



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106715465 A

(43)申请公布日 2017.05.24

(21)申请号 201580019430.0

(22)申请日 2015.04.13

(66)本国优先权数据

PCT/CN2014/075398 2014.04.15 CN

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.10.12

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2015/076483 2015.04.13

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/158237 EN 2015.10.22

(71)申请人 诺维信公司

地址 丹麦鲍斯韦

(72)发明人 李明 孙天齐 蒋先芝 韩步聪

C·H·汉森 K·博尔奇

L·鲍恩斯高

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494  
代理人 史悦

(51)Int.Cl.

*C07K 14/37*(2006.01)

*A61K 38/46*(2006.01)

*C12N 9/20*(2006.01)

*C12N 15/52*(2006.01)

*C12N 15/63*(2006.01)

*C11D 3/386*(2006.01)

权利要求书2页 说明书51页  
序列表6页

(54)发明名称

具有脂肪酶活性的多肽和编码它们的多核苷酸

(57)摘要

提供了具有脂肪酶活性的分离多肽。还提供了编码这些多肽的多核苷酸;包括这些多核苷酸的核酸构建体、载体、以及宿主细胞;包括这些多核苷酸的组合物和使用这些多肽或组合物的方法。

1. 一种具有脂肪酶活性的分离的多肽,该分离的多肽选自下组,该组由以下各项组成:
  - (a) 一种多肽,该多肽与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少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100%序列一致性;
  - (b) 一种由以下多核苷酸编码的多肽,该多核苷酸在低严格条件下、中严格条件下、中-高严格条件下、高严格条件下或非常高严格条件下与(i) SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3或(i)的全长互补体杂交;
  - (c) 一种多肽,该多肽由与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3的成熟多肽编码序列具有至少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100%序列一致性的多核苷酸编码;
  - (d) 一种多肽,该多肽是在一个或多个(例如若干个)位置处包括取代、缺失、和/或插入的SEQ ID NO:2的变体;以及
  - (e) 一种多肽,该多肽是(a)、(b)、(c)或(d)的多肽中任一个的片段。
2. 根据权利要求1所述的多肽,该多肽是没有变化的或包括在SEQ IDNO:2的一个或多个(例如,若干个)位置处的取代。
3. 根据权利要求1-2中任一项所述的多肽,其中取代的数目是1-50、1-40、1-30、1-20、1-10、1-5,如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、或50个取代。
4. 根据权利要求1-2中任一项所述的多肽,其中该成熟多肽由与SEQ IDNO:2的氨基酸1至340对应的残基组成。
5. 一种组合物,该组合物包括根据权利要求1-4中任一项所述的多肽。
6. 根据权利要求5所述的组合物,该组合物进一步包括至少一种表面活性剂、至少一种表面活性剂系统、至少一种皂,或其任何混合物。
7. 根据权利要求5或6中任一项所述的组合物,其中这些表面活性剂或表面活性剂系统选自阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、非离子表面活性剂、两性表面活性剂、两性离子表面活性剂、半极性非离子表面活性剂或其任何混合物。
8. 根据权利要求5-7中任一项所述的组合物,其中该组合物是衣物清洁组合物、餐具清洁组合物、硬表面清洁组合物和/或个人护理清洁组合物。
9. 根据权利要求5-8中任一项所述的组合物,其中将该组合物配制为一种常规的,压缩的或浓缩的液体;一种凝胶;一种膏;一种皂条;一种常规的或压缩的粉末;一种粒状固体;一种具有两个或更多个层(相同或不同相)的均匀或多层片剂;一种具有一个或多个室的袋;一种单个或多个室单位剂型;或其任何组合。
10. 一种用于水解脂质的方法,包括使该脂质与根据权利要求1-4中任一项所述的多肽或根据权利要求5-9中任一项所述的组合物接触。
11. 一种用于清洁受试物的方法,包括使存在于有待清洁的受试物上的脂质污渍与根据权利要求1-4中任一项所述的多肽或根据权利要求5-9中任一项所述的组合物接触。
12. 一种编码根据权利要求1-4中任一项所述的多肽的分离的多核苷酸。

13. 如权利要求12所述的多核苷酸,其中修饰该多核苷酸以对应于旨在用于酶的重组生产的宿主细胞的密码子使用。

14. 一种包括根据权利要求12或13中任一项所述的多核苷酸的核酸构建体。

15. 一种表达载体,该表达载体包括编码根据权利要求1-4中任一项所述的多肽的多核苷酸。

16. 一种宿主细胞,该宿主细胞包括编码根据权利要求1-4中任一项所述的多肽的多核苷酸。

17. 一种产生根据权利要求1-4中任一项所述的多肽的方法,该方法包括:(a) 在适于多肽表达的条件下培养如权利要求16所述的宿主细胞;并且 (b) 回收该多肽。

## 具有脂肪酶活性的多肽和编码它们的多核苷酸

[0001] 对序列表的引用

[0002] 本申请包括计算机可读形式的序列表,将其通过引用结合在此。

[0003] 发明背景

### 发明领域

[0004] 本发明涉及具有脂肪酶活性的多肽、编码这些多肽的多核苷酸、产生这些多肽的方法、以及使用这些多肽的方法。

[0005] 相关技术说明

[0006] 脂肪酶是重要的生物催化剂,其已显示可用于各种应用并且大量的不同脂肪酶已经被鉴定并且许多已被商品化。然而,适合于在适应于当前使用的条件的不同组合物中使用的新脂肪酶是令人希望的。

[0007] 脂肪酶已经被用于组合物中,从而用于通过水解甘油三酯以产生脂肪酸来去除脂质污渍。当前清洁和/或织物护理组合物包括许多活性成分,这些成分干扰脂肪酶去除脂质污渍的能力。因此,需要可以在用于清洁的组合物的严苛环境中起作用的脂肪酶。本申请的目的是提供具有有利特征的脂肪酶,如当应用在清洁剂组合物中时具有改进的性能的脂肪酶。

[0008] 来自米根霉 (UNIPROT B1Q560) 的已知的脂肪酶与本申请的SEQ ID NO:2的成熟多肽具有55%一致性。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明涉及具有脂肪酶活性的分离的多肽,这些分离的多肽选自下组,该组由以下各项组成:(a)与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少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100%序列一致性的多肽;(b)一种由以下多核苷酸编码的多肽,该多核苷酸在低严格条件下、中严格条件下、中-高严格条件下、高严格条件下或非常高严格条件下与(i)SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3或(i)的全长互补体杂交;(c)一种多肽,该多肽由与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3的成熟多肽编码序列具有至少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100%序列一致性的多核苷酸编码;(d)一种多肽,该多肽是在一个或多个(例如若干个)位置处包括取代、缺失、和/或插入的SEQ ID NO:2的变体;以及(e)一种多肽,该多肽是(a)、(b)、(c)或(d)的多肽中任一项的片段。

[0011] 本发明还涉及编码这些多肽的分离的多核苷酸;包含这些多核苷酸的核酸构建体、载体、以及宿主细胞;以及生产该多肽的方法和该多肽的用途。

[0012] 本发明还涉及包括该多肽的组合物和使用该多肽进行清洁的方法。

[0013] 序列表综述

[0014] SEQ ID NO:1是如从闪光须霉 (*Phycomyces nitens*) 分离的脂肪酶的DNA序列。

[0015] SEQ ID NO:2是如从SEQ ID NO:1推导的脂肪酶的氨基酸序列。

[0016] SEQ ID NO:3是针对在米曲霉中SEQ ID NO:2的表达所优化的人工DNA序列。

[0017] SEQ ID NO:4是引物lip47921-40\_C505\_BamHI。

[0018] SEQ ID NO:5是引物lip47921-40\_C505\_XhoI。

[0019] 定义

[0020] 等位基因变体:术语“等位基因变体”意指占据同一染色体基因座的基因的两种或更多种可替代形式中的任一种。等位基因变异由突变天然产生,并且可以导致群体内多态性。基因突变可以是沉默的(在所编码的多肽中没有改变)或可编码具有改变的氨基酸序列的多肽。多肽的等位基因变体是由基因的等位基因变体编码的多肽。

[0021] cDNA:术语“cDNA”意指可以通过从得自真核或原核细胞的成熟的、剪接的mRNA分子进行反转录而制备的DNA分子。cDNA缺乏可以存在于对应基因组DNA中的内含子序列。早先的初始RNA转录本是mRNA的前体,其在呈现为成熟的剪接的mRNA之前要经一系列的步骤进行加工,包括剪接。

[0022] 编码序列:术语“编码序列”意指直接指定一个多肽的氨基酸序列的多核苷酸。编码序列的边界一般由开放阅读框架决定,该开放阅读框架从起始密码子(如ATG、GTG或TTG)开始并且以终止密码子(如TAA、TAG或TGA)结束。编码序列可以是基因组DNA、cDNA、合成DNA或其组合。

[0023] 控制序列:术语“控制序列”意指对于表达编码本发明的成熟多肽的多核苷酸所必需的核酸序列。各个控制序列可以相对于编码多肽的多核苷酸是天然的(即,来自相同基因)或外源的(即,来自不同基因),或相对于彼此是天然的或外源的。此类控制序列包括但不限于前导子、多腺苷酸化序列、前肽序列、启动子、信号肽序列、以及转录终止子。至少,控制序列包括启动子以及转录和翻译终止信号。出于引入有利于将这些控制序列与编码多肽的多核苷酸的编码区连接的特异性限制酶切位点的目的,这些控制序列可以提供有多个接头。

[0024] 表达:术语“表达”包括涉及多肽产生的任何步骤,包括但不限于,转录、转录后修饰、翻译、翻译后修饰、以及分泌。

[0025] 表达载体:术语“表达载体”意指线性或环状DNA分子,该分子包含编码多肽的多核苷酸并且该多核苷酸可操作地与提供用于其表达的控制序列相连接。

[0026] 片段:术语“片段”意指在该成熟多肽的氨基(N-)和/或羧基(C-)末端缺失一个或多个(例如,若干个)氨基酸的一种多肽;其中该片段具有脂肪酶活性。在一方面,该片段包含SEQ ID NO:2的氨基酸1至340的数目的至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、或至少95%。

[0027] 宿主细胞:术语“宿主细胞”意指易于用包含本发明的多核苷酸的核酸构建体或表达载体转化、转染、转导等的任何细胞类型。术语“宿主细胞”涵盖由于复制期间发生的突变而与亲本细胞不同的亲本细胞的任何后代。

[0028] 分离的:术语“分离的”意指处于自然界中不存在的形式或环境中的物质。分离的物质的非限制性实例包括(1)任何非天然存在的物质,(2)包括但不限于任何酶、多肽、变体、核酸、蛋白质、肽或辅因子的任何物质,该物质至少部分地从与其本质上相关的一种或多种(例如,若干)或所有天然存在的成分中去除;(3)相对于天然发现的物质通过人工修饰

的任何物质；或(4)通过相对于与其天然相关联的其他组分增加该物质的量而修饰的任何物质(例如,编码该物质的基因的多个拷贝;比与编码该物质的基因天然相关联的启动子更强的启动子的使用)。分离的物质可以存在于发酵液样品中。

[0029] 脂肪酶:术语“脂肪酶(lipase)”、“脂肪酶(lipase enzyme)”、“脂解酶”、“脂质酯酶”、“脂解多肽”以及“脂解蛋白”是指如酶命名法所定义的EC 3.1.1类中的一种酶。它可以具有脂肪酶活性(三酰基甘油脂肪酶,EC 3.1.1.3)、角质酶活性(EC 3.1.1.74)、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)。出于本发明的目的,根据实例中所述的程序确定脂肪酶活性。在一方面,本发明的变体具有SEQ ID NO:2的多肽的至少20%,例如至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或100%的脂肪酶活性。

[0030] 低温:“低温”是5°C-35°C,如5°C-30°C、5°C-25°C、5°C-20°C、5°C-15°C、或5°C-10°C的温度。在另一个实施例中,“低温”是10°C-35°C,如10°C-30°C、10°C-25°C、10°C-20°C、或10°C-15°C的温度。

[0031] 成熟多肽:术语“成熟多肽”意指呈其在翻译以及任何翻译后修饰之后的最终形式的多肽,所述修饰如N-末端加工、C-末端截断、糖基化、磷酸化等。在一方面,成熟多肽是SEQ ID NO:2的氨基酸1至340。SEQ ID NO:2的氨基酸-23至1是信号肽。在本领域中已知的是,宿主细胞可以产生由相同多核苷酸表达的两种或更多种不同成熟多肽(即,具有一个不同的C-末端和/或N-末端氨基酸)的混合物。

[0032] 成熟多肽编码序列:术语“成熟多肽编码序列”意指编码具有脂肪酶活性的成熟多肽的多核苷酸。在一方面,该成熟多肽编码序列被包括在SEQ ID NO:1的核苷酸570-1029、1090-1118、1188-1245、1314-1410、1482-1579、1641-1727、1781-1861、1933-2011、2068-2101中。SEQ ID NO:1的核苷酸501至569编码信号肽。SEQ ID NO:1中的DNA序列是源自闪光须霉的基因组DNA。

[0033] 在一方面,成熟多肽编码序列被包括在SEQ ID NO:3的核苷酸70-1089中。SEQ ID NO:1的核苷酸3至69编码信号肽。在SEQ ID NO:3中的DNA序列是针对在米曲霉中SEQ ID NO:2的表达所优化的人工DNA序列。

[0034] 核酸构建体:术语“核酸构建体”意指单链或双链的核酸分子,该核酸分子是从天然存在的基因中分离的,或以本来不存在于自然界中的方式被修饰成含有核酸的区段,或是合成的,该核酸分子包括一个或多个控制序列。

[0035] 可操作地连接:术语“可操作地连接”意指如下的构造,其中,控制序列相对于多核苷酸的编码序列安置在适当位置,从而使得该控制序列指导该编码序列的表达。

[0036] 亲本或亲本脂肪酶:术语“亲本”或“亲本脂肪酶”意指如下的脂肪酶,对该脂肪酶进行取代以产生本发明的脂肪酶的变体。亲本可以是天然存在的(野生型)多肽或其变体或片段。

[0037] 序列一致性:用参数“序列一致性”来描述两个氨基酸序列之间或两个核苷酸序列之间的相关性。

[0038] 出于本发明的目的,使用如在EMBOSS包(EMBOSS:欧洲分子生物学开放软件套件,赖斯(Rice)等人,2000,遗传学趋势(Trends Genet.) 16:276-277)(优选5.0.0版或更新版

本)的尼德尔程序中所实施的尼德尔曼-翁施算法(尼德尔曼(Needleman)和翁施(Wunsch), 1970, 分子生物学杂志(J.Mol.Biol.) 48:443-453)来确定两氨基酸序列之间的序列一致性。所使用的参数是空位开放罚分10,空位延伸罚分0.5,以及EBLOSUM62(BLOSUM62的EMBOSS版)取代矩阵。尼德尔标注的“最长的一致性”的输出(使用-非简化选项获得)被用作百分比一致性,并且计算如下:

[0039]  $(\text{一致的残基} \times 100) / (\text{比对长度} - \text{比对中的空位总数})$

[0040] 出于本发明的目的,使用如在EMBOSS包(EMBOSS:欧洲分子生物学开放软件套件,赖斯(Rice)等人,2000,见上文)(优选5.0.0版或更新版本)的尼德尔程序中所实施的尼德尔曼-翁施算法(尼德尔曼(Needleman)和翁施(Wunsch),1970,见上文)来确定两个脱氧核糖核苷酸序列之间的序列一致性。所使用的参数是空位开放罚分10,空位延伸罚分0.5,以及EDNAFULL(NCBI NUC4.4的EMBOSS版)取代矩阵。尼德尔标注的“最长的一致性”的输出(使用-非简化选项获得)被用作百分比一致性,并且计算如下:

[0041]  $(\text{一致的脱氧核糖核苷酸} \times 100) / (\text{比对长度} - \text{比对中的空位总数})$

[0042] 严格条件:非常低严格条件:术语“非常低严格条件”意指对于长度为至少100个核苷酸的探针而言,遵循标准DNA印迹程序,在42°C下在5X SSPE、0.3% SDS、200微克/mL剪切并变性的鲑鱼精子DNA和25%甲酰胺中预杂交和杂交12至24小时。最后在45°C下使用2X SSC、0.2% SDS将载体材料洗涤三次,每次15分钟。低严格条件:术语“低严格条件”意指对于长度为至少100个核苷酸的探针而言,遵循标准DNA印迹程序,在42°C下在5X SSPE、0.3% SDS、200微克/mL剪切并变性的鲑鱼精子DNA和25%甲酰胺中预杂交和杂交12至24小时。最后在50°C使用2X SSC、0.2% SDS将载体材料洗涤三次,每次15分钟。中严格条件:术语“中严格条件”意指对于长度为至少100个核苷酸的探针而言,遵循标准DNA印迹程序,在42°C下在5X SSPE、0.3% SDS、200微克/mL剪切并变性的鲑鱼精子DNA和35%甲酰胺中预杂交和杂交12至24小时。最后在55°C使用2X SSC、0.2% SDS将载体材料洗涤三次,每次15分钟。中-高严格条件:术语“中-高严格条件”意指对于长度为至少100个核苷酸的探针而言,遵循标准DNA印迹程序,在42°C下在5X SSPE、0.3% SDS、200微克/mL剪切并变性的鲑鱼精子DNA以及35%甲酰胺中预杂交和杂交12至24小时。最后在60°C使用2X SSC、0.2% SDS将载体材料洗涤三次,每次15分钟。高严格条件:术语“高严格条件”意指对于长度为至少100个核苷酸的探针而言,遵循标准DNA印迹程序,在42°C下在5X SSPE、0.3% SDS、200微克/mL剪切并变性的鲑鱼精子DNA和50%甲酰胺中预杂交和杂交12至24小时。最后在65°C使用2X SSC、0.2% SDS将载体材料洗涤三次,每次15分钟。非常高严格条件:术语“非常高严格条件”意指对于长度为至少100个核苷酸的探针而言,遵循标准DNA印迹程序,在42°C下在5X SSPE、0.3% SDS、200微克/mL剪切并变性的鲑鱼精子DNA和50%甲酰胺中预杂交和杂交12至24小时。最后在70°C使用2X SSC、0.2% SDS将载体材料洗涤三次,每次15分钟。

[0043] 子序列:术语“子序列”意指使一个或多个(例如,若干个)核苷酸从成熟多肽编码序列的5'端和/或3'端缺失的多核苷酸;其中该子序列编码具有脂肪酶活性的片段。在一方面,子序列包含SEQ ID NO:2的核苷酸82至1134的数目的至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、和至少95%。

[0044] 变体:术语“变体”意指在一个或多个(例如,若干个)位置包括取代的具有脂肪酶活性的多肽,即本发明的变体也是本发明的多肽。取代意指用不同的氨基酸置换占用一个

位置的氨基酸。本发明的这些变体具有SEQ ID NO:2的脂肪酶活性的至少20%，例如至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少100%。

[0045] 洗涤性能：在本发明背景下，使用术语“洗涤性能”作为酶去除存在于待清洁的物体上的脂质或含脂质污渍的能力。洗涤性能可以通过计算在以下方法部分中的AMSA说明中定义的所谓G/(B+R)值来定量。术语“洗涤性能”包括通常清洁例如硬表面清洁，如在餐具洗涤中，但还包括在纺织品如衣物上的洗涤性能，并且还包括工业清洁和机构清洁。

[0046] 野生型脂肪酶：术语“野生型”脂肪酶意指由天然存在的微生物（如在自然界中发现的细菌、酵母或丝状真菌）表达的脂肪酶。“野生型”脂肪酶可以在宿主细胞中进行重组表达。

[0047] 发明详述

[0048] 具有脂肪酶活性的多肽

[0049] 在一个实施例中，本发明涉及具有脂肪酶活性的分离的多肽，这些分离的多肽选自下组，该组由以下各项组成：(a) 与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少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100%序列一致性的多肽；(b) 由以下多核苷酸编码的多肽，该多核苷酸在低严格条件下、中严格条件下、中-高严格条件下、高严格条件下或非常高严格条件下与(i) SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3或(i)的全长互补体杂交；(c) 一种多肽，该多肽由与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3的成熟多肽编码序列具有至少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100%序列一致性的多核苷酸编码；(d) 一种多肽，该多肽是在一个或多个（例如若干个）位置处包括取代、缺失、和/或插入的SEQ ID NO:2的变体；以及(e) 一种多肽，该多肽是(a)、(b)、(c)或(d)的多肽中任一项的片段。

[0050] 在一个具体的实施例中，本发明涉及与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少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100%的序列一致性的多肽，并且其中该多肽具有SEQ ID NO:2的成熟多肽的至少70%的脂肪酶活性。

[0051] 在一个具体的实施例中，本发明涉及与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少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100%的序列一致性的多肽，并且其中该多肽具有SEQ ID NO:2的成熟多肽的至少75%的脂肪酶活性。

[0052] 在一个具体的实施例中，本发明涉及与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少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100%的序列一致性的多肽，并且其中该多肽具有SEQ ID NO:2的成熟多肽的至少80%的脂肪酶活性。

[0053] 在一个具体的实施例中，本发明涉及与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少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100%的序列一致性的多肽，并且其中该多肽具有SEQ ID NO:2的成熟多肽的至少85%的脂肪酶活性。



[0054] 在一个具体的实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少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100%的序列一致性的多肽,并且其中该多肽具有SEQ ID NO:2的成熟多肽的至少90%的脂肪酶活性。

[0055] 在一个具体的实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少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100%的序列一致性的多肽,并且其中该多肽具有SEQ ID NO:2的成熟多肽的至少95%的脂肪酶活性。

[0056] 在一个具体的实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少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100%的序列一致性的多肽,并且其中该多肽具有SEQ ID NO:2的成熟多肽的至少100%的脂肪酶活性。

[0057] 本发明的多肽优选地包括SEQ ID NO:2的氨基酸序列或其等位基因变体或由其组成;或是其具有脂肪酶活性的片段。在另一方面,该多肽包括SEQ ID NO:2的成熟多肽或由其组成。在另一方面,该多肽包括SEQ ID NO:2的氨基酸1至340或由其组成。

[0058] 在另一个实施例中,本发明涉及由以下多核苷酸编码的具有脂肪酶活性的分离的多肽,该多核苷酸在非常低严格条件、低严格条件、中严格条件、中-高严格条件、高严格条件、或非常高严格条件下与以下各项杂交:(i) SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3的成熟多肽编码序列,或(i)的全长互补体(萨姆布鲁克(Sambrook)等人,1989,分子克隆实验指南(Molecular Cloning, A Laboratory Manual),第二版,冷泉港(Cold Spring Harbor),纽约)。

[0059] 在另一方面,该多肽是SEQ ID NO:2的多肽的片段。该片段可以包含至少250个氨基酸残基,例如,至少255个、至少260个、至少265个、至少270个、至少275个、至少280个、至少285个、至少290个、至少295个、至少300个、至少305个、至少310个、至少315个、至少320个、至少325个、至少330个、至少335个、至少340个氨基酸残基。在一方面,该片段包含SEQ ID NO:2的多肽的氨基酸的数目的至少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%或至少95%。

[0060] SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3的多核苷酸或其子序列,连同SEQ ID NO:2的多肽或其片段可根据本领域熟知的方法用于设计核酸探针以鉴定和克隆来自不同属或种的株系的、编码具有脂肪酶活性的多肽的DNA。具体地,可以遵循标准DNA印迹程序,使用此类探针与感兴趣的细胞的基因组DNA或cDNA杂交,以便鉴定和分离其中的对应基因。这样的探针可以大大短于整个序列,但是长度应该为至少15个,例如至少25个、至少35个或至少70个核苷酸。优选地,核酸探针的长度为至少100个核苷酸,例如长度为至少200个核苷酸、至少300个核苷酸、至少400个核苷酸、至少500个核苷酸、至少600个核苷酸、至少700个核苷酸、至少800个核苷酸、或至少900个核苷酸。DNA和RNA探针二者均可使用。典型地将探针进行标记,用于检测相应的基因(例如,用<sup>32</sup>P、<sup>3</sup>H、<sup>35</sup>S、生物素或抗生物素蛋白)。本发明涵盖此类探针。

[0061] 可以针对与以上描述的探针杂交并且编码具有脂肪酶活性的多肽的DNA,对从此类其他菌株制备的基因组DNA或cDNA文库进行筛选。来自此类其他菌株的基因组DNA或其他DNA可以通过琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳,或其他分离技术来分离。来自文库的DNA或分

离的DNA可转移到并固定在硝酸纤维素或其他适合的载体材料上。为了鉴定与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3或其子序列杂交的克隆或DNA,将载体材料用于DNA印迹中。

[0062] 出于本发明的目的,杂交表示多核苷酸与对应于以下项的标记的核酸探针杂交:(i) SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3;(ii) SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3的成熟多肽编码序列;(iii) 其全长互补体;或(iv) 其子序列;杂交是在非常低至非常高严格条件下进行。在这些条件下与该核酸探针杂交的分子可以使用例如X射线薄膜或本领域中已知的任何其他检测手段进行检测。

[0063] 在一方面,该核酸探针是SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3。在另一方面,该核酸探针由SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3的至少15个并且多达1000个核苷酸组成。在另一个方面,核酸探针是编码以下项的多核苷酸:SEQ ID NO:2的多肽;或其片段。

[0064] 在另一个实施例中,本发明涉及一种分离的多肽,该多肽具有脂肪酶活性,由与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3的成熟多肽编码序列具有至少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100%序列一致性的多核苷酸编码。

[0065] 在另一个实施例中,本发明涉及SEQ ID NO:2的多肽、SEQ ID NO:2的成熟多肽、或其片段的变体,这些变体在一个或多个(例如若干个)位置处包括取代。在一个实施例中,向SEQ ID NO:2的多肽中引入的氨基酸取代的数目是1-50、1-40、1-30、1-20、1-10或1-5个,如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50个。

[0066] 这些氨基酸变化可以具有微小性质,即,不会显著地影响蛋白质的折叠和/或活性的保守氨基酸取代或插入;典型地1-30个氨基酸的小缺失;小的氨基末端的或羧基末端的延伸,例如氨基末端甲硫氨酸残基;高达20-25个残基的小接头肽;或通过改变净电荷或另一功能有利于纯化的小的延伸,例如聚组氨酸段、抗原表位或结合结构域。

[0067] 保守取代的实例是在下组的范围内:碱性氨基酸(精氨酸、赖氨酸及组氨酸)、酸性氨基酸(谷氨酸和天冬氨酸)、极性氨基酸(谷氨酰胺和天冬酰胺)、疏水性氨基酸(亮氨酸、异亮氨酸及缬氨酸)、芳香族氨基酸(苯丙氨酸、色氨酸及酪氨酸)及小氨基酸(甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸及甲硫氨酸)。一般不会改变比活性的氨基酸取代是本领域已知的并且例如由H. 诺伊拉特(Neurath)和R.L. 希尔(Hill),1979,在蛋白质(The Proteins),学术出版社(Academic Press),纽约中描述。常见的取代是Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Tyr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu、和Asp/Gly。

[0068] 可替代地,氨基酸改变具有这样的性质:改变多肽的物理化学特性。例如,氨基酸改变可以改进多肽的热稳定性、改变底物特异性、改变最适pH等。

[0069] 可以根据本领域中已知的程序,如定点诱变或丙氨酸扫描诱变(坎宁汉(Cunningham)和威尔斯(Wells),1989,科学(Science) 244:1081-1085)来鉴定多肽中的必需氨基酸。在后种技术中,在分子中的每个残基处引入单个丙氨酸突变,并且测试所得突变分子的脂肪酶活性以鉴定对分子的活性关键的氨基酸残基。还参看希尔顿(Hilton)等人,1996,生物化学杂志(J. Biol. Chem.) 271:4699-4708。也可结合假定接触位点氨基酸的突变,如通过以下技术例如核磁共振、结晶学、电子衍射、或光亲和标记进行确定,对结构进行

