



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116829685 A

(43) 申请公布日 2023.09.29

(21) 申请号 202280009352.6

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

(22) 申请日 2022.01.27

11105

专利代理师 张文辉

(30) 优先权数据

PA202100089 2021.01.28 DK

(51) Int.Cl.

C11D 3/386 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.07.07

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2022/051847 2022.01.27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/162043 EN 2022.08.04

(71) 申请人 诺维信公司

地址 丹麦鲍斯韦

(72) 发明人 I·达马格 M·A·施特林格

K·博尔奇

权利要求书2页 说明书33页

序列表11页

(54) 发明名称

具有低恶臭产生的脂肪酶

(57) 摘要

本发明涉及洗涤剂组合物,这些洗涤剂组合物包含在脂质污渍去除期间具有低恶臭产生的脂肪酶。

1. 一种洗涤剂组合物,该洗涤剂组合物包含白地霉脂肪酶I (GCLI) 和至少一种表面活性剂、以及任选地一种或多种酶。

2. 根据权利要求1所述的洗涤剂组合物,其中该脂肪酶与SEQ ID NO:1具有至少70%的同一性,例如与SEQ ID NO:1具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%的同一性。

3. 根据权利要求1和2中任一项所述的洗涤剂组合物,其中该脂肪酶与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6具有100%的同一性。

4. 根据权利要求2所述的洗涤剂组合物,其中与SEQ ID NO:1相比,该脂肪酶包含1至10个氨基酸取代,优选是保守氨基酸取代。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的洗涤剂组合物,该洗涤剂组合物包含1%至15% wt%的鼠李糖脂。

6. 一种用于在洗涤周期期间去除纺织品中脂质的方法,该方法包括使该纺织品与洗涤剂组合物接触,该洗涤剂组合物包含白地霉脂肪酶I (GCLI) 和至少一种表面活性剂以及任选地一种或多种酶。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中该脂肪酶与SEQ ID NO:1具有至少70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%的同一性。

8. 根据权利要求6和7中任一项所述的方法,其中该脂肪酶与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6具有100%的同一性。

9. 一种用于纺织品的洗涤方法,该方法包括:

a. 将纺织品暴露于洗涤液,所述洗涤液包含

i. 白地霉脂肪酶I (GCLI), 或

ii. 根据权利要求1至5中任一项所述的洗涤剂组合物;

b. 完成至少一个洗涤周期,以及

c. 任选地漂洗该纺织品。

10. 根据权利要求9所述的洗涤方法,其中该洗涤液的温度在5°C至90°C的范围内、或在10°C至80°C的范围内、或在10°C至70°C的范围内、或在10°C至60°C的范围内、或在10°C至50°C的范围内、或在15°C至40°C的范围内、或在20°C至30°C的范围内。

11. 根据权利要求9或10中任一项所述的洗涤方法,其中当获得基本上相同的脂质去除水平时,与具有SEQ ID NO:3的脂肪酶的气味产生相比,来自该湿和/或干纺织品的气味较低,其中该气味产生通过感官分析或如通过固相微萃取气相色谱法测量所测定的丁酸释放来测量。

12. 根据权利要求11所述的洗涤方法,其中当通过例如Terg-0-tometer (TOM) 洗涤分析获得基本上相同的脂质去除水平时,与具有SEQ ID NO:3的脂肪酶的气味产生相比,该气味产生至少低2倍,例如低3倍,其中该气味产生通过感官分析或如通过固相微萃取气相色谱法测量所测定的丁酸释放来测量。

13. 根据前述权利要求中任一项所述的洗涤剂组合物、方法和洗涤方法,该洗涤剂组合物进一步包含一种或多种选自自由以下组成的组的酶:蛋白酶、淀粉酶、脱氧核糖核酸酶、木

葡聚糖酶、果胶酶、果胶裂解酶、黄原胶酶、过氧化物酶、卤代过氧合酶、纤维素酶、地衣多糖酶、脂肪酶、角质酶、过氧化氢酶、氧化酶、阿拉伯糖酶、半乳聚糖酶和甘露聚糖酶。

14. 洗涤液中的根据权利要求1至5中任一项所述的洗涤剂组合物用于去除纺织品上的脂质污渍的用途,其中该洗涤液包含从约0.2g洗涤剂组合物/L洗涤液至约5g洗涤剂组合物/L洗涤液。

15. 根据权利要求6至12中任一项所述的方法,其中该洗涤液包含从约0.2g洗涤剂组合物/L洗涤液至约5g洗涤剂组合物/L洗涤液。

具有低恶臭产生的脂肪酶

[0001] 序列表的引用

[0002] 本申请含有计算机可读形式的序列表,将其通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及洗涤剂组合物,这些洗涤剂组合物包含在脂质污渍去除期间具有低恶臭产生的脂肪酶。

背景技术

[0004] 洗涤剂从纺织品表面去除污渍的能力显然是消费者所关心的,各种表面活性剂成分在该过程中发挥作用。然而,出于多种原因,希望减少家庭护理中使用的洗涤剂的量。一个原因是洗涤剂中的一些成分衍生自石油化学资源,并且由于环境问题而面临审查,最重要的是因为它们来自不可再生来源并且难以生物降解或甚至一直存在于环境中,因此是不可持续的。另一个原因是降低洗涤液中的洗涤剂浓度可降低生产成本,并将最终导致较少的洗涤剂运输,并且因此减少对环境的负担。这种趋向于洗涤剂压实和表面活性剂洗涤浓度降低的趋势需要开发解决方案,以确保洗涤剂的持续性能,包括新的酶和酶的新用途。

[0005] 一些洗涤剂包含脂肪酶,以改善脂肪去除。当脂肪酶降解脂肪时,会释放短链脂肪酸(例如丁酸和己酸),从而导致恶臭感。因此,在衣物洗涤剂中,脂肪酶的剂量通常受恶臭最高可接受水平的限制,尽管通过在洗涤剂配制品中加入无酯香料体系可部分地掩盖恶臭。

[0006] 脂肪酶在半干燥条件下具有最高的活性,这种情况在干燥过程中存在。在洗涤剂含量低的洗涤条件下,脂肪酶气味产生的挑战最大,因为洗涤后会有更多的脂肪酶留在污渍上。

[0007] WO 2016/050661(诺维信公司(Novozymes A/S))披露了与亲本酶相比产生低水平或降低水平的恶臭的脂肪酶变体。

[0008] WO 2017/001673(诺维信公司)涉及在脂质污渍去除期间减少恶臭的方法。产生恶臭的问题有待解决,因为目前可用于洗涤剂的脂肪酶在脂质水解过程中都会释放出短链脂肪酸(例如丁酸),所述短链脂肪酸通常具有难闻的气味。

[0009] Bertolini等人(Eur.J.Biochem.[欧洲生物化学杂志]228,863-869(1995))披露了白地霉(*Geotrichum candidum*)脂肪酶I(GCL I)。对于具有长脂肪酰基链的不饱和底物(亚油酸和 α -亚油酸),GCL I显示出比GCL II更高的比活性,而GCL II对具有短脂肪酸链的饱和底物显示出更高的比活性。

[0010] SEQ ID NO:2披露于Shimada等人:cDNA Molecular Cloning of *Geotrichum candidum* Liase[白地霉脂肪酶的cDNA分子克隆],The Journal of Biochemistry[生物化学杂志],第106卷,第3期,1989年9月,383-388页,(万维网:doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a122862)以及Swiss-Prot:P17573。

[0011] SEQ ID NO:3披露于WO 2018/001959。

[0012] SEQ ID NO:6披露于WO 9401567(联合利华公司(Unilever))。

[0013] 现有技术没有披露GCL I在洗涤剂组合物中的用途。

发明内容

[0014] 本发明的诸位发明人已惊讶地发现,与在脂质水解过程中释放短链脂肪酸(例如丁酸)的脂肪酶相比,偏好具有长脂肪酰基链的不饱和底物(例如亚油酸和 α -亚油酸)的脂肪酶,例如白地霉脂肪酶I,可用于洗涤剂中,从而减少恶臭的产生。

[0015] 此外,存在于洗涤剂中的石油化学衍生化合物不可持续,因为它们来自不可再生来源并且难以生物降解或甚至一直存在于环境中。本发明的诸位发明人已惊讶地发现,可以通过添加GCL I减少洗涤剂加载量同时保持或甚至改善洗涤剂的洗涤性能实现更可持续的洗涤剂组合物,即具有改善的可持续性特征的洗涤剂组合物。除了产自可再生农业来源外,与多种洗涤剂成分相比,脂肪酶是环境中天然存在的并且易于生物降解。用GCL I替代洗涤剂成分符合联合国可持续发展目标,特别是目标12“负责任消费和生产”:用GCL I替代洗涤剂成分使洗涤剂生产商(以及因此最终用户)从化石原料转移至可再生原料,并且减少排放到环境中的持久性化学品的量。

[0016] 本发明的诸位发明人已惊讶地发现,当以减少的水平加入洗涤剂时,GCL I在洗涤中对脂质去除具有非常好的性能。因此,本发明使得能够在洗涤剂中使用GCL I,其在脂质去除和低气味产生方面都具有良好的益处,并且同时允许显著减少洗涤中的洗涤剂加载量。

[0017] 定义

[0018] 如本文所用,冠词“一个/一种(a/an)”,应理解为意指所保护的或所述对象中的一个或多个。

[0019] AEP(活性酶蛋白)具有催化活性的酶蛋白。有多种方式来确定AEP。例如,可以通过将总活性除以酶的比活性来计算AEP。

[0020] 对应于:如本文所用的术语“对应于”是指确定序列中的特定氨基酸(其中参考了特定氨基酸序列)的方式。例如,出于本发明的目的,当参考特定氨基酸位置时,技术人员能够将另一氨基酸序列与所述已经被参考的氨基酸序列进行比对,从而确定哪一个特定氨基酸可能在所述另一氨基酸序列中是目的性的。

[0021] 出于本发明的意图,SEQ ID NO:2中披露的成熟多肽用于测定另一种GCL I中的对应的氨基酸残基。该另一种GCL I的氨基酸序列与在SEQ ID NO:2中披露的成熟多肽进行比对,并且基于该比对,使用尼德曼-翁施算法(Needleman和Wunsch,1970,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]48:443-453)来确定对应于SEQ ID NO:2中披露的成熟多肽中的任何氨基酸残基的氨基酸位置编号,该算法如EMBOSS软件包(EMBOSS:The European Molecular Biology Open Software Suite[欧洲分子生物学开放软件套件],Rice等人,2000,Trends Genet.[遗传学趋势]16:276-277)(优选5.0.0版本或之后的版本)的尼德尔(Needle)程序中所实施的。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版本)取代矩阵。

[0022] 当相比于SEQ ID NO:2确认GCL I序列中的变化时使用下列命名法:SEQ ID NO:2的氨基酸、位置、所比较的GCL I的氨基酸。例如,当SEQ ID NO:1与SEQ ID NO:2比对时,注

意到SEQ ID NO:1中的GCL I与SEQ ID NO:2中的GCL I的不同之处在于前者在509位上具有丙氨酸(A)而非丝氨酸(S)。由于采用已接受的IUPAC单字母或三字母氨基酸缩写,因此,该变化的命名法将为S509A。

[0023] **洗涤剂辅助剂成分**:洗涤剂辅助剂成分不同于本发明的GCL I。这些另外的辅助剂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操作的性质。适合的辅料包括但不限于以下描述的组分,如表面活性剂、助洗剂、絮凝剂、螯合剂、染料转移抑制剂、酶、酶稳定剂、酶抑制剂、催化材料、漂白活化剂、过氧化氢、过氧化氢源、预形成的过酸、s、s、增亮剂、抑泡剂、染料、香料、结构弹力剂、织物柔软剂、载体、水溶助剂、助洗剂和共助洗剂、织物调色剂、消泡剂、分散剂、加工助剂、溶剂、和/或颜料。

[0024] **洗涤剂组合物**:术语“洗涤剂组合物”是指用于从有待清洁的物品(如纺织品)去除不希望的化合物的组合物。该洗涤剂组合物可以用于例如清洁纺织品,用于家用清洁和工业清洁二者。这些术语涵盖选择用于希望的特定类型的清洁组合物和产品的形式(例如,液体、凝胶、粉末、颗粒、糊状、条状、或喷雾组合物)的任何材料/化合物,并且包括但不限于洗涤剂组合物(例如,液体和/或固体衣物洗涤剂和精细织物洗涤剂;织物清新剂;织物柔软剂;洗衣增效剂;以及纺织品和衣物预去污剂/预处理)。除了含有本发明的酶之外,该洗涤剂配制品还可以含有一种或多种另外的酶(如蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶、角质酶、纤维素酶、内切葡聚糖酶、木葡聚糖酶、果胶酶、果胶裂解酶、黄原胶酶、过氧化物酶、卤代过氧合酶、过氧化氢酶以及甘露聚糖酶、或其任何混合物),和/或洗涤剂辅助剂成分,如表面活性剂、助洗剂、螯合剂或螯合剂、漂白系统或漂白组分、聚合物(如本文所列)、织物柔顺剂、增泡剂、抑泡剂、染料、香料、酶抑制剂、光学增亮剂、杀细菌剂、杀真菌剂、污垢悬浮剂、防腐蚀剂、酶抑制剂或稳定剂、酶活化剂、上蓝剂和荧光染料、抗氧化剂以及增溶剂。术语“洗涤剂组合物”可与术语“洗涤剂”互换使用。

[0025] **洗涤剂加载量**是洗涤周期中使用的洗涤剂的量。

[0026] **酶洗涤益处**:术语“酶洗涤益处”在本文定义为将酶添加至洗涤剂中与不具有该酶的同洗涤剂相比的有利效果。可由酶提供的重要洗涤益处为去除污渍,例如脂质污渍,使得在洗涤和/或清洁后无可见污垢或可见污垢非常少。

[0027] **脂肪酸**:脂肪酸是具有脂肪族尾部(链)的羧酸,其是饱和的或不饱和的。大多数天然存在的脂肪酸具有4至28个偶数个碳原子的链。脂肪酸通常衍生自甘油三酯或磷脂。当它们不与其他分子连接时,它们被称为“游离”脂肪酸。脂肪酸的实例包括但不限于,丁酸(酪酸)、戊酸(缬草酸)、己酸(羊油酸)、庚酸(葡萄花酸)、辛酸(羊脂酸)、壬酸(天竺葵酸)、癸酸(羊蜡酸)、十二烷酸(月桂酸)、十四烷酸(肉豆蔻酸)、十六烷酸(棕榈酸)、十八烷酸(硬脂酸)、二十烷酸(花生酸)、油酸、棕榈油酸、亚油酸、亚麻酸、花生四烯酸、二十碳五烯酸以及二十二碳六烯酸。应当理解,在本发明的上下文中,脂肪酸和脂质的酰基基团是等同的。当脂肪酸是脂质的酰基基团时,脂质可以是甘油单酯、甘油二酯、甘油三酯、磷脂、鞘脂、半乳糖脂、甾醇酯或蜡酯。该酰基基团可以是饱和的或不饱和的,并且任选地,可以附接官能团(取代基)。酰基基团的实例包括但不限于以下各项的酰基形式:丁酸(酪酸)、戊酸(缬草酸)、己酸(羊油酸)、庚酸(葡萄花酸)、辛酸(羊脂酸)、壬酸(天竺葵酸)、癸酸(羊蜡酸)、十二烷酸(月桂酸)、十四烷酸(肉豆蔻酸)、十六烷酸(棕榈酸)、十八烷酸(硬脂酸)、二十烷酸(花生酸)、亚油酸、亚麻酸、花生四烯酸、二十碳五烯酸、油酸、棕榈油酸以及二十二碳六烯酸。

