙基、或 N－2－羟基丙基。为最高度地起泡沫，R^1 最好是甲基或羟基烷基。

如果希望降低起泡沫能力，R^1 最好是 C_2 - C_8 烷基，特别是正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、戊基、己基和 2 - 乙基己基。

R^2 - CO - N< 可以是，例如椰子脂（酸）酰胺、硬脂酰胺、油酰胺、月桂酰胺、肉豆蔻酰胺、癸酰胺、软脂酰胺、牛脂酰胺等。

另一类非离子型的在本发明中特别有用的表面活性剂是环氧乙烷与一个憎水部分的缩合产物，它提供一种表面活性剂。其亲水 - 亲油平衡值（HLB）在 5 至 17、优选地是 6 至 14、更优选地是 7 至 12 的范围内。憎水（亲油）部分在性质上可以是脂肪或芳香的，并且与任何特定的憎水基团缩合的聚氧乙烯基的长度可被容易地调节以产生一种水溶性的化合物，它在亲水和憎水之间具有所期望的平衡程度。

这种类型的特别优选的非离子型表面活性剂是每摩尔醇含有 3～8 摩尔环氧乙烷的 C_9～C_{15} 伯醇乙氧化物、特别是每摩尔醇含有 6～8 摩尔环氧乙烷的 C_{14}～C_{15} 伯醇乙氧化物、每摩尔醇含有 3～5 摩尔环氧乙烷的 C_{12}～C_{15} 伯醇乙氧化物，以及它们的混合物。

（iv）洗涤助剂

用于本发明的供选择的洗涤剂组分含有无机和 / 或有机的洗涤助剂以协助无机物硬度控制。如果使用，这些助剂的含量为洗涤剂组合物的大约 5% 至大约 80%（重量）。

无机洗涤助剂包括，但不限制于，碱金属、铵和烷醇铵的聚磷酸盐（例如三聚磷酸盐、焦磷酸盐和玻璃状的聚合偏磷酸盐）、膦酸盐、肌醇六磷酸、硅酸盐、碳酸盐（包括碳酸氢盐和倍半碳酸盐）、硫酸盐和铝硅酸盐。但是，在某些场所也需要非磷酸盐助剂。

硅酸盐助剂的实例有碱金属硅酸盐，特别是那些 $SiO_2 : Na_2O$ 比率在 1.6 : 1 至 3.2 : 1 范围内的以及层状的硅酸盐，诸如在 1987 年 5 月 12 日授权给 H. P. Rieck 的美国专利 4,664,839 中所描述的层状硅酸钠，它的商品名称为“SKS”，可从 Hoechst 买到。SKS－6 是一种特别优选的层状硅酸盐助剂。

碳酸盐助剂，特别是表面积大于 10 M^2/g 的经细磨的碳酸钙、是可用于颗粒状组合物中的优选的增效剂。这种碱金属碳酸盐构成的洗涤剂的密度可在 450～850 克／立升范围内，湿气含量最好是低于 4％.

碳酸盐助剂的实例有碱土金属和碱金属碳酸盐，诸如 1973 年 11 月 15 日发布的德国专利申请 No. 2,321,001 中所公开的那些。

铝硅酸盐助剂在本发明中是特别有用的。经优选的铝硅酸盐有沸石类助剂，它具有下式：

$$Na_z[(AlO_2)_z (SiO_2)_y]\cdot xH_2O$$

其中 z 和 y 为至少是 6 的整数，z 对 y 的摩尔比率在 1.0 至大约 0.5 的范围内，x 是大约 15 至大约 264 之间的一个整数。

有用的铝硅酸盐离子交换材料可从市场买到。这些铝硅酸盐在结构上可以是结晶状的或无定形的，并且可以是自然界存在的或人工合成衍生的。生产铝硅酸盐离子交换材料的方法已在 1976 年 10 月 12 日授予 Krummel 等人的美国专利 3,985,669 和 1986 年 8 月 12 日授予 Corkill 等人的美国专利 4,605,509 中被公开。在这里有用的经优选的合成结晶状铝硅酸盐离子交换材料可以 Zeolite A、Zeolite P（B）（包括在 EPO 384,070 中公开的那些）和 Zeolite X

这些名称牌号从市场上买到。最好是，铝硅酸盐具有 0.1～10 微米直径的颗粒大小。

适用于本发明目的的有机洗涤助剂包括、但不仅限于，许多聚羧酸盐化合物，诸如醚聚羧酸盐，包括氧联二丁二酸盐，如 1964 年 4 月 7 日授予 Berg 的美国专利 3,128,287、1972 年 1 月 18 日授予 Lamberti 等人的美国专利 3,635,830 中公开的那些。也可参看 1987 年 5 月 5 日授予 Bush 等人的美国专利 4,663,071 中的“TMS / TDS”助剂。合适的醚聚羧酸盐也包括环状的化合物，特别是脂环化合物，诸如那些在美国专利 3,923,679、3,835,163、4,158,635、4,120,874 和 4,102,903 中描述的化合物。

其它有用的洗涤助剂包括醚羟基聚羧酸盐、马来酸酐与乙烯或乙烯基甲基醚的共聚物、1,3,5－三羟基苯－2,4,6－三磺酸、以及羧甲基－氧联丁二酸、多乙酸诸如乙二胺四乙酸和次氮基三乙酸的各种碱金属、铵和取代的铵盐，和多羧酸盐诸如苯六甲酸、丁二酸、氧联丁二酸、聚马来酸、苯 1,3,5－三羧酸、羧甲基氧联丁二酸以及它们的可溶性的盐。

柠檬酸盐助剂，例如柠檬酸和它的可溶性盐（特别是钠盐），是也能用于颗粒组合物中的优选的多羧酸盐助剂，特别是和沸石和 / 或层状硅酸盐助剂结合使用时。

也适用于本发明洗涤剂组合物的还有 3,3－二羧基－4－氧杂－1,6－己烷二羧酸盐和有关的化合物，它们被公开于 1986 年 1 月 28 日授予 Bush 的美国专利 4,566,984 中。

在可以使用基于磷的助剂的情况下，特别是为手洗衣操作用的条棒型配方中，可使用各种碱金属磷酸盐诸如众所周知的三聚磷酸钠、焦磷酸钠和正磷酸钠。磷酸盐助剂诸如乙烷－1－羟基－

1,1－二膦酸盐以及别的已知的膦酸盐（参看，例如，美国专利3,159,581； 3,213,030； 3,422,021； 3,400,148 和 3,422,137）也可以被使用。

（v）供选择的洗涤添加剂

作为经优选的实施方案，这里应用的通常的洗涤剂组分可以选型的洗涤剂组合物组分诸如洗涤表面活性剂和洗涤助剂。供选择地，洗涤剂组分可包括一种或多种别的洗涤添加剂或别的帮助或增强洗涤性能、处理被清洗的底物或修饰洗涤剂组合物的审美外观的材料。通常的洗涤剂组合物的洗涤添加剂包括 Baskerville 等人的美国专利 No. 3,936,537 所阐明的那些组分，在此引入作为参考。这类能被包括在用于本发明的洗涤剂组合物中的添加剂，以它们通常在本领域确立的使用浓度（一般为洗涤剂组分的 0％至大约 20％，最好是大约 0.5％至大约 10％）使用，包括颜色点缀剂、发泡剂、抑泡剂、防锈剂和／或防腐蚀剂、污垢悬浮剂、污垢释出剂、染料、填充剂、荧光增白剂、杀菌剂、碱性源、水溶助长剂、抗氧剂、香料、溶剂、加溶剂、除尘土污渍／抗污垢再沉积剂、聚合分散剂、操作助剂、织物软化组分（例如绿土）、染料转移抑制剂（例如，聚乙烯基吡咯烷酮）、静电控制剂等。

漂白系统供选择地，但优选地，也应含有一种螯合剂，它不仅能通过清除会分解漂白剂的重金属离子而增进漂白剂的稳定性，也能有助于除去多元酚污渍诸如茶汁污渍等。各种螯合剂，包括可从 Monsanto 公司买到的商品名称为 DEQUEST 的氨基膦酸盐。次氮三乙酸盐、羟乙基－乙二胺三乙酸盐等，已知可供这类用途。经优选的生物可降解的非磷螯合剂包括乙二胺二丁二酸盐（“EDDS”；参见 Hartman 和 Perkins 的美国专利 4,704,233）、

乙二胺－N,N'－二谷氨酸盐（EDDG）和2－羟基亚丙基二胺－N,N'－二丁二酸盐（HPDDS）等化合物。这类螯合剂可以它们的碱金属盐或碱土金属盐的形式来使用，典型的浓度为大约本组合物的0.1％至大约10％。

本发明组合物作为通常的洗衣洗涤剂组合物诸如那些典型地常见的颗粒洗涤剂或洗衣皂条是特别有用的。1965年4月13日授予Okenfuss的美国专利3,178,370中描述了洗衣洗涤剂条和制造它们的方法。1980年9月23日授予Anderson的菲律宾专利13,778中描述了合成洗涤剂洗衣皂条。用各种挤压方法来制造洗衣洗涤剂皂条的方法在本领域内是众所周知的。

下面给出的实例进一步说明了本发明，但并不想用来限制本发明。

实例1

制备了一种颗粒状洗涤剂组合物，它含有以下组分：

组　分	重量％
C_{12}线型烷基苯磺酸盐	22
磷酸盐（如三聚磷酸钠）	30
碳酸钠	14
硅酸钠	3
蛋白酶12	0.3
过碳酸钠	5
乙二胺二丁二酸盐螯合剂（EDDS）	0.4
硫酸钠	5.5
壬酰基已内酰胺	5
填充剂*和水	平衡到100％

* 注：可选自一些方便可得的材料诸如 $CaCO_3$、滑石、粘土、硅酸盐等。

洗涤剂组合物中的对热和碱稳定的组分的水溶液调和混合物制好之后经喷雾干燥，再与别的组分混合在一起，以使它们含有表中所列出的那种浓度的组分。

在这个实例中蛋白酶 1～11 号和 13～25 号列举在表Ⅲ中，包括别的用于本发明的其它蛋白酶被描述于表Ⅴ和表Ⅵ中，当用它们代替 12 号蛋白酶时得到基本上类似的结果。在本实例中也曾用表Ⅲ、Ⅴ和Ⅵ中所列的用于本发明的以及其它的蛋白酶的组合物来代替 12 号蛋白酶，结果也基本是类似的。

实例 2

制备了一种颗粒状洗涤剂组合物，它含有以下组分：

组　分	重量%
阴离子性烷基硫酸盐	7
非离子性表面活性剂	5
沸石（0.1～10 微米）	10
柠檬酸三钠	2
SKS－6 硅酸盐助剂	10
丙烯酸酯马来酸酯共聚物	4
壬酰基己内酰胺	5
过碳酸钠*	15
碳酸钠	5
乙二胺二丁二酸盐螯合剂（EDDS）	0.4
抑泡剂	2

