



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106029881 B

(45) 授权公告日 2023. 01. 10

(21) 申请号 201480075346.6

(22) 申请日 2014.12.12

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106029881 A

(43) 申请公布日 2016.10.12

(30) 优先权数据
61/915,737 2013.12.13 US
62/069,200 2014.10.27 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2016.08.11

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2014/070107 2014.12.12

(87) PCT国际申请的公布数据
W02015/089447 EN 2015.06.18

(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 M·科尔克曼 R·梅耶达尔

F·格德埃格伯 L·M·巴别
A·H·凯利特-史密斯 H·穆尔德
R·R·博特 M·C·斯科特谢尔

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

专利代理师 史文静 黄革生

(51) Int.Cl.
C12N 9/54 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 1606618 A, 2005.04.13
NCBI DATABASE.AGS78407, AprBG, partial
[Alkalihalobacillus gibsonii].《Genbank》
.2013,
NCBI DATABASE.AGS78407, AprBG, partial
[Alkalihalobacillus gibsonii].《Genbank》
.2013,

审查员 田颖

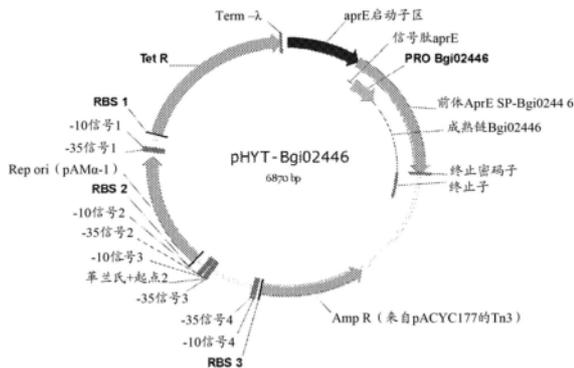
权利要求书3页 说明书71页
序列表60页 附图20页

(54) 发明名称

吉氏芽孢杆菌-进化枝的丝氨酸蛋白酶

(57) 摘要

本公开内容涉及从吉氏芽孢杆菌(Bacillus gibsonii)克隆的丝氨酸蛋白酶及其变体。包含所述丝氨酸蛋白酶的组合物适用于清洁织物和硬质表面,以及多种工业应用。



1. 一种吉氏芽孢杆菌 (*Bacillus Gibsonii*)-进化枝的重组多肽,其中所述重组多肽具有蛋白水解活性,且所述重组多肽由SEQ ID NO: 81的氨基酸序列组成。

2. 一种组合物,包含表面活性剂和权利要求1所述的重组多肽。

3. 根据权利要求2所述的组合物,其中所述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、两性离子表面活性剂、两性表面活性剂、半极性非离子表面活性剂以及它们的组合。

4. 根据权利要求3所述的组合物,其中所述表面活性剂是离子表面活性剂。

5. 根据权利要求3所述的组合物,其中所述表面活性剂是非离子表面活性剂。

6. 根据权利要求2-5中任一项所述的组合物,其中所述组合物是洗涤剂组合物。

7. 根据权利要求6所述的组合物,其中所述洗涤剂组合物选自衣物洗涤剂、织物软化洗涤剂、餐具洗涤用洗涤剂和硬质表面清洁洗涤剂。

8. 根据权利要求6所述的组合物,其中所述组合物还包含至少一种钙离子和/或锌离子。

9. 根据权利要求2-5和7-8中任一项所述的组合物,其中所述组合物还包含至少一种稳定剂。

10. 根据权利要求2-5和7-8中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含0.001重量%至1.0重量%的所述重组多肽。

11. 根据权利要求2-5和7-8中任一项所述的组合物,还包含至少一种漂白剂。

12. 根据权利要求2-5和7-8中任一项所述的组合物,其中所述组合物不含磷酸盐。

13. 根据权利要求2-5和7-8中任一项所述的组合物,其中所述组合物含有磷酸盐。

14. 根据权利要求2-5和7-8中任一项所述的组合物,其中所述组合物不含硼酸盐。

15. 根据权利要求2-5和7-8中任一项所述的组合物,其中所述组合物含有硼酸盐。

16. 根据权利要求2-5和7-8中任一项所述的组合物,还包含至少一种助剂成分。

17. 根据权利要求2-5和7-8中任一项所述的组合物,其中所述组合物是固体或液体。

18. 根据权利要求2-5和7-8中任一项所述的组合物,其中所述组合物是颗粒、粉末、棒、片剂、凝胶、糊剂或单位剂量组合物。

19. 根据权利要求2-5和7-8中任一项所述的组合物,还包含一种或多种选自下列的另外的酶或酶衍生物: 酰基转移酶、 α -淀粉酶、 β -淀粉酶、 α -半乳糖苷酶、阿拉伯糖苷酶、芳基酯酶、 β -半乳糖苷酶、卡拉胶酶、过氧化氢酶、纤维二糖水解酶、纤维素酶、软骨素酶、角质酶、内切- β -1,4-葡聚糖酶、内切- β -甘露聚糖酶、外切-甘露聚糖酶、半乳聚糖酶、葡糖淀粉酶、半纤维素酶、透明质酸酶、角蛋白酶、漆酶、乳糖酶、木质素酶、脂氧合酶、甘露聚糖酶、金属蛋白酶、氧化酶、果胶酸裂解酶、果胶乙酰酯酶、果胶酶、戊聚糖酶、过水解酶、过氧化物酶、酚氧化酶、磷酸酶、磷脂酶、植酸酶、聚半乳糖醛酸酶、普鲁兰酶、鼠李半乳糖醛酸酶、 β -葡聚糖酶、鞣酸酶、转谷氨酰胺酶、木聚糖乙酰酯酶、木聚糖酶、木葡聚糖酶、木糖苷酶、另外的丝氨酸蛋白酶以及它们的组合。

20. 根据权利要求2-5和7-8中任一项所述的组合物,还包含一种或多种选自下列的另外的酶或酶衍生物: 酯酶、脂酶、蛋白酶、还原酶以及它们的组合。

21. 根据权利要求2-5和7-8中任一项所述的组合物,其中所述组合物在8至12的pH下配制。

22. 一种用于非疾病治疗目的的清洁方法,包括使表面或物品与包含权利要求1所述的重组多肽的组合物接触。

23. 一种用于非疾病治疗目的的清洁方法,包括使表面或物品与权利要求2-21中任一项所述的组合物接触。

24. 根据权利要求22或权利要求23所述的方法,其中所述物品是餐具。

25. 根据权利要求22或权利要求23所述的方法,其中所述物品是织物。

26. 根据权利要求22或23中任一项所述的方法,还包括在使所述表面或物品与所述组合物接触之后漂洗所述表面或物品的步骤。

27. 根据权利要求26所述的方法,还包括在所述漂洗所述表面或物品之后干燥所述表面或物品的步骤。

28. 一种用于非疾病治疗目的的清洁表面或物品的方法,包括:提供权利要求2-21中任一项所述的组合物和需要清洁的表面或物品;以及使所述组合物与所述需要清洁的表面或物品在适于清洁所述表面或物品的条件下接触以产生经清洁的表面或物品。

29. 根据权利要求28所述的方法,还包括漂洗所述经清洁的表面或物品以产生经漂洗的表面或物品的步骤。

30. 根据权利要求29所述的方法,还包括干燥所述经漂洗的表面或物品的步骤。

31. 一种用于产生重组多肽的方法,包括:

用表达载体稳定转化宿主细胞,所述表达载体包含编码权利要求1所述的多肽的多核苷酸;

在适于所述经转化的宿主细胞产生所述多肽的条件下培养所述宿主细胞;以及回收所述多肽。

32. 根据权利要求31所述的方法,其中所述宿主细胞是丝状真菌或细菌细胞。

33. 根据权利要求31或权利要求32所述的方法,其中所述宿主细胞选自芽孢杆菌属菌种(*Bacillus spp.*)、链霉菌属菌种(*Streptomyces spp.*)、埃希氏菌属菌种(*Escherichia spp.*)、曲霉菌属菌种(*Aspergillus spp.*)、木霉菌属菌种(*Trichoderma spp.*)、假单胞菌属菌种(*Pseudomonas spp.*)、棒状杆菌属菌种(*Corynebacterium spp.*)、酵母属菌种(*Saccharomyces spp.*)或毕赤酵母属菌种(*Pichia spp.*)。

34. 根据权利要求31或32所述的方法,其中所述表达载体包含编码异源前肽的异源多核苷酸序列。

35. 根据权利要求31或32所述的方法,其中所述表达载体包含异源启动子和编码异源信号肽的多核苷酸序列中的一者或两者。

36. 根据权利要求31或32所述的方法,其中在培养基或发酵液中培养所述宿主细胞。

37. 一种多核苷酸,其所包含的核酸序列:

(i) 编码SEQ ID NO:81的氨基酸序列;

(ii) 与SEQ ID NO:80具有相同的序列;或者

(iii) 与SEQ ID NO:80互补。

38. 一种包含权利要求37所述的多核苷酸的表达载体。

39. 一种用权利要求38所述的表达载体转化的宿主细胞。

40. 根据权利要求39所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是选自下列的菌种:芽孢杆菌

属菌种、链霉菌属菌种、埃希氏菌属菌种、曲霉菌属菌种、木霉菌属菌种、假单胞菌属菌种、棒状杆菌属菌种、酵母属菌种或毕赤酵母属菌种。

41. 根据权利要求40所述的宿主细胞, 其中所述芽孢杆菌属菌种是枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。

42. 一种包含权利要求1所述的多肽的组合物, 其中所述组合物选自纺织物处理组合物、皮革处理组合物、毛处理组合物、伤口清洁组合物和接触镜片清洁组合物。

吉氏芽孢杆菌-进化枝的丝氨酸蛋白酶

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2013年12月13日提交的美国临时专利申请61/915737和于2014年10月27日提交的美国临时专利申请62/069200的权益,两篇临时申请的内容均在此通过引用以其整体并入本文。

技术领域

[0003] 本公开内容涉及从吉氏芽孢杆菌 (*Bacillus gibsonii*) 克隆的丝氨酸蛋白酶及其变体。包含所述丝氨酸蛋白酶的组合物适用于清洁织物和硬质表面,以及多种工业应用。

背景技术

[0004] 丝氨酸蛋白酶是具有引发蛋白质肽键的水解的活性位点丝氨酸的酶 (EC 3.4.21)。丝氨酸蛋白酶基于其结构有两大类:胰凝乳蛋白酶样(胰蛋白酶样)和枯草杆菌蛋白酶样。原型枯草杆菌蛋白酶 (EC 3.4.21.62) 初始从枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 获得。枯草杆菌蛋白酶及其同源物是MEROPS分类方案的S8肽酶家族的成员。S8家族的成员具有在其氨基酸序列中具有顺序为Asp、His和Ser的催化三联体。

[0005] 尽管丝氨酸蛋白酶在工业酶领域中早已是已知的,但是仍然需要适于特定条件和用途的其它丝氨酸蛋白酶。

发明内容

[0006] 本发明的组合物和方法涉及吉氏芽孢杆菌-进化枝枯草杆菌蛋白酶,包括从吉氏芽孢杆菌克隆的重组丝氨酸蛋白酶及其变体。本发明的组合物和方法还涉及通过常规分子生物学技术产生的吉氏芽孢杆菌-进化枝的重组丝氨酸蛋白酶(参见,例如Sambrook等人, *Molecular Cloning*: Cold Spring Harbor Laboratory Press)。包含所述丝氨酸蛋白酶的组合物适用于清洁织物和硬质表面,以及多种工业应用。

[0007] 一些实施方案涉及吉氏芽孢杆菌-进化枝的重组多肽或其活性片段,其中所述重组多肽或其活性片段具有蛋白水解活性。另一些实施方案涉及吉氏芽孢杆菌-进化枝的重组多肽或其活性片段,其中所述重组多肽或其活性片段具有蛋白水解活性,前提条件是所述吉氏芽孢杆菌-进化枝不包含W003054184-CAE48421、W02007131657-CAS91385、W02008086916-CAV33594或NCBI登录号AGS78407。

[0008] 另一些实施方案涉及吉氏芽孢杆菌-进化枝的重组多肽或其活性片段,所述重组多肽或其活性片段具有蛋白水解活性并且包含DXGIXXHSDLXXXGGASXXXXXPTTADLNXHGTH (SEQ ID NO:47) 或DXGIXXHSDLXXXGGASXXXXXTTADLXXHGTH (SEQ ID NO:90) 基序,其中起始D是活性位点天冬氨酸残基且倒数第二个H是活性位点组氨酸并且X是任意氨基酸。另一个实施方案涉及吉氏芽孢杆菌-进化枝的重组多肽或其活性片段,所述重组多肽或其活性片段具有蛋白水解活性并且包含SEQ ID NO:47或90的氨基酸序列,其中起始D是活性位点天冬氨酸残基且倒数第二个H是活性位点组氨酸并且X是任意氨基酸,前提条件是所述吉氏芽

孢杆菌-进化枝不包含W003054184-CAE48421、W02007131657-CAS91385、W02008086916-CAV33594或NCBI登录号AGS78407。

[0009] 另一个实施方案涉及吉氏芽孢杆菌-进化枝的重组多肽或其活性片段,其中具有蛋白水解活性并且包含SEQ ID NO:47或90的氨基酸序列的重组多肽或其活性片段还包含与SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有至少70%同一性的氨基酸序列。

[0010] 另一个实施方案涉及吉氏芽孢杆菌-进化枝的重组多肽或其活性片段,其中具有蛋白水解活性并且包含SEQ ID NO:47或90的氨基酸序列的重组多肽或其活性片段还包含与SEQ ID NO:11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有至少70%同一性的氨基酸序列。

[0011] 另一个实施方案涉及吉氏芽孢杆菌-进化枝的重组多肽或其活性片段,其中具有蛋白水解活性并且包含SEQ ID NO:47或90的氨基酸序列的重组多肽或其活性片段还包含与SEQ ID NO:57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有至少70%同一性的氨基酸序列。

[0012] 另一些实施方案涉及吉氏芽孢杆菌-进化枝的重组多肽或其活性片段,其中具有蛋白水解活性并且包含SEQ ID NO:47或90的氨基酸序列的重组多肽或其活性片段还包含与SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有至少70%同一性的氨基酸序列,前提条件是所述吉氏芽孢杆菌-进化枝不包含W003054184-CAE48421、W02007131657-CAS91385、W02008086916-CAV33594或NCBI登录号AGS78407。

[0013] 另一些实施方案涉及吉氏芽孢杆菌-进化枝的重组多肽或其活性片段,其中具有蛋白水解活性并且包含SEQ ID NO:47或90的氨基酸序列的重组多肽或其活性片段还包含与SEQ ID NO:11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有至少70%同一性的氨基酸序列,前提条件是所述吉氏芽孢杆菌-进化枝不包含W003054184-CAE48421、W02007131657-CAS91385、W02008086916-CAV33594或NCBI登录号AGS78407。

[0014] 另一些实施方案涉及吉氏芽孢杆菌-进化枝的重组多肽或其活性片段,其中具有蛋白水解活性并且包含SEQ ID NO:47或90的氨基酸序列的重组多肽或其活性片段还包含与SEQ ID NO:57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有至少70%同一性的氨基酸序列,前提条件是所述吉氏芽孢杆菌-进化枝不包含W003054184-CAE48421、W02007131657-CAS91385、W02008086916-CAV33594或NCBI登录号AGS78407。

[0015] 另一些实施方案涉及吉氏芽孢杆菌-进化枝的重组多肽或其活性片段,其中具有蛋白水解活性并且包含SEQ ID NO:47或90的氨基酸序列的重组多肽或其活性片段还包含与SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有至少70%同一性的氨基酸序列,前提条件是SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列不包含W003054184-CAE48421或W02007131657-CAS91385。

[0016] 另一些实施方案涉及吉氏芽孢杆菌-进化枝的重组多肽或其活性片段,其中具有蛋白水解活性并且包含SEQ ID NO:47或90的氨基酸序列的重组多肽或其活性片段还包含

与SEQ ID NO:11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有至少70%同一性的氨基酸序列,前提条件是SEQ ID NO:11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列不包含W003054184-CAE48421或W02007131657-CAS91385。

[0017] 另一些实施方案涉及吉氏芽孢杆菌-进化枝的重组多肽或其活性片段,其中具有蛋白水解活性并且包含SEQ ID NO:47或90的氨基酸序列的重组多肽或其活性片段还包含与SEQ ID NO:57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有至少70%同一性的氨基酸序列,前提条件是SEQ ID NO:57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列不包含W003054184-CAE48421或W02007131657-CAS91385。

[0018] 另一些实施方案涉及吉氏芽孢杆菌-进化枝的重组多肽或其活性片段,其中具有蛋白水解活性并且包含SEQ ID NO:47或90的氨基酸序列的重组多肽或其活性片段还包含与SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有至少70%同一性的氨基酸序列,前提条件是SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列不包含W003054184-CAE48421、W02007131657-CAS91385或NCBI登录号AGS78407。

[0019] 另一些实施方案涉及吉氏芽孢杆菌-进化枝的重组多肽或其活性片段,其中具有蛋白水解活性并且包含SEQ ID NO:47或90的氨基酸序列的重组多肽或其活性片段还包含与SEQ ID NO:11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有至少70%同一性的氨基酸序列,前提条件是SEQ ID NO:11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列不包含W003054184-CAE48421、W02007131657-CAS91385或NCBI登录号AGS78407。

[0020] 另一些实施方案涉及吉氏芽孢杆菌-进化枝的重组多肽或其活性片段,其中具有蛋白水解活性并且包含SEQ ID NO:47或90的氨基酸序列的重组多肽或其活性片段还包含与SEQ ID NO:57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有至少70%同一性的氨基酸序列,前提条件是SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列不包含W003054184-CAE48421、W02007131657-CAS91385或NCBI登录号AGS78407。

[0021] 另一个实施方案涉及吉氏芽孢杆菌-进化枝的重组多肽或其活性片段,其中具有蛋白水解活性并且包含SEQ ID NO:47或90的氨基酸序列的重组多肽或其活性片段还包含与SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有至少70%同一性的氨基酸序列,前提条件是SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列不包含W003054184-CAE48421或W02007131657-CAS91385,并且另一前提条件是所述吉氏芽孢杆菌-进化枝不包含W003054184-CAE48421、W02007131657-CAS91385或W02008086916-CAV33594。

[0022] 另一个实施方案涉及吉氏芽孢杆菌-进化枝的重组多肽或其活性片段,其中具有蛋白水解活性并且包含SEQ ID NO:47或90的氨基酸序列的重组多肽或其活性片段还包含与SEQ ID NO:11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有至少70%同一性的氨基酸序列,前提条件是SEQ ID NO:11、15、19、23、

49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列不包含W003054184-CAE48421或W02007131657-CAS91385,并且另一前提条件是所述吉氏芽孢杆菌-进化枝不包含W003054184-CAE48421、W02007131657-CAS91385或W02008086916-CAV33594。

[0023] 另一个实施方案涉及吉氏芽孢杆菌-进化枝的重组多肽或其活性片段,其中具有蛋白水解活性并且包含SEQ ID NO:47或90的氨基酸序列的重组多肽或其活性片段还包含与SEQ ID NO:57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有至少70%同一性的氨基酸序列,前提条件是SEQ ID NO:57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列不包含W003054184-CAE48421或W02007131657-CAS91385,并且另一前提条件是所述吉氏芽孢杆菌-进化枝不包含W003054184-CAE48421、W02007131657-CAS91385或W02008086916-CAV33594。

[0024] 另一个实施方案涉及吉氏芽孢杆菌-进化枝的重组多肽或其活性片段,其中具有蛋白水解活性并且包含SEQ ID NO:47或90的氨基酸序列的重组多肽或其活性片段还包含与SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有至少70%同一性的氨基酸序列,前提条件是SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列不包含W003054184-CAE48421、W02007131657-CAS91385和NCBI登录号AGS78407,并且另一前提条件是所述吉氏芽孢杆菌-进化枝不包含W003054184-CAE48421、W02007131657-CAS91385、W02008086916-CAV33594或NCBI登录号AGS78407。

[0025] 另一个实施方案涉及吉氏芽孢杆菌-进化枝的重组多肽或其活性片段,其中具有蛋白水解活性并且包含SEQ ID NO:47或90的氨基酸序列的重组多肽或其活性片段还包含与SEQ ID NO:11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有至少70%同一性的氨基酸序列,前提条件是SEQ ID NO:11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列不包含W003054184-CAE48421、W02007131657-CAS91385和NCBI登录号AGS78407,并且另一前提条件是所述吉氏芽孢杆菌-进化枝不包含W003054184-CAE48421、W02007131657-CAS91385、W02008086916-CAV33594或NCBI登录号AGS78407。

[0026] 另一个实施方案涉及吉氏芽孢杆菌-进化枝的重组多肽或其活性片段,其中具有蛋白水解活性并且包含SEQ ID NO:47或90的氨基酸序列的重组多肽或其活性片段还包含与SEQ ID NO:57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有至少70%同一性的氨基酸序列,前提条件是SEQ ID NO:57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列不包含W003054184-CAE48421、W02007131657-CAS91385和NCBI登录号AGS78407,并且另一前提条件是所述吉氏芽孢杆菌-进化枝不包含W003054184-CAE48421、W02007131657-CAS91385、W02008086916-CAV33594或NCBI登录号AGS78407。

[0027] 另一些实施方案涉及吉氏芽孢杆菌-进化枝的重组多肽或其活性片段,其中具有蛋白水解活性并且包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的重组多肽或其活性片段还包含与SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51或52的氨基酸序列具有至少70%同一性的氨基酸序列。

[0028] 另一些实施方案涉及吉氏芽孢杆菌-进化枝的重组多肽或其活性片段,其中具有蛋白水解活性并且包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的重组多肽或其活性片段还包含与SEQ

ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51或52的氨基酸序列具有至少70%同一性的氨基酸序列,前提条件是SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51或52的氨基酸序列不包含W003054184-CAE48421或W02007131657-CAS91385。

[0029] 在一些实施方案中,本发明是这样的重组多肽或其活性片段,其具有蛋白水解活性,包含与SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有至少95%同一性的氨基酸序列,前提条件是所述氨基酸序列不包含W003054184-CAE48421或W02007131657-CAS91385。

[0030] 在一些实施方案中,本发明是这样的重组多肽或其活性片段,其具有蛋白水解活性,包含与SEQ ID NO:11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有至少95%同一性的氨基酸序列,前提条件是所述氨基酸序列不包含W003054184-CAE48421或W02007131657-CAS91385。

[0031] 在一些实施方案中,本发明是这样的重组多肽或其活性片段,其具有蛋白水解活性,包含与SEQ ID NO:57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有至少95%同一性的氨基酸序列,前提条件是所述氨基酸序列不包含W003054184-CAE48421或W02007131657-CAS91385。

[0032] 在一些实施方案中,本发明是这样的重组多肽或其活性片段,其具有蛋白水解活性,包含与SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有至少95%同一性的氨基酸序列,前提条件是所述氨基酸序列不包含W003054184-CAE48421、W02007131657-CAS91385或NCBI登录号AGS78407。

[0033] 在一些实施方案中,本发明是这样的重组多肽或其活性片段,其具有蛋白水解活性,包含与SEQ ID NO:11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有至少95%同一性的氨基酸序列,前提条件是所述氨基酸序列不包含W003054184-CAE48421、W02007131657-CAS91385或NCBI登录号AGS78407。

[0034] 在一些实施方案中,本发明是这样的重组多肽或其活性片段,其具有蛋白水解活性,包含与SEQ ID NO:57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有至少95%同一性的氨基酸序列,前提条件是所述氨基酸序列不包含W003054184-CAE48421、W02007131657-CAS91385或NCBI登录号AGS78407。

[0035] 在一些实施方案中,本发明是这样的重组多肽或其活性片段,其具有蛋白水解活性,包含与SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51或52的氨基酸序列具有至少95%同一性的氨基酸序列,前提条件是所述氨基酸序列不包含W003054184-CAE48421或W02007131657-CAS91385。

[0036] 在一些实施方案中,本发明是这样的重组多肽或其活性片段,其具有蛋白水解活性,包含与SEQ ID NO:4、7、11、15、19或23的氨基酸序列具有至少95%同一性的氨基酸序列,前提条件是所述氨基酸序列不包含W003054184-CAE48421或W02007131657-CAS91385。

[0037] 在一些实施方案中,前述至少一种重组多肽具有蛋白酶活性,特别是酪蛋白水解。在一些实施方案中,至少一种重组多肽在8至12的pH范围下保留其最大蛋白酶活性的至少50%。在一些实施方案中,至少一种重组多肽在50℃至75℃的温度范围下保留其最大蛋白酶活性的至少50%。在一些实施方案中,至少一种重组多肽在洗涤剂组合物中具有清洁活性,所述洗涤剂组合物包括例如自动餐具洗涤用洗涤剂和衣物洗涤剂。

[0038] 在一些实施方案中,本发明是包含表面活性剂和上述至少一种重组多肽的组合物。在一些实施方案中,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、两性离子表面活性剂、两性表面活性剂、半极性非离子表面活性剂以及它们的组合。在一些实施方案中,所述组合物是洗涤剂组合物,例如衣物洗涤剂、织物软化洗涤剂、餐具洗涤剂用洗涤剂和硬质表面清洁洗涤剂。在一些实施方案中,所述组合物还包含至少一种钙离子和/或锌离子、至少一种稳定剂、至少一种漂白剂、磷酸盐或硼酸盐。在一些实施方案中,所述组合物不含磷酸盐和/或不含硼酸盐。在一些实施方案中,所述组合物是颗粒、粉末、固体、棒、液体、片剂、凝胶、糊剂或单位剂量组合物。在一些实施方案中,所述组合物还包含一种或多种选自下列的另外的酶或酶衍生物:酰基转移酶、 α -淀粉酶、 β -淀粉酶、 α -半乳糖苷酶、阿拉伯糖苷酶、芳基酯酶、 β -半乳糖苷酶、卡拉胶酶、过氧化氢酶、纤维二糖水解酶、纤维素酶、软骨素酶、角质酶、内切- β -1,4-葡聚糖酶、内切- β -甘露聚糖酶、酯酶、外切-甘露聚糖酶、半乳聚糖酶、葡糖淀粉酶、半纤维素酶、透明质酸酶、角蛋白酶、漆酶、乳糖酶、木质素酶、脂酶、脂氧合酶、甘露聚糖酶、氧化酶、果胶酸裂解酶、果胶乙酰胺酶、果胶酶、戊聚糖酶、过氧化物酶、过水解酶、酚氧化酶、磷酸酶、磷脂酶、植酸酶、聚半乳糖醛酸酶、蛋白酶、普鲁兰酶、还原酶、鼠李半乳糖醛酸酶、 β -葡聚糖酶、鞣酸酶、转谷氨酰胺酶、木聚糖乙酰胺酶、木聚糖酶、木葡聚糖酶、木糖苷酶、金属蛋白酶、另外的丝氨酸蛋白酶以及它们的组合。

[0039] 在一些实施方案中,本发明是清洁方法,包括使表面或物品与上文所列的组合物接触。在一些实施方案中,本发明是用于产生重组多肽的方法,包括用表达载体稳定转化宿主细胞,所述表达载体包含编码上述至少一种重组多肽的多核苷酸。

[0040] 另一些实施方案涉及多核苷酸,其所包含的核酸序列:(i) 编码SEQ ID NO:47或90的氨基酸序列;(ii) 编码SEQ ID NO:47或90的氨基酸序列,并且还编码与SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有70%同一性的氨基酸序列;iii) 编码与SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有70%同一性的氨基酸序列;(iv) 与SEQ ID NO:1、8、12、16、20、53、54、55、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82具有至少70%同一性;或者(v) 与SEQ ID NO:1、8、12、16、20、53、54、55、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82互补。

[0041] 另一些实施方案涉及多核苷酸,其所包含的核酸序列:(i) 编码SEQ ID NO:47或90的氨基酸序列;(ii) 编码SEQ ID NO:47或90的氨基酸序列,并且还编码与SEQ ID NO:11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有70%同一性的氨基酸序列;iii) 编码与SEQ ID NO:11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有70%同一性的氨基酸序列;(iv) 与SEQ ID NO:8、12、16、20、53、54、55、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82具有至少70%同一性;或者(v) 与SEQ ID NO:8、12、16、20、53、54、55、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82互补。

[0042] 另一些实施方案涉及多核苷酸,其所包含的核酸序列:(i) 编码SEQ ID NO:47或90的氨基酸序列;(ii) 编码SEQ ID NO:47或90的氨基酸序列,并且还编码与SEQ ID NO:57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有70%同一性的氨基酸序

列;iii) 编码与SEQ ID NO:57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有70%同一性的氨基酸序列;(iv) 与SEQ ID NO:53、54、55、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82具有至少70%同一性;或者(v) 与SEQ ID NO:53、54、55、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82互补。

[0043] 另一些实施方案涉及多核苷酸,其所包含的核酸序列:(i) 编码SEQ ID NO:47或90的氨基酸序列;(ii) 编码SEQ ID NO:47或90的氨基酸序列,并且还编码与SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有70%同一性的氨基酸序列;iii) 编码与SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有70%同一性的氨基酸序列;(iv) 与SEQ ID NO:1、8、12、16、20、53、54、55、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82具有至少70%同一性;或者(v) 与SEQ ID NO:1、8、12、16、20、53、54、55、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82互补;前提条件是所述核酸序列不编码包含W003054184-CAE48421或W02007131657-CAS91385的氨基酸序列。

[0044] 另一些实施方案涉及多核苷酸,其所包含的核酸序列:(i) 编码SEQ ID NO:47或90的氨基酸序列;(ii) 编码SEQ ID NO:47或90的氨基酸序列,并且还编码与SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有70%同一性的氨基酸序列;iii) 编码与SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有70%同一性的氨基酸序列;(iv) 与SEQ ID NO:1、8、12、16、20、53、54、55、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82具有至少70%同一性;或者(v) 与SEQ ID NO:1、8、12、16、20、53、54、55、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82互补;前提条件是所述核酸序列不编码包含W003054184-CAE48421、W02007131657-CAS91385或NCBI登录号AGS78407的氨基酸序列。

[0045] 另一些实施方案涉及多核苷酸,其所包含的核酸序列:(i) 编码SEQ ID NO:47或90的氨基酸序列;(ii) 编码SEQ ID NO:47或90的氨基酸序列,并且还编码与SEQ ID NO:11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有70%同一性的氨基酸序列;iii) 编码与SEQ ID NO:11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有70%同一性的氨基酸序列;(iv) 与SEQ ID NO:8、12、16、20、53、54、55、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82具有至少70%同一性;或者(v) 与SEQ ID NO:8、12、16、20、53、54、55、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82互补;前提条件是所述核酸序列不编码包含W003054184-CAE48421或W02007131657-CAS91385的氨基酸序列。

[0046] 另一些实施方案涉及多核苷酸,其所包含的核酸序列:(i) 编码SEQ ID NO:47或90的氨基酸序列;(ii) 编码SEQ ID NO:47或90的氨基酸序列,并且还编码与SEQ ID NO:11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有70%同一性的氨基酸序列;(iii) 编码与SEQ ID NO:11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有70%同一性的氨基酸序列;(iv) 与SEQ ID NO:8、12、16、20、53、54、55、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82具有至少70%同一性;或者(v) 与SEQ ID NO:8、12、16、20、53、54、55、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82互补;前提条件是所述核酸序列不编码包含W003054184-

CAE48421、W02007131657-CAS91385或NCBI登录号AGS78407的氨基酸序列。

[0047] 另一些实施方案涉及多核苷酸,其所包含的核酸序列:(i) 编码SEQ ID NO:47或90的氨基酸序列;(ii) 编码SEQ ID NO:47或90的氨基酸序列,并且还编码与SEQ ID NO:57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有70%同一性的氨基酸序列;iii) 编码与SEQ ID NO:57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有70%同一性的氨基酸序列;(iv) 与SEQ ID NO:53、54、55、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82具有至少70%同一性;或者(v) 与SEQ ID NO:53、54、55、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82互补;前提条件是所述核酸序列不编码包含W003054184-CAE48421或W02007131657-CAS91385的氨基酸序列。

[0048] 另一些实施方案涉及多核苷酸,其所包含的核酸序列:(i) 编码SEQ ID NO:47或90的氨基酸序列;(ii) 编码SEQ ID NO:47或90的氨基酸序列,并且还编码与SEQ ID NO:57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有70%同一性的氨基酸序列;iii) 编码与SEQ ID NO:57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有70%同一性的氨基酸序列;(iv) 与SEQ ID NO:53、54、55、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82具有至少70%同一性;或者(v) 与SEQ ID NO:53、54、55、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82互补;前提条件是所述核酸序列不编码包含W003054184-CAE48421、W02007131657-CAS91385或NCBI登录号AGS78407的氨基酸序列。

[0049] 一些实施方案涉及多核苷酸,其所包含的核酸序列:(i) 编码与SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51或52的氨基酸序列具有至少70%同一性的氨基酸序列;(ii) 与SEQ ID NO:1、6、8、12、16或20具有至少70%同一性;或者(iii) 与SEQ ID NO:1、6、8、12、16或20互补。

附图说明

[0050] 图1提供了用于表达Bgi02446丝氨酸蛋白酶的pHYT-Bgi02446的质粒图谱。

[0051] 图2提供了Bgi02446对DMC底物的蛋白酶活性的曲线。

[0052] 图3A提供了Bgi02446在重型液体 (heavy duty liquid, HDL) 衣物洗涤剂中的清洁效率曲线。图3B提供了Bgi02446在重型干 (heavy duty dry, HDD) 衣物洗涤剂中的清洁效率曲线。图3C提供了Bgi02446在自动餐具洗涤用 (automatic dish washing, ADW) 洗涤剂中的清洁效率曲线。

[0053] 图4A-C提供了Bgi02446的预测成熟形式的氨基酸序列 (SEQ ID NO:4) 与多种细菌丝氨酸蛋白酶的序列 (SEQ ID NO:24-44) 的比对。在比对下方示出了共有序列 (SEQ ID NO:45)。

[0054] 图5提供了Bgi02446的预测成熟形式的氨基酸序列 (SEQ ID NO:4) 与其它吉氏芽孢杆菌-进化枝枯草杆菌蛋白酶的丝氨酸蛋白酶的氨基酸序列 (SEQ ID NO:11、15、19和23) 的比对。

[0055] 图6提供了吉氏芽孢杆菌-进化枝枯草杆菌蛋白酶和多种其它细菌丝氨酸蛋白酶的系統发育树。

[0056] 图7A提供了DSM9728和DSM9731在重型液体 (HDL) 衣物洗涤剂中的清洁效率曲线。图7B提供了DSM9728和DSM9731在重型干 (HDD) 衣物洗涤剂中的清洁效率曲线。图7C-7F提供

了DSM9728和DSM9731在自动餐具洗涤用(ADW)洗涤剂中的清洁效率曲线。

[0057] 图8A-B提供了Bgi02446(在附图中称为“BG46”)、DSM9728和DSM9731与来自解淀粉芽孢杆菌(*B.amyloliquefaciens*)的枯草杆菌蛋白酶BPN'(pdb 2ST1.a)、来自地衣芽孢杆菌(*B.licheniformis*)的枯草杆菌蛋白酶Carlsberg(pdb 3UNX.a)和来自迟缓芽孢杆菌(*B.lentus*)的枯草杆菌蛋白酶(pdb 1JEA.a)的结构比对。被加亮的是基于结构的比对的一个区域,在该区域中枯草杆菌蛋白酶DSM 9728、DSM 9731和Bgi02446序列显示出在Asp(D) 31和His(H) 64之间延伸的共有基序。

[0058] 图9示出了基于迟缓芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶的结构(pdb进入号1JEA)建模的吉氏芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶(DSM 9728、DSM 9731和Bgi02446)中TTADL保守残基(基序的元件)相对于催化三联体的位置。所有丝氨酸蛋白酶共有的催化三联体的残基侧链以棒示出。

[0059] 图10A-10C提供了吉氏芽孢杆菌-进化枝蛋白酶的氨基酸序列(SEQ ID NO 4、11、23、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81和83)的比对。在比对下方示出了共有序列(SEQ ID NO:89)。

[0060] 图11提供了吉氏芽孢杆菌-进化枝蛋白酶的系统发育树。

具体实施方式

[0061] 描述了组合物和方法,涉及来自吉氏芽孢杆菌-进化枝菌株DSM 8722、DSM 9728、DSM 9729、DSM 9730和DSM 9731的重组丝氨酸蛋白酶。还描述了这样的组合物和方法,涉及通过常规分子生物学技术产生的吉氏芽孢杆菌-进化枝的重组丝氨酸蛋白酶(参见,例如 Sambrook等人, *Molecular Cloning*: Cold Spring Harbor Laboratory Press)。所述组合物和方法部分地基于以下观察结果:重组Bgi02446在表面活性剂存在下、在碱性反应条件下和在升高的温度下具有蛋白酶活性。所述组合物和方法还部分地基于以下观察结果:重组SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82在表面活性剂存在下、在碱性反应条件下和在升高的温度下具有蛋白酶活性。Bgi02446枯草杆菌蛋白酶的这些特征使得这些吉氏芽孢杆菌-进化枝枯草杆菌蛋白酶十分适用于清洁织物和硬质表面,以及纺织物、皮革和毛处理。Bgi02446、DSM 9728、DSM 9729、DSM 9730、DSM 9731、BG1-B08、BG1-C05、BG2-B08、BG2-D10、BG2-G08、BG4-A09、BG4-D10、BG5-E02、BG5-E05、BG5-F02、BG5-G10、BG6-A10、BG6-D08和BG8-B03枯草杆菌蛋白酶还十分适于包含在用于蛋白质降解的组合物中,包括但不限于衣物洗涤剂和餐具洗涤用洗涤剂。Bgi02446、DSM 9728、DSM 9729、DSM 9730、DSM 9731、BG1-B08、BG1-C05、BG2-B08、BG2-D10、BG2-G08、BG4-A09、BG4-D10、BG5-E02、BG5-E05、BG5-F02、BG5-G10、BG6-A10、BG6-D08和BG8-B03枯草杆菌蛋白酶还适于包含在个人护理组合物中,以及适于人食品和动物饲料应用。

[0062] I. 定义

[0063] 在详细描述本发明的组合物和方法之前,为了清楚起见对以下术语进行定义。未定义的术语和缩写应该与它们在相关领域中所用的普通含义一致。除非在本文中另有定义,否则本文所用的全部技术和科学术语都具有本领域普通技术人员通常理解的相同的含义。除非另外指出,否则本公开内容的实施涉及分子生物学、蛋白质工程和微生物学中常用的常规技术。尽管与本文所述的那些类似或等效的任何方法和材料均可用于本公开内容的实施,但在本文中对一些合适的方法和材料进行了描述。紧接下文定义的术语通过参考说

说明书整体而得到更充分的描述。

[0064] 如本文所用,除非上下文明确另外指出,否则单数冠词“一个”、“一种”和“所述”涵盖多个指代物。除非另外指出,否则核酸序列以5'至3'取向从左至右写出;并且氨基酸序列以氨基至羧基取向从左至右写出。应当理解,除非有相反指示,否则本公开内容不局限于本文中所述的具体方法、方案和试剂。

[0065] 预期,本说明书通篇给出的每一最大数值限度包括每一较低数值限度,如同这样的较低数值限度在本文中明确地写出一样。本说明书通篇给出的每一最小数值限度将包括每一较高数值限度,如同这样的较高数值限度在本文中明确地写出一样。本说明书通篇给出的每一数值范围将包括落入这样的较宽数值范围内的每一较窄数值范围,如同这样的较窄数值范围在本文中明确地写出一样。

[0066] 本文中结合数值使用的术语“约/大约”指该数值的 ± 0.5 的范围,除非在上下文对该术语另外特别限定。例如,短语“约6的pH值”指5.5至6.5的pH值,除非对该pH值另外特别限定。

[0067] 如本文所用,术语“蛋白酶”指能够分解蛋白质和肽的酶。蛋白酶能够通过水解肽键来进行“蛋白水解”,所述肽键将形成蛋白质的肽链或多肽链中的氨基酸连接在一起。将蛋白酶作为蛋白质消化酶的这种活性成为“蛋白水解活性”。存在很多用于测量蛋白水解活性的公知操作。例如,可通过分析相应蛋白酶水解合适底物的能力的比较测定来确定蛋白水解活性。可用于分析蛋白酶或蛋白水解活性的示例性底物包括但不限于二甲基酪蛋白(Sigma C-9801)、牛胶原(Sigma C-9879)、牛弹性蛋白(Sigma E-1625)和牛角蛋白(ICN Biomedical 902111)。利用这些底物的比色测定在本领域中是公知的(参见,例如WO 99/34011和美国专利6,376,450)。pNA肽基测定(参见,例如Del Mar等人,Anal Biochem,99:316-320,1979)也可用于确定活性酶浓度。该测定测量当酶水解可溶性底物例如琥珀酰基-丙氨酸-丙氨酸-脯氨酸-苯丙氨酸-对硝基苯胺(suc-AAPF-pNA)时释放对硝基苯胺的速率。在分光光度计上于410nm下测量由水解反应产生黄色的速率,并且其与活性酶浓度成比例。此外,可使用在280纳米(nm)下的吸光度测量结果来确定经纯化蛋白质的样品中的总蛋白质浓度。对底物的活性/蛋白质浓度得到酶比活性。

