(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102057043 B
(45)授权公告日 2015.03.04

(21)申请号 200980120922.3
(22)申请日 2009.06.03
(30)优先权数据
61/059,695 2008.06.06 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2010.12.03
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2009/046066 2009.06.03
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2009/149144 EN 2009.12.10
(73)专利权人 丹尼斯科美国公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 J·R·巴斯勒
L·G·卡斯康-佩雷拉
D·A·伊斯泰尔 J·T·凯利斯
(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所 11247
代理人 黄革生 林柏楠
(51)Int.Cl.
C12N 9/54(2006.01)

(56)对比文件
US 6312936 B1,2001.11.06,
WO 03062381 A2,2003.07.31,
Rollence ML et al.,.Engineering thermostability in subtilisin BPN′ by in vitro mutagenesis.《Crit Rev Biotechnol》.1988,
EBI.EBI:AAY43221.《EBI》.2000,

审查员 潘天耀

权利要求书3页 说明书48页
序列表2页

(54)发明名称

包含微生物蛋白酶变体的组合物和方法

(57)摘要

本发明提供枯草杆菌蛋白酶变体和包含至少一种此处陈列的枯草杆菌蛋白酶变体的组合物，以及使用这些变体和组合物的方法。在一些实施方案中，本发明提供适于衣物清洁用途的枯草杆菌蛋白酶变体。

CN 102057043 B

1. 分离的枯草杆菌蛋白酶变体，其中在 SEQ ID NO：1 中陈列的 BPN’枯草杆菌蛋白酶位置上经过取代 G97A-G128A-Y217Q。

2. 在 G97A/G128A/Y217Q 经过取代和还在以下位置中的至少一组经过取代的枯草杆菌蛋白酶变体：S24R-S87D-Q206E、P40E-A144K-K213L、N61E-P129E-S159K、S87D-S162K-K265N、S87D-T242R-Q275E、N61E-Q103E-N240K、S87D-T242R-K265N、N62R-K265N-Q275E、P129E-S145D-N240K、P129E-P239R-K265N、0103E-P129E-T242R、P40E-N61E-S87D-S162K-T242R、S24R-N62R-S87D-S145D-K265N、P40E-N62R-S87D-Q103E-S162K、S24R-P40E-S145D-S159K-K213L、S24R-S87D-A144K-K265N-Q275E、N61E-P129E-S162K-K213L-N240K、N61E-S145D-S162K-K213L-T242R、S87D-A144K-S145D-S159K-Q275E、S24R-P129E-Q206E-N240K-K265N、N61E-Q103E-A144K-K213L-T242R、N62R-S159K-Q206E-K265N-Q275E、S24R-Q103E-P129E-N240K-K265N、N61E-Q103E-P129E-P239R-N240K、P129E-S145D-N240K-T242R-K265N、Q103E-S162K-Q206E-K213L-P239R、P40E-N61E-N62R-S87D-S159K-S162K-K265N、S24R-P40E-N61E-A144K-Q206E-K213L-T242R、P40E-N61E-S87D-P129E-S159K-S162K-T242R、P40E-N62R-S87D-S145D-S159K-S162K-Q275E、P40E-N62R-S87D-Q103E-A144K-S159K-Q275E、P40E-N62R-S87D-S159K-S162K-K265N-Q275E、P40E-N61E-P129E-A144K-S162K-K213L-N240K、P40E-N61E-Q103E-A144K-S159K-S162K-Q275E、P40E-N61E-Q103E-S159K-S162K-K213L-P239R、P40E-N61E-Q103E-S159K-S162K-K213L-N240K、N62R-S87D-P129E-S145D-S159K-S162K-Q275E、S24R-N61E-Q103E-P129E-K213L-N240K-T242R、P40E-N62R-S145D-S159K-S162K-Q206E-Q275E、N62R-S87D-S145D-S159K-S162K-K265N-Q275E、N61E-S87D-Q103E-S159K-S162K-K213L-T242R、S24R-N61E-Q103E-P129E-Q206E-P239R-N240K、S24R-N62R-P129E-S145D-P239R-K265N-Q275E、S24R-N62R-P129E-Q206E-N240K-K265N-Q275E、P40E-S145D-S159K-S162K-K213L-P239R-Q275E、N61E-Q103E-A144K-Q206E-K213L-N240K-T242R、S24R-Q103E-P129E-S145D-P239R-N240K-K265N、N61E-Q103E-P129E-K213L-P239R-N240K-T242R、N61E-Q103E-Q206E-K213L-P239R-N240K-T242R、S24R-P40E-N61E-S87D-Q103E-S159K-S162K-K213L-N240K、N61E-N62R-S87D-Q103E-S159K-S162K-K213L-T242R-Q275E、P40E-N62R-S87D-S145D-S159K-S162K-N240K-K265N-Q275E、N62R-S87D-S145D-S159K-S162K-K213L-N240K-K265N-Q275E、S24R-N61E-Q103E-P129E-Q206E-K213L-P239R-N240K-T242R、S24R-N61E-Q103E-P129E-S145D-P239R-N240K-T242R-K265N、N61E-S87D-Q103E-P129E-S159K-S162K-K213L-N240K-T242R、P40E-N61E-Q103E-P129E-A144K-K213L-P239R-N240K-T242R、S24R-Q103E-P129E-S145D-Q206E-P239R-N240K-T242R-K265N、N61E-Q103E-P129E-A144K-Q206E-K213L-P239R-N240K-T242R、S24R-P40E-N61E-S87D-Q103E-P129E-A144K-K213L-P239R-N240K-T242R、S24R-P40E-N61E-Q103E-P129E-A144K-K213L-P239R-N240K-T242R-K265N、S24R-P40E-N61E-Q103E-P129E-A144K-Q206E-K213L-P239R-N240K-T242R、S24R-P40E-N61E-Q103E-P129E-A144K-S145D-K213L-P239R-N240K-T242R、S24R-N61E-S87D-Q103E-P129E-A144K-Q206E-K213L-P239R-N240K-T242R、P40E-N61E-S87D-Q103E-S145D-S159K-S162K-K213L-P239R-N240K-T242R、S24R-P40E-N61E-Q103E-P129E-S162K-Q206E-K213L-P239R-N240K-T242R、S24R-N61E-Q103E-P129E-A144K-S145D-Q206E-K213L-P239R-N240K-T242R、P40E-N61E-Q103E-P129E-A144K-S16

2K-Q206E-K213L-P239R-N240K-T242R、S24R-N61E-Q103E-P129E-A144K-Q206E-K213L-P239R-N240K-T242R-K265N、和 S24R-P40E-N61E-S87D-Q103E-P129E-A144K-S162K-Q206E-K213L-P239R-N240K-T242R，其中所述取代位于 SEQ ID NO：1 中陈列的 BPN'枯草杆菌蛋白酶位置上。

3. 在 G97A/G128A/Y217Q 经过取代和还在以下位置中的至少一组经过取代的枯草杆菌蛋白酶变体：S53G-F58G、S53G-S78N、S53G-Y104N、S53G-I111V、S53G-A114G、S53G-N117S、S53G-S125A、S53G-S132N、S53G-P239V、F58G-S78N、F58G-Y104N、F58G-I111V、F58G-A114G、F58G-N117S、F58G-S125A、F58G-S132N、F58G-P239V、S78N-Y104N、S78N-I111V、S78N-A114G、S78N-N117S、S78N-S125A、S78N-S132N、S78N-P239V、Y104N-I111V、Y104N-A114G、Y104N-N117S、Y104N-S125A、Y104N-S132N、Y104N-P239V、I111V-A114G、I111V-N117S、I111V-S125A、I111V-S132N、I111V-P239V、A114G-N117S、A114G-S125A、A114G-S132N、A114G-P239V、N117S-S125A、N117S-S132N、N117S-P239V、S125A-S132N、S125A-P239V、S132N-P239V、S53G-F58G-S78N、S53G-F58G-Y104N、S53G-F58G-I111V、S53G-F58G-A114G、S53G-F58G-N117S、S53G-F58G-S125A、S53G-F58G-S132N、S53G-F58G-P239V、S53G-S78N-Y104N、S53G-S78N-I111V、S53G-S78N-A114G、S53G-S78N-N117S、S53G-S78N-S125A、S53G-S78N-S132N、S53G-S78N-P239V、S53G-Y104N-I111V、S53G-Y104N-A114G、S53G-Y104N-N117S、S53G-Y104N-S125A、S53G-Y104N-S132N、S53G-Y104N-P239V、S53G-I111V-A114G、S53G-I111V-N117S、S53G-I111V-S125A、S53G-I111V-S132N、S53G-I111V-P239V、S53G-A114G-N117S、S53G-A114G-S125A、S53G-A114G-S132N、S53G-A114G-P239V、S53G-N117S-S125A、S53G-N117S-S132N、S53G-N117S-P239V、S53G-S125A-S132N、S53G-S125A-P239V、S53G-S132N-P239V、F58G-S78N-Y104N、F58G-S78N-I111V、F58G-S78N-A114G、F58G-S78N-N117S、F58G-S78N-S125A、F58G-S78N-S132N、F58G-S78N-P239V、F58G-Y104N-I111V、F58G-Y104N-A114G、F58G-Y104N-N117S、F58G-Y104N-S125A、F58G-Y104N-S132N、F58G-Y104N-P239V、F58G-I111V-A114G、F58G-I111V-N117S、F58G-I111V-S125A、F58G-I111V-S132N、F58G-I111V-P239V、F58G-A114G-N117S、F58G-A114G-S125A、F58G-A114G-S132N、F58G-A114G-P239V、F58G-N117S-S125A、F58G-N117S-S132N、F58G-N117S-P239V、F58G-S125A-S132N、F58G-S125A-P239V、F58G-S132N-P239V、S78N-Y104N-I111V、S78N-Y104N-A114G、S78N-Y104N-N117S、S78N-Y104N-S125A、S78N-Y104N-S132N、S78N-Y104N-P239V、S78N-I111V-A114G、S78N-I111V-N117S、S78N-I111V-S125A、S78N-I111V-S132N、S78N-I111V-P239V、S78N-A114G-N117S、S78N-A114G-S125A、S78N-A114G-S132N、S78N-A114G-P239V、S78N-N117S-S125A、S78N-N117S-S132N、S78N-N117S-P239V、S78N-S125A-S132N、S78N-S125A-P239V、S78N-S132N-P239V、Y104N-I111V-A114G、Y104N-I111V-N117S、Y104N-I111V-S125A、Y104N-I111V-S132N、Y104N-I111V-P239V、Y104N-A114G-N117S、Y104N-A114G-S125A、Y104N-A114G-S132N、Y104N-A114G-P239V、Y104N-N117S-S125A、Y104N-N117S-S132N、Y104N-N117S-P239V、Y104N-S125A-S132N、Y104N-S125A-P239V、Y104N-S132N-P239V、I111V-A114G-N117S、I111V-A114G-S125A、I111V-A114G-S132N、I111V-A114G-P239V、I111V-N117S-S125A、I111V-N117S-S132N、I111V-N117S-P239V、I111V-S125A-S132N、

I111V-S125A-P239V、I111V-S132N-P239V、A114G-N117S-S125A、A114G-N117S-S132N、A114G-N117S-P239V、A114G-S125A-S132N、A114G-S125A-P239V、A114G-S132N-P239V、N117S-S125A-S132N、N117S-S125A-P239V、N117S-S132N-P239V、S125A-S132N-P239V、N76D-D120H-K213N-M222Q，其中所述取代位于 SEQ ID NO :1 中陈列的 BPN'枯草杆菌蛋白酶位置上。

4. 分离的核酸，其编码权利要求 1-3 中任一项陈列的枯草杆菌蛋白酶变体。

5. 表达载体，其包含权利要求 4 的所述核酸。

6. 宿主细胞，其包含权利要求 5 的表达载体。

7. 清洁组合物，其包含权利要求 1-4 中任一项陈列的至少一种枯草杆菌蛋白酶变体。

8. 权利要求 7 的清洁组合物，其中所述清洁组合物为衣物洗涤剂。

9. 权利要求 8 的衣物洗涤剂，其中所述衣物洗涤剂为大容量液体衣物洗涤剂。

10. 权利要求 7 的清洁组合物，其中所述清洁组合物为餐具洗涤剂。

11. 权利要求 7-10 中任一项的清洁组合物，还包含一种或多种其他酶，所述酶选自半纤维素酶、过氧化物酶、蛋白酶、纤维素酶、木聚糖酶、脂肪酶、磷脂酶、酯酶、角质酶、果胶酶、角蛋白酶、还原酶、氧化酶、酚氧化酶、脂氧合酶、木质酶、支链淀粉酶、鞣酸酶、戊聚糖酶、麦芽聚糖酶 (malanases)、β - 葡聚糖酶、阿拉伯糖苷酶、透明质酸酶、软骨素酶、漆酶和淀粉酶，或其混合物。

12. 权利要求 7 的清洁组合物，还包含至少一种稳定剂。

13. 清洁组合物，包含至少 0.0001 重量百分比的权利要求 1-4 中任一项的至少一种枯草杆菌蛋白酶变体，和任选的至少一种合适的辅助成分。

14. 清洁的方法，包含以下步骤 :

a) 将包含织物的表面和 / 或物品与权利要求 7-13 中任一项的清洁组合物接触 ;和

b) 任选的洗涤和 / 或漂洗所述表面或物品。

15. 动物饲料，包含权利要求 1-3 中任一项的至少一种枯草杆菌蛋白酶变体。

16. 食物加工组合物，包含权利要求 1-3 中任一项的至少一种枯草杆菌蛋白酶变体。

包含微生物蛋白酶变体的组合物和方法

发明领域

[0001] 本发明提供枯草杆菌蛋白酶变体和包含至少一种此处陈列的枯草杆菌蛋白酶变体的组合物，以及使用这些变体和组合物的方法。具体的，本发明提供适于衣物清洁用途的蛋白酶变体。

[0002] 发明背景

[0003] 丝氨酸蛋白酶是包含多种酶类别的羰基水解酶亚组，具有多种特异性和生物学功能。对枯草杆菌蛋白酶已经进行了大量研究，主要是出于其在清洁和饲料应用中的用途。其他工作则着眼于在各种应用中可以负面影响这些酶的功能的不良环境条件（例如，暴露于氧化剂、螯合剂、极端的温度和 / 或 pH）。尽管如此，本领域仍然需要这样的酶系统，所述酶系统能够抵抗这些不良条件，并且与本领域目前已知的酶系统相比，保留了活性或具有提高的活性。

[0004] 发明概述

[0005] 本发明提供枯草杆菌蛋白酶变体和包含至少一种此处陈列的枯草杆菌蛋白酶变体的组合物，以及使用这些变体和组合物的方法。在一些实施方案中，本发明提供适于衣物清洁用途的蛋白酶变体。

[0006] 本发明提供分离的枯草杆菌蛋白酶变体，包含以下取代组中的至少一组：G97A-G128A-Y217Q、G97A-L126A-G128A、G97A-L126A-G128A-Y217Q、G97A-L126A-Y217Q、G97A-M124V-G128A、G97A-M124V-G128A-Y217Q、G97A-M124V-L126A、G97A-M124V-L126A-G128A、G97A-M124V-L126A-Y217Q、G97A-M124V-Y217Q、G97A-N123G-G128A、G97A-N123G-G128A-Y217Q、G97A-N123G-L126A、G97A-N123G-L126A-G128A、G97A-N123G-L126A-Y217Q、G97A-N123G-M124V、G97A-N123G-M124V-G128A、G97A-N123G-M124V-L126A、G97A-N123G-M124V-Y217Q、G97A-N123G-Y217Q、L126A-G128A-Y217Q、L96T-G128A-Y217Q、L96T-G97A-G128A、L96T-G97A-G128A-Y217Q、L96T-G97A-L126A、L96T-G97A-L126A-G128A、L96T-G97A-L126A-Y217Q、L96T-G97A-M124V、L96T-G97A-M124V-G128A、L96T-G97A-M124V-L126A、L96T-G97A-M124V-Y217Q、L96T-G97A-N123G、L96T-G97A-N123G-G128A、L96T-G97A-N123G-L126A、L96T-G97A-N123G-M124V、L96T-G97A-N123G-Y217Q、L96T-G97A-Y217Q、L96T-L126A-G128A、L96T-L126A-G128A-Y217Q、L96T-L126A-Y217Q、L96T-M124V-G128A、L96T-M124V-G128A-Y217Q、L96T-M124V-L126A、L96T-M124V-L126A-G128A、L96T-M124V-L126A-Y217Q、L96T-M124V-Y217Q、L96T-N123G-G128A、L96T-N123G-G128A-Y217Q、L96T-N123G-L126A、L96T-N123G-L126A-G128A、L96T-N123G-L126A-Y217Q、L96T-N123G-M124V、L96T-N123G-M124V-G128A、L96T-N123G-M124V-L126A、L96T-N123G-M124V-Y217Q、L96T-N123G-Y217Q、M124V-G128A-Y217Q、M124V-L126A-G128A、M124V-L126A-G128A-Y217Q、M124V-L126A-Y217Q、N123G-G128A-Y217Q、

N123G-L126A-G128A、N123G-L126A-G128A-Y217Q、N123G-L126A-Y217Q、N123G-M124V-G128A、N123G-M124V-G128A-Y217Q、N123G-M124V-L126A、N123G-M124V-L126A-G128A、N123G-M124V-L126A-Y217Q、N123G-M124V-Y217Q、N62Q-G128A-Y217Q、N62Q-G97A-G128A、N62Q-G97A-G128A-Y217Q、N62Q-G97A-L126A、N62Q-G97A-L126A-G128A、N62Q-G97A-L126A-Y217Q、N62Q-G97A-M124V、N62Q-G97A-M124V-G128A、N62Q-G97A-M124V-L126A、N62Q-G97A-M124V-Y217Q、N62Q-G97A-N123G、N62Q-G97A-N123G-G128A、N62Q-G97A-N123G-L126A、N62Q-G97A-N123G-M124V、N62Q-G97A-N123G-Y217Q、N62Q-G97A-Y217Q、N62Q-L126A-G128A、N62Q-L126A-G128A-Y217Q、N62Q-L126A-Y217Q、N62Q-L96T-G128A、N62Q-L96T-G128A-Y217Q、N62Q-L96T-G97A、N62Q-L96T-G97A-G128A、N62Q-L96T-G97A-L126A、N62Q-L96T-G97A-M124V、N62Q-L96T-G97A-N123G、N62Q-L96T-G97A-Y217Q、N62Q-L96T-L126A、N62Q-L96T-L126A-G128A、N62Q-L96T-L126A-Y217Q、N62Q-L96T-M124V、N62Q-L96T-M124V-G128A、N62Q-L96T-M124V-L126A、N62Q-L96T-M124V-Y217Q、N62Q-L96T-N123G、N62Q-L96T-N123G-G128A、N62Q-L96T-N123G-L126A、N62Q-L96T-N123G-M124V、N62Q-L96T-N123G-Y217Q、N62Q-L96T-Y217Q、N62Q-M124V-G128A、N62Q-M124V-G128A-Y217Q、N62Q-M124V-L126A、N62Q-M124V-L126A-G128A、N62Q-M124V-L126A-Y217Q、N62Q-M124V-Y217Q、N62Q-N123G-G128A、N62Q-N123G-G128A-Y217Q、N62Q-N123G-L126A、N62Q-N123G-L126A-G128A、N62Q-N123G-L126A-Y217Q、N62Q-N123G-M124V、N62Q-N123G-M124V-G128A、N62Q-N123G-M124V-L126A、N62Q-N123G-M124V-Y217Q、和 N62Q-N123G-Y217Q，其中取代位于 SEQ ID NO：1 中陈列的 BPN’枯草杆菌蛋白酶位置的等同位置。

[0007] 本发明还提供分离的枯草杆菌蛋白酶变体，包含以下取代组中的至少一组：G97N-G128A-Y217M、G97G-G128S-Y217E、G97A-G128A-Y217Q、G97M-G128S-Y217E、G97A-G128S-Y217Q、G97D-G128S-Y217Q、G97M-G128G-Y217M、G97G-G128S-Y217Q、G97S-G128S-Y217Q、G97G-G128A-Y217Q、G97S-G128A-Y217E、G97A-G128S-Y217L、G97A-G128A-Y217N、G97Q-G128S-Y217L、G97A-G128A-Y217M、G97A-G128A-Y217S、G97D-G128A-Y217Q、G97M-G128S-Y217Q、G97Q-G128G-Y217D-S87Y、G97S-G128A-Y217N、G97A-G128S-Y217T、G97D-G128S-Y217E、G97D-G128A-Y217L、G97G-G128S-Y217E-S78P-A272T、G97T-G128S-Y217D、G97D-G128A-Y217I、G97Q-G128S-Y217Q、G97G-G128A-Y217D、G97Q-G128A-Y217N、G97S-G128A-Y217M、G97S-G128S-Y217N、G97S-G128S-Y217M、G97E-G128S-Y217M、G97S-G128P-Y217Q、G97T-G128S-Y217Q、G97D-G128S-Y217Q-A73T、G97E-G128S-Y217N、G97G-G128A-Y217I、G97Q-G128A-Y217D、G97Q-G128S-Y217M、G97R-G128T-Y217Q-S162P、G97S-G128S-Y217D、G97T-G128P-Y217I、G97Q-G128G-Y217E、G97C-G128G-Y217N、G97D-G128S-Y217H、G97M-G128S-Y217L、G97M-G128S-Y217N、G97S-G128S-Y217E、G97M-G128S-Y217I、G97A-G128P-Y217A、G97R-G128S-Y217D、G97D-G128A-Y217D、G97V-G128G-Y217D、G97V-G128G-Y217E、G97A-G128G-Y217T、G97G-G128N-Y217L、G97D-G128A-Y217T、G97M-G128A-Y217E、和 G97M-G128A-Y217N，其中取代位于 SEQ ID NO：1 中陈列的 BPN’枯草

