



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102858970 B

(45)授权公告日 2017.07.21

(21)申请号 201180018494.0

(22)申请日 2011.04.12

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 102858970 A

(43)申请公布日 2013.01.02

(30)优先权数据

61/324,534 2010.04.15 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2012.10.11

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/032050 2011.04.12

(87)PCT国际申请的公布数据

W02011/130222 EN 2011.10.20

(73)专利权人 丹尼斯科美国公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 R·R·博特

L·G·卡斯康-佩雷拉

D·A·埃斯特尔 F·格德盖布

A·J·普洛斯

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 陈迎春 黄革生

(51)Int.Cl.

C12N 9/54(2006.01)

(56)对比文件

CN 102209778 A,2011.10.05,

CN 102209777 A,2011.10.05,

CN 103122345 A,2013.05.29,

CN 102762222 A,2012.10.31,

CN 102652175 A,2012.08.29,

CN 102414321 A,2012.04.11,

审查员 李楠

权利要求书3页 说明书82页

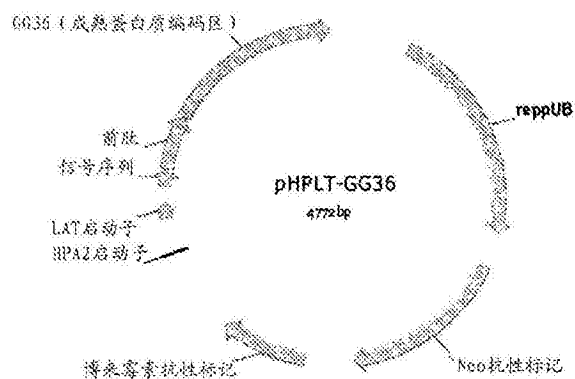
序列表22页 附图2页

(54)发明名称

包含变体蛋白酶的组合物和方法

(57)摘要

本发明提供变体蛋白酶、包含此类变体蛋白酶的组合物以及包括此类变体蛋白酶的清洁方法。



1. 一种分离的变体蛋白酶,其选自SEQ ID No:7和SEQ ID NO:8。
2. 根据权利要求1所述的变体蛋白酶,其中所述变体蛋白酶是变体枯草杆菌蛋白酶。
3. 一种组合物,所述组合物包含至少一种根据权利要求1所述的变体蛋白酶。
4. 权利要求3的组合物,其中所述组合物为液体衣物清洁组合物。
5. 权利要求3的组合物,其中所述组合物为粉末衣物清洁组合物。
6. 权利要求3的组合物,其中所述组合物为衣物助洗剂清洁组合物、衣物洗涤添加剂清洁组合物或衣物预洗剂清洁组合物。
7. 权利要求3的组合物,其中所述组合物为隐形镜片清洁组合物。
8. 一种洗涤剂组合物,所述洗涤剂组合物包含至少一种根据权利要求1所述的变体蛋白酶。
9. 一种清洁组合物,所述清洁组合物包含至少一种根据权利要求1所述的变体蛋白酶。
10. 根据权利要求9所述的清洁组合物,其中所述清洁组合物为洗涤剂组合物。
11. 根据权利要求9或10所述的清洁组合物,其中所述清洁组合物分别为衣物清洁组合物或衣物洗涤剂组合物。
12. 根据权利要求10所述的清洁组合物,其中所述清洁组合物为盛具洗涤剂组合物。
13. 根据权利要求12所述的清洁组合物,其中所述盛具洗涤剂组合物为自动盛具洗涤剂组合物。
14. 根据权利要求12所述的清洁组合物,其中所述盛具洗涤剂组合物为手动盛具洗涤剂组合物。
15. 根据权利要求9-14中任一项所述的清洁组合物,其中所述清洁组合物为液体洗涤剂组合物。
16. 根据权利要求9-14中任一项所述的清洁组合物,其中所述清洁组合物为凝胶、片状、粉末、固体或颗粒洗涤剂组合物。
17. 根据权利要求9-16中任一项所述的清洁组合物,其中所述清洁组合物不含磷酸盐。
18. 根据权利要求4-17中任一项所述的组合物,所述组合物包含至少一种另外的酶。
19. 根据权利要求18所述的组合物,其中所述至少一种另外的酶选自半纤维素酶、纤维素酶、淀粉酶、过氧化物酶、蛋白酶、木聚糖酶、酯酶、角质酶、果胶酶、果胶裂解酶、甘露聚糖酶、还原酶、氧化酶、脂氧合酶、木质素酶、鞣酸酶、戊聚糖酶、malanase、 β -葡聚糖酶、阿拉伯糖苷酶、透明质酸酶、软骨素酶和漆酶。
20. 根据权利要求19所述的组合物,其中所述蛋白酶是角蛋白酶,所述酯酶是脂肪酶或磷脂酶,所述淀粉酶是支链淀粉酶,所述氧化酶是酚氧化酶。
21. 根据权利要求19所述的组合物,所述组合物包含两种或更多种另外的酶,所述另外的酶选自半纤维素酶、纤维素酶、淀粉酶、过氧化物酶、蛋白酶、木聚糖酶、酯酶、角质酶、果胶酶、果胶酸裂解酶、甘露聚糖酶、还原酶、氧化酶、脂氧合酶、木质素酶、鞣酸酶、戊聚糖酶、malanase、 β -葡聚糖酶、阿拉伯糖苷酶、透明质酸酶、软骨素酶和漆酶。
22. 根据权利要求21所述的组合物,其中所述蛋白酶是角蛋白酶,所述酯酶是脂肪酶或磷脂酶,所述淀粉酶是支链淀粉酶,所述氧化酶是酚氧化酶。
23. 权利要求3-21任一项的组合物,所述组合物还包含至少一种助洗剂和/或至少一种表面活性剂。

24. 一种用于清洁需要清洁的物品或表面的方法,所述方法包括使所述物品或表面与根据权利要求1所述的变体蛋白酶或根据权利要求3-23中任一项所述的组合物接触。

25. 根据权利要求24所述的方法,所述方法还包括用水漂洗所述物品或表面。

26. 根据权利要求24或25所述的方法,其中所述清洁组合物是盛具洗涤剂组合物,而所述物品是盛具或餐具物品。

27. 根据权利要求24、25或26所述的方法,其中所述清洁组合物是自动盛具洗涤剂组合物或手动盛具洗涤剂组合物,而所述物品是盛具或餐具物品。

28. 根据权利要求24、25或26所述的方法,其中所述清洁组合物是衣物清洁组合物或衣物洗涤剂组合物,而所述物品是织物物品。

29. 一种分离的核酸,所述核酸由编码根据权利要求1所述的变体蛋白酶的多核苷酸序列组成。

30. 一种表达载体,所述表达载体包含至少一种权利要求29所述的核酸。

31. 根据权利要求30所述的表达载体,其中所述至少一种核酸与启动子有效连接。

32. 一种重组宿主细胞,所述重组宿主细胞包含根据权利要求30或31所述的表达载体或根据权利要求29所述的核酸。

33. 根据权利要求32所述的重组宿主细胞,其中所述宿主细胞是细菌细胞。

34. 根据权利要求33所述的重组宿主细胞,其中所述宿主细胞是芽孢杆菌细胞。

35. 根据权利要求34所述的重组宿主细胞,其中所述宿主细胞是枯草芽孢杆菌细胞。

36. 一种重组宿主细胞,所述重组宿主细胞包含根据权利要求1所述的变体蛋白酶。

37. 一种细胞培养物,所述细胞培养物包含至少一种根据权利要求1所述的变体蛋白酶或至少一种根据权利要求29所述的核酸。

38. 一种组合物,所述组合物包含至少一种根据权利要求29所述的核酸。

39. 一种产生变体蛋白酶的方法,所述方法包括在有利于产生所述变体蛋白酶的条件下培养根据权利要求32-36中任一项所述的重组宿主细胞。

40. 根据权利要求39所述的方法,所述方法还包括从所述培养物回收所述变体蛋白酶。

41. 一种产生变体蛋白酶的方法,所述方法包括:

(a) 将根据权利要求30或31所述的表达载体引入一群细胞中;以及

(b) 在有利于产生由所述表达载体编码的变体蛋白酶的条件下在培养基中培养所述细胞。

42. 根据权利要求41所述的方法,所述方法还包括:(c) 从所述细胞或从所述培养基分离所述变体蛋白酶。

43. 一种用于清洁表面、物品或物体的方法,所述方法包括使所述物品、物体或表面的至少一部分与根据权利要求1所述的至少一种变体蛋白酶或根据权利要求3-23中任一项所述的组合物接触足以清洁或洗涤所述物品或表面至所需程度的时间和/或在足以或有效清洁或洗涤所述物品、物体或表面至所需程度的条件下接触,并且任选还包括用水漂洗所述表面、物品或物体。

44. 一种用于清洁表面的方法,所述方法包括提供待清洁的表面,以及使所述表面或所述待清洁的表面的一部分与根据权利要求1所述的至少一种变体蛋白酶或根据权利要求3-23中任一项所述的组合物接触足以清洁或洗涤所述表面至所需程度的时间和/或在足以或

有效清洁或洗涤所述表面至所需程度的条件下接触,其中所述表面任选为桌子、桌面、地板、天花板、家具物品、非盛具物品或非餐具物品的表面。

45. 根据权利要求4-7中任一项所述的组合物,其中所述组合物不含磷酸盐。

46. 根据权利要求3-23和45中任一项所述的组合物,其中所述组合物不是自动盛具洗涤组合物。

包含变体蛋白酶的组合物和方法

技术领域

[0001] 本发明提供用于清洁应用和清洁方法的变体蛋白酶。在一个方面,本发明提供包括芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)变体枯草杆菌蛋白酶多肽在内的变体蛋白酶,以及包含一种或多种此类变体的清洁组合物。

背景技术

[0002] 丝氨酸蛋白酶是羧基水解酶亚群,包括各种不同类别具有广泛特异性和生物学功能的酶(参见例如Stroud, Sci. Amer. (《科学美国人》) 131:74-88)。对丝氨酸蛋白酶(例如,枯草杆菌蛋白酶)进行了许多研究,主要是由于它们在清洁和饲料应用中的有用性。虽然已经开发出许多有用的变体蛋白酶来满足这些应用相关的需要,但仍需要用于多种用途的新的改良的蛋白酶和变体蛋白酶。

发明内容

[0003] 在一个方面,本发明提供变体蛋白酶,该变体蛋白酶包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列,所述变体蛋白酶氨基酸序列包含在SEQ ID NO:1的位置76、87、118、128、129、130、188和244的氨基酸残基每一处被另一不同氨基酸残基的置换,其中每个氨基酸位置根据SEQ ID NO:2所示解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)枯草杆菌蛋白酶BPN'的氨基酸序列中对应氨基酸位置的编号方式来进行编号,所述对应氨基酸位置通过所述变体蛋白酶氨基酸序列与解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN'氨基酸序列的比对来确定。

[0004] 在一个方面,本发明提供变体蛋白酶,该变体蛋白酶包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列,所述变体蛋白酶氨基酸序列包含在相对于SEQ ID NO:1的氨基酸位置76、87、118、128、129和130每一处的氨基酸残基被另一不同氨基酸残基的置换,以及

[0005] (i) 氨基酸位置188处的丝氨酸残基或位置188处的丝氨酸残基被非天冬氨酸残基的另一不同氨基酸残基置换,和/或

[0006] (ii) 氨基酸位置248处的天冬酰胺残基或位置248处的天冬酰胺残基被非精氨酸残基的另一不同氨基酸残基置换,

[0007] 其中氨基酸位置根据SEQ ID NO:2中所示解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN'的氨基酸序列中对应氨基酸位置的编号方式来进行编号,所述对应氨基酸位置通过所述变体蛋白酶氨基酸序列与解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN'氨基酸序列的比对来确定。

[0008] 在一个方面,本发明提供变体蛋白酶,该变体蛋白酶包含与SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少99%或99.5%同一性的氨基酸序列。

[0009] 在一个方面,本发明提供变体蛋白酶,该变体蛋白酶包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,所述变体蛋白酶相对于SEQ ID NO:1包含如下氨基酸置换组中的一个:

[0010] (i) N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A,前提条件是所述变体蛋白酶不包含N248R+S188D,或

[0011] (ii) N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A+S188D+V244R,

[0012] 其中氨基酸位置根据SEQ ID NO:2中所示解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN'的氨基酸序列中对应氨基酸位置的编号方式来进行编号,所述对应氨基酸位置通过所述变体蛋白酶氨基酸序列与解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN'氨基酸序列的比对来确定。

[0013] 在一个方面,本发明提供亲本蛋白酶的变体蛋白酶,所述变体蛋白酶包含相对于亲本蛋白酶的氨基酸序列具有如下氨基酸置换组中的一个的氨基酸序列:

[0014] (i) N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A,前提条件是所述变

[0015] 体蛋白酶不包含N248R+S188D,或

[0016] (ii) N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A+S188D+V244R。

[0017] 在一个方面,本发明提供亲本枯草杆菌蛋白酶的变体枯草杆菌蛋白酶,所述变体枯草杆菌蛋白酶包含相对于亲本枯草杆菌蛋白酶的氨基酸序列具有如下氨基酸置换组中的一个的氨基酸序列:

[0018] (i) N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A,前提条件是所述变体枯草杆菌蛋白酶不包含N248R+S188D,或

[0019] (ii) N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A+S188D+V244R。

[0020] 在一个方面,本发明提供亲本蛋白酶的变体蛋白酶,所述亲本蛋白酶包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少97%、至少99%或100%同一性的氨基酸序列,所述亲本蛋白酶的所述变体蛋白酶相对于所述亲本蛋白酶包含如下氨基酸置换组中的一个:

[0021] (i) N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A,前提条件是所述变体蛋白酶不包含N248R+S188D,或

[0022] (ii) N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A+S188D+V244R,

[0023] 其中氨基酸位置根据SEQ ID NO:2中所示解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN'的氨基酸序列中对应氨基酸位置的编号方式来进行编号,所述对应氨基酸位置通过所述变体蛋白酶氨基酸序列与解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN'氨基酸序列的比对来确定。

[0024] 在一个方面,本发明提供变体蛋白酶,该变体蛋白酶包含(a)与SEQ ID NO:1所示氨基酸序列存在9至15个氨基酸残基差异,并且(b)包含氨基酸置换N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A+S188D+N248R的氨基酸序列,其中氨基酸位置根据SEQ ID NO:2中所示解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN'的氨基酸序列中对应氨基酸位置的编号方式来进行编号,所述对应氨基酸位置通过所述变体蛋白酶氨基酸序列与解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN'氨基酸序列的比对来确定。

[0025] 在一个方面,本发明提供包含至少一种本文所述发明的变体蛋白酶的组合物。一些此类组合物为包含至少一种本发明的变体蛋白酶的洗涤剂组合物。本发明的一些此类组合物还包含至少一种另外的酶、至少一种助洗剂和/或至少一种表面活性剂。一些此类组合物不含磷酸盐。

[0026] 在一个方面,本发明提供包含至少一种本文所述发明的变体蛋白酶的清洁组合物。一些此类清洁组合物为液体、凝胶、片状、粉末、固体或颗粒洗涤剂组合物。一些此类清洁组合物为衣物洗涤剂组合物或盛具洗涤剂组合物。一些此类盛具洗涤剂组合物为自动盛

具洗涤剂组合物或手动(或人工)盛具洗涤剂组合物。本发明的一些此类清洁组合物还包含至少一种另外的酶、至少一种助洗剂和/或至少一种表面活性剂。

[0027] 在一个方面,本发明提供用于清洁需要清洁的物品或表面的方法,该方法包括用本发明的变体蛋白酶或本文所述发明的组合物接触所述物品或表面。在一些此类方法中,清洁组合物是盛具洗涤剂组合物,而待清洁的物品是盛具或餐具物品。在一些此类方法中,清洁组合物是自动盛具洗涤剂组合物或手动盛具洗涤剂组合物,而待清洁的物品是盛具物品或餐具物品。在一些此类方法中,清洁组合物是衣物洗涤剂组合物,而待清洁的物品是织物物品。

[0028] 在另一个方面,本发明提供用于清洁表面、物品或物体的方法,该方法包括使待清洁的物品或表面的至少一部分与本发明的变体蛋白酶或本文所述发明的组合物接触足以清洁或洗涤物品或表面至所需程度的时间和/或在足以或有效清洁或洗涤物品或表面至所需程度的条件下接触,以及任选还包括用水漂洗所述表面、物品或物体。

[0029] 在一个方面,本发明提供清洁表面的方法,所述方法包括提供待清洁的表面,以及使表面或需要清洁的物品或表面的一部分与至少一种本发明的变体蛋白酶或本文所述任何发明的组合物接触足以清洁或洗涤物品或表面至所需程度的时间和/或在足以或有效清洁或洗涤物品或表面至所需程度的条件下接触,其中所述表面任选为桌子、桌面、地板、天花板、家具物品、非盛具物品或非餐具物品的表面。

[0030] 在一个方面,本发明提供在自动盛具洗涤剂中清洁餐具或盛具物品的方法,该方法包括:(i)提供自动盛具洗涤剂,(ii)在该机器中放入足以清洁该餐具或盛具物品的一定量的任何本文所述自动盛具洗涤剂组合物,其中所述组合物任选置于所述机器的隔室或分配器中,(iii)将盛具或餐具物品放入该机器中,以及(iv)运行该机器以清洁该餐具或盛具物品。

[0031] 在一个方面,本发明提供分离的核酸,所述核酸包含编码本文所述发明的变体蛋白酶的多核苷酸序列。

[0032] 在一个方面,本发明提供分离的核酸,所述核酸包含与SEQ ID NO:11中示出的多核苷酸序列具有至少90%同一性的多核苷酸序列或其互补多核苷酸序列。

[0033] 在一个方面,本发明提供分离的核酸,所述核酸包含与SEQ ID NO:10中示出的多核苷酸序列具有至少90%同一性的多核苷酸序列或其互补多核苷酸序列。

[0034] 在一个方面,本发明提供分离的核酸,所述核酸包含与SEQ ID NO:9中示出的多核苷酸序列具有至少90%同一性的多核苷酸序列或其互补多核苷酸序列。

[0035] 在一个方面,本发明提供分离的核酸,所述核酸包含除遗传密码简并性的多核苷酸序列之外,还包含在至少严格或高度严格条件下可在SEQ ID NO:9、10和11任一者的多核苷酸序列或它们任一者的互补序列的基本上整个长度上杂交的多核苷酸序列。

[0036] 在一个方面,本发明提供包含本文所述发明的至少一条核酸的表达载体。还提供包含本文所述发明的至少一种核酸(如编码本发明的变体蛋白酶的至少一条核酸)的组合物。一些此类组合物还包含至少一种另外的核酸,包括(例如)但不限于编码本发明的变体蛋白酶或编码已知的蛋白酶(如枯草杆菌蛋白酶)或酶的至少一种另外的核酸。还提供包含本文所述发明的表达载体或核酸的重组宿主细胞。一些此类宿主细胞包括细菌细胞。

[0037] 在一个方面,本发明提供包含本文所述发明的至少一种变体蛋白酶或至少一种核

酸的细胞培养物。

[0038] 在一个方面,本发明提供制备变体蛋白酶的方法,该方法包括在有利于制备该变体蛋白酶的条件下培养本文所述发明的重组宿主细胞。

[0039] 在一个方面,本发明提供制备变体蛋白酶的方法,该方法包括将本文所述发明的重组表达载体引入一群细胞中;以及在有利于制备由表达载体编码的变体蛋白酶的条件下在培养基中培养所述细胞。一些此类方法还包括从细胞或培养基分离变体蛋白酶。

[0040] 应当理解,本文所述发明的一个或多个方面可以组合以形成本发明的其他方面。本发明的这些和其他方面对于本领域的普通技术人员将显而易见。

附图说明

[0041] 图1展示了迟缓芽孢杆菌 (*B. lentus*) 枯草杆菌蛋白酶GG36的成熟氨基酸序列、解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN⁺ 的成熟氨基酸序列,以及分别命名为PX3、PX4和PX5的示例性的本发明变体蛋白酶多肽的氨基酸序列的比对。

[0042] 图2提供了pHPLT-GG36枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 表达质粒的质粒图谱。

具体实施方式

[0043] 本发明提供变体蛋白酶,包括(例如)但不限于尤其是非常适于以及可用于多种清洁应用的变体丝氨酸蛋白酶和变体枯草杆菌蛋白酶。在一个方面,本发明包括包含至少一种本文示出的变体蛋白酶(如变体枯草杆菌蛋白酶)的组合物。一些此类组合物包括洗涤剂组合物。在一个方面,本发明提供芽孢杆菌变体枯草杆菌蛋白酶以及包含一种或多种此类变体枯草杆菌蛋白酶的组合物。本发明还提供与已知的蛋白酶,例如已知的丝氨酸蛋白酶和/或枯草杆菌蛋白酶相比,具有类似的或改善的洗涤性能的酶组合物。

[0044] 除非另外指明,否则本发明的实施涉及常用于分子生物学、微生物学、蛋白质纯化、蛋白质工程、蛋白质和DNA测序、重组DNA领域和工业酶使用和开发的常规技术,所有这些技术均在本领域的技术范围内。

[0045] 此外,本文提供的标题并不排除本发明的其他各个方面或实施方案,这些方面或实施方案都可以通过整体参考说明书而获取。因此,通过整体参考本说明书可更完全地限定下文定义的术语。然而,为了有利于理解本发明,下面提供了多个术语的定义。

[0046] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术和科学术语均具有与本发明所属领域普通技术人员所一般理解的含义相同的含义。尽管与本文描述的方法和材料相似或等价的多种方法和材料均可用于本发明的实施,但是本文中只描述了一些方法和材料。相应地,接下来定义的术语通过整体参考本说明书来更完整地描述。另外,如本文所用,除非上下文明确指明,否则单数术语“一”、“一个”和“所述”包括复数指代。除非另外指明,否则分别地,核酸从左至右以5'至3'取向写出;氨基酸序列从左至右以氨基至羧基取向写出。应当理解,本发明不限于所描述的具体方法学、方案和试剂,因为这些方面可根据本领域技术人员使用它们的背景而有所变化。

[0047] 在本说明书通篇中给出的每一个上限值意在包括每一个下限值,就如同此类下限值在本文中明确地写出一样。在本说明书通篇中给出的每一个下限值将包括每一个上限值,就如同此类上限值在本文中明确地写出一样。在本说明书通篇中给出的每一个数值范

围将包括落入此类较宽数值范围内的每一个较窄数值范围,就如同此类较窄数值范围在本文中全部明确地写出一样。

[0048] 蛋白酶(也称为肽酶)是具有分解其他蛋白质能力的酶蛋白。蛋白酶具有进行蛋白水解的能力,其通过水解在形成该蛋白质的肽或多肽链中将氨基酸连接在一起的肽键而开始蛋白质分解代谢。蛋白酶作为蛋白质消化酶的这种活性称为蛋白水解活性。对于蛋白水解活性测定存在多个熟知的步骤(Kalish,“Microbial Proteinases (微生物蛋白酶)”,载于:Fiechter(编辑),*Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* (《生物化学工程/生物技术进展》), (1988))。例如,蛋白水解活性可通过可分析该蛋白酶水解商业底物的能力的比较测定法来确定。可用于蛋白酶或蛋白水解活性的分析的示例性底物包括但不限于:二甲基酪蛋白(Sigma C-9801)、牛胶原(Sigma C-9879)、牛弹性蛋白(Sigma E-1625)和牛角蛋白(ICN Biomedical 902111)。利用这些底物的比色测定法为本领域所熟知(例如参见,WO 99/34011和美国专利6,376,450,将这两个专利以引用的方式并入本文)。pNA测定法(参见例如Del Mar等人,*Anal. Biochem.* (《分析生物化学》) 99:316-320 (1979))也可以用于测定在梯度洗脱过程中收集的级分的活性酶浓度。该测定法测量当该酶水解可溶性的合成底物即琥珀酰-丙氨酸-丙氨酸-脯氨酸-苯丙氨酸-对硝基苯胺(suc-AAPF-pNA)时对硝基苯胺释放的速率。用分光光度计在410nm处测量从该水解反应产生黄色的速率,其与活性酶浓度成比例。此外,280纳米(nm)处的吸光度测量可用于测定总蛋白质浓度。活性酶/总蛋白质比率给出了酶纯度。

[0049] 如本文所用,“枯草杆菌蛋白酶”是指如在MEROPS-肽酶数据库中所述的S8丝氨酸蛋白酶家族的任何成员(Rawlins等人,MEROPS:the peptidase database (MEROPS:肽酶数据库),*Nucl. Acids Res.* (《核酸研究》) 34 Database issue (数据库专刊), D270-272 (2006))。如文中所述,肽酶家族S8包含丝氨酸内肽酶枯草杆菌蛋白酶及其同源物(*Biochem. J.* (《生物化学杂志》) 290:205-218 (1993))。S8家族也称为枯草杆菌酶(subtilase)家族,是丝氨酸肽酶的第二大家族。现在已经测定了S8家族若干成员的三级结构。典型的S8蛋白质结构由三个层组成,一个七股β片层夹在两层螺旋之间。枯草杆菌蛋白酶(S08.001)是异种集团(clan) SB (SB) 的典型结构。尽管结构不同,但枯草杆菌蛋白酶和胰凝乳蛋白酶(S01.001)的活性位点可叠合,这表明该相似性是趋同进化而不是趋异进化的结果。多种芽孢杆菌可分泌大量枯草杆菌蛋白酶。如本文所用,术语“蛋白酶变体”、“变体蛋白酶”、“突变体蛋白酶”和“蛋白酶突变体”可互换使用,是指例如通过至少一个氨基酸置换、缺失或添加而使氨基酸序列中至少一个氨基酸不同于参考蛋白酶(其可以为野生型蛋白酶)氨基酸序列的蛋白酶。蛋白酶变体、变体蛋白酶、突变体蛋白酶或蛋白酶突变体的蛋白水解活性可以使用本领域熟知的和/或本文所述的步骤测定。

[0050] 如本文所用,术语“变体枯草杆菌蛋白酶”、“枯草杆菌蛋白酶变体”、“突变体枯草杆菌蛋白酶”和“枯草杆菌蛋白酶突变体”可互换使用,是指通过至少一个氨基酸置换、缺失或添加而使氨基酸序列不同于参考枯草杆菌蛋白酶(其可以为野生型枯草杆菌蛋白酶)氨基酸序列的枯草杆菌蛋白酶。枯草杆菌蛋白酶变体、变体枯草杆菌蛋白酶、突变体枯草杆菌蛋白酶或枯草杆菌蛋白酶突变体的蛋白水解活性可以使用本领域熟知的和/或本文所述的步骤测定。

[0051] 如本文所用,“芽孢杆菌属(*Bacillus*)”包括本领域技术人员已知的芽孢杆菌属内

的所有种,包括但不限于例如枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌 (*B.licheniformis*)、迟缓芽孢杆菌、短芽孢杆菌 (*B.brevis*)、嗜热脂肪芽孢杆菌 (*B.stearothermophilus*)、嗜碱芽孢杆菌 (*B.alkalophilus*)、解淀粉芽孢杆菌、克劳氏芽孢杆菌 (*B.clausii*)、耐盐芽孢杆菌 (*B.halodurans*)、巨大芽孢杆菌 (*B.megaterium*)、凝结芽孢杆菌 (*B.coagulans*)、环状芽孢杆菌 (*B.circulans*)、灿烂芽孢杆菌 (*B.lautus*) 和苏云金芽孢杆菌 (*B.thuringiensis*)。应该认识到,还在继续对芽孢杆菌属进行分类学整理。因此,意在使该属包括已经重新分类的种,包括但不限于例如现在命名为“嗜热脂肪地芽孢杆菌 (*Geobacillus stearothermophilus*)”的嗜热脂肪芽孢杆菌。在存在氧气的情况下,抗性内生孢子的产生被视为芽孢杆菌属的定义性特征 (defining feature),但该特征还适用于最近命名的脂环酸芽孢杆菌属 (*Alicyclobacillus*)、双芽孢杆菌属 (*Amphibacillus*)、解硫胺素芽孢杆菌属 (*Aneurinibacillus*)、厌氧芽孢杆菌属 (*Anoxybacillus*)、短芽孢杆菌属 (*Brevibacillus*)、线芽孢杆菌属 (*Filobacillus*)、薄壁芽孢杆菌属 (*Gracilibacillus*)、喜盐芽孢杆菌属 (*Halobacillus*)、类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus*)、需盐芽孢杆菌属 (*Salibacillus*)、耐热芽孢杆菌属 (*Thermobacillus*)、解脲芽孢杆菌属 (*Ureibacillus*) 和枝芽孢杆菌属 (*Virgibacillus*)。

[0052] 术语“多核苷酸”和“核酸”在本文中可互换使用,指在链中共价键合的核苷酸单体的任何长度的聚合物。DNA (脱氧核糖核酸) (包含脱氧核糖核苷酸的多核苷酸) 和RNA (核糖核酸) (核糖核苷酸的聚合物) 是具有独特生物学功能的多核苷酸或核酸的实例。多核苷酸或核酸包括 (但不限于): 单链、双链或三链DNA、基因组DNA、cDNA、RNA、DNA-RNA杂交体,或包含嘌呤和嘧啶碱基的聚合物,或其他天然的、经化学修饰的、经生物化学修饰的、非天然的或衍生化的核苷酸碱基。如下是多核苷酸的非限制性实例: 基因、基因片段、染色体片段、表达序列标签 (EST)、外显子、内含子、信使RNA (mRNA)、转运RNA (tRNA)、核糖体RNA (rRNA)、核酶、互补DNA (cDNA)、重组多核苷酸、分支多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离的DNA、任何序列的分离的RNA、核酸探针和引物。在一些实施方案中,多核苷酸包括经修饰的核苷酸,如甲基化的核苷酸和核苷酸类似物、尿嘧啶基 (uracyl)、其他糖和连接基如氟代核糖和硫代酸酯 (thioate),以及核苷酸支链。在具体实施方案中,核苷酸的序列夹杂有非核苷酸组分。

[0053] 如本文所用,术语“载体”指用于将核酸或多核苷酸引入或转移进靶细胞或组织中的核酸构建体或多核苷酸构建体。载体通常用于将外来DNA引入另一细胞或组织中。载体通常包含作为转基因的DNA序列和充当该载体“骨架”的较大的多核苷酸序列。载体通常起到转移遗传信息 (如插入的转基因) 至靶细胞或组织的作用,以便在该靶细胞或组织中分离、增殖或表达该插入物。载体包括质粒、克隆载体、噬菌体、病毒 (如病毒载体)、粘粒、表达载体、穿梭载体、载体盒 (cassette) 等等。载体通常包含复制起点、多克隆位点和可选标记。将载体插入靶细胞的过程通常称为转染。使用病毒载体进行的细胞转染通常称为转导。在一个方面,本发明包括载体,该载体包含编码变体蛋白酶 (如前体或成熟变体蛋白酶) 的DNA序列,该DNA序列与能够实现其在合适宿主中表达的合适前序列 (如分泌序列、信号肽序列等) 有效连接。

[0054] 如本文所用,术语“表达盒”或“表达载体”指以重组方式或以合成方式产生的、用于所关注的核酸 (如外来核酸或转基因) 在靶细胞中的表达的核酸构建体或载体。所关注的核酸通常表达所关注的蛋白质。表达载体或表达盒通常包含驱动或促进外来核酸的表达的

启动子核苷酸序列。表达载体或表达盒通常还包含允许特定核酸在靶细胞中的转录的其他指定的核酸元件。重组表达盒可掺入质粒、染色体、线粒体DNA、质体DNA、病毒或核酸片段中。某些表达载体具有使异源DNA片段插入宿主细胞中以及使其在宿主细胞中表达的能力。许多原核和真核表达载体是可商购获得的。适宜的表达载体的选择在本领域技术人员知识范围内。用于从掺入表达载体中的核酸序列表达蛋白质的适当表达载体的选择在本领域技术人员知识范围内。

[0055] DNA构建体是可被引入靶细胞或组织中的人工构建的核酸区段。DNA构建体通常包含已被亚克隆进载体中的DNA插入物,该DNA插入物包含编码所关注的蛋白质的核苷酸序列。载体可含有用于在细菌中生长的细菌抗性基因和用于所关注的蛋白质在生物体中的表达的启动子。DNA可通过PCR或本领域技术人员已知的任何其他合适的技术体外产生。在一些实施方案中,DNA构建体包含所关注的核酸序列。在一些实施方案中,该序列与另外的元件例如控制元件(如启动子等)有效连接。DNA构建体可还包含选择性标记并且可还包含侧接有同源盒(homology box)的输入序列(incoming sequence)。构建体可包含添加至末端的其他非同源序列(如填充序列(stuffer sequence)或旁侧序列(flank))。在一些实施方案中,序列的末端是闭合的,使得DNA构建体形成闭环。用本领域熟知的技术掺入DNA构建体中的所关注的核酸序列可以是野生型的、突变型的或经修饰的核酸。在一些实施方案中,DNA构建体包含一条或多条与宿主细胞染色体同源的核酸序列。在其他实施方案中,DNA构建体包含一条或多条非同源核苷酸序列。一旦体外装配了DNA构建体,则可将其用于例如:1)将异源序列插入宿主细胞的所需靶序列中;和/或2)诱变宿主细胞染色体的区域(即用异源序列置换内源序列);3)使靶基因缺失;和/或4)将复制型质粒引入宿主中。在本文中“DNA构建体”可与“表达盒”互换使用。

[0056] 如本文所用,“质粒”指染色体外DNA分子,其能够独立于染色体DNA进行复制。质粒是双链的(ds)并且可以是环状的,通常用作克隆载体。

[0057] 如本文在将核酸序列引入细胞的语境中所用,术语“引入”指任何适于将核酸序列转移进细胞中的方法。适用于引入的方法包括但不限于:原生质体融合、转染、转化、电穿孔、接合和转导(参见例如Ferrari等人,“Genetics(《遗传学》)”,载于Hardwood等人(编辑),Bacillus(《芽孢杆菌》),普莱南出版公司(Plenum Publishing Corp.),第57-72页(1989))。

[0058] 转化指因遗传物质(如DNA)的吸收、基因组掺入和表达所致的细胞的遗传变更。

[0059] 如本文所用,某核酸当被设置成与另一个核酸序列处于功能关系中时,其与另一个核酸序列“有效连接”。例如,如果启动子影响核苷酸编码序列的转录,则该启动子或增强子与该编码序列有效连接。如果核糖体结合位点被设置成使得有利于编码序列的翻译,则该核糖体位点可与该编码序列有效连接。通常,“有效连接的”DNA序列是连续的。然而,增强子不必是连续的。连接是通过在便利的限制性位点处的连接来实现。如果这类位点不存在,则可根据常规操作使用合成的寡核苷酸接头或连接物。

[0060] 如本文所用,术语“基因”是指编码多肽并且包括在编码区之前和之后的区域,以及位于单独编码片段(外显子)之间的插入序列(内含子)的多核苷酸(如DNA片段)。

[0061] 如本文所用,在用于指细胞时“重组的”通常指该细胞已通过引入异源核酸序列而进行了修饰或指该细胞源自经过如此修饰的细胞。例如,重组细胞可包含这样的基因,其不

以相同的形式存在于天然(非重组)形式的该细胞内,或者重组细胞可包含(存在于天然形式的细胞中的)天然基因,但该基因已经过修饰并被再次引入该细胞中。重组细胞可包含对该细胞而言是内源性的核酸,该核酸在未将其从该细胞移除的情况下进行了修饰;这种修饰包括通过基因置换、定点突变以及本领域一般技术人员已知的相关技术获得的那些修饰。重组DNA技术包括体外产生重组DNA以及将该重组DNA转移进细胞中的技术,在所述细胞中该重组DNA可表达和增殖,从而产生重组多肽。多核苷酸或核酸的“重组”和“重组的”一般是指两条或更多条核酸或多核苷酸链或片段的组装或组合,以产生新的多核苷酸或核酸。重组多核苷酸或核酸有时称为嵌合体。当核酸或多肽为人工的或工程化改造的,或衍生自人工的或工程化改造的蛋白质或核酸时,该核酸或多肽是“重组的”。

[0062] 如本文所用,术语核酸或基因“扩增”是指这样的一种过程,通过该过程特定DNA序列以不成比例的方式复制,使得被扩增的核酸或基因以高于基因组中最初存在的拷贝数的拷贝数存在。在一些实施方案中,通过在药物(如可抑制的酶的抑制剂)的存在下进行生长来选择细胞,可导致编码在该药物存在下的生长所需的基因产物的内源基因的扩增,或者导致编码这个核酸或基因产物的外源(即输入)序列的扩增,或者导致这两种扩增。

[0063] “扩增”是涉及模板特异性的核酸复制的特定情形。它与非特异性模板复制(即依赖于模板,但不依赖于特定模板的复制)形成对比。此处模板特异性不同于复制保真性(即正确多核苷酸序列的合成)和核苷酸(核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸)特异性。模板特异性在很多情况下以“靶”特异性描述。靶序列是此种意义的“靶”,也就是可设法将它们从其他核酸挑选出来。已经设计出主要用于该挑选的扩增技术。

[0064] 如本文所用,术语“引物”指这样的寡核苷酸(核苷酸残基的聚合物),无论是如在纯化的限制酶切消化物中天然存在的还是以合成方式产生的,其当被置于与某核酸链互补的引物延伸产物的合成得以诱导的条件下(即在核苷酸、诱导剂如DNA聚合酶的存在下以及在合适的温度和pH下)时能够充当合成起始点。为了使扩增效率最高,引物优选为单链的,但作为另一种选择其也可以是双链的。如果是双链,则首先对引物进行处理以分离其链,然后再用于制备延伸产物。在一个方面,引物是寡脱氧核糖核苷酸。引物必须足够长以在诱导剂的存在下引发延伸产物的合成。引物的确切长度取决于多种因素,包括温度、引物来源以及使用的方法。

[0065] 如本文所用,术语“探针”指这样的寡核苷酸,无论是如在纯化的限制酶切消化物中的天然存在的还是以合成方式、重组方式或通过PCR扩增产生的,其通常能够与所关注的另一寡核苷酸杂交。探针可以是单链的或双链的。探针可用于特定基因序列的检测、鉴别和分离。设想到,本发明中所用的任何探针将用任何“报告分子”进行标记,从而其可在任何检测系统中检测,所述检测系统包括但不限于酶系统(如ELISA,以及基于酶的组织化学测定法)、荧光系统、放射性系统和发光系统。无意于将本发明受限于任何具体的检测系统或标记。

[0066] 如本文所用,当用于讨论聚合酶链反应时,术语“靶”是指用于聚合酶链反应的引物结合的核酸区域。因此,可设法将“靶”从其他核酸序列中挑选出来。核苷酸“片段”是在靶核酸序列内的核酸区域。

[0067] 如本文所用,术语“聚合酶链反应”(PCR)是指美国专利No.4,683,195、No.4,683,202和No.4,965,188的方法(藉此将该专利以引用方式并入本文),其包括在不进行克隆或

纯化的情况下增加靶序列的某个片段在基因组DNA的混合物中的浓度的方法。扩增靶序列的这种方法是本领域众所周知的。

[0068] 如本文所用,术语“扩增试剂”是指扩增所需的除引物、核酸模板和扩增酶以外的那些试剂(如脱氧核糖核苷三磷酸、缓冲剂等)。通常,将扩增试剂连同其他反应组分放置于和装于反应容器(试管、微孔等)中。

[0069] 如本文所用,术语“限制性内切酶”或“限制酶”指能够在称为限制位点的特定核苷酸序列处或附近切开双链或单链DNA的酶(如细菌酶)。包含限制位点的核苷酸序列为给定的限制性内切酶或限制酶所识别和切割并且常常是插入DNA片段的位点。可将限制位点工程引入到表达载体或DNA构建体中。

[0070] “同源重组”是指两个DNA分子或成对染色体之间的DNA片段在相同或几乎相同的核苷酸序列位点处的交换。在一些实施方案中,染色体整合是同源重组。

[0071] 如果核酸或多核苷酸在天然状态下或通过本领域的技术人员已知的方法操纵时,可转录和/或翻译产生多肽或其片段,则称该核酸或多核苷酸“编码”多肽。也称此类核酸的反义链编码该序列。

[0072] 如本领域已知的,DNA序列可被RNA聚合酶转录而产生RNA序列,但RNA序列可被逆转录酶逆转录而产生DNA序列。

[0073] “宿主菌株”或“宿主细胞”指适合于包含所关注的DNA序列的表达载体的宿主。所关注的DNA序列可在宿主菌株或宿主细胞中表达所关注的蛋白质。

[0074] “蛋白质”或“多肽”包含氨基酸残基的多聚序列。在本文中,术语“蛋白质”与“多肽”可互换使用。遵照国际纯化学及应用化学联合会-国际生物化学联合会的生物化学命名委员会(IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature, JCBN)所定义的氨基酸三字母代码在整个本公开中使用。还应理解,由于遗传密码的简并性,多肽可由不止一种核苷酸序列编码。

[0075] “前序列”或“前肽序列”指蛋白酶分泌所必要的处于信号肽序列和成熟蛋白酶序列之间的氨基酸序列。前序列或前肽序列的切除会得到成熟的活性蛋白酶。

[0076] 术语“信号序列”或“信号肽”指可参与成熟或前体形式的蛋白质的分泌或直接转运的氨基酸残基序列。信号序列通常位于该前体或成熟蛋白质序列的N端。信号序列可以是内源性的或外源性的。一种示例性的外源性信号序列包含来自枯草芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶的信号序列的前七个氨基酸残基和这七个氨基酸残基所融合到的来自迟缓芽孢杆菌(ATCC 21536)枯草杆菌蛋白酶的信号序列的其余部分。通常成熟蛋白质缺少信号序列。在转运蛋白质后通常由信号肽酶从该蛋白质切除信号序列。

[0077] 术语“杂合信号序列”指与待表达的基因的信号序列融合的信号序列,其中该序列的一部分从表达宿主获得。在一些实施方案中,利用合成序列。

[0078] 术语蛋白质、多肽或肽的“成熟”形式指无信号肽序列和前肽序列的该蛋白质、多肽或肽功能形式。

[0079] 术语蛋白质或肽的“前体”形式指具有与该蛋白质的氨基或羧基末端有效连接的前序列的该蛋白质成熟形式。前体还可具有与前序列的氨基末端有效连接的“信号”序列。前体还可以具有涉及翻译后活性的另外的多核苷酸(例如这样的多核苷酸,从前体上将其切除会留下蛋白质或肽的成熟形式)。