[0028] 片段:术语“片段”意指具有从成熟多肽或结构域的氨基和/或羧基末端缺失的一个或多个(例如,几个)氨基酸的多肽;其中该片段具有GCL I活性。

[0029] 真菌的:在本发明的上下文中,与多肽(如酶,例如脂肪酶)相关的术语“真菌的”是指由真菌基因组编码并且因此可直接从真菌基因衍生的多肽,其中这种真菌未经过遗传修饰(例如,通过重组DNA技术将编码序列引入基因组中)来编码所述多肽。因此,在本发明的上下文中,术语“真菌GCL I”或“获得自真菌来源的具有GCL I活性的多肽”是指由真菌物种基因组编码并且因此可直接从真菌物种基因组衍生的GCL I,其中该真菌物种未经受通过引入编码所述GCL I的重组DNA进行的遗传修饰。因此,编码具有GCL I活性的真菌多肽的核苷酸序列是在真菌物种的遗传背景下天然存在的序列。由这种序列编码的具有GCL I活性的真菌多肽还可以指野生型GCL I(或亲本GCL I)。在另外的方面,本发明提供了具有GCL I活性的多肽,其中所述多肽与真菌GCL I基本上是同源的。在本发明的上下文中,术语“基本上同源”意为具有GCL I活性的多肽,与所选的真菌GCL I的氨基酸序列具有至少80%、优选至少85%、更优选至少90%、更优选至少95%、甚至更优选至少96%、97%、98%、以及最优选至少99%的同一性。与真菌GCL I基本上同源的多肽可被包括在本发明的洗涤剂中和/或在本发明的方法中使用。

[0030] 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进行转化、转染、转导等的任何细胞类型。术语“宿主细胞”涵盖由于复制期间出现的突变而与亲本细胞不相同的任何亲本细胞子代。

[0031] 改善的洗涤性能:术语“改善的洗涤性能”在本文定义为相对于没有酶的同洗涤剂组合物的洗涤性能,酶展示出在洗涤剂组合物中增加的洗涤性能,例如,通过增加污渍去除或改善漂白。术语“改善的洗涤性能”包括在衣物中的洗涤性能。

[0032] 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、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性质相关的一种或多种或所有天然存在的组分中去除;(3)相对于自然界中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的其他组分,增加物质的量而修饰的任何物质(例如,宿主细胞中的重组生产;编码该物质的基因的多个拷贝;以及使用比与编码该物质的基因天然相关的启动子更强的启动子)。分离的物质可以存在于发酵液样品中;例如宿主细胞可以经遗传修饰以表达本发明的多肽。来自该宿主细胞的发酵液将包含分离的多肽。

[0033] 衣物洗涤:术语“衣物洗涤”涉及家庭衣物洗涤和工业衣物洗涤,并且意指用含有洗涤剂组合物和任选地一种或多种酶的溶液处理纺织品的过程。衣物洗涤过程可以例如使用例如家庭或工业洗衣机进行,或可以手动进行。

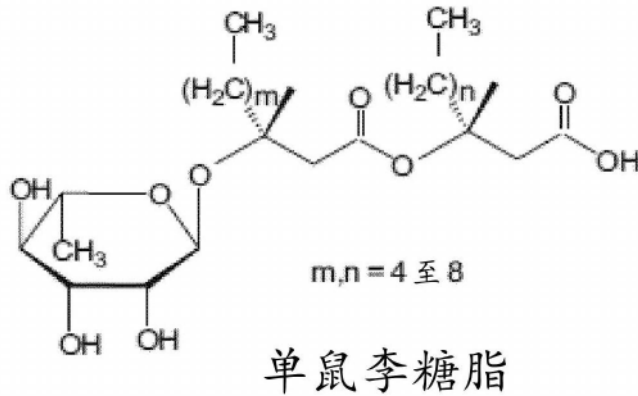
[0034] 脂肪酶:术语“脂肪酶(lipase)”、“脂肪酶(lipase enzyme)”、“脂解酶”、“脂质酯酶”、“脂解多肽”以及“脂解蛋白”是指如酶命名法所定义的EC3.1.1类中的酶。它可以具有脂肪酶活性(三酰基甘油脂肪酶,EC3.1.1.3)、角质酶活性(EC3.1.1.74)、固醇酯酶活性(EC3.1.1.13)和/或蜡酯水解酶活性(EC3.1.1.50)。在此上下文中,“脂肪酶底物”或“脂质”是可被脂肪酶水解的任何底物。术语脂肪酶涵盖GCL I。

[0035] 恶臭:术语“恶臭”意指清洁物品上不希望的气味。恶臭可以通过SPME-GC量化为释放的丁酸,或经感官小组评分进行评估。除非另有说明,否则术语恶臭可与术语气味互换使

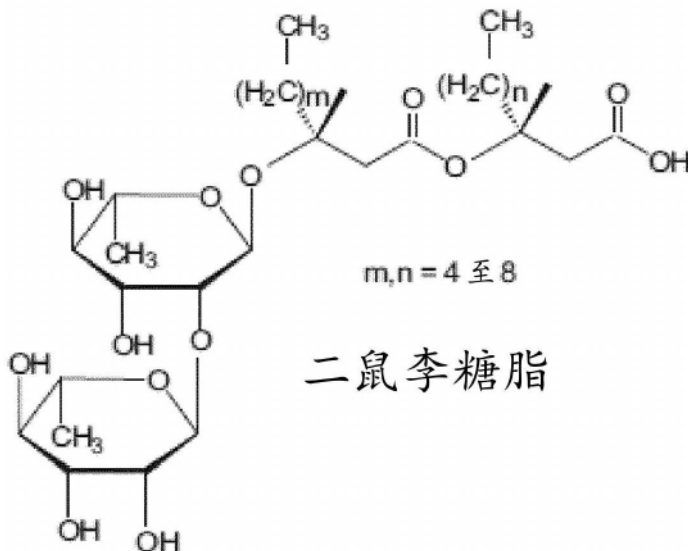
用。

[0036] **成熟多肽**:术语“成熟多肽”意指在翻译和任何翻译后修饰如N-末端加工、C-末端截短、糖基化作用、磷酸化作用等之后处于其最终形式的多肽。

[0037] **鼠李糖脂**:鼠李糖脂(RL)是可作为可生物降解表面活性剂的糖脂。RL可以呈单鼠李糖脂或二鼠李糖脂形式,其分别由一个或两个鼠李糖基团构成,其中链的长度可以变化:m、n为4至8。



[0038]



[0039] (Appl Microbiol Biotechnol[应用微生物学与生物技术] (2005) 68:718-725)。

[0040] 在本发明的上下文中,术语“鼠李糖脂”包括单鼠李糖脂或二鼠李糖脂、其混合物,和不同的链长以及鼠李糖脂的盐。

[0041] **序列同一性**:两个氨基酸序列之间或两个核苷酸序列之间的关联度通过参数“序列同一性”来描述。出于本发明的目的,使用如在EMBOSS软件包(EMBOSS:欧洲分子生物学开放软件套件(The European Molecular Biology Open Software Suite),Rice等人,2000, Trends Genet.[遗传学趋势]16:276-277)(优选5.0.0版本或更新版本)的尼德尔程序中所实施的尼德曼-翁施算法(Needleman-Wunsch algorithm)(Needleman和Wunsch,1970, J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]48:443-453)来确定两个氨基酸序列之间的序列同一性。使用的参数是空位开放罚分10、空位延伸罚分0.5以及EBLUSUM62(BLUSUM62的EMBOSS版本)取代矩阵。使用尼德尔标记的“最长同一性”的输出(使用非简化(-nobrief)选项获得)作为同

一性百分比并且如下计算：

[0042] (相同的残基x 100)/(比对长度-比对中的空位总数)

[0043] 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(EMBOSS:The European Molecular Biology Open Software Suite),Rice等人.,2000,同上)(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(Needleman和Wunsch,1970,同上)来确定两个脱氧核糖核苷酸序列之间的序列同一性。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版本)取代矩阵。使用尼德尔标记的“最长同一性”的输出(使用非简化(-nobrief)选项获得)作为同一性百分比并且如下计算：

[0044] (相同的脱氧核糖核苷酸x 100)/(比对长度-比对中的空位总数)。

[0045] 槐糖脂:在本申请的上下文中，术语“槐糖脂”包括内酯形式和相应酸形式的槐糖脂及其混合物。此外，“槐糖脂”还包括槐糖脂的盐。

[0046] 基本上相同:在本发明中的术语“基本上相同”是在本领域技术人员合理理解的范围内，且可以意指不同洗涤剂组合物去除脂质的水平相似或无明显区别，例如，根据实验误差去除脂质水平的差异在例如1%、2%或3%内。

[0047] 可持续性:可持续性和可持续的意指使用对环境损害极小或无损害且生物可降解的可再生资源。

[0048] 可持续性特征:在本发明的上下文中，术语可持续性特征用于比较(例如洗涤剂组合物中的)成分的可持续性，其中一种或多种成分可以替代其他可持续性较差的成分，同时保持系统的性能(例如物品洗涤期间洗涤剂组合物的性能)。

[0049] TEP:总酶蛋白通过氨基酸分析测量。

[0050] 纺织品:术语“纺织品”意指任何纺织品材料，该任何纺织品材料包括纱线、纱线中间体、纤维、非机织材料、天然材料、合成材料、以及任何其他纺织品材料，由这些材料制成的织物和由织物制成的产品(例如，服装和其他制品)。纺织品或织物可以处于针织品、机织物、牛仔布、非机织物、毡、纱线、以及毛巾布的形式。纺织品可以基于纤维素，如天然纤维素，包括棉、亚麻/亚麻布、黄麻、苧麻、剑麻或椰壳纤维或者人造纤维素(例如，来源于木浆)，包括纤维胶/人造丝、醋酸纤维素纤维(三胞)、莱赛尔纤维(lyocell)或其共混物。纺织品或织物也可以不基于纤维素，如天然聚酰胺，包括羊毛、驼毛、羊绒、马海毛、兔毛和蚕丝，或合成聚合物如尼龙、芳族聚酰胺、聚酯、丙烯酸酯、聚丙烯和氨纶(spandex)/弹性纤维(elastane)、或其共混物以及基于纤维素的纤维和不基于纤维素的纤维的共混物。共混物的实例是棉和/或人造丝/纤维胶与一种或多种伴随材料的共混物，该伴随材料如羊毛、合成纤维(例如聚酰胺纤维、丙烯酸纤维、聚酯纤维、聚氯乙烯纤维、聚氨酯纤维、聚脲纤维、芳族聚酰胺纤维)和/或含纤维素的纤维(例如人造丝/纤维胶、苧麻、亚麻/亚麻布、黄麻、醋酸纤维素纤维、莱赛尔纤维)。织物可以是常规的可洗涤衣物，例如有污渍的家用衣物。当使用术语织物或服装时，旨在也包括广义术语纺织品。在本发明的上下文中，术语“纺织品”还涵盖织物。在本发明的上下文中，术语“纺织品”可与织物和布料互换使用。

[0051] 变体:术语“变体”意指在一个或多个(例如，几个)位置处包含改变(即，取代、插入和/或缺失)的与亲本酶具有相同活性的多肽。取代意指用不同的氨基酸替代占据某一位置的氨基酸；缺失意指去除占据某一位置的氨基酸；而插入意指在邻接并且紧随占据某一位置

置的氨基酸之后添加氨基酸。

[0052] **洗涤周期**:术语“洗涤周期”在本文定义为如下洗涤操作,其中将纺织品浸泡在洗涤液中,将某种机械作用应用于该纺织品,以释放污渍,并且协助洗涤液流进和流出该纺织品,并且最终去除多余的洗涤液。在一个或多个洗涤周期后,总体上对该纺织品进行漂洗和干燥。

[0053] **洗涤液**:本文将术语“洗涤液”定义为任选地包括一种或多种酶的水和洗涤剂组分的溶液或混合物。

[0054] **洗涤性能**:术语“洗涤性能”被用作在洗涤期间洗涤剂组合物、酶或聚合物去除存在于有待清洁的物体上的污渍或保持纺织品的颜色和白度的能力。洗涤性能的改善可以通过如实验部分中所述的脂质去除和气味产生来量化。

[0055] **重量百分比**:缩写为w/w%、wt%或w%。这些缩写可互换使用。

[0056] 序列综述

[0057] SEQ ID NO:1是来自白地霉的脂肪酶

[0058] SEQ ID NO:2是来自白地霉的脂肪酶

[0059] SEQ ID NO:3是来自疏棉状嗜热丝孢菌(*Thermomyces lanuginosus*)的脂肪酶

[0060] SEQ ID NO:4是来自白地霉的脂肪酶

[0061] SEQ ID NO:5是来自白地霉的脂肪酶

[0062] SEQ ID NO:6是来自白地霉的脂肪酶

具体实施方式

[0063] 本发明的诸位发明人已惊讶地发现,GCL I在洗涤中从纺织品去除脂质方面具有非常好的性能,仅产生低恶臭。此外,现已确定即便当以减少的洗涤剂水平加入洗涤剂时,GCL I对脂质污渍去除仍具有良好的酶洗涤益处。因此,本发明使得使用在脂质去除和无恶臭或产生低恶臭方面具有非常好的益处的本发明的GCL I成为可能,并同时可显著降低洗涤剂加载量。

[0064] 因此,本发明涉及洗涤液中的脂肪酶用于去除纺织品上污渍的用途,其中该洗涤液包含约0.2至5g/L的洗涤剂,以及任选地一种或多种另外的酶。

[0065] 洗涤液可以具有在5°C至95°C范围内、或在10°C至80°C范围内、在10°C至70°C范围内、在10°C至60°C范围内、在10°C至50°C范围内、在15°C至40°C范围内或在20°C至40°C范围内的温度。

[0066] 在本发明的一个实施例中,用于洗涤物品的方法进一步包括在完成洗涤周期后排掉洗涤液或部分洗涤液。然后可以将洗涤液在后续洗涤周期中或在后续漂洗周期中重复使用。在第一个和任选地第二个或第三个洗涤周期期间,可以将该物品暴露于洗涤液。在一个实施例中,在暴露于洗涤液后,漂洗该物品。可以将该物品用水或用包括柔顺剂的水进行漂洗。

[0067] 适合如本申请所述使用的GCL I优选是源于白地霉的选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6的GCL I。

[0068] 在实施例中,GCL I包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,或包含与SEQ ID NO:1的多肽具有至少60%、例如至少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%的序列同一性的氨基酸序列。在一方面,这些多肽与包含SEQ ID NO:1的多肽相差多达10个(例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个)氨基酸。

[0069] 在实施例中,当采用段落“对应于”中所概述的设置与SEQ ID NO:2比对时,GCL I包含一个或多个(例如2、3、4或5)个选自由S509A、K511R、S538T、T541N和F543组成的组的变化。

[0070] 在实施例中,当采用段落“对应于”中所概述的设置与SEQ ID NO:2比对时,GCL I包含变化S509A和K511R。

[0071] 在实施例中,当采用段落“对应于”中所概述的设置与SEQ ID NO:2比对时,GCL I包含变化S538T、T541N和F543Y。

[0072] 在实施例中,当采用段落“对应于”中所概述的设置与SEQ ID NO:2比对时,GCL I包含变化T541N和F543Y。

[0073] 在实施例中,GCL I包含变化I70F、I83L、A278T、G281S、E284D、E381Q、A402S、K501Q、S509A,其中根据SEQ ID NO:2采用段落“对应于”中所概述的设置进行编号。

[0074] 在实施例中,SEQ ID NO:1的GCL I在一个或多个(例如,若干个)位置处包含取代、缺失和/或插入。在实施例中,引入SEQ ID NO:1的多肽中的氨基酸取代、缺失和/或插入的数目不超过10,例如1、2、3、4、5、6、7、8、或9。氨基酸改变可以是具有微小性质的,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;典型地为1-30个氨基酸的小缺失;小的氨基末端或羧基末端延伸,如氨基末端的甲硫氨酸残基;多达20-25个残基的小接头肽;或小的延伸,其通过改变净电荷或另一功能(如聚组氨酸段、抗原表位或结合结构域)来促进纯化。

[0075] 保守取代的实例在下组之内:碱性氨基酸(精氨酸、赖氨酸和组氨酸)、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)、疏水氨基酸(亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸)、芳族氨基酸(苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸)、以及小氨基酸(甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸和甲硫氨酸)。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.Neurath和R.L.Hill,1979,于The Proteins[蛋白质],Academic Press[学术出版社],纽约中描述。常见取代为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。

[0076] 可替代地,这些氨基酸改变具有使多肽的物理化学性质改变的这样一种性质。例如,氨基酸改变可以改善多肽的热稳定性、改变底物特异性、改变最适pH,等等。

[0077] 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(Cunningham和Wells,1989,Science[科学]244:1081-1085)来鉴定多肽中的必需氨基酸。在后一项技术中,在该分子中的每个残基处引入单个丙氨酸突变,并且对所得突变体分子的酶活性进行测试以鉴定对于该分子的活性至关重要的氨基酸残基。还参见,Hilton等人,1996,J.Biol.Chem.[生物化学杂志]271:4699-4708。也可以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的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,de Vos等人,1992,Science[科学]255:306-312;Smith等人,1992,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]224:899-