杆菌蛋白酶位置的等同位置。

[0008] 本发明还提供分离的枯草杆菌蛋白酶变体，包含以下取代组中的至少一组：S24R-S87D-Q206E、P40E-A144K-K213L、N61E-P129E-S159K、S87D-S162K-K265N、S87D-T242R-Q275E、N61E-Q103E-N240K、S87D-T242R-K265N、N62R-K265N-Q275E、P129E-S145D-N240K、P129E-P239R-K265N、Q103E-P129E-T242R、P40E-N61E-S87D-S162K-T242R、S24R-N62R-S87D-S145D-K265N、P40E-N62R-S87D-Q103E-S162K、S24R-P40E-S145D-S159K-K213L、S24R-S87D-A144K-K265N-Q275E、N61E-P129E-S162K-K213L-N240K、N61E-S145D-S162K-K213L-T242R、S87D-A144K-S145D-S159K-Q275E、S24R-P129E-Q206E-N240K-K265N、N61E-Q103E-A144K-K213L-T242R、N62R-S159K-Q206E-K265N-Q275E、S24R-Q103E-P129E-N240K-K265N、N61E-Q103E-P129E-P239R-N240K、P129E-S145D-N240K-T242R-K265N、Q103E-S162K-Q206E-K213L-P239R、P40E-N61E-N62R-S87D-S159K-S162K-K265N、S24R-P40E-N61E-A144K-Q206E-K213L-T242R、P40E-N61E-S87D-P129E-S159K-S162K-T242R、P40E-N62R-S87D-S145D-S159K-S162K-Q275E、P40E-N62R-S87D-Q103E-A144K-S159K-Q275E、P40E-N62R-S87D-S159K-S162K-K265N-Q275E、P40E-N61E-P129E-A144K-S162K-K213L-N240K、P40E-N61E-Q103E-A144K-S159K-S162K-Q275E、P40E-N61E-Q103E-S159K-S162K-K213L-P239R、P40E-N61E-Q103E-S159K-S162K-K213L-N240K、N62R-S87D-P129E-S145D-S159K-S162K-Q275E、S24R-N61E-Q103E-P129E-K213L-N240K-T242R、P40E-N62R-S145D-S159K-S162K-Q206E-Q275E、N62R-S87D-S145D-S159K-S162K-K265N-Q275E、N61E-S87D-Q103E-S159K-S162K-K213L-T242R、S24R-N61E-Q103E-P129E-Q206E-P239R-N240K、S24R-N62R-P129E-S145D-P239R-K265N-Q275E、S24R-N62R-P129E-Q206E-N240K-K265N-Q275E、P40E-S145D-S159K-S162K-K213L-P239R-Q275E、N61E-Q103E-A144K-Q206E-K213L-N240K-T242R、S24R-Q103E-P129E-S145D-P239R-N240K-K265N、N61E-Q103E-P129E-K213L-P239R-N240K-T242R、N61E-Q103E-Q206E-K213L-P239R-N240K-T242R、S24R-P40E-N61E-S87D-Q103E-S159K-S162K-K213L-N240K、N61E-N62R-S87D-Q103E-S159K-S162K-K213L-T242R-Q275E、P40E-N62R-S87D-S145D-S159K-S162K-N240K-K265N-Q275E、N62R-S87D-S145D-S159K-S162K-K213L-N240K-K265N-Q275E、S24R-N61E-Q103E-P129E-Q206E-K213L-P239R-N240K-T242R、S24R-N61E-Q103E-P129E-S145D-P239R-N240K-T242R-K265N、N61E-S87D-Q103E-P129E-S159K-S162K-K213L-N240K-T242R、P40E-N61E-Q103E-P129E-A144K-K213L-P239R-N240K-T242R、S24R-Q103E-P129E-S145D-Q206E-P239R-N240K-T242R-K265N、N61E-Q103E-P129E-A144K-Q206E-K213L-P239R-N240K-T242R、S24R-P40E-N61E-S87D-Q103E-P129E-A144K-K213L-P239R-N240K-T242R、S24R-P40E-N61E-Q103E-P129E-A144K-K213L-P239R-N240K-T242R-K265N、S24R-P40E-N61E-Q103E-P129E-A144K-Q206E-K213L-P239R-N240K-T242R、S24R-P40E-N61E-Q103E-P129E-A144K-S145D-K213L-P239R-N240K-T242R、S24R-N61E-S87D-Q103E-P129E-A144K-Q206E-K213L-P239R-N240K-T242R、P40E-N61E-S87D-Q103E-S145D-S159K-S162K-K213L-P239R-N240K-T242R、S24R-P40E-N61E-Q103E-P129E-S162K-Q206E-K213L-P239R-N240K-T242R、S24R-N61E-Q103E-P129E-A144K-S145D-Q206E-K213L-P239R-N240K-T242R、P40E-N61E-Q103E-P129E-A144K-S162K-Q206E-K213L-P239R-N240K-T242R、S24R-N61E-Q103E-P129E-A144K-Q206E-K213L-P239

R-N240K-T242R-K265N、和 S24R-P40E-N61E-S87D-Q103E-P129E-A144K-S162K-Q206E-K213L-P239R-N240K-T242R，其中所述取代位于 SEQ ID NO：1 中陈列的 BPN'枯草杆菌蛋白酶位置的等同位置。

[0009] 本发明还提供包含 G97A/G128A/Y217Q 取代和另外包含上述取代组中至少一组的枯草杆菌蛋白酶变体，其中位置对应于 SEQ ID NO：1 中的 BPN' 枯草杆菌蛋白酶的位置。

[0010] 本发明还提供分离的枯草杆菌蛋白酶变体，包含以下取代组中的至少一组：S53G-F58G、S53G-S78N、S53G-Y104N、S53G-I111V、S53G-A114G、S53G-N117S、S53G-S125A、S53G-S132N、S53G-P239V、F58G-S78N、F58G-Y104N、F58G-I111V、F58G-A114G、F58G-N117S、F58G-S125A、F58G-S132N、F58G-P239V、S78N-Y104N、S78N-I111V、S78N-A114G、S78N-N117S、S78N-S125A、S78N-S132N、S78N-P239V、Y104N-I111V、Y104N-A114G、Y104N-N117S、Y104N-S125A、Y104N-S132N、Y104N-P239V、I111V-A114G、I111V-N117S、I111V-S125A、I111V-S132N、I111V-P239V、A114G-N117S、A114G-S125A、A114G-S132N、A114G-P239V、N117S-S125A、N117S-S132N、N117S-P239V、S125A-S132N、S125A-P239V、S132N-P239V、S53G-F58G-S78N、S53G-F58G-Y104N、S53G-F58G-I111V、S53G-F58G-A114G、S53G-F58G-N117S、S53G-F58G-S125A、S53G-F58G-S132N、S53G-F58G-P239V、S53G-S78N-Y104N、S53G-S78N-I111V、S53G-S78N-A114G、S53G-S78N-N117S、S53G-S78N-S125A、S53G-S78N-S132N、S53G-S78N-P239V、S53G-Y104N-I111V、S53G-Y104N-A114G、S53G-Y104N-N117S、S53G-Y104N-S125A、S53G-Y104N-S132N、S53G-Y104N-P239V、S53G-I111V-A114G、S53G-I111V-N117S、S53G-I111V-S125A、S53G-I111V-S132N、S53G-I111V-P239V、S53G-A114G-N117S、S53G-A114G-S125A、S53G-A114G-S132N、S53G-A114G-P239V、S53G-N117S-S125A、S53G-N117S-S132N、S53G-N117S-P239V、S53G-S125A-S132N、S53G-S125A-P239V、S53G-S132N-P239V、F58G-S78N-Y104N、F58G-S78N-I111V、F58G-S78N-A114G、F58G-S78N-N117S、F58G-S78N-S125A、F58G-S78N-S132N、F58G-S78N-P239V、F58G-Y104N-I111V、F58G-Y104N-A114G、F58G-Y104N-N117S、F58G-Y104N-S125A、F58G-Y104N-S132N、F58G-Y104N-P239V、F58G-I111V-A114G、F58G-I111V-N117S、F58G-I111V-S125A、F58G-I111V-S132N、F58G-I111V-P239V、F58G-A114G-N117S、F58G-A114G-S125A、F58G-A114G-S132N、F58G-A114G-P239V、F58G-N117S-S125A、F58G-N117S-S132N、F58G-N117S-P239V、F58G-S125A-S132N、F58G-S125A-P239V、F58G-S132N-P239V、S78N-Y104N-I111V、S78N-Y104N-A114G、S78N-Y104N-N117S、S78N-Y104N-S125A、S78N-Y104N-S132N、S78N-Y104N-P239V、S78N-I111V-A114G、S78N-I111V-N117S、S78N-I111V-S125A、S78N-I111V-S132N、S78N-I111V-P239V、S78N-A114G-N117S、S78N-A114G-S125A、S78N-A114G-S132N、S78N-A114G-P239V、S78N-N117S-S125A、S78N-N117S-S132N、S78N-N117S-P239V、S78N-S125A-S132N、S78N-S125A-P239V、S78N-S132N-P239V、Y104N-I111V-A114G、Y104N-I111V-N117S、Y104N-I111V-S125A、Y104N-I111V-S132N、Y104N-I111V-P239V、Y104N-A114G-N117S、Y104N-A114G-S125A、Y104N-A114G-S132N、Y104N-A114G-P239V、Y104N-N117S-S125A、Y104N-N117S-S132N、Y104N-N117S-P239V、Y104N-S125A-S132N、Y104N-S125A-P239V、Y104N-S132N-P239V、I111V-A114G-N117S、I111V-A114G-S125A、I111V-A114G-S132N、I111V-A114G-P239V、

I111V-N117S-S125A、I111V-N117S-S132N、I111V-N117S-P239V、I111V-S125A-S132N、I111V-S125A-P239V、I111V-S132N-P239V、A114G-N117S-S125A、A114G-N117S-S132N、A114G-N117S-P239V、A114G-S125A-S132N、A114G-S125A-P239V、A114G-S132N-P239V、N117S-S125A-S132N、N117S-S125A-P239V、N117S-S132N-P239V、S125A-S132N-P239V、N76D-D120H-K213N-M222Q，其中所述取代位于 SEQ ID NO :1 中陈列的 BPN’枯草杆菌蛋白酶位置的等同位置。

[0011] 本发明还提供包含 G97A/G128A/Y217Q 取代和另外包含上述取代组中至少一组的枯草杆菌蛋白酶变体，其中位置对应于 SEQ ID NO :1 中的 BPN’枯草杆菌蛋白酶的位置。

[0012] 本发明还提供编码此处陈列的枯草杆菌蛋白酶变体的分离的核酸，以及包含这些核酸的表达载体，和包含这些表达载体的宿主细胞。

[0013] 本发明还提供包含至少一种此处提供的枯草杆菌蛋白酶变体的清洁组合物。在一些实施方案中，清洁组合物为衣物洗涤剂。在其他一些实施方案中，衣物洗涤剂为大容量 (heavy duty) 液体衣物洗涤剂。在其他一些实施方案中，清洁组合物为餐具洗涤剂。在其他一些实施方案中，清洁组合物为硬表面清洁组合物。在其他一些实施方案中，清洁组合物还包含一种或多种其他酶或酶衍生物，所述酶或酶衍生物选自半纤维素酶、过氧化物酶、蛋白酶、纤维素酶、木聚糖酶、脂肪酶、磷脂酶、酯酶、角质酶、果胶酶、角蛋白酶、还原酶、氧化酶、酚氧化酶、脂肪氧化酶、木质酶、支链淀粉酶、鞣酸酶、戊聚糖酶、麦芽聚糖酶 (malanases)、β - 葡聚糖酶、阿拉伯糖苷酶、透明质酸酶、软骨素酶、漆酶和淀粉酶，或其混合物。在一些实施方案中，清洁组合物还包含至少一种稳定剂。在另一些实施方案中，清洁组合物包含至少 0.0001 重量百分比的此处提供的至少一种枯草杆菌蛋白酶变体和任选的一种合适的辅助成分。

[0014] 本发明还提供用于清洁的方法，包含以下步骤 :将包含织物的表面和 / 或物品与此处提供的清洁组合物接触 ;任选的洗涤和 / 或漂洗所述表面或物品。

[0015] 本发明还提供包含至少一种此处提供的枯草杆菌蛋白酶变体的动物饲料。本发明还提供包含至少一种此处提供的枯草杆菌蛋白酶变体的食物加工组合物。

[0016] 发明详述

[0017] 本发明提供枯草杆菌蛋白酶变体和包含至少一种此处陈列的枯草杆菌蛋白酶变体的组合物，以及使用这些变体和组合物的方法。具体的，本发明提供适于衣物清洁用途的蛋白酶变体。

[0018] 在一些实施方案中，本发明提供制备具有多种商业用途的枯草杆菌蛋白酶变体的方法，所述用途中期望多肽的降解或合成，包括清洁组合物、饲料组分和纺织品的加工、皮革整理 (finishing)、谷物加工、肉类加工、食物加工、及蛋白质水解物、助消化剂、杀微生物组合物、抑菌组合物、抑真菌组合物和个人护理产品 (例如，口腔护理、头发护理和 / 或皮肤护理) 的制备。

[0019] 本发明还提供酶组合物，所述酶组合物与目前使用的枯草杆菌蛋白酶相比具有相当的或改进的洗涤性能。在一些实施方案中，本发明提供包含至少一种此处提供的枯草杆菌蛋白酶变体的清洁组合物。在一些实施方案中，清洁组合物为衣物洗涤剂。在一些实施方案中，衣物洗涤剂为冷水洗涤剂、低 pH 洗涤剂或浓缩 (compact) 洗涤剂。在其他实施方案中，本发明提供清洁的方法，包含以下步骤 :将包含织物的表面和 / 或物品与包含至少一

种枯草杆菌蛋白酶变体的清洁组合物接触。

[0020] 清洁组合物

[0021] 本发明的清洁组合物在例如洗衣应用中具有优势。的确，由于在较低温度溶液中有效性增加的独特优势，本发明的酶理想地适用于洗衣应用。此外，本发明的酶可应用于颗粒和液体组合物二者。

[0022] 本发明的蛋白酶变体还应用于衣物清洁添加剂产品。在一些实施方案中，其应用于低温溶液清洁用途。添加剂产品最简单的形式可为一种或多种蛋白酶。在一些实施方案中，添加剂以剂量形式包装以加入清洁过程。本发明可应用任意合适的单独剂量形式，包括但不局限于丸剂、片剂、软胶囊或其他单独剂量单位例如预定量 (pre-measured) 的粉末或液体。在一些实施方案中，也包括填充剂或载体材料以增加这些组合物的体积。合适的填充剂或载体材料包括但不局限于各种硫酸盐、碳酸盐和硅酸盐以及滑石、粘土等等。用于液体组合物的合适填充剂或载体材料包括但不局限于水或低分子量伯醇和仲醇（包括多元醇和二醇）。这些醇的示例包括但不局限于甲醇、乙醇、丙醇和异丙醇。在一些实施方案中，组合物包含从约 5％至约 90％的这些材料。酸性填充剂应用于降低 pH。可选的，清洁添加剂包括如下面更充分描述的辅助成分。

[0023] 本清洁组合物和清洁添加剂需要有效量的至少一种此处提供的蛋白酶变体，单独或与其他蛋白酶和 / 或其他酶组合。通过加入一种或多种本发明的蛋白酶变体得到需要的酶水平。通常本清洁组合物包含至少约 0.0001 重量百分比、从约 0.0001 至约 1、从约 0.001 至约 0.5、或甚至从约 0.01 至约 0.1 重量百分比的至少一种本发明的蛋白酶变体。

[0024] 此处的清洁组合物一般配制为当在水性清洁操作中使用时，洗涤水将具有从约 5.0 至约 11.0，或甚至从约 7.5 至约 10.5 的 pH。液体产品制剂一般配制为具有从约 3.0 至约 9.0 或甚至从约 3 至约 5 的净 pH(neat pH)。颗粒洗衣产品一般配制为具有从约 9 至约 11 的 pH。将 pH 控制在推荐的使用水平上的技术包括使用缓冲液、碱、酸，等等，这是本领域技术人员所熟知的。

[0025] 合适的低 pH 清洁组合物一般具有从约 3 至约 5 的净 pH，一般不含在此 pH 环境下水解的表面活性剂。这些表面活性剂包括含有至少一个环氧乙烷基或甚至（含有）从约 1 至约 16 摩尔环氧乙烷的烷基硫酸钠表面活性剂。这些清洁组合物一般包含足够量的 pH 调节剂，例如氢氧化钠、单乙醇胺或盐酸，以提供这些清洁组合物从约 3 至约 5 的净 pH。这些组合物一般包含至少一种耐酸性的酶。在一些实施方案中，组合物为液体，而在另一些实施方案中，它们为固体。这些液体组合物的 pH 一般以净 pH 测量。这些固体组合物的 pH 以所述组合物的 10％固体溶液测量，其中溶剂为蒸馏水。在这些实施方案中，所有 pH 在 20℃测量。

[0026] 在一些实施方案中，当蛋白酶变体应用于颗粒状组合物或液体时，期望蛋白酶变体为封装的颗粒形式，以在贮藏期间保护蛋白酶变体免受颗粒状组合物其他组分的破坏。此外，封装也是在清洁过程中控制蛋白酶变体可用性的方法。在一些实施方案中，封装增强蛋白酶变体和 / 或其他酶的性能。在这一点上，用本领域已知的任意合适的封装材料封装本发明的蛋白酶变体。在一些实施方案中，封装材料一般封装本发明蛋白酶变体的至少一部分催化剂。一般的，封装材料为水溶性和 / 或水分散性的。在一些实施方案中，封装材料具有 0℃或更高的玻璃转化温度 (Tg)。玻璃转化温度在 WO 97/11151 中更详细的描述。

封装材料选自碳水化合物、天然或合成树胶、壳多糖、壳聚糖、纤维素和纤维素衍生物、硅酸盐、磷酸盐、硼酸盐、聚乙烯醇、聚乙二醇、石蜡和其组合。当封装材料为碳水化合物时，其一般选自单糖、寡糖、多糖和其组合。一般的，封装材料为淀粉。合适的淀粉描述于 EP 0 922 499 ;US 4,977,252 ;US 5,354,559，和 US 5,935,826。在一些实施方案中，封装材料为塑料制成的微球，所述塑料为例如热塑性塑料、丙烯腈、甲基丙烯腈、聚丙烯腈、聚甲基丙烯腈和其混合物 ;可应用的市售微球包括 EXPANCEL®(Stockviksverken, Sweden)，和 PM 6545、PM 6550、PM 7220、PM 7228、EXTENDOSPHERES®、LUXSIL®、Q-CEL®，和 SPHERICEL®(PQ Corp.，Valley Forge，PA) 所提供的。

[0027] 如此处描述的，本发明的蛋白酶变体在衣物洗涤剂中特别有用。这些应用将酶置于多种环境压力下。本发明的蛋白酶变体由于其在多种条件下的稳定性，与多种目前使用的酶相比提供了优势。

[0028] 的确，洗涤中涉及的蛋白酶暴露于多种洗涤条件，包括不同的洗涤剂配方、洗涤用水体积、洗涤用水温度和洗涤时间的长度。此外，在不同地理区域使用的洗涤剂配方在洗涤水中具有不同浓度的相关组分。例如，欧洲洗涤剂一般在洗涤水中具有约 4500-5000ppm 的洗涤剂组分，而日本洗涤剂一般在洗涤水中具有约 667ppm 的洗涤剂组分。在北美洲，特别是在美国，洗涤剂一般在洗涤水中具有约 975ppm 的洗涤剂组分。

[0029] 低浓度洗涤剂系统包括洗涤剂，其中洗涤水中存在低于约 800ppm 的洗涤剂组分。一般认为日本洗涤剂为低浓度洗涤剂系统，因为其在洗涤水中具有约 667ppm 的洗涤剂组分。

[0030] 中等浓度洗涤剂系统包含洗涤剂，其中洗涤水中存在约 800ppm 至约 2000ppm 的洗涤剂组分。一般认为北美洗涤剂是中等浓度洗涤剂系统，因为其在洗涤水中一般具有约 975ppm 的洗涤剂组分。巴西洗涤剂一般在洗涤水中具有约 1500ppm 的洗涤剂组分。

[0031] 高浓度洗涤剂系统包含洗涤剂，其中洗涤水中具有大于约 2000ppm 的洗涤剂组分。一般认为欧洲洗涤剂是高浓度洗涤剂系统，因为其在洗涤水中具有约 4500-5000ppm 的洗涤剂组分。

[0032] 拉丁美洲洗涤剂通常是高泡磷酸增洁洗涤剂，拉丁美洲使用的洗涤剂范围可落入中洗涤剂浓度和高洗涤剂浓度之间，因为它们在洗涤水中的洗涤剂组分范围在 1500ppm 至 6000ppm。如上所述，巴西洗涤剂通常在洗涤水中含有约 1500ppm 的洗涤剂组分。然而，其他高泡磷酸增洁洗涤剂地区，不限于其他拉丁美洲国家，具有高浓度洗涤剂系统，在洗涤水中存在高达约 6000ppm 的洗涤剂组分。

[0033] 鉴于上述内容，很显然，典型的洗涤溶液中洗涤剂组合物的浓度在世界范围内变动，从低于约 800ppm 的洗涤剂组合物 (“低浓度洗涤剂系统”)，例如日本的约 667ppm，到在约 800ppm 至约 2000ppm 之间 (“中等浓度洗涤剂系统”)，例如美国的约 975ppm 和巴西的约 1500ppm，到大于约 2000ppm(“高浓度洗涤剂系统”)，例如欧洲的约 4500ppm 至约 5000ppm，以及高泡磷酸增洁洗涤剂地区的约 6000ppm。

[0034] 根据经验确定典型洗涤溶液的浓度。例如，在美国，典型的洗衣机容纳体积约 64.4L 的洗涤溶液。因此，为了获得洗涤溶液中约 975ppm 的洗涤剂浓度，应该向 64.4L 洗涤溶液中添加 62.79g 的洗涤剂组合物。该量是消费者利用洗涤剂提供的量杯量入洗涤水中的典型量。

[0035] 在另一实例中，不同地区使用不同的洗涤温度。日本的洗涤水的温度通常低于欧洲使用的温度。例如，北美和日本的洗涤水温度可以在 10 至 30℃（如，约 20℃），而欧洲洗涤水温度一般在 30 至 60℃（如，约 40℃）。

[0036] 在另一实例中，不同地区通常具有不同的水硬度。水硬度一般通过每加仑混合的 Ca2+/Mg2+ 的格令 (grain) 数来描述。硬度是水中钙 (Ca2+) 和镁 (Mg2+) 的量的度量。美国的多数水是硬水，但硬度值不同。中等硬度水 (60-120ppm) 至硬水 (121-181ppm) 具有 60 至 181ppm 的硬度矿物 (ppm 转换成格令 / 美制加仑是 :ppm 数除以 17.1 等于格令 / 加仑）。

[0037]

水	格令 / 加仑	ppm
软	小于 1.0	小于 17
轻度硬	1.0 至 3.5	17 至 60
中度硬	3.5 至 7.0	60 至 120
硬	7.0 至 10.5	120 至 180
非常硬	大于 10.5	大于 180

[0038] 欧洲水硬度通常大于 10.5(例如 10.5-20.0) 格令 / 加仑混合的 Ca2+/Mg2+(例如，约 15 格令 / 加仑混合的 Ca2+/Mg2+)。北美水硬度通常大于日本水硬度，但小于欧洲水硬度。例如，北美水硬度可以在 3-10 格令之间、3-8 格令或约 6 格令。日本水硬度通常低于北美水硬度，一般低于 4，例如 3 格令 / 加仑混合的 Ca2+/Mg2+。

[0039] 因此，在一些实施方案中，本发明提供了在至少一组洗涤条件下（例如，水温、水硬度和 / 或洗涤剂浓度），表现出令人惊讶的洗涤性能的蛋白酶。在一些实施方案中，本发明的蛋白酶变体与其他枯草杆菌蛋白酶的洗涤性能是相当的。在一些实施方案中，本发明的蛋白酶变体表现出比目前市售的枯草杆菌蛋白酶增强的洗涤性能。因此，在本发明的一些优选的实施方案中，此处提供的蛋白酶变体表现出增强的氧化稳定性、增强的热稳定性和 / 或增强的螯合剂稳定性。此外，本发明的蛋白酶变体可应用于不含有洗涤剂的清洁组合物，仍然是单独的或与促净剂和稳定剂组合。

[0040] 在本发明的一些实施方案中，清洁组合物包含以组合物重量计的约 0.00001％至约 10％水平的至少一种本发明的蛋白酶变体和以组合物重量计的包含清洁辅助材料的余量（例如，约 99.999％至约 90.0％）。在本发明的其他方面，本发明的清洁组合物还包含以组合物重量计的约 0.0001％至约 10％，约 0.001％至约 5％，约 0.001％至约 2％，约 0.005％至约 0.5％水平的至少一种蛋白酶变体和包含清洁辅助材料的清洁组合物余量（例如，以重量计的约 99.9999％至约 90.0％，约 99.999％至约 98％，约 99.995％至约 99.5％）。

[0041] 在一些实施方案中，优选的清洁组合物除了此处提供的一种或多种蛋白酶变体以外，还包含一种或多种其他酶或酶衍生物以提供清洁性能和 / 或织物护理益处。这些酶包括但不局限于其他蛋白酶、脂肪酶、角质酶、淀粉酶、纤维素酶、过氧化物酶、氧化酶（例如

