

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 9/28

C12N 15/56

C11D 3/386



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 99126451.7

[45] 授权公告日 2005 年 9 月 7 日

[11] 授权公告号 CN 1218039C

[22] 申请日 1999.12.21 [21] 申请号 99126451.7

[30] 优先权

[32] 1998.12.21 [33] JP [31] 362487/1998

[32] 1998.12.21 [33] JP [31] 362488/1998

[71] 专利权人 花王株式会社

地址 日本东京

[72] 发明人 萩原浩 北山香织 林康弘

五十岚一晓 远藤圭二 尾崎克也

审查员 欧阳石文

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 龙 淳

权利要求书 2 页 说明书 33 页 附图 6 页

[54] 发明名称 淀粉酶

[57] 摘要

描述的是一种碱性溶解淀粉酶，当在 1 - 100mM 的 EDTA 或 EGTA 存在的情况下于 PH10 和 45℃处理 30 分钟时，具有不低于 70% 的剩余活性；以及包含相同酶的去污剂。与用于去污剂的传统淀粉酶相比，它们具有高抗螯合剂性能。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种碱性溶解淀粉酶，其氨基酸序列与序列表 No.1 或 No.2 中所示的氨基酸序列具有至少 80% 的同源性，并且当在 1~100mM EDTA 或 EGTA 存在的情况下于 pH 10 和 45℃ 处理 30 分钟时，具有不低于 70% 的剩余酶活性。

2. 根据权利要求 1 所述的碱性溶解淀粉酶，进一步具有以下酶特征：

1) 最佳作用 pH

10 用可溶性淀粉为底物，于 50℃ 反应 15 分钟时，所述碱性溶解淀粉酶具有超过 8.0 的最佳作用 pH；

2) 作用

15 所述碱性溶解淀粉酶水解淀粉、直链淀粉、支链淀粉以及直链淀粉和支链淀粉的部分降解产物中的 α -1,4-糖苷键，形成葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖、麦芽四糖、麦芽五糖、麦芽六糖、麦芽七糖，然而所述碱性溶解淀粉酶并不作用于出芽短梗霉聚糖；

3) Britton-Ronbinson 缓冲液中的 pH 稳定性

在 6.5~11.0 的 pH 范围内、于 40℃ 处理 30 分钟时，所述碱性溶解淀粉酶表现不低于 70% 的剩余酶活性；

20 4) 作用温度范围和最佳作用温度：

所述碱性溶解淀粉酶在 20~80℃ 的温度范围内起作用，最佳作用温度为 50~60℃；

5) 温度稳定性：

25 于 40℃ 在 pH10 的 50mM 甘氨酸氢氧化钠缓冲液中处理 30 分钟，所述碱性溶解淀粉酶表现不低于 80% 的剩余酶活性，并且于 45℃ 表现 60% 的剩余酶活性。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的碱性溶解淀粉酶，进一步具有以下酶特征：

30 6) 氧化剂抗性

当在 2%过氧化氢存在的情况下于 pH10 和 30℃处理 60 分钟时，所述碱性溶解淀粉酶表现不低于 70%的剩余酶活性。

4. 编码根据权利要求 1 到 3 中的任意一项所述的碱性溶解淀粉酶的核苷酸序列。

5

5. 包含根据权利要求 1 到 3 中的任意一项所述的碱性溶解淀粉酶的去污剂组合物。

淀粉酶

技术领域

本发明涉及具有高抗螯合剂性能并且可用作去污剂成分的碱性溶解 α -淀粉酶。

发明背景

α -淀粉酶已广泛用于各种工业领域如淀粉、酿造、纤维、制药和食品工业。因为已知 α -淀粉酶适合用作去污剂成分，所以它们甚至作为去污增效成分掺入到自动洗碗去污剂或洗衣去污剂中（Enzymes in Detergency, 203页, Marcel Dekker Inc. , New York (1995)）。

关于可用于去污剂并且在碱性范围具有最佳效应的溶解 α -淀粉酶，本发明人先前发现的来源于芽孢杆菌属种类菌株KSM-1378（FERM BP-3048）的那些淀粉酶是已知的。最近，具有8-9.5附近的最佳pH的 α -淀粉酶已经公开（W095/2639），它们在特征和结构方面与那些来自菌株KSM-1378的淀粉酶非常相似。

在去污剂中掺入螯合剂如磷酸、柠檬酸或沸石等以从洗涤液除去洗涤干扰离子如钙离子。长期以来认为溶解 α -淀粉酶需要钙离子来发挥酶活性，但是钙离子会被上述螯合剂或更强的螯合剂EDTA钝化（淀粉酶和相关酶手册，43页，日本淀粉酶研究会（1988））。最近有报道，目前已知的溶解 α -淀粉酶的X射线晶体分析揭示三个钙原子存在其分子中，并且13个氨基酸残基以明显高频率保守[结构, 6, 281 (1998)]。

螯合剂对酶活性的抑制在上述来源于芽孢杆菌属种类菌株KSM-1378（FERM BP-3048）的碱性溶解 α -淀粉酶中发现，而且当将 α -淀粉酶掺入自动洗碗去污剂或洗衣去污剂时，这种 α -淀粉酶并不总是表现足够的效应。来源于地衣芽孢杆菌的溶解 α -淀粉酶（透阿米尔和Duramyl, Novo Nordisk A/S的产品），经常用作自动洗碗去污剂或

洗衣去污剂的一种成分，在抗整合剂的性能方面也是不够的。

目前已知的溶解淀粉酶中，来自属于热球菌属种类的菌株的溶解 α -淀粉酶(W090/11352)和来自属于硫化叶菌种类的菌株并在淀粉溶解步骤中有效的 α -淀粉酶(W096/02633)不受整合剂的影响。然而，这些酶的最佳作用pH值分别在4-6和2.5-4.5范围内，而在碱性范围起作用，因此它们不适于作为去污剂的成分。

因此，本发明的一个目的是提供具有比用于去污剂的传统淀粉酶更高的抗整合剂性能并且可用作去污剂成分的碱性溶解 α -淀粉酶以及其中掺入了此碱性溶解 α -淀粉酶的去污剂组合物。

发明公开

在本发明的一方面，提供一种碱性溶解淀粉酶，当在1-100mM EDTA或EGTA存在的情况下于pH10和45℃处理30分钟时，具有不低于70%的剩余活性。

在本发明的另一方面，提供编码所述碱性溶解淀粉酶的DNA片段。

在本发明更进一步的方面，提供含有所述碱性溶解淀粉酶的去污剂组合物。

附图简述

图1是说明EDTA处理浓度与根据本发明所述的每一种碱性溶解淀粉酶(K36和K38)和已知的用于去污剂的淀粉酶的剩余活性之间的关系图；图2是说明EGTA处理浓度与根据本发明所述的每一种碱性溶解淀粉酶(K36和K38)和已知的用于去污剂的淀粉酶的剩余活性之间的关系图；图3是说明沸石处理浓度与根据本发明所述的碱性溶解淀粉酶K36的剩余活性之间的关系图；图4是说明柠檬酸处理浓度与根据本发明所述的碱性溶解淀粉酶K36的剩余活性之间的关系图；图5是说明沸石处理浓度与根据本发明所述的碱性溶解淀粉酶K38的剩余活性之间的关系图；图6是说明柠檬酸处理浓度与根据本发明所述的碱性溶解淀粉酶K38的剩余活性之间的关系图；图7是说明反应pH与根据本发明所述的碱性溶解淀粉酶K36的相对活性之间的关系图；图8是说明反应pH与根据本发明所述的碱性溶解淀粉酶K38的相对活性之

间的关系的图；图9是说明用H₂O₂处理时间与根据本发明所述的每一种碱性溶解淀粉酶（K36和K38）和已知的用于去污剂的淀粉酶的剩余活性之间的关系的图；

实施本发明的最佳方案

此处所用的术语“碱性 α -淀粉酶”是指具有碱性范围内的最佳pH值的 α -淀粉酶。此处所用的术语“中性”是指pH值范围6-8之间，而术语“碱性”是指pH值范围高于中性。如淀粉酶和相关酶手册中所述的[40-41页，日本淀粉酶研究会（1988）]，术语“溶解 α -淀粉酶”是指高度随机地降解淀粉或淀粉多糖的 α -淀粉酶。

根据本发明所述的酶是一种碱性溶解淀粉酶，当在1-100mM EDTA或EGTA存在的情况下于PH10和45℃处理30分钟时，具有不低于70%的剩余活性，优选的是不低于80%的剩余活性，更优选的是不低于90%的剩余活性。

本发明的酶必须具有上述螯合剂抗性，但优选的是具有下述特征1)和2)，更优选的是具有特征1)到5)。

1) 最佳作用pH

它具有超过8.0的最佳作用pH(结果来自用可溶性淀粉为底物于50℃ 15分钟的反应)。

2) 作用

它水解淀粉、直链淀粉、支链淀粉以及直链淀粉和支链淀粉的部分降解产物中的 α -1, 4-糖苷键，形成葡萄糖(G1)、麦芽糖(G2)、麦芽三糖(G3)、麦芽四糖(G4)、麦芽五糖(G5)、麦芽六糖(G6)、麦芽七糖(G7)。然而它并不作用于出芽短梗霉聚糖。

3) pH稳定性 (Britton-Ronbinson 缓冲液)

在6.5-11.0的pH范围内、于40℃处理30分钟时，它表现不低于70%的剩余活性。

4) 作用温度范围和最佳作用温度:

它在20-80℃的较宽温度范围内起作用，最佳作用温度为50-60℃。

5) 温度稳定性:

于40℃在50mM甘氨酸氢氧化钠缓冲液(PH10)中处理30分钟,它表现不低于80%的剩余活性,而且它即使在45℃也表现约60%的剩余活性。

另外,更优选的是具有下述特征6)的本发明的酶。

6) 氧化剂抗性

当在2%过氧化氢存在的情况下于pH10和30℃处理60分钟时,它表现不低于70%的剩余活性。

尽管对本发明酶的比活性没有特别的限制,但具有下面7)中所述的比活性是特别优选的。

7) 比活性

从于pH10和50℃反应15分钟(以可溶性淀粉作为底物)的酶活性和用蛋白分析试剂盒(Bio-rad laboratories的产品)测定的蛋白浓度计算出的比活性为3000U/mg或更高。

本发明酶的实例包括那些具有本文随后描述的序列表No.1或2中所示的氨基酸序列的酶以及那些具有上述氨基酸序列但在其部分有一个或多个氨基酸替换、缺失或增加的酶。关于替换、缺失或增加,优选的是至少80%的同源性,特别优选的是至少90%的同源性。另外,同源性用Lipman-Pearson方法加以计算(科学, 227, 1435(1985))。

本发明酶的氨基酸序列的一个不同于在钙结合位点具有高度保守的13个氨基酸残基的目前已知溶解 α -淀粉酶的特征是,本发明酶具有低保守率。具体地,与传统溶解 α -淀粉酶中具有羧基侧链的天冬氨酸相对应,本发明酶中八个残基中的五个是无羧基侧链的天冬酰胺或丝氨酸,羧基侧链在结合钙离子方面起重要作用,这表明分子中不含有钙。换言之,因为本发明酶不需要钙来发挥酶活性,所以推测本发明酶具有高抗螯合剂性能。象这样在钙结合位点具有低氨基酸残基保守率因而不那么依赖钙的溶解 α -淀粉酶,只有来自热球菌属种类的酶已知[应用环境微生物学, 63, 3569(1997)]。然而这种酶不适于用作去污剂成分,因为它是最佳作用pH值在5.5-6附近的酸性淀粉酶,而且

其活性在温度不足50℃时大大降低。这种酶的氨基酸序列与本发明酶的氨基酸序列的同源性只有30%，表明本发明的碱性溶解 α -淀粉酶完全不同于这种酶。因此，根据本发明所述的溶解碱性 α -淀粉酶是明显不同于目前已知的溶解 α -淀粉酶的新型酶。

例如通过培养产生靶酶的属于芽孢杆菌属种类的细菌并从培养物收集酶来制备本发明的酶。这类产生靶酶的细菌实例包括具有下述微生物学特征的菌株KSM-K36和KSM-K38。

表1

	菌株KSM-K36	菌株KSM-K38
(a) 显微镜观察结果	菌株K36和K38是分别具有 $1.0-1.2\mu\text{m} \times 2.4-5.4\mu\text{m}$ 和 $1.0-1.2\mu\text{m} \times 1.8-3.8\mu\text{m}$ 大小的杆菌。它们在细胞中心或边缘形成卵形内生孢子($1.0-1.2\mu\text{m} \times 1.2-1.4\mu\text{m}$)。革兰氏染色阳性。无抗酸性。	
(b) 不同培养基中的生长 因为本菌株是嗜碱性的, 向测试中所用的培养基加入 0.5%碳酸钠		
· 营养琼脂平板培养	观察到良好生长。菌落呈圆形, 具平滑表面, 但边缘粗糙。菌落颜色为浅土色	观察到良好生长。菌落呈圆形, 有平滑表面和光滑边缘。菌落颜色为黄褐色
· 营养琼脂斜面培养	观察到生长。	观察到生长。
· 营养液体培养基培养	观察到生长。	观察到生长。
· 营养-明胶穿刺培养	观察到良好生长。未观察到明胶溶解。	观察到良好生长。未观察到明胶溶解。
· 石蕊牛奶	未观察到变化	未观察到变化
(c) 生理特征 硝酸盐还原和反硝化反应	硝酸盐还原为阳性。反硝化反应为阴性。	硝酸盐还原为阳性。反硝化反应为阴性。
MR测试	由于碱性培养基, 不能判断	由于碱性培养基, 不能判断
V-P测试	阴性	阴性
吲哚形成	阴性	阴性
氨形成	阴性	阴性
淀粉水解	阳性	阳性
柠檬酸的同化作用	在Chistensen's培养基上生长, 但在Koser's和Simmon's培养基上不生长	在Chistensen's培养基上生长, 但在Koser's和Simmon's培养基上不生长
无机氮源的同化作用	同化硝酸盐而不是铵盐	同化硝酸盐而不是铵盐
着色剂的形成	King'S B培养基上形成浅黄色	阴性
脲酶	阴性	阴性
氧化酶	阴性	阴性
过氧化氢酶	阳性	阳性
生长范围	生长的温度范围是 $15-40^{\circ}\text{C}$ 。最佳生长温度范围是 $30-37^{\circ}\text{C}$ 。	生长的温度范围是 $15-40^{\circ}\text{C}$ 。最佳生长温度范围是 30°C 。
对氧的习性	需氧	需氧
O-F实验	未观察到生长	未观察到生长

糖类的同化作用 含盐培养基上的生长	同化的是D-半乳糖、D-木糖、L-阿拉伯糖、乳糖、甘油、meribiose、libose、D-葡萄糖、D-甘露糖、麦芽糖、蔗糖、海藻糖、D-甘露醇、淀粉、棉子糖和D-果糖。 在12%盐浓度中生长，但在15%盐浓度中不生长。
--------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

作为基于上述微生物学特征的研究的结果，同时参照“Bergey氏系统细菌学手册”〔Williams&wilkins, 美国(1986)〕和“芽孢杆菌属”〔Agricultural Research Service, Washington, D.C.(1973)〕, 认为这些菌株是属于芽孢杆菌属种类的产内生孢子芽孢杆菌。因为它们不能在中性范围内生长，而在高碱性范围表现良好生长，所以它们属于嗜碱性微生物并可区别于表现中性范围内生长的属于芽孢杆菌属种类的传统细菌。另外，将它们的微生物学和生理学特征与已知的嗜碱性芽孢杆菌(微生物学, 141, 1745(1995))的微生物学和生理学特征比较。结果，菌株KSM-K36和KSM-K38与已知的任何嗜碱性芽孢杆菌不同。因此菌株KSM-K36和KSM-K38中的任意一个都被判断为新型菌株，并以FERM BP-6945和FERM BP-6946的名称保藏于国立生命科学和人体技术研究所、工业科学和技术社、工业贸易和技术部。

根据本发明所述的碱性溶解淀粉酶可以通过在培养基上接种上述微生物接着按常规方法培养而获得。因为此微生物是嗜碱性的，所以优选的是碱性培养基。可以从如此获得的培养物收集目的碱性溶解淀粉酶。也可以这样使用上清。选择性地，在将其去盐、沉淀或超滤以得到所需的粗制酶接着以常规方法纯化和结晶之后，它可以作为纯化酶使用。

本发明碱性溶解淀粉酶的纯化方法的一个实例将在下文提及。通过对培养物上清进行(1)硫酸铵沉淀、(2)DEAE-Toyopearl(TOSOH Corporation)柱层析或(3)凝胶过滤，可以获得在聚丙烯酰胺凝胶电泳(凝胶浓度10%)和十二烷基硫酸钠(SDS)电泳上表现单一条带的纯化酶。

也可以通过获得编码本发明碱性溶解淀粉酶的基因和含有这一基因的载体质粒，用质粒转化适当微生物、优选属于芽孢杆菌属种类的细菌，然后培养转化的微生物或细菌制备根据本发明所述的碱性溶解

淀粉酶。

编码本发明碱性溶解淀粉酶的基因实例包括那些具有在本文随后描述的序列表No. 3和4中所示的核苷酸序列的基因。

如上所述，根据本发明所述的碱性溶解淀粉酶具有碱性范围内的最佳pH并具有高抗螯合剂性能，因此它尤其可用作掺入去污剂的酶。本发明的碱性溶解淀粉酶具有如上所述的强氧化剂抗性，因此可以将它加入掺有氧化剂如漂白剂的去污剂中。加入去污剂的本发明酶的量优选的是0.001-5%(重量比)。

除了上述碱性溶解淀粉酶，也可将已知去污剂成分加入本发明的去污剂组合物中。已知去污剂成分的实例包括W094/26881第五页右上部分14行至相同页右下部分29行中所述的那些，例如表面活性剂、螯合剂、碱性剂、无机盐、漂白剂和荧光试剂。

以0.5-60%(重量比)的量(此后将只简单标记为“%”)将表面活性剂加入去污剂组合物中，更具体地在粉末状去污剂组合物中加入10-45%以及在液体去污剂组合物中加入20-50%。当本发明的去污剂组合物是漂白去污剂或自动洗碗去污剂时，通常以1-10%、优选地1-5%的量加入表面活性剂，以0.01-50%、优选地5-40%的量加入二价金属离子清除剂，以0.01-80%、优选地1-40%的量加入碱性剂和无机盐，。

以0.001-10%、优选地1-5%的量加入再污染防腐剂。

除了本发明的淀粉酶，还可以使用蛋白水解酶、纤维素酶、原果胶酶、果胶酶、脂肪酶、半纤维素酶、糖苷酶、葡萄糖氧化酶、胆固醇氧化酶等。这些酶可以以0.001-5%、优选地0.1-3%的量加入。优选地，漂白剂(如过氧化氢、过碳酸盐等)以1-10%的量加入。一旦使用漂白剂，可以以0.01-10%的量加入漂白激活剂。荧光试剂的实例包括联苯类荧光试剂(如“Chinoparl CBS-X”，商品名)和1,2-二苯乙烯类荧光试剂(如DM类荧光染料)。优选的是以0.001-2%的量加入荧光试剂。

