(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 101275128 B
(45)授权公告日 2012.11.07

(21)申请号 200810087668.9
(22)申请日 1999.12.20
(30)优先权数据
PA199801670 1998.12.18 DK
(62)分案原申请数据
99815883.6 1999.12.20
(73)专利权人 诺沃奇梅兹有限公司
地址 丹麦鲍斯韦
(72)发明人 K·安德森威尔布尔 F·米凯尔森
P·汉森坎姆普 C·安德森
M·诺莱加德-麦德森
(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038
代理人 罗菊华
(51)Int.Cl.
C12N 9/56(2006.01)
C12N 15/57(2006.01)
C12N 15/63(2006.01)
C12N 1/21(2006.01)
C12N 1/15(2006.01)
C12N 1/19(2006.01)
C11D 3/386(2006.01)
C12R 1/07(2006.01)
C12R 1/66(2006.01)
(56)对比文件
WO 9855634 A1,1998.12.10, 全文.
EP 0405901 A1,1991.01.02, 全文.
WO 9530011 A2,1995.11.09, 全文.
审查员 赵重甲

权利要求书 1 页 说明书 25 页 附图 5 页

(54)发明名称

在活性位点环区中具有额外氨基酸残基的I-S1和I-S2亚组枯草杆菌酶

(57)摘要

本发明涉及一种I-S1和I-S2亚组的枯草杆菌酶，其在从95-103位的活性位点环(b)区中的103位具有至少一个额外的氨基酸残基，由此所述额外氨基酸残基相应于在103-104位之间至少一个氨基酸残基的插入片段。所述枯草杆菌酶在洗涤剂中的洗涤性能相比于其亲本酶有所改良。

CN 101275128 B

1.BLS309 的枯草杆菌酶变体，其选自：

S103SA，或

S103ST。

2. 编码权利要求 1 的枯草杆菌酶变体的分离的 DNA 序列。

3. 一种含有权利要求 2 的分离的 DNA 序列的表达载体。

4. 一种转化了权利要求 3 的表达载体的微生物宿主细胞。

5. 根据权利要求 4 的微生物宿主细胞，它是细菌。

6. 根据权利要求 5 的微生物宿主细胞，它是芽孢杆菌属的细胞。

7. 根据权利要求 6 的微生物宿主细胞，它是迟缓芽孢杆菌。

8. 根据权利要求 4 的微生物宿主细胞，它是真菌。

9. 根据权利要求 8 的微生物宿主细胞，它是丝状真菌。

10. 根据权利要求 9 的微生物宿主细胞，它是曲霉属的细胞。

11. 根据权利要求 4 的微生物宿主细胞，它是酵母。

12. 生产权利要求 1 的枯草杆菌酶变体的方法，其中将权利要求 4-11 中任一项的微生物宿主细胞在有利于表达和分泌所述变体的条件下培养，并回收变体。

13. 一种含有权利要求 1 的枯草杆菌酶变体的组合物。

14. 根据权利要求 13 的组合物，其中还含有纤维素酶、脂酶、角质酶、氧化还原酶、其它蛋白酶或淀粉酶。

15. 根据权利要求 13 或 14 的组合物，其中所述组合物是洗涤剂组合物。

16. 权利要求 1 的枯草杆菌酶变体或者权利要求 13 或 14 中任一项的组合物在洗衣和 / 或洗碟洗涤剂中的用途。

在活性位点环区中具有额外氨基酸残基的 I-S1 和 I-S2 亚组枯草杆菌酶

[0001] 本案为申请日 1999 年 12 月 20 日，优先权日 1998 年 12 月 18 日，发明名称为“活性位点环区中具有额外氨基酸残基的 I-S1 和 I-S2 亚组枯草杆菌酶”的专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及一种新的 I-S1 和 I-S2 亚组的枯草杆菌酶 (subtilase)，其在从 95-103 位的活性位点环 (b) 区中的 103 位具有至少一个额外的氨基酸残基。这些蛋白酶当用于洗涤剂、清洁和洗涤剂组合物时，显示出色的或改良的洗涤性能。本发明还涉及编码用于所述酶表达的基因，当所述基因插入适当的宿主细胞或生物时表达所述酶。本发明还涉及用所述基因转化的且能够表达所述酶变体的宿主细胞，以及制备新型酶的方法

[0003] 发明背景

[0004] 在洗涤剂工业中，酶在洗涤配方中的应用已经超过 30 年。用于这些制剂的酶包括：蛋白酶、脂酶、淀粉酶、纤维素酶以及其它酶，或者它们的混合物。商业上最重要的酶是蛋白酶。

[0005] 越来越多的商业上使用的蛋白酶是天然存在的野生型蛋白酶的蛋白质工程变体，如 **DURAZYM®** (Novo Nordisk A/S)、**RELASE®** (Novo Nordisk A/S)、**MAXAPEM®** (Gist-Brocades N.V.)、**PURAFECT®** (Genencor 国际有限公司)。

[0006] 还有许多蛋白酶变体在本领域中已有描述，如 EP 130756(GENENTECH)(相应于美国再颁专利 34,606(GENENCOR))；EP214435(HENKEL)；WO 87/04461(AMGEN)；WO 87/05050(GENEX)；EP 260105(GENENCOR)；Thomas，Russell 和 Fersht(1985) 自然 (Nature)318375-376；Thomas，Russell 和 Fersht(1987) 分子生物学杂志 (J.Mol.Biol.)193 803-813；Russell 和 Fersht(1987) 自然 328496-500(1987)；WO 88/08028(Genex)；WO 88/08033(AMGEN)；WO 95/27049(SOLVAY S.A.)；WO 95/30011(PROCTER & GAMBLE 公司)；WO 95/30010(PROCTER & GAMBLE 公司)；WO95/29979(PROCTER & GAMBLE 公司)；US 5.543.302(SOLVAYS.A.)；EP 251 446(GENENCOR)；WO 89/06279(Novo Nordisk A/S)；WO 91/00345(Novo Nordisk A/S)；EP 525 610 A1(SOLVAY) 和 WO94/02618(GIST-BROCADES N.V.)。

[0007] 然而，尽管已经描述了许多有用的蛋白酶变体，许多工业用途仍然需要新的改良的蛋白酶或蛋白酶变体。

[0008] 因此，本发明的目的是提供改良的蛋白酶或蛋白质工程化蛋白酶变体，尤其是用于洗涤剂工业。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明人发现了这样的枯草杆菌酶，其中至少一个活性位点环比那些已知的长，所述酶在洗涤剂组合物中显示改进的洗涤性能。在构建尤其是枯草蛋白酶 309(BLSAVI 或 **SAVINASE®**) 的枯草蛋白酶 (subtilisin) 变体中对其进行了鉴定，相对于亲本野生型

酶该酶显示出改进的洗涤特性。这一点在我们早先的申请 DK1332/97 中已描述。

[0011] 已知 I-S1（真“枯草蛋白酶”）或 I-S2（高碱性枯草蛋白酶）亚组中的某些枯草杆菌酶或其变体在从 95-103 位的活性位点环 (b) 区中的 103 位（或在 103 位与 104 位之间）具有至少一个额外的氨基酸残基，与目前已知的那些和在所述申请中描述的那些相比，所述酶显示出人意料的改良的洗涤性能。

[0012] 本发明改进的蛋白酶可通过从自然资源中分离获得，或通过在野生枯草杆菌酶的 103 与 104 位之间的活性位点环 (b) 中导入至少一个额外的氨基酸残基（一个插入）获得（对于活性位点环和位置编码见下述）。

[0013] 尽管本发现是在枯草蛋白酶 309，预计可能产生或分离类似有益的枯草杆菌酶或枯草杆菌酶变体。

[0014] 此外，可能通过特异地筛选天然分离株，以鉴别新的野生型枯草 杆菌酶，其含有至少一个比已知野生型枯草杆菌酶相应活性位点环更长的活性位点环 (b)，如枯草蛋白酶 309，该枯草杆菌酶被认为在 103 与 104 位之间具有一个插入的氨基酸残基，且与最相关的已知枯草蛋白酶（如枯草蛋白酶 309）相比显示在洗涤剂中出色的洗涤性能。

[0015] 相关的序列比较及编码参照见如下图 1、1a、2 和 2a，显示枯草蛋白酶 BPN’(BASBPN)(a) 和枯草蛋白酶 309(BLSAVI)(b) 之间的序列比较，以及枯草蛋白酶 BPN’(BASBPN)(a) 和枯草蛋白酶 Carlsberg(g)(BLSCAR) 之间的序列比较。在图 1 和 2 中，利用 GCG 软件包常规 GAP 如下所示进行序列比较，而图 1a 和 2a 的序列比较同 WO 91/00345 所示。这些序列比较在本发明中用做残基编码的参照。

[0016] 在此定义了七个活性位点环 (a) 至 (g)（包括所示的两个末端的氨基酸残基）以涵盖如下区段的氨基酸残基：

[0017] (a) 氨基酸残基 33-43 之间的区域；

[0018] (b) 氨基酸残基 95-103 之间的区域；

[0019] (c) 氨基酸残基 125-132 之间的区域；

[0020] (d) 氨基酸残基 153-173 之间的区域；

[0021] (e) 氨基酸残基 181-195 之间的区域；

[0022] (f) 氨基酸残基 202-204 之间的区域；和

[0023] (g) 氨基酸残基 218-219 之间的区域。

[0024] 因此，本发明第一方面涉及一种分离的（即：纯度＞ 10％）的 I-S1 和 I-S2 亚组的枯草杆菌酶，其在从 95-103 位的活性位点环 (b) 区中的 103 位具有至少一个额外的氨基酸残基，由此所述额外氨基酸残基相应于在 103-104 位之间至少一个氨基酸残基的插入片段。

[0025] 本发明第二方面涉及编码本发明枯草杆菌酶变体的分离 DNA 序列。

[0026] 本发明第三方面涉及含有编码本发明枯草杆菌酶变体的分离 DNA 序列的表达载体。

[0027] 本发明第四方面涉及转化了第四方面的表达载体的微生物宿主细胞。

[0028] 本发明还涉及本发明的枯草杆菌蛋白酶的生产。

[0029] 本发明的酶可一般地通过如下方法生产，培养微生物并从中分离且以基本上纯的形式回收酶；或者通过将第四方面的表达载体插入到合适的微生物宿主中，培养宿主以表

达需要的枯草杆菌酶，并回收酶产品。

[0030] 本发明还涉及含有本发明枯草杆菌酶或枯草杆菌酶变体的组合物。

[0031] 最后本发明涉及本发明的酶在许多工业相关应用中的用途，特别是在清洁组合物中的用途，以及在含有突变酶的清洁组合物，尤其是含有突变枯草杆菌蛋白酶的洗涤剂组合物中的用途。

