



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 116568792 A

(43) 申请公布日 2023.08.08

(21) 申请号 202180084359.X

(22) 申请日 2021.12.16

(66) 本国优先权数据

PCT/CN2020/136710 2020.12.16 CN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.06.14

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/063768 2021.12.16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/133068 EN 2022.06.23

(71) 申请人 丹尼斯科美国公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 J·拉西拉 C·莱

S·A·苏纳克斯 魏维

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

专利代理师 权陆军 林毅斌

(51) Int.Cl.

C11D 3/386 (2006.01)

权利要求书4页 说明书31页 附图2页

(54) 发明名称

用于清洁的酶和酶组合物

(57) 摘要

本文披露了用于预防、减少或去除来自液体溶液以及来自表面如织物、纺织品或硬表面的恶臭和微生物生长的组合物和方法。

1. 一种具有溶菌酶活性的分离的多肽或其活性片段,其中所述多肽与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。

2. 一种分离的多核苷酸,所述分离的多核苷酸包含编码具有溶菌酶活性的多肽的核苷酸序列,其中所述多肽与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。

3. 一种包含分离的多核苷酸的重组核酸构建体,所述分离的多核苷酸包含编码具有溶菌酶活性的多肽的核苷酸序列,其中所述多肽与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性,所述核苷酸序列可操作地连接到能够控制所述多核苷酸序列的表达的启动子序列。

4. 一种包含重组核酸构建体的分离的宿主细胞,所述重组核酸构建体包含分离的多核苷酸,所述分离的多核苷酸包含编码具有溶菌酶活性的多肽的核苷酸序列,其中所述多肽与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性,所述核苷酸序列可操作地连接到能够控制所述多核苷酸序列的表达的启动子序列。

5. 一种产生具有溶菌酶活性的多肽的方法,所述方法包括:

a) 在有利于产生所述多肽的条件下培养包含重组核酸构建体的宿主细胞,所述重组核酸构建体包含分离的多核苷酸,所述分离的多核苷酸包含编码具有溶菌酶活性的多肽的核苷酸序列,其中所述多肽与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性,所述核苷酸序列可操作地连接到能够控制所述多核苷酸序列的表达的启动子序列,以及

b) 任选地,回收所述具有溶菌酶活性的多肽。

6. 一种用于预防、减少或去除微生物的生长的方法,所述方法包括使所述微生物与具有溶菌酶活性的多肽或包含具有溶菌酶活性的多肽的组合物接触。

7. 如权利要求6所述的方法,其中所述具有溶菌酶活性的多肽具有以下氨基酸序列,所述氨基酸序列与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。

8. 如权利要求6所述的方法,其中所述微生物在纺织品或硬表面上。

9. 如权利要求8所述的方法,其中所述硬表面选自自由衣物洗涤机器表面、餐具表面、或餐具清洗机表面组成的组。

10. 如权利要求6所述的方法,其中所述组合物是清洁组合物。

11. 如权利要求6-10所述的方法,其中所述清洁组合物是衣物洗涤组合物。

12. 一种用于预防、减少或去除纺织品或硬表面上的微生物生长的方法,所述方法包括:(i)使纺织品或表面与具有以下氨基酸序列并且具有溶菌酶活性的多肽或包含具有溶菌酶活性的多肽的组合物接触,所述氨基酸序列与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性;以及(ii)任选地,冲洗所述纺织品或表面。

13. 如权利要求12所述的方法,其中所述纺织品包含在所述纺织品的表面上的微生物。

14. 如权利要求13所述的方法,其中从所述纺织品减少或去除所述微生物。

15. 如权利要求6-14中任一项所述的方法,其中与使所述纺织品或硬表面与所述具有溶菌酶活性的多肽或包含具有溶菌酶活性的多肽的组合物接触之前存在于所述纺织品或硬表面上的微生物的量相比,从制品减少或去除的所述微生物生长的量选自自由以下组成的组:至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更高。

16. 如权利要求6-15中任一项所述的方法,其中使用实例2、3或4所述的方法测量所述微生物生长。

17. 如权利要求6-16中任一项所述的方法,其中所述接触步骤包括使用具有溶菌酶活性的多肽,所述多肽的量选自自由以下组成的组:0.002至10,000mg蛋白质、0.005至5000mg蛋白质、0.01至5000mg蛋白质、0.05至5000mg蛋白质、0.05至1300mg蛋白质、0.1至1300mg蛋白质、0.1至500mg蛋白质、0.1至100mg蛋白质/升清洗液,或所述量为至少0.002ppm活性溶菌酶。

18. 如权利要求6-17中任一项所述的方法,其中所述接触步骤在清洗液中进行。

19. 如权利要求6-18中任一项所述的方法,其中所述接触步骤发生的时间长度选自自由以下组成的组:约5分钟至约10天、约5分钟至约400分钟、约5分钟至约300分钟之间、约5分钟至约250分钟之间、约5分钟至约200分钟之间、约5分钟至约150分钟之间、约5分钟至约100分钟之间、约5分钟至约50分钟之间、约5分钟至约30分钟之间。

20. 如权利要求6-19中任一项所述的方法,其中所述接触步骤在选自自由以下组成的组的温度发生:约10°至60°C、15°至约55°C之间、20°至约50°C之间以及20°至约45°C之间。

21. 如权利要求6-20中任一项所述的方法,其中所述包含具有溶菌酶活性的多肽的组合物进一步包含表面活性剂。

22. 如权利要求21所述的方法,其中所述表面活性剂选自自由以下组成的组:非离子表面活性剂、两性表面活性剂、半极性表面活性剂、阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、两性离子表面活性剂、及其组合和混合物。

23. 如权利要求6-22中任一项所述的方法,其中所述组合物是洗涤剂组合物。

24. 如权利要求6-23中任一项所述的方法,其中所述接触步骤进一步包括使所述纺织品或硬表面与一种或多种另外的酶接触,所述一种或多种另外的酶选自自由以下组成的组:酰基转移酶、 α -淀粉酶、 β -淀粉酶、 α -半乳糖苷酶、阿拉伯糖苷酶、芳基酯酶、 β -半乳糖苷酶、角叉菜胶酶、过氧化氢酶、纤维二糖水解酶、纤维素酶、软骨素酶、角质酶、内切- β -1,4-葡聚糖酶、内切- β -甘露聚糖酶、酯酶、外切-甘露聚糖酶、阿魏酸酯酶、半乳聚糖酶、葡糖淀粉酶、半纤维素酶、氨基己糖苷酶、透明质酸酶、角蛋白酶、漆酶、乳糖酶、木质素酶、脂肪酶、脂加氧酶、甘露聚糖酶、金属蛋白酶、核酸酶(例如脱氧核糖核酸酶和核糖核酸酶)、氧化酶、氧化还原酶、果胶酸裂合酶、果胶乙酰酯酶、果胶酶、戊聚糖酶、过水解酶、过氧化物酶、酚氧化酶、磷酸酶、磷脂酶、植酸酶、聚半乳糖醛酸酶、聚酯酶、蛋白酶、支链淀粉酶、还原酶、鼠李糖半乳糖醛酸酶、 β -葡聚糖酶、鞣酸酶、转谷氨酰胺酶、木聚糖乙酰酯酶、木聚糖酶、木葡聚糖酶、木糖苷酶、及其任何组合或混合物。

25. 如权利要求6-24中任一项所述的方法,其中所述接触步骤在清洗机器或餐具清洗

机中发生。

26. 一种洗涤剂组合物,所述洗涤剂组合物包含具有以下氨基酸序列并具有溶菌酶活性的多肽,所述氨基酸序列与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。

27. 如权利要求26所述的洗涤剂组合物,所述洗涤剂组合物进一步包含(ii)具有蛋白酶活性的多肽;(iii)任选地,至少一种另外的多肽,其中所述至少一种另外的多肽是选自以下的酶:酰基转移酶、 α -淀粉酶、 β -淀粉酶、 α -半乳糖苷酶、阿拉伯糖苷酶、芳基酯酶、 β -半乳糖苷酶、角叉菜胶酶、过氧化氢酶、纤维二糖水解脱酶、纤维素酶、软骨素酶、角质酶、内切- β -1,4-葡聚糖酶、内切- β -甘露聚糖酶、酯酶、外切-甘露聚糖酶、阿魏酸酯酶、半乳聚糖酶、葡糖淀粉酶、半纤维素酶、氨基己糖苷酶、透明质酸酶、角蛋白酶、漆酶、乳糖酶、木质素酶、脂肪酶、脂加氧酶、甘露聚糖酶、金属蛋白酶、核酸酶(例如脱氧核糖核酸酶和核糖核酸酶)、氧化酶、氧化还原酶、果胶酸裂合酶、果胶乙酰酯酶、果胶酶、戊聚糖酶、过水解酶、过氧化物酶、酚氧化酶、磷酸酶、磷脂酶、植酸酶、聚半乳糖醛酸酶、聚酯酶、蛋白酶、支链淀粉酶、还原酶、鼠李糖半乳糖醛酸酶、 β -葡聚糖酶、鞣酸酶、转谷氨酰胺酶、木聚糖乙酰酯酶、木聚糖酶、木葡聚糖酶、木糖苷酶、及其任何组合或混合物;以及(iv)表面活性剂。

28. 如权利要求27所述的组合物,其中所述表面活性剂选自由以下组成的组:非离子表面活性剂、两性表面活性剂、半极性表面活性剂、阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、两性离子表面活性剂、及其组合和混合物。

29. 如权利要求26-28所述的组合物,其中所述组合物包含按所述组合物的重量计约0.1%至约60%之间、约1%至约50%、或约5%至约40%的表面活性剂。

30. 如权利要求26-29所述的组合物,其中所述具有溶菌酶活性的多肽具有以下氨基酸序列,所述氨基酸序列与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。

31. 如权利要求27所述的组合物,其中所述核酸酶是DNA酶。

32. 如权利要求26-31所述的组合物,其中所述组合物进一步包含选自由以下组成的组的一种或多种辅助材料:助洗剂、漂白剂、漂白活化剂、漂白催化剂、其他酶、酶稳定系统、螯合剂、光学增亮剂、去污聚合物、染料转移剂、分散剂、泡沫抑制剂、染料、香料、着色剂、填料盐、助水溶剂、光活化剂、荧光剂、织物调理剂、可水解表面活性剂、防腐剂、抗氧化剂、抗收缩剂、抗皱剂、杀菌剂、杀真菌剂、颜色点缀剂、银护理剂、抗晦暗剂和/或抗腐蚀剂、碱性来源、增溶剂、载剂、加工助剂、颜料和pH控制剂。

33. 一种用于预防、减少或去除液体洗涤剂溶液中的微生物生长的方法,所述方法包括在液体洗涤剂溶液中包括有效量的溶菌酶和表面活性剂,所述溶菌酶具有以下氨基酸序列,所述氨基酸序列与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。

34. 如权利要求33所述的方法,其中所述液体洗涤剂溶液是衣物或餐具洗涤剂。

35. 如权利要求33-34中任一项所述的方法,其中所述液体洗涤剂溶液包含溶菌酶,所述溶菌酶的量选自由以下组成的组:0.002至10,000mg蛋白质、0.005至5000mg蛋白质、0.01至5000mg蛋白质、0.05至5000mg蛋白质、0.05至1300mg蛋白质、0.1至1300mg蛋白质、0.1至

500mg蛋白质、0.1至100mg蛋白质/升清洗液,或所述量为至少0.002ppm活性溶菌酶。

36. 如权利要求33-35中任一项所述的方法,其中所述表面活性剂选自自由以下组成的组:非离子表面活性剂、两性表面活性剂、半极性表面活性剂、阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、两性离子表面活性剂、及其组合和混合物。

37. 如权利要求33-36中任一项所述的方法,其中所述液体洗涤剂溶液进一步包含选自自由以下组成的组的一种或多种另外的酶:酰基转移酶、 α -淀粉酶、 β -淀粉酶、 α -半乳糖苷酶、阿拉伯糖苷酶、芳基酯酶、 β -半乳糖苷酶、角叉菜胶酶、过氧化氢酶、纤维二糖水解酶、纤维素酶、软骨素酶、角质酶、内切- β -1,4-葡聚糖酶、内切- β -甘露聚糖酶、酯酶、外切-甘露聚糖酶、阿魏酸酯酶、半乳聚糖酶、葡糖淀粉酶、半纤维素酶、氨基己糖苷酶、透明质酸酶、角蛋白酶、漆酶、乳糖酶、木质素酶、脂肪酶、脂加氧酶、甘露聚糖酶、金属蛋白酶、核酸酶(例如脱氧核糖核酸酶和核糖核酸酶)、氧化酶、氧化还原酶、果胶酸裂合酶、果胶乙酰酯酶、果胶酶、戊聚糖酶、过水解酶、过氧化物酶、酚氧化酶、磷酸酶、磷脂酶、植酸酶、聚半乳糖醛酸酶、聚酯酶、蛋白酶、支链淀粉酶、还原酶、鼠李糖半乳糖醛酸酶、 β -葡聚糖酶、鞣酸酶、转谷氨酰胺酶、木聚糖乙酰酯酶、木聚糖酶、木葡聚糖酶、木糖苷酶、及其任何组合或混合物。

38. 溶菌酶用于预防、减少或去除液体洗涤剂中的微生物生长的用途,其中所述溶菌酶具有以下氨基酸序列,所述氨基酸序列与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。

39. 一种包含至少0.002mg的具有溶菌酶活性的多肽的组合物,其中所述多肽具有以下氨基酸序列,所述氨基酸序列与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。

40. 如权利要求39所述的组合物,其中所述组合物包含所述具有溶菌酶活性的多肽,所述多肽的量选自自由以下组成的组:0.002至10,000mg蛋白质、0.005至5000mg蛋白质、0.01至5000mg蛋白质、0.05至5000mg蛋白质、0.05至1300mg蛋白质、0.1至1300mg蛋白质、0.1至500mg蛋白质、0.1至100mg蛋白质。

41. 如权利要求39所述的组合物,其中所述组合物是洗涤剂组合物。

42. 如权利要求41所述的组合物,其中所述洗涤剂组合物是衣物洗涤剂组合物或餐具洗涤剂组合物。

43. 如权利要求39-42中任一项所述的组合物,其中所述组合物进一步包含选自自由以下组成的组的一种或多种另外的酶:酰基转移酶、 α -淀粉酶、 β -淀粉酶、 α -半乳糖苷酶、阿拉伯糖苷酶、芳基酯酶、 β -半乳糖苷酶、角叉菜胶酶、过氧化氢酶、纤维二糖水解酶、纤维素酶、软骨素酶、角质酶、内切- β -1,4-葡聚糖酶、内切- β -甘露聚糖酶、酯酶、外切-甘露聚糖酶、阿魏酸酯酶、半乳聚糖酶、葡糖淀粉酶、半纤维素酶、氨基己糖苷酶、透明质酸酶、角蛋白酶、漆酶、乳糖酶、木质素酶、脂肪酶、脂加氧酶、甘露聚糖酶、金属蛋白酶、核酸酶(例如脱氧核糖核酸酶和核糖核酸酶)、氧化酶、氧化还原酶、果胶酸裂合酶、果胶乙酰酯酶、果胶酶、戊聚糖酶、过水解酶、过氧化物酶、酚氧化酶、磷酸酶、磷脂酶、植酸酶、聚半乳糖醛酸酶、聚酯酶、蛋白酶、支链淀粉酶、还原酶、鼠李糖半乳糖醛酸酶、 β -葡聚糖酶、鞣酸酶、转谷氨酰胺酶、木聚糖乙酰酯酶、木聚糖酶、木葡聚糖酶、木糖苷酶、及其任何组合或混合物。

用于清洁的酶和酶组合物

[0001] 本申请要求于2020年12月16日提交的PCT/CN2020/136710的优先权权益,将其通过援引以其全文并入。

[0002] 本公开涉及用于清洁、例如硬表面和衣物洗涤清洁的组合物和方法。

背景技术

[0003] 冷水清洗和合成材料制运动服的趋势推动了对消除细菌和气味的洗涤剂的需求,同时,行业里正不断淘汰使用传统氧漂白剂的衣物洗涤粉。尽管暴露于来自典型衣物洗涤过程中的表面活性剂、蛋白酶、淀粉酶和机械清洗,但气味和微生物仍持续存在于衣物和清洗机器上。因此,需要新的解决方案来去除衣物中的气味和微生物。

[0004] 微生物的存在进一步使去除气味的挑战变得复杂,因为气味化合物和细菌可能会对通过传统衣物洗涤剂的去具有抗性。传统的气味捕捉剂或抗微生物剂可能无法在纺织品和清洗机器上的这些累积膜存在的情况下发挥作用。因此,也需要新的解决方案来在存在由微生物引起的这种类型的持久性污垢的情况下去除气味和微生物。

[0005] 除了衣物洗涤,许多不同的应用都需要清洁、减少恶臭和减少微生物负荷的新解决方案,这些应用包括个人护理、食品和饮料制备以及包装、工业环境以及医疗和口腔护理中的应用。

发明内容

[0006] 一个实施例涉及一种具有溶菌酶活性的分离的多肽或其活性片段,其中该多肽与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。

[0007] 在另一实施例中,本公开提供了一种分离的多核苷酸,该分离的多核苷酸包含编码具有溶菌酶活性的多肽的核苷酸序列,其中该多肽与SEQ ID NO:1的氨基酸具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。

[0008] 本公开的另外的实施例提供了一种包含分离的多核苷酸的重组核酸构建体,该分离的多核苷酸包含编码具有溶菌酶活性的多肽的核苷酸序列,其中该多肽与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性,该核苷酸序列可操作地连接到能够控制该多核苷酸序列的表达的启动子序列。

