



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119013407 A

(43) 申请公布日 2024. 11. 22

(21) 申请号 202380033820.8

(22) 申请日 2023.04.12

(30) 优先权数据

2022-066572 2022.04.13 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.10.12

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2023/014863 2023.04.12

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/199946 JA 2023.10.19

(71) 申请人 花王株式会社

地址 日本

(72) 发明人 日置贵大 寺井三佳 川原彰人

(74) 专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司 11322

专利代理师 龙淳 丁哲音

(51) Int.Cl.

C12N 15/55 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

C11D 17/06 (2006.01)

C11D 17/08 (2006.01)

C12N 1/15 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 9/20 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

权利要求书1页 说明书13页

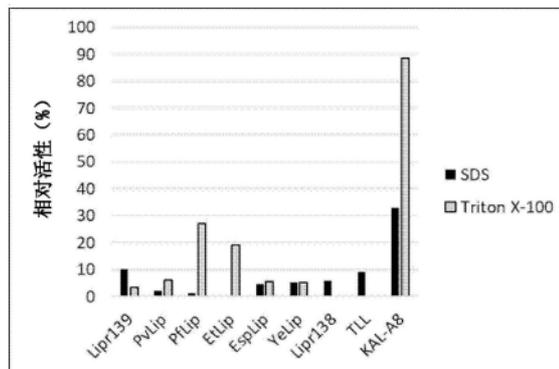
序列表(电子公布) 附图2页

(54) 发明名称

新型脂肪酶

(57) 摘要

本发明提供一种缓和表面活性剂造成的活性抑制,显示高的清洁效果的脂肪酶。该脂肪酶由序列编号14所示的氨基酸序列或与其具有至少91%的同一性的氨基酸序列构成。



1. 一种脂肪酶,其中,
由序列编号14所示的氨基酸序列或与其具有至少91%的同一性的氨基酸序列构成。
2. 一种多核苷酸,其中,
编码权利要求1所述的脂肪酶。
3. 一种载体或DNA片段,其中,
包含权利要求2所述的多核苷酸。
4. 一种转化细胞,其中,
含有权利要求3所述的载体或DNA片段。
5. 如权利要求4所述的转化细胞,其中,
所述转化细胞为微生物。
6. 一种清洁剂组合物,其中,
含有权利要求1所述的脂肪酶。
7. 如权利要求6所述的清洁剂组合物,其中,
所述清洁剂组合物为衣物清洁剂或餐具清洁剂。
8. 如权利要求7所述的清洁剂组合物,其中,
所述清洁剂组合物为粉末或液体。
9. 如权利要求7或8所述的清洁剂组合物,其中,
在低温下使用。
10. 如权利要求9所述的清洁剂组合物,其中,
在5~40°C的温度下使用。
11. 一种污垢的清洁方法,其中,
使用权利要求6~10中任一项所述的清洁剂组合物。

新型脂肪酶

技术领域

[0001] 本发明涉及一种新型脂肪酶。

背景技术

[0002] 脂肪酶在洗涤用洗涤剂、餐具用洗涤剂、油脂加工、纸浆处理、饲料、医药中间体合成等各种用途中都有用。在清洁中,脂肪酶通过将甘油三酯水解,并生成脂肪酸,从而有助于包含油的污垢的除去。

[0003] 现有的清洁组合物或清洁环境含有抑制脂肪酶的活性或清洁效果的各种成分,要求在那样的条件下发挥功能的脂肪酶。作为对清洁有用的脂肪酶,来自疏绵状嗜热丝孢菌(*Thermomyces lanuginosus*)的脂肪酶(以下称为TLL)以LIPOLASE(注册商标)的商品名销售。专利文献1中公开了来自Cedecea sp-16640株的脂肪酶Lipr139具有比TLL优异的清洁性能。专利文献2中公开了在与1个或多个参照脂肪分解酶相比较的情况下具有改善的清洁性能的来自变形杆菌(*Proteus*)属细菌的脂肪酶(以下称为PvLip)的突变体。专利文献3中公开了来自宏基因组的脂肪酶Lipr138具有比TLL优异的清洁性能。

[0004] (专利文献1)日本特表2015-523078号公报

[0005] (专利文献2)国际公开第2020/046613号

[0006] (专利文献3)日本特表2015-525248号公报

发明内容

[0007] 本发明涉及下述1)~6)。

[0008] 1)一种脂肪酶,其由序列编号14所示的氨基酸序列或与其具有至少91%的同一性的氨基酸序列构成。

[0009] 2)一种多核苷酸,其编码1)所述的脂肪酶。

[0010] 3)一种载体或DNA片段,其包含2)的多核苷酸。

[0011] 4)一种转化细胞,其含有3)的载体或DNA片段。

[0012] 5)一种清洁剂组合物,其含有1)所述的脂肪酶。

[0013] 6)一种污垢的清洁方法,其中,使用5)所述的清洁剂组合物。

附图说明

[0014] 图1是各脂肪酶在表面活性剂溶液中的脂肪酶活性。

[0015] 图2是各脂肪酶在包含表面活性剂的模型清洁液中的脂肪酶活性。

[0016] 图3是各脂肪酶在包含表面活性剂的模型清洁液中的清洁力。

具体实施方式

[0017] 在本说明书中引用的全部专利文献、非专利文献、及其他的出版物其整体作为参考援引在本说明书中。

[0018] 在本说明书中,“脂肪酶”是指三酰基甘油脂肪酶(EC3.1.1.3),意味着具有将甘油三酯水解并生成脂肪酸的活性的酶群。脂肪酶活性能够通过测定伴随4-硝基苯基辛酸酯的水解得到的4-硝基苯酚的游离的吸光度的增加速度来确定。脂肪酶活性的测定的具体步骤在后述的实施例中详述。

[0019] 在本说明书中,氨基酸序列或核苷酸序列的同一性通过Lipman-Pearson法(Science,1985,227:1435-1441)计算。具体而言,通过使用遗传信息处理软件GENETYX Ver.12的同源性分析(Search homology)程序,将Unit size to compare(ktup)设为2进行分析来计算。

[0020] 在本说明书中,启动子等的控制区域与基因的“可操作连接”是指基因与控制区域连接,使得该基因能够在该控制区域的控制下表达。基因与控制区域的“可操作连接”的步骤是本领域技术人员公知的。

[0021] 在本说明书中,关于基因的“上游”和“下游”是指该基因的转录方向的上游和下游。例如,“位于启动子下游的基因”是指在DNA有义链中该基因存在于启动子的3'侧,基因的上游是指DNA有义链中该基因的5'侧的区域。

[0022] 已知脂肪酶被清洁组合物中所含的表面活性剂抑制其活性。根据本发明者们实际验证,公开了对清洁的适应性的公知的脂肪酶中,TLL、Lipr139和PvLip均因表面活性剂的共存而受到很大的活性抑制。由表面活性剂产生的活性抑制是清洁用脂肪酶共同的重大问题。另外,脂肪酶不限于清洁用途,在纸浆处理等的工业用途中,也多与表面活性剂一起使用,由表面活性剂产生的活性抑制也是工业用脂肪酶整体的课题。要求有表面活性剂造成的活性抑制被缓和,并且显示高的清洁效果的脂肪酶。

