



(10) 申请公布号 CN 117616120 A

(43) 申请公布日 2024.02.27

(21) 申请号 202280045956.6

(22) 申请日 2022.06.27

(30) 优先权数据

63/216612 2021.06.30 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.12.27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/035080 2022.06.27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/278297 EN 2023.01.05

(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 C·D·亚当斯 L·M·贝贝

A·D·刘 C·德格林 S·伊斯兰

S·维兰德

(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 徐厚才 王伦伟

(51) Int.Cl.

*C12N 9/18* (2006.01)

*C12N 15/52* (2006.01)

*C11D 3/386* (2006.01)

*G08J 11/10* (2006.01)

权利要求书3页 说明书34页

(54) 发明名称

变体脂肪酶及其用途

(57) 摘要

本公开涉及变体脂肪分解酶,更特别地具有改善的稳定性和/或对聚酯的改善的水解活性的变体脂肪分解酶。这样的变体脂肪分解酶可用于降解聚酯,例如聚对苯二甲酸乙二醇酯。还提供了与这样的变体脂肪分解酶相关的组合物和方法。



6. 如前述权利要求中任一项所述的变体脂肪分解酶,其中所述改善的性质是:

(i) 改善的稳定性,其中当根据实例3的稳定性测定进行测量时,所述变体具有至少5%的残余活性,和/或

(ii) 对聚酯的改善的水解活性,其中当根据实例2的PET测定进行测量时,与具有有取代R40T-T64V-T117L-T177N-I178L-F180P-Y182A-R190L-S205G-F207T-S212D-F226L-Y239I-L249P-S252I-L258F的SEQ ID NO:2的氨基酸序列的脂肪分解酶相比,所述变体的PI  $\geq 1.2$ 。

7. 如权利要求1-6中任一项所述的脂肪分解酶,其中所述变体具有对聚酯的水解活性,所述聚酯选自自由以下组成的组:聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)、聚对苯二甲酸丙二酯(PTT)、聚对苯二甲酸丁二酯(PBT)、聚对苯二甲酸异山梨醇乙二醇酯(PEIT)、聚乳酸(PLA)、聚羧基烷酸酯(PHA)、聚丁二酸丁二酯(PBS)、聚丁二酸己二酸丁二酯(PBSA)、聚己二酸对苯二甲酸丁二酯(PBAT)、聚乙烯呋喃酸酯(PEF)、聚己内酯(PCL)、聚萘二甲酸乙二醇酯(PEN)、聚酯型聚氨酯、聚(己二酸乙二醇酯)(PEA)、及其组合。

8. 一种多核苷酸,其包含编码如权利要求1-7中任一项所述的变体脂肪分解酶的核酸序列。

9. 如权利要求8所述的多核苷酸,其中所述核酸序列可操作地连接到启动子。

10. 一种表达载体或表达盒,所述表达载体或表达盒包含如权利要求8或9所述的多核苷酸。

11. 一种重组宿主细胞,其包含如权利要求10所述的表达载体或表达盒。

12. 一种酶组合物,其包含如权利要求1-7中任一项所述的变体脂肪分解酶。

13. 如权利要求12所述的酶组合物,其中所述组合物进一步包含选自自由以下组成的组的至少至少一种另外的酶:酰基转移酶、 $\alpha$ -淀粉酶、 $\beta$ -淀粉酶、 $\alpha$ -半乳糖苷酶、阿拉伯糖苷酶、芳基酯酶、 $\beta$ -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- $\beta$ -1,4-葡聚糖酶、内切- $\beta$ -甘露聚糖酶、酯酶、外切-甘露聚糖酶、阿魏酸酯酶、半乳糖苷酶、葡萄糖淀粉酶、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、 $\beta$ -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。

14. 如权利要求13所述的酶组合物,其中所述至少一种另外的酶选自自由以下组成的组:蛋白酶、 $\alpha$ -淀粉酶、纤维素酶和甘露聚糖酶。

15. 一种用于降解聚酯或含聚酯材料的方法,所述方法包括

i) 使所述含聚酯材料与如权利要求1-7中任一项所述的变体脂肪分解酶或包含如权利要求1-7中任一项所述的变体脂肪分解酶的组合物接触,以及任选地,

ii) 将所述含聚酯材料进行冲洗。

16. 一种用于对聚酯或含聚酯材料进行酶法解聚的方法,所述方法包括:

i) 使所述聚酯或含聚酯材料与如权利要求1-7中任一项所述的变体脂肪分解酶或包含如权利要求1-7中任一项所述的变体脂肪分解酶的组合物接触,以及任选地,

ii) 将所述聚酯的单体和/或寡聚体回收。

17. 如权利要求15或16所述的方法,其中所述聚酯选自由以下组成的组:聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)、聚对苯二甲酸丙二酯(PTT)、聚对苯二甲酸丁二醇酯(PBT)、聚对苯二甲酸异山梨醇乙二醇酯(PEIT)、聚乳酸(PLA)、聚羟基烷酸酯(PHA)、聚丁二酸丁二醇酯(PBS)、聚丁二酸己二酸丁二醇酯(PBSA)、聚己二酸对苯二甲酸丁二醇酯(PBAT)、聚乙烯呋喃酸酯(PEF)、聚己内酯(PCL)、聚萘二甲酸乙二醇酯(PEN)、聚酯型聚氨酯、聚(己二酸乙二醇酯)(PEA)、及其组合。

## 变体脂肪酶及其用途

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求于2021年6月30日提交的美国临时申请号63/216,612的权益,并且将该临时申请通过引用以其全文并入。

[0003] 本公开涉及变体脂肪分解酶,更特别地具有改善的稳定性和/或对聚酯的改善的水解活性的变体脂肪分解酶。这样的变体脂肪分解酶可用于降解聚酯,例如聚对苯二甲酸乙二醇酯。还提供了与这样的变体脂肪分解酶相关的组合物和方法。

### 背景技术

[0004] 聚酯(例如聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET))用于大量的产品和工艺中,例如用于服装、地毯、各种包装和塑料(例如汽车塑料)的制造,这导致聚酯在垃圾填埋场中的积累,并且可能是一个生态问题。

[0005] 各种酶(例如脂肪分解酶)能够催化多种聚合物(包括聚酯)的水解。正在研究这些酶中的一些以用于许多工业应用,例如用于衣物洗涤和餐具洗涤应用的洗涤剂、用于处理生物质和食物的降解酶、在环境污染物的解毒中的生物催化剂或用于在纺织工业中处理聚酯织物的生物催化剂。这样的酶的使用对于水解聚酯(例如PET)是特别有意义的。

[0006] 持续需要具有改善的活性和/或改善的稳定性的脂肪分解酶,这些脂肪分解酶可以在处理织物和/或纺织品的组合物中使用并且用于降解聚酯的方法中。

### 发明内容

[0007] 在一个实施例中,本公开提供了变体脂肪分解酶,其包含与SEQ ID NO:2的全长氨基酸序列具有至少70%同一性的氨基酸序列,该变体脂肪分解酶包含取代T064V-T117L-T177N/R-I178L-F180P-Y182A-R190L-S205G-S212D-F226L-Y239I-L249P-S252I-L258F,并且进一步包含选自以下组成的组的至少一个另外的取代:V014S、R040A/T、G059Y、G061D、A066D、S070E、Q161H、G175A/E、F207TL/T、V210I、Q227H、A236P、S244E、E254Q和R256K,其中这些位置通过参考SEQ ID NO:2的氨基酸序列进行编号,并且其中该变体具有酯酶活性。在一些实施例中,变体脂肪分解酶包含与SEQ ID NO:2的全长氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,变体脂肪分解酶衍生自亲本酶,该亲本酶包含与SEQ ID NO:2的全长氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%同一性的氨基酸序列。

[0008] 在另一个实施例中,本公开提供了多核苷酸,其包含编码变体脂肪分解酶的核酸序列,该变体脂肪分解酶包含与SEQ ID NO:2的全长氨基酸序列具有至少70%同一性的氨基酸序列,包含取代T064V-T117L-T177N/R-I178L-F180P-Y182A-R190L-S205G-S212D-F226L-Y239I-L249P-S252I-L258F,并且进一步包含选自以下组成的组的至少一个另外的取代:V014S、R040A/T、G059Y、G061D、A066D、S070E、Q161H、G175A/E、F207TL/T、V210I、Q227H、A236P、S244E、E254Q和R256K,其中这些位置通过参考SEQ ID NO:2的氨基酸序列进

行编号,并且其中该变体具有酯酶活性。在一些实施例中,变体脂肪分解酶包含与SEQ ID NO:2的全长氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,变体脂肪分解酶衍生自亲本酶,该亲本酶包含与SEQ ID NO:2的全长氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%同一性的氨基酸序列。

[0009] 在另一个实施例中,本公开提供了表达载体或表达盒以及含有这样的表达载体或表达盒的重组宿主细胞,这些表达载体或表达盒包含编码变体脂肪分解酶的多核苷酸。

[0010] 还提供了酶组合物,其包含变体脂肪分解酶,该变体脂肪分解酶包含与SEQ ID NO:2的全长氨基酸序列具有至少70%同一性的氨基酸序列,包含取代T064V-T117L-T177N/R-I178L-F180P-Y182A-R190L-S205G-S212D-F226L-Y239I-L249P-S252I-L258F,并且进一步包含选自以下组成的组的至少一个另外的取代:V014S、R040A/T、G059Y、G061D、A066D、S070E、Q161H、G175A/E、F207TL/T、V210I、Q227H、A236P、S244E、E254Q和R256K,其中这些位置通过参考SEQ ID NO:2的氨基酸序列进行编号,并且其中该变体具有酯酶活性。在一些实施例中,变体脂肪分解酶包含与SEQ ID NO:2的全长氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,变体脂肪分解酶衍生自亲本酶,该亲本酶包含与SEQ ID NO:2的全长氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%同一性的氨基酸序列。

[0011] 本公开进一步提供了用于降解聚酯或含聚酯材料的方法以及用于对聚酯或含聚酯材料进行酶法解聚的方法。这样的方法可用于选自以下组成的组的聚酯:聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)、聚对苯二甲酸丙二酯(PTT)、聚对苯二甲酸丁二醇酯(PBT)、聚对苯二甲酸异山梨醇乙二醇酯(PEIT)、聚乳酸(PLA)、聚羟基烷酸酯(PHA)、聚丁二酸丁二醇酯(PBS)、聚丁二酸己二酸丁二醇酯(PBSA)、聚己二酸对苯二甲酸丁二醇酯(PBAT)、聚乙烯呋喃酸酯(PEF)、聚己内酯(PCL)、聚萘二甲酸乙二醇酯(PEN)、聚酯型聚氨酯、聚(己二酸乙二醇酯)(PEA)、及其组合。

### 具体实施方式

[0012] 本公开提供了变体脂肪分解酶、包含这样的变体脂肪分解酶的组合物(例如酶和洗涤剂组合物),以及使用这样的变体脂肪分解酶和组合物例如用于对纺织品和/或织物进行洗涤或处理,并且降解聚酯的方法。