物理学分析,从而确定酶的活性位点或其他生物学相互作用。参见,例如,德沃斯(de Vos)等人,1992,科学(Science) 255:306-312;史密斯(Smith)等人,1992,分子生物学杂志(J.Mol.Biol.) 224:899-904;沃勒达尔(Wlodaver)等人,1992,欧洲生物化学学会联盟通讯(FEBS Lett.) 309:59-64。还可以从与相关多肽的比对推断鉴别必需氨基酸。

[0070] 可以做出单个或多个氨基酸取代、缺失和/或插入并且使用诱变、重组、和/或改组的已知方法进行测试,随后进行相关筛选程序,如由里德哈尔-奥尔森(Reidhaar-Olson)和萨奥尔(Sauer),1988,科学(Science) 241:53-57;博维(Bowie)和萨奥尔,1989,美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA) 86:2152-2156;WO 95/17413;或WO 95/22625披露的那些。其他可以使用的方法包括易错PCR、噬菌体展示(例如洛曼(Lowman)等人,1991,生物化学(Biochemistry) 30:10832-10837;US 5223409;WO 92/06204)以及区域定向诱变(德比什尔(Derbyshire)等人,1986,基因(Gene) 46:145;内尔(Ner)等人,1988,DNA 7:127)。

[0071] 可以结合诱变/改组方法与高通量自动化筛选方法来检测由宿主细胞表达的克隆的、诱变的多肽的活性(内斯(Ness)等人,1999,自然生物技术(Nature Biotechnology) 17:893-896)。编码活性多肽的诱变的DNA分子可以回收自宿主细胞,并且使用本领域的标准方法对其进行迅速测序。这些方法允许迅速确定多肽中单个氨基酸残基的重要性。

[0072] 多肽可以是杂合多肽,其中一个多肽的区域融合在另一多肽的区域的N末端或C末端。

[0073] 多肽还可以是融合多肽或可切割的融合多肽,其中另一多肽融合在本发明的多肽的N-末端或C-末端。通过将编码另一多肽的多核苷酸融合到本发明的多核苷酸而产生融合多肽。用于产生融合多肽的技术在本领域是已知的,并且包括连接编码多肽的编码序列,这样使得它们在框内并且使得融合多肽的表达处于相同的一个或多个启动子和终止子的控制下。融合多肽还可以使用内含肽技术来构建,其中融合多肽在翻译后产生(库珀(Cooper)等人,1993,欧洲分子生物学学会杂志(EMBO J.) 12:2575-2583;道森(Dawson)等人,1994,科学(Science) 266:776-779)。

[0074] 融合多肽可以在两种多肽之间进一步包括切割位点。在融合蛋白分泌之时,该位点被切割,从而释放出这两种多肽。切割位点的实例包括但不限于以下各项中披露的位点:马丁(Martin)等人,2003,工业微生物学与生物技术杂志(J.Ind.Microbiol.Biotechnol.) 3:568-576;斯韦蒂纳(Svetina)等人,2000,生物技术杂志(J.Biotechnol.) 76:245-251;拉斯马森(Rasmussen)-威尔逊(Wilson)等人,1997,应用与环境微生物学(Appl.Environ.Microbiol.) 63:3488-3493;华德(Ward)等人,1995,生物技术(Biotechnology) 13:498-503;以及孔特拉斯(Contreras)等人,1991,生物技术9:378-381;伊顿(Eaton)等人,1986,生物化学(Biochemistry) 25:505-512;柯林斯(Collins)-莱斯(Racie)等人,1995,生物技术13:982-987;卡特(Carter)等人,1989,蛋白:结构和遗传学(Proteins:Structure,Function,and Genetics) 6:240-248;以及史蒂文斯(Stevens),2003,世界药物发现(Drug Discovery World) 4:35-48。

[0075] 考虑到如上所述的本发明的多肽还可以为用于产生脂肪酶变体的一个或多个(例如若干个)取代提供基础。因此,该多肽还应是亲本脂肪酶。

[0076] 具有脂肪酶活性的多肽的来源

[0077] 本发明的具有脂肪酶活性的多肽可以从任何属的微生物获得。出于本发明的目

的,如在此结合一种给定的来源使用的术语“从...中获得”应意指由多核苷酸编码的多肽是由该来源或者由其中已经插入来自该来源的多核苷酸的菌株产生的。在一方面,该多肽是胞外分泌的。

[0078] 该多肽可以是细菌脂肪酶或真菌脂肪酶。在一个优选的方面,该多肽是闪光须霉脂肪酶,例如,SEQ ID NO:2的脂肪酶、SEQ ID NO:2的成熟多肽或其片段。

[0079] 将理解的是,对于以上提到的物种而言,本发明涵盖完全状态和不完全状态(perfect and imperfect states)二者、以及其他分类学等效物,例如无性型,而不管它们已知的物种名称是什么。本领域普通技术人员将容易地识别适当等效物的身份。

[0080] 细菌和真菌物种的菌株可以容易地在许多培养物保藏中心为公众所获得,如美国典型培养物保藏中心(ATCC)、德国微生物菌种保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ)、荷兰菌种保藏中心(Centraalbureau Voor Schimmelcultures, CBS)以及美国农业研究服务专利培养物保藏中心北方地区研究中心(NRRL)。

[0081] 可以使用以上提到的探针从其他来源,包括从自然界(例如,土壤、堆肥、水等)分离的微生物或直接从自然材料(例如,土壤、堆肥、水等)获得的DNA样品鉴定和获得该多肽。用于从自然生活环境中直接分离微生物和DNA的技术是本领域熟知的。然后可通过在另一种微生物或混合DNA样本的基因组DNA或cDNA文库中类似地进行筛选来获得编码多肽的多核苷酸。一旦用一种或多种探针检测到编码多肽的多核苷酸,就可以通过使用本领域普通技术人员已知的技术分离或克隆该多核苷酸(参见例如,萨姆布鲁克(Sambrook)等人,1989,同上)。

[0082] 多肽的制备

[0083] 本发明还涉及用于获得具有脂肪酶活性的多肽的方法,这些方法包括:(a)向亲本脂肪酶(例如,野生型)中对应于SEQ ID NO:2的多肽的位置的一个或多个(例如,若干个)位置处引入取代;并且(b)回收该变体。

[0084] 可以使用本领域已知的任何诱变程序来制备这些变体,例如定点诱变、合成基因构建、半合成基因构建、随机诱变、改组等。

[0085] 定点诱变是在编码该亲本的多核苷酸中的一个或多个限定位点处引入一个或多个(例如,若干个)突变的技术。

[0086] 通过使用涉及含有所希望的突变的寡核苷酸引物的PCR可以体外实现定点诱变。也可以通过盒式诱变进行体外定点诱变,所述盒式诱变涉及由限制酶在包括编码亲本的多核苷酸的质粒中的位点处切割并且随后将含有突变的寡核苷酸连接在多核苷酸中。通常,消化该质粒与该寡核苷酸的限制酶是相同的,以允许该质粒的粘性末端以及插入片段彼此连接。参见,例如谢勒(Scherer)和戴维斯(Davis),1979,美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)76:4949-4955;和巴顿(Barton)等人,1990,核酸研究(Nucleic Acids Res.)18:7349-4966。

[0087] 还可以通过本领域已知的方法体内实现定点诱变。参见,例如,US 2004/0171154;斯道瑞希(Storici)等人,2001,自然生物技术(Nature Biotechnol.)19:773-776;卡伦(Kren)等人,1998,自然医学(Nat.Med.)4:285-290;以及凯利萨诺(Calissano)和马奇诺(Macino),1996,真菌遗传学简讯(Fungal Genet.Newslett.)43:15-16。

[0088] 在本发明中可以使用任何定点诱变程序。存在可用于制备变体的很多可商购的试剂盒。

[0089] 合成基因构建需要体外合成一种设计的多核苷酸分子以编码一种所感兴趣的多肽。基因合成可以利用多种技术来进行,如由田(Tian)等人(2004,自然(Nature) 432:1050-1054)所述的基于多路微芯片的技术、以及其中在光可编程的微流芯片上合成并组装寡核苷酸的类似技术。

[0090] 使用已知的诱变、重组和/或改组方法、随后进行一个相关的筛选程序可以做出单一或多种氨基酸取代、缺失和/或插入并对其进行测试,这些相关的筛选程序例如由瑞德哈尔-奥尔森(Reidhaar-Olson)和萨奥尔(Sauer),1988,科学241:53-57;鲍伊(Bowie)和萨奥尔,1989,美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA) 86:2152-2156;WO 95/17413;或WO 95/22625。其他可以使用的方法包括易错PCR、噬菌体展示(例如洛曼(Lowman)等人,1991,生物化学(Biochemistry) 30:10832-10837;US 5,223,409;WO 92/06204)以及区域定向诱变(德比什尔(Derbyshire)等人,1986,基因(Gene) 46:145;内尔(Ner)等人,1988,DNA 7:127)。

[0091] 可以结合诱变/改组方法与高通量自动化筛选方法来检测由宿主细胞表达的克隆的、诱变的多肽的活性(内斯(Ness)等人,1999,自然生物技术(Nature Biotechnology) 17:893-896)。编码活性多肽的诱变的DNA分子可以回收自宿主细胞,并且使用本领域的标准方法对其进行迅速测序。这些方法允许迅速确定多肽中单个氨基酸残基的重要性。

[0092] 通过组合合成基因构建、和/或定点诱变、和/或随机诱变、和/或改组的多个方面来实现半合成基因构建。半合成构建典型地是,利用合成的多核苷酸片段的过程结合PCR技术。因此,基因的限定的区域可以从头合成,而其他区域可以使用位点特异性诱变引物来扩增,而还有其他区域可以经受易错PCR或非易错PCR扩增。然后可以对多核苷酸子序列进行改组。核酸构建体

[0093] 本发明还涉及核酸构建体,这些核酸构建体包含可操作地连接至一个或多个控制序列的本发明的多核苷酸,在与控制序列相容的条件下,这些控制序列指导编码序列在合适的宿主细胞中的表达。

[0094] 该多核苷酸可以按多种方式操纵,以提供该多肽的表达。取决于表达载体,在多核苷酸插入载体之前对其进行操纵可以是令人希望的或必需的。用于利用重组DNA方法修饰多核苷酸的技术是本领域熟知的。

[0095] 控制序列可以是启动子,即由宿主细胞识别用于表达该多核苷酸的多核苷酸。该启动子包含转录控制序列,这些序列介导该多肽的表达。该启动子可以是在宿主细胞中显示出转录活性的任何多核苷酸,包括突变型、截短型及杂合型启动子,并且可以由编码与该宿主细胞同源或异源的细胞外或细胞内多肽的基因获得。

[0096] 在细菌宿主细胞中,适合指导本发明的核酸构建体转录的启动子的实例是获得自以下各项的启动子:解淀粉芽孢杆菌 $\alpha$ -淀粉酶基因(amyQ)、地衣芽孢杆菌 $\alpha$ -淀粉酶基因(amyL)、地衣芽孢杆菌青霉素酶基因(penP)、嗜热脂肪芽孢杆菌麦芽淀粉酶基因(amyM)、枯草芽孢杆菌果聚糖蔗糖酶基因(sacB)、枯草芽孢杆菌xy1A和xy1B基因、苏云金芽孢杆菌cryIIIA基因(阿盖斯(Agaisse)和里瑞克拉斯(Lereclus),1994,分子微生物学(Molecular Microbiology) 13:97-107)、大肠杆菌lac操纵子、大肠杆菌trc启动子(埃贡(Egon)等人,

1988,基因)69:301-315),天蓝链霉菌琼脂酶基因(dagA)、和原核 $\beta$ -内酰胺酶基因(维拉-卡玛诺夫(Villa-Kamaroff)等人,1978,美国国家科学院院刊75:3727-3731)、连同tac启动子(德波尔(DeBoer)等人,1983,美国国家科学院院刊80:21-25)。另外的启动子描述于“来自重组细菌的有用蛋白(Useful proteins from recombinant bacteria)”,吉尔伯特(Gilbert)等人,1980,科学美国人(Scientific American),242:74-94;以及萨姆布鲁克(Sambrook)等人,1989,同上。串联启动子的实例披露于WO 99/43835中。

[0097] 用于指导本发明的核酸构建体在丝状真菌宿主细胞中的转录的合适启动子的实例是从以下各项的基因获得的启动子:构巢曲霉乙酰胺酶、黑曲霉中性 $\alpha$ -淀粉酶、黑曲霉酸稳定性 $\alpha$ -淀粉酶、黑曲霉或泡盛曲霉葡糖淀粉酶(glaA)、米曲霉TAKA淀粉酶、米曲霉碱性蛋白酶、米曲霉丙糖磷酸异构酶、尖孢镰刀菌胰蛋白酶样蛋白酶(WO 96/00787)、镶片镰孢菌淀粉葡糖苷酶(WO 00/56900)、镶片镰孢菌Daria(*Fusarium venenatum* Daria)(WO 00/56900)、镶片镰孢Quinn(*Fusarium venenatum* Quinn)(WO 00/56900)、米黑根毛霉(*Rhizomucor miehei*)脂肪酶、米黑根毛霉天冬氨酸蛋白酶、里氏木霉 $\beta$ -葡糖苷酶、里氏木霉纤维二糖水解酶I、里氏木霉纤维二糖水解酶II、里氏木霉内切葡聚糖酶I、里氏木霉内切葡聚糖酶II、里氏木霉内切葡聚糖酶III、里氏木霉内切葡聚糖酶IV、里氏木霉内切葡聚糖酶V、里氏木霉木聚糖酶I、里氏木霉木聚糖酶II、里氏木霉 $\beta$ -木糖苷酶,以及NA2tpi启动子(修饰的启动子,其来自曲霉属中性 $\alpha$ -淀粉酶基因,其中未翻译的前导序列由曲霉属丙糖磷酸异构酶基因的未翻译的前导序列替代;非限制性实例包括修饰的启动子,其来自黑曲霉中性 $\alpha$ -淀粉酶的基因,其中未翻译的前导序列由构巢曲霉或米曲霉丙糖磷酸异构酶基因的未翻译的前导序列替代);以及其突变型启动子、截短型启动子、以及杂合型启动子。

[0098] 在酵母宿主中,有用的启动子获得自以下各项的基因:酿酒酵母烯醇酶(ENO1)、酿酒酵母半乳糖激酶(GAL1)、酿酒酵母醇去氢酶/甘油醛-3-磷酸去氢酶(ADH1、ADH2/GAP)、酿酒酵母丙糖磷酸异构酶(TPI)、酿酒酵母金属硫蛋白(CUP1)、以及酿酒酵母3-磷酸甘油酸激酶。罗马诺斯(Romanos)等人,1992,酵母(Yeast)8:423-488描述了酵母宿主细胞的其他有用的启动子。

[0099] 控制序列还可以是由宿主细胞识别以终止转录的转录终止子。该终止子序列被可操作地连接至编码该多肽的多核苷酸的3'-末端。可以使用在宿主细胞中具有功能的任何终止子。

[0100] 用于细菌宿主细胞的优选终止子是从克劳氏芽孢杆菌碱性蛋白酶(aprH)、地衣芽孢杆菌 $\alpha$ -淀粉酶(amyL)以及大肠杆菌核糖体RNA(rrnB)的基因获得。

[0101] 丝状真菌宿主细胞的优选终止子是从以下各项的基因中获得的:构巢曲霉邻氨基苯甲酸合酶、黑曲霉葡糖淀粉酶、黑曲霉 $\alpha$ -葡萄糖苷酶、米曲霉TAKA淀粉酶以及尖孢镰刀菌胰蛋白酶样蛋白酶。

[0102] 用于酵母宿主细胞的优选终止子是从酿酒酵母烯醇化酶、酿酒酵母细胞色素C(CYC1)、以及酿酒酵母甘油醛-3-磷酸脱氢酶的基因获得。罗马诺斯(Romanos)等人,1992,同上,描述了酵母宿主细胞的其他有用的终止子。

[0103] 控制序列还可以是启动子下游和基因的编码序列上游的mRNA稳定子区,其增加该基因的表达。

[0104] 适合的mRNA稳定子区的实例是从以下获得的:苏云金芽孢杆菌cryIIIA基因(WO

94/25612) 和枯草芽孢杆菌SP82基因(化(Hue)等人,1995,细菌学杂志(Journal of Bacteriology) 177:3465-3471)。

[0105] 该控制序列还可以是前导序列,对宿主细胞翻译很重要的非翻译mRNA区域。该前导子序列可操作地连接至编码该多肽的多核苷酸的5'-末端。可以使用在宿主细胞中起作用的任何前导序列。

[0106] 用于丝状真菌宿主细胞的优选前导序列是从米曲霉TAKA淀粉酶和构巢曲霉丙糖磷酸异构酶的基因获得。

[0107] 酵母宿主细胞的适合的前导子是从以下各项的基因中获得的:酿酒酵母烯醇酶(ENO 1)、酿酒酵母3磷酸甘油酸激酶、酿酒酵母 $\alpha$ -因子、和酿酒酵母醇去氢酶/甘油醛-3磷酸去氢酶(ADH2/GAP)。

[0108] 该控制序列还可以是一种多腺苷酸化序列,即被可操作地连接至该多肽编码序列的3'-末端并且当转录时由宿主细胞识别成将多腺苷酸残基添加到所转录的mRNA上的一个信号的一种序列。可以使用在宿主细胞中起作用的任何多腺苷酸化序列。

[0109] 丝状真菌宿主细胞的优选多腺苷酸化序列是从以下各项的基因中获得的:构巢曲霉邻氨基苯甲酸合酶、黑曲霉葡糖淀粉酶、黑曲霉 $\alpha$ -葡萄糖苷酶、米曲霉TAKA淀粉酶以及尖孢镰刀菌胰蛋白酶样蛋白酶。

[0110] 对于酵母宿主细胞有用的多腺苷酸化序列在郭(Guo)和谢尔曼(Sherman),1995,分子细胞生物学(Mol. Cellular Biol.) 15:5983-5990中得以描述。

[0111] 控制序列还可以是编码连接至多肽的N-末端的信号肽并指导该多肽进入细胞的分泌途径的信号肽编码区域。多核苷酸的编码序列的5'端本身可包含在翻译阅读框中天然与编码多肽的编码序列区段相连接的信号肽编码序列。可替代地,该编码序列的5'末端可以包含对于该编码序列来说是外来的信号肽编码序列。在编码序列不天然地包含信号肽编码序列的情况下,可能需要外源信号肽编码序列。可替代地,外源信号肽编码序列可简单地替换天然的信号肽编码序列以便增强该多肽的分泌。然而,可以使用指导所表达多肽进入宿主细胞的分泌通路的任何信号肽编码序列。

[0112] 用于细菌宿主细胞的有效信号肽编码序列是从以下各项的基因获得的信号肽编码序列:芽孢杆菌属NCIB 11837产麦芽糖淀粉酶、地衣芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶、地衣芽孢杆菌 $\beta$ -内酰胺酶、嗜热脂肪芽孢杆菌 $\alpha$ -淀粉酶、嗜热脂肪芽孢杆菌中性蛋白酶(nprT、nprS、nprM)以及枯草芽孢杆菌prsA。西蒙纳(Simonen)和帕尔瓦(Palva),1993,微生物学评论(Microbiological Reviews) 57:109-137描述了另外的信号肽。

[0113] 用于丝状真菌宿主细胞的有效信号肽编码序列是从以下各项的基因中获得的信号肽编码序列:黑曲霉中性淀粉酶、黑曲霉葡糖淀粉酶、米曲霉TAKA淀粉酶、特异腐质霉纤维素酶、特异腐质霉内切葡聚糖酶V、柔毛腐质霉脂肪酶以及米黑毛霉天冬氨酸蛋白酶。

[0114] 对于酵母宿主细胞有用的信号肽获得自以下项的基因:酿酒酵母 $\alpha$ -因子和酿酒酵母转化酶。罗马诺斯(Romanos)等人,1992,同上,描述了其他有用的信号肽编码序列。

[0115] 控制序列还可以是编码位于多肽的N-末端的前肽的前肽编码序列。生成的多肽被称为前体酶(proenzyme)或多肽原(或者在一些情况下被称为酶原(zymogen))。多肽原通常是无活性的并且可以通过从该多肽原上催化切割或自动催化切割前肽而被转化成活性多肽。前肽编码序列可以从以下各项的基因获得:枯草芽孢杆菌碱性蛋白酶(aprE)、枯草芽孢

杆菌中性蛋白酶(nprT)、嗜热毁丝霉漆酶(WO 95/33836)、曼赫根毛霉天冬氨酸蛋白酶、以及酿酒酵母 $\alpha$ 因子。

[0116] 当信号肽和前肽序列同时存在时,前肽序列的位置紧邻于多肽的N-末端,且信号肽序列的位置紧邻于前肽序列的N-末端。

[0117] 还可以希望添加调节序列,这些调节序列相对于宿主细胞的生长来调节多肽的表达。调节系统的实例是响应于化学或物理刺激而引起基因的表达开启或关闭的那些,包括调节化合物的存在。在原核系统中的调节系统包括lac、tac、以及trp操纵基因系统。在酵母中,可以使用ADH2系统或GAL1系统。在丝状真菌中,可以使用黑曲霉葡萄糖淀粉酶启动子、米曲霉TAKA $\alpha$ -淀粉酶启动子、以及米曲霉葡萄糖淀粉酶启动子。调节序列的其他例子是允许基因扩增的那些。在真核系统中,这些调控序列包括在甲氨蝶呤存在下被扩增的二氢叶酸还原酶基因以及用重金属扩增的金属硫蛋白基因。在这些情况下,编码该多肽的多核苷酸将与调控序列可操作地连接。

[0118] 表达载体

[0119] 本发明还涉及包含本发明的多核苷酸、启动子、以及转录和翻译终止信号的重组表达载体。不同的核苷酸和控制序列可以连接在一起以产生重组表达载体,该重组表达载体可以包括一个或多个便利的限制酶切位点以允许在这些位点处插入或取代编码该多肽的多核苷酸。可替代地,该多核苷酸可以通过将该多核苷酸或包括该多核苷酸的核酸构建体插入用于表达的适当载体中来表达。在产生该表达载体时,该编码序列位于该载体中,这样使得该编码序列与该供表达的适当控制序列可操作地连接。

[0120] 重组表达载体可以是可便利地经受重组DNA程序并且可引起多核苷酸表达的任何载体(例如,质粒或病毒)。载体的选择将典型地取决于该载体与有待引入该载体的宿主细胞的相容性。该载体可以是线性的或闭合的环状质粒。

[0121] 载体可以是自主复制载体,即,作为染色体外实体存在的载体,其复制独立于染色体复制,例如,质粒、染色体外元件、微染色体、或人工染色体。该载体可包含任何用以保证自我复制的要素。可替代地,该载体可以是这样载体,当它被引入该宿主细胞中时,被整合到基因组中并且与其中已整合了它的一个或多个染色体一起复制。此外,可以使用单一载体或质粒或两个或更多个载体或质粒(这些载体或质粒共同含有待引入到宿主细胞的基因组中的总DNA)或转座子。

[0122] 该载体优选包含一个或多个允许方便地选择转化细胞、转染细胞、转导细胞等细胞的选择性标记。选择性标记是这样一种基因,该基因的产物提供了杀生物剂抗性、病毒抗性、重金属抗性、营养缺陷型的原养型等。

[0123] 细菌性选择性标记的实例是地衣芽孢杆菌或枯草芽孢杆菌da1基因,或赋予抗生素抗性(例如氨苄青霉素、氯霉素、卡那霉素、新霉素、大观霉素或四环素抗性)的标记。用于酵母宿主细胞的适合的标记包括但不限于ADE2、HIS3、LEU2、LYS2、MET3、TRP1、以及URA3。用于在丝状真菌宿主细胞中使用的选择性标记包括但不限于amdS(乙酰胺酶)、argB(鸟氨酸氨甲酰基转移酶)、bar(草胺磷乙酰转移酶)、hph(潮霉素磷酸转移酶)、niaD(硝酸还原酶)、pyrG(乳清苷-5'磷酸脱羧酶)、sC(硫酸腺苷基转移酶)、以及trpC(邻氨基苯甲酸合酶),连同其等效物。优选在曲霉属细胞中使用的是构巢曲霉或米曲霉amdS和pyrG基因以及吸水链霉菌bar基因。



[0124] 载体优选含有允许载体整合到宿主细胞的基因组中或载体在细胞中独立于基因组自主复制的一个或多个元件。

[0125] 对于整合到该宿主细胞基因组中,该载体可以依靠编码该多肽的多核苷酸序列或者用于通过同源或非同源重组整合到该基因组中的该载体的任何其他元件。可替代地,该载体可以包含用于指导通过同源重组而整合到宿主细胞基因组中的一个或多个染色体中的一个或多个精确位置处的另外的多核苷酸。为了增加在精确位置整合的可能性,这些整合元件应包含足够数量的核酸,例如100至10,000个碱基对、400至10,000个碱基对、以及800至10,000个碱基对,这些碱基对与对应的靶序列具有高度的序列一致性以提高同源重组的可能性。这些整合元件可以是与宿主细胞的基因组内的靶序列同源的任何序列。此外,这些整合元件可以是非编码多核苷酸或编码多核苷酸。另一个方面,该载体可以通过非同源重组整合到宿主细胞的基因组中。

[0126] 对于自主复制,该载体可以进一步包括使该载体能够在所讨论的宿主细胞中自主复制的复制起点。复制起点可以是在细胞中起作用的介导自主复制的任何质粒复制子。术语“复制起点(origin of replication)”或“质粒复制子(plasmid replicator)”意指使得质粒或载体可在体内复制的多核苷酸。

[0127] 细菌的复制起点的实例是允许在大肠杆菌内进行复制的质粒pBR322、pUC19、pACYC177、以及pACYC184以及允许在芽孢杆菌内进行复制的pUB110、pE194、pTA1060、以及pAMB1的复制起点。

[0128] 用于在酵母宿主细胞中使用的复制起点的实例是2微米复制起点ARS1、ARS4、ARS1与CEN3的组合、以及ARS4与CEN6的组合。

[0129] 在丝状真菌细胞中有用的复制起点的实例是AMA1和ANS1(格姆斯(Gems)等人,1991,基因(Gene)98:61-67;卡伦(Cullen)等人,1987,核酸研究(Nucleic Acids Res.)15:9163-9175;WO 00/24883)。根据WO 00/24883中披露的方法可以实现AMA1基因的分离和包含该基因的质粒或载体的构建。

[0130] 可以将本发明的多核苷酸的多于一个拷贝插入宿主细胞中以增加多肽的产生。通过将序列的至少一个另外的拷贝整合到宿主细胞基因组中或者通过包含与该多核苷酸一起的可扩增的选择性标记基因可以获得多核苷酸的增加的拷贝数目,其中通过在适当的选择性试剂的存在下培养细胞可以选择包含选择性标记基因的经扩增的拷贝的细胞、以及由此该多核苷酸的另外的拷贝。

[0131] 用于连接上述元件以构建本发明的重组表达载体的程序对于本领域普通技术人员而言是熟知的(参见,例如萨拉布鲁克(Sambrook)等人,1989,同上)。

[0132] 宿主细胞

[0133] 本发明还涉及重组宿主细胞,这些重组宿主细胞包括编码本发明的多肽的、可操作地连接至一个或多个控制序列的多核苷酸,该一个或多个控制序列指导本发明的多肽的产生。将包括多核苷酸的构建体或载体引入宿主细胞中,这样使得该构建体或载体被维持作为染色体整合体或作为自主复制的染色体外载体,如早前所述。术语“宿主细胞”涵盖由于复制过程中发生的突变与亲本细胞不同的亲本细胞的任何后代。宿主细胞的选择在很大程度上取决于编码该多肽的基因及其来源。

[0134] 宿主细胞可以是在重组产生多肽中有用的任何细胞,例如原核细胞或真核细胞。

[0135] 原核宿主细胞可以是任何革兰氏阳性或革兰氏阴性细菌。革兰氏阳性细菌包括,但不限于芽孢杆菌属、梭菌属、肠球菌属、土芽孢杆菌属、乳杆菌属、乳球菌属、大洋芽孢杆菌属 (*Oceanobacillus*)、葡萄球菌属、链球菌属和链霉菌属。革兰氏阴性细菌包括,但不限于弯曲杆菌属、大肠杆菌、黄杆菌属、梭杆菌属、螺杆菌属、泥杆菌属、奈瑟球菌属、假单胞菌属、沙门菌属和脲原体属。

