

1. 一种生产过氧羧酸的方法,包括:

(a) 提供一组包含以下物质的反应组分:

(1) 至少一种选自下列的底物:

(i) 一种或多种具有以下结构的酯:



其中

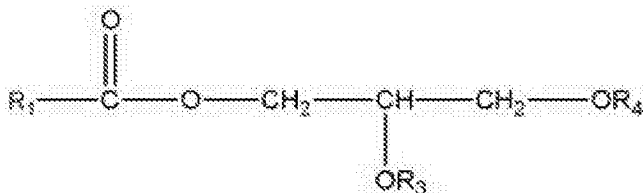
X = 式R₆-C(O)O的酯基;

R₆ = 任选地被羟基或C1-C4烷氧基取代的C1-C7直链、支化或环状烃基部分,其中对于R₆ = C2-C7, R₆任选地包含一个或多个醚键;

R₅ = 任选地被羟基取代的C1-C6直链、支化或环状烃基部分,或五元环状杂芳族部分,或六元环状芳族或杂芳族部分;其中R₅中的每个碳原子单独地包含不超过一个羟基,或不超过一个酯基或羧酸基;其中R₅任选地包含一个或多个醚键;

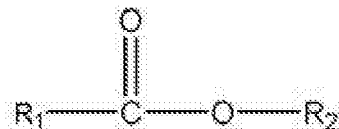
m = 1至R₅中碳原子数范围内的整数;并且其中所述酯在25°C下具有至少5ppm的水中溶解度;

(ii) 一种或多种具有以下结构的甘油酯:



其中R₁ = 任选地被羟基或C1-C4烷氧基取代的C1-C21直链或支链烷基,并且R₃和R₄单独地为H或R₁C(O);

(iii) 一种或多种下式的酯:



其中R₁ = 任选地被羟基或C1-C4烷氧基取代的C1-C7直链或支链烷基,并且R₂ = C1-C10直链或支链烷基、烯基、炔基、芳基、烷基芳基、烷基杂芳基、杂芳基、(CH₂CH₂O)_nH、或(CH₂CH(CH₃)-O)_nH,并且n为1至10;

(iv) 一种或多种酰化的单糖、酰化的二糖、或酰化的多糖;和

(v) (i)至(iv)的任何组合;

(2) 过氧源;和

(3) 包含多肽的酶催化剂,所述多肽具有过水解活性以及与SEQ ID NO: 4中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列,前提条件是结合至起催化作用的组氨酸的C-末端侧的氨基酸残基不是谷氨酸,其中所述氨基酸序列是SEQ ID NO: 14或16;

(b) 在合适的反应条件下合并该组反应组分,从而产生过氧羧酸;以及

(c) 任选地,稀释步骤(b)中产生的过氧羧酸。

2. 根据权利要求1所述的方法,还包括以下步骤:d) 使硬质表面或无生命物体与步骤(b)或步骤(c)中产生的过氧羧酸接触;从而所述硬质表面或所述无生命物体被消毒、漂白、

脱色、或它们的组合。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述无生命物体是医疗器械。

4. 根据权利要求1所述的方法,还包括以下步骤:d)使衣物制品或纺织物与步骤(b)或步骤(c)中产生的过氧羧酸接触;从而所述衣物制品或纺织物获得有益效果。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述有益效果选自消毒、卫生处理、漂白、脱色、除臭、以及它们的组合。

6. 根据权利要求1所述的方法,还包括以下步骤:d)使木浆或纸浆与步骤(b)或步骤(c)中产生的过氧羧酸接触;从而所述木浆或纸浆被漂白。

7. 根据权利要求1所述的方法,其中所述底物选自:甘油一乙酸酯;甘油二乙酸酯;甘油三乙酸酯;甘油一丙酸酯;甘油二丙酸酯;甘油三丙酸酯;甘油一丁酸酯;甘油二丁酸酯;甘油三丁酸酯;葡糖五乙酸酯; β -D-半乳糖五乙酸酯、山梨醇六乙酸酯、蔗糖八乙酸酯、木糖四乙酸酯;乙酰化木聚糖;乙酰化木聚糖片段; β -D-呋喃核糖-1,2,3,5-四乙酸酯;三-O-乙酰基-D-半乳糖;三-O-乙酰基-D-葡萄糖;1,2-乙二醇、1,2-丙二醇、1,3-丙二醇、1,2-丁二醇、1,3-丁二醇、2,3-丁二醇、1,4-丁二醇、1,2-戊二醇、2,5-戊二醇、1,2-己二醇、2,5-己二醇、1,6-己二醇的单酯或二酯;4-乙酰氧基苯甲酸;以及它们的混合物。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述底物是甘油三乙酸酯。

9. 根据权利要求1所述的方法,其中所产生的过氧羧酸为过乙酸、过丙酸、过丁酸、过乳酸、过乙醇酸、过甲氧基乙酸、过 β -羟基丁酸、或它们的混合物。

10. 根据权利要求1所述的方法,其中所述酶催化剂为微生物细胞、透化的微生物细胞、微生物细胞提取物、部分纯化的酶、或纯化的酶的形式。

11. 一种组合物,包含:

(a) 一组包含以下物质的反应组分:

(1) 至少一种选自下列的底物:

(i) 一种或多种具有以下结构的酯:



其中

X = 式R₆-C(O)O的酯基;

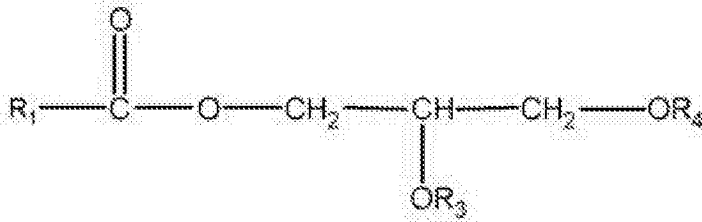
R₆ = 任选地被羟基或C₁-C₄烷氧基取代的C₁-C₇直链、支化或环状烃基部分,其中对于R₆ = C₂-C₇,R₆任选地包含一个或多个醚键;

R₅ = 任选地被羟基取代的C₁-C₆直链、支化或环状烃基部分,或五元环状杂芳族部分,或六元环状芳族或杂芳族部分;其中R₅中的每个碳原子单独地包含不超过一个羟基,或不超过一个酯基或羧酸基;其中R₅任选地包含一个或多个醚键;

m = 1至R₅中碳原子数范围内的整数;并且

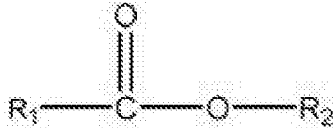
其中所述酯在25°C下具有至少5ppm的水中溶解度;

(ii) 一种或多种具有以下结构的甘油酯:



其中R₁ = 任选地被羟基或C1-C4烷氧基取代的C1-C21直链或支链烷基, 并且R₃和R₄单独地为H或R₁C(O);

(iii) 一种或多种下式的酯:



其中R₁ = 任选地被羟基或C1-C4烷氧基取代的C1-C7直链或支链烷基, 并且R₂ = C1-C10直链或支链烷基、烯基、炔基、芳基、烷基芳基、烷基杂芳基、杂芳基、(CH₂CH₂O)_nH、或(CH₂CH(CH₃)-O)_nH, 并且n为1至10;

(iv) 一种或多种酰化的单糖、酰化的二糖、或酰化的多糖; 和

(v) (i) 至 (iv) 的任何组合;

(2) 过氧源; 和

(3) 包含多肽的酶催化剂, 所述多肽具有过水解活性以及与SEQ ID NO: 4中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列, 前提条件是结合至起催化作用的组氨酸的C-末端侧的氨基酸残基不是谷氨酸, 其中所述氨基酸序列是SEQ ID NO: 14或16; 和

(b) 在合并 (a) 的该组反应组分时形成的至少一种过氧羧酸。

12. 一种过酸生成和递送体系, 包括:

(a) 第一隔室, 所述第一隔室包含:

(1) 包含多肽的酶催化剂, 所述多肽具有过水解活性和与SEQ ID NO: 4中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列, 前提条件是结合至起催化作用的组氨酸的C-末端侧的氨基酸残基不是谷氨酸, 其中所述氨基酸序列是SEQ ID NO: 14或16;

(2) 至少一种选自下列的底物:

(i) 一种或多种具有以下结构的酯:



其中

X = 式R₆-C(O)O的酯基;

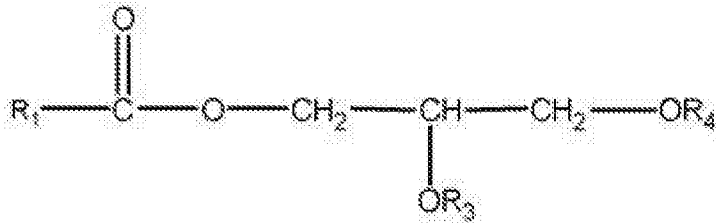
R₆ = 任选地被羟基或C1-C4烷氧基取代的C1-C7直链、支化或环状烃基部分, 其中对于R₆ = C2-C7, R₆任选地包含一个或多个醚键;

R₅ = 任选地被羟基取代的C1-C6直链、支化或环状烃基部分, 或五元环状杂芳族部分, 或六元环状芳族或杂芳族部分; 其中R₅中的每个碳原子单独地包含不超过一个羟基, 或不超过一个酯基或羧酸基; 其中R₅任选地包含一个或多个醚键;

m = 1至R₅中碳原子数范围内的整数; 并且

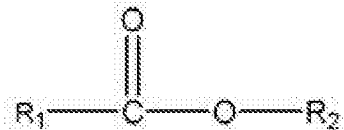
其中所述酯在25°C下具有至少5ppm的水中溶解度;

(ii) 一种或多种具有以下结构的甘油酯:



其中 R_1 = 任选地被羟基或C1-C4烷氧基取代的C1-C21直链或支链烷基, 并且 R_3 和 R_4 单独地为H或 $R_1C(O)$;

(iii) 一种或多种下式的酯:



其中 R_1 = 任选地被羟基或C1-C4烷氧基取代的C1-C7直链或支链烷基, 并且 R_2 = C1-C10直链或支链烷基、烯基、炔基、芳基、烷基芳基、烷基杂芳基、杂芳基、 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$ 、或 $(\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{O})_n\text{H}$, 并且 n 为1至10;

(iv) 一种或多种酰化的单糖、酰化的二糖、或酰化的多糖; 和

(v) (i) 至 (iv) 的任何组合; 和

(3) 任选的缓冲液; 和

(b) 第二隔室, 所述第二隔室包含:

(1) 过氧源;

(2) 过氧化物稳定剂; 和

(3) 任选的缓冲液。

13. 根据权利要求12所述的过酸生成和递送体系, 其中所述底物包括甘油三乙酸酯。

14. 一种分离的核酸分子, 选自:

编码具有过水解活性的多肽的多核苷酸, 所述多肽由SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 16的氨基酸序列组成。

15. 一种分离的核酸分子, 选自:

由SEQ ID NO: 13或SEQ ID NO: 15的核酸序列组成的多核苷酸。

16. 一种载体, 包含权利要求14或15所述的核酸分子。

17. 一种重组DNA构建体, 包含可操作地连接至合适的调控序列的权利要求14或15所述的核酸分子。

18. 一种重组宿主细胞, 包含权利要求17所述的重组DNA构建体。

19. 一种用于表达多肽的方法, 包括用权利要求17所述的重组DNA构建体转化宿主细胞。

20. 一种具有过水解活性的分离的多肽, 其由SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 16的氨基酸序列组成。

21. 一种衣物洗涤护理组合物, 包含:

a) 多肽, 所述多肽具有过水解活性和与SEQ ID NO: 4中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列, 前提条件是结合至起催化作用的组氨酸的C-末端侧的氨基酸残基不是谷氨酸, 其中所述氨基酸序列是SEQ ID NO: 14或16;

b) 至少一种选自下列的底物:

(i) 一种或多种具有以下结构的酯:



其中

X = 式R₆-C(O)O的酯基;

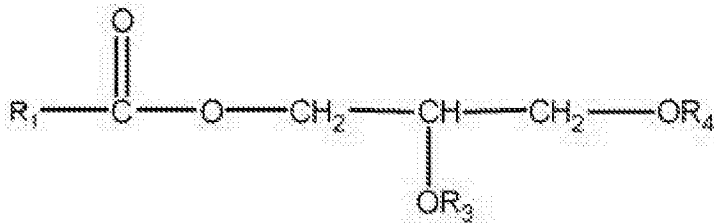
R₆ = 任选地被羟基或C1-C4烷氧基取代的C1-C7直链、支化或环状烷基部分, 其中对于R₆ = C2-C7, R₆任选地包含一个或多个醚键;

R₅ = 任选地被羟基取代的C1-C6直链、支化或环状烷基部分, 或五元环状杂芳族部分, 或六元环状芳族或杂芳族部分; 其中R₅中的每个碳原子单独地包含不超过一个羟基, 或不超过一个酯基或羧酸基; 其中R₅任选地包含一个或多个醚键;

m = 1至R₅中碳原子数范围内的整数; 并且

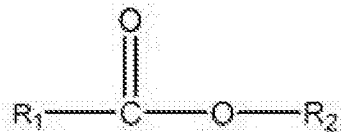
其中所述酯在25°C下具有至少5ppm的水中溶解度;

(ii) 一种或多种具有以下结构的甘油酯:



其中R₁ = 任选地被羟基或C1-C4烷氧基取代的C1-C21直链或支链烷基, 并且R₃和R₄单独地为H或R₁C(O);

(iii) 一种或多种下式的酯:



其中R₁ = 任选地被羟基或C1-C4烷氧基取代的C1-C7直链或支链烷基, 并且R₂ = C1-C10直链或支链烷基、烯基、炔基、芳基、烷基芳基、烷基杂芳基、杂芳基、(CH₂CH₂O)_nH、或(CH₂CH(CH₃)-O)_nH, 并且n为1至10;

(iv) 一种或多种酰化的单糖、酰化的二糖、或酰化的多糖; 和

(v) (i) 至 (iv) 的任何组合; 和

c) 过氧源; 和

d) 至少一种表面活性剂。

22. 一种个人护理产品, 包含具有过水解活性的多肽, 所述多肽具有与SEQ ID NO: 4中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列, 前提条件是结合至起催化作用的组氨酸的C-末端侧的氨基酸残基不是谷氨酸, 其中所述氨基酸序列是SEQ ID NO: 14或16。

23. 根据权利要求22所述的个人护理产品, 其中所述产品是洗发剂、爽身水、沐浴凝胶、局部保湿剂、牙膏、牙胶、漱口水、含漱液、抗牙斑漱口液或局部清洁剂。

对于过酸的生产有用的酶

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2012年3月30日提交的美国临时申请61/618,404的权益,所述文献全文以引用方式并入本文。

技术领域

[0003] 本公开涉及过氧羧酸生物合成和酶催化领域。更具体地,提供了包括具有过水解活性的酶催化剂的多组分的过酸生成体系。还提供了使用本发明的酶催化剂来产生过氧羧酸的方法。

背景技术

[0004] 过氧羧酸组合物可为有效的抗微生物剂。针对不希望有的微生物生长,利用过氧羧酸清洁、消毒和/或卫生处理硬质表面、纺织物、肉类产品、活植物组织、医疗器械的方法已得到描述(美国专利6,545,047;美国专利6,183,807;美国专利6,518,307;美国专利申请公布2003-0026846;和美国专利5,683,724)。过氧羧酸也已被用于多种漂白应用,包括但不限于木浆漂白/去木质化和衣物洗涤护理应用(欧洲专利1040222B1;美国专利5,552,018;美国专利3,974,082;美国专利5,296,161;和美国专利5,364,554)。在中性pH下,在1分钟至5分钟的反应时间内,过氧羧酸的期望有效浓度可根据产品应用而不同(例如对于医疗器械消毒大约500ppm至1000ppm,对于衣物洗涤漂白或消毒应用大约30ppm至80ppm)。

[0005] 结构上被归类为糖酯酶家族7(CE-7)的成员的酶,已被用作过水解酶,于碱性至酸性pH范围(从大约pH10至大约pH5)在水中催化过氧化氢(或替代性的过氧化物试剂)与羧酸的烷基酯的反应,以产生有效浓度的过氧羧酸,用于诸如消毒(例如医疗器械、硬质表面、纺织物)、漂白(例如木浆或纸浆加工/去木质化、纺织物漂白和衣物洗涤护理应用)、和其它衣物洗涤护理应用如脱色、除臭、和消毒的应用、以及个人护理应用(美国专利7,964,378;7,951,566;和7,723,083;授予DiCosimo等人的公布的美国专利申请2008-0176299;和授予Chisholm等人的公布的美国专利申请2012-0317733和2012-0328534)。CE-7酶类已被发现具有针对酯类尤其是醇、二醇和二醇的乙酰基酯类的过水解的高的特异性活性。DiCosimo等人报道了来源于多个物种的具有改善的性能的变体CE-7过水解酶(美国专利7,927,854;7,923,233;7,932,072;7,910,347;7,960,528;8,062,875;8,206,964;8,389,254;和8,389,255;以及公布的美国专利申请2011-0236336和2011-0236338)。

[0006] 先前报道的具有过水解活性的CE-7糖酯酶(野生型的和其变体)包含如Vincent等人所定义的保守的结构性“特征”基序(J.Mol.Biol.,330:593-606(2003))。更具体地,用于结构上鉴定和定义CE-7糖酯酶家族成员CE-7特征基序包含三个保守子基序:1)一个“RGQ”子基序Arg118-Gly119-Gln120,2)一个“GXSQG”子基序Gly186-Xaa187-Ser188-Gln189-Gly190,和3)一个“HE”子基序His303-Glu304(相对于海栖热袍菌(*Thermotoga maritima*)参考序列SEQ ID NO:2的残基编号和取向)。

[0007] 尽管大多数被分类为CE-7糖酯酶的酶包含由Vincent等人定义的特征基序,有多

个不包含“HE”子基序的多肽序列被添加到糖酯酶的家族7 (Cantarel等人, “The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics”, NAR, 37:D233-D238 (2009))。过水解活性在这个子群体内的存在还未被报道。

[0008] 过水解酶技术向一些应用中的掺入可能需要新的过水解酶的鉴定。如此, 仍然存在鉴定包括具有显著的过水解活性的多肽的另外的酶催化剂的需求。

发明内容

[0009] 具有适用于以有效浓度生产过酸的过水解活性的多种酶已被鉴定。

[0010] 在一个实施例中, 提供了酶催化的过酸生成体系, 包括一组反应组分, 所述反应组分包含:

[0011] (1) 至少一种选自下列的底物:

[0012] (i) 一种或多种具有以下结构的酯:

[0013] $[X]_m R_5$

[0014] 其中

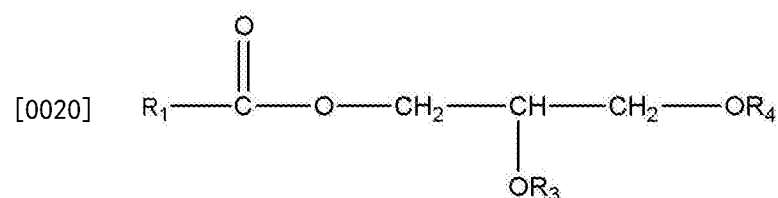
[0015] $X =$ 式 $R_6-C(O)O$ 的酯基;

[0016] $R_6 =$ 任选地被羟基或C1-C4烷氧基取代的C1-C7直链、支化或环状烷基部分, 其中对于 $R_6 = C2-C7$, R_6 任选地包含一个或多个醚键;

[0017] $R_5 =$ 任选地被羟基取代的C1-C6直链、支化或环状烷基部分, 或五元环状杂芳族部分, 或六元环状芳族或杂芳族部分; 其中 R_5 中的每个碳原子单独地包含不超过一个羟基, 或不超过一个酯基或羧酸基; 其中 R_5 任选地包含一个或多个醚键;

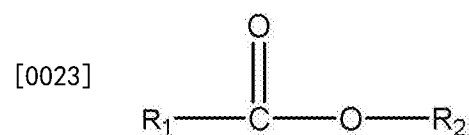
[0018] $m = 1$ 至 R_5 中碳原子数范围内的整数; 并且其中所述酯在 $25^\circ C$ 下具有至少5ppm的水中溶解度;

[0019] (ii) 一种或多种具有以下结构的甘油酯:



[0021] 其中 $R_1 =$ 任选地被羟基或C1-C4烷氧基取代的C1-C21直链或支链烷基, 并且 R_3 和 R_4 单独地为H或 $R_1C(O)$;

[0022] (iii) 一种或多种下式的酯:



[0024] 其中 $R_1 =$ 任选地被羟基或C1-C4烷氧基取代的C1-C7直链或支链烷基, 并且 $R_2 = C1-C10$ 直链或支链烷基、烯基、炔基、芳基、烷基芳基、烷基杂芳基、杂芳基、 $(CH_2CH_2O)_nH$ 、或 $(CH_2CH(CH_3)-O)_nH$, 并且 n 为1至10;

[0025] (iv) 一种或多种酰化的单糖、酰化的二糖、或酰化的多糖; 和

[0026] (v) (i) 至 (iv) 的任何组合;

[0027] (2) 过氧源;和

[0028] (3) 包含多肽的酶催化剂,所述多肽具有过水解活性以及与SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列,前提条件是结合至起催化作用的组氨酸的C-末端侧的氨基酸残基不是谷氨酸;

[0029] 从而过酸在所述反应组分在适当的反应条件下混合时以酶促方法产生。

[0030] 在另一个实施例中,还提供了生产过氧羧酸的方法,包括:

[0031] (a) 提供一组包含以下物质的反应组分:

[0032] (1) 至少一种选自下列的底物:

[0033] (i) 一种或多种具有以下结构的酯:

[0034] $[X]_m R_5$

[0035] 其中

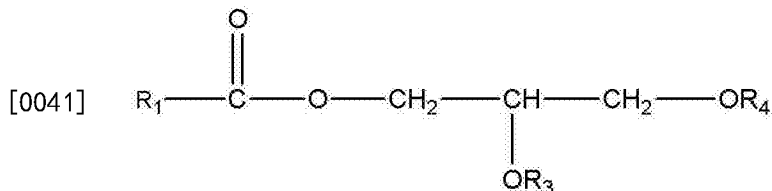
[0036] X=式R₆-C(O)O的酯基;

[0037] R₆=任选地被羟基或C1-C4烷氧基取代的C1-C7直链、支化或环状烷基部分,其中对于R₆=C2-C7,R₆任选地包含一个或多个醚键;

[0038] R₅=任选地被羟基取代的C1-C6直链、支化或环状烷基部分,或五元环状杂芳族部分,或六元环状芳族或杂芳族部分;其中R₅中的每个碳原子单独地包含不超过一个羟基,或不超过一个酯基或羧酸基;其中R₅任选地包含一个或多个醚键;

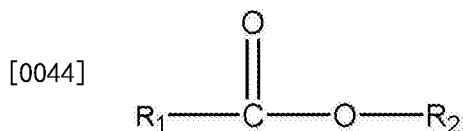
[0039] m=1至R₅中碳原子数范围内的整数;并且其中所述酯在25°C下具有至少5ppm的水中溶解度;

[0040] (ii) 一种或多种具有以下结构的甘油酯:



[0042] 其中R₁=任选地被羟基或C1-C4烷氧基取代的C1-C21直链或支链烷基,并且R₃和R₄单独地为H或R₁C(O);

[0043] (iii) 一种或多种下式的酯:



[0045] 其中R₁=任选地被羟基或C1-C4烷氧基取代的C1-C7直链或支链烷基,并且R₂=C1-C10直链或支链烷基、烯基、炔基、芳基、烷基芳基、烷基杂芳基、杂芳基、(CH₂CH₂O)_nH、或(CH₂CH(CH₃)-O)_nH,并且n为1至10;

[0046] (iv) 一种或多种酰化的单糖、酰化的二糖、或酰化的多糖;和

[0047] (v) (i) 至 (iv) 的任何组合;

[0048] (2) 过氧源;和

[0049] (3) 包含多肽的酶催化剂,所述多肽具有过水解活性和与SEQ ID NO:4中所示的氨

基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列,前提条件是结合至起催化作用的组氨酸的C-末端侧的氨基酸残基不是谷氨酸;