904;Wlodaver等人,1992,FEBS Lett.[欧洲生化学会联合会快报]309:59-64。还可以从与相关多肽的比对来推断必需氨基酸的身份。

[0078] 可以使用已知的诱变、重组和/或改组方法,随后进行相关的筛选程序做出单氨基酸或多氨基酸取代、缺失和/或插入并对其进行测试,该相关的筛选程序例如由Reidhaar-Olson和Sauer,1988,Science[科学]241:53-57;Bowie和Sauer,1989,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]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Lowman等人,1991,Biochemistry[生物化学]30:10832-10837;美国专利号5,223,409;WO 92/06204)以及区域定向诱变(Derbyshire等人,1986,Gene[基因]46:145;Ner等人,1988,DNA 7:127)。

[0079] 诱变/改组方法可以与高通量、自动化的筛选方法组合以检测由宿主细胞表达的克隆的、诱变的多肽的活性(Ness等人,1999,Nature Biotechnology[自然生物技术]17:893-896)。可从宿主细胞回收编码活性多肽的诱变的DNA分子,并使用本领域的标准方法快速测序。这些方法允许快速确定多肽中各个氨基酸残基的重要性。

[0080] 多肽可以是杂合多肽,其中一种多肽的区域在另一种多肽的区域的N-末端或C-末端处融合。

[0081] 多肽可以是融合多肽或可切割的融合多肽,其中另一种多肽在本发明多肽的N-末端或C-末端处融合。通过将编码另一种多肽的多核苷酸与本发明的多核苷酸融合来生产融合多肽。用于产生融合多肽的技术是本领域已知的,并且包括连接编码多肽的编码序列使得它们符合读框,而且融合多肽的表达处于一个或多个相同的启动子和终止子的控制之下。还可以使用内含肽技术构建融合多肽,其中在翻译后产生融合多肽(Cooper等人,1993,EMBO J.[欧洲分子生物学学会杂志]12:2575-2583;Dawson等人,1994,Science[科学]266:776-779)。

[0082] 融合多肽可进一步包含两个多肽之间的切割位点。在融合蛋白分泌之时,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在以下文献中披露的位点:Martin等人,2003,J.Ind.Microbiol.Biotechnol.[工业微生物学与生物技术杂志]3:568-576;Svetina等人,2000,J.Biotechnol.[生物技术杂志]76:245-251;Rasmussen-Wilson等人,1997,Appl.Environ.Microbiol.[应用与环境微生物学]63:3488-3493;Ward等人,1995,Biotechnology[生物技术]13:498-503;和Contreras等人,1991,Biotechnology[生物技术]9:378-381;Eaton等人,1986,Biochemistry[生物化学]25:505-512;Collins-Racie等人,1995,Biotechnology[生物技术]13:982-987;Carter等人,1989,Proteins:Structure,Function,and Genetics[蛋白质:结构、功能以及遗传学]6:240-248;以及Stevens,2003,Drug Discovery World[药物发现世界]4:35-48。

[0083] 核苷酸的PCR、克隆、连接等的一般方法是本领域技术人员熟知的,并且可以例如在以下文献中发现:“Molecular cloning:A laboratory manual[分子克隆:实验室手册]”,Sambrook等人(1989),Cold Spring Harbor lab.[冷泉港实验室],冷泉港,纽约州;Ausubel,F.M.等人(编辑);“Current protocols in Molecular Biology[分子生物学现代方法]”,John Wiley and Sons[约翰威利父子出版公司],(1995);Harwood,C.R.,和Cutting,S.M.(编辑);“DNA Cloning:A Practical Approach,Volumes I and II[DNA克隆:实用方法,第I和II卷]”,D.N.Glover编辑(1985);“Oligonucleotide Synthesis[寡核

昔酸合成]”, M.J.Gait编辑(1984); “Nucleic Acid Hybridization[核酸杂交]”, B.D.Hames和S.J.Higgins编辑(1985); “A Practical Guide To Molecular Cloning[分子克隆实用指南]”, B.Perbal, (1984)。

[0084] 洗涤液中GCL I(AEP)的浓度典型地在0.05-20ppm(mg/L)酶蛋白的范围内,例如在0.1-15ppm的范围内、在0.5-15ppm的范围内、在1-15ppm的范围内、在1-10ppm的范围内、在2-10ppm的范围内。

[0085] GCL I(作为配制产品)可以以0.2-10wt%的浓度存在于洗涤剂中,该浓度例如在0.5-5wt%的范围内、例如在0.5-3wt%的范围内、例如在0.5-2.5wt%的范围内、或在0.5-2wt%的范围内、或者甚至在0.5-1wt%的范围内。

[0086] 可以使用常规稳定剂稳定化本发明的洗涤剂组合物的GCL I,这些常规稳定剂例如是多元醇,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中所描述配制该组合物。

[0087] 本发明的多肽还可以结合到WO 97/07202中所披露的洗涤剂配制品中,将其通过引用而特此并入。

[0088] 洗涤剂组合物

[0089] 在一个实施例中,本发明涉及包含GCL I与一种或多种另外的清洁组合物组分的组合的洗涤剂组合物。在一个实施例中,该洗涤剂组合物包含具有GCL I活性的多肽,该多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列具有至少60%同一性,如70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或甚至100%同一性。在一个实施例中,该洗涤剂组合物处于固体形式。在另一个实施例中,该洗涤剂组合物处于液体或凝胶形式。在另一个实施例中,该洗涤剂组合物处于条状形式。在一个实施例中,该洗涤剂可以包裹于水溶性PVOH膜中。另外的组分的选择处于技术人员的能力范围内并且包括常规的成分,包括下文所阐述的示例性非限制性组分。

[0090] 液体洗涤剂组合物

[0091] 该液体洗涤剂组合物可以包含微囊,并且由此形成处于任何形式的任何洗涤剂组合物的一部分,如液体和粉末洗涤剂,以及皂和洗涤剂条。

[0092] 在一个实施例中,本发明涉及液体洗涤剂组合物,这些组合物包含微囊(如上所述)与一种或多种另外的清洁组合物组分的组合。

[0093] 可以将微囊(如上所述)按对应于从0.0001%至5%(w/w)活性酶蛋白(AEP)的量添加至该液体洗涤剂组合物中;优选地从0.001%至5%,更优选地从0.005%至5%,更优选地从0.005%至4%,更优选地从0.005%至3%,更优选地从0.005%至2%,甚至更优选地从0.01%至2%,并且最优选地从0.01%至1%(w/w)活性酶蛋白。

[0094] 液体洗涤剂组合物具有物理形式,它不是固体(或气体)。它可以是可倾流的液体、糊剂、可倾流的凝胶或不可倾流的凝胶。它可以是各向同性的或结构性的,优选各向同性的。它可以是用于在自动洗衣机中洗涤或用于手洗的配制品。它还可以是个人护理产品,例如洗发水、牙膏、或洗手皂。

[0095] 液体洗涤剂组合物可以是水性的,典型地含有按重量计至少20%并且高达95%的水,例如高达70%的水、高达50%的水、高达40%的水、高达30%的水、或高达20%的水。包

括但不限于链烷醇、胺、二醇、醚以及多元醇的其他类型的液体可以包含于水性液体洗涤剂中。水性液体洗涤剂可以含有从0-30%的有机溶剂。液体洗涤剂甚至可以是非水性的,其中水含量低于10%,优选低于5%。

[0096] 洗涤剂成分可以通过水可溶的袋中的室彼此物理性地分开。因此,可以避免组分间的不良的储存相互作用。在洗涤溶液中,每个室的不同溶解曲线还可以引起所选择的组分的延迟溶解。

[0097] 洗涤剂组合物可以采用单位剂量产品的形式。单位剂量产品是不可重复使用的容器中的单一剂量的包装。它越来越多地用于针对衣物的洗涤剂中。洗涤剂单位剂量产品是在单次洗涤中所用的洗涤剂的量的包装(例如,在由水溶性膜制得的袋中)。

[0098] 袋可以具有适合保存组合物的任何形式、形状和材料,例如在与水接触之前,不允许组合物从袋中释放出来。该袋由水溶性膜制成,它包含了一个内部体积。可以将所述内部体积分成袋的室。优选的膜是聚合物材料,优选地形成膜或薄片的聚合物。优选的聚合物、共聚物或其衍生物是经选择的聚丙烯酸酯、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,聚合物在膜例如PVA中的水平是至少约60%。优选的平均分子量将典型地是约20,000至约150,000。膜还可以是共混物组合物,该共混物组合物包含可水解降解并且水溶性聚合物共混物,如聚乳酸和聚乙烯醇(已知在商品参考号M8630下,如由美国印第安纳州盖里(Gary, Ind., US)的克里斯克拉夫特工业产品公司(Chris Craft In.Prod.)销售)加增塑剂,像甘油、乙二醇、丙二醇、山梨醇及其混合物。袋可以包含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离的部分组分。组合物中,液体组分的室可以与含固体的室不同(参见例如,US 2009/0011970)。

[0099] 洗涤剂成分

[0100] 洗涤剂组分的选择可以包括(用于纺织品护理)有待清洁的纺织品的类型、污垢的类型和/或程度、进行清洁时的温度、以及洗涤剂产品的配制的考虑。尽管根据特定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,组分可以包含另外的功能性。

[0101] 还可以使用本领域中已知用于在洗涤剂中使用的任何洗涤剂组分。其他任选的洗涤剂组分包括防腐蚀剂、防缩剂、抗污垢再沉积剂、抗皱剂、杀细菌剂、黏合剂、腐蚀抑制剂、崩解剂/崩解试剂、染料、酶稳定剂(包括硼酸、硼酸盐、和/或多元醇,如丙二醇)、织物柔顺剂(包括粘土)、填料/加工助剂、荧光增白剂/光学增亮剂、增泡剂、泡沫(泡)调节剂、香料、污垢悬浮剂、柔软剂、抑泡剂、酶抑制抑制剂、以及芯吸剂,单独或组合使用。可以利用本领域已知的用于在洗涤剂中使用的任何成分。此类成分的选择完全处于技术人员的能力范围内并且包括常规的成分,包括下文所阐述的示例性非限制性组分。

[0102] 表面活性剂

[0103] 清洁组合物可以包含一种或多种表面活性剂,它们可以是阴离子的和/或阳离子的和/或非离子的和/或半极性的和/或兼性离子的,或其混合物。在特定的实施例中,洗涤剂组合物包括表面活性剂系统(包含多于一种表面活性剂),例如一种或多种非离子表面活性剂和一种或多种阴离子表面活性剂的混合物。在一个实施例中,洗涤剂包含至少一种阴

离子表面活性剂和至少一种非离子表面活性剂,阴离子表面活性剂与非离子表面活性剂的重量比可以为20:1至1:20。在一个实施例中,阴离子表面活性剂的量高于非离子表面活性剂的量,例如阴离子表面活性剂与非离子表面活性剂的重量比可以为10:1至1.1:1或5:1至1.5:1。阴离子表面活性剂与非离子表面活性剂的量也可以相等并且重量比为1:1。在一个实施例中,非离子表面活性剂的量高于阴离子表面活性剂的量,并且重量比可以为1:10至1:1.1。阴离子表面活性剂与非离子表面活性剂的重量比优选为10:1至1:10,如5:1至1:5,或5:1至1:1.2。优选地,非离子表面活性剂与阴离子表面活性剂的重量分数为0至0.5或0至0.2,因此如果重量分数为0,则可以存在或不存在非离子表面活性剂,但是如果存在非离子表面活性剂,则非离子表面活性剂的重量分数优选为阴离子表面活性剂和非离子表面活性剂总重量的至多50%或至多20%。轻垢洗涤剂通常包含比阴离子表面活性剂更多的非离子表面活性剂,并且其中非离子表面活性剂与阴离子表面活性剂的分量优选为0.5至0.9。一种或多种表面活性剂的总重量典型地以按重量计约0.1%至约60%,例如约1%至约40%,或约3%至约20%,或约3%至约10%的水平存在。基于所希望的清洁应用来选择该一种或多种表面活性剂,并且该一种或多种表面活性剂可以包括本领域中已知的任何一种或多种常规表面活性剂。当被包括在其中时,该洗涤剂将通常含有按重量计从约1%至约40%的阴离子表面活性剂,如从约5%至约30%,包括从约5%至约15%,或从约15%至约20%,或从约20%至约25%的阴离子表面活性剂。阴离子表面活性剂的非限制性实例包括硫酸盐和磺酸盐,典型地以钠盐或钾盐可用,或单乙醇胺(MEA,2-氨基乙-1-醇)盐或三乙醇胺(TEA,2,2',2''-次氨基三乙-1-醇)盐;特别是直链烷基苯磺酸盐(LAS)、LAS的异构体,如支链烷基苯磺酸盐(BABS)和苯基链烷磺酸盐;烯烴磺酸盐,特别是 α -烯烴磺酸盐(AOS);烷基硫酸盐(AS),特别是脂肪醇硫酸盐(FAS),即伯醇硫酸盐(PAS),例如十二烷基硫酸盐(SLS);醇醚硫酸盐(AES或AEOS或FES,也称为醇乙氧基硫酸盐或脂肪醇醚硫酸盐);石蜡磺酸盐(PS),包括链烷-1-磺酸盐和仲链烷磺酸盐(SAS);酯磺酸盐,包括磺化脂肪酸甘油酯和 α -磺基脂肪酸甲酯(α -SFM或SES或MES);烷基琥珀酸或烯基琥珀酸,如十二碳烯基/十四碳烯基琥珀酸(DTSA);磺基琥珀酸的二酯和单酯;氨基酸的脂肪酸衍生物。阴离子表面活性剂可以作为酸、盐或乙醇胺衍生物添加。

[0104] 当被包括在其中时,该洗涤剂将通常含有按重量计从约0.1%至约40%的阳离子表面活性剂,例如从约0.5%至约30%,特别是从约1%至约20%、从约3%至约10%,如从约3%至约5%、从约8%至约12%或从约10%至约12%。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。

[0105] 当被包括在其中时,该洗涤剂将通常含有按重量计从约0.2%至约40%的非离子表面活性剂,例如从约0.5%至约30%,特别是从约1%至约20%、从约3%至约10%,如从约3%至约5%、从约8%至约12%或从约10%至约12%。非离子表面活性剂的非限制性实例包括醇乙氧基化物(AE或AEO)(例如AEO系列如AEO-7)、醇丙氧基化物(特别是丙氧基化脂肪醇(PFA)、乙氧基化醇和丙氧基化醇)、烷氧基化脂肪酸烷基酯(如乙氧基化和/或丙氧基化脂肪酸烷基酯(尤其是乙氧基甲酯,MEE))、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)),以及可以商品名SPAN和TWEEN获得的产品、及其组合。

[0106] 当被包括在其中时,该洗涤剂将通常含有按重量计从约0.01%至约10%的半极性表面活性剂。半极性表面活性剂的非限制性实例包括氧化胺(AO),如烷基二甲基氧化胺,特别是N-(椰油基烷基)-N,N-二甲基氧化胺和N-(牛脂烷基)-N,N-双(2-羟乙基)氧化胺及其组合。

[0107] 当被包括在其中时,该洗涤剂将通常含有按重量计约0.01%至约10%的兼性离子表面活性剂。兼性离子表面活性剂的非限制性实例包括甜菜碱,如烷基二甲基甜菜碱、磺基甜菜碱、及其组合。

[0108] 可以使用另外的生物基表面活性剂,例如其中表面活性剂是基于糖的非离子表面活性剂,其可以是己基- β -D-麦芽吡喃糖苷、硫代麦芽吡喃糖苷或环状麦芽吡喃糖苷,例如EP 2516606 B1中所述。其他生物表面活性剂可以包括鼠李糖脂和槐糖脂。

[0109] 水溶助剂

[0110] 水溶助剂是如下化合物,该化合物在水溶液中溶解疏水化合物(或相反地,在非极性环境中溶解极性物质)。典型地,水溶助剂具有亲水和疏水两种特征(所谓的两亲性质,如由表面活性剂已知的);然而,水溶助剂的分子结构一般不利于自发性自聚集,参见例如通过Hodgdon和Kaler(2007),Current Opinion in Colloid&Interface Science[胶体和界面科学新见]12:121-128的综述。水溶助剂并不表现如在形成胶束、薄层或其他明确限定的中间相(meso-phase)的表面活性剂和脂质中所见的临界浓度(高于此浓度则发生自聚集)。相反,许多水溶助剂示出了连续类型的聚集过程,在该过程中聚集物的大小随着浓度增加而增长。然而,许多水溶助剂改变了含有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。水溶助剂常规地在从药学、个人护理、食品到技术应用的各个产业中应用。水溶助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(如在通过去除水而压缩液体洗涤剂的过程中)而不引起不希望的现象,如相分离或高粘度。