[0023] 本发明者们鉴于该课题进行了深入研究,其结果发现了对表面活性剂造成的活性抑制具有显著高的耐性,并且显示可观的清洁效果的新型脂肪酶KAL-A8。

[0024] 本发明的脂肪酶对表面活性剂造成的活性抑制具有显著高的耐性,即使在表面活性剂存在下也显示优异的清洁效果。

[0025] <1.脂肪酶>

[0026] 本发明的脂肪酶是由序列编号14所示的氨基酸序列或与其具有至少91%的同一性的氨基酸序列构成的脂肪酶。本发明的脂肪酶对表面活性剂造成的脂肪酶活性抑制具有显著高的耐性,即使在表面活性剂存在下也显示显著高的清洁力。

[0027] 作为由与序列编号14所示的氨基酸序列具有至少91%的同一性的氨基酸序列构成的脂肪酶,可以列举由与序列编号14所示的氨基酸序列具有至少91%的同一性、具体为91%以上、优选为93%以上、更优选为95%以上、进一步优选为96%以上、进一步优选为97%以上、进一步优选为98%以上、进一步优选为99%以上的同一性的氨基酸序列构成的脂肪酶。

[0028] 具有至少91%的同一性的氨基酸序列中包括缺失、插入、取代或添加1个或多个氨基酸后的氨基酸序列。作为“缺失、插入、取代或添加1个或多个氨基酸后的氨基酸序列”可以列举缺失、插入、取代或添加1个以上30个以下、优选为20个以下、更优选为10个以下、进一步优选为5个以下的氨基酸后的氨基酸序列。

[0029] 由与序列编号14所示的氨基酸序列具有至少91%的同一性的氨基酸序列构成的脂肪酶可以列举例如由序列编号14所示的氨基酸序列构成的脂肪酶的人工制作的突变体。

该突变体例如能够通过通过对编码序列编号14所示的氨基酸序列的基因利用紫外线照射或定点突变导入(Site-Directed Mutagenesis)这样的公知的突变导入法来导入突变,使具有该突变的基因表达,选择具有所希望的脂肪酶活性的蛋白质,由此来制作。这样的突变体制作的步骤是本领域技术人员公知的。

[0030] 本发明的脂肪酶具有与以往分离或纯化的脂肪酶和NCBI蛋白质序列数据库中被推测为三酰基甘油脂肪酶的蛋白质不同的氨基酸序列。作为以往分离或纯化的脂肪酶,可以列举例如来自疏绵状嗜热丝孢菌(*Thermomyces lanuginosus*)的脂肪酶TLL(序列编号18)、在上述专利文献1中作为适于清洁的脂肪酶公开的来自*Cedecea* sp.-16640株的脂肪酶Lipr139(序列编号2)、在上述专利文献2中作为适于清洁的脂肪酶突变体群的亲本酶公开的来自变形杆菌(*Proteus*)属细菌的脂肪酶(以下称为PvLip、序列编号4)、在上述专利文献3中作为适于清洁的脂肪酶公开的来自宏基因组的脂肪酶Lipr138(序列编号16)等。另外,作为在NCBI蛋白质序列数据库中被推测为三酰基甘油脂肪酶的蛋白质,可以列举:登录号WP_123598507.1的蛋白质(以下称为PfLip,序列编号6)、登录号WP_115457195.1的蛋白质(以下称为EtLip,序列编号8)、登录号WP_135495634.1的蛋白质(以下称为EspLip,序列编号10)、登录号WP_005161363.1的蛋白质(以下称为YeLip,序列编号12)等。关于该数据库中登录的这些蛋白质,其酶学性质目前为止尚未报道。由序列编号14所示的氨基酸序列构成的本发明的脂肪酶KAL-A8与Lipr139、PvLip、PfLip、EtLip、EspLip和YeLip分别显示72%、60%、59%、68%、86%和71%的氨基酸序列同一性。

[0031] 在优选的一个实施方式中,本发明的脂肪酶是由序列编号14所示的氨基酸序列构成的脂肪酶。

[0032] <2. 脂肪酶的生产方法>

[0033] 本发明的脂肪酶例如能够通过使编码上述本发明的脂肪酶的多核苷酸表达来生产。优选本发明的脂肪酶能够由导入了编码本发明的脂肪酶的多核苷酸的转化体生产。例如,如果将编码本发明的脂肪酶的多核苷酸、或包含该多核苷酸的载体导入宿主,得到转化体后,用合适的培养基培养该转化体,则可以由导入到该转化体的编码本发明的脂肪酶的多核苷酸生产本发明的脂肪酶。通过将生产得到的脂肪酶从该培养物中分离或纯化,能够获得本发明的脂肪酶。

[0034] 编码本发明的脂肪酶的多核苷酸可以为编码由序列编号14所示的氨基酸序列或与其具有至少91%的同一性的氨基酸序列构成的脂肪酶的多核苷酸。另外,编码本发明的脂肪酶的多核苷酸可以为单链或双链DNA、RNA、或人工核酸的形态,或者可以为cDNA或不内含子的化学合成DNA。

[0035] 编码本发明的脂肪酶的多核苷酸能够基于该脂肪酶的氨基酸序列,以化学或基因工程的方式合成。例如,该多核苷酸能够基于上述本发明的脂肪酶的氨基酸序列,化学合成。多核苷酸的化学合成能够利用核酸合成受托服务(例如由株式会社医学生物学研究所、Genscript公司等提供)。此外,也可以将合成的多核苷酸通过PCR、克隆等扩增。

[0036] 或者,编码本发明的脂肪酶的多核苷酸能够通过对于由上述步骤合成的多核苷酸,利用上述紫外线照射或定点突变导入这样的公知的突变导入法导入突变来制作。例如,编码本发明的脂肪酶的多核苷酸能够通过序列编号13的多核苷酸中用公知的方法导入突变,使所得到的多核苷酸表达,调查脂肪酶活性,选择编码具有所希望的脂肪酶活性的蛋

白质的多核苷酸来得到。

[0037] 在多核苷酸中的定点突变导入例如能够通过反向PCR法或退火法等(村松等编著、“修订第4版新基因工程手册”、羊土社、p.82-88)的任意的方法进行。根据需要也可以使用Stratagene公司的QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit或QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit等的各种市售的定点突变导入用试剂盒。