[0080] 关于氨基酸序列或核酸序列的术语“野生型”指所述氨基酸序列或核酸序列是天然的或天然存在的序列。

[0081] 如本文所用,对于氨基酸残基位置,“与……相对应”或“对应于”或“对应”是指在蛋白质或肽的列举位置处的氨基酸残基,或与蛋白质或肽中列举的残基类似、同源或等同的氨基酸残基。如本文所用,“对应区域”一般是指沿相关蛋白质或参考蛋白质的类似位置。

[0082] 术语“衍生自”和“得自”不仅指通过所考虑的生物菌株产生或可产生的蛋白酶,还指从此类菌株分离的DNA序列编码的以及在包含此类DNA序列的宿主生物中产生的蛋白酶。另外,该术语指由合成的和/或cDNA起源的DNA序列编码的,并且具有所考虑的蛋白酶的鉴别特性的蛋白酶。例如,“衍生自芽孢杆菌的蛋白酶”是指芽孢杆菌天然产生的、具有蛋白水解活性的那些酶,以及指类似于芽孢杆菌来源产生的那些蛋白酶的丝氨酸蛋白酶,但其使用基因工程技术、通过编码丝氨酸蛋白酶的核酸转化的非芽孢杆菌生物产生。

[0083] 在两条核酸或多肽序列的语境中,术语“相同”是指当比对以达到最大匹配程度时两条序列中相同的残基,如使用如下序列比较或分析算法中的一种所测定的。

[0084] 如本文所用,“同源基因”是指来自不同但通常相关的物种的一对基因,这对基因彼此对应并且彼此相同或非常类似。该术语涵盖了因物种形成(即新物种的形成)而分化的基因(如垂直同源基因),以及因基因复制而分化的基因(如平行同源基因)。

[0085] 如本文所用,“同源性”指序列相似性或同一性,其中同一性是优选的。同源性可以使用本领域已知的标准技术测定(参见例如Smith和Waterman,Adv. Appl. Math. (《应用数学进展》) 2:482 (1981); Needleman和Wunsch, J. Mol. Biol. (《分子生物学杂志》) 48:443 (1970); Pearson和Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (《美国国家科学院院刊》) USA 85:2444 (1988); 软件程序,如在威斯康星遗传学软件包(Wisconsin Genetics Software Package, 得自威斯康星州麦迪逊市遗传学计算机小组(Genetics Computer Group, Madison, WI))中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA; 以及Devereux等人, Nucl. Acid Res. (《核酸研究》) 12:387-395 (1984))。可用的算法的一个实例是PILEUP。PILEUP利用渐进式成对序列比对法,由一组相关的序列产生多序列比对。其还可以画出树状图,该图示出用于产生该比对的聚类关系。PILEUP使用Feng和Doolittle的简化渐进式比对方法(Feng和Doolittle, J. Mol. Evol. (《分子进化杂志》) 35:351-360 (1987))。该方法与Higgins和Sharp描述的方法类似(Higgins和Sharp, CABIOS 5:151-153 (1989))。可用的PILEUP参数包括:默认空位权重(gap weight)为3.00,默认空位长度权重(gap length weight)为0.10,加权的末端空位。可用的算法的另一个实例是Altschul等人描述的BLAST算法(Altschul等人, J. Mol. Biol. (《分子生物学杂志》) 215:403-410, (1990); 以及Karlin等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (《美国国家科学院院刊》) 90:5873-5787 (1993))。特别有用的BLAST程序为WU-BLAST-2程序(Altschul等人, Meth. Enzymol. (《酶学方法》) 266:460-480 (1996))。WU-BLAST-2使用数种搜索参数,大部分参数设定为默认值。可调参数设定为如下值:重叠跨度(overlap span) = 1,重叠分数(overlap fraction) = 0.125,字串阈值(word threshold) (T) = 11。HSP S和HSP S2参数是动态值,由程序自身根据特定序列的组成和被用来搜索所关注的序列的特定数据库的组成来确定。然而,可以调整所述值来增加灵敏度。

[0086] 参考序列和所关注的测试序列之间的序列同一性百分数可由本领域技术人员容

易地测定。多核苷酸或多肽序列共有的同一性百分数通过分子之间序列信息的直接比较测定,所述比较通过序列比对并使用本领域已知的方法确定同一性来进行。适用于确定序列相似性的算法的实例是BLAST算法,其描述于Altschul等人,J.Mol.Biol. (《分子生物学杂志》),215:403-410 (1990) 中。进行BLAST分析的软件可通过美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information) 公开获得。该算法涉及首先通过在查询序列中确定长度为W的短字符串来确定高打分序列对(highscoring sequence pair, HSP),该短字符串当与数据库序列中相同长度的字符串比对时匹配或满足某取正值的阈值分数T。这些最初的邻近命中字符串充当起点来寻找含有它们的更长的HSP。使命中字符串沿进行比较的两条序列的每一条朝两个方向扩展至累积比对分数不能增加为止。命中字符串的延伸在如下情况会停止:累积比对分数从最大获得值下降达数量X;累积分数达到零或零以下;或者到达任一序列的末端。BLAST算法参数W、T和X决定该算法的灵敏度和速度。BLAST程序使用如下默认值:字长(W)为11,BLOSUM62打分矩阵(参见Henikoff和Henikoff, Proc.Natl.Acad.Sci.USA (《美国国家科学院院刊》) 89:10915 (1992)),比对数(B)为50,期望值(E)为10, $M' 5, N' -4$,以及对两条链的比较。

[0087] BLAST算法然后进行两条序列之间相似性的统计分析(参见例如,Karlin和Altschul,Proc.Natl.Acad.Sci.USA (美国国家科学院院刊),90:5873-5787 (1993))。BLAST算法提供的一种相似性量度是最小合计概率(smallest sum probability, $P(N)$),其指示两条核苷酸或氨基酸序列之间的匹配会偶然发生的概率。例如,如果在测试核酸与丝氨酸蛋白酶核酸的比较中最小合计概率低于约0.1,更优选低于约0.01,最优选低于0.001,则该核酸可视为与本发明的丝氨酸蛋白酶核酸相似。在测试核酸编码丝氨酸蛋白酶多肽的情况下,如果比较得到低于约0.5,更优选低于约0.2的最小合计概率,则其视为与指定的丝氨酸蛋白酶核酸相似。

[0088] 在两条或更多条核酸或多肽序列的语境中,“相同”或“同一性”百分数是指,当比较和比对以达到最大相似性时,两条或更多条序列是相同的或分别具有指定百分比的相同核酸残基或氨基酸残基,如使用序列比较算法或通过目测所确定的。主题氨基酸序列与参考(即查询)氨基酸序列的“序列同一性百分数”或“同一性%”或“序列同一性%”或“氨基酸序列同一性%”意指当将序列进行最佳比对时,在比较长度上主题氨基酸序列与查询氨基酸序列相同(即以氨基酸比氨基酸计)达指定的百分数。因此,就两条氨基酸序列而言,80%氨基酸序列同一性或80%同一性意指两条最佳比对的氨基酸序列中80%氨基酸残基是相同的。

[0089] 主题核酸序列与参考(即查询)核酸序列的“序列同一性百分数”或“同一性%”或“序列同一性%”或“核苷酸序列同一性%”意指当将序列进行最佳比对时,在比较长度上主题核酸序列与查询序列相同(即以多核苷酸序列的核苷酸比核苷酸计)达指定的百分数。因此,就两条核酸序列而言,80%核苷酸序列同一性或80%同一性意指两条最佳比对的核酸序列中80%核苷酸残基是相同的。

[0090] 在一个方面,主题序列与查询序列的“序列同一性百分数”或“序列同一性%”或“同一性%”可通过将两条序列进行最佳比对,并且在比较长度上比较两条最佳比对的序列来计算。确定在最佳比对中相同的残基出现在两条序列中的位置的数目,从而提供匹配位置的数目,然后将匹配位置的数目除以比较长度(除非另外指明,否则其为查询序列的长

度)的位置总数。所得的数目乘以100而得到主题序列与查询序列的序列同一性百分数。

[0091] “最佳比对”或“最佳比对的”指两条(或更多条)序列的给出最高同一性百分比分数的比对。例如,可通过将两条蛋白质序列进行手动比对使得每条序列中最大数目的相同氨基酸残基被一起比对,或通过使用本文描述的或本领域已知的软件程序或方法,来实现所述序列的最佳比对。可通过将两条核酸序列进行手动比对使得每条序列中最大数目的相同核苷酸残基被一起比对,或通过使用本文描述的或本领域已知的软件程序或方法,来实现所述序列的最佳比对。

[0092] 在一个示例性方面,当用限定的参数,例如限定的氨基酸置换矩阵、空位存在罚分(也称为空位开放罚分)和空位延伸罚分来比对两条多肽序列,以实现该对序列所可能的最高相似性分数时,这两条多肽序列被认为是“最佳比对的”。BLOSUM62打分矩阵(Henikoff和Henikoff,Proc.Natl.Acad.Sci.USA《美国国家科学院院刊》,89(22):10915(1992))在多肽序列比对算法(例如BLASTP)中通常用作默认打分置换矩阵。施加空位存在罚分以在被比对的序列之一者中引入单个氨基酸空位,并为该空位中的每一个残基位置施加空位延伸罚分。所采用的示例性比对参数是:BLOSUM62打分矩阵,空位存在罚分=11,空位延伸罚分=1。比对分数由每条序列的该对比开始和结束的氨基酸位置(如比对窗口),以及任选由一条或两条序列中一个空位或多个空位的插入来限定,以实现可能的最高相似性分数。

[0093] 两条或更多条序列之间的最佳比对可通过目测手动来确定,或通过使用计算机,例如但不限于如BLASTP程序(用于氨基酸序列)和BLASTN程序(用于核酸序列)(参见例如Altschul等人,Nucleic Acids Res.《核酸研究》,25(17):3389-3402(1997);还可参见美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,NCBI)网站)来确定。

[0094] 如果所关注的多肽包含与参考多肽的氨基酸序列具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或至少约99.5%序列同一性的氨基酸序列,则可称所关注的多肽与参考多肽“实质上相同”。两条这类多肽之间的同一性百分数可通过观察两条经最佳比对的多肽序列来手动确定,或通过使用软件程序或算法(如BLAST、ALIGN、CLUSTAL)采用标准参数来确定。两条多肽实质上相同的一个指示是第一多肽与第二多肽是免疫交叉反应性的。通常,因保守氨基酸置换而不同的多肽是免疫交叉反应性的。因而,例如在某条多肽与第二多肽仅因保守氨基酸置换或一个或多个保守氨基酸置换而不同的情况中,这两条多肽是实质上相同的。

[0095] 如果所关注的核酸包含与参考核酸的核苷酸序列具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或至少约99.5%序列同一性的核苷酸序列,则可称所关注的核酸与参考核酸“实质上相同”。两条这类核酸之间的同一性百分数可通过观察两条经最佳比对的核酸序列来手动确定,或通过使用软件程序或算法(如BLAST、ALIGN、CLUSTAL)采用标准参数来确定。两条核酸序列实质上相同的一个指示是这两条核酸分子在严格条件(例如,在中等严格性至高严格性的范围内)下彼此杂交。包含能够与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11的多核苷酸序列在中等严格性至高严格性或最高严格性的条件下杂交的多核苷酸序列的核酸编码的变体蛋白酶可以被认为

是与分别具有SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8中任一者的多肽序列的变体蛋白酶“等同的”。

[0096] 当核酸或多核苷酸与其他组分(例如,但不限于如其他蛋白质、核酸、细胞等)部分地或完全地分离时,该核酸或多核苷酸是“分离的”。相似地,当多肽、蛋白质或肽与其他组分(例如,但不限于如其他蛋白质、核酸、细胞等)部分地或完全地分离时,该多肽、蛋白质或肽是“分离的”。以摩尔浓度计,在组合物中,分离的物质的丰度比其他物质更高。例如,分离的物质可以占有所有存在的大分子物质的至少约50%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%(以摩尔浓度计)。优选地,所关注的物质纯化为基本上均一的(即通过常规检测方法在组合物中检测不到污染物)。纯度和均一性可以使用本领域熟知的多种技术测定,例如对蛋白质或核酸样品进行琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳,然后在染色后进行目测观察。如果需要,可采用高分辨率技术,如高效液相色谱法(HPLC)或类似的方法来纯化材料。

[0097] 应用于核酸或多肽的术语“纯化的”一般表示核酸或多肽基本上不含其他组分,如本领域熟知的分析技术所测定的(如,纯化的多肽或多核苷酸在电泳凝胶、色谱洗脱物和/或经密度梯度离心的介质中形成离散的条带)。例如,在电泳凝胶中基本上产生一个条带的核酸或多肽是“纯化的”。纯化的核酸或多肽的纯度为至少约50%,通常纯度为至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或更大(如以摩尔浓度计的重量%)。在相关的意义上,本发明提供对组合物富集一种或多种本发明的分子,例如一种或多种本发明的多肽或多核苷酸的方法。在应用纯化或富集技术后某分子的浓度有实质性增加时,则对组合物富集了该分子。实质上纯的本发明的多肽或多核苷酸(如,分别为实质上纯的本发明变体蛋白酶或编码本发明变体蛋白酶的多核苷酸)通常占特定组合物中的所有大分子物质重量(以摩尔浓度计)的至少约55%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或更高。

[0098] 在相关的意义上,本发明提供对组合物富集一种或多种本发明的分子,例如一种或多种本发明的多肽(如一种或多种本发明的变体蛋白酶)或一种或多种本发明的核酸(如编码一种或多种本发明变体蛋白酶的一种或多种核酸)的方法。在应用纯化或富集技术后某分子的浓度有实质性增加时,则对组合物富集了该分子。实质上纯的多肽或多核苷酸通常占特定组合物中的所有大分子物质重量(以摩尔浓度计)的至少约55%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或更高。

[0099] 如本文所用,术语“组合诱变”指产生参考核酸序列的核酸变体的文库的方法。在这些文库中,变体含有选自一组预定突变的一个或数个突变。这类方法还提供了引入随机突变的手段,这些随机突变不是该预定突变组的成员。一些此类方法包括在美国专利No.6,582,914中示出的那些方法,藉此将该专利以引用的方式并入本文。一些此类组合诱变方法包括和涵盖在市售试剂盒(如QuikChange®多定点诱变试剂盒(Stratagene))中体现的方法。

[0100] 如本文所用,结合变体蛋白酶使用的“具有改善的特性”是指相对于对应的参考蛋白酶(如野生型或天然存在的蛋白酶)而言,变体蛋白酶具有改善的或增强的洗涤或清洁性能,和/或改善的或增强的稳定性,任选保持了洗涤或清洁性能。变体蛋白酶的改善特性可

以包括改善的洗涤或清洁性能和/或改善的稳定性。在一个方面,本发明提供表现出如下特性中的一种或多种的本发明变体蛋白酶:相对于参考蛋白酶(如,野生型蛋白酶,例如野生型枯草杆菌蛋白酶)的改善的手动洗涤性能、改善的手动或手工盛具洗涤性能、改善的自动盛具洗涤性能、改善的衣物洗涤性能和/或改善的稳定性。

[0101] 如本文所用,术语“功能测定法”指提供蛋白质活性的指示的测定法。在一些实施方案中,该术语是指其中针对蛋白质以其惯常的本领发挥作用的能力对该蛋白质进行分析的测定系统。例如,就酶而言,功能测定法涉及测定该酶催化反应的效力。

[0102] 如本文所用,术语“靶性质”是指要改变的起始基因的性质。无意于将本发明限定于任何特定的靶性质。然而,在一些实施方案中,靶性质是基因产物的稳定性(如,对变性、蛋白水解或其他降解因素的耐受性),而在其他实施方案中,生产宿主的生产水平发生了改变。

[0103] 如本文所用,在核酸的语境中,术语“性质”或其语法等同形式是指可选择或检测的核酸的任何特性或属性。这些性质包括但不限于影响与多肽的结合的性质、赋予包含特定核酸的细胞的性质、影响基因转录的性质(如,启动子强度、启动子识别、启动子调控、增强子功能)、影响RNA加工的性质(如,RNA剪接、RNA稳定性、RNA构象和转录后修饰)、影响翻译的性质(如mRNA的水平、调控、与核糖体蛋白的结合、翻译后修饰)。例如,可以改变核酸的转录因子、聚合酶、调节因子等的结合位点以产生所需的特性或鉴别不期望的特性。

[0104] 如本文所用,在多肽(包括蛋白质)的语境中,术语“性质”或其语法等同形式是指可选择或检测的多肽的任何特性或属性。这些性质包括但不限于氧化稳定性、底物特异性、催化活性、酶活性、热稳定性、碱稳定性、pH活性分布、对蛋白降解的耐受性、 K_M 、 k_{cat} 、 k_{cat}/K_M 比率、蛋白质折叠、诱导免疫应答、与配体结合的能力、与受体结合的能力、被分泌的能力、在细胞表面上展示的能力、低聚化的能力、信号传导的能力、刺激细胞增殖的能力、抑制细胞增殖的能力、诱导细胞凋亡的能力、被磷酸化或糖基化作用修饰的能力和/或治疗疾病的能力等。

[0105] 如本文所用,术语“筛选”在本领域中具有其通常含义。在一个示例性筛选方法中,提供了突变体核酸或由其编码的变体多肽,并且分别评估或测定突变体核酸或变体多肽的性质。突变体核酸或变体多肽的测定性质可以分别与对应的前体(亲本)核酸的性质或与对应的亲本多肽的性质比较。

[0106] 对技术人员而言将显而易见的是,获得具有改变的性质的核酸或蛋白质的筛选方法取决于原料性质,突变体核酸的产生旨在促进原料性质的变更。因此,技术人员将认识到,本发明不限于要筛选的任何具体性质,并且如下性质描述仅列出了示例性的实例。筛选任何特定性质的方法通常在本领域中有所描述。例如,可在突变之前和之后测量结合性、pH、特异性等,其中变化表明发生了变更。优选地,筛选以高通量方式进行,包括同时筛选多个样品,包括但不限于利用芯片、噬菌体展示和多底物和/或指示剂的测定法。

[0107] 如本文所用,在一些实施方案中,筛选方法包括一个或多个选择步骤,在这些步骤中将所关注的变体从一群变体中富集。这些实施方案的实例包括对赋予宿主生物生长优势的变体的选择,以及噬菌体展示或任何其他展示方法,其中可根据变体的结合或催化性质从一群变体捕集该变体。在一些实施方案中,使变体文库暴露于应力(热、蛋白酶、变性)下,随后仍然完好的变体经筛选而鉴别或通过选择而富集。意在使该术语涵盖任何合适的选择

方式。实际上,无意于将本发明限定于任何特定的筛选方法。

[0108] 术语“经修饰的核酸序列”和“经修饰的基因”在本文中可互换使用,是指包含天然存在的(即野生型)核酸序列的缺失、插入或中断的核酸序列。在一些实施方案中,经修饰的核酸序列的表达产物是截短的蛋白质(例如,如果修饰为序列的缺失或中断的话)。在一些实施方案中,截短的蛋白质保留生物活性。在备选的实施方案中,经修饰的核酸序列的表达产物是延长的蛋白质(例如,修饰包括核酸序列中的插入)。在一些实施方案中,核苷酸插入核酸序列会导致截短的蛋白质(例如,当插入导致形成终止密码子时)。因此,插入可以导致截短的蛋白质或延长的蛋白质表达产物。

[0109] “突变型”核酸序列通常指这样的核酸序列,其在宿主细胞的野生型序列中存在的至少一个密码子中具有变更,使得该突变型核酸序列的表达产物是相对于野生型蛋白质而言具有改变的氨基酸序列的蛋白质。表达产物可具有改变的功能本领(例如增强的酶活性)。

[0110] 如本文所用,短语“底物特异性的改变”是指酶的底物特异性的变化。在一些实施方案中,底物特异性的变化被定义为由于酶的突变或反应条件的改变而导致的特定底物的 k_{cat} 和/或 K_m 的变化。通过比较酶表现出的对不同底物的催化效率,来确定酶的底物特异性。这些测定尤其可用于评估突变酶的效率,因为通常期望产生的变体酶对所关注的底物表现出更大 k_{cat}/K_m 比率。然而,无意于将本发明限定于任何特定的底物组合物或底物特异性。

[0111] 如本文所用,“表面性质”用于指静电荷,以及蛋白质表面所展现的诸如疏水性和亲水性之类的性质。

[0112] 术语“热稳定的”和“热稳定”和“热稳定性”是指蛋白酶在本发明的蛋白水解、水解、清洁或其他过程期间的主要条件下,暴露于确定温度指定时间段后,例如暴露于改变的温度下,仍保持指定量的酶活性。改变的温度包括增加或降低的温度。在一些实施方案中,蛋白酶在暴露于改变的温度指定时间段(例如至少约60分钟、约120分钟、约180分钟、约240分钟、约300分钟等)后保持至少约50%、约60%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约92%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%的蛋白水解活性。

[0113] 在氧化、螯合剂、热和/或pH稳定蛋白酶的语境中,术语“增强的稳定性”是指与其他蛋白酶(例如枯草杆菌蛋白酶)和/或野生型酶相比,随时间推移保持了更高的蛋白水解活性。

[0114] 在氧化、螯合剂、热和/或pH稳定蛋白酶的语境中,术语“降低的稳定性”是指与其他蛋白酶(例如枯草杆菌蛋白酶)和/或野生型酶相比,随时间推移保持了更低的蛋白水解活性。

[0115] 术语“清洁活性”是指在本发明的蛋白水解、水解、清洁或其他过程期间的主要条件下,变体蛋白酶或参考蛋白酶实现的清洁性能。在一个方面,变体蛋白酶或参考蛋白酶的清洁性能可以使用用于清洁物品或表面上的一种或多种酶敏感性污渍(例如食物、草、血、奶或卵蛋白引起的污渍)的各种测定法来测定。变体或参考蛋白酶的清洁性能可通过使物品或表面上的污渍经受标准洗涤条件,并且使用各种色谱方法、分光光度方法或其他定量方法评估污渍被移除的程度来测定。示例性的清洁测定法和方法包括但不限于,如WO 99/34011和美国专利6,605,458(二者均以引用的方式并入本文)中描述的那些方法,以及下文提供的实施例中包括的那些清洁测定法和方法。

[0116] 术语变体蛋白酶或参考蛋白酶的“清洁有效量”是指在特定清洁组合物中实现所需水平的酶活性的蛋白酶的量。这种有效量可由本领域普通技术人员容易地确定并且基于多种因素,例如所用的特定蛋白酶、清洁应用、清洁组合物的具体组成,以及是需要液体组合物还是干燥(例如颗粒状、条棒状)组合物等等。

[0117] 术语“清洁辅助材料”是指清洁组合物中包含的除本发明变体蛋白酶之外的任何液体、固体或气体材料。本发明的清洁组合物可以包括一种或多种清洁辅助材料。每种清洁辅助材料通常根据清洁组合物的特定类型和形式(例如液体、颗粒、粉末、条、糊、喷雾、片、凝胶或泡沫组合物)来选择。优选地,每种清洁辅助材料与组合物中所用的蛋白酶相容。

[0118] 在清洁活性的语境中,术语“增强的性能”是指某些酶敏感性污渍例如蛋、奶、草或血的增加的或更高的清洁活性,这种活性是在标准洗涤循环和/或多个洗涤循环后通过常用的评价法来测定的。

[0119] 在清洁活性的语境中,术语“减低的性能”是指某些酶敏感性污渍例如蛋、奶、草或血的降低的或较小的清洁活性,这种活性是在标准洗涤循环后通过常用的评价法来测定的。

[0120] 在本发明变体蛋白酶的清洁活性语境中,术语“相当的性能”是指至少约60%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%、至少约99.5%的比较或参考蛋白酶(如市售蛋白酶)的清洁活性,所述比较或参考蛋白酶包括但不限于例如OPTIMASE™蛋白酶(杰能科公司(Genencor))、PURAFFECT™蛋白酶产品(杰能科公司)、SAVINASE™蛋白酶(诺维信公司(Novozymes))、BPN'-变体(参见例如美国专利No. Re34,606)、RELASE™、DURAZYME™、EVERLASE™、KANNASE™蛋白酶(诺维信公司)、MAXACAL™、MAXAPEM™、PROPERASE™蛋白酶(杰能科公司;还可参见美国专利No. Re 34,606和美国专利No. 5,700,676、No. 5,955,340、No. 6,312,936和No. 6,482,628)和迟缓芽孢杆菌变体蛋白酶产品(例如WO 92/21760、WO 95/23221和/或WO 97/07770中描述的那些)。可如此确定清洁性能:在关于酶敏感性污渍(例如草、血或奶)的各种清洁测定法中,对本发明变体蛋白酶与参考枯草杆菌蛋白酶进行比较,这可在标准洗涤循环条件后通过常用的分光光度测定或分析法来测定。

[0121] 如本文所用,本发明的“清洁组合物”或“清洁制剂”是指可用于从待清洁的物体、物品或表面移除或除去化合物(如不需要的化合物)的任何本发明组合物,所述待清洁的物体、物品或表面包括但不限于,例如织物、织物物品、盛具物品、餐具物品、玻璃器具物品、隐形镜片、其他固体基底、毛发(洗发剂)(包括人或动物毛发)、皮肤(肥皂或/和霜剂)、牙齿(漱口水、牙膏)、物品或物体的表面(如硬质表面,例如以下的硬质表面:桌子、桌面、墙壁、家具物品、地板、天花板、非盛具物品、非餐具物品等)、接触镜等。该术语涵盖被选择用于特定类型的所需清洁组合物以及用于产品的形式(如液体、凝胶、颗粒或喷雾组合物)的任何材料和/或添加的化合物,只要该组合物与用于组合物的蛋白酶和其他酶相容即可。易于通过考虑待清洁的表面、物体、物品或织物以及针对在使用期间清洁条件所需的组合物形式来具体选择清洁组合物材料。

[0122] 清洁组合物和清洁制剂包括适于对任何物体、物品和/或表面进行清洁、漂白、消毒和/或灭菌的任何组合物。此类组合物和制剂包括但不限于例如:液体和/或固体组合物,

包括清洁或洗涤剂组合物,例如液体、片状、凝胶、颗粒和/或固体衣物清洁组合物或洗涤剂组合物以及精细织物洗涤剂组合物;硬质表面清洁组合物和制剂,如用于玻璃、木材、陶瓷和金属台面和窗;地毯洗涤剂;烘箱洗涤剂;织物清新剂;织物软化剂;以及纺织物、衣物助洗剂清洁组合物或洗涤剂组合物、洗衣添加剂清洁组合物和衣物预洗剂清洁组合物;盛具洗涤组合物,包括例如手动或手工盛具洗涤组合物(如手动或手工盛具洗涤剂)和自动盛具洗涤组合物(如自动盛具洗涤用洗涤剂)。

[0123] 除非另外指明,否则如本文所用,清洁组合物或清洁制剂包括颗粒状或粉末形式的多功能洗涤剂或重垢洗涤剂,尤其是清洁洗涤剂;液体、颗粒、凝胶、固体、片或糊形式的多功能洗涤剂,尤其是所谓的重垢液体(HDL)洗涤剂或重垢粉末洗涤剂(HDD)类型;液体精细织物洗涤剂;手动或手工盛具洗涤剂,包括高泡类型的那些;手动或手工盛具洗涤剂、自动盛具洗涤用洗涤剂或盛具或餐具洗涤剂,包括家居和公共场所使用的各种片、粉末、固体、颗粒、液体、凝胶和漂洗助剂类型;液体清洁和消毒剂,包括抗菌手洗类型、清洁条棒、漱口水、假牙洗涤剂、汽车清洗剂、地毯清洗剂、浴室洗涤剂;人和其他动物的洗发剂和/或毛发清洗剂;沐浴凝胶和泡沫浴和金属洗涤剂;以及清洁辅剂,例如漂白添加剂和“去污条”或预处理类型。在一些实施方案中,颗粒状组合物为“紧凑”形式;在一些实施方案中,液体组合物为“浓缩”形式。

[0124] 如本文所用,“织物清洁组合物”包括手洗和机洗衣物洗涤剂组合物,包括洗衣添加剂组合物和适用于染污织物(如衣物、亚麻布和其他纺织材料)的浸洗和/或预处理的组合物在内。

[0125] 如本文所用,“非织物清洁组合物”包括非织物(即非织物)表面清洁组合物,包括但不限于例如手动或手工或自动的盛具洗涤剂组合物、口腔清洁组合物、假牙清洁组合物和个人清洁组合物。

[0126] 如本文所用,术语“洗涤剂组合物”或“洗涤剂制剂”用于指旨在用于洗涤介质中用来清洁染污的或脏的物体(包括特定的织物和/或非织物物体或物品)的组合物。本发明的这类组合物不限于任何特定的洗涤剂组合物或制剂。实际上,在一些方面,本发明的洗涤剂包含至少一种本发明的变体蛋白酶,此外还包含一种或多种表面活性剂、转移酶、水解酶、氧化还原酶、助洗剂(如助洗剂盐)、漂白剂、漂白活化剂、上蓝剂、荧光染料、结块抑制剂、掩蔽剂、酶激活剂、抗氧化剂和/或增溶剂。在某些情况下,助洗剂盐为硅酸盐和磷酸盐的混合物,优选硅酸盐(如偏硅酸钠)比磷酸盐(如三聚磷酸钠)多。一些本发明的组合物(例如但不限于清洁组合物或洗涤剂组合物)不含有任何磷酸盐(如磷酸盐或磷酸盐助洗剂)。

[0127] 如本文所用,术语“漂白”是指以足够的时长和/或在合适的pH和/或温度条件下处理材料(如织物、衣物、纸浆等)或表面以实现该材料的增亮(增白)和/或清洁。适用于漂白的化学品的实例包括但不限于例如 ClO_2 、 H_2O_2 、过酸、 NO_2 等。

[0128] 如本文所用,蛋白酶(如本发明的变体蛋白酶)的“洗涤性能”是指变体蛋白酶对洗涤的贡献,与未向组合物中添加该变体蛋白酶的洗涤剂相比其为洗涤剂提供额外的清洁性能。洗涤性能是在相关的洗涤条件下进行比较。在一些测试系统中,其他相关因素(如洗涤剂组成、泡沫浓度、水硬度、洗涤力学、时间、pH和/或温度)可以使得某些细分市场中的家居应用(手动或手用盛具洗涤、自动盛具洗涤、盛具清洁、餐具清洁、织物清洁等)的典型条件得以模拟的方式进行控制。

[0129] 术语“相关洗涤条件”在本文中用于指在手动盛具洗涤、自动盛具洗涤或衣物洗涤剂细分市场中在家庭中实际上使用的条件,特别是洗涤温度、时间、洗涤力学、泡沫浓度、洗涤剂类型和水硬度。

[0130] 术语“改善的洗涤性能”用于指在相关洗涤条件下在去污方面获得更好的最终结果,或以重量计,相对于相应的野生型或起始亲本蛋白酶,需要较少的变体蛋白酶来获得相同的最终结果。

[0131] 如本文所用,术语“消毒”是指从表面除去污染物,以及抑制或杀死物品表面上的微生物。无意于将本发明受限于任何特定表面、物品或待移除的污染物或微生物。

[0132] 本文的清洁组合物的“紧凑”形式最好由密度反映,就组成来说,由无机填料盐的量反映。无机填料盐是呈粉末形式的洗涤剂组合物的常规成分。在常规洗涤剂组合物中,填料盐是大量存在,通常占总组合物的约17重量%至约35重量%。相比之下,在紧凑型组合物中,填料盐以不超过总组合物的约15%的量存在。在一些实施方案中,填料盐以不超过所述组合物的约10重量%,或更优选不超过约5重量%的量存在。在一些实施方案中,无机填料盐选自碱金属和碱土金属硫酸盐和氯化物。在一些实施方案中,填料盐为硫酸钠。

[0133] 在本文中,给定氨基酸序列中氨基酸残基的位置通常利用SEQ ID NO:2中所示解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN'氨基酸序列的对应氨基酸残基的位置的编号方式进行编号。SEQ ID NO:2的解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN'氨基酸序列因而充当参考序列。可利用本文所述的比对算法将给定氨基酸序列(如本文描述的变体蛋白酶氨基酸序列)与BPN'序列(SEQ ID NO:2)比对,该给定氨基酸序列中与BPN'序列中的氨基酸残基比对(优选最佳比对)的氨基酸残基可通过参考该枯草杆菌蛋白酶BPN'序列中的对应氨基酸残基便利地进行编号。例如,本发明的PX4变体蛋白酶可描述为SEQ ID NO:1中示出的GG36蛋白酶的变体蛋白酶,该变体蛋白酶包含相对于SEQ ID NO:1具有六个氨基酸置换N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S 130A的氨基酸序列,其中PX4变体蛋白酶的氨基酸残基位置根据SEQ ID NO:2中所示枯草杆菌蛋白酶BPN'氨基酸序列的对应氨基酸位置的编号方式进行编号,所述对应氨基酸位置通过PX4氨基酸序列与枯草杆菌蛋白酶BPN'氨基酸序列的比对来确定。

[0134] 作为另一种选择,如果PX4变体蛋白酶序列的氨基酸残基位置利用GG36氨基酸序列(SEQ ID NO:1)中的氨基酸残基位置的实际编号方式进行编号,并且在比对时不参照BPN'序列中的对应氨基酸位置,则PX4变体蛋白酶可描述为SEQ ID NO:1中示出的GG36蛋白酶的变体蛋白酶,该变体蛋白酶包含具有六个氨基酸置换N74D+S85R+G116R+S126L+P127Q+S128A的氨基酸序列。

[0135] 一般来讲,本文所用的命名以及下文描述的细胞培养、分子遗传学、分子生物学、核酸化学和蛋白质化学中的实验室方法中的许多方法是众所周知的,并常常为本领域一般技术人员所采用。标准技术,例如Sambrook等人,Molecular Cloning--A Laboratory Manual(《分子克隆--实验室手册》)(第二版),第1-3卷,冷泉港实验室(Cold Spring Harbor Laboratory),纽约州冷泉港(Cold Spring Harbor,N.Y.),1989(下文称为“Sambrook”)和CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY(《分子生物学实验室指南》),F.M.Ausubel等人编辑,Current Protocols(“实验室指南系列”),格林出版伙伴有限公司和约翰·威立父子出版公司合资企业(a joint venture between Greene Publishing Associates,Inc.and John Wiley & Sons,Inc.)(1994年,1999年增补版)(下文称为

“Ausubel”)中描述的标准技术可用于重组核酸方法、核酸合成、细胞培养方法和转基因结合,例如转染、电穿孔。寡核苷酸合成和纯化步骤通常根据说明书来进行。技术和程序通常根据本领域众所周知的常规方法以及本文通篇中提供的各种一般文献来进行。本文的程序据信是本领域普通技术人员所熟知的,并为了阅读者的便利而提供。

[0136] 本发明的多肽

[0137] 本发明提供新型多肽,这些多肽可统称为“本发明的多肽”。本发明的多肽包括分离、重组、实质上纯的或非天然存在的变体蛋白酶多肽,包括例如具有酶活性(如蛋白水解活性)的变体枯草杆菌蛋白酶多肽。在一个方面,本发明的多肽可用于清洁应用,并且可掺入可在清洁需要进行清洁的物品或表面(如物品的表面)的方法中使用的清洁组合剂中。

[0138] 在一个方面,本发明的变体蛋白酶包括“变体枯草杆菌蛋白酶”。在一个方面,本发明提供“芽孢杆菌变体蛋白酶”。在一个方面,本发明提供“芽孢杆菌变体枯草杆菌蛋白酶”。

[0139] 在一个方面,本发明包括分离、重组、实质上纯的或非天然存在的具有蛋白水解活性的变体蛋白酶,该蛋白酶多肽包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%、至少约99.5%或100%序列同一性的多肽序列,所述变体蛋白酶氨基酸序列包含在SEQ ID NO:1的位置76、87、118、128、129、130、188和244的氨基酸残基每一处被另一不同氨基酸残基的置换,其中每个氨基酸位置根据SEQ ID NO:2中所示解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN'的氨基酸序列中对应氨基酸位置的编号方式来进行编号,所述对应氨基酸位置通过所述变体蛋白酶氨基酸序列与解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN'氨基酸序列的比对来确定(参见图1)。在一个方面,此类变体蛋白酶包括变体枯草杆菌蛋白酶。

[0140] 在另一个方面,本发明提供分离、重组、实质上纯的或非天然存在的具有蛋白水解活性的变体蛋白酶(如变体枯草杆菌蛋白酶),所述变体蛋白酶包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%序列同一性的氨基酸序列,所述变体蛋白酶氨基酸序列包含在SEQ ID NO:1的位置76、87、118、128、129、130、188和244的氨基酸残基每一处被另一不同氨基酸残基的置换,其中每个氨基酸位置根据SEQ ID NO:2中所示解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN'的氨基酸序列中对应氨基酸位置的编号方式来进行编号,所述对应氨基酸位置通过所述变体蛋白酶氨基酸序列与解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN'氨基酸序列的比对来确定(参见图1)。还提供分离、重组或非天然存在的具有蛋白水解活性的变体蛋白酶,所述变体蛋白酶包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%序列同一性的氨基酸序列,所述变体蛋白酶氨基酸序列包含在SEQ ID NO:1的位置76、87、118、128、129、130、188和244的氨基酸残基每一处被另一不同氨基酸残基的置换,其中每个氨基酸位置根据SEQ ID NO:2中所示解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN'的氨基酸序列中对应氨基酸位置的编号方式来进行编号,所述对应氨基酸位置通过所述变体蛋白酶氨基酸序列与解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN'氨基酸序列的比对来确定。对于一些此类变体蛋白酶,变体蛋白酶的氨基酸序列包含在SEQ ID NO:1的氨基酸位置76、87、118、128、129、130、188和244每一处的氨基酸残基被另一不同氨基酸残基的置换,以产生具有-2、-1、0、+1、+2、+3、+4、+5、+6、+7或+8的总

电荷的变体蛋白酶,或在一个方面,具有-2、-1、0、+1、+2、+3或+4的总电荷的变体蛋白酶,或在一个方面,具有-2、-1、0、+1或+2的总电荷的变体蛋白酶,或在一个方面,具有+1的总电荷的变体蛋白酶。对于一些此类变体蛋白酶,在变体蛋白酶的氨基酸序列中,(i)位置76和188每一处的氨基酸残基被选自天冬氨酸和谷氨酸的带负电的氨基酸残基置换;(ii)位置87、118和244每一处的氨基酸残基被选自精氨酸、组氨酸和赖氨酸的带正电的氨基酸残基置换;以及(iii)位置128、129和130每一处的氨基酸残基被选自丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸的中性氨基酸残基置换。对于一些此类变体蛋白酶,所述变体蛋白酶的氨基酸序列包含氨基酸置换N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A+S188D+V244R。在一个方面,变体蛋白酶包含SEQ ID NO:8中示出的氨基酸序列。

[0141] 在另一个方面,本发明包括分离、重组、实质上纯的或非天然存在的具有蛋白水解活性的多肽,该多肽包含与选自SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少98%、至少99%、至少99.5%或100%序列同一性的多肽序列。在一个方面,本发明提供分离、重组、实质上纯的或非天然存在的具有蛋白水解活性的变体蛋白酶(如变体枯草杆菌蛋白酶),所述变体蛋白酶包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%序列同一性的氨基酸序列,所述变体蛋白酶氨基酸序列包含在相对于SEQ ID NO:1的氨基酸位置76、87、118、128、129和130的每一处氨基酸残基被另一不同氨基酸残基的置换,以及(i)氨基酸位置188处的丝氨酸残基或位置188处的丝氨酸残基被非天冬氨酸残基的另一不同氨基酸残基置换,和/或(ii)氨基酸位置248处的天冬酰胺残基或位置248处的天冬酰胺残基被非精氨酸残基的另一不同氨基酸残基置换,其中氨基酸位置根据SEQ ID NO:1中所示解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN'的氨基酸序列中对应氨基酸位置的编号方式来进行编号,所述对应氨基酸位置通过变体蛋白酶氨基酸序列与解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN'氨基酸序列的比对来确定(参见图1)。

[0142] 还提供分离、重组、实质上纯的或非天然存在的具有蛋白水解活性的变体蛋白酶,所述变体蛋白酶包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%序列同一性的氨基酸序列,所述变体蛋白酶氨基酸序列包含在相对于SEQ ID NO:1的氨基酸位置76、87、118、128、129和130每一处的氨基酸残基被另一不同氨基酸残基的置换,以及(i)氨基酸位置188处的丝氨酸残基或位置188处的丝氨酸残基被非天冬氨酸残基的另一不同氨基酸残基置换,和/或(ii)氨基酸位置248处的天冬酰胺残基或位置248处的天冬酰胺残基被非精氨酸残基的另一不同氨基酸残基置换,其中氨基酸位置根据SEQ ID NO:2中所示解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN'的氨基酸序列中对应氨基酸位置的编号方式来进行编号,所述对应氨基酸位置通过变体蛋白酶氨基酸序列与解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN'氨基酸序列的比对来确定(参见图1)。对于一些此类变体蛋白酶,变体蛋白酶的氨基酸序列包含氨基酸位置188处的丝氨酸残基和/或氨基酸位置248处的精氨酸残基。对于一些此类变体蛋白酶,变体蛋白酶氨基酸序列包含在相对于SEQ ID NO:2的氨基酸位置76、87、118、128、129和130每一处的氨基酸残基被另一不同氨基酸的置换,以产生具有-2、-1、0、+1、+2、+3、+4、+5、+6、+7或+8的总电荷的变体蛋白酶,或在一个方面,具有-2、-1、0、+1、

+2、+3或+4的总电荷的变体蛋白酶,或在一个方面,具有+1的总电荷的变体蛋白酶。对于一些此类变体蛋白酶,在变体蛋白酶的氨基酸序列中,(i)位置76处的氨基酸残基被选自天冬氨酸和谷氨酸的带负电的氨基酸残基置换,(ii)位置87和118每一处的氨基酸残基被选自精氨酸、组氨酸和赖氨酸的带正电的氨基酸残基置换,并且(iii)位置128、129和130每一处的氨基酸残基被选自丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸的不带电的(中性)氨基酸残基置换。对于一些此类变体蛋白酶,变体蛋白酶的氨基酸序列包含氨基酸置换N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A。在一个方面,变体蛋白酶包含SEQ ID NO:7中示出的氨基酸序列。