上述去污剂组合物可以以液体、粉末、颗粒等形式提供。去污剂组合物可用于洗衣去污剂、自动洗碗去污剂、管道去污剂、人工牙齿

清洁剂或漂白剂。

实施例

通过使用以下缓冲液，按照下述方法检测酶活性：

pH4.5-6.0	醋酸缓冲液
pH6.0-8.0	磷酸钾缓冲液
pH9.0-10.5	甘氨酸氢氧化钠缓冲液
pH10.0-12.0	碳酸盐缓冲液
pH4.0-12.0	Britton-Robison 缓冲液

〔淀粉酶活性的检测方法〕

1. 试剂配制的方法

（1%可溶性淀粉水溶液的配制）

将5g可溶性淀粉（来源于土豆的淀粉，Sigma 化学有限公司的产品）悬浮于400mL去离子水中。在沸水中搅拌，加热约10分钟使悬浮液溶解，接着加入去离子水至500mL总体积。

（250mM甘氨酸氢氧化钠缓冲液（pH10）的配制）

将9.38g甘氨酸〔保证级(guaranteed class)，Wako Pure Chemical Industries, Ltd.的产品〕溶于约300mL去离子水中，接着用pH计，以约5N氢氧化钠水溶液将所得到的溶液调节至pH10。向已调pH的溶液加入去离子水至500mL总体积。

（DNS试剂的配制）

将8g氢氧化钠（保证级，Wako Pure Chemical Industries, Ltd.的产品）溶于300mL去离子水中。向所得到的溶液中分步加入2.5g 3,5-二硝基水杨酸（DNS，保证级，Wako Pure Chemical Industries, Ltd.的产品），使后者溶于前者。DNS完全溶解后，加入150g酒石酸钠钾（保证级，Wako Pure Chemical Industries, Ltd.的产品）。完全溶解后，向所得溶液加入去离子水至500mL总体积。

（用于标准曲线的葡萄糖溶液的配制）

使用葡萄糖标准溶液（用于光电应用，Wako Pure Chemical Industries, Ltd.的产品）和去离子水分别配制0、1、2、3、4和5 μ

mol/0.1ml的葡萄糖溶液。

2. 淀粉酶活性的检测方法

(酶溶液的稀释)

用10mM甘氨酸氢氧化钠缓冲液(pH10)稀释纯化的酶以使 δ -吸光度 $[=(\text{样品的吸光度})-(\text{空白的吸光度})]$ 不大于0.6。

(样品的测量)

在试管中加入0.5mL 1%可溶性淀粉水溶液、0.2mL 250mM甘氨酸氢氧化钠缓冲液(pH10)、0.2mL去离子水(此后该混合物将称为“底物溶液”),接着在50℃水浴中预热约5分钟。预热后,将0.1mL适当稀释的酶溶液加入反应混合物,接着于50℃反应15分钟。反应结束后,将1.0mL DNS试剂加入反应混合物,接着在沸水中加热5分钟显色。紧接着,使溶液在冰水浴中冷却。冷却后,向所得到的溶液中加入4.0mL去离子水,接着混合。于535nm测定溶液的吸光度。

(空白检测)

在试管中加入0.9mL底物溶液,接着加入1.0mL DNS试剂和0.1mL酶溶液。将得到的混合物在沸水中加热5分钟以使之显色。紧接着,使反应混合物在冰水中冷却。冷却后,向反应混合物中加入4.0mL去离子水,接着进行混合。于535nm测定溶液的吸光度。

(标准曲线的绘制)

在试管中加入0.9mL底物溶液,接着加入1.0mL DNS试剂,然后加入0.1mL具有各种浓度的用于标准曲线的葡萄糖溶液。将得到的混合物在沸水中加热5分钟以使之显色。紧接着,使溶液在冰水中冷却。冷却后,向所得到的溶液加入4.0mL去离子水,接着混合。然后于535nm测定溶液的吸光度。在图上,葡萄糖浓度($\mu\text{mol}/0.1\text{ml}$)标为横坐标而吸光度作为纵坐标,那些线性图的斜率用最小二乘方法来确定。换算系数

(F)根据以下公式计算:

$$\text{换算系数}(F) = [1/(\text{斜率})] \times [1/15] \times [1000/0.1]$$

另外,测定活性时绘制标准曲线。

(活性的计算)

一分钟内形成相当于 $1\mu\text{mol}$ 葡萄糖的还原糖所用的酶量定义为一个单位(1U)，酶的效价根据以下公式计算：

[δ -吸光度] × [换算系数(F)] × [稀释率]
〔抗整合剂性能的测试方法〕
(EDTA溶液的配制)

将9.3g EDTA (Sigma 化学有限公司的产品) 溶于约80mL去离子水中，用pH计以约5N氢氧化钠水溶液将所得到的溶液调节至pH8。将去离子水加入已调pH的溶液中至100mL总体积，由此250mM EDTA溶液得到配制。得到的溶液用去离子水稀释以配制10-100mM EDTA溶液。

将9.5g EGTA (Sigma 化学有限公司的产品) 溶于约80mL去离子水中，用pH计以约5N氢氧化钠水溶液将所得到的溶液调节至pH8。将去离子水加入pH值调节过的溶液至总体积100mL，由此配制了250mM的EGTA溶液。得到的溶液用去离子水稀释而配制出10-100mM的EGTA溶液。

(抗整合剂性能的测试方法)

用1mM EDTA 于45℃处理30分钟的情况

在试管中加入0.1mL 10mM的EDTA溶液、0.2mL 250mM甘氨酸氢氧化钠缓冲液(pH10)和0.1mL去离子水，接着在45℃水浴中预热约5分钟。预热后，将用10mM甘氨酸氢氧化钠缓冲液(pH10)适当稀释的0.1mL酶溶液加入反应混合物。得到的混合物在45℃温度下放置30分钟。30分钟后，将0.1mL部分所得溶液加入0.9mL在50℃水浴中预热的底物溶液中并根据淀粉酶活性测试方法测定剩余酶活性。

〔抗氧化剂性能的测试方法〕

在试管中加入0.067mL过氧化氢(30%过氧化氢水溶液, Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 的产品), 0.2mL 250mM甘氨酸氢氧化钠缓冲液(pH10)和0.633mL去离子水, 接着在30℃水浴中预热约5分钟。预热后, 将用10mM甘氨酸氢氧化钠缓冲液(pH10)适当稀释的0.1mL酶溶液加入反应混合物。得到的混合物在30℃放置60分钟。60分钟后, 将所0.2mL部分所得溶液加入预先置于冰水中的含有 $1\mu\text{L}$ 过氧化氢酶(来源于牛肝, product of Boehringer Mannheim GmbH)的试管中,

由此使过氧化氢失活并终止反应。然后，将0.1mL部分反应终止的溶液加入0.9mL在50℃水浴中预热的底物溶液中并根据淀粉酶活性测试方法测定剩余酶活性。

〔蛋白的定量分析〕

用附带试剂盒中的牛血清白蛋白作为标准蛋白，按照蛋白分析试剂盒II（目录号500-0002，Bio-rad Laboratories的产品）的标准方法进行蛋白的定量分析。

实施例1：具有抗整合剂性能的碱性溶解淀粉酶的筛选

将约0.5g土壤悬浮于无菌水中，接着于80℃加热15分钟。热处理后用无菌水适当稀释上清，然后将其喷洒在琼脂培养基A上以分离以产生淀粉酶的微生物。于30℃培养两天后形成菌落。选择在边缘具有由于淀粉水解而形成的透明晕环的菌落，并将其分离为产生淀粉酶的细菌。将分离的细菌接种于培养基B上，接着于30℃振荡有氧培养两天。将所得到的培养物离心分离后，测定所得到的上清中粗提淀粉酶的抗整合剂性能。另外，测定粗提酶的最佳pH，由此筛选出本发明的产生碱性溶解淀粉酶的细菌。

根据上述方法，获得了属于芽孢杆菌属种类的菌株KSM-K36和KSM-K38。

培养基A：	胰蛋白胨	1.5%
	豆胨	0.5%
	氯化钠	0.5%
	有色淀粉	0.5%
	琼脂	1.5%
	碳酸钠	0.5%
	(pH10)	
培养基B：	胰蛋白胨	1.5%
	豆胨	0.5%
	氯化钠	0.5%
	可溶性淀粉	1.0%

碳酸钠 0.5%
(pH10)

实施例2: 菌株KSM-K36和KSM-K38的培养

将菌株KSM-K36和KSM-K38分别接种在实施例1中所述的液体培养基B上,接着于30℃振荡有氧培养两天。测定通过离心分离得到的上清的淀粉酶活性(pH8.5)。结果发现培养物溶液分别具有1177 U/L和557 U/L的活性。

实施例3: 本发明碱性溶解淀粉酶的纯化

将硫酸铵加入芽孢杆菌属种类菌株KSM-K36的培养物上清以达到80%饱和,接着搅拌。收集这样形成的沉淀并将其溶于含有2mM氯化钙的Tris-盐酸缓冲液(pH7.5),接着逆着此缓冲液透析过夜。此后将内透析液加样于已用相同缓冲液平衡的DEAE-TOYOPEARL 650 M柱上,然后用相同缓冲液中的氯化钠线性浓度梯度(0M-1M)洗脱蛋白。逆着上述缓冲液透析活性成分后,通过凝胶过滤柱层析进行进一步的纯化。将这样得到的活性成分逆着相同缓冲液透析,由此可以获得在聚丙烯酰胺凝胶电泳(凝胶浓度:10%)和十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳中表现单一条带的纯化酶。用相似方法,从芽孢杆菌属种类菌株KSM-K38的培养物上清中获得另一种纯化酶。