蛋白酶 12	0.3
脂酶	0.3
污垢释出剂	0.2
次要组分、填充剂*** 和水	平衡到 100%

* 注：其平均颗粒大小应为 400 至 1200 微米。

*** 注：可选自方便易得的材料，诸如 $CaCO_3$、滑石、粘土、硅酸盐等。

洗涤剂组合物中对热和碱稳定的组分的水溶液调和混合物，制好之后经喷雾干燥，再与别的组分混合在一起，使它们含有表中的组分以及所示的浓度。

在这个实例中曾用列举在表Ⅲ中的蛋白酶 1～11 号和 13～25 号以及表Ⅴ和表Ⅵ中描述的、用于本发明的其它蛋白酶来代替 12 号蛋白酶，得到基本上类似的结果；在本实例中也曾结合使用数种表Ⅲ、Ⅴ和Ⅵ中所列的、用于本发明的以及其它的蛋白酶来代替 12 号蛋白酶，也得到基本上类似的结果。

实例 3

按与实例 2 相同的方法制备洗涤剂组合物，只是用 15% 的苯甲酰己内酰胺、壬酰基己内酰胺和（6－壬酰胺基己酰基）氧苯磺酸盐的 1：1：1 的混合物来代替壬酰基己内酰胺，并且过碳酸钠的用量为 30%。

在这个实例中曾用列举在表Ⅲ中的蛋白酶 1～11 号和 13～25 号以及表Ⅴ和表Ⅵ中描述的、用于本发明的其它蛋白酶来代替 12 号蛋白酶，得到基本上类似的结果；在本实例中也曾任意地结合使用数种表Ⅲ、Ⅴ和Ⅵ中所列的、用于本发明的以及其它的蛋白酶来

代替 12 号蛋白酶，也得到基本上类似的结果。

实例 4

按与实例 1 相同的方法制备洗涤剂组合物，只是用 20％的苯甲酰己内酰胺和（6－壬酰胺基己酰基）氧苯磺酸盐的 1：1 的混合物来代替壬酰基己内酰胺，并且过碳酸钠的用量为 20％，而磷酸盐的用量为 0％。

在这个实例中曾用列举在表Ⅲ中的蛋白酶 1～11 号和 13～25 号以及表Ⅴ和表Ⅵ中描述的、用于本发明的其它蛋白酶来代替 12 号蛋白酶、得到基本上类似的结果；在本实例中也曾任意地结合使用数种表Ⅲ、Ⅴ和Ⅵ中所列的、用于本发明的以及其它的蛋白酶来代替 12 号蛋白酶，也得到基本上类似的结果。

实例 5

按与实例 2 相同的方法制备洗涤剂组合物，唯一例外是用等价量的苯并噁嗪型活化剂来代替壬酰基己内酰胺。

在这个实例中曾用列举在表Ⅲ中的蛋白酶 1～11 号和 13～25 号以及表Ⅴ和表Ⅵ中描述的、用于本发明的其它蛋白酶来代替 12 号蛋白酶，得到基本上类似的结果；在本实例中也曾任意地结合使用数种表Ⅲ、Ⅴ和Ⅵ中所列的、用于本发明的以及其它的蛋白酶来代替 12 号蛋白酶，也得到基本上类似的结果。

实例 6

按与实例 2 相同的方法制备洗涤剂组合物，只是用 10％苯并噁嗪型活化剂和四乙酰基乙二胺的 1：1 的混合物来代替壬酰基己内酰胺，并且过碳酸钠的用量为 25％。

在这个实例中曾用列举在表Ⅲ中的蛋白酶 1～11 号和 13～25 号以及表Ⅴ和表Ⅵ中描述的、用于本发明的其它蛋白酶来代替 12

号蛋白酶，得到基本上类似的结果；在本实例中也曾任意地结合使用数种表Ⅲ、Ⅴ和Ⅵ中所列的、用于本发明的以及其它的蛋白酶来代替 12 号蛋白酶，也得到基本上类似的结果。

实例 7

用标准的挤压工艺制备了适合于手洗污垢织物的洗衣皂条，它含有以下组分:

组　分	重量%
C_{12} 线型烷基苯磺酸盐	30
磷酸盐（如三聚磷酸钠）	7
碳酸钠	25
焦磷酸钠	7
椰油单乙醇酰胺	2
沸石 A（0.1～10 微米）	5
羧甲基纤维素	0.2
聚丙烯酸酯（分子量 1400）	0.2
（6－壬酰胺基己酰基）氧苯磺酸盐	5
过碳酸钠	5
增白剂，香料	0.2
蛋白酶 12	0.3***
脂酶	0.3
$CaSO_4$	1
$MgSO_4$	1
水	4
填料*	平衡至 100%

" 注：可选自方便的材料诸如 $CaCO_3$、滑石、粘土、硅酸盐等。

"" 注：是指每克组合物中活性酶的毫克数。

这种洗衣皂条是在本专业中一般使用的通常的肥皂或洗涤剂皂条制造设备中被加工的。

在这个实例中曾用列举在表Ⅲ中的蛋白酶 1～11 号和 13～25 号以及表Ⅴ和表Ⅵ中描述的、用于本发明的其它蛋白酶来代替 12 号蛋白酶，得到基本上类似的结果；在本实例中也曾任意地结合使用数种表Ⅲ、Ⅴ和Ⅵ中所列的、用于本发明的以及其它的蛋白酶来代替 12 号蛋白酶，也得到基本上类似的结果。

实例 8

按与实例 7 相同的方法制备洗涤剂组合物，唯一例外是用等价量的苯甲酰己内酰胺来代替（6－壬酰胺基己酰基）氧苯磺酸盐。

在这个实例中曾用列举在表Ⅲ中的蛋白酶 1～11 号和 13～25 号以及表Ⅴ和表Ⅵ中描述的、用于本发明的其它蛋白酶来代替 12 号蛋白酶，得到基本上类似的结果；在本实例中也曾任意地结合使用数种表Ⅲ、Ⅴ和Ⅵ中所列的、用于本发明的以及其它的蛋白酶来代替 12 号蛋白酶，也得到基本上类似的结果。

实例 9

按与实例 7 相同的方法制备洗涤剂组合物，唯一的例外是用等价量的壬酰基己内酰胺来代替（6－壬酰胺基己酰基）氧苯磺酸盐。

在这个实例中曾用列举在表Ⅲ中的蛋白酶 1～11 号和 13～25 号以及表Ⅴ和表Ⅵ中描述的、用于本发明的其它蛋白酶来代替 12 号蛋白酶，得到基本上类似的结果；在本实例中也曾任意地结合使

用数种表Ⅲ、Ⅴ和Ⅵ中所列的、用于本发明的以及其它的蛋白酶来代替 12 号蛋白酶，也得到基本上类似的结果.

实例 10

制备了一种颗粒状的洗涤剂组合物，它含有以下组分:

组　分	重量%
阴离子性烷基硫酸盐	7
非离子性表面活性剂	5
沸石（0.1～10 微米）	10
柠檬酸三钠	2
SKS－6 硅酸盐助剂	10
丙烯酸酯马来酸酯共聚物	4
壬酰基已内酰胺	5
过碳酸钠*	15
碳酸钠	5
乙二胺二丁二酸盐螯合剂（EDDS）	0.4
抑泡剂	2
蛋白酶 12	0.5
污垢释出剂	0.2
次要组分、填料** 和水	平衡到 100%

* 注: 其平均颗粒大小为 400 至 1200 微米.

** 注: 可选自方便的材料，诸如 $CaCO_3$、滑石、粘土、硅酸盐等.

洗涤剂组合物中的对热和碱稳定的组分的水溶液调和混合物制好之后经喷雾干燥，再与别的组分混合在一起，以使它们含有表中

的组分以及所示的浓度。

在这个实例中曾用列举在表Ⅲ中的蛋白酶 1～11 号和 13～25 号以及表Ⅴ和表Ⅵ中描述的、用于本发明的其它蛋白酶来代替 12 号蛋白酶，得到基本上类似的结果；在本实例中也曾任意地结合使用数种表Ⅲ、Ⅴ和Ⅵ中所列的、用于本发明的以及其它的蛋白酶来代替 12 号蛋白酶，也得到基本上类似的结果。

实例 11

按与实例 10 相同的方法制备洗涤剂组合物，唯一的例外是用等价量的苯甲酰己内酰胺来代替壬酰基己内酰胺。

在这个实例中曾用列举在表Ⅲ中的蛋白酶 1～11 号和 13～25 号以及表Ⅴ和表Ⅵ中描述的、用于本发明的其它蛋白酶来代替 12 号蛋白酶，得到基本上类似的结果；在本实例中也曾任意地结合使用数种表Ⅲ、Ⅴ和Ⅵ中所列的、用于本发明的以及其它的蛋白酶来代替 12 号蛋白酶，也得到基本上类似的结果。

实例 12

用与实例 10 相同的方法制备洗涤剂组合物，只是用 15%（重量）的（6－壬酰胺基己酰基）氧苯磺酸盐来代替壬酰基己内酰胺，并且过碳酸钠的量为 30%。

在这个实例中曾用列举在表Ⅲ中的蛋白酶 1～11 号和 13～25 号以及表Ⅴ和表Ⅵ中描述的、用于本发明的其它蛋白酶来代替 12 号蛋白酶，得到基本上类似的结果；在本实例中也曾任意地结合使用数种表Ⅲ、Ⅴ和Ⅵ中所列的、用于本发明的以及其它的蛋白酶来代替 12 号蛋白酶，也得到基本上类似的结果。

实例 13

用与实例 10 相同的方法制备洗涤剂组合物，只是用 15%（重

量）的一种苯并噁嗪类活化剂来代替壬酰基己内酰胺，并且过碳酸钠的用量为 30％.

在这个实例中曾用列举在表Ⅲ中的蛋白酶 1～11 号和 13～25 号以及表Ⅴ和表Ⅵ中描述的、用于本发明的其它蛋白酶来代替 12 号蛋白酶，得到基本上类似的结果；在本实例中也曾任意地结合使用数种表Ⅲ、Ⅴ和Ⅵ中所列的、用于本发明的以及其它的蛋白酶来代替 12 号蛋白酶，也得到基本上类似的结果.

实例 14

洗涤性能试验

各种在本发明中的组合物的洗涤性能，是通过测量除去 EMPA 116（血／奶／炭黑在棉花上）在小块布样（Testfabrics, Inc., Middlesex, NJ07030）上的污点的能力来评价的.

