



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112368375 A

(43) 申请公布日 2021.02.12

(21) 申请号 201980042694.6

C·埃斯珀 A·米格里奥里

(22) 申请日 2019.04.24

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

(30) 优先权数据

代理人 胡晨曦 黄革生

18194564.3 2018.09.14 EP

62/662,877 2018.04.26 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int.Cl.

C12N 9/20 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

C12P 7/10 (2006.01)

D21C 5/00 (2006.01)

2020.12.24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2019/060508 2019.04.24

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/206994 EN 2019.10.31

(71) 申请人 巴斯夫欧洲公司

地址 德国莱茵河畔路德维希港

(72) 发明人 K·克兰 A·赫斯顿达文波特

谭叙秋 O·斯潘根伯格

权利要求书2页 说明书47页

序列表2页 附图2页

(54) 发明名称

脂肪酶

(57) 摘要

具有脂肪酶活性的工程改造的多肽,包含所述酶的组合物以及制备和使用所述酶的方法。基因工程改造的脂肪酶可用于许多不同的应用中,例如衣物洗涤剂、餐具洗涤剂以及用于家庭、工业、车辆护理、烘焙、动物饲养、纸浆和纸张加工、淀粉加工、生物柴油和乙醇生产的清洁产品。

1. 具有脂肪酶活性的多肽,其包含与SEQ ID NO:1的全长氨基酸序列具有至少80%同一性或相似性的氨基酸序列,其中对SEQ ID NO:1的氨基酸序列的一个或多个氨基酸残基插入、缺失或取代是位于氨基酸残基的位置编号:14、64、67、79、145、263、265、266、272、275、291、293、297、298、303、307、308、310、340、347、375、377、405、407。

2. 如权利要求1所述的多肽,其中对SEQ ID NO:1的氨基酸序列的一个或多个氨基酸取代是以下取代中至少一个取代:K14E、F56C、K64V、K64T、K64E、P67L、W79F、W79I、K145W、K145E、E263L、I265T、I265L、Y266L、Y266V、N272P、R273Q、Y275F、N291A、N291L、N291F、A293V、F297L、M298F、A303Q、S307L、L308S、L308N、T310Q、Y340F、Y347K、V375G、Q377K、L407A和L407G。

3. 如权利要求2所述的多肽,其中对SEQ ID NO:1的氨基酸序列的一个或多个单氨基酸取代是选自以下的取代:K14E、F56C、K64V、K64T、K64E、P67L、W79F、W79I、K145W、K145E、E263L、I265T、I265L、Y266L、Y266V、N272P、R273Q、Y275F、N291A、N291L、N291F、A293V、F297L、M298F、A303Q、S307L、L308S、L308N、T310Q、Y340F、Y347K、V375G、Q377K、L407A和L407G。

4. 如权利要求3所述的多肽,其中该多肽具有对SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸修饰的组合,并且所述组合选自:

(a1) N291A, 405L; (b1) W79F, I265L, N291L; (c1) E263L, T310Q; (d1) T310Q, L407A; (e1) K145E, L407A; (f1) K64V, L407A; (g1) M298F, L407A; (h1) K145E, Y340F; (i1) T310Q, L407A; (j1) T310Q, L407A; (k1) K14E, K64V, K145E, T310Q, L407A; (l1) K64V, K145E, M298F, T310Q, L407A; (m1) E263L, F297L, T310Q, L407A; (n1) E263L, F297L, T310Q, L407G; (o1) P67L, E263L, F297L, T310Q; (p1) F297L, T310Q; (q1) E263L, F297L; (r1) E263L, Q377K, T310Q, L407A; (s1) E263L, Q377K, T310Q, L407G; (t1) K14E, E2363L, I265T, A303Q, T310Q; (u1) E263L, T310Q, L407A; (v1) E263L, T310Q, L407G; (w1) E263L, M298F, T310Q; (x1) K145E, E263L, A303Q, T310Q, L407A; (y1) K145E, E263L, A303Q, T310Q, L407G; (z1) K64V, K145E, E263L, A303Q, T310Q; (a2) K145E, E263L, A303Q; (b2) K145E, A303Q; (c2) K145E, Y340F, Y347K, L407A; (d2) K145E, T310Q; (e2) K145E, E263L; (f2) K145E, Y347K; (g2) K145E, K64V; (h2) K145E, Y266L, A303Q; (i2) K145E, E263L, M298F, T310Q, L407A; (j2) K145E, E263L, M298F, T310Q, L407G; (k2) K145E, E263L, T310Q, L407A; (l2) K145E, E263L, T310Q, L407G; (m2) K14E, A303Q, L407A; (n2) K14E, E263L, A303Q, T310Q, L407A; (o2) K145W, E263L, I265T, A303Q, T310Q, L407A; (p2) K145W, I265T, A303Q, L407A; (q2) K64V, K145W, E263L, T310Q, L407A; (r2) K64V, K145W, E263L, M298F, T310Q; (s2) K64V, K145W, E263L, Y266L, T310Q; (t2) A303Q, L407A; (u2) M298F, L407G; (v2) I265T, M298F, L407A; (w2) I265T, M298F, L407G; (x2) Y266L, M298F, L407A; (y2) Y266L, M298F, L407G; (z2) P67L, F297L, L407A; (a3) P67L, F297L, L407G; (b3) I265T, L407A; (c3) Y266L, L407G; (d3) E263L, L407A; (e3) K145E, Y340F; (f3) K145E, Y340F; (g3) K145E, Y340F; (h3) K14E, A303Q, L407A; (i3) K14E, A303Q, L407A; (j3) K14E, A303Q, L407A; 和 (k3) K14E, K64V, K145E, M298F, T310Q, L407A。

5. 如权利要求1-4所述的多肽,其中与SEQ ID NO:1的脂肪酶相比,所述多肽具有增加的酶活性、pH稳定性、抗蛋白酶解降解的稳定性或其任何组合。

6. 如权利要求1-5中任一项所述的多肽,其中所述多肽是全长氨基酸序列的片段,且所

述片段具有脂肪酶活性。

7. 一种杂合多肽,其包含权利要求1-5中任一项所述的至少一种多肽的片段,和具有脂肪酶活性的第二多肽的片段,其中所述杂合多肽具有脂肪酶活性。

8. 组合物,其包含如权利要求1-7中任一项所述的多肽。

9. 如权利要求8所述的组合物,其包含选自以下一种或多种的第二种酶:第二脂肪酶、淀粉酶、蛋白酶、纤维素酶、漆酶、果胶酶和核酸酶。

10. 变体多核苷酸,其具有当与SEQ ID NO:2的全长多核苷酸序列相比时有90%同一性或相似性的核酸序列,其中所述多核苷酸编码如权利要求1-5所述的多肽。

11. 制备如权利要求1-5中任一项所述的变体多肽的方法,其包括:提供具有权利要求10所述的核酸序列的多核苷酸,将所述核酸序列转化到表达宿主中,培养该表达宿主以产生变体多肽,并纯化该变体多肽。

12. 如权利要求11所述的方法,其中表达宿主选自:细菌表达系统(优选地选自大肠杆菌(*E. coli*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)和链霉菌属(*Streptomyces*))、酵母表达系统(优选地选自假丝酵母属(*Candida*)、毕赤酵母(*Pichia*)、酵母菌属(*Saccharomyces*)、裂殖酵母属(*Schizosaccharomyces*))、真菌表达系统(优选地选自青霉属(*Penicillium*)、曲霉属(*Aspergillus*)、镰刀菌属(*Fusarium*)、毁丝霉属(*Myceliophthora*)、*Thermothelomyces*、根毛霉菌属(*Rhizomucor*)、根霉属(*Rhizopus*)、嗜热真菌属(*Thermomyces*)和木霉属(*Trichoderma*)),以及合成的表达系统。

13. 如权利要求1-5中任一项所述的多肽用于处理脂肪、油或油料种子的用途。

14. 如权利要求13所述的用途,其中在食品和/或饲料加工过程中处理脂肪、油或油料种子是在清洁或洗涤纺织品、硬质表面或餐具的过程中;在处理纸浆或纸张时;和/或在乙醇生产过程中发生。

脂肪酶

[0001] 根据“专利合作条约 (PCT) 下国际专利申请中核苷酸和氨基酸序列表的展示标准” ST.25, 本申请包括作为ASC II文本 (.txt) 文件的计算机可读形式 (CRF) 的核苷酸和氨基酸序列表。序列表在下面被标识, 并且在此处以其整体并出于所有目的通过引用结合到本申请的说明书中。

[0002]	文件名	创建日期	大小
	161154_SequenceListing_ST25.txt	2018年3月20日	5.66KB (5,801字节)

[0003] 基因工程改造的脂肪酶, 包含所述酶的组合物以及使用所述酶的方法或包含所述酶的组合物。经基因工程改造的脂肪酶可用于许多不同的应用, 例如衣物洗涤剂、餐具洗涤剂以及用于家庭、工业、车辆护理、烘焙、动物饲料、纸浆和纸张加工、淀粉加工和乙醇生产的清洁产品。脂肪酶已用于去除油脂污渍, 并已添加到各种组合物例如清洁产品中。当前的清洁和/或织物护理组合物包含许多活性成分的制剂, 这些活性成分影响脂肪酶去除油脂污渍的能力。因此, 存在对能够在用于清洁的组合物的恶劣环境中起作用的基因工程改造的脂肪酶的需求。

[0004] 附图的几个视图的简要说明

[0005] 图1显示脂肪酶对不同pNP底物的脂肪酸选择性

[0006] 图2显示在蛋白酶存在下脂肪酶稳定性的活性。

[0007] 发明详述

[0008] 酶是包含氨基酸残基序列的生物分子 (多肽), 其中酶可以催化反应。酶的名称是根据国际生物化学与分子生物学联合会 (IUBMB) 命名委员会的建议确定的。酶由EC (酶学委员会) 编号、推荐名称、替代名称 (如果有的话)、催化活性和其它因素定义。酶也称为多肽、蛋白质、肽, 或者在专利和专利申请中通过序列标识号 (SEQ ID NO.) 进行描述。酶的替代名称可以互换使用。

[0009] 酶得自或衍生自许多不同的来源, 包括: 植物; 动物; 细菌、古细菌、真菌、酵母菌; 含有编码酶的DNA的环境样品, 或者可以在实验室中合成产生的酶。例如, 酶的细菌来源包括来自芽孢杆菌属、链霉菌属、大肠杆菌和假单胞菌的酶; 酶的真菌来源包括曲霉菌属、镰刀菌属、嗜热菌和木霉菌属的酶; 酶的酵母来源包括来自毕赤酵母和酿酒酵母的酶。

[0010] 已知有不同种类的酶可用于洗涤剂和清洁产品, 包括: 脂肪酶、淀粉酶、蛋白酶、纤维素酶、甘露聚糖酶、果胶酸裂合酶和核酸酶; 但是, 工业上需要提供一种脂肪酶, 其具有更高活性、温度特性、pH特性, 具有改善的性能 (去除污渍), 在蛋白酶存在下的稳定性, 减少洗涤剂制剂中表面活性剂的量, 无异味, 或其组合。所述变体多肽脂肪酶满足了这些工业需求。

[0011] 国际知识产权局 (WIPO) 标准ST.25 (1998) 规定, 氨基酸残基应在序列表中以下三个字母的符号表示, 首字母大写。下表概述了氨基酸标识符以及使用标准遗传标准编码氨基酸的相应DNA密码子。编码氨基酸残基的DNA密码子可以根据所使用的生物而不同, 并且可能适用略有不同的遗传密码翻译表。NCBI维护此类非标准的密码翻译表的汇编。参见例如<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Utils/wprintgc.cgi>。

[0012] “亲本”多肽氨基酸序列是向序列中引入突变(例如,通过引入一个或多个氨基酸取代、插入、缺失或其组合)的起始序列,从而导致亲本多肽氨基酸序列的“变体”。亲本包括:野生型多肽氨基酸序列或经合成产生的多肽氨基酸序列,其用作引入(进一步)变化的起始序列。本文的亲本多肽是具有根据SEQ ID NO:1的氨基酸序列的多肽。

[0013] “变体多肽”是指在氨基酸序列上不同于其亲本的酶。尽管下面的定义在氨基酸变化的背景下描述了变体,但核酸可以被类似地修饰,例如通过取代。

[0014] 本发明涉及具有脂肪酶活性的变体多肽,其包含与SEQ ID NO:1的全长氨基酸序列至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的同一性或与其相似的氨基酸序列。在一个实施方案中,与根据US5869438的SEQ ID NO:2的氨基酸1-269的疏绵状嗜热丝孢菌(*Thermomyces lanuginosa*)脂肪酶相比和/或与具有氨基酸取代T231R和N233R的根据US5869438的SEQ ID NO:2的氨基酸1-269的疏绵状嗜热丝孢菌(*Thermomyces lanuginosa*)脂肪酶相比时,所述变体多肽具有选自以下的至少一种特征的增加:酶活性、pH稳定性、抗蛋白酶降解的稳定性和在洗涤剂制剂中的稳定性、或其任何组合。

[0015] 在一个实施方案中,具有脂肪酶活性的变体多肽包含至少与SEQ ID NO:1的全长氨基酸序列至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的同一性或相似性的氨基酸序列,其当与根据SEQ ID NO:1的脂肪酶相比时具有选自以下的至少一种特征的增加:酶活性、pH-稳定性、抗蛋白酶降解的稳定性和在洗涤剂制剂中的稳定性、或其任何组合。

[0016] 本发明的变体多肽可包含选自氨基酸残基插入、缺失或取代的改变。所述变体多肽可包含在至少一个以下氨基酸残基位置中对SEQ ID NO:1的氨基酸序列的至少一个取代:14、64、67、79、145、263、265、266、272、275、291、293、297、298、303、307、308、310、340、347、375、377、405、407,或其任意组合。位置编号基于SEQ ID NO:1提供的氨基酸序列。

[0017] 具体而言,本发明的变体多肽可包含至少一个选自以下的氨基酸取代:K14E、F56C、K64V、K64T、K64E、P67L、W79F、W79I、K145W、K145E、E263L、I265T、I265L、Y266L、Y266V、N272P、R273Q、Y275F、N291A、N291L、N291F、A293V、F297L、M298F、A303Q、S307L、L308S、L308N、T310Q、Y340F、Y347K、V375G、Q377K、L407A和L407G。在一个实施方案中,该多肽包含多于一个的所述取代。

[0018] 本发明涉及具有脂肪酶活性的变体多肽,其中所述变体多肽是与SEQ ID NO:1所示的全长氨基酸序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的同一性或相似性的氨基酸序列,其中所示变体多肽具有对SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸修饰的组合,所述组合选自:

[0019] (a1) N291A, 405L; (b1) W79F, I265L, N291L; (c1) E263L, T310Q; (d1) T310Q, L407A; (e1) K145E, L407A; (f1) K64V, L407A; (g1) M298F, L407A; (h1) K145E, Y340F; (i1) T310Q, L407A; (j1) T310Q, L407A; (k1) K14E, K64V, K145E, T310Q, L407A; (I1) K64V, K145E, M298F,

T310Q,L407A; (m1) E263L,F297L,T310Q,L407A; (n1) E263L,F297L,T310Q,L407G; (o1) P67L, E263L,F297L,T310Q; (p1) F297L,T310Q; (q1) E263L,F297L; (r1) E263L,Q377K,T310Q, L407A; (s1) E263L,Q377K,T310Q,L407G; (t1) K14E,E2363L,I265T,A303Q,T310Q; (u1) E263L,T310Q,L407A; (v1) E263L,T310Q,L407G; (w1) E263L,M298F,T310Q; (x1) K145E, E263L,A303Q,T310Q,L407A; (y1) K145E,E263L,A303Q,T310Q,L407G; (z1) K64V,K145E, E263L,A303Q,T310Q; (a2) K145E,E263L,A303Q; (b2) K145E,A303Q; (c2) K145E,Y340F, Y347K,L407A; (d2) K145E,T310Q; (e2) K145E,E263L; (f2) K145E,Y347K; (g2) K145E,K64V; (h2) K145E,Y266L,A303Q; (i2) K145E,E263L,M298F,T310Q,L407A; (j2) K145E,E263L, M298F,T310Q,L407G; (k2) K145E,E263L,T310Q,L407A; (I2) K145E,E263L,T310Q,L407G; (m2) K14E,A303Q,L407A; (n2) K14E,E263L,A303Q,T310Q,L407A; (o2) K145W,E263L,I265T, A303Q,T310Q,L407A; (p2) K145W,I265T,A303Q,L407A; (q2) K64V,K145W,E263L,T310Q, L407A; (r2) K64V,K145W,E263L,M298F,T310Q; (s2) K64V,K145W,E263L,Y266L,T310Q; (t2) A303Q,L407A; (u2) M298F,L407G; (v2) I265T,M298F,L407A; (w2) I265T,M298F,L407G; (x2) Y266L,M298F,L407A; (y2) Y266L,M298F,L407G; (z2) P67L,F297L,L407A; (a3) P67L,F297L, L407G; (b3) I265T,L407A; (c3) Y266L,L407G; (d3) E263L,L407A; (e3) K145E,Y340F; (f3) K145E,Y340F; (g3) K145E,Y340F; (h3) K14E,A303Q,L407A; (i3) K14E,A303Q,L407A; (j3) K14E,A303Q,L407A; 和 (k3) K14E,K64V,K145E,M298F,T310Q,L407A.

[0020] 本发明涉及具有脂肪酶活性的多肽,其中所述变体多肽是与SEQ ID NO:1所示的全长氨基酸序列具有至少80%,至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的同一性或相似性的氨基酸序列,且该变体多肽与SEQ ID NO:1的脂肪酶相比时,具有增加的酶活性、pH稳定性、抗蛋白酶降解的稳定性和在洗涤剂制剂中的稳定性,或其任何组合。

[0021] “取代”通过提供原始氨基酸、随后是氨基酸序列内的位置编号、随后是取代的氨基酸来描述。特定的氨基酸残基可以被不同于原始氨基酸残基的19个氨基酸残基中的任何一个取代。例如,将位置120处的组氨酸用丙氨酸取代的命名为“His120Ala”或“H120A”。

[0022] 氨基酸缺失通过提供亲本酶的原始氨基酸、然后是氨基酸序列内的位置编号、再加上*来描述。

[0023] 氨基酸插入通过提供亲本酶的原始氨基酸、然后是氨基酸序列内的位置编号、然后是原始氨基酸和额外的氨基酸来描述。例如,赖氨酸在位于甘氨酸旁边的位置180处的插入被指定为“Gly180GlyLys”或“G180GK”。

[0024] 本发明涉及所述变体多肽的片段,其中所述多肽片段具有脂肪酶活性。

[0025] 本文所用的“片段”或“亚序列”是氨基酸序列的一部分,其中所述片段或亚序列保留与其相关的序列的至少一种功能活性。

[0026] 在一个实施方案中,术语“功能性片段”是指仅包含本发明变体多肽的全长氨基酸序列的一部分、但仍然具有相同或相似的活性和/或功能的任何氨基酸序列。片段占原始序列的至少70%,至少80%,至少85%,至少90%,至少95%,至少96%,至少97%,至少98%,至少99%。与原始氨基酸序列相比,功能性片段包含连续的氨基酸。

[0027] 本发明涉及具有脂肪酶活性的变体多肽,其中所述变体包含至少一种本发明的至

少一种变体多肽与具有脂肪酶活性的第二多肽的杂合体,其中所述杂合体具有脂肪酶活性。“杂合体”或“嵌合多肽”或“融合蛋白”是指第一个酶的氨基酸序列的片段与第二个酶的氨基酸序列的片段结合以形成杂合酶,其中该杂合体具有酶活性。

[0028] 杂合酶可以用来自两种以上酶的氨基酸序列的功能性片段进行工程改造。所述杂合体可以包含本发明脂肪酶的催化结构域和市售脂肪酶的一个或多个催化域,市售的例如:Lipolase™、Lipex™、Lipolex™和Lipoclean™(Novozymes A/S)、Lumafast(最初来自Genencor)和Lipomax(Gist-Brocades/目前DSM),其中该杂合体具有脂肪酶活性。

[0029] 在一个实施方案中,将本发明脂肪酶的至少一个功能性片段与选自真菌的三酰基甘油酯酶(EC类别3.1.1.3)的脂肪酶的至少一个功能性片段组合。真菌的三酰基甘油酯酶可以选自疏绵状嗜热丝孢菌(*Thermomyces lanuginosa*)的脂肪酶。在一个实施方案中,疏绵状嗜热丝孢菌脂肪酶选自根据US5869438的SEQ ID NO:2的氨基酸1-269或其变体的三酰基甘油酯酶。

[0030] 疏绵状嗜热丝孢菌脂肪酶可以选自当与US5869438的SEQ ID NO:2的氨基酸1-269相比时至少包含以下氨基酸取代的变体:T231R和N233R。所述疏绵状嗜热丝孢菌脂肪酶变体可以进一步包含一个或多个与US5869438的SEQ ID NO:2的氨基酸1-269相比的以下氨基酸交换:Q4V,V60S,A150G,L227G,P256K。

[0031] 疏绵状嗜热丝孢菌脂肪酶可以选自在US5869438的SEQ ID NO:2的氨基酸1-269的多肽序列中至少包含氨基酸取代T231R、N233R、Q4V、V60S、A150G、L227G、P256K的变体。

[0032] 疏绵状嗜热丝孢菌脂肪酶可以选自包含在US5869438的SEQ ID NO:2的氨基酸1-269内的氨基酸取代T231R和N233R的变体,并且其与US5869438的SEQ ID NO:2的氨基酸1-269的全长多肽序列相比,至少95%,至少96%,至少有97%,至少98%或至少99%相似。疏绵状嗜热丝孢菌脂肪酶可以是根据US5869438的SEQ ID NO:2的1-269位氨基酸的具有氨基酸取代T231R和N233R的脂肪酶。

[0033] 本发明的变体多肽是“成熟多肽”,是指以其最终形式的酶,包括任何翻译后修饰、糖基化、磷酸化、截短、N-末端修饰、C-末端修饰、信号序列删除。成熟多肽可以根据表达系统、载体、启动子和/或生产过程而变化。

[0034] “酶活性”是指酶发挥的至少一种催化作用。酶活性表示为每毫克酶的单位(比活性)或每分子酶每分钟转化的底物分子(分子活性)。酶活性可通过酶的实际功能来指定,例如通过催化肽键的水解裂解而发挥蛋白酶活性的蛋白酶,通过酯键的水解裂解而发挥脂分解活性的脂肪酶等。

[0035] 本发明的变体多肽发挥脂解活性或脂肪酶活性,其可以以脂解单位(LU)提供。例如,1LU可对应于在pH stat.中在以下条件下每分钟产生1 μ mol可滴定脂肪酸的脂肪酶的量:温度30 $^{\circ}$ C;pH=9.0;底物可以是在5mmol/l Tris缓冲液中的13mmol/l Ca^{2+} 和20mmol/l NaCl的存在下,3.3重量%的橄榄油和3.3%的阿拉伯胶制成的乳液。