[0038] 编码本发明的脂肪酶的多核苷酸能够整合入载体。作为含有该多核苷酸的载体的种类,没有特别限定,可以为质粒、噬菌体、噬菌粒、粘粒、病毒、YAC载体、穿梭载体等的任意的载体。另外,该载体没有限定,优选为能够在细菌内、优选为杆菌属细菌(例如枯草杆菌或其突变株)内扩增的载体,更优选为能够在杆菌属细菌内诱导导入基因的表达的载体。其中,作为在杆菌属细菌和其他生物中都能够复制的载体的穿梭载体在重组生产本发明的脂肪酶上能够合适地使用。作为优选的载体的例子,没有限定,可以列举pHA3040SP64、pHSP64R或pASP64(日本专利第3492935号)、pHY300PLK(能够转化大肠杆菌和枯草杆菌这两者的表达载体;Jpn J Genet,1985,60:235-243)、pAC3(Nucleic Acids Res,1988,16:8732)等的穿梭载体;pUB110(J Bacteriol,1978,134:318-329)、pTA10607(Plasmid,1987,18:8-15)等的杆菌属细菌的转化中能够利用的质粒载体等。另外,也可以使用来自大肠杆菌的质粒载体(例如pET22b(+)、pBR322、pBR325、pUC57、pUC118、pUC119、pUC18、pUC19、pBluescript等)。

[0039] 上述载体可以包含DNA的复制起始区域或含有复制起点的DNA区域。或者,在上述载体中,也可以在编码本发明的脂肪酶的多核苷酸(即本发明的脂肪酶基因)的上游可操作地连接用于使该基因的转录开始的启动子区域、终止子区域、或用于将所表达的蛋白质分泌到细胞外的分泌信号区域等的控制序列。在本说明书中,基因与控制序列“可操作地连接”是指基因与控制区域以该基因能够在该控制区域的控制下表达的方式配置。

[0040] 上述启动子区域、终止子区域、分泌信号区域等的控制序列的种类没有特别限定,可以根据要导入的宿主,适当选择通常所使用的启动子或分泌信号序列来使用。例如,作为能够整合入载体的控制序列的优选例子,可以列举Bacillus sp.KSM-S237株的纤维素酶基因的启动子、分泌信号序列等。

[0041] 或者,上述本发明的载体中也可以进一步整合入用于选择适当导入有该载体的宿主的标记基因(例如,氨苄西林、新霉素、卡那霉素、氯霉素等的药剂的耐性基因)。或者,在宿主使用营养缺陷株的情况下,也可以将编码所要求的营养的合成酶的基因作为标记基因整合入载体。或者,在使用为了生长而需要特定的代谢的选择培养基的情况下,也可以将该代谢的相关基因作为标记基因整合入载体。作为这样的代谢相关基因的例子,可以列举用于利用乙酰胺作为氮源的乙酰胺酶基因。

[0042] 编码上述本发明的脂肪酶的多核苷酸与控制序列和标记基因的连接能够通过SOE(splicing by overlap extension,重叠延伸拼接)-PCR法(Gene,1989,77:61-68)等本领域中公知的方法进行。连接的片段向载体的导入步骤是本领域中公知的。

[0043] 通过将包含编码本发明的脂肪酶的多核苷酸的载体导入宿主,或者将包含编码本发明的脂肪酶的多核苷酸的DNA片段导入宿主的基因组,能够得到本发明的转化细胞。

[0044] 作为宿主细胞,可以列举细菌、丝状菌等的微生物。作为细菌的例子,可以列举属于大肠杆菌(*Escherichia coli*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、肠球菌属

(Enterococcus)、李斯特菌属(*Listeria*)、杆菌属(*Bacillus*)的细菌等,其中,优选大肠杆菌和杆菌属细菌(例如,枯草杆菌*Bacillus subtilis* Marburg No.168(枯草杆菌168株)或其突变株)。作为枯草杆菌突变株的例子,能够列举J.Biosci.Bioeng.,2007,104(2):135-143中记载的蛋白酶9重缺损株KA8AX、以及使Biotechnol.Lett.,2011,33(9):1847-1852中记载的蛋白酶8重缺损株提高了蛋白质的折叠效率的D8PA株。作为丝状菌的例子,可以列举:木霉属(*Trichoderma*)、曲霉属(*Aspergillus*)、根霉属(*Rhizopus*)等。

[0045] 作为向宿主导入载体的方法,可以使用原生质体法、电穿孔法等本领域中通常使用的方法。通过以标记基因的表达、营养缺陷性等为指标选择适当进行了导入的菌株,能够得到导入了载体的目标转化体。

[0046] 或者,也可以将编码本发明的脂肪酶的多核苷酸、控制序列和标记基因连接而成的片段直接导入宿主的基因组。例如,通过SOE-PCR法等,构建在上述连接片段的两端添加与宿主的基因组互补的序列的DNA片段,将该DNA片段导入宿主,使宿主基因组与该DNA片段之间发生同源重组,由此将编码本发明的脂肪酶的多核苷酸导入宿主的基因组。

[0047] 如果用合适的培养基培养这样得到的导入了编码本发明的脂肪酶的多核苷酸或包含该多核苷酸的载体的转化体,则该载体上的编码蛋白质的基因表达,生成本发明的脂肪酶。该转化体的培养中使用的培养基可以根据该转化体的微生物的种类,由本领域技术人员适当选择。

[0048] 或者,本发明的脂肪酶也可以使用无细胞翻译体系,从编码本发明的脂肪酶的多核苷酸或其转录产物表达。“无细胞翻译体系”是在将作为宿主的细胞机械破坏得到的悬浮液中加入蛋白质的翻译所必须的氨基酸等试剂,构成体外(*in vitro*)转录翻译体系或体外(*in vitro*)翻译体系。

[0049] 由上述培养物或无细胞翻译体系生成的本发明的脂肪酶能够通过将蛋白质纯化所用的通常的方法,例如离心分离、硫酸铵沉淀、凝胶色谱、离子交换色谱、亲和色谱等单独或适当组合使用,进行分离或纯化。从培养物回收的蛋白质也可以用公知的方法进一步进行纯化。

[0050] <3. 清洁剂组合物>

[0051] 这样得到的本发明的脂肪酶与公知的蛋白质相比,对表面活性剂造成的脂肪酶活性抑制具有明显高的耐性,即使在表面活性剂存在下也显示明显高的清洁力。

[0052] 在此,“高的耐性”是指与公知的蛋白质、具体而言由序列编号2、4、6、8、10或12所示的氨基酸序列构成的脂肪酶或NCBI蛋白质序列数据库中推测为脂肪酶的蛋白质相比更高的耐性。对于表面活性剂造成的脂肪酶活性抑制的耐性可以使用本技术领域中公知的方法评价。例如,将脂肪酶溶液与表面活性剂溶液混合,在该混合液中添加作为脂肪酶的底物的4-硝基苯基辛酸酯溶液,测定伴随4-硝基苯酚的游离的405nm的吸光度变化(OD/min),求出与空白的差量 $\Delta OD/min$ 作为脂肪酶活性值(表面活性剂溶液中的脂肪酶活性值)。此外,求出代替表面活性剂溶液而使用缓冲液时的脂肪酶活性值(缓冲液中的脂肪酶活性值),将表面活性剂溶液中的脂肪酶活性值除以缓冲液中的脂肪酶活性值,再乘以100,求出该值作为相对活性(%)。相对活性(%)越高,则能够判断对表面活性剂造成的脂肪酶活性抑制的耐性越高。