把 6 块 EMPA 116 布样剪成 3 × 4-1/2 英寸大小并把边剪成锯齿形，放入含有 1000 毫升硬度为 15 gpg（其 Ca^{++} : Mg^{++} 为 3 : 1 重量：重量）的水、7 克洗涤剂以及适量酶的 7243S Terg-O-Tometer 型振荡式涤垢仪（United States Testing Co., Inc., Hoboken, NJ 出品）的每个罐中. 洗涤剂基剂是德国 Krefeld 的 *wfk*-Testgewebe GmbH, Adlerstrasse 42, Postfach 130762, D-47759 的 WFK1.洗涤剂:

组　分	在最终配方中所占的％
沸石 A	25％
硫酸钠	25％
苏打灰	10％
线型烷基苯磺酸盐	8.8％
醇乙氧化物（7～8 EO）	4.5％

钠肥皂	3％
硅酸钠	3％

再往这基剂中加入以下添加剂:

组　分	在最终配方中所占的％
过硼酸钠一水合物	13％
共聚物（Sokalan CP5）	4％
TAED（Mykon ATC Green）	3％
酶	0.5％
增白剂（Tinopal AMS-GX）	0.2％

过硼酸钠一水合物是从 Degussa Corporation, Ridgefield-Park, NJ 07660 得到的。Sokalan CP5 是从 BASF Corporation, Parsippany, NJ 07054 得到的。Mykon ATC Green（TAED，即四乙酰基乙二胺）是从英国 Warkwick International, Limited, Mostyn, Holywell, Clwyd CH8 9HE 得到的。Tinopal AMS GX 是从 Ciba-Geigy Corporation, Greensboro, NC 27419 得到的。

把六块 EMPA 116 布样在 60℃，在带有酶的洗涤剂中洗涤 30 分钟，然后每次用 1000 毫升水漂洗两次，每次 5 分钟。加入酶，为制作标准曲线可使最终浓度为 0.05 至 1 ppm，为通常的分析则只需 0.25 ppm。布样经干燥和挤压后在 CR－200 型（Minolta Corporation, Ramsey, NJ 07446 出品）Minolta 色度计的 $L^*a^*b^*$ 标度上用 L 值测量布样的反射度。性能指标是以迟缓芽孢杆菌（GG36）蛋白酶性能的百分数来报告的，它是用迟缓芽孢杆菌（GG36）蛋白酶的量除以为达到同样除污性能所需提供的各种蛋白酶的量所得数值 × 100 计算出来的。数据被列于表Ⅶ中。

表 VII

酶	洗涤性能
迟缓芽孢杆菌枯草溶菌素	100
N76D	310
N76D/S103A	230
N76D/V104I	130
N76D/V107V	160
N76D/S99D/S101R	370
N76D/S99D/S103A	290
N76D/S101R/S103A	130
N76D/S101R/V104I	300
N76D/S103A/V104I	320
N76D/S103G/V104I	160
N76D/S103A/V104F	210
N76D/S103A/V104N	110
N76D/S103A/V104T	170
N76D/V104I/I107V	210
N76D/S99D/S101R/S103A	220
N76D/S99D/S101R/V104I	140
N76D/S101G/S103A/V104I	170
N76D/S101R/S103A/V104I	150
N76D/S103A/V104I/S105A	170
N76D/S103A/V104T/I107A	120
N76D/S103A/V104T/I107L	110
N76D/S103A/V104I/L126F	110
N76D/S103A/V104I/S128G	280
N76D/S103A/V104I/L135I	160
N76D/S103A/V104I/L135V	160
N76D/S103A/V104I/D197E	170
N76D/S103A/V104I/N204A	160
N76D/S103A/V104I/N204G	150
N76D/S103A/V104I/P210I	470
N76D/S103A/V104I/M222A	100
N76D/S103A/V104I/T260P	280
N76D/S103A/V104I/S265N	190

序 列 表

（1）一般讯息:

(i) 申请人: Ghosh, Chanchal K.

Burns, Michael E.

DiGiulio, David N.

Getty, Edward E.

Hartshorn, Richard T.

Willey, Alan D.

Brode, Philip F., III

Barnett, Bobby L.

Rubingh, Donn N.

(ii) 发明名称: 含有蛋白酶的漂白组合物

(iii) 序列数: 15

(iv) 通信地址:

(A) 地址: The Procter & Gamble Company

(B) 街道: 11810 East River Road

(C) 城市: Cincinnati

(D) 州: OH

(E) 国家: 美国

(F) 邮政编码: 45253 - 8707

(v) 可从下列计算机读出:

(A) 介质形式: 硬盘

(B) 计算机: IBM PC 兼容的

(C) 操作系统: PC-DOS / MS-DOS

(D) 软件: Patentin Release #1.0, 文本#1.25.

(vi) 现行申请时期:

(A) 申请号:

(B) 申请日期: 1994.10.13

(C) 分类:

(viii) 代理人 / 代理处讯息:

(A) 姓名: Zerby, Kim William

(B) 登记号: 32,323

(C) 参考 / 摘要: 5041R

(ix) 电话电传讯息:

(A) 电话: (513) 627-2885

(B) 电传: (513) 627-0318

(2) SEQ ID NO:1 的讯息:

(i) 序列特性:

(A) 长度: 19 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 股: 单股

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: DNA (genomic)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:1:

GAAGCTGCAA CTCGTTAAA 19

(2) SEQ ID NO:2 的讯息:

(i) 序列特性:

(A) 长度: 18 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 股: 单股

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: DNA (genomic)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:2:

GCTGCTCTAG ACAATTCG 18

(2) SEQ ID NO:3 的讯息:

(i) 序列特性:

(A) 长度: 39 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 股: 单股

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: DNA (genomic)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:3:

GTATTAGGGG CGGACGGTCG AGGCGCCATC AGCTCGATT 39

(2) SEQ ID NO:4 的讯息:

(i) 序列特性:

(A) 长度: 33 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 股: 单股

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: DNA (genomic)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:4:

TCAGGTTCGG TCTCGAGCGT TGCCCAAGGA TTG 33

(2) SEQ ID NO:5 的讯息:

(i) 序列特性:

(A) 长度: 22 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 股: 单股

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: DNA (genomic)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:5:

CACGTTGCTA GCTTGAGTTT AG 22

(2) SEQ ID NO:6 的讯息:

(i) 序列特性:

(A) 长度: 1497 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 股: 单股

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: DNA (genomic)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:6:

GGTCTACTAA AATATTATTC CATACTATAC AATTAATACA CAGAATAATC TGTCTATTGG 60

TTATTCTGCA AATGAAAAAA AGGAGAGGAT AAAGAGTGAG AGGCAAAAAA GTATGGATCA 120

GTTTGCTGTT TGCTTTAGCG TTAATCTTTA CGATGGCGTT CGGCAGCACA TCCTCTGCCC 180

AGGCGGCAGG GAAATCAAAC GGGGAAAAGA AATATATTGT CGGGTTTAAA CAGACAATGA 240

GCACGATGAG CGCCGCTAAG AAGAAAGATG TCATTTCTGA AAAAGGCGGG AAAGTGCAAA 300

AGCAATTCAA ATATGTAGAC GCAGCTTCAG TCACATTAAA CGAAAAAGCT GTAAAAGAAT 360

TGAAAAAAGA CCCGAGCGTC GCTTACGTTG AAGAAGATCA CGTAGCACAT GAGTACGCGC 420

AGTCCGTGCC TTACGGCGTA TCACAAATTA AAGCCCCTGC TCTGCACTCT CAAGGCTACA 480

CTGGATCAAA TGTTAAAGTA GCGGTTATCG ACAGCGGTAT CGATTCTTCT CATCCTGATT 540

TAAAGGTAGC AAGCGGAGCC AGCATGGTTC CTTCTGAAAC AAATCCTTTC CAAGACAACA 600

ACTCTCACGG AACTCACGTT GCCGGCACAG TTGCGGCTCT TAATAACTCA ATCGGTGTAT 660

TAGGCGTTGC GCCAAGCGCA TCACTTTACG CTGTAAAAGT TCTCGGTGCT GACGGTTCCG 720

GCCAATACAG CTGGATCATT AACGGAATCG AGTGGGCGAT CGCAAACAAT ATGGACGTTA 780

TTAACATGAG CCTCGGCGGA CCTTCTGGTT CTGCTGCTTT AAAAGCGGCA GTTGATAAAG 840

CCGTTGCATC CGGCGTCGTA GTCGTTGCGG CAGCCGGTAA CGAAGGCACT TCCGGCAGCT 900

CAAGCACAGT GGGCTACCCT GGTAAATACC CTTCTGTCAT TGCAGTAGGC GCTGTTGACA 960

GCAGCAACCA AAGAGCATCT TTCTCAAGCG TAGGACCTGA GCTTGATGTC ATGGCACCTG 1020

GCGTATCTAT CCAAAGCACG CTTCCTGGAA ACAAATACGG GGCGTACAAC GGTACGTCAA 1080

TGGCATCTCC GCACGTTGCC GGAGCGGCTG CTTTGATTCT TTCTAAGCAC CCGAACTGGA 1140

CAAACACTCA AGTCCGCAGC AGTTTAGAAA ACACCACTAC AAAACTTGGT GATTCTTTGT 1200

ACTATGGAAA AGGGCTGATC AACGTACAAG CGGCAGCTCA GTAAAACATA AAAAACCGGC 1260

CTTGGCCCCG CCGGTTTTTT ATTATTTTTC TTCCTCCGCA TGTTCAATCC GCTCCATAAT 1320

CGACGGATGG CTCCCTCTGA AAATTTTAAC GAGAAACGGC GGGTTGACCC GGCTCAGTCC 1380

CGTAACGGCC AACTCCTGAA ACGTCTCAAT CGCCGCTTCC CGGTTTCCGG TCAGCTCAAT 1440

GCCATAACGG TCGGCGGCGT TTTCCTGATA CCGGGAGACG GCATTCGTAA TCGGATC 1497

(2) SEQ ID NO:7 的讯息:

(i) 序列特性:

(A) 长度: 275 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 股: 单股

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:7:

```
Ala Gln Ser Val Pro Tyr Gly Val Ser Gln Ile Lys Ala Pro Ala Leu
1               5                  10                  15

His Ser Gln Gly Tyr Thr Gly Ser Asn Val Lys Val Ala Val Ile Asp
            20                  25                  30

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

Ser Met Val Pro Ser Glu Thr Asn Pro Phe Gln Asp Asn Asn Ser His
    50                  55                  60

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

Val Leu Gly Val Ala Pro Ser Ala Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu
                85                  90                  95

Gly Ala Asp Gly Ser Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Asn Gly Ile Glu
            100                 105                 110
```

```
Trp Ala Ile Ala Asn Asn Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly
        115                 120                 125

Pro Ser Gly Ser Ala Ala Leu Lys Ala Ala Val Asp Lys Ala Val Ala
    130                 135                 140

Ser Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Glu Gly Thr Ser Gly
145                 150                 155                 160

Ser Ser Ser Thr Val Gly Tyr Pro Gly Lys Tyr Pro Ser Val Ile Ala
                165                 170                 175

Val Gly Ala Val Asp Ser Ser Asn Gln Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val
            180                 185                 190

Gly Pro Glu Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr
        195                 200                 205

Leu Pro Gly Asn Lys Tyr Gly Ala Tyr Asn Gly Thr Ser Met Ala Ser
    210                 215                 220

Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn
225                 230                 235                 240

Trp Thr Asn Thr Gln Val Arg Ser Ser Leu Glu Asn Thr Thr Thr Lys
                245                 250                 255

Leu Gly Asp Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Gln Ala
            260                 265                 270

Ala Ala Gln
        275
```