[0050] (b) 在合适的反应条件下合并该组反应组分,从而产生过氧羧酸;以及

[0051] (c) 任选地,稀释步骤(b)中产生的过氧羧酸。

[0052] 在另一个实施例中,提供了还包括步骤(d)的方法,步骤(d):其中在步骤(b)或步骤(c)中产生的过氧羧酸与硬质表面、身体表面、或至少一种衣物制品接触。

[0053] 本发明方法在混合所述反应组分时产生所述期望的过氧羧酸。所述反应组分可保持分开状态直至使用时。

[0054] 在另一个方面,提供了过氧羧酸生成和递送体系,其包括:

[0055] (a) 第一隔室,所述第一隔室包含:

[0056] (1) 包含多肽的酶催化剂,所述多肽具有过水解活性和与SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列,前提条件是结合至起催化作用的组氨酸的C-末端侧的氨基酸残基不是谷氨酸;

[0057] (2) 至少一种选自下列的底物:

[0058] (i) 一种或多种具有以下结构的酯:

[0059] $[X]_mR_5$

[0060] 其中

[0061] X=式R₆-C(O)O的酯基;

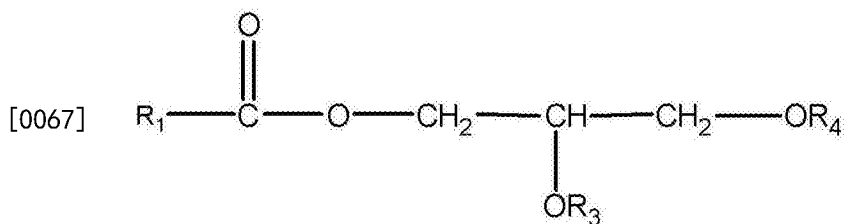
[0062] R₆=任选地被羟基或C1-C4烷氧基取代的C1-C7直链、支化或环状烃基部分,其中对于R₆=C2-C7,R₆任选地包含一个或多个醚键;

[0063] R₅=任选地被羟基取代的C1-C6直链、支化或环状烃基部分,或五元环状杂芳族部分,或六元环状芳族或杂芳族部分;其中R₅中的每个碳原子单独地包含不超过一个羟基,或不超过一个酯基或羧酸基;其中R₅任选地包含一个或多个醚键;

[0064] m=1至R₅中碳原子数范围内的整数;并且

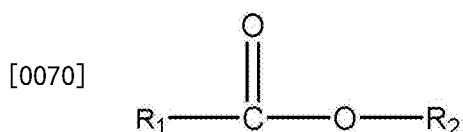
[0065] 其中所述酯在25℃下具有至少5ppm的水中溶解度;

[0066] (ii) 一种或多种具有以下结构的甘油酯:



[0068] 其中R₁=任选地被羟基或C1-C4烷氧基取代的C1-C21直链或支链烷基,并且R₃和R₄单独地为H或R₁C(O);

[0069] (iii) 一种或多种下式的酯:



[0071] 其中R₁=任选地被羟基或C1-C4烷氧基取代的C1-C7直链或支链烷基,并且R₂=C1-C10直链或支链烷基、烯基、炔基、芳基、烷基芳基、烷基杂芳基、杂芳基、(CH₂CH₂O)_nH、或

(CH₂CH(CH₃)-O)_nH, 并且n为1至10;

[0072] (iv) 一种或多种酰化的单糖、酰化的二糖、或酰化的多糖; 和

[0073] (v) (i) 至 (iv) 的任何组合; 和

[0074] (3) 任选的缓冲液; 和

[0075] (b) 第二隔室, 所述第二隔室包含:

[0076] (1) 过氧源;

[0077] (2) 过氧化物稳定剂; 和

[0078] (3) 任选的缓冲液。

[0079] 在另一个实施例中, 提供了衣物护理组合物, 其包含:

[0080] a) 多肽, 所述多肽具有过水解活性和与SEQ ID NO: 4中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列, 前提条件是结合至起催化作用的组氨酸的C-末端侧的氨基酸残基不是谷氨酸;

[0081] b) 至少一种选自下列的底物:

[0082] (i) 一种或多种具有以下结构的酯:

[0083] [X]_mR₅

[0084] 其中

[0085] X=式R₆-C(O)O的酯基;

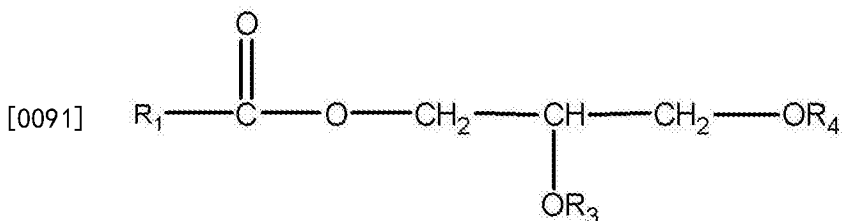
[0086] R₆=任选地被羟基或C1-C4烷氧基取代的C1-C7直链、支化或环状烃基部分, 其中对于R₆=C2-C7, R₆任选地包含一个或多个醚键;

[0087] R₅=任选地被羟基取代的C1-C6直链、支化或环状烃基部分, 或五元环状杂芳族部分, 或六元环状芳族或杂芳族部分; 其中R₅中的每个碳原子单独地包含不超过一个羟基, 或不超过一个酯基或羧酸基; 其中R₅任选地包含一个或多个醚键;

[0088] m=1至R₅中碳原子数范围内的整数; 并且

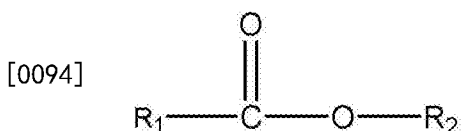
[0089] 其中所述酯在25℃下具有至少5ppm的水中溶解度;

[0090] (ii) 一种或多种具有以下结构的甘油酯:



[0092] 其中R₁=任选地被羟基或C1-C4烷氧基取代的C1-C21直链或支链烷基, 并且R₃和R₄单独地为H或R₁C(O);

[0093] (iii) 一种或多种下式的酯:



[0095] 其中R₁=任选地被羟基或C1-C4烷氧基取代的C1-C7直链或支链烷基, 并且R₂=C1-C10直链或支链烷基、烯基、炔基、芳基、烷基芳基、烷基杂芳基、杂芳基、(CH₂CH₂O)_nH、或(CH₂CH(CH₃)-O)_nH, 并且n为1至10;

- [0096] (iv) 一种或多种酰化的单糖、酰化的二糖、或酰化的多糖;和
- [0097] (v) (i) 至 (iv) 的任何组合;和
- [0098] c) 过氧源;和
- [0099] d) 至少一种表面活性剂。
- [0100] 在另一个实施例中,提供一种个人护理产品,其包含具有过水解活性的多肽,所述多肽具有与SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列,前提条件是结合至起催化作用的组氨酸的C-末端侧的氨基酸残基不是谷氨酸。
- [0101] 在另一个实施例中,所述个人护理产品是洗发剂、爽身水、沐浴凝胶、局部保湿剂、牙膏、牙胶、漱口水、含漱液、抗牙斑漱口液或局部清洁剂。
- [0102] 在另一个实施例中,提供了分离的核酸分子,其选自:
- [0103] (a) 编码具有过水解活性的多肽的多核苷酸,所述多肽包含SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:16的氨基酸序列;
- [0104] (b) 包含SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:15的核酸序列的多核苷酸;知
- [0105] (c) 与(a)或(b)的多核苷酸完全互补的多核苷酸。
- [0106] 在另一个实施例中,提供了具有过水解活性的分离的多肽,其包含SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

附图说明

- [0107] 图1是SEQ ID NO:2、4、6、8、10、和12的CLUSTALW比对。
- [0108] 生物序列简述
- [0109] 下面的序列遵循37C.F.R. §§1.821-1.825 (“对包含核苷酸序列和/或氨基酸序列公开内容的专利申请的要求-序列规则”(“Requirements for Patent Applications Containing Nucleotide Sequences and/or Amino Acid Sequence Disclosures-the Sequence Rules”)),并且符合世界知识产权组织(World Intellectual Property Organization) (WIPO) ST.25标准(2009)以及European Patent Convention (EPC) 和Patent Cooperation Treaty (PCT) 的序列表要求(规则5.2和49.5(a-bis)以及行政指令(Administrative Instructions)的208节和附录C)。用于核苷酸和氨基酸序列数据的符号和格式遵循37C.F.R. §1.822所示的规定。
- [0110] SEQ ID NO:1是编码具有过水解活性的海栖热袍菌(*Thermotoga maritima*)乙酰木聚糖酯酶的经密码子优化的编码区的核酸序列。
- [0111] SEQ ID NO:2是编码具有过水解活性的海栖热袍菌(*Thermotoga maritima*)乙酰木聚糖酯酶的氨基酸序列。
- [0112] SEQ ID NO:3是编码具有过水解活性的奇迹束丝放线菌(*Actinosynnema mirum*)乙酰木聚糖酯酶的经密码子优化的编码区的核酸序列。
- [0113] SEQ ID NO:4是编码具有过水解活性的奇迹束丝放线菌(*Actinosynnema mirum*)乙酰木聚糖酯酶的氨基酸序列。
- [0114] SEQ ID NO:5是编码具有过水解活性的痤疮丙酸杆菌(*Propionibacterium acnes*)乙酰木聚糖酯酶的经密码子优化的编码区的核酸序列。
- [0115] SEQ ID NO:6是编码具有过水解活性的痤疮丙酸杆菌(*Propionibacterium*

acnes) 乙酰木聚糖酯酶的氨基酸序列。

[0116] SEQ ID NO:7是编码具有过水解活性的马链球菌 (*Streptococcus equi*) 乙酰木聚糖酯酶经密码子优化的编码区的核酸序列。

[0117] SEQ ID NO:8是编码具有过水解活性的马链球菌 (*Streptococcus equi*) 乙酰木聚糖酯酶的氨基酸序列。

[0118] SEQ ID NO:9是编码具有过水解活性的 *Stackebrandtia nassauensis* 乙酰木聚糖酯酶经密码子优化的编码区的核酸序列。

[0119] SEQ ID NO:10是编码具有过水解活性的 *Stackebrandtia nassauensis* 乙酰木聚糖酯酶的氨基酸序列。

[0120] SEQ ID NO:11是编码具有过水解活性的无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 乙酰木聚糖酯酶经密码子优化的编码区的核酸序列。

[0121] SEQ ID NO:12是编码具有过水解活性的无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 乙酰木聚糖酯酶的氨基酸序列。

[0122] SEQ ID NO:13是编码具有过水解活性的奇迹束丝放线菌 (*Actinosynnema mirum*) C277S变体乙酰木聚糖酯酶经密码子优化的编码区的核酸序列。

[0123] SEQ ID NO:14是编码具有过水解活性的奇迹束丝放线菌 (*Actinosynnema mirum*) C277S变体乙酰木聚糖酯酶的氨基酸序列。

[0124] SEQ ID NO:15是编码具有过水解活性的奇迹束丝放线菌 (*Actinosynnema mirum*) C277T变体乙酰木聚糖酯酶经密码子优化的编码区的核酸序列。

[0125] SEQ ID NO:16是编码具有过水解活性的奇迹束丝放线菌 (*Actinosynnema mirum*) C277T变体乙酰木聚糖酯酶的氨基酸序列。

[0126] SEQ ID NO:17是海栖热袍菌 (*Thermotoga maritima*) 变体C277S(美国专利8,062,875)的氨基酸序列。

[0127] SEQ ID NO:18是海栖热袍菌 (*Thermotoga maritima*) 变体C277T(美国专利8,062,875)的氨基酸序列。

具体实施方式

[0128] 本发明提供了组合物和方法,它们包含具有过水解活性的多肽,所述多肽具有与SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列,前提条件是结合至起催化作用的组氨酸的C-末端侧的氨基酸残基不是谷氨酸。所述组合物和方法适合于酶促地产生至少一种适合于衣物洗涤护理产品、消毒产品、美容产品或个人护理产品中的过酸。

[0129] 在本公开中,使用了多个术语和缩写。除非另外特别说明,下面的定义适用。

[0130] 如本文所用,涉及元素或组分例子(即出现的事物)的数目在本发明元素或组分前的冠词“一个”、“一种”及“所述”旨在是非限制性的。因此,应将“一个”和“一种”理解为包括一个(种)或至少一个(种),并且元件或组分的词语单数形式也包括复数指代,除非有数字明显表示单数。

[0131] 术语“包含”是指如权利要求中提及的所述特征、整数、步骤或组分的存在,但它不预先排除一种或多种其它特征、整数、步骤、组分或其组的存在或添加。术语“包含”旨在包

括由术语“基本上由...组成”和“由...组成”涵盖的实施例。相似地,术语“基本上由...组成”旨在包括由术语“由...组成”涵盖的实施例。

[0132] 如本文所用,用术语“约”修饰成分或反应物的数量时是指数值量的变化,它们可能发生在,例如,典型的测量和用于制备浓缩液或实际使用溶液的液体处理程序中;这些程序中的偶然误差中;制造、来源、或用于制备组合物或实施方法的成分的纯度的差异中;等等。术语“约”还涵盖由于相对于由特定起始混合物所得的组合物的不同平衡条件而不同的量。无论是否通过术语“约”来修饰,权利要求都包括量的等同量。

[0133] 当存在时,所有范围是包括端值在内的和可以组合的。例如,当列出范围“1至5”时,所列范围应被视为包括范围“1至4”、“1至3”、“1-2”、“1-2&4-5”、“1-3&5”等等。

[0134] 如本文所用,术语“多组分体系”指在其中所述组分保持分开直到使用的酶促地生成过氧羧酸的体系。如此,多组分体系将包括与至少一种第二组分分开的至少一种第一组分。第一和第二组分在不同的隔室内分开直到使用(即,使用第一和第二隔室)。多组分体系的设计将经常取决于将被混合的组分的物理形式,并且更详细地描述于下文。

[0135] 如本文所用,术语“过氧羧酸(peroxycarboxylic acid)”与过酸(peracid)、过氧酸(peroxyacid/peroxy acid)、过羧酸(percarboxylic acid)和过氧性酸(peroxoic acid)同义。

[0136] 如本文所用,术语“过乙酸”缩写为“PAA”,并且与过氧乙酸、乙过氧酸以及CAS登记号79-21-0的所有其它同义词同义。

[0137] 如本文所用,术语“甘油一乙酸酯”与甘油单乙酸酯、甘油单醋酸酯和单醋酸甘油酯同义。

[0138] 如本文所用,术语“甘油二乙酸酯”与二乙酸甘油酯;甘油二醋酸酯、二醋酸甘油酯以及CAS登记号25395-31-7的所有其它同义词同义。

[0139] 如本文所用,术语“甘油三乙酸酯”与三乙酸甘油酯;三乙酸甘油酯;甘油三醋酸酯,1,2,3-三乙酰氧基丙烷;1,2,3-丙三醇三乙酸酯;以及CAS登记号102-76-1的所有其它同义词同义。

[0140] 如本文所用,术语“甘油一丁酸酯”与一丁酸甘油酯、甘油单丁酸酯和一丁酸甘油基酯同义。

[0141] 如本文所用,术语“甘油二丁酸酯”与二丁酸甘油酯和二丁酸甘油基酯同义。

[0142] 如本文所用,术语“甘油三丁酸酯”与三丁酸甘油酯;1,2,3-三丁酰基甘油;以及CAS登记号60-01-5的所有其它同义词同义。

[0143] 如本文所用,术语“甘油一丙酸酯”与一丙酸甘油酯、甘油单丙酸酯和一丙酸甘油基酯同义。

[0144] 如本文所用,术语“甘油二丙酸酯”与二丙酸甘油酯和二丙酸甘油基酯同义。

[0145] 如本文所用,术语“甘油三丙酸酯”与三丙酸甘油基酯、三丙酸甘油酯、1,2,3-三丙酰基甘油以及CAS登记号139-45-7的所有其它同义词同义。

[0146] 如本文所用,术语“酰化的糖”和“酰化的糖类”是指包含至少一个酰基的单糖、二糖和多糖,其中所述酰基选自具有从C2-C8的链长的直链脂族羧化物。例子包括但不限于葡萄糖五乙酸酯、木糖四乙酸酯、乙酰化木聚糖、乙酰化木聚糖片段、 β -D-呋喃核糖-1,2,3,5-四乙酸酯、三-邻-乙酰基-D-半乳糖和三-邻-乙酰基-葡萄糖。

[0147] 如本文所用,术语“烃基”和“烃基部分”指直链、支链或环状排列的碳原子,碳原子通过碳-碳单键、双键或三键和/或醚键连接且氢原子被相应取代。此类烃基基团可为脂族和/或芳族。烃基基团例子包括甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、环丙基、环丁基、戊基、环戊基、甲基环戊基、己基、环己基、苜基和苯基。在一个实施例中,烃基部分是直链的、支化的或环状的碳原子排列,碳原子通过碳-碳单键和/或醚键连接,并且相应地被氢原子取代。

[0148] 如本文所用,术语“芳族”是指特征在于由通常包含多个共轭双键的环系中的电子离域作用导致的提高的化学稳定性的有机化合物或部分。具有离域电子的平面的单环的共轭环应当是芳族的,如果其具有 $(4n+2)$ π 电子。芳族化合物的例子可包括苯的衍生物(例如2-、3-或4-乙酰基水杨酸)。在一个实施例中,所述酯底物可以是4-乙酰基水杨酸。

[0149] 如本文所用,术语“杂环的”是指具有在它的环中的至少一个具有一个或多个不是碳的原子的环结构的有机化合物或部分。

[0150] 如本文所用,术语“杂芳族”是指具有既是杂环的又是芳族的环结构的有机化合物或部分,其中所述环包含杂原子氧、氮、或硫中的至少一个。杂芳族部分的例子可包括吡啶、吡咯、咪唑、和噻吩部分。

[0151] 如本文所用,术语1,2-乙二醇、1,2-丙二醇、1,3-丙二醇、1,2-丁二醇、1,3-丁二醇、2,3-丁二醇、1,4-丁二醇、1,2-戊二醇、2,5-戊二醇、1,6-戊二醇、1,2-己二醇、2,5-己二醇、1,6-己二醇的单酯或二酯的“单酯”和“二酯”指包含式RC(O)O的至少一个酯基的所述化合物,其中R是C1-C7直链烃基部分。

[0152] 如本文所用,术语“适合的酶反应制剂”、“适用于生成过氧羧酸的组分”、“适合的反应组分”、“反应组分”、“反应制剂”、和“适合的含水反应制剂”是指反应物和包含具有过水解活性的本发明的变体多肽的酶催化剂在其中发生接触,以形成所期望的过氧羧酸的材料和水。本文提供了反应制剂的组分,并且本领域技术人员应当理解适于本发明方法的组分变化范围。在一个实施例中,酶反应制剂在反应组分混合后原位产生过氧羧酸。像这样,反应组分可以作为其中一种或多种反应组分保持分离直至使用的多成分体系提供。用于分隔与混合多种活性组分的体系和装置的设计是本领域已知的,并且一般应取决于各反应组分的物理形式。例如,多重活性流体(液体-液体)系统一般使用多室分配瓶或二相系统(美国专利申请公布2005-0139608;美国专利5,398,846;美国专利5,624,634;美国专利6,391,840;E.P.专利0807156B1;美国专利申请公布2005-0008526;和PCT公开WO 00/61713),例如在其中所需漂白剂在反应性流体混合时产生的某些漂白应用中存在的。用于以酶促方法从羧酸酯产生过氧羧酸的多组分制剂和多组分生成体系由DiCosimo等人分别描述于公布的美国专利申请2010-0086510和2010-0086621中。用于产生过氧羧酸的其它形式的多组分体系可以包括但不限于,设计用于一种或多种固体组分或固体-液体组分组合的那些,例如用于许多可商购获得的漂白组合中的粉剂(例如,美国专利5,116,575)、多层片(例如美国专利6,210,639)、具有多个隔室的水溶性包(例如美国专利6,995,125)和在水添加后反应的固体凝聚物(例如美国专利6,319,888)。

[0153] 如本文所用,术语“底物”或“羧酸酯”将指用本发明的酶催化剂在合适过氧源如过氧化氢的存在下酶促过水解的反应组分。在一个实施例中,所述底物包含至少一个酯基,能够用所述酶催化剂酶促过水解,从而产生过氧羧酸。

[0154] 如本文所用,将术语“过水解”定义为所选的底物与过氧化氢反应形成过氧羧酸。一般地,无机过氧化物与所选底物在催化剂存在下反应以生成过氧羧酸。如本文所用,术语“化学过水解”包括其中将底物(例如过氧羧酸的前体)与过氧化氢源组合的过水解反应,其中在不存在酶催化剂的情况下形成过氧羧酸。如本文所用,术语“酶促过水解”指选择底物与过氧化氢源反应以形成过氧羧酸,其中所述反应由具有过水解活性的酶催化剂催化。

[0155] 如本文所用,术语“过水解酶活性”是指每单位质量(例如毫克)蛋白、干细胞重量或固定的催化剂重量的酶催化剂活性。

[0156] 如本文所用,“一个酶活性单位”或“一个活性单位”或“U”被定义为,在指定温度每分钟产生1 μ mol过氧羧酸产物(例如过乙酸)所需的过水解酶活性的量。“一个酶活性单位”在本文中也用于指在指定温度每分钟水解1 μ mol过氧羧酸产物(例如过乙酸)所需的过氧羧酸水解活性的量。

[0157] 如本文所用,术语“酶催化剂”和“过水解酶催化剂”是指包含具有过水解活性的酶(即,多肽)的催化剂,并且可以是完整微生物细胞、透化的微生物细胞、微生物细胞提取物的一种或多种细胞组分、部分纯化的酶或纯化的酶的形式。酶催化剂也可被化学改性(如通过聚乙二醇化或通过与交联试剂的反应)。还可以使用本领域技术人员熟知的方法将过水解酶催化剂固定到可溶性或不溶性支持体上;参见例如,Immobilization of Enzymes and Cells; (第2版) Jose M. Guisan, Editor; Humana Press, Totowa, NJ, USA; 2006。

[0158] 如本文所用,“结构上归类为CE-7酶”、“结构上归类为糖酯酶家族7酶”、“结构上归类为CE-7碳水化合物酯酶”和“CE-7过水解酶”将用于在本文中指在结构上归类为CE-7碳水化合物酯酶的具有过水解活性的酶(参见Cantarel等人,“The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics”, NAR, 37: D233-D238 (2009))。

[0159] 如本文所用,术语“先锋霉素C脱乙酰酶”和“先锋霉素C乙酰水解酶”是指催化先锋霉素如先锋霉素C和7-氨基头孢烷酸的脱乙酰作用的酶(E.C.3.1.1.41)(Mitsushima等人, Appl. Environ. Microbiol., 61 (6): 2224-2229 (1995); 美国专利5,528,152; 和美国专利5,338,676)。

[0160] 如本文所用,“乙酰木聚糖酯酶”是指催化乙酰木聚糖以及其它乙酰化糖的脱乙酰作用的酶(E.C.3.1.1.72; AXEs)。

[0161] 如本文所用,术语“海栖热袍菌(Thermotoga maritima)”指据报道具有乙酰木聚糖酯酶活性的细菌细胞(GENBANK[®] NP_227893.1)。在一个方面,所述海栖热袍菌(Thermotoga maritima)菌株是海栖热袍菌(Thermotoga maritima) MSB8。来自海栖热袍菌(Thermotoga maritima)的具有过水解酶活性的野生型酶的氨基酸序列被提供为SEQ ID NO:2。

[0162] 术语“氨基酸”是指蛋白质或多肽的基本化学结构单元。在本文中使用下列缩写来表示具体的氨基酸:

	三字母	一字母
<u>氨基酸</u>	<u>缩写</u>	<u>缩写</u>
丙氨酸	Ala	A
精氨酸	Arg	R
天冬酰胺	Asn	N
天冬氨酸	Asp	D
半胱氨酸	Cys	C
谷氨酰胺	Gln	Q
谷氨酸	Glu	E
甘氨酸	Gly	G
组氨酸	His	H
[0163] 异亮氨酸	Ile	I
亮氨酸	Leu	L
赖氨酸	Lys	K
甲硫氨酸	Met	M
苯丙氨酸	Phe	F
脯氨酸	Pro	P
丝氨酸	Ser	S
苏氨酸	Thr	T
色氨酸	Trp	W
酪氨酸	Tyr	Y
缬氨酸	Val	V
任何氨基酸 (或如本文所定义的)	Xaa	X

