[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
C12N 9/18
C12N 15/55 C12P 7/62
//C11D3/386

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01808568.7

[43] 公开日 2003 年 6 月 25 日

[11] 公开号 CN 1426463A

[22] 申请日 2001.5.22 [21] 申请号 01808568.7
[30] 优先权
[32] 2000. 6. 2 [33] DK [31] PA200000861
[32] 2000.10.23 [33] DK [31] PA200001577
[32] 2000.11.24 [33] DK [31] PA200001772
[32] 2001. 1.19 [33] DK [31] PA200100100
[86] 国际申请 PCT/DK01/00350 2001.5.22
[87] 国际公布 WO01/92502 英 2001.12.6
[85] 进入国家阶段日期 2002.12.2
[71] 申请人 诺维信公司
地址 丹麦鲍斯韦
[72] 发明人 阿伦·斯文德森
桑尼·O·S·格拉德 福山志朗
松井知子

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书 5 页 说明书 28 页 序列表 4 页

[54] 发明名称 角质酶变体

[57] 摘要

具有改善热稳定性的真菌角质酶变体包括一个或多个特定氨基酸残基的取代和/或特定的 N 末端延伸。 变体还可选择地包括在其它位点的额外改变。

ISSN1008-4274

1.一种亲代真菌角质酶的变体，该变体:

a)包括至少一个相应于 *Humicola insolens* 菌株 DSM 1800 的角质酶中的位点 A4，T29，A88，N91，A130，Q139，I169，I178 或 R189(*H. insolens* 角质酶的编号)的氨基酸残基的取代，和

b)比亲代角质酶的热稳定性更强。

2.前述权利要求的变体,其中包括取代 A4V,T29M/I/C,A88H/L/V,N91H,A130V，Q139R，I169A/G/T/V，I178V 或 R189A/H/V。

3.一种亲代真菌角质酶的变体，该变体:

a)包括至少一个相应于 *Humicola insolens* 菌株 DSM 1800 的角质酶中的位点 Q1C/L, L2K/Q/V, G8D, S11T, N15D, A16T, V38H, S48E/K, H49Y, L66I, S116K, S119P, G120D, T164S, T166M/I 或 L167P(*Humicola insolens* 角质酶编号)的氨基酸残基的取代，和

b)比亲代角质酶热稳定性更强。

4.前述任一项权利要求的变体，其中亲代角质酶:

a)原产于丝状真菌,具体为腐质霉属或镰孢属的菌株,具体为 *Humicola insolens* 或 *Fusarium solani pisi*，更具体为 *Humicola insolens* 菌株 DSM 1800,

b)具有可以与 *Humicola insolens* 菌株 DSM 1800 角质酶的序列对比的氨基酸序列，或

c)具有与 *Humicola insolens* 菌株 DSM 1800 角质酶至少有 50%的同源性，特别是至少 70%同源性，更特别是至少 80%同源性的氨基酸序列。

5.一种 *Humicola insolens* 菌株 DSM 1800 的角质酶变体，该变体:

a)包括对氨基酸残基 N44，I168,或 L174 的取代，和

b)比亲代角质酶热稳定性更强。

6.前述权利要求的变体，其中包括取代 N44D，I168F,或 L174F。

7.前述任一项权利要求的变体，其具有 1-20 种所述取代，特别是 2-15 种。

8.前述任一项权利要求的变体，包括相应如下的取代:

a) S48E +A88H +N91 H +R189V

b) Q1 L +L2K +G8D +N15D
c) N44D +A130V
d) Q1C+L2V+G120D
e) A88L+R189A
f) S48E +L66I+A88L+I169A+R189H
g) A88V +S116K+S119P+Q139R+I169V+R189V
h) A88V+R189A
i) S48K +A88H +I169G+R189H
j) Q1 L +L2Q +A4V +S11T
k) T164S
I) L174F
m) H49Y
n) Q1L +L2K+G8D +N15D +S48E +A88H +N91 H +R189V
o) Q1L +L2K +G8D +N15D +N44D +A130V
p) Q1L +L2K +G8D +N15D +S48E +A88H +N91 H +A130V +R189V
q) G8D+N15D+A16T
r) A130V
s) Q1C+L2V
t) G8D+N15D+A16T
u) G8D +N15D +S48E +A88H +N91 H +A130V +R189V
v) G8D +N15D +T29M +S48E +A88H +N91 H +A130V +R189V
w) G8D +N15D +T291 +S48E +A88H +N91 H +A130V +R189V and/or
x) G8D +N15D +T29C +S48E +A88H +N91 H +A130V +R189V
y) G8D+N15D+S48E+A88H+N91H+A130V+L174F+I178V+R189V
z) G8D +N15D +S48E +A88H +N91H+A130V+T166M+I168F+R189V
aa) G8D +N15D +S48E +A88H +N91 H +A130V +T1661 +L167P +R189V
bb) G8D +N15D +V38H +S48E +A88H +N91 H +A130V +1169T + R189V
cc) G8D +N15D +V38H +S48E +A88H +N91 H +A130V +R189V
dd) G8D +N15D +T29M +S48E +A88H +N91 H +A130V +T1661 +L167P +R189V

9. 前述任一项权利要求的变体，其还包括至少一个相应于位点 Q1, L2, E6, E10, S11, A14, N15, F24, L46, E47, R51, D63, L138 和/或 E179 (*H. insolens* 的角质酶编号) 的氨基酸的取代。

10. 前述权利要求的变体，其包括至少一个相应于位点 Q1P, L2V, E6Q, E10Q, S11C, A14P, N15T, F24Y, L46I, E47K, R51P, D63N, L138I 和/或 E179Q (*H. insolens* 的角质酶编号) 的取代。

11. 前述权利要求的变体，其中包括相应 E6Q+A14P+E47K+R51P+E179Q 的取代。

12. 前述任一项权利要求的变体，其具有针对对苯二酸酯，尤其是环三(对苯二甲酸亚乙酯)和/或对苯二酸二(2-羟乙基)二苯甲酸酯(BETEB)的水解活性。

13. 前述任一项权利要求的变体，其中具有的变性温度比其亲代角质酶至少高出5℃，尤其是在pH8.5的条件下测量。

14. 编码前述任一项权利要求的变体的DNA序列。

15. 包括前述权利要求的DNA序列的载体。

16. 一种携带有权利要求14的DNA序列或权利要求15的载体转化的宿主细胞。

17. 一种制备权利要求1-13中任一项的变体的方法，包括

a)培养权利要求16的细胞，以表达并可选择地分泌变体，和

b)回收该变体。

18. 一种制备角质酶变体的方法，其中包括:

a)选择亲代真菌角质酶，

b) 在 *H. Insolens* 角质酶的位点A4，G8，A16，T29，V38，N44，S48，H49，L66，A88，N91，S116，S119，G120，A130，Q139，T164，T166，L167，I168，I169，L174，I178或R189或包括所述位点的区域(*H. insolens* 的角质酶编号)的亲代角质酶取代，缺失，或插入中改变至少一个氨基酸残基，并且也可任选在其它位点进行以得到角质酶变体，

c)测试角质酶变体的热稳定性，

d)任选重复步骤b-c，

e)选择热稳定性比其亲代角质酶更高的角质酶变体，和

f)制备所选出的角质酶变体。

19. 权利要求18的方法，其中的氨基酸的改变是在包括至少一个所示位点的区内进行定位随机突变而完成的。

20. 权利要求18的方法，其中的氨基酸的改变是通过在至少一个所示位点进行点特异性突变而完成的，具体是通过在一个，两个，三个，四个，五个或六个所述位点进行取代。

21. 前述任一项权利要求的方法，其中所选出的变体角质酶的变性温度至少比其亲代角质酶高5℃，特别是在pH为8.5时测量。

22. 前述任一项权利要求的方法，其中亲代角质酶:

a)原产于丝状真菌，具体为腐质霉属或镰孢属，具体为 *Humicola insolens* 或 *Fusarium solani pisi*，更具体为 *Humicola insolens* 菌株 DSM 1800，

b)具有可以与 *Humicola insolens* 菌株 DSM 1800 角质酶序列对比的氨基酸序列，或

c)具有与 *Humicola insolens* 菌株 DSM 1800 角质酶至少有 50%的同源性，具体为至少 70%同源性，更具体为至少 80%同源性的氨基酸序列。

23.一种酶水解对苯二甲酸亚乙酯的环状寡聚物的方法，其包括用亲代真菌角质酶的变体处理环状寡聚物，其中所述变体包括一个或多个相应如下位点的氨基酸残基的取代：*Humicola insolens* 角质酶的 A4，G8，A16，T29，V38，N44，S48，H49，L66，A88，N91，S116，S119，G120，A130，Q139，T164，T166，L167，I168，I169，L174，I178 或 R189(*H. insolens* 角质酶编号)。