(2) SEQ ID NO:8 的讯息:

(i) 序列特性:

(A) 长度: 275 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 股: 单股

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:8:

```
Ala Gln Ser Val Pro Tyr Gly Ile Ser Gln Ile Lys Ala Pro Ala Leu
1               5                   10                  15

His Ser Gln Gly Tyr Thr Gly Ser Asn Val Lys Val Ala Val Ile Asp
            20                  25                  30
```

```
Ser Gly Ile Asp Ser Ser His Pro Asp Leu Asn Val Arg Gly Gly Ala
        35                  40                  45

Ser Phe Val Pro Ser Glu Thr Asn Pro Tyr Gln Asp Gly Ser Ser His
    50                  55                  60

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

Val Leu Gly Val Ser Pro Ser Ala Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu
                85                  90                  95

Asp Ser Thr Gly Ser Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Asn Gly Ile Glu
            100                 105                 110

Trp Ala Ile Ser Asn Asn Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly
        115                 120                 125

Pro Thr Gly Ser Thr Ala Leu Lys Thr Val Val Asp Lys Ala Val Ser
    130                 135                 140

Ser Gly Ile Val Val Ala Ala Ala Ala Gly Asn Glu Gly Ser Ser Gly
145                 150                 155                 160

Ser Thr Ser Thr Val Gly Tyr Pro Ala Lys Tyr Pro Ser Thr Ile Ala
                165                 170                 175

Val Gly Ala Val Asn Ser Ser Asn Gln Arg Ala Ser Phe Ser Ser Ala
            180                 185                 190

Gly Ser Glu Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr
        195                 200                 205

Leu Pro Gly Gly Thr Tyr Gly Ala Tyr Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr
    210                 215                 220

Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Thr
225                 230                 235                 240

Trp Thr Asn Ala Gln Val Arg Asp Arg Leu Glu Ser Thr Ala Thr Tyr
                245                 250                 255

Leu Gly Asn Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Gln Ala
            260                 265                 270

Ala Ala Gln
        275
```

(2) SEQ ID NO:9 的讯息:

(i) 序列特性:

(A) 长度: 274 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 股: 单股

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:9:

```
Ala Gln Thr Val Pro Tyr Gly Ile Pro Leu Ile Lys Ala Asp Lys Val
1               5                  10                  15

Gln Ala Gln Gly Phe Lys Gly Ala Asn Val Lys Val Ala Val Leu Asp
            20                  25                  30

Thr Gly Ile Gln Ala Ser His Pro Asp Leu Asn Val Val Gly Gly Ala
        35                  40                  45

Ser Phe Val Ala Gly Glu Ala Tyr Asn Thr Asp Gly Asn Gly His Gly
    50                  55                  60

Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asp Asn Thr Thr Gly Val
65                  70                  75                  80
Leu Gly Val Ala Pro Ser Val Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Asn
                85                  90                  95

Ser Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Ser Gly Ile Val Ser Gly Ile Glu Trp
            100                 105                 110

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

Ser Gly Ser Thr Ala Met Lys Gln Ala Val Asp Asn Ala Tyr Ala Arg
    130                 135                 140

Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Ser Gly Asn Ser Gly Ser
145                 150                 155                 160

Thr Asn Thr Ile Gly Tyr Pro Ala Lys Tyr Asp Ser Val Ile Ala Val
                165                 170                 175

Gly Ala Val Asp Ser Asn Ser Asn Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val Gly
            180                 185                 190

Ala Glu Leu Glu Val Met Ala Pro Gly Ala Gly Val Tyr Ser Thr Tyr
        195                 200                 205

Pro Thr Asn Thr Tyr Ala Thr Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Ser Pro
    210                 215                 220

His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn Leu
225                 230                 235                 240

Ser Ala Ser Gln Val Arg Asn Arg Leu Ser Ser Thr Ala Thr Tyr Leu
                245                 250                 255

Gly Ser Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Glu Ala Ala
            260                 265                 270

Ala Gln
```

(2) SEQ ID NO:10 的讯息:

(i) 序列特性:

(A) 长度: 269 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 股: 单股

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:10:

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

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

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

Phe Val Pro Gly Glu Pro Ser Thr Gln Asp Gly Asn Gly His Gly Thr
    50                  55                  60

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

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

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

Gly Asn Asn Gly Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Pro Ser
        115                 120                 125

Pro Ser Ala Thr Leu Glu Gln Ala Val Asn Ser Ala Thr Ser Arg Gly
    130                 135                 140

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

Val Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Ser Thr Tyr
        195                 200                 205

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

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

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

Tyr Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
            260                 265
```

(2) SEQ ID NO:11 的讯息:

(i) 序列特性:

(A) 长度: 1140 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 股: 单股

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: DNA (genomic)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:11:

ATGAAGAAAC CGTTGGGGAA AATTGTCGCA AGCACCGCAC TACTCATTTC TGTTGCTTTT 60
AGTTCATCGA TCGCATCGGC TGCTGAAGAA GCAAAAGAAA AATATTTAAT TGGCTTTAAT 120
GAGCAGGAAG CTGTCAGTGA GTTTGTAGAA CAAGTAGAGG CAAATGACGA GGTCGCCATT 180
CTCTCTGAGG AAGAGGAAGT CGAAATTGAA TTGCTTCATG AATTTGAAAC GATTCCTGTT 240
TTATCCGTTG AGTTAAGCCC AGAAGATGTG GACGCGCTTG AACTCGATCC AGCGATTTCT 300
TATATTGAAG AGGATGCAGA AGTAACGACA ATGGCGCAAT CAGTGCCATG GGAATTAGC 360
CGTGTGCAAG CCCCAGCTGC CCATAACCGT GGATTGACAG GTTCTGGTGT AAAAGTTGCT 420
GTCCTCGATA CAGGTATTTC CACTCATCCA GACTTAAATA TTCGTGGTGG CGCTAGCTTT 480
GTACCAGGGG AACCATCCAC TCAAGATGGG AATGGGCATG GCACGCATGT GGCCGGGACG 540
ATTGCTGCTT TAAACAATTC GATTGGCGTT CTTGGCGTAG CGCCGAGCGC GGAACTATAC 600
GCTGTTAAAG TATTAGGGGC GAGCGGTTCA GGTTCGGTCA GCTCGATTGC CCAAGGATTG 660
GAATGGGCAG GGAACAATGG CATGCACGTT GCTAATTTGA GTTTAGGAAG CCCTTCGCCA 720
AGTGCCACAC TTGAGCAAGC TGTTAATAGC GCGACTTCTA GAGGCGTTCT TGTTGTAGCG 780
GCATCTGGGA ATTCAGGTGC AGGCTCAATC AGCTATCCGG CCCGTTATGC GAACGCAATG 840
GCAGTCGGAG CTACTGACCA AAACAACAAC CGCGCCAGCT TTTCACAGTA TGGCGCAGGG 900
CTTGACATTG TCGCACCAGG TGTAAACGTG CAGAGCACAT ACCCAGGTTC AACGTATGCC 960
AGCTTAAACG GTACATCGAT GGCTACTCCT CATGTTGCAG GTGCAGCAGC CCTTGTTAAA 1020
CAAAAGAACC CATCTTGGTC CAATGTACAA ATCCGCAATC ATCTAAAGAA TACGGCAACG 1080
AGCTTAGGAA GCACGAACTT GTATGGAAGC GGACTTGTCA ATGCAGAAGC GGCAACACGC 1140

(2) SEQ ID NO:12 的讯息:

(i) 序列特性:

(A) 长度: 1140 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 股: 单股

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: DNA (genomic)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:12:

```
ATGAAGAAAC CGTTGGGGAA AATTGTCGCA AGCACCGCAC TACTCATTTC TGTTGCTTTT    60
AGTTCATCGA TCGCATCGGC TGCTGAAGAA GCAAAAGAAA AATATTTAAT TGGCTTTAAT   120
GAGCAGGAAG CTGTCAGTGA GTTTGTAGAA CAAGTAGAGG CAAATGACGA GGTCGCCATT   180
CTCTCTGAGG AAGAGGAAGT CGAAATTGAA TTGCTTCATG AATTTGAAAC GATTCCTGTT   240
TTATCCGTTG AGTTAAGCCC AGAAGATGTG GACGCGCTTG AACTCGATCC AGCGATTTCT   300
TATATTGAAG AGGATGCAGA AGTAACGACA ATGGCGCAAT CAGTGCCATG GGGAATTAGC   360
CGTGTGCAAG CCCCAGCTGC CCATAACCGT GGATTGACAG GTTCTGGTGT AAAAGTTGCT   420
GTCCTCGATA CAGGTATTTC CACTCATCCA GACTTAAATA TTCGTGGTGG CGCTAGCTTT   480
GTACCAGGGG AACCATCCAC TCAAGATGGG AATGGGCATG GCACGCATGT GGCCGGGACG   540
ATTGCTGCTT TAGACAACTC GATTGGCGTT CTTGGCGTAG CGCCGAGCGC GGAACTATAC   600
GCTGTTAAAG TATTAGGGGC GAGCGGTTCA GGCGCCATCA GCTCGATTGC CCAAGGATTG   660
GAATGGGCAG GGAACAATGG CATGCACGTT GCTAATTTGA GTTTAGGAAG CCCTTCGCCA   720
AGTGCCACAC TTGAGCAAGC TGTTAATAGC GCGACTTCTA GAGGCGTTCT TGTTGTAGCG   780
GCATCTGGGA ATTCAGGTGC AGGCTCAATC AGCTATCCGG CCCGTTATGC GAACGCAATG   840
GCAGTCGGAG CTACTGACCA AAACAACAAC CGCGCCAGCT TTTCACAGTA TGGCGCAGGG   900
CTTGACATTG TCGCACCAGG TGTAAACGTG CAGAGCACAT ACCCAGGTTC AACGTATGCC   960
AGCTTAAACG GTACATCGAT GGCTACTCCT CATGTTGCAG GTGCAGCAGC CCTTGTTAAA  1020
CAAAAGAACC CATCTTGGTC CAATGTACAA ATCCGCAATC ATCTAAAGAA TACGGCAACG  1080
AGCTTAGGAA GCACGAACTT GTATGGAAGC GGACTTGTCA ATGCAGAAGC GGCAACACGC  1140
```

(2) SEQ ID NO:13 的讯息:

(i) 序列特性:

(A) 长度: 30 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 股: 单股

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: DNA (genomic)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:13:

TATGCCAGCC ACAACGGTAC TTCGATGGCT 30

(2) SEQ ID NO:14 的讯息:

(i) 序列特性:

(A) 长度: 31 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 股: 单股

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: DNA (genomic)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:14:

CACAGTTGCG GCTCTAGATA ACTCAATCGG T 31

(2) SEQ ID NO:15 的讯息:

(i) 序列特性:

(A) 长度: 33 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 股: 单股

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: DNA (genomic)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:15:

GCTGACGGTT CCGGCGCTAT TAGTTGGATC ATT 33

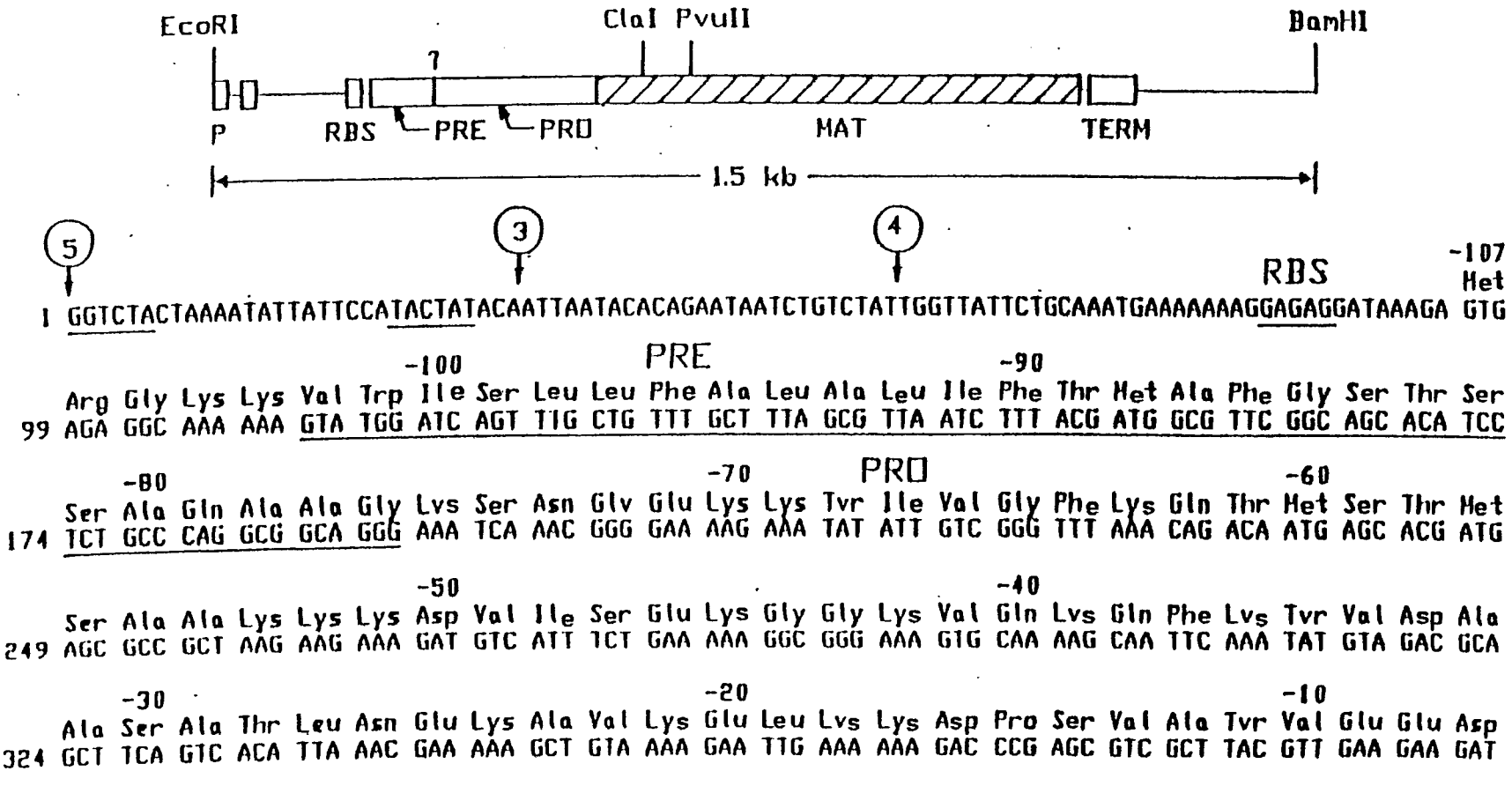


图 -1A

说 明 书 附 图 CPCH00636555D

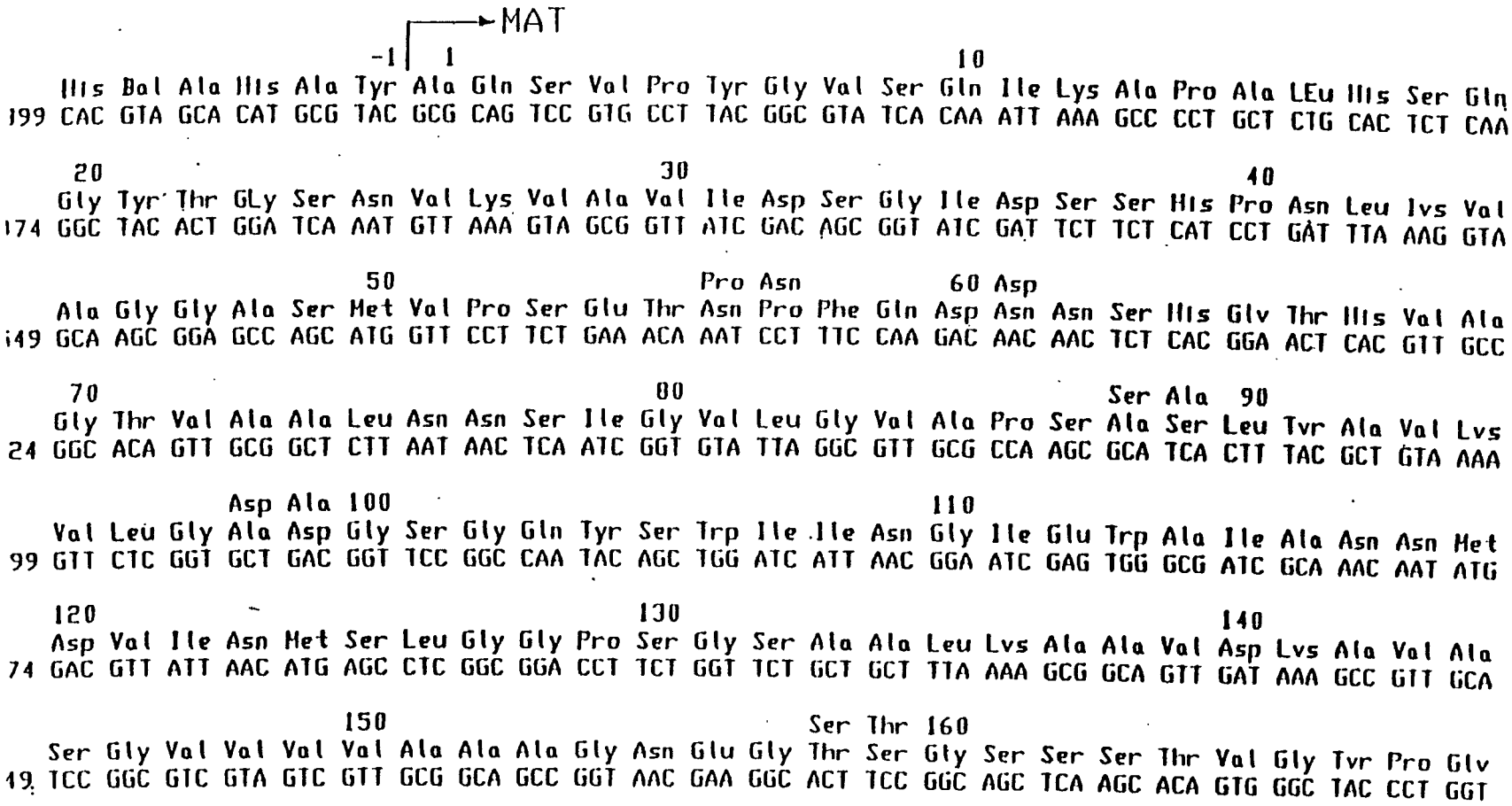

MAT
-1 1 10
His Bal Ala His Ala Tyr Ala Gln Ser Val Pro Tyr Gly Val Ser Gln Ile Lys Ala Pro Ala LEu His Ser Gln
199 CAC GTA GCA CAT GCG TAC GCG CAG TCC GTG CCT TAC GGC GTA TCA CAA ATT AAA GCC CCT GCT CTG CAC TCT CAA
20 30 40
Gly Tyr Thr GLy Ser Asn Val Lys Val Ala Val Ile Asp Ser Gly Ile Asp Ser Ser His Pro Asn Leu Ivs Val
174 GGC TAC ACT GGA TCA AAT GTT AAA GTA GCG GTT ATC GAC AGC GGT ATC GAT TCT TCT CAT CCT GAT TTA AAG GTA
50 Pro Asn 60 Asp
Ala Gly Gly Ala Ser Met Val Pro Ser Glu Thr Asn Pro Phe Gln Asp Asn Asn Ser His Glv Thr His Val Ala
149 GCA AGC GGA GCC AGC ATG GTT CCT TCT GAA ACA AAT CCT TTC CAA GAC AAC AAC TCT CAC GGA ACT CAC GTT GCC
70 80 Ser Ala 90
Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu Gly Val Ala Pro Ser Ala Ser Leu Tvr Ala Val Lvs
24 GGC ACA GTT GCG GCT CTT AAT AAC TCA ATC GGT GTA TTA GGC GTT GCG CCA AGC GCA TCA CTT TAC GCT GTA AAA
Asp Ala 100 110
Val Leu Gly Ala Asp Gly Ser Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Asn Gly Ile Glu Trp Ala Ile Ala Asn Asn Met
99 GTT CTC GGT GCT GAC GGT TCC GGC CAA TAC AGC TGG ATC ATT AAC GGA ATC GAG TGG GCG ATC GCA AAC AAT ATG
120 130 140
Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Pro Ser Gly Ser Ala Ala Leu Lvs Ala Ala Val Asp Lvs Ala Val Ala
74 GAC GTT ATT AAC ATG AGC CTC GGC GGA CCT TCT GGT TCT GCT GCT TTA AAA GCG GCA GTT GAT AAA GCC GTT GCA
150 Ser Thr 160
Ser Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Glu Gly Thr Ser Gly Ser Ser Ser Thr Val Gly Tvr Pro Glv
49 TCC GGC GTC GTA GTC GTT GCG GCA GCC GGT AAC GAA GGC ACT TCC GGC AGC TCA AGC ACA GTG GGC TAC CCT GGT

图 -1B

```
    170                                 180                                 190
    Lys Tyr Pro Ser Val Ile Ala VaL Gly Ala Val Asp Ser Ser Asn Gln Arp Ala Ser Phe Ser Ser Vsl Gly Pro
924 AAA TAC CCT TCT GTC ATT GCA GTA GGC GCT GTT GAC AGC AGC AAC CAA AGA GCA TCT TTC TCA AGC GTA GGA CCT