[0068] 术语“变体”与多肽相关时是指这样的多肽,其与指定的野生型、亲本或参照多肽的不同之处在于其包含一个或多个非天然存在或人工的氨基酸替换、插入或缺失。类似地,术语“变体”与多核苷酸相关时是指与指定的野生型、亲本或参照多核苷酸在核苷酸序列方面不同的多核苷酸。野生型、亲本或参照多肽或多核苷酸的同源性将由上下文而显而易见。

[0069] 如本文所用,“芽孢杆菌属”包括在“芽孢杆菌”属中的所有菌种,如本领域技术人员所已知的,包括但不限于枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌(*B.licheniformis*)、迟缓芽孢杆菌(*B.lentus*)、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*)、耐碱芽孢杆菌(*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*)、吉氏芽孢杆菌、饲料类芽孢杆菌(*B.pabuli*)、蜡状芽孢杆菌(*B.cereus*)、黏琼脂芽孢杆菌(*B.agaradhaerens*)、*B.akibai*、克氏芽孢杆菌(*B.clarkii*)和苏云金芽孢杆菌(*B.thuringiensis*)。认识到,芽孢杆菌属持续经历着分类学上的重构。因此,预期该属包括

已重新分类的菌种,包括但不限于诸如现在命名为嗜热脂肪地芽孢杆菌 (*Geobacillus tearothermophilus*) 的嗜热脂肪芽孢杆菌的生物。认为在应激环境条件下产生抗性内生孢子是芽孢杆菌属的限定特征,但是该特征还适用于最近命名的脂环酸芽孢杆菌属 (*Alicyclobacillus*)、兼性芽孢杆菌属 (*Amphibacillus*)、硫胺素芽孢杆菌属 (*Aneurinibacillus*)、厌氧芽孢杆菌属 (*Anoxybacillus*)、短芽孢杆菌属 (*Brevibacillus*)、线状芽孢杆菌属 (*Filobacillus*)、薄壁芽孢杆菌属 (*Gracilibacillus*)、喜盐芽孢杆菌属 (*Halobacillus*)、类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus*)、需盐芽孢杆菌属 (*Salibacillus*)、耐热芽孢杆菌属 (*Thermobacillus*)、*Ureibacillus* 和枝芽孢杆菌属 (*Virgibacillus*)。

[0070] 如本文所用,术语“突变”是指相对于参照氨基酸或核酸序列进行的改变。预期,该术语涵盖替换、插入和缺失。

[0071] 如本文所用,术语“载体”是指用于将核酸引入或转移到靶细胞或组织中的核酸构建体。载体通常用于将外来DNA引入细胞或组织中。载体包括质粒、克隆载体、噬菌体、病毒(例如,病毒载体)、粘粒、表达载体、穿梭载体等。载体通常包含复制起点、多克隆位点和选择标记。通常将载体插入靶细胞中的方法称为转化。在一些实施方案中,本发明包括包含与合适原序列(例如,分泌序列、信号肽序列等)可操纵连接的编码丝氨酸蛋白酶多肽(例如,前体或成熟丝氨酸蛋白酶多肽)的DNA序列的载体,所述原序列能够实现该DNA序列在合适宿主中的表达以及重组多肽链的折叠和转位。

[0072] 如本文所用,术语“表达盒”、“表达质粒”或“表达载体”是指用于在靶细胞中表达目的核酸的重组或合成产生的核酸构建体或载体。表达载体或表达盒通常包含驱动外来核酸表达的启动子核苷酸序列。表达载体或表达盒通常还包含允许特定核酸在靶细胞中转录的任何其它指定的核酸元件。可将重组表达盒并入质粒、染色体、线粒体DNA、质体DNA、病毒或核酸片段中。很多原核和真核表达载体均可商购获得。

[0073] 如本文所用,“质粒”是指能够独立于染色体DNA复制的染色体外DNA分子。质粒是双链(ds)的且可以是环状的并且通常用作克隆载体。

[0074] 如本文在将核酸序列引入细胞中的语境中所用,术语“引入”是指任何适于将核酸序列转移到细胞中的方法。用于引入的此类方法包括但不限于原生质体融合、转染、转化、电穿孔、接合和转导。转化是指由摄取、任选的基因组并入和遗传物质(例如,DNA)表达引起的细胞的遗传改变。

[0075] 如本文所用,当将核酸置于与另一核酸序列的功能性关系中时,其与另一核酸序列“可操作地连接”。例如,如果启动子影响编码序列的转录,则该启动子或增强子与核苷酸编码序列可操纵地连接。如果将核糖体结合位点定位成有利于编码序列的翻译,则其可与编码序列可操作地连接。通常来说,“可操作连接的”DNA序列是连续的。然而,增强子无需是连续的。连接通过在方便的限制性位点进行连接来实现。如果这样的位点不存在,则可根据常规实践使用合成的寡核苷酸衔接子或接头。

[0076] 如本文所用,术语“基因”是指编码多肽并且包含编码区之前和之后的区域的多核苷酸(例如,DNA区段)。在一些情况下,基因包含在各个编码区段(外显子)之间的间插序列(内含子)。

[0077] 如本文所用,“重组的”当提及细胞使用时通常指已通过引入外来核酸序列而对该细胞进行了修饰或者指该细胞来源于经如此修饰的细胞。例如,重组细胞可包含在天然形

式(非重组)细胞中不以相同形式存在的基因,或者重组细胞可包含已进行修饰并且重新引入细胞中的天然基因(存在于天然形式细胞中)。重组细胞可包含细胞的同源核酸,所述细胞已经进行修饰但未从该细胞中除去核酸;这样的修饰包括通过基因替换、位点特异性突变以及本领域普通技术人员已知的相关技术获得的那些。重组DNA技术包括用于体外产生重组DNA并将该重组DNA转移到在此其可表达或增殖的细胞中,从而产生重组多肽的技术。多核苷酸或核酸的“重组”一般是指装配或组合两个或更多个核酸或多核苷酸链或片段以产生新的多核苷酸或核酸。

[0078] 如果核酸或多核苷酸处于其天然状态或者当通过本领域技术人员已知的方法操作时可转录和/或翻译以产生多肽或其片段,可认为该核酸或多核苷酸“编码”多肽。还认为这样的核酸的反义链编码序列。

[0079] 术语“宿主菌株”和“宿主细胞”是指用于表达含有目的DNA序列的载体的合适宿主。

[0080] “蛋白质”或“多肽”包含氨基酸残基的聚合物序列。术语“蛋白质”和“多肽”在本文中可互换使用。本公开内容通篇使用遵照IUPAC-IUB生物化学命名联合委员会(Joint Commission on Biochemical Nomenclature(JCBN))定义的氨基酸的单字母和三字母代码。单字母X是指二十种氨基酸中的任一种。还应理解,由于遗传密码的简并性,多肽可由一种以上核苷酸序列编码。突变可如下命名:亲本氨基酸的单字母代码,接着是位置编号,之后是变体氨基酸的单字母代码。例如,将第87位的甘氨酸(G)突变为丝氨酸(S)表示为“G087S”或“G87S”。当描述修饰时,位置其后是列于括号中的氨基酸表示通过所列举的任一种氨基酸在该位置处进行替换的列表。例如,6(L,I)意指第6位可替换为亮氨酸或异亮氨酸。有时,在序列中,使用斜线(/)来限定替换,例如F/V指特定位置可在该位置处具有苯丙氨酸或丙氨酸。

[0081] “原序列”(prosequence)或“前肽序列”是指介于信号肽序列和成熟蛋白酶序列之间的氨基酸序列,其是蛋白酶的适当折叠和分泌所必需的;有时,将其称为分子内伴侣。原序列或前肽的切割产生成熟的活性蛋白酶。细菌丝氨酸蛋白酶通常作为酶原表达。

[0082] 术语“信号序列”和“信号肽”是指可参与蛋白质的成熟或前体形式的分泌或直接转运的氨基酸残基序列。信号序列通常位于前体或成熟蛋白质序列的N末端。信号序列可以是内源性的或外源性的。信号序列通常不存在于成熟蛋白质中。信号序列通常在转运蛋白质之后通过信号肽酶从蛋白质中切割。

[0083] 术语蛋白质、多肽或肽的“成熟”形式是指蛋白质、多肽或肽的无信号肽序列和前肽序列的功能性形式。

[0084] 术语蛋白质或肽的“前体”形式是指具有与该蛋白质的氨基或羧基末端可操作地连接的原序列的成熟蛋白质形式。前体也可具有与原序列的氨基末端可操作地连接的“信号”序列。前体还可额外具有参与翻译后活动的多肽(例如,从其切割以留下成熟蛋白质或肽形式的多肽)。

[0085] 术语“野生型”在提及氨基酸序列或核酸序列时指该氨基酸序列或核酸序列时天然序列或天然存在序列。如本文所用,术语“天然存在的”是指见于自然界中的任何物质(例如,蛋白质、氨基酸或核酸序列)。反之,术语“非天然存在的”是指不存在于自然界中的任何物质(例如,在实验室中产生的重组核酸和蛋白质序列以及野生型序列的变化形式)。

[0086] 如本文中关于氨基酸残基位置所用,“对应于”是指蛋白质或肽中所列举位置处的氨基酸残基,或者蛋白质或肽中与所列举残基类似、同源或等同的氨基酸残基。如本文所用,“对应区域”一般是指相关蛋白质或参照蛋白质中的类似位置。

[0087] 术语“来源于”和“获自”不仅是指由所考虑生物的菌株产生或可由其产生的蛋白质,而且还是指由从此菌株分离的DNA序列编码并且在含有此DNA序列的宿主生物体中产生的蛋白质。另外,该术语是指由合成来源和/或cDNA来源的DNA序列编码并且具有所考虑蛋白质的鉴别特征的蛋白质。例如,“来源于芽孢杆菌的蛋白酶”是指由芽孢杆菌天然产生的具有蛋白水解活性的那些酶以及与由芽孢杆菌来源产生的那些类似但通过使用遗传工程基技术由转化有编码丝氨酸蛋白酶的核酸的其它宿主细胞产生的丝氨酸蛋白酶。

[0088] 术语“相同的”在两条多核苷酸或多肽序列的语境中是指当比对最大对应性时两条序列中相同的核酸或氨基酸,如使用序列比较或分析算法所测量的。

[0089] 如本文所用,“同一性%”或“百分比同一性”或“PID”是指蛋白质序列的同一性。百分比同一性可使用本领域中已知的标准技术来确定。可用的算法包括BLAST算法(参见,Altschul等人,J Mol Biol,215:403-410,1990;以及Karlin和Altschul,Proc Natl Acad Sci USA,90:5873-5787,1993)。BLAST程序使用数个检索参数,其中大多数被设置为默认值。NCBI BLAST算法发现在生物学相似性方面最相关的序列,但是不建议用于具有少于20个残基的查询序列(Altschul等人,Nucleic Acids Res,25:3389-3402,1997;和Schaffer等人,Nucleic Acids Res,29:2994-3005,2001)。用于核酸序列检索的示例性默认BLAST参数包括:相邻字长阈值=11;E值截止值=10;评分矩阵=NUC.3.1(匹配=1,错配-3);空位开放=5;和空位延伸=2。用于氨基酸序列检索的示例性默认BLAST参数包括:字长=3;E值截止值=10;评分矩阵=BLOSUM62;空位开放=11;和空位延伸=1。百分比(%)氨基酸序列同一性值通过将匹配相同残基的数目除以“参照”序列的残基的总数目(包括程序为了进行最佳/最大比对而产生的任何空位)来确定。BLAST算法将“参照”序列作为“查询序列”。

[0090] 如本文所用,“同源蛋白质”或“同源蛋白酶”指在一级、二级和/或三级结构方面具有明显相似性的蛋白质。当对蛋白质进行比对时,蛋白质源性可指线性氨基酸序列的相似性。蛋白质序列的同源检索可使用来自NCBI BLAST的BLASTP和PSI-BLAST以0.001的阈值(E值截止值)来进行。(Altschul SF, Madde TL, Shaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI BLAST a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 1997 Set 1; 25 (17): 3389-402)。利用这一信息,可对蛋白质序列进行分组。可使用氨基酸序列来建立系统发育树。可将氨基酸序列输入诸如Vector NTI Advance工具包的程序中并使用邻接(Neighbor Joining, NJ)法来生成指南树(Guide Tree)(Saitou和Nei, Mol Biol Evol, 4:406-425, 1987)。可使用Kimura序列距离校正并忽略具有空位的位置来计算树构建。诸如AlignX的程序可将计算的距离值在括号中显示在系统发育树上所显示的分子名称之后。

[0091] 了解分子之间的源性可揭示分子的进化史以及有关其功能的信息。如果新测序的蛋白质与已表征的蛋白质同源,则强烈指示新蛋白质的生物化学功能。两个实体之间的最基本关系是源性;如果两个分子来源于同一祖先,则认为其是同源的。同源分子或同源物可分为两类:旁系同源物和直系同源物。旁系同源物是存在于一个物种中的同源物。旁系同源物通常在其具体的生物化学功能方面有所不同。直系同源物是存在于不同物种但具有

非常相似或相同功能的同源物。蛋白质超家族是可推断出具有共同系谱的最大蛋白质组群(进化枝)。通常来说,该共同系谱基于序列比对和机械相似性。超家族通常包含数个在家族内表现出序列相似性的蛋白质家族。基于MEROPS蛋白酶分类系统,术语“蛋白质宗族”通常用于蛋白酶超家族。

[0092] CLUSTAL W算法是序列比对算法的另一示例(参见,Thompson等人,Nucleic Acids Res,22:4673-4680,1994)。用于CLUSTAL W算法的默认参数包括:空位开放罚分=10.0;空位延伸罚分=0.05;蛋白质加权矩阵=BLOSUM系列;DNA加权矩阵=IUB;延迟发散序列%=40;空位分离距离=8;DNA转换加权=0.50;亲水性残基列表=GPSNDQEKR;使用负矩阵=关;Toggle残基特异性罚分=开;Toggle亲水性罚分=开;和Toggle末端空位分离罚分=关。在CLUSTAL算法中,包括发生任一末端的缺失。例如,具有500个氨基酸的多肽在任一末端(或在多肽内)具有5个氨基酸缺失的变体相对于“参照多肽”具有99%的序列同一性百分比(495/500相同残基 \times 100)。这样的变体可涵盖在相对于该多肽具有“至少99%序列同一性”的变体内。

[0093] 当核酸或多核苷酸至少部分或完全与其它组分分离时,其是“分离的”,所述组分包括但不限于例如其它蛋白质、核酸、细胞等。类似地,当多肽、蛋白质或肽至少部分或完全与其它组分分离时,其是“分离的”,所述其它组分包括但不限于例如其它蛋白质、核酸、细胞等。按摩尔计,分离的物类比组合物中的其它物类丰度更高。例如,分离的物类可占存在的所有大分子物类的至少约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%(按摩尔计)。优选地,分离的物类被纯化至基本同质(即,通过常规的检测方法在组合物中检测不到污染物物类)。纯度和同质性可使用本领域中公知的多种技术来确定,例如对核酸或蛋白质样品分别进行琼脂或多聚酰胺凝胶电泳,之后通过染色可视化。如果期望的话,可利用高分辨率技术,例如高效液相色谱(HPLC)或类似方式来纯化物质。

[0094] 术语“经纯化的”当应用于核酸或多肽时一般指代基本不含其它组分的核酸或多肽,如通过本领域中公知的分离技术所确定的(例如,经纯化的多肽或多核苷酸在电泳凝胶、色谱洗脱液和/或经受密度梯度离心的介质中形成离散带)。例如,在电泳凝胶中产生基本一条带的核酸或多肽是“经纯化的”。经纯化的核酸或多肽的纯度为至少约50%,通常纯度为至少约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%、约99.5%、约99.6%、约99.7%、约99.8%或更高(例如,按摩尔计的重量百分比)。在相关方面,当在应用纯化或富集技术之后分子的浓度显著增加时,组合物富含该分子。术语“富含”指以高于起始组合物的相对或绝对浓度存在于组合物中的化合物、多肽、细胞、核酸、氨基酸或者其它指定材料或组分。

[0095] 如本文所用,术语“功能性测定”是指指示蛋白质活性的测定。在一些实施方案中,该术语是指其中分析蛋白质以其一般能力发挥功能的能力的测定系统。例如,在蛋白酶的情况下,功能性测定涉及确定蛋白酶水解蛋白质性底物的有效性。

[0096] 术语“清洁活性”指丝氨酸蛋白酶多肽或参照蛋白酶在本公开内容的蛋白水解、水解、清洁或其它过程中普遍的条件下获得的清洁性能。在一些实施方案中,丝氨酸蛋白酶多肽或参照蛋白酶的清洁性能可通过使用用于清洁物品或表面上的一种或多种不同酶敏感性污渍(例如,由食物、草、血液、墨水、乳、油和/或卵蛋白产生的污渍)的多种测定来确定。

可如下确定变体或参照蛋白酶的清洁测定：使物品或表面上的污渍经受标准的洗涤条件并使用多种色谱、分光光度或其它定量方法来评估除去污渍的程度。示例性的清洁测定和方法在本领域中是已知的并且包括但不限于W0 99/34011和美国专利6,605,458(二者均通过引用并入本文)中所述的那些,以及下文提供的实施例包括的那些清洁测定和方法。

[0097] 术语丝氨酸蛋白酶多肽或参照蛋白酶的“清洁有效量”是指在特定清洁组合物中实现期望酶促活性水平的蛋白酶的量。本领域普通技术人员可容易地确定这样的有效量,并且其基于很多因素,例如所使用的具体蛋白酶、清洁应用、清洁组合物的特定组成以及需要的是液体组合物还是干(例如,颗粒、片剂、棒)组合物等。

[0098] 术语“清洁助剂材料”指清洁组合物中包含的除本公开内容的丝氨酸蛋白酶多肽之外的任何液体、固体或气体材料。在一些实施方案中,本公开内容的清洁组合物包含一种或多种清洁助剂材料。通常基于清洁组合物的具体类型和形式(例如,液体、颗粒、粉末、棒、糊剂、喷雾、片剂、凝胶、泡沫或其它组合物)来选择每种清洁辅助性材料。优选地,每种清洁助剂材料均与组合物中使用的蛋白酶相容。

[0099] 清洁组合物和清洁制剂包括适于清洁、漂白、消毒和/或灭菌任何物体、物品和/或表面的任何组合物。这样的组合物和制剂包括但不限于例如液体和/或固体组合物,包括清洁和洗涤剂组合物(例如,液体、片剂、凝胶、棒、颗粒和/或固体衣物清洁或洗涤剂组合物以及精细织物洗涤剂组合物;硬质表面清洁组合物和制剂,例如用于玻璃、木材、陶瓷以及金属柜台面和橱窗的清洁组合物和制剂;地毯清洁剂;烘箱清洁剂;织物清新剂;织物软化剂;以及纺织品、衣物增效剂清洁组合物或洗涤剂组合物、衣物添加剂清洁组合物和衣物预去斑剂组合物;餐具洗涤组合物,包括手洗或人工餐具洗涤用组合物(例如,“手洗”或“人工”餐具洗涤用洗涤剂)和自动餐具洗涤用组合物(例如“自动餐具洗涤用洗涤剂”)。单剂量单位形式也可用于本发明,包括但不限于丸剂、片剂、胶囊锭剂(gelcap)或其它单剂量单位,例如预测量的散剂或液体。

[0100] 除非另外指出,否则本文中使用的清洁组合物或清洁制剂包括颗粒或粉末形式的通用或重型洗涤剂,尤其是清洁洗涤剂;液体、颗粒、凝胶、固体、片剂、糊剂或单位剂型的通用洗涤剂,尤其是所谓的重型液体(HDL)洗涤剂或重型干(HDD)洗涤剂类型;液体精细织物洗涤剂;手洗或人工餐具洗涤剂,包括高度起泡类型的那些;手洗或人工餐具洗涤、自动餐具洗涤或者盘碟或餐具洗涤剂,包括用于家用和工业用途的多种片剂、粉末、固体、颗粒、液体、凝胶和漂洗助剂类型;液体清洁剂和消毒剂,包括抗菌手洗类型、清洁棒、漱口剂、托牙清洁剂、洗车液、地毯清洗剂、浴室清洁剂;人以及其它动物用的洗发剂和/或头发冲洗剂;沐浴凝胶以及泡沫浴和金属清洁剂;以及清洁辅剂,例如漂白添加剂和“去污棒”或预处理类型。在一些实施方案中,颗粒组合物为“紧凑”形式。在一些实施方案中,液体组合物为“浓缩”形式。

[0101] 如本文所用,术语“织物清洁组合物”包括手洗和机洗衣物洗涤剂组合物,包括衣物添加剂组合物和适用于浸泡和/或预处理沾污织物(例如,衣物、亚麻制品以及其它纺织物材料)的组合物。

[0102] 如本文所用,“非织物清洁组合物”包括非织物(即,非织物)表面清洁组合物,包括但不限于例如手洗或人工或自动餐具洗涤用洗涤剂组合物、经口清洁组合物、义齿清洁组合物、接触镜片清洁组合物、伤口清创组合物和个人清洁组合物。

[0103] 如本文所用,术语“洗涤剂组合物”或“洗涤剂制剂”用于指旨在用于清洁玷污或脏物体(包括特定织物和/或非织物物体或物品)的洗涤介质。本公开内容的此类组合物不限于任何特定的洗涤剂组合物或制剂。实际上,在一些实施方案中,本公开内容的洗涤剂组合物包含本公开内容的至少一种丝氨酸蛋白酶,并且另外包含一种或多种表面活性剂、转移酶、水解酶、漂白活性剂、上蓝剂、荧光染料、结块抑制剂、掩蔽剂、酶活化剂、抗氧化剂和/或增溶剂。在一些情况下,助洗剂盐是硅酸盐和磷酸盐的混合物,优选地其中硅酸盐(例如,偏硅酸钠)多于磷酸盐(例如,三磷酸钠)。本公开内容的一些组合物例如但不限于清洁组合物或洗涤剂组合物不含任何磷酸盐(例如,磷酸盐或磷酸盐助洗剂)。

[0104] 如本文所用,术语“漂白”指在足够的时间长度和/或合适的pH和/或温度条件下处理材料(例如,织物、衣物、纸浆等)以实现增亮(即,美白)和/或清洁该材料。适于漂白的化学物质的示例包括但不限于例如 ClO_2 、 H_2O_2 、过酸类、 NO_2 等。

[0105] 如本文所用,蛋白酶(例如,本公开内容的丝氨酸蛋白酶多肽)的“洗涤性能”是指丝氨酸蛋白酶多肽对洗涤的贡献,与未向组合物添加丝氨酸蛋白酶多肽的洗涤剂相比,其赋予该洗涤剂附加的清洁性能。洗涤性能在相关的洗涤条件下进行比较。在一些测试系统下,可以以使得模拟在某一市场分割(例如,手洗或人工餐具洗涤、自动餐具洗涤、盘碟清洁、餐具清洁、织物清洁等)中通常用于家庭应用的条件的方式来控制其它相关因素,例如洗涤剂组成、泡沫浓度、水硬度、洗涤机械学、时间、pH和/或温度。

[0106] 术语“相关洗涤条件”在本文中用于指在手洗餐具洗涤、自动餐具洗涤或衣物洗涤剂市场分割中实际上应用于家庭的条件,特别是洗涤温度、时间、洗涤机械学、泡沫浓度、洗涤剂的类型和水硬度。

[0107] 如本文所用,术语“消毒”指从表面去除污染物,以及抑制或杀死物品表面上的微生物。并非旨在使本公开内容局限于任何具体表面、物品或者所需去除的污染物或微生物。

[0108] 本文中清洁组合物的“紧凑”形式最佳反映在密度,并且就组合物而言,最佳反映在无机填料盐的量。无机填料盐是粉末形式的洗涤剂组合物的常规成分。在常规的洗涤剂组合物中,填料盐以相当量,通常为按总组合物的重量计约17%至约35%存在。相比之下,在紧凑型组合物中,填料盐以不超过总组合物的约15%的量存在。在一些实施方案中,填料盐以不超过按组合物的重量计约10%,或更优选约5%的量存在。在一些实施方案中,无机填料盐选自碱金属和碱土金属的硫酸盐和盐酸盐。在一些实施方案中,填料盐是硫酸钠。

[0109] II. 丝氨酸蛋白酶多肽

[0110] 本公开内容提供了新的丝氨酸蛋白酶。本公开内容的丝氨酸蛋白酶多肽包括分离的、重组的、基本纯的或非天然存在的多肽。在一些实施方案中,所述多肽可用于清洁应用,并且可掺入到可用于清洁有此需要的物品或表面的清洁组合物中。

[0111] 在一些实施方案中,本发明是吉氏芽孢杆菌-进化枝的枯草杆菌蛋白酶。

[0112] 在另一些实施方案中,吉氏芽孢杆菌-进化枝枯草杆菌蛋白酶以DXGIXXHSDLXXXGASXXXXXPTTADLNHXGTH (SEQ ID NO:47) 或DXGIXXHSDLXXXGGASXXXXXTTADLXXHGTH (SEQ ID NO:90) 基序为特征,其中起始D是活性位点天冬氨酸残基且倒数第二个H是活性位点组氨酸,并且X是任意氨基酸。在另一些实施方案中,吉氏芽孢杆菌-进化枝枯草杆菌蛋白酶以DXGIXXHSDLXXXGGASXXXXXPTTADLNHXGTH (SEQ ID NO:47) 基序为特征,其中起始D是活性位点天冬氨酸残基且倒数第二个H是活性位点组氨酸,并且X是任意氨基酸。在另一些实施方案

中,吉氏芽孢杆菌-进化枝枯草杆菌蛋白酶以DXGIXXHSDLXXXGGASXXXXXXTTADLXXHGTH (SEQ ID NO:90) 基序为特征,其中起始D是活性位点天冬氨酸残基且倒数第二个H是活性位点组氨酸,并且X是任意氨基酸。

[0113] 一些实施方案提供了吉氏芽孢杆菌-进化枝的枯草杆菌蛋白酶,其包含SEQ ID NO:47或90的氨基酸序列,并且还包含与SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。一些实施方案提供了吉氏芽孢杆菌-进化枝的枯草杆菌蛋白酶,其包含SEQ ID NO:47或90的氨基酸序列,并且还包含与SEQ ID NO:11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。一些实施方案提供了吉氏芽孢杆菌-进化枝的枯草杆菌蛋白酶,其包含SEQ ID NO:47或90的氨基酸序列,并且还包含与SEQ ID NO:57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。一些实施方案提供了吉氏芽孢杆菌-进化枝的枯草杆菌蛋白酶,其包含SEQ ID NO:47或90的氨基酸序列,并且还包含与SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。一些实施方案提供了吉氏芽孢杆菌-进化枝的枯草杆菌蛋白酶,其包含SEQ ID NO:47或90的氨基酸序列,并且还包含与SEQ ID NO:11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。一些实施方案提供了吉氏芽孢杆菌-进化枝的枯草杆菌蛋白酶,其包含SEQ ID NO:47或90的氨基酸序列,并且还包含与SEQ ID NO:57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0114] 一些实施方案提供了吉氏芽孢杆菌-进化枝的枯草杆菌蛋白酶,其包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列,并且还包含与SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。一些实施方案提供了吉氏芽孢杆菌-进化枝的枯草杆菌蛋白酶,其包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列,并且还包含与SEQ ID NO:11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。一些实施方案提供了吉氏芽孢杆菌-进化枝的枯草杆菌蛋白酶,其包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列,并且还包含与SEQ ID NO:57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。一些实施方案提供了吉氏芽孢杆菌-进化枝的枯草杆菌蛋白酶,其包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列,并且还包含与SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。一些实施方案提供了吉氏芽孢杆菌-进化枝的枯草杆菌蛋白酶,其包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列,并且还包含与SEQ ID NO:11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有

95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。一些实施方案提供了吉氏芽孢杆菌-进化枝的枯草杆菌蛋白酶,其包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列,并且还包含与SEQ ID NO:57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0115] 一些实施方案提供了吉氏芽孢杆菌-进化枝的枯草杆菌蛋白酶,其包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列,并且还包含与SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。一些实施方案提供了吉氏芽孢杆菌-进化枝的枯草杆菌蛋白酶,其包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列,并且还包含与SEQ ID NO:11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。一些实施方案提供了吉氏芽孢杆菌-进化枝的枯草杆菌蛋白酶,其包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列,并且还包含与SEQ ID NO:57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。一些实施方案提供了吉氏芽孢杆菌-进化枝的枯草杆菌蛋白酶,其包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列,并且还包含与SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。一些实施方案提供了吉氏芽孢杆菌-进化枝的枯草杆菌蛋白酶,其包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列,并且还包含与SEQ ID NO:11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。一些实施方案提供了吉氏芽孢杆菌-进化枝的枯草杆菌蛋白酶,其包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列,并且还包含与SEQ ID NO:57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0116] 在一些实施方案中,所述吉氏芽孢杆菌-进化枝不包含W003054184-CAE48421、W02007131657-CAS91385、W02008086916-CAV33594或NCBI登录号AGS78407。参考号CAE48421、CAS91385和CAV33594是列于基因组搜索数据库(Genome Quest Database)中的登录号(还参见表7-2)。参考号AGS78407是列于NCBI数据库中的登录号(还参见表7-1)。

[0117] 在一些实施方案中,本发明的多肽是与SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82具有70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽。在一些实施方案中,本发明的多肽是与SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82具有95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽。在一些实施方案中,本发明的多肽是与SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82具96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽。在一些实施方案中,本发明的多肽是与所例示多肽具有指定氨基酸序列同源性度,例如与SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51或52具有70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽。在一些实施方案中,本发明的多肽是与SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51或52具有95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多

肽。在一些实施方案中,本发明的多肽是与SEQ ID NO:57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82具有70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽。在一些实施方案中,本发明的多肽是与SEQ ID NO:57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82具有95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽。

[0118] 在一些实施方案中,SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列不包含W003054184-CAE48421或W02007131657-CAS91385。在一些实施方案中,SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列不包含W003054184-CAE48421、W02007131657-CAS91385或NCBI登录号AGS78407。在一些实施方案中,SEQ ID NO:11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列不包含W003054184-CAE48421或W02007131657-CAS91385。在一些实施方案中,SEQ ID NO:11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列不包含W003054184-CAE48421、W02007131657-CAS91385或NCBI登录号AGS78407。在一些实施方案中,SEQ ID NO:57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列不包含W003054184-CAE48421或W02007131657-CAS91385。在一些实施方案中,SEQ ID NO:57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列不包含W003054184-CAE48421、W02007131657-CAS91385或NCBI登录号AGS78407。在一些实施方案中,本发明的多肽或其活性片段不包含W003054184-CAE48421或W02007131657-CAS91385。在一些实施方案中,本发明的多肽或其活性片段不包含W003054184-CAE48421、W02007131657-CAS91385或NCBI登录号AGS78407。

[0119] 在一些实施方案中,本发明的多肽是这样的多肽,其中所述多肽包含选自SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列或者具有N末端缺失的变体。在一些实施方案中,本发明的多肽是这样的多肽,其中所述多肽包含选自SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51或52的氨基酸序列或者具有N末端缺失的变体。在一些实施方案中,本发明的多肽是这样的多肽,其中所述多肽包含选自SEQ ID NO:57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列或者具有N末端缺失的变体。在一些实施方案中,上述多肽是重组多肽。如本文中所述的,可例如使用诸如BLAST、ALIGN或CLUSTAL的程序通过氨基酸序列比对来确定同源性。在一些实施方案中,所述多肽是具有蛋白酶活性的分离的、重组的、基本纯的或非天然存在的酶。

[0120] 还提供了具有蛋白酶活性的多肽酶,所述酶包含这样的氨基酸序列,当使用前述任一种比对方法进行比对时,其与SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列的差异不超过50、不超过40、不超过30、不超过25、不超过20、不超过15、不超过10、不超过9、不超过8、不超过7、不超过6、不超过5、不超过4、不超过3、不超过2或不超过1个氨基酸残基。还提供了具有蛋白酶活性的多肽酶,所述酶包含这样的氨基酸序列,当使用前述任一种比对方法进行比对时,其与SEQ ID NO:SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51或52的氨基酸序列的差异不超过50、不超过40、不超过30、不超过25、不超过20、不超过15、不超过10、不超过9、不超过8、不超过7、不超过6、不超过5、不超过4、不超过3、不超过2或不超过1个氨基酸残基。甚至还提供了具有蛋白酶活性的多肽酶,所述酶包含这样的氨基酸序列,当使用前述任一种比对方法进行比对时,其与

SEQ ID NO:57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列的差异不超过50、不超过40、不超过30、不超过25、不超过20、不超过15、不超过10、不超过9、不超过8、不超过7、不超过6、不超过5、不超过4、不超过3、不超过2或不超过1个氨基酸残基。

[0121] 如上所述,本发明的变体酶多肽具有酶活性(例如,蛋白酶活性)并且因此可用于清洁应用,包括但不限于用于清洁盘碟物品、餐具物品、织物和具有硬质表面的物品(例如,桌子、桌面、墙、家具物品、地面、天花板等的硬质表面)的方法。在下文对包含本发明的一种或多种变体丝氨酸蛋白酶多肽的示例性清洁组合物进行描述。本发明的酶多肽的酶活性(例如,蛋白酶活性)可使用本领域普通技术人员公知的操作来容易地确定。下文所示的实施例对用于评价酶活性和清洁性能的方法进行了描述。本发明的多肽酶在去除污渍(例如,蛋白质污渍,例如血液/乳/墨水或卵黄)、清洁硬质表面或者清洁衣物、盘碟或餐具物品方面的性能可使用本领域中公知的操作和/或通过使用实施例中所述的操作来容易地确定。在一些实施方案中,本发明是本发明的重组多肽或其活性片段,其中所述多肽在表面活性剂存在下具有蛋白酶活性。在一些实施方案中,所述蛋白酶活性包括酪蛋白水解活性。在一些实施方案中,所述蛋白酶活性包括二甲基酪蛋白水解活性。

[0122] 本发明的丝氨酸蛋白酶可在广泛范围的pH条件下具有蛋白酶活性。在一些实施方案中,所述丝氨酸蛋白酶多肽对作为底物的偶氮酪蛋白具有蛋白酶活性,如实施例4中所证明的。在一些实施方案中,所述丝氨酸蛋白酶多肽在约4.0至约12.0的pH下具有蛋白酶活性。在一些实施方案中,所述丝氨酸蛋白酶多肽在约8.0至约12.0的pH下具有蛋白酶活性。在一些实施方案中,所述丝氨酸蛋白酶多肽在约8.0至约12.0的pH下具有至少50%、60%、70%、80%或90%的最大蛋白酶活性。在一些实施方案中,该丝氨酸蛋白酶多肽在高于8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0或11.5的pH下具有蛋白酶活性。在一些实施方案中,该丝氨酸蛋白酶多肽在低于12.0、11.5、11.0、10.5、10.0、9.5、9.0或8.5的pH下具有蛋白酶活性。

[0123] 在一些实施方案中,本发明的丝氨酸蛋白酶多肽在约10°C至约90°C的温度范围内具有蛋白酶活性。在一些实施方案中,本发明的丝氨酸蛋白酶多肽在约50°C至约75°C的温度范围内具有蛋白酶活性。在一些实施方案中,该丝氨酸蛋白酶多肽在约50°C至约75°C的温度下具有至少50%、60%、70%、80%或90%的最大蛋白酶活性。在一些实施方案中,该丝氨酸蛋白酶在高于50°C、55°C、60°C、65°C或70°C的温度下具有活性。在一些实施方案中,该丝氨酸蛋白酶在低于75°C、70°C、65°C、60°C或55°C的温度下具有活性。

[0124] 在一些实施方案中,本发明的丝氨酸蛋白酶多肽证明在清洁组合物中具有清洁性能。清洁组合物通常包含对酶的稳定性和性能有害的成分,导致清洁组合物成为酶(例如丝氨酸蛋白酶)保留功能的苛刻环境。因此,将酶放入清洁组合物中并且期望酶功能(例如丝氨酸蛋白酶活性,例如通过清洁性能证明的)并非微不足道的。在一些实施方案中,本发明的丝氨酸蛋白酶多肽证明在自动餐具洗涤用(ADW)洗涤剂中具有清洁性能。在一些实施方案中,在自动餐具洗涤用(ADW)洗涤剂组合物中的清洁性能包括清洁卵黄污渍。在一些实施方案中,本发明的丝氨酸蛋白酶多肽证明在衣物洗涤剂组合物中具有清洁性能。在一些实施方案中,在衣物洗涤剂组合物中的清洁性能包括清洁血液/乳/墨水污渍。在每种清洁组合物中,本发明的丝氨酸蛋白酶多肽均证明在具有或不具有漂白剂组分下具有清洁性能。

[0125] 可对本发明的多肽进行多种改变,例如一个或多个保守或非保守的氨基酸插入、缺失和/或替换,包括这样的变化基本不改变该多肽的酶活性的情况。类似地,还可对本发

明的核酸进行多种改变,例如一个或多个密码子中一个或多个核苷酸的一种或多种替换使得特定的密码子编码相同或不同的氨基酸,从而产生沉默变化(例如,当所编码的氨基酸不因核苷酸突变而改变时)或非沉默变化;对该序列中一个或多个核酸(或密码子)的一种或多种缺失;该序列中一个或多个核酸(或密码子)的一种或多种添加或插入,和/或该序列中一个或多个核酸(或密码子)的切割或者一种或多种截短。与原始核酸序列所编码的多肽酶相比,核酸序列中的很多此类变化可基本不改变得到的编码多肽酶的酶活性。还可对本发明的核酸序列进行修饰以包含允许在表达系统(例如,细菌表达系统)中最佳表达的一个或多个密码子,同时如果期望的话所述一个或多个密码仍编码相同的氨基酸。

[0126] 在一些实施方案中,本发明提供了具有期望酶活性(例如,蛋白酶活性或清洁性能活性)的吉氏芽孢杆菌-进化枝的枯草杆菌蛋白酶。在一些实施方案中,本发明提供了具有蛋白酶活性的吉氏芽孢杆菌-进化枝的枯草杆菌蛋白酶。在一些实施方案中,本发明提供了具有清洁性能活性的吉氏芽孢杆菌-进化枝的枯草杆菌蛋白酶。在一些实施方案中,具有期望酶活性的吉氏芽孢杆菌-进化枝的枯草杆菌蛋白酶包含这样的重组多肽或其活性片段,其包含与SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,前提条件是所述氨基酸序列不包含W003054184-CAE48421或W02007131657-CAS91385。在一些实施方案中,具有期望酶活性的吉氏芽孢杆菌-进化枝的枯草杆菌蛋白酶包含这样的重组多肽或其活性片段,其包含与SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,前提条件是所述氨基酸序列不包含W003054184-CAE48421或W02007131657-CAS91385。在一些实施方案中,具有期望酶活性的吉氏芽孢杆菌-进化枝的枯草杆菌蛋白酶包含这样的重组多肽或其活性片段,其包含与SEQ ID NO:11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,前提条件是所述氨基酸序列不包含W003054184-CAE48421或W02007131657-CAS91385。在一些实施方案中,具有期望酶活性的吉氏芽孢杆菌-进化枝的枯草杆菌蛋白酶包含这样的重组多肽或其活性片段,其包含与SEQ ID NO:11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,前提条件是所述氨基酸序列不包含W003054184-CAE48421或W02007131657-CAS91385。在一些实施方案中,具有期望酶活性的吉氏芽孢杆菌-进化枝的枯草杆菌蛋白酶包含这样的重组多肽或其活性片段,其包含与SEQ ID NO:57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,前提条件是所述氨基酸序列不包含W003054184-CAE48421或W02007131657-CAS91385。在一些实施方案中,具有期望酶活性的吉氏芽孢杆菌-进化枝的枯草杆菌蛋白酶包含这样的重组多肽或其活性片段,其包含与SEQ ID NO:57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,前提条件是所述氨基酸序列不包含W003054184-CAE48421或W02007131657-CAS91385。在一些实施方案中,具有期望酶活性的吉氏芽孢杆菌-进化枝的枯草杆菌蛋白酶包含这样的重

组多肽或其活性片段,其包含与SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51或52的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,前提条件是所述氨基酸序列不包含W003054184-CAE48421或W02007131657-CAS91385。在一些实施方案中,具有期望酶活性的吉氏芽孢杆菌-进化枝的枯草杆菌蛋白酶包含这样的重组多肽或其活性片段,其包含与SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51或52的氨基酸序列具有至少95%同一性的氨基酸序列,前提条件是所述氨基酸序列不包含W003054184-CAE48421或W02007131657-CAS91385。在一些实施方案中,具有期望酶活性的吉氏芽孢杆菌-进化枝的枯草杆菌蛋白酶包含这样的重组多肽或其活性片段,其包含与SEQ ID NO:11、15、19、23、49、50、51或52的氨基酸序列具有至少95%同一性的氨基酸序列,前提条件是所述氨基酸序列不包含W003054184-CAE48421、W02007131657-CAS91385或AGS78407。在一些实施方案中,具有期望酶活性的吉氏芽孢杆菌-进化枝的枯草杆菌蛋白酶包含这样的重组多肽或其活性片段,其包含与SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51、52、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81或83的氨基酸序列具有至少95%同一性的氨基酸序列,前提条件是所述氨基酸序列不包含W003054184-CAE48421、W02007131657-CAS91385或NCBI登录号AGS78407。在一些实施方案中,具有期望酶活性的吉氏芽孢杆菌-进化枝的枯草杆菌蛋白酶包含这样的重组多肽或其活性片段,其包含与SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,前提条件是所述氨基酸序列不包含W003054184-CAE48421、W02007131657-CAS91385或NCBI登录号AGS78407。在一些实施方案中,具有期望酶活性的吉氏芽孢杆菌-进化枝的枯草杆菌蛋白酶包含这样的重组多肽或其活性片段,其包含与SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,前提条件是所述氨基酸序列不包含W003054184-CAE48421、W02007131657-CAS91385或NCBI登录号AGS78407。在一些实施方案中,具有期望酶活性的吉氏芽孢杆菌-进化枝的枯草杆菌蛋白酶包含这样的重组多肽或其活性片段,其包含与SEQ ID NO:11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,前提条件是所述氨基酸序列不包含W003054184-CAE48421、W02007131657-CAS91385或NCBI登录号AGS78407。在一些实施方案中,具有期望酶活性的吉氏芽孢杆菌-进化枝的枯草杆菌蛋白酶包含这样的重组多肽或其活性片段,其包含与SEQ ID NO:11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,前提条件是所述氨基酸序列不包含W003054184-CAE48421、W02007131657-CAS91385或NCBI登录号AGS78407。在一些实施方案中,具有期望酶活性的吉氏芽孢杆菌-进化枝的枯草杆菌蛋白酶包含这样的重组多肽或其活性片段,其包含与SEQ ID NO:57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,前提条件是所述氨基酸序列不包含W003054184-CAE48421、W02007131657-CAS91385或NCBI登录号AGS78407。在一些实施方案中,具有期望酶活性的吉氏芽孢杆菌-进化枝的枯草杆菌蛋白酶包含这样的重组多肽或其活性片段,其