[0013] 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。

[0014] 除非本文另外定义,否则本文所使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,紧接在下面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“所述(the)”包括复数指示物。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它们的情境而变化。

[0015] 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。

[0016] 如本文所用,术语“聚合物”是指其结构是由通过共价化学键连接的多个重复单元构成的化合物或化合物的混合物。在本公开的上下文中,术语聚合物包括天然或合成聚合物,其由单一类型的重复单元(即,均聚物)或不同的重复单元的混合物(即,嵌段共聚物和无规共聚物)构成。

[0017] 如本文所用,术语“含聚酯材料”或“含聚酯产品”是指包含呈结晶、半结晶、或基本上无定形形式的至少一种聚酯的产品,例如纺织品、织物、或塑料产品。在一些实施例中,含聚酯材料是指由至少一种塑料材料制成的任何物品,例如塑料片材、塑料管、塑料棒、塑料型材(plastic profile)、塑料模型(plastic shape)、塑料薄膜、塑料块(plastic block)等,其含有至少一种聚酯,以及可能的其他物质或添加剂,例如增塑剂、矿物质或有机填料。在一些实施例中,含聚酯材料是指熔融或固体状态的塑料化合物、或塑料配制品,其适合于制造塑料产品。在一些实施例中,含聚酯材料是指包含至少一种聚酯的纺织品或织物或纤维。在一些实施例中,含聚酯材料是指包含至少一种聚酯的塑料废料或纤维废料。

[0018] 如本文所用,术语“聚酯”是指其单体通过酯键进行键合。如本文所用,术语“聚酯”包括但不限于选自由以下组成的组的那些聚酯:聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)、聚对苯二甲酸丙二酯(PTT)、聚对苯二甲酸丁二醇酯(PBT)、聚对苯二甲酸异山梨醇乙二醇酯(PEIT)、聚乳酸(PLA)、聚羟基烷酸酯(PHA)、聚丁二酸丁二醇酯(PBS)、聚丁二酸己二酸丁二醇酯(PBSA)、聚己二酸对苯二甲酸丁二醇酯(PBAT)、聚乙烯呋喃酸酯(PEF)、聚己内酯(PCL)、聚萘二甲酸乙二醇酯(PEN)、聚酯型聚氨酯、聚(己二酸乙二醇酯)(PEA)、及其组合。

[0019] 术语“织物”是指例如机织材料、针织材料和非机织材料,以及可以转化成例如纱线和机织材料、针织材料和非机织材料的短纤维和长丝。术语涵盖由天然的以及合成的(例如,制造的)纤维、及其组合制成的材料。

[0020] 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呈针织物、机织物、牛仔布、非机织物、毛毡、纱线和毛巾布的形式。该纺织品可以包括基于纤维素的,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、醋酸纤维素纤维(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、醋酸纤维素纤维、莱赛尔纤维)。织物可以是常规的可洗衣物,例如,沾污的家居衣物。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。在一些实施例中,纺织品包括包含至少一种聚酯的那些材料。

[0021] 术语“洗涤”包括家庭洗涤和工业洗涤两者,并且意指用含有如本文所提供的清洁或洗涤剂组合物的溶液处理纺织品的过程。洗涤过程可以例如使用例如家用或工业洗衣机进行,或者可以用手进行。

[0022] 术语“洗涤循环”是指这样的洗涤操作,其中将纺织品浸渍在洗涤液中,对纺织品施加某种机械作用以释放污渍或促进洗涤液流入和流出纺织品,以及最后除去多余的洗涤液。在一个或多个洗涤循环之后,通常冲洗并干燥纺织品。

[0023] 术语“洗涤液”在本文中定义为水和洗涤剂组分的溶液或混合物,任选地包括如本文所提供的变体脂肪分解酶。

[0024] 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)分离的基因(例如,直系同源基因)以及通过遗传重复分离的基因(例如,旁系同源基因)。

[0025] 如本文所用,术语“变体多肽”是指包含如下氨基酸序列的多肽,该氨基酸序列与亲本多肽或参考多肽(包括但不限于野生型多肽)的氨基酸序列的区别在于至少一个氨基酸残基。在一些实施例中,用于本文的亲本多肽包含与SEQ ID NO:2具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。

[0026] 变体脂肪分解酶

[0027] 在一个实施例中,提供了变体脂肪分解酶。在一些实施例中,本文所提供的变体脂肪分解酶具有对至少一种聚酯的水解活性。

[0028] 如本文所用,脂肪分解酶包括展现出降解脂质的能力(例如降解甘油三酯或磷脂的能力)的酶、多肽、或蛋白质。脂肪分解酶可以是例如,脂肪酶、磷脂酶、酯酶或角质酶。脂肪分解酶可以是具有 $\alpha/\beta$ 水解酶折叠的酶。这些酶典型地具有丝氨酸、天冬氨酸和组氨酸残基的催化三联体。 $\alpha/\beta$ 水解酶包括脂肪酶和角质酶。角质酶显示出很少(如果有的话)的界面活化,其中脂肪酶通常在脂质-水界面的存在下发生构象变化(Longhi和Cambillau(1999) *Biochimica et Biophysica Acta*[生物化学与生物物理学学报]1441:185-96)。脂肪分解酶的活性片段是脂肪分解酶的保留降解脂质的能力的部分。活性片段保留催化三联体。如本文所用,脂肪分解活性可以根据本领域已知的任何程序(参见,例如,Gupta等人, *Biotechnol. Appl. Biochem.*[生物技术应用与生物化学],37:63-71,2003;美国专利号5,990,069;以及国际专利公开号W0 96/18729A1)来确定。

[0029] 在一些实施例中,本公开的脂肪分解酶是 $\alpha/\beta$ 水解酶。在一些实施例中,本公开的脂肪分解酶是脂肪酶。在一些实施例中,本公开的脂肪分解酶是角质酶。在一些实施例中,本公开的脂肪分解酶是酯酶。

[0030] 在一些实施例中,本公开的脂肪分解酶是 $\alpha/\beta$ 水解酶。在一些实施例中,本公开的脂肪分解酶是脂肪酶。在一些实施例中,本公开的脂肪分解酶是角质酶。在一些实施例中,本公开的脂肪分解酶是酯酶。

[0031] 如本文所用,“羧酸酯水解酶”(E.C.3.1.1)是指作用于羧酸酯的酶。

[0032] 如本文所用,“脂肪酶(lipase、lipase enzyme)”、“脂肪分解酶”、“脂肪分解多

肽”、或“脂肪分解蛋白质”是指展现出降解脂质的能力(例如降解甘油三酯或磷脂的能力)的酶、多肽、或蛋白质。脂肪分解酶可以是例如,脂肪酶、磷脂酶、酯酶、聚酯酶、或角质酶。如本文所用,脂肪分解活性可以根据本领域已知的任何程序(参见,例如,Gupta等人,Biotechnol. Appl. Biochem. [生物技术应用与生物化学], 37:63-71, 2003; 美国专利号5, 990, 069; 以及国际专利公开号WO 96/18729A1)来确定。在一个实施例中,脂肪分解活性可以如实例2所提供在4-硝基苯基丁酸酯(pNB)上确定。

[0033] 如本文所用,“角质酶”是指能够水解角质底物的脂肪分解酶。

[0034] 角质酶包括衍生自各种真菌和细菌来源的那些。角质酶包括描述于以下的那些:P.E.Kolattukudy,“Lipases[脂肪酶]”,B Borgstrom和H.L.Brockman编辑,Elsevier[爱思唯尔出版社]1984,471-504;S.Longhi等人,J.of Molecular Biology[分子生物学杂志], 268(4), 779-799(1997); 美国专利号5,827,719;WO 94/14963;WO 94/14964;WO 00/05389;Appl. Environm. Microbiol[应用与环境微生物学]64, 2794-2799, 1998;Proteins: Structure, Function and Genetics[蛋白质:结构、功能以及遗传学]26, 442-458, 1996;J.of Computational Chemistry[计算化学杂志]17, 1783-1803, 1996;Protein Engineering[蛋白质工程]6, 157-165, 1993。角质酶可以是天然存在的角质酶或遗传修饰的角质酶,该遗传修饰的角质酶通过UV辐照、N-甲基-N'-亚硝基胍(NTG)处理、甲磺酸乙酯(EMS)处理、亚硝酸处理、吡啶处理等、由基因工程程序(例如细胞融合和基因重组等)诱导的重组菌株获得。

[0035] 如本文所用,术语“聚酯酶”或“PET酶”是指具有显著的催化聚酯的水解和/或表面修饰的能力的酶。合适的聚酯酶可以从动物、植物、真菌和细菌来源中分离。除了从野生菌株中分离之外,前述微生物还可以分离自任一突变体菌株、重组菌株,这些突变体菌株通过UV辐照、N-甲基-N'-亚硝基胍(NTG)处理、甲磺酸乙酯(EMS)处理、亚硝酸处理、吡啶处理等获得,这些重组菌株通过基因工程程序(例如细胞融合和基因重组等)诱导。聚酯酶可以催化选自以下组成的组的聚酯的水解和/或表面修饰:聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)、聚对苯二甲酸丙二酯(PTT)、聚对苯二甲酸丁二酯(PBT)、聚对苯二甲酸异山梨醇乙二醇酯(PEIT)、聚乳酸(PLA)、聚羟基烷酸酯(PHA)、聚丁二酸丁二酯(PBS)、聚丁二酸己二酸丁二酯(PBSA)、聚己二酸对苯二甲酸丁二酯(PBAT)、聚乙烯呋喃酸酯(PEF)、聚己内酯(PCL)、聚萘二甲酸乙二醇酯(PEN)、聚酯型聚氨酯、聚(己二酸乙二醇酯)(PEA)、及其组合。

[0036] 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,以及加权的结束空位。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。

[0037] 如本文所用,“同源蛋白质”、“同源物”或“同源蛋白质”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,蛋白质同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同源性,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。

[0038] 百分比(%)氨基酸序列同一性值由匹配相同残基的数值除以“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。

[0039] 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。

[0040] 在一些实施例中,变体脂肪酶包括衍生自2FX5\_A的那些,以及衍生自在W088/09367,美国专利号5,512,203,5,389,536,美国专利公开号US2003199068,欧洲专利公开号EP1543117,和W0 03/076580中公开的脂肪酶的那些。



S205G-F207T-V210I-S212D-F226L-A236P-Y239I-L249P-S252I-E254Q-R256K-L258F-V14S-R40A-G59Y-G61D-T64V-S70E-T117L-Q161H-T177R-I178L-F180P-Y182A-R190L-S205G-F207T-V210I-S212D-F226L-A236P-Y239I-L249P-S252I-E254Q-R256K-L258F、R40T-G61D-T64V-S70E-T117L-Q161H-T177R-I178L-F180P-Y182A-R190L-S205G-F207T-V210I-S212D-F226L-A236P-Y239I-L249P-S252I-E254Q-R256K-L258F、和V14S-R40A-G59Y-G61D-T64V-A66D-S70E-T117L-Q161H-G175A-T177R-I178L-F180P-Y182A-R190L-S205G-F207T-V210I-S212D-F226L-A236P-Y239I-L249P-S252I-E254Q-R256K-L258F,其中这些位置通过参考SEQ ID NO:2的氨基酸序列进行编号。