[0143] 还提供分离、重组、实质上纯的或非天然存在的具有蛋白水解活性的变体蛋白酶,所述变体蛋白酶包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%序列同一性的氨基酸序列,所述变体蛋白酶氨基酸序列包含在相对于SEQ ID NO:1的氨基酸位置76、87、118、128、129和130每一处的氨基酸残基被另一不同氨基酸残基的置换,以及(i)氨基酸位置188处的丝氨酸残基或位置188处的丝氨酸残基被非天冬氨酸残基的另一不同氨基酸残基置换,和(ii)位置248处的天冬酰胺残基被精氨酸残基的置换,其中氨基酸位置根据SEQ ID NO:2中所示解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN[®]的氨基酸序列中对应氨基酸位置的编号方式来进行编号,所述对应氨基酸位置通过变体蛋白酶氨基酸序列与解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN[®]氨基酸序列的比对来确定(参见图1)。对于一些此类变体蛋白酶,变体蛋白酶氨基酸序列包含在相对于SEQ ID NO:2的氨基酸位置76、87、118、128、129和130每一处的氨基酸残基被另一不同氨基酸的置换,以产生具有-2、-1、0、+1、+2、+3、+4、+5、+6、+7或+8的总电荷的变体蛋白酶,或在一个方面,具有-2、-1、0、+1、+2、+3或+4的总电荷的变体蛋白酶,或在一个方面,具有+1的总电荷的变体蛋白酶。对于一些此类变体蛋白酶,在变体蛋白酶的氨基酸序列中,(i)位置76处的氨基酸残基被选自天冬氨酸和谷氨酸的带负电的氨基酸残基置换,(ii)位置87和118每一处的氨基酸残基被选自精氨酸、组氨酸和赖氨酸的带正电的氨基酸残基置换,并且(iii)位置128、129和130每一处的氨基酸残基被选自丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸的不带电的(中性)氨基酸残基置换。对于一些此类变体蛋白酶,变体蛋白酶的氨基酸序列包含氨基酸置换N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A+N248R。

[0144] 还提供分离、重组、实质上纯的或非天然存在的具有蛋白水解活性的变体蛋白酶,所述变体蛋白酶包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%序列同一性的氨基酸序列,所述变体蛋白酶氨基酸序列包含在相对于SEQ ID NO:1的氨基酸位置76、87、118、128、129和130每一处的氨基酸残基被另一不同氨基酸残基的置换,和(i)位置188处的丝氨酸残基被天冬氨酸残基的置换,以及(ii)氨基酸位置248处的天冬酰胺残基或位置248处的天冬酰胺残基被非精氨酸残基的另一不同氨基酸残基置换,其中氨基酸位置根据SEQ ID NO:2中所示解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN[®]的氨基酸序列中对应氨基酸位置的编号方式来进行编号,所述对应氨基酸位置通过变体蛋白酶氨基酸序列与解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN[®]氨基酸序列的比对来确定(参见图1)。对于一些此类变体蛋白酶,变体蛋白酶氨基酸序列包含在相对于SEQ ID NO:2的氨基酸位置76、87、118、128、129和

130每一处的氨基酸残基被另一不同氨基酸的置换,以产生具有-2、-1、0、+1、+2、+3、+4、+5、+6、+7或+8的总电荷的变体蛋白酶,或在一个方面,具有-2、-1、0、+1、+2、+3或+4的总电荷的变体蛋白酶,或在一个方面,具有+1的总电荷的变体蛋白酶。对于一些此类变体蛋白酶,在变体蛋白酶的氨基酸序列中,(i)位置76处的氨基酸残基被选自天冬氨酸和谷氨酸的带负电的氨基酸残基置换,(ii)位置87和118每一处的氨基酸残基被选自精氨酸、组氨酸和赖氨酸的带正电的氨基酸残基置换,并且(iii)位置128、129和130每一处的氨基酸残基被选自丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸的不带电的(中性)氨基酸残基置换。对于一些此类变体蛋白酶,变体蛋白酶的氨基酸序列包含氨基酸置换N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A+S188D。

[0145] 还提供分离、重组、实质上纯的或非天然存在的具有蛋白水解活性的变体蛋白酶,所述变体蛋白酶包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%序列同一性的氨基酸序列,所述变体蛋白酶氨基酸序列包含在相对于SEQ ID NO:1的氨基酸位置76、87、118、128、129、130、188和248每一处的氨基酸残基被另一不同氨基酸残基的置换,其中氨基酸位置根据SEQ ID NO:2中所示解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN[®]的氨基酸序列中对应氨基酸位置的编号方式来进行编号,所述对应氨基酸位置通过变体蛋白酶氨基酸序列与解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN[®]氨基酸序列的比对来确定(参见图1)。对于一些此类变体蛋白酶,变体蛋白酶氨基酸序列包含在相对于SEQ ID NO:2的氨基酸位置76、87、118、128、129和130每一处的氨基酸残基被另一不同氨基酸的置换,以产生具有-2、-1、0、+1、+2、+3、+4、+5、+6、+7或+8的总电荷的变体蛋白酶,或在一个方面,具有-2、-1、0、+1、+2、+3或+4的总电荷的变体蛋白酶,或在一个方面,具有+1的总电荷的变体蛋白酶。对于一些此类变体蛋白酶,在变体蛋白酶的氨基酸序列中,(i)位置76和188处的氨基酸残基被选自天冬氨酸和谷氨酸的带负电的氨基酸残基置换,(ii)位置87、118和248每一处的氨基酸残基被选自精氨酸、组氨酸和赖氨酸的带正电的氨基酸残基置换,并且(iii)位置128、129和130每一处的氨基酸残基被选自丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸的不带电的(中性)氨基酸残基置换。对于一些此类变体蛋白酶,变体蛋白酶的氨基酸序列包含氨基酸置换N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A+S188D+N248R。在一个方面,变体蛋白酶包含SEQ ID NO:6中示出的氨基酸序列。

[0146] 在另一个方面,本发明提供分离、重组、实质上纯的或非天然存在的具有蛋白水解活性的变体蛋白酶(如变体枯草杆菌蛋白酶),所述变体蛋白酶包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%序列同一性的氨基酸序列,所述变体蛋白酶相对于SEQ ID NO:1包含如下氨基酸置换组中的一个:

[0147] (i) N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S 130A,前提条件是所述变体蛋白酶不包含N248R+S188D二者,或

[0148] (ii) N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A+S188D+V244R,其中氨基酸位置根据SEQ ID NO:2中所示解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN[®]的氨基酸序列中对应氨基酸位置的编号方式来进行编号,所述对应氨基酸位置通过所述变体蛋白酶氨基酸序列与解淀粉芽

孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN'氨基酸序列的比对来确定(参见图1)。

[0149] 在另一个方面,本发明提供分离、重组、实质上纯的或非天然存在的具有蛋白水解活性的变体蛋白酶(如变体枯草杆菌蛋白酶),所述变体蛋白酶包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%序列同一性的氨基酸序列,所述变体蛋白酶相对于SEQ ID NO:1包含如下氨基酸置换组中的一个:

[0150] (i) N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A,前提条件是所述变体蛋白酶不包含N248R+S188D二者,或

[0151] (ii) N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A+S188D+V244R,

[0152] 其中氨基酸位置根据SEQ ID NO:2中所示解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN'的氨基酸序列中对应氨基酸位置的编号方式来进行编号,所述对应氨基酸位置通过所述变体蛋白酶氨基酸序列与解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN'氨基酸序列的比对来确定(参见图1)。

[0153] 在另一个方面,本发明提供分离、重组、实质上纯的或非天然存在的具有蛋白水解活性的变体蛋白酶(如变体枯草杆菌蛋白酶),所述变体蛋白酶包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%序列同一性的氨基酸序列,所述变体蛋白酶相对于SEQ ID NO:1包含如下氨基酸置换组中的一个:

[0154] (i) N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A,前提条件是所述变体蛋白酶不包含N248R和S188D二者,或

[0155] (ii) N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A+S188D+V244R,

[0156] 其中氨基酸位置根据SEQ ID NO:2中所示解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN'的氨基酸序列中对应氨基酸位置的编号方式来进行编号,所述对应氨基酸位置通过所述变体蛋白酶氨基酸序列与解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN'氨基酸序列的比对来确定(参见图1)。

[0157] 在一个方面,本发明提供分离、实质上纯的或重组的亲本蛋白酶(如枯草杆菌蛋白酶)的变体蛋白酶(如变体枯草杆菌蛋白酶),所述变体蛋白酶相对于亲本蛋白酶氨基酸序列包含具有如下氨基酸置换组中的一个的氨基酸序列:

[0158] (i) N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A,前提条件是所述变体蛋白酶不包含N248R和S188D二者,或

[0159] (ii) N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A+S188D+V244R。

[0160] 在一个方面,本发明提供分离、实质上纯的或重组的亲本枯草杆菌蛋白酶的变体枯草杆菌蛋白酶,所述变体枯草杆菌蛋白酶包含相对于亲本枯草杆菌蛋白酶的氨基酸序列具有如下氨基酸置换组中的一个的氨基酸序列:

[0161] (i) N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A,前提条件是所述变

[0162] 体枯草杆菌蛋白酶不包含N248R和S188D二者,或

[0163] (ii) N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A+S188D+V244R。

[0164] 在另一个方面,本发明提供分离、重组或非天然存在的亲本蛋白酶的变体蛋白酶(如变体枯草杆菌蛋白酶),所述亲本蛋白酶包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少

95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%同一性的氨基酸序列,所述变体蛋白酶具有蛋白水解活性并且相对于所述亲本蛋白酶包含如下氨基酸置换组中的一个:

[0165] (i) N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A,前提条件是所述变体蛋白酶不包含N248R和S188D二者,或

[0166] (ii) N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A+S188D+V244R,

[0167] 其中氨基酸位置根据SEQ ID NO:2中所示解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN'的氨基酸序列中对应氨基酸位置的编号方式来进行编号,所述对应氨基酸位置通过所述变体蛋白酶氨基酸序列与解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN'氨基酸序列的比对来确定(参见图1)。

[0168] 在另一个方面,本发明还提供分离、重组或非天然存在的具有蛋白水解活性的变体蛋白酶(如变体枯草杆菌蛋白酶),所述变体蛋白酶包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%序列同一性的氨基酸序列,所述变体蛋白酶氨基酸序列包含在相对于SEQ ID NO:1的氨基酸位置87、118、128、129和130每一处的氨基酸残基被另一不同氨基酸残基的置换,和(i)氨基酸位置188处的丝氨酸残基或位置188处的丝氨酸残基被非天冬氨酸残基的另一不同氨基酸残基置换,和/或(ii)氨基酸位置248处的天冬酰胺残基或位置248处的天冬酰胺残基被非精氨酸残基的另一不同氨基酸残基置换,和/或(iii)位置76处的天冬酰胺或位置248处的天冬酰胺残基被非天冬氨酸残基的另一不同氨基酸残基置换,其中氨基酸位置根据SEQ ID NO:2中所示解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN'的氨基酸序列中对应氨基酸位置的编号方式来进行编号,所述对应氨基酸位置通过变体蛋白酶氨基酸序列与解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN'氨基酸序列的比对来确定(参见图1)。在一些此类变体蛋白酶中,变体蛋白酶的氨基酸序列包含氨基酸位置188处的丝氨酸残基或氨基酸位置248处的精氨酸残基。对于一些此类变体蛋白酶,变体蛋白酶氨基酸序列包含在相对于SEQ ID NO:1的氨基酸位置87、118、128、129和130每一处的氨基酸残基被另一不同氨基酸的置换,以产生具有-2、-1、0、+1、+2、+3或+4的净电荷的变体蛋白酶。对于一些此类变体蛋白酶,在变体蛋白酶的氨基酸序列中,(i)位置76处的氨基酸残基包含天冬酰胺残基、谷氨酸残基或选自丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸的不带电的(中性)氨基酸残基,(ii)位置118处的氨基酸残基被选自精氨酸、组氨酸和赖氨酸的带正电的氨基酸残基置换,并且(iii)位置128、129和130每一处的氨基酸残基被选自丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸的不带电的氨基酸残基置换。对于一些此类变体蛋白酶,变体蛋白酶的氨基酸序列包含氨基酸置换S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A。

[0169] 在另一个方面,本发明提供分离、重组或非天然存在的具有蛋白水解活性的变体蛋白酶(如变体枯草杆菌蛋白酶),所述变体蛋白酶包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%序列同一性的氨基酸序列,所述变体蛋白酶相对于SEQ ID NO:1包含如下氨基酸置换组中的一个:

[0170] (i) S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A,前提条件是所述变体蛋白酶不包含所有N248R、S188D和N76D,或

[0171] (ii) S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A+S188D+V244R,前提条件是所述变体蛋白酶不包含N76D,

[0172] 其中氨基酸位置根据SEQ ID NO:2中所示出的枯草杆菌蛋白酶BPN'的氨基酸序列中对应氨基酸位置的编号方式来进行编号,所述对应氨基酸位置通过变体蛋白酶氨基酸序列与枯草杆菌蛋白酶BPN'氨基酸序列的比对来确定。

[0173] 在另一个方面,本发明提供分离、重组或非天然存在的具有蛋白水解活性的变体蛋白酶(如变体枯草杆菌蛋白酶),所述变体蛋白酶包含(a)与SEQ ID NO:1中示出的氨基酸序列存在9至15个氨基酸残基差异,并且(b)包含氨基酸置换N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A+S118D+N248R的氨基酸序列,其中氨基酸位置根据SEQ ID NO:2中所示枯草杆菌蛋白酶BPN'的氨基酸序列中对应氨基酸位置的编号方式来进行编号,所述对应氨基酸位置通过比对来确定。

[0174] 在另一个方面,本发明提供分离、重组或非天然存在的具有蛋白水解活性的变体蛋白酶(如变体枯草杆菌蛋白酶),所述变体蛋白酶包含的氨基酸序列(a)与SEQ ID NO:1中所示出的氨基酸序列存在不超过30、不超过25、不超过20、不超过15、不超过14、不超过13、不超过12、不超过11、不超过10、不超过9或不超过8个氨基酸残基差异,并且(b)包含在SEQ ID NO:1的氨基酸位置76、87、118、128、129、130、188和244每一处氨基酸残基被另一不同氨基酸残基的置换,其中氨基酸位置根据SEQ ID NO:2中所示枯草杆菌蛋白酶BPN'的氨基酸序列中对应氨基酸位置的编号方式来进行编号,所述对应氨基酸位置通过变体蛋白酶氨基酸序列与枯草杆菌蛋白酶BPN'氨基酸序列的比对来确定。一些此类变体蛋白酶多肽与SEQ ID NO:1的多肽序列的差异为一个或多个氨基酸缺失、氨基酸添加或插入和/或氨基酸置换。氨基酸置换通常与其他19个天然存在的氨基酸中的一个进行,并且可以是保守或非保守氨基酸置换。保守氨基酸置换的实例在本文其他地方进行了论述。在一个方面,在序列中至少一个氨基酸发生缺失和/或至少一个氨基酸被置换,使得所得的多肽表现出酶活性(如蛋白水解活性),如本领域熟知的标准测定法,包括例如本文所述的测定法所测定的。

[0175] 具有蛋白水解活性的一些此类变体蛋白酶(如变体枯草杆菌蛋白酶)包含的氨基酸序列(a)与SEQ ID NO:1中所示出的氨基酸序列存在不超过25、不超过20、不超过15、不超过14、不超过13、不超过12、不超过11、不超过10、不超过9或不超过8个氨基酸残基差异,并且(b)包含SEQ ID NO:1的位置76、87、118、128、129、130、188和244处的氨基酸每一者的氨基酸残基置换,其中氨基酸位置根据SEQ ID NO:2中所示枯草杆菌蛋白酶BPN'的氨基酸序列中对应氨基酸位置的编号方式来进行编号,所述对应氨基酸位置通过变体蛋白酶氨基酸序列与枯草杆菌蛋白酶BPN'氨基酸序列的比对来确定。一些此类变体蛋白酶多肽与SEQ ID NO:1的多肽序列的差异为一个或多个氨基酸缺失、氨基酸添加或插入和/或氨基酸置换。氨基酸置换通常与其他19个天然存在的氨基酸中的一个进行,并且可以是保守或非保守氨基酸置换。示例性的保守氨基酸置换在本文其他地方进行了论述。在一个方面,在序列中至少一个氨基酸发生缺失和/或至少一个氨基酸被置换,使得所得的多肽表现出酶活性(如蛋白水解活性),如本领域熟知的测定法,包括例如本文所述的测定法所测定的。

[0176] 还提供分离、重组或非天然存在的具有蛋白水解活性的变体蛋白酶(如变体枯草杆菌蛋白酶),所述变体蛋白酶包含的氨基酸序列:

[0177] (a)与SEQ ID NO:1中所示出的氨基酸序列存在不超过30、不超过25、不超过20、不

超过15、不超过14、不超过13、不超过12、不超过11、不超过10、不超过9、不超过8、不超过7、不超过6个氨基酸残基差异;以及

[0178] (b) 包含在SEQ ID NO:1的氨基酸位置76、87、118、128、129和130每一处的氨基酸残基被另一不同氨基酸残基的置换,和(i)氨基酸位置188处的丝氨酸残基或位置188处的丝氨酸残基被非天冬氨酸残基的另一不同氨基酸残基置换,和/或(ii)氨基酸位置248处的天冬酰胺残基或位置248处的天冬酰胺残基被非精氨酸残基的另一不同氨基酸残基置换,其中氨基酸位置根据SEQ ID NO:2中所示枯草杆菌蛋白酶BPN'的氨基酸序列中对应氨基酸位置的编号方式来进行编号,所述对应氨基酸位置通过变体蛋白酶氨基酸序列与枯草杆菌蛋白酶BPN'氨基酸序列的比对来确定。一些此类变体蛋白酶多肽与SEQ ID NO:1的多肽序列的差异为一个或多个氨基酸缺失、添加或插入和/或氨基酸置换。氨基酸置换通常与其他19个天然存在的氨基酸中的一个进行,并且可以是保守或非保守置换。示例性的保守氨基酸置换在本文其他地方进行了论述。在一个方面,在序列中至少一个氨基酸发生缺失和/或至少一个氨基酸被置换,使得所得的多肽表现出酶活性(如蛋白水解活性),如本领域熟知的测定法,包括例如本文所述的测定法所测定的。

[0179] 还提供分离、重组或非天然存在的具有蛋白水解活性的变体蛋白酶(如变体枯草杆菌蛋白酶),所述变体蛋白酶包含的氨基酸序列:

[0180] (a) 与SEQ ID NO:1的氨基酸序列存在不超过25、不超过20、不超过15、不超过14、不超过13、不超过12、不超过11、不超过10、不超过9、不超过8、不超过7、不超过6个氨基酸残基差异;以及

[0181] (b) 包含在SEQ ID NO:1的氨基酸位置76、87、118、128、129和130每一处的氨基酸残基被另一不同氨基酸残基的置换,和(i)氨基酸位置188处的丝氨酸残基或位置188处的丝氨酸残基被非天冬氨酸残基的另一不同氨基酸残基置换,和/或(ii)氨基酸位置248处的天冬酰胺残基或位置248处的天冬酰胺残基被非精氨酸残基的另一不同氨基酸残基置换,其中氨基酸位置根据SEQ ID NO:2中所示枯草杆菌蛋白酶BPN'的氨基酸序列中对应氨基酸位置的编号方式来进行编号,所述对应氨基酸位置通过变体蛋白酶氨基酸序列与枯草杆菌蛋白酶BPN'氨基酸序列的比对来确定。在一个方面,一些此类变体蛋白酶包含(i)氨基酸位置188处的丝氨酸残基或位置188处的丝氨酸残基被非天冬氨酸残基的另一不同氨基酸残基置换,和(ii)位置248处的天冬酰胺残基被精氨酸残基的置换。在一个方面,一些此类变体蛋白酶包含(i)位置188处的丝氨酸残基被天冬氨酸残基的置换,和(ii)位置248处的天冬酰胺残基或位置248处的天冬酰胺残基被非精氨酸残基的另一不同氨基酸残基置换。

[0182] 一些此类变体蛋白酶多肽与SEQ ID NO:1的多肽序列的差异为一个或多个氨基酸缺失、添加或插入和/或氨基酸置换。氨基酸置换通常与其他19个天然存在的氨基酸中的一个进行,并且可以是保守或非保守置换。保守氨基酸置换的实例在本文其他地方进行了论述。在一个方面,在序列中至少一个氨基酸发生缺失和/或至少一个氨基酸被置换,使得所得的多肽表现出酶活性(如蛋白水解活性),如本领域熟知的测定法,包括例如本文所述的测定法所测定的。对于一些此类变体蛋白酶,变体蛋白酶的氨基酸序列包含氨基酸位置188处的丝氨酸残基或氨基酸位置248处的精氨酸残基。对于一些此类变体蛋白酶,变体蛋白酶氨基酸序列包含在相对于SEQ ID NO:2的氨基酸位置76、87、118、128、129和130每一处的氨基酸残基被另一不同氨基酸的置换,以产生具有-2、-1、0、+1、+2、+3或+4的净电荷的变体蛋

白酶。对于一些此类变体蛋白酶,在变体蛋白酶的氨基酸序列中,(i)位置76处的氨基酸残基被选自天冬氨酸和谷氨酸的带负电的氨基酸残基置换,(ii)位置87和118每一处的氨基酸残基被选自精氨酸、组氨酸和赖氨酸的带正电的氨基酸残基置换,并且(iii)位置128、129和130每一处的氨基酸残基被选自丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸的不带电的(中性)氨基酸残基置换。对于一些此类变体蛋白酶,变体蛋白酶的氨基酸序列包含氨基酸置换N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A。

[0183] 在另一个方面,本发明提供分离、重组或非天然存在的具有蛋白水解活性的变体蛋白酶(如变体枯草杆菌蛋白酶),所述变体蛋白酶包含与SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8具有至少99%或99.5%序列同一性的氨基酸序列。

[0184] 在另一个方面,本发明提供分离、重组或非天然存在的具有蛋白水解活性的变体蛋白酶,所述变体蛋白酶包含的氨基酸序列与SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8的氨基酸序列存在不超过1个氨基酸残基差异。例如,变体蛋白酶序列与SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8的氨基酸序列的差异可以为氨基酸置换(例如非保守或保守氨基酸置换)、氨基酸缺失或氨基酸插入。

[0185] 在一个方面,本发明提供分离、重组或非天然存在的具有蛋白水解活性的变体蛋白酶,所述变体蛋白酶包含的氨基酸序列与SEQ ID NO:7的氨基酸序列的差异为不超过1个氨基酸置换(例如非保守或保守氨基酸置换),不超过15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸缺失,和/或不超过15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸缺失、氨基酸插入或添加。

[0186] 在一个方面,本发明提供分离、重组或非天然存在的具有蛋白水解活性的变体蛋白酶,所述变体蛋白酶包含的氨基酸序列与SEQ ID NO:8的氨基酸序列的差异为不超过1个氨基酸置换(例如非保守或保守氨基酸置换),不超过15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸缺失,和/或不超过15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸缺失、氨基酸插入或添加。

[0187] 如上所述,本发明的变体蛋白酶多肽具有酶活性(例如蛋白水解活性)并且因而可用于清洁应用,例如但不限于用于清洁盛具物品、餐具物品、织物和具有硬质表面的物品(如桌子、桌面、墙壁、家具物品、地板、天花板等的硬质表面)的方法。包含一种或多种本发明的变体蛋白酶多肽的示例性清洁组合在下文中进行描述。本发明的变体蛋白酶多肽的酶活性(如蛋白酶活性)可使用本领域普通技术人员熟知的程序容易地测定。下文提供的实施例描述了用于评价酶活性、清洁性能和/或洗涤性能的方法。本发明的变体蛋白酶在移除污渍(例如蛋白质引起的污渍)、清洁硬质表面或清洁衣物、盛具或餐具物品方面的性能可用本领域所熟知的程序和/或通过使用实施例中示出的程序容易地测定。

[0188] 可对本发明的多肽进行多种改变,例如一个或多个氨基酸的插入、缺失和/或置换(保守的或非保守的置换),包括其中例如这类改变不会实质上改变该多肽的酶活性的情况。类似地,也可对本发明的核酸进行多种改变,例如在一个或多个密码子中对一条或多条核酸进行一种或多种置换使得特定的密码子编码相同或不同的氨基酸,从而导致沉默变异(例如,核苷酸序列中的突变可导致氨基酸序列中的沉默突变,如当所编码的氨基酸未因该核酸突变而变更时)或非沉默变异;序列中一条或多条核酸(或密码子)的一种或多种缺失;

序列中一条或多条核酸(密码子)的一种或多种添加或插入;和/或序列中一条或多条核酸(密码子)的切除或序列中一条或多条核酸(密码子)的一种或多种截短。与初始核酸序列编码的变体蛋白酶相比,核酸序列中的许多此类改变可能不会实质上改变所得的编码的变体蛋白酶的酶活性。还可对本发明的核酸进行修饰以包括一个或多个使得能在表达系统(如细菌表达系统)中进行最优表达的密码子,同时如果需要,所述一个或多个密码子仍编码相同氨基酸。

[0189] 在一个方面,本发明的多肽种类可以包含具有所需酶活性(如蛋白酶活性或清洁性能活性)的变体蛋白酶多肽,其包含具有本文所述的氨基酸置换的序列并且其还包含一个或多个另外的氨基酸置换,例如保守和非保守置换,其中多肽表现出、维持或大致维持所需的酶活性(如蛋白酶活性或枯草杆菌蛋白酶活性),如该变体蛋白酶的清洁活性或性能所反映的。根据本发明的氨基酸置换可包括,例如但不限于一个或多个非保守置换和/或一个或多个保守氨基酸置换。保守氨基酸残基置换通常涉及将一功能类别的氨基酸残基中的成员替换为属于同一功能类别的残基(在计算功能同源性百分数时相同氨基酸残基被视为在功能上是同源的或保守的)。保守氨基酸置换通常涉及用功能相似的氨基酸置换氨基酸序列中的氨基酸。例如,丙氨酸、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸是功能相似的,因而可充当彼此的保守氨基酸置换。天冬氨酸和谷氨酸可充当彼此的保守置换。天冬酰胺和谷氨酰胺可充当彼此的保守置换。精氨酸、赖氨酸和组氨酸可充当彼此的保守置换。异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸和缬氨酸可充当彼此的保守置换。苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸可充当彼此的保守置换。

[0190] 可以设想其他的保守氨基酸置换组。例如,可通过相似的功能或化学结构或组成对氨基酸进行分组(如酸性、碱性、脂族、芳族、含硫氨基酸)。例如,脂族组可包括:甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、缬氨酸(V)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)。含有可视为彼此保守置换的氨基酸的其他组包括:芳族组:苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W);含硫组:甲硫氨酸(M)、半胱氨酸(C);碱性组:精氨酸(R)、赖氨酸(K)、组氨酸(H);酸性组:天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);非极性不带电荷的残基的组:半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)和脯氨酸(P);亲水性不带电荷的残基的组:丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、天冬酰胺(N)和谷氨酰胺(Q)。另外的氨基酸分组还可参见Creighton(1984) *Proteins: STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES* (《蛋白质:结构和分子特性》)(第二版,1993), W.H. 弗里曼公司(W.H. Freeman and Company)。本文的多肽序列的列表,结合上文的置换组,提供了所有经保守置换的多肽序列的明确列表。

[0191] 在上文描述的氨基酸残基类别中存在更保守的置换,其也可以是合适的或者其作为另一种选择可以是合适的。用于更保守的置换的保守组包括:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸以及天冬酰胺-谷氨酰胺。因此,例如,在一个特定方面,本发明提供分离或重组的具有蛋白水解活性的变体蛋白酶多肽(如变体枯草杆菌蛋白酶),所述变体蛋白酶多肽包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或99.5%序列同一性的氨基酸序列,所述变体蛋白酶氨基酸序列包含在相对于SEQ ID NO:1的氨基酸位置76、87、118、128、129和130每一处的氨基酸残基被另一不同氨基酸残基的置换,和(i)氨基酸位置188处的丝氨酸残基或位置188处的丝氨酸残基被非天冬氨酸残基的另一不同氨基酸残基置换,和/或(ii)氨基酸位置248处的天冬酰胺残基或位置248处的天冬酰胺残基被非精氨酸残基的另一不同氨基酸残基置换,其中氨基酸位置编号是根据SEQ ID NO:2中所示枯草杆菌蛋白酶BPN'的氨基酸序列中对应氨基

酸的位置编号方式来进行,该编号是通过变体蛋白酶氨基酸序列与BPN'序列的最佳比对来确定,并且其中变体蛋白酶序列中除位置76、87、118、128、129或130之外的氨基酸位置的氨基酸残基与SEQ ID NO:1中对应的氨基酸位置(如使用BPN'编号方案进行的比对所确定)的差异为保守氨基酸置换,其中所得的变体蛋白酶表现出或保持所需的酶活性或清洁性能活性。本发明的变体蛋白酶中一个氨基酸保守置换另一个氨基酸预计不会显著改变该变体蛋白酶的酶活性或清洁性能活性。所得的蛋白酶的酶活性或清洁性能活性可容易地用标准测定法和本文所述的测定法进行测定。因此,变体蛋白酶可以包括在除上述指定位置之外的一个或多个另外的保守氨基酸置换,同时保持所需的酶活性或清洁性能活性。在一些方面,氨基酸序列变体蛋白酶中至少10%、20%、50%、60%、70%或更多(如至少75%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%)的置换包括本发明变体蛋白酶多肽序列中相对于SEQ ID NO:1的除位置76、87、118、128、129和130之外的氨基酸位置的一个或多个氨基酸残基的置换,其中氨基酸位置通过与SEQ ID NO:2的比对并使用BPN'编号方案进行编号,并且属于相同功能同源类(通过任何合适的分类系统所确定)的一个或多个氨基酸残基分别作为其每次置换的多肽序列的氨基酸残基。

[0192] 本发明的多肽序列(例如本发明的变体蛋白酶)的保守置换变异包括用相同保守置换组的保守选择氨基酸置换该多肽序列的少部分的,有时低于约25%、20%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%或6%的氨基酸,或该多肽序列的低于5%、4%、3%、2%或1%的氨基酸。

[0193] 如本文其他地方所更详细描述(以及如下示出的实施例中所描述),本发明的多肽可具有可与已知蛋白酶(包括已知枯草杆菌蛋白酶)相当的清洁能力。示例性已知枯草杆菌蛋白酶包括但不限于,例如迟缓芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶GG36(本文也称为“GCI-P036”)、解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN'、解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN'-Y217L和克劳氏芽孢杆菌PB92(本文也称为“GCI-P037”)。本文用于比较参考的另一种已知枯草杆菌蛋白酶称为“GCI-P038”。

[0194] 成熟迟缓芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶GG36蛋白(GCI-P036)的氨基酸序列为:

[0195] AQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTSGVKVAVLDTGIS:THPDLNIRGGASFVPGEPT:QDGNHGHGTHVAGTIAALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVLGASGSGSVSSIAQGLEWAGNNGMHVANLSLGSPSPSATLEQAVNSATSRGVLVVAASGNSGAGSISYPARYANAMAVGATDQNNNRASFQYAGLDIVAPGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGAAALVKQKNPSWSNVQIRNHLKNTATSLGSTNLYGSLVNAEAAATR(SEQ ID NO:1)

[0196] 成熟解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN'蛋白的氨基酸序列为:

[0197]

AQSVPYGVSQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLKVAGGASMVPSETNPFQDNNSHGTHVAGTVAALNNSIGVLGVAPSASLYAVKVLGADGSGQYSWIINGIEWAIANNMDVINMSLGGPSGSAALKA AVDKAVASGVVVVAAAGNEGTS GSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSSNQRAFSSVGPELDVMAPGVSIQSTLPGNKYGAYNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNWTNTQVRSSLENTTTKLGD SFYYGKLINVQAAAQ(SEQ ID NO:2)

[0198] 成熟解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN'-Y217L蛋白(也称为“FNA”)的氨基酸序列为:

[0199]

AQSVPYGVSQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLKVAGGASMVPSETNPFQDNNSHGTHVAGTVAALNNSIGVLGVAPSASLYAVKVLGADGSGQYSWIINGIEWAIANNMDVINMSLGGPSGSAALKA AVDKAVASGVVVVAAAGNEGTS GSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSSNQRAFSSVGPELDVMAPGVSIQSTLPGNKYGAYNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNWTNTQVRSSLENTTTKLGD SFYYGKLINVQAAAQ(SEQ ID NO:2)

SIGVLGVAPSASLYAVKVLGADGSGQYSWIINGIEWAIANNMDVINMSLGGPSGSAALKA AVDKAVASGVVVVAAAG
NEGTSGSSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSSNQRAFSSVGPELDVMAPGVSIQSTLPGNKYGALNGTSMASPHVAGAA
ALILSKHPNWTNTQVRSSLENTTTKLGD SFYYGKGLINVQAAAQ (SEQ ID NO:3)

[0200] 成熟PB92 (GCI-P037) 参考枯草杆菌蛋白酶蛋白的氨基酸序列为:

[0201]

AQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTSGGVKVAVLDTGISTHPDLNIRGGASFVPGEPTQDGNHGHTHVAGTIAALNNSI
GVLGVAPNAELYAVKVLGASGSGSVSSIAQGLEWAGNNGMHVANLSLGLSPSPSATLEQAVNSATSRGVLVVAASGNS
GAGSISYPARYANAMAVGATDQNNNRASF SQYGAGLDIVAPGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGAAALVKQK
NPSWSNVQIRNHLKNTATSLGSTNLYGSLVNAEAATR (SEQ ID NO:4)

[0202] 成熟GCI-P038参考枯草杆菌蛋白酶蛋白的氨基酸序列为:

[0203]

AQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTSGGVKVAVLDTGISTHPDLNIRGGASFVPGEPTQDGNHGHTHVAGTIAALNNSI
GVLGVAPNAELYAVKVLGASGSGSVSSIAQGLEWAGNNGMHVANLSLGLQAPSATLEQAVNSATSRGVLVVAASGNS
GAGSISYPARYANAMAVGATDQNNNRASF SQYGAGLDIVAPGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGAAALVKQK
NPSWSNVQIRNHLKNTATSLGSTNLYGSLVNAEAATR (SEQ ID NO:5)

[0204] 本发明的核酸

[0205] 本发明提供分离、非天然存在的或重组的核酸(在本文中也称为多核苷酸),其可统称为“本发明的核酸”或“本发明的多核苷酸”,其编码本发明的多肽。本发明的核酸(包括下文描述的全部核酸在内)可用于本发明多肽的重组生产(如表达),通常是通过表达包含编码所关注的多肽或其片段的序列的质粒表达载体来进行。如上面所论述,多肽包括变体蛋白酶多肽,包括如具有酶活性(如蛋白水解活性)的变体枯草杆菌蛋白酶多肽在内,其可用于清洁应用和清洁组合物,以供清洁需要进行清洁的物品或表面(如物品的表面)。

[0206] 在一个方面,本发明提供分离、重组、实质上纯的或非天然存在的核酸,该核酸包含编码本发明上述题为“本发明的多肽”的章节中以及本文其他地方所述的任何多肽(包括任何融合蛋白等)的核苷酸序列。本发明还提供分离、重组、实质上纯的或非天然存在的核酸,该核酸包含编码本发明上述和本文其他地方所述的任何多肽中两种或更多种的组合的核苷酸序列。

[0207] 例如,在一个方面,本发明提供分离、重组、实质上纯的或非天然存在的核酸,该核酸包含编码具有蛋白水解活性的变体蛋白酶(如变体枯草杆菌蛋白酶)的多核苷酸序列,所述变体蛋白酶包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%序列同一性的氨基酸序列,所述变体蛋白酶氨基酸序列包含在SEQ ID NO:1的位置76、87、118、128、129、130、188和244处的氨基酸残基每一处被另一不同氨基酸残基的置换,其中每个氨基酸位置根据SEQ ID NO:2中所示解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN'的氨基酸序列中对应氨基酸位置的编号方式来进行编号,所述对应氨基酸位置通过所述变体蛋白酶氨基酸序列与解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN'氨基酸序列的比对来确定(参见图1)。一些此类变体蛋白酶包含具有在SEQ ID NO:1的氨基酸位置76、87、118、128、129、130、188和244每一处的氨基酸残基被另一不同氨基酸残基的置换的氨基酸序列,以产生具有-2、-1、0、+1、+2、+3或+4的净电荷的变体蛋白酶。在一些此类变体蛋白酶中:(i)位置76和188每一处的氨基酸残基被选自天冬氨酸和谷

氨酸的带负电的氨基酸残基置换；(ii) 位置87、118和244每一处的氨基酸残基被选自精氨酸、组氨酸和赖氨酸的带正电的氨基酸残基置换；以及(iii) 位置128、129和130每一处的氨基酸残基被选自丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸的中性氨基酸残基置换。对于一些此类变体蛋白酶，其中所述变体蛋白酶的氨基酸序列包含氨基酸置换N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A+S188D+V244R。

[0208] 在一个方面，本发明提供分离、重组、实质上纯的或非天然存在的核酸，该核酸包含编码具有SEQ ID NO:6中所示出的氨基酸序列的变体蛋白酶(如变体枯草杆菌蛋白酶)的多核苷酸序列。在另一个方面，本发明提供分离、重组、实质上纯的或非天然存在的核酸，该核酸包含与SEQ ID NO:9的多核苷酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%核苷酸序列同一性的多核苷酸序列或其互补多核苷酸序列。在一个方面，本发明提供分离、重组、实质上纯的或非天然存在的核酸，该核酸包含SEQ ID NO:9的多核苷酸序列或其互补多核苷酸序列。

[0209] 在一个方面，本发明提供分离、重组、实质上纯的或非天然存在的核酸，该核酸包含编码具有SEQ ID NO:8中所示出的氨基酸序列的变体蛋白酶(如变体枯草杆菌蛋白酶)的多核苷酸序列。在另一个方面，本发明提供分离、重组、实质上纯的或非天然存在的核酸，该核酸包含与SEQ ID NO:11的多核苷酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%核苷酸序列同一性的多核苷酸序列或其互补多核苷酸序列。在一个方面，本发明提供分离、重组、实质上纯的或非天然存在的核酸，该核酸包含SEQ ID NO:11的多核苷酸序列或其互补多核苷酸序列。

[0210] 在一个方面，本发明提供分离、重组、实质上纯的或非天然存在的核酸，该核酸包含编码具有蛋白水解活性的变体蛋白酶(如变体枯草杆菌蛋白酶)的多核苷酸序列，所述变体蛋白酶包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%序列同一性的氨基酸序列，所述变体蛋白酶氨基酸序列包含在相对于SEQ ID NO:1的氨基酸位置76、87、118、128、129和130每一处的氨基酸残基被另一不同氨基酸残基的置换，和(i) 氨基酸位置188处的丝氨酸残基或位置188处的丝氨酸残基被非天冬氨酸残基的另一不同氨基酸残基置换，和/或(ii) 氨基酸位置248处的天冬酰胺残基或位置248处的天冬酰胺残基被非精氨酸残基的另一不同氨基酸残基置换，其中氨基酸位置根据SEQ ID NO:2中所示枯草杆菌蛋白酶BPN'的氨基酸序列中对应氨基酸位置的编号方式来进行编号，所述对应氨基酸位置通过变体蛋白酶氨基酸序列与枯草杆菌蛋白酶BPN'氨基酸序列的比对来确定。一些此类编码的变体蛋白酶包含的氨基酸序列具有氨基酸位置188处的丝氨酸残基或氨基酸位置248处的精氨酸残基。一些此类变体蛋白酶包含(i) 位置188处的丝氨酸残基或位置188处的丝氨酸残基被非天冬氨酸残基的另一不同氨基酸残基置换，和(ii) 位置248处的天冬酰胺残基被精氨酸残基的置换。一些此类变体蛋白酶包含(i) 位置188处的丝氨酸残基被天冬氨酸残基的置换，和(ii) 位置248处的天冬酰胺残基或位置248处的天冬酰胺残基被非精氨酸残基的另一不同氨基酸残基置换。一些此类变体蛋白酶包含的氨基酸序列具有在相对于SEQ ID NO:1的氨基酸位置76、87、118、128、129和130每一处的氨基酸残基被另一不同氨基酸的置换，以产生具有-2、-1、0、+1、+2、+3或+4的净电荷的变体蛋白酶。在一些此类变体蛋白酶中：(i) 位置76处的氨基酸残基被选

自天冬氨酸和谷氨酸的带负电的氨基酸残基置换,(ii)位置87和118每一处的氨基酸残基被选自精氨酸、组氨酸和赖氨酸的带正电的氨基酸残基置换,并且(iii)位置128、129和130每一处的氨基酸残基被选自丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸的不带电的氨基酸残基置换。

[0211] 在一个方面,本发明提供分离、重组、实质上纯的或非天然存在的核酸,该核酸包含的多核苷酸序列编码具有SEQ ID NO:7中所示出的氨基酸序列的变体蛋白酶(如变体枯草杆菌蛋白酶)。

[0212] 在另一个方面,本发明提供分离、重组、实质上纯的或非天然存在的核酸,该核酸包含与SEQ ID NO:10的多核苷酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%核苷酸序列同一性的多核苷酸序列或其互补多核苷酸序列。在一个方面,本发明提供分离、重组、实质上纯的或非天然存在的核酸,该核酸包含SEQ ID NO:10的多核苷酸序列或其互补多核苷酸序列。

[0213] 还提供分离、重组、实质上纯的或非天然存在的核酸,该核酸包含的多核苷酸序列编码具有蛋白水解活性的变体蛋白酶,所述变体蛋白酶(如变体枯草杆菌蛋白酶)包含的氨基酸序列:

[0214] (a)与SEQ ID NO:1的氨基酸序列存在不超过25、不超过20、不超过15、不超过14、不超过13、不超过12、不超过11、不超过10、不超过9、不超过8、不超过7、不超过6个氨基酸残基差异;以及