24.前述权利要求的方法，其中的环状寡聚物为环三(对苯二甲酸亚乙酯)。

25.权利要求 23 或 24 的方法，其中的处理在 55℃以上进行。

26.权利要求 23-25 的任一项所述方法，其中的环状寡聚物出现在含聚酯的织品或纱的纤维中。

27.权利要求 23-26 的任一项所述方法，其进一步包括随后的漂洗织品或纱，特别是用 pH 值范围在约 7-约 11 的水溶液漂洗。

28.一种改善含 PET 纱或织品的功能性整理剂的方法，包括

a)用亲代真菌角质酶变体处理纱或织品，其变体包括相应如下位点的一个或多个氨基酸残基的取代：*Humicola insolens* 角质酶的 A4，G8，A16，T29，V38，N44，S48，H49，L66，A88，N91，S116，S119，G120，A130，Q139，T164，T166，L167，I168，I169，L174，I178 或 R179(*H. insolens* 的角质酶编号)，和

b)用选自软化剂，防皱树脂，抗静电剂，抗污染剂的整理剂处理纱或织品。

29.一种聚酯织品或纱染色的方法，包括：

a)使用在 pH8.5 的条件下，热变性温度为 65℃或高于 65℃的角质酶处理织物或纱；和

b)用活性染料或分散染料对处理过的织品进行染色。

30.前述权利要求的方法，其中角质酶是亲代真菌角质酶的变体，所述变体包括相应如下位点的一个或多个氨基酸残基的取代：*Humicola insolens*角质酶的A4，G8，A16，T29，V38，N44，S48，H49，L66，A88，N91，S116，S119，G120，A130，Q139，T164，T166，L167，I168，I169，L174，I178或R179(*H. insolens*角质酶编号)。

31.一种去污剂组合物，包括表面活性剂和权利要求1-13任一项所述的变体。

32.一种真菌角质酶，其在N末端有一肽段延伸AAVDSNHTPAVPELVAR (SEQ ID NO: 2)。

# 角质酶变体

## 发明领域

本发明涉及角质酶(cutinase)变体，更具体的涉及热稳定性改善的角质酶变体。本发明还涉及编码该变体的 DNA 序列，包含所述 DNA 序列的载体，携带所述 DNA 序列或所述载体的转化宿主细胞，还涉及制备所述变体的方法，和所述变体的用途。

## 发明背景

角质酶是可以水解底物角质的脂解酶(lipolytic enzyme)。已知角质酶来自不同的真菌(P.E. Kolattukudy 在 “Lipases”, Ed.B. Borgström and H.L. Brockman, Elsevier 1984, 471-504)。*Fusarium solani pisi* 角质酶的氨基酸序列和晶体结构已经被描述(S.Longhi et al., Journal of Molecular Biology, 268(4), 779-779 (1997))。已经公开了 *Humicola insolens* 角质酶的氨基酸序列 (US 5,827,719)。

许多 *Fusarium solani pisi* 角质酶的变体已经被公开: WO 94/14963; WO 94/14964; WO 00/05389; Appl. Environm. Microbiol. 64, 2794-2799, 1998; Proteins: Structure, Function and Genetics 26, 442-458, 1996; J. of Computational Chemistry 17, 1783-1803, 1996; Protein Engineering 6, 157-165,1993; Protein: Structure, Function, and Genetics 33, 253-264,1998; J.of Biotechnology 66,11-26,1998; Biochemistry 35,398-410,1996; Chemistry and Physics of Lipids 97,181-191,1999; Proteins: Structure, Function and Genetics 31,320-333,1998; Biochimica et Biophysica Acta 1441,185-196,1999; Appl. Environm. Microbiol. 64,316-324, 1998; BioTechniques 27,1102-1108,1999。

真菌角质酶可以用在聚(对苯二甲酸乙二酯)(poly (ethylene terephthalate))的环状寡聚体(cyclic oligomers)的酶水解上，例如在自聚(对苯二甲酸乙二酯)

纤维(WO 97/27237)的纱或织品整理(finishing)中应用。期望改善真菌角质酶的热稳定性以允许有更高的处理温度。

发明概述

本发明人已经发现某些真菌角质酶的变体有改善的热稳定性。所述变体包括在如下位点的一个或多个氨基酸残基的取代, Q1, L2, A4, G8, S11, N15, A16, T29, V38, N44, S48, H49, L66, A88, N91, S116, S119, G120, A130, Q139, T164, T166, L167, I168, I169, L174, I178, R189 和/或 N 末端延伸 AAVDSNHTPAVPELVAR(SEQ ID NO: 2)。这些变体还可选择地包括在其它位点的额外改变。

本发明还提供了编码本发明变体的 DNA 序列, 包含此 DNA 序列的表达载体, 携带该 DNA 序列或表达载体的转化宿主细胞, 一种制备所述变体的方法, 以及应用该变体的方法和包含该变体的去污剂组合物。

本发明还提供了一种制备角质酶变体的方法, 所述方法是通过在一个或多个指示位点或包含这样位点的区域引入氨基酸的改变(取代, 缺失或插入), 并且筛选热稳定性改善的变体而进行的。所述氨基酸的改变可以由例如定位随机突变(localized random mutagenesis)或定点诱变而产生。

发明详述

真菌角质酶

亲代酶是根据酶命名法(在 http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme 中可得到)被分类为 EC 3.1.1.74 的角质酶。它是一种真菌角质酶, 诸如丝状真菌角质酶, 例如来自腐质霉属或镰孢属菌株, 具体为 *H. insolens* 或腐皮镰孢 *pisi*, 更具体为 *H. insolens* 菌株 DSM 1800。

SEQ ID NO: 1 显示了 *Humicola insolens* 菌株 DSM1800 的角质酶氨基酸序列(成熟肽)和本文对 *Humicola insolens* 角质酶所用的编号系统。该氨基酸序列和编码它的 DNA 序列以前公布为 US 5,827,719 的 SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 1。

*Fusarium solani pisi* 角质酶的氨基酸序列如 WO 94/14964 的图 1D 中的成熟肽所示。本文对 *Fusarium solani pisi* 角质酶所用的编号系统是 WO

94/14964 中所用的；它包括所述图 1D 中的前体序列(pro-sequence)；所以成熟角质酶在位点 16-215。

所述亲代角质酶与 *Humicola insolens* 菌株 DSM 1800 角质酶有至少 50%(特别是至少 70%或至少 80%)同源性的氨基酸序列。更具体地，该亲代角质酶是可与 *Humicola insolens* 菌株 DSM1800 角质酶序列对比的。

氨基酸和其改变的命名法

说明书与权利要求书中在提到氨基酸时使用它们的单字母密码。序列中特定的氨基酸用其单字母编码和其位置来确定，例如，Q1 表示 Gln(谷氨酸在位置 1，即，在 N 末端)。

本文用来定义取代的命名法以 WO 92/05249 中所述的命名法为基础。所以，S11T 表示在位点 11 用 T(Thr)来取代 S(ser)。Q1C/L 表示用 C(Cys)或 L(Leu)取代 Q(Gln)。

同源性与序列对比

为了本发明的目的，同源性(同一性)的程度可根据 Needleman, S.B. and Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48, 443-45 中描述的方法来适当的测定，并且遵循以下的肽段序列比较设定：GAP 生成罚分值(creation penalty)为 3.0，GAP 延伸罚分值为 0.1。同源性的测定可用例如 GCG 软件包(Program Manual for the Wisconsin Package，第八版，1994 年八月，Genetics，Computer Group，575 Sciences Drive，Madison，Wisconsin，USA 53711)中提供的 GAP 计算机程序来进行。

两个给出的序列可以根据 Neddleman(同上)中描述的方法，使用相同的参数来进行序列对比。这些可以通过 GAP 程序(同上)完成。

亲代角质酶和角质酶变体间的同源性可以高于 80%，例如，高于 85%或 90%，尤其是高于 95%。

特定的取代

变体尤其包括相应于下面 *Humicola insolens* 角质酶中(*Humicola insolens* 角质酶的编号)的一个或多个取代：Q1C/L, L2K/Q/V, A4V, G8D, S11T, N15D, A16T, T29C/I/M, V38H, N44D, S48E/K, H49Y, L66I, A88H/L/V,