[0045] 在一些实施例中,本文所提供的变体脂肪分解酶对选自以下组成的组的至少一种聚酯具有酯酶活性(例如催化水解和/或表面修饰的能力):聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)、聚对苯二甲酸丙二酯(PTT)、聚对苯二甲酸丁二醇酯(PBT)、聚对苯二甲酸异山梨醇乙二醇酯(PEIT)、聚乳酸(PLA)、聚羟基烷酸酯(PHA)、聚丁二酸丁二醇酯(PBS)、聚丁二酸己二酸丁二醇酯(PBSA)、聚己二酸对苯二甲酸丁二醇酯(PBAT)、聚乙烯呋喃酸酯(PEF)、聚己内酯(PCL)、聚萘二甲酸乙二醇酯(PEN)、聚酯型聚氨酯、聚(己二酸乙二醇酯)(PEA)、及其组合。在一个实施例中,本文所提供的变体脂肪分解酶具有对PET的酯酶活性。

[0046] 本文描述了一种或多种分离的、非天然存在的或重组的多核苷酸,该多核苷酸包含编码本文所述的一种或多种变体脂肪分解酶、或重组多肽或其活性片段的核酸序列。本文所述的一种或多种核酸序列可用于本文所述的一种或多种变体脂肪分解酶的重组生产(例如表达)中,典型地通过表达包含编码本文所述的一种或多种变体脂肪分解酶或其片段的序列的质粒表达载体。一个实施例提供了编码本文所述的一种或多种变体脂肪分解酶的核酸,其中该变体是具有脂肪分解活性的成熟形式。在一些实施例中,用同源前肽序列重组表达本文所述的一种或多种变体脂肪分解酶。在其他实施例中,用异源前肽序列重组表达本文所述的一种或多种变体脂肪分解酶。

[0047] 本文所述的一种或多种核酸序列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,本文所述的一种或多种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)以基本上形成任何需要的连续核酸序列。还可以通过本领域已知的任何合适的方法来促进本文所述的一种或多种多核苷酸的合成,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)),或如典型地在自动合成方法中所实践的在Matthes等人,EMBO J.[欧洲分子生物学学会杂志]3:801-805(1984)中描述的方法。本文所述的一种或多种多核苷酸也可以通过使用自动DNA合成仪产生。可以从各种商业来源(例如,ATUM(DNA 2.0),美国加利福尼亚州纽瓦克(Newark,CA,USA);生命技术公司(Life Tech)(GeneArt),美国加利福尼亚州卡尔斯巴德(Carlsbad,CA,USA);金斯瑞公司(GenScript),加拿大安大略省(Ontario,Canada);Base Clear公司(Base Clear B.V.),荷兰莱顿市(Leiden,Netherlands);集成DNA技术公司(Integrated DNA Technologies),美国伊利诺伊州斯科基(Skokie,IL,USA);银杏生物工作室(Ginkgo Bioworks)(Gen9),美国马萨诸塞州波士顿(Boston,MA,USA);以及特威斯特生物科学公司(Twist Bioscience),美国加利福尼亚州旧金山(San Francisco,CA,USA))订购定制核酸。

用于合成核酸的其他技术和相关原理由例如, 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) 描述。

[0048] 用于修饰核酸的重组DNA技术是本领域熟知的, 例如像限制性内切酶消化、连接、逆转录和cDNA产生、以及聚合酶链式反应(例如PCR)。本文所述的一种或多种多核苷酸还可以通过使用一个或多个寡核苷酸探针来筛选cDNA文库而获得, 这些探针可以与编码本文所述的一种或多种变体脂肪分解酶、或重组多肽或其活性片段的多核苷酸杂交或对其进行PCR扩增。用于筛选并分离cDNA克隆的程序以及PCR扩增程序是本领域技术人员熟知的并且描述于本领域技术人员已知的标准参考文献中。本文所述的一种或多种多核苷酸可以通过例如已知的诱变程序(例如, 定点诱变、位点饱和诱变和体外重组)改变天然存在的多核苷酸主链(例如, 编码本文所述的一种或多种变体脂肪分解酶或参考脂肪分解酶的多核苷酸主链)来获得。适合于产生编码本文所述的一种或多种变体脂肪分解酶的本文所述的经修饰的多核苷酸的多种方法是本领域已知的, 这些方法包括但不限于例如位点饱和诱变、扫描诱变、插入诱变、缺失诱变、随机诱变、定点诱变和定向进化、以及各种其他的重组方法。

[0049] 另外的实施例涉及一种或多种载体, 其包含本文所述的一种或多种变体脂肪分解酶(例如, 编码本文所述的一种或多种变体脂肪分解酶的多核苷酸); 表达载体或表达盒, 这些表达载体或表达盒包含本文所述的一种或多种核酸或多核苷酸序列; 分离的、基本上纯的、或重组的DNA构建体, 这些构建体包含本文所述的一种或多种核酸或多核苷酸序列; 分离的或重组的细胞, 这些细胞包含本文所述的一种或多种多核苷酸序列; 以及组合物, 这些组合物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。

[0050] 一些实施例涉及一种或多种重组细胞, 该重组细胞包含本文所述的一种或多种载体(例如表达载体或DNA构建体), 该载体包含本文所述的一种或多种核酸或多核苷酸序列。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(*Bacillus*)物种细胞, 如枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)细胞。其他实施例涉及包含本文所述的一种或多种变体脂肪分解酶的重组细胞(例如, 重组宿主细胞)。

[0051] 在一些实施例中, 本文所述的一种或多种载体是表达载体或表达盒, 该表达载体或表达盒包含可操作地连接到有效的基因表达所需的一种或多种另外的核酸区段(例如, 可操作地连接到本文所述的一种或多种多核苷酸序列的启动子)上的本文所述的一种或多种多核苷酸序列。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(例如抗生素抗性基因)。

[0052] 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); 对于枯草芽孢杆菌适合的复制质粒包括第92页列出的那些)。(还参见, Perego, "Integrational Vectors for Genetic Manipulations in *Bacillus subtilis* [在枯草芽孢杆菌中用于遗传操作的整合载体]"; 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], Washington, D.C. [华盛顿哥伦比亚特区] (1993), 第615-624页; 和p2JM103BBI)。

[0053] 为了在细胞中表达和生产目的蛋白(例如, 本文所述的一种或多种变体脂肪分解酶), 包含编码本文所述的一种或多种变体脂肪分解酶的多核苷酸的一种或多种拷贝(并且在一些情况下包含多个拷贝)的一种或多种表达载体在适合于变体表达的条件下被转化到细胞中。在一些实施例中, 将编码本文所述的一种或多种变体脂肪分解酶的多核苷酸序列(以及包含在载体中的其他序列)整合到宿主细胞的基因组中; 然而在其他实施例中, 包含编码本文所述的一种或多种变体脂肪分解酶的多核苷酸序列的质粒载体在该细胞内保持为自主的染色体外元件。一些实施例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生产本文所述的一种或多种变体脂肪分解酶。在一些实施例中, 编码本文所述的一种或多种变体脂肪分解酶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该变体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, 编码本文所述的一种或多种变体脂肪分解酶的多核苷酸的转录通过如下启动子来实现, 该启动子是亲本酶的野生型启动子。在一些其他实施例中, 启动子对于本文所述的一种或多种变体脂肪分解酶是异源的, 但在宿主细胞中是功能性的。用于细菌宿主细胞的示例性启动子包括但不限于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; 以及地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)  $\alpha$ -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 $\lambda$ PR或PL启动子以及大肠杆菌(*E. coli*) lac、trp或tac启动子。

[0054] 本文所述的一种或多种变体脂肪分解酶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, 本文所述的一种或多种变体脂肪分解酶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(*Streptomyces*)物种、埃希氏菌属(*Escherichia*)物种、曲霉属(*Aspergillus*)物种、木霉属(*Trichoderma*)物种、假单胞菌属(*Pseudomonas*)物种、棒状杆菌属(*Corynebacterium*)物种、酵母属(*Saccharomyces*)物种或毕赤酵母属(*Pichia*)物种。在一些实施例中, 本文所述的一种或多种变体脂肪分解酶由芽孢杆菌属物种宿主细胞产生。可用于本文所述的一种或多种变体脂肪分解酶的生产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、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体。在一些实施例中, 枯草芽孢杆菌宿主细胞用于生产本文所述的变体。USPN 5,264,366和4,760,025 (RE 34,606)描述了可以用于生产本文所述的一种或多种变体脂肪分解酶的各种芽孢杆菌属宿主菌株, 但是可以使用其他合适的菌株。

[0055] 可以用于生产本文所述的一种或多种变体脂肪分解酶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,其中编码本文所述的一种或多种变体脂肪分解酶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);另请参见,US 4,450,235;US 4,302,544;和EP 0134048)。枯草芽孢杆菌作为表达宿主细胞的用途是本领域众所周知的(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))。

[0056] 在一些实施例中,芽孢杆菌属宿主细胞是包括至少一个以下基因中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本文所述的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,可以用于生产本文所述的一种或多种变体脂肪分解酶的经改变的芽孢杆菌属宿主细胞菌株是已经包含上述基因中的一个或多个中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/或一个或多个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,US2005/0202535)。

[0057] 使用本领域已知的任何合适的方法用编码本文所述的一种或多种变体脂肪分解酶的一种或多种核酸序列转化宿主细胞。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。

[0058] 将本文所述的一种或多种核酸序列引入芽孢杆菌属细胞的示例性方法描述于,例如,Ferrari等人,“Genetics[遗传学]”,在Hardwood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.* [福里亚微生物学], 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.* [微生物学档案], 139:213-217 (1981); 以及 McDonald, *J. Gen. Microbiol.* [遗传微生物学杂志] 130:203 (1984)。实际上, 如转化等方法 (包括原生质体转化和转染、转导和原生质体融合) 是熟知的并且适用于本文。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等方法, 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); 和 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。

[0059] 除了通常使用的方法之外, 在一些实施例中, 用包含编码本文所述的一种或多种变体脂肪分解酶的核酸的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, 不使用中间细胞进行扩增或以其他方式处理DNA构建体或载体)。将本文所述的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中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和脂质体。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性标记 (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))。

[0060] 在一些实施例中, 将转化的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。一些实施例提供了培养物 (例如, 细胞培养物), 其包含本文所述的一种或多种变体脂肪分解酶或核酸序列。

[0061] 在一些实施例中, 将用编码本文所述的一种或多种变体脂肪分解酶的一种或多种多核苷酸序列转化的宿主细胞在允许该变体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变体。在一些实施例中, 通过常规程序从培养基中回收由细胞生产的变体, 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和色谱纯化 (例如离子交换、凝胶过滤、亲和等)。