[0009] 在又另一实施例中,本公开提供了一种包含重组核酸构建体的分离的宿主细胞,该重组核酸构建体包含分离的多核苷酸,该分离的多核苷酸包含编码具有溶菌酶活性的多肽的核苷酸序列,其中该多肽与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性,该核苷酸序列可操作地连接到能够控制该多核苷酸序列的表达的启动子序列。

[0010] 本公开还提供了用于产生具有溶菌酶活性的多肽的方法,该方法包括:a) 在有利

于产生该多肽的条件下培养包含重组核酸构建体的宿主细胞,该重组核酸构建体包含分离的多核苷酸,该分离的多核苷酸包含编码具有溶菌酶活性的多肽的核苷酸序列,其中该多肽与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性,该核苷酸序列可操作地连接到能够控制该多核苷酸序列的表达的启动子序列,以及b) 任选地,回收该具有溶菌酶活性的多肽。

[0011] 本文还提供了用于预防、减少或去除与恶臭相关的微生物的方法,这些方法使用具有溶菌酶活性的多肽或包含具有溶菌酶活性的多肽的组合物。在一些这样的实施例中,具有溶菌酶活性的多肽具有以下氨基酸序列,该氨基酸序列与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。

[0012] 在另一实施例中,本公开提供了用于在衣物洗涤中预防、减少或去除恶臭的方法,这些方法包括:(i) 使纺织品或表面与具有溶菌酶活性的多肽或包含具有溶菌酶活性的多肽的组合物接触;以及(ii) 任选地,冲洗该纺织品或表面。在一些这样的实施例中,具有溶菌酶活性的多肽具有以下氨基酸序列,该氨基酸序列与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。

[0013] 本公开进一步提供了包含具有溶菌酶活性的多肽的洗涤剂组合物,该多肽具有以下氨基酸序列,该氨基酸序列与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。在一些实施例中,洗涤剂组合物进一步包含(iii) 具有蛋白酶活性的多肽;(iii) 任选地,至少一种另外的多肽,其中该至少一种另外的多肽是选自以下的酶:酰基转移酶、 α -淀粉酶、 β -淀粉酶、 α -半乳糖苷酶、阿拉伯糖苷酶、芳基酯酶、 β -半乳糖苷酶、角叉菜胶酶、过氧化氢酶、纤维二糖水解酶、纤维素酶、软骨素酶、角质酶、内切- β -1,4-葡聚糖酶、内切- β -甘露聚糖酶、酯酶、外切-甘露聚糖酶、阿魏酸酯酶、半乳聚糖酶、葡糖淀粉酶、半纤维素酶、氨基己糖苷酶、透明质酸酶、角蛋白酶、漆酶、乳糖酶、木质素酶、脂肪酶、脂加氧酶、甘露聚糖酶、金属蛋白酶、核酸酶(例如脱氧核糖核酸酶和核糖核酸酶)、氧化酶、氧化还原酶、果胶酸裂合酶、果胶乙酰酯酶、果胶酶、戊聚糖酶、过水解酶、过氧化物酶、酚氧化酶、磷酸酶、磷脂酶、植酸酶、聚半乳糖醛酸酶、聚酯酶、蛋白酶、支链淀粉酶、还原酶、鼠李糖半乳糖醛酸酶、 β -葡聚糖酶、鞣酸酶、转谷氨酰胺酶、木聚糖乙酰酯酶、木聚糖酶、木葡聚糖酶、木糖苷酶、及其任何组合或混合物;以及(iv) 表面活性剂。

[0014] 还提供了用于预防、减少或去除液体洗涤剂溶液中的微生物生长的方法,这些方法包括在液体洗涤剂溶液中包括有效量的溶菌酶和表面活性剂。在一些这样的实施例中,溶菌酶具有以下氨基酸序列,该氨基酸序列与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。

[0015] 还提供了包含至少0.002mg的具有溶菌酶活性的多肽的组合物,其中该多肽具有以下氨基酸序列,该氨基酸序列与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列

同一性。

[0016] 本公开还提供了用于预防、减少或去除液体组合物中的微生物生长的方法,这些方法包括在该组合物中包括有效量的溶菌酶,其中该溶菌酶具有以下氨基酸序列,该氨基酸序列与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。

[0017] 本公开进一步提供了溶菌酶用于预防、减少或去除液体洗涤剂中的微生物生长的用途。

附图说明

[0018] 图1提供了本公开的一个实施例的结果的图示,其提供了液体培养物生长测试的结果,证明在暴露于不同浓度的BbuLys1溶菌酶(SEQ ID NO:1)后藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)细菌减少。

[0019] 图2提供了本公开的一个实施例的结果的图示,其提供了在使用洗涤剂中的BbuLys1溶菌酶(SEQ ID NO:1)、使用单独的洗涤剂、或使用单独的水进行模拟的衣物洗涤清洗后,奥斯陆莫拉菌(*Moraxella osloensis*)细菌的集落计数。

[0020] 图3提供了本公开的一个实施例的结果的图示,其提供了三种溶菌酶(BbuLys1、T4溶菌酶和鸡蛋清溶菌酶)对洗涤剂溶液中溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*)细胞的裂解的结果。

[0021] 图4提供了BbuLys1多肽(SEQ ID NO:1)的氨基酸序列。

具体实施方式

[0022] 本公开提供了具有溶菌酶活性的多肽、包含这样的多肽的组合物(例如,酶和洗涤剂组合物)和使用这样的组合物预防、减少或去除微生物或生物膜(例如,来自制品如硬表面或纺织品)的方法。这些组合物通常使用至少一种具有溶菌酶活性的多肽或其活性片段,或包含具有溶菌酶活性的多肽或其活性片段的组合物。这些组合物还任选地包含清洁洗涤剂的另外的组分,如一种或多种表面活性剂。

[0023] 在描述本发明的组合物和方法的实施例之前,定义以下术语。

[0024] 除非本文另外定义,否则本文所用的所有技术与科学术语均具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义。尽管与本文所述的那些方法和材料类似或等同的任何方法和材料可用于本发明的实践,但是本文描述了优选的方法和材料。因此,总体上通过参考说明书,以下立即定义的术语得以更全面地描述。此外,除非上下文另有明确指示,否则如本文所用,单数术语“一个/一种(a/an)”和“该/所述(the)”包括复数引用。应当理解,本发明不限于所描述的特定方法、方案和试剂,因为它们可以根据本领域技术人员使用的上下文而变化。

[0025] 在本说明书通篇中给出的每一最大数值限度旨在包括每一较低数值限度,如同这样的较低数值限度在本文中明确写出一样。在本说明书通篇中给出的每一最小数值限度将包括每一较高数值限度,如同这样的较高数值限度在本文中明确写出一样。在本说明书通篇中给出的每一数值范围将包括落入这样的较宽数值范围内的每一较窄数值范围,如同这样的较窄数值范围在本文中全部明确写出一样。

[0026] 如本文所用,“表面”意指具有足够质量以允许生物膜附接的任何结构,包括硬表面、软表面、多孔表面和其他类型的表面。硬表面包括但不限于金属,玻璃,陶瓷,木材,矿物(岩石、石头、大理石、花岗岩),骨料材料(aggregate material)如混凝土、塑料、复合材料、硬橡胶材料和石膏。硬材料可以用搪瓷和漆料完成。硬表面发现于例如水处理及储存设备和箱中;乳制品和食品加工设备和设施中;医疗设备和设施,如手术器械以及永久和临时植入物中;工业制药设备和工厂中。软表面是例如毛发和所有类型的纺织品。多孔表面可以是生物表面,如皮肤、角蛋白或内脏器官。多孔表面还可以在有些陶瓷以及用于过滤的膜中找到。其他表面包括但不限于船体和游泳池。

[0027] 术语“织物”是指例如机织物、针织物和非机织材料,以及可以转化成例如纱线和机织物、针织物和非机织织物的短纤维和长丝。该术语涵盖从天然纤维以及合成(例如,制造的)纤维制成的材料。

[0028] 如本文所用,术语“纺织品”是指任何纺织材料,包括纱线、纱线中间体、纤维、非机织材料、天然材料、合成材料以及任何其他纺织材料、由这些材料制成的织物和由织物制成的产品(例如,服装和其他制品)。该纺织品或织物可以是针织物、机织物、牛仔布、非机织物、毛毡、纱线和毛巾布的形式。该纺织品可以是基于纤维素的,如天然纤维素制品,包括棉、亚麻/亚麻布、黄麻、苧麻、剑麻或椰壳纤维,或者人造纤维素(例如,来源于木浆),包括粘胶纤维/人造丝、乙酸纤维素纤维(三胞)、莱赛尔纤维(lyocell)、或其共混物。该纺织品或织物还可以不基于纤维素,如天然聚酰胺,包括羊毛、驼毛、羊绒、马海毛、兔毛和蚕丝,或合成聚合物如尼龙、芳族聚酰胺、聚酯、丙烯酸、聚丙烯和氨纶/弹性纤维(spandex/elastane)、或其共混物以及基于纤维素和不基于纤维素的纤维的共混物。共混物的实例是棉和/或人造丝/粘胶纤维与一种或多种伴生材料(companion material)的共混物,该伴生材料如羊毛、合成纤维(例如,聚酰胺纤维、丙烯酸纤维、聚酯纤维、聚氯乙烯纤维、聚氨酯纤维、聚脲纤维、芳族聚酰胺纤维)和/或含纤维素的纤维(例如,人造丝/粘胶纤维、苧麻、亚麻/亚麻布、黄麻、乙酸纤维素纤维、莱赛尔纤维)。织物可以是常规的可清洗衣物,例如有污渍的家用衣物。当使用术语织物或服装时,旨在还包括广义术语纺织品。在本申请的上下文中,术语“纺织品”可与织物和布互换使用。

[0029] 如本文所用,术语“硬表面”是指具有硬表面的任何制品,包括地板、桌子、墙壁、屋顶等,以及硬物体的表面,这些硬物体如汽车(汽车清洗)、船体、餐具(餐盘)、医疗器械、管道、贮器(reservoir)或储罐(holding tank)。术语“硬表面”还包括柔性但坚固物体的表面,如可弯曲管和供能管路(supply line)的内部或者可变形储罐或容器的表面。术语“硬表面”还包括清洗机器内部的表面,如衣物洗涤清洗机器或餐具清洗机器的内部,这包括肥皂盒、墙壁、窗户、篮子、架子、喷嘴、泵、水槽、过滤器、管道、管子、接头、密封件、垫圈、配件、叶轮、鼓、排水管、存水弯(trap)、硬币存水弯入口和出口。术语硬表面不涵盖纺织品或织物。

[0030] 术语“衣物洗涤”包括家用衣物洗涤和工业衣物洗涤,并意指用含有如本文提供的清洁或洗涤剂组合物的溶液处理纺织品的过程。衣物洗涤过程可以例如使用例如家用或工业清洗机器进行或可以用手进行。

[0031] 术语“清洗周期”是指如下清洗操作,在该操作中,将纺织品浸入清洗液中,对该纺织品施加某种机械作用以释放污渍或促进清洗液流进和流出该纺织品,最后去除多余的清

洗液。在一个或多个清洗周期之后,通常对该纺织品进行冲洗和干燥。

[0032] 术语“清洗液”在本文中定义为水和洗涤剂组分的溶液或混合物,任选地包括具有溶菌酶活性的多肽。

[0033] 多肽

[0034] 在一个实施例中,提供了具有溶菌酶活性的多肽。本公开的具有溶菌酶活性的多肽包括分离的、重组的、基本上纯的、或非天然存在的多肽。在一些实施例中,多肽可用于清洁应用中,并且可以掺入可用于清洁有需要的物品或表面的方法中的清洁组合物中。

[0035] 用于在本文的方法和组合物中使用的溶菌酶多肽包括任何溶菌酶多肽。如本文所用,术语“溶菌酶”是指任何能够水解N-乙酰胞壁酰基- β -1,4-N-乙酰葡萄糖胺键以降解细菌肽聚糖的多肽或其片段(Schmelcher等人2012,Future Microbiol[未来微生物学]7:1147-1171;Loessner 2005,Current Opinion in Microbiology[微生物学当前观点]8:480-487;Thallinger等人2013,Biotechnol J[生物技术杂志]9:97-109)。溶菌酶是由BRENDA分组在E.C.3.2.1.17分类下的糖苷酶,并且也被描述为胞壁质酶。在一些实施例中,用于在本文提供的组合物和方法中使用的具有溶菌酶活性的多肽包括具有以下氨基酸序列的那些,这些氨基酸序列与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。

[0036] 如本文所用,“同源基因”是指来自不同的、但是通常相关的物种的基因对,这些基因彼此对应并且彼此相同或非常相似。该术语涵盖通过物种形成(即,新物种的发育)(例如,直系同源基因)分离的基因、以及通过遗传重复分离的基因(例如,旁系同源基因)。

[0037] 如本文所用,术语“变体多肽”是指包含以下氨基酸序列的多肽,该氨基酸序列的至少一个氨基酸残基与亲本多肽或参考多肽(包括但不限于野生型多肽)的氨基酸序列不同。

[0038] 在一些实施例中,本文提供的溶菌酶多肽具有以下氨基酸序列,该氨基酸序列与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。

[0039] 在一些实施例中,用于在本文提供的组合物和方法中使用的溶菌酶包括具有以下氨基酸序列的多肽,该氨基酸序列与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。

[0040] 如本文所用,“%同一性或百分比同一性”是指序列相似性。可以使用本领域已知的标准技术确定百分比同一性(参见例如,Smith和Waterman,Adv. Appl. Math. [应用数学进展]2:482[1981];Needleman和Wunsch,J. Mol. Biol. [分子生物学杂志]48:443[1970];Pearson和Lipman,Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美国科学院院报]85:2444[1988];威斯康星遗传学软件包(Wisconsin Genetics Software Package)(威斯康星州麦迪逊市的遗传学电脑集团(Genetics Computer Group, Madison, WI))中的软件程序,如GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA;以及Devereux等人,Nucl. Acid Res. [核酸研究]12:387-395[1984])。有用的算法的一个实例是PILEUP。PILEUP使用渐进的、两两比对创建了来自一组相关序列的多重序列比对。它还可以绘制显示用于创建该比对的聚类关系的树。PILEUP使用Feng和Doolittle

的渐进比对方法的简化(参见Feng和Doolittle, *J. Mol. Evol.* [分子进化杂志] 35:351-360 [1987])。该方法类似于Higgins和Sharp所述的方法(参见, Higgins和Sharp, *CABIOS* [生物科学中的计算机应用] 5:151-153 [1989])。有用的PILEUP参数包括为3.00的默认空位权重, 为0.10的默认空位长度权重, 以及加权的末端空位。其他有用的算法是由Altschul等人描述的BLAST算法(参见, Altschul等人, *J. Mol. Biol.* [分子生物学杂志] 215:403-410 [1990]; 以及Karlin和Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* [美国科学院院报] 90:5873-5787 [1993])。BLAST程序使用几个搜索参数, 其中大部分被设置为默认值。

[0041] 如本文所用, “同源蛋白质”或“同源溶菌酶”是指在一级、二级和/或三级结构中具有明显相似性的蛋白质。当比对蛋白质时, 蛋白质源性可指线性氨基酸序列的相似性。可以通过氨基酸序列比对来确定源性, 例如使用如BLAST、MUSCLE或CLUSTAL的程序。蛋白质序列的同源搜索可使用来自NCBI BLAST的BLASTP和PSI-BLAST使用0.001的阈值(E值截止值)进行。(Altschul等人, “Gapped BLAST and PSI BLAST a new generation of protein database search programs” [空位BLAST和PSI BLAST: 新一代蛋白质数据库搜索程序], *Nucleic Acids Res* [核酸研究], 第1组; 25(17):3389-402 (1997))。BLAST程序使用几个搜索参数, 其中大部分被设置为默认值。NCBI BLAST算法按照生物相似性找到最相关的序列, 但是不推荐用于少于20个残基的查询序列(Altschul等人, *Nucleic Acids Res* [核酸研究], 25:3389-3402, 1997和Schaffer等人, *Nucleic Acids Res* [核酸研究], 29:2994-3005, 2001)。用于核酸序列搜索的示例性默认BLAST参数包括: 相邻字长阈值=11; E值截止值=10; 评分矩阵(Scoring Matrix)=NUC.3.1(匹配=1, 错配=-3); 空位开放=5; 以及空位延伸=2。用于氨基酸序列搜索的示例性默认BLAST参数包括: 字长=3; E值截止值=10; 评分矩阵=BLOSUM62; 空位开放=11; 以及空位延伸=1。使用该信息, 可以将蛋白质序列分组和/或从中构建系统发生树。可以在如Vector NTI Advance套件等程序中输入氨基酸序列, 并且可以使用邻接(Neighbor Joining (NJ))法创建引导树(Saitou和Nei, *Mol Biol Evol* [分子生物学与进化], 4:406-425, 1987)。可以使用针对序列距离的Kimura校正并且忽略具有空位的位置来计算树结构。程序如AlignX可以在系统发生树上显示的分子名称之后的括号内显示计算的距离值。

[0042] 氨基酸序列同一性百分比(%)值由匹配相同残基的数目除以“参考”序列的残基总数(包括由程序为最佳/最大比对创建的任何空位)来确定。如果序列与SEQ ID NO:A 90%同一, 则SEQ ID NO:A是“参考”序列。BLAST算法将“参考”序列称为“查询”序列。