N91H, S116K, S119P, G120D, A130V, Q139R, T164S, T166M/I, L167P, I168F, I169A/G/T/V, L174F, I178V 和/或 R189A/H/V。

更具体地，角质酶变体可包括如下所述取代或取代的组合:

| |
|---|
| S48E +A88H +N91H +R189V |
| Q1L+L2K+G8D+N15D |
| N44D +A130V |
| Q1C+L2V+G120D |
| A88L +R189A |
| S48E +L66I+A88L+I169A+R189H |
| A88V+S116K+S119P+Q139R+I169V+R189V |
| A88V+R189A |
| S48K +A88H +I169G+R189H |
| Q1L+L2Q+A4V+S11T |
| T164S |
| L174F |
| H49Y |
| Q1L +L2K +G8D +N15D +S48E +A88H +N91 H +R189V |
| Q1L +L2K +G8D +N15D+N44D+A130V |
| Q1L +L2K +G8D +N15D +S48E +A88H +N91 H +A130V +R189V |
| G8D+N15D+A16T |
| A130V |
| Q1C+L2V |
| G8D +N15D +S48E +A88H +N91 H +A130V +R189V |
| G8D +N15D +T29M +S48E +A88H +N91H +A130V +R189V |
| G8D +N15D +T291 +S48E +A88H +N91H +A130V +R189V |
| G8D +N15D +T29C +S48E +A88H +N91H +A130V+R189V |
| G8D +N15D +S48E +A88H +N91H +A130V +L174F +1178V +R189V |
| G8D +N15D +S48E +A88H +N91H+A130V+T166M+I168F+R189V |
| G8D +N15D +S48E +A88H +N91H+A130V+T166I+L167P+R189V |
| G8D +N15D +V38H +S48E +A88H +N91H+A130V+I169T + R189V |

| |
|---|
| G8D +N15D +V38H +S48E +A88H +N91H +A130V +R189V |
| G8D +N15D +T29M +S48E +A88H +N91H +A130V +T1661+L167P +R189V |

可选的取代

除了上面描述的取代，该角质酶变体还可选择的包括一个或多个其它氨基酸的改变，尤其是相应于下面 *Humicola insolens* 角质酶中(*Humicola insolens* 角质酶的编号)的一个或多个氨基酸残基的取代：Q1，L2，E6，E10，S11，A14，N15，F24，L46，E47，R51，D63，L138 和/或 E179，更具体地，有相应如下的一个或多个取代：Q1P，L2V，E6Q，E10Q，S11C，A14P，N15T，F24Y，L46I，E47K，R51P，D63N，L138I 和/或 E179Q。

更具体地，角质酶变体还可包括如下取代或取代的组合：

R51P

E6N/Q+ L1381

A14P+ E47K

E47K

E179N/Q

E6N/Q+ E47K+ R51P

A14P+ E47K+ E179N/Q

E47K+ E179N/Q

E47K+ D63N

E6N/Q+ E10N/Q+ A14P+ E47K+ R51P+ E179N/Q

E6N/Q+ A14P+ E47K+ R51P+ E179N/Q

Q1P+ L2V+ S11C+ N15T+ F24Y+ L461+ E47K

角质酶变体的用途

本发明的角质酶变体可以用来，例如，酶水解聚对苯二甲酸乙二酯环状寡聚体，例如环状三聚对苯二甲酸亚乙酯(cyclic tri(ethylene terephthalate))，简称 c3ET。

尤其是，本发明可以通过用角质酶处理织品或纱，来去除含聚酯的织品或纱中的所述环状寡聚体，任选地，然后还可用 pH 值在约 7 到约 11 范围内的水溶液冲洗。对聚酯的处理可以在高于 c3ET 的玻璃化转变(glass

transition)温度(约 55℃)而低于聚酯的玻璃化转变温度(约 70℃)的条件下进行。该方法可以参考 WO 97/27237 进行。

所述角质酶变体可以用来处理含聚酯的纺织品，例如，PET(乙二醇和对苯二酸的聚合物)，P3GT(1，3 丙二醇和对苯二酸的聚合物)或聚酯/棉混合物。这种处理对聚酯纺织品有好处，例如，耐磨损度增加，更加舒适，透水性增加，抗静电(reduced antistatic behavior)，改善手感和柔软度，改变再沉积特性和/或颜色澄清(color clarification)。

通过用该角质酶变体处理，所述角质酶变体可以用于改善对含 PET 的纱或纺织品的功能性整理，然后再加入整理剂(finishing agent)，例如，软化剂(softener)，抗皱树脂，抗静电剂，抗油剂，或能赋予(impair)无皱褶(wrinkle free)，永久紧缩，防火(permannene press ior fire resistance)等效果的试剂。用角质酶变体进行处理可以增加表面的官能团的数量，可以用以附着功能性整理剂。修饰剂的实例在由 Nihon Seni Sentaa KK 在 1998-10-15 出版的 “SENSHOKUSIAGEKAKO BENRAN” 中描述。

本发明所述角质酶变体还可用在去污剂中，可将其整合用来增加去除脂肪污的作用，例如 WO 94/03578 和 WO 94/14964 中所述。在洗涤去污剂中添加角质酶变体可以去除衣物经多次洗/穿循环所积累的恶臭。

本角质酶变体还可用于降解和回收聚酯，例如聚己酸丙酯(PCL)，聚-乙二醇-对苯二酸(PET)，聚乳酸，聚丁烯琥珀酸酯(polybutylene succinate)，和聚(羟基丁酸)合(羟基戊酸)，例如，胶片和瓶子，例如，JP-A 5-344897 中所述。

角质酶变体还可用于其它已知的脂肪酶和角质酶的应用中，例如，烘烤工业(例如 WO 94/04035 和 EP 585988 中所述)，造纸工业(如去除树脂(pitch removal)见 EP 374700)，和皮革，毛织品或相关工业(如动物皮革，羊皮革或羊毛的去脂)，和其它涉及到去脂/去油的应用。它还可在油脂工业中以固定化形式使用，作为有机合成的催化剂(如，酯化作用，酯基转移或酯水解反应)。

聚酯染色

本发明提供了一种对聚酯织品或纱(yarn)进行染色的方法。该方法中，先用角质酶处理织品或纱，例如，在 50-70℃或 65-70℃，pH7-10 的条件下

处理 12-48 小时，然后用染料染色，例如，活性染料，分散染料或阳离子染料。所述活性染料可以是一种可与 OH 或 COOH 基团反应的染料，例如，具有生色团(chromophore)-NHPh-$SO_2CH_2CH_2OSO_3Na$ 结构。染色可以在 40-80℃条件下进行，例如，染色 20-60 分钟。

所述角质酶可以是热稳定角质酶，其热变性温度 Td，在 pH 8.5 至少高出亲代角质酶 5℃，例如，高出 7-10℃，例如一个 65℃或更高的值。可通过说明书中实施例所描述的 DSC 方法进行测量。

表面活性剂

在处理织品或纱的时候，可以使用常规湿润剂和/或分散剂来改善与酶的接触。湿润剂可以是非离子型表面活性剂，例如，乙氧基脂肪醇。非常有用的湿润剂是乙氧基(ethoxylated)和丙氧基脂肪酸酯如 Berol 087(Akzo Nobel 产品，瑞典)。

分散剂可以适当选自非离子的，阴离子的，阳离子的，两性电解质的或两性离子的表面活性剂。更具体的，分散剂可以选自羧甲基纤维素，羟丙基纤维素，烷基芳基磺化物，长链醇硫酸盐(sulfates)(一级和二级的烷基硫酸盐)，磺化石蜡，硫酸化甘油单脂肪酸酯，硫酸化醚，磺酸琥珀酸盐，磺酸化甲醚，链烷磺酸盐(alkane sulfonates)，磷酸酯，烷基 isothionates，acylsarcosides，烷基牛磺酸盐，氟化物表面活性剂(fluorosurfactants)，脂肪醇和烷基苯酚缩合物(condensates)，脂肪酸缩合物，乙烯氧化物和胺的缩合物，乙烯氧化物和酰胺的缩合物，蔗糖酯，山梨糖酯，alkyloamides，脂肪胺氧化物，乙氧基化一元胺，乙氧基化二元胺，脂肪醇乙氧基化物和它们的混合物。一个非常有用的分散剂是脂肪醇乙氧基化物(alcohol ethoxylate)，例如 Berol 08(Akzo Nobel 产品，瑞典)。

制备角质酶变体的方法

本发明的角质酶变体可以用本领域已知的方法制备，例如，WO 94/14963 或 WO 94/14964(Unilever)中所描述。下面描述了克隆角质酶编码 DNA 序列的方法，然后是在角质酶编码序列的特定位点产生突变的方法。

