



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113186178 A

(43) 申请公布日 2021.07.30

(21) 申请号 202110308080.7

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011.02.10

*C12N 9/28* (2006.01)

(30) 优先权数据

*C12N 15/56* (2006.01)

10153180.4 2010.02.10 EP

*C11D 3/386* (2006.01)

(62) 分案原申请数据

201180018387.8 2011.02.10

(71) 申请人 诺维信公司

地址 丹麦鲍斯韦

(72) 发明人 A. 斯文森 A.H. 约翰森

M.E. 比约恩瓦德 F.W. 拉斯马森

M. 斯科约特 S.E. 拉森 J. 奥布罗

S. 卡斯嘉德 L. 贝耶尔

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张文辉

权利要求书4页 说明书104页

序列表57页

(54) 发明名称

在螯合剂存在下具有高稳定性的变体和包含变体的组合物

(57) 摘要

本发明涉及相对于其亲本酶具有改善的针对螯合剂的稳定性的 $\alpha$ -淀粉酶变体,包含所述变体的组合物,编码所述变体的核酸,产生所述变体的方法和使用所述变体的方法。

1. 一种包含亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体的组合物,其中使用根据SEQ ID NO:6的编号,所述变体在一个或多个选自206,243,195,193,197,198,200,203,210,212和213的位置包含取代,并进一步包含至少一种螯合剂,其中当在21℃和pH 8.0测量时所述螯合剂在低于10mM的浓度能够将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM。

2. 根据权利要求1的组合物,其中具有淀粉分解活性的变体具有如下氨基酸序列,所述氨基酸序列与SEQ ID NO:6,8,10,12,18或20的成熟多肽具有优选至少60%,更优选至少65%,更优选至少70%,更优选至少75%,更优选至少80%,更优选至少85%,甚至更优选至少90%,并且最优选至少95%同一性。

3. 根据权利要求1或2的组合物,其中所述变体具有如下氨基酸序列,所述氨基酸序列与SEQ ID NO:10的成熟多肽具有优选至少70%,更优选至少75%,更优选至少80%,更优选至少85%,甚至更优选至少90%,并且最优选至少95%同一性。

4. 根据权利要求1-3中任一项的组合物,其中所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶序列通过至少一个下述取代修饰:位置206是[F,W,Y,N,L,I,V,H,Q,D或E];位置243是[F,W,Y,L,I或V];位置193是[G,A,S,T或M];位置195是[F,W,Y,L,I或V];位置197是[F,W,Y,L,I或V];位置198是[Q或N];位置200是[F,W,Y,L,I或V];位置203是[F,W,Y,L,I或V];位置210是[F,W,Y,L,I或V];位置212是[F,W,Y,L,I或V];或位置213是[G,A,S,T或M]。

5. 根据权利要求1-4中任一项的组合物,其中使用SEQ ID NO:6用于编号,所述变体在181,182,183或184的氨基酸区中进一步包含至少一个、至少两个、或至少三个缺失;优选地使用SEQ ID NO:6用于编号,在181,182,183或184的氨基酸区中包含两个缺失。

6. 根据权利要求1-5中任一项的组合物,其中所述变体选自下组:AA560+R181\*G182\*N195F;AA560+G182\*D183\*N195F;AA560+D183\*G184\*N195F;AA560+D183\*G184\*I206Y;AA560+D183\*G184\*Y243F;AA560+D183\*G184\*V206L,Y243F;AA560+D183\*G184\*N195F V206L;AA560+D183\*G184\*N195F Y243F;AA560+D183\*G184\*N195F V206L Y243F;AA560+D183\*G184\*N195F V206Y Y243F;AA560+R181\*G182\*N195F M202L;AA560+G182\*D183\*N195F M202L;AA560+D183\*G184\*N195F M202L;AA560+R181\*G182\*R118K N195F R320K R458K;AA560+G182\*D183\*R118K N195F R320K R458K;AA560+D183\*G184\*R118K N195F R320K R458K;AA560+D183\*G184\*R118K N195F I206L R320K R458K;AA560+D183\*G184\*R118K N195F I206Y R320K R458K;AA560+D183\*G184\*R118K N195F Y243F R320K R458K;AA560+D183\*G184\*R118K N195FI206L Y243F R320K R458K。

7. 根据权利要求1-6中任一项的组合物,其中所述变体选自下组:AA560+D183\*G184\*N195L;AA560+D183\*G184\*N197F;AA560+D183\*G184\*N197L;AA560+D183\*G184\*Y243F;AA560+D183\*G184\*N195F,AA560+D183\*G184\*N277F;AA560+D183\*G184\*S431T;AA560+D183\*G184\*A434T;AA560+D183\*G184\*I235N A339P;AA560+D183\*G184\*L351F;D183\*G184\*G186D N195F E212V V213A AA560+D183\*G184\*G186R,N195F;AA560+D183\*G184\*H210Y;AA560+D183\*G184\*I206Y;AA560+D183\*G184\*I206L;AA560+D183\*G184\*I206F;AA560+D183\*G184\*V213AQ174R;AA560+D183\*G184\*E212V;AA560+D183\*G184\*I206Y E212G G304V A447V;AA560+M116T G133E K142R D183\*G184\*Y198N I206Y;AA560+G133E D183\*G184\*N195Y Y198N Y200F;AA560+M116T D183\*G184\*N195Y Y198N;AA560+K142R P146S G149K D183\*G184\*N195Y Y198N I206I;AA560+E134Y D183\*G184\*;AA560+T151R D183\*G184\*H210Y

R320N R359I N418D;AA560+G147E G149R Q169E D183\*G184\*Y198N Y203F I206Y;AA560+G133E G149R D183\*G184\*N195Y Y198N Y203F I206Y;AA560+G147E Y152H Q169E D183\*G184\*Y198N I206Y;AA560+D183\*G184\*N195F I206Y;AA560+D183\*G184\*N195F I206L;AA560+D183\*G184\*N195F I206F;AA560+D183\*G184\*I206L Y243F;AA560+D183\*G184\*I206F Y243F;AA560+D183\*G184\*N195F Y243F;AA560+D183\*G184\*N195F H210Y;AA560+D183\*G184\*I206Y H210Y;AA560+D183\*G184\*V213A;AA560+D183\*G184\*S193T;AA560+D183\*G184\*G186T N195F;AA560+D183\*G184\*N195F I206Y Y243F,AA560+D183\*G184\*N195F I206L Y243F;AA560+D183\*G184\*N195F I206Y Y243F AA560+D183\*G184\*I206Y Y243F;AA560+D183\*G184\*I206L Y243F;AA560+D183\*G184\*N195Y;AA560+G133D G149R D183\*G184\*Y198N I206Y;AA560+M116T G133E G147E Y152H D183\*G184\*Y198N Y203F I206Y;AA560+G147E G149R D183\*G184\*N195F Y198N I206Y;AA560+G133E K142R D183\*G184\*N195F Y198N;AA560+G133E G149R Y152H D183\*G184\*N195Y Y198N I206Y;AA560+M116T Q129L K142R D183\*G184\*N195Y Y198N Y203F I206Y;AA560+G133E G149R Y152H D183\*G184\*N195Y Y198N Y203F I206Y;AA560+M116T G133E G149R G182\*D183\*Y198N Y203F I206Y;AA560+D183\*G184\*R118K N195F R320K R458K;AA560+D183\*G184\*R118K N195F I206L R320K R458K;AA560+D183\*G184\*R118K N195F I206Y R320K R458K;AA560+D183\*G184\*R118K N195F Y243F R320K R458K;AA560+D183\*G184\*R118K N195FI206L Y243F R320K R458K。

8. 根据权利要求1-7中任一项的组合物,其中所述变体与所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶相比具有改善的洗涤性能。

9. 根据权利要求1-8中任一项的组合物,其中所述螯合剂选自下组:EDTA, MGDA, EGTA, DTPA, DTPMP和HEDP。

10. 亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体,其中使用根据SEQ ID NO:6的编号,所述变体在对应于位置206,243,195,193,197,198,200,203,210,212和213的位置包含取代,并且其中所述变体具有 $\alpha$ -淀粉酶的活性,其中位置206的取代是F,W,Y,L,I,V,H或N;位置243的取代是F,W,Y,L,I或V;位置193的取代是[G,A,S,T或M];位置195的取代是[F,W,Y,L,I或V];位置197的取代是[F,W,Y,L,I或V];位置198的取代是[Q或N];位置200的取代是[F,W,Y,L,I或V];位置203的取代是[F,W,Y,L,I或V];位置210的取代是[F,W,Y,L,I或V];位置212的取代是[F,W,Y,L,I或V];和/或位置213的取代是[G,A,S,T或M]。

11. 权利要求10的亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体,其中使用SEQ ID NO:6用于编号,所述变体在181,182,183或184的氨基酸区中进一步包含至少一个、至少两个、或至少三个缺失;优选地使用SEQ ID NO:6用于编号,在181,182,183或184的氨基酸区中包含两个缺失。

12. 权利要求10或11的亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体,其中所述变体选自下组:AA560+R181\*G182\*N195F;AA560+G182\*D183\*N195F;AA560+D183\*G184\*N195F;AA560+D183\*G184\*I206Y;AA560+D183\*G184\*Y243F;AA560+D183\*G184\*V206L,Y243F;AA560+D183\*G184\*N195F V206L;AA560+D183\*G184\*N195F Y243F;AA560+D183\*G184\*N195F V206L Y243F;AA560+D183\*G184\*N195F V206Y Y243F;AA560+R181\*G182\*N195F M202L;AA560+G182\*D183\*N195F M202L;AA560+D183\*G184\*N195F M202L;AA560+R181\*G182\*R118K N195F R320K R458K;AA560+G182\*D183\*R118K N195F R320K R458K;AA560+D183\*G184\*R118K N195F R320K R458K;AA560+D183\*G184\*R118K N195F I206L R320K R458K;AA560+D183\*G184\*R118K

N195F I206Y R320K R458K;AA560+D183\*G184\*R118K N195F Y243F R320K R458K;AA560+D183\*G184\*R118K N195FI206L Y243F R320K R458K。

13. 权利要求10-12中任一项的亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体,其中所述变体选自下组:AA560+D183\*G184\*N195L;AA560+D183\*G184\*N197F;AA560+D183\*G184\*N197L;AA560+D183\*G184\*Y243F;AA560+D183\*G184\*N195F,AA560+D183\*G184\*N277F;AA560+D183\*G184\*S431T;AA560+D183\*G184\*A434T;AA560+D183\*G184\*I235N A339P;AA560+D183\*G184\*L351F;D183\*G184\*G186D N195F E212V V213A AA560+D183\*G184\*G186R,N195F;AA560+D183\*G184\*H210Y;AA560+D183\*G184\*I206Y;AA560+D183\*G184\*I206L;AA560+D183\*G184\*I206F;AA560+D183\*G184\*V213A Q174R;AA560+D183\*G184\*E212V;AA560+D183\*G184\*I206Y E212G G304V A447V;AA560+M116T G133E K142R D183\*G184\*Y198N I206Y;AA560+G133E D183\*G184\*N195Y Y198N Y200F;AA560+M116T D183\*G184\*N195Y Y198N;AA560+K142R P146S G149K D183\*G184\*N195Y Y198N I206I;AA560+E134Y D183\*G184\*;AA560+T151R D183\*G184\*H210Y R320N R359I N418D;AA560+G147E G149RQ169E D183\*G184\*Y198N Y203F I206Y;AA560+G133E G149R D183\*G184\*N195Y Y198N Y203F I206Y;AA560+G147E Y152H Q169E D183\*G184\*Y198N I206Y;AA560+D183\*G184\*N195F I206Y;AA560+D183\*G184\*N195F I206L;AA560+D183\*G184\*N195F I206F;AA560+D183\*G184\*I206L Y243F;AA560+D183\*G184\*I206F Y243F;AA560+D183\*G184\*N195F Y243F;AA560+D183\*G184\*N195F H210Y;AA560+D183\*G184\*I206Y H210Y;AA560+D183\*G184\*V213A;AA560+D183\*G184\*S193T;AA560+D183\*G184\*G186T N195F;AA560+D183\*G184\*N195FI206Y Y243F,AA560+D183\*G184\*N195F I206L Y243F;AA560+D183\*G184\*N195F I206Y Y243F AA560+D183\*G184\*I206Y Y243F;AA560+D183\*G184\*I206L Y243F;AA560+D183\*G184\*N195Y;AA560+G133D G149R D183\*G184\*Y198N I206Y;AA560+M116T G133E G147E Y152H D183\*G184\*Y198N Y203F I206Y;AA560+G147E G149R D183\*G184\*N195F Y198N I206Y;AA560+G133E K142R D183\*G184\*N195F Y198N;AA560+G133E G149R Y152H D183\*G184\*N195Y Y198N I206Y;AA560+M116T Q129L K142R D183\*G184\*N195Y Y198N Y203F I206Y;AA560+G133E G149R Y152H D183\*G184\*N195Y Y198N Y203F I206Y;AA560+M116T G133E G149R G182\*D183\*Y198N Y203F I206Y;AA560+D183\*G184\*R118K N195F R320K R458K;AA560+D183\*G184\*R118K N195F I206L R320K R458K;AA560+D183\*G184\*R118K N195F I206Y R320K R458K;AA560+D183\*G184\*R118K N195F Y243F R320K R458K;AA560+D183\*G184\*R118K N195F I206L Y243F R320K R458K。

14. 权利要求10-13中任一项的亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体,其中所述变体与所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶相比具有改善的洗涤性能。

15. 分离的核苷酸序列,其编码权利要求10至14中任一项的变体。

16. 重组宿主细胞,其包含权利要求15的核苷酸序列。

17. 用于制备多肽的方法,其包括

(a) 提供具有淀粉酶活性的亲本多肽的氨基酸序列;

(b) 在位置181,182,183或184的氨基酸区中产生两个缺失,并且进一步选择对应于SEQ ID NO:6的成熟多肽的位置206的位置,并进一步选择对应于位置210或243的位置;其中位置206的取代是F,W,Y,L,I,V,H或N;位置210的取代是F,W,Y,L,I或V;位置243的取代是F,W,

Y,L,I或V;

(c)通过取代选定的氨基酸残基来修饰所述序列;

(d)产生具有所述修饰序列的变体多肽;

(e)测试所述变体多肽的淀粉酶活性和稳定性;和

(f)选择在螯合剂存在下具有淀粉酶活性并相对于所述亲本多肽稳定性增加的变体多肽,其中在21℃和pH 8.0,所述螯合剂在低于10mM的浓度能够将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM。

18.Color Eye测量,其包括

洗涤性能表示为白度差值( $\Delta$  Rem);

样品的光反射衡量使用具有非常小,即0.7cm<sup>2</sup>(~0.7x1.0cm)的椭圆光圈的Macbeth Color Eye 7000反射分光光度计进行;

其中该测量在入射光中不含UV的情况下进行,并推出460nm的白度;

其中将待测量的样品置于相同类型的另一个样品之上,然后进行测量以减少来自将所述样品针对测量开口向上推送的活塞的反射;

其中对于各个样品的白度差值通过从用淀粉酶洗涤的样品的白度值减去未经添加淀粉酶洗涤的样品(对照)的白度值来计算。

## 在螯合剂存在下具有高稳定性的变体和包含变体的组合物

[0001] 本申请是申请日为2011年2月10日,申请号为“201510319549.1”,发明名称为“在螯合剂存在下具有高稳定性的变体和包含变体的组合物”的中国发明专利申请的分案申请。

[0002] 本发明是基于申请日为2011年2月10日,申请号为“201180018387.8”(国际申请号为PCT/EP2011/051982),发明名称为“在螯合剂存在下具有高稳定性的变体和包含变体的组合物”的专利申请的分案申请。

[0003] 涉及序列列表

[0004] 本申请包含计算机可读形式的序列列表。该计算机可读形式通过提述并入本文。

### 发明领域

[0005] 本发明涉及与其亲本酶相比针对螯合剂具有改善的稳定性的 $\alpha$ -淀粉酶变体,包含所述变体的组合物,编码所述变体的核酸,产生所述变体的方法,和使用所述变体的方法。

[0006] 发明背景

[0007]  $\alpha$ -淀粉酶( $\alpha$ -1,4-葡聚糖-4-葡聚糖水解酶,E.C.3.2.1.1)由一组酶组成,其催化淀粉和其它直链和支链1,4-糖苷寡糖和多糖的水解。

[0008]  $\alpha$ -淀粉酶在例如洗涤剂、烘焙、酿造、淀粉液化和糖化,如在制备高果糖糖浆或作为从淀粉产生乙醇的一部分中,具有悠久的产业应用历史。许多这些和其他的 $\alpha$ -淀粉酶应用使用来源于微生物的 $\alpha$ -淀粉酶,特别是细菌 $\alpha$ -淀粉酶。

[0009] 首先使用的细菌 $\alpha$ -淀粉酶中包括来自地衣芽孢杆菌(*B.licheniformis*)的 $\alpha$ -淀粉酶,也称作Termamyl,其已经得到广泛表征并已经确定了该酶的晶体结构。碱性淀粉酶,如源自披露于W0 95/26397中的芽孢杆菌属菌种的 $\alpha$ -淀粉酶,形成了用于洗涤剂的特定的 $\alpha$ -淀粉酶组。已经对很多这些已知的细菌淀粉酶进行了修饰,以改进它们在具体应用中的功能性。

[0010] Termamyl和很多高效 $\alpha$ -淀粉酶的活性都需要钙。发现Termamyl的晶体结构中四个钙原子通过带负电荷的氨基酸残基配位结合在 $\alpha$ -淀粉酶结构中。在其他 $\alpha$ -淀粉酶中,结合在结构中的钙离子的量可能不同。对于钙的需要存在强螯合化合物的应用中,如在洗涤剂或从全谷物产生乙醇的过程中是缺点。

[0011] 如上所述,众所周知多种酶依赖于钙或其他金属离子如酶或锌以供其活性和稳定性,因此在包含螯合剂的组合物,例如含有螯合剂的洗涤剂或供用于产生生物燃料、其中植物材料或含淀粉材料具有天然螯合剂成分如例如植酸的组合物中开发既稳定又显示良好性能的酶是一个挑战。举例而言,添加或掺入螯合剂以在洗涤过程中降低水硬度,保护可能还存在的漂白剂,且螯合剂亦对一些污迹的去除具有直接作用。钙依存性酶在洗涤剂中的稳定性有时可通过将钙添加至该洗涤剂而改善,但常常这样做会随即破坏污迹去除作用。此外,将钙添加至液体洗涤剂可导致配制上的问题,即洗涤剂的物理稳定性。

## 发明内容

[0012] 因此,提供如下 $\alpha$ -淀粉酶的组合物和变体会是有利的,其对于螯合剂是稳定的,并优选与亲本 $\alpha$ -淀粉酶相比具有得到保持或提高的洗涤性能。

[0013] 因此,本发明的第一个方面涉及组合物,其包含亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体,其中所述变体在选自使用根据SEQ ID NO:6编号的195、193、197、198、200、203、206、210、212、213和243的一个或多个位置包含取代,并且还包含至少一种螯合剂,其中当在21℃和pH 8.0测量时,所述螯合剂在低于10mM的浓度能够将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM。

[0014] 另一个方面涉及组合物,其包含亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体,其中所述变体在选自使用根据SEQ ID NO:6编号的195、193、197、198、200、203、206、210、212、213和243的一个或多个位置包含取代,并且还包含至少一种螯合剂,其中当在21℃和pH 8.0测量时,所述螯合剂能够在低于0.9倍能够将钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM的柠檬酸盐浓度的螯合剂浓度将游离钙离子浓度从2.0mM减少至0.10mM。

[0015] 本发明进一步涉及用于制备多肽的方法,包括:

[0016] (a) 提供具有淀粉酶活性的亲本多肽的氨基酸序列;

[0017] (b) 选择占据对应于SEQ ID NO:6的成熟多肽的位置195、197、198、200、203、206、210、212、213、243的一个或多个位置的一个或多个氨基酸,并进一步选择对应于位置116、118、129、133、142、146、147、149、151、152、169、174、186、235、244、303、320、339、359、418、431、434、447、458的一个或多个位置;

[0018] (c) 通过取代或缺失选定的氨基酸残基或邻接选定的氨基酸残基插入一个或多个氨基酸残基来修饰所述序列;

[0019] (d) 产生具有修饰序列的变体多肽;

[0020] (e) 测试所述变体多肽的淀粉酶活性和稳定性;和

[0021] (f) 选择在螯合剂存在下相对于亲本多肽稳定性增加并具有淀粉酶活性的变体多肽,其中在21℃和pH 8.0,所述螯合剂在低于10mM的浓度能够将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM。

[0022] 在一个优选的方面,本发明涉及亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体,所述变体在对应于选自195、197、198、200、203、206、210、212、213和243的位置的一个或多个位置包含改变,并进一步在对应于选自116、118、129、133、142、146、147、149、151、152、169、174、186、235、244、303、320、339、359、418、431、434、447和458的位置的一个或多个位置包含改变,其中

[0023] (a) 所述各改变独立地为

[0024] (i) 紧接着该位置下游并邻接该位置插入氨基酸,

[0025] (ii) 缺失占据该位置的氨基酸,和/或

[0026] (iii) 取代占据该位置的氨基酸,

[0027] (b) 该变体具有 $\alpha$ -淀粉酶活性;并且

[0028] (c) 每个位置对应于具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的酶的氨基酸序列的位置。

[0029] 在另一个方面,本发明涉及亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区中包含至少一个、至少两个或至少三个缺失,并进一步在选自195、197、198、200、203、206、210、212、213和243的一个或多个位置包含改变,并进一步在选自116、118、129、133、142、146、147、149、151、152、169、174、186、235、244、303、320、339、359、418、431、

434、447和458的一个或多个位置包含改变,其中

[0030] (a) 所述各改变独立地为

[0031] (i) 紧接着该位置下游并邻接该位置插入氨基酸,

[0032] (ii) 缺失占据该位置的氨基酸,和/或

[0033] (iii) 取代占据该位置的氨基酸,

[0034] (b) 该变体具有 $\alpha$ -淀粉酶活性;并且

[0035] (c) 每个位置对应于具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的酶的氨基酸序列的位置。

[0036] 本发明进一步涉及编码本发明的变体的分离的核苷酸序列和包含编码本发明的变体的核苷酸序列的重组宿主细胞。

[0037] 发明详述

[0038] 定义

[0039]  $\alpha$ -淀粉酶( $\alpha$ -1,4-葡聚糖-4-葡聚糖水解酶,E.C.3.2.1.1)由一组酶组成,其催化淀粉和其它直链和支链1,4-糖苷寡糖和多糖的水解。已知 $\alpha$ -淀粉酶来源于广泛选择范围的生物,包括细菌,如来自芽孢杆菌属(*Bacillus*)的种,例如地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*),来自真菌的种,如米曲霉(*Aspergillus oryzae*) (TAKA-淀粉酶)或黑曲霉(*Aspergillus niger*);来自植物如大麦和来自哺乳动物。

[0040] 野生型酶:术语“野生型” $\alpha$ -淀粉酶指由天然存在的微生物,如见于自然界的细菌、酵母或丝状真菌表达的 $\alpha$ -淀粉酶。当亲本酶并非变体酶时,术语“野生型酶”和“亲本酶”可互换使用。

[0041] 变体酶:术语“变体”在本文中定义为具有 $\alpha$ -淀粉酶活性的多肽,其在亲本或野生型 $\alpha$ -淀粉酶的一个或多个(或一个或几个)特定位置包含一个或多个(或一个或几个)氨基酸残基的改变,如取代、插入和/或缺失。优选少于50个修饰,更优选少于30个修饰。改变的 $\alpha$ -淀粉酶藉由通过修饰亲本 $\alpha$ -淀粉酶的人为介入来获得。

[0042] 亲本酶:术语“亲本” $\alpha$ -淀粉酶如用于本文中意指这样的 $\alpha$ -淀粉酶,本发明的变体 $\alpha$ -淀粉酶是对其进行修饰而产生的。该术语还指本发明的变体与之进行比较的多肽。所述亲本可为天然存在(野生型)的多肽,或甚至可为其通过任何合适手段制备的变体。举例而言,所述亲本蛋白可为天然存在的多肽的变体,其氨基酸序列经修饰或改变。因此,所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶可具有一个或多个(或一个或几个)氨基酸取代、缺失和/或插入。因此所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶可为亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体。亲本亦可为等位变体,其为由任何占据相同染色体基因座的基因的两种或更多种可选形式编码的多肽。

[0043] 改善的特性:术语“改善的特性”在本文中定义为与变体相关的特征,其相对于亲本 $\alpha$ -淀粉酶得到改善。此类改善的特性包括但不限于增加的淀粉分解活性,例如当如本文实施例部分中所述在EnzChek测定或PNP-G7测定中测量时,增加的洗涤性能,如污物性能,例如对含有淀粉的污物、污物去除、抗变灰色(anti-greying)的性能,稳定性例如热稳定性、pH稳定性或助洗剂包括螯合剂存在下的稳定性,在粉末、液体或凝胶洗涤剂配制物或洗碟组合物中的稳定性,改变的温度依存性性能和活性分布,pH活性,底物特异性,产物特异性和化学稳定性。洗涤性能和/或洗碟性能可如本申请中下文“材料和方法”中所述进行测量。优选本发明的变体包括改善的性质如改善的稳定性,改善的洗涤性能,改善的洗碟性能和/或改善的洗涤剂中的活性的组合。改善的稳定性包括在储藏过程中在浓缩洗涤剂产物



中的稳定性和在洗涤过程中在稀释洗涤剂中的稳定性。改善的特性包括在低温下改善的洗涤或洗碟性能。

[0044] 活性:在本文语境中,术语“活性”为淀粉分解活性,其通过在特定条件下在含有三个或更多个1,4- $\alpha$ -连接的D-葡萄糖单元的多糖中如例如在淀粉中,每单位时间和每单位酶蛋白水解的1,4- $\alpha$ -D糖苷键的数量来测量,例如,在特定条件下每mL以g计的酶蛋白的酶样品而获得的活性。所述活性可在例如下文中在“材料和方法”中所述的EnzChek测定或PNP-G7测定中测量。在本申请中,术语“活性”可与“淀粉分解活性”互换使用。术语“比活性”常用于描述每mL(或g)的酶蛋白获得的最大活性。

[0045] 改善的化学稳定性:术语“改善的化学稳定性”在本文中定义为变体酶在减少亲本酶的酶活性的天然存在或合成的一种或多种化学物存在下温育一段时间之后,呈现酶活性的保持。改善的化学稳定性亦可导致在此类化学物的存在下能够更好地催化反应的变体。在本发明的一个具体方面,所述改善的化学稳定性是在洗涤剂中,特别是在液体洗涤剂中改善的稳定性。所述改善的洗涤剂稳定性具体而言是当本发明的 $\alpha$ -淀粉酶变体混合入包含螯合剂的液体洗涤剂配制物中时,改善的 $\alpha$ -淀粉酶活性的稳定性,其中所述液体亦包括凝胶或糊剂。所述液体洗涤剂配制物可指在洗衣或自动洗碟过程中添加的浓缩的洗涤剂,或稀释的洗涤剂如洗涤溶液,即添加了所述浓缩洗涤剂的水溶液。

[0046] 在本发明中,液体洗涤剂具体而言可用作液体洗衣洗涤剂。

[0047] 稳定性:术语“稳定性”包括储藏稳定性和使用过程中,例如洗涤工艺过程或其他工业工艺中的稳定性,且淀粉酶的稳定性反映为时间的函数,例如,当将淀粉酶保持在溶液,特别是在洗涤剂溶液中,保留了多少活性。举例而言,所述 $\alpha$ -淀粉酶变体可在31°C下18小时之后,具有超过70%的剩余活性,即保留活性的量。所述稳定性受许多因素影响,例如pH,温度,洗涤剂组成例如助洗剂、表面活性剂等量和类型。淀粉酶稳定性使用“材料和方法”中所述的EnzCheck测定或PNP-G7测定来进行测量。

[0048] 改善的稳定性:术语“改善的稳定性”在本文中定义为变体酶呈现增加的稳定性,所述稳定性比亲本 $\alpha$ -淀粉酶的稳定性更高,例如,当在“材料和方法”中所述的EnzCheck测定中测量时,在31°C在1.5% (w/v) DTPA的存在下在pH 8下18小时之后,相对于亲本具有超过70%的剩余活性,或具有至少10pp剩余活性的改善。变体相对于亲本在剩余活性上的百分点(pp)改善计算为“材料和方法”中所述的变体的剩余活性和亲本的剩余活性之间的差异。

[0049] 助洗剂:助洗剂可通过M.K.Nagarajan等,JA0CS,Vol.61,no.9(September 1984), pp.1475-1478描述的测试进行分类以确定在溶液中在pH 8将水硬度从2.0mM(按CaCO<sub>3</sub>)降至0.10mM所需的最低助洗剂水平。所述助洗剂可具体而言为螯合剂,其与例如钙和镁离子形成水溶性络合物。

[0050] 螯合剂为与某些金属离子形成分子,使所述离子失活从而使其无法与其他元素反应的化学物,因此为通过形成螯合物抑制化学活性的结合剂。螯合作用是配体和单个中心原子之间的两个或更多个单独结合的存在或形成。所述配体可为任何有机化合物、硅酸根或磷酸根。在本文语境下,术语“螯合剂”包括与金属离子如钙和镁形成水溶性络合物的螯合剂、络合剂或掩蔽剂。螯合作用描述螯合配体对金属离子的亲和力相对于类似的一组非螯合配体对相同金属的亲力的增强。螯合剂具有与金属离子特别是钙(Ca<sup>2+</sup>)离子的结合

能力,并广泛应用于洗涤剂,和一般用于洗涤如洗衣或洗碟的组合物。然而,螯合剂自身呈现出抑制酶活性。在本申请中,术语螯合剂与“络合剂”或“螯合剂”可互换使用。

[0051] 由于大多数 $\alpha$ -淀粉酶具有钙敏感性,螯合剂的存在可影响酶活性。 $\alpha$ -淀粉酶的钙敏感性可通过将给定 $\alpha$ -淀粉酶在强螯合剂的存在下温育,并分析该温育对所述 $\alpha$ -淀粉酶的活性的影响来确定。钙敏感性 $\alpha$ -淀粉酶会在温育过程中丧失其活性的主要部分或全部。

[0052] 表征性螯合剂:如上所述,螯合作用描述螯合配体对金属离子的亲和力相对于一组类似的非螯合配体对相同金属的亲力的增强。然而,该螯合作用的强度可通过多种类型的测定或测量方法决定,由此根据其螯合作用(或强度)对螯合剂进行区分和排位。

[0053] 在一个优选的测定中,螯合剂可表征为其在pH 8.0将游离钙离子( $\text{Ca}^{2+}$ )浓度从2.0mM减少至0.10mM或更低的能力,例如通过以M.K.Nagarajan等,JAOCs,Vol.61,no.9 (September 1984),pp.1475-1478所述的方法为基础的测试进行。使用基于Nagarajan等的方法对螯合剂进行表征的实例描述于实施例2a。优选地,本发明的螯合剂涵盖当在21℃在pH 8.0下测量时,能够在低于10mM,优选低于9.5mM,优选低于9mM,优选低于8.5mM,优选低于8mM,优选低于7.5mM,优选低于7mM,优选低于6.5mM,优选低于6mM,优选低于5.5mM,优选地,优选低于5mM,优选低于4.5mM,低于4mM,优选低于3.5mM,优选低于3mM,优选低于2.5mM,优选低于2mM,优选低于1.5mM或优选低于1mM的浓度将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.1mM或更低的螯合剂。

[0054] 优选地,本发明的螯合剂涵盖当在21℃在pH 8,在80mM氯化钾和49mM EPPS((4-(2-羟乙基)哌嗪-1-丙磺酸))中测量时,能够在低于10mM,优选低于9.5mM,优选低于9mM,优选低于8.5mM,优选低于8mM,优选低于7.5mM,优选低于7mM,优选低于6.5mM,优选低于6mM,优选低于5.5mM,优选地,优选低于5mM,优选低于4.5mM,低于4mM,优选低于3.5mM,优选低于3mM,优选低于2.5mM,优选低于2mM,优选低于1.5mM或优选低于1mM的浓度将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.1mM的螯合剂。在一个具体的优选实施方案中,所述螯合剂当在pH 8和21℃,在80mM氯化钾和49mM EPPS中测量,并如“材料和方法”中所述使用钙离子选择性电极确定游离钙浓度时,能够将游离钙离子浓度从2.0mM减少至0.1mM。因此优选地,所述螯合剂涵盖当如“材料和方法”中所述在pH 8.0和21℃测试时,能够在低于10mM,优选低于9.5mM,优选低于9.0mM,优选低于8.5mM,优选低于8.0mM,优选低于7.5mM,优选低于7.0mM,优选低于6.5mM,优选低于6.0mM,优选低于5.5mM,优选地,优选低于5.0mM,优选低于4.5mM,低于4.0mM,优选低于3.5mM,优选低于3.0mM,优选低于2.5mM,优选低于2.0mM,优选低于1.5mM或优选低于1.0mM的浓度将游离钙离子浓度从2.0mM减少至0.10mM的螯合剂。

[0055] 在一个特别优选的实施方案中,所述螯合剂当在pH 8和21℃在80mM氯化钾和49mM EPPS中测量时,能够以9mM至0.5mM,优选9mM至1mM,优选8mM至1mM,优选7mM至1mM,优选6mM至1mM,优选5mM至1mM,优选4mM至1mM,优选3mM至1mM,优选2mM至1mM,优选9.0mM至1.5mM,优选8.0mM至1.5mM,优选7.0mM至1.5mM,优选6.0mM至1.5mM,优选5.0mM至1.5mM,优选4.0mM至1.5mM,优选3.0至1.5mM,优选2.5mM至1.0mM,优选2.0mM至1.1mM,优选1.85mM至1.0mM的浓度将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM。

[0056] 游离钙离子浓度从2.0mM  $\text{Ca}^{2+}$ 减少至0.10mM,对应于将水硬度从200ppm(按 $\text{CaCO}_3$ ,在酸性 $\text{CO}_2$ 存在下为 $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ 的形式)减少至10ppm。最低助洗剂水平从螯合剂的钠盐计算,并基于100%干螯合剂。

[0057] 螯合剂的螯合作用亦可相对于柠檬酸盐(citrate)测量。将能够将游离钙离子浓度的量从2.0mM减少至0.10mM的柠檬酸盐的浓度的值指定为1,并将螯合剂的结果与该值相比较。根据本发明优选的螯合剂当在pH 8.0和21℃测量时,能够以与柠檬酸盐的浓度相比低至低于0.9,如低于0.8,如低于0.7,如低于0.6,如低于0.5,如低于0.4,如低于0.3,如低于0.2,如低于0.1倍的浓度将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM。根据本发明优选的螯合剂当使用钙离子选择性电极确定游离钙浓度时,当在21℃和pH 8.0在80mM氯化钾和49mM EPPS中测量时,能够以与柠檬酸盐的浓度相比低至低于0.9,如低于0.8,如低于0.7,如低于0.6,如低于0.5,如低于0.4,如低于0.3,如低于0.2,如低于0.1倍的浓度将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM。

[0058] 在一个特别优选的实施方案中,当在pH 8.0和21℃测量时,所述螯合剂能够以与下述柠檬酸盐浓度相比低至低于1.0至0.1,如低于0.9至0.1,如低于0.8至0.1,如低于0.7至0.1,如低于0.6至0.1,如低于0.5至0.1,如低于0.4至0.1,如低于0.35至0.1,如低于0.3至0.1倍的螯合剂浓度将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM,所述柠檬酸盐的浓度能够将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM。

[0059] 因此本发明的一个优选实施方案涉及组合物,其包含亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体,其中所述变体使用根据SEQ ID NO:6的编号在193至213范围的一个或多个位置包含取代,且进一步包含至少一种螯合剂,其中当在21℃和pH 8测量时,所述螯合剂能够在低于下述柠檬酸盐浓度的0.9倍的螯合剂浓度将游离钙离子浓度从2.0mM减少至0.10mM,所述柠檬酸盐的浓度能够将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM。

[0060] 本发明的一个进一步的实施方案涉及组合物,其包含亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体,其中所述变体 $\alpha$ -淀粉酶使用根据SEQ ID NO:6的编号在选自193、195、197、198、200、203、206、210、212和213的一个或多个位置包含取代,且进一步包含至少一种螯合剂,其中当在21℃和pH 8.0测量时,所述螯合剂能够在低于10mM的浓度将游离钙离子浓度从2.0mM减少至0.10mM。

[0061] 本发明的一个进一步的实施方案涉及组合物,其包含亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体,其中所述变体 $\alpha$ -淀粉酶使用根据SEQ ID NO:6的编号在选自193、195、197、198、200、203、206、210、212和213的一个或多个位置包含取代,且进一步包含至少一种螯合剂,其中当在21℃和pH 8.0测量时,所述螯合剂能够在低于10mM的浓度将游离钙离子浓度从2.0mM减少至0.10mM,且任选地包含清洗助剂(cleaning adjunct)。

[0062] 本发明的一个进一步的实施方案涉及组合物,其包含亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体,其中所述变体 $\alpha$ -淀粉酶包含与SEQ ID NO:6至少70%相同的氨基酸序列,并进一步使用根据SEQ ID NO:6的编号在选自193、195、197、198、200、203、206、210、212和213的一个或多个位置包含取代,且进一步包含至少一种螯合剂,其中当在21℃和pH 8.0测量时,所述螯合剂能够在低于10mM的浓度将游离钙离子浓度从2.0mM减少至0.10mM。

[0063] 因此,本发明的螯合剂能够在低于下述柠檬酸盐的浓度的浓度将游离钙离子浓度从2.0mM减少至0.10mM,所述柠檬酸盐的浓度是在相同条件下将游离钙离子浓度从2.0mM减少至0.10mM所必需的。

[0064] 或者,由螯合剂和金属离子如钙和/或镁之间形成的络合物的强度表示为log K值(平衡或结合或解离或稳定常数)。该常数可在给定pH,在给定温度和在给定离子强度测量。

[0065] 如上所述,由螯合剂和金属离子如钙和/或镁之间形成的络合物的强度可表示为  $\log K$  值(平衡或结合或解离或稳定常数),所述常数可如 A. Nielsen 等, Anal. Biochem. Vol. 314, (2003), pp 227-234 中所述从  $K$  值通过等温滴定量热法(isothermal titration calorimetry, ITC)来测量,所述  $\log K$  可计算为  $K$  值的对数(以 10 为底)。通过该方法测得的  $\log K$  值会取决于温度、pH、离子强度,因此当比较  $\log K$  值时,重要的是它们是在类似地,优选相同的条件下确定的。此外,通过导入标样如柠檬酸盐作为参照,可减少实验中差异导致的影响。优选地,  $\log K$  是如本申请“材料和方法”中所述确定的,因此在本发明的一个实施方案中,当  $\log K$  在 pH 10 和 19°C 如“材料和方法”中所述测量时,根据本发明的组合物中的螯合剂具有至少 3,如至少 4,如至少 5,如至少 6,如至少 7,如至少 8,如至少 9,如至少 10,如至少 11 的  $\log K$ 。根据本发明的组合物中的螯合剂的  $\log K$  值亦可在 3-11,如 3-10,如 3-9,如 3-8,如 4-11,如 5-11 如 6-11,如 4-10,如 5-10,如 4-9,如 5-9,如 4-8,特别是 5-8 的范围。优选地,根据本发明的组合物中的螯合剂的  $\log K$  是如在“材料和方法”中所述确定的柠檬酸盐的  $\log K$  的至少 1,如至少 1.33,如至少 1.67,如至少 2,如至少 2.33,如至少 2.67,如至少 3,如至少 3.33,如至少 3.67 倍。根据本发明的组合物中的螯合剂亦可为如在“材料和方法”中所述确定的柠檬酸盐的  $\log K$  的 1-3.67,如 1-3.33,如 1-3.00,如 1-2.67,如 1.33-3.67,如 1.33-3.33,如 1.33-3.00,如 1.33-2.67,如 1.67-3.67,如 1.67-3.33,如 1.67-3,特别是 1.67-2.67 倍的范围。

[0066] 可用的螯合剂可为,但不限于下述:N-(1,2-二羧基-乙基)-D,L-天冬氨酸(IDS), N-(2-羟乙基)亚胺二乙酸(EDG),天冬氨酸-N-一乙酸(ASMA),天冬氨酸-N,N-二乙酸(ASDA),天冬氨酸-N-一丙酸(ASMP),亚胺二琥珀酸(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-甲基亚胺基二乙酸(MIDA), $\alpha$ -丙氨酸-N,N-二乙酸( $\alpha$ -ALDA),丝氨酸-N,N-二乙酸(SED), 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),牛磺酸-N,N-二乙酸(TUDA),磺甲基-N,N-二乙酸(SMDA),N-(羟乙基)-乙二胺三乙酸(HEDTA),二乙醇甘氨酸(DEG),氨基三(亚甲基膦酸)(ATMP)。

[0067] 优选的螯合剂可含有氨基基团,并可例如为氨基聚羧酸或膦酸盐。其可为含有一个、两个或三个氨基基团的单体分子(通常为仲胺或叔胺基团),且其可含有两个、三个、四个或五个羧基基团或甚至更多的羧基基团。所述螯合剂可含磷或不含磷。有许多方式将螯合剂归类,一种方式可如下所述:

[0068] 螯合剂可为羧酸盐,或可基于羧酸基团,如 EDTA(乙二胺四乙酸)、NTA(2,2',2''-氮三乙酸)、柠檬酸盐、2-羟基丙烷-1,2,3-三羧酸、DTPA(二亚乙基三胺五乙酸)、MGDA(甲基甘氨酸二乙酸或 N,N'-二(羧甲基)丙氨酸)、EGTA(乙二醇四乙酸)、EDDS(乙二胺-N,N'-二琥珀酸)、GLDA(L-谷氨酸-N,N-二乙酸)、聚羧酸如 PAA[聚丙烯酸]、PAA/PMA(丙烯酸/马来酸共聚物)。

[0069] 含磷的螯合剂可为多磷酸盐或膦酸盐,如三磷酸钠(STP)、HEDP(1-羟基亚乙基-1,1-二膦酸)、EDTMP[二(膦酰甲基)氨基]甲基膦酸]或(乙二胺四(亚甲基膦酸))、EDTMPA(乙二胺四亚甲基四膦酸)、DTPMP(二亚乙基三胺五(亚甲基膦酸))、DTMPA(二亚乙基三胺五(亚甲基膦酸))。所述螯合剂可含氮,如 EDTA、NTA、DTPA、PDPA、GLDA、MGDA、EDDS、EDTMP、EDTMPA,

以及DTPMP或ASMA、ASDA、ASMP、IDA、SMAS、SEAS、SMGL、SEGL、MIDA、 $\alpha$ -ALDA、SEDA、ISDA、PHDA、ANDA、SLDA、TUDA、SMDA、HEDTA、DEG、ATMP,或其混合物。

[0070] 因此,优选的螯合剂可为,但不限于下述:乙二胺四乙酸(EDTA)、二亚乙基三胺五亚甲基膦酸(DTMPA,DTPMP)、羟基乙烷二膦酸(HEDP)、乙二胺N,N'-二琥珀酸(EDDS)、甲基甘氨酸二乙酸(MGDA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)、丙二胺四乙酸(PDTA)、2-羟基吡啶-N-氧化物(HPNO)、甲基甘氨酸二乙酸(MGDA)、谷氨酸N,N'-二乙酸(N,N'-二羧甲基谷氨酸四钠盐)(GLDA)和氮三乙酸(NTA)或其混合物。所述螯合剂可以其酸形式或盐存在,优选所述螯合剂可作为钠盐、铵盐或钾盐存在。

[0071] 其他螯合剂可为来源于植物材料的螯合剂,如例如下文详述的含淀粉材料。此类天然螯合剂的实例为,但不限于植酸(亦称作肌醇六磷酸(IP6),或植酸(phytin),或当盐形式时称作植酸盐)、肌醇二磷酸、肌醇三磷酸或肌醇五磷酸。

[0072] 螯合剂可以以0.0001wt%至20wt%,优选0.01至10wt%,更优选0.1至5wt%的量存在于组合物中。

[0073] 亲本 $\alpha$ -淀粉酶:亲本 $\alpha$ -淀粉酶可理论上为任何 $\alpha$ -淀粉酶,对其期望制备在储藏过程中或在使用中,例如在洗涤过程中或在淀粉水解工艺中具有改善的稳定性的变体。因此,所述改善的稳定性可观察为在储藏过程中淀粉分解活性丧失的减少或在使用过程中活性和性能的增加。已知的 $\alpha$ -淀粉酶来源于广泛的生物选择范围,包括细菌,如来自芽孢杆菌属(*Bacillus*)的种,例如地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*);来自真菌的种,如米曲霉(*Aspergillus oryzae*)(TAKA-淀粉酶)或黑曲霉(*Aspergillus niger*);来自植物如大麦,和来自哺乳动物。亲本 $\alpha$ -淀粉酶理论上可为任何此种 $\alpha$ -淀粉酶而不论其来源。

[0074] 众所周知许多由芽孢杆菌属的种产生的 $\alpha$ -淀粉酶在氨基酸水平高度类似。因为见于这些 $\alpha$ -淀粉酶之间的高度同一性(substantial identity),它们被认为属于同一类 $\alpha$ -淀粉酶,即“Termamyl样 $\alpha$ -淀粉酶”类。

[0075] 相应地,在本文语境中,术语“Termamyl样” $\alpha$ -淀粉酶旨在表示下述 $\alpha$ -淀粉酶,特别是芽孢杆菌 $\alpha$ -淀粉酶,所述 $\alpha$ -淀粉酶在氨基酸水平与具有本文SEQ ID NO:20中所示的氨基酸序列的地衣芽孢杆菌 $\alpha$ -淀粉酶(Termamyl<sup>TM</sup>)呈现高度同一性,即至少60%同一性。

[0076] Termamyl样 $\alpha$ -淀粉酶

[0077] 许多已知的芽孢杆菌属 $\alpha$ -淀粉酶的同源性可见于下表1:

[0078] 表1

[0079]

	SEQ ID NO	百分比同一性							
		#707	AP1378	BAN	BSG	SP690	SP722	AA560	Termamyl
#707	8	100.0	86.4	66.9	66.5	87.6	86.2	95.5	68.1
AP1378	18	86.4	100.0	67.1	68.1	95.1	86.6	86.0	69.4
BAN	14	66.9	67.1	100.0	65.6	67.1	68.8	66.9	80.7
BSG	16	66.5	68.1	65.6	100.0	67.9	67.1	66.3	65.4
SP690	12	87.6	95.1	67.1	67.9	100.0	87.2	87.0	69.2
SP722	6	86.2	86.6	68.8	67.1	87.2	100.0	86.8	70.8
AA560	10	95.5	86.0	66.9	66.3	87.0	86.8	100.0	68.3
Termamyl	20	68.1	69.4	80.7	65.4	69.2	70.8	68.3	100.0

[0080] 举例而言,发现包含SEQ ID NO:20中所示的氨基酸序列的地衣芽孢杆菌 $\alpha$ -淀粉酶(商业上可作为Termamyl<sup>TM</sup>获得)与包含SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列的解淀粉芽孢杆菌 $\alpha$ -淀粉酶(BAN)具有约81%同源性,并与包含SEQ ID NO:16中所示的氨基酸序列的嗜热脂肪芽孢杆菌 $\alpha$ -淀粉酶(BSG)具有约65%同源性。其他同源 $\alpha$ -淀粉酶包括WO 95/26397中公开,并进一步分别在本文SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:12中描述的SP722和SP690。其他淀粉酶为来源于芽孢杆菌属菌种并示于SEQ ID NO:10的AA560 $\alpha$ -淀粉酶,和来源于芽孢杆菌属菌种,示于SEQ ID NO:8并描述于Tsukamoto等,Biochemical and Biophysical Research Communications,151(1988),pp.25-31的SP707或#707 $\alpha$ -淀粉酶。其他同源 $\alpha$ -淀粉酶为公开于WO 97/00324(来自KA0 Corporation)SEQ ID NO:18中的KSM AP1378 $\alpha$ -淀粉酶。仍有另一种同源 $\alpha$ -淀粉酶为具有SEQ ID NO:22的SP.7-7 $\alpha$ -淀粉酶。其他合适的亲本淀粉酶为K38SEQ ID NO:2或具有SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:24,描述于W02005/001064的环状芽孢杆菌(*B.circulans*)淀粉酶。

[0081] 仍进一步令人感兴趣的 $\alpha$ -淀粉酶包括由描述于EP 0252666的地衣芽孢杆菌菌株(ATCC 27811)产生的 $\alpha$ -淀粉酶,和WO 91/00353和WO 94/18314中鉴定的 $\alpha$ -淀粉酶。其他商业性Termamyl样 $\alpha$ -淀粉酶包含于以下述商品名出售的产品中:Optitherm<sup>TM</sup>和Takatherm<sup>TM</sup>(Solvay);Maxamyl<sup>TM</sup>(可从Gist-brocades/Genencor获得)、Spezym AA<sup>TM</sup>和Spezyme Delta AA<sup>TM</sup>(可从Genencor获得),和Keistase<sup>TM</sup>(可从Daiwa获得)、Dex lo,GC 521(可从Genencor获得)和Ultraplow(来自Enzyme Biosystems)、Purastar<sup>TM</sup>ST 5000E、PURAstra<sup>TM</sup>HPAM L、POWERASE<sup>TM</sup>、Spezyme FRED、GC358、ClearFlow AA(from Danisco.)或 $\alpha$ -淀粉酶TS-23(SEQ ID NO 26(Lin等,J.App.Microbiol.1997,82,325-334))。

[0082] 非Termamyl样 $\alpha$ -淀粉酶可为例如真菌 $\alpha$ -淀粉酶、哺乳动物 $\alpha$ -淀粉酶或植物 $\alpha$ -淀粉酶,或细菌 $\alpha$ -淀粉酶(与Termamyl样 $\alpha$ -淀粉酶不同)。此类 $\alpha$ -淀粉酶的具体实例包括米曲霉TAKA $\alpha$ -淀粉酶,黑曲霉酸性 $\alpha$ -淀粉酶,枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) $\alpha$ -淀粉酶,猪胰 $\alpha$ -淀粉酶和大麦 $\alpha$ -淀粉酶。所有这些 $\alpha$ -淀粉酶结构已阐明,其与本文中提及的典型

Termamyl样 $\alpha$ -淀粉酶的结构显著不同。

[0083] 上述提及的真菌 $\alpha$ -淀粉酶,即来源于黑曲霉和米曲霉的 $\alpha$ -淀粉酶,在氨基酸水平高度类似,并通常认为属于同一 $\alpha$ -淀粉酶家族。来源于米曲霉的真菌 $\alpha$ -淀粉酶商业上可以商品名Fungamyl<sup>TM</sup>获得。

[0084] 亲本杂合 $\alpha$ -淀粉酶

[0085] 所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶可为杂合 $\alpha$ -淀粉酶,即包含来源于至少两种 $\alpha$ -淀粉酶的部分氨基酸序列的组别的 $\alpha$ -淀粉酶。

[0086] 所述亲本杂合 $\alpha$ -淀粉酶可为下述 $\alpha$ -淀粉酶,其基于氨基酸同源性和/或免疫交叉反应性和/或DNA杂交(如上所定义)可确定为属于Termamyl样 $\alpha$ -淀粉酶家族。在此情况下,所述杂合 $\alpha$ -淀粉酶通常由至少Termamyl样 $\alpha$ -淀粉酶的一部分和一种或多种选自Termamyl样 $\alpha$ -淀粉酶或微生物(细菌或真菌)和/或哺乳动物来源的非Termamyl样 $\alpha$ -淀粉酶的其他 $\alpha$ -淀粉酶的部分构成。

[0087] 因此,所述亲本杂合 $\alpha$ -淀粉酶可包含来源于至少两种Termamyl样 $\alpha$ -淀粉酶,或来源于至少一种Termamyl样和至少一种非Termamyl样细菌 $\alpha$ -淀粉酶,或来源于至少一种Termamyl样和至少一种真菌 $\alpha$ -淀粉酶的部分氨基酸序列的组合。所述部分氨基酸序列所来源的Termamyl样 $\alpha$ -淀粉酶可为任何本文中提及的那些Termamyl样 $\alpha$ -淀粉酶。

[0088] 在一个实施方案中,所述亲本Termamyl样 $\alpha$ -淀粉酶是与SEQ ID NO:20中所示的地衣芽孢杆菌 $\alpha$ -淀粉酶完全相同的杂合Termamyl样 $\alpha$ -淀粉酶,除了(成熟蛋白的)N端的35个氨基酸残基由SEQ ID NO:14中所示的解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) $\alpha$ -淀粉酶的成熟蛋白的N端33个氨基酸残基所替代,所述杂合体可进一步具有下述突变: H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S(使用SEQ ID NO:6中的编号),称作LE174。在另一个实施方案中,LE174进一步包含突变G48A、T49I、G107A、I201F,称作LE399。在一个实施方案中,所述亲本为具有突变I181\*+G182\*+N195F的SEQ ID NO:16。

[0089] 在本发明的一个优选的方面,所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶是下述 $\alpha$ -淀粉酶,其具有本文中SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26中所示的氨基酸序列。在另一个优选的方面,所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶是下述 $\alpha$ -淀粉酶,其与SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26的成熟多肽呈现60%,优选至少65%,优选至少70%,优选至少75%优选至少80%,优选至少81%,优选至少82%,优选至少83%,优选至少84%优选至少85%,优选至少86%,优选至少87%,优选至少88%,优选至少89%,特别优选至少90%,特别优选至少91%,特别优选至少92%,特别优选至少93%,特别优选至少94%,甚至特别更优选至少95%同源性,更优选至少96%,更优选至少97%,更优选至少98%,更优选至少99%同源性。

[0090] 在一个方面,所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶具有下述氨基酸序列,其与SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26的成熟多肽相差(例如缺失、插入或取代)一个或几个氨基酸,优选十个氨基酸,更优选九个、八个、七个、六个、五个氨基酸,更优选相差四个氨基酸,甚至更优选相差三个氨基酸,最优选相差两个氨基酸,且甚至最优选相差一个氨基酸。

[0091] 所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶可为下述 $\alpha$ -淀粉酶,其与针对具有选自SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24和26的氨基酸序列之一的 $\alpha$ -淀粉酶培育的抗体呈现免疫交叉反应性。在一个优选实施方案中,所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶是下述 $\alpha$ -淀粉酶,其中针对所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶培育的抗体在竞争性测定技术如例如ELISA或BiaCore中,分别对于具有SEQ ID NO:2、

4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26中所示的氨基酸序列之一的 $\alpha$ -淀粉酶呈现亲和力(affinity)或亲合力(avidity),或呈现与亲本 $\alpha$ -淀粉酶相当的亲和力或亲合力,且其中针对具有SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26中所示的氨基酸序列之一的 $\alpha$ -淀粉酶培育的抗体在所述竞争性测定技术中对于亲本 $\alpha$ -淀粉酶呈现与针对具有SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26所示的氨基酸序列之一的 $\alpha$ -淀粉酶的亲和力或亲合力相当的亲和力或亲合力。在进一步的实施方案中,所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶是下述 $\alpha$ -淀粉酶,其具有的亲和力或亲合力是具有SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26所示的氨基酸序列之一的 $\alpha$ -淀粉酶的亲和力或亲合力的至少70%,优选至少75%优选至少80%,优选至少85%,优选至少90%,优选至少95%,优选至少100%,优选至少110%,优选至少120%,特别优选至少125%。

[0092] 所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶亦可为下述 $\alpha$ -淀粉酶,其由DNA序列编码,所述DNA序列与编码上述指明的 $\alpha$ -淀粉酶的DNA序列杂交,这从本申请的SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23或25是显而易见的。因此,一个实施方案涉及亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体 $\alpha$ -淀粉酶,其中所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶:

[0093] (A) 来源于地衣芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、芽孢杆菌属菌种或KS MAP1378的菌株,

[0094] (B) 选自具有如SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26中所示的氨基酸序列的组,

[0095] (C) 与SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26之一具有至少70%,优选至少80%,更优选至少约90%,甚至更优选至少95%,甚至更优选至少97%,并且甚至更优选至少99%的序列同一性,或

[0096] (D) 由核酸序列编码,所述核酸序列在低严格条件,优选中等严格条件,优选高严格条件下与SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23或25之一的核酸序列杂交。

[0097] 在一个方面,所述具有淀粉分解增强活性的亲本多肽为(a)多肽,其包含氨基酸序列,所述氨基酸序列与SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26的成熟多肽具有至少60%同一性;(b)多肽,其由多核苷酸编码,所述多核苷酸在至少低严格条件下与以下杂交:(i)SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23或25的成熟多肽编码序列,(ii)包含SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23或25的成熟多肽编码序列的基因组DNA序列,或(iii)(i)或(ii)的全长互补链;或(c)多肽,其由多核苷酸编码,所述多核苷酸包含核苷酸序列,所述核苷酸序列与SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23或25的成熟多肽编码序列具有至少60%同一性。

[0098] 当通过提及具体 $\alpha$ -淀粉酶的氨基酸序列中的具体氨基酸残基的修饰(例如缺失或取代),即以常规方式,提及亲本 $\alpha$ -淀粉酶的具体变体时,应理解的是,由此亦涵盖了在相当位置(如根据相应的氨基酸序列之间的所能得到的最佳氨基酸序列的比对所确定)修饰的另一个 $\alpha$ -淀粉酶的变体。

[0099] 在本发明的一个具体方面,所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶是天然存在的(野生型) $\alpha$ -淀粉酶的变体,该变体通过任何合适的方式制备。举例而言,所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶可为天然存在的 $\alpha$ -淀粉酶的变体,其在氨基酸序列中受修饰或改变。

[0100] 所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶可为基本上同源的亲本 $\alpha$ -淀粉酶,其具有一个或多个(几个)氨



基酸取代、缺失和/或插入。这些变化优选是小规模的 (of a minor nature), 其为下述的保守氨基酸取代和其他不显著影响蛋白或多肽的三维折叠或活性的取代; 小缺失, 通常为1至约30个氨基酸; 和小氨基或羧基末端延伸, 如氨基末端的甲硫氨酸残基, 长至约20-25个残基的小接头肽, 或协助纯化的小延伸 (亲和标记), 如一段多组氨酸, 或蛋白A (Nilsson等, 1985, EMBO J. 4:1075; Nilsson等, 1991, Methods Enzymol. 198:3。亦一般地参见Ford等, 1991, Protein Expression and Purification 2:95-107。

[0101] 尽管上述的变化优选是小规模的, 此类变化亦可为大规模的 (of a substantive nature), 如长至300个或更多个氨基酸的较大多肽作为氨基或羧基末端延伸的融合。

[0102] 当通过提及具体亲本 $\alpha$ -淀粉酶的氨基酸序列中的具体氨基酸残基的修饰 (例如缺失或取代), 即以常规方式, 提及亲本 $\alpha$ -淀粉酶的具体变体 (本发明的变体) 时, 应理解的是, 由此亦涵盖了在相当位置 (如根据相应的氨基酸序列之间的所能得到的最佳氨基酸序列的比对所确定) 修饰的另一个亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体。

[0103] 同源性 (序列同一性)