[0136] 细菌宿主细胞可以是任何芽孢杆菌的细胞,包括但不限于嗜碱芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、短芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、克劳氏芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、坚强芽孢杆菌、灿烂芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、以及苏云金芽孢杆菌的细胞。

[0137] 细菌宿主细胞还可以是任何链球菌属的细胞,包括但不限于似马链球菌、酿脓链球菌、乳房链球菌和马链球菌兽瘟亚种的细胞。

[0138] 细菌宿主细胞还可以是任何链霉菌细胞,包括但不局限于不产色链霉菌、除虫链霉菌、天蓝链霉菌、灰色链霉菌以及浅青紫链霉菌细胞。

[0139] 将DNA引入芽孢杆菌属细胞中可通过以下来实现:原生质体转化(参见例如,张(Chang)和科恩(Cohen),1979,分子遗传学与基因组学(*Mol.Gen.Genet.*)168:111-115)、感受态细胞转化(参见,例如,杨格(Young)和斯皮辛曾(Spizizen),1961,细菌学杂志(*J.Bacteriol.*)81:823-829;或杜拜努(Dubnau)以及大卫杜夫-阿贝尔森(Davidoff-Abelson),1971,分子生物学杂志(*J.Mol.Biol.*)56:209-221)、电穿孔(参见,例如,茂川(Shigekawa)和道尔(Dower),1988,生物技术(*Biotechniques*)6:742-751)、或者接合(参见,例如克勒(Koehler)和索恩(Thorne),1987,细菌学杂志(*J.Bacteriol.*)169:5271-5278)。通过原生质体转化(参见,例如,哈纳汉(Hanahan),1983,分子生物学杂志(*J.Mol.Biol.*)166:557-580)或电穿孔(参见,例如,道尔(Dower)等人,1988,核酸研究(*Nucleic Acids Res.*)16:6127-6145)可以实现将DNA引入到大肠杆菌细胞中。将DNA引入链霉菌属细胞中可通过以下来实现:原生质体转化、电穿孔(参见,例如,贡(Gong)等人,2004,叶线形微生物学(*Folia Microbiol.*) (Praha(布拉格))49:399-405)、接合(参见,例如,马佐迪耶(Mazodier)等人,1989,细菌学杂志(*J.Bacteriol.*)171:3583-3585)、或转导(参见,例如,伯克(Burke)等人,2001,美国科学院院刊(*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*)98:6289-6294)。将DNA引入假单胞菌属细胞中可通过以下来实现:电穿孔(参见,例如,蔡(Choi)等人,2006,微生物学方法杂志(*J.Microbiol.Methods*)64:391-397)或接合(参见,例如,皮内多(Pinedo)和斯梅茨(Smets),2005,应用与环境微生物学(*Appl.Environ.Microbiol.*)71:51-57)。将DNA引入链球菌属细胞中可通过以下来实现:天然感受态(参见,例如,佩里(Perry)和藏满(Kuramitsu),1981,感染与免疫(*Infect.Immun.*)32:1295-1297)、原生质体转化(参见,例如,凯特(Catt)和乔力克(Jollick),1991,微生物学(*Microbios*)68:189-207)、电穿孔(参见,例如,巴克利(Buckley)等人,1999,应用与环境微生物学(*Appl.Environ.Microbiol.*)65:3800-3804)、或者接合(参见,例如,克莱威尔(Clewell),1981,微生物学评论(*Microbiol.Rev.*)45:409-436)。然而,可以使用本领域已知的用于将DNA引入宿主细胞中的任何方法。

[0140] 宿主细胞还可以是真核细胞,如哺乳动物、昆虫、植物、或真菌细胞。

[0141] 宿主细胞可以是真菌细胞。如在此使用的“真菌”包括子囊菌门(*Ascomycota*)、担

子菌门 (Basidiomycota)、壶菌门 (Chytridiomycota)、以及接合菌门 (Zygomycota)、连同卵菌门 (Oomycota) 和全部有丝分裂孢子真菌 (如由霍克斯沃思 (Hawksworth) 等人在安斯沃思和拜斯比真菌词典 (Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi), 第8版, 1995, 国际应用生物科学中心 (CAB International), 大学出版社 (University Press), 英国剑桥 (Cambridge, UK) 中进行定义的)。

[0142] 该真菌宿主细胞可以是酵母细胞。如在此使用的“酵母”包括产子囊酵母 (内孢霉目)、产担子酵母和属于半知菌类 (芽孢纲) 的酵母。由于酵母的分类在将来可能有变化, 出于本发明的目的, 酵母应如酵母生物学和活动性 (Biology and Activities of Yeast) (斯金纳 (Skinner)、帕斯莫尔 (Passmore)、以及达文波特 (Davenport) 编辑, 应用细菌学学会讨论会 (Soc. App. Bacteriol. Symposium) 系列第9期, 1980) 所述地进行定义。

[0143] 酵母宿主细胞可以是假丝酵母属、汉逊酵母属、克鲁弗酵母属、毕赤酵母属、酵母属、裂殖酵母属、或亚罗酵母属细胞, 例如乳酸克鲁弗酵母、卡氏酵母 (*Saccharomyces carlsbergensis*)、酿酒酵母、糖化酵母、道格拉氏酵母 (*Saccharomyces douglasii*)、克鲁弗酵母 (*Saccharomyces kluyveri*)、诺地酶母 (*Saccharomyces norbensis*)、卵形酵母、或亚罗解脂酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 细胞。

[0144] 真菌宿主细胞可以是丝状真菌细胞。“丝状真菌”包括真菌门 (Eumycota) 和卵菌门的亚门 (如由霍克斯沃思 (Hawksworth) 等人, 1995, 见上文所定义) 的所有丝状形式。丝状真菌通常的特征在于由壳多糖、纤维素、葡聚糖、壳聚糖、甘露聚糖、以及其他复杂多糖构成的菌丝体壁。营养生长是通过菌丝延伸, 而碳分解代谢是专性需氧的。相反, 酵母 (如酿酒酵母) 的营养生长是通过单细胞菌体的出芽 (budding), 而碳分解代谢可以是发酵的。

[0145] 丝状真菌宿主细胞可以是枝顶孢霉属、曲霉属、短梗霉属、烟管菌属、拟蜡菌属、金孢子菌属、鬼伞菌属、革盖菌属、隐球菌属、线黑粉酵母属、镰孢属、腐质霉属、梨孢菌属、毛霉属、毁丝霉属、新美鞭菌属、脉孢菌属、拟青霉属、青霉菌属、平革菌属、白腐菌属、瘤胃壶菌属、侧耳属、裂褶菌属、踝节菌属、嗜热子囊菌属、梭孢壳属、弯颈霉属、栓菌属、或木霉属的细胞。

[0146] 例如, 丝状真菌宿主细胞可以是泡盛曲霉、臭曲霉、烟曲霉、日本曲霉、构巢曲霉、黑曲霉、米曲霉、黑刺烟管菌 (*Bjerkandera adusta*)、干拟蜡菌 (*Ceriporiopsis aneirina*)、卡内基拟蜡菌 (*Ceriporiopsis caregiea*)、浅黄拟蜡孔菌 (*Ceriporiopsis gilvescens*)、潘诺希塔拟蜡菌 (*Ceriporiopsis pannocinta*)、环带拟蜡菌 (*Ceriporiopsis rivulosa*)、微红拟蜡菌 (*Ceriporiopsis subrufa*)、虫拟蜡菌 (*Ceriporiopsis subvermispora*)、狭边金孢子菌 (*Chrysosporium inops*)、嗜角质金孢子菌、卢克诺文思金孢子菌 (*Chrysosporium lucknowense*)、粪状金孢子菌 (*Chrysosporium merdarium*)、租金孢子菌、昆士兰金孢子菌、热带金孢子菌、褐薄金孢子菌 (*Chrysosporium zonatum*)、灰盖鬼伞 (*Coprinus cinereus*)、毛革盖菌 (*Coriolus hirsutus*)、杆孢状镰孢、谷类镰孢、库威镰孢、大刀镰孢、禾谷镰孢、禾赤镰孢、异孢镰孢、合欢木镰孢、尖镰孢、多枝镰孢、粉红镰孢、接骨木镰孢、肤色镰孢、拟分枝孢镰孢、硫色镰孢、圆镰孢、拟丝孢镰孢、镶片镰孢、特异腐质霉、柔毛腐质霉、米黑毛霉、卷枝毛霉、嗜热毁丝霉、粗糙链孢菌、产紫青霉菌、黄孢原毛平革菌、射脉菌 (*Phlebia radiata*)、刺芹侧耳 (*Pleurotus eryngii*)、土生梭孢壳、长域毛栓菌 (*Trametes villosa*)、变色栓菌 (*Trametes versicolor*)、哈茨木霉、康宁木霉、长枝木霉、

里氏木霉或绿色木霉细胞。

[0147] 可以将真菌细胞通过涉及原生质体形成、原生质体转化、以及细胞壁再生的方法以本身已知的方式转化。用于转化曲霉属和木霉属宿主细胞的适合程序在EP 238023和约尔顿(Yelton)等人,1984,美国国家科学院院刊81:1470-1474、以及克里斯滕森(Christensen)等人,1988,生物/技术(Bio/Technology)6:1419-1422中描述。用于转化镰孢属物种的适合方法由马拉迪尔(Malardier)等人,1989,基因(Gene)78:147-156、以及W096/00787描述。可以使用由如以下文献描述的程序转化酵母:贝克(Becker)和瓜伦特(Guarente),在阿贝尔森(Abelson),J.N.和西蒙(Simon),M.I.编,酵母遗传学与分子生物学指南,酶学方法(Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology,Methods in Enzymology),第194卷,第182-187页,学术出版社有限公司(Academic Press,Inc.),纽约;伊藤(Ito)等人,1983,细菌学杂志153:163;以及哈尼恩(Hinnen)等人,1978,美国国家科学院院刊75:1920。

[0148] 生产方法

[0149] 本发明还涉及产生多肽的方法,这些方法包括:(a)在适于表达该多肽的条件下培养本发明的宿主细胞;并且(b)回收该多肽。在一个优选方面,该细胞是曲霉属细胞。在一个更优选的方面,该细胞是米曲霉细胞。在一个最优选的方面,该细胞是米曲霉MT3568。

[0150] 这些宿主细胞是在适合于使用本领域中已知的方法产生该多肽的营养培养基中培养的。例如,可以通过摇瓶培养,或者在一种适合的培养基中并在允许该多肽表达和/或分离的条件下在实验室或工业发酵罐中进行小规模或大规模发酵(包括连续发酵、分批发酵、分批给料发酵或固态发酵)来培养该细胞。该培养是使用本领域中已知的程序,在一种适合营养培养基中发生,该培养基包括碳和氮来源及无机盐。适合的培养基可从商业供应商获得或可以根据公开的组成(例如,在美国典型培养物保藏中心的目录中)制备。如果多肽分泌到该营养培养基中,那么可直接从培养基中回收多肽。如果多肽不被分泌,那么其可从细胞裂解液中进行回收。

[0151] 可以使用特异性针对这些多肽的本领域已知的方法来检测该多肽。这些检测方法包括但不限于,特异性抗体的使用、酶产物的形成或酶底物的消失。例如,可以使用酶测定来确定该多肽的活性。脂肪酶活性测定的实例是本领域中已知的,包括如在实例中所描述的平板测定和pNP测定。

[0152] 可以使用本领域已知的方法来回收多肽。例如,该多肽可以通过常规程序,包括但不限于,收集、离心、过滤、提取、喷雾干燥、蒸发或沉淀,从该营养培养基回收。

[0153] 可以通过本领域中已知的多种程序来纯化该多肽以获得基本上纯的多肽,这些程序包括但不限于:色谱法(例如,离子交换色谱、亲和色谱、疏水作用色谱、色谱聚焦、以及尺寸排阻色谱)、电泳程序(例如,制备型等电点聚焦)、差别溶解度(例如,硫酸铵沉淀)、SDS-PAGE、或提取(参见例如,蛋白纯化(Protein Purification),詹森(Janson)和赖登(Ryden)编辑,VCH出版社(VCH Publishers),纽约,1989)。

[0154] 在一个替代性方面中,该多肽未被回收,而是使用表达该多肽的本发明的宿主细胞作为该多肽来源。

[0155] 组合物

[0156] 也考虑到包括本发明的多肽的组合物。

[0157] 在某些方面,本发明涉及具有脂肪酶活性的分离的多肽,这些分离的多肽选自下组,该组由以下各项组成:(a)与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少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100%序列一致性的多肽;(b)一种由以下多核苷酸编码的多肽,该多核苷酸在低严格条件下、中严格条件下、中-高严格条件下、高严格条件下或非常高严格条件下与(i)SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3或(i)的全长互补体杂交;(c)一种多肽,该多肽由与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3具有至少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100%序列一致性的多核苷酸编码;(d)一种多肽,该多肽是在一个或多个(例如若干个)位置处包括取代、缺失、和/或插入的SEQ ID NO:2的变体;以及(e)一种多肽,该多肽是(a)、(b)、(c)或(d)的多肽中任一项的片段。

[0158] 在某些方面,本发明涉及包括多肽的组合物,该多肽包括在SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:2的成熟多肽或其片段的一个或多个(例如,若干个)位置处的取代。在一些方面,本发明涉及包括多肽的组合物,该多肽是没有变化的,即,并不包括在SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:2的成熟多肽或其片段的一个或多个(例如,若干个)位置处的取代。

[0159] 下文阐述的组合物组分的非限制性列表适合用于这些组合物中,并且在此的方法可以合宜地并入本发明的某些实施例中,例如用以辅助或增强清洁性能,用于处理有待清洁的底物,或用以在与香料、着色剂、染料或类似物一起的情况下修饰该组合物的美感。掺入任何组合物中的任何此类组分的水平是除了先前引用的用于掺入的任何材料之外的。这些另外的组分的精确性质及其掺入水平将取决于组合物的物理形式和将在其中使用组合物的清洁操作的性质。尽管根据具体的功能性对以下提及的组分由通用标题进行分类,但是这并不被解释为限制,因为如将被普通技术人员所理解,一种组分可以包括另外的功能性。

[0160] 除非另外表明,以百分比计的量是按该组合物的重量计(wt%)。适合的组分材料包括但不限于表面活性剂、助洗剂、螯合剂、染料转移抑制剂、分散剂、酶、以及酶稳定剂、催化材料、漂白活化剂、过氧化氢、过氧化氢源、预形成的过酸、聚合物分散剂、粘土去除/抗再沉积剂、增亮剂、泡沫抑制剂、染料、调色染料、香料、香料递送系统、结构弹力剂、织物软化剂、载体、助水溶物、加工助剂、溶剂和/或颜料。除了以下披露,此类其他组分的适合实例以及使用水平发现于US 5576282、US 6306812、和US 6326348中,通过引用将这些文献特此结合。

[0161] 因此,在某些实施例中,本发明不包含以下附属材料的一种或多种:表面活性剂、皂、助洗剂、螯合剂、染料转移抑制剂、分散剂、另外的酶、酶稳定剂、催化材料、漂白活化剂、过氧化氢、过氧化氢源、预形成的过酸、聚合物分散剂、粘土去除/抗再沉积剂、增亮剂、泡沫抑制剂、染料、香料、香料递送系统、结构弹力剂、织物软化剂、载体、助水溶物、加工助剂、溶剂和/或颜料。然而,当一种或多种组分存在时,这样的一种或多种组分可以是如下文详述地存在的:

[0162] 表面活性剂-根据本发明的组合物可以包括表面活性剂或表面活性剂系统,其中该表面活性剂可以选自非离子型表面活性剂、阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、两性

表面活性剂、兼性离子表面活性剂、半极性非离子表面活性剂、及其混合物。当存在时，表面活性剂典型地以从0.1wt%至60wt%、从0.2wt%到40wt%、从0.5wt%至30wt%、从1wt%至50wt%、从1wt%至40wt%、从1wt%至30wt%、从1wt%至20wt%、从3wt%至10wt%、从3wt%至5wt%、从5wt%至40wt%、从5wt%至30wt%、从5wt%至15wt%、从3wt%至20wt%、从3wt%至10wt%、从8wt%至12wt%、从10wt%至12wt%或从20wt%至25wt%的水平存在。

[0163] 适合的阴离子去污表面活性剂包括硫酸盐和磺酸盐去污表面活性剂。

[0164] 适合的磺酸盐去污表面活性剂包括烷基苯磺酸盐，在一方面为C<sub>10-13</sub>烷基苯磺酸盐。可以通过磺化可商购的直链烷基苯 (LAB) 获得适合的烷基苯磺酸盐 (LAS)，适合的LAB包括低碳2-苯基LAB，如 Isochem® 或 Petrelab®，其他适合LAB包括高碳2-苯基LAB，如 Hyblene®。适合的阴离子去污表面活性剂是通过DETAL催化工艺获得的烷基苯磺酸盐，但其他合成途径(如HF)也可以是适合的。在一方面，使用LAS的镁盐。

[0165] 适合的硫酸盐去污表面活性剂包括烷基硫酸盐，在一方面，为C<sub>8-18</sub>烷基硫酸盐，或主要为C<sub>12</sub>烷基硫酸盐。

[0166] 另外的适合的硫酸盐去污表面活性剂是烷基烷氧基化硫酸盐，在一方面为烷基乙氧基化硫酸盐，在一方面为C<sub>8-18</sub>烷基烷氧基化硫酸盐，在另一方面为C<sub>8-18</sub>烷基乙氧基化硫酸盐，典型地烷基烷氧基化硫酸盐具有从0.5至20或从0.5至10的平均烷氧基化度，典型地烷基烷氧基化硫酸盐是C<sub>8-18</sub>烷基乙氧基化硫酸盐，具有0.5至10、从0.5至7、从0.5至5或从0.5至3的平均乙氧基化度。

[0167] 烷基硫酸盐、烷基烷氧基化硫酸盐和烷基苯磺酸盐可以是直链或支链的、取代或未取代的。

[0168] 去污表面活性剂可以是中链分支的去污表面活性剂，在一方面为中链分支的阴离子去污表面活性剂，在一方面为中链分支的烷基硫酸盐和/或中链分支的烷基苯磺酸盐，例如中链分支的烷基硫酸盐。在一方面，中链分支是C<sub>1-4</sub>烷基，典型地为甲基和/或乙基。

[0169] 阴离子表面活性剂的非限制性实例包括硫酸盐和磺酸盐，具体地说是直链烷基苯磺酸盐 (LAS)、LAS的异构体、支链烷基苯磺酸盐 (BABS)、苯基链烷磺酸盐、 $\alpha$ -烯烴磺酸盐 (AOS)、烯烴磺酸盐、链烯烴磺酸盐、链烷-2,3-二基双(磺酸盐)、羟基链烷磺酸盐以及二磺酸盐、烷基硫酸盐 (AS) (如十二烷基硫酸钠 (SDS))、脂肪醇硫酸盐 (FAS)、伯醇硫酸盐 (PAS)、醇醚硫酸盐 (AES或AEOS或FES，也被称为醇乙氧基硫酸盐或脂肪醇醚硫酸盐)、仲链烷磺酸盐 (SAS)、石蜡烴磺酸盐 (PS)、酯磺酸盐、磺化的脂肪酸甘油酯、 $\alpha$ -磺酸基脂肪酸甲酯 ( $\alpha$ -SFMe或SES) (包括甲酯磺酸盐 (MES))、烷基琥珀酸或烯基琥珀酸、十二烯基/十四烯基琥珀酸 (DTSA)、氨基酸的脂肪酸衍生物、磺酸基琥珀酸或皂的二酯和单酯、及其组合。

[0170] 适合的非离子去污表面活性剂选自下组，该组由以下各项组成：C<sub>8-18</sub>烷基乙氧基化物，如NEODOL®；C<sub>6-12</sub>烷基苯酚烷氧基化物，其中该烷氧基化物单元可以是乙烯氧基单元，丙烯氧基单元或其混合物；C<sub>12-18</sub>醇和C<sub>6-12</sub>烷基苯酚与环氧乙烷/环氧丙烷嵌段聚合物的缩合物，如普朗尼克 (Pluronic)®；C<sub>14-22</sub>中链分支的醇；C<sub>14-22</sub>中链分支的烷基烷氧基化物，典型地具有从1至30的平均烷氧基化度；烷基多糖，在一方面为烷基多糖苷；多羟基脂肪酸酰胺；醚封端的聚(烷氧基化)醇表面活性剂；及其混合物。

[0171] 适合的非离子去污表面活性剂包括烷基多糖苷和/或烷基烷氧基化醇。

[0172] 在一方面,非离子去污表面活性剂包括烷基烷氧基化醇,在一方面为C<sub>8-18</sub>烷基烷氧基化醇,例如C<sub>8-18</sub>烷基乙氧基化醇,该烷基烷氧基化醇可以具有从1至50、从1至30、从1至20、或从1至10的平均烷氧基化度。在一方面,烷基烷氧基化醇可以是C<sub>8-18</sub>烷基乙氧基化醇,具有从1至10、从1至7,更多是从1至5或从3至7的平均乙氧基化度。烷基烷氧基化醇可以是直链或支链的、以及取代或未取代的。适合的非离子表面活性剂包括Lutensol®。

[0173] 非离子型表面活性剂的非限制性实例包括醇乙氧基化物(AE或AEO)、醇丙氧基化物、丙氧基化的脂肪醇(PFA),烷氧基化的脂肪酸烷基酯(例如乙氧基化的和/或丙氧基化的脂肪酸烷基酯),烷基酚乙氧基化物(APE),壬基酚乙氧基化物(NPE),烷基多糖苷(APG),烷氧基化胺,脂肪酸单乙醇酰胺(FAM),脂肪酸二乙醇酰胺(FADA),乙氧基化的脂肪酸单乙醇酰胺(EFAM),丙氧基化的脂肪酸单乙醇酰胺(PFAM),多羟基烷基脂肪酸酰胺,或葡萄糖胺的N-酰基N-烷基衍生物(葡糖酰胺(GA),或脂肪酸葡糖酰胺(FAGA)),连同在SPAN和TWEEN商品名下可获得的产品,及其组合。

[0174] 适合的阳离子去污表面活性剂包括烷基吡啶鎓化合物、烷基季铵化合物、烷基季磷化合物、烷基三铈化合物、及其混合物。

[0175] 适合的阳离子去污表面活性剂是具有以下通式的季铵化合物: $(R)(R_1)(R_2)(R_3)N^+X^-$ ,其中R是直链或支链的、取代或未取代的C<sub>6-18</sub>烷基或烯基部分,R<sub>1</sub>和R<sub>2</sub>独立地选自甲基或乙基部分,R<sub>3</sub>是羟基、羟甲基或羟乙基部分,X是提供电荷中性的阴离子,适合的阴离子包括卤化物,例如氯化物;硫酸盐;以及磺酸盐。适合的阳离子去污表面活性剂是单-C<sub>6-18</sub>烷基单-羟乙基二甲基季铵氯化物。高度合适的阳离子去污表面活性剂是单-C<sub>8-10</sub>烷基单-羟乙基二甲基季铵氯化物、单-C<sub>10-12</sub>烷基单-羟乙基二甲基季铵氯化物以及单-C<sub>10</sub>烷基单-羟乙基二甲基季铵氯化物。

[0176] 阳离子表面活性剂的非限制性实例包括烷基二甲基乙醇季胺(ADMEAQ)、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、二甲基二硬脂酰氯化铵(DSDMAC)、以及烷基苄基二甲基铵、烷基季铵化合物、烷氧基化季铵(AQA)化合物、酯季铵及其组合。

[0177] 适合的两性表面活性剂/兼性离子表面活性剂包括氧化胺和甜菜碱(如烷基二甲基甜菜碱、磺基甜菜碱)、或其组合。本发明的胺中和的阴离子表面活性剂-阴离子表面活性剂以及附属的阴离子共表面活性剂可以按酸形式存在,并且所述酸形式可以被中和以形成希望用于本发明洗涤剂组合物的表面活性剂盐。典型的用于中和的试剂包括金属反离子碱,例如氢氧化物,如NaOH或KOH。用于中和本发明的阴离子表面活性剂和处于其酸形式的附属阴离子表面活性剂或共表面活性剂的另外优选的试剂包括氨、胺、或烷醇胺。优选烷醇胺。适合的非限制性实例包括单乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、以及其他本领域中已知的直链或支链的烷醇胺;例如,高度优选的烷醇胺包括2-氨基-1-丙醇、1-氨基丙醇、单异丙醇胺、或1-氨基-3-丙醇。胺中和可以进行到完全或部分的程度,例如,阴离子表面活性剂混合物的部分可以被钠或钾中和,并且阴离子表面活性剂混合物的部分可以被胺或烷醇胺中和。

[0178] 半极性表面活性剂的非限制性实例包括氧化胺(AO),如烷基二甲胺氧化物

[0179] 包含一种或多种阴离子表面活性剂以及另外一种或多种非离子表面活性剂、并可任选地与另外的表面活性剂例如阳离子表面活性剂的混合物的表面活性剂系统可以是优选的。优选的阴离子与非离子表面活性剂的重量比是至少2:1、或至少1:1至1:10。

[0180] 在本发明的某些实施例中,该组合物选自如下的表面活性剂或表面活性剂体系:十二烷基苯磺酸钠、氢化椰油酸钠、月桂醇醚硫酸钠、C12-14烷醇聚醚-7、C12-15烷醇聚醚-7、C12-15烷醇聚醚硫酸钠、以及C14-15烷醇聚醚-4。

[0181] 皂-在此的组合物可以包含皂。不受理论的限制,可令人希望的是包括皂,因为它部分充当表面活性剂并且部分充当助洗剂,并且可用于抑制泡沫,并且此外,可以有利地与组合物的多种阳离子化合物相互作用以增强用本发明组合物处理的纺织品织物的柔软性。可以利用本领域中已知的用于在衣物洗涤剂中使用的任何皂。在一个实施例中,这些组合物包含从0wt%至20wt%、从0.5wt%至20wt%、从4wt%至10wt%、或从4wt%至7wt%的皂。

[0182] 在此有用的皂的实例包括油酸皂、棕榈酸皂、棕榈仁脂肪酸皂、及其混合物。典型的皂处于具有不同链长和取代度的脂肪酸皂混合物的形式。一种这样的混合物是拔顶棕榈仁脂肪酸。

[0183] 在一个实施例中,该皂选自游离脂肪酸。合适的脂肪酸是饱和和/或不饱和的并且可以从天然来源如植物或动物酯(例如,棕榈仁油、棕榈油、椰子油、巴巴苏油、红花油、妥尔油、蓖麻油、牛油和鱼油、油脂、及其混合物)中获得,或合成地制备(例如,经由石油的氧化或者经由费托法(Fisher Tropsch process)氢化一氧化碳)。

[0184] 用于在本发明组合物中使用的适合的饱和脂肪酸的实例包括癸酸、月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、花生酸和山萘酸。合适的饱和脂肪酸种类包括:棕榈油酸、油酸、亚油酸、亚麻酸和蓖麻油酸。优选的脂肪酸的实例是饱和C<sub>n</sub>脂肪酸、饱和C<sub>12</sub>-C<sub>14</sub>脂肪酸、和饱和或不饱和的C<sub>n</sub>至C<sub>18</sub>脂肪酸、及其混合物。

[0185] 当存在时,织物软化阳离子辅助表面活性剂与脂肪酸的重量比优选地是从约1:3至约3:1,更优选地从约1:1.5至约1.5:1,最优选地约1:1。

[0186] 在此的皂和非皂阴离子表面活性剂的水平是以酸式基础指定的按洗涤剂组合物的重量计的百分比。然而,正如本领域中通常理解的,在实践中使用钠、钾或链烷醇铵碱如氢氧化钠或单乙醇胺中和阴离子表面活性剂和皂。