[0215] (b)包含在SEQ ID NO:1的氨基酸位置76、87、118、128、129和130每一处的氨基酸残基被另一不同氨基酸残基的置换,和(i)氨基酸位置188处的丝氨酸残基或位置188处的丝氨酸残基被非天冬氨酸残基的另一不同氨基酸残基置换,和/或(ii)氨基酸位置248处的天冬酰胺残基或位置248处的天冬酰胺残基被非精氨酸残基的另一不同氨基酸残基置换,其中氨基酸位置根据SEQ ID NO:2中所示解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN'的氨基酸序列中对应氨基酸位置的编号方式来进行编号,所述对应氨基酸位置通过变体蛋白酶氨基酸序列与解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN'氨基酸序列的比对来确定。一些此类编码变体蛋白酶包含的氨基酸序列具有(i)氨基酸位置188处的丝氨酸残基或位置188处的丝氨酸残基被非天冬氨酸残基的另一不同氨基酸残基置换,和(ii)位置248处的天冬酰胺残基被精氨酸残基的置换。一些此类编码变体蛋白酶包含的氨基酸序列具有:位置188处的丝氨酸残基被天冬氨酸残基置换,和(ii)位置248处的天冬酰胺残基或位置248处的天冬酰胺残基被非精氨酸残基的另一不同氨基酸残基置换。

[0216] 在另一个方面,本发明提供分离、重组、实质上纯的或非天然存在的具有蛋白水解活性的变体蛋白酶(如变体枯草杆菌蛋白酶),所述变体蛋白酶包含的氨基酸序列(a)与SEQ ID NO:1中所示出的氨基酸序列存在不超过25、不超过20、不超过15、不超过14、不超过13、不超过12、不超过11、不超过10、不超过9、不超过8个氨基酸残基差异,并且(b)包含SEQ ID NO:1的位置76、87、118、128、129、130、188和244的氨基酸每一处的氨基酸残基置换,其中氨基酸位置根据SEQ ID NO:2中所示解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN'的氨基酸序列中对应氨基酸位置的编号方式来进行编号,所述对应氨基酸位置通过变体蛋白酶氨基酸序列与解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN'氨基酸序列的比对来确定。

[0217] 在一个方面,本发明提供分离、重组、实质上纯的或非天然存在的核酸,该核酸包

含与SEQ ID NO:9、10和11中的任一者的多核苷酸序列具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%序列同一性的多核苷酸序列。

[0218] 本发明的核酸可通过使用任何合适的合成、操纵和/或分离技术或这些技术的组合来产生。例如,本发明的多核苷酸可用标准的核酸合成技术,如本领域技术人员所熟知的固相合成技术来制备。在这类技术中,通常合成多达50个或更多个核苷酸碱基的片段,然后连接(如通过酶连接方法或化学连接方法,或者聚合酶介导的重组方法连接)以形成基本上任何所需的连续核酸序列。也可通过化学合成,使用例如经典的亚磷酰胺方法(该方法在例如Beaucage等人,(1981) Tetrahedron Letters (《四面体通讯》),22:1859-69中有所描述),或Matthes等人,(1984) EMBO J. (《欧洲分子生物学组织杂志》),3:801-05描述的方法(例如通常在自动合成法中实施)来促进(或者实现)本发明核酸的合成。本发明的核酸也可以通过使用自动DNA合成仪来制备。定制的核酸可以从多种商业来源订购,例如米德兰认证试剂公司(The Midland Certified Reagent Company) (mcrc@oligos.com)、大美洲基因公司(Great American Gene Company) (万维网地址genco.com)、加利福尼亚州的阿拉米达操纵子技术公司(Operon Technologies Inc. (Alameda, Calif.))和加利福尼亚州门洛帕克(Menlo Park, CA)的DNA2.0公司。其他核酸合成技术和相关的原理在例如Itakura等人,Annu.Rev.Biochem. (《生物化学年评》),53:323 (1984)和Itakura等人,Science (《科学》),198:1056 (1984)中有所描述。

[0219] 可用于修饰核酸的重组DNA技术是本领域所熟知的。例如,诸如限制性内切酶消化、连接、逆转录和cDNA产生以及聚合酶链反应(如PCR)的技术是已知的并容易地由本领域技术人员采用。可用的重组DNA技术及其相关原理在Sambrook等人(1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (分子克隆—实验室手册),冷泉港出版社(Cold Spring Harbor Press)及其第三版(2001年);Ausubel等人(1994-1999) Current Protocols in Molecular Biology (《分子生物学实验室指南》),威立出版社(Wiley Interscience Publishers);以及Berger和Kimmel,“Guide to Molecular Cloning Techniques (《分子克隆技术指南》)”,载于Methods in Enzymol. (《酶学方法》),第152卷,学术出版社有限公司(Acad.Press, Inc.), San Diego, CA (加利福尼亚州圣地亚哥)中有所描述。

[0220] 本发明的核苷酸还可以通过使用一种或多种可与编码本发明变体蛋白酶多肽的多核苷酸杂交或使之PCR扩增的寡核苷酸探针来筛选cDNA文库(使用本领域常用的诱变技术(包括本文所述的那些)产生)而获得。筛选和分离cDNA克隆的程序和PCR扩增程序是本领域的技术人员熟知的,并且在例如上文Berger、Sambrook和Ausubel中有所描述。本发明的一些核酸可通过利用例如已知的诱变程序(如定点诱变、点饱和诱变以及体外重组)来改变天然存在的多核苷酸骨架(如编码酶或亲本蛋白酶的多核苷酸骨架)来获得。

[0221] 本发明的经修饰的变体蛋白酶的制备方法

[0222] 多种适于产生编码本发明变体蛋白酶的本发明经修饰的多核苷酸的方法是本领域已知的,包括但不限于例如点饱和诱变、扫描诱变、插入诱变、缺失诱变、随机诱变、定点诱变和定向进化以及各种其他重组方法。经修饰的多核苷酸和蛋白质(如变体蛋白酶)的制备方法包括DNA改组方法(参见例如Stemmer WP, 91 (22):10747-51 (1994)),基于基因的非同源重组的方法,例如ITCHY (Ostermeier等人, 7 (10):2139-44 (1999))、SCRACHY (Lutz等人, 98 (20):11248-53 (2001))、SHIPREC (Sieber等人, 19 (5):456-60 (2001))和NRR (Bittker

等人,20 (10):1024-9 (2001));Bittker等人,101 (18):7011-6 (2004)),以及依赖于使用寡核苷酸来插入随机和定标性突变、缺失和/或插入的方法(Ness等人,20 (12):1251-5 (2002);Coco等人,20 (12):1246-50 (2002);Zha等人,4 (1):34-9 (2003);Glaser等人,149 (12):3903-13 (1992);和,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(《美国国家科学院院刊》)89 (8):3581-5 (1992);Yáñez等人,32 (20):e158 (2004);Osuna等人,32 (17):e136 (2004);Gaytán等人,29 (3):E9 (2001)和Gaytán等人,30 (16):e84 (2002))。

[0223] 用于产生本发明的变体蛋白酶的载体、细胞和方法

[0224] 本发明提供分离的或重组的包含至少一种本文所述的本发明多核苷酸(如编码本文所述的本发明变体蛋白酶的多核苷酸)的载体;分离的或重组的包含至少一种本发明的核酸或多核苷酸的表达载体或表达盒;分离的、实质上纯的或重组的包含至少一种本发明的核酸或多核苷酸的DNA构建体;分离的或重组的包含至少一种本发明的多核苷酸的细胞;包含细胞的细胞培养物,该细胞包含至少一种本发明的多核苷酸;包含至少一种本发明的核酸或多核苷酸的细胞培养物;和包含一种或多种此类载体、核酸、表达载体、表达盒、DNA构建体、细胞、细胞培养物或它们的任何组合或混合物的组合物。

[0225] 在一个方面,本发明提供包含至少一种本发明的载体(如表达载体或DNA构建体)的重组细胞,所述载体包含至少一种本发明的核酸或多核苷酸。一些这类重组细胞转化有或转染有所述至少一种载体。这类细胞通常称为宿主细胞。一些此类细胞包括细菌细胞,包括但不限于例如芽孢杆菌细胞,例如枯草芽孢杆菌细胞。本发明还提供包含至少一种本发明的变体蛋白酶的重组细胞(如重组宿主细胞)。

[0226] 在一个方面,本发明提供包含本发明的核酸或多核苷酸的载体。在一个方面,载体是表达载体或表达盒,其中编码本发明变体蛋白酶的本发明多核苷酸序列有效连接至高效基因表达所需的一个或额外的核酸区段(例如与编码本发明变体蛋白酶的本发明多核苷酸有效连接的启动子)。载体可包含转录终止子和/或选择基因,如抗生素抗性基因,该抗性基因使得能通过含有抗微生物剂的培养基中生长而对质粒感染的宿主细胞进行连续的培养维持。

[0227] 表达载体可衍生自质粒或病毒DNA,或在备选实施方案中,含有这二者的元件。示例性的载体包括但不限于pXX、pC194、pJH101、pE194、pHP13(Harwood和Cutting(编辑)),Molecular Biological Methods for Bacillus(《芽孢杆菌的分子生物学方法》),约翰·威立父子出版公司(John Wiley&Sons)(1990),参见例如第3章;适于枯草芽孢杆菌的复制型质粒包括第92页列出的那些;Perego,M.(1993)Integrational Vectors for Genetic Manipulations in *Bacillus subtilis*(《枯草芽孢杆菌中遗传操纵的整合载体》)615-624页;A.L.Sonenshein,J.A.Hoch和R.Losick(编辑),*Bacillus subtilis and other Gram-positive bacteria:biochemistry,physiology and molecular genetics*(《枯草芽孢杆菌和其他革兰氏阳性细菌:生物化学、生理学和分子遗传学》),美国微生物学学会(American Society for Microbiology),华盛顿哥伦比亚特区(Washington,D.C.)。

[0228] 为了在细胞中表达和产生所关注的蛋白质(如变体蛋白酶),将至少一个包含至少一个拷贝(优选包含多个拷贝)的编码经修饰的蛋白酶的多核苷酸的表达载体在适于表达该蛋白酶的条件下转化进细胞中。在一个方面,将编码变体蛋白酶的多核苷酸序列(以及载体中包含的其他序列)整合进宿主细胞的基因组中,而在另一个方面,将包含编码变体蛋白

酶的多核苷酸序列的质粒载体在该细胞内保持为自主的染色体外元件。本发明提供染色体外核酸元件以及整合进宿主细胞基因组中的输入核苷酸序列二者。本文所述的载体可用于产生本发明的变体蛋白酶。在一个方面,编码变体蛋白酶的多核苷酸构建体存在于整合型载体上,该整合型载体使得编码变体蛋白酶的多核苷酸能整合以及任选扩增进细菌染色体中。整合位点的实例包括本领域的技术人员熟知的。在一些实施方案中,编码本发明变体蛋白酶的多核苷酸的转录由启动子引发,该启动子对于选择的前体蛋白酶是野生型启动子。在一些其他实施方案中,启动子对于前体蛋白酶而言是异源的,但在宿主细胞中有功能。具体而言,适用于细菌宿主细胞中的启动子的实例包括但不限于例如amyE、amyQ、amyL、pstS、sacB、pSPAC、pAprE、pVeg、pHpaII启动子、嗜热脂肪芽孢杆菌产麦芽糖淀粉酶基因启动子、解淀粉芽孢杆菌(BAN)淀粉酶基因启动子、枯草芽孢杆菌碱性蛋白酶基因启动子、克劳氏芽孢杆菌碱性蛋白酶基因启动子、短小芽孢杆菌(*B. pumilis*)木糖苷酶基因启动子、苏云金芽孢杆菌cryIIIA启动子和地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶基因启动子。另外的启动子包括但不限于A4启动子以及噬菌体 λ Pr或Pl启动子,和大肠杆菌lac、trp或tac启动子。

[0229] 本发明的变体蛋白酶可在任何合适的革兰氏阳性微生物(包括细菌和真菌)的宿主细胞中产生。例如,在一些实施方案中,变体蛋白酶在真菌和/或细菌来源的宿主细胞中产生。在一些实施方案中,宿主细胞是芽孢杆菌、链霉菌(*Streptomyces* sp.)、埃希杆菌(*Escherichia* sp.)或曲霉菌(*Aspergillus* sp.)。在一些实施方案中,变体蛋白酶通过芽孢杆菌宿主细胞来产生。可用于产生本发明变体蛋白酶的芽孢杆菌宿主细胞的实例包括但不限于地衣芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、短芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、嗜碱芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、克劳氏芽孢杆菌和巨大芽孢杆菌以及芽孢杆菌属内的其他生物体。在一些实施方案中,枯草芽孢杆菌宿主细胞用于产生变体蛋白酶。美国专利5,264,366和4,760,025(RE 34,606)描述了多种可用于产生本发明变体蛋白酶的芽孢杆菌宿主菌株,但可以使用其他合适的菌株。

[0230] 可用于产生本发明变体蛋白酶的多种工业细菌菌株包括非重组(即野生型)芽孢杆菌菌株,以及天然存在的菌株的变体和/或重组菌株。在一些实施方案中,宿主菌株是重组菌株,其中编码所关注的多肽的多核苷酸已引入该宿主中。在一些实施方案中,宿主菌株是枯草芽孢杆菌宿主菌株,尤其是重组枯草芽孢杆菌宿主菌株。许多枯草芽孢杆菌菌株是已知的,包括但不限于例如1A6(ATCC 39085)、168(1A01)、SB19、W23、Ts85、B637、PB1753至PB1758、PB3360、JH642、1A243(ATCC 39,087)、ATCC 21332、ATCC 6051、MI113、DE100(ATCC 39,094)、GX4931、PBT 110和PEP 211菌株(参见例如Hoch等人,Genetics(《遗传学》)73:215-228(1973))(还可参见美国专利No.4,450,235和No.4,302,544以及EP 0134048,这些专利每一者全文以引用方式并入本文)。枯草芽孢杆菌用作表达宿主细胞是本领域熟知的(参见例如Palva等人,Gene(《基因》)19:81-87(1982);Fahnestock和Fischer,J.Bacteriol.(《细菌学杂志》),165:796-804(1986);以及Wang等人,Gene(《基因》)69:39-47(1988))。

[0231] 在一些实施方案中,芽孢杆菌宿主细胞是在如下基因中的至少一者中包括突变或缺失的芽孢杆菌:degU、degS、degR和degQ。优选地,突变在degU基因内,并且更优选地,突变是degU(Hy)32。参见例如Msadek等人,J.Bacteriol.(《细菌学杂志》)172:824-834(1990)和

Olmos等人, Mol. Gen. Genet. (《分子遗传学和基因组学》) 253:562-567 (1997)。优选的宿主菌株是携带degU32 (Hy) 突变的枯草芽孢杆菌。在一些实施方案中, 芽孢杆菌宿主包含如下基因中的突变或缺失: scoC4 (参见例如Caldwell等人, J. Bacteriol. (《细菌学杂志》) 183:7329-7340 (2001)); spoIIE (参见例如Arigoni等人, Mol. Microbiol. (《分子微生物学》) 31:1407-1415 (1999)); 和/或oppA或opp操纵子的其他基因 (参见例如Perego等人, Mol. Microbiol. (《分子微生物学》) 5:173-185 (1991))。实际上, 设想到opp操纵子中的导致与oppA基因中的突变相同的表型的任何突变将可用于本发明的改变的芽孢杆菌菌株的一些实施方案。在一些实施方案中, 这些突变单独地出现, 而在其他实施方案中, 存在突变的组合。在一些实施方案中, 可用于产生本发明的变体蛋白酶的改变的芽孢杆菌宿主细胞菌株是已在上述基因中的一者或多者中包含突变的芽孢杆菌宿主菌株。另外, 可使用包含内源蛋白酶基因的突变和/或缺失的芽孢杆菌宿主细胞。在一些实施方案中, 芽孢杆菌宿主细胞包含aprE和nprE基因的缺失。在其他实施方案中, 芽孢杆菌宿主细胞包含5个蛋白酶基因的缺失, 而在其他实施方案中, 芽孢杆菌宿主细胞包含9个蛋白酶基因的缺失 (参见例如美国专利申请公开No. 2005/0202535)。

[0232] 使用任何合适的本领域已知的方法用至少一条编码至少一种本发明变体蛋白酶的核酸转化宿主细胞。无论是将核酸整合进载体中还是在不存在质粒DNA的情况下使用核酸, 通常将其引入微生物中, 在一些实施方案中, 优选引入大肠杆菌细胞或感受态芽孢杆菌细胞中。利用质粒DNA构建体或载体并且将此类质粒DNA构建体或载体转化进芽孢杆菌细胞或大肠杆菌细胞中来将核酸 (如DNA) 引入此类细胞中的方法是所熟知的。在一些实施方案中, 随后从大肠杆菌细胞分离该质粒并且转化进芽孢杆菌细胞中。然而, 使用例如大肠杆菌的中间微生物不是必需的, 在一些实施方案中, 将DNA构建体或载体直接引入芽孢杆菌宿主中。

[0233] 本领域的技术人员十分了解适于将本发明的核酸或多核苷酸序列引入芽孢杆菌细胞中的方法 (参见例如Ferrari等人, “Genetics (遗传学)” 载于Harwood等人 (编辑) Bacillus (《芽孢杆菌》), 普莱南出版公司 (Plenum Publishing Corp.) (1989), 第57-72页; Saunders等人, J. Bacteriol. (《细菌学杂志》) 157:718-726 (1984); Hoch等人, J. Bacteriol. (《细菌学杂志》) 93:1925-1937 (1967); Mann等人, Current Microbiol. (《当前微生物学》) 13:131-135 (1986); 以及Holubova, Folia Microbiol. (《微生物学报》) 30:97 (1985); Chang等人, Mol. Gen. Genet. (《分子遗传学和基因组学》) 168:11-115 (1979); Vorobjeva等人, FEMS Microbiol. Lett. (《欧洲微生物学会联合会微生物学通讯》) 7:261-263 (1980); Smith等人, Appl. Env. Microbiol. (《应用和环境微生物学》) 51:634 (1986); Fisher等人, Arch. Microbiol. (《微生物学档案》) 139:213-217 (1981); 以及McDonald, J. Gen. Microbiol. (《普通微生物学杂志》) 130:203 (1984))。实际上, 诸如转化 (包括原生质体转化和中板集合 (congression)、转导和原生质体融合) 之类的方法是众所周知的并且适用于本发明。使用转化方法将包含编码本发明变体蛋白酶的核酸的DNA构建体或载体引入宿主细胞中。本领域已知的转化芽孢杆菌细胞的方法包括诸如质粒标志补救转化之类的方法, 质粒标志补救转化涉及携带部分同源的内生质粒的感受态细胞摄入供体质粒 (Contente等人, Plasmid (《质粒》) 2:555-571 (1979); Haima等人, Mol. Gen. Genet. (分子遗传学和基因组学) 223:185-191 (1990); Weinrauch等人, J. Bacteriol. (《细菌学杂志》))

154:1077-1087 (1983); 以及Weinrauch等人, J. Bacteriol. (《细菌学杂志》) 169:1205-1211 (1987)。在这个方法中, 输入的供体质粒与内生的“辅助”质粒的同源区在模拟染色体转化的过程中发生重组。

[0234] 除了通常使用的方法, 在一些实施方案中, 将宿主细胞直接用包含编码本发明变体蛋白酶的核酸的DNA构建体或载体转化 (即在引入宿主细胞之前, 未使用中间细胞来扩增该DNA构建体或载体, 或未对该DNA构建体或载体以别的方式处理)。将本发明的DNA构建体或载体引入宿主细胞包括本领域已知的那些在不插入质粒或载体的情况下将核酸序列 (如DNA序列) 引入宿主细胞中的物理和化学方法。这类方法包括但不限于氯化钙沉淀法、电穿孔法、裸DNA法、脂质体法等等。在另外的实施方案中, 将DNA构建体或载体与质粒共同转化, 而不插入质粒中。在另一个实施方案中, 通过本领域已知的方法从已改变的芽孢杆菌菌株缺失掉选择标记 (参见Stahl等人, J. Bacteriol. (《细菌学杂志》) 158:411-418 (1984); 和Palmeros等人, Gene (《基因》) 247:255-264 (2000))。

[0235] 在一些实施方案中, 将本发明的转化的细胞在常规营养培养基中培养。合适的具体培养条件 (如温度、pH等) 是本领域技术人员已知的。此外, 某些培养条件可见于科学文献中, 例如Hopwood (2000) Practical Streptomyces Genetics (《实用链霉菌遗传学》), 英国诺里奇约翰·英纳斯基金 (John Innes Foundation, Norwich UK); Hardwood等人, (1990) Molecular Biological Methods for Bacillus (《芽孢杆菌的分子生物学方法》), 约翰·威立出版 (John Wiley) 以及从美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC) 找到。在一个方面, 本发明提供包含至少一种本发明的变体蛋白酶或至少一种本发明的核酸的培养物 (如细胞培养物)。还提供的是包含至少一种本发明的核酸、载体或DNA构建体的组合物。

[0236] 在一些实施方案中, 将用至少一条编码至少一种本发明变体蛋白酶的多核苷酸序列转化的宿主细胞在允许本发明蛋白酶表达的条件下在合适的营养培养基中培养, 此后从该培养物回收所得的蛋白酶。用于培养细胞的培养基包含任何适于生长宿主细胞的常规培养基, 如含有适当的补充成分的基本培养基和复合培养基。合适的培养基可从商业供应商获得或可根据公布的配方 (如美国典型培养物保藏中心的目录中公布的配方) 制备。在一些实施方案中, 通过常规的程序从培养基回收由细胞产生的蛋白酶, 包括但不限于例如, 通过离心或过滤从培养基分离出宿主细胞, 借助于盐 (如硫酸铵) 沉淀出上清液或滤液的蛋白质组分, 进行色谱纯化 (如离子交换色谱、凝胶过滤色谱、亲和色谱等)。可使用任何适于回收或纯化本发明的变体蛋白酶的方法。

[0237] 在一个方面, 由重组宿主细胞产生的变体蛋白酶分泌进培养基中。编码利于纯化的结构域的核酸序列可用来利于可溶性蛋白质的纯化。包含编码变体蛋白酶的多核苷酸序列的载体或DNA构建体, 还可以包含编码利于纯化的结构域的核酸序列以利于纯化变体蛋白酶 (参见例如Kroll, D.J. 等人, DNA Cell Biol. (《DNA细胞生物学》) 12:441-53 (1993))。此类利于纯化的结构域包括但不限于, 例如金属螯合肽, 如允许在固定化金属上纯化的组氨酸-色氨酸模組 (histidine-tryptophan module) (Porath J., Protein Expr. Purif. (《蛋白质表达和纯化》) 3:263-281 (1992)), 允许在固定化免疫球蛋白上纯化的蛋白A结构域, 以及用于FLAGS延伸/亲和纯化系统 (华盛顿州西雅图 (Seattle, WA) 的英姆纳克斯公司 (Immunex Corp.)) 中使用的结构域。在纯化结构域和异源蛋白质之间包括可裂解的连接序

列如XA因子或肠激酶(加利福尼亚州圣地牙哥(San Diego,CA)的英杰公司(Invitrogen))也可用于利于纯化。

[0238] 用于检测和测量酶(如本发明的变体蛋白酶)的酶活性的测定法是所熟知的。各种用于检测和测量蛋白酶(例如本发明的变体蛋白酶)活性的测定法也是本领域一般技术人员已知的。具体地讲,基于酸可溶性肽从酪蛋白或血红蛋白的释放的测定法可用于测量蛋白酶活性,其作为280nm处的吸光度测量或使用福林(Folin)法进行比色测量(参见例如Bergmeyer等人,“Methods of Enzymatic Analysis(酶分析方法)”第5卷,Peptidases, Proteinases and their Inhibitors(《肽酶、蛋白酶及其抑制剂》),魏恩海姆化学出版社(Verlag Chemie,Weinheim)(1984))。其他示例性的测定法涉及显色底物的增溶作用(参见例如Ward,“Proteinases(蛋白酶)”,载于Fogarty(编辑),Microbial Enzymes and Biotechnology(《微生物酶和生物技术》),伦敦应用科学出版社(Applied Science, London), (1983),第251-317页)。其他示例性的测定法包括但不限于琥珀酰-Ala-Ala-Pro-Phe-对硝基苯胺测定法(SAAPFPNA)和2,4,6-三硝基苯磺酸钠盐测定法(TNBS测定法)。本领域人员已知的许多另外的参考文献提供了合适的方法(参见例如Wells等人,Nucleic Acids Res. (《核酸研究》) 11:7911-7925 (1983); Christianson等人,Anal. Biochem. (《分析生物化学》) 223:119-129 (1994); 以及Hsia等人,Anal. Biochem. (《分析生物化学》) 242: 221-227 (1999))。

[0239] 多种方法可用于测定成熟蛋白酶(例如本发明的成熟变体蛋白酶)在宿主细胞中的产生水平。这类方法包括但不限于例如利用蛋白酶特异性的多克隆或单克隆抗体的方法。示例性的方法包括但不限于例如酶联免疫吸附测定法(ELISA)、放射免疫测定法(RIA)、荧光免疫测定法(FIA)和荧光激活细胞分选法(FACS)。这些和其他测定法是本领域所熟知的(参见例如Maddox等人,J. Exp. Med. (《实验医学杂志》) 158:1211 (1983))。

[0240] 在另一个方面,本发明提供用于制备或产生本发明的成熟变体蛋白酶的方法。成熟变体蛋白酶不包含信号肽或前肽序列。一些此类方法包括在重组细菌宿主细胞(例如芽孢杆菌细胞,包括例如枯草芽孢杆菌细胞)中制备或产生本发明的变体蛋白酶。在一个方面,本发明提供产生本发明的变体蛋白酶的方法,该方法包括在有利于产生变体蛋白酶的条件下培养包含重组表达载体的重组宿主细胞,该重组表达载体包含编码本发明的变体蛋白酶的核酸。一些这类方法还包括从培养物回收变体蛋白酶。

[0241] 在一个方面,本发明提供产生本发明的变体蛋白酶的方法,该方法包括:(a) 将包含编码本发明变体蛋白酶的核酸的重组表达载体引入一群细胞中(例如细菌细胞,如枯草芽孢杆菌细胞)中;以及(b) 在有利于产生由该表达载体编码的变体蛋白酶的条件下在培养基中培养该细胞。一些这类方法还包括:(c) 从细胞或从培养基分离变体蛋白酶。

[0242] 本发明的清洁组合物

[0243] 在另一个方面,本发明提供包含一种或多种本发明多肽(如变体蛋白酶)的组合物(如清洁组合物)。此类组合物可以包含至少一种赋形剂或载体和/或其他取代物、组分或材料。如本文所进一步论述的,本发明的多肽(包括本发明的变体蛋白酶)可用于多种清洁应用,包括衣物清洁应用、自动盛具洗涤应用、手动盛具洗涤应用、硬质表面清洁应用和本文描述的其他应用。因而,例如,在一个方面,本发明提供包含至少一种本发明的多肽(如变体蛋白酶)的清洁组合物。如上所述,此类清洁组合物包括但不限于例如自动和手洗用盛具洗

涤剂组合物、衣物洗涤剂组合物(包括例如液体和粉末衣物洗涤剂组合物)、硬质表面清洁组合物(包括但不限于例如非盛具物品、非餐具物品、桌子、桌面、家具物品、墙壁、地板、天花板等的硬质表面)。可用于清洁需要进行清洁的物品或表面的方法中的这类清洁组合物,可包含例如但不限于至少一种赋形剂、载体和/或其他取代物、组分或材料。在一个方面,本发明提供本文和通篇所述的本发明任何组合物(如清洁组合物或洗涤剂组合物),所述组合物包含通篇和本文所述的本发明任何多肽(如本发明任何蛋白酶变体或枯草杆菌蛋白酶变体),但其中所述组合物不是自动盛具洗涤组合物(如自动盛具洗涤剂组合物)。

[0244] 除非另作说明,否则本文提供的所有组分或组合物水平都是指所述组分或组合物的活性水平,而且市售来源中可能存在的杂质(例如残余溶剂或副产物)不排除在外。酶组分重量是以总活性蛋白质计。除非另作说明,否则所有百分比和比率都以重量计算。除非另作说明,否则所有百分比和比率都是以总组合物计算。在示例性的洗涤剂组合物中,酶水平是以纯酶占总组合物的重量比表示,并且除非另作规定,否则洗涤剂成分是以占总组合物的重量比表示。

[0245] 如本文所指出,在一些实施方案中,本发明的清洁组合物还可以包含一种或多种辅助材料,包括但不限于,例如一种或多种表面活性剂、助洗剂、漂白剂、漂白活化剂、漂白催化剂、其他酶、酶稳定系统、螯合剂、荧光增白剂、去污聚合物、染料转移剂、分散剂、抑泡剂、染料、香料、着色剂、填料盐、水溶助长剂、光活化剂、荧光剂、织物调理剂、可水解表面活性剂、防腐剂、抗氧化剂、抗收缩剂、抗皱剂、杀菌剂、杀真菌剂、色粒、银护理剂、抗晦暗剂和/或抗腐蚀剂、碱度源、增溶剂、载体、加工助剂、颜料、漂洗助剂(如含有至少一种表面活性剂以通过使水以薄膜从被清洁的物品的表面排出而不是形成小滴来防止水滴形成的漂洗助剂)和/或pH控制剂(参见例如美国专利No.6,610,642、No.6,605,458、No.5,705,464、No.5,710,115、No.5,698,504、No.5,695,679、No.5,686,014和No.5,646,101,所有这些专利以引用的方式并入本文)。特定清洁组合物材料的实施方案在下文中举例说明。如果在所需的清洁组合物中清洁辅助材料与本发明变体蛋白酶不相容,则使用将清洁辅助材料与变体蛋白酶在适于将这两种组分进行组合之前保持分开(即彼此不接触)的合适方法。这种分离方法包括本领域已知的任何合适方法(例如胶囊锭法(gelcap)、包封法、片剂法、物理分离法等)。

[0246] 有利的是,本发明的清洁组合物用于例如洗衣应用、硬质表面清洁应用、手动或手工盛具洗涤应用、自动盛具洗涤应用、镜片清洁应用以及美容应用,例如用于清洁假牙、牙齿、毛发和皮肤。由于在低温溶液中效力增加的独特优势,本发明的变体蛋白酶适于洗衣应用和盛具洗涤应用,包括手动和自动盛具洗涤应用。此外,本发明的变体蛋白酶可用于固体、凝胶、颗粒和/或液体组合物,包括固体、凝胶、颗粒和/或液体洗涤剂组合物和/或制剂。

[0247] 本发明的变体蛋白酶还可用于清洁添加剂产品组合物。在一些实施方案中,本发明的变体蛋白酶可用于低温溶液清洁应用和方法。在一个方面,本发明提供清洁添加剂产品组合物,其包括至少一种本发明的变体蛋白酶并且在需要额外的漂白效力时其可理想地适于包括在洗涤过程中。这种情况包括但不限于例如低温溶液清洁应用。在一些实施方案中,添加剂产品组合物为其最简单的形式,即一种或多种本发明的变体蛋白酶。在一些实施方案中,添加剂产品组合物以用于添加至清洁过程的剂型进行包装。在一些实施方案中,添加剂产品组合物以用于添加到采用过氧源并且需要增加的漂白效力的清洁过程的剂型进

行包装。可使用任何合适的单一剂量单位形式,包括(但不限于):丸剂、片剂、胶囊锭,或其他单一剂量单位如预先测量的粉末或液体。因而,在一个方面,本发明提供包含至少一种本发明变体蛋白酶的清洁产品组合物,其中该产品以合适的形式(例如,作为液体、粉末、固体、丸剂、片剂、胶囊锭或其他合适的形式)配制成为合适的单一剂量单位,使得可提供单一剂量的变体蛋白酶。此类清洁产品用于多种清洁方法和应用,包括但不限于,例如机器或手动衣物洗涤方法和应用、自动盛具洗涤或手动盛具洗涤方法和应用等。此类清洁方法和应用可以在低温或低pH条件下进行。在一些实施方案中,包括至少一种填料和/或至少一种载体材料以增加此类组合物的体积。合适的填料或载体材料包括但不限于例如硫酸盐、碳酸盐和硅酸盐的各种盐,以及滑石、粘土等。适于液体组合物的填料或载体材料包括但不限于例如水或低分子量伯醇和仲醇,包括多元醇和二醇。这些醇的实例包括但不限于例如甲醇、乙醇、丙醇和异丙醇。在一些实施方案中,组合物包含约5%至约90%的此类填料或载体材料。可在这类组合物中包含酸性填料以在清洁方法或应用中降低所得溶液的pH。作为另外一种选择,在一些实施方案中,清洁添加剂包括一种或多种辅助成分,如下文所更全面描述的。

[0248] 本发明清洁组合物和清洁添加剂需要有效量的单独的或与其他蛋白酶和/或额外的酶进行组合的至少一种本发明变体蛋白酶。所需的酶水平通过添加一种或多种本发明的变体蛋白酶来实现。通常,清洁组合物包含至少约0.0001重量%至约20重量%、约0.0001至约10重量%、约0.0001至约1重量%、约0.001至约1重量%或约0.01至约0.1重量%的至少一种本发明的变体蛋白酶。在一个方面,本发明的组合物(如本发明的清洁组合物)每克组合物包含约0.01毫克(mg)至约10mg、约0.01至约5mg、约0.01mg至约2mg、约0.01至约1mg、约0.5mg至约10mg、约0.5至约5mg、约0.5至约4mg、约0.5至约4mg、约0.5至约3mg、约0.5至约2mg、约0.5至约1mg、约0.1至约10mg、约0.1至约5mg、约0.1至约4mg、约0.1至约3mg、约0.1至约2mg、约0.1至约2mg、约0.1至约1mg、约0.1至约0.5mg的至少一种本发明的活性变体蛋白酶。

[0249] 通常配制本发明的清洁组合物,使得在含水清洁操作中使用期间,洗涤水的pH将为约5.0至约11.5或甚至约7.5至约10.5。液体产品组合物或制剂通常配制成具有约3.0至约9.0或约3.0至约5.0的净pH。颗粒洗衣用产品组合物通常配制成pH为约9至约11。手工盛具洗涤剂组合物和自动盛具洗涤剂组合物通常配制成具有约8至约11.5的pH,包括但不限于例如约8至约10、约9至约11.5和约9.5至约11.5的pH范围,这取决于方法和具体的应用。用于将pH控制在推荐的使用水平的技术包括使用缓冲液、碱、酸等,并且这些技术是本领域技术人员众所周知的。

[0250] 合适的低pH清洁组合物的净pH通常为约3至约5,并且通常不含在此类pH环境中水解的表面活性剂。这类表面活性剂包括包含至少一个环氧乙烷部分或甚至约1至约16摩尔的环氧乙烷的烷基硫酸钠表面活性剂。这类清洁组合物通常包含足量的pH调节剂,如氢氧化钠、单乙醇胺或盐酸,用以使此类清洁组合物的净pH为约3至约5。这些组合物通常包含至少一种酸稳定性酶。在一些实施方案中,所述组合物为液体,而在其他实施方案中,其为固体。这类液体组合物的pH通常是以净pH度量。这类固体组合物的pH是以所述组合物的10%固形物溶液度量,其中溶剂是蒸馏水。在这些实施方案中,除非另外指明,否则所有pH测量值都是在20℃下取得。

[0251] 在一些实施方案中,当颗粒组合物或液体中采用本发明的变体蛋白酶时,期望变

体蛋白酶为封装颗粒的形式,以在存储过程中保护变体蛋白酶免受该颗粒组合物的其他组分的影响。此外,封装还是控制变体蛋白酶在清洁过程期间的利用度的方式。在一些实施方案中,封装可增强变体蛋白酶和/或其他酶的性能。就这一点而言,本发明的变体蛋白酶使用本领域已知的任何合适的封装材料封装。在一些实施方案中,封装材料通常包封本发明变体蛋白酶的催化剂的至少一部分。通常,封装材料具有水溶性和/或水分散性。在一些实施方案中,封装材料的玻璃化转变温度(T_g)为 0°C 或更高。玻璃化转变温度在W0 97/11151中进行了更详细的描述。封装材料通常选自如下:碳水化合物、天然的或合成的树胶、甲壳质、壳聚糖、纤维素和纤维素衍生物、硅酸盐、磷酸盐、硼酸盐、聚乙烯醇、聚乙二醇、石蜡以及它们的组合。当封装材料是碳水化合物时,其通常选自单糖、寡糖、多糖以及它们的组合。在一些典型的实施方案中,封装材料是淀粉(参见例如EP 0 922 499、美国专利No.4,977,252、No.5,354,559和No.5,935,826)。在一些实施方案中,封装材料是由诸如热塑性塑料、丙烯腈、甲基丙烯腈、聚丙烯腈、聚甲基丙烯腈及它们的混合物之类的塑料制成的微球体;可使用的市售微球体包括但不限于由EXPANCEL®(瑞典斯托克韦斯文肯(Stockviksverken, Sweden))以及PM 6545、PM 6550、PM 7220、PM 7228、EXTENDOSPHERES®、LUXSIL®、Q-CEL®和SPHERICEL®(宾夕法尼亚州翠谷的PQ公司(PQ Corp., Valley Forge, PA))提供的微球体。

[0252] 如本文所述的,本发明的变体蛋白酶特别可用于清洁方法和应用,包括但不限于例如清洁、衣物洗涤、手动盛具洗涤和自动盛具洗涤剂组合物。这些应用使酶处于各种环境压力下。本发明的变体蛋白酶由于其在各种条件下的蛋白水解活性和稳定性,提供了优于许多目前在此类清洁应用中使用的酶的优势。

[0253] 实际上,洗涤中所涉及的蛋白酶暴露于多种洗涤条件,包括变化的洗涤剂制剂、洗涤水体积、洗涤水温度和洗涤时间长度。此外,不同地理区域中使用的洗涤剂制剂在洗涤水中存在不同浓度的其相关组分。例如,欧洲的洗涤剂通常在洗涤水中具有约4500–5000份每一百万份(ppm)的洗涤剂组分,而日本的洗涤剂通常在洗涤水中具有大约667ppm的洗涤剂组分。在北美,尤其是在美国,洗涤剂通常在洗涤水中具有约975ppm的洗涤剂组分。

[0254] 低洗涤剂浓度系统包括在洗涤水中存在少于约800ppm的洗涤剂组分的洗涤剂。日本的洗涤剂通常被认为是低洗涤剂浓度系统,因为其在洗涤水中具有大约667ppm的洗涤剂组分。

[0255] 中等洗涤剂浓度包括在洗涤水中存在介于约800ppm至约2000ppm之间的洗涤剂组分的洗涤剂。北美的洗涤剂一般被认为是中等洗涤剂浓度系统,因为其在洗涤水中具有大约975ppm的洗涤剂组分。巴西通常在洗涤水中具有大约1500ppm的洗涤剂组分。

[0256] 高洗涤剂浓度系统包括在洗涤水中存在超过约2000ppm的洗涤剂组分的洗涤剂。欧洲的洗涤剂一般被认为是高洗涤剂浓度系统,因为其在洗涤水中具有大约4500–5000ppm的洗涤剂组分。

[0257] 拉丁美洲的洗涤剂一般是高泡磷酸盐助洗剂洗涤剂,而且拉丁美洲中使用的洗涤剂的范围可在中等洗涤剂浓度至高洗涤剂浓度之间,因为其在洗涤水中具有1500ppm至6000ppm的洗涤剂组分。如上所述,巴西通常在洗涤水中具有大约1500ppm的洗涤剂组分。然而,其他高泡磷酸盐助洗剂洗涤剂地理区域(不限于其他拉丁美洲国家)也可具有在洗涤水中存在最高达约6000ppm的洗涤剂组分的高洗涤剂浓度系统。

[0258] 按照前述内容,很明显在全世界范围内,典型洗涤溶液中洗涤剂组合物的浓度在

低于约800ppm洗涤剂组合物(“低洗涤剂浓度地理位置”,例如在日本约667ppm)至介于约800ppm至约2000ppm之间(“中等洗涤剂浓度地理位置”,例如在美国约975ppm,在巴西约1500ppm)再到高于约2000ppm(“高洗涤剂浓度地理位置”,例如在欧洲约4500ppm至约5000ppm,以及在高泡磷酸盐助洗剂地理位置中约6000ppm)间变动。

[0259] 典型的洗涤溶液的浓度凭经验确定。例如,在美国,典型洗涤机器容纳约64.4L体积的洗涤溶液。因此,为了在洗涤溶液内获得约975ppm的洗涤剂浓度,须将约62.79g洗涤剂组合物添加至64.4L洗涤溶液中。该量是由消费者使用随洗涤剂一起提供的量杯计量加入洗涤水中的典型量。

[0260] 再举个例子,不同地理区域使用不同的洗涤温度。日本的洗涤水温度通常低于欧洲所用的洗涤水温度。例如,北美和日本的洗涤水温度通常介于约10℃和约30℃之间(例如约20℃),而欧洲的洗涤水温度通常介于约30和约60℃之间(例如约40℃)。然而,为了节省能源,许多消费者转向使用冷水洗涤。此外,在一些另外的区域中,通常将冷水用于洗衣以及盛具洗涤应用。在一些实施方案中,本发明的“冷水洗涤”利用在约10℃至约40℃,或约20℃至约30℃,或约15℃至约25℃,以及在约15℃至约35℃范围内的所有其他组合和在10℃至40℃内的所有范围的温度下进行的洗涤。

[0261] 再举个例子,不同地理区域通常具有不同的水硬度。水硬度通常以每加仑混合的 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 的格令数来描述。硬度是水中钙(Ca^{2+})和镁(Mg^{2+})的量的量度。在美国,大多数水都较硬,但硬度有波动。中等硬(60–120ppm)至硬(121–181ppm)水具有60至181ppm(ppm换算成每美制加仑格令数是ppm数除以17.1等于每加仑格令数)的硬度矿物质。

[0262]

水	每加仑格令数	份每一百万份
软	小于 1.0	小于 17
略硬	1.0 至 3.5	17 至 60
中等硬	3.5 至 7.0	60 至 120
硬	7.0 至 10.5	120 至 180
极硬	大于 10.5	大于 180

[0263] 欧洲的水硬度通常是每加仑的混合的 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 高于约10.5(例如约10.5至约20.0)格令(例如每加仑的混合的 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 为约15格令)。北美的水硬度通常高于日本的水硬度,但小于欧洲的水硬度。例如,北美的水硬度可介于约3至约10格令、约3至约8格令之间或为约6格令。日本的水硬度通常小于北美的水硬度,通常小于约4,例如每加仑混合的 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 为约3格令。