[0053] 本发明的脂肪酶是在后述实施例的(3)的条件下,SDS溶液(0.1%(w/v))中的脂肪

酶相对活性(%)优选为20%以上、更优选为30%以上的脂肪酶。

[0054] 本发明的脂肪酶是在后述实施例的(3)的条件下,Triton X-100溶液(0.1%(w/v))中的脂肪酶相对活性(%)优选为50%以上、更优选为70%以上的脂肪酶。

[0055] 另外,“高的清洁力”是指与公知的蛋白质、具体而言由序列编号2、4、6、8、10或12所示的氨基酸序列构成的脂肪酶或NCBI蛋白质序列数据库中被推测为脂肪酶的蛋白质相比更高的清洁力,例如在洗涤或清洁工序中带来污垢的除去的能力。清洁力能够使用本技术领域中公知的方法评价。例如,在包含规定的指标物质(例如苏丹III等的对脂肪的溶解性高的染色剂)的模型污垢中添加包含脂肪酶的清洁液在规定的条件下进行清洁处理。能够分取清洁液的一部分,例如通过吸光度测定来测量通过清洁处理在清洁液中可溶化的模型污垢中的指标物质的浓度,求出与空白的差量作为清洁力。

[0056] 本发明的脂肪酶作为各种清洁剂组合物配合用酶是有用的,特别是作为适于低温清洁的清洁剂组合物配合用酶是有用的。

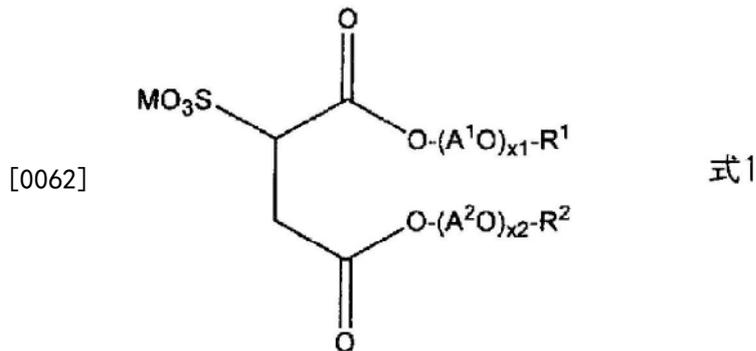
[0057] 在此,作为“低温”,可以列举40°C以下、35°C以下、30°C以下、25°C以下,另外可以列举5°C以上、10°C以上、15°C以上。另外,可以列举5~40°C、10~35°C、15~30°C、15~25°C。

[0058] 清洁剂组合物中的本发明的脂肪酶的配合量只要是该脂肪酶显示活性的量就没有特别限制,例如清洁剂组合物每1kg优选为0.1mg以上、更优选为1mg以上、更优选为5mg以上,且优选为5000mg以下、更优选为1000mg以下、更优选为500mg以下。另外,优选为0.1~5000mg,更优选为1~1000mg,更优选为5~500mg。

[0059] 清洁剂组合物优选除了本发明的脂肪酶以外,还包含磺基琥珀酸酯或其盐。磺基琥珀酸酯或其盐已知是在清洁剂组合物中配合的成分(例如日本特开2019-182911号公报)。磺基琥珀酸酯或其盐优选为具有碳原子数9以上12以下的支链烷基的磺基琥珀酸支链烷基酯或其盐,更优选为具有碳原子数9或10的支链烷基的磺基琥珀酸支链烷基酯或其盐,进一步优选为具有碳原子数10的支链烷基的磺基琥珀酸支链烷基酯或其盐。另外,磺基琥珀酸酯或其盐优选为磺基琥珀酸二支链烷基酯或其盐,且2个支链烷基分别为碳原子数9以上12以下的支链烷基的磺基琥珀酸二支链烷基酯或其盐,更优选为2个支链烷基分别为碳原子数9或10的支链烷基的磺基琥珀酸二支链烷基酯或其盐,进一步优选为2个支链烷基分别为碳原子数10的支链烷基的磺基琥珀酸二支链烷基酯或其盐,进一步优选为双-(2-丙基庚基)磺基琥珀酸酯或其盐。

[0060] 作为盐,可以列举例如碱金属盐、烷醇胺盐等,优选碱金属盐或烷醇胺盐,更优选为选自钠盐、钾盐、三乙醇胺盐、二乙醇胺盐、和单乙醇胺盐中的盐,进一步优选为钠盐。

[0061] 作为磺基琥珀酸酯或其盐,可以列举下述式1所示的化合物。



[0063] (式1中, R^1 、 R^2 分别为碳原子数9以上12以下的支链烷基, A^1O 、 A^2O 分别为碳原子数2以上4以下的亚烷氧基, x_1 、 x_2 为平均加成摩尔数, 分别为0以上10以下的数, M 为阳离子。)

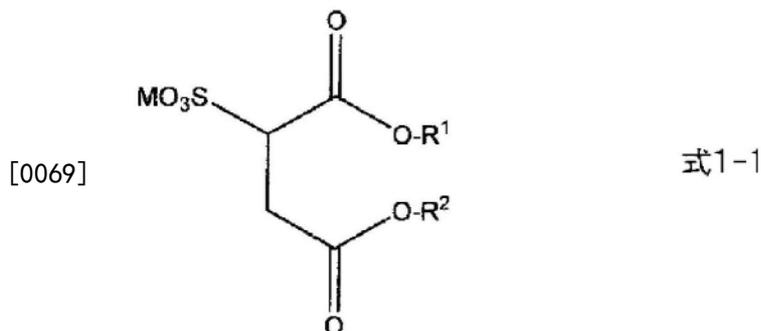
[0064] 式1中, R^1 、 R^2 分别优选为选自支链壬基、支链癸基和支链十二烷基中的支链烷基, 更优选为支链癸基。支链癸基优选为2-丙基庚基。

[0065] 式1中, A^1O 、 A^2O 分别为碳原子数2以上4以下, 从对水的润滑性的观点出发, 优选为碳原子数2或3的亚烷氧基。式1中, x_1 、 x_2 表示 A^1O 、 A^2O 的平均加成摩尔数, 分别为0以上10以下, 从对水的润滑性的观点出发, 优选为6以下、更优选为4以下、进一步优选为2以下的数, 进一步优选为0。

[0066] 式1中, M 为阳离子。 M 优选为氢离子以外的阳离子。作为 M , 可以列举例如锂离子、钠离子、钾离子等的碱金属离子、钙离子、钡离子等的碱土金属离子、三乙醇铵离子、二乙醇铵离子、单乙醇铵离子、三甲基铵离子、单甲基铵离子等的有机铵离子等。