[0164] 如本文所用,术语“生物污染物”是指一种或多种不想要的和/或病原性的生物实体,包括但不限于微生物、孢子、病毒、朊病毒、以及它们的混合物。本发明的酶能够被用于生产有效浓度的至少一种用于降低和/或消除存在的活体生物污染物的过氧羧酸。在一个优选的实施例中,生物污染物是活体病原微生物。

[0165] 如本文所用,术语“消毒”指破坏或防止生物污染物生长的方法。如本文所用,术语“消毒剂”指通过破坏/中和、或抑制生物污染物生长来进行消毒的制剂。消毒剂通常用于处理无生命的物体或表面。如本文所用,术语“防腐剂”是指抑制带病微生物生长的化学试剂。在实施例的一个方面,生物污染物是病原微生物。

[0166] 如本文所用,术语“卫生”指或涉及通常通过移除、阻止或控制可能危害健康的剂来恢复或保持健康。如本文所用,术语“卫生处理”指采取卫生措施保持卫生。如本文所用,术语“杀菌消毒剂”指消毒剂。如本文所用,术语“卫生处理”指卫生处理的行为或过程。

[0167] 如本文所用,术语“杀病毒剂”是指抑制或杀灭病毒的剂,并且与“病毒杀灭剂”同

义。表现出抑制或杀灭病毒能力的剂被描述为具有“杀病毒”活性。过氧羧酸具有杀病毒活性。可适用于本发明使用的本领域已知的典型备选杀病毒剂包括例如醇、醚、氯仿、甲醛、苯酚、β丙内酯、碘、氯、汞盐、羟胺、环氧乙烷、乙二醇、季铵化合物、酶和洗涤剂。

[0168] 如本文所用,术语“生物杀灭剂”是指灭活或破坏微生物的通常为广谱的化学试剂。将表现出灭活或破坏微生物能力的化学试剂称为具有“生物杀灭”活性。过氧羧酸具有生物杀灭活性。可适用于本发明使用的本领域已知的典型备选生物杀灭剂包括例如氯、二氧化氯、氯异氰尿酸盐、次氯酸盐、臭氧、丙烯醛、胺、氯化酚醛树脂、铜盐、有机硫化物、和季铵盐。

[0169] 如本文所用,短语“最低生物杀灭浓度”指生物杀灭剂在特定接触时间内的最低浓度,其将产生期望的杀灭效果,不可逆的减少目标微生物的活体数量。效力可通过处理后活体微生物 \log_{10} 的减少来度量。在一个方面,处理后活体微生物的目标减少为至少 $3-\log_{10}$ 的减少,更优选至少 $4-\log_{10}$ 的减少,最优选至少 $5-\log_{10}$ 的减少。在另一方面,最低生物杀灭浓度为减少活体微生物细胞至少 $6-\log_{10}$ 。

[0170] 如本文所用,术语“过氧源”和“过氧的来源”是指当在水溶液中时能够提供约1mM或更高浓度过氧化氢的化合物,包括但不限于过氧化氢、过氧化氢加合物(如尿素-过氧化氢加合物(过氧化脲))、过硼酸盐、以及过碳酸盐如过碳酸钠。如本文所述,当与反应组分组合时,在含水反应制剂中通过过氧化氢化合物提供的过氧化氢浓度为初始至少1mM或更高浓度。在一个实施例中,在含水反应制剂中的过氧化氢浓度为至少0.5mM。在另一个实施例中,含水反应制剂中过氧化氢浓度为至少10mM。在另一个实施例中,在含水反应制剂中的过氧化氢浓度为至少100mM。在另一个实施例中,在含水反应制剂中的过氧化氢浓度为至少200mM。在另一个实施例中,在含水反应制剂中的过氧化氢浓度为500mM或更高。在另一个实施例中,在含水反应制剂中的过氧化氢浓度为1000mM或更高。含水反应制剂中过氧化氢与酶底物(如甘油三酯)的摩尔比(H_2O_2 :底物)可从约0.002至20、优选约0.1至10、以及最优选约0.5至5。

[0171] 如本文所用,术语“有益剂”是指促进或增强有用的优点、有利的/期望的效果或有益效果的物质。在一个实施例中,提供了有益剂如包含过氧羧酸的组合物可凭其被施用于织物或衣物制品以获得期望的有益效果(例如消毒、漂白、脱色、除臭、以及它们的任何组合)的方法。在另一个实施例中,具有过水解活性的本发明的变体多肽可被用于产生用于个人护理产品(利润毛发护理产品、皮肤护理产品、指/趾甲护理产品或口腔护理产品)的基于过酸的有益剂。在一个实施例中,提供一种个人护理产品,其包含具有过水解活性的多肽,所述多肽具有与SEQ ID NO:4,14或16中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列,前提条件是结合至起催化作用的组氨酸的C-末端侧的氨基酸残基不是谷氨酸。所述个人护理产品被配制为提供安全和有效浓度的所期望的过酸有益剂。

[0172] 如本文所用,“个人护理产品”是指在毛发、皮肤、头皮和牙齿的清洁、漂白和/或消毒中使用的产品,包括但不限于洗发剂、爽身水、沐浴凝胶、局部保湿剂、牙膏、牙胶、漱口水、漱口水、抗牙斑漱口水和/或其它局部清洁剂。在一些尤其优选的实施例中,这些产品用于人体,而在其它实施例中,这些产品用于除人之外的动物(例如兽医方面的用途)。

[0173] 如本文所用,术语“牙齿美白”和“牙齿漂白”互换使用,是指改善牙齿的亮白程度(例如美白)。所述术语意在涵盖任何适于美白牙齿的方法(包括本发明)、以及化学处理、

弱酸处理、牙齿打磨美白、和激光牙齿美白。在尤其优选的实施例中，本发明提供了适于美白牙齿的过水解酶和包含过水解酶的组合物。

[0174] 具有过水解活性的多肽

[0175] 先前报道的具有过水解活性的CE-7酯酶的“特征基序”包含三个保守子基序：(相对于参考序列SEQ ID NO:2的残基位置编号；野生型海栖热袍菌 (*Thermotoga maritima*) 乙酰木聚糖酯酶)：

[0176] a) Arg118-Gly119-Gln120； (“RGQ基序”)；

[0177] b) Gly186-Xaa187-Ser188-Gln189-Gly190；和 (“GXSQG基序”)；以及

[0178] c) His303-Glu304。 (“HE基序”)。

[0179] 在氨基酸残基位置187的Xaa通常是甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸、色氨酸、苏氨酸。属于催化三联体的三个氨基酸残基中的两个用粗体表示。

[0180] 尽管本发明的过水解酶包含RGQ基序和GXSQG基序，没有本发明的过水解酶包含先前被报道为保守结构基序的“HE基序”内的谷氨酸，如表A和图1中所示。

[0181] 表A：存在于具有过水解酶活性的本发明的酶中的基序。

[0182]

过水解酶序列	RGQ 基序 (残基号)	GXSQG 基序 (残基号)	HX 基序 (残基号)	结合至 HX 基序中起催化作用的组氨酸残基处的氨基酸残基
SEQ ID NO: 2 ^a	118-120	186-190	303-304	E ^b
SEQ ID NO: 4	118-120	184-188	302-303	A
SEQ ID NO: 6	117-119	184-188	309-310	A
SEQ ID NO: 8	114-116	177-181	299-300	D
SEQ ID NO: 10	117-119	186-190	303-304	S
SEQ ID NO: 12	115-117	178-182	299-300	D
SEQ ID NO: 14	118-120	184-188	302-303	A
SEQ ID NO: 16	118-120	184-188	302-303	A

[0183] ^a=海栖热袍菌 (*Thermotoga maritima*) 参考序列。

[0184] ^b=先前被报道为是保守的谷氨酸，形成“HE”基序。

[0185] 看起来具有过水解活性的本发明的多肽可代表一个在较大类CE-7糖酯酶内的新的子群体，列为CAZy数据库中的成员 (Cantarel等人，“The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics”, NAR, 37:D233-D238 (2009))。如此，用于本专利申请中的具有过水解活性的多肽将在本文中被称为“CE-7碳水化合物酯酶”或“CE-7过水解酶”，虽然它们可能缺少先前被定义的“特征基序”的一部分。

[0186] 在另一个实施例中，具有过水解活性的本发明的多肽还被定义为在与参考序列SEQ ID NO:2进行比对时具有以下基序组合 (相对于参考序列SEQ ID NO:2的残基位置编号；野生型海栖热袍菌 (*Thermotoga maritima*) 乙酰木聚糖酯酶)：

[0187] a) Arg118-Gly119-Gln120； (“RGQ基序”)；

[0188] b) Gly186-Xaa187-Ser188-Gln189-Gly190；和 (“GXSQG基序”)；以及

[0189] c) Xaa304His303-。 (“HX基序”)；其中“Xaa”不是谷氨酸。

[0190] 在一个优选的方面，“HE基序”内的“X”氨基酸残基是丙氨酸、天冬氨酸、或丝氨酸。

[0191] 在另一方面，具有过水解活性的本发明的多肽包含与选自SEQ ID NO:4、6、8、10、

12、14、和16的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列,前提条件是结合至起催化作用的组氨酸的C-末端侧的氨基酸残基不是谷氨酸。

[0192] 在一个实施例中,具有过水解活性的本发明的多肽与本文提供的序列具有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、84、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%的氨基酸同一性,前提条件是结合至起催化作用的组氨酸的C-末端侧的氨基酸残基不是谷氨酸。

[0193] 在另一方面,具有过水解活性的本发明的多肽包含跟与如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列,前提条件是被限定在起催化作用的组氨酸的C-末端侧的氨基酸残基不是谷氨酸。在另一方面,具有过水解活性的本发明的多肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:4。

[0194] 如本文所用,术语“过水解酶变体”或“变体”将指具有基因修饰的过水解酶,在与变体来源的对应酶(通常野生型酶)进行比较时所述修饰引起至少一个氨基酸的添加、缺失、和/或取代;只要保留了本文所述的必需基序和相关联的过水解活性即可。CE-7过水解酶变体也可在本发明组合物和方法中使用。变体的例子被提供为SEQ ID NO:14和16。

[0195] 技术人员认识到基本上类似的过水解酶序列也可用于本发明的组合物和方法。在一个实施例中,基本上类似的序列通过它们在高严格条件下杂交到与本文例示的序列相关联的核酸分子上的能力被定义。在另一个实施例中,可基于与本文提供的DNA或氨基酸序列的百分比同一性,使用序列对比算法定义基本上类似的酶。

[0196] 如本文所用,当第一个分子的单链能够在合适的温度和溶液离子浓度条件下对其它分子退火时,核酸分子对另一个核酸分子如cDNA、基因组DNA、或RNA来说为“可杂交的”。杂交和洗涤条件是熟知的并且例示于Sambrook, J. 和Russell, D., T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第三版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (2001)。温度和离子强度条件确定杂交的“严格性”。可以调节严格性条件以筛选中度相似的分子(例如来自远缘生物的同源序列)到高度相似的分子(例如从近缘生物复制功能性酶的基因)。杂交后洗涤通常决定严格性条件。一组优选的条件使用一系列洗涤步骤,开始是6X SSC、0.5% SDS在室温下洗涤15分钟,然后用2X SSC、0.5% SDS在45°C下重复30分钟,再用0.2X SSC、0.5% SDS在50°C下重复洗涤两次,每次30分钟。一组更优选的条件使用更高的温度,其中洗涤步骤与上述步骤相同,不同的是将最后两次用0.2X SSC、0.5% SDS洗涤30分钟的洗涤温度提高到了60°C。另一组优选的高严格杂交条件为:用0.1X SSC、0.1% SDS在65°C下处理,然后用2X SSC、0.1% SDS洗涤,最后用0.1X SSC、0.1% SDS在65°C下洗涤。

[0197] 杂交需要两种核酸含有互补序列,但取决于杂交的严格性,碱基之间可能会发生错配。用于使核酸杂交的合适的严格性取决于核酸的长度和互补的程度,它们为本领域熟知的变量。两条核苷酸序列之间的相似性或同源性程度越高,具有那些序列的核酸的杂交体的 T_m 值就越大。核酸杂交的相对稳定性(对应于较高的 T_m)按以下顺序依次降低:RNA:RNA、DNA:RNA、DNA:DNA。就长度大于100个核苷酸的杂交体而言,已经获得了计算 T_m 的方程式(Sambrook和Russell, 同上)。对于较短核酸(即寡核苷酸)的杂交,错配的位置变得更重要,而且寡核苷酸的长度决定了其特异性(Sambrook和Russell, 同上)。在一个方面,可杂交核酸的长度为至少约10个核苷酸。优选地,可杂交的核酸的最小长度为至少约15个核苷酸,

更优选至少约20个核苷酸,甚至更优选至少30个核苷酸,甚至更优选至少300个核苷酸,最优选至少800个核苷酸。此外,技术人员将认识到,必要时可根据诸如探针长度之类的因素来调节温度和洗涤溶液的盐浓度。

[0198] 如本文所用,术语“百分比同一性”为两条或更多条多肽序列之间或两条或更多条多核苷酸序列之间的关系,该关系通过对序列进行比较确定。在本领域中,“同一性”还表示多肽或多核苷酸序列之间序列关联的程度,根据具体情况,它由这些序列的序列串之间的匹配程度确定。“同一性”和“相似性”可通过已知的方法容易地计算,包括但不限于下列中所述的那些:Computational Molecular Biology (Lesk,A.M.编辑) Oxford University Press, NY (1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects (Smith,D.W.编辑) Academic Press, NY (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Part I (Griffin, A.M.和Griffin,H.G.编辑) Humana Press, NJ (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology (von Heinje,G.编辑) Academic Press (1987); 以及 Sequence Analysis Primer (Gribskov,M.和Devereux,J.编辑) Stockton Press, NY (1991)。确定同一性和相似性的方法在可公开获得的计算机程序中被编成了代码。序列比对和百分比同一性计算可通过 LASERGENE 生物信息学计算套件中的 Megalign 程序 (DNASTAR Inc., Madison, WI)、Vector NTI v.7.0 (Informax, Inc., Bethesda, MD)、或 EMBOSS Open Software Suite (EMBL-EBI; Rice 等人, Trends in Genetics 16, (6): 276-277 (2000))。序列多重比对可使用 CLUSTAL 比对方法进行 (例如 CLUSTALW; 例如 1.83 版) (Higgins 和 Sharp, CABIOS, 5: 151-153 (1989); Higgins 等人, Nucleic Acids Res. 22: 4673-4680 (1994); 和 Chenna 等人, Nucleic Acids Res 31 (13): 3497-500 (2003)), 它们得自 European Molecular Biology Laboratory via the European Bioinformatics Institute), 使用默认参数。CLUSTALW 蛋白比对的合适参数包括 GAP Existence penalty=15、GAP extension=0.2、matrix=Gonnet (例如 Gonnet250)、Protein ENDGAP=-1、Protein GAPDIST=4、以及 KTUPLE=1。在一个实施例中,使用默认设置进行快速或慢速比对,其中优选慢速比对。作为另外一种选择,可将使用 CLUSTALW 方法 (例如 1.83 版) 的参数修改为也使用 KTUPLE=1、GAP PENALTY=10、GAP extension=1、matrix=BLOSUM (如 BLOSUM64)、WINDOW=5、以及 TOP DIAGONALS SAVED=5。

[0199] “起催化作用的组氨酸”是指与丝氨酸和天冬氨酸形成催化三元体的本发明所公开的过水解酶中的组氨酸残基。例如,在 SEQ ID NO:4 中,起催化作用的组氨酸是氨基酸残基编号 302。当使用 CLUSTALW 比较序列时,具有过水解活性的 SEQ ID NO:4 的变体将具有它的与 SEQ ID NO:4 的起催化作用的组氨酸对齐的起催化作用的组氨酸,意味着该变体的起催化作用的组氨酸可能、但是不一定位于变体的氨基酸位置 302 上。

[0200] 在一个方面,适合的分离的核酸分子编码具有与本文报道的氨基酸序列至少 70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、84、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、或 99% 相同的氨基酸序列的多肽。合适核酸分子不仅具有上述同源性,而且通常编码长度为约 210 个至 340 个氨基酸,约 300 个至约 340 个氨基酸,优选地约 310 个至约 330 个氨基酸,并且最优选地约 318 至约 325 个氨基酸的多肽,其中每个多肽特征在于具有过水解活性。

[0201] 从羧酸酯和过氧化氢中酶催化制备过氧羧酸的合适反应条件

[0202] 提供了通过在具有过水解活性的酶催化剂的存在下羧酸酯与无机过氧化物 (例如

过氧化氢、过硼酸钠或过碳酸钠)的反应制备包含至少一种氧羧酸的含水制剂的方法,其中所述酶催化剂在一个实施例中包含与选自SEQ ID NO:4、6、8、10、12、14、和16的氨基酸序列具有至少80%同一性的多肽,前提条件是结合至起催化作用的组氨酸的C-末端侧的氨基酸残基不是谷氨酸。在另一个实施例中,具有过水解活性的多肽包含选自SEQ ID NO:4、6、8、10、12、14、和16的氨基酸序列。在另一个实施例中,所述多肽具有SEQ ID NO:4。

[0203] 在一个实施例中,适合的底物包括由下式提供的一种或多种酯:

[0204] $[X]_mR_5$

[0205] 其中x=式R₆C(O)O的酯基

[0206] R₆=任选地被羟基或C1-C4烷氧基取代的C1-C7直链、支化或环状烃基部分,其中对于R₆=C2-C7,R₆任选地包含一个或多个醚键;

[0207] R₅=任选地被羟基取代的C1-C6直链、支化或环状烃基部分,或五元环状杂芳族部分,或六元环状芳族或杂芳族部分;其中R₅中的每个碳原子单独地包含不超过一个羟基,或不超过一个酯基或羧酸基;其中R₅任选地包含一个或多个醚键;

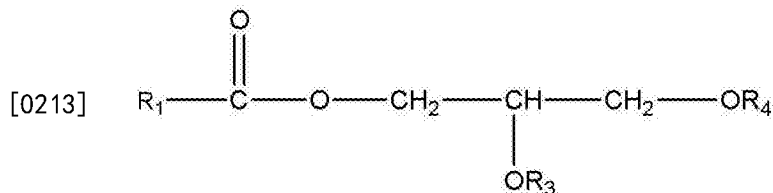
[0208] m=1至R₅中碳原子数范围内的整数;并且

[0209] 其中所述酯在25°C下具有至少5ppm的水中溶解度。

[0210] 在另一个实施例中,R₆=任选地被羟基或C1-C4烷氧基取代的C1-C7直链的烃基部分,任选地包含一个或多个醚键。在另一个优选的实施例中,R₆=任选地被羟基取代和/或任选地包含一个或多个醚键的C2-C7直链的烃基部分。

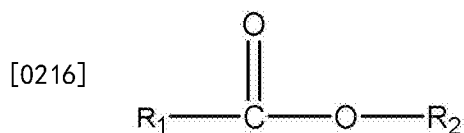
[0211] 在一个实施例中,适合的底物可包括2-乙酰氧基苯甲酸、3-乙酰氧基苯甲酸、4-乙酰氧基苯甲酸或它们的混合物。

[0212] 在另一个实施例中,适合的底物还包括符合下列分子式的一种或多种甘油酯:



[0214] 其中R₁=任选地被羟基或C1-C4烷氧基取代的C1-C21直链或支链烷基,并且R₃和R₄单独地为H或R₁C(O)。在一个实施例中,适合的底物是上式的甘油酯,其中R₁=任选地被羟基或C1-C4烷氧基取代的C1-C7直链或支链烷基,并且R₃和R₄单独地为H或R₁C(O)。

[0215] 在另一方面,适合的底物还可以包括符合下列分子式的一种或多种酯:



[0217] 其中R₁=任选地被羟基或C1-C4烷氧基取代的C1-C7直链或支链烷基,并且R₂=C1-C10直链或支链烷基、烯基、炔基、芳基、烷基芳基、烷基杂芳基、杂芳基、(CH₂CH₂O)_nH、或(CH₂CH(CH₃)-O)_nH,并且n为1至10。

[0218] 适合的底物还可以包括一种或多种选自酰化的单糖、二糖、和多糖的酰化的糖类。在另一个实施例中,乙酰化糖类选自乙酰化木聚糖、乙酰化木聚糖片段、乙酰化木糖(例如木糖四乙酸酯)、乙酰化葡萄糖(如α-D-葡萄糖五乙酸酯;β-D-葡萄糖五乙酸酯)、β-D-半乳糖五

乙酸酯、山梨醇六乙酸酯、蔗糖辛乙酸酯、 β -D-呋喃核糖-1,2,3,5-四乙酸酯、三-O-乙酰基-D-半乳糖、三-O-乙酰基-D-葡萄糖、呋喃木糖四乙酸酯、 α -D-吡喃葡萄糖五乙酸酯、 α -D-吡喃甘露糖五乙酸酯、和乙酰化纤维素。在一个优选的实施例中，乙酰化糖类选自 β -D-呋喃核糖-1,2,3,5-四乙酸酯、三-O-乙酰基-D-半乳糖、三-O-乙酰基-D-葡萄糖、蔗糖辛乙酸酯、以及乙酰化纤维素。

[0219] 在另一个实施例中，合适的底物选自：甘油一乙酸酯；甘油二乙酸酯；甘油三乙酸酯；甘油一丙酸酯；甘油二丙酸酯；甘油三丙酸酯；甘油一丁酸酯；甘油二丁酸酯；甘油三丁酸酯；葡萄糖五乙酸酯；木糖四乙酸酯；乙酰化木聚糖；乙酰化木聚糖片段； β -D-呋喃核糖-1,2,3,5-四乙酸盐或酯；三-邻-乙酰基-D-半乳糖；三-邻-乙酰基-D-葡萄糖；1,2-乙二醇、1,2-丙二醇、1,3-丙二醇、1,2-丁二醇、1,3-丁二醇、2,3-丁二醇、1,4-丁二醇、1,2-戊二醇、2,5-戊二醇、1,6-戊二醇、1,2-己二醇、2,5-己二醇、1,6-己二醇的单酯或二酯；以及它们的混合物。

[0220] 在另一个实施例中，羧酸酯选自甘油一乙酸酯、甘油二乙酸酯、甘油三乙酸酯、以及它们的组合。在另一个实施例中，所述底物为包含一个或多个酯基的C1-C6多元醇。在一个优选的实施例中，在C1-C6多元醇上的一个或多个羟基被一个或多个乙酰氧基（例如1,3-丙二醇二乙酸酯、1,4-丁二醇二乙酸酯等）取代。在另一个实施例中，所述底物为丙二醇二乙酸酯（PGDA）、乙二醇二乙酸酯（EGDA）、或它们的混合物。

[0221] 在另一个实施例中，合适的底物选自：乙酸乙酯；乳酸甲酯；乳酸乙酯；乙醇酸甲酯；乙醇酸乙酯；甲氧基乙酸甲酯；甲氧基乙酸乙酯；3-羟基丁酸甲酯；3-羟基丁酸乙酯；2-乙酰柠檬酸三乙酯；葡萄糖五乙酸酯；葡糖酸内酯；甘油酯（单甘油酯、二甘油酯、和三甘油酯）如甘油一乙酸酯、甘油二乙酸酯、甘油三乙酸酯、甘油一丙酸酯、甘油二丙酸酯（二丙酸甘油基酯）、甘油三丙酸酯（1,2,3-三丙酰基甘油）、甘油一丁酸酯、甘油二丁酸酯（二丁酸甘油基酯）、甘油三丁酸酯（1,2,3-三丁酰基甘油）；乙酰化糖、以及它们的混合物。

[0222] 在另一个实施例中，合适的底物选自甘油一乙酸酯、甘油二乙酸酯、甘油三乙酸酯、甘油一丙酸酯、甘油二丙酸酯、甘油三丙酸酯、甘油一丁酸酯、甘油二丁酸酯、甘油三丁酸酯、乙酸乙酯和乳酸乙酯。在另一方面，所述底物选自甘油二乙酸酯、甘油三乙酸酯、乙酸乙酯和乳酸乙酯。在最优选的实施例中，适合的底物包括甘油三乙酸酯。

