



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104350149 A

(43) 申请公布日 2015.02.11

(21) 申请号 201380006499.0

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013.01.25

C12N 9/52(2006.01)

A23K 1/165(2006.01)

(30) 优先权数据

12152669.3 2012.01.26 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014.07.24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2013/051448 2013.01.25

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/110766 EN 2013.08.01

(71) 申请人 诺维信公司

地址 丹麦鲍斯韦

(72) 发明人 R·P·奥林斯基 T·霍夫

P·R·厄斯特高 C·舍霍尔姆

K·F·蓬托皮丹

(74) 专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司

11322

代理人 顾小曼

权利要求书3页 说明书56页

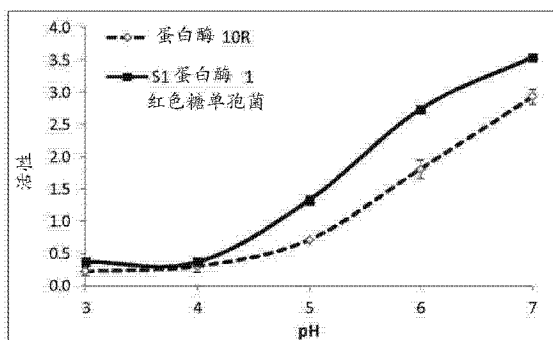
序列表30页 附图3页

(54) 发明名称

具有蛋白酶活性的多肽在动物饲料和洗涤剂中的用途

(57) 摘要

本发明涉及具有蛋白酶活性的分离的多肽以及编码这些多肽的分离的多核苷酸在动物饲料和洗涤剂中的用途。本发明还涉及包含这些多核苷酸的核酸构建体、载体以及宿主细胞,连同生产这些多肽以及在例如动物饲料和洗涤剂中使用这些多肽的方法。



1. 一种具有蛋白酶活性的分离的多肽,该分离的多肽选自下组,该组由以下各项组成:

(a) 一种与 SEQ ID NO:5 具有至少 80%,例如至少 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%、或 100%序列一致性的多肽;

(b) 一种由在高严谨度条件、或非常高严谨度条件下与以下各项杂交的多核苷酸编码的多肽:

(i) SEQ ID NO:1 的成熟多肽编码序列;

(ii) SEQ ID NO:3 的成熟多肽编码序列;和 / 或

(iii) (i) 或 (ii) 的全长互补链;

(c) 一种由以下多核苷酸编码的多肽,该多核苷酸与 SEQ ID NO:1 和 / 或 SEQ ID NO:3 的成熟多肽编码序列具有至少 80%,例如至少 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%、或 100%序列一致性;

(d) 包含 SEQ ID NO:5 的一个或多个(若干个)氨基酸的取代、缺失和 / 或插入的变体;以及

(e) (a)、(b)、(c) 或 (d) 的多肽的一个片段,该片段具有蛋白酶活性;

在动物饲料和洗涤剂组合物中的用途。

2. 如权利要求 1 所述的用途,其中该多肽由在高严谨度条件、或非常高严谨度条件下与以下各项杂交的多核苷酸编码:

(i) SEQ ID NO:1 的成熟多肽编码序列;

(ii) SEQ ID NO:3 的成熟多肽编码序列;和 / 或

(iii) (i) 或 (ii) 的全长互补链。

3. 如权利要求 1-2 中任一项所述的用途,其中该多肽包含 SEQ ID NO:2 或由其组成。

4. 如权利要求 1-2 中任一项所述的用途,其中该多肽包含 SEQ ID NO:4 或由其组成。

5. 如权利要求 1-4 中任一项所述的用途,其中该多肽是 SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4;和 / 或 SEQ ID NO:5 的一个片段,其中该片段具有蛋白酶活性。

6. 一种具有蛋白酶活性并且与 SEQ ID NO:5 具有至少 85%,例如至少 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%、或至少 99%序列一致性的变体多肽,该变体多肽包含 SEQ ID NO:5 的至少一个或多个(若干个)氨基酸的至少一个取代、缺失和 / 或插入。

7. 一种包含具有蛋白酶活性的分离的多肽的组合物,该分离的多肽选自下组,该组由以下各项组成:

(a) 一种与 SEQ ID NO:5 具有至少 80%,例如至少 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%、或 100%序列一致性的多肽;

(b) 一种由在高严谨度条件、或非常高严谨度条件下与以下各项杂交的多核苷酸编码的多肽:

(i) SEQ ID NO:1 的成熟多肽编码序列;

(ii) SEQ ID NO:3 的成熟多肽编码序列 ;和 / 或

(iii) (i) 或 (ii) 的全长互补链 ;

(c) 一种由以下多核苷酸编码的多肽,该多核苷酸与 SEQ ID NO:1 和 / 或 SEQ ID NO:3 的成熟多肽编码序列具有至少 80%,例如至少 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%、或 100% 序列一致性 ;

(d) 包含 SEQ ID NO:5 的一个或多个 (若干个) 氨基酸的取代、缺失和 / 或插入的变体 ;以及

(e) (a)、(b)、(c) 或 (d) 的多肽的一个片段,该片段具有蛋白酶活性。

8. 一种编码如权利要求 1-7 中任一项表明的多肽的分离的多核苷酸,其条件是它与 SEQ ID NO:1 或其成熟多肽编码部分不 100% 相同。

9. 一种核酸构建体或表达载体,该核酸构建体或表达载体包含如权利要求 8 所述的多核苷酸,该多核苷酸可操作地连接至在表达宿主细胞内指导该多肽产生的一个或多个 (若干个) 控制序列上。

10. 一种重组表达宿主细胞,该重组表达宿主细胞包含如权利要求 8 所述的一种多核苷酸,该多核苷酸可操作地连接至指导该多肽产生的一个或多个控制序列上。

11. 如权利要求 10 所述的宿主细胞,其中该宿主是一种细菌,如芽孢杆菌属 ;一种真菌,如曲霉属 ;或一种酵母菌,如假丝酵母属、克鲁维酵母属、毕赤酵母属、酵母属、裂殖酵母属、或亚罗酵母属。

12. 如权利要求 11 所述的宿主细胞,其中该宿主是一种芽孢杆菌属细菌,例如地衣芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、或苏云金芽孢杆菌。

13. 一种产生如权利要求 1-7 中任一项表明的多肽的方法,该方法包含 :

(a) 在有益于产生该多肽的条件下培养一种细胞,该细胞以其野生型形式产生该多肽 ;
并且

(b) 回收该多肽。

14. 一种产生如权利要求 1-7 中任一项表明的多肽的方法,该方法包含 :

(a) 在有益于产生该多肽的条件下培养如权利要求 10 至 12 中任一项所述的一种宿主细胞 ;并且

(b) 回收该多肽。

15. 用一种多核苷酸转化的一种转基因植物、植物部分或植物细胞,该多核苷酸编码如权利要求 1-7 中任一项表明的多肽。

16. 一种产生如权利要求 1-7 中任一项表明的多肽的方法,该方法包含 :

(a) 在有益于产生该多肽的条件下培养如权利要求 15 所述的一种转基因植物或植物细胞 ;并且

(b) 回收该多肽。

17. 如权利要求 1-7 中任一项表明的至少一种多肽在以下各项中的用途 :

在动物饲料中 ;

在动物饲料添加剂中 ;

在用于在动物饲料中使用的组合物的制备中；
用于改善动物饲料的营养价值；
用于增加动物饲料中的可消化和 / 或可溶性蛋白；
用于增加动物饮食中的蛋白的水解程度；和 / 或
用于处理蛋白。

18. 一种用于改善动物饲料的营养价值的方法，其中向该饲料中添加至少一种如权利要求 1-7 中任一项表明的多肽。

19. 一种动物饲料添加剂，包含：
至少一种如权利要求 1-7 中任一项表明的多肽；以及
至少一种脂溶性维生素，和 / 或
至少一种水溶性维生素，和 / 或
至少一种微量矿物质。

20. 如权利要求 19 所述的动物饲料添加剂，该动物饲料添加剂进一步包含以下各项中的一种或多种：淀粉酶；肌醇六磷酸酶；木聚糖酶；半乳聚糖酶； α -半乳糖苷酶；蛋白酶，磷脂酶， β -葡聚糖酶，或其任何混合物。

21. 一种动物饲料，包含如权利要求 18 或 19 所述的动物饲料添加剂。

22. 根据权利要求 21 所述的动物饲料，具有 50 至 800g/kg 的粗蛋白含量。

23. 一种用于处理蛋白的方法，该方法包含将如权利要求 1-7 中任一项表明的至少一种多肽添加至至少一种蛋白或蛋白来源中的步骤。

24. 如权利要求 23 所述的方法，其中大豆包含在该至少一种蛋白来源中。

25. 如权利要求 1-7 中任一项所述的至少一种多肽在动物饲料或洗涤剂中的用途。

26. 一种动物饲料或洗涤剂组合物，包含至少一种如权利要求 1 至 7 中任一项表明的多肽。

27. 如权利要求 26 所述的动物饲料或洗涤剂组合物，其中该组合物包含一种或多种另外的酶。

28. 如权利要求 26 所述的动物饲料或洗涤剂组合物，其中这些另外的酶选自下组，该组由以下各项组成：蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶、角质酶、纤维素酶、内切葡聚糖酶、木葡聚糖酶、果胶酶、果胶裂解酶、黄原胶酶、过氧化物酶、卤代过氧羟基脂肪酸羟化环氧化酶 (haloperoxygenase)、过氧化氢酶以及甘露聚糖酶，或其任何混合物。

29. 如权利要求 26 至 28 中任一项所述的洗涤剂组合物，包含一种或多种选自下组的组分，该组包括表面活性剂、助洗剂、助水溶剂、漂白系统、聚合物、织物调色剂、辅料、分散剂、染料转移抑制剂、荧光增白剂、污物释放聚合物以及抗再沉积剂。

具有蛋白酶活性的多肽在动物饲料和洗涤剂中的用途

[0001] 对序列表的引用

[0002] 本申请包含一个计算机可读形式的序列表,将其通过引用结合在此。

[0003] 发明背景

发明领域

[0004] 本发明涉及具有蛋白酶活性的分离的多肽在动物饲料和洗涤剂中的用途。本发明还涉及编码这些蛋白酶的分离的核酸序列在具有蛋白酶活性的分离的多肽的重组产生中的用途以及编码这些蛋白酶的分离的核酸序列。本发明还涉及包含这些核酸序列的核酸构建体、载体和宿主细胞(包含植物和动物细胞),以及生产和使用(尤其在动物饲料和洗涤剂中使用这些蛋白酶)这些蛋白酶的方法。

[0005] 相关技术说明

[0006] S1组以及分离自糖多孢菌的蛋白酶在本领域中是已知的。一种来自红色糖多孢菌(*Saccharopolyspora erythraea*)的蛋白酶由奥林利克(Oliynyk)等人于2007年披露于‘产生红霉素的细菌红色糖多孢菌NRRL23338的全基因组序列(Complete genome sequence of the erythromycin-producing bacterium *Saccharopolyspora erythraea* NRRL23338)’,自然生物技术(Nat. Biotechnol.)25:447-453中。该全基因组序列在登录号AM420293下被提交至EMBL/GenBank。该氨基酸序列(uniprot:A4FNQ0)与SEQ ID NO:2(在此)的序列相同并且成熟的氨基酸序列被披露于SEQ ID NO:5中。

[0007] 其他S1蛋白酶被披露于现有技术中,例如由帕蒂(Pati)等人于2009年,‘绿色糖单孢菌型菌株(P101T)的全基因组序列(Complete genome sequence of *Saccharomonospora viridis* type strain(P101T))’,基因组科学标准(Stand. Genomic Sci.),1:141-149描述的与SEQ ID NO:5具有80.7%的序列一致性的蛋白酶(Uniprot:C7MV18, SEQ ID NO:9)。鑫(Yum)等人已经在‘来自嗜碱链霉菌属的碱性丝氨酸蛋白酶的纯化及表征(Purification and characterization of alkaline serine protease from an alkalophilic *Streptomyces* sp.)’,生物科学,生物技术以及生物化学(Biosci. Biotechnol. Biochem.),58:470-474(1994)中描述了一种与SEQ ID NO:5具有70.4%的序列一致性的蛋白酶(Uniprot:Q55353, SEQ ID NO:10)。

[0008] 卢卡斯(Lucas)等人已经向EMBL/GenBank提交了一种来自新疆糖单孢菌(*Saccharomonospora xinjiangensis*)XJ-54的与SEQ ID NO:5具有79.6%序列一致性的蛋白酶(Uniprot:I0V8H8, SEQ ID NO:11)并且向EMBL/GenBank提交了另一种来自深蓝糖单孢菌(*Saccharomonospora cyanea*)NA-134的与SEQ ID NO:5具有79.0%序列一致性的蛋白酶(Uniprot:H5XE4, SEQ ID NO:12)。已经向EMBL/GenBank提交了一种来自弱代谢糖单孢菌(*Saccharomonospora paurometabolica*)YIM90007的与SEQ ID NO:5具有76.1%序列一致性的另外的蛋白酶(Uniprot:G4J6Q2, SEQ ID NO:13)。

[0009] 在专利文献中,一种来自链霉菌属的与Uniprot:Q55353(在此的SEQ ID NO:10)相同的蛋白酶披露于WO 2005/052146(SEQ ID NO:649, Genesepq:AEA48820)中并且另一

种蛋白酶披露于 WO 2005/052161 (SEQ ID NO:649, Geneseq: AEA80317) 中, 两者与 SEQ ID NO:5 均具有 70.4% 的序列一致性, 用于在动物饲料和洗涤剂组合物中使用。其他已知的蛋白酶具有约 70% 或低于 70% 的序列一致性。

[0010] 在动物饲料中使用蛋白酶以改善饲料中蛋白的消化是已知的。涉及一种来自链霉菌属的与 SEQ ID NO:2 当前指示的蛋白酶具有 66% 一致性的蛋白酶 (链霉菌属 1AG3 蛋白酶) 的 WO 2009/058679 和 US 2009/0111161 提及这些蛋白酶在动物饲料中的用途。WO 95/28850 披露了一种肌醇六磷酸酶与一种或多种微生物蛋白水解酶组合以改善植物性蛋白的溶解度。WO 01/58275 披露了枯草杆菌蛋白酶家族的酸稳定性蛋白酶在动物饲料中的用途。WO 01/58276 披露了与以下蛋白酶相关的酸稳定性蛋白在动物饲料中的用途: 衍生自拟诺卡菌 NRRL 18262 (10R 蛋白酶) 的蛋白酶, 连同衍生自拟诺卡氏菌 DSM 14010 的一种蛋白酶。WO 04/072221、WO 04/111220、WO 04/111223、WO 05/035747、和 WO 05/123911 披露了与 10R 蛋白酶相关的蛋白酶及其在动物饲料中的用途。另外, WO 04/072279 披露了其他蛋白酶在动物饲料中的用途。

[0011] WO 04/034776 披露了一种枯草杆菌蛋白酶 / 角蛋白酶, 来自地衣芽孢杆菌的 PWD-1, 在家禽饲料中的用途。WO 04/077960 披露了一种通过采用一种细菌或真菌蛋白酶增加草料或谷物在反刍动物中的消化率的方法。

[0012] 包含一种蛋白酶的并且销售以用于在动物饲料中使用的商业产品包含 **RONOZYME®** ProAct (DSM NP/ 诺维信公司 (Novozymes))、**Axtra®** (丹尼斯克公司 (Danisco))、**Avizyme®** (丹尼斯克公司)、**Porzyme®** (丹尼斯克公司)、**Allzyme™** (奥特奇公司 (Alltech))、**Versazyme®** (生物资源有限公司 (BioResources, Int.))、**Poultrygrow™** (杰夫公司 (Jefo)) 和 **Cibenza®DP100** (诺伟思公司 (Novus))。

[0013] 发明概述

[0014] 发明背景

[0015] 在动物饲料中使用蛋白酶 (体内), 和 / 或这类的蛋白酶用于处理植物性蛋白 (体外) 的用途中, 注意的是蛋白对于动物和人类是必需营养因子。大部分家畜和许多人从植物性蛋白来源获得这些必需蛋白。重要的植物性蛋白来源是例如油籽作物、豆类和谷类。

[0016] 当例如大豆粉包含在单胃动物如猪和家禽的饲料中时, 相当比例的大豆饼粉固体未被有效地消化 (在小猪、生长猪和家禽如肉仔鸡、蛋鸡和公鸡中的表观回肠蛋白消化率仅是 80% 左右)。

[0017] 动物的胃肠道是由一系列各自呈现不同 pH 环境的段组成。在单胃动物如猪和家禽以及许多鱼中, 胃展现了低至 pH1-2 的强酸性 pH, 而肠展现了在 pH6-7 范围内的一个更中性的 pH。除了胃和肠之外在胃之前家禽还具有一个嗉囊, 该嗉囊中的 pH 主要取决于咽下的饲料并因此典型地处于 pH4-6 的范围内。通过一种蛋白酶消化蛋白可发生在整个消化道中, 假如该蛋白酶是有活性的并存活于该消化道的条件下的话。因此, 以下这样的蛋白酶是特别令人希望的: 它是高度地酸稳定的以在胃环境中存活, 并且同时在靶动物的宽的生理 pH 下是有效地有活性的。

[0018] 另外, 动物饲料常常是以丸形式配制的, 其中在该造丸过程中采用蒸汽。因此以下也是令人希望的, 在动物饲料中使用的蛋白酶能在暴露于蒸汽处理之后保持活性。

[0019] 多年以来,蛋白酶也被用在洗涤剂组合物中用于水解纺织品、硬质表面和其他表面(例如皮肤等)上的肮材料。这类洗涤剂组合物可通过粉末、片或肥皂条以手洗或自动化机器的方式用于纺织品的清洁中,以及作为粉末和片通过手工或机器的方式用在餐具洗涤中。

[0020] 本发明的新颖的 S1 蛋白酶变体对于这些目的也是有用的。

[0021] 为了生产用于工业使用的蛋白酶,重要的是生产高产量的蛋白酶,使得可获得足够量的该产品以能够以有利的价格提供该蛋白酶。

[0022] 本发明涉及具有蛋白酶活性的分离的多肽在动物饲料和洗涤剂中的用途,这些分离的多肽选自下组,该组由以下各项组成:

[0023] (a) 与 SEQ ID NO:5 具有至少 80% 序列一致性的多肽;

[0024] (b) 由在高严谨度条件或非常高严谨度条件下与以下各项杂交的多核苷酸编码的多肽:

[0025] (i) SEQ ID NO:1 的成熟多肽编码序列;

[0026] (ii) SEQ ID NO:3 的成熟多肽编码序列;

[0027] (iii) (i) 或 (ii) 的全长互补链;

[0028] (c) 由与 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:3 的成熟多肽编码序列具有至少 80% 序列一致性的多核苷酸编码的多肽;

[0029] (d) 包含 SEQ ID NO:5 的一个或多个(若干个)氨基酸的取代、缺失和/或插入的变体;以及

[0030] (e) (a)、(b)、(c) 或 (d) 的多肽的一个片段,该片段具有蛋白酶活性。

[0031] 本发明还涉及具有蛋白酶活性并且与 SEQ ID NO:5 具有至少 85% 序列一致性的、包含 SEQ ID NO:5 或同源序列的至少一个或多个(若干个)氨基酸的至少一个取代、缺失和/或插入的变体多肽。

[0032] 本发明还涉及编码本发明的多肽的分离的多核苷酸、包含这些多核苷酸的核酸构建体、重组表达载体、以及重组宿主细胞,并且涉及重组地产生这些多肽的方法。

[0033] 本发明还涉及用于制备一种用于在动物饲料中使用的组合物以提高动物饲料的营养价值的方法,以及处理蛋白以在动物饲料组合物中使用的方法。

[0034] 此外,本发明还涉及包含这些蛋白酶的洗涤剂组合物。

[0035] 附图简要说明

[0036] 在附图中:

[0037] 图 1 示出了与 10R 蛋白酶相比,来自红色糖单孢菌(*Saccharomonospora erythraea*) 的 S1 蛋白酶 1 对 Suc-AAPF-pNA 底物的 pH- 活性曲线,

[0038] 图 2 示出了与 10R 蛋白酶相比,来自红色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1 在 37°C 下 2 小时之后的 pH 稳定性曲线(残余活性),

[0039] 图 3 示出了与 10R 蛋白酶相比,来自红色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1 在 pH7.0 下对 Protazyme AK 的温度活性曲线,

[0040] 图 4 示出了与 10R 蛋白酶相比,来自红色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1 在 pH9.0 下对 10 种 Suc-AAPF-pNA 底物的 P1- 特异性,

[0041] 图 5 示出了与 10R 蛋白酶相比,来自红色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1 在 pH3.0、4.0、

5.0、6.0 以及 7.0(40℃) 下对大豆 - 玉米粉的 pH 活性。

[0042] 序列表综述

[0043] SEQ ID NO:1 是如从自红色糖多孢菌分离的 DNA 序列。

[0044] SEQ ID NO:2 是如从 SEQ ID NO:1 演绎的氨基酸序列。

[0045] SEQ ID NO:3 是用于重组产生来自红色糖多孢菌的 S1 蛋白酶 1 的合成 DNA 序列。

[0046] SEQ ID NO:4 是如从 SEQ ID NO:3 演绎的氨基酸序列。

[0047] SEQ ID NO:5 是来自红色糖多孢菌的成熟 S1 蛋白酶 1 的氨基酸序列。

[0048] SEQ ID NO:6 是迟缓芽孢杆菌分泌信号。

[0049] SEQ ID NO:7 是 10R 蛋白酶 (WO 05/035747, SEQ ID NO:1) 的 DNA 序列。

[0050] SEQ ID NO:8 是 10R 蛋白酶 (WO 05/035747, SEQ ID NO:2) 的氨基酸序列。

[0051] SEQ ID NO:9 是来自绿色糖单孢菌 (UNIPROT :C7MV18) 的丝氨酸蛋白酶的氨基酸序列。

[0052] SEQ ID NO:10 是来自链霉菌属 (UNIPROT :Q55353) 的丝氨酸蛋白酶的氨基酸序列。

[0053] SEQ ID NO:11 是来自新疆糖单孢菌 XJ-54 (UNIPROT :I0V8H8) 的丝氨酸蛋白酶的氨基酸序列。

[0054] SEQ ID NO:12 是来自深蓝糖单孢菌 NA-134 (UNIPROT :H5XEH4) 的丝氨酸蛋白酶的氨基酸序列。

[0055] SEQ ID NO:13 是来自弱代谢糖单孢菌 YIM90007 (UNIPROT :G4J6Q2) 的丝氨酸蛋白酶的氨基酸序列。

[0056] 序列的一致性矩阵

[0057]

	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:13
SEQ ID NO:2	100	95.2	100	48.5	63.2	56.5	61.1	62.6	63.4
SEQ ID NO:4	95.2	100	100	47.7	61.5	55.5	60.4	61.5	61.2
SEQ ID NO:5	100	100	100	58.3	80.7	70.4	79.6	79.0	76.1
SEQ ID NO:8	48.5	47.7	58.3	100	50.0	50.8	49.7	51.2	48.5
SEQ ID NO:9	63.2	61.5	80.7	50.0	100	54.9	73.8	73.3	70.1
SEQ ID NO:10	56.5	55.5	70.4	50.8	54.9	100	56.1	55.0	54.4
SEQ ID NO:11	61.1	60.4	79.6	49.7	73.8	56.1	100	89.4	73.1
SEQ ID NO:12	62.6	61.5	79.0	51.2	73.3	55.0	89.4	100	72.5
SEQ ID NO:13	63.4	61.2	76.1	48.5	70.1	54.4	73.1	72.5	100

[0058] 定义

[0059] 具有蛋白酶活性的多肽：具有蛋白酶活性的多肽、或蛋白酶有时还被指定为肽酶、肽酶、肽水解酶或蛋白水解酶。蛋白酶可以是在其任一端开始水解肽的外切型蛋白酶或在多肽链内部发挥作用的内切型蛋白酶（内肽酶）。内肽酶对 N- 和 C- 末端被封闭的肽底物显示出活性，该底物与所讨论的蛋白酶的特异性有关。

[0060] 本文将术语“蛋白酶”定义为水解肽键的酶。蛋白酶的定义也适用于如此处使用的术语“母体蛋白酶”和“蛋白酶变体”的蛋白酶部分。术语“蛋白酶”包含属于 EC3.4 酶组（包含其 13 个亚类中的每一个）的任何酶。该 EC 编号指的是酶命名法 (Enzyme Nomenclature), 1992 来自 NC-IUBMB, 学术出版社 (Academic Press), 圣地亚哥, 加利福尼亚, 包含增刊 1-5, 各自发表于欧洲生物化学杂志 (Eur. J. Bio-chem.) 1994, 223, 1-5; 欧洲生物化学杂志 1995, 232, 1-6; 欧洲生物化学杂志 1996, 237, 1-5; 欧洲生物化学杂志 1997, 250, 1-6; 以及欧洲生物化学杂志 1999, 264, 610-650。命名定期得以增补和更新; 参见例如万维网 (WWW) 于 <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme/index.html>。

[0061] 本发明提供了具有蛋白酶活性的多肽在动物饲料和洗涤剂组合物中的用途。本发明还提供了具有蛋白酶活性的多肽和编码这些多肽的多核苷酸。本发明的蛋白酶是 S1 肽酶家族的丝氨酸蛋白酶。本发明的蛋白酶展现了出人意料的 pH 特性, 尤其是 pH 稳定性特性, 这使得它们成为用于在动物饲料中使用的感兴趣的候选物。本发明的蛋白酶因此在从 pH4-11 的广范围内对 Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA 具有活性并且在范围 pH6-11 中展现尤其高的活性, 在从 pH3-7 的广生理 pH 范围内对饲料相关的大豆粉-玉米粉底物具有活性并且经受低至 2 的 pH2 小时后仍保留多于 80% 活性。

[0062] 本发明的和根据本发明使用的蛋白酶选自下组,该组由以下各项组成:

[0063] (a) 属于 EC3. 4. 21 酶组的蛋白酶;和/或

[0064] (b) S1 肽酶家族的丝氨酸蛋白酶;

[0065] 如在生物化学杂志 (Biochem. J.) 290:205-218(1993) 和在 MEROPS 蛋白酶数据库,发行 9.4(2011 年 1 月 31 日) (www.merops. ac. uk) 中所述的。该数据库描述于罗林斯 (Rawlings), N. D., 巴雷特 (Barrett), A. J. & 贝特曼 (Bateman), A. (2010) ‘MEROPS: 肽酶数据库 (MEROPS: the peptidase database)’, 核酸研究 (Nucleic Acids Res) 38, D227-D233 中。

[0066] 本发明的蛋白酶是内肽酶 (EC3. 4. 21)。存在若干蛋白酶活性类型:三种主要的活性类型是:胰蛋白酶样,其中存在 P1 处 Arg 或 Lys 后酰胺底物的切割;糜蛋白酶样,其中切割发生在 P1 处疏水性氨基酸中的一个之后;以及弹性蛋白酶样,在 P1 处 Ala 之后切割。

[0067] 本发明的这些多肽具有 SEQ ID NO:5 或 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:4 的成熟多肽的至少 20%,例如至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、以及至少 100%的蛋白酶活性。

[0068] 更确切地说,在本发明中使用的这些蛋白酶是在位置 P1 处优选疏水性芳香族氨基酸残基的那些。

[0069] 为了测定给定蛋白酶是否为丝氨酸蛋白酶和 S1 家族的蛋白酶,可参考上述手册和其中述及的原理。可对所有蛋白酶类型进行确定,而不论其是天然或野生型蛋白酶,还是经基因工程改造或合成的蛋白酶。

[0070] S1 家族的肽酶以该顺序含有催化三联体 His、Asp 和 Ser。该催化三联体的任意氨基酸的突变将导致酶活性的变化或损失。如从红色糖多孢菌 (SEQ ID NO:5) 分离的 S1 蛋白酶 1 的催化三联体的氨基酸可能是位置 His-35、Asp-63 和 Ser-144。

[0071] 可使用任何测定来测量蛋白酶活性,其中采用一种底物,该底物包含与所讨论的蛋白酶的特异性相关的肽键。pH 测定和温度测定同样适用于所讨论的蛋白酶。pH 值测定的实例是 pH2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、或 12。测定温度的实例是 15°C、20°C、25°C、30°C、35°C、37°C、40°C、45°C、50°C、55°C、60°C、65°C、70°C、80°C、90°C 或 95°C。普通蛋白酶底物的实例是酪蛋白、牛血清白蛋白以及血红蛋白。在经典的安森 (Anson) 和米尔斯基 (Mirsky) 方法中,将变性的血红蛋白用作底物并且在用所讨论的蛋白酶孵育测定后,确定三氯乙酸可溶的血红蛋白的量用作蛋白酶活性的量度 (安森 (Anson), M. L. 和米尔斯基 (Mirsky), A. E., 1932, 普通生理学杂志 (J. Gen. Physiol.) 16:59 以及安森 (Anson), M. L., 1938, 普通生理学杂志 (J. Gen. Physiol.) 22:79)。

[0072] 用于本发明的目的,使用描述于“材料与方法”中的测定确定蛋白酶活性,如动力学 Suc-AAPF-pNA 测定、Protazyme AK 测定、动力学 Suc-AAPX-pNA 测定以及邻苯二甲醛 (OPA)。对于 Protazyme AK 测定,当用该蛋白酶孵育时,不可溶 Protazyme AK (天青精-交联的酪蛋白) 底物释放蓝色并且确定该颜色作为蛋白酶活性的量度。对于 Suc-AAPF-pNA 测定,当用该蛋白酶孵育时,无色的 Suc-AAPF-pNA 底物释放黄色的对硝基苯胺并且确定该黄色作为蛋白酶活性的量度。

[0073] 等位基因变体:术语“等位基因变体”意思指占据同一染色体基因座的一个基因的两种或更多种替代形式中的任一种。等位基因变异由突变天然产生,并且可以导致群体内

的多态性。基因突变可以是沉默的（编码的多肽中无改变），或可以编码出具有改变的氨基酸序列的多肽。一种多肽的等位基因变体是由基因的等位基因变体编码的一种多肽。

[0074] cDNA：术语“cDNA”意思指可以通过得自真核细胞的，从成熟的、剪接的 mRNA 分子的反转录而制备的 DNA 分子。cDNA 缺乏内含子序列，这些序列可以存在于相应的基因组 DNA 中。早先的初始 RNA 转录本是 mRNA 的前体，其在呈现为成熟的剪接的 mRNA 之前要经一系列的步骤进行加工，包括剪接。

[0075] 编码序列：术语“编码序列”是指多核苷酸，其直接明确多肽的氨基酸序列。编码序列的边界通常由一个开放阅读框确定，通常始于 ATG 起始密码子或替代起始密码子如 GTG 和 TTG，并以终止密码子如 TAA、TAG、和 TGA 结束。编码序列可以是 DNA、cDNA、合成或重组多核苷酸。

[0076] 控制序列：术语“控制序列”意指表达编码本发明的多肽的多核苷酸所需的所有元件。每个控制序列对于编码该多肽的多核苷酸而言可以是天然的或外来的，或对于彼此而言是天然的或外来的。这类控制序列包含但不限于一个前导子、聚腺苷酸化序列、前肽序列、启动子、信号肽序列、以及转录终止子。至少，该控制序列包含一个启动子，以及转录和翻译终止信号。该控制序列可配备有接头，目的是引入特异性限制性位点，促进这些控制序列与编码多肽的多核苷酸的编码区域的连接。

[0077] 表达：术语“表达”包括在多肽的产生中涉及的任何步骤，包括但不限于，转录、转录后修饰、翻译、翻译后修饰、以及分泌。

[0078] 表达载体：术语“表达载体”是指包括编码多肽的多核苷酸并且可操作地与提供了其表达的额外的核苷酸相连接的线性或环状 DNA 分子。

[0079] 片段：术语“片段”意指使一个或多个（若干个）氨基酸从成熟多肽的氨基和 / 或羧基末端缺失的多肽，其中该片段具有蛋白酶活性。在一个方面，一个片段含有至少 169 个氨基酸残基（例如，SEQ ID NO:2 的氨基酸 10 至 178）或至少 179 个氨基酸残基（例如，SEQ ID NO:2 的氨基酸 5 至 183）；或相应地，对于 SEQ ID NO:4 而言，一个片段含有至少 169 个氨基酸残基（例如，SEQ ID NO:4 的氨基酸 10 至 178）或至少 179 个氨基酸残基（例如，SEQ ID NO:4 的氨基酸 5 至 183）；或相应地，对于 SEQ ID NO:5 而言，一个片段含有至少 169 个氨基酸残基（例如，SEQ ID NO:5 的氨基酸 10 至 178）或至少 179 个氨基酸残基（例如，SEQ ID NO:5 的氨基酸 5 至 183）。

[0080] 宿主细胞：术语“宿主细胞”意指容易被包含本发明的多核苷酸的核酸构建体或表达载体转化、转染、转导等等的任何细胞类型。术语“宿主细胞”包含母体细胞的与其不完全相同的任何子代，这种不同归因于发生在复制期间的突变。

[0081] 分离的多核苷酸：术语“分离的多核苷酸”意指被人工修饰的多核苷酸，相对于在自然中发现的多核苷酸。在一个方面，该分离的多核苷酸是至少 1% 纯的，例如至少 5% 纯的，更多至少 10% 纯的，至少 20% 纯的，至少 40% 纯的，至少 60% 纯的，至少 80% 纯的，至少 90% 纯的，以及至少 95% 纯的，如通过琼脂糖电泳所确定的。该多核苷酸可以是基因组、cDNA、RNA、半合成、合成来源的，或其任意组合。