编码角质酶的 DNA 序列的克隆

利用本领域所熟知的各种方法，编码亲代角质酶的 DNA 序列可以从任意一种产生所述角质酶的细胞或微生物中分离。首先，用产生所述角质酶的生物的染色体 DNA 或信使 RNA 来构建基因组 DNA 和/或 cDNA 文库。然后，例如果该角质酶的氨基酸序列已知，合成标记的寡核苷酸探针，用它从上面所述生物的基因组文库中鉴定出编码角质酶的克隆。或者，低严紧度的杂交和洗脱条件下，还可选择用包含与另一已知的角质酶基因具有序列同源的标记寡核苷酸探针来鉴定编码角质酶的克隆。

还有一种鉴定编码角质酶克隆的方法是把基因组 DNA 片断插入表达载体，例如质粒，用得到的基因组 DNA 文库转化角质酶阴性细菌，然后把转化过的菌在含有角质酶底物(即麦芽糖)的琼脂上涂板，以使表达角质酶的克隆能被鉴定出来。

或者，编码所述酶的 DNA 序列可以用已确定的标准方法来合成制备，例如，用 S.L. Beaucage 和 M.H. Caruthers, (1981), Tetrahedron Letters 22, p. 1859-1869 中描述的 phosphoroamidite 法，或 Matthes et al. (1984), EMBO J. 3, p. 801－805 中描述的方法。在 phosphoroamidite 中，寡核苷酸的合成是在 DNA 自动合成仪中合成，纯化，退火，连接和克隆在合适的载体中进行。

最后，应用标准技术，DNA 序列可以是来自基因组和合成的混合来源，合成物和 cDNA 的混合来源或基因组和 cDNA 的混合来源，通过连接合成的，基因组，cDNA 来源的片断来制备(合适地，相应于整个 DNA 序列的各部分片断)。DNA 序列还可以用特异引物，经聚合酶链式反应(PCR)制备，例如，如 US 4,683,202 或 R.K. Saiki et al., (1988), Science 239, 1988, pp. 487-491 中描述。

角质酶变体的构建

角质酶变体可以用在选定位点进行定点诱变或局部随机诱变得到，即在亲代角质酶的选定位点或区域引入随机的氨基酸残基，例如，WO 95/22615 中描述的。更优选的方法使用掺杂的(doped)的或掺加的(spiked)寡核苷酸来进行突变。

选定的位点可以是上面说的一个或多个位点，选定的区域可以是包含一个或多个这样位点的区域。下面是一些特例:

A. 掺加的寡改组(oligo shuffling) :

文库(Library S1 : 44,46,48,51,55
文库 S2: 48,66,88,91,119,169,189
文库 S3: 26,66,70,139,167,168,169,174
文库 S4: 4,5,6,33,34
文库 S5: 6,7,8,9,55,56,57

B. 掺杂的文库:

文库 1: 42-52
文库 2: 59-77
文库 3: 116-122
文库 4: 1-16
文库 5: 69,70,73
文库 6: 140-145
文库 7: 161,162,164-174

定点诱变

当角质酶编码 DNA 序列被分离出来，并且希望突变的位点鉴定出后，就可以用合成的寡核苷酸引入突变。这些寡核苷酸包括侧接希望突变的位点的核苷酸序列。用一种具体的方法，在携带所述角质酶基因的载体中产生 DNA 的一个单链缺口，所述 DNA 为角质酶编码序列。然后，携带所希望的突变的合成核苷酸，被退火到所述单链 DNA 的同源部分。余下的缺口被 DNA 聚合酶 I (Klenow 片断)补齐，用 T4 连接酶连接该构建体。所述方法的以特定实例在 Morinaga et al., (1984), Biotechnology 2, p. 646-639 中描述。US 4,760,025 公开了通过盒(cassette)的微量变化来引入编码多突变的寡核苷酸。然而，用 Morinaga 方法可以在任意一次引入有更大多样性的突变，因为一个很大数量的不同长度的寡核苷酸可以被引入。

另一种在角质酶编码 DNA 序列中引入突变的方法在 Nelson 和 Long, (1989), Analytical Biochemistry 180, p. 147-151 中描述。它涉及到产生包括所希望的突变的 PCR 片断 3 个步骤，其中的突变是在 PCR 反应中用化学合成的 DNA 链作为一个引物而引入的。携带突变的 DNA 片断可以用限制性内切酶切割而分离，然后再重新插入表达质粒中。

角质酶变体的表达

根据本发明，用上述方法或其它本领域所任何可选择的方法得到的编码所述变体的 DNA 序列，可以利用表达载体，以酶的形式表达，其中所述表达载体典型的包括编码启动子，操纵子，核糖体结合位点，翻译起始信号，还可以选择的包括抑制基因或不同的激活基因的控制序列。

表达载体

携带编码本发明角质酶变体的重组表达载体可以是任意一种能方便的进行重组 DNA 方法的载体，它的选择常常要取决于它所要引入的宿主细胞。这个载体可以是一种当引入到宿主细胞时，就整合入宿主细胞的基因组，然后随着所整合的染色体一同进行复制的载体。合适的表达载体实例包括 pMT838。

启动子

在载体中，该 DNA 序列必须可操纵的与合适的启动子序列相连。所述启动子可以是任何在所选宿主细胞中显示出转录活性的 DNA 序列，并且可以衍生自编码与宿主细胞同源或异源的蛋白的基因。

可指导本发明的编码角质酶变体 DNA 序列进行转录的合适的启动子，尤其是在以细菌为宿主时，是大肠杆菌的 *lac* 操纵子的启动子，天蓝色链霉菌(*Streptomyces coliclor*)的琼脂水解酶(agarase)基因 *dagA* 启动子，地衣形芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)的α-淀粉酶(*amyL*)启动子，嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearotherophilus*)的麦芽淀粉酶基因(*amyM*)启动子，解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)α-淀粉酶(*amyQ*)启动子，枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的 xylA 和 xylB 基因启动子等等。在真菌宿主中转录时，有用的启动子的实施例是那些衍生自编码米曲霉(*A. oryzae*)的 TAKA 淀粉酶，酿酒酵母(*S. cerevisiae*)的 TPI(丙糖磷酸异构酶)启动子(Alber et al. (1982), J. Mol. Appl. Genet 1, p. 419-434, R)，米赫根毛霉的天冬氨酸蛋白酶启动子，黑色曲霉(*A. niger*)中性α-淀粉酶启动子，黑曲霉酸稳定α-淀粉酶启动子，黑曲霉葡糖淀粉酶启动子，米赫根毛霉脂酶启动子，米曲霉碱性蛋白酶启动子，米曲霉丙糖磷酸异构酶启动子或构巢曲酶(*A. nidulans*)乙酰胺酶启动子的基因。

表达载体

本发明的表达载体还包括合适的转录终止子，和在真核细胞中，与本发明的编码α-淀粉酶的 DNA 序列可操纵连接的聚腺苷酸化序列。终止和聚腺苷酸序列可以适合的衍生自与启动子有相同的来源。

所用载体还可以包括一段可以让载体在所讨论的宿主细胞中复制的 DNA 序列。这样序列的实施例有质粒 pUC19，pACYC177，pUB110，pE194，pAMB1 和 pIJ702 的复制起始位点。

所用载体还可包括一个选择性标记，例如，基因，其产物补充了宿主细胞的缺陷，例如枯草芽孢杆菌或地衣形芽孢杆菌的 dal 基因，或带来对抗生素的抗性，例如氨苄青霉素，卡那霉素，氯霉素或四环素抗性。此外，所用载体可包含曲霉属(*Aspergillus*)选择标记，例如 amdS，argB，niaD 和 sC，带来潮霉素抗性的标记，或用共转化来实现的选择，例如 WO 91/17243 中所述。

本方法分别用来连接编码角质酶变体的本发明 DNA 构建体，启动子，终止子，和其它元件，与把它们插入到合适的具有复制所必需的信息的载体中，这些都是本领域技术人员所熟知的(比较，例如，Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, 1989)。

宿主细胞

本发明所用宿主细胞，其包括本发明的 DNA 构建体或如上所定义的表达载体，被方便的用作本发明角质酶变体的重组产生的宿主细胞。该细胞可以很方便的通过整合 DNA 构建体(一拷贝或多拷贝)到宿主染色体中，而被本发明编码变体的 DNA 构建体所转化。这种整合一般被认为是有利的，因为这样所述 DNA 序列在所述细胞中更可能被稳定的维持。将所述 DNA 构建体整合到宿主染色体中，可以按照常规的方法进行，例如，用同源或异源重组。或者，所述细胞还可以根据宿主细胞类型的不同，用上面所述的表达载体来转化。