[0187] 助水溶剂-本发明的组合物可以包括一种或多种助水溶剂。助水溶剂是如下化合物,该化合物在水性溶液中溶解疏水化合物(或相反地,在非极性环境中的极性物质)。一般地,助水溶物具有亲水和疏水两种特征(如由表面活性剂已知的所谓的两亲性质);然而,助水溶物的分子结构一般不利于自发性自聚集,参见例如通过霍奇登(Hodgdon)和卡勒(Kaler)(2007),胶体&界面科学新见(Current Opinion in Colloid&Interface Science) 12:121-128的综述。助水溶剂并不显示临界浓度,高于该浓度就会发生如对表面活性剂而言所发现的自聚集以及脂质形成胶束、薄层或其他很好地定义的中间相。很多助水溶剂反而示出连续型聚集过程,其中聚集体的大小随着浓度增加而增长。然而,很多助水溶剂改变了包括极性和非极性特征的物质的系统(包括水、油、表面活性剂、和聚合物的混合物)的相行为、稳定性、和胶体特性。经典地从制药、个人护理、食品跨行业至技术应用使用助水溶剂。助水溶剂在洗涤剂组合物中的使用允许例如更浓的表面活性剂配制品(如在通过除去水而压缩液体洗涤剂的过程中)而不引起不希望的现象,例如相分离或高粘度。

[0188] 洗涤剂可以包含从0wt%至10wt%,如从0wt%至5wt%、0.5wt%至5wt%、或从3wt%至5wt%的助水溶剂。可以利用本领域中已知的用于在洗涤剂中使用的任何助水溶剂。助水溶剂的非限制性实例包括苯磺酸钠、对甲苯磺酸钠(STS)、二甲苯磺酸钠(SXS)、桔



烯磺酸钠 (SCS)、伞花炔磺酸钠、氧化胺、醇和聚乙二醇醚、羟基萘甲酸钠、羟基萘磺酸钠、乙基己基磺酸钠及其组合。

[0189] 助洗剂-本发明的组合物可以包括一种或多种助洗剂、共助洗剂、助洗剂系统或其混合物。当使用助洗剂时,清洁组合物将典型地包括从0wt%至65wt%、至少1wt%、从2wt%至60wt%或从5wt%至10wt%的助洗剂。在洗涤餐具清洁组合物中,助洗剂的水平典型地是40wt%至65wt%或50wt%至65wt%。该组合物可以是基本上不含助洗剂;基本上不含意思为“没有有意添加的”沸石和/或磷酸盐。典型的沸石助洗剂包括沸石A、沸石P和沸石MAP。典型的磷酸盐助洗剂是三聚磷酸钠。

[0190] 助洗剂和/或共助洗剂可以具体是形成具有Ca和Mg的水溶性复合物的螯合剂。可以使用本领域中已知用于在洗涤剂中使用的任何助洗剂和/或共助洗剂。助洗剂的非限制性实例包括沸石、二磷酸盐(焦磷酸盐)、三磷酸盐(如三磷酸钠(STP或STPP))、碳酸盐(如碳酸钠)、可溶性硅酸盐(如偏硅酸钠)、层状硅酸盐(例如,来自赫斯特公司(Hoechst)的SKS-6)、乙醇胺(如2-氨基乙-1-醇(MEA)、亚胺基二乙醇(DEA)和2,2',2''-次氨基三乙醇(TEA))、以及羧甲基菊粉(CMI)、以及其组合。

[0191] 清洁组合物可以单独地包括共助洗剂,或与助洗剂,例如沸石助洗剂组合。共助洗剂的非限制性实例包括聚丙烯酸酯的均聚物或其共聚物,例如聚(丙烯酸)(PAA)或共聚(丙烯酸/马来酸)(PAA/PMA)。另外的非限制性实例包括柠檬酸盐,螯合剂,例如氨基羧酸盐、氨基多羧酸盐和膦酸盐,以及烷基-或烯基琥珀酸。另外的特定实例包括2,2',2''-次氨基三乙酸(NTA)、乙二胺四乙酸(EDTA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)、亚氨二琥珀酸(IDS)、乙二胺-N,N'-二琥珀酸(EDDS)、甲基甘氨酸二乙酸(MGDA)、谷氨酸-N,N-二乙酸(GLDA)、1-羟乙烷-1,1-二基双(膦酸)(HEDP)、乙二胺四(亚甲基)四(膦酸)(EDTMPA)、二亚乙基三胺五(亚甲基)五(膦酸)(DTPMPA)、N-(2-羟乙基)亚氨基二乙酸(EDG)、天冬氨酸-N-单乙酸(ASMA)、天冬氨酸-N,N-二乙酸(ASDA)、天冬氨酸-N-单丙酸(ASMP)、亚氨二琥珀酸(IDA)、N-(2-磺甲基)天冬氨酸(SMAS)、N-(2-磺乙基)天冬氨酸(SEAS)、N-(2-磺甲基)谷氨酸(SMGL)、N-(2-磺乙基)谷氨酸(SEGL)、N-甲基亚氨基二乙酸(MIDA)、 $\alpha$ -丙氨酸-N,N-二乙酸( $\alpha$ -ALDA)、丝氨酸-N,N-二乙酸(SEDA)、异丝氨酸-N,N-二乙酸(ISDA)、苯丙氨酸-N,N-二乙酸(PHDA)、邻氨基苯甲酸-N,N-二乙酸(ANDA)、对氨基苯磺酸-N,N-二乙酸(SLDA)、氨基乙磺酸-N,N-二乙酸(TUDA)和磺甲基-N,N-二乙酸(SMDA)、N-(羟乙基)-亚乙基二胺三乙酸盐(HEDTA)、二乙醇甘氨酸(DEG)、二亚乙基三胺五(亚甲基膦酸)(DTPMP)、氨基三(亚甲基膦酸)(ATMP),及其组合和盐。另外的示例性助洗剂和/或共助洗剂描述于例如WO 09/102854、US 5977053中。

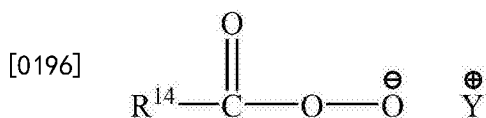
[0192] 螯合剂和晶体生长抑制剂-在此的组合物可以包含螯合剂和/或晶体生长抑制剂。适合的分子包括铜、离子和/或锰螯合剂及其混合物。适合的分子包括DTPA(二亚乙基三胺五乙酸)、HEDP(羟基乙烷二膦酸)、DTPMP(二亚乙基三胺五(亚甲基膦酸))、1,2-二羟基苯-3,5-二磺酸二钠盐氢氧化物、乙二胺、二亚乙基三胺、乙二胺二琥珀酸(EDDS)、N-羟基乙基乙二胺三乙酸(HEDTA)、三亚乙基四胺六乙酸(TTHA)、N-羟基乙基亚氨基二乙酸(HEIDA)、二羟基乙基甘氨酸(DHEG)、亚乙基二胺四丙酸(EDTP)、羧甲基菊粉以及2-膦羧基丁烷1,2,4-三羧酸(**Bayhibit®AM**)及其衍生物。典型地,该组合物可以包括从0.005wt%至15wt%或从3.0wt%至10wt%的螯合剂或晶体生长抑制剂。

[0193] 漂白组分-适合用于掺入本发明的方法和组合物中的漂白组分包括多于一种漂白

组分中的一种或混合物。适合的漂白组分包括漂白催化剂、光漂白剂、漂白活化剂、过氧化氢、过氧化氢源、预形成的过酸及其混合物。通常,当使用漂白组分时,本发明的组合物可以包括从0wt%至30wt%、从0.00001wt%至90wt%、0.0001wt%至50wt%、从0.001wt%至25wt%或从1wt%至20wt%。适合的漂白组分的实例包括:

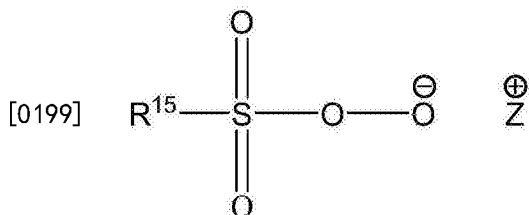
[0194] (1) 预形成的过酸:适合的预形成的过酸包括但不限于选自下组的化合物,该组由预先形成的过氧酸或其盐组成,典型地是过氧羧酸或其盐或过氧硫酸或其盐。

[0195] 预形成的过氧酸或其盐优选是过氧羧酸或其盐,典型地具有对应于以下化学式的化学结构:



[0197] 其中: $R^{14}$ 选自烷基、芳烷基、环烷基、芳基或杂环基团; $R^{14}$ 基团可以是直链或支链的、取代或未取代的;并且Y是达到电荷中性的任何适合的反离子,优选地Y选自氢、钠或钾。优选地, $R^{14}$ 是直链的或支链的、取代的或未取代的 $C_{6-9}$ 烷基。优选地,过氧酸或其盐选自过氧己酸、过氧庚酸、过氧辛酸、过氧壬酸、过氧癸酸、其任何盐、或其任何组合。特别优选的过氧酸是邻苯二甲酰亚胺基-过氧基-链烷酸,特别是 $\epsilon$ -邻苯二甲酰亚胺基过氧基己酸(PAP)。优选地,过氧酸或其盐具有处于从 $30^{\circ}\text{C}$ 至 $60^{\circ}\text{C}$ 的范围内的熔点。

[0198] 预形成的过氧酸或其盐还可以是过氧硫酸或其盐,典型地具有对应于以下化学式的化学结构:



[0200] 其中: $R^{15}$ 选自烷基、芳烷基、环烷基、芳基或杂环基团; $R^{15}$ 基团可以是直链或支链的、取代或未取代的;并且Z是达到电荷中性的任何适合的反离子,优选地Z选自氢、钠或钾。优选地, $R^{15}$ 是直链的或支链的、取代的或未取代的 $C_{6-9}$ 烷基。优选地,此类漂白组分可以按从0.01wt%至50wt%、或从0.1wt%至20wt%的量存在于本发明的组合物中。

[0201] (2) 过氧化氢源包括例如无机过氧化氢合物盐,包括碱金属盐,如过硼酸盐(通常是一水合物或四水合物),过碳酸盐,过硫酸盐,过磷酸盐,过硅酸盐的钠盐及其混合物。在本发明的一个方面,无机过氧化氢合物盐是例如选自下组的那些,该组由以下各项组成:过硼酸盐、过碳酸盐的钠盐及其混合物。当使用时,无机过氧化氢合物盐典型地以整体组合物的0.05wt%至40wt%或1wt%至30wt%的量存在并且典型地被掺入进此类组合物中作为可以被包衣的结晶固体。适合的包衣包括:无机盐,例如碱金属硅酸盐、碳酸盐或硼酸盐或其混合物,或有机材料,例如水溶性或水分散性聚合物、蜡、油或脂肪皂。优选地,此类漂白组分可以按0.01wt%至50wt%、或0.1wt%至20wt%的量存在于本发明的组合物中。

[0202] (3) 术语漂白活化剂在此意指与过氧化氢反应以经由过水解反应形成过酸的化合物。以此方式形成的过酸构成活化的漂白剂。有待在此使用的适合漂白活化剂包括属于酯、酰胺、酰亚胺或酸酐类别的那些。适合的漂白活化剂是具有 $R-(C=O)-L$ 的那些,其中R是烷

基基团(优选是支链的),当该漂白活化剂是疏水的时候,具有从6个至14个碳原子或从8个至12个碳原子,并且当该漂白活化剂是亲水的时,具有少于6个碳原子或少于4个碳原子;并且是L离去基团。适合的离去基团的实例是苯甲酸及其衍生物-尤其是苯磺酸盐。适合的漂白活化剂包括十二酰氧基苯磺酸盐、癸酰氧基苯磺酸盐、癸酰氧基苯甲酸或其盐、3,5,5-三甲基己酰氧基苯磺酸盐、四乙酰基乙二胺(TAED)、4-[(3,5,5-三甲基己酰基)氧基]苯-1-磺酸钠(ISONOBS)、4-(十二酰基氧基)苯-1-磺酸盐(LOBS)、4-(癸酰基氧基)苯-1-磺酸盐、4-(癸酰基氧基)苯甲酸盐(DOBS或DOBA)、4-(壬酰基氧基)苯-1-磺酸盐(NOBS)、和/或披露于W0 98/17767中的那些。漂白活化剂的家族披露于EP 624154中并且在那个家族中特别优选的是乙酰柠檬酸三乙酯(ATC)。ATC或短链甘油三酸酯(像三醋汀)具有以下优点,它是环境友好的。此外,乙酰柠檬酸三乙酯和三醋汀在存储时在产品中具有良好的水解稳定性,并且是有效的漂白活化剂。最后,ATC是多功能的,因为在过水解反应中释放的柠檬酸盐可以作为助洗剂起作用。可替代地,漂白系统可以包括例如酰胺、酰亚胺或矾型的过氧酸。漂白系统还可以包括过酸,例如6-(邻苯二甲酰亚胺基)过氧己酸(PAP)。适合的漂白活化剂还披露于W098/17767中。尽管可以使用任何适合的漂白活化剂,但是在本发明的一个方面,主题清洁组合物可以包括NOBS、TAED或其混合物。当存在时,基于织物及家居护理组合物,过酸和/或漂白活化剂通常以0.1wt%至60wt%、0.5wt%至40wt%或0.6wt%至10wt%的量存在于组合物中。可以将一种或多种疏水性过酸或其前体与一种或多种亲水性过酸或其前体组合使用。优选地,此类漂白组分可以按0.01wt%至50wt%、或0.1wt%至20wt%的量存在于本发明的组合物中。

[0203] 可以对过氧化氢源和过酸或漂白活化剂的量进行选择,以使得可用氧(来自过氧化物源)与过酸的摩尔比是从1:1至35:1,或甚至2:1至10:1。

[0204] (4) 二酰基过氧化物-优选的二酰基过氧化物漂白种类包括选自具有以下通式的二酰基过氧化物的那些: $R^1-C(O)-OO-(O)C-R^2$ ,其中 $R^1$ 表示 $C_6-C_{18}$ 烷基,优选地是包含具有至少5个碳原子的直链并且任选地包含一个或多个取代基(例如 $-N^+(CH_3)_3$ 、 $-COOH$ 或 $-CN$ )和/或一个或多个在烷基的相邻碳原子之间插入的中断部分(例如 $-CONH-$ 或 $-CH=CH-$ )的 $C_6-C_{12}$ 烷基基团,并且 $R^2$ 表示与过氧化物部分可相容的脂肪族基团,以使得 $R^1$ 和 $R^2$ 一起包含总共8个至30个碳原子。在一个优选方面, $R^1$ 和 $R^2$ 是直链的未取代的 $C_6-C_{12}$ 烷基链。最优选地, $R^1$ 和 $R^2$ 是相同的。二酰基过氧化物(其中 $R^1$ 和 $R^2$ 均是 $C_6-C_{12}$ 烷基基团)是特别优选的。优选地, $R$ 基团( $R_1$ 或 $R_2$ )中的至少一者、最优选地仅有一者在 $\alpha$ 位不包含分枝的或下垂的环,或优选在 $\alpha$ 位或 $\beta$ 位都不包含分枝的或下垂的环,或最优选在 $\alpha$ 位或 $\beta$ 位或 $\gamma$ 位都不包含分枝的或下垂的环。在一个进一步优选的实施例中,DAP可以是不对称的,以使得优选地 $R_1$ 酰基基团的水解是迅速的以产生过酸,但是 $R_2$ 酰基基团的水解是缓慢的。

[0205] 四酰基过氧化物漂白种类优选选自具有以下通式的四酰基过氧化物: $R^3-C(O)-OO-C(O)-(CH_2)_n-C(O)-OO-C(O)-R^3$ ,其中 $R^3$ 表示 $C_1-C_9$ 烷基,或 $C_3-C_7$ 基团,并且 $n$ 表示从2至12或4至10(包括端值)的整数。

[0206] 优选地,二酰基和/或四酰基过氧化物漂白种类以足够提供按重量计至少0.5ppm、至少10ppm、或至少50ppm的洗涤液的量存在。在一个优选实施例中,这些漂白种类以足够提供按重量计从0.5ppm至300ppm、从30ppm至150ppm的洗涤液的量存在。

[0207] 优选地,漂白组分包括漂白催化剂(5和6)。

[0208] (5) 优选的是有机(非金属)漂白催化剂,包括能够接受来自过氧酸和/或其盐的氧原子并且将该氧原子转移至可氧化的底物的漂白催化剂。适合的漂白催化剂包括但不限于:亚胺鎓阳离子及聚离子;亚胺鎓兼性离子;改性胺;改性氧化胺;N-磺酰基亚胺;N-膦酰基亚胺;N-酰基亚胺;噻二唑二氧化物;全氟亚胺;环状糖酮及其混合物。

[0209] 适合的亚胺鎓阳离子及聚离子包括但不限于,N-甲基-3,4-二氢异喹啉鎓四氟硼酸盐,如四面体(Tetrahedron) (1992),49(2),423-38所述的进行制备(例如,化合物4,第433页);N-甲基-3,4-二氢异喹啉鎓对-甲苯磺酸盐,如US 5360569所述的进行制备(例如第11栏,实例1);以及正辛基-3,4-二氢异喹啉鎓对-甲苯磺酸盐,如US 5360568所述的进行制备(例如第10栏,实例3)。

[0210] 适合的亚胺鎓兼性离子包括但不限于,N-(3-磺丙基)-3,4-二氢异喹啉鎓,内盐,如US 5576282所述的进行制备(例如第31栏,实例II);N-[2-(磺氧基)十二烷基]-3,4-二氢异喹啉鎓,内盐,如US 5817614所述的进行制备(例如,第32栏,实例V);2-[3-[(2-乙基己基)氧基]-2-(磺氧基)丙基]-3,4-二氢异喹啉鎓,内盐,如WO 05/047264所述的进行制备(例如,第18页,实例8),以及2-[3-[(2-丁基辛基)氧基]-2-(磺氧基)丙基]-3,4-二氢异喹啉鎓,内盐。

[0211] 适宜的改性胺氧转移催化剂包括但不限于1,2,3,4-四氢-2-甲基-1-异喹啉醇,其可依照描述于四面体通讯(Tetrahedron Letters) (1987),28(48),6061-6064中的方法制备。适合的改性氧化胺氧传递催化剂包括但不限于1-羟基-N-氧基-N-[2-(磺氧基)癸基]-1,2,3,4-四氢异喹啉钠。

[0212] 适合的N-磺酰基亚胺氧传递催化剂包括但不限于根据有机化学杂志(Journal of Organic Chemistry) (1990),55(4),1254-61中描述的程序制备的3-甲基-1,2-苯并异噻唑1,1-二氧化物。

[0213] 适宜的N-膦酰基亚胺氧转移催化剂包括但不限于[R-(E)]-N-[(2-氯-5-硝基苯基)亚甲基]-对苯基-对-(2,4,6-三甲基苯基)次膦酸酰胺,其可依照描述于化学学会杂志,化学通讯(Journal of the Chemical Society,Chemical Communications) (1994), (22), 2569-70中的方法制备。

[0214] 适合的N-酰基亚胺氧传递催化剂包括但不限于可以根据波兰化学杂志(Polish Journal of Chemistry) (2003),77(5),577-590中描述的程序制造的[N(E)]-N-(苯基亚甲基)乙酰胺。

[0215] 适合的噻二唑二氧化物氧传递催化剂包括但不限于可以根据US5753599(第9栏,实例2)中所述的程序制造的3-甲基-4-苯基-1,2,5-噻二唑1,1-二氧化物。

[0216] 适宜的全氟亚胺氧转移催化剂包括但不限于(Z)-2,2,3,3,4,4,4-七氟-N-(壬氟丁基)丁酰亚胺氟化物,其可依照四面体通讯(Tetrahedron Letters) (1994),35(34), 6329-30中所述的方法制备。

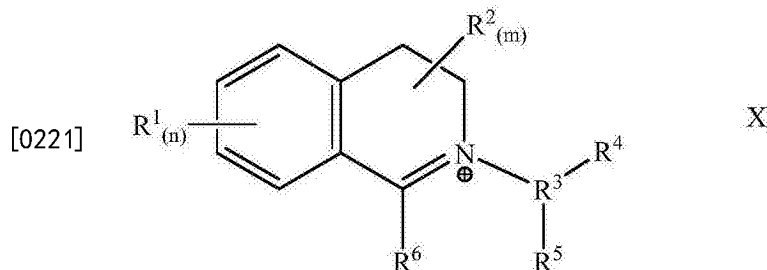
[0217] 适合的环状糖酮氧传递催化剂包括但不限于如在US 6649085(第12栏,实例1)中制备的1,2:4,5-二-O-异亚丙基-D-赤-2,3-己二酮(hexodiuro)-2,6-吡喃糖。

[0218] 优选地,所述漂白催化剂包含亚胺鎓和/或羰基官能团,并且通常能够在接受氧原子,尤其是从过氧酸和/或其盐接受氧原子后形成过氧亚胺正离子(oxaziridinium)和/或双环氧乙烷官能团。优选地,漂白催化剂包括过氧亚胺正离子官能团和/或在接受氧原子

时,尤其是在接受来自过氧酸和/或其盐的氧原子时能够形成过氧亚胺正离子官能团。优选地,漂白催化剂包括环状亚胺鎓官能团,优选其中该环状部分具有从五个至八个原子(包括氮原子)、优选六个原子的环尺寸。优选地,漂白催化剂包括芳基亚胺鎓官能团,优选二环芳基亚胺官能团,优选是3,4-二氢异喹啉鎓官能团。典型地,亚胺官能团是季亚胺官能团并且典型地在接受氧原子时,尤其是在接受来自过氧酸和/或其盐的氧原子时能够形成季过氧亚胺正离子官能团。在另一方面,该洗涤剂组合物包括具有不大于0、不大于-0.5、不大于-1.0、不大于-1.5、不大于-2.0、不大于-2.5、不大于-3.0、或不大于-3.5的 $\log P_{o/w}$ 的漂白组分。下面更加详细地描述用于确定 $\log P_{o/w}$ 的方法。

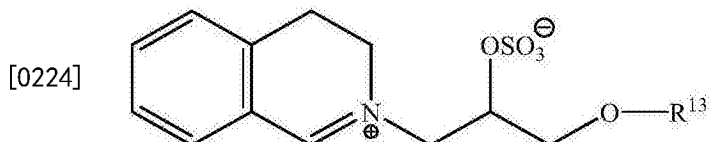
[0219] 典型地,漂白成分能够产生具有从0.01至0.30、从0.05至0.25或从0.10至0.20的 $X_{50}$ 的漂白种类。下面更加详细地描述用于确定 $X_{50}$ 的方法。例如,具有异喹啉鎓结构的漂白成分能够产生具有过氧亚胺正离子结构的漂白种类。在这一实例中, $X_{50}$ 是过氧亚胺正离子漂白种类的 $X_{50}$ 。

[0220] 优选地,漂白催化剂具有对应于以下化学式的化学结构:



[0222] 其中:n和m独立地是从0至4,优选n和m均是0;每个 $R^1$ 独立地选自取代的或未取代的选自下组的基团,该组由以下各项组成:氢、烷基、环烷基、芳基、稠合芳基、杂环、稠合杂环、硝基、卤基、氰基、磺酸根、烷氧基、酮基、羧基以及烷氧羰基;并且任何两个连位的 $R^1$ 取代基可以合并以形成稠合芳基、稠合碳环或稠合杂环;每个 $R^2$ 独立地选自取代的或未取代的独立地选自下组的基团,该组由以下各项组成:氢、羟基、烷基、环烷基、烷芳基、芳基、芳烷基、亚烷基、杂环、烷氧基、芳基羰基、羧基烷基以及酰胺基团;任何 $R^2$ 可以与任何其他 $R^2$ 结合在一起以形成常见环的一部分;任何偕 $R^2$ 可以合并以形成羰基;并且任何两个 $R^2$ 可以合并以形成取代的或未取代的稠合的不饱和部分; $R^3$ 是 $C_1$ 至 $C_{20}$ 取代的或未取代的烷基; $R^4$ 是氢或 $Q_t-A$ 部分,其中:Q是分支或未分支的烯烃, $t=0$ 或1,并且A是选自下组的阴离子基团,该组由以下各项组成: $OSO_3^-$ 、 $SO_3^-$ 、 $CO_2^-$ 、 $OCO_2^-$ 、 $OPo_3^{2-}$ 、 $OPo_3H^-$ 和 $OPo_2^-$ ;  $R^5$ 是氢或 $-CR^{11}R^{12}-Y-G_b-Y_c-[(CR^9R^{10})_y-O]_k-R^8$ 部分,其中:每个Y独立地选自下组,该组由以下各项组成:O、S、N-H、或N- $R^8$ ;并且每个 $R^8$ 独立地选自下组,该组由以下各项组成:烷基、芳基和杂芳基,所述部分是取代或未取代的,并且无论是取代的还是未取代的,所述部分具有少于21个碳;每个G独立地选自下组,该组由以下各项组成:CO、 $SO_2$ 、SO、PO和 $PO_2$ ;  $R^9$ 和 $R^{10}$ 独立地选自下组,该组由以下各项组成:H和 $C_1$ - $C_4$ 烷基; $R^{11}$ 和 $R^{12}$ 独立地选自下组,该组由以下各项组成:H和烷基,或者当放一起时可以结合形成羰基; $b=0$ 或1; $c$ 可以=0或1,但是如果 $b=0$ , $c$ 必须=0; $y$ 是从1至6的整数; $k$ 是从0至20的整数; $R^6$ 是H,或是烷基、芳基或杂芳基部分;所述部分是取代或未取代的;并且X,如果存在的话,是适合的电荷平衡反离子,优选地当 $R^4$ 是氢时,X是存在的,适合的X包括但不限于:氯化物、溴化物、硫酸盐、甲氧硫酸盐(methosulphate)、磺酸盐、对甲苯磺酸盐、硼四氟化物以及磷酸盐。

[0223] 在本发明的一个实施例中,漂白催化剂具有对应于以下通式的结构:



[0225] 其中R<sup>13</sup>是包含从三个至24个碳原子(包括分支的碳原子)的支链烷基或包含从一个至24个碳原子的直链烷基;优选地,R<sup>13</sup>是包含从八个至18个碳原子的支链烷基或包含从八个至十八个碳原子的直链烷基;优选地,R<sup>13</sup>选自下组,该组由以下各项组成:2-丙基庚基、2-丁基辛基、2-戊基壬基、2-己基癸基、正-十二烷基、正-十四烷基、正-十六烷基、正-十八烷基、异-壬基、异-癸基、异-十三基和异-十五烷基;优选地,R<sup>13</sup>选自下组,该组由以下各项组成:2-丁基辛基、2-戊基壬基、2-己基癸基、异-十三基和异-十五烷基。

[0226] 优选地,除了漂白催化剂、特别是有机漂白催化剂以外,漂白组分还包括过酸源。过酸源可以选自(a)预形成的过酸;(b)过碳酸盐、过硼酸盐或过硫酸盐(过氧化氢源),优选与一种漂白活化剂组合;和(c)过水解酶以及酯,用于在纺织品或硬表面处理步骤中在水的存在下原位形成过酸。

[0227] 当存在时,基于该组合物,过酸和/或漂白活化剂通常以从0.1wt%至60wt%、从0.5wt%至40wt%或从0.6wt%至10wt%的量存在于该组合物中。可以将一种或多种疏水性过酸或其前体与一种或多种亲水性过酸或其前体组合使用。

[0228] 可以对过氧化氢源和过酸或漂白活化剂的量进行选择,以使得可用氧(来自过氧化物源)与过酸的摩尔比是从1:1至35:1,或2:1至10:1。

[0229] (6)包含金属的漂白催化剂-可以由催化金属络合物提供漂白组分。一种类型的包含金属的漂白催化剂是以下催化系统,该催化系统包括一种具有限定的漂白催化活性的过渡金属阳离子(例如铜、铁、钛、钆、钼或锰阳离子),一种具有很少或不具有漂白催化活性的辅助金属阳离子(例如锌或铝阳离子),以及一种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隔离物,特别是乙二胺四乙酸、乙二胺四(亚甲基膦酸)及其水溶性盐。此类催化剂披露于US 4430243中。优选的催化剂描述于WO 09/839406、US 6218351和WO 00/012667中。特别优选的是过渡金属催化剂或因此作为跨桥(cross-bridged)多齿N-供体配体的配体。