[0032] 定义

[0033] 在进一步详细论述本发明之前，先定义下列术语。

[0034] 氨基酸的命名

[0035] A = Ala = 丙氨酸

[0036] V = Val = 缬氨酸

[0037] L = Leu = 亮氨酸

[0038] I = Ile = 异亮氨酸

[0039] P = Pro = 脯氨酸

[0040] F = Phe = 苯丙氨酸

[0041] W = Trp = 色氨酸

[0042] M = Met = 甲硫氨酸

[0043] G = Gly = 甘氨酸

[0044] S = Ser = 丝氨酸

[0045] T = Thr = 苏氨酸

[0046] C = Cys = 半胱氨酸

[0047] Y = Tyr = 酪氨酸

[0048] N = Asn = 天冬酰胺

[0049] Q = Gln = 谷氨酰胺

[0050] D = Asp = 天冬氨酸

[0051] E = Glu = 谷氨酸

[0052] K = Lys = 赖氨酸

[0053] R = Arg = 精氨酸

[0054] H = His = 组氨酸

[0055] X = Xaa = 任何氨基酸

[0056] 核酶命名

[0057] A = 腺嘌呤

[0058] G = 鸟嘌呤

[0059] C = 胞嘧啶

[0060] T = 胸腺嘧啶（只存在于 DNA 中）

[0061] U = 尿嘧啶（只存在于 RNA 中）

[0062] 变体的命名

[0063] 在描述本发明产生或包括的各种酶变体时，采用以下命名法以便于参考：

[0064] 首先通过分离的或亲本野生型酶与枯草蛋白酶 BPN'(BASBPN) 的排列比较定义参照框架。

[0065] 利用如下参数：区间产生罚＝8及区间延伸罚＝8且所有其他参数保持为默认值，通过GCG软件包9.1版的GAP常规分析可获得排列对比。

[0066] 另一种方法是利用已知的公认的枯草杆菌酶之间的排列对比，如WO91/00345中所示的排列对比。在多数情况下，差异并不重要。

[0067] 在图1、1a、2和2a中分别显示了枯草蛋白酶BPN'(BASBPN)和枯草蛋白酶309(BLSAVI)及枯草蛋白酶Carlsberg(BLSCAR))之间的序列比较。相对于BASBPN定义了许多缺失和插入。在图1中，相比于BASBPN，枯草蛋白酶309在36、58、158、162、163和164位具有6个缺失，而在图1a中，相比于BASBPN，枯草蛋白 酶309在36、56、159、164、165和166位具有同样的缺失。在图2中，相比于BASBPN，枯草蛋白酶Carlsberg在58位具有1个缺失，而在图2a中，相比于BASBPN，枯草蛋白酶Carlsberg在56位具有1个缺失。这些缺失在图1、1a、2和2a中由星号(*)显示。

[0068] 在野生型酶中进行的多种修饰一般地使用如下三种要素显示：

[0069] 原始氨基酸 位点 替换的氨基酸

[0070] 注释G195E因此是指195位的甘氨酸由谷氨酸替换。

[0071] 在原始氨基酸可以是任何氨基酸残基的情况下，有时可以使用简写符号，只表示位点和取代氨基酸：

[0072] 位点 替换的氨基酸

[0073] 这种符号在表示同源枯草杆菌酶内的修饰时尤其合适（见下文）。

[0074] 类似地，当替换氨基酸残基的身份不明确时，表示为：

[0075] 原始氨基酸 位点

[0076] 当原始氨基酸和替换氨基酸都可能是任何氨基酸时，则仅表示位点，如：170。

[0077] 当原始氨基酸和/或替换氨基酸可包括一种以上氨基酸但非所有氨基酸时，则可选的氨基酸表示于括号{}中：

[0078] 原始氨基酸 位点 {替换的氨基酸$_1$,...,替换的氨基酸$_n$}

[0079] 对于特定的变体，使用特异的三字母或单字母符号，包括用Xaa和X表示任何氨基酸残基。

[0080] 替换：

[0081] 在位点195由谷氨酸替换甘氨酸被记做：

[0082] Gly 195 Glu或G195E

[0083] 在位点195由任何氨基酸替换甘氨酸被记做：

[0084] Gly 195 Xaa或G195X，或者

[0085] Gly 195或G195

[0086] 因此在位点170由丝氨酸替换任何氨基酸残基记作：

[0087] Xaa 170Ser或X170S，或者

[0088] 170Ser或170S

[0089] 这种符号在表示同源枯草杆菌酶内的修饰时尤其合适（见下文）。因此，170Ser意指包括例如BASBPN内的Lys170Ser修饰和BLSAVI内的Arg170Ser修饰。有关这些实例参见图1。

[0090] 对于原始氨基酸和/或替换氨基酸可包括一种以上氨基酸但非所有氨基酸的修

饰，由甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸或苏氨酸替换 170 位的精氨酸可记作：

[0091] Arg 170{Gly，Ala，Ser，Thr} 或 R170{G，A，S，T}

[0092] 以表示变体

[0093] R170G，R170A，R170S，R170T。

[0094] 删除：

[0095] 195 位的甘氨酸被删除记做：

[0096] Gly 195* 或 G195*

[0097] 相应地，一个以上氨基酸残基的删除，如 195 和 196 位的甘氨酸和亮氨酸的删除记作：

[0098] Gly195*+Leu196* 或 G195*+L196*

[0099] 插入：

[0100] 一个额外的氨基酸残基的插入如 G195 后插入赖氨酸记做：

[0101] Gly 195 GlyLys 或 G195GK；或者

[0102] 当插入一个以上氨基酸残基时，如 G195 后插入赖氨酸、丙氨酸和丝氨酸，可记作：

[0103] Gly 195 GlyLysAlaSer 或 G195GKAS

[0104] 在这样的情况下，插入的氨基酸残基的编号用该插入氨基酸前的氨基酸残基位点号加上小写字母表示。在上述实例中，序列 194-196 可记作：

[0105] 194 195 196

[0106] BLSAVI A - G - L

[0107] 194 195 195a 195b 195c 196

[0108] 变体 A - G - K - A - S - L

[0109] 如果插入一个与已有氨基酸残基相同的氨基酸残基，显然在命名 上可以有几种方式。例如，在上述实例中，在甘氨酸后插入一个甘氨酸可表示为 G195GG。这一相同的改变也可以表示为 A194AG，显示由：

[0110] 194 195 196

[0111] BLSAVI A - G - L 改变为

[0112] 194 195 195a 196

[0113] 变体 A - G - G - L

[0114] 194 194a 195 196

[0115] 这样的情形是本领域技术人员显而易见的，因此 G195GG 和表示同一类型插入的相应记法意指包括这样的等同简并记法。

[0116] 缺口的填充：

[0117] 当一种酶与用于编号的枯草杆菌蛋白酶序列相比存在删除时，在该位点的插入记法类似于用：

[0118] *36Asp 或 *36D

[0119] 表示天冬氨酸在位点 36 的插入。

[0120] 多重修饰：

[0121] 含有多重修饰的变体用加号分开，如：

[0122] Arg 170 Tyr+Gly 195Glu 或 R170Y+G195E

[0123] 表示在位点 170 和 195 分别用酪氨酸和谷氨酸替换精氨酸和甘氨酸的修饰。

[0124] 或者例如 Tyr167{Gly,Ala,Ser,Thr}+Arg170{Gly,Ala,Ser,Thr}

[0125] 表示变体

[0126] Tyr167Gly+Arg170Gly,Tyr167Gly+Arg170Ala,

[0127] Tyr167Gly+Arg170Ser,Tyr167Gly+Arg170Thr,

[0128] Tyr167Ala+Arg170Gly,Tyr167Ala+Arg170Ala,

[0129] Tyr167Ala+Arg170Ser,Tyr167Ala+Arg170Thr,

[0130] Tyr167Ser+Arg170Gly,Tyr167Ser+Arg170Ala,

[0131] Tyr167Ser+Arg170Ser,Tyr167Ser+Arg170Thr,

[0132] Tyr167Thr+Arg170Gly,Tyr167Thr+Arg170Ala,

[0133] Tyr167Thr+Arg170Ser,和 Tyr167Thr+Arg170Thr.

[0134] 在表示有关具有特定共同特征的氨基酸残基的替换、代替、插入或删除,例如带正电荷的残基 (K,R,H)、带负电荷的残基 (D,E) 或保守氨基酸修饰时,这种命名法特别有用,例如 Tyr167{Gly,Ala,Ser,Thr}+Arg170{Gly,Ala,Ser,Thr} 表示用小氨基酸替换另一小氨基酸。详细内容参见“发明详述”部分。

[0135] 蛋白酶

[0136] 将能切开蛋白质底物中酰氨键的酶归类为蛋白酶或肽酶 (可互换使用)(参阅 Walsh,1979,酶反应机制 (Enzymatic ReactionMechanisms),W.H.Freeman and Company,旧金山,第三章)。

[0137] 氨基酸位点 / 残基的编号

[0138] 如果没有特别指出,本文使用的氨基酸编号相应于枯草杆菌酶 BPN’(BASBPN) 序列的编号。BPN’ 序列的进一步描述参阅 Siezen 等人,蛋白质工程 (Protein Engng.)4(1991)719-737 和图 1。

[0139] 丝氨酸蛋白酶

[0140] 丝氨酸蛋白酶是指能催化肽键水解,并且在其活性位点存在必需丝氨酸残基的酶 (White,Handler 和 Smith,1973 “生化原理”(Principles of Biochemistry),第五版,McGraw-Hill 书籍公司,纽约,第 271-272 页)。

[0141] 细菌丝氨酸蛋白酶的分子量范围为 20,000-45,000 道尔顿。它们被二异丙基磷酸氟抑制。它们水解简单的末端酯,而且与真核生物的糜蛋白酶 (也是丝氨酸蛋白酶) 的活性相似。范围更窄的术语 - 碱性蛋白酶 (包括一个亚组) 反映了一些丝氨酸蛋白酶最适 pH 高,从 pH9.0 到 11.0(有关综述参阅 Priest(1977) 细菌学回顾 (Bacteriological Rev.)41711-753)。

[0142] 枯草杆菌酶

[0143] 丝氨酸蛋白酶的一个暂时命名为枯草杆菌酶的亚组,由 Siezen 等人 [蛋白质工程 4(1991)719-737] 提出。它们由对 170 多种丝氨酸蛋白酶 (以前被称作枯草蛋白酶样蛋白酶 (subtilisin-like protease)) 的氨基酸序列同源分析确定。枯草杆菌蛋白酶以前常被定义为由革兰氏阳性细菌或真菌产生的丝氨酸蛋白酶,而现在根据 Siezen 等人的定义,它是枯草杆菌酶的一个亚组。已经鉴定了多种枯草杆菌酶,而且许多枯草杆菌酶的氨基酸序列已经测定。关于这些枯草杆菌酶更详细的描述和它们的氨基酸序列参阅 Siezen 等人

(1997) 的文献。

[0144] 枯草杆菌酶的一个亚组，I-S1 或“真枯草蛋白酶”，包括“经典的”枯草蛋白酶，如枯草蛋白酶 168、枯草蛋白酶 BPN’、枯草蛋白酶 Carlsberg(**ALCALASE®**, Novo NordiskA/S) 和枯草蛋白酶 DY。

[0145] 由 Siezen 等人（见上文）划分了枯草杆菌酶的另一个亚组，I-S2。I-S2 亚组蛋白酶被描述成高度碱性的枯草蛋白酶，包括如枯草蛋白酶 PB92(BAALKP)(**MAXACAL®**, Gist-Brocades NV)、枯草蛋白酶 309(**SAVINASE®**, Novo Nordisk A/S)、枯草蛋白酶 147(**ESPERASE®**, Novo Nordisk A/S) 和碱性弹性蛋白酶 YaB。

[0146] 枯草杆菌酶首字母缩略词列表

[0147] I-S1

[0148] 枯草蛋白酶 168，BSS168(BSSAS(Subtilisinamylosaccharíticus)，BSAPRJ（枯草蛋白酶 J)，BSAPRN（枯草蛋白酶 NAT)，BMSAMP(Mes-entericopeptidase)，