[0062] 在一些实施例中, 由重组宿主细胞产生的一种或多种变体脂肪分解酶被分泌到培养基中。编码纯化促进结构域的核酸序列可以用于促进该变体的纯化。包含编码本文所述的一种或多种变体脂肪分解酶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变体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FLAG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质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。

[0063] 可以使用各种方法来确定宿主细胞中本文所述的一种或多种成熟变体脂肪分解酶的生产水平。这样的方法包括但不限于例如使用对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))。在另一个实施例中,可以使用的方法包括实例2和3中提供的测定。

[0064] 一些其他的实施例提供了用于制备或生产本文所述的一种或多种成熟变体脂肪分解酶的方法。成熟变体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))中制备或生产本文所述的一种或多种变体脂肪分解酶。其他实施例提供了生产本文所述的一种或多种变体的方法, 其中该方法包括在有利于生产该变体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文所述的一种或多种变体脂肪分解酶的核酸序列。一些这样的方法进一步包括从培养物中回收该变体。

[0065] 另外的实施例提供了生产本文所述的一种或多种变体脂肪分解酶的方法, 其中这些方法包括: (a) 将包含编码该变体的核酸的重组表达载体引入细胞群(例如, 细菌细胞, 如枯草芽孢杆菌细胞)中; 和 (b) 在有利于生产由该表达载体编码的变体的条件下在培养基中培养细胞。一些这样的方法进一步包括: (c) 从细胞或从培养基中分离该变体。

[0066] 组合物

[0067] 本文提供的变体脂肪分解酶可用于生产各种组合物, 例如酶组合物和清洁或洗涤剂组合物。因此, 在一个实施例中, 本公开提供了包含本公开的变体脂肪分解酶的酶组合物、以及清洁或洗涤剂组合物, 这些清洁或洗涤剂组合物包含本文提供的变体脂肪分解酶或含有这样的变体脂肪分解酶的酶组合物。

[0068] 如本文所用, “酶组合物”是指包含本文提供的变体脂肪分解多肽中的至少一种的任何酶产物、制剂或组合物。这样的酶组合物可以是含有一种或多种变体脂肪分解酶、或者一种或多种变体脂肪分解酶和一种或多种另外的酶的用过的培养基或滤液。用过的培养基意指包含产生的酶的宿主的培养基。优选地, 在生产后将宿主细胞与培养基分离。酶组合物可以是任选地将一种或多种生产宿主或一种或多种微生物灭活后不进行任何生物物质分离、下游处理或对一种或多种所需变体脂肪分解酶的纯化的“全培养液”组合物, 因为变体多肽可以被分泌到培养基中, 并且它们在用过的培养基的环境条件下表现出活性。

[0069] 酶组合物可以含有呈至少部分纯化和分离的形式的变体脂肪分解酶。它甚至可以基本上由所需的一种或多种酶组成。如果需要, 可以对酶组合物进行干燥、喷雾干燥或冻干、造粒或者可以以其他方式将酶活性浓缩和/或稳定化用于储存。如果需要, 可以根据常规方法(例如过滤、萃取、沉淀、色谱、亲和色谱、电泳等)结晶或分离或纯化所需的酶。

[0070] 酶颗粒可以例如通过以下方式制备: 旋转雾化、湿法造粒、干法造粒、喷雾干燥、圆盘造粒、挤出、锅涂层法、滚圆、转鼓造粒、流化床结块、高剪切造粒、流化床喷涂、结晶、沉淀、乳液胶凝、旋转盘式雾化和其他浇铸方法以及球形化工艺。颗粒的核可以是颗粒本身或者是分层颗粒的内核。

[0071] 在一些实施例中, 酶组合物包含如本文所提供的变体脂肪分解酶与选自由以下组

成的组的一种或多种另外的酶的组合: 酰基转移酶、 $\alpha$ -淀粉酶、 $\beta$ -淀粉酶、 $\alpha$ -半乳糖苷酶、阿拉伯糖苷酶、芳基酯酶、 $\beta$ -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- $\beta$ -1,4-葡聚糖酶、内切- $\beta$ -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、 $\beta$ -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。通常,至少一个酶涂层包含至少一种变体脂肪分解酶。

[0072] 酶组合物可以呈任何合适的形式。例如,酶组合物可以呈液体组合物或固体组合物的形式,例如溶液、分散体、糊剂、粉剂、颗粒、颗粒剂、包衣颗粒剂、片剂、饼、晶体、晶体浆料、凝胶或球剂。

[0073] 酶组合物可用于清洁剂或促进剂中,该清洁剂或促进剂在洗涤过程中或洗涤之前在洗涤剂之外添加并且例如呈液体、凝胶、粉剂、颗粒或片剂的形式。也可以将酶组合物和洗涤剂组分浸泡在纺织品等载剂中。

[0074] 本公开进一步提供了清洁或洗涤剂组合物,其包含如本文所提供的变体脂肪分解酶。清洁或洗涤剂组合物通常包含如本文所提供的变体脂肪分解酶以及一种或多种另外的洗涤剂组分,例如表面活性剂。

[0075] 本公开进一步包括洗涤剂或清洁组合物。如本文所用,关于旨在用于在清洁或处理污染的物体或脏的物体(包括特定纺织品或非纺织品物体或物品)的洗涤介质(例如,洗涤液)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。实际上,在一些实施例中,本发明的洗涤剂包含如本文所提供的至少一种变体脂肪分解酶,另外还包含一种或多种表面活性剂、一种或多种转移酶、另外的水解酶、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,诸如但不限于清洁组合物或洗涤剂组合物,不含任何磷酸盐(例如,磷酸盐或磷酸盐助洗剂)。

[0076] 可在本文所提供的方法中使用的具有变体脂肪分解酶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0.1至5000mg/L、或0.1至2000mg/L、或0.1至1300mg/L、或1至5000mg/L、或1至1300mg/L、或1至500mg/L、或10至5000mg/L、或10至1300mg/L、或10至500mg/L的变体脂肪分解酶。在另一个实施例中,组合物可以含有变体脂肪分解酶,该变体脂肪分解酶的量可为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/升洗涤液,或该量为至少0.01ppm活性脂肪酶。

[0077] 在一个实施例中,组合物包含如本文所提供的变体脂肪分解酶以及至少一个另外

的洗涤剂组分,以及任选地一种或多种另外的酶。

[0078] 在一些实施例中,本发明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、碱度源、增溶剂、载剂、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,其全部通过引用并入本文)。

[0079] 本公开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、餐具洗涤应用、以及装饰品应用(诸如假牙、牙齿、头发和皮肤清洁)。另外,在一些实施例中,本发明的变体脂肪分解酶理想地适合于衣物洗涤应用。此外,本公开的变体可用于颗粒和液体组合物。

[0080] 酶组分重量是基于总的活性蛋白。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,其等于mg活性蛋白/kg洗涤剂组合物。

[0081] 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。

[0082] 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、月桂醇聚醚硫酸酯钠(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)、 $\alpha$ -烯烴磺酸盐(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)、 $\alpha$ -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W092/06154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。

[0083] 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。

[0084] 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、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。

[0085] 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(诸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,诸如苯六甲酸、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。

[0086] 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),诸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以用于本文所述的组合物中,包括本领域已知的那些助洗剂。

[0087] 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、碱度源、增溶剂、载剂、加工助剂、颜料、pH控制剂及其组合。(参见例如US6610642、US6605458、US5705464、US5710115、US5698504、US5695679、US5686014、和US5646101)。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(用于处理待清洁的底物),或者以便改良清洁组合物的美观性(例如用香料、着色剂、染料等的情况)。任何这样的辅助成分是除了本文所提供的变体酶之外的。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。

[0088] 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,该酶稳定剂是钙和/或镁离子的水溶性来源。在一些实施例中,这些酶稳定剂包括寡糖、多糖、和无机二价金属盐(包括碱土金属盐,诸如钙盐)。在一些实施例中,本文使用的酶通过存在为这些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)、铈(II)、铁(II)、锰(II)、铝(III)、锡(II)、钴(II)、铜(II)、镍(II)、和氧钒(IV))来稳定。氯化物和硫酸盐也可以用于一些实施例中。示例性寡糖和多糖(例如,糊精)描述于例如W007145964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蛋白酶抑制剂,这些可逆蛋白酶抑制剂选

自含硼化合物(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W09641859中)、肽醛(例如像描述于W0 2009118375和W0 2013004636中)、及其组合。

[0089] 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,洗涤水的pH为从约3.0至约11。液体产品配制品典型地被配制成净pH为从约5.0至约9.0、更优选地从约7.5至约9。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控制在推荐使用水平下的技术包括使用缓冲液、碱、酸等,并且是本领域的技术人员熟知的。

[0090] 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(诸如氢氧化钠、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,组合物是固体。

[0091] 在一个实施例中,清洁组合物包括具有pH为从7.4至pH 11.5、或pH 7.4至pH 11.0、或pH 7.5至pH 11.5、或pH 7.5至pH 11.0、或pH 7.5至pH 10.5、或pH 7.5至pH 10.0、或pH 7.5至pH 9.5、或pH 7.5至pH 9.0、或pH 7.5至pH 8.5、或pH 7.5至pH 8.0、或pH 7.6至pH 11.5、或pH 7.6至pH 11.0、或pH 7.6至pH 10.5、或pH 8.7至pH 10.0、或pH 8.0至pH 11.5、或pH 8.0至pH 11.0、或pH 8.0至pH 10.5、或pH 8.0至pH 10.0的那些清洁组合物。

[0092] 全世界典型的洗涤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)。

[0093] 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下使用。在一些实施例中,本文所述的洗涤剂组合物在“冷水洗涤”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下使用。

[0094] 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Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>的颗粒数来描述水硬度。硬度是水中钙(Ca<sup>2+</sup>)和镁(Mg<sup>2+</sup>)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数除以17.1等于颗粒/加仑)的硬度矿物质。

[0095] 表I. 水硬度水平

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

[0097] 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Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>(例如,约15颗粒/加仑混合的Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>)。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 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 。

[0098] 在其他实施例中,本文所述的组合物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、 $\alpha$ -淀粉酶、 $\beta$ -淀粉酶、 $\alpha$ -半乳糖苷酶、阿拉伯糖苷酶、芳基酯酶、 $\beta$ -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、DNA酶、内切- $\beta$ -1,4-葡聚糖酶、内切- $\beta$ -甘露聚糖酶、酯酶、外切-甘露聚糖酶、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、 $\beta$ -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”),该组合与本文所提供的组合物中的一种或多种变体脂肪分解酶结合。

