



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110325636 A

(43)申请公布日 2019.10.11

(21)申请号 201780087051.4

(22)申请日 2017.12.22

(30)优先权数据

16206367.1 2016.12.22 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.08.21

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2017/084452 2017.12.22

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/115473 EN 2018.06.28

(71)申请人 EW营养有限责任公司

地址 德国菲斯贝克

(72)发明人 A·米歇尔斯 A·沙伊迪格

C·埃伦德 C·克拉普 T·霍恩

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 左路 林晓红

(51)Int.Cl.

C12N 9/52(2006.01)

C11D 3/386(2006.01)

A23K 20/189(2006.01)

权利要求书2页 说明书31页

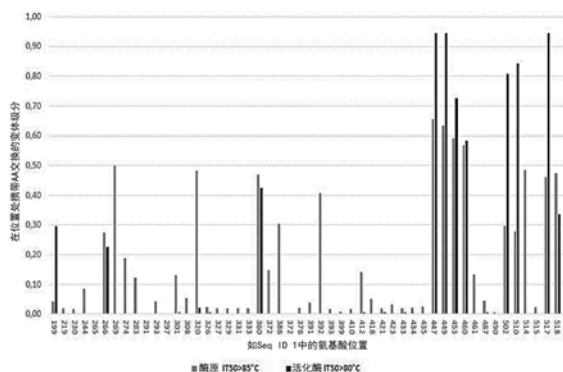
序列表8页 附图5页

(54)发明名称

稳定的蛋白酶变体

(57)摘要

本发明涉及蛋白酶变体,其与同时维持蛋白水解活性的如SEQ ID NO 1-3中任一者所示的Kumamolisin AS主链的全长氨基酸序列,或者其维持蛋白水解活性的片段、级分或改组变体至少90%相同,所述蛋白酶变体展示与以下相比改变或改善的稳定性:如SEQ ID NO 4中所示的Kumamolisin AS野生型,或如SEQ ID NO 1-3中任一者所示的Kumamolisin AS主链。



1. 蛋白酶变体, 其与如SEQ ID NO 1-3中任一者所示的Kumamolisin AS主链的全长氨基酸序列至少90%相同且同时维持蛋白水解活性, 或者其维持蛋白水解活性的片段、级分或改组变体, 所述蛋白酶变体展示与以下相比改变或改善的稳定性:

(i) 如SEQ ID NO 4中所示的Kumamolisin AS野生型, 或

(ii) 如SEQ ID NO 1-3中任一者所示的Kumamolisin AS主链。

2. 蛋白酶变体, 其包含衍生自如SEQ ID NO 1中所示的Kumamolisin AS的氨基酸序列, 或者其维持蛋白水解活性的片段、级分或改组变体, 所述蛋白酶变体在选自以下的SEQ ID NO.1中的一个或多个残基位置处具有一个或多个氨基酸取代: D447、A449、A517、N510、V502、E453、E360、A514、A460、A392、A386、T301、D199、Q518、G266、P553、E269、R412、S435、G320、T326、T461、Q244、D293、A487、V274、A372、K283、T308、A418、I391、A423、A331、S327、I219、M333、A329、N515、A378、S434、E421、A433、S230、Q393、D399、Y490、G281、Y287、R516、A475、S354、S315P、W325、L442、A470、S324、Q361、A190、T196、Q202、E228、A229、A242、D251、S262、N291、L297、H305、D306、V314、A328、I330、L338、A342、A351、D358、G388、D402、V455、E459、A478、K483、Q497、T507、L540、Q542、A548、P551、R166和/或D265。

3. 根据权利要求2的蛋白酶变体, 所述蛋白酶变体展示与以下相比至少一种改变或改善的稳定性:

(iii) 如SEQ ID NO 4中所示的Kumamolisin AS野生型, 或

(iv) 如SEQ ID NO 1-3中任一者所示的Kumamolisin AS主链。

4. 根据权利要求2-3中任一项的蛋白酶变体, 与如SEQ ID NO 1中所示的Kumamolisin AS相比, 所述蛋白酶变体具有选自以下的至少一个氨基酸取代: D447S、A449Y、A517T、N510H、E360L、E360V、E360C、V502C、E453W、A514T、A514Y、A514D、A514S、A460W、A386I、A392V、A392L、A392I、A392M、T301S、D199E、Q518G、P553K、E269M、E269T、E269C、E269H、E269Q、G266A、D293Y、G320A、R412Q、E421R、A487Q、T461V、T461C、A331F、A331Y、A329Q、A329H、A329T、S435I、S435R、S435T、S435V、V274I、A372S、K283L、Q244C、Q244G、T308C、A418W、I391W、A423V、T326R、T326W、T326L、T326K、I219L、S327F、S327L、S327W、M333I、N515G、A378G、S434G、A433G、S230D、Q393S、D399S、Y490W、A190D、T196S、Q202D、E228Q、A229W、A242S、D251S、S262C、G281R、Y287K、N291T、N291S、D293F、L297T、T301C、T301M、H305F、H305W、D306S、V314M、V314L、S315P、G320Q、G320S、S324L、S324R、W325K、A328W、A328D、A328R、A328Y、I330L、M333Y、M333L、L338R、A342R、A351S、S354E、S354Q、D358G、Q361C、Q361L、A386L、A386V、A386M、G388C、D402E、R412M、R412E、R412D、L442W、L442V、D447C、D447A、A449L、A449M、A449E、A449N、E453Y、E453F、V455I、V455L、E459W、A460R、A470V、A475V、A478L、K483A、Q497Y、Q497M、Q497D、Q497R、V502T、T507L、R516L、R516E、R516I、A517S、L540V、Q542H、Q542D、Q542S、A548S、P551N、P551R、P553L、R166I、D265T。

5. 根据前述权利要求中任一项的蛋白酶变体, 与如SEQ ID NO 1或4中所示的Kumamolisin AS主链相比, 所述蛋白酶变体具有至少2个氨基酸取代。

6. 根据前述权利要求中任一项的蛋白酶变体, 所述蛋白酶变体具有选自D447S、A449Y、A517T、N510H、E360L、E360V、E360C、V502C、E453W、A514T、A514Y、A514D、A514S、A460W、A386I的至少一个, 优选至少两个, 更优选至少三个, 更优选至少四个, 更优选至少五个, 最优选至少六个氨基酸取代。

7. 根据前述权利要求中任一项的蛋白酶变体,所述蛋白酶变体具有在如SEQ ID NO 1或4所示的Kumamolisin AS主链中选定的残基处的取代集合,所述集合是下述中的至少一种:

- a) 360、447、449和510
- b) 447、449和514,和/或
- c) 447、449、453和517。

8. 根据前述权利要求中任一项的蛋白酶变体,其中所述改善的稳定性是活化酶或酶原的改善的热稳定性(IT50)。

9. 根据前述权利要求中任一项的蛋白酶变体,所述蛋白酶变体具有 $\geq 75^{\circ}\text{C}$ 至 $\leq 105^{\circ}\text{C}$ 的IT50。

10. 一种核酸分子,其编码根据前述权利要求中任一项的蛋白酶变体。

11. 一种质粒或载体系统,其包含根据权利要求10的核酸分子。

12. 一种组合物,其包含根据前述权利要求中任一项的蛋白酶变体或蛋白酶,所述组合物具有 $\geq 5$ 的pH。

13. 一种饲料添加剂、饲料成分、饲料补充剂和/或饲料,其包含根据前述权利要求中任一项的蛋白酶变体或蛋白酶或组合物。

14. 根据权利要求1-9中任一项的蛋白酶变体或根据权利要求12的组合物用于制造饲料的用途。

15. 一种制备根据前述权利要求中任一项的蛋白酶变体的方法,所述方法包括:

i) 使编码如SEQ ID NO 1-4中任一者所示的Kumamolisin AS氨基酸序列的DNA、cDNA或mRNA诱变

ii) 表达因此获得的一种或多种的Kumamolisin AS突变体,和

iii) 测试所述一种或多种的Kumamolisin AS突变体的稳定性,优选热稳定性。

## 稳定的蛋白酶变体

### 技术领域

[0001] 本发明涉及蛋白酶领域。

### 背景技术

[0002] 蛋白酶目前用于大量工业应用,包括动物饲料、洗涤剂、水果和饮料加工、皮革加工、蛋白质水解产物的生产、硬表面清洁或生物膜清洁、坏死或烧伤组织的治疗以促进伤口愈合和/或食物制备包括烘烤面团制备。

[0003] 在这些应用的许多中,酶的改善稳定性是显著优点。改善的热稳定性帮助增加分别蛋白酶的可加工性,因为后者经常在制造过程期间经历热处理。

[0004] 这尤其应用于在动物饲料中蛋白酶的使用,在其中它们帮助改善饲料的消化率和营养利用。

[0005] 在饲料加工过程中,饲料经常经受例如通过应用蒸汽的加热,以减少或消除病原体,增加饲料的贮存寿命和优化的成分利用,导致改善的饲料转化率。条件化时间可以从几秒直到几分钟不等,取决于饲料的类型和配方。在条件化期间的温度通常范围为70℃至100℃。在条件化后,有时将进料挤出通过造粒模具,由于通过摩擦引起的散热,所述造粒模具在短时间内逐渐升高进料的温度。

[0006] 然而在其它应用中,蛋白酶也暴露于热。这包括用于洗涤剂(例如在衣物洗涤过程中暴露于热水)、水果和饮料加工(在挤压过程中的热暴露或者由于巴氏灭菌或灭菌)、皮革加工、蛋白质水解产物的生产、硬表面清洁或生物膜清洁、坏死或烧伤组织的治疗以促进伤口愈合、组织工程中的加工助剂(灭菌和朊病毒蛋白的变性)和/或食物制备包括烘焙面团制备。

[0007] 因为蛋白酶是蛋白质,所以它们对通过热和压力的变性敏感。变性基本上改变酶的结构,导致酶的活性水平降低和功效降低。

[0008] 存在改善蛋白酶稳定性或保护蛋白酶免受热影响的不同方法。在动物饲料应用中,一种选项是形成团块后的液体应用,其是相对复杂且昂贵的,因为它需要专门设备的购买和安装,在其中贮存液体酶的空间以及应用的酶量的仔细计算。

[0009] 另一种选项是在用其它成分(例如在饲料或洗涤剂中)的蛋白酶造粒之前应用保护性涂层。这种方法可能降低酶的功效,因为涂层可能不完全溶解例如在洗涤介质或动物的消化道中。此外,难以实现这样的涂层设计,其可以承受造粒过程的高热和水分含量,但随后在较低温度和较高湿度条件下溶解例如在动物的肠道或洗衣机中。

[0010] 另一种选项是使用本质上热稳定的蛋白酶。这些蛋白酶衍生自嗜热和超嗜热生物,并且具有独特的高热稳定性结构和功能特性。然而,这些蛋白酶可能受到其它限制,例如亚最佳活性、特异性、生物利用度、pH范围或可加工性。

[0011] 因此,本发明的一个目的是提供稳定的蛋白酶变体,其并未受到上文讨论的限制的影响。

## 发明内容

[0012] 根据本发明的独立权利要求的方法和手段满足了这些目的和进一步目的。从属权利要求涉及具体实施方案。

## 具体实施方式

[0013] 在详细描述本发明之前,应理解本发明并不限于所述装置或组合物的特定组成部分或结构特征,或所述方法的加工步骤,因为此类装置和方法可以变化。还应理解,本文使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,而不预期是限制性的。在相互不同的从属权利要求中叙述某些措施的仅有事实并不指示这些措施的组合不能用于获益。权利要求中的任何参考标记不应被解释为限制范围。必须注意,如说明书和所附权利要求中所使用的,单数形式“一个”、“一种”和“该/所述”包括单数和/或复数指示物,除非上下文另有明确说明。此外,在权利要求中,词语“包括”不排除其它元件或步骤。

[0014] 此外,应理解,在给出由数值界定的参数范围的情况下,范围被认为包括这些限制值。

[0015] 进一步应理解,本文公开的实施方案并不意味着理解为彼此不相关的各个实施方案。与一个实施方案一起讨论的特征也意味着与本文所示的其它实施方案结合进行公开。在一种情况下,如果没有与一个实施方案而是另一个实施方案一起公开具体特征,则技术人员将理解,并不一定意味着所述特征不意味着与所述其它实施方案一起公开。技术人员将理解,本申请的要点在于还对于其它实施方案公开所述特征,而是仅为了清楚起见并且将规范保持在可管理的体积中,这尚未完成。

[0016] 根据本发明的一个实施方案,提供了蛋白酶变体,其与如SEQ ID NO 1-3中任一者所示的Kumamolisin AS主链的全长氨基酸序列至少90%相同,或者其维持蛋白水解活性的片段、级分或改组变体。蛋白酶变体展示与以下相比改变或改善的稳定性

[0017] (i) 如SEQ ID NO 4中所示的Kumamolisin AS野生型,或

[0018] (ii) 如SEQ ID NO 1-3中任一者所示的Kumamolisin AS主链。

[0019] 术语“改组变体(shuffled variant)”涉及此类片段或级分与来自其它同源酶的一个或多个片段的组合,只要此类组合维持蛋白水解活性。

[0020] 术语“同源酶”描述了属于与Kumamolisin相同的结构折叠的酶和至少40%的序列相同性。该类别涵盖如本文下文所讨论的Sedolisin。

[0021] Kumamolisin AS的一些突变体已得到描述。已讨论了Kumamolisin AS的N291D突变株的发现,以提供针对乳糜泻的有用治疗。存在建议创造遗传修饰生物的许多提议,所述遗传修饰生物可以在人的胃肠道中产生N291D Kumamolisin AS蛋白。参见美国申请US 20140178355A1。

[0022] 优选地,根据本发明的Kumamolisin AS变体具有93%的相同性,更优选95%的相同性,更优选98%的相同性,最优选99%的相同性。

[0023] 术语“Kumamolisin”指来自肽酶的Sedolisin家族的酸性蛋白酶,也称为S53 (MEROPS Accession MER000995,还参见Wlodawer等人,2003),其包含酸作用内肽酶和三肽基肽酶。Sedolisin是具有酸性最适pH的内肽酶,其在对通过胃蛋白酶的抑制抗性方面不同于大多数内肽酶(Terashita等人,1981;Oda等人,1998)。

[0024] Sedolisin的活化涉及在低于pH 6.5的pH下的自催化切割,更好地低于pH 3.5(还参见专利申请EP16176044和Okubo等人,2016),其释放一种或多种肽以递送成熟和活性形式。在碱性、中性和弱酸性条件下抑制所述自催化切割。