[0082] 分离的多肽：术语“分离的多肽”意思指相对于在自然界中发现的那一多肽通过人工修饰的与其他组分如其他多肽、次级代谢产物、盐等掺合的多肽。在一个方面，该多肽是至少 1% 纯的，例如至少 5% 纯的，至少 10% 纯的，至少 20% 纯的，至少 40% 纯的，至少 60%

纯的,至少 80%纯的,以及至少 90%纯的,如通过 SDS-PAGE 所确定的。

[0083] 成熟多肽:术语“成熟多肽”意思指在翻译和任何翻译后修饰(如 N-端加工、C-端截短、糖基化、磷酸化等)之后处于其最终形式的多肽。在一个方面,基于还预测 SEQ ID NO:2 的 -183 至 -157 是一个信号肽的 SignalP(尼尔森(Nielsen)等人,1997,蛋白质工程(Protein Engineering)10:1-6)预测程序,该成熟多肽是 SEQ ID NO:2 的氨基酸 1 至 190。在另一方面,基于使用埃德曼(Edman)降解和整体分子量分析的测序,该成熟多肽是 SEQ ID NO:4 的氨基酸 1 至 190。SEQ ID NO:4 的氨基酸 -184 至 -157 是 Savinase 信号肽。本领域已知,宿主细胞可以产生由相同多核苷酸表达的两种或更多种不同的成熟多肽的混合物(即,具有不同的 C-末端和/或 N-末端氨基酸)。本领域还已知,不同的宿主细胞不同地加工多肽,并且因此一个表达一种多核苷酸的宿主细胞当与另一个表达相同多核苷酸的宿主细胞相比时可以产生一种不同的成熟多肽(例如,具有一个不同的 C-末端和/或 N-末端氨基酸)。

[0084] 成熟多肽编码序列:术语“成熟肽编码序列”意指编码一种具有蛋白酶活性的成熟多肽的多核苷酸。在一个方面,基于还预测 SEQ ID NO:1 的核苷酸 1 至 84 编码信号肽的 SignalP(尼尔森(Nielsen)等人,1997,蛋白质工程(Protein Engineering)10:1-6)预测程序,该成熟多肽编码序列是 SEQ ID NO:1 的核苷酸 553 至 1122。在另一方面,基于使用该成熟多肽的埃德曼降解和整体分子量分析的测序,该成熟多肽编码序列是 SEQ ID NO:3 的核苷酸 550 至 1119。SEQ ID NO:3 的核苷酸 1 至 81 编码 Savinase 信号肽。

[0085] 核酸构建体:术语“核酸构建体”意思指从天然存在的基因中分离的、或以自然界中不会另外出现的方式被修饰成包含核酸区段的、或合成的单链或双链的核酸分子。当核酸构建体包含表达本发明的编码序列所需的控制序列时,术语核酸构建体与术语“表达盒”同义。

[0086] 可操作地连接:术语“可操作地连接”意指如下构造,其中控制序列相对于多核苷酸的编码序列安置在适当位置处,这样使得控制序列指导编码序列的表达。

[0087] 序列一致性:用参数“序列一致性”来描述两个氨基酸序列之间或两个核苷酸序列之间的相关性。

[0088] 出于本发明的目的,使用尼德曼-翁施(Needleman-Wunsch)算法(尼德曼(Needleman)和翁施(Wunsch),1970,分子生物学杂志(J. Mol. Biol.)48:443-453)来确定两个氨基酸序列之间的序列一致性的程度,如在 EMBOSS 软件包(EMBOSS:欧洲分子生物学开放软件套件(The European Molecular Biology Open Software Suite),赖斯(Rice)等人,2000,遗传学趋势(Trends Genet.)16:276-277)(优选 3.0.0 版或更新版本)的尼德尔(Needle)程序中所实施的。所使用的这些任选参数是空位开放罚分 10、空位延伸罚分 0.5,及 EBLOSUM62(BLOSUM62 的 EMBOSS 版本)取代矩阵。尼德尔标注的“最长的一致性”的输出(使用 -非简化选项获得)被用作百分比一致性,并且如下计算:

[0089] $(\text{一致的残基} \times 100) / (\text{比对长度} - \text{比对中的空位总数})$

[0090] 出于本发明的目的,使用尼德曼-翁施算法(尼德曼(Needleman)和翁施(Wunsch),1970,见上文)来确定两个脱氧核糖核苷酸序列之间的序列一致性的程度,如在 EMBOSS 软件包(EMBOSS:欧洲分子生物学开放软件套件(The European Molecular Biology Open Software Suite),赖斯(Rice)等人,2000,见上文)(优选 3.0.0 版或更新版本)

的尼德尔程序中所实施的。使用的任选参数是空位开放罚分 10, 空位延伸罚分 0.5, 以及 EDNAFULL (NCBI NUC4.4 的 EMBOSS 版本) 取代矩阵。尼德尔标注的“最长的一致性”的输出 (使用 - 非简化选项获得) 被用作百分比一致性, 并且如下计算:

[0091] $(\text{一致的脱氧核糖核酸} \times 100) / (\text{比对长度} - \text{比对中的空位总数})$

[0092] 严谨度条件: 不同的严谨度条件定义如下。

[0093] 术语“非常低严谨度条件”意指对于长度为至少 100 个核苷酸的探针而言, 遵循标准 DNA 印迹 (Southern blotting) 程序, 在 42°C 下在 5X SSPE、0.3% SDS、200 微克/ml 剪切并变性的鲑鱼精子 DNA 和 25% 甲酰胺中预杂交和杂交 12 至 24 小时。在 45°C 使用 2X SSC, 0.2% SDS 将载体材料最终洗涤三次, 每次 15 分钟。

[0094] 术语“低严谨度条件”意指对于长度为至少 100 个核苷酸的探针而言, 遵循标准 DNA 印迹程序, 在 42°C 下在 5X SSPE、0.3% SDS、200 微克/ml 剪切并变性的鲑鱼精子 DNA 和 25% 甲酰胺中预杂交和杂交 12 至 24 小时。在 50°C 使用 2X SSC, 0.2% SDS 将载体材料最终洗涤三次, 每次 15 分钟。

[0095] 术语“中严谨度条件”意指对于长度为至少 100 个核苷酸的探针而言, 遵循标准 DNA 印迹程序, 在 42°C 下在 5X SSPE、0.3% SDS、200 微克/ml 剪切并变性的鲑鱼精子 DNA 和 35% 甲酰胺中预杂交和杂交 12 至 24 小时。在 55°C 使用 2X SSC, 0.2% SDS 将载体材料最终洗涤三次, 每次 15 分钟。

[0096] 术语“中 - 高严谨度条件”意指对于长度为至少 100 个核苷酸的探针而言, 遵循标准 DNA 印迹程序, 在 42°C 下在 5X SSPE、0.3% SDS、200 微克/ml 剪切并变性的鲑鱼精子 DNA 和 35% 甲酰胺中预杂交和杂交 12 至 24 小时。在 60°C 使用 2X SSC, 0.2% SDS 将载体材料最终洗涤三次, 每次 15 分钟。

[0097] 术语“高严谨度条件”意指对于长度为至少 100 个核苷酸的探针而言, 遵循标准 DNA 印迹程序, 在 42°C 下在 5X SSPE、0.3% SDS、200 微克/ml 剪切并变性的鲑鱼精子 DNA 和 50% 甲酰胺中预杂交和杂交 12 至 24 小时。在 65°C 使用 2X SSC, 0.2% SDS 将载体材料最终洗涤三次, 每次 15 分钟。

[0098] 术语“非常高严谨度条件”意指对于长度为至少 100 个核苷酸的探针而言, 遵循标准 DNA 印迹程序, 在 42°C 下在 5X SSPE、0.3% SDS、200 微克/ml 剪切并变性的鲑鱼精子 DNA 和 50% 甲酰胺中预杂交和杂交 12 至 24 小时。在 70°C 使用 2X SSC, 0.2% SDS 将载体材料最终洗涤三次, 每次 15 分钟。

[0099] 子序列: 术语“子序列”意指使一个或多个 (若干个) 核苷酸从成熟多肽编码序列的 5' 端和 / 或 3' 端缺失的多核苷酸, 其中该子序列编码具有蛋白酶活性的一个片段。在一个方面, 一个子序列含有至少 507 个核苷酸 (例如 SEQ ID NO:1 的核苷酸 580 至 1086), 或至少 537 个核苷酸 (例如 SEQ ID NO:1 的核苷酸 565 至 1101)。在另一个方面, 一个子序列含有至少 507 个核苷酸 (例如 SEQ ID NO:3 的核苷酸 577 至 1083), 或至少 537 个核苷酸 (例如 SEQ ID NO:3 的核苷酸 562 至 1098)。

[0100] 基本上纯的多核苷酸: 术语“基本上纯的多核苷酸”意指不含其他外部或不想要的核苷酸并且处在适用于基因工程化多肽生产系统内部的形式下的多核苷酸制剂。因而, 基本上纯的多核苷酸包含按重量计最多 10%、最多 8%、最多 6%、最多 5%、最多 4%、最多 3%、最多 2%、最多 1% 和最多 0.5% 与该多核苷酸天然或重组结合的其他多核苷酸物质。

然而,基本上纯的多核苷酸可以包含天然存在的 5' 和 3' 非翻译区,如启动子和终止子。优选地,该多核苷酸是按重量计至少 90% 纯的,例如至少 92% 纯的、至少 94% 纯的、至少 95% 纯的、至少 96% 纯的、至少 97% 纯的、至少 98% 纯的、至少 99% 纯的、以及至少 99.5% 纯的。本发明的多核苷酸优选地处于基本上纯的形式。

[0101] 基本上纯的多肽:术语“基本上纯的多肽”意指按重量计包含最多 10%、最多 8%、最多 6%、最多 5%、最多 4%、最多 3%、最多 2%、最多 1% 和最多 0.5% 与该多肽天然或重组结合的其他多肽物质的制剂。优选地,按在该制剂中存在的总多肽物质的重量计,该多肽是至少 92% 纯的,例如至少 94% 纯的、至少 95% 纯的、至少 96% 纯的、至少 97% 纯的、至少 98% 纯的、至少 99%、至少 99.5% 纯的、和 100% 纯的。本发明的多肽优选地处于基本上纯的形式。这可以例如通过熟知的重组方法或通过经典纯化方法制备该多肽来实现。

[0102] 变体:术语“变体”意思指具有蛋白酶活性并且与 SEQ ID NO:5 具有至少 85%,例如至少 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% 序列一致性,在一个或多个(若干个)位置处包含一个或多个(若干个)氨基酸残基的改变(即取代、插入和/或缺失)的多肽。取代意指将占据某个位置的氨基酸替换为不同的氨基酸;缺失意指去除占据 1-5 个位置的例如 1-5 个氨基酸残基;并且插入意指邻近占据某个位置的氨基酸添加例如 1-5 个氨基酸。本发明的这些变体具有 SEQ ID NO:5 的多肽的至少 20%、例如至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、或至少 100% 的蛋白酶活性。变体还可以是一种与 SEQ ID NO:5 具有至少 85%,例如至少 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%、或至少 99% 序列一致性的天然存在的蛋白酶。

[0103] 发明详细说明

[0104] 具有蛋白酶活性的多肽

[0105] 本发明涉及具有蛋白酶活性的分离的多肽在动物饲料或洗涤剂中的用途,这些分离的多肽选自下组,该组由以下各项组成:

[0106] (a) 与 SEQ ID NO:5 具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 序列一致性的多肽;

[0107] (b) 由在高严谨度条件、或非常高严谨度条件下与以下各项杂交的多核苷酸编码的多肽:

[0108] (i) SEQ ID NO:1 的成熟多肽编码序列;

[0109] (ii) SEQ ID NO:3 的成熟多肽编码序列;

[0110] (iii) (i) 或 (ii) 的全长互补链;

[0111] (c) 由与 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:3 的成熟多肽编码序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 序列一致性的多核苷酸编码的多肽;和/或

[0112] (d) 包含 SEQ ID NO:5 的一个或多个(若干个)氨基酸的取代、缺失和/或插入的变体;以及

[0113] (e) (a)、(b)、(c) 或 (d) 的多肽的一个片段,该片段具有蛋白酶活性。

[0114] 本发明涉及分离的多肽在动物饲料或洗涤剂中的用途,这些分离的多肽与 SEQ ID NO:2 的成熟多肽具有至少 80%,例如至少 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% 或 100% 序列一致性,这些分离的多肽具有蛋白酶活性。在一个方面,这些多肽与 SEQ ID NO:2 的成熟多肽相差不多于三十六个氨基酸,例如相差三十个氨基酸、相差二十五个氨基酸、相差二十个氨基酸、相差十五个氨基酸、相差十个氨基酸、相差九个氨基酸、相差八个氨基酸、相差七个氨基酸、相差六个氨基酸、相差五个氨基酸、相差四个氨基酸、相差三个氨基酸、相差两个氨基酸、以及相差一个氨基酸。

[0115] 本发明还涉及分离的多肽在动物饲料或洗涤剂中的用途,这些分离的多肽与 SEQ ID NO:4 的成熟多肽具有至少 80%,例如至少 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% 或 100% 序列一致性,这些分离的多肽具有蛋白酶活性。在一个方面,这些多肽与 SEQ ID NO:4 的成熟多肽相差不多于三十六个氨基酸,例如相差三十个氨基酸、相差二十五个氨基酸、相差二十个氨基酸、相差十五个氨基酸、相差十个氨基酸、相差九个氨基酸、相差八个氨基酸、相差七个氨基酸、相差六个氨基酸、相差五个氨基酸、相差四个氨基酸、相差三个氨基酸、相差两个氨基酸、以及相差一个氨基酸。

[0116] 本发明进一步涉及分离的多肽在动物饲料或洗涤剂中的用途,这些分离的多肽与 SEQ ID NO:5 的成熟多肽具有至少 80%,例如至少 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% 或 100% 序列一致性,这些分离的多肽具有蛋白酶活性。在一个方面,这些多肽与 SEQ ID NO:5 的成熟多肽相差不多于三十六个氨基酸,例如相差三十个氨基酸、相差二十五个氨基酸、相差二十个氨基酸、相差十五个氨基酸、相差十个氨基酸、相差九个氨基酸、相差八个氨基酸、相差七个氨基酸、相差六个氨基酸、相差五个氨基酸、相差四个氨基酸、相差三个氨基酸、相差两个氨基酸、以及相差一个氨基酸。

[0117] 本发明的一个实施例是用于在动物饲料或洗涤剂中使用的一种多肽或一种由多核苷酸编码的多肽,该多肽与 SEQ ID NO:5 的多肽具有至少 80% 序列一致性。

[0118] 本发明的一个实施例是用于在动物饲料或洗涤剂中使用的一种多肽或一种由多核苷酸编码的多肽,该多肽与 SEQ ID NO:5 的多肽具有至少 82% 序列一致性。

[0119] 本发明的一个实施例是用于在动物饲料或洗涤剂中使用的一种多肽或一种由多核苷酸编码的多肽,该多肽与 SEQ ID NO:5 的多肽具有至少 84% 序列一致性。

[0120] 本发明的一个实施例是用于在动物饲料或洗涤剂中使用的一种多肽或一种由多核苷酸编码的多肽,该多肽与 SEQ ID NO:5 的多肽具有至少 85% 序列一致性。

[0121] 本发明的一个实施例是用于在动物饲料或洗涤剂中使用的一种多肽或一种由多核苷酸编码的多肽,该多肽与 SEQ ID NO:5 的多肽具有至少 86% 序列一致性。

[0122] 本发明的一个实施例是用于在动物饲料或洗涤剂中使用的一种多肽或一种由多核苷酸编码的多肽,该多肽与 SEQ ID NO:5 的多肽具有至少 87% 序列一致性。

[0123] 本发明的一个实施例是用于在动物饲料或洗涤剂中使用的一种多肽或一种由多核苷酸编码的多肽,该多肽与 SEQ ID NO:5 的多肽具有至少 88% 序列一致性。

[0124] 本发明的一个实施例是用于在动物饲料或洗涤剂中使用的一种多肽或一种由多

核苷酸编码的多肽,该多肽与 SEQ ID NO:5 的多肽具有至少 89%序列一致性。

[0125] 本发明的一个实施例是用于在动物饲料或洗涤剂中使用的一种多肽或一种由多核苷酸编码的多肽,该多肽与 SEQ ID NO:5 的多肽具有至少 90%序列一致性。

[0126] 本发明的一个实施例是用于在动物饲料或洗涤剂中使用的一种多肽或一种由多核苷酸编码的多肽,该多肽与 SEQ ID NO:5 的多肽具有至少 91%序列一致性。

[0127] 本发明的一个实施例是用于在动物饲料或洗涤剂中使用的一种多肽或一种由多核苷酸编码的多肽,该多肽与 SEQ ID NO:5 的多肽具有至少 92%序列一致性。

[0128] 本发明的一个实施例是用于在动物饲料或洗涤剂中使用的一种多肽或一种由多核苷酸编码的多肽,该多肽与 SEQ ID NO:5 的多肽具有至少 93%序列一致性。

[0129] 本发明的一个实施例是用于在动物饲料或洗涤剂中使用的一种多肽或一种由多核苷酸编码的多肽,该多肽与 SEQ ID NO:5 的多肽具有至少 94%序列一致性。

[0130] 本发明的一个实施例是用于在动物饲料或洗涤剂中使用的一种多肽或一种由多核苷酸编码的多肽,该多肽与 SEQ ID NO:5 的多肽具有至少 95%序列一致性。

[0131] 本发明的一个实施例是用于在动物饲料或洗涤剂中使用的一种多肽或一种由多核苷酸编码的多肽,该多肽与 SEQ ID NO:5 的多肽具有至少 96%序列一致性。

[0132] 本发明的一个实施例是用于在动物饲料或洗涤剂中使用的一种多肽或一种由多核苷酸编码的多肽,该多肽与 SEQ ID NO:5 的多肽具有至少 97%序列一致性。

[0133] 本发明的一个实施例是用于在动物饲料或洗涤剂中使用的一种多肽或一种由多核苷酸编码的多肽,该多肽与 SEQ ID NO:5 的多肽具有至少 98%序列一致性。

[0134] 本发明的一个实施例是用于在动物饲料或洗涤剂中使用的一种多肽或一种由多核苷酸编码的多肽,该多肽与 SEQ ID NO:5 的多肽具有至少 99%序列一致性。

[0135] 本发明的一个实施例是用于在动物饲料或洗涤剂中使用的一种多肽或一种由多核苷酸编码的多肽,该多肽与 SEQ ID NO:5 的多肽具有 100%序列一致性。

[0136] 有待在本发明中使用的多肽优选地包含 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4 和 / 或 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列或其等位基因变体或由其组成;或是从 N 端和 / 或 C 端缺失例如 30、25、20、15、10 或 5 个氨基酸并具有蛋白酶活性的片段。在另一个方面,该多肽包含 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4 和 / 或 SEQ ID NO:5 或由其组成。在另一个优选的方面,该多肽包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸 1 至 190、SEQ ID NO:4 的氨基酸 1 至 190 和 / 或 SEQ ID NO:5 的氨基酸 1 至 190 或由其组成。

[0137] 本发明还涉及具有蛋白酶活性的分离的多肽,这些分离的多肽由多核苷酸编码,该多核苷酸在高严谨度条件或非常高严谨度条件下与 (i)SEQ ID NO:1 的成熟多肽编码序列、(ii)SEQ ID NO:3 的成熟多肽编码序列、或 (iii) (i) 或 (ii) 的全长互补链杂交 (J. 萨姆布鲁克 (Sambrook), E. F. 弗里奇 (Fritsch) 和 T. 马尼亚蒂斯 (Maniatis), 1989, 分子克隆实验手册 (Molecular Cloning, A Laboratory Manual), 第 2 版, 冷泉港, 纽约)。

[0138] SEQ ID NO:1 和 / 或 SEQ ID NO:3 的多核苷酸或其子序列以及 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4 和 / 或 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列或其片段可以用于设计核酸探针,用以根据本领域中众所周知的方法从不同属或种的菌株中鉴定并且克隆出编码具有蛋白酶活性的多肽的 DNA。具体而言,这类探针可以用于按照标准 DNA 印迹程序与感兴趣的属或种的基因组或 cDNA 杂交,以便鉴定并分离其中的相应基因。这类探针可以明显短于完整序列,但是长

度应为至少 14, 例如至少 25、至少 35、或至少 70 个核苷酸。优选地, 该核酸探针的长度为至少 100 个核苷酸, 例如长度为至少 200 个核苷酸、至少 300 个核苷酸、至少 400 个核苷酸、至少 500 个核苷酸、至少 600 个核苷酸、至少 700 个核苷酸、至少 800 个核苷酸、或至少 900 个核苷酸。DNA 和 RNA 探针二者均可使用。典型地将探针进行标记 (例如, 用 ^{32}P 、 ^3H 、 ^{35}S 、生物素或抗生物素蛋白), 以检测相对应的基因。这类探针涵盖于本发明中。

[0139] 可以筛选从这类其他菌株制备的基因组 DNA 或 cDNA 文库的与上述探针杂交并编码具有蛋白酶活性的多肽的 DNA。来自这类其他菌株的基因组或其他 DNA 可以通过琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳, 或其他分离技术来分离。来自文库的 DNA 或分离的 DNA 可转移到并固定在硝酸纤维素或其他适合的载体材料上。为了鉴定与 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:3 同源的克隆或 DNA 或其子序列, 优选地在 DNA 印迹中使用载体材料。

[0140] 出于本发明的目的, 杂交表示多核苷酸在高至非常高严谨度条件下与标记的核酸探针杂交, 该标记的核酸探针对应于 SEQ ID NO:1 的成熟多肽编码序列; SEQ ID NO:3 的成熟多肽编码序列; 其全长互补链; 或其子序列。在这些条件下, 核酸探针杂交的分子可以使用例如 X 射线胶片而进行检测。

[0141] 在一个方面, 该核酸探针是 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:3 的成熟多肽编码序列。在另一个方面, 该核酸探针是其片段。在另一个方面, 该核酸探针是编码 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4 和 / 或 SEQ ID NO:5 的多肽或其片段的多核苷酸。在另一个优选的方面, 该核酸探针是 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:3。

[0142] 对于长度为至少 100 个核苷酸的长探针而言, 高至非常高严谨度条件定义为最佳地按照标准 DNA 印迹程序, 在 42°C 下在 5X SSPE、0.3% SDS、200 微克 /ml 剪切并变性的鲑鱼精子 DNA 中, 以及对于非常低和低严谨度在 25% 甲酰胺中, 对于中和中 - 高严谨度在 35% 甲酰胺中, 或对于高和非常高严谨度在 50% 甲酰胺中预杂交和杂交 12 至 24 小时。在 65°C (高严谨度) 和在 70°C (非常高严谨度) 使用 2X SSC、0.2% SDS 将载体材料最终洗涤三次, 每次 15 分钟。

[0143] 对于长度为约 15 个核苷酸至约 70 个核苷酸的短的探针而言, 严谨度条件被定义为最佳地按照标准 DNA 印迹程序, 在比使用根据博尔顿 (Bolton) 和麦卡锡 (McCarthy) (1962, 美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 48:1390) 的计算计算的 T_m 低约 5°C 至约 10°C 下, 在 0.9M NaCl、0.09M Tris-HCl (pH7.6)、6mM EDTA、0.5% NP-40、1X 登哈特氏溶液 (Denhardt's solution)、1mM 焦磷酸钠、1mM 磷酸二氢钠、0.1mM ATP、以及每 ml 0.2mg 的酵母 RNA 中预杂交和杂交 12 至 24 小时。最后将载体材料在计算的 T_m 以下 5°C 至 10°C , 在 6X SSC 加 0.1% SDS 中洗涤 1 次持续 15 分钟并且使用 6X SSC 洗涤 2 次, 每次 15 分钟。

[0144] 本发明还涉及分离的多肽在动物饲料或洗涤剂中的用途, 这些分离的多肽具有蛋白酶活性, 由与 SEQ ID NO:1 的成熟多肽编码序列具有至少 80%, 例如至少 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% 或 100% 序列一致性的多核苷酸编码。

[0145] 本发明进一步涉及分离的多肽在动物饲料或洗涤剂中的用途, 这些分离的多肽具有蛋白酶活性, 由与 SEQ ID NO:3 的成熟多肽编码序列具有至少 80%, 例如至少 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% 或 100% 序列一致性的多核苷酸编码。

[0146] 在具体实施例中,本发明和根据本发明使用的母体蛋白酶和 / 或蛋白酶变体选自下组,该组由以下各项组成:

[0147] (a) 属于 EC3. 4. 21. 酶组的蛋白酶;以及

[0148] (b) S1 肽酶家族的丝氨酸蛋白酶;如在生物化学杂志 (Biochem. J.) 290:205-218(1993) 和在 MEROPS 蛋白酶数据库,发行 9. 5 (www.merops. ac. uk) 中所述的。该数据库描述于罗林斯 (Rawlings), N. D., 巴雷特 (Barrett), A. J. & 贝特曼 (Bateman), A. (2010) MEROPS: 肽酶数据库 (MEROPS: the peptidase database). 核酸研究 (Nucleic Acids Res) 38, D227-D233 中。

[0149] 为了测定给定蛋白酶是否为丝氨酸蛋白酶和 S1 家族的蛋白酶,可参考上述手册和其中述及的原理。可对所有蛋白酶类型进行确定,而不论其是天然或野生型蛋白酶,还是经基因工程改造或合成的蛋白酶。

[0150] 本发明还涉及具有蛋白酶活性并且与 SEQ ID NO:5 具有至少 85%,例如至少 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% 或至少 99% 序列一致性、包含 SEQ ID NO:5 或其同源序列的至少一个或多个(若干个)氨基酸的至少一个取代、缺失和 / 或插入的变体多肽。

[0151] 在一个实施例中,本发明的变体多肽可以与 SEQ ID NO:5 具有至少 86% 序列一致性。

[0152] 在一个实施例中,本发明的变体多肽可以与 SEQ ID NO:5 具有至少 87% 序列一致性。

[0153] 在一个实施例中,本发明的变体多肽可以与 SEQ ID NO:5 具有至少 88% 序列一致性。

[0154] 在一个实施例中,本发明的变体多肽可以与 SEQ ID NO:5 具有至少 89% 序列一致性。

[0155] 在一个实施例中,本发明的变体多肽可以与 SEQ ID NO:5 具有至少 90% 序列一致性。

[0156] 在一个实施例中,本发明的变体多肽可以与 SEQ ID NO:5 具有至少 91% 序列一致性。

[0157] 在一个实施例中,本发明的变体多肽可以与 SEQ ID NO:5 具有至少 92% 序列一致性。

[0158] 在一个实施例中,本发明的变体多肽可以与 SEQ ID NO:5 具有至少 93% 序列一致性。

[0159] 在一个实施例中,本发明的变体多肽可以与 SEQ ID NO:5 具有至少 94% 序列一致性。

[0160] 在一个实施例中,本发明的变体多肽可以与 SEQ ID NO:5 具有至少 95% 序列一致性。

[0161] 在一个实施例中,本发明的变体多肽可以与 SEQ ID NO:5 具有至少 96% 序列一致性。

[0162] 在一个实施例中,本发明的变体多肽可以与 SEQ ID NO:5 具有至少 97% 序列一致性。

[0163] 在一个实施例中,本发明的变体多肽可以与 SEQ ID NO:5 具有至少 98% 序列一致性。

[0164] 在一个实施例中,本发明的变体多肽可以与 SEQ ID NO:5 具有至少 99% 序列一致性。

[0165] 在另一实施例中,具有氨基酸取代、缺失和 / 或插入的本发明的变体多肽 (SEQ ID NO:5) 的位置总数不多于 27, 例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26 或 27。氨基酸变化可以是一种次要性质的变化, 即并不显著影响蛋白质的折叠和 / 或活性的保守氨基酸取代或插入; 典型地具有一个到约 30 个氨基酸的小缺失; 小氨基 - 或羧基 - 末端延伸, 如一种氨基 - 末端蛋氨酸残基; 具有至多约 20-25 个残基的一种小连接肽; 或通过改变净电荷促进纯化或另一种功能的一种小延伸, 如一种聚组氨酸段、一种抗原表位或一种结合域。

[0166] 在另一个实施例中, 本发明还涉及用于在动物饲料或洗涤剂中使用的变体, 这些变体包含 SEQ ID NO:2 或其同源序列的一个或多个 (或若干个) 氨基酸取代、缺失和 / 或插入。在 SEQ ID NO:2 中具有氨基酸取代、缺失和 / 或插入的位置总数不多于 36, 例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35 或 36。氨基酸变化可以是一种次要性质的变化, 即并不显著影响蛋白质的折叠和 / 或活性的保守氨基酸取代或插入; 典型地具有一个到约 30 个氨基酸的小缺失; 小氨基 - 或羧基 - 末端延伸, 如一种氨基 - 末端蛋氨酸残基; 具有至多约 20-25 个残基的一种小连接肽; 或通过改变净电荷促进纯化或另一种功能的一种小延伸, 如一种聚组氨酸段、一种抗原表位或一种结合域。

[0167] 在另一个实施例中, 本发明还涉及用于在动物饲料或洗涤剂中使用的变体, 这些变体包含 SEQ ID NO:4 或其同源序列的一个或多个 (或若干个) 氨基酸取代、缺失和 / 或插入。在 SEQ ID NO:4 中具有氨基酸取代、缺失和 / 或插入的位置总数不多于 36, 例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35 或 36。氨基酸变化可以是一种次要性质的变化, 即并不显著影响蛋白质的折叠和 / 或活性的保守氨基酸取代或插入; 典型地具有一个到约 30 个氨基酸的小缺失; 小氨基 - 或羧基 - 末端延伸, 如一种氨基 - 末端蛋氨酸残基; 具有至多约 20-25 个残基的一种小连接肽; 或通过改变净电荷促进纯化或另一种功能的一种小延伸, 如一种聚组氨酸段、一种抗原表位或一种结合域。

[0168] 在另一个实施例中, 本发明还涉及用于在动物饲料或洗涤剂中使用的变体, 这些变体包含 SEQ ID NO:5 或其同源序列的一个或多个 (或若干个) 氨基酸取代、缺失和 / 或插入。在 SEQ ID NO:5 中具有氨基酸取代、缺失和 / 或插入的位置总数不多于 36, 例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35 或 36。氨基酸变化可以是一种次要性质的变化, 即并不显著影响蛋白质的折叠和 / 或活性的保守氨基酸取代或插入; 典型地具有一个到约 30 个氨基酸的小缺失; 小

氨基-或羧基-末端延伸,如一种氨基-末端蛋氨酸残基;具有至多约 20-25 个残基的一种小连接肽;或通过改变净电荷促进纯化或另一种功能的一种小延伸,如一种聚组氨酸段、一种抗原表位或一种结合域。

[0169] 保守取代的实例是在碱性氨基酸(精氨酸、赖氨酸及组氨酸)、酸性氨基酸(谷氨酸和天冬氨酸)、极性氨基酸(谷氨酰胺和天冬酰胺)、疏水性氨基酸(亮氨酸、异亮氨酸及缬氨酸)、芳香族氨基酸(苯丙氨酸、色氨酸及酪氨酸)及小氨基酸(甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸及甲硫氨酸)的组内。一般不改变比活性的氨基酸取代是本领域中已知的,并且(例如)由 H. 纽拉特(Neurath)和 R.L. 希尔(Hill),1979 年在蛋白(The Proteins)(学术出版社(Academic Press),纽约(New York))中描述。最常发生的交换是 Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Tyr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu、以及 Asp/Gly。

[0170] 可替代地,氨基酸改变具有改变多肽的物理化学特性的这样一种性质。例如,氨基酸改变可以改善多肽的热稳定性、改变底物特异性、改变 pH 最佳值等。一种母体多肽中的必需氨基酸可以根据本领域中已知的程序来识别,如定点诱变或丙氨酸扫描诱变(坎宁安(Cunningham)和韦尔斯(Wells),1989,科学(Science)244:1081-1085)。在后一种技术中,将单个丙氨酸突变在分子中的每个残基处引入,并且对所产生的突变体分子测试蛋白酶活性以鉴定对该分子活性至关重要的氨基酸残基。还参见,希尔顿(Hilton)等人,1996,生物化学杂志(J. Biol. Chem.)271:4699-4708。酶的活性位点或其他生物学相互作用也可以通过对其结构进行物理学分析来确定,如通过此类技术如核磁共振、结晶学、电子衍射、或光亲和标记,与假定接触位点氨基酸的突变相结合所确定的。参见,例如,德弗斯(de Vos)等人,1992,科学(Science)255:306-312;史密斯(Smith)等人,1992,分子生物学杂志(J. Mol. Biol.)224:899-904;乌乐达维尔(Wlodaver)等人,1992,欧洲生化学会联合会快报(FEBS Lett.)309:59-64。还可以从与母体多肽相关的多肽的一致性分析推断必需氨基酸的一致性。

[0171] 可以做出单个或多个氨基酸取代、缺失和/或插入并且使用诱变、重组和/或改组的已知方法进行测试,随后进行相关筛选程序,如由里德哈尔-奥尔森(Reidhaar-Olson)和萨奥尔(Sauer),1988,科学(Science)241:53-57;博维(Bowie)和萨奥尔,1989,美国国家科学院院刊(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)86:2152-2156;WO 95/17413;或 WO 95/22625 披露的那些。其他可以使用的方法包含易错 PCR、噬菌体展示(例如洛曼(Lowman)等人,1991,生物化学(Biochemistry)30:10832-10837;美国专利号 5,223,409;WO 92/06204)以及区域定向诱变(德比什尔(Derbyshire)等人,1986,基因(Gene)46:145;内尔(Ner)等人,1988,DNA7:127)。

[0172] 诱变/改组方法可以与高通量、自动筛选方法组合以检测由宿主细胞表达的克隆、诱变的多肽的活性(内丝(Ness)等人,1999,自然生物技术(Nature Biotechnology)17:893-896)。编码活性多肽的诱变的 DNA 分子可以回收自宿主细胞,并且使用本领域的标准方法对其进行迅速测序。这些方法允许迅速确定多肽中单个氨基酸残基的重要性。