漆酶）和 / 或甘露聚糖酶。

[0042] 任意其他合适的蛋白酶可用于本发明的组合物。合适的蛋白酶包括动物、植物或微生物来源的蛋白酶。在一些特别优选的实施方案中，使用微生物蛋白酶。在一些实施方案中，包含化学的或遗传修饰的突变体。在一些实施方案中，蛋白酶是丝氨酸蛋白酶，优选的是碱性微生物蛋白酶或胰蛋白酶样蛋白酶。碱性蛋白酶的实例包含枯草杆菌蛋白酶，特别是源自芽孢杆菌属物种 (Bacillus)（例如，枯草芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg、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）。其他实例包含在美国专利号 RE 34,606、5,955,340、5,700,676、6,312,936 和 6,482,628 中描述的蛋白酶变体，此处均引入作为参考。其他蛋白酶的实例包含但不限于胰蛋白酶（例如，猪或牛来源的），和 WO 89/06270 中描述的镰孢菌 (Fusarium) 蛋白酶。优选的市售蛋白酶包含 MAXATASE ®、MAXACAL、MAXAPEM、OPTICLEAN ®、OPTIMASE ®、PROPERASE ®、PURAFECT ® 和 PURAFECT ® OXP(Genencor) ;ALCALASE ®、SAVINASE ®、PRIMASE ®、DURAZYM、RELASE ® 和 ESPERASE ® (Novozymes) ;和 BLAP(Henkel Kommanditgesellschaft auf Aktien,Duesseldorf,德国）。在 WO95/23221、WO 92/21760，和美国专利号 5,801,039、5,340,735、5,500,364、5,855,625 中描述了多种蛋白酶。

[0043] 此外，任意合适的脂肪酶都可用于本发明。合适的脂肪酶包含但不限于细菌或真菌来源的。本发明涵盖了化学或遗传修饰的变体。有用的脂肪酶的实例包含 Humicola lanuginosa 脂肪酶（参见例如，EP 258 068 和 EP 305 216）、米赫根毛霉 (Rhizomucor miehei) 脂肪酶（参见例如，EP 238 023）、假丝酵母 (Candida) 脂肪酶，例如南极假丝酵母 (C.antarctica) 脂肪酶（例如，南极假丝酵母脂肪酶 A 或 B，参见例如 EP 214 761）、假单胞菌 (Pseudomonas) 脂肪酶例如产碱假单胞菌 (P.alcaligenes) 和类产碱假单胞菌 (P.pseudoalcaligenes) 脂肪酶（参见例如 EP 218 272）、洋葱假单胞菌 (P.cepacia) 脂肪酶（参见例如 EP 331 376）、斯氏假单胞菌 (P.stutzeri) 脂肪酶（参见例如 GB 1,372,034）、荧光假单胞菌 (P.fluorescens) 脂肪酶、芽孢杆菌脂肪酶（例如，枯草芽孢杆菌脂肪酶 (Dartois 等人，Biochem.Biophys.Acta 1131 :253-260[1993]) ;嗜热脂肪芽孢杆菌脂肪酶（参见例如 JP 64/744992) ;和短芽孢杆菌脂肪酶（参见例如 WO91/16422)）。

[0044] 此外，多种克隆的脂肪酶可用于本发明的一些实施方案，包含但不限于沙门柏干酪青霉 (Penicillium camembertii) 脂肪酶（参见，Yamaguchi 等人，Gene 103 :61-67[1991])、白地霉 (Geotricum candidum) 脂肪酶（参见，Schimada 等人，J.Biochem.，106 :383-388[1989]) 和多种根霉 (Rhizopus) 脂肪酶，例如德氏根霉 (R.delemar) 脂肪酶（参见，Hass 等人，Gene 109 :117-113[1991])、雪白根霉 (R.niveus) 脂肪酶 (Kugimiya 等人，Biosci.Biotech.Biochem.56 :716-719[1992]) 和米根霉 (R.oryzae) 脂肪酶。

[0045] 其他类型的脂肪水解酶（如角质酶）也可用于本发明的一些实施方案中，包含但不限于源自门多萨假单胞菌 (Pseudomonas mendocina) 的角质酶（参见 WO 88/09367)，或源自腐皮镰孢菌 (Fusarium solani pisi) 的角质酶（参见 WO 90/09446)。

[0046] 其他合适的脂肪酶包含市售脂肪酶例如 M1LIPASE、LUMA FAST 和 LIPOMAX(Genencor) ;LIPOLASE ® 和 LIPOLASE ® ULTRA(Novozymes) ; 和 LIPASE P" Amano" (Amano Pharmaceutical Co.Ltd.，日本）。

[0047] 在本发明的一些实施方案中，本发明的清洁组合物还包含脂肪酶，水平为占组合

物重量的 0.00001％至 10％，以及占组合物重量的余量清洁辅助材料。在本发明的其他方面，本发明的清洁组合物还包含脂肪酶，水平为占组合物重量的 0.0001％至 10％，0.001％至 5％，0.001％至 2％，0.005％至 0.5％。

[0048] 任何适合在碱性溶液中使用的淀粉酶（α 和 / 或 β）都可用于本发明。合适的淀粉酶包含但不限于细菌或真菌来源的。在一些实施方案中还包含了化学或遗传修饰的变体。可用于本发明的淀粉酶的实例包含但不限于获得自地衣芽孢杆菌的 α - 淀粉酶（参见例如，GB 1,296,839）。可用于本发明的市售淀粉酶包含但不限于 DURAMYL ®、TERMAMYL ®、FUNGAMYL ®和 BAN(Novozymes)，以及 RAPIDASE ®和 MAXAMYL ® P(Genencor)。

[0049] 在本发明的一些实施方案中，本发明的清洁组合物还包含淀粉酶，水平为占组合物重量的约 0.00001％至约 10％的其他淀粉酶，以及以重量计，占余量的清洁辅助材料。在本发明的其他方面，本发明的清洁组合物还包含淀粉酶，水平为占组合物重量的约 0.0001％至约 10％，约 0.001％至约 5％，约 0.001％至约 2％，约 0.005％至约 0.5％。

[0050] 任何合适的纤维素酶都可用于本发明的一些实施方案。合适的纤维素酶包含但不限于细菌或真菌来源的。在一些实施方案中还包含了化学或遗传修饰的变体。合适的纤维素酶的实例包含但不限于 Humicola insolens 纤维素酶（参见例如，美国专利号 4,435,307）。特别适合的纤维素酶是有颜色护理益处的纤维素酶（参见例如，EP 0 495 257）。可用于本发明的市售纤维素酶包含但不限于 CELLUZYMF ® (Novozymes) 和 KAC-500(B)(Kao Corporation)。在一些实施方案中，掺入的纤维素酶是成熟野生型或变体纤维素酶的部分或片段，其中缺失了 N 端部分（参见例如，美国专利号 5,874,276）。在一些实施方案中，本发明的清洁组合物还包含纤维素酶，水平为占组合物重量的约 0.00001％至约 10％的其他纤维素酶，以及以重量计，占余量的清洁辅助材料。在本发明的其他方面，本发明的清洁组合物还包含纤维素酶，水平为占组合物重量的约 0.0001％至约 10％，约 0.001％至约 5％，约 0.001％至约 2％，约 0.005％至约 0.5％。

[0051] 任何适合在洗涤剂组合物中使用的甘露聚糖酶都可用于本发明。合适的甘露聚糖酶包含但不限于细菌或真菌来源的。在一些实施方案中还包含了化学或遗传修饰的变体。可用于本发明的多种甘露聚糖酶是已知的（参见例如，美国专利号 6,566,114、6,602,842 和 6,440,991，均引入本文作为参考）。在一些实施方案中，本发明的清洁组合物还可以包含甘露聚糖酶，水平为占组合物重量的约 0.00001％至约 10％的其他甘露聚糖酶，以及以重量计，占余量的清洁辅助材料。在本发明的其他方面，本发明的清洁组合物还包含甘露聚糖酶，水平为占组合物重量的约 0.0001％至约 10％，约 0.001％至约 5％，约 0.001％至约 2％，约 0.005％至约 0.5％。

[0052] 在一些实施方案中，过氧化物酶与过氧化氢或其来源（例如，过碳酸盐、过硼酸盐或过硫酸盐）组合的使用。在一些替代性实施方案中，氧化酶与氧组合使用。两类酶都用于“溶液漂白”（即，当在洗涤液中同时洗涤织物时，防止纺织品染料从染色的织物转移到其他织物上），优选的与增效剂一起使用（参见例如，WO 94/12621 和 WO 95/01426）。合适的过氧化物酶 / 氧化酶包含但不限于植物、细菌或真菌来源的。在一些实施方案中还包含了化学或遗传修饰的变体。在一些实施方案中，本发明的清洁组合物还可以包含过氧化物酶和 / 或氧化酶，其水平为占组合物重量的约 0.00001％至约 10％的其他过氧化物酶和 / 或氧化酶，以及以重量计，占余量的清洁辅助材料。在本发明的其他方面，本发明的清洁组合物还

包含过氧化物酶和/或氧化酶，水平为占组合物重量的约0.0001%至约10%，约0.001%至约5%，约0.001%至约2%，约0.005%至约0.5%。

[0053] 在一些实施方案中，可应用其他酶，包含但不限于过水解酶（见例如WO 05/056782）。此外，在一些特别优选的实施方案中，本文涵盖了上述酶的混合物，特别是一种或多种其他蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶、至少一种甘露聚糖酶，和/或至少一种纤维素酶。实际上，本发明可以考虑使用这些酶的多种混合物。还考虑蛋白酶变体以及一种或多种其他酶的不同水平均可独立的达到10%，清洁组合物的余量为清洁辅助材料。通过考虑待清洁的表面、物品或织物，以及在使用过程中（例如，提供洗涤洗涤剂使用）用于清洁条件的组合物的期望形态，可以方便的确定对清洁辅助材料的具体选择。

[0054] 合适的清洁辅助材料的实例包含但不限于表面活性剂、增洁剂、漂白剂、漂白活化剂、漂白催化剂、其他酶、酶稳定系统、螯合剂、光学增白剂、土壤释放聚合物、染料转移剂、分散剂、消泡剂、染料、香料、着色剂、填充盐、水溶助长剂、光活化剂、荧光剂、织物调节剂、可水解的表面活性剂、防腐剂、抗氧化剂、抗收缩剂、抗皱剂、杀菌剂、杀真菌剂、色斑、银护理剂、抗晦暗剂和/或抗腐蚀剂、碱度来源、增溶剂、载体、加工助剂、色素和pH控制剂（参见例如，美国专利号6,610,642、6,605,458、5,705,464、5,710,115、5,698,504、5,695,679、5,686,014和5,646,101，均引入本文作为参考）。下文详细示例了特定清洁组合物材料的实施方案。如果清洁辅助材料与清洁组合物中的本发明蛋白酶变体不相容，则使用合适的方法将清洁辅助材料和蛋白酶分隔（即，不彼此接触），直至适合组合这两种组分时。此类分隔方法包括本领域已知的任何合适方法（例如，软胶囊、封装、片剂、物理分隔等）。

[0055] 作为示例，下文更详细地描述了可使用本发明的蛋白酶变体的一些清洁组合物。在一些实施方案中，本发明的清洁组合物配制成适合衣物机洗方法的组合物，本发明的组合物优选的含有至少一种表面活性剂和至少一种增洁剂化合物，以及一种或多种清洁辅助材料，所述材料优选的选自有机聚合化合物、漂白剂、其他酶、消泡剂、分散剂、石灰皂分散剂、土壤悬浮剂和抗再沉积剂以及缓蚀剂。在一些实施方案中，洗衣组合物还含有软化剂（即，作为其他的清洁辅助材料）。本发明的组合物还可用于固体或液体形式的洗涤剂添加剂产品。此类添加剂产品旨在补充和/或提高常规洗涤剂组合物的性能，可以在清洁过程的任何阶段添加。在一些实施方案中，本文的衣物洗涤剂组合物的密度范围在约400至约1200g/升，而在其他实施方案中，在约20℃下测量时，范围在约500至约950g/升组合物。

[0056] 在一些实施方案中，本发明的蛋白酶变体可用于多种清洁组合物，例如在美国专利号6,605,458中提供的。因此，在一些实施方案中，包含至少一种本发明蛋白酶变体的组合物是致密的颗粒状织物清洁组合物，而在其他实施方案中，组合物是用于着色织物洗涤的颗粒状织物清洁组合物，在其他实施方案中，组合物是通过洗涤力提供软化的颗粒状织物清洁组合物，在其他实施方案中，组合物是大容量液体织物清洁组合物。在一些实施方案中，包含至少一种本发明蛋白酶变体的组合物是织物清洁组合物，例如在美国专利号6,610,642和美国专利号6,376,450中描述的。此外，本发明的蛋白酶变体可用于在欧洲或日本洗涤条件下的特定用途的颗粒状衣物洗涤剂组合物（参见例如，美国专利号6,610,642）。

[0057] 本发明的清洁组合物可配制成任意合适的形式，并可由配制者选择的任意方法制备，非局限性示例描述于美国专利号5,879,584、5,691,297、5,574,005、5,569,645、

5,565,422、5,516,448、5,489,392 和 5,486,303，均引入本文作为参考。当需要低 pH 清洁组合物时，通过加入例如乙醇胺的物质或例如 HCl 的酸性物质调节该组合物的 pH。

[0058] 尽管不是本发明的目的不是必要的，在下文中阐明的辅料的非局限性列表适用于即用 (instant) 清洁组合物。在一些实施方案中，引入这些辅料以例如帮助或增强清洁性能、处理待清洁的物质或修饰清洁组合物的美观，例如香料、着色剂、染料等等。应当理解这些辅料是在本发明的蛋白酶变体以外的。这些其他组分的准确性质和其加入的水平将取决于组合物的物理形式和其用于的清洁操作的性质。合适的辅助材料包括但不局限于表面活性剂、增洁剂、螯合剂、染料转移抑制剂、沉淀助剂、分散剂、其他酶、和酶稳定剂、催化物质、漂白活化剂、漂白增强剂、过氧化氢、过氧化氢来源、预制过酸 (preformed peracids)、聚合分散剂、粘土去除 / 抗再沉淀剂、增白剂、消泡剂、染料、香料、结构弹性剂 (structure elasticizing agents)、织物软化剂、载体、助水溶剂、加工助剂和 / 或色素。除了以上公开的，这些其他辅料和使用水平的合适示例可在美国专利号 5,576,282、6,306,812 和 6,326,348 中找到，将这些引入作为参考。上述附加成分可组成本发明清洁组合物的余量。

[0059] 在一些实施方案中，根据本发明的清洁组合物包含表面活性剂或表面活性剂系统，其中表面活性剂选自非离子表面活性剂、阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、两性表面活性剂、两性离子表面活性剂、半极性非离子表面活性剂和其混合物。

[0060] 在一些其他的实施方案中，本发明的清洁组合物包含一种或多种洗涤剂增洁剂或增洁剂系统。增洁剂包括但不局限于碱金属、铵、多磷酸烷醇铵 (alkanolammonium) 盐、碱金属硅酸盐、碱土金属和碱金属碳酸盐、铝硅酸盐增洁剂、聚羧酸酯化合物、ether hydroxypolycarboxylate、马来酸酐和乙烯或乙烯甲基醚的共聚物、1,3,5- 三羟基苯 -2,4,6- 三磺酸、和羧甲基羟丁二酸 (carboxymethyloxysuccinic acid)、各种碱金属、铵和聚乙酸（例如乙二胺四乙酸和次氮基三乙酸）的取代铵盐、以及聚羧酸酯例如苯六甲酸、琥珀酸、柠檬酸、羟丁二酸 (oxydisuccinic acid)、聚马来酸、1,3,5- 苯三羧酸、羧甲基羟丁二酸，和其可溶盐。

[0061] 在一些其他的实施方案中，本文的清洁组合物包含螯合剂。合适的螯合剂包括铜、铁和 / 或镁螯合剂和其混合物。

[0062] 在一些其他的实施方案中，本文提供的清洁组合物包含沉淀助剂。合适的沉淀助剂包括聚乙二醇、聚丙二醇、聚羧酸酯、泥土释放 (soil release) 聚合物例如聚对苯二甲酸、粘土例如高岭石、蒙脱石、凹凸棒石 (atapulgite)、伊利石、膨润土、多水高岭石，和其混合物。

[0063] 在一些其它实施方案中，本发明的清洁组合物还包括一种或多种染料转移抑制剂。合适的染料转移抑制剂聚合物包括但不限于聚乙烯吡咯烷酮聚合物、N- 氧化聚胺聚合物、N- 乙烯吡咯烷酮和 N- 乙烯咪唑的共聚物、聚乙烯噁唑烷酮和聚乙烯咪唑或其混合物。

[0064] 在一些其他的实施方案中，本发明的清洁组合物还包含分散剂。合适的水溶性有机物质包括同聚酸或共聚酸或其盐，其中多聚羧酸包含至少 2 个相隔不超过 2 个碳原子的羧基。

[0065] 在一些特别优选的实施方案中，清洁组合物包含一种或多种提供清洁性能和 / 或织物护理益处的洗涤剂酶。合适的酶示例包括但不限于半纤维素酶、过氧化物酶、蛋白酶、纤维素酶、木聚糖酶、脂肪酶、磷脂酶、酯酶、角质酶、果胶酶、角蛋白酶、还原酶、氧化酶、酚

氧化酶、脂氧合酶、木质酶、支链淀粉酶、鞣酸酶、戊聚糖酶、麦芽聚糖酶、β-葡聚糖酶、阿拉伯糖苷酶、透明质酸酶、软骨素酶、漆酶和淀粉酶，或其混合物。典型组合为传统适用酶的混合物，包括至少一种蛋白酶、至少一种脂肪酶、至少一种角质酶和/或至少一种纤维素酶，组合至少一种淀粉酶。

[0066] 在一些其它实施方案中，通过任意合适的技术稳定清洁组合物中使用的酶。在一些实施方案中，本文应用的酶通过最终组合物中存在的水溶性来源的钙和/或镁离子稳定，以将这些离子提供给酶。

[0067] 在一些其他的实施方案中，本发明的清洁组合物包括催化金属复合物。一类包含金属的漂白催化剂是催化系统，包含具有确定的漂白催化活性的过渡金属阳离子例如铜、铁、钛、钌、钨、钼或锰阳离子，具有很少或没有漂白催化活性的辅助金属阳离子例如锌或铝阳离子，和对催化和辅助金属阳离子具有确定的稳定常数的螯合剂，具体的是乙二胺四乙酸、乙二胺四（亚甲基膦酸）和其水溶性盐。这些催化剂在美国专利号4,430,243中公开。

[0068] 在一些实施方案中，本文的组合物通过锰化合物催化。这些化合物和使用水平是本领域所熟知的，包括例如在美国专利号5,576,282中公开的基于锰的催化剂。此外，本文中有效的钴漂白催化剂是已知的，并描述于例如美国专利号5,597,936和5,595,967。通过已知的程序可容易的制备这些钴催化剂，例如在美国专利号5,597,936和5,595,967中所教授的。在一些实施方案中，本文提供的组合物还适当包括大多环(macropolycyclic)刚性配体（即“MRL”）的过渡金属复合物。实际上，不为限制，本文的组合物和清洁方法是可调整的，以提供相当于至少亿分之一的水性洗涤介质中的活性MRL族，优选的提供从约0.005ppm至约25ppm，更优选的从约0.05ppm至约10ppm，和最优选的从约0.1ppm至约5ppm洗涤液中的MRL。优选的即用过渡金属漂白催化剂中的过渡金属包括锰、铁和铬。本文优选的MRL是超刚性配体的特殊种类，具有例如5,12-二乙基-1,5,8,12-四氮杂双环[6.6.2]十六烷的交联桥。通过已知程序可容易的制备合适的过渡金属MRL，例如在例如WO 00/332601和美国专利号6,225,464中所教授的。

[0069] 如上面指出的，本发明的清洁组合物可通过配制者选择的任意方法配置成任意合适的形式和制备，非局限性示例描述于美国专利号5,879,584、5,691,297、5,574,005、5,569,645、5,516,448、5,489,392和5,486,303，均引入本文作为参考。

[0070] 本文公开的清洁组合物可应用于清洁某个部位（例如，一种表面、餐具或织物）。一般的，至少一部分该部位与不掺水形式的或稀释在洗涤液中的本清洁组合物的实施方案接触，之后任选的洗涤和/或漂洗该部位。为了本发明的目的，“洗涤”包括但不局限于擦洗和机械搅动。在一些实施方案中，清洁组合物在溶液中一般以从约500ppm至约15,000ppm的浓度应用。当洗涤溶剂为水时，水温范围一般从约5℃至约90℃，当该部位包含织物时，水和织物的质量比率一般从约1∶1至约30∶1。

[0071] 定义

[0072] 除非另外指出，本发明的实施涉及分子生物学、蛋白质工程、微生物学和重组DNA中常用的传统技术，这是本领域技术人员知识范围内的。这些技术是本领域技术人员所公知的，并在许多课本和参考书中描述（见例如Sambrook等人，″Molecular Cloning:A Laboratory Manual″，第二版(Cold Spring Harbor)，[1989])。本文提及的所有专利、专利申请、文章和出版物，无论在上文还是下文中，在此明确的引入本文作为参考。

[0073] 除非本文中另外提及，本文使用的所有技术和科学术语都具有本发明所属领域普遍技术人员常规理解的相同含义。现有多种本领域技术人员公知的字典可提供这些术语的定义。虽然与本文所述相似或等价的方法和材料也可用于本发明的实施，但本文描述了优选的方法和材料。因此，通过整体参考说明书，可以更全面的描述下文定义的术语。此外，除非文中明确地另外指出，本文中使用的单数形式“一个”和“这个”包含了复数含义。数值范围包含了定义范围的数。除非另外指出，核酸序列以从 5’至 3’方向由左至右的书写；氨基酸序列以从氨基至羧基方向由左至右的书写。可以理解，发明不限于所描述的特定方法、方案和试剂，本领域技术人员可以根据所使用的情况而进行变动。

[0074] 除非另外指出，本发明的实施使用蛋白质纯化、分子生物学、微生物学、重组 DNA 技术和蛋白质测序的常规技术，其均属于本领域技术人员的知识范围内。

[0075] 此外，本文提供的标题并不限制本发明的多个方面或实施方案，其可参照说明书整体。因此，通过整体参照说明书可以更完整的定义下文定义的术语。尽管如此，为了便于理解发明，下文仍定义了多个术语。

[0076] 如本文中使用的，术语“蛋白酶”和“蛋白酶解活性”指这样的蛋白质或肽，其显示出具有水解肽或具有肽键的底物的能力。有多种用于测量蛋白酶解活性的已知方法，且是本领域技术人员熟知的 (Kalisz, ″ Microbial Proteinases, ″ 于 :Fiechter(编), Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, [1988])。例如，可通过比较测定来证实蛋白酶解的活性，所述测定分析各蛋白酶水解商品底物的能力。可用于蛋白酶或蛋白酶解活性分析的示例性底物包含但不限于，二甲基酪蛋白 (Sigma C-9801)、牛胶原 (Sigma C-9879)、牛弹性蛋白 (Sigma E-1625) 和牛角蛋白 (ICN Biomedical 902111)。使用这些底物的比色测定是本领域熟知的 (参见例如，WO 99/34011 ;和美国专利号 6,376,450，均引入本文作为参考)。pNA 测定 (参见例如，Del Mar 等人，Anal.Biochem.，99 :316-320[1979]) 也可用于确定在梯度洗脱中收集的组分中的活性酶浓度。上述测定测量了当酶水解可溶性合成底物琥珀酰 - 丙氨酸 - 丙氨酸 - 脯氨酸 - 苯丙氨酸 - 对硝基苯胺 (sAAPE-pNA) 时，对硝基苯胺的释放速率。在分光光度计上，410nm 处测量水解反应中产生黄色的速率，其与活性酶浓度成比例。此外，在 280nm 处的吸光度测量值可用于确定总蛋白浓度。活性酶 / 总蛋白比例给出了酶的纯度。