[0230] 如果希望的话,可以借助锰化合物催化在此的组合物。此类化合物以及使用水平在本领域中是熟知的并且包括例如披露于US 5576282中的基于锰的催化剂。

[0231] 在此有用的钴漂白催化剂是已知的并且例如描述于US 5597936;US 5595967中。通过已知的程序可容易地制备此类钴催化剂,例如像US 5597936和US 5595967中传授的程序。

[0232] 在此的组合物还可以适合地包括配体的过渡金属络合物,例如双哌啶酮(bispidone)(US 7501389)和/或大多环刚性配体-缩写为“MRL”。作为一个实际问题而并不作为限制之用,可以调整在此的组合物和方法,以在水性洗涤介质中提供大约至少一亿分之一的活性MRL种类,并且将典型地在洗涤液中提供从0.005ppm至25ppm、从0.05ppm至10ppm、或从0.1ppm至5ppm的MRL。

[0233] 即成的过渡金属漂白催化剂中的适合的过渡金属包括例如锰、铁和铬。适合的MRL包括5,12-二乙基-1,5,8,12-四氮杂二环[6.6.2]十六烷。通过已知的程序可容易地制备适

合的过渡金属MRL,例如像US 6225464和WO 00/32601中传授的程序。

[0234] (7) 光漂白剂-适合的光漂白剂包括例如磺化的酞菁锌、磺化的酞菁铝、咕吨染料及其混合物。用于在本发明的这些组合物中使用的优选漂白组分包括过氧化氢源、漂白活化剂和/或有机过氧酸,任选地通过过氧化氢源和漂白活化剂与漂白催化剂相组合的反应而原位产生。优选的漂白组分包括漂白催化剂,优选以上所述的有机漂白催化剂。

[0235] 特别优选的漂白组分是漂白催化剂,特别是有机漂白催化剂。

[0236] 示例性漂白系统还描述于例如WO 2007/087258、WO 2007/087244、WO 2007/087259以及WO 2007/087242中。

[0237] 织物调色剂-该组合物可以包括织物调色剂。适合的织物调色剂包括染料、染料-粘土轭合物、以及颜料。适合的染料包括小分子染料和聚合物染料。适合的小分子染料包括选自下组的小分子染料,该组由以下各项组成:属于以下比色指数(C.I.)分类的染料:直接蓝、直接红、直接紫、酸性蓝、酸性红、酸性紫、碱性蓝、碱性紫和碱性红或其混合物。

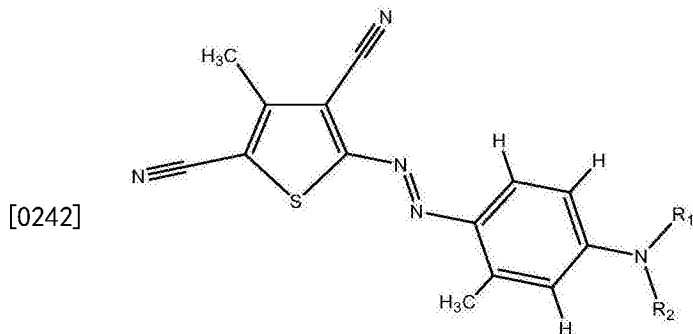
[0238] 在另一方面,适合的小分子染料包括选自下组的小分子染料,该组由以下各项组成:比色指数(染工和着色师学会(Society of Dyers and Colorists),布拉德福德,英国)编号直接紫9、直接紫35、直接紫48、直接紫51、直接紫66、直接紫99、直接蓝1、直接蓝71、直接蓝80、直接蓝279、酸性红17、酸性红73、酸性红88、酸性红150、酸性紫15、酸性紫17、酸性紫24、酸性紫43、酸性红52、酸性紫49、酸性紫50、酸性蓝15、酸性蓝17、酸性蓝25、酸性蓝29、酸性蓝40、酸性蓝45、酸性蓝75、酸性蓝80、酸性蓝83、酸性蓝90和酸性蓝113、酸性黑1、碱性紫1、碱性紫3、碱性紫4、碱性紫10、碱性紫35、碱性蓝3、碱性蓝16、碱性蓝22、碱性蓝47、碱性蓝66、碱性蓝75、碱性蓝159及其混合物。在另一方面,适合的小分子染料包括选自下组的小分子染料,该组由以下各项组成:比色指数(染工和着色师学会,布拉德福德,英国)编号酸性紫17、酸性紫43、酸性红52、酸性红73、酸性红88、酸性红150、酸性蓝25、酸性蓝29、酸性蓝45、酸性蓝113、酸性黑1、直接蓝1、直接蓝71、直接紫51及其混合物。在另一方面,适合的小分子染料包括选自下组的小分子染料,该组由以下各项组成:比色指数(染工和着色师学会,布拉德福德,英国)编号酸性紫17、直接蓝71、直接紫51、直接蓝1、酸性红88、酸性红150、酸性蓝29、酸性蓝113或其混合物。

[0239] 适合的聚合物染料包括选自下组的聚合物染料,该组由以下各项组成:包含轭合色原体的聚合物(染料-聚合物轭合物)以及与色原体共聚合进聚合物主链中的聚合物,及其混合物。

[0240] 在另一方面,适合的聚合物染料包括选自下组的聚合物染料,该组由以下各项组成:在Liquitint®(美利肯(Milliken))名称之下的织物实质性着色剂,从至少一种反应性染料和选自下组的聚合物形成的染料-聚合物轭合物,该组由以下各项组成:包含选自由羟基部分、一级胺部分、二级胺部分、硫醇部分及其混合物组成的组的部分的聚合物。在再另一方面,适合的聚合物染料包括选自下组的聚合物染料,该组由以下各项组成:Liquitint®紫色CT,与活性蓝、活性紫或活性红染料轭合的羧甲基纤维素(CMC),如与C.I.反应性蓝19(由麦格酶(Megazyme),威克洛,爱尔兰,以产品名AZO-CM-CELLULOSE,产品代码S-ACMC下售卖)轭合的CMC、烷氧基化的三苯基-甲烷聚合物着色剂,烷氧基化的噻吩聚合物着色剂、及其混合物。

[0241] 优选的调色染料包括发现于WO 08/87497中的增白剂。这些增白剂可以由以下结

构(I)表征:



(I)

[0243] 其中R<sub>1</sub>和R<sub>2</sub>可以独立地选自:

[0244] a) [(CH<sub>2</sub>CR'H<sub>0</sub>)<sub>x</sub>(CH<sub>2</sub>CR''H<sub>0</sub>)<sub>y</sub>H]

[0245] 其中R'选自下组,该组由以下各项组成:H、CH<sub>3</sub>、CH<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>z</sub>H、及其混合物;其中R''选自下组,该组由以下各项组成:H、CH<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>z</sub>H、及其混合物;其中x+y≤5;其中y≥1;并且其中z=0至5;

[0246] b) R<sub>1</sub>=烷基、芳基或芳基烷基,并且R<sub>2</sub>=[(CH<sub>2</sub>CR'H<sub>0</sub>)<sub>x</sub>(CH<sub>2</sub>CR''H<sub>0</sub>)<sub>y</sub>H]

[0247] 其中R'选自下组,该组由以下各项组成:H、CH<sub>3</sub>、CH<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>z</sub>H、及其混合物;其中R''选自下组,该组由以下各项组成:H、CH<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>z</sub>H、及其混合物;其中x+y≤10;其中y≥1;并且其中z=0至5;

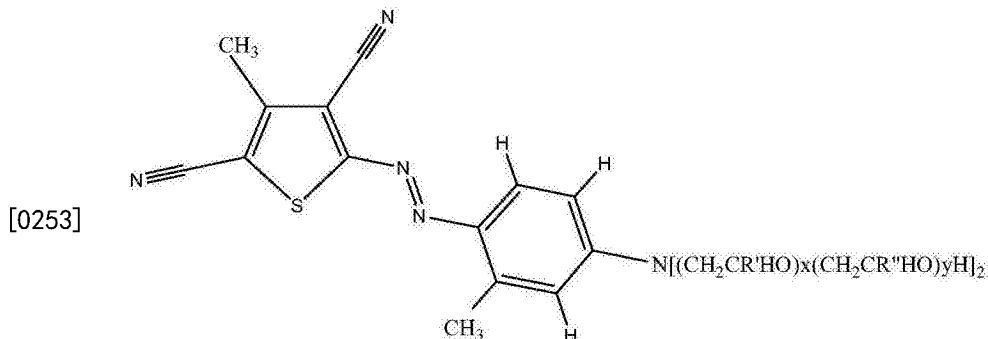
[0248] c) R<sub>1</sub>=[CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(OR<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>OR<sub>4</sub>]并且R<sub>2</sub>=[CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(OR<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>OR<sub>4</sub>]

[0249] 其中R<sub>3</sub>选自下组,该组由以下各项组成:H、(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>z</sub>H、及其混合物;并且其中z=0至10;

[0250] 其中R<sub>4</sub>选自下组,该组由以下各项组成:(C<sub>1</sub>-C<sub>16</sub>)烷基、芳基基团、及其混合物;并且

[0251] (d) 其中R<sub>1</sub>和R<sub>2</sub>可以独立地选自氧化苯乙烯、缩水甘油甲醚、异丁基缩水甘油醚、异丙基缩水甘油醚、叔丁基缩水甘油醚、2-乙基己基缩水甘油醚、以及缩水甘油十六烷基醚的氨基加成产物,随后为从1至10个环氧烷单位的加成。

[0252] 本发明的优选增白剂可以由以下结构(II)表征:



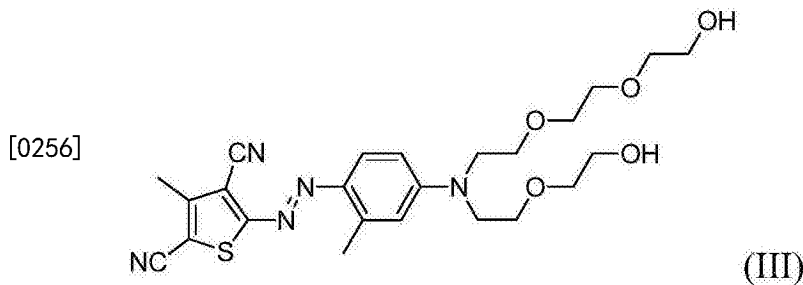
(II)

[0254] 其中R'选自下组,该组由以下各项组成:H、CH<sub>3</sub>、CH<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>z</sub>H、及其混合物;其中



R'选自下组,该组由以下各项组成:H、CH<sub>2</sub>O (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>z</sub>H、及其混合物;其中x+y≤5;其中y≥1;并且其中z=0至5。

[0255] 本发明的另外优选的增白剂可以由以下结构(III)表征:



[0257] 典型地包括具有一共5个E0基团的混合物。适合的优选分子是处于结构I的具有以下上文中“部分a”中的侧基的那些。

[0258] 表A

[0259]

	R1				R2			
	R'	R''	x	y	R'	R''	x	y
a	H	H	3	1	H	H	0	1
b	H	H	2	1	H	H	1	1
c=b	H	H	1	1	H	H	2	1
d=a	H	H	0	1	H	H	3	1

[0260] 另外的使用的增白剂包括描述于US 2008/34511 (联合利华(Unilever))中的那些。优选的试剂是“紫色13”。

[0261] 适合的染料粘土钶合物包括选自下组的染料粘土钶合物,该组包括至少一种阳离子/碱性染料和绿土、及其混合物。在另一方面,适合的染料粘土钶合物包括选自下组的染料粘土钶合物,该组由一种阳离子/碱性染料和一种粘土组成,该阳离子/碱性染料选自下组,该组由以下各项组成:C.I.碱性黄1至108、C.I.碱性橙1至69、C.I.碱性红1至118、C.I.碱性紫1至51、C.I.碱性蓝1至164、C.I.碱性绿1至14、C.I.碱性棕色1至23、CI碱性黑1至11,并且该粘土选自下组,该组由以下各项组成:蒙脱石粘土、水辉石粘土、皂石粘土及其混合物。在再另一方面,适合的染料粘土钶合物包括选自下组的染料粘土钶合物,该组由以下各项组成:蒙脱石碱性蓝B7C.I.42595钶合物、蒙脱石碱性蓝B9C.I.52015钶合物、蒙脱石碱性紫V3C.I.42555钶合物、蒙脱石碱性绿G1C.I.42040钶合物、蒙脱石碱性红R1C.I.45160钶合物、蒙脱石C.I.碱性黑2钶合物、水辉石碱性蓝B7C.I.42595钶合物、水辉石碱性蓝B9C.I.52015钶合物、水辉石碱性紫V3C.I.42555钶合物、水辉石碱性绿G1C.I.42040钶合物、水辉石碱性红R1C.I.45160钶合物、水辉石C.I.碱性黑2钶合物、皂石碱性蓝B7C.I.42595钶合物、皂石碱性蓝B9C.I.52015钶合物、皂石碱性紫V3C.I.42555钶合物、皂石碱性绿G1C.I.42040钶合物、皂石碱性红R1C.I.45160钶合物、皂石C.I.碱性黑2钶合物及其混合物。

[0262] 适合的颜料包括选自下组的颜料,该组由以下各项组成:黄士酮、阴丹酮、包含1至4个氯原子的含氯阴丹酮、皮葱酮、二氯皮葱酮、单溴二氯皮葱酮、二溴二氯皮葱酮、四溴皮葱酮、二萘嵌苯-3,4,9,10-四羧酸二酰亚胺(其中该酰亚胺基团可以是未取代的或被C1-

C3-烷基或苯基或杂环基团取代的,并且其中该苯基和杂环基团可以另外地带有不赋予在水中的溶解性的取代基)、葱素嘧啶羧酸酰胺、葱酮紫、异葱酮紫、二噁嗪颜料、每个分子可以包含高达2个氯原子的酞菁铜、多氯-酞菁铜或每个分子包含高达14个溴原子的多溴氯-酞菁铜,及其混合物。

[0263] 在另一方面,适合的颜料包括选自下组的颜料,该组由以下各项组成:群青(C.I. 颜料蓝29)、群青紫(C.I. 颜料紫15)及其混合物。

[0264] 上述织物调色剂可以组合使用(可以使用织物调色剂的任何混合物)。适合的调色剂更详细地描述于US 7208459中。染料在本发明的组合物中的优选水平是0.00001wt%至0.5wt%、或0.0001wt%至0.25wt%。优选在水中用于处理和/或清洁步骤的染料的浓度是从1ppb至5ppm、10ppb至5ppm或20ppb至5ppm。在优选的组合物中,表面活性剂的浓度将是0.2至3g/l。

[0265] 胶囊化物-该组合物可以包含胶囊化物。在一方面,胶囊化物包括一个核心,具有内表面和外表面的包壳,所述包壳胶囊化所述核心。

[0266] 在所述胶囊化物的一个方面,所述核心可以包括一种选自下组的材料,该组由以下各项组成:香料;增亮剂;染料;驱虫剂;硅酮;蜡;调味剂;维生素;织物软化剂;护肤剂,在一个方面是石蜡;酶;抗菌剂;漂白剂;感受剂(sensate);及其混合物;并且所述包壳可以包括一种选自下组的材料,该组由以下各项组成:聚乙烯;聚酰胺;聚乙烯醇,可任选地包含其他共聚单体;聚苯乙烯;聚异戊二烯;聚碳酸酯;聚酯;聚丙烯酸酯;氨基塑料,在一个方面,所述氨基塑料可以包括聚脲、聚氨酯和/或聚脲聚氨酯(polyureaurethane),在一个方面,所述聚脲可以包括聚氧基亚甲基脲和/或三聚氰胺甲醛;聚烯烃;多糖,在一个方面,所述多糖可以包括海藻酸盐和/或壳聚糖;明胶;虫胶;环氧树脂;乙烯基聚合物水不溶性无机物;硅酮;及其混合物。

[0267] 在所述胶囊化物的一个方面,所述核心可以包括香料。

[0268] 在所述胶囊化物的一个方面,所述包壳可以包括三聚氰胺甲醛和/或交联的三聚氰胺甲醛。

[0269] 在一方面,披露了适合的胶囊化物可以包括核心材料和包壳,所述包壳至少部分地包围所述核心材料。所述胶囊化物的85%或90%可以具有从0.2MPa至10MPa、从0.4MPa至5MPa、从0.6MPa至3.5MPa、或从0.7MPa至3MPa的抗断强度;并且具有从0至30%、从0至20%、或从0至5%的有益试剂泄露。

[0270] 在一方面,所述胶囊化物的85%或90%可以具有从1至80微米、从5至60微米、从10至50微米、或从15至40微米的粒度。

[0271] 在一方面,所述胶囊化物的85%或90%可以具有从30至250nm、从80至180nm、或从100至160nm的颗粒壁厚。

[0272] 在一方面,所述胶囊化物的核心材料可以包括一种选自由香料原材料组成的组的材料,和/或任选地包括一种选自下组的材料,该组由以下各项组成:植物油,包括纯净植物油和/或共混植物油,包括蓖麻油(caster oil)、椰子油、棉籽油、葡萄籽油、油菜籽、大豆油、玉米油、棕榈油、亚麻籽油、红花油、橄榄油、花生油、椰子油、棕榈仁油、蓖麻油(castor oil)、柠檬油及其混合物;植物油的酯,酯,包括己二酸二丁酯、酞酸二丁酯、己二酸丁基苯酯、己二酸辛基苯酯、磷酸三甲苯酯、磷酸三辛酯及其混合物;直链或支链烃,包括具有高于

约80℃的沸点的那些直链或支链烃；部分氢化的三联苯、二烷基邻苯二甲酸酯、烷基联苯（包括单异丙基联苯）、烷基化的萘（包括二丙基萘）、石油精（包括煤油）、矿物油及其混合物；芳香族溶剂，包括苯、甲苯及其混合物；硅酮油；及其混合物。

[0273] 在一方面，所述胶囊化物的壁材料可以包括适合的树脂，该树脂包括醛和胺的反应产物，适合的醛包括甲醛。适合的胺包括三聚氰胺、脲、苯并胍胺、甘脲、及其混合物。适合的三聚氰胺包括羟甲基三聚氰胺、甲基化的羟甲基三聚氰胺、亚氨基三聚氰胺及其混合物。适合的脲包括二羟甲基脲、甲基化的二羟甲基脲、脲-间苯二酚、及其混合物。

[0274] 在一方面，在将胶囊化物添加至组合物之前、期间或之后，适合的甲醛清除剂可以与例如处于胶囊浆料中的胶囊化物一起使用和/或添加至这种组合物中。适合的胶囊可以通过US 2008/0305982；和/或US 2009/0247449的以下传授来制成。

[0275] 在一个优选方面，该组合物还可以包括沉积酸，优选由下组组成，该组包括阳离子或非离子聚合物。适合的聚合物包括阳离子淀粉、阳离子羟基乙基纤维素、聚乙烯甲醛、槐树豆胶、甘露聚糖、木葡聚糖、罗望子胶、聚乙烯对苯二甲酸盐，以及包含二甲基氨基乙基甲基丙烯酸酯的且任选具有一种或多种选自下组的单体的聚合物，该组包括丙烯酸和丙烯酰胺。

[0276] 香料-在一方面，该组合物包括含有选自下组的一种或多种香料原材料的香料，该组由以下各项组成：1,1'-氧基双-2-丙醇；1,4-环己烷二羧酸，二乙基酯；(乙氧基甲氧基)环十二烷；1,3-壬二醇，单乙酸酯；(3-甲基丁氧基)乙酸，2-丙烯基酯；β-甲基环十二烷乙醇；2-甲基-3-[(1,7,7-三甲基二环[2.2.1]庚-2-基)氧基]-1-丙醇；氧杂环十六-2-酮；α-甲基-苯甲醇乙酸盐；反式-3-乙氧基-1,1,5-三甲基环己烷；4-(1,1-二甲基乙基)环己醇乙酸酯；十二氢-3a,6,6,9a-四甲基萘并[2,1-b]呋喃；β-甲基苯丙醛；β-甲基-3-(1-甲基乙基)苯丙醛；4-苯基-2-丁酮；2-甲基丁酸，乙基酯；苯甲醛；2-甲基丁酸，1-甲基乙基酯；二氢-5-戊基-2(3H)呋喃酮；(2E)-1-(2,6,6-三甲基-2-环己烯-1-基)-2-丁烯-1-酮；十二醛；十一醛；2-乙基-α,α-二甲基苯丙醛；癸醛；α,α-二甲基苯乙醇乙酸酯；2-(苯基亚甲基)辛醛；2-[[3-[4-(1,1-二甲基乙基)苯基]-2-甲基亚丙基]氨基]苯甲酸，甲基酯；1-(2,6,6-三甲基-3-环己烯-1-基)-2-丁烯-1-酮；2-戊基环戊酮；3-氧代-2-戊基环戊烷乙酸，甲基酯；4-羟基-3-甲氧基苯甲醛；3-乙氧基-4-羟基苯甲醛；2-庚基环戊酮；1-(4-甲基苯基)乙酮；(3E)-4-(2,6,6-三甲基-1-环己烯-1-基)-3-丁烯-2-酮；(3E)-4-(2,6,6-三甲基-2-环己烯-1-基)-3-丁烯-2-酮；苯乙醇；2H-1-苯并吡喃-2-酮；4-甲氧基苯甲醛；10-十一烯醛；丙酸，苯基甲基酯；β-甲基苯戊醇；1,1-二乙氧基-3,7-二甲基-2,6-辛二烯；α,α-二甲基苯乙醇；(2E)-1-(2,6,6-三甲基-1-环己烯-1-基)-2-丁烯-1-酮；乙酸，苯基甲基酯；环己烷丙酸，2-丙烯基酯；己酸，2-丙烯基酯；1,2-二甲氧基-4-(2-丙烯基)苯；1,5-二甲基-二环[3.2.1]辛-8-酮肟；4-(4-羟基-4-甲基戊烷基)-3-环己烯-1-甲醛；3-丁烯-2-醇；2-[[[2,4(或3,5)-二甲基-3-环己烯基-1-基]亚甲基]氨基]苯甲酸，甲基酯；8-环十六-1-酮；甲基紫罗酮；2,6-二甲基-7-辛烯-2-醇；2-甲氧基-4-(2-丙烯基)苯酚；(2E)-3,7-二甲基-2,6-辛二烯-1-醇；2-羟基-苯甲酸，(3Z)-3-己烯基酯；2-十三烯腈；4-(2,2-二甲基-6-亚甲基环己基)-3-甲基-3-丁烯-2-酮；四氢-4-甲基-2-(2-甲基-1-丙烯基)-2H-吡喃；乙酸，(2-甲基丁氧基)-,2-丙烯基酯；苯甲酸，2-羟基-,3-甲基丁基酯；2-丁烯-1-酮，1-(2,6,6-三甲基-1-环己烯-1-基)-, (Z)-；环戊烷羧酸，2-己基-3-氧代-, 甲基酯；苯丙醛，4-乙基-α,α-二甲基-；3-环己烯-1-甲醛，3-(4-羟基-4-甲基戊基)-；乙酮，1-(2,3,4,7,8,8a-六氢-3,6,8,8-

四甲基-1H-3a,7-甲醇甘菊蓝-5-基)-, [3R-(3.α., 3a.β., 7.β., 8a.α.)]-; 十一醛, 2-甲基-2H-吡喃-2-酮, 6-丁基四氢-; 苯丙醛, 4-(1,1-二甲基乙基)-.α.-甲基-; 2(3H)-呋喃酮、5-庚基二氢-; 苯甲酸, 2-[(7-羟基-3,7-二甲基亚辛基)氨基]-、甲基; 苯甲酸, 2-羟基-, 苯基甲基酯; 萘, 2-甲氧基-; 2-环戊烯-1-酮, 2-己基-; 2(3H)-呋喃酮、5-己基二氢-; 氧杂环丙烷羧酸, 3-甲基-3-苯基-, 乙基酯; 2-氧杂二环[2.2.2]辛烷, 1,3,3-三甲基-; 苯戊醇, .γ.-甲基-; 3-辛醇, 3,7-二甲基-; 3,7-二甲基-2,6-辛二烯腈; 3,7-二甲基-6-辛烯-1-醇; 萘品醇乙酸酯; 2-甲基-6-亚甲基-7-辛烯-2-醇, 二氢衍生物; 3a,4,5,6,7,7a-六氢-4,7-甲醇-1H-茛-6-酚丙酸酯; 3-甲基-2-丁烯-1-醇乙酸酯; (Z)-3-己烯-1-醇乙酸酯; 2-乙基-4-(2,2,3-三甲基-3-环戊烯-1-基)-2-丁烯-1-醇; 4-(八氢-4,7-甲醇-5H-亚茛-5-基)-丁醛; 3-2,4-二甲基-环己烯-1-甲醛; 1-(1,2,3,4,5,6,7,8-八氢-2,3,8,8-四甲基-2-萘基)-乙酮; 2-羟基-苯甲酸, 甲基酯; 2-羟基-苯甲酸, 己基酯; 2-苯氧基-乙醇; 2-羟基-苯甲酸, 戊基酯; 2,3-庚烷二酮; 2-己烯-1-醇; 6-辛烯-2-醇、2,6-二甲基-; 突厥酮(α,β,γ或δ或其混合物), 4,7-甲醇-1H-茛-6-酚, 3a,4,5,6,7,7a-六氢-, 乙酸酯; 9-十一烯醛; 8-十一烯醛; 异环柠檬醛; 乙酮, 1-(1,2,3,5,6,7,8,8a-八氢-2,3,8,8-四甲基-2-萘基)-; 3-环己烯-1-甲醛, 3,5-二甲基-; 3-环己烯-1-甲醛, 2,4-二甲基-; 1,6-辛二烯-3-醇, 3,7-二甲基-; 1,6-辛二烯-3-醇, 3,7-二甲基-, 乙酸酯; 铃兰醛(p-t-Bucinal), 以及环戊酮、2-[2-(4-甲基-3-环己烯-1-基)丙基]-以及1-甲基-4-(1-甲基乙烯基)环己烯及其混合物。

[0277] 在一方面,该组合物可以包括胶囊化的香料颗粒,该颗粒包含水溶性羟基化合物或三聚氰胺-甲醛或改性的聚乙烯醇。在一方面,胶囊化物包括(a)至少部分水溶的固体基质,包含一种或多种水溶性羟基化合物,优选淀粉;以及(b)由该固体基质包封的香料油。

[0278] 在另一方面,该香料可以是与多胺(优选聚乙烯亚胺)预复合的,以形成席夫碱(Schiff base)。

[0279] 聚合物-该组合物可以包括一种或多种聚合物。实例为羧甲基纤维素、聚(乙烯基-吡咯烷酮)、聚(乙二醇)、聚(乙醇醇)、聚(乙烯基吡啶-N-氧化物)、聚(乙烯基咪唑)、聚羧酸酯(如聚丙烯酸酯)、马来酸/丙烯酸共聚物、以及甲基丙烯酸月桂酯/丙烯酸共聚物。

[0280] 该组合物可以包括一种或多种两亲清洁聚合物,例如具有以下通用结构的化合物:双((C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O)(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>)(CH<sub>3</sub>)-N<sup>+</sup>-C<sub>x</sub>H<sub>2x</sub>-N<sup>+</sup>-(CH<sub>3</sub>)-双((C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O)(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>),其中n=从20至30,并且x=从3至8,或其硫酸化的或磺化的变体。

[0281] 该组合物可以包括两亲烷氧基化油脂清洁聚合物,这些聚合物具有平衡的亲水和疏水特性,使得它们从织物和表面去除油脂颗粒。本发明的两亲烷氧基化油脂清洁聚合物的具体实施例包括一个核心结构和与那个核心结构连接的多个烷氧基化基团。这些可以包括烷氧基化的聚烯属烃亚胺(polyalkylenimine),优选具有内聚环氧乙烷嵌段和外聚环氧丙烷嵌段。