包含与SEQ ID NO:57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,前提条件是所述氨基酸序列不包含W003054184-CAE48421、W02007131657-CAS91385或NCBI登录号AGS78407。在一些实施方案中,具有期望酶活性的吉氏芽孢杆菌-进化枝的枯草杆菌蛋白酶包含这样的重组多肽或其活性片段,其包含与SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51或52的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,前提条件是所述氨基酸序列不包含W003054184-CAE48421、W02007131657-CAS91385或NCBI登录号AGS78407。在一些实施方案中,具有期望酶活性的吉氏芽孢杆菌-进化枝的枯草杆菌蛋白酶包含这样的重组多肽或其活性片段,其包含与SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51或52的氨基酸序列具有至少95%同一性的氨基酸序列,前提条件是所述氨基酸序列不包含W003054184-CAE48421、W02007131657-CAS91385或NCBI登录号AGS78407。在一些实施方案中,具有期望酶活性的吉氏芽孢杆菌-进化枝的枯草杆菌蛋白酶包含这样的重组多肽或其活性片段,其包含与SEQ ID NO:11、15、19、23、49、50、51或52的氨基酸序列具有至少95%同一性的氨基酸序列,前提条件是所述氨基酸序列不包含W003054184-CAE48421或W02007131657-CAS91385。在一些实施方案中,具有期望酶活性的吉氏芽孢杆菌-进化枝的枯草杆菌蛋白酶包含这样的重组多肽或其活性片段,其包含与SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51、52、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81或83的氨基酸序列具有至少95%同一性的氨基酸序列,前提条件是所述氨基酸序列不包含W003054184-CAE48421、W02007131657-CAS91385或NCBI登录号AGS78407。

[0127] 在一些实施方案中,本发明提供了一类具有期望酶活性(例如,蛋白酶活性或清洁性能活性)的酶多肽,其包含具有本文中所述的氨基酸替换的序列,并且它还包含一种或多种另外的氨基酸替换,例如保守和非保守替换,其中所述多肽表现出、维持或大致维持期望的酶活性(例如,蛋白水解活性,如反映在SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的多肽酶清洁活性或性能方面)。在一些实施方案中,蛋白水解活性反映在SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的多肽酶清洁活性或性能方面。在一些实施方案中,蛋白水解活性反映在SEQ ID NO:11、15、19、23、49、50、51、52、57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的多肽酶清洁活性或性能方面。在一些实施方案中,蛋白水解活性反映在SEQ ID NO:57、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的多肽酶清洁活性或性能方面。根据本发明的氨基酸替换可包括但不限于一种或多种非保守替换和/或一种或多种保守氨基酸替换。保守氨基酸残基替换通常涉及将一个功能类的氨基酸残基中的成员替换成属于同一功能类的残基(认为保守的氨基端残基在功能上是同源的或者在计算功能同源性百分比时是保守的)。保守氨基酸替换通常涉及用功能上类似的氨基酸来替换氨基酸序列中的氨基酸。例如,丙氨酸、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸在功能上类似,并且因此可充当彼此的保守氨基酸替换。天冬氨酸和谷氨酸可充当彼此的保守替换。天冬酰胺和谷氨酰胺可充当彼此的保守替换。精氨酸、赖氨酸和组氨酸可充当彼此的保守替换。异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸和缬氨酸可充当彼此的保守替换。苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸可充当彼此的保守替换。

[0128] 还可设想其它的保守氨基酸替换组。例如,可通过类似的功能或化学结构或组成

来对氨基酸进行分组(例如,酸性、碱性、脂族、芳族、含硫)。例如,脂族分组可包括:甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、缬氨酸(V)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)。包含认为是彼此的保守氨基酸替换的氨基酸的其它组包括:芳族:苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W);含硫:甲硫氨酸(M)、半胱氨酸(C);碱性:精氨酸(R)、赖氨酸(K)、组氨酸(H);酸性:天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);非极性的不带电荷残基:半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)和脯氨酸(P);亲水性的不带电荷残基:丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、天冬酰胺(N)和谷氨酰胺(Q)。另外的氨基酸分组是本领域技术人员公知的并且在多种标准教科书中进行了描述。本文多肽序列结合上述替换组的列表提供了所有经保守替换的多肽序列的明确列表。

[0129] 上述氨基酸残基类别中存在较为保守的替换,其也或者作为替代地可以是合适的。较为保守的保守替换组包括:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸和天冬酰胺-谷氨酰胺。

[0130] 本发明多肽序列的经保守替换变型(例如,本发明的变体丝氨酸蛋白酶)包括用同一保守替换组中保守选择的氨基酸对该多肽序列的氨基酸进行小百分比,有时小于5%、4%、3%、2%或1%的替换,或者少于10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸替换。

[0131] III. 编码丝氨酸蛋白酶的核酸

[0132] 本发明提供了编码本发明多肽的分离的、非天然存在的或重组的核酸,可将其统称为“本发明的核酸”或“本发明的多核苷酸”。本发明的核酸(包括下文所述的全部核酸)可用于重组产生本发明的多肽,其通常通过表达包含编码目的多肽或其片段的序列的质粒表达载体来进行。如上文所讨论的,多肽包括具有酶活性(蛋白水解活性)的丝氨酸蛋白酶多肽,其可用于清洁应用和用于清洁需要清洁的物品或表面(例如,物品的表面)的清洁组合物。

[0133] 在一些实施方案中,本发明的多核苷酸是与所例示多核苷酸具有指定核酸同源性的多核苷酸。在一些实施方案中,本发明的多核苷酸具有与SEQ ID NO:1、8、12、16、20、53、54、55、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82具有至少50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的核酸序列。在一些实施方案中,本发明的多核苷酸具有与SEQ ID NO:1、12、16、20、53、54、55、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82具有至少50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的核酸序列。在一些实施方案中,本发明的多核苷酸具有与SEQ ID NO:53、54、55、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82具有至少50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的核酸序列。在另一些实施方案中,本发明的多核苷酸还可具有与SEQ ID NO:1、12、16、20、53、54、55、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的互补核酸序列。在另一些实施方案中,本发明的多核苷酸还可具有与SEQ ID NO:12、16、20、53、54、55、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的互补核酸序列。在另一些实施方案中,本发明的多核苷酸还可具有与SEQ ID NO:53、54、55、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的互补核酸序列。在一些实施方案中,本发明的多核苷酸具有这样的核酸序列,其编码与SEQ ID NO:1、8、12、16、20、53、54、55、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的

氨基酸序列。在一些实施方案中,本发明的多核苷酸具有这样的核酸序列,其编码与SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51或52的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,本发明的多核苷酸具有这样的核酸序列,其编码与SEQ ID NO:53、54、55、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,本发明的多核苷酸具有这样的核酸序列,其编码与SEQ ID NO:1、8、12、16、20、53、54、55、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,本发明的多核苷酸具有这样的核酸序列,其编码与SEQ ID NO:4、7、11、15、19、23、49、50、51或52的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,本发明的多核苷酸具有这样的核酸序列,其编码与SEQ ID NO:53、54、55、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。如本文中所述的,可例如使用诸如BLAST、ALIGN或CLUSTAL的程序通过氨基酸序列比对来确定同源性。

[0134] 在另一个实施方案中,本发明的多核苷酸编码SEQ ID NO:47的氨基酸序列并且还编码与SEQ ID NO:1、8、12、16、20、53、54、55、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在另一个实施方案中,本发明的多核苷酸编码SEQ ID NO:47的氨基酸序列并且还编码与SEQ ID NO:1、8、12、16、20、53、54、55、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在另一个实施方案中,本发明的多核苷酸编码SEQ ID NO:47的氨基酸序列并且还编码与SEQ ID NO:8、12、16、20、53、54、55、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在另一个实施方案中,本发明的多核苷酸编码SEQ ID NO:47的氨基酸序列并且还编码与SEQ ID NO:8、12、16、20、53、54、55、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在另一个实施方案中,本发明的多核苷酸编码SEQ ID NO:47的氨基酸序列并且还编码与SEQ ID NO:53、54、55、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在另一个实施方案中,本发明的多核苷酸编码SEQ ID NO:47的氨基酸序列并且还编码与SEQ ID NO:53、54、55、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80或82的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。

[0135] 在一些实施方案中,本发明提供了分离的、重组的、基本纯的或非天然存在的核酸,其包含编码本发明的任意多肽(包括任意融合蛋白等)的核苷酸序列,所述多肽在上文标题为“本发明的多肽”的部分或本文的其它部分进行了描述。在一些实施方案中,本发明提供了合成来源的核酸,其包含编码本文中所述的本发明任意多肽(包括任意融合蛋白等)的核苷酸序列。本发明还提供了分离的、重组的、基本纯的或非天然存在的核酸,其包含编

码上文以及本文中其它部分所述的本发明任意两种或更多种多肽的组合的核苷酸序列。本发明还提供了合成来源的核酸,其包含编码本文中所述的本发明任意两种或更多种多肽的组合的核苷酸序列。本发明提供了编码本发明的丝氨酸蛋白酶多肽的核酸,其中该丝氨酸蛋白酶多肽是具有蛋白水解活性的成熟形式。在一些实施方案中,用同源前肽序列(例如,Bgi02446前肽)重组表达丝氨酸蛋白酶。

[0136] 本发明的核酸可通过使用合适的合成、操作和/或分离技术或者它们的组合来产生。例如,可使用标准的核酸合成技术,例如本领域技术人员公知的固相合成技术来产生本发明的多核苷酸。在这样的技术中,通常合成具有多至50或更多个核苷酸碱基的片段,然后将其连接(例如,通过酶促或化学连接方法)以形成基本上任何期望的连续核酸序列。还可通过本领域中已知的任何合适方法来促进本发明核酸的合成,包括但不限于使用经典的亚磷酸胺方法的化学合成(参见,例如Beaucage等人,Tetrahedron Letters 22:1859-69 [1981]);或Matthes等人所述的方法(参见,Matthes等人,EMBO J.3:801-805[1984]),如自动化合成方法中通常实施的。还可通过使用自动化DNA合成仪来产生本发明的核酸。定制核酸可从多种商业来源(例如,The Midland Certified Reagent Company、Great American Gene Company、Operon Technologies Inc.和DNA2.0)订购。用于合成核酸的其它技术以及相关原理在本领域中是已知的(参见,例如Itakura等人,Ann.Rev.Biochem.53:323[1984];和Itakura等人,Science 198:1056[1984])。

[0137] 如上所述,可用于修饰核酸的重组DNA技术在本领域中是公知的。例如,本领域技术人员知晓并且可容易地采用诸如限制性内切核酸酶消化、连接、逆转录和cDNA产生以及聚合酶链反应(例如,PCR)的技术。还可通过使用一种或多种寡核苷酸探针筛选cDNA文库来获得本发明的核苷酸,所述探针可与编码本发明的丝氨酸蛋白酶多肽的多核苷酸杂交或者对其进行PCR扩增。用于筛选并分离cDNA的操作以及PCR扩增操作是本领域技术人员公知的,并且在本领域技术人员已知的标准参考文献中进行了描述。本发明的一些核酸可借助例如已知的诱变操作(例如,定点诱变、位点饱和又诱变和体外重组)通过改变天然存在的多核苷酸骨架(例如,编码酶或亲本蛋白酶的天然存在多核苷酸骨架)来获得。适于产生编码本发明丝氨酸蛋白酶多肽的本发明的经修饰多核苷酸的多种方法在本领域中是已知的,包括但不限于位点饱和诱变、扫描诱变、插入诱变、缺失诱变、随机诱变、定点诱变和定向进化以及多种其它重组方法。

[0138] IV. 用于产生丝氨酸蛋白酶的载体、宿主细胞和方法

[0139] 本发明提供了包含本文中所述的本发明的至少一种丝氨酸蛋白酶多核苷酸(例如,本文中所述的编码本发明丝氨酸蛋白酶多肽的多核苷酸)的载体,包含本发明的至少一种核酸或多核苷酸的表达载体或表达盒,包含本发明的至少一种核酸或多核苷酸的分离的、基本纯的或重组的DNA构建体,包含本发明的至少一种多核苷酸的分离的或重组的细胞,以及包含一种或多种这样的载体、核酸、表达载体、表达盒、DNA构建体、细胞、细胞培养物或其它它们的任意组合或混合物的组合物。

[0140] 在一些实施方案中,本发明提供了包含本发明的至少一种载体(例如,表达载体或DNA构建体)的重组细胞,所述载体包含本发明的至少一种核酸或多核苷酸。一些这样的重组细胞经至少一种这样的载体转化或转染,但是其它方法也是可用的并且在领域中是已知的。通常将这样的细胞称为宿主细胞。一些这样的细胞包含细菌细胞,包括但不限于芽孢杆

菌细胞,例如枯草芽孢杆菌细胞。本发明还提供了包含本发明的至少一种丝氨酸蛋白酶多肽的重组细胞(例如,重组宿主细胞)。

[0141] 在一些实施方案中,本发明提供了包含本发明的核酸或多核苷酸的载体。在一些实施方案中,所述载体是表达载体或表达盒,其中编码本发明丝氨酸蛋白酶多肽的本发明多核苷酸序列与有效基因表达所需的一个或另外的核酸区段可操作地连接(例如,启动子与编码本发明丝氨酸蛋白酶多肽的本发明多核苷酸可操作地连接)。载体可包含转录终止子和/或选择基因,例如抗生素抗性基因,其能够通过含抗微生物剂培养基中培养来实现经质粒感染细胞的连续培养维持。

[0142] 表达载体可衍生自质粒或病毒DNA,或者在一些另选的实施方案中,包含两者的元件。示例性的载体包括但不限于pC194、pJH101、pE194、pHP13(参见,Harwood和Cutting[编辑],第3章,Molecular Biological Methods for Bacillus,John Wiley&Sons[1990];用于枯草芽孢杆菌的合适复制型质粒包括第92页列出的那些)还参见,Perego, Integrational Vectors for Genetic Manipulations in *B.subtilis*,Sonenshein等人,[编辑]*B.subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria:Biochemistry,Physiology and Molecular Genetics,American Society for Microbiology,Washington,D.C.[1993],第615-624页),以及p2JM103BBI。

[0143] 对于在细胞中表达和产生目的蛋白(例如,丝氨酸蛋白酶多肽),在适于表达丝氨酸蛋白酶的条件下,将包含至少一个拷贝的编码丝氨酸蛋白酶多肽的多核苷酸(在一些情况下,包含多个拷贝)的至少一种表达载体转化到细胞中。在本发明的一些实施方案中,编码丝氨酸蛋白酶多肽的多核苷酸序列(以及载体中包括的其它序列)整合到宿主细胞的基因组中,而在另一些实施方案中,包含编码丝氨酸蛋白酶多肽的多核苷酸序列的质粒载体在细胞中保持为自主染色体外元件。本发明提供了染色体外核酸元件以及整合到宿主细胞基因组中的引入核苷酸序列二者。本文中所述的载体可用于产生本发明的丝氨酸蛋白酶多肽。在一些实施方案中,编码丝氨酸蛋白酶多肽的多核苷酸构建体存在于能够将编码丝氨酸蛋白酶多肽的多核苷酸整合到宿主染色体中并任选地对其进行扩增的整合型载体上。整合位点的示例是本领域技术人员公知的。在一些实施方案中,编码本发明丝氨酸蛋白酶多肽的多核苷酸的转录通过为所选前体蛋白酶的野生型启动子的启动子来实现。在另一些实施方案中,启动子与前体蛋白酶异源,但是在宿主细胞中具有功能。特别地,用于细菌宿主细胞的合适启动子的示例包括但不限于amyE、amyQ、amyL、pstS、sacB、pSPAC、pAprE、pVeg、pHpaII的启动子,嗜热脂肪芽孢杆菌产麦芽糖淀粉酶基因、解淀粉芽孢杆菌(BAN)淀粉酶基因、枯草芽孢杆菌碱性蛋白酶基因、克劳氏芽孢杆菌碱性蛋白酶基因、短小芽孢杆菌木糖苷酶基因、苏云金芽孢杆菌cryIII_A和地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶基因的启动子。另外的启动子包括但不限于A4启动子以及 λ PR或PL启动子,和大肠杆菌lac、trp或tac启动子。

[0144] 本发明的丝氨酸蛋白酶可在任何合适微生物(包括细菌和真菌)的宿主细胞中产生。在一些实施方案中,可在革兰氏阳性细菌中产生本发明的丝氨酸蛋白酶多肽。在一些实施方案中,宿主细胞是芽孢杆菌属菌种、链霉菌属菌种(*Streptomyces* spp.)、埃希氏菌属菌种(*Escherichia* spp.)、曲霉菌属菌种(*Aspergillus* spp.)、木霉菌属菌种(*Trichoderma* spp.)、假单胞菌属菌种(*Pseudomonas* spp.)、棒状杆菌属菌种(*Corynebacterium* spp.)、酵母属菌种(*Saccharomyces* spp.)或毕赤酵母属菌种(*Pichia*

spp.)。在一些实施方案中,通过芽孢杆菌宿主细胞来产生丝氨酸蛋白酶多肽。可用于产生本发明丝氨酸蛋白酶多肽的芽孢杆菌宿主细胞的示例包括但不限于地衣芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、短芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、嗜碱芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、克劳氏芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、*Myceliophthera* spp和耶氏酵母,以及在芽孢杆菌属内的其它生物。在一些实施方案中,使用枯草芽孢杆菌宿主细胞来产生丝氨酸蛋白酶多肽。美国专利5,264,366和4,760,025 (RE 34,606) 描述了可用于产生本发明的丝氨酸蛋白酶多肽的多种芽孢杆菌宿主菌株,但是也可使用其它合适的菌株。

[0145] 可用于产生本发明的丝氨酸蛋白酶多肽的数种细菌菌株包括非重组(即,野生型)芽孢杆菌菌株,以及天然存在菌株的变体和/或重组菌株。在一些实施方案中,宿主菌株是其中已将编码目的多肽的多核苷酸导入宿主中的重组菌株。在一些实施方案中,宿主菌株是枯草芽孢杆菌宿主菌株,并且特别地是重组的枯草芽孢杆菌宿主菌株。多种枯草芽孢杆菌菌株是已知的,包括但不限于例如1A6 (ATCC 39085)、168 (1A01)、SB19、W23、Ts85、B637、PB1753至PB1758、PB3360、JH642、1A243 (ATCC 39,087)、ATCC 21332、ATCC 6051、MI113、DE100 (ATCC 39,094)、GX4931、PBT 110和PEP 211菌株(参见,例如Hoch等人,Genetics 73:215-228[1973];还参见,美国专利4,450,235和4,302,544,以及EP 0134048,其各自通过引用整体并入)。枯草芽孢杆菌作为表达宿主细胞的用途在本领域中是公知的(参见,例如Palva等人,Gene 19:81-87[1982];Fahnestock和Fischer,J.Bacteriol.,165:796-804[1986];和Wang等人,Gene 69:39-47[1988])。

[0146] 在一些实施方案中,芽孢杆菌宿主细胞是在至少一个以下基因中包含突变或缺失的芽孢杆菌:degU、degS、degR和degQ。在一些实施方案中,突变在degU基因中,并且在一些实施方案中,突变是degU (Hy) 32(参见,例如Msadek等人,J.Bacteriol.172:824-834[1990];和Olmos等人,Mol.Gen.Genet.253:562-567[1997])。在一些实施方案中,芽孢杆菌宿主在scoC4(参见例如,Caldwell等人,J.Bacteriol.183:7329-7340[2001]);spoIIE(参见例如,Arigoni等人,Mol.Microbiol.31:1407-1415[1999]);和/或oppA或opp操纵子的其它基因(参见例如,Perego等人,Mol.Microbiol.5:173-185[1991])中包含突变或缺失。实际上,预期与oppA基因中的突变产生相同表型的opp操纵子中的任何突变均可用于本发明的经改变芽孢杆菌菌株的一些实施方案。在一些实施方案中,这些突变单独发生,而在另一些实施方案中,存在突变的组合。在一些实施方案中,可用于产生本发明的丝氨酸蛋白酶多肽的经改变芽孢杆菌宿主细胞菌株是已在上述一个或多个基因中包含突变的芽孢杆菌宿主菌株。另外,可使用包含内源性蛋白酶基因的突变和/或缺失的芽孢杆菌宿主细胞。在一些实施方案中,芽孢杆菌宿主细胞包含aprE和nprE基因的缺失。在另一些实施方案中,芽孢杆菌宿主细胞包含5个蛋白酶基因的缺失,而在另一些实施方案中,芽孢杆菌宿主细胞包含9个蛋白酶基因的缺失(参见,例如美国专利申请公开2005/0202535,其通过引用并入本文)。

[0147] 使用本领域中已知的任何合适方法用编码本发明的至少一种丝氨酸蛋白酶多肽的至少一种核酸来转化宿主细胞。利用质粒DNA构建体或载体来将核酸(例如,DNA)引入芽孢杆菌细胞或大肠杆菌细胞中以及将这样的质粒DNA构建体或载体转化到此类细胞中的方法是公知的。在一些实施方案中,随后从大肠杆菌细胞分离质粒,并将其转化到芽孢杆菌细

胞中。然而,并非必须使用诸如大肠杆菌的中间微生物,并且在一些实施方案中,将DNA构建体或载体直接引入芽孢杆菌属宿主中。

[0148] 本领域技术人员熟知用于将本发明的核酸引入芽孢杆菌宿主中的合适方法(参见例如,Ferrari等人,“Genetics,”Harwood等人[编辑],Bacillus,Plenum Publishing Corp.[1989],第57-72页;Saunders等人,J.Bacteriol.157:718-726[1984];Hoch等人,J.Bacteriol.93:1925-1937[1967];Mann等人,Current Microbiol.13:131-135[1986];Holubova,Folia Microbiol.30:97[1985];Chang等人,Mol.Gen.Genet.168:11-115[1979];Vorobjeva等人,FEMS Microbiol.Lett.7:261-263[1980];Smith等人,Appl.Env.Microbiol.51:634[1986];Fisher等人,Arch.Microbiol.139:213-217[1981];以及McDonald,J.Gen.Microbiol.130:203[1984])。实际上,这样的方法例如转化(包括原生质体转化以及转染、转导和原生质体融合)均是公知的并且适用于本发明。转化芽孢杆菌细胞的本领域已知方法包括这样的方法,例如质粒标记拯救转化,其涉及通过携带部分同源的内生质粒(resident plasmid)的感受态细胞摄入供体质粒(参见,Contente等人,Plasmid 2:555-571[1979];Haima等人,Mol.Gen.Genet.223:185-191[1990];Weinrauch等人,J.Bacteriol.154:1077-1087[1983];和Weinrauch等人,J.Bacteriol.169:1205-1211[1987])。在该方法中,引入的供体质粒与内生“辅助性”质粒的同源区在模拟染色体转化的过程中发生重组。

[0149] 除常用的方法之外,在一些实施方案中,用包含编码本发明丝氨酸蛋白酶的核酸的DNA构建体或载体直接转化宿主细胞(即,在引入宿主细胞之前,不使用中间细胞来扩增或者以别的方式处理该DNA构建体或载体)。将本发明的DNA构建体或载体引入宿主细胞中包括本领域中已知的将核酸序列(例如,DNA序列)引入宿主细胞中而不插入宿主基因组中的那些物理和化学方法。这样的方法包括但不限于氯化钙沉淀、电穿孔、裸DNA、脂质体等。在另一些实施方案中,将DNA构建体或载体与质粒共转化,而不插入到质粒中。在另一些实施方案中,通过本领域中已知的方法从经改变的芽孢杆菌菌株缺失选择标记(参见,Stahl等人,J.Bacteriol.158:411-418[1984];和Palmeros等人,Gene 247:255-264[2000])。

[0150] 在一些实施方案中,将本发明的转化细胞在常规的营养培养基中进行培养。合适的培养条件(例如温度、pH等)是本领域技术人员已知的,并且在科学文献中进行了充分描述。在一些实施方案中,本发明提供了包含本发明的至少一种丝氨酸蛋白酶多肽或至少一种核酸的培养物(例如,细胞培养物)。

[0151] 在一些实施方案中,在允许表达本发明蛋白酶的条件下在合适的营养培养基中培养经编码本发明的至少一种丝氨酸蛋白酶多肽的至少一种多核苷酸序列转化的宿主细胞,在此之后从培养物中回收得到的蛋白酶。在一些实施方案中,通过常规操作来从培养基中回收细胞产生的蛋白酶,包括但不限于例如,通过离心或过滤从培养基中分离宿主细胞、借助于盐(硫酸铵)沉淀出上清液或滤液的蛋白质性组分、色谱纯化(例如,离子交换、凝胶过滤、亲和等)。

[0152] 在一些实施方案中,通过重组宿主细胞产生的丝氨酸蛋白酶分泌到培养基中。编码纯化促进结构域的核酸序列可用于促进蛋白质的纯化。包含编码丝氨酸蛋白酶多肽的多核苷酸序列的载体或DNA构建体可还包含编码促进该丝氨酸蛋白酶多肽纯化的纯化促进结构域的核酸序列(参见,例如Kroll等人,DNA Cell Biol.12:441-53[1993])。这样的纯化促

进结构域包括但不限于例如允许在固定化金属上进行纯化的金属螯合肽,例如组氨酸-色氨酸模块(参见, Porath, *Protein Expr. Purif.* 3:263-281 [1992]); 在固定化免疫球蛋白上进行纯化的蛋白A结构域; 和用于LAGS延伸/亲和纯化系统的结构域。还可利用在纯化结构域和异源蛋白质之间包括可切割的接头序列例如因子XA或肠激酶(例如, 可获自 Invitrogen, San Diego, CA的序列) 来促进纯化。

[0153] 用于检测和测量酶(例如, 本发明的丝氨酸蛋白酶多肽)的酶活性的测定是公知的。用于检测和测量蛋白酶(例如, 本发明的丝氨酸蛋白酶多肽)的活性的多种测定也是本领域普通技术人员知晓的。特别地, 可利用基于酸溶性肽从酪蛋白或血红蛋白的释放(作为280nm下的吸光度测量或者使用福林法比色测量)的测定来测量蛋白酶活性。一种示例性的测定涉及溶解生色底物(参见, 例如Ward, "Proteinases," Fogarty (编辑), *Microbial Enzymes and Biotechnology*, Applied Science, London, [1983], 第251-317页)。其它的示例性测定包括但不限于琥珀酰-Ala-Ala-Pro-Phe-对硝基苯胺测定(suc-AAPF-pNA)和2,4,6-三硝基苯磺酸钠盐测定(TNBS测定)。本领域人员已知的很多其它参考文献提供了合适的方法(参见, 例如Wells等人, *Nucleic Acids Res.* 11:7911-7925 [1983]; Christianson等人, *Anal. Biochem.* 223:119-129 [1994]; 和Hsia等人, *Anal. Biochem.* 242:221-227 [1999])。

[0154] 多种方法可用于确定成熟蛋白酶(例如, 本发明的成熟丝氨酸蛋白酶多肽)在宿主细胞中的产生水平。这样的方法包括但不限于例如利用对该蛋白酶具有特异性的多克隆或单克隆抗体的方法。示例性的方法包括但不限于酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、荧光免疫测定(FIA)和荧光激活细胞分选(FACS)。这些及其它测定在本领域中是公知的(参见例如, Maddox等人, *J. Exp. Med.* 158:1211 [1983])。

[0155] 在另一些实施方案中, 本发明提供了用于制备或产生本发明的成熟丝氨酸蛋白酶多肽的方法。成熟丝氨酸蛋白酶多肽不包含信号肽或前肽序列。一些方法包括在重组细菌宿主细胞例如芽孢杆菌细胞(例如枯草芽孢杆菌细胞)中制备或产生本发明的丝氨酸蛋白酶多肽。在一些实施方案中, 本发明提供了产生本发明的丝氨酸蛋白酶多肽的方法, 该方法包括在有助于产生该丝氨酸蛋白酶多肽的条件下培养包含重组表达载体的重组宿主细胞, 所述重组表达载体包含编码本发明的丝氨酸蛋白酶多肽的核酸。一些这样的方法还包括从培养物中回收丝氨酸蛋白酶多肽。

[0156] 在一些实施方案中, 本发明提供了产生本发明的丝氨酸蛋白酶多肽的方法, 所述方法包括: (a) 将包含编码本发明丝氨酸蛋白酶多肽的核酸的重组表达载体引入细胞(例如细菌细胞, 例如枯草芽孢杆菌细胞)群中; 以及(b) 在有助于产生由该表达载体编码的丝氨酸蛋白酶多肽的条件下在培养基中培养细胞。一些这样的方法还包括: (c) 从细胞或者从培养基中分离丝氨酸蛋白酶多肽。

[0157] V. 包含丝氨酸蛋白酶的组合物

[0158] A. 织物和家庭护理产品

[0159] 除非另外指出, 否则本文中提供的所有组分或组合物水平均是指该组分或组合物的活性水平, 并且不包括可商购获得来源中可能存在的杂质, 例如残余溶剂或副产物。酶组分重量基于总活性蛋白质。除非另外指出, 否则所有的百分比和比率均为按重量计。除非另外指出, 否则所有的百分比和比率均基于总组合物来计算。本发明的组合物包括清洁组合物, 例如洗涤剂组合物。在所例示的洗涤剂组合物中, 酶水平通过按总组合物的重量计的纯

酶来表示,并且除非另外规定,否则洗涤剂成分表示为按总组合物的重量计。

[0160] 尽管不是本发明的目的所必需的,但是下文所举例说明的助剂的非限制性列表适用于本发明的清洁组合物。在一些实施方案中,引入这些助剂例如是为了有助于或增强清洁性能(对于处理需清洁的基质),或者为了修饰清洁组合物的美观,如在香料、着色剂、染料等的情况下。应理解,这样的助剂在本发明的丝氨酸蛋白酶多肽之外。这些附加组分的准确性质及其引入水平将取决于组合物的物理形式以及其所用于的清洁操作的性质。合适的助剂材料包括但不限于漂白催化剂、其它酶、酶稳定体系、螯合剂、光学增亮剂、去污聚合物、染料转移剂、分散剂、抑泡剂、染料、香料、着色剂、填料盐、光活化剂、荧光剂、织物调理剂、可水解表面活性剂、防腐剂、抗氧化剂、抗收缩剂、抗皱剂、杀菌剂、杀真菌剂、色粒、银护理剂、抗晦暗剂和/或抗腐蚀剂、碱度源、增溶剂、载体、加工助剂、颜料和pH控制剂、表面活性剂、助洗剂、螯合剂、染料转移抑制剂、沉积助剂、分散剂、另外的酶和酶稳定剂、催化材料、漂白活性剂、漂白增效剂、过氧化氢、过氧化氢源、预先形成的过酸、聚合物分散剂、粘土污垢去除剂/抗再沉积剂、增亮剂、抑泡剂、染料、香料、结构增弹剂、织物软化剂、载体、水溶助剂、加工助剂和/或颜料。除下文的公开内容之外,其它这样的助剂的合适示例以及使用水平见于美国专利5,576,282、6,306,812、6,326,348、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,其全部通过引用并入本文。在其中清洁助剂材料与本发明的丝氨酸蛋白酶多肽在清洁组合物中不相容的实施方案中,则可使用使清洁助剂材料和蛋白酶保持分离(即,彼此不接触)直至适宜组合这两种组分的合适方法。这样的分离方法包括本领域中已知的任何合适方法(例如胶囊锭(gelcap)、包封、片剂、物理分离等)。前述助剂成分可构成本发明的清洁组合物的剩余部分。

[0161] 本发明的清洁组合物有利地用于例如洗衣应用、硬质表面清洁应用、餐具洗涤应用(包括自动餐具洗涤和手洗餐具洗涤),以及化妆品应用,例如托牙、牙齿、毛发和皮肤清洁。本发明的酶还适用于接触镜片清洁和伤口清创应用。另外,由于在温度较低的溶液中效能增加的独特优势,本发明的酶理想地适于洗衣应用。此外,本发明的酶可用于颗粒和液体组合物。

[0162] 本发明的丝氨酸蛋白酶还可用于清洁添加剂产品。在一些实施方案中,可用于低温溶液清洁应用。在一些实施方案中,本发明提供了包含本发明的至少一种酶的清洁添加剂产品,当期望附加的漂白效果时,其理想地适于包括在洗涤过程中。这样的实例包括但不限于低温溶液清洁应用。在一些实施方案中,添加剂产品为其最简单的形式,即一种或多种蛋白酶。在一些实施方案中,将添加剂包装成用于添加至清洁过程的剂型。在一些实施方案中,将添加剂包装成用于添加至采用过氧源并且期望漂白效果增加的清洁过程的剂型。任何合适的单剂量单位形式均可用于本发明,包括但不限于丸剂、片剂、胶囊锭剂或其它单剂量单位,例如预先测量的散剂或液体。在一些实施方案中,包含填料或载体材料以增加这样的组合物的体积。合适的填料或载体材料包括但不限于多种硫酸盐、碳酸盐和硅酸盐以及滑石、粘土等。用于液体组合物的合适填料或载体材料包括但不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,组合物包含约5%至约90%的此类材料。酸性填料可用于降低pH。另选地,在一些实施方案中,清洁添加剂包含助剂成分,如下文更充分描述的。

[0163] 本发明的清洁组合物和清洁添加剂需要有效量的单独或者与其它蛋白酶和/或另外的酶组合的本文中提供的至少一种丝氨酸蛋白酶多肽。所需的酶水平通过添加本发明的一种或多种本发明的丝氨酸蛋白酶多肽来实现。通常来说,本发明的清洁组合物包含至少约0.0001重量百分比、约0.0001至约10、约0.001至约1或者约0.01至约0.1重量百分比的本发明的至少一种丝氨酸蛋白酶多肽。

[0164] 通常将本文中的清洁组合物配制成使得在用于水性清洁操作期间洗涤水将具有约4.0至约11.5、或者甚至约5.0至约11.5、或者甚至约5.0至约8.0、或者甚至约7.5至约10.5的pH。通常将液体产品制剂配制成使得具有约3.0至约9.0或者甚至约3至约5的pH。通常将颗粒洗衣用产品配制成使得具有约9至约11的pH。在一些实施方案中,可将本发明的清洁组合物配制成在洗涤条件下具有碱性pH,例如约8.0至约12.0、或者约8.5至约11.0、或者约9.0至约11.0的pH。在一些实施方案中,可将本发明的清洁组合物配制成在洗涤条件下具有中性pH,例如约5.0至约8.0、或者约5.5至约8.0、或者约6.0至约8.0、或者约6.0至约7.5的pH。在一些实施方案中,使用常规的pH计所测量的,当将清洁组合物在20℃下以1:100 (wt:wt) 溶解于去离子水时,可测量到中性pH条件。用于将pH控制在建议使用水平的技术包括使用缓冲液、碱、酸等,并且是本领域技术人员公知的。

[0165] 在一些实施方案中,当在颗粒组合物或液体中使用丝氨酸蛋白酶多肽时,期望该丝氨酸蛋白酶多肽为经包封颗粒的形式以保护该丝氨酸蛋白酶多肽在储存期间免受颗粒组合物的其它组分。另外,包封也是控制丝氨酸蛋白酶多肽在清洁过程期间的可用性的一种方式。在一些实施方案中,包封增强丝氨酸蛋白酶多肽和/或另外的酶的性能。就此而言,将本发明的丝氨酸蛋白酶多肽用本领域中已知的任何合适的包封材料进行包封。在一些实施方案中,包封材料通常包封本发明的丝氨酸蛋白酶多肽的至少一部分。通常来说,包封材料是水溶性的和/或水分散性的。在一些实施方案中,包封材料具有0℃或更高的玻璃化转变温度(Tg)。玻璃化转变温度在W097/11151中进行了更详细的描述。包封材料通常选自碳水化合物、天然或合成树脂、甲壳质、壳聚糖、纤维素和纤维素衍生物、硅酸盐、磷酸盐、硼酸盐、聚乙烯醇、聚乙二醇、石蜡以及它们的组合。当包封材料是碳水化合物时,其通常选自单糖、寡糖、多糖以及它们的组合。在一些典型的实施方案中,包封材料是淀粉(参见例如,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,包封材料是由塑料例如热塑性塑料、丙烯腈、甲基丙烯腈、聚丙烯腈、聚甲基丙烯腈及它们的混合物制成的微球体;可使用的可商购获得微球体包括但不限于由EXPANCEL® (Stockviksverken, Sweden) 以及PM 6545、PM 6550、PM 7220、PM 7228、EXTENDOSPHERES®, LUXSIL®, Q-CEL® 和 SPHERICEL® (PQ Corp., Valley Forge, PA) 供应的那些。

[0166] 参与洗涤的蛋白酶暴露于多种洗涤条件,包括变化的洗涤剂配方、洗涤水体积、洗涤水温度和洗涤时长。低洗涤剂浓度体系包括洗涤水中存在少于约800ppm的洗涤剂组分的洗涤剂。中等洗涤剂浓度包括洗涤水中存在约800ppm至约2000ppm的洗涤剂组分的洗涤剂。高洗涤剂浓度体系包括洗涤水中存在大于约2000ppm的洗涤剂组分的洗涤剂。在一些实施方案中,本发明的“冷水洗涤”利用适于在以下温度下洗涤的“冷水洗涤剂”:约10℃至约40℃、或者约20℃至约30℃、或者约15℃至约25℃,以及在约15℃至约35℃范围内的所有其它组合,和在10℃至40℃内的所有范围。

[0167] 不同的地理区域通常具有不同的水硬度。水硬度通常按每加仑混合Ca²⁺/Mg²⁺的格

令数 (grain) 来描述。硬度是水中钙 (Ca^{2+}) 和镁 (Mg^{2+}) 的量的量度。在美国,大多数水都较硬,但硬度不同。中等硬 (60-120ppm) 至硬 (121-181ppm) 水具有60至181百万分之一。

[0168] 表I. 水硬度

水	每加仑的格令数	百万分之一
软	小于1.0	小于17
略硬	1.0至3.5	17至60
中等硬	3.5至7.0	60至120
硬	7.0至10.5	120至180
非常硬	大于10.5	大于180

[0170] 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(例如水温、水硬度和/或洗涤剂浓度)下显示出惊人洗涤性能的丝氨酸蛋白酶多肽。在一些实施方案中,本发明的丝氨酸蛋白酶多肽与其它丝氨酸蛋白酶多肽蛋白酶在洗涤性能方面相当。在一些实施方案中,本文中提供的丝氨酸蛋白酶多肽显示出增强的氧化稳定性、增强的热稳定性、增强的在多种条件下的清洁能力和/或增强的螯合剂稳定性。另外,本发明的丝氨酸蛋白酶多肽仍可单独或者与助洗剂和稳定剂组合用于不包含洗涤剂的清洁组合物。

[0171] 在本发明的在一些实施方案中,清洁组合物包含按该组合物的重量计约0.00001%至约10%水平的本发明的至少一种丝氨酸蛋白酶多肽,并且按该组合物的重量计的余量(例如,约99.999%至约90.0%)包含清洁助剂材料。在本发明的另一些实施方案中,本发明的清洁组合物包含按该组合物的重量计约0.0001%至约10%、约0.001%至约5%、约0.001%至约2%、约0.005%至约0.5%水平的至少一种丝氨酸蛋白酶多肽,并且该清洁组合物的余量(例如,按重量计约9.9999%至约90.0%、约99.999%至约98%、约99.995%至约99.5%)包含清洁助剂材料。

[0172] 在一些实施方案中,本发明的清洁组合物包含一种或多种另外的提供清洁性能和/或织物护理和/或餐具洗涤益处的洗涤剂酶。合适酶的示例包括但不限于另外的丝氨酸蛋白酶、酰基转移酶、 α -淀粉酶、 β -淀粉酶、 α -半乳糖苷酶、阿拉伯糖苷酶、芳基酯酶、 β -半乳糖苷酶、卡拉胶酶、过氧化氢酶、纤维二糖水解酶、纤维素酶、软骨素酶、角质酶、内切- β -1,4-葡聚糖酶、内切- β -甘露聚糖酶、酯酶、外切-甘露聚糖酶、半乳聚糖酶、葡糖淀粉酶、半纤维素酶、透明质酸酶、角蛋白酶、漆酶、乳糖酶、木质素酶、脂酶、脂氧合酶、甘露聚糖酶、金属蛋白酶、非丝氨酸蛋白酶、氧化酶、果胶酸裂解酶、果胶乙酰酯酶、果胶酶、戊聚糖酶、过水解酶、过氧化物酶、酚氧化酶、磷酸酶、磷脂酶、植酸酶、聚半乳糖醛酸酶、普鲁兰酶、还原酶、鼠李半乳糖醛酸酶、 β -葡聚糖酶、鞣酸酶、转谷氨酰胺酶、木聚糖乙酰酯酶、木聚糖酶、木葡聚糖酶和木糖苷酶,或者它们的任意组合或混合物。在一些实施方案中,使用包含常规可应用酶的酶组合(即“混合物(cocktail)”),例如将淀粉酶、脂酶、角质酶和/或纤维素酶与蛋白酶联合使用。