[0111] 洗涤剂可以含有按重量计0-10%,例如按重量计0-5%,例如约0.5%至约5%、或约3%至约5%的水溶助剂。可以利用本领域中已知的用于在洗涤剂中使用的任何水溶助剂。水溶助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)、枯烯磺酸钠(SCS)、伞花烃磺酸钠、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。

[0112] 助洗剂和共助洗剂

[0113] 洗涤剂组合物可以含有按重量计约0-65%(如约5%至约50%)的洗涤剂助洗剂或共助洗剂、或其混合物。助洗剂和/或共助洗剂可以特别是与Ca和Mg形成水溶性复合物的螯合试剂。可以利用本领域已知的用于在清洁洗涤剂中使用的任何助洗剂和/或共助洗剂。

[0114] 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(例如来自科莱恩特公司(Clariant)的SKS-6)、乙醇胺如2-氨基乙-1-醇(MEA)、二乙醇胺(DEA,也称为2,2'-亚氨基二乙-1-醇)、三乙醇胺(TEA,也称为2,2',2''-次氨基三乙-1-醇)以及(羧甲基)菊粉(CMI)、及其组合。

[0115] 该洗涤剂组合物还可以含有按重量计从约0-50%，如约5%至约30%的洗涤剂共助洗剂。洗涤剂组合物可以包括单独或与助洗剂(例如沸石助洗剂)组合的共助洗剂。共助洗剂的非限制性实例包括或其共聚物，如聚(丙烯酸)(PAA)或共聚(丙烯酸/马来酸)(PAA/PMA)。根据本发明，这些组分可以以低于目前可用的洗涤剂组合物中的水平包含在内。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、氨基聚羧酸盐、和膦酸盐)、以及烷基琥珀酸、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)、亚氨基二琥珀酸(IDS)、乙二胺-N,N'-二丁二酸(EDDS)、甲基甘氨酸二乙酸(MGDA)、谷氨酸-N,N'-二乙酸(GLDA)、1-羟基乙烷-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(膦酸)(DTMPA或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)、亚氨基二琥珀酸(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)、 α -丙氨酸-N,N'-二乙酸(α -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)、磺胺酸-N,N'-二乙酸(SLDA)、牛磺酸-N,N'-二乙酸(TUDA)以及磺甲基-N,N'-二乙酸(SMDA)、N-(2-羟乙基)乙二胺-N,N',N''-三乙酸(HEDTA)、二乙醇甘氨酸(DEG)、氨基三亚甲基(膦酸)(ATMP)、及其组合和盐。进一步的示例性助洗剂和/或共助洗剂描述于例如WO 09/102854和US 5977053中。

[0116] 聚合物和分散剂

[0117] 通常，洗涤剂组合物可以含有按重量计0-10%，如0.5%-5%、2%-5%、0.5%-2%或0.2%-1%的聚合物。可以利用本领域中已知的用于在洗涤剂中使用的任何聚合物。聚合物可以作为如上文提到的共助洗剂起作用，或可以提供抗再沉积、纤维保护、污垢释放、染料转移抑制、油脂清洁、和/或消泡性质。一些聚合物可以具有多于一种的以上提及的特性和/或多种的下文提及的基序。示例性聚合物包括聚(乙烯醇)(PVA)、聚(乙烯吡咯烷酮)(PVP)、聚(乙二醇)或聚(环氧乙烷)(PEG)、乙氧基化的聚(亚乙基亚胺)、羧甲基菊粉(CMI)、和硅酮、对苯二甲酸和低聚乙二醇的共聚物、聚(对苯二甲酸乙二酯)和聚(氧乙烯对苯二甲酸乙二酯)的共聚物(PET-POET)、PVP、聚(乙烯基咪唑)(PVI)、聚(乙烯吡啶-N-氧化物)(PVPO或PVPNO)以及聚(乙烯吡咯烷酮-乙烯基咪唑)(PVPVI)。更多示例性聚合物包括聚环氧乙烷和聚环氧丙烷(PEO-PPO)、乙氧基硫酸双季铵盐、苯乙烯/丙烯酸共聚物和香料胶囊。其他示例性聚合物披露于例如WO 2006/130575中。还考虑了以上提及的聚合物的盐。

[0118] 本发明的洗涤剂组合物还可以含有分散剂。特别地，粉末洗涤剂可以包含分散剂。合适的水溶性有机材料包括均聚的或共聚的酸或其盐，其中聚羧酸包含被不多于两个碳原子彼此分开的至少两个羧基。合适的分散剂例如描述于Powdered Detergents[粉末洗涤剂], Surfactant science series[表面活性剂科学系列]第71卷, Marcel Dekker, Inc.[马塞尔德克尔公司]中。

[0119] 织物调色剂

[0120] 本发明的洗涤剂组合物还可以包括织物调色剂，如染料或颜料，当配制在洗涤剂组合物中时，当所述织物与包含所述洗涤剂组合物的洗涤液接触时织物调色剂可以沉积在织物上，并且因此通过可见光的吸收/反射改变所述织物的色彩。荧光增白剂发射至少一些

可见光。相反,当织物调色剂吸收至少部分可见光谱时,它们改变表面的色彩。合适的织物调色剂包括染料和染料-粘土缀合物,并且还可以包括颜料。合适的染料包括小分子染料和聚合物染料。合适的小分子染料包括选自落入颜色索引(Colour Index)(C.I.)分类的以下染料组成的小分子染料: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,例如如W0 2005/03274、W0 2005/03275、W0 2005/03276和EP 1876226中所述(通过引用并入本文)。洗涤剂组合物优选地包含从约0.00003wt%至约0.2wt%、从约0.00008wt%至约0.05wt%、或甚至从约0.0001wt%至约0.04wt%的织物调色剂。该组合物可以包含从0.0001wt%至0.2wt%的织物调色剂,当该组合物处于单位剂量袋的形式时,这可以是尤其优选的。合适的调色剂还披露于例如W0 2007/087257和W0 2007/087243中。

[0121] 染料转移抑制剂

[0122] 本发明的洗涤剂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-乙烯吡咯烷酮和N-乙烯基咪唑的共聚物、聚乙烯噁唑烷酮和聚乙烯基咪唑、或其混合物。当在主题组合物中存在时,染料转移抑制剂可以按该组合物的重量计以从约0.0001%至约10%、从约0.01%至约5%或甚至从约0.1%至约3%的水平存在。

[0123] 荧光增白剂

[0124] 本发明的洗涤剂组合物将优选地还含有另外的组分,这些组分可以给正在清洁的制品着色,如荧光增白剂或光学增亮剂。当存在时,增亮剂的水平优选为约0.01%至约0.5%。在本发明的组合物中可以使用合适的用于在衣物洗涤剂组合物中使用的任何荧光增白剂。最常用的荧光增白剂是属于以下类别的那些:二氨基芪-磺酸衍生物、二芳基吡啶啉衍生物和二苯基-联苯乙烯基衍生物。荧光增白剂的二氨基芪-磺酸衍生物类型的实例包括以下的钠盐:4,4'-双-(2-二乙醇氨基-4-苯胺-s-三嗪-6-基氨基)芪-2,2'-二磺酸盐、4,4'-双-(2,4-二苯胺基-s-三嗪-6-基氨基)芪-2,2'-二磺酸盐、4,4'-双-(2-苯胺基-4-(N-甲基-N-2-羟基-乙基氨基)-s-三嗪-6-基氨基)芪-2,2'-二磺酸盐、4,4'-双-(4-苯基-1,2,3-三唑-2-基)芪-2,2'-二磺酸盐以及5-(2H-萘并[1,2-d][1,2,3]三唑-2-基)-2-[(E)-2-苯基乙烯基]苯磺酸钠。优选的荧光增白剂是可从汽巴-嘉基股份有限公司(Ciba-Geigy AG)(巴塞尔,瑞士)获得的天来宝(Tinopal)DMS和天来宝CBS。天来宝DMS是4,4'-双-(2-吗啉代-4-苯胺基-s-三嗪-6-基氨基)芪-2,2'-二磺酸盐的二钠盐。天来宝CBS是2,2'-双-(苯基-苯乙烯基)-二磺酸盐的二钠盐。还优选的荧光增白剂是可商购的Parawhite KX,由印度孟买的派拉蒙矿物与化学品公司(Paramount Minerals and Chemicals)供应。天来宝CBS-X是4,4'-双-(磺基苯乙烯基)-联苯基二钠盐,也称作二苯乙烯基联苯基二磺酸二钠盐。适合用于在本发明中使用的其他荧光剂包括1-3-二芳基吡啶啉和7-烷氨基香豆素。

[0125] 合适的荧光增亮剂水平包括从约0.01、从0.05、从约0.1或甚至从约0.2wt%的较低水平至0.5或甚至0.75wt%的较高水平。

[0126] 污垢释放聚合物

[0127] 本发明的洗涤剂组合物还可以包括一种或多种污垢释放聚合物,这些聚合物帮助从织物(如棉和基于聚酯的织物)去除污垢,特别是从基于聚酯的织物去除疏水性污垢。污垢释放聚合物可以例如是基于非离子型或阴离子型对苯二甲酸的聚合物、聚乙烯基己内酰

胺和相关共聚物、乙烯基接枝共聚物、聚酯聚酰胺,参见例如Powdered Detergents[粉末洗涤剂],Surfactant science series[表面活性剂科学系列],第71卷,第7章,Marcel Dekker, Inc.[马塞尔德克尔公司]。另一种类型的污垢释放聚合物是包含核芯结构和附接至该核芯结构的多个烷氧基化基团的两亲性烷氧基化油脂清洁聚合物。核芯结构可以包含聚烷基亚胺结构或聚烷醇胺结构,如WO 2009/087523中详细所述的(通过引用并入本文)。而且,随机接枝共聚物是合适的污垢释放聚合物。合适的接枝共聚物更详细地描述于WO 2007/138054、WO 2006/108856以及WO 2006/113314中(通过引用并入本文)。

[0128] 抗再沉积剂

[0129] 本发明的洗涤剂组合物还可以包括一种或多种抗再沉积剂,如羧甲基纤维素(CMC)、聚乙烯醇(PVA)、聚氧乙烯和/或聚乙二醇(PEG)、丙烯酸的均聚物、丙烯酸和马来酸的共聚物。以上在污垢释放聚合物下所描述的基于纤维素的聚合物还可以作为抗再沉积剂起作用。

[0130] 流变改性剂

[0131] 本发明的洗涤剂组合物还可以包括一种或多种流变改性剂、结构剂或增稠剂,不同于降粘剂。流变改性剂选自由以下组成的组:非聚合物结晶、羟基功能材料、聚物流变改性剂,它们为液体洗涤剂组合物的水性液体基质赋予剪切稀化特征。可以通过本领域已知的方法修饰和调整洗涤剂的流变学和粘度,例如,如在EP 2169040中所示。

[0132] 其他适合的辅料包括但不限于防缩剂、抗皱剂、杀细菌剂、粘合剂、运载体、染料、酶稳定剂、织物柔软剂、填充剂、泡沫调节剂、助水溶剂、香料、色素、抑泡剂、溶剂以及用于液体洗涤剂的结构剂和/或结构弹性剂。

[0133] 另外的酶

[0134] 洗涤剂添加剂连同洗涤剂组合物可以包含一种或多种另外的酶,例如蛋白酶、脂肪酶、角质酶、纤维素酶、淀粉酶、糖酶、DNA酶、果胶酶、甘露聚糖酶、阿拉伯糖酶、半乳聚糖酶、木聚糖酶、氧化酶,例如漆酶、和/或过氧化物酶。

[0135] 通常,选择的一种或多种酶的特性应当与所选择的洗涤剂相容(即,最适pH,与其他酶成分或非酶成分的相容性等),并且该一种或多种酶应当以有效量存在。

[0136] 纤维素酶

[0137] 术语“纤维素酶”意指水解纤维素材料的一种或多种(例如,几种)酶。可互换使用两个术语:具有纤维素酶活性的多肽和纤维素酶。纤维素酶可以选自由以下组成的组:属于GH5、GH44、GH45、EC 3.2.1.4、EC 3.2.1.21、EC 3.2.1.91和EC 3.2.1.172的纤维素酶。此类酶包括一种或多种内切葡聚糖酶(例如,EC 3.2.1.4)、一种或多种纤维二糖水解酶、一种或多种 β -葡糖苷酶、或其组合。

[0138] 适合的纤维素酶包括细菌或真菌来源的酶的单组分和混合物。还设想到了化学修饰的突变体或蛋白质工程化的突变体。纤维素酶可以例如是单组分内切-1,4- β -葡聚糖酶(又称为内切葡聚糖酶)、或单组分内切-1,4- β -葡聚糖酶的混合物。

[0139] DNA酶(脱氧核糖核酸酶)

[0140] 术语“DNA酶”意指具有DNA酶活性的多肽,该多肽催化DNA主链中的磷酸二酯键的水解切割,从而降解DNA。

[0141] 甘露聚糖酶

[0142] 合适的甘露聚糖酶包括细菌或真菌来源的那些。包括化学或遗传修饰的突变体。甘露聚糖酶可以是家族5或26的碱性甘露聚糖酶。它可以是来自芽孢杆菌属或腐质霉属 (*Humicola*) 的野生型,特别是来自粘琼脂芽孢杆菌 (*B. agaradhaerens*)、地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*)、嗜碱芽孢杆菌 (*B. halodurans*)、克劳氏芽孢杆菌 (*B. clausii*)、或特异腐质霉 (*H. insolens*)。合适的甘露聚糖酶描述于W0 1999/064619中。可商购的甘露聚糖酶是Mannaway(诺维信公司(Novozymes A/S))。

[0143] 蛋白酶

[0144] 合适的蛋白酶可以是任何来源的,但优选地是细菌或真菌来源的,任选地呈蛋白质工程化的或化学修饰的突变体的形式。蛋白酶可以是碱性蛋白酶,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家族的(如胰蛋白酶)或S8家族的(如枯草杆菌蛋白酶(subtilisin))。金属蛋白酶可以例如是嗜热菌蛋白酶,例如来自M4家族的嗜热菌蛋白酶,或另一种金属蛋白酶,如来自M5、M7或M8家族的那些。

[0145] 术语“枯草杆菌酶(subtilase)”是指根据Siezen等人,Protein Eng.[蛋白质工程]4(1991)719-737和Siezen等人,Protein Sci.[蛋白质科学]6(1997)501-523的丝氨酸蛋白酶的亚组。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亚组。枯草杆菌酶可以被划分为六个亚类:枯草杆菌蛋白酶家族、嗜热蛋白酶家族、蛋白酶K家族、羊毛硫氨酸抗生素肽酶家族、Kexin家族和Pyrolysin家族。

[0146] 尽管适于洗涤剂用途的蛋白酶可以从多种生物(包括如曲霉属(*Aspergillus*)等真菌)获得,但洗涤剂蛋白酶通常从细菌(特别是从芽孢杆菌属)获得。衍生枯草杆菌酶的芽孢杆菌属物种的实例包括迟缓芽孢杆菌(*Bacillus lentus*)、嗜碱芽孢杆菌(*Bacillus alkalophilus*)、枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、短小芽孢杆菌和吉氏芽孢杆菌(*Bacillus gibsonii*)。特别的枯草杆菌蛋白酶包括迟缓枯草杆菌蛋白酶(subtilisin lentus)、枯草杆菌蛋白酶Novo、枯草杆菌蛋白酶Carlsberg、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、以及例如蛋白酶PD138(描述于W0 93/18140中)。其他有用的蛋白酶是例如在W0 01/16285和W0 02/16547中描述的那些。

[0147] 胰蛋白酶样蛋白酶的实例包括镰孢属蛋白酶(在W0 94/25583和W0 2005/040372中描述),以及衍生自纤维单胞菌(*Cellulomonas*)的糜蛋白酶(在W0 2005/052161和W0 2005/052146中描述)。

[0148] 金属蛋白酶的实例包括在W0 2007/044993中描述的中性金属蛋白酶(例如衍生自解淀粉芽孢杆菌的那些),以及例如在W0 2015/158723和W0 2016/075078中描述的金属蛋白酶。