本发明所述细胞可以是高等生物体的细胞，例如，哺乳动物或昆虫的细胞，尤其是微生物细胞，例如，细菌或真菌(包括酵母)的细胞。

合适的细菌的实施例有，革兰氏阳性菌如枯草芽孢杆菌，地衣芽孢杆

菌，缓慢芽孢杆菌(*Bacillus lentus*)，短芽孢杆菌(*Bacillus brevis*)，嗜热脂肪芽孢杆菌，*Bacillus alkalophilus*，解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)，凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)，环状芽孢杆菌(*Bacillus circulans*)，灿烂芽孢杆菌(*Bacillus lautus*)，巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)，苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*)，或变青链霉菌(*Streptomyces lividans*)或鼠灰链霉菌(*Streptomyces murinus*)，或革兰氏阴性菌例如大肠杆菌。细菌的转化可以例如，按照熟知的方法用原生质或感受态细胞实现。

酵母有机体优先选自糖酵母属(*Saccharomyces*)或裂殖糖酵母属(*Schizos -accharomyces*)菌株中选择，例如啤酒糖酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。

宿主细胞还可以是丝状真菌，例如菌株选自曲霉属(*Aspergillus*)，尤其是米曲霉或黑色曲霉，或镰孢属(*Fusarium*)的菌株，例如尖孢镰孢(*Fusarium oxysporum*)，禾谷镰孢(*Fusarium graminearum*)(在 *perfect state*叫玉蜀黍赤霉，还曾叫 *Sphaeria zeae*，也称 *Gibberella roseum*和 *Gibberella roseum f.sp.cerealis*)或硫色镰孢(*Fusarium Sulphureum*)(在 *perfect state*叫 *Gibberella puricaris*，也叫 *Fusarium trichothecioides*，杆孢状镰孢(*Fusarium bactridioides*)，接骨木镰孢(*Fusarium sambucinum*)，玫瑰色镰孢(*Fusarium roseum*)，与玫瑰色镰孢 *var. graminearum*)，*Fusarium cerealis* (也叫 *Fusarium crokkwellense*)，或 *Fusarium venenatum*的菌株。

在本发明特定的实施方案中，宿主细胞是蛋白酶缺陷型或蛋白酶 minus strain。

上述可以是例如的蛋白酶缺陷型菌株米曲霉 JaL125，缺失了称作“alp”的碱性蛋白酶基因。该菌株在 WO 97/35956(Novo Nordisk)中描述。

丝状真菌细胞的转化可通过本领域已知的涉及到原生质的形成和其转化，然后进行细胞壁的再生的方法进行。利用曲霉属作宿主微生物在 EP 238 023(Novo Nordisk A/S)中有所描述，在此引入用作参考。

通过培养转化体制备角质酶变体

本发明尤其涉及一种制备本发明角质酶变体的方法，所述方法包括在易于制备所述变体的条件下培养宿主细胞，和从细胞和/或培养基中回收该变体。

用来培养细胞的培养基可以是常规的，适合所述的细胞生长并能得到本发明角质酶变体表达的任何培养基。合适的培养基可以从供应商处得到，或根据公开的配方制备(例如，American Type Culture Collection 的目录中所述)。

宿主细胞中分泌的角质酶变体，通过熟知的方法可以很方便的从培养基中回收，包括用离心或过滤将细胞从培养基上分离，通过盐，例如硫酸铵，沉淀培养基中的蛋白成份，然后使用层析方法，例如离子交换层析，亲和层析等。

在植物中表达变体

本发明还涉及到转基因植物，植物部分或植物细胞，其是被编码本发明变体的 DNA 序列所转化，以使所述酶的表达与制备达到一个可回收的数量。酶可以从植物或植物部分中回收。或者，包含重组酶的植物或植物部分可以同样的被应用。

所述转基因植物可以是双子叶的，或是单子叶的，简写为 dicot 或 momocot。单子叶植物的实例有草，例如牧场草(禾本科，bluegrass ,Poa)，饲料草，例如 festuca，lolium，温带草，例如翦股颖，禾谷类，例如小麦，燕麦，黑麦，大麦，水稻，高粱和玉米。

双子叶植物的实施例有烟草，豆类，例如羽扇豆，马铃薯，甜菜，豌豆，豆(bean)，大豆，和十字花科(家种的菜)，例如，花椰菜，菜籽油菜，和亲缘关系很近的模式生物拟南芥(Arabidopsis thaliana)。

植物部分的实施例有茎，愈伤组织，叶，根，果实，种子，和块茎。在本文中，还有一些特定的植物组织，例如叶绿体，质外体，线粒体，液泡，过氧化物酶体和细胞质，也被认为是植物部分。此外，任何植物细胞，无论其组织来源，也被认为是植物部分。

本发明的范围还包括这些植物，植物部分和植物细胞的后代。

表达本发明变体的转基因植物和植物细胞可以按照本领域已知的方法构建。简而言之，植物或植物细胞通过一个或多个编码本发明所述酶的表

达构建体整合到该植物宿主基因组中，然后增殖所得到的修饰过的植物或植物细胞，使它们成为转基因植物或植物细胞而得以构建。

便利地，所述表达构建体是包括编码本发明酶基因的 DNA 构建体，其可操纵地与在选择的植物或植物细胞中表达该酶基因所需要之合适的调控序列相连接。此外，该表达构建体可以包含选择性标记，所述选择性标记可用于鉴定整合了表达构建体的宿主细胞和将构建体导入所述植物中所必需的 DNA 序列(后者取决于所用的导入 DNA 的方法)。

调控序列，例如启动子和终止子序列和其它任选的信号或转运(transit)序列的选择的决定，例如是以希望酶何时，何处，怎么表达为基础的。例如，编码所述发明酶基因的表达可以是组成型的，诱导型的，或发育，时期或组织特异性的，并且基因产物可以靶向特定的组织或植物部分，例如种子或叶中。调控序列在 Tague et al, Plant, Phys., 86, 506, 1988 中有描述。

组成型表达可以应用 35S-CaMV 启动子(Franck et al., 1980. Cell 21: 285-294)。器官特异性启动子可以是例如用来自贮藏组织(storage sink tissue)，例如种子，马铃薯块茎，果实的(Edwards & Coruzzi, 1990. Annu. Rev. Genet. 24: 275-303)，或来自代谢库组织(metabolic sink tissue)，例如分生组织的(Ito et al., 1994. Plant Mol. Biol. 24: 863-878)，种子特异性启动子例如来自水稻的谷蛋白，醇溶谷蛋白，球蛋白或清蛋白启动子(Wu et al., Plant and Cell Physiology Vol. 39, No. 8 pp. 885-889 (1998))，蚕豆(*vicia faba*)的 B4 豆球蛋白的启动子和由 Conrad U. et al, Journal of Plant Physiology Vol. 152, No. 6 pp. 708-711(1998)中所述的蚕豆的未知种子蛋白基因，和来自种子油体(seed oil body)蛋白的启动子(Chen et al., Plant and Cell Physiology vol. 39, No. 9 pp. 935-941 (1998))，来自欧洲油菜(Brassica napus)的贮藏蛋白 napA 启动子，或其它本领域已知的种子特异性启动子，例如 WO 91/14772 中所描述的。此外，启动子可以是叶特异性的启动子，例如来自水稻和番茄的 rbcs 启动子(Kyozuka et al., Plant Physiology vol. 102, No. 3 pp. 991-1000 (1993))，小球藻病毒腺嘌呤甲基转移酶启动子(Mitra, A. and Higgins, DW, Plant Molecular Biology Vol. 26, No. 1 pp. 85-93 (1994))，或来自水稻的 aldP 基因启动子(Kagaya et al., Molecular and General Genetics

Vol. 248, No. 6 pp. 668-674 (1995))，或创伤诱导(wound inducible)启动子例如马铃薯 pin2 启动子(Xu et al., Plant Molecular Biology Vol. 22, No. 4 pp. 573-588 (1993))。

启动子增强子元件可以用来实现酶在植物中的较高表达。例如，所述启动子增强子元件可以是位于启动子和编码酶的核苷酸序列之间的内含子。例如，Xu et al., *op cit* 公开了用来促进表达的水稻 actin 1 基因的第一个内含子。

选择性标记基因和表达构建体的其它任何部分可以从本领域可得到那些中选取。

将 DNA 构建体用所述领域熟知的常规技术整合到植物基因组中，包括农杆菌属介导的转化，病毒介导的转化，微注射，粒子轰击，基因枪转化(blolistic transformation)，电穿孔(Gasser et al., Sciences, 244, 1293; Potrykus, Bio/Techn. 8, 535, 1990; Shimamoto et al., Nature, 338, 274, 1989)。