[0067] 从对水的分散性的观点出发, M 优选为碱金属离子、烷醇铵离子, 更优选为钠离子、钾离子、三乙醇铵离子、二乙醇铵离子、单乙醇铵离子, 进一步优选为钠离子。

[0068] 磺基琥珀酸酯或其盐优选为下述式1-1所示的化合物。式1-1的化合物是式1中的 x_1 、 x_2 分别为0的化合物。



[0070] (式1-1中, R^1 、 R^2 分别为碳原子数9以上12以下的支链烷基, M 为阳离子。)

[0071] 式1-1中的 R^1 、 R^2 、 M 的具体例子或优选例子与式1相同。

[0072] 在优选的一个实施方式中, 磺基琥珀酸酯或其盐为双(2-丙基庚基)磺基琥珀酸酯或其盐。

[0073] 清洁剂组合物中的磺基琥珀酸酯或其盐的配合量优选为0.01质量%以上、更优选为0.1质量%以上, 且优选为2.0质量%以下、更优选为1.0质量%以下。另外, 优选为0.01~2.0质量%, 进一步优选为0.1~1.0质量%。

[0074] 清洁剂组合物在本发明的脂肪酶以外还可以并用各种酶。例如为水解酶、氧化酶、还原酶、转移酶、裂解酶、异构酶、连接酶、合成酶等。其中, 优选为与本发明的脂肪酶不同的

脂肪酶、淀粉酶、蛋白酶、纤维素酶、角蛋白酶、酯酶、角质酶、支链淀粉酶、果胶酶、甘露聚糖酶、葡萄糖苷酶、葡聚糖酶、胆固醇氧化酶、过氧化物酶、漆酶等,特别优选为蛋白酶、纤维素酶、淀粉酶、脂肪酶。

[0075] 作为蛋白酶,可以列举市售的Alcalase、Esperase、Everlase、Savinase、Kannase、Progress Uno(注册商标;Novozymes A/S)、PREFERENZ、EFFECTENZ、EXCELLENZ(注册商标;杜邦公司)、Lavergy(注册商标;BASF公司)、以及KAP(花王)等。

[0076] 作为纤维素酶,可以列举Celluclean、Carezyme(注册商标;Novozymes A/S)、以及KAC、日本特开平10-313859号公报记载的芽孢杆菌KSM-S237株生产的碱性纤维素酶、日本特开2003-313592号公报记载的突变碱性纤维素酶(以上、花王)等。

[0077] 作为淀粉酶,可以列举Termamyl、Duramyl、Stainzyme、Stainzyme Plus、Amplify Prime(注册商标;Novozymes A/S)、PREFERENZ、EFFECTENZ(注册商标;杜邦公司)、以及KAM(花王)等。

[0078] 作为脂肪酶,可以列举Lipolase、Lipex(注册商标;Novozymes A/S)等。

[0079] 清洁剂组合物中能够配合公知的清洁剂成分,作为该公知的清洁剂成分,可以列举例如以下的物质。

[0080] (1) 表面活性剂

[0081] 表面活性剂在清洁剂组合物中配合0.5~60质量%,特别在粉末状清洁剂组合物中优选配合10~45质量%,在液体清洁剂组合物中优选配合20~90质量%。另外,在本发明的清洁剂组合物为洗衣店用衣物清洁剂、自动餐具清洗机用清洁剂的情况下,表面活性剂通常配合1~10质量%、优选为1~5质量%。

[0082] 作为清洁剂组合物中使用的表面活性剂,能够列举除上述的磺基琥珀酸酯或其盐以外的阴离子表面活性剂、非离子表面活性剂、两性表面活性剂、阳离子表面活性剂的1种或组合,优选为阴离子表面活性剂、非离子表面活性剂。

[0083] 作为阴离子表面活性剂,优选碳原子数10~18的醇的硫酸酯盐、碳原子数8~20的醇的烷氧基化物的硫酸酯盐、烷基苯磺酸盐、链烷烃磺酸盐、 α -烯炔磺酸盐、内部烯炔磺酸盐、 α -磺基脂肪酸盐、 α -磺基脂肪酸烷基酯盐或脂肪酸盐。在本发明中,特别优选选自烷基链的碳原子数为10~14、更优选为12~14的直链烷基苯磺酸盐和亚烷基链的碳原子数为12~20、更优选为16~18的内部烯炔磺中的一种以上的阴离子表面活性剂,作为平衡离子,优选碱金属盐或胺类,特别优选钠和/或钾、单乙醇胺、二乙醇胺。内部烯炔磺能够参照例如W02017/098637。

[0084] 作为非离子表面活性剂,优选聚氧亚烷基烷基(碳原子数8~20)醚、烷基多糖苷、聚氧亚烷基烷基(碳原子数8~20)苯基醚、聚氧亚烷基山梨糖醇酐脂肪酸(碳原子数8~22)酯、聚氧亚烷基二醇脂肪酸(碳原子数8~22)酯、聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段聚合物。特别是作为非离子表面活性剂,优选在碳原子数10~18的醇上加成有环氧乙烷或环氧丙烷等的环氧烷烃4~20摩尔而成的(如HLB值(以Griffin法计算)为10.5~15.0、优选为11.0~14.5)聚氧亚烷基烷基醚。

[0085] (2) 二价金属离子捕捉剂

[0086] 二价金属离子捕捉剂配合0.01~50质量%、优选配合5~40质量%。作为本发明清洁剂组合物中所用的二价金属离子捕捉剂,可以列举:三聚磷酸盐、焦磷酸盐、正磷酸盐等

的缩合磷酸盐、沸石等的铝硅酸盐、合成层状结晶性硅酸盐、次氨基三乙酸盐、乙二胺四乙酸盐、柠檬酸盐、异柠檬酸盐、聚缩醛羧酸盐等。其中,特别优选结晶性铝硅酸盐(合成沸石),A型、X型、P型沸石中,特别优选A型。合成沸石适合使用平均一次粒径 $0.1 \sim 10\mu\text{m}$ 、特别是 $0.1 \sim 5\mu\text{m}$ 的沸石。

[0087] (3) 碱剂

[0088] 碱剂配合 $0.01 \sim 80$ 质量%,优选配合 $1 \sim 40$ 质量%。粉末洗涤剂的情况下,可以列举被统称为重灰和轻灰的碳酸钠等的碱金属碳酸盐、以及JIS1号、2号、3号等的非晶质的碱金属硅酸盐。这些无机性的碱剂在洗涤剂干燥时,在颗粒的骨架形成上有效,能够得到比较硬、流动性优异的洗涤剂。作为这些以外的碱,可以列举倍半碳酸钠、碳酸氢钠等,另外,三聚磷酸盐等的磷酸盐也具有作为碱剂的作用。另外,作为在液体洗涤剂中使用的碱剂,除了上述碱剂以外,还可以使用氢氧化钠、以及单乙醇胺、二乙醇胺或三乙醇胺,也可以作为活性剂的平衡离子使用。