[0173] 除本文中提供的丝氨酸蛋白酶多肽之外,任何其它合适的蛋白酶均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那些。在一些实施方案中,使用微生物蛋白酶。在一些实施方案中,包括经化学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,优选碱性微生物蛋白酶或胰蛋白酶样蛋白酶。碱性蛋白酶的示例包括枯草杆菌蛋白酶,尤其是来源于芽孢杆菌的那些(例如,迟缓芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶、

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枯草杆菌蛋白酶和168枯草杆菌蛋白酶)。另外的示例包括美国专利RE 34,606;5,955,340;5,700,676;6,312,936;和6,482,628中所述的那些突变型蛋白酶,所述专利全部通过引用并入本文。另外的蛋白酶示例包括但不限于胰蛋白酶(例如,猪或牛来源的胰蛋白酶)和WO 89/06270中所述的镰孢菌(*Fusarium*)蛋白酶。在一些实施方案中,可用于本发明的可商购获得的蛋白酶包括但不限于 MAXATASE[®]、MAXACAL[™]、MAXAPEM[™]、OPTICLEAN[®]、OPTIMASE[®]、PROPERASE[®]、PURAFECT[®]、PURAFECT[®] OXP、PURAMAX[™]、EXCELLASE[™]、PREFERENZ[™]蛋白酶(例如P100、P110、P280)、EFFECTENZ[™]蛋白酶(例如P1000、P1050、P2000)、EXCELLENZ[™]蛋白酶(例如P1000)、ULTIMASE[®]和PURAFAST[™](Genencor); ALCALASE[®]、SAVINASE[®]、PRIMASE[®]、DURAZYM[™]、POLARZYME[®]、OVOZYME[®]、KANNASE[®]、LIQUANASE[®]、NEUTRASE[®]、RELEASE[®]和 ESPERASE[®](Novozymes);BLAP[™]和BLAP[™]变体(Henkel Kommanditgesellschaft auf Aktien,Duesseldorf,Germany),以及KAP(嗜碱芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶;Kao Corp.,Tokyo,Japan)。多种蛋白酶在以下中进行了描述:WO95/23221、WO 92/21760、WO 09/149200、WO 09/149144、WO 09/149145、WO 11/072099、WO 10/056640、WO 10/056653、WO 11/140364、WO 12/151534、美国专利公开2008/0090747;和美国专利5,801,039、5,340,735、5,500,364、5,855,625、US RE 34,606、5,955,340、5,700,676、6,312,936、6,482,628、8,530,219,以及多篇其它专利。在另一些实施方案中,金属蛋白酶可用于本发明,包括但不限于以下中描述的金属蛋白酶:WO1999014341、WO1999033960、WO1999014342、WO1999034003、WO2007044993、WO2009058303、WO2009058661和WO2014194032、WO2014194034和WO2014194054。示例性的金属蛋白酶包括nprE、在枯草芽孢杆菌中表达的中性金属蛋白酶的重组形式(参见例如,WO 07/044993)和PMN,其是来自解淀粉芽孢杆菌的经纯化的中性金属蛋白酶。

[0174] 另外,任何合适的脂酶均可用于本发明。合适的脂酶包括但不限于细菌或真菌来源的那些。本发明涵盖经化学或遗传修饰的突变体。可用脂酶的示例包括疏绵状毛腐质霉(*Humicola lanuginosa*)脂酶(参见例如,EP 258 068和EP 305 216);米黑根毛霉(*Rhizomucor miehei*)脂酶(参见例如,EP 238 023);假丝酵母属(*Candida*)脂酶,例如南极假丝酵母(*C.antarctica*)脂酶(例如,南极假丝酵母脂酶A或B;参见例如,EP 214 761);假单胞菌(*Pseudomonas*)脂酶,例如产碱假单胞菌(*P.alcaligenes*)脂酶和类产碱假单胞菌(*P.pseudoalcaligenes*)脂酶(参见例如,EP 218 272)、洋葱假单胞菌(*P.cepacia*)脂酶(参见例如,EP 331 376)、施氏假单胞菌(*P.stutzeri*)脂酶(参见例如,GB 1,372,034)、荧光假单胞菌(*P.fluorescens*)脂酶;芽孢杆菌脂酶(例如,枯草芽孢杆菌脂酶[Dartois等人,Biochem.Biophys.Acta 1131:253-260[1993]];嗜热脂肪芽孢杆菌脂酶[参见例如,JP 64/744992];和短小芽孢杆菌脂酶[参见例如,WO 91/16422])。

[0175] 此外,很多克隆的脂酶可用于本发明的一些实施方案,包括但不限于沙门柏干酪青霉(*Penicillium camembertii*)脂酶(参见,Yamaguchi等人,Gene 103:61-67[1991])、白地霉(*Geotricum candidum*)脂酶(参见,Schimada等人,J.Biochem.,106:383-388[1989])

以及多种根霉(Rhizopus)脂酶,例如德氏根霉(R.delemar)脂酶(参见,Hass等人,Gene 109: 117-113[1991])、雪白根霉(R.niveus)脂酶(Kugimiya等人,BiosciBiotech.Biochem.56: 716-719[1992])和米根霉(R.oryzae)脂酶。

[0176] 其它类型的脂酶多肽酶例如角质酶也可用于本发明的一些实施方案,包括但不限于来源于门多萨假单胞菌(Pseudomonas mendocina)的角质酶(参见,WO 88/09367)和来源于腐皮镰孢菌(Fusarium solani pisi)的角质酶(参见,WO 90/09446)。

[0177] 另外合适的脂酶包括以下脂酶,例如M1LIPASETM、LUMA FASTTM和LIPOMAXTM (Genencor); LIPEX[®]、LIPOLASE[®]和LIPOLASE[®] ULTRA (Novozymes); 以及LIPASE PTM“Amano”(Amano Pharmaceutical Co.Ltd.,Japan)。

[0178] 在本发明的一些实施方案中,本发明的清洁组合物还包含按该组合物的重量计约0.00001%至约10%另外脂酶的水平脂酶和按该组合物的重量计余量的清洁助剂材料。在本发明的另一些实施方案中,本发明的清洁组合物还包含按该组合物的重量计约0.0001%至约10%、约0.001%至约5%、约0.001%至约2%、约0.005%至约0.5%脂酶的水平脂酶。

[0179] 在本发明的一些实施方案中,任何合适的淀粉酶均可用于本发明。在一些实施方案中,还可使用任何适用于碱性溶液的淀粉酶(例如, α 和/或 β 淀粉酶)。合适的淀粉酶包括但不限于细菌或真菌来源的那些。在一些实施方案中包括经化学或经遗传修饰的突变体。可用于本发明的淀粉酶包括但不限于从地衣芽孢杆菌获得的 α -淀粉酶(参见例如,GB 1, 296, 839)。另外的合适淀粉酶包括见于以下中的那些:W09510603、W09526397、W09623874、W09623873、W09741213、W09919467、W00060060、W00029560、W09923211、W09946399、W00060058、W00060059、W09942567、W00114532、W002092797、W00166712、W00188107、W00196537、W00210355、W09402597、W00231124、W09943793、W09943794、W02004113551、W02005001064、W02005003311、W00164852、W02006063594、W02006066594、W02006066596、W02006012899、W02008092919、W02008000825、W02005018336、W02005066338、W02009140504、W02005019443、W02010091221、W02010088447、W00134784、W02006012902、W02006031554、W02006136161、W02008101894、W02010059413、W02011098531、W02011080352、W02011080353、W02011080354、W02011082425、W02011082429、W02011076123、W02011087836、W02011076897、W094183314、W09535382、W09909183、W09826078、W09902702、W09743424、W09929876、W09100353、W09605295、W09630481、W09710342、W02008088493、W02009149419、W02009061381、W02009100102、W02010104675、W02010117511和W02010115021。可用于本发明的可商购获得的淀粉酶包括但不限于DURAMYL[®]、TERMAMYL[®]、FUNGAMYL[®]、STAINZYME[®]、STAINZYME PLUS[®]、STAINZYME ULTRA[®]和BANTM (Novozymes), 以及POWERASETM、RAPIDASE[®]和MAXAMYL[®] P (Genencor)。

[0180] 在本发明的一些实施方案中,本发明的清洁组合物还包含按该组合物的重量计约0.00001%至约10%另外淀粉酶的水平淀粉酶和按该组合物的重量计余量的清洁助剂材料。在本发明的另一些实施方案中,本发明的清洁组合物还包含按该组合物的重量计约0.0001%至约10%、约0.001%至约5%、约0.001%至约2%、约0.005%至约0.5%淀粉酶的

水平的淀粉酶。

[0181] 在另一些实施方案中,任何合适的纤维素酶均可用于本发明的清洁组合物。合适的纤维素酶包括但不限于细菌或真菌来源的那些。在一些实施方案中包括经化学或经遗传修饰的突变体。合适的纤维素酶包括但不限于特异腐质霉(*Humicola insolens*)纤维素酶(参见例如,美国专利4,435,307)。特别合适的纤维素酶是具有颜色护理有益效果的纤维素酶(参见例如,EP 0495 257)。可用于本发明的可商购获得纤维素酶包括但不限于 **CELLUZYME[®]**、**CAREZYME[®]** (Novozymes)、**REVITALENZ[™]100** (Danisco US Inc) 和 **KAC-500 (B)[™]** (Kao Corporation)。在一些实施方案中,纤维素酶作为成熟野生型纤维素酶或变体纤维素酶的一部分或片段引入,其中N末端的一部分缺失(参见例如,美国专利5,874,276)。另外合适的纤维素酶包括见于W02005054475、W02005056787、美国专利7,449,318和美国专利7,833,773中的那些。在一些实施方案中,本发明的清洁组合物还包含按该组合物的重量计约0.00001%至约10%另外纤维素酶的水平纤维素酶和按该组合物的重量计余量的清洁助剂材料。在另一些实施方案中,本发明的清洁组合物还包含按该组合物的重量计约0.0001%至约10%、约0.001%至约5%、约0.001%至约2%、约0.005%至约0.5%纤维素酶的水平纤维素酶。

[0182] 任何适用于洗涤剂组合物的甘露聚糖酶也可用于本发明。合适的甘露聚糖酶包括但不限于细菌或真菌来源的那些。在一些实施方案中包括经化学或经遗传修饰的突变体。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6,566,114、美国专利6,602,842和美国专利6,440,991,其全部通过引用并入本文)。可用于本发明的可商购获得甘露聚糖酶包括但不限于 **MANNASTAR[®]**、**PURABRITE[™]**和**MANNAWAY[®]**。在一些实施方案中,本发明的清洁组合物还包含按该组合物的重量计约0.00001%至约10%另外甘露聚糖酶的水平甘露聚糖酶和按该组合物的重量计余量的清洁助剂材料。在本发明的一些实施方案中,本发明的清洁组合物还包含按该组合物的重量计约0.0001%至约10%、约0.001%至约5%、约0.001%至约2%、约0.005%至约0.5%纤甘露聚糖酶的水平甘露聚糖酶。

[0183] 在一些实施方案中,将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)组合用于本发明的组合物。在一些另选的实施方案中,将氧化酶与氧组合使用。两种类型的酶优选地与增强剂一起用于“溶液漂白”(即,当将织物在洗涤液中一起洗涤时防止纺织品染料从经染色的织物转移至另一织物)(参见例如,W094/12621和W095/01426)。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。在一些实施方案中包括经化学或经遗传修饰的突变体。在一些实施方案中,本发明的清洁组合物还包含按该组合物的重量计约0.00001%至约10%另外过氧化物酶和/或氧化酶的水平过氧化物酶和/或氧化酶和按该组合物的重量计余量的清洁助剂材料。在另一些实施方案中,本发明的清洁组合物还包含按该组合物的重量计约0.0001%至约10%、约0.001%至约5%、约0.001%至约2%、约0.005%至约0.5%纤氧化物酶和/或氧化酶的水平过氧化物酶和/或氧化酶。

[0184] 在一些实施方案中,可使用另外的酶,包括但不限于过水解酶(参见例如,W02005/056782、W02007106293、W02008063400、W02008106214和W02008106215)。另外,在一些实施方案中,本文中涵盖上述酶的混合物,特别是一种或多种另外的蛋白酶、淀粉酶、脂酶、甘露

聚糖酶和/或至少一种纤维素酶的混合物。实际上,预期这些酶的多种混合物均可用于本发明。还预期,丝氨酸蛋白酶多肽和一种或多种另外的酶的不同水平的范围均可独立达到约10%,并且该清洁组合物的余量为一种或多种清洁助剂材料。清洁助剂材料的具体选择可通过考虑所需清洁的表面、物品或织物以及该组合物在使用期间在用于清洁条件的期望形式(例如,通过洗涤剂使用)来容易地进行。

[0185] 在一些实施方案中,可用于清洁需要去除蛋白质性污渍的多种表面的组合物中包含有效量的本文中提供的一种或多种丝氨酸蛋白酶多肽。这样的清洁组合物包括用于诸如清洁硬质表面、织物和盘碟的应用的清洁组合物。实际上,在一些实施方案中,本发明提供了织物清洁组合物,而在另一些实施方案中,本发明提供了非织物清洁组合物。值得注意的是,本发明还提供了适于个人护理的清洁组合物,例如口腔护理组合物(包括洁牙剂、牙膏、漱口剂等,以及托牙清洁组合物)、皮肤清洁组合物和毛发清洁组合物。预期,本发明涵盖任何形式(即,液体、颗粒、棒、半固体、凝胶、乳剂、片剂、胶囊剂等)的洗涤剂组合物。

[0186] 以举例的方式,在下文对数种其中可使用本发明的丝氨酸蛋白酶多肽的清洁组合物进行更详细描述。在其中将本发明的清洁组合物配制成适用于洗衣机洗涤方法的组合物的一些实施方案中,本发明的组合物优选地包含至少一种表面活性剂和至少一种助洗剂化合物,以及一种或多种清洁助剂材料,其优选地选自有机聚合物化合物、漂白剂、另外的酶、抑泡剂、分散剂、石灰皂分散剂、悬污剂和抗再沉积剂以及腐蚀抑制剂。在一些实施方案中,洗衣组合物还包含软化剂(即,作为另外的清洁助剂材料)。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。这样的添加剂产品旨在补充和/或提高常规洗涤剂组合物的性能,并且可在洗涤过程的任意阶段添加。在20℃下所测量的,在一些实施方案中,本文中的衣物洗涤剂组合物的密度在约400至约1200g/L的范围内,而在另一些实施方案中,其在约500至约950g/L组合物的范围内。

[0187] 在配制为用于人工盘碟洗涤方法的组合物的实施方案中,本发明的组合物优选地包含至少一种表面活性剂,并且优选地包含至少一种选自下列的另外的清洁助剂材料:有机聚合物化合物、泡沫增强剂、II族金属离子、溶剂、水溶助剂和另外的酶。

[0188] 在一些实施方案中,多种清洁组合物(例如美国专利6,605,458中提供的那些)可与本发明的丝氨酸蛋白酶多肽一起使用。因此,在一些实施方案中,包含本发明的至少一种丝氨酸蛋白酶多肽的组合物是紧凑型颗粒织物清洁组合物,而在另一些实施方案中,该组合物是可用于清洗着色织物的颗粒织物清洁组合物,在另一些实施方案中,该组合物是通过洗涤能力提供软化的颗粒织物清洁组合物,在另一些实施方案中,该组合物是重型液体织物清洁组合物。在一些实施方案中,包含本发明的至少一种丝氨酸蛋白酶多肽的组合物是织物清洁组合物,如美国专利6,610,642和6,376,450中所述的那些。此外,本发明的丝氨酸蛋白酶多肽可用于在欧洲或日本洗涤条件下具有特别实用性的颗粒衣物洗涤组合物(参见例如,美国专利6,610,642)。

[0189] 在一些另选的实施方案中,本发明提供了包含本文中提供的至少一种丝氨酸蛋白酶多肽的硬质表面清洁组合物。因此,在一些实施方案中,包含本发明的至少一种丝氨酸蛋白酶多肽的组合物是硬质表面清洁组合物,如美国专利6,610,642、6,376,450和6,376,450中所述的那些。

[0190] 在另一些实施方案中,本发明提供了包含本文中提供的至少一种丝氨酸蛋白酶多

肽的盘碟洗涤组合物。因此,在一些实施方案中,包含本发明的至少一种丝氨酸蛋白酶多肽的组合物是硬质表面清洁组合物,如美国专利6,610,642和6,376,450中所述的那些。在另一些实施方案中,本发明提供了包含本文中提供的至少一种丝氨酸蛋白酶多肽的盘碟洗涤组合物。在另一些实施方案中,包含本发明的至少一种丝氨酸蛋白酶多肽的组合物包含口腔护理组合物,例如美国专利6,376,450和6,376,450中所述的那些。前述美国专利6,376,450、6,605,458、6,605,458和6,610,642中包含的化合物和清洁助剂材料的配制和描述可用于本文提供丝氨酸蛋白酶多肽。

[0191] 本发明的清洁组合物可配制成任何合适的形式并且通过由配制者选择的任何方法来制备(参见例如,美国专利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,其全部通过引用并入本文。当期望低pH清洁组合物时,通过添加诸如单乙醇胺或酸性材料(例如HCl)的材料来调节此类组合物的pH。

[0192] 在一些实施方案中,根据本发明的清洁组合物包含酸化颗粒或氨基羧基助洗剂。氨基羧基助洗剂的示例包括氨基羧酸、其盐和衍生物。在一些实施方案中,氨基羧基助洗剂是氨基多羧基助洗剂,例如甘氨酸-N,N-二乙酸或通式 $\text{MOOC-CHR-N}(\text{CH}_2\text{COOM})_2$ 的衍生物,其中R是 C_{1-12} 烷基并且M是碱金属。在一些实施方案中,氨基羧基助洗剂可以是甲基甘氨酸二乙酸(MGDA)、GLDA(谷氨酸-N,N-二乙酸)、亚氨基二琥珀酸(IDS)、羧甲基菊粉及其盐和衍生物、天冬氨酸-N-单乙酸(ASMA)、天冬氨酸-N,N-二乙酸(ASDA)、天冬氨酸-N-单丙酸(ASMP)、亚氨基二琥珀酸(IDA)、N-(2-磺甲基)天冬氨酸(SMAS)、N-(2-磺乙基)天冬氨酸(SEAS)、N-(2-磺甲基)谷氨酸(SMGL)、N-(2-磺乙基)谷氨酸(SEGL)、IDS(亚氨基二乙酸)及其盐和衍生物(例如N-甲基亚氨基二乙酸(MIDA))、 α -丙氨酸-N,N-二乙酸(α -ALDA)、丝氨酸-N,N-二乙酸(SEDA)、异丝氨酸-N,N-二乙酸(ISDA)、苯基丙氨酸-N,N-二乙酸(PHDA)、邻氨基苯甲酸-N,N-二乙酸(ANDA)、对氨基苯磺酸-N,N-二乙酸(SLDA)、牛磺酸-N,N-二乙酸(TUDA)和磺甲基-N,N-二乙酸(SMDA)以及它们的碱金属盐和衍生物。在一些实施方案中,酸化颗粒具有约400 μ 至约1200 μ 的加权几何平均粒度和至少550g/L的体密度。在一些实施方案中,酸化颗粒包含至少约5%的助洗剂。

[0193] 在一些实施方案中,酸化颗粒可包含任意酸,包括有机酸和无机酸。有机酸可具有一个或多个羧基并且在一些情况下可具有多至15个碳,特别是多至10个碳,例如甲酸、乙酸、丙酸、癸酸、草酸、琥珀酸、脂肪酸、马来酸、富马酸、癸二酸、苹果酸、乳酸、乙醇酸、酒石酸和水合乙醛酸。在一些实施方案中,所述酸是柠檬酸。无机酸包括盐酸和硫酸。在一些情况下,本发明的酸化颗粒是包含高水平氨基羧基助洗剂的高活性颗粒。已发现,硫酸还有助于最终颗粒的稳定性。

[0194] 在一些实施方案中,根据本发明的清洁组合物包含至少一种表面活性剂和/或表面活性剂体系,其中所述表面活性剂选自非离子表面活性剂、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以及它们的混合物。按清洁组合物的重量计,在一些实施方案中,表面活性剂以约0.1%至约60%的水平存在,而在一些另选的实施方案中,该水平为约1%至约50%,而在另一些实施方案中,该水平为约5%至约40%。

[0195] 在一些实施方案中,本发明的清洁组合物包含一种或多种洗涤剂助洗剂或助洗剂体系。在掺入至少一种助洗剂的一些实施方案中,清洁组合物包含按该清洁组合物的重量

计至少约1%、约3%至约60%或者甚至约5%至约40%的助洗剂。助洗剂包括但不限于：聚磷酸的碱金属盐、铵盐和链烷醇铵盐；碱金属硅酸盐；碱土金属和碱金属碳酸盐；铝硅酸盐；聚羧酸盐化合物；醚羟基聚羧酸盐；马来酸酐与乙烯或乙烯基甲基醚的共聚物；1,3,5-三羟基苯-2,4,6-三磺酸；和羧甲基氧基琥珀酸；聚乙酸（如乙二胺四乙酸和氨三乙酸）的多种碱金属盐、铵盐和经取代的铵盐；以及聚羧酸盐，例如苯六甲酸、琥珀酸、柠檬酸、氧基二琥珀酸、聚马来酸、苯1,3,5-三羧酸、羧甲基氧基琥珀酸以及它们的可溶性盐。实际上，预期任何合适的助洗剂都可用于本发明多个实施方案。

[0196] 在一些实施方案中，助洗剂形成水溶性硬度离子络合物（例如，螯合助洗剂），如柠檬酸盐和聚磷酸盐（例如，三聚磷酸钠和六水合三聚磷酸钠、三聚磷酸钾以及混合的三聚磷酸钠与三聚磷酸钾等）。预期，任何合适的助洗剂都可用于本发明，包括本领域中已知的那些（参见例如，EP2 100 949）。

[0197] 在一些实施方案中，用于本文的助洗剂包括磷酸盐助洗剂和非磷酸盐助洗剂。在一些实施方案中，助洗剂是磷酸盐助洗剂。在一些实施方案中，助洗剂是非磷酸盐助洗剂。如果存在的话，以按组合物的重量计0.1%至80%、或者5%至60%、或者10%至50%的水平使用助洗剂。在一些实施方案中，产品包含磷酸盐助洗剂和非磷酸盐助洗剂的混合物。合适的磷酸盐助洗剂包括单磷酸盐、二磷酸盐、三磷酸盐或低聚多磷酸盐，包括这些化合物的碱金属盐，包括钠盐。在一些实施方案中，助洗剂可以是三聚磷酸钠（STPP）。另外地，组合物可包含碳酸盐和/或柠檬酸盐，优选柠檬酸盐，其有助于实现本发明的中性pH组合物。其它合适的非磷酸盐助洗剂包括多元羧酸的均聚物和共聚物以及它们部分或完全中和的盐，单体多元羧酸和羟基羧酸以及它们的盐。在一些实施方案中，上述化合物的盐包括铵盐和/或碱金属盐，即锂盐、钠盐和钾盐，包括钠盐。合适的多元羧酸包括无环羧酸、脂环族羧酸、杂环羧酸和芳族羧酸，其中在一些实施方案中，它们可包含至少两个羧基，在每种情况下，所述羧基均彼此隔开，在一些情况下，彼此相隔不超过两个碳原子。

[0198] 在一些实施方案中，本发明的清洁组合物包含至少一种螯合剂。合适的螯合剂包括但不限于铜、铁和/或锰螯合剂以及它们的混合物。在使用至少一种螯合剂的实施方案中，本发明的清洁组合物包含按主题清洁组合物的重量计约0.1%至约15%或者甚至约3.0%至约10%的螯合剂。

[0199] 在另一些实施方案中，本文中提供的清洁组合物含有至少一种沉积助剂。合适的沉积助剂包括但不限于聚乙二醇；聚丙二醇；聚羧酸盐；去污聚合物，例如聚对苯二甲酸；粘土，例如高岭土、蒙脱土、绿坡缕石（*atapulgit*e）、伊利石、膨润土、多水高岭土以及它们的混合物。

[0200] 如本文所指出的，在一些实施方案中，抗再沉积剂可用于本发明的一些实施方案。在一些实施方案中，可使用非离子表面活性剂。例如，在自动盘碟洗涤实施方案中，非离子表面活性剂可用于表面修饰目的，特别是用于掩盖（*sheeting*），以避免成膜和起斑以及用于改善光泽度。这些非离子表面活性剂还可用于防止污垢再沉积。在一些实施方案中，抗再沉积剂是本领域中已知的非离子表面活性剂（参见例如，EP2 100 949）。在一些实施方案中，非离子表面活性剂可以是乙氧基化的非离子表面活性剂、环氧封端的聚（烷氧基化）醇和氧化胺表面活性剂。

[0201] 在一些实施方案中，本发明的清洁组合物包含一种或多种染料转移抑制剂。合适

的聚合物染料转移抑制剂包括但不限于聚乙烯吡咯烷酮聚合物、聚胺N-氧化物聚合物、N-乙烯吡咯烷酮和N-乙烯咪唑的共聚物、聚乙烯噁唑烷酮和聚乙烯咪唑或者它们的混合物。在使用至少一种染料转移抑制剂的实施方案中,本发明的清洁组合物包含按该组合物的重量计约0.0001%至约10%、约0.01%至约5%或者甚至约0.1%至约3%。

[0202] 在一些实施方案中,本发明的组合物中包含硅酸盐。在一些这样的实施方案中,可使用硅酸钠(例如,二硅酸钠、偏硅酸钠和结晶页硅酸盐)。在一些实施方案中,硅酸盐以约1%至约20%的水平存在。在一些实施方案中,硅酸盐以按组合物的重量计约5%至约15%的水平存在。

[0203] 在另一些实施方案中,本发明的清洁组合物还包含分散剂。合适的水溶性有机材料包括但不限于均聚酸或共聚酸或它们的盐,其中多元羧酸包含至少两个羧基,其彼此相隔不超过两个碳原子。

[0204] 在另一些实施方案中,通过任何合适的技术来稳定清洁组合物中使用的酶。在一些实施方案中,本文中所采用的酶通过在成品组合物中存在可给该酶提供钙和/或镁离子的钙和/或镁离子的水溶性源来稳定。在一些实施方案中,酶稳定剂包括寡糖、多糖和无机二价金属盐,包括碱土金属,硫如钙盐,例如甲酸钙。预期,用于酶稳定的多种技术均可用于本发明。例如,在一些实施方案中,本文中所采用的酶通过在成品组合物中存在可给该酶提供锌(II)、钙(II)和/或镁(II)离子的此类离子的水溶性源来稳定,其它金属离子(例如钡(II)、铈(II)、铁(II)、锰(II)、铝(III)、锡(II)、钴(II)、铜(II)、镍(II)和氧钒(IV))同样如此。氯化物和硫酸盐也可用于本发明一些实施方案。合适的寡糖和多糖(例如,糊精)的示例在本领域中是已知的(参见例如,WO 07/145964)。在一些实施方案中,如果期望的话,还可使用可逆性蛋白酶抑制剂,例如含硼化合物(例如,硼酸盐、4-甲酰基-苯基硼酸)和/或使用三肽醛以进一步提高稳定性。

[0205] 在一些实施方案中,本发明的组合物中存在漂白剂、漂白活性剂和/或漂白催化剂。在一些实施方案中,本发明的清洁组合物包含无机和/或有机漂白化合物。无机漂白剂包括但不限于过氧化氢合物盐(例如过硼酸盐、过碳酸盐、过磷酸盐、过硫酸盐和过硅酸盐)。在一些实施方案中,无机过氧化氢合物盐是碱金属盐。在一些实施方案中,无机过氧化氢合物盐作为结晶固体包含在内而无需额外保护,但是在另一些实施方案中,该盐是经包被的。本领域中已知的任何合适的盐均可用于本发明(参见例如,EP 2 100 949)。

[0206] 在一些实施方案中,用于在本发明的组合物中使用漂白活化剂。漂白活化剂通常为在60°C和更低温度下的清洁过程中增强漂白作用的有机过酸前体。适用于本文的漂白活化剂包括这样的化合物,其在过水解条件下产生优选具有约1至约10个碳原子、特别是约2至约4个碳原子的脂族过氧羧酸,和/或任选经取代的过苯甲酸。另外的漂白活化剂在本领域中是已知的并且可用于本发明(参见例如,EP 2 100 949)。

[0207] 此外,在一些实施方案中并且如本文中进一步描述的,本发明的清洁组合物还包含至少一种漂白催化剂。在一些实施方案中,可使用三氮杂环壬烷锰及相关络合物,以及钴、铜、锰和铁络合物。另外的漂白催化剂也可用于本发明(参见例如,US4,246,612、5,227,084、4,810410、W099/06521和EP2 100 949)。

[0208] 在一些实施方案中,本发明的清洁组合物包含一种或多种催化性金属络合物。在一些实施方案中,可使用含金属的漂白催化剂。在一些实施方案中,金属漂白催化剂包含含

有以下物质的催化剂体系:具有确定的漂白催化活性的过渡金属阳离子(例如,铜、铁、钛、钪、钨、钼或锰阳离子)、具有微小漂白催化活性或无漂白催化活性的辅助性金属阳离子(例如,锌或铝阳离子),以及对催化性和辅助性金属阳离子具有确定的稳定性常数的螯合剂(sequesterant),特别地可使用乙二胺四乙酸、乙二胺四(亚甲基膦酸)以及它们的水溶性盐(参见例如,美国专利4,430,243)。在一些实施方案中,借助于锰化合物来催化本发明的清洁组合物。这样的化合物及其使用水平在本领域中是公知的(参见例如,美国专利5,576,282)。在另一些实施方案中,钴漂白催化剂可用于本发明的清洁组合物。多种钴漂白催化剂在本领域中是已知的(参见例如,美国专利5,597,936和5,595,967)并且可通过已知的操作来容易地制备。

[0209] 在另一些实施方案中,本发明的清洁组合物包含大多环刚性配体(MRL)的过渡金属络合物。实际上而非限制,在一些实施方案中,对本发明提供的组合物和清洁方法进行调整以在水性洗涤介质中提供约至少亿分之一的活性MRL物质,而在另一些实施方案中,在洗涤液中提供约0.005ppm至约25ppm、更优选约0.05ppm至约10ppm并且最优选约0.1ppm至约5ppm的MRL。

[0210] 在一些实施方案中,在本发明的过渡金属漂白催化剂中的过渡金属包括但不限于锰、铁和铬。MRL还包括但不限于交叉桥接的特殊超刚性配体(例如,5,12-二乙基-1,5,8,12-四氮杂双环[6.6.2]十六烷)。合适的过渡金属MRL通过已知的操作来容易地制备(参见例如,WO2000/32601和美国专利6,225,464)。

[0211] 在一些实施方案中,本发明的清洁组合物包含金属护理剂。金属护理剂可用于防止和/或降低金属(包括铝、不锈钢和非铁金属(例如银和铜)的锈蚀、腐蚀和/或氧化。合适的金属护理剂包括EP 2 100 949、WO 9426860和WO 94/26859中所述的那些。在一些实施方案中,金属护理剂是锌盐。在另一些实施方案中,本发明的清洁组合物包含按重量计约0.1%至约5%的一种或多种金属护理剂。

[0212] 在一些实施方案中,清洁组合物是具有变体丝氨酸蛋白酶多肽蛋白酶的高密度液体(HDL)组合物。HDL液体衣物洗涤剂可包含去污表面活性剂(10%-40%wt/wt),其包括阴离子去污表面活性剂(选自直链或支链或无规链的、经取代或未经取代的烷基硫酸盐、烷基磺酸盐、烷基烷氧基化硫酸盐、烷基磷酸盐、烷基膦酸盐、烷基羧酸盐和/或它们的混合物;并且任选地包含非离子表面活性剂(选自直链或支链或无规链的、经取代或未经取代的烷基烷氧基化醇,例如C₈-C₁₈烷基乙氧基化醇和/或C₆-C₁₂烷基酚烷氧基化物),任选地其中阴离子去污表面活性剂(具有6.0至9的亲水指数(HIc))与非离子去污表面活性剂的重量比大于1:1。合适的去污表面活性剂还包括阳离子去污表面活性剂(选自烷基吡啶鎓化合物、烷基季铵化合物、烷基季磷鎓化合物、烷基叔铊鎓化合物和/或它们的混合物);两性离子去污表面活性剂和/或两性去污表面活性剂(选自链烷醇胺磺基-甜菜碱);两性表面活性剂;半极性非离子表面活性剂以及它们的混合物。

[0213] 该组合物可任选地包含由以下组成的表面活性增强聚合物:两亲性烷氧基化油脂清洁聚合物(选自具有支化亲水性和疏水性的烷氧基化聚合物,例如烷氧基化聚亚烷基胺,在0.05wt%-10wt%的范围内)和/或无规介质聚合物(通常由含有选自下列的单体的亲水性骨架组成:不饱和C₁-C₆羧酸、醚、醇、醛、酮、酯、糖单元、烷氧基单元、马来酸酐、饱和多元醇(例如甘油)以及他们的混合物;和选自下列的疏水性侧链:C₄-C₂₅烷基、聚丙烯、聚丁

烯、饱和 C_1-C_6 单羧酸的乙烷基酯、丙烯酸或甲基丙烯酸的 C_1-C_6 烷基酯,以及他们的混合物。

[0214] 该组合物可包含另外的聚合物,例如去污聚合物(包括经阳离子封端的聚酯(例如SRP1),无规或嵌段构型的含有选自糖类、二羧酸、多元醇以及它们的组合的至少一种单体单元的聚合物,无规或嵌段构型的对苯二甲酸乙二醇酯基聚合物及其共聚物,例如Repel-o-tex SF、SF-2和SRP6, Texcare SRA100、SRA300、SRN100、SRN170、SRN240、SRN300和SRN325、Marloquest SL)、抗再沉积聚合物(0.1wt%至10wt%,包括羧酸酯聚合物,例如包含选自丙烯酸、马来酸(或马来酸酐)、富马酸、衣康酸、乌头酸、甲基富马酸、柠康酸、亚甲基丙二酸以及它们的任意混合物的至少一种单体的聚合物,乙烷基吡咯烷酮均聚物和/或聚乙二醇,分子量在500至100,000Da的范围内);纤维素聚合物(可包括选自烷基纤维素、烷基烷氧基烷基纤维素、羧基烷基纤维素、烷基羧基烷基纤维素,其示例包括羧甲基纤维素、甲基纤维素、甲基羟乙基纤维素、甲基羧甲基纤维素以及它们的混合物)和聚合物羧酸酯(例如,马来酸酯/丙烯酸酯无规共聚物或聚丙烯酸酯均聚物)。

[0215] 该组合物还可包含饱和或不饱和的脂肪酸,优选饱和或不饱和的 $C_{12}-C_{24}$ 脂肪酸(0wt%至10wt%);沉积助剂(其示例包括多糖(优选地纤维素聚合物)、聚二烯丙基二甲基卤化铵(DADMAC)和DADMAC与乙烷基吡咯烷酮的共聚物、丙烯酰胺、咪唑啉鎓卤化物以及它们的混合物(其为无规或嵌段构型的)、阳离子瓜尔胶、阳离子纤维素(例如阳离子羟乙基纤维素)、阳离子淀粉、阳离子聚丙烯酰胺以及它们的混合物)。

[0216] 该组合物还可包含以下物质:染料转移抑制剂,其示例包括酞菁锰、过氧化物酶、聚乙烯吡咯烷酮聚合物、聚胺N-氧化物聚合物、N-乙烷基吡咯烷酮和N-乙烷基咪唑的共聚物、聚乙烯咪唑烷酮和聚乙烯咪唑和/或它们的混合物;螯合剂,其示例包括乙二胺四乙酸(EDTA)、二亚乙基三胺五亚甲基膦酸(DTPMP)、羟基-乙烷二膦酸(HEDP)、乙二胺N,N'-二琥珀酸(EDDS)、甲基甘氨酸二乙酸(MGDA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)、丙二胺四乙酸(PDTA)、2-羟基吡啶-N-氧化物(HPNO)、或甲基甘氨酸二乙酸(MGDA)、谷氨酸N,N'-二乙酸(N,N'-二羧基甲基谷氨酸四钠盐(GLDA)、次氨基三乙酸(NTA)、4,5-二羟基-间-苯二磺酸、柠檬酸及其任意盐、N-羟乙基乙二胺三乙酸(HEDTA)、三亚乙基四胺六乙酸(TTHA)、N-羟乙基亚氨基二乙酸(HEIDA)、二羟基乙基甘氨酸(DHEG)、乙二胺四丙酸(EDTP)以及它们的衍生物。

[0217] 该组合物可任选地包含选自下列的酶(一般为约0.01wt%活性酶至0.5wt%活性酶):蛋白酶、淀粉酶、脂酶、纤维素酶、胆碱氧化酶、过氧化物酶/氧化酶、果胶酸裂解酶、甘露聚糖酶、角质酶、漆酶、磷脂酶、溶血磷脂酶、酰基转移酶、过水解酶、芳基酯酶以及它们的任意混合物。该组合物可包含酶稳定剂(其示例包括多元醇(例如丙二醇或甘油)、糖或糖醇、乳酸、可逆性蛋白酶抑制剂、硼酸或硼酸衍生物,例如芳族硼酸酯或苯基硼酸衍生物,例如4-甲酰基苯基硼酸)。

[0218] 该组合物还可包含硅酮或脂肪酸基抑泡剂、调色染料、钙和镁阳离子、可视信号成分、消泡剂(0.001wt%至约4.0wt%)和/或结构剂/增稠剂(0.01wt%至5wt%,选自甘油二酯和甘油三酯、乙二醇二硬脂酸酯、微晶纤维素、纤维素基材料、微纤维纤维素、生物聚合物、黄原胶、吉兰胶以及它们的混合物)。

[0219] 该组合物可为任何液体形式如液体或凝胶形式,或者它们的任意组合。

[0220] 在一些实施方案中,以单位剂型提供本发明的清洁组合物,包括片剂、胶囊剂、扁囊剂(sachet)、袋剂(pouch)和多隔室袋剂。在一些实施方案中,将单位剂型设计成提供成

分在多隔室袋剂(或其它单位剂量形式)内控制释放。合适的单位剂型和控制释放形式在本领域中是已知的(有关适用于单位剂型和控制释放形式的材料,参见例如EP 2 100 949,WO 02/102955,美国专利4,765,916和4,972,017,以及W004/111178)。在一些实施方案中,通过经水溶性膜或水溶性小袋包装的片剂来提供单位剂型。多种单位剂型提供于EP 2 100 947和WO2013/165725中(其在此通过引用并入)并且在本领域中是已知的。

[0221] 在一些实施方案中,清洁组合物是具有变体丝氨酸蛋白酶多肽蛋白酶的高密度粉末(HDD)组合物。HDD粉末衣物洗涤剂可包含去污表面活性剂,包括阴离子去污表面活性剂(例如直链或支链或无规链的、经取代或未经取代的烷基硫酸盐、烷基磺酸盐、烷基烷氧基硫酸盐、烷基磷酸盐、烷基膦酸盐、烷基羧酸盐和/或它们的混合物)、非离子去污表面活性剂(例如直链或支链或无规链的、经取代或未经取代的C₈-C₁₈烷基乙氧基化物和/或C₆-C₁₂烷基酚烷氧基化物)、阳离子去污表面活性剂(例如,烷基吡啶鎓化合物、烷基季铵化合物、烷基季膦鎓化合物、烷基叔铈鎓化合物以及它们的混合物)、两性离子去污表面活性剂和/或两性去污表面活性剂(例如,链烷醇胺磺基-甜菜碱);两性表面活性剂;半极性非离子表面活性剂以及它们的混合物;助洗剂(无磷酸盐助洗剂(例如,沸石助洗剂,其示例包括在0wt%至小于10wt%范围内的沸石A、沸石X、沸石P和沸石MAP];磷酸盐助洗剂[其示例包括在0wt%至小于10wt%范围内的三聚磷酸钠];在小于15%范围内的柠檬酸、柠檬酸盐和次氨基三乙酸或它们的盐);硅酸盐(例如,在0wt%至小于10wt%范围内的硅酸钠或硅酸钾或偏硅酸钠,或者层状硅酸盐(SKS-6));碳酸盐(例如,在0wt%至小于10wt%范围内的碳酸钠和/或碳酸氢钠);以及漂白剂(包括光漂白剂(例如,磺化酞菁锌、磺化酞菁铝、咕吨类染料以及它们的混合物);疏水性或亲水性漂白活化剂(例如,十二烷酰羟苯磺酸盐癸酰羟苯磺酸盐、癸酰羟苯甲酸或其盐、3,5,5-三甲基己酰基羟基苯磺酸盐、四乙酰基乙二胺(TAED)和壬酰羟苯磺酸盐(NOBS)、季膦以及它们的混合物);过氧化氢源(例如,无机过氧化氢化合物盐,其示例包括过硼酸盐、过碳酸盐、过硫酸盐、过磷酸盐或过硅酸盐的单或四水合物钠盐);预先制备的亲水性和/或疏水性过酸(例如,过羧酸及盐、过碳酸及盐、过亚氨酸及盐、过氧单硫酸及其盐),以及它们的混合物和/或漂白催化剂(例如,亚胺漂白增效剂(例如,亚胺鎓阳离子和聚离子);亚胺鎓两性离子;经修饰的胺;经修饰的氧化胺;N-磺酰基亚胺;N-膦酰基亚胺;N-酰基亚胺;噻二唑二氧化物;全氟亚胺;环状糖酮以及它们的混合物;以及含金属漂白催化剂(例如,铜、铁、钛、钇、钨、钼或锰阳离子,连同辅助性金属离子例如锌或,和螯合剂,例如乙二胺四乙酸、乙二胺四(亚甲基膦酸)以及它们的可溶性盐)。