[0036] 测定脂解活性的方法在文献中是熟知的(参见例如Gupta等人(2003),*Biotechnol. Appl. Biochem.* 37, p.63-71)。例如,脂肪酶活性可通过底物对-硝基苯基棕榈酸酯(pNP棕榈酸酯,C:16)中的酯键水解来测定,释放出呈黄色且可在405nm处检测到的pNP。

[0037] 在酶的储存或操作使用过程中,酶活性可能会发生变化。术语“酶稳定性”涉及在

储存或操作过程中酶活性的保留,其作为时间的函数。术语“储存”在本文中是指从制造时到最终应用使用的时间点的储存的产品或组合物或制剂的事实。在洗涤剂中储存的期间,酶活性作为时间函数的保留可以称为“储存稳定性”。储存可以指在37°C的储存温度下储存至少两天,至少7天,至少14天,至少21天或至少28天。在一个实施方案中,储存是指包含至少一种选自本发明的多肽的酶的洗涤剂制剂的储存。

[0038] 在本发明的一个方面中,储存意味着包含至少两种酶的洗涤剂制剂的储存,其中一种酶选自本发明的多肽,第二种酶选自至少一种蛋白酶。在一个实施方案中,至少一种蛋白酶是枯草杆菌蛋白酶,其选自EP1921147中所述的SEQ ID NO:22及其具有蛋白酶解活性的变体。EP1921147中所述的SEQ ID NO:22的变体可以是与EP1921147中描述的SEQ ID NO:22具有至少80%同一性或相似性的多肽序列,并且具有蛋白酶解活性。在一个实施方案中,枯草杆菌蛋白酶至少具有与EP 1921147中所述的SEQ ID NO:22至少80%的同一性或相似性,且其特征在于在101位(根据BPN'编号)具有氨基酸谷氨酸(E),或天冬氨酸(D),或天冬酰胺(N),或谷氨酰胺(Q),或丙氨酸(a),或甘氨酸(G),或丝氨酸(S),并且具有蛋白酶解活性。在一个实施方案中,枯草杆菌蛋白酶具有与EP 1921147中所述的SEQ ID NO:22至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的同一性或相似性,且其特征在于在101位(根据BPN'编号)具有氨基酸谷氨酸(E)或天冬氨酸(D),并且具有蛋白酶解活性。在一个实施方案中,枯草杆菌蛋白酶是如EP 1921147中所述的SEQ ID NO:22,其特征在于在101位的氨基酸取代,例如R101E或R101D,其单独或与在以下位点的一个或多个取代组合:3、4、9、15、24、27、33、36、57、68、76、77、87、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、106、118、120、123、128、129、130、131、154、160、167、170、194、195、199、205、206、217、218、222、224、232、235、236、245、248、252和/或274(根据BPN'编号),并且具有蛋白酶解活性。在一个实施方案中,枯草杆菌蛋白酶变体包含在101位的氨基酸取代(例如R101E或R101D)和一个或多个其它取代:(a)在3位的苏氨酸(3T),(b)在4位的异亮氨酸(4I),(c)在63位的丙氨酸、苏氨酸或精氨酸(63A、63T或63R),(d)在156位的天冬氨酸或谷氨酸(156D或156E),(e)在194位的脯氨酸(194P),(f)在199位的甲硫氨酸(199M),(g)在205位的异亮氨酸(205I),(h)在217位的天冬氨酸、谷氨酸或甘氨酸(217D、217E或217G),(i)如(a)-(h)所述的两个或更多个氨基酸的组合。

[0039] 为了确定和量化在一定条件下储存或使用的酶的催化活性随时间的变化,在规定的条件下于零时(100%)和稍后的某个时间点(x%)测量“初始酶活性”。通过比较测量值,可以确定其范围内酶活性的潜在损失。酶活性损失的程度决定了酶的稳定性或非稳定性。

[0040] 影响酶的酶活性和/或储存稳定性和/或操作稳定性的参数例如是pH、温度和氧化性物质的存在:

[0041] 变体多肽在宽pH范围内在约pH 4.0至约pH 12.0范围内的任何单个点上均具有活性。变体多肽酶可在以下pH范围内具有活性:pH 4.0至pH 11.0、pH 4.0至pH 10.0、pH 4.0至pH 9.0、pH 4.0至pH 8.0、pH 4.0至pH 7.0、pH 4.0至pH 6.0或pH 4.0至pH 5.0。变体多肽可以在以下pH下具有活性:pH 4.0、pH 4.1、pH 4.2、pH 4.3、pH 4.4、pH 4.5、pH 4.6、pH 4.7、pH 4.8、pH 4.9、pH 5.0、pH 5.1、pH 5.2、pH 5.3、pH 5.4、pH 5.5、pH 5.6、pH 5.7、pH 5.8、pH 5.9、pH 6.0、pH 6.1、pH 6.2、pH 6.3、pH 6.4、pH 6.5、pH 6.6、pH 6.7、pH 6.8、pH 6.9、pH 7.0、pH 7.1、pH 7.2、pH 7.3、pH 7.4、pH 7.5、pH 7.6、pH 7.7、pH 7.8、pH 7.9、pH

8.0、pH 8.1、pH 8.2、pH 8.3、pH 8.4、pH 8.5、pH 8.6、pH 8.7、pH 8.8、pH 8.9、pH 9.0、pH 9.1、pH 9.2、pH 9.3、pH 9.4、pH 9.5、pH 9.6、pH 9.7、pH 9.8、pH 9.9、pH 10.0、pH 10.1、pH 10.2、pH 10.3、pH 10.4、pH 10.5、pH 10.6、pH 10.7、pH 10.8、pH 10.9、pH 11.0、pH 11.1、pH 11.2、pH 11.3、pH 11.4、pH 11.5、pH 11.6、pH 11.7、pH 11.8、pH 11.9、pH 12.0、pH 12.1、pH 12.2、pH 12.3、pH 12.4和pH 12.5、pH 12.6、pH 12.7、pH 12.8、pH 12.9及更高。

[0042] “pH稳定性”是指酶在特定pH范围内发挥酶活性的能力。

[0043] 变体多肽在宽温度范围下具有活性，其中所述温度是在约10°C至约60°C范围内的任何点。变体多肽可以在以下温度范围内有活性：10°C至55°C、10°C至50°C、10°C至45°C、10°C至40°C、10°C至35°C、10°C至30°C或10°C至25°C。变体多肽可以在以下温度范围内有活性：20°C至55°C、20°C至50°C、20°C至45°C、20°C至40°C、20°C至35°C、20°C至30°C或20°C至25°C。变体多肽可在至少以下温度下具有活性：10°C、11°C、12°C、13°C、14°C、15°C、16°C、17°C、18°C、19°C、20°C、21°C、22°C、23°C、24°C、25°C、26°C、27°C、28°C、29°C、30°C、31°C、32°C、33°C、34°C、35°C、36°C、37°C、38°C、39°C、40°C、41°C、42°C、43°C、44°C、45°C、46°C、47°C、48°C、49°C、50°C、51°C、52°C、53°C、54°C、55°C、56°C、57°C、58°C、59°C、60°C、61°C、62°C，或更高的温度。

[0044] 术语“热稳定性”和“热稳定”是指蛋白质在特定温度或温度范围内发挥催化活性的能力。酶通常在一定温度范围内发挥催化活性。除了在中等温度（例如室温）下发挥催化活性的酶外，还有能够在非常高或非常低的温度下发挥催化活性的酶。热稳定性可以通过称为T₅₀的值来表征（也称为半衰期，见上文）。T₅₀表示与未进行热处理的参照样品相比，在一定时间的热灭活后仍存在50%的残留酶活性的温度。

[0045] 术语“耐热性”和“耐热”是指蛋白质在暴露于特定温度（例如非常高或非常低的温度）后发挥催化活性的能力。耐热蛋白在暴露温度下可能不会发挥催化活性，但一旦恢复到合适的温度，则发挥催化活性。

[0046] 本发明进一步涉及编码本发明的变体多肽的多核苷酸。术语“多核苷酸”、“核酸序列”、“核苷酸序列”、“核酸”、“核酸分子”在本文中可互换使用，是指任何长度的聚合的直链形式的核苷酸，无论它是核糖核苷酸还是脱氧核糖核苷酸或两者的组合。“基因”是带有特定遗传信息的DNA片段。

[0047] “亲本”多核苷酸序列是用于将突变引入该序列的起始序列，突变的引入导致了所述亲本多核苷酸序列的“变体”。该亲本多核苷酸序列是SEQ ID NO:2的多核苷酸序列。“变体多核苷酸”是指编码与亲本多核苷酸相同的酶的多核苷酸。在这种情况下，变体多核苷酸在其核酸序列上不同于其亲本多核苷酸，但是编码的多肽保持不变。

[0048] 一方面，本发明的变体多核苷酸具有与SEQ ID NO:2的全长多核苷酸序列相比至少80%相同或相似的核酸序列。与SEQ ID NO:2的全长多核苷酸序列相比，本发明的变体多核苷酸可以具有至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性或相似性的核酸序列。

[0049] 在一个实施方案中，与SEQ ID NO:2的全长多核苷酸序列相比，至少80%相同或相似的变体多核苷酸编码具有脂肪酶活性的多肽序列，该多肽序列包含与SEQ ID NO:1的全

长氨基酸序列至少80%相同或相似的氨基酸序列。

[0050] 本发明的变体多核苷酸编码具有脂肪酶活性的多肽,该多肽包含与SEQ ID NO:1的全长氨基酸序列至少80%相同或相似的氨基酸序列。本发明的多核苷酸可以编码具有脂肪酶活性的多肽,该多肽包含与SEQ ID NO:1的全长氨基酸序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同或相似的氨基酸序列。

[0051] 在一个实施方案中,本发明的变体多核苷酸编码具有脂肪酶活性的多肽,该多肽包含与SEQ ID NO:1的全长氨基酸序列至少80%相同或相似的氨基酸序列,其包含对SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸残基插入、缺失或取代。所述氨基酸残基插入、缺失或取代可以位于以下氨基酸残基的位置编号:14、64、67、79、145、263、265、266、272、275、291、293、297、298、303、307、308、310、340、347、375、377、405、407或其任何组合。氨基酸取代可选自:K14E、F56C、K64V、K64T、K64E、P67L、W79F、W79I、K145W、K145E、E263L、I265T、I265L、Y266L、Y266V、N272P、R273Q、Y275F、N291A、N291L、N291F、A293V、F297L、M298F、A303Q、S307L、L308S、L308N、T310Q、Y340F、Y347K、V375G、Q377K、L407A、L407G或其任何组合。

[0052] 在一个实施方案中,本发明涉及编码具有脂肪酶活性的多肽的变体多核苷酸,所述多肽具有与SEQ ID NO:1所示的全长氨基酸序列至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的同一性或相似性,其中SEQ ID NO:1的氨基酸序列包括至少一个选自以下的取代:

[0053] K14E, F56C, K64V, K64T, K64E, P67L, W79F, W79I, K145W, K145E, E263L, I265T, I265L, Y266L, Y266V, N272P, R273Q, Y275F, N291A, N291L, N291F, A293V, F297L, M298F, A303Q, S307L, L308S, L308N, T310Q, Y340F, Y347K, V375G, Q377K, L407A, L407G.

[0054] 在一个实施方案中,本发明涉及编码具有脂肪酶活性的多肽的变体多核苷酸,所述多肽具有与SEQ ID NO:1所示的全长氨基酸序列至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的同一性或相似性,其中SEQ ID NO:1的氨基酸序列包括超过一个的选自以下的取代:

[0055] K14E, F56C, K64V, K64T, K64E, P67L, W79F, W79I, K145W, K145E, E263L, I265T, I265L, Y266L, Y266V, N272P, R273Q, Y275F, N291A, N291L, N291F, A293V, F297L, M298F, A303Q, S307L, L308S, L308N, T310Q, Y340F, Y347K, V375G, Q377K, L407A, L407G.

[0056] 所述SEQ ID NO:1的氨基酸序列可以包括选自以下的组合:(a1)

[0057] N291A, 405L; (b1) W79F, I265L, N291L; (c1) E263L, T310Q; (d1) T310Q, L407A; (e1) K145E, L407A; (f1) K64V, L407A; (g1) M298F, L407A; (h1) K145E, Y340F; (i1) T310Q, L407A; (j1) T310Q, L407A; (k1) K14E, K64V, K145E, T310Q, L407A; (l1) K64V, K145E, M298F, T310Q, L407A; (m1) E263L, F297L, T310Q, L407A; (n1) E263L, F297L, T310Q, L407G; (o1) P67L, E263L, F297L, T310Q; (p1) F297L, T310Q; (q1) E263L, F297L; (r1) E263L, Q377K, T310Q, L407A; (s1) E263L, Q377K, T310Q, L407G; (t1) K14E, E263L, I265T, A303Q, T310Q; (u1) E263L, T310Q, L407A; (v1) E263L, T310Q, L407G; (w1) E263L, M298F, T310Q; (x1) K145E, E263L, A303Q,

T310Q,L407A; (y1) K145E,E263L,A303Q,T310Q,L407G; (z1) K64V,K145E,E263L,A303Q,T310Q; (a2) K145E,E263L,A303Q; (b2) K145E,A303Q; (c2) K145E,Y340F,Y347K,L407A; (d2) K145E,T310Q; (e2) K145E,E263L; (f2) K145E,Y347K; (g2) K145E,K64V; (h2) K145E,Y266L,A303Q; (i2) K145E,E263L,M298F,T310Q,L407A; (j2) K145E,E263L,M298F,T310Q,L407G; (k2) K145E,E263L,T310Q,L407A; (I2) K145E,E263L,T310Q,L407G; (m2) K14E,A303Q,L407A; (n2) K14E,E263L,A303Q,T310Q,L407A; (o2) K145W,E263L,I265T,A303Q,T310Q,L407A; (p2) K145W,I265T,A303Q,L407A; (q2) K64V,K145W,E263L,T310Q,L407A; (r2) K64V,K145W,E263L,M298F,T310Q; (s2) K64V,K145W,E263L,Y266L,T310Q; (t2) A303Q,L407A; (u2) M298F,L407G; (v2) I265T,M298F,L407A; (w2) I265T,M298F,L407G; (x2) Y266L,M298F,L407A; (y2) Y266L,M298F,L407G; (z2) P67L,F297L,L407A; (a3) P67L,F297L,L407G; (b3) I265T,L407A; (c3) Y266L,L407G; (d3) E263L,L407A; (e3) K145E,Y340F; (f3) K145E,Y340F; (g3) K145E,Y340F; (h3) K14E,A303Q,L407A; (i3) K14E,A303Q,L407A; (j3) K14E,A303Q,L407A; 和 (k3) K14E,K64V,K145E,M298F,T310Q,L407A.

[0058] 一方面,本发明的多核苷酸编码具有脂肪酶活性的变体多肽,其中所述变体多肽是具有与SEQ ID NO:1所示的全长氨基酸序列至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的同一性或相似性的氨基酸序列,其中与SEQ ID NO:1的脂肪酶相比,所述变体多肽发挥增强的酶活性、pH稳定性、对蛋白酶水解降解的稳定性或其任何组合。

[0059] 在一个方面,本发明的变异多核苷酸编码具有脂肪酶活性的多肽,其包含与SEQ ID NO:1的全长氨基酸序列至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性或相似性的氨基酸序列,所述多肽当与具有氨基酸取代T231R和N233R的根据US5869438的SEQ ID NO:2的氨基酸1-269的疏绵状嗜热丝孢菌脂肪酶比较时,具有选自酶活性、pH稳定性、对蛋白酶解降解的稳定性和在洗涤剂制剂中的稳定性及其任何组合中的至少一个特征的增强。

[0060] 在一个实施方案中,本发明涉及编码具有脂肪酶活性的多肽的多核苷酸,其中该多肽是上述的本发明的全长氨基酸序列的片段。

[0061] 在一个实施方案中,本发明涉及编码具有脂肪酶活性的多肽的多核苷酸,其中所述多肽是至少一种本发明的多肽和至少一种不同于本发明的多肽的多肽的杂合体。在一个实施方案中,所述多核苷酸编码具有脂肪酶活性的多肽,其中该多肽是至少一种本发明的多肽和至少一种不同于本发明的多肽的脂肪酶的杂合体。

[0062] 当与亲本序列相比时,变体多核苷酸和变体多肽序列可以通过它们的“序列同一性”来定义。序列同一性通常以“序列同一性%”或“同一性%”提供。为了计算序列同一性,第一步必须产生序列比对。根据本发明,必须产生成对的总体比对,这意味着必须在两个序列的整个长度上进行比对,这通常是通过使用称为比对算法的数学方法来产生的。

[0063] 根据本发明,通过使用Needleman和Wunsch的算法(J.Mol.Biol.(1979) 48,443-453页)产生比对。优选地,出于本发明的目的,使用程序“NEEDLE”(The European Molecular Biology Open Software Suite(EMBOSS)),并使用程序默认参数(多核苷酸:空

位开放=10.0,空位延伸=0.5,矩阵=EDNAFULL;多肽:空位开放=10.0,空位延伸=0.5,矩阵=EBLOSUM62)。

[0064] 在比对两个序列之后,在第二步骤中从产生的比对中确定同一性值。

[0065] 在一个实施方案中,同一性%通过将相同残基的数目除以比对区域的长度(其在全长上显示本发明的各个序列),再乘以100来计算:同一性%=(相同残基/在全长上显示本发明各序列的比对区域的长度)*100。

[0066] 在一个优选实施方案中,同一性%通过将相同残基的数目除以比对区域的长度(其在全长上显示两个比对的序列),再乘以100来计算:同一性%=(相同残基/在全长上显示两个比对序列的比对区域的长度)*100。

[0067] 当与亲本序列相比时,变体多肽可以由它们的“序列相似性”来定义。序列相似性通常以“序列相似性%”或“相似性%”提供。序列相似性%考虑了限定的氨基酸组具有相似的特性,例如,通过大小、疏水性、电荷或其它特性。在此,一个氨基酸与相似氨基酸的交换可称为“保守突变”。根据本发明的相似氨基酸定义如下:氨基酸A与氨基酸S类似;氨基酸D与氨基酸E、N类似;氨基酸E与氨基酸D、K、Q类似;氨基酸F与氨基酸W、Y类似;氨基酸H与氨基酸N、Y类似;氨基酸I与氨基酸L、M和V类似;氨基酸K与氨基酸E、Q和R类似;氨基酸L与氨基酸I、M和V类似;氨基酸M与氨基酸I、L和V类似;氨基酸N与氨基酸D、H和S类似;氨基酸Q与氨基酸E、K和R类似;氨基酸R与氨基酸K和Q类似;氨基酸S与氨基酸A、N和T类似;氨基酸T与氨基酸S类似;氨基酸V与氨基酸I、L和M类似;氨基酸W与氨基酸F和Y类似;氨基酸Y与氨基酸F、H和W类似。

[0068] 保守的氨基酸取代可以在功能性蛋白质如酶的多肽序列的全长上发生。在一个实施方案中,这种突变不涉及酶的功能结构域。在一个实施方案中,保守突变不涉及酶的催化中心。

[0069] 为了计算序列相似性,第一步必须如上所述产生序列比对。

[0070] 在一个实施方案中,相似性%通过将相同残基的数量加上相似残基的数量再除以比对区域的长度(其在全长上显示本发明的各个序列),再乘以100来计算:相似性%=[(相同残基+相似残基)/在全长上显示本发明的各个序列的比对区的长度]*100。

[0071] 在一个优选的实施方案中,相似性%通过将相同残基的数量加上相似残基的数量再除以比对区域的长度(其在全长上显示两个比对的序列),再乘以100来计算:相似性%=[(相同残基+相似残基)/在全长上显示两个比对的序列的比对区的长度]*100。

[0072] 可以“表达”编码多肽的多核苷酸。“表达”通常描述编码多肽的多核苷酸序列经历的在生物体中实际产生所述多肽的过程。

[0073] 酶的工业生产通常通过使用表达系统来完成。本文中的“野生型细胞”是指某些修饰之前的细胞。术语“重组细胞”(在本文中也称为“遗传修饰的细胞”)是指已经在遗传上被改变、修饰或工程改造的细胞,从而与其所衍生自的野生型细胞相比,其表现出改变的、修饰的或不同的基因型。“重组细胞”可以包含编码某种蛋白质或酶的外源多核苷酸,因此可以表达所述蛋白质或酶。

[0074] “表达系统”可以指宿主微生物、表达宿主、宿主细胞、生产生物体或生产菌株,并且这些术语中的每一个可以互换使用。表达系统的实例包括但不限于:黑曲霉菌(*Aspergillus niger*)、米曲霉菌(*Aspergillus oryzae*)、多形汉森酵母(*Hansenula*

polymorpha)、疏棉状嗜热丝孢菌 (*Thermomyces lanuginosus*)、尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*)、异孢镰刀菌 (*Fusarium heterosporum*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、优选枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、或地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、优选荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*)、毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) (也称为 *Komagataella phaffii*)、嗜热毁丝霉 (*Myceliophthora thermophila*) (C1)、喜热梭孢壳 (*Thermothelomyces thermophila*)、裂殖酵母菌丝 (*Schizosaccharomyces pombe*)、木霉属 (*Trichoderma*)、优选里氏木霉 (*Trichoderma reesei*)、和酵母菌属 (*Saccharomyces*)、优选酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)。使用上面列出的表达系统生产变体多肽。

[0075] 术语“非天然存在”是指在其原始天然存在的环境或来源中不存在的(多)核苷酸、氨基酸、(多)肽、酶、蛋白质、细胞、生物或其它物质。

[0076] 在多核苷酸和多肽的上下文中,术语“异源的”(或外源或外来或重组)在本文中定义为:

[0077] (a) 不是宿主细胞天然的;

[0078] (b) 宿主细胞天然的;但是,由于通过重组DNA技术操纵宿主细胞的DNA改变了天然序列,从而包括了结构修饰(例如缺失、取代和/或插入);或

[0079] (c) 宿主细胞天然的,但由于通过重组DNA技术(例如更强的启动子)对宿主细胞的DNA进行操作,表达被定量改变或表达是从不同于天然宿主细胞的基因组位置进行。

[0080] 对于两个或更多个多核苷酸序列或两个或更多个氨基酸序列,术语“异源”用于表征两个或更多个多核苷酸序列或两个或更多个氨基酸序列不是天然地以彼此特异性组合的方式出现的。

[0081] 如本文所用,“基因构建体”或“表达盒”是由至少一个待表达的目的序列组成的DNA分子,其与如本文所述的一个或多个控制序列(至少与启动子)可操作地连接。通常情况下,表达盒包含三个元件:启动子序列、开放阅读框和3'非翻译区,在真核生物中通常含有聚腺苷酸化位点。其他调控元件可包括转录增强子和翻译增强子。也可以将内含子序列添加到5'非翻译区(UTR)或编码序列中,以增加在胞质溶胶中积累的成熟信息的量。表达盒可以是载体的一部分,或者可以整合到宿主细胞的基因组中并与其宿主细胞的基因组一起复制。表达盒通常能够增加或减少表达。