[0104] 同源性可作为两个序列之间表明第一个序列从第二个序列衍生的同一性程度来确定。就本发明而言, 两个氨基酸序列之间的序列同一性程度使用如EMBOSS程序包 (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice等, 2000, Trends in Genetics 16:276-277) (优选版本3.0.0或更新的版本) 的Needle程序中执行的Needleman-Wunsch算法 (Needleman和Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443-453) 来测定。使用的可选参数是: 缺口打开罚分为10, 缺口延伸罚分为0.5, 和EBL0SUM62 (BLOSUM62的EMBOSS版本) 取代矩阵。将标记为“最长同一性”的Needle输出 (使用-nobrief选项获得) 用作百分比同一性并且是如下计算的:

[0105]  $(\text{相同的残基} \times 100) / (\text{比对的长度} - \text{比对中的缺口总数})$

[0106] 就本发明而言, 两个脱氧核糖核苷酸序列之间的序列同一性程度使用如EMBOSS程序包 (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice等, 2000, 见上) (优选版本3.0.0或更新的版本) 的Needle程序中执行的Needleman-Wunsch算法 (Needleman和Wunsch, 1970, 见上) 来测定。使用的可选参数是: 缺口打开罚分为10, 缺口延伸罚分为0.5, 和EDNAFULL (NCBI NUC4.4的EMBOSS版本) 取代矩阵。将标记为“最长同一性”的Needle输出 (使用-nobrief选项获得) 用作百分比同一性并且是如下计算的:

[0107]  $(\text{相同的脱氧核糖核苷酸} \times 100) / (\text{比对的长度} - \text{比对中的缺口总数})$

[0108] 同源性或序列同一性亦可作为两个序列之间表明第一个序列从第二个序列衍生的同一性程度来确定。同源性可适当地通过本领域中已知的较旧计算机程序如GCG程序包中提供的GAP的方式来确定。因此可使用Gap GCGv8, 其使用用于同一性的缺省评分矩阵和下述缺省参数: 对于核酸序列比较, GAP形成罚分和GAP延伸罚分分别为5.0和0.3, 对于蛋白序列比较, GAP形成罚分和GAP延伸罚分分别为3.0和0.1。GAP使用Needleman and Wunsch, (1970), J. Mol. Biol. 48, p. 443-453的方法来进行比对和计算同一性。

[0109] 例如Termamyl和 $\alpha$ -淀粉酶之间的结构比对可用于鉴定其他 $\alpha$ -淀粉酶中的相当/相应位置。一种获得所述结构比对的方法是使用来自GCG包的Pile Up程序, 并使用缺省的缺口罚分值, 即缺口形成罚分为3.0而缺口延伸罚分为0.1。其他结构比对方法包括疏水簇分析 (Gaboriaud等, (1987), FEBS LETTERS 224, pp. 149-155) 和反向螺旋 (reverse

threading) (Huber, T; Torda, AE, PROTEIN SCIENCE Vol. 7, No. 1 pp. 142-149 (1998)).  $\alpha$ -淀粉酶的特性, 即免疫交叉反应性, 可使用针对相关的Termamyl样 $\alpha$ -淀粉酶的至少一个表位培育, 或与该表位具反应性的抗体来测定。该抗体, 其可为单克隆或多克隆, 可通过本领域中已知方法, 例如Hudson等, Practical Immunology, Third edition (1989)、Blackwell Scientific Publications描述的方法来产生。所述免疫交叉反应性可使用本领域中已知测定法来确定, 其实例为Western Blotting或放射免疫扩散测定法, 例如Hudson等, 1989等所述的。

#### [0110] 杂交

[0111] 在一个方面, 具有淀粉分解活性的亲本多肽由多核苷酸编码, 所述多核苷酸在非常低严格条件, 优选低严格条件, 更优选中等严格条件, 更优选中等-高严格条件, 甚至更优选高严格条件, 和最优选非常高严格条件下与以下杂交: (i) SEQ ID NO: 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23或25的成熟多肽编码序列, (ii) 包含SEQ ID NO: 1的成熟多肽编码序列的基因组DNA序列, (iii) (i) 或(ii) 的亚序列, 或(iv) (i)、(ii) 或(iii) 的全长互补链(J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d edition, Cold Spring Harbor, New York)。所述亚序列可编码具有淀粉分解活性的多肽片段。在一个方面, 所述互补链是SEQ ID NO: 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23或25的成熟多肽编码序列的全长互补链。

[0112] 用于根据所需的特性(其可为 $\alpha$ -淀粉酶活性)表征 $\alpha$ -淀粉酶的寡核苷酸探针可适当地基于讨论的 $\alpha$ -淀粉酶的全部或部分核苷酸或氨基酸序列来制备。

[0113] 测试杂交的合适条件涉及在5xSSC(标准柠檬酸钠, 1x SSC对应于0.1650M NaCl)预浸泡和在20%甲酰胺, 5xDenhardt溶液, 50mM磷酸钠, pH 6.8和50mg的变性的经声处理的牛胸腺DNA的溶液在 $\sim 40^{\circ}\text{C}$ 预杂交1小时, 接着在补充100mM ATP(腺苷三磷酸)的相同溶液在 $\sim 40^{\circ}\text{C}$ 杂交18小时, 接着将滤纸在2xSSC, 0.2% SDS(十二烷基硫酸钠)中在 $40^{\circ}\text{C}$ (低严格性), 优选在 $50^{\circ}\text{C}$ (中等严格性), 更优选在 $65^{\circ}\text{C}$ (高严格性), 甚至更优选在 $\sim 75^{\circ}\text{C}$ (非常高严格性)洗涤三次30分钟。关于杂交方法的更多细节可见于Sambrook等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, 1989。

[0114] 在本文语境中, “来源于”不仅旨在表示由所讨论的生物的株产生或可产生的 $\alpha$ -淀粉酶, 还表示由从此种株分离的DNA序列编码并在用所述DNA序列转化的宿主生物中产生的 $\alpha$ -淀粉酶。最后, 该术语旨在表示下述 $\alpha$ -淀粉酶, 其由合成和/或cDNA来源的DNA序列编码, 并具有所讨论的 $\alpha$ -淀粉酶的鉴定性特征。该术语亦旨在表示所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶可为天然存在的 $\alpha$ -淀粉酶的变体, 即, 下述变体, 其为天然存在的 $\alpha$ -淀粉酶的一个或多个氨基酸残基的修饰(插入、取代、缺失)的结果。

#### [0115] 制备 $\alpha$ -淀粉酶变体的方法

[0116] 几种将突变导入基因的方法在本领域是已知的。首先对编码 $\alpha$ -淀粉酶的DNA序列进行简短介绍, 然后将讨论用于在 $\alpha$ -淀粉酶编码序列内特定位点生成突变的方法。

#### [0117] 编码 $\alpha$ -淀粉酶的DNA序列的克隆

[0118] 编码亲本 $\alpha$ -淀粉酶的DNA序列可从任何产生所讨论的 $\alpha$ -淀粉酶的细胞或微生物, 使用多种本领域公知的方法来分离。首先, 应使用来自产生待研究的 $\alpha$ -淀粉酶的生物的染色体DNA或信使RNA来构建基因组DNA和/或cDNA文库。然后, 若已知 $\alpha$ -淀粉酶的氨基酸序列,

可合成同源的、标记的寡核苷酸探针并用其从自所讨论的生物制备的基因组文库鉴定 $\alpha$ -淀粉酶编码克隆。或者,可使用含有与已知的 $\alpha$ -淀粉酶基因同源的序列的标记的寡核苷酸探针作为探针,使用较低严格性的杂交和洗涤条件鉴定 $\alpha$ -淀粉酶编码克隆。

[0119] 还有另一种鉴定 $\alpha$ -淀粉酶编码克隆的方法会涉及将基因组DNA的片段插入表达载体,如质粒,用所得的基因组DNA文库转化 $\alpha$ -淀粉酶阴性细菌,然后将转化的细菌铺板于含有 $\alpha$ -淀粉酶的底物的琼脂上,由此允许鉴定表达 $\alpha$ -淀粉酶的克隆。

[0120] 或者,编码所述酶的DNA序列可通过公认的标准方法,例如S.L.Beaucage和M.H.Caruthers,1981,Tetrahedron Letters 22:1859所述的亚磷酰胺(phosphoroamidite)或Matthes等,1984,EMBO J.3 801-805所述的方法来合成制备。在亚磷酰胺方法中,例如在自动DNA合成仪中合成寡核苷酸,并将其纯化,退火并在合适的载体中连接和克隆。

[0121] 最后,DNA序列可为基因组和合成的混合来源,合成和cDNA的混合来源或基因组和cDNA的混合来源,其通过根据标准技术将合成、基因组或cDNA来源的片段(适当地,所述片段对应于整个DNA序列的不同部分)连接来制备。所述DNA序列亦可通过聚合酶链式反应(PCR)使用例如US 4,683,202或R.K.Saiki等,1988,Science Vol.239no.4839pp.487-491中所述的特异性引物来制备。

#### [0122] 定位诱变

[0123] 一旦分离了 $\alpha$ -淀粉酶编码DNA序列,并鉴定了用于突变的所需位点,可使用合成寡核苷酸导入突变。这些寡核苷酸含有包夹所需突变位点的寡核苷酸序列;突变核苷酸在寡核苷酸合成过程中插入。在一个具体方法中,在携带 $\alpha$ -淀粉酶基因的载体上构建单链DNA缺口,其跨越 $\alpha$ -淀粉酶编码序列。然后,将携带所需突变的合成核苷酸退火至该单链DNA的同源部分。然后用DNA聚合酶I(Klenow片段)填充剩余的缺口,并使用T4连接酶连接该构建体。该方法的具体实例描述于Morinaga等,1984,Biotechnology 2,pp.636-639。US 4,760,025公开了通过对盒进行小规模改变来导入编码多个突变的寡核苷酸。然而,在任何时候可通过Morinaga方法一次导入甚至更多的突变,因为可导入多个不同长度的寡核苷酸。

[0124] 另一个用于将突变导入 $\alpha$ -淀粉酶编码DNA序列的方法描述于Nelson和Long(1989)。其涉及3步生成含有所需突变的PCR片段,所述突变通过使用化学合成的DNA链作为PCR反应中的一个引物而导入。从该PCR生成的片段,可通过用限制性内切核酸酶切割来分离携带该突变的DNA片段,并将其重新插入表达质粒。

#### [0125] 随机诱变

[0126] 随机诱变可作为局部化或区域特异性随机诱变在翻译为所讨论的所示氨基酸序列的基因的至少三部分中,或在整个基因内适当地进行。

[0127] 编码亲本 $\alpha$ -淀粉酶的DNA序列的随机诱变可使用本领域中已知的任何方法方便地进行。

[0128] 与上述相关,本发明的一个进一步的方面涉及生成亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体的方法,例如,其中所述变体相对于亲本呈现改变的淀粉亲和力,所述方法包括:

[0129] (a) 对编码所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶的DNA序列进行随机诱变,

[0130] (b) 将步骤(a)中获得的突变的DNA序列在宿主细胞中表达,和

[0131] (c) 筛选出表达相对于亲本 $\alpha$ -淀粉酶具有改变的淀粉亲和力的 $\alpha$ -淀粉酶变体的宿

主细胞。

[0132] 本发明上述方法的步骤(a)优选使用掺杂(doped)引物进行。举例而言,随机诱变可通过使用合适的物理或化学诱变剂,通过使用合适的寡核苷酸,或通过对DNA序列进行PCR生成的诱变来进行。此外,所述随机诱变可通过使用这些诱变剂的任意组合来进行。所述诱变剂可为例如诱导转换、颠换、倒位、乱序(scrambling)、缺失和/或插入的诱变剂。

[0133] 适用于本发明目的的物理或化学诱变剂的实例包括紫外(UV)辐照、羟胺、N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)、O-甲基羟胺、亚硝酸、甲磺酸乙酯(EMS)、亚硫酸氢钠、甲酸和核苷酸类似物。当使用此类药剂时,诱变通常如下进行:即将待诱变的编码亲本酶的DNA序列在合适的条件下在所选的诱变剂的存在下进行温育以待诱变发生,并选择具有所需特性的突变DNA。当诱变是通过使用寡核苷酸进行时,所述寡核苷酸可用在寡核苷酸合成过程中在待改变的位置用三个非亲本核苷酸进行掺杂(dope)或掺夹(spike)。进行所述掺杂或掺夹时应避免不希望的氨基酸的密码子。可将掺杂或掺夹的寡核苷酸通过任何公开的技术,使用例如PCR、LCR或任何认为合适的DNA聚合酶或连接酶并入编码 $\alpha$ -淀粉酶的DNA。优选地,掺杂是使用“恒定随机掺杂(constant random doping)”进行的,其中在每个位置野生型和突变的百分比是预决的。此外,掺杂可导向偏好导入某些核苷酸,由此偏好导入一种或多种特定氨基酸残基。可进行所述掺杂例如使得允许在每个位置导入90%野生型和10%突变。掺杂方案的选择的另一个考虑是基于遗传以及蛋白质结构限制。掺杂方案可通过使用DOPE程序进行,其确保避免导入终止密码子等。当使用PCR生成的诱变时,对经化学处理或未经处理的编码亲本 $\alpha$ -淀粉酶的基因在增加核苷酸的错组入(mis-incorporation)的条件下进行PCR(Deshler 1992, Genetic Analysis: Biomolecular Engineering, 9(4), pp 103-106; Leung等, 1989, Technique, Vol. 1, pp. 11-15)。大肠杆菌(Fowler等, 1974, Molec. Gen. Genet., 133, pp. 179-191)、酿酒酵母(*S. cerevisiae*)或任何其他微生物的突变菌株可用于编码 $\alpha$ -淀粉酶的DNA的随机诱变,即,例如将含有亲本糖苷酶的质粒转化入突变菌株,培养具有所述质粒的突变菌株,并从突变菌株分离突变的质粒。之后可将突变的质粒转化入表达生物。待诱变的DNA序列可方便地存在于从表达亲本 $\alpha$ -淀粉酶的生物制备的基因组或cDNA文库中。或者,所述DNA序列可存在于合适的载体如质粒或细菌噬菌体上,其可由此用诱变剂温育或以其他方式暴露于诱变剂。待诱变的DNA亦可以下述方式存在于宿主细胞中,即整合入所述细胞的基因组或存在于细胞中携带的载体上。最后,待诱变的DNA可为分离形式。应理解的是,待进行随机诱变的DNA序列优选为cDNA或基因组DNA序列。在一些情况下,在进行表达步骤(b)或筛选步骤(c)之前扩增突变的DNA序列可能是便利的。此种扩增可根据本领域中已知方法进行,目前优选的方法为使用基于亲本酶的DNA或氨基酸序列制备的寡核苷酸引物进行的PCR-生成的扩增。在用诱变剂温育或暴露于诱变剂之后,表达突变的DNA,即在允许表达发生的条件下培养携带所述DNA序列的合适宿主细胞。用于该目的的宿主细胞可为用突变的DNA序列转化的宿主细胞,任选地存在于载体上,或为在诱变处理过程中携带编码亲本酶的DNA序列的宿主细胞。合适宿主细胞的实例如下所述:革兰氏阳性细菌如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、迟缓芽孢杆菌(*Bacillus lentus*)、短芽孢杆菌(*Bacillus brevis*)、嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)、嗜碱芽孢杆菌(*Bacillus alkalophilus*)、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)、凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)、环状芽孢杆

菌 (*Bacillus circulans*)、灿烂芽孢杆菌 (*Bacillus lautus*)、巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)、苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*)、浅青紫链霉菌 (*Streptomyces lividans*) 或鼠灰链霉菌 (*Streptomyces murinus*)，和革兰氏阴性细菌如大肠杆菌。突变的 DNA 序列可进一步包含编码允许突变的 DNA 序列表达的功能的 DNA 序列。

#### [0134] 局部化随机诱变

[0135] 随机诱变可有利地局部化至所讨论的亲本  $\alpha$ -淀粉酶的一部分。例如当酶的某些区域鉴定为对于酶的给定特性特别重要时，和当预期修饰导致具有改善特性的变体时，这可有利的。当已经阐明了亲本酶的三级结构并将其与酶功能相关联时，通常可鉴定出此类区域。

[0136] 局部化或区域特异性的随机诱变通过使用如上所述的 PCR 生成的诱变技术或其他任何本领域中已知的合适技术来方便地进行。或者，可分离编码待修饰的 DNA 序列的部分的 DNA 序列，例如通过插入合适载体，然后可随后对所述部分通过使用任何上述讨论的诱变方法进行诱变。

#### [0137] 提供 $\alpha$ -淀粉酶变体的其他方法

[0138] 用于提供本发明的变体的其他方法包括本领域中已知的基因改组方法，包括例如描述于 WO 95/22625 (来自 Affymax Technologies N.V.) 和 WO 96/00343 (来自 Novo Nordisk A/S) 中的方法。

#### [0139] $\alpha$ -淀粉酶变体的表达

[0140] 根据本发明，通过上述方法或通过任何本领域中已知的任何其他方法产生的编码变体的 DNA 序列，可使用表达载体以酶形式表达，所述表达载体通常包括调控序列，其编码启动子、操纵子、核糖体结合位点、翻译起始信号和任选地，抑制基因或多种活化基因。

[0141] 携带编码本发明的  $\alpha$ -淀粉酶变体的 DNA 序列的重组表达载体可为任何载体，只要可方便地对其进行重组 DNA 步骤即可，且载体的选择通常会取决于其待导入的宿主细胞。因此，载体可为自主复制载体，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、细菌噬菌体或染色体外元件、微染色体或人工染色体。或者，所述载体可为当导入宿主细胞中时，可整合入宿主细胞基因组并与其整合入的染色体一同复制的载体。

[0142] 在载体中，DNA 序列应可操作地连接于合适的启动子序列。启动子序列可为任何 DNA 序列，其在所选的宿主细胞中显示转录活性，并可来源于编码对于宿主细胞是同源或异源的蛋白的基因。用于指导编码本发明的  $\alpha$ -淀粉酶变体的 DNA 序列特别是在细菌宿主中的转录的合适启动子的实例是大肠杆菌 lac 操纵子的启动子，天蓝链霉菌琼脂糖酶基因 dagA 启动子、地衣芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶基因 (amyL) 的启动子、嗜热脂肪芽孢杆菌产麦芽淀粉酶基因 (amyM) 的启动子、解淀粉芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶 (amyQ) 的启动子、枯草芽孢杆菌 xylA 和 xylB 基因的启动子等。对于在真菌宿主中转录，可用的启动子的实例为来源于编码下述的基因的那些：米曲霉 TAKA 淀粉酶、曼赫根毛霉 (*Rhizomucor miehei*) 天冬氨酸蛋白酶、黑曲霉中性  $\alpha$ -淀粉酶、黑曲霉酸性稳定  $\alpha$ -淀粉酶、黑曲霉葡糖淀粉酶、曼赫根毛霉脂肪酶、米曲霉碱性蛋白酶、米曲霉丙糖磷酸异构酶或构巢曲霉 (*A.nidulans*) 乙酰胺酶。

[0143] 本发明的表达载体亦可包含合适的转录终止子，并且在真核生物中，包含可操作地连接于编码本发明的  $\alpha$ -淀粉酶变体的 DNA 序列的多腺苷酸化序列。终止和多腺苷酸化序列可合适地来源于与启动子相同的来源。

[0144] 所述载体可进一步包含DNA序列,其使得载体能够在所讨论的宿主细胞中复制。此类序列的实例是质粒pUC19、pACYC177、pUB110、pE194、pAMB1和pIJ702的复制起点。

[0145] 所述载体亦可包含选择性标记,例如,其产物弥补(complent)宿主细胞中缺陷的基因,如来自枯草芽孢杆菌或地衣芽孢杆菌的dal基因,或赋予抗生素抗性如氨苄青霉素、卡那霉素、氯霉素或四环素抗性的基因。此外,所述载体可包含曲霉属(*Aspergillus*)选择性标记如amdS、argB、niaD和sC,导致潮霉素抗性的标记,或选择可伴随共转化,例如描述于WO 91/17243中的。

[0146] 尽管胞内表达在某些方面可能是有利的,例如,当使用某些细菌作为宿主细胞时,但是通常优选表达是胞外的。一般而言,本文中提及的芽孢杆菌 $\alpha$ -淀粉酶包含允许表达的蛋白酶分泌入培养基的前区。若需要,该前区可由不同的前区或信号序列替代,其方便地通过取代编码相应前区的DNA序列来实现。

[0147] 用于分别连接本发明的编码 $\alpha$ -淀粉酶变体的DNA构建体、启动子、终止子和其他元件,并将其插入含有复制所需信息的合适载体的方法,对于本领域技术人员是公知的(参见,例如Sambrook等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,2nd Ed.,Cold Spring Harbor,1989)。

[0148] 将本发明的细胞,无论包含如上所述的本发明的DNA构建体或表达载体,在本发明的 $\alpha$ -淀粉酶变体的重组产生中有利地用作宿主。该细胞可用编码变体的本发明的DNA构建体转化,方便地将DNA构建体(一个或多个拷贝)整合入宿主染色体。这种整合通常被认为是一种优势,因为DNA序列更可能在细胞中稳定维持。DNA构建体整合入宿主染色体可根据常规方法进行,例如通过同源或异源重组。或者,细胞可用如上所述的与不同类型的宿主细胞相关的表达载体转化。

[0149] 本发明的细胞可为更高等的动物如哺乳动物或昆虫的细胞,但优选微生物细胞,例如细菌或真菌(包括酵母)细胞。

[0150] 合适的细菌的实例为革兰氏阳性细菌如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、迟缓芽孢杆菌(*Bacillus lentus*)、短芽孢杆菌(*Bacillus brevis*)、嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)、嗜碱芽孢杆菌(*Bacillus alkalophilus*)、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)、凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)、环状芽孢杆菌(*Bacillus circulans*)、灿烂芽孢杆菌(*Bacillus lautus*)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)、浅青紫链霉菌(*Streptomyces lividans*)或鼠灰链霉菌(*Streptomyces murinus*),或革兰氏阴性细菌如大肠杆菌。细菌的转化例如可通过原生质体转化或通过自身已知的方式使用感受态细胞来实现。

[0151] 酵母生物可有利地选自酵母属(*Saccharomyces*)或裂殖酵母属(*Schizosaccharomyces*)的种,例如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。丝状真菌可有利地属于曲霉属的种,例如米曲霉或黑曲霉。真菌细胞可以自身已知的方式通过涉及原生质体形成和原生质体的转化,继以再生细胞壁的过程转化。用于转化曲霉属宿主细胞的合适的方法描述于EP 238 023。

[0152] 还在一个进一步的方面,本发明涉及产生本发明的 $\alpha$ -淀粉酶变体的方法,该方法包括在有助于所述变体产生的条件下培养如上所述的宿主细胞,并从细胞和/或培养基回

收所述变体。

[0153] 用于培养细胞的培养基可为适于生长所讨论的宿主细胞并获得本发明的 $\alpha$ -淀粉酶变体的表达的任何常规的培养基。合适的培养基可从商业供应商获得,或可根据公开的配方(例如,描述于美国典型培养物保藏中心的目录中)来制备。

[0154] 从宿主细胞分泌的 $\alpha$ -淀粉酶变体可通过公知的方法方便地从培养基回收,所述方法包括通过离心或过滤将细胞从培养基分离,和通过盐如硫酸铵的方式沉淀蛋白组分,接着使用层析方法如离子交换层析、亲和层析等。

[0155] 变体命名规则

[0156] 使用来源于SEQ ID NO:6中公开的 $\alpha$ -淀粉酶的氨基酸序列与多种其他 $\alpha$ -淀粉酶的氨基酸序列比对的编号系统,可以在 $\alpha$ -淀粉酶中具有结构同源性的区域中表示氨基酸残基的位置。

[0157] 在描述本发明的多种 $\alpha$ -淀粉酶变体时,采用下述命名法以便于参照。在所有情况下,使用通用的IUPAC单字母或三字母氨基酸缩写。

[0158] 在本发明的说明书和权利要求中,使用常规的单字母和三字母氨基酸残基编码。为了便于参照,本发明的 $\alpha$ -淀粉酶变体通过使用下述命名法来描述:

[0159] 起始氨基酸:位置:取代氨基酸

[0160] 根据该命名法,例如在30位将丙氨酸取代为天冬酰胺示为:

[0161] Ala30Asn或A30N

[0162] 在同一位置丙氨酸的缺失示为:

[0163] Ala30\*或A30\*

[0164] 而在位置30之后插入另一个氨基酸残基如赖氨酸示为:

[0165] Ala30AlaLys或A30AK

[0166] 连续氨基酸残基段的缺失,如氨基酸残基30-33的缺失,表示为(30-33)\*或 $\Delta$ (A30-N33)。单个氨基酸残基的缺失可简单地公开为30\*。

[0167] 当具体 $\alpha$ -淀粉酶与其他 $\alpha$ -淀粉酶相比含有“缺失”,并在该位置进行插入,这表示为:

[0168] \*36Asp或\*36D

[0169] 表示位置36的天冬氨酸插入。

[0170] 多重突变可由加号或以空格分开,即:

[0171] Ala30Asn+Glu34Ser或A30N+E34S

[0172] Ala30Asn Glu34Ser或A30N E34S

[0173] 分别代表30和34位丙氨酸和谷氨酸取代为天冬酰胺和丝氨酸的突变。

[0174] 或者,多重突变可用逗号或分号分开,即:

[0175] Ala30Asn,Glu34Ser或A30N,E34S

[0176] 甚至更简化的多重突变可由空格分开,例如:

[0177] 或者多重突变可由逗号或分号分开,即:

[0178] Ala30Asn Glu34Ser或A30N E34S

[0179] 当一个或多个可选的氨基酸可插入给定位置时,其表示为

[0180] A30N,E或

[0181] A30N或A30E

[0182] 或者,一个或多个可选的氨基酸可插入给定位置时,其表示为:

[0183] A30[N,E]或A30[N E],或者A30{N,E}或A30{N E}

[0184] 为了简化起见,可在某位置取代的可选氨基酸可表示为:

[0185] A30 N,E,H,L或V

[0186] 此外,当在本文中鉴定出适于修饰的位置而未提及任何具体修饰时,这应理解为可用任何氨基酸残基取代存在于该位置的氨基酸残基。因此,例如,当提及但未指明30位的丙氨酸的修饰时,应理解的是,可缺失该丙氨酸或将其取代为任何其他氨基酸,即

[0187] R,N,D,A,C,Q,E,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V之任一。

[0188] 此外,“A30X”意指任何下述取代:

[0189] A30R,A30N,A30D,A30C,A30Q,A30E,A30G,A30H,A30I,A30L,A30K,A30M,A30F,A30P,A30S,A30T,A30W,A30Y或A30 V;或简言之:A30R,N,D,C,Q,E,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V。

[0190] 或例如A30[R,N,D,C,Q,E,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V]

[0191] 本领域技术人员会知道,使用例如根据SEQ ID NO:6的编号意指使用SEQ ID NO:6计数,并非表示该亲本必然是SEQ ID NO:6,而仅单纯表示待改变的位置是根据SEQ ID NO:6定义的。因此,另一种描述具体取代的方式是用X表示待改变的氨基酸。因此X30N意指在位置30存在的任何氨基酸可用N取代,这反映了不同的 $\alpha$ -淀粉酶可用作亲本 $\alpha$ -淀粉酶。

[0192] 因此,命名“X30N”或“X30V”意指可在亲本 $\alpha$ -淀粉酶的位置30的任何氨基酸由天冬酰胺或缬氨酸取代。

[0193] 氨基酸残基的表征

[0194] 带电荷的氨基酸:

[0195] Asp,Glu,Arg,Lys,His

[0196] 荷负电的氨基酸(最负电的残基列在最先)

[0197] Asp,Glu

[0198] 荷正电的氨基酸(最正电的残基列在最先)

[0199] Arg,Lys,His

[0200] 中性氨基酸:

[0201] Gly,Ala,Val,Leu,Ile,Phe,Tyr,Trp,Met,Cys,Asn,Gln,Ser,Thr,Pro

[0202] 疏水氨基酸残基(最疏水的残基列在最后):

[0203] Gly,Ala,Val,Pro,Met,Leu,Ile,Tyr,Phe,Trp,

[0204] 亲水氨基酸(最亲水的残基列在最后):

[0205] Thr,Ser,Cys,Gln,Asn

[0206] 该命名法对于涉及取代、插入或缺失具有特定共同特性的氨基酸残基的修饰特别相关。此类修饰称作保守氨基酸修饰。保守修饰的实例在以下组之内:碱性氨基酸组(精氨酸、赖氨酸和组氨酸)、酸性氨基酸组(谷氨酸和天冬氨酸)、极性氨基酸组(谷氨酰胺和天冬酰胺)、疏水性氨基酸组(亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸)、芳族氨基酸组(苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸)和小氨基酸组(甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸和甲硫氨酸)。通常不改变比活性(specific activity)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,Academic Press,New York中描述。最普遍发生的交换是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,以及相反的交换(Taylor, 1986,Journal of Theoretical Biology 119:205-218)。

[0207] 本发明的变体

[0208] 在一个优选实施方案中,所述变体在亲本 $\alpha$ -淀粉酶的区域193至213中的一个或多个或一个或几个氨基酸残基中包含改变。在一个特别优选的实施方案中,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区中包含至少一个、至少两个或至少三个缺失,并进一步在区域193至213中的一个或多个,或一个或几个氨基酸残基中包含改变,其中编号对应于SEQ ID NO:6的成熟多肽,即使用根据SEQ ID NO:6的编号。发明人发现此类改变提供的变体在包含螯合剂的组合物中具有增加的稳定性,特别是当所述螯合剂如描述于下文“材料和方法”中,在21℃和pH 8.0测量时,能够在低于10mM,优选低于9.5mM,优选低于9.0mM,优选低于8.5mM,优选低于8.0mM,优选低于7.5mM,优选低于7.0mM,优选低于6.5mM,优选低于6.0mM,优选低于5.5mM,优选地,优选低于5.0mM,优选低于4.5mM,低于4.0mM,优选低于3.5mM,优选低于3.0mM,优选低于2.5mM,优选低于2.0mM,优选低于1.5mM或优选低于1.0mM的浓度将游离钙离子浓度从2.0mM减少至0.10mM。

[0209] 本发明的一个第一个方面涉及组合物,其包含亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体,其中所述变体在使用根据SEQ ID NO:6编号的193至213范围的一个或多个位置包含取代,并进一步包含至少一种螯合剂,其中在21℃和pH 8.0测量时,所述螯合剂在低于10mM的浓度能够将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM。

[0210] 本发明的一个第一个方面涉及组合物,其包含亲本 $\alpha$ -淀粉酶变体,其中所述变体在使用根据SEQ ID NO:6的编号193至213范围的一个或多个位置包含取代,并进一步包含至少一种螯合剂,其中在21℃和pH 8.0测量时,所述螯合剂在低于10mM的浓度能够将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM,并任选地包含清洗助剂。

[0211] 一个第二个方面提供组合物,其包含亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体,其中所述变体 $\alpha$ -淀粉酶包含氨基酸序列,所述氨基酸序列与SEQ ID NO:6、8、10、12、18和22至少70%,如至少75%,如至少80%,如至少85%,如至少90%,如至少95%,如至少100%相同,并进一步在使用根据SEQ ID NO:6编号的选自包含195、193、197、198、200、203、206、210、212、213和243的组的一个或多个位置包含取代,且进一步包含至少一种螯合剂,其中当在21℃和pH 8.0测量时所述螯合剂在低于10mM的浓度能够将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM。

[0212] 一个进一步的方面提供组合物,其包含变体,所述变体在选自包含195、193、197、198、200、203、206、210、212、213和243(使用根据SEQ ID NO:6的编号)的组的一个或多个位置包含取代,其中所述组合物进一步包含至少一种螯合剂,其中当在21℃和pH 8.0测量时所述螯合剂在低于10mM的浓度能够将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM。

[0213] 一个进一步的方面提供组合物,其包含变体,所述变体在选自包含195、193、197、198、200、203、206、210、212、213和243(使用根据SEQ ID NO:6的编号)的组的一个或多个位置包含取代,且其中所述变体包含氨基酸序列,所述氨基酸序列与选自SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24和26,优选SEQ ID NO:14、16或20,优选SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:22的氨基酸序列具有至少

70%同一性,其中所述组合物进一步包含至少一种螯合剂,其中当在21℃和pH 8.0测量时所述螯合剂在低于10mM的浓度能够将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM。

[0214] 一个进一步的方面提供组合物,其包含变体,所述变体在选自包含195、193、197、198、200、203、206、210、212、213和243的组的一个或多个位置包含取代(使用根据SEQ ID NO:6的编号),且其中所述变体包含氨基酸序列,所述氨基酸序列与选自SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:20的氨基酸序列具有至少70%同一性,且其中所述组合物进一步包含至少一种螯合剂,其中当在21℃和pH 8.0测量时所述螯合剂在低于10mM的浓度能够将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM。

[0215] 一个第三个方面涉及组合物,其中所述螯合剂当在21℃和pH 8.0在80mM氯化钾和49mM EPPS中测量时在低于10mM的浓度能够将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM。

[0216] 一个第三个方面涉及组合物,其中所述螯合剂当在下文“材料和方法”中描述的测定法中测量时在低于10mM的浓度能够将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM。

[0217] 因此,在本发明的一个优选方面,所述变体在对应于SEQ ID NO:6的成熟多肽的位置193至213的范围中的一个或多个位置包含至少一个取代。术语“使用根据…的编号”或“对应于”在本申请中可互换使用,并指本申请中使用的编号系统。因此位置195是对应于SEQ ID NO:6中位置195的氨基酸。因此,应理解的是,由此涵盖其他在相当位置(如根据相应的氨基酸序列之间的可能的最佳氨基酸序列比对确定)修饰的亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体。当存在缺失时,如不存在缺失一般进行计数。

[0218] 在一个特别优选的实施方案中,所述组合物包含变体,该变体在对应于选自193、195、197、198、200、203、206、210、212、213和243的位置的一个或多个位置包含改变,并在对应于选自116,118,129,133,134,142,146,147,149,151,152,169,174,186,235,244,303,320,339,359,418,431,434,447,458(使用根据SEQ ID NO:6的编号)的位置的一个或多个位置包含改变。

[0219] 在一个特别优选的实施方案中,所述组合物包含变体,该变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失,并进一步在一个或多个,或一个或几个对应于选自193、195、197、198、200、203、206、210、212、213和243的位置的位置包含改变,并在一个或多个,或一个或几个对应于选自116,118,129,133,134,142,146,147,149,151,152,169,174,186,235,244,303,320,339,359,418,431,434,447,458(使用根据SEQ ID NO:6的编号)的位置的位置包含改变。

[0220] 在本发明的一个方面中,所述组合物包含亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体,所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶使用根据SEQ ID NO:6的编号在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失,并进一步在一个或多个,或一个或几个选自193、195、197、198、200、203、206、210、212、213和243的位置包含取代,且其中所述变体具有的氨基酸序列与亲本 $\alpha$ -淀粉酶的氨基酸序列具有至少70%,优选至少75%,优选至少80%,优选至少81%,优选至少82%,优选至少83%,优选至少84%,优选至少85%,优选至少86%,优选至少87%,优选至少88%,优选至少89%,特别优选至少90%,优选至少91%,优选至少92%,优选至少93%,优选至少94%,优选至少95%,优选至少96%,优选至少97%,优选至少98%,优选至少99%同一性的同一性程度,所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶可为任何具有SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26,优选SEQ ID NO:14、16或20,优选SEQ ID NO:6、8、10、12、18或22的序列,

且其中所述变体具有至少70%剩余活性,优选至少75%剩余活性,优选至少80%剩余活性,优选至少85%剩余活性,优选至少90%剩余活性,优选至少95%剩余活性,优选至少100%剩余活性,优选至少105%剩余活性,优选至少110%剩余活性,或具有的剩余活性相对于亲本 $\alpha$ -淀粉酶的剩余活性改善了至少5,10,20,30,40,50,60,70,80,90,100pp,其中剩余活性是在pH 8和31℃如EnzChek或PNP-G7测定法(详细请参加下文“材料和方法”中所述)中所述在螯合剂存在下18小时之后确定的,其中如下文中所述,当在21℃和pH 8.0测量时所述螯合剂在低于10mM的浓度能够将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM。

[0221] 根据本发明的组合物优选包含 $\alpha$ -淀粉酶,其中所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶由至少一种下述取代所修饰:位置193是[G,A,S,T,或M];位置195是[F,W,Y,L,I,或V];位置197是[F,W,Y,L,I,或V];位置198是[Q或N];位置200是[F,W,Y,L,I,或V];位置203是[F,W,Y,L,I,或V];位置206是[F,W,Y,N,L,I,V,或H];位置210是[F,W,Y,L,I,或V];位置212是[F,W,Y,L,I,或V]或位置213是[G,A,S,T,或M],其中所述位置对应于SEQ ID NO:6成熟多肽的位置,且进一步包含至少一种螯合剂,其中当如“材料和方法”中所述在21℃和pH 8.0测量时所述螯合剂在低于10mM的浓度能够将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM。

[0222] 根据本发明的组合物优选包含 $\alpha$ -淀粉酶变体,其中所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失,且其中所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶由至少一个下述取代所进一步修饰:193是[G,A,S,T,或M];位置195是[F,W,Y,L,I,或V];位置197是[F,W,Y,L,I,或V];位置198是[Q或N];位置200是[F,W,Y,L,I,或V];位置203是[F,W,Y,L,I,或V];位置206是[F,W,Y,N,L,I,V,或H];位置210是[F,W,Y,L,I,或V];位置212是[F,W,Y,L,I,或V],位置213是[G,A,S,T,或M]或位置243是[F,W,Y,L,I,或V],其中所述位置对应于SEQ ID NO:6成熟多肽的位置且进一步包含至少一种螯合剂,其中当如“材料和方法”中所述在21℃和pH 8.0测量时所述螯合剂在低于10mM的浓度能够将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM。

[0223] 具体而言,本发明涉及组合物,所述组合物包含 $\alpha$ -淀粉酶,其中氨基酸序列由至少一种下述取代所修饰:193是T;位置195是F或Y;位置197是F或L;位置198是N;位置200是F;位置203是F;位置206是F,L或Y;位置210是Y;位置212是V;位置213是A位置243是F,其中所述位置对应于SEQ ID NO:6成熟多肽的位置且进一步包含至少一种螯合剂,其中所述螯合剂当如“材料和方法”中所述在21℃和pH 8.0测量时在低于10mM的浓度能够将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM。

[0224] 在一个进一步的方面,所述组合物包含 $\alpha$ -淀粉酶变体,其中所述变体包含在两个或更多个,或两个或几个选自193、195、197、198、200、203、206、210、212、213和243的位置的取代,其中所述位置对应于SEQ ID NO:6的成熟多肽的位置,且进一步包含至少一种螯合剂,其中当如“材料和方法”中所述在21℃和pH 8.0测量时所述螯合剂在低于10mM的浓度能够将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM。

[0225] 还在一个进一步的方面,所述组合物包含 $\alpha$ -淀粉酶变体,其中所述变体在181,182,183或184的氨基酸区包含至少两个或更多个,或至少三个或更多个缺失,并进一步在两个或更多个选自193、195、197、198、200、203、206、210、212、213和243的位置包含取代,其中所述位置对应于SEQ ID NO:6的成熟多肽的位置,且进一步包含至少一种螯合剂,其中当如“材料和方法”中所述在21℃和pH 8.0测量时所述螯合剂在低于10mM的浓度能够将游离

钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM,且其中当剩余活性如EnzChek或PNP-G7测定(详细参见“材料和方法”)中所述在螯合剂的存在下在pH 8和31℃18小时之后确定时,所述变体相对于亲本 $\alpha$ -淀粉酶的剩余活性具有至少70%剩余活性,优选至少75%剩余活性,优选至少80%剩余活性,优选至少85%剩余活性,优选至少90%剩余活性,优选至少95%剩余活性,优选至少100%剩余活性,优选至少105%剩余活性,优选至少110%剩余活性或具有至少5,10,20,30,40,50,60,70,80,90,100pp改善的剩余活性,其中当如下所述在21℃和pH 8.0测量时所述螯合剂在低于10mM的浓度能够将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM。

[0226] 在优选的实施方案中,所述181,182,183或184的氨基酸区的至少两个缺失选自:181\*+182\*;181\*+183\*,182\*+183\*;181\*+184\*,182\*+184\*和183\*+184\*。

[0227] 在一个甚至进一步的方面,所述组合物包含 $\alpha$ -淀粉酶变体,其中所述变体在181,182,183或184的氨基酸区中包含至少两个,或至少三个缺失,并进一步在两个或更多个选自193、195、197、198、200、203、206、210、212、213和243的位置包含取代,其中所述位置对应于SEQ ID NO:6的成熟多肽的位置,并且在一个或多个,或一个或几个对应于选自116,118,129,133,134,142,146,147,149,151,152,169,174,186,235,244,303,320,339,359,418,431,434,447,458(使用根据SEQ ID NO:6的编号)的位置的位置存在改变,并进一步包含至少一种螯合剂,其中当如“材料和方法”中所述在21℃和pH 8.0测量时所述螯合剂在低于10mM的浓度能够将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM。

[0228] 在本发明的一个方面,所述组合物包含至少一种螯合剂,其中当在21℃和pH 8.0测量时所述螯合剂在低于10mM的浓度能够将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM,以及包含一种或多种,或一种或几种下述淀粉酶变体:SP722+R181\*G182\*N195F;SP722+G182\*D183\*N195F;SP722+D183\*G184\*N195F;SP722+R181\*G182\*N195F M202L;SP722+G182 D183\*N195F M202L;SP722+D183\*G184\*N195F M202L;SP722+D183\*G184\*N195F V206L Y243F;SP722+D183\*G184\*N195F V206Y Y243F;SP722+R181\*G182\*L118K N195F R458K;SP722+G182\*D183\*L118K N195F H458K;SP722+D183\*G184\*L118K N195F H458K;SP722+D183\*G184\*G133E G149R N195Y Y203F V206L。

[0229] AA560+R181\*G182\*N195F;AA560+G182\*D183\*N195F;AA560+D183\*G184\*N195F;AA560+D183\*G184\*I206Y;AA560+D183\*G184\*Y243F;AA560+D183\*G184\*V206L,Y243F;AA560+D183\*G184\*N195F V206L;AA560+D183\*G184\*N195F Y243F;AA560+D183\*G184\*N195F V206L Y243F;AA560+D183\*G184\*N195F V206Y Y243F;AA560+R181\*G182\*N195F M202L;AA560+G182\*D183\*N195F M202L;AA560+D183\*G184\*N195F M202L;AA560+R181\*G182\*R118K N195F R320K R458K;AA560+G182\*D183\*R118K N195F R320K R458K;AA560+D183\*G184\*R118K N195F R320K R458K;AA560+D183\*G184\*R118K N195F I206L R320K R458K;AA560+D183\*G184\*R118K N195F I206Y R320K R458K;AA560+D183\*G184\*R118K N195F Y243F R320K R458K;AA560+D183\*G184\*R118K N195F I206L Y243F R320K R458K。

[0230] SP707+R181\*G182\*N195F;SP707+G182\*H183\*N195F;SP707+H183\*G184\*N195F;SP707+H183\*G184\*I206Y;SP707+H183\*G184\*N195F I206Y;SP707+H183\*G184\*N195F Y243F;SP707+H183\*G184\*I206Y Y243F;SP707+H183\*G184\*N195F I206L Y243F;SP707+H183\*G184\*N195F I206Y Y243F;SP707+R181\*G182\*N195F M202L;SP707+G182\*H183\*N195F M202L;SP707+H183\*G184\*N195F M202L;SP707+R181\*G182\*R118K N195F R320K R458K;

SP707+G182\*H183\*R118K N195F R320K R458K;SP707+H183\*G184\*R118K N195F R320K R458K;

[0231] SP690+R181\*G182\*N195F;SP690+G182\*T183\*N195F;SP690+T183\*G184\*N195F;SP690+H183\*G184\*V206Y;SP690+H183\*G184\*N195F V206Y;SP690+H183\*G184\*N195F Y243F;SP690+H183\*G184\*V206Y Y243F;SP690+H183\*G184\*N195F V206L Y243F;SP690+H183\*G184\*N195F V206Y Y243F;SP690+R181\*G182\*N195F M202L;SP690+G182\*T183\*N195F M202L;SP690+T183\*G184\*N195F M202L;SP690+R181\*G182\*R118K N195F R320K R458K;SP690+G182\*T183\*R118K N195F R320K R458K;SP690+T183\*G184\*R118K N195F R320K R458K。

[0232] 在有用的实施方案中,根据本发明的组合物包含淀粉酶,其为亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体,其中所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶为SEQ ID NO:6的,且所述变体包含缺失D183\*和G184\*以及一组下述突变:(a) N195F+H210Y;(b) N195F+V206L,H,Y;(c) N195F+V206L,F+H210Y;(d) N195F+V206Y+Y243F;(e) N195F+Y243F;(f) S193T+V206L;(g) G133E+G149R+N195Y+Y203F+V206L;(h) V206L,Y;(i) Y243F;(j) N195F+V206L+Y243F;(k) N195F;或(l) V206F+Y243F。

[0233] 本发明的另一个实施方案涉及组合物,其中在螯合剂存在下变体相对于亲本 $\alpha$ -淀粉酶的剩余活性为至少70%,如至少75%,如至少80%,如至少85%,如至少90%,如至少95%,如至少100%,如至少105%,如至少110%,如至少115%剩余活性,其中当如“材料和方法”中所述在21℃和pH 8.0测量时所述螯合剂在低于10mM,优选低于9.5mM,优选低于9mM,优选低于8.5mM,优选低于8mM,优选低于7.5mM,优选低于7mM,优选低于6.5mM,优选低于6mM,优选低于5.5mM,优选地,优选低于5mM,优选低于4.5mM,低于4mM,优选低于3.5mM,优选低于3mM,优选低于2.5mM,优选低于2mM,优选低于1.5mM或优选低于1mM的浓度能够将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM,且剩余活性是在“材料和方法”中所述的EnzChek或PNP-G7测定中所述在pH 8在31℃18小时之后确定的。

[0234] 本发明的一个进一步的实施方案涉及组合物,其中在螯合剂存在下变体相对于亲本 $\alpha$ -淀粉酶的剩余活性的剩余活性改善了至少5,10,20,30,40,50,60,70,80,90,100pp,其中当如“材料和方法”中所述在21℃和pH 8.0测量时所述螯合剂在低于10mM,优选低于9.5mM,优选低于9mM,优选低于8.5mM,优选低于8mM,优选低于7.5mM,优选低于7mM,优选低于6.5mM,优选低于6mM,优选低于5.5mM,优选地,优选低于5mM,优选低于4.5mM,低于4mM,优选低于3.5mM,优选低于3mM,优选低于2.5mM,优选低于2mM,优选低于1.5mM或优选低于1mM的浓度能够将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM,且其中剩余活性是在“材料和方法”中所述的EnzChek或PNP-G7测定中所述在pH 8在31℃18小时之后确定的。变体相对于亲本的剩余活性的百分点(pp)改善计算为变体的剩余活性和亲本的剩余活性之间的差异。

[0235] 因此在本发明的一个特定方面,所述组合物包含选自下组的螯合剂:含磷螯合剂,不含磷螯合剂,含羧酸螯合剂,含氮螯合剂或不含氮螯合剂,优选的螯合剂为EDTA,MGDA,EGTA,DTPA,DTPMP,HEDP,及其混合物。

[0236] 在本发明的一个优选的方面,所述变体在一个或多个选自195,193,197,198,200,203,206,210,212和213的位置包含取代,其中位置对应于SEQ ID NO:6的成熟多肽的位置。

[0237] 在本发明一个特别优选的方面,所述变体在181,182,183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失,并进一步在一个或多个选自195,193,197,198,200,

203,206,210,212,213和243的位置包含取代,其中位置对应于SEQ ID NO:6的成熟多肽的位置。在优选的实施方案中,所述181,182,183或184的氨基酸区的至少两个缺失选自:181\*+182\*;181\*+183\*,182\*+183\*;181\*+184\*,182\*+184\*和183\*+184\*。

[0238] 在本发明另一个优选的方面,所述变体在一个或多个选自195,193,197,198,200,203,206,210,212,213和243的位置包含取代,并进一步在一个或多个,或一个或几个选自116,118,129,133,134,142,146,147,149,151,152,169,174,186,235,244,303,320,339,359,418,431,434,447,458的位置包含取代,其中位置对应于SEQ ID NO:6的成熟多肽的位置。

[0239] 还在本发明的一个优选的方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失,并进一步在一个或多个选自195,193,197,198,200,203,206,210,212,213和243的位置包含取代,并进一步在一个或多个选自116,118,129,133,134,142,146,147,149,151,152,169,174,186,235,244,303,320,339,359,418,431,434,447,458的位置包含取代,其中位置对应于SEQ ID NO:6的成熟多肽的位置。

[0240] 在一个进一步的方面,所述变体在两个或更多个选自116,118,129,133,134,142,146,147,149,151,152,169,174,186,193,195,197,198,200,203,206,210,212,213,235,243,244,303,320,339,359,418,431,434,447和458的位置包含取代,其中位置对应于SEQ ID NO:6的成熟多肽的位置。

[0241] 还在一个进一步的方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失,并进一步在两个或更多个选自116,118,129,133,134,142,146,147,149,151,152,169,174,186,193,195,197,198,200,203,206,210,212,213,235,243,244,303,320,339,359,418,431,434,447和458的位置包含取代,其中位置对应于SEQ ID NO:6的成熟多肽的位置。

[0242] 优选地,在一个或多个上述鉴定的位置包含改变的变体在包含螯合剂的组合物中,例如在洗涤剂中,优选在液体洗涤剂中,相对于亲本 $\alpha$ -淀粉酶具有增加的稳定性。

[0243] 因此,在一个优选实施方案中,根据本发明的变体在一种或多种螯合剂的存在下相对于其亲本淀粉酶具有改善的稳定性。在一个优选的方面,根据本发明的变体在一种或多种螯合剂和低钙浓度的存在下相对于其亲本淀粉酶具有改善的稳定性。还在一个优选的方面,根据本发明的变体在螯合剂的存在下相对于其亲本淀粉酶具有改善的稳定性,其中当在21℃和pH 8.0测量时所述螯合剂在低于10mM的浓度能够将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM。

[0244] 在一个具体的方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失,并进一步在选自193,195,197,198,200,203,206,210,212,213和243的一个或多个位置包含取代和在选自116,118,129,133,134,142,146,147,149,151,152,169,174,186,235,244,303,320,338,359,418,431,434,447和458的一个或多个位置包含取代,其中位置对应于SEQ ID NO:6的成熟多肽的位置,且其中所述变体进一步在螯合剂存在下具有至少60%,如至少65%,如至少70%,如至少75%,如至少80%,如至少85%,如至少90%,如至少95%,如至少100%剩余活性,其中所述螯合剂如下所述在21℃和pH 8.0在低于10mM,优选低于9.5mM,优选低于9mM,优选低于8.5mM,优选低于8mM,优选低于7.5mM,优选低于7mM,优选低于6.5mM,优选低于6mM,优选低于5.5mM,优选地,优选低于5mM,

优选低于4.5mM, 低于4mM, 优选低于3.5mM, 优选低于3mM, 优选低于2.5mM, 优选低于2mM, 优选低于1.5mM或优选低于1mM的浓度能够将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM, 且其中剩余活性是在“材料和方法”中所述的EnzChek或PNP-G7测定中所述在pH 8在31℃18小时之后确定的。在优选的实施方案中, 所述181, 182, 183或184的氨基酸区的至少两个缺失选自: 181\*+182\*; 181\*+183\*, 182\*+183\*; 181\*+184\*, 182\*+184\*和183\*+184\*。

[0245] 在另一个具体方面, 所述变体在一个或多个选自193、195、197、198、200、203、206、210、212、213和243的位置包含取代并进一步在一个或多个选自116, 118, 129, 133, 134, 142, 146, 147, 149, 151, 152, 169, 174, 186, 235, 244, 303, 320, 339, 359, 418, 431, 434, 447和458的位置包含取代, 其中位置对应于SEQ ID NO:6的成熟多肽的位置, 且其中所述变体进一步在螯合剂存在下相对于亲本 $\alpha$ -淀粉酶的剩余活性具有至少60%, 如至少65%, 如至少70%, 如至少75%, 如至少80%, 如至少85%, 如至少90%, 如至少95%, 如至少100%剩余活性或具有至少5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100pp改善的剩余活性, 其中当如“材料和方法”中所述在21℃和pH 8.0测量时所述螯合剂在低于10mM, 优选低于9.5mM, 优选低于9mM, 优选低于8.5mM, 优选低于8mM, 优选低于7.5mM, 优选低于7mM, 优选低于6.5mM, 优选低于6mM, 优选低于5.5mM, 优选地, 优选低于5mM, 优选低于4.5mM, 低于4mM, 优选低于3.5mM, 优选低于3mM, 优选低于2.5mM, 优选低于2mM, 优选低于1.5mM或优选低于1mM的浓度能够将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM, 且其中剩余活性是在“材料和方法”中所述的EnzChek或PNP-G7测定中所述在31℃在DTPA存在下在pH 8 18小时之后确定的。

[0246] 根据本发明的变体具有下述优点: 相对于其亲本 $\alpha$ -淀粉酶对于强螯合剂更加稳定, 然而同时其保持亲本 $\alpha$ -淀粉酶的性能特性如洗涤性能或洗碟性能。在一个优选实施方案中, 根据本发明的变体具有对于螯合剂更加稳定的优点, 其中当如“材料和方法”中所述在80mM氯化钾和49mMEPPS中, 在21℃和pH 8.0测量时, 所述螯合剂在低于10mM的浓度能够将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM。这些优选的螯合剂可选自但不限于EDTA, MGDA, EGTA, DTPA, DTPMP, HEDP, 及其混合物。

[0247] 因此, 本发明的变体在螯合剂(其结合金属离子, 特别是钙离子)的存在下相对于其亲本 $\alpha$ -淀粉酶具有增加的稳定性。在洗涤剂中, 通常因为其在洗衣过程中的有益作用而包含螯合剂, 但增加的稳定性亦可为在当存在包含天然螯合剂如植酸盐或柠檬酸盐的植物材料的条件下。具体而言, 强螯合剂会与钙敏感性 $\alpha$ -淀粉酶竞争钙离子, 并会在一定程度上剥夺 $\alpha$ -淀粉酶结合在其结构中的钙离子, 其结果是所述 $\alpha$ -淀粉酶的稳定性或活性减少。

[0248] 因此本发明的变体在螯合剂如EDTA, MGDA, EGTA, DTPA, DTPMP HEDP及其混合物的存在下相对于其亲本 $\alpha$ -淀粉酶具有改善的稳定性和/或活性。

[0249] 除了对于螯合剂相对于亲本 $\alpha$ -淀粉酶增加的稳定性之外, 本发明的变体相对于亲本 $\alpha$ -淀粉酶保留或改善了洗涤性能。改善的洗涤性能可用AMSA或在如“材料和方法”中所述使用烧杯的洗涤性能测试中进行测量。

[0250] 因此, 在本发明一个具体实施方案中, 所述变体相对于亲本 $\alpha$ -淀粉酶的剩余活性具有至少60%如至少65%剩余活性, 优选至少70%剩余活性, 优选至少75%剩余活性, 优选至少80%剩余活性, 优选至少85%剩余活性, 优选至少90%剩余活性, 优选至少95%剩余活性或具有至少5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100pp改善的剩余活性, 其中剩余活性是EnzChek或PNP-G7测定(在“材料和方法”中详述)中所述在pH 8和31℃在螯合剂存在下18小

时之后确定的,其中如下所述当在21℃和pH 8.0测量时所述螯合剂在低于10mM的浓度能够将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM,且其中所述变体进一步在AMSA中或在如“材料和方法”中所述使用烧杯的洗涤性能测试中进行测量时相对于亲本 $\alpha$ -淀粉酶具有至少40%,如至少50%,如至少55%,如至少60%,如至少65%,如至少70%,如至少75%,如至少80%,如至少85%,如至少90%,如至少95%,如至少100%改善的洗涤性能。

[0251] 在本发明的一个优选的方面,所述组合物包含变体,所述变体在螯合剂存在下相对于亲本 $\alpha$ -淀粉酶具有至少60%,如至少65%,如至少70%,如至少75%,如至少80%,如至少85%,如至少90%,如至少95%,如至少100%剩余活性,其中当如实施例2a中所述在21℃和pH 8.0测量时所述螯合剂在低于10mM,优选低于9.5mM,优选低于9mM,优选低于8.5mM,优选低于8mM,优选低于7.5mM,优选低于7mM,优选低于6.5mM,优选低于6mM,优选低于5.5mM,优选地,优选低于5mM,优选低于4.5mM,低于4mM,优选低于3.5mM,优选低于3mM,优选低于2.5mM,优选低于2mM,优选低于1.5mM或优选低于1mM的浓度能够将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM,且其中剩余活性是在“材料和方法”中所述的EnzChek或PNP-G7测定中所述在pH 8在31℃18小时之后确定的。

[0252] 因此,在本发明的一个具体的方面,所述组合物包含选自下组的螯合剂:含磷螯合剂,不含磷螯合剂,含氮螯合剂或不含氮螯合剂,优选的螯合剂为EDTA,MGDA,EGTA,DTPA,DTPMP,HEDP,及其混合物。

[0253] 在一个优选的方面,根据本发明的变体具有氨基酸序列,所述氨基酸序列与亲本 $\alpha$ -淀粉酶的氨基酸序列具有至少60%,优选至少65%,优选至少70%,优选至少75%,优选至少80%,优选至少81%,优选至少82%,优选至少83%,优选至少84%,优选至少85%,优选至少86%,优选至少87%,优选至少88%,优选至少89%,特别优选至少90%,优选至少91%,优选至少92%,优选至少93%,优选至少94%,优选至少95%,优选至少96%,优选至少97%,优选至少98%,优选至少99%同一性的同一性程度,所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶的氨基酸序列可为任何具有SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26的序列,优选SEQ ID NO:6、8、10、12、18或22,优选SEQ ID NO:14、16或20,优选SEQ ID NO:6、8、10或12的序列。

[0254] 在本发明的一个方面,使用根据SEQ ID NO:6的编号,亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体在一个或多个选自193,195,197,198,200,203,206,210,212,213和243的位置包含取代,且其中所述变体具有氨基酸序列,所述氨基酸序列与亲本 $\alpha$ -淀粉酶的氨基酸序列具有至少60%,优选至少65%,优选至少70%,优选至少75%,优选至少80%,优选至少81%,优选至少82%,优选至少83%,优选至少84%,优选至少85%,优选至少86%,优选至少87%,优选至少88%,优选至少89%,特别优选至少90%,优选至少91%,优选至少92%,优选至少93%,优选至少94%,优选至少95%,优选至少96%,优选至少97%,优选至少98%,优选至少99%同一性的同一性程度,所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶的氨基酸序列可为任何具有SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26,优选SEQ ID NO:14、16或20,优选SEQ ID NO:6、8、10、12、18或22,优选SEQ ID NO:6、8、10或12的序列。