[0222] 该组合物还可包含诸如以下的酶:蛋白酶、淀粉酶、脂酶、纤维素酶、胆碱氧化酶、过氧化物酶/氧化酶、果胶酸裂解酶、甘露聚糖酶、角质酶、漆酶、磷脂酶、溶血磷脂酶、酰基转移酶、过水解酶、芳基酯酶以及它们的任意混合物。

[0223] 该组合物还可包含另外的洗涤剂成分,包括香料微胶囊、经淀粉包封的香料谐香剂、调色剂、另外的聚合物(包括织物完整剂和阳离子聚合物)、锁色成分(dye lock ingredient)、织物软化剂、增白剂(例C.I. 荧光增白剂)、絮凝剂、螯合剂、烷氧基化多胺、织物沉积助剂和/或环糊精。

[0224] 在一些实施方案中,清洁组合物是具有本发明的丝氨酸蛋白酶的自动餐具洗涤(ADW)洗涤剂组合物。ADW洗涤剂组合物可包含以按重量计0%至10%的量存在的选自下列的两种或更多种非离子表面活性剂:乙氧基化非离子表面活性剂、醇烷氧基化表面活性剂、

环氧封端的聚(烷氧基化的)醇或氧化胺表面活性剂;在5-60%范围内的助洗剂,包含磷酸盐(单磷酸盐、二磷酸盐、三磷酸盐或低聚多磷酸盐,优选三聚磷酸钠-STPP)或不含磷酸盐的助洗剂(氨基酸基化合物,其示例包括MGDA(甲基-甘氨酸-二乙酸)及其盐和衍生物、GLDA(谷氨酸-N,N二乙酸)及其盐和衍生物、IDS(亚氨基二琥珀酸)及其盐和衍生物、羧甲基菊粉及其盐和衍生物以及它们的混合物、次氨基三乙酸(NTA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)、B-丙氨酸二乙酸(B-ADA)以及它们的盐]、多元羧酸的均聚物和共聚物以及它们部分或完全中和的盐、单体多元羧酸和羟基羧酸以及它们的盐,在按重量计0.5%至50%的范围内;在按重量计约0.1%至约50%范围内的磺化/羧基化聚合物(赋予产品尺寸稳定性);在按重量计约0.1%至约10%范围内的干燥助剂(选自聚酯,尤其是任选地与具有3至6个有助于多聚的官能团的其它单体在一起的阴离子聚酯,特别是酸、醇或酯官能团,反应性环状碳酸酯和脲类型的聚碳酸酯-、聚脲-和/或聚脲-聚有机硅氧烷化合物或它们的前体化合物);在按重量计约1%至约20%范围内的硅酸盐(硅酸钠或硅酸钾,例如二硅酸钠、偏硅酸钠和结晶页硅酸盐);漂白无机物(例如过氧化氢合物盐,例如过硼酸盐、过碳酸盐、过磷酸盐、过硫酸盐和过硅酸盐)和有机物(例如,有机过氧酸,包括二酰基和四酰基过氧化物,特别是二过氧十二烷二酸、二过氧十四烷二酸和二过氧十六烷二酸);在按重量计约0.1%至约10%范围内的漂白活化剂-有机过酸前体;漂白催化剂(选自三氮杂环壬烷合锰及相关络合物,联吡啶胺合Co、Cu、Mn和Fe及相关络合物,以及五胺乙酸酯合钴(III)及相关络合物);在按重量计约0.1%至5%范围内的金属护理剂(选自苯并三唑(benzotriazole)、金属盐及络合物,和/或硅酸盐);在约0.01至5.0mg活性酶/kg自动盘碟洗涤用洗涤剂组合物范围内的酶(酰基转移酶、 α -淀粉酶、 β -淀粉酶、 α -半乳糖苷酶、阿拉伯糖苷酶、芳基酯酶、 β -半乳糖苷酶、卡拉胶酶、过氧化氢酶、纤维二糖水解酶、纤维素酶、软骨素酶、角质酶、内切- β -1,4-葡聚糖酶、内切- β -甘露聚糖酶、酯酶、外切-甘露聚糖酶、半乳聚糖酶、葡糖淀粉酶、半纤维素酶、透明质酸酶、角蛋白酶、漆酶、乳糖酶、木质素酶、脂酶、脂氧合酶、甘露聚糖酶、氧化酶、果胶酸裂解酶、果胶乙酰酯酶、果胶酶、戊聚糖酶、过氧化物酶、酚氧化酶、磷酸酶、磷脂酶、植酸酶、聚半乳糖醛酸酶、蛋白酶、普鲁兰酶、还原酶、鼠李半乳糖醛酸酶、 β -葡聚糖酶、鞣酸酶、转谷氨酰胺酶、木聚糖乙酰酯酶、木聚糖酶、木葡聚糖酶和木糖苷酶,以及它们的任意混合物);以及酶稳定剂组分(选自寡糖、多糖和无机二价金属盐)。

[0225] 在一些实施方案中,清洁组合物不含硼酸盐。在一些实施方案中,清洁组合物不含磷酸盐。在一些实施方案中,清洁组合物在该组合物中可具有少于10ppm或少于5ppm或少于1ppm的硼酸盐和/或磷酸盐。

[0226] 有利地包含本发明的丝氨酸蛋白酶多肽的代表性洗涤剂制剂包括见于W02013063460,第78-152页中的洗涤剂制剂,并且特别地第94至152页的表格在此通过引用并入。通常将丝氨酸蛋白酶以按组合物的重量计0.00001%至10%酶蛋白的水平掺入到洗涤剂组合物中。在一些实施方案中,洗涤剂组合物包含按该组合物的重量计超过0.0001%、0.001%、0.01%或0.1%的丝氨酸蛋白酶。在一些实施方案中,洗涤剂组合物包含按该组合物的重量计少于1%、0.1%、0.01%或0.001%的丝氨酸蛋白酶。

[0227] B. 纺织物处理

[0228] 还提供了使用本发明的丝氨酸蛋白酶多肽来处理织物(例如,以使纺织物退浆)的组合物和方法。织物处理方法在本领域中是公知的(参见,例如美国专利6,077,316)。例如,

可通过包括使织物与在溶液中的丝氨酸蛋白酶接触的方法来改善织物的触感和外观。可用该溶液在压力下处理织物。

[0229] 本发明的丝氨酸蛋白酶可在编织纺织物期间或之后施用,或者在退浆阶段期间施用,或者是一个或多个另外的织物处理步骤。在编织纺织物期间,使线暴露于相当大的机械应变。在于机械织机上进行编织之前,经常用施胶淀粉或淀粉衍生物包被经纱以增大其拉伸强度并防止断裂。本发明的丝氨酸蛋白酶可在编织期间或之后施用以除去这些施胶淀粉或淀粉衍生物。在编织之后,可使用丝氨酸蛋白酶来除去浆料涂层(size coating),之后进一步处理织物以确保均相且耐洗的结果。

[0230] 本发明的丝氨酸蛋白酶可单独使用或者可作为洗涤剂添加剂与其它使织物(包括含棉织物)退浆的退浆化学试剂和/或退浆酶一起在例如含水组合物中使用。在用于对斜纹粗棉布织物和服装产生石磨洗外观的组合物和方法中还可使用淀粉酶。对于衣服的制作,可将织物剪切并缝制成衣服或服装,之后对其进行修整(finish)。特别地,对于粗斜纹棉布裤的制作,已开发了不同的酶促修整方法。斜纹粗棉布服装的修整通常以酶促退浆步骤起始,在此期间使服装经受蛋白水解酶的作用以赋予织物柔软性并且使棉织物更容易进行随后的酶促修整步骤。丝氨酸蛋白酶可用于修整斜纹粗棉布服装(例如,“生物石磨洗工艺”)、酶促退浆以及赋予织物柔软性和/或修整工艺的方法。

[0231] C. 皮革和毛处理

[0232] 本文中所述的丝氨酸蛋白酶多肽还可用于蛋白质从动物的酶辅助性去除及其后续降解或处理,例如毛、皮肤、毛发、皮革等。在一些情况下,与传统地浸入烫水中或脱毛处理相比,将动物屠体浸入包含本发明丝氨酸蛋白酶多肽的溶液中可用于保护皮肤免受损害。在一个实施方案中,可在适于消化或起始降解羽毛的条件下用本发明的分离丝氨酸蛋白酶多肽喷洒毛。在一些实施方案中,可如上所述将本发明的丝氨酸蛋白酶与氧化剂组合使用。

[0233] 在一些实施方案中,通过使用本发明的丝氨酸蛋白酶来帮助去除与原毛相关的油或脂肪。在一些实施方案中,丝氨酸蛋白酶多肽用于清洁毛以及消毒和部分脱水纤维的组合物。在另一些实施方案中,所公开的丝氨酸蛋白酶多肽可用于从羽毛回收蛋白质。在另一些实施方案中,将丝氨酸蛋白酶多肽与95%乙醇或其它极性有机溶剂在约0.5%(v/v)表面活性剂存在或不存在下组合用于洗涤溶液。

[0234] D. 动物饲料应用

[0235] 在本发明的另一个实施方案中,本发明的丝氨酸蛋白酶多肽可用作含有丝氨酸蛋白酶及其变体的动物饲料组合物、动物饲料添加剂和/或宠物食品的组分。本发明还涉及用于制备这样的动物饲料组合物、动物饲料添加剂组合物和/或宠物食品的方法,包括将丝氨酸蛋白酶多肽与一种或多种动物饲料成分和/或动物饲料添加剂成分和/或宠物食品成分混合。此外,本发明涉及丝氨酸蛋白酶多肽在制备动物饲料组合物和/或动物饲料添加剂组合物和/或宠物食品中的用途。

[0236] 术语“动物”包括所有的非反刍动物和反刍动物。在一个具体实施方案中,所述动物是非反刍动物,例如马和单胃动物。单胃动物的示例包括但不限于野猪或猪,包括但不限于小猪、生长猪、母猪;家禽,例如火鸡、鸭、鸡、肉鸡、蛋鸡(layer);鱼,例如鲑鱼、鳟鱼、罗非鱼、鲶鱼和鲤鱼;以及甲壳动物,例如虾和对虾。在另一个实施方案中,所述动物是反刍动

物,包括但不限于牛、幼牛、山羊、绵羊、长颈鹿、野牛、驼鹿、麋鹿、牦牛、水牛、鹿、骆驼、羊驼、美洲驼、羚羊、叉角羚和蓝牛。

[0237] 在本发明的情形下,预期术语“宠物食品”应理解为意指用于家养动物的食品,所述家养动物包括但不限于狗、猫、沙鼠、仓鼠、南美栗鼠、观赏型大鼠、豚鼠;禽类宠物,例如金丝雀、长尾鹦鹉和鹦鹉;爬行动物类宠物,例如龟、蜥蜴和蛇;以及水生类宠物,例如,热带鱼和青蛙。

[0238] 术语“动物饲料组合物”、“饲料”和“草料”可互换使用,并且可包含选自下列的一种或多种饲料材料:a) 谷类,例如小粒谷物(例如小麦、大麦、黑麦、燕麦以及它们的组合)和/或大粒谷物例如玉蜀黍或高粱;b) 来自谷类的副产物,例如玉米谷蛋白粉、可溶性谷物干酒糟(DDGS)(特别是基于玉米的可溶性谷物干酒糟(cDDG))、麦麸、小麦粗粉、小麦次粉、米糠、稻壳、燕麦壳、棕榈仁和柑橘渣;c) 由以下来源获得的蛋白质:例如大豆、向日葵、花生、羽扇豆、豌豆、蚕豆、棉花、卡诺拉、鱼粉、干血浆蛋白质、肉和骨粉、马铃薯蛋白、乳清、干椰肉、芝麻;d) 从植物和动物来源获得的油和脂肪;e) 矿物质和维生素。

[0239] E. 纸浆漂白

[0240] 本文中所述的蛋白酶多肽还可用于纸浆的酶辅助性漂白,所述纸浆例如化学纸浆、半化学纸浆、牛皮纸浆、机械纸浆或通过亚硫酸盐方法制备的纸浆。一般来说,将纸浆与本发明的蛋白酶多肽在适于漂白纸浆的条件下一起孵育。

[0241] 在一些实施方案中,纸浆是经氧、臭氧、过氧化物或过氧酸漂白的无氯纸浆。在一些实施方案中,丝氨酸蛋白酶用于通过经改进或连续制浆方法产生的显示出低木质素含量的纸浆的酶辅助性漂白。在另一些实施方案中,丝氨酸蛋白酶单独应用或者优选地与木聚糖酶和/或内切葡聚糖酶和/或 α -半乳糖苷酶和/或纤维二糖水解酶组合应用。

[0242] F. 蛋白质降解

[0243] 本文中所述的丝氨酸蛋白酶多肽还可用于蛋白质从动物的酶辅助性去除及其后续降解或处理,例如毛、皮肤、毛发、皮革等。在一些情况下,与传统地浸入烫水中或脱毛处理相比,将动物屠体浸入包含本发明蛋白酶多肽的溶液中可用于保护皮肤免受损害。在一个实施方案中,可在适于消化或起始降解羽毛的条件下用本发明的分离蛋白酶多肽喷洒毛。在一些实施方案中,可如上所述将本发明的蛋白酶与氧化剂组合使用。

[0244] 在一些实施方案中,通过使用本发明的蛋白酶多肽来帮助去除与原毛相关的油或脂肪。在一些实施方案中,蛋白酶多肽用于清洁毛以及消毒和部分脱水纤维的组合物。在另一些实施方案中,将蛋白酶多肽与95%乙醇或其它极性有机溶剂在约0.5% (v/v) 表面活性剂存在或不存在下组合用于洗涤溶液。在另一些实施方案中,所公开的蛋白酶多肽可用于从羽毛回收蛋白质。所公开的蛋白酶多肽可单独使用或者与合适的毛处理和蛋白水解方法组合使用,所述方法例如PCT/EP2013/065362、PCT/EP2013/065363和PCT/EP2013/065364中公开的那些,其在此通过引用并入。在一些实施方案中,随后可将回收的蛋白酶用于动物或鱼饲料中。

[0245] G. 组织清创

[0246] 本文中所述的蛋白酶多肽还可用于组织的酶辅助性清创。这涉及除去死或受损组织,例如需要帮助愈合的伤口除去死或受损组织。

[0247] H. 组织培养

[0248] 本文中所述的蛋白酶多肽还可用于组织培养。特别地,本发明的蛋白酶可用于使贴壁于细胞培养物壁的细胞悬浮或重悬,例如在收获细胞的过程期间。本发明的蛋白酶可用于切开培养细胞和培养皿之间的蛋白键,从而使细胞悬浮于溶液中。

[0249] I. 食品应用

[0250] 本文中所述的蛋白酶多肽还可用作食品添加剂、消化助剂或食品加工助剂。

[0251] 实施例

[0252] 提供了以下实施例以证明并举例说明本公开内容的某些优选实施方案和方面,但不应解释为进行限制。

[0253] 在下文的实验公开内容中,应用了以下缩写:ADW(自动餐具洗涤);BMI(血液/乳/墨水);BSA(牛血清白蛋白);CAPS(N-环己基-3-氨基丙磺酸);CHES(N-环己基-2-氨基乙磺酸);DMC(二甲基酪蛋白);HDD(重型干/粉末);HDL(重型液体);HEPES(4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸);MTP(微量滴定板);ND(未进行);OD(光密度);PCR(聚合酶链反应);ppm(百万分之一);QS(足量);rpm(转数/分钟);AAPF(琥珀酰基-Ala-Ala-Pro-Phe-对硝基苯胺);TNBSA(2,4,6-三硝基苯磺酸);v/v(体积/体积);w/v(重量/体积)。

[0254] 实施例1

[0255] 吉氏芽孢杆菌丝氨酸蛋白酶Bgi02446的克隆

[0256] 选择吉氏芽孢杆菌DSM 8722菌株(从Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH获得)作为可用于多种工业应用的酶的潜在来源。通过合成技术使用ILLUMINA®测序来对吉氏芽孢杆菌DSM 8722菌株的整个基因组进行测序。通过BaseClear(Leiden,The Netherlands)来进行基因组测序和序列数据的装配。通过BioXpr(Namur,Belgium)来标注重叠群。以此方式在吉氏芽孢杆菌DSM 8722中鉴定到的一个基因编码显示与其它细菌的丝氨酸蛋白酶具有同源性的丝氨酸蛋白酶。

[0257] Bgi02446n的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示:

[0258] ATGAAAAGAAAAGTAGGAAAGCTTATGGTGGGGCTTGTATGTGTAACAGCTCTAGTAACCGTGACAGATTCTGCATCTGCGGCAGAAAGAAAAGTAAAATACTTAATAGGTTTCGAAGAAGAAGCAGAAGCTTGAAGCCTTCACTGAGGAAATTGACCAAGTTGGTGTATTTTCTGTTGAAGAACAAAGTGTAGCTGAGGATACGTTAGATATTGATGTAGACATTATTGATGAATATGATTATATTGATGTGTTAGCTGTAGAATTAGATCCTGAGGATGTAGATGCGTTAAGTGAAGAAGCAGGTATCTCATTTATTGAAGAAGACATTGAACTGTCTATTCAACAAACAGTTCCTTGGGGCATTACTCGTGTACAAGCTCCGGCTGTTTCATAACCGTGGGATTACAGGTTCTGGAGTAAGAGTAGCTATCCTTGATTCAGGGATTT CAGCCCATAGTGATTTGAATATCCGCGGTGGAGCTAGCTTTGTACCGGGTGAACCAACGACAGCTGATTTAAATGG ACATGGTACTCACGTGGCCGGAACAGTAGCAGCTCTAAATAATTCAATTGGTGTCAATTGGTGTTCACCGAATGCT GAATTATATGCTGTTAAAGTACTTGGAGCAAATGGAAGCGGAAGTGAAGTGGGATTGCTCAAGGTTTAGAGTGGG CGGCAACCAATAACATGCATATTGCGAACATGAGTCTCGGTAGTGATTTTCCTAGCTCTACACTTGAGCGTGCAGT CAACTATGCAACAAGCCGTGATGTACTAGTTATTGCAGCGACTGGTAATAACGGTCTGGTTACAGTAGGCTATCCT GCTCGTTATGCAAACGCAATGGCTGTAGGAGCGACTGACCAAAACAACAGACGCGCAAACCTTTCTCAGTATGGTA CGGGAATTGACATCGTAGCACCTGGTGTAAACGTACAAAGTACGTATCCAGGTAACCGTTACGTGAGTATGAATGG TACATCTATGGCTACTCCACACGTAGCTGGTGCCGACGCGCTTGTAAGCAACGCTATCCGTCTTGAATGCGACT CAAATTCGCAATCATCTGAAAAATACAGCAACAAATCTAGGAAACTCTTCAAAATTTGGTAGTGGCCTAGTTAACG

CAGAAGCAGCAACACGT。

[0259] 由Bgi02446n编码的前酶原的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示:

MKRKVGLMVGLVCVTALVTVTDSASAAEEKVKYLIGFEEAELEAFTEEI

[0260] ***DQVGVFSVEEQSVAEDTLDIDVDIIDEYDYIDVLAVELDPEDVDALSEEAGISFI***

EEDIELSIQQTVPWGITRVQAPAVHNRGITGSGVRVAILDSGISAHSDLNIRGGASFVPGEPTTADLNGHGTHVAGTVAALNNSIGVIGVAPNAELYAVKVLGANGSGSVSGIAQGLEWAATNNMHIANMSLGSDFPSSTLERAVNYATSRDVLVIAATGNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYGTGIDIVAPGVNVQSTYPGNRYVSMNGTSMATPHVAGAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATNLGNSSQFGSGLVNAEAATR。

[0261] 由Bgi02446n编码的酶原的氨基酸序列如EQ ID NO:3所示:

[0262] ***AEEKVKYLIGFEEAELEAFTEEIDQVGVFSVEEQSVAEDTLDIDVDIIDEYDYI***

DVLAVELDPEDVDALSEEAGISFIEEDIELSIQQTVPWGITRVQAPAVHNRGITGSGVRVAILDSGISAHSDLNIRGGASFVPGEPTTADLNGHGTHVAGTVAALNNSIGVIGVAPNAELYAVKVLGANGSGSVSGIAQGLEWAATNNMHIANMSLGSDFPSSTLERAVNYATSRDVLVIAATGNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYGTGIDIVAPGVNVQSTYPGNRYVSMNGTSMATPHVAGAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATNLGNSSQFGSGLVNAEAATR。

[0263] 如使用SignalP-NN (Emanuelsson等人, Nature Protocols, 2:953-971, 2007) 所确定的, 在N末端, 该酶原具有预测长度为27个氨基酸的信号肽 (在SEQ ID NO:2中以粗斜体表示)。信号序列的存在指示该丝氨酸蛋白酶是一种分泌酶。不同于其它的丝氨酸蛋白酶, 该酶具有预测长度为87个氨基酸的原序列 (在SEQ ID NO:2和3中以斜体表示)。该原序列预测基于对同源丝氨酸蛋白酶例如BPN' (Wells等人, Nucleic Acids Res, 11:7911-25, 1983) 和PB92蛋白酶 (van der Laan等人, Appl Environ Microbiol, 57:901-909, 1991) 中原成熟 (pro-mature) 接点的了解。

[0264] 成熟酶Bgi02446的预测氨基酸序列 (269个氨基酸) 如SEQ ID NO:4所示:

[0265] QQTVPWGITRVQAPAVHNRGITGSGVRVAILDSGISAHSDLNIRGGASFVPGEPTTADLNGHGTHVAGTVAALNNSIGVIGVAPNAELYAVKVLGANGSGSVSGIAQGLEWAATNNMHIANMSLGSDFPSSTLERAVNYATSRDVLVIAATGNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYGTGIDIVAPGVNVQSTYPGNRYVSMNGTSMATPHVAGAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATNLGNSSQFGSGLVNAEAATR。

[0266] 实施例2

[0267] Bgi02446的异源表达

[0268] 使用由以下组成的表达盒在枯草芽孢杆菌中产生Bgi02446蛋白酶: 枯草芽孢杆菌aprE启动子、枯草芽孢杆菌aprE信号肽序列、天然Bgi02446蛋白酶前肽、成熟Bgi0244蛋白酶和BPN' 终止子。将Bgi02446表达盒克隆到pHYT复制型穿梭载体中并转化。pHYT载体由pHY300PLK (Takara) 通过使用BstEII和EcoRI位点在四环素抗性基因之后添加终止子来获得 (终止子序列: GGTTACCTG AATGTATATA AACATTCTCA AAGGGATTTC TAATAAAAAA CGCTCGGTTG CCGCCGGGCG TTTTATGC ATCGATGGAA TTC, 如SEQ ID NO:5所示)。还使用克隆到BamHI和HindIII位点中的接头来除去HY300PLK中的HindIII位点 (接头序列: GGATCCTGAC TGCCTGAGCT T, 如SEQ ID NO:48所示)。用于表达Bgi02446丝氨酸蛋白酶的pHYT载体 (pHYT-Bgi02446) 的图谱示于图1中。

[0269] 将编码通过引入数个沉默密码子变化进行修饰的Bgi02446的原成熟区的合成基因克隆到pHYT载体中,该替代Bgi02446基因的核苷酸序列示于SEQ ID NO:6中。

[0270] 编码Bgi02446原成熟基因的合成核苷酸序列如SEQ ID NO:6所示;

[0271] GCAGAAGAAAAAGTCAAATATCTGATCGGCTTTGAAGAAGAAGCAGAACTGGAAGCATTACGGAAGAAATTGATCAAGTTGGCGTTTTTAGCGTCGAAGAACAATCAGTTGCAGAAGATACACTGGATATCGATGTCGATATCATCGACGAATATGACTATATTGATGTTCTGGCGGTTGAACTTGATCCGGAAGATGTTGATGCACTGTCAGAAGAAGCAGGCATTAGCTTTATTGAAGAAGATATCGAACTGAGCATTCAACAAACAGTTCCGTGGGGCATTACAAGAGTTCAAGCACCGGCAGTTCATAATCGCGGAATTACAGGCTCAGGCGTTAGAGTTGCAATTCTGGATTCAGGCATTTTCAGCACATAGCGATCTGAATATTAGAGGCGGAGCATCATTTGTCCCTGGCGAACCGACAACAGCAGATCTGAATGGCCATGGCACACATGTTGCAGGCACAGTTGCAGCACTGAATAATTCAATTGGCGTTATTGGAGTTGCACCGAATGCAGAAGTGTATGCAGTTAAAGTTCTTGGCGCAAATGGCTCAGGCTCAGTTTCAGGCATTGCACAAGGCCTGGAATGGGCAGCAACAAATAACATGCATATTGCAAATATGTCAGTGGGCTCAGATTTCCGTCATCAACACTGGAACGCGCAGTTAATTATGCAACATCAAGAGATGTTCTGGTCATTGCAGCAACAGGCAATAATGGCAGCGGCTCAGTTGGCTATCCGGCAAGATATGCAAATGCAATGGCAGTTGGCGCTACAGATCAAAAATAATCGCAGAGCAAATTTTAGCCAATATGGCACAGGCATTGATATTGTGTCACCTGGCGTTAATGTTTCAGTCAACATATCCGGGAAATCGCTATGTTTCAATGAATGGCACATCAATGGCAACACCGCATGTGCGAGGCGCAGCAGCACTGGTTAAACAAAGATATCCGTCATGGAATGCGACACAGATTGCAATCATCTGAAAAATACAGCAACAAATCTGGGCAATTCAAGCCAATTTGGCTCAGGCCTGGTTAATGCAGAAGCAGCAACAAGATAA

[0272] 为了产生Bgi02446,将含有pHYT-Bgi02446的枯草芽孢杆菌转化体在基于MOP缓冲液的富集半确定培养基中培养,所述培养基以尿素作为主要氮源、葡萄糖作为主要碳源并且补充有1%大豆脲以用于稳健细胞生长。该培养基补充有25ppm四环素。在孵育之后(32℃下2天),在生长培养基中检测Bgi02446蛋白酶。在离心和过滤之后,将具有Bgi02446蛋白酶的培养上清液用于测定和纯化。

[0273] 通过免染Imager Criterion方法来量化蛋白质。该方法基于利用免染的预制PAGE凝胶,其中每条蛋白质带的强度取决于目的蛋白中存在的色氨酸残基的数目。用于PAGE的CRITERION™TGX(Tris-甘氨酸延伸型)STAIN-FREE™预制凝胶包含独特的三卤代化合物。这允许用GEL DOC™EZ成像系统对蛋白质进行快速的荧光检测。三卤代化合物与色氨酸残基在UV诱导的反应中反应以产生荧光,荧光可通过Gel Doc EZ成像仪在凝胶中容易地检测到。该测定中使用的试剂包括:浓缩的(10X)Laemli样品缓冲液(Kem-En-Tec,目录号42556);18-或26-孔Criterion TGX免染预制凝胶(Bio-Rad,目录号分别为567-8124和567-8125);以及蛋白质标记物“Precision Plus Protein Standards”(Bio-Rad,目录号161-0363)。如下进行测定:将25μl蛋白质样品和25μl 0.5M HCl添加至在冰上的96孔PCR板以使蛋白酶失活并防止自水解。将50μl酸蛋白质混合物添加至在96孔板中的含有0.385mg DTT的50μL样品缓冲液。在此之后,用运行缓冲液填充室并设置凝胶盒。然后,将10μL的每份样品连同标记物一起上样在每个凹穴(pocket)中。在200V下开始电泳,持续35分钟。电泳之后,将凝胶转移至成像仪,并使用Image Lab软件来计算每条带的强度。通过已知标准样品的蛋白质质量和色氨酸含量,制作校准曲线。通过从带强度和色氨酸数目外推到蛋白质浓度来确定实验样品的量。采用这种蛋白质量化方法来制备用于后续实施例中所述的测定的Bgi02446样品。

[0274] 如后文所述,通过LC-MS/MS来分析分离的Bgi02446的样品。在准备序列确定(包括N末端和C末端确定)中,在10kDa旋转过滤器中对Bgi02446蛋白酶样品进行一系列的化学处理。使样品变性并通过尿素和DTT/碘乙酰胺处理还原/烷基化。进行胍基化步骤来将赖氨酸转化为高精氨酸以保护赖氨酸侧链免受乙酰化。使用磺基-NHS-乙酸酯(磺基琥珀酰亚胺基乙酸酯)的乙酰化反应仅修饰N末端残基。然后,将样品与含有40v/v% ¹⁸O水:60v/v% ¹⁶O水和用于蛋白质消化的蛋白水解酶的缓冲液混合。如由肽的同位素模式将显而易见的是,除将保留天然¹⁶O的羧基末端之外,所得肽将含有¹⁸O和¹⁶O的混合物。源于蛋白质N末端的肽将作为仅乙酰化肽显现。使用纳米LC系统,接着是LTQ Orbitrap (Thermo Fisher) 高分辨率质谱仪来分离并分析所得肽。由该肽的MS/MS片段谱推导出氨基酸序列。基于该分析,确定分离蛋白质的N末端在预测成熟序列的第2位以Q开始。

[0275] 经纯化并用于进一步表征的经加工成熟酶Bgi02446的氨基酸序列(268个氨基酸)如SEQ ID NO:7所示:

[0276] QTVPWGITRVQAPAVHNRGITGSGVRVAILDGSAHSIDLNIRGGASFVPGEPTADLNHGTHVAGTVAALNNSIGVIGVAPNAELYAVKVLGANGSGSVSGIAQGLEWAATNMHIANMSLGSDFPSSTLERAVNYATSRDVLVIAATGNNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYGTGIDIVAPGVNVQSTYPGNRYVSMNGTSMATPHVAGAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATNLGNSSQFGSGLVNAEAATR。

[0277] 实施例3

[0278] Bgi02446的蛋白酶活性

[0279] 通过测量二甲基酪蛋白(DMC)底物的水解来测试Bgi02446的蛋白酶活性。用于DMC测定的试剂溶液是:在100mM碳酸钠缓冲液pH 9.5中的2.5%w/v DMC(Sigma C-9801)、在试剂A中的0.075% TNBSA(Thermo Scientific)。试剂A:15mL 4N NaOH中的45.4g Na₂B₄O₇·10H₂O(Merck),在去离子水中达到1000mL的终体积。将蛋白酶上清液在稀释溶液:10mM NaCl、0.1mM CaCl₂、0.005% Tween-80中稀释至期望的浓度以实现在水解期间在5分钟内进行线性响应。用95μl DMC底物填充96孔微量滴定板(MTP),之后添加5μl经稀释的蛋白酶上清液。然后,在缓慢混合下添加100μl在试剂A中的TNBSA。使用SpectraMax读板仪在RT下以动力学模式于405nm处经5分钟测量活性。从每个样品读数中减去不含蛋白酶的空白的吸光度。将蛋白酶活性表示为mOD/分钟。Bgi02446的蛋白酶活性曲线示于图2中。发现Bgi02446蛋白酶在DMC测定中的比活性为55mOD/分钟/ppm(在此ppm是该测定中蛋白酶的终浓度)。在相同的测定条件下,发现迟缓芽孢杆菌P29600和解淀粉芽孢杆菌CAA24990蛋白酶的比活性分别为54和23mOD/分钟/ppm。

[0280] 实施例4

[0281] Bgi02446的pH特征

[0282] 使用氮酪蛋白底物在包含50mM CaCl₂的50mM乙酸盐/bis-Tris/HEPES/CHES缓冲液中来检测Bgi02446的蛋白水解活性的pH依赖性。以1pH单位增量来测量4至12范围的pH的效果。将一片Protaxyme AK片剂(Megazyme, Ireland)连同1.9mL缓冲液和磁力搅拌器一起添加至玻璃试管,之后在安装磁力搅拌器的控温水浴中于40℃下温和水化5分钟。向经预水化的底物添加100μl的新鲜制备蛋白酶样品(在去离子水中稀释至适于测定的浓度)并在40℃下进行反应10分钟。为了停止反应,添加10mL的2%w/v Tris缓冲液pH 12,搅拌溶液并立即通过Whatman1号过滤器进行过滤。收集上清液并测量上清液在590nm下的吸光度以量

化该反应的产物。从每个样品读数中减去只有缓冲液的对照的吸光度,并通过限定最佳pH下的活性为100%来将所得数值转化为相对活性的百分比。经确定Bgi02446在该测定的条件下在8至12的pH范围内维持 $\geq 50\%$ 活性。

[0283] 实施例5

[0284] Bgi02446的温度特征

[0285] 使用偶氮酪蛋白底物在包含50mM CaCl₂的50mM乙酸盐/bis-Tris/HEPES/CHES缓冲液pH 9中的来测量Bgi02446的蛋白水解活性的温度依赖性。在30℃至80℃的温度下以10℃的增量测量活性。将一片Protaxyme AK片剂(Megazyme, Ireland)连同1.9mL缓冲液和磁力搅拌器一起添加至玻璃试管,之后在安装磁力搅拌器的控温水浴中于设定温度下温和水化5分钟。向经预水化的底物添加100 μ l的新鲜制备蛋白酶样品(在去离子水中稀释至适于测定的浓度)并在30℃至80℃的温度下进行反应10分钟。为了停止反应,添加10mL的2% w/v Tris缓冲液pH 12,搅拌溶液并立即通过Whatman1号过滤器进行过滤。收集上清液并测量上清液在590nm下的吸光度以量化该反应的产物。从每个样品读数中减去只有缓冲液的对照的吸光度,并通过将限定最佳温度下的活性为100%来将所得数值转化为相对活性的百分比。经确定,Bgi02446在该测定的条件下在50℃至75℃的范围内保留 $\geq 50\%$ 活性。

[0286] 实施例6

[0287] Bgi02446的清洁性能

[0288] 针对衣物类应用在BMI(棉织物上的血液/乳/墨水)微样本(EMPA-116, Center for Testmaterials, The Netherlands)上并且针对餐具类应用在卵黄(聚丙烯织物上的卵黄,经陈化并且经炭黑染料着色)微样本(PAS-38, Center for Testmaterials, The Netherlands)上测试Bgi02446的清洁性能。用洗涤剂填充装有经预漂洗、预穿孔(以安装在MTP上)样本的MTP(Corning 9017),之后添加酶。将市售洗涤剂加热失活以除去现有的酶活性,并如表6-1所述加料。

[0289] 通过在水浴中于95℃下加热4小时来使重型液体(HDL)衣物洗涤剂失活。通过制备10%w/v溶液并在95℃下加热4小时来使重型干(HDD)衣物洗涤剂失活。在将HDD和HDL洗涤剂二者加热4小时之后,确定现有的蛋白酶活性不存在。

[0290] 制备具有表6-1中所述的终洗涤剂洗液浓度(g/L)的洗涤溶液,并用于清洁性能测定。

[0291] 表6-1:用于清洁性能测定的洗涤剂条件

洗涤剂*	类型	洗涤剂洗液浓度(g/L)	硬度浓度(ppm)	缓冲液	pH
OMO 色彩	HDD	5.3	250	2mM NaCO ₃	10.6
Kirkland Ultra	HDD	1.09	150	2mM NaCO ₃	10.6
OMO K & K	HDL	2.8	250	5mM Na HEPES	8.2
Kirkland Ultra	HDL	0.71	150	5mM Na HEPES	8.2
GSM-B 10.5	ADW	3	374	未缓冲	~10.5
GSM-B 9	ADW	3	374	未缓冲, +1M 柠檬酸盐以 调节 pH	9

[0293] *洗涤剂来源:Kirkland Ultra HDD和HDL(Sun Products)于2012年购买自美国的当地超市。OMO色彩HDD和OMO Klein&Krachtig9Unilever)于2013年购买自荷兰的当地超

市。GSM-B购买自WFK Testgewebe GmbH, 德国。

[0294] 表6-2:GSM-B pH 10.5无磷酸盐ADW洗涤剂成分

组分	重量%
脱水柠檬酸钠	30.0
马来酸/丙烯酸共聚物钠盐 (SOKALAN [®] CP5; BASF)	12.0
[0295] 过硼酸钠一水合物	5.0
TAED	2.0
二硅酸钠: Protil A (Cognis)	25.0
线性脂肪醇乙氧基化物	2.0
无水碳酸钠	加至 100

[0296] 将酶的等分试样添加至填充有洗涤剂的微样本板以达到200 μ L的总体积且酶终浓度为0.04至10ppm以用于清洁性能测定。使用HDL或HDD洗涤剂的衣物清洁测定在25 $^{\circ}$ C下进行15分钟,而自动盘碟(ADW)测定在40 $^{\circ}$ C下进行30分钟。

[0297] 在温育之后,将100 μ L上清液转移至新鲜的MTP (Costar 9017),并使用SpectraMax读板仪在600nm下读取EMPA-116样本的吸光度,或者在405nm下读取PAS-38样本的吸光度。减去只有缓冲液的对照的吸光度,并将600nm(对于HDL和HDD洗涤剂)和405nm(对于ADW洗涤剂)下的所得OD值作为蛋白酶浓度的函数绘图。使用Langmuir方程来拟合数据。Bgi02446在不同洗涤剂中的清洁性能示于图3A-3C中。

[0298] 实施例7

[0299] 同源蛋白酶的鉴定

[0300] 针对NCBI非冗余蛋白质数据库对Bgi02446的预测成熟形式的氨基酸序列(269个残基)(SEQ ID NO:4)进行BLAST检索(Altschul等人,Nucleic Acids Res,25:3389-402,1997)。使用SEQ ID NO:4作为查询序列针对基因组探索专利数据(Genome Quest Patent database)并将检索参数设置为默认值来进行类似的检索。检索结果的子集示于表7-1和7-2中。将两个检索子集的百分比同一性(PID)限定为相同残基的数目除以逐对比对中所比对残基的数目。标记为“序列长度”的柱指与所列登录号相关的蛋白质序列,而标记为“比对长度”的柱指所比对蛋白酶序列的长度(氨基酸长度),其用于进行PID计算。

[0301] 表7-1:Bgi02446与NCBI非冗余蛋白质数据库中的条目共有的百分比同一性(PID)

登录号	PID	生物	序列长度	比对长度
AGS78407	100.0	吉氏芽孢杆菌 (<i>Bacillus gibsonii</i>)	375	269
AAA22212	80.3	嗜碱芽孢杆菌 (<i>Bacillus alcalophilus</i>)	380	269
[0302] BAD63300	79.9	克劳氏芽孢杆菌 (<i>Bacillus clausii</i>) KSM-K16	380	269
P29600	79.9	迟缓芽孢杆菌 (<i>Bacillus lentus</i>)	269	269
BAA06157	78.1	芽孢杆菌 (<i>Bacillus sp.</i>) Sendai	382	269
BAA25184	77.7	芽孢杆菌 (<i>Bacillus sp.</i>) AprN	379	269
ADK62564	65.8	芽孢杆菌 (<i>Bacillus sp.</i>) B001	375	269
BAA05540	63.9	芽孢杆菌 (<i>Bacillus sp.</i>) AprM	361	269

登录号	PID	生物	序列长度	比对长度
ADD64465	63.2	芽孢杆菌 (<i>Bacillus sp.</i>) JB99	361	269
BAA06158	62.1	芽孢杆菌 (<i>Bacillus sp.</i>) ALP I	374	272
ADC49870	62.1	专性嗜碱芽孢杆菌 (<i>Bacillus pseudofirmus</i>) OF4	374	272
AAC43580	61.3	芽孢杆菌 (<i>Bacillus sp.</i>) SprC	378	272
BAD11988.2	58.8	芽孢杆菌 (<i>Bacillus sp.</i>) KSM-LD1 SA	376	272
YP_003972439	58.4	萎缩芽孢杆菌 (<i>Bacillus atrophaeus</i>) 1942	382	274
CAA24990	56.6	解淀粉芽孢杆菌 (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>)	376	274
BAN09118	56.2	枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)	381	274
BAD21128	56.0	芽孢杆菌 (<i>Bacillus sp.</i>) KSM-LD1 SB	377	273
CAA74536	55.8	枯草芽孢杆菌菌株 (<i>Bacillus subtilis str.</i>) 168	381	274
AGC81872	55.5	甲基营养芽孢杆菌 (<i>Bacillus methylotrophicus</i>)	382	274
WP_010329279	55.5	死谷芽孢杆菌 (<i>Bacillus vallismortis</i>)	381	274
WP_010333625	55.5	莫海威芽孢杆菌 (<i>Bacillus mojavensis</i>)	381	274
AGS78407	100.0	吉氏芽孢杆菌 (<i>Bacillus gibsonii</i>)	375	269
CAJ70731	55.3	地衣芽孢杆菌 (<i>Bacillus licheniformis</i>)	379	273
ABY25856	54.7	嗜热脂肪芽孢杆菌 (<i>Geobacillus stearothermophilus</i>)	382	274
WP_007497196	54.6	同温层芽孢杆菌 (<i>Bacillus stratosphericus</i>)	383	273
AAC43581	54.2	芽孢杆菌 (<i>Bacillus sp.</i>) SprD	379	273
WP_006636716	54.2	索诺拉沙漠芽孢杆菌 (<i>Bacillus sonorensis</i>)	378	273
AFP23380	54.2	<i>Bacillus lehensis</i>	276	273
ADN04910	53.8	环状芽孢杆菌 (<i>Bacillus circulans</i>)	275	273
ADK11996	53.8	短小芽孢杆菌 (<i>Bacillus pumilus</i>)	383	273