[0025] Sedolisin包含具有Glu、Asp和Ser的催化三联体,其在根据SEQ ID NO 1的Kumamolisin AS中位于位置Glu267、Asp271和Ser278中。Ser残基是在枯草杆菌蛋白酶(MEROPS家族S8)的催化三联体Asp、His、Ser三联体中与Ser等价的亲核体,并且三联体的Glu是关于枯草杆菌蛋白酶中的His一般碱基的功能性取代,尽管不是在结构等价物位置中。

[0026] Sedolisin的蛋白质折叠明显与枯草杆菌蛋白酶的那种相关,并且两组有时被称为丝氨酸蛋白酶。然而,Sedolisin具有另外的环。氨基酸序列与枯草杆菌蛋白酶并非紧密相似,并且这连同完全不同的活性位点残基以及所得到的较低pH值用于最大活性一起证明了分开的家族。

[0027] 在一个实施方案中,提供了蛋白酶变体,其包含衍生自如SEQ ID NO.1中所示的Kumamolisin AS的氨基酸序列,或者其维持蛋白水解活性的片段、级分或改组变体,所述蛋白酶变体在选自以下的SEQ ID NO.1中的一个或多个残基位置处具有一个或多个氨基酸取代:D447、A449、A517、N510、V502、E453、E360、A514、A460、A392、A386、T301、D199、Q518、G266、P553、E269、R412、S435、G320、T326、T461、Q244、D293、A487、V274、A372、K283、T308、A418、I391、A423、A331、S327、I219、M333、A329、N515、A378、S434、E421、A433、S230、Q393、D399、Y490、G281、Y287、R516、A475、S354、S315P、W325、L442、A470、S324、Q361、A190、T196、Q202、E228、A229、A242、D251、S262、N291、L297、H305、D306、V314、A328、I330、L338、A342、A351、D358、G388、D402、V455、E459、A478、K483、Q497、T507、L540、Q542、A548、P551、R166和/或D265。

[0028] 注意,虽然上述编号指SEQ ID NO 1或4(其是几乎相同的,其中4是野生型,且1是用于诱变的实际主链,两者之间的差异是N末端AA残基),但请求保护的蛋白酶可以是其维持蛋白水解活性的片段、级分或改组变体。在此类情况下,所得到的氨基酸序列短于SEQ ID NO 1或4的那种,而突变残基的编号仍指SEQ ID NO 1或4的全长,并且必须分别转变为较短形式的编号。

[0029] 在一个实施方案中,蛋白酶变体展示与以下相比改变或改善的稳定性,

[0030] (i) 如SEQ ID NO 4中所示的Kumamolisin AS野生型,或

[0031] (ii) 如SEQ ID NO 1-3中任一者所示的Kumamolisin AS主链。

[0032] 在一个实施方案中,与如SEQ ID NO 1或4中所示的Kumamolisin AS相比,蛋白酶变体具有选自以下的至少一个氨基酸取代:D447S、A449Y、A517T、N510H、E360L、E360V、E360C、V502C、E453W、A514T、A514Y、A514D、A514S、A460W、A386I、A392V、A392L、A392I、A392M、T301S、D199E、Q518G、P553K、E269M、E269T、E269C、E269H、E269Q、G266A、D293Y、G320A、R412Q、E421R、A487Q、T461V、T461C、A331F、A331Y、A329Q、A329H、A329T、S435I、S435R、S435T、S435V、V274I、A372S、K283L、Q244C、Q244G、T308C、A418W、I391W、A423V、T326R、T326W、T326L、T326K、I219L、S327F、S327L、S327W、M333I、N515G、A378G、S434G、A433G、S230D、Q393S、D399S、Y490W、A190D、T196S、Q202D、E228Q、A229W、A242S、D251S、S262C、G281R、Y287K、N291T、N291S、D293F、L297T、T301C、T301M、H305F、H305W、D306S、

V314M、V314L、S315P、G320Q、G320S、S324L、S324R、W325K、A328W、A328D、A328R、A328Y、I330L、M333Y、M333L、L338R、A342R、A351S、S354E、S354Q、D358G、Q361C、Q361L、A386L、A386V、A386M、G388C、D402E、R412M、R412E、R412D、L442W、L442W、D447C、D447A、A449L、A449M、A449E、A449N、E453Y、E453F、V455I、V455L、E459W、A460R、A470V、A475V、A478L、K483A、Q497Y、Q497M、Q497D、Q497R、V502T、T507L、R516L、R516E、R516I、A517S、L540V、Q542H、Q542D、Q542S、A548S、P551N、P551R、P553L、R166I、D265T。

[0033] 这些个别的氨基酸取代显示于表1中。注意,虽然上述编号指SEQ ID NO 1或4,但请求保护的蛋白酶可以是其维持蛋白水解活性的片段、级分或改组变体。在此类情况下,所得到的氨基酸序列短于或长于SEQ ID NO 1或4的那种,而突变残基的编号仍指SEQ ID NO 1或4的全长。

[0034] 在本发明的一个实施方案中,与SEQ ID NO 1或4中所示的Kumamolisin AS相比,蛋白酶变体具有至少一个氨基酸取代,所述取代选自以下:

- [0035] • A517T或A517S
- [0036] • A514S、A514T或A514D
- [0037] • N510H
- [0038] • V502C
- [0039] • A449Y、A449N或较不优选的A449E
- [0040] • D447S或D447C
- [0041] • A392I、A392L、A392V或A392M
- [0042] • E360L、E360V或E360C
- [0043] • E269H、E269T、E269M、E269C或E269Q
- [0044] • Q518G
- [0045] • G320Q、G320A或较不优选的G320S
- [0046] • A386I、A386L、A386V或A386M
- [0047] • G266A
- [0048] • A372S
- [0049] • E453Y、E453W或较不优选的E453F
- [0050] • A460W
- [0051] • A329Q、A329H或A329T
- [0052] • D293Y
- [0053] • R412E、R412D、R412Q或R412M
- [0054] • T301S
- [0055] • D199E
- [0056] • A331F或A331Y
- [0057] • S435T、S435R或S435I
- [0058] • V274I
- [0059] • D399S
- [0060] • S230D
- [0061] • S434G

- [0062] • M333I或M333L
- [0063] • N515G
- [0064] • A418W
- [0065] • I391W
- [0066] • E421R
- [0067] • A487Q
- [0068] • A378G
- [0069] • A423V
- [0070] • T326K、T326L、T326R或T326W
- [0071] • A433G
- [0072] • D399S
- [0073] • Y490W
- [0074] • R516E或R516I
- [0075] • P553K
- [0076] • V314L
- [0077] • S327W、S327L或S327FA475V
- [0078] • A342R
- [0079] • S354E或S354Q
- [0080] • S315P

[0081] 当如SEQ ID NO 1或4中所示个别引入Kumamolisin AS内时,这些取代中的一些引起高 $\Delta$ IT50,并且因此是优选的,而其它在表2a、2b和4以及一些组合的组合和不同克隆中具有高发生率,其具有含有高总体 $\Delta$ IT50的个别取代的组合。

[0082] 一些可以可互换地用于稳定酶,并且一些组合导致与饲料中的生产或性能相关的其它性状,如发酵滴度、作为蛋白酶抑制剂的抗营养因子的水解(大豆Bowman-Birk和Kunitz型胰蛋白酶和/或胰凝乳蛋白酶抑制剂)、pH概况、pH和胃蛋白酶稳定性、或针对较高离子强度的稳定性和在较高离子强度下的性能。

[0083] 注意,虽然上述编号指SEQ ID NO 1或4,但请求保护的蛋白酶可以是其维持蛋白水解活性的片段、级分或改组变体。在此类情况下,所得到的氨基酸序列短于SEQ ID NO1或4的那种,而突变残基的编号仍指SEQ ID NO 1或4的全长。

[0084] 在本发明的一个实施方案中,与如SEQ ID NO 1或4中所示的Kumamolisin AS主链相比,蛋白酶变体具有至少两个氨基酸取代。优选地,蛋白酶变体具有选自所述组的至少三个,更优选至少四个,更优选至少五个,且最优选至少六个氨基酸取代。优选地,这些氨基酸取代是上文讨论的各个取代的组合。

[0085] 在本发明的一个实施方案中,与如SEQ ID NO 1或4中所示的Kumamolisin AS主链相比,蛋白酶变体具有至少两个氨基酸取代,至少2个氨基酸取代位于选自以下的SEQ ID NO 1或4中的两个或更多个残基位置处:447和449、453、502、510、517、360、460、199、266、301、386和514。优选地,蛋白酶变体具有选自所述组的至少三个,更优选至少四个,更优选至少五个,且最优选至少六个氨基酸取代。

[0086] 在一个优选实施方案中,蛋白酶变体具有选自以下的至少一个,优选至少两个,更



优选至少三个,更优选至少四个,更优选至少五个,且最优选至少六个氨基酸取代:D447S、A449Y、A517T、N510H、E360L、E360V、E360C、V502C、E453W、A514T、A514Y、A460W、A386I、D199E、G266A、T301S。

[0087] 表2a、2b和4显示了此类所谓的“不同克隆”或“组合克隆”的集合,其具有上文阐述的各个突变的组合。

[0088] 如本文使用的,术语“组合的克隆或变体”意指从重组文库中筛选的克隆或变体。此类重组文库含有携带不同量和选自表1的突变的群体。

[0089] 如本文使用的,术语“不同的克隆或变体”意指合理方法中构建的A克隆,其含有选自表1的确定的突变集合。

[0090] 优选地,根据本发明的蛋白酶变体具有的所述改善的稳定性是改善的热稳定性(IT50)。酶的热稳定性通常通过测量失活温度(IT50)来确定。“失活温度”定义为在其下温育一定持续时间且随后冷却至室温后酶的残留活性为在室温下在相同条件下温育相同持续时间的相同酶的残留活性的50%。

[0091] 根据一个实施方案,蛋白酶变体具有在如SEQ ID NO 1或4中所示的KumamolisinAS主链中选定的残基处的取代集合,所述集合是下述中的至少一个:

[0092] a) 360、447、449和510

[0093] b) 447、449和514,和/或

[0094] c) 447、449、453和517。

[0095] 这三个同时取代的残基集合出现在三个特定不同克隆或组合克隆的集合中,其是特别优选的(共有突变)。参见表2a/图3、表2b/图4和表4/图5。出于这些原因,当涉及稳定性的改善时,这些同时取代的残基集合似乎是特别协同作用的。

[0096] 根据一个实施方案,所述改善的稳定性是活化酶或酶原的改善的热稳定性(IT50)。在一个实施方案中,蛋白酶变体具有 $\geq 75$ 至 $\leq 105^{\circ}\text{C}$ 的IT50。

[0097] 在一些实施方案中,对于活化酶,提供了 $\geq 70$ 至 $\leq 90^{\circ}\text{C}$ 的IT50,而对于酶原,提供了 $\geq 80$ 至 $\leq 105^{\circ}\text{C}$ 的IT50。

[0098] Kumamolisin AS野生型酶作为酶原,即无活性的酶原具有 $79,6^{\circ}\text{C} \pm 0,4^{\circ}\text{C}$  ( $n=46$ )的IT50,并且作为活化酶具有 $59^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  ( $n=10$ )的IT50。在本说明书的内容中,不同变体的特征在于其IT50或 $\Delta$ IT50(即与野生型IT 50相比的差异)。

[0099] 根据本发明的另一个实施方案,提供了编码根据上文描述的蛋白酶变体的核酸分子。此外,提供了包含所述核酸分子的质粒或载体系统,以及提供了用所述质粒或载体转化和/或包含所述核酸分子的宿主细胞。

[0100] 此外,提供了用于产生蛋白酶或蛋白酶变体的方法,所述方法涵盖:

[0101] a) 培养所述宿主细胞,和

[0102] b) 从所述宿主细胞中分离蛋白酶或蛋白酶变体,或者从培养基中收获蛋白酶或蛋白酶变体。

[0103] 根据本发明的另一个实施方案,提供了包含根据上文描述的蛋白酶变体的组合物,所述组合物具有 $\geq 5$ 的pH。

[0104] 此类组合物一般在EP申请号16176044.2-1375和以后要求其优先权的申请中讨论-而不是本文公开的特定蛋白酶变体-所述申请的内容通过引用并入本文。

[0105] 根据本发明的另一个实施方案,提供了包含根据上文描述的蛋白酶变体或组合物的饲料添加剂、饲料成分、饲料补充剂和/或饲料。

[0106] 此外,提供了根据上文描述的蛋白酶变体用于制备饲料的用途。

[0107] 此类饲料添加剂、饲料成分、饲料补充剂和/或饲料优选意指用于单胃家禽、猪、鱼和水产养殖,在其中它帮助增加蛋白质从饲料中的消化和吸收,加上对于动物健康或消化有害的蛋白质化合物的降解。

[0108] 此外,根据上文描述的蛋白酶的用途对于选自以下的至少一种目的或试剂提供:

- [0109] • 洗涤剂
- [0110] • 水果和饮料加工
- [0111] • 皮革加工
- [0112] • 蛋白质水解产物的生产
- [0113] • 硬表面清洁或生物膜清洁
- [0114] • 坏死或烧伤组织的治疗,以促进伤口愈合,
- [0115] • 组织工程中的加工助剂和/或
- [0116] • 食物制备包括烘烤面团制备。

[0117] 同样地,提供了用于选自以下的一种目的或试剂的添加剂、成分或试剂:

- [0118] • 洗涤剂
- [0119] • 水果和饮料加工
- [0120] • 皮革加工
- [0121] • 蛋白质水解产物的生产
- [0122] • 硬表面清洁或生物膜清洁
- [0123] • 坏死或烧伤组织的治疗,以促进伤口愈合,
- [0124] • 组织工程中的加工助剂和/或
- [0125] • 食物制备包括烘烤面团制备,

[0126] 所述添加剂、成分或试剂包含根据上文描述的组合物。

[0127] 此外,提供了根据上文描述生成蛋白酶变体的方法,所述方法包括:

[0128] i) 使编码如SEQ ID NOs 1-4中任一者所示的Kumamolisin AS氨基酸序列的DNA、cDNA或mRNA诱变,

[0129] ii) 表达因此获得的一种或多种Kumamolisin AS的突变体,和

[0130] iii) 对于至少稳定性,优选热稳定性,测试一种或多种Kumamolisin AS的突变体。

[0131] 优选地,在所述方法中,测定一种或多种Kumamolisin AS的变体的编码核酸序列和/或氨基酸序列。为此目的,可以使用来自现有技术的常规方法。

[0132] 实验和附图

[0133] 虽然已在附图和前文描述中详细示出且描述了本发明,但此类图示和描述应被视为说明性或示例性的而非限制性的;本发明并不限于所公开的实施方案。根据附图、公开内容和所附权利要求的研究,本领域技术人员在实践本发明时可以理解且实现所公开实施方案的其它变化。任何参考标记都不应被解释为限制范围。