[0082] 如本文所用,术语“载体”包括任何类型的构建体,其适合于携带外源多核苷酸序列以转移至另一细胞或用于在给定的细胞内稳定或瞬时表达。如本文所用,术语“载体”涵盖任何种类的克隆载体,例如但不限于质粒、噬菌粒、病毒载体(例如噬菌体)、细菌噬菌体、杆状病毒、粘粒、fosmid、人工染色体或任何其他针对特定目的宿主的特异性的载体。还包括低拷贝数或高拷贝数的载体。外源多核苷酸序列通常包含编码序列,其在本文中可称为“目的基因”。目的基因可以包含内含子和外显子,这取决于宿主细胞的来源或目标。

[0083] 本文所用的载体可以提供用于在转化到宿主细胞或宿主细胞细胞器中之后外源多核苷酸转录和翻译的片段。此类额外的片段可包括调控性核苷酸序列、在特定细胞类型中维持和/或复制所必需的一个或多个复制起点、一个或多个可选择的标记、聚腺苷酸化信号、用于插入外源编码序列的合适位点例如多克隆位点等。一个例子是当需要将载体作为游离基因元件(例如质粒或粘粒分子)维持在细菌细胞中时。合适的复制起点的非限制性实

例包括f1-ori和colE1。

[0084] 载体可以复制而不整合到宿主细胞的基因组中,例如作为细菌宿主细胞中的质粒,或者它可以将其部分或全部DNA整合到宿主细胞的基因组中,从而导致其DNA的复制和表达。

[0085] 可以通过克隆将外源核酸引入载体。克隆可以指通过以合适的方式和方法(例如限制性内切酶)切割载体(例如在多克隆位点内)和外源多核苷酸,可以在单个核酸内产生匹配的结构,使所述外源核酸和载体可控地融合。

[0086] 一旦引入载体中,包含编码序列的外源核酸可能适合被引入(转化、转导、转染等)到宿主细胞或宿主细胞细胞器中。可以选择适合在宿主细胞或宿主细胞细胞器中表达外源多核苷酸序列的克隆载体。

[0087] 如本文所指,术语“引入”或“转化”涵盖外源多核苷酸向宿主细胞的转移,无论采用哪种转移方法。即,本文所用的术语“转化”不依赖于载体、穿梭系统或宿主细胞,并且不仅涉及本领域已知的转化的多核苷酸转移方法(参见例如Sambrook, J. 等人(1989)分子克隆:实验室手册,第二版,冷泉港实验室出版社,冷泉港,纽约),而且涵盖了任何其他种类的多核苷酸转移方法,例如但不限于转导或转染。可以用遗传构建体转化,通过器官发生或胚胎发生而产生能够随后克隆繁殖的植物组织,并从中再生出整株植物。选择的特定组织将根据可用的且最适合于被转化的特定物种的克隆繁殖系统而变化。

[0088] 在本发明的一个实施方案中,载体用于转化宿主细胞。

[0089] 可以将多核苷酸瞬时或稳定地引入宿主细胞,并且可以保持非整合状态,例如作为质粒。“稳定的转化”可以指转化的细胞或细胞器将包含外源编码序列的核酸传给下一代细胞或细胞器。通常,稳定的转化归因于将包含外源编码序列的核酸整合到染色体中或作为游离基因(核DNA的独立片段)。

[0090] “瞬时转化”可表示细胞或细胞器一旦转化,就在特定时间内表达外源核酸序列,大部分情况是在一代以内。通常,瞬时转化是由于包含外源核酸序列的核酸未整合入染色体或没有作为游离基因。

[0091] 或者,可以将其整合到宿主基因组中。然后可以以本领域技术人员已知的方式将所得的转化植物细胞用于再生转化的植物。

[0092] 与相应的野生型细胞相比,重组细胞可表现为“增加”或“减少”的表达。

[0093] 如本文所用,术语“表达增加”、“增强表达”或“过表达”是指在原始的野生型表达水平(其也可以是缺乏表达或不可测量的表达)之外的任何形式的表达。本文中提及“表达增加”、“增强表达”或“过表达”之处,是指相对于对照生物体,基因表达的增加和/或就多肽而言,多肽水平增加和/或多肽活性增加。表达的增加可以是与对照生物体相比,优选增加至少5%,至少10%,至少20%,至少30%,至少40%,至少50%,至少60%,至少70%,至少80%,至少85%,至少90%或100%或甚至更多。

[0094] 增加基因或基因产物表达的方法,例如通过适当的启动子驱动过的表达,转录增强子或翻译增强子的使用。可以将用作启动子或增强子元件的分离的核酸引入多核苷酸的非异源形式的适当位置(通常在上游),以增加编码目的多肽的核酸的表达。例如,可以通过突变、缺失和/或取代而在体内改变内源性启动子(参见,Kmiec, US 5,565,350; Zarling 等人, WO 93/22443),或者可以以适合本发明基因的正确方向和距离将分离的启动子引入生

物体中,以便控制该基因的表达。

[0095] 也可以将内含子序列添加到5'非翻译区(UTR)或部分编码序列的编码序列中,以增加在胞质溶胶中积累的成熟信息的量。已显示,在表达构建体的转录单位中包含可剪接的内含子可在mRNA和蛋白质水平上将基因表达增加多达1000倍(Buchman和Berg(1988) Mol.Cell Biol.8:4395-4405;Callis等(1987) Genes Dev 1:1183-1200)。当置于转录单位的5'末端附近时,基因表达的这种内含子增强通常是最大的。

[0096] 为了获得多肽的增加表达或过表达,最通常地,编码该多肽的核酸在有义方向上用聚腺苷酸化信号过表达。除了适合于以预期的表达模式驱动表达的启动子之外,还可以使用内含子或其他增强元件。

[0097] 通常通过使用重组细胞在商业上生产酶,所述重组细胞通过在适合所需的酶表达的条件下培养所述细胞来表达所需酶。

[0098] 培养通常在合适的营养培养基中进行,以使重组细胞生长(此过程可称为发酵)并表达所需蛋白质。在发酵结束时,收集发酵液并可进行进一步处理,其中所述发酵液包含液体部分和固体部分。

[0099] 目的酶可以被分泌(进入发酵液的液体部分),也可以不从宿主细胞分泌(因此包含在发酵液的细胞中)。据此,所需的蛋白质或酶可从发酵液的液体部分或从细胞裂解液中回收。所需酶的回收使用本领域技术人员已知的方法。从发酵液中回收蛋白质或酶的合适方法包括但不限于收集、离心、过滤、提取和沉淀。如果目的酶在发酵液中沉淀或结晶,或至少部分地与发酵液的颗粒物结合,则可能需要另外的处理步骤,以便从生物量中释放酶或溶解酶晶体和沉淀。US6316240B1描述了从发酵液中回收在发酵过程中沉淀和/或结晶的酶的方法。如果发酵液的细胞中含有所需的酶,则可能需要从细胞中释放酶。例如,可通过使用技术人员熟知的技术进行细胞裂解来实现从细胞中释放(但不限于此)。

[0100] 目的酶可以从发酵液中进一步纯化。所得产物在本文中可以为“分离的多肽产物”或“分离的脂肪酶产物”,其中在此背景下的多肽或脂肪酶是指本发明的多肽或脂肪酶。术语“纯化”是指这样的过程,其中至少一种组分,例如目的蛋白质,与至少另一种组分例如发酵液的颗粒物质分离,并转移到不同的隔室或相中,其中所述不同隔室或相不一定需要由物理屏障隔开。所述不同的隔室的例子是由过滤膜或滤布隔开的两个隔室,即滤液和截留物;所述不同相的例子分别是沉淀物和上清液,或滤饼和滤液。

[0101] “具有脂肪酶活性的纯多肽”是指相对于分离的多肽产物的总重量,本发明的多肽占分离的多肽产物的量为至少约80重量%。“具有脂肪酶活性的纯多肽”可以指本发明的多肽占分离的多肽产物的量为至少约81重量%、至少约82重量%、至少约83重量%、至少约84重量%、至少约85重量%、至少约86重量%、至少约87重量%、至少约88重量%、至少约89重量%、至少约90重量%、至少约91重量%、至少约92重量%、至少约93重量%、至少约94重量%、至少约95重量%、至少约96重量%、至少约97重量%、至少约98重量%、至少约99重量%、或100重量%,所有这些都相对于多肽产物的总重量而言。优选地,“纯化的”是指材料处于100%纯状态。“具有脂肪酶活性的纯多肽”可以表示分离的多肽产物中包含的与本发明多肽不同的化合物的量小于20重量%、小于19重量%、小于18重量%、小于17重量%、小于16重量%、小于15重量%、小于14重量%、小于13重量%、小于12重量%、小于11重量%、小于10重量%、小于9重量%、小于8重量%、小于7重量%、小于6重量%、小于5重量%、小于

4重量%、小于3重量%、小于2重量%、或小于1重量%，所有这些都相对于多肽产物的总重量而言。分离的多肽产物中包含的与本发明多肽不同的化合物可以是例如组分如源自发酵培养基的盐、源自生产宿主细胞的细胞碎片、生产宿主细胞在发酵过程中产生的代谢产物。

[0102] 通过发酵产生并在一定程度上纯化的酶可以是液体形式。“液体”与在20℃和101.3kPa下的物理外观有关。

[0103] 分离的多肽产物可以被进一步加工以形成“酶制剂”。

[0104] “酶制剂”是指包含少数成分的任何非复合制剂，其中所述成分用于稳定酶制剂中包含的酶和/或稳定酶制剂本身的目的。术语“酶稳定性”涉及在储存或操作过程中酶活性作为函数随时间的保留。术语“酶制剂的稳定性”涉及在储存或操作过程中酶制剂的物理外观的维持和在储存或操作过程中避免微生物污染。

[0105] “酶制剂”是指用来配制到复合制剂中的组合物，所述复合制剂本身可以被确定最终用途。本发明的“酶制剂”不是包含几种组分的复合制剂，其中将这些组分配制成复合制剂以在最终应用中各自单独发挥特定作用。复合制剂可以是、但不限于洗涤剂制剂，其中单独的洗涤剂组分以对洗涤剂制剂的洗涤性能有效的量配制。

[0106] 在本发明的一方面，酶制剂中包含至少一种本发明的淀粉酶变体。

[0107] 酶制剂可以是固体或液体。酶制剂可以通过使用本领域已知的技术获得。例如但不限于，可以通过挤出或造粒获得固体酶制剂。合适的挤出和造粒技术是本领域已知的，并且描述在例如WO 94/19444A1和WO 97/43482A1中。

[0108] 液体酶制剂可包含的酶量为相对于酶浓缩物的总重量在0.1重量%至40重量%，或0.5重量%至30重量%，或1重量%至25重量%，或3重量%至10重量%的范围内。

[0109] 液体酶制剂可以包含一种以上类型的酶。在一个实施方案中，酶制剂包含一种或多种本发明的脂肪酶。在一个实施方案中，该酶制剂包含一种或多种本发明的脂肪酶和至少一种另外的酶，其选自与本发明的脂肪酶不同的脂肪酶、蛋白酶、纤维素酶、淀粉酶、漆酶、果胶酶、核酸酶及其任意组合。本发明的水性酶制剂可包含的水的量按重量计大于约50%，按重量计大于约60%，按重量计大于约70%，或按重量计大于约80%，它们全部都相对于酶制剂的总重量计算。

[0110] 在一个实施方案中，所述酶制剂除了至少一种本发明的多肽外，还包含一种或多种选自其他酶、防腐剂和稳定剂的化合物。

[0111] 在一个实施方案中，液体酶制剂包含至少一种本发明的多肽变体和至少一种防腐剂。合适的防腐剂的非限定性实例包括(季)铵化合物、异噻唑啉酮、有机酸和甲醛释放剂。合适的(季)铵化合物的非限定性实例包括苯扎氯铵、聚六亚甲基双胍(PHMB)、十二烷基二甲基氯化铵(DDAC)和N-(3-氨基丙基)-N-十二烷基丙烷-1,3-二胺(二胺)。合适的异噻唑啉酮的非限制性实例包括1,2-苯并噻唑啉-3-酮(BIT)、2-甲基-2H-异噻唑-3-酮(MIT)、5-氯-2-甲基-2H-异噻唑-3-酮(CIT)、2-辛基-2H-异噻唑-3-酮(OIT)和2-丁基-苯并[d]异噻唑-3-酮(BBIT)。合适的有机酸的非限定性实例包括苯甲酸、山梨酸、L-(+)-乳酸、甲酸和水杨酸。合适的甲醛释放剂的非限定性实例包括N,N'-亚甲基双吗啉(MBM)、2,2',2''-(六氢-1,3,5-三嗪-1,3,5-三基)三乙醇(HHT)、(亚乙二氧基)二甲醇、 α,α',α'' -三甲基-1,3,5-三嗪-1,3,5(2H,4H,6H)-三乙醇(HPT)、3,3'-亚甲基双[5-甲基噁唑烷](MBO)和顺式1-(3-氯烯丙基)-3,5,7-三氮杂-1-氮鎓金刚烷氯化物(CTAC)。

[0112] 其它有用的防腐剂包括碘丙炔基丁基氨基甲酸酯 (IPBC)、释放卤素的化合物,例如二氯二甲基乙内酰脲 (DCDMH), 溴氯二甲基乙内酰脲 (BCDMH) 和二溴二甲基乙内酰脲 (DBDMH); 溴-硝基化合物, 例如溴硝丙二醇 (即2-溴-2-硝基丙烷-1,3-二醇)、2,2-二溴-2-氰基乙酰胺 (DBNPA); 醛类, 如戊二醛; 苯氧基乙醇; 联苯-2-醇; 和硫氧吡啶锌或钠。

[0113] 在一个实施方案中, 液体酶制剂包含至少一种本发明的多肽变体和至少一种酶稳定剂。酶稳定剂选自能够减少液体酶浓缩物中包含的至少一种酶在储存过程中酶活性损失的物质。在本发明中减少的酶活性损失可意味着与储存前的初始酶活性相比, 酶活性的损失降低了至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或至少99.5%。

[0114] 在一个实施方案中, 至少一种酶稳定剂选自稳定脂肪酶的化合物。与储存之前的初始脂解活性相比, 当“可应用的”其脂解活性等于100%时, 本发明的脂酶是稳定的。与储存前的初始脂解活性相比, 如果脂肪酶可应用的脂解活性为至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或至少99.5%, 则在本发明中脂肪酶可以称为稳定的。

[0115] 脂肪酶可以在至少一种选自例如NaCl或KCl的盐或乳酸和甲酸的碱金属盐的化合物的存在下稳定。

[0116] 本发明涉及至少一种本发明的变体多肽和至少一种其它酶的组合。在一方面, 这种组合是在20°C和101.3kPa下液体酶制剂的一部分。

[0117] 酶的组合可以是相同类别的, 例如包含第一脂肪酶和第二脂肪酶的组合。酶的组合可以来自不同种类的酶, 例如, 包含脂肪酶和淀粉酶的组合。酶的组合可以包含至少一种本发明的变体脂肪酶和一种其他酶。组合可以包含三种酶、四种酶或多于四种酶。

[0118] “其他酶”表示不同于本发明的脂肪酶变体的任何酶。至少一种“其他酶”可选自脂肪酶、淀粉酶、蛋白酶、纤维素酶、甘露聚糖酶、果胶酸裂合酶和核酸酶。

[0119] 至少一种酶可以选自与本发明的多肽不同的脂肪酶。“脂肪酶”、“脂肪分解酶”、“脂类酯酶”都是指EC 3.1.1类的酶(“羧酸酯水解酶”)。脂肪酶(E.C.3.1.1.3, 三酰基甘油酯酶)通常将甘油三酯水解为亲水性更高的甘油单酯和甘油二酯、游离脂肪酸和甘油。脂肪酶通常还包括在不同于甘油三酯的底物上有活性或裂解特定脂肪酸的酶, 例如磷脂酶A (EC 3.1.1.4)、半乳糖脂酶 (EC 3.1.1.26)、角质酶 (cutinase) (EC 3.1.1.74) 和具有固醇酯酶活性 (EC 3.1.1.13) 和/或蜡酯水解酶活性 (EC 3.1.1.50) 的酶。

[0120] 在专利和公开的专利申请中已经描述了许多脂肪酶, 包括但不限于: WO 2000/032758、WO 2003/089620、WO 2005/032496、WO 2005/086900、WO 2006/00976、WO 2006/031699、WO 2008/036863、WO 2011/046812和WO 2014/059360。

[0121] 脂肪酶用于洗涤剂 and 清洁产品中, 以去除油脂、脂肪、油和奶渍。

[0122] 在一个实施方案中, 脂肪酶是选自真菌的三酰基甘油脂肪酶 (EC类1.1.1.1)。真菌三酰基甘油脂肪酶可选自疏绵状嗜热丝孢菌 (*Thermomyces lanuginosa*) 的脂肪酶, 例如根据US5869438的SEQ ID NO:2的氨基酸1-269 (在本文中可称为Lipolase) 的三酰甘油脂肪酶及其具有脂解活性的变体。

[0123] 根据US5869438的SEQ ID NO:2的氨基酸1-269的疏绵状嗜热丝孢菌脂肪酶变体可以选自具有脂解活性的变体,其与US5869438的SEQ ID NO:2的氨基酸1-269的全长多肽序列相比时,具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性或相似性。所述变体可以选自当与US5869438的SEQ ID NO:2的氨基酸1-269的全长多肽序列相比时具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性或相似性的多肽序列。

[0124] 疏绵状嗜热丝孢菌脂肪酶可以选自变体,其选自当与US5869438的SEQ ID NO:2的氨基酸1-269的全长多肽序列相比时具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性或相似性的多肽序列,所述全长多肽序列具有脂解活性且包含与US5869438的SEQ ID NO:2的氨基酸1-269相比的至少以下氨基酸取代:T231R和N233R(具有T231R和N233R的US5869438的SEQ ID NO:2的氨基酸1-269的酶在本文中可称为Letra Lip)。所述脂肪酶变体当与US5869438的SEQ ID NO:2的氨基酸1-269比较时,可进一步包含以下一种或多种氨基酸交换:Q4V、V60S、A150G、L227G、P256K。

[0125] 至少一种酶可以选自淀粉酶。 α -淀粉酶(E.C.3.2.1.1)酶通常对包含三个或更多(1 \rightarrow 4)- α -连接的D-葡萄糖单元的多糖进行(1 \rightarrow 4)- α -D-糖苷键的内水解。淀粉酶随机地作用于淀粉、糖原及相关多糖和寡糖;还原基团以 α -构型释放。淀粉酶的其他实例包括 β -淀粉酶(EC 3.2.1.2)、葡聚糖1,4- α -麦芽四糖水解酶(EC 3.2.1.60)、异淀粉酶(EC 3.2.1.68)、葡聚糖1,4- α -麦芽六糖苷酶(EC 3.2.1.98)和葡聚糖1,4- α -麦芽糖水解酶(EC 3.2.1.133)。

[0126] 许多淀粉酶已经在专利和公开的专利申请中进行了描述,包括但不限于:WO 2002/068589、WO 2002/068597、WO 2003/083054、WO 2004/091544和WO 2008/080093。

[0127] 已知淀粉酶源自如WO 95/10603中所述的具有SEQ ID NO:2的地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)。合适的变体是与WO 95/10603中所述的SEQ ID NO:2至少90%相同和/或在以下位置包含一个或多个取代的那些变体:15、23、105、106、124、128、133、154、156、178、179、181、188、190、197、201、202、207、208、209、211、243、264、304、305、391、408和444,它们具有淀粉水解活性。所述变体描述于WO 94/02597、WO 94/018314、WO 97/043424和WO 99/019467的SEQ ID NO:4中。

[0128] 已知衍生自具有WO 02/10355中所述的SEQ ID NO:6的嗜热脂肪芽孢杆菌(*B. stearothermophilus*)的淀粉酶或具有淀粉分解活性的与其至少90%相同或相似的淀粉酶。SEQ ID NO:6的合适变体包括与其具有至少90%同一性或相似性和/或进一步包含在位置181和/或182处缺失和/或在位置193处取代的那些。

[0129] 已知衍生自WO 99/19467中公开的具有SEQ ID NO:6的芽孢杆菌属(*Bacillus*)物种707的淀粉酶或具有淀粉分解活性的与其至少90%相同或相似的淀粉酶。

[0130] 已知从盐敏芽孢杆菌(*Bacillus halmapalus*)获得的具有如WO 96/23872(也称为SP-722)中所述的SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:7的淀粉酶,或具有淀粉分解活性的与所述序列之一至少90%相同或相似的淀粉酶。

[0131] 已知源自芽孢杆菌物种DSM 12649的具有如WO 00/22103中公开的SEQ ID NO:4的

淀粉酶或具有淀粉分解活性的与其至少90%相同或相似的淀粉酶。

[0132] 已知源自芽孢杆菌菌株TS-23的具有如WO 2009/061380中公开的SEQ ID NO:2的淀粉酶或具有淀粉分解活性的与其至少90%相同或相似的淀粉酶。

[0133] 已知源自纤维粘菌属物种(*Cytophaga* sp.)的具有如WO 2013/184577中公开的SEQ ID NO:1的淀粉酶或具有淀粉分解活性的与其至少90%相同或相似的淀粉酶。

[0134] 已知源自巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*) DSM 90的具有如2010/104675中公开的SEQ ID NO:1的淀粉酶或具有淀粉分解活性的与其至少90%相同或相似的淀粉酶。

[0135] 已知具有如WO 00/60060中所述的SEQ ID NO:2的氨基酸1至485的淀粉酶或具有淀粉分解活性的包含与SEQ ID NO:2的氨基酸1至485的氨基酸至少96%相同或相似的氨基酸序列的淀粉酶。

[0136] 还已知淀粉酶具有如WO 2006/002643中所述的SEQ ID NO:12或与其具有至少80%同一性且具有淀粉分解活性的淀粉酶。合适的淀粉酶包括与SEQ ID NO:12相比具有至少80%同一性和/或在位置Y295F和M202LITV处包含取代并具有淀粉分解活性的那些。

[0137] 还已知具有如WO 2011/098531中所述的SEQ ID NO:6的淀粉酶或与其具有至少80%同一性且具有淀粉分解活性的淀粉酶。合适的淀粉酶包括与SEQ ID NO:6相比具有至少80%同一性和/或包含在一个或多个选自以下位置的取代:193[G、A、S、T或M]、195[F、W、Y、L、I或V]、197[F、W、Y、L、I或V]、198[Q或N]、200[F、W、Y、L、I或V]、203[F、W、Y、L、I或V]、206[F、W、Y、N、L、I、V、H、Q、D或E]、210[F、W、Y、L、I或V]、212[F、W、Y、L、I或V]、213[G、A、S、T或M]和243[F、W、Y、L、I或V],且具有淀粉分解活性的那些。

[0138] 已知具有如WO 2013/001078中所述的SEQ ID NO:1的淀粉酶或具有淀粉分解活性的与其具有至少85%同一性的淀粉酶。合适的淀粉酶包括与SEQ ID NO:1相比具有至少85%同一性和/或在对应于位置G304、W140、W189、D134、E260、F262、W284、W347、W439、W469、G476和G477的两个或更多个(几个)位置处包含改变并具有淀粉分解活性的淀粉酶。