实施例4: 本发明的碱性溶解淀粉酶的抗整合剂性能

使用分别从实施例3中的菌株KSM-K36和KSM-K38得到两种本发明的纯化碱性溶解淀粉酶(以后分别简称为“K36”和“K38”),测定抗各种整合剂的性能。

1) 抗EDTA或EGTA的性能

在含有0-100mM终浓度EDTA或EGTA(都是Sigma化学有限公司的产品)的50mM甘氨酸氢氧化钠缓冲液(pH10)中,加入用10mM甘氨酸氢氧化钠缓冲液(pH10)适当稀释的纯化酶,接着在预先确定的温度(30℃、40℃或50℃)下处理30分钟。按照淀粉酶活性测定方法〔用50mM甘氨酸氢氧化钠缓冲液(pH10)〕测定反应混合物的剩余酶活性。作为对照,使用来源于地衣芽孢杆菌的淀粉酶透阿米尔和Duramyl(分别

从Novo Industry A/S的颗粒型产品纯化而来)的纯化产品。

如图1和图2中所示,已经证实与透阿米尔和Duramyl相比, K36和K38都具有高抗螯合剂性能,不受高浓度EDTA和EGTA的影响。

2) 抗柠檬酸或沸石的性能

在含有各具有0-0.5%终浓度的二水合柠檬酸三钠(保证级, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.的产品)或合成的沸石A-3(Wako Pure Chemical Industries, Ltd.的产品)的50mM甘氨酸氢氧化钠缓冲液(pH10)中,加入用10mM甘氨酸氢氧化钠缓冲液(pH10)适当稀释的纯化酶,接着分别在预先确定的温度(40℃和45℃)下处理30分钟。按照淀粉酶活性测定方法〔用50mM甘氨酸氢氧化钠缓冲液(pH10)〕测定反应混合物的剩余酶活性。结果,已经证实 K36和K38都不受柠檬酸或沸石的影响(如图3-6中所示)。

实施例5: 本发明碱性溶解淀粉酶的作用pH和最佳作用pH

使用具有50mM终浓度的不同缓冲液〔醋酸缓冲液(pH4.5-6.0)、磷酸钾缓冲液(pH6.0-8.0)、甘氨酸氢氧化钠缓冲液(pH9.0-10.5)和碳酸盐缓冲液(pH10.0-12.0)〕,按照淀粉酶活性测定方法分别测定K36和K38的作用pH和最佳作用pH,并且将它们以相对活性表示,最大活性为100%。

结果(如图7和8中所示),已经证实K36和K38都在pH6.0-10.0范围内起作用,并且最佳作用pH为8.0-9.0。另外,所示的pH值是反应混合物的实际测值量。

实施例6: 本发明碱性溶解淀粉酶的抗氧化剂性能和相对酶活性

将用10mM甘氨酸氢氧化钠缓冲液(pH10)适当稀释的酶(K36、K38、Tarmamyl或Duramyl)加入含有2%终浓度(580mM)过氧化氢的50mM甘氨酸氢氧化钠缓冲液(pH10)中,接着于30℃处理60分钟。按照淀粉酶活性测定方法〔用50mM甘氨酸氢氧化钠缓冲液(pH10)〕以适当间隔测定剩余活性。

以处理前的活性为100%,用剩余活性来表示抗氧化剂性能。

结果(图9),即使在2%过氧化氢存在的情况下于pH10、30℃处理

60分钟后，仍观察到K36和K38都保留不低于70%的剩余活性，尤其不低于94%，因此具有足够的抗氧化剂活性。

从于pH10和50℃反应15分钟时的酶活性数值和用蛋白分析试剂盒（Bio-rad Laboratories的产品）测定的蛋白浓度计算而来的K36和K38的比活性分别是4300 U/mg和3600 U/mg（表2）。这表明每种酶都具有不低于3000U/mg的比活性，与通过蛋白工程制成的抗氧化剂酶（LAMY·M202T（W098/44126）和Duramyl）相比具有明显高的比活性。因此，本发明的碱性溶解淀粉酶在向去污剂添加的量、工业发酵生产等方面是有利的。

表2: 比活性的比较

酶	比活性 (U/mg)
K36	4300
K38	3600
LAMY*	4000
LAMY·M202T**	1700
Duramyl	500

*LAMY: 来源于芽孢杆菌属种类菌株KSM-1378。

**LAMY·M202T: 具有Met202Thr替换的上述酶。

酶活性: 用甘氨酸氢氧化钠缓冲液（pH10），于50℃反应15分钟（以可溶性淀粉为底物）的活性。

蛋白量: 用蛋白分析试剂盒（Bio-rad Laboratories的产品）测定

实施例7: 本发明碱性溶解淀粉酶（K36和K38）的其它酶特征

这两种纯化酶经分析具有以下特征:

(1) 作用:

它们都水解淀粉、直链淀粉、支链淀粉以及直链和支链淀粉的部分降解产物中的 α -1, 4-糖苷键，形成葡萄糖（G1）、麦芽糖（G2）、麦芽三糖（G3）、麦芽四糖（G4）、麦芽五糖（G5）、麦芽六糖（G6）、

麦芽七糖 (G7)。然而它并不作用于出芽短梗霉聚糖。

(2) pH稳定性 (Britton-Ronbinson 缓冲液)

它们都在6.5-11.0的pH范围内、于40℃处理30分钟时表明不低于70%的剩余活性。

(3) 作用温度范围和最佳作用温度:

它们都在20-80℃的较宽温度范围内起作用, 最佳作用温度为50-60℃。

(4) 温度稳定性:

作为在不同温度条件下在50mM甘氨酸氢氧化钠缓冲液 (pH10) 中处理30分钟的结果, 它们于40℃表现不低于80%的剩余活性, 并且即使在45℃也表现约60%的剩余活性。

(5) 分子量:

根据十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳的测定, 它们都具有55, 000 ±5, 000的分子量。

(6) 等电点:

用等电聚焦电泳的测定时, 它们都具有pH4.2左右的等电点。

(7) 表面活性剂的影响

当于pH10和30℃在表面活性剂溶液中处理30分钟时, 它们都基本上无活性抑制 (活性保留率不低于90%)。表面活性剂溶液是例如直链烷基苯磺酸钠、烷基硫酸酯钠、聚氧乙烯烷基硫酸酯钠、 α -烯磺酸酯钠、 α -磺酸脂肪酸酯钠、烷基磺酸钠、DSD、肥皂或softanol。

(8) 金属盐的影响:

将它们于pH10、30℃在各种金属盐存在的情况下处理30分钟, 由此研究它们的影响。结果, 1mM Mn^{2+} 抑制K36 (抑制率: 约95%), 1mM的 Hg^{2+} 、 Be^{2+} 或 Cd^{2+} 轻度抑制K36 (抑制率: 30-40%)。1mM Mn^{2+} 抑制K38 (抑制率: 约75%), 1mM的 Sr^{2+} 或 Cd^{2+} 轻度抑制K38 (抑制率: 约30%)。

(9) N-端氨基酸序列

用蛋白测序仪 (ABI公司生产的477A型) 通过Edman降解法 [Edman, P., Acta Chem. Scand., 4, 283 (1948)] 测定每种本发明淀粉酶的N-

端氨基酸序列。结果，发现具有顺序Asp-Gly-Leu-Asn-Gly-Thr-Met-Met-Gln-Tyr-Tyr-Glu-Trp-His-Leu。

实施例8: 含有本发明任意一种碱性溶解淀粉酶的自动洗碗去污剂的去污力评估

含有本发明任意一种碱性溶解淀粉酶（K36和K38）的自动洗碗去污剂的去污力在下述条件下进行评估。作为对照，使用不含本发明酶的去污剂。

1) 脏碗的制备

将在沸腾的自来水中煮过的1ml燕麦（Quaker公司）加到瓷碗中，然后加入自来水在其中溶解。将碗在室温下干燥三小时后，储存于5℃（半密封条件）直至使用。用这种方法性制备三次脏碗用于一次清洗。

2) 清洗条件

. 使用的洗碗机:全自动洗碗机“NP-810”，商品名；由Matsushita Electric Industries Co.,Ltd生产。

. 清洗温度:水温逐渐增至55℃左右。

. 清洗用水: 自来水

. 去污剂浓度: 0.2%（重量比）

. 清洗时间:洗涤约20分钟→冲洗约20分钟（标准过程）

. 清洗时循环水的量:3.5L

3) 去污剂的组成（%是指重量百分比）

2.2%的Pullulonic L-61、24.7%碳酸钠、24.7%碳酸氢钠、10.0%过碳酸钠、12.0%NO.1硅酸钠、20.0%柠檬酸三钠、2.2%“丙二醇3000”、0.2%硅氧烷“KST-04”（商品名；BASF AG的产品）