[0149] 枯草蛋白酶 BPN’，BASBPN，

[0150] 枯草蛋白酶 DY，BSSDY，

[0151] 枯草蛋白酶 Carlsberg，BLSCAR(BLKERA（角蛋白酶），BLSCA1，BLSCA2，BLSCA3)，

[0152] BSSPRC，丝氨酸蛋白酶 C

[0153] BSSPRD，丝氨酸蛋白酶 D

[0154] I-S2

[0155] 枯草蛋白酶 Sendai，BSAPRS

[0156] 枯草蛋白酶 ALP 1，BSAPRQ，

[0157] 枯草蛋白酶 147，**Esperase®** BLS147(BSAPRM（枯草蛋白酶 AprM)，BAH101)，

[0158] 枯草蛋白酶 309，Savinase ®，BLS309/BLSAVI(BSKSMK(M- 蛋白酶)，BAALKP（枯草蛋白酶 PB92，嗜碱芽孢杆菌 (Bacillusalkalophilic) 碱性蛋白酶)，BLSUBL（枯草蛋白酶 BL))，

[0159] 碱性弹性蛋白酶 YaB，BYSYAB，

[0160] “SAVINASE ®”

[0161] **SAVINASE®** 由 Novo NordiskA/S 出售。它是来源于迟缓芽孢杆菌的枯草杆菌蛋白酶 309，而且与 BABP92 只在一个位点不同 (N87S，参阅本文图 1)。 **SAVINASE®** 具有命名为 BLSAVI 的氨基酸序列（参见本文图 1)。

[0162] 亲本枯草杆菌酶

[0163] 术语“亲本枯草杆菌酶”指根据 Siezen 等人（蛋白质工程 4 :719-737(1991)) 定义的枯草杆菌酶。进一步细节参阅上文“枯草杆菌酶”的描述。亲本枯草杆菌酶也可以是由天然来源分离得到的枯草杆菌酶，随后进行了修饰而同时保留了枯草杆菌酶的特征。术语“亲本枯草杆菌酶”或者可以称作“野生型枯草杆菌酶”。

[0164] 枯草杆菌酶变体的修饰

[0165] 本文中使用的术语“修饰”被定义为包括枯草杆菌酶化学修饰以及编码枯草杆菌酶的基因操作。修饰可以是在感兴趣的氨基酸位点处的替换、删除和 / 或插入。

[0166] 枯草杆菌酶变体

[0167] 在本文中，术语枯草杆菌酶变体或突变的枯草杆菌酶指由表达突 变基因的生物体产生的枯草杆菌酶，该突变基因来源于具有原始或亲本基因并产生相应亲本酶的亲本微生物，其中亲本基因已经被突变以得到在合适的宿主中表达时产生突变枯草杆菌酶的突变基因。

[0168] 同源枯草杆菌酶序列

[0169] 本文鉴定了枯草杆菌酶 **SAVINASE®**中的特异活性位点环区以及所述环中进行修饰的氨基酸插入，以得到本发明的枯草杆菌酶变体。

[0170] 然而，本发明并不限于这种特殊枯草杆菌酶的修饰，而可以扩展到与**SAVINASE®**有同源的一级结构的其它亲本（野生型）枯草杆菌酶。

[0171] 为了鉴定其它同源枯草杆菌酶之间的同一性程度，可使用相同的参数设置利用GCG 软件包 9.1 版的 GAP 常规进行。由常规分析的输出结果在氨基酸排列比较旁，计算了两个序列间“同一性百分比”

[0172] 基于此处的描述，对于本领域普通技术人员而言鉴定适当的同源性枯草杆菌酶和相应的同源性活性位点环区是常规技术，其可依本发明进行修改。

[0173] 洗涤性能

[0174] 酶在例如清洗过程或硬表面清洁过程中催化待清洗物体上的各种天然存在底物的降解的能力，通常被称作它的洗涤能力 (washingability)、可洗力 (washability)、去垢力 (detergency) 或洗涤性能 (washperformance)。在本申请中，用术语洗涤性能表示这种特性。

[0175] 分离的 DNA 序列

[0176] 术语“分离的”，当应用于 DNA 序列分子时，表示该 DNA 序列已从其天然遗传环境中取出，并且因而不含其它无关的或多余的编码序列，而且以适合于在基因工程蛋白质生产系统中使用的形式存在。这些分离的分子是与其天然环境分开的分子，包括 cDNA 和基因组克隆。本发明的分离的 DNA 分子不含它们最初与之相关的其它基因，但是可能包含天然存在的 5’和 3’非翻译区如启动子和终止子。这些相关区域的鉴定显然是本领域的基本技术之一（参阅如 Dynan 和 Tijan，自然 (Nature) 316 :774-78，1985）。术语“分离 DNA 序列”也可称作“克隆 DNA 序列”。

[0177] 分离的蛋白质

[0178] 当应用于蛋白质时，术语“分离的”说明该蛋白质存在于不同于它的天然环境的条件下。分离的蛋白质优选基本不含其它蛋白质，尤其是其它同源蛋白质（即“同源杂质”（见下文））。

[0179] 分离蛋白质由 SDS-PAGE 测定纯度高于 10％，优选高于 20％，更优选高于 30％。优选提供高度纯化形式的蛋白质，即由 SDS-PAGE 鉴定纯度高于 40％、纯度高于 60％、纯度高于 80％，更优选纯度高于 95％，甚至更优选纯度高于 99％。

[0180] 术语“分离的蛋白质”也可称作“纯化的蛋白质”。

[0181] 同源杂质

[0182] 术语“同源杂质”指来自本发明多肽最初来源的同源细胞中的任何杂质（如除本发明多肽外的另一种多肽）。

[0183] 来源于

[0184] 如本文与特殊微生物来源一起使用的术语“来源于”，指多核苷酸和 / 或多肽由特殊来源、或由插入了来自该来源的基因的细胞产生。

[0185] 底物

[0186] 术语“底物”与蛋白酶底物有关的使用，应当被理解为其范围最宽的形式，如含有至少一个易被蛋白酶水解的肽键的化合物。

[0187] 产物

[0188] 术语“产物”与来源于蛋白酶酶反应的产物有关的使用在本文中应当被理解为包括涉及枯草杆菌酶蛋白酶的水解反应的产物。产物可能是下一个水解反应的底物。

[0189] 图的简要描述

[0190] 图 1 显示了利用上述 GAP 常规方法的枯草蛋白酶 BPN’(a) 与 Savinase(b) 之间的排列比较。

[0191] 图 1a 显示了取自 WO91/00345D 的枯草蛋白酶 BPN’与 Savinase 之间的排列比较。

[0192] 图 2 显示了利用上述 GAP 常规方法的枯草蛋白酶 BPN’ 与枯草蛋白酶 Carlsberg 之间的排列比较。。

[0193] 图 2a 显示了取自 WO91/00345D 的枯草蛋白酶 BPN’与枯草杆菌酶 Carlsberg 之间的排列比较。

[0194] 图 3 显示 Savinase(蛋白质数据库 (PDB) 录入号 1SVN) 的三维结构。此图显示了本文感兴趣的活性位点环 (b)。

[0195] 发明详述

[0196] 本发明枯草杆菌酶的第一方面涉及一种分离的 (即 :纯度＞ 10％) 的 I-S1 和 I-S2 亚组的枯草杆菌酶，其在从 95-103 位的活性位点环 (b) 区中的 103 位具有至少一个额外的氨基酸残基，由此所述额外氨基酸残基相应于在 103-104 位之间至少一个氨基酸残基的插入片段。

[0197] 换言之，本发明的枯草蛋白酶特征在于，包含一个多于 9 个氨基酸残基的活性位点环 (b)，与亲本或已知野生型枯草蛋白酶相比，其中额外的氨基酸残基是或可以被认为在 103 与 104 位插入。

[0198] 本发明第一方面的枯草杆菌酶可以是从自然界鉴定并分离出的亲本或野生型枯草杆菌酶。

[0199] 这样的亲本野生型枯草杆菌酶可以通过本领域熟知的标准技术特异地筛选出来。

[0200] 完成这项工作的一种优选途径是从各种不同的微生物，优选不同的芽孢杆菌菌株中，用 PCR 特异性扩增已知编码枯草杆菌酶的活性位点环的 DNA 区。

[0201] 枯草杆菌酶是一组保守的酶，因为它们的 DNA 和氨基酸序列有 同源性。因此，有可能构建活性位点环侧翼的相对特异引物。

[0202] 例如，通过分析不同枯草杆菌酶的对比 (参见例如 Siezen 等人，蛋白质科学 (Protein Science)，6 :501-523，1997)，本领域技术人员可以常规地构建例如对应于 I-S1 或 I-S2 组中任一个 (如来自 BLSAVI) 的氨基酸残基 95-103 之间的活性位点环 (b) 的活性位点环侧翼的 PCR 引物。利用这些 PCR 引物，从不同的微生物，优选不同的芽孢杆菌菌株扩增 DNA，随后对扩增出的 PCR 片段进行 DNA 测序，有可能鉴定出能生产含有相比于 BLSAVI 内 95-103 的相应活性位点区、但更长的活性位点区，并且其中插入片段可被认为存在于位置

103 和 104 之间的枯草杆菌酶的那些菌株。鉴定出菌株及感兴趣的枯草杆菌酶的部分 DNA 序列后，本领域技术人员可以常规地完成目的枯草杆菌酶的克隆、表达和纯化。

[0203] 然而，预计本发明枯草杆菌酶主要是亲本枯草杆菌酶的变体。

[0204] 因此，本发明的一个实施方案涉及本发明第一方面的分离的枯草杆菌酶，其中所述枯草杆菌酶是一种比其亲本酶有更长活性位点环 (b) 的构建变体，该变体在氨基酸残基 103 和 104 之间含有至少一个氨基酸的插入。

[0205] 本发明的枯草杆菌酶在洗涤剂中显示出色的洗涤性能，如果该酶是构建的变体，与其最相关的枯草杆菌酶（如枯草蛋白酶 309）相比显示在洗涤剂中改进的洗涤性能。

[0206] 不同的枯草杆菌酶蛋白酶产品在不同类型的洗涤剂组合物中将具有不同的洗涤性能。本发明的枯草杆菌酶在大多数不同类型的洗涤剂组合物中具有改善的洗涤性能。

[0207] 如本文实施例 3 所示，优选本发明的枯草杆菌酶在洗涤剂组合物（见下文）中具有改善的洗涤性能。

[0208] 为鉴定一种给定的枯草杆菌酶氨基酸序列（不论该枯草杆菌酶序列是亲本野生型枯草杆菌酶序列还是由定点突变之外的方法产生的枯草杆菌酶变体序列）是否在本发明枯草杆菌酶序列的范围之内，可以进行下述步骤：

[0209] i) 对所述枯草杆菌酶与枯草蛋白酶 BPN'（参见本文“定义”部分进行对比（见上文），；

[0210] ii) 根据步骤 i) 进行的对比，鉴定出所述枯草杆菌酶序列中对应于枯草蛋白酶 BPN'（包括两端氨基酸在内的 95-103 位氨基酸残基之间的区域）活性位点环区 (b) 的活性位点环；

[0211] iii) 确定步骤 ii) 中鉴定出的所述枯草杆菌酶序列中的一个或多个活性位点环是否比 BLSAVI 中的相应活性位点环更长，以及所述延长是否相应于 103-104 位之间的至少一个氨基酸残基。

[0212] 如果满足这样的标准，则该枯草杆菌酶是本发明范围内的枯草杆菌酶序列。

[0213] 利用 GAP 常规方法进行上述步骤 i) 中的排列比较。

[0214] 根据上文描述，本领域技术人员可以常规地鉴定出枯草杆菌酶的活性位点环 (b) 以及所述枯草杆菌酶是否落入本发明的范围。如果变体通过定点突变方法构建，当然可事先知道该枯草杆菌酶变体是否落入本发明的范围。