[0255] 在本发明的一个方面,亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失,并进一步在一个或多个选自193,195,197,198,200,203,206,210,212,213和243的位置包含取代,使用根据SEQ ID NO:6的编号,且其中所述变体具有的氨基酸序列与亲本 $\alpha$ -淀粉酶的氨基酸序列具有至少60%,优选至少65%,优选至



少70%，优选至少75%，优选至少80%，优选至少81%，优选至少82%，优选至少83%，优选至少84%，优选至少85%，优选至少86%，优选至少87%，优选至少88%，优选至少89%，特别优选至少90%，优选至少91%，优选至少92%，优选至少93%，优选至少94%，优选至少95%，优选至少96%，优选至少97%，优选至少98%，优选至少99%同一性的同一性程度，所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶的氨基酸序列可为任何具有SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26，优选SEQ ID NO:14、16或20，优选SEQ ID NO:6、8、10、12、18或22，优选SEQ ID NO:6、8、10或12的序列。

[0256] 在本发明的一个进一步的方面，所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失，并进一步在一个或多个选自193、195、197、198、200、203、206、210、212、213和243的位置包含取代，其使用根据SEQ ID NO:6的编号，且其中所述变体具有的氨基酸序列与示于SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26，优选SEQ ID NO:14、16或20，优选SEQ ID NO:6、8、10、12、18或22，优选SEQ ID NO:6、8、10或12的氨基酸序列具有至少60%，优选至少65%，优选至少70%，优选至少75%，优选至少80%，优选至少81%，优选至少82%，优选至少83%，优选至少84%，优选至少85%，优选至少86%，优选至少87%，优选至少88%，优选至少89%，特别优选至少90%，优选至少91%，优选至少92%，优选至少93%，优选至少94%，优选至少95%，优选至少96%，优选至少97%，优选至少98%，优选至少99%同一性的同一性程度。

[0257] 在本发明的另一个方面，所述变体在位置193、195、197、198、200、203、206、210、212、213或243的一个或多个包含取代，并在位置116、118、129、133、134、142、146、147、149、151、152、169、174、186、235、244、303、320、339、359、418、431、434、447、458的一个或多个包含取代，使用根据SEQ ID NO:6的编号，且其中所述变体具有氨基酸序列，所述氨基酸序列与亲本 $\alpha$ -淀粉酶的氨基酸序列具有至少60%，优选至少65%，优选至少70%，优选至少75%，优选至少80%，优选至少81%，优选至少82%，优选至少83%，优选至少84%，优选至少85%，优选至少86%，优选至少87%，优选至少88%，优选至少89%，特别优选至少90%，优选至少91%，优选至少92%，优选至少93%，优选至少94%，优选至少95%，优选至少96%，优选至少97%，优选至少98%，优选至少99%同一性的同一性程度，所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶的氨基酸序列可为任何具有SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26，优选SEQ ID NO:14、16或20，优选SEQ ID NO:6、8、10、12、18或22，优选SEQ ID NO:6、8、10或12的序列。

[0258] 在本发明的另一个方面，所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失，并进一步在位置193、195、197、198、200、203、206、210、212、213或243的一个或多个包含取代，并在位置116、118、129、133、134、142、146、147、149、151、152、169、174、186、235、244、303、320、339、359、418、431、434、447、458的一个或多个包含取代，使用根据SEQ ID NO:6的编号，且其中所述变体具有氨基酸序列，所述氨基酸序列与亲本 $\alpha$ -淀粉酶的氨基酸序列具有至少60%，优选至少65%，优选至少70%，优选至少75%，优选至少80%，优选至少81%，优选至少82%，优选至少83%，优选至少84%，优选至少85%，优选至少86%，优选至少87%，优选至少88%，优选至少89%，特别优选至少90%，优选至少91%，优选至少92%，优选至少93%，优选至少94%，优选至少95%，优选至少96%，优选至少97%，优选至少98%，优选至少99%同一性的同一性程度，所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶的氨基酸序

列可为任何具有SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26,优选SEQ ID NO:14,16或20,优选SEQ ID NO:6,8,10,12,18或22,优选SEQ ID NO:6,8,10或12的序列。

[0259] 在一个方面,相对于亲本 $\alpha$ -淀粉酶本发明的变体中氨基酸取代的数量为低于10个取代,如低于9个取代,如低于8个取代,如低于7个取代,如低于6个取代,如低于5个取代,如低于4个取代,如低于3个取代,如低于2个取代,和/或其中缺失的数量为低于10个缺失,如低于9个缺失,如低于8个缺失,如低于7个缺失,如低于6个缺失,如低于5个缺失,如低于4个缺失,如低于3个缺失,如低于2个缺失,如低于1个缺失,或所述变体可不包含个缺失,和/或其中插入的数量为低于10个插入,如低于9个插入,如低于8个插入,如低于7个插入,如低于6个插入,如低于5个插入,如低于4个插入,如低于3个插入,如低于2个插入,如低于1个插入或所述变体不包含插入,所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶可为任何具有SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26,优选SEQ ID NO:6,8,10,12,18或22,优选SEQ ID NO:14,16或20,优选SEQ ID NO:6,8,10或12的序列。

[0260] 在一个方面,所述变体包含在对应于位置193的位置的取代。在另一个方面,所述变体包含在对应于SEQ ID NO:6的成熟多肽的位置193的位置用[G,A,T或M]的取代。在一个具体实施方案中,所述变体包含SEQ ID NO:6的成熟多肽的取代S193T。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含取代S193T,其中所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶是任何具有SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26,优选SEQ ID NO:14,16或20,优选SEQ ID NO:6,8,10,12,18或22,优选SEQ ID NO:6,8,10或12的成熟多肽。

[0261] 在一个方面,亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体包含在位置195的取代,在一个优选的方面,所述变体包含在位置195用[F,W,Y,L,I或V]的取代,在另一个优选的方面,所述变体在位置195包含F,还在另一个优选的方面,所述变体包含取代N195F,其中所述亲本是任何具有SEQ ID NO:6,8,10或12的成熟多肽。在另一个方面,所述变体包含Y作为在位置195的取代。在另一个方面,所述变体包含取代N195Y,其中所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶是任何具有SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26,优选SEQ ID NO:14,16或20,优选SEQ ID NO:6,8,10,12,18或22,优选SEQ ID NO:6,8,10或12的成熟多肽。

[0262] 在一个方面,亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失,并进一步在位置195包含取代,在一个优选的方面,所述变体包含在位置195用[F,W,Y,L,I或V]的取代,在另一个优选的方面,所述变体在位置195包含F,还在另一个优选的方面,所述变体包含取代N195F,其中所述亲本是任何具有SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26,优选SEQ ID NO:6,8,10,12,18或22,优选SEQ ID NO:6,8,10或12的成熟多肽。在另一个方面,所述变体在位置195包含Y作为取代。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含取代N195Y,其中所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶是任何具有SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26,优选SEQ ID NO:14,16或20,优选SEQ ID NO:6,8,10,12,18或22,优选SEQ ID NO:6,8,10或12的成熟多肽。

[0263] 在一个方面,亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体在位置197包含取代,在一个优选的方面,所述变体包含在位置197用[F,W,Y,L,I或V]的取代,在另一个优选的方面,所述变体在位置197包含F,还在另一个优选的方面,所述变体包含取代N197F,其中所述亲本是任何具有SEQ ID

N0:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26,优选SEQ ID N0:14,16或20,优选SEQ ID N0:6,8,10,12,18或22,优选SEQ ID N0:6,8,10或12的成熟多肽。在另一个方面,所述变体在位置197包含L作为取代。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含取代N197L,其中所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶是任何具有SEQ ID N0:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26,优选SEQ ID N0:14,16或20,优选SEQ ID N0:6,8,10,12,18或22,优选SEQ ID N0:6,8,10或12的成熟多肽。

[0264] 在一个方面,亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失,并进一步在位置197包含取代,在一个优选的方面,所述变体包含在位置197用[F,W,Y,L,I或V]的取代,在另一个优选的方面,所述变体在位置197包含F,还在另一个优选的方面,所述变体包含取代N197F,其中所述亲本是任何具有SEQ ID N0:6,8,10或12的成熟多肽。在另一个方面,所述变体在位置197包含L作为取代。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含取代N197L,其中所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶是任何具有SEQ ID N0:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26,优选SEQ ID N0:14,16或20,优选SEQ ID N0:6,8,10,12,18或22,优选SEQ ID N0:6,8,10或12的成熟多肽。

[0265] 在一个方面,亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体在位置198包含取代,在一个优选的方面,所述变体包含在位置198用[Q,N,D,E,R,K或H]的取代,在另一个优选的方面,所述变体在位置198包含N,还在另一个优选的方面,所述变体包含取代Y198N,其中所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶是任何具有SEQ ID N0:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26,优选SEQ ID N0:14,16或20,优选SEQ ID N0:6,8,10,12,18,20或22,优选SEQ ID N0:6,8,10或12的成熟多肽。

[0266] 在一个方面,亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失,并进一步在位置198包含取代,在一个优选的方面,所述变体包含在位置198用[Q,N,D,E,R,K或H]的取代,在另一个优选的方面,所述变体在位置198包含F,还在另一个优选的方面,所述变体包含取代Y198N,其中所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶是任何具有SEQ ID N0:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26,优选SEQ ID N0:14,16或20,优选SEQ ID N0:6,8,10,12,18或22,优选SEQ ID N0:6,8,10或12的成熟多肽。

[0267] 在一个方面,亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体在位置200包含取代,在一个优选的方面,所述变体包含在位置200用[F,W,Y,L,I或V]的取代,在另一个优选的方面,所述变体在位置200包含F,还在另一个优选的方面,所述变体包含取代Y200F,其中所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶是任何具有SEQ ID N0:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26,优选SEQ ID N0:14,16或20,优选SEQ ID N0:6,8,10,12,18或22,优选SEQ ID N0:6,8,10或12的成熟多肽。

[0268] 在一个方面,亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失,并进一步在位置200包含取代,在一个优选的方面,所述变体包含在位置200用[F,W,Y,L,I或V]的取代,在另一个优选的方面,所述变体在位置200包含F,还在另一个优选的方面,所述变体包含取代Y200F,其中所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶是任何具有SEQ ID N0:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26,优选SEQ ID N0:14,16或20,优选SEQ ID N0:6,8,10,12,18或22,优选SEQ ID N0:6,8,10或12的成熟多肽。

[0269] 在一个方面,亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体在位置203包含取代,在一个优选的方面,所述变体包含在位置203用[F,W,Y,L,I或V]的取代,在另一个优选的方面,所述变体在位置203

包含F,还在另一个优选的方面,所述变体包含取代Y203F,其中所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶是任何具有SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26,优选SEQ ID NO:14,16或20,优选SEQ ID NO:6,8,10,12,18或22,优选SEQ ID NO:6,8,10或12的成熟多肽。

[0270] 在一个方面,亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失,并进一步在位置203包含取代,在一个优选的方面,所述变体包含在位置203用[F,W,Y,L,I或V]的取代,在另一个优选的方面,所述变体在位置203包含F,还在另一个优选的方面,所述变体包含取代Y203F,其中所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶是任何具有SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26,优选SEQ ID NO:14,16或20,优选SEQ ID NO:6,8,10,12,18或22,优选SEQ ID NO:6,8,10或12的成熟多肽。

[0271] 在一个方面,亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体在位置206包含取代,在一个优选的方面,所述变体包含在位置206用[F,W,Y,N,L,I,V,H,Q,D或E]的取代,在另一个优选的方面,所述变体在位置206包含F,还在另一个优选的方面,所述变体在位置206包含Y,仍在另一个方面,所述变体在位置206包含L,其中所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶是任何具有SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26,优选SEQ ID NO:14,16或20,优选SEQ ID NO:6,8,10,12,18或22,优选SEQ ID NO:6,8,10或12的成熟多肽。

[0272] 在一个具体实施方案中,所述变体包含SEQ ID NO:6或12的成熟多肽的取代V206Y。在另一个具体实施方案中,所述变体包含SEQ ID NO:8或10的成熟多肽的取代I206Y。

[0273] 在一个具体实施方案中,所述变体包含SEQ ID NO:6或12的成熟多肽的取代V206F。在另一个具体实施方案中,所述变体包含SEQ ID NO:8或10的成熟多肽的取代I206F。

[0274] 在一个具体实施方案中,所述变体包含SEQ ID NO:6或12的成熟多肽的取代V206L。在另一个具体实施方案中,所述变体包含SEQ ID NO:8或10的成熟多肽的取代I206L。

[0275] 在一个具体实施方案中,所述变体包含SEQ ID NO:6或12的成熟多肽的取代V206H。在另一个具体实施方案中,所述变体包含SEQ ID NO:8或10的成熟多肽的取代I206H。

[0276] 在一个方面,亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失,并进一步在位置206包含取代,在一个优选的方面,所述变体包含在位置206用[F,W,Y,N,L,I,V,H,Q,D或E]的取代,在另一个优选的方面,所述变体在位置206包含F,在另一个优选的方面,所述变体在位置206包含Y。

[0277] 在一个具体实施方案中,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含SEQ ID NO:6或12的成熟多肽的取代V206Y。在另一个具体实施方案中,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含SEQ ID NO:8或10的成熟多肽的取代I206Y。

[0278] 在一个具体实施方案中,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含SEQ ID NO:6或12的成熟多肽的取代V206L。在另一个具体实施方案中,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含取代SEQ ID NO:8或10的成熟多肽的I206L。

[0279] 在一个具体实施方案中,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含SEQ ID NO:6或12的成熟多肽的取代V206H。在另一个具体实施方案中,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含SEQ ID NO:8或10的成熟多肽的取代I206H。

[0280] 在一个方面,亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体在位置210包含取代,在一个优选的方面,所述变体包含在位置210用[F,W,Y,L,I或V]的取代,在另一个优选的方面,所述变体在位置210包含Y,还在另一个优选的方面,所述变体包含取代H210Y,其中所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶是任何具有SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26,优选SEQ ID NO:14,16或20,优选SEQ ID NO:6,8,10,12,18或22,优选SEQ ID NO:6,8,10或12的成熟多肽。

[0281] 在一个方面,亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失,并进一步在位置210包含取代,在一个优选的方面,所述变体包含在位置210用[F,W,Y,L,I或V]的取代,在另一个优选的方面,所述变体在位置210包含Y,还在另一个优选的方面,所述变体包含取代H210Y,其中所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶是任何具有SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26,优选SEQ ID NO:14,16或20,优选SEQ ID NO:6,8,10,12,18或22,优选SEQ ID NO:6,8,10或12的成熟多肽。

[0282] 在一个方面,亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体在位置212包含取代,在一个优选的方面,所述变体包含在位置212用[F,W,Y,L,I或V]的取代,在另一个优选的方面,所述变体在位置212包含V,还在另一个优选的方面,所述变体包含取代E212V,其中所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶是任何具有SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26,优选SEQ ID NO:14,16或20,优选SEQ ID NO:6,8,10,12,18或22,优选SEQ ID NO:6,8,10或12的成熟多肽。

[0283] 在一个方面,亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失,并进一步在位置212包含取代,在一个优选的方面,所述变体包含在位置212用[F,W,Y,L,I或V]的取代,在另一个优选的方面,所述变体在位置212包含V,还在另一个优选的方面,所述变体包含取代E212V,其中所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶是任何具有SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26,优选SEQ ID NO:6,8,10,12,18或22,优选SEQ ID NO:6,8,10或12的成熟多肽。

[0284] 在一个方面,亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体在位置213包含取代,在一个优选的方面,所述变体包含在位置213用[G,A,S,T或M]的取代,在另一个优选的方面,所述变体在位置213包含A,还在另一个优选的方面,所述变体包含取代V213A,其中所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶是任何具有SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26,优选SEQ ID NO:14,16或20,优选SEQ ID NO:6,8,10,12,18或22,优选SEQ ID NO:6,8,10或12的成熟多肽。

[0285] 在一个方面,亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失,并进一步在位置213包含取代,在一个优选的方面,所述变体包含在位置213用[G,A,S,T或M]的取代,在另一个优选的方面,所述变体在位置213包含A,还在另一个优选的方面,所述变体包含取代V213A,其中所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶是任何具有SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26,优选SEQ ID NO:14,16或20,优选SEQ ID NO:6,8,10,12,18或22,优选SEQ ID NO:6,8,10或12的成熟多肽。

[0286] 在一个方面,亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体在位置243包含取代,在一个优选的方面,所述变体包含在位置243用[F,W,Y,L,I或V]的取代,在另一个优选的方面,所述变体在位置243

包含F,还在另一个优选的方面,所述变体包含取代Y243F,其中所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶是任何具有SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26,优选SEQ ID NO:14,16或20,优选SEQ ID NO:6,8,10,12,18或22,优选SEQ ID NO:6,8,10或12的成熟多肽。

[0287] 在一个方面,亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失,并进一步在位置243包含取代,在一个优选的方面,所述变体包含在位置243用[F,W,Y,L,I或V]的取代,在另一个优选的方面,所述变体在位置243包含A,还在另一个优选的方面,所述变体包含取代Y243F,其中所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶是任何具有SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26,优选SEQ ID NO:14,16或20,优选SEQ ID NO:6,8,10,12,18或22,优选SEQ ID NO:6,8,10或12的成熟多肽。

[0288] 在另一个方面,所述变体包含在位置193和195的取代。在另一个方面,所述变体包含在位置193和195用[F,W,Y,L,I,V,N,G,A,T,M或Q]的取代。在另一个方面,所述变体分别包含T和F作为在位置193和195的取代。在另一个方面,所述变体包含SEQ ID NO:6的成熟多肽的取代S193T+N195F。在另一个方面,所述变体分别包含T和Y作为在位置193和195的取代。在另一个方面,所述变体包含SEQ ID NO:6的成熟多肽的取代S193T+N195Y。

[0289] 在另一个方面,亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含在位置193和195的取代。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含在位置193和195用[F,W,Y,L,I,V,N,G,A,T,M或Q]的取代。在另一个方面,所述变体分别包含T和F作为在位置193和195的取代。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含SEQ ID NO:6的成熟多肽的取代S193T+N195F。在另一个方面,所述变体分别包含T和Y作为在位置193和195的取代。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含SEQ ID NO:6的成熟多肽的取代S193T+N195Y。

[0290] 在另一个方面,亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体在位置195和198包含取代,使用SEQ ID NO:6的编号。在另一个方面,所述变体包含在位置195和198用[F,W,Y,L,I,V,N或Q]的取代。在另一个方面,所述变体分别包含F和N作为在位置195和198的取代。在另一个方面,所述变体包含取代N195F+Y198N,其中所述亲本的任何具有SEQ ID NO:6,8,10或12的成熟多肽。在另一个方面,所述变体分别包含Y和N作为在位置195和198的取代。在另一个方面,所述变体包含取代N195Y+Y198N,其中所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶是任何具有SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26,优选SEQ ID NO:14,16或20,优选SEQ ID NO:6,8,10,12,18或22,优选SEQ ID NO:6,8,10或12的成熟多肽。

[0291] 在另一个方面,亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失,并进一步在位置195和198包含取代,使用SEQ ID NO:6的编号。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含在位置195和198用[F,W,Y,L,I,V,N或Q]的取代。在另一个方面,所述变体分别包含F和N作为在位置195和198的取代。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含N195F+Y198N的取代,其中所述亲本的任何具有SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26,优选SEQ ID NO:14,16或20,优选SEQ ID NO:6,8,10,12,18或22,优选SEQ ID NO:6,8,10或12

的成熟多肽。在另一个方面,所述变体分别包含Y和N作为在位置195和198的取代。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含取代N195Y+Y198N,其中所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶是任何具有SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26,优选SEQ ID NO:14,16或20,优选SEQ ID NO:6,8,10,12,18或22,优选SEQ ID NO:6,8,10或12的成熟多肽。

[0292] 在另一个方面,亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体在位置195和206包含取代,使用根据SEQ ID NO:6的编号。在另一个方面,所述变体包含在位置195和206用[F,W,Y,V,I,L,C,N,S,T,D,E或H]的取代。在另一个方面,所述变体分别包含F和L作为在位置195和206的取代。在另一个方面,所述变体包含SEQ ID NO:6或12的成熟多肽的取代N195F+V206[F,Y,L,H或N]。在另一个方面,所述变体包含SEQ ID NO:8或10的成熟多肽的取代N195F+I206[F,Y,L,H或N]。在另一个方面,所述变体分别包含Y和L作为在195和206的取代。在另一个方面,所述变体包含SEQ ID NO:6或12的成熟多肽的取代N195Y+V206[F,Y,L,H或N]。在另一个方面,所述变体包含SEQ ID NO:8或10的成熟多肽的取代N195Y+I206[F,Y,L,H或N]。

[0293] 在另一个方面,亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步在位置195和206包含取代,使用根据SEQ ID NO:6的编号。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含在位置195和206用[F,W,Y,V,I,L,C,N,S,T,D,E或H]的取代。在另一个方面,所述变体分别包含F和L作为在位置195和206的取代。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含SEQ ID NO:6或12的成熟多肽的取代N195F+V206[F或Y]。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含SEQ ID NO:8或10的成熟多肽的取代N195F+I206[F,Y,L,H或N]。在另一个方面,所述变体分别包含Y和L作为在位置195和206的取代。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含SEQ ID NO:6或12的成熟多肽的取代N195Y+V206[F,Y,L,H或N]。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含SEQ ID NO:8或10的成熟多肽的取代N195Y+I206F。

[0294] 在另一个方面,亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体在位置195和210包含取代,使用根据SEQ ID NO:6的编号。在另一个方面,所述变体包含在位置195和210用[F,W,Y,V,I,L,C,N,S,T或H]的取代。在另一个方面,所述变体分别包含F和Y作为在位置195和210的取代。在另一个方面,所述变体包含取代N195F+H210Y,其中所述亲本是任何具有SEQ ID NO:6,8,10或12的成熟多肽。在另一个方面,所述变体包含Y作为在位置195和210的取代。在另一个方面,所述变体包含取代N195Y+H210Y,其中所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶是任何具有SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26,优选SEQ ID NO:14,16或20,优选SEQ ID NO:6,8,10,12,18或22,优选SEQ ID NO:6,8,10或12的成熟多肽。

[0295] 在另一个方面,亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步在位置195和210包含取代,使用根据SEQ ID NO:6的编号。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含在位置195和210用[F,W,Y,V,I,L,C,N,S,T或H]的取代。在另一

个方面,所述变体分别包含F和Y作为在位置195和210的取代。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含取代N195F+H210Y,其中所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶是任何具有SEQ ID NO:6,8,10,12,18或22,优选SEQ ID NO:6,8,10或12的成熟多肽。在另一个方面,所述变体包含Y作为在对应于位置195和210的位置的取代。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含取代N195Y+H210Y,其中所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶是任何具有SEQ ID NO:2,4,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24或26,优选SEQ ID NO:14,16或20,优选SEQ ID NO:6,8,10,12,18或22,优选SEQ ID NO:6,8,10或12的成熟多肽。

[0296] 在另一个方面,所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体在对应于位置198和206的位置包含取代,使用根据SEQ ID NO:6的编号。在另一个方面,所述变体包含在位置198和206用[N,Q,L,I,F,Y,C,N,S,T,D,E或H]的取代。在另一个方面,所述变体分别包含N和[F或Y]作为在位置198和206的取代。在另一个方面,所述变体包含SEQ ID NO:6或12的成熟多肽的取代Y198N+V206[F,Y,L,H或N]。在另一个方面,所述变体包含SEQ ID NO:8或10的成熟多肽的取代Y198N+I206[F,Y,L,H或N]。

[0297] 在另一个方面,所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步在对应于位置198和206的位置包含取代,使用根据SEQ ID NO:6的编号。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含在位置198和206用[N,Q,L,I,F,Y,C,N,S,T,D,E或H]的取代。在另一个方面,所述变体分别包含N和[F或Y]作为在位置198和206的取代。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含SEQ ID NO:6或12的成熟多肽的取代Y198N+V206[F,Y,L,H或N]。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含SEQ ID NO:8或10的成熟多肽的取代Y198N+I206[F,Y,L,H或N]。

[0298] 在另一个方面,亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体在位置206和213包含取代,使用根据SEQ ID NO:6的编号。在另一个方面,所述变体包含在位置206和213用[D,E,L,I,V,F,Y,W,G,A,S,T或M]的取代。在另一个方面,所述变体分别包含[F或Y]和A作为在位置206和210的取代。在另一个方面,所述变体包含SEQ ID NO:6或12的成熟多肽的取代V206F或Y+V213A。在另一个方面,所述变体包含SEQ ID NO:8或10的成熟多肽的取代I206[F,Y,L,H或N]+V213A。

[0299] 在另一个方面,亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含在位置206和213的取代,使用根据SEQ ID NO:6的编号。

[0300] 在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含在位置206和213用[D,E,L,I,V,F,Y,W,G,A,S,T或M]的取代。在另一个方面,所述变体分别包含[F或Y]和A作为在位置206和210的取代。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含SEQ ID NO:6或12的成熟多肽的取代V206[F,Y,L,H或N],V213A。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含SEQ ID NO:8或10的成熟多肽的取代I206[F,Y,L,H或N]+V213A。

[0301] 在另一个方面,亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体在位置195和243包含取代,使用根据SEQ ID



N0:6的编号。在另一个方面,所述变体包含在位置195和243用[F,W,Y,L,I或V]的取代。在另一个方面,所述变体分别包含F作为在位置195和243的取代。在另一个方面,所述变体包含取代N195F+Y243F,其中所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶是任何具有SEQ ID N0:6,8,10或12的成熟多肽。在另一个方面,所述变体分别包含Y和F作为在位置195和243的取代。在另一个方面,所述变体包含取代N195Y+Y243F,其中所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶是任何具有SEQ ID N0:6,8,10或12的成熟多肽。

[0302] 在另一个方面,亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步在对应于位置195和243的位置包含取代。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含在位置195和243用[F,W,Y,L,I或V]的取代。在另一个方面,所述变体分别包含F作为在位置195和243的取代。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含取代N195F+Y243F,其中所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶是任何具有SEQ ID N0:6,8,10或12的成熟多肽。在另一个方面,所述变体分别包含Y和F作为在位置195和243的取代。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含取代N195Y+Y243F,其中所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶是任何具有SEQ ID N0:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26,优选SEQ ID N0:6,8,10,12,18或22,优选SEQ ID N0:6,8,10或12的成熟多肽。

[0303] 在另一个方面,亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体在位置206和243包含取代,使用根据SEQ ID N0:6的编号。在另一个方面,所述变体包含在位置206和243用[H,D,E,N,F,W,Y,L,I或V]的取代。在另一个方面,所述变体分别包含L和F作为在位置206和243的取代。在另一个方面,所述变体包含SEQ ID N0:6或12的成熟多肽的取代V206[F,Y,L,H或N]+Y243F。在另一个方面,所述变体包含SEQ ID N0:8或10的成熟多肽的取代V206[F,Y,L,H或N]+Y243F。

[0304] 在另一个方面,亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含在位置206和243的取代,使用根据SEQ ID N0:6的编号。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含在位置206和243用[H,D,E,N,F,W,Y,L,I或V]的取代。在另一个方面,所述变体分别包含L和F作为在位置206和243的取代。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含SEQ ID N0:6或12的成熟多肽的取代V206[F,Y,L,H或N]+Y243F。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含SEQ ID N0:8或10的成熟多肽的取代V206[F,Y,L,H或N]+Y243F。

[0305] 在另一个方面,亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体在位置193,195和197包含取代,使用根据SEQ ID N0:6的编号。在另一个方面,所述变体包含在位置193,195和197用[F,W,Y,L,I或V]的取代。在另一个方面,所述变体分别包含T和F作为在位置对应于位置193,195和197的取代。在另一个方面,所述变体包含取代S193T+N195F+N197F,其中所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶是任何具有SEQ ID N0:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26,优选SEQ ID N0:6,8,10,12,18或22,优选SEQ ID N0:6,8,10或12的成熟多肽。在另一个方面,所述变体分别包含T,F和L作为在位置193,195和197的取代。在另一个方面,所述变体包含取代S193T+N195F+N197L,其中所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶是任何具有SEQ ID N0:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26,优选SEQ

ID NO:6,8,10,12,18或22,优选SEQ ID NO:6,8,10或12的成熟多肽。在另一个方面,所述变体分别包含T,Y和F作为在对应于位置193,195和197的位置的取代。在另一个方面,所述变体包含取代S193T+N195Y+N197F,其中所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶是任何具有SEQ ID NO:2,4,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24或26,优选SEQ ID NO:6,8,10,12,18或22,优选SEQ ID NO:6,8,10或12的成熟多肽。在另一个方面,所述变体分别包含T,Y和L作为在对应于位置193,195和197的位置的取代。在另一个方面,所述变体包含取代S193T+N195Y+N197L,其中所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶是任何具有SEQ ID NO:2,4,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24或26,优选SEQ ID NO:14,16或20,优选SEQ ID NO:6,8,10,12,18,20或22,优选SEQ ID NO:6,8,10或12的成熟多肽。

[0306] 在另一个方面,所述变体在181,182,183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含在位置193,195和197的取代,使用根据SEQ ID NO:6的编号。在另一个方面,所述变体在181,182,183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含在位置193,195和197用[F,W,Y,L,I或V]的取代。在另一个方面,所述变体分别包含T和F作为在位置193,195和197的取代。在另一个方面,所述变体在181,182,183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含取代S193T+N195F+N197F,其中所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶是任何具有SEQ ID NO:2,4,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24或26,优选SEQ ID NO:14,16或20,优选SEQ ID NO:6,8,10,12,18或22,优选SEQ ID NO:6,8,10或12的成熟多肽。在另一个方面,所述变体分别包含T,F和L作为在位置193,195和197的取代。在另一个方面,所述变体在181,182,183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含取代S193T+N195F+N197L,其中所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶是任何具有SEQ ID NO:2,4,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24或26,优选SEQ ID NO:6,8,10,12,18或22,优选SEQ ID NO:14,16或20,优选SEQ ID NO:6,8,10或12的成熟多肽。在另一个方面,所述变体分别包含T,Y和F作为在位置193,195和197的取代。在另一个方面,所述变体在181,182,183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含取代S193T+N195Y+N197F,其中所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶是任何具有SEQ ID NO:6,8,10或12的成熟多肽。在另一个方面,所述变体分别包含T,Y和L作为在位置193,195和197的取代。在另一个方面,所述变体在181,182,183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含取代S193T+N195Y+N197L,其中所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶是任何具有SEQ ID NO:2,4,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24或26,优选SEQ ID NO:14,16或20,优选SEQ ID NO:6,8,10,12,18或22,优选SEQ ID NO:6,8,10或12的成熟多肽。

[0307] 在另一个方面,亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体在位置195,206和243包含取代,使用根据SEQ ID NO:6的编号。在另一个方面,所述变体包含在位置195,206和243用[D,E,L,I,F,V,Y,C,N,S,T或H]的取代。在另一个方面,所述变体分别包含F,Y和F作为在位置195,206和243的取代。在另一个方面,所述变体包含SEQ ID NO:6或12的成熟多肽的取代N195F+V206Y+Y243F。在另一个方面,所述变体包含SEQ ID NO:8或10的成熟多肽的取代N195F+I206Y+Y243F。在另一个方面,所述变体分别包含Y,Y和F作为在位置195,206和243的取代。在另一个方面,所述变体包含SEQ ID NO:6或12的成熟多肽的取代N195Y+V206Y+Y243F。在另一个方面,所述变体包含SEQ ID NO:8或10的成熟多肽的取代N195Y+I206Y+Y243F。

[0308] 在另一个方面,亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体在位置195,206和243包含取代,使用根据SEQ

ID NO:6的编号。在另一个方面,所述变体包含在位置195,206和243用[D,E,L,I,F,V,Y,C,N,S,T或H]的取代。在另一个方面,所述变体分别包含F,L和F作为在位置195,206和243的取代。在另一个方面,所述变体包含SEQ ID NO:6或12的成熟多肽的取代N195F+V206L+Y243F。在另一个方面,所述变体包含SEQ ID NO:8或10的成熟多肽的取代N195F+I206L+Y243F。在另一个方面,所述变体分别包含Y,L和F作为在位置195,206和243的取代。在另一个方面,所述变体包含SEQ ID NO:6或12的成熟多肽的取代N195Y+V206L+Y243F。在另一个方面,所述变体包含SEQ ID NO:8或10的成熟多肽的取代N195Y+I206L+Y243F。

[0309] 在另一个方面,亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体在位置195,206和243包含取代,使用根据SEQ ID NO:6的编号。在另一个方面,所述变体包含在位置195,206和243用[D,E,L,I,F,V,Y,C,N,S,T或H]的取代。在另一个方面,所述变体分别包含F,N和F作为在位置195,206和243的取代。在另一个方面,所述变体包含SEQ ID NO:6或12的成熟多肽的取代N195F+V206N+Y243F。在另一个方面,所述变体包含SEQ ID NO:8或10的成熟多肽的取代N195F+I206N+Y243F。在另一个方面,所述变体分别包含Y,N和F作为在位置195,206和243的取代。在另一个方面,所述变体包含SEQ ID NO:6或12的成熟多肽的取代N195Y+V206N+Y243F。在另一个方面,所述变体包含SEQ ID NO:8或10的成熟多肽的取代N195Y+I206N+Y243F。

[0310] 在另一个方面,亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体在位置195,206和243包含取代,使用根据SEQ ID NO:6的编号。在另一个方面,所述变体包含在位置195,206和243用[D,E,L,I,F,V,Y,C,N,S,T或H]的取代。在另一个方面,所述变体分别包含F,H和F作为在位置195,206和243的取代。在另一个方面,所述变体包含SEQ ID NO:6或12的成熟多肽的取代N195F+V206H+Y243F。在另一个方面,所述变体包含SEQ ID NO:8或10的成熟多肽的取代N195F+I206H+Y243F。在另一个方面,所述变体分别包含Y,H和F作为在位置195,206和243的取代。在另一个方面,所述变体包含SEQ ID NO:6或12的成熟多肽的取代N195Y+V206H+Y243F。在另一个方面,所述变体包含SEQ ID NO:8或10的成熟多肽的取代N195Y+I206H+Y243F。

[0311] 在另一个方面,亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体在位置195,206和243包含取代,使用根据SEQ ID NO:6的编号。在另一个方面,所述变体包含在位置195,206和243用[D,E,L,I,F,V,Y,C,N,S,T或H]的取代。在另一个方面,所述变体分别包含F,F和F作为在位置195,206和243的取代。在另一个方面,所述变体包含SEQ ID NO:6或12的成熟多肽的取代N195F+V206F+Y243F。在另一个方面,所述变体包含SEQ ID NO:8或10的成熟多肽的取代N195F+I206F+Y243F。在另一个方面,所述变体分别包含Y,F和F作为在位置195,206和243的取代。在另一个方面,所述变体包含SEQ ID NO:6或12的成熟多肽的取代N195Y+V206F+Y243F。在另一个方面,所述变体包含SEQ ID NO:8或10的成熟多肽的取代N195Y+I206F+Y243F。

[0312] 在另一个方面,亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步在位置195,206和243包含取代,使用根据SEQ ID NO:6的编号。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含在位置195,206和243用[D,E,L,I,F,V,Y,C,N,S,T或H]的取代。在另一个方面,所述变体分别包含F,Y和F作为在位置195,206和243的取代。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含SEQ ID NO:6或12的成熟多肽的取代N195F+V206Y+Y243F。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步

步包含SEQ ID NO:8或10的成熟多肽的取代N195F+I206Y+Y243F。在另一个方面,所述变体分别包含Y,Y和F作为在位置195,206和243的取代。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含SEQ ID NO:6或12的成熟多肽的取代N195Y+V206Y+Y243F。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含SEQ ID NO:8或10的成熟多肽的取代N195Y+I206Y+Y243F。

[0313] 在另一个方面,亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步在位置195,206和243包含取代,使用根据SEQ ID NO:6的编号。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含在位置195,206和243用[D,E,L,I,F,V,Y,C,N,S,T或H]的取代。在另一个方面,所述变体分别包含F,L和F作为在位置195,206和243的取代。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含SEQ ID NO:6或12的成熟多肽的取代N195F+V206L+Y243F。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含SEQ ID NO:8或10的成熟多肽的取代N195F+I206L+Y243F。在另一个方面,所述变体分别包含Y,L和F作为在位置195,206和243的取代。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含SEQ ID NO:6或12的成熟多肽的取代N195Y+V206L+Y243F。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含SEQ ID NO:8或10的成熟多肽的取代N195Y+I206L+Y243F。

[0314] 在另一个方面,亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步在位置195,206和243包含取代,使用根据SEQ ID NO:6的编号。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含在位置195,206和243用[D,E,L,I,F,V,Y,C,N,S,T或H]的取代。在另一个方面,所述变体分别包含F,N和F作为在位置195,206和243的取代。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含SEQ ID NO:6或12的成熟多肽的取代N195F+V206N+Y243F。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含SEQ ID NO:8或10的成熟多肽的取代N195F+I206N+Y243F。在另一个方面,所述变体分别包含Y,N和F作为在位置195,206和243的取代。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含SEQ ID NO:6或12的成熟多肽的取代N195Y+V206N+Y243F。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含SEQ ID NO:8或10的成熟多肽的取代N195Y+I206N+Y243F。

[0315] 在另一个方面,亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步在位置195,206和243包含取代,使用根据SEQ ID NO:6的编号。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含在位置195,206和243用[D,E,L,I,F,V,Y,C,N,S,T或H]的取代。在另一个方面,所述变体分别包含F,H和F作为在位置195,206和243的取代。在另一

个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含SEQ ID NO:6或12的成熟多肽的取代N195F+V206H+Y243F。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含SEQ ID NO:8或10的成熟多肽的取代N195F+I206H+Y243F。在另一个方面,所述变体分别包含Y,H和F作为在位置195,206和243的取代。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含SEQ ID NO:6或12的成熟多肽的取代N195Y+V206H+Y243F。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含SEQ ID NO:8或10的成熟多肽的取代N195Y+I206H+Y243F。

[0316] 在另一个方面,亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步在位置195,206和243包含取代,使用根据SEQ ID NO:6的编号。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含在位置195,206和243用[D,E,L,I,F,V,Y,C,N,S,T或H]的取代。在另一个方面,所述变体分别包含F,F和F作为在位置195,206和243的取代。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含SEQ ID NO:6或12的成熟多肽的取代N195F+V206F+Y243F。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含SEQ ID NO:8或10的成熟多肽的取代N195F+I206F+Y243F。在另一个方面,所述变体分别包含Y,F和F作为在位置195,206和243的取代。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含SEQ ID NO:6或12的成熟多肽的取代N195Y+V206F+Y243F。在另一个方面,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步包含SEQ ID NO:8或10的成熟多肽的取代N195Y+I206F+Y243F。

[0317] 在本发明的一个方面,所述变体在SEQ ID NO:10的成熟多肽序列或与SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少60%,优选至少65%,优选至少70%,优选至少75%优选至少80%,优选至少81%,优选至少82%,优选至少83%,优选至少84%优选至少85%,优选至少86%,优选至少87%,优选至少88%,优选至少89%,特别优选至少90%,特别优选至少91%,特别优选至少92%,特别优选至少93%,特别优选至少94%,甚至特别是更优选至少95%同源性的氨基酸序列中在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失和一个或多个下述取代:N195[F或Y],N197[F或L],Y198N,Y200F,Y203F,I206[H,L,N,F或Y],H210Y,E212[V或G],V213A,以及在M116T,Q129L,G133E,E134Y,K142R,P146S,G147E,G149R,N151R,Y152H,Q169E,N174R,G186R,Y243F,S244Q,G303V,R320N,R359I,N418D,A447V的一个或多个位置的取代。

[0318] 在本发明的另一个方面,所述变体在SEQ ID NO:8的成熟多肽序列和与SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少60%,优选至少65%,优选至少70%,优选至少75%优选至少80%,优选至少81%,优选至少82%,优选至少83%,优选至少84%优选至少85%,优选至少86%,优选至少87%,优选至少88%,优选至少89%,特别优选至少90%,特别优选至少91%,特别优选至少92%,特别优选至少93%,特别优选至少94%,甚至特别是更优选至少

95%同源性,更优选至少96%,更优选至少97%,更优选至少98%,更优选至少99%同一性程度的氨基酸序列中在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失和一个或多个下述取代:N195[F或Y],N197[F或L],Y198N,Y200F,Y203F,I206[F,Y,L,H或N],H210Y,E212[V或G],V213A,以及在M116T,Q129L,G133E,E134Y,P146S,G147E,G149R,T151R,Y152H,Q169E,N174R,A186R,Y243F,S244Q,G303V,R320N,R359I,N418D,A447V的一个或多个位置的取代。

[0319] 在本发明的一个方面,所述变体在SEQ ID NO:6的成熟多肽序列或与SEQ ID NO:6具有至少60%,优选至少65%,优选至少70%,优选至少75%优选至少80%,优选至少81%,优选至少82%,优选至少83%,优选至少84%优选至少85%,优选至少86%,优选至少87%,优选至少88%,优选至少89%,特别优选至少90%,特别优选至少91%,特别优选至少92%,特别优选至少93%,特别优选至少94%,甚至特别是更优选至少95%同源性,更优选至少96%,更优选至少97%,更优选至少98%,更优选至少99%的同一性程度的氨基酸序列中在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失和一个或多个下述取代:N195[F或Y],N197[F或L],Y198N,Y200F,Y203F,V206[F,Y,L,H或N],H210Y,E212[V或G],V213A或Y243F,以及在I116T,Q129L,G133E,E134Y,K142R,P146S,G147E,G149R,N151R,Y152H,Q169E,Q174R,A186R,S244Q,G303V,K320N,R359I,N418D,A447V的一个或多个位置的取代。

[0320] 在本发明的一个方面,所述变体在SEQ ID NO:12的成熟多肽序列和与SEQ ID NO:12的氨基酸序列具有至少60%,优选至少65%,优选至少70%,优选至少75%优选至少80%,优选至少81%,优选至少82%,优选至少83%,优选至少84%优选至少85%,优选至少86%,优选至少87%,优选至少88%,优选至少89%,特别优选至少90%,特别优选至少91%,特别优选至少92%,特别优选至少93%,特别优选至少94%,甚至特别是更优选至少95%同源性,更优选至少96%,更优选至少97%,更优选至少98%,更优选至少99%的同一性程度的氨基酸序列中在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失和一个或多个下述取代:N195[F或Y],N197[F或L],Y198N,Y200F,Y203F,V206[F,Y,L,H或N],H210Y,E212[V或G],V213A或Y243F,以及在I116T,Q129L,G133E,E134Y,K142R,P146S,G147E,G149R,N151R,Y152H,Q169E,Q174R,A186R,S244Q,G303V,K320N,R359I,N418D,A447V的一个或多个位置的取代。

[0321] 因此,本发明的一个方面涉及亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体,其在一个或多个选自195,197,198,200,203,206,210,212,213和243的位置并包含改变,并进一步在一个或多个选自116,118,129,133,134,142,146,147,149,151,152,169,174,186,235,244,303,320,359,418,431,434,447和458的位置包含改变,其中:

[0322] (a) 各个改变彼此独立地为

[0323] (i) 紧邻某位置下游的氨基酸插入,

[0324] (ii) 占据某位置的氨基酸的缺失,和/或

[0325] (iii) 占据某位置的氨基酸的取代,

[0326] (b) 所述变体具有 $\alpha$ -淀粉酶活性;并且

[0327] (c) 每个位置对应于具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的酶的氨基酸序列的位置。

[0328] 因此,本发明的一个方面涉及亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体,其在181、182、183或184的氨

基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失和在一个或多个选自195,197,198,200,203,206,210,212,213,243的位置的改变并进一步包含在一个或多个选自116,118,129,133,134,142,146,147,149,151,152,169,174,186,235,244,303,320,339,359,418,431,434,447和458的位置的改变,其中

[0329] (a) 各个改变彼此独立地为

[0330] (i) 紧邻某位置下游并邻接该位置的氨基酸插入,

[0331] (ii) 占据某位置的氨基酸的缺失,和/或

[0332] (iii) 占据某位置的氨基酸的取代,

[0333] (b) 所述变体具有 $\alpha$ -淀粉酶活性;并且

[0334] (c) 每个位置对应于具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的酶的氨基酸序列的位置。

[0335] 优选所述变体包含氨基酸序列,所述氨基酸序列与SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26,优选SEQ ID NO:14,16或20,优选SEQ ID NO:6,8,10,12,14,16,18,22或20之一的氨基酸序列具有至少70%,优选至少75%,更优选至少80%,更优选至少85%,甚至更优选至少90%,最优选至少95%,并且甚至最优选至少约97%的同一性程度。

[0336] 优选地,在一个或多个上述鉴定的位置包含改变的变体在包含螯合剂的组合物如工业组合物,例如洗涤剂,优选液体洗涤剂中相对于亲本 $\alpha$ -淀粉酶具有增加的稳定性。

[0337] 发明人发现这些变体相对于亲本 $\alpha$ -淀粉酶在包含螯合剂的组合物中具有改善的稳定性,其中如“材料和方法”中所述在21℃和pH 8.0,所述螯合剂在低于10mM的浓度能够将游离钙离子的浓度从2.0mM降低至0.10mM。

[0338] 因此本发明的另一个方面涉及用于制备多肽的方法,其包括

[0339] (a) 提供具有淀粉酶活性的亲本多肽的氨基酸序列;

[0340] (b) 选择占据对应于SEQ ID NO:6的成熟多肽的位置195,197,198,200,203,206,210,212,213,243的一个或多个位置的一个或多个氨基酸,并进一步选择对应于位置116,118,129,133,134,142,146,147,149,151,152,169,174,186,235,244,303,320,339,359,418,431,434,447,458的一个或多个位置;

[0341] (c) 通过取代或缺失选择的氨基酸残基或在邻接所述选择的氨基酸残基的下游插入一个或多个氨基酸残基来修饰该序列;

[0342] (d) 产生具有修饰的序列的变体多肽;

[0343] (e) 测试所述变体多肽的淀粉酶活性和稳定性;和

[0344] (f) 选择下述变体多肽,其具有淀粉酶活性,并在螯合剂存在下相对于亲本多肽具有增加的稳定性,其中所述螯合剂在21℃和pH 8.0在低于10mM的浓度能够将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM。

[0345] 优选地,所述变体在三个位置,更优选四个位置,甚至更优选五个位置,并且最优选六个位置包含改变,在一个特别优选的实施方案中,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步在对应于所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶中选自193,195,197,198,200,203,206,210,212,213,243的位置的一个或多个位置包含一个或多个取代(使用根据SEQ ID NO:6的编号)。

[0346] 因此,一个优选的方面涉及亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失,和在一个或多个选自195,197,198,

200,203,206,210,212,213,243的位置的改变,并进一步在一个或多个选自116,118,129,133,134,142,146,147,149,151,152,169,174,186,235,244,303,320,339,359,418,413,434,447,458的位置包含改变,其中

[0347] (a) 各个改变彼此独立地为

[0348] (i) 紧邻某位置下游并邻接该位置的氨基酸插入,

[0349] (ii) 占据某位置的氨基酸的缺失,和/或

[0350] (iii) 占据某位置的氨基酸的取代,

[0351] (b) 所述变体具有 $\alpha$ -淀粉酶活性;并且

[0352] (c) 每个位置对应于具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的酶的氨基酸序列的位置。

[0353] 在一个优选实施方案中,所述变体 $\alpha$ -淀粉酶具有一个或多个(几个)氨基酸缺失和/或取代和/或插入。在一个特别优选的实施方案中,所述变体 $\alpha$ -淀粉酶包括下述 $\alpha$ -淀粉酶,其具有本文中SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列,并进一步包含下述改变:D183\*+G184\*(在位置183和184的缺失),该变体在洗涤剂中显示良好的性能,并在螯合剂的存在下具有改善的稳定性。

[0354] 在一个优选实施方案中,所述变体 $\alpha$ -淀粉酶包含SP707 (SEQ ID NO:8),其包括任何SP707+R181\*G182\*,SP707+G182\*H183\*,SP707+H183\*G184\*。

[0355] 在另一个优选实施方案中,所述变体 $\alpha$ -淀粉酶包含SP722 (SEQ ID NO:6),其包括任何SP722+R181\*G182\*,SP722+G182\*D183\*,SP722+D183\*G184\*。

[0356] 还在另一个优选实施方案中,所述变体 $\alpha$ -淀粉酶包含AA560 (SEQ ID NO:10),其包括任何AA560+R181\*G182\*,AA560+G182\*D183\*,AA560+D183\*G184\*。

[0357] 在另一个优选实施方案中,所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶包含SP690 (SEQ ID NO:12),其包括任何SP690+R181\*G182\*;SP690+G182\*T183\*;SP690+T183\*G184\*。

[0358] SP722+R181\*G182\*意指芽孢杆菌属菌种 $\alpha$ -淀粉酶SP722通过在位置R181和G182的缺失而进行了突变,其中编号对应于SEQ ID NO:6。

[0359] 因此,在本发明的一个方面,所述变体 $\alpha$ -淀粉酶包含下述任一:SP722,SP690,SP707或AA560,其包括任何:

[0360] SP722+R181\*G182\*,SP722+G182\*+D183\*,SP722+D183\*+G184\*;SP722+R181\*G182\*N195F;SP722+G182\*D183\*N195F;SP722+D183\*G184\*N195F;SP722+R181\*G182\*M202L;SP722+G182\*D183\*M202L;SP722+D183\*G184\*M202L;SP722+R181\*G182\*N195F M202L;SP722+G182D183\*N195F M202L;SP722+D183\*G184\*N195F M202L;SP722+D183\*G184\*N195F V206L Y243F;SP722+D183\*G184\*N195F V206Y Y243F SP722+D183\*G184\*N195F V206F Y243F;SP722+R181\*G182\*R181Q;SP722+G182\*D183\*R181Q;SP722+D183\*G184\*R181Q;SP722+R181\*G182\*L118K N195F H458K;SP722+G182\*D183\*L118K N195F H458K;SP722+D183\*G184\*L118K N195F H458K;SP722+D183\*G184\*G133E G149R N195Y Y203F V206L。

[0361] AA560+R181\*G182\*,AA560+G182\*D183\*,AA560+D183\*G184\*;AA560+R181\*G182\*N195F;AA560+G182\*D183\*N195F;AA560+D183\*G184\*N195F;AA560+D183\*G184\*I206Y;AA560+D183\*G184\*Y243F;AA560+D183\*G184\*I206L Y243F;AA560+D183\*G184\*N195F I206L;AA560+D183\*G184\*N195F Y243F;AA560+D183\*G184\*N195F I206L,Y243F;AA560+D183\*G184\*N195F I206Y Y243F;AA560+D183\*G184\*N195F I206F;AA560+R181\*G182\*M202L;



AA560+G182\*D183\*M202L;AA560+D183\*G184\*M202L;AA560+R181\*G182\*N195F M202L;AA560+G182\*D183\*N195F M202L;AA560+D183\*G184\*N195F M202L;AA560+R181\*G182\*R118K N195F R320K T458K;AA560+G182\*D183\*R118K N195F R320K T458K;AA560+D183\*G184\*R118K N195F R320K T458K;AA560+D183\*G184\*R118K N195F I206L R320K R458K;AA560+D183\*G184\*R118K N195F I206Y R320K R458K;AA560+D183\*G184\*R118K N195F Y243F R320K R458K;AA560+D183\*G184\*R118K N195F I206L Y243F R320K R458K。

[0362] SP707+R181\*G182\*,SP707+G182\*H183\*,SP707+H183\*G184\*;SP707+R181\*G182\*N195F;SP707+G182\*H183\*N195F;SP707+H183\*G184\*N195F I206L,Y243F;SP707+H183\*G184\*N195F I206Y Y243F;SP707+H183\*G184\*N195F I206F Y243F;SP707+H183\*G184\*N195F;SP707+R181\*G182\*M202L;SP707+G182\*H183\*M202L;SP707+D183\*G184\*M202L;SP707+R181\*G182\*N195F M202L;SP707+G182\*H183\*N195F M202L;SP707+H183\*G184\*N195F M202L;SP707+R181\*G182\*R181Q;SP707+G182\*H183\*R181Q;SP707+H183\*G184\*R181Q;SP707+R181\*G182\*R118K N195F R320K R458K;SP707+G182\*H183\*R118K N195F R320K R458K;SP707+H183\*G184\*R118K N195F R320K R458K;

[0363] SP690+R181\*G182\*,SP690+G182\*T183\*,SP690+T183\*G184\*;SP690+R181\*G182\*N195F;SP690+G182\*T183\*N195F;SP690+T183\*G184\*N195F;SP690+T183\*G184\*N195F V206L,Y243F;SP690+T183\*G184\*N195F V206Y Y243F;SP690+T183\*G184\*N195F V206F Y243F SP690+R181\*G182\*M202L;SP690+G182\*T183\*M202L;SP690+T183\*G184\*M202L;SP690+R181\*G182\*N195F M202L;SP690+G182\*T183\*N195F M202L;SP690+T183\*G184\*N195F M202L;SP690+R181\*G182\*R118K N195F R320K R458K;SP690+G182\*T183\*R118K N195F R320K R458K;SP690+T183\*G184\*R118K N195F R320K R458K。

[0364] “SP722+R181\*G182\*N195F”意指芽孢杆菌属菌种 $\alpha$ -淀粉酶SP722进行了如下所述突变:在位置R181和G182的缺失,以及在位置195由Asn (N) 取代为Phe (F),其中编号对应于SEQ ID NO:6(缺失位置仍按存在进行计数,即编号并不在缺失两个位置时变小两个)。

[0365] 在本发明一个特别优选的实施方案中,所述改变选自下述取代:

[0366] X193A,C,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,X,Y,优选S193T;

[0367] X195A,C,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,X,Y,优选N195[F或Y];

[0368] X197A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,S,T,V,W,X,Y,优选N197[F或L];

[0369] X198A,C,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,X,Y,优选Y198N;

[0370] X200A,C,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,X,Y,优选Y200F;

[0371] X203A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,T,V,W,X,Y,优选Y203F。

[0372] X206A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,S,T,V,W,X,Y,优选V206[F,Y,L,H或N];

[0373] X210A,C,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,X,Y,优选H210Y;

[0374] X212A,C,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,X,Y,优选E212[V或G];和

[0375] X213A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,T,V,W,X,Y,优选V213A

[0376] X243A,C,D,E,F,G,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y,优选Y243F

[0377] 在另一个优选实施方案中,所述变体在三个位置,更优选四个位置,更优选五个位置和更优选六个位置包含改变,在一个特别优选的实施方案中,所述变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失并进一步在对应于选自193,195,

197,198,200,203,206,210,212,213,243的位置的一个或多个位置包含改变,以及在对应于选自116,129,133,142,146,147,149,151,152,169,174,186,244,303,320,359,418,447的位置的一个或多个位置包含改变(使用根据SEQ ID NO:6的编号)。

[0378] 因此在本发明的一个特别优选的实施方案中,所述改变选自下述取代:

[0379] X116A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y,优选N116T

[0380] X118A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y,优选R118K

[0381] X129A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y,优选Q129L

[0382] X133A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y,优选G133E

[0383] X134A,C,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y,优选D134Y

[0384] X142A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y,优选K142R

[0385] X146A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y,优选P146S

[0386] X147A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,W,Y,优选G147E

[0387] X149A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y,优选G149R

[0388] X151A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y,优选T151R

[0389] X152A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y,优选Y152H

[0390] X169A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y,优选Q169E

[0391] X174C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y,优选Q174R

[0392] X186A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,W,Y,优选A186R

[0393] X235A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y,优选I235N

[0394] X244A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y,优选S244Q

[0395] X303A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y,优选G303V

[0396] X320A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y,优选K320N

[0397] X339A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y,优选S339P

[0398] X359C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y,优选R359I

[0399] X418A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y,优选N418D

[0400] X431A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y,优选S431T

[0401] X434A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y,优选P434T

[0402] X447A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y,优选A447V

[0403] X458A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y,优选R458K

[0404] 在一个特别优选的实施方案中,所述变体进一步在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失。

[0405] 在一个优选实施方案中,在本发明的变体中的氨基酸取代数为优选17个取代,更优选16个取代,更优选15个取代,更优选14个取代,更优选13个取代,更优选12个取代,更优选11个取代,更优选10个取代,更优选9个取代,更优选8个取代,更优选7个取代,更优选6个取代,更优选5个取代,更优选4个取代,甚至更优选3个取代,并且最优选2个取代。在另一个优选实施方案中,在本发明变体中的氨基酸取代数组成为优选17个取代,更优选16个取代,更优选15个取代,更优选14个取代,更优选13个取代,更优选12个取代,更优选11个取代,更优选10个取代,更优选9个取代,更优选8个取代,更优选7个取代,更优选6个取代,更优选5个取代,更优选4个取代,甚至更优选3个取代,并且最优选2个取代。

[0406] 在特别优选的实施方案中,根据本发明的变体包含不同改变的组合。因此在一个优选实施方案中,根据本发明的变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失,优选缺失在位置183和184的缺失并进一步包含一种下述的改变组合:在位置186和195取代;在位置174和212取代;在位置206和212取代;在位置206,212和304取代;在位置206,212,304和447取代;在位置116和133取代;在位置235和339取代;在位置193和206取代;在位置116,133和142取代;在位置116,133,142和198取代;在位置116,133,142,198和206取代;在位置133和195取代;在位置133,195和198取代;在位置133,195,198和200取代;在位置116和195取代;在位置116,195和198取代;在位置142和146取代;在位置142,146和149取代;在位置142,146,149和195取代;在位置142,146,149,195和198取代;在位置142,146,149,195,198和206取代;在位置151和210取代;在位置151,210和320取代;在位置186,195,212和213取代;在位置151,210,320和359取代;在位置151,210,320,359和418取代;在位置147和149取代;在位置147,149和169取代;在位置147,149,169和198取代;在位置147,149,169,198和203取代;在位置147,149,169,198,203和206取代;在位置133和149取代;在位置133,149和195取代;在位置133,149,195和198取代;在位置133,149,195,198和203取代;在位置147和152取代;在位置147,152和169取代;在位置147,152,169和198取代;在位置147,152,169,198和206取代;在位置195和206取代;在位置195和243取代;在位置195和210取代;在位置206和210取代;在位置186和195取代;在位置195和206取代;在位置195,206和243取代;在位置206和243取代;在位置133和149取代;在位置133,149和198取代;在位置133,149,198和206取代;在位置116和133取代;在位置116,133和147取代;在位置116,133,147和152取代;在位置116,133,147,152和198取代;在位置116,133,147,152,198和203取代;在位置116,133,147,152,198,203和206取代;在位置147和149取代;在位置147,149和195取代;在位置147,149,195和198取代;在位置147,149,195,198和206取代;在位置133和142取代;在位置133,142和195取代;在位置133,142,195和198取代;在位置133和149取代;在位置133,149和152取代;在位置133,149,152和195取代;在位置133,149,152,195和198取代;在位置133,149,152,195,198和206取代;在位置116和129取代;在位置116,129和142取代;在位置116,129,142和195取代;在位置116,129,142,195和198取代;在位置116,129,142,195,198和203取代;在位置116,129,142,195,198,203和206取代;在位置133和149取代;在位置133,149和152取代;在位置133,149,152和195取代;在位置133,149,152,195和198取代;在位置133,149,152,195,198和203取代;在位置133,149,152,195,198,203和206取代;在位置116和133取代;在位置116,133和149取代;在位置116,133,149和198取代;在位置116,133,149,198和203取代;在位置116,133,149,198,203和206取代;在位置195和198取代;在位置195,198和203取代;在位置195,198,203和206取代;在位置133,149,195,203和206取代。