[0099] 在一些实施例中,本文所提供的组合物包含与蛋白酶组合的变体脂肪分解酶。用于在本公开的组合物中与变体脂肪分解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。在另一个实施例中,另外的蛋白酶是金属蛋白酶、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。在另一个实施例中,蛋白酶是枯草杆菌蛋白酶样蛋白酶或胰蛋白酶样蛋白酶。在其他实施例中,另外的蛋白酶不含有与变体交叉反应的表位,如通过抗体结合或本领域可用的其他测定测量的。示例性枯草杆菌蛋白酶包括衍生自例如芽孢杆菌属(例如,BPN'、嘉士伯(Carlsberg)、枯草杆菌蛋白酶309、枯草杆菌蛋白酶147、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W092/21760、W095/23221、W02008/010925、W009/149200、W009/149144、W009/149145、WO 10/056640、W010/056653、W02010/0566356、W011/072099、W02011/13022、W011/140364、WO 12/151534、W02015/038792、W02015/089447、W02015/089441、W02017/215925、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、国际公开WO 2016001449、WO 2016087617、WO 2016096714、WO 2016203064、WO 2017089093、和WO 2019180111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W089/06270中的镰孢菌属(*Fusarium*)蛋白酶。示例性商业蛋白酶包括但不限于MAXATASE<sup>®</sup>、MAXACAL<sup>™</sup>、MAXAPEM<sup>™</sup>、OPTICLEAN<sup>®</sup>、

OPTIMASE<sup>®</sup>、PROPERASE<sup>®</sup>、PURAFECT<sup>®</sup>、PURAFECT<sup>®</sup> OXP、PURAMAX<sup>™</sup>、EXCELLASE<sup>™</sup>、PREFERENZ<sup>™</sup>蛋白酶(例如P100、P110、P280)、EFFECTENZ<sup>™</sup>蛋白酶(例如P1000、P1050、P2000)、EXCELLENZ<sup>™</sup>蛋白酶(例如P1000)、ULTIMASE<sup>®</sup>、和PURAFAST<sup>™</sup>(杜邦公司(DuPont));

ALCALASE<sup>®</sup>、BLAZE<sup>®</sup>、BLAZE<sup>®</sup>变体、

BLAZE<sup>®</sup> EVITY<sup>®</sup>、BLAZE<sup>®</sup> EVITY<sup>®</sup> 16L、CORONASE<sup>®</sup>、

SAVINASE<sup>®</sup>、SAVINASE<sup>®</sup> ULTRA、SAVINASE<sup>®</sup> EVITY<sup>®</sup>、

SAVINASE<sup>®</sup> EVERIS<sup>®</sup>、PRIMASE<sup>®</sup>、DURAZYM<sup>™</sup>、POLARZYME<sup>®</sup>、

OVOZYME<sup>®</sup>、KANNASE<sup>®</sup>、LIQUANASE<sup>®</sup>、LIQUANASE EVERIS<sup>®</sup>、

[0100] NEUTRASE<sup>®</sup>、PROGRESSUNO<sup>®</sup>、RELEASE<sup>®</sup>、和ESPERASE<sup>®</sup>(诺维信公司(Novozymes)); BLAP<sup>™</sup>和BLAP<sup>™</sup>变体(汉高公司(Henkel)); LAVERGY<sup>™</sup>PRO 104L、LAVERGY<sup>™</sup>PRO 106LS、LAVERGY<sup>™</sup>PRO114LS(巴斯夫公司(BASF))、KAP(嗜碱芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶(花王公司(Kao)))和BIOTOUCH<sup>®</sup>(AB酶制剂公司(AB Enzymes))。

[0101] 在一些实施例中,本文所提供的组合物包含与一种或多种淀粉酶组合的变体脂肪分解酶。在一个实施例中,组合物包含按组合物重量计从约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, $\alpha$ 淀粉酶和/或 $\beta$ 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淀粉酶,例如像描述于以下中的淀粉酶:GB 1,296,839、W09100353、W09402597、W094183314、W09510603、W09526397、W09535382、W09605295、W09623873、W09623874、W0 9630481、W09710342、W09741213、W09743424、W09813481、W0 9826078、W09902702、W0 9909183、W09919467、W09923211、W09929876、W09942567、W0 9943793、W09943794、W0 9946399、W00029560、W00060058、W00060059、W00060060、W0 0114532、W00134784、W0 0164852、W00166712、W00188107、W00196537、W002092797、W0 0210355、W00231124、W0 2004055178、W0 2004113551、W0 2005001064、W0 2005003311、W0 2005018336、W0 2005019443、W0 2005066338、W0 2006002643、W0 2006012899、W0 2006012902、W0 2006031554、W0 2006063594、W0 2006066594、W0 2006066596、W0 2006136161、W0 2008000825、W0 2008088493、W0 2008092919、W0 2008101894、W02008/112459、W0 2009061380、W0 2009061381、W0 2009100102、W0 2009140504、W0 2009149419、W0 2010/059413、W0 2010088447、W0 2010091221、W0 2010104675、W0 2010115021、W010115028、W0 2010117511、W0 2011076123、W0 2011076897、W0 2011080352、W0 2011080353、W0 2011080354、W0 2011082425、W0 2011082429、W0 2011087836、W0 2011098531、W0 2013063460、W0 2013184577、W0 2014099523、W0 2014164777、和W0 2015077126。示例性商业淀粉酶包括但不限于

AMPLIFY<sup>®</sup>、DURAMYL<sup>®</sup>、TERMAMYL<sup>®</sup>、FUNGAMYL<sup>®</sup>、

STAINZYME<sup>®</sup>、STAINZYME PLUS<sup>®</sup>、STAINZYME PLUS<sup>®</sup>、STAINZYME

ULTRA<sup>®</sup> EVITY<sup>®</sup>、和BAN<sup>™</sup>(诺维信公司); EFFECTENZ<sup>™</sup>S1000、POWERASE<sup>™</sup>、

PREFERENZ<sup>TM</sup>S100、PREFERENZ<sup>TM</sup>S110、EXCELLENZ<sup>TM</sup>S2000、RAPIDASE<sup>®</sup>和MAXAMYL<sup>®</sup>P (杜邦公司)。

[0102] 在一些实施例中,本文所提供的组合物包含与一种或多种另外的脂肪酶组合的变体脂肪分解酶。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WO2015/010009)、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 solani pisi*) (参见WO90/09446)的角质酶。示例性商业脂肪酶包括但不限于M1 LIPASE<sup>TM</sup>、LUMAFAS<sup>TM</sup>和LIPOMAX<sup>TM</sup> (杜邦公司); LIPEX<sup>®</sup>、LIPOCLEAN<sup>®</sup>、LIPOLASE<sup>®</sup>和LIPOLASE<sup>®</sup> ULTRA (诺维信公司);以及LIPASE P<sup>TM</sup> (天野药业有限公司(Amano Pharmaceutical Co.Ltd))。

[0103] 在一些实施例中,本文所提供的组合物包含与一种或多种甘露聚糖酶组合的变体脂肪分解酶。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;USPN 6,566,114;6,602,842;和6,440,991;以及美国临时申请号62/251516、62/278383和62/278387。示例性商业甘露聚糖酶包括但不限于MANNAWAY<sup>®</sup> (诺维信公司)和EFFECTENZ<sup>TM</sup> 1000、EFFECTENZ<sup>TM</sup> 2000、PREFERENZ<sup>®</sup> M 100、MANNASTAR<sup>®</sup>、和PURABRITE<sup>TM</sup> (杜邦公司)。

[0104] 在一些实施例中,本文所提供的组合物和方法包含与核酸酶(如DNA酶或RNA酶)组合的变体脂肪分解酶。示例性核酸酶包括但不限于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、和WO 2018206553中描述的那些核酸酶。可以在本文所提供的组合物和方法中与变体脂肪分解酶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。

[0105] 又仍另外的实施例涉及包含本文所述的一种或多种变体脂肪分解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<sup>®</sup>、CELLUZYME<sup>®</sup>、CAREZYME<sup>®</sup>、ENDOLASE<sup>®</sup>、RENOZYME<sup>®</sup>、和CAREZYME<sup>®</sup> PREMIUM(诺维信公司);REVITALENZ<sup>™</sup>100、REVITALENZ<sup>™</sup>200/220、和REVITALENZ<sup>®</sup> 2000(杜邦公司);和KAC-500(B)<sup>™</sup>(花王公司(Kao Corporation))。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)。

[0106] 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。

[0107] 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(诸如聚对苯二甲酸)、粘土(诸如高岭土)、蒙脱石、绿坡缕石、伊利石、膨润土、多水高岭土、及其混合物。

[0108] 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。

[0109] 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、和聚乙烯咪唑、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。

[0110] 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。在一些

这样的实施例中,可使用硅酸钠(例如,二硅酸钠、偏硅酸钠、和结晶层状硅酸盐)。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。

[0111] 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,其中多元酸包含被不超过两个碳原子彼此分开的至少两个羧基基团。

[0112] 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,无机过氧化氢合物盐作为结晶固体包含在内而没有另外保护,但是在一些其他实施例中,该盐被包衣。合适的盐包括例如EP2100949中描述的那些盐。漂白活化剂典型地是有机过酸前体,其在清洁过程中在60°C及以下的温度下增强漂白作用。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)的脂肪族过氧羧酸和/或任选取代的过氧苯甲酸的化合物。漂白催化剂典型地包括例如锰三氮杂环壬烷和相关络合物,以及钴、铜、锰和铁络合物,以及US4246612、US5227084、US4810410、W09906521和EP2100949中描述的那些。

[0113] 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,US4430243)。在一些实施例中,本文所述的衣物洗涤剂组合物通过锰化合物来催化。这样的化合物和使用水平是本领域熟知的(参见例如US5576282)。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US5597936和US 5595967),并且通过已知的程序容易地制备。

[0114] 如本文所用的聚酯包括在其主链聚合物中含有至少一个酯重复单元的聚合物。在最简单的形式中,聚酯是通过乙二醇(二醇)与二羧酸(二酸)或其二酯的缩聚反应产生的。聚酯包括天然存在的化学物质,例如植物角质层的角质中的化学物质,以及通过逐步生长聚合(step-growth polymerization)的合成物质,例如聚丁酸酯。

[0115] 可与本文所提供的变体脂肪酶接触的聚酯(例如在本文所提供的方法中),或包含这样的变体脂肪酶的组合物包括任何含酯键的聚合物。这样的聚酯包括脂肪族和芳香族聚酯。脂肪族聚酯包括:聚羟基烷酸酯(PHA),其可以分为聚羟基丁酸酯(PHB)、聚羟基戊酸酯(PHV)、聚羟基己酸酯(PHH)、及其共聚物;聚乳酸(PLA);聚( $\epsilon$ -己内酯)(PCL);聚丁二酸丁二醇酯(PBS)及其衍生物聚(丁二酸己二酸丁二醇酯)(PBSA)。芳香族聚酯包括:经修饰的聚(对苯二甲酸乙二醇酯)(PET),例如聚(己二酸对苯二甲酸丁二醇酯)(PBAT)和聚(己二酸四亚甲基-共对苯二甲酸酯)(PTMAT);以及脂肪族-芳香族共聚酯(AAC)。在一些实施例中,聚酯可以是部分或基本上可生物降解的。在其他实施例中,聚酯对于微生物和酶攻击可以部

分或基本上有抗性的。

[0116] 在一些实施例中,聚酯可以是脂肪族聚酯。在一些实施例中,聚酯可以是芳香族聚酯。在一些实施例中,芳香族聚酯可以是聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)。在一些实施例中,芳香族聚酯可以是聚对苯二甲酸丙二酯(PTT)。