                    200                                 210
    Glu Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr Leu Pro Gly Asn Lys Tyr Gly Ala Tyr Asn Gly
999 GAG CTT GAT GTC ATG GCA CCT GGC GTA TCT ATC CAA AGC ACG CTT CCT GGA AAC AAA TAC GGG GCG TAC AAC GGT

    220                                 230                                 240
    Thr Ser Met Ala Ser Pro His Val Ala Gly Asl Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn Trp Thr Asn Thr
1074 ACG TCA ATG GCA TCT CCG CAC GTT GCC GGA GCG GCT GCT TTG ATT CTT TCT AAG CAC CCG AAC TGG ACA AAC ACT

                    250 Gln                             260
    Gln Val Aro Ser Ser Leu Glu Asn Thr Thr Thr Lys Leu Gly Asp Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn
1149 CAA GTC CGC AGC AGT TTA GAA AAC ACC ACT ACA AAA CTT GGT GAT TCT TTG TAC TAT GGA AAA GGG CTG ATC AAC

    270                 275
    Val Gln Ala Ala Ala Gln DC                  TERM
1224 GTA CAA GCG GCA GCT CAG TAA  AACATAAAAAACCGGCCTTGGCCCCGCCGGTTTTTTATTATTTTTCTTCCTCCGCATGTTCAATCCGCTCC

316 ATAATCGACGGATGGCTCCCTCTGAAAATTTTAACGAGAAACGGCGGGTTGACCCGGCTCAGTCCCGTAACGGCCAACTCCTGAAACGTCTCAATCGCCG

416 CTTCCCGGTTTCCGGTCAGCTCAATGCCATAACGGTCGGCGGCGTTTTCCTGATACCGGGAGACGGCATTCGTAATCGGATC
```

图-1C

在由解淀粉芽孢杆菌得到的
枯草溶菌素中保存的残基

```
1                                   10                                  20
A  Q  S  V  P  .  G  .  .  .  .  .  A  P  A  .  H  .  .  G

21                                  30                                  40
.  T  G  S  .  V  K  V  A  V  .  D  .  G  .  .  .  .  H  P

41                                  50                                  60
D  L  .  .  .  G  G  A  S  .  V  P  .  .  .  .  .  .  Q  D

61                                  70                                  80
.  N  .  H  G  T  H  V  A  G  T  .  A  A  L  N  N  S  I  G

81                                  90                                 100
V  L  G  V  A  P  S  A  .  L  Y  A  V  K  V  L  G  A  .  G

101                                110                                 120
S  G  .  .  S  .  L  .  .  G  .  E  W  A  .  N  .  .  .  .

121                                130                                 140
V  .  N  .  S  L  G  .  P  S  .  S  .  .  .  .  .  A  .  .

141                                150                                 160
.  .  .  .  .  G  V  .  V  V  A  A  .  G  N  .  G  .  .  .

161                                170                                 180
.  .  .  .  .  .  Y  P  .  .  Y  .  .  .  .  A  V  G  A  .

181                                190                                 200
D  .  .  N  .  .  A  S  F  S  .  .  G  .  .  L  D  .  .  A

201                                210                                 220
P  G  V  .  .  Q  S  T  .  P  G  .  .  Y  .  .  .  N  G  T

221                                230                                 240
S  M  A  .  P  H  V  A  G  A  A  A  L  .  .  .  K  .  .  .

241                                250                                 260
W  .  .  .  Q  .  R  .  .  L  .  N  T  .  .  .  L  G  .  .

261                                270
.  .  Y  G  .  G  L  .  N  .  .  A  A  .  .
```

图 2

图 3/A

枯草溶菌素序列的比较
解淀粉芽孢杆菌
枯草杆菌
地衣芽孢杆菌
迟缓芽孢杆菌

```
01                  10                  20                  30
A Q S V P Y G V S Q I K A P A L H S Q G Y T G S N V K V A V I D S G I D S S H P
A Q S V P Y G I S Q I K A P A L H S Q G Y T G S N V K V A V I D S G I D S S H P
A Q T V P Y G I P L I K A D K V Q A Q G F K G A N V K V A V L D T G I Q A S H P
A Q S V P W G I S R V Q A P A A H N R G L T G S G V K V A V L D T G I S T * H P

41                  50                  60                  70
D L K V A G G A S M V P S E T N P F Q D N N S H G T H V A G T V A A L N N S I G
D L N V R G G A S F V P S E T N P Y Q D G S S H G T H V A G T I A A L N N S I G
D L N V V G G A S F V A G E A Y N * T D G N G H G T H V A G T V A A L D N T T G
D L N I R G G A S F V P G E * P S T Q D G N G H G T H V A G T I A A L N N S I G

81                  90                  100                 110
V L G V A P S A S L Y A V K V L G A D G S G Q Y S W I I N G I E W A I A N N M D
V L G V S P S A S L Y A V K V L D S T G S G Q Y S W I I N G I E W A I S N N M D
V L G V S P S A S L Y A V K V L N S S G S G S Y S G I V S G I E W A T T N G M D
V L G V A P S V S L Y A V K V L G A S G S G S V S S I A Q G L E W A G N N G M H

121                 130                 140                 150
V I N M S L G G P S G S A A L K A A V D K A V A S G V V V V A A A G N E G T S G
V I N M S L G G P T G S T A L K T V V D K A V S S G I V V A A A A G N E G S S G
V I N M S L G G A S G S T A M K Q A V D N A Y A R G V V V V A A A G N S G N S G
V A N L S L G S P S P S A T L E Q A V N S A T S R G V L V V A A S G N S G A G S
```

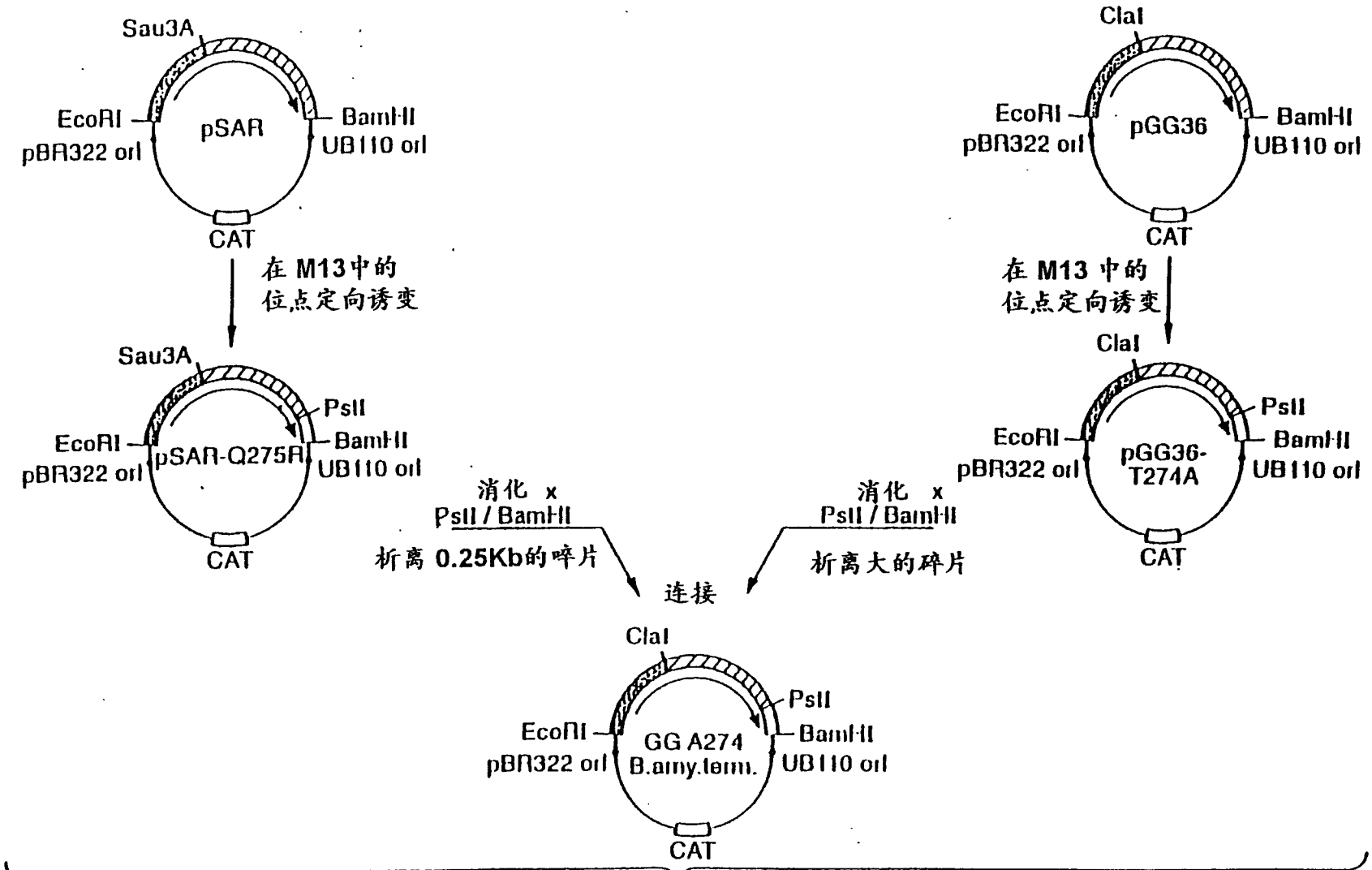
```
161                 170                 180                 190
S S S T V G Y P G K Y P S V I A V G A V D S S N Q R A S F S S V G P E L D V M A
S T S T V G Y P A K Y P S T I A V G A V N S S N Q R A S F S S A G S E L D V M A
S T N T I G Y P A K Y D S V I A V G A V D S N S N R A S F S S V G A E L E V M A
* * * * I S Y P A R Y A N A M A V G A T D Q N N N R A S F S Q Y G A G L D I V A

201                 210                 220                 230
P G V S I Q S T L P G N K Y G A Y N G T S M A S P H V A G A A A L I L S K H P N
P G V S I Q S T L P G G T Y G A Y N G T S M A T P H V A G A A A L I L S K H P T
P G A G V Y S T Y P T N T Y A T L N G T S M A S P H V A G A A A L I L S K H P N
P G V N V Q S T Y P G S T Y A S L N G T S M A T P H V A G A A A L V K Q K N P S