[0089] (4) 再污染防止剂

[0090] 再污染防止剂配合 $0.001 \sim 10$ 质量%、优选配合 $1 \sim 5$ 质量%。作为本发明清洁剂组合物中所用的再污染防止剂,可以列举:聚乙二醇、羧酸类聚合物、聚乙烯醇、聚乙烯基吡咯烷酮等。其中,羧酸类聚合物除了再污染防止能力以外,还具有捕捉金属离子的功能、使固体颗粒污垢从衣物分散到洗涤浴中的作用。羧酸类聚合物为丙烯酸、甲基丙烯酸、衣康酸等的均聚物或共聚物,作为共聚物优选上述单体与马来酸共聚而成的共聚物,分子量优选数千 ~ 10 万。在上述羧酸类聚合物以外,聚缩水甘油酸盐等的聚合物、羧甲基纤维素等的纤维素衍生物、以及聚天冬氨酸等的氨基酸类的聚合物也由于具有金属离子捕捉剂、分散剂和再污染防止能力,因此优选。

[0091] (5) 漂白剂

[0092] 例如过氧化氢、过碳酸盐等的漂白剂优选配合 $1 \sim 10$ 质量%。在使用漂白剂时,能够配合四乙酰基乙二胺(TAED)或日本特开平6-316700号公报记载等的漂白活化剂(活化剂) $0.01 \sim 10$ 质量%。

[0093] (6) 荧光剂

[0094] 作为清洁剂组合物中使用的荧光剂,可以列举联苯型荧光剂(例如Tinopal CBS-X等)或二苯乙烯型荧光剂(例如DM型荧光染料等)。荧光剂优选配合 $0.001 \sim 2$ 质量%。

[0095] (7) 其他成分

[0096] 清洁剂组合物中,可以含有衣物用洗涤剂的领域中公知的助洗剂、柔软剂、还原剂(亚硫酸盐等)、抑泡剂(硅酮等)、香料、防菌防霉剂(Proxel[商品名]、苯甲酸等)、其他添加剂。

[0097] 清洁剂组合物能够将上述方法得到的本发明的脂肪酶和上述公知的清洁成分组合按照常规方法制造。洗涤剂的形态可以根据用途选择,例如可以制成液体、粉体、颗粒、膏、固体等。

[0098] 这样得到的清洁剂组合物能够作为衣物清洁剂、餐具清洁剂、漂白剂、硬质表面清洁用清洁剂、排水管清洁剂、假牙清洁剂、医疗器具用的杀菌清洁剂等使用,优选可以列举衣物清洁剂、餐具清洁剂,更优选可以列举洗衣店用衣物清洁剂(洗衣店用洗涤清洗剂)、手洗的餐具清洁剂、自动餐具清洗机用清洁剂。

[0099] 另外,该清洁剂组合物适合在40°C以下、35°C以下、30°C以下、25°C以下且5°C以上、10°C以上、15°C以上使用。另外,适于5~40°C、10~35°C、15~30°C、15~25°C下的使用。作为优选的使用方式,可以列举洗衣店的低温(15~30°C)清洁中的使用、利用自动餐具清洗机的低温(15~30°C)清洁中的使用。

[0100] 通过使用本发明的清洁剂组合物,能够对需要除去污垢的被清洁物(例如,衣类、餐具、硬质表面、排水管、假牙、医疗器具等)进行清洁、即去除污垢。该清洁方法包括使需要除去污垢的被清洁物与本发明的清洁剂组合物接触的步骤。优选污垢为皮脂污垢或含有来自食品的油脂的污垢。

[0101] 在本发明的清洁方法中,使被清洁物与清洁剂组合物接触可以在溶解有该清洁剂组合物的水中,浸渍该被清洁物,也可以将该清洁剂组合物直接涂布于该被清洁物。在本发明的方法中,也可以将该浸渍或洗涤剂组合物涂布后的被清洁物进一步进行手洗,用洗衣机等进行清洗,但这并不是必须的。

[0102] 关于上述实施方式,在本发明中还公开了以下的方式。

[0103] <1>一种脂肪酶,其由序列编号14所示的氨基酸序列或与其具有至少91%的同一性的氨基酸序列构成。

[0104] <2>如<1>所述的脂肪酶,其由序列编号14所示的氨基酸序列构成。

[0105] <3>一种多核苷酸,其编码<1>或<2>所述的脂肪酶。

[0106] <4>一种载体或DNA片段,其包含<3>所述的多核苷酸。

[0107] <5>一种转化细胞,其含有<4>所述的载体或DNA片段。

[0108] <6>如<5>所述的转化细胞,其中,所述转化细胞为微生物。

[0109] <7>如<5>或<6>所述的转化细胞,其中,所述转化细胞为大肠杆菌或杆菌属细菌。

[0110] <8>一种清洁剂组合物,其含有<1>或<2>所述的脂肪酶。

[0111] <9>如<8>所述的清洁剂组合物,其中,还含有磺基琥珀酸酯或其盐、优选为具有碳原子数9以上12以下的支链烷基的磺基琥珀酸支链烷基酯或其盐、更优选为具有碳原子数9或10的支链烷基的磺基琥珀酸支链烷基酯或其盐、进一步优选为具有碳原子数10的支链烷基的磺基琥珀酸支链烷基酯或其盐。

[0112] <10>如<8>所述的清洁剂组合物,其中,还含有磺基琥珀酸二酯或其盐、优选为2个支链烷基分别为碳原子数9以上12以下的支链烷基的磺基琥珀酸二支链烷基酯或其盐、更优选为2个支链烷基分别为碳原子数9或10的支链烷基的磺基琥珀酸二支链烷基酯或其盐、进一步优选为2个支链烷基分别为碳原子数10的支链烷基的磺基琥珀酸二支链烷基酯或其盐、进一步优选为双(2-丙基庚基)磺基琥珀酸酯或其盐。

[0113] <11>如<8>~<10>中任一项所述的清洁剂组合物,其中,所述清洁剂组合物为衣物清洁剂或餐具清洁剂。

[0114] <12>如<8>~<11>中任一项所述的清洁剂组合物,其中,所述清洁剂组合物为粉末或液体。

[0115] <13>如<8>~<12>中任一项所述的清洁剂组合物,其中,在低温下使用。

[0116] <14>如<13>所述的清洁剂组合物,其中,在40°C以下、35°C以下、30°C以下、25°C以下且5°C以上、10°C以上、15°C以上使用,或者在5~40°C、10~35°C、15~30°C、15~25