[0173] 该多肽可以是杂合多肽,其中一种多肽的一部分在另一种多肽的一部分的 N-末端或 -C 末端处融合。

[0174] 该多肽还可以是融合多肽或可切割的融合多肽,其中另一种多肽在本发明的多肽

的 N- 末端或 C- 末端处融合。通过将编码另一种多肽的多核苷酸与本发明多核苷酸融合而产生融合多肽。产生融合多肽的技术是本领域中已知的, 并且包含连接编码多肽的编码序列, 以使得它们同框, 并且融合多肽的表达受到相同的一种或多种启动子和终止子的控制。融合蛋白还可以使用内蛋白技术构建, 其中融合在翻译后产生 (库珀 (Cooper) 等人, 1993, 欧洲分子生物学学会杂志 (EMBO J.) 12:2575-2583 ;道森 (Dawson) 等人, 1994, 科学 266:776-779)。

[0175] 融合多肽可以进一步包含两个多肽之间的一个切割位点。在融合蛋白分泌之后, 该位点被切割, 从而释放出这两个多肽。切割位点的实例包含但不限于在以下披露的位点: 马丁 (Martin) 等人, 2003, 工业微生物学与生物技术杂志 (J. Ind. Microbiol. Biotechnol.) 3:568-576 ; 斯韦蒂娜 (Svetina) 等人, 2000, 生物技术杂志 (J. Biotechnol.) 76:245-251 ; 罗斯默森 - 威尔森 (Rasmussen-Wilson) 等人, 1997, 应用与环境微生物学 (Appl. Environ. Microbiol.) 63:3488-3493 ; 沃德 (Ward) 等人, 1995, 生物技术 (Biotechnology) 13:498-503 ; 以及孔特雷拉斯 (Contreras) 等人, 1991, 生物技术 9:378-381 ; 伊顿 (Eaton) 等人, 1986, 生物化学 (Biochemistry) 25:505-512 ; 柯林斯 - 雷西 (Collins-Racie) 等人, 1995, 生物技术 13:982-987 ; 卡特 (Carter) 等人, 1989, 蛋白: 结构、功能与遗传学 (Proteins: Structure, Function, and Genetics) 6:240-248 ; 以及史蒂文斯 (Stevens), 2003, 世界药物发现 (Drug Discovery World) 4:35-48。

[0176] 实施方式

[0177] 在本发明的某些实施例中, 本发明的蛋白酶展现了有益的热特性如热稳定性、蒸汽稳定性等, 和 / 或有益的 pH 特性如酸稳定性、pH 最佳值等。

[0178] 本发明的一个实施例是与蛋白酶 10R 相比在 25°C 下, 在 pH6 与 9 之间, 例如在 pH6 下、例如在 pH8 下、例如在 pH9 下, 具有改善的蛋白酶活性的用于在动物饲料和洗涤剂中使用的分离的多肽。

[0179] 本发明的另一实施例是与蛋白酶 10R 相比在 37°C 下, 在 pH2 下或在 pH11 下, 具有改善的稳定性的用于在动物饲料和洗涤剂中使用的分离的多肽。

[0180] 本发明的另一个实施例是与蛋白酶 10R 相比在 40°C 下, 在 pH3.0 与 7.0 之间, 例如在 pH5.0 与 pH7.0 之间, 例如在 pH5.0、6.0 或 7.0 下, 对大豆 - 玉米粉具有改善的蛋白酶活性的用于在动物饲料和洗涤剂中使用的分离的多肽。

[0181] 本发明的另一实施例是当与空白相比时, 在 3 小时后具有改善的表示为作物中伯胺的水平肉仔鸡消化物的蛋白水解活性的用于在动物饲料和洗涤剂中使用的分离的多肽。

[0182] 酸度 / 碱度特性

[0183] 在本发明的某些实施例中, 本发明的蛋白酶展现了关于 pH 的有益的特性, 如酸稳定性、pH 最佳值等。该蛋白酶在一个低的 pH 下的稳定性是有益的, 这样一来该蛋白酶可以在穿越胃之后在肠中具有活性。在本发明的一个实施例中, 该蛋白酶在 pH2 下 2 小时之后保持了 >95% 的活性, 如使用实例 3 中所述的方法确定的。

[0184] pH- 活性特性

[0185] 可以如在实例 3 中所述确定该蛋白酶的 pH- 活性曲线。在 pH6-8 下的活性对于蛋白质在动物的肠中的消化可以是有利的。

[0186] 在一个实施例中,本发明包含在 25℃下,当与蛋白酶在 pH10 下的活性相比时,具有在 pH8 下的相对活性为 0.7 或更高的 pH- 活性曲线的用于在动物饲料中使用的蛋白酶(比较实例 3)。

[0187] 热稳定性

[0188] 可如在实例 6 中所述确定热稳定性,即使用 DSC 测量来确定经纯化的蛋白酶蛋白的变性温度 (T_d)。 T_d 指示了该蛋白的热稳定性: T_d 越高,热稳定性越高。因此,在一个优选的实施例中,本发明的蛋白酶具有一个 T_d ,该 T_d 高于参照蛋白酶的 T_d ,其中该 T_d 是在经纯化的蛋白酶样品(优选地具有至少 90%或 95%的纯度,如通过 SDS-PAGE 确定的)上确定的。

[0189] 在优选实施例中,如通过残余活性,变性温度 T_d 所提供的这些热特性(例如加热稳定性、温度稳定性、热稳定性、蒸汽稳定性和/或造丸稳定性),或本发明的蛋白酶的其他参数高于 SEQ ID NO:5 的蛋白酶的相应的值(如残余活性或 T_d),更优选地是它的至少 101%,或者它的至少 102%、103%、104%、105%、106%、107%、108%、109%、或至少 110%。甚至更优选地,本发明的蛋白酶的参数(如残余活性或 T_d)的值是 SEQ ID NO:5 的蛋白酶的值的至少 120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、或至少 190%。

[0190] 在仍另外的具体实施例中,本发明的热稳定蛋白酶具有至少 50℃的熔化温度 T_m (或变性温度 T_d),如使用实例 10(即在 20mM 乙酸钠, pH 值 4.0)中所述的差示扫描量热法(DSC)所确定的。在仍另外的具体实施例中,该 T_m 是至少 51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 或至少 100℃。

[0191] 蒸汽稳定性

[0192] 蒸汽稳定性可以如在实例 7 中所述的通过确定在 85℃或 90℃下蒸汽处理一个短的时间之后蛋白酶分子的残余活性来确定。

[0193] 造丸稳定性

[0194] 造丸稳定性可如在实例 8 中所述的通过使用与饲料预混合的酶颗粒来确定。由该混合器用蒸汽将该饲料调节至 95℃。在调节之后,将该饲料加压成丸并确定残余活性。

[0195] 具有蛋白酶活性的多肽的来源

[0196] 可以从任何属的微生物获得具有蛋白酶活性且有待根据本发明而使用的多肽。为了本发明的目标,结合给定来源,如在此使用,术语“获得自”应指由该来源或由其中已经插入来自该来源的多核苷酸的株系产生的多核苷酸编码的多肽。在一个方面中,获得自给定来源的多肽被分泌到细胞外。

[0197] 该多肽可以是细菌多肽。例如,该多肽可以是具有蛋白酶活性的来自例如放线菌门内的一种革兰氏阳性细菌或来自例如变形菌门内的一种革兰氏阴性细菌的多肽。

[0198] 在一个方面,该多肽是来自放线菌纲,例如来自放线菌目,或来自假诺卡氏菌亚目(Pseudonocardineae),或来自假诺卡氏菌科(Pseudonocardiaceae),或来自糖多孢菌属,或来自红色糖多孢菌种的细菌的蛋白酶。

[0199] 将理解的是,对于以上提到的物种而言,本发明涵盖完全状态和不完全状态(perfect and imperfect states)二者、以及其他分类学等效物,例如无性型,而不管它们已知的物种名称是什么。本领域的普通技术人员将容易地识别适当等效物的身份。

[0200] 这些分类单元的菌株可以容易地在许多培养物保藏中心为公众所获得,如美国典型培养物保藏中心(ATCC)、德国微生物菌种保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ)、荷兰菌种保藏中心(Centraalbureau Voor Schimmelcultures, CBS)、以及美国农业研究菌种保藏中心北方地区研究中心(NRRL)。

[0201] 可以使用上述探针,鉴定多肽并从其他来源包含从自然界(例如,土壤、堆肥、水,等等)分离的微生物获得该多肽。用于从自然生境分离微生物的技术是本领域熟知的。随后可以通过类似地筛选另一种微生物的基因组或cDNA文库或混合DNA样品获得编码该多肽的多核苷酸。一旦用这种或这些探针检测到编码一种多肽的多核苷酸,就可以通过使用本领域普通技术人员众所周知的的技术分离或克隆该多核苷酸(参见,例如,萨姆布鲁克(Sambrook)等人,1989,见上文)。

[0202] 多核苷酸

[0203] 本发明还涉及编码本发明的多肽且用于重组产生该多肽的分离的多核苷酸。

[0204] 用来分离或克隆编码多肽的多核苷酸的技术是本领域已知的,并且包含从基因组DNA分离、从cDNA制备或其组合。可以例如通过使用熟知的聚合酶链反应(PCR)或表达文库的抗体筛选来检测具有共有结构特征的克隆DNA片段,实现从这样的基因组DNA克隆多核苷酸。参见例如,伊尼斯(Innis)等人,1990,PCR:方法和应用指南(PCR:A Guide to Methods and Application),学术出版社,纽约。可以使用其他核酸扩增程序例如连接酶链式反应(LCR)、连接激活转录(LAT)和基于多核苷酸的扩增(NASBA)。可以从糖多孢菌属菌株或来自放线菌目的另一种或相关生物中克隆多核苷酸,并且因此,例如可以是多核苷酸的多肽编码区的等位基因变体或物种变体。

[0205] 本发明还涉及包含与SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列具有至少80%,例如至少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%的序列一致性程度(其条件是它与SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列不100%相同)并且编码具有蛋白酶活性的多肽的多核苷酸或由其组成的分离的多核苷酸。

[0206] 本发明进一步涉及与SEQ ID NO:3的成熟多肽编码序列具有至少80%,例如至少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%或100%的序列一致性程度的多核苷酸或由其组成的分离的多核苷酸,这些分离的多核苷酸编码具有蛋白酶活性的多肽。

[0207] 修饰编码本发明多肽的多核苷酸对于合成与该多肽基本上相似的多肽可能是必需的。术语“基本上类似”于该多肽是指该多肽的非天然发生的形式。这些多肽可能以某种工程化方式而不同于从其天然来源分离的多肽,例如在比活性、热稳定性、pH最佳值等方面不同的变体。该变体可以基于以SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3的成熟多肽编码序列(例如其子序列)形式呈现的多核苷酸,和/或通过引入不会改变该多肽的氨基酸序列,但对应于预定用于产生该酶的宿主有机体的密码子用法的核苷酸取代,或通过引入可能产生不同氨基酸序列的核苷酸取代来构建。对于核苷酸取代的一般描述,参见例如福德(Ford)等人,1991,蛋白表达与纯化(Protein Expression and Purification)2:95-107。

[0208] 本发明还涉及编码本发明的多肽的分离的多核苷酸,这些分离的多核苷酸在高严谨度条件或非常高严谨度条件下与 (i) SEQ ID NO:1 的成熟多肽编码序列、(ii) SEQ ID NO:3 的成熟多肽编码序列、(iii) 包含 SEQ ID NO:1 的成熟多肽编码序列的基因组 DNA 序列、(iv) 包含 SEQ ID NO:3 的成熟多肽编码序列的基因组 DNA 序列、或 (v) (i)、(ii)、(iii) 或 (iv) 的全长互补链杂交;或如在此所定义的其等位基因变体和子序列(萨姆布鲁克(Sambrook)等人,1989,见上文)。

[0209] 在一个方面,该多核苷酸包含 SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:3 的成熟多肽编码序列,编码具有蛋白酶活性的 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:5 的片段的 SEQ ID NO:1 的子序列,或编码具有蛋白酶活性的 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:5 的片段的 SEQ ID NO:3 的子序列,例如 SEQ ID NO:3 的核苷酸 550 至 1119 的多核苷酸,或由其组成。

[0210] 核酸构建体

[0211] 本发明还涉及包含与一个或多个(若干个)控制序列可操作地连接的本发明多核苷酸的核酸构建体,其中该控制序列指导编码序列在适合的宿主细胞中在与该控制序列相容的条件下的表达。

[0212] 多核苷酸可以按各种方式操纵以提供该多肽的表达。取决于表达载体,在其插入载体以前操纵多核苷酸可以是希望的或必需的。用于利用重组 DNA 方法修饰多核苷酸的技术是本领域熟知的。

[0213] 控制序列可以是启动子序列,由宿主细胞识别的多核苷酸,用于表达编码本发明的多肽的多核苷酸。启动子序列包含介导多肽表达的转录控制序列。启动子可以是在选择的宿主细胞中示出转录活性的任何多核苷酸,包含突变的、截短的和杂交的启动子,并且可以获得自编码细胞外或细胞内多肽的基因,对于宿主细胞而言,是同源的亦或异源的。

[0214] 用于在细菌宿主细胞中指导本发明的核酸构建体转录的适合启动子的实例是从以下获得的启动子:解淀粉芽孢杆菌 α -淀粉酶基因(amyQ)、地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶基因(amyL)、地衣芽孢杆菌青霉素酶基因(penP)、嗜热脂肪芽孢杆菌产麦芽淀粉酶基因(amyM)、枯草芽孢杆菌果聚糖蔗糖酶基因(sacB)、枯草芽孢杆菌 xy1A 和 xy1B 基因、大肠杆菌 lac 操纵子、天蓝链霉菌琼脂糖酶基因(dagA)、以及原核 β -内酰胺酶基因(维拉-科马罗夫(Villa-Kamaroff)等人,1978,美国国家科学院院刊(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)75:3727-3731),以及 tac 启动子(德波尔(DeBoer)等人,1983,美国国家科学院院刊(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)80:21-25)。另外的启动子描述于吉尔伯特(Gilbert)等人,1980,科学美国人(Scientific American)242:74-94 中的“来自重组细菌的有用蛋白”(“Useful proteins from recombinant bacteria”)、以及萨姆布鲁克(Sambrook)等人,1989,见上文。

[0215] 用于在丝状真菌宿主细胞中指导本发明的核酸构建体转录的适合启动子的实例是从以下基因获得的启动子:构巢曲霉乙酰胺酶、黑曲霉中性 α -淀粉酶、黑曲霉酸稳定性 α -淀粉酶、黑曲霉或泡盛曲霉葡糖淀粉酶(g1aA)、米曲霉 TAKA 淀粉酶、米曲霉碱性蛋白酶、米曲霉丙糖磷酸异构酶、尖镰孢胰蛋白酶样蛋白酶(WO 96/00787)、镶片镰孢淀粉葡糖苷酶(WO 00/56900)、镶片镰孢 Daria(WO 00/56900)、镶片镰孢 Quinn(WO 00/56900)、曼赫根毛霉(Rhizomucor miehei)脂肪酶、曼赫根毛霉天冬氨酸蛋白酶、里氏木霉 β -葡糖苷酶、里氏木霉纤维二糖水解酶 I、里氏木霉纤维二糖水解酶 II、里氏木霉内切葡聚糖酶 I、

里氏木霉内切葡聚糖酶 II、里氏木霉内切葡聚糖酶 III、里氏木霉内切葡聚糖酶 IV、里氏木霉内切葡聚糖酶 V、里氏木霉木聚糖酶 I、里氏木霉木聚糖酶 II、里氏木霉 β -木糖苷酶、以及 NA2-tpi 启动子（一种修饰的启动子，包含曲霉中一种编码中性 α -淀粉酶的基因，其中未翻译的前导子由来自曲霉中一种编码丙糖磷酸异构酶的基因的未翻译的前导子替代；非限制性实例包含修饰的启动子，包含来自黑曲霉中编码中性 α -淀粉酶的基因，其中未翻译的前导子由来自构巢曲霉或米曲霉中编码丙糖磷酸异构酶的基因的未翻译的前导子替代）；及其突变的、截短的、以及杂合的启动子。

[0216] 在酵母宿主中，有用的启动子获得自以下各项的基因：酿酒酵母烯醇酶 (ENO-1)、酿酒酵母半乳糖激酶 (GAL1)、酿酒酵母醇去氢酶 / 甘油醛-3 磷酸去氢酶 (ADH1、ADH2/GAP)、酿酒酵母丙糖磷酸异构酶 (TPI)、酿酒酵母金属硫蛋白 (CUP1)、以及酿酒酵母 3-磷酸甘油酸激酶。用于酵母宿主细胞的其他有用的启动子由罗马努斯 (Romanos) 等人, 1992, 酵母 (Yeast) 8:423-488 描述。

[0217] 控制序列还可以是由宿主细胞识别以终止转录的适合的转录终止子序列。该终止子序列可操作地连接至编码该多肽的多核苷酸的 3'-末端。在选择宿主细胞中有功能的任何终止子可以用于本发明中。

[0218] 丝状真菌宿主细胞的优选终止子是从以下各项的基因中获得的：构巢曲霉邻氨基苯甲酸合酶、黑曲霉葡糖淀粉酶、黑曲霉 α -葡萄糖苷酶、米曲霉 TAKA 淀粉酶以及尖孢镰刀菌胰蛋白酶样蛋白酶。

[0219] 酵母宿主细胞的优选终止子是从以下各项的基因中获得的：酿酒酵母烯醇酶、酿酒酵母细胞色素 C (CYC1)、以及酿酒酵母甘油醛-3-磷酸去氢酶。用于酵母宿主细胞的其他有用的终止子由罗马努斯等人, 1992, 见上文描述。

[0220] 控制序列还可以是一个适合的前导序列，当被转录时是对于通过宿主细胞来翻译而言重要的 mRNA 的一个非翻译区。该前导序列可操作地连接至编码该多肽的多核苷酸的 5'-末端。可以使用在选择宿主细胞中具有功能的任何前导序列。

[0221] 用于丝状真菌宿主细胞的优选前导子从以下基因获得：米曲霉 TAKA 淀粉酶和构巢曲霉丙糖磷酸异构酶。

[0222] 酵母宿主细胞的适合的前导子是从以下各项的基因中获得的：酿酒酵母烯醇酶 (ENO-1)、酿酒酵母 3-磷酸甘油酸激酶、酿酒酵母 α -因子、和酿酒酵母醇去氢酶 / 甘油醛-3-磷酸去氢酶 (ADH2/GAP)。

[0223] 控制序列还可以是一种多腺苷酸化序列，可操作地连接至该多核苷酸的 3'-末端并且当转录时由宿主细胞识别为将多腺苷酸残基添加至所转录的 mRNA 的信号的序列。可以使用在选择宿主细胞中具有功能的任何多腺苷酸化序列。

[0224] 丝状真菌宿主细胞的优选的多腺苷酸化序列是从以下各项的基因中获得的：米曲霉 TAKA 淀粉酶、黑曲霉葡糖淀粉酶、构巢曲霉邻氨基苯甲酸合酶、尖孢镰刀菌胰蛋白酶样蛋白酶、和黑曲霉 α -葡萄糖苷酶。

[0225] 用于酵母宿主细胞的有用的聚腺苷酸化序列由郭 (Guo) 和舍曼 (Sherman), 1995, 分子细胞生物学 (Mol. Cellular Biol.) 15:5983-5990 描述。

[0226] 控制序列还可以是编码连接至多肽的 N-末端的信号肽并指导该多肽进入细胞的分泌途径的信号肽编码区域。该多核苷酸的编码序列的 5'-端可以固有地包含在翻译读码

框内与编码该多肽的编码序列的区段天然地连接的信号肽编码序列。可替代地,编码序列的 5'-端可以包含对编码序列是外源的信号肽编码序列。在编码序列不天然地包含信号肽编码序列的情况下,可能需要外来信号肽编码序列。可替代地,外来信号肽编码序列可以单纯地替代天然信号肽编码序列以便增强多肽的分泌。然而,可以使用指导表达的多肽进入选择的宿主细胞的分泌途径中的任何信号肽编码序列。

[0227] 用于细菌宿主细胞的有效信号肽编码序列是从以下基因获得的信号肽编码序列:芽孢杆菌属 NCIB 11837 产麦芽糖淀粉酶、地衣芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶、地衣芽孢杆菌 β -内酰胺酶、嗜热脂肪芽孢杆菌 α -淀粉酶、嗜热脂肪芽孢杆菌中性蛋白酶 (nprT、nprS、nprM)、以及枯草芽孢杆菌 prsA。另外的信号肽由西蒙 (Simonen) 和帕夫拉 (Palva), 1993, 微生物学综述 (Microbiological Reviews) 57:109-137 描述。

[0228] 用于丝状真菌宿主细胞的有效信号肽编码序列是从以下基因获得的信号肽编码序列:黑曲霉中性淀粉酶、黑曲霉葡糖淀粉酶、米曲霉 TAKA 淀粉酶、特异腐质霉纤维素酶、特异腐质霉内切葡聚糖酶 V、疏棉状腐质霉脂肪酶、以及曼赫根毛霉天冬氨酸蛋白酶。

[0229] 用于酵母宿主细胞的有用的信号肽是从酿酒酵母 α 因子和酿酒酵母转化酶的基因获得。其它有用的信号肽编码序列由罗马努斯等人, 1992, 见上文描述。

[0230] 控制序列还可以是编码位于多肽的 N-末端的前肽的前肽编码序列。生成的多肽被称为前体酶或多肽原(或者在一些情况下被称为酶原)。多肽原一般是无活性的并且可以通过从该多肽原上催化切割或自动催化切割前肽而被转化成一种活性多肽。前肽编码序列可以从以下基因获得:枯草芽孢杆菌碱性蛋白酶 (aprE)、枯草芽孢杆菌中性蛋白酶 (nprT)、嗜热毁丝霉漆酶 (WO 95/33836)、曼赫根毛霉天冬氨酸蛋白酶、以及酿酒酵母 α 因子。

[0231] 在多肽的 N-末端处信号肽序列和前肽序列都存在的情况下,前肽序列定位成紧邻多肽的 N-末端并且信号肽序列定位成紧邻前肽序列的 N-末端。

[0232] 也可能令人希望的是添加调节序列,该调节序列允许相对于宿主细胞的生长而调节多肽的表达。调节系统的实例是引起将响应于化学或物理刺激(包含调节性化合物的存在)而开启或关闭的基因表达的那些系统。原核系统中的调节序列包含 lac、tac、以及 trp 操纵基因系统。在酵母中,可以使用 ADH2 系统或 GAL1 系统。在丝状真菌中,可以使用黑曲霉葡糖淀粉酶启动子、米曲霉 TAKA α -淀粉酶启动子及米曲霉葡糖淀粉酶启动子。调节序列的其他实例是允许基因扩增的那些序列。在真核系统中,这些调节序列包含在氨甲蝶呤的存在下扩增的二氢叶酸还原酶基因、以及以重金属扩增的金属硫蛋白基因。在这些情况下,编码该多肽的多核苷酸将与调节序列可操作地连接。

[0233] 表达载体

[0234] 本发明还涉及包含本发明的多核苷酸、启动子、以及转录和翻译终止信号的重组表达载体。各种核苷酸和控制序列可以连接在一起以产生重组表达载体,该重组表达载体可以包含一个或多个(若干个)合宜的限制性位点以允许在这样的位点插入或置换编码多肽的多核苷酸。可替代地,通过将该多核苷酸或者包含该序列的核酸构建体插入到用于表达的适当载体中可以表达该多核苷酸。在产生表达载体时,该编码序列是位于该载体中,由此使该编码序列与该供表达的适当控制序列可操作地连接。

[0235] 重组表达载体可以是任何载体(例如,质粒或病毒),其能够方便地进行重组 DNA

程序,并且能够引起多核苷酸的表达。载体的选择将典型地取决于载体与该载体待引入其中的宿主细胞的相容性。该载体可以是一种线性的或闭合的环状质粒。

[0236] 载体可以是自主复制载体,即,作为染色体外实体存在的载体,其复制独立于染色体复制,例如,质粒、染色体外元件、微染色体、或人工染色体。该载体可以包含用于确保自我复制任何装置。可替代地,该载体可以是这样一种载体,当它被引入该宿主细胞中时,被整合到基因组中并且与其中已整合了它的一个或多个染色体一起复制。此外,可以使用单一载体或质粒、或两个或更多个载体或质粒(这些载体或质粒共同包含了有待引入到宿主细胞的基因组中的总 DNA)、或转座子。

[0237] 载体优选地包含允许便于选择转化细胞、转染细胞、转导细胞等的一个或多个(若干个)选择性标记。选择性标记是基因,其产物提供杀生物剂或病毒抗性、对重金属的抗性、对营养缺陷型的原养性等。

[0238] 细菌选择性标记的实例是来自枯草芽孢杆菌或地衣芽孢杆菌的 *daI* 基因,或赋予抗生素抗性(例如氨基青霉素、氯霉素、卡那霉素、或四环素抗性)的标记。酵母宿主细胞的适合的标记是 *ADE2*、*HIS3*、*LEU2*、*LYS2*、*MET3*、*TRP1*、以及 *URA3*。用于在一个丝状真菌宿主细胞中使用的选择性标记包含但不限于 *amdS*(乙酰胺酶)、*argB*(鸟氨酸氨甲酰基转移酶)、*bar*(草胺膦乙酰转移酶)、*hph*(潮霉素磷酸转移酶)、*niaD*(硝酸还原酶)、*pyrG*(乳清苷-5'-磷酸脱羧酶)、*sC*(硫酸腺苷基转移酶)和 *trpC*(邻氨基苯甲酸合酶)及其等效物。优选用于曲霉细胞中的是构巢曲霉或米曲霉的 *amdS* 和 *pyrG* 基因以及吸水链霉菌的 *bar* 基因。

[0239] 载体优选包含其允许载体整合到宿主细胞的基因组中或载体在细胞中独立于基因组自主复制的一个或多个元件。

[0240] 对于整合到该宿主细胞基因组中,该载体可以依靠编码该多肽的多核苷酸序列或者通过同源或非同源重组整合到该基因组中的该载体的任何其他元件。作为替代方案,该载体可以包含引导通过同源重组而整合到宿主细胞基因组中一个或多个染色体中的一个或多个精确位置处的另外的多核苷酸。为了增加在精确位置处整合的可能性,这些整合的元件应包含足够数量的核酸,例如 100 至 10,000 个碱基对、400 至 10,000 个碱基对、以及 800 至 10,000 个碱基对,这些碱基对与对应的靶序列具有高度的序列一致性以提高同源重组的可能性。这些整合元件可以是与宿主细胞的基因组内的靶序列同源的任何序列。此外,这些整合元件可以是非编码多核苷酸或编码多核苷酸。另一方面,通过非同源重组可以将该载体整合到该宿主细胞的基因组内。

[0241] 对于自主复制,该载体可以进一步包含使该载体能够在所讨论的宿主细胞内进行自主复制的复制起点。复制起点可以是在细胞内起作用的介导自主复制的任何质粒复制因子。术语“复制起点”或“质粒复制子”意指能够使质粒或载体在体内复制的多核苷酸。

[0242] 细菌复制起点的实例是允许在大肠杆菌中复制的质粒 *pBR322*、*pUC19*、*pACYC177*、以及 *pACYC184* 的复制起点,以及允许在芽孢杆菌中复制的质粒 *pUB110*、*pE194*、*pTA1060*、以及 *pAM β 1* 的复制起点。

[0243] 用于酵母宿主细胞的复制起点的实例是 2 微米复制起点,*ARS1*、*ARS4*、*ARS1* 和 *CEN3* 的组合、以及 *ARS4* 和 *CEN6* 的组合。

[0244] 适用于丝状真菌细胞的复制起点的实例是 *AMA1* 和 *ANS1*(格姆斯(Gems))等

人,1991,基因 (Gene)98:61-67;卡伦 (Cullen) 等人,1987,核酸研究 (Nucleic Acids Res.)15:9163-9175;WO 00/24883)。根据 WO 00/24883 中披露的方法可以实现 AMA1 基因的分离和包含该基因的质粒或载体的构建。

[0245] 可以将本发明的多核苷酸的多于一个的拷贝插入到宿主细胞中以增加多肽的产生。通过将序列的至少一个额外的拷贝整合到宿主细胞基因组中或者通过包含一个可扩增的选择性标记基因与该多核苷酸可以获得增加的多核苷酸拷贝数目,其中通过在适当选择性试剂存在下培养细胞可以选择包含扩增的选择性标记基因拷贝和由此额外的多核苷酸拷贝的细胞。

[0246] 用于连接上述元件以构建本发明的重组表达载体的程序是本领域技术人员熟知的(参见,例如,萨姆布鲁克等人,1989,见上文)。

[0247] 宿主细胞

[0248] 本发明还涉及重组宿主细胞,该重组宿主细胞包含与指导本发明多肽产生的一个或多个(若干个)控制序列可操作地连接的本发明多核苷酸。将包含多核苷酸的构建体或载体引入到宿主细胞中,这样使得该构建体或载体被维持作为染色体整合体或作为自主复制的染色体外载体,如早前所描述。术语“宿主细胞”涵盖由于复制期间发生的突变与亲本细胞不同的亲本细胞的任何后代。宿主细胞的选择在很大程度上取决于编码该多肽的基因及其来源。

[0249] 该宿主细胞可以是适用于重组产生本发明的多肽的任何细胞,例如原核细胞或真核细胞。

[0250] 原核宿主细胞可以是任何革兰氏阳性或革兰氏阴性细菌。革兰氏阳性细菌包含但不限于:芽孢杆菌属、短芽孢杆菌属、梭菌属、土芽孢杆菌属、乳杆菌属、乳球菌属、类芽孢杆菌属、以及链霉菌属。革兰氏阴性细菌包含但不限于大肠杆菌和假单胞菌属。

[0251] 细菌宿主细胞可以是任何芽孢杆菌目细胞,包含但不限于解淀粉芽孢杆菌、短短芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、克劳氏芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、嗜热脂肪土芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌以及苏云金芽孢杆菌细胞。特别优选的宿主细胞是迟缓芽孢杆菌细胞。

[0252] 细菌宿主细胞还可以是任何链霉菌属细胞,包含但不限于产色链霉菌、阿维链霉菌、天蓝色链霉菌、灰色链霉菌以及变铅青链霉菌细胞。

[0253] 可以例如通过原生质体转化(参见,例如常 (Chang) 和科恩 (Cohen),1979,分子遗传学与普通遗传学 (Mol. Gen. Genet.)168:111-115)、通过使用感受态细胞(参见,例如杨 (Young) 和斯皮宰曾 (Spizizen),1961,细菌学杂志 (J. Bacteriol.)81:823-829,或杜博楠 (Dubnau) 和大卫多夫-阿贝尔森 (Davidoff-Abelson),1971,分子生物学杂志 (J. Mol. Biol.)56:209-221)、通过电穿孔(参见,例如茂川 (Shigekawa) 和道尔 (Dower),1988,生物技术 (Biotechniques)6:742-751) 或通过接合(参见,例如克勒 (Koehler) 和索恩 (Thorne),1987,细菌学杂志 (J. Bacteriol.)169:5271-5278) 实现将 DNA 引入到芽孢杆菌属细胞之中。可以例如通过原生质体转化(参见,例如哈那汗 (Hanahan),1983,分子生物学杂志 (J. Mol. Biol.)166:557-580) 或电穿孔(见,例如道尔等人,1988,核酸研究 (Nucleic Acids Res.)16:6127-6145)) 实现将 DNA 引入到大肠杆菌细胞之中。可以例如通过原生质体转化和电穿孔(参见,例如贡 (Gong) 等人,2004,微生物学报 (Folia Microbiol.) (布

拉格 (Praha) 49:399-405)、通过接合 (参见,例如马卓德 (Mazodier) 等人,1989,细菌学杂志 (J. Bacteriol.) 171:3583-3585) 或通过转导 (参见,例如伯克 (Burke) 等人,2001,美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 98:6289-6294) 实现将 DNA 引入到链霉菌属细胞之中。可以例如通过电穿孔 (参见,例如崔 (Choi) 等人,2006,微生物学方法杂志 (J. Microbiol. Methods) 64:391-397) 或通过结合 (参见,例如皮内多 (Pinedo) 和斯梅茨 (Smets),2005,应用与环境微生物学 (Appl. Environ. Microbiol.) 71:51-57) 实现将 DNA 引入到假单胞菌属细胞之中。可以例如通过天然感受态 (参见,例如佩里 (Perry) 和藏满 (Kuramitsu),1981,传染与免疫 (Infect. Immun.) 32:1295-1297)、通过原生质体转化 (参见,例如卡特 (Catt) 和约里克 (Jollick),1991,微生物 (Microbios) 68:189-207)、通过电穿孔 (参见,例如布克莱 (Buckley) 等人,1999,应用与环境微生物学 (Appl. Environ. Microbiol.) 65:3800-3804) 或通过接合 (参见,例如克莱怀尔 (Clewel),1981,微生物学综述 (Microbiol. Rev.) 45:409-436) 实现向链球菌属细胞中引入 DNA。然而,可以使用在本领域已知的任何方法将 DNA 引入到宿主细胞中。

[0254] 该宿主细胞还可以是真核细胞,例如哺乳动物、昆虫、植物、或真菌细胞。

[0255] 该宿主细胞可以是真菌细胞。如在此所用的“真菌”包含子囊菌门、担子菌门、壶菌门和接合菌门 (如霍克斯沃思 (Hawksworth) 等人在安-倍氏菌物辞典 (Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi), 第 8 版,1995,国际 CAB, 大学出版社, 剑桥 (Cambridge), 英国中所定义的) 以及卵菌门 (Oomycota) (如在霍克斯沃思 (Hawksworth) 等人,1995,见上文,第 171 页中所引用的) 和所有有丝分裂孢子真菌 (霍克斯沃思 (Hawksworth) 等人,1995,见上文)。