241                 250                 260                 270
W T N T Q V R S S L E N T T T K L G D S F Y Y G K G L I N V Q A A A Q
W T N A Q V R D R L E S T A T Y L G N S F Y Y G K G L I N V Q A A A Q
L S A S Q V R N R L S S T A T Y L G S S F Y Y G K G L I N V E A A A Q
W S N V Q I R N H L K N T A T S L G S T N L Y G S G L V N A E A A T R
```

图 3/B

图_4


Sau3A
EcoRI
pBR322 ori
pSAR
BamHI
UB110 ori
CAT
在 M13中的
位点定向诱变
Sau3A
PstI
EcoRI
pBR322 ori
pSAR-Q275R
BamHI
UB110 ori
CAT
消化 x
PstI / BamHI
析离 0.25Kb的碎片
ClaI
EcoRI
pBR322 ori
pGG36
BamHI
UB110 ori
CAT
在 M13 中的
位点定向诱变
ClaI
PstI
EcoRI
pBR322 ori
pGG36-
T274A
BamHI
UB110 ori
CAT
消化 x
PstI / BamHI
析离大的碎片
连接
ClaI
PstI
EcoRI
pBR322 ori
GG A274
B.amy.term.
BamHI
UB110 ori
CAT


ClaI
PstI
EcoRI
pBR322 ori
GG A274
B.amy.term.
BamHI
UB110 ori
CAT
在 M13 中的
位点定向诱变
ClaI
EcoRI
pBR322 ori
GG T274
B.amy.term.
BamHI
UB110 ori
CAT

图_5

```
        10                  30                  50
ATGAAGAAACCGTTGGGGAAAATTGTCGCAAGCACCGCACTACTCATTTCTGTTGCTTTT
MetLysLysProLeuGlyLysIleValAlaSerThrAlaLeuLeuIleSerValAlaPhe
        70                  90                  110
AGTTCATCGATCGCATCGGCTGCTGAAGAAGCAAAAGAAAAATATTTAATTGGCTTTAAT
SerSerSerIleAlaSerAlaAlaGluGluAlaLysGluLysTyrLeuIleGlyPheAsn
        130                 150                 170
GAGCAGGAAGCTGTCAGTGAGTTTGTAGAACAAGTAGAGGCAAATGACGAGGTCGCCATT
GluGlnGluAlaValSerGluPheValGluGlnValGluAlaAsnAspGluValAlaIle
        190                 210                 230
CTCTCTGAGGAAGAGGAAGTCGAAATTGAATTGCTTCATGAATTTGAAACGATTCCTGTT
LeuSerGluGluGluGluValGluIleGluLeuLeuHisGluPheGluThrIleProVal
        250                 270                 290
TTATCCGTTGAGTTAAGCCCAGAAGATGTGGACGCGCTTGAACTCGATCCAGCGATTTCT
LeuSerValGluLeuSerProGluAspValAspAlaLeuGluLeuAspProAlaIleSer
        310                 330                 350
TATATTGAAGAGGATGCAGAAGTAACGACAATGGCGCAATCAGTGCCATGGGGAATTAGC
TyrIleGluGluAspAlaGluValThrThrMetAlaGlnSerValProTrpGlyIleSer
        370                 390                 410
CGTGTGCAAGCCCCAGCTGCCCATAACCGTGGATTGACAGGTTCTGGTGTAAAAGTTGCT
ArgValGlnAlaProAlaAlaHisAsnArgGlyLeuThrGlySerGlyValLysValAla
        430                 450                 470
GTCCTCGATACAGGTATTTCCACTCATCCAGACTTAAATATTCGTGGTGGCGCTAGCTTT
ValLeuAspThrGlyIleSerThrHisProAspLeuAsnIleArgGlyGlyAlaSerPhe
        490                 510                 530
GTACCAGGGGAACCATCCACTCAAGATGGGAATGGGCATGGCACGCATGTGGCCGGGACG
ValProGlyGluProSerThrGlnAspGlyAsnGlyHisGlyThrHisValAlaGlyThr
        550                 570                 590
ATTGCTGCTTTAAACAATTCGATTGGCGTTCTTGGCGTAGCGCCGAGCGCGGAACTATAC
IleAlaAlaLeuAsnAsnSerIleGlyValLeuGlyValAlaProSerAlaGluLeuTyr
        610                 630                 650
GCTGTTAAAGTATTAGGGGCGAGCGGTTCAGGTTCGGTCAGCTCGATTGCCCAAGGATTG
AlaValLysValLeuGlyAlaSerGlySerGlySerValSerSerIleAlaGlnGlyLeu
        670                 690                 710
GAATGGGCAGGGAACAATGGCATGCACGTTGCTAATTTGAGTTTAGGAAGCCCTTCGCCA
GluTrpAlaGlyAsnAsnGlyMetHisValAlaAsnLeuSerLeuGlySerProSerPro
        730                 750                 770
AGTGCCACACTTGAGCAAGCTGTTAATAGCGCGACTTCTAGAGGCGTTCTTGTTGTAGCG
SerAlaThrLeuGluGlnAlaValAsnSerAlaThrSerArgGlyValLeuValValAla
        790                 810                 830
GCATCTGGGAATTCAGGTGCAGGCTCAATCAGCTATCCGGCCCGTTATGCGAACGCAATG
AlaSerGlyAsnSerGlyAlaGlySerIleSerTyrProAlaArgTyrAlaAsnAlaMet
        850                 870                 890
GCAGTCGGAGCTACTGACCAAAACAACAACCGCGCCAGCTTTTCACAGTATGGCGCAGGG
AlaValGlyAlaThrAspGlnAsnAsnAsnArgAlaSerPheSerGlnTyrGlyAlaGly
```

图 6A

41

```
        910                 930                 950
CTTGACATTGTCGCCACCAGGTGTAAACGTGCAGAGCACATACCCAGGTTCAACGTATGCC
LeuAspIleValAlaProGlyValAsnValGlnSerThrTyrProGlySerThrTyrAla

        970                 990                 1010
AGCTTAAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTGCCACGTGCAGCAGCCCTTGTTAAA
SerLeuAsnGlyThrSerMetAlaThrProHisValAlaGlyAlaAlaAlaLeuValLys

        1030                1050                1070
CAAAACAACCCATCTTGGTCCAATGTACAAATCCGCAATCATCTAAAGAATACGGCAACG
GlnLysAsnProSerTrpSerAsnValGlnIleArgAsnHisLeuLysAsnThrAlaThr

        1090                1110                1130
AGCTTAGGAAGCACGAACTTGTATGGAAGCGGACTTGTCAATGCAGAAGCGGCAACACGC
SerLeuGlySerThrAsnLeuTyrGlySerGlyLeuValAsnAlaGluAlaAlaThrArg
```

图 6B

```
        10                  30                  50
ATGAAGAAACCGTTGGGGAAAATTGTCGCAAGCACCGCACTACTCATTTCTGTTGCTTTT
MetLysLysProLeuGlyLysIleValAlaSerThrAlaLeuLeuIleSerValAlaPhe

        70                  90                  110
AGTTCATCGATCGCATCGGCTGCTGAAGAAGCAAAAGAAAAATATTTAATTGGCTTTAAT
SerSerSerIleAlaSerAlaAlaGluGluAlaLysGluLysTyrLeuIleGlyPheAsn

       130                 150                 170
GAGCAGGAAGCTGTCAGTGAGTTTGTAGAACAAGTAGAGGCAAATGACGAGGTCGCCATT
GluGlnGluAlaValSerGluPheValGluGlnValGluAlaAsnAspGluValAlaIle

       190                 210                 230
CTCTCTGAGGAAGAGGAAGTCGAAATTGAATTGCTTCATGAATTTGAAACGATTCCTGTT
LeuSerGluGluGluGluValGluIleGluLeuLeuHisGluPheGluThrIleProVal

       250                 270                 290
TTATCCGTTGAGTTAAGCCCAGAAGATGTGGACGCGCTTGAACTCGATCCAGCGATTTCT
LeuSerValGluLeuSerProGluAspValAspAlaLeuGluLeuAspProAlaIleSer

       310                 330                 350
TATATTGAAGAGGATGCAGAAGTAACGACAATGGCGCAATCAGTGCCATGGGGAATTAGC
TyrIleGluGluAspAlaGluValThrThrMetAlaGlnSerValProTrpGlyIleSer

       370                 390                 410
CGTGTGCAAGCCCCAGCTGCCCATAACCGTGGATTGACAGGTTCTGGTGTAAAAGTTGCT
ArgValGlnAlaProAlaAlaHisAsnArgGlyLeuThrGlySerGlyValLysValAla

       430                 450                 470
GTCCTCGATACAGGTATTTCCACTCATCCAGACTTAAATATTCGTGGTGGCGCTAGCTTT
ValLeuAspThrGlyIleSerThrHisProAspLeuAsnIleArgGlyGlyAlaSerPhe

       490                 510                 530
GTACCAGGGGAACCATCCACTCAAGATGGGAATGGGCATGGCACGCATGTGGCGGGGACG
ValProGlyGluProSerThrGlnAspGlyAsnGlyHisGlyThrHisValAlaGlyThr

       550                 570                 590
ATTGCTGCTTTAGACAACTCGATTGGCGTTCTTGGCGTAGCGCCCAGCGCGCGAACTATAC
IleAlaAlaLeuAspAsnSerIleGlyValLeuGlyValAlaProSerAlaGluLeuTyr

       610                 630                 650
GCTGTTAAAGTATTAGGGGCGAGCGGTTCAGGCGCCCATCAGCTCGATTGCCCAAGGATTG
AlaValLysValLeuGlyAlaSerGlySerGlyAlaIleSerSerIleAlaGlnGlyLeu

       670                 690                 710
GAATGGGCAGGGAACAATGGCATGCACGTTGCTAATTTGAGTTTAGGAAGCCCTTCGCCA
GluTrpAlaGlyAsnAsnGlyMetHisValAlaAsnLeuSerLeuGlySerProSerPro

       730                 750                 770
AGTGCCACACTTGAGCAAGCTGTTAATAGCGCGACTTCTAGAGGCGTTCTTGTTGTAGCG
SerAlaThrLeuGluGlnAlaValAsnSerAlaThrSerArgGlyValLeuValValAla

       790                 810                 830
GCATCTGGGAATTCAGGTGCAGGCTCAATCAGCTATCCGGCCCGTTATGCGAACGCAATG
AlaSerGlyAsnSerGlyAlaGlySerIleSerTyrProAlaArgTyrAlaAsnAlaMet

       850                 870                 890
GCAGTCGGAGCTACTGACCAAAACAACAACGCGCCAGCTTTTCACAGTATGCGCAGGG
AlaValGlyAlaThrAspGlnAsnAsnAsnArgAlaSerPheSerGlnTyrGlyAlaGly
```

图 7A

43

```
                                    930                 950
CTTGACATTGTCGCACCAGGTGTAAACGTGCAGAGCACATACCCAGGTTCAACGTATGCC
LeuAspIleValAlaProGlyValAsnValGlnSerThrTyrProGlySerThrTyrAla

        970                 990                 1010
AGCTTAAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTGCAGGTGCAGCAGCCCTTGTTAAA
SerLeuAsnGlyThrSerMetAlaThrProHisValAlaGlyAlaAlaAlaLeuValLys

       1030                1050                1070
CAAAAGAACCCATCTTGGTCCAATGTACAAATCCGCAATCATCTAAAGAATACGGCAACG
GlnLyaAsnProSerTrpSerAsnValGlnIleArgAsnHisLeuLysAsnThrAlaThr