[0215] 可以通过本领域已知的标准技术，如定点 / 随机诱变或不同枯草杆菌酶序列的 DNA 重排构建枯草杆菌酶变体。进一步的细节参阅“生产枯草杆菌酶变体”部分以及本文的材料与方法（见下文）。

[0216] 在进一步的实施方案中，本发明涉及：

[0217] 1. 根据本发明的一种分离的枯草杆菌酶，其中所述插入氨基酸残基中的至少一个选自 T、G、A 和 S；

[0218] 2. 根据本发明的一种分离的枯草杆菌酶，其中所述插入氨基酸残基中的至少一个选自带电氨基酸残基 D、E、H、K 和 R，更优选选自 D、E、K 和 R；

[0219] 3. 根据本发明的一种分离的枯草杆菌酶，其中所述插入氨基酸残基中的至少一个选自亲水性氨基酸残基 C、N、Q、S 和 T，更优选选自 N、Q、S 和 T；

[0220] 4. 根据本发明的一种分离的枯草杆菌酶，其中所述插入氨基酸残基中的至少一个

选自小的疏水性氨基酸残基 A、G 和 V ;或

[0221] 5. 根据本发明的一种分离的枯草杆菌酶，其中所述插入氨基酸残基中的至少一个选自大的疏水性氨基酸残基 F、I、L、M、P、W 和 Y，更优选选自 F、I、L、M 和 Y。

[0222] 在进一步的实施方案中，本发明涉及根据本发明的一种分离的枯草杆菌酶，其中位点 103 与 104 之间的所述插入与 BLSAVI 内的相应活性位点环相比包含有至少两个氨基酸。

[0223] 在进一步的实施方案中，本发明涉及根据本发明的一种分离的枯草杆菌酶，其中所述枯草杆菌酶包含选自下组的至少一个插入 (BASBPN 编号法）：

[0224] X103X{A，T，G，S}

[0225] X103X{D，E，K，R}

[0226] X103X{H，V，C，N，Q}

[0227] X103X{F，I，L，M，P，W，Y}

[0228] 或更具体的枯草蛋白酶 309 和最相关枯草杆菌酶，如 BAALKP、BLSUBL 和 BSKSMK。

[0229] S103SA

[0230] S103ST

[0231] S103SG

[0232] S103SS

[0233] S103SD

[0234] S103SE

[0235] S103SK

[0236] S103SR

[0237] S103SH

[0238] S103SV

[0239] S103SC

[0240] S103SN

[0241] S103SQ

[0242] S103SF

[0243] S103SI

[0244] S103SL

[0245] S103SM

[0246] S103SP

[0247] S103SW

[0248] S103SY

[0249] 此外，本发明涉及在位置 103 中包含多种插入的枯草杆菌酶

[0250] 或下列任一的一种组合 ：

[0251] S103ST+Y167A

[0252] 本领域内熟知一个氨基酸被所谓的保守氨基酸替换通常只引起酶特性的微小改变。

[0253] 下面的表 III 列出了几组保守氨基酸。

[0254] 表 III 保守氨基酸替换

[0255] 共同性质 氨基酸

[0256] 碱性的 :R = 精氨酸

[0257] K = 赖氨酸

[0258] H = 组氨酸

[0259] 酸性的 :E = 谷氨酸

[0260] D = 天冬氨酸

[0261] 极性的 :Q = 谷氨酰胺

[0262] N = 天冬酰胺

[0263] 疏水性的 :L = 亮氨酸

[0264] I = 异亮氨酸

[0265] V = 缬氨酸

[0266] M = 甲硫氨酸

[0267] 芳香族的 :F = 苯丙氨酸

[0268] W = 色氨酸

[0269] Y = 酪氨酸

[0270] 小的 : G = 甘氨酸

[0271] A = 丙氨酸

[0272] S = 丝氨酸

[0273] T = 苏氨酸

[0274] 因此,包含保守性替换的枯草杆菌酶变体如 G97A+A98AS+S99G, G97S+A98AT+S99A 预期具有彼此间无甚差异的特征。

[0275] 根据本文公开的和 / 或是举例的枯草杆菌酶变体,本领域技术人员根据本发明所有方面和实施方案可以常规地鉴定出这些变体的适当的保守修饰,以获得具有改良的洗涤性能的枯草杆菌酶变体。

[0276] 在本发明的实施方案中,感兴趣的是那些属于 I-S1 和 I-S2 亚组的枯草杆菌酶,其用于从天然或从人工产生的不同种类中分离本发明的新型酶,且用于从亲本酶中设计和产生变体。

[0277] 关于从 I-S1 亚组的变体,优选的亲本枯草杆菌酶选自 BSS168(BSSAS, BSAPRJ, BSAPRN, BMSAMP)、BASBPN、BSSDY 和 BLSCAR(BLKERA, BLSCA1, BLSCA2, BLSCA3), BSSPRC,和 BSSPRD,或它们的保留了 I-S1 亚组特征的功能性变体。

[0278] 关于从 I-S2 亚组的变体,优选的亲本枯草杆菌酶选自 BSAPRQ, BLS147(BSAPRM, BAH101)、BLSAVI(BSKSMK, BAALKP, BLSUBL)、BYSYAB 和 BSAPRS,或它们的保留了 I-S2 亚组特征的功能性变体。

[0279] 更具体地说,所述亲本枯草杆菌酶是 BLSAVI(**SAVINASE®**, NOVONORDISK A/S),且本发明的优选枯草杆菌酶变体是 **SAVINASE®** 的变体。

[0280] 本发明还包括上述本发明的枯草杆菌酶与任何其他对亲本酶氨基酸序列的修饰的组合。尤其包括与本领域所知的用以改良酶特性的其它修饰的组合。本领域描述了许多具有不同改良特性的枯草杆菌酶变体,其中一部分在本文“发明背景”部分中提及 (见上

文)。那些参考文献在本文公开,作为鉴定可以有利地与本发明枯草杆菌酶变体相组合的枯草杆菌酶变体的参考。

[0281] 这些组合包括位点:222(改善氧化稳定性)和218(改善热稳定性),Ca结合位点内的替换使酶稳定,如位点76,和现有技术已知的许多其它修饰。

[0282] 在进一步的实施方案中,本发明的枯草杆菌酶变体可以有利地与下列任何位点处的一个或多个修饰组合:

[0283] 27、36、57、76、87、97、101、104、120、123、167、170、206、218、222、224、235和274。

[0284] 特别地,下面的BLSAVI,BLSUBL,BSKSMK和BAALKP变体被认为适合于组合:

[0285] K27R、*36D、S57P、N76D、S87N、G97N、S101G、S103A、V104A、V104I、V104N、V104Y、H120D、N123S、Y167、R170、Q206E、N218S、M222S、M222A、T224S、K235L和T274A。

[0286] 另外,包括V104N+S101G、S87N+S101G+V104N、K27R+V104Y+N123S+T274A、N76D+S103A+V104I或N76D+V104A变异或者这些突变(V104N、S101G、K27R、V104Y、N123S、T274A、N76D、V104A)的其它组合的任何变异与任何一个或多个上文提及的修饰组合的变体具有改良的特性。

[0287] 此外,本发明主要方面的枯草杆菌酶变体优选与129、131、133和194中任何位点处的一个或多个修饰(更优选129K、131H、133P、133D和194P修饰,最优选P129K、P131H、A133P、A133D和A194P修饰)组合。那些修饰中的任何一种都使本发明的枯草杆菌酶变体的表达水平更高。

[0288] 因此,本发明更进一步的实施方案涉及本发明的变体,其中所述 修饰选自下组:

[0289] 产生枯草杆菌酶变体

[0290] 用于克隆本发明的枯草杆菌酶和用于将插入引入基因(如枯草杆菌酶基因)的许多方法在本领域中是众所周知,参见“发明背景”部分引用的文献。

[0291] 通常,可以使用克隆基因和在该基因中引入插入(随机和/或定点)的标准方法得到本发明的枯草杆菌酶变体。关于合适技术的进一步描述参阅本文实施例(见下文)和(Sambrook等人(1989)分子克隆:实验室手册,冷泉港实验室,冷泉港,纽约;F.M.Ausubel等人(主编)“分子生物学的最新方法”,John Wiley and Sons,1995;C.R.Harwood和S.M.Cutting(主编)“芽孢杆菌的分子生物学方法”,John Wiley andSons,(1990);和WO 96/34946)。

[0292] 此外,本发明枯草杆菌酶变体可以通过例如不同枯草杆菌酶基因的DNA重排的用于人工产生多样性之标准技术构建(WO95/22625;Stemmer WPC,自然370:389-91,1994)。例如将 **Savinase®**与自然界中鉴定出的包含比 **Savinase®**活性位点环区更长的相应区的一或多个枯草杆菌酶部分序列的DNA重排,随后筛选洗涤性能有所改善的变体,可以提供本发明的枯草杆菌酶变体。

[0293] 表达载体

[0294] 含有编码本发明酶的DNA构建体的重组表达载体可以是能够方便地进行重组DNA操作的任何载体。

[0295] 载体的选择经常取决于它将要导入的宿主细胞。由此,载体可以是自主复制的载体,即以染色体外实体形式存在的载体,其复制独立于染色体的复制,如质粒。或者,载体可以是这样一种类型,当它被导入到宿主细胞中时,会部分或全部整合到宿主细胞基因组中,

并与整合的染色体一起复制。

[0296] 载体优选是表达载体，其中编码本发明酶的 DNA 序列可操作地连接于 DNA 转录所需的附加区段。一般来说，表达载体来源于质粒或 病毒 DNA，或者可以含有二者的元件。术语“可操作地连接”指的是诸区段的排列方式使得它们能够行使与预期用途（如转录由启动子起始并贯穿编码酶的 DNA 序列）一致的功能。

[0297] 启动子可以是在所选宿主细胞中显示转录活性的任何 DNA 序列，可以来源于编码与宿主细胞同源或异源的蛋白质的基因。

[0298] 适用于细菌宿主细胞的启动子的例子包括嗜热脂肪芽孢杆菌生麦芽糖淀粉酶基因、地衣芽孢杆菌 α－淀粉酶基因、解淀粉芽孢杆菌 α－淀粉酶基因、枯草芽孢杆菌碱性蛋白酶基因或短小芽孢杆菌木糖苷酶基因的启动子，或者 λ 噬菌体 P_R 或 P_L 启动子，或者大肠杆菌 lac、trp 或 tac 启动子。

[0299] 如果需要，编码本发明酶的 DNA 序列还可以可操作地连接合适的终止子。

[0300] 本发明的重组载体还可以含有使载体能够在所选宿主细胞中复制的 DNA 序列。

[0301] 载体还可以含有选择标记，如其产物互补宿主细胞缺陷的基因，或者编码对卡那霉素、氯霉素、红霉素、四环素、壮观霉素等抗生素或对重金属或除草剂的抗性的基因。

[0302] 为了将本发明的酶导入宿主细胞的分泌途径，可以在重组载体中提供分泌信号序列（也称作前导序列、前体序列或前序列）。分泌信号序列以正确的阅读框架与编码酶的 DNA 序列连接。分泌信号序列通常位于编码酶的 DNA 序列的 5’端。分泌信号序列可以是通常与酶有关的序列或可以来自编码其它分泌蛋白的基因。

[0303] 用于分别连接编码本发明酶的 DNA 序列、启动子和任选地终止子和／或分泌信号序列，或用适当的 PCR 扩增方案将这些序列装配起来，和将它们插入含有复制或整合所需信息的合适载体的方法，是本领域技术人员众所周知的（参阅如 Sambrook 等人，出处同上）。