4) 加入的酶量

实施例3中所获得的每种纯化酶的活性值通过使用甘氨酸氢氧化钠缓冲液（PH10）根据上述淀粉酶活性测定方法得到测定。

根据此结果，加入去污剂的酶量是150 U。

5) 去污力的评估方法

将碘溶液加到洗过的碟子上，肉眼判断由于碘-淀粉反应产生的颜色。

结果，含有任一种本发明酶的去污剂完全去除了污迹，因此，与不含该酶的去污剂相比表现很高的去污力。

实施例9

以用Saito-Miura方法〔(Biochim. Biophys. Acta, 72, 619(1961))〕分别提取的菌株KSM-K36和KSM-K38的染色体DNA为模板，使用两个寡聚核苷酸引物，按照常规方法进行PCR反应，这两个引物根据在来自属于芽孢杆菌属种类的细菌的已知溶解淀粉酶中高度保守Met-Gln-Tyr-Phe-Glu-Trp和Trp-Phe-Lys-Pro-Leu-Tyr序列设计。每种情况中，都得到约1.0kb的DNA片段。对此DNA片段进行核苷酸序列分析之后，对用反义PCR方法〔T. Triglia等，核酸研究，16, 81(1988)〕和体外PCR克隆试剂盒(Boehringer Mannheim GmbH的产品)得到的上游和下游DNA片段的核苷酸序列进行分析。结果，发现在每个菌株的约1.7kb基因区域中只有一个开放读码框，编码序列表No. 1和2中所示的501个氨基酸残基。已经阐明，氨基末端的序列(氨基酸数Asp1-Leu15)与从菌株KSM-K36和KSM-K38培养液纯化的淀粉酶K36和K38的氨基末端序列(15个氨基酸残基)完全一致。发现如此确定的淀粉酶K36和K38基因分别具有序列表No. 3和No. 4中所示的序列。

实施例10

分别用两个菌株的染色体DNA为模板，用PCR方法扩增到1.7kb的DNA片段，从起始密码子上游0.7kb到终止密码子下游0.1kb，接着通过使用穿梭载体PHY300PLK(商品名; Yakult Honsha Co., Ltd的产品)将其导入枯草芽孢杆菌菌株ISW1214。将如此得到的重组枯草杆菌菌株进行液体培养，由此在培养液中产生淀粉酶。作为按实施例3中所述的方法对从所得培养物上清纯化的淀粉酶进行特征分析的结果，表明它们与那些分别从菌株KSM-K36和KSM-K38的培养液纯化的淀粉酶具有很好的一致性。具体地说，发现最佳作用pH值在8-9范围内，于pH10的比活性为约4000 U/mg，而且对螯合剂和氧化剂的抗性高。

工业中开发的可能性

与已知用于去污剂的传统淀粉酶相比，本发明的碱性溶解淀粉酶具有高抗螯合剂性能。它们的最佳pH值超过8。因此根据本发明所述的碱性溶解淀粉酶可用于明显广泛的工业领域，例如用于在碱性范围内加工淀粉的步骤。具体地在将它们掺入含有螯合剂的自动洗碗去污剂、洗衣去污剂、漂白剂等的时候，它们具有优势，因此具有巨大的工业重要性。

序列表

<110> KAO CORPORATION

<120> **新型淀粉酶**

<130> P05631012

<160> 4

<210> 1

<211> 501

<212> PRT

<213> **芽孢杆菌属种类**

<400> 1

```

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

```

	85	90	95
Lys Tyr Gly Thr	Lys Ala Gln Leu Glu Arg Ala Ile Gly Ser Leu Lys		
	100	105	110
Ser Asn Asp Ile Asn Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Leu			
	115	120	125
Gly Ala Asp Phe Thr Glu Ala Val Gln Ala Val Gln Val Asn Pro Ser			
	130	135	140
Asn Arg Trp Gln Asp Ile Ser Gly Val Tyr Thr Ile Asp Ala Trp Thr			
145	150	155	160
Gly Phe Asp Phe Pro Gly Arg Asn Asn Ala Tyr Ser Asp Phe Lys Trp			
	165	170	175
Arg Trp Phe His Phe Asn Gly Val Asp Trp Asp Gln Arg Tyr Gln Glu			
	180	185	190
Asn His Leu Phe Arg Phe Ala Asn Thr Asn Trp Asn Trp Arg Val Asp			
	195	200	205
Glu Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Leu Gly Ser Asn Ile Asp Phe			
	210	215	220
Ser His Pro Glu Val Gln Glu Glu Leu Lys Asp Trp Gly Ser Trp Phe			
225	230	235	240
Thr Asp Glu Leu Asp Leu Asp Gly Tyr Arg Leu Asp Ala Ile Lys His			
	245	250	255
Ile Pro Phe Trp Tyr Thr Ser Asp Trp Val Arg His Gln Arg Ser Glu			
	260	265	270
Ala Asp Gln Asp Leu Phe Val Val Gly Glu Tyr Trp Lys Asp Asp Val			
	275	280	285
Gly Ala Leu Glu Phe Tyr Leu Asp Glu Met Asn Trp Glu Met Ser Leu			

290	295	300	
Phe Asp Val Pro Leu Asn Tyr Asn Phe Tyr Arg Ala Ser Lys Gln Gly			
305	310	315	320
Gly Ser Tyr Asp Met Arg Asn Ile Leu Arg Gly Ser Leu Val Glu Ala			
	325	330	335
His Pro Ile His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro			
	340	345	350
Gly Glu Ser Leu Glu Ser Trp Val Ala Asp Trp Phe Lys Pro Leu Ala			
	355	360	365
Tyr Ala Thr Ile Leu Thr Arg Glu Gly Gly Tyr Pro Asn Val Phe Tyr			
370	375	380	
Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Asn Asp Asn Ile Ser Ala Lys Lys Asp			
385	390	395	400
Met Ile Asp Glu Leu Leu Asp Ala Arg Gln Asn Tyr Ala Tyr Gly Thr			
	405	410	415
Gln His Asp Tyr Phe Asp His Trp Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu			
	420	425	430
Gly Thr Ser Ser Arg Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asn			
	435	440	445
Gly Pro Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Gln Gln His Ala Gly			
450	455	460	
Gln Thr Trp Thr Asp Leu Thr Gly Asn His Ala Ala Ser Val Thr Ile			
465	470	475	480
Asn Gly Asp Gly Trp Gly Glu Phe Phe Thr Asn Gly Gly Ser Val Ser			
	485	490	495
Val Tyr Val Asn Gln			

Gly Glu Ser Leu Glu Ser Trp Val Ala Asp Trp Phe Lys Pro Leu Ala
 355 360 365
 Tyr Ala Thr Ile Leu Thr Arg Glu Gly Gly Tyr Pro Asn Val Phe Tyr
 370 375 380
 Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Asn Asp Asn Ile Ser Ala Lys Lys Asp
 385 390 395 400
 Met Ile Asp Glu Leu Leu Asp Ala Arg Gln Asn Tyr Ala Tyr Gly Thr
 405 410 415
 Gln His Asp Tyr Phe Asp His Trp Asp Val Val Gly Trp Thr Arg Glu
 420 425 430
 Gly Ser Ser Ser Arg Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asn
 435 440 445
 Gly Pro Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly
 450 455 460
 Gln Thr Trp Thr Asp Leu Thr Gly Asn Asn Gly Ala Ser Val Thr Ile
 465 470 475 480
 Asn Gly Asp Gly Trp Gly Glu Phe Phe Thr Asn Gly Gly Ser Val Ser
 485 490 495
 Val Tyr Val Asn Gln
 500

<210> 3

<211> 1650

<212> DNA

<213> 芽孢杆菌属种类

<400> 3

```

cttgaatcat tatttaaagc tggttatgat atatgtaagc gttatcatta aaaggaggta 60
tttg atg aaa aga tgg gta gta gca atg ctg gca gtg tta ttt tta ttt 109
Met Lys Arg Trp Val Val Ala Met Leu Ala Val Leu Phe Leu Phe
          5          10          15
cct tcg gta gta gtt gca gat ggc ttg aat gga acg atg atg cag tat 157
Pro Ser Val Val Val Ala Asp Gly Leu Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr
          20          25          30
tat gag tgg cat cta gag aat gat ggg caa cac tgg aat cgg ttg cat 205
Tyr Glu Trp His Leu Glu Asn Asp Gly Gln His Trp Asn Arg Leu His
          35          40          45
gat gat gcc gaa gct tta agt aat gcg ggt att aca gct att tgg ata 253
Asp Asp Ala Glu Ala Leu Ser Asn Ala Gly Ile Thr Ala Ile Trp Ile
          50          55          60
ccc cca gcc tac aaa gga aat agt cag gct gat gtt ggg tat ggt gca 301
Pro Pro Ala Tyr Lys Gly Asn Ser Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala
          65          70          75
tac gac ctt tat gat tta ggg gag ttt aat caa aaa ggt acc gtt cga 349
Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg
          80          85          90          95
acg aaa tac ggg aca aag gct cag ctt gag cga gct ata ggg tcc cta 397
Thr Lys Tyr Gly Thr Lys Ala Gln Leu Glu Arg Ala Ile Gly Ser Leu
          100          105          110
aag tcg aat gat atc aat gtt tat ggg gat gtc gta atg aat cat aaa 445
Lys Ser Asn Asp Ile Asn Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys
          115          120          125
tta gga gct gat ttc acg gag gca gtg caa gct gtt caa gta aat cct 493