[0043] CLUSTAL W算法是序列比对算法的另一个实例(参见Thompson等人, *Nucleic Acids Res* [核酸研究] 22:4673-4680, 1994)。CLUSTAL W算法的默认参数包括: 空位开放罚分=10.0; 空位延伸罚分=0.05; 蛋白质权重矩阵=BLOSUM系列; DNA权重矩阵=IUB; 延迟发散序列%=40; 空位分隔距离=8; DNA转换权重=0.50; 列表亲水残基=GPSNDQEKR; 使用负性矩阵=关; 切换特殊残基罚分=开; 切换亲水罚分=开; 以及切换结束空位分隔罚分=关。在CLUSTAL算法中, 包括在任一末端发生的缺失。例如, 在500个氨基酸的多肽的任一末端(或多肽内)具有五个氨基酸缺失的变体相对于“参考”多肽具有99%(495/500个相同的残基×100)的百分比序列同一性。这样的变体将由与该多肽具有“至少99%序列同一性”的变体所涵盖。

[0044] 在一些实施例中, 本发明的多肽是与所示例的多肽具有指定程度的氨基酸序列同

源性的多肽,例如与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸序列同一性的多肽。如本文所述,同源性可以通过氨基酸序列比对,例如使用如BLAST、ALIGN、或CLUSTAL等程序来确定。在一些实施例中,多肽是分离的、重组的、基本上纯的或非天然存在的酶,该酶具有溶菌酶活性,如N-乙酰基胞壁酰基- β -1,4-N-乙酰葡糖胺水解活性和/或细菌肽聚糖降解活性。

[0045] 还提供了具有溶菌酶活性的变体溶菌酶多肽酶,其中该酶包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列相差不超过50个、不超过40个、不超过30个、不超过25个、不超过20个、不超过15个、不超过10个、不超过9个、不超过8个、不超过7个、不超过6个、不超过5个、不超过4个、不超过3个、不超过2个、或不超过1个氨基酸残基的氨基酸序列(当使用任何先前描述的比对方法进行比对时)。

[0046] 本公开的变体酶多肽具有酶活性(例如,溶菌酶活性)并且因此可用于多种清洁应用中,这些清洁应用包括但不限于用于清洁餐具物品、桌面器具物品、织物、纺织品和具有硬表面的物品(例如,桌子、桌面、墙壁、家具物品、地板、天花板等的硬表面)的方法。下面描述包含本公开的一种或多种具有溶菌酶活性的多肽的示例性清洁组合物。本发明的酶多肽的酶活性(例如,溶菌酶活性)可以容易地使用本领域普通技术人员熟知的程序来确定。下面提供的实例描述用于评价酶活性和清洁性能的方法。可以容易地使用本领域熟知的程序和/或通过使用实例中阐述的程序来确定本发明的多肽酶在减少、预防和/或去除微生物(例如,与恶臭相关的微生物)方面的性能。

[0047] 在一些实施例中,本公开的多肽可以在宽范围的pH条件内具有溶菌酶活性。在一些实施例中,多肽具有溶菌酶活性,如使用实例中描述的方法所表明的。在一些实施例中,多肽具有溶菌酶活性,如使用可商购的或文献中描述的活性测定所表明的,这些活性测定如EnzChek®溶菌酶测定试剂盒(赛默飞世尔公司(ThermoFisher))或由Gorin等人描述的活性测定(Gorin,G.,Wang,S.F.,Papapavlou,L(1971) Assay of lysozyme by its lytic action on *M-lysodeikticus* cells[通过溶菌酶对溶壁微球菌细胞的裂解作用测定溶菌酶].Analytical Biochemistry[分析生物化学]39:113-127)。在一些实施例中,多肽在从约4.0至约12.0的pH处具有溶菌酶活性。在一些实施例中,多肽在从约6.0至约12.0的pH处具有溶菌酶活性。在一些实施例中,多肽在从约6.0至约12.0、或从约7.0至约12.0的pH处、或从约6至约10的pH处、或从约6至约9的pH处具有至少50%、60%、70%、80%或90%的最大溶菌酶活性。在一些实施例中,多肽在高于6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0或11.5的pH处具有溶菌酶活性。在一些实施例中,多肽在低于12.0、11.5、11.0、10.5、10.0、9.5、9.0、8.5、8.0、7.5、7.0或6.5的pH处具有溶菌酶活性。

[0048] 在一些实施例中,本公开的多肽在从约10°C至约90°C或从约20°C至约40°C的温度范围内具有溶菌酶活性。在一些实施例中,本公开的多肽在从约20°C至约40°C的温度范围内具有溶菌酶活性。在一些实施例中,多肽在从约20°C至约40°C的温度下具有至少50%、60%、70%、80%或90%的最大溶菌酶活性。在一些实施例中,多肽在高于50°C、55°C、60°C、65°C或70°C的温度下具有活性。在一些实施例中,多肽在低于90°C、85°C、80°C、75°C、70°C、65°C、60°C或55°C的温度下具有活性。

[0049] 可以使本公开的溶菌酶多肽经受多种变化,如一个或多个氨基酸插入、缺失和/或

取代(保守或非保守的),包括这样的变化基本上不改变该多肽的酶活性的情况。类似地,本发明的核酸也可以经受多种变化,如在一个或多个密码子中的一个或多个核苷酸的一个或多个取代,这样使得特定的密码子编码相同或不同的氨基酸,导致沉默变异(例如,当编码的氨基酸不被核苷酸突变改变时)或非沉默变异;序列中一个或多个核酸(或密码子)的一个或多个缺失;序列中一个或多个核酸(或密码子)的一个或多个添加或插入;和/或序列中一个或多个核酸(或密码子)的切割或一个或多个截短。与由原始核酸序列编码的多肽酶相比,核酸序列中的许多这样的变化基本上不会改变所得的编码的多肽酶的酶活性。还可以对本发明的核酸序列进行修饰以便包括一个或多个密码子,该一个或多个密码子在表达系统(例如,细菌表达系统)中提供最佳表达,同时,若希望,所述一个或多个密码子仍编码一个或多个相同的氨基酸。

[0050] 本公开提供分离的、非天然存在的或重组的核酸,其可统称为编码本公开多肽的“核酸”或“多核苷酸”。本公开的核酸,包括下面描述的全部,可用于本公开多肽的重组产生(例如,表达),典型地通过包含编码目的多肽或其片段的序列的质粒表达载体进行表达。如上所讨论,本公开的多肽包括具有酶活性(例如,溶菌酶活性)的多肽,这些多肽可用于清洁应用和清洁组合中,这些清洁组合用于清洁需要清洁的物品或表面(例如,物品的表面)和/或用于减少、去除或预防来自物品、表面或溶液的微生物。

[0051] 在一些实施例中,本公开的多核苷酸是与所示例的多核苷酸具有指定程度的核酸同源性的多核苷酸。在一些实施例中,多核苷酸具有编码如下多肽或其活性片段的核酸序列,该多肽或其活性片段与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的氨基酸序列同一性。如本文所述,同源性可以通过氨基酸序列比对,例如使用如BLAST、ALIGN、或CLUSTAL等程序来确定。

[0052] 在一些实施例中,本公开提供了分离的、重组的、基本上纯的、合成衍生的或非天然存在的核酸,该核酸包含编码本文所述的任何具有溶菌酶活性的多肽(包括任何融合蛋白等)的核苷酸序列。本公开还提供了分离的、重组的、基本上纯的、合成衍生的或非天然存在的核酸,该核酸包含编码本文提供的任何多肽中的两个或更多个的组合的核苷酸序列。本公开提供了编码本公开的具有溶菌酶活性的多肽的核酸,其中该多肽是具有溶菌酶活性的成熟形式。在一些实施例中,用同源前肽序列重组表达多肽。在其他实施例中,用异源前肽序列重组表达多肽。

[0053] 本文提供的核酸可以通过使用任何合适的合成、操作和/或分离技术、或其组合来产生。例如,本文提供的多核苷酸可以使用本领域技术人员熟知的标准核酸合成技术、如固相合成技术来产生。在这样的技术中,典型地合成高至50个或更多个核苷酸碱基的片段,然后连接(例如通过酶或化学连接方法)以基本上形成任何希望的连续核酸序列。还可以通过本领域已知的任何合适的方法来促进核酸的合成,该方法包括但不限于使用以下方法的化学合成:经典的亚磷酰胺方法(参见例如Beaucage等人Tetrahedron Letters[四面体快报]22:1859-69[1981]);或Matthes等人描述的方法(参见Matthes等人,EMBO J.[欧洲分子生物学学会杂志]3:801-805[1984]),如典型地在自动合成方法中所实践的。本发明的核酸还可以通过使用自动DNA合成仪来产生。可以从各种商业来源(例如,米德兰认证试剂公司(The Midland Certified Reagent Company)、大美国基因公司(Great American Gene

Company)、操纵子技术公司(Operon Technologies Inc.)和DNA2.0)订购定制的核酸。用于合成核酸的其他技术和相关原理是本领域已知的(参见例如,Itakura等人,Ann.Rev.Biochem.[生物化学年鉴]53:323[1984];和Itakura等人,Science[科学]198:1056[1984])。

[0054] 本公开还提供了包含本文所述的至少一种多核苷酸的重组载体(例如,编码本文提供的具有溶菌酶活性的多肽的多核苷酸),包含本公开的至少一种核酸或多核苷酸的表达载体或表达盒,包含本公开的至少一种核酸或多核苷酸的分离的、基本上纯的或重组的DNA构建体,包含本公开的至少一种多核苷酸的分离的或重组的细胞,以及包含一种或多种这样的载体、核酸、表达载体、表达盒、DNA构建体、细胞、细胞培养物、或其任何组合或混合物的组合物。

[0055] 在一些实施例中,本公开提供了包含至少一种载体(例如表达载体或DNA构建体)的重组细胞,该至少一种载体包含本文提供的至少一种核酸或多核苷酸。一些这样的重组细胞使用这样的至少一种载体转化或转染,尽管其他方法在本领域中是可获得且已知的。这样的细胞典型地称为宿主细胞。一些这样的细胞包含细菌细胞,包括但不限于芽孢杆菌属物种(*Bacillus* sp.)细胞,如枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)细胞。一些这样的细胞包含真菌细胞,包括但不限于木霉属(*Trichoderma*)细胞,如里氏木霉(*Trichoderma reesei*)细胞。本公开还提供包含本公开的至少一种具有溶菌酶活性的多肽的重组细胞(例如,重组宿主细胞)。

[0056] 在一些实施例中,本公开提供了包含如本文所述的核酸或多核苷酸的载体。在一些实施例中,载体是表达载体或表达盒,其中编码具有溶菌酶活性的多肽的多核苷酸序列可操作地连接到有效基因表达所需的一个或另外的核酸区段(例如与编码本发明的丝氨酸蛋白酶多肽的本发明的多核苷酸可操作地连接的启动子)。载体可以包括转录终止子和/或能够通过含有抗微生物剂的培养基中生长来实现质粒感染的宿主细胞的连续培养维持的选择基因,如抗生素抗性基因。

[0057] 表达载体可以衍生自质粒或病毒DNA,或在替代性的实施例中,含有这两者的元件。示例性载体包括但不限于pC194、pJH101、pE194、pHP13(参见Harwood和Cutting[编辑],第3章,Molecular Biological Methods for *Bacillus*[针对芽孢杆菌的分子生物学方法],John Wiley&Sons[约翰威利父子公司][1990];对于枯草芽孢杆菌合适的复制质粒包括第92页列出的那些)。还参见Perego,Integrational Vectors for Genetic Manipulations in *Bacillus subtilis*[枯草芽孢杆菌遗传操作整合载体],在Sonenshein等人,[编辑]*Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria:Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics[枯草芽孢杆菌和其他革兰氏阳性细菌:生物化学、生理学和分子遗传学],American Society for Microbiology[美国微生物学会],华盛顿(1993),第615-624页)中,以及p2JM103BBI。

[0058] 为了在细胞中表达并产生目的蛋白(例如,具有溶菌酶活性的多肽),将包含编码具有溶菌酶活性的多肽的多核苷酸的至少一个拷贝(并且在一些情况下包含多个拷贝)的至少一种表达载体在适合于该多肽表达的条件下转化到该细胞中。在一些实施例中,将编码具有溶菌酶活性的多肽的多核苷酸序列(以及载体中包括的其他序列)整合到宿主细胞的基因组中;然而在其他实施例中,包含编码具有溶菌酶活性的多肽的多核苷酸序列的质

粒载体在细胞内保持为自主的染色体外元件。本公开提供了染色体外核酸元件以及整合到宿主细胞基因组中的输入性核苷酸序列。本文所述的载体可用于产生如本文提供的具有溶菌酶活性的多肽。在一些实施例中,编码多肽的多核苷酸构建体存在于整合载体上,该整合载体能够将编码多肽的多核苷酸整合到宿主染色体中并且任选地在宿主染色体中扩增。整合位点的实例是本领域技术人员熟知的。在一些实施例中,编码本公开的多肽的多核苷酸的转录通过启动子来实现,该启动子是所选前体溶菌酶的野生型启动子。在一些其他实施例中,启动子与前体溶菌酶是异源的,但在宿主细胞中具有功能。特别地,用于细菌宿主细胞的合适的启动子的实例包括但不限于例如amyE、amyQ、amyL、pstS、sacB、pSPAC、pAprE、pVeg、pHpaII启动子,嗜热脂肪芽孢杆菌(*B. stearothermophilus*)生麦芽糖淀粉酶基因的启动子、解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*) (BAN) 淀粉酶基因的启动子、枯草芽孢杆菌碱性蛋白酶基因的启动子、克劳氏芽孢杆菌(*B. clausii*)碱性蛋白酶基因的启动子、短小芽孢杆菌(*B. pumilis*)木糖苷酶基因的启动子、苏云金芽孢杆菌(*B. thuringiensis*) cryIII A的启动子、和地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*) α -淀粉酶基因的启动子。另外的启动子包括但不限于A4启动子,以及噬菌体 λ PR或PL启动子,以及大肠杆菌(*E. coli*) lac、trp或tac启动子。

[0059] 本公开的多肽可以在任何合适的微生物(包括细菌和真菌)的宿主细胞中产生。在一些实施例中,本公开的多肽可以在革兰氏阳性细菌中产生。在一些实施例中,宿主细胞是芽孢杆菌属物种、链霉菌属物种(*Streptomyces* spp.)、埃希氏菌属物种(*Escherichia* spp.)、曲霉属物种(*Aspergillus* spp.)、木霉属物种(*Trichoderma* spp.)、假单胞菌属物种(*Pseudomonas* spp.)、棒状杆菌属物种(*Corynebacterium* spp.)、酵母属物种(*Saccharomyces* spp.)或毕赤酵母属物种(*Pichia* spp.)。在一些实施例中,多肽由芽孢杆菌属物种宿主细胞产生。可用于本发明的多肽的产生的芽孢杆菌属物种宿主细胞的实例包括但不限于:地衣芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌(*B. lentus*)、枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、短芽孢杆菌(*B. brevis*)、嗜热脂肪芽孢杆菌、嗜碱芽孢杆菌(*B. alkalophilus*)、凝结芽孢杆菌(*B. coagulans*)、环状芽孢杆菌(*B. circulans*)、短小芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、克劳氏芽孢杆菌和巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*),以及芽孢杆菌属内的其他生物。在一些实施例中,枯草芽孢杆菌宿主细胞被用于产生具有溶菌酶活性的多肽。US 5,264,366和4,760,025(RE 34,606)描述了可以用于产生本公开的多肽的多种芽孢杆菌属宿主菌株,尽管可以使用其他合适的菌株。

[0060] 可以用于产生本公开多肽的几种细菌菌株包括非重组(即野生型)芽孢杆菌属物种菌株,以及天然存在的菌株和/或重组菌株的变体。在一些实施例中,宿主菌株是重组菌株,其中编码目的多肽的多核苷酸已经被引入宿主中。在一些实施例中,宿主菌株是枯草芽孢杆菌宿主菌株,特别是重组枯草芽孢杆菌宿主菌株。许多枯草芽孢杆菌菌株是已知的,包括但不限于例如1A6(ATCC 39085)、168(1A01)、SB19、W23、Ts85、B637、PB1753至PB1758、PB3360、JH642、1A243(ATCC 39,087)、ATCC 21332、ATCC 6051、MI113、DE100(ATCC 39,094)、GX4931、PBT 110、和PEP 211菌株(参见例如Hoch等人,Genetics[遗传学]73:215-228[1973];还参见美国专利号4,450,235和4,302,544,以及EP 0134048,其各自通过援引以其全文并入)。使用枯草芽孢杆菌作为表达宿主细胞是本领域熟知的(参见例如,Palva等人,Gene[基因]19:81-87[1982];Fahnestock和Fischer,J.Bacteriol.[细菌学杂志],165:

796-804[1986];和Wang等人, Gene[基因]69:39-47[1988])。

[0061] 在一些实施例中,芽孢杆菌属宿主细胞是包括以下基因中的至少一个的突变或缺失的芽孢杆菌属物种:degU、degS、degR和degQ。在一些实施例中,突变是在degU基因中,并且在一些实施例中,突变为degU(Hy) 32(参见例如,Msadek等人, J.Bacteriol.[细菌学杂志]172:824-834[1990];以及Olmos等人, Mol.Gen.Genet.[分子和普通遗传学]253:562-567[1997])。在一些实施例中,芽孢杆菌属宿主在以下中包含突变或缺失:scoC4(参见例如,Caldwell等人, J.Bacteriol.[细菌学杂志]183:7329-7340[2001]);spoIIE(参见例如, Arigoni等人, Mol.Microbiol.[分子微生物学]31:1407-1415[1999]);和/或oppA或opp操纵子的其他基因(参见例如, Perego等人, Mol.Microbiol.[分子微生物学]5:173-185[1991])。实际上,预期引起与oppA基因中的突变相同的表型的opp操纵子中的任何突变将可用于经改变的芽孢杆菌属菌株的一些实施例中。在一些实施例中,这些突变单独发生,而在其他实施例中,存在突变的组合。在一些实施例中,可以用于产生本发明的溶菌酶多肽的改经变的芽孢杆菌属宿主细胞株是已经包括上述基因中的一个或多个的突变的芽孢杆菌属宿主菌株。另外,可使用包含内源蛋白酶基因的一个或多个突变和/或缺失的芽孢杆菌属物种宿主细胞。在一些实施例中,芽孢杆菌属宿主细胞包含aprE和nprE基因的缺失。在其他实施例中,芽孢杆菌属物种宿主细胞包含5个蛋白酶基因的缺失,而在其他实施例中,芽孢杆菌属物种宿主细胞包含9个蛋白酶基因的缺失(参见例如,US 2005/0202535,通过援引并入本文)。