[0077] 如本文中使用的，“芽孢杆菌 (Bacillus) 属”包含所有属于“芽孢杆菌 (Bacillus)”属中的物种，本领域技术人员已知，包含但不限于枯草芽孢杆菌 (B.subtilis)、地衣芽孢杆菌 (B.licheniformis)、迟缓芽孢杆菌 (B.lehtus)、短芽孢杆菌 (B.brevis)、嗜热脂肪芽孢杆菌 (B.stearothermophilus)、嗜碱芽孢杆菌 (B.alkalophilus)、解淀粉芽孢杆菌 (B.amyloliquefaciens)、克劳氏芽孢杆菌 (B.clausii)、耐盐芽孢杆菌 (B.halodurans)、巨大芽孢杆菌 (B.megaterium)、凝结芽孢杆菌 (B.coagulans)、环状芽孢杆菌 (B.circulans)、灿烂芽孢杆菌 (B.lautus) 和苏云金芽孢杆菌 (B.thuringiensis)。公认芽孢杆菌属不断经历着分类重组。因此，该属意在包含已重新分类的物种，包含但不限于生物体例如嗜热脂肪芽孢杆菌 (B.stearothermophilus)，现名为嗜热脂肪地芽孢杆菌 (Geobacillus stearothermophilus)。在氧存在的条件下产生抗性内生孢子被认为是芽孢杆菌属的决定性特征，但该特征也可用于最近命名的环脂酸芽孢杆菌属 (Alicyclobacillus)、双芽孢杆菌属 (Amphibacillus)、Aneurinibacillus、

Anoxybacillus、短芽孢杆菌属 (Brevibacillus)、Filobacillus、Gracilibacillus、喜盐芽孢杆菌属 (Halobacillus)、类芽孢杆菌属 (Paenibacillus)、Salibacillus、热杆菌属 (Thermobacillus)、解脲芽孢杆菌属 (Ureibacillus) 和枝芽孢杆菌属 (Virgibacillus)。

[0078] 术语“多核苷酸”和“核酸”在本文中可互换的使用，指任何长度的核苷酸的聚合形式，不论是核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸。这些术语包含但不限于，单链、双链或三链的 DNA、基因组 DNA、cDNA、RNA、DNA-RNA 杂交体，或包含嘌呤和嘧啶碱基或其他天然的、化学的、生物化学修饰的、非天然的或衍生的核苷酸碱基的多聚体。以下是多核苷酸的非限制性实例 :基因、基因片段、染色体片段、EST、外显子、内含子、mRNA、tRNA、rRNA、核酶、cDNA、重组多核苷酸、支链多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离的 DNA、任何序列的分离的 RNA、核酸探针和引物。在一些实施方案中，多核苷酸包含修饰的核苷酸，例如甲基化核苷酸和核苷酸类似物、尿嘧啶、其他糖和连接基团，例如氟代核糖 (fluororibose) 和硫代酸酯 (thioate)，以及核苷酸支链。在替代性实施方案中，核苷酸序列被非核苷酸组分中断。

[0079] 如本文中使用的，术语“DNA 构建体”和“转化 DNA”是可互换使用的，指用于向宿主细胞或生物体中引入序列的 DNA。可以通过 PCR 或本领域已知的其他合适技术在体外产生 DNA。在特别优选的实施方案中，DNA 构建体包含目的序列 (例如，输入的 (incoming) 序列)。在一些实施方案中，序列与其他元件是有效连接的，例如调控元件 (如，启动子等)。DNA 构建体还可以包含选择性标记物。还包含侧接同源盒的输入序列。在其他实施方案中，转化 DNA 包含添加在末端的其他非同源序列 (例如，填充序列 (stuffer sequences) 或侧翼)。在一些实施方案中，输入序列的末端是封闭的，从而使转化 DNA 形成封闭环状。转化序列可以是野生型、变体或修饰的。在一些实施方案中，DNA 构建体包含与宿主细胞染色体同源的序列。在其他实施方案中，DNA 构建体包含非同源的序列。一旦 DNA 构建体在体外装配，则可用于 :1) 将异源序列插入到宿主细胞的期望靶序列中，和 / 或 2) 突变宿主细胞染色体的区域 (即，用异源序列替代内源性序列)，3) 删除靶基因 ;和 / 或 4) 向宿主引入复制性质粒。

[0080] 如本文中使用的，术语“表达盒”和“表达载体”指重组地或合成地产生的核酸构建体，具有一系列特殊的核酸元件，允许特定核酸在靶细胞内的转录。重组表达盒可以整合到质粒、染色体、线粒体 DNA、质体 DNA、病毒或核酸片段中。一般地，除其他序列外，表达载体的重组表达盒部分包含待转录的核酸序列和启动子。在优选的实施方案中，表达载体具有在宿主细胞内掺入和表达异源 DNA 片段的能力。多种原核和真核表达载体是市售的。选择合适的表达载体属于本领域技术人员的知识范围。术语“表达盒”与“DNA 构建体”及其语法等价体可互换的使用。选择合适的表达载体属于本领域技术人员的知识范围。

[0081] 如本文中使用的，术语“载体”指设计用于将核酸引入一种或多种细胞类型中的多核苷酸构建体。载体包含克隆载体、表达载体、穿梭载体、质粒、盒式结构 (cassette) 等。在一些实施方案中，多核苷酸构建体包含编码蛋白酶 (例如，前体或成熟蛋白酶) 的 DNA 序列，有效连接了能够影响 DNA 在合适宿主中的表达的合适的原序列 (例如，分泌性的等)。

[0082] 如本文中使用的，术语“质粒”指作为克隆载体使用的环状双链 (ds)DNA 构建体，其在一些真核细胞或原核细胞中形成染色体外自我复制的遗传元件，或整合到宿主染色体中。

[0083] 如本文中使用的，在向细胞内引入核酸序列的情况下，术语“引入”指适合将核酸

序列转移到细胞内的任何方法。此类引入的方法包括但不限于原生质体融合、转染、转化、接合和转导（参见例如，Ferrari 等人，“Genetics，”在 Hardwood 等人（编著），Bacillus，Plenum Publishing Corp.，第 57-72 页，[1989] 中）。

[0084] 如本文中使用的，术语“转化的”和“稳定转化的”指这样的细胞，所述细胞具有非天然（异源）多核苷酸序列整合在其基因组中，或作为辅助型质粒维持至少 2 代。

[0085] 当其置于与另一核酸序列的功能性关联中时，核酸是“有效连接的”。例如，如果作为参与多肽分泌的前蛋白质表达，则编码分泌前导区（即，信号肽）的 DNA 与多肽 DNA 是有效连接的；如果影响序列的转录，则启动子或增强子与编码序列是有效连接的；如果其位置有利于翻译，则核糖体结合位点与编码序列是有效连接的。通常，“有效连接的”意指连接的 DNA 序列是连续的，并且在分泌前导区的情况下，是以阅读相 (in reading phase) 连续的。然而，增强子不需要是连续的。通过在常规的限制性酶切位点连接来实现连接。如果不存在此类位点，则根据常规操作使用合成的寡核苷酸衔接头 (adaptor) 或接头。

[0086] 如本文中使用的，术语“基因”指多核苷酸（例如，DNA 片段），所述多核苷酸编码多肽，并包含位于编码区前后的区域，以及在各编码片段（外显子）之间的间插序列（内含子）。

[0087] 如本文中使用的，术语“同源基因”指来自不同但通常相关的物种的成对基因，所述基因相互对应，且彼此相同或高度相似。该术语涵盖了由于物种形成（即，新物种产生）而不同的基因（例如，直系同源基因），和由于基因复制而不同的基因（例如，旁系同源基因）。

[0088] 如本文中使用的，如果蛋白质在相同的排列中具有相同的主要二级结构并具有相同的拓扑连接，则定义蛋白质具有共同的“折叠”。具有相同折叠的不同蛋白质经常具有不同大小和构象的二级结构和转折区的外周元件。有时，这些不同的外周区可包含结构的一半。一起处于相同折叠种类的蛋白质不一定具有共同的进化起源（例如从偏好某些包装排列和链拓扑的蛋白质的物理和化学中产生的结构相似性）。

[0089] 如本文中使用的，“同源性”指序列相似性或同一性，优选的指同一性。该同源性是使用本领域已知的标准技术确定的（参见例如，Smith 和 Waterman，Adv. Appl. Math.，2：482[1981]；Needleman 和 Wunsch，J. Mol. Biol.，48：443[1970]；Pearson 和 Lipman，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85：2444[1988]；程序，例如 Wisconsin Genetics 软件包中的 GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA(Genetics Computer Group，Madison，WI)；和 Devereux 等人，Nucl. Acid Res.，12：387-395[1984])。

[0090] 如本文中使用的，“类似序列”是这样的序列，其中基因的功能与基于野生型枯草杆菌蛋白酶的基因基本相同。此外，类似基因与野生型枯草杆菌蛋白酶的序列包含至少约 45％、约 50％、约 55％、约 60％、约 65％、约 70％、约 75％、约 80％、约 85％、约 90％、约 95％、约 97％、约 98％、约 99％或约 100％的序列同一性。可选的，类似序列与解淀粉芽孢杆菌的枯草杆菌蛋白酶区中发现的基因具有约 70 至约 100％的匹配 (alignment)。在另一些实施方案中，一种以上上述性质适用于该序列。通过序列比对的已知方法来确定类似序列。常用的比对方法是 BLAST，但如上下文种指出的，其他方法也可用于比对序列。

[0091] 有用的算法的一个实例是 PILEUP。PILEUP 利用渐进的、成对比对，从一组相关序列中创建多重序列比对。也可以绘制树状图来显示用于创建比对的簇状关系。PILEUP 使

用了 Feng 和 Doolittle(Feng 和 Doolittle，Mol.Evol.，35 :351-360[1987]) 的渐进比对方法的简化版。该方法与 Higgins 和 Sharp(Higgins 和 Sharp，CABIOS 5 :151-153[1989]) 所述的相似。有用的 PILEUP 参数包含缺省的空位权重 3.00，缺省的空位长度权重 0.10，和加权的末端空位。

[0092] 有用的算法的另一个实例是 BLAST 算法，由 Altschul 等人所述 (Altschul 等人，J.Mol.Biol.，215 :403-410，[1990] ；和 Karlin 等人，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90 ：5873-5787[1993])。特别有效的 BLAST 算法是 WU-BLAST-2 程序（参见，Altschul 等人，Meth.Enzymol.，266 :460-480[1996])。WU-BLAST-2 使用若干检索参数，大部分设定为缺省值。可调节的参数设定为下列值 :重叠跨度＝ 1，重叠分数＝ 0.125，字符阈值 (T) ＝ 11。HSP S 和 HSP S2 参数是动态值，由程序本身根据特定序列的组成和检索目的序列的特定数据库的组成来确定。然而，可以调整值来增加灵敏度。通过匹配的相同残基数除以比对区域中“较长”序列的总残基数，来确定％氨基酸序列同一性值。“较长”序列是在比对区域中具有最多的实际残基的序列（忽略由 WU-BLAST-2 为了使比对分数最大化而引入的空位）。

[0093] 因此，“百分比（％）核酸序列同一性”定义为在候选序列中与起始序列（即，目的序列）的核苷酸残基相同的核苷酸残基的百分比。优选的方法使用 WU-BLAST-2 的 BLASTN 模块设定缺省参数，重叠跨度和重叠分数分别设定为 1 和 0.125。

[0094] 如本文中使用的，“重组”包含指细胞或载体，其已通过引入异源核酸序列进行了修饰，或所述细胞源自上述修饰的细胞。因此，例如，由于有意地人为干预，重组细胞表达在天然（非重组）形式的细胞中未发现的相同形式的基因，或者异常地表达、低表达或完全不表达天然基因。“重组”、“重组的”和产生“重组”核酸通常是组装两个或多个核酸片段，其中所述组装产生嵌合基因。

[0095] 在一些实施方案中，在至少 1 个密码子处产生位点饱和诱变的突变 DNA 序列。在另一个实施方案中，在两个或多个密码子处实施位点饱和诱变。在另一个优选的实施方案中，突变 DNA 序列与野生型序列具有高于 50％，高于 55％，高于 60％，高于 65％，高于 70％，高于 75％，高于 80％，高于 85％，高于 90％，高于 95％，或高于 98％的同源性。在替代性实施方案中，使用任何已知的诱变程序在体内产生突变 DNA，例如辐射、亚硝基胍等。然后，分离期望的 DNA 序列，并用于本文提供的方法。

[0096] 如本文中使用的，术语“扩增”和“基因扩增”是指一种方法，通过此方法不成比例地复制特异 DNA 序列，从而使扩增的基因比最初在基因组中存在的（基因）以更高的拷贝数存在。在一些实施方案中，通过在药物（例如，可被抑制的酶的抑制剂）存在下培养细胞进行选择，导致编码在药物存在下生长必需的基因产物的内源基因的扩增，或编码此基因产物的外源（即，输入）序列的扩增，或二者（同时扩增）。

[0097] “扩增”是涉及模板特异性的核酸复制的一种特殊情况。其对立于非特异性模板复制（即，复制是模板依赖性的但不依赖于特异性模板）。在这里，模板特异性区别于复制保真度（即，固有 (proper) 的多核苷酸序列的合成）和核苷酸（核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸）特异性。模板特异性经常描述为“靶”特异性。因为试图将靶序列从其他核酸中区分出来的，所以靶序列是“靶”。主要为了此区分（目的）而设计了扩增技术。

[0098] 如本文中使用的，术语“引物”是指寡核苷酸，或为天然存在的如纯化的限制酶消化物或经合成制备，当处于诱导引物延伸产物合成的条件下（即存在核苷酸和诱导剂例如

DNA 聚合酶以及合适的温度和 pH) 时其能够作为合成起始点，所述产物和核酸链互补。引物优选的为单链以获得扩增的最大效率，但可选的可为双链。如果为双链，首先处理引物以在使用前分离两条链以制备延伸产物。优选的，引物为寡脱氧核糖核苷酸。引物必须足够长以在诱导剂的存在下引发延伸产物的合成。引物的准确长度取决于多种因素，包括温度、引物来源和使用的方法。

[0099] 如本文中使用的，术语“探针”是指寡核苷酸（即核苷酸序列），或为天然存在的如纯化的限制酶消化物或经合成、重组或通过 PCR 扩增制备，其能够与其他目的寡核苷酸杂交。探针可为单链或双链。探针在检测、鉴定和分离特定的基因序列中有用。考虑用任意“报告分子”标记本发明中使用的任意探针，从而在任意检测系统中可检测探针，所述检测系统包括但不限于酶（例如酶联免疫吸附测定 (ELISA) 和基于酶的组织化学方法）、荧光、放射性和发光的系统。本发明无意局限于任意具体的检测系统或标记。

[0100] 如本文中使用的，当在提及聚合酶链式反应中使用术语“靶”时，是指聚合链式反应中使用的引物界定的核酸区域。因此，认为“靶”是意图从其他核酸序列中区分开的。定义“区段 (segment)”为靶序列中的核酸区域。

[0101] 如本文中使用的，术语“聚合酶链式反应”（“PCR”）是指美国专利号 4,683,195、4,683,202 和 4,965,188 中的方法，此处引入作为参考，其包括在基因组 DNA 混合物中不经过克隆或纯化提高靶序列区段的浓度。这种扩增靶序列的方法包含将过量的 2 条寡核苷酸引物引入含有期望靶序列的 DNA 混合物，之后在 DNA 聚合酶存在下进行精确次序的热循环。2 条引物与其双链靶序列的各自链互补。为了实现扩增，将混合物变性，之后引物与靶分子中的其互补序列退火。退火后，用聚合酶延伸引物从而形成新的互补链对。变性、引物退火和聚合酶延伸的步骤可重复多次（即变性、退火和延伸组成一个“循环”；可以有多次“循环”）以获得高浓度的期望靶序列的扩增片段。期望靶序列的扩增片段长度由引物彼此的相对位置决定，因此此长度是可控参数。由于方法的重复方面，该方法被称为“聚合酶链式反应”（下文中称“PCR”）。因为靶序列的期望扩增片段变为混合物中的优势序列（就浓度而言），称其为“PCR 扩增的”。

[0102] 如本文中使用的，术语“扩增试剂”是指除了引物、核酸模板和扩增酶以外扩增需要的试剂（脱氧核糖核苷酸三磷酸、缓冲液，等等）。一般扩增试剂和其他反应组分置于和包含于反应容器（试管、微孔，等等）中。

[0103] 如本文中使用的，术语“RT-PCR”是指 RNA 序列的复制和扩增。在此方法中，逆转录与 PCR 偶联，最常使用单酶程序，其中应用热稳定的聚合酶，如美国专利号 5,322,770 中描述的，引入本文作为参考。在 RT-PCR 中，由于聚合酶的逆转录酶活性将 RNA 模板转变为 cDNA，之后使用聚合酶的聚合活性扩增（即如其他 PCR 方法）。

[0104] 如本文中使用的，术语“限制性内切酶”和“限制酶”是指细菌酶，各自在特异性核苷酸序列上或附近切割双链 DNA。

[0105] “限制性位点”是指特定限制性内切酶识别和切割的核苷酸序列，常常是插入 DNA 片段的位点。在本发明的某些实施方案中将限制性位点经基因改造加入选择性标记和 DNA 构建体的 5′ 和 3′ 末端。

[0106] “同源重组”意指在相同或几乎相同的核苷酸序列的位点处，两个 DNA 分子或成对染色体之间 DNA 片段的交换。在一个优选的实施方案中，染色体整合是同源重组。

[0107] 如本文中使用的，“氨基酸”指肽或蛋白质序列或其部分。术语“蛋白质”、“肽”和“多肽”是可互换使用的。

[0108] 如本文中使用的，“目的蛋白”和“目的多肽”指期望的和 / 或待评估的蛋白质 / 多肽。在一些实施方案中，目的蛋白在胞内表达，而在其他实施方案中，其是分泌多肽。在特别优选的实施方案中，这些酶包含本发明的丝氨酸蛋白酶。在一些实施方案中，目的蛋白是与信号肽融合的分泌多肽（即，待分泌蛋白质的氨基端延伸）。几乎所有的分泌蛋白都使用氨基端的蛋白质延伸，其在跨膜定位和前体蛋白质转运中发挥关键作用。该延伸是在膜转运过程中或之后立即被信号肽酶通过蛋白酶解切除的。

[0109] 如本文中使用的，术语“异源蛋白质”指不天然存在于宿主细胞内的蛋白质或多肽。异源蛋白质的实例包含酶，例如水解酶，包含蛋白酶。在一些实施方案中，编码蛋白质的基因是天然存在的基因，而在其他实施方案中，使用了突变的和 / 或合成的基因。

[0110] 如果多核苷酸在天然状态下或在用本领域技术人员已知的方法操纵下可以转录和 / 或翻译以产生 RNA、多肽或其片段，则被称为“编码”RNA 或多肽。该核酸的反义链也被称为编码序列。如本领域所公知的，DNA 可通过 RNA 聚合酶转录产生 RNA，但 RNA 可通过逆转录酶逆转录以产生 DNA。因此 DNA 可编码 RNA，反之亦然。

[0111] “宿主菌株”或“宿主细胞”指用于表达载体的合适的宿主，所述载体包含本发明一些实施方案的 DNA。

[0112] 如果酶在细胞中表达的水平高于其在相应野生型细胞中表达的水平，则酶在宿主细胞中是“过表达的”。

[0113] 术语“蛋白质”和“多肽”在本文中可互换使用。在此公开全文中使用与 IUPAC-IUB 联合生物化学命名委员会 (IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature, JCBN) 定义一致的 3 字母氨基酸编码。应当理解由于遗传密码的简并性，多肽可由多于一条核苷酸序列编码。

[0114] “原序列”是在信号序列和成熟蛋白酶之间，对蛋白酶分泌所必需的氨基酸序列。切除原序列可以获得成熟活性蛋白酶。

[0115] 术语“信号序列”或“信号肽”指参与成熟或前体形式的蛋白质分泌的任何核苷酸和 / 或氨基酸序列。该信号序列的定义是功能性的，意在包含由蛋白质基因 N 末端部分编码的所有氨基酸序列，所述序列参与蛋白质分泌的实施。它们通常，但不是总是连接到蛋白质的 N 端部分或连接到前体蛋白质的 N 端部分。信号序列可以是内源的或外源的。信号序列通常可以与蛋白质（例如蛋白酶）连接，或可以来自编码另一分泌蛋白质的基因，一个示例性外源信号序列包含来自枯草芽孢杆菌的信号序列的前七个氨基酸残基，与来自迟缓芽孢杆菌 (Bacillus lentus, ATCC 21536) 的枯草杆菌蛋白酶的剩余的信号序列融合。

[0116] 术语“杂交信号序列”指这样的信号序列，其部分序列来自与待表达基因的信号序列融合的表达宿主。在一些实施方案中，使用合成的序列。

[0117] 术语“成熟”形态的蛋白质或肽指最终功能形态的蛋白质或肽。例如，成熟形态的本发明的 BPN’ 枯草杆菌蛋白酶至少包含与如下陈列的 SEQ ID NO :1 的 1-275 位残基相同的氨基酸序列 :

[0118] AQSVPYGVSQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLKVAGGASMVPSETNPFQDNNSHGTHVAGTVAALNNSIGVLGVAPSASLYAVKVLGADGSGQYSWIINGIEWAIANNMDVINMSLGGPSGSAALKAAVDKAVASG

VVVVAAAGNEGTSGSSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSSNQRASFSSVGPELDVMAPGVSIQSTLPGNKYGAYNGTSMA SPHVAGAAALILSKHPNWTNTQVRSSLENTTTKLGDSFYYGKGLINVQAAAQ(SEQ ID NO:1)

[0119] 术语“前体”形态的蛋白质或肽指具有与蛋白质氨基或羧基端有效连接的原序列的成熟形态的蛋白质。前体也可以具有与原序列氨基端有效连接的“信号”序列。前体还可以具有参与翻译后活性的其他多核苷酸（例如，切除多核苷酸产生成熟形态的蛋白质或肽）。

[0120] “天然存在的酶”指具有与天然发现的酶相同的、未修饰的氨基酸序列的酶。天然存在的酶包含天然的酶、在特定微生物体中天然表达或发现的酶。

[0121] 术语“源自”和“获得自”不仅指由或可由所讨论的生物菌株产生的蛋白酶，还指由分离自此类菌株的 DNA 序列编码、且在含有此类 DNA 序列的宿主生物中产生的蛋白酶。此外，该术语指由合成的和 / 或 cDNA 来源的 DNA 序列编码的蛋白酶，所述蛋白酶具有所讨论的蛋白酶已鉴定的特征。

[0122] 该定义范围内的“衍生物”通常保留了在野生型、天然或亲本形式中观察到的特征性蛋白酶解活性至下述程度：使该衍生物可用于与所述野生型、天然或亲本形式相似的目的。丝氨酸蛋白酶的功能性衍生物涵盖了天然存在的、合成的或重组产生的肽或肽片段，其具有本发明丝氨酸蛋白酶的一般特征。

[0123] 术语“功能性衍生物”指这样的核酸衍生物，其具有编码丝氨酸蛋白酶的核酸的功能性特征。编码本发明丝氨酸蛋白酶的核酸的功能性衍生物涵盖了天然存在的、合成的或重组产生的核酸或核酸片段，并编码本发明的特征性丝氨酸蛋白酶。编码本发明丝氨酸蛋白酶的野生型核酸包含天然存在的等位基因，以及基于本领域已知的遗传密码简并性的同源物。

[0124] 在两个核酸或多肽序列的情况下，术语“相同”指当以最高对应性比对时，两条序列中相同的残基，使用下列序列比较或分析算法之一进行测量。

[0125] 术语“优化比对”指产生最高百分比同一性分数的比对。

[0126] 就两个氨基酸、多核苷酸和 / 或基因序列（适当地）而言，“百分比同一性”、“百分比氨基酸序列同一性”、“百分比基因序列同一性”和 / 或“百分比核酸 / 多核苷酸序列同一性”指当两条序列最优比对时，两条序列中相同残基的百分比。因此，80％氨基酸序列同一性意指在两条最优比对的多肽序列中，80％的氨基酸是相同的。