       1090                1110                1130
AGCTTAGGAAGCACGAACTTGTATGGAAGCGGACTTGTCAATGCAGAAGCGGCAACACGC
SerLeuGlySerThrAsnLeuTyrGlySerGlyLeuValAsnAlaGluAlaAlsThrArg
```

图 7B

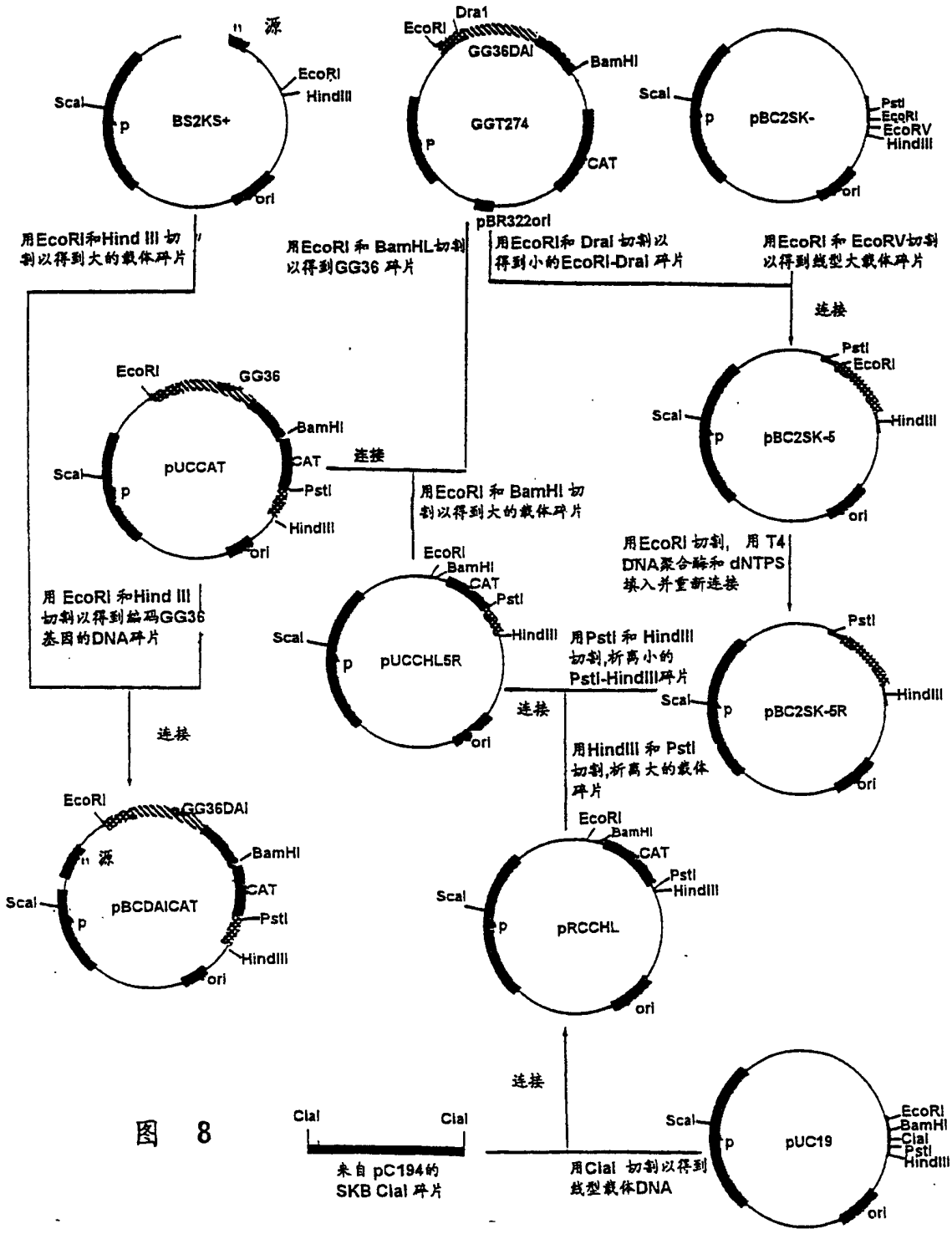

f1 源
EcoRI
HindIII
ScaI
p
BS2KS+
ori
Dra1
EcoRI
GG36DAI
BamHI
GGT274
P
CAT
pBR322ori
ScaI
p
pBC2SK-
PstI
EcoRI
EcoRV
HindIII
ori
用EcoRI和Hind III 切割以得到大的载体碎片
用EcoRI 和 BamHL切割以得到GG36 碎片
用EcoRI和 DraI 切割以得到小的EcoRI-DraI 碎片
用EcoRI 和 EcoRV切割以得到线型大载体碎片
连接
EcoRI
GG36
BamHI
CAT
ScaI
p
pUCCAT
PstI
HindIII
ori
连接
PstI
EcoRI
ScaI
p
pBC2SK-5
HindIII
ori
用EcoRI 和 BamHI 切割以得到大的载体碎片
用EcoRI 切割，用 T4 DNA聚合酶和 dNTPS 填入并重新连接
EcoRI
BamHI
CAT
PstI
ScaI
p
pUCCHL5R
HindIII
ori
用PstI 和 HindIII 切割,析离小的 PstI-HindIII碎片
PstI
ScaI
p
pBC2SK-5R
HindIII
ori
用 EcoRI 和Hind III 切割以得到编码GG36 基因的DNA碎片
连接
连接
用HindIII 和 PstI 切割,析离大的载体碎片
EcoRI
GG36DAI
f1 源
BamHI
ScaI
p
pBCDAICAT
CAT
PstI
HindIII
ori
EcoRI
BamHI
CAT
PstI
ScaI
p
pRCCHL
HindIII
ori
连接
ClaI
ClaI
来自 pC194的 SKB ClaI 碎片
用ClaI 切割以得到线型载体DNA
ScaI
p
pUC19
EcoRI
BamHI
ClaI
PstI
HindIII
ori

图 8

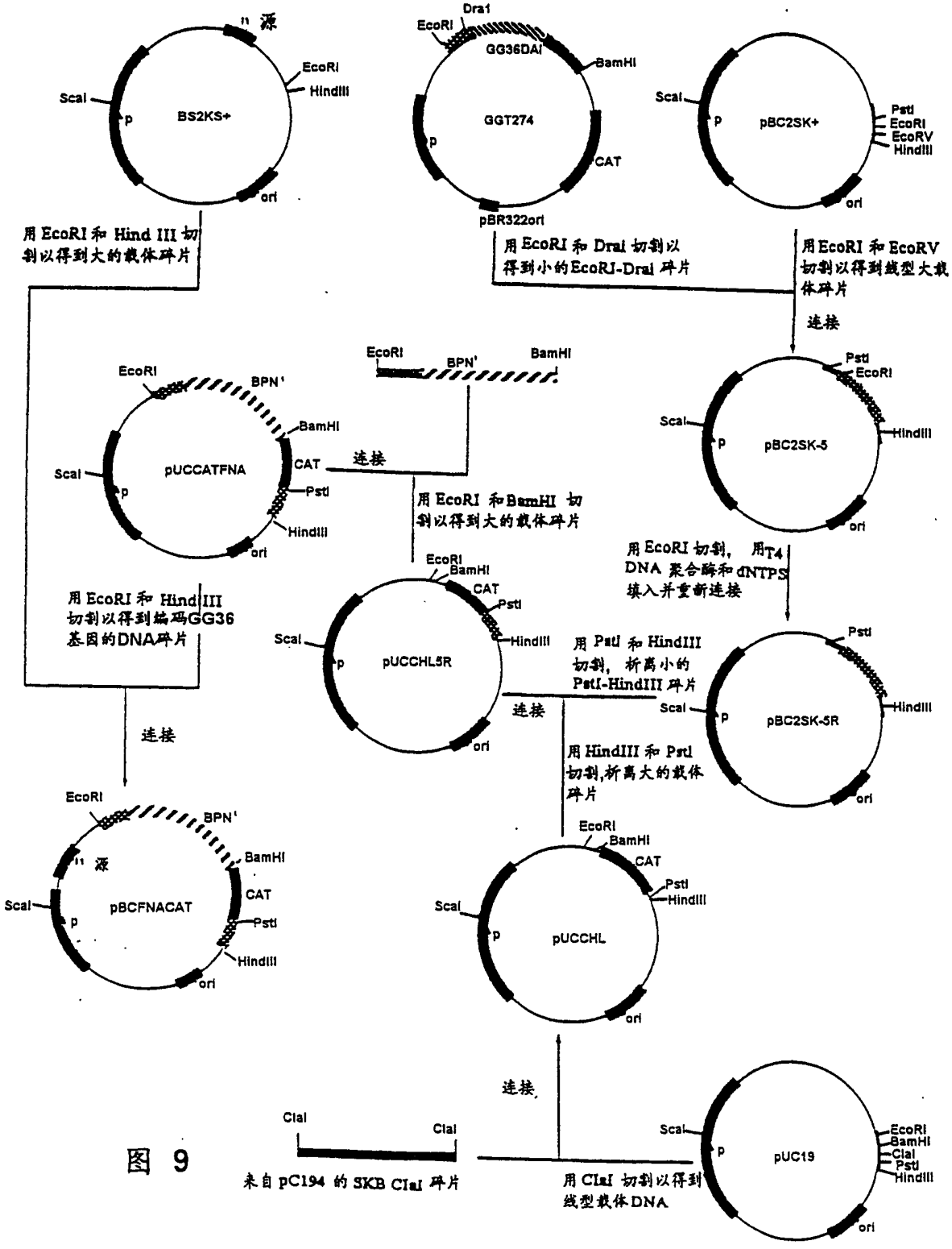

f1 源
EcoRI
HindIII
ScaI
BS2KS+
p
ori
Dra1
EcoRI
GG36DAI
BamHI
GGT274
CAT
pBR322ori
ScaI
pBC2SK+
PstI
EcoRI
EcoRV
HindIII
用EcoRI和 Hind III 切割以得到大的载体碎片
用EcoRI和 DraI 切割以得到小的EcoRI-DraI 碎片
用EcoRI和 EcoRV 切割以得到线型大载体碎片
连接
EcoRI
BPN'
BamHI
pUCCATFNA
CAT
PstI
HindIII
连接
pBC2SK-5
用EcoRI 和BamHI 切割以得到大的载体碎片
用EcoRI 切割，用T4 DNA 聚合酶和 dNTPS 填入并重新连接
用EcoRI 和 HindIII 切割以得到编码GG36基因的DNA碎片
pUCCHL5R
用 PstI 和 HindIII 切割，析离小的 PstI-HindIII 碎片
pBC2SK-5R
连接
用HindIII 和 PstI 切割,析离大的载体碎片
连接
pBCFNACAT
pUCCHL
连接
ClaI
来自 pC194 的 SKB ClaI 碎片
用 ClaI 切割以得到线型载体DNA
pUC19

图 9