[0117] 因此,在一个实施例中,可用于本文所提供的方法中的聚酯包括选自自由以下组成的组的那些:聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)、聚对苯二甲酸丙二酯(PTT)、聚对苯二甲酸丁二醇酯(PBT)、聚对苯二甲酸异山梨醇乙二醇酯(PEIT)、聚乳酸(PLA)、聚羟基烷酸酯(PHA)、聚丁二酸丁二醇酯(PBS)、聚丁二酸己二酸丁二醇酯(PBSA)、聚己二酸对苯二甲酸丁二醇酯(PBAT)、聚乙烯呋喃酸酯(PEF)、聚己内酯(PCL)、聚萘二甲酸乙二醇酯(PEN)、聚酯型聚氨酯、聚(己二酸乙二醇酯)(PEA)、及其组合。

[0118] 在另一个实施例中,可用于本文所提供的方法中的织物或纺织品包括含有选自自由以下组成的组的至少一种聚酯的织物和纺织品:聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)、聚对苯二甲酸丙二酯(PTT)、聚对苯二甲酸丁二醇酯(PBT)、聚对苯二甲酸异山梨醇乙二醇酯(PEIT)、聚乳酸(PLA)、聚羟基烷酸酯(PHA)、聚丁二酸丁二醇酯(PBS)、聚丁二酸己二酸丁二醇酯(PBSA)、聚己二酸对苯二甲酸丁二醇酯(PBAT)、聚乙烯呋喃酸酯(PEF)、聚己内酯(PCL)、聚萘二甲酸乙二醇酯(PEN)、聚酯型聚氨酯、聚(己二酸乙二醇酯)(PEA)、及其组合。

[0119] 在一些实施例中,本公开提供了用于处理织物或纺织品的方法,这些方法包括使织物或纺织品与如本文所提供的变体脂肪分解酶、或包含这样的变体脂肪分解酶的组合物接触,以及任选地将织物或纺织品进行冲洗。

[0120] 在一些实施例中,本文所提供的方法的接触步骤包括变体脂肪分解酶,该变体脂肪分解酶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/升洗涤液。

[0121] 用于表面修饰的酯酶

[0122] 在一些实施例中,含聚酯(例如PET)纺织品、织物、或薄膜在其表面上可以具有可水解的聚合物端或环。本文所提供的变体脂肪分解酶可用于聚酯(例如PET)纤维的表面修饰的方法中,其可以改善例如后整理牢度(finishing fastness)、可染色性、可润湿性、去球和防止起球等因素。在一些实施例中,在含聚酯(例如PET)的纺织品、纤维或薄膜的表面上突出或形成环的聚合物链可以通过本文的变体脂肪酶水解为羧酸和羟基残基,从而增加表面亲水性。起球是在聚酯(例如PET)织物的表面形成小绒球,导致纺织品出现难看的磨损外观。通常,这些球状物是由织物中的松散纤维或从组织中释放的纤维产生的。

[0123] 因此,在一些实施例中,本公开的变体脂肪分解酶可以在用于聚酯(例如PET)纺织品、织物、和薄膜的后整理牢度、可染色性、可润湿性、去球和防止起球的方法中使用。在其他实施例中,本公开的变体脂肪分解酶可以用于洗涤剂组合物中,以减少纺织品清洁过程中的起球。在一些实施例中,本公开的变体脂肪分解酶具有PET酶活性。

[0124] 在一个实施例中,提供了用于降解聚酯或含聚酯材料的方法,其中这些方法包括使含聚酯材料与如本文所提供的变体脂肪分解酶或包含变体脂肪分解酶的组合物接触。在一些实施例中,含聚酯材料是聚酯纺织品或织物。

[0125] 在另一个实施例中,本公开提供了用于对含聚酯材料进行酶法解聚的方法,其中

该方法包括使含聚酯材料与如本文所提供的变体脂肪分解酶或包含变体脂肪分解酶的组合物接触,以及将聚酯的单体和/或寡聚体回收。在一些实施例中,含聚酯材料是聚酯纺织品或织物。

[0126] 在其他实施例中,本公开的变体脂肪分解酶可以在用于清洁或调理纺织品或织物、改善包含聚酯的纺织品或织物的热生理学性质(例如热或湿度管理或穿着舒适性)、以及增加包含聚酯的纺织品或织物的亲水性的方法中使用。在其他实施例中,本公开的变体脂肪分解酶可用于洗涤剂组合物中,以清洁或调理纺织品或织物、改善包含聚酯的纺织品或织物的热生理学性质(例如热或湿度管理或穿着舒适性)、以及增加包含聚酯的纺织品或织物的亲水性。在一些实施例中,本公开的变体脂肪分解酶具有PET酶活性。

[0127] 在其他实施例中,本公开的变体脂肪分解酶可以在用于减少清洁组合物对包含聚酯的纺织品或织物的起球作用和/或增加其抗灰化作用的方法中使用。在其他实施例中,本公开的变体脂肪分解酶可用于洗涤剂组合物中,以减少洗涤剂组合物对包含聚酯的纺织品或织物的起球作用和/或增加其抗灰化作用。在一些实施例中,本公开的变体脂肪分解酶具有PET酶活性。在一些实施例中,将本公开的变体脂肪分解酶与第二种酶(例如纤维素酶)组合。

[0128] 可以在洗衣机或手动洗涤桶(例如,用于手洗)中使纺织品或织物与变体脂肪分解酶或包含该变体脂肪分解酶的组合物接触。在一个实施例中,在洗涤液中使纺织品或织物与变体脂肪分解酶或包含该变体脂肪分解酶的组合物接触。在另一个实施例中,将含有变体脂肪分解酶的溶液与含聚酯材料一起孵育或流过该含聚酯材料,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液器。

[0129] 在一些实施例中,在具有允许变体脂肪分解酶具有活性的温度条件下使纺织品或制品与变体脂肪分解酶或包含该变体脂肪分解酶的组合物接触。在一些实施例中,本文公开的方法中的温度包括在10°C至60°C之间、在10°C至约45°C之间、在15°C至约55°C之间、在15°C至约50°C之间、在15°C至约45°C之间、在20°C至约60°C之间、在20°C至约50°C之间和在20°C至约45°C之间的那些温度。

[0130] 本文所提供的多肽、组合物和方法可用于需要降解聚酯(例如PET)的广泛应用中,例如包括洗衣机、洗碗机和家用表面上的家居清洁。

[0131] 本发明的组合物和方法的其他方面和实施例将从前述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,由此覆盖在权利要求书的范围内的方法和结构及其等同物。

#### [0132] 实施例

[0133] 实施例1.一种变体脂肪分解酶,其包含与SEQ ID NO:2的全长氨基酸序列具有至少70%同一性的氨基酸序列,所述变体脂肪分解酶包含取代T064V-T117L-T177N/R-I178L-F180P-Y182A-R190L-S205G-S212D-F226L-Y239I-L249P-S252I-L258F,并且进一步包含选自以下组成的组的至少一个另外的取代:V014S、R040A/T、G059Y、G061D、A066D、S070E、Q161H、G175A/E、F207TL/T、V210I、Q227H、A236P、S244E、E254Q和R256K,其中所述位置通过参考SEQ ID NO:2的氨基酸序列进行编号,并且其中所述变体具有酯酶活性。

[0134] 实施例2.如实施例1所述的变体脂肪分解酶,其中所述变体包含与SEQ ID NO:2的

全长氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%同一性的氨基酸序列。

[0135] 实施例3.如实施例1或2所述的变体脂肪分解酶,其中所述变体衍生自亲本酶,所述亲本酶包含与SEQ ID NO:2的全长氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%同一性的氨基酸序列。

[0136] 实施例4.如前述实施例中任一项所述的变体脂肪分解酶,其中所述变体包含选自由以下组成的组的取代的组合:R40T-T64V-T117L-G175E-T177N-F180P-Y182A-R190L-S205G-F207L-S212D-F226L-Y239I-L249P-S252I-L258F、R40T-G61D-T64V-S70E-T117L-T177N-I178L-F180P-Y182A-R190L-S205G-F207T-S212D-F226L-Q227H-A236P-Y239I-L249P-S252I-E254Q-L258F、R40T-T64V-S70E-T117L-T177N-I178L-F180P-Y182A-R190L-S205G-F207T-S212D-F226L-A236P-Y239I-L249P-S252I-E254Q-L258F、R40A-T64V-S70E-T117L-T177N-I178L-F180P-Y182A-R190L-S205G-F207T-S212D-F226L-A236P-Y239I-L249P-S252I-E254Q-L258F、R40A-T64V-S70E-T117L-T177N-I178L-F180P-Y182A-R190L-S205G-F207T-S212D-F226L-A236P-Y239I-L249P-S252I-E254Q-L258F、R40T-T64V-S70E-T117L-Q161H-T177N-I178L-F180P-Y182A-R190L-S205G-F207T-S212D-F226L-A236P-Y239I-L249P-S252I-E254Q-L258F、R40T-T64V-S70E-T117L-T177N-I178L-F180P-Y182A-R190L-S205G-F207T-S212D-F226L-A236P-Y239I-L249P-S252I-E254Q-L258F、R40T-T64V-S70E-T117L-T177N-I178L-F180P-Y182A-R190L-S205G-F207T-S212D-F226L-A236P-Y239I-L249P-S252I-E254Q-R256K-L258F、V14S-R40A-G59Y-G61D-T64V-A66D-S70E-T117L-Q161H-T177R-I178L-F180P-Y182A-R190L-S205G-F207T-V210I-S212D-F226L-A236P-Y239I-L249P-S252I-E254Q-R256K-L258F、V14S-R40A-G59Y-G61D-T64V-S70E-T117L-Q161H-T177R-I178L-F180P-Y182A-R190L-S205G-F207T-V210I-S212D-F226L-A236P-Y239I-L249P-S252I-E254Q-R256K-L258F、R40T-G61D-T64V-S70E-T117L-Q161H-T177R-I178L-F180P-Y182A-R190L-S205G-F207T-V210I-S212D-F226L-A236P-Y239I-L249P-S252I-E254Q-R256K-L258F、和V14S-R40A-G59Y-G61D-T64V-A66D-S70E-T117L-Q161H-G175A-T177R-I178L-F180P-Y182A-R190L-S205G-F207T-V210I-S212D-F226L-A236P-Y239I-L249P-S252I-E254Q-R256K-L258F,其中所述位置通过参考SEQ ID NO:2的氨基酸序列进行编号。

[0137] 实施例5.如前述实施例中任一项所述的变体脂肪分解酶,其中当与亲本或参考脂肪分解酶相比时,所述变体具有一个或多个改善的性质,其中所述改善的性质选自改善的稳定性、对聚酯的改善的水解活性、或其组合。

[0138] 实施例6.如前述实施例中任一项所述的变体脂肪分解酶,其中所述改善的性质是:

[0139] (i) 改善的稳定性,其中当根据实例3的稳定性测定进行测量时,所述变体具有至少5%的残余活性,和/或

[0140] (ii) 对聚酯的改善的水解活性,其中当根据实例2的PET测定进行测量时,与具有有取代R40T-T64V-T117L-T177N-I178L-F180P-Y182A-R190L-S205G-F207T-S212D-F226L-Y239I-L249P-S252I-L258F的SEQ ID NO:2的氨基酸序列的脂肪分解酶相比,所述变体的PI

≥1.2。

[0141] 实施例7.如实施例1-6中任一项所述的脂肪分解酶,其中所述变体具有对聚酯的水解活性,所述聚酯选自由以下组成的组:聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)、聚对苯二甲酸丙二酯(PTT)、聚对苯二甲酸丁二醇酯(PBT)、聚对苯二甲酸异山梨醇乙二醇酯(PEIT)、聚乳酸(PLA)、聚羟基烷酸酯(PHA)、聚丁二酸丁二醇酯(PBS)、聚丁二酸己二酸丁二醇酯(PBSA)、聚己二酸对苯二甲酸丁二醇酯(PBAT)、聚乙烯呋喃酸酯(PEF)、聚己内酯(PCL)、聚萘二甲酸乙二醇酯(PEN)、聚酯型聚氨酯、聚(己二酸乙二醇酯)(PEA)、及其组合。

[0142] 实施例8.一种多核苷酸,其包含编码如实施例1-7中任一项所述的变体脂肪分解酶的核酸序列。

[0143] 实施例9.如实施例8所述的多核苷酸,其中所述核酸序列可操作地连接到启动子。

[0144] 实施例10.一种表达载体或表达盒,所述表达载体或表达盒包含如实施例8或9所述的多核苷酸。

[0145] 实施例11.一种重组宿主细胞,其包含如实施例10所述的表达载体或表达盒。

[0146] 实施例12.一种酶组合物,其包含如实施例1-7中任一项所述的变体脂肪分解酶。

[0147] 实施例13.如实施例12所述的酶组合物,其中所述组合物进一步包含选自由以下组成的组的至少至少一种另外的酶:酰基转移酶、 $\alpha$ -淀粉酶、 $\beta$ -淀粉酶、 $\alpha$ -半乳糖苷酶、阿拉伯糖苷酶、芳基酯酶、 $\beta$ -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- $\beta$ -1,4-葡聚糖酶、内切- $\beta$ -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、 $\beta$ -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。

[0148] 14.如实施例13所述的酶组合物,其中所述至少一种另外的酶选自由以下组成的组:蛋白酶、 $\alpha$ -淀粉酶、纤维素酶和甘露聚糖酶。

[0149] 实施例15.一种用于降解聚酯或含聚酯材料的方法,所述方法包括

[0150] i) 使所述含聚酯材料与如实施例1-7中任一项所述的变体脂肪分解酶或包含如实施例1-7所述的变体脂肪分解酶的组合物接触,以及任选地,

[0151] ii) 将所述含聚酯材料进行冲洗。

[0152] 实施例16.一种用于对聚酯或含聚酯材料进行酶法解聚的方法,所述方法包括:

[0153] i) 使所述聚酯或含聚酯材料与如实施例1-7中任一项所述的变体脂肪分解酶或包含如实施例1-7所述的变体脂肪分解酶的组合物接触,以及任选地,

[0154] ii) 将所述聚酯的单体和/或寡聚体回收。

[0155] 实施例17.如实施例15或16所述的方法,其中所述聚酯选自由以下组成的组:聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)、聚对苯二甲酸丙二酯(PTT)、聚对苯二甲酸丁二醇酯(PBT)、聚对苯二甲酸异山梨醇乙二醇酯(PEIT)、聚乳酸(PLA)、聚羟基烷酸酯(PHA)、聚丁二酸丁二醇酯(PBS)、聚丁二酸己二酸丁二醇酯(PBSA)、聚己二酸对苯二甲酸丁二醇酯(PBAT)、聚乙烯呋喃酸酯(PEF)、聚己内酯(PCL)、聚萘二甲酸乙二醇酯(PEN)、聚酯型聚氨酯、聚(己二酸乙二

醇酯) (PEA)、及其组合。

[0156] 实例

[0157] 实例1

[0158] 门多萨假单胞菌脂肪酶变体的重组表达和产生

[0159] 制备了编码野生型门多萨假单胞菌脂肪酶 (SEQ ID NO:2) 的密码子优化的合成基因 (SEQ ID NO:1), 并且作为模板用于构建表达其变体多肽的质粒。脂肪酶基因由GeneArt AG公司 (德国雷根斯堡 (Regensburg)) 或特威斯特生物科学公司 (美国旧金山) 生产, 并且使用标准分子生物学技术将其克隆到pSB表达载体中 (Babé, L.M., 等人 (1998) *Biotechnol Appl Biochem.* [生物技术与应用生物化学] 27:117-24), 从而产生适合在枯草芽孢杆菌中表达的表达质粒。构建体的元件包括: 包含aprE启动子序列 (SEQ ID NO:3) 的DNA片段、编码aprE信号肽序列 (SEQ ID NO:4) 或杂合aprE-门多萨假单胞菌脂肪酶信号肽序列 (SEQ ID NO:5) 的核苷酸序列、与编码成熟脂肪酶的基因对应的序列、BPN' 终止子 (SEQ ID NO:6)、以及来自pUB110 (McKenzie等人 (1986) *Plasmid* [质粒] 15:93-103) 的另外的元件 (包括复制酶基因 (reppUB)、新霉素/卡那霉素抗性基因 (neo)、以及博来霉素抗性标记 (bleo))。

[0160] 使用本领域已知的方法 (WO 02/14490) 用pSB表达质粒转化合适的枯草芽孢杆菌宿主菌株。将转化混合物铺板到含有10ppm硫酸新霉素的LA板上, 并且在37°C下孵育过夜。挑取单菌落并使其在抗生素选择下在Luria培养液中在37°C下生长。

[0161] 为了产生用于筛选的酶样品, 将转化的枯草芽孢杆菌细胞在96孔微量滴定板 (MTP, 制造) 的每个孔中的培养基 (基于MOPS缓冲液的富集的半限定培养基, 其中尿素为主要氮源, 葡萄糖为主要碳源, 并且补充有1%大豆胨用于稳健细胞生长) 中在37°C下生长68小时。通过以3600rpm离心15min收获培养物, 并使用密理博公司真空系统通过 **Multiscreen**<sup>®</sup> 过滤板 (EMD密理博公司, 美国马萨诸塞州比尔里卡 (Billerica)) 进行过滤。将过滤的培养物上清液用于下述测定。典型地, 在96孔板 (能肯公司 (NUNC), 267245) 中将培养液在100mM Tris (pH 8) 中稀释。通过使用Zorbax 300SB-C3柱 (安捷伦公司 (Agilent)) 分离蛋白组分, 并且运行0.1%三氟乙酸在水 (缓冲液A) 中和0.1%三氟乙酸在乙腈 (缓冲液B) 中的线性梯度, 以及在UHPLC上在220nm处进行检测, 来测定酶浓度。使用纯化的参考酶PEV132的标准曲线计算样品的酶浓度。

[0162] 实例2

[0163] 门多萨假单胞菌脂肪酶变体的酶活性

[0164] 通过测量PET粒料底物在溶液中的水解, 在PET (聚对苯二甲酸乙二醇酯) 底物上测试了门多萨假单胞菌脂肪酶变体 (列于表1) 的酶活性。PET粒料购自科学聚合物产品公司 (Scientific Polymer Products) (目录号138)。将一个PET粒料 (20-30mg) 添加到微量滴定板 (能肯公司, 267245) 的每个孔中, 并且添加洗涤剂溶液。特别地, 洗涤剂溶液由在10mM Tris-HCl缓冲液 (水硬度为6gpg, Ca:Mg=3:1, pH 8) 中制备的两百微升的配方A HDL (3.0g/L) (表2中的组合物) 组成。

[0165]

表 1: 变体列表 (用样品 ID 和相对于门多萨假单胞菌野生型酶的氨基酸取代构建)	
样品 ID	相对于门多萨假单胞菌野生型脂肪酶的氨基酸取代
PEV132	R40T-T64V-T117L-T177N-I178L-F180P-Y182A-R190L-S205G-F207T-S212D-F226L-Y239I-L249P-S252I-L258F
PEV132v1	R040A-T064V-T117L-T177N-I178L-F180P-Y182A-R190L-S205G-F207T-S212D-F226L-Y239I-L249P-S252I-L258F
PEV132v2	R040T-T064V-T117L-T177R-I178L-F180P-Y182A-R190L-S205G-F207T-S212D-F226L-Y239I-L249P-S252I-L258F
PEV176	R40T-T64V-T117L-G175E-T177N-F180P-Y182A-R190L-S205G-F207L-S212D-F226L-Y239I-L249P-S252I-L258F
PEV192	R40T-G61D-T64V-S70E-T117L-T177N-I178L-F180P-Y182A-R190L-S205G-F207T-S212D-F226L-Q227H-A236P-Y239I-L249P-S252I-E254Q-L258F
PEV194	R40T-T64V-S70E-T117L-T177N-I178L-F180P-Y182A-R190L-S205G-F207T-S212D-F226L-A236P-Y239I-L249P-S252I-E254Q-L258F
PEV304	R40A-T64V-S70E-T117L-T177N-I178L-F180P-Y182A-R190L-S205G-F207T-S212D-F226L-A236P-Y239I-L249P-S252I-E254Q-L258F

[0166]

PEV314	R40T-T64V-S70E-T117L-Q161H-T177N-I178L-F180P-Y182A-R190L-S205G-F207T-S212D-F226L-A236P-Y239I-L249P-S252I-E254Q-L258F
PEV315	R40T-T64V-S70E-T117L-G175A-T177N-I178L-F180P-Y182A-R190L-S205G-F207T-S212D-F226L-A236P-Y239I-L249P-S252I-E254Q-L258F
PEV318	R40T-T64V-S70E-T117L-T177N-I178L-F180P-Y182A-R190L-S205G-F207T-V210I-S212D-F226L-A236P-Y239I-L249P-S252I-E254Q-L258F
PEV319	R40T-T64V-S70E-T117L-T177N-I178L-F180P-Y182A-R190L-S205G-F207T-S212D-F226L-A236P-Y239I-S244E-L249P-S252I-E254Q-L258F
PEV320	R40T-T64V-S70E-T117L-T177N-I178L-F180P-Y182A-R190L-S205G-F207T-S212D-F226L-A236P-Y239I-L249P-S252I-E254Q-R256K-L258F
PEV325	V14S-R40A-G59Y-G61D-T64V-A66D-S70E-T117L-Q161H-T177R-I178L-F180P-Y182A-R190L-S205G-F207T-V210I-S212D-F226L-A236P-Y239I-L249P-S252I-E254Q-R256K-L258F
PEV328	V14S-R40A-G59Y-G61D-T64V-S70E-T117L-Q161H-T177R-I178L-F180P-Y182A-R190L-S205G-F207T-V210I-S212D-F226L-A236P-Y239I-L249P-S252I-E254Q-R256K-L258F
PEV329	R40T-G61D-T64V-S70E-T117L-Q161H-T177R-I178L-F180P-Y182A-R190L-S205G-F207T-V210I-S212D-F226L-A236P-Y239I-L249P-S252I-E254Q-R256K-L258F
PEV334	V14S-R40A-G59Y-G61D-T64V-A66D-S70E-T117L-Q161H-G175A-T177R-I178L-F180P-Y182A-R190L-S205G-F207T-V210I-S212D-F226L-A236P-Y239I-L249P-S252I-E254Q-R256K-L258F