[0062] 使用本领域已知的任何合适的方法,用编码本发明的至少一种溶菌酶多肽的至少一种核酸转化宿主细胞。利用质粒DNA构建体或载体将核酸(例如DNA)引入芽孢杆菌属细胞或大肠杆菌细胞并且将这样的质粒DNA构建体或载体转化到这样的细胞中的方法是熟知的。在一些实施例中,质粒随后从大肠杆菌细胞中分离并且转化到芽孢杆菌属细胞中。然而,使用介入微生物如大肠杆菌不是必需的,并且在一些实施例中,将DNA构建体或载体直接引入芽孢杆菌属宿主中。

[0063] 用于将本发明的核酸序列引入芽孢杆菌属细胞中的合适方法包括描述于例如以下中的那些:Ferrari等人,“Genetics[遗传学]”,在Harwood等人[编辑], Bacillus[芽孢杆菌属], Plenum Publishing Corp.[普莱南出版公司][1989],第57-72页;Saunders等人, J.Bacteriol.[细菌学杂志]157:718-726[1984];Hoch等人, J.Bacteriol.[细菌学杂志]93:1925-1937[1967];Mann等人, Current Microbiol.[现代微生物学]13:131-135[1986];Holubova, Folia Microbiol.[微生物学大观]30:97[1985];Chang等人, Mol.Gen.Genet.[分子和普通遗传学]168:11-115[1979];Vorobjeva等人, FEMS Microbiol.Lett.[FEMS微生物学快报]7:261-263[1980];Smith等人, Appl.Env.Microbiol.[应用与环境微生物]51:634[1986];Fisher等人, Arch.Microbiol.[微生物学文献集]139:213-217[1981];以及McDonald, J.Gen.Microbiol.[普通微生物学杂志]130:203[1984])。实际上,包括原生质体转化和转染、转导和原生质体融合在内的转化方法是熟知的并且适合用于本发明。本领域已知的用于转化芽孢杆菌属细胞的方法包括例如质粒标记拯救转化的方法,其涉及通过携带部分同源的驻留质粒的感受态细胞摄取供体质粒(参见,Contente等人, Plasmid[质粒]2:555-571[1979];Haima等人, Mol.Gen.Genet.[分子和普通遗传学]223:185-191[1990];Weinrauch等人, J.Bacteriol.[细菌学杂志]154:1077-1087[1983];以及Weinrauch等人,

J. Bacteriol. [细菌学杂志] 169:1205-1211 [1987])。在该方法中,输入性供体质粒在模拟染色体转化的过程中与驻留的“辅助”质粒的同源区重组。

[0064] 除了通常使用的方法之外,在一些实施例中,用包含编码本发明的溶菌酶多肽的核酸的DNA构建体或载体直接转化宿主细胞(即,在引入宿主细胞之前,不使用中间细胞扩增或以其他方式处理DNA构建体或载体)。将本发明的DNA构建体或载体引入宿主细胞包括本领域已知的将核酸序列(例如DNA序列)引入宿主细胞而不插入宿主基因组的那些物理和化学方法。这样的方法包括但不限于氯化钙沉淀、电穿孔、裸DNA、脂质体等。在另外的实施例中,DNA构建体或载体与质粒一起共转化而不插入质粒。在另外的实施例中,通过本领域已知的方法从经改变的芽孢杆菌属菌株中缺失选择标记(参见,Stahl等人,J. Bacteriol. [细菌学杂志] 158:411-418 [1984];以及Palmeros等人,Gene [基因] 247:255-264 [2000])。

[0065] 在一些实施例中,将本发明的转化细胞在常规营养培养基中培养。合适的特别培养条件,如温度、pH等是本领域技术人员已知的,并且详细描述于科学文献中。在一些实施例中,本发明提供包含本公开的至少一种溶菌酶多肽或至少一种核酸的培养物(例如细胞培养物)。

[0066] 在一些实施例中,将用编码本公开的至少一种溶菌酶多肽的至少一种多核苷酸序列转化的宿主细胞在允许本发明的溶菌酶表达的条件下在合适的营养培养基中培养,其后从培养物中回收所得的溶菌酶。在一些实施例中,通过常规程序从培养基中回收由细胞产生的溶菌酶,这些常规程序包括但不限于例如通过离心或过滤从培养基中分离宿主细胞、借助于盐(例如硫酸铵)沉淀上清液或滤液的蛋白质组分、层析法纯化(例如离子交换、凝胶过滤、亲和等)。

[0067] 在一些实施例中,由重组宿主细胞产生的溶菌酶多肽被分泌到培养基中。编码纯化促进结构域的核酸序列可以用于促进蛋白质的纯化。包含编码溶菌酶多肽的多核苷酸序列的载体或DNA构建体可以进一步包含编码促进溶菌酶多肽纯化的纯化促进结构域的核酸序列(参见例如,Kroll等人,DNA Cell Biol. [DNA细胞生物学] 12:441-53 [1993])。这样的纯化促进结构域包括但不限于例如金属螯合肽,如允许在固定化的金属上纯化的组氨酸-色氨酸模块(参见Porath,Protein Expr. Purif. [蛋白质表达与纯化] 3:263-281 [1992])、允许在固定化的免疫球蛋白上纯化的蛋白A结构域、以及在FLAGS延伸/亲和纯化系统中采用的结构域。还发现在纯化结构域与异源蛋白之间包括可切割的接头序列如因子XA或肠激酶(例如,可获自加利福尼亚州圣地亚哥的英杰公司(Invitrogen)的序列)可用于促进纯化。

[0068] 用于检测和测量酶(如本发明的溶菌酶多肽)的酶活性的测定法是熟知的。用于检测和测量溶菌酶的活性的多种测定法也是本领域普通技术人员已知的。特别地,测定法可用于测量溶菌酶活性,例如实例中描述的那些、Gorin等人描述的那些(Gorin,G.,Wang,S.F.,Papapavlou,L.,(1971) Assay of lysozyme by its lytic action on *M. lysodeikticus* cells. [通过溶菌酶对溶壁微球菌细胞的裂解作用测定溶菌酶] Analytical Biochemistry [分析生物化学] 39:113-127)、或如在EnzChek®溶菌酶测定试剂盒(赛默飞世尔公司)中可商购的那些。

[0069] 可以使用各种方法来确定宿主细胞中成熟溶菌酶的产生水平。这样的方法包括但不限于例如使用对溶菌酶具有特异性的多克隆或单克隆抗体的方法。示例性方法包括但不

限于酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、荧光免疫测定(FIA)和荧光激活细胞分选术(FACS)。这些和其他测定法是本领域熟知的(参见例如,Maddox等人,J.Exp.Med.[实验医学杂志]158;1211[1983])。

[0070] 在一些其他实施例中,本发明提供了用于制备或产生本公开的成熟溶菌酶多肽的方法。成熟的溶菌酶多肽不包括信号肽或前肽序列。一些方法包括在重组细菌宿主细胞(例如像芽孢杆菌属物种细胞(例如,枯草芽孢杆菌细胞))中制备或产生本公开的溶菌酶多肽。在一些实施例中,本公开提供了一种产生本发明的溶菌酶多肽的方法,该方法包括在有利于产生该溶菌酶多肽的条件下培养包含重组表达载体的重组宿主细胞,该重组表达载体包含编码本公开的溶菌酶多肽(例如,与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的多肽)的核酸。一些这样的方法进一步包括从培养物中回收溶菌酶多肽。

[0071] 在一些实施例中,本公开提供了产生本发明的溶菌酶多肽的方法,这些方法包括:(a)将重组表达载体引入细胞群体(例如,细菌细胞,如枯草芽孢杆菌细胞)中,该重组表达载体包含编码本公开的溶菌酶多肽(例如,与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的多肽)的核酸;和(b)在有利于产生由该表达载体编码的溶菌酶多肽的条件下在培养基中培养这些细胞。一些这样的方法进一步包括:(c)从这些细胞或从该培养基中分离该溶菌酶多肽。

[0072] 清洁方法

[0073] 提供了用于预防、减少或去除微生物的方法。可用于这些方法中的微生物包括任何微生物。这些微生物可以是革兰氏阳性细菌或革兰氏阴性细菌(需氧或厌氧);藻类、原生动物、和/或酵母或丝状真菌、及其组合。在一些实施例中,生物膜可以包括活细胞,这些细胞包括以下一个或多个细菌属:不动杆菌属物种(*Acinetobacter* sp.)、气微菌属物种(*Aeromicrobium* sp.)、短波单胞菌属物种(*Brevundimonas* sp.)、伯克霍尔德菌属物种(*Burkholderia* sp.)、弯曲杆菌属物种(*Campylobacter* sp.)、梭菌属物种(*Clostridium* sp.)、脱硫弧菌属物种(*Desulfovibrio* sp.)、埃希氏菌属物种、嗜血杆菌属物种(*Haemophilus* sp.)、乳杆菌属物种(*Lactobacillus* sp.)、乳球菌属物种(*Lactococcus* sp.)、李斯特菌属物种(*Listeria* sp.)、微杆菌属物种(*Microbacterium* sp.)、微球菌属物种(*Micrococcus* sp.) (例如藤黄微球菌或溶壁微球菌)、莫拉菌属物种(*Moraxella* sp.) (例如奥斯陆莫拉菌)、卟啉单胞菌属物种(*Porphyromonas* sp.)、丙酸杆菌属物种(*Priopionibacterium* sp.)、假单胞菌属物种(例如荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、沙门氏菌属物种(*Salmonella* sp.)、葡萄球菌属物种(*Staphylococcus* sp.) (例如表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*))、和寡养单胞菌属物种(*Stenotrophomonas* sp.)、链霉菌属物种、李斯特菌属物种(*Listeria* sp.)、链球菌属物种(*Streptococcus* sp.) (例如变异链球菌(*Streptococcus mutans*))、和弧菌属物种(*Vibrio* sp.) ,或酵母(如假丝酵母属物种(*Candida* sp.))。

[0074] 在一个实施例中,提供了用于预防或减少表面的与污垢相关的微生物的方法,其

中这些方法包括使表面与具有溶菌酶活性的多肽(该多肽与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)或包含这样的具有溶菌酶活性的多肽的组合物接触。

[0075] 在另一实施例中,本公开提供了一种用于预防或减少纺织品或硬表面上的微生物生长的方法,其中该方法包括使纺织品或硬表面与具有溶菌酶活性的多肽(其中该多肽与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)或包含具有溶菌酶活性的多肽的组合物接触,以及任选地冲洗该纺织品或硬表面。

[0076] 在一个实施例中,纺织品或硬表面包含例如在其表面上的微生物。在一个实施例中,相对于使表面或纺织品与具有溶菌酶活性的多肽或包含具有溶菌酶活性的多肽的组合物接触之前存在于该表面或纺织品上的微生物的量,微生物生长减少至少约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更高。在一个实施例中,使用本领域可用于确定微生物生长的方法测定存在于表面或纺织品上的微生物的减少水平。在一个实施例中,可以使用本文下面的实例2、3或4中提供的方法测量微生物生长。

[0077] 在另一实施例中,微生物的生长的预防或减少包括纺织品或硬表面上的至少一种微生物的形成、生长或增殖的减少。在一个实施例中,纺织品或硬表面上的微生物的形成、生长或增殖的减少可以通过使用下面的实例2、3或4中提供的方法或本领域中另一种合适的方法在合适的时间段内跟踪该微生物的量的变化来测量。例如,相对于未处理的硬表面或纺织品的情况,微生物生长可以以从1%至约99%范围内的量被抑制。相对于未处理的硬表面或纺织品上的微生物生长,微生物生长可被抑制至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、或至少约95%。在另一实施例中,与未处理的表面的情况相比,表面上的微生物生长可在多个衣物洗涤周期内发生或可在多个衣物洗涤周期内延迟。

[0078] 在另一实施例中,提供了用于预防、去除或减少纺织品上、表面上或溶液中的微生物的方法,其中这些方法包括使该纺织品、表面或溶液与具有溶菌酶活性的多肽(例如,与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的多肽)或包含具有溶菌酶活性的多肽的组合物接触。在一个实施例中,可以使用本领域中已知的标准方法如通过对集落进行计数、通过测量光密度、或通过使用指示染色剂或染料来测量纺织品上、表面上或溶液中微生物计数的减少。在一个实施例中,所预防、去除或减少的纺织品上、表面上或溶液中的生物可以包括但不限于以下一个或多个细菌属:不动杆菌属物种、气微菌属物种、短波单胞菌属物种、伯克霍尔德菌属物种、弯曲杆菌属物种、梭菌属物种、脱硫弧菌属物种、埃希氏菌属物种、嗜血杆菌属物种、乳杆菌属物种、乳球菌属物种、李斯特菌属物种、微杆菌属物种、微球菌属物种(例如藤黄微球菌或溶壁微球菌)、莫拉菌属物种(例如奥斯陆莫拉菌)、卟啉单胞菌属物种、假单胞菌属物种(例如荧光假单胞菌、恶臭假单胞菌、铜绿假单胞菌)、沙门氏菌属物种、葡萄球菌属物种(例如表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌)、寡养单胞菌属物种、链霉菌属物种、链球菌属物种(例如变异链球菌)、和弧菌属物种。在一个实施例中,这些生物可以包括真菌或酵母物种,如白假丝酵母(*Candida albicans*)。

[0079] 在另一实施例中,提供了用于预防、去除或减少纺织品上、表面上或溶液中的恶臭的方法,其中这些方法包括使该纺织品、表面或溶液与具有溶菌酶活性的多肽(例如,与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的多肽)或包含具有溶菌酶活性的多肽的组合物接触。在一个实施例中,可以通过人感官观察来测量恶臭的减少,如通过闻表面、纺织品或溶液,或通过恶臭化合物的分析测量,如但不限于气相色谱-质谱法(GC/MS)或带固相微萃取的气相色谱质谱法(GC/MS-SPME)或气相色谱嗅闻分析法(GC-O)。在一个实施例中,相对于未处理的对照,恶臭可以减少至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少30%、或至少40%、或至少50%、或至少60%、或至少70%、或至少80%、或至少90%。可以在清洗机器或手动清洗桶(例如,用于手洗)中使该纺织品或表面与该多肽或包含该具有溶菌酶活性的多肽的组合物接触。在一个实施例中,在清洗液中使该纺织品或表面与该具有溶菌酶活性的多肽或该包含具有溶菌酶活性的肽的组合物接触。在另一实施例中,将含有该具有溶菌酶活性的多肽的溶液与该硬表面一起孵育或流过该硬表面,如通过将该溶液泵送通过管子或管道或通过用该溶液填充贮器。

[0080] 在一些实施例中,使纺织品或表面与多肽或包含多肽的组合物在持续所希望的任何时间长度或持续足以预防、减少或去除该纺织品上的微生物生长的任何时间段的条件下接触。在一个实施例中,接触步骤在约5分钟与约10天之间。在一些实施例中,接触在清洗液中发生,持续约5至约400分钟、约5分钟至约300分钟之间、约5分钟至约250分钟之间、约5分钟至约200分钟之间、约5分钟至约150分钟之间、约5分钟至约100分钟之间、约5分钟至约50分钟之间、约5分钟至约30分钟之间。在一些实施例中,微生物生长或生物膜的预防、减少或去除在单个清洗周期中发生。在一些实施例中,微生物生长或生物膜的预防、减少或去除在多个清洗周期内发生,使得多个清洗周期内的总接触时间为约5至约400分钟、约5分钟至约300分钟之间、约5分钟至约250分钟之间、约5分钟至约200分钟之间、约5分钟至约150分钟之间、约5分钟至约100分钟之间、约5分钟至约50分钟之间、约5分钟至约30分钟之间。

[0081] 在一些实施例中,使纺织品或制品与多肽或包含多肽的组合物在具有允许预防、减少或去除该纺织品或制品的微生物的温度的条件下接触。在一些实施例中,本文公开的方法中的温度包括10°至60°C之间、10°至约45°C之间、15°至约55°C之间、15°至约50°C之间、15°至约45°C之间、20°至约60°C之间、20°至约50°C之间、和20°至约45°C之间的那些。

[0082] 本文提供的多肽、组合物和方法可用于希望预防、减少或去除微生物或生物膜的广泛应用中,如家用清洁,包括清洗机器、餐具清洗机和家用表面。这些多肽、组合物和方法还应用于处理医学和牙科生物膜中,包括但不限于牙齿上、肺部感染(例如, **Pulmozyme®**)、导管和植入的医疗器械上、隐形眼镜上、医疗器械清洁中、和伤口敷料中的斑块。这些多肽、组合物和方法还应用为用于个人护理的抗微生物剂,包括但不限于应用在牙膏、漱口剂、口气清新剂、化妆品、霜剂、清洗剂、漂洗剂、擦拭物、洗漱用品、洗发剂和皂中。这些多肽、组合物和方法还应用为用于食品和饮料的抗微生物剂,包括但不限于应用在蔬菜、水果、肉、家禽、鱼或包装材料(包括片材、瓶子、小瓶、袋子、盒子、托盘或纸盒)中。本文提供的多肽、组合物和方法还可用于处理各种工业环境中的生物淤积和微生物污染,这些工业环境包括但不限于工业工艺用水、废水处理、冷却系统、蒸发冷凝器、喷泉、过滤系统、超滤系统、热交换器、纸浆与造纸加工液、纺织品加工或产品、印刷液、金属加工液、液压液、油田流体、注射