[0304] 表7-2: Bgi02446与基因组探索数据库中的条目共有的百分比同一性 (PID)

列于基因组探索数据库中的 专利-SEQ ID NO/登录号	PID	生物	序列长度	比对长度
WO03054184-CAE48421	95.2	吉氏芽孢杆菌 (<i>B. gibsonii</i>)	383	269
WO2007131657-CAS91385	94.4	吉氏芽孢杆菌 (<i>B. gibsonii</i>)	383	269
WO2008086916-CAV33594	93.3	吉氏芽孢杆菌 (<i>B. gibsonii</i>)	383	269
WO03054185-CAE48424	89.9	吉氏芽孢杆菌 (<i>B. gibsonii</i>)	383	269
WO2011110625-0002	89.6	芽孢杆菌 (<i>Bacillus sp.</i>)	269	269
WO2012119955-0005	88.9	芽孢杆菌 (<i>Bacillus sp.</i>)	269	269
WO2012119955-0004	88.5	芽孢杆菌 (<i>Bacillus sp.</i>)	269	269
[0305] WO2012119955-0006	88.5	芽孢杆菌 (<i>Bacillus sp.</i>)	269	269
US7642080-0002	87.4	芽孢杆菌属菌株 (<i>Bacillus sp. strain</i>) <i>Zi344</i>	381	269
US7507569-0002	87.3	人工序列	269	268
US7507569-0004	85.5	人工序列	269	268
US7507569-0006	85.1	人工序列	269	268
US7642080-0006	84.8	芽孢杆菌属菌株 (<i>Bacillus sp. strain</i>) <i>p203</i>	383	269
US7642080-0004	84.8	芽孢杆菌属菌株 (<i>Bacillus sp. strain</i>) <i>EP655</i>	383	269
US7262042-0004	80.6	嗜碱芽孢杆菌 (<i>B. alkalophilus</i>)	268	268
WO2011130222-0004	80.6	克劳氏芽孢杆菌 (<i>B. clausii</i>)	269	268

[0306] 使用CLUSTALW软件 (Thompson等人, *Nucleic Acids Research*, 22:4673-4680, 1994) 以默认参数将Bgi02446的预测成熟形式的氨基酸序列 (SEQ ID NO:4) 与表7-1和7-2中所列的多个蛋白酶的氨基酸序列进行比对。图4A-C示出了CLUSTAL W (1.83) 多序列比对。将编码Bgi02446的核苷酸序列 (SEQ ID NO:1) 与编码WO03054184-CAE48421的吉氏芽孢杆菌蛋白酶的核苷酸序列进行比对。在1149个核苷酸的比对长度内, 经确定这两条序列在使用BLAST或GAP样式参数时具有91.6%同一性, 在使用Needle样式参数时具有91.3%同一性。

[0307] 实施例8

[0308] 另外的吉氏芽孢杆菌-进化枝蛋白酶的鉴定

[0309] 通过对以下吉氏芽孢杆菌菌株的基因组进行测序来鉴定另外的枯草杆菌蛋白酶: DSM 9728、DSM 9729、DSM 9730和DSM 9731 (DSMZ (Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche

Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)。基因组测序、装配和标注基本上如实施例1中所述。所述基因组编码与Bgi02446类似但不相同的枯草杆菌蛋白酶。

[0310] 编码DSM 9728枯草杆菌蛋白酶的核苷酸序列如SEQ ID NO:8所示：

[0311] ATGAAAAGAAGAGTAGGAAAGCTGTAGTGGGGCTTGTGTTGTGTAACAGCTCTAGTAACAGTAACAGATTCTGCATCTGCAGCAGAAGAAAAGGTAAAATACTTAATAGGGTTTGAAGAAGAAGCAGAACTGAAGCCTTCACTGAGGAAATTGACCAAGTTGGTGTGTTTTCTGTTGAAGAACAAAGTGTAGCTGAGGATACGTTAGATATTGATGTAGACATTATTGATGAATATGATTATATTGATGTATTAGCCGTAGAATTAGATCCTGAGGATGTAGATGCGTTAAGCGAAGAAGCAGGTATCTCATTTATTGAAGAAGACATTGAACTGTCTATCCAACAAACGGTTCCTTGGGGCATTACTCGTGTACAAGCTCCAGCTGTGCATAACCGAGGAGTAACAGGGTCTGGTGTAAAGAGTAGCGATTCTAGATTCAGGAATCTCTACACATAGTGATTTAACGATTCGCGGTGGAGCTAGCTTTGTACCGGGTGAACCAACAACGGCTGATTTAAATGGTCATGGGACTCACGTTGCAGGAACAGTGGCAGCTCTTAATAATTCAATCGGTGTGATTGGTGTGGCACCAAGTGCTGATCTATACGCTGTAAAAGTACTTGGAGCAAATGGTAGAGGAAGCGTTAGTGGAATTGCTCAAGGTCTAGAGTGGGCTGCAGCGAATAACATGCATATTGCTAACATGAGTCTCGGTAGTGATGCACCTAGTACTACTTGGCGTGCAGTCAACTATGCGACAAGCCAAGGTGACTAGTTATTGCAGCGACTGGTAACAACGGTCTGGTTCAGTTGGCTATCCTGCTCGTTATGCAAACGCAATGGCTGTAGGAGCGACTGACCAAAAACAACAGACGTGCAAACCTTCTCAGTATGGTACAGGAATTGACATCGTAGCACCAGGGTTAATGTACAAAGTACGTATCCTGGAAACCGCTATGCAAGTTAAATGGTACATCTATGGCTACTCCACACGTAGCTGGTGGCGCTGCACCTGTAAAGCAACGCTATCCATCTTGAATGCAACTCAAATTCGCAATCATCTGAAAAATACAGCGACAAATCTAGGAAACTCTTCGCAATTTGGTAGTGGCCTAGTCAACGCAGAAGCAGCAACACGT。

[0312] SM 9728前酶原的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示：

[0313] MKRRVGLVVLVLCVLTALVTVDASAAEEKVKYLIGFEEAELEAFTEEIDQVGVFSVVEEQSVAEDTLDIDVDIIDEYDYIDVLAVELDPEDVDALSEEAGISFIEEDIELSIQQTVPWGITRVQAPAVHNRGVTGSGVRVAI LDSGISTHSDLTIRGGASFVPGEPTTADLNHGHTHVAGTVAALNNSIGVIGVAPSADLYAVKVLGANGRGSVSGIAQGLEWAAANNMHIANMSLGSDAPSTTLERAVNYATSQGVLVIAATGNNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYGTGIDIVAPGVNVQSTYPGNRYASLNGTSMATPHVAGAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATNLGNSSQFGSGLVNAEAATR。

[0314] DMS 9728酶原的氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示：

[0315] AEEKVKYLIGFEEAELEAFTEEIDQVGVFSVVEEQSVAEDTLDIDVDIIDEYDYIDVLAVELDPEDVDALSEEAGISFIEEDIELSIQQTVPWGITRVQAPAVHNRGVTGSGVRVAI LDSGISTHSDLTIRGGASFVPGEPTTADLNHGHTHVAGTVAALNNSIGVIGVAPSADLYAVKVLGANGRGSVSGIAQGLEWAAANNMHIANMSLGSDAPSTTLERAVNYATSQGVLVIAATGNNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYGTGIDIVAPGVNVQSTYPGNRYASLNGTSMATPHVAGAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATNLGNSSQFGSGLVNAEAATR。

[0316] DSM 9728枯草杆菌蛋白酶的成熟形式的预测氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示：

[0317] QQTVPWGITRVQAPAVHNRGVTGSGVRVAI LDSGISTHSDLTIRGGASFVPGEPTTADLNHGHTHVAGTVAALNNSIGVIGVAPSADLYAVKVLGANGRGSVSGIAQGLEWAAANNMHIANMSLGSDAPSTTLERAVNYATSQGV LVIAATGNNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYGTGIDIVAPGVNVQSTYPGNRYASLNGTSMATPHVAGAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATNLGNSSQFGSGLVNAEAATR。

[0318] DSM 9728枯草杆菌蛋白酶的经加工成熟形式(268个氨基酸)的氨基酸序列如SEQ ID NO:49所示：

[0319] QTVPWGITRVQAPAVHNRGVTGSGVRVAILDSGISTHSDLTIRGGASFVPGEPTTADLNHGHTHVAGTVAALNNSIGVIGVAPSADLYAVKVLGANGRGSVSGIAQGLEWAAANMHIANMSLGSDAPSTTLERAVNYATSQGV LVIAATGNNNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYGTGIDIVAPGVNVQSTYPGNRYASLNGTSMATPHVAGAAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATNLGNSSQFGSGLVNAEAATR。

[0320] 编码DSM 9729枯草杆菌蛋白酶的核苷酸序列如SEQ ID NO:12所示:

[0321] ATGAAAAGAAGAGTAGGTAAGCTTGTGGTGGGGCTTGTATGTGTAACAGCTCTAGTAACCGTGACAGATTCTGCATCTGCGGCAGAGAAAAAGTAAAATACTTAATAGGTTTTGAAGAAGAAGCAGAACTGAAGCCTTCACTGAGGAAATTGACCAAGTTGGTGTATTTTCTGTTGAAGAACAAAGTGTAGCTGAGGATACGTTAGATATTGATGTAGACATTATTGATGAATATGATTATATTGATGTGTTAGCTGTAGAATTAGATCCTGAGGATGTAGATGCGTTAAGCGAAGAAGCAGGTATCTCATTTATTGAAGAAGACATTGAACTGTCTATTCAACAAACAGTTCCTTGGGGCATTACTCGTGTACAAGCTCCGGCTGTTTCATAACCGAGGGATTACAGGTTCTGGAGTAAGAGTAGCTATCCTTGATTGAGGATTTGAGGATGCTCAAGGTTTAGAGTGGCGGCAACCAATAACATGCATATTGCGAACATGAGTCTCGGTAGTGATTTTCTAGCTCTACACTTGAGCGTGCAGTCAACTATGCGACAAGCCGTGATGTACTAGTTATTGCAGCGACTGGTAACAACGGTCTGGTTCAGTAGGCTATCCTGCTCGTTATGCAAACGCAATGGCTGTAGGAGCGACTGACCAAAAACAACAGACGCGCAAACCTTTCTCAGTACGGTACAGGAATTGACATCGTAGCACCTGGAGTTAACGTACAAAGTACGTATCCAGGAAACCGTTATGTGAGTATGAATGGTACATCTATGGCCACTCCACATGTAGCTGGTGGCGCTGCACCTGTAAAGCAACGCTATCCTTCTGGAATGCGACTCAAATTCGCAATCATCTGAAAAATACAGCAACAAATCTAGGAAACTCTTCGCAATTTGGTAGTGGCCTAGTTAACGCAGAAGCAGCAACACGT。

[0322] SM 9729前酶原的氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示:

[0323] MKRRVGLLVVGLVCVTALVTVDASASAAEEKVKYLIGFEEEALEAFTEEIDQVGVFSVEEQSVAEDTLDIDVDIIDEYDYIDVLAVELDPEDVDALSEEAGISFIEEDIELSIQQTVPWGITRVQAPAVHNRGITGSGVRVAILDSGISAHSDLNIRGGASFVPGEPTTADLNHGHTHVAGTVAALNNSIGVIGVAPNADLYAVKVLGANGSGSVSGIAQGLEWAATNMHIANMSLGSDFPSSTTLERAVNYATSRDVLVIAATGNNNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYGTGIDIVAPGVNVQSTYPGNRYVSMNGTSMATPHVAGAAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATNLGNSSQFGSGLVNAEAATR。

[0324] DSM 9729酶原的氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示:

[0325] AEEKVKYLIGFEEEALEAFTEEIDQVGVFSVEEQSVAEDTLDIDVDIIDEYDYIDVLAVELDPEDVDALSEEAGISFIEEDIELSIQQTVPWGITRVQAPAVHNRGITGSGVRVAILDSGISAHSDLNIRGGASFVPGEPTTADLNHGHTHVAGTVAALNNSIGVIGVAPNADLYAVKVLGANGSGSVSGIAQGLEWAATNMHIANMSLGSDFPSSTLERAVNYATSRDVLVIAATGNNNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYGTGIDIVAPGVNVQSTYPGNRYVSMNGTSMATPHVAGAAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATNLGNSSQFGSGLVNAEAATR。

[0326] DSM 9729枯草杆菌蛋白酶的成熟形式的预测氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示:

[0327] QQTVPWGITRVQAPAVHNRGITGSGVRVAILDSGISAHSDLNIRGGASFVPGEPTTADLNHGHTHVAGTVAALNNSIGVIGVAPNADLYAVKVLGANGSGSVSGIAQGLEWAATNMHIANMSLGSDFPSSTTLERAVNYATSRDVLVIAATGNNNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYGTGIDIVAPGVNVQSTYPGNRYVSMNGTSMATPHVAGAAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATNLGNSSQFGSGLVNAEAATR。

[0328] DSM 9729 枯草杆菌蛋白酶的经加工成熟形式(268个氨基酸)的氨基酸序列如SEQ ID NO:50所示:

[0329] QTVPWGITRVQAPAVHNRGITGSGVRVAILDSGISAHSDLNIRGGASFVPGEPTTADLNHGHTHVAGTV
AALNNSIGVIGVAPNADLYAVKVLGANGSGSVSGIAQGLEWAAATNMHIANMSLGSDFPSSTLERAVNYATSRDVLV
IAATGNNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYGTGIDIVAPGVNVQSTYPGNRYVSMNGTSMATPHVAGA
AALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATNLGNSSQFGSGLVNAEAATR

[0330] 编码DSM 9730 枯草杆菌蛋白酶的核苷酸序列如SEQ ID NO:16所示:

[0331] ATGAAAAGAAGAGTAGGAAAGCTTGTGGTGGGGCTTGTGTTGTGTAACAGCTCTAGTAACTGTAACAGA
TTCTGCATCTGCAGCAGAAAGAAAGGTAATACTTAATAGGGTTTGAAGAAGAAGCAGAACTGAAGCCTTCACT
GAGGAAATTGACCAAGTTGGTGTATTTTCTGTTGAAGAACAAAGTGTAGCTGAGGATACGTTAGATATTGATGTAG
ACATTATTGATGAATATGATTATATTGATGTATTAGCTGTAGAATTAGATCCTGAGGATGTAGATGCGTTAAGCGA
AGAAGCAGGTATCTCATTTATTGAAGAAGACATTGAACTGTCTATTCAACAAACAGTTCCTTGGGGCATTACTCGT
GTACAAGCTCCGGCTGTTTCATAACCGAGGAGTAACAGGGTCTGGTGTAAAGAGTAGCGATTCTAGATTCAGGAATCT
CTACACATAGTGATTTAACGATCCGCGGTGGAGCTAGCTTTGTACCGGGTGAACCAACAACGGCTGATTTAAATGG
TCATGGGACTCACGTTGCAGAACAGTGGCAGCTCTTAATAATTCAATCGGTGTGATTGGTGTGGCACCAAGTGTCT
GATCTATACGCTGTAAAAGTACTTGGAGCAAATGGTAGAGGAAGCGTTAGTGGAATTGCTCAAGGTTTAGAGTGGG
CTGCAGCGAATAACATGCATATTGCTAACATGAGTCTCGGTAGTGATGCACCTAGTACTACTTGGCGTGCAGT
CAACTATGCGACAAGCCAAGGTGACTAGTTATTGCAGCGACTGGTAACAACGGTCTGGTTCAGTAGGCTATCCT
GCTCGTTATGCAAACGCAATGGCTGTAGGAGCGACTGACCAAAAACAACAGACGCGCAAACCTTTCTCAGTACGGTA
CAGGAATTGACATCGTAGCACCTGGAGTTAACGTACAAAGTACGTATCCAGGAAACCGTTATGTGAGTATGAATGG
TACATCTATGGCCACTCCACATGTAGCTGGTGGCGCTGCACCTGTAAAGCAACGCTATCCTTCTTGAATGCGACT
CAAATTCGCAATCATCTGAAAAATACAGCAACAAATCTAGGAAACTCTTCGCAATTTGGTAGTGGCCTAGTGAACG
CAGAAGCAGCAACACGT。

[0332] SM 9730 前酶原的氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示:

[0333] MKRRVGKLVVGLVCVTALVTVTDSASAAEEKVKYLIGFEEAELEAFTEEIDQVGVFSVVEEQSVAEDT
LDIDVDIIDEYDYIDVLAVELDPEDVDALSEEAGISFIEEDIELSIQQTVPWGITRVQAPAVHNRGVTGSGVRVAI
LDSGISHTSDLTIRGGASFVPGEPTTADLNHGHTHVAGTVAALNNSIGVIGVAPSADLYAVKVLGANGRGSVSGIA
QGLEWAAANNMHIANMSLGS DAPSTTLERAVNYATSQGVLVIAATGNNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRAN
FSQYGTGIDIVAPGVNVQSTYPGNRYVSMNGTSMATPHVAGAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATNLGNSSQFG
SGLVNAEAATR。

[0334] DSM 9730 酶原的氨基酸序列如SEQ ID NO:18所示:

[0335] AEEKVKYLIGFEEAELEAFTEEIDQVGVFSVVEEQSVAEDTLDIDVDIIDEYDYIDVLAVELDPEDVD
ALSEEAGISFIEEDIELSIQQTVPWGITRVQAPAVHNRGVTGSGVRVAILDSGISHTSDLTIRGGASFVPGEPTTA
DLNHGHTHVAGTVAALNNSIGVIGVAPSADLYAVKVLGANGRGSVSGIAQGLEWAAANNMHIANMSLGS DAPSTTL
ERAVNYATSQGVLVIAATGNNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYGTGIDIVAPGVNVQSTYPGNRYV
SMNGTSMATPHVAGAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATNLGNSSQFGSGLVNAEAATR。

[0336] DSM 9730 枯草杆菌蛋白酶的成熟形式的预测氨基酸序列如SEQ ID NO:19所示:

[0337] QQTVPWGITRVQAPAVHNRGVTGSGVRVAILDSGISHTSDLTIRGGASFVPGEPTTADLNHGHTHVAG
TVAALNNSIGVIGVAPSADLYAVKVLGANGRGSVSGIAQGLEWAAANNMHIANMSLGS DAPSTTLERAVNYATSQ

VLVIAATGNNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYGTGIDIVAPGVNVQSTYPGNRYVSMNGTSMATPH
VAGAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATNLGNSSQFGSGLVNAEAATR。

[0338] DSM 9730 枯草杆菌蛋白酶的经加工成熟形式 (268 个氨基酸) 的氨基酸序列如 SEQ
ID NO:51 所示:

[0339] QTVPWGITRVQAPAVHNRGVTGSGVRVAILDGISTHSDLTIRGGASFVPGEPTTADLNHGHTHVAGT
VAALNNSIGVIGVAPSADLYAVKVLGANGRGSVSGIAQGLEWAAANMHIANMSLGSDAPSTTLERAVNYATSQGV
LVIAATGNNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYGTGIDIVAPGVNVQSTYPGNRYVSMNGTSMATPHV
AGAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATNLGNSSQFGSGLVNAEAATR。

[0340] 编码 DSM 9731 枯草杆菌蛋白酶的核苷酸序列如 SEQ ID NO:20 所示:

[0341] ATGAAAAGAAGAGTAGGAAAGCTTGTAGTGGGGCTTGTGTTGTGTAACAGCTCTAGTAACTGTAACAGA
TTCTGCATCTGCAGCAGAAAGAAAGGTAATACTTAATAGGGTTTGAAGAAGAAGCAGAACTGAAGCCTTCACT
GAGGAAATTGACCAAGTTGGTGTGTTTTCTGTTGAAGAACAAAGTGTAGCTGAGGATACGTTAGATATTGATGTAG
ACATTATTGATGAATATGATTATATTGATGTATTAGCTGTAGAATTAGATCCTGAGGATGTAGATGCGTTAAGTGA
AGAAGCAGGTATCTCATTTATTGAAGAAGACATTGAACTGTCTATTCAACAAACGGTTCCTTGGGGCATTACTCGT
GTACAAGCTCCAGCTGTGCATAACCGAGGAGTAACAGGGTCTGGTGTAAAGAGTAGCGATTCTAGATTCAGGAATCT
CTACACATAGTGATTTAACGATTCGCGGTGGAGCTAGCTTTGTACCGGGTGAACCAACAACGGCTGATTTAAATGG
TCATGGGACTCACGTTGCAGGAACAGTGGCAGCTCTTAATAATTCAATTGGTGTGATTGGTGTGGCACCAGTGTCT
GATCTATACGCTGTAAAAGTACTTGGAGCAAATGGTAGAGGAAGCGTTAGTGGAATTGCTCAAGGTCTAGAGTGGG
CTGCAGCGAATAACATGCATATTGCTAACATGAGTCTCGGTAGTGATGCACCTAGTACTACACTTGAGCGTGCAGT
CAACTATGCGACAAGCCAAGGTGACTAGTTATTGCAGCGACTGGTAACAACGGTCTGGTTCAGTTGGCTATCCT
GCTCGTTATGCAAACGCAATGGCTGTAGGAGCGACTGACCAAAAACAACAGACGCGCAAACCTTTCTCAATATGGTT
CAGGAATTGATATCGTAGCACCAGGAGTTAACGTACAAAGTACGTATCCAGGAAACCGTTATGTGAGTATGAATGG
TACATCTATGGCCACTCCACACGTAGCTGGTGGCGCTGCGCTTGAAAGCAACGCTATCCATCTTGAATGCGACT
CAAATTCGCAATCATCTGAAAAATACAGCGACAAATCTAGGAAACTCTTCGCAATTTGGTAGTGGCCTAGTGAACG
CAGAAGCAGCAACACGT。

[0342] SM 9731 前酶原的氨基酸序列如 SEQ ID NO:21 所示:

[0343] MKRRVGKLVVGLVCVTALVTVTDSASAAEEKVKYLIGFEEAELEAFTEEIDQVGVFSVEEQSVAEDT
LDIDVDIIDEYDYIDVLAVELDPEDVDALSEEAGISFIEEDIELSIQQTVPWGITRVQAPAVHNRGVTGSGVRVAI
LDGISTHSDLTIRGGASFVPGEPTTADLNHGHTHVAGTVAALNNSIGVIGVAPSADLYAVKVLGANGRGSVSGIA
QGLEWAAANMHIANMSLGSDAPSTTLERAVNYATSQGVLVIAATGNNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRAN
FSQYGSIDIVAPGVNVQSTYPGNRYVSMNGTSMATPHVAGAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATNLGNSSQFG
SGLVNAEAATR。

[0344] DSM 9731 酶原的氨基酸序列如 SEQ ID NO:22 所示:

[0345] AEEKVKYLIGFEEAELEAFTEEIDQVGVFSVEEQSVAEDTLDIDVDIIDEYDYIDVLAVELDPEDVD
ALSEEAGISFIEEDIELSIQQTVPWGITRVQAPAVHNRGVTGSGVRVAILDGISTHSDLTIRGGASFVPGEPTTA
DLNHGHTHVAGTVAALNNSIGVIGVAPSADLYAVKVLGANGRGSVSGIAQGLEWAAANMHIANMSLGSDAPSTTL
ERAVNYATSQGVLVIAATGNNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYGSIDIVAPGVNVQSTYPGNRYV
SMNGTSMATPHVAGAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATNLGNSSQFGSGLVNAEAATR。

[0346] DSM 9731 枯草杆菌蛋白酶的成熟形式的预测氨基酸序列如 SEQ ID NO:23 所示:

[0347] QQTVPWGITRVQAPAVHNRGVTGSGVRVAILDSGISTHSDLTIRGGASFPGEPTTADLNHGHTHVAG
TVAALNNSIGVIGVAPSADLYAVKVLGANGRGSVSGIAQGLEWAAANMHIANMSLGSADPSTTLERAVNYATSQG
VLVIAATGNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYGSIDIVAPGVNVQSTYPGNRYVSMNGTSMATPH
VAGAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATNLGNSSQFGSGLVNAEAAATR。

[0348] DSM 9731枯草杆菌蛋白酶的经加工成熟形式(268个氨基酸)的氨基酸序列如SEQ
ID NO:52所示:

[0349] QTVPWGITRVQAPAVHNRGVTGSGVRVAILDSGISTHSDLTIRGGASFPGEPTTADLNHGHTHVAGT
VAALNNSIGVIGVAPSADLYAVKVLGANGRGSVSGIAQGLEWAAANMHIANMSLGSADPSTTLERAVNYATSQGV
LVIAATGNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYGSIDIVAPGVNVQSTYPGNRYVSMNGTSMATPHV
AGAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATNLGNSSQFGSGLVNAEAAATR。

[0350] DSM 9728、DSM 9729、DSM 9730、DSM 9731和Bgi02446枯草杆菌蛋白酶的预测成熟
形式的氨基酸序列的比对示于图5中。使用CLUSTALW软件(Thompson等人,Nucleic Acids
Research,22:4673-4680,1994)以默认参数来比对序列。

[0351] 表8-1:Bgi02446与其它吉氏芽孢杆菌枯草杆菌酶共有的百分比同一性(PID)

[0352]

PID	Bgi02446	DSM9728	DSM9729	DSM9730	DSM9731
Bgi02446	100	95.2	99.6	95.9	95.5
DSM9728	95.2	100	95.5	99.3	98.9
DSM9729	99.6	95.5	100	96.3	95.9
DSM9730	95.9	99.3	96.3	100	99.6
DSM9731	95.5	98.9	95.9	99.6	100

[0353] 除Bgi02446、DSM 9728、DSM 9729、DSM 9730和DSM 9731枯草杆菌蛋白酶成熟形式
的氨基酸序列之外,还使用表7-1和7-2中所列的多个蛋白酶的氨基酸序列来建立以下吉氏
芽孢杆菌-进化枝成员DSM9728的预测成熟形式的氨基酸序列的系统发育树:Bgi02446(SEQ
ID NO:4)、(SEQ ID NO:11)、DSM9729(SEQ ID NO:15)、DSM9730(SEQ ID NO:19)和DSM9731
(SEQ ID NO:23)可将序列输入Vector NTI Advance工具包中并使用邻接(NJ)法来生成指
南树(Saitou和Nei,Mol Biol Evol,4:406-425,1987)。NJ方法基于需分析的所有序列对之
间的距离的矩阵来工作。这些距离与序列之间的趋异度相关。在对序列进行比对之后,计算
指南树。使用以下参数并忽略具空位的位置来计算树构建:Kimura的序列距离校正.AlignX
将计算的距离值在括号中显示在图6所示树上的显示的分子名称之后。Bgi02446、DSM
9728、DSM 9729、DSM 9730和DSM 9731枯草杆菌蛋白酶全部聚簇在同一区域中(如图6中所
示)形成吉氏芽孢杆菌-进化枝。

[0354] 实施例9

[0355] 吉氏芽孢杆菌蛋白酶的清洁性能

[0356] 如实施例6中所述,针对衣物类应用在BMI(棉织物上的血液/乳/墨水)微样本
(EMPA-116,Center for Testmaterials,The Netherlands)上,并且针对餐具类应用在卵
黄(聚丙烯织物上的卵黄,经陈化并且经炭黑染料着色)微样本(PAS-38,Center for
Testmaterials,The Netherlands)上测试吉氏芽孢杆菌蛋白酶、Bgi02446、DSM 9728和DSM
9731的清洁性能。将装有经预穿孔(以安装在MTP上)样本的MTP(Corning 9017)漂洗或者不
漂洗以用于ADW测定,并用洗涤剂填充,之后添加酶。在HDD测定中使用1个微样本,在HDL测

定中使用2个微样本。蛋白酶在不同洗涤剂中的清洁性能示于图7A-7F中。

[0357] 实施例10

[0358] 吉氏芽孢杆菌蛋白酶的特有特征

[0359] 使用分子操作环境(Molecular Operating Environment, MOE)软件中的“比对”选择(Chemical Computing Group, Montreal, Quebec, Canada)来进行DSM 9728 (SEQ ID NO: 11)、DSM 9731 (SEQ ID NO: 23)和Bgi02446 (SEQ ID NO: 4) 枯草杆菌蛋白酶成熟形式与来自解淀粉芽孢杆菌的BPN' 枯草杆菌蛋白酶 (pdb进入号2STI)、来自地衣芽孢杆菌的Carlsberg (pdb进入号1CSE) 和迟缓芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶 (pdb进入号1JEA) 的基于结构的氨基酸序列比对(图8A-B)。该比对向常规的序列比对应用保守结构基序作为另一向导。使用2012年10月发行的MOE中存在的标准程序默认值来进行该比对。

[0360] 在图8A-B中,被加亮的是基于结构的比对的一个区域,在该区域中枯草杆菌蛋白酶DSM 9728、DSM 9731和Bgi02446序列显示出在Asp (D) 31和His (H) 64之间延伸的共有基序。在所有这些酶中,催化三联体均由Asp (D) 31、His (H) 61和Ser (S) 214形成。基序DXGIXXHSDLXXXGGASXXXXXPTTADLNHXHGTH (SEQ ID NO: 47) 或DXGIXXHSDLXXXGGASXXXXXTTADLXXHGTH (SEQ ID NO: 90) 包含序列TTAD, 其是DSM 9728、DSM 9731和Bgi02446序列所特有的, 并且还是之前鉴定的其它吉氏芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶 (CAS91385、CAE48421、CAE4842) 所共有的。参考图6中的枯草杆菌蛋白酶系统发育树可见所有的吉氏芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶均聚簇在同一区域中形成吉氏芽孢杆菌-进化枝。所有的吉氏芽孢杆菌-进化枝枯草杆菌蛋白酶共有基序DXGIXXHSDLXXXGGASXXXXXPTTADLNHXHGTH (SEQ ID NO: 47) 或DXGIXXHSDLXXXGGASXXXXXTTADLXXHGTH (SEQ ID NO: 90)。

[0361] 图9示出了基于迟缓芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶的结构 (pdb进入号1JEA) 建模的吉氏芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶 (DSM 9728、DSM 9731和Bgi02446) 中TTADL保守残基相对于催化三联体的位置。吉氏芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶 (SEQ ID NO 4) 的所述保守残基形成引导进入催化残基His (H) 61的环。认为所述保守残基与催化His (H) 61残基和该环紧密邻近是影响该酶的蛋白水解稳定性和活性的关键因素。还注意到, 前述环中存在的第39位丝氨酸在催化天冬氨酸 (Asp 32) 之后并且不同于现今产品中存在的市售枯草杆菌蛋白酶中见于同源位置的脯氨酸残基。不受限于任何具体理论, 该环小于见于枯草杆菌蛋白酶BPN' 和Carlsberg中的环, 并且由存在丝氨酸而非脯氨酸所期望的额外柔性可能还有益于性能。

[0362] 实施例11

[0363] 另外的吉氏芽孢杆菌-进化枝枯草杆菌蛋白酶的产生

[0364] 使用常规的分子生物学技术来进行产生另外的吉氏芽孢杆菌-进化枝枯草杆菌蛋白酶的DNA操作(参见, 例如, Sambrook等人, Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press)。以与前述实施例中所述的方式相同的方式来表达、回收变体, 并使用上清液进行测定。

[0365] 编码Bgi02446枯草杆菌蛋白酶的核苷酸序列如SEQ ID NO: 53所示:

[0366] CAACAAACAGTGCCATGGGGAATTACTCGTGTGCAAGCCCCAGCTGTCATAACCGTGAATTACAGGTTCTGGTGTAAAGAGTTGCTATCCTCGATTACAGGATTTCCGCCATAGTGACTTAAATATTCGTGGTGGCGCTAGCTTTGTACCAGGGGAACCAACGACTGCTGATTTAAATGGGCATGGCACGCATGTGGCTGGGACGGTAGCTGCTTTAAACAATTCGATTGGCGTTATTGGCGTAGCACCGAACGCGGAACCTATACGCTGTAAAGTATTAGGGGCGAATGGTTC

AGGTTTCGGTCAGCGGGATTGCCCAAGGATTGGAATGGGCAGCAACCAATAACATGCACATTGCTAATATGAGTTTAA
GGAAGCGATTTTCCAAGTTCTACACTTGAGCGTGCTGTTAATTATGCGACTTCTAGAGATGTTCTTGTATTGCGG
CAACTGGGAATAACGGTTCTGGCTCAGTAGGCTATCCGGCCCCGTTATGCGAACGCAATGGCAGTCGGAGCTACTGA
CCAAAACAACAGACGCGCCAACCTTTTCACAGTATGGCACGGGGATTGACATTGTTCGCACCAGGTGTAAACGTGCAG
AGCACATAACCAGGTAACCGTTATGTGAGCATGAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTGCAGGTGCAGCAG
CCCTTGTTAAACAACGCTATCCATCTTGAATGCGACTCAAATCCGCAATCATCTAAAGAATACGGCAACGAATTT
AGGAAACTCTTACAATTTGGAAGCGGACTTGTCAATGCAGAAGCGGCAACACGCTAA。

[0367] 编码DSM-9728枯草杆菌蛋白酶的核苷酸序列如SEQ ID NO:54所示:

[0368] CAACAAACAGTGCCATGGGGAATTACTCGTGTGCAAGCCCCAGCTGTTTCATAACCGTGGAGTTACAGG
TTCTGGTGTAAAGAGTTGCTATCCTCGATTACAGTATTTCCACACATAGTGACTTAAACAATTCGTGGTGGCGCTAGC
TTTGTACCAGGGGAACCAACGACTGCTGATTTAAATGGGCATGGCACGCATGTGGCTGGGACGGTAGCTGCTTTAA
ACAATTCGATTGGCGTTATTGGCGTAGCACCGTCAGCGGATCTATACGCTGTAAAGTATTAGGGGCGAATGGTAG
AGGTTTCGGTCAGCGGGATTGCCAAGGATTGGAATGGGCAGCAGCAATAACATGCACATTGCTAATATGAGTTTAA
GGAAGCGATGCACCAAGTACAACACTTGAGCGTGCTGTTAATTATGCGACTTCTCAAGGCGTCTTGTATTGCGG
CAACTGGGAATAACGGTTCTGGCTCAGTAGGCTATCCGGCCCCGTTATGCGAACGCAATGGCAGTCGGAGCTACTGA
CCAAAACAACAGACGCGCCAACCTTTTCACAGTATGGCACGGGGATTGACATTGTTCGCACCAGGTGTAAACGTGCAG
AGCACATAACCAGGTAACCGTTATGCAAGCCTGAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTGCAGGTGCAGCAG
CCCTTGTTAAACAACGCTATCCATCTTGAATGCGACTCAAATCCGCAATCATCTAAAGAATACGGCAACGAATTT
AGGAAACTCTTACAATTTGGAAGCGGACTTGTCAATGCAGAAGCGGCAACACGCTAA。

[0369] 编码DSM-9731枯草杆菌蛋白酶的核苷酸序列如SEQ ID NO:55所示:

[0370] CAACAAACAGTGCCATGGGGAATTACTCGTGTGCAAGCCCCAGCTGTTTCATAACCGTGGAGTTACAGG
TTCTGGTGTAAAGAGTTGCTATCCTCGATTACAGTATTTCCACACATAGTGACTTAAACAATTCGTGGTGGCGCTAGC
TTTGTACCAGGGGAACCAACGACTGCTGATTTAAATGGGCATGGCACGCATGTGGCTGGGACGGTAGCTGCTTTAA
ACAATTCGATTGGCGTTATTGGCGTAGCACCGTCAGCGGATCTATACGCTGTAAAGTATTAGGGGCGAATGGTAG
AGGTTTCGGTCAGCGGGATTGCCAAGGATTGGAATGGGCAGCAGCAATAACATGCACATTGCTAATATGAGTTTAA
GGAAGCGATGCACCAAGTACAACACTTGAGCGTGCTGTTAATTATGCGACTTCTCAAGGCGTCTTGTATTGCGG
CAACTGGGAATAACGGTTCTGGCTCAGTAGGCTATCCGGCCCCGTTATGCGAACGCAATGGCAGTCGGAGCTACTGA
CCAAAACAACAGACGCGCCAACCTTTTCACAGTATGGCTCAGGGATTGACATTGTTCGCACCAGGTGTAAACGTGCAG
AGCACATAACCAGGTAACCGTTATGTGAGCATGAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTGCAGGTGCAGCAG
CCCTTGTTAAACAACGCTATCCATCTTGAATGCGACTCAAATCCGCAATCATCTAAAGAATACGGCAACGAATTT
AGGAAACTCTTACAATTTGGAAGCGGACTTGTCAATGCAGAAGCGGCAACACGCTAA。

[0371] 编码BG5-F02枯草杆菌蛋白酶的核苷酸序列如SEQ ID NO:56所示:

[0372] CAACAAACAGTGCCATGGGGAATTACTCGTGTGCAAGCCCCAGCTGTTTCATAACCGTGGAAATTACAGG
TTCTGGTGTAAAGAGTTGCTATCCTCGATTACAGTATTTCCGCCCATAGTGACTTAAATATTCGTGGTGGCGCTAGC
TTTGTACCAGGGGAACCAACGACTGCTGATTTAAATGGGCATGGCACGCATGTGGCTGGGACGGTAGCTGCTTTAA
ACAATTCGATTGGCGTTATTGGCGTAGCACCGAACGCGGAACCTATAACGCTGTAAAGTATTAGGGGCGAATGGTTC
AGGTTTCGGTCAGCGGGATTGCCAAGGATTGGAATGGGCAGCAACCAATAACATGCACATTGCTAATATGAGTTTAA
GGAAGCGATTTTCCAAGTTCTACACTTGAGCGTGCTGTTAATTATGCGACTTCTCAAGGCGTCTTGTATTGCGG
CAACTGGGAATAACGGTTCTGGCTCAGTAGGCTATCCGGCCCCGTTATGCGAACGCAATGGCAGTCGGAGCTACTGA

CCAAAACAACAGACGCGCCAACCTTTTCACAGTATGGCACGGGAATTGACATTGTTCGCACCAGGTGTAAACGTGCAG
AGCACATAACCAGGTAACCGTTATGTGAGCATGAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTGCAGGTGCAGCAG
CCCTTGTTAAACAACGCTATCCWTCTTGAATGCGACTCAAATCCGCAATCATCTGAAAAATACGGCAACGAATTT
AGGAAACTCTTACAATTTGGAAGCGGACTTGTCAATGCAGAAGCGGCAACACGC。

[0373] BG5-F02枯草杆菌蛋白酶的成熟形式的预测氨基酸序列如SEQ ID NO:57所示:

[0374] QQTVPWGITRVQAPAVHNRGITGSGVRVAILDSGISAHSDLNIRGGASFPGEPTADLNHGHTHVAG
TVAALNNSIGVIGVAPNAELYAVKVLGANGSGSVSGIAQGLEWAATNNMHIANMSLGSDFPSSTLERAVNYATSQG
VLVIAATGNNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYGTGIDIVAPGVNVQSTYPGNRYVSMNGTSMATPH
VAGAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATNLGNSSQFGSGLVNAEAATR。

[0375] 编码BG5-E05枯草杆菌蛋白酶的核苷酸序列如SEQ ID NO:58所示:

[0376] CAACAAACAGTGCCATGGGGAATTACTCGTGTGCAAGCCCCAGCTGTCATAACCGTGAATTACAGG
TTCTGGTGTAAAGATTGCTATCCTCGATTACAGTATTTCCGCCATAGTACTTAAATATTCGTGGTGGCGCTAGC
TTTGTACCAGGGGAACCAACGACTGCTGATTTAAATGGGCATGGCACGCATGTGGCTGGGACGGTAGCTGCTTTAA
ACAATTCGATTGGCGTTATTGGCGTAGCACCGAACGCGGAACATAACGCTGTAAAGTATTAGGGGCGAATGGTTC
AGGTTCCGGTCAGCGGGATTGCCAAGGATTGGAATGGGCAGCAACCAATAACATGCACATTGCTAATATGAGTTTA
GGAAGCGATTTTCCAAGTTCTACACTTGAGCGTGCTGTTAATTATGCGACTTCTAGAGATGTTCTTGTATTGCGG
CAACTGGGAATAACGGTTCTGGCTCAGTAGGCTATCCGGCCCCGTTATGCGAACGCAATGGCAGTCGGAGCTACTGA
CCAAAACAACAGACGCGCCAACCTTTTCACAGTATGGCGCAGGGCTGGACATTGTTCGCACCAGGTGTAAACGTGCAG
AGCACATAACCAGGTAACCGTTATGTGAGCATGAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTGCAGGTGCAGCAG
CCCTTGTTAAACAACGCTATCCATCTTGAATGCGACTCAAATCCGCAATCATCTAAAGAATACGGCAACGAATTT
AGGAAACTCTTACAATTTGGAAGCGGACTTGTCAATGCAGAAGCGGCAACACGC。

[0377] BG5-E05枯草杆菌蛋白酶的成熟形式的预测氨基酸序列如SEQ ID NO:59所示:

[0378] QQTVPWGITRVQAPAVHNRGITGSGVRVAILDSGISAHSDLNIRGGASFPGEPTADLNHGHTHVAG
TVAALNNSIGVIGVAPNAELYAVKVLGANGSGSVSGIAQGLEWAATNNMHIANMSLGSDFPSSTLERAVNYATSRD
VLVIAATGNNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYAGLDIVAPGVNVQSTYPGNRYVSMNGTSMATPH
VAGAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATNLGNSSQFGSGLVNAEAATR。

[0379] 编码BG1-C05枯草杆菌蛋白酶的核苷酸序列如SEQ ID NO:60所示:

[0380] CAACAAACAGTGCCATGGGGAATTACTCGTGTGCAAGCCCCAGCTGTCATAACCGTGAATTACAGG
TTCTGGTGTAAAGATTGCTATCCTCGATTACAGTATTTCCGCCATAGTACTTAAATATTCGTGGTGGCGCTAGC
TTTGTACCAGGGGAACCAACGACTGCTGATTTAAATGGGCATGGCACGCATGTGGCTGGGACGGTAGCTGCTTTAA
ACAATTCGATTGGCGTTATTGGCGTAGCACCGAACGCGGAACATAACGCTGTAAAGTATTAGGGGCGAATGGTAG
AGGTTCCGGTCAGCGGGATTGCCAAGGATTGGAATGGGCAGCAACCAATAACATGCACATTGCTAATATGAGTTTA
GGAAGCGATGCACCAAGTACTACACTTGAGCGTGCTGTTAATTATGCGACTTCTAGAGATGTTCTTGTATTGCGG
CAACTGGGAATAACGGTTCTGGCTCAGTAGGCTATCCGGCCCCGTTATGCGAACGCAATGGCAGTCGGAGCTACTGA
CCAAAACAACAGACGCGCCAACCTTTTCACAGTATGGCACGGGGATTGACATTGTTCGCACCAGGTGTAAACGTGCAG
AGCACATAACCAGGTAACCGTTATGTGAGCATGAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTGCAGGTGCAGCAG
CCCTTGTTAAACAACGCTATCCATCTTGAATGCGACTCAAATCCGCAATCATCTAAAGAATACGGCAACGAATTT
AGGAAACTCTTACAATTTGGAAGCGGACTTGTCAATGCAGAAGCGGCAACACGC。

[0381] BG1-C05枯草杆菌蛋白酶的成熟形式的预测氨基酸序列如SEQ ID NO:61所示:

[0382] QQTVPWGITRVQAPAVHNRGITGSGVRVAILDSGISAHSDLNIRGGASFVPGEPTADLNHGTHVAG
TVAALNNSIGVIGVAPNAELYAVKVLGANGRGSVSGIAQGLEWAATNNMHIANMSLGSDAPSTTLERAVNYATSRD
VLVIAATGNNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYGTGIDIVAPGVNVQSTYPGNRYVSMNGTSMATPH
VAGAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATNLGNSSQFGSGLVNAEAAATR。

[0383] 编码BG2-D10枯草杆菌蛋白酶的核苷酸序列如SEQ ID NO:62所示:

[0384] CAACAAACAGTGCCATGGGGAATTACTCGTGTGCAAGCCCCAGCTGTTTCATAACCGTGAATTACAGG
TTCTGGTGTAAAGATTGCTATCCTCGATTACAGTATTTCCGCCCATAGTGACTTAAATATTCGTGGTGGCGCTAGC
TTTGTACCAGGGGAACCAACGACTGCTGATTTAAATGGGCATGGCACGCATGTGGCTGGGACGGTAGCTGCTTTAA
ACAATTTCGATTGGCGTTATTGGCGTAGCACCGAACGCGAACTATACGCTGTAAAAGTATTAGGGGCGAATGGTTC
AGGTTTCGGTCAGCGGGATTGCCAAGGATTGGAATGGGCAGCAACCAATAACATGCACATTGCTAATATGAGTTTA
GGAAGCGATGCACCAAGTACAACACTTGAGCGTGCTGTTAATTATGCGACTTCTCAAGGCGTCTTGTATTGCGG
CAACTGGGAATAACGGTCTGGCTCAGTAGGCTATCCGGCCCCTTATGCGAACGCAATGGCAGTCGGAGCTACTGA
CCAAAACAACAGACGCGCAACTTTTCACAGTATGGCACGGGGATTGACATTGTCGCACCAGGTGTAACGTGCAG
AGCACATAACCAGGTAACCGTTATGTGAGCATGAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTGCAGGTGCAGCAG
CCCTTGTTAAACAACGCTATCCATCTTGAATGCGACTCAAATCCGCAATCATCTAAAGAATACGGCAACGAATTT
AGGAAACTCTTACAATTTGGAAGCGGACTTGTCAATGCAGAAGCGGCAACACGC。

[0385] BG2-D10枯草杆菌蛋白酶的成熟形式的预测氨基酸序列如SEQ ID NO:63所示:

[0386] QQTVPWGITRVQAPAVHNRGITGSGVRVAILDSGISAHSDLNIRGGASFVPGEPTADLNHGTHVAG
TVAALNNSIGVIGVAPNAELYAVKVLGANGSGSVSGIAQGLEWAATNNMHIANMSLGSDAPSTTLERAVNYATSQ
VLVIAATGNNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYGTGIDIVAPGVNVQSTYPGNRYVSMNGTSMATPH
VAGAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATNLGNSSQFGSGLVNAEAAATR。

[0387] 编码BG1-B08枯草杆菌蛋白酶的核苷酸序列如SEQ ID NO:64所示:

[0388] CAACAAACAGTGCCATGGGGAATTACTCGTGTGCAAGCCCCAGCTGTTTCATAACCGTGAATTACAGG
TTCTGGTGTAAAGATTGCTATCCTCGATTACAGTATTTCCGCCCATAGTGACTTAAATATTCGTGGTGGCGCTAGC
TTTGTACCAGGGGAACCAACGACTGCTGATTTAAATGGGCATGGCACGCATGTGGCTGGGACGGTAGCTGCTTTAA
ACAATTTCGATTGGCGTTATTGGCGTAGCACCGAACGCGAACTATACGCTGTAAAAGTATTAGGGGCGAATGGTTC
AGGTTTCGGTCAGCGGGATTGCCAAGGATTGGAATGGGCAGCAACCAATAACATGCACATTGCTAATATGAGTTTA
GGAAGCGATTTTCCAAGTTCTACACTTGAGCGTGCTGTTAATTATGCGACTTCTCAAGGCGTCTTGTATTGCGG
CAACTGGGAATAACGGTCTGGCTCAGTAGGCTATCCGGCCCCTTATGCGAACGCAATGGCAGTCGGAGCTACTGA
CCAAAACAACAGACGCGCAACTTTTCACAGTATGGCACGGGGATTGACATTGTCGCACCAGGTGTAACGTGCAG
AGCACATAACCAGGTAACCGTTATGTGAGCATGAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTGCAGGTGCAGCAG
CCCTTGTTAAACAACGCTATCCATCTTGAATGCGACTCAAATCCGCAATCATCTAAAGAATACGGCAACGAATTT
AGGAAACACAAATCTGTATGGAAGCGGACTTGTCAATGCAGAAGCGGCAACACGC。

[0389] BG1-B08枯草杆菌蛋白酶的成熟形式的预测氨基酸序列如SEQ ID NO:65所示:

[0390] QQTVPWGITRVQAPAVHNRGITGSGVRVAILDSGISAHSDLNIRGGASFVPGEPTADLNHGTHVAG
TVAALNNSIGVIGVAPNAELYAVKVLGANGSGSVSGIAQGLEWAATNNMHIANMSLGSDFPSSTTLERAVNYATSQ
VLVIAATGNNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYGTGIDIVAPGVNVQSTYPGNRYVSMNGTSMATPH
VAGAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATNLGNTNLYGSGLVNAEAAATR。

[0391] 编码BG4-A09枯草杆菌蛋白酶的核苷酸序列如SEQ ID NO:66所示:

[0392] CAACAAACAGTGCCATGGGGAATTACTCGTGTGCAAGCCCCAGCTGTTTCATAACCGTGGAGTTACAGGTTCTGGTGTAAAGATTGCTGTTCTCGATACAGGTATTTCCGCCATAGTACTTAAATATTCGTGGTGGCGCTAGCTTTGTACCAGGGGAACCAACGACTGCTGATTTAAATGGGCATGGCACGCATGTGGCTGGGACGGTAGCTGCTTTAAACAATTCGATTGGCGTTATTGGCGTAGCACCGAACGCGGAACTATACGCTGTTAAAGTATTAGGGGCGAATGGTTCAGGTTTCGGTTCAGCGGATTGCCAAGGATTGGAATGGGCAGCAACCAATAACATTCACATTGCTAATATGAGTTTAAAGAACAGATGCACCAAGTACAACACTTGAGCGTGCTGTTAATTATGCGACTTCTCAAGGCGTCTTGTATTGCGGCAACTGGGAATAACGGTCTGGCACAATTTTCATATCCGGCCCCGTTATGCGAACGCAATGGCAGTCGGAGCTACTGACCAAAACAACAATCGCGCCTCATTTCACAGTATGGCGCAGGGCTGGACATTGTCGCACCAGGTGTAACGTGCAGAGCACATAACCAGGTAACCGTTATGTGAGCATGAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTGCAGGTGCAGCAGCCCTTGTTAAACAACGCTATCCATCTTGAATGCGACTCAAATCCGCAATCATCTAAAGAATACGGCAACGAATTTAGGAAACTCTTACAATTTGGAAGCGGACTTGTCAATGCAGAAGCGGCAACACGC。

[0393] BG4-A09枯草杆菌蛋白酶的成熟形式的预测氨基酸序列如SEQ ID NO:67所示:

[0394] QQTVPWGITRVQAPAVHNRGVTGSGVRVAVLDTGISAHSDLNIRGGASFPGEPTADLNHGHTHVAGTVAALNNSIGVIGVAPNAELYAVKVLGANGSGSVSGIAQGLEWAATNNIHANMSLGTDPSTTLERAVNYATSQGLVIAATGNNGSGTISYPARYANAMAVGATDQNNRRASFQYAGLDIVAPGVNVQSTYPGNRYVSMNGTSMATPHVAGAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATNLGNSSQFGSGLVNAEAATR。

[0395] 编码BG4-D10枯草杆菌蛋白酶的核苷酸序列如SEQ ID NO:68所示:

[0396] CAACAAACAGTGCCATGGGGAATTACTCGTGTGCAAGCCCCAGCTGTTTCATAACCGTGGATTTACAGGTTCTGGTGTAAAGATTGCTATCCTCGATTACAGGTATTTCCACACATAGTACTTAAATTCGTGGTGGCGCTAGCTTTGTACCAGGGGAACCAACGACTGCTGATTTAAATGGGCATGGCACGCATGTGGCTGGGACGGTAGCTGCTTTAAACAATTCGATTGGCGTTCTGGGCGTAGCACCGAACGCGGAACTATACGCTGTTAAAGTATTAGGGGCGAATGGTTCAGGTTTCGATTAGCGGGATTGCCAAGGATTGGAATGGGCAGCAGCAATAACATGCACATTGCTAATATGAGTTTAAAGAACAGATGCACCAAGTTCTACACTTGAGCGTGCTGTTAATTATGCGACTTCTCAAGGCGTCTTGTATTGCGGCAACTGGGAATAACGGTCTGGCACAATTTTCATATCCGGCCCCGTTATGCGAACGCAATGGCAGTCGGAGCTACTGACCAAAACAACAGACGCGCAACTTTTCACAGTATGGCTCAGGGATTGACATTGTCGCACCAGGTGTAACGTGCAGAGCACATAACCAGGTAACCGTTATGCAAGCCTGTGAGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTGCAGGTGCAGCAGCCCTTGTTAAACAACGCTATCCATCTTGAATGCGACTCAAATCCGCAATCATCTAAAGAATACGGCAACGAATTTAGGAAACTCTTACAATTTGGAAGCGGACTTGTCAATGCAGAAGCGGCAACACGC。

[0397] BG4-D10枯草杆菌蛋白酶的成熟形式的预测氨基酸序列如SEQ ID NO:69所示:

[0398] QQTVPWGITRVQAPAVHNRGFTGSGVRVAILDSGISTHSDLTIRGGASFPGEPTADLNHGHTHVAGTVAALNNSIGVLGVAPNAELYAVKVLGANGSGSISGIAQGLEWAAANMHIANMSLGTDPSSTLERAVNYATSQGLVIAATGNNGSGTISYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYSGSIDIVAPGVNVQSTYPGNRYASLSGTSMATPHVAGAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATNLGNSSQFGSGLVNAEAATR。

[0399] 编码BG2-B08枯草杆菌蛋白酶的核苷酸序列如SEQ ID NO:70所示:

[0400] CAACAAACAGTGCCATGGGGAATTACTCGTGTGCAAGCCCCAGCTGTTTCATAACCGTGGAAATTACAGGTTCTGGTGTAAAGATTGCTATCCTCGATTACAGGTATTTCCGCCATAGTACTTAAATATTCGTGGTGGCGCTAGCTTTGTACCAGGGGAACCAACGACTGCTGATTTAAATGGGCATGGCACGCATGTGGCTGGGACGGTAGCTGCTTTAAACAATTCGATTGGCGTTATTGGCGTAGCACCGAACGCGGAACTATACGCTGTTAAAGTATTAGGGGCGTCAGGTTTCAGGTTTCGATTAGCGGGATTGCCAAGGATTGCAATGGGCAGCAACCAATAACATGCACATTGCTAATATGAGTTTAAAGAACAGATGCACCAAGTACAACACTTGAGCGTGCTGTTAATTATGCGACTTCTCAAGGCGTCTTGTATTGCGGCAACTGGGAATAACGGTCTGGCACAATTTTCATATCCGGCCCCGTTATGCGAACGCAATGGCAGTCGGAGCTACTGACCAAAACAACAATCGCGCCTCATTTCACAGTATGGCGCAGGGCTGGACATTGTCGCACCAGGTGTAACGTGCAGAGCACATAACCAGGTAACCGTTATGTGAGCATGAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTGCAGGTGCAGCAGCCCTTGTTAAACAACGCTATCCATCTTGAATGCGACTCAAATCCGCAATCATCTAAAGAATACGGCAACGAATTTAGGAAACTCTTACAATTTGGAAGCGGACTTGTCAATGCAGAAGCGGCAACACGC。

GGAAGCGATGCACCAAGTACAACACTTGAGCGTGCTGTTAATTATGCGACTTCTAGAGATGTTCTTGTATTGCGG
CAACTGGGAATAACGGTTCTGGCTCAGTAGGCTATCCGGCCCCTTATGCGAACGCAATGGCAGTCGGAGCTACTGA
CCAAAACAACAGACGCGCCAACCTTTTCACAGTATGGCACGGGGATTGACATTGTCGCACCAGGTGTAAACGTGCAG
AGCACATAACCAGGTAACCGTTATGTGAGCATGAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTGCAGGTGCAGCAG
CCCTTGTTAAACAACGCTATCCATCTTGAATGCGACTCAAATCCGCAATCATCTAAAGAATACGGCAACGAATTT
AGGAAACTCTTACAATTTGGAAGCGGACTTGTCAATGCAGAAGCGGCAACACGC。

[0401] BG2-B08枯草杆菌蛋白酶的成熟形式的预测氨基酸序列如SEQ ID NO:71所示:

[0402] QQTVPWGITRVQAPAVHNRGITGSGVRVAILDSGISAHSDLNIRGGASFPGEPTADLNHGHTHVAG
TVAALNNSIGVIGVAPNAELYAVKVLGASGSGSISGIAQGLQWAATNNMHIANMSLGS DAPSTTLERAVNYATSRD
VLVIAATGNNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYGTGIDIVAPGVNVQSTYPGNRYVSMNGTSMATPH
VAGAAALVKQRYPSWNTQIRNHLKNTATNLGNSSQFGSGLVNAEAATR。

[0403] 编码BG8-B03枯草杆菌蛋白酶的核苷酸序列如SEQ ID NO:72所示:

[0404] GCACAAACAGTGCCATGGGGAATTACTCGTGTGCAAGCCCCAGCTGTCATAACCGTGAATTACAGG
TTCTGGTGTAAAGAGTTGCTATCCTCGATTCAGGTAATTTCCGCCATAGTACTTAAACAATTCGTGGTGGCGCTGC
TTTGTACCAGGGGAACCAACGACTGCTGATTTAAATGGGCATGGCACGCATGTGGCTGGGACGGTAGCTGCTTTAA
ACAATTCGATTGGCGTTATTGGCGTAGCACCGTCAGCGGATCTATACGCTGTAAAGTATTAGGGGCGAATGGTAG
AGGTTCCGGTCAGCGGGATTGCCAAGGATTGGAATGGGCAGCAACCAATAACATGCACATTGCTAATATGAGTTTA
GGAAGCGATGCACCAAGTACAACACTTGAGCGTGCTGTTAATTATGCGACTTCTCAAGGCGTCTTGTATTGCGG
CAACTGGGAATAACGGTTCTGGCTCAGTAGGCTATCCGGCCCCTTATGCGAACGCAATGGCAGTCGGAGCTACTGA
CCAAAACAACAATCGCGCCTCATTTTCACAGTATGGCGCAGGGCTGGACATTGTCGCACCAGGTGTAAACGTGCAG
AGCACATAACCAGGTAACCGTTATGTGAGCATGAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTGCAGGTGTTGCAG
CCCTTGTTAAACAACGCTATCCATCTTGAATGCGACTCAAATCCGCAATCATCTAAAGAATACGGCAACGAATTT
AGGAAACTCTTACAATTTGGAAGCGGACTTGTCAATGCAGAAGCGGCAACACGC。

[0405] BG8-B03枯草杆菌蛋白酶的成熟形式的预测氨基酸序列如SEQ ID NO:73所示:

[0406] AQTVPWGITRVQAPAVHNRGITGSGVRVAILDSGISAHSDLTIRGGASFPGEPTADLNHGHTHVAG
TVAALNNSIGVIGVAPSADLYAVKVLGANGRGSVSGIAQGLEWAATNNMHIANMSLGS DAPSTTLERAVNYATSQG
VLVIAATGNNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNNRASFSQYAGLDIVAPGVNVQSTYPGNRYVSMNGTSMATPH
VAGVAALVKQRYPSWNTQIRNHLKNTATNLGNSSQFGSGLVNAEAATR。

[0407] 编码BG6-A10枯草杆菌蛋白酶的核苷酸序列如SEQ ID NO:74所示:

[0408] CAACAAACAGTGCCATGGGGAATTACTCGTGTGCAAGCCCCAGCTGTCATAACCGTGAATTACAGG
TTCTGGTGTAAAGAGTTGCTATCCTCGATTCAGGTAATTTCCGCCATAGTACTTAAATATTCGTGGTGGCGCTAGC
TTTGTACCAGGGGAACCAACGACTGCTGATTTAAATGGGCATGGCACGCATGTGGCTGGGACGGTAGCTGCTTTAA
ACAATTCGATTGGCGTTATTGGCGTAGCACCGAACGCGGAACCTATACGCTGTAAAGTATTAGGGGCGTCAGGTTT
AGGTTCCGGTCAGCGGGATTGCCAAGGATTGGAATGGGCAGCAACCAATAACATGCACATTGCTAATATGAGTTTA
GGAAGCGATTTTCCAAGTTCTACACTTGAGCGTGCTGTTAATTATGCGACTTCTAGAGATGTTCTTGTATTGCGG
CAACTGGGAATAACGGTTCTGGCTCAGTAGGCTATCCGGCCCCTTATGCGAACGCAATGGCAGTCGGAGCTACTGA
CCAAAACAACAGACGCGCCAACCTTTTCACAGTATGGCACGGGGATTGACATTGTCGCACCAGGTGTAAACGTGCAG
AGCACATAACCAGGTAACCGTTATGTGAGCATGAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTGCAGGTGCAGCAG
CCCTTGTTAAACAACGCTATCCATCTTGAATGCGACTCAAATCCGCAATCATCTAAAGAATACGGCAACGAATTT

AGGAAACACAAATCTGTATGGAAGCGGACTTGTCAATGCAGAAGCGGCAACACGC。

[0409] BG6-A10枯草杆菌蛋白酶的成熟形式的预测氨基酸序列如SEQ ID NO:75所示:

[0410] QQTVPWGITRVQAPAVHNRGITGSGVRVAILDSGISAHSDLNIRGGASFPGEPTADLNHGHTHVAG
TVAALNNSIGVIGVAPNAELYAVKVLGASGSGSVSGIAQGLEWAATNMHIANMSLGSDFPSSTLERAVNYATSRD
VLVIAATGNNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYGTGIDIVAPGVNVQSTYPGNRYVSMNGTSMATPH
VAGAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATNLGNTNLYGSLVNAEAATR。

[0411] 编码BG6-D08枯草杆菌蛋白酶的核苷酸序列如SEQ ID NO:76所示:

[0412] CAACAATCAGTGCCATGGGGAATTCACGTGTGCAAGCCCCAGCTGTCATAACCGTGAATTACAGG
TTCAGGTGTAAGAGTTGCTATCCTCGATTACAGTATTTCCGCCATAGTGACTTAAATATTCGTGGTGGCGCTAGC
TTTGTACCAGGGGAACCAACGACTGCTGATTTAAATGGGCATGGCACGCATGTGGCTGGGACGGTAGCTGCTTTAA
ACAATTCGATTGGCGTTATTGGCGTAGCACCGTCAGCGGATCTATACGCTGTAAAGTATTAGGGCGAATGGTTC
AGGTTTCGGTCAGCGGGATTGCCAAGGATTGGAATGGGCAGCAGCAAATAACATGCACATTGCTAATATGAGTTTA
GGAAGCGATTTTCCAAGTTCTACACTTGAGCGTGCTGTTAATTATGCGACTTCTAGAGATGTTCTTGTATTGCGG
CAACTGGGAATAACGGTTCTGGCTCAGTAGGCTATCCGGCCC GTTATGCGAACGCAATGGCAGTCGGAGCTACTGA
CCAAAACAACAGACGCGCCAACCTTTTCACAGTATGGCACGGGGATTGACATTGTCGCACCAGGTGTAACGTGCAG
AGCACATAACCAGGTAACCGTTATGTGAGCATGAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTGCAGGTGCAGCAG
CCCTTGTTAAACAACGCTATCCATCTTGAATGCGACTCAAATCCGCAATCATCTAAAGAATACGGCAACGAATTT
AGGAAACACAAATCTGTATGGAAGCGGACTTGTCAATGCAGAAGCGGCAACACGC。

[0413] BG6-D08枯草杆菌蛋白酶的成熟形式的预测氨基酸序列如SEQ ID NO:77所示:

[0414] QQTVPWGITRVQAPAVHNRGITGSGVRVAILDSGISAHSDLNIRGGASFPGEPTADLNHGHTHVAG
TVAALNNSIGVIGVAPNAELYAVKVLGASGSGSVSGIAQGLEWAATNMHIANMSLGSDFPSSTLERAVNYATSRD
VLVIAATGNNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYGTGIDIVAPGVNVQSTYPGNRYVSMNGTSMATPH
VAGAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATNLGNTNLYGSLVNAEAATR。

[0415] 编码BG5-G10枯草杆菌蛋白酶的核苷酸序列如SEQ ID NO:78所示:

[0416] CAACAAACAGTGCCATGGGGAATTA CTCTGTGCAAGCCCCAGCTGTCATAACCGTGAATTACAGG
TTCTGGTGTAAAGTTGCTATCCTCGATTACAGTATTTCCGCCATAGTGACTTAAATATTCGTGGTGGCGCTAGC
TTTGTACCAGGGGAACCAACGACTGCTGATTTAAATGGGCATGGCACGCATGTGGCTGGGACGGTAGCTGCTTTAA
ACAATTCGATTGGCGTTATTGGCGTAGCACCGTCAGCGGATCTATACGCTGTAAAGTATTAGGGCGAATGGTTC
AGGTTTCGGTCAGCGGGATTGCCAAGGATTGGAATGGGCAGCAACCAATAACATGCACATTGCTAATATGAGTTTA
GGAAGCGATTTTCCAAGTTCTACACTTGAGCGTGCTGTTAATTATGCGACTTCTAGAGATGTTCTTGTATTGCGG
CAACTGGGAATAACGGTTCTGGCTCAGTAGGCTATCCGGCCC GTTATGCGAACGCAATGGCAGTCGGAGCTACTGA
CCAAAACAACAGACGCGCCAACCTTTTCACAGTATGGCACGGGGATTGACATTGTCGCACCAGGTGTAACGTGCAG
AGCACATAACCAGGTAACCGTTATGTGAGCATGAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTGCAGGTGCAGCAG
CCCTTGTTAAACAACGCTATCCATCTTGAATGCGACTCAAATCCGCAATCATCTAAAGAATACGGCAACGAATTT
AGGAAACACAAATCTGTATGGAAGCGGACTTGTCAATGCAGAAGCGGCAACACGC。

[0417] BG5-G10枯草杆菌蛋白酶的成熟形式的预测氨基酸序列如SEQ ID NO:79所示:

[0418] QQTVPWGITRVQAPAVHNRGITGSGVRVAILDSGISAHSDLNIRGGASFPGEPTADLNHGHTHVAG
TVAALNNSIGVIGVAPSADLYAVKVLGANGSGSVSGIAQGLEWAATNMHIANMSLGSDFPSSTLERAVNYATSRD
VLVIAATGNNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYGTGIDIVAPGVNVQSTYPGNRYVSMNGTSMATPH

VAGAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATNLGNTNLYGSGLVNAEAAATR。

[0419] 编码BG5-E02枯草杆菌蛋白酶的核苷酸序列如SEQ ID NO:80所示:

[0420] CAACAAACAGTGCCATGGGGAATTCACGTGTGCAAGCCCCAGCTGTTTCATAACCGTGAATTACAGGTTCTGGTGTAAAGATTGCTATCCTCGATTACAGGATTTCCGCCCATAGTACTTAAATATTCGTGGTGGCGCTAGCTTTGTACCAGGGGAACCAACGACTGCTGATTTAAATGGGCATGGCACGCATGTGGCTGGGACGGTAGCTGCTTTAAACAATTCGATTGGCGTTATTGGCGTAGCACCGAACGCGGAACCTATACGCTGTAAAGTATTAGGGGCGTCAGGTTACAGGTTTCGATTAGCGGGATTGCCAAGGATTGGAATGGGCAGCAACCAATAACATGCACATTGCTAATATGAGTTTAAAGGAAAGCGATGCACCAAGTACAACACTTGAGCGTGCTGTTAATTATGCGACTTCTAGAGATGTTCTTGTATTGCGGCAACTGGGAATAACGGTTCTGGCTCAGTAGGCTATCCGGCCCCTTATGCGAACGCAATGGCAGTCGGAGCTACTGCCAAAACAACAGACGCGCAACTTTTCACAGTATGGCACGGGGATTGACATTGTCGCACCAGGTGTAACGTGCAGAGCACATAACCAGGTAACCGTTATGTGAGCATGAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTGCAGGTGCAGCAGCCCTTGTTAAACAACGCTATCCATCTTGAATGCGACTCAAATCCGCAATCATCTAAAGAATACGGCAACGAATTTAGGAAACACAAATCTGTATGGAAGCGGACTTGTCAATGCAGAAGCGGCAACACGC。

[0421] BG5-E02枯草杆菌蛋白酶的成熟形式的预测氨基酸序列如SEQ ID NO:81所示:

[0422] QQTVPWGISRVQAPAVHNRGITGSGVRVAILDSGISAHSDLNIRGGASFPGEPTTADLNHGHTHVAGTVAALNNSIGVIGVAPNAELYAVKVLGASGSGSISGIAQGLEWAATNNMHIANMSLGSDAPSTTLERAVNYATSRDVLVIAATGNNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYGTGIDIVAPGVNVQSTYPGNRYVSMNGTSMATPHVAGAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATNLGNTNLYGSGLVNAEAAATR。

[0423] 编码BG2-G08枯草杆菌蛋白酶的核苷酸序列如SEQ ID NO:82所示:

[0424] CAACAAACAGTGCCATGGGGAATTACTCGTGTGCAAGCCCCAGCTGTTTCATAACCGTGAATTACAGGTTCTGGTGTAAAGATTGCTATCCTCGATTACAGGATTTCCGCCCATAGTACTTAAATATTCGTGGTGGCGCTAGCTTTGTACCAGGGGAACCAACGACTGCTGATTTAAATGGGCATGGCACGCATGTGGCTGGGACGGTAGCTGCTTTAAACAATTCGATTGGCGTTATTGGCGTAGCACCGAACGCGGAACCTATACGCTGTAAAGTATTAGGGGCGAATGGTTACAGGTTTCGATCAGCGGGATTGCCAAGGATTGGAATGGGCAGCAACCAATAACATGCACATTGCTAATATGAGTTTAAAGGAAAGCGATGCACCAAGTACAACACTTGAGCGTGCTGTTAATTATGCGACTTCTGCAGGCGTTCTTGTGTTGCGGCAACTGGGAATAACGGTTCTGGCTCAGTAGGCTATCCGGCCCCTTATGCGAACGCAATGGCAGTCGGAGCTACTGCCAAAACAACAGACGCGCAACTTTTCACAGTATGGCACGGGGATTGACATTGTCGCACCAGGTGTAACGTGCAGAGCACATAACCAGGTAACCGTTATGTGAGCATGAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTGCAGGTGCAGCAGCCCTTGTTAAACAACGCTATCCATCTTGAATGCGACTCAAATCCGCAATCATCTAAAGAATACGGCAACGAATTTAGGAAACTCTTACAATTTGGAAGCGGACTTGTCAATGCAGAAGCGGCAACACGC。

[0425] BG2-G08枯草杆菌蛋白酶的成熟形式的预测氨基酸序列如SEQ ID NO:83所示:

[0426] QQTVPWGITRVQAPAVHNRGITGSGVRVAILDSGISAHSDLNIRGGASFPGEPTTADLNHGHTHVAGTVAALNNSIGVIGVAPNAELYAVKVLGANGSGSVSISGIAQGLEWAATNNMHIANMSLGSDAPSTTLERAVNYATSAGVLVVAATGNNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYGTGIDIVAPGVNVQSTYPGNRYVSMNGTSMATPHVAGAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATNLGNSSQFGSGLVNAEAAATR。

[0427] 实施例12

[0428] 数种吉氏芽孢杆菌-进化枝枯草杆菌蛋白酶以及其它已知枯草杆菌蛋白酶的清洁性能比较

[0429] 如实施例6中所述,针对衣物类应用在BMI(棉织物上的血液/乳/墨水)微样本上并

且在卵黄(用于餐具类应用)上测量吉氏芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶Bgi02446、DSM 9728和DSM 9731以及来自以下其它芽孢杆菌属菌种的枯草杆菌蛋白酶的相对清洁性能:地衣芽孢杆菌(BliD02330 (SEQ ID NO:84))、芽孢杆菌m3-13((枯草杆菌蛋白酶E (SEQ ID NO:85))、芽孢杆菌LG12 (LG12SprC (SEQ ID NO:86))、迟缓芽孢杆菌 (P29600 (SEQ ID NO:87))和解淀粉芽孢杆菌 (CAA24990 (SEQ ID NO:88))。所使用的洗涤剂Kirkland Ultra HDD (Sun Products)、OMO Klein&Krachtig HDL (Unilever) 和GSM-B pH10.5 (对于ADW) 描述于表6.1中。蛋白酶在不同洗涤剂中的相对清洁性能示于表12.1中,其中LG12SprC枯草杆菌蛋白酶是针对其来评级清洁性能提高或降低的基线。

[0430] 地衣芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶BliD02339的成熟形式的氨基酸序列如SEQ ID NO:84所示:

[0431] AQTVPYGIPLIKADKVKQAQGFKGANVKVAVLDTGIQASHPDLNVVGGASFVAGEAYNTDGNHGHGTHVAGTVAALDNTTGV LGVAPNVSLYAVKVLNSSGSGSYSGIVSGIEWATTNGMDVINMSLGGPSGSTAMKQAVDNAYARGVVVVAAGNSGSSGNTNTIGYPAKYDSVIAVGAVDSNSNRASFSSVGAKLEVMAPGAGVYSTYPTSTYATLNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNLSASQVRNLSSTATYLGSSFFYYGKGLINVEAAAQ。

[0432] 芽孢杆菌m3-13枯草杆菌蛋白酶E的成熟形式的氨基酸序列如SEQ ID NO:85所示:

[0433] AQTVPWGIPHIKADKAHASGVTGSGVKVAVLDTGIDANHADLNVKGGASFVSGEPNALQDGNHGHGTHVAGTVAALNNTTGV LGVAYNADLYAVKVL SASGSGTSLGIAQGIIEWSIANDMDVINMSLGGSTGSTALLQACDNAYASGIVVVAAGNSGSKGKRNTMGYPARYSSVIAVGAVDSSNNRASFSVSGSELEVMAPGVSILSTTPGNNYSSFNGTSMASPHVAGAAALIKAKYPSMTNVQIREKLKNTATNLGDAFYFGHGVINVESALQ。

[0434] 芽孢杆菌LG12SprC AAC43580的成熟形式的氨基酸序列如SEQ ID NO:86所示:

[0435] AQTVPWGIPHIKADKAHAAGVTGSGVKVAILDTGIDANHADLNVKGGASFVSGEPNALQDGNHGHGTHVAGTVAALNNTTGV LGVAYNADLYAVKVL SASGSGTSLGIAQGIIEWSISNGMNVINMSLGGSSGSTALLQACNNAYNRGIVVIAAAGNSGSSGNRNTMGYPARYSSVIAVGAVSSNTRASFSSVSGSELEVMAPGVNLSLSTTPGNNYASFNGTSMASPHVAGAAALIKAKYPSMTNVQIRERLKNTATNLGDPFFYYGKGVINVESALQ。

[0436] 迟缓芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶P29600的成熟形式的氨基酸序列如SEQ ID NO:87所示:

[0437] QSVPWGISRVQAPAAHNRGLTSGSGVKVAVLDTGISTHPDLNIRGGASFVPGEPSTQDGNHGHGTHVAGTIAALNNSIGVLGVAPS AELYAVKVLGASGSGSVSSIAQGLEWAGNNGMHVANLSLGSPSPSATLEQAVNSATSRGVLVVAASGNSGAGSISYPARYANAMAVGATDQNNNRASFSSQYGAGLDIVAPGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGAAALVKQKNPSWSNVQIRNHLKNTATSLGSTNLYGSGLVNAEAATR。

[0438] 解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶CAA24990的成熟形式的氨基酸序列如SEQ ID NO:88所示:

[0439] AQSVPYGVSVQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLKVVAGGASMVPSETNPFQDNNSHGTHVAGTVAALNNSIGVLGVAPSASLYAVKVLGADGSGQYSWIINGIEWAIANNMDVINMSLGGPSGSAALKA AVDKAVASGVVVVAAAGNEGTS GSSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSSNQ RASFSSVGP ELDMAPGVS IQSTLPGNKYGAYNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNWTNTQVRSSLENTTKLGD SFYYGKGLIN VQAAAQ。

[0440] 表12.1多种吉氏芽孢杆菌-进化枝枯草杆菌蛋白酶相对于其它枯草杆菌蛋白酶的相对清洁性能

		相对清洁性能 +/-是中性; +是可以; ++是良好; +++是更佳; ++++是甚至更佳; +++++是最佳		
芽孢杆菌属生物	枯草杆菌蛋白酶	ADW	HDL	HDD
[0441] 吉氏芽孢杆菌 (<i>B. gibsonii</i>)	Bgi02446	+++	++	++++
吉氏芽孢杆菌 (<i>B. gibsonii</i>)	DSM9728	+++	+	ND*
吉氏芽孢杆菌 (<i>B. gibsonii</i>)	DSM9731	+++	+/-	ND*
地衣芽孢杆菌 (<i>B. licheniformis</i>)	Blid02339	+/-	+/-	+/-
芽孢杆菌 (<i>Bacillus sp.</i>) m3-13	枯草杆菌蛋白酶 E	+	+/-	+/-
芽孢杆菌 (<i>Bacillus sp.</i>) LG12	LG12 SprC	+	+	+
迟缓芽孢杆菌 (<i>B. lentus</i>)	P29600	++	++	+++++
解淀粉芽孢杆菌 (<i>B. amyloliquefaciens</i>)	CAA24990	+	++	+

[0442] *未确定

[0443] 实施例13

[0444] 吉氏芽孢杆菌-进化枝蛋白酶的清洁性能和稳定性

[0445] 用Agilent (U) HPLC系统来由培养上清液进行吉氏芽孢杆菌-进化枝蛋白酶测定。制作使用经纯化Bgi02466蛋白的校准曲线(0ppm-500ppm)。将吉氏芽孢杆菌-进化枝蛋白酶在稀释缓冲液(Tris 25mM, pH 7.4, 5mM CaCl₂)中稀释10倍,然后以1:1比与乙腈缓冲液(Tris 22.5mM, pH 7.4, 4.5mM CaCl₂, 9%乙腈)混合。然后,使用45μm过滤板过滤样品并通过自动取样器上样到反相柱(Zorbax 300SB-C3柱, 2.1×100mm&2.1×50mm,二者均具有1.8 μm珠尺寸)上。用缓冲液A(0.1%三氟乙酸)和缓冲液B(0.07%乙腈)的梯度从柱洗脱样品。流量为1mL/分钟,运行4分钟,在运行平衡之后1分钟。在220nm下测量吸光度并使用ChemStation软件(Agilent Technologies)来对峰进行积分。基于经纯化亲本酶的标准曲线来计算样品的蛋白质浓度。

[0446] 如实施例6中所述,(i)使用BMI微样本(EMPA-116)在液体衣物洗涤剂OMO Klein&Krachtig(OMO HDL)中以及(ii)使用GSM-B pH 10.5配方和卵黄微样本(AS-38)在餐具类应用(ADW)中测量实施例11中所述的每种吉氏芽孢杆菌-进化枝蛋白酶以及Bgi02446、DSM 9728和DSM 9731的清洁性能对于ADW测定,将预穿孔的PAS-38样本漂洗或不漂洗。为了制作经漂洗的PAS38样本,向含有PAS38μ样本的微板添加180μl 10mM CAPS缓冲液pH11。将板密封并在60℃和1100rpm摇动下在iEMS培养箱中温育30分钟。在温育之后,使用Biotek洗板器来去除缓冲液,并将样本用软化水漂洗以除去任何残余的CAPS缓冲液。将板风干,之后用于进行性能测定。

[0447] 在温育之后,使用SpectraMax读板仪在405nm下读取EMPA-116和PAS-38样本的吸

光度。通过从每个样品值减去空白对照(无酶)的值来获得吸光度结果。通过将给定蛋白质的吸光度值除以Bgi02446在相同浓度下的吸光度值来获得每种测定条件的清洁PI。通过将亲本的标准曲线与Langmuir拟合或Hill Sigmodial拟合进行拟合来确定Bgi02446值。新蛋白酶在不同洗涤剂中的清洁性能作为相比较于野生型Bgi02446枯草杆菌蛋白酶的PI示于表13.1中。

[0448] 在两种应激条件下测试变体的稳定性以通过测量在升高温度下温育之后的残余活性来测量蛋白质稳定性。一种测试条件是:50mM Tris pH9;1mM EDTA;0.005%Tween (Tris/EDTA),在52℃下温育。另一种测试条件:50mM Tris pH9;2mM CaCl₂;0.005%Tween (Tris/CA),在72℃下温育。将经稀释的酶样品在应激器中混合,并测量未受应激的蛋白酶活性。将在应激器中的经稀释样品在升高的温度下温育,并且在温育之后,测量受到应激的蛋白酶活性。对于未受应激的条件,立即测定酶对DMC的活性。对于受到应激的条件,将PCR板密封并使用Eppendorf 384热循环仪在升高的温度下温育5分钟,然后测定活性。通过合成底物DMC的水解来测量受到应激和未受应激的活性:用于DMC测定的试剂溶液是:在100mM碳酸钠pH 9.5中的2.5%二甲基酪蛋白(DMC,Sigma)、在试剂A中的0.075%TNBSA(2,4,6-三硝基苯磺酸,Thermo Scientific)。试剂A:在15mL 4N NaOH中的45.4g Na₂B₄O₇·10H₂O(Merck),在MQ水中达到1000mL的终体积,经稀释溶液:10mM NaCl、0.1mM CaCl₂、0.005% Tween-80、0.02%叠氮化钠。在添加2.5uL的20ppm蛋白酶上清液之后,用47.5uL DMC底物填充MTP(Greiner PS-微孔384)。然后,在缓慢混合下添加50uL在试剂A中的TNBSA。使用SpectraMax读板仪在RT下以动力学模式于405nm处经5分钟测量活性。将活性表示为mOD*分钟⁻¹。通过取得受应激活性:未受应激活性之比并乘以100来计算残余活性%。通过将所考虑蛋白质的残余活性除以Bgi02446的残余活性来获得稳定性PI,并且结果示于表13.1。

[0449] 表13.1吉氏芽孢杆菌-进化枝枯草杆菌蛋白酶的清洁性能和稳定性

[0450]

蛋白质	ADW pH 10.5 经漂洗	ADW pH 10.5 未经漂洗	OMO HDL	Tris/EDTA 稳定性	Tris/Ca 稳 定性
BG1-B08	1.1	1.0	1.2	1.4	1.4
BG1-C05	1.8	3.2	1.4	1.0	1.1
BG2-B08	1.3	1.5	1.0	1.2	1.2
BG2-D10	1.3	1.3	1.3	1.0	1.1
BG2-G08	1.1	1.1	1.1	1.1	1.4
BG4-A09	1.3	1.3	1.1	2.0	2.0