[0149] 有用的蛋白酶的实例是在W0 89/06279、W0 92/19729、W0 96/34946、W0 98/20115、W0 98/20116、W0 99/11768、W0 01/44452、W0 03/006602、W0 2004/003186、W0 2004/041979、W0 2007/006305、W0 2011/036263、W0 2014/207227、W0 2016/087617和W0 2016/174234中描述的蛋白酶变体。

[0150] 适合的可商购的蛋白酶包括以下列商品名出售的那些: **Alcalase®**、**Duralase™**、**Durazym™**、**Relase®**、**Relase®Ultra**、**Savinase®**、**Savinase®Ultra**、**Primase™**、**Polarzyme®**、**Kannase®**、**Liquanase®**、**Liquanase®Ultra**、

Ovozyme®、Coronase®、Coronase® Ultra、Blaze®、Blaze Evity® 100T、Blaze Evity® 125T、Blaze Evity® 150T、Blaze Evity® 200T、Neutrase®、Everlase®、Esperase®、Progress® Uno、Progress® In和Progress® Excel (诺维信公司), 以下列商品名出售的那些: Maxatase™、Maxacal™、Maxapem®、Purafect® 0x、Purafect® 0xP、Puramax®、FN2™、FN3™、FN4^{ex}™、Excellase®、Excellenz™ P1000、Excellenz™ P1250、Eraser™、Preferenz® P100、Purafect Prime、Preferenz P110™、Effectenz P1000™、Purafect®、Effectenz P1050™、Purafect® 0x、Effectenz™ P2000、Purafast™、Properase®、Opticlean™和Optimase® (丹斯尼克公司(Danisco)/杜邦公司(DuPont))、BLAP(在US 5352604的图29中显示的序列)及其变体(汉高公司(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)。

[0151] 脂肪酶和角质酶

[0152] 合适的脂肪酶和角质酶包括细菌或真菌来源的那些。包括化学修饰的突变体酶或蛋白质工程化的突变体酶。实例包括来自嗜热丝孢菌属, 例如来自如EP 258068和EP 305216中描述的疏绵状嗜热丝孢菌(早先命名为疏棉状腐质霉(*Humicola lanuginosa*))的脂肪酶; 来自腐质霉属, 例如特异腐质霉(*H. insolens*) (WO 96/13580)的角质酶; 来自假单胞菌属(*Pseudomonas*)的菌株(这些中的一些现在改名为伯克霍尔德菌属(*Burkholderia*)), 例如产碱假单胞菌(*P. alcaligenes*)或类产碱假单胞菌(*P. pseudoalcaligenes*) (EP 218272)、洋葱假单胞菌(*P. cepacia*) (EP 331376)、假单胞菌属物种(*P. sp.*)菌株SD705 (WO 95/06720和WO 96/27002)、威斯康星假单胞菌(*P. wisconsinensis*) (WO 96/12012)的脂肪酶; GDSL-型链霉菌属(*Streptomyces*)脂肪酶(WO10/065455); 来自稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)的角质酶(WO 10/107560); 来自门多萨假单胞菌(*Pseudomonas mendocina*)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); 嗜热脂肪土芽孢杆菌(*Geobacillus stearothermophilus*)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(*Streptomyces griseus*) (WO 11/150157)和始旋链霉菌(*S. pristinaespiralis*) (WO 12/137147)的脂肪酶。

[0153] 其他实例是脂肪酶变体, 例如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中描述的那些。

[0154] 优选的商业脂肪酶产品包括Lipolase 100T/L、Lipex 100T/L、Lipex 105T、Lipex Evity 100L、Lipex Evity 200L(全部来自诺维信公司)、Preferenz® L 100(杜邦公司)。

[0155] 仍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(WO09/67279)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)的商业化产品Gentle Power Bleach中所用的S54V

变体) (WO 10/100028)。

[0156] 淀粉酶

[0157] 合适的淀粉酶包括 α -淀粉酶或葡糖淀粉酶并且可以是细菌或真菌来源的。包括化学修饰的突变体或蛋白质工程化的突变体。淀粉酶包括例如从芽孢杆菌属,例如地衣芽孢杆菌的特定菌株(更详细地描述于GB 1,296,839中)获得的 α -淀粉酶。

[0158] 合适的淀粉酶包括具有WO 95/10603中的SEQ ID NO:2的淀粉酶或与SEQ ID NO:3具有90%序列同一性的其变体。优选的变体描述于WO 94/02597、WO 94/18314、WO 97/43424中以及WO 99/019467的SEQ ID NO:4中,如在以下位置的一个或多个中具有取代的变体:15、23、105、106、124、128、133、154、156、178、179、181、188、190、197、201、202、207、208、209、211、243、264、304、305、391、408和444。

[0159] 不同的合适的淀粉酶包括具有WO 02/010355中的SEQ ID NO:6的淀粉酶或与SEQ ID NO:6具有90%序列同一性的其变体。SEQ ID NO:6的优选的变体是在位置181和182处具有缺失并且在位置193处具有取代的那些。

[0160] 其他合适的淀粉酶是包含示于WO 2006/066594的SEQ ID NO:6中的衍生自解淀粉芽孢杆菌的 α -淀粉酶的残基1-33和示于WO 2006/066594的SEQ ID NO:4中的地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶的残基36-483的杂合 α -淀粉酶或其具有90%序列同一性的变体。

[0161] 其他实例是淀粉酶变体,例如WO 2011/098531、WO 2013/001078和WO 2013/001087中所述的那些。

[0162] 可商购的淀粉酶为DuramylTM、TermamylTM、FungamylTM、StainzymeTM、Stainzyme PlusTM、NatalaseTM、Liquozyme X和BANTM Amplify; Amplify Prime; (来自诺维信公司)、以及RapidaseTM、PurastarTM/EffectenzTM、Powerase、Preferenz S1000、Preferenz S100和Preferenz S110(来自杰能科国际有限公司(Genencor International Inc.)/杜邦公司)。

[0163] 过氧化物酶/氧化酶

[0164] 合适的过氧化物酶/氧化酶包括植物、细菌、或真菌来源的那些。包括化学修饰的突变体或蛋白质工程化的突变体。有用的过氧化物酶的实例包括来自鬼伞属(Coprinus),例如来自灰盖鬼伞(C.cinereus)的过氧化物酶,及其变体,如在WO 93/24618、WO 95/10602和WO 98/15257中描述的那些。可商购的过氧化物酶包括GuardzymeTM(诺维信公司)。

[0165] 适合的过氧化物酶优选是由国际生物化学与分子生物学联合会(IUBMB)命名委员会(Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology)陈述的酶分类EC 1.11.1.7,或源自其中的表现出过氧化物酶活性的任何片段构成的过氧化物酶。

[0166] 适合的过氧化物酶还包括卤代过氧化物酶,例如氯过氧化物酶、溴过氧化物酶以及表现出氯过氧化物酶或溴过氧化物酶活性的化合物。根据其对卤素离子的特异性将卤代过氧化物酶进行分类。氯过氧化物酶(E.C.1.11.1.10)催化氯离子形成次氯酸盐。卤代过氧化物酶可以是氯过氧化物酶。优选地,卤代过氧化物酶是钒卤代过氧化物酶,即含钒酸盐的卤代过氧化物酶。在优选方法中,将含钒酸盐的卤代过氧化物酶与氯离子来源组合。

[0167] 已从许多不同真菌,特别是从暗色丝孢菌(dematiaceous hyphomycetes)真菌组中分离出了卤代过氧化物酶,如卡尔黑霉属(Caldariomyces)(例如,煤卡尔黑霉(C.fumago))、链格孢属(Alternaria)、弯孢属(Curvularia)(例如,疣枝弯孢

(*C. verruculosa*) 和不等弯孢 (*C. inaequalis*)、内脐蠕孢属 (*Drechslera*)、细基格孢属 (*Ulocladium*) 以及葡萄孢属 (*Botrytis*)。

[0168] 还已从细菌如假单胞菌属 (例如吡咯假单胞菌 (*P. pyrrocinia*)) 和链霉菌属 (例如, 金色链霉菌 (*S. aureofaciens*)) 中分离出了卤代过氧化物酶。

[0169] 卤代过氧化物酶可衍生自弯孢属物种, 特别是疣枝弯孢或不等弯孢, 如 W0 95/27046 中所述的不等弯孢 CBS 102.42; 或如描述于 W0 97/04102 中的疣枝弯孢 CBS 147.63 或疣枝弯孢 CBS 444.70; 或衍生自如描述于 W0 01/79459 中的哈特乐比内脐蠕孢 (*Drechslera hartlebii*)、如描述于 W0 01/79458 中的盐沼小树状霉 (*Dendryphiella salina*)、如描述于 W0 01/79461 中的 *Phaeotrichoconis crotalarie*、或如描述于 W0 01/79460 中的 *Geniculosporium* 属物种。

[0170] 适合的氧化酶特别地包括由酶分类 EC 1.10.3.2 所构成的任何漆酶或源自其的表现出漆酶活性的任何片段、或表现出类似活性的化合物, 例如儿茶酚氧化酶 (EC 1.10.3.1)、邻氨基苯酚氧化酶 (EC 1.10.3.4) 或胆红素氧化酶 (EC 1.3.3.5)。

[0171] 优选的漆酶是微生物来源的酶。这些酶可以衍生自植物、细菌或真菌 (包括丝状真菌和酵母)。

[0172] 来自真菌的合适的实例包括可衍生自以下的菌株的漆酶: 曲霉属, 脉孢菌属 (*Neurospora*) (例如, 粗糙脉孢菌 (*N. crassa*)), 柄孢壳菌属 (*Podospora*), 葡萄孢属, 金钱菌属 (*Collybia*), 层孔菌属 (*Fomes*), 香菇属 (*Lentinus*), 侧耳属 (*Pleurotus*), 栓菌属 (*Trametes*) (例如, 长绒毛栓菌 (*T. villosa*) 和变色栓菌 (*T. versicolor*)), 丝核菌属 (*Rhizoctonia*) (例如, 立枯丝核菌 (*R. solani*)), 拟鬼伞属 (*Coprinopsis*) (例如, 灰盖拟鬼伞 (*C. cinerea*)、毛头拟鬼伞 (*C. comatus*)、弗瑞氏拟鬼伞 (*C. friesii*) 及褶皱鬼伞 (*C. plicatilis*)), 小脆柄菇属 (*Psathyrella*) (例如, 白黄小脆柄菇 (*P. condelleana*)), 斑褶菇属 (*Panaeolus*) (例如, 蝶形斑褶菇 (*P. papilionaceus*)), 毁丝霉属 (*Myceliophthora*) (例如, 嗜热毁丝霉 (*M. thermophila*)), 柱顶孢霉属 (*Schytalidium*) (例如, 嗜热柱顶孢霉 (*S. thermophilum*)), 多孔菌属 (*Polyporus*) (例如, 非褶菌目多孔菌 (*P. pinsitus*)), 射脉菌属 (*Phlebia*) (例如, 射脉侧菌 (*P. radiata*)) (W0 92/01046) 或革盖菌属 (*Coriolus*) (例如, 毛革盖菌 (*C. hirsutus*)) (JP 2238885)。

[0173] 来自细菌的合适的实例包括可衍生自芽孢杆菌属的菌株的漆酶。

[0174] 优选的是衍生自拟鬼伞属或毁丝霉属的漆酶; 特别是衍生自灰盖拟鬼伞的漆酶, 如披露于 W0 97/08325 中; 或来源于嗜热毁丝霉, 如披露于 W0 95/33836 中。

[0175] 地衣多糖酶

[0176] 地衣多糖酶 (或地衣聚糖酶) (例如 EC 3.2.1.73) 水解含有 (1,3)-和 (1,4)-键的 β -D-葡聚糖中的 (1,4)- β -D-糖苷键并且可以作用于地衣淀粉和谷类 β -D-葡聚糖, 但不作用于仅含有 1,3-键或 1,4-键的 β -D-葡聚糖。

[0177] 果胶裂解酶

[0178] 果胶裂解酶通过消除途径催化 α -1,4-D-聚半乳糖醛酸 (galacturonan) (即, 同聚半乳糖醛酸或多聚半乳糖醛酸) 的裂解, 从而在 +1 亚位点的 C4 和 C5 之间留下双键, 并且在 -1 亚位点留下还原糖。果胶裂解酶还可具有果胶裂解酶活性。

[0179] 洗涤剂产品的配制

[0180] 本发明的洗涤剂组合物可以处于任何常规形式,例如条,均匀的片剂,具有两层或更多层的片剂,具有一个或多个室的袋,规则的或压缩的粉末,颗粒,糊剂,凝胶,或规则的、压缩的或浓缩的液体。

[0181] 袋可以被配置为单一室或多室。它可以具有合适的用于容持组合物的任何形式、形状和材料,例如在与水接触之前,不使组合物从袋中释放出来。该袋由水溶性膜制成,它包含了一个内部体积。可以将所述内部体积分成袋的室。优选的膜是聚合物材料,优选地形成膜或薄片的聚合物。优选的聚合物、共聚物或其衍生物是经选择的聚丙烯酸酯、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,聚合物在膜例如PVA中的水平是至少约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,这些共混组合物包含可水解降解并且水溶性聚合物共混物,如聚乳酸和聚乙烯醇(已知在贸易参考号M8630下,如由美国印第安纳州的MonoSol有限责任公司(MonoSol LLC)销售)加增塑剂,像甘油、乙二醇、丙二醇、山梨醇及其混合物。袋可以包含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含有固体的室不同:US 2009/0011970 A1。

[0182] 可以由水可溶的袋中的室或以片剂的不同层来将洗涤剂成分彼此物理分开。因此,可以避免组分间的不良的储存相互作用。在洗涤溶液中,每个室的不同溶解曲线还可以引起所选择的组分的延迟溶解。

[0183] 非单位剂量的液体或凝胶洗涤剂可以是水性的,典型地含有按重量计至少20%并且最多达95%的水,如多达约70%的水、多达约65%的水、多达约55%的水、多达约45%的水、多达约35%的水。包括但不限于链烷醇、胺、二醇、醚、以及多元醇的其他类型的液体可以被包括在水性液体或凝胶中。水性液体或凝胶洗涤剂可以含有从0-30%的有机溶剂。液体或凝胶洗涤剂可以是非水性的。

[0184] 洗衣皂条

[0185] 本发明的GCL I可以被添加至洗衣皂条中并且用于手洗衣物、织物和/或纺织品。术语洗衣皂条包括洗衣条、皂条、组合条(combo bar)、合成洗涤剂条、以及洗涤剂条。条的类型的通常区别在于他们含有的表面活性剂的类型,并且术语洗衣皂条包括含有来自脂肪酸的皂和/或合成皂的那些。洗衣皂条具有在室温下为固体而非液体、凝胶、或粉末的物理形式。术语固体被定义为不随时间显著变化的物理形式,即如果固体物体(例如洗衣皂条)被放置在容器里,该固体物体不会为了填充其被放置的容器而发生改变。该条是固体时典型地是条的形式但也可以是其他的固体形状诸如圆形或椭圆。

[0186] 该洗衣皂条可以包含一个或多个另外的酶、蛋白酶抑制剂如肽醛类(或次硫酸盐加合物或半缩醛加合物)、硼酸、硼酸盐、硼砂和/或苯基硼酸衍生物如4-甲酰基苯基硼酸、一个或多个皂或合成的表面活性剂、多元醇如甘油、pH控制化合物如脂肪酸、柠檬酸、乙酸和/或甲酸、和/或一价阳离子和有机阴离子的盐,其中该一价阳离子可以是例如 Na^+ 、 K^+ 或 NH_4^+ 并且该有机阴离子可以是例如甲酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐或乳酸盐,这样使得一价阳离子和有机阴离子的盐可以是例如甲酸钠。

[0187] 洗衣皂条还可以包含复合剂像EDTA和HEDP、香料和/或不同类型的填料、表面活性

剂例如阴离子合成表面活性剂、助洗剂、聚合的污垢释放剂、洗涤剂螯合剂、稳定剂、填料、染料、着色剂、染料转移抑制剂、烷氧基化的聚碳酸酯、抑泡剂、结构剂、黏合剂、浸出剂、漂白活化剂、粘土去污剂、抗再沉积剂、聚合分散剂、增亮剂、织物柔软剂、香料和/或本领域已知的其他化合物。