```

Leu Gly Ala Asp Phe Thr Glu Ala Val Gln Ala Val Gln Val Asn Pro
 130 135 140
 tcg aac cgt tgg cag gat att tca ggt gtc tac acg att gat gca tgg 541
 Ser Asn Arg Trp Gln Asp Ile Ser Gly Val Tyr Thr Ile Asp Ala Trp
 145 150 155
 acg gga ttt gac ttt cca ggg cgc aac aat gcc tat tcc gat ttt aaa 589
 Thr Gly Phe Asp Phe Pro Gly Arg Asn Asn Ala Tyr Ser Asp Phe Lys
 160 165 170 175
 tgg aga tgg ttc cat ttt aat ggc gtt gac tgg gat caa cgc tat caa 637
 Trp Arg Trp Phe His Phe Asn Gly Val Asp Trp Asp Gln Arg Tyr Gln
 180 185 190
 gaa aac cat ctt ttt cgc ttt gca aat acg aac tgg aac tgg cga gtg 685
 Glu Asn His Leu Phe Arg Phe Ala Asn Thr Asn Trp Asn Trp Arg Val
 195 200 205
 gat gaa gag aat ggt aat tat gac tat tta tta gga tcg aac att gac 733
 Asp Glu Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Leu Gly Ser Asn Ile Asp
 210 215 220
 ttt agc cac cca gag gtt caa gag gaa tta aag gat tgg ggg agc tgg 781
 Phe Ser His Pro Glu Val Gln Glu Glu Leu Lys Asp Trp Gly Ser Trp
 225 230 235
 ttt acg gat gag cta gat tta gat ggg tat cga ttg gat gct att aag 829
 Phe Thr Asp Glu Leu Asp Leu Asp Gly Tyr Arg Leu Asp Ala Ile Lys
 240 245 250 255
 cat att cca ttc tgg tat acg tca gat tgg gtt agg cat cag cga agt 877
 His Ile Pro Phe Trp Tyr Thr Ser Asp Trp Val Arg His Gln Arg Ser
 260 265 270

gaa gca gac caa gat tta ttt gtc gta ggg gag tat tgg aag gat gac 925
 Glu Ala Asp Gln Asp Leu Phe Val Val Gly Glu Tyr Trp Lys Asp Asp
 275 280 285

gta ggt gct ctc gaa ttt tat tta gat gaa atg aat tgg gag atg tct 973
 Val Gly Ala Leu Glu Phe Tyr Leu Asp Glu Met Asn Trp Glu Met Ser
 290 295 300

cta ttc gat gtt ccg ctc aat tat aat ttt tac cgg gct tca aag caa 1021
 Leu Phe Asp Val Pro Leu Asn Tyr Asn Phe Tyr Arg Ala Ser Lys Gln
 305 310 315

ggc gga agc tat gat atg cgt aat att tta cga gga tct tta gta gaa 1069
 Gly Gly Ser Tyr Asp Met Arg Asn Ile Leu Arg Gly Ser Leu Val Glu
 320 325 330 335

gca cat ccg att cat gca gtt acg ttt gtt gat aat cat gat act cag 1117
 Ala His Pro Ile His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln
 340 345 350

cca gga gag tca tta gaa tca tgg gtc gct gat tgg ttt aag cca ctt 1165
 Pro Gly Glu Ser Leu Glu Ser Trp Val Ala Asp Trp Phe Lys Pro Leu
 355 360 365

gct tat gcg aca atc ttg acg cgt gaa ggt ggt tat cca aat gta ttt 1213
 Ala Tyr Ala Thr Ile Leu Thr Arg Glu Gly Gly Tyr Pro Asn Val Phe
 370 375 380

tac ggt gac tac tat ggg att cct aac gat aac att tca gct aag aag 1261
 Tyr Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Asn Asp Asn Ile Ser Ala Lys Lys
 385 390 395

gat atg att gat gag ttg ctt gat gca cgt caa aat tac gca tat ggc 1309
 Asp Met Ile Asp Glu Leu Leu Asp Ala Arg Gln Asn Tyr Ala Tyr Gly

400 405 410 415
 aca caa cat gac tat ttt gat cat tgg gat atc gtt gga tgg aca aga 1357
 Thr Gln His Asp Tyr Phe Asp His Trp Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg
 420 425 430
 gaa ggt aca tcc tca cgt cct aat tcg ggt ctt gct act att atg tcc 1405
 Glu Gly Thr Ser Ser Arg Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser
 435 440 445
 aat ggt cct gga gga tca aaa tgg atg tac gta gga cag caa cat gca 1453
 Asn Gly Pro Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Gln Gln His Ala
 450 455 460
 gga caa acg tgg aca gat tta act ggc aat cac gcg gcg tcg gtt acg 1501
 Gly Gln Thr Trp Thr Asp Leu Thr Gly Asn His Ala Ala Ser Val Thr
 465 470 475
 att aat ggt gat ggc tgg ggc gaa ttc ttt aca aat gga gga tct gta 1549
 Ile Asn Gly Asp Gly Trp Gly Glu Phe Phe Thr Asn Gly Gly Ser Val
 480 485 490 495
 tcc gtg tat gtg aac caa taataaaaag ccttgagaag ggattcctcc ctaactca 1605
 Ser Val Tyr Val Asn Gln

500

aggctttctt tatgtcgttt agctcaacgc ttctacgaag ctta 1650

<210> 4

<211> 1745

<212> DNA

<213> 芽孢杆菌属种类

<400> 4

aactaagtaa catcgattca ggataaaagt atgcgaaacg atgcgcaaaa ctgcgcaact 60
actagcactc ttcagggact aaaccacctt tttccaaaa atgacatcat ataaacaat 120
ttgtctacca atcactatntt aaagctgttt atgatatatg taagcgttat cattaanaagg 180
aggtatnttg atg aga aga tgg gta gta gca atg ttg gca gtg tta ttt tta 231
Met Arg Arg Trp Val Val Ala Met Leu Ala Val Leu Phe Leu
5 10
ttt cct tcg gta gta gtt gca gat gga ttg aac ggt acg atg atg cag 279
Phe Pro Ser Val Val Val Ala Asp Gly Leu Asn Gly Thr Met Met Gln
15 20 25 30
tat tat gag tgg cat ttg gaa aac gac ggg cag cat tgg aat cgg ttg 327
Tyr Tyr Glu Trp His Leu Glu Asn Asp Gly Gln His Trp Asn Arg Leu
35 40 45
cac gat gat gcc gca gct ttg agt gat gct ggt att aca gct att tgg 375
His Asp Asp Ala Ala Ala Leu Ser Asp Ala Gly Ile Thr Ala Ile Trp
50 55 60
att ccg cca gcc tac aaa ggt aat agt cag gcg gat gtt ggg tac ggt 423
Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly Asn Ser Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly
65 70 75
gca tac gat ctt tat gat tta gga gag ttc aat caa aag ggt act gtt 471
Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val
80 85 90
cga acg aaa tac gga act aag gca cag ctt gaa cga gct att ggg tcc 519
Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys Ala Gln Leu Glu Arg Ala Ile Gly Ser
95 100 105 110
ctt aaa tct aat gat atc aat gta tac gga gat gtc gtg atg aat cat 567
Leu Lys Ser Asn Asp Ile Asn Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His

	115	120	125	
aaa atg gga gct gat ttt acg gag gca gtg caa gct gtt caa gta aat				615
Lys Met Gly Ala Asp Phe Thr Glu Ala Val Gln Ala Val Gln Val Asn				
	130	135	140	
cca acg aat cgt tgg cag gat att tca ggt gcc tac acg att gat gcg				663
Pro Thr Asn Arg Trp Gln Asp Ile Ser Gly Ala Tyr Thr Ile Asp Ala				
	145	150	155	
tgg acg ggt ttc gac ttt tca ggg cgt aac aac gcc tat tca gat ttt				711
Trp Thr Gly Phe Asp Phe Ser Gly Arg Asn Asn Ala Tyr Ser Asp Phe				
	160	165	170	
aag tgg aga tgg ttc cat ttt aat ggt gtt gac tgg gat cag cgc tat				759
Lys Trp Arg Trp Phe His Phe Asn Gly Val Asp Trp Asp Gln Arg Tyr				
	175	180	185	190
caa gaa aat cat att ttc cgc ttt gca aat acg aac tgg aac tgg cga				807
Gln Glu Asn His Ile Phe Arg Phe Ala Asn Thr Asn Trp Asn Trp Arg				
	195	200	205	
gtg gat gaa gag aac ggt aat tat gat tac ctg tta gga tcg aat atc				855
Val Asp Glu Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Leu Gly Ser Asn Ile				
	210	215	220	
gac ttt agt cat cca gaa gta caa gat gag ttg aag gat tgg ggt agc				903
Asp Phe Ser His Pro Glu Val Gln Asp Glu Leu Lys Asp Trp Gly Ser				
	225	230	235	
tgg ttt acc gat gag tta gat ttg gat ggt tat cgt tta gat gct att				951
Trp Phe Thr Asp Glu Leu Asp Leu Asp Gly Tyr Arg Leu Asp Ala Ile				
	240	245	250	
aaa cat att cca ttc tgg tat aca tct gat tgg gtt cgg cat cag cgc				999