[0282] 在此,烷氧基化的聚羧酸酯(例如从聚丙烯酸酯制备的那些)可用于提供另外的油脂去除性能。此类材料描述于WO 91/08281和PCT 90/01815中。化学上地,这些材料包括聚丙烯酸酯,每7-8个丙烯酸脂单位具有一个乙氧基侧链。侧链具有化学式-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>m</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>,其中m是2-3并且n是6-12。侧链是酯连接至聚丙烯酸酯“主链”,以提供“梳子状”聚合物类型结构。分子量可以不同,但典型地处于2000至50,000的范围内。此类烷氧基化的聚羧酸酯可以包括在此的组合物的从0.05wt%至10wt%。

[0283] 本发明的类异戊二烯衍生的表面活性剂,以及它们与其他辅助表面活性剂和其他佐剂成分一起形成的混合物特别适合与两亲接枝共聚物一起使用,优选地该两亲接枝共聚物包括(i)聚乙二醇主链;以及(ii)和至少一种下垂物部分,该下垂物部分选自聚乙酸乙烯酯、聚乙烯醇及其混合物。优选的两亲接枝共聚物是由巴斯夫供应的Sokalan HP22。适合的聚合物包括随机接枝共聚物,优选聚乙酸乙烯酯接枝的聚环氧乙烷共聚物,具有聚环氧乙烷主链和多重聚乙酸乙烯酯侧链。聚环氧乙烷主链的分子量优选是6000,并且聚环氧乙烷与聚乙酸乙烯酯的重量比是40比60,并且每50个环氧乙烷单位有不多于1个接枝点。

[0284] 羧酸酯聚合物-本发明的组合物还包括一种或多种羧酸酯聚合物,例如马来酸酯/丙烯酸酯随机共聚物或聚丙烯酸酯均聚物。在一方面,该羧酸酯聚合物是具有从4,000Da至9,000Da或从6,000Da至9,000Da的分子量的聚丙烯酸酯均聚物。

[0285] 污物释放聚合物-本发明的组合物还可以包括一种或多种污物释放聚合物,这些聚合物具有如由以下结构(I)、(II)或(III)之一所定义的结构:

[0286] (I) -  $[(\text{OCHR}^1-\text{CHR}^2)_a-\text{O}-\text{OC}-\text{Ar}-\text{CO}]_d$

[0287] (II) -  $[(\text{OCHR}^3-\text{CHR}^4)_b-\text{O}-\text{OC}-s\text{Ar}-\text{CO}]_e$

[0288] (III) -  $[(\text{OCHR}^5-\text{CHR}^6)_c-\text{OR}^7]_f$

[0289] 其中:

[0290] a、b和c是从1至200;

[0291] d、e和f是从1至50;

[0292] Ar是1,4-取代的亚苯基;

[0293] sAr是1,3-取代的亚苯基,该亚苯基在5位上被SO<sub>3</sub>Me取代;

[0294] Me是Li,K,Mg/2,Ca/2,Al/3,铵,单-、二-、三-、或四烷基铵,其中烷基是C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>烷基或C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>羟基烷基,或其混合物;

[0295] R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>和R<sup>6</sup>独立地选自H或C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>正-或异-烷基;并且

[0296] R<sup>7</sup>是直链或支链的C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>烷基,或直链或支链的C<sub>2</sub>-C<sub>30</sub>烯基,或具有5至9个碳原子的环烷基,或C<sub>8</sub>-C<sub>30</sub>芳基,或C<sub>6</sub>-C<sub>30</sub>芳基烷基。

[0297] 适合的去污聚合物是聚酯去污聚合物,例如Repel-o-tex聚合物,包括Repel-o-tex、SF-2和SRP6,由罗地亚(Rhodia)供应。其他适合的去污聚合物包括Texcare聚合物,包括Texcare SRA100、SRA300、SRN100、SRN170、SRN240、SRN300和SRN325,由科莱恩(Clariant)供应。其他适合的去污聚合物是Marloquest聚合物,例如Marloquest SL,由萨索尔(Sasol)供应。

[0298] 纤维素聚合物-本发明的组合物还包括一种或多种纤维素聚合物,包括选自烷基纤维素、烷基烷氧基烷基纤维素、羧基烷基纤维素、烷基羧基烷基纤维素的那些。在一方面,纤维素聚合物选自下组,该组包括羧甲基纤维素、甲基纤维素、甲基羟基乙基纤维素、甲基羧甲基纤维素、及其混合物。在一方面,羧甲基纤维素具有从0.5至0.9的羧甲基取代度以及从100,000Da至300,000Da的分子量。

[0299] 酶-该组合物可以包括提供清洁性能和/或织物护理益处的一种或多种酶。适合的酶的实例包括但不限于半纤维素酶、过氧化物酶、蛋白酶、纤维素酶、木聚糖酶、脂肪酶、磷脂酶、酯酶、角质酶、果胶酶、甘露聚糖酶、果胶裂解酶、角蛋白酶、还原酶、氧化酶、酚氧化酶、脂加氧酶、木质素酶、支链淀粉酶、鞣酸酶、聚戊糖酶、马拉纳酶(malanase)、β-葡聚糖

酶、阿拉伯糖苷酶、透明质酸酶、软骨素酶、漆酶、叶绿素酶和淀粉酶、或其混合物。典型的组合是酶混合物,可以包含例如蛋白酶和脂肪酶连同淀粉酶。当存在于组合物中时,前述另外的酶可以按组合物的重量计以从0.00001wt%至2wt%、从0.0001wt%至1wt%或从0.001wt%至0.5wt%酶蛋白的水平存在。

[0300] 一般而言,一种或多种所选酶的特性应与选定的洗涤剂相容(即,最适pH,与其他酶和非酶成分的相容性,等等),并且该一种或多种酶应以有效量存在。

[0301] **纤维素酶**:适合的纤维素酶包括细菌或真菌来源的那些。包括化学修饰的或蛋白质工程化的变体。适合的纤维素酶包括来自以下属的纤维素酶:芽孢杆菌属、假单胞菌属、腐质霉属、镰孢菌属、梭孢壳属、枝顶孢霉属,例如US 4435307、US 5648263、US 5691178、US 5776757以及WO 89/09259中披露的由特异腐质霉、嗜热毁丝霉以及尖孢镰孢菌产生的真菌纤维素酶。

[0302] 特别适合的纤维素酶是具有颜色护理益处的碱性或中性纤维素酶。这样的纤维素酶的实例是EP 0495257、EP 0531372、WO 96/11262、WO 96/29397、WO 98/08940中所述的纤维素酶。其他实例是纤维素酶变体,如WO 94/07998、EP 0531315、US 5457046、US 5686593、US 5763254、WO 95/24471、WO 98/12307以及PCT/DK 98/00299中所述的那些。

[0303] 可商购的纤维素酶包括Celluzyme™、和Carezyme™(诺维信公司(Novozymes A/S))、Clazinase™、和Puradax HA™(杰能科国际有限公司(Genencor International Inc.))、以及KAC-500(B)™(花王株式会社(Kao Corporation))。

[0304] 在一方面,优选的酶将包括蛋白酶。适合的蛋白酶包括细菌、真菌、植物、病毒或动物起源的那些,例如植物或微生物起源。优选微生物来源。包括化学修饰的或蛋白质工程化的变体。它可以是碱性蛋白酶,例如丝氨酸蛋白酶或金属蛋白酶。丝氨酸蛋白酶可以例如是S1家族(如胰蛋白酶)或S8家族(如枯草杆菌蛋白酶)。金属蛋白酶可以例如是来自例如家族M4的嗜热菌蛋白酶或其他金属蛋白酶,例如来自M5、M7或M8家族的那些。

[0305] 术语“枯草杆菌酶”是指根据斯艾森(Siezen)等人,蛋白质工程学(Protein Engng.) 4(1991)719-737和斯艾森等人,蛋白质科学(Protein Science) 6(1997)501-523的丝氨酸蛋白酶亚组。丝氨酸蛋白酶是特征为在活性位点具有与底物形成共价加合物的丝氨酸的蛋白酶的一个亚组。枯草杆菌酶可以划分为6个亚部,即,枯草杆菌蛋白酶家族、嗜热蛋白酶家族、蛋白酶K家族、羊毛硫抗生素肽酶家族、Kexin家族和Pyrolysin家族。

[0306] 枯草杆菌酶的实例是来源于芽孢杆菌属的那些,例如描述于US 7262042和WO 2009/021867中的迟缓芽孢杆菌、嗜碱芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、短小芽孢杆菌和吉氏芽孢杆菌;和描述于WO 89/06279中的枯草杆菌蛋白酶迟缓(lentus)、枯草杆菌蛋白酶诺和(Novo)、枯草杆菌蛋白酶嘉士伯(Carlsberg)、地衣芽孢杆菌、枯草杆菌蛋白酶BPN'、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以及描述于(WO 93/18140)中的蛋白酶PD138。其他有用的蛋白酶可以是描述于WO 92/175177、WO 01/016285、WO 02/026024以及WO 02/016547中的那些。胰蛋白酶样蛋白酶的实例是胰蛋白酶(例如猪或牛来源的)和镰孢菌蛋白酶(描述于WO 89/06270、WO 94/25583和WO 05/040372中),以及衍生自纤维单胞菌(Cellulomonas)的胰凝乳蛋白酶(描述于WO 05/052161和WO 05/052146中)。

[0307] 进一步优选的蛋白酶是来自迟缓芽孢杆菌DSM 5483的碱性蛋白酶(如在例如WO

95/23221中所述)、及其变体(在WO 92/21760、WO 95/23221、EP 1921147以及EP 1921148中描述的)。

[0308] 金属蛋白酶的实例是如描述于WO 07/044993(杰能科国际公司(Genencor Int.))中的中性金属蛋白酶,例如来源于解淀粉芽孢杆菌的那些。

[0309] 有用的蛋白酶的实例是于以下各项中的变体:WO 92/19729、WO 96/034946、WO 98/20115、WO 98/20116、WO 99/011768、WO 01/44452、WO 03/006602、WO 04/03186、WO 04/041979、WO 07/006305、WO 11/036263、WO 11/036264,尤其是在以下位置的一个或多个中具有取代的变体:3、4、9、15、27、36、57、68、76、87、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、106、118、120、123、128、129、130、160、167、170、194、195、199、205、206、217、218、222、224、232、235、236、245、248、252以及274,使用BPN<sup>®</sup>编号。更优选地,这些枯草杆菌酶变体可以包含以下突变:S3T、V4I、S9R、A15T、K27R、\*36D、V68A、N76D、N87S、R、\*97E、A98S、S99G、D、A、S99AD、S101G、M、R S103A、V104I、Y、N、S106A、G118V、R、H120D、N、N123S、S128L、P129Q、S130A、G160D、Y167A、R170S、A194P、G195E、V199M、V205I、L217D、N218D、M222S、A232V、K235L、Q236H、Q245R、N252K、T274A(使用BPN<sup>®</sup>编号)。

[0310] 适合的可商购蛋白酶包括以下列商品名出售的那些:Alcalase<sup>®</sup>、Duralase<sup>™</sup>、Durazym<sup>™</sup>、Relase<sup>®</sup>、Relase<sup>®</sup> Ultra、Savinase<sup>®</sup>、Savinase<sup>®</sup> Ultra、Primase<sup>®</sup>、Polarzyme<sup>®</sup>、Kannase<sup>®</sup>、Liquanase<sup>®</sup>、Liquanase<sup>®</sup> Ultra、Ovozyme<sup>®</sup>、Coronase<sup>®</sup>、Coronase<sup>®</sup> Ultra、Neutrase<sup>®</sup>、Everlase<sup>®</sup>和Esperase<sup>®</sup>(诺维信公司),以下列商品名出售的那些:Maxatase<sup>®</sup>、Maxacal<sup>®</sup>、Maxapem<sup>®</sup>、Purafect<sup>®</sup>、Purafect Prime<sup>®</sup>、Preferenz<sup>™</sup>、Purafect MA<sup>®</sup>、Purafect Ox<sup>®</sup>、Purafect OxP<sup>®</sup>、Puramax<sup>®</sup>、Properase<sup>®</sup>、Effectenz<sup>™</sup>、FN2<sup>®</sup>、FN3<sup>®</sup>、FN4<sup>®</sup>、Excellase<sup>®</sup>、Opticlean<sup>®</sup>以及Optimase<sup>®</sup>(丹尼斯克/杜邦公司(Danisco/DuPont))、Axapem<sup>™</sup>(吉斯特布罗卡德斯公司(Gist-Brocades N.V.))、BLAP(序列示于US 5352604的图29中)及其变体(汉高股份(Henkel AG))以及来自花王株式会社(Kao)的KAP(嗜碱芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶)。

[0311] 适合的脂肪酶和角质酶包括细菌或真菌来源的那些。包括化学修饰的或蛋白工程化的突变体酶。实例包括来自嗜热真菌属的脂肪酶,例如如描述于EP 258068和EP 305216中的来自疏绵状嗜热丝孢菌(早先命名为疏棉状腐质霉);来自腐质霉属的角质酶,例如特异腐质霉(WO 96/13580);来自假单胞菌属的菌株的脂肪酶(这些中的一些现在改名为伯克霍尔氏菌属),例如产碱假单胞菌或类产碱假单胞菌(EP 218272)、洋葱假单胞菌(EP 331376)、假单胞菌属菌株SD705(WO 95/06720&WO 96/27002)、威斯康星假单胞菌(*P.wisconsinensis*)(WO 96/12012);GDSL-型链霉菌属脂肪酶(WO 10/065455);来自稻瘟病菌的角质酶(WO 10/107560);来自门多萨假单胞菌的角质酶(US 5,389,536);来自褐色嗜热裂孢菌(*Thermobifida fusca*)的脂肪酶(WO 11/084412,WO 13/033318,WO 2013/096653);嗜热脂肪土芽孢杆菌脂肪酶(WO 11/084417);来自枯草芽孢杆菌的脂肪酶(WO 11/084599);以及来自灰色链霉菌(WO 11/150157)和始旋链霉菌(*S.pristinaespiralis*)(WO 12/137147)的脂肪酶。

[0312] 其他实例是脂肪酶变体,例如描述于EP 407225、WO 92/05249、WO 94/01541、WO 94/25578、WO 95/14783、WO 95/30744、WO 95/35381、WO 95/22615、WO 96/00292、WO 97/

04079、WO 97/07202、WO 00/34450、WO 00/60063、WO 01/92502、WO 07/87508以及WO 09/109500中的那些。

[0313] 优选的商业化脂肪酶产品包括Lipolase™、Lipex™;Lipolex™和Lipoclean™(诺维信公司),Lumafast(最初来自杰能科公司(Genencor))以及Lipomax(最初来自吉斯特-博克德斯公司(Gist-Brocades))。

[0314] 再其他实例是有时称为酰基转移酶或过水解酶的脂肪酶,例如与南极假丝酵母(*Candida antarctica*)脂肪酶A具有同源性的酰基转移酶(WO 10/111143)、来自耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*)的酰基转移酶(WO 05/56782)、来自CE 7家族的过水解酶(WO 09/67279)以及耻垢分枝杆菌过水解酶的变体(特别是来自亨斯迈纺织品染化有限公司(Huntsman Textile Effects Pte Ltd)的商业产品Gentle Power Bleach中所用的S54V变体)(WO 10/100028)。

[0315] 在一方面,其他优选的酶包括微生物衍生的展现出内切- $\beta$ -1,4-葡聚糖酶活性的内切葡聚糖酶(EC3.2.1.4),包括对于芽孢杆菌属的成员而言内源的细菌多肽,具有与US 7141403中的氨基酸序列SEQ ID NO:2至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或甚至100%一致性的序列,以及其混合物。适合的内切葡聚糖酶是在商标名Celluclean®和Whitezyme®(诺维信公司)下售卖的。

[0316] 其他优选的酶包括在商标名Pectawash®、Pectaway®、Xpect®下售卖的果胶裂解酶,以及在商标名Mannaway®下售卖的甘露聚糖酶(诺维信公司),以及Purabrite®(丹尼斯克/杜邦公司(Danisco/DuPont))。

[0317] 该一种或多种洗涤剂酶可以通过添加包含一种或多种酶的单独的添加剂,或通过添加包括所有这些酶的组合添加剂而被包括于洗涤剂组合物中。本发明的洗涤剂添加剂,即,独立添加剂或组合添加剂,可以被配制为,例如颗粒、液体、浆料等。优选的洗涤剂添加剂制品是颗粒,尤其是非尘颗粒;液体,尤其是稳定化的液体;或浆料。

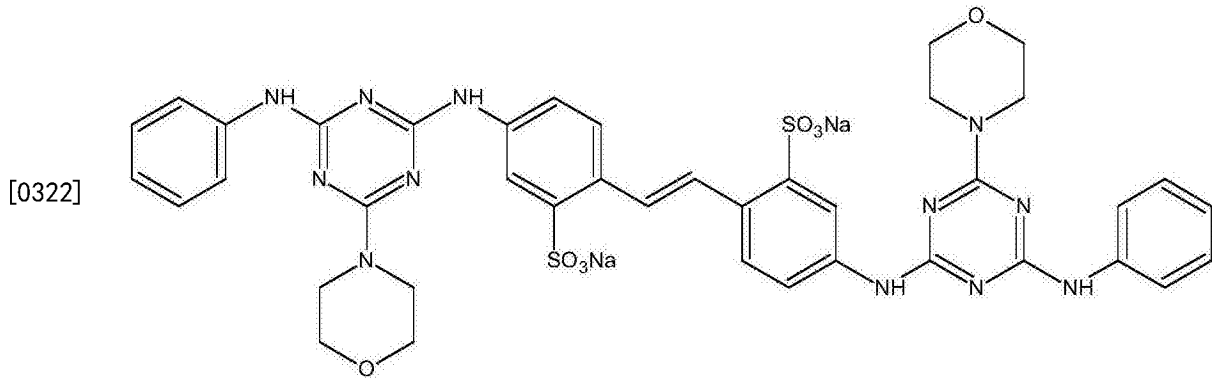
[0318] 非尘颗粒可以例如如US 4106991和US 4661452中所披露来制造,并且可以任选地通过本领域中已知的方法来涂布。蜡状包衣材料的实例是平均分子量为1000至20000的聚(环氧乙烷)产品(聚乙二醇,PEG);具有16-50个环氧乙烷单位的乙氧基化壬基酚;具有15至80个环氧乙烷单位的乙氧基化脂肪族醇,其中醇含有12至20个碳原子;脂肪醇;脂肪酸;以及脂肪酸的单-和双-和三甘油酯。适用于通过流化床技术应用的成膜包衣材料的实例在GB1483591中给出。液体酶制剂可以例如通过根据已确立的方法添加多元醇(如丙二醇)、糖或糖醇、乳酸或硼酸而稳定化。受保护的酶可以根据EP238216中披露的方法来制备。

[0319] 染料转移抑制剂-本发明的组合物还可以包括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、多胺N-氧化物聚合物、N-乙烯吡咯烷酮与N-乙烯基咪唑的共聚物、聚乙烯噁唑烷酮以及聚乙烯咪唑或其混合物。当存在于组合物中时,染料转移抑制剂可以按从0.0001wt%至10wt%、从0.01wt%至5wt%或从0.1wt%至3wt%的水平存在。

[0320] 增亮剂-本发明的组合物还可包含另外的组分,这些组分可以给正清洁的物品着色,例如荧光增亮剂。

[0321] 该组合物可以包括C.I.荧光增亮剂260,处于具有以下结构的 $\alpha$ -晶体形式:





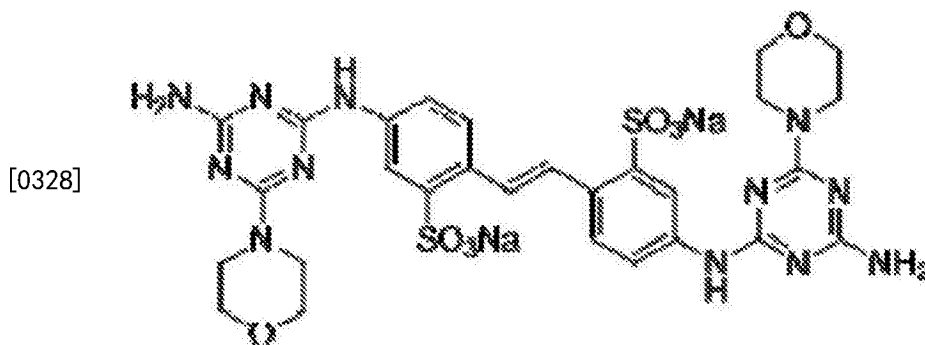
[0323] 在一方面,增亮剂是冷水可溶增亮剂,例如处于 $\alpha$ -晶体形式的C.I. 荧光增亮剂260。在一方面,增亮剂主要处于 $\alpha$ -晶体形式,这意味着典型地至少50wt%、至少75wt%、至少90wt%、至少99wt%、或甚至基本上全部的C.I. 荧光增亮剂260是处于 $\alpha$ -晶体形式。

[0324] 增亮剂典型地是处于微粒化微粒形式,具有从3至30微米、从3微米至20微米、或从3至10微米的加权平均初级粒度。

[0325] 该组合物可以包括处于 $\beta$ -晶体形式的C.I. 荧光增亮剂260,并且(i)处于 $\alpha$ -晶体形式的C.I. 荧光增亮剂260与(ii)处于 $\beta$ -晶体形式的C.I. 荧光增亮剂260的重量比可以是至少0.1或至少0.6。BE 680847涉及用于制得处于 $\alpha$ -晶体形式的C.I. 荧光增亮剂260的方法。

[0326] 可以用于本发明中的商业光学增亮剂可以划分为多个亚组,这些亚组包括但不是必须限制于:二苯乙烯、吡唑啉、香豆素、羧酸、次甲基菁、二苯并噻吩-5,5-二氧化物、唑、5和6元环杂环的衍生物以及其他混杂剂。此类增亮剂的实例披露于“荧光增亮剂的生产 and 应用”,M. 佐赫劳德尼克(Zahradnik),由约翰威利父子公司(John Wiley&Sons),纽约(1982)出版。可以用于本发明组合物的光学增亮剂的具体非限制性实例是在US 4790856和US 3646015中鉴定的那些。

[0327] 另外适合的增亮剂具有以下结构:



[0329] 适合的荧光增亮剂水平包括从0.01wt%、从0.05wt%、从0.1wt%或从0.2wt%的较低水平至0.5wt%或0.75wt%的较高水平。

[0330] 在一方面,增亮剂可以装载在粘土上以形成颗粒。硅酸盐-本发明的组合物还可以包含硅酸盐,例如硅酸钠或钾。该组合物可以包含从0wt%至小于10wt%硅酸盐,至9wt%、或至8wt%、或至7wt%、或至6wt%、或至5wt%、或至4wt%、或至3wt%、或甚至至2wt%,并且从高于0wt%、或从0.5wt%、或从1wt%起的硅酸盐。适合的硅酸盐是硅酸钠。

[0331] 分散剂-本发明的组合物还可以包含分散剂。适合的水溶性有机材料包括均聚合或共聚合的酸或其盐,其中聚羧酸包括至少两个羧基,这两个羧基被不超过两个碳原子彼

此分开。

[0332] 酶稳定剂-用于在组合物中使用的酶可以通过各种技术来稳定。在此使用的酶可以通过钙和/或镁离子的水溶性来源的存在来稳定。常规的稳定剂的实例是,例如,丙二醇或甘油、糖或糖醇、乳酸、硼酸或硼酸衍生物,例如芳香族硼酸酯,或苯基硼酸衍生物,例如4-甲酰苯基硼酸,并且可以如在例如WO 92/19709和WO 92/19708中所述配制该组合物。在包含蛋白酶的水性组合物的情况下,可以添加可逆蛋白酶抑制剂,例如包括硼酸盐、4-甲酰苯基硼酸、苯基硼酸及其衍生物的硼化合物,或例如甲酸钙、甲酸钠和1,2-丙二醇的化合物,以进一步改进稳定性。

[0333] 溶剂-适合的溶剂包括水和其他溶剂,例如亲脂性流体。适合的亲脂性流体的实例包括硅氧烷、其他硅酮、烃、乙二醇醚、甘油衍生物(例如甘油醚)、全氟化的胺、全氟化的和氢氟醚溶剂、低挥发性非氟化的有机溶剂、二醇溶剂、其他环境友好型溶剂及其混合物。

[0334] 结构化剂/增稠剂-结构化液体可以从内部结构化,由此结构由初级成分(例如,表面活性剂材料)形成,和/或通过使用次级成分(例如,聚合物、粘土和/或硅酸盐材料)提供三维基质结构而从外部结构化。该组合物可以包括从0.01wt%至5wt%、或从0.1wt%至2.0wt%的结构化剂。该结构化剂典型地选自下组,该组由以下各项组成:甘油二酯和甘油三酯、硬脂酸乙二醇双酯、微晶纤维素、基于纤维素的材料、微纤维纤维素、疏水改性的碱性可膨胀的乳液(例如Polygel W30 (3VSigma))、生物聚合物,黄原胶、吉兰糖胶、及其混合物。适合的结构化剂包括氢化的蓖麻油及其非乙氧基化的衍生物。适合的结构化剂披露于US 6855680中。此类结构化剂具有螺旋样结构化系统,该系统具有一系列纵横比。其他适合的结构化剂和用于制得它们的方法描述于WO 10/034736中。

[0335] 调节剂-本发明的组合物可以包括高熔点脂肪化合物。在此有用的高熔点脂肪化合物具有25°C或更高的熔点,并且选自下组,该组由以下各项组成:脂肪醇、脂肪酸、脂肪醇衍生物、脂肪酸衍生物、及其混合物。此类具有低熔点的化合物并非旨在被包括在此部分中。高熔点化合物的非限制性实例发现于国际化妆品成分词典,第五版,1993,以及CTFA化妆品成分手册,第二版,1992中。

[0336] 鉴于提供改进的调节益处(如在施用至湿发的过程中的湿滑感、柔和以及对干发的保湿感),高熔点脂肪化合物被以从0.1wt%至40wt%、从1wt%至30wt%、从1.5wt%至16wt%、从1.5wt%至8wt%的水平包括在该组合物中。

[0337] 本发明的组合物可以包含阳离子聚合物。在组合物中阳离子聚合物的浓度典型地范围为从0.05wt%至3wt%、从0.075wt%至2.0wt%、或从0.1wt%至1.0wt%。在预期使用该组合物的pH下,适合的阳离子聚合物将具有至少0.5meq/gm、至少0.9meq/gm、至少1.2meq/gm、至少1.5meq/gm、或小于7meq/gm、以及小于5meq/gm的阳离子电荷密度,该pH的范围将大体上是从pH 3至pH 9、或在pH 4与pH 8之间。在此,聚合物的“阳离子电荷密度”是指聚合物上的正电荷数目与聚合物的分子量之比。此类适合的阳离子聚合物的平均分子量将大体上是在10,000与1000万之间、在50,000与500万之间、或在100,000与300万之间。

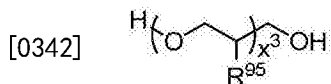
[0338] 用于在本发明的组合物中使用的适合的阳离子聚合物包含阳离子含氮部分,例如季铵或阳离子质子化的氨基部分。可以将任何阴离子反离子与阳离子聚合物关联使用,只要聚合物保持溶解于水中、组合物中、或组合物的凝聚相中,并且只要反离子在物理和化学上与组合物的主要成分相容或以另外的方式不会不适当地损害组合物性能、稳定性或美

感。此类反离子的非限制性实例包括卤化物(例如,氯化物、氟化物、溴化物、碘化物)、硫酸盐和甲基硫酸盐。

[0339] 此类聚合物的非限制性实例描述于CTFA化妆品成分词典,第三版,埃斯特林(Estrin)、克罗斯利(Crosley)、和海恩斯(Haynes)编写(化妆品、化妆用具以及香水联合公司(The Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association, Inc.), 华盛顿(1982))。

[0340] 用于在该组合物中使用的其他适合的阳离子聚合物包括多糖聚合物,阳离子瓜尔豆胶衍生物,含四价氮的纤维素醚,合成聚合物,醚化纤维素、瓜尔豆胶和淀粉的共聚物。当使用的时候,在此的阳离子聚合物可溶解于组合物中或可溶解于组合物中的复合凝聚相中,该凝聚相是由上文所述的阳离子聚合物和阴离子、两性或/或兼性离子表面活性剂组分形成。阳离子聚合物的复合凝聚物还可以与组合物中其他带电荷的材料形成。适合的阳离子聚合物描述于US 3962418;US 3958581;和US 2007/0207109中。