[0188] 洗衣皂条可以在常规的洗衣皂条制造设备中进行加工,如但不限制于混合器、压条机例如双级真空压条机、挤出机、切割机、标识压模机 (logo-stamper)、冷却隧道以及包装机。本发明不局限于通过任何单一方法制备洗衣皂条。可以在过程的不同阶段向皂中添加本发明的预混料。例如,可以制备含有皂、GCL I、任选地一种或多种另外的酶、蛋白酶抑制剂以及一价阳离子和有机阴离子的盐的预混料,然后将该混合物压条。可以同时添加作为例如处于液态的蛋白酶抑制剂的GCL I以及任选的另外的酶。除了混合步骤和压条步骤以外,该过程还可以进一步包括研磨、挤出、切割、压模、冷却和/或包装的步骤。

[0189] 本发明的实施例

[0190] 在以下实施例中进一步定义本发明:

[0191] E(1) 一种洗涤剂组合物,该洗涤剂组合物包含脂肪酶以及至少一种表面活性剂,其特征在于脂肪酶对不饱和长脂肪酰基链(例如,油酸)的活性与对饱和短酰基链(例如,丁酸盐或戊酸盐)的活性的比率为4或更高,例如6、8或10。

[0192] E(2) 一种洗涤剂组合物,该洗涤剂组合物包含白地霉脂肪酶I (GCL I) 和至少一种表面活性剂,以及任选地一种或多种酶。

[0193] E(3) 根据前述实施例中任一项所述的洗涤剂组合物,其中该脂肪酶与SEQ ID NO: 1具有至少70%的同一性,例如与SEQ ID NO:1具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%的同一性。

[0194] E(4) 根据E(1) 和E(2) 中任一项所述的洗涤剂组合物,其中该脂肪酶与SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6具有100%的同一性。

[0195] E(5) 根据E(1) 至E(3) 中任一项所述的洗涤剂组合物,其中与SEQ ID NO:1相比,该脂肪酶包含1至10个氨基酸取代,优选是保守氨基酸取代。

[0196] E(6) 根据E(1) 至E(5) 中任一项所述的洗涤剂组合物,其中在该洗涤剂组合物中以活性酶蛋白(AEP) 计算的GCL I 的量为从0.1mg AEP/g洗涤剂组合物至50mg AEP/g洗涤剂组合物,例如0.1mg AEP/g洗涤剂组合物至40mg AEP/g洗涤剂组合物、例如0.1mg AEP/g洗涤剂组合物至30mg AEP/g洗涤剂组合物、例如0.1mg AEP/g洗涤剂组合物至20mg AEP/g洗涤剂组合物、例如0.1mg AEP/g洗涤剂组合物至10mg AEP/g洗涤剂组合物、例如0.2mg AEP/g洗涤剂组合物至50mg AEP/g洗涤剂组合物、例如0.2mg AEP/g洗涤剂组合物至40mg AEP/g洗涤剂组合物、例如0.2mg AEP/g洗涤剂组合物至30mg AEP/g洗涤剂组合物、例如0.2mg AEP/g洗涤剂组合物至20mg AEP/g洗涤剂组合物、例如0.2mg AEP/g洗涤剂组合物至10mg AEP/g洗涤剂组合物。

[0197] E(7) 一种用于在洗涤周期期间去除纺织品中脂质的方法,该方法包括使该纺织品与洗涤剂组合物接触,该洗涤剂组合物包含白地霉脂肪酶I (GCL I) 和至少一种表面活性剂以及任选地一种或多种酶。

[0198] E(8) 根据E(7) 所述的方法,其中该脂肪酶与SEQ ID NO:1具有至少70%、80%、

85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%的同源性。

[0199] E(9)根据E(7)和E(8)中任一项所述的方法,其中该脂肪酶与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6具有100%的同源性。

[0200] E(10)一种用于纺织品的洗涤方法,该方法包括:

[0201] a.将纺织品暴露于洗涤液

[0202] i.该洗涤液包含白地霉脂肪酶I(GCL I),或

[0203] ii.包含根据实施例(E1)至E(6)中任一项所述的洗涤剂组合物;

[0204] b.完成至少一个洗涤周期,以及

[0205] c.任选地漂洗该纺织品。

[0206] E(11)根据E(10)所述的洗涤方法,其中该洗涤液的温度在5℃至90℃的范围内、或在10℃至80℃的范围内、或在10℃至70℃的范围内、或在10℃至60℃的范围内、或在10℃至50℃的范围内、或在15℃至40℃的范围内、或在20℃至30℃的范围内。

[0207] E(12).根据E(10)或E(11)中任一项所述的洗涤方法,其中当获得基本上相同的脂质去除水平时,与具有SEQ ID NO:3的脂肪酶的气味产生相比,来自该湿和/或干纺织品的气味较低,其中该气味产生通过感官分析或如通过固相微萃取气相色谱法测量所测定的丁酸释放来测量。

[0208] E(13)根据E(12)所述的洗涤方法,其中当通过例如Terg-0-tometer(TOM)洗涤分析获得基本上相同的脂质去除水平时,与具有SEQ ID NO:3的脂肪酶的气味产生相比,该气味产生至少低2倍,例如低3倍,其中该气味产生通过感官分析或如通过固相微萃取气相色谱法测量所测定的丁酸释放来测量。

[0209] E(14)根据前述实施例中任一项所述的洗涤剂组合物、方法和洗涤方法,该洗涤剂组合物进一步包含一种或多种选自由以下组成的组的酶:蛋白酶、淀粉酶、脱氧核糖核酸酶、木葡聚糖酶、果胶酶、果胶裂解酶、黄原胶酶、过氧化物酶、卤代过氧合酶、纤维素酶、地衣多糖酶、脂肪酶、角质酶、过氧化氢酶、氧化酶、阿拉伯糖酶、半乳聚糖酶和甘露聚糖酶。

[0210] E(15)根据E(1)至E(6)中任一项所述的洗涤剂组合物用于通过向该洗涤剂组合物中添加GCL I减少该洗涤剂加载量同时保持该洗涤剂组合物基本上相同的洗涤性能来改善洗涤剂组合物的可持续性特征的用途。

[0211] E(16)洗涤液中的根据E(1)至E(6)中任一项所述的洗涤剂组合物用于去除纺织品上脂质污渍的用途,其中该洗涤液包含从约0.2g洗涤剂组合物/L洗涤液至约5g洗涤剂组合物/L洗涤液,例如0.3至4.5g洗涤剂组合物/L洗涤液、0.4至4g洗涤剂组合物/L洗涤液或0.5或3.5g洗涤剂组合物/L洗涤液。

[0212] E(17)根据E(7)至E(13)中任一项所述的方法,其中该洗涤液包含从约0.2g洗涤剂组合物/L洗涤液至约5g洗涤剂组合物/L洗涤液,例如0.3至4.5g洗涤剂组合物/L洗涤液、0.4至4g洗涤剂组合物/L洗涤液或0.5至3.5g洗涤剂组合物/L洗涤液。

[0213] E(18)根据E(1)至E(17)中任一项所述的洗涤剂组合物、方法或用途,其中该GCL I包含一种或多种,例如2、3、4、5、6、7、8或9种选自由以下组成的组的变化:I70F、I83L、A278T、G281S、E284D、E381Q、A402S、K501Q、S509A、K511R、S538T、T541N和F543Y,其中根据SEQ ID NO:2采用段落“对应于”中所概述的设置进行编号。

[0214] E(19)根据E(1)至E(18)中任一项所述的洗涤剂组合物、方法或用途,其中GCL I包含变化S509A和K511R,其中根据SEQ ID NO:2采用段落“对应于”中所概述的设置进行编号。

[0215] E(20)根据E(1)至E(18)中任一项所述的洗涤剂组合物、方法或用途,其中GCL I包含变化S538T、T541N和F543Y,其中根据SEQ ID NO:2采用段落“对应于”中所概述的设置进行编号。

[0216] E(21)根据E(1)至E(18)中任一项所述的洗涤剂组合物、方法或用途,其中GCL I包含变化T541N和F543Y,其中根据SEQ ID NO:2采用段落“对应于”中所概述的设置进行编号。

[0217] E(22)根据E(1)至E(18)中任一项所述的洗涤剂组合物、方法或用途,其中GCL I包含变化I70F、I83L、A278T、G281S、E284D、E381Q、A402S、K501Q、S509A,其中根据SEQ ID NO:2采用段落“对应于”中所概述的设置进行编号。

[0218] E(23)根据E(1)至E(6)中任一项所述的洗涤剂组合物,该洗涤剂组合物进一步包含0.05-20wt%鼠李糖脂,例如1-15wt%鼠李糖脂、例如2-10wt%鼠李糖脂、例如3-9wt%鼠李糖脂、例如4-8wt%鼠李糖脂。

[0219] E(24)根据E(23)所述的洗涤剂组合物用于预防在洗衣期间污垢再沉积的用途。

[0220] E(25)一种用于预防在洗涤纺织品期间污垢再沉积的方法,所述方法包括:

[0221] a. 将纺织品暴露于洗涤液,该洗涤液包含根据E(23)所述的洗涤剂组合物

[0222] b. 完成至少一个洗涤周期,以及

[0223] c. 任选地漂洗该纺织品。

[0224] 实验

[0225] 洗涤剂

[0226] 实验中使用的商业洗涤剂

[0227] 在洗衣实验中使用商业洗涤剂Ecover非生物液。

[0228]	Ecover非生物液
	水
	脂肪醇乙氧基化物C12-18
	月桂基硫酸钠
	油酸钾
	变性醇
	柠檬酸钠
	乙二胺二琥珀酸三钠
	聚对苯二甲酸丙二酯
	香料
	柠檬酸
	甘油
	柠檬烯
	芳樟醇

[0229] 表1:Ecover非生物洗涤剂中的组分

[0230] 实验中使用的模式洗涤剂

[0231] 在洗衣实验中使用了以下模式洗涤剂:

	化合物	化合物的含量 (% w/w)
[0232]	月桂基硫酸钠 (SLS)	5.0
	烷基糖苷 (APG)	4.0
	可可皂	2.0

[0233]	N,N-二(羧甲基)谷氨酸 (GLDA)	0.75
	甘油	2.5
	EtOH	2.5
	H ₂ O, 离子交换	83.25

[0234] 表2: 模式1洗涤剂

[0235]	化合物	化合物的含量(%w/w)
	槐糖脂	4.9
	可可皂	5.6
	N,N-二(羧甲基)谷氨酸(GLDA)	1.1
	甘油	15
	EtOH	6
	KOH	1.4
	H ₂ O, 离子交换	66

[0236] 表3: 模式2洗涤剂

[0237] 用于确定脂肪酶活性的pNP测定

[0238] 原理

[0239] 底物pNP-底物在标准条件下经脂肪分解酶水解。pNP-戊酸酯用作饱和短链脂肪酸的实例。作为酰基基团的戊酸可被长链脂肪酸例如油酸所替代。

[0240] pNP-底物的水解产生黄色溶液,在405nm处测量的该溶液的吸光度为该脂肪分解酶的活性的函数。

[0241] 通过改变pNP底物,可确定脂肪酶对具有长脂肪酰基链(例如油酸)的不饱和底物的活性与对具有短酰基链(例如对硝基苯丁酸酯和/或对硝基苯戊酸酯)的不饱和底物的活性之间的比率。底物的变化可能需要调整例如缓冲系统,这些调整显而易见地在技术人员知识领域内。

[0242] 脂肪酶活性

[0243] 将酶在缓冲液中稀释

[0244] 底物: 相关的pNP底物(例如pNp-戊酸酯, σN-4377) 1mM于缓冲液中,由甲醇中的100mM储备溶液制备

[0245] 缓冲液: 将50mM TRIS, 0.4% Triton X-100配制成pH 7.7

步骤	制备
1	在甲醇中将底物原料制备成 100 mM 112 mg pNp-戊酸酯在 5 ml 甲醇中。 必须将该溶液在暗瓶中保存或用铝箔包裹，以避免日光照射。 在-18°C 保存该溶液 每 2 周换新
2	将酶稀释至对应于 $V_{max} < 70$ mAbs/分钟的浓度
3	制备底物： 0.1 ml pNp-戊酸酯储备溶液 9.9 ml 缓冲液
步骤	测定
1	样品： 经稀释的酶 20 微升 pNP-底物 150 微升
2	参考： 缓冲液 20 微升 pNP-底物 150 微升 每一个测定必须包括参照
3	测量是在 405 nm 处以动力学测量完成的。
4	设置： 波长： 405 nm 时间： 10:00 分钟。 间隔 10 秒。 读段： 61 自动混合： 一次 延迟时间： 0 结束时间： 10:00 ODmin： 0 ODmax： 2
5	结果： 从测量点计算 V_{max}

[0246]

[0247] 根据以下计算结果：

[0248] $[V_{max}(\text{酶}) - V_{max}(\text{缓冲液})] / [\text{标准曲线斜率}]$

[0249] 用于酶标仪分光光度计(分子仪器公司(Molecular Devices)Spectramax190)的微量滴定板(赛默科技公司269620 96F无盖微孔板)可以便利地用于通过基于使用对硝基苯酚酯的标准法来确定脂肪酶活性。

[0250] Terg-0-tometer (TOM) 洗涤测定

[0251] Terg-0-tometer (TOM) 是一种中等规模模式洗涤系统,它可以应用于同时测试16种不同的洗涤条件。TOM基本上是大型的具有多达16个开放金属烧杯(1000mL)淹没至其中的温度受控的水浴。每个烧杯构成一个小的顶装式洗衣机并且在实验期间,每个烧杯将含有特定洗涤剂/酶系统的溶液并且在弄脏的和未弄脏的织物上测试其性能。通过旋转搅拌臂获得机械应力,该旋转搅拌臂搅拌在每个烧杯内的液体。

[0252] TOM模式洗涤系统主要用于在US或拉丁美洲/亚太(LA/AP)洗涤条件下的洗涤剂和酶的中等规模测试。在TOM实验中,因素如压载物与污垢的比率和织物与洗涤液的比率可以变化。因此,TOM提供了在小规模实验(如AMSA和微型洗涤)与在上开门式洗衣机中的更-费时的全-规模实验之间的联系。

[0253] GCL I的序列同一性

[0254] 如段落“序列同一性”所定义的,已对SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6之间的序列同一性进行计算,结果如下:

	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
SEQ ID NO: 1	100.00	99.63	99.08	99.26	98.35
[0255] SEQ ID NO: 2	99.63	100.00	99.45	99.63	98.35
SEQ ID NO: 4	99.08	99.45	100.00	99.82	97.79
SEQ ID NO: 5	99.26	99.63	99.82	100.00	97.98
SEQ ID NO: 6	98.35	98.35	97.79	97.98	100.00

[0256] 表4:GCL I的序列同一性

[0257] 实例

[0258] 实例1:Terg-0-tometer (TOM) 洗涤

[0259] 通过添加CaCl₂、MgCl₂和NaHCO₃将水硬度调节至下述强度。如下所述,在桶中制备具有所希望的量的洗涤剂、温度和水硬度的洗涤溶液。在磁力搅拌过程中将洗涤剂溶解10分钟(洗涤溶液在制备后30分钟至60分钟内使用)。

[0260] 在Terg-0-Tometer中,根据以下设置设定水浴中的温度和转速(转/分钟)。当根据设置调节温度(+/-1°C)时,将洗涤溶液根据下文描述的量添加至TOM烧杯。

[0261] 在烧杯中以120rpm进行搅拌。将2份的自制的猪脂污渍和2份来自Equest公司的CS-10乳脂污渍添加至每个烧杯并且根据下文所述的时间进行洗涤。每个烧杯中的每个污渍类型都有2个副本。将布样在冷自来水中漂洗10分钟,并黑暗中干燥过夜。将猪脂污渍放在分析天平(348-AV-50)上称重。将CS-10乳脂污渍切成直径2cm并用于气味测量。

[0262] 纺织品:将蓝色针织棉布样(WFK80A, 5x 5cm, 来自沃里克Equest有限公司(Warwick Equest Ltd), 55单元, 康塞特商业园(Consett Business Park), 康塞特, 达勒姆郡, DH8 6BN, 英国)在100°C下加热20分钟,之后在室温下放置60min。将猪脂(在75°C水浴中加热, 100微升)涂在每一个布样上并在100°C下加热20分钟,然后在室温下放置60分钟。在

分析天平 (348-AV-50) 上称重。CS-10 (乳脂) 污渍获得自BV测试材料中心 (Center For Testmaterials BV), 邮箱120,3133KT, 弗拉尔丁恩, 荷兰。