[0256] 该真菌宿主细胞可以是一个酵母细胞。如在此所使用的“酵母”包含产子囊酵母 (ascosporogenous yeast) (内孢霉目 (Endomycetales))、产担子酵母 (basidiosporogenous yeast)、以及属于不完全真菌 (Fungi Imperfecti) (芽生菌目 (Blastomycetes)) 的酵母。由于酵母的分类在将来可能改变,用于本发明的目的,酵母应如在酵母生物学与活性 (Biology and Activities of Yeast) (斯金纳 (Skinner), F. A., 帕斯莫尔 (Passmore), S. M. 和达文波特 (Davenport), R. R. 编著,应用细菌学研讨会系列第 9 期 (Soc. App. Bacteriol. Symposium Series No. 9), 1980) 中所述进行定义。

[0257] 酵母宿主细胞可以是假丝酵母属 (Candida)、汉逊酵母属 (Hansenula)、克鲁维酵母属 (Kluyveromyces)、毕赤酵母属 (Pichia)、酵母属 (Saccharomyces)、裂殖酵母属 (Schizosaccharomyces)、或者亚罗酵母属 (Yarrowia) 细胞,例如一种乳酸克鲁维酵母 (Kluyveromyces lactis)、卡尔斯伯酵母 (Saccharomyces carlsbergensis)、酿酒酵母、糖化酵母 (Saccharomyces diastaticus)、道格拉氏酵母 (Saccharomyces douglasii)、克鲁维氏酵母 (Saccharomyces kluyveri)、诺地酵母 (Saccharomyces norbensis)、卵形酵母 (Saccharomyces oviformis)、或解脂耶氏酵母 (Yarrowia lipolytica) 细胞。

[0258] 该真菌宿主细胞可以是一个丝状真菌细胞。“丝状真菌”包含真菌门 (Eumycota) 和卵菌门的亚门 (如由霍克斯沃思等人,1995,见上文所定义) 的所有丝状形式。丝状真菌通常的特征在于由壳多糖、纤维素、葡聚糖、壳聚糖、甘露聚糖、以及其他复杂多糖构成的菌丝体壁。营养生长是通过菌丝延长,而碳分解代谢是专性需氧的。相反,酵母 (如酿酒酵母) 的营养生长是通过单细胞菌体的出芽 (budding), 而碳分解代谢可以是发酵的。

[0259] 丝状真菌宿主细胞可以是枝顶孢属 (*Acremonium*)、曲霉菌属、短梗霉属 (*Aureobasidium*)、烟管菌属 (*Bjerkandera*)、拟蜡菌属 (*Ceriporiopsis*)、金孢子菌属 (*Chrysosporium*)、鬼伞属 (*Coprinus*)、革盖菌属 (*Coriolus*)、隐球菌属 (*Cryptococcus*)、网孢菌属 (*Filibasidium*)、镰刀菌属 (*Fusarium*)、腐质霉属 (*Humicola*)、稻瘟病菌属 (*Magnaporthe*)、毛霉菌 (*Mucor*)、毁丝霉属 (*Myceliophthora*)、新美鞭菌属 (*Neocallimastix*)、脉孢菌属 (*Neurospora*)、拟青霉属 (*Paecilomyces*)、青霉菌属 (*Penicillium*)、平革菌属 (*Phanerochaete*)、白腐菌属 (*Phlebia*)、梨囊鞭菌属 (*Piromyces*)、侧耳属 (*Pleurotus*)、裂褶菌属 (*Schizophyllum*)、踝节菌属 (*Talaromyces*)、嗜热子囊菌属 (*Thermoascus*)、梭孢壳属 (*Thielavia*)、弯颈霉属 (*Tolyposcladium*)、栓菌属 (*Trametes*)、或木霉属 (*Trichoderma*) 细胞。

[0260] 例如, 丝状真菌宿主细胞可以是泡盛曲霉 (*Aspergillus awamori*)、臭曲霉 (*Aspergillus foetidus*)、烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*)、日本曲霉 (*Aspergillus japonicus*)、构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、米曲霉 (*Aspergillus oryzae*)、黑刺烟管菌 (*Bjerkandera adusta*)、干拟蜡菌 (*Ceriporiopsis aneirina*)、*Ceriporiopsis caregiea*、*Ceriporiopsis gilvescens*、*Ceriporiopsis pannocinta*、*Ceriporiopsis rivulosa*、*Ceriporiopsis subrufa*、虫拟腊菌 (*Ceriporiopsis subvermisporea*)、*Chrysosporium inops*、嗜角质金孢子菌 (*Chrysosporium keratinophilum*)、*Chrysosporium lucknowense*、*Chrysosporium merdarium*、毡金孢子菌 (*Chrysosporium pannicola*)、*Chrysosporium queenslandicum*、热带金孢子菌 (*Chrysosporium tropicum*)、*Chrysosporium zonatum*、灰盖鬼伞 (*Coprinus cinereus*)、毛革盖菌 (*Coriolus hirsutus*)、杆孢状镰孢 (*Fusarium bactridioides*)、禾谷镰孢 (*Fusarium cerealis*)、库威镰孢 (*Fusarium crookwellense*)、大刀镰孢 (*Fusarium culmorum*)、禾本科镰孢 (*Fusarium graminearum*)、禾赤镰孢 (*Fusarium graminum*)、异孢镰孢 (*Fusarium heterosporum*)、合欢木镰孢 (*Fusarium negundi*)、尖镰孢 (*Fusarium oxysporum*)、多枝镰孢 (*Fusarium reticulatum*)、粉红镰孢 (*Fusarium roseum*)、接骨木镰孢 (*Fusarium sambucinum*)、肤色镰孢 (*Fusarium sarcochroum*)、拟分枝孢镰孢 (*Fusarium sporotrichioides*)、硫色镰孢 (*Fusarium sulphureum*)、圆镰孢 (*Fusarium torulosum*)、拟丝孢镰孢 (*Fusarium trichothecioides*)、镶片镰孢 (*Fusarium venenatum*)、特异腐质霉 (*Humicola insolens*)、疏棉状腐质霉 (*Humicola lanuginosa*)、米黑毛霉 (*Mucor miehei*)、嗜热毁丝霉 (*Myceliophthora thermophila*)、粗糙链孢霉 (*Neurospora crassa*)、产紫青霉 (*Penicillium purpurogenum*)、黄孢平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*)、福射射脉菌 (*Phlebia radiata*)、刺芹侧耳 (*Pleurotus eryngii*)、土生梭孢霉 (*Thielavia terrestris*)、长绒毛栓菌 (*Trametes villosa*)、变色栓菌 (*Trametes versicolor*)、哈茨木霉 (*Trichoderma harzianum*)、康宁木霉 (*Trichoderma koningii*)、长枝木霉 (*Trichoderma longibrachiatum*)、里氏木霉 (*Trichoderma reesei*)、或绿色木霉 (*Trichoderma viride*) 细胞。

[0261] 可以将真菌细胞通过涉及原生质体形成、原生质体转化、以及细胞壁再生的方法以本身已知的方式转化。用于转化曲霉属和木霉属宿主细胞的适合程序在 EP 238023 和约尔顿 (Yelton) 等人, 1984, 美国国家科学院院刊 (*Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA)81:1470-1474 中描述。用于转化镰孢属物种的适合方法由马拉迪尔 (Malardier) 等人,1989,基因 (Gene)78:147-156、以及 WO 96/00787 描述。可以使用由如以下文献描述的程序转化酵母:贝克尔 (Becker) 和瓜伦特 (Guarente),在阿贝尔森 (Abelson), J. N. 和西蒙 (Simon), M. I. 编,酵母遗传学与分子生物学指南,酶学方法 (Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology), 第 194 卷,第 182-187 页,学术出版社有限公司 (Academic Press, Inc.), 纽约;伊藤 (Ito) 等人,1983,细菌学杂志 (J. Bacteriol.) 153:163;以及哈尼恩 (Hinnen) 等人,1978,美国科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 75:1920。

[0262] 产生方法

[0263] 本发明还涉及产生本发明多肽的方法,该方法包含:(a) 在有益于产生该多肽的条件下培养一种细胞,该细胞以其野生型形式产生该多肽;并且 (b) 回收该多肽。在一个方面,该细胞属于糖多孢菌属。在一个更优选的方面,该细胞是红色糖多孢菌细胞。

[0264] 红色糖多孢菌的染色体 DNA 可以如奥林利克 (Oliynyk) 等人,产生红霉素的细菌红色糖多孢菌 NRRL23338 的全基因组序列 (Complete genome sequence of the erythromycin-producing bacterium *Saccharopolyspora erythraea* NRRL23338), 自然生物技术 (Nat Biotechnol), 25:447-453 (2007) 中所指示的分离。这一 DNA 可以用于重组产生有待根据本发明而使用的蛋白酶。

[0265] 本发明还涉及产生本发明多肽的方法,该方法包含:(a) 在有益于产生该多肽的条件下培养本发明的重组宿主细胞;并且 (b) 回收该多肽。

[0266] 使用本领域熟知的方法,在适合产生该多肽的营养培养基中培养宿主细胞。例如,可以通过在适合的培养基中和在允许表达和/或分离该多肽的条件下,在实验室或工业发酵罐中,进行摇瓶培养、以及小规模或大规模发酵(包含连续,分批,补料分批,或固态发酵)来培养细胞。该培养是使用本领域中已知的程序,在一种适合营养培养基中发生,该培养基包含碳和氮来源及无机盐。适合的培养基可从商业供应商获得或可以根据公开的组成(例如,在美国典型培养物保藏中心的目录中)制备。如果多肽分泌到该营养培养基中,那么可直接从培养基中直接回收多肽。如果多肽不分泌,那么其可从细胞裂解液中进行回收。

[0267] 在上面的部分以及以下关于“核酸构建体、表达载体、重组宿主细胞和用于生产蛋白酶的方法”的部分中提供了更多的细节。

[0268] 该多肽可以使用本领域中已知的特定用于这些多肽的方法进行检测。这些检测方法可以包含使用特异抗体、形成酶产物、或酶底物的消失。例如,可以使用酶测定来确定该多肽的活性。

[0269] 可以使用本领域已知的方法来回收多肽。例如,可以通过常规程序,包含,但不局限于离心、过滤、提取、喷雾干燥、蒸发、或沉淀,从营养培养基中回收该多肽。

[0270] 可以通过本领域已知的多种方法纯化该多肽,该方法包含但不限于色谱法(例如,离子交换色谱法、亲和色谱法、疏水色谱法、聚焦色谱法和大小排阻色谱法)、电泳方法(例如,制备性等电聚焦)、差异性溶解(例如,硫酸铵沉淀)、SDS-PAGE 或提取(参见,例如,蛋白纯化 (Protein Purification), 编者 J. -C. 詹森 (Janson) 和拉尔斯赖登 (Lars Ryden), VCH 出版公司,纽约,1989), 以便获得基本上纯的多肽。

[0271] 在替代性方面,不回收多肽,而是使用表达多肽的本发明宿主细胞作为多肽的来

源。

[0272] 植物

[0273] 本发明还涉及植物,例如,转基因植物、植物部分、或植物细胞,其包含本发明的分离的多核苷酸,以便以可回收的量表达和产生该多肽。该多肽可以从植物或植物部分回收。可替代地,可以按原样将包含该多肽的植物或植物部分用于改善食品或饲料的质量,例如,改善营养价值、适口性、以及流变性质,或用以破坏抗营养因子。

[0274] 转基因植物可以是双子叶的(双子叶植物)或单子叶的(单子叶植物)。单子叶植物的实例是草,如草地早熟禾(meadow grass)(蓝草(blue grass),早熟禾属(Poa));饲用牧草(forage grass),如羊茅属(Festuca)、黑麦草属(Lolium);温带草(temperate grass),如翦股颖属(Agrostis);以及谷类,例如,小麦、燕麦、黑麦、大麦、稻、高粱、以及玉蜀黍(玉米)。

[0275] 双子叶植物的实例是烟草、豆类(如羽扇豆(lupins)、马铃薯、糖甜菜(sugar beet)、豌豆、豆(bean)和大豆(soybean))、以及十字花科植物(十字花科(family Brassicaceae))(如花椰菜、油菜籽、以及紧密相关的模式生物拟南芥)。

[0276] 植物部分的实例是茎、愈伤组织、叶、根、果实、种子、以及块茎、以及包含这些部分的独立组织,例如,表皮、叶肉、薄壁组织(parenchyme)、维管组织、分生组织。特定植物细胞区室,如叶绿体、质外体(apoplast)、线粒体、液泡、过氧化物酶体以及细胞质也被认为是植物部分。此外,任何植物细胞,无论是何种组织来源,都被认为是植物部分。同样地,植物部分,如分离以促进本发明的利用的特定组织和细胞也被认为是植物部分,例如胚、胚乳、糊粉层和种皮。

[0277] 同样包含于本发明范围内的是这些植物、植物部分和植物细胞的后代。

[0278] 表达多肽的转基因植物或植物细胞可以根据本领域已知的方法构建。简而言之,通过如下方法构建该植物或植物细胞:将编码多肽的一个或多个(若干个)表达构建体并入到植物宿主基因组或叶绿体基因组中,并且使所得的修饰植物或植物细胞繁殖为转基因植物或植物细胞。

[0279] 表达构建体宜为包含编码多肽的多核苷酸的核酸构建体,该多核苷酸与在选择的植物或植物部分中表达该多核苷酸所需的适当的调节序列可操作地连接。此外,表达构建体可以包含对于鉴定植物细胞有用的选择性标记,在这些宿主细胞中整合了表达构建体并将该构建体引入所讨论的植物中所必需的DNA序列(后者取决于使用的DNA引入方法)。

[0280] 调节序列(如启动子和终止子序列以及任选地信号或转运序列)的选择(例如)基于期望何时、何处以及如何表达多肽而确定。例如,编码多肽的基因的表达可以是组成性的或可诱导的,或可以为发育、阶段或组织特异性的,并且可以使基因产物靶向特定组织或植物部分,例如种子或叶。调节序列由例如塔格(Tague)等人,1988,植物生理学(Plant Physiology)86:506描述。

[0281] 对于组成型表达,可以使用35S-CaMV、玉米泛素1、和稻肌动蛋白1启动子(弗兰克(Franck)等人,1980,细胞(Cell)21:285-294;克里斯滕森(Christensen)等人,1992,植物分子生物学(Plant Mol. Biol.)18:675-689;张(Zhang)等人,1991,植物细胞(Plant Cell)3:1155-1165)。器官特异性启动子可以是例如:来自贮藏库组织(storage sink tissue)(如种子、马铃薯块茎、以及果实)(爱德华兹(Edwards)和科鲁兹(Coruzzi),

1990, 遗传学年度综述 (Ann. Rev. Genet.) 24:275-303)、或代谢库组织 (metabolic sink tissue) (如分生组织) 的启动子 (伊托 (Ito) 等人, 1994, 植物分子生物学 24:863-878); 种子特异性启动子, 如来自稻的谷蛋白、醇溶蛋白 (prolamin)、球蛋白 (globulin)、或白蛋白启动子 (吴 (Wu) 等人, 1998, 植物细胞生理学 (Plant Cell Physiol.) 39:885-889); 来自豆球蛋白 B4 和来自蚕豆的未知种子蛋白基因的蚕豆启动子 (康拉德 (Conrad) 等人, 1998, 植物生理学杂志 (J. Plant Physiol.) 152:708-711); 来自种子油体蛋白的启动子 (陈 (Chen) 等人, 1998, 植物细胞生理学 39:935-941); 来自欧洲油菜 (*Brassica napus*) 的贮藏蛋白 napA 启动子、或本技术领域已知的任何其他种子特异性启动子, 例如, 如在 WO 91/14772 中所描述。此外, 启动子可以是叶特异性启动子, 如来自稻或番茄的 *rbcS* 启动子 (京冢 (Kyojuka) 等人, 1993, 植物生理学 (Plant Physiol.) 102:991-1000)、小球藻病毒腺嘌呤甲基转移酶基因启动子 (麦卓 (Mitra) 和希金斯 (Higgins), 1994, 植物分子生物学 26:85-93)、来自稻的 *aldP* 基因启动子 (加贺屋 (Kagaya) 等人, 1995, 分子遗传学与基因组学 (Mol. Gen. Genet.) 248:668-674)、或伤口诱导型启动子 (如马铃薯 *pin2* 启动子) (许 (Xu) 等人, 1993, 植物分子生物学 22:573-588)。同样地, 该启动子可以通过非生物处理来诱导, 如温度、干旱、或盐度变化, 或通过外源施加的激活该启动子的物质来诱导, 例如乙醇、雌激素、植物激素 (如乙烯、脱落酸和赤霉素)、以及重金属。

[0282] 启动子增强子元件也可以用于实现多肽在植物中的较高表达。例如, 启动子增强子元件可以是置于启动子与编码多肽的多核苷酸之间的内含子。例如, 许等人, 1993, 见上文, 披露了使用稻肌动蛋白 1 基因的第一内含子以增强表达。

[0283] 该选择性标记基因及该表达构建体的任何其他部分可以选自本领域中可用的那些。

[0284] 核酸构建体是根据本领域已知的常规技术并入到植物基因组中, 这些常规技术包含: 农杆菌介导的转化、病毒介导的转化、显微注射、粒子轰击、生物射弹转化、以及电穿孔 (盖瑟 (Gasser) 等人, 1990, 科学 244:1293; 波特里库斯 (Potrykus), 1990, 生物/技术 (Bio/Technology) 8:535; 岛本 (Shimamoto) 等人, 1989, 自然 (Nature) 338:274)。

[0285] 目前, 根癌农杆菌介导的基因转移是用于产生转基因双子叶植物的所选方法 (关于综述, 请参见霍伊卡 (Hooykas) 和施尔伯鲁特 (Schilperoort), 1992, 植物分子生物学 19:15-38), 并且还可被用于转化单子叶植物, 虽然对于这些植物常常使用其他的转化方法。目前, 用于产生转基因单子叶植物的所选方法是粒子 (用转化 DNA 涂覆的微观的金或钨粒子) 轰击胚愈伤组织或发育中的胚 (克里斯托 (Christou), 1992, 植物杂志 (Plant J.) 2:275-281; 岛本, 1994, 生物技术当前述评 (Curr. Opin. Biotechnol.) 5:158-162; 瓦西尔 (Vasil) 等人, 1992, 生物/技术 10:667-674)。用于转化单子叶植物的替代方法是基于原生质体转化, 如由欧米璐 (Omirulleh) 等人, 1993, 植物分子生物学 (Plant Mol. Biol.) 21:415-428 所描述。根据本披露使用的额外的转化方法包含美国专利号 6, 395, 966 和 7, 151, 204 中所述的那些 (这二者都通过引用以其全文结合在此)。

[0286] 在转化之后, 根据本领域中众所周知的方法对并入了该表达构建体的转化株进行选择并且使其再生成为完整植物。通常转化程序被设计成通过使用例如用两种分开的 T-DNA 构建体共转化或通过特异性重组酶进行的选择基因的位点特异性切除, 在再生期间或在后代中选择性清除选择基因。

[0287] 除用根据本发明制备的构建体直接转化具体植物基因型之外,还可以通过将具有构建体的植物与缺乏该构建体的第二植物杂交来制备转基因植物。例如,可以将编码多肽的构建体通过杂交引入具体植物品种,而根本无需直接转化那个给定品种的植物。因此,本发明不仅涵盖了从根据本发明已经转化的细胞直接再生的植物,而且还涵盖了这类植物的后代。如在此使用的,后代可以是指根据本发明制备的亲本植物的任何代的后代。这种后代可以包含根据本发明制备的 DNA 构建体或根据本发明制备的 DNA 构建体的一部分。杂交导致转基因通过将起始种系与供体植物种系交叉授粉而引入植物种系。这类步骤的非限制性实例进一步在美国专利号 7, 151, 204 中明确地表达。

[0288] 植物可以通过回交转化方法生成。例如,植物包含被称为回交转化的基因型、种系、近交体、或杂交体的植物。

[0289] 可以使用遗传标记以协助本发明的一种或多种转基因从一个遗传背景渗入到另一个。标记协助的选择提供了相对于常规育种的优势,在于其可以用于避免由表型变异导致的错误。另外,遗传标记可以在具体杂交的个别后代中提供有关良种种质相对程度的数据。例如,当具有所希望性状并且另外具有非农艺学所希望的遗传背景的植物与良种亲本杂交时,可以使用遗传标记来选择不仅具有感兴趣的性状,还具有相对较大比例所希望种质的后代。以此方式,使一种或多种性状渗入特定遗传背景所需的世代数得以最小化。

[0290] 本发明还涉及产生本发明多肽的方法,该方法包含:(a) 在有益于产生多肽的条件下,培养包含编码该多肽的多核苷酸的转基因植物或植物细胞,并且 (b) 回收该多肽。

[0291] 组合物

[0292] 本发明还涉及包含本发明的蛋白酶的组合物。优选地,这些组合物富集了这样一种蛋白酶。术语“富集”指示该组合物的蛋白酶活性已经增加,例如,以至少 1.1 的一个富集因子。

[0293] 该组合物可以包含本发明的蛋白酶作为主要酶组分,例如单组分组合物。可替代地,该组合物可以包含多种酶活性,如氨肽酶、淀粉酶、碳水化合物酶、羧肽酶、过氧化氢酶、纤维素酶、壳多糖酶、角质酶、环糊精糖基转移酶、脱氧核糖核酸酶、酯酶、 α -半乳糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、 α -葡糖苷酶、 β -葡糖苷酶、卤素过氧化物酶、转化酶、漆酶、脂酶、甘露糖苷酶、氧化酶、果胶分解酶、肽谷氨酰胺酶、过氧化物酶、肌醇六磷酸酶、多酚氧化酶、蛋白水解酶、核糖核酸酶、转谷氨酰胺酶或木聚糖酶。可以例如通过微生物(如细菌或真菌)或通过植物或通过动物产生另外的一种或多种酶。这些组合物可以根据本领域中已知的方法制备,并且可以呈液体或干组合物的形式。例如,组合物可以处于颗粒或微颗粒的形式。该蛋白酶可以根据本领域中已知的方法稳定化。

[0294] 应用

[0295] 本发明针对用于使用具有蛋白酶活性的多肽或其组合物的方法。

[0296] 动物饲料

[0297] 本发明针对在动物饲料中使用具有蛋白酶活性的蛋白酶的方法,以及包含本发明的蛋白酶的饲料组合物和饲料添加剂。

[0298] 术语动物包含所有动物,包含人类。动物的实例为非反刍动物,和反刍动物。反刍动物包含,例如,动物,如绵羊、山羊、和牛,例如,肉牛、奶牛和牛犊。在具体实施例中,动物为非反刍动物。非-反刍动物包含单胃动物,如猪(pig 或 swine)(包含但不限于小猪、生

长中的猪和大母猪) ;家禽,如火鸡,鸭和鸡(包含但不限于肉仔鸡、蛋鸡) ;马(包含但不限于热血动物、冷血动物和温血动物),小牛 ;和鱼(包含但不限于鲑鱼、鳟鱼、罗非鱼、鲈鱼和鲤鱼) ;和甲壳类动物(包含但不限于河虾和对虾)。

[0299] 术语饲料或饲料组合物意思指适于或者意在由动物摄入的任意化合物、制剂、混合物或组合物。

[0300] 在根据本发明的用途中,可在饮食之前,之后或同时给动物饲喂蛋白酶。优选后者。

[0301] 在具体实施例中,明确限定了往饲料中添加的蛋白酶或包括在饲料添加剂中的蛋白酶。明确限定指的是如经大小排阻色谱法(参见 WO 01/58275 的实例 12)测定的,蛋白酶制品至少为 50% 纯。在其他具体实施例中,如经此方法测定的,蛋白酶制品至少为 60%、70%、80%、85%、88%、90%、92%、94%、或至少为 95% 纯。

[0302] 明确限定的蛋白酶制剂是有利的。例如,对于实质上不受其他蛋白酶干扰或污染的蛋白酶而言,更容易确定它在饲料中的正确剂量。术语正确剂量具体指得到一致和恒定的结果的目标,和基于所希望的效果能够优化剂量。

[0303] 然而,为了在动物饲料中使用,蛋白酶不必那么纯 ;它可以例如包含其他酶,此时可将其称为蛋白酶制品。

[0304] 该蛋白酶制剂可以 (a) 直接加入饲料(或者直接用于蛋白处理过程),或者 (b) 它可以用于一种或多种随后加入饲料(或者用于处理过程中)的中间组合物,如饲料添加剂或者预混合物的生产。不论是否根据上述 (a) 或 (b) 来使用,上文所述的纯度指的都是原始蛋白酶制品的纯度。

[0305] 具体地说,使用重组生产方法即可获得纯度为上述数量级的蛋白酶制品,然而,当通过传统的发酵方法生产蛋白酶时,要想获得这些蛋白酶制品却并非易事,而且,批次与批次之间会有较高的差异。

[0306] 这类蛋白酶制品当然可以与其他酶混合。

[0307] 该蛋白可以是一种动物性蛋白,如肉和骨粉、羽毛粉、和 / 或鱼粉 ;或者他可以是一种植物性蛋白。

[0308] 本文所用术语植物性蛋白指的是包含至少一种衍生自或源自植物的蛋白,包含修饰的蛋白和蛋白衍生物的任何化合物,组合物,制品或混合物。在具体实施例中,这些植物性蛋白的蛋白含量至少为 10、20、30、40、50 或 60% (w/w)。

[0309] 植物性蛋白可以衍生自植物性蛋白来源,如豆类和谷类,例如得自蝶形花科(豆科),十字花科,藜科和早熟禾科植物的材料,如大豆粉,羽扇豆粉和油菜籽粉。

[0310] 在具体实施例中,植物性蛋白来源是得自蝶形花科的一种或多种植物,如大豆,羽扇豆,豌豆或蚕豆的材料。

[0311] 在另一个具体实施例中,植物性蛋白来源是得自藜科的一种或多种植物,如甜菜,糖甜菜,菠菜或奎奴亚藜的材料。

[0312] 植物性蛋白来源的其他实例为油菜籽、向日葵籽、棉籽和卷心菜。

[0313] 大豆为优选的植物性蛋白来源。

[0314] 植物性蛋白来源的其他实例为谷类,如大麦、小麦、黑麦、燕麦、玉蜀黍(玉米)、稻、黑小麦和高粱。

[0315] 在处理过程的具体实施例中,所讨论的这种或这些种蛋白酶影响这些蛋白如植物性蛋白或蛋白来源(或对其发挥作用或施加水解或降解影响)。为了达到此目的,一般将蛋白或蛋白来源悬浮于溶剂,例如含水溶剂,如水中,并适当关注所讨论的酶的特征,以调节pH和温度值。例如,可在能使实际蛋白酶的活性至少为5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、或至少为90%的pH值下进行处理。类似地,例如,可在能使实际蛋白酶的活性至少为5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、或至少为90%的温度下进行处理。上述活性百分比指示是相对于最大活性而言的。持续进行酶促反应直至获得所需结果,然后通过例如热-处理步骤灭活酶来终止反应,或者也可以不终止反应。

[0316] 在本发明处理过程的另一个具体实施例中,蛋白酶作用被维持,这意味着例如将蛋白酶加入这些蛋白,但其水解影响可以说尚未开启,直到后来当有此需求时,一旦建立了适当的水解条件,或一旦灭活了任何酶抑制剂,或不使用何种其他方式延迟了酶的作用,才会开启其水解影响。

[0317] 在一个实施例中,处理是预-处理动物饲料或用于动物饲料的蛋白,即这些蛋白是在摄入之前被水解的。

[0318] 术语改善动物饲料的营养价值指的是提高饲料中的营养的可利用性。在本发明中,改善营养价值具体指的是改善饲料的蛋白部分的可利用性,从而导致蛋白提取的增加,较高的蛋白产量,和/或蛋白利用的改善。当饲料的营养价值增加时,蛋白和/或氨基酸消化率增加,并且该动物的生长速率和/或体重增加量和/或饲料转化(即相对于体重增加的饲料摄取量)可被改善。

[0319] 能以任何形式将蛋白酶添加至饲料中,如它是相对纯的蛋白酶,或与欲添加至动物饲料的其他组分的混合物,即以动物饲料添加剂的形式,例如所谓的动物饲料预混物。

[0320] 在另一方面,本发明涉及用于动物饲料的组合物,如动物饲料和动物饲料添加剂,如预混合物。

[0321] 除本发明的蛋白酶以外,本发明的动物饲料添加剂还包含至少一种脂溶性维生素、和/或至少一种水溶性维生素、和/或至少一种微量矿物质、和/或至少一种大量矿物质。

[0322] 另外,可任选的,饲料添加成分是着色剂例如类胡萝卜素如 β -胡萝卜素、虾青素、和叶黄素;稳定剂;生长改善添加剂和芳香化合物/调味品,例如甲氧甲酚,茴香脑,十一-、十一-和/或十二-内酯,紫罗酮、鸢尾酮、姜辣素、哌啶、亚丙基苯酞、亚丁基苯酞、辣椒素和/或丹宁酸;抗微生物肽;多不饱和脂肪酸(PUFA);产活性氧种类;另外,可以使用一种支持物,其可包含例如按重量计40%-50%的木质纤维、按重量计8%-10%的硬脂酸、按重量计4%-5%的姜黄粉、按重量计4%-58%的迷迭香粉、按重量计22%-28%的石灰岩、按重量计1%-3%的树胶如阿拉伯树胶、按重量计5%-50%的糖和/或淀粉以及按重量计5%-15%的水。

[0323] 本发明的一种饲料或饲料添加剂还可包含选自以下各项之中的至少一种其他的酶:肌醇六磷酸酶(EC3.1.3.8或3.1.3.26);木聚糖酶(EC3.2.1.8);半乳聚糖酶(EC3.2.1.89); α -半乳糖苷酶(EC3.2.1.22);另外的蛋白酶(EC3.4),磷脂酶A1(EC3.1.1.32);磷脂酶A2(EC3.1.1.4);溶血磷脂酶(EC3.1.1.5);磷脂酶C(3.1.4.3);磷脂酶D(EC3.1.4.4);淀粉酶如,例如 α -淀粉酶(EC3.2.1.1);和/或 β -葡聚糖酶

(EC3. 2. 1. 4 或 EC3. 2. 1. 6)。

[0324] 在具体实施例中,这些其他酶被明确定义(如上对蛋白酶制剂定义的)。

[0325] 抗微生物肽(AMP)的实例是CAP18、Leucocin(林可霉素)A、Tritrpticin、Protegrin-1、Thanatin(死亡素)、防卫肽、乳铁蛋白、乳铁蛋白肽、和Ovispirin如Novispirin(Robert Lehrer(罗伯特·莱勒),2000)、Plectasins(菌丝霉素)以及他汀类,包含在WO 03/044049和WO 03/048148中所披露的化合物和多肽,以及以上的保留了抗微生物活性的变体或片段。

[0326] 抗真菌多肽(AFP)的实例是巨大曲霉(*Aspergillus giganteus*)和黑曲霉的肽,连同其保留了抗真菌活性的变体和片段,如在WO 94/01459和WO 02/090384中披露的。

[0327] 多不饱和脂肪酸的实例为C18、C20和C22多不饱和脂肪酸,如花生四烯酸、二十二碳六烯酸、二十碳五烯酸和 γ -亚麻酸。

[0328] 产生活性氧的种类的实例为化学品,如过硼酸盐、过硫酸盐或过碳酸盐;和酶,如氧化酶、加氧酶或合成酶。

[0329] 通常,脂-和水-溶性维生素,以及微量矿物质形成意在添加至饲料的所谓的预混物的一部分,而大量矿物质通常单独添加至饲料中。这些组合物的任一个类型,当富含于本发明的蛋白酶时,都是本发明的动物饲料添加剂。

[0330] 在具体实施例中,本发明的动物饲料添加剂以0.01%至10.0%,更具体0.05%至5.0%或0.2%至1.0%(%指g添加剂/100g饲料)的水平包含(或规定为必须包含)在动物饮食或饲料中。具体地说,对预混物也是如此。

[0331] 下文列出了这些组分的非-排他性实例:

[0332] 脂溶性维生素的实例是维生素A、维生素D3、维生素E和维生素K,例如维生素K3。

[0333] 水溶性维生素的实例是维生素B12、生物素和胆碱、维生素B1、维生素B2、维生素B6、烟酸、叶酸和泛酸酯,例如Ca-D-泛酸酯。

[0334] 微量矿物质的实例为锰、锌、铁、铜、碘、硒和钴。

[0335] 大量矿物质的实例为钙、磷和钠。

[0336] 这些组分的营养需求(以家禽和小猪/猪举例)列于WO 01/58275中的表A中。营养需求指的是应在饮食中以所示浓度提供这些组分。

[0337] 在可替代的实施例中,本发明的动物饲料添加剂包含WO 01/58275中的表A所详细说明的单个组分中的至少一种。至少一种指的是一种或两种或三种或四种等直至所有十三种,或直至所有15种单个组分中的任一种,一种或多种。更具体地,本发明的添加剂包含该至少一种单个组分,其含量能使其在饲料中的浓度落入表A第4或第5或第6栏所示的范围。

[0338] 在仍另外的实施例中,本发明的动物饲料添加剂包含以下维生素中的至少一种,优选地以在以下的表1中所详细说明的饲料内浓度范围提供(分别对于小猪饮食和肉仔鸡饮食)。

[0339] 表1:一般的维生素建议

[0340]