[0223] 羧酸酯在含水反应制剂中的浓度应足以在酶催化的过水解时生成所需浓度的过氧羧酸。羧酸酯不需要在含水反应制剂中完全溶解，但是其溶解度足以通过过水解酶催化剂将酯转化成相应的过氧羧酸。羧酸酯在含水反应制剂中的浓度为所述含水反应制剂的0.0005重量%至40重量%，优选的浓度为所述含水反应制剂的0.01重量%至20重量%，更优选的浓度为所述含水反应制剂的0.05重量%至10重量%。羧酸酯的重量%可任选地大于羧酸酯的溶解度限制，使得含水反应制剂中的羧酸酯浓度为至少0.0005重量%，所述含水反应制剂包含水、酶催化剂和过氧化物源，其中残留的羧酸酯保留作为两相含水/有机反应制剂的第二分离相。不是所有加入的羧酸酯必然立即溶解在含水反应制剂中，并且在初始混合所有反应组分后，任选地进行附加的连续或不连续混合。

[0224] 一旦使用本发明的酶催化剂，由本发明的反应组分产生的过氧羧酸可取决于选择的底物而不同。在一个实施例中，产生的过氧羧酸为过乙酸、过丙酸、过丁酸、过辛酸、过乳酸、过乙醇酸、过甲氧基乙酸、过- β -羟基丁酸、或它们的混合物。

[0225] 过氧源可包括但不限于过氧化氢、过氧化氢加合物(如尿素-过氧化氢加合物(过氧化脲))、过硼酸盐和过碳酸盐。作为另外一种选择,过氧化氢能够通过由具有氧化酶活性的酶(包括但不限于葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶、山梨醇氧化酶、己糖氧化酶、醇氧化酶、甘油氧化酶、单胺氧化酶、乙醇酸氧化酶、乳酸氧化酶、丙酮酸氧化酶、草酸氧化酶、胆碱氧化酶、胆固醇氧化酶、吡喃糖氧化酶、羧基醇氧化酶(carboxyalcohol oxidase)、L-氨基酸氧化酶、甘氨酸氧化酶、谷氨酸氧化酶、赖氨酸氧化酶、和尿酸酶)催化的底物和氧的反应原位生成。含水反应制剂中的过氧化物的浓度可以是0.0033重量%至约50重量%范围,优选为0.033重量%至约40重量%,更优选为0.33重量%至约30重量%。

[0226] 据报道,许多过水解酶催化剂(例如全细胞、透化的全细胞和部分纯化的全细胞提取物)都具有过氧化氢酶活性(EC 1.11.1.6)。过氧化氢酶催化过氧化氢转化成氧和水。在一个方面,具有过水解酶活性的所述酶催化剂缺乏过氧化氢酶活性。在另一方面,具有过水解酶活性的酶催化剂具有足够低的过氧化氢酶活性,使得所述过氧化氢酶活性的存在不会显著地妨碍过水解酶催化的过氧羧酸生产。在另一方面,过氧化氢酶抑制剂被添加到含水反应制剂中。过氧化氢酶抑制剂的例子包括但不限于叠氮化钠和羟胺硫酸盐。本领域的技术人员能够按需调节过氧化氢酶抑制剂的浓度。过氧化氢酶抑制剂的浓度通常在约0.1mM至约1M的范围内;优选地在约1mM至约50mM的范围内;更优选地在约1mM至约20mM的范围内。在一个方面,叠氮化钠浓度通常在约20mM至约60mM的范围内,而羟胺硫酸盐的浓度通常在约0.5mM至约30mM的范围内,优选地约10mM。

[0227] 宿主细胞中的过氧化氢酶活性能够通过使用熟知的技术包括但不限于转座子诱变、RNA反义表达、定向诱变和随机诱变,破坏负责过氧化氢酶活性的基因而被下调或消除。在一个优选的实施例中,编码内源性过氧化氢酶活性的一种或多种基因是被下调或破坏(即“敲除”)的。如本文所用,“被破坏的”基因是其中不再存在由经修饰的基因编码的蛋白的活性和/或功能的基因。破坏基因的方法是本领域熟知的,包括但不限于插入、缺失、或突变,只要相应蛋白的活性和/或功能不再存在即可。在另一个优选的实施例中,生产宿主是大肠杆菌(E.coli)生产宿主,其包含被破坏的过氧化氢酶基因,该基因选自katG和katE(参见DiCosimo等人的美国专利7,951,566)。在另一个实施例中,生产宿主是大肠杆菌(E.coli)菌株,它包含被下调和/或破坏的katG和katE过氧化氢酶基因。包含katG和katE双重敲除的大肠杆菌(E.coli)菌株已被制备,并被描述为大肠杆菌(E.coli)菌株KLP18(DiCosimo等人的美国专利7,951,566)。

[0228] 含水反应制剂中的催化剂浓度取决于催化剂的催化比活性,并且经选择以获取期望的反应速率。过水解反应中的催化剂的重量通常在0.0001mg至50mg/mL总反应体积,优选0.0005mg至10mg/mL,更优选0.0010mg至2.0mg/mL。还可以使用本领域技术人员众所周知的方法将催化剂固定在可溶性或不溶性载体上;参见例如Immobilization of Enzymes and Cells; (第2版) Jose M. Guisan, Editor; Humana Press, Totowa, NJ, USA; 2006。使用固定化催化剂允许在后续反应中进行回收和重复使用。酶催化剂可为下列形式:全微生物细胞、透化微生物细胞、微生物细胞提取物、部分纯化的或纯化的酶、以及它们的混合物。

[0229] 在一个方面,通过组合化学过水解和酶促过水解羧酸酯生成的过氧羧酸浓度足以提供有效浓度的过氧羧酸用于在所期望的pH消毒、漂白、卫生处理、除臭或去污。在另一方面,过氧羧酸以适合用于将被施用于毛发、皮肤、指/趾甲或口腔的组织如牙釉质、牙薄膜或

牙龈的个人护理产品中的安全和有效的浓度被生成。在另一方面,本发明的方法提供酶和酶底物的组合以生产期望有效浓度的过氧羧酸,其中在不加入酶的情况下,产生的过氧羧酸浓度显著更低。虽然通过无机过氧化物与酶底物的直接化学反应,酶底物可发生一些化学过水解,但产生的过氧羧酸浓度可能不足以在所需的应用中提供有效浓度的过氧羧酸,而通过在含水反应制剂中加入合适的过水解酶催化剂可以显著提高过氧羧酸的总浓度。

[0230] 在本发明的一个方面,在酶促过水解反应开始的5分钟内,更优选地在1分钟内,通过酶促过水解而产生的过氧羧酸(例如过乙酸)浓度为至少约2ppm,优选地为至少20ppm,优选地为至少100ppm,更优选地为至少约200ppm的过氧羧酸,更优选地为至少300ppm,更优选地为至少500ppm,更优选地为至少700ppm,更优选地为至少约1000ppm过氧羧酸,更优选地为至少约2000ppm过氧羧酸,最优选地为至少10,000ppm过氧羧酸。在本发明的第二方面,在酶促过水解反应开始(即,从混合反应组分以形成所述制剂开始计时)的5分钟内,更优选地在1分钟内,通过酶促过水解而产生的过氧羧酸(例如过乙酸)浓度为至少约2ppm,优选地为至少20ppm,优选地为至少30ppm,更优选地为至少约40ppm过氧羧酸,更优选地为至少50ppm,更优选地为至少60ppm,更优选地为至少70ppm,更优选地为至少约80ppm过氧羧酸,最优选地为至少约100ppm过氧羧酸。

[0231] 包含过氧羧酸的含水制剂可任选地用稀释剂进行稀释以制备具有期望的较低目标浓度的过氧羧酸的制剂,所述稀释剂是包含水或主要包含水的溶液。在一个方面,制备期望浓度(或浓度范围)过氧羧酸所需的反应时间为约20分钟或更短,优选约5分钟或更短,最优选约1分钟或更短。

[0232] 在其它方面,在将所述反应组分结合后约1分钟至约168小时内,或约1分钟至约48小时内,或约1分钟至2小时内,或其中的任何此类时间间隔内,将被一定浓度的生物污染物污染的表面或无生命物体与根据本文所述的方法形成的过氧羧酸接触。

[0233] 在另一方面,根据本文所述方法形成的过氧羧酸用于衣物洗涤护理应用,其中过氧羧酸与衣物或纺织物接触以提供有益效果,如消毒、漂白、脱色、除臭和/或它们的组合。过氧羧酸可用于多种衣物洗涤护理产品,包括但不限于衣物洗涤或纺织物预洗涤处理剂、衣物洗涤剂或添加剂、污渍移除剂、漂白组合物、除臭组合物、以及漂洗剂。在一个实施例中,本发明制备过氧羧酸用于目标表面的方法在原位进行。

[0234] 在衣物洗涤护理应用的情况下,术语“接触衣物或纺织物”指将衣物或纺织物暴露于本文所公开的制剂。为此,有多种制剂形式可用于处理衣物或纺织物,包括但不限于液体、固体、凝胶、糊料、巴、片剂、喷剂、泡沫、粉末、或颗粒,并且能够经由手动给料、单位给料、从底物给料、从衣物洗涤或干燥机中喷洒并自动给料进行递送。颗粒状组合物也可为致密形式;液体组合物也可为浓缩形式。

[0235] 当本文所公开的制剂用于洗衣机时,所述制剂还可包含对衣物洗涤剂来说典型的组分。例如,典型的组分包括但不限于表面活性剂、漂白剂、漂白活化剂、附加酶、抑泡剂、分散剂、酸橙-皂分散剂、垢悬浮和抗再沉淀剂、软化剂、腐蚀抑制剂、玷污抑制剂、杀菌剂、pH调节剂、非助洗剂碱度来源、螯合剂、有机和/或无机填料、溶剂、水溶助长剂、光学增白剂、染料和香料。本文所公开的制剂也可用作固体或液体形式的洗涤剂助剂产品。此类助剂产品旨在补充或提高常规洗涤剂组合物的性能,并且在清洁过程的任何阶段加入。

[0236] 关于用于衣物洗涤护理的本发明的体系和方法(其中生成的过酸用于漂白、脱色、

和减少异味中的一者或多者),通过至少一种羧酸酯的过水解而生成的过酸(如过乙酸)的浓度可以为至少约2ppm,优选至少20ppm,优选至少100ppm,更优选至少约200ppm。关于用于衣物洗涤护理的本发明的体系和方法(其中生成的过酸用于消毒或卫生处理),在过水解反应开始的10分钟内、优选5分钟内、最优选1分钟内,通过至少一种羧酸酯的过水解而生成的过酸(如过乙酸)的浓度可以为至少约2ppm,更优选至少约20ppm,更优选至少200ppm,更优选至少500ppm,更优选至少700ppm,更优选至少约1000ppm,最优选至少2000ppm。包含过酸的产物制剂可以任选地用水或主要由水构成的溶液稀释,以制备具有所需较低过酸浓度的制剂。在本发明方法和体现的一个方面,生产期望浓度过酸的反应时间不大于约两小时,优选地不大于约30分钟,更优选地不大于约10分钟,甚至更优选地不大于约5分钟,最优选地在约1分钟或更短时间内。

[0237] 选择反应温度以控制反应速率和酶催化活性的稳定性。反应温度可在正好高于含水反应制剂凝固点(大约0°C)至约85°C的范围内,反应温度的优选范围为约5°C至约75°C。

[0238] 当酶促制备过氧羧酸时,含水反应制剂的pH保持在约5.0至约10.0,优选地约6.5至约8.5,甚至更优选地约6.5至约7.5的范围内。在一个实施例中,在混合反应组分至少30分钟内含水反应制剂的pH范围为约6.5至约8.5。可以通过添加或掺入合适的缓冲液,包括但不限于磷酸盐、焦磷酸盐、碳酸氢盐、乙酸盐或柠檬酸盐,来调节或控制反应和含水反应制剂的pH值。在一个实施例中,所述缓冲液选自磷酸盐缓冲液、碳酸氢盐缓冲液、或通过将硬水(用于模拟衣物洗涤护理应用的自来水)和过碳酸盐(来自用于生成过氧化氢的过碳酸钠)混合形成的缓冲液。当使用时,缓冲液浓度通常为0.1mM至1.0M,优选地1mM至300mM,最优选地10mM至100mM。在本发明的另一方面,当酶促地产生过氧羧酸时,没有缓冲液被添加至反应混合物。

[0239] 在又一方面,酶促过水解含水反应制剂可以包含充当分散剂的有机溶剂,以提高羧酸酯在含水反应制剂中的溶解速率。此类溶剂包括但不限于丙二醇甲醚、丙酮、环己酮、二甘醇丁醚、三丙二醇甲醚、二甘醇甲醚、丙二醇丁醚、双丙二醇甲醚、环己醇、苜醇、异丙醇、乙醇、丙二醇、以及它们的混合物。

[0240] 在另一方面,酶促过水解产物可包含提供期望功能的附加组分。这些附加组分包括但不限于缓冲液、洗涤剂助剂、增稠剂、乳化剂、表面活性剂、润湿剂、腐蚀抑制剂(如苯并三唑)、酶稳定剂和过氧化物稳定剂(如金属离子螯合剂)。许多附加组分是洗涤剂工业中熟知的(参见例如美国专利5,932,532;以引用方式并入本文)。乳化剂的例子包括但不限于聚乙烯醇或聚乙烯吡咯烷酮。增稠剂的例子包括但不限于LAPONITE[®]RD(合成的层状硅酸盐)、玉米淀粉、PVP、CARBOWAX[®](聚乙二醇和/或聚乙二醇单甲醚)、CARBOPOL[®](丙烯酸酯交联聚合物)、CABOSIL[®](合成的无定形的气相二氧化硅)、聚山梨醇酯20、PVA、和卵磷脂。缓冲体系的例子包括但不限于磷酸二氢钠/磷酸氢二钠;氨基磺酸/三乙醇胺;柠檬酸/三乙醇胺;酒石酸/三乙醇胺;琥珀酸/三乙醇胺;和乙酸/三乙醇胺。表面活性剂的例子包括但不限于a)非离子表面活性剂如环氧乙烷或环氧丙烷的嵌段共聚物、乙氧基化的或丙氧基化的直链和支链的伯醇和仲醇、以及脂族膦氧化物;b)阳离子表面活性剂如季铵化合物,尤其是具有结合氮原子,附加地结合三个C1-C2烷基的C8-C20烷基的季铵化合物;c)阴离子表面活性剂如烷烃羧酸(例如C8-C20脂肪酸)、烷基膦酸酯、烷基磺酸盐(例如

十二烷基磺酸钠“SDS”)或直链或支链的烷基苯磺酸盐、烯基磺酸盐;和d)两性和两性离子表面活性剂如氨基酸、氨基二羧酸、烷基甜菜碱、以及它们的混合物。附加组分可包括芳香剂、染料、过氧化氢稳定剂(例如金属螯合剂如1-羟基亚乙基-1,1-二膦酸(DEQUEST[®] 2010, Solutia Inc., St. Louis, MO)和乙二胺四乙酸(EDTA))、TURPINAL[®]SL(羟乙膦酸)、DEQUEST[®]0520(膦酸盐)、DEQUEST[®]0531(膦酸盐)、酶活性稳定剂(例如聚乙二醇(PEG))、以及洗涤剂助剂。

[0241] 在另一方面,可将酶促过水解产物预混合以在接触要消毒的表面或无生命的物体之前产生期望浓度的过氧羧酸。

[0242] 在另一方面,不将酶促过水解产物预混合以在接触要消毒的表面或无生命的物体之前产生期望浓度的过氧羧酸,而是将产生期望浓度的过氧羧酸的含水反应制剂的组分与要消毒和/或漂白或脱色的表面或无生命的物体接触,产生期望浓度的过氧羧酸。在一些实施例中,所述含水反应制剂的组分在所在处被组合或混合。在一些实施例中,将反应组分递送或施涂到所述位点并且随后混合或组合以产生期望浓度的过氧羧酸。

[0243] 用过水解酶催化剂制备过氧羧酸

[0244] 一旦制备出过氧羧酸,其反应性非常强并且在一段时间后浓度可降低,这取决于包括但不限于温度和pH在内的变量。因此,可期望将各种反应组分分开,尤其是液体制剂。在一个方面,过氧化氢源与或者底物或者过水解酶催化剂分开,优选地与二者都分开。这能够使用多种技术完成,所述技术包括但不限于使用多隔室分配器(美国专利4,585,150),并且在使用时完全混合过水解酶催化剂与过氧源(例如过氧化氢)以及本发明的底物以开始含水酶促过水解反应。过水解酶催化剂可任选地固化在反应室内或在接触拟处理的表面和/或物体前与包含过氧羧酸的反应产物分离(例如过滤分离等)。过水解酶催化剂可为液体基质或固体形式(例如粉末或片剂),或置于固体基质内,随后与底物混合以开始酶促过水解反应。在另一方面,过水解酶催化剂可包含在可溶解的或多孔小袋内,可将其加到含水底物基质中以开始酶促过水解。在又一个方面,过水解酶催化剂可包括可溶解的或多孔的小袋的独立隔室内包含的内容物,所述小袋具有至少一个另外的隔室用于包含酯底物和/或过氧化物源的内容物。在附加的另一方面,将包含酶催化剂的粉末悬浮在底物(例如甘油三乙酸酯)中,并且在使用时与水中的过氧源混合。

[0245] 用于测定过氧羧酸和过氧化氢浓度的方法。

[0246] 本发明的方法能够使用多种分析方法分析反应物和产物,包括但不限于滴定、高效液相色谱(HPLC)、气相色谱(GC)、质谱(MS)、毛细管电泳(CE)、由U. Karst等人(Anal. Chem., 69(17):3623-3627(1997))、以及2,2'-联氮-双(3-乙基苯并噻唑啉)-6-磺酸(ABTS)检测分析法(参见U. Pinkernell等人, The Analyst 122:567-571(1997); S. Minning等人, Analytica Chimica Acta 378:293-298(1999)和WO 2004/058961A1),如美国专利7,951,566所述。

[0247] 确定过氧羧酸的最低生物杀灭浓度

[0248] J. Gabrielson等人(J. Microbiol. Methods 50:63-73(2002))所述的方法能够被用于确定过氧羧酸或过氧化氢与酶底物的最低生物杀灭浓度(MBC)。测定方法基于XTT还原抑制,其中XTT(2,3-二[2-甲氧基-4-硝基-5-磺苯基]-5-[(苯氨基)羰基]-2H-四唑鎓,

内盐,单钠盐)为氧化还原染料,通过在490nm或450nm处测得的光密度(OD)的变化来表明微生物呼吸活性。然而,还有许多种其它方法可用于检测消毒剂和防腐剂的活性,包括但不限于平板活菌计数、直接显微镜计数、干重、浊度测量、吸光度和生物发光(参见,例如Brock、Semour S.,Disinfection, Sterilization, and Preservation,第5版,Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, PA, USA; 2001)。

[0249] 酶法制备的过氧羧酸组合物的用途

[0250] 根据本发明方法制备的酶催化剂生成的过氧羧酸可用于许多硬质表面/无生命物体应用,以降低生物污染物的浓度,例如用于医疗器械(如内窥镜)、纺织物(如服装和地毯)、食品制备表面、食品贮存和食品包装设备、食品包装材料、鸡孵化和养成场所、动物笼舍、以及具有微生物和/或抗病毒活性的工艺废水的消毒。所述酶生成的过氧羧酸可用于设计用于使朊病毒失活的制剂(例如,某些蛋白酶),从而还提供了杀灭活性(参见授予DiCosimo等人的美国专利7,550,420)。

[0251] 在一个方面,所述过氧羧酸组合物可用作消毒剂以用于不可高温高压消毒的器械和制品包装设备。由于含过氧羧酸的制剂可以用GRAS(一般认为安全)或食品级组分(酶、酶底物、过氧化氢和缓冲液)制备而得,因此酶催化法产生的过氧羧酸也可用于动物尸体、肉、水果和蔬菜的消毒,或用于预制食品的消毒。可将酶促生产的过氧羧酸掺入最终形式是粉末、液体、薄膜、固体或气溶胶的产品。可将酶促生产的过氧羧酸稀释到仍提供有效净化效果的浓度。

[0252] 可以使用包含有效浓度的过氧羧酸的组合物,通过使带有生物污染物(例如病原微生物污染物)的受生物污染物污染(或怀疑被污染)的表面和/或物体与通过本发明方法制备的产品接触,对所述表面或物体进行消毒。如本文所用,“接触”是指使包包含有效浓度的过氧羧酸的消毒组合物与怀疑被生物污染物污染的表面或无生命物体接触一段足以达到清洁和消毒效果的时间。接触包括通过喷洒、处理、浸入、冲洗、倾注、混合、组合、涂抹、涂覆、施加、粘附以及其它方式,使包含有效浓度过氧羧酸的过氧羧酸溶液或组合物,或者可形成有效浓度过氧羧酸的溶液或组合物与怀疑被一定浓度的生物污染物污染的表面或无生命物体相连。可以将消毒组合物与清洁组合物结合在一起,以同时提供清洁和消毒功能。作为另外一种选择,可将清洁剂(例如表面活性剂或洗涤剂)掺入制剂以在单一组合物中提供清洁和消毒效果。

[0253] 包含有效浓度过氧羧酸的组合物也可包含至少一种附加的抗微生物剂、朊病毒降解蛋白酶、杀病毒剂、杀孢子剂、或生物杀灭剂的组合。当将这些药剂与通过受权利要求书保护的方法制备的过氧羧酸的组合用于对被生物污染物污染(或怀疑被污染)的表面和/或物体进行清洁和消毒时,可以提供增强和/或协同效应。合适的抗微生物剂包括羧酸酯(例如,对-羟基烷基苯甲酸盐和烷基肉桂酸酯)、磺酸例如十二烷基苯磺酸);碘代化合物或活性卤素化合物(例如卤素单质、卤素氧化物(例如NaOCl、HOCl、HOBr、ClO₂)、碘、卤间化合物(例如一氯化碘、二氯化碘、三氯化碘、四氯化碘、一氯化溴、一溴化碘、或二溴化碘)、多卤化物、次氯酸盐、次氯酸、次溴酸盐、次溴酸、氯代-和溴代-乙内酰脲、二氧化氯、以及亚氯酸钠);有机过氧化物包括过氧化苯甲酰、烷基过氧化苯甲酰、臭氧、单重态氧发生器、以及它们的混合物;(例如邻-苯基苯酚、邻-苯甲基-对-氯酚、叔-戊醇酚和C₁-C₆烷基羟基苯甲酸盐);季铵盐化合物(例如烷基苄基二甲基氯化铵、二烷基二甲基氯化铵以及它们的混合

物)；以及此类抗微生物剂的混合物，其量足以提供期望的微生物防护程度。有效量的抗微生物剂包括约0.001重量%至约60重量%的抗微生物剂，约0.01重量%至约15重量%的抗微生物剂，或约0.08重量%至约2.5重量%的抗微生物剂。

[0254] 在一个方面，当施用于场所上和/或场所中时，通过所述方法形成的过氧羧酸能够被用于降低活体生物污染物(例如微生物种群)的浓度。如本文所用，“场所”包括适于进行消毒或漂白的部分或全部目标表面。目标表面包括可能潜在地被生物污染物污染的所有表面。非限制性例子包括存在于食品或饮料工业中的设备表面(例如罐、传送机、地面、排水沟、冷却器、冷冻机、设备表面、墙面、阀门、束带、管道、排水沟、接头、裂缝、以及它们的组合等)；建筑表面(例如墙面、地面和窗户)；非食品工业相关的管道和排水沟，包括水处理设施、水池和矿泉池、以及发酵罐；医院或兽医院表面(如墙面、地面、床、设备(例如内窥镜)、医院/兽医院或其它保健机构中穿着的衣服，包括衣服、洗擦布、鞋子和其它医院或兽医院表面)；餐馆表面；浴室表面；盥洗室；衣服和鞋子；谷仓或畜栏表面，例如家禽、牛、乳牛、山羊、马和猪的畜栏；家禽或虾的孵卵处；以及药物或生物药物表面(例如药物或生物药物制造设备、药物或生物药物成分、药物或生物药物赋形剂)。附加的硬质表面包括食物产品，例如牛肉、禽肉、猪肉、蔬菜、水果、海产品、它们的组合等。场所也可包括水吸收材料如感染的亚麻布或其它纺织物。场所也包括收获的植物或植物产品，包括种子、球茎、块茎、果实和蔬菜、生长的植物、尤其是作物生长植物、包括谷类食物、叶片蔬菜和色拉作物、根用蔬菜、豆类、浆果果实、柑橘类水果和坚果。