水、压裂液、钻井泥浆、储罐、燃料、石油加工液、垫片、管道、管子、医疗器械、水处理设施、海洋设备、动物护理水和食品递送系统、围栏、笼子、谷仓、棚或地板。这些多肽、组合物和方法还应用为用于以下的抗微生物剂：工业清洁剂、地板抛光剂、木材、木质产品、皮革、绝缘材料、漆料和涂料、织物、粘合剂、浴室和厨房清洁剂或擦拭物。

[0083] 另一实施例涉及对纺织品进行衣物洗涤的方法，其中该方法包括使纺织品与具有溶菌酶活性的多肽或包含具有溶菌酶活性的多肽的组合物接触，持续足以预防、减少或去除该纺织品的微生物和/或生物膜的时间长度，以及任选地冲洗该纺织品。

[0084] 另一实施例涉及用于清洁制品的方法，其中该方法包括使该制品与具有溶菌酶活性的多肽或包含具有溶菌酶活性的多肽的组合物在足以减少或去除该制品的微生物或生物膜的条件接触，以及任选地冲洗该制品。

[0085] 组合物

[0086] 在一个实施例中，本公开提供了用于在本文提供的方法中使用的组合物（例如，洗涤剂组合物）。这些组合物通常包含具有溶菌酶活性的多肽（例如，与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的多肽）以及一种或多种另外的洗涤剂组分（如表面活性剂）。

[0087] 可在本文提供的方法中使用的包含具有溶菌酶活性的多肽的组合物可以包含使用浓度为0.001至10,000mg/L、或0.001至2000mg/L、或0.01至5000mg/L、或0.01至2000mg/L、或0.01至1300mg/L、或0.01至500mg/L、或0.1至5000mg/L、或0.1至2000mg/L、或0.1至1300mg/L、或0.1至100mg/L、或0.1至50mg/L、或1至5000mg/L、或1至1300mg/L、或1至500mg/L、或1至100mg/L、或10至5000mg/L、或10至1300mg/L、或10至500mg/L的具有溶菌酶活性的多肽。在另一实施例中，组合物可以含有具有溶菌酶活性的多肽，该多肽的量为0.002至5000mg蛋白质，如0.005至1300mg蛋白质、或0.01至5000mg蛋白质、或0.01至1300mg蛋白质、或0.1至5000mg蛋白质、或1至1300mg蛋白质、优选地0.1至1300mg蛋白质、更优选地1至1300mg蛋白质、甚至更优选地10至500mg蛋白质/升清洗液，或该量为至少0.002ppm活性溶菌酶。在另一实施例中，洗涤剂组合物包含具有溶菌酶活性的多肽，该多肽的量在清洗液提供溶菌酶，该溶菌酶在该清洗液中的量为0.01至1000ppm之间、约0.1至5000ppm之间、约0.1至2500ppm之间、约0.1至1500ppm之间、约0.1至1300ppm之间、约0.1至1000ppm之间、约0.1至500ppm之间、1至1300ppm之间、约1至约500ppm之间、约1至约100ppm之间、10至1300ppm之间、约10与500PPM之间、约50与1300ppm之间、约50与500ppm之间。

[0088] 在一个实施例中，组合物包含溶菌酶和至少一种另外的洗涤剂组分，以及任选的一种或多种另外的酶。

[0089] 还提供了用于在本文提供的方法中使用的洗涤剂组合物。如本文所用，关于旨在用于在清洁污染的物体或肮脏物体（包括特定纺织品或非纺织品物体或物品）的清洗介质（例如，清洗液）中使用的组合物，使用术语“洗涤剂组合物”或“洗涤剂配制品”。本发明的这样的组合物不限于任何特定的洗涤剂组合物或配制品。事实上，在一些实施例中，本发明的洗涤剂包含至少一种溶菌酶多肽（与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的多肽）和另外的一种或多种表面活性剂、一种或多种转移酶、水解酶、氧化还原酶、助洗剂（例如助洗剂盐）、漂白剂、漂白活化剂、上蓝剂、荧光染料、结块抑制剂、掩蔽剂、酶活化剂、抗氧化剂和/或增

溶剂。在一些情况下,助洗剂盐是硅酸盐和磷酸盐的混合物,优选具有比磷酸盐(例如,三聚磷酸钠)更多的硅酸盐(例如,偏硅酸钠)。本发明的一些组合物(例如但不限于清洁组合物或洗涤剂组合物)不含有任何磷酸盐(例如,磷酸盐或磷酸盐助洗剂)。

[0090] 在一些实施例中,本公开的清洁或洗涤剂组合物进一步包含辅助材料,这些辅助材料包括但不限于表面活性剂、助洗剂、漂白剂、漂白活化剂、漂白催化剂、其他酶、酶稳定系统、螯合剂、光学增亮剂、去污聚合物、染料转移剂、分散剂、泡沫抑制剂、染料、香料、着色剂、填料盐、助水溶剂、光活化剂、荧光剂、织物调理剂、可水解表面活性剂、防腐剂、抗氧化剂、抗收缩剂、抗皱剂、杀菌剂、杀真菌剂、颜色点缀剂、银护理剂、抗晦暗剂和/或抗腐蚀剂、碱性来源、增溶剂、载体、加工助剂、颜料和pH控制剂(参见例如,美国专利号6,610,642、6,605,458、5,705,464、5,710,115、5,698,504、5,695,679、5,686,014和5,646,101,其全部通过援引并入本文)。

[0091] 本发明的洗涤剂或清洁组合物有利地用于例如衣物洗涤应用、硬表面清洁、餐具清洗应用以及个人护理或化妆品应用,如义齿、牙膏、化妆品、洗剂、洗发剂、调理剂、霜剂、擦拭物、预润湿的擦拭物、香膏、糊剂或软膏。另外,由于在较低温度溶液中具有增加的有效性的独特优点,本发明的酶理想地适合于衣物洗涤应用。此外,本发明的酶可用于颗粒和液体组合物。

[0092] 酶组分重量是基于总的活性蛋白质。除非另有指示,否则所有百分比和比率均按重量计算。除非另有指示,否则所有百分比和比率均基于总组合物计算。在衣物洗涤剂组合物中,酶水平以ppm表示,相当于mg活性蛋白质/kg洗涤剂组合物。

[0093] 在一些实施例中,本文所述的衣物洗涤剂组合物进一步包含表面活性剂。在一些实施例中,表面活性剂选自非离子表面活性剂、两性表面活性剂、半极性表面活性剂、阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、两性离子表面活性剂、及其组合和混合物。在另外的实施例中,表面活性剂选自阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、两性离子表面活性剂、及其组合。在一些实施例中,本文所述的衣物洗涤剂组合物包含按组合物的重量计从约0.1%至约60%、约1%至约50%、或约5%至约40%的表面活性剂。

[0094] 示例性表面活性剂包括但不限于十二烷基苯磺酸钠、C12-14链烷醇聚醚-7、C12-15链烷醇聚醚-7、C12-15链烷醇聚醚硫酸钠、C14-15链烷醇聚醚-4、月桂醇醚硫酸钠(例如,Steol CS-370)、氢化椰油酸钠、C12乙氧基化物(Alfonic 1012-6、Hetoxol LA7、Hetoxol LA4)、烷基苯磺酸钠(例如,Nacconol 90G)、及其组合和混合物。阴离子表面活性剂包括但不限于直链烷基苯磺酸盐(LAS)、 α -烯炔磺酸盐(AOS)、烷基硫酸盐(脂肪醇硫酸盐)(AS)、醇乙氧基硫酸盐(AEOS或AES)、仲链烷磺酸盐(SAS)、 α -磺基脂肪酸甲酯、烷基-或烯基琥珀酸、或皂。非离子表面活性剂包括但不限于醇乙氧基化物(AEO或AE)、羧化醇乙氧基化物、壬基苯酚乙氧基化物、烷基多糖苷、烷基二甲基胺氧化物、乙氧基化脂肪酸单乙醇酰胺、脂肪酸单乙醇酰胺、多羟基烷基脂肪酸酰胺(例如,如WO 92/06154中所述)、脂肪酸的聚氧乙烯酯、聚氧乙烯脱水山梨糖醇酯(例如,TWEEN)、聚氧乙烯醇、聚氧乙烯异醇、聚氧乙烯醚(例如,TRITON和BRIJ)、聚氧乙烯酯、聚氧乙烯-对-叔辛基苯酚或辛基苯基-环氧乙烷缩合物(例如,NONIDET P40)、环氧乙烷与脂肪醇的缩合物(例如,LUBROL)、聚氧乙烯壬基苯酚、聚亚烷基二醇(SYNPERONIC F108)、糖基表面活性剂(例如,吡喃葡萄糖苷、硫代吡喃葡萄糖苷)、及其组合和混合物。

[0095] 在另外的实施例中,本文所述的衣物洗涤剂组合物进一步包含表面活性剂混合物,包括但不限于5%-15%阴离子表面活性剂、<5%非离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、膦酸酯、皂、酶、香料、丁基苯基甲基丙酸酯、香叶醇、沸石、聚羧酸酯、己基肉桂醛、柠檬烯、阳离子表面活性剂、香茅醇、和苯并异噻唑啉酮。

[0096] 本文所述的衣物洗涤剂组合物可另外地包括一种或多种洗涤剂助洗剂或助洗剂系统、络合剂、聚合物、漂白系统、稳定剂、泡沫促进剂、泡沫抑制剂、抗腐蚀剂、污垢悬浮剂、抗污垢再沉积剂、染料、杀细菌剂、助水溶剂、光学增亮剂、织物调理剂和香料。如本文更详细提供的,本文所述的衣物洗涤剂组合物还可包括选自蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶、脂肪酶、氨基己糖苷酶、甘露聚糖酶、核酸酶、果胶酶、木葡聚糖酶、或过水解酶的另外的酶。

[0097] 在一些实施例中,本文所述的衣物洗涤剂组合物进一步包含按清洁组合物的重量计从约1%、从约3%至约60%、或甚至从约5%至约40%的助洗剂。助洗剂可以包括但不限于聚磷酸盐的碱金属、铵和链烷醇铵盐;碱金属硅酸盐、碱土金属和碱金属碳酸盐;铝硅酸盐;聚羧酸酯化合物;醚羟基聚羧酸酯;马来酸酐与乙烯或乙烯基甲基醚、1,3,5-三羟基苯-2,4,6-三磺酸、和羧基甲基氧基琥珀酸的共聚物;聚乙酸(如乙二胺四乙酸和次氨基三乙酸)的各种碱金属、铵和取代的铵盐;以及聚羧酸酯,如苯六甲酸、琥珀酸、柠檬酸、氧代二琥珀酸(oxydisuccinic acid)、聚马来酸、苯1,3,5-三羧酸、羧基甲基氧基琥珀酸、及其可溶性盐。

[0098] 在一些实施例中,助洗剂形成水溶性硬度离子络合物(例如,螯合助洗剂),如柠檬酸盐和聚磷酸盐(例如,三聚磷酸钠和三聚磷酸钠六水合物、三聚磷酸钾、以及混合的三聚磷酸钠和三聚磷酸钾等)。任何合适的助洗剂可用于本文所述的组合物中,包括本领域已知的那些。

[0099] 在一些实施例中,本文所述的衣物洗涤剂组合物进一步包含辅助成分,该辅助成分包括但不限于表面活性剂、助洗剂、漂白剂、漂白活化剂、漂白催化剂、另外的酶、酶稳定剂(包括例如,酶稳定系统)、螯合剂、光学增亮剂、去污聚合物、染料转移剂、染料转移抑制剂、催化材料、过氧化氢、过氧化氢源、预成型过酸、聚合物分散剂、粘土污垢去除剂、结构弹性剂、分散剂、泡沫抑制剂、染料、香料、着色剂、填料盐、助水溶剂、光活化剂、荧光剂、织物调理剂、可水解表面活性剂、溶剂、防腐剂、抗氧化剂、抗收缩剂、抗皱剂、杀菌剂、杀真菌剂、颜色点缀剂、抗腐蚀剂、碱性来源、增溶剂、载剂、加工助剂、颜料、pH控制剂及其组合。(参见例如,US 6610642、US 6605458、US 5705464、US 5710115、US 5698504、US 5695679、US 5686014、和US 5646101)。在一些实施例中,掺入一种或多种辅助剂例如以便辅助或增强清洁性能(用于处理待清洁的基材),或者以便修饰清洁组合物的美观性(如用香料、着色剂、染料等的情况)。任何这样的辅助成分是除了本文所述的溶菌酶多肽以外的。在一些实施例中,辅助成分选自表面活性剂、酶稳定剂、助洗剂化合物、聚合物化合物、漂白剂、另外的酶、泡沫抑制剂、分散剂、钙皂分散剂、污垢悬浮剂、软化剂、抗再沉积剂、腐蚀抑制剂、及其组合。

[0100] 在一些另外的实施例中,本文所述的衣物洗涤剂组合物包含一种或多种酶稳定剂。在一些实施例中,酶稳定剂是钙和/或镁离子的水溶性来源。在一些实施例中,酶稳定剂包括寡糖、多糖和无机二价金属盐(包括碱土金属盐,如钙盐)。在一些实施例中,本文使用的酶通过存在于为酶提供以下这样的离子的成品组合物中的锌(II)、钙(II)和/或镁(II)

离子的水溶性来源,以及其他金属离子(例如,钡(II)、钪(II)、铁(II)、锰(II)、铝(III)、锡(II)、钴(II)、铜(II)、镍(II)以及氧钒(IV))来稳定。氯化物和硫酸盐还可用于一些实施例中。示例性寡糖和多糖(例如,糊精)描述于例如WO 07145964中。在一些实施例中,本文所述的衣物洗涤剂组合物含有可逆酶抑制剂,例如像糖苷或蛋白质溶菌酶抑制剂、含硼化合物(例如,硼酸盐、4-甲酰基苯基硼酸、和苯基硼酸衍生物,例如像描述于WO 9641859中)、肽醛(例如像描述于WO 2009118375和WO 2013004636中)、或其组合。

[0101] 本文的清洁组合物典型地被配制以使得在水性清洁操作中使用期间,清洗水的pH为从约3.0至约11。液体产品配制品典型地被配制成具有从约5.0至约9.0的净pH。颗粒衣物洗涤产品典型地被配制成pH为从约8.0至约11.0。用于将pH控制在推荐的使用水平的技术包括使用缓冲液、碱、酸等,并且是本领域技术人员熟知的。

[0102] 合适的高pH清洁组合物典型地具有从约9.0至约11.0的净pH、或甚至从9.5至10.5的净pH。这样的清洁组合物典型地包含足够量的pH调节剂(如氢氧化钠、单乙醇胺或盐酸)以提供净pH为从约9.0至约11.0的这样的清洁组合物。这样的组合物典型地包含至少一种碱稳定的酶。在一些实施例中,组合物是液体,而在其他实施例中,这些组合物是固体。

[0103] 全世界典型的清洗溶液中的洗涤剂组合物的浓度从洗涤剂组合物的小于约800ppm(“低洗涤剂浓度地理位置”) (例如在日本为约667ppm) 变化至在约800ppm至约2000ppm之间(“中洗涤剂浓度地理位置”) (例如在美国为约975ppm,在巴西为约1500ppm), 变化至大于约2000ppm(“高洗涤剂浓度地理位置”) (例如在欧洲为约4500ppm至约5000ppm,在高泡沫磷酸盐助洗剂地理位置为约6000ppm)。

[0104] 在一些实施例中,本文所述的洗涤剂组合物可以在从约10°C至约60°C、或从约20°C至约60°C、或从约30°C至约60°C、从约40°C至约60°C、从约40°C至约55°C、或在10°C至60°C内的所有范围的温度被利用。在一些实施例中,本文所述的洗涤剂组合物在“冷水清洗”中在从约10°C至约40°C、或从约20°C至约30°C、从约15°C至约25°C、从约15°C至约35°C、或在10°C至40°C内的所有范围的温度使用。

[0105] 作为另外的实例,不同的地理位置典型地具有不同的水硬度。通常按照每加仑混合的Ca²⁺/Mg²⁺的颗粒数来描述水硬度。硬度是水中钙(Ca²⁺)和镁(Mg²⁺)的量的量度。在美国,大部分水都是硬水,但是硬度不同。中等硬(60-120ppm)至硬(121-181ppm)水具有60至181份/百万份(将份/百万份转化为颗粒/美国加仑是将ppm#除以17.1等于颗粒/加仑)的硬度矿物质。

[0106] 表I. 水硬度水平

[0107]

水	颗粒/加仑	份/百万份
软	小于1.0	小于17
略硬	1.0至3.5	17至60
中等硬	3.5至7.0	60至120
硬	7.0至10.5	120至180
非常硬	大于10.5	大于180

[0108] 典型地,欧洲水硬度大于约10.5(例如,约10.5至约20.0)颗粒/加仑混合的Ca²⁺/Mg²⁺(例如,约15颗粒/加仑混合的Ca²⁺/Mg²⁺)。典型地,北美水硬度大于日本水硬度、但低于欧洲水硬度。例如,北美水硬度可以在约3至约10颗粒之间、约3至约8颗粒或约6颗粒。典型