维生素	小猪饮食	肉仔鸡饮食

维生素 A	10,000-15,000IU/kg 饲料	8-12,500IU/kg 饲料
维生素 D3	1800-2000IU/kg 饲料	3000-5000IU/kg 饲料
维生素 E	60-100mg/kg 饲料	150-240mg/kg 饲料
维生素 K3	2-4mg/kg 饲料	2-4mg/kg 饲料
维生素 B1	2-4mg/kg 饲料	2-3mg/kg 饲料
维生素 B2	6-10mg/kg 饲料	7-9mg/kg 饲料
维生素 B6	4-8mg/kg 饲料	3-6mg/kg 饲料
维生素 B12	0.03-0.05mg/kg 饲料	0.015-0.04mg/kg 饲料
烟酸 (维生素 B3)	30-50mg/kg 饲料	50-80mg/kg 饲料
泛酸	20-40mg/kg 饲料	10-18mg/kg 饲料
叶酸	1-2mg/kg 饲料	1-2mg/kg 饲料
生物素	0.15-0.4mg/kg 饲料	0.15-0.3mg/kg 饲料
氯化胆碱	200-400mg/kg 饲料	300-600mg/kg 饲料

[0341] 本发明还涉及动物饲料组合物。动物饲料组合物或饮食具有相对高的蛋白含量。家禽和猪饮食的特征如 WO 01/58275, 表 B 第 2-3 栏所示。鱼食可被表征为该表 B 第 4 栏中所示的。另外, 这类鱼食通常具有 200-310g/kg 的粗脂肪含量。

[0342] WO 01/58275 相当于 US 09/779334, 被列入本文作为参考。

[0343] 根据本发明的动物饲料组合物具有的粗蛋白含量为 50-800g/kg, 此外还包含至少一种本文所要求的蛋白酶。

[0344] 此外, 或替代地 (对于以上所示的粗蛋白含量), 本发明的动物饲料组合物具有 10-30MJ/kg 的可代谢能量含量; 和 / 或 0.1-200g/kg 的钙含量; 和 / 或 0.1-200g/kg 的有效磷含量; 和 / 或 0.1-100g/kg 的甲硫氨酸含量; 和 / 或 0.1-150g/kg 的甲硫氨酸加半胱氨酸含量; 和 / 或 0.5-50g/kg 的赖氨酸含量。

[0345] 在具体实施例中, 可代谢能量、粗蛋白、钙、磷、甲硫氨酸、甲硫氨酸加半胱氨酸、和 / 或赖氨酸的含量落入 WO 01/58275, 表 B, 范围 2、3、4 或 5 中的任何一个中 (R. 2-5)。

[0346] 粗蛋白以氮 (N) 乘以系数 6.25 计算, 即粗蛋白 (g/kg) = N(g/kg) × 6.25。通过凯氏定氮法 (Kjeldahl method) 测定氮含量 (A. O. A. C., 1984, 官方分析方法 (Official Methods of Analysis) 第 14 版, 官方分析化学家集 (Association of Official Analytical Chemists), 华盛顿特区)。

[0347] 可代谢能量可根据 NRC 出版物猪的营养需求 (Nutrient requirements in swine), 第九次再版 1988, 国家研究委员会农业部动物营养协会猪营养分会, 美国国家

科学院出版社, 华盛顿特区, 第 2-6 页和欧洲家禽饲养材料能量值表 (European Table of Energy Values for Poultry Feed-stuffs), 斯克得霍特 (Spelderholt) 家禽研究与推广中心, 7361DA 贝克贝亨, 荷兰, Grafisch bedrijf Ponsen&looijen 公司, 瓦赫宁恩. ISBN90-71463-12-5 计算。

[0348] 完整的动物食料中钙、有效磷和氨基酸的饮食含量根据如 Veevoedertable1997, gegevens over chemische samenstelling, verteerbaarheid en voederwaarde van voedermiddelen, Central Veevoederbureau, Runderweg6, 8219pk Lelystad. ISBN90-72839-13-7 计算。

[0349] 在具体实施例中, 本发明的动物饲料组合物包含如上定义的至少一种植物性蛋白。

[0350] 本发明的动物饲料组合物还可以包含动物性蛋白, 如肉和骨粉、羽毛粉、和 / 或鱼粉, 通常量为 0-25%。本发明的动物饲料组合物还可以包含具有可溶物的干酒糟 (Dried Distillers Grains), 通常量为 0-30%。

[0351] 在另一具体实施例中, 本发明的动物饲料组合物包含 0-80% 的玉米; 和 / 或 0-80% 的高粱; 和 / 或 0-70% 小麦; 和 / 或 0-70% 的大麦; 和 / 或 0-30% 的燕麦; 和 / 或 0-40% 的大豆粉; 和 / 或 0-25% 的鱼粉; 和 / 或 0-25% 的肉和骨粉; 和 / 或 0-20% 的乳清。

[0352] 可将动物饮食制备成例如糊状饲料 (非丸状) 或丸状饲料。通常, 混合研磨的饲料并根据所讨论的这些种类的说明加入必需维生素和矿物质的足够量。以固体或液体酶配制品的形式加入酶。例如, 对于糊状饲料, 在成分混合步骤前或期间可加入固体或液体酶配制品。对于丸状饲料, 在饲料成分步骤前或期间还可加入该 (固体或液体) 蛋白酶 / 酶制剂。典型地, 在造丸步骤之后加入一种液体蛋白酶 / 酶制剂。也可以将酶掺入饲料添加剂或预混物。

[0353] 饮食中最终的酶浓度范围为 0.01-200mg 酶蛋白 /kg 饮食, 例如在 0.5-25mg 酶蛋白 /kg 动物饮食的范围内。

[0354] 当然, 应该以有效量, 即足以改善饲料的水解、消化性和 / 或改善营养价值的量使用蛋白酶。目前期望以下述量 (剂量范围) 中的一种或多种施用酶: 0.01-200; 0.01-100; 0.5-100; 1-50; 5-100; 10-100; 0.05-50 或 0.10-10- 所有这些范围都是每 kg 饲料中蛋白酶蛋白的 mg 数 (ppm)。

[0355] 为了测定每 kg 饲料中蛋白酶蛋白的 mg 数, 从饲料组合物中纯化蛋白酶, 并且使用相关试验 (参见蛋白酶活性, 底物和试验) 测定经纯化的蛋白酶的比活性。使用相同试验测定该饲料组合物的蛋白酶活性, 并且在这两次测定的基础上计算出以每 kg 饲料中蛋白酶蛋白的 mg 数计的剂量。

[0356] 使用相同的原理测定饲料添加剂中的蛋白酶蛋白 mg 数。当然, 如果可获得制备饲料添加剂或饲料所用蛋白酶的样品, 可由该样品测定比活性 (无需从饲料组合物或添加剂中纯化蛋白酶)。

[0357] 洗涤剂组合物

[0358] 在一个实施例中, 本发明针对洗涤剂组合物, 该洗涤剂组合物包含结合一种或多种额外的清洁组合物组分的本发明的酶。额外的组分的选择在普通技术人员技术内并且包括常规成分, 包括以下列出的示例性、非限制性组分。

[0359] 对于纺织品保养,组分的选择可以包括以下考虑:有待清洁的纺织品的类型、污物的类型和/或程度、进行清洁时的温度、以及洗涤剂产品的配制。尽管根据一种具体的功能性将以下提及的组分通过一般标题进行了分类,但是由于该组分可能具有熟练的业内人士将领会的一种或多种另外的功能,因此不应该将这理解为限制。

[0360] 洗涤剂组合物可以适于洗涤纺织品,例如像织物、衣服或亚麻布,或用于清洁硬表面,例如像地板、桌子、或洗碗盘。

[0361] 洗涤剂洗涤剂中的酶量

[0362] 在本发明的一个实施例中,可以将本发明的多肽以对应于以下的量添加至一种洗涤剂组合物中:每升的洗涤液 0.0001-200mg 的酶蛋白,例如 0.0005-100mg 的酶蛋白,优选 0.001-30mg 的酶蛋白,更优选 0.005-8mg 的酶蛋白,甚至更优选 0.01-2mg 的酶蛋白。

[0363] 用于在自动洗碗机(ADW)中使用的组合物例如可以包含按该组合物的重量计 0.0001% -50%,例如 0.001% -20%,例如 0.01% -10%,例如 0.05% -5%的酶蛋白。

[0364] 用于在洗衣造粒(laundry granulation)中使用的组合物例如可以包含按该组合物的重量计 0.0001% -50%,例如 0.001% -20%,例如 0.01% -10%,例如 0.05% -5%的酶蛋白。

[0365] 用于在洗衣液中使用的组合物例如可以包含按该组合物的重量计 0.0001% -10%,例如 0.001% -7%,例如 0.1% -5%的酶蛋白。

[0366] 可以使用常规稳定剂稳定本发明的洗涤剂组合物的一种或多种酶,这些常规稳定剂例如是多元醇,例如丙二醇或甘油、糖或糖醇、乳酸、硼酸或硼酸衍生物,例如芳香族硼酸酯,或苯基硼酸衍生物,例如 4-甲酰苯基硼酸,并且可以如在例如 WO 92/19709 和 WO 92/19708 中所述配制该组合物。

[0367] 在某些市场中,不同洗涤条件并且就其本身而言,使用不同类型的洗涤剂。这披露于例如 EP 1 025 240 中。例如,在亚洲(日本)使用低的洗涤剂浓度体系,而美国使用中等洗涤剂浓度体系,并且欧洲使用高的洗涤剂浓度体系。

[0368] 低的洗涤剂浓度体系包含以下洗涤剂,其中在洗涤水中存在少于约 800ppm 的洗涤剂组分。日本洗涤剂典型地被认为是低的洗涤剂浓度体系,因为它们具有存在于洗涤水中的大约 667ppm 的洗涤剂组分。

[0369] 中等洗涤剂浓度体系包含以下洗涤剂,其中在洗涤水中存在约 800ppm 与约 2000ppm 之间的洗涤剂组分。北美洗涤剂通常被认为是中等洗涤剂浓度体系,因为它们具有存在于洗涤水中的大约 975ppm 的洗涤剂组分。

[0370] 高的洗涤剂浓度体系包含以下洗涤剂,其中在洗涤水中存在多于约 2000ppm 的洗涤剂组分。欧洲洗涤剂通常被认为是高的洗涤剂浓度体系,因为在洗涤水中它们具有大约 4500-5000ppm 的洗涤剂组分。

[0371] 拉丁美洲洗涤剂通常是高泡沫磷酸盐助洗剂洗涤剂并且在拉丁美洲使用的洗涤剂的范围可以落入中等和高的洗涤剂浓度两者中,因为在洗涤水中它们的洗涤剂组分的范围从 1500ppm 至 6000ppm。此类洗涤剂组合物都是本发明的实施例。

[0372] 本发明的多肽还可以结合到 WO 97/07202 中所披露的洗涤剂配制品中,通过引用将其结合在此。

[0373] 表面活性剂

[0374] 洗涤剂组合物可以包含一种或多种表面活性剂,它们可以是阴离子的和 / 或阳离子的和 / 或非离子的和 / 或半极性的和 / 或兼性离子的,或其混合物。在一个具体实施例中,洗涤剂组合物包括一种或多种非离子型表面活性剂和一种或多种阴离子表面活性剂的混合物。这种或这些表面活性剂典型地以按重量计从约 0.1% 至 60% 的水平存在,例如约 1% 至约 40%、或约 3% 至约 20%、或约 3% 至约 10%。基于所希望的清洁应用来选择这种或这些表面活性剂,并且这种或这些表面活性剂包括本领域中已知的任何一种或多种常规表面活性剂。可以利用本领域中已知的用于在洗涤剂中使用的任何表面活性剂。

[0375] 当被包括在其中时,洗涤剂将通常包含按重量计从约 1% 至约 40%,例如从约 5% 至约 30% (包括从约 5% 至约 15%)、或从约 20% 至约 25% 的阴离子表面活性剂。阴离子表面活性剂的非限制性实例包括硫酸盐和磺酸盐,具体地,直链烷基苯磺酸盐 (LAS), LAS 的异构体,支链烷基苯磺酸盐 (BABS), 苯基链烷磺酸盐, α - 烯烴磺酸盐 (AOS), 烯烴磺酸盐, 链烯烴磺酸盐, 链烷 -2, 3- 二基双 (硫酸盐), 羟基链烷磺酸盐以及二磺酸盐, 烷基硫酸盐 (AS) (例如十二烷基硫酸钠 (SDS)), 脂肪醇硫酸盐 (FAS), 伯醇硫酸盐 (PAS), 醇醚硫酸盐 (AES 或 AEOS 或 FES, 也被称为醇乙氧基硫酸盐或脂肪醇醚硫酸盐), 仲链烷磺酸盐 (SAS), 石蜡烴磺酸盐 (PS), 酯磺酸盐, 磺化的脂肪酸甘油酯, α - 磺酸基脂肪酸甲酯 (α -SFMe 或 SES) (包括甲酯磺酸盐 (MES)), 烷基琥珀酸或烯基琥珀酸, 十二烯基 / 十四烯基琥珀酸 (DTSA), 氨基酸的脂肪酸衍生物, 磺酸基琥珀酸或皂的二酯和单酯, 及其组合。

[0376] 当被包括在其中时,洗涤剂将通常包含按重量计从约 0% 至约 10% 的阳离子表面活性剂。阳离子表面活性剂的非限制性实例包括烷基二甲基乙醇季胺 (ADMEAQ)、十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB)、二甲基二硬脂酰氯化铵 (DSDMAC)、以及烷基苄基二甲基铵、烷基季铵化合物、烷氧基化季铵 (AQA) 化合物、及其组合。

[0377] 当被包括在其中时,洗涤剂将通常包含按重量计从约 0.2% 至约 40% 的非离子型表面活性剂,例如从约 0.5% 至约 30%,特别是从约 1% 至约 20%、从约 3% 至约 10%,例如从约 3% 至约 5%、或从约 8% 至约 12%。非离子型表面活性剂的非限制性实例包括醇乙氧基化物 (AE 或 AEO)、醇丙氧基化物、丙氧基化的脂肪醇 (PFA), 烷氧基化的脂肪酸烷基酯 (例如乙氧基化的和 / 或丙氧基化的脂肪酸烷基酯), 烷基酚乙氧基化物 (APE), 壬基酚乙氧基化物 (NPE), 烷基多糖苷 (APG), 烷氧基化胺, 脂肪酸单乙醇酰胺 (FAM), 脂肪酸二乙醇酰胺 (FADA), 乙氧基化的脂肪酸单乙醇酰胺 (EFAM), 丙氧基化的脂肪酸单乙醇酰胺 (PFAM), 多羟基烷基脂肪酸酰胺, 或葡萄糖胺的 N- 酰基 N- 烷基衍生物 (葡糖酰胺 (GA), 或脂肪酸葡糖酰胺 (FAGA)), 连同在 SPAN 和 TWEEN 商品名下可获得的产品, 及其组合。

[0378] 当被包括在其中时,洗涤剂将通常包含按重量计从约 0% 至约 10% 的半极化表面活性剂。半极性表面活性剂的非限制性实例包括氧化胺 (AO), 例如烷基二甲胺氧化物、N-(椰油基烷基)-N, N- 二甲胺氧化物和 N-(牛油-烷基)-N, N- 双 (2- 羟乙基) 胺氧化物、脂肪酸链烷醇酰胺和乙氧基化的脂肪酸链烷醇酰胺, 及其组合。

[0379] 当被包括在其中时,洗涤剂将通常包含按重量计从约 0% 至约 10% 的兼性离子表面活性剂。兼性离子表面活性剂的非限制性实例包括甜菜碱、烷基二甲基甜菜碱、磺基甜菜碱、及其组合。

[0380] 助水溶剂

[0381] 助水溶剂是一种化合物,该化合物在水溶液中溶解疏水化合物 (或相反地,在非

极性环境中的极性物质)。典型地,助水溶剂同时具有亲水的和疏水的特征(如从表面活性剂已知的所谓两亲特性);然而助水溶剂的分子结构一般并不有利于自发自聚集,参见例如霍奇登(Hodgdon)和卡勒(Kaler)的综述(2007),胶体 & 界面科学新见(Current Opinion in Colloid&Interface Science),12:121-128。助水溶剂并不显示一个临界浓度,高于该浓度就会发生如对表面活性剂而言所发现的自聚集以及脂质形成胶束、薄层或其他很好地定义的中间相。很多助水溶剂反而示出一个连续型聚集过程,其中聚集体的大小随着浓度增加而增长。然而,很多助水溶剂改变了包含极性和非极性特征的物质的系统(包括水、油、表面活性剂、和聚合物的混合物)的相状态、稳定性、和胶体特性。经典地从制药、个人护理、食品跨行业至技术应用使用助水溶剂。洗涤剂组合物中助水溶剂的使用允许例如更浓的表面活性剂配制品(如在通过除去水而压缩液体洗涤剂的过程中)而不引起不希望的现象,例如相分离或高黏度。

[0382] 洗涤剂可以包含按重量计 0-5%,例如约 0.5%至约 5%、或约 3%至约 5%的助水溶剂。可以利用本领域中已知的用于在洗涤剂中使用的任何助水溶剂。助水溶剂的非限制性实例包括苯磺酸钠、对甲苯磺酸钠(STS)、二甲苯磺酸钠(SXS)、枯烯磺酸钠(SCS)、伞花烃磺酸钠、氧化胺、醇和聚乙二醇醚、羟基萘甲酸钠、羟基萘磺酸钠、乙基己基磺酸钠、及其组合。

[0383] 助洗剂和共助洗剂

[0384] 洗涤剂组合物可以包含按重量计约 0-65%,例如约 5%至约 45%的洗涤剂助洗剂或共助洗剂、或其混合物。在洗涤餐具洗涤剂中,助洗剂的水平典型地是 40% -65%,特别是 50% -65%。助洗剂和 / 或共助洗剂可以具体是形成具有 Ca 和 Mg 的水溶性复合物的螯合剂。可以利用本领域中已知的用于在衣物洗涤剂中使用的任何助洗剂和 / 或共助洗剂。助洗剂的非限制性实例包括沸石、二磷酸盐(焦磷酸盐)、三磷酸盐例如三磷酸钠(STP 或 STPP)、碳酸盐例如碳酸钠、可溶性硅酸盐例如硅酸钠、层状硅酸盐(例如来自赫斯特公司(Hoechst)的 SKS-6)、乙醇胺例如 2-氨基乙-1-醇(MEA)、二乙醇胺(DEA,也称为亚氨基二乙醇)、三乙醇胺(TEA,也称为 2, 2', 2''-次氨基三乙醇)、以及羧甲基菊粉(CMI)、及其组合。

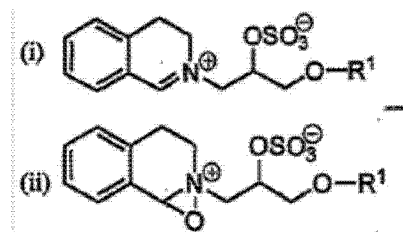
[0385] 洗涤剂组合物还可以包含按重量计 0-20%,例如约 5%至约 10%的洗涤剂共助洗剂、或其混合物。洗涤剂组合物可以单独地包括一种共助洗剂,或与一种助洗剂,例如沸石助洗剂组合。共助洗剂的非限制性实例包括聚丙烯酸酯的均聚物或其共聚物,例如聚(丙烯酸)(PAA)或共聚(丙烯酸/马来酸)(PAA/PMA)。另外的非限制性实例包括柠檬酸盐,螯合剂,例如氨基羧酸盐、氨基多羧酸盐和膦酸盐,以及烷基-或链烯基琥珀酸。另外的具体实例包括 2, 2', 2''-次氨基三乙酸(NTA)、乙二胺四乙酸(EDTA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)、亚氨基二丁二酸(iminodisuccinic acid)(IDS)、乙二胺-N,N'-二丁二酸(EDDS)、甲基甘氨酸二乙酸(MGDA)、谷氨酸-N,N'-二乙酸(GLDA)、1-羟基乙烷-1,1-二膦酸(HEDP)、乙二胺四-(亚甲基膦酸)(EDTMPA)、二亚乙基三胺五(亚甲基膦酸)(DTPMPA 或 DTMPA)、N-(2-羟乙基)亚氨基二乙酸(EDG)、天冬氨酸-N-单乙酸(ASMA)、天冬氨酸-N,N'-二乙酸(ASDA)、天冬氨酸-N-单丙酸(ASMP)、亚氨基二丁二酸(iminodisuccinic acid)(IDA)、N-(2-磺甲基)-天冬氨酸(SMAS)、N-(2-磺乙基)-天冬氨酸(SEAS)、N-(2-磺甲基)-谷氨酸(SMGL)、N-(2-磺乙基)-谷氨酸(SEGL)、N-甲基亚氨基二乙酸(MIDA)、 α -丙氨

酸-N,N-二乙酸 (α -ALDA)、丝氨酸-N,N-二乙酸 (SEDA)、异丝氨酸-N,N-二乙酸 (ISDA)、苯丙氨酸-N,N-二乙酸 (PHDA)、邻氨基苯甲酸-N,N-二乙酸 (ANDA)、磺胺酸-N,N-二乙酸 (SLDA)、牛磺酸-N,N-二乙酸 (TUDA) 以及磺甲基-N,N-二乙酸 (SMDA)、N-(2-羟乙基)-亚乙基二胺-N,N',N'-三乙酸盐 (HEDTA)、二乙醇甘氨酸 (DEG)、二亚乙基三胺五(亚甲基膦酸) (DTPMP)、氨基三(亚甲基膦酸) (ATMP)、及其组合和盐。另外的示例性助洗剂和/或共助洗剂描述于例如 WO 09/102854、US 5977053 中。

[0386] 漂白系统

[0387] 该洗涤剂可以包含按重量计 0-50%，例如约 0.1% 至约 25% 的漂白系统。可以利用本领域中已知的用于在衣物洗涤剂中使用的任何漂白系统。适合的漂白系统组分包括漂白催化剂、光漂白剂 (photobleach)、漂白活化剂、过氧化氢源 (例如过碳酸钠和过硼酸钠)、预成型的过酸及其混合物。适合的预成型过酸包括，但不限于：过氧羧酸及盐，过碳酸及盐，过白啶酸 (perimidic acid) 及盐，过氧单硫酸及盐 (例如过硫酸氢钾 (Oxone(R))，及其混合物。漂白系统的非限制性实例包括基于过氧化物的漂白系统，该系统可以包括例如一种与过酸形成漂白活化剂组合的无机盐，包括碱金属盐，例如过硼酸盐 (通常是单水合物或四水合物)、过碳酸盐、过硫酸盐、过磷酸盐、过硅酸盐的钠盐。术语漂白活化剂在此意指一种与过氧化物漂白剂 (像过氧化氢) 反应以形成过酸的化合物。以此方式形成的过酸构成活化的漂白剂。有待在此使用的适合的漂白活化剂包括属于酯类、酰胺类、酰亚胺类或酸酐类的那些。适合的实例是四乙酰基乙二胺 (TAED)、4-[(3,5,5-三甲基己酰)氧基]苯磺酸钠 (ISONOBS)、二过氧月桂酸、4-(十二酰基氧基)苯磺酸盐 (LOBS)、4-(癸酰基氧基)苯磺酸盐、4-(癸酰基氧基)苯甲酸盐 (DOBS)、4-(壬酰基氧基)-苯磺酸盐 (NOBS)、和/或披露于 WO 98/17767 中的那些。感兴趣的漂白活化剂的具体家族披露于 EP 624154 中，并且在那个家族中特别优选的是乙酰柠檬酸三乙酯 (ATC)。ATC 或短链甘油三酸酯 (像三醋汀) 具有以下优点，它是环境友好的，因为它最终降解为柠檬酸和醇。此外，乙酰柠檬酸三乙酯和三醋汀在存储时在产品中具有良好的水解稳定性，并且它是一种有效的漂白活化剂。最后，ATC 为洗衣添加剂提供一种良好的助洗能力。可替代地，漂白系统可以包括例如酰胺、亚胺、或酮型的过氧酸。漂白系统还可以包括过酸，例如 6-(苯二甲酰亚氨基)过己酸 (PAP)。漂白系统还可以包括一种漂白催化剂。在一些实施例中，漂白组分可以是选自下组的有机催化剂，该组由以下各项组成：具有下式的有机催化剂：

[0388]



[0389] (iii) 及其混合物；其中每个 R¹ 独立地是包含从 9 至 24 个碳的支链烷基基团或包含从 11 至 24 个碳的直链烷基基团，优选地，每个 R¹ 独立地是包含从 9 至 18 个碳的支链烷基基团或包含从 11 至 18 个碳的直链烷基基团，更优选地，每个 R¹ 独立地选自下组，该组由以下各项组成：2-丙基庚基、2-丁基辛基、2-戊基壬基、2-己基癸基、正-十二烷基、正-十四烷基、正-十六烷基、正-十八烷基、异-壬基、异-癸基、异-十三烷基和异-十五烷基。其

他示范性漂白系统描述于例如 WO 2007/087258、WO 2007/087244、WO 2007/087259 以及 WO 2007/087242 中。适合的光漂白剂可以例如是磺化的酞菁锌。

[0390] 聚合物

[0391] 该洗涤剂可以包含按重量计 0-10%，例如 0.5% -5%、2% -5%、0.5% -2% 或 0.2% -1% 的聚合物。可以利用本领域中已知的用于在洗涤剂中使用的任何聚合物。聚合物的功能可以是如以上提到的共助洗剂，或可以提供抗再沉积、纤维保护、污物释放、染料转移抑制、油污清洁和 / 或抗发泡特性。一些聚合物可以具有多于一种的上述特性和 / 或多于一种的下述基元 (motif)。示范性聚合物包括 (羧甲基) 纤维素 (CMC)、聚 (乙烯醇) (PVA)、聚 (乙烯吡咯烷酮) (PVP)、聚 (乙二醇) 或聚 (环氧乙烷) (PEG)、乙氧基化的聚 (亚乙基亚胺)、羧甲基菊粉 (CMI)、和聚羧化物，例如 PAA、PAA/PMA、聚 - 天冬氨酸、和甲基丙烯酸月桂酯 / 丙烯酸共聚物、疏水改性 CMC (HM-CMC) 和硅酮、对苯二甲酸和低聚乙二醇的共聚物、聚 (对苯二甲酸乙二酯) 和聚 (氧乙烯对苯二甲酸乙二酯) 的共聚物 (PET-POET)、PVP、聚 (乙烯基咪唑) (PVI)、聚 (乙烯吡啶 -N- 氧化物) (PVP0 或 PVPNO) 以及聚乙烯吡咯烷酮 - 乙烯基咪唑 (PVPVI)。另外的示范性聚合物包括磺化的聚羧酸酯、聚环氧乙烷和聚环氧丙烷 (PEO-PPO) 以及乙氧基磺酸二季铵盐。其他示范性聚合物披露于例如 WO 2006/130575 中。也考虑了上述聚合物的盐。

[0392] 织物调色剂

[0393] 本发明的洗涤剂组合物还可以包括织物调色剂，例如染料或色素，当配制在洗涤剂组合物中时，当所述织物与一种洗液接触时织物调色剂可以沉积在织物上，该洗液包括所述洗涤剂组合物，并且因此通过可见光的吸收 / 反射改变所述织物的色彩。荧光增白剂发射至少一些可见光。相比之下，因为它们吸收至少一部分可见光光谱，所以织物调色剂改变表面的色彩。适合的织物调色剂包括染料和染料 - 黏土混合物，并且还可以包括色素。适合的染料包括小分子染料和聚合物染料。适合的小分子染料包括选自下组的小分子染料，该组由落入颜色索引 (Colour Index) (C. I.) 分类的以下染料组成：直接蓝、直接红、直接紫、酸性蓝、酸性红、酸性紫、碱性蓝、碱性紫和碱性红、或其混合物，例如描述于 WO 2005/03274、WO 2005/03275、WO 2005/03276 和 EP1876226 中 (将其通过引用结合在此)。洗涤剂组合物优选包括从约 0.00003wt% 至约 0.2wt%、从约 0.00008wt% 至约 0.05wt%、或甚至从约 0.0001wt% 至约 0.04wt% 的织物调色剂。该组合物可以包括从 0.0001wt% 至 0.2wt% 的织物调色剂，当该组合物处于单位剂量袋的形式时，这可以是尤其优选的。适合的调色剂还披露于例如 WO 2007/087257 和 WO 2007/087243 中。

[0394] 另外的酶

[0395] 洗涤剂添加剂连同洗涤剂组合物可以包括一种或多种另外的酶，例如蛋白酶、脂肪酶、角质酶、淀粉酶、碳水化合物分解酶、纤维素酶、果胶酶、甘露聚糖酶、阿拉伯糖酶、半乳聚糖酶、木聚糖酶、氧化酶，例如漆酶、和 / 或过氧化物酶。

[0396] 一般而言，一种或多种所选酶的性质应与选定的洗涤剂相容 (即，最优 pH，与其他酶和非酶成分的相容性，等等)，并且该一种或多种酶应以有效量存在。

[0397] 纤维素酶：适合的纤维素酶包括细菌或真菌来源的那些。包含化学修饰的或蛋白工程化的突变体。适合的纤维素酶包括来自芽孢杆菌属、假单胞菌属、腐质霉属、镰孢属、梭孢壳属、枝顶孢霉属的纤维素酶，例如，从在 US 4, 435, 307、US 5, 648, 263、US 5, 691, 178、

US 5,776,757 以及 WO 89/09259 中披露的特异腐质霉、嗜热毁丝霉和尖镰孢产生的真菌纤维素酶。

[0398] 特别适合的纤维素酶是具有颜色保护益处的碱性或中性纤维素酶。这类纤维素酶的实例为在 EP 0 495 257、EP 0 531 372、WO 96/11262、WO 96/29397、WO 98/08940 中描述的纤维素酶。其他实例为纤维素酶变体,如在 WO 94/07998、EP 0 531 315、US 5,457,046、US 5,686,593、US 5,763,254、WO 95/24471、WO 98/12307 以及 PCT/DK98/00299 中描述的那些。

[0399] 展现内切- β -1,4-葡聚糖酶活性的纤维素酶 (EC 3.2.1.4) 的实例是已经描述于 WO 02/099091 中的那些。

[0400] 纤维素酶的其他实例包括描述于 WO 96/29397 中的家族 45 纤维素酶,并且特别是在对应于 WO 02/099091 的 SEQ ID NO:8 中的以下位置的一个或多个位置处具有取代、插入和 / 或缺失的其变体:2、4、7、8、10、13、15、19、20、21、25、26、29、32、33、34、35、37、40、42、42a、43、44、48、53、54、55、58、59、63、64、65、66、67、70、72、76、79、80、82、84、86、88、90、91、93、95、95d、95h、95j、97、100、101、102、103、113、114、117、119、121、133、136、137、138、139、140a、141、143a、145、146、147、150e、150j、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160c、160e、160k、161、162、164、165、168、170、171、172、173、175、176、178、181、183、184、185、186、188、191、192、195、196、200、和 / 或 20, 优选选自 P19A、G20K、Q44K、N48E、Q119H 或 Q146R。

[0401] 可商购的纤维素酶包括 Celluzyme™、和 Carezyme™(诺维信公司)、Clazinase™、和 Puradax HA™(杰能科国际有限公司 (Genencor International Inc.))、以及 KAC-500(B)™(花王株式会社 (Kao Corporation))。

[0402] 蛋白酶:另外的酶可以是另一种蛋白酶或蛋白酶变体。该蛋白酶可以是动物、植物或微生物来源的,包括化学或基因修饰的突变体。优选微生物来源。它可以是一种碱性蛋白酶,例如丝氨酸蛋白酶或金属蛋白酶。丝氨酸蛋白酶可以例如是 S1 家族的(例如胰蛋白酶)或 S8 家族的(例如枯草杆菌蛋白酶)。金属蛋白酶蛋白酶可以例如是一种来自例如家族 M4、M5、M7 或 M8 的嗜热菌蛋白酶。

[0403] 根据司爱森 (Siezen) 等人,蛋白质工程 (Protein Engng.)4(1991)719-737 和司爱森 (Siezen) 等人,蛋白质科学 (Protein Science)6(1997)501-523,术语“枯草杆菌酶”是指丝氨酸蛋白酶的一个亚类。丝氨酸蛋白酶是特征为在活性位点具有与底物形成共价化合物的丝氨酸的蛋白酶的一个亚类。枯草杆菌酶可以划分为 6 个亚部,即,枯草杆菌蛋白酶家族、嗜热蛋白酶 (Thermitase) 家族、蛋白酶 K 家族、羊毛硫氨酸抗生素肽酶 (Lantibiotic peptidase) 家族、Kexin 家族和 Pyrolysin 家族。在本发明的一个方面,该蛋白酶可以是一种枯草杆菌酶,例如枯草杆菌蛋白酶或其变体。另外,枯草杆菌酶(以及丝氨酸蛋白酶)的特征为除了丝氨酸以外,还具有两个活性位点氨基酸残基,即一个组氨酸和一个天冬氨酸残基。

[0404] 枯草杆菌蛋白酶的实例是来源于芽孢杆菌属的那些,例如描述于 WO 89/06279 中的枯草杆菌蛋白酶迟缓 (lentus)、迟缓芽孢杆菌、枯草杆菌蛋白酶 Novo、枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg、地衣芽孢杆菌、枯草杆菌蛋白酶 BPN'、枯草杆菌蛋白酶 309、枯草杆菌蛋白酶 147 和枯草杆菌蛋白酶 168 以及蛋白酶 PD138(WO 93/18140)。另外的丝氨酸蛋白酶实例