[0407] 在另一个特别优选的实施方案中,根据本发明的变体包含不同改变的组合。因此在一个优选实施方案中,根据本发明的变体在181、182、183或184的氨基酸区包含至少一个、至少两个或至少三个缺失,优选缺失在位置183和184的缺失并进一步包含一个下述改变组合:在位置186用[R,T,K,H,E,D,Q或N]和195用[F,W,Y,L,I或oV]取代;在位置174用[R,K,H,E,D,Q或N]和212用[F,W,Y,L,I或V]取代;在位置206用[D,E,F,W,Y,L,I,V,N,Q或H]和212用[F,W,Y,L,I或V]取代;在位置206用[F,W,Y,L,I,V,N,Q或H],212用[F,W,Y,L,I或V]和

304用[F,W,Y,L,I或V]取代;在位置206用[F,W,Y,L,I,V,N,Q或H],212用[F,W,Y,L,I或V],304用[F,W,Y,L,I或V]和447用[F,W,Y,L,I或V]取代;在位置116用[G,A,S,T或M]和133用[E或D]取代;在位置235用[N或L]和339用[P]取代;在位置193用[G,A,T或M]和206用[F,W,Y,L,I,V,N,Q或H]取代;在位置116用[G,A,S,T或M],133用[E或D]和142用[R,K,H,Q或N]取代;在位置116用[G,A,S,T或M],133用[E或D],142用[R,K,H,Q或N]和198用[Q或N]取代;在位置116用[G,A,S,T或M],133用[E或D],142用[R,K,H,Q或N],198用[Q或N]和206用[F,W,Y,L,I,V,N,Q或H]取代;在位置133用[E或D]和195用[F,W,Y,L,I或V]取代;在位置133用[E或D],195用[F,W,Y,L,I或V]和198用[Q或N]取代;在位置186用[R,T,K,H,E,D,Q或N],195,用[F,W,Y,L,I或V],212用[F,W,Y,L,I或V]和213;用[A]取代;在位置133用[E或D],195用[F,W,Y,L,I或V],198用[Q或N]和200用[F,W,Y,L,I或V]取代;在位置116用[G,A,S,T或M]和195用[F,W,Y,L,I或V]取代;在位置116用[G,A,S,T或M],195用[F,W,Y,L,I或V]和198用[Q或N]取代;在位置142用[R,K,H,Q或N]和146用[G,A,S,T或M]取代;在位置142用[R,K,H,Q或N],146用[G,A,S,T或M]和149用[R,K,H,Q或N]取代;在位置142用[R,K,H,Q或N],146用[G,A,S,T或M],149用[R,K,H,Q或N]和195用[F,W,Y,L,I或V]取代;在位置142用[R,K,H,Q或N],146用[G,A,S,T或M],149用[R,K,H,Q或N],195用[F,W,Y,L,I或V]和198用[Q或N]取代;在位置142用[R,K,H,Q或N],146用[G,A,S,T或M],149用[R,K,H,Q或N],195用[F,W,Y,L,I或V],198用[Q,N]和206用[F,W,Y,L,I,V,N,Q或H]取代;在位置151用[R]和210用[F,W,Y,L,I或V]取代;在位置151用[R],210用[F,W,Y,L,I或V],320用[Q或N]取代;在位置151用[R],210用[F,W,Y,L,I或V],320用[Q,N]和359用[F,W,Y,L,I或V]取代;在位置151用[R],210用[F,W,Y,L,I或V],320用[Q或N],359用[F,W,Y,L,I或V]和418用[E或D]取代;在位置147用[E或D]和149用[R,K,H,Q或N]取代;在位置147用[E或D],149用[R,K,H,Q或N]和169用[E或D]取代;在位置147用[E或D],149用[R,K,H,Q或N],169用[E或D]和198用[Q或N]取代;在位置147用[E或D],149用[R,K,H,Q或N],169用[E或D],198用[Q或N]和203用[F,W,Y,L,I或V]取代;在位置147用[E或D],149用[R,K,H,Q或N],169用[E或D],198用[Q或N],203用[F,W,Y,L,I或V]和206用[F,W,Y,L,I,V,N,Q或H]取代;在位置133用[E或D]和149用[R,K,H,Q或N]取代;在位置133用[E或D],149用[R,K,H,Q或N]和195用[F,W,Y,L,I或V]取代;在位置133用[E或D],149用[R,K,H,Q或N],195用[F,W,Y,L,I或V]和198用[Q或N]取代;在位置133用[E或D],149用[R,K,H,Q或N],195用[F,W,Y,L,I或V],198用[Q或N]和203用[F,W,Y,L,I或V]取代;在位置147用[E或D]和152用[R,K,H,Q或N]取代;在位置147用[E或D],152用[R,K,H,Q或N]和169用[E或D]取代;在位置147用[E或D],152用[R,K,H,Q或N],169用[E或D]和198用[Q或N]取代;在位置147用[E或D],152用[R,K,H,Q或N],169用[E或D],198用[Q或N]和206用[F,W,Y,L,I,V,N,Q或H]取代;在位置195用[F,W,Y,L,I或V]和206用[F,W,Y,L,I,V,N,Q或H]取代;在位置195用[F,W,Y,L,I或V]和243用[F,W,Y,L,I或V]取代;在位置195用[F,W,Y,L,I或V]和210用[F,W,Y,L,I或V]取代;在位置206用[F,W,Y,L,I,V,N,Q或H]和210用[F,W,Y,L,I或V]取代;在位置186用[R,T,K,H,E,D,Q或N]和195用[F,W,Y,L,I或V]取代;在位置195用[F,W,Y,L,I或V]和206用[F,W,Y,L,I,V,N,Q或H]取代;在位置195用[F,W,Y,L,I或V],206和243用[F,W,Y,L,I或V]取代;在位置206和243用[F,W,Y,L,I或V]取代;在位置133用[E或D]和149用[R,K,H,Q或N]取代;在位置133用[E或D],149用[R,K,H,Q或N]和198用[Q或N]取代;在位置133用[E或D],149用[R,K,H,Q或N],198用[Q或N]和206的取代;在位置116用[G,A,S,

T或M]和133用[E或D]取代;在位置116用[G,A,S,T或M],133用[E或D]和147用[E或D]取代;在位置116用[G,A,S,T或M],133用[E或D],147用[E或D]和152用[R,K,H,Q或N]取代;在位置116用[G,A,S,T或M],133用[E或D],147用[E或D],152用[R,K,H,Q或N]和198用[Q或N]取代;在位置116用[G,A,S,T或M],133用[E或D],147用[E或D],152用[R,K,H,Q或N],198用[Q或N]和203用[F,W,Y,L,I或V]取代;在位置116用[G,A,S,T或M],133用[E或D],147用[E或D],152用[R,K,H,Q或N],198用[Q或N],203用[F,W,Y,L,I或V]和206的取代;在位置147用[E或D]和149用[R,K,H,Q或N]取代;在位置147用[E或D],149用[R,K,H,Q或N]和195用[F,W,Y,L,I或V]取代;在位置147用[E或D],149用[R,K,H,Q或N],195用[F,W,Y,L,I或V]和198用[Q或N]取代;在位置147用[E或D],149用[R,K,H,Q或N],195用[F,W,Y,L,I或V],198用[Q或N]和206的取代;在位置133用[E或D]和142用[R,K,H,Q或N]取代;在位置133用[E或D],142用[R,K,H,Q或N]和195用[F,W,Y,L,I或V]取代;在位置133用[E或D],142用[R,K,H,Q或N],195用[F,W,Y,L,I或V]和198用[Q或N]取代;在位置133用[E或D]和149用[R,K,H,Q或N]取代;在位置133用[E或D],149用[R,K,H,Q或N]和152用[R,K,H,Q或N]取代;在位置133用[E或D],149用[R,K,H,Q或N],152用[R,K,H,Q或N]和195用[F,W,Y,L,I或V]取代;在位置133用[E或D],149用[R,K,H,Q或N],152用[R,K,H,Q或N],195用[F,W,Y,L,I或V]和198用[Q或N]取代;在位置133用[E或D],149用[R,K,H,Q或N],152用[R,K,H,Q或N],195用[F,W,Y,L,I或V],198用[Q或N]和206的取代;在位置116用[G,A,S,T或M]和129用[F,W,Y,L,I或V]取代;在位置116用[G,A,S,T或M],129用[F,W,Y,L,I或V]和142用[R,K,H,Q或N]取代;在位置116用[G,A,S,T或M],129用[F,W,Y,L,I或V],142用[R,K,H,Q或N]和195用[F,W,Y,L,I或V]取代;在位置116用[G,A,S,T或M],129用[F,W,Y,L,I或V],142用[R,K,H,Q或N],195用[F,W,Y,L,I或V]和198用[Q或N]取代;在位置116用[G,A,S,T或M],129用[F,W,Y,L,I或V],142用[R,K,H,Q或N],195用[F,W,Y,L,I或V],198用[Q或N]和203用[F,W,Y,L,I或V]取代;在位置116用[G,A,S,T或M],129用[F,W,Y,L,I或V],142用[R,K,H,Q或N],195用[F,W,Y,L,I或V],198用[Q或N],203用[F,W,Y,L,I或V]和206的取代;在位置133用[E或D]和149用[R,K,H,Q或N]取代;在位置133用[E或D],149用[R,K,H,Q或N]和152用[R,K,H,Q或N]取代;在位置133用[E或D],149用[R,K,H,Q或N],152用[R,K,H,Q或N]和195用[F,W,Y,L,I或V]取代;在位置133用[E或D],149用[R,K,H,Q或N],152用[R,K,H,Q或N],195用[F,W,Y,L,I或V]和198用[Q或N]取代;在位置133用[E或D],149用[R,K,H,Q或N],152用[R,K,H,Q或N],195用[F,W,Y,L,I或V],198用[Q或N]和203用[F,W,Y,L,I或V]取代;在位置133用[E或D],149用[R,K,H,Q或N],152用[R,K,H,Q或N],195用[F,W,Y,L,I或V],198用[Q或N],203用[F,W,Y,L,I或V]和206的取代;在位置116用[G,A,S,T或M]和133用[E或D]取代;在位置116用[G,A,S,T或M],133用[E或D]和149用[R,K,H,Q或N]取代;在位置116用[G,A,S,T或M],133用[E或D],149用[R,K,H,Q或N]用[R,K,H,Q或N]和198用[Q或N]取代;在位置116用[G,A,S,T或M],133用[E或D],149用[R,K,H,Q或N],198用[Q或N]和203用[F,W,Y,L,I或V]取代;在位置116用[G,A,S,T或M],133用[E或D],149用[R,K,H,Q或N],198用[Q或N],203用[F,W,Y,L,I或V]和206的取代;在位置195用[F,W,Y,L,I或V]和198用[Q或N]取代;在位置195用[F,W,Y,L,I或V],198用[Q或N]和203用[F,W,Y,L,I或V]取代;在位置195用[F,W,Y,L,I或V],198用[Q或N],203用[F,W,Y,L,I或V]和206用[F,W,Y,L,I,V,N,Q或H]取代;在位置133用[E或D],149用[R,K,H,Q或N],195用[F,W,Y,L,I或V],203用[F,W,Y,L,I或V]和206用[F,W,Y,L,I,V,N,Q或H]取代。

[0408] 根据本发明特别有用的变体包括(使用SEQ ID NO:6的编号):D183\*G184\*N195L; D183\*G184\*N197F;D183\*G184\*N197L;D183\*G184\*Y243F;D183\*G184\*N195F,D183\*G184\*N277F;D183\*G184\*S431T;D183\*G184\*P434T;D183\*G184\*I235N S339P;D183\*G184\*L351F; D183\*G184\*A186R,N195F;D183\*G184\*H210Y;D183\*G184\*V206Y;D183\*G184\*V206L;D183\*G184\*V206F;D183\*G184\*V213A Q174R;D183\*G184\*E212V;D183\*G184\*V206F E212G G304V A447V;N116T G133E K142R D183\*G184\*Y198N V206Y;G133E D183\*G184\*N195Y Y198N Y200F;D183\*G184\*A186D N195F E212V V213A;N116T D183\*G184\*N195Y Y198N;K142R P146S G149K D183\*G184\*N195Y Y198N V206I;D134Y D183\*G184\*;T151R D183\*G184\*H210Y K320N R359I N418D Q490H;G147E G149R Q169E D183\*G184\*Y198N Y203F V206Y; G133E G149R D183\*G184\*N195Y Y198N Y203F V206Y;G147E Y152H Q169E D183\*G184\*Y198N V206Y;D183\*G184\*N195F V206Y;D183\*G184\*N195F V206L;D183\*G184\*N195F V206F;D183\*G184\*V206L Y243F;D183\*G184\*V206F Y243F;D183\*G184\*N195F Y243F;D183\*G184\*N195F H210Y;D183\*G184\*V206Y H210Y;D183\*G184\*V213A;D183\*G184\*S193T;D183\*G184\*A186T N195F;D183\*G184\*N195F V206Y Y243F;D183\*G184\*N195F V206L Y243F; D183\*G184\*N195F V206Y Y243F;D183\*G184\*N195F V206F Y243F;D183\*G184\*V206Y Y243F;D183\*G184\*N195Y;G133D G149R D183\*G184\*Y198N V206Y;N116T G133E G147E Y152H D183\*G184\*Y198N Y203F V206Y;G147E G149R D183\*G184\*N195F Y198N V206Y; G133E K142R D183\*G184\*N195F Y198N;G133E G149R Y152H D183\*G184\*N195Y Y198N V206Y;N116T Q129L K142R D183\*G184\*N195Y Y198N Y203F V206Y;G133E G149R Y152H D183\*G184\*N195Y Y198N Y203F V206Y;N116T G133E G149R G182\*D183\*Y198N Y203F V206Y,D183\*G184\*S193T V206L,D183\*G184\*G133E G149R N195Y Y203F V206L

[0409] 在一个优选实施方案中,根据本发明的变体包括:SP722SP722+D183\*G184\*N195L; SP722SP722+D183\*G184\*N197F;SP722SP722+D183\*G184\*N197L;SP722SP722+D183\*G184\*Y243F;SP722SP722+D183\*G184\*N195F,SP722SP722+D183\*G184\*N277F;SP722+D183\*G184\*S431T;SP722+D183\*G184\*P434T;SP722+D183\*G184\*I235N S339P;SP722+D183\*G184\*L351F;SP722+D183\*G184\*A186D N195F E212V V213A;SP722+D183\*G184\*A186R N195F; SP722+D183\*G184\*H210Y;SP722+D183\*G184\*V206Y;SP722+D183\*G184\*V206L,SP722+D183\*G184\*V206F;SP722+D183\*G184\*V213A Q174R;SP722+D183\*G184\*E212V;SP722+D183\*G184\*V206Y E212G G304V A447V;;SP722+N116T G133E K142R D183\*G184\*Y198N V206Y;SP722+G133E D183\*G184\*N195Y Y198N Y200F;SP722+N116T D183\*G184\*N195Y Y198N;SP722+K142R P146S G149K D183\*G184\*N195Y Y198N V206I;SP722+D134Y D183\*G184\*;SP722+T151R D183\*G184\*H210Y K320N R359I N418D;SP722+G147E G149R Q169E D183\*G184\*Y198N Y203F V206Y;SP722+G133E G149R D183\*G184\*N195Y Y198N Y203F V206Y;SP722+G147E Y152H Q169E D183\*G184\*Y198N V206Y;SP722+D183\*G184\*N195F V206Y;SP722+D183\*G184\*N195F V206F;SP722+D183\*G184\*N195F V206L;SP722+D183\*G184\*I206L Y243F;SP722+D183\*G184\*I206F Y243F;SP722+D183\*G184\*N195F Y243F;SP722+D183\*G184\*N195F H210Y;SP722+D183\*G184\*V206Y H210Y;SP722+D183\*G184\*V213A;SP722+D183\*G184\*S193T;SP722+D183\*G184\*A186T N195F;SP722+D183\*G184\*N195F V206Y Y243F;SP722+D183\*G184\*V206Y Y243F;SP722+D183\*G184\*N195Y;SP722+G133D G149R

D183\*G184\*Y198N V206Y;SP722+N116T G133E G147E Y152H D183\*G184\*Y198N Y203F V206Y;SP722+G147E G149R D183\*G184\*N195F Y198N V206Y;SP722+G133E K142R D183\*G184\*N195F Y198N;SP722+G133E G149R Y152H D183\*G184\*N195Y Y198N V206Y;SP722+N116T Q129L K142R D183\*G184\*N195Y Y198N Y203F V206Y;SP722+G133E G149R Y152H D183\*G184\*N195Y Y198N Y203F V206Y;SP722+N116T G133E G149R G182\*D183\*Y198N Y203F V206Y,SP722+D183\*G184\*G133E G149R N195Y Y203F V206L。

[0410] 在一个优选实施方案中,变体选自下组:

[0411] SP722+D183\*G184\*N195F V206L Y243F;SP722+D183\*G184\*N195F V206Y Y243F;SP722+D183\*G184\*N195F V206N Y243F;SP722+D183\*G184\*N195F V206F Y243F;SP722+D183\*G184\*N195F V206H;SP722+D183\*G184\*N195F V206Y;SP722+D183\*G184\*V206F Y243F;SP722+D183\*G184\*N195F V206L H210Y;SP722+D183\*G184\*S193T V206L;SP722+D183\*G184\*G133E G149R N195Y Y203F V206L。

[0412] 在另一个优选实施方案中,根据本发明的变体包括:

[0413] SP707+H183\*G184\*N195L;SP707+H183\*G184\*N197F;SP707+H183\*G184\*N197L;SP707+H183\*G184\*Y243F;SP707+H183\*G184\*N195F,SP707+H183\*G184\*N277F;SP707+H183\*G184\*A186D N195F E212V V213A;SP707+H183\*G184\*S431T;SP707+H183\*G184\*A434T;SP707+H183\*G184\*I235N A339P;SP707+H183\*G184\*L351F,SP707+H183\*G184\*A186R,N195F;SP707+H183\*G184\*H210Y;SP707+H183\*G184\*I206Y;SP707+H183\*G184\*I206L,SP707+H183\*G184\*I206F;SP707+H183\*G184\*V213AQ174R;SP707+H183\*G184\*E212V;SP707+H183\*G184\*I206Y E212G G304V A447V;;SP707+M116T G133E H183\*G184\*Y198N I206Y;SP707+G133E H183\*G184\*N195Y Y198N Y200F;SP707+M116T H183\*G184\*N195Y Y198N;SP707+P146S G149K H183\*G184\*N195Y Y198N V206I;SP707+E134Y H183\*G184\*;SP707+T151R H183\*G184\*H210Y R320N R359I N418D;SP707+G147E G149R Q169E H183\*G184\*Y198N Y203F I206Y;SP707+G133E G149R H183\*G184\*N195Y Y198N Y203F I206Y;SP707+G147E Q169E H183\*G184\*Y198N I206Y;SP707+H183\*G184\*N195F I206Y;SP707+H183\*G184\*N195F I206L;SP707+H183\*G184\*N195F I206F;SP707+H183\*G184\*N195F Y243F;SP707+H183\*G184\*N195F H210Y;SP707+H183\*G184\*I206Y H210Y;SP707+H183\*G184\*V213A;SP707+H183\*G184\*S193T;SP707+H183\*G184\*A186T N195F;SP707+H183\*G184\*N195F I206Y Y243F;SP707+H183\*G184\*N195F I206F Y243F;SP707+H183\*G184\*N195F I206L Y243F;SP707+H183\*G184\*N195F I206Y Y243F SP707+H183\*G184\*I206Y Y243F;SP707+H183\*G184\*I206L Y243F;SP707+H183\*G184\*I206F Y243F;SP707+H183\*G184\*N195Y;SP707+G133D G149R H183\*G184\*Y198N I206Y;SP707+M116T G133E G147E H183\*G184\*Y198N Y203F I206Y;SP707+G147E G149R+H183\*G184\*N195F Y198N I206Y;SP707+G133E H183\*G184\*N195F Y198N;SP707+G133E G149R H183\*G184\*N195Y Y198N I206Y;SP707+M116T Q129L H183\*G184\*N195Y Y198N Y203F I206Y;SP707+G133E G149R H183\*G184\*N195Y Y198N Y203F I206Y;SP707+M116T G133E G149R G182\*H183\*Y198N Y203F I206Y;SP707+D183\*G184\*R118K N195F R320K R458K;SP707+D183\*G184\*R118K N195F I206L R320K R458K;SP707+D183\*G184\*R118K N195F I206Y R320K R458K;SP707+D183\*G184\*R118K N195F Y243F R320K R458K;SP707+D183\*G184\*R118K N195F I206L Y243F R320K R458K。

[0414] 在一个优选实施方案中,根据本发明的变体包括:

[0415] AA560+D183\*G184\*N195L;AA560+D183\*G184\*N197F;AA560+D183\*G184\*N197L;AA560+D183\*G184\*Y243F;AA560+D183\*G184\*N195F,AA560+D183\*G184\*N277F;AA560+D183\*G184\*S431T;AA560+D183\*G184\*A434T;AA560+D183\*G184\*I235N A339P;AA560+D183\*G184\*L351F;D183\*G184\*G186D N195F E212V V213AAA560+D183\*G184\*G186R,N195F;AA560+D183\*G184\*H210Y;AA560+D183\*G184\*I206Y;AA560+D183\*G184\*I206L;AA560+D183\*G184\*I206F;AA560+D183\*G184\*V213A Q174R;AA560+D183\*G184\*E212V;AA560+D183\*G184\*I206Y E212G G304V A447V;AA560+M116T G133E K142R D183\*G184\*Y198N I206Y;AA560+G133E D183\*G184\*N195Y Y198N Y200F;AA560+M116T D183\*G184\*N195Y Y198N;AA560+K142R P146S G149K D183\*G184\*N195Y Y198N I206I;AA560+E134Y D183\*G184\*;AA560+T151R D183\*G184\*H210Y R320N R359I N418D;AA560+G147E G149R Q169E D183\*G184\*Y198N Y203F I206Y;AA560+G133E G149R D183\*G184\*N195Y Y198N Y203F I206Y;AA560+G147E Y152H Q169E D183\*G184\*Y198N I206Y;AA560+D183\*G184\*N195F I206Y;AA560+D183\*G184\*N195F I206L;AA560+D183\*G184\*N195F I206F;AA560+D183\*G184\*I206L Y243F;AA560+D183\*G184\*I206F Y243F;AA560+D183\*G184\*N195F Y243F;AA560+D183\*G184\*N195F H210Y;AA560+D183\*G184\*I206Y H210Y;AA560+D183\*G184\*V213A;AA560+D183\*G184\*S193T;AA560+D183\*G184\*G186T N195F;AA560+D183\*G184\*N195F I206Y Y243F,AA560+D183\*G184\*N195F I206L Y243F;AA560+D183\*G184\*N195F I206Y Y243F AA560+D183\*G184\*I206Y Y243F;AA560+D183\*G184\*I206L Y243F;AA560+D183\*G184\*N195Y;AA560+G133D G149R D183\*G184\*Y198N I206Y;AA560+M116T G133E G147E Y152H D183\*G184\*Y198N Y203F I206Y;AA560+G147E G149R D183\*G184\*N195F Y198N I206Y;AA560+G133E K142R D183\*G184\*N195F Y198N;AA560+G133E G149R Y152H D183\*G184\*N195Y Y198N I206Y;AA560+M116T Q129L K142R D183\*G184\*N195Y Y198N Y203F I206Y;AA560+G133E G149R Y152H D183\*G184\*N195Y Y198N Y203F I206Y;AA560+M116T G133E G149R G182\*D183\*Y198N Y203F I206Y;AA560+D183\*G184\*R118K N195F R320K R458K;AA560+D183\*G184\*R118K N195F I206L R320K R458K;AA560+D183\*G184\*R118K N195F I206Y R320K R458K;AA560+D183\*G184\*R118K N195F Y243F R320K R458K;AA560+D183\*G184\*R118K N195F I206L Y243F R320K R458K。

[0416] 在一个优选实施方案中,根据本发明的变体包括:

[0417] SP690+T183\*G184\*N195L;SP690+T183\*G184\*N197F;SP690+T183\*G184\*N197L;SP690+T183\*G184\*Y243F;SP690+T183\*G184\*N195F,SP690+T183\*G184\*N277F;SP690+T183\*G184\*S431T;SP690+T183\*G184\*P434T;SP690+T183\*G184\*I235N A339P;SP690+T183\*G184\*L351F;SP690+T183\*G184\*A186D N195F E212V V213A;SP690+T183\*G184\*A186R N195F;SP690+T183\*G184\*H210Y;SP690+T183\*G184\*V206Y;SP690+T183\*G184\*V206L,SP690+T183\*G184\*V206F;SP690+T183\*G184\*V213AQ174R;SP690+T183\*G184\*E212V;SP690+T183\*G184\*V206Y E212G G304V A447V;SP690+N116T G133E K142R T183\*G184\*Y198N V206Y;SP690+G133E T183\*G184\*N195Y Y198N Y200F;SP690+N116T T183\*G184\*N195Y Y198N;SP690+K142R P146S G149K T183\*G184\*N195Y Y198N V206I;SP690+E134Y T183\*G184\*;SP690+N151R T183\*G184\*H210Y K320N R359I N418D;SP690+G147E G149R Q169E T183\*G184\*



Y198N Y203F V206Y;SP690+G133E G149R T183\*G184\*N195Y Y198N Y203F V206Y;SP690+G147E Y152H Q169E T183\*G184\*Y198N V206Y;SP690+T183\*G184\*N195F V206Y;SP690+T183\*G184\*N195F V206F;SP690+T183\*G184\*N195F V206L;SP690+T183\*G184\*I206L Y243F;SP690+T183\*G184\*I206F Y243F;SP690+T183\*G184\*N195F Y243F;SP690+T183\*G184\*N195F H210Y;SP690+T183\*G184\*V206Y H210Y;SP690+T183\*G184\*V213A;SP690+T183\*G184\*S193T;SP690+T183\*G184\*A186T N195F;SP690+T183\*G184\*N195F V206Y Y243F;SP690+T183\*G184\*V206Y Y243F;SP690+T183\*G184\*N195Y;SP690+G133D G149R T183\*G184\*Y198N V206Y;SP690+N116T G133E G147E Y152H T183\*G184\*Y198N Y203F V206Y;SP690+G147E G149R T183\*G184\*N195F Y198N V206Y;SP690+G133E K142R T183\*G184\*N195F Y198N;SP690+G133E G149R Y152H T183\*G184\*N195Y Y198N V206Y;SP690+N116T Q129L K142R T183\*G184\*N195Y Y198N Y203F V206Y;SP690+G133E G149R Y152H T183\*G184\*N195Y Y198N Y203F V206Y;SP690+N116T G133E G149R G182\*T183\*Y198N Y203F V206Y;SP690+T183\*G184\*G133E G149R N195Y Y203F V206L;SP690+T183\*G184\*R118K N195F R320K R458K;SP690+T183\*G184\*N118K N195F V206L R320K R458K;SP690+T183\*G184\*N118K N195F V206Y R320K R458K;SP690+T183\*G184\*N118K N195F Y243F R320K R458K;SP690+T183\*G184\*N118K N195F V206L Y243F R320K R458K;SP690+T183\*G184\*N195F V206L Y243F;SP690+T183\*G184\*N195F V206Y Y243F;SP690+T183\*G184\*N195F V206N Y243F;SP690+T183\*G184\*N195F V206F Y243F;SP690+T183\*G184\*N195F V206H;SP690+T183\*G184\*N195F V206Y;SP690+T183\*G184\*V206F Y243F;SP690+T183\*G184\*N195F V206L H210Y;SP690+T183\*G184\*S193T V206L;SP690+T183\*G184\*G133E G149R N195Y Y203F V206L。

[0418] 在一个优选实施方案中,根据本发明的变体包括亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体,其中所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶是SEQ ID NO:6的,且所述变体包含缺失D183\*和G184\*以及一种下述组的突变:(a) N195F+H210Y;(b) N195F+V206L,H,Y;(c) N195F+V206L,F+H210Y;(d) N195F+V206Y+Y243F;(e) N195F+Y243F;(f) S193T+V206L;(g) G133E+G149R+N195Y+Y203F+V206L;(h) V206L,Y;(i) Y243F;(j) N195F+V206L+Y243F;(k) N195F;或(l) V206F+Y243F。

[0419] 洗涤剂组合物:根据本发明,上述 $\alpha$ -淀粉酶变体通常可为洗涤剂组合物例如洗衣洗涤剂组合物或洗碟洗涤剂组合物的组分。在本发明的一个具体实施方案中,所述组合物进一步包含强螯合剂或络合剂。因此本发明的一个方面涉及组合物,其包含亲本 $\alpha$ -淀粉酶变体,所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶变体在对应于SEQ ID NO:6的成熟多肽的位置193至213的范围中的一个或多个位置包含取代,并进一步包含螯合剂,其中当如“材料和方法”中所述在21℃和pH 8.0测量时所述螯合剂在低于10mM的浓度能够将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM。

[0420] 在另一个实施方案中,所述组合物包含选自但不限于下述的螯合剂:所述螯合剂可包含氨基基团,并可例如为氨基多羧酸盐或膦酸盐。其可为含有一个、两个或三个氨基基团的单体分子(通常为仲胺或叔胺基团),且其可含有两个、三个、四个或五个羧基基团或甚至更多羧基基团。螯合剂可为但不限于下述:乙二胺四乙酸(EDTA)、二亚乙基三胺五亚甲基膦酸(DTPMP)、羟基乙烷二膦酸(HEDP)、乙二胺-N,N'-二琥珀酸(EDDS)、甲基甘氨酸二乙酸(MGDA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)、丙二胺四乙酸(PDPA)、2-羟基吡啶-N-氧化物(HPNO)

或乙二胺四(亚甲基膦酸)N,N-二氧化物(ethylenedinitrilotertrakis(methylenephosphonic acid)N,N,-dioxide)、甲基甘氨酸二乙酸(MGDA)、谷氨酸N,N-二乙酸(N,N-二羧甲基谷氨酸四钠盐)(GLDA)和氮三乙酸(NTA),或其混合物。所述螯合剂通常以按洗涤剂重量计0.1%至75%的水平存在。

[0421] 本发明的洗涤剂组合物可进一步包含并非如上所定义的螯合剂的清洗/洗涤助剂,优选包含组分的混合物。通常所述清洗助剂会以0.001至99.9wt%的量存在于组合物中,更通常为0.01至80wt%的清洗助剂。合适的清洗助剂包括:表面活性剂、助洗剂、漂白剂、漂白催化剂(bleach catalyst)、着色剂、漂白增强剂、染料转移剂(dye transfer agent)、助沉积剂(deposition aid)、分散剂、其他酶,以及酶稳定剂、催化材料、漂白激活剂(bleach activator)、过氧化氢、过氧化氢源、光学增亮剂(optical brightener)、光活化剂(photoactivator)、荧光剂、织物调色剂(fabric hueing agent)、织物调理剂(fabric conditioner)、预制的过酸、聚合物分散剂(polymeric dispersing agent)、粘土污物去除/抗再沉积剂(clay soil removal/anti-redeposition agents)、填充盐(filler salt)、助水溶剂、增亮剂、抑泡剂(suds suppressor)、结构弹性剂(structure elasticizing agent)、织物软化剂(fabric softener)、可水解的表面活性剂、防腐剂、抗氧化剂、抗缩水剂(anti-shrinkage agent)、杀细菌剂、杀真菌剂、抗晦暗剂(anti-tarnish)、抗腐蚀剂、碱源、助溶剂、载体、助加工剂(processing aid)、色素、染料、香料和pH控制剂。举例而言,这些可包括:漂白成分如亚胺漂白增强剂;过氧化氢源如过碳酸和/或过硼酸,特别是涂覆如碳酸盐和/或硫酸盐、硅酸盐、硼硅酸盐及其任何混合物的过碳酸盐;预制的过酸,包括包囊形式的预制的过酸;过渡金属催化剂;抑泡剂或抑泡系统如基于硅氧烷的抑泡剂和/或基于脂肪酸的抑泡剂;织物软化剂如粘土、硅氧烷和/或季铵化合物;絮凝剂如聚环氧乙烷;染料转移抑制剂如聚乙烯基吡咯烷酮、聚4-乙烯基吡啶N-氧化物和/或乙烯基吡咯烷酮和乙烯基咪唑的共聚物;织物完整性成分(fabric integrity component)如通过咪唑和环氧氯丙烷缩合产生的寡聚物;污物分散剂和污物抗再沉积助剂如烷氧化的多胺和乙氧化的氮丙啶(ethyleneimine)聚合物;抗再沉积成分如聚酯;羧酸聚合物如马来酸聚合物或马来酸和丙烯酸共聚物;香料如香料微胶囊、淀粉包囊的accord、香料喷射物(perfume spray-on);皂环(soap ring);装饰颗粒(aesthetic particles);染料;填充物如硫酸钠,尽管优选组合物基本上不含填充物;硅酸盐如硅酸钠,包括1.6R和2.0R硅酸钠或偏硅酸钠;二羧酸和二醇的共聚物;纤维素聚合物如甲基纤维素、羧甲基纤维素、羟乙氧基纤维素(hydrox-yethoxycellulose)或其他烷基或烷基烷氧基纤维素;溶剂如1,2-丙二醇、单乙醇胺、二乙二醇、乙醇及其任意混合物;助水溶剂如枯烯磺酸钠(sodium cumene sulphonate)、二甲苯磺酸钠(sodium xylene sulphonate)、甲苯磺酸钠(sodium toluene sulphonate)及其任意混合物;有机酸如柠檬酸;及其任意组合。

[0422] 相应地,所述组合物可进一步包含助洗剂,如基于碳酸盐、碳酸氢盐或硅酸盐的助洗剂,其可为沸石,如Zeolit A、Zeolit MAP(Miximum Aluminium类型P)。可用于洗衣的沸石优选具有式 $\text{Na}_{12}(\text{AlO}_2)_{12}(\text{SiO}_2)_{12} \cdot 27\text{H}_2\text{O}$ 且粒径通常对于zeolit A为1-10 $\mu\text{m}$ 而对于zeolit MAP为0.7-2 $\mu\text{m}$ 。其他助洗剂为偏硅酸钠( $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ 或 $\text{Na}_2\text{Si}_2\text{O}_5 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ )强碱,并优选用于洗碟。在优选实施方案中,洗涤剂助洗剂的量可为高于5%,高于10%,高于20%,高于30%,高于40%或高于50%并可低于80%、65%。在洗碟洗涤剂中,助洗剂的水平通常

为40-65%，特别是50-65%或甚至75-90%。

[0423] 在另一个优选的方面，所述组合物包一种或多种表面活性剂，其可为非离子的，包括半极性，和/或阴离子和/或阳离子和/或两性离子和/或两性的和/或半极性非离子表面活性剂和/或其混合物。所述表面活性剂通常以按重量计0.1%至60%的水平存在，而在其他实施方案中，该水平为约1%至约50%，而在还进一步的实施方案中，该水平为约5%至约40%，按洗涤剂组合物的重量计。

[0424] 当其中包含阴离子表面活性剂时，所述洗涤剂通常含有约1%至约40%的阴离子表面活性剂，如直链烷基苯磺酸盐， $\alpha$ -烯基磺酸盐，烷基硫酸盐（脂肪醇硫酸盐），醇乙氧基硫酸盐，仲烷磺酸盐， $\alpha$ -磺基脂肪酸甲基酯，烷基或烯基琥珀酸或皂类。

[0425] 当其中包含非离子表面活性剂时，所述洗涤剂通常含有约0.2%至约40%的非离子表面活性剂如醇乙氧化物，壬基苯酚乙氧化物，烷基聚糖苷，烷基二甲基胺氧化物，乙氧化脂肪酸单乙醇胺，脂肪酸单乙醇胺，多羟基烷基脂肪酸酰胺，或葡糖胺N-酰基N-烷基衍生物（“葡糖酰胺”）。

[0426] 更加合适的阴离子表面活性剂为皂类和含有硫酸或磺酸基团的那些。可考虑的磺酸类型的表面活性剂为(C9-C13烷基)苯磺酸盐和烯基磺酸盐，后者被理解为亚烷基磺酸盐和羟烷基磺酸盐以及二磺酸盐的混合物，如例如通过具有位置在末端或内部的双键的C12-C18单烯的磺酸化获得。(C12-C18)烷基磺酸盐和 $\alpha$ -磺基脂肪酸的酯（磺酸酯）也是合适的，例如可使用氢化椰子油、棕榈仁油或动物脂脂肪酸的 $\alpha$ -磺基化甲基酯，其通常通过来自植物或动物油的甘油三酯的皂化，接着进行甲基化和磺化来产生。

[0427] 更加合适的阴离子表面活性剂是磺酸化的脂肪酸甘油酯，包括单酯、二酯和三酯及其混合物。

[0428] 提及的烷(烯)基硫酸盐为C12-C18脂肪醇(例如来自椰子脂肪醇、动物脂脂肪醇，月桂醇、肉豆蔻醇、鲸蜡醇或硬脂醇)，或C10-C20氧代醇的硫酸单酯和具有该链长度的仲醇的硫酸单酯的碱金属盐和钠盐。从洗涤技术的视点来看，特别优选C12-C16烷基硫酸盐和C12-C15烷基硫酸盐，亦优选C14-C15烷基硫酸盐。合适的阴离子表面活性剂还包括烷基-2,3-二基二硫酸盐，其依照例如US3,234,258或US5,075,041制备。

[0429] 用1至6摩尔的环氧乙烷乙氧化的直链或支化的C7-C21醇，如具有平均3.5摩尔的环氧乙烷(EO)的2-甲基支化C9-C11醇，或具有1至4EO的C12-C18脂肪醇的硫酸单酯也是合适的。由于其高度起泡的特征，它们通常仅以相对较低水平，例如按重量计1%至5%的水平用于洗涤和清洁组合物。

[0430] 阴离子表面活性剂表面活性剂亦可包括硫代琥珀酸与C8-C18脂肪醇残基的二酯，和/或单酯的盐，或其混合物。特别优选其中脂肪醇残基具有较窄的链长度分布的硫代琥珀酸酯。同样亦可使用在烷(烯)基链上具有优选8至18个碳原子的烷(烯)基硫代琥珀酸酯，或其盐。

[0431] 还可考虑的阴离子表面活性剂为氨基酸的脂肪酸衍生物，例如甲基牛磺酸(牛磺酸盐)和/或甲基甘氨酸(肌氨酸盐)。还可考虑的阴离子表面活性剂为皂类。饱和脂肪酸皂类如月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、氢化芥酸和山嵛酸的盐和衍生自天然脂肪酸(例如椰子、棕榈仁和动物脂的脂肪酸)的皂类混合物。阴离子表面活性剂，包括皂类，可以以其钠、钾或铵盐的形式和以有机碱如单乙醇胺、二乙醇胺或三乙醇胺的可溶性盐形式存在。阴

离子表面活性剂可以以其钠或钾盐的形式存在。作为非离子表面活性剂,使用优选烷氧化,有利地为乙氧化和/或丙氧化的,特别是具有8至18个碳原子和平均每摩尔醇1至12摩尔的环氧乙烷(E0)和/或1至10摩尔环氧丙烷(P0)的伯醇。特别优选C8-C16醇烷氧化物,有利地为乙氧化和/或丙氧化的C10-C15醇烷氧化物,特别是C12-C14醇烷氧化物,具有2至10或3至8的乙氧化度,和/或1至6或1.5至5的丙氧化度。醇残基可优选为直链的,或特别是在2位,具有甲基支链,或可包含直链和甲基支链的混合物,如通常存在于氧代醇中的。然而,特别优选衍生自含有12至18个碳原子,和平均每摩尔醇2至8个E0的天然来源(例如椰子、棕榈和动物脂脂肪醇或油醇)的直链醇的醇乙氧化物。乙氧化醇包括,例如具有3个E0或4个E0的C12-C14醇,具有7个E0的C9-C11醇,具有3、5、7或8个E0的C13-C15醇,具有3、5或7个E0的C12-18醇,其混合物,如具有3个E0的C12-C14醇和具有5个E0的C12-C18醇的混合物。提及的乙氧化度和丙氧化度代表统计平均值,对于特定产物,可为整数或分数。优选的醇乙氧化物和丙氧化物具有有限的同系物分布(窄范围乙氧化物/丙氧化物,NRE/NRP)。除了这些非离子表面活性剂,亦可使用具有多于12个E0的脂肪醇乙氧化物。其实例为具有14、25、30或40个E0的动物脂脂肪醇乙氧化物。

[0432] 亦适用的是烷氧化的胺,其为乙氧化和/或丙氧化的,特别是具有每烷基链1至18个碳原子和每摩尔胺平均1至12摩尔的环氧乙烷(E0)和/或1至10摩尔环氧丙烷(P0)的伯胺或仲胺。

[0433] 此外作为其他非离子表面活性剂,亦可使用通式 $R_1O(G)_x$ 的烷基聚糖苷(alkyl polyglycoside),其中 $R_1$ 是具有8至22,优选12至18个碳原子的直链或甲基支化(特别是2位具甲基支化)的伯烷基,而‘G’表示具有5或6个碳原子的单糖(glycose)(单糖, monosaccharide)单元,优选G是葡萄糖。表示单糖单元平均数值的寡聚度x,通常为1至10;x优选为1.2至1.4。

[0434] 作为单独的非离子表面活性剂或与其他非离子表面活性剂组合的另一类所用的非离子表面活性剂,包括烷氧化的,优选在烷基链上具有1至4个碳原子的乙氧化或乙氧化和丙氧化的脂肪酸烷基酯,特别是如例如描述于JP58/217598的脂肪酸甲基酯。

[0435] 亦可适用氧化胺类型的非离子表面活性剂,例如N-(可可烷基)-N,N-二甲基胺氧化物(N-(coco alkyl)-N,N-dimethylamine oxide)和N-(动物脂-烷基)-N,N-二(2-羟乙基)胺氧化物(N-(tallow-alkyl)-N,N-bis(2-hydroxyethyl)amine oxide),和脂肪酸烷醇酰胺(fatty acid alkanolamide)或乙氧化脂肪酸烷醇酰胺类型的非离子表面活性剂。

[0436] 在一个更优选的实施方案中,所述表面活性剂为十二烷基硫酸钠,季铵盐化合物,烷基吡啶碘化物,Tween 80,Tween 85,Triton X-100,Brij 56、生物表面活性剂、鼠李糖脂、surfactin、visconsin或磺酸酯。

[0437] 在一些实施方案中,本发明涉及其中至少一种表面活性剂的浓度为每克洗涤中的纺织品0至500,0.00001至100,0.0001至50,0.0001至40,0.001至30,0.01至20,0.1至15,1至10毫克的组合物。

[0438] 在一些实施方案中,本发明涉及组合物,其中至少一种表面活性剂的浓度为每L溶液0至50,0.0001至40,0.001至30,0.01至20,0.1至10或1至5g。

[0439] 本发明的洗涤剂组合物可例如配制为手洗或机洗洗衣洗涤剂组合物,包括适用于预处理有污迹的织物的洗衣添加组合物,和漂洗添加的织物软化剂组合物,或配制为用于

一般家用硬表面清洁操作的洗涤剂组合物,或配制为供手洗或机洗的洗碟操作。所述洗涤剂可为粉末或颗粒形式,或其可为液体、凝胶或糊剂的形式,或为单位剂量产品如片剂或小袋 (pouch),包括多区室小袋 (multi-compartment pouch) 的形式,或洗涤剂可为薄片 (sheet) 的形式。

[0440] 所述洗涤剂组合物可以进一步包含一种或多种其它酶,如蛋白酶、脂肪酶、过氧化物酶、另一种淀粉分解酶,例如,另一种 $\alpha$ -淀粉酶,葡糖淀粉酶,产麦芽糖淀粉酶,CGT酶和/或纤维素酶,甘露聚糖酶(如来自Novozymes,Denmark的Mannaway<sup>TM</sup>),果胶酶,果胶裂合酶,角质酶,和/或漆酶。

[0441] 通常,选择的酶的性质应该与选择的洗涤剂相容(即,最适pH,与其它酶和非酶成分的相容性,等),并且酶应该以有效量存在。

[0442] 蛋白酶:合适的蛋白酶包括金属蛋白酶和/或丝氨酸蛋白酶,包括中性或碱性微生物丝氨酸蛋白酶,如枯草杆菌蛋白酶 (EC 3.4.21.62)。合适的蛋白酶包括动物、植物或微生物来源的那些。在一个方面,此种合适的蛋白酶可为微生物来源。合适的蛋白酶包括前述合适的蛋白酶的化学或遗传修饰的突变体。在一个方面,合适的蛋白酶可为丝氨酸蛋白酶,如碱性微生物蛋白酶和/或胰蛋白酶类型蛋白酶。合适的中性或碱性蛋白酶的实例包括:

[0443] (a) 枯草杆菌蛋白酶 (EC 3.4.21.62),包括那些来源于芽孢杆菌属 (*Bacillus*),如 US 6,312,936B1,US 5,679,630,US 4,760,025,US 7,262,042和W009/021867中所述的来源于迟缓芽孢杆菌 (*Bacillus lentus*),嗜碱芽孢杆菌 (*B.alkalophilus*),枯草芽孢杆菌 (*B.subtilis*),解淀粉芽孢杆菌 (*B.amyloliquefaciens*) 和 *Bacillus gibsonii* 的那些。

[0444] (b) 胰蛋白酶类型或胰凝乳蛋白酶类型蛋白酶,如胰蛋白酶(例如猪或牛来源的),包括描述于W0 89/06270中的镰孢属 (*Fusarium*) 蛋白酶和W0 05/052161和W0 05/052146所述的来源于纤维单胞菌属 (*Cellulomonas*) 的胰凝乳蛋白酶。

[0445] (c) 金属蛋白酶,包括W0 07/044993 A2中所述来源于解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 的那些。

[0446] 优选的蛋白酶包括那些来源于 *Bacillus gibsonii* 或迟缓芽孢杆菌的。

[0447] 合适的商业上可获得的蛋白酶包括那些由Novozymes A/S (Denmark) 以商品名 **Alcalase®**, **Savinase®**, **Primase®**, **Durazym®**, **Polarzyme®**, **Kannase®**, **Liquanase®**, **Liquanase Ultra®**, **Savinase Ultra®**, **Ovozyme®**, **Neutrase®**, **Everlase®** 和 **Esperase®** 出售的那些,由Genencor International以商品名 **Maxatase®**, **Maxacal®**, **Maxapem®**, **Properase®**, **Purafect®**, **Purafect Prime®**, **Purafect Ox®**, **FN3®**, **FN4®**, **Excellase®** and **Purafect OXP®** 出售的那些,由Solvay Enzymes以商品名 **Opticlean®** 和 **Optimase®** 出售的那些,可从Henkel/Kemira获得的那些,即BLAP (示于US 5,352,604的图29的序列,具有下述突变:S99D+S101 R+S103A+V104I+G159S,下文称作BLAP)、BLAP R (具有S3T+V4I+V199M+V205I+L217D的BLAP)、BLAP X (具有S3T+V4I+V205I的BLAP) 以及BLAP F49 (具有S3T+V4I+A194P+V199M+V205I+L217D的BLAP) -均来自Henkel/Kemira;和来自Kao的KAP (嗜碱芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶,具有突变A230V+S256G+S259N)。

[0448] 脂肪酶:合适的脂肪酶包括细菌或真菌来源的那些。包括化学修饰或蛋白质工程的突变体。可用的脂肪酶的实例包括来自腐质霉属 (*Humicola*) (同义词 *Thermomyces*), 例如来自如描述于 EP 258 068 和 EP 305 216 的疏棉状腐质霉 (*T. lanuginosus*) 或来自如描述于 WO 96/13580 的特异腐质霉 (*H. insolens*) 的脂肪酶, 假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 脂肪酶, 例如来自产碱假单胞菌 (*P. alcaligenes*) 或类产碱假单胞菌 (*P. pseudoalcaligenes*) (EP 218 272), 洋葱假单胞菌 (*P. cepacia*) (EP 331 376), 施氏假单胞菌 (*P. stutzeri*) (GB 1,372, 034), 荧光假单胞菌 (*P. fluorescens*), 假单胞菌属菌种菌株 SD 705 (WO 95/06720 和 WO 96/27002), 威斯康星假单胞菌 (*P. wisconsinensis*) (WO 96/12012), 芽孢杆菌属脂肪酶, 例如来自枯草芽孢杆菌 (Dartois 等 (1993), *Biochemica et Biophysica Acta*, 1131, 253-360), 嗜热脂肪芽孢杆菌 (JP 64/744992) 或短小芽孢杆菌 (*B. pumilus*) (WO 91/16422) 的脂肪酶。

[0449] 所述脂肪酶可为“第一循环脂肪酶 (first cycle lipase)”, 如描述于美国专利 6, 939, 702B1 和 US PA 2009/0217464 的那些。在一个方面, 所述脂肪酶为第一洗涤脂肪酶 (first-wash lipase), 优选为来自疏棉状腐质霉 (*Thermomyces lanuginosus*) 的野生型脂肪酶包含 T231R 和 N233R 突变的变体。野生型序列为 Swissprot 登录号 Swiss-Prot 059952 (来源于疏棉状腐质霉 (*Thermomyces lanuginosus* (*Humicola lanuginosa*))) 的 269 个氨基酸 (氨基酸 23-291)。优选的的脂肪酶包括以商品名 **Lipex®**, **Lipolex®** 和 **Lipoclean®** 出售的那些。

纤维素酶:合适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的突变体。合适的纤维素酶包括来自芽孢杆菌属、假单胞菌属、腐质霉属、镰孢属、梭孢壳属、枝顶孢霉属 (*Acremonium*) 的纤维素酶, 例如, 从公开于 US 4,435,307、US 5,648,263、US 5,691,178、US 5,776,757 和 WO 89/09259 的特异腐质霉、嗜热毁丝霉 (*Myceliophthora thermophila*) 和尖镰孢 (*Fusarium oxysporum*) 产生的真菌纤维素酶。

[0450] 纤维素酶:合适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的突变体。合适的纤维素酶包括来自芽孢杆菌属、假单胞菌属、腐质霉属、镰孢属、梭孢壳属、枝顶孢霉属 (*Acremonium*) 的纤维素酶, 例如, 从公开于 US 4,435,307、US 5,648,263、US 5,691,178、US 5,776,757 和 WO 89/09259 的特异腐质霉、嗜热毁丝霉 (*Myceliophthora thermophila*) 和尖镰孢 (*Fusarium oxysporum*) 产生的真菌纤维素酶。

[0451] 特别合适的纤维素酶为具有颜色保护益处的碱性或中性纤维素酶。此类纤维素酶的实例为描述于 EP 0 495 257、EP 0 531 372、WO 96/11262、WO 96/29397、WO 98/08940 的纤维素酶。其他实例为纤维素酶变体如描述于 WO 94/07998、EP 0 531 315、US 5,457,046、US 5,686,593、US 5,763,254、WO 95/24471、WO 98/12307 和 PCT/DK98/00299 的那些。

[0452] 商业上可获得的纤维素酶包括 **CELLUZYME®** 和 **CAREZYME®** (Novozymes A/S)、**CLAZINASE™** 和 **PURADAX HA™** (Genencor International Inc.)、和 **KAC-500 (B)™** (Kao Corporation)。

[0453] 过氧化物酶/氧化酶: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。包括化学修饰或蛋白质工程的突变体。有用的过氧化物酶的实例包括来自鬼伞属 (*Coprinus*), 例如灰盖鬼伞 (*C. cinerius*) 的过氧化物酶及其变体, 如描述于 WO 93/24618、WO 95/10602 和 WO 98/15257 的那些。

[0454] 商业上可获得的过氧化物酶包括 **GUARDZYME®** (Novozymes A/S)。

[0455] 其他酶:其他优选的酶包括以商品名 **Pectawash®**, **Pectaway®** 出售的果胶酸裂合酶,和以商品名 **Mannaway®** 出售的甘露聚糖酶(均来自Novozymes A/S,Bagsvaerd, Denmark),以及 **Purabrite®** (Genencor International Inc.,Palo Alto,California)。

[0456] 所述洗涤剂酶可通过添加含有一种或多种酶的单独的添加剂,或通过添加包含所有这些酶的组合的添加剂而包含于洗涤剂组合物中。本发明的洗涤剂添加剂,即单独的添加剂或组合的添加剂,可例如配制为颗粒、液体、浆料等等。优选的洗涤剂添加剂剂型为颗粒,特别是无尘颗粒,液体,特别是稳定化的液体,或浆料。

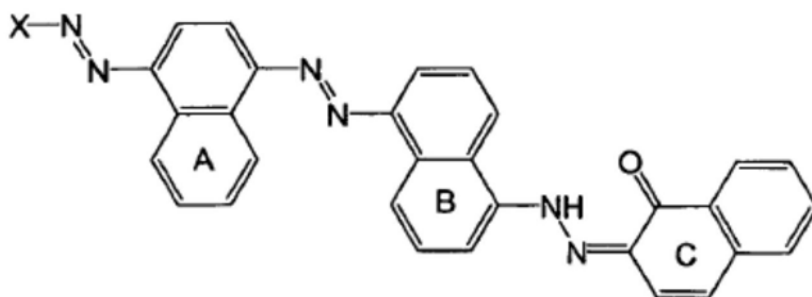
[0457] 无尘颗粒可例如如US 4,106,991和4,661,452中所公开而产生,并可任选地通过本领域已知方法涂覆。蜡状涂覆材料的实例为具有1000至20000的平均摩尔重量的聚环氧乙烷产物(聚乙二醇,PEG);具有16至50个环氧乙烷单元的乙氧化壬基酚(ethoxylated nonylphenol);乙氧化脂族醇,其中所述醇含有12至20个碳原子,且其中有15至80个环氧乙烷单元;脂肪醇;脂肪酸;和脂肪酸的甘油一酯、甘油二酯和甘油三酯。适用于通过流动床技术施用的形成薄膜的涂覆材料的实例在GB 1483591中给出。液体酶制备物可例如通过根据已确立的方法添加多元醇如丙二醇,糖或糖醇,乳酸或硼酸而稳定化。受保护的酶可根据EP 238,216中公开的方法制备。

[0458] 本发明的洗涤剂组合物可为任何便利的形式,例如条、片、粉末、颗粒、糊、凝胶、液体、泛用的(all-purpose)粉末状形式、“重质(heavy-duty)”洗剂、糊形式的泛用洗剂、重质液体类型、液体精细织物(fine-fabric)洗涤剂、手洗洗碟剂、轻质(light duty)洗碟剂、高泡沫类型洗涤剂、机洗洗碟剂、多种片、洗碟颗粒、洗碟液体、助漂洗(rinse-aid)类型洗涤剂。所述组合物亦可为单位剂量包装,包括本领域已知的那些和水溶性、水不溶性和/或水渗透性的那些。液体洗涤剂可为水性的,通常含有高至70%的水和0-30%的有机溶剂,或可为非水性的,或可为包含多于0.5g/L的洗涤剂组合物的溶液。本发明的组合物可例如配制为手洗或机洗洗衣洗涤剂组合物,包括适用于预处理有污迹的织物的洗衣添加组合物,和漂洗添加的织物软化剂组合物,或配制为用于一般家用硬表面清洁操作的洗涤剂组合物,或配制为供手洗或机洗的洗碟操作。所述洗涤剂可为粉末或颗粒形式,或其可为液体、凝胶或糊剂的形式,或为单位剂量产品如片剂或小袋(pouch),包括多区室小袋(multi-compartment pouch)的形式,或洗涤剂可为薄片(sheet)的形式

[0459] 所述组合物可包含织物调色剂。合适的织物调色剂包括染料、染料-粘土缀合物和颜料,其优选满足本文中下文所述测试方法1的要求。合适的染料包括小分子染料和聚合染料。合适的小分子染料包括选自下述落入Colour Index(C.I.)分类的染料的小分子染料: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:

[0460] (1) 下式的三偶氮(Tris-azo)直接蓝染料:

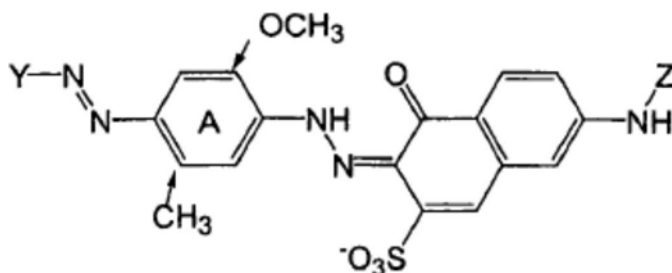
[0461]



[0462] 其中A、B和C萘环中的至少两个由磺酸基团取代,C环可在5位由NH<sub>2</sub>或NPh基团取代,X是用多至两个磺酸基团取代的萘环或苄基,且可在2位有OH基团取代,且亦可用NH<sub>2</sub>或NPh基团取代。

[0463] (2) 下式的二偶氮 (bis-azo) 直接染料:

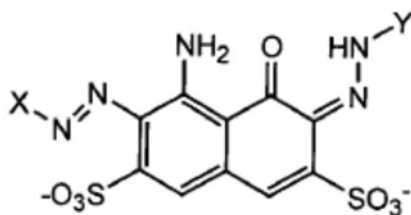
[0464]



[0465] 其中Z是H或苯基,A环优选由甲基和甲氧基在箭头所示位置取代,A环亦可为萘环,Y基团为苄基或萘环,其可由磺酸基团取代,且可由甲基基团单取代或双取代。

[0466] (3) 下式的蓝或红色酸性染料:

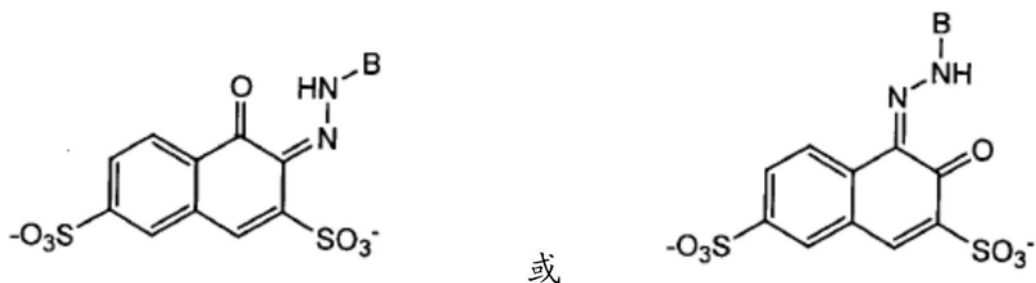
[0467]



[0468] 其中至少一个X和Y必须是芳基基团。在一个方面,两个芳基基团均为取代的苄基或萘基基团,其可用非水溶性基团如烷基或烷氧基或芳氧基基团取代,X和Y不可用水溶性基团如磺酸基或羧基取代。在另一个方面,X是氮取代的苄基基团,而Y是苄基基团。

[0469] (4) 下述结构的红色酸性染料:

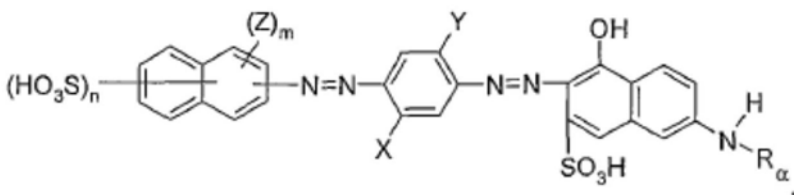
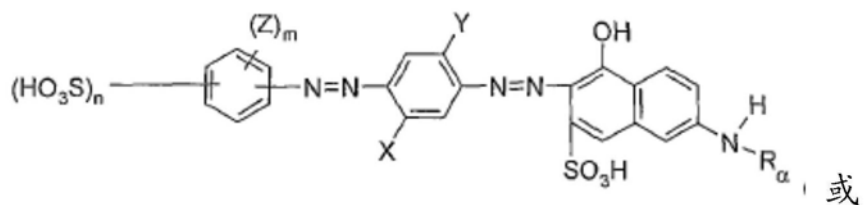
[0470]



[0471] 其中B是可由非水溶性基团如烷基或烷氧基或芳氧基基团取代的苄基或萘基基团,B不可用水溶性基团如磺酸基或羧基取代。

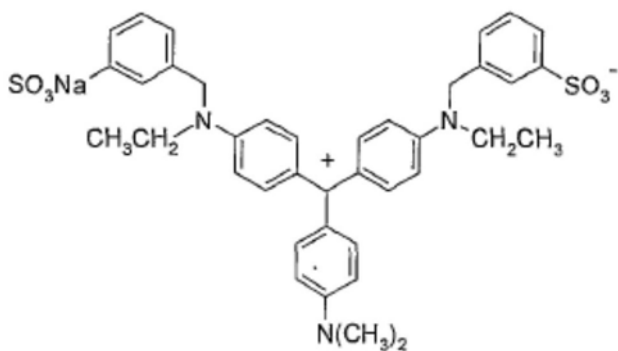
[0472] (5) 下述结构的二偶氮染料:

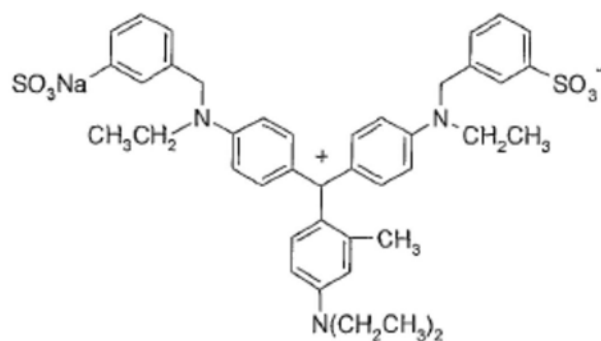
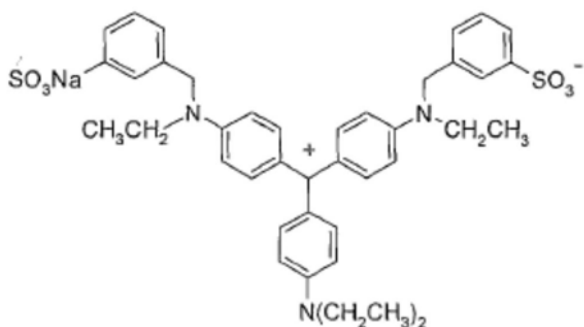




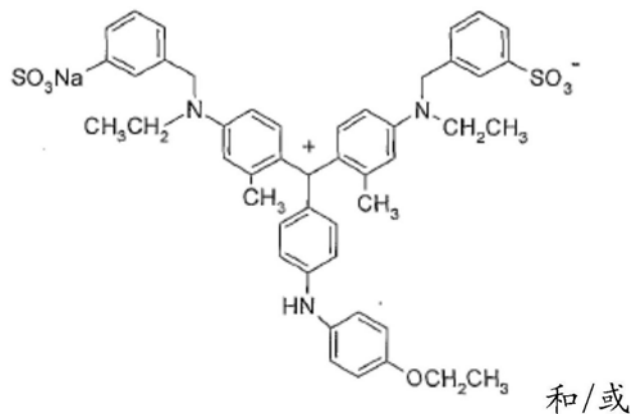
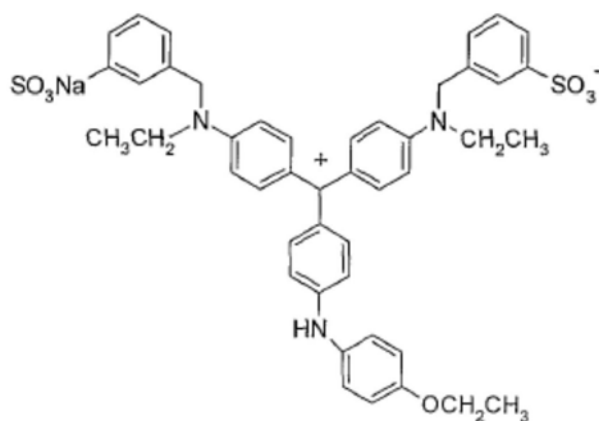
[0474] 其中X和Y彼此独立,各自为氢、 $C_1-C_4$ 烷基或 $C_1-C_4$ -烷氧基,R是氢或芳基,Z是 $C_1-C_4$ 烷基; $C_1-C_4$ -烷氧基;卤素;羟基或羧基,n是1或2,而m是0、1或2,以及其相应的盐及其混合物。

[0475] (6) 下述结构的三苯甲烷染料:

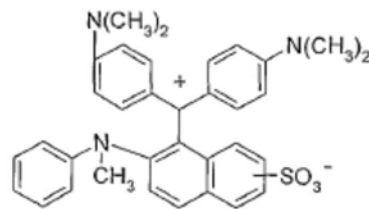




[0477]



和/或



[0478] 及其混合物。在另一个方面,合适的小分子染料包括下述选自Colour Index (Society of Dyers and Colourists,Bradford,UK)编号的小分子染料:直接紫9,直接紫35,直接紫48,直接紫51,直接紫66,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。在另一个方面,合适的小分子染料包括下述选自Colour Index (Society of Dyers and Colourists,Bradford,UK) 编号的小分子染料: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。在另一个方面,合适的小分子染料包括下述选自Colour Index (Society of Dyers and Colourists,Bradford,UK) 编号的小分子染料: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。

[0479] 合适的聚合染料包括选自下组的聚合染料:含有缀合的色原体的聚合物(染料-聚合物缀合物)和具有共聚合入所述聚合物骨架的色原体的聚合物,及其混合物。

[0480] 在另一个方面,合适的聚合染料包括选自下组的聚合染料:以 **Liquitint®** (Milliken,Spartanburg,South Carolina,USA) 名称出售的织物直接着色剂(fabric-substantive colorant),从至少一种活性染料和一种聚合物形成的染料-聚合物缀合物,其中所述聚合物选自下组:包含选自下组的模块的聚合物:羟基模块、伯胺模块、叔胺模块、巯基模块及其混合物。还在另一个方面,合适的聚合染料包括选自下组的聚合染料:**Liquitint®** (Milliken,Spartanburg,South Carolina,USA) Violet CT,与活性蓝、活性紫或活性红染料缀合的羧甲基纤维素(CMC),如与C.I.活性蓝19缀合的CMC(其由Megazyme,Wicklow,Ireland以产品名AZO-CM-CELLULOSE,产品编号S-ACMC出售),烷氧化的三苯甲烷聚合着色剂,烷氧化的噻吩聚合着色剂,及其混合物。

[0481] 合适的染料-粘土缀合物包括选自下组的染料-粘土缀合物,所述组包含至少一种阳离子/碱性染料和蒙皂石粘土,及其混合物。在另一个方面,合适的染料-粘土缀合物包括选自下组的染料-粘土缀合物:一种选自下组的阳离子/碱性染料: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1至23,CI碱性黑1至11,和选自下组的粘土:Montmorillonite粘土,Hectorite粘土,Saponite粘土及其混合物。仍在另一个方面,合适的染料-粘土缀合物包括选自下组的染料-粘土缀合物:Montmorillonite碱性蓝B7 C.I.42595缀合物,Montmorillonite碱性蓝B9 C.I.52015缀合物,Montmorillonite碱性紫V3 C.I.42555缀合物,Montmorillonite碱性绿G1 C.I.42040缀合物,Montmorillonite碱性红R1 C.I.45160缀合物,Montmorillonite C.I.碱性黑2缀合物,Hectorite碱性蓝B7 C.I.42595缀合物,Hectorite碱性蓝B9 C.I.52015缀合物,Hectorite碱性紫V3 C.I.42555缀合物,Hectorite碱性绿G1 C.I.42040缀合物,Hectorite碱性红R1 C.I.45160缀合物,Hectorite C.I.碱性黑2缀合物,Saponite碱性蓝B7 C.I.42595缀合物,Saponite碱性蓝B9 C.I.52015缀合物,Saponite碱性紫V3 C.I.42555缀合物,Saponite碱性绿G1 C.I.42040缀合物,Saponite碱性红R1 C.I.45160缀合物,Saponite C.I.碱性黑2缀合物,及其混合物。

[0482] 合适的颜料包括选自下组的颜料:黄烷士酮(flavanthrone),阴丹酮(indanthrone),含有1至4个氯原子的氯代阴丹酮,皮蒽酮(pyranthrone),二氯皮蒽酮,单溴二氯皮蒽酮,二溴二氯皮蒽酮,四溴皮蒽酮,花-3,4,9,10-四羧酸二亚酰胺(其中所述亚酰胺基团可为未取代的,或由C1-C3-烷基或苯基或杂环基团取代,并且其中所述苯基和杂

环基团还可携带在水中不赋予溶解性的取代基), 蒽嘧啶二羧酸酰胺(anthrapyrimidinecarboxylic acid amide), 蒽酮紫(violanthrone), 异蒽酮紫(isoviolanthrone), 二噁嗪(dioxazine) 颜料, 每分子可含有多至2个氯原子的铜酞菁, 多氯-铜酞菁或每分子含有多至14个溴原子的多溴-铜酞菁, 及其混合物。

[0483] 在另一个方面, 合适的颜料包括选自下组的颜料: 群青蓝(C.I. 颜料蓝29)、群青紫(C.I. 颜料紫15), 及其混合物。

[0484] 前述织物调色剂可组合使用(可使用织物调色剂的任意混合物)。合适的织物调色剂可购自Aldrich, Milwaukee, Wisconsin, USA; Ciba Specialty Chemicals, Basel, Switzerland; BASF, Ludwigshafen, Germany; Dayglo Color Corporation, Mumbai, India; Organic Dyestuffs Corp., East Providence, Rhode Island, USA; Dystar, Frankfurt, Germany; Lanxess, Leverkusen, Germany; Megazyme, Wicklow, Ireland; Clariant, Muttenz, Switzerland; Avecia, Manchester, UK, 和/或根据本文中包含的实例制备。合适的调色剂在US 7,208,459B2更加详细地描述。

[0485] 测试方法1

[0486] 在此给出定义染料或颜料物质是否就本发明的目的为织物调色剂的实验方案:

[0487] 1.) 将两个tergotometer罐用800ml的Newcastle upon Tyne, UK, City Water (~12颗粒(grain) 每美式加仑的总硬度, 由Northumbrian Water, Pity Me, Durham, Co. Durham, UK供应) 填充。

[0488] 2) 将罐插入tergotometer, 在实验期间将水温控制在30℃, 并将搅拌设为40rpm。

[0489] 3) 将4.8g由wfk, Brüggem-Bracht, Germany供应的IEC-B洗涤剂(IEC60456Washing Machine Reference Base Detergent Type B) 添加至每个罐。

[0490] 4) 在两分钟之后, 向第一罐添加2.0mg活性着色剂。

[0491] 5) 在一分钟之后, 将50g的切为5cm x 5cm样品的平坦棉布片(flat cotton vest) (由Warwick Equest, Consett, County Durham, UK提供) 添加至各罐。

[0492] 6) 在10分钟之后, 排干所述罐, 并重新注入冷水(16℃), 所述水具有14.4English Clark Degrees Hardness的水硬度以及3:1的钙镁摩尔比。

[0493] 7) 在2分钟漂洗之后, 去除织物。

[0494] 8) 使用相同处理进一步重复步骤3-7三个循环。

[0495] 9) 收集织物, 并使其在室内晾晒干燥(line dry) 12小时。

[0496] 10) 使用配有D65光源和UVA截断滤镜(cutting filter)的Hunter Miniscan分光光度计分析样品, 以获得Hunter a(红-绿轴)和Hunter b(黄蓝轴)值。

[0497] 11) 对于每组织物平均Hunter a和Hunter b值。若在评估中用着色剂处理的织物在a轴或b轴在色调方面显示大于0.2个单位的平均差异, 其就本发明的目的视为织物调色剂。

[0498] 所述组合物可包含包囊。在一个方面, 包囊包含核, 以及具有内表面和外表面的壳, 所述壳包裹所述核。

[0499] 在所述包囊的一个方面, 所述核可包含选自下组的材料: 香料; 增亮剂; 染料; 驱昆虫剂(insect repellent); 硅氧烷; 蜡; 调味剂; 维生素; 织物软化剂; 皮肤护理剂, 在一个方面, 石蜡; 酶; 抗菌剂; 漂白剂; 感知物(sensate); 及其混合物; 且所述壳可包含选自下组

的材料:聚乙烯;聚酰胺;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,所述氨基塑料可包含聚脲、聚氨酯和/或聚脲氨酯(polyureaurethane),在一个方面,所述聚脲可包含聚甲醛脲(polyoxymethyleneurea)和/或密胺甲醛(melamine formaldehyde);聚烯烃;多糖,在一个方面,所述多糖可包括海藻酸和/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;硅氧烷;及其混合物。

[0500] 在所述包囊的一个方面,所述核可包含香料。

[0501] 在所述包囊的一个方面,所述壳可包含密胺甲醛和/或交联的密胺甲醛。

[0502] 在一个方面,公开了合适的包囊可包含核材料和壳,所述壳至少部分围绕所述核材料。所述包囊的至少75%,85%或甚至90%可具有约0.2MPa至约10MPa,约0.4MPa至约5MPa,约0.6MPa至约3.5MPa或甚至约0.7MPa至约3MPa的断裂强度;和0%至约30%,0%至约20%或甚至0%至约5%的有益试剂泄露。

[0503] 在一个方面,所述包囊的至少75%,85%或甚至90%可具有约1微米至约80微米,约5微米至60微米,约10微米至约50微米或甚至约15微米至约40微米的粒径。

[0504] 在一个方面,所述包囊的至少75%,85%或甚至90%可具有约30nm至约250nm,约80nm至约180nm或甚至约100nm至约160nm的颗粒壁厚度。

[0505] 在一个方面,所述包囊的核材料可包含选自下组的材料:香料原材料和/或任选地包含选自下组的材料:植物油,包括纯的(neat)和/或掺和的植物油,包括蓖麻油、椰子油、棉籽油、葡萄油、菜籽油、豆油、玉米油、棕榈油、亚麻油、红花油、橄榄油、花生油、椰子油、棕榈仁油、蓖麻油、柠檬油及其混合物;植物油的酯,酯包括肥酸二丁酯,邻苯二甲酸二丁酯,肥酸丁基苄基酯,肥酸苄基辛基酯,磷酸三甲苯酯,磷酸三辛酯及其混合物;直链或支链烃,包括那些具有高于约80℃的沸点的直链或支链烃;部分氢化的萜烯,邻苯二甲酸二烷基酯,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;芳族溶剂,包括苯、甲苯及其混合物;硅油;及其混合物。

[0506] 在一个方面,所述包囊的壁材料可包含合适的树脂,其包括醛和胺的反应产物,合适的醛包括甲醛。合适的胺包括密胺、尿素、苯并胍胺(benzoguanamine),甘脲(glycoluril),及其混合物。合适的密胺包括羟甲基密胺,甲基化羟甲基密胺,亚氨基密胺及其混合物。合适的脲包括:二羟甲基脲,甲基化的二羟甲基脲,脲-间苯二酚,及其混合物。

[0507] 在一个方面,可对包囊采用合适的甲醛清除剂,例如,在胶囊浆料中和/或在将包囊添加至商品之前、之中或之后添加至该商品。

[0508] 合适的胶囊可遵循USPA 2008/0305982A1和/或USPA 2009/0247449A1的教导制成。或者,合适的胶囊可购自Appleton,Wisconsin USA的Appleton Papers Inc.。

[0509] 此外,用于制备前述包囊的材料可从Solutia Inc.(St Louis, Missouri U.S.A.)、Cytec Industries(West Paterson, New Jersey U.S.A.)、sigma-Aldrich(St.Louis, Missouri U.S.A.)、CP Kelco Corp., San Diego, California, USA; BASF AG, Ludwigshafen, Germany; Rhodia Corp., Cranbury, New Jersey, USA; Hercules Corp., Wilmington, Delaware, USA; Agrium Inc., Calgary, Alberta, Canada, ISP, New Jersey U.S.A., Akzo Nobel, Chicago, IL, USA; Stroeve Shellac Bremen, Bremen, Germany; Dow Chemical Company, Midland, MI, USA; Bayer AG, Leverkusen, Germany; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Missouri, USA获得。

[0510] 在一个方面,所述组合物可包含选自下组的酶稳定剂:(a)选自下组的无机盐:钙盐、镁盐及其混合物;(b)选自下组的糖:寡糖、多糖及其混合物;(c)选自下组的质量效应(mass efficient)可逆蛋白酶抑制剂:苯基硼酸及其衍生物;和(d)其混合物。

[0511] 在另一个实施方案中,所述组合物包含:(1)可逆蛋白酶抑制剂如含硼化合物;(2)1,2-丙二醇;(3)甲酸钙和/或甲酸钠;和(4)其任意组合。

[0512] 在一个方面,所述组合物可包含选自下组的结构剂(structurant):甘油二酯和甘油三酯,乙二醇二硬脂酸酯微晶纤维素,基于纤维素的材料,微纤维纤维素,生物聚合物,黄胞胶,胶凝糖,及其混合物。

[0513] 所述洗涤剂可包含一种或多种聚合物。实例为羧甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙二醇、聚乙烯醇、聚乙烯基吡啶-N-氧化物、聚乙烯基咪唑、聚碳酸酯如聚丙烯酸酯、马来酸/丙烯酸共聚物和甲基丙烯酸/丙烯酸月桂酯共聚物。

[0514] 所述洗涤剂可包含漂白系统,其可包含 $H_2O_2$ 源如过硼酸或过碳酸,其可与形成过酸的漂白活化剂如四乙酰基乙二胺或壬酰氧苯磺酸组合。或者,所述漂白系统可包含例如酰胺、亚酰胺或砜类型的过氧酸。一般而言,当使用漂白剂时,本发明的组合物可按主体清洁组合物重量计包含约0.1%至约50%或甚至约0.1%至约25%漂白剂。本发明的酶变体可使用常规稳定剂和/或蛋白酶抑制剂稳定,例如多元醇如丙二醇或甘油,糖或糖醇,不同的盐如NaCl和KCl;乳酸,甲酸,硼酸或硼酸衍生物例如芳族硼酸酯或苯基硼酸衍生物如4-甲基苯基硼酸,或肽醛如二、三或四肽醛或醛类似物(形式B1-B0-R之一,其中R为H,CH<sub>3</sub>,CX<sub>3</sub>,CHX<sub>2</sub>或CH<sub>2</sub>X(X=卤素),B0是单个氨基酸残基(优选具有任选取代的脂族或芳族侧链);而B1组成为一个或多个氨基酸残基(优选一个、两个或三个),任选地包含N-端保护基团,或如W009118375,W098/13459中所述),或蛋白质类型的蛋白酶抑制剂如RASI,BASI,WASI(稻、大麦和小麦的双功能性 $\alpha$ -淀粉酶/枯草杆菌蛋白酶抑制剂)或CI2或SSI。

[0515] 所述组合物可如W0 92/19709和W0 92/19708或US6,472,364中所述配制。在一些实施方案中,本文中使用的酶由在最终组合物中锌(II)、钙(II)和/或镁(II)离子的水溶性来源的存在而稳定化,所述来源向酶提供这些离子,以及其他金属离子(例如钡(II)、钪(II)、铁(II)、锰(II)、铝(III)、锡(II)、钴(II)、铜(II)、镍(II)和氧钒(oxovanadium)(IV))。

[0516] 所述洗涤剂亦可含有其他常规洗涤剂成分,如例如织物调理剂包括粘土,泡沫增强剂,抑泡剂,抗腐蚀剂、污物悬浮剂(soil-suspending agents)、抗污物再沉积剂、染料、杀细菌剂、光学增亮剂、助水溶剂、晦暗抑制剂、有机溶剂如乙醇、或香料。此外,所述洗涤剂可包含预洗剂(pre-spotter)或增强剂(booster),其添加至洗涤中以增加一般清洁水平,这些添加剂中的一些亦可在洗涤步骤之前用作施于纺织品的预处理剂。

[0517] 现在认为,在洗涤剂组合物中的任何酶,特别是本发明的酶,可以以对应于0.001-100mg酶蛋白每升洗液,优选0.005-5mg酶蛋白每升洗液,更优选0.01-1mg酶蛋白每升洗液,且特别是0.1-1mg酶蛋白每升洗液的量添加。然而,本发明的洗涤剂组合物包含至少0.0001至约0.1%重量百分比的纯酶蛋白,如约0.0001%至约0.01%,约0.001%至约0.01%或约0.001%至约0.01%。然而,当使用配制的酶时,所述洗涤剂组合物包含约0.02%至约20%重量百分比,如或约0.05%至约15%或约0.05至约20%或约0.05%至约5%或约0.05%至约3%的重量百分比。

[0518] 本发明的 $\alpha$ -淀粉酶变体还可掺入W0 97/07202(通过提述并入本文)中公开的洗涤剂组合物。

[0519] 所述组合物通常包含其他洗涤剂成分。合适的洗涤剂成分包括:漂白剂;亚胺漂白增强剂;过氧化氢源如过碳酸和/或过硼酸,特别是涂覆如碳酸盐和/或硫酸盐、硅酸盐、硼硅酸盐及其任何混合物的过碳酸盐;预制的过酸,包括包囊形式的预制的过酸;过渡金属催化剂;抑泡系统如基于硅氧烷的抑泡剂和/或基于脂肪酸的抑泡剂;增亮剂;光漂白剂;织物软化剂如粘土、硅氧烷和/或季铵化合物;絮凝剂如聚环氧乙烷;染料转移抑制剂如聚乙烯基吡咯烷酮、聚4-乙烯基吡啶N-氧化物和/或乙烯基吡咯烷酮和乙烯基咪唑的共聚物;织物完整性成分(fabric integrity component)如通过咪唑和环氧氯丙烷缩合产生的寡聚物;污物分散剂和污物抗再沉积助剂如烷氧化的多胺和乙氧化的氮丙啶(ethyleneimine)聚合物;抗再沉积成分如聚酯;羧酸聚合物如马来酸聚合物或马来酸和丙烯酸的共聚物;香料如香料微胶囊、淀粉包囊的accord、香料喷射物(perfume spray-on);皂环(soap ring);装饰颗粒(aesthetic particles);染料;填充物如硫酸钠,尽管优选组合物基本上不含填充物;硅酸盐如硅酸钠,包括1.6R和2.0R硅酸钠或偏硅酸钠;二羧酸和二醇的共聚物;纤维素聚合物如甲基纤维素、羧甲基纤维素、羟乙氧基纤维素或其他烷基或烷基烷氧基纤维素;溶剂如1,2-丙二醇、单乙醇胺、二乙二醇、乙醇及其任意混合物;助水溶剂如枯烯磺酸钠(sodium cumene sulphonate)、二甲苯磺酸钠(sodium xylene sulphonate)、甲苯磺酸钠(sodium toluene sulphonate)及其任意混合物;有机酸如柠檬酸;及其任意组合。

[0520] 洗衣洗涤剂组合物的实例

[0521] 下述为适于顶部装入式自动洗衣机(1和2)和前部装入式洗衣机(3)的液体洗衣洗涤剂组合物。

成分	组合物 (组合物的 wt%)		
	1	2	3
[0522] C <sub>12-15</sub> 烷基乙氧基(1.8)硫酸盐/酯	14.7	11.6	
C <sub>11.8</sub> 烷基苯磺酸盐/酯	4.3	11.6	8.3
C <sub>16-17</sub> 支化烷基硫酸盐/酯	1.7	1.29	

[0523]	C <sub>12-14</sub> 烷基-9-乙氧化物	0.9	1.07	
	C <sub>12</sub> 二甲胺氧化物	0.6	0.64	
	柠檬酸	3.5	0.65	3
	C <sub>12-18</sub> 脂肪酸	1.5	2.32	3.6
	硼酸钠(硼砂)	2.5	2.46	1.2
	C <sub>12-14</sub> 烷基乙氧基 3 硫酸钠			2.9
	C <sub>14-15</sub> 烷基 7-乙氧化物			4.2
	C <sub>12-14</sub> 烷基-7-乙氧化物			1.7
	甲酸钙	0.09	0.09	
	具有下述通式的化合物：二 ((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> )-二 ((C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O)(C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) <sub>n</sub> ), 其中 n=20 至 30, 而 x=3 至 8 或其硫酸化或磺酸化的变体			1.2
	随机接枝共聚物 <sup>1</sup>		1.46	0.5
	乙氧化的聚乙烯亚胺 (Ethoxylated Polyethylenimine) <sup>2</sup>	1.5	1.29	
	二亚乙基三胺五乙酸	0.34	0.64	
	二乙三胺五(亚甲基膦酸)			0.3
	Tinopal AMS-GX		0.06	
	Tinopal CBS-X	0.2	0.17	
	两亲性烷氧化的油脂清洁聚合物 <sup>3</sup>	1.28	1	0.4
	乙醇	2	1.58	1.6
	丙二醇	3.9	3.59	1.3
	二乙二醇	1.05	1.54	
	聚乙二醇	0.06	0.04	
	单乙醇胺	3.05	2.41	0.4
	NaOH	2.44	1.8	
	枯烯磺酸钠			1
	甲酸钠		0.11	
	水, 装饰物(染料, 香料)和次要物质(酶、溶剂、结	平衡	平衡	平衡
	构剂)			
[0524]				
[0525]				

<sup>1</sup>随机接枝共聚物是聚乙酸乙烯酯接枝的聚环氧乙烷共聚物, 其具有聚环氧乙烷骨架和多个聚乙酸乙烯酯侧链。聚环氧乙烷骨架的分子量约为6000, 而聚环氧乙烷对聚乙



酸乙烯酯的重量比为约40比60,且每50个环氧乙烷单元不超过1个接枝点。

[0526] <sup>2</sup>具有每-NH计20个乙氧基基团的聚乙烯亚胺 (MW=600)

[0527] <sup>3</sup>两亲性烷氧化油脂清洁聚合物是具有每-NH计24个乙氧基基团和每-NH计16个丙氧基基团的聚乙烯亚胺 (MW=600)

[0528] 组合物4-8自动洗碟凝胶

[0529]

	4 (wt %)	5 (wt %)	6 (wt %)	7 (wt %)	8 (wt %)
润湿剂 <sup>1</sup>	1.0	1.3	0.8	1	0.9
苯甲酸钠(33%活性)	0.61	0.61	0.61	0.6	0.6
黄胞胶	1.0	0.8	1.2	1	1.1
硫酸钠	10.0	10.0	10.0	8	10
香料	0.03	0.05	0.03	0.06	0.1
硅酸钠	0	0	0	0	2
柠檬酸(50%活性)	12.5	0	11	0	12
GLDA	0	7	0	8	0
Savinase Ultra XL(44mg 活性 / g) <sup>2</sup>	0.7	0	0.3	0	0
4-甲基苯基硼酸	0	0	0.05	0	0
包囊的蛋白酶(10mg/g) <sup>3</sup>	0.0	2.0	0.0	0	0
FN3 液体(48mg 活性/g) <sup>4</sup>	0.0	0.0	0	0.6	0
蛋白酶颗粒 (Protease Prill) (123 mg 活性/g) <sup>4</sup>	0	0	0	0	0.5
乙醇	0.0	0.0	0	0.3	0
氢氧化钾(45%活性)	14.6	14.6	14.6	14	0

[0530]	氯化钙(25%活性)	1.8	1.8	1.8	1.1	0.4
	染料	0.05	0.05	0.05	0.05	0.02
	Proxcel GXL™ (19%活性) <sup>8</sup>	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
	Acusol™ 820 <sup>9</sup>	0.34	0.34	0.3	0.35	0.3
	Acusol™ 425N (50%活性) <sup>9</sup>	3.0	3.0	3.5	2.5	2
	本发明的淀粉酶(25 mg/g 活性) <sup>2</sup>	0.2	0.5	0.4	0.3	0.1
	水和其他辅助成分	平衡至 100%	平衡至 100%	平衡至 100%	平衡至 100%	平衡 至 100%

[0531] <sup>1</sup>由BASF, Ludwigshafen, Germany以商品名 **Polytergent®** SLF-18出售。

[0532] <sup>2</sup>由Novozymes A/S, Denmark出售。

[0533] <sup>3</sup>本发明的包裹的蛋白酶。

[0534] <sup>4</sup>由Genencor International, California, USA出售。合适的蛋白酶颗粒以商品名 **FN3®**和 **Properase®**出售。

[0535] <sup>6</sup>由Alco Chemical, Tennessee, USA出售。

[0536] <sup>7</sup>一种这样的合适聚合物会由Nippon Shokubai, Japan以商品名Aqualic TL出售。

[0537] <sup>8</sup>由Arch Chemicals Incorporated, Smyrna, Georgia, USA出售

[0538] <sup>9</sup>由Rohm and Haas, Philadelphia, Pennsylvania, USA出售

[0539] 2.0R硅酸盐由PQ Corporation, Malvern, PA, USA供应。

[0540] 碳酸钠由Solvay, Houston, Texas, USA供应

[0541] 过碳酸钠 (2Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>·3H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 由Solvay, Houston, Texas, USA供应

[0542] 羟基乙烷二膦酸 (HEDP) 由Dow Chemical, Midland, Michigan, USA供应。

[0543] 洗碟洗涤剂组合物

[0544] 本发明的酶亦可用于洗碟洗涤剂组合物, 包括下述:

[0545] 1) 自动洗碟组合物粉末

[0546]	非离子表面活性剂	0.4 - 2.5%
--------	----------	------------

[0547]

偏硅酸钠	0 - 20%
二硅酸钠	0 - 20%
三磷酸钠	0 - 40%
碳酸钠	0 - 20%
过硼酸钠	2 - 9%
四乙酰基乙二胺(TAED)	1 - 4%
硫酸钠	5 - 33%
酶	0.0001 - 0.1%

[0548] 2) 自动洗碟组合物粉末

[0549]

非离子表面活性剂(例如醇乙氧化物)	1 - 2%
二硅酸钠	0 - 30%
碳酸钠	10 - 50%
膦酸钠	0 - 5%
二水合柠檬酸三钠 (Trisodium citrate dehydrate)	0 - 30%
氮三乙酸钠(Nitrilotrisodium acetate, NTA)	0 - 20%
一水合过硼酸钠	5 - 10%
四乙酰基乙二胺(TAED)	1 - 2%
聚丙烯酸聚合物(例如马来酸/丙烯酸共聚物)	6 - 25%
酶	0.0001 - 0.1%
香料	0.1 - 0.5%
水	5 - 10

[0550] 3) 自动洗碟组合物粉末

[0551]

非离子表面活性剂	0.5 - 2.0%
二硅酸钠	0- 40%
柠檬酸钠	0- 55%
碳酸钠	0- 29%

[0552]

碳酸氢钠	0- 20%
一水合过硼酸钠	0- 15%
四乙酰基乙二胺(TAED)	0 - 6%
马来酸/丙烯酸共聚物	0 - 5%
粘土	0 - 3%
聚氨基酸	0 - 20%
聚丙烯酸钠	0 - 8%
酶	0.0001 - 0.1%

[0553]

4) 自动洗碟组合物粉末

[0554]

非离子表面活性剂	1-2%
沸石MAP	15-42%
二硅酸钠	0-34%
柠檬酸钠	0-12%
碳酸钠	0-20%
一水合过硼酸钠	7-15%
四乙酰基乙二胺 (TAED)	0-3%
聚合物	0-4%
马来酸丙烯酸共聚物	0-5%
有机膦酸盐/酯	0-4%
粘土	0-2%
酶	0.0001-0.1%
硫酸钠	平衡

[0555]

5) 自动洗碟组合物粉末

[0556]

非离子表面活性剂	1 - 7%
二硅酸钠	0 - 30%
柠檬酸三钠	0 - 24%
碳酸钠	12 - 20%
单过硫酸盐(2 KHSO <sub>5</sub> .KHSO <sub>4</sub> .K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	15 - 21%

[0557]

漂白剂稳定剂	0.1 - 2%
马来酸/丙烯酸共聚物	0 - 6%
二亚乙基三胺五乙酸, 五钠盐	0 - 2.5%
酶	0.0001 - 0.1%
硫酸钠, 水	平衡

[0558] 6) 具有清洁表面活性剂系统的粉末和液体洗碟组合物

[0559]

非离子表面活性剂	0 - 1.5%
十八烷基二甲胺 N-氧化物二水合物	0 - 5%
十八烷基二甲胺 N-氧化物二水合物和十六烷基二甲胺 N-氧化物二水合物的 80:20 wt.C18/C16 混合物	0 - 4%
无水十八烷基二(羟乙基)胺 N-氧化物和无水十六烷基二(羟乙基)胺 N-氧化物的 70:30 wt.C18/C16 混合物	0 - 5%
平均乙氧化程度为 3 的 C <sub>13</sub> -C <sub>15</sub> 烷基乙氧基硫酸盐/酯	0 - 10%
平均乙氧化程度为 3 的 C <sub>12</sub> -C <sub>15</sub> 烷基乙氧基硫酸盐/酯	0 - 5%
平均乙氧化程度为 12 的 C <sub>13</sub> -C <sub>15</sub> 乙氧化的醇	0 - 5%
平均乙氧化程度为 9 的 C <sub>12</sub> -C <sub>15</sub> 乙氧化的醇的混合物	0 - 6.5%
平均乙氧化程度为 30 的 C <sub>13</sub> -C <sub>15</sub> 乙氧化的醇的混合物	0 - 4%
二硅酸钠	0 - 33%
三聚磷酸钠	0 - 46%
柠檬酸钠	0 - 28%
柠檬酸	0 - 29%
碳酸钠	0 - 20%
过硼酸钠一水合物	0 - 11.5%

[0560]	四乙酰基乙二胺(TAED)	0 - 4%
	马来酸/丙烯酸共聚物	0 - 7.5%
	硫酸钠	0 - 12.5%
	酶	0.0001 - 0.1%

## [0561] 7) 非水性液体自动洗碟组合物

[0562]	液体非离子表面活性剂(例如醇乙氧化物)	2.0- 10.0%
	碱金属硅酸盐	0 - 15.0%
	碱金属磷酸盐	0 - 40.0%
	液体载体, 选自高级二醇, 聚二醇, 聚氧化物, 二醇醚	25.0 - 45.0%
	稳定剂(例如磷酸和 C <sub>16</sub> -C <sub>18</sub> 烷基醇的偏酯)	0.5 - 7.0%
	抑泡剂(例如硅氧烷)	0 - 1.5%
	酶	0.0001 - 0.1%

## [0563] 8) 非水性液体自动洗碟组合物

[0564]	液体非离子表面活性剂(例如醇乙氧化物)	2.0 - 10.0%
	二硅酸钠	0 - 15.0%
	碱金属碳酸盐	7.0 - 20.0%
	柠檬酸钠	0 - 1.5%
	稳定系统(例如细分(finely divided)的硅氧烷和低分子量二烷基聚乙二醇醚的混合物)	0.5 - 7.0%
	低分子量聚丙烯酸聚合物	5.0 - 15.0%
	粘土凝胶增稠剂(例如膨润土)	0 - 10.0%
	羟丙基纤维素聚合物	0 - 0.6%
	酶	0.0001 - 0.1%
	液体载体, 选自高级二醇, 聚二醇, 聚氧化物和二醇醚	平衡

## [0565] 9) 触变性液体自动洗碟组合物

[0566]	C <sub>12</sub> -C <sub>14</sub> 脂肪酸	0-0.5%
	嵌段共聚物表面活性剂	1.5-15.0%

柠檬酸钠	0-12%
三聚磷酸钠	0-15%
碳酸钠	0-8%
三硬脂酸铝	0-0.1%
枯烯磺酸钠	0-1.7%
聚丙烯酸酯增稠剂	1.32-2.5%
聚丙烯酸钠	2.4-6.0%
硼酸	0-4.0%
甲酸钠	0-0.45%
甲酸钙	0-0.2%
正癸基联苯氧化物二磺酸钠	0-4.0%
单乙醇胺 (MEA)	0-1.86%
氢氧化钠 (50%)	1.9-9.3%
1,2-丙二醇	0-9.4%
酶	0.0001-0.1%
抑泡剂,染料,香料,水	平衡

## [0567] 10) 液体自动洗碟组合物

醇乙氧化物	0 - 20%
脂肪酸酯磺酸	0 - 30%
十二烷基硫酸钠	0 - 20%
烷基聚糖苷	0 - 21%
油酸	0 - 10%
二硅酸钠一水合物	0 - 33%
柠檬酸钠二水合物	0 - 33%
硬脂酸钠	0 - 2.5%
过硼酸钠一水合物	0 - 13%
四乙酰基乙二胺(TAED)	0 - 8%

[0568]

[0569]

马来酸/丙烯酸共聚物	4 - 8%
酶	0.0001 - 0.1%

## [0570] 11) 含有保护的漂白剂颗粒的液体自动洗碟组合物

[0571]

硅酸钠	5-10%
焦磷酸四钾	0-25%
三磷酸钠	0-2%
碳酸钾	4-8%

保护的漂白剂颗粒,例如氯	5-10%
聚合增稠剂	0.7-1.5%
氢氧化钾	0-2%
酶	0.0001-0.1%
水	平衡

[0572] 12) 如1)、2)、3)、4)、6)和10)中所述的自动洗碟组合物,其中用过碳酸盐替代过硼酸盐。

[0573] 13) 1) -6) 中所述的自动洗碟组合物,其还含有锰催化剂,该锰催化剂例如可为“Efficient manganese catalysts for low-temperature bleaching”,Nature,369,1994, pp.637-639中描述的一种化合物。

[0574] 工业应用

[0575] 本发明亦涉及使用 $\alpha$ -淀粉酶变体的方法。

[0576] 所述变体 $\alpha$ -淀粉酶优选掺入洗涤剂组合物和/或与洗涤剂组合物一同使用,例如用于洗衣洗涤剂组合物中,例如用于家用洗衣洗涤剂组合物中,特别是液体洗衣洗涤剂组合物中。具体而言,所述洗涤剂包含至少一种螯合剂,且所述洗涤剂组合物通常包含常规的洗涤剂成分如表面活性剂(阴离子、阳离子、非离子、两性离子、两性)、助洗剂、漂白剂、聚合物、其他酶和其他成分,例如如WO 2007/130562和WO 2007/149806中所述,其通过全文提述并入本文。

[0577] 由于其在碱性pH值的活性,本发明的 $\alpha$ -淀粉酶良好地适用于多种工业工艺,特别是所述酶具有潜在的在洗涤、洗碟和硬表面清洁洗涤剂组合物中的用途,但其亦可用于产生增甜剂,糖浆如葡萄糖等,塑料前体,发酵产物特别是乙醇、丁醇和甲醇,和生物气如甲烷,或其他来源于淀粉的产物。用于常规淀粉转化工艺和液化和/或糖化工艺的条件描述于例如美国专利号3,912,590和EP专利公开号EP 252,730和EP 63,909。

[0578] 本发明的 $\alpha$ -淀粉酶变体亦可用于从淀粉加强的废纸和纸板产生木素纤维素材料,如纸浆,纸和纸板,特别是当重新纸浆化(repulping)发生在pH高于7且淀粉酶可通过降解增强的淀粉促进废物材料的崩解时。本发明的 $\alpha$ -淀粉酶变体亦可用于修饰淀粉,其中酶修饰的淀粉与碱性填充物如碳酸钙、高岭土和粘土一同用于造纸时。

[0579] 因此,上述组合物可进一步包含非洗涤剂组分,发酵生物如例如酵母,优选酵母属的菌株,植物材料或含淀粉材料如例如块茎、根、茎、全谷粒、玉米、穗轴、小麦、大麦、黑麦、买罗高粱、西米、木薯、木薯淀粉、高粱、稻、豌豆、大豆或红薯,或其混合物,或谷物,含糖原材料如糖蜜、水果材料、甘蔗或甜菜,马铃薯,以及含纤维素材料,如木材或植物残余物,或其混合物。

[0580] 本发明的 $\alpha$ -淀粉酶变体亦可用于纺织品脱浆。在纺织品加工工业中, $\alpha$ -淀粉酶传统上在脱浆工艺中用作辅助剂以促进在纺织过程中在纬丝棉纱上用作保护涂层的含淀粉浆物质的去除。

[0581] 在纺织之后浆物质涂层的完全去除对于确保后续工艺中的最佳结果是重要的,在后续工艺中,将织物洗涤、漂白并染色。酶法淀粉降解是优选的,因为其不涉及对纤维材料的任何有害作用。

[0582] 为了减少加工成本并增加工厂的产量,脱浆加工有时与洗涤和漂白步骤合并。在



此类情况下,通常使用非酶辅助剂如碱或氧化剂以分解淀粉,因为传统的 $\alpha$ -淀粉酶与高pH水平和漂白剂并非非常相容。淀粉浆物质的非酶法分解可导致一些纤维损伤,因为使用了较具腐蚀性的化学品。

[0583] 相应地,会需要使用本发明的 $\alpha$ -淀粉酶变体,因为其在碱性溶液中具有改善的性能。所述 $\alpha$ -淀粉酶变体可单独使用,或当对含纤维素的织物或纺织品进行脱浆时与纤维素酶组合使用。

[0584] 在一个实施方案中,本发明涉及请求保护的组合物的产品和/或涉及该组合物的方法和/或该组合物的用途,所述组合物并非用于空气护理 (air care)。在一个实施方案中,本发明涉及请求保护的组合物的产品和/或涉及该组合物的方法和/或该组合物的用途,所述组合物并非用于汽车护理 (car care)。在一个实施方案中,本发明涉及请求保护的组合物的产品和/或涉及该组合物的方法和/或该组合物的用途,所述组合物并非用于洗碟。在一个实施方案中,本发明涉及请求保护的组合物的产品和/或涉及该组合物的方法和/或该组合物的用途,所述组合物并非用于织物调理 (包括软化)。在一个实施方案中,本发明涉及请求保护的组合物的产品和/或涉及该组合物的方法和/或该组合物的用途,所述组合物并非用于衣物洗涤。在一个实施方案中,本发明涉及请求保护的组合物的产品和/或涉及该组合物的方法和/或该组合物的用途,所述组合物并非用于洗涤和漂洗添加剂和/或护理。在一个实施方案中,本发明涉及请求保护的组合物的产品和/或涉及该组合物的方法和/或该组合物的用途,所述组合物并非用于硬表面清洁/或处理以及其他用于消费者或机构用途的清洁。在一个实施方案中,本发明涉及请求保护的组合物的产品和/或涉及该组合物的方法和/或该组合物的用途,所述组合物并非用于空气护理,汽车护理,洗碟,织物调理 (包括软化),衣物洗涤,洗涤和漂洗添加剂和/或护理,硬表面清洁和/或处理以及其他用于消费者或机构用途的清洁。

[0585] 材料和方法

[0586] 酶:

[0587] SP722:SEQ ID NO:6,可从Novozymes获得,并公开于WO 95/26397。

[0588] SP707或#707:SEQ ID NO:8

[0589] AA560:SEQ ID NO:10

[0590] 一般分子生物学方法:

[0591] 除非另行提及,DNA操纵和转化使用分子生物学的标准方法进行 (Sambrook等 (1989); Ausubel等 (1995); Harwood and Cutting (1990))。

[0592]  $\alpha$ -淀粉酶和变体的发酵

[0593] 发酵可通过本领域中公知方法,或如下所述进行。将携带相关表达质粒的枯草芽孢杆菌菌株划线于含有相关抗生素的LB琼脂平板上,并在37℃生长过夜。

[0594] 将菌落转移至500ml摇瓶中的100ml补充相关抗生素 (例如10mg/l氯霉素) BPX培养基中。

[0595] BPX培养基的组合物:

	马铃薯淀粉	100 g/l
	大麦粉	50 g/l
	BAN 5000 SKB	0.1 g/l
[0596]	酪蛋白水解物钠盐	10 g/l
	大豆粉	20 g/l
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O	9 g/l
	抑泡剂	0.1 g/l

[0597] 将培养物在37℃以270rpm振荡4至5日。

[0598] 将细胞和细胞碎片从发酵液通过在4500rpm离心20-25分钟来去除。在此之后,过滤上清以获得完全澄清的溶液。将滤过物浓缩,并在UF-过滤器上洗涤(10000截取膜),并将缓冲液例如通过透析或凝胶过滤改变为20mM乙酸盐pH 5.5。将UF-滤过物施于S-sepharose F.F. (General Electric, 阳离子交换, 基质: 交联琼脂糖, 官能团: -OCH<sub>2</sub>CHOHCH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>) 之上, 并通过用0.2M NaCl在相同缓冲液中逐步洗脱来进行洗脱。将洗脱物针对10mMTris (2-氨基-2-羟甲基-丙烷-1,3-二醇), pH 9.0透析, 并施于Q-sepharose F.F. (General Electric, 阴离子交换, 基质: 交联的琼脂糖, 官能团: -OCH<sub>2</sub>CHOHCH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CHOHCH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) 之上, 并用0-0.3M NaCl的线性梯度经六个柱体积进行洗脱。汇集含有活性(通过EnzCheck测定测量)的级分, 将pH调整至pH 7.5, 并通过用0.5%w/vol活性炭处理5分钟来去除剩余颜色。添加例如通过透析或凝胶过滤的进一步的缓冲液交换至缓冲系统的步骤也可有利的, 所述缓冲液系统本身不影响洗涤结果, 例如EPPS-缓冲液, 甘氨酸缓冲液, 乙酸盐缓冲液等, 优选含有少量浓度的钙(例如0.1mM)以在储藏过程中稳定所述淀粉酶, 以及含有约0.01%Triton X-100以减少酶蛋白吸附于容器和移液管的风险。

[0599] 模式洗涤剂

[0600] 模式洗涤剂A的组成:

[0601]	化合物	量 g/100g	% 活性成分
		表面活性剂	
	Na-LAS (92%) (Nacconol 90G) (阴离子) (直链烷基苯磺酸酯/盐)	10.87	10

[0602]

STEOL CS-370E (70%) (阴离子), CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>m</sub> - (OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , 其中 m=11-13	7.14	5
Bio-soft N25-7 (99.5%) (非离子): CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>m</sub> - (OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -OH, 其中 m=11-14	5	5
油酸(脂肪酸)	2	2
	溶剂	
H <sub>2</sub> O	62	65
乙醇	0.5	0.5
STS (对甲苯磺酸钠(40%))	3.75	1.5
单丙二醇	2	2
	助洗剂	
柠檬酸三钠	4	4
三乙醇胺(TEA)	0.5	0.5
	稳定剂	
硼酸	1.5	1.5
	次要成分	
10N NaOH (供调整至 pH 8.5)	0.8	0.8

[0603]

模式洗涤剂B的组成:

[0604]

化合物	量 g/100g	%活性成分
	表面活性剂	
Na-LAS (92%) (Nacconol 90G) (阴离子)	10.87	10
STEOL CS-370E (70%) (阴离子)	7.14	5
Bio-soft N25-7 (99.5%) (非离子)	5	5
油酸(脂肪酸)	2	2
	溶剂	
H <sub>2</sub> O	62	65
乙醇	0.5	0.5
STS (对甲苯磺酸钠) (40%)	3.75	1.5

[0605]	单丙二醇	2	2
		助洗剂	
	二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)	1.5	1.5
	三乙醇胺(TEA)	0.5	0.5
		稳定剂	
	硼酸	1.5	1.5
		次要成分	
	10N NaOH (供调整至 pH 8.0)	0.8	0.8

[0606] 用于测量游离钙离子的测定

[0607] 下述测定可用于测量溶液中的游离钙离子,并因此用于确定螯合剂在pH8将游离钙离子( $\text{Ca}^{2+}$ )浓度从例如2.0mM减少至0.10mM的能力。

[0608] 测定原理:

[0609] 将不同量的螯合剂添加至2.0mM  $\text{Ca}^{2+}$ 的溶液,并通过使用Calcium Ion Selective Electrode (钙离子选择电极)在固定pH和温度确定游离 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度。将游离钙的浓度从2.0mM减少至0.10mM所需的螯合剂的浓度可根据测量的游离钙浓度针对螯合剂的浓度的曲线图来确定。在本测定中,将游离钙浓度从2.0mM减少至0.10mM所需的螯合剂浓度在pH 8在21℃,在氯化钾和49mM EPPS中测量。

[0610] 溶液:

[0611] 电解质溶液:超纯水(Milli-Q水)中4M氯化钾。

[0612] pH 8缓冲液:使用最少量的1N氢氧化钠调整至pH 8.0的50mM EPPS(4-(2-羟乙基)哌嗪-1-丙磺酸)。

[0613] 钙储液:pH 8缓冲液中25mM  $\text{Ca}^{2+}$ ,从 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 制备。

[0614] 螯合剂储液:pH 8缓冲液中15mM螯合剂(基于100%干螯合剂),使用最少量的1M NaOH或1M HCl重新调整至pH 8.0。

[0615] 超纯水(Milli Q水)用于制备所有缓冲液和溶液。

[0616] 装置:

[0617] 来自Thermo Scientific(目录号9720BNWP)的钙离子选择电极,针对氯化钙标准溶液校准。电极如伴随电极的指南中所述进行校准。

[0618] 步骤:

[0619] 准备一系列小瓶,每个含有4mL的钙储液(终浓度2.0mM)、1mL电解质溶液(终浓度80mM氯化钾)、多种量的螯合剂储液(0-45mL),并使用pH 8缓冲液以供将总体积调整至50mL。EPPS在该测定中的终浓度为49mM。

[0620] 在混合之后,游离 $\text{Ca}^{2+}$ 的浓度通过钙电极测量。游离钙浓度对于每个测试的螯合剂应在充分数量的不同螯合剂浓度进行确定,确保数据组覆盖从2.0mM游离钙离子至低于0.10mM的值整个范围,或测定中最终螯合剂浓度高于10.0mM。数据点的合适数量为8或更多。将起始的2.0mM游离钙离子降低至0.10mM所需的螯合剂浓度从测量的游离钙离子浓度对于螯合剂浓度的曲线图通过内插获得。

[0621] 将溶液平衡至所需温度,其在目前的测定中为21℃。

[0622] logK的确定

[0623] 螯合剂亦可通过螯合剂和钙离子的结合常数来表征。该常数可通过如AD Nielsen,CC Fuglsang and P Westh,Analytical Biochemistry Vol.314(2003)第227-234页和T Wiseman,S Williston,JF Brandts and L-N Lin,Analytical Biochemistry Vol.179(1989)第131-137页所述的ITC(等温滴定量热法, isothermal titration calorimetry)来确定。

[0624] 将所有使用的玻璃器皿和塑料瓶用1% (w/w) EDTA溶液洗涤,并随后在Chelex 100处理的超纯水(Milli-Q水)中充分漂洗。将溶液储藏于塑料瓶中并维持在5℃直至使用。

[0625] 缓冲液:

[0626] 20mM HEPES (2-[4-(2-羟乙基)-1-哌嗪基]-乙磺酸), pH 8,用超纯水(Milli-Q水)制备

[0627] 20mM甘氨酸, pH 10,用超纯水(Milli-Q水)制备

[0628] 溶液:

[0629] -20mM HEPES中的125μM螯合剂, pH 8,或20mM甘氨酸中的125μM螯合剂, pH 10

[0630] -20mM HEPES中的4mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8,或20mM甘氨酸中的4mM CaCl<sub>2</sub>, pH 10

[0631] -超纯水(Milli-Q水)

[0632] 将所有缓冲液经过Chelex 100柱(Sigma Aldrich C-7901,基质:1%交联的聚苯乙烯基质,活性基团:亚氨基二乙酸(钠盐形式),基质附着:通过甲基基团附于芳环)以去除钙离子。所有溶液在实验前通过在真空下搅拌除气。

[0633] 仪器:

[0634] MCS-ITC (MicroCal Inc., Northampton, MA, USA)

[0635] 步骤:

[0636] 将参照小室用超纯水(Milli-Q水)填充。将样品小室用选定pH的螯合剂填充,并将注射器用选定pH的钙溶液填充。将溶液平衡至所需温度,例如19℃。

[0637] 然后将样品小室中的螯合剂溶液用30-40个等分试样的8μL钙溶液滴定。

[0638] 然后使用由MicroCal Inc.供应的原始软件整合从ITC获得的信号。为了获得结合等温线,使用相同软件包进行回归程序(regression routine)。然后将这些数据拟合于使用原始软件中嵌入的程序的模型。目前,优选“OneSites”模型,其对于大部分常用的螯合剂提供最佳拟合,即残差在零周围平均分布。根据K值,log K作为K值的对数(以10为底)来计算。

[0639] 用于确定洗涤性能的测定

[0640] 为了评估α-淀粉酶变体在洗涤剂组合物中的洗涤性能,可进行洗涤实验。使用Automatic Mechanical Stress Assay (AMSA)或使用烧杯的洗涤性能测试来测试这些酶。用AMSA测试,可检查大量小体积酶-洗涤剂溶液的洗涤性能。AMSA平板具有多个槽以供测试溶液,并具有将待洗涤纺织物样品针对所有槽开口牢固挤压的盖。在洗涤时间期间中,将平板、测试溶液、纺织品和盖剧烈振荡以使得测试溶液与纺织品相接触,并以规律的、周期性振动形式施加机械应力。关于进一步描述,参见WO 02/42740,特别是第23-24页的段落“Special method embodiments”。

[0641] 一般洗涤性能描述:

[0642] 制备如上所述包含水(15°dH)、0.8g/L洗涤剂例如模式洗涤剂A或B,或50mM HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>,以及例如0、0.2、0.4、0.8和/或1.2mg酶蛋白/L浓度的本发明的酶的测试溶液。添加用淀粉(例如来自Center For Testmaterials BV,P.O.Box 120,3133KT,Vlaardingen,The Netherlands的CS-28)沾污的织物并在20℃洗涤30分钟。在流淌的自来水下充分漂洗并在暗处干燥之后,接着测量沾污的织物的光强度或反射值作为洗涤性能的量度。用0mg酶蛋白/L进行的测试用作空白以获得白度差值(delta remission value)。优选地,在洗涤步骤过程中以例如振荡、旋转或搅拌含织物的洗涤溶液的形式施加机械作用。

[0643] AMSA洗涤性能实验可在如下指定的实验条件下进行:

[0644]	洗涤剂	模式洗涤剂A或B
	洗涤剂剂量	0.8g/L
	测试溶液体积	160微升
	pH	照原样
	洗涤时间	30分钟
	温度	20℃
	水硬度	15°dH
	测试溶液中的酶浓度	0;0.2;0.4;0.8;1.2mg/L
	测试材料	CS-28(棉上的稻米淀粉)

[0645] 通过向测试系统添加CaCl<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub>和NaHCO<sub>3</sub>(Ca<sup>2+</sup>:Mg<sup>2+</sup>:HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>=4:1:7.5,基于摩尔比)将水硬度调整至15°dH。在洗涤之后,将纺织品在自来水中冲洗并在暗处干燥。

[0646] 酶变体的性能作为用该具体淀粉酶洗涤的纺织品的颜色的亮度来测量。亮度亦可表示为当用白光照射时从该样品反射的光的强度。当样品受沾污时,反射光的强度与干净样品相比较低。因此,反射光的强度可用于测量淀粉酶的洗涤性能。

[0647] 颜色测量用专业的平台式扫描器(Kodak iQsmart,Kodak)进行,其用于捕获经洗涤的纺织品的图像。

[0648] 为了从扫描的图像提取光强度的值,将来自图像的24位像素值换算为关于红色(r)、绿色(g)和蓝色(b)的值,亦称作RGB值。强度值(Int)通过将RGB值作为矢量加合,然后取所得矢量的长度来进行计算:

$$[0649] \quad Int = \sqrt{r^2 + g^2 + b^2}.$$

[0650] 纺织品:纺织品样品CS-28(棉上的稻米淀粉)可从Center For Test materials BV,P.O.Box 120,3133KT Vlaardingen,the Netherlands获得。

[0651] 使用烧杯的洗涤性能测试是在顶部装入式洗衣机的小规模模型中进行的测定,并用于衡量淀粉酶的洗涤性能。烧杯洗涤性能测试,使用250mL烧杯和提供每个方向180°并具有每分钟80下的频率的振动旋转运动的桨式搅拌器,并包括下述步骤:提供100mL含有50mM NaHCO<sub>3</sub>和0.4mg/L酶的洗涤溶液(6℃,15°dH,pH 8.0);将两个CS-28样品(5x5 cm)和两个EMPA 162(5x5 cm)样品添加至洗涤溶液以起始洗涤;将搅拌速度设定为80rpm;在60分钟之后停止搅拌,在冷的流动自来水下漂洗样品;在暗处将漂洗的样品干燥过夜;并如下所述通过使用Color Eye测量460nm的入射光的白度来衡量洗涤性能。

**[0652] 装置和材料**

**[0653]** 具有循环的水浴 (5℃); 玻璃烧杯 (250mL); 具有100mL洗涤溶液容量的每个烧杯一个旋转臂; 测试样品: 来自Center for Testmaterials BV, Vlaardingen, The Netherlands 的CS-28 (棉上的稻米淀粉) 和来自EMPA Testmaterials AG, St.Gallen, Switzerland 的EMPA 162 (棉/聚酯上的稻米淀粉), 样品切割为5x5 cm。

**[0654]** 洗涤溶液: 50mM  $\text{NaHCO}_3$  缓冲液, pH 8.0, 水硬度15°dH, 钙: 镁比为4:1。

**[0655]** 淀粉酶储液: 1mg酶蛋白每mL。-使用超纯水 (MilliQ水) 中的0.1% (w/v) Triton X-100和0.1mM  $\text{CaCl}_2$  的溶液用于稀释淀粉酶 (淀粉酶稀释缓冲液)。

**[0656] Color Eye测量**

**[0657]** 洗涤性能表示为白度差值 ( $\Delta \text{Rem}$ )。样品的光反射衡量使用具有非常小 (即 $0.7\text{cm}^2$  ( $\sim 0.7 \times 1.0\text{cm}$ )) 的椭圆光圈的Macbeth Color Eye 7000反射分光光度计进行。该测量在入射光中不含UV的情况下进行, 并推出 (extract) 460nm的白度。将待测量的样品置于相同类型的另一个样品之上, 然后进行测量以减少来自将样品针对测量开口向上推送的活塞的反射。对于各个样品的白度差值通过从用淀粉酶洗涤的样品的白度值减去未经添加淀粉酶洗涤的样品 (对照) 的白度值来计算。