[0127] 因此，在两个核酸或多肽的情况下，短语“基本相同”指与使用标准参数的程序或算法（例如，BLAST、ALIGN、CLUSTAL）的参照序列相比，多核苷酸或多肽包含至少约 70％序列同一性，优选的至少约 75％、优选的至少约 80％、优选的至少约 85％、优选的至少约 90％、优选的至少约 95％、优选的至少约 97％、优选的至少约 98％和优选的至少约 99％序列同一性。两条多肽基本相同的一个指标是第一条多肽与第二条是免疫交叉反应的。一般地，由于保守氨基酸取代而相异的多肽是免疫交叉反应的。因此，例如当两条多肽仅由于保守取代而不同时，多肽与第二多肽是基本相同的。两条核酸序列基本相同的另一指标是两个分子在严格条件下彼此杂交（例如，在中度至高度严格度的范围）。

[0128] 在本文中术语“等同的”指在中度至高度严格度条件下，能够与编码目的蛋白酶的多核苷酸杂交的多核苷酸编码的丝氨酸蛋白酶。例如，等同的是指等同的成熟丝氨酸蛋白酶与具有 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的成熟枯草杆菌蛋白酶具有至少约 70％、至少约

80％、至少约 85％、至少约 90％、至少约 91％、至少约 92％、至少约 93％、至少约 94％、至少约 95％、至少约 96％、至少约 97％、至少约 98％，和 / 或至少约 99％的序列同一性。

[0129] 术语“分离的”或“纯化的”指从其原始环境中移出的材料（例如，如果是天然存在的，则指天然环境）。例如，如果材料在特定组合物中存在的浓度高于或低于其在天然存在的或在野生型生物中存在的浓度，或者与在天然存在的或野生型生物中表达后通常不存在的组分组合，则认为所述材料是“纯化的”。例如，在活动物中存在的天然存在的多核苷酸活多肽不是分离的，但与天然系统中共存的部分或全部材料分离的相同多核苷酸或多肽则是分离的。在一些实施方案中，此类多核苷酸是载体的一部分，和 / 或此类多核苷酸或多肽是组合物的一部分，只要此类载体或组合物不是其天然环境的一部分，则仍然是分离的。在优选的实施方案中，例如，如果核酸或蛋白质在凝胶电泳或印迹中基本产生一条带，则认为所述核酸或蛋白质是纯化的。

[0130] 当用于指代 DNA 序列时，术语“分离的”指已经从天然遗传环境中移出的 DNA 序列，并因此不含其他外来的或不期望的编码序列，其存在形式适合在遗传工程改造的蛋白质产生系统中使用。此类分离的分子是与其天然环境分离的分子，包含 cDNA 和基因组克隆。本发明的分离的 DNA 分子不含其常规相关的其他基因，但可以包含天然存在的 5’ 和 3’ 非翻译区，例如启动子和终止子。相关区域的鉴定对本领域技术人员是显而易见的（参见例如，Dynan 和 Tijan，Nature 316 :774-78[1985]）。术语“分离的 DNA 序列”也称为“克隆的 DNA 序列”。

[0131] 当用于指代蛋白质时，术语“分离的”指在其天然环境以外的条件下存在的蛋白质。在优选的形式中，分离的蛋白质基本不含其他蛋白质，特别是其他同源蛋白质。通过 SDS-PAGE 确定时，分离的蛋白质纯度高于约 10％，优选的高于约 20％，和更优选的高于约 30％。通过 SDS-PAGE 确定时，发明的其他方面涵盖了更高纯度形式的蛋白质（即，纯度高于约 40％，高于约 60％，高于约 80％，高于约 90％，高于约 95％，高于约 97％，甚至高于约 99％）。

[0132] 如本文中使用的，术语“组合突变”指从初始序列产生变体文库的方法。在这些文库中，变体包含选自预定义突变组的一处或几处突变。此外，所述方法提供了引入随机突变的方式，所述随机突变不属于预定义突变组。在一些实施方案中，所述方法包括在 2000 年 10 月 26 日提交的美国专利申请序列号 09/699.250 中陈列的方法，此处引入作为参考。在可选的实施方案中，组合突变法涵盖市售的试剂盒（例如 QuikChange ® Multisite，Stratagene，San Diego，CA）。

[0133] 如本文中使用的，术语“突变体文库”指具有相同的大部分基因组但包括一种或多种基因的不同同源物的细胞群。这些文库可用于例如鉴定具有改进性状的基因或操纵子。

[0134] 如本文中使用的，术语“初始基因”指编码目的蛋白的目的基因，所述目的蛋白有待使用本发明进行改进和 / 或改变。

[0135] 如本文中使用的，术语“多重序列比对”（“MSA”）指使用算法（例如 Clustal W）比对初始基因的多重同系物的序列。

[0136] 如本文中使用的，术语“共有序列”和“标准序列”指氨基酸序列原型，所有特定目的蛋白质或序列变体与之比较。此术语也指列出目的 DNA 序列中最常出现的核苷酸的序列。对基因的每个位置，共有序列给出了在 MSA 中此位置丰度最高的氨基酸。

[0137] 如本文中使用的，术语“共有突变”指初始基因序列和共有序列的差异。通过比较初始基因序列和 MSA 中得到的共有序列鉴定共有突变。在一些实施方案中，在初始基因中引入共有突变从而使初始序列与共有序列更相似。共有突变也包括氨基酸改变，即将初始基因的氨基酸改变为相对初始基因中的氨基酸频率在该位置上 MSA 中更经常出现的氨基酸。因此，术语共有突变包含将初始基因的氨基酸替换为比 MSA 中的氨基酸丰度更高的氨基酸的所有单氨基酸改变。

[0138] 如本文中使用的，术语“增强的组合共有突变文库”指基于更早轮的 CCM 突变和筛选的筛选和 / 或测序结果设计和构建的 CCM 文库。在一些实施方案中，增强的 CCM 文库基于在更早轮 CCM 中得到的起始击中 (hit) 的序列。在其他实施方案中，增强的 CCM 设计为有利于在更早轮突变和筛选的初始击中中经常观察到的突变。在一些优选的实施方案中，这通过相对在更早的 CCM 文库中使用的其他引物的浓度，删除编码降低性能的突变的引物或通过提高编码增强性能的突变的引物而实现。

[0139] 如本文中使用的，术语“性能降低突变”指与未经筛选的组合共有突变文库相比，在组合共有突变文库筛选中较少在击中中发现的突变。在优选的实施方案中，筛选方法去除和 / 或降低包含“性能降低的突变”的变体丰度。

[0140] 如本文中使用的，术语“功能性测定”指提供蛋白质活性的指示的测定。在特别优选的实施方案中，该术语指分析蛋白质以其常见能力发挥作用的测定系统。例如，在酶的情况下，功能性测定涉及确定酶在催化反应时的效率。

[0141] 如本文中使用的，术语“靶性质”指待改变的起始基因的性质。本发明并非意在限定任何特定的靶性质。但是，在一些优选的实施方案中，靶性质是基因产物的稳定性（例如，对变性、蛋白酶解或其他降解因素的抗性），而在其他实施方案中，改变了在产生宿主中的产生水平。实际上，起始基因的任何性质均可考虑用于本发明。

[0142] 如本文中使用的，术语“性质”或其同义词在核酸的情况下，指核酸的可以选择或检测的任何特征或属性。这些性质包括但不限于影响结合多肽的性质、赋予包含特定核酸的细胞的性质、影响基因转录（例如，启动子强度、启动子识别、启动子调节、增强子功能）的性质、影响 RNA 加工（例如，RNA 剪切、RNA 稳定性、RNA 构象和转录后修饰）的性质、影响翻译（例如，水平、调节、mRNA 至核糖体蛋白质的结合、翻译后修饰）的性质。例如，可改变核酸的转录因子、聚合酶、调节因子等等的结合位点以产生期望的特征或鉴定不期望的特征。

[0143] 如本文中使用的，术语“性质”或其语法等价物在多肽（包括蛋白质）的情况下，指多肽的可以选择或检测的任何特征或属性。这些性质包含但不限于氧化稳定性、底物特异性、催化活性、热稳定性、碱稳定性、pH 活性谱、对蛋白酶解降解的抗性、K_M、K_{cat}、K_{cat}/K_M 比、蛋白质折叠、诱导免疫应答、结合配体的能力、结合受体的能力、分泌能力、在细胞表面展示的能力、寡聚化的能力、信号（发放）能力、刺激细胞增殖的能力、抑制细胞增殖的能力、诱导凋亡的能力、提供磷酸化或糖基化修饰的能力和 / 或治疗疾病的能力，等等。

[0144] 术语“修饰的序列”和“修饰的基因”在本文中可互换的使用，指在天然存在的核酸序列中包含缺失、插入或间断的序列。在一些优选的实施方案中，修饰的序列的表达产物是截短的蛋白质（例如，如果修饰是删除或间断序列）。在一些特别优选的实施方案中，截短的蛋白质保留了生物学活性。在替代性实施方案中，修饰的序列的表达产物是延长的蛋

白质（例如，在核酸序列中包含插入片段的修饰作用）。在一些实施方案中，插入片段导致截短的蛋白质（例如，当插入片段导致形成终止密码子时）。因此，插入片段可以导致截短的蛋白质或延长的蛋白质作为表达产物。

[0145] 如本文中使用的，术语“突变序列”和“突变基因”可互换使用，指序列具有存在于宿主细胞野生型序列中的至少一个密码子的改变。突变序列的表达产物是相对野生型具有改变的氨基酸序列的蛋白质。表达产物可具有改变的功能（例如，增强的酶活性）。

[0146] 术语“突变引物”或“突变寡核苷酸”（本文中可互换使用）旨在指寡核苷酸组合物，所述组合物对应模板序列的一部分并能够与其杂交。就突变引物而言，引物不与模板核酸精确配对，使用引物中的错配将期望的突变引入核酸文库。如本文中使用的，“非突变引物”或“非突变寡核苷酸”指与模板核酸精确配对的寡核苷酸组合物。在本发明的一个实施方案中，只使用突变引物。在本发明的另一优选的实施方案中，将引物设计为对于包含突变引物的至少一个区域，寡核苷酸混合物中也包含其非突变引物。通过加入突变引物和对应至少一种突变引物的非突变引物，有可能产生具有多种组合突变模式的核酸文库。例如，如果期望突变核酸文库中的一些成员在某些位置维持其前体序列，而其他成员在这些位点为突变的，非突变引物提供核酸文库中的非突变成员得到给定残基的特异水平的能力。本发明的方法应用长度一般在 10-50 碱基之间，更优选的长度在约 15-45 碱基之间的突变和非突变寡核苷酸。然而，可能有必要使用短于 10 碱基或长于 50 碱基的引物以获得期望的突变结果。就对应的突变和非突变引物而言，对应的寡核苷酸没有必要为相同的长度，只需在待添加的突变的对应区域具有重叠。可根据本发明以预定义的比率加入引物。例如，如果期望得到的文库具有显著水平的某些特异特变，和较少量的在相同或不同位点的不同突变，通过调节加入的引物量，有可能产生期望的有偏向的文库。可选的，通过加入较少或较多量的非突变引物，有可能调节在突变核酸文库中产生的该引物的对应突变的频率。

[0147] 如本文中使用的，术语“邻近突变”指在同一条寡核苷酸引物中存在的突变。例如，邻近突变可为相邻的或在彼此附近，然而，它们将由同一条引物引入所得到的突变模板核酸。

[0148] 术语“野生型序列”或“野生型基因”在本文中可互换的使用，指宿主细胞中天然的或天然存在的序列。在一些实施方案中，野生型序列指作为蛋白质工程计划起点的目的序列。野生型序列可以编码同源或异源的蛋白。同源蛋白是宿主细胞无需干预即产生的蛋白质。异源蛋白是宿主细胞没有干预就不产生的蛋白质。除非另外指出，氨基酸位置数对应于 SEQ ID NO :1 的成熟解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶序列的位置。然而，本发明不限于此特定枯草杆菌蛋白酶的突变，还涉及前体蛋白酶，所述前体蛋白酶在对应位置包含与解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶中特别鉴定的残基“等同的”氨基酸残基。

[0149] 如本文中使用的，术语“蛋白酶变体”、“枯草杆菌蛋白酶变体”用于指与在蛋白质工程起点使用的野生型枯草杆菌蛋白酶或亲本蛋白酶（例如枯草杆菌蛋白酶）相似的蛋白酶。这些变体与野生型或其他亲本在功能上相似，但在其氨基酸序列中有突变，使其与野生型或亲本蛋白酶（例如枯草杆菌蛋白酶）的序列不同。

[0150] 如本文中使用的，术语“修饰”和“突变”指氨基酸序列的任意变化或改变。所述术语旨在涵盖目的氨基酸序列（例如枯草杆菌蛋白酶序列）的氨基酸侧链的取代、缺失、插入和 / 或替换。所述术语旨在涵盖目的氨基酸序列（例如枯草杆菌蛋白酶序列）的化学修

饰。

[0151] 术语“氧化稳定的”指本发明的蛋白酶处于蛋白酶解、水解、清洁或其他本发明过程中的常见条件下（例如，暴露于或接触漂白剂或氧化剂）一段给定时间后，保留特定量的酶活性。在一些实施方案中，蛋白酶在接触漂白剂或氧化剂给定时间段后，例如至少约 1 分钟、约 3 分钟、约 5 分钟、约 8 分钟、约 12 分钟、约 16 分钟、约 20 分钟等，保留至少约 50％、约 60％、约 70％、约 75％、约 80％、约 85％、约 90％、约 92％、约 95％、约 96％、约 97％、约 98％或约 99％的蛋白酶解活性。在一些实施方案中，如实施例所述测量稳定性。

[0152] 术语“螯合剂稳定的”指本发明的蛋白酶处于蛋白酶解、水解、清洁或其他本发明过程中的常见条件下（例如，暴露于或接触螯合剂）一段给定时间后，保留特定量的酶活性。在一些实施方案中，蛋白酶在接触螯合剂给定时间后，例如至少约 10 分钟、约 20 分钟、约 40 分钟、约 60 分钟、约 100 分钟等，保留至少约 50％、约 60％、约 70％、约 75％、约 80％、约 85％、约 90％、约 92％、约 95％、约 96％、约 97％、约 98％或约 99％的蛋白酶解活性。在一些实施方案中，如实施例中描述的（方法）测量螯合剂的稳定性。

[0153] 术语“热稳定的”和“热稳定”指本发明的蛋白酶处于蛋白酶解、水解、清洁或其他本发明过程中的常见条件下（例如，暴露于改变的温度）一段给定时间后，保留特定量的酶活性。改变的温度包含升高或降低的温度。在一些实施方案中，蛋白酶在暴露于改变的温度一段给定时间后，例如至少约 60 分钟、约 120 分钟、约 180 分钟、约 240 分钟、约 300 分钟等，保留至少约 50％、约 60％、约 70％、约 75％、约 80％、约 85％、约 90％、约 92％、约 95％、约 96％、约 97％、约 98％或约 99％的蛋白酶解活性。在一些实施方案中，如实施例中描述的（方法）测量热稳定性。

[0154] 在氧化、螯合剂、热和 / 或 pH 稳定性蛋白酶的情况下，术语“增强的稳定性”指与其他的丝氨酸蛋白酶（例如，枯草杆菌蛋白酶）和 / 或野生型酶相比，随时间流逝保留更高的蛋白酶解活性。

[0155] 在氧化、螯合剂、热和 / 或 pH 稳定性蛋白酶的情况下，术语“降低的稳定性”指与其他的丝氨酸蛋白酶（例如，枯草杆菌蛋白酶）和 / 或野生型酶相比，随时间流逝保留更低的蛋白酶解活性。

[0156] 术语“清洁活性”指蛋白酶在蛋白酶解、水解、清洁或本发明的其他过程中常见条件下获得的清洁性能。在一些实施方案中，通过使用多种涉及酶敏感性污渍（例如，草、血、奶、或卵蛋白）的清洁测定来确定清洁性能，通过将污渍置于标准洗涤条件后，进行多种层析、分光光度或其他定量方法来确定。示例性测定包含但不限于在 WO 99/34011 和 U.S.Pat.6,605,458 中描述的（均引入本文作为参考），以及实施例中包含的那些方法。

[0157] 如本文中使用的，“清洁组合物”和“清洁制剂”指组合物，所述组合物应用于去除待清洁的物品上不想要的化合物，所述物品为例如织物、餐具、隐形眼镜、其他固体底物、头发（洗发剂）、皮肤（肥皂和霜剂）、牙齿（漱口水、牙膏）等等。只要组合物与组合物中使用的过水解酶和其他酶相容，所述术语涵盖任意为了期望的清洁组合物的特定类型和产品的形式（例如，液体、凝胶、颗粒或喷雾组合物）而选择的材料 / 化合物。通过考虑待清洁的表面、物品或织物，和在使用时的清洁条件下期望的组合物形式可容易的进行清洁组合物材料的特异性选择。

[0158] 所述术语还指适于清洁、漂白、消毒和 / 或灭菌任意物体和 / 或表面的任意组

合物。所述术语旨在包括但不限于洗涤剂组合物（例如，液体和/或固体衣物洗涤剂和细薄（fine）织物洗涤剂；硬表面清洁制剂，例如用于玻璃、木头、陶器和金属柜台面和窗；地毯清洁剂；烤箱（炉灶）清洁剂；织物清新剂；织物软化剂；和纺织品和衣物预去污剂(pre-spotter)，以及餐具洗涤剂）。

[0159] 事实上，除非另外指出，如本文中使用的术语“清洁组合物”包括颗粒或粉状的多用途或大容量洗涤剂，特别是清洁洗涤剂；液体、凝胶或糊状的多用途洗涤剂，特别是所谓的大容量液体（HDL）类型；液体细薄织物洗涤剂；手洗餐具洗涤剂或轻役型（light duty）餐具洗涤剂，特别是高泡型；机洗餐具洗涤剂，包括各种用于家用和机构用途的片剂、颗粒、液体和助漂洗型；液体清洁和消毒剂，包括抗细菌手洗型，清洁棒、漱口水、假牙清洁剂、汽车或地毯洗涤剂、浴室清洁剂；洗发剂和润发素（hair-rinse）；沐浴凝胶和泡沫浴和金属清洁剂；以及清洁辅料例如漂白添加剂和“污渍棒（stain-stick）”或预处理类型。

[0160] 如本文中使用的，术语“洗涤剂组合物”和“洗涤剂制剂”用于指混合物，其旨在用于在洗涤介质中清洁有污渍的物体。在一些优选的实施方案中，所述术语用于洗织物和/或衣服中（例如，“衣物洗涤剂”）。在可选的实施方案中，所述术语指其他洗涤剂，例如在清洁餐具、刀具，等等（例如，“餐具洗涤剂”）。本发明无意局限于任意特定的洗涤剂制剂或组合物。事实上，所述术语除了过水解酶以外，旨在还涵盖包含表面活性剂、转移酶、水解酶、氧化还原酶、增洁剂、漂白剂、漂白活化剂、上蓝剂和荧光染料、抗结块剂、掩蔽剂、酶活化剂、抗氧化剂和增溶剂的洗涤剂。

[0161] 术语蛋白酶的“清洁有效量”指在特定清洁组合物中实现预期酶活性水平的上述蛋白酶的量。此类有效量易于为本领域技术人员确定，并取决于多种因素，例如所使用的特定蛋白酶、清洁用途、清洁组合物的特定组成，以及需要液体组合物还是干燥组合物（例如，颗粒状、条形）。

[0162] 如本文中使用的，术语“清洁辅助材料”意指为期望的特定类型的清洁组合物和产品形式（例如，液体、颗粒、粉末、条形、糊状、喷雾、片剂、凝胶或泡沫组合物）而选择的任何液体、固体或气体材料，所述材料与组合物中使用的蛋白酶相容。在一些实施方案中，颗粒状组合物是“致密”形式的，而在其他实施方案中，液体组合物是“浓缩”形式的。

[0163] 在清洁活性的情况下，术语“增强的性能”指通过标准洗涤循环和/或多个洗涤循环后的常规评估，确定对一些酶敏感性污渍（如卵、奶、草或血）提高的或增加的清洁活性。

[0164] 在清洁活性的情况下，术语“降低的性能”指通过标准洗涤循环后的常规评估，确定对一些酶敏感性污渍（如卵、奶、草或血）降低的或减少的清洁活性。

[0165] 在清洁活性的情况下，术语“相当的性能”指比较的枯草杆菌蛋白酶（如，市售蛋白酶）的至少约60％、至少约70％、至少约80％、至少约90％、至少约95％的清洁活性，所述枯草杆菌蛋白酶包含但不限于OPTIMASE蛋白酶(Genencor)、PURAFECT™蛋白酶产品(Genencor)、SAVINASE™蛋白酶(Novozymes)、BPN’-变体（参见例如，美国专利号34,606)、RELASE™、DURAZYME™、EVERLASE™、KANNASE™蛋白酶(Novozymes)、MAXACAL™、MAXAPEM™、PROPERASE™蛋白酶(Genencor；还参见，美国专利号34,606，和美国专利号5,700,676；5,955,340；6,312,936；和6,482,628)，和迟缓芽孢杆菌变体蛋白酶产品（例如，在WO 92/21760、WO 95/23221和/或WO 97/07770中描述的）。示例性枯草杆菌蛋白酶变体包含但不限于在等价于BPN’的76、101、103、104、120、159、167、170、194、195、217、232、235、

236、245、248 和 / 或 252 位的残基位置上具有取代或缺失的对象。可以通过将本发明的蛋白酶与上述枯草杆菌蛋白酶在多个清洁测定中进行比较，来确定清洁性能，所述清洁测定涉及酶敏感性污渍（如，草、血或奶），在标准洗涤循环条件后，通过常规的分光光度法或分析方法来测定。

[0166] 如本文中使用的，“纺织品清洁组合物”包含手洗和机洗洗涤剂组合物，包含洗衣添加组合物和适用于浸泡和 / 或预处理污损纺织品（例如，衣物、亚麻和其他纺织材料）的组合物。

[0167] 本文中，清洁组合物的“致密”形式最好通过密度来反映，对组合物而言，通过无机填充盐的量来反映。无机填充盐是粉末形态的洗涤剂组合物的常规成分。在常规的洗涤剂组合物中，填充盐以显著的量存在，一般为总组合物重量的约 17 至约 35％。相反，在致密组合物中，填充盐以不超过总组合物约 15％的量存在。在一些实施方案中，填充盐存在的量不超过组合物重量的约 10％，或更优选的约 5％。在一些实施方案中，无机填充盐选自硫酸和盐酸的碱金属盐和碱土金属盐。优选的示例性的填充盐是硫酸钠。

[0168] 如本文中使用的，术语“表面活性剂”指本领域一般认为的具有表面活性的任意化合物。表面活性剂一般包括阴离子、阳离子、非离子和两性离子化合物，在本文中将进一步描述。