[0167]

化学名称	原材料中活性物质的WT%	配制品中活性物质的WT%
脱矿质水	100	Ad 100
烷基苯磺酸 (LAS)	96	3-7
阴离子表面活性剂 (FAEOS)	70	2-6

[0168]	椰子脂肪酸	30	0.3-1
	非离子型表面活性剂 (FAEO)	100	3-7
	柠檬酸	100	0.1-2
	NaOH	50	0.3-1
	甘油	99,5	0.3-1
	防腐剂	100	0.05-0.1
	硼酸	100	0.3-1
	光学增亮剂	90	0.01-0.08
	增稠剂	25	1-3
	酶 (除脂肪酶外)	100	0.5-2
	Dequest	40	0.1-2
	染料、香料、消泡剂	t.q.	微量
	pH = 8.2至8.6 剂量 = 50 mL		

[0169] 还设置了一组孔中没有PET的板用作酶背景的对照。将二十微升的每个酶样品添加到测定板的每个孔中以引发反应。伴随在孵育振荡器 (伊孚森生物技术公司 (Infors HT), Multitron) 中振荡 (180rpm), 将反应在40℃下进行24小时。孵育后, 将100u1的反应上清液转移到新的UV透明板 (康宁公司 (Corning) 3635) 中, 并且在酶标仪 (分子仪器公司, SpectraMax plus 384) 上在240nm处进行测量。减去酶背景板的吸光度后, 将所得的吸光度作为PET水解活性的量度。将吸光度值相对于酶浓度进行作图。每种变体以一式三份进行测定。PET活性报告为性能指数 (PI) 值, 这些值通过将每种变体的PET活性除以在相同蛋白质浓度下测试的亲本的PET活性来计算。表3显示了来自表1的变体在PET底物上的聚酯酶活性 (性能指数)。使用从亲本酶活性的标准曲线的测量值的朗缪尔 (Langmuir) 拟合中提取的参数计算在相关蛋白质浓度下亲本酶的PET活性的理论值。

**表 3: 门多萨假单胞菌脂肪酶变体在配方 A HDL 中的 PET 活性。PET 底物上的相对活性报告为相对于门多萨假单胞菌脂肪酶 PEV132 计算的性能指数值 (PI)**

样品 ID	聚酯酶活性 (PI)
PEV132	1.0
PEV132v1	1.1
PEV132v2	1.0
PEV318	1.4
PEV319	1.5
PEV314	1.7
PEV194	1.8
PEV329	1.8
PEV192	1.9
PEV328	1.9
PEV315	1.9
PEV334	1.9
PEV325	2.1
PEV320	2.2
PEV304	2.2

[0170]

[0171] 实例3

[0172] 门多萨假单胞菌变体的热稳定性

[0173] 在应激条件下,在配方A HDL洗涤剂的50% (v/v) 水溶液中,通过测量在56°C下孵育16小时后的样品残余活性来测试门多萨假单胞菌脂肪酶变体(显示在表1中)的稳定性。制备67% (v/v) 洗涤剂的水溶液,并将来自过滤的培养物上清液的酶样品与适当体积的该洗涤剂溶液混合,以达到50% (v/v) 的最终洗涤剂浓度。为了测量初始(无应激)活性,将该混合物的等分试样在100mM Tris-HCl,0.1% Triton X-100 (pH 8) 中立即稀释,并在pNB底物上测定活性。通过将0.2mL的pNB储备溶液(100mM在DMSO中)添加到20mL的缓冲液(100mM Tris-HCl,0.1% Triton X-100,pH 8)中来制备pNB底物(4-硝基苯基丁酸酯,西格玛公司(Sigma))溶液(1mM)。将十微升稀释的酶溶液混合到96孔板(Costar,编号9017,赛默飞世尔公司(ThermoFisher))中的测定缓冲液中的190ul的1mM pNB中以开始反应。将板充分混合,并且在酶标仪(分子仪器公司,SpectraMax plus 384)中每12秒监测OD 405nm处的吸光度3分钟。从含酶样品的V<sub>max</sub>值中减去不含酶样品(空白)的V<sub>max</sub>值(以mOD/min为单位)。将所得的V<sub>max</sub>(以mOD/min为单位)记录为在pNB底物上的酶活性。一旦如上所述通过pNB底物的水解来测量应激和无应激活性值,则通过取应激与无应激活性的比率并乘以100来计算残

余活性百分比(%)。表4显示了测试的门多萨假单胞菌脂肪酶变体的残余活性%。

**表 4：门多萨假单胞菌脂肪酶变体在配方 A 液体洗涤剂中的稳定性。稳定性报告为在 56°C 下孵育 16 小时后剩余的残余活性%。**

样品 ID	残余活性%
PEV132	20
PEV176	90
PEV192	20
PEV194	40
PEV304	40
PEV314	50
PEV315	50
PEV318	60
PEV319	80
PEV320	100
PEV325	90
PEV328	100
PEV329	80
PEV334	90

[0175] 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。

[0176] 本说明书中提到的所有出版物、专利和专利申请通过引用以其整体并入本说明书,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引用并入本文一样。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该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。

[0177] 序列表

[0178] SEQ ID NO:1(来自门多萨假单胞菌的野生型脂肪酶的密码子优化的基因序列)

- GCTCCTCTTCTGATACACCGGGAGCGCCATTTCTGCTGTCGCAAACCTTCGACCGC  
AGCGGCCCTTACTGTTTCTAGCCAGTCAGAAGGGCCGAGCTGTCGCATCTATAGA  
CCTCGCGACCTGGGTCAGGGAGGCGTACGCCATCCGGTTATTCTTTGGGGCAACGGC  
ACTGGTGCTGGACCGTCTACATATGCAGGCTTGCTTTCACACTGGGCAAGCCACGGT  
TTCGTTGTAGCGGCTGCGGAAACATCTAACGCTGGTACCGGACGCGAAATGCTCGCC  
TGCCTGGACTATCTGGTACGTGAGAACGACACCCCTACGGCACCTATTCCGGCAAG  
CTCAATACCGGGCGAGTCGGCACTTCTGGGCATTCTCAAGGTGGAGGCGGGTCAATC  
[0179] ATGGCTGGCCAGGATACGAGAGTACGTACAACGGCGCCGATCCAGCCTTACTCT  
TGGCCTGGGACACGACAGCGCTTCTCAACGCCCAACAGGGACCGATGTTCCCTTAT  
GTCTGGTGGCGGAGACACAATCGCTTTCCTTACCTCAACGCTCAGCCGGTCTACCG  
CCGTGCAAACGTACCTGTATTCTGGGGCGAAAGACGTTACGTTTCACACTTCGAACC  
GGTAGGTAGCGGTGGGGCTTATCGCGGCCCGTCTACAGCATGGTTCGCTTCCAAC  
TATGGATGACCAAGACGCTCGCGCTACATTCTACGGCGCGCAGTGCAGCCTTTGCAC  
TTCTTACTTTGGTCAGTCGAACGCCGCGGGCTTAA
- [0180] SEQ ID NO:2 (来自门多萨假单胞菌的野生型脂肪酶的氨基酸序列)  
APLPDTPGAPFPVAVANFDRSGPYTVSSQSEGPSRIYRPRDLGQGGVVRHPVILWNGT  
AGPSTYAGLLSHWASHGFVVA AETS NAGTGREMLACLDYLVRENDTPYGTYSGLN
- [0181] TGRVGTSGHSQGGGGSIMAGQDTRVRTAPIQPYTLGLGHDSASQRRQOGPMFLMSGG  
GDTIAFPYLNAPVYRRANVPVFWGERRYVSHFEPVSGGAYRGPSTAWFRFQLMDDQ  
DARATFYGAQCSLCTSLLSVERRGL
- [0182] SEQ ID NO:3 (aprE启动子DNA序列)  
GAATTCTCCATTTTCTTCTGCTATCAAATAACAGACTCGTGATTTTCAAACGAGCT  
TTCAAAAAGCCTCTGCCCTTGCAAATCGGATGCCTGTCTATAAAATTCCC  
GATATGGTTAAACAGCGGCGCAATGGCGGCCGCATCTGATGCTTTTCTTGGCGAATGTT  
ATCTTATTTCTTCCCTCTCAATAATTTTTTTCATTCTATCCCTTTTCTGTAAAGTT  
ATTTTTCAGAATACTTTTATCATCATGCTTTGAAAAAATATCACGATAATATCCATTG  
[0183] TTCTCACGGAAGCACACGCAGGTCATTTGAACGAATTTTTTCGACAGGAATTTGCCG  
GGACTCAGGAGCATTAAACCTAAAAAAGCATGACATTCAGCATAATGAACATTTAC  
TCATGCTATTTTCGTTCTTTTCTGTATGAAAATAGTTATTTTCGAGTCTCTACGGAAA  
TAGCGAGAGATGATATACCTAAATAGAGATAAAATCATCTCAAAAAAATGGGTCTA  
CTAAAAATATTATCCATCTATTACAATAAATTCACAGAATAGTCTTTTAAGTAAGTCT  
ACTCTGAATTTTTTTTAAAAGGAGAGGGTAAAGA
- [0184] SEQ ID NO:4 (aprE信号肽DNA序列)  
GTGAGAAGCAAAAAATTGTGGATCAGCTTGTTGTTTGCCTAACGTTAATCTTTACG
- [0185] ATGGCGTTCAGCAACATGTCTGCGCAGGCT
- [0186] SEQ ID NO:5 (杂合aprE-门多萨假单胞菌脂肪酶信号肽DNA序列)  
GTGAGAAGCAAAAAATTGTGGATCAGCTTGTTGTTTGCCTAACGTTAGCGGCTTCT
- [0187] TGCCTGAGCGTCTGTGCAACTGTAGCTGCA
- [0188] SEQ ID NO:6 (BPN' 终止子DNA序列)

[0189] ACATAAAAAACCGGCCTTGGCCCCGCCGGTTTTTTTATTATTTTCTTCCTCCGCATGT  
TCAATCCGCTCCATAATCGACGGATGGCTCCCTCTGAAAATTTAACGAGAAACGGC  
GGGTTGACCCGGCTCAGTCCCGTAACGGCCAAGTCCTGAAACGTCTCAATCGCCGCT  
TCCCGGTTCCGGTCAGCTCAATGCCGTAACGGTCGGCGGCGTTTTCTGATACCGG  
GAGACGGCATTTCGTAATC