是描述于 WO 98/020115、WO 01/44452、WO 01/58275、WO 01/58276、WO 03/006602 以及 WO 04/099401 中。枯草杆菌酶变体的实例可以是在以下任意位置中具有突变的那些 :3、4、9、15、27、36、68、76、87、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、106、118、120、123、128、129、130、160、167、170、194、195、199、205、217、218、222、232、235、236、245、248、252 以及 274, 使用 BPN' 编号。更优选地, 这些枯草杆菌酶变体可以包含以下突变 :S3T、V4I、S9R、A15T、K27R、*36D、V68A、N76D、N87S、R、*97E、A98S、S99G、D、A、S99AD、S101G、M、R、S103A、V104I、Y、N、S106A、G118V、R、H120D、N、N123S、S128L、P129Q、S130A、G160D、Y167A、R170S、A194P、G195E、V199M、V205I、L217D、N218D、M222S、A232V、K235L、Q236H、Q245R、N252K、T274A(使用 BPN' 编号)。进一步优选的蛋白酶是如描述于例如 WO 95/23221 中的来自迟缓芽孢杆菌 DSM5483 的碱性蛋白酶以及描述于 WO 92/21760、WO 95/23221、EP 1921147 以及 EP 1921148 中的其变体。

[0405] 胰蛋白酶样蛋白酶的实例为胰蛋白酶(例如来自猪或牛的)和如 WO 89/06270 和 WO 94/25583 中所公开的镰孢霉属的蛋白酶。有用的蛋白酶的实例是如 WO 92/19729, WO 98/20115, WO 98/20116 和 WO 98/34946 所描述的变体, 特别是在一个或多个下述位置发生取代的变体 :27、36、57、76、87、97、101、104、120、123、167、170、194、206、218、222、224、235、以及 274。

[0406] 金属蛋白酶的实例是如描述于 WO 07/044993 中的中性金属蛋白酶。

[0407] 优选的可商购的蛋白酶酶类包括 Alcalase™、Coronase™、Duralase™、Durazym™、Esperase™、Everlase™、Kannase™、Liquanase™、Liquanase Ultra™、Ovozyme™、Polarzyme™、Primase™、Relase™、Savinase™ 和 Savinase Ultra™(诺维信公司), Axapem™(吉斯特 - 博克斯公司 (Gist-Brocases N. V.)), BLAP 和 BLAP X(汉高公司 (Henkel AG&Co. KGaA)), Excellase™、FN2™、FN3™、FN4™、Maxaca™、Maxapem™、Maxatase™、Properase™、Purafast™、Purafect™、Purafect OxP™、Purafect Prime™ 和 Puramax™(杰能科有限公司)。

[0408] 脂肪酶和角质酶: 适合的脂肪酶和角质酶包括细菌或真菌来源的那些。包括化学修饰的或蛋白工程化的突变体酶。实例包括来自嗜热真菌属的脂肪酶, 例如如描述于 EP 258068 和 EP 305216 中的来自疏绵状嗜热丝孢菌(早先命名为疏棉状腐质霉); 来自腐质霉属的角质酶, 例如特异腐质霉 (WO 96/13580); 来自假单胞菌属的菌株的脂肪酶(这些中的一些现在改名为伯克霍尔氏菌属), 例如产碱假单胞菌或类产碱假单胞菌 (EP 218272)、洋葱假单胞菌 (EP 331376)、假单胞菌属菌株 SD705 (WO 95/06720 & WO 96/27002)、P. wisconsinensis (WO 96/12012); GDSL- 型链霉菌属脂肪酶 (WO 10/065455); 来自稻瘟病菌的角质酶 (WO 10/107560); 来自门多萨假单胞菌的角质酶 (US 5, 389, 536); 来自褐色嗜热裂孢菌 (*Thermobifida fusca*) 的脂肪酶 (WO 11/084412); 嗜热脂肪土芽孢杆菌脂肪酶 (WO 11/084417); 来自枯草芽孢杆菌的脂肪酶 (WO 11/084599); 以及来自灰色链霉菌 (WO 11/150157) 和始旋链霉菌 (*S. pristinaespiralis*) 的脂肪酶 (WO 12/137147)。

[0409] 另外的实例是有时被称为酰基转移酶或过水解酶 (perhydrolase) 的脂肪酶, 例如与南极假丝酵母脂肪酶 A 具有同源性的酰基转移酶 (WO 10/111143)、来自耻垢分枝杆菌的酰基转移酶 (WO 05/56782)、来自 CE 7 家族的过水解酶 (WO 09/67279)、以及耻垢分枝杆菌过水解酶的变体, 特别是用于在来自亨斯迈纺织染化私人有限公司 (Huntsman Textile

Effects Pte Ltd) 的商业化产品 Gentle Power Bleach(柔和漂白剂) 中使用的 S54V 变体 (WO 10/100028)。

[0410] 其他实例是脂肪酶变体, 例如描述于 EP 407225、WO 92/05249、WO 94/01541、WO 94/25578、WO 95/14783、WO 95/30744、WO 95/35381、WO 95/22615、WO 96/00292、WO 97/04079、WO 97/07202、WO 00/34450、WO 00/60063、WO 01/92502、WO 07/87508 以及 WO 09/109500 中的那些。

[0411] 优选的商业化脂肪酶产品包括 Lipolase[™]、Lipex[™]、Lipolex[™] 和 Lipoclean[™](诺维信公司), Lumafast(来自杰能科公司 (Genencor)) 以及 Lipomax(来自吉斯特-博克德斯公司 (Gist-Brocades))。

[0412] 淀粉酶: 淀粉酶可以是一种 α -淀粉酶、 β -淀粉酶或葡糖淀粉酶并且可以是细菌或真菌来源的。包括化学修饰的或蛋白工程化的突变体。淀粉酶包括例如获得自芽孢杆菌属的 α -淀粉酶, 例如 GB 1, 296, 839 中更详细描述的地衣芽孢杆菌具体株系的 α -淀粉酶。

[0413] 淀粉酶的实例是具有 WO 95/10603 中的 SEQ ID NO:3 的那些或与 SEQ ID NO:3 具有 90% 序列一致性的其变体。优选的变体描述于 WO 94/02597、WO 94/18314、WO 97/43424 以及 WO 99/019467 的 SEQ ID NO:4 中, 例如在 WO 95/10603 中的 SEQ ID NO:3 的一个或多个以下位置处具有取代的变体: 15、23、105、106、124、128、133、154、156、178、179、181、188、190、197、201、202、207、208、209、211、243、264、304、305、391、408 以及 444。

[0414] 可以使用的其他淀粉酶是具有 WO 02/010355 中的 SEQ ID NO:6 的淀粉酶或其变体以及包含示于 WO 2006/066594 的 SEQ ID NO:6 中的来源于解淀粉芽孢杆菌的 α -淀粉酶的残基 1-33 和示于 WO 2006/066594 的 SEQ ID NO:4 中的地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶的残基 36-483 的杂合 α -淀粉酶。

[0415] 另外的淀粉酶实例是具有 WO 99/019467 中的 SEQ ID NO:6 的淀粉酶或其变体以及具有 WO 96/023873 的 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:7 的淀粉酶或其变体。可以使用的其他淀粉酶是具有 WO 08/153815 的 SEQ ID NO:2、WO 01/66712 中的 SEQ ID NO:10 的淀粉酶或其变体。

[0416] 可以使用的另外的淀粉酶是具有 WO 09/061380 的 SEQ ID NO:2 的淀粉酶或其变体以及具有 WO 01/66712 中的 SEQ ID NO:12 的 α -淀粉酶或其变体。

[0417] 可商购的淀粉酶是 Duramyl[™]、Termamyl[™]、Fungamyl[™]、Stainzyme[™]、Stainzyme Plus[™]、Natalase[™] 和 BAN[™](诺维信公司), Rapidase[™] 和 Purastar[™](来自杰能科国际有限公司)。

[0418] 过氧化物酶/氧化酶: 适合的过氧化物酶/氧化酶包括植物、细菌或真菌来源的那些。包含化学修饰的或蛋白工程化的突变体。有用的过氧化物酶的实例包括来自鬼伞属, 例如来自灰盖鬼伞的过氧化物酶, 以及其变体, 如在 WO 93/24618、WO 95/10602、以及 WO 98/15257 中描述的那些。

[0419] 可商购的过氧化物酶包括 Guardzyme[™](诺维信公司)。

[0420] 这种或这些洗涤剂酶可以通过添加包含一种或多种酶的单独的添加剂, 或通过添加包含所有这些酶的一种组合添加剂而被包含于洗涤剂组合物中。本发明的洗涤剂添加剂, 即单独的添加剂或组合的添加剂, 可以例如配制为颗粒、液体、浆料等。优选的洗涤剂添

加剂配制品为颗粒,尤其是无尘颗粒;液体,尤其是稳定化的液体;或浆料。

[0421] 无尘颗粒可以例如如在 US 4,106,991 和 4,661,452 中所披露而产生,并且可以任选地通过本领域已知的方法进行涂覆。蜡状涂覆材料的实例为具有 1000 至 20000 的平均摩尔重量的聚环氧乙烷产物(聚乙二醇,PEG);具有 16 至 50 个环氧乙烷单元的乙氧基壬基苯酚;乙氧基脂肪醇,其中该醇包含 12 至 20 个碳原子,并且其中有 15 至 80 个环氧乙烷单元;脂肪醇;脂肪酸;以及脂肪酸的甘油单酯、甘油二酯和甘油三酯。适用于通过流化床技术应用的成膜涂覆材料的实例在 GB 1483591 中给出。液体酶制剂可以例如通过根据已确立的方法添加多元醇(如丙二醇)、糖或糖醇、乳酸或硼酸而稳定化。受保护的酶可以根据 EP 238,216 中披露的方法制备。

[0422] 辅料

[0423] 还可以利用本领域中已知的用于在衣物洗涤剂中使用的任何洗涤剂组分。其他任选的洗涤剂组分包括防腐剂、防缩剂、抗污物再沉积剂、抗皱剂、杀细菌剂、粘合剂、腐蚀抑制剂、崩解剂(disintegrant)/崩解剂(disintegration agent)、染料、酶稳定剂(包括硼酸、硼酸盐、CMC、和/或多元醇例如丙二醇)、织物整理剂包括黏土、填充剂/加工助剂、荧光剂增白剂/光增亮剂、泡沫促进剂、泡沫(泡)调节剂、香料、污物助悬剂、软化剂、抑泡剂、酶暗抑制剂、和芯吸剂,单独亦或组合使用。可以利用本领域中已知的用于在衣物洗涤剂中使用的任何成分。此类成分的选择很好地在业内人士的技术内。

[0424] 分散剂:本发明的洗涤剂组合物还可以包含分散剂。具体地粉状洗涤剂可以包括分散剂。适合的水溶性有机材料包括均聚合或共聚合的酸或其盐,其中多羧酸包含至少两个羧基,这两个羧基被不超过两个碳原子彼此分开。例如适合的分散剂描述于粉状洗涤剂,表面活性剂科学系列(Powdered Detergents, Surfactant science series)第 71 卷中,马塞尔·德克尔公司(Marcel Dekker, Inc.)。

[0425] 染料转移抑制剂:本发明的洗涤剂组合物还可以包括一种或多种染料转移抑制剂。适合的聚合物染料转移抑制剂包括但不限于聚乙烯吡咯烷酮聚合物、多胺 N-氧化物聚合物、N-乙烯吡咯烷酮和 N-乙烯基咪唑的共聚物、聚乙烯噁唑烷酮和聚乙烯咪唑或其混合物。当存在于主题组合物中时,按组合物重量计,染料转移抑制剂可以按以下水平存在:从约 0.0001%至约 10%、从约 0.01%至约 5%或甚至从约 0.1%至约 3%。

[0426] 荧光增白剂:本发明的洗涤剂组合物将优选地还包含另外的组分,这些组分可以给正在清洁的物品着色,例如荧光增白剂或光增亮剂。其中增亮剂优选以约 0.01%至约 0.5%的水平存在。在本发明的组合物中可以使用适合用于在衣物洗涤剂组合物中使用的任何荧光增白剂。最常用的荧光增白剂是属于以下类别的那些:二氨基-磺酸衍生物、二芳基吡啶啉衍生物和二苯基-联苯乙烯基衍生物。荧光增白剂的二氨基-磺酸衍生物型的实例包括以下各项的钠盐:4,4'-双-(2-二乙醇氨基-4-苯胺基-s-三嗪-6-基氨基)芪-2,2'-二磺酸盐;4,4'-双-(2,4-二苯胺基-s-三嗪-6-基氨基)芪-2,2'-二磺酸盐;4,4'-双-(2-苯胺基-4(N-甲基-N-2-羟基-乙氨基)-s-三嗪-6-基氨基)芪-2,2'-二磺酸盐;4,4'-双-(4-苯基-2,1,3-三唑-2-基)芪-2,2'-二磺酸盐;4,4'-双-(2-苯胺基-4(1-甲基-2-羟基-乙氨基)-s-三嗪-6-基氨基)芪-2,2'-二磺酸盐和 2-(二苯乙烯基-4"-萘-1,2':4,5)-1,2,3-三唑-2"-磺酸盐。优选的荧光增白剂是 Tinopal(天来宝)DMS 和 Tinopal(天来宝)CBS,从 Ciba-Geigy AG(汽巴-嘉基股份有限公司),巴塞

尔,瑞士可得。Tinopal(天来宝)DMS是4,4'-双-(2-吗啉代-4-苯胺基-s-三嗪-6-氨基)芪二磺酸盐的二钠盐。Tinopal(天来宝)CBS是2,2'-双-(苯基-苯乙烯基)二磺酸盐的二钠盐。还优选的是,荧光增白剂是可商购的Parawhite KX,由Paramount Minerals and Chemicals(派拉蒙矿物和化学品公司),孟买,印度供应。适合用于本发明的其他荧光剂包括1-3-二芳基吡唑啉和7-氨基香豆素。适合的荧光增白剂水平包括从约0.01、从0.05、从约0.1或甚至从约0.2wt%的较低水平至0.5或甚至0.75wt%的较高水平。

[0427] **污物释放聚合物**:本发明的洗涤剂组合物还可以包括一种或多种污物释放聚合物,这些污物释放聚合物有助于从织物,例如棉的或聚酯基织物上除去污物,特别是从聚酯基织物上除去疏水污物。污物释放聚合物可以例如是非离子的或阴离子的对苯二酸酯基聚合物、聚乙烯基己内酰胺和相关共聚物、乙烯基接枝共聚物、聚酯聚酰胺,参见例如粉状洗涤剂,表面活性剂科学系列(Powdered Detergents, Surfactant science series)第71卷中,第7章,马塞尔·德克尔公司(Marcel Dekker, Inc.)。污物释放聚合物的另一类型是两亲烷氧基化的油污清洁聚合物,该聚合物包括芯结构和多个附接至该芯结构的烷氧基化基团。芯结构可以包括聚烷基亚胺结构或聚烷醇胺结构,如详述于WO 2009/087523中(将其通过引用结合在此)。此外,随机接枝共聚物是适合的污物释放聚合物。适合的接枝共聚物更详细地描述于WO 2007/138054、WO 2006/108856和WO 2006/113314中(将其通过引用结合在此)。其他污物释放聚合物是取代的多糖结构,尤其是取代的纤维素结构,例如改性纤维素衍生物,例如描述于EP 1867808或WO 2003/040279中的那些(将这二者都通过引用结合在此)。适合的纤维素聚合物包括纤维素、纤维素醚、纤维素酯、纤维素酰胺及其混合物。适合的纤维素聚合物包括阴离子改性的纤维素、非离子改性的纤维素、阳离子改性的纤维素、两性离子改性的纤维素、及其混合物。适合的纤维素聚合物包括甲基纤维素、羧甲基纤维素、乙基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、酯羧甲基纤维素、及其混合物。

[0428] **抗再沉积剂**:本发明的洗涤剂组合物还可以包括一种或多种抗再沉积剂,例如羧甲基纤维素(CMC)、聚乙烯醇(PVA)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、聚环氧乙烷和/或聚乙二醇(PEG)、丙烯酸的均聚物、丙烯酸和马来酸的共聚物、和乙氧基化的聚乙亚胺。以上在污物释放聚合物下描述的基于纤维素的聚合物的功能还可以是抗再沉积剂。

[0429] **其他适合的辅料**包括但不限于防缩剂、抗皱剂、杀细菌剂、粘合剂、载体、染料、酶稳定剂、织物软化剂、填充剂、泡沫调节剂、助水溶剂、香料、色素、抑泡剂、溶剂、和用于液体清洁剂的结构剂和/或结构弹性剂。

[0430] **洗涤剂产品的配制**

[0431] 本发明的洗涤剂组合物可以处于任何常规形式,例如棒、均匀的片剂、具有两个或更多个层的片剂、具有一个或多个室的袋、规则的或压缩的粉、颗粒、膏、凝胶、或规则压缩的或浓缩的液体。存在多种洗涤剂配制品形式,例如层(相同或不同相)、袋以及用于机械给料装置的形式。

[0432] 袋可以被配置为单个或多个的室。它可以具有适合保存该组合物的任何形式、形状和材料,例如在与水接触之前,不允许该组合物从袋中释放出来。袋由封装内体积的水溶性膜制成。可以将所述内体积分为袋的室。优选的膜是形成膜或片的聚合材料,优选是聚合物。优选的聚合物、共聚物或其衍生物选自聚丙烯酸酯、和水溶性丙烯酸酯共聚物、甲基纤维素、羧甲基纤维素、糊精钠、乙基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、麦芽糊精、

聚甲基丙烯酸酯,最优选地是聚乙烯醇共聚物以及,羟丙基甲基纤维素 (HPMC)。优选地,在膜中的聚合物(例如 PVA)的水平是至少约 60%。优选的平均分子量将典型地是约 20,000 至约 150,000。膜还可以是共混物组合物,该共混物组合物包含可水解降解并且水可溶的聚合物共混物,例如聚乳酸和聚乙烯醇(已知在贸易参考 M8630 下,如由美国印第安纳州盖里(Gary, Ind., US) 的克里斯克拉夫特工业产品公司(Chris Craft In. Prod.) 销售) 加增塑剂,像甘油、乙二醇、丙二醇、山梨醇及其混合物。这些袋可以包括固体衣物清洁组合物或部分组分和 / 或液体清洁组合物或由水溶性膜分离的部分组分。用于液体组分的室在构成上可以与包含固体的室不同。参考文献:(US 2009/0011970 A1)。

[0433] 可以由水可溶的袋中或片剂的不同层中的室来将洗涤剂成分物理地彼此分开。由此可以避免组分之间的负面的存储相互作用。在洗涤溶液中,每个室的不同溶解曲线还可以引起选择的组分的延迟溶解。

[0434] 非单位剂量的液体或凝胶洗涤剂可以是水性的,典型地包含按重量计至少 20% 并且最高达 95% 的水,例如高达约 70% 的水、高达约 65% 的水、高达约 55% 的水、高达约 45% 的水、高达约 35% 的水。其他类型的液体,包括但不局限于链烷醇、胺、二醇、醚和多元醇,可以包含在水性液体或凝胶中。水性液体或凝胶洗涤剂可以包含从 0-30% 的有机溶剂。液体或凝胶洗涤剂可以是非水性的。

[0435] 洗衣皂条

[0436] 本发明的酶可以被添加至洗衣皂条中并且用于手洗洗衣、织物和 / 或纺织品。术语洗衣皂条包括洗衣条、皂条、组合条 (combo bar)、合成洗涤剂条以及洗涤剂条。条的类型通常区别在于它们包含的表面活性剂的类型,并且术语洗衣皂条包括包含来自脂肪酸的肥皂和 / 或合成皂的那些。洗衣皂条具有在室温下为固体而非液体、凝胶或粉末的物理形式。术语固体被定义为不随着时间显著变化的物理形式,即如果将一固体物体(例如洗衣皂条)放置于一个容器内部,该固体物体不发生改变来填充它被放置于其中的容器。条典型地是处于条形的固体但是可以处于其他固体形状,例如圆形或卵形。

[0437] 洗衣皂条可以包含一种或多种另外的酶,蛋白酶抑制剂例如肽醛类(或次硫酸盐加合物或半缩醛加合物),硼酸,硼酸盐,硼砂和 / 或苯基硼酸衍生物例如 4- 甲酰基苯基硼酸,一种或多种肥皂或合成表面活性剂,多元醇例如甘油, pH 控制化合物例如脂肪酸、柠檬酸、乙酸和 / 或甲酸,和 / 或一价阳离子和有机阴离子的盐,其中该一价阳离子可以是例如 Na^+ 、 K^+ 或 NH_4^+ 并且该有机阴离子可以是例如甲酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐或乳酸盐,这样使得一价阳离子和有机阴离子的盐可以是例如甲酸钠。

[0438] 洗衣皂条还可以包含络合剂像 EDTA 和 HEDP,香料和 / 或不同类型的填充剂,表面活性剂例如阴离子型合成表面活性剂,助洗剂,聚合的污物释放剂,洗涤剂螯合剂,稳定剂,填充剂,染料,着色剂,染料转移抑制剂,烷氧基化的聚碳酸酯,抑泡剂,结构剂,粘合剂,浸出剂,漂白活化剂,粘土去污剂,抗再沉积剂,聚合分散剂,增白剂,织物柔软剂,香料和 / 或本领域已知的其他化合物。

[0439] 洗衣皂条可以在常规的洗衣皂条制造设备中进行加工,例如但不限制于:混合器、压条机例如双级真空压条机、挤出机、切割机、标识压模机 (logo-stamper)、冷却隧道以及包装机。本发明不局限于通过任何单一方法制备洗衣皂条。可以在过程的不同阶段向肥皂中添加本发明的预混料。例如,可以制备包含肥皂、酶、任选地一种或多种另外的酶、蛋白酶

抑制剂以及一价阳离子和有机阴离子的盐的预混料并且然后将该混合物压条。可以同时添加作为例如处于液态的蛋白酶抑制剂的酶以及任选的另外的酶。除了混合步骤和压条步骤以外,该工艺还可以进一步包括研磨、挤出、切割、压模、冷却和 / 或包装的步骤。

[0440] 颗粒洗涤剂配制品

[0441] 如描述于 WO 09/092699、EP 1705241、EP 1382668、WO 07/001262、US 6472364、WO 04/074419 或 WO 09/102854 中的,可以配制颗粒洗涤剂。其他有用的洗涤剂配制品描述于以下各项中:WO 09/124162、WO 09/124163、WO 09/117340、WO 09/117341、WO 09/117342、WO 09/072069、WO 09/063355、WO 09/132870、WO 09/121757、WO 09/112296、WO 09/112298、WO 09/103822、WO 09/087033、WO 09/050026、WO 09/047125、WO 09/047126、WO 09/047127、WO 09/047128、WO 09/021784、WO 09/010375、WO 09/000605、WO 09/122125、WO 09/095645、WO 09/040544、WO 09/040545、WO 09/024780、WO 09/004295、WO 09/004294、WO 09/121725、WO 09/115391、WO 09/115392、WO 09/074398、WO 09/074403、WO 09/068501、WO 09/065770、WO 09/021813、WO 09/030632、以及 WO 09/015951。

[0442] WO 2011025615、WO 2011016958、WO 2011005803、WO 2011005623、WO 2011005730、WO 2011005844、WO 2011005904、WO 2011005630、WO 2011005830、WO 2011005912、WO 2011005905、WO 2011005910、WO 2011005813、WO 2010135238、WO 2010120863、WO 2010108002、WO 2010111365、WO 2010108000、WO 2010107635、WO 2010090915、WO 2010033976、WO 2010033746、WO 2010033747、WO 2010033897、WO 2010033979、WO 2010030540、WO 2010030541、WO 2010030539、WO 2010024467、WO 2010024469、WO 2010024470、WO 2010025161、WO 2010014395、WO 2010044905、

[0443] WO 2010145887、WO 2010142503、WO 2010122051、WO 2010102861、WO 2010099997、WO 2010084039、WO 2010076292、WO 2010069742、WO 2010069718、WO 2010069957、WO 2010057784、WO 2010054986、WO 2010018043、WO 2010003783、WO 2010003792、

[0444] WO 2011023716、WO 2010142539、WO 2010118959、WO 2010115813、WO 2010105942、WO 2010105961、WO 2010105962、WO 2010094356、WO 2010084203、WO 2010078979、WO 2010072456、WO 2010069905、WO 2010076165、WO 2010072603、WO 2010066486、WO 2010066631、WO 2010066632、WO 2010063689、WO 2010060821、WO 2010049187、WO 2010031607、WO 2010000636。

[0445] 以下实例进一步描述本发明,这些实例不应当解释为限制本发明的范围。

[0446] 实例

[0447] 材料与amp;方法

[0448] 蛋白酶测定法

[0449] 1) Suc-AAPF-pNA 测定法:

[0450] pNA 底物: Suc-AAPF-pNA(瑞士巴亨(Bachem)L-1400)。

[0451] 温度: 室温(25℃)

[0452] 测定缓冲液:100mM 琥珀酸,100mM HEPES,100mM CHES,100mM CABS,1mM CaCl₂,150mM KCl,0.01% Triton X-100,用 HCl 或 NaOH 调节至 pH 值 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、和 11.0。

[0453] 将 20 μ l 蛋白酶 (稀释于 0.01% Triton X-100 中) 与 100 μ l 测定缓冲液混合。通过添加 100 μ l pNA 底物 (50mg 溶解于 1.0ml DMSO 中并且用 0.01% Triton X-100 进一步稀释 45 倍) 开始测定。监测 OD₄₀₅ 的增加作为蛋白酶活性的量度。

[0454] 2) Protazyme AK 测定法:

[0455] 底物: Protazyme AK 片 (交联和染色的酪蛋白; 来自麦格酶公司 (Megazyme))

[0456] 温度: 受控的 (测定温度)。

[0457] 测定缓冲液: 100mM 琥珀酸, 100mM HEPES, 100mM CHES, 100mM CABS, 1mM CaCl₂, 150mM KCl, 0.01% Triton X-100, pH6.5 或 pH7.0。

[0458] 通过温和搅拌, 将一片 Protazyme AK 悬浮于中 2.0ml 0.01% Triton X-100 中。将 500 μ l 的这种悬液和 500 μ l 的测定缓冲液分散在艾本德离心管 (Eppendorf tube) 中并置于冰上。添加 20 μ l 蛋白酶样品 (稀释在 0.01% Triton X-100 中)。通过将艾本德离心管转移至设定为测定温度的艾本德恒温混匀仪 (Eppendorf thermomixer) 来启动测定。将管在艾本德恒温混匀仪上在最高振摇速率 (1400 转 / 分钟) 下孵育 15 分钟。通过转移该管返回至冰浴停止孵育。随后将管在冰冷的离心机中离心数分钟并将 200 μ l 上清液转移至微量滴定板。读取 OD₆₅₀ 作为蛋白酶活性的量度。在测定法中包含空白缓冲液 (buffer blind) (代替酶)。

[0459] 3) Suc-AAPX-pNA 测定:

[0460] pNA 底物: Suc-AAPA-pNA (瑞士巴亨 (Bachem) L-1775)

[0461] Suc-AAPR-pNA (瑞士巴亨 (Bachem) L-1720)

[0462] Suc-AAPD-pNA (瑞士巴亨 (Bachem) L-1835)

[0463] Suc-AAPI-pNA (瑞士巴亨 (Bachem) L-1790)

[0464] Suc-AAPM-pNA (瑞士巴亨 (Bachem) L-1395)

[0465] Suc-AAPV-pNA (瑞士巴亨 (Bachem) L-1770)

[0466] Suc-AAPL-pNA (瑞士巴亨 (Bachem) L-1390)

[0467] Suc-AAPE-pNA (瑞士巴亨 (Bachem) L-1710)

[0468] Suc-AAPK-pNA (瑞士巴亨 (Bachem) L-1725)

[0469] Suc-AAPF-pNA (瑞士巴亨 (Bachem) L-1400)

[0470] 温度: 室温 (25°C)

[0471] 测定缓冲液: 100mM 琥珀酸, 100mM HEPES, 100mM CHES, 100mM CABS, 1mM CaCl₂, 150mM KCl, 0.01% Triton X-100, pH9.0。

[0472] 将 20 μ l 蛋白酶 (稀释于 0.01% Triton X-100 中) 与 100 μ l 测定缓冲液混合。通过添加 100 μ l pNA 底物 (50mg 溶解于 1.0ml DMSO 中并且用 0.01% Triton X-100 进一步稀释 45 倍) 开始测定。监测 OD₄₀₅ 的增加作为蛋白酶活性的量度。

[0473] 邻苯二甲醛 (OPA) 测定法

[0474] 这一测定检测伯胺并且因此可以将肽键由一种蛋白酶的切割测量为蛋白酶处理的样品与对照样品之间的吸光度的差异。基本上根据尼尔森 (Nielsen) 等人 (尼尔森 (Nielsen), PM, 彼得森 (Petersen), D, 达姆麦妮 (Dampmann), C. 用于确定食物蛋白水解程度的改进方法 (Improved method for determining food protein degree of hydrolysis), 2001, 食品科学杂志 (J Food Sci), 66:642-646) 进行该测定。

[0475] 将 500 μ l 样品通过 100kDa 微量浓缩 (Microcon) 离心过滤器 (60min, 11,000rpm, 5 $^{\circ}$ C) 过滤。将这些样品在去离子水中稀释大约 (例如 10 倍、50 倍或 100 倍), 并将 25 μ l 的每份样品装载到 96 孔微量滴定板中 (5 个重复)。将 200 μ l OPA 试剂 (100mM 四硼酸二钠十水合物, 3.5mM 十二烷基硫酸钠 (SDS), 5.7mM 二硫苏糖醇 (DDT), 6mM 邻苯二甲醛) 分配在所有孔中, 振荡该板 (10sec, 750rpm) 并且在 340nm 下测量吸光度。

[0476] 大豆 - 玉米粉测定法 (SMM 测定法)

[0477] 使用大豆 - 玉米粉作为底物的终点测定以获得在 pH3-7 时该蛋白酶的活性曲线。

[0478] 底物: 将大豆粉 - 玉米粉以 30:70 比例混合物。

[0479] 测定缓冲液: 制备包含 100mM 琥珀酸, 100mM HEPES, 100mM CHES, 100mM CAPS, 1mM CaCl_2 , 150mM KCl, 0.01% Triton X-100 的 9 种缓冲液并使用 HCl 或 NaOH 调节至一 pH 值这样使得在将大豆 - 玉米粉底物 (1g) 与测定缓冲液 (10mL) 混合之后给出一种浆体, 该浆体的终 pH 是以下 pH 之一: 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 以及 11.0。

[0480] 在添加蛋白酶并在 40 $^{\circ}$ C 下孵育 (500rpm) 3 小时之前将底物浆体 (2mL) 混合 30min。将蛋白酶 (200mg 酶蛋白/kg 干物质) 溶解于 100 μ l 100mM 乙酸钠 (NaOAc) 缓冲液 (9.565g/l NaOAc, 1.75g/l 乙酸, 5mM CaCl_2 , 0.01% BSA, 0.01% 吐温 20, pH6.0) 中并且添加。离心 (10min, 4000rpm, 0 $^{\circ}$ C) 后收集上清液并且基于基本上根据尼尔森 (Nielsen) 等人 (尼尔森 (Nielsen), PM, 彼得森 (Petersen), D, 达姆麦妮 (Dampmann), C. 用于确定食物蛋白水解程度的改进方法 (Improved method for determining food protein degree of hydrolysis). 食品科学杂志 (J Food Sci), 2001, 66:642-646) 的邻苯二醛 (o-phthal-dialdehyde) (OPA) 方法, 使用比色测定确定蛋白活性。本测定检测游离 α -氨基基团, 并且因此蛋白酶活性可被测量为吸光度的增加。将每份上清液的第一个 500 μ l 通过 100kDa 微量浓缩过滤器经由离心 (60min, 11,000rpm, 5 $^{\circ}$ C) 进行过滤。将这些样品在去离子水中稀释 10x, 并将 25 μ l 的每份样品装载到 96 孔微量滴定板中 (5 个重复)。最后, 将 200 μ l OPA 试剂分配在所有孔中, 并振荡该板 (10sec, 750rpm), 并且在 340nm 下测量吸光度。蛋白酶活性水平被计算为酶处理的样品和空白样品的吸光度之间的差异, 并且表示为 'OD x 稀释系数'。

[0481] 结果提供于以下实例 4 中。

[0482] 菌株

[0483] 编码来自红色糖多孢菌的 S1 蛋白酶 1 的核苷酸序列由奥林利克 (Oliylyk) 等人公布于 '产生红霉素的细菌红色糖多孢菌 NRRL23338 的全基因组序列 (Complete genome sequence of the erythromycin-producing bacterium *Saccharopolyspora erythraea* NRRL23338)' 中, 2007, 自然生物技术 (Nat. Biotechnol.) 25:447-453 并且将该基因在登录号 EMBL:AM420293 下提交至 EMBL/GenBank。根据奥林利克 (Oliylyk), '使用的菌株 NRRL23338 是红色糖多孢菌 NRRL2338 的模式菌株的原始形式, 现在该菌株在 NRRL 数据库中被列为白色 NRRL23338 (NRRL23338white)'。NRRL 数据库指示 (在对应于白色 NRRL23338 的 NRRL 编号 B-24071 下) '白色菌落变体分离自来自第二冻干的安瓿的生长'。用于 NRRL2338 的参考文献引用 US 2,653,899, 其中指出在 1952 年或之前从菲律宾群岛的怡朗市 (Ilongo City) 获得作为土壤样品的红色糖多孢菌 NRRL2338 的原始样品。

[0484] 实例 1: 用于表达来自红色糖多孢菌的 S1 蛋白酶 1 的枯草芽孢杆菌菌株的构建

[0485] 基于被鉴定为 SEQ ID NO:1 的公开的核苷酸序列,由 Gene Art (基因技术生物园公司 (GENEART AG BioPark),约瑟夫-恩格特大街 (Josef-Engert-Str.) 11 号,93053,雷根斯堡,德国)合成具有 SEQ ID NO:3 的合成基因。如在 PCT/EP11/064585 的实例 1 中所述,使用 ClaI 和 MluI 限制酶切位点将该合成基因亚克隆进芽孢杆菌属表达载体中。在补充有 6 μ g 氯霉素每 ml 的 LB 板上选择转化株。