地,日本水硬度低于北美水硬度,通常小于约4、例如约3颗粒/加仑混合的 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 。

[0109] 在其他实施例中,本文所述的组合物可进一步包含一种或多种另外的酶。该一种或多种另外的酶选自酰基转移酶、 α -淀粉酶、 β -淀粉酶、 α -半乳糖苷酶、阿拉伯糖苷酶、芳基酯酶、 β -半乳糖苷酶、角叉菜胶酶、过氧化氢酶、纤维二糖水解酶、纤维素酶、软骨素酶、角质酶、内切- β -1,4-葡聚糖酶、内切- β -甘露聚糖酶、酯酶、外切-甘露聚糖酶、阿魏酸酯酶、半乳糖聚糖酶、葡糖淀粉酶、半纤维素酶、氨基己糖苷酶、透明质酸酶、角蛋白酶、漆酶、乳糖酶、木质素酶、脂肪酶、脂加氧酶、甘露聚糖酶、金属蛋白酶、核酸酶(例如脱氧核糖核酸酶和核糖核酸酶)、氧化酶、氧化还原酶、果胶酸裂合酶、果胶乙酰酯酶、果胶酶、戊聚糖酶、过水解酶、过氧化物酶、酚氧化酶、磷酸酶、磷脂酶、植酸酶、聚半乳糖醛酸酶、聚酯酶、另外的蛋白酶、支链淀粉酶、还原酶、鼠李糖半乳糖醛酸酶、 β -葡聚糖酶、鞣酸酶、转谷氨酰胺酶、木聚糖乙酰酯酶、木聚糖酶、木葡聚糖酶、木糖苷酶、及其任何组合或混合物。一些实施例涉及包含酶(像淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶、甘露聚糖酶和/或核酸酶)的酶的组合(即“混合物”),该组合与本文提供的组合物中的一种或多种溶菌酶多肽结合。

[0110] 在一些实施例中,本文提供的组合物包含与一种或多种蛋白酶组合的、具有溶菌酶活性的多肽。用于在本公开的组合物中与溶菌酶组合的蛋白酶包括具有蛋白酶活性的任何多肽。在一个实施例中,另外的蛋白酶是丝氨酸蛋白酶。在另一实施例中,另外的蛋白酶是另外的金属蛋白酶、真菌枯草杆菌蛋白酶、或碱性微生物蛋白酶或胰蛋白酶样蛋白酶。合适的另外的蛋白酶包括动物、植物或微生物来源的那些蛋白酶。在一些实施例中,蛋白酶是微生物蛋白酶。在其他实施例中,蛋白酶是化学或遗传修饰的突变体。在另一实施例中,蛋白酶是枯草杆菌蛋白酶样蛋白酶或胰蛋白酶样蛋白酶。示例性枯草杆菌蛋白酶包括衍生自例如芽孢杆菌属(例如,例如,BPN'、Carlsberg、枯草杆菌蛋白酶309、枯草杆菌蛋白酶147、TY145和枯草杆菌蛋白酶168)或真菌来源的那些,例如像美国专利号8,362,222中描述的那些。示例性另外的蛋白酶包括但不限于WO 92/21760、WO 92/17577、WO 95/23221、WO 2008/010925、WO 09/149200、WO 09/149144、WO 09/149145、WO 10/056640、WO 10/056653、WO 2010/0566356、WO 11/072099、WO 2011/13022、WO 11/140364、WO 12/151534、WO 2015/038792、WO 2015/089447、WO 2015/089441、WO 2016/097352、WO 2017/215925、美国公开号2008/0090747、US 5,801,039、US 5,340,735、US 5,500,364、US 5,855,625、RE 34,606、US 5,955,340、US 5,700,676、US 6,312,936、US 6,482,628、US 8,530,219、美国临时申请号62/180673和62/161077、以及PCT申请号PCT/US2015/021813、PCT/US2015/055900、PCT/US2015/057497、PCT/US2015/057492、PCT/US2015/057512、PCT/US2015/057526、PCT/US2015/057520、PCT/US2015/057502、PCT/US2016/022282和PCT/US16/32514中描述的那些,以及WO 1999014341、WO 1999033960、WO 1999014342、WO 1999034003、WO 2007044993、WO 2009058303、WO 2009058661、WO 2014071410、WO 2014194032、WO 2014194034、WO 2014194054和WO 2014/194117中描述的金属蛋白酶。示例性另外的蛋白酶包括但不限于胰蛋白酶(例如,猪或牛来源的)和描述于WO 89/06270中的镰孢属(*Fusarium*)蛋白酶。示例性商业蛋白酶包括但不限于MAXATASE[®]、OPTICLEAN[®]、OPTIMASE[®]、PROPERASE[®]、PURAFECT[®]、PURAFECT[®] OXP、PURAMAX[™]、EXCELLASE[™]、PREFERENZ[™]蛋白酶(例如P100、P110、P280、P300)、EFFECTENZ[™]蛋白酶(例如P1000、P1050、P2000)、EXCELLENZ[™]蛋白酶(例如P1000)、ULTIMASE[®]、和PURAFAST[™](杜

邦公司 (DuPont)); ALCALASE[®]、BLAZE[®]和BLAZE[®]变体、BLAZE[®] EVITY[®] 16L、CORONASE[®]、SAVINASE[®]、SAVINASE[®] ULTRA、SAVINASE[®] EVITY[®]、SAVINASE[®] EVERIS[®]、PRIMASE[®]、DURAZYM[™]、POLARZYME[®]、OVOZYME[®]、KANNASE[®]、LIQUANASE[®]、LIQUANASE EVERIS[®]、NEUTRASE[®]、RELEASE[®]、PROGRESS UNO[®]、EASYZYME[®]、和 ESPERASE[®] (诺维信公司 (Novozymes)); BLAP[™]和BLAP[™]变体 (汉高公司 (Henkel)); KAP (嗜碱芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶 (花王公司 (Kao))); 和 BIOTOUCH[®] (AB酶制剂公司 (AB Enzymes))。示例性金属蛋白酶包括在枯草芽孢杆菌中表达的重组形式的中性金属蛋白酶nprE (参见例如WO 07/044993) 和来自解淀粉芽孢杆菌的纯化的中性金属蛋白酶PMN。

[0111] 在一些实施例中,本文提供的组合物包含与一种或多种淀粉酶组合的、具有溶菌酶活性的多肽。在一个实施例中,组合物包含按组合物的重量计从约0.00001%至约10%、约0.0001%至约10%、约0.001%至约5%、约0.001%至约2%、或约0.005%至约0.5%的淀粉酶。适合用于碱性溶液中的任何淀粉酶(例如, α 淀粉酶和/或 β 淀粉酶)可以用于包括在这样的组合物中。示例性淀粉酶可以是化学或遗传修饰的突变体。示例性淀粉酶包括但不限于细菌或真菌来源的那些,例如像在GB 1,296,839、WO 9100353、WO 9402597、WO 94183314、WO 9510603、WO 9526397、WO 9535382、WO 9605295、WO 9623873、WO 9623874、WO 9630481、WO 9710342、WO 9741213、WO 9743424、WO 981 3481、WO 9826078、WO 9902702、WO 99091 83、WO 9919467、WO 9923211、WO 9929876、WO 9942567、WO 9943793、WO 9943794、WO 9946399、WO 0029560、WO 0060058、WO 0060059、WO 0060060、WO 0114532、WO 0134784、WO 0164852、WO 0166712、WO 0188107、WO 0196537、WO 02092797、WO 0210355、WO 0231124、WO 2004055178、WO 2004113551、WO 2005001064、WO 2005003311、WO 200501 8336、WO 2005019443、WO 2005066338、WO 2006002643、WO 2006012899、WO 2006012902、WO 2006031554、WO 2006063594、WO 2006066594、WO 2006066596、WO 2006136161、WO 2008000825、WO 2008088493、WO 2008092919、WO 2008101894、WO2008/112459、WO 2009061380、WO 2009061381、WO 2009100102、WO 2009140504、WO 2009149419、WO 2010/059413、WO 2010088447、WO 2010091221、WO 2010104675、WO 2010115021、WO10115028、WO 2010117511、WO 2011076123、WO 2011076897、WO 2011080352、WO 2011080353、WO 2011080354、WO 2011082425、WO 2011082429、WO 2011087836、WO 2011098531、WO 2013063460、WO 2013184577、WO 2014099523、WO 2014164777和WO 2015077126中描述的淀粉酶。示例性商业淀粉酶包括但不限于AMPLIFY[®]、DURAMYL[®]、TERMAMYL[®]、FUNGAMYL[®]、STAINZYME[®]、STAINZYME PLUS[®]、STAINZYME PLUS[®]、STAINZYME ULTRA[®] EVITY[®]、和BAN[™] (诺维信公司); EFFECTENZ[™] S 1000、POWERASE[™]、PREFERENZ[™] S 100、PREFERENZ[™] S 110、EXCELLENZ[™] S 2000、RAPIDASE[®]和MAXAMYL[®]P (杜邦公司)。

[0112] 在一些实施例中,本文提供的组合物包含与一种或多种脂肪酶组合的、具有溶菌酶活性的多肽。在一些实施例中,组合物包含按组合物的重量计从约0.00001%至约10%、约0.0001%至约10%、约0.001%至约5%、约0.001%至约2%、或约0.005%至约0.5%的脂

肪酶。示例性脂肪酶可以是化学或遗传修饰的突变体。示例性脂肪酶包括但不限于例如细菌或真菌来源的那些,例如像绵毛状腐质菌(*H.lanuginosa*)脂肪酶(参见例如,EP 258068和EP 305216)、疏棉状嗜热丝孢菌(*T.lanuginosa*)脂肪酶(参见例如,WO 2014/059360和WO 2015/010009)、米黑根毛霉(*Rhizomucor miehei*)脂肪酶(参见例如,EP 238023)、假丝酵母属(*Candida*)脂肪酶例如南极洲假丝酵母(*C.antarctica*)脂肪酶(例如南极洲假丝酵母脂肪酶A或B)(参见例如,EP 214761)、假单胞菌属脂肪酶例如产碱假单胞菌(*P.alcaligenes*)和假产碱假单胞菌(*P.pseudoalcaligenes*)脂肪酶(参见例如,EP 218272)、洋葱假单胞菌(*P.cepacia*)脂肪酶(参见例如,EP 331376)、施氏假单胞菌(*P.stutzeri*)脂肪酶(参见例如,GB 1,372,034)、荧光假单胞菌(*P.fluorescens*)脂肪酶、芽孢杆菌属脂肪酶(例如枯草芽孢杆菌脂肪酶(Dartois等人,Biochem.Biophys.Acta[生物化学与生物物理学报]1131:253-260(1993))、嗜热脂肪芽孢杆菌脂肪酶(参见例如,JP 64/744992)、和短小芽孢杆菌(*B.pumilus*)脂肪酶(参见例如,WO 91/16422))。示例性克隆的脂肪酶包括但不限于沙门柏干酪青霉(*Penicillium camembertii*)脂肪酶(参见Yamaguchi等人,Gene[基因]103:61-67(1991));白地霉(*Geotrichum candidum*)脂肪酶(参见Schimada等人,J.Biochem.[生物化学杂志],106:383-388(1989));以及各种根霉属(*Rhizopus*)脂肪酶,如德氏根霉(*R.delemar*)脂肪酶(参见Hass等人,Gene[基因]109:117-113(1991))、雪白根霉(*R.niveus*)脂肪酶(Kugimiya等人,Biosci.Biotech.Biochem.[生物科学、生物技术与生物化学]56:716-719(1992))和米根霉(*R.oryzae*)脂肪酶。其他脂肪分解酶(例如角质酶)也可用于本文所述的一种或多种组合物中,包括但不限于例如衍生自门多萨假单胞菌(*Pseudomonas mendocina*)(参见WO 88/09367)和/或豌豆根腐镰孢菌(*Fusarium sokanipisi*)(参见WO 90/09446)的角质酶。示例性商业脂肪酶包括但不限于MILIPASE™、LUMA FAST™和LIPOMAX™(杜邦公司);LIPEX®、LIPOCLEAN®、LIPOLASE®和LIPOLASE®ULTRA(诺维信公司);以及LIPASE P™(天野药业有限公司(Amano Pharmaceutical Co.Ltd))。

[0113] 在一些实施例中,本文提供的组合物包含与一种或多种甘露聚糖酶组合的、具有溶菌酶活性的多肽。在一个实施例中,组合物包含按组合物的重量计从约0.00001%至约10%、约0.0001%至约10%、约0.001%至约5%、约0.001%至约2%、或约0.005%至约0.5%的甘露聚糖酶。示例性甘露聚糖酶可以是化学或遗传修饰的突变体。示例性甘露聚糖酶包括但不限于细菌或真菌来源的那些,例如像以下中描述的那些:WO 2016/007929;WO 2017/079756、WO 2017/079751、USPN 6,566,114;6,602,842;和6,440,991中描述的那些。示例性商业甘露聚糖酶包括但不限于MANNAWAY®(诺维信公司)和EFFECTENZ™ M 1000、EFFECTENZ™ M 2000、PREFERENZ® M 100、MANNASTAR®、和PURABRITE™(杜邦公司)。可以在本文提供的组合物中组合的甘露聚糖酶的示例性组合包括WO 2019/081515中描述的那些。

[0114] 在一些实施例中,本文提供的组合物和方法包含与核酸酶(如DNA酶或RNA酶)组合的、具有溶菌酶活性的多肽。示例性核酸酶包括但不限于在WO 2015181287、WO 2015155350、WO 2016162556、WO 2017162836、WO 2017060475(例如,SEQ ID NO:21)、WO 2018184816、WO 2018177936、WO 2018177938、WO2018/185269、WO 2018185285、WO 2018177203、WO 2018184817、WO 2019084349、WO 2019084350、WO 2019081721、WO

2018076800、WO 2018185267、WO 2018185280、WO 2018206553、WO 2019/086530、和WO 2020099490中描述的那些。可以在本文提供的组合物和方法中与具有溶菌酶活性的多肽组合使用的其他核酸酶包括以下中描述的那些：Nijland R, Hall MJ, Burgess JG (2010) Dispersal of Biofilms by Secreted, Matrix Degrading, Bacterial DNase [通过分泌、矩阵降解、细菌DNA酶分散生物膜] PLoS ONE [公共科学图书馆：综合] 5(12) 和Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P.C., Mattick, J.S. (2002) Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation [细菌生物膜形成所需的细胞外DNA] .Science [科学] 295:1487。

[0115] 又仍另外的实施例涉及包含本文所述的一种或多种溶菌酶和一种或多种纤维素酶的组合物。在一个实施例中，组合物包含按该组合物的重量计从约0.00001%至约10%、0.0001%至约10%、约0.001%至约5%、约0.001%至约2%、或约0.005%至约0.5%的纤维素酶。任何合适的纤维素酶可用于本文所述的组合物中。示例性纤维素酶可以是化学或遗传修饰的突变体。示例性纤维素酶包括但不限于细菌或真菌来源的那些，例如像在以下中描述的那些：WO 2005054475、WO 2005056787、US 7,449,318、US 7,833,773、US 4,435,307；EP 0495257；以及美国临时申请号62/296,678。示例性商业纤维素酶包括但不限于CELLUCLEAN[®]、CELLUZYME[®]、CAREZYME[®]、ENDOLASE[®]、RENOZYME[®]、和CAREZYME[®] PREMIUM (诺维信公司)；REVITALENZ[™] 100、REVITALENZ[™] 200/220、和REVITALENZ[®] 2000 (杜邦公司)；以及KAC-500 (B)[™] (花王公司)。在一些实施例中，纤维素酶作为成熟野生型或变体纤维素酶 (其中N-末端的一部分缺失) 的部分或片段掺入 (参见例如，US 5,874,276)。

[0116] 在一些实施例中，本文所述的衣物洗涤剂组合物包含至少一种螯合剂。合适的螯合剂可以包括但不限于铜、铁和/或锰螯合剂、及其混合物。在一些实施例中，本文所述的衣物洗涤剂组合物包含按组合物的重量计从约0.1%至约15%、或甚至从约3.0%至约10%的螯合剂。

[0117] 在一些仍另外的实施例中，本文所述的衣物洗涤剂组合物包含至少一种沉积助剂。合适的沉积助剂包括但不限于聚乙二醇、聚丙二醇、聚羧酸酯、去污聚合物 (如聚对苯二甲酸)、粘土如高岭土、蒙脱石、绿坡缕石、伊利石、膨润土、多水高岭土、及其混合物。

[0118] 在一些实施例中，本文所述的衣物洗涤剂组合物包含至少一种抗再沉积剂。

[0119] 在一些实施例中，本文所述的衣物洗涤剂组合物包含一种或多种染料转移抑制剂。合适的聚合物染料转移抑制剂包括但不限于聚乙烯吡咯烷酮聚合物、聚胺N-氧化物聚合物、N-乙烯吡咯烷酮与N-乙烯基咪唑的共聚物、聚乙烯噁唑烷酮以及聚乙烯咪唑、或其混合物。在一些实施例中，本文所述的衣物洗涤剂组合物包含按组合物的重量计从约0.0001%至约10%、从约0.01%至约5%、或甚至从约0.1%至约3%的染料转移抑制剂。

[0120] 在一些实施例中，本文所述的衣物洗涤剂组合物包含一种或多种硅酸盐。在这样的一些实施例中，可使用硅酸钠 (例如，二硅酸钠、偏硅酸钠和结晶页硅酸盐)。在一些实施例中，本文所述的衣物洗涤剂组合物包含按该组合物的重量计从约1%至约20%、或从约5%至约15%的硅酸盐。