[0134] 本文公开的所有氨基酸序列都从N末端到C末端显示;本文公开的所有核酸序列都显示为5'→3'。

[0135] 1.Kumamolisin AS主链的氨基酸序列

[0136] SEQ ID NO 1显示本文使用的Kumamolisin AS主链的前酶(前肽加上酶,本文也称为酶原)序列。重要的是要理解,虽然Kumamolisin AS的野生型序列具有N末端M残基,但本文使用的Kumamolisin AS主链缺乏所述M,因为后者替换为以后被切割掉的信号序列。此类信号序列是例如sacB信号肽MNIKKFAKQATVLTFTTALLAGGATQAF A。

[0137] 在SEQ ID NO 1中,前肽因此包含AA2-189(前者缺乏的N末端M在SEQ ID NO的编号中仍被视为AA NO 1),并且该酶包含AA 190-553:

SDMEKPWKE	GEEAVLQG	HARAPQAV	DKGPVAGDER	MAVTVLRRQ	RAGELAAHVE	60
RQAIAIPHAR	EHLKREAF A	SHGASLDDFA	ELRRFADAHG	LALDRANVAA	GTAVLSGPVD	120
AINRAFGVEL	RHFDHPDGSY	RSYLGEVTV	ASIAPMIEAV	LGLDTRPVAR	PHFRMQRRAE	180
GGFEARSQAA	APTAYTPLDV	AQAYQFPEGL	DGQGQCIAI	ELGGGYDEAS	LAQYFASLGV	240
PAPQVVSVS	DGASNQPTGD	PSGPDGEVEL	DIEVAGALAP	GAKFAVYFAP	NTDAGFLDAI	300
TTAIHDPILK	PSVVSISWGG	PEDSWTSAAI	AAMNRAFLDA	AALGVTVLAA	AGDSGSTDGE	360
QDGLYHVDFF	AASPYVLACG	GTRLVASGGR	IAQETVWNDG	PDGGATGGGV	SRI FPLPAWQ	420
EHANVPPSAN	PGAS SGRGVP	DLAGNADPAT	GYEVVI DGEA	TVIGGTSAVA	PLFAALVARI	480
NQKLKAVGY	LNPTLYQLPA	DVFHDI TEGN	NDIANRAQIY	QAGPGWDPCT	GLGS PIGVRL	540
LQALLPSASQ	PQP	553				

[0139] 前肽为灰色阴影。催化三联体SED(=Ser/Glu/Asp)由E267、D271和S467组成,以斜体显示。其中本发明人已发现导致改变/改善特性的突变的位置是加下划线的。

[0140] 2.Kumamolisin AS主链的氨基酸序列加上前导序列和His标签

[0141] 在SEQ ID NO 2中,sacB前导序列包含AA 1-29(波浪下划线),并且替换前肽的原始N末端M。前肽(灰色阴影)包含AA 30-217,活化酶包含AA 218-581,且His-标签包含AA 582-587(双下划线)。

MNIKKFAKQA	TVLTFTTALL	AGGATQAFAS	DMEKPWKEGE	EARAVLQGH A	RAQAPQAVDK	60
GPVAG DERMA	VTTVLRRQRA	GELAAHVERQ	AAIAPHAREH	LKREAF AASH	GASLDDFAEL	120
RRFADAHGLA	LDRANVAAGT	AVLSGPVDAI	NRAFGVELRH	FDHPDGSYRS	YLGEVTVPAS	180
IAPMIEAVLG	LDTRPVARPH	FRMQRR AEGG	FEARSQAAAP	TAYTPLDVAQ	AYQFPEGLDG	240
QGQCIAI IEL	GGGYDEASLA	QYFASLG VPA	PQVVSVSVDG	ASNQPTGDPS	GPDGEVELDI	300
EVAGALAPGA	KFAVYFAPNT	DAGFLDAITT	AIHDPILKPS	VVSISWGGPE	DSWTSAAIAA	360
MNRAFLDAAA	LGVTVLAAAG	DSGSTDGEQD	GLYHVDFFPAA	SPYVLACGGT	RLVASGGRIA	420
QETVWNDGPD	GGATGGGVSR	IFPLPAWQEH	ANVPPSANPG	ASSGRGVPDL	AGNADPATGY	480
EVVIDGEATV	IGGTSAVAPL	FAALVARINQ	KLGKAVGYLN	PTLYQLPADV	FHDITEGNND	540
IANRAQIYQA	GPGWDPCTGL	GSPIGVRL LQ	ALLPSASQPQ	PHHHHHH	587	

[0143] 3.缺少前肽的活化的Kumamolisin AS主链的氨基酸序列

[0144] 在SEQ ID NO 3中,活化的Kumamolisin AS主链酶以AA 1-364显示:

AAPTAYTPLD	VAQAYQFPEG	LDGQGQCIAI	IELGGGYDEA	SLAQYFASLG	VPAPQVVSVS	60
VDGASNQPTG	DPSGPDGEVE	LDIEVAGALA	PGAKFAVYFA	PNTDAGFLDA	ITTAIHDPIL	120
KPSVVSISWG	GPEDSWTSAA	IAAMNRAFLD	AAALGVTVLA	AAGDSGSTDG	EQDGLYHVDF	180
PAASPYVLAC	GGTRLVASGG	RIAQETVWND	GPDGGATGGG	VSRIFFPLPAW	QEHANVPPSA	240
NPGASSGRGV	PDLAGNADPA	TGYEVVIDGE	ATVIGGTSAV	APLFAALVAR	INQKLKAVG	300
YLNPTLYQLP	ADVFDHITEG	NNDIANRAQI	YQAGPGWDPC	TGLGSPIGVRL	LQALLPSAS	360
QPQP	364					

[0146] 4.Kumamolisin AS野生型的氨基酸序列

[0147] SEQ ID NO 4显示了如从嗜酸热异养菌(*Alicyclobacillus sendaiensis*) (GenBank:AB085855.1)获得的Kumamolisin AS野生型的前酶(前肽加上酶)序列。SEQ ID NO 4与SEQ ID NO 1不同,所述SEQ ID NO 1显示本文使用的Kumamolisin AS主链的序列,因为后者缺乏野生型SEQ ID No 4中仍存在的N末端M。这是因为N末端M在SEQ ID No 1中替换为sacB信号序列,其以后被切割掉。在SEQ ID NO 4中,前肽包含AA1-189,并且酶包含AA 190-553:

[0148]

MSDMEKPWKE	GEEARAVLQG	HARAQAPQAV	DKGPVAGDER	MAVTTVLRRQ	RAGELAAHVE	60
RQAATAPHAR	EHLKREAFAA	SHGASLDDFA	ELRRFADAHG	LALDRANVAA	GTAVLSGPVD	120
AINRAFGVEL	RHFDHPDGSY	RSYLGEVTVP	ASIAPMIEAV	LGLDTRPVAR	PHFRMQRRAE	180
GGFEARSQAA	APTAYTPLDV	AQAYQFPEGL	DGQGQCIAT I	ELGGGYDEAS	LAQYFASLGV	240
PAPQVVSVSV	DGASNQPTGD	PSGPDGEVEL	DIEVAGALAP	GAKFAVYFAP	NTDAGFLDAI	300
TTAIHDPTLK	PSVVSISWGG	PEDSWTSAAI	AAMNRAFLDA	AALGVTVLAA	AGDSGSTDGE	360
QDGLYHVDFF	AASPYVLACG	GTRLVASGGR	IAQETVWNDG	PDGGATGGGV	SRIFPLPAWQ	420
EHANVPPSAN	PGASSGRGVP	DLAGNADPAT	GYEVVIDGEA	TVIGGTSAVA	PLFAALVARI	480
NQKLKGAVGY	LNPTLYQLPA	DVFHDITEGN	NDIANRAQIY	QAGPGWDPCT	GLGSPIGVRL	540
LQALLPSASQ	PQP					553

[0149] 再者,前肽为灰色阴影。催化三联体SED(=Ser/Glu/Asp)由E267、D271和S467组成,以斜体显示。

[0150] 附图简述

[0151] 图1显示了对于酶原和活化酶的热稳定性优化的变体中突变的分布。

[0152] 图2显示了离子强度对WT以及来自表4的顶部变体#1至#7的稳定性和性能的作用。

[0153] 图3-5显示了在不同克隆和组合克隆的不同集合中的AA位置处的取代的出现。

[0154] 实施例1:蛋白酶活性测定

[0155] 蛋白酶活性测定在微量滴定板中进行

[0156] a) AAPF测定96孔甲酸盐

[0157] 测定缓冲液:以pH 3的200mM乙酸钠、1mM CaCl<sub>2</sub>、0.01% Triton X-100取决于实验

[0158] 底物储备溶液:在无水DMSO中100mM

[0159] 底物工作溶液:在测定缓冲液中1:50稀释的底物储备溶液,

[0160] 执行:将50μL稀释的样品装载到Nunc 96透明平底板的孔内。在含有对应于样品的体积活性的0.01% Triton-X100的水中进行稀释。通过添加50μL底物工作溶液起始反应。通过监测在410nm处的吸附中的增加作为酶促活性的量度,在37℃下测量动力学。通过用具有已知蛋白水解活性的主链的参考酶制剂构建校准曲线来计算活性,所述已知蛋白水解活性通过参考方法测量。

[0161] 为了测定在不同pH值下的蛋白酶活性,使用各200mM的下述缓冲液:pH 2.0-3.0的甘氨酸/HCL,3.0至6.0的柠檬酸三钠/柠檬酸,6.0至7.5的Tris/马来酸。

[0162] b) IT<sub>50</sub>

[0163] IT<sub>50</sub>定义了在上述条件下50%活性失活的温度。虽然并不等价,但它是应用中的热稳定性的量度,例如,造粒条件或洗涤剂应用或者餐具洗涤或者织物或硬表面清洁和其它技术应用中的条件。

[0164] 在预测条件下酶变体的筛选是必要的。对于蛋白酶如本文所述的那些,通过也如本文所述的方法筛选热更稳定的变体可以受蛋白酶的自水解的影响。如已经在专利申请EP16176044实施例9中描述的,在其中蛋白酶活性的条件下筛选具有较高热稳定性的变体导致大量假阳性,这是热失活和自水解的混合效应的结果。相同的申请教导在不存在小分子可逆酶抑制剂的情况下避免这个问题,如本文所述的酸性蛋白酶类别的情况,通过以下文描述的方式以失活酶酶原的形式执行关于酶和酶变体的热稳定性的测试。

[0165] 测定缓冲液:50mM磷酸钠,0,25mM  $\text{CaCl}_2$  pH6.5 800mM甘氨酸/HCl pH2.8

[0166] 执行热失活:在磷酸钾缓冲液中对应于体积活性稀释样品。检查最终溶液的pH以高于pH 6.3。根据PCR机器的温度梯度的方向,将样品以每孔20 $\mu\text{L}$ 重复转移到384孔PCR板内。将板用粘合剂或热熔覆盖箔密封,并且在具有预期IT50值约 $\pm 12^\circ\text{C}$ 的温度梯度的热梯度循环仪上温育10分钟。将样品冷却至 $8^\circ\text{C}$ ,然后如下用AAPF-pNA测量样品的残留活性。将来自温度温育板的各15 $\mu\text{L}$ 的样品转移到384孔greiner透明平底PS-微孔板中,并加入9 $\mu\text{L}$ 甘氨酸缓冲液,以在 $37^\circ\text{C}$ 下的1小时温育期间活化蛋白酶。在蛋白酶活化后,通过加入24 $\mu\text{L}$ 的AAPF-pNA溶液(具有0.01% Triton-X100的水中的2mM AAPF-pNA)起始测定,并且通过遵循在 $37^\circ\text{C}$ 下的动力学测量活性。关于在失活温度下的残留活性的标准化实验数据拟合到四参数逻辑函数,以评估IT50。

[0167] c) 不含前肽的IT50-活化的酶蛋白:

[0168] 执行在热失活之前的酶活化。如2b)中所述,对应于甘氨酸缓冲液pH 2.8中的体积活性稀释样品,并且pH检查为等于或低于pH 4.0。通过在 $37^\circ\text{C}$ 下的1小时温育来活化样品。在温育后,通过在50mM磷酸钠缓冲液pH 8.0中将样品1:3稀释,将pH设定为高于7.0。执行活化酶蛋白的热失活。根据PCR机器的温度梯度的方向,将活化酶蛋白的等分试样以每孔20 $\mu\text{L}$ 重复转移到384孔PCR板内。将板用粘合剂或热熔覆盖箔密封,并且在具有预期IT50值约 $\pm 12^\circ\text{C}$ 的温度梯度的热梯度循环仪上温育10分钟。将样品冷却至 $8^\circ\text{C}$ ,然后如下用AAPF-pNA测量样品的残留活性。将来自温度温育板的各15 $\mu\text{L}$ 的样品转移到384孔greiner透明平底PS-微孔板中,并加入9 $\mu\text{L}$ 甘氨酸/HCl缓冲液,以将pH调整至3.0。通过加入24 $\mu\text{L}$ 的AAPF-pNA溶液(具有0.01% Triton-X100的水中的2mM AAPF-pNA)起始测定,并且通过遵循在 $37^\circ\text{C}$ 下的动力学测量活性。关于在失活温度下的残留活性的标准化实验数据拟合到四参数逻辑函数,以评估IT50。

[0169] d) pH概况-活化的酶蛋白

[0170] 含有酶蛋白的未稀释的细菌上清液用1M HCl滴定至pH 4,并且将酶在 $37^\circ\text{C}$ 下活化60分钟。将20 $\mu\text{L}$ 样品加入具有pH 1.8-7.0的200 $\mu\text{L}$  Britton Robinson缓冲液中(用NaCl调整至15mS/cm的电导率)。然后将20 $\mu\text{L}$ 转移到384孔Greiner平底PS-微孔板加上20 $\mu\text{L}$ 底物溶液(具有0.01% Triton-X100的水中的2mM AAPF-pNA)内,并且通过监测在410nm和 $37^\circ\text{C}$ 下的动力学来测量活性,如实施例1a)中所述。每个动力学实验一式四份运行。