目前，产生转基因双子叶植物的方法是选用根癌土壤杆菌介导的基因转移(参看 Hooykas & Schilperoort, 1992. Plant Mol. Biol. 19: 15-38)，虽然这个方法也可用来转化单子叶植物，然而对于这些植物，通常其它转化方法是优选的。目前，用来产生转基因单子叶植物的方法选择粒子轰击(用要转化的 DNA 包被微小的金或钨颗粒)胚愈伤组织或发育的胚芽(Christou, 1992. Plant J. 2: 275-281; Shimamoto, 1994. Curr. Opin. Biotechnol. 5: 158-162; Vasil et al., 1992 Bio/Technology 10: 667-674)。另一种转化单子叶植物的方法基于原生质转化，例如 Omirulleh S, et al., Plant Molecular Biology Vol. 21, No. 3 pp. 415-428(1993)中所述。

转化以后，根据本领域所熟知的方法筛选整合了表达构建体的转化体，并再生成整株植物。

材料与方法

菌株和质粒

大肠杆菌 DH12S(来源于 Gibco BRL)用与酵母质粒拯救(rescue)。

大肠杆菌 JM110(来源于 Toyobo K.K., Japan)用来制备重组质粒。

pJSO026 是酿酒酵母的表达质粒，描述于 WO 97/07205 和 J.S.Okkels, (1996)中，pYES 载体的 A URA3 启动子的缺失增加真菌脂肪酶在啤酒糖酵母中的表达水平。重组 DNA 生物技术 III: The Integration of Biological and Engineering Sciences, vol. 782 of the Annals of the New York Academy of Sciences)。

pJC039 是酵母和大肠杆菌的穿梭质粒，用于表达“参考(reference)”角质酶变体，在 TPI 启动子控制的实施例中有所描述，其构建自 pSJ0026。

啤酒糖酵母 YNG318: MATa Dpep4[cir+] ura3-52, leu2-D2, his 4-539 用作构建酵母文库和 *H. insolens* 的角质酶表达。其在 J. Biol. Chem. 272 (15), 9720-9727, 1997 中描述。

培养基与底物

SC-葡萄糖

| | |
|---|---|
| 100ml/L | 20%葡萄糖 |
| 4ml/L | 5%苏氨酸 |
| 10ml/L | 1%色氨酸 |
| 25ml/L | 20%酪蛋白氨基酸 |
| 100ml/L | 10X 基础溶液 |
| | 分别过滤灭菌 |

10X 基础溶液

| | |
|---|---|
| 66.8 g/L | 酵母氮源碱 w/o 氨基酸 |
| 100 g/L | 琥珀酸盐(succinate) |
| 60 g/L | NaOH |

YPD

| | |
|---|---|
| 20 g/L | 细菌蛋白胨(Bacto pepto) |
| 10 g/L | 酵母提取物 |

| | |
|---|---|
| 100 ml/L | 20%葡萄糖(分别灭菌) |

BETEB

对苯二酸二(2-羟乙基)酯二苯甲酰酯(Terephthdic acid bis(2-hydroxyethyl)ester dibenzoate)在这里简写为 BETEB(苯甲酰基-乙烯-对苯二酸-ethelene-苯甲酰酯)。它是由对苯二酸二(2-羟乙基)酯与苯甲酸制成。

BETEB 平板

| | |
|---|---|
| 100 ml/L | 500 mM 甘氨酸缓冲液(pH 8.5) |
| 1 g/L | BETEB(可溶于乙醇) |
| 30 g/L | 琼脂 |

PEG/LiAc 溶液

| | |
|---|---|
| 50 ml | 40%PEG4000(灭菌的) |
| 1 ml | 5M LiAc(灭菌的) |

Dop83-2 的核苷酸混合物(SEQ ID NO: 5):

1 (核苷酸 25): G 91 %, A 9 %
2 (核苷酸 26): G 96%, C 4%
3 (核苷酸 37) : G 92.5%, A 7.5%
4 (核苷酸 38): A 96%, C 4%
5 (核苷酸 39): G 0.5%, A 3.5%, T 96%
6 (核苷酸 40): G 96%, A 2%, T 2%
7 (核苷酸 41): A 4.5%, C 95.5%
8 (核苷酸 42): A 2.5%, T 97.5%
9 (核苷酸 43): G 92%, A 2.5%, T 3%, C 2.5%
10 (核苷酸 45): G 71.5%, A 1 %, T 27. 5%
11 (核苷酸 46): G 3.5%, A 2%, T 43%, C 51.5%
12 (核苷酸 47): T 93.5%, C 6.5%
13 (核苷酸 49): G 92%, A 2.5%, T 3%, C 2.5%

14 (核苷酸 51): G 71.5%, T 27. 5%, A 1%
15 (核苷酸 52): A 98%, C 2%
16 (核苷酸 53) : G2.5%, T 4.5%, C 93%
17 (核苷酸 54) : G 54.5%, A 9.5%, T 36%
18 (核苷酸 58) : G 2%, A 3.5%, T 94.5%
19 (核苷酸 59) : A 4%, T 91 %, C 5%
20 (核苷酸 61) : G 4.5%, T 95. 5%
21 (核苷酸 62): T95.5%, C 4.5 %
22 (核苷酸 63): G 98%, A 2%

**方法**

脂酶活性(LU)

用阿拉伯树胶作乳化剂乳化甘油三丁酸酯(甘油三丁酸酯)，来制备脂酶的底物。30℃，pH 为 7 时水解甘油三丁酸酯，然后进行 pH-stat 滴定试验。一单位的脂酶活性(1LU)等于在标准条件下，能够释放 1μml 丁酸/min 的酶的量。

初步筛选方法

1.将酵母文库涂布到 SC-葡萄糖平板上，在 30℃下温育 3 天。

2.通过应用绒布(velvet cloth)把菌复制到有硝酸(nitrate)滤膜的新的 SC-葡萄糖平板上，在 30℃温度下温育 1 天(或 20℃ O/W)。

3.将滤膜转移到预热的加/未加 50ppm 的 Avolan 的 0.1%BETEB 平板(pH 8.5)上。

4.加入 Avolan 的 BETEB 平板 70℃温育，并且 w/o Avolan 的在 73℃O/N。

5.除去滤膜，找到清晰区(zone)的酵母菌落。

6.从主平板上分离候选菌落，并接种到新的 SC-葡萄糖平板和 1mlYPD 培养基的 24 孔板上。

次级筛选的方法

1.在 30℃下，180rpm，培养 24 孔板的 YPD 培养基 2 天。

2.离心平板/或静置几小时。

3.把5μl和10μl的上清液加到BETEB平板有Avolan的孔中，再加两个没有Avolan的。

4.在60℃培养一个BETEB平板和加过Avolan的BETEB平板，其它BETEB平板在68℃，过夜。

5.检查清晰区的直径。

6.测定68℃或60℃的加有Avolan的保留有活性的上清液之LU活性。

7.调LU活性至10LU/ml，并如4)应用到BETEB平板。

8.检查清晰区的直径。

酵母文库的构建方法

1. 混合0.5μl载体(经Hind III-Xba I消化)和1μl的PCR片断。

2. 在冰上解冻YNG318感受态细胞。

3. 混合100μl所述细胞，DNA混合物和10μl载体DNA(Clontech)在Falcon 1058中。

4. 加入0.6mlPEG/LiAc溶液，温和地混合。

5. 30℃，200rpm，温育30分钟。

6. 42℃，温育15分钟(热激(heat shock))。

7. 转移到eppendorf管，离心5秒。

8. 除去上清，用3mlYPD溶解。

9. 30℃，30rpm，温育细胞悬浮液45分钟。

10.将悬浮液倒到SC-葡萄糖平板上，以得到 ca.300菌落/平板。

文库构建

通过SOE方法构建Dop文库在酵母重组后。

其它方法

■用来构建文库和亚克隆的大肠杆菌转化是用电穿孔(BIO-RAD Gene Pulser)。

■DNA质粒是用碱法制备(Molecular cloning, Cold Spring Harbor)或Qiagen®质粒试剂盒制得。

■从琼脂糖胶中回收 DNA 片断是用 Qiagen 胶提取试剂盒回收。

■PCR 是用 PTC-200 DNA Engine 完成。

■ABI PRISM™ 310 Genetic analyzer 用来测定所有的 DNA 序列。

■酵母的转化是用醋酸锂法完成。

■酵母总 DNA 是用 Robzyk 和 Kassir's 方法提取的，在 Nucleic acids research vol. 20, No14(1992) 3790 中描述。

■次级分析中的所有阳性菌落都是在 1mlYPD 中，30℃下温育过夜，以用来提取酵母总 DNA。所制备的 DNA 被导入大肠杆菌(*E. coli*)，分离大肠杆菌菌落并制备其质粒，以备序列测定和进一步评估。