[0255] 硬质表面材料的非限制性例子为金属(如钢、不锈钢、铬、钛、铁、铜、黄铜、铝和它们的合金)、矿物质(如混凝土)、聚合物和塑料(如聚烯烃，如聚乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯、聚(甲基)丙烯酸酯、聚丙烯腈、聚丁二烯、聚(丙烯腈-丁二烯-苯乙烯)、聚(丙烯腈-丁二烯)、丙烯腈丁二烯；聚酯如聚对苯二甲酸乙二酯；和聚酰胺如尼龙)。另外的表面包括砖、瓷砖、瓷器、陶器、木材、木浆、纸材、乙烯树脂、油毡和地毯。

[0256] 可使用通过本发明方法形成的过氧羧酸向衣物或纺织物提供有益效果，包括但不限于消毒、卫生处理、漂白、去污和除臭。通过本发明方法形成的过氧羧酸可用于许多衣物洗涤护理产品，包括但不限于纺织物预洗处理剂、衣物洗涤剂、衣物洗涤剂或添加剂、脱色剂、漂白组合物、除臭组合物和漂洗剂，以上仅为数例。

[0257] 通过本发明的方法形成的过氧羧酸可用于木浆或纸浆漂白/脱木质化过程的一个或多个步骤，尤其是在使用过酸的情况下(例如，参见EP1040222B1和授予Devenyns, J.的美国专利5,552,018)。

[0258] 个人护理应用

[0259] 本文所述的过水解酶能够被用于生产用于个人应用，举例来说，如毛发护理(漂白、脱毛)、皮肤护理(亮肤、抗微生物)、和口腔护理应用(牙齿美白/漂白或抗菌)的过酸有益剂。如本文所述的组合物和方法还可包含已知或换句话讲有效用于毛发护理、护肤、指/趾甲护理或其它个人护理产品的一种或多种皮肤病学或美容上可接受的组分，前提条件是所述任选组分与本文所述的基本组分在物理上和化学上相容，或不会另外不当地损害产品的稳定性、美观或性能。此类任选组分的非限制性例子公开于 International Cosmetic Ingredient Dictionary, 第九版, 2002, 和 CTFA Cosmetic Ingredient Handbook, 第十版, 2004。

[0260] 在一个实施例中,皮肤病学/美容上可接受的载体可包括约10重量%至约99.9重量%,或者约50重量%至约95重量%,或者约75重量%至约95重量%的皮肤病学可接受的载体。适用于同组合物一起使用的载体可包括例如用在发胶、摩丝、滋补剂、凝胶、皮肤保湿剂、洗剂和免洗型调理剂的制剂中的那些。载体可包含水;有机油;硅氧烷如挥发性硅氧烷、氨基或非氨基硅氧烷树胶或油、以及它们的混合物;矿物油;植物油如橄榄油、蓖麻油、油菜籽油、椰子油、小麦胚芽油、甜杏仁油、鳄梨油、澳洲坚果油、杏仁油、红花油、桐树油、亚麻荠油、琼崖海棠油、柠檬油、以及它们的混合物;蜡;和有机化合物如C₂-C₁₀烷烃、丙酮、甲基乙基酮、挥发性有机C₁-C₁₂醇、C₁-C₂₀酸和C₁-C₈醇的酯(根据条件可取决于酯是否可用作过水解酶的羧酸酯底物进行选择)如乙酸甲酯、乙酸丁酯、乙酸乙酯、和肉豆蔻酸异丙酯、二甲氧基乙烷、二乙氧基乙烷C₁₀-C₃₀脂肪醇如月桂醇、十六烷基醇、硬脂醇、和二十二醇;C₁₀-C₃₀脂肪酸如月桂酸和硬脂酸;C₁₀-C₃₀脂肪酰胺如月桂酸二乙醇酰胺;C₁₀-C₃₀脂肪烷基酯如C₁₀-C₃₀脂肪烷基苯甲酸酯;羟丙基纤维素、以及它们的混合物。在一个实施例中,载体包含水、脂肪醇、挥发性有机醇、以及它们的混合物。本发明的组合物还可以包含约0.1%至约10%,或者约0.2%至约5.0%的胶凝剂以帮助向组合物提供所需的粘度。合适的任选胶凝剂的非限制性例子包括交联羧酸聚合物;未中和的交联羧酸聚合物;未中和的改性交联羧酸聚合物;交联乙烯/马来酸酐共聚物;未中和的交联乙烯/马来酸酐共聚物(例如EMA81,可从Monsanto商购获得);未中和的交联烯丙基醚/丙烯酸酯共聚物(例如,SALCARE™ SC90可从Allied Colloids商购获得);聚丙烯酸钠、矿物油、和PEG-1十三烷醇聚醚-6的未中和的交联共聚物(例如SALCARE™ SC91,可从Allied Colloids商购获得);乙烯基甲醚与马来酸酐的未中和的交联共聚物(例如STABILEZE™ QM-PVM/MA共聚物,可从International Specialty Products商购获得);疏水改性的非离子纤维素聚合物;疏水改性的乙氧基氨基甲酸酯聚合物(例如UCARE™ Polyphobe碱性可溶胀聚合物系列,可从Union Carbide商购获得);以及它们的组合。在该上下文中,术语“未中和的”是指任选聚合物和共聚物胶凝剂材料包含未中和的酸单体。优选的胶凝剂包括水溶性未中和的交联乙烯/马来酸酐共聚物、水溶性未中和的交联甲酸聚合物、水溶性疏水改性的非离子纤维素聚合物和表面活性剂/脂肪醇凝胶网络,如适用于毛发调理产品的那些。

[0261] 重组微生物的表达

[0262] 本发明序列的基因和基因产物可在异源宿主细胞尤其是微生物宿主细胞中产生。用于表达本发明基因和核酸分子的优选异源宿主细胞是存在于真菌或细菌家族中并在宽温度、pH值和溶剂耐受性范围内生长的微生物宿主。例如,预期任何细菌、酵母和丝状真菌可为表达本发明核酸分子的合适宿主。过氧化水解酶可在细胞内、细胞外、或细胞内和细胞外组合表达,其中细胞外表达细胞外表达比细胞内表达能够从发酵产物中更容易地回收期望蛋白。转录、翻译和蛋白生物合成设备相对于用于生成细胞生物质的细胞原料保持不变;无论如何将表达功能基因。宿主菌株的例子包括但不限于细菌、真菌或酵母物种例如曲霉属(*Aspergillus*)、木霉属(*Trichoderma*)、糖酵母属(*Saccharomyces*)、毕赤酵母属(*Pichia*)、红发夫酵母属(*Phaffia*)、克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)、假丝酵母属(*Candida*)、汉逊酵母属(*Hansenula*)、耶氏酵母属(*Yarrowia*)、沙门氏菌属(*Salmonella*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、发酵单胞菌属(*Zymomonas*)、农杆菌属(*Agrobacterium*)、赤细菌属(*Erythrobacter*)、绿菌属(*Chlorobium*)、着色菌属

(Chromatium)、黄杆菌属(Flavobacterium)、噬纤维菌属(Cytophaga)、红细菌属(Rhodobacter)、红球菌属(Rhodococcus)、链霉菌属(Streptomyces)、短杆菌属(Brevibacterium)、棒状杆菌属(Corynebacteria)、分枝杆菌属(Mycobacterium)、异常球菌属(Deinococcus)、埃希氏菌属(Escherichia)、欧文氏菌属(Erwinia)、泛菌属(Pantoea)、假单胞菌属(Pseudomonas)、鞘氨醇单胞菌属(Sphingomonas)、甲基单胞菌属(Methylomonas)、甲基细菌属(Methylobacter)、甲基球菌属(Methylococcus)、甲基弯菌属(Methylosinus)、甲基微菌属(Methylomicrobium)、甲基孢囊菌属(Methylocystis)、产碱菌属(Alcaligenes)、集胞蓝细菌属(Synechocystis)、聚球蓝细菌属(Synechococcus)、鱼腥蓝细菌属(Anabaena)、硫杆菌属(Thiobacillus)、甲烷杆菌属(Methanobacterium)、克雷伯氏菌属(Klebsiella)和粘球菌属(Myxococcus)。在一个实施例中,细菌宿主菌株包括埃希氏菌属(Escherichia)、芽孢杆菌属(Bacillus)、以及假单胞菌属(Pseudomonas)。在一个优选的实施例中,细菌宿主细胞是枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)或大肠杆菌(Escherichia coli)。

[0263] 工业生产

[0264] 多种培养方法可用来制备过水解酶催化剂。从重组微生物宿主过表达的特定基因产物的大规模生产可通过分批、分批补料或连续培养的方法进行。分批和补料-分批培养方法是常见的和本领域熟知的,例子可见于Thomas D. Brock in Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology, 第二版, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA (1989) 和Deshpande, Mukund V., Appl. Biochem. Biotechnol., 36:227 (1992)。

[0265] 在一个实施例中,所期望的过水解酶催化剂的商业生产通过连续培养进行。连续培养是一种开放式体系,其中将设定好的培养基连续加入生物反应器中,并同时移出等量条件培养基用于加工。连续培养一般使细胞维持在其中细胞主要处于对数生长期的恒定高液相密度。作为另外一种选择,连续培养可以用固定化细胞来进行,其中连续添加碳和营养素,并且连续从细胞团块中取出有价值的产物、副产物或废弃物。细胞固定可使用范围广泛的固体载体进行,所述固体载体由天然材料和/或合成材料组成。

[0266] 可通过本领域的技术人员已知的任何方法实现从分批或分批补料发酵或连续培养中回收所需过水解酶催化剂。例如,当在细胞内生产酶催化剂时,通过离心或膜过滤从培养基中分离细胞浆液,任选地用水或期望pH的含水缓冲液洗涤,然后将期望pH的含水缓冲液中的细胞浆液悬浮使其匀化,生产出包含期望酶催化剂的细胞提取物。细胞提取物可任选地滤过合适的助滤剂如硅藻土或二氧化硅以在热处理步骤前除去细胞碎片,所述热处理步骤用于从酶催化剂溶液中沉淀非期望的蛋白。包含期望的酶催化剂的溶液然后可通过膜过滤或离心与热处理步骤中产生的沉淀的细胞碎片和蛋白分离,并且所得部分纯化的酶催化剂溶液通过附加地膜过滤进行富集,然后任选地与合适赋形剂混合(例如麦芽糖糊精、海藻糖、蔗糖、乳糖、山梨醇、甘露糖醇磷酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、或它们的混合物)并喷雾干燥的以制备包含期望酶催化剂的固体粉末。作为另外一种选择,如上文所述制备的所得到的部分纯化的酶催化剂溶液可以通过附加的膜过滤被任选地浓缩,并且所述部分纯化的酶催化剂溶液或所得到的酶浓缩液随后被任选地与一种或多种稳定剂(例如,甘油、山梨醇、丙二醇、1,3-丙二醇、多元醇、聚合的多元醇、聚乙烯醇或它们的混合物)、一种或多种盐(例如,氯化钠、硫酸钠、氯化钾、硫酸钾、或它们的混合物)、和一种或多种灭微生物剂混

合,并被维持为含水溶液直到使用。

[0267] 当数量、浓度或其它数值或参数以范围、优选范围或优选上限数值和优选下限数值的列表形式给出时,其应理解为具体地公开由任何范围上限或优选数值和任何范围下限或优选数值的任何一对所构成的所有范围,而不管所述范围是否被单独地公开。凡在本文中给出某一数值范围之处,该范围都意在包括其端点,以及位于该范围内的所有整数和分数,除非另行指出。当定义一个范围时,不希望范围限定于所列举的具体数值。

[0268] 一般方法

[0269] 提供了以下实例来展示不同的实施例。本领域的技术人员应认识到下文实例中公开的技术代表本发明人发现的在本文所公开方法的实施中功能良好的技术,因此可认为其构成实施的优选模式。然而,本领域的技术人员应依据本发明理解的是,在不背离本发明所公开方法的精神和范围的情况下,可对所公开的具体实施例进行许多更改并仍能获得相同或相似的结果。

[0270] 所有试剂和材料均得自DIFCO Laboratories (Detroit,MI),GIBCO/BRL (Gaithersburg,MD),TCI America (Portland,OR),Roche Diagnostics Corporation (Indianapolis,IN)或Sigma-Aldrich Chemical Company (St.Louis,MO),除非另外指明。

[0271] 本说明书中的下列缩写对应于量度、技术、特性、或化合物的单位如下:“sec”或“s”指秒,“min”指分钟,“h”或“hr”指小时,“ μ L”指微升,“mL”指毫升,“L”指升,“mM”指毫摩尔每升,“M”指摩尔,“mmol”指毫摩尔,“ppm”指份每百万份,“wt”指重量,“wt%”指重量百分比,“g”指克,“ μ g”指微克,“ng”指纳克,“g”指重力,“HPLC”指高效液相色谱法,“dd H₂O”指蒸馏和去离子水,“dew”指干细胞重量,“ATCC”或“ATCC[®]”指美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection,Manassas,VA),“U”指过水解酶活性单位,“rpm”指每分钟转数,“EDTA”指乙二胺四乙酸,“IPTG”指异丙基- β -D-硫代半乳糖苷,“BCA”指二喹啉甲酸,“ABTS”指2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)。

[0272] 实例1

[0273] 在大肠杆菌中克隆并制备来自从奇迹束丝放线菌(Actinosynnema mirum)的CE-7乙酰木聚糖酯酶

[0274] 编码来自奇迹束丝放线菌(Actinosynnema mirum)的乙酰木聚糖酯酶的基因在GENBANK[®](登录号ACU35776.1;GI:255920265)中报道,该基因利用经优化用于在大肠杆菌在表达的密码子合成(DNA 2.0,Menlo Park,CA)。将核酸产物(SEQ ID NO:3)亚克隆进PJEXPRESS404[®](DNA 2.0,Menlo Park,CA)中以生成标识为pMP91的质粒。质粒pMP91用于转化大肠杆菌KLP18(描述于美国专利7,723,083中)以生成标识为KLP18/pMP91的菌株。KLP18/pMP91在37℃在LB培养基中振荡培养至OD_{600nm}=0.4-0.5,此时加入IPTG至终浓度为1mM并继续孵育2-3小时。以5,000×g离心15分钟收获细胞,然后重悬(20%w/v)在pH7.0、具有1.0mM二硫苏糖醇的50mM磷酸钾缓冲液中。使重悬的细胞通过弗氏压碎器两次。以12,000×g离心裂解的细胞30分钟,使用BCA测定试剂盒(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO)测定了提取上清液中的蛋白质浓度。利用SDS-PAGE确认CE-7酶(SEQ ID NO:4)的表达,并且使用公共领域的Java图像处理程序ImageJ分析凝胶,指示过水解酶占总可溶蛋白的11%。

[0275] 实例2

[0276] 在大肠杆菌中克隆并制备来自从痤疮丙酸杆菌(Propionibacterium acnes)的

CE-7乙酰木聚糖酯酶

[0277] 编码来自痤疮丙酸杆菌(*Propionibacterium acnes*)的乙酰木聚糖酯酶的基因在GENBANK[®](登录号AEE71478.1;GI:332674662)中报道,该基因利用经优化用于在大肠杆菌在表达的密码子合成(DNA 2.0, Menlo Park, CA)。将核酸产物(SEQ ID NO:5)亚克隆进PJEXPRESS404[®](DNA 2.0, Menlo Park, CA)中以生成标识为pMP92的质粒。质粒pMP92用于转化大肠杆菌KLP18(描述于美国专利7,723,083中)以生成标识为KLP18/pMP92的菌株。KLP18/pMP92在37℃在LB培养基中振荡培养至OD_{600nm}=0.4-0.5,此时加入IPTG至终浓度为1mM并继续孵育2-3小时。以5,000×g离心15分钟收获细胞,然后重悬(20%w/v)在pH7.0、具有1.0mM二硫苏糖醇的50mM磷酸钾缓冲液中。使重悬的细胞通过弗氏压碎器两次。以12,000×g离心裂解的细胞30分钟,使用BCA测定试剂盒(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)测定了提取上清液中的总可溶性蛋白质浓度。利用SDS-PAGE确认CE-7酶(SEQ ID NO:6)的表达,并且使用公共领域的Java图像处理程序ImageJ分析凝胶,指示过水解酶占总可溶蛋白的13%。

[0278] 实例3

[0279] 在大肠杆菌中克隆并制备来自从马链球菌(*Streptococcus equi*)的CE-7乙酰木聚糖酯酶

[0280] 编码来自马链球菌(*Streptococcus equi*)的乙酰木聚糖酯酶的基因在GENBANK[®](登录号CAX00506.1;GI:225702544)中报道,该基因利用经优化用于在大肠杆菌在表达的密码子合成(DNA 2.0, Menlo Park, CA)。将核酸产物(SEQ ID NO:7)亚克隆进PJEXPRESS404[®](DNA 2.0, Menlo Park, CA)中以生成标识为pMP93的质粒。质粒pMP93用于转化大肠杆菌KLP18(描述于美国专利7,723,083中)以生成标识为KLP18/pMP93的菌株。KLP18/pMP93在37℃在LB培养基中振荡培养至OD_{600nm}=0.4-0.5,此时加入IPTG至终浓度为1mM并继续孵育2-3小时。以5,000×g离心15分钟收获细胞,然后重悬(20%w/v)在pH7.0、具有1.0mM二硫苏糖醇的50mM磷酸钾缓冲液中。使重悬的细胞通过弗氏压碎器两次。以12,000×g离心裂解的细胞30分钟,使用BCA测定试剂盒(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)测定了提取上清液中的总可溶性蛋白质浓度。利用SDS-PAGE确认CE-7酶(SEQ ID NO:8)的表达,并且使用公共领域的Java图像处理程序ImageJ分析凝胶,指示过水解酶占总可溶蛋白的26%。

[0281] 实例4

[0282] 在大肠杆菌中克隆并制备来自从Stackebrandtia nassauensis的CE-7乙酰木聚糖酯酶

[0283] 编码来自Stackebrandtia nassauensis的乙酰木聚糖酯酶的基因在GENBANK[®](登录号ADD42786.1;GI:290569821)中报道,该基因利用经优化用于在大肠杆菌在表达的密码子合成(DNA 2.0, Menlo Park, CA)。将核酸产物(SEQ ID NO:9)亚克隆进PJEXPRESS404[®](DNA 2.0, Menlo Park, CA)中以生成标识为pMP94的质粒。质粒pMP94用于转化大肠杆菌KLP18(描述于美国专利7,723,083中)以生成标识为KLP18/pMP94的菌株。KLP18/pMP94在37℃在LB培养基中振荡培养至OD_{600nm}=0.4-0.5,此时加入IPTG至终浓度为1mM并继续孵育2-3小时。以5,000×g离心15分钟收获细胞,然后重悬(20%w/v)在pH7.0、具有1.0mM二硫苏糖醇的50mM磷酸钾缓冲液中。使重悬的细胞通过弗氏压碎器两次。以12,000×g离心裂解的细胞30分钟,使用BCA测定试剂盒(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)测定了

提取上清液中的总可溶性蛋白质浓度。利用SDS-PAGE确认CE-7酶 (SEQ ID NO:10) 的表达, 并且使用公共领域的Java图像处理程序ImageJ分析凝胶, 指示过水解酶占总可溶蛋白的33%。

[0284] 实例5

[0285] 在大肠杆菌中克隆并制备来自从无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 的CE-7乙酰木聚糖酯酶

[0286] 编码来自无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 的乙酰木聚糖酯酶的基因在GENBANK[®] (登录号AAM98949.1;GI:22533045) 中报道, 该基因利用经优化用于在大肠杆菌在表达的密码子合成 (DNA 2.0, Menlo Park, CA)。将核酸产物 (SEQ ID NO:11) 亚克隆进PJEXPRESS404[®] (DNA 2.0, Menlo Park, CA) 中以生成标识为pMP95的质粒。质粒pMP95用于转化大肠杆菌KLP18 (描述于美国专利7,723,083中) 以生成标识为KLP18/pMP95的菌株。KLP18/pMP95在37°C在LB培养基中振荡培养至OD_{600nm}=0.4-0.5, 此时加入IPTG至终浓度为1mM并继续孵育2-3小时。以5,000×g离心15分钟收获细胞, 然后重悬 (20%w/v) 在pH7.0、具有1.0mM二硫苏糖醇的50mM磷酸钾缓冲液中。使重悬的细胞通过弗氏压碎器两次。以12,000×g离心裂解的细胞30分钟, 使用BCA测定试剂盒 (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO) 测定了提取上清液中的总可溶性蛋白质浓度。利用SDS-PAGE确认CE-7酶 (SEQ ID NO:12) 的表达, 并且使用公共领域的Java图像处理程序ImageJ分析凝胶, 指示过水解酶占总可溶蛋白的7.3%。

[0287] 实例6

[0288] 过水解酶活性测定

[0289] 通过包含22.5mM甘油三乙酸酯、22.5mM过氧化氢和6.25μg提取上清液总可溶性蛋白质/mL的反应测定了提取上清液中的过水解酶活性。孵育在环境温度 (22-24°C) 进行10分钟。通过添加包含100mM邻-苯二胺的等体积的1.25M磷酸终止反应。30分钟后, 测量了在458nm的吸光度 (表1)。在包含10mM甘油三乙酸酯和10mM过氧化氢或50mM甘油三乙酸酯和50mM过氧化氢的反应中进行了附加的过水解酶活性测量 (表1)。来自海栖热袍菌 (*T.maritima*) 的CE-7乙酰木聚糖酯酶也在大肠杆菌 (*E.coli*) KLP18中被生产 (描述于美国专利申请公布2008-0176299中), 并用作过水解酶测定的阳性对照。不包含CE-7酶的大肠杆菌 (*E.coli*) KLP18提取物被用作阴性对照。

[0290] 表1:

[0291]

CE-7 酯酶来源	ref	SEQ ID NO:	OD 458nm			
			甘油三 乙酸酯	10mM	22.5mM	50mM
			H ₂ O ₂	10mM	22.5mM	50mM
奇迹束丝放线菌 (<i>A. mirum</i>)	Ami	4	0.6	2.3	2.9	
痤疮丙酸杆菌 (<i>P. acnes</i>)	Pac	6	0.4	1.2	2.5	
马链球菌 (<i>S. equi</i>)	Seq	8	0.3	1.9	2.0	
<i>S. nassauensis</i>	Sna	10	0.1	0.2	0.8	
无乳链球菌 (<i>S. agalactiae</i>)	Sag	12	0.0	0.1	0.3	
海栖热袍菌 (<i>T. maritima</i>)	Tma	2	0.2	1.0	2.5	
无 (对照)			0.0	0.0	0.0	

[0292] 实例7

[0293] 通过CE-7酯酶从甘油三乙酸酯和过氧化氢生产过乙酸

[0294] 反应(10mL总体积)在25℃下,在磷酸钾缓冲液(50mM,pH7.0)中进行,该缓冲液包含甘油三乙酸酯(10mM)、过氧化氢(20mM)和5.0μg/mL提取上清液总可溶蛋白,其包含来自奇迹束丝放线菌(*Actinosynnema mirum*)(SEQ ID NO:4)、痤疮丙酸杆菌(*Propionibacterium acnes*)(SEQ ID NO:6)、马链球菌(*Streptococcus equi*)(SEQ ID NO:8)、*Stackebrandtia nassauensis*(SEQ ID NO:10)或无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)(SEQ ID NO:12)的CE-7酯酶,如实例1-5所述制备。仅仅在反应头45秒搅动反应物以初始混合反应物和酶。使用5.0μg/mL的从大肠杆菌(*E. coli*)KLP18(用于表达CE-7酯酶)分离的提取物总可溶性蛋白质,在与上文所描述的相同的条件下进行了比较性对照反应,其中提取上清液是按照实例1的方法制备的。采用没有添加提取上清液总可溶性蛋白质,还在与上文所描述的相同的条件下进行了第二比较性对照反应,其中在添加的酯酶的不存在下产生的过乙酸是在所指定的反应条件下甘油三乙酸酯被过氧化氢化学过水解的结果。来自海栖热袍菌(*T. maritima*)的CE-7乙酰木聚糖酯酶(SEQ ID NO:2)也在大肠杆菌KLP18(在美国专利申请公布2008-0176299)中产生并用作比较反应(在细胞提取上清液中11%的总可溶蛋白)中的阳性对照。