[0139] 已知具有如WO 2013/001087中所述的SEQ ID NO:2的淀粉酶或具有淀粉分解活性的与其具有至少85%同一性的淀粉酶。合适的淀粉酶包括与SEQ ID NO:2相比具有至少85%同一性和/或具有淀粉分解活性的在位置181+182、或182+183或183+184处包含缺失的那些。合适的淀粉酶包括与SEQ ID NO:2相比具有至少85%同一性和/或在181+182、或182+183、或183+184处包含缺失的淀粉酶,其在对应于以下位置的任何位置包含一个或两个或多个修饰:W140、W159、W167、Q169、W189、E194、N260、F262、W284、F289、G304、G305、R320、W347、W439、W469、G476和G477,且具有淀粉分解活性。

[0140] 淀粉酶还包括来自上述淀粉酶的杂合的 α -淀粉酶,例如描述于WO 2006/066594。

[0141] 淀粉酶包括根据WO 2014/183920的杂合淀粉酶,其中A和B结构域与WO 2014/183920的SEQ ID NO:2具有至少90%的同一性,且C结构域与WO 2014/183920的SEQ ID NO:6具有至少90%的同一性,其中,所述杂合淀粉酶具有淀粉分解活性;优选地,所述杂合 α -淀粉酶与WO 2014/183920的SEQ ID NO:23具有至少95%的同一性或相似性,并且具有淀粉分解活性。

[0142] 淀粉酶包括WO 2014/183921所述的杂合淀粉酶,其中A和B结构域与WO 2014/183921中公开的SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:39具有至少75%的同一性,且C结构域与WO

2014/183921的SEQ ID NO:6具有至少90%的同一性,其中,所述杂合淀粉酶具有淀粉分解活性;优选地,所述杂合 α -淀粉酶与WO 2014/183921中公开的SEQ ID NO:30至少95%的同一性或相似性,并且具有淀粉分解活性。

[0143] 在一个实施方案中,淀粉酶变体包括与如上所公开的母体酶的全长多肽序列相比具有至少40%至100%同一性或相似性的多肽。在一个实施方案中,具有淀粉分解活性的淀粉酶变体与上述公开的母体酶的全长多肽序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的同一性或相似性。

[0144] 本发明的淀粉酶具有“淀粉分解活性”或“淀粉酶活性”,涉及多糖中的糖苷键的(内切)水解。 α -淀粉酶活性可以通过测定 α -淀粉酶活性的测定法来确定。测量 α -淀粉酶活性的测定方法的实例为: α -淀粉酶活性可以通过使用Phadebas片作为底物的方法(Phadebas淀粉酶测试,由Magle Life Science提供)来测定。淀粉被 α -淀粉酶水解,产生可溶的蓝色碎片。在620nm处用分光光度法测得的所得蓝色溶液的吸光度是 α -淀粉酶活性的函数。在给定的条件下,所测得的吸光度与所讨论的 α -淀粉酶的比活性(活性/纯 α -淀粉酶蛋白的毫克数)成正比。

[0145] α -淀粉酶活性也可以通过使用亚乙基-4-硝基苯基- α -D-麦芽七糖苷(EPS)的方法来确定。D-麦芽七糖苷是一种封闭的寡糖,可以被内切淀粉酶裂解。切割后,试剂盒中包含的 α -葡萄糖苷酶可消化底物以释放黄色的游离PNP分子,因此可以通过可见光分光光度法在405nm处进行测量。含有EPS底物和 α -葡萄糖苷酶的试剂盒由Roche Costum Biotech(目录号10880078103)制造。在给定的条件下,时间依赖性的吸收曲线的斜率与所讨论的 α -淀粉酶的比活性(每毫克酶的活性)成正比。

[0146] 至少一种酶可选自纤维素酶的组。“纤维素酶”或“纤维素分解酶”是指参与纤维素水解的酶。三个主要类型的纤维素酶是已知的,即内切-ss-1,4-葡聚糖酶(内切-1,4-P-D-葡聚糖4-葡聚糖水解酶,E.C.3.2.1.4;水解纤维素中的 β -1,4-葡萄糖苷键)、纤维二糖水解酶(1,4--P-D-葡聚糖纤维二糖水解酶,EC3.2.1.91)和ss葡萄糖苷酶(EC3.2.1.21)。

[0147] 内切葡聚糖酶可以通过含有20多种EC3.2.1.4的内切葡聚糖酶家族5的氨基酸序列相似性进行分类(Henrissat,B.Accessed at UniProt 10/26/2011)。还可以参考T.-M.Enveri,“Microbial Cellulases”in W.M.Fogarty,Microbial Enzymes and Biotechnology,Applied Science Publishers,p.183-224(1983);Methods in Enzymology,(1988)Vol.160,p.200-391(Wood,W.A.和Kellogg,S.T.编辑);Béguin,P.,“Molecular Biology of Cellulose Degradation”,Annu.Rev.Microbiol.(1990),Vol.44,pp.219-248;Begun,P.和Aubert,J-P.,“The biological degradation of cellulose”,FEMS Microbiology Reviews 13(1994)p.25-58;Henrissat,B.,“Cellulases and their interaction with cellulose”,Cellulose(1994),Vol.1,pp.169-196。

[0148] 优选地,从糖基水解酶家族7(GH7,pfam00840)中选择至少一种纤维素酶,优选地选自内切葡聚糖酶(EC 3.2.1.4)。

[0149] 纤维素酶已在专利和已公布的专利申请中进行了描述,包括但不限于:WO 1997/025417、WO 1998/024799、WO 2003/068910、WO 2005/003319和WO 2009/020459。

[0150] 在一个实施方案中,至少一种纤维素酶选自包含纤维素结合结构域的纤维素酶。

在一个实施方案中,至少一种纤维素酶选自仅包含催化结构域的纤维素酶,这意味着该纤维素酶缺少纤维素结合结构域。

[0151] 在一个实施方案中,至少一种纤维素酶选自腐质霉属(*Humicola*),例如在EP 0495257、EP 0531315、EP 0531372、US 4435307、US 5648263、US 5776757、WO 89/09259、WO 91/17244、WO 94/07998(序列如图1所示“43kd人类变体”)、WO 95/24471、WO 96/11262和WO 98/12307中公开的*Humicola insolens* (DSM1800)。

[0152] 在一个实施方案中,至少一种纤维素酶选自木霉属(*Trichoderma*),例如里氏木霉(*Trichoderma reesei*)、*Trichoderma longibrachiatum*或*Trichoderma harzianum*,如EP 1305432、EP 1240525、WO 92/06165、WO 94/21801、WO 94/26880、WO 95/02043、WO 95/24471和WO 02/099091中所公开。

[0153] 适合的纤维素酶包括具有纤维素分解活性的纤维素酶变体,其当与各自母体酶的全长多肽序列相比时具有至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的同一性或相似性。

[0154] 本发明的纤维素酶具有“纤维素酶活性”或“纤维素分解活性”。测定纤维素分解活性的试验包括:纤维素分解活性可通过纤维素酶水解羧甲基纤维素以还原碳水化合物的事实来确定,其还原能力按照Hoffman, W.S., *J. Biol. Chem.* 120, 51 (1937)所述通过铁氰化物反应比色测定。

[0155] 至少一种酶可从甘露聚糖降解酶中选择。至少一种甘露聚糖降解酶可选自 β -甘露糖苷酶(EC3.2.1.25)、内切-1,4- β -甘露糖苷酶(EC3.2.1.78)和1,4- β -甘露二糖糖苷酶(酶代码EC3.2.1.100)。优选地,至少一种甘露聚糖降解酶是选自内切-1,4- β -甘露糖苷酶(EC 3.2.1.78),其是在本文中可称为内切- β -1,4-D-甘露聚糖酶、 β -甘露聚糖酶或甘露聚糖酶的一组酶。

[0156] 具有甘露聚糖降解活性或甘露聚糖酶活性的多肽可根据本领域已知的标准测试方法进行测试,例如,将待测试溶液施加到含有0.2%AZCL半乳甘露聚糖(角豆)的琼脂板中冲出的直径为4mm的孔中,即可用的内切-1,4- β -D-甘露聚糖酶的测定底物为来自Megazyme公司的目录号I-AZGMA(Megazyme的互联网地址:<http://www.megazyme.com/Purchase/index.html>)。

[0157] 至少一种甘露聚糖酶可选自家族5或26的碱性甘露聚糖酶。术语“碱性甘露聚糖酶”指包括在给定pH值范围7到12,优选7.5到10.5时具有至少为其最大活性40%的酶活性的甘露聚糖酶。

[0158] 至少一种甘露聚糖酶可以选自源自芽孢杆菌属生物体的甘露聚糖酶,例如以下所述:JP-0304706[β -甘露聚糖酶,来自芽孢杆菌属物种]、JP-63056289[碱性耐热 β -甘露聚糖酶]、JP-63036774[芽孢杆菌属微生物FERM P-8856,其在碱性pH下产生 β -甘露聚糖酶和 β -甘露糖苷酶]、JP-08051975[碱性 β -甘露聚糖酶,来自嗜碱性芽孢杆菌属物种AM-001]、WO 97/11164[甘露聚糖酶,来自解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)]、WO 91/18974[在极端pH和温度下有甘露聚糖酶活性]、WO 97/11164[甘露聚糖酶,来自解淀粉芽孢杆菌]、WO 2014/100018[内切-(3-甘露聚糖酶1,从环状芽孢杆菌(*Bacillus circulans*)或迟缓芽孢杆菌(*Bacillus lentus*)菌株CMG1240克隆(Bleman1;参见U.S.5,476,775)]。适合

的甘露聚糖酶如WO 99/064619中所述]。

[0159] 组分(b)中包含的至少一种甘露聚糖酶可选自源自木霉菌属(*Trichoderma*)生物体的甘露聚糖酶,如在WO 93/24622或WO 2011/085747中公开。

[0160] 合适的甘露聚糖酶还包括具有甘露聚糖降解活性的上述甘露聚糖酶的变体。在一个实施方案中,甘露聚糖酶变体包括与如上所公开的母体酶的全长多肽序列相比具有至少40%至100%的同一性或相似性的变体。在一个实施方案中,具有甘露聚糖降解活性的甘露聚糖酶变体具有与上述母体酶的全长多肽序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性或相似性。

[0161] 至少一种酶可从果胶酸裂解酶中选择。果胶酸裂解酶(E.C.4.2.2.2)酶消除性切割(1→4)- α -D-聚半乳糖醛酸,得到在其非还原末端具有4-脱氧- α -D-半乳糖-4-烯醛糖基的低聚糖。

[0162] 果胶酸裂解酶已在专利和公开的专利申请中描述,包括但不限于:W02004/090099。果胶酸裂解酶已知来源于芽孢杆菌属(*Bacillus*),特别是地衣芽孢杆菌(*B.licheniformis*)或琼脂芽孢杆菌(*B.agaradhaerens*),或任何这些来源的变体,例如US 6,124,127、WO 99/027083、WO 99/027084、WO 2002/006442、WO 2002/092741、WO 2003/095638中所述。

[0163] 市售果胶酸裂解酶包括:XpectTM、PectawashTM和PectawayTM(Novozymes A/S); PrimaGreenTM、EcoScour(DuPont)。

[0164] 至少一种酶可从核酸酶中选择。核酸酶(EC3.1.21.1)也被称为脱氧核糖核酸酶I,或脱氧核糖核酸酶(DNase)能将核酸内切裂解成5'-磷酸二核苷酸和5'-磷酸寡核苷酸终产物。

[0165] 核酸酶已在专利和公开的专利申请中描述,包括但不限于:US 3451935、GB 1300596、DE 10304331、WO 2015/155350、WO 2015/155351、WO 2015/166075、WO 2015/181287和WO 2015/181286。

[0166] 至少一种酶可以选自蛋白酶。具有蛋白酶解活性的酶称为“蛋白酶”或“肽酶”。蛋白酶是发挥“蛋白酶活性”或“蛋白酶解活性”的活性蛋白。

[0167] 蛋白酶是EC 3.4类别的成员,包括氨基肽酶(EC 3.4.11)、二肽酶(EC 3.4.13)、二肽基肽酶和三肽基肽酶(EC 3.4.14)、肽基二肽酶(EC 3.4.15)、丝氨酸型羧肽酶(EC 3.4.16)、金属羧肽酶(EC 3.4.17)、半胱氨酸型羧肽酶(EC 3.4.18)、 ω 肽酶(EC 3.4.19)、丝氨酸内肽酶(EC 3.4.21)、半胱氨酸内肽酶(EC 3.4.22)、天冬氨酸内肽酶(EC 3.4.23)、金属内肽酶(EC 3.4.24)、苏氨酸内肽酶(EC 3.4.25)、催化机理未知的内肽酶(EC 3.4.99)。

[0168] 市售的蛋白酶包括但不限于LavergyTM Pro(BASF); **Alcalase®**、**Blaze®**、**DuralaseTM**、**DurazymTM**、**Relase®**、**Relase® Ultra**、**Savinase®**、**Savinase® Ultra**、**Primase®**、**Polarzyme®**、**Kannase®**、**Liquanase®**、**Liquanase® Ultra**、**Ovozyme®**、**Coronase®**、**Coronase® Ultra**、**Neutrase®**、**Everlase®**和**Esperase®**(Novozymes A/S),以下述商标名出售的那些:**Maxatase®**、**Maxacal®**、

Maxapem®、Purafect®、Purafect® Prime、Purafect MA®、Purafect Ox®、Purafect OxP®、Puramax®、Properase®、FN2®、FN3®、FN4®、Excellase®、Eraser®、Ultimase®、Opticlean®、Effectenz®、Preferenz®和 Optimase® (Danisco/DuPont)、Axapem™ (Gist-Brocases N.V.)、迟缓芽胞杆菌 (*Bacillus lentus*) 碱性蛋白酶和获自Kao的KAP (*Bacillus alkalophilus* 枯草杆菌蛋白酶)。

[0169] 至少一种蛋白酶可以从丝氨酸蛋白酶 (EC 3.4.21) 中选择。丝氨酸蛋白酶或丝氨酸肽酶 (EC 3.4.21) 的特征在于在催化活性位点具有丝氨酸,其在催化反应过程中与底物形成共价加合物。丝氨酸蛋白酶可以选自糜蛋白酶 (例如EC 3.4.21.1)、弹性蛋白酶 (例如EC 3.4.21.36)、弹性蛋白酶 (例如EC 3.4.21.37或EC 3.4.21.71)、粒酶 (例如EC 3.4.21.78或EC 3.4.21.79)、激肽释放酶 (例如EC 3.4.21.34、EC 3.4.21.35、EC 3.4.21.118或EC 3.4.21.119)、纤溶酶 (例如EC 3.4.21.7)、胰蛋白酶 (例如EC 3.4.21.4)、凝血酶 (例如EC 3.4.21.5) 和枯草杆菌蛋白酶 (也称为枯草肽酶,例如EC 3.4.21.62),后者在下文中也称为“枯草杆菌蛋白酶”。

[0170] Siezen等人 (1991), *Protein Eng.* 4:719-737和Siezen等人 (1997), *Protein Science* 6:501-523中提出了暂时指定为枯草杆菌酶 (subtilase) 的丝氨酸蛋白酶的亚组。它们是通过丝氨酸蛋白酶 (以前称为枯草杆菌蛋白酶样蛋白酶) 的170多个氨基酸序列进行同源性分析而定义。枯草杆菌蛋白酶以前通常被定义为由革兰氏阳性细菌或真菌产生的丝氨酸蛋白酶,根据Siezen等人的报道,现在是枯草杆菌酶的一个亚组。已经鉴定出各种各样的枯草杆菌酶,并且已经确定了许多枯草杆菌酶的氨基酸序列。有关此类枯草杆菌酶及其氨基酸序列的更详细说明,参见Siezen等人 (1997), *Protein Science* 6:501-523。枯草杆菌酶可分为6个亚类,即枯草杆菌蛋白酶族、热酶族、蛋白酶K族、羊毛硫抗生素肽酶族、kexin族和极端嗜热古菌蛋白酶 (pyrolysin) 族。

[0171] 枯草杆菌酶的一个亚组是枯草杆菌蛋白酶,它们是MEROPS数据库 (<http://merops.sanger.ac.uk>) 所定义的S8家族的丝氨酸蛋白酶。肽酶家族S8包含丝氨酸内肽酶枯草杆菌蛋白酶及其同源物。肽酶家族S8的大多数成员在中性至弱碱pH下均具有活性。该家族中的许多肽酶都是热稳定的。

[0172] 枯草杆菌蛋白酶类型 (EC 3.4.21.62) 及其变体的亲本蛋白酶可以是细菌蛋白酶。所述细菌蛋白酶可以是革兰氏阳性细菌多肽,例如芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、梭菌属 (*Clostridium*)、肠球菌属 (*Enterococcus*)、土芽孢杆菌属 (*Geobacillus*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、乳球菌属 (*Lactococcus*)、海洋杆菌属 (*Oceanobacillus*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、链球菌属 (*Streptococcus*) 或链霉菌属 (*Streptomyces*) 的蛋白酶,或者是革兰氏阴性细菌多肽,例如弯曲杆菌属 (*Campylobacter*)、大肠杆菌 (*E. coli*)、黄杆菌属 (*Flavobacterium*)、梭杆菌属 (*Fusobacterium*)、螺杆菌属 (*Helicobacter*)、llyobacter、奈瑟球菌属 (*Neisseria*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、沙门氏菌属 (*Salmonella*) 或尿素支原体 (*Ureaplasma*) 的蛋白酶。例如,R. Siezen在R. Bott和C. Betzel编辑,纽约,1996的“*Subtilisin enzymes*”中的第75-95页“*Subtilases: Subtilisin-like Proteases*”中提供了该家族的综述。

[0173] 至少一种蛋白酶可以选自以下:来自解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus*

amyloliquefaciens) BPN' 的枯草杆菌蛋白酶(由Vasanth等人(1984)在J.Bacteriol.Volume 159,p.811-819和JA Wells等人(1983)在Nucleic Acids Research, Volume 11,p.7911-7925中所述);地衣芽孢杆菌(Bacillus licheniformis)的枯草杆菌蛋白酶(枯草溶菌素;在EL Smith等人(1968)在J.Biol Chem,Volume243,pp.2184-2191和Jacobs等人(1985)在Nucl.Acids Res,Vol 13,p.8913-8926中公开);枯草杆菌蛋白酶PB92(碱性蛋白酶PB92的原始序列在EP 283075 A2中有描述);如WO 89/06279中公开的枯草杆菌蛋白酶147和/或309(分别为**Esperase®**、**Savinase®**),如WO 91/02792中公开的来自迟缓芽孢杆菌(Bacillus lentus)的枯草杆菌蛋白酶,例如WO 95/23221中所述来自迟缓芽孢杆菌DSM5483或迟缓芽孢杆菌DSM 5483的变体;如DE 10064983中公开的来自嗜碱芽孢杆菌(Bacillus alcalophilus) (DSM 11233)的枯草杆菌蛋白酶;如WO 2003/054184中公开的来自嗜碱芽孢杆菌(Bacillus alcalophilus) (DSM 14391)的枯草杆菌蛋白酶;如WO 2003/056017公开的来自芽孢杆菌属物种(DSM 14390)的枯草杆菌蛋白酶;在WO 2003/055974中公开的来自芽孢杆菌属物种(DSM 14392)的枯草杆菌蛋白酶;在WO 2003/054184中公开的来自吉氏芽孢杆菌(Bacillus gibsonii) (DSM 14393)的枯草杆菌蛋白酶;如WO 2005/063974中描述的具有SEQ ID NO:4的枯草杆菌蛋白酶;如WO 2005/103244中描述的具有SEQ ID NO:4的枯草杆菌蛋白酶;如WO 2005/103244中描述的具有SEQ ID NO:7的枯草杆菌蛋白酶;和如在申请DE 102005028295.4中描述的具有SEQ ID NO:2的枯草杆菌蛋白酶。

[0174] 至少一种枯草杆菌蛋白酶可以是如在WO 89/06279的表I中的序列a)所公开的枯草杆菌蛋白酶309(在本文中可称为**Savinase®**)或与其至少80%相同或相似并且具有蛋白酶解活性的变体。

[0175] 已知蛋白酶包含以下文献所述的变体:WO 92/19729、WO 95/23221、WO 96/34946、WO 98/20115、WO 98/20116、WO 99/11768、WO 01/44452、WO 02/088340、WO 03/006602、WO 2004/03186、WO 2004/041979、WO 2007/006305、WO 2011/036263、WO 2011/036264和WO 2011/072099。合适的实例尤其包括衍生自如EP 1921147中所述的SEQ ID NO:22的枯草杆菌蛋白酶的蛋白酶变体(具有一个或多个以下位置的氨基酸取代:3、4、9、15、24、27、33、36、57、68、76、77、87、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、106、118、120、123、128、129、130、131、154、160、167、170、194、195、199、205、206、217、218、222、224、232、235、236、245、248、252和274,并且具有蛋白酶解活性。此外,一种枯草杆菌蛋白酶不在位置Asp32、His64和Ser221处突变。

[0176] 合适的蛋白酶包括具有蛋白酶解活性的与如上所述的亲本酶的全长多肽序列相比时具有至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性或相似性的蛋白酶变体。

[0177] 至少一种枯草杆菌蛋白酶可以具有如EP 1921147中所述的SEQ ID NO:22,或者是其变体,其与如EP 1921147中所述的SEQ ID NO:22至少80%相同或相似并且具有蛋白酶解活性。在一个实施方案中,枯草杆菌蛋白酶与EP1921147中描述的SEQ ID NO:22至少80%相同或相似,并且特征在于在位置101处(根据BPN' 编号)具有氨基酸谷氨酸(E)或天冬氨酸(D)或天冬酰胺(N)或谷氨酰胺(Q)或丙氨酸(A)或甘氨酸(G)或丝氨酸(S),并且具有蛋白酶解活性。在一个实施方案中,枯草杆菌蛋白酶与EP 1921147中所述的SEQ ID NO:22至少

80%相同或相似,并且特征在于在位置101处(根据BPN' 编号)具有氨基酸谷氨酸(E)或天冬氨酸(D),并且具有蛋白酶解活性。此类枯草杆菌蛋白酶变体可在位置101处(例如R101E或R101D)单独包含氨基酸取代,或与以下位置的一个或多个取代组合:3、4、9、15、24、27、33、36、57、68、76、77、87、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、106、118、120、123、128、129、130、131、154、160、167、170、194、195、199、205、206、217、218、222、224、232、235、236、245、248、252和/或274(根据BPN' 编号),并且具有蛋白酶解活性。在一个实施方案中,所述蛋白酶包含一个或多个其它取代:(a)在位置3的苏氨酸(3T), (b)在位置4的异亮氨酸(4I), (c)在位置63(63A、63T或63R)的丙氨酸、苏氨酸或精氨酸, (d)在位置156(156D或156E)的天冬氨酸或谷氨酸, (e)在位置194的脯氨酸(194P), (f)在位置199的甲硫氨酸(199M), (g)在位置205的异亮氨酸(205I), (h)在位置217(217D、217E或217G)的天冬氨酸、谷氨酸或甘氨酸, (i)根据(a)至(h)的两个或更多个氨基酸的组合。