**[0658] 用于测量淀粉分解活性 ( $\alpha$ -淀粉酶活性) 的测定****[0659] EnzChek测定**

**[0660]** 淀粉酶活性或残余淀粉酶活性可通过下述EnzCheck测定来确定。底物为玉米淀粉衍生物DQ<sup>TM</sup>淀粉 (玉米淀粉BODIPY FL缀合物), 其为用BODIPY<sup>®</sup> FL (4,4-二氟-5,7-二甲基-4-硼-3a,4a-二氮杂-s-indacene-3-丙酸) 染料标记至淬灭荧光的程度的玉米淀粉。将一个小瓶的含有大约1mg冻干的底物溶解于100 $\mu\text{L}$  50mM乙酸钠pH 4.0。将小瓶涡旋20分钟, 并在暗处置于室温, 时时混合直至溶解。然后添加950 $\mu\text{L}$  10mM乙酸钠0.01% (w/v) Triton X100 ((聚乙二醇对-(1,1,3,3-四甲基丁基) 苯基醚 ( $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$  ( $n=9-10$ )), pH 5.0, 充分涡旋, 并在暗处储藏于室温直至即将使用。从1mL该溶液, 通过与5mL 50mM HEPES, 0.01% (w/v) Triton X100, 1mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7.0混合来制备底物工作溶液。

**[0661]** 将含酶洗涤剂在50mM HEPES, 0.01% Triton X100, 1mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7.0中稀释至15ng酶蛋白/ml (6826.7倍稀释) 的浓度。

**[0662]** 对于该测定, 将25 $\mu\text{L}$ 的底物工作溶液与25 $\mu\text{L}$ 的稀释的酶在黑色384孔微滴定板中混合10秒。在25℃对于每个孔每两分钟测量荧光强度 (激发: 485nm, 发射: 555nm) 一次测量30分钟, 且 $V_{\text{max}}$  计算为荧光强度针对时间的曲线图的斜率。该曲线图应为线性的, 且必须调整剩余活性测定使得稀释的参照酶溶液位于活性测定的线性范围内。

**[0663]** 在少数情况下, 不含淀粉酶的洗涤剂对测定具有显著干扰。在此类情况下, 可使用其他淀粉酶测定。洗涤剂对于淀粉酶测定的干扰可通过将已知量的淀粉酶以两个水平添加至洗涤剂, 然后测量两个样品的活性来进行测试。如果测量的活性的差异对应于添加的淀粉酶的水平, 该测定可用于确定淀粉酶在储藏之后的剩余活性。

**[0664] PNP-G7测定**

**[0665]**  $\alpha$ -淀粉酶活性可通过采用PNP-G7底物的方法来确定。PNP-G7, 其为4,6-亚乙基 ( $G_7$ )-对-硝基苯基 ( $G_1$ )- $\alpha$ ,D-麦芽庚糖苷的缩写, 是封闭的寡糖, 其可由内切淀粉酶如 $\alpha$ -淀粉酶切割。在切割之后, 包含于试剂盒的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶进一步消化水解的底物以释放游离的

PNP分子,其具有黄色,并因此可通过可见光分光光度法在 $\lambda=405\text{nm}$  (400-420nm.) 测量。含有PNP-G7和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的试剂盒由Roche/Hitachi制造(目录号11876473)。

[0666] 试剂:

[0667] 来自该试剂盒的G7-PNP含有22mM 4,6-亚乙基-G7-PNP和52.4mM HEPES (2-[4-(2-羟乙基)-1-哌嗪基]-乙磺酸), pH 7.0)。

[0668]  $\alpha$ -葡萄糖苷酶试剂含有52.4mM HEPES, 87mM NaCl, 12.6mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.075mM  $\text{CaCl}_2$ , > 4kU/L $\alpha$ -葡萄糖苷酶)。

[0669] 底物工作溶液通过将1mL的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶试剂与0.2mL的G7-PNP底物混合来制备。该底物工作溶液在使用前立即制备。

[0670] 稀释缓冲液: 50mM EPPS, 0.01% (w/v) Triton X100 (聚乙二醇对-(1,1,3,3,四甲基丁基)-苯基醚 ( $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$  ( $n=9-10$ ))), 1mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7.0。

[0671] 步骤:

[0672] 将待分析的淀粉酶样品在稀释缓冲液中稀释以确保稀释样品中的pH为7。进行测定,即将20 $\mu\text{l}$ 稀释的酶样品转移至96孔微滴定板并添加80 $\mu\text{l}$ 底物工作溶液。将溶液混合并在室温预温育1分钟,然后在5分钟内在OD 405nm每20秒测量吸光度。

[0673] 时间依存性吸光度曲线的斜率(吸光度每分钟)在给定组的条件下与所讨论的 $\alpha$ -淀粉酶的比活性(每mg酶的活性)成正比。淀粉酶样品应稀释至斜率低于每分钟0.4吸光度单位的水平。

[0674] 百分点(pp)的确定

[0675] 变体相对于亲本的剩余活性(稳定性)的百分点(pp)改善作为变体的剩余活性和亲本的剩余活性的差异,即变体的剩余活性减去亲本的剩余活性来计算。

## 实施例

[0676] 实施例1:变体的制备

[0677] SEQ ID NO:6 (SP722)的淀粉酶变体通过标准方法制备,简言之:将随机和/或定位诱变导入基因,用突变的基因转化枯草芽孢杆菌宿主细胞,发酵转化的宿主细胞(例如如WO 2004/111220的实施例1中所述),并从发酵液纯化淀粉酶。参照淀粉酶(SEQ ID NO:6)以类似方式在枯草芽孢杆菌中重组产生。

[0678] 实施例2:螯合剂的表征

[0679] 实施例2a:

[0680] 游离钙离子的测量

[0681] 螯合剂可根据其在pH 8将游离钙离子( $\text{Ca}^{2+}$ )的浓度从2.0mM减少至0.10mM的能力根据M.K.Nagarajan等,JAOCs, Vol.61, no.9 (September 1984), pp.1475-1478所述的方法开发的方法进行排序。使用在上文“材料和方法”中描述的供测量游离钙离子的测定。相应地,将水硬度从2.0mM减少至0.10mM所需的螯合剂浓度如上所述确定。实验在21 $^{\circ}\text{C}$ 用pH 8缓冲液进行。

[0682] 使用的螯合剂的终浓度和测量的游离 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度示于下表2.1。

[0683] 表2.1:在2.0mM  $\text{Ca}^{2+}$ 和不同量的螯合剂的混合物中在pH 8确定的游离 $\text{Ca}^{2+}$ 的浓度。



[0684]

mL 钙储液	mL 电解质溶液	mL pH 8 缓冲液	mL 螯合剂	mM 螯合剂终浓度
4	1	45.0	0.0	0.00
4	1	44.0	1.0	0.30
4	1	43.0	2.0	0.60
4	1	41.0	4.0	1.20
4	1	39.0	6.0	1.80
4	1	38.5	6.5	1.95
4	1	38.0	7.0	2.10
4	1	37.5	7.5	2.25
4	1	37.0	8.0	2.40
4	1	36.5	8.5	2.55
4	1	36.0	9.0	2.70
4	1	35.5	9.5	2.85
4	1	35.0	10.0	3.00
4	1	32.5	12.5	3.75
4	1	30.0	15.0	4.50
4	1	25.0	20.0	6.00
4	1	20.0	25.0	7.50
4	1	15.0	30.0	9.00
4	1	10.0	35.0	10.50

[0685] 从这些数据,将游离 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度从2.0mM减少至低于0.10mM所需的螯合剂浓度通过内插确定。

[0686] 使用该测定表征多种螯合剂,且在pH 8.0在49mM EPPS缓冲液和80mM氯化钾中将游离钙离子浓度从2.0mM减少至0.10mM所需的螯合剂浓度示于表2.2。

[0687] 表2.2

[0688]

	mM	相对于柠檬酸盐
柠檬酸盐	8.36	1.00
EGTA	2.60	0.33
EDTA	1.90	0.21
HEDP	1.60	0.20

DTPA	1.87	0.24
DTPMP	1.17	0.15
MGDA	2.56	0.33

[0689] 实施例2b:

[0690] log K的确定

[0691] 或者,螯合剂可通过螯合剂和钙离子的结合常数来表征。该常数可如AD Nielsen, CC Fuglsang and P Westh, Analytical Biochemistry Vol.314 (2003) 第227-234页和T Wiseman, S Williston, JF Brandts and L-N Lin, Analytical Biochemistry Vol.179 (1989) 第131-137页所述通过ITC (等温滴定量热法) 确定。用于确定log K的步骤在上文“材料和方法”中详细描述。

[0692] 使用用于确定log K的该方法,在pH 10对于几种螯合剂确定了下述log K值(表2.3)。

[0693] 表2.3

[0694]

	Log K	相对于柠檬酸盐的log K的Log K
柠檬酸盐	3	1.00
EGTA	9	3.0
EDTA	8	2.7
HEDP	6	2.0
DTPA	7	2.7
MGDA	5	1.3

[0695] 实施例3:在用螯合剂温育之后的剩余活性

[0696] EnzChek测定

[0697] 在本发明中淀粉酶活性或剩余淀粉酶活性如上所述通过EnzCheck测定来确定。一般而言,模式洗涤剂B中的剩余淀粉酶活性在31℃温育18小时之后确定,然后将该活性与如上所述在4℃温育18小时的参照的活性相比较。

[0698] 在含有1.5%DTPA作为螯合剂的洗涤剂中对淀粉酶变体的稳定性的测试

[0699] 对于确定洗涤剂中的淀粉酶稳定性,将待测试的酶通过在20mM HEPES, 0.1% (w/V) Triton X100, pH 8.0中稀释而调整至0.6mg/mL酶蛋白的浓度。如果起始淀粉酶浓度太低,其可通过例如使用10kDa的截取值的UF膜的超滤(UF)来浓缩。

[0700] 将25μL的淀粉酶溶液和125μL洗涤剂(模式洗涤剂B)转移至一式四份的96孔微滴定板。将一个小磁棒(5x 2mm)置于每个孔中,并将混合物在磁力搅拌器上在室温混合5分钟。准备了两个完全相同的平板。将一个平板在4℃温育18小时(参照试样),并将另一个平板在31℃温育18小时(31℃样品)。

[0701] 紧接着在温育之后,如用于确定洗涤剂中的剩余淀粉酶活性的EnzCheck测定中所述对平板上的样品分析淀粉酶活性。应注意的是,为了减少来自测定中除了酶之外其他洗涤剂成分的干扰,将参照和31℃样品稀释至相同蛋白质浓度。将参照样品和31℃样品二者的活性在相同的384孔板上确定。确保参照淀粉酶包含于所有测试微滴定板中。剩余活性计算为 $100 \times V_{\max}(31^\circ\text{C样品}) / V_{\max}(\text{参照样品})$ 。

[0702] 结果示于表3.1,使用SP722或SP722+D183\*G184\*作为参照淀粉酶(亲本)。变体相

对于亲本的剩余活性的百分点 (pp) 改善计算为变体和亲本的剩余活性的差异。

[0703] 表3.1

[0704]		剩余活性(%)	相对于亲本剩余活性的 pp 改善	
	酶		SP722	SP722 + D183* G184*

[0705]

SP722 (亲本)	12	0	-
SP722 + D183* G184* (亲本)	65	53	0
SP722 + D183* G184* N195F	88	76	23
SP722 + D183* G184* N195L	79	67	14
SP722 + D183* G184* N197F	95	83	30
SP722 + D183* G184* N197L	81	69	16
SP722 + D183* G184* Y243F	80	68	15
SP722 + D183* G184* A186R, N195F	79	67	14
SP722 + D183* G184* H210Y	74	62	9
SP722 + D183* G184* V206L	91	79	26
SP722 + D183* G184* V213A	87	75	22
SP722 + Q174R D183* G184* E212V	83	71	18
SP722 + D183* G184* V206L E212G G304V A447V	80	68	15
SP722 + N116T G133E K142R D183* G184* Y198N V206L	90	78	25
SP722 + G133E D183* G184* N195Y Y198N Y200F	83	71	18
SP722 + N116T D183* G184* N195Y Y198N	79	67	14
SP722 + K142R P146S G149K D183* G184* N195Y Y198N V206I	80	68	15
SP722 + D134Y D183* G184*	72	60	7
SP722 + T151R D183* G184* H210Y K320N R359I N418D	78	66	13
SP722 + G147E G149R Q169E D183* G184* Y198N Y203F V206L	87	75	22

[0706]

SP722 + G133E G149R D183* G184* N195Y Y198N Y203F V206L	91	79	26
SP722 + G147E Y152H Q169E D183* G184* Y198N V206L	90	78	25
SP722 + D183* G184* N195F V206L	98	86	33
SP722 + D183* G184* N195F Y243F	100	88	35
SP722 + D183* G184* N195F H210Y	93	81	28
SP722 + D183* G184* V206L H210Y	95	83	30
SP722 + D183* G184* V213A	93	81	28
SP722 + D183* G184* S193T	85	73	20
SP722 + D183* G184* A186T N195F	96	84	31
SP722 + D183* G184* N195F V206L Y243F	94	82	29
SP722 + D183* G184* V206L Y243F	98	86	33
SP722 + D183* G184* N195Y	93	81	28
SP722 + G133D G149R D183* G184* Y198N V206L	92	80	27
SP722 + N116T G133E G147E Y152H D183* G184* Y198N Y203F V206L	94	82	29
SP722 + G147E G149R D183* G184* N195F Y198N V206L	96	84	31
SP722 + G133E K142R D183* G184* N195F Y198N	95	83	30

[0707]

SP722 + G133E G149R Y152H D183* G184* N195Y Y198N V206L	97	85	32
SP722 + N116T Q129L K142R D183* G184* N195Y Y198N Y203F V206L	101	89	36
SP722 + G133E G149R Y152H D183* G184* N195Y Y198N Y203F V206L	101	89	36
SP722 + N116T G133E G149R D183* G184* Y198N Y203F V206L	104	92	39
SP722 + D183* G184* N195F V206Y Y243F	109	97	44
SP722 + D183* G184* N195F V206C Y243F	113	101	48
SP722 + D183* G184* N195F V206T Y243F	109	97	44
SP722 + D183* G184* N195F V206N Y243F	99	87	34
SP722 + D183* G184* N195F V206C	101	89	36
SP722 + D183* G184* N195F V206H	105	93	40
SP722 + D183* G184* N195F V206Y	110	98	45
SP722 + D183* G184* N195F V206L	111	99	46
SP722 + D183* G184* N195F V206G Y243F	104	92	39
SP722 + D183* G184* V206F Y243F	104	92	39

[0708]	SP722 + D183* G184* N195F V206I Y243F	105	93	40
	SP722 + D183* G184* N195F V206F Y243F	92	80	27
	SP722 + D183* G184* N195F V206S Y243F	104	92	39
	SP722 + D183* G184* A186T N195F	103	91	38
	SP722 + D183* G184* N195F V206L H210Y	102	90	37
	SP722 + D183* G184* S193T V206L	101	89	36
	SP722 + D183* G184* S193T V213A	108	96	43
	SP722 + D183* G184* S193T Y243F	103	91	38
	SP722 + D183* G184* N195F V206N	107	95	42

[0709] 结果清楚地显示本发明的变体与参照 $\alpha$ -淀粉酶相比对于强螯合剂的存在显著更具抗性。在少数情况下,剩余活性高于100,反映了测定的分析差异。

[0710] 结果显示本发明的变体在pH 8亦与参照 $\alpha$ -淀粉酶相比具有改善的稳定性,所述参照可为SEQ ID NO:6 (SP722) 或SEQ ID NO:6+D183\*G184\*,其为其中氨基酸183和184缺失的SEQ ID NO:6。

[0711] 实施例4:在pH 8和pH 10用螯合剂温育之后的剩余活性

[0712] 在该实施例中,将上述PNP-G7测定用于在螯合剂DTPA的存在下温育之后确定剩余淀粉酶活性,且该原理与上述使用EnzCheck测定确定活性的原理是相同的。一般而言,剩余淀粉酶活性在含有螯合剂的缓冲液中在pH 8和49℃或pH 10和42℃温育1小时之后确定,然后将该活性与如上文在“材料和方法”中所述在4℃温育1小时的参照的活性相比较。

[0713] 在用螯合剂在pH 8和pH 10在缓冲液中温育之后测试淀粉酶变体的稳定性

[0714] 原理:

[0715] 将酶样品在含有1.5%终浓度的DTPA的缓冲液pH 8.0中在49℃温育1h,并将参照样品在4℃温育1h。此外,将酶样品在含有1.5%终浓度的DTPA的缓冲液pH 10.0中在42℃温育1h,并将其参照样品在4℃温育1h。在温育之后,使用PNP-G7淀粉酶活性测定确定剩余活性。

[0716] 试剂:

[0717] 含DTPA的pH 8缓冲液:50mM EPPS,0.01%Triton X100,1.875%DTPA(二亚乙基三

胺五乙酸,目录号67-43-6),pH8.0。

[0718] 含DTPA的pH 10缓冲液:50mM EPPS,0.01%Triton X100,1.875%DTPA(二亚乙基三胺五乙酸,目录号67-43-6),pH 10.0。

[0719] 淀粉酶溶液:5mM EPPS,0.01%Triton X-100,pH 8.0中0.25和0.5mg活性淀粉酶蛋白/mL。

[0720] 步骤:

[0721] 将160 $\mu$ L缓冲液(含有DTPA的pH 8缓冲液或含有DTPA的pH 10缓冲液)和40 $\mu$ L的淀粉酶溶液转移至一式两份96孔PCR微滴定板,并将内含物混合1分钟(PCR:聚合酶链式反应)。DTPA的最终浓度在每个孔中为1.5%。将来自每个孔的20 $\mu$ L转移至新的PCR微滴定板(PCR MTP),将其置于4 $^{\circ}$ C(参照样品)。当缓冲液具有pH 8.0(pH 8,49 $^{\circ}$ C样品)时,将PCR MTP在PCR机器中在49 $^{\circ}$ C温育1h,并当pH具有pH 10.0(pH 10,42 $^{\circ}$ C样品)时,在42 $^{\circ}$ C温育1h。

[0722] 紧接着温育之后,将PCR平板上的样品在稀释缓冲液中稀释十倍,并如PNP-G7测定中所述分析淀粉酶活性。应注意的是,为了减少来自螯合剂的干扰,在此,在分析剩余活性之前,将DTPA,测定中的参照和pH 8,49 $^{\circ}$ C样品/pH 10,42 $^{\circ}$ C样品稀释至相同浓度。参照样品和pH 8,49 $^{\circ}$ C样品或pH 10,42 $^{\circ}$ C样品的活性在相同的96孔板上确定。确保亲本淀粉酶包含于所有测试微滴定板之上。剩余活性作为 $100 \times V_{\max}(\text{pH } 8, 42^{\circ}\text{C 或 pH } 10, 49^{\circ}\text{C 样品}) / V_{\max}(\text{参照样品})$ 来计算,且结果示于表4.1。百分点(pp)改善作为变体的剩余活性减去亲本的剩余活性来计算。

[0723] 表4.1



[0724]

	pH 8, 49℃			pH 10, 42℃		
	剩余活性 (%)	变体相对于亲本的 pp 点改善		剩余活性 (%)	变体相对于亲本的 pp 改善	
酶		SP722	SP722 + D183* 184*		SP722	SP722 + D183* 184*
SP722 (亲本)	1	0		8	0	
SP722 + D183* G184* (亲本)	20	-	0	20	-	0
SP722 + D183* G184* N195F V206L Y243F	97	96	77	93	85	73
SP722 + D183* G184* N195F V206Y Y243F	97	96	77	100	92	80
SP722 + D183* G184* N195F V206N Y243F	96	95	75	92	84	64
SP722 + D183* G184* N195F V206F Y243F	101	100	80	97	89	69
SP722 + D183* G184*	92	92	72	88	80	60

[0725]	N195F V206H					
	SP722 + D183* G184* N195F V206Y	95	94	74	96	88 68
	SP722 + D183* G184* V206F Y243F	87	86	66	89	81 61
	SP722 + D183* G184* N195F V206L H210Y	98	97	77	96	88 68
	SP722 + D183* G184* S193T V206L	79	78	58	73	65 45
	SP722 + D183* G184* G133E G149R N195Y Y203F V206L	90	89	69	83	75 55

[0726] 结果清楚地显示本发明的变体在pH 8,49℃和pH 10,42℃温育1小时之后,当将变体的剩余活性与亲本的相比较时,以及当观察变体的百分点改善时,是高度稳定并具有高剩余活性。与之相比,SP722+D183\*G184\*淀粉酶具有20%剩余活性,而SP722甚至具有更少的剩余活性。

[0727] 实施例5:在pH 8和pH 10在含1.5% (w/v) DTPA的缓冲液中温育之后的剩余活性

[0728] 在该实施例中,使用上述的PNP-G7测定以在螯合剂DTPA的存在下温育之后确定SP722变体的剩余淀粉酶活性。一般而言,剩余淀粉酶活性在含有螯合剂的缓冲液中在pH 8或pH 10在所示的温度和温育时间进行温育之后确定,然后将该活性与如上文“材料和方法”中所述在4℃温育的参照的活性相比较。

[0729] 在与螯合剂在pH 8和pH 10在缓冲液中温育之后对淀粉酶变体的稳定性的测试

[0730] 原理:

[0731] 将酶样品在含有1.5% (w/v) 终浓度的DTPA的缓冲液pH 8.0中在所示温度和温育时间进行温育,并将参照样品在4℃以相同温育时间进行温育。此外,将酶样品在含有1.5% (w/v) 终浓度的DTPA的缓冲液pH 10.0中在所示温度和温育时间进行温育,并将其参照样品在4℃以相同温育时间进行温育。在温育之后,使用PNP-G7淀粉酶活性测定确定剩余活性。

[0732] 试剂:

[0733] 含DTPA的pH 8缓冲液:50mM EPPS,0.01% (w/v) Triton X100,1.875% (w/v) DTPA (二亚乙基三胺五乙酸,目录号67-43-6),pH8.0。

[0734] 含DTPA的pH 10缓冲液:50mM甘氨酸,0.01%Triton X100,1.875%DTPA(二亚乙基三胺五乙酸,目录号67-43-6),pH 10.0。

[0735] 淀粉酶溶液:5mM EPPS,0.01%Triton X-100,pH 8.0中0.25和0.5mg活性淀粉酶蛋白/mL。

[0736] 步骤:

[0737] 将160 $\mu$ L缓冲液(含有DTPA的pH 8缓冲液或含有DTPA的pH 10缓冲液)和40 $\mu$ L的淀粉酶溶液转移至一式两份96孔PCR微滴定板,并将内含物混合1分钟(PCR:聚合酶链式反应)。DTPA的最终浓度在每个孔中为1.5% (w/v)。将来自每个孔的20 $\mu$ L转移至微滴定板(MTP),将其置于4 $^{\circ}$ C(参照样品)。将PCR MTP(应激样品)在PCR机器中如下表所示进行温育。

[0738] 紧接着温育之后,将PCR平板上的样品在稀释缓冲液中稀释十倍,并如PNP-G7测定中所述分析淀粉酶活性。应注意的是,为了减少来自螯合剂的干扰,在此,在分析剩余活性之前,将DTPA,测定中的参照和应激样品稀释至相同浓度。参照样品和应激样品的活性在相同的96孔板上确定。确保亲本淀粉酶包含于所有测试微滴定板之上。剩余活性作为 $100 \times V_{\max}(\text{应激}) / V_{\max}(\text{参照})$ 来计算。变体相对于亲本的稳定性的百分点(pp)改善作为变体的剩余活性减去亲本的剩余活性来计算。结果示于表5.1。

[0739] 表5.1:含DTPA螯合剂的SP722变体

酶	pH8, 49 $^{\circ}$ C, 10 分钟, 1.5% DTPA		pH10, 42 $^{\circ}$ C, 20 分钟, 1.5% DTPA	
	剩余活性 (%)	相对于亲本 剩余活性的 pp 改善	剩余活性(%)	相对于亲本 剩余活性的 pp 改善
[0740] SP722 (亲本)	29	0	25	0
SP722 + N195F	51	22	42	17
SP722 + V206L	36	7	32	7
SP722 + V206Y	48	19	41	16
SP722 + Y243F	34	5	35	10
SP722 + N195F V206L	68	39	62	37
SP722 + N195F V206L Y243F	78	49	77	52

[0741] 根据剩余活性,明显可见SP722的变体在DTPA存在下更加稳定,这亦反映在变体相对于亲本的稳定性的百分点改善中。

[0742] 实施例6:在pH 10用HEDP温育之后的剩余活性

[0743] 在该实施例中,将上述PNP-G7测定用于在螯合剂HEDP的存在下温育之后确定剩余淀粉酶活性。一般而言,剩余淀粉酶活性在含有螯合剂的缓冲液中在pH 10在所示的温度和温育时间进行温育之后确定,然后将活性与如上文“材料和方法”中所述在4 $^{\circ}$ C温育的参照

的活性相比较。

[0744] 在与螯合剂在pH 10在缓冲液中温育之后对淀粉酶变体的稳定性的测试

[0745] 原理:

[0746] 将酶样品在含有1.5% (w/v) 终浓度的HEDP的缓冲液pH 10.0中在所示温度和温育时间进行温育,并将参照样品在4℃以相同温育时间进行温育。在温育之后,使用PNP-G7淀粉酶活性测定确定剩余活性。

[0747] 试剂:

[0748] 含HEDP的pH 10缓冲液:50mM甘氨酸,0.01% Triton X100,1.875% (w/v) HEDP (1-羟基亚乙基二膦酸,目录号2809-21-4),pH 10.0。

[0749] 淀粉酶溶液:5mM EPPS,0.01% (w/v) Triton X-100,pH 8.0中0.25和0.5mg活性淀粉酶蛋白/mL。

[0750] 步骤:

[0751] 将160μL缓冲液(含有HEDP的pH 10缓冲液)和40μL的淀粉酶溶液转移至一式两份96孔PCR微滴定板,并将内含物混合1分钟(PCR:聚合酶链式反应)。HEDP的最终浓度在每个孔中为1.5% (w/v)。将来自每个孔的20μL转移至微滴定板(MTP),将其置于4℃(参照样品)。将PCR MTP(应激样品)如下表6.1所示在PCR机器中进行温育。剩余活性作为 $100 \times V_{\max}$  (应激样品) /  $V_{\max}$  (参照样品) 来计算。变体相对于亲本的稳定性的百分点(pp)改善作为变体的剩余活性减去亲本的剩余活性来计算。

[0752] 表6.1:SP722及其变体用HEDP处理

酶	pH 10, 42℃, 20 分钟, 1.5% HEDP	
	剩余活性(%)	相对于亲本的 pp 改善
SP722 (亲本)	44	0
SP722 + N195F V206L Y243F	76	32

[0754] 结果明显地显示当在HEDP的存在下温育时,变体相对于亲本更加稳定。

[0755] 实施例7:SP722+D183\*G184\*及其变体用1.5% (w/v) HEDP处理的稳定性

[0756] 在该实施例中,将上述PNP-G7测定用于在螯合剂HEDP的存在下温育之后确定剩余淀粉酶活性。一般而言,剩余淀粉酶活性在含有螯合剂的缓冲液中在pH 8或pH 10在所示的温度和温育时间进行温育之后确定,然后将活性与如上文“材料和方法”中所述在4℃温育的参照的活性相比较。

[0757] 在与螯合剂在pH 8和pH 10在缓冲液中温育之后对淀粉酶变体的稳定性的测试

[0758] 原理:

[0759] 将酶样品在含有1.5% (w/v) 终浓度的HEDP的缓冲液pH 8.0中在所示温度和温育时间进行温育,并将参照样品在4℃在相同温育时间进行温育。此外,将酶样品在含有1.5% (w/v) 终浓度的HEDP的缓冲液pH 10.0中在所示温度和温育时间进行温育,并将其参照样品在4℃以相同温育时间进行温育。在温育之后,使用PNP-G7淀粉酶活性测定确定剩余活性。

[0760] 试剂:

[0761] 含HEDP的pH 8缓冲液:50mM EPPS,0.01% Triton X100,1.875% (w/v) HEDP (1-羟基亚乙基二膦酸,目录号2809-21-4),pH 8.0。

[0762] 含HEDP的pH 10缓冲液:50mM甘氨酸,0.01%Triton X100,1.875% (w/v) HEDP (1-羟基亚乙基二膦酸,目录号2809-21-4),pH 10.0。

[0763] 淀粉酶溶液:5mM EPPS,0.01% (w/v) Triton X-100,pH 8.0中0.25和0.5mg活性淀粉酶蛋白/mL。

[0764] 步骤:

[0765] 将160μL缓冲液(含有HEDP的pH 8缓冲液或含有HEDP的pH 10缓冲液)和40μL的淀粉酶溶液转移至一式两份96孔PCR微滴定板,并将内含物混合1分钟(PCR:聚合酶链式反应)。HEDP的最终浓度在每个孔中为1.5% (w/v)。将来自每个孔的20μl转移至微滴定板(MTP),将其置于4℃(参照样品)。将PCR MTP(应激样品)如下表7.1所示在PCR机器中进行温育。剩余活性作为 $100 \times V_{\max}(\text{应激样品}) / V_{\max}(\text{参照样品})$ 来计算。变体相对于亲本的稳定性的百分点(pp)改善作为变体的剩余活性减去亲本的剩余活性来计算。

[0766] 表7-1:SP722+D183\*G184\*变体用HEDP处理

[0767]	酶	pH 8, 50℃, 210 分钟, 1.5% HEDP		pH10, 42℃, 60 分钟, 1.5% HEDP	
		剩余活性 (%)	相对于亲本的 pp 改善	剩余活性 (%)	相对于亲本的 pp 改善
[0768]	SP722 + D183* G184* (亲本)	16	0	16	0
	SP722 + D183* G184* N195F V206Y Y243F	96	80	95	79
	SP722 + D183* G184* S193T V206L	61	45	62	46
	SP722 + D183* G184* G133E G149R N195Y Y203F V206L	82	66	74	58

[0769] 结果明显地显示当在作为螯合剂的HEDP的存在下温育时,SP722+D183\*G184\*的变体更加稳定。

[0770] 实施例8:AA560变体在1.5% (w/v) DTPA或1.5% (w/v) HEDP存在下的稳定性

[0771] 在该实施例中,将上述PNP-G7测定用于在螯合剂DTPA或HEDP的存在下温育之后确定剩余淀粉酶活性。一般而言,剩余淀粉酶活性在含有螯合剂的缓冲液中在pH 8或pH 10在所示的温度和温育时间进行温育之后确定,然后将活性与如上文“材料和方法”中所述在4℃温育的参照的活性相比较。

[0772] 在与螯合剂在pH 8和pH 10在缓冲液中温育之后对淀粉酶变体的稳定性的测试

[0773] 原理:

[0774] 将酶样品在含有1.5% (w/v) 终浓度的DTPA或HEDP的缓冲液pH 8.0中在所示温度和温育时间进行温育,并将参照样品在4℃以相同温育时间进行温育。此外,将酶样品在含有1.5% (w/v) 终浓度的DTPA或HEDP的缓冲液pH 10.0中在所示温度和温育时间进行温育,

并将其参照样品在4℃以相同温育时间进行温育。在温育之后,使用PNP-G7淀粉酶活性测定确定剩余活性。

[0775] 试剂:

[0776] 含DTPA的pH 8缓冲液:50mM EPPS,0.01% (w/v) Triton X100,1.875% (w/v) DTPA (二亚乙基三胺五乙酸,目录号67-43-6),pH 8.0。

[0777] 含DTPA的pH 10缓冲液:50mM甘氨酸,0.01% (w/v) Triton X100,1.875% (w/v) DTPA (二亚乙基三胺五乙酸,目录号67-43-6),pH 10.0。

[0778] 含HEDP的pH 8缓冲液:50mM EPPS,0.01% (w/v) Triton X100,1.875% (w/v) HEDP (1-羟基亚乙基二膦酸,目录号2809-21-4),pH 8.0。

[0779] 含HEDP的pH 10缓冲液:50mM甘氨酸,0.01% (w/v) Triton X100,1.875% (w/v) HEDP (1-羟基亚乙基二膦酸,目录号2809-21-4),pH 10.0。

[0780] 淀粉酶溶液:5mM EPPS,0.01% (w/v) Triton X-100,pH 8.0中0.25和0.5mg活性淀粉酶蛋白质/mL。

[0781] 步骤:

[0782] 将160μL缓冲液(含有DTPA或HEDP的pH 8缓冲液或含有DTPA或HEDP的pH 10缓冲液)和40μL的淀粉酶溶液转移至一式两份96孔PCR微滴定板,并将内含物混合1分钟(PCR:聚合酶链式反应)。DTPA或HEDP的最终浓度在每个孔中为1.5% (w/v)。将来自每个孔的20μL转移至微滴定板(MTP),将其置于4℃(参照样品)。将PCR MTP(应激样品)如下表8.1和8.2所示在PCR机器中进行温育。剩余活性作为 $100 \times V_{\max}(\text{应激样品}) / V_{\max}(\text{参照样品})$ 来计算。变体相对于亲本的稳定性的百分点(pp)改善作为变体的剩余活性减去亲本的剩余活性来计算。

[0783] 表8.1:AA560变体用DTPA处理

酶	pH 8, 49℃, 150 分钟, 1.5% DTPA		pH10, 42℃, 60 分钟, 1.5% DTPA	
	剩余活性(%)	相对于亲本的 pp 改善	剩余活性(%)	相对于亲本的 pp 改善
[0784] AA560 + 118K D183* G184* N195F R320K R458K (亲本)	20	0	21	0
Parent + I206L	49	29	45	24
Parent + I206Y	77	57	78	57
Parent + Y243F	31	11	36	15

[0785] 表8.2:AA560变体用HEDP处理

酶	pH8, 50℃, 210 分钟, 1.5% HEDP		pH10, 42℃, 60 分钟, 1.5% HEDP	
	剩余活性(%)	相对于亲本的 pp 改善	剩余活性(%)	相对于亲本的 pp 改善
[0786] AA560 + 118K D183* G184* N195F R320K R458K (亲本)	60	0	19	0
Parent + I206L	68	8	38	19
Parent + I206Y	85	25	72	53
Parent + Y243F	59	-1	34	15

[0787] 在本文中引用了多种参考文献,其公开以全文提述的方式并入本文。

[0788] 实施例9:在含螯合剂的洗涤剂中温育之后的剩余活性

[0789] 在该实施例中,将PNP-G7测定用于在螯合剂的存在下在洗涤剂中温育之后确定剩余淀粉酶活性,如上文“材料和方法”中所述。

[0790] 一般而言,剩余淀粉酶活性在含有螯合剂DTPMP和HEDP的洗涤剂C(表9.1)中在pH 8.2在30℃温育3周和6周之后确定。然后将淀粉酶的剩余活性与在第零日(温育之前)新鲜制备的洗涤剂中的淀粉酶的活性相比较,如下所述。

[0791] 表9.1:洗涤剂C

洗涤剂 C	用于稳定性测试的洗涤剂的组合物
	组合物(组合物的 wt%)
[0792] C <sub>11-8</sub> 烷基苯磺酸盐/酯	5.89
柠檬酸盐	2.56
C <sub>12-18</sub> 脂肪酸	2.56
C <sub>12-14</sub> 烷基乙氧基-3-硫酸钠	1.96
C <sub>14-15</sub> 烷基-7-乙氧化物	1.94

[0793]	C <sub>12-14</sub> 烷基-7-乙氧化物	2.21
	硼酸	0.5
	具有下述通式的化合物： 二 ((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> )-二 ((C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O)(C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) <sub>n</sub> ), 其中 n = 20 至 30, 且 x = 3 至 8, 或其硫酸化或磺酸化的变体	1.46
	DTPMP (二乙三胺五(亚甲基膦酸))	0.19
	HEDP (羟乙烷二膦酸)	1.6
	乙醇	1.95
	丙二醇	1.5
	单乙醇胺	5.15
	水, 装饰物(染料, 香料), pH 调整剂(氢氧化钠) 和次要成分(酶, 溶剂, 结构剂, 增亮剂)	平衡至 pH 8.2

[0794] 在pH 8.2在含有螯合剂的洗涤剂C中温育之后对淀粉酶变体的稳定性的测试

[0795] 方法:

[0796] 制备洗涤剂C, pH 8.2样品, 每个含有本发明的淀粉酶变体或具有下述两个缺失D183\*+G184\*的SEQ ID NO:6 (SP722) -亦称作SP722+D183\*G184\*。在温育之前, 确定每个洗涤剂样品的起始剩余酶活性(参照样品)。

[0797] 对于每个样品, 剩余酶活性在30℃温育3周和6周之后确定, 并与其参照样品相比较。剩余活性使用PNP-G7淀粉酶活性测定来确定。

[0798] 淀粉酶溶液: 100g洗涤剂C, pH 8.2中13.77mg活性淀粉酶蛋白。

[0799] 方法:

[0800] 将含有淀粉酶的洗涤剂C, 5g pH 8.2一式两份置于具有气密盖的7ml玻璃小瓶中。在温育之前, 对于起始样品一式两份确定剩余酶活性。

[0801] 将样品置入培养箱在30℃进行3周和6周。紧接着温育之后, 如PNP-G7测定中所述分析样品的剩余淀粉酶活性。在该测试中, 100%的剩余活性等于与温育之前的起始剩余酶活性(参照样品)相比淀粉酶活性未丧失。变体相对于亲本的剩余活性(稳定性)的百分点(pp)改善作为变体的剩余活性与亲本的剩余活性的差异来计算。

[0802] 表9.2



	剩余活性 pH 8.2, 30℃		相对于亲本的剩余活性 的 pp 改善	
	3 周	6 周	3 周	6 周
[0803] SP722 + D183* G184* (亲本)	19	3		
SP722 + D183* G184* N195F	67	47	48	44
SP722 + D183* G184* N195F			63	75
H210Y	82	78		
SP722 + D183* G184* N195F			68	80
V206L	87	83		
SP722 + D183* G184* N195F			79	94
V206Y	98	97		
SP722 + D183* G184* N195F	100	97	81	94
V206Y Y243F				

[0804] 结果明显地显示本发明的变体在洗涤剂C中在pH 8.2在30℃温育3周和6周之后是高度稳定并具有高剩余活性。与之相比,SP722+D183\*G184\*淀粉酶在3周之后具有19%剩余活性,而在6周之后具有3%的剩余活性。

[0805] 本文中引用了多种参考文献,其公开以全文提述的方式并入本文。

[0806] 本文中公开的维度和值不应理解为严格限定于记载的准确数值。相反,除非另行指明,每个此种维度旨在意指记载的值和该值周围功能上等同的范围。举例而言,作为“40mm”公开的维度旨在意指“约40mm”。

[0807] 本文中描述和要求保护的发明的范围并不受本文中公开的具体实施方案所限,因为这些实施方案旨在作为本发明几个方面的说明。旨在将任何等同的实施方案包括在本发明的范围内。事实上,根据前述描述,除了本文中显示和描述的之外,多种本发明的修饰对于本领域技术人员会是显而易见的。亦旨在将此类修饰包括在所附权利要求的范围内。在冲突的情况下,以本公开包括定义为准。

[0808] 本发明涉及:

[0809] 12.一种包含亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体的组合物,其中使用根据SEQ ID NO:6的编号,所述变体在一个或多个选自195,193,197,198,200,203,206,210,212,213和243的位置包含取代,并进一步包含至少一种螯合剂,其中当在21℃和pH 8.0测量时所述螯合剂在低于10mM的浓度能够将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM。

[0810] 13.前述任一项的组合物,其中当在21℃和pH 8.0在80mM氯化钾和49mM EPPS中测量时所述螯合剂在低于10mM的浓度能够将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM。

[0811] 14.前述任一项的组合物,其中当在“材料和方法”中描述的测定法中测量时所述螯合剂在低于10mM的浓度能够将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM。

[0812] 15.前述任一项的组合物,其中所述螯合剂能够在低于8mM,优选低于7mM,优选低于6mM,优选低于5mM,优选低于4mM的螯合剂浓度将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至

0.10mM。

[0813] 16. 包含亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体的组合物,其中使用根据SEQ ID NO:6的编号,所述变体在一个或多个选自195,193,197,198,200,203,206,210,212,213和243的位置包含取代,并进一步包含至少一种螯合剂,其中当在21℃和pH 8测量时所述螯合剂能够在低于0.9倍能够将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM的柠檬酸盐浓度的螯合剂浓度将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM。

[0814] 17. 前述任一项的组合物,其中所述螯合剂能够在低于0.7倍,如低于0.5倍,如低于0.3倍能够将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM的柠檬酸盐浓度的螯合剂浓度将游离钙离子浓度从2.0mM减少至0.10mM。

[0815] 18. 前述任一项的组合物,其中所述变体在一个或多个对应于SEQ ID NO:6的成熟多肽的位置195,193,197,198,200,203,206,210,212,213或243的位置包含至少两个取代。

[0816] 19. 前述任一项的组合物,其中所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶序列通过至少一个下述取代修饰:位置193是[G,A,S,T或M];位置195是[F,W,Y,L,I或V];位置197是[F,W,Y,L,I或V];位置198是[Q或N];位置200是[F,W,Y,L,I或V];位置203是[F,W,Y,L,I或V];位置206是[F,W,Y,N,L,I,V,H,Q,D或E];位置210是[F,W,Y,L,I或V];位置212是[F,W,Y,L,I或V];位置213是[G,A,S,T或M]或位置243是[F,W,Y,L,I或V]。

[0817] 20. 前述任一项的组合物,其中所述亲本 $\alpha$ -淀粉酶序列通过至少一个下述取代修饰:位置193是T;位置195是F或Y;位置197是F或L;位置198是N;位置200是F;位置203是F;位置206是Y;位置210是Y;位置212是V,位置213是A或位置243是F。

[0818] 21. 前述任一项的组合物,其中使用SEQ ID NO:6用于编号,所述变体在181,182,183或184的氨基酸区中进一步包含至少一个、至少两个、或至少三个缺失。

[0819] 22. 前述任一项的组合物,其中所述变体在一个或多个对应于SEQ ID NO:6的成熟多肽的位置195,193,197,198,200,203,206,210,212,213或243的位置包含取代并在一个或多个对应于位置116,118,129,133,142,146,147,149,151,152,169,174,186,235,244,303,320,339,359,418,431,434,447或458的位置包含取代。

[0820] 23. 前述任一项的组合物,其中所述变体在螯合剂存在下在pH 8和31℃18小时之后具有至少60%剩余活性,其中所述螯合剂在21℃和pH 8.0在低于10mM的浓度能够将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM。

[0821] 24. 前述任一项的组合物,其中所述变体在螯合剂存在下在pH 8和31℃18小时之后具有至少70%剩余活性,其中所述螯合剂在21℃和pH 8.0在低于10mM的浓度能够将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM,且其中所述剩余活性如“材料和方法”中所述测量。

[0822] 25. 前述任一项的组合物,其中当如“材料和方法”中所述在AMSA中测量时,所述变体相对于亲本 $\alpha$ -淀粉酶具有改善的洗涤性能。

[0823] 26. 项1至14任一项所述的组合物,其中所述螯合剂选自下组:EDTA,MGDA,EGTA,DTPA,DTPMP和HEDP。

[0824] 27. 一种用于制备多肽的方法,包括:

[0825] (a) 提供具有淀粉酶活性的亲本多肽的氨基酸序列;

[0826] (b) 选择占据对应于SEQ ID NO:6的成熟多肽的位置195,197,198,200,203,206,210,212,213或243的一个或多个位置的一个或多个氨基酸,并进一步选择对应于位置116,

118,129,133,142,146,147,149,151,152,169,174,186,235,244,303,320,339,359,418,431,434,447或458的一个或多个位置;

[0827] (c) 通过取代或缺失选定的氨基酸残基或邻接选定的氨基酸残基插入一个或多个氨基酸残基来修饰所述序列;

[0828] (d) 产生具有修饰序列的变体多肽;

[0829] (e) 测试所述变体多肽的淀粉酶活性和稳定性;和

[0830] (f) 选择在螯合剂存在下相对于亲本多肽稳定性增加并具有淀粉酶活性的变体多肽,其中在21℃和pH 8.0,所述螯合剂在低于10mM的浓度能够将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM。

[0831] 28. 一种亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体,所述变体在对应于选自195,197,198,200,203,206,210,212,213,243的位置的一个或多个位置包含改变,并进一步在对应于选自116,118,129,133,142,146,147,149,151,152,169,174,186,235,244,303,320,339,359,418,431,434,447和458的位置的一个或多个位置包含改变,其中

[0832] (a) 所述各改变独立地为

[0833] (i) 紧接着该位置下游并邻接该位置插入氨基酸,

[0834] (ii) 缺失占据该位置的氨基酸,和/或

[0835] (iii) 取代占据该位置的氨基酸,

[0836] (b) 所述变体具有 $\alpha$ -淀粉酶活性;并且

[0837] (c) 每个位置对应于具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的酶的氨基酸序列的位置。

[0838] 29. 一种亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体,所述变体在181,182,183或184的氨基酸区中包含至少一个,至少两个或至少三个缺失,并进一步在选自195,197,198,200,203,206,210,212,213和243的一个或多个位置包含改变,并进一步在选自116,118,129,133,142,146,147,149,151,152,169,174,186,235,244,303,320,339,359,418,431,434,447和458的一个或多个位置包含改变,其中

[0839] (a) 所述各改变独立地

[0840] (i) 紧接着该位置下游并邻接该位置插入氨基酸,

[0841] (ii) 缺失占据该位置的氨基酸,和/或

[0842] (iii) 取代占据该位置的氨基酸,

[0843] (b) 所述变体具有 $\alpha$ -淀粉酶活性;并且

[0844] (c) 每个位置对应于具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的酶的氨基酸序列的位置。

[0845] 30. 项17或18的变体,所述变体在包含螯合剂的组合物中相对于亲本 $\alpha$ -淀粉酶或相对于SEQ ID NO:6具有改善的稳定性,其中所述螯合剂在21℃和pH 8.0在低于10mM的浓度能够将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM。

[0846] 31. 项17至19任一项所述的变体,其中所述变体在螯合剂存在下在pH 8 18小时之后具有至少60%剩余活性,其中所述螯合剂在21℃和pH 8.0在低于10mM的浓度能够将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM,其中所述剩余活性如“材料和方法”中所述测量。

[0847] 32. 项17至20任一项所述的变体,其中当如“材料和方法”中所述在AMSA中测量时,所述变体相对于亲本 $\alpha$ -淀粉酶具有改善的洗涤性能。

[0848] 33. 项17至21任一项所述的变体,其中具有淀粉分解活性的变体具有如下氨基酸

序列,所述氨基酸序列与SEQ ID NO:6,8,10,12,18或20的成熟多肽具有优选至少60%,更优选至少65%,更优选至少70%,更优选至少75%,更优选至少80%,更优选至少85%,甚至更优选至少90%,并且最优选至少95%同一性。

[0849] 34.项17至22任一项所述的变体,其中具有淀粉分解酶活性的亲本多肽由如下多核苷酸编码,所述多核苷酸在优选至少低严格条件下,更优选至少中等严格条件下,甚至更优选至少中-高严格条件下,并且最优选至少高严格条件下与以下杂交:(i) SEQ ID NO:5,7,9或11,17,19的成熟多肽编码序列;(ii) 包含SEQ ID NO:5,7,9,11,17,19的成熟多肽编码序列的基因组DNA序列;或(iii) (i) 或(ii) 的全长互补链。

[0850] 35.一种分离的核苷酸序列,其编码项17至23任一项的变体。

[0851] 36.一种重组宿主细胞,其包含SEQ ID NO:24的核苷酸序列。

[0852] 本发明还提供了

[0853] 1.一种亲本 $\alpha$ -淀粉酶的变体,其中使用SEQ ID NO:6的编号,变体包含对应于206位置的取代,并选择性地进一步包含对应于210或243位置的取代,所述变体具有 $\alpha$ -淀粉酶活性。

[0854] 2.项1的变体,其中位置206的取代为F,W,Y,L,I,V,H或N;位置210的取代为F,W,Y,L,I或V;位置243的取代为F,W,Y,L,I或V。

[0855] 3.项1或2的变体,进一步在对应于选自193,197,198,200,203,212,213,243,116,118,129,133,142,146,147,149,151,152,169,174,186,320,359,418,447和458的位置的一个或多个位置包含氨基酸的取代;

[0856] 其中在位置193的取代为T;位置197的取代为F或L;位置198的取代为N;位置200的取代为F;位置203的取代为F;位置210的取代为Y;位置212的取代为V或G;位置213的取代为A;位置116的取代为T;位置118的取代为K;位置129的取代为L;位置133的取代为E或D;位置142的取代为R;位置146的取代为S;位置147的取代为E;位置149的取代为K或R;位置151的取代为R;位置152的取代为H;位置169的取代为E;位置174的取代为R;位置186的取代为R或T;位置320的取代为N或K;位置359的取代为I;位置418的取代为D;位置447的取代为V;位置458的取代为K。

[0857] 4.前述任一项的变体,其中使用SEQ ID NO:6的编号,所述变体在183或184的氨基酸区中包含至少一个氨基酸的缺失。

[0858] 5.前述任一项的变体,所述变体在包含螯合剂的组合物中相对于亲本 $\alpha$ -淀粉酶或相对于SEQ ID NO:6具有改善的稳定性,其中所述螯合剂在21℃和pH 8.0在低于10mM的浓度能够将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM。

[0859] 6.前述任一项的变体,其中所述变体在螯合剂存在下在pH 8、18小时之后具有至少60%剩余活性,其中所述螯合剂在21℃和pH 8.0在低于10mM的浓度能够将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM,其中所述剩余活性采用PNP-G7底物的方法确定,即采用由Roche/Hitachi制造、目录号为11876473的含有PNP-G7和-葡糖苷酶的试剂盒测定。

[0860] 7.前述任一项的变体,其中当根据自动机械应力分析(AMSA)方法测量时,所述变体相对于亲本 $\alpha$ -淀粉酶具有改善的洗涤性能。

[0861] 8.一种分离的核苷酸序列,其编码项1-7任一项的变体。

[0862] 9.一种重组宿主细胞,其包含项8的核苷酸序列。

[0863] 10. 一种包含项1-7任一项变体的组合物,并进一步包含至少一种螯合剂,其中当在21℃和pH 8.0测量时所述螯合剂在低于10mM的浓度能够将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM。

[0864] 11. 项10的组合物,其中所述变体在螯合剂存在下在pH 8和31℃18小时之后具有至少60%剩余活性,其中所述螯合剂在21℃和pH 8.0在低于10mM的浓度能够将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM。

[0865] 12. 项10或11的组合物,其中所述变体在螯合剂存在下在pH 8和31℃18小时之后具有至少70%剩余活性,其中所述螯合剂在21℃和pH 8.0在低于10mM的浓度能够将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM,其中所述剩余活性采用PNP-G7底物的方法确定,即采用由Roche/Hitachi制造、目录号为11876473的含有PNP-G7和-葡萄糖苷酶的试剂盒测定。

[0866] 13. 项10-12任一项所述的组合物,其中当根据自动机械应力分析 (AMSA) 方法测量时,所述变体相对于亲本 $\alpha$ -淀粉酶具有改善的洗涤性能。

[0867] 14. 一种用于制备多肽的方法,包括:

[0868] (a) 提供具有淀粉酶活性的亲本多肽的氨基酸序列;

[0869] (b) 选择占据对应于SEQ ID NO:6的成熟多肽的位置206,以及选择位置210或243;其中位置206的取代为F,W,Y,L,I,V,H或N;位置210的取代为F,W,Y,L,I或V;位置243的取代为F,W,Y,L,I或V;

[0870] (c) 通过取代选定的氨基酸残基来修饰所述序列;

[0871] (d) 产生具有修饰序列的变体多肽;

[0872] (e) 测试所述变体多肽的淀粉酶活性和稳定性;和

[0873] (f) 选择在螯合剂存在下相对于亲本多肽稳定性增加并具有淀粉酶活性的变体多肽,其中在21℃和pH 8.0,所述螯合剂在低于10mM的浓度能够将游离钙离子的浓度从2.0mM减少至0.10mM。

## 序列表

&lt;110&gt; 诺维信公司

&lt;120&gt; 在螯合剂存在下具有高稳定性的变体和包含变体的组合物

&lt;130&gt; 11605-W0-PCT

&lt;160&gt; 26

&lt;170&gt; PatentIn version 3.4

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1440

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 芽孢杆菌属菌种 (Bacillus sp.)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1) .. (1440)

&lt;400&gt; 1

```

gat gga ttg aac ggt acg atg atg cag tat tat gag tgg cat ttg gaa 48
Asp Gly Leu Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Tyr Glu Trp His Leu Glu
1           5           10           15
aac gac ggg cag cat tgg aat cgg ttg cac gat gat gcc gca gct ttg 96
Asn Asp Gly Gln His Trp Asn Arg Leu His Asp Asp Ala Ala Ala Leu
          20           25           30
agt gat gct ggt att aca gct att tgg att ccg cca gcc tac aaa ggt 144
Ser Asp Ala Gly Ile Thr Ala Ile Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly
        35           40           45
aat agt cag gcg gat gtt ggg tac ggt gca tac gat ctt tat gat tta 192
Asn Ser Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu
       50           55           60
gga gag ttc aat caa aag ggt act gtt cga acg aaa tac gga act aag 240
Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys
      65           70           75           80
gca cag ctt gaa cga gct att ggg tcc ctt aaa tct aat gat atc aat 288
Ala Gln Leu Glu Arg Ala Ile Gly Ser Leu Lys Ser Asn Asp Ile Asn
          85           90           95
gta tac gga gat gtc gtg atg aat cat aaa atg gga gct gat ttt acg 336
Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Met Gly Ala Asp Phe Thr
        100          105          110
gag gca gtg caa gct gtt caa gta aat cca acg aat cgt tgg cag gat 384
Glu Ala Val Gln Ala Val Gln Val Asn Pro Thr Asn Arg Trp Gln Asp
       115          120          125

```

```

att tca ggt gcc tac acg att gat gcg tgg acg ggt ttc gac ttt tca 432
Ile Ser Gly Ala Tyr Thr Ile Asp Ala Trp Thr Gly Phe Asp Phe Ser
130 135 140
ggg cgt aac aac gcc tat tca gat ttt aag tgg aga tgg ttc cat ttt 480
Gly Arg Asn Asn Ala Tyr Ser Asp Phe Lys Trp Arg Trp Phe His Phe
145 150 155 160
aat ggt gtt gac tgg gat cag cgc tat caa gaa aat cat att ttc cgc 528
Asn Gly Val Asp Trp Asp Gln Arg Tyr Gln Glu Asn His Ile Phe Arg
165 170 175
ttt gca aat acg aac tgg aac tgg cga gtg gat gaa gag aac ggt aat 576
Phe Ala Asn Thr Asn Trp Asn Trp Arg Val Asp Glu Glu Asn Gly Asn
180 185 190
tat gat tac ctg tta gga tcg aat atc gac ttt agt cat cca gaa gta 624
Tyr Asp Tyr Leu Leu Gly Ser Asn Ile Asp Phe Ser His Pro Glu Val
195 200 205
caa gat gag ttg aag gat tgg ggt agc tgg ttt acc gat gag tta gat 672
Gln Asp Glu Leu Lys Asp Trp Gly Ser Trp Phe Thr Asp Glu Leu Asp
210 215 220
ttg gat ggt tat cgt tta gat gct att aaa cat att cca ttc tgg tat 720
Leu Asp Gly Tyr Arg Leu Asp Ala Ile Lys His Ile Pro Phe Trp Tyr
225 230 235 240
aca tct gat tgg gtt cgg cat cag cgc aac gaa gca gat caa gat tta 768
Thr Ser Asp Trp Val Arg His Gln Arg Asn Glu Ala Asp Gln Asp Leu
245 250 255
ttt gtc gta ggg gaa tat tgg aag gat gac gta ggt gct ctc gaa ttt 816
Phe Val Val Gly Glu Tyr Trp Lys Asp Asp Val Gly Ala Leu Glu Phe
260 265 270
tat tta gat gaa atg aat tgg gag atg tct cta ttc gat gtt cca ctt 864
Tyr Leu Asp Glu Met Asn Trp Glu Met Ser Leu Phe Asp Val Pro Leu
275 280 285
aat tat aat ttt tac cgg gct tca caa caa ggt gga agc tat gat atg 912
Asn Tyr Asn Phe Tyr Arg Ala Ser Gln Gln Gly Gly Ser Tyr Asp Met
290 295 300
cgt aat att tta cga gga tct tta gta gaa gcg cat ccg atg cat gca 960
Arg Asn Ile Leu Arg Gly Ser Leu Val Glu Ala His Pro Met His Ala
305 310 315 320
gtt acg ttt gtt gat aat cat gat act cag cca ggg gag tca tta gag 1008
Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Glu Ser Leu Glu
325 330 335

```

```

tca tgg gtt gct gat tgg ttt aag cca ctt gct tat gcg aca att ttg 1056
Ser Trp Val Ala Asp Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Thr Ile Leu
          340          345          350
acg cgt gaa ggt ggt tat cca aat gta ttt tac ggt gat tac tat ggg 1104
Thr Arg Glu Gly Gly Tyr Pro Asn Val Phe Tyr Gly Asp Tyr Tyr Gly
          355          360          365
att cct aac gat aac att tca gct aaa aaa gat atg att gat gag ctg 1152
Ile Pro Asn Asp Asn Ile Ser Ala Lys Lys Asp Met Ile Asp Glu Leu
          370          375          380
ctt gat gca cgt caa aat tac gca tat ggc acg cag cat gac tat ttt 1200
Leu Asp Ala Arg Gln Asn Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln His Asp Tyr Phe
385          390          395          400
gat cat tgg gat gtt gta gga tgg act agg gaa gga tct tcc tcc aga 1248
Asp His Trp Asp Val Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Ser Ser Ser Arg
          405          410          415
cct aat tca ggc ctt gcg act att atg tcg aat gga cct ggt ggt tcc 1296
Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asn Gly Pro Gly Gly Ser
          420          425          430
aag tgg atg tat gta gga cgt cag aat gca gga caa aca tgg aca gat 1344
Lys Trp Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Gln Thr Trp Thr Asp
          435          440          445
tta act ggt aat aac gga gcg tcc gtt aca att aat ggc gat gga tgg 1392
Leu Thr Gly Asn Asn Gly Ala Ser Val Thr Ile Asn Gly Asp Gly Trp
          450          455          460
ggc gaa ttc ttt acg aat gga gga tct gta tcc gtg tac gtg aac caa 1440
Gly Glu Phe Phe Thr Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Tyr Val Asn Gln
465          470          475          480
<210> 2
<211> 480
<212> PRT
<213> 芽孢杆菌属菌种 (Bacillus sp.)
<400> 2
Asp Gly Leu Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Tyr Glu Trp His Leu Glu
1          5          10          15
Asn Asp Gly Gln His Trp Asn Arg Leu His Asp Asp Ala Ala Ala Leu
          20          25          30
Ser Asp Ala Gly Ile Thr Ala Ile Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly
          35          40          45
Asn Ser Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu

```



50	55	60
Gly Glu Phe Asn Gln Lys	Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys	
65	70	75
Ala Gln Leu Glu Arg Ala Ile Gly Ser Leu Lys Ser Asn Asp Ile Asn		80
85	90	95
Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Met Gly Ala Asp Phe Thr		
100	105	110
Glu Ala Val Gln Ala Val Gln Val Asn Pro Thr Asn Arg Trp Gln Asp		
115	120	125
Ile Ser Gly Ala Tyr Thr Ile Asp Ala Trp Thr Gly Phe Asp Phe Ser		
130	135	140
Gly Arg Asn Asn Ala Tyr Ser Asp Phe Lys Trp Arg Trp Phe His Phe		
145	150	155
Asn Gly Val Asp Trp Asp Gln Arg Tyr Gln Glu Asn His Ile Phe Arg		
165	170	175
Phe Ala Asn Thr Asn Trp Asn Trp Arg Val Asp Glu Glu Asn Gly Asn		
180	185	190
Tyr Asp Tyr Leu Leu Gly Ser Asn Ile Asp Phe Ser His Pro Glu Val		
195	200	205
Gln Asp Glu Leu Lys Asp Trp Gly Ser Trp Phe Thr Asp Glu Leu Asp		
210	215	220
Leu Asp Gly Tyr Arg Leu Asp Ala Ile Lys His Ile Pro Phe Trp Tyr		
225	230	235
Thr Ser Asp Trp Val Arg His Gln Arg Asn Glu Ala Asp Gln Asp Leu		
245	250	255
Phe Val Val Gly Glu Tyr Trp Lys Asp Asp Val Gly Ala Leu Glu Phe		
260	265	270
Tyr Leu Asp Glu Met Asn Trp Glu Met Ser Leu Phe Asp Val Pro Leu		
275	280	285
Asn Tyr Asn Phe Tyr Arg Ala Ser Gln Gln Gly Gly Ser Tyr Asp Met		
290	295	300
Arg Asn Ile Leu Arg Gly Ser Leu Val Glu Ala His Pro Met His Ala		
305	310	315
Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Glu Ser Leu Glu		
325	330	335
Ser Trp Val Ala Asp Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Thr Ile Leu		
340	345	350
Thr Arg Glu Gly Gly Tyr Pro Asn Val Phe Tyr Gly Asp Tyr Tyr Gly		
355	360	365

Ile Pro Asn Asp Asn Ile Ser Ala Lys Lys Asp Met Ile Asp Glu Leu  
 370 375 380  
 Leu Asp Ala Arg Gln Asn Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln His Asp Tyr Phe  
 385 390 395 400  
 Asp His Trp Asp Val Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Ser Ser Ser Arg  
 405 410 415  
 Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asn Gly Pro Gly Gly Ser  
 420 425 430  
 Lys Trp Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Gln Thr Trp Thr Asp  
 435 440 445  
 Leu Thr Gly Asn Asn Gly Ala Ser Val Thr Ile Asn Gly Asp Gly Trp  
 450 455 460  
 Gly Glu Phe Phe Thr Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Tyr Val Asn Gln  
 465 470 475 480

<210> 3

<211> 1476

<212> DNA

<213> 环状芽孢杆菌 (Bacillus circulans)

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (1476)

<400> 3

aag aga aat cat acc atg atg cag ttt ttt gaa tgg cac ctg gct gca 48  
 Lys Arg Asn His Thr Met Met Gln Phe Phe Glu Trp His Leu Ala Ala  
 1 5 10 15  
 gac gga gat cat tgg aag cga ctg gct gaa atg gcc ccg gaa ttg aaa 96  
 Asp Gly Asp His Trp Lys Arg Leu Ala Glu Met Ala Pro Glu Leu Lys  
 20 25 30  
 gcc aaa ggc att gat acg gta tgg gtg cct cct gtg acc aaa gcc gta 144  
 Ala Lys Gly Ile Asp Thr Val Trp Val Pro Pro Val Thr Lys Ala Val  
 35 40 45  
 tca gct gag gat aca ggt tat ggt gta tat gat ctg tat gat ttg ggt 192  
 Ser Ala Glu Asp Thr Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly  
 50 55 60  
 gaa ttt gac caa aag ggt acc gtg cgt acc aaa tac ggc acc aag cag 240  
 Glu Phe Asp Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys Gln  
 65 70 75 80  
 gaa ctg ata gag gcc att gct gag tgt cag aag aac gga atc gcc gtc 288  
 Glu Leu Ile Glu Ala Ile Ala Glu Cys Gln Lys Asn Gly Ile Ala Val

85	90	95
tat gtg gat ctg gtt atg aat cac aag gcc gga gca gat gag acg gaa 336		
Tyr Val Asp Leu Val Met Asn His Lys Ala Gly Ala Asp Glu Thr Glu		
100	105	110
gtt ttt aaa gtg att gag gtt gat ccc aat gat cga acg aag gaa att 384		
Val Phe Lys Val Ile Glu Val Asp Pro Asn Asp Arg Thr Lys Glu Ile		
115	120	125
tct gag ccg ttc gaa att gag ggc tgg acc aaa ttc aca ttc ccg ggt 432		
Ser Glu Pro Phe Glu Ile Glu Gly Trp Thr Lys Phe Thr Phe Pro Gly		
130	135	140
cgc ggg gat caa tac tcc tct ttt aaa tgg aac tct gaa cac ttc aat 480		
Arg Gly Asp Gln Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Asn Ser Glu His Phe Asn		
145	150	155
ggc acg gac ttt gat gcc agg gaa gaa cga aca ggt gta ttc cgc atc 528		
Gly Thr Asp Phe Asp Ala Arg Glu Glu Arg Thr Gly Val Phe Arg Ile		
165	170	175
gca gga gag aat aaa aaa tgg aat gag aat gtc gat gat gag ttt ggt 576		
Ala Gly Glu Asn Lys Lys Trp Asn Glu Asn Val Asp Asp Glu Phe Gly		
180	185	190
aac tat gac tat ctg atg ttc gcc aat ata gat tat aac cac ccg gat 624		
Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Phe Ala Asn Ile Asp Tyr Asn His Pro Asp		
195	200	205
gtt cgg cgc gag atg atc gat tgg ggg aaa tgg ctg atc gat acc ctt 672		
Val Arg Arg Glu Met Ile Asp Trp Gly Lys Trp Leu Ile Asp Thr Leu		
210	215	220
cag tgc ggt ggg ttc cgg ctg gat gcg att aag cat atc aac cat gaa 720		
Gln Cys Gly Gly Phe Arg Leu Asp Ala Ile Lys His Ile Asn His Glu		
225	230	235
ttc att aag gag ttc gca gca gag atg atc cgc aaa cgc ggt cag gat 768		
Phe Ile Lys Glu Phe Ala Ala Glu Met Ile Arg Lys Arg Gly Gln Asp		
245	250	255
ttc tac atc gta ggc gag ttc tgg aac tcg aac ctg gat gca tgt cgt 816		
Phe Tyr Ile Val Gly Glu Phe Trp Asn Ser Asn Leu Asp Ala Cys Arg		
260	265	270
gaa ttc ctt gat acg gta gac tat cag atc gac ctg ttt gat gtg tct 864		
Glu Phe Leu Asp Thr Val Asp Tyr Gln Ile Asp Leu Phe Asp Val Ser		
275	280	285
ctt cac tac aag ttg cat gag gct tcg ctt aaa ggc aga gac ttt gat 912		
Leu His Tyr Lys Leu His Glu Ala Ser Leu Lys Gly Arg Asp Phe Asp		

290	295	300	
ctc tcc aaa att ttt gat gac acc ttg gtg cag acc cat cct acc cat	960		
Leu Ser Lys Ile Phe Asp Asp Thr Leu Val Gln Thr His Pro Thr His			
305	310	315	320
gcg gta acc ttc gta gat aac cat gac tcc caa cct cat gaa gcg ttg	1008		
Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro His Glu Ala Leu			
325	330	335	
gaa tca tgg att ggt gat tgg ttt aag ccg agc gct tat gcg ttg acg	1056		
Glu Ser Trp Ile Gly Asp Trp Phe Lys Pro Ser Ala Tyr Ala Leu Thr			
340	345	350	
cta tta cgt cgt gat ggc tat ccg gtt gta ttt tac ggc gat tat tat	1104		
Leu Leu Arg Arg Asp Gly Tyr Pro Val Val Phe Tyr Gly Asp Tyr Tyr			
355	360	365	
ggc att ggt ggt cct gaa cct gtg gat ggc aaa aaa gaa att ctg gac	1152		
Gly Ile Gly Gly Pro Glu Pro Val Asp Gly Lys Lys Glu Ile Leu Asp			
370	375	380	
att ctg ctg tct gcc cgt tgc aac aaa gcg tat gga gag cag gaa gat	1200		
Ile Leu Leu Ser Ala Arg Cys Asn Lys Ala Tyr Gly Glu Gln Glu Asp			
385	390	395	400
tac ttc gat cac gcc aat acg att ggc tgg gta cgt cgt ggc gta gag	1248		
Tyr Phe Asp His Ala Asn Thr Ile Gly Trp Val Arg Arg Gly Val Glu			
405	410	415	
gaa atc gaa ggt tcc ggt tgt gca gtg gtc atc tcc aac ggg gat gac	1296		
Glu Ile Glu Gly Ser Gly Cys Ala Val Val Ile Ser Asn Gly Asp Asp			
420	425	430	
ggt gag aag aga atg ttc atc gga gag cat cgt gct ggt gaa gtc tgg	1344		
Gly Glu Lys Arg Met Phe Ile Gly Glu His Arg Ala Gly Glu Val Trp			
435	440	445	
gtg gat ctg acg aag agc tgt gat gat cag att acc att gag gaa gac	1392		
Val Asp Leu Thr Lys Ser Cys Asp Asp Gln Ile Thr Ile Glu Glu Asp			
450	455	460	
ggc tgg gcc acc ttc cat gtg tgc ggt gga ggt gtc tcg gta tgg gct	1440		
Gly Trp Ala Thr Phe His Val Cys Gly Gly Gly Val Ser Val Trp Ala			
465	470	475	480
ctt cct gaa cag aat gag gac tgc gct gac gct gag	1476		
Leu Pro Glu Gln Asn Glu Asp Cys Ala Asp Ala Glu			
485	490		
<210> 4			
<211> 492			

&lt;212&gt; PRT

<213> 环状芽孢杆菌 (*Bacillus circulans*)

&lt;400&gt; 4

```

Lys Arg Asn His Thr Met Met Gln Phe Phe Glu Trp His Leu Ala Ala
1           5           10           15
Asp Gly Asp His Trp Lys Arg Leu Ala Glu Met Ala Pro Glu Leu Lys
           20           25           30
Ala Lys Gly Ile Asp Thr Val Trp Val Pro Pro Val Thr Lys Ala Val
           35           40           45
Ser Ala Glu Asp Thr Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly
           50           55           60
Glu Phe Asp Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys Gln
65           70           75           80
Glu Leu Ile Glu Ala Ile Ala Glu Cys Gln Lys Asn Gly Ile Ala Val
           85           90           95
Tyr Val Asp Leu Val Met Asn His Lys Ala Gly Ala Asp Glu Thr Glu
           100          105          110
Val Phe Lys Val Ile Glu Val Asp Pro Asn Asp Arg Thr Lys Glu Ile
           115          120          125
Ser Glu Pro Phe Glu Ile Glu Gly Trp Thr Lys Phe Thr Phe Pro Gly
           130          135          140
Arg Gly Asp Gln Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Asn Ser Glu His Phe Asn
145          150          155          160
Gly Thr Asp Phe Asp Ala Arg Glu Glu Arg Thr Gly Val Phe Arg Ile
           165          170          175
Ala Gly Glu Asn Lys Lys Trp Asn Glu Asn Val Asp Asp Glu Phe Gly
           180          185          190
Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Phe Ala Asn Ile Asp Tyr Asn His Pro Asp
           195          200          205
Val Arg Arg Glu Met Ile Asp Trp Gly Lys Trp Leu Ile Asp Thr Leu
           210          215          220
Gln Cys Gly Gly Phe Arg Leu Asp Ala Ile Lys His Ile Asn His Glu
225          230          235          240
Phe Ile Lys Glu Phe Ala Ala Glu Met Ile Arg Lys Arg Gly Gln Asp
           245          250          255
Phe Tyr Ile Val Gly Glu Phe Trp Asn Ser Asn Leu Asp Ala Cys Arg
           260          265          270
Glu Phe Leu Asp Thr Val Asp Tyr Gln Ile Asp Leu Phe Asp Val Ser
           275          280          285

```

Leu His Tyr Lys Leu His Glu Ala Ser Leu Lys Gly Arg Asp Phe Asp  
 290 295 300  
 Leu Ser Lys Ile Phe Asp Asp Thr Leu Val Gln Thr His Pro Thr His  
 305 310 315 320  
 Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro His Glu Ala Leu  
 325 330 335  
 Glu Ser Trp Ile Gly Asp Trp Phe Lys Pro Ser Ala Tyr Ala Leu Thr  
 340 345 350  
 Leu Leu Arg Arg Asp Gly Tyr Pro Val Val Phe Tyr Gly Asp Tyr Tyr  
 355 360 365  
 Gly Ile Gly Gly Pro Glu Pro Val Asp Gly Lys Lys Glu Ile Leu Asp  
 370 375 380  
 Ile Leu Leu Ser Ala Arg Cys Asn Lys Ala Tyr Gly Glu Gln Glu Asp  
 385 390 395 400  
 Tyr Phe Asp His Ala Asn Thr Ile Gly Trp Val Arg Arg Gly Val Glu  
 405 410 415  
 Glu Ile Glu Gly Ser Gly Cys Ala Val Val Ile Ser Asn Gly Asp Asp  
 420 425 430  
 Gly Glu Lys Arg Met Phe Ile Gly Glu His Arg Ala Gly Glu Val Trp  
 435 440 445  
 Val Asp Leu Thr Lys Ser Cys Asp Asp Gln Ile Thr Ile Glu Glu Asp  
 450 455 460  
 Gly Trp Ala Thr Phe His Val Cys Gly Gly Gly Val Ser Val Trp Ala  
 465 470 475 480  
 Leu Pro Glu Gln Asn Glu Asp Cys Ala Asp Ala Glu  
 485 490

<210> 5

<211> 1455

<212> DNA

<213> 芽孢杆菌属菌种 (Bacillus sp.)

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (1455)

<400> 5

cat cat aat ggg aca aat ggg acg atg atg caa tac ttt gaa tgg cac 48  
 His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp His  
 1 5 10 15  
 ttg cct aat gat ggg aat cac tgg aat aga tta aga gat gat gct agt 96  
 Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Asp Asp Ala Ser

20	25	30	
aat cta aga aat aga ggt ata acc gct att tgg att ccg cct gcc tgg	144		
Asn Leu Arg Asn Arg Gly Ile Thr Ala Ile Trp Ile Pro Pro Ala Trp			
35	40	45	
aaa ggg act tcg caa aat gat gtg ggg tat gga gcc tat gat ctt tac	192		
Lys Gly Thr Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr			
50	55	60	
gat tta ggg gaa ttt aat caa aag ggg acg gtt cgt act aag tat ggg	240		
Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly			
65	70	75	80
aca cgt agt caa ttg gag tct gcc atc cat gct tta aag aat aat ggc	288		
Thr Arg Ser Gln Leu Glu Ser Ala Ile His Ala Leu Lys Asn Asn Gly			
85	90	95	
gtt caa gtt tat ggg gat gta gtg atg aac cat aaa gga gga gct gat	336		
Val Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp			
100	105	110	
gct aca gaa aac gtt ctt gct gtc gag gtg aat cca aat aac cgg aat	384		
Ala Thr Glu Asn Val Leu Ala Val Glu Val Asn Pro Asn Asn Arg Asn			
115	120	125	
caa gaa ata tct ggg gac tac aca att gag gct tgg act aag ttt gat	432		
Gln Glu Ile Ser Gly Asp Tyr Thr Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp			
130	135	140	
ttt cca ggg agg ggt aat aca tac tca gac ttt aaa tgg cgt tgg tat	480		
Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp Arg Trp Tyr			
145	150	155	160
cat ttc gat ggt gta gat tgg gat caa tca cga caa ttc caa aat cgt	528		
His Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Gln Ser Arg Gln Phe Gln Asn Arg			
165	170	175	
atc tac aaa ttc cga ggt gat ggc aaa gct tgg gat tgg gaa gta gat	576		
Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Asp Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp			
180	185	190	
tcg gaa aat gga aat tat gat tat tta atg tat gca gat gta gat atg	624		
Ser Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Val Asp Met			
195	200	205	
gat cat ccg gag gta gta aat gag ctt aga aga tgg gga gaa tgg tat	672		
Asp His Pro Glu Val Val Asn Glu Leu Arg Arg Trp Gly Glu Trp Tyr			
210	215	220	
aca aat aca tta aat ctt gat gga ttt agg atc gat gcg gtg aag cat	720		
Thr Asn Thr Leu Asn Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His			

225	230	235	240
att aaa tat agc ttt aca cgt gat tgg ttg acc cat gta aga aac gca 768			
Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Leu Thr His Val Arg Asn Ala			
	245	250	255
acg gga aaa gaa atg ttt gct gtt gct gaa ttt tgg aaa aat gat tta 816			
Thr Gly Lys Glu Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu			
	260	265	270
ggt gcc ttg gag aac tat tta aat aaa aca aac tgg aat cat tct gtc 864			
Gly Ala Leu Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Trp Asn His Ser Val			
	275	280	285
ttt gat gtc ccc ctt cat tat aat ctt tat aac gcg tca aat agt gga 912			
Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Asn Ser Gly			
	290	295	300
ggc aac tat gac atg gca aaa ctt ctt aat gga acg gtt gtt caa aag 960			
Gly Asn Tyr Asp Met Ala Lys Leu Leu Asn Gly Thr Val Val Gln Lys			
305	310	315	320
cat cca atg cat gcc gta act ttt gtg gat aat cac gat tct caa cct 1008			
His Pro Met His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro			
	325	330	335
ggg gaa tca tta gaa tca ttt gta caa gaa tgg ttt aag cca ctt gct 1056			
Gly Glu Ser Leu Glu Ser Phe Val Gln Glu Trp Phe Lys Pro Leu Ala			
	340	345	350
tat gcg ctt att tta aca aga gaa caa ggc tat ccc tct gtc ttc tat 1104			
Tyr Ala Leu Ile Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr			
	355	360	365
ggt gac tac tat gga att cca aca cat agt gtc cca gca atg aaa gcc 1152			
Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Ser Val Pro Ala Met Lys Ala			
	370	375	380
aag att gat cca atc tta gag gcg cgt caa aat ttt gca tat gga aca 1200			
Lys Ile Asp Pro Ile Leu Glu Ala Arg Gln Asn Phe Ala Tyr Gly Thr			
385	390	395	400
caa cat gat tat ttt gac cat cat aat ata atc gga tgg aca cgt gaa 1248			
Gln His Asp Tyr Phe Asp His His Asn Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu			
	405	410	415
gga aat acc acg cat ccc aat tca gga ctt gcg act atc atg tcg gat 1296			
Gly Asn Thr Thr His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp			
	420	425	430
ggg cca ggg gga gag aaa tgg atg tac gta ggg caa aat aaa gca ggt 1344			
Gly Pro Gly Gly Glu Lys Trp Met Tyr Val Gly Gln Asn Lys Ala Gly			



435	440	445	
caa gtt tgg cat gac ata act gga aat aaa cca gga aca gtt acg atc	1392		
Gln Val Trp His Asp Ile Thr Gly Asn Lys Pro Gly Thr Val Thr Ile			
450	455	460	
aat gca gat gga tgg gct aat ttt tca gta aat gga gga tct gtt tcc	1440		
Asn Ala Asp Gly Trp Ala Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser			
465	470	475	480
att tgg gtg aaa cga	1455		
Ile Trp Val Lys Arg			
485			
<210> 6			
<211> 485			
<212> PRT			
<213> 芽孢杆菌属菌种 (Bacillus sp.)			
<400> 6			
His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp His			
1 5 10 15			
Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Asp Asp Ala Ser			
20 25 30			
Asn Leu Arg Asn Arg Gly Ile Thr Ala Ile Trp Ile Pro Pro Ala Trp			
35 40 45			
Lys Gly Thr Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr			
50 55 60			
Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly			
65 70 75 80			
Thr Arg Ser Gln Leu Glu Ser Ala Ile His Ala Leu Lys Asn Asn Gly			
85 90 95			
Val Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp			
100 105 110			
Ala Thr Glu Asn Val Leu Ala Val Glu Val Asn Pro Asn Asn Arg Asn			
115 120 125			
Gln Glu Ile Ser Gly Asp Tyr Thr Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp			
130 135 140			
Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp Arg Trp Tyr			
145 150 155 160			
His Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Gln Ser Arg Gln Phe Gln Asn Arg			
165 170 175			
Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Asp Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp			
180 185 190			

Ser Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Val Asp Met		
195	200	205
Asp His Pro Glu Val Val Asn Glu Leu Arg Arg Trp Gly Glu Trp Tyr		
210	215	220
Thr Asn Thr Leu Asn Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His		
225	230	235
Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Leu Thr His Val Arg Asn Ala		
	245	250
		255
Thr Gly Lys Glu Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu		
	260	265
		270
Gly Ala Leu Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Trp Asn His Ser Val		
	275	280
		285
Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Asn Ser Gly		
290	295	300
Gly Asn Tyr Asp Met Ala Lys Leu Leu Asn Gly Thr Val Val Gln Lys		
305	310	315
		320
His Pro Met His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro		
	325	330
		335
Gly Glu Ser Leu Glu Ser Phe Val Gln Glu Trp Phe Lys Pro Leu Ala		
	340	345
		350
Tyr Ala Leu Ile Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr		
	355	360
		365
Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Ser Val Pro Ala Met Lys Ala		
370	375	380
Lys Ile Asp Pro Ile Leu Glu Ala Arg Gln Asn Phe Ala Tyr Gly Thr		
385	390	395
		400
Gln His Asp Tyr Phe Asp His His Asn Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu		
	405	410
		415
Gly Asn Thr Thr His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp		
	420	425
		430
Gly Pro Gly Gly Glu Lys Trp Met Tyr Val Gly Gln Asn Lys Ala Gly		
	435	440
		445
Gln Val Trp His Asp Ile Thr Gly Asn Lys Pro Gly Thr Val Thr Ile		
	450	455
		460
Asn Ala Asp Gly Trp Ala Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser		
465	470	475
		480
Ile Trp Val Lys Arg		
	485	

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 1455

&lt;212&gt; DNA

<213> 芽孢杆菌属菌种 (*Bacillus* sp.)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1) .. (1455)

&lt;400&gt; 7

```

cat cat aac ggt acg aac ggg aca atg atg caa tac ttt gaa tgg tat 48
His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr
1           5           10           15
cta cct aat gac gga aat cat tgg aat cga tta aac tct gat gcg agt 96
Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Asn Ser Asp Ala Ser
          20          25          30
aac ctt aaa agc aaa ggg att aca gcg gtg tgg att cct cca gca tgg 144
Asn Leu Lys Ser Lys Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Trp
          35          40          45
aag ggc gct tct caa aat gac gta gga tac gga gcc tat gac ctg tat 192
Lys Gly Ala Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr
          50          55          60
gat ctg gga gaa ttt aat caa aaa ggt acc gtc cgt aca aaa tat gga 240
Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly
65           70           75           80
aca cgt agt cag tta caa gct gcg gta acc tcc tta aaa aat aat gga 288
Thr Arg Ser Gln Leu Gln Ala Ala Val Thr Ser Leu Lys Asn Asn Gly
          85          90          95
att caa gta tat ggt gac gtt gtt atg aat cac aaa ggt ggc gca gac 336
Ile Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp
          100          105          110
gct act gaa atg gta agg gcc gtt gaa gtg aat ccc aat aac cgt aac 384
Ala Thr Glu Met Val Arg Ala Val Glu Val Asn Pro Asn Asn Arg Asn
          115          120          125
caa gaa gtg act ggt gaa tat acc att gaa gct tgg act aga ttt gat 432
Gln Glu Val Thr Gly Glu Tyr Thr Ile Glu Ala Trp Thr Arg Phe Asp
          130          135          140
ttt cca ggg cga gga aat act cat tct agc ttt aaa tgg aga tgg tat 480
Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr His Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr
145           150           155           160
cat ttt gat ggt gtg gat tgg gat cag tca cgt aga ctg aac aat cgc 528
His Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Gln Ser Arg Arg Leu Asn Asn Arg

```

165	170	175	
atc tat aaa ttt aga ggt cat ggc aaa gct tgg gat tgg gaa gtt gat	576		
Ile Tyr Lys Phe Arg Gly His Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp			
180	185	190	
acg gaa aat ggt aat tat gat tat tta atg tac gct gat att gat atg	624		
Thr Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Met			
195	200	205	
gat cac cca gaa gta gta aat gaa tta aga aat tgg ggt gtt tgg tac	672		
Asp His Pro Glu Val Val Asn Glu Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp Tyr			
210	215	220	
aca aac aca tta gga ctc gat gga ttt aga ata gat gcg gtt aaa cat	720		
Thr Asn Thr Leu Gly Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His			
225	230	235	240
ata aag tat agc ttt acg cgc gat tgg att aat cac gtt aga agt gca	768		
Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Ile Asn His Val Arg Ser Ala			
245	250	255	
aca ggt aaa aat atg ttt gcg gtt gct gag ttt tgg aag aat gat tta	816		
Thr Gly Lys Asn Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu			
260	265	270	
ggt gca att gaa aac tat ctg cag aaa aca aac tgg aac cat tca gtc	864		
Gly Ala Ile Glu Asn Tyr Leu Gln Lys Thr Asn Trp Asn His Ser Val			
275	280	285	
ttt gat gtg ccg tta cat tat aat ctt tat aat gca tca aaa agc gga	912		
Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Lys Ser Gly			
290	295	300	
ggg aac tat gat atg cga aac ata ttt aat gga acg gtt gtt caa cga	960		
Gly Asn Tyr Asp Met Arg Asn Ile Phe Asn Gly Thr Val Val Gln Arg			
305	310	315	320
cat cca agt cat gct gta aca ttt gtt gat aat cat gat tcg cag cct	1008		
His Pro Ser His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro			
325	330	335	
gaa gaa gca tta gaa tct ttt gtt gaa gaa tgg ttt aaa cca tta gcg	1056		
Glu Glu Ala Leu Glu Ser Phe Val Glu Glu Trp Phe Lys Pro Leu Ala			
340	345	350	
tat gcg ctt aca tta acg cgt gaa caa gga tac cct tct gta ttt tac	1104		
Tyr Ala Leu Thr Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr			
355	360	365	
gga gat tat tat ggg att cca aca cat gga gtg cca gca atg aga tca	1152		
Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Gly Val Pro Ala Met Arg Ser			

370	375	380
aaa atc gat ccg att tta gaa gca cgt caa aag tat gca tac gga aaa 1200		
Lys Ile Asp Pro Ile Leu Glu Ala Arg Gln Lys Tyr Ala Tyr Gly Lys		
385	390	395
caa aat gat tac tta gac cat cat aat atc att ggt tgg acg cgt gaa 1248		
Gln Asn Asp Tyr Leu Asp His His Asn Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu		
405	410	415
ggg aat aca gca cac ccc aat tca ggt cta gct acc atc atg tct gat 1296		
Gly Asn Thr Ala His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp		
420	425	430
gga gcg ggt gga agt aag tgg atg ttt gtt ggg cgt aat aag gct ggt 1344		
Gly Ala Gly Gly Ser Lys Trp Met Phe Val Gly Arg Asn Lys Ala Gly		
435	440	445
caa gta tgg agt gat att aca gga aac cgt aca ggt acg gtt aca atc 1392		
Gln Val Trp Ser Asp Ile Thr Gly Asn Arg Thr Gly Thr Val Thr Ile		
450	455	460
aat gca gac ggt tgg ggc aat ttc tct gtg aat gga ggg tca gtt tct 1440		
Asn Ala Asp Gly Trp Gly Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser		
465	470	475
att tgg gtc aac aaa 1455		
Ile Trp Val Asn Lys		
485		
<210> 8		
<211> 485		
<212> PRT		
<213> 芽孢杆菌属菌种 (Bacillus sp.)		
<400> 8		
His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr		
1	5	10
Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Asn Ser Asp Ala Ser		
20	25	30
Asn Leu Lys Ser Lys Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Trp		
35	40	45
Lys Gly Ala Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr		
50	55	60
Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly		
65	70	75
Thr Arg Ser Gln Leu Gln Ala Ala Val Thr Ser Leu Lys Asn Asn Gly		
85	90	95

Ile	Gln	Val	Tyr	Gly	Asp	Val	Val	Met	Asn	His	Lys	Gly	Gly	Ala	Asp	
				100					105					110		
Ala	Thr	Glu	Met	Val	Arg	Ala	Val	Glu	Val	Asn	Pro	Asn	Asn	Arg	Asn	
				115					120					125		
Gln	Glu	Val	Thr	Gly	Glu	Tyr	Thr	Ile	Glu	Ala	Trp	Thr	Arg	Phe	Asp	
				130					135					140		
Phe	Pro	Gly	Arg	Gly	Asn	Thr	His	Ser	Ser	Phe	Lys	Trp	Arg	Trp	Tyr	
				145					150					155		
His	Phe	Asp	Gly	Val	Asp	Trp	Asp	Gln	Ser	Arg	Arg	Leu	Asn	Asn	Arg	
				165					170					175		
Ile	Tyr	Lys	Phe	Arg	Gly	His	Gly	Lys	Ala	Trp	Asp	Trp	Glu	Val	Asp	
				180					185					190		
Thr	Glu	Asn	Gly	Asn	Tyr	Asp	Tyr	Leu	Met	Tyr	Ala	Asp	Ile	Asp	Met	
				195					200					205		
Asp	His	Pro	Glu	Val	Val	Asn	Glu	Leu	Arg	Asn	Trp	Gly	Val	Trp	Tyr	
				210					215					220		
Thr	Asn	Thr	Leu	Gly	Leu	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Ala	Val	Lys	His	
				225					230					235		
Ile	Lys	Tyr	Ser	Phe	Thr	Arg	Asp	Trp	Ile	Asn	His	Val	Arg	Ser	Ala	
				245					250					255		
Thr	Gly	Lys	Asn	Met	Phe	Ala	Val	Ala	Glu	Phe	Trp	Lys	Asn	Asp	Leu	
				260					265					270		
Gly	Ala	Ile	Glu	Asn	Tyr	Leu	Gln	Lys	Thr	Asn	Trp	Asn	His	Ser	Val	
				275					280					285		
Phe	Asp	Val	Pro	Leu	His	Tyr	Asn	Leu	Tyr	Asn	Ala	Ser	Lys	Ser	Gly	
				290					295					300		
Gly	Asn	Tyr	Asp	Met	Arg	Asn	Ile	Phe	Asn	Gly	Thr	Val	Val	Gln	Arg	
				305					310					315		
His	Pro	Ser	His	Ala	Val	Thr	Phe	Val	Asp	Asn	His	Asp	Ser	Gln	Pro	
				325					330					335		
Glu	Glu	Ala	Leu	Glu	Ser	Phe	Val	Glu	Glu	Trp	Phe	Lys	Pro	Leu	Ala	
				340					345					350		
Tyr	Ala	Leu	Thr	Leu	Thr	Arg	Glu	Gln	Gly	Tyr	Pro	Ser	Val	Phe	Tyr	
				355					360					365		
Gly	Asp	Tyr	Tyr	Gly	Ile	Pro	Thr	His	Gly	Val	Pro	Ala	Met	Arg	Ser	
				370					375					380		
Lys	Ile	Asp	Pro	Ile	Leu	Glu	Ala	Arg	Gln	Lys	Tyr	Ala	Tyr	Gly	Lys	
				385					390					395		
Gln	Asn	Asp	Tyr	Leu	Asp	His	His	Asn	Ile	Ile	Gly	Trp	Thr	Arg	Glu	

	405		410		415
Gly Asn Thr Ala His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp					
	420		425		430
Gly Ala Gly Gly Ser Lys Trp Met Phe Val Gly Arg Asn Lys Ala Gly					
	435		440		445
Gln Val Trp Ser Asp Ile Thr Gly Asn Arg Thr Gly Thr Val Thr Ile					
	450		455		460
Asn Ala Asp Gly Trp Gly Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser					
465		470		475	480
Ile Trp Val Asn Lys					
	485				

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 1458

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 芽孢杆菌属菌种 (Bacillus sp.)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1) .. (1458)

&lt;400&gt; 9

```

cac cat aat ggt acg aac ggc aca atg atg cag tac ttt gaa tgg tat 48
His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr
1           5           10           15
cta cca aat gac gga aac cat tgg aat aga tta agg tct gat gca agt 96
Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Ser Asp Ala Ser
           20           25           30
aac cta aaa gat aaa ggg atc tca gcg gtt tgg att cct cct gca tgg 144
Asn Leu Lys Asp Lys Gly Ile Ser Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Trp
           35           40           45
aag ggt gcc tct caa aat gat gtg ggg tat ggt gct tat gat ctg tat 192
Lys Gly Ala Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr
           50           55           60
gat tta gga gaa ttc aat caa aaa gga acc att cgt aca aaa tat gga 240
Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Ile Arg Thr Lys Tyr Gly
65           70           75           80
acg cgc aat cag tta caa gct gca gtt aac gcc ttg aaa agt aat gga 288
Thr Arg Asn Gln Leu Gln Ala Ala Val Asn Ala Leu Lys Ser Asn Gly
           85           90           95
att caa gtg tat ggc gat gtt gta atg aat cat aaa ggg gga gca gac 336
Ile Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp

```

100	105	110
gct acc gaa atg gtt agg gcg gtt gaa gta aac ccg aat aat aga aat 384		
Ala Thr Glu Met Val Arg Ala Val Glu Val Asn Pro Asn Asn Arg Asn		
115	120	125
caa gaa gtg tcc ggt gaa tat aca att gag gct tgg aca aag ttt gac 432		
Gln Glu Val Ser Gly Glu Tyr Thr Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp		
130	135	140
ttt cct gga cga ggt aat acc cat tca aac ttc aaa tgg aga tgg tat 480		
Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr His Ser Asn Phe Lys Trp Arg Trp Tyr		
145	150	155
cac ttt gat gga gta gat tgg gat cag tca cgt aag ctg aac aat cga 528		
His Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Gln Ser Arg Lys Leu Asn Asn Arg		
165	170	175
att tat aaa ttt aga ggt gat gga aaa ggg tgg gat tgg gaa gtc gat 576		
Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Asp Gly Lys Gly Trp Asp Trp Glu Val Asp		
180	185	190
aca gaa aac ggt aac tat gat tac cta atg tat gca gat att gac atg 624		
Thr Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Met		
195	200	205
gat cac cca gag gta gtg aat gag cta aga aat tgg ggt gtt tgg tat 672		
Asp His Pro Glu Val Val Asn Glu Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp Tyr		
210	215	220
acg aat aca tta ggc ctt gat ggt ttt aga ata gat gca gta aaa cat 720		
Thr Asn Thr Leu Gly Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His		
225	230	235
ata aaa tac agc ttt act cgt gat tgg atc aat cat gtt aga agt gca 768		
Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Ile Asn His Val Arg Ser Ala		
245	250	255
act ggc aaa aat atg ttt gcg gtt gcg gaa ttt tgg aaa aat gat tta 816		
Thr Gly Lys Asn Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu		
260	265	270
ggt gct att gaa aac tat tta aac aaa aca aac tgg aac cat tca gtc 864		
Gly Ala Ile Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Trp Asn His Ser Val		
275	280	285
ttt gat gtt ccg ctg cac tat aac ctc tat aat gct tca aaa agc gga 912		
Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Lys Ser Gly		
290	295	300
ggg aat tat gat atg agg caa ata ttt aat ggt aca gtc gtg caa aga 960		
Gly Asn Tyr Asp Met Arg Gln Ile Phe Asn Gly Thr Val Val Gln Arg		



305	310	315	320
cat cca atg cat gct gtt aca ttt gtt gat aat cat gat tcg caa cct	1008		
His Pro Met His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro			
325	330	335	
gaa gaa gct tta gag tct ttt gtt gaa gaa tgg ttc aaa cca tta gcg	1056		
Glu Glu Ala Leu Glu Ser Phe Val Glu Glu Trp Phe Lys Pro Leu Ala			
340	345	350	
tat gct ttg aca tta aca cgt gaa caa ggc tac cct tct gta ttt tat	1104		
Tyr Ala Leu Thr Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr			
355	360	365	
gga gat tat tat ggc att cca acg cat ggt gta cca gcg atg aaa tcg	1152		
Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Gly Val Pro Ala Met Lys Ser			
370	375	380	
aaa att gac ccg att cta gaa gcg cgt caa aag tat gca tat gga aga	1200		
Lys Ile Asp Pro Ile Leu Glu Ala Arg Gln Lys Tyr Ala Tyr Gly Arg			
385	390	395	400
caa aat gac tac tta gac cat cat aat atc att ggt tgg aca cgt gaa	1248		
Gln Asn Asp Tyr Leu Asp His His Asn Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu			
405	410	415	
ggg aat aca gca cac ccc aac tct ggt tta gct act atc atg tcc gat	1296		
Gly Asn Thr Ala His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp			
420	425	430	
gga gca gga gga aat aag tgg atg ttt gtt ggg cgt aat aaa gct ggt	1344		
Gly Ala Gly Gly Asn Lys Trp Met Phe Val Gly Arg Asn Lys Ala Gly			
435	440	445	
caa gtt tgg acc gat atc act gga aat cgt gca ggt act gtt acg att	1392		
Gln Val Trp Thr Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ala Gly Thr Val Thr Ile			
450	455	460	
aat gct gat gga tgg ggt aat ttt tct gta aat gga gga tca gtt tct	1440		
Asn Ala Asp Gly Trp Gly Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser			
465	470	475	480
att tgg gta aac aaa taa	1458		
Ile Trp Val Asn Lys			
485			
<210> 10			
<211> 485			
<212> PRT			
<213> 芽孢杆菌属菌种 (Bacillus sp.)			
<400> 10			

His	His	Asn	Gly	Thr	Asn	Gly	Thr	Met	Met	Gln	Tyr	Phe	Glu	Trp	Tyr
1				5				10						15	
Leu	Pro	Asn	Asp	Gly	Asn	His	Trp	Asn	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Ala	Ser
			20					25					30		
Asn	Leu	Lys	Asp	Lys	Gly	Ile	Ser	Ala	Val	Trp	Ile	Pro	Pro	Ala	Trp
		35					40					45			
Lys	Gly	Ala	Ser	Gln	Asn	Asp	Val	Gly	Tyr	Gly	Ala	Tyr	Asp	Leu	Tyr
	50					55					60				
Asp	Leu	Gly	Glu	Phe	Asn	Gln	Lys	Gly	Thr	Ile	Arg	Thr	Lys	Tyr	Gly
65					70				75						80
Thr	Arg	Asn	Gln	Leu	Gln	Ala	Ala	Val	Asn	Ala	Leu	Lys	Ser	Asn	Gly
			85					90						95	
Ile	Gln	Val	Tyr	Gly	Asp	Val	Val	Met	Asn	His	Lys	Gly	Gly	Ala	Asp
			100					105						110	
Ala	Thr	Glu	Met	Val	Arg	Ala	Val	Glu	Val	Asn	Pro	Asn	Asn	Arg	Asn
		115					120					125			
Gln	Glu	Val	Ser	Gly	Glu	Tyr	Thr	Ile	Glu	Ala	Trp	Thr	Lys	Phe	Asp
	130					135					140				
Phe	Pro	Gly	Arg	Gly	Asn	Thr	His	Ser	Asn	Phe	Lys	Trp	Arg	Trp	Tyr
145					150				155						160
His	Phe	Asp	Gly	Val	Asp	Trp	Asp	Gln	Ser	Arg	Lys	Leu	Asn	Asn	Arg
			165					170						175	
Ile	Tyr	Lys	Phe	Arg	Gly	Asp	Gly	Lys	Gly	Trp	Asp	Trp	Glu	Val	Asp
		180					185						190		
Thr	Glu	Asn	Gly	Asn	Tyr	Asp	Tyr	Leu	Met	Tyr	Ala	Asp	Ile	Asp	Met
	195						200					205			
Asp	His	Pro	Glu	Val	Val	Asn	Glu	Leu	Arg	Asn	Trp	Gly	Val	Trp	Tyr
	210					215					220				
Thr	Asn	Thr	Leu	Gly	Leu	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Ala	Val	Lys	His
225					230				235						240
Ile	Lys	Tyr	Ser	Phe	Thr	Arg	Asp	Trp	Ile	Asn	His	Val	Arg	Ser	Ala
			245					250						255	
Thr	Gly	Lys	Asn	Met	Phe	Ala	Val	Ala	Glu	Phe	Trp	Lys	Asn	Asp	Leu
		260					265					270			
Gly	Ala	Ile	Glu	Asn	Tyr	Leu	Asn	Lys	Thr	Asn	Trp	Asn	His	Ser	Val
	275						280				285				
Phe	Asp	Val	Pro	Leu	His	Tyr	Asn	Leu	Tyr	Asn	Ala	Ser	Lys	Ser	Gly
	290					295					300				
Gly	Asn	Tyr	Asp	Met	Arg	Gln	Ile	Phe	Asn	Gly	Thr	Val	Val	Gln	Arg

305	310	315	320
His Pro Met His	Ala Val Thr Phe Val	Asp Asn His Asp	Ser Gln Pro
	325	330	335
Glu Glu Ala Leu	Glu Ser Phe Val	Glu Glu Trp Phe	Lys Pro Leu Ala
	340	345	350
Tyr Ala Leu Thr	Leu Thr Arg Glu	Gln Gly Tyr Pro	Ser Val Phe Tyr
	355	360	365
Gly Asp Tyr Tyr	Gly Ile Pro Thr	His Gly Val Pro	Ala Met Lys Ser
	370	375	380
Lys Ile Asp Pro	Ile Leu Glu Ala	Arg Gln Lys Tyr	Ala Tyr Gly Arg
385	390	395	400
Gln Asn Asp Tyr	Leu Asp His His	Asn Ile Ile Gly	Trp Thr Arg Glu
	405	410	415
Gly Asn Thr Ala	His Pro Asn Ser	Gly Leu Ala Thr	Ile Met Ser Asp
	420	425	430
Gly Ala Gly Gly	Asn Lys Trp Met	Phe Val Gly Arg	Asn Lys Ala Gly
	435	440	445
Gln Val Trp Thr	Asp Ile Thr Gly	Asn Arg Ala Gly	Thr Val Thr Ile
	450	455	460
Asn Ala Asp Gly	Trp Gly Asn Phe	Ser Val Asn Gly	Gly Ser Val Ser
465	470	475	480
Ile Trp Val Asn	Lys		
	485		

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 1455

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 芽孢杆菌属菌种

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1) .. (1455)

&lt;400&gt; 11

cat cat aat gga	aca aat ggt act	atg atg caa tat	ttc gaa tgg tat	48
His His Asn Gly	Thr Asn Gly Thr	Met Met Gln Tyr	Phe Glu Trp Tyr	
1	5	10	15	
ttg cca aat gac	ggg aat cat tgg	aac agg ttg agg	gat gac gca gct	96
Leu Pro Asn Asp	Gly Asn His Trp	Asn Arg Leu Arg	Asp Asp Ala Ala	
	20	25	30	
aac tta aag agt	aaa ggg ata aca	gct gta tgg att	cca cct gca tgg	144
Asn Leu Lys Ser	Lys Gly Ile Thr	Ala Val Trp Ile	Pro Pro Ala Trp	

35	40	45	
aag ggg act tcc cag aat gat gta ggt tat gga gcc tat gat tta tat	192		
Lys Gly Thr Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr			
50	55	60	
gat ctt gga gag ttt aac cag aag ggg acg gtt cgt aca aaa tat gga	240		
Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly			
65	70	75	80
aca cgc aac cag ctg cag gct gcc gtg aca tct tta aaa aat aac ggc	288		
Thr Arg Asn Gln Leu Gln Ala Ala Val Thr Ser Leu Lys Asn Asn Gly			
85	90	95	
att cag gta tat ggt gat gtc gtc atg aat cat aaa ggt gga gca gat	336		
Ile Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp			
100	105	110	
ggt acg gaa att gta aat gcg gta gaa gtg aat cgg agc aac cga aac	384		
Gly Thr Glu Ile Val Asn Ala Val Glu Val Asn Arg Ser Asn Arg Asn			
115	120	125	
cag gaa acc tca gga gag tat gca ata gaa gcg tgg aca aag ttt gat	432		
Gln Glu Thr Ser Gly Glu Tyr Ala Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp			
130	135	140	
ttt cct gga aga gga aat aac cat tcc agc ttt aag tgg cgc tgg tat	480		
Phe Pro Gly Arg Gly Asn Asn His Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr			
145	150	155	160
cat ttt gat ggg aca gat tgg gat cag tca cgc cag ctt caa aac aaa	528		
His Phe Asp Gly Thr Asp Trp Asp Gln Ser Arg Gln Leu Gln Asn Lys			
165	170	175	
ata tat aaa ttc agg gga aca ggc aag gcc tgg gac tgg gaa gtc gat	576		
Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Thr Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp			
180	185	190	
aca gag aat ggc aac tat gac tat ctt atg tat gca gac gtg gat atg	624		
Thr Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Val Asp Met			
195	200	205	
gat cac cca gaa gta ata cat gaa ctt aga aac tgg gga gtg tgg tat	672		
Asp His Pro Glu Val Ile His Glu Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp Tyr			
210	215	220	
acg aat aca ctg aac ctt gat gga ttt aga ata gat gca gtg aaa cat	720		
Thr Asn Thr Leu Asn Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His			
225	230	235	240
ata aaa tat agc ttt acg aga gat tgg ctt aca cat gtg cgt aac acc	768		
Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Leu Thr His Val Arg Asn Thr			

245	250	255
aca ggt aaa cca atg ttt gca gtg gct gag ttt tgg aaa aat gac ctt 816		
Thr Gly Lys Pro Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu		
260	265	270
ggt gca att gaa aac tat ttg aat aaa aca agt tgg aat cac tcg gtg 864		
Gly Ala Ile Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Ser Trp Asn His Ser Val		
275	280	285
ttt gat gtt cct ctc cac tat aat ttg tac aat gca tct aat agc ggt 912		
Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Asn Ser Gly		
290	295	300
ggt tat tat gat atg aga aat att tta aat ggt tct gtg gtg caa aaa 960		
Gly Tyr Tyr Asp Met Arg Asn Ile Leu Asn Gly Ser Val Val Gln Lys		
305	310	315
cat cca aca cat gcc gtt act ttt gtt gat aac cat gat tct cag ccc 1008		
His Pro Thr His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro		
325	330	335
ggg gaa gca ttg gaa tcc ttt gtt caa caa tgg ttt aaa cca ctt gca 1056		
Gly Glu Ala Leu Glu Ser Phe Val Gln Gln Trp Phe Lys Pro Leu Ala		
340	345	350
tat gca ttg gtt ctg aca agg gaa caa ggt tat cct tcc gta ttt tat 1104		
Tyr Ala Leu Val Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr		
355	360	365
ggg gat tac tac ggt atc cca acc cat ggt gtt ccg gct atg aaa tct 1152		
Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Gly Val Pro Ala Met Lys Ser		
370	375	380
aaa ata gac cct ctt ctg cag gca cgt caa act ttt gcc tat ggt acg 1200		
Lys Ile Asp Pro Leu Leu Gln Ala Arg Gln Thr Phe Ala Tyr Gly Thr		
385	390	395
cag cat gat tac ttt gat cat cat gat att atc ggt tgg aca aga gag 1248		
Gln His Asp Tyr Phe Asp His His Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu		
405	410	415
gga aat agc tcc cat cca aat tca ggc ctt gcc acc att atg tca gat 1296		
Gly Asn Ser Ser His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp		
420	425	430
ggt cca ggt ggt aac aaa tgg atg tat gtg ggg aaa aat aaa gcg gga 1344		
Gly Pro Gly Gly Asn Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Asn Lys Ala Gly		
435	440	445
caa gtt tgg aga gat att acc gga aat agg aca ggc acc gtc aca att 1392		
Gln Val Trp Arg Asp Ile Thr Gly Asn Arg Thr Gly Thr Val Thr Ile		

450	455	460	
aat gca gac gga tgg ggt aat ttc tct gtt aat gga ggg tcc gtt tcg 1440			
Asn Ala Asp Gly Trp Gly Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser			
465	470	475	480
gtt tgg gtg aag caa 1455			
Val Trp Val Lys Gln			
	485		
<210> 12			
<211> 485			
<212> PRT			
<213> 芽孢杆菌属菌种			
<400> 12			
His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr			
1	5	10	15
Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Asp Asp Ala Ala			
	20	25	30
Asn Leu Lys Ser Lys Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Trp			
	35	40	45
Lys Gly Thr Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr			
	50	55	60
Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly			
65	70	75	80
Thr Arg Asn Gln Leu Gln Ala Ala Val Thr Ser Leu Lys Asn Asn Gly			
	85	90	95
Ile Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp			
	100	105	110
Gly Thr Glu Ile Val Asn Ala Val Glu Val Asn Arg Ser Asn Arg Asn			
	115	120	125
Gln Glu Thr Ser Gly Glu Tyr Ala Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp			
	130	135	140
Phe Pro Gly Arg Gly Asn Asn His Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr			
145	150	155	160
His Phe Asp Gly Thr Asp Trp Asp Gln Ser Arg Gln Leu Gln Asn Lys			
	165	170	175
Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Thr Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp			
	180	185	190
Thr Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Val Asp Met			
	195	200	205
Asp His Pro Glu Val Ile His Glu Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp Tyr			

210	215	220
Thr Asn Thr Leu Asn Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His		
225	230	235
Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Leu Thr His Val Arg Asn Thr		240
	245	250
Thr Gly Lys Pro Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu		255
	260	265
Gly Ala Ile Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Ser Trp Asn His Ser Val		270
	275	280
Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Asn Ser Gly		285
290	295	300
Gly Tyr Tyr Asp Met Arg Asn Ile Leu Asn Gly Ser Val Val Gln Lys		
305	310	315
His Pro Thr His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro		320
	325	330
Gly Glu Ala Leu Glu Ser Phe Val Gln Gln Trp Phe Lys Pro Leu Ala		335
	340	345
Tyr Ala Leu Val Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr		350
355	360	365
Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Gly Val Pro Ala Met Lys Ser		
370	375	380
Lys Ile Asp Pro Leu Leu Gln Ala Arg Gln Thr Phe Ala Tyr Gly Thr		
385	390	395
Gln His Asp Tyr Phe Asp His His Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu		400
	405	410
Gly Asn Ser Ser His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp		415
	420	425
Gly Pro Gly Gly Asn Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Asn Lys Ala Gly		430
	435	440
Gln Val Trp Arg Asp Ile Thr Gly Asn Arg Thr Gly Thr Val Thr Ile		445
	450	455
Asn Ala Asp Gly Trp Gly Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser		460
465	470	475
Val Trp Val Lys Gln		480
	485	

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 1452

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 解淀粉芽孢杆菌 (Bacillus amyloliquefaciens)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1) .. (1449)

&lt;400&gt; 13

```

gta aat ggc acg ctg atg cag tat ttt gaa tgg tat acg ccg aac gac 48
Val Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Thr Pro Asn Asp
1           5           10           15
ggc cag cat tgg aaa cga ttg cag aat gat gcg gaa cat tta tcg gat 96
Gly Gln His Trp Lys Arg Leu Gln Asn Asp Ala Glu His Leu Ser Asp
           20           25           30
atc gga atc act gcc gtc tgg att cct ccc gca tac aaa gga ttg agc 144
Ile Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly Leu Ser
           35           40           45
caa tcc gat aac gga tac gga cct tat gat ttg tat gat tta gga gaa 192
Gln Ser Asp Asn Gly Tyr Gly Pro Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Glu
           50           55           60
ttc cag caa aaa ggg acg gtc aga acg aaa tac ggc aca aaa tca gag 240
Phe Gln Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys Ser Glu
65           70           75           80
ctt caa gat gcg atc ggc tca ctg cat tcc cgg aac gtc caa gta tac 288
Leu Gln Asp Ala Ile Gly Ser Leu His Ser Arg Asn Val Gln Val Tyr
           85           90           95
gga gat gtg gtt ttg aat cat aag gct ggt gct gat gca aca gaa gat 336
Gly Asp Val Val Leu Asn His Lys Ala Gly Ala Asp Ala Thr Glu Asp
           100          105          110
gta act gcc gtc gaa gtc aat ccg gcc aat aga aat cag gaa act tcg 384
Val Thr Ala Val Glu Val Asn Pro Ala Asn Arg Asn Gln Glu Thr Ser
           115          120          125
gag gaa tat caa atc aaa gcg tgg acg gat ttt cgt ttt ccg ggc cgt 432
Glu Glu Tyr Gln Ile Lys Ala Trp Thr Asp Phe Arg Phe Pro Gly Arg
           130          135          140
gga aac acg tac agt gat ttt aaa tgg cat tgg tat cat ttc gac gga 480
Gly Asn Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp His Trp Tyr His Phe Asp Gly
145          150          155          160
gcg gac tgg gat gaa tcc cgg aag atc agc cgc atc ttt aag ttt cgt 528
Ala Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Ile Ser Arg Ile Phe Lys Phe Arg
           165          170          175
ggg gaa gga aaa gcg tgg gat tgg gaa gta tca agt gaa aac ggc aac 576
Gly Glu Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Ser Ser Glu Asn Gly Asn

```



180	185	190
tat gac tat tta atg tat gct gat gtt gac tac gac cac cct gat gtc 624		
Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Val Asp Tyr Asp His Pro Asp Val		
195	200	205
gtg gca gag aca aaa aaa tgg ggt atc tgg tat gcg aat gaa ctg tca 672		
Val Ala Glu Thr Lys Lys Trp Gly Ile Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Ser		
210	215	220
tta gac ggc ttc cgt att gat gcc gcc aaa cat att aaa ttt tca ttt 720		
Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Lys Phe Ser Phe		
225	230	235
ctg cgt gat tgg gtt cag gcg gtc aga cag gcg acg gga aaa gaa atg 768		
Leu Arg Asp Trp Val Gln Ala Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Glu Met		
245	250	255
ttt acg gtt gcg gag tat tgg cag aat aat gcc ggg aaa ctc gaa aac 816		
Phe Thr Val Ala Glu Tyr Trp Gln Asn Asn Ala Gly Lys Leu Glu Asn		
260	265	270
tac ttg aat aaa aca agc ttt aat caa tcc gtg ttt gat gtt ccg ctt 864		
Tyr Leu Asn Lys Thr Ser Phe Asn Gln Ser Val Phe Asp Val Pro Leu		
275	280	285
cat ttc aat tta cag gcg gct tcc tca caa gga ggc gga tat gat atg 912		
His Phe Asn Leu Gln Ala Ala Ser Ser Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met		
290	295	300
agg cgt ttg ctg gac ggt acc gtt gtg tcc agg cat ccg gaa aag gcg 960		
Arg Arg Leu Leu Asp Gly Thr Val Val Ser Arg His Pro Glu Lys Ala		
305	310	315
gtt aca ttt gtt gaa aat cat gac aca cag ccg gga cag tca ttg gaa 1008		
Val Thr Phe Val Glu Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu		
325	330	335
tcg aca gtc caa act tgg ttt aaa ccg ctt gca tac gcc ttt att ttg 1056		
Ser Thr Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu		
340	345	350
aca aga gaa tcc ggt tat cct cag gtg ttc tat ggg gat atg tac ggg 1104		
Thr Arg Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly		
355	360	365
aca aaa ggg aca tcg cca aag gaa att ccc tca ctg aaa gat aat ata 1152		
Thr Lys Gly Thr Ser Pro Lys Glu Ile Pro Ser Leu Lys Asp Asn Ile		
370	375	380
gag ccg att tta aaa gcg cgt aag gag tac gca tac ggg ccc cag cac 1200		
Glu Pro Ile Leu Lys Ala Arg Lys Glu Tyr Ala Tyr Gly Pro Gln His		

385	390	395	400
gat tat att gac cac ccg gat gtg atc gga tgg acg agg gaa ggt gac 1248			
Asp Tyr Ile Asp His Pro Asp Val Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp			
	405	410	415
agc tcc gcc gcc aaa tca ggt ttg gcc gct tta atc acg gac gga ccc 1296			
Ser Ser Ala Ala Lys Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro			
	420	425	430
ggc gga tca aag cgg atg tat gcc ggc ctg aaa aat gcc ggc gag aca 1344			
Gly Gly Ser Lys Arg Met Tyr Ala Gly Leu Lys Asn Ala Gly Glu Thr			
	435	440	445
tgg tat gac ata acg ggc aac cgt tca gat act gta aaa atc gga tct 1392			
Trp Tyr Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Lys Ile Gly Ser			
	450	455	460
gac ggc tgg gga gag ttt cat gta aac gat ggg tcc gtc tcc att tat 1440			
Asp Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Asp Gly Ser Val Ser Ile Tyr			
465	470	475	480
gtt cag aaa taa 1452			
Val Gln Lys			
<210> 14			
<211> 483			
<212> PRT			
<213> 解淀粉芽孢杆菌 (Bacillus amyloliquefaciens)			
<400> 14			
Val Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Thr Pro Asn Asp			
1	5	10	15
Gly Gln His Trp Lys Arg Leu Gln Asn Asp Ala Glu His Leu Ser Asp			
	20	25	30
Ile Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly Leu Ser			
	35	40	45
Gln Ser Asp Asn Gly Tyr Gly Pro Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Glu			
	50	55	60
Phe Gln Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys Ser Glu			
65	70	75	80
Leu Gln Asp Ala Ile Gly Ser Leu His Ser Arg Asn Val Gln Val Tyr			
	85	90	95
Gly Asp Val Val Leu Asn His Lys Ala Gly Ala Asp Ala Thr Glu Asp			
	100	105	110
Val Thr Ala Val Glu Val Asn Pro Ala Asn Arg Asn Gln Glu Thr Ser			
	115	120	125