[0171] e) pH/胃蛋白酶抗性

[0172] 含有酶蛋白的未稀释的细菌上清液用1M HCl滴定至pH 2.5。然后将90 $\mu\text{L}$ 转移到Nunc 96孔透明平底微量滴定板中。将10 $\mu\text{L}$ 在pH 2.5缓冲液中的250 $\mu\text{g/mL}$ 胃蛋白酶储备溶液(在测定中的最终浓度25 $\mu\text{g/mL}$ )或pH 2.5缓冲液加入每个孔中,然后在 $37^\circ\text{C}$ 下温育30分钟。最后,向每个孔中加入5 $\mu\text{L}$  100 $\mu\text{M}$  Pepstatin溶液(最终浓度5 $\mu\text{M}$ ),以停止胃蛋白酶反

应。将25 $\mu$ l样品转移到新的Nunc 96孔透明平底微量滴定板中的175 $\mu$ l甘氨酸/HCl缓冲液pH 3.0中。然后将20 $\mu$ L转移到384孔Greiner平底PS-微孔板加上20 $\mu$ l底物溶液(具有0.01% Triton-X100的水中的2mM AAPF-pNA)内,并且通过监测在410nm和37 $^{\circ}$ C下的动力学来测量活性,如实施例1a)中所述。每个动力学实验一式四份运行。

[0173] f) 电导率依赖性

[0174] 20 $\mu$ l未稀释的细菌上清液在用NaCl调整的180 $\mu$ L甘氨酸/HCl缓冲液pH 3.0中,在Nunc 96孔透明平底微量滴定板中稀释至2、4、6、10、20、30、40、50mS/cm的电导率。使样品在37 $^{\circ}$ C下温育20分钟,然后将20 $\mu$ L转移到384孔Greiner平底PS-微孔板加上20 $\mu$ l底物溶液(具有0.01% Triton-X100的水中的2mM AAPF-pNA)内,并且通过监测在410nm和37 $^{\circ}$ C下的动力学来测量活性,如实施例1a)中所述。每个动力学实验一式四份运行。

[0175] g) BBI/KTI水解-功能性胰蛋白酶测定

[0176] Bowman-Birk和Kunitz型抑制剂(BBI/KTI)是丝氨酸蛋白酶的强抑制剂,所述丝氨酸蛋白酶广泛分布于豆类和谷物的种子中。测定原理是如果没有抑制剂,BBI/KTI通过蛋白酶活性的蛋白水解降解恢复了对苜蓿基-精氨酸-pNA(Bz-R-pNA)底物的天然胰蛋白酶活性。将90 $\mu$ L含有酶蛋白的细菌上清液在甘氨酸/HCl缓冲液中稀释至pH 3.0,然后在37 $^{\circ}$ C下温育30分钟。然后将20 $\mu$ l样品与20 $\mu$ l抑制剂溶液(KTI:8 $\mu$ g/mL;BBI:16 $\mu$ g/mL;KTI/BBI:4/8 $\mu$ g/mL在甘氨酸缓冲液pH 3.0中稀释)混合,并且进一步在37 $^{\circ}$ C下温育60分钟。将15 $\mu$ l样品转移到384孔Greiner平底PS-微孔板内,然后将15 $\mu$ l以pH 8.0的胰蛋白酶溶液(最终胰蛋白酶浓度1 $\mu$ g/mL;最终pH 7.0或pH 7.5)加入每个孔中,并且使板在37 $^{\circ}$ C下温育10分钟。最后,向每个孔中加入30 $\mu$ L底物溶液(具有0.01% Triton-X100的水中的2mM Bz-R-pNA),并且通过监测在410nm和37 $^{\circ}$ C下的动力学来测量活性,如实施例1a)中所述。每个动力学实验一式四份运行。

[0177] 实施例2:遗传多样性的生成

[0178] 通过随机化SEQ ID NO 1的活性酶核心序列的每个位置引入初始遗传多样性。使用如Green & Sambrook(编辑),Molecular Cloning,第4版,CSHL,以及如Cadwell和Joyce(PCR Methods Appl.3[194],136-140)中所公开的合适的诱变PCR方法,将突变酶单一位点饱和文库引入大肠杆菌/芽孢杆菌穿梭载体上携带的基因中。蛋白酶酶变体在枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)中的异源表达后进行表征,并且通过实施例3中概述的筛选程序选择表型优化的变体。

[0179] 一般而言,使蛋白质(如酶)诱变以获得其成员可能具有改变特征的突变蛋白质文库的方法已得到充分建立。使蛋白质诱变的方法涵盖定点诱变及其它,如例如在Hsieh & Vaisvila (2013)中所述,所述参考文献的内容通过引用并入本文用于实现目的。

[0180] 此类方法有时被称为“定向进化”,即当所建立的文库随后就特定特征进行筛选时。Packer & Liu (2015)提供了分别方法的概述,所述参考文献的内容通过引用并入本文用于实现目的。

[0181] 实施例3:关于具有增加热稳定性的酶变体的表型筛选

[0182] 使用如实施例1b)中所述的方法,伴随在高流通量下在完全自动化的机器人工作站中运行其所需的修改,就具有优化表型,即增加的热稳定性的变体筛选在初始阶段以单一位点饱和文库的形式或者在后续阶段以重组文库或不同克隆的形式生成的遗传多样性。

这些主要是在温育时间、体积、底物中的适应性,并且主要适应性不是通过在温度梯度上的热失活概况,而是通过在单一温度下温育后的残留活性,来选择优化的变体,其温度设定为将优化变体与遗传多样性平均值区别开。衍生出蛋白酶变体,其在一个或多个氨基酸位置中不同于SEQ ID NO 2,包括两个位置、三个位置、n个位置。执行适当迭代轮的本文所述程序,以满足应用的需求。

[0183] 实施例4:

[0184] 鉴定了与使用的主链相比增加IT50的下述各个突变。如上所述分析IT50,并且通过相应的  $\Delta$  IT50表征变体,与使用的主链(=具有缺失的N末端甲硫氨酸的野生型)的IT50相比较。主链作为酶原具有 $79,6^{\circ}\text{C} \pm 0,4^{\circ}\text{C}$  ( $n=46$ )的IT50,并且作为活化酶具有 $59^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  ( $n=10$ )的IT50。

[0185]

位置	突变	$\Delta$ IT50 酶原	$\Delta$ IT50 活化酶
A190	D	1,5	0,8
T196	S	0,7	0,3
D199	E	0,5	1,0
Q202	D	0,4	-0,3
I219	L	1,1	0,8

[0186]

E228	Q	0,7	0,1
A229	W	0,2	n.d.
S230	D	2,8	-0,8
A242	S	0,3	-0,4
Q244	C	0,5	-3,6
Q244	G	0,7	1,5
D251	S	0,8	-0,3
S262	C	0,9	-0,3
G266	A	1,7	0,0
E269	M	2,4	-0,1
E269	T	2,6	-0,1
E269	C	2,1	-1,1
E269	H	4,0	-0,5
E269	Q	2,0	-1,4
V274	I	1,8	1,3
G281	R	2,0	5,4
K283	L	0,6	-0,2
Y287	K	0,2	5,2
N291	T	0,7	0,5
N291	S	-0,2	1,0
D293	Y	0,8	1,0
D293	F	1,1	1,3
L297	T	1,2	0,2
T301	S	0,6	7,6
T301	C	0,8	1,0
T301	M	0,7	0,5
H305	F	0,4	-0,4
H305	W	0,1	-2,7
D306	S	0,3	-0,5
T308	C	0,5	-0,8
V314	M	0,6	0,3
V314	L	2,5	0,7
S315P	P	0,8	3,0
G320	A	3,0	-0,2
G320	Q	3,6	1,5
G320	S	1,0	0,6
S324	L	0,1	1,3
S324	R	0,7	2,0
W325	K	-0,3	2,7
T326	R	1,7	1,2
T326	W	0,9	0,2
T326	L	1,7	1,6
T326	K	1,9	1,2



[0187]

S327	F	1,2	0,6
S327	L	1,5	1,1
S327	W	2,0	1,0
A328	W	0,6	0,5
A328	D	1,3	1,1
A328	R	1,1	0,1
A328	Y	1,5	0,8
A329	Q	2,8	0,2
A329	H	2,1	0,3
A329	T	1,0	0,9
I330	L	1,1	0,8
A331	F	2,0	0,6
A331	Y	1,3	0,6
M333	I	2,5	-0,7
M333	Y	0,3	1,0
M333	L	2,4	-1,0
L338	R	-0,5	1,5
A342	R	-0,6	3,9
A351	S	1,3	-0,9
S354	E	1,6	3,3
S354	Q	2,0	0,3
D358	G	-2,0	0,7
E360	L	1,4	3,1
E360	V	2,4	2,9
E360	C	2,3	2,3
Q361	C	0,9	1,5
Q361	L	0,2	0,1
A372	S	2,4	-0,7
A378	G	1,5	1,5
A386	I	3,6	0,5
A386	L	2,7	1,3
A386	V	2,1	1,2
A386	M	1,7	0,0
G388	C	0,6	-3,5
I391	W	1,7	0,6
A392	V	2,8	0,7
A392	L	3,0	0,9
A392	I	3,7	2,4
A392	M	2,3	2,0
Q393	S	0,9	0,2
D399	S	2,3	2,1
D402	E	0,6	1,7
R412	Q	0,5	2,4

[0188]

R412	M	1,5	2,9
R412	E	1,8	4,4
R412	D	0,4	3,5
A418	W	2,8	0,2
E421	R	1,0	0,5
A423	V	1,1	0,8
A433	G	1,4	1,9
S434	G	1,9	0,7
S435	I	1,7	1,6
S435	R	1,8	0,5
S435	T	2,5	4,7
S435	V	1,6	2,1
L442	W	1,4	0,3
L442	W	-0,7	2,4
D447	S	4,0	3,2
D447	C	3,0	1,4
D447	A	1,6	1,3
A449	Y	1,7	0,7
A449	L	0,8	0,3
A449	M	1,9	-0,9
A449	E	1,6	0,4
A449	N	1,6	3,3
E453	W	2,4	0,0
E453	Y	2,6	0,7
E453	F	1,1	-0,5
V455	I	1,2	0,3
V455	L	1,8	0,7
E459	W	0,9	-0,3
A460	W	2,6	0,5
A460	R	2,0	-0,6
T461	V	1,2	0,0
T461	C	1,2	0,6
A470	V	0,6	2,3
A475	V	-0,3	3,7
A478	L	1,2	0,2
K483	A	1,5	0,7
A487	Q	0,0	1,6
Y490	W	1,5	0,3
Q497	Y	1,8	1,2
Q497	M	0,8	0,8
Q497	D	0,3	1,0
Q497	R	0,6	0,2
V502	C	2,3	1,9
V502	T	1,5	1,6

[0189]

T507	L	0,2	1,0
N510	H	2,4	7,9
A514	T	2,2	1,3
A514	Y	1,3	-1,2
A514	D	1,5	1,2
A514	S	2,4	0,5
N515	G	2,0	-0,2
R516	L	0,5	1,2
R516	E	1,1	3,5
R516	I	1,2	4,3
A517	T	1,3	3,9
A517	S	0,3	7,7
Q518	G	1,6	4,1
L540	V	0,7	0,5
Q542	H	0,9	-0,2
Q542	D	1,1	0,4
Q542	S	0,4	0,5
A548	S	0,2	n.d.
P551	N	0,9	-0,4
P551	R	0,6	0,3
P553	K	0,5	0,3
P553	L	0,8	0,2
R166	I	1,0	0,7
D265	T	1,7	n.d.

[0190] 表1:相对于SEQ ID NO 1的Kumamolisin AS单个氨基酸取代,以及其与酶原和活化酶的主链相比的  $\Delta$  IT50

[0191] 如表3中所示的相当多的不同克隆和组合克隆具有在这些位置处的取代,当其两个或更多个残基同时突变时,导致热稳定化中的协同效应。

[0192] 实施例5

[0193] 通过经由定点诱变,将选择的不同突变引入Kumamolisin AS野生型序列内,生成不同变体。使用本领域已知的合适的诱变PCR方法,以及如Green&Sambrook (编辑), Molecular Cloning, 第4版, CSHL中描述的标准克隆技术。在枯草芽孢杆菌中的异源表达以及使用上述方法的表型分析后表征蛋白酶变体。

[0194] 通过如Yolov和Shabarova (1990) 中描述的众所周知的PCR方法生成组合文库, 组合在上文提供且在表1中概述的实施例中鉴定的突变, 并且使用如Green&Sambrook (编辑), Molecular Cloning, 第4版, CSHL中描述的标准克隆技术。如实施例3中所述就优化变体筛选组合文库。

[0195] 实施例6

[0196] 鉴定了包含来自表1的两个或更多个突变的不同克隆和组合克隆, 如上所述分析 IT50, 并且通过相应的  $\Delta$  IT50 表征变体, 与使用的主链 (= 具有缺失的N末端甲硫氨酸的野生型) 的IT50相比较。由于主链的IT50在与变体相同的实验中确定, 因此主链的测量IT50可以与平均值略微不同。结果显示于下表2a中 (图3以图形形式显示结果):

[0197]

#	不同克隆和选择的组合克隆中的突变							
1						E360L		A392V
2				T301S		E360V	A386I	
3						E360L	A386I	A392V
4						E360L		A392I
5						E360V	A386I	A392I
6				T301S	G320A	E360L		
7				T301S		E360L	A386I	A392I
8				T301S		E360V		A392I
9						E360V		A392V
10						E360L	A386I	
11				T301S		E360L		A392I
12				T301S		E360L	A386I	
13						E360L	A386I	A392I
14						E360V		A392V
15						E360L	A386I	
16				T301S		E360L		
17				T301S		E360L		A392V
18				T301S		E360V	A386I	
19						E360V	A386I	
20				T301S		E360V		A392I
21	D199E					E360V		
22						E360L	A386I	
23						E360L	A386I	A392I
24						E360V		A392V
25			E269T			E360V	A386I	
26				T301S		E360L		A392V
27						E360L		A392V
28						E360V		A392I
29				T301S		E360L		
30						E360L	A386I	A392I
31				T301S		E360L	A386I	A392V
32						E360V		A392I
33				T301S		E360L		A392I
34						E360V		
35						E360L	A386I	A392V
36				T301S		E360V	A386I	
37						E360L	A386I	
38				T301S		E360L	A386I	A392V
39				T301S		E360V		A392V
40				T301S		E360L	A386I	A392V

[0198] 表2a: 包含来自表1的选择突变组合的不同克隆, 以及其与野生型相比的  $\Delta$  IT50

#	不同克隆和选择的组合克隆中的突变						
1		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
2		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
3		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
4		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
5		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
6		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
7		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
8		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
9		D447S	A449Y	E453W	A460W		N510H
10		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
11		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
12		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
13		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
14		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
15		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
16		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
17		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
18		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
19		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
20		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
21		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
22		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
23		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
24		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
25		D447S	A449Y			V502C	N510H
26		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
27		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
28		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
29		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
30		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
31		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
32		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
33		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
34		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
35		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
36		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
37		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
38		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
39		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
40		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H