[0178] 合适的枯草杆菌蛋白酶可以与如EP 1921147中所述的SEQ ID NO:22至少80%相同或相似,并且特征在于包含一个氨基酸(根据(a)-(h))或根据(i)的组合以及氨基酸101E、101D、101N、101Q、101A、101G或101S(根据BPN' 编号),并且具有蛋白酶解活性。

[0179] 在一个实施方案中,枯草杆菌蛋白酶与EP 1921147中所述的SEQ ID NO:22至少80%相同或相似,并且特征在于包含突变(根据BPN' 编号)R101E,或S3T+V4I+V205I,或S3T+V4I+R101E+V205I,或S3T+V4I+V199M+V205I+L217D,并具有蛋白酶解活性。

[0180] 在另一个实施方案中,枯草杆菌蛋白酶包含与EP 1921147中所述的SEQ ID NO:22至少80%相同的氨基酸序列,并且特征还在于包含S3T+V4I+S9R+A15T+V68A+D99S+R101S+A103S+I104V+N218D(根据BPN' 编号),并具有蛋白酶解活性。

[0181] 枯草杆菌蛋白酶可以具有与EP 1921147中所述的SEQ ID NO:22至少80%相同或相似的氨基酸序列,并且特征还在于包含R101E,以及一个或多个选自以下的取代:S156D、L262E、Q137H、S3T、R45E、D、Q、P55N、T58W、Y、L、Q59D、M、N、T、G61 D、R、S87E、G97S、A98D、E、R、S106A、W、N117E、H120V、D、K、N、S125M、P129D、E136Q、S144W、S161T、S163A、G、Y171 L、A172S、N185Q、V199M、Y209W、M222Q、N238H、V244T、N261T、D和L262N、Q、D(如WO 2016/096711所述并根据BPN' 编号)并具有蛋白酶解活性。

[0182] 本发明的蛋白酶具有蛋白酶解活性。确定蛋白酶解活性的方法在文献中是公知的(参见例如Gupta等人(2002), *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60:381-395)。可以通过使用琥珀酰-丙氨酸-丙氨酸-脯氨酸-苯丙氨酸-对硝基苯胺(Suc-AAPF-pNA,短AAPF;参见例如DelMar等人(1979), *Analytical Biochem* 99,316-320)作为底物确定蛋白酶解活性。将pNA通过蛋白酶解裂解从底物分子上裂解下来,从而释放出黄色的游离pNA,可以通过测量OD405对其进行定量。

[0183] 在本发明的一个方面,提供了与具有脂肪酶活性的SEQ ID NO:1的全长氨基酸序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性或相似性的氨基酸序列的多肽,其与至少一种蛋白酶组合,优选地选自枯草杆菌蛋白酶。至少一种枯草杆菌蛋白酶可以选自本文所述的那些。在一个实施方案中,所述多肽包含与具有脂肪酶活性的SEQ ID NO:1的全长氨基酸序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少

87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性或相似性的氨基酸序列,所述多肽当与疏绵状嗜热丝孢菌脂肪酶比较时,具有在蛋白酶存在下(优选在枯草杆菌蛋白酶存在下)对蛋白酶解降解的增强的稳定性。在一个实施方案中,所述多肽包含与具有脂肪酶活性的SEQ ID NO:1的全长氨基酸序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性或相似性的氨基酸序列,所述多肽当与SEQ ID NO:1的脂肪酶比较时,其具有在蛋白酶存在下(优选在枯草杆菌蛋白酶存在下)对蛋白酶解降解的增强的稳定性。至少一种蛋白酶(优选枯草杆菌蛋白酶)自身可由蛋白酶稳定剂稳定,或该蛋白酶可以是不稳定的。

[0184] 在本发明的一方面,提供了至少一种本发明的脂肪酶变体与至少一种枯草杆菌蛋白酶的组。在一个实施方案中,本发明的脂肪酶变体对蛋白酶解降解是稳定的。在一个实施方案中,与相应的脂肪酶亲本相比,在蛋白酶存在下,优选在枯草杆菌蛋白酶存在下,本发明的脂肪酶变体具有抗蛋白酶解降解的增强的稳定性。

[0185] 在一个实施方案中,至少一种枯草杆菌蛋白酶选自在WO 89/06279的表I中的序列a)所公开的枯草杆菌蛋白酶309或与其至少80%相同或相似并且具有蛋白酶解活性的变体。

[0186] 在一个实施方案中,枯草杆菌蛋白酶是选自EP1921147中所述SEQ ID NO:22及其具有蛋白酶解活性的变体。如EP1921147中所述的SEQ ID NO:22变体可以是与如EP1921147中所述SEQ ID NO:22具有至少80%同一性或相似性的多肽序列,并且具有蛋白酶解活性。在一个实施方案中,枯草杆菌蛋白酶与如EP1921147中所述SEQ ID NO:22具有至少80%同一性或相似性,且其特征是在101位(根据BPN'编号)具有氨基酸谷氨酸(E),或天冬氨酸(D),或天冬酰胺(N),或谷氨酰胺(Q),或丙氨酸(A),或甘氨酸(G),或丝氨酸(S),并且具有蛋白酶解活性。在一个实施方案中,枯草杆菌蛋白酶与EP1921147中所述SEQ ID NO:22具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的同一性或相似性,且其特征是在101位(根据BPN'编号)具有氨基酸谷氨酸(E)或天冬氨酸(D),并且具有蛋白酶解活性。在一个实施方案中,枯草杆菌蛋白酶是如EP1921147中所述的SEQ ID NO:22,其特征是在101位具有氨基酸取代,例如R101E或R101D,其单独存在或与在以下位置的一个或多个取代组合:3、4、9、15、24、27、33、36、57、68、76、77、87、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、106、118、120、123、128、129、130、131、154、160、167、170、194、195、199、205、206、217、218、222、224、232、235、236、245、248、252和/或274(根据BPN'编号),并且具有蛋白酶解活性。在一个实施方案中,枯草杆菌蛋白酶变体包含在101位的氨基酸取代,例如R101E或R101D,以及一个或多个其它取代:(a)在3位的苏氨酸(3T),(b)在4位的异亮氨酸(4I),(c)在63位的丙氨酸、苏氨酸或精氨酸(63A、63T或63R),(d)在156位的天冬氨酸或谷氨酸(156D或156E),(e)在194位的脯氨酸(194P),(f)在199位的甲硫氨酸(199M),(g)在205位的异亮氨酸(205I),(h)在217位的天冬氨酸、谷氨酸或甘氨酸(217D、217E或217G),(i)如(a)到(h)所述的两个或多个氨基酸的组合。

[0187] 在一个实施方案中,本发明的脂肪酶变体与SEQ ID NO:1的脂肪酶相比,在枯草杆

菌蛋白酶309或与其具有至少80%同一性或相似性的变体存在下具有增强的抗蛋白酶解降解的稳定性。枯草杆菌蛋白酶309或其变体可以是稳定的或非稳定的。

[0188] 在一个实施方案中,当与SEQ ID:1的脂肪酶相比时,本发明的脂肪酶变体具有抗蛋白酶解降解的增强的稳定性,例如对抗非稳定的枯草杆菌蛋白酶309或与其至少80%同一性或相似性的非稳定变体。在另一个实施方案中,当与SEQ ID NO:1的脂肪酶相比时,本发明的脂肪酶变体在稳定的枯草杆菌蛋白酶309的存在下或在其稳定的变体(与其具有至少80%同一性或相似性)的存在下具有抗蛋白酶解降解的增强的稳定性。

[0189] 在一个实施方案中,当存在至少一种如EP1921147所述SEQ ID NO:22的枯草杆菌蛋白酶及其具有蛋白酶解活性的变体时,与根据SEQ ID NO:1的脂肪酶相比,本发明的脂肪酶变体具有增强的抗蛋白酶解降解的稳定性。如EP1921147所述SEQ ID NO:22的变体可以是与EP 1921147所述SEQ ID NO:22具有至少80%同一性或相似性的多肽序列,并且具有蛋白酶解活性。在一个实施方案中,枯草杆菌蛋白酶与EP 1921147所述SEQ ID NO:22具有至少80%同一性或相似性,且其特征在于在101位(根据BPN'编号)具有氨基酸谷氨酸(E),或天冬氨酸(D),或天冬酰胺(N),或谷氨酰胺(Q),或丙氨酸(A),或甘氨酸(G),或丝氨酸(S),并且具有蛋白酶解活性。在一个实施方案中,枯草杆菌蛋白酶与EP 1921147所述SEQ ID NO:22具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性或相似性,且其特征在于在101位(根据BPN'编号)具有氨基酸谷氨酸(E)或天冬氨酸(D),并且具有蛋白酶解活性。在一个实施方案中,枯草杆菌蛋白酶是EP 1921147所述SEQ ID NO:22,其特征在于在101位的氨基酸取代,例如R101E或R101D,其单独存在或与以下位置的一个或多个取代组合:3、4、9、15、24、27、33、36、57、68、76、77、87、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、106、118、120、123、128、129、130、131、154、160、167、170、194、195、199、205、206、217、218、222、224、232、235、236、245、248、252和/或274(根据BPN'编号),并且具有蛋白酶解活性。在一个实施方案中,所述枯草杆菌蛋白酶变体包含在101位的氨基酸取代,例如R101E或R101D,以及一个或多个其它取代:(a)在3位的苏氨酸(3T),(b)在4位的异亮氨酸(4I),(c)在63位的丙氨酸、苏氨酸或精氨酸(63A、63T或63R),(d)在156位的天冬氨酸或谷氨酸(156D或156E),(e)在194位的脯氨酸(194P),(f)在199位的甲硫氨酸(199M),(g)在205位的异亮氨酸(205I),(h)在217位的天冬氨酸、谷氨酸或甘氨酸(217D、217E或217G),(i)如(a)到(h)所述的两个或多个氨基酸的组合。根据EP 1921147的SEQ ID NO:22的枯草杆菌蛋白酶或其变体可以是稳定的或非稳定的。

[0190] 在另一个实施方案中,本发明的脂肪酶变体与SEQ ID NO:1的脂肪酶相比时具有增强的抗蛋白酶解降解的稳定性,例如对抗如EP 1921147所述的SEQ ID NO:22的非稳定的枯草杆菌蛋白酶或与其具有至少80%同一性或相似性的非稳定变体。在另一个实施方案中,本发明的脂肪酶变体在存在如EP 1921147所述的SEQ ID NO:22的稳定的枯草杆菌蛋白酶或与其具有至少80%同一性或相似性的非稳定变体的情况下,当与SEQ ID NO:1的脂肪酶比较时具有增强的抗蛋白酶解降解的稳定性。所述SEQ ID NO:22的变体是本文所述的那些,例如EP 1921147中所述的具有R101E取代的SEQ ID NO:22。

[0191] 在一个实施方案中,包含与具有脂肪酶活性的SEQ ID NO:1的全长氨基酸序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至

少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性或相似性的氨基酸序列的多肽,当与US5869438的SEQ ID NO:2的氨基酸1-269的疏绵状嗜热丝孢菌脂肪酶相比,或与带有氨基酸取代T231R和N233R的US5869438的SEQ ID NO:2的氨基酸1-269的疏绵状嗜热丝孢菌脂肪酶相比,在如EP 1921147所述SEQ ID NO:22的至少一种枯草杆菌蛋白酶及其具有蛋白酶解活性的变体存在下,该多肽具有增强的抗蛋白酶解降解的稳定性。如EP 1921147中所述的SEQ ID NO:22的变体可以是与EP 1921147中所述SEQ ID NO:22具有至少80%同一性或相似性的多肽序列,并且具有蛋白酶解活性。在一个实施方案中,枯草杆菌蛋白酶与如EP 1921147中所述SEQ ID NO:22具有至少80%同一性或相似性,且特征在于在101位(根据BPN'编号)具有氨基酸谷氨酸(E),或天冬氨酸(D),或天冬酰胺(N),或谷氨酰胺(Q),或丙氨酸(A),或甘氨酸(G),或丝氨酸(S),并且具有蛋白酶解活性。在一个实施方案中,枯草杆菌蛋白酶与EP 1921147中所述SEQ ID NO:22具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性或相似性,且其特征在于在101位(根据BPN'编号)具有氨基酸谷氨酸(E)或天冬氨酸(D),且具有蛋白分解活性。在一个实施方案中,枯草杆菌蛋白酶是EP 1921147中所述的SEQ ID NO:22,其特征在于在101位的氨基酸取代,例如R101E或R101D,其单独存在或与以下位置的一个或多个取代组合:3、4、9、15、24、27、33、36、57、68、76、77、87、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、106、118、120、123、128、129、130、131、154、160、167、170、194、195、199、205、206、217、218、222、224、232、235、236、245、248、252和/或274(根据BPN'编号),并且具有蛋白酶解活性。在一个实施方案中,枯草杆菌蛋白酶变体包含在101位的氨基酸取代,例如R101E或R101D,以及一个或多个其它取代:(a)在3位的苏氨酸(3T), (b)在4位的异亮氨酸(4I), (c)在63位的丙氨酸、苏氨酸或精氨酸(63A、63T或63R), (d)在156位的天冬氨酸或谷氨酸(156D或156E), (e)在194位的脯氨酸(194P), (f)在199位的甲硫氨酸(199M), (g)在205位的异亮氨酸(205I), (h)在217位的天冬氨酸、谷氨酸或甘氨酸(217D、217E或217G), (i)如(a)到(h)所述的两个或多个氨基酸的组合。根据EP 1921147的SEQ ID NO:22的枯草杆菌蛋白酶或其变体可以是稳定的或非稳定的。

[0192] 在一个实施方案中,当与US 5869438的SEQ ID NO:2的氨基酸1-269的疏绵状嗜热丝孢菌脂肪酶相比,或当与具有氨基酸取代T231R和N233R的US5869438的SEQ ID NO:2的氨基酸1-269的疏绵状嗜热丝孢菌脂肪酶相比时,在枯草杆菌蛋白酶309或与其具有80%同一性或相似性的变体存在下,根据SEQ ID NO:1的氨基酸序列的多肽具有抗蛋白酶解降解的增强的稳定性,其中所述枯草杆菌蛋白酶可以是稳定的或非稳定的。

[0193] 在一个实施方案中,当与根据US 5869438的SEQ ID NO:2的氨基酸1-269的疏绵状嗜热丝孢菌脂肪酶相比或者当与带有氨基酸取代T231R和N233R的US 5869438的SEQ ID NO:2的氨基酸1-269的疏绵状嗜热丝孢菌脂肪酶相比时,在枯草杆菌蛋白酶309或与其具有至少80%同一性或相似性的变体存在下,本文公开的SEQ ID NO:1的脂肪酶变体具有增强的抗蛋白酶解降解的稳定性。枯草杆菌蛋白酶309或其变体可以是稳定的或非稳定的。

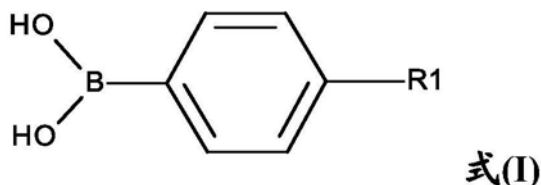
[0194] 在一个实施方案中,当与根据US 5869438的SEQ ID NO:2的氨基酸1-269的疏绵状嗜热丝孢菌脂肪酶相比或与带有氨基酸取代T231R和N233R的US 5869438的SEQ ID NO:2的氨基酸1-269的疏绵状嗜热丝孢菌脂肪酶相比时,在具有氨基酸取代R101E的如EP 1921147

所述的SEQ ID NO:22的枯草杆菌蛋白酶存在下,根据SEQ ID NO:1的氨基酸序列的多肽具有增强的抗蛋白酶降解的稳定性,其中枯草杆菌蛋白酶可以是稳定的或非稳定的。

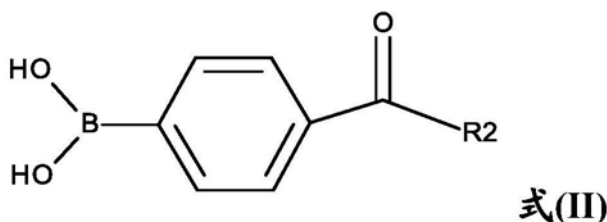
[0195] 在一个实施方案中,当与根据US 5869438的SEQ ID NO:2的氨基酸1-269的疏绵状嗜热丝孢菌脂肪酶相比或者当与带有氨基酸取代T231R和N233R的US 5869438的SEQ ID NO:2的氨基酸1-269的疏绵状嗜热丝孢菌脂肪酶相比时,在具有氨基酸取代R101E的如EP 1921147所述的SEQ ID NO:22的枯草杆菌蛋白酶存在下,如本文公开的SEQ ID NO:1的脂肪酶变体具有增强的抗蛋白酶降解的稳定性,其中枯草杆菌蛋白酶可以是稳定的或非稳定的。

[0196] 蛋白酶稳定剂可以选自含硼化合物。含硼化合物选自硼酸或其衍生物,以及选自有机硼酸或其衍生物,例如芳基硼酸或其衍生物,选自其盐及其混合物。本文中的硼酸可以称为原硼酸。

[0197] 在一个实施方案中,含硼化合物选自芳基硼酸及其衍生物。在一个实施方案中,含硼化合物选自也称为苯基硼酸(PBA)的苯硼酸(BBA)、其衍生物和其混合物。在一个实施方案中,苯基硼酸衍生物选自式(I)和式(II)的衍生物:



[0198]



[0199] 其中R1选自氢、羟基、未取代或取代的C₁-C₆烷基和未取代或取代的C₁-C₆链烯基;在优选的实施方案中,R选自羟基和未取代的C₁烷基。

[0200] 其中R2选自氢、羟基、未取代或取代的C₁-C₆烷基和未取代或取代的C₁-C₆链烯基;在优选的实施方案中,R选自H、羟基和取代的C₁烷基。

[0201] 在一个实施方案中,苯基硼酸衍生物选自4-甲酰基苯基硼酸(4-FPBA)、4-羧基苯基硼酸(4-CPBA)、4-(羟基甲基)苯基硼酸(4-HMPBA)和对甲苯基硼酸(p-TBA)。

[0202] 其它适合的衍生物包括:2-噻吩基硼酸、3-噻吩基硼酸、(2-乙酰胺基苯基)硼酸、2-苯并呋喃基硼酸、1-萘基硼酸、2-萘基硼酸、2-FPBA、3-FBPA、1-噻蒎基硼酸、4-二苯并呋喃硼酸、5-甲基-2-噻吩基硼酸、1-苯并噻吩-2硼酸、2-呋喃基硼酸、3-呋喃基硼酸、4,4联苯-二硼酸、6-羟基-2-萘硼酸、4-(甲硫基)苯基硼酸、4-(三甲基硅烷基)苯基硼酸、3-溴噻吩硼酸、4-甲基噻吩硼酸、2-萘基硼酸、5-溴噻吩硼酸、5-氯噻吩硼酸、二甲基噻吩硼酸、2-溴苯基硼酸、3-氯苯基硼酸、3-甲氧基-2-噻吩硼酸、对甲基-苯基乙基硼酸、2-噻蒎基硼酸、二-苯并噻吩硼酸、9-蒎硼酸、3,5二氯苯基硼酸、二苯基硼酸酐、邻氯苯基硼酸、对氯苯基硼酸、间溴苯基硼酸、对溴苯基硼酸、对氟苯基硼酸、辛基硼酸、1,3,5三甲基苯基硼酸、3-氯-4-氟苯基硼酸、3-氨基苯基硼酸、3,5-二-(三氟甲基)苯基硼酸、2,4-二氯苯基硼酸、4-甲氧基苯基硼酸,及其混合物。

[0203] 在一个实施方案中,将至少一种含硼化合物与至少一种含有2至6个羟基基团的多元醇一起使用以稳定蛋白酶。合适的例子包括乙二醇、丙二醇、1,2-丙二醇、1,2-丁二醇、乙二醇、己二醇、甘油、山梨糖醇、甘露糖醇、赤藓醇、葡萄糖、果糖、乳糖醇和赤藓糖醇。

[0204] 本发明的变体多肽可以用于几种工业中,在这些工业中脂肪酶在加工应用中是有用的和/或脂肪酶在制剂中是有用的组分。

[0205] 一方面,本发明涉及本发明的变体多肽在食品和/或饲料加工过程中的处理脂肪、油或油料种子中的用途,优选在清洁或洗涤纺织品、硬质表面或餐具的过程中;在处理纸浆或纸张时;和/或在乙醇生产过程中的用途:

[0206] 本发明的脂肪酶变体可以用于食品制剂中,例如该酶可以是用于烘烤的添加剂(参见W0 2017/142904)。在一个实施方案中,本发明的具有脂肪酶活性的多肽可用于制备面团的方法中,或用于由面团制备的烘焙产品中,其中该方法包括以下步骤:(a)将具有脂肪酶活性的多肽添加至面团中,和(b)烘烤它。

[0207] 本发明的脂肪酶变体可以用于油料种子加工工业中,例如该酶用于加工植物油(大豆油、芥花油)(W0 2005/086900)。在一个实施方案中,本发明的具有脂肪酶活性的多肽可以用于加工脂肪、油或油料种子的方法中;其中该方法包括(a)提供脂肪、油或油料种子;(b)提供具有脂肪酶活性的多肽;和(c)使多肽与脂肪、油或油料种子接触,其中多肽将脂肪水解为所需的产物。

[0208] 本发明的脂肪酶变体可以用于饲料配方中(参见美国专利号:8,735,123)。在一个实施方案中,具有脂肪酶活性的本发明多肽可以用于喂养动物的方法中;其中该方法包括(a)提供饲料制剂或颗粒,(b)在饲料制剂或颗粒中提供脂肪酶,和(c)给动物喂食饲料制剂。

[0209] 本发明的脂肪酶变体可用于淀粉加工工业,例如在用淀粉酶将淀粉转化为乙醇或糖的过程(高果糖玉米糖浆)中加工副产物例如油(参见W02004/029193)。在一个实施方案中,具有脂肪酶活性的本发明多肽可以用于制造乙醇的方法中,其中在该方法中包括:(a)提供来自乙醇生产的材料,其中该材料具有油,(b)提供脂肪酶,和(c)使所述材料与脂肪酶接触,其中所述脂肪酶有助于改善从所述材料中回收油。在另一个实施方案中,本发明的脂肪酶变体可以用于生物柴油生产(U.S.7,550,278)。

[0210] 本发明的脂肪酶变体可用于纸浆和纸张加工中,例如,所述酶(脂肪酶)可用于改善纸张强度(参见W0 2006/031699)和间距控制(参见U.S.2010/0269989)。在一个实施方案中,具有脂肪酶活性的本发明多肽可用于加工纸浆或纸的方法中,其中该方法包括(a)提供纸浆或纸,(b)提供脂肪酶,和(c)将纸浆或纸与脂肪酶接触,其中脂肪酶提高纸浆或纸的强度。

[0211] 本发明的脂肪酶变体可以用于采矿和油井服务,例如,纤维素酶、淀粉酶和/或脂肪酶可用于在油井压裂过程中破坏瓜尔胶(US 5725771)。

[0212] 本发明的脂肪酶变体可以用于洗涤剂制剂或清洁制剂中。在一个实施方案中,本发明的具有脂肪酶活性的多肽可以用于清洁或洗涤纺织品、硬表面或餐具的方法,其中所述方法包括:(a)提供纺织品、硬表面或餐具,(b)提供脂肪酶,和(c)将纺织品、硬表面或餐具与脂肪酶接触,其中脂肪酶从纺织品、硬表面或餐具上除去脂肪污渍。