°C使用。

[0117] <15>一种污垢的清洁方法,其中,使用<8>~<14>中任一项所述的清洁剂组合物。

[0118] <16>如<15>所述的方法,其中,包括使被清洁物与<8>~<14>中任一项所述的清洁剂组合物接触的步骤。

[0119] <17>如<15>或<16>所述的方法,其中,污垢为皮脂污垢或含有来自食品的油脂的污垢。

[0120] <18>由序列编号14所示的氨基酸序列或与其具有至少91%的同一性的氨基酸序列构成的脂肪酶在制造清洁剂组合物中的用途。

[0121] <19>如<18>所述的用途,其中,脂肪酶为由序列编号14所示的氨基酸序列构成的脂肪酶。

[0122] <20>如<18>或<19>所述的用途,其中,清洁剂组合物为衣物清洁剂或餐具清洁剂。

[0123] <21>如<18>~<20>中任一项所述的用途,其中,清洁剂组合物为粉末或液体。

[0124] <22>如<18>~<21>中任一项所述的用途,其中,清洁剂组合物在低温下使用。

[0125] <23>如<22>所述的用途,其中,清洁剂组合物在40°C以下、35°C以下、30°C以下、25°C以下且5°C以上、10°C以上、15°C以上使用,或者在5~40°C、10~35°C、15~30°C、15~25°C使用。

[0126] <24>由序列编号14所示的氨基酸序列或与其具有至少91%的同一性的氨基酸序列构成的脂肪酶在污垢的清洁中的用途。

[0127] <25>如<24>所述的用途,其中,脂肪酶为由序列编号14所示的氨基酸序列构成的脂肪酶。

[0128] <26>如<24>或<25>所述的用途,其中,污垢为皮脂污垢或含有来自食品的油脂的污垢。

[0129] <27>如<24>~<26>中任一项所述的用途,其中,清洁为低温下的清洁。

[0130] <28>如<27>所述的用途,其中,清洁为在40°C以下、35°C以下、30°C以下、25°C以下且5°C以上、10°C以上、15°C以上的清洁,或者为在5~40°C、10~35°C、15~30°C、15~25°C的清洁。

[0131] 实施例

[0132] 以下,基于实施例对本发明进行更加详细地说明,但本发明并不限于此。

[0133] (1) 脂肪酶表达质粒的构建

[0134] 脂肪酶表达质粒是以W02021/153129中记载的包含来自枯草杆菌spoVG基因的启动子的序列编号26的VHH的表达用质粒为模板构建的。通过In-Fusion反应将各脂肪酶基因转移到上述质粒的包含VHH基因的ORF全长上进行构建。由人工基因合成的脂肪酶基因Lipr139、PvLip、PflLip、EtLip、EspLip、YeLip、KAL-A8、Lipr138(分别为序列编号1、3、5、7、9、11、13和15的多核苷酸、分别编码序列编号2、4、6、8、10、12、14和16的氨基酸序列),分别构建质粒pHY-Lipr139、pHY-PvLip、pHY-PflLip、pHY-EtLip、pHY-EspLip、pHY-YeLip、pHY-

KAL-A8、pHY-Lipr138。通过In-Fusion反应将在N末端侧连接有来自枯草杆菌amyE的信号序列(序列编号19的多核苷酸、编码序列编号20的氨基酸序列)的脂肪酶TLL基因(序列编号17的多核苷酸、编码序列编号18的氨基酸序列)的人工合成基因转移到质粒pHY-Lipr139的包含Lipr139基因的ORF全长上,构建pHY-amyEsig-TLL。

[0135] (2) 脂肪酶溶液的制备

[0136] 将脂肪酶表达质粒通过原生质体法导入枯草杆菌株,用 $2 \times L$ -麦芽糖培养基(2%胰蛋白胨、1%酵母提取物、1%NaCl、7.5%麦芽糖、7.5ppm硫酸锰五水合物、0.04%氯化钙二水合物、15ppm四环素;%为(w/v)%),在 30°C 下培养2天后,将包含脂肪酶的培养上清液通过离心分离回收。通过透析,将培养上清液更换为缓冲液10mM Tris-HCl+0.01%Triton-X100(pH7.0),由SDS-PAGE的条带强度对脂肪酶浓度进行定量。

[0137] (3) 表面活性剂溶液中的活性测定

[0138] 使用4-硝基苯基辛酸酯(SIGMA)作为底物。能够通过测定伴随由脂肪酶的作用带来的4-硝基苯酚的游离的吸光度的增加速度来求出脂肪酶的活性。使用20mM Tris-HCl(pH7.0)中的20mM 4-硝基苯基辛酸酯作为底物溶液。使用在20mM Tris-HCl(pH7.0)中添加了0.1%(w/v)的SDS或Triton X-100的溶液作为表面活性剂溶液。将调整为2ppm的脂肪酶溶液 $5\mu\text{L}$ 和表面活性剂溶液 $100\mu\text{L}$ 在96孔测定板的各孔中混合,添加底物溶液 $10\mu\text{L}$,在 30°C 下测定405nm的吸光度变化(OD/min)。将与空白(无酶添加样品)的差量 $\Delta\text{OD}/\text{min}$ 作为活性值。关于各脂肪酶,将代替表面活性剂溶液而使用20mM Tris-HCl(pH7.0)时的活性值(缓冲液中的活性)除以表面活性剂溶液中的活性值并乘以100得到的值作为相对活性(%)求出(图1)。

[0139] TLL、专利文献1、2和3中公开了对清洁的适应性的Lipr139、PvLip和Lipr138、以及作为自然界中现存的脂肪酶序列的Pflip、EtLip、EspLip和YeLip在SDS和Triton X-100的存在下活性明显受到抑制。与这些相比,新型脂肪酶KAL-A8对SDS和Triton X-100造成的活性抑制显示出较高的耐性。

[0140] (4) 模型清洁液中的活性测定

[0141] 使用20mM Tris-HCl(pH7.0)中的20mM 4-硝基苯基辛酸酯作为底物溶液。作为模型清洁液,使用表1的水性介质。将调整为4ppm的脂肪酶溶液 $2\mu\text{L}$ 和试验液(模型清洁液或20mM Tris-HCl(pH7.0)) $100\mu\text{L}$ 在96孔测定板的各孔中混合,添加底物溶液 $10\mu\text{L}$,在 30°C 下测定405nm的吸光度变化(OD/min)。求出与空白(无酶添加样品)的差量 $\Delta\text{OD}/\text{min}$ 。将包含 $31 \sim 500\mu\text{M}$ 的4-硝基苯酚的20mM Tris-HCl(pH7.0) $10\mu\text{L}$ 与各试验液 $100\mu\text{L}$ 混合,测定405nm的吸光度制作标准曲线。从各试验液的标准曲线与 $\Delta\text{OD}/\text{min}$ 的值,算出每一分钟的4-硝基苯酚的游离速度($\mu\text{M}/\text{min}$)作为活性值。

[0142] 关于各脂肪酶,将以20mM Tris-HCl(pH7.0)为试验液时的活性值(缓冲液中的活性)除以以模型清洁液为试验液时的活性值并乘以100后的值作为相对活性(%)求出(图2)。

[0143] TLL、专利文献1、2和3中公开了对清洁的适应性的Lipr139、PvLip和Lipr138、以及作为自然界中现存的脂肪酶序列的Pflip、EtLip、EspLip和YeLip在模型清洁液中活性明显受到抑制。另一方面,新型脂肪酶KAL-A8对于在模型清洁液中的活性抑制显示出较高的耐性。