[0295] 用于过乙酸的生产的反应样品的分析按照Pinkernell等人,(*Analyst*,122:567(1997))中描述的方法,使用过乙酸对ABTS的氧化的比色检测。将50μL反应样品添加至950μL的5mM H₃PO₄以终止酶促反应(最终pH在pH 2-3之间),并将50μL的所得到的溶液添加至容纳有200μL包含0.25M乙酸、0.125g/L ABTS和5.0mg/L KI的水溶液的96孔微量滴定板的孔中。使溶液反应5分钟,然后使用酶标仪在405nm测量溶液的吸光度。从使用过乙酸试剂溶液同时生成的标准曲线计算了每一样品中的过乙酸浓度(表2)。

表 2: 于 25°C 在磷酸钾缓冲液 (50mM, pH7.0) 中由 CE-7 过水解酶催化的过乙酸 (PAA) 从甘油三乙酸酯和过氧化氢的生产。

CE-7 酯酶来源	SEQ ID NO	甘油三乙酸酯 (mM)	H ₂ O ₂ (mM)	总可溶性蛋白 (μg/mL)	PAA, 2 分钟 (ppm)	PAA, 5 分钟 (ppm)	PAA, 10 分钟 (ppm)	PAA, 20 分钟 (ppm)	PAA, 30 分钟 (ppm)
对照-没有酶		10	20	0	4.1	4.3	3.1	4.0	4.6
对照-大肠杆菌 (<i>E. coli</i>) K1P18		10	20	5.0	3.9	4.0	4.1	4.0	4.8
奇迹束丝放线菌 (<i>A. mirum</i>)	4	10	20	5.0	8.8	17	30	50	68
痤疮丙酸杆菌 (<i>P. acnes</i>)	6	10	20	5.0	6.4	12	18	28	36
马链球菌 (<i>S. equi</i>)	8	10	20	5.0	18	33	47	53	52
<i>S. massauensis</i>	10	10	20	5.0	4.3	6.0	7.8	11	15
无乳链球菌 (<i>S. agalactiae</i>)	12	10	20	5.0	4.3	4.5	5.1	6.6	7.4
海栖热袍菌 (<i>T. maritima</i>)	2	10	20	5.0	5.6	11	16	28	43

[0296]

[0297] 实例8

[0298] 通过CE-7酯酶从丙二醇二乙酸酯和过氧化氢生产过乙酸

[0299] 反应(10mL总体积)在25℃下,在磷酸钾缓冲液(50mM,pH7.0)中进行,该缓冲液包含丙二醇二乙酸酯(10mM)、过氧化氢(20mM)和5.0μg/mL提取上清液总可溶蛋白,其包含来自奇迹束丝放线菌(*Actinosynnema mirum*) (SEQ ID NO:4)、痤疮丙酸杆菌(*Propionibacterium acnes*) (SEQ ID NO:6)、马链球菌(*Streptococcus equi*) (SEQ ID NO:8)、或Stackebrandtia nassauensis (SEQ ID NO:10)的CE-7酯酶,如实例1-4所述制备。仅仅在反应头45秒搅动反应物以初始混合反应物和酶。使用5.0μg/mL的从大肠杆菌(*E.coli*) KLP18(用于表达CE-7酯酶)分离的提取物总可溶性蛋白质,在与上文所描述的相同的条件下进行了比较性对照反应,其中提取上清液是按照实例1的方法制备的。采用没有添加提取上清液总可溶性蛋白质,还在与上文所描述的相同的条件下进行了第二比较性对照反应,其中在添加的酯酶的不存在下产生的过乙酸是在所指定的反应条件下丙二醇二乙酸酯被过氧化氢化学过水解的结果。来自海栖热袍菌(*T.maritima*)的CE-7乙酰木聚糖酯酶(SEQ ID NO:2)也在大肠杆菌KLP18(在美国专利申请公布2008-0176299)中产生并用作比较反应(在细胞提取上清液中11%的总可溶蛋白)中的阳性对照。用于过乙酸的生产的反应样品的分析按照实例7中描述的方法(表3)。

表 3: 于 25°C 在磷酸钾缓冲液 (50mM, pH7.0) 中由 CE-7 过水解酶催化的过乙酸 (PAA) 从丙二醇二乙酸酯和过氧化氢的生产。

CE-7 酯酶来源	SEQ ID NO	丙二醇二乙酸酯 (mM)	H ₂ O ₂ (mM)	总可溶性蛋白质 (µg/mL)	PAA, 2 分钟 (ppm)	PAA, 5 分钟 (ppm)	PAA, 10 分钟 (ppm)	PAA, 20 分钟 (ppm)	PAA, 30 分钟 (ppm)
对照-没有酶		10	20	0	5.4	5.0	5.0	5.2	5.1
对照-大肠杆菌 (<i>E. coli</i>) KLP18		10	20	5.0	5.4	5.1	5.2	5.1	5.2
奇迹来丝效线菌 (<i>A. mirum</i>)	4	10	20	5.0	8.0	13	22	35	47
痤疮丙酸杆菌 (<i>P. acnes</i>)	6	10	20	5.0	6.1	6.9	8.6	13	12
马链球菌 (<i>S. equi</i>)	8	10	20	5.0	6.6	11	11	12	12
<i>S. massauensis</i>	10	10	20	5.0	4.6	4.8	8.2	6.4	7.6
海栖热袍菌 (<i>T. maritima</i>)	2	10	20	5.0	5.7	6.8	8.3	12	15

[0300]

实例9

[0301]

[0302] 通过CE-7酯酶从 α -D-葡萄糖五乙酸酯和过氧化氢生产过乙酸

[0303] 反应(10mL总体积)在25℃下,在磷酸钾缓冲液(50mM,pH7.0)中进行,该缓冲液包含 α -D-葡萄糖五乙酸酯(10mM)、过氧化氢(20mM)和5.0 μ g/mL提取上清液总可溶蛋白,其包含来自奇迹束丝放线菌(*Actinosynnema mirum*) (SEQ ID NO:4)、马链球菌(*Streptococcus equi*) (SEQ ID NO:8)、或无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*) (SEQ ID NO:12)的CE-7酯酶,如实例1、3和5所述制备。仅仅在反应头45秒搅动反应物以初始混合反应物和酶。使用5.0 μ g/mL的从大肠杆菌(*E. coli*) KLP18(用于表达CE-7酯酶)分离的提取物总可溶性蛋白质,在与上文所描述的相同的条件下进行了比较性对照反应,其中提取上清液是按照实例1的方法制备的。采用没有添加提取上清液总可溶性蛋白质,还在与上文所描述的相同的条件下进行了第二比较性对照反应,其中在添加的酯酶的不存在下产生的过乙酸是在所指定的反应条件下 α -D-葡萄糖五乙酸酯被过氧化氢化学过水解的结果。来自海栖热袍菌(*T. maritima*)的CE-7乙酰木聚糖酯酶(SEQ ID NO:2)也在大肠杆菌KLP18(在美国专利申请公布2008-0176299)中产生并用作比较反应(在细胞提取上清液中11%的总可溶蛋白)中的阳性对照。用于过乙酸的生产的反应样品的分析按照实例7中描述的方法(表4)。

表 4: 于 25°C 在磷酸钾缓冲液 (50mM, pH7.0) 中由 CE-7 过水解酶催化的过乙酸 (PAA) 从 α -D-葡糖五乙
酸酯和过氧化氢的生产。

CE-7 酯酶来源	SEQ ID NO	α -D-葡糖五 乙酸酯 (mM)	H ₂ O ₂ (mM)	总可溶性蛋 白质 (μ g/mL)	PAA, 2 分钟 (ppm)	PAA, 5 分钟 (ppm)	PAA, 10 分钟 (ppm)	PAA, 20 分钟 (ppm)	PAA, 30 分钟 (ppm)
对照-没有酶		10	20	0	6.7	18	41	93	136
对照-大肠杆菌 (<i>E. coli</i>) K1P18		10	20	5.0	8.7	20	46	94	137
奇迹束丝放线菌 (<i>A. mirum</i>)	4	10	20	5.0	20	34	68	130	179
马链球菌 (<i>S. equi</i>)	8	10	20	5.0	11	23	46	93	141
无乳链球菌 (<i>S. agalactiae</i>)	12	10	20	5.0	16	29	51	99	148
海栖热袍菌 (<i>T. maritima</i>)	2	10	20	5.0	11	24	47	99	144

[0304]

[0305] 实例10

[0306] 通过CE-7酯酶从D-山梨醇六乙酸酯和过氧化氢生产过乙酸

[0307] 反应(10mL总体积)在25℃下,在磷酸钾缓冲液(50mM,pH7.0)中进行,该缓冲液包含D-山梨醇六乙酸酯(10mM)、过氧化氢(20mM)和5.0μg/mL提取上清液总可溶蛋白,其包含来自奇迹束丝放线菌(*Actinosynnema mirum*) (SEQ ID NO:4)、或马链球菌(*Streptococcus equi*) (SEQ ID NO:8)的CE-7酯酶,如实例1和3所述制备。仅仅在反应头45秒搅动反应物以初始混合反应物和酶。使用5.0μg/mL的从大肠杆菌(*E.coli*)KLP18(用于表达CE-7酯酶)分离的提取物总可溶性蛋白质,在与上文所描述的相同的条件下进行了比较性对照反应,其中提取上清液是按照实例1的方法制备的。采用没有添加提取上清液总可溶性蛋白质,还在与上文所描述的相同的条件下进行了第二比较性对照反应,其中在添加的酯酶的不存在下产生的过乙酸是在所指定的反应条件下D-山梨醇六乙酸酯被过氧化氢化学过水解的结果。来自海栖热袍菌(*T.maritima*)的CE-7乙酰木聚糖酯酶(SEQ ID NO:2)也在大肠杆菌KLP18(在美国专利申请公布2008-0176299)中产生并用作比较反应(在细胞提取上清液中11%的总可溶蛋白)中的阳性对照。用于过乙酸的生产的反应样品的分析按照实例7中描述的方法(表5)。

表 5: 于 25°C 在磷酸钾缓冲液 (50mM, pH7.0) 中由 CE-7 过水解酶催化的过乙酸 (PAA) 从 D-山梨醇六乙酸酯和过氧化氢的生产。

CE-7 酯酶来源	SEQ ID NO	D-山梨醇六乙酸酯 (mM)	H ₂ O ₂ (mM)	总可溶性蛋白质 (µg/ml)	PAA, 2 分钟 (ppm)	PAA, 5 分钟 (ppm)	PAA, 10 分钟 (ppm)	PAA, 20 分钟 (ppm)	PAA, 30 分钟 (ppm)
对照-没有酶		10	20	0	3.6	3.9	4.4	4.2	4.5
对照-大肠杆菌 (<i>E. coli</i>) KLP18		10	20	5.0	3.8	4.2	4.1	4.1	4.7
奇逆束丝放线菌 (<i>A. mirum</i>)	4	10	20	5.0	5.6	9.0	15	25	34
马链球菌 (<i>S. equi</i>)	8	10	20	5.0	4.8	5.9	7.7	9.1	9.8
海柄热孢菌 (<i>T. maritima</i>)	2	10	20	5.0	5.0	6.0	11	15	21

[0308]

实例11

[0309]

[0310] 通过CE-7酯酶从三-O-乙酰基-D-葡萄糖烯糖和过氧化氢生产过乙酸

[0311] 反应(50mL总体积)在25℃下,在磷酸钾缓冲液(10mM,pH7.0)中进行,该缓冲液包含三-邻-乙酰基-D-葡萄糖烯糖(2mM)、过氧化氢(10mM)和5.0μg/mL提取上清液总可溶蛋白,其包含来自奇迹束丝放线菌(*Actinosynnema mirum*) (SEQ ID NO:4)、或马链球菌(*Streptococcus equi*) (SEQ ID NO:8)的CE-7酯酶,如实例1和3所述制备。仅仅在反应头45秒搅动反应物以初始混合反应物和酶。使用5.0μg/mL的从大肠杆菌(*E.coli*) KLP18(用于表达CE-7酯酶)分离的提取物总可溶性蛋白质,在与上文所描述的相同的条件下进行了比较性对照反应,其中提取上清液是按照实例1的方法制备的。采用没有添加提取上清液总可溶性蛋白质,还在与上文所描述的相同的条件下进行了第二比较性对照反应,其中在添加的酯酶的不存在下产生的过乙酸是在所指定的反应条件下三-O-乙酰基-D-葡萄糖烯糖被过氧化氢化学过水解的结果。来自海栖热袍菌(*T.maritima*)的CE-7乙酰木聚糖酯酶(SEQ ID NO:2)也在大肠杆菌KLP18(在美国专利申请公布2008-0176299)中产生并用作比较反应(在细胞提取上清液中11%的总可溶蛋白)中的阳性对照。用于过乙酸的生产的反应样品的分析按照实例7中描述的方法(表6)。

表 6: 于 25°C 在磷酸钾缓冲液 (10mM, pH7.0) 中由 CE-7 过水酶催化的过乙酸 (PAA) 从三-O-乙酰基-D-葡萄糖烯糖和过氧化氢的生产。

CE-7 酯酶来源	SEQ ID NO:	三-O-乙酰基-D-葡萄糖烯糖 (mM)	H ₂ O ₂ (mM)	总可溶性蛋白质 (µg/mL)	PAA, 5 分钟 (ppm)	PAA, 20 分钟 (ppm)
对照-没有酶		2	10	0	2.6	2.2
对照-大肠杆菌 (<i>E. coli</i>) K1.P18		2	10	5.0	2.5	1.5
奇迹束丝放线菌 (<i>A. nirmum</i>)	4	2	10	5.0	6.7	18
马链球菌 (<i>S. equi</i>)	8	2	10	5.0	5.8	6.4
海柯热袍菌 (<i>T. maritima</i>)	2	2	10	5.0	4.9	13

[0312]

[0313] 实例12

[0314] 通过CE-7酯酶从4-(乙酰氧基)-苯甲酸和过氧化氢生产过乙酸

[0315] 反应(10mL总体积)在20℃下,在磷酸钾缓冲液(50mM,pH7.0)中进行,该缓冲液包含4-(乙酰氧基)-苯甲酸(CAS 2345-34-8;25mM)、过氧化氢(20mM)和5.0μg/mL提取上清液总可溶蛋白,其包含来自奇迹束丝放线菌(*Actinosynnema mirum*) (SEQ ID NO:4)、痤疮丙酸杆菌(*Propionibacterium acnes*) (SEQ ID NO:6)、马链球菌(*Streptococcus equi*) (SEQ ID NO:8)、或Stackebrandtia nassauensis (SEQ ID NO:10)的CE-7酯酶,如实例1-4所述制备。仅仅在反应头45秒搅动反应物以初始混合反应物和酶。使用5.0μg/mL的从大肠杆菌(*E.coli*)KLP18(用于表达CE-7酯酶)分离的经热处理的提取物总可溶性蛋白质,在与上文所描述的相同的条件下进行了比较性对照反应,其中提取上清液是按照实例1的方法制备的。采用没有添加提取上清液总可溶性蛋白质,还在与上文所描述的相同的条件下进行了第二比较性对照反应,其中在添加的酯酶的不存在下产生的过乙酸是在所指定的反应条件下4-(乙酰氧基)-苯甲酸被过氧化氢化学过水解的结果。来自海栖热袍菌(*T.maritima*)的CE-7乙酰木聚糖酯酶(SEQ ID NO:2)也在大肠杆菌KLP18(在美国专利申请公布2008-0176299)中产生并用作比较反应(在细胞提取上清液中11%的总可溶蛋白)中的阳性对照。用于过乙酸的生产的反应样品的分析按照实例7中描述的方法(表7)。

表 7: 于 20°C 在磷酸钾缓冲液 (50mM, pH7.0) 中由 CE-7 过水分解酶催化的过乙酸 (PAA) 从 4-(乙酰氧基)-苯甲酸和过氧化氢的生产。

CE-7 酯酶来源	SEQ ID NO	4-(乙酰氧基)-苯甲酸 (mM)	H ₂ O ₂ (mM)	总可溶性蛋白质 (µg/mL)	PAA, 5 分钟 (ppm)	PAA, 20 分钟 (ppm)
对照-没有酶		25	20	0	28	74
对照-大肠杆菌 (<i>E. coli</i>) K12 P18		25	20	5.0	21	73
奇迹束丝放线菌 (<i>A. mirum</i>)	4	25	20	5.0	36	85
痤疮丙酸杆菌 (<i>P. acnes</i>)	6	25	20	5.0	31	90
马链球菌 (<i>S. equi</i>)	8	25	20	5.0	31	98
<i>S. massauensis</i>	10	25	20	5.0	29	80
海栖热袍菌 (<i>T. maritima</i>)	2	25	20	5.0	21	71

[0316]

[0317] 实例13

[0318] 奇迹束丝放线菌 (Actinosynnema mirum) 乙酰木聚糖酯酶变体的克隆和生产

[0319] 编码来自奇迹束丝放线菌 (*A. mirum*) 的乙酰木聚糖酯酶变体的基因在 GENBANK® (登录号 ACU35776.1:GI:255920265) 中报道, 该基因利用经优化用于在大肠杆菌在表达的密码子合成 (DNA 2.0, Menlo Park, CA)。将核酸产物 (SEQ ID NO:13) 亚克隆进 PJEXPRESS404® (DNA 2.0, Menlo Park, CA) 中以生成标识为 pMP91a 的质粒。所编码的变体蛋白质被称为 Ami_C276S (SEQ ID NO:14)。质粒 pMP91a 用于转化大肠杆菌 KLP18 (描述于美国专利 7,723,083 中) 以生成标识为 KLP18/pMP91a 的菌株。KLP18/pMP91a 在 37°C 在 LB 培养基中振荡培养至 OD_{600nm} = 0.4-0.5, 此时加入 IPTG 至终浓度为 1mM 并继续孵育 2-3 小时。以 5,000 × g 离心 15 分钟收获细胞, 然后重悬 (20% w/v) 在 pH7.0、具有 1.0mM 二硫苏糖醇的 50mM 磷酸钾缓冲液中。使重悬的细胞通过弗氏压碎器两次。以 12,000 × g 离心裂解的细胞 30 分钟, 使用 BCA 测定试剂盒 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 测定了上清液中的蛋白质浓度。SDS-PAGE 被用于确认酶的表达, 并使用密度计量术 (ImageJ software, National Institutes of Health, Bethesda, MD) 计算酶蛋白质为总蛋白质的大约 16-18%。

[0320] 实例14

[0321] 奇迹束丝放线菌 (Actinosynnema mirum) 乙酰木聚糖酯酶变体的克隆和生产

[0322] 编码来自奇迹束丝放线菌 (*A. mirum*) 的乙酰木聚糖酯酶变体的基因在 GENBANK® (登录号 ACU35776.1:GI:255920265) 中报道, 该基因利用经优化用于在大肠杆菌在表达的密码子合成 (DNA 2.0, Menlo Park, CA)。将核酸产物 (SEQ ID NO:15) 亚克隆进 PJEXPRESS404® (DNA 2.0, Menlo Park, CA) 中以生成标识为 pMP91b 的质粒。所编码的变体蛋白质被称为 Ami_C276T (SEQ ID NO:16)。质粒 pMP91b 用于转化大肠杆菌 KLP18 (描述于美国专利 7,723,083 中) 以生成标识为 KLP18/pMP91b 的菌株。KLP18/pMP91b 在 37°C 在 LB 培养基中振荡培养至 OD_{600nm} = 0.4-0.5, 此时加入 IPTG 至终浓度为 1mM 并继续孵育 2-3 小时。以 5,000 × g 离心 15 分钟收获细胞, 然后重悬 (20% w/v) 在 pH7.0、具有 1.0mM 二硫苏糖醇的 50mM 磷酸钾缓冲液中。使重悬的细胞通过弗氏压碎器两次。以 12,000 × g 离心裂解的细胞 30 分钟, 使用 BCA 测定试剂盒 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 测定了上清液中的蛋白质浓度。SDS-PAGE 被用于确认酶的表达, 并使用密度计量术 (ImageJ software, National Institutes of Health, Bethesda, MD) 计算酶蛋白质为总蛋白质的大约 16-18%。

[0323] 实例15

[0324] 过水解酶活性测定

[0325] 通过包含 22.5mM 甘油三乙酸酯、22.5mM 过氧化氢和 1.5μg 总蛋白质/mL 的反应测定了提取物中的过水解酶活性。孵育在环境温度 (22-24°C) 进行 10 分钟。通过添加包含 100mM 邻-苯二胺的等体积的 1.25M 磷酸终止反应。30 分钟后, 测量了在 458nm 的吸光度 (表 8)。不含乙酰木聚糖酯酶的大肠杆菌 (*E. coli*) KLP18 提取物被用作阴性对照。

[0326] 表8:

[0327]

酶ID.	SEQ IDNO:	OD 458nm
Ami_wt	4	0.21
Ami_C276S	14	2.3
Ami_C276T	16	1.5

对照-没有酶		0
--------	--	---

[0328] 实例16

[0329] 通过CE-7酯酶变体由甘油三乙酸酯和过氧化氢制备过乙酸

[0330] 反应(10mL总体积)在25℃下,在磷酸钾缓冲液(20mM,pH7.0)中进行,该缓冲液包含甘油三乙酸酯(0.75mM)、过氧化氢(1.4mM)和来自野生型奇迹束丝放线菌(*Actinosynnema mirum*) (SEQ ID NO:4,如实例1所述制备)、奇迹束丝放线菌(*Actinosynnema mirum*) C276S变体(SEQ ID NO:14,如实例13所述制备)、奇迹束丝放线菌(*Actinosynnema mirum*) C276T变体(SEQ ID NO:16,如实例14所述制备)、海栖热袍菌(*T.maritima*) C277S (SEQ ID NO:17,在大肠杆菌KLP18中如美国专利8,062,875所述制备)、和海栖热袍菌(*T.maritima*) C277T (SEQ ID NO:18,在大肠杆菌KLP18中如美国专利8,062,875所述制备)的1.0μg/mL或2.0μg/mL的CE-7酯酶。通过SDS-PAGE凝胶对包含 CE-7酯酶的细胞提取物的分析结合使用公共领域的Java图像处理程序ImageJ对凝胶的分析,被用于以占总可溶性蛋白质的百分比计算细胞提取物中CE-7酯酶的浓度。仅仅在反应头45秒搅动反应物以初始混合反应物和酶。采用不添加CE-7酯酶,在与上文所描述的相同的条件下进行了第二比较性对照反应,其中在添加的酯酶的不存在下产生的过乙酸是在所指定的反应条件下甘油三乙酸酯被过氧化氢化学过水解的结果。用于过乙酸的生产的反应样品的分析按照实例7中描述的方法(表9)。