[0263] 表1.1: 实验条件

[0264]		欧洲 (EU) 条件
	洗涤剂	Ecover非生物液
	洗涤剂剂量	2.33g/L和0.47g/L
	水硬度	15° dH (Ca ²⁺ :Mg ²⁺ :HCO ₃ ⁻ = 4:1:7.5)
	酶	SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:3
	洗涤溶液中的酶浓度	0.1或5mg总或活性酶蛋白/L
	测试溶液体积	1000mL
	洗涤时间	30分钟
	转速	120rpm
	pH	按原样
	温度	30°C

[0265] TOM洗涤的结果在下表1.2 (脂质去除) 和表2.1 (气味) 中示出。

[0266] 表1.2 脂质去除

	20% Ecover 非生物液			100% Ecover 非生物液		
	无酶	SEQ ID NO: 3 0.1 ppm AEP	SEQ ID NO: 1 5 ppm TEP	无酶	SEQ ID NO: 3 0.1 ppm AEP	SEQ ID NO: 1 5 ppm TEP
[0267] 脂质去除%	-4.96	8.87	30.1	17.4	24.9	24.1
StdDev	0.215	2.46	3.37	0.84	0.40	1.28

[0268] 在完全配制的洗涤剂 (100% Ecover非生物液) 中, 以0.1ppm添加的SEQ ID NO:3 和以5ppm添加的SEQ ID NO:1产生了相似的脂质去除效果。同时, 在减少的洗涤剂中, 当使用SEQ ID NO:3时脂质去除效果降低, 而SEQ ID NO:1增强了脂质去除效果, 这证实GCL I可在减少的洗涤剂水平下使用。

[0269] 实例2: 气味测量

[0270] 通过固相微萃取气相色谱法测量进行的气味检测。

[0271] 使用以下方法, 通过固相微提取气相色谱法 (SPME-GC) 测量来自脂肪酶洗涤的布样的丁酸释放 (气味)。

[0272] 如上文所规定的将棉纺织品洗涤并在洗涤后使用滤纸将多余水分从纺织品中去除, 然后将纺织品在25°C下干燥2小时。每次用四片洗涤并干燥的纺织品 (直径5mm) 进行SPME-GC测量, 所述纺织品被转移到气相色谱仪 (GC) 小瓶并且将小瓶封闭。将样品在30°C下孵育24小时, 并且随后加热至140°C持续30分钟, 并且储存在20°C-25°C持续至少4小时, 之后进行分析。在配备有Stabilwax-DA w/Integra-Guard柱 (30m, 0.32mm ID和0.25um df) 和

Carboxen PDMS SPME纤维 (85微米)的Varian 3800GC上进行分析。在纺织晶片上的顶部空间(head space)中,用SPME纤维在50℃下进行从每个GC小瓶的取样,持续8分钟,且随后将取样的化合物注射到柱上(注射器温度=250℃)。柱流速=2ml氦气/分钟。柱加热炉温度梯度:0分钟=50℃,2分钟=50℃,6分45秒=240℃,11分45秒=240℃。使用火焰离子化检测器(Flame Ionization Detector,FID)进行检测,并且使用可靠的标准鉴定出丁酸的保留时间。

[0273] 表2.1气味产生(曲线下面积)

	20% Ecover 非生物液			100% Ecover 非生物液		
	无酶	SEQ ID NO: 3 0.1 ppm AEP	SEQ ID NO: 1 5 ppm TEP	无酶	SEQ ID NO: 3 0.1 ppm AEP	SEQ ID NO: 1 5 ppm TEP
[0274] 气味产生	10138	750193	180824	3989	489409	150961
StdDev	8004	60458	17988	1715	67053	2121

[0275] 在完全配制的洗涤剂(100% Ecover非生物液)中,SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:1产生相似的脂质去除效果(参见表1.2),但使用SEQ ID NO:3产生的气味显著更高。同时,与完全配制的洗涤剂相比,在减少的洗涤剂水平(20%)下,SEQ ID NO:3的气味产生进一步增加,然而完全配制的洗涤剂与减少的洗涤剂(20%)相比,SEQ ID NO:1的气味产生仅略微增加且远低于20%洗涤剂中的SEQ ID NO:3,这证实与具有SEQ ID NO:3的脂肪酶相比,GCL I可在减少的洗涤剂水平下使用,同时保持良好的脂质去除效果(实例1)和显著减少的气味产生。

[0276] 实例3:含和不含鼠李糖脂的模式1洗涤剂的性能和气味产生

[0277] 将0或14wt%鼠李糖脂(RL)添加至模式洗涤剂1中,如实例1和实例2中所述评估脂质去除和气味,不同的是实验条件如表3.1中所概述。

[0278] 表3.1:实验条件

[0279]	欧洲条件
洗涤剂剂量	模式1:1.23g/L
洗涤溶液中的脂肪酶浓度	0.1或5mg酶蛋白/L
水硬度	15° dH(Ca ²⁺ :Mg ²⁺ :HCO ₃ ⁻ =4:1:7.5)
测试溶液体积	1000ml
洗涤时间	50分钟
转速	120rpm
pH	按原样
温度	30℃

[0280] 当将鼠李糖脂添加至模式洗涤剂1中时,GCL I在脂质去除方面的性能通常会增强(表3.2)。

[0281] 表3.2脂质去除

		模式 1											
无酶		SEQ ID NO: 3 0.1 ppm AEP		SEQ ID NO: 1 5 ppm TEP		SEQ ID NO: 2 5 ppm TEP		SEQ ID NO: 5 5 ppm TEP		SEQ ID NO: 4 5 ppm TEP			
		不含 RL	含 RL	不含 RL	含 RL	不含 RL	含 RL	不含 RL	含 RL	不含 RL	含 RL	不含 RL	含 RL
脂质去 除%		7.8	9.4	40.4	67.8	54.2	89.9	45.6	41.2	66.2	94.3	71.4	94.2
StdDev		1.8	1.5	3.7	2.3	3.3	2.8	3.1	2.2	4.5	1.2	0.8	2.8

[0283] 当将鼠李糖脂添加至模式洗涤剂1中时,通常可以看到GCL I在减少气味方面的性能增强(表3.3) :

[0284] 表3.3气味产生(曲线下面积)

		模式 1											
无酶		SEQ ID NO: 3 0.1 ppm AEP		SEQ ID NO: 1 5 ppm TEP		SEQ ID NO: 2 5 ppm TEP		SEQ ID NO: 5 5 ppm TEP		SEQ ID NO: 4 5 ppm TEP			
		不含 RL	含 RL	不含 RL	含 RL	不含 RL	含 RL	不含 RL	含 RL	不含 RL	含 RL	不含 RL	含 RL
气味产 生		8962	8338	1582	1729	8519	5517	9817	1571	3248	1733	4694	5498
StdDev		1048	1000	7764	8193	2358	2061	2564	5163	3827	1881	1254	6644
		3	0	9	3	8	1	2	4	9	96	3	

[0286] 实例4:含和不含鼠李糖脂情况下的纺织品上的再沉积

[0287] 表4.1:实验条件

	欧洲条件
洗涤剂剂量	模式 2: 1.61 g/L
洗涤溶液中的脂肪酶浓度	0.1 或 5 mg 酶蛋白/L
Medley Delicate 300L 的剂量*	67 mg/L
水硬度	15°dH (Ca ²⁺ :Mg ²⁺ :HCO ₃ ⁻ = 4:1:7.5)

[0289]	测试溶液体积	1000 ml
	洗涤时间	50 分钟
	转速	120 rpm
	pH	按原样
	温度	30°C

[0290] *Medley Delicate 300L是来自诺维信公司(Novozymes)的商业酶共混物

[0291] 如前所述,在TOM洗涤设置中引用以下数据,但进行了以下更改:使用商业污渍代替猪脂污渍。将熟牛脂污渍(WE5BBPC2)与带有胡萝卜色素的猪脂(NZ-H002)、带有胡萝卜色素的鸡脂(NZ-H009)、带有胡萝卜色素的羊脂(NZ-H013)、带有着色剂的乳脂(CS-10)一同洗涤。将布样(每一类型2条)和包括Medley Delicate 300L(66.7mg/L)的酶以及鼠李糖(0wt%或7wt%)添加至烧杯中并在30°C下洗涤50分钟。将布样在冷自来水中漂洗5分钟。将布样在干燥橱中的滤纸之间分类并干燥,而不加热过夜。对污渍周围的纺织品(周围的纺织品)和污渍进行反射测量。

[0292] 将洗涤性能测量为所洗涤的纺织品的颜色的亮度,以反射值(REM)或强度单位表示。使用Macbeth 7000Color Eye分光光度计进行反射测量。测量每个干燥的布样。由于存在来自背景的干扰风险,在测量反射期间将布样置于2层织物的顶部。在460nm处测量反射。不包括UV滤光片。计算布样的反射的平均结果。

[0293] 表4.2中描绘的结果清楚地示出了添加的鼠李糖脂减轻了纺织品上污垢的再沉积。

[0294] 表4.2含和不含鼠李糖脂情况下的周围的纺织品上的再沉积

	模式 2					
	无酶		SEQ ID NO: 3 0.1 ppm AEP		SEQ ID NO: 1 5 ppm TEP	
	不含 RL	含 RL	不含 RL	含 RL	不含 RL	含 RL
[0295]						
反射 (460 nm) 周围的纺织品	70.0	73.7	71.1	74.8	78.3	79.9
StdDev 周围的纺织品	1.8	1.2	0.6	1.4	0.3	0.8

[0296] 对不同污渍的洗涤性能在表4.3中示出,并且据观察GCL I (SEQ ID NO:1)的性能优于具有SEQ ID NO:3的脂肪酶的性能。

[0297] 表4.3

	模式洗涤剂 2					
	无酶		SEQ ID NO: 3 0.1 ppm AEP		SEQ ID NO: 1 5 ppm TEP	
	不含 RL	含 RL	不含 RL	含 RL	不含 RL	含 RL
反射 (460 nm) 熟牛脂	41.9	41.1	46.8	42.9	53.4	57.8
StdDev 熟牛脂	0.7	1.1	0.7	0.2	1.4	0.7
反射 (460 nm) 猪脂/胡萝卜脂	43.0	40.7	41.3	43.2	52.4	57.4
StdDev 猪脂/胡萝卜脂	0.6	0.8	1.8	1.3	0.5	0.2
反射 (460 nm) 鸡脂	48.3	47.1	47.1	48.4	53.0	54.3
StdDev 鸡脂	0.4	0.8	0.3	0.7	0.6	0.6
反射 (460 nm) 羊脂	41.6	40.7	41.3	43.2	46.9	52.8
StdDev 羊脂	0.6	1.5	1.0	1.1	1.0	0.5
反射 (460 nm) 乳脂	44.6	45.0	44.5	44.5	44.3	45.7
StdDev 乳脂	0.3	0.5	0.5	0.4	0.9	0.7

[0298] 实例5:GCL I的发酵和纯化

[0300] 为了大规模生产脂肪酶,如WO 04/032648所述,在黑曲霉中性淀粉酶II启动子的控制下,将表达脂肪酶的米曲霉的重组株在含有150ml DAP-4C-1培养基的500ml带挡板的烧瓶中培养(WO 12/103350)。将培养物在旋转台上在30°C的温度以100RPM振荡4天。将培养液通过穿过0.22um过滤单元与细胞材料分离。

[0301] 随后将培养的上清液通过凝胶过滤Sephadex G-25和阴离子交换Q-sepharose Fast Flow进行提纯。如下进行培养上清液的纯化:将培养液通过Nalgene 0.2um过滤单元过滤以去除宿主细胞。将经过滤的上清液施加到在50mM Hepes (pH 7.6)中平衡的1000mL Sephadex G-25柱(思拓凡公司(Cytiva))上。使用50mM Hepes (pH 7.6)将酶从柱上洗脱,收集级分。

[0302] 将级分池施加到在50mM Hepes (pH 7.6)中平衡的50mL Q-sepharose快流柱(思拓凡公司)上。在将柱用平衡缓冲液洗涤之后,将GCL-1使用50mM Hepes、1M NaCl (pH 7.6)缓冲液利用线性NaCl梯度(0-1M NaCl)经五个柱体积进行洗脱。将级分通过SDS-PAGE分析,并将级分(其中在考马斯染色的SDS-PAGE凝胶上仅观察到一个条带)合并为纯化的酶制剂并用于进一步的实验。

[0303] 由于具有SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5的GCL1的样品已被冷藏(冷藏柜),将其使用尺寸排阻进行另外步骤的纯化。根据早期的研究,冷藏后观察到GCL 1的一些聚集,因此决定使用尺寸排阻来去除/避免GCL1样品的聚集。尺寸排阻使用Sephadex G25 PD-10柱和以下重力方案进行:

[0304] • 将PD-10柱使用20mM HEPES pH 7.0,0.1M NaCl缓冲液经4个柱体积进行平衡。弃去流过液体。

[0305] • 将分别具有SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5的2.5mL GCL1样品添加至pr.柱,并且该样品完全进入到填充床柱,弃去流过液体。

[0306] • 最后,使用3.5mL 20mM HEPES pH 7.0,0.1M NaCl缓冲液将这些柱进行洗脱并收集洗脱液。

序列表

<110> 诺维信公司(Novozymes A/S)

<120> 具有低恶臭产生的脂肪酶

<130> 15215-W0-PCT

<160> 6

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 544

<212> PRT

<213> 白地霉(Geotrichum candidum)

<400> 1

Gln Ala Pro Thr Ala Val Leu Asn Gly Asn Glu Val Ile Ser Gly Val
 1 5 10 15
 Leu Glu Gly Lys Val Asp Thr Phe Lys Gly Ile Pro Phe Ala Asp Pro
 20 25 30
 Pro Val Gly Asp Leu Arg Phe Lys His Pro Gln Pro Phe Thr Gly Ser
 35 40 45
 Tyr Gln Gly Leu Lys Ala Asn Asp Phe Ser Ser Ala Cys Met Gln Leu
 50 55 60
 Asp Pro Gly Asn Ala Ile Ser Leu Leu Asp Lys Val Val Gly Leu Gly
 65 70 75 80
 Lys Ile Ile Pro Asp Asn Leu Arg Gly Pro Leu Tyr Asp Met Ala Gln
 85 90 95
 Gly Ser Val Ser Met Asn Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn Val Phe Arg
 100 105 110
 Pro Ala Gly Thr Lys Pro Asp Ala Lys Leu Pro Val Met Val Trp Ile
 115 120 125
 Tyr Gly Gly Ala Phe Val Phe Gly Ser Ser Ala Ser Tyr Pro Gly Asn
 130 135 140
 Gly Tyr Val Lys Glu Ser Val Glu Met Gly Gln Pro Val Val Phe Val
 145 150 155 160
 Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Gly Pro Tyr Gly Phe Leu Gly Gly Asp Ala
 165 170 175
 Ile Thr Ala Glu Gly Asn Thr Asn Ala Gly Leu His Asp Gln Arg Lys
 180 185 190
 Gly Leu Glu Trp Val Ser Asp Asn Ile Ala Asn Phe Gly Gly Asp Pro
 195 200 205
 Asp Lys Val Met Ile Phe Gly Glu Ser Ala Gly Ala Met Ser Val Ala

210	215	220
His Gln Leu Val Ala Tyr Gly Gly Asp Asn Thr Tyr Asn Gly Lys Gln		
225	230	235
Leu Phe His Ser Ala Ile Leu Gln Ser Gly Gly Pro Leu Pro Tyr Phe		
	245	250
Asp Ser Thr Ser Val Gly Pro Glu Ser Ala Tyr Ser Arg Phe Ala Gln		
	260	265
Tyr Ala Gly Cys Asp Ala Ser Ala Gly Asp Asn Glu Thr Leu Ala Cys		
	275	280
Leu Arg Ser Lys Ser Ser Asp Val Leu His Ser Ala Gln Asn Ser Tyr		
290	295	300
Asp Leu Lys Asp Leu Phe Gly Leu Leu Pro Gln Phe Leu Gly Phe Gly		
305	310	315
Pro Arg Pro Asp Gly Asn Ile Ile Pro Asp Ala Ala Tyr Glu Leu Tyr		
	325	330
Arg Ser Gly Arg Tyr Ala Lys Val Pro Tyr Ile Thr Gly Asn Gln Glu		
	340	345
Asp Glu Gly Thr Ile Leu Ala Pro Val Ala Ile Asn Ala Thr Thr Thr		
	355	360
Pro His Val Lys Lys Trp Leu Lys Tyr Ile Cys Ser Glu Ala Ser Asp		
370	375	380
Ala Ser Leu Asp Arg Val Leu Ser Leu Tyr Pro Gly Ser Trp Ser Glu		
385	390	395
Gly Ala Pro Phe Arg Thr Gly Ile Leu Asn Ala Leu Thr Pro Gln Phe		
	405	410
Lys Arg Ile Ala Ala Ile Phe Thr Asp Leu Leu Phe Gln Ser Pro Arg		
	420	425
Arg Val Met Leu Asn Ala Thr Lys Asp Val Asn Arg Trp Thr Tyr Leu		
	435	440
Ala Thr Gln Leu His Asn Leu Val Pro Phe Leu Gly Thr Phe His Gly		
	450	455
Ser Asp Leu Leu Phe Gln Tyr Tyr Val Asp Leu Gly Pro Ser Ser Ala		
465	470	475
Tyr Arg Arg Tyr Phe Ile Ser Phe Ala Asn His His Asp Pro Asn Val		
	485	490
Gly Thr Asn Leu Lys Gln Trp Asp Met Tyr Thr Asp Ala Gly Arg Glu		
	500	505
Met Leu Gln Ile His Met Ile Gly Asn Ser Met Arg Thr Asp Asp Phe		
	515	520
		525