[0486] 选择包含整合的表达构建体的重组体枯草芽孢杆菌克隆并且将其指定为红色糖多孢菌 S1-1。将其在 500mL 带挡板的锥形瓶 (Erlenmeyer flask) 中的旋转摇床上培养,每个锥形瓶包含补充有 34mg/1 氯霉素的 100ml 基于酪蛋白的培养基。将该克隆在 37°C 下培养 3 天。收获包含上清液的酶并如实施例 2 中所述的将该酶进行纯化。将纯化的肽酶指定为来自红色糖多孢菌的 S1 蛋白酶 1。

[0487] 实例 2:来自菌株红色糖多孢菌 S1-1 的红色糖多孢菌的 S1 蛋白酶 1 的纯化。

[0488] 将红色糖多孢菌 S1-1 培养液离心 (20000xg, 20min) 并且将上清液小心地与沉淀物离心分开。上清液通过耐洁 (Nalgene) 0.2 μ m 过滤装置过滤以便除去剩余芽孢杆菌属宿主细胞。向 0.2 μ m 滤液中添加固体硫酸铵,至 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的终硫酸铵浓度为 1.4M。将硫酸铵调节的 0.2 μ m 滤液施加至在 100mM H_3BO_3 , 10mM MES/NaOH, 2mM CaCl_2 , 1.4M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH6.0 中平衡的苯基 Toyopearl650S 柱 (来自东曹公司 (TosoHaas)) 上。在用平衡缓冲液充分洗涤该柱之后,在相同的缓冲液中将蛋白酶经三个柱体积的线性 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 梯度 (1.4—>0M) 进行洗脱。分析来自该柱的部分的蛋白酶活性 (使用 pH9 下的 Suc-AAPF-pNA 测定法)。合并蛋白酶峰并且将其转移至 G25 交联葡聚糖 (G25Sephadex) 柱 (来自 GE 医疗集团) 上的 100mM H_3BO_3 , 10mM MES/NaOH, 2mM CaCl_2 , pH6.0。G25 交联葡聚糖转移的酶轻微混浊并且将其通过耐洁 0.2 μ m 过滤装置进行过滤。用 20% CH_3COOH 将过滤的酶溶液的 pH 调节至 pH4.5 并且将该溶液施加至在 20mM $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{NaOH}$, 1mM CaCl_2 , pH4.5 中平衡的 SP-琼脂糖 FF (SP-sepharose FF) 柱 (来自 GE 医疗集团) 上。在用平衡缓冲液充分洗涤该柱之后,在相同的缓冲液中将蛋白酶经五个柱体积的线性 NaCl 梯度 (0—>0.5M) 进行洗脱。分析来自该柱的部分的蛋白酶活性 (使用 pH9 下的 Suc-AAPF-pNA 测定法)。合并蛋白酶峰并且将其转移至 G25 交联葡聚糖柱 (来自 GE 医疗集团) 上的 10mM 丁二酸 /NaOH, pH3.5。将 G25 交联葡聚糖转移的酶施加至在 10mM 丁二酸 /NaOH, pH3.5 中平衡的 SOURCE S 柱 (来自 GE 医疗集团) 上。在用平衡缓冲液充分洗涤该柱之后,在相同的缓冲液中将蛋白酶经三十个柱体积的线性 NaCl 梯度 (0—>0.5M) 进行洗脱。分析来自该柱的部分的蛋白酶活性 (使用 pH9 下的 Suc-AAPF-pNA 测定法),并且通过 SDS-PAGE 进一步分析活性部分。将在考马斯染色的 SDS-PAGE 凝胶上仅见到一条带的部分合并并且用 3% NaOH 将 pH 调节至 pH5.0。来自 SOURCE S 柱的调节的合并物是纯化制剂并且用于进一步表征。

[0489] 实例 3:来自红色糖多孢菌的 S1 蛋白酶 1 的表征

[0490] 将 Suc-AAPF-pNA 测定法用于获得 pH-活性曲线和 pH-稳定性曲线 (在指示的 pH 值下 2 小时之后的残余活性)。对于 pH-稳定性曲线,将蛋白酶在不同测定缓冲液中稀释 10x 以达到这些缓冲液的 pH 值并且然后在 37°C 下孵育 2 小时。在孵育之后,通过稀释于 pH10.0 测定缓冲液中,使该蛋白酶孵育物的 pH 转至与残余活性测定之前相同的 pH 值。使用 Protazyme AK 测定法以获得在 pH7.0 下的温度-活性曲线。使用 Suc-AAPX-pNA 测定和十种不同的 Suc-AAPX-pNA 底物以获得这些酶在 pH9.0 下的 P1-特异性。

[0491] 结果显示在下表 2-5 中。对于表 2, 活性是相对于酶的最佳 pH 而言。对于表 3, 活性是相对于样品的残余活性, 将该样品在稳定条件 (5°C, pH9.0) 下保持。对于表 4, 活性是相对于酶在 pH7.0 下的最佳温度而言。对于表 5, 活性是相对于酶的最佳底物 (Suc-AAPF-pNA) 而言。

[0492] 表 2 : 在 25°C 下的 pH- 活性曲线

[0493]

pH	来自红色糖多孢菌的 S1 蛋白酶 1	蛋白酶 10R
2	0.00	
3	0.00	0.00
4	0.02	0.02
5	0.09	0.07
6	0.26	0.21
7	0.45	0.44
8	0.74	0.67
9	0.96	0.88

[0494]

10	1.00	1.00
11	1.00	0.93

[0495] 表 3 : pH- 稳定性曲线 (在 37°C 下 2 小时之后的残余活性)

[0496]

pH	来自红色糖多孢菌的S1蛋白酶1	蛋白酶10R
2	0.98	0.78
3	0.99	1.03
4	0.99	0.99
5	1.02	1.00
6	0.96	1.03
7	1.00	1.01
8	0.99	0.98
9	0.99	0.99
10	0.96	0.99
11	0.95	0.86
在5°C下2小时之后	1.00 (在pH 9处)	1.00 (在pH 9处)

[0497] 表 4 :在 pH7.0 或 pH6.5 处的温度活性曲线

[0498]

温度 (°C)	来自红色糖多孢菌的S1蛋白酶1 (pH 7)	蛋白酶10R (pH 6.5)
15	0.01	0.01
25	0.01	0.02
37	0.04	0.06
50	0.10	0.13
60	0.19	0.35
70	0.59	0.96
80	1.00	1.00
90	0.16	0.18

[0499] 表 5 :在 pH9.0 处对 10 种 Suc-AAPX-pNA 底物的 P1- 特异性

[0500]

Suc-AAPX-pNA	来自红色糖多孢菌的 S1 蛋白酶 1	蛋白酶 10R
Suc-AAPA-pNA	0.03	0.13

Suc-AAPR-pNA	0.08	0.09
Suc-AAPD-pNA	0.00	0.00
Suc-AAPI-pNA	0.00	0.00
Suc-AAPM-pNA	0.40	0.78
Suc-AAPV-pNA	0.01	0.01
Suc-AAPL-pNA	0.19	0.18
Suc-AAPE-pNA	0.00	0.00
Suc-AAPK-pNA	0.04	0.08
Suc-AAPF-pNA	1.00	1.00

[0501] 与蛋白酶 10R 的数据比较的来自红色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1 的对 Suc-AAPF-pNA 底物的 pH- 活性、pH- 稳定性曲线（在 37 °C 下 2 小时之后的残余活性）、在 pH7.0 下对 Protazyme AK 的温度活性曲线以及在 pH9.0 下对 10 种 Suc-AAPF-pNA 底物的 P1- 特异性也示于图 1 至图 4 中。

[0502] 来自红色糖多孢菌的 S1 蛋白酶 1 的其他特征

[0503] 抑制剂 :PMSF。

[0504] 确定 N- 端序列为 :YNVVGGD。

[0505] 如通过 SDS-PAGE 确定的相对分子量是大约 $M_r = 20\text{kDa}$ 。

[0506] 通过完整分子量分析确定的分子量是 19337.5Da。

[0507] 来自 MS- 埃德曼 (MS-EDMAN) 数据的成熟序列（并且如从 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:3 演绎的）：

[0508] YNVVGGDAYYMGGRCVGFVSVRSSSGQAGFVTAGHCGTRGTAVSGYNQVAMGSFQSSFPNNDYAWVSV NSNWTPQPWNLYNGSARVVSGSSAAPVGSICRSGSTTGWHCQSVQALNQTVRYAEGTVYGLTRTNVCAEPGDSGG SFISGNQAQGMTSGGSGNCSSGGTTYFQPVNEALSAYGLSLVRG (SEQ ID NO:5)。

[0509] 来自这一成熟序列的计算的分子量是 19336.9Da。

[0510] 实例 4 :在大豆 - 玉米粉测定法 (SMM 测定法) 中的蛋白酶活性

[0511] 使用大豆 - 玉米粉测定法描述蛋白酶对与动物饲料相关的底物的活性。结果示于下表 6 和图 5 中。来自红色糖多孢菌的 S1 蛋白酶 1 对大豆 - 玉米粉的蛋白水解活性以从 pH3 至 pH7 的渐增的 pH 增加,并且在整个 pH 范围内的活性高于蛋白酶 10R,表明来自红色糖多孢菌的 S1 蛋白酶 1 在例如猪和家禽的胃肠道中可以更有效水解蛋白质。

[0512] 表 6 :在 pH3.0、4.0、5.0、6.0、和 7.0 处对大豆 - 玉米粉的蛋白酶活性

[0513]

pH	来自红色糖多孢菌的S1蛋白酶1		蛋白酶10R	
	平均数	标准差	平均数	标准差
3.0	0.37	0.01	0.22	0.06
4.0	0.36	0.03	0.30	0.10
5.0	1.32	0.07	0.71	0.01
6.0	2.74	0.06	1.81	0.14
7.0	3.54	0.06	2.92	0.11

[0514] 实例 5 :对来自肉仔鸡的嗦囊、砂囊和回肠消化物的蛋白水解活性

[0515] 收集来自喂食玉米 - 大豆饮食的 21 天大的肉仔鸡的嗦囊、砂囊和回肠消化物材料 ;冻干并用小型磨咖啡机进行研磨。将这些研磨的样品悬浮 (47% w/v) 于以下的缓冲液中并且使其在 4°C 与水化合过夜 (不搅拌) :

[0516] 嗦囊缓冲液 :100mM HEPES, 1mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 150mM KCl, 0.01% Triton X-100, 使用 HCl 调节至 pH5

[0517] 砂囊缓冲液 :100mM 琥珀酸, 1mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 150mM KCl, 0.01% Triton X-100, 使用 HCl 调节至 pH1.67

[0518] 回肠缓冲液 :100mM HEPES, 1mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 150mM KCl, 0.01% Triton X-100, 使用 HCl 调节至 pH7.2

[0519] 所得 pH 是 :在嗦囊样品中 pH5 ;在砂囊样品中 pH3 ;以及在回肠样品中 pH7。将悬浮液加热至 40°C 并将 1ml 分配到多个管中,保持在 40°C 下。将代表空白 (T_0) 的三个管即刻离心 (3000xg, 0°C, 10min) 并冷冻上清液。向这些管中添加在 50 μL 100mM 乙酸钠缓冲液 (9.565g/l NaOAc, 1.75g/l 乙酸, 5mM CaCl_2 , 0.01% BSA, 0.01% 吐温 20, pH6.0) 中的酶 (200mg 酶蛋白 /kg 底物) 或用于空白样品的仅仅乙酸钠缓冲液 (50 μL), 并且在 40°C 下伴随振荡 (500rpm), 将嗦囊和回肠样品孵育 3 小时 (T_3) 而将砂囊样品孵育 1 小时 (T_1)。将这些样品离心 (3000xg, 0°C, 10min) 并且恢复上清液并冷冻。使用邻苯二甲醛 (OPA) 测定法通过分析伯胺确定蛋白水解活性。

[0520] 结果示于表 7 中。对于这些消化物类型 (嗦囊、砂囊和回肠) 中的每种,在空白 T_0 样品中的可溶性伯胺的水平之间存在显著差异,并将这些空白样品孵育 1 或 3 小时。这一差异可以归因于底物中存在的以及源自饮食原料或动物的蛋白酶的溶解作用和活性。与空白样品相比,来自红色糖多孢菌的 S1 蛋白酶 1 显著地增加了嗦囊和回肠样品中的可溶性伯胺的水平。通过来自红色糖多孢菌的 S1 蛋白酶 1 观察到的增加与蛋白酶 10R 的增加一样高或数字上高于蛋白酶 10R 的增加,表明这一蛋白酶对给定的底物具有略高的蛋白水解潜力。

[0521] 表 7 :与蛋白酶 10R 相比,当用肉仔鸡消化物孵育时,来自红色糖多孢菌的 S1 蛋白酶 1 的蛋白水解活性,并表示为由 OPA 测定法所测量的伯胺的水平 ($\text{OD}_{340} \times$ 稀释系数)

[0522]

处理	嗦囊 (3 小时)	砂囊 (1 小时)	回肠 (3 小时)

空白 (T_0)	2.21 ± 0.02^c	2.95 ± 0.02^b	9.37 ± 0.08^b
空白	3.54 ± 0.02^b	3.85 ± 0.13^a	14.42 ± 0.52^a
蛋白酶 10R	3.85 ± 0.07^a	3.87 ± 0.13^a	14.74 ± 0.16^a
来自红色糖多孢菌的 S1 蛋白酶 1	3.87 ± 0.10^a	3.89 ± 0.04^a	14.84 ± 0.14^a

[0523] 在一栏中的没有通过相同的上标字母连贯的 ^{a,b,c,d} 值是通过图基克雷默 (Tukey Kramer) 检验 ($\alpha = 0.05$) (由 ANOVA 程序 (SAS 研究所有限公司) 提供) 确定的统计性差异。

[0524] 实例 6 :热稳定性

[0525] 将蛋白酶的蛋白样品的等分试样 (如实例 2 中所述的经过纯化的) 脱盐或使用预装 PD-10 柱改变缓冲液为 20mM 乙酸钠, pH4.0 或在 4°C 下以 2-3h 步骤针对 2x500ml 20mM 乙酸钠, pH4.0 进行透析, 随后是一个过夜步骤。将该样品进行 0.45 μ m 过滤并用缓冲液稀释至大约 2 A280 单位。在差示扫描量热法 (DSC) 中使用该透析缓冲液作为参照。使用真空吸引器对这些样品进行脱气并搅拌大约 10 分钟。

[0526] 以 1.5°C /min 的连续扫描速率从 20°C -90°C 在 MicroCal VP-DSC 上进行 DSC 扫描。使用 MicroCal 起点软件 (Origin software) (4.10 版本) 进行数据处理, 并将变性温度 T_d (也称为溶解温度 T_m) 定义为温度自记曲线的峰尖端的温度。

[0527] 实例 7 :蒸汽稳定性

[0528] 使用以下测定法评价蒸汽处理后该蛋白酶的残余活性。

[0529] 在这些试验中, 使用修改设置从而该蒸汽是从蒸汽发生器中提供的并导入到箱中。当温度达到约 93°C -94°C 时, 通过抽屉将放置在板上的这些样品插入到该箱中。插入这些样品后, 温度即降低 4°C。当温度停留在大约恒定的 90°C 时, 孵育 30 秒。其后, 将该板快速从该箱中移出, 将这些样品放置在冰上, 重悬浮并针对蛋白酶活性使用 Suc-AAPF-pNA 或邻苯二甲醛 (OPA) 测定法进行评价。将每个酶样品与未经过蒸汽处理的相似样品进行对比以计算残余活性。

[0530] 实例 8 :造丸稳定性测试

[0531] 如美国专利号 4, 106, 991, 实例 1 中所述的方式进行酶粒化。将获得的颗粒在流化床中干燥至含水量低于 1% 并过筛以获得具有 250 μ m 至 850 μ m 粒子范围的产物。最终, 将该产物用棕榈油和碳酸钙以如在美国专利号 4, 106, 991, 实例 22 中所述的方式进行包衣。

[0532] 在小型卧式搅拌器中, 大致地将 50g 酶颗粒与 10kg 饲料预混合 10 分钟。在大型卧式搅拌器中将该预混合物与 90kg 饲料混合 10 分钟。将该饲料从该搅拌器中以大约 300kg/小时的速率导至调节器 (带有蒸汽注入的串联搅拌器)。该调节器通过注入蒸汽将该饲料加热至 95°C (在排气口进行测量)。在该调节器中的停留时间是 30 秒。将该饲料从该调节器中导至配备有 3.0x35mm 水平冲模的西蒙黑森 (Simon Heesen) 压力机中并将其压缩成具有大约 15mm 的长度的丸。在压缩后, 将这些丸放置在冷气机中并冷却 15 分钟。

[0533] 在造丸之前使用 Suc-AAPF-pNA 测定法测量蛋白酶活性, 并在造丸之后测量该饲料丸中的蛋白酶活性。通过将丸状饲料中的蛋白酶活性相对于非丸状饲料中的活性相对比

确定造丸稳定性。

[0534] 在此描述并且要求的本发明不限于在此披露的具体方面的范围,因为这些方面意图作为本发明若干方面的说明。预期任何等效方面都处于本发明的范围内。实际上,除在此所示和描述的那些之外,本发明的不同修改对于本领域普通技术人员而言从前述描述将变得清楚。这类修改也旨在落入所附权利要求书的范围内。在有冲突的情况下,以包含定义的本披露为准。

[0001]

序列表

<110> 诺维信公司

<120> 蛋白酶、其用途和产生

<130> 12159-W0-PCT

<150> EP 12152669.3

<151> 2012-01-26

<160> 13

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 1122

<212> DNA

<213> 红色糖多孢菌

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1122)

<220>

<221> 信号肽

<222> (1)..(84)

<220>

<221> 成熟肽

<222> (553)..(1122)

<400> 1

```

atg aag cga aca att  egg ctg gcc ggt gtg  gcc gtg ctc geg geg      45
Met Lys Arg Thr Ile  Arg Leu Ala Gly Val  Ala Val Leu Ala Ala
                    -180                -175                -170

```

```

ggc acc atc gcc gcg  atc ggc gca cca acc  gtc ggc gcc gag cgg      90
Gly Thr Ile Ala Ala  Ile Gly Ala Pro Thr  Val Gly Ala Glu Pro
                    -165                -160                -155

```

```

gtg tog ccc gac ctc  gtc geg gcg atg gag  cgc gac ctc ggc atc      135
Val Ser Pro Asp Leu  Val Ala Ala Met Glu  Arg Asp Leu Gly Ile

```

[0002]

	-150	-145	-140	
tcc gcc cag cag gcg cac gcg cgg ctg gcg cag gag gcc acg gcg				180
Ser Ala Gln Gln Ala His Ala Arg Leu Ala Gln Glu Ala Thr Ala				
	-135	-130	-125	
atg cgg gcc gac gcc gag ctg agc cgc tgc ctg ggc gag agc ttc				225
Met Arg Ala Asp Ala Glu Leu Ser Arg Ser Leu Gly Glu Ser Phe				
	-120	-115	-110	
ggc ggt tcc tac ttc gac gcg gcg cgc ggc aag ctc gtc gtc ggg gtg				273
Gly Gly Ser Tyr Phe Asp Ala Ala Arg Gly Lys Leu Val Val Gly Val				
	-105	-100	-95	
acc gag cag gcc gat gcg gcg aag gtg cgg gcg gcg gga gcc gag gcc				321
Thr Glu Gln Ala Asp Ala Ala Lys Val Arg Ala Ala Gly Ala Glu Ala				
	-90	-85	-80	
gcg gtc gtg cgg aac agc ctg cgc gaa ctg gac gcc acc aag gcg gcg				369
Ala Val Val Pro Asn Ser Leu Arg Glu Leu Asp Ala Thr Lys Ala Ala				
	-75	-70	-65	
ctg gac gcg atg gac gct gcg gcg ccc gcc tgc gtg acc gcc tgg tac				417
Leu Asp Ala Met Asp Ala Ala Ala Pro Ala Ser Val Thr Gly Trp Tyr				
	-60	-55	-50	
gtc gac gtg ccc agc agc agc gtg gtc gtc tcc gtc aac ggg cgc gac				465
Val Asp Val Pro Ser Ser Ser Val Val Val Ser Val Asn Gly Arg Asp				
	-45	-40	-35	-30
gcc gcg acc gac gcc ttc ctg gac aag gcg aag gcc gcc ggt gac tgc				513
Ala Ala Thr Asp Ala Phe Leu Asp Lys Ala Lys Ala Ala Gly Asp Ser				
	-25	-20	-15	
gtg cgc gtg cag gag gtc gcc gag tgc cgc cgc ctc tac aac gtg				561
Val Arg Val Gln Glu Val Ala Glu Ser Pro Arg Pro Leu Tyr Asn Val				
	-10	-5	-1 1	
gtc ggc ggc gac gcc tac tac atg ggc gga cgc tgc tgc gtg ggc ttc				609
Val Gly Gly Asp Ala Tyr Tyr Met Gly Gly Arg Cys Ser Val Gly Phe				
	5	10	15	
tgc gtg cgc tgc tcc tcc gcc cag gcg gcc ttc gtc acc gcc ggg cac				657
Ser Val Arg Ser Ser Ser Gly Gln Ala Gly Phe Val Thr Ala Gly His				

[0003]

20	25	30	35	
tgc ggt acc cgc ggc acg gcg gtc tcc ggc tac aac cag gtc gcc atg				705
Cys Gly Thr Arg Gly Thr Ala Val Ser Gly Tyr Asn Gln Val Ala Met				
	40	45	50	
ggc tcg ttc cag ggt tcg tcc ttc ccg aac aac gac tac gcc tgg gtc				753
Gly Ser Phe Gln Gly Ser Ser Phe Pro Asn Asn Asp Tyr Ala Trp Val				
	55	60	65	
tcg gtg aac tcg aac tgg acg ccg cag ccg tgg gtg aac ctc tac aac				801
Ser Val Asn Ser Asn Trp Thr Pro Gln Pro Trp Val Asn Leu Tyr Asn				
	70	75	80	
ggc tcg gcc cgc gtg gtg tcg ggc tcg tcg gcg gcg ccg gtg ggc agc				849
Gly Ser Ala Arg Val Val Ser Gly Ser Ser Ala Ala Pro Val Gly Ser				
	85	90	95	
tcg atc tgc cgt tcc ggt tcc acg acc ggc tgg cac tgc ggc agc gtg				897
Ser Ile Cys Arg Ser Gly Ser Thr Thr Gly Trp His Cys Gly Ser Val				
100	105	110	115	
cag gcg ctg aac cag acc gtc cgc tac gcg gaa ggc acg gtc tac gcc				945
Gln Ala Leu Asn Gln Thr Val Arg Tyr Ala Glu Gly Thr Val Tyr Gly				
	120	125	130	
ctg acc cgc acc aac gtc tgc gcc gag ccg ggt gac tcc ggt ggc tcc				993
Leu Thr Arg Thr Asn Val Cys Ala Glu Pro Gly Asp Ser Gly Gly Ser				
	135	140	145	
ttc atc agc ggc aac cag gcc cag ggc atg acc tcg ggc ggc tcg ggc				1041
Phe Ile Ser Gly Asn Gln Ala Gln Gly Met Thr Ser Gly Gly Ser Gly				
	150	155	160	
aac tgc agc tcg ggc ggc acg acc tac ttc cag ccc gtc aac gag gcg				1089
Asn Cys Ser Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Phe Gln Pro Val Asn Glu Ala				
	165	170	175	
ctg agc gcc tac ggc ctg agc ctg gtc agg ggt				1122
Leu Ser Ala Tyr Gly Leu Ser Leu Val Arg Gly				
180	185	190		

<210> 2

[0004]

<211> 374

<212> PRT

<213> 红色糖多孢菌

<400> 2

Met Lys Arg Thr Ile Arg Leu Ala Gly Val Ala Val Leu Ala Ala
-180 -175 -170

Gly Thr Ile Ala Ala Ile Gly Ala Pro Thr Val Gly Ala Glu Pro
-165 -160 -155

Val Ser Pro Asp Leu Val Ala Ala Met Glu Arg Asp Leu Gly Ile
-150 -145 -140

Ser Ala Gln Gln Ala His Ala Arg Leu Ala Gln Glu Ala Thr Ala
-135 -130 -125

Met Arg Ala Asp Ala Glu Leu Ser Arg Ser Leu Gly Glu Ser Phe
-120 -115 -110

Gly Gly Ser Tyr Phe Asp Ala Ala Arg Gly Lys Leu Val Val Gly Val
-105 -100 -95

Thr Glu Gln Ala Asp Ala Ala Lys Val Arg Ala Ala Gly Ala Glu Ala
-90 -85 -80

Ala Val Val Pro Asn Ser Leu Arg Glu Leu Asp Ala Thr Lys Ala Ala
-75 -70 -65

Leu Asp Ala Met Asp Ala Ala Ala Pro Ala Ser Val Thr Gly Trp Tyr
-60 -55 -50

Val Asp Val Pro Ser Ser Ser Val Val Val Ser Val Asn Gly Arg Asp
-45 -40 -35 -30

[0005]

Ala Ala Thr Asp Ala Phe Leu Asp Lys Ala Lys Ala Ala Gly Asp Ser
 -25 -20 -15

Val Arg Val Gln Glu Val Ala Glu Ser Pro Arg Pro Leu Tyr Asn Val
 -10 -5 -1 1

Val Gly Gly Asp Ala Tyr Tyr Met Gly Gly Arg Cys Ser Val Gly Phe
 5 10 15

Ser Val Arg Ser Ser Ser Gly Gln Ala Gly Phe Val Thr Ala Gly His
 20 25 30 35

Cys Gly Thr Arg Gly Thr Ala Val Ser Gly Tyr Asn Gln Val Ala Met
 40 45 50

Gly Ser Phe Gln Gly Ser Ser Phe Pro Asn Asn Asp Tyr Ala Trp Val
 55 60 65

Ser Val Asn Ser Asn Trp Thr Pro Gln Pro Trp Val Asn Leu Tyr Asn
 70 75 80

Gly Ser Ala Arg Val Val Ser Gly Ser Ser Ala Ala Pro Val Gly Ser
 85 90 95

Ser Ile Cys Arg Ser Gly Ser Thr Thr Gly Trp His Cys Gly Ser Val
 100 105 110 115

Gln Ala Leu Asn Gln Thr Val Arg Tyr Ala Glu Gly Thr Val Tyr Gly
 120 125 130

Leu Thr Arg Thr Asn Val Cys Ala Glu Pro Gly Asp Ser Gly Gly Ser
 135 140 145

[0006]

Phe Ile Ser Gly Asn Gln Ala Gln Gly Met Thr Ser Gly Gly Ser Gly
 150 155 160

Asn Cys Ser Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Phe Gln Pro Val Asn Glu Ala
 165 170 175

Leu Ser Ala Tyr Gly Leu Ser Leu Val Arg Gly
 180 185 190

<210> 3
 <211> 1119
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (1119)

<220>
 <221> 信号肽
 <222> (1).. (81)

<220>
 <221> 成熟肽
 <222> (550).. (1119)

<400> 3
 atg aag aaa ccg ttg ggg aaa att gtc gca agc acc gca cta ctc 45
 Met Lys Lys Pro Leu Gly Lys Ile Val Ala Ser Thr Ala Leu Leu
 -180 -175 -170

att tct gtt gct ttt agt tca tcg atc gca tcg gct gaa ccg gta 90
 Ile Ser Val Ala Phe Ser Ser Ser Ile Ala Ser Ala Glu Pro Val
 -165 -160 -155

[0007]

tct cct gac ttg gtt gct gcg atg gag cgc gat ctt gga atc tct	135
Ser Pro Asp Leu Val Ala Ala Met Glu Arg Asp Leu Gly Ile Ser	
-150 -145 -140	
gct cag caa gcg cat gct cgc tta gct cag gaa gca act gct atg	180
Ala Gln Gln Ala His Ala Arg Leu Ala Gln Glu Ala Thr Ala Met	
-135 -130 -125	
cgt gcg gat gct gaa ttg tct cgc tca ttg gga gaa tct ttt gga	225
Arg Ala Asp Ala Glu Leu Ser Arg Ser Leu Gly Glu Ser Phe Gly	
-120 -115 -110	
ggt tct tac ttc gat gca gca cgc ggt aaa ctt gtt gta ggt gta aca	273
Gly Ser Tyr Phe Asp Ala Ala Arg Gly Lys Leu Val Val Gly Val Thr	
-105 -100 -95	
gaa caa gca gac gct gct aag gta cgc gct gcg gga gct gaa gcg gca	321
Glu Gln Ala Asp Ala Ala Lys Val Arg Ala Ala Gly Ala Glu Ala Ala	
-90 -85 -80	
ggt gtt cct aac tct tta cgt gaa ttg gat gct aca aaa gca gca tta	369
Val Val Pro Asn Ser Leu Arg Glu Leu Asp Ala Thr Lys Ala Ala Leu	
-75 -70 -65	
gat gca atg gac gca gca gct cct gcg agc gtt act gga tgg tat gtt	417
Asp Ala Met Asp Ala Ala Ala Pro Ala Ser Val Thr Gly Trp Tyr Val	
-60 -55 -50 -45	
gat gta cca tca tct tca gta gtt gta tct gta aat ggt cgc gat gca	465
Asp Val Pro Ser Ser Ser Val Val Val Ser Val Asn Gly Arg Asp Ala	
-40 -35 -30	
gca aca gat gcg ttc ctt gac aaa gct aag gct gct gga gac tca gtt	513
Ala Thr Asp Ala Phe Leu Asp Lys Ala Lys Ala Ala Gly Asp Ser Val	
-25 -20 -15	
cgc gta caa gaa gtt gcg gaa tca ccg cgt cca ttg tac aat gtt gta	561
Arg Val Gln Glu Val Ala Glu Ser Pro Arg Pro Leu Tyr Asn Val Val	
-10 -5 -1 1	
ggt ggc gat gcg tac tat atg gga gga cgc tgt tca gtt ggt ttc tca	609
Gly Gly Asp Ala Tyr Tyr Met Gly Gly Arg Cys Ser Val Gly Phe Ser	
5 10 15 20	

[0008]

gtt egc tet agc tet ggc caa gct ggt ttc gta aca get ggt cat tgc Val Arg Ser Ser Ser Gly Gln Ala Gly Phe Val Thr Ala Gly His Cys 25 30 35	657
ggt act egc gga aca gct gtt tet ggt tac aat cag gta get atg ggt Gly Thr Arg Gly Thr Ala Val Ser Gly Tyr Asn Gln Val Ala Met Gly 40 45 50	705
tca ttt caa gga tet tet ttt ccg aac aac gat tat gca tgg gta tet Ser Phe Gln Gly Ser Ser Phe Pro Asn Asn Asp Tyr Ala Trp Val Ser 55 60 65	753
gtt aac tca aac tgg aca cct caa cca tgg gta aac ttg tac aat gga Val Asn Ser Asn Trp Thr Pro Gln Pro Trp Val Asn Leu Tyr Asn Gly 70 75 80	801
agc gct cgt gta gtt agc gga tca tca gct gca cca gtt ggt tet tca Ser Ala Arg Val Val Ser Gly Ser Ser Ala Ala Pro Val Gly Ser Ser 85 90 95 100	849
att tgc egc tca gga tet aca act ggt tgg cat tgc ggc tet gtt cag Ile Cys Arg Ser Gly Ser Thr Thr Gly Trp His Cys Gly Ser Val Gln 105 110 115	897
gca ctt aac caa act gta cgt tac gct gag ggt act gtt tac ggc ttg Ala Leu Asn Gln Thr Val Arg Tyr Ala Glu Gly Thr Val Tyr Gly Leu 120 125 130	945
act cgt act aac gtt tgt gcg gaa cct ggc gat tet gga ggc tet ttc Thr Arg Thr Asn Val Cys Ala Glu Pro Gly Asp Ser Gly Gly Ser Phe 135 140 145	993
att tct ggt aac cag gca caa ggc atg acg agc ggt gga tet gga aat Ile Ser Gly Asn Gln Ala Gln Gly Met Thr Ser Gly Gly Ser Gly Asn 150 155 160	1041
tgt tct tct gga ggt act acg tac ttt cag cca gtt aac gag gcg ttg Cys Ser Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Phe Gln Pro Val Asn Glu Ala Leu 165 170 175 180	1089
agc gct tac gga ctt agc tta gtt cgt gga Ser Ala Tyr Gly Leu Ser Leu Val Arg Gly 185 190	1119

[0009]

<210> 4
 <211> 373
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成构建体

 <400> 4

 Met Lys Lys Pro Leu Gly Lys Ile Val Ala Ser Thr Ala Leu Leu
 -180 -175 -170

 Ile Ser Val Ala Phe Ser Ser Ser Ile Ala Ser Ala Glu Pro Val
 -165 -160 -155

 Ser Pro Asp Leu Val Ala Ala Met Glu Arg Asp Leu Gly Ile Ser
 -150 -145 -140

 Ala Gln Gln Ala His Ala Arg Leu Ala Gln Glu Ala Thr Ala Met
 -135 -130 -125

 Arg Ala Asp Ala Glu Leu Ser Arg Ser Leu Gly Glu Ser Phe Gly
 -120 -115 -110

 Gly Ser Tyr Phe Asp Ala Ala Arg Gly Lys Leu Val Val Gly Val Thr
 -105 -100 -95

 Glu Gln Ala Asp Ala Ala Lys Val Arg Ala Ala Gly Ala Glu Ala Ala
 -90 -85 -80

 Val Val Pro Asn Ser Leu Arg Glu Leu Asp Ala Thr Lys Ala Ala Leu
 -75 -70 -65

 Asp Ala Met Asp Ala Ala Ala Pro Ala Ser Val Thr Gly Trp Tyr Val

[0010]