[0213] 本发明涉及洗涤剂制剂或清洁制剂,其包含至少一种本发明的脂肪酶变体和至少

一种洗涤剂组分。“洗涤剂制剂”或“清洁制剂”是指用于清洁脏污材料的组合物。清洁包括洗衣和硬表面清洁。根据本发明的脏污材料包括纺织品和/或硬表面。

[0214] 术语“洗衣”涉及家庭洗衣和工业洗衣,是指用含有本发明洗涤剂组合物的溶液处理纺织品的方法。洗衣过程可以通过使用例如家用或工业洗衣机的技术设备来进行。或者,洗衣过程可以手工完成。

[0215] 术语“纺织品”是指任何纺织材料,包括纱线(用于针织或机织的天然或合成纤维制成的线)、纱线中间体、纤维、非织造材料、天然材料、合成材料以及由这些材料制成的织物(通过机织、针织或毡合纤维制成的织物),例如服装(任何织物制成的衣物)、布料和其它物品。

[0216] 术语“纤维”包括天然纤维、合成纤维及其混合物。天然纤维的实例是植物(例如亚麻、黄麻和棉花)或动物来源的,其包含例如胶原蛋白、角蛋白和丝蛋白的蛋白质(例如丝绸、绵羊毛、安哥拉呢、马海毛、羊绒)。合成来源的纤维的例子是聚氨酯纤维,例如 **Spandex®**或 **Lycra®**,聚酯纤维、聚烯烃,例如elastofin,或聚酰胺纤维例如尼龙。纤维可以是单纤维或纺织品的一部分,例如针织品、织造物或非织造物。

[0217] 术语“硬表面清洁”在本文中定义为硬表面的清洁,其中硬表面可以包括家庭中的任何硬表面,例如地板、家具、墙壁、卫生陶瓷、玻璃、金属表面,包括餐具或餐盘。

[0218] 术语“餐具洗涤”是指所有形式的餐具洗涤,例如用手或自动洗碗机。餐具清洗包括但不限于清洗各种形式的陶器,例如盘子、杯子、玻璃杯、碗,各种形式的餐具,例如汤匙、刀、叉和进餐用具,以及陶瓷制品、塑料(例如三聚氰胺)、金属、瓷器、玻璃和丙烯酸酯类。

[0219] 本发明的洗涤剂制剂包含一种或多种洗涤剂组分。选择的组分取决于所需的清洁应用和/或洗涤剂组合物的物理形式。

[0220] 术语“洗涤剂组分”在本文中定义为指适用于洗涤剂组合物的任何类型的成分,例如表面活性剂、助剂、聚合物、漂白体系。本领域内已知的确认其已知特性的任何组分是根据本发明的合适的洗涤剂组分。在一个实施方案中,洗涤剂组分是指当以有效量存在时提供洗涤或清洁性能或有效地辅助加工(在加工、储存和使用过程中保持物理特性;例如流变改进剂、助水溶物、干燥剂)的组分。

[0221] 通常情况下,洗涤剂组合物是具有两种以上洗涤剂成分的复合制剂。

[0222] 洗涤剂组分在洗涤剂制剂的最终应用中可以具有不止一种功能,因此,在本文特定功能的上下文中提及的任何洗涤剂组分在洗涤剂制剂的最终应用中也可以具有另一种功能。特定洗涤剂组分在洗涤剂制剂的最终应用中的功能通常取决于其在洗涤剂制剂中的量,即洗涤剂组分的有效量。

[0223] 术语“有效量”包括提供有效去除污渍和有效清洁条件(例如,pH、起泡量)的各成分的量,有效提供光学益处(例如,荧光增白,抑制染料转移)的某些成分的量,以及有效地辅助加工(在加工、储存和使用过程中保持物理特性;例如流变改进剂、助水溶物、干燥剂)的某些成分的量。

[0224] 在一个实施方案中,洗涤剂制剂是多于两种洗涤剂组分的制剂,其中至少一种组分可有效去除污渍,至少一种组分可有效提供最佳清洁条件,且至少一种组分可有效保持洗涤剂的物理特性。

[0225] 在相关的清洁条件下评估清洁性能。术语“相关的清洁条件”在本文中是指在洗衣

机、自动洗碗机或手动清洁过程中实际使用的条件,尤其是清洁温度、时间、清洁机制、泡沫浓度、洗涤剂类型和水硬度。

[0226] 含脂肪酶的洗涤剂的清洁性能在本文中可称为脱脂性能。脱脂性能可能与洗涤剂制剂除去沉积在纺织品上的脂肪污渍的能力有关。

[0227] 根据融化温度,脂肪可分为脂肪、油脂或油。油在室温下通常是液体。油脂在室温下的粘度比油高,因此称为糊状。由于油和油脂的较低融化温度,洗涤温度 $\geq 40^{\circ}\text{C}$ 有助于清除沉积在纺织品上的油和油脂污渍。包含熔融温度 $>30^{\circ}\text{C}$ 的脂肪化合物的脂肪沉积物是指在 $\leq 30^{\circ}\text{C}$ 的温度下保持固态的脂肪。

[0228] 沉积在纺织品上的脂肪污渍在本文中可称为脂肪沉积物。在一个实施方案中,脂肪沉积物包含熔点 $>40^{\circ}\text{C}$ 的脂肪化合物,这意味着这些脂肪化合物在 $\leq 40^{\circ}\text{C}$ 的洗涤温度下保持固体。在一个实施方案中,脂肪沉积物包含熔点 $>30^{\circ}\text{C}$ 的脂肪化合物,这意味着这些脂肪化合物在 $\leq 30^{\circ}\text{C}$ 的洗涤温度下保持固体。

[0229] 一方面,本发明涉及用于洗涤温度 $\leq 40^{\circ}\text{C}$ 的固体或液体洗衣制剂,其包含本发明的至少一种脂肪酶变体,以及所述制剂在洗涤温度 $\leq 40^{\circ}\text{C}$ 时去除包含熔融温度 $>40^{\circ}\text{C}$ 的脂肪化合物的脂肪沉积物中的用途。在一个实施方案中,本发明涉及一种用于洗涤温度 $\leq 30^{\circ}\text{C}$ 的固体或液体洗衣制剂,其包含至少一种本发明的脂肪酶变体,以及所述制剂在洗涤温度 $\leq 30^{\circ}\text{C}$ 时去除包含熔融温度 $>40^{\circ}\text{C}$ 的脂肪化合物的脂肪沉积物中的用途。在一个实施方案中,本发明涉及一种用于洗涤温度 $\leq 30^{\circ}\text{C}$ 的固体或液体洗衣制剂,其包含至少一种本发明的脂肪酶变体,以及所述制剂在洗涤温度 $\leq 30^{\circ}\text{C}$ 时去除包含熔融温度 $>30^{\circ}\text{C}$ 的脂肪化合物的脂肪沉积物中的用途。在一个实施方案中,本发明涉及一种用于洗涤温度 $\leq 25^{\circ}\text{C}$ 的固体或液体衣物制剂,其包含至少一种本发明的脂肪酶变体,以及所述制剂在洗涤温度 $\leq 25^{\circ}\text{C}$ 时去除包含熔融温度 $>25^{\circ}\text{C}$ 的脂肪化合物的脂肪沉积物中的用途。在一个实施方案中,本发明涉及一种用于洗涤温度 $\leq 25^{\circ}\text{C}$ 的固体或液体洗衣制剂,其包含至少一种本发明的脂肪酶变体,以及所述制剂在洗涤温度 $\leq 25^{\circ}\text{C}$ 时去除包含熔融温度 $>30^{\circ}\text{C}$ 的脂肪化合物的脂肪沉积物中的用途。

[0230] 当改善脂肪污渍的去除时,意味着改善去油脂性能。在此背景下的改进可意味着,与非本发明的脂肪酶和/或缺少本发明的脂肪酶的洗衣制剂和/或包含母体脂肪酶的洗衣制剂相比,本发明的脂肪酶和/或包含至少一种本发明的脂肪酶的洗涤剂制剂表现出更好的去油脂性能。脂肪污渍的去除可能由于沉积在纺织品上的脂肪化合物的酶促降解和/或增溶和/或分散和/或乳化而发生。

[0231] 一方面,本发明涉及固体或液体洗衣制剂,其包含

[0232] (a) 至少一种脂肪酶,其中至少一种脂肪酶选自包含与SEQ ID NO:1的全长氨基酸序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性或相似性的氨基酸序列的多肽,

[0233] (b) 至少一种蛋白酶,其中至少一种蛋白酶选自枯草杆菌蛋白酶,所述枯草杆菌蛋白酶包含与EP 1921147所述SEQ ID NO:22至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性或相似性的多肽序列且其特征在于具有在101位(根据BPN'编号)的氨基酸取代,并且具有蛋

白酶解活性,且

[0234] (c) 至少一种有效量的洗涤剂组分。

[0235] 在一个实施方案中,枯草杆菌蛋白酶是EP 1921147所述的SEQ ID NO:22,特征在于在101位有氨基酸取代,例如R101E或R101D,其单独或与一个或多个其它取代组合:(a) 3位的苏氨酸(3T), (b) 4位的异亮氨酸(4I), (c) 63位的丙氨酸、苏氨酸或精氨酸(63A、63T或63R), (d) 156位的天冬氨酸或谷氨酸(156D或156E), (e) 194位的脯氨酸(194P), (f) 199位的甲硫氨酸(199M), (g) 205位的异亮氨酸(205I), (h) 217位的天冬氨酸、谷氨酸或甘氨酸(217D、217E或217G), (i) 如(a)-(h)所述的两种或多种氨基酸的组合。在一个实施方案中,枯草杆菌蛋白酶是带有氨基酸取代R101E的如EP 1921147所述的SEQ ID NO:22。

[0236] 在一个实施方案中,所述固体或液体洗衣制剂包含

[0237] (a) 至少一种脂肪酶,其包含与SEQ ID NO:1的全长氨基酸序列具有至少至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性或相似性的氨基酸序列,

[0238] (b) 带有氨基酸取代R101E的如EP 1921147所述的SEQ ID NO:22的枯草杆菌蛋白酶,以及

[0239] (c) 有效量的至少一种洗涤剂组分。

[0240] 在一个实施方案中,所述固体或液体洗衣制剂包含

[0241] (a) SEQ ID NO:1的氨基酸序列的脂肪酶,

[0242] (b) 带有氨基酸取代R101E的如EP 1921147所述的SEQ ID NO:22的枯草杆菌蛋白酶,以及

[0243] (c) 有效量的至少一种洗涤剂组分。

[0244] 在一个实施方案中,枯草杆菌蛋白酶是EP 1921147所述的SEQ ID NO:22,特征在于在101位有氨基酸取代,例如R101E或R101D,其单独或与一个或多个其它取代组合:(a) 3位的苏氨酸(3T), (b) 4位的异亮氨酸(4I), (c) 63位的丙氨酸、苏氨酸或精氨酸(63A、63T或63R), (d) 156位的天冬氨酸或谷氨酸(156D或156E), (e) 194位的脯氨酸(194P), (f) 199位的甲硫氨酸(199M), (g) 205位的异亮氨酸(205I), (h) 217位的天冬氨酸、谷氨酸或甘氨酸(217D、217E或217G), (i) 如(a)-(h)所述的两种或多种氨基酸的组合。在一个实施方案中,枯草杆菌蛋白酶是带有氨基酸取代R101E的如EP 1921147所述的SEQ ID NO:22。

[0245] 在一个实施方案中,包含(a) 脂肪酶、(b) 枯草杆菌蛋白酶和(c) 至少一种如上文所公开的洗涤剂组分的洗衣制剂用于在选自 $\leq 40^{\circ}\text{C}$ 、 $\leq 30^{\circ}\text{C}$ 和 $\leq 25^{\circ}\text{C}$ 的洗衣温度下除去包含熔点温度 $>40^{\circ}\text{C}$ 的脂肪族化合物的脂肪沉积物。在一个实施方案中,包含(a) 脂肪酶、(b) 枯草杆菌蛋白酶和(c) 至少一种如上文所公开的洗涤剂组分的洗衣制剂用于在选自 $\leq 30^{\circ}\text{C}$ 和 $\leq 25^{\circ}\text{C}$ 的洗衣温度下除去包含熔点温度 $>30^{\circ}\text{C}$ 的脂肪族化合物的脂肪沉积物。在一个实施方案中,包含(a) 脂肪酶、(b) 枯草杆菌蛋白酶和(c) 至少一种如上文所公开的洗涤剂组分的洗衣制剂用于在 $\leq 25^{\circ}\text{C}$ 的洗衣温度下除去包含熔点温度 $>25^{\circ}\text{C}$ 的脂肪族化合物的脂肪沉积物。

[0246] 各种洗涤剂组分和在洗涤剂组合物中的用途是本领域技术人员已知的。合适的洗涤剂组分尤其包括表面活性剂、助剂、聚合物、碱、漂白体系、荧光增白剂、抑泡剂和稳定剂、

助水溶物和腐蚀抑制剂。例如,进一步的示例描述在“complete Technology Book on Detergents with Formulations (Detergent Cake, Dishwashing Detergents, Liquid & Paste Detergents, Enzyme Detergents, Cleaning Powder & Spray Dried Washing Powder)”, Engineers India Research Institute (EIRI), 第6版 (2015)。本领域技术人员的另一本参考书可以是“Detergent Formulations Encyclopedia”, Solverchem Publications, 2016。

[0247] 在洗涤剂制剂中的洗涤剂组分的类型和/或含量会有所不同,取决于所需的应用,例如洗涤白色纺织品、有色纺织品和羊毛。所选择的组分还取决于洗涤剂制剂的物理形式(液体、固体、凝胶、以小袋形式或以片剂形式提供等)。选择的组分例如用于洗衣配方的还取决于地区惯例,这些惯例本身涉及以下方面:所用的洗涤温度、洗衣机的机械原理(垂直与水平轴洗衣机)、每个洗涤周期的耗水量等,以及地理特征,例如水的平均硬度。

[0248] 例如:低洗涤剂浓度体系包括这样的洗涤制剂,其中洗涤水中存在的洗涤剂成分少于约800ppm;中等洗涤剂浓度包括这样的洗涤制剂,其中洗涤水中存在的洗涤剂成分在约800ppm至约2,000ppm。高洗涤剂浓度包括这样的洗涤制剂,其中洗涤水中存在约2,000ppm以上的洗涤剂成分。

[0249] 对各个洗涤剂组分列举的数字范围提供了洗涤剂组合物中包含的量。这样的范围必须被理解为包括限定范围的数字,并且包括所限定范围内的每个整数。

[0250] 如果没有另外描述,则“重量%”或“%w/w”是指与总洗涤剂组合物相比。在这种情况下,“重量%”或“%w/w”的计算方法如下:物质的浓度等于物质的重量除以组合物的总重量再乘以100。

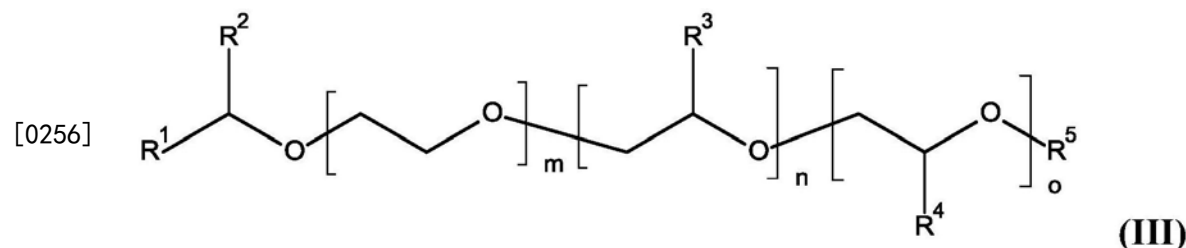
[0251] 本发明的洗涤剂制剂可以包含一种或多种表面活性剂。“表面活性剂”(在本文中与“表面活性剂”同义使用)是指一种有机化学品,当添加到液体中时,会改变该液体在界面处的性质。根据其离子电荷,表面活性剂称为非离子、阴离子、阳离子或两性表面活性剂。

[0252] 表面活性剂的非限制性实例公开于McCutcheon's 2016 Detergents and Emulsifiers,以及McCutcheon's 2016 Functional Materials,北美版和国际版,MC Publishing Co,2016版本。在本领域技术人员已知的这些出版物的早期版本中公开了更多有用的示例。

[0253] 非离子表面活性剂是指既不带正电也不带负电(即离子性)官能团的表面活性剂。与阴离子和阳离子表面活性剂相反,非离子表面活性剂不会在溶液中离子化。

[0254] 下文提供的对于任何类型表面活性剂的实例应理解为非限制性的。

[0255] 在一个实施方案中,本发明的洗涤剂制剂包含至少一种非离子表面活性剂。非离子表面活性剂可以是通式(III)的化合物:



[0257] 通式(III)的变量如下所定义:

[0258] R^1 选自 C_1 - C_{23} 烷基和 C_2 - C_{23} 链烯基,其中烷基和/或链烯基是直链或支链的;例如正- C_7H_{15} 、正- C_9H_{19} 、正- $C_{11}H_{23}$ 、正- $C_{13}H_{27}$ 、正- $C_{15}H_{31}$ 、正- $C_{17}H_{35}$ 、异- C_9H_{19} 、异- $C_{12}H_{25}$ 。

[0259] R^2 选自H、 C_1 - C_{20} 烷基和 C_2 - C_{20} 链烯基,其中烷基和/或链烯基是直链或支链的。

[0260] R^3 和 R^4 各自独立地选自 C_1 - C_{16} 烷基,其中烷基是直链或支链的;例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、仲戊基、新戊基、1,2-二甲基丙基、异戊基、己基、异己基、仲己基、正庚基、正辛基、2-乙基己基、正壬基、正癸基、异癸基。

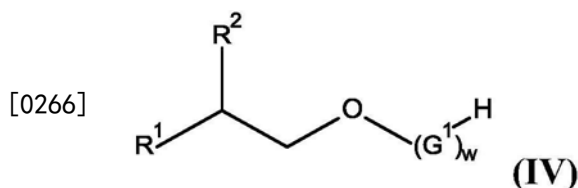
[0261] R^5 选自H和 C_1 - C_{18} 烷基,其中烷基是直链或支链的。

[0262] 通式(III)的整数定义如下: m 在0至200的范围内,优选1-80,更优选3-20; n 和 o 各自独立地在0至100的范围内; n 优选为1至10,更优选为1至6; o 优选为1至50,更优选为4至25。 m 、 n 和 o 的总和至少为1,优选地, m 、 n 和 o 的总和在5至100的范围内,更优选地在9至50的范围内。

[0263] 通式(III)的非离子表面活性剂可以具有任何结构,可以是嵌段结构或无规结构,并且不限于所显示的序列。

[0264] 在一个实施方案中,洗涤剂制剂包含至少一种选自通式(III)的非离子表面活性剂,其中 m 为3-11,优选不大于7; n 和 o 是0, R^1 是 C_{12} - C_{14} , R^5 是H。所述洗涤剂制剂可包含至少两种选自通式(III)的化合物的非离子表面活性剂,其中一种所述非离子表面活性剂的特征在于 R^1 是 C_{12} , R^5 是H, m 是7, n 和 $o=0$,且另一种表面活性剂的特征在于 R^1 是 C_{14} , R^5 是H, m 是7, n 和 $o=0$ 。

[0265] 非离子表面活性剂还可以是通式(IV)的化合物,其可称为烷基-聚糖苷类(APG):



[0267] 通式(IV)的变量如下所定义:

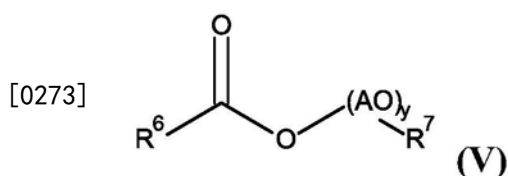
[0268] R^1 选自 C_1 - C_{17} 烷基和 C_2 - C_{17} 链烯基,其中烷基和/或链烯基是直链或支链的;例如正- C_7H_{15} 、正- C_9H_{19} 、正- $C_{11}H_{23}$ 、正- $C_{13}H_{27}$ 、正- $C_{15}H_{31}$ 、正- $C_{17}H_{35}$ 、异- C_9H_{19} 、异- $C_{12}H_{25}$ 。

[0269] R^2 选自H、 C_1 - C_{17} 烷基和 C_2 - C_{17} 链烯基,其中烷基和/或链烯基是直链或支链的。

[0270] G^1 选自具有4-6个碳原子的单糖残基,例如葡萄糖和木糖。

[0271] 通式(IV)的整数 w 在1.1至4的范围, w 是平均数。

[0272] 非离子表面活性剂还可以是通式(V)的化合物:



[0274] 通式(V)的变量如下所定义:

[0275] AO选自环氧乙烷(EO)、环氧丙烷(PO)、环氧丁烷(BO),以及它们的混合物。

[0276] R^6 选自 C_5 - C_{17} 烷基和 C_5 - C_{17} 链烯基,其中烷基和/或链烯基是直链或支链的。

[0277] R^7 选自H、 C_1 - C_{18} -烷基,其中烷基是直链或支链的。

[0278] 通式(V)的整数y是1至70,优选7至15的数字。

[0279] 非离子表面活性剂还可选自脱水山梨糖醇酯和/或乙氧基化或丙氧基化脱水山梨糖醇酯。非限制性实例是以商标名称SPAN和TWEEN出售的产品。

[0280] 非离子表面活性剂还可以选自烷氧基化的单或二烷基胺、脂肪酸单乙醇酰胺(FAMA)、脂肪酸二乙醇酰胺(FADA)、乙氧基化脂肪酸单乙醇酰胺(EFAM)、丙氧基化脂肪酸单乙醇酰胺(PFAM)、聚羟烷基脂肪酸酰胺或葡糖胺的N-酰基N-烷基衍生物(葡糖酰胺、GA或脂肪酸葡糖酰胺、FAGA)及其组合。

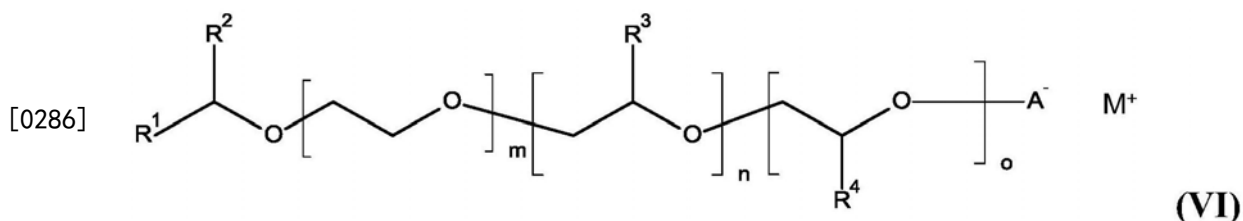
[0281] 根据本发明,两种或多种不同的非离子表面活性剂的混合物也可以存在于洗涤剂制剂中。