[0264] 因此,在一些方面,本发明提供的变体蛋白酶在至少一组洗涤条件(如水温、水硬度和/或洗涤剂浓度)下显示出惊人的洗涤性能。在一些方面,本发明的变体蛋白酶与其他枯草杆菌蛋白酶的洗涤性能相当。在一些方面,与目前市售的枯草杆菌蛋白酶相比本发明的变体蛋白酶表现出增强的洗涤性能。因此,在本发明的一些方面,本文提供的变体蛋白酶表现出增强的氧化稳定性、增强的热稳定性、增强的在各种条件下的清洁能力和/或增强的螯合剂稳定性。此外,本发明的变体蛋白酶可用于不包含洗涤剂(同样单独或与助洗剂和稳定剂组合)的清洁组合物。

[0265] 在一个方面,本发明提供包含至少一种本发明变体蛋白酶的清洁组合物,以该组

合物的重量计,该变体蛋白酶以约0.00001%至约10%的水平存在,以组合物的重量计,余量(如约99.999%至约90.0%)包含一种或多种清洁辅助材料。在另一个方面,本发明提供包含至少一种本发明变体蛋白酶的清洁组合物,以该组合物的重量计,该变体蛋白酶以约0.0001%至约10%、约0.001%至约5%、约0.001%至约2%或约0.005%至约0.5%的水平存在,该清洁组合物的余量(如约99.9999重量%至约90.0重量%、约99.999重量%至约98重量%、约99.995重量%至约99.5重量%)包含一种或多种清洁辅助材料。

[0266] 在一些方面,除了至少一种本发明的变体蛋白酶外,本发明的清洁组合物还包含一种或多种另外的酶,该另外的酶可提供清洁性能和/或织物护理和/或手动或手工盛具洗涤和/或自动盛具洗涤益处。合适酶的实例包括但不限于例如半纤维素酶、纤维素酶、过氧化物酶、蛋白酶、木聚糖酶、脂肪酶、磷脂酶、酯酶、角质酶、果胶酶、果胶裂解酶、甘露聚糖酶、角蛋白酶、还原酶、氧化酶、酚氧化酶、脂氧合酶、木质素酶、支链淀粉酶、鞣酸酶、戊聚糖酶、malanase、 β -葡聚糖酶、阿拉伯糖苷酶、透明质酸酶、软骨素酶、漆酶和/或淀粉酶、中性金属蛋白酶(简称为“nprE”)或它们的混合物。在一些方面,除了至少一种本发明的变体蛋白酶外,清洁组合物还包含另外的酶的组合(即“混合物(cocktail)”),所述的另外的酶的组合包含常规的可适用的酶,例如至少一种另外的蛋白酶、脂肪酶、角质酶、纤维素和/或淀粉酶。

[0267] 除了本文提供的变体蛋白酶,任何其他合适的蛋白酶均可用于本发明的组合物并且可包括在本发明的组合物中。在一个方面,本发明提供包含至少一种本发明的变体蛋白酶和至少一种另外的蛋白酶的组合物(如清洁组合物)。合适的蛋白酶包括动物、植物或微生物来源的酶。在一个实施方案中,可包括微生物蛋白酶。可包括蛋白酶的经化学或遗传修饰的突变体。在一个方面,所述至少一种另外的蛋白酶是丝氨酸蛋白酶,优选是碱性微生物蛋白酶或胰蛋白酶样蛋白酶。碱性蛋白酶的实例包括枯草杆菌蛋白酶,尤其是衍生自芽孢杆菌的那些枯草杆菌蛋白酶(例如枯草杆菌蛋白酶、迟缓芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶(即GG36)、解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶(即BPN')、枯草菌溶素、枯草杆菌蛋白酶309、枯草杆菌蛋白酶147、PB92和枯草杆菌蛋白酶168)。另外的实例包括美国专利No. RE 34,606、No. 5,955,340、No. 5,700,676、No. 6,312,936和No. 6,482,628中描述的那些突变型蛋白酶(即变体蛋白酶),所有这些专利以引用方式并入本文。另外的蛋白酶包括但不限于胰蛋白酶(如猪或牛来源的胰蛋白酶)和WO 89/06270中描述的镰孢菌属(*Fusarium*)蛋白酶。包含至少一种本发明变体蛋白酶的本发明组合物还可包含至少一种市售的蛋白酶。可用于本发明组合物的市售蛋白酶包括但不限于例如MAXATASE®、MAXACAL™、MAXAPEM™、OPTICLEAN®、OPTIMASE®、PROPERASE®、PURAFECT®、PURAFECT® OXP、PURAMAX™、EXCELLASE™和PURAFAST™(杰能科公司);ALCALASE®、SAVINASE®、PRIMASE®、DURAZYM™、POLARZYME®、OVOZYME®、KANNASE®、LIQUANASE®、NEUTRASE®、RELASE®和ESPERASE®(诺维信公司);具有A230V+S256G+S259N的KAP嗜碱芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶(花王公司(Kao));以及BLAP™迟缓芽孢杆菌蛋白酶,BLAP X和BLAP S(德国杜塞尔多夫汉高公司(Henkel Kommanditgesellschaft auf Aktien, Duesseldorf, Germany))。可包含在本发明组合物中的另外的蛋白酶包括W095/23221、W0 92/21760、美国专利公开No. 2008/0090747和美国专利No. 5,801,039、No. 5,340,735、No. 5,500,364、No. 5,855,625、No. RE 34,606、No. 5,955,340、No. 5,700,676、No. 6,312,936和No. 6,482,628以及各种其他专利中描述的那些蛋白酶。金属蛋白酶可包括在本

发明的组合中。这类金属蛋白酶包括但不限于例如WO 07/044993中描述的中性金属蛋白酶(nprE)。

[0268] 在一个方面,本发明提供包含至少一种本发明的变体蛋白酶和至少一种脂肪酶的组合物(如清洁组合物)。合适的脂肪酶包括但不限于例如细菌或真菌来源的那些脂肪酶。脂肪酶的经化学或遗传修饰的突变体可包括在组合物中。可用的脂肪酶的实例包括绵毛状腐质菌(*Humicola lanuginosa*)脂肪酶(参见例如EP 258 068和EP 305 216)、米黑根毛霉(*Rhizomucor miehei*)脂肪酶(参见例如EP 238 023)、假丝酵母(*Candida*)脂肪酶例如南极假丝酵母(*C. antarctica*)脂肪酶(如南极假丝酵母脂肪酶A或B;参见例如EP 214 761)、假单胞菌(*Pseudomonas*)脂肪酶例如产碱假单胞菌(*P. alcaligenes*)脂肪酶和类产碱假单胞菌(*P. pseudoalcaligenes*)脂肪酶(参见例如EP 218 272)、洋葱假单胞菌(*P. cepacia*)脂肪酶(参见例如EP 331 376)、施氏假单胞菌(*P. stutzeri*)脂肪酶(参见例如GB 1,372,034)、荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)脂肪酶、芽孢杆菌脂肪酶(例如枯草芽孢杆菌脂肪酶(Dartois等人,*Biochem. Biophys. Acta*(《生物化学与生物物理学报》)1131:253-260(1993))、嗜热脂肪芽孢杆菌脂肪酶(参见例如JP64/744992)和短小芽孢杆菌脂肪酶(参见例如WO 91/16422))。

[0269] 此外,多个克隆的脂肪酶可用于本发明的组合物(如清洁组合物),包括但不限于例如卡门柏青霉(*Penicillium camembertii*)脂肪酶(Yamaguchi等人,*Gene*(《基因》)103:61-67(1991))、白地霉(*Geotricum candidum*)脂肪酶(Schimada等人,*J. Biochem.*(《生物化学杂志》)106:383-388(1989))以及各种根霉(*Rhizopus*)脂肪酶例如戴尔根霉(*R. delemar*)脂肪酶(Hass等人,*Gene*(《基因》)109:117-113(1991))、雪白根霉(*R. niveus*)脂肪酶(Kugimiya等人,*Biosci. Biotech. Biochem.*(《生物科学、生物技术和生物化学》)56:716-719(1992))和米根霉(*R. oryzae*)脂肪酶。

[0270] 其他类型的脂肪分解酶(例如角质酶)也可用于本发明的一些实施方案,包括但不限于例如衍生自门多萨假单胞菌(*Pseudomonas mendocina*)的角质酶(参见WO 88/09367)和衍生自豌豆根腐镰孢菌(*Fusarium solani pisi*)的角质酶(参见WO 90/09446)。

[0271] 其他合适的脂肪酶包括市售脂肪酶,如M1 LIPASETM、LUMA FASTTM和LIPOMAXTM(杰能科公司);LIPOLASE®和LIPOLASE®ULTRA(诺维信公司);和LIPASE PTM“Amano”(日本的天野制药有限公司(Amano Pharmaceutical Co.Ltd.,Japan))。

[0272] 在一些实施方案中,本发明提供包含至少一种本发明的变体蛋白酶和至少一种脂肪酶的组合物(例如清洁组合物),以该组合物的重量计脂肪酶以约0.00001%至约10%的另外的脂肪酶的水平存在,并且以组合物的重量计余量为一种或多种清洁辅助材料。在一个方面,除了至少一种本发明变体蛋白酶外,本发明的清洁组合物还包含至少一种脂肪酶,以该组合物的重量计,该脂肪酶的水平为约0.0001%至约10%、约0.001%至约5%、约0.001%至约2%或约0.005%至约0.5%脂肪酶。

[0273] 还包括的是包含至少一种本发明的变体和至少一种淀粉酶的组合物(例如清洁组合物)。任何适用于碱性溶液的淀粉酶(例如 α 和/或 β 淀粉酶)可用于包括在这种组合物中。合适的淀粉酶包括(但不限于)细菌或真菌来源的那些酶。可包括淀粉酶的经化学或遗传修饰的突变体。可用于本发明的组合物中的淀粉酶包括但不限于例如从地衣芽孢杆菌获得的 α -淀粉酶(参见例如GB 1,296,839)。可用于本发明组合物中的市售淀粉酶包括但不限于例

如DURAMYL®、TERMAMYL®、FUNGAMYL®、STAINZYME®、STAINZYME PLUS®、STAINZYME ULTRA®和BAN™(诺维信公司)以及POWERASE™、RAPIDASE®和MAXAMYL®P(杰能科公司)。

[0274] 在一个方面,本发明提供包含至少一种变体蛋白酶或至少一种淀粉酶的清洁组合物,其中以该组合物的重量计淀粉酶以约0.00001%至约10%另外的淀粉酶的水平存在,并且以组合物的重量计余量为一种或多种清洁辅助材料。在另一个方面,本发明包括包含至少一种变体蛋白酶和至少一种淀粉酶的清洁组合物,以该组合物的重量计,淀粉酶以约0.0001%至约10%、约0.001%至约5%、约0.001%至约2%、约0.005%至约0.5%淀粉酶的水平存在。

[0275] 任何合适的纤维素酶可用于本发明的清洁组合物。在一个方面,本发明提供包含至少一种本发明的变体蛋白酶和一种或至少一种纤维素酶的清洁组合物。合适的纤维素酶包括但不限于例如细菌或真菌来源的那些。纤维素酶的经化学或遗传修饰的突变体可包括在本发明的组合物中。合适的纤维素酶包括但不限于例如特异腐质霉(*Humicola insolens*)纤维素酶(参见例如美国专利No.4,435,307)和具有颜色护理益处的纤维素酶(参见例如EP 0 495 257)。另外的合适的纤维素酶是本领域已知的。可用于并且可包括于本发明组合物中的市售纤维素酶包括但不限于例如CELLUZYME®、CAREZYME®(诺维信公司)和KAC-500(B)™(花王公司)。在一些实施方案中,纤维素酶作为成熟野生型纤维素酶或变体纤维素酶的部分或片段掺入,其中N末端的一部分缺失(参见例如美国专利No.5,874,276)。在一个方面,本发明的清洁组合物包含至少一种本发明的变体蛋白酶和至少一种纤维素酶,以该组合物的重量计该纤维素酶的水平为约0.00001%至约10%另外的纤维素酶,以组合物的重量计余量为一种或多种清洁辅助材料。在另一个方面,本发明提供包含至少一种本发明的变体蛋白酶和至少一种纤维素酶的清洁组合物,以该组合物的重量计该纤维素酶的水平为约0.0001%至约10%、约0.001%至约5%、约0.001%至约2%、约0.005%至约0.5%纤维素酶。

[0276] 任何适用于洗涤剂组合物的甘露聚糖酶也可用于本发明的清洁组合物中并因而可包括在本发明的清洁组合物中。在一个方面,本发明提供包含至少一种本发明的变体蛋白酶和至少一种甘露聚糖酶的清洁组合物。合适的甘露聚糖酶包括但不限于细菌或真菌来源的那些。甘露聚糖酶的经化学或遗传修饰的突变体可包括在本发明的组合物中。多种可用于本发明组合物并且可包括在本发明组合物中的甘露聚糖酶是已知的(例如参见美国专利No.6,566,114、No.6,602,842和No.6,440,991中所述的甘露聚糖酶,所有这些专利均以引用方式并入本文)。在一个方面,本发明提供包含至少一种本发明的变体蛋白酶和至少一种甘露聚糖酶的清洁组合物,以该组合物的重量计该甘露聚糖酶的水平为约0.00001%至约10%的另外甘露聚糖酶,并且以组合物的重量计余量为一种或多种清洁辅助材料。在一些这类清洁组合物中,以该组合物的重量计,每种甘露聚糖酶以约0.0001%至约10%、约0.001%至约5%、约0.001%至约2%或约0.005%至约0.5%的水平存在。

[0277] 过氧化物酶可与过氧化氢或其来源(例如过碳酸盐、过硼酸盐或过硫酸盐)组合用于本发明的组合物中。氧化酶可与氧组合用于本发明的组合物中。这两种类型的酶都优选连同增强剂一起用于“溶液漂白”(即,当各织物一起在洗涤液中洗涤时防止纺织品染料由染色的织物转移到另一织物)(例如参见WO 94/12621和WO 95/01426)。可包括在本发明的组合物中的合适过氧化物酶/氧化酶包括但不限于例如植物、细菌或真菌来源的那些。过氧

化物酶或氧化酶的经化学或遗传修饰的突变体可包括在本发明的组合物中。在一个方面,本发明提供包含至少一种本发明的变体蛋白酶和至少一种过氧化物酶和/或至少一种氧化酶的清洁组合物。以该组合物的重量计,每一所述过氧化物酶或氧化酶可以约0.00001%至约10%过氧化物酶或氧化酶的水平存在于该组合物中,且以组合物重量计余量为一种或多种清洁辅助材料。在另一个方面,本发明提供包含至少一种本发明的变体蛋白酶和至少一种过氧化物酶和/或至少氧化酶的清洁组合物,其中以该组合物的重量计,每个所述过氧化物酶或氧化酶分别以约0.0001%至约10%、约0.001%至约5%、约0.001%至约2%或约0.005%至约0.5%过氧化物酶或氧化酶的水平存在。

[0278] 在一个方面,本发明提供包含至少一种本发明的变体蛋白酶的组合物(例如清洁组合物)并且可采用一种或多种另外的酶,所述酶包括但不限于例如一种或多种过水解酶(参见例如WO 05/056782)。

[0279] 在另一个方面,本发明提供包含至少一种本发明的变体蛋白酶的组合物(例如清洁组合物)并且涵盖上述各种酶的一种或多种混合物,例如一种或多种另外的蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶、甘露聚糖酶和/或纤维素酶。实际上,设想到这些酶的各种混合物将可用于本发明的组合物。还设想到,变体蛋白酶与一种或多种另外的酶的不同水平都可独立地在最高达约10%的范围内,该清洁组合物的余量为一种或多种清洁辅助材料。通过考虑待清洁的物品(例如盛具物品、餐具物品或织物物品)的表面或织物,以及在使用过程中对于清洁条件(例如,通过手动或自动盛具洗涤剂用途)所希望的组合物形式,可容易地对清洁辅助材料作出具体选择。

[0280] 在一个方面,本发明提供包含至少一种本发明的变体蛋白酶(以及如果需要的话,任选至少一种另外的酶)和一种或多种清洁辅助材料的组合物(例如清洁组合物)。合适的清洁辅助材料的实例包括但不限于例如表面活性剂、助洗剂、漂白剂、漂白活化剂、漂白催化剂、其他酶、酶稳定系统、螯合剂、荧光增白剂、去污聚合物、染料转移剂、染料转移抑制剂、催化材料、过氧化氢、过氧化氢源、预先形成的过酸、聚合物分散剂、粘土污垢去除剂、结构增塑剂、分散剂、抑泡剂、染料、芳香剂、着色剂、填料盐、水溶助长剂、光活化剂、荧光剂、织物调理剂、织物软化剂、载体、水溶助长剂、加工助剂、溶剂、颜料、可水解表面活性剂、防腐剂、抗氧化剂、抗收缩剂、抗皱剂、杀菌剂、杀真菌剂、色粒、银护理剂、抗晦暗剂和/或抗腐蚀剂、碱度源、增溶剂、载体、加工助剂、颜料和pH控制剂(参见例如美国专利No.6,610,642、No.6,605,458、No.5,705,464、No.5,710,115、No.5,698,504、No.5,695,679、No.5,686,014和No.5,646,101,所有这些专利都以引用方式并入本文)。特定清洁组合物材料的实施方案在下文中举例说明。如上所述,如果清洁辅助材料与包括在所需的清洁组合物中的本发明变体蛋白酶不相容,则使用将清洁辅助材料与蛋白酶这两种组分在适于进行组合之前保持分开(即彼此不接触)的合适方法。这种分离方法包括本领域已知的任何合适方法(例如胶囊锭法、包封法、片剂法、物理分离法等)。

[0281] 在一些方面,本发明的组合物(例如清洁组合物)包含有效量的至少一种本发明的变体蛋白酶,该变体蛋白酶可用于清洁或能有效清洁需要移除蛋白质性质的污渍的表面。这种清洁组合物包括用于诸如清洁硬质表面、衣物、织物、器皿、餐具或盛具(例如通过手动或人工盛具洗涤或自动盛具洗涤来清洁)之类的应用的清洁组合物。实际上,在一些实施方案中,本发明提供织物清洁组合物,而在其他实施方案中,本发明提供非织物清洁组合物。

要注意的是,本发明还提供包含至少一种本发明的变体蛋白酶的清洁组合物,其中此类清洁组合物适用于个人护理,包括口腔护理(包括洁牙剂、牙膏、漱口水等,以及假牙清洁组合物),适用于清洁皮肤和毛发,以及适用于清洁镜片。意在使本发明涵盖任何形式(即,液体、颗粒状、条状、固体、半固体、凝胶、乳液、片状、胶囊等)的洗涤剂组合物。

[0282] 举例来说,在下文更详细地描述了多种在其中可使用本发明变体蛋白酶的清洁组合物。在其中本发明的清洁组合物配制成适用于洗衣机洗涤方法的组合物的一些实施方案中,本发明的组合物优选包含至少一种表面活性剂和至少一种助洗化合物以及一种或多种清洁辅助材料,包括例如一种或多种选自有机聚合化合物、漂白剂、另外的酶、抑泡剂、分散剂、钙皂分散剂、悬污剂和抗再沉积剂以及腐蚀抑制剂的清洁辅助材料。在一些实施方案中,洗衣组合物还包含一种或多种软化剂(即作为另外的清洁辅助材料)。可添加一种或多种本发明变体蛋白酶的另外的示例性衣物或织物清洁组合物和制剂在下面的实施例中给出。

[0283] 本发明的组合物还可用作固体或液体形式的洗涤剂添加剂产品。所述添加剂产品旨在补充和/或提高常规洗涤剂组合物的性能,并且可在洗涤过程的任何阶段添加。在一些实施方案中,在20℃下测量时,衣物洗涤剂组合物的密度在约400至约1200g/L的范围内,而在其他实施方案中,其在约500至约950g/L组合物的范围内。

[0284] 在一个方面,本发明提供清洁组合物,例如美国专利No.6,605,458中提供的那些,其包含至少本发明的变体蛋白酶。在一些实施方案中,包含至少一种本发明的变体蛋白酶的组合物是紧凑型颗粒状织物清洁组合物,而在其他实施方案中,组合物是可用于洗涤有色织物的颗粒状织物清洁组合物。在其他实施方案中,组合物是颗粒状织物清洁组合物,该组合物提供通过洗涤软化的能力,在另外的实施方案中,组合物是重垢液体织物清洁组合物。在一些实施方案中,包含至少一种本发明变体蛋白酶的组合物是织物清洁组合物,例如美国专利No.6,610,642和No.6,376,450中所述的那些组合物。还提供的是在欧洲或日本洗涤条件下特别实用的颗粒状衣物洗涤剂组合物(参见例如美国专利No.6,610,642),其包含至少一种本发明的变体蛋白酶。

[0285] 在一些方面,本发明提供包含至少一种本文提供的变体蛋白酶的硬质表面清洁组合物。一些此类组合物包含硬质表面清洁组合物,例如在美国专利No.6,610,642、No.6,376,450和No.6,376,450中描述的那些组合物,其包含至少一种此类变体蛋白酶。

[0286] 在一个方面,本发明提供手动盛具洗涤或自动盛具洗涤剂组合物,该组合物包含至少一种本文提供的变体蛋白酶。一些这类组合物包含硬质表面清洁组合物,如在美国专利No.6,610,642和No.6,376,450中描述的那些。

[0287] 在一个方面,本发明提供用于人工或手动盛具洗涤或自动盛具洗涤方法的清洁组合物,其包含至少一种本发明的变体蛋白酶和/或至少一种表面活性剂和/或至少一种另外的清洁辅助材料,所述清洁辅助材料选自有机聚合化合物、泡沫增强剂、II族金属离子、溶剂、水溶助长剂和另外的酶。

[0288] 在其中本发明的清洁组合物配制成适用于自动盛具洗涤机方法的组合物的一些实施方案中,本发明的组合物通常包含至少一种表面活性剂和/或至少一种助洗化合物并且可以包含一种或多种清洁辅助材料,所述清洁辅助材料优选地选自有机聚合化合物、漂白剂、另外的酶、抑泡剂、分散剂、钙皂分散剂、悬污剂和抗再沉积剂以及腐蚀抑制剂。可添

加一种或多种本发明变体蛋白酶的另外的示例性盛具洗涤组合物和制剂在下面的实施例中给出。

[0289] 在另一个方面,本发明提供包含至少一种本发明变体蛋白酶的口腔护理组合物,其可用于口腔护理(如清洁牙齿和假牙);口腔护理组合物的可用于并且可包含在其中的组分包括在美国专利No.6,376,450中描述的那些。本发明的组合物可还包含美国专利No.6,376,450、No.6,605,458和No.6,610,642中描述的清洁辅助材料和化合物,将所有这些专利以引用的方式并入本文。

[0290] 本发明的清洁组合物可配制成任何合适的形式以及通过配制人员选择的任何方法制备,其非限制性实例描述于美国专利No.5,879,584、No.5,691,297、No.5,574,005、No.5,569,645、No.5,565,422、No.5,516,448、No.5,489,392和No.5,486,303中,所有这些专利都以引用的方式并入本文中。当需要低pH清洁组合物时,通过添加诸如单乙醇胺之类的材料或诸如氯化氢(HCl)之类的酸性材料来调整此类组合物的pH。

[0291] 尽管不是实现本发明目的所必需的,但下文示例的辅助材料的非限制性名单适用于本发明清洁组合物。在一些实施方案中,掺入这些辅助材料,例如以帮助或增强清洁性能以便处理待清洁的基材,或改变清洁组合物的美观性,如利用芳香剂、着色剂、染料等情形就是如此。应当理解,这些助剂是本发明的变体蛋白酶的补充。这些另外的组分的精确性质以及其掺入的水平将取决于组合物的物理形式和打算使用组合物的清洁操作的性质。合适的辅助材料包括但不限于例如:表面活性剂、助洗剂、螯合剂、染料转移抑制剂、沉积助剂、分散剂、另外的酶和酶稳定剂、催化材料、漂白活化剂、漂白增强剂、过氧化氢、过氧化氢源、预先形成的过酸、聚合物分散剂、粘土污垢去除剂/抗再沉积剂、增亮剂、抑泡剂、染料、芳香剂、结构增塑剂、织物软化剂、载体、水溶助长剂、加工助剂和/或颜料。除下文的公开内容外,此类其它助剂及使用水平的适合实例见于美国专利No.5,576,282、No.6,306,812和No.6,326,348(以引用的方式并入本文)中。上述辅助成分可构成本发明清洁组合物的余量。

[0292] 在一些方面,本发明的清洁组合物包含至少一种表面活性剂和/或表面活性剂体系,其中所述表面活性剂选自:非离子型表面活性剂、阴离子型表面活性剂、阳离子型表面活性剂、两性表面活性剂、两性离子型表面活性剂、半极性非离子型表面活性剂以及它们的混合物。在一些低pH清洁组合物实施方案(例如净pH为约3至约5的组合物)中,组合物通常不含烷基乙氧基化硫酸盐,因为据信此类表面活性剂可能会被所述组合物的酸性内含物水解。在一些实施方案中,以清洁组合物的重量计,表面活性剂以约0.1%至约60%的水平存在,而在可供选择的实施方案中,所述量为约1%至约50%,而在其他实施方案中,所述水平为约5%至约40%。

[0293] 在一些方面,本发明的清洁组合物包含一种或多种洗涤剂助剂或助洗剂系统。在一些这类掺入至少一种助洗剂的组合物中,以清洁组合物的重量计清洁组合物包含至少约1%、约3%至约60%或甚至约5%至约40%的助洗剂。助洗剂包括但不限于例如:聚磷酸的碱金属盐、铵盐和链烷醇铵盐;碱金属硅酸盐;碱土金属和碱金属碳酸盐;铝硅酸盐;聚羧酸系化合物;醚羟基聚羧酸系;马来酸酐与乙烯或乙烯基甲基醚的共聚物;1,3,5-三羟基苯-2,4,6-三磺酸;和羧甲基氧基琥珀酸;聚乙酸(如乙二胺四乙酸和次氨基三乙酸)的各种碱金属盐、铵盐和取代的铵盐;以及聚羧酸系,如苯六甲酸、琥珀酸、柠檬酸、氧基二琥珀酸、聚

马来酸、苯1,3,5-三甲酸、羧甲基氧基琥珀酸以及它们的可溶性盐。设想到任何合适的助洗剂将可用于本发明的各种组合物。

[0294] 在一些这类组合物中,助洗剂形成水溶性硬度离子络合物(例如螯合助洗剂),如柠檬酸盐和聚磷酸盐(例如三聚磷酸钠和六水合三聚磷酸钠、三聚磷酸钾以及三聚磷酸钠与三聚磷酸钾的混合物等)。设想到,任何合适的助洗剂都将可用于本发明,包括本领域已知的那些助洗剂(例如参见EP 2 100 949)。

[0295] 除了至少一种变体蛋白酶,一些本发明的清洁组合物还包含至少一种螯合剂。合适的螯合剂包括但不限于例如:铜、铁和/或锰螯合剂以及它们的混合物。在使用至少一种螯合剂的实施方案中,以主题清洁组合物的重量计,本发明清洁组合物包含约0.1%至约15%或甚至约3%至约10%的螯合剂。

[0296] 除了至少一种变体蛋白酶,本文提供的一些清洁组合物还包含至少一种沉积助剂。合适的沉积助剂包括但不限于例如:聚乙二醇;聚丙二醇;聚羧酸系;去污聚合物,如聚对苯二甲酸;粘土,如高岭土、蒙脱石、凹凸棒石、伊利石、膨润土、多水高岭土以及它们的混合物。

[0297] 如本文所指出,在一些实施方案中,抗再沉积剂可用于本发明的一些实施方案。在一些实施方案中,可使用非离子型表面活性剂。这些非离子型表面活性剂也可用于防止污垢再沉积。在一些实施方案中,抗再沉积剂是本领域已知的非离子型表面活性剂(参见例如EP 2 100 949)。

[0298] 在一些实施方案中,本发明清洁组合物包含一种或多种染料转移抑制剂。合适的聚合物染料转移抑制剂包括(但不限于):聚乙烯吡咯烷酮聚合物、聚胺N-氧化物聚合物、N-乙烯吡咯烷酮与N-乙烯咪唑的共聚物、聚乙烯噁唑烷酮和聚乙烯咪唑或它们的混合物。在使用至少一种染料转移抑制剂的实施方案中,以清洁组合物的重量计,本发明清洁组合物包含约0.0001%至约10%、约0.01%至约5%或甚至约0.1%至约3%。

[0299] 在一些实施方案中,硅酸盐包含在本发明的组合物中。在一些此类实施方案中,使用硅酸钠(例如二硅酸钠、偏硅酸钠和结晶页硅酸盐)。在一些实施方案中,硅酸盐以约1%至约20%的水平存在。在一些实施方案中,以组合物的重量计,硅酸盐以约5%至约15%的水平存在。

[0300] 在一些另外的实施方案中,本发明的清洁组合物还包含分散剂。合适的水溶性有机材料包括但不限于例如:均聚酸或共聚酸或它们的盐,其中多元羧酸包含至少两个彼此相隔不超过两个碳原子的羧基。

[0301] 在另一些实施方案中,使用任何合适的技术稳定用于清洁组合物的酶(如本发明的变体蛋白酶或其他另外的酶)。在一些实施方案中,本文所用的酶由成品组合物中存在的可给该酶提供钙和/或镁离子的水溶性钙和/或镁离子源来稳定。在一些实施方案中,酶稳定剂包括寡糖、多糖和无机二价金属盐(包括碱土金属,如钙盐)。设想到,各种酶稳定化技术将可用于本发明。例如,在一些实施方案中,本文所采用的酶由成品组合物中存在的可给该酶提供锌(II)、钙(II)和/或镁(II)离子的水溶性的这类离子源,以及其他金属离子(例如钡(II)、铈(II)、铁(II)、锰(II)、铝(III)、锡(II)、钴(II)、铜(II)、镍(II)和氧钒(IV))来稳定。氯化物和硫酸盐也可用于本发明一些实施方案。合适的寡糖和多糖(例如糊精)的实例是本领域已知的(参见例如WO 07/145964)。在一些实施方案中,也可使用可逆的蛋白

酶抑制剂,例如含硼化合物(如硼酸盐、4-甲酰基苯基硼酸)和/或必要时,可在本发明的组合合物中使用三肽醛进一步改进稳定性。

[0302] 在一些实施方案中,漂白剂、漂白活化剂和/或漂白催化剂包含在本发明的组合合物中。在一些实施方案中,本发明的清洁组合合物包含无机的和/或有机的漂白化合物。无机漂白剂包括但不限于过氧化氢合物盐(例如过硼酸盐、过碳酸盐、过磷酸盐、过硫酸盐和过硅酸盐)。在一些实施方案中,无机过氧化氢合物盐是碱金属盐。在一些实施方案中,包括的无机过氧化氢合物盐为结晶固体形式,无额外保护,但在一些另外的实施方案中,所述盐带涂层。本领域已知的任何合适的盐都可用于本发明的组合合物(例如参见EP 2 100 949)。

[0303] 在一些实施方案中,漂白活化剂用于本发明的组合合物中。漂白活化剂通常为有机过酸前体,这些有机过酸前体在60℃和低于60℃温度下进行的清洁过程中会增强漂白作用。适用于本文中的漂白活化剂包括在过氧化氢解条件下提供优选具有约1至约10个碳原子,尤其约2至约4个碳原子的脂族过氧羧酸和/或任选取代的过苯甲酸的化合物。另外的漂白活化剂是本领域已知的并且可用于本发明的组合合物(例如参见EP 2 100 949)。

[0304] 此外,在一些实施方案中以及如本文所进一步描述,本发明清洁组合合物还包含至少一种漂白催化剂。在一些实施方案中,可使用三氮杂环壬烷锰和相关络合物,以及钴、铜、锰和铁络合物。另外的漂白催化剂可用于本发明(例如参见美国专利No.4,246,612、No.5,227,084和No.4,810410;WO 99/06521;和EP 2 100 949)。

[0305] 在一些实施方案中,本发明的清洁组合合物包含一种或多种催化性金属络合物。在一些实施方案中,可使用含金属漂白催化剂。在一些实施方案中,金属漂白催化剂包含催化剂系统,所述催化剂系统包含具有确定的漂白催化活性的过渡金属阳离子(例如铜、铁、钛、钪、钨、钼或锰阳离子)、具有极低或无漂白催化活性的辅助性金属阳离子(例如锌或铝阳离子),以及对催化性和辅助性金属阳离子具有确定的稳定性常数的金属封锁剂,尤其可使用乙二胺四乙酸、乙二胺四(亚甲基膦酸)以及它们的水溶性盐(参见例如美国专利No.4,430,243)。在一些实施方案中,使用锰化合物催化本发明的清洁组合合物。这些化合物及使用水平是本领域公知的(例如参见美国专利No.5,576,282)。在另外的实施方案中,钴漂白催化剂可以使用,并且包含在本发明的清洁组合合物中。各种钴漂白催化剂是本领域已知的(例如参见美国专利No.5,597,936和No.5,595,967)且易于用已知程序制备。

[0306] 在一些另外的实施方案中,本发明清洁组合合物包含大多环刚性配体(MRL)的过渡金属络合物。作为一种实践(但绝非限制),在一些实施方案中,对本发明提供的组合合物和清洁方法进行调整,以在水性洗涤介质中为每亿份活性MRL物质提供大约至少一份,而在一些实施方案中,在洗涤液中提供约0.005ppm至约25ppm、约0.05ppm至约10ppm以及约0.1ppm至约5ppm的MRL。

[0307] 在一些实施方案中,本发明过渡金属漂白催化剂中的过渡金属包括但不限于例如锰、铁和铬。优选MRL还包括但不限于例如:交叉桥接的特殊超刚性配体(例如5,12-二乙基-1,5,8,12-四氮杂双环(6.6.2)十六烷)。合适的过渡金属MRL易于通过已知程序制备(例如参见WO 2000/32601和美国专利No.6,225,464)。

[0308] 在一个方面,本发明提供配制为洗涤剂片的自动盛具洗涤剂组合物。此类洗涤剂片包含至少一种本发明的变体蛋白酶和助洗剂,例如助洗剂盐。一些这类洗涤剂片具有至少等价于3克(g)氢氧化钠/100克片状组合物的碱度和至少1.4克/立方厘米的密度。助洗剂

盐可包含硅酸盐和磷酸盐的混合物,优选硅酸盐(如偏硅酸钠)比磷酸盐(如三聚磷酸钠)多。一些这类洗涤剂片不含表面活性剂材料并且特别适合用于自动盛具洗涤剂。

[0309] 在一个方面,本发明的清洁组合物包含金属护理剂。金属护理剂可用于防止和/或减少包括铝、不锈钢和非铁金属(例如银和铜)在内的金属的锈污、腐蚀和/或氧化。合适的金属护理剂包括EP 2 100 949、WO 9426860和WO 94/26859中所述的金属护理剂。在一些这类清洁组合物中,金属护理剂是锌盐。一些这类清洁组合物包含约0.1重量%至约5重量%的一种或多种金属护理剂。

[0310] 如上文所指出的,本发明清洁组合物配制成任何合适的形式并由配制者选择的任何方法制备,其非限制性实例描述于美国专利No.5,879,584、No.5,691,297、No.5,574,005、No.5,569,645、No.5,516,448、No.5,489,392和No.5,486,303中,所有这些专利都以引用的方式并入本文中。在需要低pH清洁组合物的一些实施方案中,通过添加诸如氯化氢(HCl)之类的酸性物质来调整此类组合物的pH。

[0311] 本文所公开的清洁组合物可用于清洁位置(situs)(例如表面、盛具、餐具或织物)。通常,使所述位置的至少一部分与纯的本发明清洁组合物或在洗涤液中稀释的本发明清洁组合物接触,随后任选洗涤和/或漂洗所述位置。出于本发明的目的,“洗涤”包括但不限于例如擦洗和机械搅动。在一些实施方案中,清洁组合物在溶液中以约500ppm至约15,000ppm的浓度使用。当洗涤溶剂是水时,水温通常在约5℃至约90℃的范围内,并且当所述位置包括织物时,水与织物的质量比通常为约1:1至约30:1。

[0312] 清洁组合物的制备和使用方法

[0313] 本文和通篇所述的本发明清洁组合物可配制成任何合适的形式并且可通过配制者所选择的任何合适方法制备(参见例如美国专利No.5,879,584、No.5,691,297、No.5,574,005、No.5,569,645、No.5,565,422、No.5,516,448、No.5,489,392、No.5,486,303、No.4,515,705、No.4,537,706、No.4,515,707、No.4,550,862、No.4,561,998、No.4,597,898、No.4,968,451、No.5,565,145、No.5,929,022、No.6,294,514和No.6,376,445)。

[0314] 在一些实施方案中,本发明的清洁组合物以单位剂型提供,包括片剂、胶囊剂、囊剂(sachet)、袋剂(pouch)和多隔室袋剂。在一些实施方案中,对单位剂量形式进行设计以提供多隔室小袋(或其他单位剂量形式)内的成分的控制释放。合适的单位剂量和控制释放形式是本领域已知的(参见例如EP 2100949、WO 02/102955、美国专利No.4,765,916和No.4,972,017,以及WO 04/111178关于适用于单位剂量和控制释放形式的材料)。在一些实施方案中,单位剂型以包有水溶性膜或水溶性小袋的片剂提供。各种用于单位剂量的形式在EP 2 100 947中提供,并且是本领域已知的。

[0315] 本发明的方法

[0316] 本发明提供用于清洁或洗涤需要清洁的物品或表面(例如硬质表面)的方法,包括但不限于例如清洁或洗涤盛具物品、餐具物品、织物物品、衣物物品、个人护理物品等等的方法,以及清洁或洗涤硬质或软质表面(例如物品的硬质表面)的方法。

[0317] 在一个方面,本发明提供清洁需要清洁的物品、物体或表面的方法,该方法包括使物品或表面(或希望进行清洁的物品或表面的一部分)与任何本发明的变体蛋白酶或本发明的组合物接触足以清洁所述物品、物体或表面至所需程度的时间和/或在适于或有效用于清洁所述物品、物体或表面至所需程度的条件下进行接触。一些这类方法还包括用水漂

洗物品、物体或表面。对于一些这类方法,清洁组合是盛具洗涤剂组合,而待清洁的物品或物体是盛具物品或餐具物品。盛具物品是通常用于供给食物或食用食物的器皿物品。盛具物品可以是但不限于例如盘子、碟子、杯子、碗等等。餐具是更广泛的术语,其包括但不限于例如器皿、刀具、餐刀、餐叉、匙、筷子、玻璃器具、罐壶、调味汁碟、饮用容器等等;餐具物品包括这些或相似的用于供应食物或食用食物的物品中的任何一种。对于一些这类方法,清洁组合是自动盛具洗涤剂组合或手动盛具洗涤剂组合,而待清洁的物品或物体是盛具或餐具物品。对于一些这类方法,清洁组合是衣物洗涤剂组合,例如粉末衣物洗涤剂组合或液体衣物洗涤剂组合,而待清洁的物品是织物物品。

[0318] 在一个方面,本发明提供用于清洁或洗涤任选需要分别清洁或洗涤的织物物品的方法。一些此类方法包括提供包含变体蛋白酶的组合物(例如但不限于例如织物或衣物清洁组合)和需要清洁的织物物品或衣物物品,并且使该织物物品或衣物物品(希望进行清洁的物品的一部分)与该组合在足以或有效清洁或洗涤该织物或衣物物品至所需程度的条件下接触。

[0319] 在一个方面,本发明提供清洁或洗涤任选需要清洁的物品或表面(例如硬质表面)的方法,该方法包括提供待清洁或洗涤的物品或表面,使物品或表面(或希望进行清洁或洗涤的物品或表面的一部分)与至少一种本发明的变体蛋白酶或包含至少一种此类变体蛋白酶的本发明组合物接触足以清洁或洗涤物品或表面至所需程度的时间和/或在足以或有效清洁或洗涤物品或表面至所需程度的条件下接触。这类组合包括但不限于:例如本发明的清洁组合或洗涤剂组合(包括但不限于:例如手动盛具洗涤剂组合、手动盛具洗涤清洁组合、衣物洗涤剂组合或织物洗涤剂组合或者衣物或织物清洁组合、液体衣物洗涤剂、液体衣物清洁组合、粉末衣物洗涤剂组合、粉末衣物清洁组合、自动盛具洗涤剂组合、衣物助洗剂清洁组合或洗涤剂组合、衣物清洁添加剂和衣物预洗剂组合等)。在某些情况下,如果需要,可将该方法重复一次或多次,尤其是如果需要额外的清洁或洗涤的话。例如,在某些情况下,该方法任选还包括让物品或表面与至少一种变体蛋白酶或组合物保持接触足以或有效清洁或洗涤物品或表面至所需程度的一段时间。一些这类方法还包括用水漂洗物品或表面。一些此类方法还包括再次用至少一种本发明的变体蛋白酶或本发明的组合物接触物品或表面,并且让该物品或表面与至少一种变体蛋白酶或组合物保持接触足以清洁或洗涤物品或表面至所需程度的一段时间。对于一些这类方法,清洁组合是盛具洗涤剂组合,而待清洁的物品是盛具或餐具物品。对于一些这类方法,清洁组合是自动盛具洗涤剂组合或手动盛具洗涤剂组合,而待清洁的物品是盛具或餐具物品。对于一些这类方法,清洁组合是衣物洗涤剂组合,而待清洁的物品是织物物品。

[0320] 在一个方面,本发明提供在自动盛具洗涤机中清洁餐具或盛具物品的方法,该方法包括提供自动盛具洗涤机,在该机器中放入足以清洁餐具或盛具物品的一定量的包含至少一种本发明变体蛋白酶或本发明的组合物的自动盛具洗涤组合(例如,通过将该组合置于机器中的合适的或提供的洗涤剂隔室或分配器中),将盛具或餐具物品放入该机器中,运行该机器以清洁该餐具或盛具物品(例如按照生产商的说明书)。此类方法可包括本文所述的任何自动盛具洗涤组合,其包括但不限于例如本文所述的任何变体蛋白酶。待使用的自动盛具洗涤组合的量可根据生产商的说明书或建议容易地确定,可采用任何形式的包含至少一种本发明变体蛋白酶的自动盛具洗涤组合(例如液体、粉末、固体、凝胶、