	120		125		130
Thr Arg Thr Asn Val Cys Ala Glu Pro Gly Asp Ser Gly Gly Ser Phe					
	135		140		145
Ile Ser Gly Asn Gln Ala Gln Gly Met Thr Ser Gly Gly Ser Gly Asn					
	150		155		160
Cys Ser Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Phe Gln Pro Val Asn Glu Ala Leu					
	165		170		175
					180
Ser Ala Tyr Gly Leu Ser Leu Val Arg Gly					
		185		190	
<210>	5				
<211>	190				
<212>	PRT				
<213>	红色糖多孢菌				
<220>					
<221>	成熟肽				
<222>	(1)..(190)				
<400>	5				
Tyr Asn Val Val Gly Gly Asp Ala Tyr Tyr Met Gly Gly Arg Cys Ser					
1		5		10	15
Val Gly Phe Ser Val Arg Ser Ser Ser Gly Gln Ala Gly Phe Val Thr					
	20		25		30
Ala Gly His Cys Gly Thr Arg Gly Thr Ala Val Ser Gly Tyr Asn Gln					
	35		40		45
Val Ala Met Gly Ser Phe Gln Gly Ser Ser Phe Pro Asn Asn Asp Tyr					

[0012]

50	55	60
Ala Trp Val Ser Val Asn Ser Asn Trp Thr Pro Gln Pro Trp Val Asn		
65	70	75 80
Leu Tyr Asn Gly Ser Ala Arg Val Val Ser Gly Ser Ser Ala Ala Pro		
	85	90 95
Val Gly Ser Ser Ile Cys Arg Ser Gly Ser Thr Thr Gly Trp His Cys		
	100	105 110
Gly Ser Val Gln Ala Leu Asn Gln Thr Val Arg Tyr Ala Glu Gly Thr		
	115	120 125
Val Tyr Gly Leu Thr Arg Thr Asn Val Cys Ala Glu Pro Gly Asp Ser		
	130	135 140
Gly Gly Ser Phe Ile Ser Gly Asn Gln Ala Gln Gly Met Thr Ser Gly		
145	150	155 160
Gly Ser Gly Asn Cys Ser Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Phe Gln Pro Val		
	165	170 175
Asn Glu Ala Leu Ser Ala Tyr Gly Leu Ser Leu Val Arg Gly		
	180	185 190

<210> 6

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 迟缓芽孢杆菌分泌信号

[0013]

<220>

<221> 信号

<222> (1)..(27)

<400> 6

Met Lys Lys Pro Leu Gly Lys Ile Val Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ile
 1 5 10 15

Ser Val Ala Phe Ser Ser Ser Ile Ala Ser Ala
 20 25

<210> 7

<211> 1596

<212> DNA

<213> 拟诺卡氏菌 NRRL 18262

<220>

<221> CDS

<222> (318)..(1463)

<220>

<221> 信号肽

<222> (318)..(404)

<220>

<221> 成熟肽

<222> (900)..(1463)

<400> 7

```

acgttttgta cgggtaccgg tgtecgcatg tggecagaat gccccettgc gacagggaac      60
ggattcggtc ggtagcgcac cgactccgac aaccgcgagg tgcccgttcg cgtcgccacg      120
ttctcgacc  gtcatcgac  ccatcatcgg  gtgacccac  cgagctctga  atggtccacc      180
gttctgacgg tctttcctc accaaaacgt gcaacctatg ttaggacggt gtttaccgaa      240
tgtctcggtg aacgacagg gccggacggt attcggcccc gateccccgt tgatccccc      300
aggagagtag ggacccc atg cga ccc tcc ccc  gtt gtc tcc gcc atc  ggt      350
    
```

[0014]

	Met Arg Pro Ser Pro Val Val Ser Ala Ile Gly	
	-190	-185
acg gga gcg ctg gcc ttc ggt ctg gcg ctg tcc ggt acc ccg ggt		395
Thr Gly Ala Leu Ala Phe Gly Leu Ala Leu Ser Gly Thr Pro Gly		
	-180	-175
		-170
gcc ctc gcg gcc acc gga gcg ctc ccc cag tca ccc acc ccg gag		440
Ala Leu Ala Ala Thr Gly Ala Leu Pro Gln Ser Pro Thr Pro Glu		
	-165	-160
		-155
gcc gac gcg gtc tcc atg cag gag gcg ctc cag cgc gac ctc gac		485
Ala Asp Ala Val Ser Met Gln Glu Ala Leu Gln Arg Asp Leu Asp		
	-150	-145
		-140
ctg acc tcc gcc gag gcc gag gag ctg ctg gcc gcc cag gac acc		530
Leu Thr Ser Ala Glu Ala Glu Glu Leu Leu Ala Ala Gln Asp Thr		
	-135	-130
		-125
gcc ttc gag gtc gac gag gcc gcg gcc gag gcc gcc ggg gac gcc		575
Ala Phe Glu Val Asp Glu Ala Ala Ala Glu Ala Ala Gly Asp Ala		
	-120	-115
		-110
tac ggc ggc tcc gtc ttc gac acc gag agc ctg gaa ctg acc gtc ctg		623
Tyr Gly Gly Ser Val Phe Asp Thr Glu Ser Leu Glu Leu Thr Val Leu		
	-105	-100
		-95
gtc acc gat gcc gcc gcg gtc gag gcc gtg gag gcc acc ggc gcc ggg		671
Val Thr Asp Ala Ala Ala Val Glu Ala Val Glu Ala Thr Gly Ala Gly		
	-90	-85
		-80
acc gag ctg gtc tcc tac ggc atc gac ggt ctc gac gag atc gtc cag		719
Thr Glu Leu Val Ser Tyr Gly Ile Asp Gly Leu Asp Glu Ile Val Gln		
	-75	-70
		-65
gag ctc aac gcc gcc gac gcc gtt ccc ggt gtg gtc ggc tgg tac ccg		767
Glu Leu Asn Ala Ala Asp Ala Val Pro Gly Val Val Gly Trp Tyr Pro		
	-60	-55
		-50
		-45
gac gtg gcg ggt gac acc gtc gtc ctg gag gtc ctg gag ggt tcc gga		815
Asp Val Ala Gly Asp Thr Val Val Leu Glu Val Leu Glu Gly Ser Gly		
	-40	-35
		-30
gcc gac gtc agc ggc ctg ctc gcg gac gcc ggc gtg gac gcc teg gcc		863

[0015]

Ala Asp Val Ser Gly Leu Leu Ala Asp Ala Gly Val Asp Ala Ser Ala	
-25 -20 -15	
gtc gag gtg acc acg agc gac cag ccc gag ctc tac gcc gac atc atc	911
Val Glu Val Thr Thr Ser Asp Gln Pro Glu Leu Tyr Ala Asp Ile Ile	
-10 -5 -1 1	
ggt ggt ctg gcc tac acc atg ggc ggc cgc tgt tgg gtc ggc ttc gcg	959
Gly Gly Leu Ala Tyr Thr Met Gly Gly Arg Cys Ser Val Gly Phe Ala	
5 10 15 20	
gcc acc aac gcc gcc ggt cag ccc ggg ttc gtc acc gcc ggt cac tgc	1007
Ala Thr Asn Ala Ala Gly Gln Pro Gly Phe Val Thr Ala Gly His Cys	
25 30 35	
ggc cgc gtg gcc acc cag gtg acc atc ggc aac gcc agg gcc gtc ttc	1055
Gly Arg Val Gly Thr Gln Val Thr Ile Gly Asn Gly Arg Gly Val Phe	
40 45 50	
gag cag tcc gtc ttc ccc gcc aac gac gcg gcc ttc gtc cgc ggt acg	1103
Glu Gln Ser Val Phe Pro Gly Asn Asp Ala Ala Phe Val Arg Gly Thr	
55 60 65	
tcc aac ttc acg ctg acc aac ctg gtc agc cgc tac aac acc gcc ggg	1151
Ser Asn Phe Thr Leu Thr Asn Leu Val Ser Arg Tyr Asn Thr Gly Gly	
70 75 80	
tac gcc acg gtc gcc ggt cac aac cag gcc ccc atc gcc tcc tcc gtc	1199
Tyr Ala Thr Val Ala Gly His Asn Gln Ala Pro Ile Gly Ser Ser Val	
85 90 95 100	
tgc cgc tcc gcc tcc acc acc ggt tgg cac tgc gcc acc atc cag gcc	1247
Cys Arg Ser Gly Ser Thr Thr Gly Trp His Cys Gly Thr Ile Gln Ala	
105 110 115	
cgc gcc cag tgg gtg agc tac ccc gag gcc acc gtc acc aac atg acc	1295
Arg Gly Gln Ser Val Ser Tyr Pro Glu Gly Thr Val Thr Asn Met Thr	
120 125 130	
cgg acc acc gtg tgc gcc gag ccc gcc gac tcc gcc gcc tcc tac atc	1343
Arg Thr Thr Val Cys Ala Glu Pro Gly Asp Ser Gly Gly Ser Tyr Ile	
135 140 145	
tcc gcc acc cag gcc cag gcc gtg acc tcc gcc gcc tcc gcc aac tgc	1391

[0016]

Ser Gly Thr Gln Ala Gln Gly Val Thr Ser Gly Gly Ser Gly Asn Cys
 150 155 160
 cgc acc ggc ggg acc acc ttc tac cag gag gtc acc ccc atg gtg aac 1439
 Arg Thr Gly Gly Thr Thr Phe Tyr Gln Glu Val Thr Pro Met Val Asn
 165 170 175 180
 tcc tgg ggc gtc cgt etc egg acc tgateccgc ggttcaggc ggaccgacgg 1493
 Ser Trp Gly Val Arg Leu Arg Thr
 185
 tcgtgacctg agtaccaggc gtccccgcg cttccagcgg cgtccgcacc ggggtgggac 1553
 cggsgctggc cacggcccc cccgtgaccg gaccgccgg eta 1596

 <210> 8
 <211> 382
 <212> PRT
 <213> 拟诺卡氏菌 NRRL 18262

 <400> 8

 Met Arg Pro Ser Pro Val Val Ser Ala Ile Gly Thr Gly Ala Leu
 -190 -185 -180

 Ala Phe Gly Leu Ala Leu Ser Gly Thr Pro Gly Ala Leu Ala Ala
 -175 -170 -165

 Thr Gly Ala Leu Pro Gln Ser Pro Thr Pro Glu Ala Asp Ala Val
 -160 -155 -150

 Ser Met Gln Glu Ala Leu Gln Arg Asp Leu Asp Leu Thr Ser Ala
 -145 -140 -135

 Glu Ala Glu Glu Leu Leu Ala Ala Gln Asp Thr Ala Phe Glu Val
 -130 -125 -120

 Asp Glu Ala Ala Ala Glu Ala Ala Gly Asp Ala Tyr Gly Gly Ser

[0017]

	-115		-110		-105
Val Phe Asp Thr Glu Ser Leu Glu Leu Thr Val Leu Val Thr Asp Ala					
	-100		-95		-90
Ala Ala Val Glu Ala Val Glu Ala Thr Gly Ala Gly Thr Glu Leu Val					
	-85		-80		-75
Ser Tyr Gly Ile Asp Gly Leu Asp Glu Ile Val Gln Glu Leu Asn Ala					
	-70		-65		-60
Ala Asp Ala Val Pro Gly Val Val Gly Trp Tyr Pro Asp Val Ala Gly					
	-55		-50		-45
Asp Thr Val Val Leu Glu Val Leu Glu Gly Ser Gly Ala Asp Val Ser					
	-40		-35		-30
Gly Leu Leu Ala Asp Ala Gly Val Asp Ala Ser Ala Val Glu Val Thr					
	-20		-15		-10
Thr Ser Asp Gln Pro Glu Leu Tyr Ala Asp Ile Ile Gly Gly Leu Ala					
	-5		-1 1		5
Tyr Thr Met Gly Gly Arg Cys Ser Val Gly Phe Ala Ala Thr Asn Ala					
	10		15		20
Ala Gly Gln Pro Gly Phe Val Thr Ala Gly His Cys Gly Arg Val Gly					
	25		30		35
Thr Gln Val Thr Ile Gly Asn Gly Arg Gly Val Phe Glu Gln Ser Val					
	45		50		55
Phe Pro Gly Asn Asp Ala Ala Phe Val Arg Gly Thr Ser Asn Phe Thr					

[0018]

60	65	70
Leu Thr Asn Leu Val Ser Arg Tyr Asn Thr Gly Gly Tyr Ala Thr Val		
75	80	85
Ala Gly His Asn Gln Ala Pro Ile Gly Ser Ser Val Cys Arg Ser Gly		
90	95	100
Ser Thr Thr Gly Trp His Cys Gly Thr Ile Gln Ala Arg Gly Gln Ser		
105	110	115
Val Ser Tyr Pro Glu Gly Thr Val Thr Asn Met Thr Arg Thr Thr Val		
125	130	135
Cys Ala Glu Pro Gly Asp Ser Gly Gly Ser Tyr Ile Ser Gly Thr Gln		
140	145	150
Ala Gln Gly Val Thr Ser Gly Gly Ser Gly Asn Cys Arg Thr Gly Gly		
155	160	165
Thr Thr Phe Tyr Gln Glu Val Thr Pro Met Val Asn Ser Trp Gly Val		
170	175	180
Arg Leu Arg Thr		
185		
<210> 9		
<211> 381		
<212> PRT		
<213> 绿色糖单孢菌		
<400> 9		
Met Leu Pro Lys Lys His Arg Leu Val Ala Arg Met Thr Ala Thr Ala		
1	5	10
		15

[0019]

Met Leu Ala Ala Gly Thr Ala Ala Ala Val Ala Leu Pro Ala Thr Ala
 20 25 30

Glu Thr Val Thr Pro Gln Thr Glu Val Thr Ala Glu Ala Asp Pro Met
 35 40 45

Leu Gln Ala Met Gln Arg Asp Leu Gly Leu Thr Ala Gln Glu Ala Gln
 50 55 60

Gln Arg Leu Glu Gln Glu Ser Val Ala Arg Thr Leu Asp Glu Thr Leu
 65 70 75 80

Arg Ala Lys Leu Gln Asp Asn Phe Gly Gly Ser Tyr Tyr Asp Ala Asp
 85 90 95

Thr Gly Thr Leu Val Val Gly Val Thr Glu Ala Ser Ala Leu Asp Asp
 100 105 110

Val Arg Ala Ala Gly Ala Lys Ala Lys Leu Val Asp Ala Ser Ile Asp
 115 120 125

Glu Leu Asn Thr Ala Val Asp Arg Leu Asp Arg Lys Glu Ser Ser Ala
 130 135 140

Pro Glu Ser Val Thr Gly Trp Tyr Val Asp Val Lys Asn Asn Ser Val
 145 150 155 160

Val Val Thr Thr Ala Pro Gly Thr Ala Ala Gln Ala Glu Lys Phe Val
 165 170 175

Ala Ala Ser Gly Val Asp Gly Asp Asn Val Glu Ile Val Glu Ser Thr
 180 185 190

[0020]

Glu Gln Pro Arg Thr Phe Met Asp Val Ile Gly Gly Asn Ala Tyr Tyr
 195 200 205

Met Gly Asn Gly Gly Arg Cys Ser Val Gly Phe Thr Val Gln Gly Gly
 210 215 220

Phe Val Thr Ala Gly His Cys Gly Thr Thr Gly Thr Ser Thr Ser Ser
 225 230 235 240

Pro Ser Gly Thr Phe Ala Gly Ser Ser Phe Pro Gly Asn Asp Tyr Ala
 245 250 255

Phe Val Arg Thr Gly Ser Gly Asp Thr Leu Arg Pro Trp Val Asn Met
 260 265 270

Tyr Asn Gly Ser Ala Arg Val Val Ser Gly Ser Ser Val Ala Pro Val
 275 280 285

Gly Ser Ser Ile Cys Arg Ser Gly Ser Thr Thr Gly Trp His Cys Gly
 290 295 300

Gln Val Gln Ala Phe Asn Gln Thr Val Arg Tyr Ala Glu Gly Thr Val
 305 310 315 320

Thr Gly Leu Thr Arg Thr Asn Val Cys Ala Glu Pro Gly Asp Ser Gly
 325 330 335

Gly Ser Phe Ile Ser Gly Asn Gln Ala Gln Gly Met Thr Ser Gly Gly
 340 345 350

Ser Gly Asn Cys Thr Phe Gly Gly Thr Thr Tyr Phe Gln Pro Val Asn
 355 360 365

[0021]

Glu Val Leu Ser Ala Tyr Asn Leu Arg Leu Ile Thr Gly
 370 375 380

<210> 10
 <211> 382
 <212> PRT
 <213> 链霉菌属

<400> 10

Met Arg His Thr Gly Arg Asn Ala Ile Gly Ala Ala Ile Ala Ala Ser
 1 5 10 15

Ala Leu Ala Phe Ala Leu Val Pro Ser Gln Ala Ala Ala Asn Asp Thr
 20 25 30

Leu Thr Glu Arg Ala Glu Ala Ala Val Ala Asp Leu Pro Ala Gly Val
 35 40 45

Leu Asp Ala Met Glu Arg Asp Leu Gly Leu Ser Glu Gln Glu Ala Gly
 50 55 60

Leu Lys Leu Val Ala Glu His Asp Ala Ala Leu Leu Gly Glu Thr Leu
 65 70 75 80

Ser Ala Asp Leu Asp Ala Phe Ala Gly Ser Trp Leu Ala Glu Gly Thr
 85 90 95

Glu Leu Val Val Ala Thr Thr Ser Glu Ala Glu Ala Ala Glu Ile Thr
 100 105 110

Glu Ala Gly Ala Thr Ala Glu Val Val Asp His Thr Leu Ala Glu Leu
 115 120 125

[0022]

Asp Ser Val Lys Asp Ala Leu Asp Thr Ala Ala Glu Ser Tyr Asp Thr
 130 135 140

Thr Asp Ala Pro Val Trp Tyr Val Asp Val Thr Thr Asn Gly Val Val
 145 150 155 160

Leu Leu Thr Ser Asp Val Thr Glu Ala Glu Gly Phe Val Glu Ala Ala
 165 170 175

Gly Val Asn Ala Ala Ala Val Asp Ile Gln Thr Ser Asp Glu Gln Pro
 180 185 190

Gln Ala Phe Tyr Asp Leu Val Gly Gly Asp Ala Tyr Tyr Met Gly Gly
 195 200 205

Gly Arg Cys Ser Val Gly Phe Ser Val Thr Gln Gly Ser Thr Pro Gly
 210 215 220

Phe Ala Thr Ala Gly His Cys Gly Thr Val Gly Thr Ser Thr Thr Gly
 225 230 235 240

Tyr Asn Gln Ala Ala Gln Gly Thr Phe Glu Glu Ser Ser Phe Pro Gly
 245 250 255

Asp Asp Met Ala Trp Val Ser Val Asn Ser Asp Trp Asn Thr Thr Pro
 260 265 270

Thr Val Asn Glu Gly Glu Val Thr Val Ser Gly Ser Thr Glu Ala Ala
 275 280 285

Val Gly Ala Ser Ile Cys Arg Ser Gly Ser Thr Thr Gly Trp His Cys
 290 295 300

[0023]

Arg Phe Ala Gly Ser Ser Phe Pro Gly Asn Asp Tyr Ala Phe Val Arg
 245 250 255

Thr Gly Ser Gly Asp Thr Leu Arg Pro Trp Val Asn Met Tyr Asn Gly
 260 265 270

Ser Ala Arg Val Val Ser Gly Ser Ser Glu Ala Pro Val Gly Ser Ser
 275 280 285

Ile Cys Arg Ser Gly Ser Thr Thr Gly Trp His Cys Gly Thr Val Glu
 290 295 300

Ala Lys Asn Gln Thr Val Arg Tyr Pro Gln Gly Thr Val Tyr Gly Leu
 305 310 315 320

Thr Arg Thr Asn Val Cys Ala Glu Pro Gly Asp Ser Gly Gly Ser Phe
 325 330 335

Ile Ser Gly Asn Gln Ala Gln Gly Met Thr Ser Gly Gly Ser Gly Asn
 340 345 350

Cys Thr Trp Gly Gly Thr Thr Tyr Phe Gln Pro Val Asn Glu Val Leu
 355 360 365

Asn Ala Tyr Gly Leu Arg Leu Ile Thr Gly
 370 375

<210> 12

<211> 379

<212> PRT

<213> 深蓝糖单孢菌

<400> 12

Met Asn Arg Lys Thr Ala Ala Arg Leu Ile Ala Ser Val Thr Leu Ala

[0026]

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

[0027]

	180		185		190
Pro Arg Ala Leu Met Asp Ile Ile Gly Gly Asn Ala Tyr Tyr Met Gly					
	195		200		205
Ser Gly Gly Arg Cys Ser Ile Gly Phe Ala Val Gln Gly Gly Phe Val					
	210		215		220
Thr Ala Gly His Cys Gly Thr Thr Gly Thr Ser Thr Ser Ser Pro Thr					
	225		230		240
Gly Arg Phe Ala Gly Ser Ser Phe Pro Gly Asn Asp Tyr Ala Phe Val					
		245		250	255
Gln Thr Gly Ser Gly Asp Thr Leu Arg Pro Trp Val Asn Met Tyr Asn					
	260		265		270
Gly Ser Ala Arg Val Val Ser Gly Ser Ser Glu Ala Pro Val Gly Ser					
	275		280		285
Ser Val Cys Arg Ser Gly Ser Thr Thr Gly Trp His Cys Gly Thr Ile					
	290		295		300
Gln Ala Lys Asn Gln Thr Val Arg Tyr Ala Glu Gly Thr Val Tyr Gly					
	305		310		320
Leu Thr Arg Thr Asn Val Cys Ala Glu Pro Gly Asp Ser Gly Gly Ser					
		325		330	335
Phe Ile Ser Gly Asn Gln Ala Gln Gly Met Thr Ser Gly Gly Ser Gly					
	340		345		350
Asn Cys Thr Trp Gly Gly Thr Thr Tyr Phe Gln Pro Val Asn Glu Val					

[0028]

355	360	365
Leu Asn Ala Tyr Gly Leu Arg Leu Ile Thr Gly		
370	375	
<210> 13		
<211> 375		
<212> PRT		
<213> 弱代谢糖单孢菌		
<400> 13		
Met Lys Arg Thr Arg Asn Gly Phe Ala Ala Arg Ala Gly Ala Ala Ala		
1	5	10 15
Val Leu Ala Ala Gly Thr Ala Ala Ala Phe Ala Leu Pro Ala Ser Ala		
20	25	30
Gln Pro Ala Pro Met Asp Val Asp Pro Gly Met Val Gln Ala Met Glu		
35	40	45
Arg Asp Leu Gly Leu Ser Gly Thr Gln Ala Glu Gln Arg Leu Arg Ser		
50	55	60
Glu Ala Thr Ala Arg Ala Val Asp Glu Thr Val Arg Ala Glu Leu Gly		
65	70	75 80
Asp Ser Phe Gly Gly Ser Phe Tyr Asp Ala Asp Lys Gly Gly Leu Val		
85	90	95
Val Ser Val Thr Asp Pro Ala Gln Leu Arg Glu Ala Arg Ala Ala Gly		
100	105	110
Ala Glu Ala Arg Met Val Asp Asp Ser Ala Ala Glu Leu Glu Ala Ala		
115	120	125

[0029]

Ala Asn Arg Leu Asn Arg Ala Glu Ser Arg Ala Pro Gly Ser Val Thr
 130 135 140

Gly Trp Tyr Val Asp Val Glu Arg Asn Ser Val Val Val Thr Thr Thr
 145 150 155 160

Pro Gly Thr Ala Ala Gly Ala Glu Glu Phe Val Ala Ser Ala Gly Val
 165 170 175

Asp Ala Asp Thr Ala Glu Val Val Glu Ser Ala Glu Arg Pro Arg Ala
 180 185 190

Leu Met Asp Val Val Gly Gly Asn Ala Tyr Tyr Met Gly Ser Gly Gly
 195 200 205

Arg Cys Ser Val Gly Phe Ala Val Asn Gly Gly Phe Val Thr Ala Gly
 210 215 220

His Cys Gly Ser Thr Gly Glu Ser Thr Ser Gln Pro Ser Gly Thr Phe
 225 230 235 240

Ala Gly Ser Ser Phe Pro Tyr Asn Asp Tyr Ala Tyr Val Glu Thr Gly
 245 250 255

Ser Asp Asp Thr Pro Arg Pro Tyr Val Asn Thr Tyr Ser Gly Thr Arg
 260 265 270

Thr Val Ser Gly Ser Asn Glu Ala Pro Val Gly Ser Ser Ile Cys Arg
 275 280 285

Ser Gly Ser Thr Thr Gly Trp His Cys Gly Thr Val Glu Ala Lys Asn
 290 295 300

[0030]

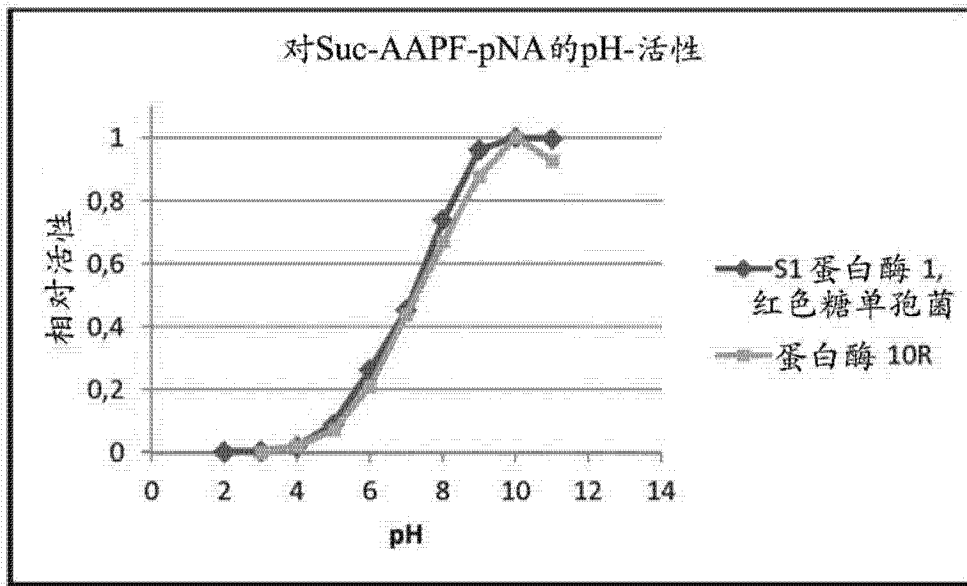


图 1

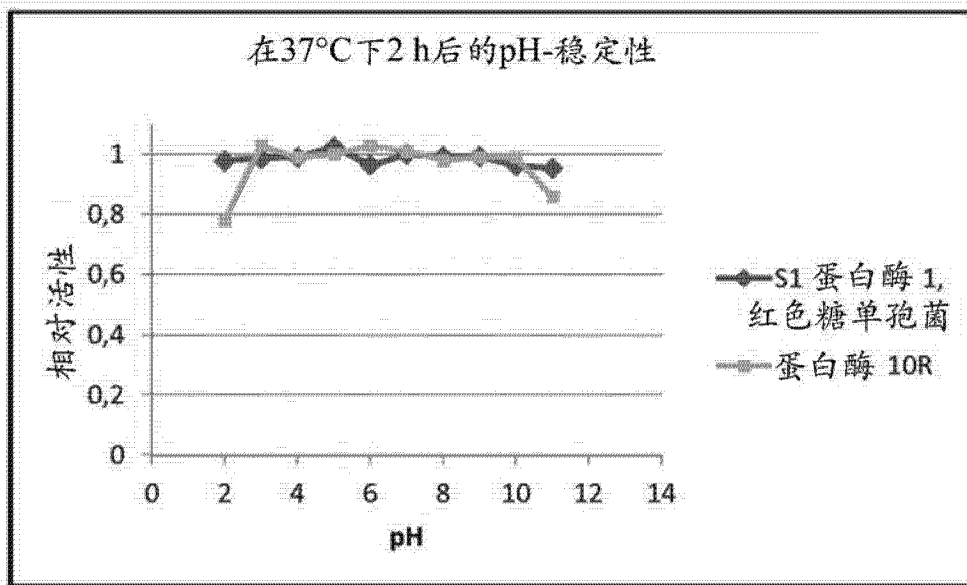


图 2

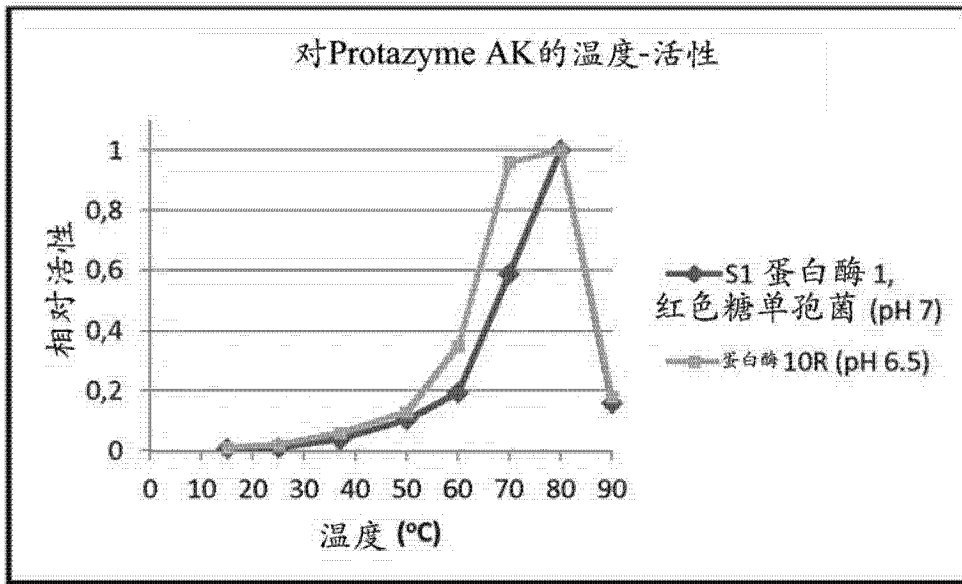


图 3

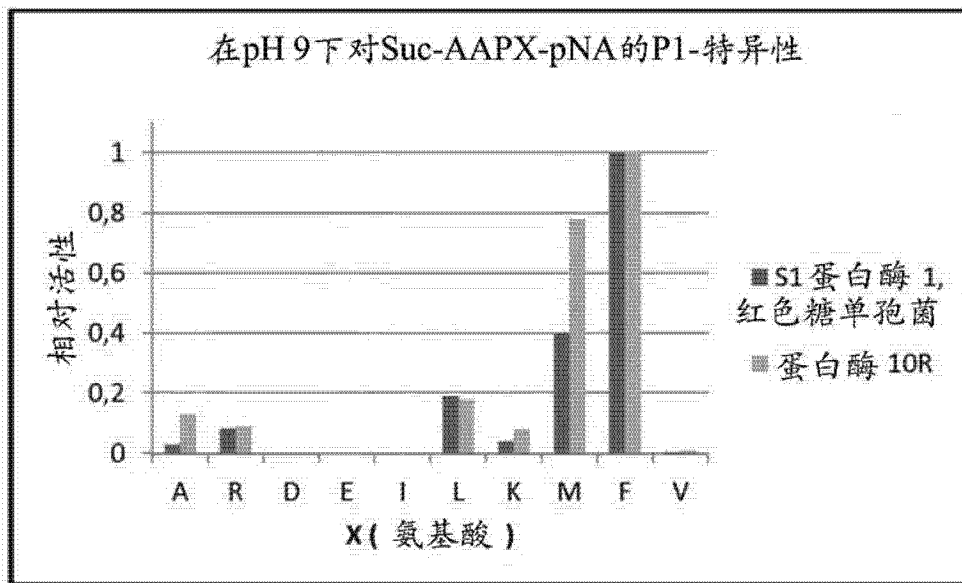


图 4

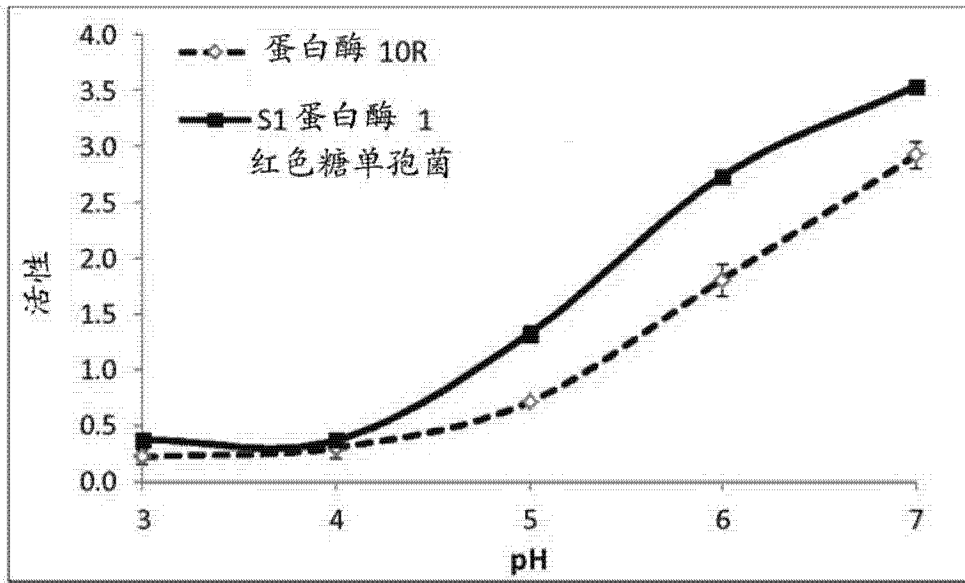


图 5