[0199]

[0200] 表2a续: 包含来自表1的选择突变组合的不同克隆, 以及其与野生型相比的  $\Delta$  IT50

[0201]

#	不同克隆和选择的 组合克隆中的突变				IT50 酶原	$\Delta$ IT50 酶原	IT50 活性酶	$\Delta$ IT50 活性酶
1		A517T			95,5	17,0	90,1	30,6
2		A517T			>95	>17	90,1	30,6
3		A517T			99,5	21,0	89,2	29,7
4		A517T			97,3	18,8	89,1	29,6
5		A517T			99,4	20,9	88,8	29,3
6		A517T			96,4	17,9	88,6	29,1
7		A517T			96,4	17,9	88,5	29,0
8		A517T			99,1	20,6	88,5	29,0
9		A517T	Q518G		97,8	19,3	88,5	29,0
10		A517T			98,4	19,9	88,4	28,9
11		A517T			97,7	19,2	88,4	28,9
12		A517T			98,6	20,1	88,3	28,8
13		A517T			99,5	21,0	88,2	28,7
14		A517T			>95	>17	88,2	28,7
15		A517T			98,3	19,8	88,1	28,6
16		A517T			95,8	17,3	88,0	28,5
17		A517T			97,2	18,7	88,0	28,5
18		A517T			97,6	19,1	87,8	28,3
19		A517T			98,5	20,0	87,8	28,3
20		A517T	Q518G		97,0	18,5	87,8	28,3
21		A517T			>95	>17	87,8	28,3
22		A517T			>95	>17	87,8	28,3
23		A517T			97,1	18,6	87,8	28,3
24		A517T			99,0	20,5	87,8	28,3
25		A517T			94,0	16,0	87,7	27,0
26		A517T			97,4	18,9	87,7	28,2
27		A517T	Q518G		98,0	19,5	87,7	28,2
28		A517T			>95	>17	87,6	28,1
29		A517T			96,5	18,0	87,6	28,1
30		A517T			99,0	20,2	87,5	28,0
31		A517T			98,1	19,6	87,5	28,0
32		A517T	Q518G		97,9	19,4	87,4	27,9
33		A517T	Q518G		97,1	18,6	87,4	27,9
34		A517T			95,6	17,1	87,4	27,9
35		A517T			98,2	19,7	87,4	27,9
36		A517T			98,5	20,0	87,4	27,9
37		A517T	Q518G		97,9	19,4	87,4	27,9
38		A517T			>95	>17	87,3	27,8
39		A517T			96,2	17,7	87,2	27,7
40		A517T	Q518G		>95	>17	87,1	27,6

[0202] 表2a续:包含来自表1的选择突变组合的不同克隆,以及其与野生型相比的  $\Delta$  IT50



[0203]

#	不同克隆和选择的组合克隆中的突变							
41				T301S		E360L	A386I	
42						E360V		A392I
43						E360V	A386I	A392I
44						E360L		A392V
45	D199E					E360V		
46				T301S		E360L	A386I	A392I
47	D199E	G266A				E360V		A392V
48		G266A				E360V		A392V
49						E360L		A392I
50				T301S		E360V	A386I	
51						E360L	A386I	
52						E360L	A386I	
53	D199E	G266A				E360V		A392V
54						E360V	A386I	A392I
55	D199E	G266A	E269H			E360V		A392L
56						E360V	A386I	
57						E360V		A392V
58				T301S		E360L	A386I	A392I
59	D199E					E360V	A386I	
60						E360V	A386I	A392I
61	D199E					E360V	A386I	
62						E360V	A386I	
63	D199E	G266A		T301S		E360L		
64	D199E	G266A	E269T		G320A	E360V		A392L
65						E360L	A386I	
66		G266A				E360V		A392V
67						E360L	A386I	
68	D199E					E360V		
69	D199E					E360V	A386I	
70	D199E					E360L		
71	D199E	G266A	E269H	T301S		E360L		
72	D199E					E360L		
73	D199E	G266A				E360V		
74	D199E	G266A	E269H			E360V		A392L
75	D199E					E360V		
76				T301S		E360L		A392I
77	D199E					E360V		
78	D199E					E360L		
79						E360V	A386I	

[0204] 表2a续:包含来自表1的选择突变组合的不同克隆,以及其与野生型相比的  $\Delta$  IT50

#	不同克隆和选择的组合克隆中的突变						
41		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
42		D447S	A449Y		A460W		N510H
43		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
44		D447S	A449Y	E453W	A460W		N510H
45		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
46		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
47		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
48	R412E	D447S	A449Y	E453W	A460W		
49		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
50		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
51		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
52		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
53		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
54		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
55		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
56		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
57		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
58		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
59		D447S	A449Y			V502C	N510H
60		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
61		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
62		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
63		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
64		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
65		D447S	A449Y			V502C	N510H
66		D447S	A449Y	E453W	A460W		
67		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
68		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
69		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
70		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
71		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
72		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
73		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
74		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
75		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
76		D447S	A449Y	E453W	A460W		N510H
77		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
78		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
79		D447S	A449Y			V502C	N510H

[0205]

[0206] 表2a续:包含来自表1的选择突变组合的不同克隆,以及其与野生型相比的  $\Delta$  IT50



[0207]

#	不同克隆和选择的 组合克隆中的突变				IT50 酶原	$\Delta$ IT50 酶原	IT50 活性酶	$\Delta$ IT50 活性酶
41		A517T	Q518G		98,4	19,9	87,0	27,5
42		A517T			92,7	14,2	86,9	27,4
43		A517T			>95	>17	86,9	27,4
44		A517T			96,9	18,4	86,8	27,3
45		A517T			93,5	15,1	86,7	26,0
46		A517T	Q518G		97,4	18,9	86,7	27,2
47		A517T	Q518G		101,5	23,0	86,6	27,1
48		A517T	Q518G		100,3	21,8	86,6	27,1
49		A517T	Q518G		>95	>17	86,6	27,1
50		A517T	Q518G		94,7	16,2	86,5	27,0
51		A517T			>95	>17	86,5	27,0
52		A517T			>95	>17	86,4	26,9
53		A517T	Q518G	P553K	102,2	23,7	86,4	26,9
54		A517T	Q518G		>95	>17	86,4	26,9
55		A517T	Q518G	P553K	101,7	23,2	86,3	26,8
56		A517T			93,1	14,6	86,2	27,0
57		A517T	Q518G		>95	>17	86,2	26,7
58		A517T	Q518G		>95	>17	86,2	26,7
59		A517T			92,2	14,1	86,1	25,4
60		A517T	Q518G		97,2	18,7	86,0	26,5
61		A517T			93,2	14,9	85,9	26,2
62		A517T			92,4	13,9	85,9	26,6
63		A517T			95,7	17,2	85,8	26,3
64		A517T	Q518G	P553K	100,1	21,6	85,8	26,8
65		A517T			94,0	15,9	85,8	25,1
66	R516I	A517T	Q518G		100,1	21,6	85,7	26,2
67		A517T			>95	>17	85,7	26,2
68		A517T	Q518G		>95	>17	85,7	26,2
69		A517T			94,9	16,6	85,4	25,7
70		A517T			-10,0	-10,0	85,4	25,9
71		A517T			95,8	17,3	85,4	25,9
72		A517T	Q518G		>95	>17	85,4	25,9
73		A517T	Q518G		>95	>17	85,4	25,9
74		A517T	Q518G		100,4	21,9	85,3	25,8
75		A517T			>95	>17	85,3	25,8
76		A517T	Q518G		95,1	16,6	85,2	25,7
77		A517T			94,9	16,4	85,1	25,5
78		A517T			>95	>17	85,1	25,6
79		A517T			93,0	15,0	85,0	25,7

[0208] 表2a续:包含来自表1的选择突变组合的不同克隆,以及其与野生型相比的  $\Delta$  IT50

[0209]

G320	A	3,0	-0,2	2	186
	Q	3,6	1,5		46
	S	1,0	0,6		35
T326	R	1,7	1,2		11
	W	0,9	0,2		
	L	1,7	1,6	1	6
	K	1,9	1,2	1	1
T461	V	1,2	0,0	1	26
	C	1,2	0,6		48
Q244	C	0,5	-3,6		46
	G	0,7	1,5	1	1
D293	Y	0,8	1,0	1	24
	F	1,1	1,3		
A487	Q	0,0	1,6	1	24
V274	I	1,8	1,3		104
A372	S	2,4	-0,7		82
K283	L	0,6	-0,2		68
T308	C	0,5	-0,8		30
A418	W	2,8	0,2		12
	H	1,1	1,3		16
I391	W	1,7	0,6		21
A423	V	1,1	0,8		18
A331	F	2,0	0,6		7
	Y	1,3	0,6		9
S327	F	1,2	0,6		
	L	1,5	1,1		16
	W	2,0	1,0		
I219	L	1,1	0,8		16
M333	I	2,5	-0,7		16
A329	Q	2,8	0,2		5
	H	2,1	0,3		3
	T	1,0	0,9		7
N515	G	2,0	-0,2		13
A378	G	1,5	1,5		12
S434	G	1,9	0,7		12
E421	R	1,0	0,5	1	11
A433	G	1,4	1,9		11
S230	D	2,8	-0,8		9
Q393	S	0,9	0,2		3
D399	S	2,3	2,1		4
Y490	W	1,5	0,3		2
G281	R	2,0	5,4		

[0210]

Y287	K	0,2	5,2	
R516	I	1,2	4,3	
	E	1,1	3,5	
	L	0,5	1,2	
A475	V	-0,3	3,7	
S354	E	1,6	3,3	
S315P	P	0,8	3,0	
W325	K	-0,3	2,7	
L442	W	-0,7	2,4	
	W	1,4	0,3	
A470	V	0,6	2,3	
S324	R	0,7	2,0	
S324	L	0,1	1,3	
Q361	C	0,9	1,5	
Q361	L	0,2	0,1	
A190	D	1,5	0,8	
T196	S	0,7	0,3	
Q202	D	0,4	-0,3	
E228	Q	0,7	0,1	
A229	W	0,2	n.d.	
A242	S	0,3	-0,4	
D251	S	0,8	-0,4	
S262	C	0,9	-0,3	
N291	T	0,7	0,5	
N291	S	-0,2	1,0	
L297	T	1,2	0,2	
H305	F	0,4	-0,4	
H305	W	0,1	-2,7	
D306	S	0,3	-0,5	
V314	M	0,6	0,3	
V314	L	2,5	0,7	
A328	W	0,6	0,5	
A328	D	1,3	1,1	
A328	R	1,1	0,1	
A328	Y	1,5	0,8	
I330	L	1,1	0,8	
M333	Y	0,3	1,0	
M333	L	2,4	-i,0	
L338	R	-0,5	1,5	
A342	R	-0,6	3,9	
A351	S	1,3	-0,9	
S354	Q	2,0	0,3	
D358	G	-2,0	0,7	

[0211]

G388	C	0,6	-3,5	
D402	E	0,6	1,7	
V455	I	1,2	0,3	
V455	L	1,8	0,7	
E459	W	0,9	-0,3	
A478	L	1,2	0,2	
K483	A	1,5	0,7	
Q497	Y	1,8	1,2	
Q497	M	0,8	0,8	
Q497	D	0,3	1,0	
Q497	R	0,6	0,2	
V502	T	1,5	1,6	
T507	L	0,2	1,0	
L540	V	0,7	0,5	
Q542	H	0,9	-0,2	
Q542	D	1,1	0,4	
Q542	S	0,4	0,5	
A548	S	0,2	n.d.	
P551	N	0,9	-0,4	
P551	R	0,6	0,3	
P553	L	0,8	0,2	
R166	I	1,0	0,7	
D265	T	1,7	n.d.	

[0212] 表3:一些优选的取代及其关键特征

[0213] 进一步应理解,突变可以对其它酶参数具有正面或负面作用,所述其它酶参数如发酵微生物生产系统中的可生产性或者针对动物的pH条件或内源性蛋白酶,如胃蛋白酶的稳定性。在低pH和胃蛋白酶的存在下测试饲料酶的稳定性是关于饲料酶的标准,并且如实施例1e中所概述的在该研究中执行。针对较高离子强度的稳定性不是用于饲料酶的标准测试,尽管高离子浓度可以干扰酶稳定性和在此类条件下的酶性能,并且可以例如在肠中发现。肠道中的酸分泌和饲料成分转变为增加的离子强度。

[0214] 图2显示了野生型在较高离子强度的存在下具有稳定性和性能减少的组合效应。图2还显示了离子强度对也显示于表4中的顶部变体,变体#1至#7的作用。

[0215] 如实施例1d中所述测试高离子强度中的性能和稳定性。pH概况是控制参数并且如实施例1f中所述进行测试。蛋白质抗营养因子如胰蛋白酶/胰凝乳蛋白酶抑制剂BBI和KTI (Bowman-Birk抑制剂和Kunitz型抑制剂)的消化是蛋白酶的潜在有益性能特征,其如实施例1g中所述进行测试。

[0216] 从详细测试的651个个别组合和不同变体中,表4描述了巩固多种性能和稳定性参数的变体(图5以图形形式显示结果)。

[0217] 表4中显示的所有变体在微生物生产系统中比野生型更好或同等良好地生产,并且在其如实施例1d中所述测试的pH活性谱中没有相关变化。表4基于活化酶的热稳定性、pH/胃蛋白酶稳定性以及针对较高离子强度的稳定性和在较高离子强度下的性能,对这些





[0220] 表4:具有特别好的性能的一些不同和组合克隆

[0221] 下表5显示了给定突变的出现频率、优选组合和不同变体。出现的频率是关于给定突变的作用和重要性的量度。

[0222]

突变	优选的组合变体和不同变体中的出现频率 (活化酶 (IT50>80°C))	突变	优选的组合变体和不同变体酶原中的出现频率 (IT50>85°C)	突变	优选的组合变体和不同变体酶原中的出现频率 (IT50>85°C)
D447S	127	D447S	365	A331F	7
A449Y	127	A449Y	353	A331Y	9
A517T	127	A517T	256	A329Q/H/T	15
N510H	125	N510H	175	S435R/I	11
E360L/V	125	E360V/L	262	V274I	104
V502C	120	V502C	185	A372S	82
E453W	92	E453W	320	K283L	66
A514Y/T	84	A514Y/T	265	Q244C	46
A460W	72	A460W	308	T380C	30
A386I	56	A386I	178	A418W	28
A392V/I	50	A392V/I	392	I391W	21
T301S	44	T301S	79	A423V	18
D199E	43	D199E	30	T326L	16
Q518G	36	Q518G	250	I219L	16
P553K	20	P553K	6	S327L	16
E269T/H	12	E269T/H	133	M333I	16
G266A	19	G266A	133	N515G	13
D293Y	1	D293Y	24	A378G	12
G320A	1	G320A	265	S434G	12
R412Q	1	R412Q	74	A433G	10
E421R	1	E421R	11	S230D	9
A487Q	1	A487Q	24	Q393S	3
T461V	1	T461V	26	D399S	3
		T461C	48	Y490W	3