## 实施例

### 实施例 1：通过掺杂(doping)构建角质酶变体

第一次 PCR 反应是用如下两对引物，620AM34(SEQ ID NO: 3)和 Dop2-R(SEQ ID NO: 4)，及 Dop83-2(具有如上所述核酸序列混合物的 SEQ ID NO: 5)和 680AM35(SEQ ID NO: 6)，在如下条件下进行的：

| | |
|---|---|
| 48.6μl | 水 |
| 33μl | 3.3X 反应缓冲液 |
| 4.4μl | 25mM MgOAc |
| 2μl | *rTth* 聚合酶(Perkin Elmer) |
| 8μl | 10mM dNTPs |
| 1μl x 2 | 100 pmol/μl 引物 |
| 1μl | 0.5μg/L 模版 |

| | | |
|---|---|---|
| 1 | 94℃ | 20 秒 |
| 2 | 94℃ | 15 秒 |
| 3 | 45℃ | 45 秒 |
| 4 | 72℃ | 30 秒+3 秒/循环 |
| | 2-4 | 50 次循环 |
| 5 | 72℃ | 10 分钟 |

得到的片断用胶纯化(gel-purified)，用作第二次 PCR 反应的模板。第二次 PCR 反应用 620(SEQ ID NO: 7)和 680(SEQ ID NO: 8)作为引物，反应条件如下。

| | |
|---|---|
| 38.2μl | 水 |
| 5μl | 10X 反应缓冲液 |
| 1μl | *Klen Taq LA* (CLONTECH) |
| 4μl | 10mM dNTPs |
| 0.4μl x 2 | 100 pmol/μl 引物 |
| 0.5μl x 2 | PCR 片断 |

| | | |
|---|---|---|
| 1 | 98℃ | 10 秒 |
| 2 | 68℃ | 90 秒 |
| 1-2 | 30 循环 | |
| 3 | 68℃ | 10 分钟 |

掺加寡改组文库(spiked oligo shuffling library)

掺入文库按照如下构建:

制备后面实施例中描述的参考变体的基因片断之 PCR 反应是用 *rTth* 聚合酶与引物 AM34(SEQ ID NO: 9)和 AM35(SEQ ID NO: 10)如上所述进行的，片断用胶纯化。

约 10 ug DNA/250μl 与 0.8μl DNaseI(Gibco BRL 18068-015)和 30μl 10X 缓冲液在 25℃温育 7-10 分钟。加入 EDTA 至终浓度为 10mM，停止反应。

大小正确的 DNA 片断(50-150bp)用 Whatman 玻璃滤器纯化。

然后在如下条件重装 DNase 处理过的片断。

| | |
|---|---|
| 0.2, 0.5 和 1pmol | DNase 处理过的模版 |
| 3, 6, 12X molar | 过量的每种诱变的寡核苷酸(oligo) |
| 1 珠粒 | Ready-to-go |
| 0.1μl | *Pwo* 聚合酶 |

| | |
|---|---|
| 终体积 25μl | |

| | | |
|---|---|---|
| 1 | 94℃ | 2 分钟 |
| 2 | 94℃ | 30 秒 |
| 3 | 45℃ | 30 秒 |
| 4 | 72℃ | 1 分钟 |
| 2-4 | 30 次循环 | |
| 5 | 72℃ | 5 分钟 |

用上面的 PCR 混合物为模板，在如下条件进行第二次 PCR:

| | |
|---|---|
| 0.2, 0.5, 1 和 2μl | 第一次 PCR 反应 |
| 2 珠粒 | Ready-to-go |
| 0.3μl | 100 pmol 引物 1 (AM34, SEQ ID NO: 9) |
| 0.3μl | 100 pmol 引物 2 (AM35, SEQ ID NO: 10) |
| 0.1μl | *Pwo* 聚合酶 |

| | | |
|---|---|---|
| 1 | 94℃ | 2 分钟 |
| 2 | 94℃ | 30 秒 |
| 3 | 55℃ | 30 秒 |
| 4 | 72℃ | 90 秒 |
| 2-4 | 25 次循环 | |
| 5 | 72℃ | 10 分钟 |

**实施例 2: 变体的热稳定性**

制备许多样品，每个样品包含 10LU/ml *H. insolens* 角质酶变体。将各样品 20μl 应用到 BETEB 平板的孔，平板在 68℃下温育过夜(14 小时)。在孔周围出现清晰区域，将其作为阳性结果。

将下面本发明的变体进行测试，用于对比的包括参考变体(不是基于所述发明)。

| | |
|---|---|
| 参考变体 | E6Q +A14P +E47K +R51P +E179Q |
| 本发明变体 | 参考 +S48E +A88H +N91H +R189V |
| | 参考 + (AAVDSNHTPAVPELVAR, SEQ ID NO: 2) +Q1L +L2K+G8D +N15D |
| | 参考 +N44D +A130V |
| | 参考 +Q1 C +L2V +G120D |
| | 参考 +A88L +R189A |
| | 参考 +S48E +L661 +A88L +1169A +R189H |
| | 参考 +A88V +S116K +S119P +Q139R +1169V +R189V |
| | 参考 +A88V +R189A |
| | 参考 +S48K +A88H +1169G +R189H |
| | 参考 +Q1 L +L2Q +A4V +S11T |
| | 参考 +T164S |
| | 参考 +L174F |
| | 参考 +H49Y |
| | 参考 + (AAVDSNHTPAVPELVAR, SEQ ID NO: 2) +Q1 L +L2K +G8D +N15D +S48E +A88H +N91H+R189V |
| | 参考 + (AAVDSNHTPAVPELVAR, SEQ ID NO: 2) +Q1L +L2K+G8D +N15D +N44D +A130V |
| | 参考 + (AAVDSNHTPAVPELVAR, SEQ ID NO : 2) +Q1L +L2K+G8D +N15D +N44D +S48E +A88H +N91 H +A130V +R189V |
| | 参考 +G8D +N15D +A16T |
| | 参考 +A130V |
| | 参考 +Q1 C +L2V |
| | 参考 +G8D +N15D +S48E +A88H +N91 H +A130V +R189V |
| | 参考 +G8D +N15D +T29M +S48E +A88H +N91H +A130V+R189V |
| | 参考 +G8D +N15D +T291 +S48E +A88H +N91H +A130V+R189V |
| | 参考 +G8D +N15D +T29C +S48E +A88H +N91 H +A130V+R189V |
| | 参考 +G8D +N15D +S48E +A88H +N91 H +A130V +L174F +1178V +R189V |
| | 参考 +G8D +N15D +S48E +A88H +N91 H +A130V +T166M |

| | |
|---|---|
| | +1168F +R189V |
| | 参考 +G8D +N15D +S48E +A88H +N91 H +A130V +T1661 +L167P +R189V |
| | 参考 +G8D +N15D +V38H +S48E +A88H +N91 H +A130V +1169T + R189V |
| | 参考 +G8D +N15D +V38H +S48E +A88H +N91 H +A130V +R189V |
| | 参考 +G8D +N15D +T29M +S48E +A88H +N91 H +A130V +T1661 +L167P +R189V |

如上所示，每一种变体都包含与参考变体有相同的取代(E6Q+A14P+ E47K +R51P+ E179Q)，以及额外的一个或多个基于本发明的取代。如上面所示，有 4 个变体被认为拥有 N 末端延伸，自前导序列中的取代 A(-7)V 开始，其导致了切割位点的改变。

结果显示本发明所有的变体都显示了明显的清晰区，而参考变体却没有出现。参考变体在 60℃的相似试验中出现了清晰区。所以，根据本发明的每组取代明显的改善了变体的热稳定性。

一些变体还在更高的温度下进行了检测，上面的一些变体在 76℃的高温下显示阳性结果。

**实施例 3：在去污剂存在下变体的稳定性**

角质酶变体和阴离子表面活性剂(10 或 40ppm 的 Avolan，Bayer 产品)在 60℃下温育，14 小时后测定残余活性。在前面实施例中描述过的变体中 8 个被发现在与 10ppm 去污剂温育后还有明显的残余活性，与 40ppm 去污剂温育后还有一些活性。参考变体没有显示残余活性。

**实施例 4：通过 DSC 的热稳定性**

角质酶变体的热稳定性在 pH 10(50mM 甘氨酸缓冲液)的条件下通过 DSC 进行了研究。以恒定程序的加热速率加热酶溶液后所得到的温谱图(Cp vs. T)中热变性曲线的峰值(主热吸收峰)作为热变性温度，Td。

发现上述参考变体其 Td 为 68℃。在实施例 2 中描述的本发明的变体被发现其 Td 为 71-72℃，即这是一个很明显的改进。

**实施例 5：变体的清洗性能**

在下面条件下，参考变体和实施例 2 中描述的本发明变体在清洗试验中用两种不同去污剂进行检测:

去污剂：商用日本去污剂，含大量阴离子表面活性剂

去污剂浓度：0.50 g/L 或 0.67 g/L

每杯测试布样(swatch)：

3 个棉布样(8 x 8 cm)，被猪油/棕脂肪(fat brown)污染

3 个棉/聚酯布样(4.5 x 4.5 cm)被口红污染

2 个商用皮脂(sebum)布样(5 x 5 cm)

1 个白色聚酯布样(5 x 5 cm)

清洗机器：Terg-O-Tometer，100 r.p.m.