[0341] 本发明的组合物可以包括作为调节剂的非离子聚合物。在此具有大于1000的分子量的聚二醇(polyalkylene glycol)是有用的。具有以下通式的那些是有用的:



[0343] 其中R<sup>95</sup>选自下组,该组由以下各项组成:H、甲基及其混合物。调节剂,并且特别是硅酮,可以被包括在组合物中。用于本发明的组合物中的调节剂典型地包括形成乳化液体颗粒的水不溶性、水分散性、非挥发性的液体。用于在该组合物中使用的适合的调节剂是通常表征为以下项的那些调节剂:硅酮(例如,硅酮油、阳离子硅酮、硅酮胶、高折射性硅酮、以及硅酮树脂)、有机调节油(例如,烃油、聚烯烃、以及脂肪酯)或其组合,或者以另外方式在于此的水性表面活性剂基质中形成液体分散颗粒的那些调节剂。此类调节剂应该在物理和化学上是与组合物中的主要组分相容的,并且不应该以另外的方式不适当地损害组合物稳定性、美感或性能。

[0344] 在组合物中调节剂的浓度应该足以提供所希望的调节益处。这种浓度可以随着调节剂、所希望的调节性能、调节剂颗粒的平均大小、其他组分的类型和浓度以及其他类似因素而变化。

[0345] 硅酮调节剂的浓度范围典型地是从0.01wt%至10wt%。适合的硅酮调节剂以及对于硅酮的任意的悬浮剂的非限制性实例描述于美国再公告专利号34,584;US 5104646;US 5106609;US 4152416;US 2826551;US 3964500;US 4364837;US 6607717;US 6482969;US 5807956;US 5981681;US 6207782;US 7465439;US 7041767;US 7217777;US 2007/0286837 A1;US 2005/0048549 A1;US 2007/0041929 A1;GB 849433;DE 10036533中,将所有文献通过引用结合于此;硅酮的化学与技术,纽约:学术出版社(1968);通用电气硅酮橡胶产品数据列表SE 30, SE 33, SE 54和SE 76;硅酮化合物,彼特拉克系统公司(Petrarch Systems, Inc.) (1984);以及聚合物科学与工程化百科全书,15卷,第2版,204-308页,约翰威利父子公司(John Wiley & Sons, Inc.) (1989)中。

[0346] 本发明的组合物还可以包括从0.05wt%至3wt%的至少一种有机调节油作为调节剂,单独或与其他调节剂例如硅酮(在此所述的)组合。适合的调节油包括烃油、聚烯烃、以及脂肪酯。还适合用于在此的组合物中的是在US 5674478和US 5750122或在US 4529586;US 4507280;US 4663158;US 4197865;US 4217914;US 4381919;以及US 4422853中所描述

的调节剂。

[0347] 卫生学与恶味-本发明的组合物还可以包括蓖麻酸锌、百里酚、季铵盐(例如 Bardac®)、聚乙烯亚胺(例如来自巴斯夫的 Lupasol®)及其锌复合物、银和银化合物(尤其是被设计为缓慢释放Ag<sup>+</sup>或纳米银分散体的那些)中的一种或多种。

[0348] 益生菌-这些组合物可以包括益生菌,如描述于W0 09/043709中的那些。

[0349] 增泡剂-如果高的起泡是希望的,增泡剂(例如C<sub>10</sub>-C<sub>16</sub>烷醇酰胺或C<sub>10</sub>-C<sub>14</sub>烷基硫酸酯)可以典型地以1wt%至10wt%的水平掺入组合物中。C<sub>10</sub>-C<sub>14</sub>单乙醇和二乙醇酰胺阐述了此类增泡剂的典型的类别。此类增泡剂与高的起泡佐剂表面活性剂(例如,以上提及的氧化胺、甜菜碱、以及磺基甜菜碱(sultaine))一起使用也是有利的。如果希望的话,水溶性镁和/或钙盐(例如MgCl<sub>2</sub>、MgSO<sub>4</sub>、CaCl<sub>2</sub>、CaSO<sub>4</sub>等)可以典型地以0.1wt%至2wt%的水平添加,以提供另外的泡沫并且以增强油脂去除性能。

[0350] 泡沫抑制剂-用于减少或抑制泡沫形成的化合物可以掺入本发明的组合物中。泡沫抑制在如在US 4489455和US 4489574中描述的所谓“高浓度清洁工艺”中以及在前载式(front-loading-style)洗涤剂中可能是特别重要的。多种多样的材料可以用作泡沫抑制剂,并且泡沫抑制剂对于本领域的技术人员而言是熟知的。参见,例如柯克·奥思默化工百科全书(Kirk Othmer Encyclopedia of Chemical Technology),第三版,第7卷,第430-447页(约翰威利父子公司,1979)。泡沫抑制剂的实例包括单羧基脂肪酸以及其中的可溶盐,高分子量烃例如石蜡,脂肪酸酯(例如,脂肪酸甘油三酯),单价醇的脂肪酸酯,脂肪族C<sub>18</sub>-C<sub>40</sub>酮(例如硬脂酮),N-烷基化的氨基三嗪,优选具有约100℃之下的熔点的蜡烃,硅酮泡沫抑制剂,以及二级醇。泡沫抑制剂描述于US 2954347;US 4265779;US 4265779;US 3455839;US 3933672;US 4652392;US 4978471;US 4983316;US 5288431;US 4639489;US 4749740;US 4798679;US 4075118;EP 8930785.1;EP 150872;以及DOS 2,124,526中。

[0351] 对于有待用于自动洗衣机中的任何洗涤剂组合物,泡沫不应该形成到它们溢出洗衣机的程度。当使用时,泡沫抑制剂优选是以“泡沫抑制量”存在的。“泡沫抑制量”意指组合物的配制者可以选择这种泡沫控制剂的量,这个量将充分地控制泡沫以导致用于自动洗衣机中的低起泡衣物洗涤剂。

[0352] 在此的组合物将通常包含从0wt%至10wt%的泡沫抑制剂。当用作泡沫抑制剂时,单羧基脂肪酸以及其中的盐将典型地以高至5wt%的量存在。优选地,使用从0.5wt%至3wt%的脂肪单羧酸酯泡沫抑制剂。典型地以高至2.0wt%的量使用硅酮泡沫抑制剂,虽然可以使用更高的量。通常以从0.1wt%至2wt%的范围的量使用单硬脂酰磷酸酯泡沫抑制剂。典型地以从0.01wt%至5.0wt%的范围的量使用烃泡沫抑制剂,虽然可以使用更高的水平。典型地以0.2wt%至3wt%使用醇泡沫抑制剂。

[0353] 在此的组合物可以在宽的pH范围内具有清洁活性。在某些实施例中,这些组合物具有从pH 4至pH 11.5的清洁活性。在其他实施例中,这些组合物从pH 6至pH 11、从pH 7至pH 11、从pH 8至pH 11、从pH 9至pH 11、或从pH 10至pH 11,5具有活性。

[0354] 在此的组合物可以在宽范围的温度(例如从10℃或更低至90℃)内具有清洁活性。优选地,该温度将低于50℃或40℃或甚至30℃。在某些实施例中,对于这些组合物来说的最适温度范围是从10℃至20℃、从15℃至25℃、从15℃至30℃、从20℃至30℃、从25℃至35℃、从30℃至40℃、从35℃至45℃、或从40℃至50℃。

### [0355] 组合物的形式

[0356] 在此描述的组合物被有利地用在例如洗衣应用、硬表面清洁、餐具洗涤应用,连同化妆品应用(如义齿、牙齿、头发和皮肤)中。本发明的组合物具体是固体或液体清洁和/或处理组合物。在一方面,本发明涉及一种组合物,其中该组合物的形式选自下组,该组由以下各项组成:一种常规的,压缩的或浓缩的液体;一种凝胶;一种膏;一种皂条;一种常规的或压缩的粉末;一种粒状固体;一种具有两个或更多个层(相同或不同相)的均匀或多层片剂;一种具有一个或多个室的袋;一种单个或多个室单位剂型;或其任何组合。

[0357] 该组合物的形式可以将多个室(例如像可水溶的袋)中或片剂的不同层中的组分物理地彼此分离。由此可以避免组分之间的负面的存储相互作用。在洗涤溶液中,每个室的不同溶解曲线还可以引起选择的组分的延迟溶解。

[0358] 袋可以被配置为单个或多个的室。它可以具有适合容持该组合物的任何形式、形状和材料,例如在与水接触之前,不允许该组合物从袋中释放出来。袋由封装内体积的水溶性膜制成。可以将所述内体积分具有袋的室。优选的膜是形成膜或片的聚合材料,优选是聚合物。优选的聚合物、共聚物或其衍生物选自聚丙烯酸酯、和水溶性丙烯酸酯共聚物、甲基纤维素、羧甲基纤维素、糊精钠、乙基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、麦芽糊精、聚甲基丙烯酸酯,最优选地是聚乙烯醇共聚物以及羟丙基甲基纤维素(HPMC)。优选地,在膜中的聚合物(例如PVA)的水平是至少约60%。优选的平均分子量将典型地是约20,000至约150,000。膜还可以是共混组合物,该共混组合物包括可水解降解并且水可溶的聚合物共混物,例如聚乳酸和聚乙烯醇(已知在贸易参考M8630下,如由美国印第安纳州的MonoSol LLC公司销售)加增塑剂,像甘油、乙二醇、丙二醇、山梨醇及其混合物。这些袋可以包括固体衣物清洁组合物或部分组分和/或液体清洁组合物或由水溶性膜分开的部分组分。用于液体组分的室在组成上可以与包括固体的室不同(US 2009/0011970 A1)。

[0359] 水溶性膜-本发明的组合物还可以被包封于水溶性膜之内。优选地,优选的膜材料是聚合物材料。膜材料可以是例如通过聚合物材料的铸造、吹塑、挤出或吹胀挤塑来获得,如本领域中已知的。适合用于用作袋材料的优选的聚合物、共聚物或其衍生物是选自:聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚环氧烷、丙烯酰胺、丙烯酸、纤维素、纤维素醚、纤维素酯、纤维素酰胺、聚乙烯乙酸酯、聚羧酸和盐、聚氨基酸或肽、聚酰胺、聚丙烯酰胺、马来酸/丙烯酸的共聚物、多糖(包括淀粉和明胶)、天然胶(例如黄原胶和卡拉胶(carragum))。更优选的聚合物选自聚丙烯酸酯和水溶性丙烯酸酯共聚物、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、糊精、乙基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、麦芽糊精、聚甲基丙烯酸酯,并且最优选地选自聚乙烯醇、聚乙烯醇共聚物和羟丙基甲基纤维素(HPMC)、及其组合。优选地,聚合物在袋材料(例如,PVA聚合物)中的水平是至少60wt%。聚合物可以具有任何重均分子量,优选是从约1,000至1,000,000、从约10,000至300,000、从约20,000至150,000。聚合物的混合物还可以用作袋材料。

[0360] 天然地,不同的膜材料和/或不同厚度的膜可以用于制作本发明的室。在选择不同的膜中的益处是所得的室可以展现不同溶解度或释放特征。

[0361] 优选的膜材料是在MonoSol商标名称M8630、M8900、H8779下已知的PVA膜,以及描述于US 6166117和US 6787512中的那些,以及具有相应溶解度和变形特征的PVA膜。

[0362] 在此的膜材料还可以包括一种或多种添加剂成分。例如,可以有益的是添加增塑

剂,例如甘油、乙二醇、二乙二醇、丙二醇、山梨醇及其混合物。其他添加剂包括有待被递送至洗涤用水的功能性洗涤剂添加剂,例如有机聚合物分散剂等。

#### [0363] 制造组合物的方法

[0364] 本发明的组合物可以被配制为任何适合的形式,并且可通过被配制者所选择的任何方法来制备,这些方法的非限制性实例描述于申请人的实例中以及US 4990280;US 20030087791 A1;US 20030087790 A1;US 20050003983 A1;US 20040048764 A1;US 4762636;US 6291412;US 20050227891 A1;EP 1070115 A2;US 5879584;US 5691297;US 5574005;US 5569645;US 5565422;US 5516448;US 5489392;US 5486303中,将所有文献通过应用结合于此。本发明的组合物或根据本发明制备的组合物包括清洁和/或处理组合物,包括但不限于用于在织物和家居护理领域中处理织物、硬质表面和任何其他表面的组合物,包括:空气护理(包括空气清新剂和气味递送系统)、汽车护理、洗碗、织物调节(包括软化和/或清新)、洗衣去垢、洗衣和漂洗添加剂和/或护理、硬质表面清洁和/或处理(包括地板和马桶清洁剂)、颗粒或粉末形式通用型或“重负荷”洗涤剂,尤其是清洁洗涤剂;液体、胶或膏形式通用型洗涤剂,尤其是所谓的重负荷液体类型;液体精细-织物洗涤剂;手工洗碗剂或轻负荷洗碗剂,尤其是高起泡类型的那些;机器洗碗剂,包括用于供家庭和公共机构使用的不同的片剂、颗粒、液体和漂洗助剂类型;汽车或地毯香波,浴室清洁剂(包括马桶清洁剂);以及清洁辅助剂,例如漂白添加剂以及“污物-粘住(stain-stick)”或预处理类型、装载基质的组合物(例如添加干燥剂的片层)。优选的是用于清洁和/或处理纺织品和/或硬表面(最优选为纺织品)的组合物和方法。组合物优选地是在洗涤过程的预处理步骤中或主要洗涤步骤中(最优选用于纺织品洗涤步骤)使用的组合物。

[0365] 如在此使用的,术语“织物和/或硬质表面清洁和/或处理组合物”是清洁和处理组合物的子集,除非另外指出,该子集包括颗粒或粉末形式通用型或“重负荷”洗涤剂,尤其是清洁洗涤剂;液体、胶或膏形式通用型洗涤剂,尤其是所谓的重负荷液体类型;液体精细织物洗涤剂;手工洗碗剂或轻负荷洗碗剂,尤其是高起泡类型的那些;机器洗碗剂,包括用于供家庭和公共机构使用的不同的片剂、颗粒、液体和漂洗助剂类型;液体清洁和消毒剂,汽车或地毯香波,浴室清洁剂(包括马桶清洁剂);织物调节组合物(包括软化和/或清新),可以处于液体、固体和/或干燥剂片层形式;连同清洁辅助剂,例如漂白添加剂和“去污棒”或预处理类型、装载基质的组合物(例如添加干燥剂的片层)。所有的可应用的此类组合物可以是处于标准的、浓缩的或甚至高度浓缩的形式,甚至到此类组合物可以在某些方面呈非水性的程度。

#### [0366] 使用方法

[0367] 本发明包括在织物和/或家居护理领域中用于清洁任何表面(包括处理纺织品或硬表面或其他表面)的方法。在本发明的一个方面,该方法包括在洗涤过程的预处理步骤或主要洗涤步骤(最优选用于在纺织品洗涤步骤中使用或可替代地用于在餐具洗涤(包括手动以及自动/机械餐具洗涤两者)中使用)中接触有待处理的表面的步骤。在本发明的一个实施例中,将脂肪酶变体和其他组分顺序地添加到用于清洁和/或处理表面的方法中。可替代地,同时地添加脂肪酶变体和其他组分。

[0368] 如在此使用的,洗涤包括但不限于擦洗和机械搅拌。洗涤可以用泡沫组合物进行(如在W0 08/101958中所述),和/或通过施加交变压力(压力/真空)作为擦洗和机械搅拌的

附加方法或替代方式来进行。对此类表面或织物进行干燥可以通过在家庭或工业环境中采用的通用手段的任一种来完成。本发明的清洁组合物理想地适用于在洗衣以及餐具洗涤应用中使用。因此,本发明包括用于清洁物体(包括但不限于织物、餐具、刀具以及厨具)的方法。该方法包括使有待清洁的物体与上述清洁组合物接触的步骤,该清洁组合物包括申请人的清洁组合物、清洁添加剂或其混合物中的至少一个实施例。织物可以包括能够在常规消费者或公共机构使用条件下被洗涤的大多数任何织物。该溶液可以具有从8至10.5的pH。可以在溶液中以从500ppm至15,000ppm的浓度使用组合物。水温范围典型地是从5°C至90°C。水与织物之比典型地是从1:1至30:1。

[0369] 在一方面,本发明涉及使用多肽用于生产一种组合物的方法,该多肽与SEQ ID NO:2具有至少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100%一致性。在一方面,本发明涉及该组合物用于清洁物体的用途。

[0370] 在一方面,本发明涉及生产组合物的方法,该方法包括添加与SEQ ID NO:2具有至少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100%一致性的多肽,和表面活性剂。在一方面,本发明涉及用于清洁表面的方法,该方法包括使待清洁的表面上存在的脂质污渍与该清洁组合物接触。在一方面,本发明涉及用于水解存在于表面上的污渍和/或污渍中的脂质的方法,该方法包括使污渍和/或污渍与清洁组合物接触。

[0371] 植物

[0372] 本发明还涉及植物,例如转基因植物、植物部分或植物细胞,这些植物包括本发明的多核苷酸,以便以可回收的量表达和产生该多肽。该多肽可以从植物或植物部分回收。可替代地,可以按原样将包含该多肽的植物或植物部分用于改善食品或饲料的质量,例如,改善营养价值、适口性、以及流变性质,或用以破坏抗营养因子。

[0373] 转基因植物可以是双子叶的(双子叶植物)或单子叶的(单子叶植物)。单子叶植物的实例是草例如草地早熟禾(蓝草,早熟禾属),饲草例如羊茅属(*Festuca*)、黑麦草属(*Lolium*),温带草例如剪股颖属(*Agrostis*)和谷物例如小麦、燕麦、黑麦、大麦、水稻、高粱、和玉蜀黍(玉米)。

[0374] 双子叶植物的实例是烟草、豆类(如羽扇豆(*lupins*)、马铃薯、糖甜菜(*sugar beet*)、豌豆、豆(*bean*)和大豆(*soybean*))、以及十字花科植物(十字花科(*family Brassicaceae*)) (如花椰菜、油菜籽、以及紧密相关的模式生物拟南芥)。

[0375] 植物部分的实例是茎、愈伤组织、叶、根、果实、种子、以及块茎、以及包括这些部分的独立组织,例如,表皮、叶肉、薄壁组织(*parenchyme*)、维管组织、分生组织。特定植物细胞区室,如叶绿体、质外体(*apoplast*)、线粒体、液泡、过氧化物酶体以及细胞质也被认为是植物部分。此外,任何植物细胞,无论是何种组织来源,都被认为是植物部分。同样地,植物部分,如分离以有助于本发明的利用的特定组织和细胞也被认为是植物部分,例如胚、胚乳、糊粉和种皮。

[0376] 同样包括于本发明范围内的是此类植物、植物部分以及植物细胞的子代。

[0377] 表达多肽的转基因植物或植物细胞可以根据本领域已知的方法构建。简而言之,

通过如下方法构建该植物或植物细胞：将编码多肽的一个或多个表达构建体并入到植物宿主基因组或叶绿体基因组中，并且使所得的修饰植物或植物细胞繁殖为转基因植物或植物细胞。

[0378] 本发明还涉及产生本发明的多肽的方法，包括：(a) 在有助于产生该多肽的条件下培养包括编码该多肽的多核苷酸的转基因植物或植物细胞；并且 (b) 回收该多肽。

[0379] 通过以下实例进一步描述本发明，但不应将其理解为对本发明范围的限制。

[0380] 实例

[0381] 培养基和溶液

[0382] 除非另外指明，用作缓冲液和底物的化学品至少是试剂等级的商品。可商购的酶 Lipolase™ 和 Lipex™ 获自诺维信公司。

[0383] Lipolase™ 包括来自疏棉状嗜热丝孢菌的、在米曲霉中表达的野生型三酰基甘油脂肪酶。

[0384] Lipex™ 包括衍生自野生型疏棉状嗜热丝孢菌三酰基甘油脂肪酶的、具有突变 T231R 和 N233R 的并且在米曲霉中表达的三酰基甘油脂肪酶。

[0385] 菌株

[0386] 使用购自天根 (TIANGEN) (天根生物科技有限公司 (TIANGEN Biotech Co.Ltd.)，北京，中国) 的大肠杆菌 Top-10 菌株来繁殖表达载体。

[0387] 使用米曲霉 MT3568 菌株用于编码多肽的基因的异源表达，该多肽与具有脂肪酶活性的多肽具有同源性。米曲霉 MT3568 是米曲霉 JaL355 的 amdS (乙酰胺酶) 破坏的基因衍生物 (WO 02/40694)，其中通过用 pyrG 基因破坏米曲霉乙酰胺酶 (amdS) 基因恢复 pyrG 营养缺陷型。

[0388] 培养基

[0389] YPM 培养基由 10g 的酵母提取物、20g 的细菌用蛋白胨、20g 的麦芽糖、以及补足至 1000ml 的去离子水构成。

[0390] LB 板是由 10g 的细菌用胰蛋白胨 (Bacto-Tryptone)、5g 的酵母提取物、10g 的氯化钠、15g 的细菌用琼脂及补足至 1000ml 的去离子水构成。

[0391] LB 培养基由 10g 的细菌用胰蛋白胨、5g 的酵母提取物及 10g 的氯化钠，以及补足至 1000ml 的去离子水构成。

[0392] COVE 蔗糖板由 342g 的蔗糖、20g 的琼脂粉、20ml 的 COVE 盐溶液及补足至 1 升的去离子水构成。将培养基在 15psi 下通过高压灭菌进行灭菌 15 分钟。将该培养基冷却至 60°C 并且添加 10mM 的乙酰胺、15mM 的 CsCl、曲通 X-100 (50μl/500ml)。

[0393] 用于分离的 COVE-2 板/管：30g/L 蔗糖、20ml/L COVE 盐溶液、10mM 乙酰胺、30g/L 诺布尔 (noble) 琼脂 (Difco，目录号 214220)。

[0394] COVE 盐溶液由 26g 的 MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O、26g 的 KCl、26g 的 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、50ml 的 COVE 痕量金属溶液、以及补足至 1000ml 的去离子水构成。

[0395] COVE 痕量金属溶液由 0.04g 的 Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> · 10H<sub>2</sub>O、0.4g 的 CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O、1.2g 的 FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O、0.7g 的 MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O、0.8g 的 Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O、10g 的 ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O、以及补足至 1000ml 的去离子水构成。

[0396] 菌株



[0397] 使用购自天根 (TIANGEN) (天根生物科技有限公司 (TIANGEN Biotech Co.Ltd.), 北京, 中国) 的大肠杆菌 Top-10 菌株来繁殖表达载体。

[0398] 将米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) MT3568 菌株用于异源表达。米曲霉 MT3568 是米曲霉 JaL355 的 amdS (乙酰胺酶) 破坏的基因衍生物 (WO 02/40694), 其中通过用 pyrG 基因破坏米曲霉乙酰胺酶 (amdS) 基因恢复 pyrG 营养缺陷型。

[0399] 培养基

[0400] YPM 培养基由 10g 的酵母提取物、20g 的细菌用蛋白胨、20g 的麦芽糖、以及补足至 1000ml 的去离子水构成。

[0401] LB 板是由 10g 的细菌用胰蛋白胨、5g 的酵母提取物、10g 的氯化钠、15g 的细菌用琼脂及补足至 1000ml 的去离子水构成。

[0402] LB 培养基由 1g 的细菌用胰蛋白胨、5g 的酵母提取物及 10g 的氯化钠, 以及补足至 1000ml 的去离子水构成。

[0403] COVE 蔗糖板由 342g 的蔗糖、20g 的琼脂粉、20ml 的 COVE 盐溶液及补足至 1 升的去离子水构成。将培养基在 15psi 下通过高压灭菌进行灭菌 15 分钟。将该培养基冷却至 60°C 并且添加 10mM 乙酰胺、15mM CsCl、Triton X-100 (50 $\mu$ l/500ml)。

[0404] 用于分离的 COVE-2 板/管: 30g/L 蔗糖、20mL/L COVE 盐溶液、10mM 乙酰胺、30g/L 诺布尔 (noble) 琼脂 (Difco, 目录号 214220)。

[0405] COVE 盐溶液由 26g 的 MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O、26g 的 KCl、26g 的 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、50ml 的 COVE 痕量金属溶液、以及补足至 1000ml 的去离子水构成。

[0406] COVE 痕量金属溶液由 0.04g 的 Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> · 10H<sub>2</sub>O、0.4g 的 CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O、1.2g 的 FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O、0.7g 的 MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O、0.8g 的 Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O、10g 的 ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 及补足到 1000ml 的去离子水构成。

[0407] 实例 1: 鉴别和克隆来自闪光须霉的脂肪酶基因

[0408] 通过 QIAamp DNA 血液迷你试剂盒 (凯杰公司, 希尔登, 德国) 分离来自闪光须霉 (来自英国, 分离的菌株 CBS 304.58, 1958) 的染色体 DNA。将 5 $\mu$ g 的染色体 DNA 送至 FASTERIS SA, 瑞士进行测序。针对编码脂肪分解酶的开放阅读框分析基因组序列, 并且鉴定闪光须霉脂肪酶基因 D234Z5 (SEQ ID NO: 1)。从 D234Z5 的编码 DNA 序列 (CDS), 翻译蛋白质序列 (SEQ ID NO: 2)。基于 SEQ ID NO: 2 的蛋白质序列, 根据米曲霉密码子使用设计编码这种闪光须霉脂肪酶的合成的 CDS (SEQ ID NO: 3), 并且放入 pUC57 载体中。为了亚克隆到表达载体中, 将该合成基因用表 1 中所示的引物进行扩增。

[0409]

	序列 (5'-3') *	引物名称
SEQ ID NO: 4	acacaactggggatccacc ATGAAATTCACCCCTCTCTCCGTG	lip47921- 40_C505_BamHI
SEQ ID NO: 5	gtcaccctctagatctcgag TTACAAACACAAGCCAGTGTTAATGTCGA	lip47921- 40_C505_XhoI

[0410] \*大写字母表示有待扩增的基因的 5'-和 3'-区域, 而小写字母在 pCaHj505 载体的

插入位

[0411] 点处与载体序列同源。

[0412] 对于PCR扩增,在PCR反应中使用了20pmol的引物对(正向和反向中每一个),该PCR反应是由以下各项构成:1 $\mu$ l的包括SEQ ID NO:3的质粒DNA、10 $\mu$ L的5X GC缓冲液、1.5 $\mu$ L的DMSO、2.5mM的dATP、dTTP、dGTP及dCTP中每一种,及0.6个单位的Phusion<sup>TM</sup>高保真度DNA聚合酶,最终体积为50 $\mu$ l。扩增是使用帕尔帖热循环仪(MJ研究有限公司,南旧金山,加利福尼亚州,美国)进行的,编程为:在98 $^{\circ}$ C下变性1分钟;10个循环,在98 $^{\circ}$ C下变性15秒、在65 $^{\circ}$ C下退火30秒(其中每个循环降低1 $^{\circ}$ C)和在72 $^{\circ}$ C下延长90秒;以及另外的26个循环,各自在98 $^{\circ}$ C下15秒、60 $^{\circ}$ C下30秒和72 $^{\circ}$ C下90秒;在72 $^{\circ}$ C下最终延伸10分钟。然后将加热块转到4 $^{\circ}$ C浸泡循环。

[0413] 使用TBE缓冲液通过0.7%琼脂糖凝胶电泳分离PCR产物,其中在UV光下看到1.1kb的产物带。然后,通过使用GFX PCR DNA和凝胶带纯化试剂盒(Gel Band Purification Kit)(GE医疗集团(GE Healthcare),白金汉郡,英国)从溶液中纯化出这些PCR产物。

[0414] 用来自NEB(新英格兰生物实验室(New England Biolabs),法兰克福,德国)的BamHI和XhoI消化质粒pCaHj505(WO 2013029496),并且使用TBE缓冲液通过0.7%琼脂糖凝胶电泳分离产生的片段,并且使用GFX PCR DNA和凝胶带纯化试剂盒(GE医疗集团(GE Healthcare),白金汉郡,英国)进行纯化。通过与IN-FUSION<sup>TM</sup>CF脱水克隆试剂盒(克隆技术实验室有限公司(Clontech Laboratories, Inc.),山景城,加利福尼亚州,美国)连接,将60ng的这种纯化的PCR产物克隆到200ng的之前消化的表达载体pCaHj505中。