[0223] 表5:优选的组合变体和不同变体中给定突变的出现频率。出现频率是关于给定突变的作用和重要性的量度。

[0224] 下表6显示了单个突变对酶原或活化形式的  $\Delta$  IT50的影响。再次,单个突变对  $\Delta$  IT50的影响量是关于所述突变的作用和重要性的量度。

[0225]

突变	$\Delta$ IT50 酶原	突变	$\Delta$ IT50 酶原	突变	$\Delta$ IT50 活化酶	突变	$\Delta$ IT50 活化酶
D447S	4,8	L297T	1,2	A517S	7,7	D358G	0,7
E269H	4,0	S327F	1,2	N510H	7,6	A331Y	0,6
A392I	3,7	V455I	1,2	T301S	7,6	S327F	0,6
G320Q	3,6	T461V	1,2	G281R	5,4	T461C	0,6
A386I	3,6	T461C	1,2	Y287K	5,2	G320S	0,6
G320A	3,0	A478L	1,2	S435T	4,7	A386I	0,5
A392L	3,0	R516I	1,2	R412E	4,4	A460W	0,5
D447C	3,0	I219L	1,1	R516I	4,3	A514S	0,5
S230D	2,8	D293F	1,1	Q518G	4,1	S435R	0,5
A329Q	2,8	A328R	1,1	A517T	3,9	A190D	0,5
A392V	2,8	I330L	1,1	A475V	3,7	E421R	0,5
A418W	2,8	A423V	1,1	R516E	3,5	N291T	0,5
A386L	2,7	E453F	1,1	R412D	3,5	T301M	0,5
E269T	2,6	R516E	1,1	A342R	3,4	L540V	0,5
E453Y	2,6	Q542D	1,1	D447S	3,3	A328W	0,5
A460W	2,6	G320S	1,0	S354E	3,3	Q542S	0,5
V314L	2,5	A329T	1,0	A449N	3,3	A449E	0,4
M333I	2,5	E421R	1,0	E360L	3,1	Q542D	0,4

[0226]

S435T	2,5	R166I	1,0	S315PP	3,0	A329H	0,3
E269M	2,4	V410I	1,0	E360V	2,9	S354Q	0,3
M333L	2,4	S262C	0,9	R412M	2,9	Y490W	0,3
E360V	2,4	T326W	0,9	W325K	2,7	L442W	0,3
A372S	2,4	Q361C	0,9	A392I	2,4	V455I	0,3
E453W	2,4	Q393S	0,9	R412Q	2,4	A449L	0,3
N510H	2,4	E459W	0,9	L442W	2,4	T196S	0,3
A514S	2,4	Q542H	0,9	E360C	2,3	V314M	0,3
E360C	2,3	P551N	0,9	A470V	2,3	P551R	0,3
A392M	2,3	D251S	0,8	D399S	2,1	P553K	0,3
D399S	2,3	D293Y	0,8	S435V	2,1	A329Q	0,2
V502C	2,3	T301C	0,8	A392M	2,0	A418W	0,2

[0227] 表6: 单个突变对酶原(左)或活化形式(右)的 $\Delta IT50$ 的影响。单个突变对 $\Delta IT50$ 的影响量是关于所述突变的作用和重要性的量度。

[0228]

突变	$\Delta IT50$ 酶原	突变	$\Delta IT50$ 酶原	突变	$\Delta IT50$ 活化酶	突变	$\Delta IT50$ 活化酶
A514T	2,2	S315P	0,8	V502C	1,9	L297T	0,2
E269C	2,1	A449L	0,8	A433G	1,9	A478L	0,2
A329H	2,1	Q497M	0,8	S324R	1,9	T326W	0,2
A331F	2,1	P553L	0,8	D402E	1,7	Q393S	0,2
A386V	2,1	T196S	0,7	T326L	1,6	P553L	0,2
E269Q	2,0	E228Q	0,7	S435I	1,6	Q497R	0,2
G281R	2,0	Q244G	0,7	V502T	1,6	A331F	0,1
S327W	2,0	N291T	0,7	A487Q	1,6	A328R	0,1
S354Q	2,0	T301M	0,7	G320Q	1,5	E228Q	0,1
A460R	2,0	L540V	0,7	A378G	1,5	Q361L	0,1
N515G	2,0	K283L	0,6	Q361C	1,5	E453W	0
T326K	1,9	T301S	0,6	Q244G	1,5	G266A	0
S434G	1,9	V314M	0,6	L338R	1,5	A386M	0
A449M	1,9	S324R	0,6	D447C	1,4	I391W	0
V274I	1,8	A328W	0,6	A386L	1,3	T461V	0
R412E	1,8	G388C	0,6	A514T	1,3	E269T	-0,1
S435R	1,8	D402E	0,6	V274I	1,3	E269M	-0,1
V455L	1,8	A470V	0,6	D447A	1,3	Q542H	-0,1
Q497Y	1,8	Q497R	0,6	D293F	1,3	G320A	-0,2
G266A	1,7	P551R	0,6	S324L	1,3	N515G	-0,2
T326R	1,7	D199E	0,5	A386V	1,2	K283L	-0,2
T326L	1,7	Q244C	0,5	T326K	1,2	S262C	-0,3
A386M	1,7	T308C	0,5	Q497Y	1,2	E459W	-0,3
I391W	1,7	R412Q	0,5	T326R	1,2	D251S	-0,3
S435I	1,7	R516L	0,5	A514D	1,2	Q202D	-0,3
A449Y	1,7	P553K	0,5	R516L	1,2	P551N	-0,4
D265T	1,7	Q202D	0,4	S327L	1,1	H305F	-0,4
S354E	1,6	H305F	0,4	A328D	1,1	A242S	-0,4

[0229]

S435V	1,6	R412D	0,4	S327W	1,0	E269H	-0,5
D447A	1,6	Q542S	0,4	D293Y	1,0	E453F	-0,5
A449E	1,6	A242S	0,3	T301C	1,0	D306S	-0,5
A449N	1,6	D306S	0,3	D199E	1,0	A460R	-0,6
Q518G	1,6	M333Y	0,3	M333Y	1,0	M333I	-0,7
A190D	1,5	Q497D	0,3	Q497D	1,0	A372S	-0,7
S327L	1,5	A517S	0,3	T507L	1,0	S230D	-0,8
A328Y	1,5	A229W	0,2	N291S	1,0	T308C	-0,8
A378G	1,5	Y287K	0,2	A392L	0,9	A449M	-0,9

[0230] 表6续:单个突变对酶原(左)或活化形式(右)的 $\Delta IT_{50}$ 的影响。单个突变对 $\Delta IT_{50}$ 的影响量是关于所述突变的作用和重要性的量度。

[0231]

突变	$\Delta IT_{50}$ 酶原	突变	$\Delta IT_{50}$ 酶原	突变	$\Delta IT_{50}$ 活化酶	突变	$\Delta IT_{50}$ 活化酶
R412M	1,5	Q361L	0,2	A329T	0,9	A351S	-0,9
K483A	1,5	T507L	0,2	V455L	0,8	M333L	-1,0
Y490W	1,5	A548S	0,2	A328Y	0,8	E269C	-1,1
A514D	1,5	S324L	0,1	I330L	0,8	E269Q	-1,4
E360L	1,4	A487Q	0	A423V	0,8	H305W	-2,7
A433G	1,4	N291S	-0,2	Q497M	0,8	G388C	-3,5
L442W	1,4	W325K	-0,3	A392V	0,7	Q244C	-3,6
A328D	1,3	A475V	-0,3	E453Y	0,7	D265T	n.d.
A331Y	1,3	L338R	-0,5	V314L	0,7	R166I	n.d.
A351S	1,3	A342R	-0,6	S434G	0,7	V410I	n.d.
A514Y	1,3	L442W	-0,7	A449Y	0,7	A229W	n.d.
A517T	1,3	D358G	-2	K483A	0,7	A548S	n.d.

[0232] 表6续:单个突变对酶原(左)或活化形式(右)的 $\Delta IT_{50}$ 的影响。单个突变对 $\Delta IT_{50}$ 的影响量是关于所述突变的作用和重要性的量度。

[0233] 进一步应理解,表1和表6的一些突变可以可互换地用于改造Kumamolisin As的热稳定性。表7显示了基于表7的变体#1的变体集合。在改造过程中,在位置502和510处的突变似乎改变了在低于pH 2的极端酸性pH下的活性。

[0234] 排除在502和510处的突变使热稳定性显著低于关于活化酶的靶向温度稳定性,如例如在表7中,与克隆#1相比,克隆#2具有热稳定性中的7.8°C减少。利用表1和表6中鉴定且显示的突变,通过合理的方法构建了不同变体的集合,以补偿502和510的效应。除了D399S以外,取代可以逐渐或完全补偿在502和510处的突变的影响。



[0235]

不同克隆和选择的组合克隆中的突变														IT50 [°C] Δ IT50 [°C] 酶原 / 活化的
#	G266A	E360V	A392V											
1	G266A	E360V	A392V											101.5
2	G266A	E360V	A392V											86.6
3	G266A	E360V	A392V											>95
4	G266A	E360V	A392V											100.3
5	G266A	E360V	A392V											86.6
6	G266A	E360V	A392V											96.5
7	G266A	E360V	A392V											84.3
8	G266A	E360V	A392V											97.7
9	G266A	E360V	A392V											81.8
10	G266A	E360V	A392V											97.4
11	G266A	E360V	A392V											81.4
12	G266A	E360V	A392V											98.1
13	G266A	E360V	A392V											81.3
14	G266A	E360V	A392V											98.7
15	G266A	E360V	A392V											81.1
16	G266A	E360V	A392V											98.3

不同克隆和选择的组合克隆中的突变														IT50 [°C] Δ IT50 [°C] 酶原 / 活化的
#	G266A	E360V	A392V											
1	G266A	E360V	A392V											101.5
2	G266A	E360V	A392V											86.6
3	G266A	E360V	A392V											>95
4	G266A	E360V	A392V											100.3
5	G266A	E360V	A392V											86.6
6	G266A	E360V	A392V											96.5
7	G266A	E360V	A392V											84.3
8	G266A	E360V	A392V											97.7
9	G266A	E360V	A392V											81.8
10	G266A	E360V	A392V											97.4
11	G266A	E360V	A392V											81.4
12	G266A	E360V	A392V											98.1
13	G266A	E360V	A392V											81.3
14	G266A	E360V	A392V											98.7
15	G266A	E360V	A392V											81.1
16	G266A	E360V	A392V											98.3

[0236] 表7:基于变体#1的变体集合

[0237] 参考文献:

[0238] Wlodawer A1,Li M,Gustchina A,Oyama H,Dunn BM,Oda K.,Acta Biochim

Pol.2003;50(1):81-102

[0239] Terashita,T.,Oda,K.,Kono,M.&Murao,S.,Agric Biol Chem(1981)45,1937-1943

[0240] Oda,K.,Takahashi,S.,Ito,M.&Dunn,B.M.,Adv Exp Med Biol(1998)436,349-353

[0241] Packer&Liu,Methods for the directed evolution of proteins.Nature Reviews Genetics16,379-394(2015)

[0242] Hsieh&Vaisvila,Protein engineering:single or multiple site-directed mutagenesis.Methods Mol Biol.2013;978:173-86

[0243] Cadwell和Joyce,Mutagenic PCR.PCR Methods Appl.3,1994,136-140

[0244] Okubo等人,2006Jun;273(11):2563-76.

## 序列表

&lt;110&gt; EW营养有限责任公司

&lt;120&gt; 稳定的蛋白酶变体

&lt;130&gt; ED41048

&lt;140&gt; 16206367.1 - 1410

&lt;141&gt; 22.12.2016

&lt;160&gt; 5

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 552

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Kumamolisin 1 proenzyme, backbone variant (N-terminal M is lacking)

&lt;400&gt; 1

```

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

```

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

				485				490				495			
Leu	Pro	Ala	Asp	Val	Phe	His	Asp	Ile	Thr	Glu	Gly	Asn	Asn	Asp	Ile
				500				505				510			
Ala	Asn	Arg	Ala	Gln	Ile	Tyr	Gln	Ala	Gly	Pro	Gly	Trp	Asp	Pro	Cys
				515				520				525			
Thr	Gly	Leu	Gly	Ser	Pro	Ile	Gly	Val	Arg	Leu	Leu	Gln	Ala	Leu	Leu
				530				535				540			
Pro	Ser	Ala	Ser	Gln	Pro	Gln	Pro								
545				550											
<210> 2															
<211> 587															
<212> PRT															
<213> artificial															
<220>															
<223> Kumamolisin 1 proenzyme backbone variant with leader sequence and															
His tag															
<400> 2															
Met	Asn	Ile	Lys	Lys	Phe	Ala	Lys	Gln	Ala	Thr	Val	Leu	Thr	Phe	Thr
1				5				10				15			
Thr	Ala	Leu	Leu	Ala	Gly	Gly	Ala	Thr	Gln	Ala	Phe	Ala	Ser	Asp	Met
				20				25				30			
Glu	Lys	Pro	Trp	Lys	Glu	Gly	Glu	Glu	Ala	Arg	Ala	Val	Leu	Gln	Gly
				35				40				45			
His	Ala	Arg	Ala	Gln	Ala	Pro	Gln	Ala	Val	Asp	Lys	Gly	Pro	Val	Ala
50				55				60							
Gly	Asp	Glu	Arg	Met	Ala	Val	Thr	Val	Val	Leu	Arg	Arg	Gln	Arg	Ala
65				70				75				80			
Gly	Glu	Leu	Ala	Ala	His	Val	Glu	Arg	Gln	Ala	Ala	Ile	Ala	Pro	His
				85				90				95			
Ala	Arg	Glu	His	Leu	Lys	Arg	Glu	Ala	Phe	Ala	Ala	Ser	His	Gly	Ala
				100				105				110			
Ser	Leu	Asp	Asp	Phe	Ala	Glu	Leu	Arg	Arg	Phe	Ala	Asp	Ala	His	Gly
				115				120				125			
Leu	Ala	Leu	Asp	Arg	Ala	Asn	Val	Ala	Ala	Gly	Thr	Ala	Val	Leu	Ser
130				135				140							
Gly	Pro	Val	Asp	Ala	Ile	Asn	Arg	Ala	Phe	Gly	Val	Glu	Leu	Arg	His
145				150				155				160			
Phe	Asp	His	Pro	Asp	Gly	Ser	Tyr	Arg	Ser	Tyr	Leu	Gly	Glu	Val	Thr
				165				170				175			