Lys His Ile Pro Phe Trp Tyr Thr Ser Asp Trp Val Arg His Gln Arg	
255	260
265	270
aac gaa gca gat caa gat tta ttt gtc gta ggg gaa tat tgg aag gat	1047
Asn Glu Ala Asp Gln Asp Leu Phe Val Val Gly Glu Tyr Trp Lys Asp	
275	280
285	
gac gta ggt gct ctc gaa ttt tat tta gat gaa atg aat tgg gag atg	1095
Asp Val Gly Ala Leu Glu Phe Tyr Leu Asp Glu Met Asn Trp Glu Met	
290	295
300	
tct cta ttc gat gtt cca ctt aat tat aat ttt tac cgg gct tca caa	1143
Ser Leu Phe Asp Val Pro Leu Asn Tyr Asn Phe Tyr Arg Ala Ser Gln	
305	310
315	
caa ggt gga agc tat gat atg cgt aat att tta cga gga tct tta gta	1191
Gln Gly Gly Ser Tyr Asp Met Arg Asn Ile Leu Arg Gly Ser Leu Val	
320	325
330	
gaa gcg cat ccg atg cat gca gtt acg ttt gtt gat aat cat gat act	1239
Glu Ala His Pro Met His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr	
335	340
345	350
cag cca ggg gag tca tta gag tca tgg gtt gct gat tgg ttt aag cca	1287
Gln Pro Gly Glu Ser Leu Glu Ser Trp Val Ala Asp Trp Phe Lys Pro	
355	360
365	
ctt gct tat gcg aca att ttg acg cgt gaa ggt ggt tat cca aat gta	1335
Leu Ala Tyr Ala Thr Ile Leu Thr Arg Glu Gly Gly Tyr Pro Asn Val	
370	375
380	
ttt tac ggt gat tac tat ggg att cct aac gat aac att tca gct aaa	1383
Phe Tyr Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Asn Asp Asn Ile Ser Ala Lys	
385	390
395	

```

aaa gat atg att gat gag ctg ctt gat gca cgt caa aat tac gca tat 1431
Lys Asp Met Ile Asp Glu Leu Leu Asp Ala Arg Gln Asn Tyr Ala Tyr
    400                405                410
ggc acg cag cat gac tat ttt gat cat tgg gat gtt gta gga tgg act 1479
Gly Thr Gln His Asp Tyr Phe Asp His Trp Asp Val Val Gly Trp Thr
    415                420                425                430
agg gaa gga tct tcc tcc aga cct aat tca ggc ctt gcg act att atg 1527
Arg Glu Gly Ser Ser Ser Arg Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met
                435                440                445
tcg aat gga cct ggt ggt tcc aag tgg atg tat gta gga cgt cag aat 1575
Ser Asn Gly Pro Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn
                450                455                460
gca gga caa aca tgg aca gat tta act ggt aat aac gga gcg tcc gtt 1623
Ala Gly Gln Thr Trp Thr Asp Leu Thr Gly Asn Asn Gly Ala Ser Val
                465                470                475
aca att aat ggc gat gga tgg ggc gaa ttc ttt acg aat gga gga tct 1671
Thr Ile Asn Gly Asp Gly Trp Gly Glu Phe Phe Thr Asn Gly Gly Ser
                480                485                490
gta tcc gtg tac gtg aac caa taacaaaaag ccttgagaag ggattcctcc ctaa 1726
Val Ser Val Tyr Val Asn Gln
    495                500
ctcaaggctt tctttatgt 1745