[0144] [表1]

配合成分	质量%
磺基琥珀酸支链烷基酯	0.2
甜菜碱	2
二乙二醇丁醚	6.5
水	余量
合计	100

[0146] • 磺基琥珀酸支链烷基酯:双(2-丙基庚基)磺基琥珀酸钠

[0147] • 甜菜碱:月桂基(2-羟基-3-磺基丙基)二甲基甜菜碱、AMPHITOL 20HD、花王株式会社制

[0148] (5) 模型清洁液中的清洁评价

[0149] 将牛脂(SIGMA, 03-0660)与菜籽油(SIGMA, 23-0450)以重量比9:1混合,溶解于3倍量的氯仿中后,用0.2wt%的苏丹III染色,将染色后的物质作为模型污垢。在聚丙烯制的96孔深孔板的孔底滴加模型污垢各10 μ L,将氯仿蒸发、干燥,作为污垢板。

[0150] 在表1记载的模型清洁液中添加1/100容量的240ppm的脂肪酶溶液,将得到的混合物作为清洁液。在污垢板中缓慢添加清洁液各300 μ L,在室温(约22 $^{\circ}$ C)下静置15分钟进行浸渍清洁。以不接触底部的污垢的方式分取清洁液各100 μ L,转移到新的96孔板。为了对通过浸渍清洁而可溶化于清洁液的模型污垢中的苏丹III进行定量,测定500nm的吸光度(A500)。清洁后的A500减去清洁前的A500得到的值 Δ A500对应于清洁液中的油的游离量,能够作为清洁力的指标使用。将各脂肪酶的清洁力 Δ A500示于图3中。

[0151] 专利文献1中公开了对清洁的适应性的Lipr139与TLL、Lipr138、PvLip、Pflip、EtLip、EspLip和YeLip相比,在模型清洁液中显示出较高的清洁力。另一方面,新型脂肪酶KAL-A8在模型清洁液中与包含Lipr139在内的其他脂肪酶相比,显示出显著高的清洁力。

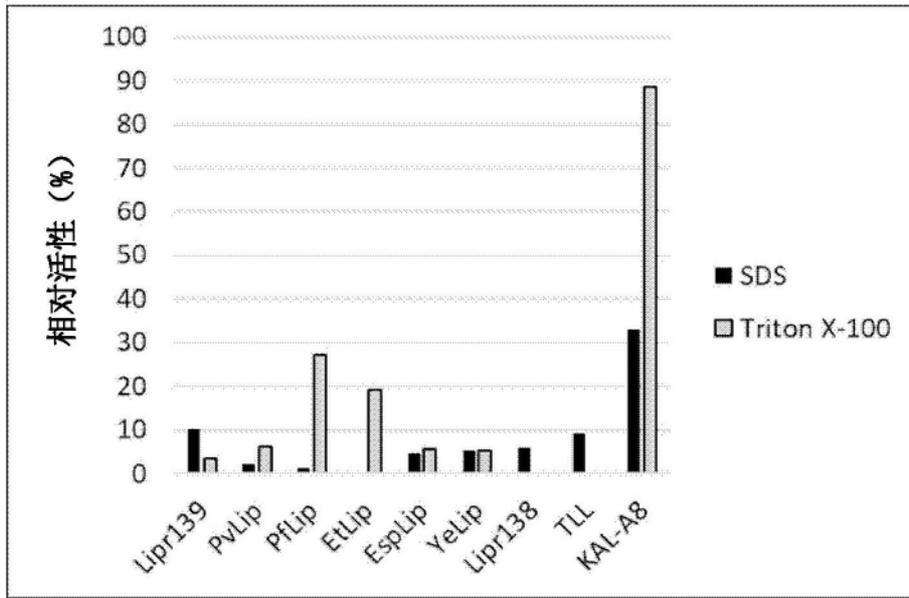


图1

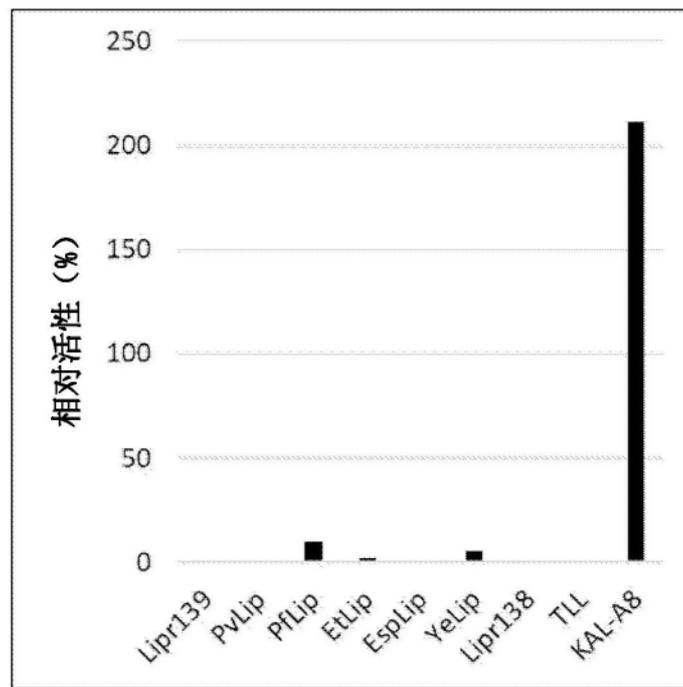


图2

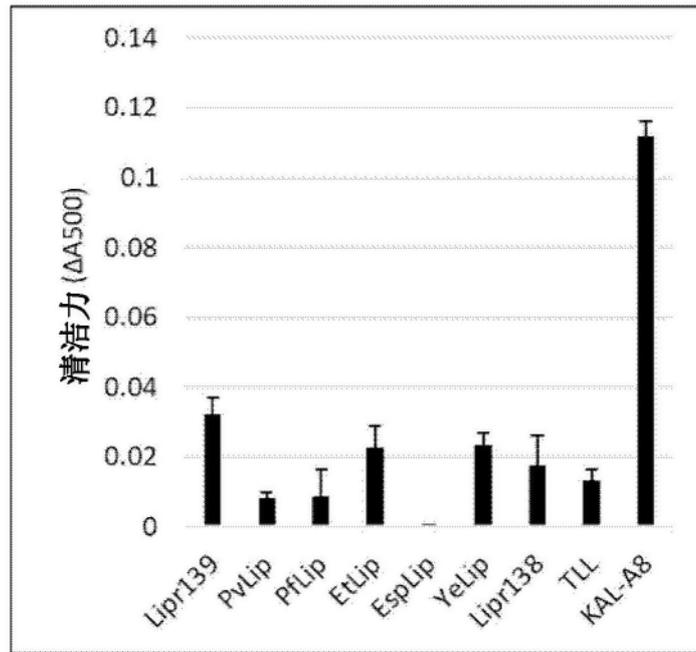


图3