Val	Pro	Ala	Ser	Ile	Ala	Pro	Met	Ile	Glu	Ala	Val	Leu	Gly	Leu	Asp
180				185				190							
Thr	Arg	Pro	Val	Ala	Arg	Pro	His	Phe	Arg	Met	Gln	Arg	Arg	Ala	Glu
195				200				205							
Gly	Gly	Phe	Glu	Ala	Arg	Ser	Gln	Ala	Ala	Ala	Pro	Thr	Ala	Tyr	Thr
210				215				220							
Pro	Leu	Asp	Val	Ala	Gln	Ala	Tyr	Gln	Phe	Pro	Glu	Gly	Leu	Asp	Gly
225				230				235				240			
Gln	Gly	Gln	Cys	Ile	Ala	Ile	Ile	Glu	Leu	Gly	Gly	Gly	Tyr	Asp	Glu
245				250				255							
Ala	Ser	Leu	Ala	Gln	Tyr	Phe	Ala	Ser	Leu	Gly	Val	Pro	Ala	Pro	Gln
260				265				270							
Val	Val	Ser	Val	Ser	Val	Asp	Gly	Ala	Ser	Asn	Gln	Pro	Thr	Gly	Asp
275				280				285							
Pro	Ser	Gly	Pro	Asp	Gly	Glu	Val	Glu	Leu	Asp	Ile	Glu	Val	Ala	Gly
290				295				300							
Ala	Leu	Ala	Pro	Gly	Ala	Lys	Phe	Ala	Val	Tyr	Phe	Ala	Pro	Asn	Thr
305				310				315				320			
Asp	Ala	Gly	Phe	Leu	Asp	Ala	Ile	Thr	Thr	Ala	Ile	His	Asp	Pro	Thr
325				330				335							
Leu	Lys	Pro	Ser	Val	Val	Ser	Ile	Ser	Trp	Gly	Gly	Pro	Glu	Asp	Ser
340				345				350							
Trp	Thr	Ser	Ala	Ala	Ile	Ala	Ala	Met	Asn	Arg	Ala	Phe	Leu	Asp	Ala
355				360				365							
Ala	Ala	Leu	Gly	Val	Thr	Val	Leu	Ala	Ala	Ala	Gly	Asp	Ser	Gly	Ser
370				375				380							
Thr	Asp	Gly	Glu	Gln	Asp	Gly	Leu	Tyr	His	Val	Asp	Phe	Pro	Ala	Ala
385				390				395				400			
Ser	Pro	Tyr	Val	Leu	Ala	Cys	Gly	Gly	Thr	Arg	Leu	Val	Ala	Ser	Gly
405				410				415							
Gly	Arg	Ile	Ala	Gln	Glu	Thr	Val	Trp	Asn	Asp	Gly	Pro	Asp	Gly	Gly
420				425				430							
Ala	Thr	Gly	Gly	Gly	Val	Ser	Arg	Ile	Phe	Pro	Leu	Pro	Ala	Trp	Gln
435				440				445							
Glu	His	Ala	Asn	Val	Pro	Pro	Ser	Ala	Asn	Pro	Gly	Ala	Ser	Ser	Gly
450				455				460							
Arg	Gly	Val	Pro	Asp	Leu	Ala	Gly	Asn	Ala	Asp	Pro	Ala	Thr	Gly	Tyr
465				470				475				480			
Glu	Val	Val	Ile	Asp	Gly	Glu	Ala	Thr	Val	Ile	Gly	Gly	Thr	Ser	Ala

				485				490				495			
Val	Ala	Pro	Leu	Phe	Ala	Ala	Leu	Val	Ala	Arg	Ile	Asn	Gln	Lys	Leu
				500				505				510			
Gly	Lys	Ala	Val	Gly	Tyr	Leu	Asn	Pro	Thr	Leu	Tyr	Gln	Leu	Pro	Ala
				515				520				525			
Asp	Val	Phe	His	Asp	Ile	Thr	Glu	Gly	Asn	Asn	Asp	Ile	Ala	Asn	Arg
				530				535				540			
Ala	Gln	Ile	Tyr	Gln	Ala	Gly	Pro	Gly	Trp	Asp	Pro	Cys	Thr	Gly	Leu
545				550				555				560			
Gly	Ser	Pro	Ile	Gly	Val	Arg	Leu	Leu	Gln	Ala	Leu	Leu	Pro	Ser	Ala
				565				570				575			
Ser	Gln	Pro	Gln	Pro	His	His	His	His	His	His	His				
				580				585							
<210> 3															
<211> 364															
<212> PRT															
<213> artificial															
<220>															
<223> activated Kumamolisin 1, backbone variant															
<400> 3															
Ala	Ala	Pro	Thr	Ala	Tyr	Thr	Pro	Leu	Asp	Val	Ala	Gln	Ala	Tyr	Gln
1				5				10				15			
Phe	Pro	Glu	Gly	Leu	Asp	Gly	Gln	Gly	Gln	Cys	Ile	Ala	Ile	Ile	Glu
				20				25				30			
Leu	Gly	Gly	Gly	Tyr	Asp	Glu	Ala	Ser	Leu	Ala	Gln	Tyr	Phe	Ala	Ser
				35				40				45			
Leu	Gly	Val	Pro	Ala	Pro	Gln	Val	Val	Ser	Val	Ser	Val	Asp	Gly	Ala
				50				55				60			
Ser	Asn	Gln	Pro	Thr	Gly	Asp	Pro	Ser	Gly	Pro	Asp	Gly	Glu	Val	Glu
65				70				75				80			
Leu	Asp	Ile	Glu	Val	Ala	Gly	Ala	Leu	Ala	Pro	Gly	Ala	Lys	Phe	Ala
				85				90				95			
Val	Tyr	Phe	Ala	Pro	Asn	Thr	Asp	Ala	Gly	Phe	Leu	Asp	Ala	Ile	Thr
				100				105				110			
Thr	Ala	Ile	His	Asp	Pro	Thr	Leu	Lys	Pro	Ser	Val	Val	Ser	Ile	Ser
				115				120				125			
Trp	Gly	Gly	Pro	Glu	Asp	Ser	Trp	Thr	Ser	Ala	Ala	Ile	Ala	Ala	Met
				130				135				140			
Asn	Arg	Ala	Phe	Leu	Asp	Ala	Ala	Ala	Leu	Gly	Val	Thr	Val	Leu	Ala

145	150	155	160
Ala Ala Gly Asp Ser Gly Ser Thr Asp Gly Glu Gln Asp Gly Leu Tyr			
	165	170	175
His Val Asp Phe Pro Ala Ala Ser Pro Tyr Val Leu Ala Cys Gly Gly			
	180	185	190
Thr Arg Leu Val Ala Ser Gly Gly Arg Ile Ala Gln Glu Thr Val Trp			
	195	200	205
Asn Asp Gly Pro Asp Gly Gly Ala Thr Gly Gly Gly Val Ser Arg Ile			
	210	215	220
Phe Pro Leu Pro Ala Trp Gln Glu His Ala Asn Val Pro Pro Ser Ala			
225	230	235	240
Asn Pro Gly Ala Ser Ser Gly Arg Gly Val Pro Asp Leu Ala Gly Asn			
	245	250	255
Ala Asp Pro Ala Thr Gly Tyr Glu Val Val Ile Asp Gly Glu Ala Thr			
	260	265	270
Val Ile Gly Gly Thr Ser Ala Val Ala Pro Leu Phe Ala Ala Leu Val			
	275	280	285
Ala Arg Ile Asn Gln Lys Leu Gly Lys Ala Val Gly Tyr Leu Asn Pro			
	290	295	300
Thr Leu Tyr Gln Leu Pro Ala Asp Val Phe His Asp Ile Thr Glu Gly			
305	310	315	320
Asn Asn Asp Ile Ala Asn Arg Ala Gln Ile Tyr Gln Ala Gly Pro Gly			
	325	330	335
Trp Asp Pro Cys Thr Gly Leu Gly Ser Pro Ile Gly Val Arg Leu Leu			
	340	345	350
Gln Ala Leu Leu Pro Ser Ala Ser Gln Pro Gln Pro			
	355	360	
<210> 4			
<211> 553			
<212> PRT			
<213> Alicyclobacillus sendaiensis			
<400> 4			
Met Ser Asp Met Glu Lys Pro Trp Lys Glu Gly Glu Glu Ala Arg Ala			
1	5	10	15
Val Leu Gln Gly His Ala Arg Ala Gln Ala Pro Gln Ala Val Asp Lys			
	20	25	30
Gly Pro Val Ala Gly Asp Glu Arg Met Ala Val Thr Val Val Leu Arg			
	35	40	45
Arg Gln Arg Ala Gly Glu Leu Ala Ala His Val Glu Arg Gln Ala Ala			



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

Phe Pro Ala Ala Ser Pro Tyr Val Leu Ala Cys Gly Gly Thr Arg Leu  
 370 375 380  
 Val Ala Ser Gly Gly Arg Ile Ala Gln Glu Thr Val Trp Asn Asp Gly  
 385 390 395 400  
 Pro Asp Gly Gly Ala Thr Gly Gly Gly Val Ser Arg Ile Phe Pro Leu  
 405 410 415  
 Pro Ala Trp Gln Glu His Ala Asn Val Pro Pro Ser Ala Asn Pro Gly  
 420 425 430  
 Ala Ser Ser Gly Arg Gly Val Pro Asp Leu Ala Gly Asn Ala Asp Pro  
 435 440 445  
 Ala Thr Gly Tyr Glu Val Val Ile Asp Gly Glu Ala Thr Val Ile Gly  
 450 455 460  
 Gly Thr Ser Ala Val Ala Pro Leu Phe Ala Ala Leu Val Ala Arg Ile  
 465 470 475 480  
 Asn Gln Lys Leu Gly Lys Ala Val Gly Tyr Leu Asn Pro Thr Leu Tyr  
 485 490 495  
 Gln Leu Pro Ala Asp Val Phe His Asp Ile Thr Glu Gly Asn Asn Asp  
 500 505 510  
 Ile Ala Asn Arg Ala Gln Ile Tyr Gln Ala Gly Pro Gly Trp Asp Pro  
 515 520 525  
 Cys Thr Gly Leu Gly Ser Pro Ile Gly Val Arg Leu Leu Gln Ala Leu  
 530 535 540  
 Leu Pro Ser Ala Ser Gln Pro Gln Pro  
 545 550  
 <210> 5  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> sacB signal peptide  
 <400> 5  
 Met Asn Ile Lys Lys Phe Ala Lys Gln Ala Thr Val Leu Thr Phe Thr  
 1 5 10 15  
 Thr Ala Leu Leu Ala Gly Gly Ala Thr Gln Ala Phe Ala  
 20 25