[0415] 将2.5 $\mu$ L体积的稀释的连接混合物用于转化大肠杆菌TOP10化学感受态细胞。从每ml包含100 $\mu$ g氨比西林的LB琼脂糖平板选择4个菌落,并且通过菌落PCR用载体引物证实。通过DNA测序用载体引物(由中国北京的诺赛基因有限公司(SinoGenoMax Company Limited),北京,中国)验证闪光须霉脂肪酶合成序列。选择被指定为D235M8#1的包括SEQ ID NO:3的质粒用于在米曲霉宿主细胞MT3568中进行原生质体转化及其编码的脂肪酶的异源表达。将重组大肠杆菌转化细胞在3ml的、每ml补充以100 $\mu$ g的氨比西林的LB培养基中培养过夜。使用凯杰公司(Qiagen)旋转迷你制备型(Spin Miniprep)试剂盒(目录27106)(凯杰股份有限公司(QIAGEN GmbH),希尔登,德国)纯化质粒DNA。

[0416] 发现闪光须霉脂肪酶成熟蛋白由340个氨基酸(SEQ ID NO:2的氨基酸1至340)组成。计算等电点为6.8。

[0417] 实例2:用编码来自闪光须霉的脂肪酶的基因转化米曲霉宿主细胞

[0418] 根据WO 95/002043,制备米曲霉MT3568的原生质体。将100 $\mu$ l的原生质体与2.5-10 $\mu$ g的包括D235M8#1(实例1)的曲霉属表达载体和250 $\mu$ L的60%PEG 4000、10mM CaCl<sub>2</sub>、和10mM Tris-HCl(pH 7.5)混合,并且轻轻混合。将混合物在37 $^{\circ}$ C下孵育30分钟并且将这些原生质体涂布到COVE蔗糖平板上用于选择。在37 $^{\circ}$ C下孵育4-7天后,将四个转化体的孢子接种到3ml的YPM培养基中。在30 $^{\circ}$ C下培养3天之后,使用Novex<sup>®</sup>4%-20%Tris-甘氨酸凝胶(英杰公司,卡尔斯巴德,加州,美国(Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA))通过SDS-PAGE分析培养液,以鉴定从闪光须霉产生最大量的重组脂肪酶的转化体。

[0419] 使用橄榄油/琼脂糖平板(1%蛋白质级琼脂糖;1%橄榄油;0.008%亮绿;50mM HEPES;pH 7.2)调研由曲霉属转化体产生的脂肪酶的脂肪分解活性。将来自不同转化体的

20 $\mu$ l等分试样的培养液、缓冲液(阴性对照)分配到直径为3mm的冲孔中并且在37 $^{\circ}$ C下孵育1小时。随后检查这些平板中的孔周围存在或不存在对应于脂肪分解活性的深绿区。

[0420] 基于这两个选择标准,将最好的转化体的孢子涂布于用于再分离的COVE-2板上,以分离单个菌落。然后将单个菌落涂布于COVE-2管上并且孵育直到孢子形成。

[0421] 实例3:转化的宿主细胞的发酵和从闪光须霉生产脂肪酶

[0422] 在80rpm搅拌下在30 $^{\circ}$ C温度下的3天期间,将来自最好转化体的孢子在摇瓶的2400ml的YPM培养基中培养。通过使用0.2 $\mu$ m过滤装置过滤收获培养肉汤。过滤的发酵液用于酶表征。

[0423] 首先,由(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>沉淀培养液,然后在pH 5.5下用20mM NaAC进行透析。然后将该样品施加到用pH 5.5的NaAC平衡的Q SEPHAROSE<sup>®</sup>快流(通用电气医疗集团)上。以16倍柱体积,从0至0.35M NaCl施加NaCl浓度梯度,然后以5倍柱体积进行施加,直至1M NaCl。收集并浓缩具有脂肪酶活性的部分。

[0424] 实例4:脂肪酶的鉴定

[0425] 根据以下方法,对以上实例中所纯化的本发明的脂肪酶进行表征。所有反应都一式两份来进行。

[0426] SDS-PAGE:使用SDS-PAGE,确定脂肪酶的分子量为约26kDa。

[0427] pNP-C8测定:使用pNP-C8测定来量化脂肪分解活性。将来自西格玛的4-硝基苯基辛酸盐(C8:21742)以16.5mM的终浓度溶解于异丙醇中作为原液,然后用所需pH的缓冲液或水稀释10倍,该缓冲液或水包含0.4%Triton X-100、10mM CaCl<sub>2</sub>。

[0428] 通过将处于0.5mg/ml的20 $\mu$ l酶样品或作为空白的水和150 $\mu$ l的底物工作溶液混合开始该反应,此后读取OD405。

[0429] pH曲线:将20 $\mu$ l酶样品和在B&R缓冲液(伯瑞坦-罗宾森(Britton-Robinson)缓冲液:100mM丁二酸、HEPES、CHES、CAPSO、1mM CaCl<sub>2</sub>、150mM KCl、0.01%Triton X-100,用HCl和NaOH将pH调节至3.0、4.0、5.0、6.0 7.0、8.0、9.0和10.0)中的150 $\mu$ l pNP-C8在微量滴定板中混合并且在反应前置于冰上。通过将微量滴定板转移至设置为15 $^{\circ}$ C的艾本德恒温混匀仪来开始该测定,并且孵育40分钟,此后读取OD405。

[0430] 本发明的脂肪酶的最适pH是约pH 8。

表2.本发明脂肪酶的pH曲线

pH	3	4	5	6	7	8	9	10
相对活性	3.69	2.42	5.44	0.78	0.67	100	58.3	0.78

[0432] 温度曲线

[0433] 将20 $\mu$ l酶样品和pH 7.0的、在Tris-HCl中的150 $\mu$ l pNP-C8在微量滴定板中进行混合,并置于冰上。通过将微量滴定板转移至设置为15 $^{\circ}$ C、20 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C、70 $^{\circ}$ C和75 $^{\circ}$ C测定温度的艾本德恒温混匀仪来开始该测定40分钟,并且读取OD405。

[0434] 该脂肪酶具有约30 $^{\circ}$ C的最适温度,但是还显示出在从30 $^{\circ}$ C至75 $^{\circ}$ C的范围中的良好活性。

表3. 本发明脂肪酶的温度曲线

[0435]

温度 (°C)	15	20	30	40	50	60	70	75
相对活性	35	49	100	88	67	55.7	76.6	57

[0436] 热稳定性

[0437] 将酶样品在50°C下孵育0、10、30、60、和120分钟并且置于冰上。将20 $\mu$ l酶添加到pH 8.0的、具有Tris-HCl的150 $\mu$ pNP-C8溶液中,并且在150°C下孵育40分钟,此后读取OD405。

[0438] 在50°C下,该脂肪酶是非常稳定的。在孵育120分钟的最长测试时间后,只有略微的活性降低。

[0439]

表4. 本发明脂肪酶的热稳定性

[0440]

时间 (min)	0	10	30	60	120
相对活性	100	91	108	95	83

[0441] 实例5: 相对的洗涤性能

[0442] 自动机械应力测定 (AMSA): 为了评估在衣物洗涤中的洗涤性能,使用自动机械应力测定 (AMSA) 进行洗涤实验。AMSA平板具有许多用于测试溶液的缝和盖子,盖子针对所有缝开口强力挤压洗涤样品 (有待洗涤的纺织品)。在洗涤时间期间,将平板、测试溶液、纺织品和盖子剧烈振动从而使测试溶液与纺织品接触并以规则、周期性振荡方式施加机械压力。关于进一步描述,参见WO 02/42740,尤其是第23-24页的“特定方法实施例 (Special method embodiments)”段落。

[0443] 在不同pH的甘氨酸缓冲液中并且在具有不同表面活性剂水平的标准洗涤剂中进行衣物洗涤实验。实验条件在以下指定:

洗涤剂/缓冲液: 50 mM甘氨酸缓冲液pH 8  
 50 mM甘氨酸缓冲液pH 9  
 3.3 g/L洗涤剂0%表面活性剂, 50 mM甘氨酸缓冲液pH 8  
 3.3 g/L洗涤剂0%表面活性剂, 50 mM甘氨酸缓冲液pH 9  
 3.3 g/L洗涤剂10%表面活性剂, 50 mM甘氨酸缓冲液pH 8  
 3.3 g/L洗涤剂10%表面活性剂, 50 mM甘氨酸缓冲液pH 9  
 3.3 g/L洗涤剂20%表面活性剂, 50 mM甘氨酸缓冲液pH 8  
 3.3 g/L洗涤剂60%表面活性剂, 50 mM甘氨酸缓冲液pH 8  
 3.3 g/L洗涤剂100%表面活性剂, 50 mM甘氨酸缓冲液pH 8

[0444]

测试溶液体积: 160  $\mu$ L  
 洗涤时间: 15分钟  
 温度: 25°C  
 水硬度: 15°dH  
 脂肪酶剂量: 0 ppm或0.5 ppm  
 测试材料: 根据WO 06/125437的奶油姜黄污渍

[0445]

洗涤剂组合物 (wt%)	包括的总表面活性剂				
	0%	10%	20%	60%	100%
NaOH, 球粒 (> 99%)	0	0.18	0.35	1.05	1.75
直链烷基苯磺酸 (LAS) (97%)	0	1.20	2.40	7.20	12.00
月桂醇醚硫酸钠 (SLES) (28%)	0	1.76	3.53	10.58	17.63

[0446]

大豆脂肪酸 (> 90%)	2.75	2.75	2.75	2.75	2.75
可可脂肪酸 (> 99%)	2.75	2.75	2.75	2.75	2.75
AEO; 具有8 mol EO的醇乙氧基化物; Lutensol TO 8 (约100%)	0	1.10	2.20	6.60	11.00
三乙醇胺 (100%)	3.33	3.33	3.33	3.33	3.33
柠檬酸钠, 二水合物 (100%)	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
DTMPA; 二亚乙基三胺五(亚甲基)五 (磷酸), 七钠盐 (Dequest 2066 C) (约 42%为Na7盐)	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48
MPG (> 98%)	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
EtOH, 丙-2-醇 (90%/10%)	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
甘油 (> 99.5)	1.71	1.71	1.71	1.71	1.71
甲酸钠 (> 95%)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
PCA (40%为钠盐)	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46
加水至	100	100	100	100	100

[0447] 用NaOH或柠檬酸进行最后调节至指定pH。通过将CaCl<sub>2</sub>和MgCl<sub>2</sub> (Ca<sup>2+</sup>:Mg<sup>2+</sup>=4:1) 添加到测试系统中, 将水硬度调节至15°dH。

[0448] 洗涤之后, 将纺织品在自来水中冲洗并且使用滤纸将过量的水从纺织品中去除, 并且之后立即将纺织品在85°C下干燥5min。

[0449] 将洗涤性能测量为所洗涤的脏纺织品的颜色变化。该污渍是与姜黄混合的奶油。姜黄包含着色剂姜黄素, 其作为pH指示剂通过具有pH依赖性颜色变化起作用。脂肪酶活性导致游离脂肪酸从乳脂酰基甘油酯释放并且这导致pH降低并且由此导致姜黄素pH指示剂的颜色变化。脂肪酶洗涤性能因此可以被表示为当用白光照射时, 从所洗涤的脏纺织品反射-发射的光的变色程度。

[0450] 使用专业平板扫描仪 (EPSON EXPRESSION 10000XL, 阿特亚公司 (Atea A/S), Lautrupvang 6, 2750巴勒鲁普, 丹麦) 进行颜色测量, 该扫描仪用于捕获所洗涤的脏纺织品的图像。为了从扫描的图像中提取光强度值, 将来自图像的24位像素值转化为红色、绿色和蓝色 (RGB) 值。

[0451] 归因于脂肪酶活性的颜色变化被测量为相对于反射-发射的蓝色 (B) 和红色 (R) 光的总和,绿色光 (G) 的反射-发射的增加。相对于参比脂肪酶 (Lipolase™), 脂肪酶的洗涤性能 (RP (洗涤)) 被计算为:  $RP(\text{洗涤}) = (G / (B+R) (\text{测试的脂肪酶}) - G / (B+R) (\text{无酶})) / (G / (B+R) (\text{参比脂肪酶}) - G / (B+R) (\text{无酶}))$ 。

[0452]

	Lipolase	Lipex	本发明的脂肪酶
缓冲液0%表面活性剂	1.00	1.02	1.67
洗涤剂0%表面活性剂	1.00	1.15	2.01
洗涤剂10%表面活性剂	1.00	1.65	2.83
洗涤剂20%表面活性剂	1.00	1.70	2.38
洗涤剂60%表面活性剂	1.00	2.21	2.49
洗涤剂100%表面活性剂	1.00	3.05	3.74

[0453]

	Lipolase	Lipex	本发明的脂肪酶
缓冲液0%表面活性剂	1.00	3.11	5.99
洗涤剂0%表面活性剂	1.00	3.83	6.57
洗涤剂10%表面活性剂	1.00	5.48	2.55

[0454] 实例6:通过差示扫描量热法测定Td。

[0455] 使用一台VP-毛细管差示扫描量热仪 (微量热公司 (MicroCal Inc.), 皮斯卡塔韦, 新泽西州, 美国) 通过差示扫描热量测定 (DSC) 测定本发明脂肪酶的热稳定性。在200K/小时的恒定的程序化加热速率下, 加热在缓冲液 (50mM HEPES, pH 8.0) 中的酶溶液后获得的热分析图 (Cp对T) 中, 将热变性温度Td (°C) 当作变性峰 (主要的吸热峰) 的顶端。

[0456] 将样品溶液和参比溶液 (大约0.2mL) 从10°C下持续3小时 (混合) 的储存条件下装载到量热仪中 (参比溶液:不具有酶的缓冲液), 并且在20°C下热预平衡约20分钟, 随后从20°C至100°C进行DSC扫描。以大约+/-1°C的精确度确定变性温度为49°C。

序列表

<110> 诺维信公司 (Novozymes A/S)  
 <120> 具有脂肪酶活性的多肽和编码它们的多核苷酸  
 <130> 12880-W0-PCT[2]  
 <160> 5  
 <170> PatentIn 3.5版  
 <210> 1  
 <211> 2601  
 <212> DNA  
 <213> 闪光须霉

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (501)..(1029)

<220>  
 <221> 信号肽  
 <222> (501)..(569)

<220>  
 <221> 成熟肽  
 <222> (570)..(2098)

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1090)..(1118)

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1188)..(1245)

[0001]

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1314)..(1410)

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1482)..(1579)

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1641)..(1727)

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1781)..(1861)

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1933)..(2011)

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (2068)..(2098)

<400> 1  
 agacaatatt tctctacaaa ttctttatac atgatgtctg tacttgaaaa taaagacatg 60  
 gcaatlcatt aagcgggcca caggatgca tgtatacct gttctactga tctgtataaa 120  
 cgtgtacaca aaatgaatt gagcctaaa taatattaat aatccacaa ggtagtacc 180  
 aagaattatt tggcatgta atatcccaga ttgttgaga ggaattttt gaagaaact 240  
 taatgtccat agtctcgcat gtacaggact tagattcaat ggtgattgga gataggogga 300  
 aanaacteta taacatcttt nctgtaaagt fgtacagtgt ttaatcaggg gataattatt 360  
 atattagtaa tttaagctg gtatgagcat tcaatgaaat taaaaactag tataataacc 420

	agcaagacat gcggtatttt ttttcattat acaaatetec ttctcatett tccitttggt	480
	caecttcagt actateagcc atg aag ttc act ccc ttg tcc gtt gta gca att Met Lys Phe Thr Pro Leu Ser Val Val Ala Ile -20 -15	533
	gct atg ctc ttt gtc tet tcc cct gtt tcc atg gct gct cct get act Ala Met Leu Phe Val Ser Ser Pro Val Ser Met Ala Ala Pro Ala Thr -10 -5 -1 1	581
	gag aac acc ctc aat acc act gtt acc cag cca ttt act ctc cct gca Glu Asn Thr Leu Asn Thr Thr Val Thr Gln Pro Phe Thr Leu Pro Ala 5 10 15 20	629
	att ctc get ggc cgt aca teg gtt cca aaa aac ttg cct gat gtt aac Ile Leu Ala Gly Arg Thr Ser Val Pro Lys Asn Leu Pro Asp Val Asn 25 30 35	677
	ttg tet gca gaa aag act gcc att aag acc aat gga cct ett cct gcc Leu Ser Ala Glu Lys Thr Ala Ile Lys Thr Asn Gly Pro Leu Pro Ala 40 45 50	725
	aat gtc gag caa aag ggt ggt atg ggt ctc aac tet act act atc gac Asn Val Glu Gln Lys Gly Gly Met Gly Leu Asn Ser Thr Thr Ile Asp 55 60 65	773
	ttt agt gcc tet gga tet gga gtc tet cgt agg gca gat gtt tat gct Phe Ser Ala Ser Gly Ser Gly Val Ser Arg Arg Ala Asp Val Tyr Ala 70 75 80	821
	act gcc gca aag gtc cag gaa ttg aag ctc tat act caa ett get gcc Thr Ala Ala Lys Val Gln Glu Leu Lys Leu Tyr Thr Gln Leu Ala Ala 85 90 95 100	869
	aat get tat tgc cgt get gtt gtt cct gga aac aaa tgg aac tgt aaa Asn Ala Tyr Cys Arg Ala Val Val Pro Gly Asn Lys Trp Asn Cys Lys 105 110 115	917
[0002]	cat tgc tcc cag gat gac att ett gtt tet act ttt gat tet tet aaa His Cys Ser Gln Asp Asp Ile Leu Val Ser Thr Phe Asp Ser Ser Lys 120 125 130	965
	tac gac acc aac gga tat gtg gcc cgt aat gat aag tcc aag gtc att Tyr Asp Thr Asn Gly Tyr Val Ala Arg Asn Asp Lys Ser Lys Val Ile 135 140 145	1013
	aac ett gta ttc aga g gtatggcctt aacgittatt aaattgagcc aattctaata Asn Leu Val Phe Arg 150	1069
	cctttacttg tttctaacag gc aca agc tet ett ccc aac ttt gtt gcc Gly Thr Ser Ser Leu Pro Asn Phe Val Ala 155 160	1118
	glaagtttat attagattta tattgtatat ttacaagga taclaatcca aitttggtac 1178	
	tttaaaaag gat ttt gaa ttc att get caa acc tac cct cct gtc agc ggt Asp Phe Glu Phe Ile Ala Gln Thr Tyr Pro Pro Val Ser Gly 165 170 175	1229
	gcc aag gtt cac act g gtatgagcta aaagatattg ttttcaite tetigaatat Ala Lys Val His Thr 180	1285
	ccaattgaeg tgtgaaatac aatectag gt ttc tac aaa gca tat atg gag Gly Phe Tyr Lys Ala Tyr Met Glu 185 190	1336
	gta cag aaa gat gtt gtt tcc agc atg att gaa cag att act get tac Val Gln Lys Asp Val Val Ser Ser Met Ile Glu Gln Ile Thr Ala Tyr 195 200 205	1384
	ccc aac taf caa gtc gtt gtc tet gg glaattatat atacatafat Pro Asn Tyr Gln Val Val Val Ser Gly 210 215	1430
	ataacaagat acttagagta aatacttate ctatttataa ttggetttta g a cac 1485	



	His	
tet ctt ggt ggt gct ctt gct act att ggt get ctc gac ttg tat cag Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Ile Gly Ala Leu Asp Leu Tyr Gln 220 225 230		1533
cgt gat act cgc ttc aac gcc aaa aac ctt get atc aga acc tat g Arg Asp Thr Arg Phe Asn Ala Lys Asn Leu Ala Ile Arg Thr Tyr 235 240 245		1579
gtaatttcag aaacatacct catgegtaca attataataa caatatacct acaacaacca		1639
g gc ggt cct cgt gtt gga aac cct aca ttt gcc tac tat gtc act gga Gly Gly Pro Arg Val Gly Asn Pro Thr Phe Ala Tyr Tyr Val Thr Gly 250 255 260		1687
act gga atc gac ctt gag cgt acc gtc gac aga caa gac a gtatgtgctg Thr Gly Ile Asp Leu Glu Arg Thr Val Asp Arg Gln Asp 265 270 275		1737
atattctttt aatccattcc gttactaaca tgtctaccat tag tt gtt ccc cat Ile Val Pro His 280		1791
ctt ccc cct cag tcc ttt gga ttc ttg cac ccc ggt gtt gaa tac tgg Leu Pro Pro Gln Ser Phe Gly Phe Leu His Pro Gly Val Glu Tyr Trp 285 290 295		1839
atc aga gaa gcc gac aac gtc a gtaagtacta attgaacaca gtttgcaaat Ile Arg Glu Gly Asp Asn Val 300		1891
aatagtatta ttgacaane taattiacat tattttacta g aa atc tgc gac gat Lys Ile Cys Asp Asp 305		1946
[0003] gtt ctt gat tet tcc gag tgc tcc aac tcc atc gtc cca ttc acc aag Val Leu Asp Ser Ser Glu Cys Ser Asn Ser Ile Val Pro Phe Thr Lys 310 315 320		1994
ctt tea gat cac ett ag gtaaatitgg attatattaa gattatagga Leu Ser Asp His Leu Ser 325 330		2041
aaqtaatata ccttttattt caatag c tac ttt gat atc aat acc ggt ctc Tyr Phe Asp Ile Asn Thr Gly Leu 335		2092
tgt ctt taattcafc a ttgtctttt tactcatcaa cactafatat ttattcgctt Cys Leu 340		2148
caaaatcagc ttcttttatt aaataaaaaa ggecactttt tagagacca ataaacccaa		2208
gttattattt tgtaaatit tttttatcaa ctigtctatt ttataaaaa gtaaattaga		2268
tttgagaaaa cagttaattg tagaactata tcaagtttct gtatattatc aataaattta		2328
ctattattaa aataattatt atattititg gactatccta ccttttaggtt ctttataaac		2388
aatttaataaa tttctgaaaa aaaaagataa acgtatgaga tgatgaettt tcttttttga		2448
taaataggt a ctttaattc gaagtaacta tgcggaaac tctaaatgaa tgcacgtgg		2508
glatactgta ttgctgggta tattaictat cglagtigaa ttgtttgcca agacatatac		2568
atgctatata tattactitg ccagctctgtt tga		2601
<210> 2		
<211> 363		
<212> PRT		
<213> 闪光须霉		
<400> 2		

Met Lys Phe Thr Pro Leu Ser Val Val Ala Ile Ala Met Leu Phe Val  
 -20 -15 -10

Ser Ser Pro Val Ser Met Ala Ala Pro Ala Thr Glu Asn Thr Leu Asn  
 -5 -1 1 5

Thr Thr Val Thr Gln Pro Phe Thr Leu Pro Ala Ile Leu Ala Gly Arg  
 10 15 20 25

Thr Ser Val Pro Lys Asn Leu Pro Asp Val Asn Leu Ser Ala Glu Lys  
 30 35 40

Thr Ala Ile Lys Thr Asn Gly Pro Leu Pro Ala Asn Val Glu Gln Lys  
 45 50 55

Gly Gly Met Gly Leu Asn Ser Thr Thr Ile Asp Phe Ser Ala Ser Gly  
 60 65 70

Ser Gly Val Ser Arg Arg Ala Asp Val Tyr Ala Thr Ala Ala Lys Val  
 75 80 85

Gln Glu Leu Lys Leu Tyr Thr Gln Leu Ala Ala Asn Ala Tyr Cys Arg  
 90 95 100 105

Ala Val Val Pro Gly Asn Lys Trp Asn Cys Lys His Cys Ser Gln Asp  
 110 115 120

Asp Ile Leu Val Ser Thr Phe Asp Ser Ser Lys Tyr Asp Thr Asn Gly  
 125 130 135

Tyr Val Ala Arg Asn Asp Lys Ser Lys Val Ile Asn Leu Val Phe Arg  
 140 145 150

Gly Thr Ser Ser Leu Pro Asn Phe Val Ala Asp Phe Glu Phe Ile Ala  
 155 160 165

Gln Thr Tyr Pro Pro Val Ser Gly Ala Lys Val His Thr Gly Phe Tyr  
 170 175 180 185

Lys Ala Tyr Met Glu Val Gln Lys Asp Val Val Ser Ser Met Ile Glu  
 190 195 200

Gln Ile Thr Ala Tyr Pro Asn Tyr Gln Val Val Val Ser Gly His Ser  
 205 210 215

Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Ile Gly Ala Leu Asp Leu Tyr Gln Arg  
 220 225 230

Asp Thr Arg Phe Asn Ala Lys Asn Leu Ala Ile Arg Thr Tyr Gly Gly  
 235 240 245

Pro Arg Val Gly Asn Pro Thr Phe Ala Tyr Tyr Val Thr Gly Thr Gly  
 250 255 260 265

Ile Asp Leu Glu Arg Thr Val Asp Arg Gln Asp Ile Val Pro His Leu  
 270 275 280

Pro Pro Gln Ser Phe Gly Phe Leu His Pro Gly Val Glu Tyr Trp Ile

[0004]

285 290 295  
 Arg Glu Gly Asp Asn Val Lys Ile Cys Asp Asp Val Leu Asp Ser Ser  
 300 305 310  
 Glu Cys Ser Asn Ser Ile Val Pro Phe Thr Lys Leu Ser Asp His Leu  
 315 320 325  
 Ser Tyr Phe Asp Ile Asn Thr Gly Leu Cys Leu  
 330 335 340

<210> 3  
 <211> 1092  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的DNA

<400> 3  
 atgaaattca cccctctctc cgtggctcgc atcgcctatc tctctctctc gtcacctgtc 60  
 tccatggcag caacctgccac agagaacaca ttgaacacga cagtcactca gccctteacc 120  
 ttgcttccca tctctcagg acgcacatcc gtccttaaga acctccccga cgtgaacctc 180  
 tctgcagaaa agacctcgaat caagacaaaac ggtccctctc ctgcaaaact ggaacagaaa 240  
 ggtggnaatg gctcaactc gacaacaatc gatttctcgg cctcggctc cgggtctctc 300  
 cgacgagccg atgtgtatgc aacagcagcc aaagtcagc agctcaagct ctacacacag 360  
 ttggcagcga acgcatattg tgcagcctgc gtccttggca acaaatggaa ctgtaaacad 420  
 [0005] tgttccagg atgacatctt ggtgtccacg ttgcactcgt cgaagtatga tacaaaaggt 480  
 tactgtggac gaaacgacaa gtccaaagtc atcaacctcg tcttcagggg aacctctctc 540  
 ttccgaact tctgtgccga ttctcagttc attgcccaga cttatctctc cgtctccgga 600  
 gccaaaggtc atactggatt ctacaaggcg tacatggagg tgcagaagga tgtgtctctc 660  
 tccatgatlg agtagatcac cgcclacccc aactaccagg tggctctctc cggctcactc 720  
 ttgggtggag cgtctcgaac ctttggcga ttggatttgt accagaggga tacgcggttc 780  
 aacgccaaaga acctcgccat cgcacatat ggcggctcgc gactgggcaa ccccacgttc 840  
 gctactatg tgaactggac cggaatcgat ttggagcga ctgtcagccg acaggacatc 900  
 gtccccatt tgcctctca gtcttctcgc ttcttgcac ctggcgttga gtaactggatt 960  
 cgcgagggcg ataactcga aatctctgat gacgttctg attctctgga gtgtctgaac 1020  
 tgcagctctc ccttccagaa actctctgat cactctctgt acttccatc taactctgga 1080  
 ttgtgtttgt aa 1092

<210> 4  
 <211> 43  
 <212> DNA  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 引物

<400> 4  
 acacaactgg ggaaccacca tgaattcacc cctctctcct gtc 43

<210> 5  
 <211> 49

---

	<212> DNA	
	<213> 人工的	
[0006]	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 5	
	gtcacctct agatctcgag ttacaaacac aagccagtgt taatgtcga	49