[0304] 宿主细胞

[0305] 导入宿主细胞的编码本发明酶的 DNA 序列可以是与所选宿主同 源或异源的序列。如果与宿主细胞同源，即由宿主细胞天然产生的，则通常将它可操作地连接另一个启动子序列，或者如果可行的话，可连接另一分泌信号序列和／或终止子序列从而不处于其天然环境下。术语“同源”意指包括编码所选宿主生物天然的酶的 DNA 序列。术语“异源”意指包括宿主细胞天然不表达的 DNA 序列。因此，DNA 序列可以来自另一种生物体，或者可以是合成序列。

[0306] 待导入本发明 DNA 构建体或重组载体的宿主细胞可以是能够产生本发明酶的任何细胞，包括细菌、酵母、真菌和高等真核细胞。

[0307] 经过培养能够产生本发明酶的细菌宿主细胞的例子是革兰氏阳性细菌，如芽孢杆菌属的菌株，诸如枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、短芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、嗜碱芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、灿烂芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌或苏云金芽孢杆菌菌株，或链霉菌属的菌株，诸如浅青紫链霉菌或鼠灰链霉菌，或者革兰氏阴性细菌诸如大肠杆菌。细菌的转化可以通过原生质体转化、电穿孔、接合或通过感受态细胞以已知的方式进行（参阅 Sambrook 等人，见上文）。

[0308] 当在细菌诸如大肠杆菌中进行表达时，酶可以保留在细胞质中，通常以不溶性颗

粒存在（称为包涵体），或可以被细菌分泌序列引导到周质空间。在前一种情况中，裂解细胞，回收颗粒，变性，然后稀释变性剂使酶重新折叠。在后一种情况中，酶可以从周质空间回收，如用超声波或渗透休克破碎细胞，以释放周质空间的成分，并回收酶。

[0309] 当在革兰氏阳性细菌诸如芽孢杆菌或链霉菌菌株中表达酶时，酶可以保留在细胞质中，或可以被细菌分泌序列引导到细胞外培养基中。在后一种情况中，酶可以如下文所述从培养基中回收。

[0310] 生产枯草杆菌酶的方法

[0311] 本发明提供了生产本发明之分离的酶的方法，其中将已转化了编码该酶的 DNA 序列的合适宿主细胞在允许酶产生的条件下培养，并从培养物中回收产生的酶。

[0312] 当含有编码酶的 DNA 序列的表达载体被转化到异源宿主细胞中时，有可能异源重组产生本发明的酶。

[0313] 由此有可能得到高度纯化的枯草杆菌酶组合物，其特征为不合同源杂质。

[0314] 在本文中，同源杂质指由本发明的酶最初来源的同源细胞产生的任何杂质（如不同于本发明的酶的其它多肽）。

[0315] 用于培养转化宿主细胞的培养基可以是适合于所选宿主细胞生长的任何常规培养基。可以很方便地将表达的枯草杆菌酶分泌到培养基中，并通过众所周知的方法从中回收，所述方法包括经离心或过滤将细胞与培养基分开、经盐（如硫酸铵）沉淀培养基中的蛋白质成分，随后通过如离子交换层析、亲和层析等层析方法纯化。

[0316] 本发明的枯草杆菌酶变体的用途

[0317] 本发明的枯草杆菌酶变体可以用于许多工业用途，尤其是用于洗涤剂工业中。

[0318] 本发明还涉及含有本发明的枯草杆菌酶变体的酶组合物。

[0319] 下文描述了关于优选的工业应用的概述和相应的优选酶组合物。

[0320] 此概述并非旨在完全列出本发明枯草杆菌酶变体的所有适当应用。本发明的枯草杆菌酶变体可应用于本领域内已知使用蛋白酶、尤其是枯草杆菌酶的其它工业应用中。

[0321] 含有突变酶的洗涤剂组合物

[0322] 本发明包括本发明的突变酶在清洁和去污组合物中的用途以及含有突变枯草杆菌蛋白酶的这种组合物。这些清洁和去污组合物在本领域中有很好的描述，关于合适的清洁和洗涤剂组合物的进一步描述参阅 WO 96/34946、WO 97/07202 和 WO 95/30011。

[0323] 还可以参考本文如下的实施例，显示本发明的许多枯草杆菌酶变体改良的洗涤性能。

[0324] 洗涤剂组合物

[0325] 本发明的酶可以被加入从而构成洗涤剂组合物中的成分。

[0326] 本发明的洗涤剂组合物可以例如被配制成手洗或机洗洗涤剂组合物，其中包括适于污染了的织物预处理的洗衣添加组合物，以及增加织物柔软性的漂洗组合物，或可被配制成用于一般家用硬表面清洁操作的组合物，或被配制用于手工或机械洗碟操作。

[0327] 在一个特殊方面，本发明提供了一种含有本发明的酶的洗涤添加剂。洗涤添加剂及洗涤剂组合物可含有一种或多种其他酶，如蛋白酶、脂酶、角质酶、淀粉酶、碳水化合物酶、纤维素酶、果胶酶、甘露聚糖酶、阿拉伯糖酶、半乳聚糖酶、木聚糖酶、氧化酶，如漆酶和 / 或过氧化物酶。

[0328] 一般地，所选酶的性质应与所选的洗涤剂相适应（即：pH 最适，与其他酶和非酶组分相容，等），且酶应以有效量存在。

[0329] 蛋白酶：合适的蛋白酶包括动物、植物或微生物来源的。微生物来源是优选的。包括化学修饰或蛋白质工程的突变体。蛋白酶可以是丝氨酸蛋白酶或金属蛋白酶，优选碱性微生物蛋白酶或胰蛋白酶样蛋白酶。碱性蛋白酶的例子是枯草蛋白酶，尤其是从芽孢衍生的那些，例如枯草蛋白酶 Novo、枯草蛋白酶 Carlsberg、枯草蛋白酶 309、枯草蛋白酶 147 和枯草蛋白酶 168（描述于 WO 89/06270 中）。胰蛋白酶样蛋白酶的例子是胰蛋白酶（例如猪或牛来源的）和描述于 WO84/25583 中的镰孢属蛋白酶。

[0330] 有用的蛋白酶的例子如 WO92/19729、WO98/20115、WO98/20116 和 WO98/34946，尤其是在如下位置具有一个或多个替换的变体：27、36、57、76、87、97、101、104、120、123、167、170、194、206、218、222、224、235 和 274。

[0331] 优选的市售蛋白酶包括：Novo Nordisk A/S（丹麦）以商品名 Alcalase™、Savinase™、Primase™、Durazym™、Esperase™ 和 Kannase™ 销售的那些，由 Genencor International 以商品名 Maxatase™、Maxacal™、Maxapem™、Properase™、Purafect™、和 Purafect OXP™、FN2™ 和 FN3™ 销售的那些。

[0332] 脂酶：合适的脂酶包括细菌或真菌来源的那些。包括化学或蛋白质工程修饰的突变体。有用的脂酶的例子包括来自腐质霉属的（同义词 Thermomyces）脂酶，包括 Humicola lanuginosa 的例如描述于 EP258068 和 EP305216 中的，或来自 H. insolens 如 WO96/13580 中所述的，假单胞菌属脂酶例如描述于 EP 218272 中的产碱假单胞菌或类产碱假单胞菌脂酶、例如描述于 EP 331376 中的洋葱假单胞菌脂酶、例如公开于 GB1372034 中的司徒茨氏假单胞菌脂酶，荧光假单胞菌脂酶，假单胞菌属菌株 SD705（WO95/06720 和 WO96/27002），P. wisconsinensis（WO96/12012），芽孢杆菌脂酶例如枯草芽孢杆菌脂酶（Dartois 等，（1993），Biochemica et Biophsica acta 1131，253-260）、嗜热脂肪芽孢杆菌脂酶（JP 64/744992）或短小芽孢杆菌脂酶（WO91/16422）。

[0333] 其他脂酶变体的例子如在下列文献中所述：

[0334] WO 92/05249，WO 94/01541，EP 407 225，EP 260 105，WO95/35381，WO 96/00292，WO 95/30744，WO 94/25578，WO 95/14783，WO95/22615，WO 97/04079 and WO 97/07202.

[0335] 优选的市售脂酶包括 Lipolase™ 和 Lipolase Ultra™（Novo NordiskA/S）。

[0336] 淀粉酶：。合适的淀粉酶（α 和 / 或 β）包括细菌和真菌来源的那些。包括化学修饰或蛋白质工程化的突变体。淀粉酶包括：例如，在 GB1296839 中详细描述的从地衣芽孢杆菌的特定菌株得到的 α - 淀粉酶。

[0337] 有用的淀粉酶的例子如 WO 94/02597，WO94/18314，WO 96/23837 和 WO 97/43424 中所述，尤其是在如下位置存在一个或多个替换的变体：15、23、105、106、124、128、133、154、156、181、188、190、197、202、208、209、243、264、304、305、391、408 和 444。

[0338] 市售的淀粉酶是 Duramyl™、Termamyl™、Fungamyl™ 和 BAN™（从 Novo Nordisk A/S 得到）和 Rapidase™ 和 Maxamyl P™（从 Genencor 得到）。

[0339] 纤维素酶：合适的纤维素酶包括细菌和真菌来源的那些。包括化学修饰或蛋白质工程化的突变体。合适的纤维素酶包括来自芽孢杆菌属、假单胞菌属、腐质霉属、镰孢霉属、梭孢壳属、小枝顶孢属（Acremonium）的种的纤维素酶，如公开于 US4435307，US 5648263，

US 5691178，US 5776757 和 WO 89/09259 中的从 Humicola insolens、Myceliophthora thermophila 和尖镰孢中生产的真菌纤维素酶。

[0340] 尤其适合的纤维素酶是具有护色功能的碱性或中性纤维素酶。这类纤维素酶的例子 EP 0495257，EP0531372，WO96/11262，WO96/29397，WO98/08940 中所述。其它纤维素酶变体的例子见如 WO 94/07998，EP 0531315，US 5457046，US 5686593，US 5763254，WO 95/24471，WO 98/42307 和 PCT/DK98/00299 中所述。

[0341] 市售的纤维素酶包括 Celluzyme™ 和 Carezyme™(Novo NordiskA/S)，Clazinase™ 和 Puradax HA™(Genencor International Inc.) 以及 KAC-500(B)™(Kao Corporation)。

[0342] 过氧化物酶 / 氧化酶 ：合适的过氧化物酶 / 氧化酶包括植物、细菌或真菌来源的那些。包括化学修饰或蛋白质工程化的突变体。有用的过氧化物酶的例子包括来自鬼伞菌属 (Corpinus)，例如来自 C.cinereus 的过氧化物酶及其变体，如 WO 93/24618，WO 95/10602 和 WO 98/15257 中所述。市售的过氧化物酶包括 Guardzyme™(Novo Nordisk A/S)。

[0343] 可以通过加入含有一种或多种酶的独立添加剂，或通过加入含有所有这些酶的组合添加剂，将这些洗涤剂酶包含在洗涤剂组合物中。本发明的洗涤剂添加剂即独立添加剂或组合添加剂，可以配制成例如颗粒、液体或浆液等等。优选的洗涤剂添加剂制品是颗粒，尤其是非起尘 (non-dusting) 颗粒、液体，尤其是稳定的液体，或浆液。