具体实施方式

[0169] 以下的实施例更详细地描述了本发明，但其并非意在以任何方式限制本发明的范围。提供以下实施例以用于说明而非限制本发明。

[0170] 在下文公开的实验内容中使用以下缩写：PI（蛋白酶抑制剂）；ppm（百万分之一）；M（摩尔 / 升）；mM（毫摩尔 / 升）；μM（微摩尔 / 升）；nM（纳摩尔 / 升）；mol（摩尔）；mmol（毫摩尔）；μmol（微摩尔）；nmol（纳摩尔）；gm（克）；mg（毫克）；μg（微克）；pg（皮克）；L（升）；ml 和 mL（微升）；μl 和 μL（微升）；cm（厘米）；mm（毫米）；μm（微米）；nm（纳米）；U（单位）；V（伏特）；MW（分子量）；sec（秒）；min（分钟）；h 和 hr（小时）；℃（摄氏度）；QS（有效量）；ND（未进行）；NA（不适用）；rpm（每分钟转数）；H_2O（水）；dH_2O（去离子水）；HCl（盐酸）；aa（氨基酸）；bp（碱基对）；kb（千碱基对）；kD（千道尔顿）；cDNA（拷贝或互补 DNA）；DNA（脱氧核糖核酸）；ssDNA（单链 DNA）；dsDNA（双链 DNA）；dNTP（脱氧核糖核苷酸三磷酸）；RNA（核糖核酸）；$MgCl_2$（氯化镁）；NaCl（氯化钠）；w/v（重量 / 体积）；v/v（体积 / 体积）；g（重力）；OD（光密度）；Dulbecco 磷酸缓冲液 (DPBS)；SOC（2％细菌用胰蛋白胨、0.5％细菌用酵母提取物、10mM NaCl、2.5mMKCl）；Terrific 培养液 (TB；12g/l 细菌用胰蛋白胨、24g/l 甘油、2.31g/l KH_2PO_4 和 12.54g/l K_2HPO_4)；OD_{280}（280nm 处的光密度）；OD_{600}（600nm 处的光密度）；A_{405}（405nm 处的吸光度）；Vmax（酶催化反应的最高起始速率）；PAGE（聚丙烯酰胺凝胶电泳）；PBS（磷酸缓冲盐水 [150mM NaCl、10mM 磷酸钠缓冲液，pH 7.21]）；PBST（PBS+0.25％ TWEEN® 20）；PEG（聚乙二醇）；PCR（聚合酶链式反应）；RT-PCR（逆转录 PCR）；SDS（十二烷基硫酸钠）；Tris（三（羟甲基）氨基甲烷）；HEPES（N-[2- 羟乙基] 哌嗪 -N-[2- 乙磺酸]）；HBS（HEPES 缓冲盐水）；Tris HCl（三 [羟甲基] 氨基甲烷 - 盐酸盐）；Tricine（N-[三 -（羟甲基）- 甲基]- 甘氨酸）；CHES（2-（N- 环己基氨基）乙磺酸）；TAPS（3-{[三 -（羟甲基）- 甲基]- 氨基 }- 丙

磺酸）;CAPS(3-（环己基氨基）-丙磺酸;DMSO（二甲亚砜）;DTT(1,4-二硫代-DL-苏糖醇）;SA（芥子酸（s,5-二甲氧基-4-羟基肉桂酸））;TCA（三氯乙酸）;Glut 和 GSH（还原型谷胱甘肽）;GSSG（氧化型谷胱甘肽）;TCEP（三[2-羧乙基]膦）;Ci（居里）;mCi（毫居里）;μCi（微居里）;HPLC（高压液相层析）;RP-HPLC（反向高压液相层析）;TLC（薄层层析）;MALDI-TOF（基质辅助的激光解吸/电离飞行时间）;Ts（甲苯磺酰基）;Bn（苄基）;Ph（苯基）;Ms（甲磺酰基）;Et（乙基）,Me（甲基）;Taq（栖热水生菌(Thermus aquaticus) DNA 聚合酶）;Klenow(DNA 聚合酶 I 大(Klenow)片段）;EGTA（乙二醇-双（β-氨基乙醚)N,N,N',N'-四乙酸）;EDTA（乙二胺四乙酸）;bla（β-内酰胺酶或氨苄青霉素抗性基因）;HDL（高密度液体）;MJ Research(MJ Research,Reno,NV);Baseclear(Baseclear BV,Inc.,Leiden,the Netherlands);PerSeptive(PerSeptive Biosystems,Framingham,MA);ThermoFinnigan(ThermoFinnigan,San Jose,CA);Argo(Argo BioAnalytica,Morris Plains,NJ);Seitz EKS(SeitzSchenk Filtersystems GmbH,Bad Kreuznach,德国）;Pall(Pall Corp.,East Hills,NY);Spectrum(Spectrum Laboratories,Dominguez Rancho,CA);Molecular Structure(Molecular Structure Corp.,Woodlands,TX);Accelrys(Accelrys,Inc.,San Diego,CA);Chemical Computing(Chemical Computing Corp.,Montreal,加拿大）;New Brunswick(New Brunswick Scientific,Co.,Edison,NJ);CFT(Center for Test Materials,Vlaardingen,the Netherlands);Test Fabrics(Test Fabrics,Inc.,West Pittiston,PA),Procter & Gamble(Procter & Gamble,Inc.,Cincinnati,OH);GE Healthcare(GE Healthcare,Chalfont St.Giles,United Kingdom);OXOID(Oxoid,Basingstoke,Hampshire,UK);Megazyme(Megazyme International Ireland Ltd.,Bray Business Park,Bray,Co.,Wicklow,爱尔兰）;Finnzymes(Finnzymes Oy,Espoo,芬兰）;Kelco(CP Kelco,Wilmington,DE);Corning(Corning Life Sciences,Corning,NY);(NEN(NEN Life Science Products,Boston,MA);Pharma AS(Pharma AS,Oslo,挪威）;Dynal(Dynal,Oslo,挪威）;Bio-Synthesis(Bio-Synthesis,Lewisville,TX);ATCC(American Type Culture Collection,Rockville,MD);Gibco/BRL(Gibco/BRL,Grand Island,NY);Sigma(Sigma Chemical Co.,St.Louis,MO);Pharmacia(Pharmacia Biotech,Piscataway,NJ);NCBI(National Center for Biotechnology Information);Applied Biosystems(Applied Biosystems,Foster City,CA);BD Biosciences 和/或 Clontech(BD Biosciences CLONTECH Laboratories,Palo Alto,CA);Operon Technologies(Operon Technologies,Inc.,Alameda,CA);MWG Biotech(MWG Biotech,High Point,NC);Oligos Etc(Oligos Etc.Inc,Wilsonville,OR);Bachem(Bachem Bioscience,Inc.,King of Pruss ia,PA);Difco(Difco Laboratories,Detroit,MI);Mediatech(Mediatech,Herndon,VA;Santa Cruz(Santa Cruz Biotechnology,Inc.,Santa Cruz,CA);Oxoid(Oxoid Inc.,Ogdensburg,NY);Worthington(Worthington Biochemical Corp.,Freehold,NJ);GIBCO BRL 或 Gibco BRL(Life Technologies,Inc.,Gaithersburg,MD);Millipore(Millipore,Billerica,MA);Bio-Rad(Bio-Rad,Hercules,CA);Invitrogen(Invitrogen Corp.,San Diego,CA);NEB(New England Biolabs,Ipswich,MA);Sigma(Sigma Chemical Co.,St.Louis,MO);Pierce(Pierce Biotechnology,Rockford,IL);Takara(Takara Bio Inc.Otsu,日本）;Roche(Hoffmann-La

Roche, Basel, 瑞 士) ;EM Science(EM Science, Gibbstown, NJ) ;Qiagen(Qiagen, Inc., Valencia, CA) ;Biodesign(Biodesign Intl., Saco, 缅因州) ;Aptagen(Aptagen, Inc., Herndon, VA) ;Sorvall(Sorvall brand, from Kendro Laboratory Products, Asheville, NC) ;United States Testing(United States Testing Co., Hoboken, NJ) ; Molecular Devices(Molecular Devices, Corp., Sunnyvale, CA) ;R&D Systems(R&D Systems, Minneapolis, MN) ;Stratagene(Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA) ;Marsh(Marsh Biosciences, Rochester, NY) ;Geneart(Geneart GmbH, Regensburg, Germany) ;DNA2.0(DNA2.0, Menlo Park, CA) ;Gene Oracle(Gene Oracle, Mountain View, CA) ;Bio-Tek(Bio-Tek Instruments, Winooski, VT) ;Biacore(Biacore, Inc., Piscataway, NJ) ;PeproTech(PeproTech, Rocky Hill, NJ) ;SynPep(SynPep, Dublin, CA) ;New Objective(New Objective brand ;Scientific Instrument Services, Inc., Ringoes, NJ) ;Waters(Waters, Inc., Milford, MA) ;Matrix Science(Matrix Science, Boston, MA) ;Dionex(Dionex, Corp., Sunnyvale, CA) ;Monsanto(Monsanto Co., St. Louis, MO) ;Wintershall(Wintershall AG, Kassel, 德国) ;BASF(BASF Co., Florham Park, NJ) ; Huntsman(Huntsman Petrochemical Corp., Salt Lake City, UT) ;Enichem(Enichem Iberica, Barcelona, 西 班 牙) ;Fluka Chemie AG(Fluka Chemie AG, Buchs, 瑞 士) ; Gist-Brocades(Gist-Brocades, NV, Delft, 荷 兰) ;Dow Corning(Dow Corning Corp., Midland, MI) ;和 Microsoft (Microsoft, Inc., Redmond, WA)。

[0171] 实施例 1

[0172] 测定法

[0173] 在下面的实施例中, 为了容易阅读, 使用如下给出的多种测定法。在实施例中指出了与下面提供的方案的任何偏差。

[0174] A. 用于 96 孔微量滴定板中蛋白质含量测定的 TCA 测定法

[0175] 对于 BPN’(例如, 参考蛋白酶) 和 BPN’变体, 使用在 33℃下以 230rpm 摇动并且湿润通风的条件下生长 3-4 天的微量滴定板的经过滤培养物上清液开始该测定法。新的 96 孔平底微量滴定板 (MTP) 用于该测定法。首先, 在每个孔中放置 100μL/ 孔的 0.25N HCl。然后, 加入 50μL 过滤的培养液。然后测定 405nm(在平板读出器中使用 5 秒混合模式) 下的光散射 / 吸收以便提供“空白”读数。对于测试, 将 100μL/ 孔的 15% (w/v) 三氯乙酸 (TCA) 置于平板并在室温温育 5 到 30 分钟。然后测定 405nm(在平板读出器中使用 5 秒混合模式) 下的光散射 / 吸收。

[0176] 使用的设备为 Biomek FX Robot(Beckman Coulter) 和 SpectraMAX(340 型 ; Molecular Devices)MTP 读出器 ;MTP’s 来自 Costar(type 9017)。使用的设备为 Biomek FX Robot(Beckman Coulter) 和 SpectraMAX type 340(Molecular Devices)MTP 读出器 ; 并且 MTPs 为 9017 型 (Costar)。

[0177] 通过从使用 TCA 的测试读数扣除空白 (无 TAC) 进行计算以提供样品中蛋白质含量的相对测量。如果希望, 通过用已知的转换系数用克隆的 AAPF 测定法校准 TCA 读数产生标准曲线。然而, TCA 结果可以在从 50 到 500 蛋白质 /ml(ppm) 的蛋白质浓度方面是线性的并且可以为了选择好性能的变体的目的, 针对酶性能直接作图。样品中浊度 / 光散射增加与培养物上清液中可沉淀的蛋白质的总量相关。

[0178] B.96 孔微量滴定板中的 AAPF 蛋白酶测定法

[0179] 为了测定本发明的蛋白酶及其变体的蛋白酶活性，测量 N- 琥珀酰 -L- 丙氨酰 -L- 丙氨酰 -L- 脯氨酰 -L- 苯基 - 对 - 硝基苯胺 (suc-AAPF-pNA) 的水解。使用的试剂溶液为 :100mM Tris/HCl，pH 8.6，含有 0.005％ TWEEN® -80(Tris 稀释缓冲液) ;100mM Tri 缓冲液，pH 8.6，含有 10mM $CaCl_2$ 和 0.005％ TWEEN® -80(Tris/Ca 缓冲液) ;和 DMSO 中的 160mM suc-AAPF-pNA(suc-AAPF-pNA 贮存液)(Sigma :S-7388)。为了制备 suc-AAPF-pNA 工作液，向 100ml Tris/Ca 缓冲液中加入 1ml suc-AAPF-pNA 贮存液并充分混合至少 10 秒。通过向每孔加入 10μl 稀释的蛋白酶溶液，接着立即加入 190μl 1mg/ml suc-AAPF-pNA 工作液进行测定法。溶液混合 5 秒，并在 MTP 读出器中 25℃下以动力学模式 (5 分钟内 20 次读数) 读出吸光度改变。将蛋白酶活性表达为 AU(活性＝ ΔOD • $min^{-1}ml^{-1}$)。

[0180] C. 表面活性剂和螯合剂稳定性测定法

[0181] 分别在 LAS 和 LAS/EDTA 存在下温育测试蛋白酶后测量 LAS 和 LAS/EDTA 稳定性，作为使用 AAPF 测定法测量的残留活性的函数。

[0182] LAS 稳定性方法

[0183] 试剂 :

[0184] 十二烷基苯磺酸钠盐 (＝ LAS) :Sigma D-2525

[0185] TWEEN® -80 :Sigma P-8074

[0186] TRIS 缓冲液 (无酸的) :Sigma T-1378) ;将 6.35g 溶于约 960ml 水中，用 4N HCl 将 pH 调节至 8.2。TRIS 终浓度为 52.5mM。

[0187] LAS 贮存液 :在 MQ 水中制备 10.5％ LAS 溶液 (＝ 10.5g/100ml MQ)

[0188] TRIS 缓冲液 -100mM/pH 8.6(100mM Tris/0.005％ Tween® 80)

[0189] TRIS-Ca 缓冲液，pH 8.6(100mM Tris/10mM $CaCl_2$/0.005％ Tween® 80)

[0190] 硬件 :

[0191] 平底 MTP :Costar(#9017)

[0192] Biomek FX

[0193] ASYS 多道移液器

[0194] Spectramax MTP 读数器

[0195] iEMS 培养箱 / 摇床

[0196] Innova 4330 培养箱 / 摇床

[0197] Biohit 多道移液器

[0198] BMG Thermostar 摇床

[0199] 在 52.5mM Tris 缓冲液 pH 8.2 中制备 0.063％ LAS 溶液。通过将 1ml 100mg/ml suc-AAPF-pNA 贮存液 (DMSO 中) 加入 100ml(100mM)TRIS 缓冲液，pH 8.6 中来制备 suc-AAPF-pNA 工作液。为了稀释上清液，将平底平板中装入稀释缓冲液，加入上清液等分试样并充分混合。稀释比取决于培养板中蛋白酶对照的浓度 (AAPF 活性)。期望的蛋白质浓度为 80ppm。

[0200] 将 10μl 稀释的上清液加入 190μl 0.063％ LAS 缓冲液 / 孔中。用胶带盖上 MTP，摇动几秒并置于 45℃的培养箱 (Innova 4230) 中 60 分钟，以 200rpm 摇动。在孵育 10 分钟后通过将每个孔中的 10μl 混合物转移至含有 190μl suc-AAPF-pNA 工作液的新 MTP 中来

测定起始活性（t = 10 分钟）。将这些溶液充分混合，并使用 MTP 读数器（在 5 分钟内和 25℃下读出 20 个读数）测定 AAPF 活性。

[0201] 通过在孵育 60 分钟后再将 10μl 溶液从孵育平板中取出来测定最终活性（t = 60 分钟）。如上述测定 AAPF 活性。通过如下计算残留的和初始 AAPF 活性的比例测定样品的稳定性：

[0202] 残留活性（%）= [t-60 值]*100/[t-10 值]。

[0203] LAS/EDTA 稳定性方法

[0204] 在确定的条件下温育后测量代表性阴离子表面活性剂（LAS = 直链烷基苯磺酸盐，，十二烷基苯磺酸钠 -DOBS）和 EDTA 二钠存在下蛋白酶变体的稳定性并使用 AAPF 测定法测量残留活性。使用的试剂为十二烷基磺酸钠盐（DOBS，Sigma No.D-2525），TWEEN®-80（Sigma No.P-8074），EDTA 二 钠（Siegfried Handel No.164599-02），HEPES（Sigma No.H-7523），非胁迫缓冲液：50mM HEPES（11.9g/l）+0.005% TWEEN®-80，pH 8.0，胁迫缓冲液：50mM HEPES（11.9g/l），0.1%（w/v）DOBS（1g/l），10mM EDTA（3.36g/l），pH 8.0，参考蛋白酶和蛋白酶变体培养物上清液，含有 200-400μg/ml 蛋白质。使用的设备为 V- 或 U- 底 MTP 作为稀释平板（分别为 Greiner 651101 和 650161），F- 底 MTP（Corning 9017）用于非胁迫和 LAS/EDTA 缓冲液以及用于 suc-AAPF-pNA 平板，Biomek FX（Beckman Coulter），Spectramax Plus 384 MTP 读出器（Molecular Devices），iEMS 培养箱 / 摇床（1mm 振幅）（Thermo Electron Corporation），密封带：Nunc（236366）。

[0205] iEMS 培养箱 / 摇床（Thermo/Labsystems）设置在 29℃。将培养物上清液稀释到含有无胁迫缓冲液的平板中至～ 25ppm（主稀释平板）的浓度。将来自主稀释平板的 20μl 样品加入含有 180μl 非胁迫缓冲液的平板中以得到 2.5ppm 的最终温育浓度。将内含物混合并保持在室温，在该平板上进行 AAPF 测定法。向含有 180μl 胁迫缓冲液（50mM HEPES（11.9g/l），0.1%（w/v）DOBS（1g/l），10mM EDTA（3.36g/l），pH 8.0）的 180μl 胁迫缓冲液的平板加入来自主稀释平板的 20μl 样品。混合溶液并立即置于 29℃ iEMS 摇床中 400rpm 下 30 分钟。温育 30 分钟后，在胁迫平板上进行 AAPF 测定法。如下通过计算残留的和最初 AAPF 活性的比例测定样品的稳定性：残留活性（%）= [mOD.min-1 胁迫的]*100/[mOD.min-1 非胁迫的]。

[0206] D. 清洁性能测定法

[0207] 在可商购洗涤剂中测定蛋白酶变体的污物去除性能。商业洗涤剂配方产品的热失活用于破坏任何蛋白质组分的酶活性而保留非酶组分的性质。从而，该方法适于制备商购的洗涤剂用于测试本发明的酶变体。

[0208] 微样品：

[0209] 从 CFT（Vlaardingen，The Netherlands）订购得到 1/4”圆形直径的微样品。将单个微样品或两个微样品垂直置于 96 孔 MTP 的每孔中以暴露整个表面区域（即，在孔底部上不是平的）。

[0210] BMI 微样品测定法

[0211] 从 CFT 得到 0.25 英寸圆形直径的含有血、奶和墨（BMI）的微样品。在切割样品前，将织物（EMPA 116）用水洗涤。将一个微样品垂直置于 96 孔微量滴定板的每孔中以暴露整个表面区域（即，在孔底部上不是平的）。如本文所述的制备希望的洗涤剂溶液。在

25℃平衡 Thermomixer 后，向含有微样品的 MTP 的每孔加入 190μl 洗涤剂溶液。向该混合物中加入 10μl 稀释的酶溶液，使得最终酶浓度为 1μg/ml（从 BCA 测定法测定）。将 MTP 用胶带封闭并置于培养箱中 30 分钟，在 1400rpm 下搅拌。在合适条件下温育后，从每孔转移 100μl 溶液到新的 MTP 中。该含有 100μl 溶液 / 孔的新的 MTP 用 MTP SpectraMax 读出器在 405nm 下读数。也包括空白对照，以及含有两个微样品和洗涤剂但是没有酶的对照。

[0212] “预洗的”样品

[0213] 该类型的微样品在室温下在去离子水中预洗 20 分钟。预洗步骤后，将样品置于纸巾上方干燥。然后将风干的样品用 1/4”圆形模子在冲击式打孔器 (expulsion press) 上打孔。最后，将两个微样品垂直置于 96 孔 MTP 的每个孔中以暴露整个表面区域（即，在孔的底部上不是平的）。

[0214] 洗涤剂

[0215] 对于北美 (NA) 和西欧 (WE) 重负荷液体洗衣 (HDL) 洗涤剂，通过将预先称重的液体洗涤剂（玻璃瓶中）置于水浴中 95℃下 2 小时进行热失活。洗涤剂购自当地超市商店。溶解洗涤剂 5 分钟内测定未加热和加热的洗涤剂以准确测定去活化的百分比。通过 AAPF 测定法测定酶活性。

[0216] 为测定热失活洗涤剂中的酶活性，洗涤剂的工作溶液由热失活的贮存液制备。向洗涤剂溶液中加入合适量的水硬度 (6gpg) 和缓冲剂以匹配希望的条件。通过涡旋或者倒置瓶子混合溶液。

[0217] 酶和设备

[0218] 从生长在 MTP 平板中的培养物的过滤培养液得到参考丝氨酸蛋白酶及其变体的样品。使用的设备为 Biomek FX Robot(Beckman Coulter)，SpectraMAX MTP 读出器 (type 340 ;Molecular Devices)，iEMS 培养箱 / 摇床 (Thermo/Labsystems) ;F- 底 MTPs(Costar 9017 型，用于温育后对反应平板读数）；和 V- 底 MTPs(Greiner 651101，用于上清液的预稀释）。在该测定法中，蛋白酶水解底物并从底物释放色素和不溶性颗粒。从而，浊度率为酶活性的度量。

[0219] 在可商购的热失活洗涤剂中在 MTP 规模上测定参考丝氨酸蛋白酶和其变体对微样品的污物去除性能。使用的试剂为 5mM HEPES，pH 8.0 或 5mM MOPS，pH 7 缓冲液，对于中等水硬度为 3 ： 1 Ca ： Mg。($CaCl_2$:$MgCl2 \cdot 6H2O$) ;15000 格令 / 加仑 (gpg) 贮存液稀释到 6gpg，2BMI（血 / 奶 / 墨）微样品 / 平板 :通过 CFT 处理的 EMPA-116BMI 棉样品 :每孔预冲洗并打孔的 2 个样品，热失活的 TIDE ® 2X Cold 现货洗涤剂，其中证实了缺少蛋白酶活性。

[0220]

表 1-2 工作洗涤剂溶液						
洗涤剂	温度 (C)	洗涤剂 g/L	pH	缓冲液	gpg	蛋白酶
TIDE® 2X Cold	16	0.98	8	5mM HEPES	6	BPN'
TIDE® 2X Cold	32	0.98	8	5mM HEPES	6	GG36, BPN'
TIDE® 2X Cold	16	0.98	7	5mM MOPS	6	BPN'

[0221] 将培养箱设置在希望的温度(16℃或32℃)。将～10ppm酶的主稀释平板的10μL样品加入具有上面列出的190μL工作洗涤剂溶液的BMI 2-样品平板。调节体积到测定平板中变体的终浓度为0.5ppm。立即将平板转移到iEMS培养箱中并在给定温度下以1400rpm摇动温育30分钟。温育后,转移100μL上清液到新的96孔板并在MTP读出器中405nm和/或600nm下测量吸光度。在测试中也包括对照孔,其含有1或2个微样品和没有加入蛋白酶样品的洗涤剂。405nm下的测量提供了较高的值并且跟踪了色素去除,而600nm下的测量跟踪浊度和清洁。

[0222] 为所有微样品测定方法计算污物去除活性:

[0223] 为空白值(没有酶的底物)校正所得的吸光度值,提供了水解活性的度量。对于每种样品(变体),计算性能指数。性能指数比较在相同蛋白质浓度下变体(实际值)和标准酶(理论值)的性能。此外,使用标准酶的朗缪尔方程的参数可以计算理论值。

[0224] E. 蛋白酶及其变体的相对比活性

[0225] 为了区分蛋白酶变体,使用suc-AAPF-pNA作为底物计算相对比活性,其使得能够比较并排序变体与野生型或标准蛋白酶。通过将蛋白水解活性除以使用上述测定法测量的每种样品的TCA值确定对suc-AAPF-pNA底物的比活性。使用这些值,计算相对比活性(变体的比活性/参考蛋白酶的比活性)。

[0226] F. 性能指数

[0227] 性能指数比较相同蛋白质浓度下变体(实际值)和标准或参考蛋白酶(理论值)的性能。此外,使用标准蛋白酶的结合曲线(即朗缪尔方程)的参数可以计算理论值。大于1的性能指数(PI)(PI ＞ 1)鉴定与标准品(例如野生型)相比更好的变体,而PI 1(PI ＝ 1)将变体鉴定为性能与标准品相同,小于1的PI(PI ＜ 1)鉴定比标准品更差的变体。从而,PI鉴定在某些条件下的成功者,以及较不希望使用的变体。