```

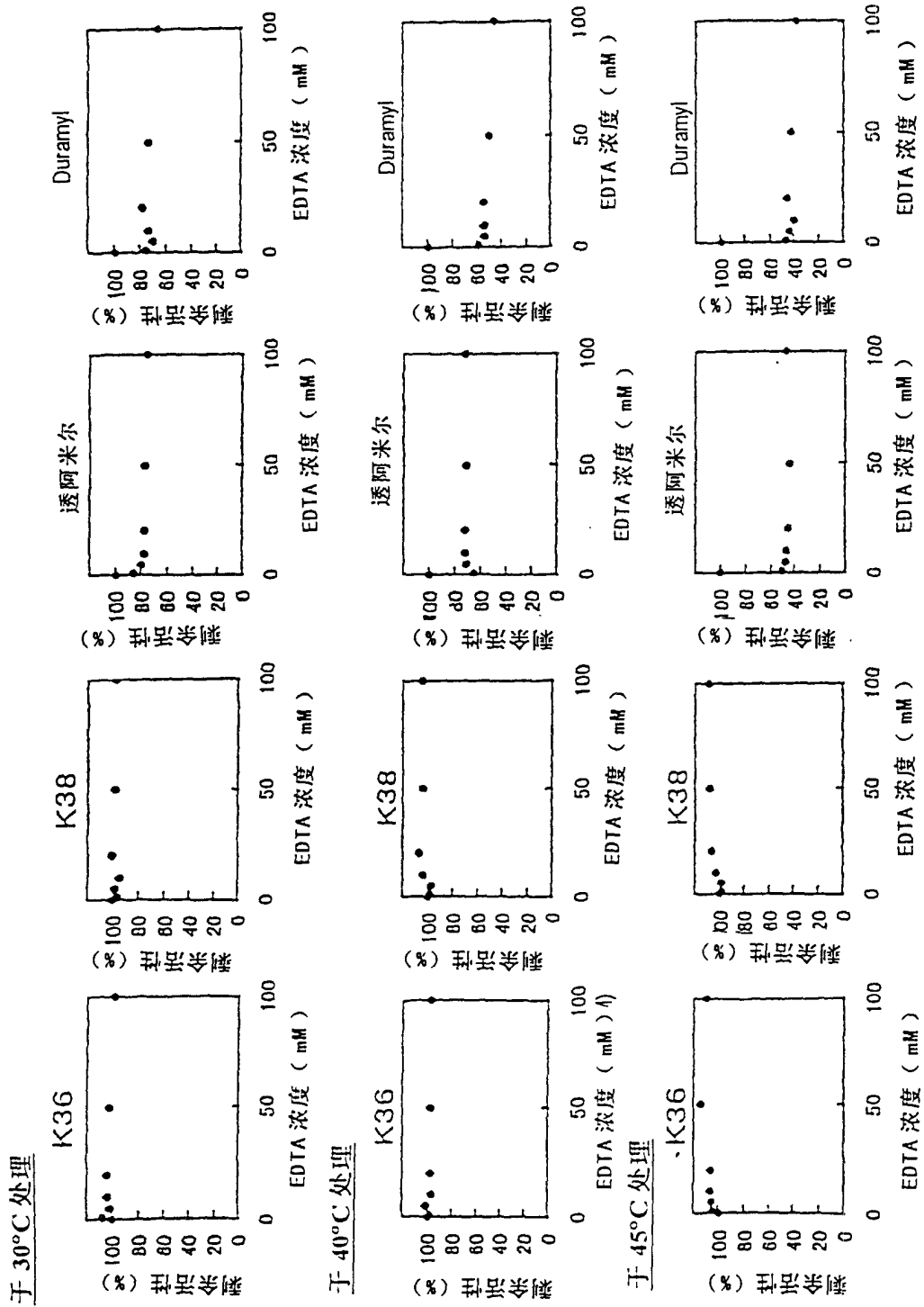


图 1: 抗 EDTA 表现

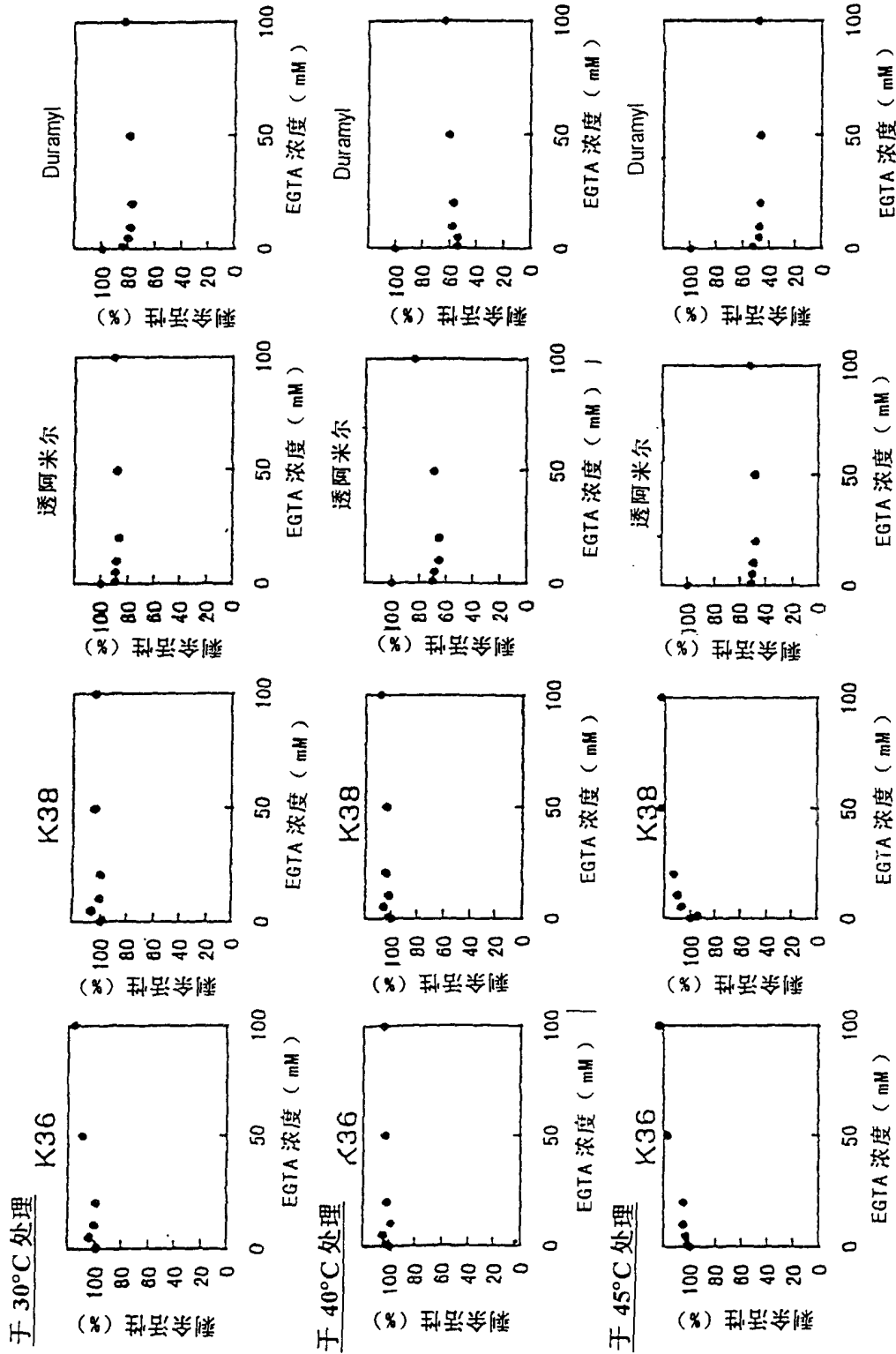


图 2：抗 EGTA 表现

图 3

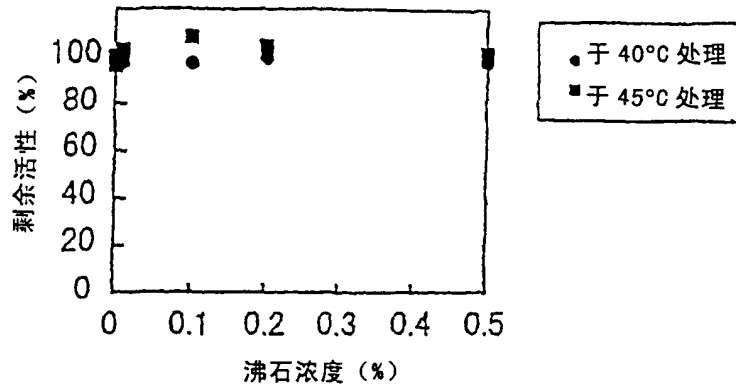


图 4

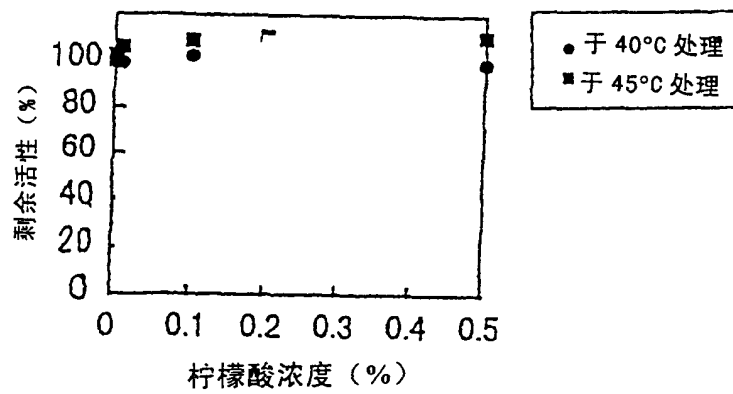


图 5

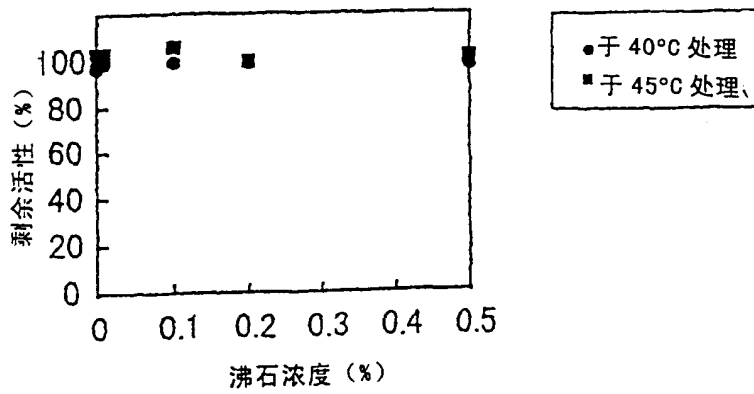


图 6

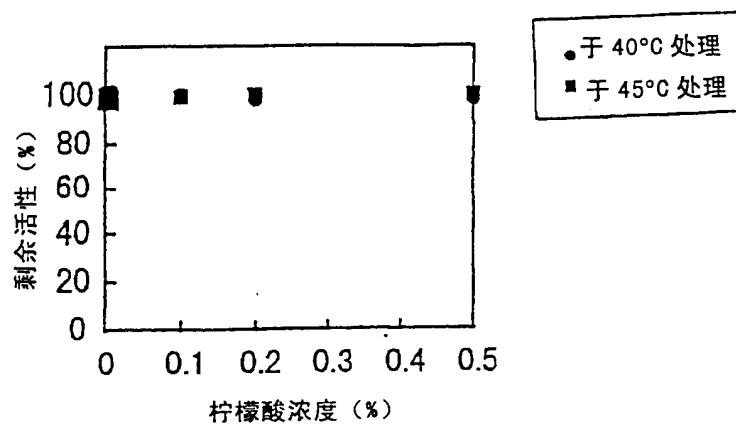


图 7

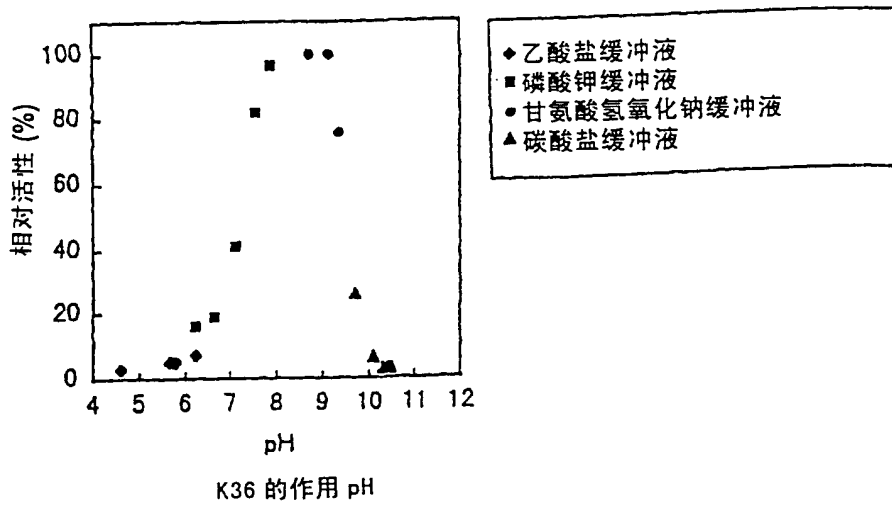
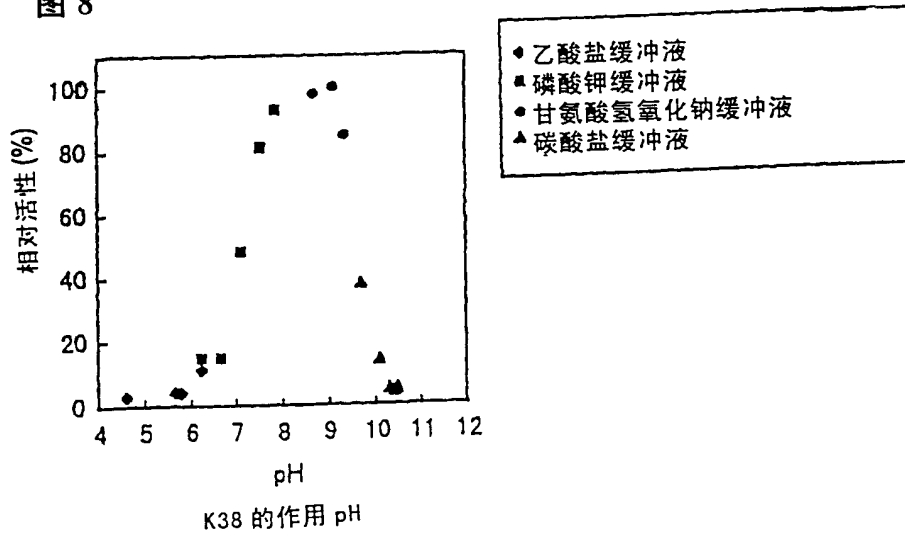


图 8



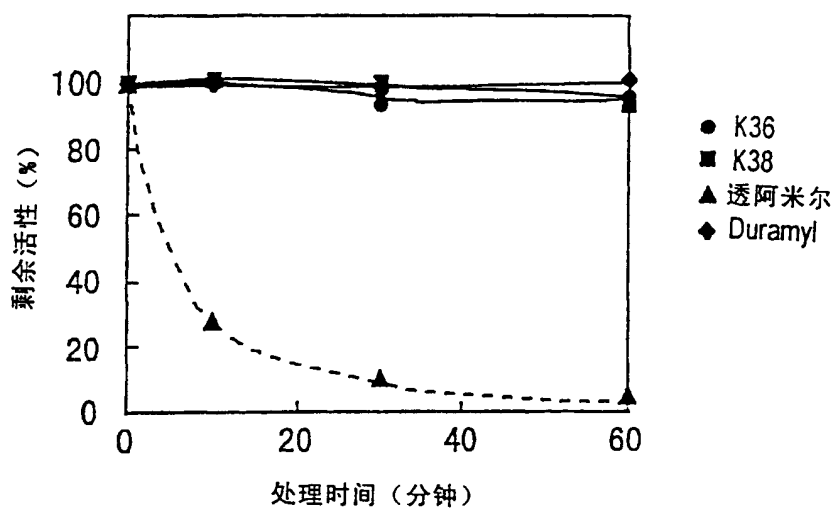


图 9：抗氧化剂表现