表 9: 于 25°C 在磷酸钾缓冲液 (20mM, pH7.0) 中由 CE-7 过水分解酶催化的过乙酸 (PAA) 从甘油三乙酸酯和过氧化氢的生产。

CE-7 酯酶来源	SEQ ID NO	甘油三乙酸酯 (mM)	H ₂ O ₂ (mM)	CE-7 酯酶变体 (μg/mL)	PAA, 2 分钟 (ppm)	PAA, 5 分钟 (ppm)	PAA, 10 分钟 (ppm)	PAA, 20 分钟 (ppm)	PAA, 30 分钟 (ppm)
对照-没有酶		0.75	1.4	0	0.5	0.4	0.4	0.4	0.3
奇迹束丝放线菌 (<i>A. mirum</i>) 野生型	4	0.75	1.4	1.0	0.6	1.4	2.1	1.2	0.6
奇迹束丝放线菌 (<i>A. mirum</i>) C276S	14	0.75	1.4	1.0	3.1	5.4	6.8	4.9	3.0
奇迹束丝放线菌 (<i>A. mirum</i>) C276T	16	0.75	1.4	1.0	3.0	6.0	8.8	8.1	5.1
海栖热袍菌 (<i>T. maritima</i>) C277S	17	0.75	1.4	1.0	1.3	2.6	4.2	4.8	4.2
海栖热袍菌 (<i>T. maritima</i>) C277T	18	0.75	1.4	1.0	2.4	4.8	6.1	5.6	3.7
奇迹束丝放线菌 (<i>A. mirum</i>) 野生型	4	0.75	1.4	2.0	1.0	1.8	1.2	0.4	0.4
奇迹束丝放线菌 (<i>A. mirum</i>) C276S	14	0.75	1.4	2.0	5.3	6.7	4.8	1.8	1.2
奇迹束丝放线菌 (<i>A. mirum</i>) C276T	16	0.75	1.4	2.0	5.5	8.6	7.7	2.4	1.4
海栖热袍菌 (<i>T. maritima</i>) C277S	17	0.75	1.4	2.0	2.9	4.2	5.0	3.4	2.0
海栖热袍菌 (<i>T. maritima</i>) C277T	18	0.75	1.4	2.0	4.1	6.2	5.5	2.1	1.1

[0331]

[0332] 实例17

[0333] 通过CE-7酯酶变体由甘油三乙酸酯和过氧化氢制备过乙酸

[0334] 反应 (10mL 总体积) 在 25°C 下, 在磷酸钾缓冲液 (50mM, pH7.0) 中进行, 该缓冲液包含甘油三乙酸酯 (10mM)、过氧化氢 (20mM) 和来自野生型奇迹束丝放线菌 (*Actinosynnema mirum*) (SEQ ID NO:4, 如实例1所述制备)、奇迹束丝放线菌 (*Actinosynnema mirum*) C276S 变体 (SEQ ID NO:14, 如实例13所述制备)、奇迹束丝放线菌 (*Actinosynnema mirum*) C276T

变体 (SEQ ID NO:16, 如实例14所述制备)、海栖热袍菌 (*T.maromma*) C277S (SEQ ID NO:17)、和海栖热袍菌 (*T.maritima*) C277T (SEQ ID NO:18) 的0.5µg/mL的CE-7酯酶。通过SDS-PAGE凝胶对包含CE-7酯酶的细胞提取物的分析结合使用公共领域的Java图像处理程序ImageJ对凝胶的分析,被用于以占总可溶性蛋白质的百分比计算细胞提取物中CE-7酯酶的浓度。仅仅在反应头45秒搅动反应物以初始混合反应物和酶。采用不添加CE-7酯酶,在与上文所描述的相同的条件下进行了第二比较性对照反应,其中在添加的酯酶的不存在下产生的过乙酸是在所指定的反应条件下甘油三乙酸酯被过氧化氢化学过水解的结果。用于过乙酸的生产的反应样品的分析按照实例7中描述的方法(表10)。

表 10: 于 25°C 在磷酸钾缓冲液 (50mM, pH7.0) 中由 CE-7 过水解酶催化的过乙酸 (PAA) 从甘油三乙酸酯和过氧化氢的生产。

CE-7 酯酶来源	SEQ ID NO	甘油三乙酸酯 (mM)	H ₂ O ₂ (mM)	CE-7 酯酶变体 (µg/mL)	PAA, 2 分钟 (ppm)	PAA, 5 分钟 (ppm)	PAA, 10 分钟 (ppm)	PAA, 20 分钟 (ppm)	PAA, 30 分钟 (ppm)
对照-没有酶		10	20	0	3.1	8.0	2.6	4.1	4.0
奇逆来丝放线菌 (<i>A. mirum</i>) 野生型	4	10	20	0.5	8.1	11	19	34	46
奇逆来丝放线菌 (<i>A. mirum</i>) C276S	14	10	20	0.5	39	76	99	92	80
奇逆来丝放线菌 (<i>A. mirum</i>) C276T	16	10	20	0.5	26	60	96	118	115
海栖热袍菌 (<i>T. maritima</i>) C277S	17	10	20	0.5	22	43	63	74	68
海栖热袍菌 (<i>T. maritima</i>) C277T	18	10	20	0.5	29	58	96	131	132

[0335]

[0336] 实例18

[0337] 通过CE-7酯酶变体由甘油三乙酸酯和过氧化氢制备过乙酸

[0338] 反应(10mL总体积)在25℃下,在碳酸钠缓冲液(20mM,pH10.5)中进行,该缓冲液包含甘油三乙酸酯(0.75mM)、过氧化氢(1.4mM,来自过碳酸钠)和来自野生型奇迹束丝放线菌(*Actinosynnema mirum*) (SEQ ID NO:4,如实例1所述制备)、奇迹束丝放线菌(*Actinosynnema mirum*) C276S变体(SEQ ID NO:14,如实例13所述制备)、奇迹束丝放线菌(*Actinosynnema mirum*) C276T变体(SEQ ID NO:16,如实例14所述制备)、海栖热袍菌(*T.maritima*) C277S(SEQ ID NO:17)、和海栖热袍菌(*T.maritima*) C277T(SEQ ID NO:18)的1.0μg/mL或2.0μg/mL的CE-7酯酶。通过SDS-PAGE凝胶对包含CE-7酯酶的细胞提取物的分析结合使用公共领域的Java图像处理程序ImageJ对凝胶的分析,被用于以占总可溶性蛋白质的百分比计算细胞提取物中CE-7酯酶的浓度。仅仅在反应头45秒搅动反应物以初始混合反应物和酶。采用不添加CE-7酯酶,在与上文所描述的相同的条件下进行了第二比较性对照反应,其中在添加的酯酶的不存在下产生的过乙酸是在所指定的反应条件下甘油三乙酸酯被过氧化氢化学过水解的结果。用于过乙酸的生产的反应样品的分析按照实例7中描述的方法(表11)。

表 11: 于 25°C 在碳酸钠缓冲液 (20mM, pH10.5) 中由 CE-7 过水分解酶催化的过乙酸 (PAA) 从甘油三乙酸酯和过氧化氢的生产。

CE-7 酯酶来源	SEQ ID NO	甘油三乙酸酯 (mM)	H ₂ O ₂ (mM)	CE-7 酯酶变体 (μg/ml)	PAA, 2 分钟 (ppm)	PAA, 5 分钟 (ppm)	PAA, 10 分钟 (ppm)	PAA, 20 分钟 (ppm)	PAA, 30 分钟 (ppm)
对照-没有酶		0.75	1.4	0	1.3	2.7	4.7	7.7	9.7
奇迹束丝放线菌 (<i>A. mirum</i>) 野生型	4	0.75	1.4	1.0	2.0	3.6	5.4	6.8	7.5
奇迹束丝放线菌 (<i>A. mirum</i>)C276S	14	0.75	1.4	1.0	4.6	9.3	13.0	16.0	17.0
奇迹束丝放线菌 (<i>A. mirum</i>)C276T	16	0.75	1.4	1.0	5.3	11.1	17.1	21.1	23.1
海栖热袍菌 (<i>T. maritima</i>)C277S	17	0.75	1.4	1.0	2.9	5.2	8.0	11.1	12.0
海栖热袍菌 (<i>T. maritima</i>)C277T	18	0.75	1.4	1.0	3.4	6.2	9.5	13.2	14.5
奇迹束丝放线菌 (<i>A. mirum</i>) 野生型	4	0.75	1.4	2.0	2.1	3.8	5.2	6.3	6.5
奇迹束丝放线菌 (<i>A. mirum</i>)C276S	14	0.75	1.4	2.0	6.8	12.0	14.9	17.2	18.7
奇迹束丝放线菌 (<i>A. mirum</i>)C276T	16	0.75	1.4	2.0	8.6	16.0	20.7	24.4	26.1
海栖热袍菌 (<i>T. maritima</i>)C277S	17	0.75	1.4	2.0	3.8	7.0	10.5	13.4	14.4
海栖热袍菌 (<i>T. maritima</i>)C277T	18	0.75	1.4	2.0	4.7	8.4	12.8	16.5	17.9

[0339]

序列表

<110> E. I. duPont de Nemours and Company Inc.
Payne, Mark
DiCosimo, Robert

<120> 对于过酸的生产有用的酶

<130> CL5630USNP

<150> US 61/618, 404

<151> 2012-03-30

<160> 18

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 978

<212> DNA

<213> 海栖热袍菌 (Thermotoga maritime)

<400> 1

```

atggcgttct tgcacctgcc tctggaagaa ctgaagaaat accgtccaga gcgttacgaa      60
gagaaggact tcgacgagtt ctgggaggaa acctctggcg agagcgaaaa gtttccgctg      120
gaccctagtg tcgacgctat ggaatctcac ctgaaaaccg tggaggeata tgacgttact      180
ttttctggtt accgtggcca gcgtatcaaa ggcctggctc tggttccgaa actggaggaa      240
gaaaaactgc cgtgcgtagt teagtacatc ggttacaacg gtggccctgg ctttccgeac      300
gatggctgtt tctggccgtc taiggcctac attgcttccg tcattgatac tcgtggctag      360
ggttccgctt ggetgaaagg cgatactccg gattatccgg agggcccggg agaccctcag      420
tacctggtt tcattgacgg tggattctcg gaccccgcta cctattacta tcgcccggtt      480
tttaaccgat cagttctgtc cgtagaggcc gcgcttctt tccctcaggt tgaccaggag      540
cgtattgita tcctgggtgg ctcccagggt ggcggcatcg cccctggcgt atctgcctg      600
ageaagaaag ctaaggcact gcgtgtgtac gtcctctcc tgtgtcactt cctgcctgct      660
gttcagctgg tagataccca tcctacggcg gagattacta acttccctga aactcaccgc      720
gacaagaaga aaatcgtttt ccgcacctg tctatttccg accggcgtta cttccggcgt      780
cgtgcaaaaa ttccggcact gttctctgtt ggtctgatgg acaacatctg cctctcttct      840
accgttttct eggcatataa ctattatgcg ggtccgaaag aaatccgtat ctatccgtac      900
aacaaccacg aaggcggctg tagcttctag gcgtgtgaac aagtgaaatt cctgaagaaa      960
ctgtttgaga agggetaa

```

[0001]

<210> 2

<211> 325

<212> PRT

<213> 海栖热袍菌 (Thermotoga maritime)

<400> 2

```

Met Ala Phe Phe Asp Leu Pro Leu Glu Glu Leu Lys Lys Tyr Arg Pro
1           5           10           15

Glu Arg Tyr Glu Glu Lys Asp Phe Asp Glu Phe Trp Glu Glu Thr Leu
20           25           30

Ala Glu Ser Glu Lys Phe Pro Leu Asp Pro Val Phe Glu Arg Met Glu
35           40           45

```

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

Arg Gly Gln Arg Ile Lys Gly Trp Leu Leu Val Pro Lys Leu Glu Glu
 65 70 75 80

Glu Lys Leu Pro Cys Val Val Gln Tyr Ile Gly Tyr Asn Gly Gly Arg
 85 90 95

Gly Phe Pro His Asp Trp Leu Phe Trp Pro Ser Met Gly Tyr Ile Cys
 100 105 110

Phe Val Met Asp Thr Arg Gly Gln Gly Ser Gly Trp Leu Lys Gly Asp
 115 120 125

Thr Pro Asp Tyr Pro Glu Gly Pro Val Asp Pro Gln Tyr Pro Gly Phe
 130 135 140

Met Thr Arg Gly Ile Leu Asp Pro Arg Thr Tyr Tyr Tyr Arg Arg Val
 145 150 155 160

Phe Thr Asp Ala Val Arg Ala Val Glu Ala Ala Ala Ser Phe Pro Glu
 165 170 175

Val Asp Gln Glu Arg Ile Val Ile Ala Gly Gly Ser Gln Gly Gly Gly
 180 185 190

[0002] Ile Ala Leu Ala Val Ser Ala Leu Ser Lys Lys Ala Lys Ala Leu Leu
 195 200 205

Cys Asp Val Pro Phe Leu Cys His Phe Arg Arg Ala Val Gln Leu Val
 210 215 220

Asp Thr His Pro Tyr Ala Glu Ile Thr Asn Phe Leu Lys Thr His Arg
 225 230 235 240

Asp Lys Glu Glu Ile Val Phe Arg Thr Leu Ser Tyr Phe Asp Gly Val
 245 250 255

Asn Phe Ala Ala Arg Ala Lys Ile Pro Ala Leu Phe Ser Val Gly Leu
 260 265 270

Met Asp Asn Ile Cys Pro Pro Ser Thr Val Phe Ala Ala Tyr Asn Tyr
 275 280 285

Tyr Ala Gly Pro Lys Glu Ile Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Asn His Glu
 290 295 300

Gly Gly Gly Ser Phe Gln Ala Val Glu Gln Val Lys Phe Leu Lys Lys
 305 310 315 320

Leu Phe Glu Lys Gly
 325

<210> 3
 <211> 963
 <212> DNA

<213> 奇迹束丝放线菌 (*Actinosynnema mirum*)
 <400> 3
 atgccatggt ttgacctgcc agaagcagag ctgcgcgaat accgcacccc gacgcgggag 60
 ccagcgggct tggacgcgtg gtggcggag cgtctggcgg aggcgcgtgc gctggccgaa 120
 ccggttacca gcaccccgca cgaagagtec gcgtatggtc cgttgggcgt cegtacgtg 180
 gaattttccg gcgcactggg cgatecgttc cgcgcgtggc acctcgttc ggctggcgat 240
 gaccgcgtgc cgacggcggt cgtattcatt ggtaacggtg gtggtcgtgg taceccgacc 300
 gageatgect ggctggccgc agcaggttac ggcgtgctgg ttgtcgatac ccggggctcag 360
 ggttgatggtt ggaacgaccg tgcgacgget gaitctgcgc cgcgcggtec gagccatccg 420
 ggtttcatga ctgcgggtat tacgagcccg gagggetatt actatacccg tctgatgacc 480
 gatcctgcac tggcgggtga cgttcgacc gccctggatg gcgtggatcc ggaacgtatc 540
 gccgtgcgtg gtgcacgca aggcgggtgc ctggcgttgg cagccgcagc tctgaaccg 600
 accaaagita aggtctgcca cgcgatggtt ccgtttctgt ggcactcca gcgtgccatt 660
 acgctgacgg gtgcggacc gtaccgggag atcgcgaatt tctgtctca taatgtccc 720
 ctggtaagc aggttctga aacctgact tacgtggacg cggctctget gagecgtct 780
 atcaccgcaa ctgacctgtt gagecaggt ctgatggacg aagtttctc tccgagacc 840
 gtgtttggc cgtalaacga gatcacggtt cctaaacgta ttgaggtttt cccgtttac 900
 gcccacggg tccgcgcac ccacgacgaa gtc aaattga agcatctgcg cgcgcactg 960
 taa 963

[0003]

<210> 4
 <211> 320
 <212> PRT
 <213> 奇迹束丝放线菌 (*Actinosynnema mirum*)
 <400> 4
 Met Pro Trp Phe Asp Leu Pro Glu Ala Glu Leu Ala Gln Tyr Arg Thr
 1 5 10 15
 Pro Thr Pro Glu Pro Ala Gly Leu Asp Ala Trp Trp Ala Glu Arg Leu
 20 25 30
 Ala Glu Ala Arg Ala Leu Ala Glu Pro Val Thr Ser Thr Pro His Glu
 35 40 45
 Glu Ser Ala Tyr Gly Pro Leu Gly Val Arg Asp Val Glu Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ala Leu Gly Asp Arg Val Arg Ala Trp His Leu Arg Pro Ala Gly Asp
 65 70 75 80
 Asp Pro Leu Pro Thr Ala Val Val Phe Ile Gly Tyr Gly Gly Gly Arg
 85 90 95
 Gly Thr Pro Thr Glu His Ala Trp Leu Ala Ala Ala Gly Tyr Gly Val
 100 105 110
 Leu Val Val Asp Thr Arg Gly Gln Gly Gly Arg Trp Thr Thr Gly Ala
 115 120 125

Thr Ala Asp Ser Ala Pro Ser Gly Pro Ser His Pro Gly Phe Met Thr
 130 135 140

Arg Gly Ile Thr Ser Pro Glu Gly Tyr Tyr Tyr Thr Arg Leu Met Thr
 145 150 155 160

Asp Ala Ala Leu Ala Val Asp Val Ala Ala Gly Leu Asp Gly Val Asp
 165 170 175

Pro Glu Arg Ile Ala Val Leu Gly Ala Ser Gln Gly Gly Gly Leu Ala
 180 185 190

Leu Ala Ala Ala Ala Leu Asn Pro Thr Lys Val Lys Val Cys His Ala
 195 200 205

Asp Val Pro Phe Leu Cys Asp Phe Gln Arg Ala Ile Thr Leu Thr Gly
 210 215 220

Ala Asp Pro Tyr Ala Gln Ile Ala Asn Phe Leu Ser His Asn Val Ala
 225 230 235 240

Leu Val Lys Gln Val Arg Glu Thr Leu Thr Tyr Val Asp Ala Ala Leu
 245 250 255

Leu Ser Arg Arg Ile Thr Ala Thr Ser Leu Leu Ser Ala Gly Leu Met
 260 265 270

Asp Glu Val Cys Pro Pro Ser Thr Val Phe Ala Ala Tyr Asn Glu Ile
 275 280 285

Thr Ala Pro Lys Arg Ile Glu Val Phe Pro Phe Ser Gly His Ala Val
 290 295 300

Pro Arg Thr His Asp Glu Val Lys Leu Lys His Leu Arg Glu His Leu
 305 310 315 320

[0004]

<210> 5
 <211> 990
 <212> DNA
 <213> 痤疮丙酸杆菌 (Propionibacterium acnes)

<400> 5
 atgccgctga ccgacttggg tattgacgaa gcgagaacct acagaccgaa cgtgccagag 60
 cgggatgggt ttgatagctt ttggcggaa acctggatg agtacagcgg tgttccgcag 120
 gatctgaccg cgggtccggt cgacaacct caagccctga ttgacaegtg ggacctgtcg 180
 tggcctggct atcataactc tcgcgtcagc ggetggetgc acgccccagc ggcctgaac 240
 ggtecgctgc cgttggatcat tgaatactg ggttacagea gcagccgtgg tgtaccgatt 300
 ggtagcgtgt tcgcgcgtgc gggctatgag cacatcgtcg ttgaccgcgg tggtcagggt 360
 tggggtcacc cgacgttgac cgagaattgc ccggaegtgc atgacggctc eggcctcct 420
 ggttttatga cccaaagcct gagegaccgg caggtcatt actatcgtcg cctgttcag 480
 gatcgcgtcc cctgtctgca agcagcacgt gagatggaat tgggtgateg gacgcgtatc 540
 gctgttctgg gccactccca aggtgggtgc cagcagattg cggtgtgtgc gctggcggcc 600
 atgcgcggca tcaagctggc ggggtcgttc gttgacgtcc cgttccctgt ccatatccgt 660

cgtagctgcg acatcgcaac ggatggtecg tacctggagg ttgttegtta cctggcagcg 720
 cacccgagcc tgtgtgcecg tgettttcag accctgggct acttcgacgg cttgcacttt 780
 gcaegtegtg cccgcaccte cacctggttt tctgtcgega tgatggatea ggcagtcctt 840
 ccgagcagcg ttggggcage gtataatgcg iggggcgatg gtatggttgc agataaacac 900
 atcgccgttt atccgtttgc aggtcatgca gggggcaggg atgtccaacg ctggaatcag 960
 ctgggtgtgc tggeccagct gttcagctaa 990

<210> 6
 <211> 329
 <212> PRT
 <213> 痤疮丙酸杆菌 (Propionibacterium acnes)
 <400> 6

Met Pro Leu Thr Asp Leu Gly Ile Asp Glu Ala Arg Thr Tyr Arg Pro
 1 5 10 15
 Asn Val Pro Glu Pro Asp Gly Phe Asp Ser Phe Trp Ala Glu Thr Leu
 20 25 30
 Asp Glu Tyr Ser Gly Val Pro Gln Asp Leu Thr Ala Val Pro Phe Asp
 35 40 45
 Asn Arg Gln Ala Leu Ile Asp Thr Trp Asp Leu Ser Trp Ala Gly Tyr
 50 55 60
 [0005] His Asn Ser Arg Val Ser Gly Trp Leu His Ala Pro Ala Ala Val Asn
 65 70 75 80
 Gly Pro Leu Pro Leu Val Ile Glu Tyr Leu Gly Tyr Ser Ser Ser Arg
 85 90 95
 Gly Val Pro Ile Gly Ser Val Phe Ala Ala Ala Gly Tyr Ala His Ile
 100 105 110
 Val Val Asp Pro Arg Gly Gln Gly Trp Gly His Pro Thr Leu Thr Glu
 115 120 125
 Asn Cys Pro Asp Val His Asp Gly Ser Gly Ala Pro Gly Phe Met Thr
 130 135 140
 Gln Ser Leu Ser Asp Pro His Gly His Tyr Tyr Arg Arg Leu Phe Thr
 145 150 155 160
 Asp Ala Phe Arg Cys Leu Gln Ala Ala Arg Glu Met Glu Leu Val Asp
 165 170 175
 Pro Thr Arg Ile Ala Val Leu Gly His Ser Gln Gly Gly Gly Gln Ala
 180 185 190
 Ile Ala Val Cys Ala Leu Ala Ala Met Arg Gly Ile Lys Leu Ala Gly
 195 200 205
 Ala Phe Val Asp Val Pro Phe Leu Cys His Ile Arg Arg Ser Cys Asp
 210 215 220

Ile Ala Thr Asp Gly Pro Tyr Leu Glu Val Val Arg Tyr Leu Ala Ala
 225 230 235 240
 His Pro Ser Leu Cys Gly Arg Ala Phe Gln Thr Leu Gly Tyr Phe Asp
 245 250 255
 Gly Leu His Phe Ala Arg Arg Ala Arg Thr Ser Thr Trp Phe Ser Val
 260 265 270
 Ala Met Met Asp Gln Ala Val Pro Pro Ser Ser Val Trp Ala Ala Tyr
 275 280 285
 Asn Ala Trp Gly Asp Gly Met Val Ala Asp Lys His Ile Ala Val Tyr
 290 295 300
 Pro Phe Ala Gly His Ala Ala Gly Gln Asp Val Gln Arg Trp Asn Gln
 305 310 315 320
 Leu Gly Val Leu Ala Gln Leu Phe Ser
 325

<210> 7
 <211> 969
 <212> DNA
 <213> 马链球菌 (Streptococcus equi)

[0006]

<400> 7
 atgatcgaaa ccatgagett agaagagatg atgtectaca gagcccgcca cgaagtcccg 60
 aaagatttcg accatttttg ggagacttgc attaaggaaa accagcgggc atcgtatcag 120
 ctggaccaga aggattttgg cctggacttc gccgactggt atgaactcgc tttcaagggc 180
 agcaacggta gcaccattta cgtctaatgt gtttttcga aagcgaaca actggtcceg 240
 gtggtgtctt atttccacgg ttatcagggt cagagcccg actggagcga ccaattcaat 300
 taccctgggg ctggtaagc cgttgcagc atggacgttc gtggtcagge gggctactcc 360
 caggatctgg gtaatttga tggatcacc gtaaaaggte aagttatccg tggatgacc 420
 tctggccggg agcaattgtt ttacaaggat gtgtacctgg acgtatatea actgatcgac 480
 attgttagcg cgtttgcgcg tgtggaigat agccgcttgt actcttatgg ctggagccag 540
 ggcggtgcgc tgagcctgat cgcagcagcc ttgcaccca aaatcgaaa aaccgtgcc 600
 gtttaccggt tccctgagcga ctttaagcgt gtgctggagc tgggtaacea cagcagcgg 660
 tatgacgagc tgtttcgta ctcaaatc cagaccat ttcacgatac ggaagcggag 720
 gtgctgggta atctggcgt tctcagcgt aaaaacttcg cacatctgat tacgtgcccg 780
 gtctgtgagt tgaegtgcct ggaggatggt atttgccegc cttecaccca gttcgcgatc 840
 ttaategcc tggcgacggc agataagigt cacaagctga ttcggacta cggtcacgac 900
 ccaatggcgg tcaaaagttaa ggatttcatt ttgatcaac tgaaccggcag ccattttacc 960
 aaggcttaa 969