[0228] 实施例2

[0229] BPN'多突变文库(MML)变体的污物去除性能

[0230] BPN'多突变文库(或者组合文库)由Geneart或DNA 2.0使用BPN'作为亲本蛋白产生。如实施例1所述通过TCA沉淀测定培养上清液的蛋白质浓度。使用实施例1描述的方法,使用下面的修饰,在洗衣应用中pH8/16℃,pH 7/16℃和pH 8/32℃下测试变体对EMPA 116样品(BMI污物,CFT)的污物去除性能。使用的测试洗涤剂为热失活的TIDE®2X Cold洗涤剂(Procter & Gamble),如实施例1所述制备。商业洗涤剂配方产品的热失活用

于破坏任何蛋白质组分的内源酶活性而保留非酶组分的性质。通过将预称重量的液体洗涤剂（玻璃瓶中）置于水浴中 95℃下 2 小时进行洗涤剂的热失活。洗涤剂购自当地超市商店。在溶解洗涤剂的 5 分钟内测定未加热和加热的洗涤剂，以便准确测定失活百分比。通过 AAPF 测定法测试酶活性。将 BPN'变体的功能性定量为性能指数 (Pi)（即变体相对于亲本 BPN' 的性能比例）。结果在表 2-1 中显示。对于一种或多种 BMI 污物去除性能测试和 / 或 TCA 沉淀显示出大于或等于 0.5 的 Pi 值的 BPN' 变体显示出提高的清洁益处和 / 或表达。小于或等于 0.05 的性能指数被固定为 0.05 并且在表中以粗斜体标出。对于 TCA 蛋白质性能指数小于或等于 0.05 的每种变体，将所有值固定为 0.05。

[0231]

表 2-1. 表达 (TCA) 和去污性能 (BMI pH 8/16℃, BMI pH 7/16℃, 和 BMI pH 8/32℃) 检测中的 BPN' 变体的 P_i 值

变体编码	TCA	BMI pH 8/16℃	BMI pH 7/16℃	BMI pH 8/32℃
亲本 BPN'	1.00	1.00	1.00	1.00
FNA (BPN' Y217L)	1.01	1.12	1.08	1.08
G97A-G128A-Y217Q	1.33	1.4	1.24	1.23
G97A-L126A-G128A	0.56	0.83	0.85	0.89
G97A-L126A-G128A-Y217Q	0.45	0.57	0.79	0.79
G97A-L126A-Y217Q	1.11	1.32	1.24	1.23
G97A-M124V-G128A	0.63	1.16	1.1	1.07
G97A-M124V-G128A-Y217Q	0.52	1.12	1.04	1.06
G97A-M124V-L126A	1.63	1.29	1.21	1.18
G97A-M124V-L126A-G128A	0.66	1.04	1.15	0.95
G97A-M124V-L126A-Y217Q	1.79	1.35	1.22	1.16
G97A-M124V-Y217Q	0.72	***0.05***	***0.05***	***0.05***
G97A-N123G-G128A	0.5	0.54	0.55	0.55
G97A-N123G-G128A-Y217Q	0.36	0.5	0.59	0.53
G97A-N123G-L126A	0.64	0.46	0.4	0.65
G97A-N123G-L126A-G128A	0.47	***0.05***	0.12	***0.05***
G97A-N123G-L126A-Y217Q	0.62	0.24	0.38	0.43
G97A-N123G-M124V	0.38	0.38	0.34	0.53
G97A-N123G-M124V-G128A	0.36	***0.05***	***0.05***	***0.05***
G97A-N123G-M124V-L126A	0.58	0.4	0.4	0.49
G97A-N123G-M124V-Y217Q	***0.05***	***0.05***	***0.05***	***0.05***

[0232]

表 2-1. 表达(TCA)和去污性能(BMI pH 8/16℃, BMI pH 7/16℃,和 BMI pH 8/32℃)检测中的 BPN' 变体的 P_i 值

变体编码	TCA	BMI pH 8/16℃	BMI pH 7/16℃	BMI pH 8/32℃
G97A-N123G-Y217Q	0.55	1.35	1.24	1.13
L126A-G128A-Y217Q	0.56	0.8	0.84	0.79
L96T-G128A-Y217Q	0.3	0.28	0.32	0.58
L96T-G97A-G128A	0.39	0.41	0.3	0.54
L96T-G97A-G128A-Y217Q	0.5	0.21	0.34	0.5
L96T-G97A-L126A	0.47	0.16	0.1	0.32
L96T-G97A-L126A-G128A	0.43	0.1	0.19	0.09
L96T-G97A-L126A-Y217Q	0.59	*0.05*	0.11	*0.05*
L96T-G97A-M124V	0.49	1.17	1.03	1.02
L96T-G97A-M124V-G128A	0.54	0.19	0.31	0.32
L96T-G97A-M124V-L126A	0.88	0.34	0.52	0.57
L96T-G97A-M124V-Y217Q	0.43	1.08	1.06	0.95
L96T-G97A-N123G	0.35	0.13	0.09	0.21
L96T-G97A-N123G-G128A	0.44	*0.05*	0.06	*0.05*
L96T-G97A-N123G-L126A	0.48	*0.05*	*0.05*	*0.05*
L96T-G97A-N123G-M124V	0.49	0.22	0.28	0.24
L96T-G97A-N123G-Y217Q	0.49	*0.05*	0.22	0.07
L96T-G97A-Y217Q	0.46	1.3	1.11	1.08
L96T-L126A-G128A	0.56	*0.05*	*0.05*	*0.05*
L96T-L126A-G128A-Y217Q	0.42	*0.05*	0.06	*0.05*
L96T-L126A-Y217Q	0.51	0.11	0.06	0.36
L96T-M124V-G128A	0.49	0.59	0.53	0.67
L96T-M124V-G128A-Y217Q	0.42	0.34	0.54	0.51
L96T-M124V-L126A	0.68	0.62	0.6	0.79
L96T-M124V-L126A-G128A	0.48	*0.05*	0.08	0.09
L96T-M124V-L126A-Y217Q	0.73	0.43	0.53	0.67
L96T-M124V-Y217Q	0.51	1.23	1.06	1.03
L96T-N123G-G128A	0.48	*0.05*	*0.05*	*0.05*
L96T-N123G-G128A-Y217Q	0.49	*0.05*	0.09	0.08
L96T-N123G-L126A	0.43	*0.05*	*0.05*	*0.05*
L96T-N123G-L126A-G128A	0.48	*0.05*	*0.05*	*0.05*
L96T-N123G-L126A-Y217Q	0.35	*0.05*	*0.05*	*0.05*
L96T-N123G-M124V	0.51	*0.05*	*0.05*	0.07
L96T-N123G-M124V-G128A	0.41	*0.05*	0.06	*0.05*
L96T-N123G-M124V-L126A	0.42	0.06	0.14	*0.05*
L96T-N123G-M124V-Y217Q	0.48	0.06	0.12	0.14

表 2-1. 表达(TCA)和去污性能(BMI pH 8/16℃, BMI pH 7/16℃,和 BMI pH 8/32℃)检测中的 BPN' 变体的 P_i 值

变体编码	TCA	BMI pH 8/16℃	BMI pH 7/16℃	BMI pH 8/32℃
L96T-N123G-Y217Q	0.45	0.15	*0.05*	0.27
M124V-G128A-Y217Q	0.77	1.27	1.18	1.03
M124V-L126A-G128A	0.72	1.12	1.1	1.02
M124V-L126A-G128A-Y217Q	0.52	1.21	1.22	1.12
M124V-L126A-Y217Q	1.71	1.39	1.16	1.17
N123G-G128A-Y217Q	0.13	1	1.25	1.08
N123G-L126A-G128A	0.49	0.13	0.17	0.33
N123G-L126A-G128A-Y217Q	0.39	0.13	0.11	0.21
N123G-L126A-Y217Q	0.91	0.37	0.43	0.55
N123G-M124V-G128A	0.6	*0.05*	0.13	0.38
N123G-M124V-G128A-Y217Q	0.63	*0.05*	*0.05*	*0.05*
N123G-M124V-L126A	0.81	0.48	0.44	0.62
N123G-M124V-L126A-G128A	0.46	0.24	0.47	0.44
N123G-M124V-L126A-Y217Q	0.71	0.35	0.44	0.48
N123G-M124V-Y217Q	0.6	0.35	0.42	0.51
N62Q-G128A-Y217Q	0.69	1.3	1.2	1.13
N62Q-G97A-G128A	0.69	1.15	1.14	1.07
N62Q-G97A-G128A-Y217Q	0.67	1.15	1.17	0.98
N62Q-G97A-L126A	0.94	0.74	0.74	0.96
N62Q-G97A-L126A-G128A	0.47	*0.05*	0.23	0.28
N62Q-G97A-L126A-Y217Q	0.87	0.58	0.77	0.72
N62Q-G97A-M124V	1.17	1.19	1.08	1.11
N62Q-G97A-M124V-G128A	0.57	0.52	0.62	0.64
N62Q-G97A-M124V-L126A	1.21	1.03	1.08	1.03
N62Q-G97A-M124V-Y217Q	0.94	1.21	1.14	1.04
N62Q-G97A-N123G	0.37	0.58	0.56	0.58
N62Q-G97A-N123G-G128A	0.44	*0.05*	0.08	0.09
N62Q-G97A-N123G-L126A	0.53	*0.05*	0.07	0.06
N62Q-G97A-N123G-M124V	0.37	*0.05*	0.07	*0.05*
N62Q-G97A-N123G-Y217Q	0.51	0.72	0.8	0.72
N62Q-G97A-Y217Q	1.72	1.38	1.18	1.32
N62Q-L126A-G128A	0.48	0.12	0.13	0.36
N62Q-L126A-G128A-Y217Q	0.47	0.08	0.27	0.15
N62Q-L126A-Y217Q	0.99	0.93	0.95	1
N62Q-L96T-G128A	0.48	0.2	0.1	0.31
N62Q-L96T-G128A-Y217Q	0.9	0.11	0.26	0.27

[0233]

表 2-1. 表达(TCA)和去污性能(BMI pH 8/16℃, BMI pH 7/16℃,和 BMI pH 8/32℃)检测中的 BPN' 变体的 P_i 值

[0234]

变体编码	TCA	BMI pH 8/16℃	BMI pH 7/16℃	BMI pH 8/32℃
N62Q-L96T-G97A	0.48	0.88	0.82	0.9
N62Q-L96T-G97A-G128A	0.53	0.15	0.2	0.25
N62Q-L96T-G97A-L126A	0.58	*0.05*	0.16	0.14
N62Q-L96T-G97A-M124V	0.64	0.68	0.74	0.72
N62Q-L96T-G97A-N123G	0.37	0.09	0.25	0.14
N62Q-L96T-G97A-Y217Q	0.57	0.85	0.74	0.83
N62Q-L96T-L126A	0.5	*0.05*	*0.05*	*0.05*
N62Q-L96T-L126A-G128A	0.51	0.09	0.2	0.18
N62Q-L96T-L126A-Y217Q	0.43	*0.05*	0.19	0.23
N62Q-L96T-M124V	0.44	0.78	0.72	0.79
N62Q-L96T-M124V-G128A	0.74	*0.05*	0.14	0.11
N62Q-L96T-M124V-L126A	0.7	0.25	0.3	0.44
N62Q-L96T-M124V-Y217Q	0.55	0.73	0.78	0.76
N62Q-L96T-N123G	0.36	*0.05*	*0.05*	0.06
N62Q-L96T-N123G-G128A	0.44	*0.05*	*0.05*	*0.05*
N62Q-L96T-N123G-L126A	0.42	*0.05*	0.14	0.18
N62Q-L96T-N123G-M124V	0.41	*0.05*	*0.05*	*0.05*
N62Q-L96T-N123G-Y217Q	0.5	*0.05*	0.08	*0.05*
N62Q-L96T-Y217Q	0.58	0.86	0.64	0.85
N62Q-M124V-G128A	0.46	0.75	0.71	0.71
N62Q-M124V-G128A-Y217Q	0.45	0.43	0.59	0.46
N62Q-M124V-L126A	1.62	1.2	1.06	1.09
N62Q-M124V-L126A-G128A	0.51	0.23	0.45	0.42
N62Q-M124V-L126A-Y217Q	0.97	*0.05*	0.09	*0.05*
N62Q-M124V-Y217Q	1.04	1.22	1.09	0.89
N62Q-N123G-G128A	0.41	*0.05*	*0.05*	0.06
N62Q-N123G-G128A-Y217Q	0.43	*0.05*	0.13	0.09
N62Q-N123G-L126A	0.55	*0.05*	*0.05*	0.14
N62Q-N123G-L126A-G128A	0.5	*0.05*	*0.05*	*0.05*
N62Q-N123G-L126A-Y217Q	0.54	*0.05*	0.09	*0.05*
N62Q-N123G-M124V	0.48	*0.05*	*0.05*	*0.05*
N62Q-N123G-M124V-G128A	0.45	*0.05*	*0.05*	*0.05*
N62Q-N123G-M124V-L126A	0.34	*0.05*	0.11	0.07
N62Q-N123G-M124V-Y217Q	0.41	*0.05*	0.08	0.1
N62Q-N123G-Y217Q	0.49	0.97	0.8	0.92

[0235] 实施例 3

[0236] 在 97-128-217 位的饱和文库和其他突变

[0237] 通过 DNA 2.0 制备 BPN'（亲本）中 97-128-217 位的饱和文库。如实施例 1 中描述的 TCA 沉淀测定培养上清的蛋白质浓度。在 EMPA 116 样品 (BMI 污垢,CFT) 上进行洗衣应用检测变体的去污性能,在 pH 8/16℃使用实施例 1 中描述的方法,如实施例 2 中所述。如实施例 1 中所述通过 AAPF 试验检测酶活性。BPN' 变体的功能性通过性能指标 (Pi)（即变体相对 FNA 的性能比率）定量。结果显示于表 3-1。BPN' 变体在 BMI 去污性能检测中显示了大于或等于 0.5 的 Pi 值和 / 或 TCA 沉淀显示了改进的清洁益处和 / 或表达。

[0238]

表 3-1: 蛋白质测定(TCA)和去污性能(BMI pH 8/16℃)检测中的 BPN' 变体的 P_i 值

变体编号	变体	TCA	BMI pH 8 16℃
1	G97N-G128A-Y217M	1.09	1.43
2	G97G-G128S-Y217E	1.53	1.39
3	G97A-G128A-Y217Q	1.34	1.36
4	G97M-G128S-Y217E	1.20	1.35
5	G97A-G128S-Y217Q	1.90	1.33
6	G97D-G128S-Y217Q	1.55	1.33
7	G97M-G128G-Y217M	1.61	1.33
8	G97G-G128S-Y217Q	1.64	1.32
9	G97S-G128S-Y217Q	1.52	1.32
10	G97G-G128A-Y217Q	1.33	1.30
11	G97S-G128A-Y217E	1.03	1.30
12	G97A-G128S-Y217L	2.18	1.29
13	G97A-G128A-Y217N	1.22	1.28
14	G97Q-G128S-Y217L	1.89	1.28
15	G97A-G128A-Y217M	1.45	1.28
16	G97A-G128A-Y217S	1.35	1.27
17	G97D-G128A-Y217Q	1.14	1.27
18	G97M-G128S-Y217Q	0.99	1.27
19	G97Q-G128G-Y217D-S87Y	1.45	1.27
20	G97S-G128A-Y217N	1.09	1.27
21	G97A-G128S-Y217T	1.61	1.27
22	G97D-G128S-Y217E	1.01	1.27
23	G97D-G128A-Y217L	1.38	1.26
24	G97G-G128S-Y217E-S78P-A272T	1.00	1.26
25	G97T-G128S-Y217D	1.13	1.26

[0239]

表 3-1: 蛋白质测定(TCA)和去污性能(BMI pH 8/16℃)检测中的 BPN' 变体的 P_i 值			
变体编号	变体	TCA	BMI pH 8 16℃
26	G97D-G128A-Y217I	0.99	1.26
27	G97Q-G128S-Y217Q	1.59	1.26
28	G97G-G128A-Y217D	1.12	1.25
29	G97Q-G128A-Y217N	1.09	1.25
30	G97S-G128A-Y217M	1.41	1.25
31	G97S-G128S-Y217N	1.55	1.25
32	G97S-G128S-Y217M	1.53	1.25
33	G97E-G128S-Y217M	1.58	1.24
34	G97S-G128P-Y217Q	0.99	1.24
35	G97T-G128S-Y217Q	1.06	1.24
36	G97D-G128S-Y217Q-A73T	1.18	1.23
37	G97E-G128S-Y217N	1.24	1.23
38	G97G-G128A-Y217I	1.51	1.23
39	G97Q-G128A-Y217D	1.14	1.23
40	G97Q-G128S-Y217M	1.98	1.23
41	G97R-G128T-Y217Q-S162P	0.68	1.23
42	G97S-G128S-Y217D	1.50	1.23
43	G97T-G128P-Y217I	1.30	1.23
44	G97Q-G128G-Y217E	1.58	1.23
45	G97C-G128G-Y217N	1.26	1.22
46	G97D-G128S-Y217H	1.49	1.22
47	G97M-G128S-Y217L	1.02	1.22
48	G97M-G128S-Y217N	0.98	1.21
49	G97S-G128S-Y217E	0.59	1.21
50	G97M-G128S-Y217I	1.11	1.19
51	G97A-G128P-Y217A	0.84	1.18
52	G97R-G128S-Y217D	0.95	1.16
53	G97D-G128A-Y217D	0.75	1.15
54	G97V-G128G-Y217D	0.71	1.14
55	G97V-G128G-Y217E	0.72	1.13
56	G97A-G128G-Y217T	1.29	1.12
57	G97G-G128N-Y217L	0.82	1.12
58	G97D-G128A-Y217T	0.69	1.11
59	G97M-G128A-Y217E	0.64	1.11
60	G97M-G128A-Y217N	0.58	1.06
FNA	G97G-G128G-Y217L	1.00	1.00

[0240] 实施例 4

[0241] 其他文库设计和变体的去污性能

[0242] 通过 Geneart 或 Gene Oracle 制备其他 BPN' 多重突变文库，使用 BPN' : G97A-G128A-Y217Q 蛋白质作为亲本分子。实验结果用于测定去污活性（微样品试验以测

定在洗衣应用中的去污性能，使用 EMPA 116 样品 (BMI 污垢，CFT Vlaardingen)(BMI pH8，BMI pH7，BMI 32℃))，BPN' 变体的 TCA 沉淀蛋白质测定和 LAS/EDTA 稳定性（目的性质的检测）显示于表 4-1、4-2、4-3 和 4-4。

[0243] 使用具有以下修饰的实施例 1 中描述的方法进行去污性能试验得到结果。使用的检测洗涤剂为热失活的 TIDE ® 2X Cold 洗涤剂 (Procter & Gamble，Cincinnati，OH，USA)

[0244] 热失活的商业洗涤剂配方用于破坏任意蛋白质组分的酶活性，同时保留非酶组分的性质。通过将预称重的液体洗涤剂（在玻璃瓶中）在 95℃水浴 2 小时对洗涤剂进行热失活。所述洗涤剂购自当地的超市商店。未加热和加热的洗涤剂都在溶解洗涤剂 5 分钟内进行试验以准确测定失活百分比。通过 AAPF 试验检测酶活性。如本文一贯描述的，BPN' 变体的功能性通过性能指标 (Pi) 定量，其为变体和亲本蛋白质 BPN′ :G97A-G128A-Y217Q 的性能比率。BPN′ :G97A-G128A-Y217Q 变体在 BMI 去污性能中显示了大于或等于 0.5 的 Pi 值和 / 或 TCA 沉淀显示了改进的清洁益处和 / 或表达。将低于或等于 0.05 的性能指标固定为 0.05，在表中以加粗斜体表示。

[0245]

表 4-1: 多重突变变体 BPN′: G97A-G128A-Y217Q 亲本的去污性能

变体	BMI pH 8	BMI pH 7	BMI 32℃	TCA
S145D	1.06	1.03	1.18	0.96
P239R	1.03	0.98	1.11	0.67
N61E P129E S162K K213L N240K	1.02	0.93	1.05	0.98
N61E	1.02	0.98	1.09	1.33
P40E A144K K213L	1.01	0.92	0.91	0.80
P129E	0.99	1.01	1.03	1.04
N61E P129E S159K	0.99	0.98	1.07	1.19
K213L	0.98	1.00	1.03	1.06
S87D	0.98	1.03	1.02	0.75
Q206E	0.97	0.96	0.98	1.01
S24R P40E S145D S159K K213L	0.97	0.96	0.98	0.91
K265N	0.96	1.00	1.00	0.93

[0246]

表 4-1：多重突变变体 BPN'：G97A-G128A-Y217Q 亲本的去污性能

变体	BMI pH 8	BMI pH 7	BMI 32℃	TCA
S24R	0.96	0.87	0.99	0.99
P40E	0.96	0.96	0.96	0.80
Q275E	0.95	1.01	0.95	0.99
P129E S145D N240K	0.95	0.97	0.98	0.82
A144K	0.95	0.87	0.95	0.93
S159K	0.94	0.90	0.96	1.03
S162K	0.94	0.92	1.01	0.96
N240K	0.94	0.92	1.03	0.71
S24R S87D Q206E	0.90	0.95	0.98	0.83
S87D S162K K265N	0.89	0.96	0.93	0.64
N61E S145D S162K K213L T242R	0.88	0.95	0.89	0.72
S87D A144K S145D S159K Q275E	0.88	0.91	0.96	0.72
S24R S87D A144K K265N Q275E	0.88	0.94	0.93	0.55
T242R	0.87	0.84	0.83	0.53
P40E N61E P129E A144K S162K K213L N240K	0.85	0.88	0.89	0.64
S24R P40E N61E A144K Q206E K213L T242R	0.85	0.81	0.91	0.45
P129E P239R K265N	0.83	0.93	0.86	0.59
S24R P129E Q206E N240K K265N	0.81	0.86	0.82	0.63
P40E S145D S159K S162K K213L P239R Q275E	0.78	0.82	0.83	0.47
Q103E	0.67	0.84	0.72	0.46
S87D T242R Q275E	0.60	0.74	0.62	0.38
P129E S145D N240K T242R K265N	0.58	0.72	0.68	0.37
N62R	0.58	0.63	0.64	0.44
P40E N61E S87D S162K T242R	0.55	0.62	0.58	0.29
P40E N61E S87D P129E S159K S162K T242R	0.52	0.47	0.57	0.27
P40E N61E Q103E A144K S159K S162K Q275E	0.44	0.50	0.53	0.30
N61E Q103E N240K	0.44	0.62	0.51	0.42
S87D T242R K265N	0.42	0.60	0.48	0.28
Q103E S162K Q206E K213L P239R	0.42	0.53	0.46	0.31
P40E N61E Q103E S159K S162K K213L P239R	0.39	0.43	0.50	0.25
P40E N61E Q103E S159K S162K K213L N240K	0.38	0.40	0.49	0.26
N61E Q103E A144K K213L T242R	0.36	0.38	0.49	0.27
N62R K265N Q275E	0.29	0.42	0.32	0.38
N62R S159K Q206E K265N Q275E	0.26	0.35	0.33	0.35
S24R Q103E P129E N240K K265N	0.24	0.29	0.27	0.24
N62R S87D P129E S145D S159K S162K Q275E	0.24	0.25	0.33	0.30
Q103E P129E T242R	0.23	0.28	0.31	0.28
S24R N61E Q103E P129E K213L N240K T242R	0.22	0.15	0.27	0.25
P40E N62R S145D S159K S162K Q206E Q275E	0.21	0.24	0.31	0.32