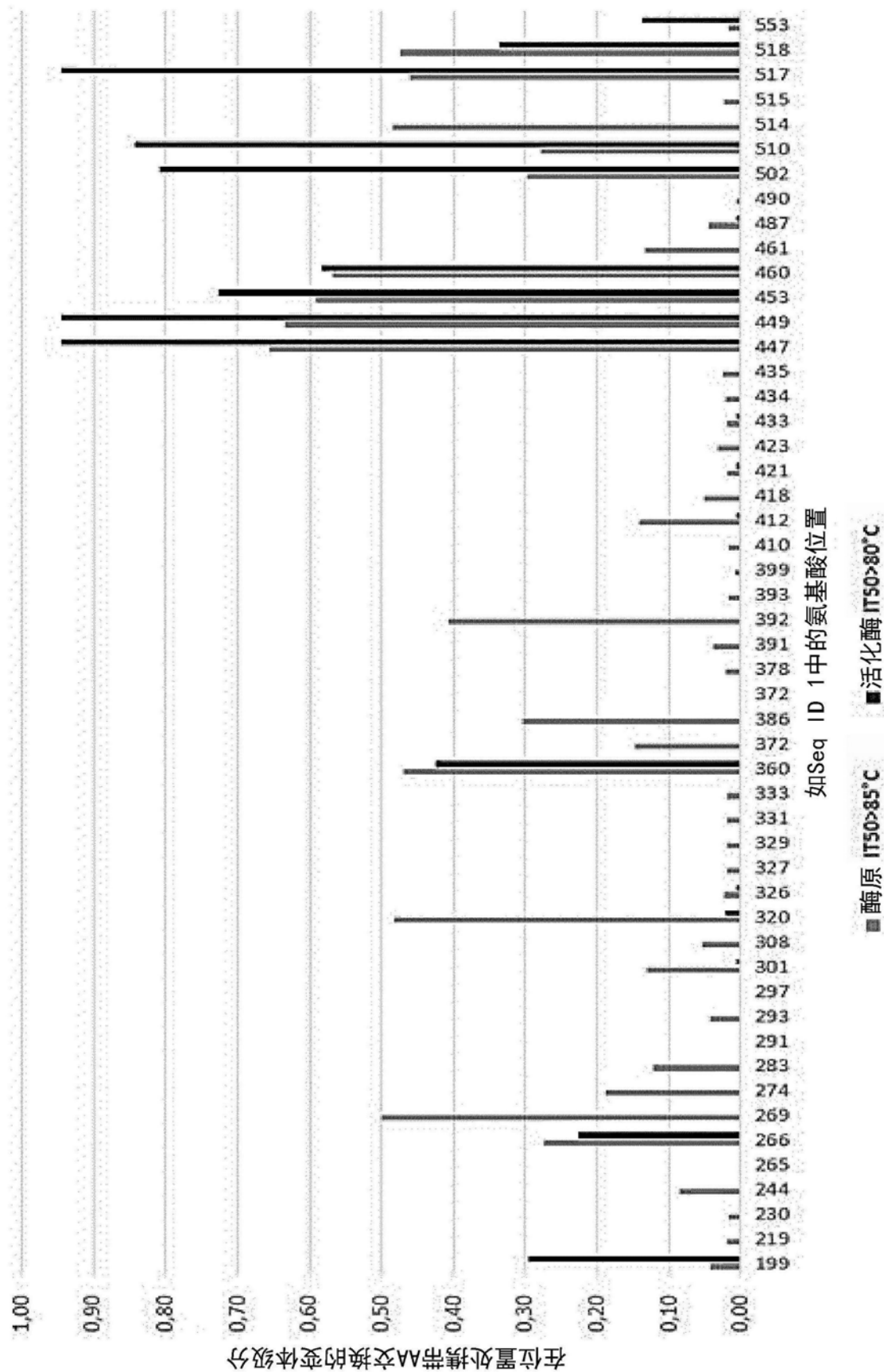


图1

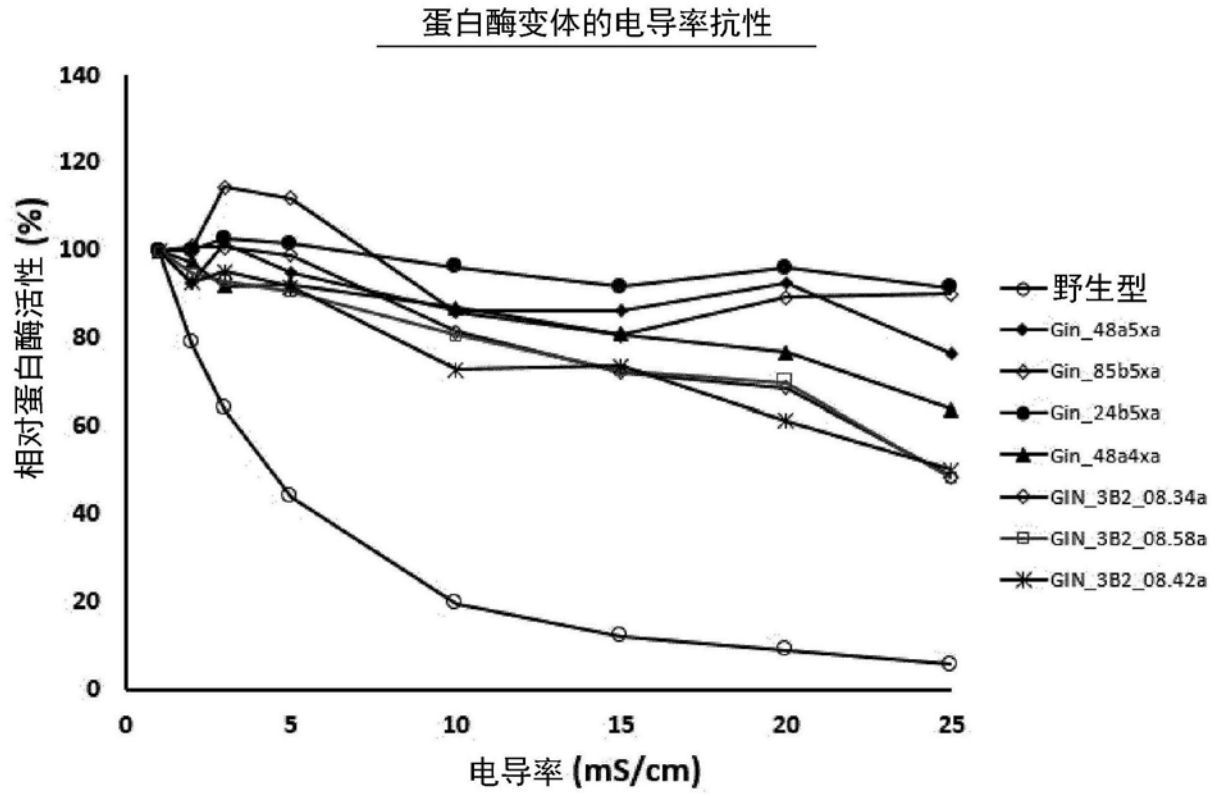


图2

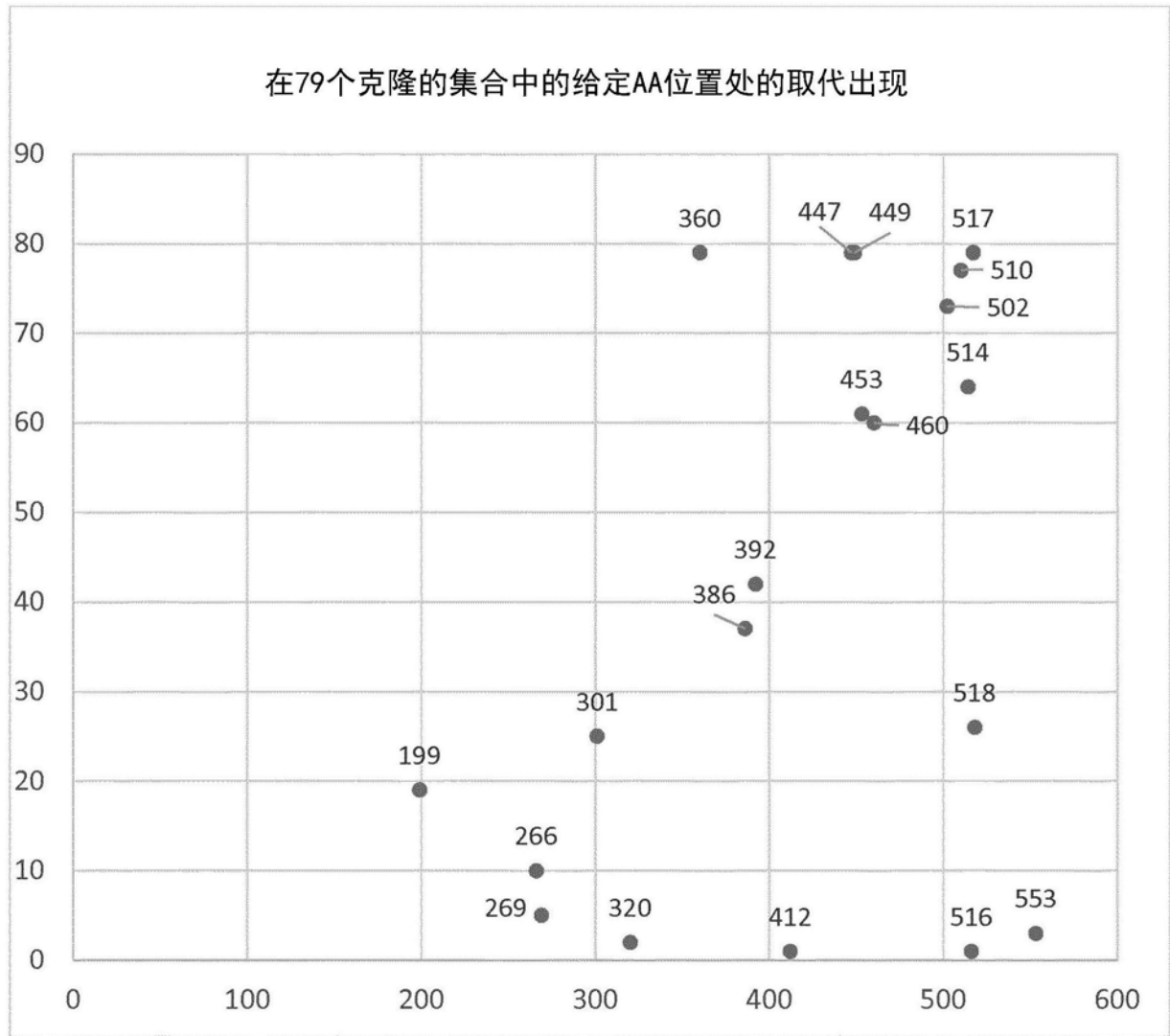


图3

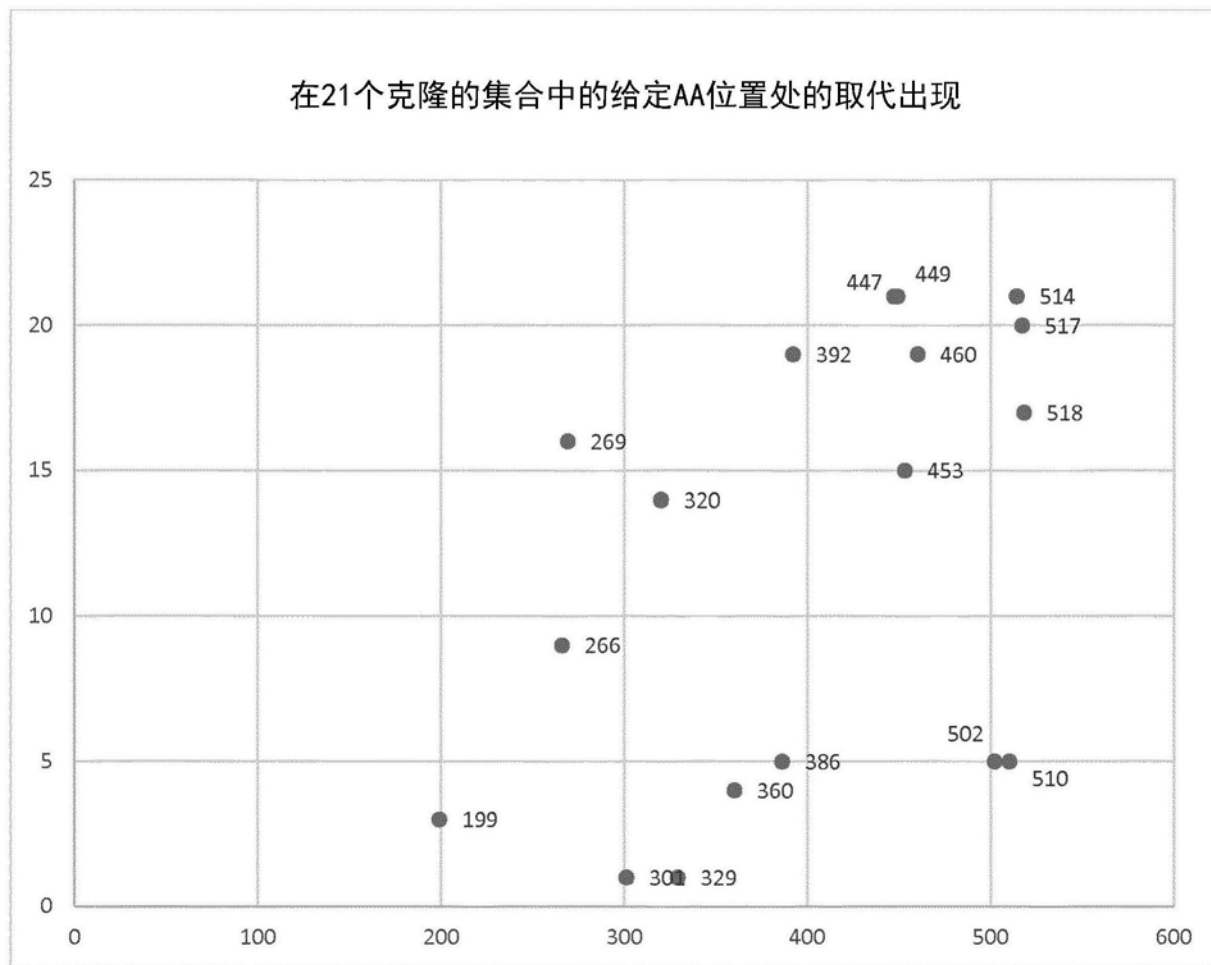


图4

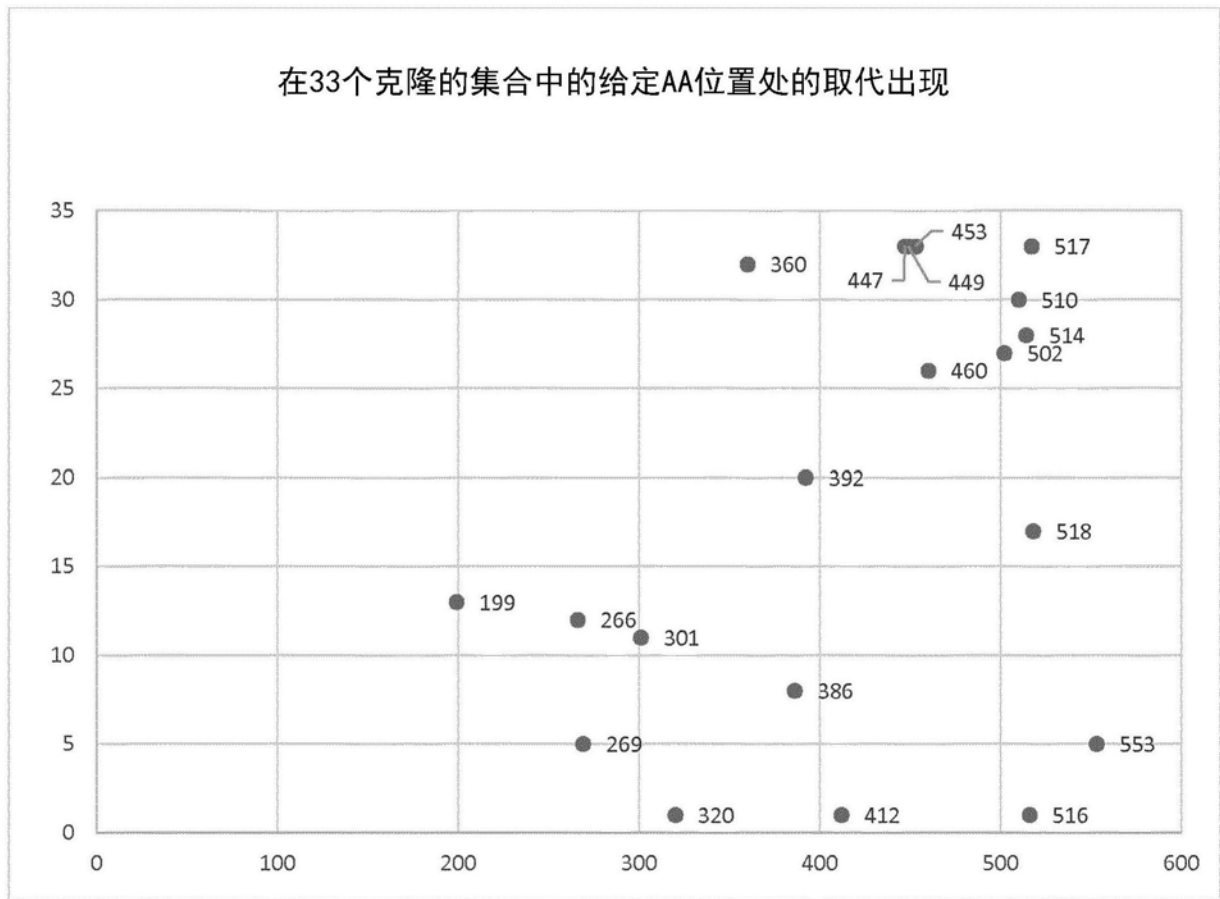


图5