片等),包括本文所述的任何组合物在内。

[0321] 在一个方面,本发明提供清洁任选需要清洁的表面、物品或物体的方法,该方法包括使物品或表面(或希望进行清洁的物品或表面的一部分)与纯的或在洗涤液中稀释的至少一种本发明变体蛋白酶或本发明清洁组合物接触足以清洁或洗涤该物品或表面至所需程度的时间和/或在足以或有效清洁或洗涤该物品或表面至所需程度的条件下进行接触。然后如果需要,可对表面、物品或物体(任选)进行洗涤和/或漂洗。出于本发明的目的,“洗涤”包括但不限于例如擦洗和机械搅动。在一些实施方案中,清洁组合物在溶液(如水溶液)中以约500ppm至约15,000ppm的浓度使用。当洗涤溶剂是水时,水温通常在约5℃至约90℃的范围内,并且当所述位置包括织物时,水与织物的质量比通常为约1:1至约30:1。

[0322] 在一个方面,本发明提供在洗涤机中清洁衣物或织物物品的方法,该方法包括提供洗涤机,将足以清洁衣物或织物物品的一定量的包含至少一种本发明变体蛋白酶的衣物洗涤剂组合物置于该机器中(例如通过该组合物置于机器中的合适的或提供的洗涤剂隔室中或分配器中),将衣物或织物物品放入该机器中,运行该机器以清洁餐具或盛具物品(例如,按照生产商的说明书)。此类方法可包括本文所述的任何衣物洗涤剂组合物,其包括但不限于例如本文所述的任何变体蛋白酶。要使用的衣物洗涤剂组合物的量可根据生产商的说明书或建议容易地确定,可采用任何形式的包含至少一种本发明变体蛋白酶的衣物洗涤剂组合物(例如固体、粉末、液体、片、凝胶等),包括本文所述的任何组合物在内。

[0323] 另外的示例性清洁方法在下面的实施例中提供。

[0324] 本发明的另外方面

[0325] 在一个方面,本发明提供本文和通篇所述的本发明任何组合物(例如清洁组合物或洗涤剂组合物),所述组合物包含通篇和本文所述的本发明任何多肽(例如本发明任何蛋白酶变体或枯草杆菌蛋白酶变体),但其中所述组合物不是自动盛具洗涤组合物。在一个方面,本发明提供的组合物包含通篇和本文所述的本发明任何变体蛋白酶,但其中所述组合物不包含自动盛具洗涤剂组合物,所述组合物包含亲本蛋白酶的变体蛋白酶,所述亲本蛋白酶包含的氨基酸序列与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少97%、至少99%或100%同一性,所述亲本蛋白酶的所述变体蛋白酶相对于所述亲本蛋白酶包含如下氨基酸置换组中的一个:

[0326] (i) N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A,前提条件是所述变体蛋白酶不包含N248R+S188D,或

[0327] (ii) N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A+S188D+V244R,

[0328] (iii) 以及助洗剂,

[0329] 其中氨基酸位置根据SEQ ID NO:2中所示解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN'的氨基酸序列中对应氨基酸位置的编号方式来进行编号,所述对应氨基酸位置通过所述变体蛋白酶氨基酸序列与解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BPN'氨基酸序列的比对来确定。在一个方面,此类组合物是洗涤剂组合物。在一个方面,此类组合物是清洁组合物。在一个方面,此类组合物是液体洗涤剂或粉末洗涤剂组合物。在一个方面,此类组合物是液体、凝胶、片、粉末、固体或颗粒形式的清洁组合物。在一个方面,此类组合物是自动盛具洗涤剂组合物。在一个方面,此类组合物是不含磷酸盐的清洁组合物。在任何方面,所述组合物包含至少一种另外的酶。在所述组合物的任何方面,所述组合物至少包含此类至少一种另外的可选自

如下的酶：半纤维素酶、纤维素酶、淀粉酶、过氧化物酶、蛋白酶、木聚糖酶、脂肪酶、磷脂酶、酯酶、角质酶、果胶酶、果胶裂解酶、甘露聚糖酶、角蛋白酶、还原酶、氧化酶、酚氧化酶、脂氧合酶、木质素酶、支链淀粉酶、鞣酸酶、戊聚糖酶、malanase、 β -葡聚糖酶、阿拉伯糖苷酶、透明质酸酶、软骨素酶和漆酶。在所述组合物的任何方面，所述组合物可包含两种或更多种另外的选自如下的酶：半纤维素酶、纤维素酶、淀粉酶、过氧化物酶、蛋白酶、木聚糖酶、脂肪酶、磷脂酶、酯酶、角质酶、果胶酶、果胶裂解酶、甘露聚糖酶、角蛋白酶、还原酶、氧化酶、酚氧化酶、脂氧合酶、木质素酶、支链淀粉酶、鞣酸酶、戊聚糖酶、malanase、 β -葡聚糖酶、阿拉伯糖苷酶、透明质酸酶、软骨素酶和漆酶。在所述组合物的任何方面，所述组合物还可以包含至少一种助洗剂和/或至少一种表面活性剂。

[0330] 在一个方面，本发明提供清洁需要清洁的物品或表面的方法，该方法包括使物品或表面与任何前述组合物接触。在所述方法的一个方面，所述方法还包括用水漂洗物品或表面。在所述方法的一个方面，清洁组合物是盛具洗涤剂组合物，而待清洁的物品是盛具或餐具物品。在所述方法的一个方面，清洁组合物是自动盛具洗涤剂组合物，而待清洁的物品是盛具或餐具物品。

[0331] 在一个方面，本发明提供用于清洁表面、物品或物体的方法，该方法包括使待清洁的物品或表面的至少一部分与任何前述组合物接触足以清洁或洗涤物品或表面至所需程度的时间和/或在足以或有效清洁或洗涤物品或表面至所需程度的条件下接触，以及任选还包括用水漂洗表面、物品或物体。

[0332] 在一个方面，本发明提供在自动盛具洗涤剂中清洁餐具或盛具物品的方法，该方法包括：(i) 提供自动盛具洗涤剂，(ii) 在该机器中放入足以在机器中清洁餐具或盛具物品的一定量的任何前述组合物或自动盛具洗涤剂组合物，其中所述组合物任选置于所述机器的隔室或分配器中，(iii) 将盛具或餐具物品放入机器中，以及(iv) 运行机器以清洁餐具或盛具物品。

[0333] 实施例

[0334] 为了展示和进一步说明本发明的某些方面，提供了以下实施例，并且这些实施例不应理解为对本发明的范围构成限制。

[0335] 在本文下面和其他地方的实验公开中，采用以下缩写：PI (蛋白酶抑制剂)，ppm (份每一百万份)；M (摩尔/升)；mM (毫摩尔/升)； μ M (微摩尔/升)；nM (纳摩尔/升)；mol (摩尔)；mmol (毫摩尔)； μ mol (微摩尔)；nmol (纳摩尔)；gm (克)；mg (毫克)； μ g (微克)；pg (皮克)；L 或 l (升)；ml 和 mL (毫升)； μ l 或 μ L (微升)；cm (厘米)；mm (毫米)； μ m (微米)；nm (纳米)；U (单位)；V (伏)；MW (分子量)；sec (秒)；min (分钟)；h 或 hr (小时)； $^{\circ}$ C (摄氏度)；ND (未测定)；rpm (每分钟转数)；GH (德国硬度度)；H₂O (水)；dH₂O (去离子水)；HCl (盐酸)；aa (氨基酸)；bp (碱基对)；kb (千碱基对)；kD (千道尔顿)；cDNA (拷贝DNA 或互补DNA)；DNA (脱氧核糖核酸)；ssDNA (单链DNA)；dsDNA (双链DNA)；RNA (核糖核酸)；MgCl₂ (氯化镁)；NaCl (氯化钠)；BPN' (解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶)；PB92 (克劳氏芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶)；w/v (重量/体积比)；v/v (体积比)；w/w (重量比)；g (重力)；OD (光密度)；ppm (份每一百万份)；OD₂₈₀ (280nm 处的光密度)；OD₆₀₀ (600nm 处的光密度)；A₄₀₅ (405nm 处的吸光度)；PAGE (聚丙烯酰胺凝胶电泳)；PBS (磷酸盐缓冲盐水 [150mM NaCl, 10mM 磷酸钠缓冲液, pH 7.2])；PEG (聚乙二醇)；PCR (聚合酶链反应)；SDS (十二烷基硫酸钠)；TRIS 或 Tris (三(羟甲基)氨基甲烷)；HEPES (N-[2-羟乙基]

哌嗪-N-[2-乙磺酸]);HBS(HEPES缓冲盐水);Tris-HCl(三[羟甲基]氨基甲烷-盐酸盐);DMSO(二甲基亚砷);SA(芥子酸(s,5-二甲氧基-4-羟基肉桂酸);TCA(三氯乙酸);HPLC(高压液相色谱);Taq(水生栖热菌(*Thermus aquaticus*)DNA聚合酶);Klenow(DNA聚合酶I大(Klenow)片段);EDTA(乙二胺四乙酸);bla(β -内酰胺酶或氨苄青霉素抗性基因);HDL(高密度液体);HDD(重垢粉末洗涤剂);HSG(高泡颗粒状洗涤剂);CEE(中欧和东欧);WE(西欧);当用于指洗涤剂时,NA(北美);当用于指洗涤剂时,JPN(日本);CFT(材料测试中心(Center for Test Materials),荷兰费拉尔丁恩(Vlaardingen,The Netherlands));P&G和Procter & Gamble(宝洁公司(Procter & Gamble,Inc.)),俄亥俄州辛辛那提(Cincinnati,OH));DNA2.0(DNA2.0公司,加利福尼亚州门洛帕克(Menlo Park,CA));Corning(康宁生命科学(Corning Life Sciences),纽约州科宁(Corning,NY));ATCC(美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection),马里兰州洛克维尔(Rockville,MD));Sigma(西格玛化工有限公司(Sigma Chemical Co.)),密苏里州圣路易斯(St.Louis,MO));NCBI(美国国家生物技术信息中心);Operon Technologies(操纵子技术公司(Operon Technologies, Inc.)),加利福尼亚州阿拉米达(Alameda,CA));Invitrogen(英杰公司(Invitrogen Corp.)),加利福尼亚州圣地亚哥(San Diego,CA));Qiagen(凯杰公司(Qiagen,Inc.)),加利福尼亚瓦伦西亚(Valencia,CA));Molecular Devices(分子仪器公司(Molecular Devices Corp.)),加利福尼亚州森尼韦尔(Sunnyvale,CA));Siegfried Handel(Siegfried Handel AG公司,瑞士祖芬根(Zofingen,Switzerland));Stratagene(Stratagene Cloning Systems公司,加利福尼亚州拉荷雅(La Jolla,CA));Monsanto(孟山都公司(Monsanto Co.)),密苏里州圣路易斯(St.Louis,MO));Wintershall(温特斯霍尔公司(Wintershall AG),德国卡塞尔(Kassel,Germany));BASF(巴斯夫公司(BASF Co.)),新泽西州弗洛勒姆帕克(Florham Park,NJ));Huntsman(亨斯迈石化公司(Huntsman Petrochemical Corp.)),犹他州盐湖城(Salt Lake City,UT);Enichem(Enichem Iberica公司,西班牙巴萨罗那(Barcelona,Spain));Fluka Chemie AG(Fluka Chemie AG公司,瑞士布克斯(Buchs, Switzerland));Gist-Brocades(吉斯特-布罗卡德斯公司(Gist-Brocades,NV),荷兰代夫特(Delft,The Netherlands));Dow Corning(道康宁公司(Dow Corning Corp.)),密歇根州米德兰(Midland,MI));RB(英国斯劳利洁时公司(Reckitt-Benckiser,Slough,UK))。

[0336] 如本文所用,在一些列表中,标出了前面的“0”,以提供每个位点的三位数名称(例如“001”与“1”相同,因此“A001C”与“A1C”相同)。在一些列表中,未包括前面的“0”。此外,如本文所用,“X”是指任何氨基酸。

[0337] 在本文提供的示例性洗涤剂组合物中,酶水平是以总组合物重量计的纯酶表示,除非另外指明,否则洗涤剂成分是以总组合物的重量表示。其中的缩写的组分标识具有如下含义:

[0338]

缩写	成分
LAS	: 直链 C ₁₁₋₁₃ 烷基苯磺酸钠
NaC16-17HSAS	: C ₁₆₋₁₇ 高可溶性烷基硫酸钠
TAS	: 牛脂烷基硫酸钠
CxyAS	: C _{1x} - C _{1y} 烷基硫酸钠
CxyEz	: 与平均 z 摩尔环氧乙烷缩合的 C _{1x} - C _{1y} 主要直链的伯醇
CxyAEzS	: 与平均 z 摩尔环氧乙烷缩合的 C _{1x} - C _{1y} 烷基硫酸钠。在实施例中增添分子名称。
非离子型	: 混合的乙氧基化的/丙氧基化的脂肪醇, 如 Plurafac LF404 为平均乙氧基化度为 3.8 并且平均丙氧基化度为 4.5 的醇
QAS	: R ₂ = C ₁₂ -C ₁₄ 的 R ₂ .N+(CH ₃) ₂ (C ₂ H ₄ OH)
硅酸盐	: 无定形硅酸钠 (SiO ₂ :Na ₂ O 比率 = 1.6-3.2:1)
偏硅酸盐	: 偏硅酸钠 (SiO ₂ :Na ₂ O 比率 = 1.0)
沸石 A	: 式 Na ₁₂ (AlO ₂ SiO ₂) ₁₂ · 27H ₂ O 的水合硅铝酸盐
SKS-6	: 式 δ-Na ₂ Si ₂ O ₅ 的结晶层状硅酸盐
硫酸盐	: 无水硫酸钠
STPP	: 三聚磷酸钠
MA/AA	: 4:1 丙烯酸系(acrylate)/马来酸系(maleate)的无规共聚物, 平均分子量为约 70,000-80,000
AA	: 平均分子量为 4,500 的聚丙烯酸钠聚合物
聚羧酸系	: 分子量范围为 2,000-80,000 之间的、包含羧化单体例如丙烯酸系、马来酸系和甲基丙烯酸系的混合物的共聚物, 例如可从 BASF 商购获得的 Sokolan, 其为丙烯酸的共聚物, 分子量为 4,500
BB1	: 3-(3,4-二氢异喹啉)丙磺酸盐
BB2	: 1-(3,4-二氢异喹啉)-癸烷-2-磺酸盐
PB1	: 过硼酸钠一水合物
PB4	: 标称化学式为 NaBO ₃ · 4H ₂ O 的过硼酸钠四水合物。
过碳酸盐	: 标称化学式为 2Na ₂ CO ₃ · 3H ₂ O ₂ 的过碳酸钠。
TAED	: 四乙酰基乙二胺
NOBS	: 钠盐形式的壬酰氧基苯磺酸盐
DTPA	: 二亚乙基三胺五乙酸
HEDP	: 1,1-羟基乙烷二膦酸
DETPMP	: 二乙基三胺五(亚甲基)膦酸, 由孟山都公司(Monsanto)以商品名 Dequest 2060 销售
EDDS	: 其钠盐形式的乙二胺-N,N'-二琥珀酸, (S,S)异构体

[0339]

缩写	成分
二胺	: 二甲基氨基丙胺; 1,6-己二胺; 1,3-丙二胺; 2-甲基-1,5-戊二胺; 1,3-戊二胺; 1-甲基-二氨基丙烷
DETBCHD	: 5, 12-二乙基-1,5,8,12-四氮杂双环[6,6,2]十六烷, 二氯化物, Mn(II)盐
PAAC	: 五氨合钴乙酸盐(Pentaamine acetate cobalt(III) salt)
石蜡	: 石蜡油, 由温特斯霍尔公司(Wintershall)以商品名 Winog 70 销售
链烷磺酸盐	: 其中一些氢原子已被磺酸根基团取代的石蜡油或蜡
醛糖氧化酶	: 氧化酶, 由诺维信公司(Novozymes A/S)以商品名醛糖氧化酶(Aldose Oxidase)销售
半乳糖氧化酶	: 购自西格玛(Sigma)的半乳糖氧化酶
nprE	: 在枯草芽孢杆菌中表达的重组形式的中性金属蛋白酶(参见例如 WO 07/044993)
PMN	: 纯化的来自解淀粉芽孢杆菌的中性金属蛋白酶
淀粉酶	: 合适的淀粉分解酶, 如由杰能科公司销售的在 WO 94/18314、WO96/05295 中描述的以商品名 PURAFECT [®] Ox 销售的那些; NATALASE [®] 、TERMAMYL [®] 、FUNGAMYI [®] 和 DURAMYL [™] , 全部可得自诺维信公司
脂肪酶	: 合适的脂肪分解酶, 例如由诺维信公司以商品名 LIPEX [®] 、LIPOLEASE [®] 、LIPOLEASE [®] Ultra 销售的以及由吉斯特-布罗卡德斯公司(Gist-Brocades)以 Lipomax [™] 销售的那些。
纤维素酶	: 合适的纤维素分解酶, 例如由诺维信公司以商品名 CAREZYME [®] 、CELLUZYME [®] 和/或 ENDOLASE [®] 销售的那些
果胶裂解酶	: 合适的果胶裂解酶, 例如可得自诺维信公司的以商品名 PECTAWAY [®] 和 PECTAWASH [®] 销售的那些
PVP	: 平均分子量为 60,000 的聚乙烯基吡咯烷酮
PVNO	: 聚乙烯基吡啶-N-氧化物, 平均分子量为 50,000
PVPVI	: 乙烯基咪唑和乙烯基吡咯烷酮的共聚物, 平均分子量为 20,000
增白剂 1	: 4,4'-双(2-磺基苯乙烯基)联苯二钠
有机硅消泡剂	: 以硅氧烷-氧化烯共聚物作为分散剂的聚二甲基硅氧烷泡沫控制剂, 所述泡沫控制剂与所述分散剂的比例为 10:1 至 100:1
抑泡剂	: 12%有机硅/硅石, 18%硬脂醇, 70%颗粒形式的淀粉
SRP 1	: 阴离子封端的聚酯
PEG X	: 分子量为 X 的聚乙二醇

[0340]

缩写	成分
PVP K60 [®]	: 乙烯基吡咯烷酮均聚物 (平均分子量为 160,000)
Jeffamine [®] ED-2001	: 得自亨斯迈(Huntsman)的封端的聚乙二醇
Isachem [®] AS	: 购自 Enichem 的支链醇烷基硫酸盐
MME PEG (2000)	: 购自 Fluka Chemie AG 的聚乙二醇单甲醚(MW 2000)
DC3225C	: 有机硅抑泡剂, 购自道康宁公司的硅油和硅石混合物
TEPAE	: 四亚乙基五胺乙氧基化物
BTA	: 苯并三唑
甜菜碱	: $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COO}^-$
糖	: 工业级 D-葡萄糖或食品级糖
CFAA	: $\text{C}_{12}\text{-C}_{14}$ 烷基 N-甲基葡萄糖酰胺
TPKFA	: $\text{C}_{12}\text{-C}_{14}$ 拔顶全馏份脂肪酸
粘土	: 通式为 $\text{Al}_2\text{O}_3\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ 的水合硅酸铝。类型: 高岭石、蒙脱石、凹凸棒石、伊利石、膨润土、多水高岭土

[0341] 对于北美 (NA) 和西欧 (WE) 重垢液体衣物 (HDL) 洗涤剂, 通过将预称重的液体洗涤剂 (于玻璃瓶中) 置于 95°C 水浴中 2 小时对市售洗涤剂中存在的酶进行热灭活。热灭活 NA 和 WE 自动餐具洗涤 (ADW) 洗涤剂的温育时间是 8 小时。未加热的和加热过的洗涤剂二者均在溶解该洗涤剂 5 分钟内测定, 以便精确地测定灭活百分比。通过 AAPF 测定法测试酶活性。

[0342] 为了测试在热灭活洗涤剂中的酶活性, 由热灭活的储备液制备洗涤剂的工作溶液。添加适当量的水硬度 (例如 6 格令每加仑 (gpg) 或 12 gpg) 和缓冲液至该洗涤剂溶液以匹配所需的条件。通过涡旋或倒转瓶子来混合溶液。一些市售洗涤剂在如下实施例中有描述。

[0343] 实施例 1

[0344] 变体蛋白酶的构建

[0345] 本发明的变体蛋白酶多肽以及编码此类变体蛋白酶的本发明的核酸可通过使用本领域普通技术人员熟知的多种标准方法中的一种或多种而产生。例如, 编码本发明的变体蛋白酶的核酸可通过以下方法构建: 进行质粒 DNA 的定点诱变, 该质粒 DNA 编码如 SEQ ID NO: 18 所示的迟缓芽孢杆菌 GG36 蛋白酶编码核苷酸序列, 使得由此编码的所得变体蛋白酶在相对于如 SEQ ID NO: 1 所示的 GG36 氨基酸序列的所需氨基酸位置包含一个或多个所需的氨基酸置换 (突变)。例如, 本领域的技术人员可容易地采用使用 SEQ ID NO: 18 的核苷酸序列 (其编码 GG36 蛋白酶多肽) 的标准定点诱变程序, 产生编码下述变体蛋白酶多肽的核酸, 该变体蛋白酶多肽在 GG36 蛋白酶 (SEQ ID NO: 1) 的一个或多个氨基酸位置包含所需的氨基酸置换。另外, 本领域的技术人员可容易地采用使用 SEQ ID NO: 18 的核苷酸序列的已知定点诱变程序, 产生编码下述变体蛋白酶多肽的核酸, 该变体蛋白酶多肽在 GG36 (SEQ ID NO: 1) 的一个或多个氨基酸位置包含氨基酸置换, 所述位置选自第 76、87、118、128、129、130、188、244 和 248 位, 其中每个氨基酸位置根据如 SEQ ID NO: 2 所示的解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶 BPN' 的氨基酸序列中对应氨基酸位置的编号方式进行编号, 所述对应氨基酸位置通过所关注的变体蛋白酶氨基酸序列与 BPN' 氨基酸序列进行比对而确定。

[0346] 还可容易地采用此类程序, 例如产生编码变体蛋白酶 PX3 (SEQ ID NO: 6)、PX4 (SEQ

ID NO:7) 和PX5 (SEQ ID NO:8) 的核酸及其各自的变体蛋白酶,例如包含附加氨基酸置换的PX3、PX4和PX5的变体,这些置换包括例如非保守和保守氨基酸置换、氨基酸缺失和/或氨基酸插入和/或添加。

[0347] GG36蛋白酶编码核苷酸序列如下所示:

[0348]

gtgagaagcaaaaaattgtggatcgctcgctcgaccgcactactcatttctgttgctttcagttcatcgatcgcatc
ggctgctgaagaagcaaaagaaaaatatattaattggctttaatgagcaggaagctgtcagtgagttttagaacaag
tagaggcaaatgacgaggtcgccattctctctgaggaagaggaagtgcgaattgaattgcttcatgaatttgaaacg
attcctgttttatccgttgagttaagcccagaagatgtggacgcgcttgagctcgatccagcgatttcttatattga
agaggatgcagaagtaacgacaatgGCGCAATCAGTGCCATGGGGAATTAGCCGTGTGCAAGCCCCAGCTGCCATA
ACCGTGGATTGACAGGTTCTGGTGTAAGGTTGCTGTCTCGATACAGGTATTTCCACTCATCCAGACTTAAATATT
CGTGGTGGCGTAGCTTTGTACCAGGGGAACCATCCACTCAAGATGGGAATGGGCATGGCACGCATGTGGCCGGGAC
GATTGCTGCTTTAAACAATTCGATTGGCGTTCCTGGCGTAGCGCCGAGCGCGAACTATACGCTGTTAAAGTATTAG
GGGCGAGCGGTTCAAGTTCGGTCAGCTCGATTGCCAAGGATTGGAATGGGCAGGGAACAATGGCATGCACGTTGCT
AATTTGAGTTTAGGAAGCCCTTCGCCAAGTGCCACACTTGAGCAAGCTGTTAATAGCGCGACTTCTAGAGGCGTTCT
TGTTGTAGCGGCATCTGGAATTCAGGTGCAGGCTCAATCAGCTATCCGGCCCGTTATGCGAACGCAATGGCAGTCG
GAGCTACTGACCAAAACAACAACCGCGCCAGCTTTTACAGTATGGCGCAGGGCTTGACATTGTGCGACCAGGTGTA
AACGTGCAGAGCACATACCCAGGTTCAACGTATGCCAGCTTAAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTGCAGG
TGCAGCAGCCCTTGTTAAACAAAAGAACCCATCTTGGTCCAATGTACAAATCCGCAATCATCTAAAGAATACGGCAA
CGAGCTTAGGAAGCACGAACTTGTATGGAAGCGGACTTGTCAATGCAGAAGCTGCAACTCGTTAA (SEQ ID NO:
18)

[0349] 如上所示,SEQ ID NO:18的DNA序列包含编码信号肽的核苷酸序列(上面以不带下划线的小写字母示出)、编码前肽的核苷酸序列(上文以带下划线的小写字母示出)和编码成熟GG36多肽的核苷酸序列(上面以大写字母示出)。

[0350] 在下面提供的GG36的蛋白序列中,信号肽序列以小写字母示出,前肽序列以带下划线的小写字母示出,GG36成熟蛋白酶序列以大写字母示出:

[0351]

vrskklwivastallisvafsssiasaaeeakekyligfneqeavsefveqveandevailseeeveiellhefet
ipvlsvlspedvdaleldpaisyieedaevttmAQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTSGVKVAVLDTGISTHPDLNI
RGGASFVPGEPTQDGNHGHVAGTIAALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVLGASGSGSVSSIAQGLEWAGNNGMHVA
NLSLGSPSPSATLEQAVNSATSRGVLVVAASGNSGAGSISYPARYANAMAVGATDQNNNRASFQYAGLDIVAPGV
NVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGAAALVKQKNPSWSNVQIRNHLKNTATSLGSTNLYGSLVNAEAATR (SEQ
ID NO:19)

[0352] 本文称为PX3多肽并具有相对于SEQ ID NO:1的氨基酸置换N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A+S188D+N248R(使用通过将PX3多肽序列与SEQ ID NO:2所示的BPN'多肽序列进行比对而确定的BPN'编号方式)的成熟变体蛋白酶的氨基酸序列为:

[0353]

AQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTSGVKVAVLDTGISTHPDLNIRGGASFVPGEPTQDGNHGHVAGTIAALDNSI
GVLGVAPRAELYAVKVLGASGSGSVSSIAQGLEWAGNNRMHVNLSLGLQAPSATLEQAVNSATSRGVLVVAASGNS

GAGSISYPARYANAMAVGATDQNNNRADFSQYGAGLDIVAPGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGAAALVKQKNPSWSNVQIRRHKLNTATSLGSTNLYGSGLVNAEAATR (SEQ ID NO:6)。

[0354] 本文称为PX4多肽并包含相对于SEQ ID NO:1的氨基酸置换N76D/S87R/G118R/S128L/P129Q/S130A(使用通过将PX4多肽序列与SEQ ID NO:2所示的BPN'多肽序列进行比对而确定的BPN'编号方式)的成熟变体蛋白酶(变体枯草杆菌蛋白酶)的氨基酸序列为:

[0355]

AQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTGSGVKVAVLDTGISTHPDLNIRGGASFVPGEPTQDGNHGHVAGTIAALDNSIGV L G V A P R A E L Y A V K V L G A S G S G S V S SIAQGLEWAGNNRMHVANLSLGLQAPSATLEQAVNSATSRGVLVVAASGNSGAGSISYPARYANAMAVGATDQNNNRASFSQYGAGLDIVAPGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGAAALVKQKNPSWSNVQIRNHLKNTATSLGSTNLYGSGLVNAEAATR (SEQ ID NO:7)。

[0356] 本文称为PX5多肽并包含相对于SEQ ID NO:1的氨基酸置换N76D/S87R/G118R/S128L/P129Q/S130A/S188D/V244R(使用通过将PX3多肽序列与SEQ ID NO:2所示的BPN'多肽序列进行比对而确定的BPN'编号方式)的成熟变体蛋白酶(变体枯草杆菌蛋白酶)的氨基酸序列为:

[0357]

AQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTGSGVKVAVLDTGISTHPDLNIRGGASFVPGEPTQDGNHGHVAGTIAALDNSIGVLGVAPRAELYAVKVLGASGSGSVSSIAQGLEWAGNNRMHVANLSLGLQAPSATLEQAVNSATSRGVLVVAASGNSGAGSISYPARYANAMAVGATDQNNNRADFSQYGAGLDIVAPGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGAAALVKQKNPSWSNRQIRNHLKNTATSLGSTNLYGSGLVNAEAATR (SEQ ID NO:8)。

[0358] 编码成熟变体蛋白酶(变体枯草杆菌蛋白酶)PX3的核酸序列为:

[0359]

GCGCAATCAGTGCCATGGGGAATTAGCCGTGTGCAAGCCCCAGCTGCCATAACCGTGGATTGACAGGTTCTGGTGTAAAAGTTGCTGTCTCGATACAGGTATTTCCACTCATCCAGACTTAAATATTCGTGGTGGCGCTAGCTTTGTACCAGGGGAACCATCCACTCAAGATGGGAATGGGCATGGCACGCATGTGGCCGGGACGATTGCTGCTTTAGACAATTCGATTGGCGTTCTTGCGTAGCGCCGAGAGCGGAACCTATACGCTGTAAAGTATTAGGGGCGAGCGGTTAGGTTCCGGTCAGCTCGATTGCCAAGGATTGGAATGGGCAGGGAACAATCGTATGCACGTTGCTAATTTAGTTTAGGACTGCAGGCACCAAGTGCCACACTTGAGCAAGCTGTTAATAGCGGACTTCTAGAGGCGTTCTTGTGTAGCGGCATCTGGAATTCAGGTGCAGGCTCAATCAGCTATCCGCGCCGTTATGCGAACGCAATGGCAGTCGAGCTACTGACCAAAACAACAACCGCGCCGATTTTTCACAGTATGGCGCAGGGCTTGACATTGTTCGCACCAGGTGTAAACGTGCAGAGCACATACCCAGGTTCAACGTATGCCAGCTTAAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTGCAGGTGCAGCAGCCCTGTAAACAAAAGAACCCATCTTGGTCCAATGTACAAATCCGAGACATCTAAAGAATACGGCAACGAGCTTAGGAAGCACGAACTTGTA TGAAGCGGACTTGTCATGCAGAAGCTGCAACTCGTTAA (SEQ ID NO:9)

[0360] 编码成熟变体蛋白酶(变体枯草杆菌蛋白酶)PX4的核酸序列为:

[0361]

GCGCAATCAGTGCCATGGGGAATTAGCCGTGTGCAAGCCCCAGCTGCCATAACCGTGGATTGACAGGTTCTGGTGTAAAAGTTGCTGTCTCGATACAGGTATTTCCACTCATCCAGACTTAAATATTCGTGGTGGCGCTAGCTTTGTACCAGGGGAACCATCCACTCAAGATGGGAATGGGCATGGCACGCATGTGGCCGGGACGATTGCTGCTTTAGACAATTCGATTGGCGTTCTTGCGTAGCGCCGAGAGCGGAACCTATACGCTGTAAAGTATTAGGGGCGAGCGGTTAGGTTCCGGTCAG

CTCGATTGCCAAGGATTGGAATGGGCAGGGAACAATCGTATGCACGTTGCTAATTTGAGTTTAGGACTGCAGGCAC
CAAGTGCCACACTTGAGCAAGCTGTTAATAGCGCGACTTCTAGAGGCGTTCTTGTGTAGCGGCATCTGGAAATTCA
GGTGCAGGCTCAATCAGCTATCCGGCCCGTTATGCGAACGCAATGGCAGTCGGAGCTACTGACCAAAACAACAACCG
CGCCAGCTTTTTCACAGTATGGCGCAGGGCTTGACATTGTTCGCACCAGGTGTAAACGTGCAGAGCACATACCCAGGTT
CAACGTATGCCAGCTTAAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTGCAGGTGCAGCAGCCCTTGTTAAACAAAAG
AACCCATCTTGGTCCAATGTACAAATCCGCAATCATCTAAAGAATACGGCAACGAGCTTAGGAAGCACGAACTTGTA
TGGAAGCGGACTTGTCATGCAGAAGCTGCAACTCGTTAA (SEQ ID NO:10)

[0362] 编码成熟变体蛋白酶(变体枯草杆菌蛋白酶)PX5的核酸序列为:

[0363]

GCGCAATCAGTGCCATGGGGAATTAGCCGTGTGCAAGCCCCAGCTGCCATAACCGTGGATTGACAGGTTCTGGTGT
AAAAGTTGCTGTCTCGATACAGGTATTTCCACTCATCCAGACTTAAATATTCGTGGTGGCGCTAGCTTTGTACCAG
GGGAACCATCCACTCAAGATGGGAATGGGCATGGCACGCATGTGGCCGGGACGATTGCTGCTTTAGACAATTCGATT
GGCGTTCTTGGCGTAGCGCCGAGAGCGGAACATACGCTGTAAAGTATTAGGGGCGAGCGGTTAGGTTCCGGTCAG
CTCGATTGCCAAGGATTGGAATGGGCAGGGAACAATCGTATGCACGTTGCTAATTTGAGTTTAGGACTGCAGGCAC
CAAGTGCCACACTTGAGCAAGCTGTTAATAGCGCGACTTCTAGAGGCGTTCTTGTGTAGCGGCATCTGGAAATTCA
GGTGCAGGCTCAATCAGCTATCCGGCCCGTTATGCGAACGCAATGGCAGTCGGAGCTACTGACCAAAACAACAACCG
CGCCGATTTTTCACAGTATGGCGCAGGGCTTGACATTGTTCGCACCAGGTGTAAACGTGCAGAGCACATACCCAGGTT
CAACGTATGCCAGCTTAAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTGCAGGTGCAGCAGCCCTTGTTAAACAAAAG
AACCCATCTTGGTCCAATCGTCAAAATCCGCAATCATCTAAAGAATACGGCAACGAGCTTAGGAAGCACGAACTTGTA
TGGAAGCGGACTTGTCATGCAGAAGCTGCAACTCGTTAA (SEQ ID NO:11)

[0364] 本领域熟知的示例性定点诱变程序包括但不限于(例如)QuikChange®多定点诱变方法,其由QuikChange®多定点诱变试剂盒(QCMS;加利福尼亚州拉荷亚安捷伦科技Stratagene公司(Agilent Technologies-Stratagene,La Jolla,CA))具体体现,这种试剂盒允许同时进行多达五个不同位点的质粒DNA定点诱变。附加的示例性已知诱变程序在本文中的其他地方有所描述。编码如本文所述的本发明变体蛋白酶(包括例如PX3、PX4和PX5变体蛋白酶多肽)的本发明核酸还可容易地通过本领域的技术人员使用熟知的基因合成方法和/或融合PCR方法(参见例如美国专利申请公开No.2006/0252155,其以引用方式并入本文以教导实验实施例)由例如SEQ ID NO:18所示的GG36蛋白酶编码核苷酸序列制得。

[0365] 编码变体蛋白酶的核酸还可使用以下方法通过化学合成制备:例如经典亚磷酰胺方法(参见例如Beaucage等人,Tetrahedron Letters(《四面体通讯》)22:1859-69(1981)或Matthes等人,EMBO J.《欧洲分子生物学组织杂志》3:801-05(1984)所述的方法,例如通常在自动合成方法中进行。或者,可从许多商业来源订购编码变体蛋白酶的核酸,例如德克萨斯州米德兰认证试剂公司(万维网地址oligos.com),大美洲基因公司(万维网地址genco.com)、加利福尼亚州的阿拉米达操纵子科技公司(现名凯杰(Qiagen),参见万维网地址qiagen.com)或加利福尼亚州的门洛帕克DNA2.0公司。其他核酸合成技术和相关的原理在例如Itakura等人,Annu.Rev.Biochem.《生物化学年评》53:323(1984)和Itakura等人,Science(《科学》)198:1056(1984)中有所描述。

[0366] 在一个方面,例如,如果将基因合成用于生成变体蛋白酶编码核酸,则此类核酸可设计有旁侧限制性位点(诸如BgIII),这些位点可用于将变体编码核酸克隆进也用BgIII消

化的表达质粒(例如枯草芽孢杆菌表达质粒),例如本文所述的pHPLT-GG36枯草芽孢杆菌表达质粒。该示例性pHPLT枯草芽孢杆菌表达载体包含地衣芽孢杆菌LAT启动子(Plat)、HPA2启动子和源自pUB110的另外的元件(参见例如McKenzie等人,Plasmid(《质粒》),15:93-103(1986)),包括复制酶基因(reppUB)、新霉素抗性基因(neo)和博来霉素抗性标记(bleo)(还可参见美国专利No.6,566,112的图4)。pHPLT-GG36质粒图谱在图2中提供,GG36表达盒序列在下文提供。对于本文所述的QuikChange®多定点诱变试剂盒(QCMS试剂盒)或融合PCR方法,可将包含迟缓芽孢杆菌GG36编码核酸的pHPLT-GG36质粒用作DNA模板来制备本发明的变体蛋白酶。在示例性格式中,对包含所需突变的核苷酸引物与pHPLT-GG36质粒中的GG36编码核酸进行退火,再用DNA聚合酶延伸,如Stratagene QCMS产品手册和美国专利申请公布No.2006/0252155针对融合PCR所述。表1-1提供可用于定点诱变的引物的示例性核苷酸序列。

[0367]

表 1-1. 用于 QuikChange®多定点诱变方法的示例性引物	
引物序列	引物名称
CGGGACGATTGCTGCTTTAGACAATTCGATTGGCGTTC (SEQ ID NO:12)	N76D
GGCGTTCTTGGCGTAGCGCCGAACGCGGAACCTATACG (SEQ ID NO:13)	S87N
CCAAGGATTGGAATGGGCAGGGAACAATCGTATGCACGTTG (SEQ ID NO:14)	G118R
TAATTTGAGTTTAGGACTGCAGGCACCAAGTGCCACACTTGAG C (SEQ ID NO:15)	S128L,P129Q,S130A
CCAAAACAACAACCGCGCCGATTTTTTCACAGTATGGCGC (SEQ ID NO:16)	S188D
ATCTTGGTCCAATCGTCAAATCCGCAATCATCTAAAGAATACG GC (SEQ ID NO:17)	V244R

[0368] 可通过多轮方式在各变体蛋白酶中引入突变,直到获得最终的变体蛋白酶。可按照制造商的说明使用滚环扩增(新泽西州皮斯卡特维通用电气医疗集团(GE Healthcare, Piscataway,NJ)),以扩增在QCMS或融合PCR连接反应中闭合的突变质粒,然后再转化进枯草芽孢杆菌(新泽西州皮斯卡特维通用电气医疗集团)细胞。

[0369] 可使用本领域已知的程序(参见例如WO 02/14490),用变体质粒或1μL滚环扩增反应物转化感受态枯草芽孢杆菌细胞(表型:Δ aprE, Δ nprE, oppA, Δ spoIIIE, degUHy32, Δ amyE:: (xylR, pxy1A-comK)),得到蛋白酶阳性转化株。可通过在木糖诱导型启动子的控制下通过comK基因的诱导制备感受态细菌(参见例如Hahn等人,Mol.Microbiol.(《分子微生物学》)21:763-775(1996))。可在脱脂牛奶/琼脂板上选择变体蛋白酶阳性克隆,分离、测序,并可通过摇瓶培养产生变体蛋白酶蛋白以生成显著量的酶样品用于表征。

[0370] 实施例2

[0371] 枯草芽孢杆菌中变体蛋白酶的产生

[0372] 通过将枯草芽孢杆菌转化株在10ml TSB(胰蛋白胨大豆肉汤)培养基中在37℃培养过夜,产生了变体蛋白酶(例如变体枯草杆菌蛋白酶)。将过夜培养物的250μl等分试样转

移到100ml摇瓶中的25ml MOPS限定培养基,在37℃下培养68小时。该限定培养基基本上按照本领域已知的方法制备(参见Neidhardt等人,J Bacteriol.《细菌学杂志》119:736-747,1974),不同的是,从基础培养基中省略掉 NH_4Cl 、 FeSO_4 和 CaCl_2 ,使用3mM K_2HPO_4 ,并为基础培养基补充60mM尿素、75g/L葡萄糖和1%大豆胨。还配制了作为100X储液的微量营养素,该储液在一升中含400mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、100mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、100mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、50mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、100mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、100mg $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、100mg $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 、10ml 1M的 CaCl_2 以及10ml 0.5M的柠檬酸钠。从培养基中分离所关注的蛋白酶。

[0373] 实施例3

[0374] 测定变体蛋白酶样品纯度的分析方法

[0375] 在该实施例中,描述了用于测定得自枯草芽孢杆菌培养物的重组变体蛋白酶(例如变体枯草杆菌蛋白酶)纯度的方法。当分别通过凝胶电泳和高效液相色谱(HPLC)只发现单一条带或峰时,可认为变体蛋白酶为纯蛋白酶。

[0376] 如本领域所已知的(Laemmli,Nature《自然》,227:680-685,1970)进行存在十二烷基硫酸钠(SDS)的聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)。然而,在蛋白样品变性(例如,在100℃的含SDS样品缓冲液中处理10分钟)前,需要使蛋白酶失活,以防止自动降解。蛋白酶失活通过将蛋白样品用1mM PMSF在室温下温育30分钟或通过用8%三氯乙酸(TCA)在冰上处理30分钟使蛋白沉淀而实现。让蛋白样品接受在pH 7.45下进行的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。凝胶缓冲液由20mM组氨酸和50mM 3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)组成,并且5%的聚丙烯酰胺凝胶具有20:1的丙烯酰胺:双丙烯酰胺比。将蛋白样品上样到平板凝胶的顶部,朝阴极电泳。将同样的组氨酸/MOPS缓冲液用作电泳(槽)缓冲液,但调节到pH 6.3。电泳(350V约1-2小时)后,将凝胶浸入8%乙酸以固定凝胶中的蛋白质,随后用考马斯亮蓝R250染色以及按照本领域已知的方法进行脱色,以找到凝胶上的蛋白质条带。

[0377] 还通过使用MonoS阳离子交换柱接着是TSK 2000凝胶过滤柱的HPLC分析法确认了蛋白酶样品纯度。前者以10mM的磷酸钠缓冲液(pH5.5)运行,使用10-300mM磷酸钠(pH 5.5)的线性梯度来洗脱结合的蛋白酶。凝胶过滤柱则以0.25M的乙酸钠(pH 5.5)运行。在280nm处监测了蛋白质洗脱图,以找到所关注的蛋白酶以及测定样品的百分比纯度。