表 4-1：多重突变变体 BPN′：G97A-G128A-Y217Q 亲本的去污性能

变体	BMI pH 8	BMI pH 7	BMI 32℃	TCA
S24R P40E N61E S87D Q103E S159K S162K K213L N240K	0.19	0.21	0.25	0.23
N62R S87D S145D S159K S162K K265N Q275E	0.19	0.22	0.19	0.33
P40E N61E N62R S87D S159K S162K K265N	0.18	0.19	0.21	0.28
N61E S87D Q103E S159K S162K K213L T242R	0.17	0.13	0.17	0.25
N61E Q103E P129E P239R N240K	0.14	0.18	0.23	0.33
P40E N62R S87D S145D S159K S162K Q275E	0.14	0.14	0.27	0.33
S24R N62R S87D S145D K265N	0.13	0.22	0.16	0.32
N62R S87D S145D S159K S162K K213L N240K K265N Q275E	0.11	0.11	0.12	0.32
S24R N61E Q103E P129E Q206E P239R N240K	0.09	*0.05*	*0.05*	0.26
N61E Q103E A144K Q206E K213L N240K T242R	0.07	*0.05*	0.15	0.31
S24R Q103E P129E S145D P239R N240K K265N	0.06	*0.05*	*0.05*	0.26
S24R N61E Q103E P129E Q206E K213L P239R N240K T242R	*0.05*	*0.05*	*0.05*	0.43
N61E Q103E P129E K213L P239R N240K T242R	*0.05*	*0.05*	*0.05*	0.38
P40E N62R S87D Q103E A144K S159K Q275E	*0.05*	*0.05*	*0.05*	0.25
N61E N62R S87D Q103E S159K S162K K213L T242R Q275E	*0.05*	*0.05*	*0.05*	0.33
S24R P40E N61E Q103E P129E A144K K213L P239R N240K T242R K265N	*0.05*	*0.05*	*0.05*	0.36
S24R Q103E P129E S145D Q206E P239R N240K T242R K265N	*0.05*	*0.05*	*0.05*	0.38
P40E N62R S87D Q103E S162K	*0.05*	*0.05*	*0.05*	0.29
N61E Q103E Q206E K213L P239R N240K T242R	*0.05*	*0.05*	*0.05*	0.32
S24R P40E N61E Q103E P129E A144K Q206E K213L P239R N240K T242R	*0.05*	*0.05*	*0.05*	0.37
S24R N61E Q103E P129E A144K S145D Q206E K213L P239R N240K T242R	*0.05*	*0.05*	*0.05*	0.38
S24R N61E Q103E P129E S145D P239R N240K T242R K265N	*0.05*	*0.05*	*0.05*	0.35
S24R P40E N61E Q103E P129E A144K S145D K213L P239R N240K T242R	*0.05*	*0.05*	*0.05*	0.34
N61E S87D Q103E P129E S159K S162K K213L N240K T242R	*0.05*	*0.05*	*0.05*	0.25
S24R P40E N61E S87D Q103E P129E A144K S162K Q206E K213L P239R N240K T242R	*0.05*	*0.05*	*0.05*	0.35
S24R N61E S87D Q103E P129E A144K Q206E K213L P239R N240K T242R	*0.05*	*0.05*	*0.05*	0.34
S24R N62R P129E S145D P239R K265N Q275E	*0.05*	*0.05*	*0.05*	0.28

[0247]

[0248]

表 4-1：多重突变变体 BPN′：G97A-G128A-Y217Q 亲本的去污性能				
变体	BMI pH 8	BMI pH 7	BMI 32℃	TCA
P40E N61E S87D Q103E S145D S159K S162K K213L P239R N240K T242R	*0.05*	*0.05*	*0.05*	0.30
P40E N61E Q103E P129E A144K S162K Q206E K213L P239R N240K T242R	*0.05*	*0.05*	*0.05*	0.37
S24R N62R P129E Q206E N240K K265N Q275E	*0.05*	*0.05*	*0.05*	0.28
P40E N62R S87D S145D S159K S162K N240K K265N Q275E	*0.05*	*0.05*	*0.05*	0.27
P40E N62R S87D S159K S162K K265N Q275E	*0.05*	0.06	0.06	0.30
S24R P40E N61E Q103E P129E S162K Q206E K213L P239R N240K T242R	*0.05*	*0.05*	*0.05*	0.37
N61E Q103E P129E A144K Q206E K213L P239R N240K T242R	*0.05*	*0.05*	*0.05*	0.34
S24R P40E N61E S87D Q103E P129E A144K K213L P239R N240K T242R	*0.05*	*0.05*	*0.05*	0.33
P40E N61E Q103E P129E A144K K213L P239R N240K T242R	*0.05*	*0.05*	*0.05*	0.34
S24R N61E Q103E P129E A144K Q206E K213L P239R N240K T242R K265N	*0.05*	*0.05*	*0.05*	0.43

[0249] 检测了 BPN’多重突变文库的 LAS/EDTA 稳定性，并与 BPN′ :G97A-G128A-Y217Q 比较。除了压力缓冲液包含 0.1% LAS+10mM EDTA 和压力板在 40℃孵育 30 分钟以外，LAS/EDTA 试验按实施例 1 中描述的 LAS 稳定性试验进行。BPN’变体的功能性通过性能指标 (Pi) 定量，其为变体和亲本蛋白质 BPN′ :G97A-G128A-Y217Q 的性能比率。结果显示于表 4-2。

[0250]

表 4-2：多重突变变体 BPN′：G97A-G128A-Y217Q 亲本的去污性能								
变体	突变				BMI pH8	BMI pH7	TCA	LAS/EDTA
LHS1	S53G				1.05	1.03	1.18	0.98
LHS2	F58G				0.38	0.43	0.50	0.99
LHS3	S78N				0.99	1.00	1.00	1.50
LHS4	Y104N				0.36	0.53	0.73	1.49
LHS5	I111V				0.91	0.95	0.75	1.19
LHS6	A114G				0.71	0.72	0.60	0.93
LHS7	N117S				0.80	0.88	0.66	0.97
LHS8	S125A				0.73	0.79	0.85	0.97

[0251]

表 4-2: 多重突变变体 BPN′: G97A-G128A-Y217Q 亲本的去污性能								
变体	突变				BMI pH8	BMI pH7	TCA	LAS/EDTA
LHS9	S132N				0.86	0.80	0.59	1.03
LHS10	P239V				0.42	0.43	0.47	1.22
LHS11	S53G	F58G			0.67	0.71	0.49	0.75
LHS12	S53G	S78N			0.98	0.99	1.10	1.44
LHS13	S53G	Y104N			0.35	0.56	0.71	1.47
LHS14	S53G	I111V			0.99	0.99	0.83	1.20
LHS15	S53G	A114G			0.85	0.91	0.64	1.15
LHS16	S53G	N117S			0.93	1.00	0.75	1.30
LHS17	S53G	S125A			0.71	0.76	0.85	0.87
LHS18	S53G	S132N			0.93	0.93	0.74	1.03
LHS19	S53G	P239V			0.52	0.59	0.46	1.12
LHS20	F58G	S78N			0.44	0.49	0.50	1.32
LHS21	F58G	Y104N			*0.05*	*0.05*	0.56	1.67
LHS22	F58G	I111V			0.15	0.19	0.52	1.33
LHS23	F58G	A114G			*0.05*	*0.05*	0.59	1.59
LHS24	F58G	N117S			0.09	0.09	0.53	1.47
LHS25	F58G	S125A			*0.05*	*0.05*	0.56	1.56
LHS26	F58G	S132N			0.07	0.07	0.49	1.17
LHS27	F58G	P239V			*0.05*	*0.05*	0.52	1.64
LHS28	S78N	Y104N			0.37	0.56	0.67	1.71
LHS29	S78N	I111V			0.92	0.92	0.71	1.53
LHS30	S78N	A114G			0.74	0.75	0.48	1.49
LHS31	S78N	N117S			0.83	0.87	0.61	1.51
LHS32	S78N	S125A			0.77	0.79	0.89	1.33
LHS33	S78N	S132N			0.81	0.76	0.60	1.38
LHS34	S78N	P239V			0.40	0.47	0.50	1.66
LHS35	Y104N	I111V			0.21	0.31	0.64	1.55
LHS36	Y104N	A114G			*0.05*	0.06	0.59	1.70
LHS37	Y104N	N117S			0.08	0.14	0.45	1.72
LHS38	Y104N	S125A			0.06	0.09	0.64	1.77
LHS39	Y104N	S132N			0.98	1.07	0.74	1.26
LHS40	Y104N	P239V			*0.05*	0.05	0.69	1.82
LHS41	I111V	A114G			0.15	0.16	0.43	1.24
LHS42	I111V	N117S			0.45	0.43	0.51	1.12
LHS43	I111V	S125A			0.37	0.47	0.62	1.21
LHS44	I111V	S132N			0.53	0.58	0.41	1.00
LHS45	I111V	P239V			0.24	0.31	0.40	1.29
LHS46	A114G	N117S			0.14	0.15	0.48	1.37
LHS47	A114G	S125A			0.20	0.29	0.58	1.41

[0252]

表 4-2：多重突变变体 BPN′：G97A-G128A-Y217Q 亲本的去污性能

变体	突变				BMI pH8	BMI pH7	TCA	LAS/EDTA
LHS48	A114G	S132N			0.24	0.25	0.50	1.14
LHS49	A114G	P239V			*0.05*	0.07	0.48	1.48
LHS50	N117S	S125A			0.31	0.39	0.48	1.27
LHS51	N117S	S132N			0.35	0.35	0.45	1.12
LHS52	N117S	P239V			0.15	0.19	0.38	1.32
LHS53	S125A	S132N			0.38	0.51	0.47	1.03
LHS54	S125A	P239V			0.09	0.12	0.47	1.59
LHS55	S132N	P239V			0.16	0.22	0.45	1.29
LHS56	S53G	F58G	S78N		0.72	0.76	0.56	1.48
LHS57	S53G	F58G	Y104N		*0.05*	*0.05*	0.52	1.78
LHS58	S53G	F58G	I111V		0.35	0.43	0.38	1.16
LHS59	S53G	F58G	A114G		0.10	0.14	0.46	1.37
LHS60	S53G	F58G	N117S		0.22	0.30	0.41	1.19
LHS61	S53G	F58G	S125A		0.18	0.23	0.44	1.46
LHS62	S53G	F58G	S132N		0.29	0.32	0.41	1.01
LHS63	S53G	F58G	P239V		0.06	0.08	0.49	1.54
LHS64	S53G	S78N	Y104N		0.43	0.63	0.76	1.80
LHS65	S53G	S78N	I111V		0.97	1.01	0.89	1.69
LHS66	S53G	S78N	A114G		0.85	0.89	0.60	1.63
LHS67	S53G	S78N	N117S		0.94	0.92	0.69	1.61
LHS68	S53G	S78N	S125A		0.78	0.82	0.90	1.37
LHS69	S53G	S78N	S132N		0.96	0.93	0.75	1.48
LHS70	S53G	S78N	P239V		0.62	0.66	0.44	1.59
LHS71	S53G	Y104N	I111V		0.25	0.41	0.63	1.73
LHS72	S53G	Y104N	A114G		0.08	0.09	0.53	1.75
LHS73	S53G	Y104N	N117S		*0.05*	0.12	0.50	1.68
LHS74	S53G	Y104N	S125A		0.20	0.23	0.50	1.20
LHS75	S53G	Y104N	S132N		0.94	1.00	1.21	1.10
LHS76	S53G	Y104N	P239V		*0.05*	*0.05*	0.54	1.63
LHS77	S53G	I111V	A114G		0.48	0.51	0.47	1.25
LHS78	S53G	I111V	N117S		0.66	0.74	0.48	1.17
LHS79	S53G	I111V	S125A		0.49	0.64	0.72	1.27
LHS80	S53G	I111V	S132N		0.78	0.80	0.54	1.19
LHS81	S53G	I111V	P239V		0.32	0.38	0.43	1.26
LHS82	S53G	A114G	N117S		0.16	0.29	0.47	1.19
LHS83	S53G	A114G	S125A		0.32	0.44	0.50	1.19
LHS84	S53G	A114G	S132N		0.44	0.50	0.40	1.05
LHS85	S53G	A114G	P239V		0.15	0.31	0.44	1.42
LHS86	S53G	N117S	S125A		0.50	0.56	0.54	1.08

[0253]

表 4-2：多重突变变体 BPN′：G97A-G128A-Y217Q 亲本的去污性能

变体	突变				BMI pH8	BMI pH7	TCA	LAS/EDTA
LHS87	S53G	N117S	S132N		0.54	0.59	0.49	1.15
LHS88	S53G	N117S	P239V		0.28	0.41	0.50	1.31
LHS89	S53G	S125A	S132N		0.50	0.55	0.67	*N/D*
LHS90	S53G	S125A	P239V		0.06	0.12	0.59	*N/D*
LHS91	S53G	S132N	P239V		0.27	0.33	0.49	*N/D*
LHS92	F58G	S78N	Y104N		*0.05*	*0.05*	0.67	*N/D*
LHS93	F58G	S78N	I111V		0.17	0.18	0.56	*N/D*
LHS94	F58G	S78N	A114G		*0.05*	0.07	0.67	*N/D*
LHS95	F58G	S78N	N117S		0.11	0.12	0.64	*N/D*
LHS96	F58G	S78N	S125A		0.11	0.15	0.65	*N/D*
LHS97	F58G	S78N	S132N		0.06	0.12	0.57	*N/D*
LHS98	F58G	S78N	P239V		*0.05*	*0.05*	0.60	*N/D*
LHS99	F58G	Y104N	I111V		*0.05*	*0.05*	0.57	*N/D*
LHS100	F58G	Y104N	A114G		*0.05*	*0.05*	0.59	*N/D*
LHS101	F58G	Y104N	N117S		*0.05*	*0.05*	0.61	*N/D*
LHS102	F58G	Y104N	S125A		*0.05*	*0.05*	0.61	*N/D*
LHS103	F58G	Y104N	S132N		0.19	0.28	0.48	*N/D*
LHS104	F58G	Y104N	P239V		0.05	*0.05*	0.62	*N/D*
LHS105	F58G	I111V	A114G		*0.05*	*0.05*	0.62	*N/D*
LHS106	F58G	I111V	N117S		*0.05*	*0.05*	0.58	*N/D*
LHS107	F58G	I111V	S125A		*0.05*	*0.05*	0.53	*N/D*
LHS108	F58G	I111V	S132N		*0.05*	*0.05*	0.52	*N/D*
LHS109	F58G	I111V	P239V		*0.05*	*0.05*	0.55	*N/D*
LHS110	F58G	A114G	N117S		*0.05*	*0.05*	0.64	*N/D*
LHS111	F58G	A114G	S125A		*0.05*	*0.05*	0.62	*N/D*
LHS112	F58G	A114G	S132N		*0.05*	*0.05*	0.58	*N/D*
LHS113	F58G	A114G	P239V		*0.05*	*0.05*	0.45	*N/D*
LHS114	F58G	N117S	S125A		*0.05*	*0.05*	0.60	*N/D*
LHS115	F58G	N117S	S132N		*0.05*	*0.05*	0.55	*N/D*
LHS116	F58G	N117S	P239V		*0.05*	*0.05*	0.52	*N/D*
LHS117	F58G	S125A	S132N		*0.05*	*0.05*	0.62	*N/D*
LHS118	F58G	S125A	P239V		*0.05*	*0.05*	0.62	*N/D*
LHS119	F58G	S132N	P239V		*0.05*	*0.05*	0.65	*N/D*
LHS120	S78N	Y104N	I111V		0.33	0.44	0.63	*N/D*
LHS121	S78N	Y104N	A114G		*0.05*	*0.05*	0.68	*N/D*
LHS122	S78N	Y104N	N117S		*0.05*	0.13	0.60	*N/D*
LHS123	S78N	Y104N	S125A		*0.05*	0.06	0.69	*N/D*
LHS124	S78N	Y104N	S132N		1.02	1.00	0.77	*N/D*
LHS125	S78N	Y104N	P239V		0.05	*0.05*	0.65	*N/D*

[0254]

表 4-2：多重突变变体 BPN′：G97A-G128A-Y217Q 亲本的去污性能								
变体	突变				BMI pH8	BMI pH7	TCA	LAS/EDTA
LHS126	S78N	I111V	A114G		0.35	0.36	0.60	*N/D*
LHS127	S78N	I111V	N117S		0.52	0.53	0.54	*N/D*
LHS128	S78N	I111V	S125A		0.51	0.57	0.67	*N/D*
LHS129	S78N	I111V	S132N		0.50	0.46	0.49	*N/D*
LHS130	S78N	I111V	P239V		0.27	0.29	0.55	*N/D*
LHS131	S78N	A114G	N117S		0.11	0.14	0.50	*N/D*
LHS132	S78N	A114G	S125A		0.27	0.27	0.51	*N/D*
LHS133	S78N	A114G	S132N		0.23	0.21	0.56	*N/D*
LHS134	S78N	A114G	P239V		0.12	0.11	0.54	*N/D*
LHS135	S78N	N117S	S125A		0.39	0.48	0.62	*N/D*
LHS136	S78N	N117S	S132N		0.42	0.47	0.55	*N/D*
LHS137	S78N	N117S	P239V		0.09	0.05	0.53	*N/D*
LHS138	S78N	S125A	S132N		0.46	0.47	0.56	*N/D*
LHS139	S78N	S125A	P239V		0.06	0.08	0.64	*N/D*
LHS140	S78N	S132N	P239V		0.21	0.16	0.45	*N/D*
LHS141	Y104N	I111V	A114G		*0.05*	0.06	0.63	*N/D*
LHS142	Y104N	I111V	N117S		0.05	0.05	0.57	*N/D*
LHS143	Y104N	I111V	S125A		0.05	0.09	0.66	*N/D*
LHS144	Y104N	I111V	S132N		0.87	0.91	0.60	*N/D*
LHS145	Y104N	I111V	P239V		*0.05*	*0.05*	0.61	*N/D*
LHS146	Y104N	A114G	N117S		*0.05*	*0.05*	0.53	*N/D*
LHS147	Y104N	A114G	S125A		*0.05*	*0.05*	0.50	*N/D*
LHS148	Y104N	A114G	S132N		0.32	0.45	0.50	*N/D*
LHS149	Y104N	A114G	P239V		0.05	0.05	0.62	*N/D*
LHS150	Y104N	N117S	S125A		0.05	*0.05*	0.56	*N/D*
LHS151	Y104N	N117S	S132N		0.53	0.63	0.54	*N/D*
LHS152	Y104N	N117S	P239V		0.06	*0.05*	0.66	*N/D*
LHS153	Y104N	S125A	S132N		0.30	0.41	0.69	*N/D*
LHS154	Y104N	S125A	P239V		*0.05*	*0.05*	0.54	*N/D*
LHS155	Y104N	S132N	P239V		0.25	0.36	0.50	*N/D*
LHS156	I111V	A114G	N117S		*0.05*	0.05	0.54	*N/D*
LHS157	I111V	A114G	S125A		0.05	0.06	0.59	*N/D*
LHS158	I111V	A114G	S132N		*0.05*	0.05	0.58	*N/D*
LHS159	I111V	A114G	P239V		*0.05*	*0.05*	0.63	*N/D*
LHS160	I111V	N117S	S125A		0.10	0.10	0.66	*N/D*
LHS161	I111V	N117S	S132N		*0.05*	*0.05*	0.55	*N/D*
LHS162	I111V	N117S	P239V		*0.05*	*0.05*	0.55	*N/D*
LHS163	I111V	S125A	S132N		*0.05*	0.14	0.56	*N/D*
LHS164	I111V	S125A	P239V		*0.05*	*0.05*	0.60	*N/D*

[0255]

表 4-2：多重突变变体 BPN′：G97A-G128A-Y217Q 亲本的去污性能								
变体	突变				BMI pH8	BMI pH7	TCA	LAS/EDTA
LHS165	I111V	S132N	P239V		*0.05*	*0.05*	0.57	*N/D*
LHS166	A114G	N117S	S125A		*0.05*	*0.05*	0.57	*N/D*
LHS167	A114G	N117S	S132N		*0.05*	0.07	0.52	*N/D*
LHS168	A114G	N117S	P239V		*0.05*	*0.05*	0.67	*N/D*
LHS169	A114G	S125A	S132N		*0.05*	*0.05*	0.59	*N/D*
LHS170	A114G	S125A	P239V		*0.05*	*0.05*	0.63	*N/D*
LHS171	A114G	S132N	P239V		*0.05*	*0.05*	0.55	*N/D*
LHS172	N117S	S125A	S132N		*0.05*	0.05	0.56	*N/D*
LHS173	N117S	S125A	P239V		*0.05*	*0.05*	0.56	*N/D*
LHS174	N117S	S132N	P239V		*0.05*	*0.05*	0.57	*N/D*
LHS175	S125A	S132N	P239V		*0.05*	*0.05*	0.55	*N/D*
LHS176	N76D	D120H	K213N	M222Q	0.22	0.31	0.68	*N/D*

[0256] 检测了 BPN’三重突变体的 LAS/EDTA 稳定性，并与 BPN’-Y217L 比较。LAS/EDTA 试验按实施例 1 的“LAS 稳定性试验”章节描述的进行，除了压力缓冲液包含 0.1% LAS+10mM EDTA 和压力板在 35℃孵育 25 分钟以外。BPN’变体的功能性通过性能指标 (Pi) 定量，其为变体和亲本蛋白质 BPN’-Y217L 的性能比率。结果显示于表 4-3。

[0257]

表 4-3：BPN’变体的 LAS/EDTA 稳定性结果	
变体	Pi LAS/EDTA
N62Q-G97A-Y217Q	1.26
G97A-N123G-Y217Q	0.95
G97A-G128A-Y217Q	1.24
FNA：G97G-G128G-Y217L	1.00

[0258] 本说明书中提及的所有专利和出版物是发明所属领域的技术人员的水平指标。本领域技术人员可以容易的理解，本发明很适于实施所提及的目标并获得所述结果和优势，以及其他本文内在的属性。本文描述的组合物和方法是代表了优选的实施方案，是示例性的，并非意在限制本发明的范围。在不脱离发明的范围和精神的条件下，可以对本文公开的发明进行多种取代和修饰，这对本领域技术人员是显而易见的。

[0259] 本文说明性描述的发明可以适当地在缺少本文未具体公开的任何要素或限制的情况下实施。所使用的术语和表述用于描述而非限制，这些术语和表述的使用并不旨在排除所述特征的任何等同物或其部分，而是应该认识到，在要求保护的本发明范围内可以有多种修改。因此，应该理解，尽管通过优选实施方案和任选特征具体公开了本发明，但本领域技术人员可应用本文所公开概念的修饰和变体，这些修饰和变体均认为落入本文所限定的本发明范围之内。

[0260] 本文已经宽泛并一般性地描述了发明。落入一般性公开范围内的任何较小种类和

亚类也都构成发明的一部分。这包含对本发明的一般性描述，其前提或反面限制为从该类中去除任何主题，无论所去除的内容是否在本文中具体描述。

[0001]

序列表

<110> 丹尼斯科美国公司

<120> 包含微生物蛋白酶变体的组合物和方法

<130> 31178WO-2B

<140> PCT/US09/46066
<141> 2009-06-03

<150> US 61/059,695
<151> 2008-06-06

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 275
<212> PRT
<213> 解淀粉芽孢杆菌 (Bacillus amyloliquefaciens)

<400> 1

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

[0002]

```
Ser Ser Ser Thr Val Gly Tyr Pro Gly Lys Tyr Pro Ser Val Ile Ala
                165                 170                 175
Val Gly Ala Val Asp Ser Ser Asn Gln Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val
            180                 185                 190
Gly Pro Glu Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr
        195                 200                 205
Leu Pro Gly Asn Lys Tyr Gly Ala Tyr Asn Gly Thr Ser Met Ala Ser
    210                 215                 220
Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn
225                 230                 235                 240
Trp Thr Asn Thr Gln Val Arg Ser Ser Leu Glu Asn Thr Thr Thr Lys
                245                 250                 255
Leu Gly Asp Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Gln Ala
            260                 265                 270
Ala Ala Gln
        275
```

<210> 2
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成试剂

<400> 2

```
Ala Ala Pro Phe
1
```