Glu	Glu	Tyr	Gln	Ile	Lys	Ala	Trp	Thr	Asp	Phe	Arg	Phe	Pro	Gly	Arg
130						135					140				
Gly	Asn	Thr	Tyr	Ser	Asp	Phe	Lys	Trp	His	Trp	Tyr	His	Phe	Asp	Gly
145					150					155				160	
Ala	Asp	Trp	Asp	Glu	Ser	Arg	Lys	Ile	Ser	Arg	Ile	Phe	Lys	Phe	Arg
				165					170					175	
Gly	Glu	Gly	Lys	Ala	Trp	Asp	Trp	Glu	Val	Ser	Ser	Glu	Asn	Gly	Asn
			180					185					190		
Tyr	Asp	Tyr	Leu	Met	Tyr	Ala	Asp	Val	Asp	Tyr	Asp	His	Pro	Asp	Val
	195					200						205			
Val	Ala	Glu	Thr	Lys	Lys	Trp	Gly	Ile	Trp	Tyr	Ala	Asn	Glu	Leu	Ser
	210					215					220				
Leu	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Ala	Ala	Lys	His	Ile	Lys	Phe	Ser	Phe
225				230						235				240	
Leu	Arg	Asp	Trp	Val	Gln	Ala	Val	Arg	Gln	Ala	Thr	Gly	Lys	Glu	Met
				245					250					255	
Phe	Thr	Val	Ala	Glu	Tyr	Trp	Gln	Asn	Asn	Ala	Gly	Lys	Leu	Glu	Asn
			260					265					270		
Tyr	Leu	Asn	Lys	Thr	Ser	Phe	Asn	Gln	Ser	Val	Phe	Asp	Val	Pro	Leu
	275					280						285			
His	Phe	Asn	Leu	Gln	Ala	Ala	Ser	Ser	Gln	Gly	Gly	Gly	Tyr	Asp	Met
	290					295				300					
Arg	Arg	Leu	Leu	Asp	Gly	Thr	Val	Val	Ser	Arg	His	Pro	Glu	Lys	Ala
305				310						315				320	
Val	Thr	Phe	Val	Glu	Asn	His	Asp	Thr	Gln	Pro	Gly	Gln	Ser	Leu	Glu
				325					330					335	
Ser	Thr	Val	Gln	Thr	Trp	Phe	Lys	Pro	Leu	Ala	Tyr	Ala	Phe	Ile	Leu
			340					345					350		
Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Tyr	Pro	Gln	Val	Phe	Tyr	Gly	Asp	Met	Tyr	Gly
	355					360					365				
Thr	Lys	Gly	Thr	Ser	Pro	Lys	Glu	Ile	Pro	Ser	Leu	Lys	Asp	Asn	Ile
	370					375					380				
Glu	Pro	Ile	Leu	Lys	Ala	Arg	Lys	Glu	Tyr	Ala	Tyr	Gly	Pro	Gln	His
385				390						395				400	
Asp	Tyr	Ile	Asp	His	Pro	Asp	Val	Ile	Gly	Trp	Thr	Arg	Glu	Gly	Asp
				405					410				415		
Ser	Ser	Ala	Ala	Lys	Ser	Gly	Leu	Ala	Ala	Leu	Ile	Thr	Asp	Gly	Pro
			420					425					430		
Gly	Gly	Ser	Lys	Arg	Met	Tyr	Ala	Gly	Leu	Lys	Asn	Ala	Gly	Glu	Thr

435	440	445
Trp Tyr Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Lys Ile Gly Ser		
450	455	460
Asp Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Asp Gly Ser Val Ser Ile Tyr		
465	470	475
Val Gln Lys		
<210> 15		
<211> 1548		
<212> DNA		
<213> 嗜热脂肪芽孢杆菌 (Bacillus stearothermophilus)		
<220>		
<221> CDS		
<222> (1) .. (1548)		
<400> 15		
gcc gca ccg ttt aac ggc acc atg atg cag tat ttt gaa tgg tac ttg 48		
Ala Ala Pro Phe Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Leu		
1 5 10 15		
ccg gat gat ggc acg tta tgg acc aaa gtg gcc aat gaa gcc aac aac 96		
Pro Asp Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Ala Asn Glu Ala Asn Asn		
20 25 30		
tta tcc agc ctt ggc atc acc gct ctt tgg ctg ccg ccc gct tac aaa 144		
Leu Ser Ser Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala Tyr Lys		
35 40 45		
gga aca agc cgc agc gac gta ggg tac gga gta tac gac ttg tat gac 192		
Gly Thr Ser Arg Ser Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu Tyr Asp		
50 55 60		
ctc ggc gaa ttc aat caa aaa ggg acc gtc cgc aca aaa tac gga aca 240		
Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr		
65 70 75 80		
aaa gct caa tat ctt caa gcc att caa gcc gcc cac gcc gct gga atg 288		
Lys Ala Gln Tyr Leu Gln Ala Ile Gln Ala Ala His Ala Ala Gly Met		
85 90 95		
caa gtg tac gcc gat gtc gtg ttc gac cat aaa ggc ggc gct gac ggc 336		
Gln Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asp His Lys Gly Gly Ala Asp Gly		
100 105 110		
acg gaa tgg gtg gac gcc gtc gaa gtc aat ccg tcc gac cgc aac caa 384		
Thr Glu Trp Val Asp Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asp Arg Asn Gln		
115 120 125		
gaa atc tcg ggc acc tat caa atc caa gca tgg acg aaa ttt gat ttt 432		

Glu Ile Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe Asp Phe			
130	135	140	
ccc ggg cgg ggc aac acc tac tcc agc ttt aag tgg cgc tgg tac cat	480		
Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr His			
145	150	155	160
ttt gac ggc gtt gat tgg gac gaa agc cga aaa ttg agc cgc att tac	528		
Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Ser Arg Ile Tyr			
165	170	175	
aaa ttc cgc ggc atc ggc aaa gcg tgg gat tgg gaa gta gac acg gaa	576		
Lys Phe Arg Gly Ile Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp Thr Glu			
180	185	190	
aac gga aac tat gac tac tta atg tat gcc gac ctt gat atg gat cat	624		
Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Leu Asp Met Asp His			
195	200	205	
ccc gaa gtc gtg acc gag ctg aaa aac tgg ggg aaa tgg tat gtc aac	672		
Pro Glu Val Val Thr Glu Leu Lys Asn Trp Gly Lys Trp Tyr Val Asn			
210	215	220	
aca acg aac att gat ggg ttc cgg ctt gat gcc gtc aag cat att aag	720		
Thr Thr Asn Ile Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys			
225	230	235	240
ttc agt ttt ttt cct gat tgg ttg tcg tat gtg cgt tct cag act ggc	768		
Phe Ser Phe Phe Pro Asp Trp Leu Ser Tyr Val Arg Ser Gln Thr Gly			
245	250	255	
aag ccg cta ttt acc gtc ggg gaa tat tgg agc tat gac atc aac aag	816		
Lys Pro Leu Phe Thr Val Gly Glu Tyr Trp Ser Tyr Asp Ile Asn Lys			
260	265	270	
ttg cac aat tac att acg aaa aca gac gga acg atg tct ttg ttt gat	864		
Leu His Asn Tyr Ile Thr Lys Thr Asp Gly Thr Met Ser Leu Phe Asp			
275	280	285	
gcc ccg tta cac aac aaa ttt tat acc gct tcc aaa tca ggg ggc gca	912		
Ala Pro Leu His Asn Lys Phe Tyr Thr Ala Ser Lys Ser Gly Gly Ala			
290	295	300	
ttt gat atg cgc acg tta atg acc aat act ctc atg aaa gat caa ccg	960		
Phe Asp Met Arg Thr Leu Met Thr Asn Thr Leu Met Lys Asp Gln Pro			
305	310	315	320
aca ttg gcc gtc acc ttc gtt gat aat cat gac acc gaa ccc ggc caa	1008		
Thr Leu Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Glu Pro Gly Gln			
325	330	335	
gcg ctg cag tca tgg gtc gac cca tgg ttc aaa ccg ttg gct tac gcc	1056		

Ala Leu Gln Ser Trp Val Asp Pro Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala  
 340 345 350  
 ttt att cta act cgg cag gaa gga tac ccg tgc gtc ttt tat ggt gac 1104  
 Phe Ile Leu Thr Arg Gln Glu Gly Tyr Pro Cys Val Phe Tyr Gly Asp  
 355 360 365  
 tat tat ggc att cca caa tat aac att cct tcg ctg aaa agc aaa atc 1152  
 Tyr Tyr Gly Ile Pro Gln Tyr Asn Ile Pro Ser Leu Lys Ser Lys Ile  
 370 375 380  
 gat ccg ctc ctc atc gcg cgc agg gat tat gct tac gga acg caa cat 1200  
 Asp Pro Leu Leu Ile Ala Arg Arg Asp Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln His  
 385 390 395 400  
 gat tat ctt gat cac tcc gac atc atc ggg tgg aca agg gaa ggg ggc 1248  
 Asp Tyr Leu Asp His Ser Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Gly  
 405 410 415  
 act gaa aaa cca gga tcc gga ctg gcc gca ctg atc acc gat ggg ccg 1296  
 Thr Glu Lys Pro Gly Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro  
 420 425 430  
 gga gga agc aaa tgg atg tac gtt ggc aaa caa cac gct gga aaa gtg 1344  
 Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Gln His Ala Gly Lys Val  
 435 440 445  
 ttc tat gac ctt acc ggc aac cgg agt gac acc gtc acc atc aac agt 1392  
 Phe Tyr Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile Asn Ser  
 450 455 460  
 gat gga tgg ggg gaa ttc aaa gtc aat ggc ggt tcg gtt tcg gtt tgg 1440  
 Asp Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Trp  
 465 470 475 480  
 gtt cct aga aaa acg acc gtt tct acc atc gct cgg ccg atc aca acc 1488  
 Val Pro Arg Lys Thr Thr Val Ser Thr Ile Ala Arg Pro Ile Thr Thr  
 485 490 495  
 cga ccg tgg act ggt gaa ttc gtc cgt tgg acc gaa cca cgg ttg gtg 1536  
 Arg Pro Trp Thr Gly Glu Phe Val Arg Trp Thr Glu Pro Arg Leu Val  
 500 505 510  
 gca tgg cct tga 1548  
 Ala Trp Pro  
 515  
 <210> 16  
 <211> 515  
 <212> PRT  
 <213> 嗜热脂肪芽孢杆菌 (Bacillus stearothermophilus)

&lt;400&gt; 16

Ala	Ala	Pro	Phe	Asn	Gly	Thr	Met	Met	Gln	Tyr	Phe	Glu	Trp	Tyr	Leu
1				5					10					15	
Pro	Asp	Asp	Gly	Thr	Leu	Trp	Thr	Lys	Val	Ala	Asn	Glu	Ala	Asn	Asn
			20					25					30		
Leu	Ser	Ser	Leu	Gly	Ile	Thr	Ala	Leu	Trp	Leu	Pro	Pro	Ala	Tyr	Lys
		35					40					45			
Gly	Thr	Ser	Arg	Ser	Asp	Val	Gly	Tyr	Gly	Val	Tyr	Asp	Leu	Tyr	Asp
	50					55					60				
Leu	Gly	Glu	Phe	Asn	Gln	Lys	Gly	Thr	Val	Arg	Thr	Lys	Tyr	Gly	Thr
65					70				75					80	
Lys	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln	Ala	Ile	Gln	Ala	Ala	His	Ala	Ala	Gly	Met
				85				90						95	
Gln	Val	Tyr	Ala	Asp	Val	Val	Phe	Asp	His	Lys	Gly	Gly	Ala	Asp	Gly
			100					105					110		
Thr	Glu	Trp	Val	Asp	Ala	Val	Glu	Val	Asn	Pro	Ser	Asp	Arg	Asn	Gln
		115					120						125		
Glu	Ile	Ser	Gly	Thr	Tyr	Gln	Ile	Gln	Ala	Trp	Thr	Lys	Phe	Asp	Phe
	130					135						140			
Pro	Gly	Arg	Gly	Asn	Thr	Tyr	Ser	Ser	Phe	Lys	Trp	Arg	Trp	Tyr	His
145					150					155				160	
Phe	Asp	Gly	Val	Asp	Trp	Asp	Glu	Ser	Arg	Lys	Leu	Ser	Arg	Ile	Tyr
			165						170					175	
Lys	Phe	Arg	Gly	Ile	Gly	Lys	Ala	Trp	Asp	Trp	Glu	Val	Asp	Thr	Glu
			180					185					190		
Asn	Gly	Asn	Tyr	Asp	Tyr	Leu	Met	Tyr	Ala	Asp	Leu	Asp	Met	Asp	His
		195					200						205		
Pro	Glu	Val	Val	Thr	Glu	Leu	Lys	Asn	Trp	Gly	Lys	Trp	Tyr	Val	Asn
	210					215						220			
Thr	Thr	Asn	Ile	Asp	Gly	Phe	Arg	Leu	Asp	Ala	Val	Lys	His	Ile	Lys
225					230					235				240	
Phe	Ser	Phe	Phe	Pro	Asp	Trp	Leu	Ser	Tyr	Val	Arg	Ser	Gln	Thr	Gly
			245						250					255	
Lys	Pro	Leu	Phe	Thr	Val	Gly	Glu	Tyr	Trp	Ser	Tyr	Asp	Ile	Asn	Lys
			260					265					270		
Leu	His	Asn	Tyr	Ile	Thr	Lys	Thr	Asp	Gly	Thr	Met	Ser	Leu	Phe	Asp
		275					280					285			
Ala	Pro	Leu	His	Asn	Lys	Phe	Tyr	Thr	Ala	Ser	Lys	Ser	Gly	Gly	Ala
	290					295						300			

Phe Asp Met Arg Thr Leu Met Thr Asn Thr Leu Met Lys Asp Gln Pro  
 305 310 315 320  
 Thr Leu Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Glu Pro Gly Gln  
 325 330 335  
 Ala Leu Gln Ser Trp Val Asp Pro Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala  
 340 345 350  
 Phe Ile Leu Thr Arg Gln Glu Gly Tyr Pro Cys Val Phe Tyr Gly Asp  
 355 360 365  
 Tyr Tyr Gly Ile Pro Gln Tyr Asn Ile Pro Ser Leu Lys Ser Lys Ile  
 370 375 380  
 Asp Pro Leu Leu Ile Ala Arg Arg Asp Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln His  
 385 390 395 400  
 Asp Tyr Leu Asp His Ser Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Gly  
 405 410 415  
 Thr Glu Lys Pro Gly Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro  
 420 425 430  
 Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Gln His Ala Gly Lys Val  
 435 440 445  
 Phe Tyr Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile Asn Ser  
 450 455 460  
 Asp Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Trp  
 465 470 475 480  
 Val Pro Arg Lys Thr Thr Val Ser Thr Ile Ala Arg Pro Ile Thr Thr  
 485 490 495  
 Arg Pro Trp Thr Gly Glu Phe Val Arg Trp Thr Glu Pro Arg Leu Val  
 500 505 510

Ala Trp Pro  
 515

<210> 17

<211> 1455

<212> DNA

<213> 芽孢杆菌属菌种 (Bacillus sp.)

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (1455)

<400> 17

cat cat aat ggg acg aat ggg acc atg atg cag tat ttt gaa tgg cat 48  
 His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp His  
 1 5 10 15



```

ttg cca aat gac ggg aac cac tgg aac agg tta cga gat gac gca gct 96
Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Asp Asp Ala Ala
                20                      25                      30

aac tta aag agt aaa ggg att acc gct gtt tgg att cct cct gca tgg 144
Asn Leu Lys Ser Lys Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Trp
                35                      40                      45

aag ggg act tcg caa aat gat gtt ggg tat ggt gcc tat gat ttg tac 192
Lys Gly Thr Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr
                50                      55                      60

gat ctt ggt gag ttt aac caa aag gga acc gtc cgt aca aaa tat ggc 240
Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly
        65                      70                      75                      80

aca agg agt cag ttg caa ggt gcc gtg aca tct ttg aaa aat aac ggg 288
Thr Arg Ser Gln Leu Gln Gly Ala Val Thr Ser Leu Lys Asn Asn Gly
                85                      90                      95

att caa gtt tat ggg gat gtc gtg atg aat cat aaa ggt gga gca gac 336
Ile Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp
                100                      105                      110

ggg aca gag atg gta aat gcg gtg gaa gtg aac cga agc aac cga aac 384
Gly Thr Glu Met Val Asn Ala Val Glu Val Asn Arg Ser Asn Arg Asn
                115                      120                      125

caa gaa ata tca ggt gaa tac acc att gaa gca tgg acg aaa ttt gat 432
Gln Glu Ile Ser Gly Glu Tyr Thr Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp
                130                      135                      140

ttc cct gga aga gga aat acc cat tcc aac ttt aaa tgg cgc tgg tat 480
Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr His Ser Asn Phe Lys Trp Arg Trp Tyr
        145                      150                      155                      160

cat ttt gat ggg aca gat tgg gat cag tca cgt cag ctt cag aac aaa 528
His Phe Asp Gly Thr Asp Trp Asp Gln Ser Arg Gln Leu Gln Asn Lys
                165                      170                      175

ata tat aaa ttc aga ggt acc gga aag gca tgg gac tgg gaa gta gat 576
Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Thr Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp
                180                      185                      190

ata gag aac ggc aac tat gat tac ctt atg tat gca gac att gat atg 624
Ile Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Met
                195                      200                      205

gat cat cca gaa gta atc aat gaa ctt aga aat tgg gga gtt tgg tat 672
Asp His Pro Glu Val Ile Asn Glu Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp Tyr
                210                      215                      220

```

```

aca aat aca ctt aat cta gat gga ttt aga atc gat gct gtg aaa cat 720
Thr Asn Thr Leu Asn Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His
225                230                235                240
att aaa tac agc tat acg aga gat tgg cta aca cat gtg cgt aac acc 768
Ile Lys Tyr Ser Tyr Thr Arg Asp Trp Leu Thr His Val Arg Asn Thr
                245                250                255
aca ggt aaa cca atg ttt gca gtt gca gaa ttt tgg aaa aat gac ctt 816
Thr Gly Lys Pro Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu
                260                265                270
gct gca atc gaa aac tat tta aat aaa aca agt tgg aat cac tcc gtg 864
Ala Ala Ile Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Ser Trp Asn His Ser Val
                275                280                285
ttc gat gtt cct ctt cat tat aat ttg tac aat gca tct aat agt ggt 912
Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Asn Ser Gly
                290                295                300
ggc tat ttt gat atg aga aat att tta aat ggt tct gtc gta caa aaa 960
Gly Tyr Phe Asp Met Arg Asn Ile Leu Asn Gly Ser Val Val Gln Lys
305                310                315                320
cac cct ata cat gca gtc aca ttt gtt gat aac cat gac tct cag cca 1008
His Pro Ile His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro
                325                330                335
gga gaa gca ttg gaa tcc ttt gtt caa tcg tgg ttc aaa cca ctg gca 1056
Gly Glu Ala Leu Glu Ser Phe Val Gln Ser Trp Phe Lys Pro Leu Ala
                340                345                350
tat gca ttg att ctg aca agg gag caa ggt tac cct tcc gta ttt tac 1104
Tyr Ala Leu Ile Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr
                355                360                365
ggt gat tac tac ggt ata cca act cat ggt gtt cct tcg atg aaa tct 1152
Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Gly Val Pro Ser Met Lys Ser
                370                375                380
aaa att gat cca ctt ctg cag gca cgt caa acg tat gcc tac gga acc 1200
Lys Ile Asp Pro Leu Leu Gln Ala Arg Gln Thr Tyr Ala Tyr Gly Thr
385                390                395                400
caa cat gat tat ttt gat cat cat gat att atc ggc tgg acg aga gaa 1248
Gln His Asp Tyr Phe Asp His His Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu
                405                410                415
ggg gac agc tcc cac cca aat tca gga ctt gca act att atg tcc gat 1296
Gly Asp Ser Ser His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp
                420                425                430

```

```

ggg cca ggg ggt aat aaa tgg atg tat gtc ggg aaa cat aaa gct ggc 1344
Gly Pro Gly Gly Asn Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys His Lys Ala Gly
      435              440              445
caa gta tgg aga gat atc acc gga aat agg tct ggt acc gtc acc att 1392
Gln Val Trp Arg Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Gly Thr Val Thr Ile
      450              455              460
aat gca gat ggt tgg ggg aat ttc act gta aac gga ggg gca gtt tcg 1440
Asn Ala Asp Gly Trp Gly Asn Phe Thr Val Asn Gly Gly Ala Val Ser
465              470              475              480
gtt tgg gtg aag caa 1455
Val Trp Val Lys Gln
      485
<210> 18
<211> 485
<212> PRT
<213> 芽孢杆菌属菌种 (Bacillus sp.)
<400> 18
His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp His
1              5              10              15
Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Asp Asp Ala Ala
      20              25              30
Asn Leu Lys Ser Lys Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Trp
      35              40              45
Lys Gly Thr Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr
      50              55              60
Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly
65              70              75              80
Thr Arg Ser Gln Leu Gln Gly Ala Val Thr Ser Leu Lys Asn Asn Gly
      85              90              95
Ile Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp
      100             105             110
Gly Thr Glu Met Val Asn Ala Val Glu Val Asn Arg Ser Asn Arg Asn
      115             120             125
Gln Glu Ile Ser Gly Glu Tyr Thr Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp
      130             135             140
Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr His Ser Asn Phe Lys Trp Arg Trp Tyr
145             150             155             160
His Phe Asp Gly Thr Asp Trp Asp Gln Ser Arg Gln Leu Gln Asn Lys
      165             170             175

```

Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Thr Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp		
180	185	190
Ile Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Met		
195	200	205
Asp His Pro Glu Val Ile Asn Glu Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp Tyr		
210	215	220
Thr Asn Thr Leu Asn Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His		
225	230	235
Ile Lys Tyr Ser Tyr Thr Arg Asp Trp Leu Thr His Val Arg Asn Thr		
245	250	255
Thr Gly Lys Pro Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu		
260	265	270
Ala Ala Ile Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Ser Trp Asn His Ser Val		
275	280	285
Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Asn Ser Gly		
290	295	300
Gly Tyr Phe Asp Met Arg Asn Ile Leu Asn Gly Ser Val Val Gln Lys		
305	310	315
His Pro Ile His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro		
325	330	335
Gly Glu Ala Leu Glu Ser Phe Val Gln Ser Trp Phe Lys Pro Leu Ala		
340	345	350
Tyr Ala Leu Ile Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr		
355	360	365
Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Gly Val Pro Ser Met Lys Ser		
370	375	380
Lys Ile Asp Pro Leu Leu Gln Ala Arg Gln Thr Tyr Ala Tyr Gly Thr		
385	390	395
Gln His Asp Tyr Phe Asp His His Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu		
405	410	415
Gly Asp Ser Ser His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp		
420	425	430
Gly Pro Gly Gly Asn Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys His Lys Ala Gly		
435	440	445
Gln Val Trp Arg Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Gly Thr Val Thr Ile		
450	455	460
Asn Ala Asp Gly Trp Gly Asn Phe Thr Val Asn Gly Gly Ala Val Ser		
465	470	475
Val Trp Val Lys Gln		480

485

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 1452

&lt;212&gt; DNA

<213> 地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1) .. (1452)

&lt;400&gt; 19

```

gca aat ctt aat ggg acg ctg atg cag tat ttt gaa tgg tac atg ccc 48
Ala Asn Leu Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Met Pro
1           5           10          15
aat gac ggc caa cat tgg agg cgt ttg caa aac gac tcg gca tat ttg 96
Asn Asp Gly Gln His Trp Arg Arg Leu Gln Asn Asp Ser Ala Tyr Leu
          20          25          30
gct gaa cac ggt att act gcc gtc tgg att ccc ccg gca tat aag gga 144
Ala Glu His Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly
          35          40          45
acg agc caa gcg gat gtg ggc tac ggt gct tac gac ctt tat gat tta 192
Thr Ser Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu
          50          55          60
ggg gag ttt cat caa aaa ggg acg gtt cgg aca aag tac ggc aca aaa 240
Gly Glu Phe His Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys
65          70          75          80
gga gag ctg caa tct gcg atc aaa agt ctt cat tcc cgc gac att aac 288
Gly Glu Leu Gln Ser Ala Ile Lys Ser Leu His Ser Arg Asp Ile Asn
          85          90          95
gtt tac ggg gat gtg gtc atc aac cac aaa ggc ggc gct gat gcg acc 336
Val Tyr Gly Asp Val Val Ile Asn His Lys Gly Gly Ala Asp Ala Thr
          100          105          110
gaa gat gta acc gcg gtt gaa gtc gat ccc gct gac cgc aac cgc gta 384
Glu Asp Val Thr Ala Val Glu Val Asp Pro Ala Asp Arg Asn Arg Val
          115          120          125
att tca gga gaa cac cta att aaa gcc tgg aca cat ttt cat ttt ccg 432
Ile Ser Gly Glu His Leu Ile Lys Ala Trp Thr His Phe His Phe Pro
          130          135          140
ggg cgc ggc agc aca tac agc gat ttt aaa tgg cat tgg tac cat ttt 480
Gly Arg Gly Ser Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp His Trp Tyr His Phe
145          150          155          160

```

```

gac gga acc gat tgg gac gag tcc cga aag ctg aac cgc atc tat aag 528
Asp Gly Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg Ile Tyr Lys
165 170 175
ttt caa gga aag gct tgg gat tgg gaa gtt tcc aat gaa aac ggc aac 576
Phe Gln Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Ser Asn Glu Asn Gly Asn
180 185 190
tat gat tat ttg atg tat gcc gac atc gat tat gac cat cct gat gtc 624
Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Tyr Asp His Pro Asp Val
195 200 205
gca gca gaa att aag aga tgg ggc act tgg tat gcc aat gaa ctg caa 672
Ala Ala Glu Ile Lys Arg Trp Gly Thr Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Gln
210 215 220
ttg gac ggt ttc cgt ctt gat gct gtc aaa cac att aaa ttt tct ttt 720
Leu Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys Phe Ser Phe
225 230 235 240
ttg cgg gat tgg gtt aat cat gtc agg gaa aaa acg ggg aag gaa atg 768
Leu Arg Asp Trp Val Asn His Val Arg Glu Lys Thr Gly Lys Glu Met
245 250 255
ttt acg gta gct gaa tat tgg cag aat gac ttg ggc gcg ctg gaa aac 816
Phe Thr Val Ala Glu Tyr Trp Gln Asn Asp Leu Gly Ala Leu Glu Asn
260 265 270
tat ttg aac aaa aca aat ttt aat cat tca gtg ttt gac gtg ccg ctt 864
Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Phe Asn His Ser Val Phe Asp Val Pro Leu
275 280 285
cat tat cag ttc cat gct gca tcg aca cag gga ggc ggc tat gat atg 912
His Tyr Gln Phe His Ala Ala Ser Thr Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met
290 295 300
agg aaa ttg ctg aac ggt acg gtc gtt tcc aag cat ccg ttg aaa tcg 960
Arg Lys Leu Leu Asn Gly Thr Val Val Ser Lys His Pro Leu Lys Ser
305 310 315 320
gtt aca ttt gtc gat aac cat gat aca cag ccg ggg caa tcg ctt gag 1008
Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu
325 330 335
tcg act gtc caa aca tgg ttt aag ccg ctt gct tac gct ttt att ctc 1056
Ser Thr Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu
340 345 350
aca agg gaa tct gga tac cct cag gtt ttc tac ggg gat atg tac ggg 1104
Thr Arg Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly
355 360 365

```

```

acg aaa gga gac tcc cag cgc gaa att cct gcc ttg aaa cac aaa att 1152
Thr Lys Gly Asp Ser Gln Arg Glu Ile Pro Ala Leu Lys His Lys Ile
      370              375              380
gaa ccg atc tta aaa gcg aga aaa cag tat gcg tac gga gca cag cat 1200
Glu Pro Ile Leu Lys Ala Arg Lys Gln Tyr Ala Tyr Gly Ala Gln His
385              390              395              400
gat tat ttc gac cac cat gac att gtc ggc tgg aca agg gaa ggc gac 1248
Asp Tyr Phe Asp His His Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp
      405              410              415
agc tcg gtt gca aat tca ggt ttg gcg gca tta ata aca gac gga ccc 1296
Ser Ser Val Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro
      420              425              430
ggt ggg gca aag cga atg tat gtc ggc cgg caa aac gcc ggt gag aca 1344
Gly Gly Ala Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Glu Thr
      435              440              445
tgg cat gac att acc gga aac cgt tcg gag ccg gtt gtc atc aat tcg 1392
Trp His Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile Asn Ser
      450              455              460
gaa ggc tgg gga gag ttt cac gta aac ggc ggg tcg gtt tca att tat 1440
Glu Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Tyr
465              470              475              480
gtt caa aga tag 1452
Val Gln Arg
<210> 20
<211> 483
<212> PRT
<213> 地衣芽孢杆菌 (Bacillus licheniformis)
<400> 20
Ala Asn Leu Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Met Pro
1              5              10              15
Asn Asp Gly Gln His Trp Arg Arg Leu Gln Asn Asp Ser Ala Tyr Leu
      20              25              30
Ala Glu His Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly
      35              40              45
Thr Ser Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu
      50              55              60
Gly Glu Phe His Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys
65              70              75              80
Gly Glu Leu Gln Ser Ala Ile Lys Ser Leu His Ser Arg Asp Ile Asn

```

				85				90				95			
Val	Tyr	Gly	Asp	Val	Val	Ile	Asn	His	Lys	Gly	Gly	Ala	Asp	Ala	Thr
				100				105				110			
Glu	Asp	Val	Thr	Ala	Val	Glu	Val	Asp	Pro	Ala	Asp	Arg	Asn	Arg	Val
				115				120				125			
Ile	Ser	Gly	Glu	His	Leu	Ile	Lys	Ala	Trp	Thr	His	Phe	His	Phe	Pro
				130				135				140			
Gly	Arg	Gly	Ser	Thr	Tyr	Ser	Asp	Phe	Lys	Trp	His	Trp	Tyr	His	Phe
145				150				155				160			
Asp	Gly	Thr	Asp	Trp	Asp	Glu	Ser	Arg	Lys	Leu	Asn	Arg	Ile	Tyr	Lys
				165				170				175			
Phe	Gln	Gly	Lys	Ala	Trp	Asp	Trp	Glu	Val	Ser	Asn	Glu	Asn	Gly	Asn
				180				185				190			
Tyr	Asp	Tyr	Leu	Met	Tyr	Ala	Asp	Ile	Asp	Tyr	Asp	His	Pro	Asp	Val
				195				200				205			
Ala	Ala	Glu	Ile	Lys	Arg	Trp	Gly	Thr	Trp	Tyr	Ala	Asn	Glu	Leu	Gln
210				215				220							
Leu	Asp	Gly	Phe	Arg	Leu	Asp	Ala	Val	Lys	His	Ile	Lys	Phe	Ser	Phe
225				230				235				240			
Leu	Arg	Asp	Trp	Val	Asn	His	Val	Arg	Glu	Lys	Thr	Gly	Lys	Glu	Met
				245				250				255			
Phe	Thr	Val	Ala	Glu	Tyr	Trp	Gln	Asn	Asp	Leu	Gly	Ala	Leu	Glu	Asn
				260				265				270			
Tyr	Leu	Asn	Lys	Thr	Asn	Phe	Asn	His	Ser	Val	Phe	Asp	Val	Pro	Leu
				275				280				285			
His	Tyr	Gln	Phe	His	Ala	Ala	Ser	Thr	Gln	Gly	Gly	Gly	Tyr	Asp	Met
290				295				300							
Arg	Lys	Leu	Leu	Asn	Gly	Thr	Val	Val	Ser	Lys	His	Pro	Leu	Lys	Ser
305				310				315				320			
Val	Thr	Phe	Val	Asp	Asn	His	Asp	Thr	Gln	Pro	Gly	Gln	Ser	Leu	Glu
				325				330				335			
Ser	Thr	Val	Gln	Thr	Trp	Phe	Lys	Pro	Leu	Ala	Tyr	Ala	Phe	Ile	Leu
				340				345				350			
Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Tyr	Pro	Gln	Val	Phe	Tyr	Gly	Asp	Met	Tyr	Gly
				355				360				365			
Thr	Lys	Gly	Asp	Ser	Gln	Arg	Glu	Ile	Pro	Ala	Leu	Lys	His	Lys	Ile
370				375				380							
Glu	Pro	Ile	Leu	Lys	Ala	Arg	Lys	Gln	Tyr	Ala	Tyr	Gly	Ala	Gln	His
385				390				395				400			



Asp Tyr Phe Asp His His Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp  
 405 410 415  
 Ser Ser Val Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro  
 420 425 430  
 Gly Gly Ala Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Glu Thr  
 435 440 445  
 Trp His Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile Asn Ser  
 450 455 460  
 Glu Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Tyr  
 465 470 475 480  
 Val Gln Arg

<210> 21

<211> 1455

<212> DNA

<213> 芽孢杆菌属菌种 (Bacillus sp.)

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (1455)

<400> 21

cac cat aat ggc aca aat gga aca atg atg caa tat ttt gaa tgg tat 48  
 His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr  
 1 5 10 15  
 ttg cca aat gac ggt aat cat tgg aat aga tta aga tca gat gca agt 96  
 Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Ser Asp Ala Ser  
 20 25 30  
 aat ctt aaa gat aaa ggg att aca gcg gtt tgg att cca cct gct tgg 144  
 Asn Leu Lys Asp Lys Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Trp  
 35 40 45  
 aaa ggg gct tct caa aat gat gta ggg tat gga gcc tat gat ctg tat 192  
 Lys Gly Ala Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr  
 50 55 60  
 gat tta gga gaa ttc aat caa aaa gga acc gta cgt aca aag tac gga 240  
 Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly  
 65 70 75 80  
 acc cgt aat caa tta caa gct gca gta acc gcc tta aaa agt aat ggt 288  
 Thr Arg Asn Gln Leu Gln Ala Ala Val Thr Ala Leu Lys Ser Asn Gly  
 85 90 95  
 att caa gta tac gga gat gtc gta atg aat cat aag ggt gga gcg gat 336  
 Ile Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp

100	105	110
gcc act gag tgg gtt cga gcg gtt gaa gtg aac cca agt aat cgt aat 384		
Ala Thr Glu Trp Val Arg Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asn Arg Asn		
115	120	125
caa gaa gtc tct ggt gat tat acg att gag gct tgg act aag ttt gat 432		
Gln Glu Val Ser Gly Asp Tyr Thr Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp		
130	135	140
ttt cct ggt cga ggt aat acc cac tct aac ttt aaa tgg aga tgg tat 480		
Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr His Ser Asn Phe Lys Trp Arg Trp Tyr		
145	150	155
cat ttc gat ggt gta gat tgg gat cag tca cgt caa ttg cag aat cga 528		
His Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Gln Ser Arg Gln Leu Gln Asn Arg		
165	170	175
atc tat aaa ttc aga gga gat gga aaa ggt tgg gac tgg gaa gtt gat 576		
Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Asp Gly Lys Gly Trp Asp Trp Glu Val Asp		
180	185	190
aca gag aac gga aac tat gac tat cta atg tac gcg gat att gat atg 624		
Thr Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Met		
195	200	205
gat cac cct gaa gta gtg aat gaa ctc aga aac tgg ggt gta tgg tat 672		
Asp His Pro Glu Val Val Asn Glu Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp Tyr		
210	215	220
acc aat aca ctg ggg cta gac ggg ttc aga ata gat gcg gta aaa cat 720		
Thr Asn Thr Leu Gly Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His		
225	230	235
ata aaa tat agc ttt act cgt gat tgg ctt act cac gtt aga aat acg 768		
Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Leu Thr His Val Arg Asn Thr		
245	250	255
aca ggt aaa aat atg ttt gca gtt gca gag ttc tgg aag aat gac ata 816		
Thr Gly Lys Asn Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Ile		
260	265	270
ggt gca att gaa aat tac tta agt aaa aca aat tgg aat cat tca gtt 864		
Gly Ala Ile Glu Asn Tyr Leu Ser Lys Thr Asn Trp Asn His Ser Val		
275	280	285
ttt gat gtg ccc ctg cat tat aac ctt tat aat gca tcg aga agt ggt 912		
Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Arg Ser Gly		
290	295	300
ggc aat tat gat atg agg caa ata ttt aat gga aca gtt gtt cag aga 960		
Gly Asn Tyr Asp Met Arg Gln Ile Phe Asn Gly Thr Val Val Gln Arg		

305	310	315	320
cat cct aca cat gct gta aca ttt gtt gat aac cat gat tca cag ccg	1008		
His Pro Thr His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro			
325	330	335	
gaa gaa gcc cta gag tca ttt gtt gaa gag tgg ttc aaa ccg tta gcg	1056		
Glu Glu Ala Leu Glu Ser Phe Val Glu Glu Trp Phe Lys Pro Leu Ala			
340	345	350	
tat gct ctc aca cta aca cgt gat caa gga tat cct tcc gtt ttt tat	1104		
Tyr Ala Leu Thr Leu Thr Arg Asp Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr			
355	360	365	
gga gat tat tat ggg att ccg acg cat ggt gta cca gca atg aaa tct	1152		
Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Gly Val Pro Ala Met Lys Ser			
370	375	380	
aag att gat ccg att tta gaa gca cgt caa aag tat gcg tac gga aaa	1200		
Lys Ile Asp Pro Ile Leu Glu Ala Arg Gln Lys Tyr Ala Tyr Gly Lys			
385	390	395	400
caa aat gat tat ttg gat cac cat aat atg att ggc tgg acg cgt gaa	1248		
Gln Asn Asp Tyr Leu Asp His His Asn Met Ile Gly Trp Thr Arg Glu			
405	410	415	
ggt aat aca gca cat ccc aac tca gga cta gca act att atg tcg gat	1296		
Gly Asn Thr Ala His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp			
420	425	430	
ggc cca gga gga aat aaa tgg atg tat gtt ggg cgt aat aag gct gga	1344		
Gly Pro Gly Gly Asn Lys Trp Met Tyr Val Gly Arg Asn Lys Ala Gly			
435	440	445	
caa gtt tgg aga gat att aca gga aat cgc tca ggt acg gtg acg att	1392		
Gln Val Trp Arg Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Gly Thr Val Thr Ile			
450	455	460	
aac gca gat ggg tgg ggt aat ttt tct gta aat ggt ggg tct gta tct	1440		
Asn Ala Asp Gly Trp Gly Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser			
465	470	475	480
ata tgg gta aat aat	1455		
Ile Trp Val Asn Asn			
485			
<210> 22			
<211> 485			
<212> PRT			
<213> 芽孢杆菌属菌种 (Bacillus sp.)			
<400> 22			

His	His	Asn	Gly	Thr	Asn	Gly	Thr	Met	Met	Gln	Tyr	Phe	Glu	Trp	Tyr
1				5				10						15	
Leu	Pro	Asn	Asp	Gly	Asn	His	Trp	Asn	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Ala	Ser
			20					25					30		
Asn	Leu	Lys	Asp	Lys	Gly	Ile	Thr	Ala	Val	Trp	Ile	Pro	Pro	Ala	Trp
		35					40					45			
Lys	Gly	Ala	Ser	Gln	Asn	Asp	Val	Gly	Tyr	Gly	Ala	Tyr	Asp	Leu	Tyr
	50					55					60				
Asp	Leu	Gly	Glu	Phe	Asn	Gln	Lys	Gly	Thr	Val	Arg	Thr	Lys	Tyr	Gly
65					70					75					80
Thr	Arg	Asn	Gln	Leu	Gln	Ala	Ala	Val	Thr	Ala	Leu	Lys	Ser	Asn	Gly
			85						90					95	
Ile	Gln	Val	Tyr	Gly	Asp	Val	Val	Met	Asn	His	Lys	Gly	Gly	Ala	Asp
			100					105						110	
Ala	Thr	Glu	Trp	Val	Arg	Ala	Val	Glu	Val	Asn	Pro	Ser	Asn	Arg	Asn
		115						120					125		
Gln	Glu	Val	Ser	Gly	Asp	Tyr	Thr	Ile	Glu	Ala	Trp	Thr	Lys	Phe	Asp
	130					135						140			
Phe	Pro	Gly	Arg	Gly	Asn	Thr	His	Ser	Asn	Phe	Lys	Trp	Arg	Trp	Tyr
145					150					155					160
His	Phe	Asp	Gly	Val	Asp	Trp	Asp	Gln	Ser	Arg	Gln	Leu	Gln	Asn	Arg
			165						170					175	
Ile	Tyr	Lys	Phe	Arg	Gly	Asp	Gly	Lys	Gly	Trp	Asp	Trp	Glu	Val	Asp
			180					185					190		
Thr	Glu	Asn	Gly	Asn	Tyr	Asp	Tyr	Leu	Met	Tyr	Ala	Asp	Ile	Asp	Met
		195						200				205			
Asp	His	Pro	Glu	Val	Val	Asn	Glu	Leu	Arg	Asn	Trp	Gly	Val	Trp	Tyr
	210					215					220				
Thr	Asn	Thr	Leu	Gly	Leu	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Ala	Val	Lys	His
225					230					235					240
Ile	Lys	Tyr	Ser	Phe	Thr	Arg	Asp	Trp	Leu	Thr	His	Val	Arg	Asn	Thr
			245						250					255	
Thr	Gly	Lys	Asn	Met	Phe	Ala	Val	Ala	Glu	Phe	Trp	Lys	Asn	Asp	Ile
			260					265					270		
Gly	Ala	Ile	Glu	Asn	Tyr	Leu	Ser	Lys	Thr	Asn	Trp	Asn	His	Ser	Val
	275							280					285		
Phe	Asp	Val	Pro	Leu	His	Tyr	Asn	Leu	Tyr	Asn	Ala	Ser	Arg	Ser	Gly
	290						295				300				
Gly	Asn	Tyr	Asp	Met	Arg	Gln	Ile	Phe	Asn	Gly	Thr	Val	Val	Gln	Arg

305	310	315	320
His Pro Thr His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro			
	325	330	335
Glu Glu Ala Leu Glu Ser Phe Val Glu Glu Trp Phe Lys Pro Leu Ala			
	340	345	350
Tyr Ala Leu Thr Leu Thr Arg Asp Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr			
	355	360	365
Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Gly Val Pro Ala Met Lys Ser			
	370	375	380
Lys Ile Asp Pro Ile Leu Glu Ala Arg Gln Lys Tyr Ala Tyr Gly Lys			
385	390	395	400
Gln Asn Asp Tyr Leu Asp His His Asn Met Ile Gly Trp Thr Arg Glu			
	405	410	415
Gly Asn Thr Ala His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp			
	420	425	430
Gly Pro Gly Gly Asn Lys Trp Met Tyr Val Gly Arg Asn Lys Ala Gly			
	435	440	445
Gln Val Trp Arg Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Gly Thr Val Thr Ile			
	450	455	460
Asn Ala Asp Gly Trp Gly Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser			
465	470	475	480
Ile Trp Val Asn Asn			
	485		

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 1452

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 芽孢杆菌属菌种

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1) .. (1452)

&lt;400&gt; 23

gga agt gtg ccg gta aat ggc aca atg atg caa tat ttc gaa tgg tac 48
Gly Ser Val Pro Val Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr
1                      5                      10                      15
ctt cca gac gat gga aca cta tgg acg aaa gta gca aat aac gct caa 96
Leu Pro Asp Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Ala Asn Asn Ala Gln
20                      25                      30
tct tta gcg aat ctt ggc att act gcc ctt tgg ctt ccc cct gcc tat 144
Ser Leu Ala Asn Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala Tyr

35	40	45	
aaa gga aca agc agc agt gac gtt gga tat ggc gtt tat gat tta tat	192		
Lys Gly Thr Ser Ser Ser Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu Tyr			
50	55	60	
gac ctt gga gag ttt aat caa aaa gga act gtc cga aca aaa tac ggg	240		
Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly			
65	70	75	80
aca aaa aca caa tat atc caa gca atc caa gcg gcg cat aca gca ggg	288		
Thr Lys Thr Gln Tyr Ile Gln Ala Ile Gln Ala Ala His Thr Ala Gly			
85	90	95	
atg caa gta tat gca gat gtc gtc ttt aac cat aaa gcc ggt gca gat	336		
Met Gln Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asn His Lys Ala Gly Ala Asp			
100	105	110	
gga aca gaa cta gtc gat gca gta gaa gta aat cct tct gac cgc aat	384		
Gly Thr Glu Leu Val Asp Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asp Arg Asn			
115	120	125	
caa gaa ata tca gga aca tat caa atc caa gcg tgg aca aaa ttt gat	432		
Gln Glu Ile Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe Asp			
130	135	140	
ttt cct ggt cgt gga aac acc tat tct agt ttt aaa tgg cgt tgg tat	480		
Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr			
145	150	155	160
cat ttc gat gga acg gac tgg gat gag agt aga aaa cta aat cgt att	528		
His Phe Asp Gly Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg Ile			
165	170	175	
tac aag ttc cgc ggc acg gga aaa gca tgg gat tgg gaa gta gat aca	576		
Tyr Lys Phe Arg Gly Thr Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp Thr			
180	185	190	
gaa aac ggg aat tat gac tat ctc atg tat gca gat tta gat atg gat	624		
Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Leu Asp Met Asp			
195	200	205	
cat cca gag gtt gta tcc gaa cta aaa aat tgg gga aag tgg tat gta	672		
His Pro Glu Val Val Ser Glu Leu Lys Asn Trp Gly Lys Trp Tyr Val			
210	215	220	
acc aca acc aat atc gac gga ttc cgt ctg gat gca gtg aag cat att	720		
Thr Thr Thr Asn Ile Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile			
225	230	235	240
aaa tat agc ttt ttc ccg gac tgg cta tcg tac gta cga acc caa aca	768		
Lys Tyr Ser Phe Phe Pro Asp Trp Leu Ser Tyr Val Arg Thr Gln Thr			

245	250	255
caa aag cct ctt ttt gcc gtt ggg gaa ttt tgg agc tat gac att agc 816		
Gln Lys Pro Leu Phe Ala Val Gly Glu Phe Trp Ser Tyr Asp Ile Ser		
260	265	270
aag ttg cac aac tat att aca aag acg aac ggc tct atg tcc cta ttc 864		
Lys Leu His Asn Tyr Ile Thr Lys Thr Asn Gly Ser Met Ser Leu Phe		
275	280	285
gat gcc ccg ctg cat aac aat ttt tat ata gca tcg aaa tca ggc ggt 912		
Asp Ala Pro Leu His Asn Asn Phe Tyr Ile Ala Ser Lys Ser Gly Gly		
290	295	300
tat ttt gat atg cgc aca tta ctc aac aac aca ttg atg aaa gat cag 960		
Tyr Phe Asp Met Arg Thr Leu Leu Asn Asn Thr Leu Met Lys Asp Gln		
305	310	315
cct aca tta gca gtc aca tta gtg gat aat cac gat act gag cca ggg 1008		
Pro Thr Leu Ala Val Thr Leu Val Asp Asn His Asp Thr Glu Pro Gly		
325	330	335
caa tct ctg cag tca tgg gtc gag cca tgg ttt aaa ccg tta gct tac 1056		
Gln Ser Leu Gln Ser Trp Val Glu Pro Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr		
340	345	350
gca ttt atc ttg acc cgc caa gaa ggt tat cct tgc gtc ttt tat gga 1104		
Ala Phe Ile Leu Thr Arg Gln Glu Gly Tyr Pro Cys Val Phe Tyr Gly		
355	360	365
gat tac tat ggt att cca aaa tac aac att cct gcg ctg aaa agc aaa 1152		
Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Lys Tyr Asn Ile Pro Ala Leu Lys Ser Lys		
370	375	380
ctt gat ccg ctg tta att gcc aga aga gat tat gcc tat gga aca cag 1200		
Leu Asp Pro Leu Leu Ile Ala Arg Arg Asp Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln		
385	390	395
cac gac tat att gac agt gcg gat att atc ggt tgg acg cgg gaa gga 1248		
His Asp Tyr Ile Asp Ser Ala Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly		
405	410	415
gtg gct gaa aaa gca aat tca gga ctg gct gca ctc att acc gac ggg 1296		
Val Ala Glu Lys Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly		
420	425	430
cct ggc gga agc aaa tgg atg tat gtt gga aaa caa cac gct ggc aaa 1344		
Pro Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Gln His Ala Gly Lys		
435	440	445
acg ttt tat gat tta acc ggc aat cga agt gat aca gtg aca atc aat 1392		
Thr Phe Tyr Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile Asn		

450	455	460	
gct gat gga tgg gga gaa ttt aaa gtc aat gga ggg tct gta tcc ata 1440			
Ala Asp Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile			
465	470	475	480
tgg gtt cca aaa 1452			
Trp Val Pro Lys			
<210> 24			
<211> 484			
<212> PRT			
<213> 芽孢杆菌属菌种			
<400> 24			
Gly Ser Val Pro Val Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr			
1	5	10	15
Leu Pro Asp Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Ala Asn Asn Ala Gln			
	20	25	30
Ser Leu Ala Asn Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala Tyr			
	35	40	45
Lys Gly Thr Ser Ser Ser Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu Tyr			
	50	55	60
Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly			
65	70	75	80
Thr Lys Thr Gln Tyr Ile Gln Ala Ile Gln Ala Ala His Thr Ala Gly			
	85	90	95
Met Gln Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asn His Lys Ala Gly Ala Asp			
	100	105	110
Gly Thr Glu Leu Val Asp Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asp Arg Asn			
	115	120	125
Gln Glu Ile Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe Asp			
	130	135	140
Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr			
145	150	155	160
His Phe Asp Gly Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg Ile			
	165	170	175
Tyr Lys Phe Arg Gly Thr Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp Thr			
	180	185	190
Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Leu Asp Met Asp			
	195	200	205
His Pro Glu Val Val Ser Glu Leu Lys Asn Trp Gly Lys Trp Tyr Val			
210	215	220	



Thr Thr Thr Asn Ile Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile			
225	230	235	240
Lys Tyr Ser Phe Phe Pro Asp Trp Leu Ser Tyr Val Arg Thr Gln Thr			
	245	250	255
Gln Lys Pro Leu Phe Ala Val Gly Glu Phe Trp Ser Tyr Asp Ile Ser			
	260	265	270
Lys Leu His Asn Tyr Ile Thr Lys Thr Asn Gly Ser Met Ser Leu Phe			
	275	280	285
Asp Ala Pro Leu His Asn Asn Phe Tyr Ile Ala Ser Lys Ser Gly Gly			
	290	295	300
Tyr Phe Asp Met Arg Thr Leu Leu Asn Asn Thr Leu Met Lys Asp Gln			
305	310	315	320
Pro Thr Leu Ala Val Thr Leu Val Asp Asn His Asp Thr Glu Pro Gly			
	325	330	335
Gln Ser Leu Gln Ser Trp Val Glu Pro Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr			
	340	345	350
Ala Phe Ile Leu Thr Arg Gln Glu Gly Tyr Pro Cys Val Phe Tyr Gly			
	355	360	365
Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Lys Tyr Asn Ile Pro Ala Leu Lys Ser Lys			
	370	375	380
Leu Asp Pro Leu Leu Ile Ala Arg Arg Asp Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln			
385	390	395	400
His Asp Tyr Ile Asp Ser Ala Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly			
	405	410	415
Val Ala Glu Lys Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly			
	420	425	430
Pro Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Gln His Ala Gly Lys			
	435	440	445
Thr Phe Tyr Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile Asn			
	450	455	460
Ala Asp Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile			
465	470	475	480
Trp Val Pro Lys			
<210> 25			
<211> 1455			
<212> DNA			
<213> 芽孢杆菌属菌种 (Bacillus sp.)			
<220>			
<221> CDS			

&lt;222&gt; (1) .. (1455)

&lt;400&gt; 25

```

gct aat act gca cct att aac gaa aca atg atg caa tat ttt gaa tgg 48
Ala Asn Thr Ala Pro Ile Asn Glu Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp
1           5           10           15
gat tta ccg aac gat gga acc ctt tgg aca aag gtg aaa aat gaa gcc 96
Asp Leu Pro Asn Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Lys Asn Glu Ala
           20           25           30
gca aat ctt tct tct tct ggt att aca gcg tta tgg ctt cct cca gcg 144
Ala Asn Leu Ser Ser Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala
           35           40           45
tat aaa gga aca agt caa agc gat gtc gga tac ggc gtg tac gat tta 192
Tyr Lys Gly Thr Ser Gln Ser Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu
           50           55           60
tat gac ctt ggg gaa ttt aat caa aaa gga acg att cga aca aaa tac 240
Tyr Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Ile Arg Thr Lys Tyr
           65           70           75           80
gga aca aaa aca caa tat att caa gcc atc caa gct gcc aaa gcc gca 288
Gly Thr Lys Thr Gln Tyr Ile Gln Ala Ile Gln Ala Ala Lys Ala Ala
           85           90           95
ggg atg caa gta tat gca gat gtt gtc ttt aat cat aag gcg gga gct 336
Gly Met Gln Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asn His Lys Ala Gly Ala
           100          105          110
gac ggc aca gaa ttt gtc gat gcg gtt gag gta gac cct tct aat cga 384
Asp Gly Thr Glu Phe Val Asp Ala Val Glu Val Asp Pro Ser Asn Arg
           115          120          125
aat caa gaa aca tct gga aca tat caa att caa gca tgg aca aaa ttt 432
Asn Gln Glu Thr Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe
           130          135          140
gat ttt ccc ggt cgg ggg aac aca tac tct agt ttt aaa tgg cgt tgg 480
Asp Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp
           145          150          155          160
tat cat ttt gac ggt acc gat tgg gat gaa agc cga aaa tta aat cgg 528
Tyr His Phe Asp Gly Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg
           165          170          175
att tac aaa ttc cgc agt aca gga aaa gca tgg gac tgg gaa gtc gat 576
Ile Tyr Lys Phe Arg Ser Thr Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp
           180          185          190
aca gaa aac gga aac tat gat tat tta atg ttc gct gat tta gat atg 624

```

```

Thr Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Phe Ala Asp Leu Asp Met
      195                      200                      205
gat cac cct gag gtt gtg aca gaa tta aaa aac tgg gga acg tgg tac 672
Asp His Pro Glu Val Val Thr Glu Leu Lys Asn Trp Gly Thr Trp Tyr
      210                      215                      220
gtc aat act aca aat atc gat gga ttc cgc tta gat gcc gta aaa cat 720
Val Asn Thr Thr Asn Ile Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His
      225                      230                      235                      240
att aaa tac agc ttt ttc cct gac tgg cta aca tat gta cgt aat caa 768
Ile Lys Tyr Ser Phe Phe Pro Asp Trp Leu Thr Tyr Val Arg Asn Gln
      245                      250                      255
aca gga aaa aat tta ttt gcc gtt ggg gaa ttt tgg agc tat gac gtc 816
Thr Gly Lys Asn Leu Phe Ala Val Gly Glu Phe Trp Ser Tyr Asp Val
      260                      265                      270
aat aag ctg cat aat tac att aca aaa aca aat gga tcg atg tca tta 864
Asn Lys Leu His Asn Tyr Ile Thr Lys Thr Asn Gly Ser Met Ser Leu
      275                      280                      285
ttt gat gca cct ttg cat aac aac ttt tat acc gct tcc aaa tcg agt 912
Phe Asp Ala Pro Leu His Asn Asn Phe Tyr Thr Ala Ser Lys Ser Ser
      290                      295                      300
gga tat ttt gac atg cgt tat tta ttg aat aat aca tta atg aaa gat 960
Gly Tyr Phe Asp Met Arg Tyr Leu Leu Asn Asn Thr Leu Met Lys Asp
      305                      310                      315                      320
caa cct tca ctc gct gtg aca ctt gtc gat aac cac gac acg caa cca 1008
Gln Pro Ser Leu Ala Val Thr Leu Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro
      325                      330                      335
ggg caa tct tta cag tca tgg gtc gaa cct tgg ttt aaa cca ctt gct 1056
Gly Gln Ser Leu Gln Ser Trp Val Glu Pro Trp Phe Lys Pro Leu Ala
      340                      345                      350
tac gcc ttt att tta acg aga caa gag gga tat cct tgc gta ttt tac 1104
Tyr Ala Phe Ile Leu Thr Arg Gln Glu Gly Tyr Pro Cys Val Phe Tyr
      355                      360                      365
ggg gac tat tat gga atc ccg aaa tac aat att cca gga tta aaa agc 1152
Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Lys Tyr Asn Ile Pro Gly Leu Lys Ser
      370                      375                      380
aaa atc gac ccg ctt tta att gct cgt cgg gac tat gcc tat gga aca 1200
Lys Ile Asp Pro Leu Leu Ile Ala Arg Arg Asp Tyr Ala Tyr Gly Thr
      385                      390                      395                      400
caa cgt gat tac att gac cat caa gac att att gga tgg aca cgc gaa 1248

```

Gln Arg Asp Tyr Ile Asp His Gln Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu  
 405 410 415  
 ggc att gat aca aaa cca aac tct gga ctg gcg gct tta att acc gac 1296  
 Gly Ile Asp Thr Lys Pro Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp  
 420 425 430  
 ggc cct ggc gga agc aaa tgg atg tat gtc ggt aaa aaa cat gct gga 1344  
 Gly Pro Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Lys His Ala Gly  
 435 440 445  
 aaa gta ttt tat gat tta acc gga aac cga agt gac aca gta acg att 1392  
 Lys Val Phe Tyr Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile  
 450 455 460  
 aat gcg gat ggt tgg gga gaa ttt aaa gta aac gga ggc tcc gtt tcg 1440  
 Asn Ala Asp Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser  
 465 470 475 480  
 att tgg gtg gct aaa 1455  
 Ile Trp Val Ala Lys  
 485

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 485

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 芽孢杆菌属菌种 (Bacillus sp.)

&lt;400&gt; 26

Ala Asn Thr Ala Pro Ile Asn Glu Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp  
 1 5 10 15  
 Asp Leu Pro Asn Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Lys Asn Glu Ala  
 20 25 30  
 Ala Asn Leu Ser Ser Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala  
 35 40 45  
 Tyr Lys Gly Thr Ser Gln Ser Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu  
 50 55 60  
 Tyr Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Ile Arg Thr Lys Tyr  
 65 70 75 80  
 Gly Thr Lys Thr Gln Tyr Ile Gln Ala Ile Gln Ala Ala Lys Ala Ala  
 85 90 95  
 Gly Met Gln Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asn His Lys Ala Gly Ala  
 100 105 110  
 Asp Gly Thr Glu Phe Val Asp Ala Val Glu Val Asp Pro Ser Asn Arg  
 115 120 125  
 Asn Gln Glu Thr Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe

130	135	140
Asp Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp		
145	150	155
Tyr His Phe Asp Gly Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg		
165	170	175
Ile Tyr Lys Phe Arg Ser Thr Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp		
180	185	190
Thr Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Phe Ala Asp Leu Asp Met		
195	200	205
Asp His Pro Glu Val Val Thr Glu Leu Lys Asn Trp Gly Thr Trp Tyr		
210	215	220
Val Asn Thr Thr Asn Ile Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His		
225	230	235
Ile Lys Tyr Ser Phe Phe Pro Asp Trp Leu Thr Tyr Val Arg Asn Gln		
245	250	255
Thr Gly Lys Asn Leu Phe Ala Val Gly Glu Phe Trp Ser Tyr Asp Val		
260	265	270
Asn Lys Leu His Asn Tyr Ile Thr Lys Thr Asn Gly Ser Met Ser Leu		
275	280	285
Phe Asp Ala Pro Leu His Asn Asn Phe Tyr Thr Ala Ser Lys Ser Ser		
290	295	300
Gly Tyr Phe Asp Met Arg Tyr Leu Leu Asn Asn Thr Leu Met Lys Asp		
305	310	315
Gln Pro Ser Leu Ala Val Thr Leu Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro		
325	330	335
Gly Gln Ser Leu Gln Ser Trp Val Glu Pro Trp Phe Lys Pro Leu Ala		
340	345	350
Tyr Ala Phe Ile Leu Thr Arg Gln Glu Gly Tyr Pro Cys Val Phe Tyr		
355	360	365
Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Lys Tyr Asn Ile Pro Gly Leu Lys Ser		
370	375	380
Lys Ile Asp Pro Leu Leu Ile Ala Arg Arg Asp Tyr Ala Tyr Gly Thr		
385	390	395
Gln Arg Asp Tyr Ile Asp His Gln Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu		
405	410	415
Gly Ile Asp Thr Lys Pro Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp		
420	425	430
Gly Pro Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Lys His Ala Gly		
435	440	445

---

Lys	Val	Phe	Tyr	Asp	Leu	Thr	Gly	Asn	Arg	Ser	Asp	Thr	Val	Thr	Ile
450							455					460			
Asn	Ala	Asp	Gly	Trp	Gly	Glu	Phe	Lys	Val	Asn	Gly	Gly	Ser	Val	Ser
465							470				475				480
Ile	Trp	Val	Ala	Lys											
							485								