[0378] 实施例4

[0379] 测定变体蛋白酶浓度

[0380] 在该实施例中,描述了用于测定变体蛋白酶浓度的方法。在一些实验中,使用计算的消光系数(ϵ) 在280nm处进行了消光(吸光度)测量,并使用活性位点滴定测定了纯化蛋白酶溶液中的蛋白浓度,如下所述。

[0381] 通过每个酶分子的色氨酸(Trp, $\epsilon = 5,600\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)和酪氨酸(Tyr, $\epsilon = 1,330\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)的数目计算了280nm处的消光系数。对于PB92蛋白酶,摩尔消光系数为 $26,100\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (3个Trp+7个Tyr残基),这相当于在280nm处测得的等于9.7的 $\epsilon 1\%$ ($M_r = 26,729\text{Da}$)。在变体蛋白酶具有改变的色氨酸和/或酪氨酸残基数目的情况下,相应地进行修正。

[0382] 通过活性位点滴定获得了活性酶分子的浓度估计值。由于已证实广泛使用的通过N-反式肉桂酰咪唑进行的酰化方法(Bender等人,J.Amer.Chem.Soc.《美国化学会志》,88:5890-5931,1966)对PB92蛋白酶的效果不尽人意,因此作为代替开发了使用不可逆抑制剂PMSF的方法。在该方法中,将具有估计酶浓度(通过280nm处的吸光度估计)的蛋白酶溶液

分别与0.25、0.50、0.75、1.00和1.25当量的PMSF混合,然后在10mM的磷酸钠(pH 6.5)中在室温下反应一小时。使用琥珀酰-L-丙氨酰-L-丙氨酰-L-脯氨酰-L-苯基-丙氨酰-对硝基苯胺(suc-AAPF-pNA)作为底物通过分光光度法测量了残余的蛋白酶活性。对于这些研究,通过核磁共振光谱测定了PMSF的纯度(并因此测定了浓度),在异丙醇中配制了PMSF的储液。据发现,活性位点滴定结果与使用HPLC方法进行纯度检查获得的蛋白浓度结果一致。

[0383] 实施例5

[0384] 测定法

[0385] 在该实施例中,描述了评估本发明的变体蛋白酶稳定性和清洁性能的方法。

[0386] AAPF水解方法

[0387] 在将变体蛋白酶在68℃温育1小时后,通过使用AAPF测定法分析蛋白酶活性,测定了丝氨酸变体蛋白酶的热稳定性。在该测定法条件下,参考蛋白酶(例如,野生型GG36=GCI-P036)的残余活性为约50%。所用的设备为:平底微滴定板(Costar No.9017)、Biomek FX和/或Biomek FXp Robot(贝克曼库尔特公司(Beckman Coulter))、Spectramax Plus 384MTP读板仪(分子仪器公司)、iEMS培养箱/摇床(1mm振幅)(热电/雷勃公司(Thermo/Labsystems))、密封胶带(Nunc No.236366)和冰浴。通过将3.75g甘氨酸(默克公司No.1.04201.1000)溶于960mL水,配制了甘氨酸缓冲液。将1ml 5%的Tween®-80(西格玛公司No.P-8074)和10ml 1000mM的CaCl₂储液(默克公司No.1.02382.1000)(29.4g溶解定容到200ml)加到该溶液中。将pH用4N NaOH调节到10.5,定容至1000ml。甘氨酸、CaCl₂和TWEEN®-80的最终浓度分别为:50mM、10mM和0.005%。将培养箱设定为68℃(用于温育)和25℃(用于AAPF测定法)。将90μl和190μl甘氨酸缓冲液分别加到空白稀释和温育平板。然后将10μl上清液加到稀释平板,再将稀释平板中的10μl加到温育平板中。然后,将孵育平板中的10μl混合物加到含有suc-AAPF-pNA底物的预热平板中。在MTP读板仪中在410nm处读取suc-AAPF-pNA平板(t=0时测量)。将温育平板用胶带覆盖,在68℃和400rpm下温育1小时。在温育结束时,将平板从培养箱中取出,在冰上冷却至少5分钟。将温育平板中的10μl混合物转移到含suc-AAPF-pNA底物的平板,在410nm处读取平板(t=60时测量)。百分比残余活性按如下方式计算:

[0388] 残余活性%:(t=60时的mOD.min-1)/(t=0时的mOD.min-1)×100

[0389] 表面活性剂和螯合剂稳定性测定法

[0390] 在分别存在LAS和LAS/EDTA的情况下温育供试蛋白酶后,测量了随残余活性(使用AAPF测定法测定)而变化的LAS和LAS/EDTA稳定性。

[0391] LAS稳定性方法

[0392] 试剂:

[0393] 十二烷基苯磺酸钠盐(=LAS):西格玛公司D-2525

[0394] TWEEN®-80:西格玛公司P-8074

[0395] TRIS缓冲液(游离酸):西格玛公司T-1378;将6.35g溶于约960ml水中;将pH用4N HCl调至8.2。TRIS的最终浓度为52.5mM。

[0396] LAS储液:在MQ水中配制10.5%的LAS溶液(=10.5g每100ml MQ)

[0397] TRIS缓冲液-100mM/pH 8.6(100mM Tris/0.005% Tween®-80)

[0398] TRIS-Ca缓冲液,pH 8.6(100mM TRIS/10mM CaCl₂/0.005% Tween®-80)

[0399] 硬件:

[0400] 平底微滴定板 (Costar No.9017)

[0401] Biomek FX

[0402] ASYS多用移液器 (Multipipettor)

[0403] Spectramax MTP读板仪

[0404] iEMS培养箱/摇床

[0405] 英诺华 (Innova) 4330培养箱/摇床

[0406] 百得 (Biohit) 多道移液器

[0407] BMG ThermoStar摇床

[0408] 在52.5mM TRIS缓冲液 (pH 8.2) 中配制了0.063%的LAS溶液。通过将1ml 100mg/ml的suc-AAPF-pNA储液 (溶于DMSO) 加到100ml (100mM) TRIS缓冲液 (pH 8.6) 中配制了suc-AAPF-pNA工作溶液。为了稀释上清液,将稀释缓冲液添加在平底板上,再加入上清液的等分试样,然后混匀。稀释比取决于培养平板中蛋白酶对照品的浓度 (AAPF活性)。所需的蛋白浓度为80ppm。

[0409] 将十微升稀释后的上清液加到190μl 0.063%的LAS缓冲液/孔中。将微滴定板用胶带覆盖,振摇数秒,然后放入25℃或35℃ (对于ASP) 或45℃ (对于BPN' 或GG36) 的培养箱 (英诺华 (Innova) 4230), 在200rpm转速的摇动下处理60分钟。通过将各孔中的10μl混合物转移到含有190μl suc-AAPF-pNA工作溶液的新微滴定板中温育10分钟后测定了初始活性 (t=10分钟)。将这些溶液混匀,使用酶标仪测量AAPF活性 (在25℃的5分钟内获取20个读数)。

[0410] 在温育60分钟后通过从温育平板中另取出10μl溶液测定了最终活性 (t=60分钟)。然后如上所述测定了AAPF活性。如下通过计算残余和初始AAPF活性之比测定了样品的稳定性:

[0411] 残余活性 (%) = (t-60值) * 100 / (t-10值)。

[0412] LAS/EDTA稳定性方法

[0413] 在限定条件下温育后测量变体蛋白酶在存在代表性阴离子型表面活性剂 (LAS=直链烷基苯磺酸盐,十二烷基苯磺酸钠-DOBS) 和乙二胺四乙酸二钠的情况下的稳定性,使用AAPF测定法测定了残余的活性。使用的试剂是十二烷基苯磺酸钠盐 (DOBS, 西格玛No.D-2525)、TWEEN®-80 (西格玛No.P-8074)、乙二胺四乙酸二钠 (Siegfried Handel No.164599-02)、HEPES (西格玛No.H-7523)、非应激缓冲液 (50mM HEPES (11.9g/l) +0.005% TWEEN®-80, pH 8.0)、应激缓冲液 (50mM HEPES (11.9g/l), 0.1% (w/v) DOBS (1g/l), 10mM EDTA (3.36g/l), pH 8.0) 以及含有200-400μg/ml蛋白质的参考蛋白酶和变体蛋白酶培养上清液。使用的设备是作为稀释平板的V形底或U形底微滴定板 (分别为葛莱娜 (Greiner) 651101和650161)、用于非应激缓冲液和LAS/EDTA缓冲液以及用于suc-AAPF-pNA平板的平底微滴定板 (康宁9017)、Biomek FX (贝克曼库尔特公司)、Spectramax Plus 384酶标仪 (分子仪器公司)、得自热电公司 (Thermo Electron Corporation) 的iEMS培养箱/摇床 (1mm振幅)、密封胶带 (Nunc 236366)。

[0414] 将iEMS培养箱/摇床 (热电/雷勃公司) 设定为29℃。将培养上清液稀释到装有非应激缓冲液的板中至约25ppm的浓度 (母稀释板)。将20μl来自母稀释板的样品添加至装有180

μl 非应激缓冲液的板以得到2.5ppm的最终温育浓度。将内容物混合并保持在室温下,对该板进行AAPF测定法。将20 μl 来自母稀释板的样品也添加到装有180 μl 应激缓冲液(50mM HEPES (11.9g/l), 0.1% (w/v) DOBS (1g/l), 10mM EDTA (3.36g/l), pH 8.0)的板。将溶液混合后立刻置于29℃的iEMS摇床中在400rpm下处理30分钟。温育30分钟后,对应激板进行了AAPF测定法。(OD=光密度吸光度)。如下通过计算残余和初始AAPF活性之比测定了样品的稳定性:残余活性(%) = (mOD.min-1应激)*100/(mOD.min-1非应激)。

[0415] 实施例6

[0416] 变体PX3的洗涤性能测试

[0417] 在该实施例中,描述了适合评价在市售盘碟及衣物洗涤剂中的变体蛋白酶PX3(如变体枯草杆菌蛋白酶)以及GCI-P038参考枯草杆菌蛋白酶的盛具洗涤和织物清洁性能的方法。

[0418] 盛具洗涤性能

[0419] 本文描述了用于测量在市售盘碟洗涤剂中的本发明变体蛋白酶(如枯草杆菌蛋白酶变体)以及GCI-P038参考枯草杆菌蛋白酶的盛具洗涤性能的方法。

[0420] 在多种自动盛具洗涤条件下测试了变体蛋白酶的性能。盘碟洗涤剂的组成在表6-1和6-2中示出。这些洗涤剂可从wfk Testmaterials (www.testgewebe.de/en/products/detergents/) 商购获得,并以其wfk Testmaterials命名而提及。从该来源获得这些洗涤剂,不存在酶,以使得能分析变体蛋白酶。

[0421]

表 6-1. 无磷酸盐的洗涤剂 IEC-60436 WFK B 型 (浓度 3g/l, pH=10.4)	
组分	重量%
无水柠檬酸钠	30.0
马来酸/丙烯酸共聚物钠盐	12.0
过硼酸钠一水合物	5.0
TAED	2.0
二硅酸钠: Prottil A (科宁公司)	25.0
直链脂肪醇乙氧基化物	2.0
无水碳酸钠	加至 100

表 6-2. 含磷酸盐的洗涤剂: IEC-60436 WFK C 型 (浓度 3g/l, pH=10.5)	
组分	重量%
三聚磷酸钠	23.0
无水柠檬酸钠	22.3
马来酸/丙烯酸共聚物钠盐	4.0
过硼酸钠一水合物	6.0

[0422]

TAED	2.0
二硅酸钠: Prottil A (科宁公司)	5.0
直链脂肪醇乙氧基化物	2.0
无水碳酸钠	加至 100

[0423] 下文提供制备各种类型的污渍(蛋黄、碎肉与蛋、含奶的蛋)的方案。在将各污垢类型施加至测试盘碟之前,对盘碟进行彻底洗涤。这是特别必要的,因为某些顽固污渍的残余可能会仍存在于来自之前的测试的盘碟上。在新盘碟在测试中第一次使用前,也将其进行三次彻底洗涤。

[0424] 在不锈钢上制备蛋黄污渍

[0425] 将这些实验中所用的不锈钢板(10×15cm;一侧已擦刷)在95℃的实验室盛具洗碗机中用高碱性商业洗涤剂(例如ECOLAB®洗涤剂;汉高公司(Henkel))彻底洗涤,以提供清洁无油脂的钢板。在第一次使用这些钢板之前对它们清理毛刺。将钢板在80℃的热柜中干燥30分钟,然后用蛋黄染污。在进行染污之前不接触待擦刷的表面。另外,在表面上不允许有水渍或尘块。在染污之前对冷却的钢板进行称重。

[0426] 通过将大约10-11只蛋的蛋黄(200g蛋黄)与蛋白分离来制备蛋黄。将蛋黄用叉子在玻璃烧杯中搅拌以匀化蛋黄悬浮液。然后使蛋黄通过滤器(大约0.5mm网孔)以除去粗颗粒和任何蛋壳碎片。

[0427] 用平刷(2.5")将 2.0 ± 0.1 g蛋黄悬浮液尽可能均匀地涂抹在每个不锈钢板的擦刷过的侧面的140cm²面积上,留下大约1cm宽的未染污的边缘(需要时使用胶带)。将染污的钢板在室温下水平干燥(以防止在钢板的边缘形成小滴)4小时(最多24小时)。

[0428] 为了使蛋黄蛋白质变性,将钢板浸入沸腾的软化水中30秒(必要时使用夹持装置)。然后,将钢板在80℃下再次干燥30分钟。干燥并冷却后,对钢板进行称重。称重后,使钢板静置至少24小时(20℃,40-60%相对湿度)后再让其接受洗涤测试。为了满足测试要求,仅将具有 1000 ± 100 mg/140cm²(变性后的蛋黄)的钢板用于测试。在进行洗涤测试后,将钢板在80℃的热柜中干燥30分钟,冷却后再次称重。通过将洗涤后释放的蛋黄毫克数除以施加的变性蛋黄毫克数再乘以100,测定了百分比清洁性能。

[0429] 在瓷盘上制备碎肉与蛋污渍

[0430] 对于这些实验,使用符合EN 50242,form 1495,No.0219的甜点盘(Arzberg公司,直径19cm,白釉瓷器)。将总共225g瘦猪肉和牛肉(比率50:50)切细,保持冷却。将混合物两次通过碎肉器。避免温度高于35℃。然后,将225g碎肉与75g蛋(蛋白和蛋黄混合在一起)混合。然后在使用前,在-18℃将制备物冷冻至多三个月。如果不能获得猪肉,则使用100%的牛肉,因为它们可以互换。

[0431] 使该碎肉和蛋混合物(300g)升至室温并与80ml软化水混合。然后使用厨房手动混合器将该混合物匀化2分钟。使用叉子将3g碎肉/蛋/水混合物铺展在每个白色瓷盘上,在边缘周围留下大约2cm宽的未染污的空白区。施加的量为 11.8 ± 0.5 mg/cm²。将瓷盘在120℃的预热热柜中干燥2小时。盘一冷却后,它们即可使用。

[0432] 在进行盛具洗涤测试后,将盘用茚三酮溶液(在乙醇中配制成1%)喷雾,以更清楚地识别碎肉蛋白残留。为了促进该颜色反应,将盘在80℃的热柜中加热10分钟。通过参考

IKW照片目录(IKW-德国美容化妆品、香水和洗涤剂协会(The German Cosmetic,Toiletry, Perfumery and Detergent Association))对碎肉残留的颜色反应进行视觉检查,评价了洗涤性能。

[0433] 在不锈钢上制备蛋/奶污渍

[0434] 将这些实验中所用的不锈钢板(10×15cm;一侧擦刷过)在95℃的实验室盛具洗涤机中用高碱性商业洗涤剂彻底洗涤,以移除油脂并清洁钢板。用纤维素布将钢板擦亮擦干。在进行染污之前不接触待擦刷的表面。另外,在表面上不允许有水渍或尘块。在进行染污之前,将钢板置于80℃的热柜中30分钟。在染污之前对冷却的钢板进行称重。

[0435] 将完整生蛋(3-4只;约160g/只蛋)的蛋黄和蛋白置于碗中,用搅蛋器搅打。然后,将50ml半脱脂奶(1.5%脂肪,超高温,经匀化)添加至该混合物。在不产生泡沫的情况下将奶和蛋混合。用平刷将 1.0 ± 0.1 g蛋/奶混合物均匀分布在不锈钢板的经擦刷的一侧上,用天平检查分布。在钢板的短侧边周围留下大约1.0cm的空白区。将染污的钢板在室温下水平干燥(以防止在钢板的边缘形成小滴)4小时(最多24小时)。

[0436] 然后将钢板浸入沸腾的软化水中30秒(必要时使用夹持装置)。然后,将钢板在80℃下再次干燥30分钟。干燥并冷却后,对钢板进行称重。称重后,使钢板静置至少24小时(20℃,40-60%相对湿度)后再让其接受洗涤测试。为了满足测试要求,仅使用具有 190 ± 10 mg蛋黄/奶的钢板。

[0437] 在进行洗涤测试后,将钢板在80℃的热柜中干燥30分钟,冷却后再次称重。通过将洗涤后释放的蛋/奶毫克数除以施加的蛋/奶毫克数再乘以100,测定了百分比清洁性能。

[0438] 洗涤设备和条件

[0439] 洗涤测试在配有如上所述制备的染污盘碟和不锈钢板的自动洗碗机(例如美诺(Miele)G690SC型)中进行。使用了限定量的洗涤剂。测试温度为50℃。水硬度为21°GH(德国硬度)。

[0440] 如上所述,在洗涤后,利用0至10的照片等级量表对用碎肉染污的盘子进行视觉评估,其中“0”定为完全脏的盘子,“10”定为清洁的盘子。这些值与含酶洗涤剂的污渍或污垢移除(SR)能力相对应。

[0441] 将洗涤过的染有蛋黄和/或蛋黄/奶的不锈钢板通过重量测定法进行分析,以测定洗涤后残余污渍的量。以每次洗涤0与30mg之间的活性蛋白水平测试了枯草杆菌蛋白酶变体PX3和GCI-P038参考枯草杆菌蛋白酶。

[0442] 各种盛具洗涤测试的结果在下表6-3至6-6中提供。在这些实验的每一个中,每次洗涤使用了不同的活性蛋白酶浓度。为GCI-P038参考枯草杆菌蛋白酶的洗涤性能赋予“100”的值,而将变体的洗涤性能与该值进行了比较。例如,如果GCI-P038参考枯草杆菌蛋白酶具有45%的污渍移除结果,变体具有52%的污渍移除结果,则作为性能指数(PI)显示的枯草杆菌蛋白酶变体结果将为 $52/45 \times 100 = 116$ 。因此,对于测试的两种洗涤剂,在盛具洗涤应用中的蛋白质性污渍移除方面,枯草杆菌蛋白酶变体PX3比GCI-P038参考枯草杆菌蛋白酶更有效或一样有效。

[0443]

表 6-3. 含磷酸盐的洗涤剂, 50℃, 21°GH, 剂量为 0.05%的活性蛋白			
酶	PI 蛋黄	PI 碎肉	PI 蛋黄/奶
参考 GCI-P038	100	100	100
变体 PX3	111	157	147

[0444]

表 6-4. 含磷酸盐的洗涤剂 50℃, 21°GH, 剂量为 0.15%的活性蛋白			
酶	PI 蛋黄	PI 碎肉	PI 蛋黄/奶
参考 GCI-P038	100	100	100
变体 PX3	135	100*	113

[0445] *在这些指定条件下,GCI-P038的污垢移除率为100%。

[0446]

表 6-5. 无磷酸盐的洗涤剂 50℃, 21°GH, 剂量为 0.05%的活性蛋白			
酶	PI 蛋黄	PI 碎肉	PI 蛋黄/奶
参考 GCI-P038	100	100	100
变体 PX3	124	150	117

表 6-6. 无磷酸盐的洗涤剂 50℃, 21°GH, 剂量为 0.15%的活性蛋白			
酶	PI 蛋黄	PI 碎肉	PI 蛋黄/奶
参考 GCI-P038	100	100	100
变体 PX3	115	118	103

[0447] 实施例7[0448] 洗涤性能测试

[0449] 在该实施例中,描述了适用于评价本发明的变体蛋白酶在市售衣物洗涤剂中的织物清洁性能的方法。

[0450]

表 7-1. 衣物洗涤条件							
地区	形式	剂量	洗涤剂*	缓冲液	Gpg	pH	T (°C)
衣物 (重垢液体和颗粒)							
NA	HDL	0.78g/l	P&G TIDE® 2X	5mM HEPES	6	8.0	20
WE	HDL	5.0g/L	Henkel PERSIL™	5mM HEPES	12	8.2	40
WE	HDG	8.0g/L	P&G ARIEL™	2mM Na ₂ CO ₃	12	10.5	40
JPN	HDG	0.7g/L	P&G TIDE®	2mM Na ₂ CO ₃	6	10.0	20

[0451]

NA	HDG	1.0g/L	P&G TIDE®	2mM Na ₂ CO ₃	6	10.0	20
----	-----	--------	-----------	-------------------------------------	---	------	----

[0452] *缩写:宝洁 (Procter & Gamble) (P&G);利洁时 (Reckitt Benckiser) (RB);重垢液体洗涤剂 (HDL);重垢颗粒状洗涤剂 (HDG)。

[0453] 血-奶-墨 (BMI) 微样本测定法

[0454] 可在市售洗涤剂中以微滴定板 (MTP) 规模测定变体蛋白酶的污渍移除性能。在微滴定板中于 37°C/300rpm/90% 相对湿度的条件下培养 3 天,从培养物的过滤培养肉汤中获得参考蛋白酶 (如参考枯草杆菌蛋白酶) 和变体蛋白酶的样品。将使用的设备包括:96 孔聚苯乙烯板 (Costar No.9017 中结合力平底)、Biomek FX 和/或 Biomek FXp (贝克曼库尔特公司)、Spectramax Plus 384 (分子仪器公司)、iEMS 培养箱/摇床 (1mm 振幅) (热电公司) 和密封胶带 (Nunc No.236366)。将使用的试剂包括:5mM HEPES (pH 8.0) 或 5mM MOPS (pH 7) 缓冲液,3:1 Ca:Mg 的培养基水硬度 (CaCl₂:MgCl₂ • 6H₂O);稀释到 6 格令每加仑 (gpg) 的 15000gpg 储液,每块板两个 BMI (血/奶/墨) 样本;CFT 处理的 EMPA-116 BMI 棉布样本:将样本预冲洗后裁成圆片,每孔放两个,并热灭活 TIDE® 2X 现成洗涤剂,确保无蛋白酶活性。在该测定法中,蛋白酶水解底物并从该底物释放颜料和不溶性粒子。

[0455]

表 7-2. 工作洗涤剂溶液					
洗涤剂	温度 (°C)	洗涤剂 g/L	pH	缓冲液	每加仑格令数 (gpg)
TIDE® 2X	16	0.98	8	5mM HEPES	6
TIDE® 2X	32	0.98	8	5mM HEPES	6
TIDE® 2X	16	0.98	7	5mM MOPS	6

[0456] 将培养箱设定为所需的温度 (16°C 或 32°C)。首先,将约 10ppm 酶的母稀释板中的 10 μL 样品加到具有 190 μL 上列工作洗涤剂溶液的 BMI 双样本板中。调整体积,在测定板中得到 0.5ppm 的变体蛋白酶最终浓度。然后立即将平板转移到 iEMS 培养箱中,在给定的温度和 1400rpm 的振摇下温育 30 分钟。温育后,将 100 μL 上清液转移到新的 96 孔板中,在 MTP 读板仪中在 405nm 和/或 600nm 处测量吸光度。在该测试中还包括了对照孔,其装有一个或两个微样本和洗涤剂但未添加蛋白酶样品。405nm 处的吸光度测量得到较高的值并跟踪颜料移除情

况,而600nm处的吸光度测量则跟踪浊度和清洁。

[0457] 去污活性计算:

[0458] 针对空白值(无酶的底物)校正获得的吸光度值,从而提供水解活性的度量。对每个样品(例如,变体蛋白酶或参考蛋白酶)计算性能指数(PI)。性能指数在相同的蛋白浓度下比较变体蛋白酶(实际值)与标准参考蛋白酶(理论值)的性能。另外,可用标准酶的朗缪尔方程的参数来计算理论值。大于1的性能指数(PI) ($PI > 1$) 表示变体蛋白酶与参考蛋白酶(如野生型枯草杆菌蛋白酶)相比更优;也就是说,大于1的性能指数表示:与参考蛋白酶减少或移除所关注污渍的能力相比,变体蛋白酶具有增强的或改善的减少、消除或移除相同或相似污渍的能力。PI值为1 ($PI = 1$) 表示变体蛋白酶与参考蛋白酶的性能相同或大致相同(即,与参考蛋白酶减少或移除所关注污渍的能力相比,变体蛋白酶具有相同的或大致相同的减少、消除或移除相同或相似污渍的能力)。小于1的PI ($PI < 1$) 表示变体蛋白酶的性能差于参考蛋白酶(即,与参考蛋白酶减少或移除所关注污渍的能力相比,变体蛋白酶具有降低的或较低的减少、消除或移除相同或相似污渍的能力)。因此,PI值表示:在某些情况或条件下,与参考蛋白酶减少、消除或移除所关注污渍的能力相比,变体蛋白酶具有增强的或改善的减少、消除或移除相同或相似污渍的能力;以及变体蛋白酶不太适合在某些情况下使用,诸如与参考蛋白酶移除所关注污渍的能力相比具有降低的减少、消除或移除相同或相似污渍的能力的那些变体蛋白酶。

[0459] 实施例8

[0460] PX3、PX4和PX5变体蛋白酶的清洁性能

[0461] 在衣物洗涤应用中的BMI微样本测定法

[0462] 测定变体PX4和PX5在衣物洗涤应用中的清洁性能所开展的实验的结果在表8-1中示出。所用的供试洗涤剂为热灭活的商业渠道获得的TIDE®2X Free (P&G; “NA HDL”)、TIDE Free (P&G; “NA HDD”)。以200μL的体积,使用0.2ppm的变体在25℃和1400rpm的振摇下处理30分钟,测试了对BMI染污的微样本的清洁性能。将GCI-P036变体的功能以性能指数(Pi)进行定量,其为变体与亲本GCI-P036蛋白的性能比。还测试了枯草杆菌蛋白酶FNA (BPN’ - Y217L) 和GCI-P036-S87N-G118V-S128L-P129Q-S130A蛋白。

[0463]

表 8-1. 在 NA HDL 和 NA HDD 洗涤剂中测试对 BMI 微样本的去污性能 GCI-P036 变体的 P _i 值			
UV #	基于 GCI-P036 的变体	NA HDL pH 8	NA HDD pH 10
GCI-P036	-	1.00	1.00
PX4	N76D/S87R/G118R/S128L/ P129Q/S130A	0.97	1.07
PX5	S87R/ N76D/G118R/S128L/ P129Q/ S130A/ S188D/V244R	0.87	0.98
GCI-P036 变体	S87N-G118V-S128L-P129Q-S130A	1.22	1.14
FNA	BPN’ Y217L	1.29	0.66

[0464] 实施例9

[0465] PX3、PX4和PX5变体蛋白酶的清洁性能

[0466] 在盛具洗涤应用中的烘烤蛋黄微样本测定法

[0467] 在市售洗涤剂CALGONH®(利洁时公司)和CASCADE®(宝洁)中以微滴定板(MTP)规模测定了变体蛋白酶(如变体枯草杆菌蛋白酶)的去污性能。在微滴定板中于37℃/300rpm/90%相对湿度的条件下培养3天,从培养物的过滤培养肉汤中获得用于测试变体枯草杆菌蛋白酶的样品。所用的设备包括:Biomek FX Robot(贝克曼库尔特公司、SpectraMAX MTP读板仪(340型;分子仪器公司)、iEMS培养箱/摇床(热电/雷勃公司);用于在温育后读取反应板的平底微滴定板(Costar 9017型),以及用于预稀释上清液的V形底微滴定板(葛莱娜(Greiner) 651101)。将得自CFT Vlaardingen的CS-38微样本(含染料的蛋黄,通过加热老化)用作底物。每个孔使用两个样本。将Calgonit五合一自动盛具洗涤(ADW)片用于配制洗涤剂溶液。为了使该片剂中存在的蛋白酶活性失活,将21g片剂溶于在水浴中加热至60℃温度的Milli-Q水中。使溶液冷却至室温,将水的体积调节至700mL。用水进一步稀释该溶液以达到3g/L的最终浓度。通过添加1.46mL Ca/Mg混合物(Ca/Mg混合物((3:1), 1.92M CaCl₂=282.3g/L CaCl₂·2H₂O; 0.64M MgCl₂=130.1g/L MgCl₂·6H₂O), 15000gpg)将水硬度调至21°GH。将酶样品在10mM NaCl、0.1mM CaCl₂、0.005% TWEEN®-80溶液中预先稀释,在适当浓度下进行测试。

[0468] 将培养箱设定在40℃或50℃的所需温度,将72μL稀释缓冲液加到空的V形底板(=稀释板),然后加入8μL上清液。然后,将稀释板中的9μL添加至装有在171μL洗涤剂溶液中温育过的微样本的板中。将该微样本板(具有洗涤剂和酶)用胶带覆盖并置于培养箱/摇床中1400rpm下30分钟。温育后,将75μL反应混合物转移至空的平底板,在用吹风机去泡后在MTP读板仪中读取405nm处的吸光度。在该测试中还包括了空白对照,其装有一个或两个微样本和洗涤剂但未添加含参考枯草杆菌蛋白酶的样品。

[0469]

表 9-1. 自动盛具洗涤条件

地区	形式	剂量	洗涤剂*	缓冲液	Gpg	pH	T (°C)
WE	ADW	3.0g/L	RB CALGONIT™	2mM Na ₂ CO ₃	21	10.0	40
NA	ADW	3.0g/L	P&G CASCADE™	2mM Na ₂ CO ₃	9	10.0	40

[0470] *缩写:宝洁(Procter & Gamble) (P&G);和利洁时(Reckitt Benckiser) (RB)。

[0471] 去污活性计算:

[0472] 针对空白值(无酶的底物)校正所得的吸光度值,从而提供水解活性的度量。对每个样品(例如,变体蛋白酶或参考蛋白酶)计算性能指数(PI)。性能指数在相同的蛋白浓度下比较变体蛋白酶(实际值)与参考蛋白酶(理论值)的性能。另外,可用标准酶的朗缪尔方程的参数来计算理论值。大于1的性能指数(PI) (PI>1)表示变体蛋白酶与参考蛋白酶(如野生型枯草杆菌蛋白酶)相比更优;也就是说,大于1的性能指数表示:与参考蛋白酶减少或移除所关注污渍(含染料的蛋黄,通过加热老化)的能力相比,变体蛋白酶具有增强的或改善的减少、消除或移除相同或相似污渍的能力。PI值为1 (PI=1)表示变体蛋白酶与参考蛋白酶的性能相同或大致相同(即,与参考蛋白酶减少或移除所关注污渍的能力相比,变体蛋白酶具有相同的或大致相同的减少、消除或移除相同或相似污渍的能力)。小于1的PI (PI<1)表示变体蛋白酶的性能差于参考蛋白酶(即,与参考蛋白酶减少或移除所关注污渍的能力相比,变体蛋白酶具有降低的或较低的减少、消除或移除相同或相似污渍的能力)。因此,

PI值表示：在某些情况或条件下，与参考蛋白酶减少、消除或移除所关注污渍的能力相比，变体蛋白酶具有增强的或改善的减少、消除或移除相同或相似污渍的能力；以及变体蛋白酶不太适合在某些情况下使用，诸如与参考蛋白酶移除所关注污渍的能力相比具有降低的减少、消除或移除相同或相似污渍的能力的那些变体蛋白酶。

[0473] 使用微样本测定法(CS-38样本，例如用含颜料的蛋黄染污、通过加热老化)测定了变体蛋白酶(如变体枯草杆菌蛋白酶)的清洁性能。还使用上述方法测定了通过变体的TCA沉淀法进行的LAS/EDTA稳定性、热稳定性和蛋白测定。结果示于表9-2中。

[0474]

表 9-2. 与 GCI-P038 相比测试对 CS38 微样本去污性能的 GCI-P036 变体的 P _I 值、LAS/EDTA 稳定性、蛋白测定和热稳定性 (“ND” 表示未测定)							
变体	基于 GCI-P036 的变体	CALGONIT® 五合一 40℃	CALGONIT® 五合一 50℃	CASCADE® 多效合一 50℃	LAS/ EDTA 稳定性	TCA	热稳定性
PX3	S87R/G118R/S128L/P129Q/S130A/N76D/S188D/N248R	0.93	1.20	1.24	1.54	1.39	0.7
PX4	N76D/S87R/G118R/S128L/P129Q/S130A	1.20	1.44	1.35	ND	ND	ND
PX5	N76D/S87R/G118R/S128L/P129Q/S130A/S188D/V244R	0.97	1.16	1.17	ND	ND	ND

[0475] 如表9-2所示，在各种洗涤剂组合物中，在50℃下变体蛋白酶与参考蛋白酶GG36相比表现出增强的或改善的清洁性能。具体地讲，PX3变体在50℃下在CALGONIT®五合一和CASCADE®多效合一中表现出优于GG36蛋白酶的清洁性能(PI值)，在40℃下与CALGONIT®五合一的清洁性能几乎相同。PX4变体在50℃下在CALGONIT®五合一和CASCADE®多效合一中以及在40℃下在CALGONIT®五合一中表现出明显优于GG36蛋白酶的清洁性能(PI值)。因此，预计需要较少的PX4蛋白酶量即可实现与GG36蛋白酶相同的清洁性能。另外，值得注意的是，PX4变体甚至在较低的温度下也表现出比GG36蛋白酶明显更佳的清洁性能。PX5变体蛋白酶在50℃下在CALGONIT®五合一和CASCADE®多效合一中表现出优于GG36蛋白酶的清洁性能(PI值)，在40℃下与CALGONIT®五合一的清洁性能几乎相同。

[0476] 实施例10

[0477] 液体衣物洗涤剂组合物

[0478] 该实施例提供本发明的液体衣物洗涤剂组合物的多种制剂。可向其中添加本发明的至少一种变体蛋白酶的示例性液体衣物洗涤剂制剂在下表10-1和10-2中提供。本发明的至少一种变体蛋白酶可按所得制剂(组合物)约0.0001至约10重量%的浓度包含在每种这样的制剂中。制剂可包含可供选择的变体蛋白酶浓度，如配制人员按配制人员的需求所确定的。

[0479] 表10-1.

化合物	制剂				
	I	II	III	IV	V
LAS	24.0	32.0	6.0	3.0	6.0
Na C ₁₆ -C ₁₇ HSAS	-	-	-	5.0	-
C ₁₂ -C ₁₅ AE _{1.8} S	-	-	8.0	7.0	5.0
C ₈ -C ₁₀ 丙基二甲胺	2.0	2.0	2.0	2.0	1.0
C ₁₂ -C ₁₄ 烷基二甲基氧化胺	-	-	-	-	2.0
C ₁₂ -C ₁₅ AS	-	-	17.0	-	8.0
CFAA	-	5.0	4.0	4.0	3.0
C ₁₂ -C ₁₄ 脂肪醇乙氧基化物	12.0	6.0	1.0	1.0	1.0
C ₁₂ -C ₁₈ 脂肪酸	3.0	-	4.0	2.0	3.0
柠檬酸 (无水)	4.5	5.0	3.0	2.0	1.0
DETPMP	-	-	1.0	1.0	0.5
单乙醇胺	5.0	5.0	5.0	5.0	2.0
氢氧化钠	-	-	2.5	1.0	1.5
1N HCl 水溶液	#1	#1	-	-	-
丙二醇	12.7	14.5	13.1	10.	8.0
乙醇	1.8	2.4	4.7	5.4	1.0
DTPA	0.5	0.4	0.3	0.4	0.5

[0480]

化合物	制剂				
	I	II	III	IV	V
果胶裂解酶	-	-	-	0.005	-
淀粉酶	0.001	0.002	-	-	-
纤维素酶	-	-	0.000 2	-	0.000 1
脂肪酶	0.1	-	0.1	-	0.1
NprE (任选)	0.05	0.3	-	0.5	0.2
PMN	-	-	0.08	-	-
蛋白酶 A (任选)	-	-	-	-	0.1
醛糖氧化酶	-	-	0.3	-	0.003
ZnCl ₂	0.1	0.05	0.05	0.05	0.02
甲酸钙	0.05	0.07	0.05	0.06	0.07
DETBCHD	-	-	0.02	0.01	-
SRP1	0.5	0.5	-	0.3	0.3
硼酸	-	-	-	-	2.4
二甲苯磺酸钠	-	-	3.0	-	-
异丙苯磺酸钠	-	-	-	0.3	0.5
DC 3225C	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
2-丁基-辛醇	0.03	0.04	0.04	0.03	0.03
增白剂 1	0.12	0.10	0.18	0.08	0.10
余量为香料/染料和/或水, 补足到 100%					

[0481]

[0482] #1: 添加1N HCl水溶液来调节制剂的净pH处于约3至约5的范围内。

[0483] 制剂(I) - (II) 的pH为约5至约7, 制剂(III) - (V) 的pH为约7.5至约8.5。

[0484] 表10-2.

化合物	制剂					
	I	II	III	IV	V	VI
LAS	11.5	11.5	9.0	-	4.0	-
C ₁₂ -C ₁₅ AE _{2.85} S	-	-	3.0	18.0	-	16.0
C ₁₄ -C ₁₅ E _{2.5} S	11.5	11.5	3.0	-	16.0	-
C ₁₂ -C ₁₃ E ₉	-	-	3.0	2.0	2.0	1.0
C ₁₂ -C ₁₃ E ₇	3.2	3.2	-	-	-	-
CFAA	-	-	-	5.0	-	3.0
TPKFA	2.0	2.0	-	2.0	0.5	2.0
柠檬酸(无水)	3.2	3.2	0.5	1.2	2.0	1.2
甲酸钙	0.1	0.1	0.06	0.1	-	-
甲酸钠	0.5	0.5	0.06	0.1	0.05	0.05
ZnCl ₂	0.1	0.05	0.06	0.03	0.05	0.05
异丙苯磺酸钠	4.0	4.0	1.0	3.0	1.2	-

[0485]

化合物	制剂					
	I	II	III	IV	V	VI
硼酸盐	0.6	0.6	1.5	-	-	-
氢氧化钠	6.0	6.0	2.0	3.5	4.0	3.0
乙醇	2.0	2.0	1.0	4.0	4.0	3.0
1,2 丙二醇	3.0	3.0	2.0	8.0	8.0	5.0
单乙醇胺	3.0	3.0	1.5	1.0	2.5	1.0
TEPAE	2.0	2.0	-	1.0	1.0	1.0
nprE(任选)	0.03	0.05	-	0.03	-	0.02
PMN	-	-	0.01	-	0.08	-
蛋白酶A(任选)	-	-	0.01	-	-	-
脂肪酶	-	-	-	0.002	-	-
淀粉酶	-	-	-	-	0.002	-
纤维素酶	-	-	-	-	-	0.0001
果胶裂解酶	0.005	0.005	-	-	-	-
醛糖氧化酶	0.05	-	-	0.05	-	0.02
半乳糖氧化酶	-	0.04	-	-	-	-
PAAC	0.03	0.03	0.02	-	-	-
DETBCHD	-	-	-	0.02	0.01	-
SRP 1	0.2	0.2	-	0.1	-	-
DTPA	-	-	-	0.3	-	-
PVNO	-	-	-	0.3	-	0.2
增白剂 1	0.2	0.2	0.07	0.1	-	-
有机硅消泡剂	0.04	0.04	0.02	0.1	0.1	0.1
余量为香料/染料和/或水, 补足至 100%						

[0486]

[0487] 实施例11

[0488] 液体手洗盛具洗涤剂组合物

[0489] 该实施例提供本发明的液体手洗盛具洗涤剂组合物的多种制剂。可向其中添加本发明的至少一种变体蛋白酶的示例性液体手洗盛具洗涤剂制剂在下文中提供。本发明的至少一种变体蛋白酶可按所得制剂(组合物)约0.0001至约10重量%的浓度包含在每种这样的制剂中。制剂可包含可供选择的变体蛋白酶浓度,如配制人员按配制人员的需求所确定的。

[0490] 表11-1.

[0491]

化合物	制剂					
	I	II	III	IV	V	VI
C ₁₂ -C ₁₅ AE _{1.8} S	30.0	28.0	25.0	-	15.0	10.0
LAS	-	-	-	5.0	15.0	12.0

[0492]

化合物	制剂					
	I	II	III	IV	V	VI
链烷磺酸盐	-	-	-	20.0	-	-
C ₁₀ -C ₁₈ 烷基二甲基氧化胺	5.0	3.0	7.0	-	-	-
甜菜碱	3.0	-	1.0	3.0	1.0	-
C ₁₂ 多羟基脂肪酰胺	-	-	-	3.0	-	1.0
C ₁₄ 多羟基脂肪酰胺	-	1.5	-	-	-	-
C ₁₁ E ₉	2.0	-	4.0	-	-	20.0
DTPA	-	-	-	-	0.2	-
二水合柠檬酸三钠	0.25	-	-	0.7	-	-
二胺	1.0	5.0	7.0	1.0	5.0	7.0
MgCl ₂	0.25	-	-	1.0	-	-
nprE (任选)	0.02	0.01	-	0.01	-	0.05
PMN	-	-	0.03	-	0.02	-
蛋白酶 A (任选)	-	0.01	-	-	-	-
淀粉酶	0.001	-	-	0.002	-	0.001
醛糖氧化酶	0.03	-	0.02	-	0.05	-
异丙苯磺酸钠	-	-	-	2.0	1.5	3.0
PAAC	0.01	0.01	0.02	-	-	-
DETBCHD	-	-	-	0.01	0.02	0.01
余量为香料/染料和/或水, 补足到 100%						

[0493] 制剂(I)-(VI)的pH为约8至约11。

[0494] 实施例12

[0495] 液体自动盛具洗涤剂组合物

[0496] 该实施例提供本发明的液体自动盛具洗涤剂组合物的多种制剂。可向其中添加本发明的至少一种变体蛋白酶的示例性液体自动盛具洗涤剂制剂在下文中提供。本发明的至少一种变体蛋白酶可按所得制剂(组合物)约0.0001至约10重量%的浓度包含在每种这样的制剂中。制剂可包含可供选择的变体蛋白酶浓度,如配制人员按配制人员的需求所确定的。

[0497] 表12-1.