[0282] 在一个实施方案中,本发明的洗涤剂制剂包含至少一种选自两性表面活性剂的表面活性剂。两性表面活性剂是这样的表面活性剂,其根据pH可以是阳离子的、两性离子的或阴离子的;两性表面活性剂是本领域技术人员已知的。通常情况下:两性表面活性剂可以是被称为修饰氨基酸(蛋白原性和非蛋白原性的)的化合物。两性表面活性剂还可以是称为甜菜碱类和/或磺基甜菜碱、烷基两性羧酸盐和氧化胺(AO)的化合物。

[0283] 两种或更多种不同的两性表面活性剂的混合物可以存在于本发明的洗涤剂组合物中。

[0284] 阴离子表面活性剂是指具有带负电的离子基团的表面活性剂。阴离子表面活性剂包括但不限于包含疏水基团和至少一个水溶性阴离子基团的表面活性化合物,所述阴离子基团通常选自硫酸根、磺酸根和羧酸根以形成水溶性化合物。

[0285] 阴离子表面活性剂可以是通式(VI)的化合物,当A⁻为SO₃⁻时,可以称为(脂肪)醇/烷基(乙氧基/醚)硫酸盐[[F]A(E)S],当A⁻为RCOO⁻时,为(脂肪)醇/烷基(乙氧基/醚)羧酸盐[[F]A(E)C]:



[0287] 通式(VI)中的变量定义如下:

[0288] R¹选自C₁-C₂₃-烷基(例如1-、2-、3-、4-C₁-C₂₃-烷基)和C₂-C₂₃-链烯基,其中烷基和/或链烯基是直链或支链的,并且其中2-、3-或4-烷基;例如正-C₇H₁₅、正-C₉H₁₉、正-C₁₁H₂₃、正-C₁₃H₂₇、正-C₁₅H₃₁、正-C₁₇H₃₅、异-C₉H₁₉、异-C₁₂H₂₅。

[0289] R²选自H、C₁-C₂₀-烷基和C₂-C₂₀-链烯基,其中烷基和/或链烯基是直链或支链的。

[0290] R³和R⁴各自独立地选自C₁-C₁₆-烷基,其中烷基是直链或支链的;例如甲基,乙基,正丙基,异丙基,正丁基,异丁基,仲丁基,叔丁基,正戊基,异戊基,仲戊基,新戊基,1,2-二甲基丙基,异戊基,正己基,异己基,仲己基,正庚基,正辛基,2-乙基己基,正壬基,正癸基,异癸基。

[0291] A⁻选自-RCOO⁻、-SO₃⁻和RSO₃⁻,其中R选自直链或支链C₁-C₈-烷基,和C₁-C₄羟基烷基,其中烷基是。

[0292] M⁺选自H和成盐阳离子。成盐阳离子可以是一价或多价;因此M⁺等于1/v M^{v+}。实例

包括但不限于钠、钾、镁、钙、铵和乙醇胺、二乙醇胺和三乙醇胺的铵盐。

[0293] 通式(VI)的整数定义如下： m 在0-200的范围内，优选1-80，更优选3-20； n 和 o 各自独立地在0至100的范围内； n 优选为1-10，更优选为1-6； o 优选为1-50，更优选为4-25。 m 、 n 和 o 的总和至少为1，优选地， m 、 n 和 o 的总和在5-100的范围内，更优选在9-50的范围内。

[0294] 通式(VI)的阴离子表面活性剂可以是任何结构、嵌段共聚物或无规共聚物。

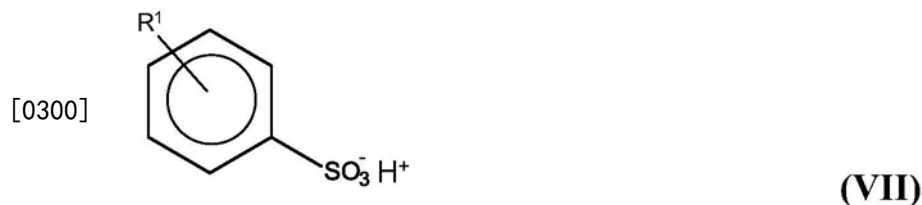
[0295] 其他合适的阴离子表面活性剂包括 C_{12} - C_{18} 磺基脂肪酸烷基酯(例如 C_{12} - C_{18} 磺基脂肪酸甲基酯)、 C_{10} - C_{18} -烷基芳基磺酸(例如正- C_{10} - C_{18} -烷基苯磺酸)和 C_{10} - C_{18} 烷基烷氧基羧酸酯的盐(M^+)。

[0296] M^+ 在任何情况下都选自成盐阳离子。成盐阳离子可以是一价或多价；因此 M^+ 等于 $1/v M^{v+}$ 。实例包括但不限于钠、钾、镁、钙、铵和乙醇胺、二乙醇胺和三乙醇胺的铵盐。

[0297] 在一个实施方案中，洗涤剂制剂包含至少一种选自通式(VI)化合物的阴离子表面活性剂，其中 R^1 是 C_{11} - C_{13} ， R_2 是H， m 是1-4， n 和 $o=0$ ， A^- 是 SO_3^- ， M^+ 是 Na^+ 。该洗涤剂制剂可包含至少两种选自通式(VI)化合物的阴离子表面活性剂，其中所述阴离子表面活性剂之一的特征在于 R^1 为 C_{11} ， R^2 为H， m 为2， n 和 $o=0$ ， A^- 为 SO_3^- ， M^+ 为 Na^+ ，另一种表面活性剂的特征为 R^1 为 C_{13} ， R^2 为H， m 为2， n 和 $o=0$ ， A^- 为 SO_3^- ， M^+ 为 Na^+ 。

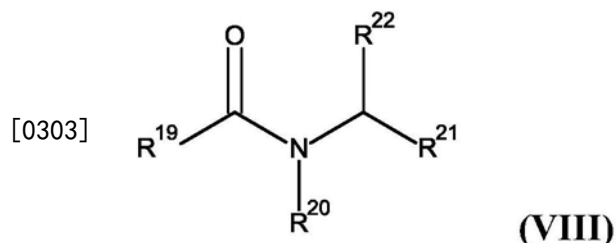
[0298] 其它合适的阴离子表面活性剂的非限制性实例包括支链烷基苯磺酸盐(BABS)、苯基链烷磺酸盐、 α -烯烴磺酸盐(AOS)、烯烴磺酸盐、烯烴磺酸盐、烷烴-2,3-二烷基双(硫酸盐)、羟基烷烴磺酸盐和二磺酸盐、仲烷烴磺酸盐(SAS)、石蜡磺酸盐(PS)、磺化的脂肪酸甘油酯、烷基或链烯基琥珀酸、氨基酸的脂肪酸衍生物、磺基琥珀酸的二酯和单酯。

[0299] 在一个实施方案中，洗涤剂制剂包含至少一种选自通式(VII)的化合物的阴离子表面活性剂：



[0301] 其中式(VII)中的 R^1 为 C_{10} - C_{13} 烷基。该洗涤剂制剂可以包含至少两种选自通式(VII)化合物的阴离子表面活性剂，其中所述阴离子表面活性剂之一的特征在于 R^1 为 C_{10} ，而另一种表面活性剂的特征在于 R^1 为 C_{13} 。

[0302] 阴离子表面活性剂可以是通式(VIII)的化合物，其可以称为N-酰基氨基酸表面活性剂：



[0304] 通式(VIII)的变量如下所定义：

[0305] R^{19} 选自直链或支链 C_6 - C_{22} -烷基和直链或支链 C_6 - C_{22} -链烯基，例如油烯基。

[0306] R^{20} 选自H和 C_1 - C_4 -烷基。

[0307] R^{21} 选自H、甲基、 $-(CH_2)_3NHC(NH)NH_2$ 、 $-CH_2C(O)NH_2$ 、 $-CH_2C(O)OH$ 、 $-(CH_2)_2C(O)NH_2$ 、 $-(CH_2)_2C(O)OH$ 、(咪唑-4-基)-甲基、 $-CH(CH_3)C_2H_5$ 、 $-CH_2CH(CH_3)_2$ 、 $-(CH_2)_4NH_2$ 、苄基、羟基甲基、 $-CH(OH)CH_3$ 、(咪唑-3-基)-甲基、(4-羟基-苯基)-甲基、异丙基、 $-(CH_2)_2SCH_3$ 和 $-CH_2SH$ 。

[0308] R^{22} 选自 $-COOX$ 和 $-CH_2SO_3X$ ，其中X选自 Li^+ 、 Na^+ 和 K^+ 。

[0309] 合适的N-酰基氨基酸表面活性剂的非限定性实例是N-酰化的谷氨酸的单和二羧酸盐(例如钠、钾、铵和乙醇胺、二乙醇胺和三乙醇胺的铵盐)，例如，椰油酰谷氨酸钠、月桂酰谷氨酸钠、肉豆蔻酰谷氨酸钠、棕榈酰谷氨酸钠、硬脂酰谷氨酸钠、椰油酰谷氨酸二钠、硬脂酰谷氨酸二钠、椰油酰谷氨酸钾、月桂酰谷氨酸钾和肉豆蔻酰谷氨酸钾；N-酰化丙氨酸的羧酸盐(例如钠、钾、铵和乙醇胺、二乙醇胺和三乙醇胺的铵盐)，例如椰油酰丙氨酸钠和月桂酰丙氨酸三乙醇胺；N-酰化的甘氨酸的羧酸盐(例如钠、钾、铵和乙醇胺、二乙醇胺和三乙醇胺的铵盐)，例如椰油酰基甘氨酸钠和椰油酰基甘氨酸钾；N-酰化的肌氨酸的羧酸盐(例如钠、钾、铵和乙醇胺、二乙醇胺和三乙醇胺的铵盐)，例如月桂酰肌氨酸钠、椰油酰肌氨酸钠、肉豆蔻酰肌氨酸钠、油酰肌氨酸钠和月桂酰肌氨酸铵。

[0310] 阴离子表面活性剂可以进一步选自皂类。合适的是饱和的和不饱和的 C_{12} - C_{18} 脂肪酸的盐(M^+)，例如月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、山嵛酸、油酸、(水合)芥酸的盐。 M^+ 选自成盐阳离子。成盐阳离子可以是一价或多价；因此 M^+ 等于 $1/v M^{v+}$ 。实例包括但不限于钠、钾、镁、钙、铵，和乙醇胺、二乙醇胺和三乙醇胺的铵盐。

[0311] 合适的皂类的其它非限定性实例包括衍生自天然脂肪酸的皂类混合物，例如牛脂、椰子油、棕榈仁油、月桂油、橄榄油或芥花油。这样的皂类混合物包括以不同量的月桂酸和/或肉豆蔻酸和/或棕榈酸和/或硬脂酸和/或油酸和/或亚油酸的皂类，取决于皂类所衍生的天然脂肪酸。

[0312] 合适的阴离子表面活性剂的其它非限定性实例包括衍生自天然脂肪酸的硫酸盐、磺酸盐或羧酸盐的盐(M^+)，例如牛脂、椰子油、棕榈仁油、月桂油、橄榄油或芥花油。此类阴离子表面活性剂包括以不同量的月桂酸和/或肉豆蔻酸和/或棕榈酸和/或硬脂酸和/或油酸和/或亚油酸的硫酸盐、磺酸盐或羧酸盐，取决于皂类所衍生的天然脂肪酸。

[0313] 两种或更多种不同的阴离子表面活性剂的混合物也可以存在于本发明的洗涤剂组合物中。

[0314] 非离子和/或两性阴离子表面活性剂的混合物也可以存在于本发明的洗涤剂组合物中。

[0315] 在一个实施方案中，本发明的洗涤剂制剂包含至少一种阳离子表面活性剂，其是指具有带正电的离子基团的表面活性剂。通常，这些阳离子部分是含氮基团，例如季铵或质子化的氨基。阳离子型的质子化胺可以是伯、仲或叔胺。

[0316] 洗涤剂制剂可包含选自通式(III)的化合物、通式(VI)的化合物和通式(VII)的化合物的表面活性剂的混合物。

实施例

[0317] 实施例1:ELISA测定

[0318] 酶联免疫吸附试验(ELISA)用于测定表达和分泌的脂肪酶的量。产生针对SEQ ID NO:1的多克隆抗体，并通过标准方法纯化(一抗)。通过用纯化的脂肪酶(SEQ ID NO:1)包被

板子、然后封闭以最小化非特异性结合来使用竞争性ELISA。将每个样品与一抗混合,然后在平板上孵育以与预包被的酶竞争。在用购买的二抗孵育之前洗涤板子。洗涤板,然后使用商业显影溶液,并在450nm读取最终数据。

[0319] 实施例2:pNPC8测定

[0320] 通过跟踪4-硝基苯基辛酸酯(pNP-C8)水解释放的对-硝基苯酚来测量脂肪酶活性。通过将脂肪酸与对-硝基苯酚关联,可通过检测405nm处对-硝基苯酚的释放来追踪脂解活性。表达脂肪酶并通过离心将分泌的脂肪酶与细胞分离。将上清液添加到在96孔板内的测定缓冲液(pNP-C8,Hepes pH 7.5,山梨糖醇,Triton X100和BPER)中。每30秒检测405nm处的吸光度,持续2到15分钟。斜率用于确定活性速率。将每个变体的活性相对于每个板的亲本酶对照标准化。

[0321] 实施例3:C16

[0322] 通过追踪4-硝基苯基棕榈酸酯(pNP-C16)水解后释放的对-硝基苯酚来测量脂肪酶活性。通过将脂肪酸与对-硝基苯酚关联,可通过检测405nm处对硝基苯酚的释放来追踪脂解活性。表达脂肪酶并通过离心将分泌的脂肪酶与细胞分离。将上清液添加到在96孔板内的测定缓冲液(pNP-C16,Hepes pH 7.5,山梨糖醇,Triton X100和BPER)中。每30秒检测405nm处的吸光度,持续2到15分钟。斜率用于确定活性速率。将每个变体的活性相对于每个板的亲本酶对照标准化。

[0323] 实施例4:脂肪酶变体表达

[0324] 通过构建含有编码多核苷酸序列的表达质粒,将质粒转化入巴斯德毕赤酵母(*Komagataella phaffii*)并以以下方式培养所得的表达菌株,获得了变体脂肪酶。表达菌株的新鲜巴斯德毕赤酵母细胞是通过将序列已确认的菌株的甘油储备液铺到含有Zeocin的酵母提取物蛋白胍葡萄糖(YPD)琼脂平板上而获得的。2天后,使用来自这些平板的细胞将生产菌株的起始种子培养物接种到100mL缓冲甘油复合培养基(BMGY)中,并在30℃和225-250rpm下生长20-24小时。通过将合适量转移到装有挡板的发酵罐中的2-4L BMMY培养基中来扩大种子培养的规模。发酵是在30℃和1100rpm的搅拌下进行的,该搅拌是通过平叶轮提供的,持续48-72小时。在发酵的初始分批阶段之后,每当培养物中的溶解氧水平降至30%以下时,就添加无菌过滤的甲醇作为养料。或者,每3小时以起始分批培养物的0.5%v/v添加养料。将最终的发酵液在4℃下以7000xg离心30分钟,以获得无细胞的上清液。

[0325] 变体脂肪酶的表达水平测定如下:通过SDS-PAGE或毛细管电泳并以PNP-辛酸酯为底物通过酶促活性测定上清液中目的蛋白的表达。

[0326] 实施例5:脂肪酶变体单点突变

[0327] 选择亲本脂肪酶(SEQ ID NO:1/2),并使用基因位点饱和诱变(GSSM)来产生非天然存在的变体脂肪酶,如至少美国专利中所述:6,171,820;6,562,594;或6,764,835。脂肪酶变体包括在SEQ ID NO:1/2的氨基酸序列的全长上的每个氨基酸残基的所有19个氨基酸取代。从384平板中筛选了来自GSSM文库的变体脂肪酶的上清液。将上清液中的变异酶添加到100mM Hepes pH8中的0.01%表面活性剂混合物(2:5:3的直链烷基苯磺酸盐(Meranyl DSB/E):月桂基硫酸钠2E0(TexaponN70):烷基聚乙二醇醚(LutensolA07))中的猪油中。Hit(选中的变体)定义为这样的上清液,其水解的猪油比用OD600测得的亲本水解猪油更多。与亲本脂肪酶相比,鉴定出脂肪酶变体具有改善的特性,且结果如下表1中所示。当与亲本酶

相比时,鉴定出脂肪酶变体具有改善的特性,例如更高的活性、改善的性能(去除布料上的污渍)、抗蛋白质酶解降解的稳定性、pH特性、更高表达或其任意组合。下面列出的结果描述了与亲本脂肪酶(SEQ ID NO:1/2)相比具有改善的性质的脂肪酶变体。所述脂肪酶变体还可在相同的氨基酸残基位置编号处包含不同的氨基酸取代。例如,在64位的脂肪酶变体可以是:K64V、K64T或K64E,其中与亲本脂肪酶相比,任一种脂肪酶变体均具有改善的特性。

表 1:

脂肪酶编号	原始氨基酸	氨基酸残基	新氨基酸
LV005	K	14	E
LV074	F	56	C
LV008	K	64	V
LV075	K	64	T
LV076	K	64	E
LV077	P	67	L
LV078	W	79	F
LV079	W	79	i
LV080	K	145	W
LV081	K	145	E
LV082	E	263	L
LV083	I	265	T
LV084	I	265	L
LV085	Y	266	L
LV086	Y	266	V
LV087	N	272	P

[0328]

表 1:			
脂肪酶编号	原始氨基酸	氨基酸残基	新氨基酸
LV088	R	273	Q
LV089	Y	275	F
LV090	P	287	R
LV091	N	291	A
LV092	N	291	L
LV006	N	291	F
LV007	A	293	V
LV093	F	297	L
LV009	M	298	F
LV012	A	303	Q
LV094	S	307	L
LV095	L	308	S
LV096	L	308	N
LV097	T	310	Q
LV098	Y	340	F
LV099	Y	347	K
LV100	V	375	G
LV101	Q	377	K
LV011	L	407	A
LV010	L	407	G

[0329]

[0330] 实施例6:脂肪酶变体的突变组合

[0331] 如W02009/018449中所述,使用定制多位点组合装配(TMSCA)的方法通过组合来自前述实施例的单点突变来产生另外的非天然存在的脂肪酶变体。鉴定出这些脂肪酶变体与亲本酶相比具有改善的特征,例如更高的活性、改善的性能(去除布料上的污渍)、更高的表达、抗蛋白酶解降解的稳定性或其任意组合。与亲本酶相比,氨基酸突变的组合显示在下表2中。

表 2:	
多肽变体脂肪酶	脂肪酶编号
无——亲本骨架	SEQ ID NO:1
N291A, 405L	LV001
W79F, I265L, N291L	LV002
E263L, T310Q	LV003

[0332]

[0333]

表 2:	
多肽变体脂肪酶	脂肪酶编号
T310Q, L407A	LV013
K145E, L407A	LV014
K64V, L407A	LV015
M298F, L407A	LV016
K145E, Y340F	LV017
T310Q, L407A, K64V, K145E	LV018
T310Q, L407A, K145E, M298F	LV019
K14E, K64V, K145E, T310Q, L407A	LV020
K64V, K145E, M298F, T310Q, L407A	LV021
E263L, F297L, T310Q, L407A	LV022
E263L, F297L, T310Q, L407G	LV023
P67L, E263L, F297L, T310Q,	LV024
F297L, T310Q	LV025
E263L, F297L	LV026
E263L, Q377K, T310Q, L407A	LV027
E263L, Q377K, T310Q, L407G	LV028
K14E, E263L, I265T, A303Q, T310Q	LV029
E263L, T310Q, L407A	LV030
E263L, T310Q, L407G	LV031
E263L, M298F, T310Q	LV032
K145E, E263L, A303Q, T310Q, L407A	LV033
K145E, E263L, A303Q, T310Q, L407G	LV034
K64V, K145E, E263L, A303Q, T310Q	LV035
K145E, E263L, A303Q,	LV036
K145E, A303Q	LV037
K145E, Y340F, Y347K, L407A	LV038
K145E, T310Q	LV039
K145E, E263L	LV040
K145E, Y347K	LV041
K145E, K64V	LV042
K145E, Y266L, A303Q	LV043

表 2:	
多肽变体脂肪酶	脂肪酶编号
K145E, E263L, M298F, T310Q, L407A	LV044
K145E, E263L, M298F, T310Q, L407G	LV045
K145E, E263L, T310Q, L407A	LV046
K145E, E263L, T310Q, L407G	LV047
K14E, A303Q, L407A	LV048
K14E, E263L, A303Q, T310Q, L407A	LV049
K145W, E263L, I265T, A303Q, T310Q, L407A	LV050
K145W, I265T, A303Q, L407A	LV051
K64V, K145W, E263L, T310Q, L407A	LV052
K64V, K145W, E263L, M298F, T310Q	LV053
K64V, K145W, E263L, Y266L, T310Q	LV054
A303Q, L407A	LV055
M298F, L407G	LV056
I265T, M298F, L407A	LV057
I265T, M298F, L407G	LV058
Y266L, M298F, L407A	LV059
Y266L, M298F, L407G	LV060
P67L, F297L, L407A	LV061
P67L, F297L, L407G	LV062
I265T, L407A	LV063
Y266L, L407G	LV064
E263L, L407A	LV065
K145E, Y340F	LV066
K145E, Y340F, M298F, L407A	LV067
K145E, Y340F, K64V, L407A	LV068
K14E, A303Q, L407A, K145E	LV069
K14E, A303Q, L407A, K145E, Y340F	LV070
K14E, A303Q, L407A, M298F	LV071
K14E, K64V, K145E, M298F, T310Q, L407A	LV072
T312Q	LV073

[0334]

[0335] 多肽脂肪酶变体酶的改善的特性的结果显示于下表3中,表示为与亲本酶 (SEQ ID NO:1/2) 相比时的百分比。

[0336]

表 3:			
脂肪酶	ELISA	pNPC8	C16
SEQ ID NO:1	100%	100%	100%
LV013	140%	37%	103%
LV014	146%	93%	89%
LV015	84%	53%	69%
LV016	98%	100%	95%
LV017	122%	91%	91%
LV018	256%	30%	249%
LV019	168%	32%	164%
LV020	142%	25%	227%
LV021	361%	28%	168%
LV022	0%	0%	2%
LV023	0%	0%	1%
LV024	3%	2%	7%
LV025	46%	25%	71%
LV026	5%	20%	11%
LV027	13%	1%	8%
LV028	5%	2%	5%
LV029	22%	47%	40%
LV030	8%	49%	12%
LV031	6%	3%	17%
LV032	14%	1%	5%
LV033	9%	10%	18%
LV034	5%	7%	15%
LV035	15%	45%	27%
LV036	22%	49%	18%
LV037	147%	100%	89%
LV038	41%	60%	41%
LV039	89%	14%	45%
LV040	32%	111%	97%

[0337]