[0121] 在又另外的实施例中，本文所述的衣物洗涤剂组合物包含一种或多种分散剂。合适的水溶性有机材料包括但不限于均聚合或共聚合的酸或其盐，其中多元羧酸包含至少两

个被不超过两个碳原子彼此分开的羧基自由基。

[0122] 在一些实施例中,本文所述的衣物洗涤剂组合物包含一种或多种漂白剂、漂白活化剂、和/或漂白催化剂。在一些实施例中,本文所述的衣物洗涤剂组合物包含一种或多种无机和/或有机漂白化合物。无机漂白剂可以包括但不限于过氧化氢合物盐(例如过硼酸盐、过碳酸盐、过磷酸盐、过硫酸盐和过硅酸盐)。在一些实施例中,无机过氧化氢合物盐是碱金属盐。在一些实施例中,包括为结晶固体但没有另外保护的无机过氧化氢合物盐,但是在一些其他实施例中,该盐被包衣。合适的盐包括例如描述于EP2100949中的那些。漂白活化剂典型地是在60°C及以下的温度在清洁过程中增强漂白作用的有机过酸前体。适合用于本文的漂白活化剂包括在过水解条件下给出优选具有从约1至约10个碳原子、特别是从约2至约4个碳原子的脂肪族过氧羧酸的化合物和/或任选地取代的过氧苯甲酸。漂白催化剂典型地包括例如,锰三氮杂环壬烷及相关络合物,以及钴、铜、锰和铁络合物,以及在US 4246612、US 5227084、US 4810410、WO 9906521、和EP 2100949中描述的那些。在一些实施例中,包括溶菌酶与用于产生过酸(如过乙酸)的酶催化剂的组合,例如WO 2005/056782 A2、US 7,754,460 B2、US 2008/0176299、或US 2006/0286651中描述的那些。

[0123] 在一些实施例中,本文所述的衣物洗涤剂组合物包含一种或多种催化性金属络合物。在一些实施例中,可使用含金属的漂白催化剂。在其他实施例中,金属漂白催化剂包含含有以下的催化系统:具有限定的漂白催化活性的过渡金属阳离子(例如,铜、铁、钛、钪、钨、钼或锰阳离子)、具有很少或不具有漂白催化活性的辅助性金属阳离子(例如,锌或铝阳离子)、以及对于催化性和辅助性金属阳离子具有限定的稳定性常数的螯合物,特别是乙二胺四乙酸、乙二胺四(亚甲基膦酸)及其水溶性盐(参见例如,US 4430243)。在一些实施例中,本文所述的衣物洗涤剂组合物借助于锰化合物来催化。这样的化合物和使用水平是本领域熟知的(参见例如,US 5576282)。在另外的实施例中,钴漂白催化剂可用于本文所述的衣物洗涤剂组合物中。各种钴漂白催化剂是本领域已知的(参见例如,US 5597936和US 5595967),并且通过已知的程序容易地制备。

[0124] 一些实施例涉及一种清洁方法,该清洁方法包括使有效量的本文所述的包含溶菌酶多肽的清洁或衣物洗涤组合物与包含污垢、污渍或生物膜的物品或表面接触以水解该污垢、或污渍或生物膜。

[0125] 本发明组合物和方法的其他方面和实施例将从前面的描述和以下实例中显而易见。在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可以在实践本发明时采用超出本文所述的实施例的各种替代性实施例。因此,权利要求书,而不是本文所述的特定实施例,限定了本发明的范围,并且正因为如此,在权利要求书的范围内的方法和结构及其等同物由此被覆盖。

[0126] 实施例

[0127] 实施例1.一种具有溶菌酶活性的分离的多肽或其活性片段,其中该多肽与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。

[0128] 实施例2.一种分离的多核苷酸,该分离的多核苷酸包含编码具有溶菌酶活性的多肽的核苷酸序列,其中该多肽与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。

[0129] 实施例3.一种包含分离的多核苷酸的重组核酸构建体,该分离的多核苷酸包含编码具有溶菌酶活性的多肽的核苷酸序列,其中该多肽与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性,该核苷酸序列可操作地连接到能够控制该多核苷酸序列的表达的启动子序列。

[0130] 实施例4.一种包含重组核酸构建体的分离的宿主细胞,该重组核酸构建体包含分离的多核苷酸,该分离的多核苷酸包含编码具有溶菌酶活性的多肽的核苷酸序列,其中该多肽与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性,该核苷酸序列可操作地连接到能够控制该多核苷酸序列的表达的启动子序列。

[0131] 实施例5.一种产生具有溶菌酶活性的多肽的方法,该方法包括:

[0132] a) 在有利于产生该多肽的条件下培养包含重组核酸构建体的宿主细胞,该重组核酸构建体包含分离的多核苷酸,该分离的多核苷酸包含编码具有溶菌酶活性的多肽的核苷酸序列,其中该多肽与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性,该核苷酸序列可操作地连接到能够控制该多核苷酸序列的表达的启动子序列,以及

[0133] b) 任选地,回收该具有溶菌酶活性的多肽。

[0134] 实施例6.一种用于预防、减少或去除微生物的方法,该方法包括使该微生物与具有溶菌酶活性的多肽或包含具有溶菌酶活性的多肽的组合物接触,其中该多肽与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。

[0135] 实施例7.如实施例6所述的方法,其中该微生物或生物膜在纺织品或硬表面上。

[0136] 实施例8.如实施例7所述的方法,其中该硬表面选自自由衣物洗涤机器表面、餐具表面、或餐具清洗机表面组成的组。

[0137] 实施例9.如实施例6所述的方法,其中该组合物是清洁组合物。

[0138] 实施例10.如实施例6-9所述的方法,其中该清洁组合物是衣物洗涤组合物。

[0139] 实施例11.一种用于预防、减少或去除纺织品或硬表面上的微生物生长的方法,该方法包括:(i)使纺织品或表面与多肽或包含这样的具有溶菌酶活性的多肽的组合物接触,该多肽与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性并且具有溶菌酶活性;以及(ii)任选地,冲洗该纺织品或表面。

[0140] 实施例12.如实施例11所述的方法,其中该纺织品包含在该纺织品的表面上的生物膜。

[0141] 实施例13.如实施例12所述的方法,其中从该纺织品减少或去除该生物膜。

[0142] 实施例14.如实施例6-13中任一项所述的方法,其中与使该纺织品或硬表面与该具有溶菌酶活性的多肽或包含具有溶菌酶活性的多肽的组合物接触之前存在于该纺织品或硬表面上的生物膜的量相比,从制品减少或去除的生物膜或微生物生长的量选自自由以下组成的组:至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更高。

[0143] 实施例15.如实施例6-14中任一项所述的方法,其中使用实例2或3的方法测量该微生物生长。

[0144] 实施例16.如实施例6-15中任一项所述的方法,其中该接触步骤包括使用具有溶菌酶活性的多肽,其中该多肽与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性,该多肽的量选自由以下组成的组:0.002至10,000mg蛋白质、0.005至5000mg蛋白质、0.01至5000mg蛋白质、0.05至5000mg蛋白质、0.05至1300mg蛋白质、0.1至1300mg蛋白质、0.1至500mg蛋白质、0.1至100mg蛋白质/升清洗液,或该量为至少0.002ppm活性溶菌酶。

[0145] 实施例17.如实施例6-16中任一项所述的方法,其中该接触步骤在清洗液中进行。

[0146] 实施例18.如实施例6-17中任一项所述的方法,其中该接触步骤发生的时间长度选自由以下组成的组:约5分钟至约10天、约5分钟至约400分钟、约5分钟至约300分钟之间、约5分钟至约250分钟之间、约5分钟至约200分钟之间、约5分钟至约150分钟之间、约5分钟至约100分钟之间、约5分钟至约50分钟之间、约5分钟至约30分钟之间。

[0147] 实施例19.如实施例6-18中任一项所述的方法,其中该接触步骤在选自由以下组成的组的温度进行:约10°至60°C、15°至约55°C之间、20°至约50°C之间以及20°至约45°C之间。

[0148] 实施例20.如实施例6-19中任一项所述的方法,其中该包含具有溶菌酶活性的多肽的组合物进一步包含表面活性剂。

[0149] 实施例21.如实施例20所述的方法,其中该表面活性剂选自由以下组成的组:非离子表面活性剂、两性表面活性剂、半极性表面活性剂、阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、两性离子表面活性剂、及其组合和混合物。

[0150] 实施例22.如实施例6-21中任一项所述的方法,其中该组合物是洗涤剂组合物。

[0151] 实施例23.如实施例6-22中任一项所述的方法,其中该接触步骤进一步包括使该纺织品或硬表面与一种或多种另外的酶接触,该一种或多种另外的酶选自由以下组成的组:酰基转移酶、 α -淀粉酶、 β -淀粉酶、 α -半乳糖苷酶、阿拉伯糖苷酶、芳基酯酶、 β -半乳糖苷酶、角叉菜胶酶、过氧化氢酶、纤维二糖水解酶、纤维素酶、软骨素酶、角质酶、内切- β -1,4-葡聚糖酶、内切- β -甘露聚糖酶、酯酶、外切-甘露聚糖酶、阿魏酸酯酶、半乳聚糖酶、葡糖淀粉酶、半纤维素酶、氨基己糖苷酶、透明质酸酶、角蛋白酶、漆酶、乳糖酶、木质素酶、脂肪酶、脂加氧酶、甘露聚糖酶、金属蛋白酶、核酸酶(例如脱氧核糖核酸酶和核糖核酸酶)、氧化酶、氧化还原酶、果胶裂合酶、果胶乙酰酯酶、果胶酶、戊聚糖酶、过水解酶、过氧化物酶、酚氧化酶、磷酸酶、磷脂酶、植酸酶、聚半乳糖醛酸酶、聚酯酶、蛋白酶、支链淀粉酶、还原酶、鼠李糖半乳糖醛酸酶、 β -葡聚糖酶、鞣酸酶、转谷氨酰胺酶、木聚糖乙酰酯酶、木聚糖酶、木葡聚糖酶、木糖苷酶、及其任何组合或混合物。

[0152] 实施例23.如实施例6-23中任一项所述的方法,其中该接触步骤在清洗机器或餐具清洗机中进行。

[0153] 实施例24.一种洗涤剂组合物,该洗涤剂组合物包含具有溶菌酶活性的多肽,其中该多肽与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。

[0154] 实施例25.如实施例24所述的洗涤剂组合物,其中该组合物进一步包含(ii)具

有蛋白酶活性的多肽；(iii) 任选地，至少一种另外的多肽，其中该至少一种另外的多肽是选自以下的酶：酰基转移酶、 α -淀粉酶、 β -淀粉酶、 α -半乳糖苷酶、阿拉伯糖苷酶、芳基酯酶、 β -半乳糖苷酶、角叉菜胶酶、过氧化氢酶、纤维二糖水解酶、纤维素酶、软骨素酶、角质酶、内切-p-1,4-葡聚糖酶、内切- β -甘露聚糖酶、酯酶、外切-甘露聚糖酶、阿魏酸酯酶、半乳聚糖酶、葡糖淀粉酶、半纤维素酶、氨基己糖苷酶、透明质酸酶、角蛋白酶、漆酶、乳糖酶、木质素酶、脂肪酶、脂加氧酶、甘露聚糖酶、金属蛋白酶、核酸酶（例如脱氧核糖核酸酶和核糖核酸酶）、氧化酶、氧化还原酶、果胶酸裂合酶、果胶乙酰酯酶、果胶酶、戊聚糖酶、过水解酶、过氧化物酶、酚氧化酶、磷酸酶、磷脂酶、植酸酶、聚半乳糖醛酸酶、聚酯酶、蛋白酶、支链淀粉酶、还原酶、鼠李糖半乳糖醛酸酶、 β -葡聚糖酶、鞣酸酶、转谷氨酰胺酶、木聚糖乙酰酯酶、木聚糖酶、木葡聚糖酶、木糖苷酶、及其任何组合或混合物；以及(iv) 表面活性剂。

[0155] 实施例26. 如实施例24所述的组合物，其中该表面活性剂选自由以下组成的组：非离子表面活性剂、两性表面活性剂、半极性表面活性剂、阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、两性离子表面活性剂、及其组合和混合物。

[0156] 实施例27. 如实施例24-26所述的组合物，其中该组合物包含按该组合物的重量计约0.1%至约60%之间、约1%至约50%、或约5%至约40%的表面活性剂。

[0157] 实施例28. 如实施例24-27所述的组合物，其中该具有溶菌酶活性的多肽具有以下氨基酸序列，该氨基酸序列与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。

[0158] 实施例29. 如实施例24-28所述的组合物，其中该核酸酶是DNA酶。

[0159] 实施例30. 如实施例24-29所述的组合物，其中该组合物进一步包含选自由以下组成的组的一种或多种辅助材料：助洗剂、漂白剂、漂白活化剂、漂白催化剂、其他酶、酶稳定系统、螯合剂、光学增亮剂、去污聚合物、染料转移剂、分散剂、泡沫抑制剂、染料、香料、着色剂、填料盐、助水溶剂、光活化剂、荧光剂、织物调理剂、可水解表面活性剂、防腐剂、抗氧化剂、抗收缩剂、抗皱剂、杀菌剂、杀真菌剂、颜色点缀剂、银护理剂、抗晦暗剂和/或抗腐蚀剂、碱性来源、增溶剂、载剂、加工助剂、颜料和pH控制剂。

[0160] 实施例31. 一种用于预防、减少或去除液体洗涤剂溶液中的微生物生长的方法，所述方法包括在液体洗涤剂溶液中包括有效量的溶菌酶和表面活性剂。

[0161] 实施例32. 如实施例31所述的方法，其中该溶菌酶具有以下氨基酸序列，该氨基酸序列与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。

[0162] 实施例33. 如实施例31或32所述的方法，其中该液体洗涤剂溶液是衣物或餐具洗涤剂。

[0163] 实施例34. 如实施例31-33中任一项所述的方法，其中该液体洗涤剂溶液包含溶菌酶，该溶菌酶的量选自由以下组成的组：0.002至10,000mg蛋白质、0.005至5000mg蛋白质、0.01至5000mg蛋白质、0.05至5000mg蛋白质、0.05至1300mg蛋白质、0.1至1300mg蛋白质、0.1至500mg蛋白质、0.1至100mg蛋白质/升清洗液，或该量为至少0.002ppm活性溶菌酶。

[0164] 实施例35. 如实施例31-34中任一项所述的方法，其中该表面活性剂选自由以下组成的组：非离子表面活性剂、两性表面活性剂、半极性表面活性剂、阴离子表面活性剂、阳离

子表面活性剂、两性离子表面活性剂、及其组合和混合物。

[0165] 实施例36.如实施例31-35中任一项所述的方法,其中该液体洗涤剂溶液进一步包括选自由以下组成的组的一种或多种另外的酶:酰基转移酶、 α -淀粉酶、 β -淀粉酶、 α -半乳糖苷酶、阿拉伯糖苷酶、芳基酯酶、 β -半乳糖苷酶、角叉菜胶酶、过氧化氢酶、纤维二糖水解酶、纤维素酶、软骨素酶、角质酶、内切- β -1,4-葡聚糖酶、内切- β -甘露聚糖酶、酯酶、外切-甘露聚糖酶、阿魏酸酯酶、半乳聚糖酶、葡糖淀粉酶、半纤维素酶、氨基己糖苷酶、透明质酸酶、角蛋白酶、漆酶、乳糖酶、木质素酶、脂肪酶、脂加氧酶、甘露聚糖酶、金属蛋白酶、核酸酶(例如脱氧核糖核酸酶和核糖核酸酶)、氧化酶、氧化还原酶、果胶酸裂合酶、果胶乙酰酯酶、果胶酶、戊聚糖酶、过水解酶、过氧化物酶、酚氧化酶、磷酸酶、磷脂酶、植酸酶、聚半乳糖醛酸酶、聚酯酶、蛋白酶、支链淀粉酶、还原酶、鼠李糖半乳糖醛酸酶、 β -葡聚糖酶、鞣酸酶、转谷氨酰胺酶、木聚糖乙酰酯酶、木聚糖酶、木葡聚糖酶、木糖苷酶、及其任何组合或混合物。

[0166] 实施例37.溶菌酶多肽用于预防、减少或去除液体洗涤剂中的微生物生长的用途,该溶菌酶多肽具有以下氨基酸序列,该氨基酸序列与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。

[0167] 实施例38.一种包含至少0.002mg的具有溶菌酶活性的多肽的组合物,其中该多肽具有以下氨基酸序列,该氨基酸序列与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。

[0168] 实施例39.如实施例38所述的组合物,其中该组合物包含该具有溶菌酶活性的多肽,该多肽的量选自由以下组成的组:0.002至10,000mg蛋白质、0.005至5000mg蛋白质、0.01至5000mg蛋白质、0.05至5000mg蛋白质、0.05至1300mg蛋白质、0.1至1300mg蛋白质、0.1至500mg蛋白质、0.1至100mg蛋白质。