Arg Ile Glu Gly Ile Ser Asn Phe Glu Ser Asp Val Thr Leu Phe Gly
 530 535 540
 <210> 2
 <211> 544
 <212> PRT
 <213> 白地霉(Geotrichum candidum)
 <400> 2
 Gln Ala Pro Thr Ala Val Leu Asn Gly Asn Glu Val Ile Ser Gly Val
 1 5 10 15
 Leu Glu Gly Lys Val Asp Thr Phe Lys Gly Ile Pro Phe Ala Asp Pro
 20 25 30
 Pro Val Gly Asp Leu Arg Phe Lys His Pro Gln Pro Phe Thr Gly Ser
 35 40 45
 Tyr Gln Gly Leu Lys Ala Asn Asp Phe Ser Ser Ala Cys Met Gln Leu
 50 55 60
 Asp Pro Gly Asn Ala Ile Ser Leu Leu Asp Lys Val Val Gly Leu Gly
 65 70 75 80
 Lys Ile Ile Pro Asp Asn Leu Arg Gly Pro Leu Tyr Asp Met Ala Gln
 85 90 95
 Gly Ser Val Ser Met Asn Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn Val Phe Arg
 100 105 110
 Pro Ala Gly Thr Lys Pro Asp Ala Lys Leu Pro Val Met Val Trp Ile
 115 120 125
 Tyr Gly Gly Ala Phe Val Phe Gly Ser Ser Ala Ser Tyr Pro Gly Asn
 130 135 140
 Gly Tyr Val Lys Glu Ser Val Glu Met Gly Gln Pro Val Val Phe Val
 145 150 155 160
 Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Gly Pro Tyr Gly Phe Leu Gly Gly Asp Ala
 165 170 175
 Ile Thr Ala Glu Gly Asn Thr Asn Ala Gly Leu His Asp Gln Arg Lys
 180 185 190
 Gly Leu Glu Trp Val Ser Asp Asn Ile Ala Asn Phe Gly Gly Asp Pro
 195 200 205
 Asp Lys Val Met Ile Phe Gly Glu Ser Ala Gly Ala Met Ser Val Ala
 210 215 220
 His Gln Leu Val Ala Tyr Gly Gly Asp Asn Thr Tyr Asn Gly Lys Gln
 225 230 235 240
 Leu Phe His Ser Ala Ile Leu Gln Ser Gly Gly Pro Leu Pro Tyr Phe
 245 250 255

Asp Ser Thr Ser Val Gly Pro Glu Ser Ala Tyr Ser Arg Phe Ala Gln
 260 265 270
 Tyr Ala Gly Cys Asp Ala Ser Ala Gly Asp Asn Glu Thr Leu Ala Cys
 275 280 285
 Leu Arg Ser Lys Ser Ser Asp Val Leu His Ser Ala Gln Asn Ser Tyr
 290 295 300
 Asp Leu Lys Asp Leu Phe Gly Leu Leu Pro Gln Phe Leu Gly Phe Gly
 305 310 315 320
 Pro Arg Pro Asp Gly Asn Ile Ile Pro Asp Ala Ala Tyr Glu Leu Tyr
 325 330 335
 Arg Ser Gly Arg Tyr Ala Lys Val Pro Tyr Ile Thr Gly Asn Gln Glu
 340 345 350
 Asp Glu Gly Thr Ile Leu Ala Pro Val Ala Ile Asn Ala Thr Thr Thr
 355 360 365
 Pro His Val Lys Lys Trp Leu Lys Tyr Ile Cys Ser Glu Ala Ser Asp
 370 375 380
 Ala Ser Leu Asp Arg Val Leu Ser Leu Tyr Pro Gly Ser Trp Ser Glu
 385 390 395 400
 Gly Ala Pro Phe Arg Thr Gly Ile Leu Asn Ala Leu Thr Pro Gln Phe
 405 410 415
 Lys Arg Ile Ala Ala Ile Phe Thr Asp Leu Leu Phe Gln Ser Pro Arg
 420 425 430
 Arg Val Met Leu Asn Ala Thr Lys Asp Val Asn Arg Trp Thr Tyr Leu
 435 440 445
 Ala Thr Gln Leu His Asn Leu Val Pro Phe Leu Gly Thr Phe His Gly
 450 455 460
 Ser Asp Leu Leu Phe Gln Tyr Tyr Val Asp Leu Gly Pro Ser Ser Ala
 465 470 475 480
 Tyr Arg Arg Tyr Phe Ile Ser Phe Ala Asn His His Asp Pro Asn Val
 485 490 495
 Gly Thr Asn Leu Lys Gln Trp Asp Met Tyr Thr Asp Ser Gly Lys Glu
 500 505 510
 Met Leu Gln Ile His Met Ile Gly Asn Ser Met Arg Thr Asp Asp Phe
 515 520 525
 Arg Ile Glu Gly Ile Ser Asn Phe Glu Ser Asp Val Thr Leu Phe Gly
 530 535 540
 <210> 3
 <211> 269
 <212> PRT

<213> 疏棉状嗜热丝孢菌(Thermomyces lanuginosus)

<400> 3

Cys Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe Asn Leu Phe Ala Gln Tyr
 1 5 10 15
 Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn Arg Ala Pro Ala Gly Thr
 20 25 30
 Asn Ile Thr Cys Thr Ala Asn Ala Cys Pro Glu Val Glu Lys Ala Asp
 35 40 45
 Ala Thr Val Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser Gly Val Gly Asp Val Thr
 50 55 60
 Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys Leu Ile Val Leu Ser Phe
 65 70 75 80
 Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile Gly Asn Leu Asn Phe Glu
 85 90 95
 Leu Ile Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly Cys Arg Gly His Ala Gly
 100 105 110
 Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp Thr Leu Arg Gln Lys Val
 115 120 125
 Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr Arg Val Val Phe Thr Gly
 130 135 140
 His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val Ala Gly Ala Asp Leu Arg
 145 150 155 160
 Gly Asn Lys Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser Tyr Gly Ala Pro Arg Val
 165 170 175
 Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr Val Gln Thr Gly Gly Thr
 180 185 190
 Leu Tyr Arg Ile Thr Ser Thr Asn Asp Ile Val Pro Arg Leu Pro Pro
 195 200 205
 Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro Glu Phe Trp Ile Lys Ser
 210 215 220
 Gly Thr Leu Val Pro Val Arg Arg Cys Asp Ile Val Lys Ile Glu Gly
 225 230 235 240
 Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro Asn Ile Pro Ser Ile Thr
 245 250 255
 Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly Thr Cys Leu
 260 265

<210> 4

<211> 544

<212> PRT

290	295	300
Asp Leu Lys Asp Leu Phe Gly Leu Leu Pro Gln Phe Leu Gly Phe Gly		
305	310	315
Pro Arg Pro Asp Gly Asn Ile Ile Pro Asp Ala Ala Tyr Glu Leu Tyr		
	325	330
Arg Ser Gly Arg Tyr Ala Lys Val Pro Tyr Ile Thr Gly Asn Gln Glu		
	340	345
Asp Glu Gly Thr Ile Leu Ala Pro Val Ala Ile Asn Ala Thr Thr Thr		
	355	360
Pro His Val Lys Lys Trp Leu Lys Tyr Ile Cys Ser Glu Ala Ser Asp		
370	375	380
Ala Ser Leu Asp Arg Val Leu Ser Leu Tyr Pro Gly Ser Trp Ser Glu		
385	390	395
Gly Ala Pro Phe Arg Thr Gly Ile Leu Asn Ala Leu Thr Pro Gln Phe		
	405	410
Lys Arg Ile Ala Ala Ile Phe Thr Asp Leu Leu Phe Gln Ser Pro Arg		
	420	425
Arg Val Met Leu Asn Ala Thr Lys Asp Val Asn Arg Trp Thr Tyr Leu		
435	440	445
Ala Thr Gln Leu His Asn Leu Val Pro Phe Leu Gly Thr Phe His Gly		
450	455	460
Ser Asp Leu Leu Phe Gln Tyr Tyr Val Asp Leu Gly Pro Ser Ser Ala		
465	470	475
Tyr Arg Arg Tyr Phe Ile Ser Phe Ala Asn His His Asp Pro Asn Val		
	485	490
Gly Thr Asn Leu Lys Gln Trp Asp Met Tyr Thr Asp Ser Gly Lys Glu		
	500	505
Met Leu Gln Ile His Met Ile Gly Asn Ser Met Arg Thr Asp Asp Phe		
	515	520
Arg Ile Glu Gly Ile Ser Asn Phe Glu Thr Asp Val Asn Leu Tyr Gly		
530	535	540
<210> 5		
<211> 544		
<212> PRT		
<213> 白地霉 (Geotrichum candidum)		
<400> 5		
Gln Ala Pro Thr Ala Val Leu Asn Gly Asn Glu Val Ile Ser Gly Val		
1	5	10
Leu Glu Gly Lys Val Asp Thr Phe Lys Gly Ile Pro Phe Ala Asp Pro		

	20	25	30
Pro Val Gly Asp Leu Arg Phe Lys His Pro Gln Pro Phe Thr Gly Ser			
	35	40	45
Tyr Gln Gly Leu Lys Ala Asn Asp Phe Ser Ser Ala Cys Met Gln Leu			
	50	55	60
Asp Pro Gly Asn Ala Ile Ser Leu Leu Asp Lys Val Val Gly Leu Gly			
65	70	75	80
Lys Ile Ile Pro Asp Asn Leu Arg Gly Pro Leu Tyr Asp Met Ala Gln			
	85	90	95
Gly Ser Val Ser Met Asn Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn Val Phe Arg			
	100	105	110
Pro Ala Gly Thr Lys Pro Asp Ala Lys Leu Pro Val Met Val Trp Ile			
	115	120	125
Tyr Gly Gly Ala Phe Val Phe Gly Ser Ser Ala Ser Tyr Pro Gly Asn			
	130	135	140
Gly Tyr Val Lys Glu Ser Val Glu Met Gly Gln Pro Val Val Phe Val			
145	150	155	160
Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Gly Pro Tyr Gly Phe Leu Gly Gly Asp Ala			
	165	170	175
Ile Thr Ala Glu Gly Asn Thr Asn Ala Gly Leu His Asp Gln Arg Lys			
	180	185	190
Gly Leu Glu Trp Val Ser Asp Asn Ile Ala Asn Phe Gly Gly Asp Pro			
	195	200	205
Asp Lys Val Met Ile Phe Gly Glu Ser Ala Gly Ala Met Ser Val Ala			
	210	215	220
His Gln Leu Val Ala Tyr Gly Gly Asp Asn Thr Tyr Asn Gly Lys Gln			
225	230	235	240
Leu Phe His Ser Ala Ile Leu Gln Ser Gly Gly Pro Leu Pro Tyr Phe			
	245	250	255
Asp Ser Thr Ser Val Gly Pro Glu Ser Ala Tyr Ser Arg Phe Ala Gln			
	260	265	270
Tyr Ala Gly Cys Asp Ala Ser Ala Gly Asp Asn Glu Thr Leu Ala Cys			
	275	280	285
Leu Arg Ser Lys Ser Ser Asp Val Leu His Ser Ala Gln Asn Ser Tyr			
	290	295	300
Asp Leu Lys Asp Leu Phe Gly Leu Leu Pro Gln Phe Leu Gly Phe Gly			
305	310	315	320
Pro Arg Pro Asp Gly Asn Ile Ile Pro Asp Ala Ala Tyr Glu Leu Tyr			
	325	330	335

Arg Ser Gly Arg Tyr Ala Lys Val Pro Tyr Ile Thr Gly Asn Gln Glu
 340 345 350
 Asp Glu Gly Thr Ile Leu Ala Pro Val Ala Ile Asn Ala Thr Thr Thr
 355 360 365
 Pro His Val Lys Lys Trp Leu Lys Tyr Ile Cys Ser Glu Ala Ser Asp
 370 375 380
 Ala Ser Leu Asp Arg Val Leu Ser Leu Tyr Pro Gly Ser Trp Ser Glu
 385 390 395 400
 Gly Ala Pro Phe Arg Thr Gly Ile Leu Asn Ala Leu Thr Pro Gln Phe
 405 410 415
 Lys Arg Ile Ala Ala Ile Phe Thr Asp Leu Leu Phe Gln Ser Pro Arg
 420 425 430
 Arg Val Met Leu Asn Ala Thr Lys Asp Val Asn Arg Trp Thr Tyr Leu
 435 440 445
 Ala Thr Gln Leu His Asn Leu Val Pro Phe Leu Gly Thr Phe His Gly
 450 455 460
 Ser Asp Leu Leu Phe Gln Tyr Tyr Val Asp Leu Gly Pro Ser Ser Ala
 465 470 475 480
 Tyr Arg Arg Tyr Phe Ile Ser Phe Ala Asn His His Asp Pro Asn Val
 485 490 495
 Gly Thr Asn Leu Lys Gln Trp Asp Met Tyr Thr Asp Ser Gly Lys Glu
 500 505 510
 Met Leu Gln Ile His Met Ile Gly Asn Ser Met Arg Thr Asp Asp Phe
 515 520 525
 Arg Ile Glu Gly Ile Ser Asn Phe Glu Ser Asp Val Asn Leu Tyr Gly
 530 535 540
 <210> 6
 <211> 544
 <212> PRT
 <213> 白地霉(Geotrichum candidum)
 <400> 6
 Gln Ala Pro Thr Ala Val Leu Asn Gly Asn Glu Val Ile Ser Gly Val
 1 5 10 15
 Leu Glu Gly Lys Val Asp Thr Phe Lys Gly Ile Pro Phe Ala Asp Pro
 20 25 30
 Pro Val Gly Asp Leu Arg Phe Lys His Pro Gln Pro Phe Thr Gly Ser
 35 40 45
 Tyr Gln Gly Leu Lys Ala Asn Asp Phe Ser Ser Ala Cys Met Gln Leu
 50 55 60

370	375	380
Ala Ser Leu Asp Arg Val Leu Ser Leu Tyr Pro Gly Ser Trp Ser Glu		
385	390	395
Gly Ser Pro Phe Arg Thr Gly Ile Leu Asn Ala Leu Thr Pro Gln Phe		
	405	410
Lys Arg Ile Ala Ala Ile Phe Thr Asp Leu Leu Phe Gln Ser Pro Arg		
	420	425
Arg Val Met Leu Asn Ala Thr Lys Asp Val Asn Arg Trp Thr Tyr Leu		
	435	440
Ala Thr Gln Leu His Asn Leu Val Pro Phe Leu Gly Thr Phe His Gly		
450	455	460
Ser Asp Leu Leu Phe Gln Tyr Tyr Val Asp Leu Gly Pro Ser Ser Ala		
465	470	475
Tyr Arg Arg Tyr Phe Ile Ser Phe Ala Asn His His Asp Pro Asn Val		
	485	490
Gly Thr Asn Leu Gln Gln Trp Asp Met Tyr Thr Asp Ala Gly Lys Glu		
	500	505
Met Leu Gln Ile His Met Ile Gly Asn Ser Met Arg Thr Asp Asp Phe		
	515	520
Arg Ile Glu Gly Ile Ser Asn Phe Glu Ser Asp Val Thr Leu Phe Gly		
530	535	540