表 3:			
脂肪酶	ELISA	pNPC8	C16
LV041	14%	35%	20%
LV042	97%	102%	110%
LV043	142%	106%	124%
LV044	39%	18%	48%
LV045	34%	12%	40%
LV046	29%	12%	51%
LV047	15%	10%	47%
LV048	130%	107%	63%
LV049	10%	9%	14%
LV050	1%	100%	100%
LV051	47%	74%	67%
LV052	19%	47%	47%
LV053	27%	95%	114%
LV054	15%	31%	20%
LV055	110%	83%	76%
LV056	107%	118%	90%
LV057	51%	53%	48%
LV058	180%	75%	71%
LV060	150%	31%	25%
LV061	0%	1%	3%
LV062	0%	1%	2%
LV063	31%	44%	49%
LV064	54%	53%	75%
LV065	16%	30%	19%
LV066	112%	82%	65%
LV068	153%	81%	103%
LV069	126%	74%	68%
LV070	141%	77%	65%
LV071	92%	72%	38%
LV072	188%	27%	158%

[0338] 实施例7:脂肪去除性能

[0339] 脂肪酶变体多肽在以下污渍上进行了小规模测试:1) C-S-61:棉花上的牛肉脂肪,洗涤前的实验室值;2) EMPA112:猪油浸在棉花上,洗涤前的实验室值。生产商:测试材料中心(CFT)BV,NL-3130 AC Vlaardingen。

[0340] 将污染的样品放入尺寸<2000微升、填充率<80%并装有以下类型洗涤液之一的开放式圆柱体[不锈钢]容器(高度与直径的比为1:1至3:1)中:(a)在水中的洗涤剂(硬度为2.5mmol/L;Ca²⁺:Mg²⁺:HCO₃⁻=4:1:8);(b)在水的洗涤剂+脂肪酶(不同浓度,以ppm为单位)。

[0341] 将污染的样品在洗涤液中以1:35的织物/液体比率在振动台装置上以选定的温度振荡20分钟。洗涤后,将样品在连续的自来水(12-21°dH)流(2-6l/min)下冲洗<5分钟。将冲洗后的样品在连续气流下干燥,并在环境条件下储存在黑暗的密闭室内,直到对其进行测量。

[0342] 通过使用MACH5多区域颜色测量来测定去污性能,该测量给出了LAB值和在未洗涤和已洗涤的污渍之间计算出的ΔE。

[0343] 亮度L*,红-绿色轴上的a*值和黄-蓝色轴上的b*值是在洗涤前后通过使用MACH 5多区域颜色测量(测试材料中心(CFT)BV,NL-3130 AC Vlaardingen)。颜色值(ΔE)值的变化。根据CIELAB色空间测量ΔE,并由评估颜色工具根据以下方程自动定义和计算:ΔE=根(ΔDelta a*²+ΔDelta b*²+ΔDelta L*²)。ΔE是达到的去污效果或洗涤效果的量度。重复所有测量两次,得到平均值。注意的是,与较低的ΔE值相比,较高的ΔE值表示更好的洗涤效果。

[0344] 结果也列于下表4的试验1至4中。

[0345] 实施例8:用Launder-o-meter (LOM)的脂肪污渍去除

[0346] 用LOM测试脂肪酶变体多肽。使用基本制剂ES1或ES4在launder-o-meter (LP2 Typ,SDL Atlas Inc.,USA)中在25°C在以下洗涤条件下将选定的污渍监测物与在洗涤液中的棉制压舱织物和钢球一起洗涤:

[0347] ES1洗涤剂制剂:

[0348]

组分	类型	A Conc[%]
Lutensit A-LBS	LAS	5,5
Edenor椰油基脂肪酸	C ₁₂ -C ₁₈ 椰油基脂肪酸	2,4
Lutensol A07	AEO	5,5
Texapon N70	FAEO	5,5
	1,2丙二醇	6,0
	乙醇	2,0
	KOH	2,2

[0349] ES4洗涤剂制剂:

[0350]

组分	类型	A Conc[%]
Lutensit A-LBS	LAS	3,63
Edenor椰油基脂肪酸	C ₁₂ -C ₁₈ 椰油基脂肪酸	2,67
Lutensol AO 7	AEO	7,62
Texapon N70	FAEO	10,37

	1,2丙二醇	4,45
	乙醇	1,48
	KOH	2,45

[0351] 试验条件

[0352]	洗涤液	250ml
	#钢球*	20
	洗涤时间/温度	20min, 在25℃或40℃
	脂肪酶用量	0ppm、0.2ppm或1.5ppm
	洗涤剂用量	2g/L或5g/L
	洗涤循环	1
	水硬度	2.5mmol/L;
	压舱织物	15g棉织物283
	压舱织物+污染织物的总和	20g
	污染的样品	2x 2.5g C-S-61或C-S 62
	织物/液体比率	1:12.5

[0353] 洗涤后,将织物漂洗,旋转脱水并在空气中干燥。对单个污渍的洗涤性能是通过使用来自Fa.Datacolor (Elrepho 2000) 的分光光度计在460nm测量污染织物在洗涤后的消退值来确定的。通常,消退值越高,性能越好。对于多污渍监测物,通过使用MACH5多区域颜色测量来确定去污性能,该测量给出了LAB值和在未洗涤和已洗涤的污渍之间计算的 ΔE (根据实施例7的计算)。结果也在下表4的试验5至8中概述。

[0354] 单污渍试验:

[0355] 试验1:用牛肉脂肪污染的棉花 (CFT-CS 61), 2g/L ES 4 (30%), 25℃, 小规模, 在1,5ppm的 ΔE 。

[0356] 试验2:用牛肉脂肪污染的棉花 (CFT-CS 61), 2g/L ES 4 (30%), 40℃, 小规模, 在1,5ppm的 ΔE 。

[0357] 试验3:牛肉脂肪 (CFT-CS 61), 2g/L ES 1 (20%), 25℃, 小规模, 在1,5ppm的 ΔE 。

[0358] 试验4:牛肉脂肪 (CFT-CS 61), 2g/L ES 1 (20%), 40℃, 小规模, 在1,5ppm的 ΔE 。

[0359] 试验5:可可 (EMPA 112), 2g/L ES 4 (30%), 25℃, LOM, 在1,5ppm的 ΔE 。

[0360] 试验6:聚酯/棉花,用色素/皮脂污染 (wfk 20D), 2g/L ES 4 (30%), 25℃, LOM, 在1,5ppm的 ΔE 。

[0361] 试验7:聚酯/棉花,用色素/皮脂污染 (wfk 20D), 2g/L ES 1 (20%), 25℃, LOM, 在1,5ppm的 ΔE 。

[0362] 试验8:用巧克力慕斯污染的棉花 (CFT CS-70), 2g/L ES 1 (20%), 25℃, LOM, 在1,5ppm的 ΔE 。

[0363] 表4:脂肪酶变体对脂肪污渍的洗涤性能 (以 ΔEE 表示) (标准化的) ND=没有数据产生

	脂肪酶	试验 1	试验 2	试验 3	试验 4	试验 5	试验 6	试验 7	试验 8
[0364]	SEQ ID NO:1/2	100	100	100	100	100	100	100	100
	LV004	71	106	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	LV005	120	99	ND	ND	ND	ND	ND	ND

	脂肪酶	试验 1	试验 2	试验 3	试验 4	试验 5	试验 6	试验 7	试验 8	
[0365]	LV006	104	101	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	LV007	96	100	38	49	ND	120	ND	ND	
	LV008	228	205	110	113	ND	194	ND	ND	
	LV009	248	211	109	116	ND	180	ND	ND	
	LV010	195	206	107	110	ND	178	ND	ND	
	LV011	195	205	95	100	102	197	97	110	
	LV012	101	147	ND	ND	92	188	107	100	
	LV013	77	99	ND	ND	92	175	88	100	
	LV014	110	112	ND	ND	93	186	88	101	
	LV015	95	106	ND	ND	86	184	87	100	
	LV016	109	106	ND	ND	90	193	96	93	
	LV017	116	133	123	105	ND	ND	ND	ND	
	LV018	111	116	111	91	ND	ND	ND	ND	
	LV019	102	115	117	97	ND	ND	ND	ND	
	LV020	94	101	107	94	ND	ND	ND	ND	
	LV021	83	109	107	92	ND	ND	ND	ND	
		单独使用洗涤剂	100	100	89	97	43	100	72	92

[0366] 试验1和2:脂肪酶变体LV005、LV006、LV008、LV009、LV010、LV011、LV014、LV016、LV017、LV018、LV019与亲本脂肪酶(SEQ ID NO:1/2)相比,对牛肉脂肪污渍的性能显著提高。在高通量洗涤中,以1.5ppm的酶施用,LV008、LV009、LV010、LV011变体在洗涤剂ES4(2g/l)中在25℃和40℃时对牛肉脂肪污渍的性能为亲本脂肪酶的两倍。

[0367] 试验3和4:与SEQ ID NO:1相比,在25℃和40℃的相同条件下,使用2g/l洗涤液和1.5ppm酶剂量,在洗涤剂ES1中确认了性能优势。

[0368] 试验6:变体LV008、LV009、LV010、LV011、LV012、LV013、LV014、LV015和LV016与SEQ ID NO:1/2的亲本脂肪酶相比,在25℃洗涤温度下在LOM中在洗涤剂ES 4(2g/l)中,对聚酯/棉上的污染色素/皮脂具有性能优势。

[0369] 实施例9:脂肪酸选择性

[0370] 通过4-硝基苯基丁酸酯(pNP-C4)、4-硝基苯基辛酸酯(pNP-C8)、4-硝基苯基月桂酸酯(pNP-C12)、4-硝基苯基肉豆蔻酸酯(pNP-C14)、4-硝基苯基棕榈酸酯(pNP-C16)和4-硝基苯基硬脂酸酯(pNP-C18)水解后释放对-硝基苯酚来测定脂肪酶活性。通过将脂肪酸与对-硝基苯酚关联,可以通过在405nm处检测对硝基苯酚的释放来跟踪脂溶活性。表达脂肪

酶并通过离心将分泌的脂肪酶与细胞分离。将上清液以96孔板的形式添加到分析缓冲液(pNP底物、Hepes pH 7.5、山梨醇、Triton X100和BPER)中。每30秒检测405nm处的吸光度,持续2至15分钟。斜率被用来确定活性速率。选择性报告为对不同pNP底物的活性,结果如图1所示。

[0371] 实施例10:在蛋白酶存在下脂肪酶变体的稳定性

[0372] 在蛋白酶存在下测试脂肪酶变体的稳定性。

[0373] 在pH8.6 Tris缓冲液中的蛋白酶(Detralase)存在下(样品储存于37°C,脂肪酶测定,Detralase 1%w/w)的脂肪酶的稳定性。图2所示的结果表明,当与SEQ ID NO:1的脂肪酶相比时,脂肪酶变体在80分钟后仍保持活性。在存在蛋白酶的情况下,与亲本脂肪酶(SEQ ID NO.:1/2)相比,脂肪酶变体具有不同的活性。

[0374] 此外,已在多种蛋白酶存在下测试了在洗涤剂制剂中SEQ ID NO:1的脂肪酶的稳定性。表格组分:

[0375]

组分	%w/w
Lutensit A-LBS	5,7
1,2丙二醇	6
Edenor棕榈酸/油酸K12-18	2,4
KOH	3,1
Texapon N70	7,7
Lutensol A0 7	5,4
乙醇	2
水	57,7
总计:	90
美学,物理稳定性	澄清,稳定

[0376] 使用琥珀酰-丙氨酸-丙氨酸-脯氨酸-苯丙氨酸-对硝基苯胺(Suc-AAPF-pNA,简称:AAPF;参见例如DeIMar等人(1979),Analytical Biochem 99,316-320)作为底物测定蛋白酶活性。从底物分子上裂解出pNA。裂解速率可以通过测量OD₄₀₅(在405nm处的光密度),通过溶液中游离pNA的黄色增加来测定。

[0377] 将BLAP野生型(如EP 1921147所述的SEQ ID NO:22)和BLAP变体(具有氨基酸取代R99E的如EP 1921147所述的SEQ ID NO:22)以1%w/w的剂量添加到洗涤剂制剂中(参见上述表格组分)并充分混合。另外,添加0.3%的所述脂肪酶。在指定的时间点采集样品,并保持冷冻直至采集所有样品。在研究结束时用AAPF分析法测量所有样品。

[0378] 使用基于合成底物对-硝基苯酚戊酸酯的脂肪酶测定法测试脂肪酶活性。

[0379] 包含Lipolase和蛋白酶的组合物中的酶活性:

[0380]

天数	0	2	7	14	21	28
	储存 X 天后的 Lipolase 活性[%]					
BLAP WT, R99	100	13	1	0	0	0
BLAP 变体, R99E	100	63	45	33	21	18

[0381] 包含Letra Lip和蛋白酶的组合物中的酶活性:

天数	0	2	7	14	21	28
	储存 X 天后的 Letra Lip 活性[%]					
BLAP WT, R99	100	11	1	1	0	0
BLAP 变体, R99E	100	81	47	27	16	12

[0383] 在包含脂肪酶 (SEQ ID NO:1) 和蛋白酶的组合物中的酶活性:

天数	0	2	7	14	21	28
	储存 X 天后的脂肪酶(SEQ ID NO: 1)活性[%]					
BLAP WT, R99	100	38	0	0	0	0
BLAP 变体, R99E	100	91	76	49	42	31

[0385] 数据表明,与Lipolase和Letra Lip相比,根据SEQ ID NO:3的脂肪酶在包含BLAP变体,R99E蛋白酶的洗涤剂制剂中更稳定。

序列表

<110> BASF SE
 <120> 脂肪酶
 <130> 161154
 <150> 62/662877
 4/26/2018
 <150> 18194564.3
 9/14/2018
 <160> 2
 <170> PatentIn 版本3.5
 <210> 1
 <211> 437
 <212> PRT
 <213> 未知
 <220>
 <223> 合成产生的
 <400> 1
 Ala Thr Lys Ile Ser Asp Leu Gly Glu Val Tyr Thr Val Lys Thr Ala
 1 5 10 15
 Asp Gly Ile Thr Leu Lys Leu Leu Arg Tyr His Pro Pro Gly Gly Gln
 20 25 30
 Pro Asn Ala Gly Ala Gln Pro Val Leu Leu Phe Ser Gly Leu Leu Cys
 35 40 45
 Asn Met Asn Glu Phe Val Val Phe Thr Pro Asp Gly Leu Glu Ser Lys
 50 55 60
 Tyr Lys Pro Tyr Tyr Pro Lys Glu Leu Ala Glu Trp Ala Lys Asp Asp
 65 70 75 80
 Pro Tyr Ile Ala Lys Asp Pro Met Leu Tyr Tyr Ser Leu Ala His Tyr
 85 90 95
 Leu Trp Lys Lys Gly Tyr Asp Val Trp Leu Leu Asn Tyr Arg Gly Thr
 100 105 110
 Gly Val Gly Glu Met Lys Ser Gly Val Gly Asn Ala Arg Val Ser Leu
 115 120 125
 Asp Val Trp Ala Leu Tyr Asp Val Pro Ala Ala Ile Asp Phe Val Asn
 130 135 140
 Lys Lys Thr Gly Lys Ser Leu Ile Ile Gly Gly His Ser Thr Gly Gly
 145 150 155 160
 Leu Val Thr Tyr Val Tyr Leu Gln Gly Ala Lys Phe Val Lys Thr Pro
 165 170 175
 Ser Cys Leu Ile Asn Leu Ala Trp Cys Glu Lys Val Ser Ala Ser Asp
 180 185 190
 Ser Leu Ala Glu Glu Arg Asn Ser Lys Ile Val Gly Val Ile Ala Ile
 195 200 205
 Asp Pro Ala Met Ile Pro Pro Leu Pro Lys Ile Leu Asp Thr Lys Ala
 210 215 220
 Gly Trp Leu Leu Leu Asp Thr Pro Leu Tyr Ile Asp Leu Arg Asp Thr
 225 230 235 240
 Ile Glu Thr Leu Ala Lys Lys Lys Gly Leu Trp Glu Ser Phe Leu Leu
 245 250 255
 Thr Glu Lys Phe Leu Phe Glu Ala Ile Tyr Ser Leu Tyr Asn Arg Tyr
 260 265 270
 Gly Glu Ile Ser Glu Ile Ile Lys Ala Leu Ala Phe Met Asn Pro Asn
 275 280 285
 Asn Met Asn Pro Ala Leu Ser Asp Phe Met Thr Arg Tyr Val Ala Asp
 290 295 300
 Ser Leu Tyr Thr Pro Thr Leu Ala Gln Tyr Ala Asp Phe Gly Leu Arg

[0001]

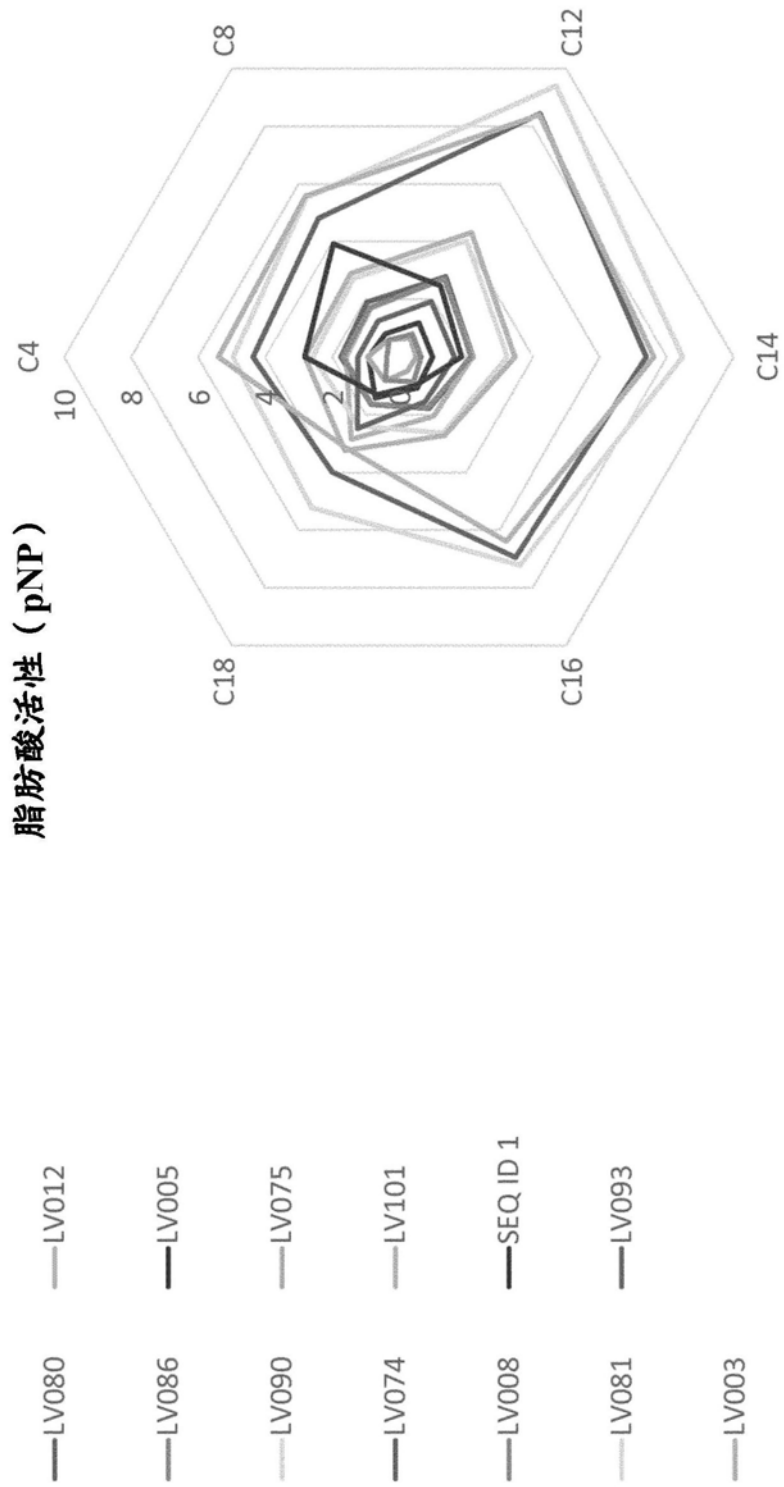


图1

蛋白酶稳定性测试

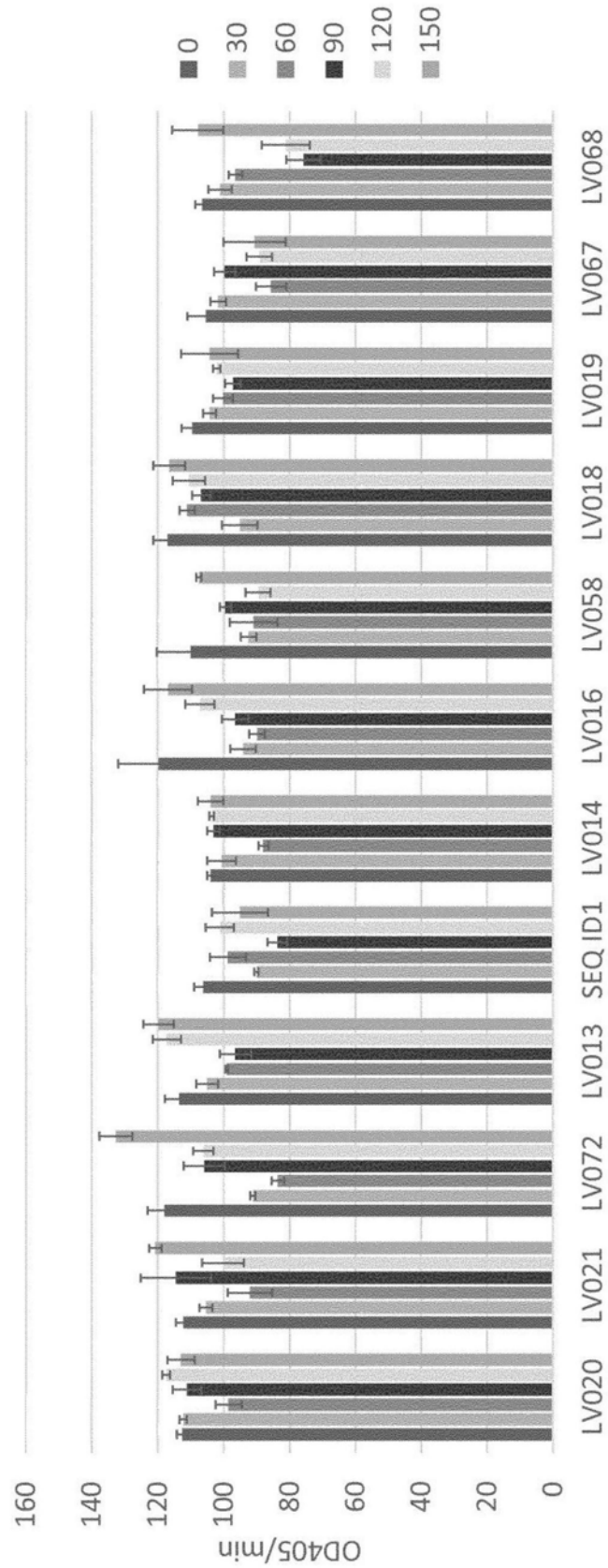


图2