[0169] 实施例40.如实施例38-39所述的组合物,其中该组合物是洗涤剂组合物。

[0170] 实施例41.如实施例40所述的组合物,其中该洗涤剂组合物是衣物洗涤剂组合物或餐具洗涤剂组合物。

[0171] 实施例42.如实施例38-41中任一项所述的组合物,其中该组合物进一步包含选自由以下组成的组的一种或多种另外的酶:酰基转移酶、 α -淀粉酶、 β -淀粉酶、 α -半乳糖苷酶、阿拉伯糖苷酶、芳基酯酶、 β -半乳糖苷酶、角叉菜胶酶、过氧化氢酶、纤维二糖水解酶、纤维素酶、软骨素酶、角质酶、内切- β -1,4-葡聚糖酶、内切- β -甘露聚糖酶、酯酶、外切-甘露聚糖酶、阿魏酸酯酶、半乳聚糖酶、葡糖淀粉酶、半纤维素酶、氨基己糖苷酶、透明质酸酶、角蛋白酶、漆酶、乳糖酶、木质素酶、脂肪酶、脂加氧酶、甘露聚糖酶、金属蛋白酶、核酸酶(例如脱氧核糖核酸酶和核糖核酸酶)、氧化酶、氧化还原酶、果胶酸裂合酶、果胶乙酰酯酶、果胶酶、戊聚糖酶、过水解酶、过氧化物酶、酚氧化酶、磷酸酶、磷脂酶、植酸酶、聚半乳糖醛酸酶、聚酯酶、蛋白酶、支链淀粉酶、还原酶、鼠李糖半乳糖醛酸酶、 β -葡聚糖酶、鞣酸酶、转谷氨酰胺酶、木聚糖乙酰酯酶、木聚糖酶、木葡聚糖酶、木糖苷酶、及其任何组合或混合物。

[0172] 实施例43.一种用于预防、减少或去除液体组合物中的微生物生长的方法,该方法包括在该组合物中包括有效量的溶菌酶,其中该溶菌酶具有以下氨基酸序列,该氨基酸序列与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、

92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。

[0173] 实施例44.如实施例43所述的方法,其中该液体组合物进一步包含表面活性剂。

[0174] 实施例45.如实施例43或44中任一项所述的方法,其中该液体组合物包含溶菌酶,该溶菌酶的量选自由以下组成的组:0.002至10,000mg蛋白质、0.005至5000mg蛋白质、0.01至5000mg蛋白质、0.05至5000mg蛋白质、0.05至1300mg蛋白质、0.1至1300mg蛋白质、0.1至500mg蛋白质、0.1至100mg蛋白质/升清洗液,或该量为至少0.002ppm活性溶菌酶。

[0175] 实施例46.如实施例44-45中任一项所述的方法,其中该表面活性剂选自由以下组成的组:非离子表面活性剂、两性表面活性剂、半极性表面活性剂、阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、两性离子表面活性剂、及其组合和混合物。

[0176] 实施例47.如实施例43-46中任一项所述的方法,其中该液体洗涤剂溶液进一步包含选自由以下组成的组的一种或多种另外的酶:酰基转移酶、 α -淀粉酶、 β -淀粉酶、 α -半乳糖苷酶、阿拉伯糖苷酶、芳基酯酶、 β -半乳糖苷酶、角叉菜胶酶、过氧化氢酶、纤维二糖水解酶、纤维素酶、软骨素酶、角质酶、内切- β -1,4-葡聚糖酶、内切- β -甘露聚糖酶、酯酶、外切-甘露聚糖酶、阿魏酸酯酶、半乳聚糖酶、葡糖淀粉酶、半纤维素酶、氨基己糖苷酶、透明质酸酶、角蛋白酶、漆酶、乳糖酶、木质素酶、脂肪酶、脂加氧酶、甘露聚糖酶、金属蛋白酶、核酸酶(例如脱氧核糖核酸酶和核糖核酸酶)、氧化酶、氧化还原酶、果胶酸裂合酶、果胶乙酰酯酶、果胶酶、戊聚糖酶、过水解酶、过氧化物酶、酚氧化酶、磷酸酶、磷脂酶、植酸酶、聚半乳糖醛酸酶、聚酯酶、蛋白酶、支链淀粉酶、还原酶、鼠李糖半乳糖醛酸酶、 β -葡聚糖酶、鞣酸酶、转谷氨酰胺酶、木聚糖乙酰酯酶、木聚糖酶、木葡聚糖酶、木糖苷酶、及其任何组合或混合物。

[0177] 实例

[0178] 实例1.溶菌酶的鉴定、克隆和表达

[0179] 基于PFAM预测,从NCBI和JGI数据库中收集溶菌酶基因。去除冗余基因并进行系统发育分析。从这些分析中选择编码BbuLys1(SEQ ID NO:1)的基因进行进一步评价。

[0180] 合成编码BbuLys1(SEQ ID NO:1)的基因,将其克隆到pGX256载体中,并转化到里氏木霉中表达。将澄清的发酵液的样品用于以溶壁微球菌为底物的初步活性测试。之后,使用标准蛋白质纯化技术从大规模发酵中纯化蛋白质产物。

[0181] 实例2.针对藤黄微球菌的抗微生物活性

[0182] 从美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection,ATCC)获得藤黄微球菌(ATCC 4698),并将其在允许的温度下在BHI培养基(Bacto)中培养过夜。在600nm处测量过夜培养物的浊度,并取出一定体积的OD600对应于0.5的细胞并通过离心沉淀。将细胞用1 \times 磷酸盐缓冲盐水溶液(PBS)清洗两次以去除痕量的生长培养基并在第二次清洗后重悬于1mL的PBS中。将细胞悬浮液保持在冰上以防止在剩余的制备阶段期间的生长。

[0183] 对细胞悬浮液进行CFU计数以准确计量模拟清洗板的每个孔中的细胞数目。简言之,将细胞悬浮液在PBS中稀释 10^4 至 10^6 倍,并将100 μ L的每种稀释液铺板,直到孵育过夜后出现可计数的集落数目。根据该计数过程,模拟清洗液中的细胞计数为大约 7×10^5 CFU/孔的藤黄微球菌。

[0184] 将BbuLys1溶菌酶的储备溶液稀释到pH 7.2的磷酸盐缓冲盐水(PBS)的灭菌溶液中以获得最终模拟清洗溶液中0、1.56、3.13、6.25、12.5或25PPM的最终溶菌酶浓度。

[0185] 在无菌96孔微量滴定板中,用125 μ L的PBS溶菌酶溶液或无溶菌酶阴性对照处理每

种微生物的2 μ L细胞悬浮液。在室温下以中等速度搅动板40分钟以模拟清洗机器周期。清洗后,如下允许清洗板中的细胞在液体生长培养基中恢复过夜以评估处理后的存活率。

[0186] 将模拟清洗板的每个孔的二十微升转移到含有180 μ L BHI液体生长培养基的新板中。在允许的温度下将板在不搅动的情况下孵育过夜。第二天,搅动板以使孔内容物均匀,并在板读取器上读取每个孔的OD₆₀₀。生成了绘制浊度针对溶菌酶浓度的存活曲线。

[0187] 图1显示了小规模衣物洗涤模拟测试后液体培养物生长测试的结果。

[0188] 实例3. 针对奥斯陆莫拉菌的抗微生物活性

[0189] 从美国典型培养物保藏中心(ATCC)获得奥斯陆莫拉菌(ATCC 19976)。将细胞在脑心浸液(BHI)琼脂板上划线。使用单个集落接种5mL的BHI液体培养基,并使培养物在37摄氏度下搅动生长24小时。通过连续稀释并在琼脂板上铺板,估计培养物的细菌密度为大约3x10⁸CFU/mL。在BHI培养基中稀释培养物,使用243倍的稀释因子,结果在图2中示出。在具有BbuLys1溶菌酶的清洗浓度的洗涤剂、单独的清洗浓度的洗涤剂或单独的水存在下使细菌经受模拟清洗。通过将250mL去离子水与69 μ L Blue Moon洗涤剂(3X浓缩配方)混合,然后进行无菌过滤,制备大约清洗浓度的洗涤剂溶液。对于含有溶菌酶的溶液,将BbuLys1溶菌酶添加至20PPM的最终浓度。在聚苯乙烯、平底、无菌96孔板(猎鹰公司(Falcon) 351172)中,在具有或不具有溶菌酶的情况下,将125 μ L的洗涤剂溶液或水与2 μ L的细胞悬浮液混合。将这些溶液在25摄氏度下孵育30分钟,同时以37rpm振荡。孵育后,将3 μ L的培养物点在BHI琼脂板上,并在孵育过夜后,对集落进行计数。将集落的数目(两次试验的平均值)绘制在图2中。

[0190] 实例4. 在衣物洗涤剂清洗中的性能

[0191] 为了评价与衣物洗涤剂清洗溶液的相容性,在洗涤剂溶液中测试了溶壁微球菌的裂解。从商业上获得T4溶菌酶(MC Lab公司)。从商业上获得鸡蛋清溶菌酶(西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich))。如实例1中所述获得BbuLys1。

[0192] 从商业上获得液体衣物洗涤剂:Blue Moon®深层清洁、Blue Moon®机器清洗用浓缩洗涤剂、Arm&Hammer™加OxiClean™(杜威公司(Church and Dwight))、Amway Home™ SA8™、Persil® ProClean®(汉高公司)和Hex Performance®无香料。在室温下在水中制备大约清洗浓度的衣物洗涤剂溶液(对于所有洗涤剂为776mg/L)。向这些洗涤剂溶液中添加冻干的溶壁微球菌细胞(西格玛奥德里奇公司)至300mg/L的浓度。

[0193] 用1.2mL的洗涤剂-细胞溶液准备分光光度计比色皿(1cm路径长度)。对于每个反应,将酶溶液的等分试样添加到比色皿中以在反应中达到25PPM酶的最终浓度。添加酶后,立即通过以下混合溶液:快速向上和向下吸移7次,然后放入分光光度计中。以10秒的时间间隔读取450nm处的吸光度,持续3分钟。将溶液的吸光度损失拟合为指数曲线,以估计洗涤剂溶液中酶的速率常数。将从曲线拟合获得的近似速率常数绘制在图3中。

[0194] 实例5. 气味的减少

[0195] 在5%人工顶浆分泌汗液(apocrine perspiration)(皮克林实验室(Pickering Laboratories),目录编号1700-0556)存在下使藤黄微球菌(ATCC 4698)在无菌试管中在TSB培养基中生长。样品不包括溶菌酶或包括10PPM BbuLys1溶菌酶。

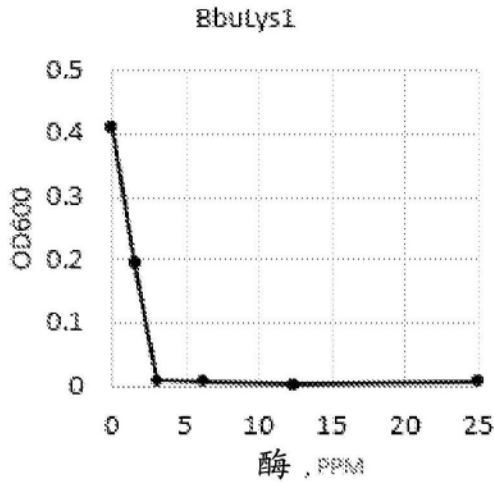
[0196] 约48小时后,对培养物进行短暂离心以澄清,并将上清液放入螺口顶空GCMS小瓶中。用SPME GCMS分析气味化合物,其使用具有CTC GC PAL自动进样器的Agilent 7890/

5975GC-MS系统,配备有Zebron ZB-FFAP柱和Supelco carboxen/PDMS SPME纤维,使用不分流模式以40摄氏度开始并斜坡上升至240摄氏度。

[0197] 鉴定了几种在溶菌酶存在下减少的挥发性气味化合物,包括丙酮、2-丁酮、2-戊酮、2-庚酮、乙偶姻和2-十三酮。

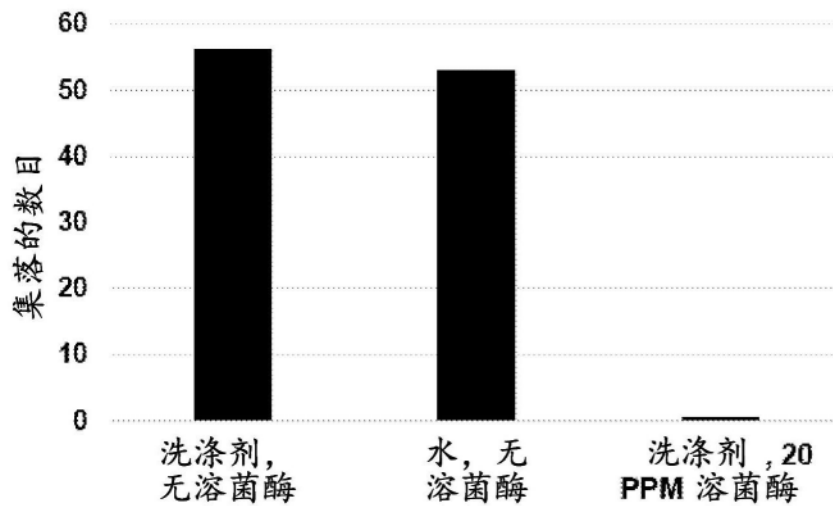
[0198] 尽管已经结合本公开的特定实施例描述了本公开,但是显而易见的是,许多替代、修改和变化对于本领域技术人员将是显而易见的。因此,本公开意图涵盖落入所附权利要求书的精神和广泛范围内的所有这样的替代、修改和变化。

[0199] 本说明书中提到的所有出版物、专利和专利申请通过援引以其全文并入本文,其程度就像明确且单独地指出每一份单独的出版物、专利或专利申请通过援引并入本文一样。另外,在本申请中对任何参考文献的引用或标识均不应被解释为承认这样的参考文献可作为本公开的现有技术获得。就使用章节标题而言,不应将其解释为必然的限制。



液体培养物生长的结果证明在暴露于不同浓度的BbuLys1溶菌酶后藤黄微球菌细菌减少。

图1



在使用洗涤剂中的BbuLys1溶菌酶、单独的洗涤剂、或单独的水进行模拟清洗后奥斯陆莫拉菌细菌的集落计数。

图2

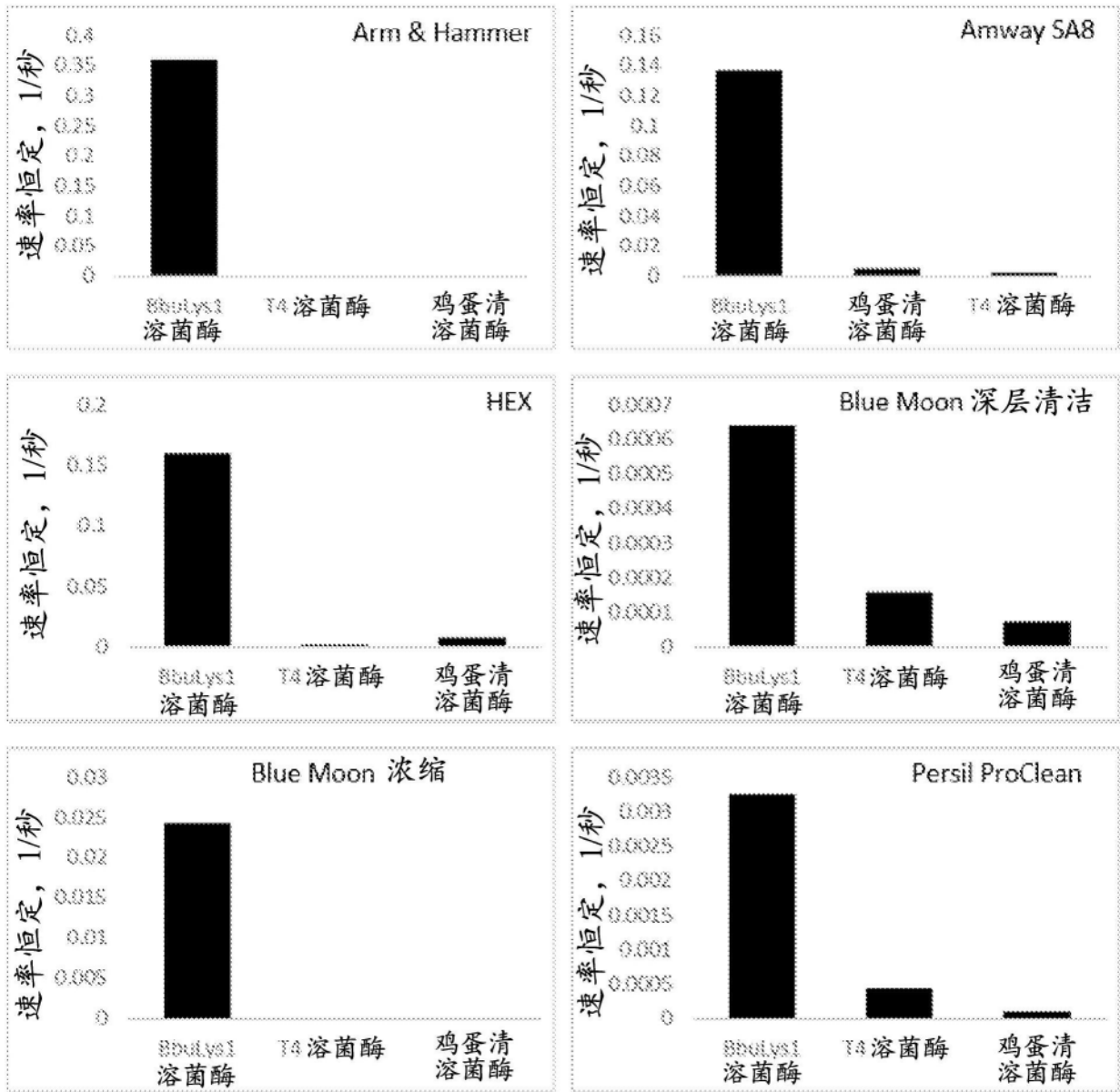


图3

序列表

> BbuLys1
 KVFERCELAR ALKRFGMDNF RGISLANWMC LARWESSYNT RATNYNAGDR STDYGIFQIN SRWWCNDGKT PGAVNACGIP
 CSVLLQDDIT
 QAVACAKRVV SDPQGIRAWV AWRSHCQNQD LTSYIQGCGV

图4