[0344] 非起尘颗粒可以按例如 US 4,106,991 和 4,661,452 中所公开的方法生产，并且可以任选地通过本领域已知方法进行包被。蜡样包被材料的例子是平均分子量为 1000 到 20000 的聚（环氧乙烷）产品（聚乙二醇，PEG）；具有 16 到 50 个环氧乙烷单元的乙氧基化壬基酚；乙氧基化脂肪醇，其中醇含有 12 到 20 个碳原子，且具有 15 到 80 个环氧乙烷单元；脂肪醇；脂肪酸；以及脂肪酸的单、二和三甘油酯。适于通过流化床技术应用的薄膜形成包被材料见 GB 1483591 中所述。液体酶制品可以根据已有技术通过加入多元醇（如丙二醇）、糖或糖醇、乳酸或硼酸来稳定。可以根据 EP 238,216 中公开的方法制备受保护的酶。

[0345] 本发明的洗涤剂组合物可以呈任何方便的形式，例如条形、片剂、粉剂、颗粒、糊剂或液体。液体洗涤剂可以是水性的，一般含有至多 70％的水和 0-30％的有机溶剂，或者是非水性的。

[0346] 洗涤剂组合物含有一种或多种表面活性剂，所述表面活性剂可以是非离子型的包括半极性和 / 或阴离子型和 / 或阳离子型和 / 或两性型离子表面活性剂。这些表面活性剂一般以 0.1％到 60％（重量）的水平存在。

[0347] 当包括在其中时，洗涤剂通常含有大约 1％到大约 40％的阴离子型表面活性剂，例如直链烷基苯磺酸盐、α - 烯基磺酸盐、烷基硫酸盐（脂肪醇硫酸盐）、醇乙氧基硫酸盐、仲烷基磺酸盐、α - 磺基脂肪酸甲基酯，烷基 - 或烯基丁二酸或肥皂。

[0348] 当包括在其中时，洗涤剂通常含有大约 0.2％到大约 40％的非离子表面活性剂，诸如脂肪醇乙氧基化物、壬基苯酚乙氧基化物、烷基多葡糖苷、烷基二甲基胺氧化物、乙氧基化脂肪酸单乙醇酰胺、脂肪酸单乙醇酰胺、聚羟基烷基脂肪酸酰胺，或氨基葡糖（“葡糖酰胺”）的 N- 酰基 N- 烷基衍生物。

[0349] 该洗涤剂可以含有 0-65％的洗涤助剂或配位剂例如沸石，二磷酸盐，三磷酸盐，膦酸酯，碳酸盐，柠檬酸盐，次氮基三乙酸，乙二胺四乙酸，二亚乙基三胺五乙酸、烷基 - 或链烯基琥珀酸、可溶性硅酸 盐或分层的硅酸盐（例如来自 Hoechst 的 SKS-6）。

[0350] 洗涤剂可以包含一种或多种聚合物。例子有羧甲基纤维素，聚（乙烯基吡咯烷酮），聚（乙二醇），聚（乙烯醇），聚（乙烯基吡啶 -N- 氧化物），聚（乙烯基咪唑）、聚羧酸酯例如聚丙烯酸酯，马来酸 / 丙烯酸共聚物和十二烷基甲基丙烯酸 / 丙烯酸共聚物。

[0351] 洗涤剂可以含有漂白体系，其可以包括 H_2O_2 源物质，例如过硼酸盐或过碳酸盐，这些物质又可以与形成过酸的漂白活性剂例如四乙酰乙二胺或壬酰基羟基苯磺酸盐结合。或者，漂白体系可以含有例如酰胺、酰亚胺或砜类的过氧酸。

[0352] 本发明洗涤剂组合物中的酶可以通过使用常规稳定剂来稳定，例如多元醇（如丙二醇或丙三醇）、糖或糖醇、乳酸、硼酸或硼酸衍生物（如芳香硼酸酯）、或苯基硼酸衍生物（如 4- 甲酰基苯基硼酸），并且该组合物可以按例如 WO 92/19709 和 WO 92/19708 所述配制。

[0353] 洗涤剂还可以含有其它常规去污成分，例如织物调理剂，其包括粘土、发泡增效剂、泡沫抑制剂、抗腐蚀剂、污垢悬浮剂、抗污垢再沉积剂、染料、杀菌剂、光漂白剂、增溶剂、晦暗抑制剂或香料。

[0354] 目前已构思可在洗涤剂组合物中加入任何酶，尤其是本发明的酶，加入量为每升洗涤液中加入相当于 0.01-100mg 的酶蛋白，优选每升洗涤液中加入 0.05-5mg 的酶蛋白，尤其是每升洗涤液中加入 0.1-1mg 的酶蛋白。

[0355] 另外，可以将本发明的酶掺入 WO 97/07202 中所公开的洗涤剂制品中，在此引入作为参考。

[0356] 在皮革工业中的应用

[0357] 本发明的枯草杆菌酶可以用于皮革工业，尤其是用于皮肤的脱毛。

[0358] 在该应用中，本发明的枯草杆菌酶变体优选在还含有另一种蛋白酶的酶组合物中使用。

[0359] 关于合适的其它蛋白酶的更详细的描述参阅关于适用于洗涤剂组合物中的酶的部分（见上文）。

[0360] 在毛纺工业中的应用

[0361] 本发明的枯草杆菌酶可以用于毛纺工业，尤其是用于含毛衣物的洗涤。

[0362] 在该应用中，本发明的枯草杆菌酶变体优选在还含有另一种蛋白酶的酶组合物中使用。

[0363] 关于适当的其它蛋白酶的更详细描述参阅关于适用于洗涤剂组合物中的酶的部分（见上文）。

[0364] 本发明在下列实施例中有更详细的描述，这些实施例并不以任何方式意图限制本发明要求的范围。

[0365] 材料和方法

[0366] 菌株：

[0367] 枯草芽孢杆菌 DN1885(Diderichsen 等人，1990)。

[0368] 迟缓芽孢杆菌 309 和 147 是迟缓芽孢杆菌的特殊菌株，保藏于 NCIB，编号 NCIB 10309 和 10147，而且描述于美国专利号 3,723,250 中，该专利文献本文引用作为参考。

[0369] 大肠杆菌 MC1000(M.J.Casadaban 和 S.N.Cohen(1980)；分子生物学杂志 138179-207)，用常规方法制成 r-，m+，其还描述于美国专利申请号 039,298 中。

[0370] 质粒

[0371] pJS3：大肠杆菌－枯草芽孢杆菌穿梭载体，含有编码枯草杆菌酶 309 的合成基因（由 Jacob Schiodt 等人描述于“蛋白质和肽通讯”(Protein and Peptide letters)3：39-44(1996)）。

[0372] pSX222：枯草芽孢杆菌表达载体（描述于 WO 96/34946）。

[0373] 常用分子生物学方法

[0374] 除非特别指出，DNA 操作和转化用分子生物学的标准方法进行 (Sambrook 等人 (1989) 分子克隆：实验室手册，冷泉港实验室，冷泉港，纽约；F.M.Ausubel 等人（主编）“分子生物学通用方法”(CurrentProtocols in Molecular Biology)，John Wiley and Sons，1995；C.R.Harwood 和 S.M.Cutting（主编）“芽孢杆菌的分子生物学方法”(Molecular Biological Methods for Bacillus)，John Wiley and Sons，1990)。

[0375] 用于 DNA 操作的酶根据供应商的说明书使用。

[0376] 用于 DNA 操作的酶

[0377] 除非特别指出，所有用于 DNA 操作的酶，如限制性内切酶、连接酶等等，均购自 New England Biolabs，Inc.。

[0378] 蛋白水解活性

[0379] 在本发明中蛋白水解活性以“千诺氏蛋白酶单位”(Kilo NOVOProtease Units，KNPU) 表示。活性是相对于标准酶（ **SAVINASE®** ）测定的，而且测定是建立在标准条件下（即 50℃，pH8.3，反应时间 9 分钟，测量时间 3 分钟）蛋白水解酶消化二甲基酪蛋白 (DMC) 溶液的基础之上的。可以向丹麦 Novo Nordisk A/S 索取文件 AF 220/1，该文件此处引用作为参考。

[0380] GU 即甘氨酸单位，定义为以 N- 乙酰酪蛋白作为底物，在标准条件下，于 40℃保温 15 分钟时，产生相当于 1 毫摩尔甘氨酸的氨基量的蛋白水解酶活性。

[0381] 酶活性也可以用 PNA 实验，根据与可溶性底物琥珀酰－丙氨酰－丙氨酰－脯氨酰－苯丙氨酰－对硝基苯酚的反应测量（描述于美国石油化学协会杂志 (Journal of American Oil Chemists Society)，T.M.Rothgeb，B.D.Goodlander，P.H.Garrison 和 L.A.Smith，(1988)）。

[0382] 发酵

[0383] 枯草杆菌酶的发酵于 30℃在旋转摇床上 (300r.p.m.) 含 100ml BPX 培养基的 500ml 带挡板 Erlenmeyer 锥形瓶中进行 5 天。

[0384] 因此，为了得到例如 2 升培养液，需要 20 个 Erlenmeyer 锥形瓶同时进行发酵。

[0385] 培养基

[0386] BPX：组成（每升）

[0387] 土豆淀粉 100g

[0388] 碾碎的大麦 50g

[0389] 大豆粉 20g

[0390] $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 9g

[0391] Pluronic 0.1g

[0392] 酪蛋白酸钠 10g

[0393] 培养基中的淀粉用 α-淀粉酶液化，培养基通过加热至120℃并保持45分钟灭菌。灭菌后加 $NaHCO_3$ 至 0.1M 将培养基的 pH 调至 9。

[0394] 实施例 1

[0395] 酶变体的构建和表达：

[0396] 定点诱变：

[0397] 枯草杆菌酶 309 定点诱变突变体包括活性位点环 (b)103 与 104 位之间的特定的插入，其是通过 DNA 片段的传统克隆获得的 (Sambrook 等人 (1989) 分子克隆：实验室手册，冷泉港实验室，冷泉港)，所述 DNA 片段由含有期望的插入片段之寡核苷酸（见下）的 PCR 产生。

[0398] 模板质粒 DNA 是 pJS3，或该质粒含有枯草杆菌酶 309 的类似物。

[0399] 用一段寡核苷酸指导突变的插入片段的导入以构建 S103SX 插入变体 (X ＝在 103 与 104 位之间插入的任意氨基酸残基)，产生 S103SX 枯草杆菌酶 309 变体。

[0400] 将枯草杆菌酶 309 变体转化大肠杆菌，用从这些转化子的过夜培养物中纯化的 DNA 转化枯草芽孢杆菌，方法是用限制酶消化、DNA 片段的纯化、连接、和枯草芽孢杆菌的转化。枯草芽孢杆菌的转化如 Dubnau 等人，1971，分子生物学杂志，56：209-211 中所述。

[0401] 定域随机诱变以将随机插入导入确定区域中：

[0402] 进行定域随机诱变的完整策略是：

[0403] 合成对应于插入位点侧翼的 DNA 序列中的诱变引物（寡核苷酸），该引物由定义插入片段的 DNA 碱基对分隔。

[0404] 然后，将得到的诱变引物与适当的对向引物一起用于 PCR 反应。将得到的 PCR 片段纯化和消化并克隆到大肠杆菌－枯草芽孢杆菌穿梭载体中（见下）。

[0405] 或者，如果有必要，将得到的 PCR 片段作为引物与第二个适当的对向引物一起用于第二个 PCR 反应，使得能够消化诱变区并将其克隆到穿梭载体中。PCR 反应在常规条件下进行。