角质酶变体剂量：0，2000，5000，10000 LU/L

水硬度：3° dH (Ca)

清洗温度：25℃

清洗液：1 升/杯

清洗时间：10 min

漂洗：10 min 流动自来水

干燥：line dry，过夜

去垢力是通过比较口红样品与没加角质酶变体洗涤的样品的缓解增加值(remission increase)(ΔR)来测定的。结果显示在各种去污剂的剂量为 2000-10000LU/L 时，加入本发明角质酶变体所提供的ΔR 为 10-16，而参考变体提供的ΔR 为 3-7。

来自猪油样品的棕脂肪的再沉积，是通过比较白色聚酯样品与未加角质酶变体的样品缓解增加值(ΔR)来测定的。结果显示，在在各种去污剂的剂量为 5000-10000LU/L 时，本发明角质酶变体提供的ΔR 是参考变体的两倍多。

此外，所述两种变体的稳定性也在两种去污剂溶液中进行了测定。在 25℃，10 分钟后，本发明角质酶变体在两种去污剂中的残余活性为 92-95%，

而参考变体的残余活性为 71-72%。结果显示本发明变体在洗涤性能，抗再沉积效果和在去污剂溶液中的稳定性方面有很明显改善。

**实施例 6：聚酯织品处理**

聚酯织品用本发明角质酶变体与参考变体(都在实施例 2 中作了描述)进行了如下的处理：

1.测试条件

温度：75℃

清洗时间：3hrs

pH:9.0(50mM 甘氨酰甘氨酸缓冲液)

织品：聚酯(Teijin)，14 cmX 14 cm

浴比(bath ratio)：5 片(pieces)/1000ml(=约 13g/L)

酶的剂量：0，10，50，100mg/L(基于酶蛋白)

T-O-M：100rpm

漂洗时间：用自来水(tap water)处理 10 min

2.程序

1. 在 105℃，干燥一组 5 片的聚酯 2 小时
2. 在干燥器中冷却至少 30 分钟
3. 称量该组重量
4. 在 75℃，100rpm，用变体洗涤该组聚酯 3 小时
5. 用自来水漂洗该组 10 分钟
6. 将其 line dry 过夜
7. 105℃干燥 2 小时
8. 在干燥器中冷却至少 30 分钟
9. 称量该组重量
10. 计算重量损失

下面结果显示了重量损失

| 变体 | 剂量 | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 0mg/L | 10 mg/L | 50 mg/L | 100 mg/L |
| 本发明 | 0.05% | 0.95% | 1.44% | 1.44% |
| 参考 | 0.05% | 0.33% | 0.43% | 0.20% |

结果显示本发明变体在 75℃时的热稳定性足以使其发挥效用，而参考变体没有什么效果。

**实施例 7：对变性(denatured)厨用油(cooking oil)的清洁效果**

本发明的角质酶变体(实施例 2 中描述)被用来测试其对厨房中真实的氧化油污的清洁效果。

在中性 pH 条件的商用液体洗餐具(dish-washing)去污剂中加入 1000LU/ml 的角质酶变体。将有角质酶变体的去污剂直接用于粘在厨房通风设备 filter 上的变性厨用油油渍上，放置 15，30，或 60 分钟，最后用自来水冲洗 1 分钟。

目视可见氧化的油渍被有效的清除。而对照试验中使用没有加入角质酶的去污剂显示去污效果很小。

**实施例 8：角质酶变体的抗-起球(anti-pilling)与去起球(depilling)效果**

用实施例 2 中的参考变体作为对照，用本发明角质酶变体(在实施例 2 中描述)处理聚酯织品。条件是：75℃，3 小时洗涤，pH9.0(甘氨酰甘氨酸缓冲液)，14 x 14 cm 桃色外表聚酯织品(peach skin polyester)(Toray 生产，日本)，浴比为 5 片(约 16 克)每 1000ml，Tergotometer (涤垢仪)为 100rpm，然后用自来水漂洗 10 分钟。

用 10，50 和 100mg/L 角质酶变体处理的织品与对照试验相比显示改善的去-起球和抗-起球效果。观察到纱的网格在处理后变得更加清晰，显然是因为细毛(fuzz)被去除并且细毛(微纤维)变短。

**实施例 9：角质酶变体在吸水(water absorption)方面的效果**

用与前述实施例相同的角质酶变体 100mg/l 和相同条件处理热带平织聚酯(Teijin，日本)，然后用蛋白酶(Alcalase®)处理以除去残留在织品表面的任何角质酶蛋白，皂洗，漂洗，干燥。对照试验除了不用角质酶处理以外同样进行。

通过切成条，将条的末端浸入色料溶液中，去除条上多余的色料，并测量被染色部分的高度，来检测处理过的织品。被角质酶变体处理过的增加的染色部分高度从 16 到 77mm，显示出改善了吸水性。

<110> 诺维信公司(NOVOZYMES A/S)

<120> 角质酶变体

<130> 10038-WO

<160> 10

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1
<211> 194
<212> PRT
<213> Humicola insolens

<400> 1

Gln Leu Gly Ala Ile Glu Asn Gly Leu Glu Ser Gly Ser Ala Asn Ala
1 5 10 15

Cys Pro Asp Ala Ile Leu Ile Phe Ala Arg Gly Ser Thr Glu Pro Gly
20 25 30

Asn Met Gly Ile Thr Val Gly Pro Ala Leu Ala Asn Gly Leu Glu Ser
35 40 45

His Ile Arg Asn Ile Trp Ile Gln Gly Val Gly Gly Pro Tyr Asp Ala
50 55 60

Ala Leu Ala Thr Asn Phe Leu Pro Arg Gly Thr Ser Gln Ala Asn Ile
65 70 75 80

Asp Glu Gly Lys Arg Leu Phe Ala Leu Ala Asn Gln Lys Cys Pro Asn
85 90 95

Thr Pro Val Val Ala Gly Gly Tyr Ser Gln Gly Ala Ala Leu Ile Ala
100 105 110

Ala Ala Val Ser Glu Leu Ser Gly Ala Val Lys Glu Gln Val Lys Gly
115 120 125

Val Ala Leu Phe Gly Tyr Thr Gln Asn Leu Gln Asn Arg Gly Gly Ile
130 135 140

Pro Asn Tyr Pro Arg Glu Arg Thr Lys Val Phe Cys Asn Val Gly Asp
145 150 155 160

Ala Val Cys Thr Gly Thr Leu Ile Ile Thr Pro Ala His Leu Ser Tyr
165 170 175

Thr Ile Glu Ala Arg Gly Glu Ala Ala Arg Phe Leu Arg Asp Arg Ile
180 185 190

Arg Ala

<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工的／未知的

<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()
<223> N-末端延伸

<400> 2

Ala Ala Val Asp Ser Asn His Thr Pro Ala Val Pro Glu Leu Val Ala
1 5 10 15

Arg

<210> 3
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工的／未知的

<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()
<223> 620AM34

<400> 3
gagtactatc ttgcatttgt actaggagtt tagtgaactt gc 42

<210> 4
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工的／未知的

<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()
<223> Dop2-R

<400> 4
gacgccctgg atccag 16

<210> 5
<211> 87
<212> DNA
<213> 人工的／未知的

<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()
<223> Dop83-2

<220>
<221> modified_base
<222> (25)..(63)
<223> See text

<400> 5
cggaacatct ggatccaggg cgtcnntggc ccttacnnnn nnncnnngnc nnnnaacnnt 60

nnnccgcggg gcacctcgca ggccaac 87

<210> 6
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工的/未知的

<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()
<223> 680AM35

<400> 6
atggttatgg atttcgggga ttcttcgagc gtcccaaaac c 41

<210> 7
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工的/未知的

<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()
<223> 620

<400> 7
gagtactatc ttgcatttgt ac 22

<210> 8
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工的/未知的

<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()
<223> 680

<400> 8
atggttatgg atttcgggga ttc 23

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工的／未知的

<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()
<223> AM34

<400> 9
taggagttta gtgaacttgc 20

<210> 10
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工的／未知的

<220>
<221> misc_feature
<222> ()..()
<223> AM35

<400> 10
ttcgagcgtc ccaaaacc 18