<210> 8
 <211> 322
 <212> PRT
 <213> 马链球菌 (Streptococcus equi)

<400> 8

Met Ile Glu Thr Met Ser Leu Glu Glu Met Met Ser Tyr Arg Gly Arg
1 5 10 15

His Glu Val Pro Lys Asp Phe Asp His Phe Trp Glu Thr Cys Ile Lys
20 25 30

Glu Asn Gln Ala Ala Ser Tyr Gln Leu Asp Gln Lys Asp Phe Gly Leu
35 40 45

Asp Phe Ala Asp Cys Tyr Glu Leu Arg Phe Lys Gly Ser Asn Gly Ser
50 55 60

Thr Ile Tyr Ala Lys Cys Val Phe Pro Lys Ala Lys Gln Leu Val Pro
65 70 75 80

Val Val Phe Tyr Phe His Gly Tyr Gln Gly Gln Ser Pro Asp Trp Ser
85 90 95

Asp Gln Phe Asn Tyr Leu Ala Ala Gly Tyr Ala Val Val Ser Met Asp
100 105 110

Val Arg Gly Gln Ala Gly Tyr Ser Gln Asp Leu Gly Gln Phe Asp Gly
115 120 125

Ile Thr Val Lys Gly Gln Val Ile Arg Gly Met Thr Ser Gly Pro Glu
130 135 140

[0007] Gln Leu Phe Tyr Lys Asp Val Tyr Leu Asp Val Tyr Gln Leu Ile Asp
145 150 155 160

Ile Val Ser Ala Phe Ala Arg Val Asp Asp Ser Arg Leu Tyr Ser Tyr
165 170 175

Gly Trp Ser Gln Gly Gly Ala Leu Ser Leu Ile Ala Ala Ala Leu His
180 185 190

Pro Lys Ile Ala Lys Thr Val Ala Val Tyr Pro Phe Leu Ser Asp Phe
195 200 205

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

Phe Arg Tyr Phe Lys Tyr His Asp Pro Phe His Asp Thr Glu Ala Glu
225 230 235 240

Val Leu Gly Asn Leu Ala Tyr Ile Asp Val Lys Asn Phe Ala His Leu
245 250 255

Ile Thr Cys Pro Val Val Met Leu Thr Cys Met Glu Asp Val Ile Cys
260 265 270

Pro Pro Ser Thr Gln Phe Ala Ile Phe Asn Arg Leu Ala Thr Ala Asp
275 280 285

Lys Cys His Lys Leu Ile Pro Asp Tyr Gly His Asp Pro Met Gly Val
290 295 300

Lys Val Lys Asp Phe Ile Phe Asp Gln Leu Thr Gly Ser His Phe Thr
 305 310 315 320

Lys Ala

<210> 9
 <211> 978
 <212> DNA
 <213> *Stackebrandtia nassauensis*

<400> 9
 atgccacitt ttgatttccc acttgacgaa ctgctgtcgt acagaccgga gccggacgaa 60
 ccgcaggact tegacgcatt ttgggaccgc acctccgaag tggcggaccg tcacctcgtg 120
 gatgtgcgcc tgacctcgca accgggtcac ctgggtttgg tggatgtgig ggatgttctg 180
 ttfgcgggtt ggaacggcga cccgatcaac gcattgctga tcgcgcctgc cggtcgaage 240
 cgtgtgggct gcgtggtcac ctacattggt taccatggcg gtcgcggctt tcgcaccaaa 300
 catctgcgct gcccggctgc ggcttgsgcg acgctggttg ttgatacgcg cggtcagggt 360
 gcgagcgcca gcgcgagctc tggcgtcacg ggtgatccgc accgtagcga gtltgccat 420
 gctccgggta tctgaccaa gggtatcccg gatccggaig agtaactacta tcgtcgtgtt 480
 ttcactgacg ccgctcgcgc agtggatggt gccgcgagcc tggacattgt tgacgagagc 540
 cgtattgtcg ttacgggtca ttccagggt ggcggtatcg cgcaagcggg tagcgcactg 600
 cgctccggcg tggcagcggc ttgggtaaat gaaccgttcc tgtgtcactt tcgtcgtagc 660
 [0008] tgtgagattg cgagcaggg tcctaccgc gaactggctg cattcctggg tgcgcagcgt 720
 gacctggagc agcgcgtttt cgtaccctg tctatttcc aagcctgag ctccgcctcg 780
 cgtgcceaaq ccctgcctt giatagcgtg gcactgatgg ataccacgtg cccaccgagc 840
 accgtcttgc cggcttaccg tcgttggccc ggtccgaaag acatcgaggt ctggccgtgg 900
 aacggtaact ccggtggtga agctatcac gcacaacgtc agcctggagt gctgagcgag 960
 cgttcggca ccgctaa 978

<210> 10
 <211> 325
 <212> PRT
 <213> *Stackebrandtia nassauensis*

<400> 10

Met Pro Leu Phe Asp Phe Pro Leu Asp Glu Leu Arg Ala Tyr Arg Pro
 1 5 10 15
 Glu Pro Asp Glu Pro Gln Asp Phe Asp Ala Phe Trp Asp Arg Thr Ser
 20 25 30
 Glu Val Ala Asp Arg His Pro Leu Asp Val Arg Leu Thr Pro Gln Pro
 35 40 45
 Gly His Leu Gly Leu Val Asp Val Trp Asp Val Arg Phe Ala Gly Trp
 50 55 60
 Asn Gly Asp Pro Ile Asn Ala Trp Leu Ile Ala Pro Ala Gly Ala Ser
 65 70 75 80

Arg Val Gly Cys Val Val Thr Tyr Ile Gly Tyr His Gly Gly Arg Gly
 85 90 95

Phe Pro His Gln His Leu Arg Trp Pro Val Ala Gly Trp Ala Thr Leu
 100 105 110

Val Val Asp Thr Arg Gly Gln Gly Ala Ser Ala Ser Ala Ser Ser Gly
 115 120 125

Val Thr Gly Asp Pro His Gly Ser Gln Phe Gly His Ala Pro Gly Met
 130 135 140

Leu Thr Lys Gly Ile Leu Asp Pro Asp Gln Tyr Tyr Tyr Arg Arg Val
 145 150 155 160

Phe Thr Asp Ala Ala Arg Ala Val Asp Val Ala Ala Ser Leu Asp Ile
 165 170 175

Val Asp Glu Ser Arg Ile Val Val Ser Gly His Ser Gln Gly Gly Gly
 180 185 190

Ile Ala Gln Ala Val Ser Ala Leu Arg Pro Gly Val Ala Ala Ala Leu
 195 200 205

Val Asn Glu Pro Phe Leu Cys His Phe Arg Arg Ser Cys Glu Ile Ala
 210 215 220

Ser Thr Gly Pro Tyr Pro Gln Leu Val Ala Phe Leu Gly Ala Gln Arg
 225 230 235 240

Asp Leu Gln Gln Arg Val Phe Ala Thr Leu Ser Tyr Phe Gln Gly Met
 245 250 255

Ser Phe Ala Ser Arg Ala Gln Ala Pro Ala Leu Tyr Ser Val Ala Leu
 260 265 270

Met Asp Thr Thr Cys Pro Pro Ser Thr Val Phe Ala Ala Tyr Asn Arg
 275 280 285

Trp Ala Gly Pro Lys Asp Ile Gln Val Trp Pro Trp Asn Gly His Ser
 290 295 300

Gly Gly Glu Gly Tyr His Ala Gln Arg Gln Leu Glu Trp Leu Ser Glu
 305 310 315 320

Arg Phe Gly Thr Gly
 325

[0009]

<210> 11
 <211> 978
 <212> DNA
 <213> 无乳链球菌 (Streptococcus agalactiae)

<400> 11
 atgattgaaa cgatgagctt ggatgacatg cgtgaatact tgggtcaaga tcaaatccg 60
 gaggattttg acgacttttg gaagaaacag accatgaagt accaaggeaa caftgagtat 120
 cgccctggata agaaagactt caacatcacc ttigcgcagg cgtacgacct gcatttcaaa 180

```

ggttcgaaca attccattgt gtaccgcaaa tgtctgtttc cgaaaacgaa taagccgtat    240
ccggtcgtgt tctacttcea eggtaccaca aaccaaaccc eggattggtc tgaccagctg    300
aattacgttg cagcgggcta tgggtgcgtc agcatggaag ttcceggtea ggetggtcag    360
tctcaggata agggccactt cgatggtait actgtcaaag gccaaatcgt tcgtggcatg    420
atcagcggtc egaatcactt gttctacaag gacatttate tggacgtgtt tcaactgatt    480
gatatcatcg caacctgga gtcctagac ageaaccaag tgtacageta tggttggagc    540
caagggtgtg cgcgtgcact gattggcgct gcgctgaacc caaaaatcgt taaaaccgtg    600
gcegttiatc cgtttctgag cgatttcctg cgcgtgcctg acctggcgcg tctgagcgag    660
ccgtacgaag aactgttcct ttaacttaag tatagcgatc cgttccacaa gacggaaaaac    720
aatgttttga aaacctggc atatacagc gtaagaatt ttgcgcacg tattagetgc    780
ccggttgttc tctgaccgc cctgaaagac gacatttccc cgcctagcac ccagtttccc    840
atctcaatc gctgacttc caagaaaaag caactgctgc tcccagatta cggtcctgat    900
ccgatgaccg tgcaggtcaa ggaccacatc ttgatcagc tgaccgcag ccaatttacg    960
aagcagaaaa ttgagtaa                                                    978
    
```

```

<210> 12
<211> 325
<212> PRT
<213> 无乳链球菌 (Streptococcus agalactiae)
<400> 12
    
```

[0010]

```

Met Ile Glu Thr Met Ser Leu Asp Asp Met Arg Glu Tyr Leu Gly Gln
1           5           10           15

Asp Gln Ile Pro Glu Asp Phe Asp Asp Phe Trp Lys Lys Gln Thr Met
                20           25           30

Lys Tyr Gln Gly Asn Ile Glu Tyr Arg Leu Asp Lys Lys Asp Phe Asn
35           40           45

Ile Thr Phe Ala Gln Ala Tyr Asp Leu His Phe Lys Gly Ser Asn Asn
50           55           60

Ser Ile Val Tyr Ala Lys Cys Leu Phe Pro Lys Thr Asn Lys Pro Tyr
65           70           75           80

Pro Val Val Phe Tyr Phe His Gly Tyr Gln Asn Gln Ser Pro Asp Trp
85           90           95

Ser Asp Gln Leu Asn Tyr Val Ala Ala Gly Tyr Gly Val Val Ser Met
100          105          110

Asp Val Arg Gly Gln Ala Gly Gln Ser Gln Asp Lys Gly His Phe Asp
115          120          125

Gly Ile Thr Val Lys Gly Gln Ile Val Arg Gly Met Ile Ser Gly Pro
130          135          140

Asn His Leu Phe Tyr Lys Asp Ile Tyr Leu Asp Val Phe Gln Leu Ile
145          150          155          160
    
```

Asp Ile Ile Ala Thr Leu Glu Ser Val Asp Ser Asn Gln Leu Tyr Ser
 165 170 175

Tyr Gly Trp Ser Gln Gly Gly Ala Leu Ala Leu Ile Ala Ala Ala Leu
 180 185 190

Asn Pro Lys Ile Val Lys Thr Val Ala Val Tyr Pro Phe Leu Ser Asp
 195 200 205

Phe Arg Arg Val Leu Asp Leu Gly Gly Val Ser Glu Pro Tyr Asp Glu
 210 215 220

Leu Phe Arg Tyr Phe Lys Tyr Ser Asp Pro Phe His Lys Thr Glu Asn
 225 230 235 240

Asn Val Leu Lys Thr Leu Ala Tyr Ile Asp Val Lys Asn Phe Ala His
 245 250 255

Arg Ile Ser Cys Pro Val Val Leu Leu Thr Ala Leu Lys Asp Asp Ile
 260 265 270

Cys Pro Pro Ser Thr Gln Phe Ala Ile Phe Asn Arg Leu Thr Ser Thr
 275 280 285

Lys Lys His Leu Leu Leu Pro Asp Tyr Gly His Asp Pro Met Thr Val
 290 295 300

[0011] Gln Val Lys Asp His Ile Phe Asp Gln Leu Thr Gly Ser Gln Phe Thr
 305 310 315 320

Lys Gln Lys Ile Glu
 325

<210> 13
 <211> 963
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 13
 atgccatggt ttgacctgcc agaagcagag ctgcgcgaat accgcacccc gacgccggag 60
 ccagcgggct tggacgcgtg gtggcgggag cgtctggcgg aggcgcgtgc gctggccgaa 120
 ccggttacca gcaaccgccg cgaagagtcc gcgtatggtc cgtgggcgt cegtgaactg 180
 gaatttccg gcgcactggg cgatecgtc cgcgcgtggc acctgcgtcc gctggegat 240
 gaccctgtgc cgacggcggc cgtattcatt ggttacggtg gtggtctgg taccccgacc 300
 gagcatgcct ggctggccgc agcaggttac ggcgtctggt ttgtcgatac ccgcggtcag 360
 ggtggtctgt ggacgaccgg tgcgacggct gattctgcgc cgagcggtec gagccatccg 420
 ggtttcaiga ctgcgggtat tacgagcccc gagggctatt actatacccc tetgatgacc 480
 gatgctgcac tggcgggtga cgttcagcc ggcctggatg gcgtggatcc ggaacgtate 540
 gccgtctgtg gtgcctcgcg agcgggtggc ctggcgttgg cagccgcage tetgaacccc 600
 accaaagtta aggtctgcca cgcgatggtt ccgttctgt gcgacttcca gctgcccatt 660

acgctgacgg gtgeggacce gtacgaggag atcgegaatt tcttgctca taatgtegce 720
 ctggfgaagc aggttcgtga aacctgact tacgtggaeg cggctctgct gagecgtcgt 780
 atcacceaa ctagecgtgt gagecaggt ctgatggacg aagttagecc tccgagcacc 840
 ggtttgccc cgtataacga gatcacggt cctaaacgta ttgaggtttt cccgtttage 900
 ggccacgccc ttcgcegeac ccaegaagaa gtcnaattga agcatctgeg cgagcacctg 960
 taa 963

- <210> 14
- <211> 320
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 合成构建体
- <400> 14

Met Pro Trp Phe Asp Leu Pro Glu Ala Glu Leu Ala Gln Tyr Arg Thr
 1 5 10 15
 Pro Thr Pro Glu Pro Ala Gly Leu Asp Ala Trp Trp Ala Glu Arg Leu
 20 25 30
 Ala Glu Ala Arg Ala Leu Ala Glu Pro Val Thr Ser Thr Pro His Glu
 35 40 45
 Glu Ser Ala Tyr Gly Pro Leu Gly Val Arg Asp Val Glu Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ala Leu Gly Asp Arg Val Arg Ala Trp His Leu Arg Pro Ala Gly Asp
 65 70 75 80
 Asp Pro Leu Pro Thr Ala Val Val Phe Ile Gly Tyr Gly Gly Gly Arg
 85 90 95
 Gly Thr Pro Thr Glu His Ala Trp Leu Ala Ala Ala Gly Tyr Gly Val
 100 105 110
 Leu Val Val Asp Thr Arg Gly Gln Gly Gly Arg Trp Thr Thr Gly Ala
 115 120 125
 Thr Ala Asp Ser Ala Pro Ser Gly Pro Ser His Pro Gly Phe Met Thr
 130 135 140
 Arg Gly Ile Thr Ser Pro Glu Gly Tyr Tyr Tyr Thr Arg Leu Met Thr
 145 150 155 160
 Asp Ala Ala Leu Ala Val Asp Val Ala Ala Gly Leu Asp Gly Val Asp
 165 170 175
 Pro Glu Arg Ile Ala Val Leu Gly Ala Ser Gln Gly Gly Gly Leu Ala
 180 185 190
 Leu Ala Ala Ala Ala Leu Asn Pro Thr Lys Val Lys Val Cys His Ala
 195 200 205
 Asp Val Pro Phe Leu Cys Asp Phe Gln Arg Ala Ile Thr Leu Thr Gly

[0012]

<220>
 <223> 合成构建体
 <400> 16
 Met Pro Trp Phe Asp Leu Pro Glu Ala Glu Leu Ala Gln Tyr Arg Thr
 1 5 10 15
 Pro Thr Pro Glu Pro Ala Gly Leu Asp Ala Trp Trp Ala Glu Arg Leu
 20 25 30
 Ala Glu Ala Arg Ala Leu Ala Glu Pro Val Thr Ser Thr Pro His Glu
 35 40 45
 Glu Ser Ala Tyr Gly Pro Leu Gly Val Arg Asp Val Glu Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ala Leu Gly Asp Arg Val Arg Ala Trp His Leu Arg Pro Ala Gly Asp
 65 70 75 80
 Asp Pro Leu Pro Thr Ala Val Val Phe Ile Gly Tyr Gly Gly Gly Arg
 85 90 95
 Gly Thr Pro Thr Glu His Ala Trp Leu Ala Ala Ala Gly Tyr Gly Val
 100 105 110
 Leu Val Val Asp Thr Arg Gly Glu Gly Gly Arg Trp Thr Thr Gly Ala
 115 120 125
 [0014] Thr Ala Asp Ser Ala Pro Ser Gly Pro Ser His Pro Gly Phe Met Thr
 130 135 140
 Arg Gly Ile Thr Ser Pro Glu Gly Tyr Tyr Tyr Thr Arg Leu Met Thr
 145 150 155 160
 Asp Ala Ala Leu Ala Val Asp Val Ala Ala Gly Leu Asp Gly Val Asp
 165 170 175
 Pro Glu Arg Ile Ala Val Leu Gly Ala Ser Gln Gly Gly Gly Leu Ala
 180 185 190
 Leu Ala Ala Ala Ala Leu Asn Pro Thr Lys Val Lys Val Cys His Ala
 195 200 205
 Asp Val Pro Phe Leu Cys Asp Phe Gln Arg Ala Ile Thr Leu Thr Gly
 210 215 220
 Ala Asp Pro Tyr Ala Glu Ile Ala Asn Phe Leu Ser His Asn Val Ala
 225 230 235 240
 Leu Val Lys Gln Val Arg Glu Thr Leu Thr Tyr Val Asp Ala Ala Leu
 245 250 255
 Leu Ser Arg Arg Ile Thr Ala Thr Ser Leu Leu Ser Ala Gly Leu Met
 260 265 270
 Asp Glu Val Thr Pro Pro Ser Thr Val Phe Ala Ala Tyr Asn Glu Ile
 275 280 285

Thr Ala Pro Lys Arg Ile Glu Val Phe Pro Phe Ser Gly His Ala Val
290 295 300

Pro Arg Thr His Asp Glu Val Lys Leu Lys His Leu Arg Glu His Leu
305 310 315 320

<210> 17
<211> 325
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 17

Met Ala Phe Phe Asp Leu Pro Leu Glu Glu Leu Lys Lys Tyr Arg Pro
1 5 10 15

Glu Arg Tyr Glu Glu Lys Asp Phe Asp Glu Phe Trp Glu Glu Thr Leu
20 25 30

Ala Glu Ser Glu Lys Phe Pro Leu Asp Pro Val Phe Glu Arg Met Glu
35 40 45

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

Arg Gly Gln Arg Ile Lys Gly Trp Leu Leu Val Pro Lys Leu Glu Glu
65 70 75 80

[0015]

Glu Lys Leu Pro Cys Val Val Gln Tyr Ile Gly Tyr Asn Gly Gly Arg
85 90 95

Gly Phe Pro His Asp Trp Leu Phe Trp Pro Ser Met Gly Tyr Ile Cys
100 105 110

Phe Val Met Asp Thr Arg Gly Gln Gly Ser Gly Trp Leu Lys Gly Asp
115 120 125

Thr Pro Asp Tyr Pro Glu Gly Pro Val Asp Pro Gln Tyr Pro Gly Phe
130 135 140

Met Thr Arg Gly Ile Leu Asp Pro Arg Thr Tyr Tyr Tyr Arg Arg Val
145 150 155 160

Phe Thr Asp Ala Val Arg Ala Val Glu Ala Ala Ala Ser Phe Pro Gln
165 170 175

Val Asp Gln Glu Arg Ile Val Ile Ala Gly Gly Ser Gln Gly Gly Gly
180 185 190

Ile Ala Leu Ala Val Ser Ala Leu Ser Lys Lys Ala Lys Ala Leu Leu
195 200 205

Cys Asp Val Pro Phe Leu Cys His Phe Arg Arg Ala Val Gln Leu Val
210 215 220

Asp Thr His Pro Tyr Ala Glu Ile Thr Asn Phe Leu Lys Thr His Arg

225 230 235 240
 Asp Lys Glu Glu Ile Val Phe Arg Thr Leu Ser Tyr Phe Asp Gly Val
 245 250 255
 Asn Phe Ala Ala Arg Ala Lys Ile Pro Ala Leu Phe Ser Val Gly Leu
 260 265 270
 Met Asp Asn Ile Ser Pro Pro Ser Thr Val Phe Ala Ala Tyr Asn Tyr
 275 280 285
 Tyr Ala Gly Pro Lys Glu Ile Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Asn His Glu
 290 295 300
 Gly Gly Gly Ser Phe Gln Ala Val Glu Gln Val Lys Phe Leu Lys Lys
 305 310 315 320
 Leu Phe Glu Lys Gly
 325
 <210> 18
 <211> 325
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 18
 [0016] Met Ala Phe Phe Asp Leu Pro Leu Glu Glu Leu Lys Lys Tyr Arg Pro
 1 5 10 15
 Glu Arg Tyr Glu Glu Lys Asp Phe Asp Glu Phe Trp Glu Glu Thr Leu
 20 25 30
 Ala Glu Ser Glu Lys Phe Pro Leu Asp Pro Val Phe Glu Arg Met Glu
 35 40 45
 Ser His Leu Lys Thr Val Glu Ala Tyr Asp Val Thr Phe Ser Gly Tyr
 50 55 60
 Arg Gly Gln Arg Ile Lys Gly Trp Leu Leu Val Pro Lys Leu Glu Glu
 65 70 75 80
 Glu Lys Leu Pro Cys Val Val Gln Tyr Ile Gly Tyr Asn Gly Gly Arg
 85 90 95
 Gly Phe Pro His Asp Trp Leu Phe Trp Pro Ser Met Gly Tyr Ile Cys
 100 105 110
 Phe Val Met Asp Thr Arg Gly Gln Gly Ser Gly Trp Leu Lys Gly Asp
 115 120 125
 Thr Pro Asp Tyr Pro Glu Gly Pro Val Asp Pro Gln Tyr Pro Gly Phe
 130 135 140
 Met Thr Arg Gly Ile Leu Asp Pro Arg Thr Tyr Tyr Tyr Arg Arg Val
 145 150 155 160

Phe Thr Asp Ala Val Arg Ala Val Glu Ala Ala Ala Ser Phe Pro Gln
 165 170 175

Val Asp Gln Glu Arg Ile Val Ile Ala Gly Gly Ser Gln Gly Gly Gly
 180 185 190

Ile Ala Leu Ala Val Ser Ala Leu Ser Lys Lys Ala Lys Ala Leu Leu
 195 200 205

Cys Asp Val Pro Phe Leu Cys His Phe Arg Arg Ala Val Gln Leu Val
 210 215 220

Asp Thr His Pro Tyr Ala Glu Ile Thr Asn Phe Leu Lys Thr His Arg
 225 230 235 240

[0017] Asp Lys Glu Glu Ile Val Phe Arg Thr Leu Ser Tyr Phe Asp Gly Val
 245 250 255

Asn Phe Ala Ala Arg Ala Lys Ile Pro Ala Leu Phe Ser Val Gly Leu
 260 265 270

Met Asp Asn Ile Thr Pro Pro Ser Thr Val Phe Ala Ala Tyr Asn Tyr
 275 280 285

Tyr Ala Gly Pro Lys Glu Ile Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Asn His Glu
 290 295 300

Gly Gly Gly Ser Phe Gln Ala Val Glu Gln Val Lys Phe Leu Lys Lys
 305 310 315 320

Leu Phe Gln Lys Gly
 325