[0406] 遵循这种策略，构建 SAVINASE 的定域随机文库，其中在 103-104 位置之间的活性位点环区内导入插入。

[0407] 通过诱变引物（见下文）导入突变，代表了所有 20 种氨基酸 (N ＝ 25％的 A，T，C 和 G；而 S ＝ 50％ C 和 G。通过又一轮 PCR 将所产生的 PCR 片段向 Savinase 的 N 端延伸，方法是利用如下引物，与带有由 PCR 扩增产生的 PCR 片段与重叠序列的组合：5’ CTA AATATT CGT GGT GGC GC 3’（有义），和 5GAC TTT AAC AGC GTATAG CTC AGC 3’（反义）。将延伸的 DNA 片段克隆入经修饰的质粒 pJS3 的 HindIII 和 MluI 位点（见上），对随机选出的 10 个大肠杆菌菌落进行测序，以证实含有所设计的突变。

[0408] 将诱变引物 (5’ CTA GGG GCG AGC GGT TCA GGT TCG NNSGTC AGC TCG ATT GCC CAA GGA TTG 3’（有义）) 与位于 pJS3 中 MluI 位点下游的适当的对向引物（如 5’-CCC TTT AAC CGC ACAGCG TTT-3’（反义））一起用于 PCR 反应，而质粒 pJS3 作为模板。用限制酶 HindIII 和 MluI 将所得 PCR 产物克隆到 pJS3 穿梭载体中。

[0409] 然后用周知的方法将随机文库转化入大肠杆菌。

[0410] 如此制备的文库含有大约 100,000 个单克隆 / 文库。

[0411] 对随机选取的 10 个菌落测序以确认设计的突变。

[0412] 为了纯化本发明的枯草杆菌酶变体，将含有本发明变体的枯草芽孢杆菌 pJS3 表达质粒转化到感受态枯草芽孢杆菌菌株中，并如上文所述在含 10μg/ml 氯霉素 (CAM) 的培养基中发酵。

[0413] 实施例 2

[0414] 酶变体的纯化：

[0415] 这一步骤涉及 2 升水平发酵的纯化，用于在枯草芽孢杆菌宿主细胞中产生枯草杆菌酶。

[0416] 将大约 1.6 升发酵液在 1 升离心杯中于 5000rpm 离心 35 分钟。用 10％醋酸将上清液调至 pH6.5，并在 Seitz Supra S100 过滤板上过滤。

[0417] 使用配备了 Amicon S1Y10UF 柱体的 Amicon CH2A UF 装置将滤出液浓缩至大约 400ml。在上 Bacitracin 亲和柱（室温，pH7）吸附前，先将 UF 浓缩液离心并过滤。用含 25％ 2- 丙醇和 1M 氯化钠的 0.01M 二甲基戊二酸、0.1M 硼酸和 0.002M 氯化钙缓冲液 (pH7) 于室温将蛋白酶从 Bacitracin 柱上洗脱下来。

[0418] 将来自 Bacitracin 纯化步骤具有蛋白酶活性的级分合并，并加到 750ml Sephadex G25 柱（直径 5cm，用含 0.01M 二甲基戊二酸、0.2M 硼酸和 0.002M 氯化钙，pH6.5 的缓冲液平衡过）上。

[0419] 将来自 Sephadex G25 柱具有蛋白水解活性的级分合并，并加到 150ml CM Sepharose CL 6B 阳离子交换柱（直径 5cm，用含 0.01M 二甲基戊二酸、0.2M 硼酸和 0.002M 氯化钙，pH6.5 的缓冲液平衡过）上。

[0420] 用 2 升相同缓冲液中的线形梯度 0-0.1M 氯化钠（枯草蛋白酶 147 的情况下用 0-0.2M 氯化钠）将蛋白酶洗脱下来。

[0421] 在最后的纯化步骤中，将来自 CM Sepharose 柱含有蛋白酶的级分合并，并在配备了 GR81PP 膜（购自 Danish Sugar Factories Inc.）的 Amicon 超滤室中浓缩。

[0422] 通过使用实施例 1 用于构建的技术和上述分离方法，生产并分离得到下列枯草杆菌蛋白酶 309 变体：

[0423] 在初步分析中这些变体显示优于 Savinase 的洗涤性能。

[0424] 实施例 3

[0425] 含有酶变体的洗涤剂组合物的洗涤性能：

[0426] 下列实施例提供了在指明的条件下进行的一些洗涤测试的结果。

[0427] 实验条件

[0428] 表 III：评价枯草蛋白酶 309 变体的实验条件

[0429]

洗涤剂	Europe	US
洗涤剂剂量	4g/l	1g/l
洗涤温度	30℃	25℃
洗涤时间	30min	10min
水硬度	18° dH(Ca^{2+}/Mg^{2+} = 5 ： 1)	6° dH(Ca^{2+}/Mg^{2+} = 2 ： 1)
pH	未调	未调
酶浓度	1,2,5,10,30nM	1,2,5,10,30nM
测试系统	带有搅棒的 150ml 玻璃烧杯	带有搅棒的 150ml 玻璃烧杯
纺织品 / 体积	5 片纺织品（φ2.5cm）于 50ml 洗 涤剂中	5 片纺织品（φ2.5cm）于 50ml 洗 涤剂中
测试材料	EMPA116	EMPA117

[0430] [0431] 洗涤剂

[0431] 使用的洗涤剂或是模式洗涤剂，称作洗涤剂 95，或者分别获自丹麦的超级市场 (OMO，目录 ED-9745105) 和美国 (Wisk，目录 ED-9711893)。使用前所有洗涤剂中的酶活性均用微波处理灭活。

[0432] 样本

[0433] 使用的样本为 EMPA116 和 EMPA117，获自 EMPA Testmareialen，Movenstrasse 12，CH-9015，St.Gall，瑞士。

[0434] 参照

[0435] 使用 Macbeth ColorEye 7000 型光度计测量测试材料在 460nm 的反射率 (R)。测量根据供应商的说明书进行。

[0436] 评估

[0437] 枯草杆菌酶的洗涤性能所研究的枯草杆菌酶之改善因子或性能因子评价：

[0438] 改善因子 $IF_{剂量/反应}$ 定义为含有待研究的枯草杆菌酶之洗涤剂，与所述参照枯草杆菌酶含量趋近于零之相同洗涤剂的洗涤性能曲线的斜率之比。

[0439] $IF_{剂量/反应} = a/a_{参照}$

[0440] 根据式 I 计算洗涤性能：

[0441] $$R = R_0 + \frac{a \cdot \Delta R_{max} \cdot c}{\Delta R_{max} + a \cdot c} \qquad (I);$$

[0442] 其中

[0443] R 是以反射率单位表示的洗涤性能；R_0 是拟合曲线对 Y 轴的截距（空白）；a 是当 c 趋近于 0 时拟合曲线的斜率，c 是酶浓度；且 ΔR_{MAX} 是当 c 趋向于无穷大时的理论最大洗涤效率。

[0444] 性能因子 P 根据式 II 计算：

[0445] $P = (R_{变体} - R_{空白}) / (R_{Savinase} - R_{空白})$ (II)

[0446] 其中

[0447] $R_{变体}$：用 10nM 变体洗涤后测试材料的反射率；$R_{Savinase}$：用 10nM **Savinase®** 洗涤后测试材料的反射率；$R_{空白}$：不用酶洗涤后测试材料的反射率。

[0448] US（洗涤剂：US Wisk，样本：EMPA117）

[0449]

变体	$IF_{剂量/反应}$	P
S103SA		1.3
S103ST	＞ 3	2.3

[0450] *P 在 [E] = 5nM 计算

[0451] 由此可见，本发明的枯草杆菌酶与 **SAVINASE®** 相比在洗涤性能方面有所改善。

[0452] 序列表

[0453]

<110> Novo Nordisk A/S

<120> 在活性位点环区中具有额外氨基酸残基的 I-S1 和 I-S2 亚组的枯草杆菌酶

<130> 5798.204

<140>
<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 275
<212> PRT
<213> 地衣芽孢杆菌

<400> 1

```
Ala Gln Thr Val Pro Tyr Gly Ile Pro Leu Ile Lys Ala Asp Lys Val
  1               5                  10                  15

Gln Ala Gln Gly Phe Lys Gly Ala Asn Val Lys Val Ala Val Leu Asp
             20                  25                  30

Thr Gly Ile Gln Ala Ser His Pro Asp Leu Asn Val Val Gly Gly Ala
         35                  40                  45

Ser Phe Val Ala Gly Glu Ala Tyr Asn Thr Asp Gly Asn Gly His Gly
     50                  55                  60

Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asp Asn Thr Thr Gly Val
 65                  70                  75                  80

Leu Gly Val Ala Pro Ser Val Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Asn
                 85                  90                  95

Ser Ser Gly Ser Gly Thr Xaa Tyr Ser Gly Ile Val Ser Gly Ile Glu
            100                 105                 110

Trp Ala Thr Thr Asn Gly Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly
        115                 120                 125

Pro Ser Gly Ser Thr Ala Met Lys Gln Ala Val Asp Asn Ala Tyr Ala
```

[0454]

130 135 140

Arg Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Ser Gly Ser Ser Gly
145 150 155 160

Asn Thr Asn Thr Ile Gly Tyr Pro Ala Lys Tyr Asp Ser Val Ile Ala
165 170 175

Val Gly Ala Val Asp Ser Asn Ser Asn Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val
180 185 190

Gly Ala Glu Leu Glu Val Met Ala Pro Gly Ala Gly Val Tyr Ser Thr
195 200 205

Tyr Pro Thr Ser Thr Tyr Ala Thr Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Ser
210 215 220

Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn
225 230 235 240

Leu Ser Ala Ser Gln Val Arg Asn Arg Leu Ser Ser Thr Ala Thr Tyr
245 250 255

Leu Gly Ser Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Glu Ala
260 265 270

Ala Ala Gln
275

<210> 2
<211> 270
<212> PRT
<213> 迟缓芽孢杆菌

<400> 2
Ala Gln Ser Val Pro Trp Gly Ile Ser Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala
1 5 10 15

His Asn Arg Gly Leu Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp
20 25 30

Thr Gly Ile Ser Thr His Pro Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser
35 40 45

Phe Val Pro Gly Glu Pro Ser Thr Gln Asp Gly Asn Gly His Gly Thr
50 55 60

[0455]

His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu
65 70 75 80

Gly Val Ala Pro Ser Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala
85 90 95

Ser Gly Ser Gly Ser Xaa Val Ser Ser Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp
100 105 110

Ala Gly Asn Asn Gly Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Pro
115 120 125

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

Gly Val Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Gly Ala Gly Ser Ile
145 150 155 160

Ser Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp
165 170 175

Gln Asn Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Ala Gly Leu Asp
180 185 190

Ile Val Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Ser Thr
195 200 205

Tyr Ala Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly
210 215 220

Ala Ala Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln
225 230 235 240

Ile Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Ser Leu Gly Ser Thr Asn
245 250 255

Leu Tyr Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
260 265 270

```
No: 1         10         20         30         40         50
a)  AQSVPYGVSQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLKVAGGASM
b)  AQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTGSGVKVAVLDTGI*STHPDLNIRGGASF

No:           60         70         80         90         100
a)  VPSETNPFQDNNSHGTHVAGTVAALNNSIGVLGVAPSASLYAVKVLGADG
b)  VPGEPST*QDGNGHGTHVAGTIAALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVLGASG

No:           110        120        130        140        150
a)  SGQYSWIINGIEWAIANNMDVINMSLGGPSGSAALKAAVDKAVASGVVVV
b)  SGSVSSIAQGLEWAGNNGMHVANLSLGSPSPSATLEQAVNSATSRGVLVV

No:           160        170        180        190        200
a)  AAAGNEGTSGSSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSSNQRASFSSVGPELDVMA
b)  AASGNSG*AGS***ISYPARYANAMAVGATDQNNNRASFSQYGAGLDIVA

No:           210        220        230        240        250
a)  PGVSIQSTLPGNKYGAYNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNWTNTQVRSSL
b)  PGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGAAALVKQKNPSWSNVQIRNHL

No:           260        270  275
a)  ENTTTKLGDSFYYGKGLINVQAAAQ
b)  KNTATSLGSTNLYGSGLVNAEAATR
```