化合物	制剂				
	I	II	III	IV	V
STPP	16	16	18	16	16
硫酸钾	-	10	8	-	10
1,2 丙二醇	6.0	0.5	2.0	6.0	0.5
硼酸	-	-	-	4.0	3.0

[0498]

化合物	制剂				
	I	II	III	IV	V
CaCl ₂ 二水合物	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
非离子型	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
nprE (任选)	0.1	0.03	-	0.03	-
PMN	-	-	0.05	-	0.06
蛋白酶 B (任选)	-	-	-	0.01	-
淀粉酶	0.02	-	0.02	0.02	-
醛糖氧化酶	-	0.15	0.02	-	0.01
半乳糖氧化酶	-	-	0.01	-	0.01
PAAC	0.01	-	-	0.01	-
DETBCHD	-	0.01	-	-	0.01
余量为香料/染料和/或水, 补足到 100%					

[0499]

[0500] 实施例13

[0501] 颗粒状和/或片状洗衣组合物

[0502] 该实施例提供本发明的颗粒状和/或片状衣物洗涤剂组合物的多种制剂。可向其中添加本发明的至少一种变体蛋白酶的可为颗粒状或片状形式的本发明的示例性洗衣组合物在下文提供。本发明的至少一种变体蛋白酶可按所得制剂(组合物)约0.0001至约10重量%的浓度包含在每种这样的制剂中。制剂可包含可供选择的变体蛋白酶浓度,如配制人员按配制人员的需求所确定的。

[0503] 表13-1.

[0504]

化合物	制剂				
	I	II	III	IV	V
C ₁₄ -C ₁₅ AS 或 TAS	8.0	5.0	3.0	3.0	3.0
LAS	8.0	-	8.0	-	7.0
C ₁₂ -C ₁₅ AE ₃ S	0.5	2.0	1.0	-	-
C ₁₂ -C ₁₅ E ₅ 或 E ₃	2.0	-	5.0	2.0	2.0
QAS	-	-	-	1.0	1.0
沸石 A	20.0	18.0	11.0	-	10.0
SKS-6 (干加)	-	-	9.0	-	-
MA/AA	2.0	2.0	2.0	-	-
AA	-	-	-	-	4.0
二水合柠檬酸三钠	-	2.0	-	-	-
柠檬酸 (无水)	2.0	-	1.5	2.0	-
DTPA	0.2	0.2	-	-	-
EDDS	-	-	0.5	0.1	-

[0505]

化合物	制剂				
	I	II	III	IV	V
HEDP	-	-	0.2	0.1	-
PB1	3.0	4.8	-	-	4.0
过碳酸盐	-	-	3.8	5.2	-
NOBS	1.9	-	-	-	-
NACA OBS	-	-	2.0	-	-
TAED	0.5	2.0	2.0	5.0	1.00
BB1	0.06	-	0.34	-	0.14
BB2	-	0.14	-	0.20	-
无水碳酸钠	15.0	18.0	-	15.0	15.0
硫酸盐	5.0	12.0	5.0	17.0	3.0
硅酸盐	-	1.0	-	-	8.0
nprE (任选)	0.03	-	0.1	0.06	-
PMN	-	0.05	-	-	0.1
蛋白酶 B (任选)	-	0.01	-	-	-
蛋白酶 C (任选)	-	-	-	0.01	-
脂肪酶	-	0.008	-	-	-
淀粉酶	0.001	-	-	-	0.001
纤维素酶	-	0.0014	-	-	-
果胶裂解酶	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
醛糖氧化酶	0.03	-	0.05	-	-
PAAC	-	0.01	-	-	0.05
余量为水分和/或微量物质*, 补足至 100%					

[0506] *香料、染料、增白剂/SRP1/羧甲基纤维素钠/光漂白剂/MgSO₄/PVPVI/抑泡剂/高分子聚乙二醇(PEG)/粘土。

[0507] 实施例14

[0508] 高密度自动盛具洗涤剂组合物

[0509] 该实施例提供本发明的高密度自动盛具洗涤剂组合物的多种制剂。可向其中添加本发明的至少一种变体蛋白酶的示例性高密度自动盛具洗涤剂组合物在下文中提供。本发明的至少一种变体蛋白酶可按所得制剂(组合物)约0.0001至约10重量%的浓度包含在每种这样的制剂中。制剂可包含可供选择的变体蛋白酶浓度,如配制人员按配制人员的需求所确定的。

[0510] 表14-1.

[0511]

化合物	制剂					
	I	II	III	IV	V	VI

[0512]

化合物	制剂					
	I	II	III	IV	V	VI
STPP	-	45.0	45.0	-	-	40.0
二水合柠檬酸三钠	17.0	-	-	50.0	40.2	-
碳酸钠	17.5	14.0	20.0	-	8.0	33.6
碳酸氢盐	-	-	-	26.0	-	-
硅酸盐	15.0	15.0	8.0	-	25.0	3.6
偏硅酸盐	2.5	4.5	4.5	-	-	-
PB1	-	-	4.5	-	-	-
PB4	-	-	-	5.0	-	-
过碳酸盐	-	-	-	-	-	4.8
BB1	-	0.1	0.1	-	0.5	-
BB2	0.2	0.05	-	0.1	-	0.6
非离子型	2.0	1.5	1.5	3.0	1.9	5.9
HEDP	1.0	-	-	-	-	-
DETPMP	0.6	-	-	-	-	-
PAAC	0.03	0.05	0.02	-	-	-
石蜡	0.5	0.4	0.4	0.6	-	-
nprE (任选)	0.072	0.053	-	0.026	-	0.01
PMN	-	-	0.053	-	0.059	-
蛋白酶 B (任选)	-	-	-	-	-	0.01
淀粉酶	0.012	-	0.012	-	0.021	0.006
脂肪酶	-	0.001	-	0.005	-	-
果胶裂解酶	0.001	0.001	0.001	-	-	-
醛糖氧化酶	0.05	0.05	0.03	0.01	0.02	0.01
BTA	0.3	0.2	0.2	0.3	0.3	0.3
聚羧酸系	6.0	-	-	-	4.0	0.9
香料	0.2	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2
余量为水分和/或微量物质*, 补足至 100%						

[0513] *增白剂/染料/SRP1/羧甲基纤维素钠/光漂白剂/MgSO₄/PVPVI/抑泡剂/高分子PEG/粘土。

[0514] 制剂(I)-(VI)的pH为约9.6至约11.3。

[0515] 实施例15

[0516] 片状洗涤剂组合物

[0517] 该实施例提供多种片状洗涤剂制剂。通过以下方法制备可向其中添加本发明的至少一种变体蛋白酶的本发明的以下示例性片状洗涤剂组合物：使用标准12头旋转压片机以13KN/cm²的压力压制颗粒状盛具洗涤剂组合物。本发明的至少一种变体蛋白酶可按所得制剂(组合物)约0.0001至约10重量%的浓度包含在每种这样的制剂中。制剂可包含可供选择的变体蛋白酶浓度，如配制人员按配制人员的需求所确定的。

[0518] 表15-1.

[0519]

化合物	制剂							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
STPP	-	48.8	44.7	38.2	-	42.4	46.1	46.0
二水合柠檬酸三钠	20.0	-	-	-	35.9	-	-	-
碳酸钠	20.0	5.0	14.0	15.4	8.0	23.0	20.0	-
硅酸盐	15.0	14.8	15.0	12.6	23.4	2.9	4.3	4.2
脂肪酶	0.001	-	0.01	-	0.02	-	-	-
蛋白酶B(任选)	0.01	-	-	-	-	-	-	-
蛋白酶C(任选)	-	-	-	-	-	0.01	-	-
nprE(任选)	0.01	0.08	-	0.04	-	0.023	-	0.05
PMN	-	-	0.05	-	0.052	-	0.023	-
淀粉酶	0.012	0.012	0.012	-	0.015	-	0.017	0.002
果胶裂解酶	0.005	-	-	0.002	-	-	-	-
醛糖氧化酶	-	0.03	-	0.02	0.02	-	0.03	-
PB1	-	-	3.8	-	7.8	-	-	4.5
过碳酸盐	6.0	-	-	6.0	-	5.0	-	-
BB1	0.2	-	0.5	-	0.3	0.2	-	-
BB2	-	0.2	-	0.5	-	-	0.1	0.2
非离子型	1.5	2.0	2.0	2.2	1.0	4.2	4.0	6.5
PAAC	0.01	0.01	0.02	-	-	-	-	-
DETBCHD	-	-	-	0.02	0.02	-	-	-
TAED	-	-	-	-	-	2.1	-	1.6
HEDP	1.0	-	-	0.9	-	0.4	0.2	-
DETPMP	0.7	-	-	-	-	-	-	-
石蜡	0.4	0.5	0.5	0.5	-	-	0.5	-
BTA	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	-
聚羧酸系	4.0	-	-	-	4.9	0.6	0.8	-
PEG 400-30,000	-	-	-	-	-	2.0	-	2.0
甘油	-	-	-	-	-	0.4	-	0.5
香料	-	-	-	0.05	0.2	0.2	0.2	0.2
余量为水分和/或微量物质*, 补足至 100%								

[0520] *增白剂/SRP1/羧甲基纤维素钠/光漂白剂/MgSO₄/PVPVI/抑泡剂/高分子PEG/粘土。

[0521] 制剂(I)-(VII)的pH为约10至约11.5;制剂(VIII)的pH为约8至约10。制剂(I)-(VIII)的片重为约20克至约30克。

[0522] 实施例16

[0523] 液体硬质表面清洁洗涤剂

[0524] 该实施例提供本发明的液体硬质表面清洁洗涤剂组合物的多种制剂。可向其中添加本发明的至少一种变体蛋白酶的示例性液体硬质表面清洁洗涤剂组合物在下文中提供。本发明的至少一种变体蛋白酶可按所得制剂(组合物)约0.0001至约10重量%的浓度包含在每种这样的制剂中。制剂可包含可供选择的变体蛋白酶浓度,如配制人员按配制人员的需求所确定的。

[0525] 表16-1.

[0526]

化合物	制剂						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
C ₉ -C ₁₁ E ₅	2.4	1.9	2.5	2.5	2.5	2.4	2.5
C ₁₂ -C ₁₄ E ₅	3.6	2.9	2.5	2.5	2.5	3.6	2.5
C ₇ -C ₉ E ₆	-	-	-	-	8.0	-	-
C ₁₂ -C ₁₄ E ₂₁	1.0	0.8	4.0	2.0	2.0	1.0	2.0
LAS	-	-	-	0.8	0.8	-	0.8
异丙苯磺酸钠	1.5	2.6	-	1.5	1.5	1.5	1.5
Isachem [®] AS	0.6	0.6	-	-	-	0.6	-
Na ₂ CO ₃	0.6	0.13	0.6	0.1	0.2	0.6	0.2
二水合柠檬酸三钠	0.5	0.56	0.5	0.6	0.75	0.5	0.75
NaOH	0.3	0.33	0.3	0.3	0.5	0.3	0.5
脂肪酸	0.6	0.13	0.6	0.1	0.4	0.6	0.4
2-丁基辛醇	0.3	0.3	-	0.3	0.3	0.3	0.3
PEG DME-2000 [®]	0.4	-	0.3	0.35	0.5	-	-
PVP	0.3	0.4	0.6	0.3	0.5	-	-
MME PEG (2000) [®]	-	-	-	-	-	0.5	0.5
Jeffamine [®] ED-2001	-	0.4	-	-	0.5	-	-
PAAC	-	-	-	0.03	0.03	0.03	-
DETBCHD	0.03	0.05	0.05	-	-	-	-
nprE (任选)	0.07	-	0.08	0.03	-	0.01	0.04
PMN	-	0.05	-	-	0.06	-	-
蛋白酶 B (任选)	-	-	-	-	-	0.01	-
淀粉酶	0.12	0.01	0.01	-	0.02	-	0.01
脂肪酶	-	0.001	-	0.005	-	0.005	-
果胶裂解酶	0.001	-	0.001	-	-	-	0.002
ZnCl ₂	0.02	0.01	0.03	0.05	0.1	0.05	0.02

[0527]

化合物	制剂						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
甲酸钙	0.03	0.03	0.01	-	-	-	-
PB1	-	4.6	-	3.8	-	-	-
醛糖氧化酶	0.05	-	0.03	-	0.02	0.02	0.05
余量为香料/染料和/或水, 补足到 100%							

[0528] 制剂(I)-(VII)的pH为约7.4至约9.5。

[0529] 说明书中提及的所有专利和出版物代表本发明所属领域内的技术人员的水平。本

领域的技术人员将容易地认识到,本发明能够很好地实现目标,并获得本文提及的以及固有的那些结果和优点。本文所述的组合物和方法仅代表实施方案,且为示例性的,不旨在限制本发明的范围。对本领域技术人员显而易见的是,可在不脱离本发明范围和精神的情况下对本文所公开的发明进行不同的替代和修改。

[0530] 本文以示例性方式适当描述的发明可在不存在本文未具体公开的任何一种或多种要素、一种或多种限制的情况下实践。所采用的术语和表达作为描述性而非限制性术语使用,不旨在表示在此类术语和表达的使用中将所示及所述特征的任何等同形式或其部分排除在外,而是应当认识到在受权利要求书保护的发明范围内可能存在各种修改。因此,应当理解,虽然本发明通过实施方案和任选特征进行了具体公开,但是本领域的技术人员可对本文所公开的概念作出修改和变化,并且此类修改和变化被视为落在本文所限定的本发明范围内。

[0531] 本文以宽泛性和一般性方式描述了本发明。落在该一般性公开范围内的每种更窄的种类和一般性亚组也构成本发明的一部分。这包括具有从分类中删除任何主题的前提条件或负面限制的发明一般性描述,而不论移除的材料在本文中是否具体列举。

序列表

<110> 美国丹尼斯克公司

R·R·博特

L·G·卡斯康-佩雷拉

D·A·埃斯特尔

F·格德盖布

A·J·普洛斯

<120> 包含变体蛋白酶的组合物和方法

<130> 31518W0-2

[0001] <140> PCT/US11/32050

<141> 2011-04-12

<150> US 61/324,534

<151> 2010-04-15

<160> 20

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 269

<212> PRT

<213> 迟缓芽孢杆菌(Bacillus lentus)

<400> 1

Ala Gln Ser Val Pro Trp Gly Ile Ser Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala

1 5 10 15

His Asn Arg Gly Leu Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp

20 25 30

Thr Gly Ile Ser Thr His Pro Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser

35 40 45

Phe Val Pro Gly Glu Pro Ser Thr Gln Asp Gly Asn Gly His Gly Thr

50 55 60

His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu

65 70 75 80

Gly Val Ala Pro Ser Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala

85 90 95

[0002]

Ser Gly Ser Gly Ser Val Ser Ser Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala

100 105 110

Gly Asn Asn Gly Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Pro Ser

115 120 125

Pro Ser Ala Thr Leu Glu Gln Ala Val Asn Ser Ala Thr Ser Arg Gly

130 135 140

Val Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Gly Ala Gly Ser Ile Ser

145 150 155 160

Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln

165 170 175

Asn Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Ala Gly Leu Asp Ile

180 185 190

Val Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Ser Thr Tyr

195	200	205	
Ala Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala			
210	215	220	
Ala Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile			
225	230	235	240
Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Ser Leu Gly Ser Thr Asn Leu			
245	250	255	
Tyr Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg			
260	265		

<210> 2

<211> 275

<212> PRT

[0003] <213> 解淀粉芽孢杆菌(Bacillus amyloliquefaciens)

<400> 2

Ala Gln Ser Val Pro Tyr Gly Val Ser Gln Ile Lys Ala Pro Ala Leu			
1	5	10	15
His Ser Gln Gly Tyr Thr Gly Ser Asn Val Lys Val Ala Val Ile Asp			
20	25	30	
Ser Gly Ile Asp Ser Ser His Pro Asp Leu Lys Val Ala Gly Gly Ala			
35	40	45	
Ser Met Val Pro Ser Glu Thr Asn Pro Phe Gln Asp Asn Asn Ser His			
50	55	60	
Gly Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly			
65	70	75	80
Val Leu Gly Val Ala Pro Ser Ala Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu			

	85	90	95
	Gly Ala Asp Gly Ser Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Asn Gly Ile Glu		
	100	105	110
	Trp Ala Ile Ala Asn Asn Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly		
	115	120	125
	Pro Ser Gly Ser Ala Ala Leu Lys Ala Ala Val Asp Lys Ala Val Ala		
	130	135	140
	Ser Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Glu Gly Thr Ser Gly		
	145	150	155
	Ser Ser Ser Thr Val Gly Tyr Pro Gly Lys Tyr Pro Ser Val Ile Ala		
	165	170	175
	Val Gly Ala Val Asp Ser Ser Asn Gln Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val		
	180	185	190
[0004]	Gly Pro Glu Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr		
	195	200	205
	Leu Pro Gly Asn Lys Tyr Gly Ala Tyr Asn Gly Thr Ser Met Ala Ser		
	210	215	220
	Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn		
	225	230	235
	Trp Thr Asn Thr Gln Val Arg Ser Ser Leu Glu Asn Thr Thr Thr Lys		
	245	250	255
	Leu Gly Asp Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Gln Ala		
	260	265	270
	Ala Ala Gln		
	275		

<210> 3

<211> 275

<212> PRT

<213> 解淀粉芽孢杆菌

<400> 3

Ala Gln Ser Val Pro Tyr Gly Val Ser Gln Ile Lys Ala Pro Ala Leu

1 5 10 15

His Ser Gln Gly Tyr Thr Gly Ser Asn Val Lys Val Ala Val Ile Asp

20 25 30

Ser Gly Ile Asp Ser Ser His Pro Asp Leu Lys Val Ala Gly Gly Ala

35 40 45

Ser Met Val Pro Ser Glu Thr Asn Pro Phe Gln Asp Asn Asn Ser His

50 55 60

[0005]

Gly Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly

65 70 75 80

Val Leu Gly Val Ala Pro Ser Ala Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu

85 90 95

Gly Ala Asp Gly Ser Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Asn Gly Ile Glu

100 105 110

Trp Ala Ile Ala Asn Asn Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly

115 120 125

Pro Ser Gly Ser Ala Ala Leu Lys Ala Ala Val Asp Lys Ala Val Ala

130 135 140

Ser Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Glu Gly Thr Ser Gly

145 150 155 160

Ser Ser Ser Thr Val Gly Tyr Pro Gly Lys Tyr Pro Ser Val Ile Ala

165 170 175

Val Gly Ala Val Asp Ser Ser Asn Gln Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val

180

185

190

Gly Pro Glu Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr

195

200

205

Leu Pro Gly Asn Lys Tyr Gly Ala Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Ser

210

215

220

Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn

225

230

235

240

Trp Thr Asn Thr Gln Val Arg Ser Ser Leu Glu Asn Thr Thr Thr Lys

245

250

255

Leu Gly Asp Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Gln Ala

260

265

270

Ala Ala Gln

[0006]

275

<210> 4

<211> 269

<212> PRT

<213> 克劳氏芽孢杆菌(Bacillus clausii)

<400> 4

Ala Gln Ser Val Pro Trp Gly Ile Ser Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala

1

5

10

15

His Asn Arg Gly Leu Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp

20

25

30

Thr Gly Ile Ser Thr His Pro Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser

35

40

45

Phe	Val	Pro	Gly	Glu	Pro	Ser	Thr	Gln	Asp	Gly	Asn	Gly	His	Gly	Thr
50						55						60			
His	Val	Ala	Gly	Thr	Ile	Ala	Ala	Leu	Asn	Asn	Ser	Ile	Gly	Val	Leu
65					70					75				80	
Gly	Val	Ala	Pro	Asn	Ala	Glu	Leu	Tyr	Ala	Val	Lys	Val	Leu	Gly	Ala
					85					90				95	
Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Val	Ser	Ser	Ile	Ala	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ala
					100					105				110	
Gly	Asn	Asn	Gly	Met	His	Val	Ala	Asn	Leu	Ser	Leu	Gly	Ser	Pro	Ser
					115					120				125	
Pro	Ser	Ala	Thr	Leu	Glu	Gln	Ala	Val	Asn	Ser	Ala	Thr	Ser	Arg	Gly
					130					135				140	
Val	Leu	Val	Val	Ala	Ala	Ser	Gly	Asn	Ser	Gly	Ala	Gly	Ser	Ile	Ser
[0007]	145					150					155			160	
Tyr	Pro	Ala	Arg	Tyr	Ala	Asn	Ala	Met	Ala	Val	Gly	Ala	Thr	Asp	Gln
						165					170			175	
Asn	Asn	Asn	Arg	Ala	Ser	Phe	Ser	Gln	Tyr	Gly	Ala	Gly	Leu	Asp	Ile
						180					185			190	
Val	Ala	Pro	Gly	Val	Asn	Val	Gln	Ser	Thr	Tyr	Pro	Gly	Ser	Thr	Tyr
						195					200			205	
Ala	Ser	Leu	Asn	Gly	Thr	Ser	Met	Ala	Thr	Pro	His	Val	Ala	Gly	Ala
						210					215			220	
Ala	Ala	Leu	Val	Lys	Gln	Lys	Asn	Pro	Ser	Trp	Ser	Asn	Val	Gln	Ile
225						230					235			240	
Arg	Asn	His	Leu	Lys	Asn	Thr	Ala	Thr	Ser	Leu	Gly	Ser	Thr	Asn	Leu
						245					250			255	
Tyr	Gly	Ser	Gly	Leu	Val	Asn	Ala	Glu	Ala	Ala	Thr	Arg			

260

265

<210> 5

<211> 269

<212> PRT

<213> 芽孢杆菌(Bacillus sp.)

<400> 5

Ala Gln Ser Val Pro Trp Gly Ile Ser Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala

1 5 10 15

His Asn Arg Gly Leu Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp

20 25 30

Thr Gly Ile Ser Thr His Pro Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser

[0008] 35 40 45

Phe Val Pro Gly Glu Pro Ser Thr Gln Asp Gly Asn Gly His Gly Thr

50 55 60

His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu

65 70 75 80

Gly Val Ala Pro Asn Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala

85 90 95

Ser Gly Ser Gly Ser Val Ser Ser Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala

100 105 110

Gly Asn Asn Val Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Leu Gln Ala

115 120 125

Pro Ser Ala Thr Leu Glu Gln Ala Val Asn Ser Ala Thr Ser Arg Gly

130 135 140

Val Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Gly Ala Gly Ser Ile Ser

145	150	155	160
Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln			
	165	170	175
Asn Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Ala Gly Leu Asp Ile			
	180	185	190
Val Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Ser Thr Tyr			
	195	200	205
Ala Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala			
	210	215	220
Ala Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile			
225	230	235	240
Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Ser Leu Gly Ser Thr Asn Leu			
	245	250	255
[0009] Tyr Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg			
	260	265	

<210> 6

<211> 269

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的变体

<400> 6

Ala Gln Ser Val Pro Trp Gly Ile Ser Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala

1

5

10

15

His Asn Arg Gly Leu Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp			
20	25	30	
Thr Gly Ile Ser Thr His Pro Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser			
35	40	45	
Phe Val Pro Gly Glu Pro Ser Thr Gln Asp Gly Asn Gly His Gly Thr			
50	55	60	
His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asp Asn Ser Ile Gly Val Leu			
65	70	75	80
Gly Val Ala Pro Arg Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala			
85	90	95	
Ser Gly Ser Gly Ser Val Ser Ser Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala			
100	105	110	
Gly Asn Asn Arg Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Leu Gln Ala			
[0010]	115	120	125
Pro Ser Ala Thr Leu Glu Gln Ala Val Asn Ser Ala Thr Ser Arg Gly			
130	135	140	
Val Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Gly Ala Gly Ser Ile Ser			
145	150	155	160
Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln			
165	170	175	
Asn Asn Asn Arg Ala Asp Phe Ser Gln Tyr Gly Ala Gly Leu Asp Ile			
180	185	190	
Val Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Ser Thr Tyr			
195	200	205	
Ala Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala			
210	215	220	
Ala Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile			

225	230	235	240
Arg Arg His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Ser Leu Gly Ser Thr Asn Leu			
	245	250	255
Tyr Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg			
	260	265	

<210> 7

<211> 269

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的变体

[0011]

<400> 7

Ala Gln Ser Val Pro Trp Gly Ile Ser Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala			
1	5	10	15
His Asn Arg Gly Leu Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp			
	20	25	30
Thr Gly Ile Ser Thr His Pro Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser			
	35	40	45
Phe Val Pro Gly Glu Pro Ser Thr Gln Asp Gly Asn Gly His Gly Thr			
	50	55	60
His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asp Asn Ser Ile Gly Val Leu			
65	70	75	80
Gly Val Ala Pro Arg Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala			
	85	90	95

Ser Gly Ser Gly Ser Val Ser Ser Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala			
100	105	110	
Gly Asn Asn Arg Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Leu Gln Ala			
115	120	125	
Pro Ser Ala Thr Leu Glu Gln Ala Val Asn Ser Ala Thr Ser Arg Gly			
130	135	140	
Val Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Gly Ala Gly Ser Ile Ser			
145	150	155	160
Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln			
165	170	175	
Asn Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Ala Gly Leu Asp Ile			
180	185	190	
Val Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Ser Thr Tyr			
[0012] 195	200	205	
Ala Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala			
210	215	220	
Ala Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile			
225	230	235	240
Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Ser Leu Gly Ser Thr Asn Leu			
245	250	255	
Tyr Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg			
260	265		

<210> 8

<211> 269

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的变体

<400> 8

Ala Gln Ser Val Pro Trp Gly Ile Ser Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala

1 5 10 15

His Asn Arg Gly Leu Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp

20 25 30

Thr Gly Ile Ser Thr His Pro Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser

35 40 45

Phe Val Pro Gly Glu Pro Ser Thr Gln Asp Gly Asn Gly His Gly Thr

50 55 60

His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asp Asn Ser Ile Gly Val Leu

[0013]

65 70 75 80

Gly Val Ala Pro Arg Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala

85 90 95

Ser Gly Ser Gly Ser Val Ser Ser Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala

100 105 110

Gly Asn Asn Arg Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Leu Gln Ala

115 120 125

Pro Ser Ala Thr Leu Glu Gln Ala Val Asn Ser Ala Thr Ser Arg Gly

130 135 140

Val Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Gly Ala Gly Ser Ile Ser

145 150 155 160

Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln

165 170 175

Asn Asn Asn Arg Ala Asp Phe Ser Gln Tyr Gly Ala Gly Leu Asp Ile
 180 185 190
 Val Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Ser Thr Tyr
 195 200 205
 Ala Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala
 210 215 220
 Ala Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Arg Gln Ile
 225 230 235 240
 Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Ser Leu Gly Ser Thr Asn Leu
 245 250 255
 Tyr Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
 260 265

[0014]

<210> 9

<211> 810

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码 SEQ ID NO:6 的合成多核苷酸

<400> 9

gcgcaatcag tgccatgggg aattagccgt gtgcaagccc cagctgccca taaccgtgga 60
 ttgacagggt ctggtgtaaa agttgctgtc ctcgatacag gtatttccac tcatccagac 120
 ttaaatatc gtggtggcgc tagctttgta ccagggaac catccactca agatgggaat 180
 gggcatggca cgcattgtgc cgggacgatt gctgcttttag acaattcgat tggcgttctt 240
 ggcgtagcgc cgagagcgga actatacgct gttaaagtat tagggcgag cggttcaggt 300

tcggtcagct cgattgccca aggattggaa tgggcaggga acaatcgtat gcacgttgct	360
aatttgagtt taggactgca ggcaccaagt gccacacttg agcaagctgt taatagcgcg	420
acttctagag gcgttcttgt tgtagcggca tctggaaatt cagggtgcagg ctcaatcagc	480
tatcgggccc gttatgcgaa cgcaatgcea gtcggagcta ctgacaaaa caacaaccgc	540
gccgattttt cacagtatgg cgcagggett gacattgtcg caccagggtgt aaacgtgcag	600
agcacatacc caggttcaac gtatgccagc ttaaaccgta catcgatggc tactcctcat	660
gttgcaggtg cagcagccct tgttaaacia aagaacccat cttggtccaa tgtacaaatc	720
cgcagacatc taaagaatac ggcaacgagc ttaggaagca cgaacttgta tggaagcgga	780
cttgtcaatg cagaagctgc aactcgttaa	810

<210> 10

<211> 810

<212> DNA

[0015] <213> 人工序列

<220>

<223> 编码 SEQ ID NO:7 的合成多核苷酸

<400> 10

gcgcaatcag tgccatgggg aattagccgt gtgcaagccc cagctgccca taaccgtgga	60
ttgacagggtt ctggtgtaaa agttgcigtg ctcgatacag gtatttccac tcattccagac	120
ttaaataatc gtggtggcgc tagctttgta ccaggggaaac catccactca agatgggaat	180
gggcatggca cgcattgtgc cgggacgatt gctgctttag acaattcgat tggcgttctt	240
ggcgtagcgc cgagagcgga actatacgct gttaaagtat taggggcgag cggttcagg	300
tcggtcagct cgattgccca aggattggaa tgggcaggga acaatcgtat gcacgttgct	360
aatttgagtt taggactgca ggcaccaagt gccacacttg agcaagctgt taatagcgcg	420
acttctagag gcgttcttgt tgtagcggca tctggaaatt cagggtgcagg ctcaatcagc	480

tatccggccc gttatgcgaa cgcaatggca gtcggagcta ctgacaaaa caacaaccgc	540
gccagctttt cacagtatgg cgcagggtt gacattgtcg caccaggtgt aaacgtgcag	600
agcacatacc cagggtcaac gtatgccagc ttaaaccgta catcgatggc tactcctcat	660
gttgcagggtg cagcagccct tgtaaataaa aagaacccat cttggtccaa tgtacaaatc	720
cgcaatcatc taaagaatac ggcaacgagc ttaggaagca cgaacttgta tggaagcgga	780
cttgtcaatg cagaagctgc aactcgtaa	810

<210> 11

<211> 810

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

[0016] <223> 编码 SEQ ID NO:8 的合成多核苷酸

<400> 11

gcgcaatcag tgccatgggg aattagccgt gtgcaagccc cagctgcccc taaccgtgga	60
ttgacagggtt ctggtgtaaa agttgctgtc ctcgatacag gtatttccac tcatccagac	120
ttaaataatc gtggtggcgc tagctttgta ccagggggaa catccactca agatgggaat	180
gggcatggca cgcattgggc cgggacgatt gctgcttttag acaattcgat tggcgttctt	240
ggcgtagcgc cgagagcgga actatacgct gttaaagtat taggggcgag cggttcaggt	300
tcggtcagct cgattgcca aggattggaa tgggcaggga acaatcgat gcacgttgct	360
aatttagatt taggactgca ggcaccaagt gccacacttg agcaagctgt taatagcgcg	420
acttctagag gcgttcttgt tgtagcggca tctggaaatt caggtgcagg ctcaatcagc	480
tatccggccc gttatgcgaa cgcaatggca gtcggagcta ctgacaaaa caacaaccgc	540
gccgattttt cacagtatgg cgcagggtt gacattgtcg caccaggtgt aaacgtgcag	600
agcacatacc cagggtcaac gtatgccagc ttaaaccgta catcgatggc tactcctcat	660

	gttgcaggtg cagcagccct tgtaaataa aagaacccat cttgggtccaa tcgtcaaatac	720
	cgcaatcatc taaagaatac ggcaacgagc ttaggaagca cgaacttgta tggaagcgga	780
	cttgtcaatg cagaagctgc aactcgttaa	810
	<210> 12	
	<211> 38	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的引物	
	<400> 12	
[0017]	cgggacgatt gctgcttttag acaattcgat tggcgttc	38
	<210> 13	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的引物	
	<400> 13	
	ggcgttccttg gcgtagcgcc gaacgcggaa ctatacg	37
	<210> 14	

	<211>	41	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成的引物	
	<400>	14	
		ccaaggattg gaatgggcag ggaacaatcg tatgcacgtt g	41
	<210>	15	
	<211>	44	
	<212>	DNA	
[0018]	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成的引物	
	<400>	15	
		taatttgagt ttaggactgc aggcaccaag tgccacactt gagg	44
	<210>	16	
	<211>	39	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		

<223> 合成的引物

<400> 16

ccaaaacaac aaccgcgccg atttttcaca gtatggcgc

39

<210> 17

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的引物

[0019] <400> 17

atcttggtcc aatcgtcaaa tccgcaatca tctaaagaat acggc

45

<210> 18

<211> 1143

<212> DNA

<213> 迟缓芽孢杆菌

<400> 18

gtgagaagca aaaaattgtg gatcgtcgcg tcgaccgcac tactcatttc tgttgctttc 60

agttcatcga tcgcatcggc tgctgaagaa gcaaaagaaa aatatttaat tggctttaat 120

gagcaggaag ctgtcagtga gttttagtaa caagtagagg caaatgacga ggtcgccatt 180

ctctctgagg aagaggaagt cgaaattgaa ttgtttcatg aatttgaaac gattcctgtt 240

ttatccgttg agttaagccc agaagatgtg gacgcgcttg agctcgatcc agcgatttct 300

	tatattgaag aggatgcaga agtaacgaca atggcgcaat cagtgccatg gggaattagc	360
	cgtgtgcaag cccagctgc ccataaccgt ggattgacag gttctggtgt aaaagttgct	420
	gtcctcgata caggatattc cactcatcca gacttaaata ttcgtggtgg cgctagcttt	480
	gtaccagggg aaccatccac tcaagatggg aatgggcatg gcacgcatgt ggccgggacg	540
	attgctgctt taaacaattc gattggcgtt cttggcgtag cgccgagcgc ggaactatac	600
	gctgttaaag tattaggggc gagcggttca ggctcgtca gctcgattgc ccaaggattg	660
	gaatgggcag ggaacaatgg catgcacgtt gctaatttga gtttaggaag cccttcgcca	720
	agtgccacac ttgagcaagc tgtaatatgc gcgacttcta gaggcgttct tgttgtagcg	780
	gcactcggaa attcaggtgc aggcctcaatc agctatccgg ccggttatgc gaacgcaatg	840
	gcagtcggag ctactgacca aaacaacaac cgcgccagct tttcacagta tggcgcaggg	900
	cttgacattg tcgcaccagg tgtaaactg cagagcacat acccaggttc aacgtatgcc	960
	agcttaaacg gtacatgat ggctactcct catgttcag gtgcagcagc cttgtttaa	1020
	caaaagaacc catcttggtc caatgtacaa atccgcaatc atctaaagaa tacggcaacg	1080
[0020]	agcttaggaa gcacgaactt gtatggaagc ggacttgta atgcagaagc tgcaactcgt	1140
	taa	1143

<210> 19

<211> 380

<212> PRT

<213> 迟缓芽孢杆菌

<400> 19

Val Arg Ser Lys Lys Leu Trp Ile Val Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ile

1

5

10

15

Ser Val Ala Phe Ser Ser Ser Ile Ala Ser Ala Ala Glu Glu Ala Lys

20

25

30

Glu Lys Tyr Leu Ile Gly Phe Asn Glu Gln Glu Ala Val Ser Glu Phe

	35	40	45	
	Val Glu Gln Val Glu Ala Asn Asp Glu Val Ala Ile Leu Ser Glu Glu			
	50	55	60	
	Glu Glu Val Glu Ile Glu Leu Leu His Glu Phe Glu Thr Ile Pro Val			
	65	70	75	80
	Leu Ser Val Glu Leu Ser Pro Glu Asp Val Asp Ala Leu Glu Leu Asp			
	85	90	95	
	Pro Ala Ile Ser Tyr Ile Glu Glu Asp Ala Glu Val Thr Thr Met Ala			
	100	105	110	
	Gln Ser Val Pro Trp Gly Ile Ser Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala His			
	115	120	125	
	Asn Arg Gly Leu Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp Thr			
	130	135	140	
[0021]	Gly Ile Ser Thr His Pro Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser Phe			
	145	150	155	160
	Val Pro Gly Glu Pro Ser Thr Gln Asp Gly Asn Gly His Gly Thr His			
	165	170	175	
	Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu Gly			
	180	185	190	
	Val Ala Pro Ser Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala Ser			
	195	200	205	
	Gly Ser Gly Ser Val Ser Ser Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala Gly			
	210	215	220	
	Asn Asn Gly Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Pro Ser Pro			
	225	230	235	240
	Ser Ala Thr Leu Glu Gln Ala Val Asn Ser Ala Thr Ser Arg Gly Val			
	245	250	255	

Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Gly Ala Gly Ser Ile Ser Tyr

260

265

270

Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln Asn

275

280

285

Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Ala Gly Leu Asp Ile Val

290

295

300

Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Ser Thr Tyr Ala

305

310

315

320

Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala Ala

325

330

335

Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile Arg

340

345

350

Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Ser Leu Gly Ser Thr Asn Leu Tyr

[0022]

355

360

365

Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg

370

375

380

<210> 20

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的底物

<400> 20

Ala Ala Pro Phe

GG36	1	AQSVPMGISR	VQAPAAHNRG	LTGSGVKVAV	LDTGIS-THP	DLNIRGGASF	VPGEPT-QD
BPN'	1	AQSVPMGISR	IKAPALHSQG	YTGSMVKVAV	IDSGIDSSH	DLKVAGGASM	VPSETNPFQD
PX3	1	AQSVPMGISR	VQAPAAHNRG	LTGSGVKVAV	LDTGIS-THP	DLNIRGGASF	VPGEPT-QD
PX4	1	AQSVPMGISR	VQAPAAHNRG	LTGSGVKVAV	LDTGIS-THP	DLNIRGGASF	VPGEPT-QD
PX5	1	AQSVPMGISR	VQAPAAHNRG	LTGSGVKVAV	LDTGIS-THP	DLNIRGGASF	VPGEPT-QD
保守	1	*****:~::~	::**** *~::~	***:*****	::~::~	****:~::~	***:~::~
GG36	59	GNGHGTAVAG	TIAALNNSIG	VLGVAPSAEL	YAVKVLGASG	SGSVSSIAQG	LEWAGNNGMH
BPN'	61	NNSHGTAVAG	TVAALNNSIG	VLGVAPSAEL	YAVKVLGASG	SGQYSSIIQG	IEWAIANNMD
PX3	59	GNGHGTAVAG	TIAALNNSIG	VLGVAPSAEL	YAVKVLGASG	SGSVSSIAQG	LEWAGNNGMH
PX4	59	GNGHGTAVAG	TIAALNNSIG	VLGVAPSAEL	YAVKVLGASG	SGSVSSIAQG	LEWAGNNGMH
PX5	59	GNGHGTAVAG	TIAALNNSIG	VLGVAPSAEL	YAVKVLGASG	SGSVSSIAQG	LEWAGNNGMH
保守	61	*~::~*****	*~::~*****	*****~::~	*****~::~	*****~::~	*****~::~
GG36	119	VANLSLGSFS	PSATLEQAVN	SATSRGVLV	AASGNSGAGS	-----ISYPAR	YANAMAVGAT
BPN'	121	VINMSLGGPS	GSAALKAADV	KAVASGVVAV	AAAGNEGTS	SSSTVGYPGK	YPSVIAVGAV
PX3	119	VANLSLGLQA	PSATLEQAVN	SATSRGVLV	AASGNSGAGS	-----ISYPAR	YANAMAVGAT
PX4	119	VANLSLGLQA	PSATLEQAVN	SATSRGVLV	AASGNSGAGS	-----ISYPAR	YANAMAVGAT
PX5	119	VANLSLGLQA	PSATLEQAVN	SATSRGVLV	AASGNSGAGS	-----ISYPAR	YANAMAVGAT
保守	121	*~::~*****	*~::~*****	*****~::~	*****~::~	*****~::~	*****~::~
GG36	175	DQNNNRASFS	QYGAGLDIVA	PGVNVQSTYP	GSTYASLNGT	SMATPHVAGA	AALVKQKNPS
BPN'	181	DSSNQASFS	SVGPELDVMA	PGVSIQSTLP	GNKYGAYNGT	SMASPHVAGA	AALILSKHPN
PX3	175	DQNNNRADFS	QYGAGLDIVA	PGVNVQSTYP	GSTYASLNGT	SMATPHVAGA	AALVKQKNPS
PX4	175	DQNNNRASFS	QYGAGLDIVA	PGVNVQSTYP	GSTYASLNGT	SMATPHVAGA	AALVKQKNPS
PX5	175	DQNNNRADFS	QYGAGLDIVA	PGVNVQSTYP	GSTYASLNGT	SMATPHVAGA	AALVKQKNPS
保守	181	*~::~*****	*~::~*****	*****~::~	*****~::~	*****~::~	*****~::~
GG36	235	WSNVQIRNHL	KNTATSLGST	NLYGSGLVNA	EAATR		
BPN'	241	WTNTQVRSSL	ENTTKLGDS	FYKGKGLNV	QAAAQ		
PX3	235	WSNVQIRNHL	KNTATSLGST	NLYGSGLVNA	EAATR		
PX4	235	WSNVQIRNHL	KNTATSLGST	NLYGSGLVNA	EAATR		
PX5	235	WSNVQIRNHL	KNTATSLGST	NLYGSGLVNA	EAATR		
保守	241	*~::~*****	*~::~*****	*****~::~	*****~::~		

图1

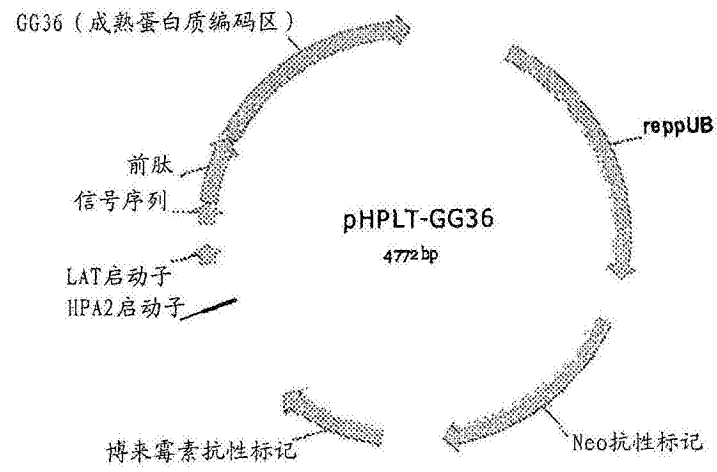


图2