图 1

```
No: 1                   10                  20                  30
a)  A-Q-S-V-P-Y-G-V-S-Q-I-K-A-P-A-L-H-S-Q-G-Y-T-G-S-N-V-K-V-A-V-
b)  A-Q-S-V-P-W-G-I-S-R-V-Q-A-P-A-A-H-N-R-G-L-T-G-S-G-V-K-V-A-V-

No:                 40                  50                  60
a)  I-D-S-G-I-D-S-S-H-P-D-L-K-V-A-G-G-A-S-M-V-P-S-E-T-N-P-F-Q-D-
b)  L-D-T-G-I-*-S-T-H-P-D-L-N-I-R-G-G-A-S-F-V-P-G-E-P-*-S-T-Q-D-

No:                 70                  80                  90
a)  N-N-S-H-G-T-H-V-A-G-T-V-A-A-L-N-N-S-I-G-V-L-G-V-A-P-S-A-S-L-
b)  G-N-G-H-G-T-H-V-A-G-T-I-A-A-L-N-N-S-I-G-V-L-G-V-A-P-S-A-E-L-
No:                 100                 110                 120
a)  Y-A-V-K-V-L-G-A-D-G-S-G-Q-Y-S-W-I-I-N-G-I-E-W-A-I-A-N-N-M-D-
b)  Y-A-V-K-V-L-G-A-S-G-S-G-S-V-S-S-I-A-Q-G-L-E-W-A-G-N-N-G-M-H-
No:                 130                 140                 150
a)  V-I-N-M-S-L-G-G-P-S-G-S-A-A-L-K-A-A-V-D-K-A-V-A-S-G-V-V-V-V-
b)  V-A-N-L-S-L-G-S-P-S-P-S-A-T-L-E-Q-A-V-N-S-A-T-S-R-G-V-L-V-V-
No:                 160                 170                 180
a)  A-A-A-G-N-E-G-T-S-G-S-S-S-T-V-G-Y-P-G-K-Y-P-S-V-I-A-V-G-A-V-
b)  A-A-S-G-N-S-G-A-*-G-S-I-S-*-*-*-Y-P-A-R-Y-A-N-A-M-A-V-G-A-T-
No:                 190                 200                 210
a)  D-S-S-N-Q-R-A-S-F-S-S-V-G-P-E-L-D-V-M-A-P-G-V-S-I-Q-S-T-L-P-
b)  D-Q-N-N-N-R-A-S-F-S-Q-Y-G-A-G-L-D-I-V-A-P-G-V-N-V-Q-S-T-Y-P-
No:                 220                 230                 240
a)  G-N-K-Y-G-A-Y-N-G-T-S-M-A-S-P-H-V-A-G-A-A-A-L-I-L-S-K-H-P-N-
b)  G-S-T-Y-A-S-L-N-G-T-S-M-A-T-P-H-V-A-G-A-A-A-L-V-K-Q-K-N-P-S-
No:                 250                 260                 270
a)  W-T-N-T-Q-V-R-S-S-L-E-N-T-T-T-K-L-G-D-S-F-Y-Y-G-K-G-L-I-N-V-
b)  W-S-N-V-Q-I-R-N-H-L-K-N-T-A-T-S-L-G-S-T-N-L-Y-G-S-G-L-V-N-A-
No:         275
a)  Q-A-A-A-Q
b)  E-A-A-T-R
```

图 1a

```
No.:          10         20         30         40         50
a)  AQSVPYGVSQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLKVAGGASM
g)  AQTVPYGIPLIKADKVQAQGFKGANVKVAVLDTGIQASHPDLNVVGGASF

No.:          60         70         80         90         100
a)  VPSETNPFQDNNSHGTHVAGTVAALNNSIGVLGVAPSASLYAVKVLGADG
g)  VAGEAYN*TDGNGHGTHVAGTVAALDNTTGVLGVAPSVSLYAVKVLNSSG

No.:          110        120        130        140        150
a)  SGQYSWIINGIEWAIANNMDVINMSLGGPSGSAALKAAVDKAVASGVVVV
b)  SGTYSGIVSGIEWATTNGMDVINMSLGGPSGSTAMKQAVDNAYARGVVVV

No.:          160        170        180        190        200
a)  AAAGNEGTSGSSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSSNQRASFSSVGPELDVMA
b)  AAAGNSGSSGNTNTIGYPAKYDSVIAVGAVDSNSNRASFSSVGAELEVMA

No.:          210        220        230        240        250
a)  PGVSIQSTLPGNKYGAYNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNWTNTQVRSSL
b)  PGAGVYSTYPTSTYATLNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNLSASQVRNRL

No.:          260        270  275
a)  ENTTTKLGDSFYYGKGLINVQAAAQ
b)  SSTATYLGSSFYYGKGLINVEAAAQ
```

图 2

```
No: 1                   10                  20                  30
a)  A-Q-S-V-P-Y-G-V-S-Q-I-K-A-P-A-L-H-S-Q-G-Y-T-G-S-N-V-K-V-A-V-
g)  A-Q-T-V-P-Y-G-I-P-L-I-K-A-D-K-V-Q-A-Q-G-F-K-G-A-N-V-K-V-A-V-

No:                 40                  50                  60
a)  I-D-S-G-I-D-S-S-H-P-D-L-K-V-A-G-G-A-S-M-V-P-S-E-T-N-P-F-Q-D-
g)  L-D-T-G-I-Q-A-S-H-P-D-L-N-V-V-G-G-A-S-F-V-A-G-E-A-*-Y-N-T-D-

No:                 70                  80                  90
a)  H-G-T-H-V-N-N-S-A-G-T-V-A-A-L-N-N-S-I-G-V-L-G-V-A-P-S-A-S-L-
g)  G-N-G-H-G-T-H-V-A-G-T-V-A-A-L-D-N-T-T-G-V-L-G-V-A-P-S-V-S-L-

No:                 100                 110                 120
a)  Y-A-V-K-V-L-G-A-D-G-S-G-Q-Y-S-W-I-I-N-G-I-E-W-A-I-A-N-N-M-D-
g)  Y-A-V-K-V-L-N-S-S-G-S-G-T-Y-S-G-I-V-S-G-I-E-W-A-T-T-N-G-M-D-

No:                 130                 140                 150
a)  V-I-N-M-S-L-G-G-P-S-G-S-A-A-L-K-A-A-V-D-K-A-V-A-S-G-V-V-V-V-
g)  V-I-N-M-S-L-G-G-P-S-G-S-T-A-M-K-Q-A-V-D-N-A-Y-A-R-G-V-V-V-V-
No:                 160                 170                 180
a)  A-A-A-G-N-E-G-T-S-G-S-S-S-T-V-G-Y-P-G-K-Y-P-S-V-I-A-V-G-A-V-
g)  A-A-A-G-N-S-G-S-S-G-N-T-N-T-I-G-Y-P-A-K-Y-D-S-V-I-A-V-G-A-V-
No:                 190                 200                 210
a)  D-S-S-N-Q-R-A-S-F-S-S-V-G-P-E-L-D-V-M-A-P-G-V-S-I-Q-S-T-L-P-
g)  D-S-N-S-N-R-A-S-F-S-S-V-G-A-E-L-E-V-M-A-P-G-A-G-V-Y-S-T-Y-P-
No:                 220                 230                 240
a)  G-N-K-Y-G-A-Y-N-G-T-S-M-A-S-P-H-V-A-G-A-A-A-L-I-L-S-K-H-P-N-
g)  T-S-T-Y-A-T-L-N-G-T-S-M-A-S-P-H-V-A-G-A-A-A-L-I-L-S-K-H-P-N-
No:                 250                 260                 270
a)  W-T-N-T-Q-V-R-S-S-L-E-N-T-T-T-K-L-G-D-S-F-Y-Y-G-K-G-L-I-N-V-
g)  L-S-A-S-Q-V-R-N-R-L-S-S-T-A-T-Y-L-G-S-S-F-Y-Y-G-K-G-L-I-N-V-
No:         275
a)  Q-A-A-A-Q
g)  E-A-A-A-Q
```

图 2a

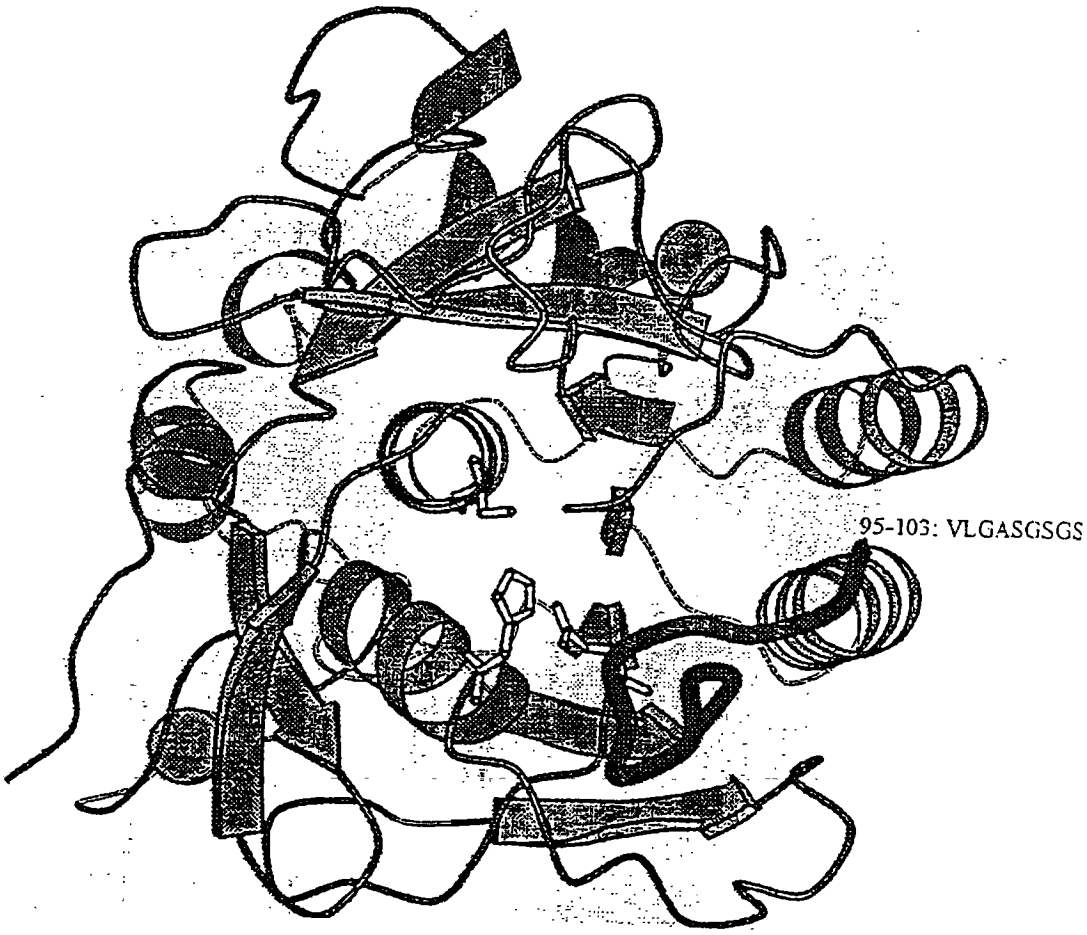


图 3