[0451]	BG4-D10	1.1	1.1	1.0	1.6	1.8
	BG5-E02	1.2	1.7	1.3	1.7	1.7
	BG5-E05	1.0	1.0	0.9	1.6	1.4
	BG5-F02	1.0	1.1	1.1	1.1	1.0
	BG5-G10	1.1	1.2	1.1	1.6	1.4
	BG6-A10	1.1	1.2	0.9	1.4	1.3
	BG6-D08	1.0	1.0	1.1	1.5	1.1
	BG8-B03	1.3	1.4	1.0	1.5	1.1
	Bgi02446	1	0.96	1.1	1	1
	DSM9728	1.2	1.8	0.95	0.25	0.28
	DSM9731	1.2	1.6	0.9	0.4	0.65

[0452] 实施例14

[0453] 吉氏芽孢杆菌-进化枝枯草杆菌蛋白酶的序列分析

[0454] 使用CLUSTALW软件(Thompson等人,Nucleic Acids Research,22:4673-4680,1994)以默认参数来比对以下的预测成熟形式的氨基酸序列:BG1-B08(SEQ ID NO:65)、BG1-C05(SEQ ID NO:61)、BG2-B08(SEQ ID NO:71)、BG2-D10(SEQ ID NO:63)、BG2-G08(SEQ ID NO:83)、BG4-A09(SEQ ID NO:67)、BG4-D10(SEQ ID NO:69)、BG5-E02(SEQ ID NO:81)、BG5-E05(SEQ ID NO:59)、BG5-F02(SEQ ID NO:57)、BG5-G10(SEQ ID NO:79)、BG6-A10(SEQ ID NO:75)、BG6-D08(SEQ ID NO:77)、BG8-B03(SEQ ID NO:73)、Bgi02446(SEQ ID NO:4)、DSM9728(SEQ ID NO:11)、DSM9729(SEQ ID NO:15)、DSM9730(SEQ ID NO:19)和DSM9731(SEQ ID NO:23)。图10A-C示出了CLUSTAL W(1.83)多序列比对。图10A-C中所比对序列的分析表明,它们全部都含有SEQ ID NO:47或90中所示的序列基序。

[0455] 除DSM 9728,DSM 9729,DSM 9730,DSM 9731枯草杆菌蛋白酶成熟形式的氨基酸序列之外,还使用表7-1和7-2中所列的多个蛋白酶的氨基酸序列来建立以下吉氏芽孢杆菌-进化枝成员的预测成熟形式的氨基酸序列的系统发育树:BG1-B08(SEQ ID NO:65)、BG1-C05(SEQ ID NO:61)、BG2-B08(SEQ ID NO:71)、BG2-D10(SEQ ID NO:63)、BG2-G08(SEQ ID NO:83)、BG4-A09(SEQ ID NO:67)、BG4-D10(SEQ ID NO:69)、BG5-E02(SEQ ID NO:81)、BG5-E05(SEQ ID NO:59)、BG5-F02(SEQ ID NO:57)、BG5-G10(SEQ ID NO:79)、BG6-A10(SEQ ID NO:75)、BG6-D08(SEQ ID NO:77)、BG8-B03(SEQ ID NO:73)、Bgi02446(SEQ ID NO:4)、DSM9728(SEQ ID NO:11)、DSM9729(SEQ ID NO:15)、DSM9730(SEQ ID NO:19)和DSM9731(SEQ ID NO:23)。将序列输入Vector NTI Advance工具包中并使用邻接(NJ)法来生成指南树(Saitou和Nei,Mol Biol Evol,4:406-425,1987)。NJ方法基于需分析的所有序列对之间的距离的矩阵来工作。这些距离与序列之间的趋异度相关。在对序列进行比对之后,计算指南树。使用以下参数并忽略具空位的位置来计算树构建:Kimura的序列距离校正.AlignX将计算的数值在括号中显示在图11所示树上的显示的分子名称之后。

[0456] 图10A-C中所比对序列的分析表明,它们全部都含有SEQ ID NO:47中所述的序列基序。此外,BG1-B08、BG1-C05、BG2-B08、BG2-D10、BG2-G08、BG4-A09、BG4-D10、BG5-E02、BG5-E05、BG5-F02、BG5-G10、BG6-A10、BG6-D08和BG8-B03枯草杆菌蛋白酶全部聚簇在同一区域中(如图11中所示)形成吉氏芽孢杆菌-进化枝。

序列表

<110> DANISCO US INC.
 <120> 吉氏芽孢杆菌-进化枝的丝氨酸蛋白酶
 <130> 40493-W0-PCT
 <140> PCT/US14/70107
 <141> 2014-12-12
 <150> US 61/915,737
 <151> 2013-12-13
 <150> US 62/069,200
 <151> 2014-10-27
 <160> 91
 <170> PatentIn版本3.5
 <210> 1
 <211> 1149
 <212> DNA
 <213> 吉氏芽孢杆菌 (B. gibsonii)

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1)..(1149)
 <223> Bgi02446n的核苷酸序列

<400> 1
 atgaaaagaa aagtaggaaa gcttatggg gggcctgtat gigtacacg tctagtaacc 60
 gtgacagatt ctgcatctgc gccagaagaa aaagtaaaat acttaatagg ttctgaagaa 120
 gaagcagaac ttgaagcctt cactgaggaa attgaccaag ttgggtgtat ttctgttgaa 180
 gaacaaagt tagctgagga tagcttagat atfgatgtag acattatiga tgaatatgat 240
 tatatgatg tgttagctgt agaattagat cctgaggatg tagatgcgtt aagtgaaaga 300
 gcaggatatc cattatttga agaagacatt gaactgtcta ttcaacaac agttccttgg 360
 ggcattactc gtgtacaagc tccggctgtt cataaccgtg ggattacagg ttctggagta 420
 agagtagcta tctctgattc agggatttca gcccatagtg atttgaatat ccgcggtgga 480
 gctagctttg taccgggtga accaacgaca gctgatttaa atggacatgg tactcaactg 540
 gccggaacag tagcagctct aalaattca attgggtgca ttgggttgc accgaatgct 600
 gaattatag ctgttaaagt acttggagca aatggaagcg gaagtgtlaag tgggattgct 660
 caaggtttag agtggcgcgc aaccaatac atgcatatig cgaacatgag tctcggtagt 720
 gattttccta gctctacact tgagcgtgca gtcaactatg caacaacccg tgaatgacta 780
 gttatgtag cgactggtaa taacggttct ggttcagtag gctatcctgc tegttagtga 840
 aacgcaatgg ctgtaggagc gactgacca aacaacagac gcgcaacti ttctcagtat 900
 ggtacgggaa ttgacatcgt agcacctggt gttaacgtac aaagtacgta tccaggtaac 960
 cgttacgtag gtatgaatgg tacatctatg gctactccac acgtagctgg tggcgcagcg 1020
 cttgtaaagc aacgctatcc gctttggaat gcgactcaaa ttgcgaatca tctgaaaaat 1080
 acagcaacaa atctaggaaa ctcttcacaa tttgtagtgg gcttagttaa cgcagaagca 1140
 gcaacacgt 1149

[0001]

<210> 2
 <211> 383
 <212> PRT
 <213> 吉氏芽孢杆菌 (B. gibsonii)

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1)..(383)
 <223> 由Bgi02446n编码的前酶原的氨基酸序列

<400> 2
 Met Lys Arg Lys Val Gly Lys Leu Met Val Gly Leu Val Cys Val Thr 1
 5 10 15
 Ala Leu Val Thr Val Thr Asp Ser Ala Ser Ala Ala Glu Glu Lys Val 20
 25 30
 Lys Tyr Leu Ile Gly Phe Glu Glu Glu Ala Glu Leu Glu Ala Phe Thr 35
 40 45
 Glu Glu Ile Asp Gln Val Gly Val Phe Ser Val Glu Glu Gln Ser Val 50
 55 60
 Ala Glu Asp Thr Leu Asp Ile Asp Val Asp Ile Ile Asp Glu Tyr Asp 65
 70 75 80
 Tyr Ile Asp Val Leu Ala Val Glu Leu Asp Pro Glu Asp Val Asp Ala 85
 90 95

Leu Ser Glu Glu Ala Gly Ile Ser Phe Ile Glu Glu Asp Ile Glu Leu
 100 105 110

Ser Ile Gln Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Thr Arg Val Gln Ala Pro
 115 120 125

Ala Val His Asn Arg Gly Ile Thr Gly Ser Gly Val Arg Val Ala Ile
 130 135 140

Leu Asp Ser Gly Ile Ser Ala His Ser Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly
 145 150 155 160

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

Gly Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly
 180 185 190

Val Ile Gly Val Ala Pro Asn Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu
 195 200 205

Gly Ala Asn Gly Ser Gly Ser Val Ser Gly Ile Ala Gln Gly Leu Glu
 210 215 220

Trp Ala Ala Thr Asn Asn Met His Ile Ala Asn Met Ser Leu Gly Ser
 225 230 235 240

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

Arg Asp Val Leu Val Ile Ala Ala Thr Gly Asn Asn Gly Ser Gly Ser
 260 265 270

Val Gly Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr
 275 280 285

Asp Gln Asn Asn Arg Arg Ala Asn Phe Ser Gln Tyr Gly Thr Gly Ile
 290 295 300

[0002] Asp Ile Val Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Asn
 305 310 315 320

Arg Tyr Val Ser Met Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala
 325 330 335

Gly Ala Ala Ala Leu Val Lys Gln Arg Tyr Pro Ser Trp Asn Ala Thr
 340 345 350

Gln Ile Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Asn Leu Gly Asn Ser
 355 360 365

Ser Gln Phe Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
 370 375 380

<210> 3
 <211> 356
 <212> PRT
 <213> 吉氏芽孢杆菌 (B. gibsonii)

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1)..(356)
 <223> 由Bg102446n编码的酶原的氨基酸序列

<400> 3

Ala Glu Glu Lys Val Lys Tyr Leu Ile Gly Phe Glu Glu Glu Ala Glu
 1 5 10 15

Leu Glu Ala Phe Thr Glu Glu Ile Asp Gln Val Gly Val Phe Ser Val
 20 25 30

Glu Glu Gln Ser Val Ala Glu Asp Thr Leu Asp Ile Asp Val Asp Ile
 35 40 45

Ile Asp Glu Tyr Asp Tyr Ile Asp Val Leu Ala Val Glu Leu Asp Pro
 50 55 60

Glu Asp Val Asp Ala Leu Ser Glu Glu Ala Gly Ile Ser Phe Ile Glu
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Glu Leu Ser Ile Gln Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Thr
 85 90 95

Arg Val Gln Ala Pro Ala Val His Asn Arg Gly Ile Thr Gly Ser Gly
 100 105 110

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

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

Asp Leu Asn Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu
 145 150 155 160

Asn Asn Ser Ile Gly Val Ile Gly Val Ala Pro Asn Ala Glu Leu Tyr
 165 170 175

Ala Val Lys Val Leu Gly Ala Asn Gly Ser Gly Ser Val Ser Gly Ile
 180 185 190

Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala Ala Thr Asn Asn Met His Ile Ala Asn
 195 200 205

Met Ser Leu Gly Ser Asp Phe Pro Ser Ser Thr Leu Glu Arg Ala Val
 210 215 220

Asn Tyr Ala Thr Ser Arg Asp Val Leu Val Ile Ala Ala Thr Gly Asn
 225 230 235 240

Asn Gly Ser Gly Ser Val Gly Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met
 245 250 255

Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln Asn Asn Arg Arg Ala Asn Phe Ser Gln
 260 265 270

Tyr Gly Thr Gly Ile Asp Ile Val Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser
 275 280 285

Thr Tyr Pro Gly Asn Arg Tyr Val Ser Met Asn Gly Thr Ser Met Ala
 290 295 300

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

Ser Trp Asn Ala Thr Gln Ile Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr
 325 330 335

Asn Leu Gly Asn Ser Ser Gln Phe Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu
 340 345 350

Ala Ala Thr Arg
 355

<210> 4
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> 吉氏芽孢杆菌 (B. gibsonii)

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1)..(269)
 <223> 成熟酶Bgi02446 (269个氨基酸) 的预测氨基酸序列

<400> 4

Gln Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Thr Arg Val Gln Ala Pro Ala Val
 1 5 10 15

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

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

Phe Val Pro Gly Glu Pro Thr Thr Ala Asp Leu Asn Gly His Gly Thr
 50 55 60

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

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

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

[0003]

Ala Thr Asn Asn Met His Ile Ala Asn Met Ser Leu Gly Ser Asp Phe
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Leu Val Lys Gln Arg Tyr Pro Ser Trp Asn Ala Thr Gln Ile
 225 230 235 240

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

Phe Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
 260 265

<210> 5
 <211> 93
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列: 终止子序列

<400> 5
 ggttaccttg aatgtatata aacattctca aaggatttc taataaaaa cgctcggtg 60
 ccgccggcg tttttatgc atcgatgaa ttc 93

[0004]

<210> 6
 <211> 1071
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列: 编码Bgi02446的原成熟基因的核苷酸序列

<400> 6
 gcagaagaaa aagtcaata tctgatcggc ttigaagaag aagcagaact ggaagcattt 60
 acggaagaaa ttgatcaagt tggcgttttt agcgtcgaag aacaatcagt tgcagaagat 120
 acaactggata tctgatcga tctatcgcac gaatatgact atattgatgt tctggcggtt 180
 gaacttgatc cggaagatgt tgatgcactg tcagaagaag caggcattag ctttattgaa 240
 gaagatctgc aactgagcat tcaacaaca gtccctggg gcattacaag agttcaagca 300
 ccggcagttc ataatcggcg aattacagc tcaggcgtta gaggttgcaat tctggattca 360
 ggcatttcag cacatagcga tctgaatatt agagcggag catcatttgt ccttggcgaa 420
 ccgacaacag cagatcigaa tggccatggc acacatgttg caggcacagt tgcagcactg 480
 aataattcaa ttggcgttat tggagttgca ccgaatgcag aactgtatgc agttaaagtt 540
 cttggcgcaa atggctcagg ctacatttca ggcattgcac aaggccigga atggcgagca 600
 acaaaataca tgcataattgc aaataigtca ctgggctcag attttccgtc atcaacactg 660
 gaacgcgag ttaattatgc aacatcaaga gatgttctgg tcattgcagc aacaggcaat 720
 aatggcagcg gctcagttgg ctatccgca agatagcaa atgcaatggc agttggcgct 780
 acagatcaaa ataatcgcag agcaaatitt agccaatatg gcacaggcat tgatattgtt 840
 gcaccigggc ttaattgtca gtcaacatat ccgggaaatc gctatgtttc aatgaatggc 900
 acatcaatgg caacaccgca tctcgcagc gcagcagcac tggttaaaca aagatatccg 960
 tcatggaatg cgacacagat tgcfaatcat ctgaaaaata cagcaacaaa tctgggcaat 1020
 tcaagccaat ttggctcagg cctggttaat gcagaagcag caacaagata a 1071

<210> 7
 <211> 268
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列: 进行纯化并且用于进一步表征的经加工成熟酶Bgi02446 (268个氨基酸) 的氨基酸序列

<400> 7
 Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Thr Arg Val Gln Ala Pro Ala Val His
 1 5 10 15
 Asn Arg Gly Ile Thr Gly Ser Gly Val Arg Val Ala Ile Leu Asp Ser
 20 25 30
 Gly Ile Ser Ala His Ser Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser Phe
 35 40 45
 Val Pro Gly Glu Pro Thr Thr Ala Asp Leu Asn Gly His Gly Thr His
 50 55 60
 Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Ile Gly
 65 70 75 80
 Val Ala Pro Asn Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala Asn
 85 90 95
 Gly Ser Gly Ser Val Ser Gly Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala Ala
 100 105 110
 Thr Asn Asn Met His Ile Ala Asn Met Ser Leu Gly Ser Asp Phe Pro
 115 120 125
 Ser Ser Thr Leu Glu Arg Ala Val Asn Tyr Ala Thr Ser Arg Asp Val
 130 135 140
 Leu Val Ile Ala Ala Thr Gly Asn Asn Gly Ser Gly Ser Val Gly Tyr
 145 150 155 160
 Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln Asn
 165 170 175
 Asn Arg Arg Ala Asn Phe Ser Gln Tyr Gly Thr Gly Ile Asp Ile Val
 180 185 190
 Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Asn Arg Tyr Val
 195 200 205
 Ser Met Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala Ala
 210 215 220
 Ala Leu Val Lys Gln Arg Tyr Pro Ser Trp Asn Ala Thr Gln Ile Arg
 225 230 235 240
 Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Asn Leu Gly Asn Ser Ser Gln Phe
 245 250 255
 Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
 260 265

[0005]

<210> 8
 <211> 1149
 <212> DNA
 <213> 吉氏芽孢杆菌 (B. gibsonii)

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1)..(1149)
 <223> 编码DSM 9728枯草杆菌蛋白酶I的核苷酸序列

<400> 8
 atgaaaagaa gactaggaaa gctttagtg ggccttgitt gtgtaacagc tctagtaaca 60
 gtaacagatt ctgcatctgc agcagaagaa aaggtaaaat acttaatagg gtttgaagaa 120
 gaagcagaac ttgaagccit cactgaggaa atgaccaag ttggtgtggt ttctgttgaa 180
 gaacaaagt tagctgagga tacgttagat attgatgtag acattattga tgaatatgat 240
 tatattgatg tattagccgt agaattagat cctgaggatg tagatgcgtt aagcgaagaa 300
 gcaggatctc catttattga agaagacatt gaactgtceta tccaacaac gggtccttgg 360
 ggcattactc gtgtacaagc tccagctgtg cataaccgag gagtaacagg gtcctggtga 420
 agagtagcga ttctagattc aggaatctct acacatagtg atttaacgat tccggtgga 480
 gctagctttg taccgggtga accaacaacg gctgatttaa atggctatgg gactcaggtt 540
 gcaggaacag tggcagctct taataatca atcgggtgta ttggtgtggc accaagtgct 600
 gatctatagc ctgtaaaagt acttgagca aatggtagag gaagcgttag tggaattgct 660
 caaggtctag agtgggctgc agcgaataac atgcatattg ctaacatgag tctcggtag 720
 gatgcaccta gtactacact tgagcgtgca gtcaactatg cgacaagcca aggtgtacta 780

```

gtattgcag cgactggtaa caacgttct ggttcagttg gctatcctgc tcgttatgca      840
aacgcaatgg ctgtaggagc gactgaccaa aacaacagac gtgcaaaactt ttctcagtat      900
ggtagcagaa ttgacatcgt agcaccaggg gttaatgtac aaagtagta tcttggaac      960
cgctatgcaa gttttaaagg tacatctatg gctactccac acgtagctgg tgccgctgca     1020
cttgtaaagc aacgctatcc atcttggaaat gcaactcaaa ttgcgaatca tctgaaaaat     1080
acagcgacaa atctaggaaa ctcttcgcaa ttggtagtg gcctagtcaa cgcagaagca     1140
gcaacacgt

```

```

<210> 9
<211> 383
<212> PRT
<213> 吉氏芽孢杆菌 (B. gibsonii)

```

```

<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1)..(383)
<223> DSM 9728前酶原的氨基酸序列

```

```

<400> 9
Met Lys Arg Arg Val Gly Lys Leu Val Val Gly Leu Val Cys Val Thr
1          5          10          15
Ala Leu Val Thr Val Thr Asp Ser Ala Ser Ala Ala Glu Glu Lys Val
20         25         30
Lys Tyr Leu Ile Gly Phe Glu Glu Glu Ala Glu Leu Glu Ala Phe Thr
35         40         45
Glu Glu Ile Asp Gln Val Gly Val Phe Ser Val Glu Glu Gln Ser Val
50         55         60
Ala Glu Asp Thr Leu Asp Ile Asp Val Asp Ile Ile Asp Glu Tyr Asp
65         70         75         80
Tyr Ile Asp Val Leu Ala Val Glu Leu Asp Pro Glu Asp Val Asp Ala
85         90         95
Leu Ser Glu Glu Ala Gly Ile Ser Phe Ile Glu Glu Asp Ile Glu Leu
100        105        110
Ser Ile Gln Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Thr Arg Val Gln Ala Pro
115        120        125
Ala Val His Asn Arg Gly Val Thr Gly Ser Gly Val Arg Val Ala Ile
130        135        140
Leu Asp Ser Gly Ile Ser Thr His Ser Asp Leu Thr Ile Arg Gly Gly
145        150        155        160
Ala Ser Phe Val Pro Gly Glu Pro Thr Thr Ala Asp Leu Asn Gly His
165        170        175
Gly Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly
180        185        190
Val Ile Gly Val Ala Pro Ser Ala Asp Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu
195        200        205
Gly Ala Asn Gly Arg Gly Ser Val Ser Gly Ile Ala Gln Gly Leu Glu
210        215        220
Trp Ala Ala Ala Asn Asn Met His Ile Ala Asn Met Ser Leu Gly Ser
225        230        235        240
Asp Ala Pro Ser Thr Thr Leu Glu Arg Ala Val Asn Tyr Ala Thr Ser
245        250        255
Gln Gly Val Leu Val Ile Ala Ala Thr Gly Asn Asn Gly Ser Gly Ser
260        265        270
Val Gly Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr
275        280        285
Asp Gln Asn Asn Arg Arg Ala Asn Phe Ser Gln Tyr Gly Thr Gly Ile
290        295        300
Asp Ile Val Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Asn
305        310        315        320
Arg Tyr Ala Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala

```

[0006]

325 330 335

Gly Ala Ala Ala Leu Val Lys Gln Arg Tyr Pro Ser Trp Asn Ala Thr
 340 345 350

Gln Ile Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Asn Leu Gly Asn Ser
 355 360 365

Ser Gln Phe Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
 370 375 380

<210> 10
 <211> 356
 <212> PRT
 <213> 吉氏芽孢杆菌 (B. gibsoni)

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1) . . (356)
 <223> DMS 9728酶原的氨基酸序列

<400> 10

Ala Glu Glu Lys Val Lys Tyr Leu Ile Gly Phe Glu Glu Glu Ala Glu
 1 5 10 15

Leu Glu Ala Phe Thr Glu Glu Ile Asp Gln Val Gly Val Phe Ser Val
 20 25 30

Glu Glu Gln Ser Val Ala Glu Asp Thr Leu Asp Ile Asp Val Asp Ile
 35 40 45

Ile Asp Glu Tyr Asp Tyr Ile Asp Val Leu Ala Val Glu Leu Asp Pro
 50 55 60

Glu Asp Val Asp Ala Leu Ser Glu Glu Ala Gly Ile Ser Phe Ile Glu
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Glu Leu Ser Ile Gln Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Thr
 85 90 95

Arg Val Gln Ala Pro Ala Val His Asn Arg Gly Val Thr Gly Ser Gly
 100 105 110

Val Arg Val Ala Ile Leu Asp Ser Gly Ile Ser Thr His Ser Asp Leu
 115 120 125

Thr Ile Arg Gly Gly Ala Ser Phe Val Pro Gly Glu Pro Thr Thr Ala
 130 135 140

Asp Leu Asn Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu
 145 150 155 160

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

Ala Val Lys Val Leu Gly Ala Asn Gly Arg Gly Ser Val Ser Gly Ile
 180 185 190

Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala Ala Ala Asn Asn Met His Ile Ala Asn
 195 200 205

Met Ser Leu Gly Ser Asp Ala Pro Ser Thr Thr Leu Glu Arg Ala Val
 210 215 220

Asn Tyr Ala Thr Ser Gln Gly Val Leu Val Ile Ala Ala Thr Gly Asn
 225 230 235 240

Asn Gly Ser Gly Ser Val Gly Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met
 245 250 255

Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln Asn Asn Arg Arg Ala Asn Phe Ser Gln
 260 265 270

Tyr Gly Thr Gly Ile Asp Ile Val Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser
 275 280 285

Thr Tyr Pro Gly Asn Arg Tyr Ala Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala
 290 295 300

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

Ser Trp Asn Ala Thr Gln Ile Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr

[0007]

325 330 335

Asn Leu Gly Asn Ser Ser Gln Phe Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu
340 345 350

Ala Ala Thr Arg
355

<210> 11
<211> 269
<212> PRT
<213> 吉氏芽孢杆菌 (B. gibsonii)

<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1)..(269)
<223> DSM 9728枯草杆菌蛋白酶的成熟形式的预测氨基酸序列

<400> 11

Gln Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Thr Arg Val Gln Ala Pro Ala Val
1 5 10 15

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

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

Phe Val Pro Gly Glu Pro Thr Thr Ala Asp Leu Asn Gly His Gly Thr
50 55 60

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

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

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

Ala Ala Asn Asn Met His Ile Ala Asn Met Ser Leu Gly Ser Asp Ala
115 120 125

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Leu Val Lys Gln Arg Tyr Pro Ser Trp Asn Ala Thr Gln Ile
225 230 235 240

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

Phe Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
260 265

<210> 12
<211> 1149
<212> DNA
<213> 吉氏芽孢杆菌 (B. gibsonii)

<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1)..(1149)
<223> 编码DSM 9729枯草杆菌蛋白酶的核苷酸序列

<400> 12

atgaaaagaa gagtagtaa gcttgggtg gggcttgtat gtgtaacage tctagtaacc 60

gtgacagatt ctgcactctgc ggcagaagaa aaagtaaaat acttaatagg ttttgaagaa 120

gaagcagaac ttgaagccct cactgaggaa attgaccaag ttgggtatt tctgttgaa 180

[0008]

```

gaacaaagt tagctgagga tacgttagat attgatgtag acattattga tgaatatgat      240
tatattgatg tggtagctgt agaattagat cctgaggatg tagatgcgtt aagcgaagaa      300
gcaggatctt catttattga agaagacatt gaactgtcta ttcaacaaac agttccttgg      360
ggcattactc gtgtacaagc tccggctgtt cataaccgag ggattacagg ttctggagta      420
agagtagcta tccttgattc agggatttca gcccatagtg atttgaatat ccgcggtgga      480
gctagctttg taccgggtga accaacgacg gctgatttaa atggacatgg tactcactg      540
gccggaacag tagcagctct aaataattca attggtgca ttggtgtgc accgaatgct      600
gacttatatg ctgttaaagt actcggagca aatggaagcg gaagtgtaa tgggatgct      660
caaggttagt agtggcgccg aaccaataac atgcatattg cgaacatgag tctcgtagt      720
gatttccta gctctacact tgagcgtgca gtcaactatg cgacaagccg tgatgtacta      780
gttattgtag cgactgtaa caacggttct ggttcagttag gctatcctgc tcgttatgca      840
aacgcaatgg ctgtaggagc gactgaccaa aacaacagac gcgcaaaact ttctcagtac      900
ggtacagaaa ttgacatgct agcacctgga gtaactgtac aaagtacgta tccagaaac      960
cgttatgta gtagaatgg tacatctatg gccactccac atgtagctgg tgcgctgca      1020
cttgtaaagc aacgctatcc ttcttggat ggcactaaa ttcgcaatca tctgaaaaat      1080
acagcaacaa atctaggaaa ctcttcgcaa ttggttagtg gcctagttaa cgcagaagca      1140
gcaacacgt
1149

```

```

<210> 13
<211> 383
<212> PRT
<213> 吉氏芽孢杆菌 (B. gibsonii)

```

```

<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1)..(383)
<223> DSM 9729前酶原的氨基酸序列

```

```

<400> 13
Met Lys Arg Arg Val Gly Lys Leu Val Val Gly Leu Val Cys Val Thr
1          5          10          15
Ala Leu Val Thr Val Thr Asp Ser Ala Ser Ala Ala Glu Glu Lys Val
20          25          30
Lys Tyr Leu Ile Gly Phe Glu Glu Glu Ala Glu Leu Glu Ala Phe Thr
35          40          45
Glu Glu Ile Asp Gln Val Gly Val Phe Ser Val Glu Glu Gln Ser Val
50          55          60
Ala Glu Asp Thr Leu Asp Ile Asp Val Asp Ile Ile Asp Glu Tyr Asp
65          70          75          80
Tyr Ile Asp Val Leu Ala Val Glu Leu Asp Pro Glu Asp Val Asp Ala
85          90          95
Leu Ser Glu Glu Ala Gly Ile Ser Phe Ile Glu Glu Asp Ile Glu Leu
100         105         110
Ser Ile Gln Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Thr Arg Val Gln Ala Pro
115        120        125
Ala Val His Asn Arg Gly Ile Thr Gly Ser Gly Val Arg Val Ala Ile
130        135        140
Leu Asp Ser Gly Ile Ser Ala His Ser Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly
145        150        155        160
Ala Ser Phe Val Pro Gly Glu Pro Thr Thr Ala Asp Leu Asn Gly His
165        170        175
Gly Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly
180        185        190
Val Ile Gly Val Ala Pro Asn Ala Asp Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu
195        200        205
Gly Ala Asn Gly Ser Gly Ser Val Ser Gly Ile Ala Gln Gly Leu Glu
210        215        220
Trp Ala Ala Thr Asn Asn Met His Ile Ala Asn Met Ser Leu Gly Ser
225        230        235        240

```

[0009]

Asp Phe Pro Ser Ser Thr Leu Glu Arg Ala Val Asn Tyr Ala Thr Ser
 245 250 255
 Arg Asp Val Leu Val Ile Ala Ala Thr Gly Asn Asn Gly Ser Gly Ser
 260 265 270
 Val Gly Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr
 275 280 285
 Asp Gln Asn Asn Arg Arg Ala Asn Phe Ser Gln Tyr Gly Thr Gly Ile
 290 295 300
 Asp Ile Val Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Asn
 305 310 315 320
 Arg Tyr Val Ser Met Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala
 325 330 335
 Gly Ala Ala Ala Leu Val Lys Gln Arg Tyr Pro Ser Trp Asn Ala Thr
 340 345 350
 Gln Ile Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Asn Leu Gly Asn Ser
 355 360 365
 Ser Gln Phe Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
 370 375 380

<210> 14
 <211> 356
 <212> PRT
 <213> 吉氏芽孢杆菌 (B. gibsonii)

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1)..(356)
 <223> DSM 9729酶原的氨基酸序列

<400> 14

Ala Glu Glu Lys Val Lys Tyr Leu Ile Gly Phe Glu Glu Glu Ala Glu
 1 5 10 15

[0010]

Leu Glu Ala Phe Thr Glu Glu Ile Asp Gln Val Gly Val Phe Ser Val
 20 25 30
 Glu Glu Gln Ser Val Ala Glu Asp Thr Leu Asp Ile Asp Val Asp Ile
 35 40 45
 Ile Asp Glu Tyr Asp Tyr Ile Asp Val Leu Ala Val Glu Leu Asp Pro
 50 55 60
 Glu Asp Val Asp Ala Leu Ser Glu Glu Ala Gly Ile Ser Phe Ile Glu
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Glu Leu Ser Ile Gln Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Thr
 85 90 95
 Arg Val Gln Ala Pro Ala Val His Asn Arg Gly Ile Thr Gly Ser Gly
 100 105 110
 Val Arg Val Ala Ile Leu Asp Ser Gly Ile Ser Ala His Ser Asp Leu
 115 120 125
 Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser Phe Val Pro Gly Glu Pro Thr Thr Ala
 130 135 140
 Asp Leu Asn Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu
 145 150 155 160
 Asn Asn Ser Ile Gly Val Ile Gly Val Ala Pro Asn Ala Asp Leu Tyr
 165 170 175
 Ala Val Lys Val Leu Gly Ala Asn Gly Ser Gly Ser Val Ser Gly Ile
 180 185 190
 Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala Ala Thr Asn Asn Met His Ile Ala Asn
 195 200 205
 Met Ser Leu Gly Ser Asp Phe Pro Ser Ser Thr Leu Glu Arg Ala Val
 210 215 220
 Asn Tyr Ala Thr Ser Arg Asp Val Leu Val Ile Ala Ala Thr Gly Asn
 225 230 235 240

Asn Gly Ser Gly Ser Val Gly Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met
 245 250 255

Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln Asn Asn Arg Arg Ala Asn Phe Ser Gln
 260 265 270

Tyr Gly Thr Gly Ile Asp Ile Val Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser
 275 280 285

Thr Tyr Pro Gly Asn Arg Tyr Val Ser Met Asn Gly Thr Ser Met Ala
 290 295 300

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

Ser Trp Asn Ala Thr Gln Ile Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr
 325 330 335

Asn Leu Gly Asn Ser Ser Gln Phe Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu
 340 345 350

Ala Ala Thr Arg
 355

<210> 15
 <211> 269
 <212> FRT
 <213> 吉氏芽孢杆菌 (B. gibsonii)

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1), (269)
 <223> DSM 9729枯草杆菌蛋白酶的成熟形式的预测氨基酸序列

<400> 15

Gln Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Thr Arg Val Gln Ala Pro Ala Val
 1 5 10 15

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

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

Phe Val Pro Gly Glu Pro Thr Thr Ala Asp Leu Asn Gly His Gly Thr
 50 55 60

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

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

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

Ala Thr Asn Asn Met His Ile Ala Asn Met Ser Leu Gly Ser Asp Phe
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Leu Val Lys Gln Arg Tyr Pro Ser Trp Asn Ala Thr Gln Ile
 225 230 235 240

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

[0011]

Phe Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
 260 265

<210> 16
 <211> 1149
 <212> DNA
 <213> 吉氏芽孢杆菌 (B. gibsonii)

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1)..(1149)
 <223> 编码DSM 9730枯草杆菌蛋白酶核酸序列

<400> 16
 atgaaaagaa gagtagaaga gcttgggtg gggcttgtt gtgtaacagc tctagtaact 60
 gtaacagatt ctgcatctgc agcagaaga aagtaaaat acttaatagg gttgaagaa 120
 gaagcagaac ttgaagcctt cactgagaa atgaccaag ttggtgtatt ttctgtgaa 180
 gaacaaagt tagctgagga tacgttagat atgatgtag acattattga tgaatatgat 240
 tatattgat tattagctgt agaattagat cctgaggat tagatgcgtt aagcgaagaa 300
 gcaggtatct catttattga agaagacatt gaactgtcta ttcaacaac agttccttgg 360
 ggcattactc gtgtacaagc tccggctgt cataaccgag gactaacagg gctgtgtgta 420
 agagtagcga ttctagattc aggaatctct acacatagtg attaacgat ccgcggtgga 480
 gctagctttg taccgggtga accaacaacg gctgatitaa atggtcatgg gactcacgtt 540
 gcaggaacag tggcagctct taataattca atcgggtgta ttggtgtggc accaagtgct 600
 gatctatagc ctgtaaaagt acttgagca aatggtagag gaagcgttag tggaaatgct 660
 caaggtttag agtgggctgc agcgaataac atgcataatg ctaacatgag tctcgtagt 720
 gatgcaccta gtactacact tgagcgtgca gtcaactatg cgacaagcca aggtgtacta 780
 gttattcgag cgactggtaa caacggttct gggtcagtag gctatcctgc tcgttatgca 840
 aacgcaatgg ctgtaggagc gactgaccaa aacaacagac gcgcaaaact ttctcagtac 900
 ggtacagaaa ttgacatcgt agcacctgga gttaacgtac aaagtacgta tccaggaaac 960
 cgttatgtag gtatgaatgg tacatctatg gccactccac atgtagctgg tgcccgtagca 1020
 cttgtaaacg aacgetatcc ttcttggaa ggcactcaaa ttgcgaatca tctgaaaaat 1080
 acagcaacaa atctaggaaa ctcttcgcaa ttggtagtgc gctagtgaa cgcagaagca 1140
 gcaacacgt 1149

[0012]

<210> 17
 <211> 383
 <212> PRT
 <213> 吉氏芽孢杆菌 (B. gibsonii)

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1)..(383)
 <223> DSM 9730前酶原的氨基酸序列

<400> 17
 Met Lys Arg Arg Val Gly Lys Leu Val Val Gly Leu Val Cys Val Thr
 1 5 10 15
 Ala Leu Val Thr Val Thr Asp Ser Ala Ser Ala Ala Glu Glu Lys Val
 20 25 30
 Lys Tyr Leu Ile Gly Phe Glu Glu Glu Ala Glu Leu Glu Ala Phe Thr
 35 40 45
 Glu Glu Ile Asp Gln Val Gly Val Phe Ser Val Glu Glu Gln Ser Val
 50 55 60
 Ala Glu Asp Thr Leu Asp Ile Asp Val Asp Ile Ile Asp Glu Tyr Asp
 65 70 75 80
 Tyr Ile Asp Val Leu Ala Val Glu Leu Asp Pro Glu Asp Val Asp Ala
 85 90 95
 Leu Ser Glu Glu Ala Gly Ile Ser Phe Ile Glu Glu Asp Ile Glu Leu
 100 105 110
 Ser Ile Gln Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Thr Arg Val Gln Ala Pro
 115 120 125
 Ala Val His Asn Arg Gly Val Thr Gly Ser Gly Val Arg Val Ala Ile
 130 135 140
 Leu Asp Ser Gly Ile Ser Thr His Ser Asp Leu Thr Ile Arg Gly Gly
 145 150 155 160

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

Gly Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly
 180 185 190

Val Ile Gly Val Ala Pro Ser Ala Asp Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu
 195 200 205

Gly Ala Asn Gly Arg Gly Ser Val Ser Gly Ile Ala Gln Gly Leu Glu
 210 215 220

Trp Ala Ala Ala Asn Asn Met His Ile Ala Asn Met Ser Leu Gly Ser
 225 230 235 240

Asp Ala Pro Ser Thr Thr Leu Glu Arg Ala Val Asn Tyr Ala Thr Ser
 245 250 255

Gln Gly Val Leu Val Ile Ala Ala Thr Gly Asn Asn Gly Ser Gly Ser
 260 265 270

Val Gly Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr
 275 280 285

Asp Gln Asn Asn Arg Arg Ala Asn Phe Ser Gln Tyr Gly Thr Gly Ile
 290 295 300

Asp Ile Val Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Asn
 305 310 315 320

Arg Tyr Val Ser Met Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala
 325 330 335

Gly Ala Ala Ala Leu Val Lys Gln Arg Tyr Pro Ser Trp Asn Ala Thr
 340 345 350

Gln Ile Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Asn Leu Gly Asn Ser
 355 360 365

Ser Gln Phe Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
 370 375 380

[0013]

<210> 18
 <211> 356
 <212> PRT
 <213> 吉氏芽孢杆菌 (B. gibsonii)

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1).. (356)
 <223> DSM 9730酶原的氨基酸序列

<400> 18
 Ala Glu Glu Lys Val Lys Tyr Leu Ile Gly Phe Glu Glu Glu Ala Glu
 1 5 10 15

Leu Glu Ala Phe Thr Glu Glu Ile Asp Gln Val Gly Val Phe Ser Val
 20 25 30

Glu Glu Gln Ser Val Ala Glu Asp Thr Leu Asp Ile Asp Val Asp Ile
 35 40 45

Ile Asp Glu Tyr Asp Tyr Ile Asp Val Leu Ala Val Glu Leu Asp Pro
 50 55 60

Glu Asp Val Asp Ala Leu Ser Glu Glu Ala Gly Ile Ser Phe Ile Glu
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Glu Leu Ser Ile Gln Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Thr
 85 90 95

Arg Val Gln Ala Pro Ala Val His Asn Arg Gly Val Thr Gly Ser Gly
 100 105 110

Val Arg Val Ala Ile Leu Asp Ser Gly Ile Ser Thr His Ser Asp Leu
 115 120 125

Thr Ile Arg Gly Gly Ala Ser Phe Val Pro Gly Glu Pro Thr Thr Ala
 130 135 140

Asp Leu Asn Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu
 145 150 155 160

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

Ala Val Lys Val Leu Gly Ala Asn Gly Arg Gly Ser Val Ser Gly Ile
180 185 190

Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala Ala Ala Asn Asn Met His Ile Ala Asn
195 200 205

Met Ser Leu Gly Ser Asp Ala Pro Ser Thr Thr Leu Glu Arg Ala Val
210 215 220

Asn Tyr Ala Thr Ser Gln Gly Val Leu Val Ile Ala Ala Thr Gly Asn
225 230 235 240

Asn Gly Ser Gly Ser Val Gly Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met
245 250 255

Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln Asn Asn Arg Arg Ala Asn Phe Ser Gln
260 265 270

Tyr Gly Thr Gly Ile Asp Ile Val Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser
275 280 285

Thr Tyr Pro Gly Asn Arg Tyr Val Ser Met Asn Gly Thr Ser Met Ala
290 295 300

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

Ser Trp Asn Ala Thr Gln Ile Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr
325 330 335

Asn Leu Gly Asn Ser Ser Gln Phe Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu
340 345 350

Ala Ala Thr Arg
355

[0014]

<210> 19
<211> 269
<212> PRT
<213> 吉氏芽孢杆菌 (B. gibsonii)

<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1)..(269)
<223> DSM 9730枯草杆菌蛋白酶的成熟形式的预测氨基酸序列

<400> 19

Gln Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Thr Arg Val Gln Ala Pro Ala Val
1 5 10 15

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

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

Phe Val Pro Gly Glu Pro Thr Thr Ala Asp Leu Asn Gly His Gly Thr
50 55 60

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

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

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

Ala Ala Asn Asn Met His Ile Ala Asn Met Ser Leu Gly Ser Asp Ala
115 120 125

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Leu Val Lys Gln Arg Tyr Pro Ser Trp Asn Ala Thr Gln Ile
 225 230 235 240

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

Phe Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
 260 265

<210> 20
 <211> 1149
 <212> DNA
 <213> 吉氏芽孢杆菌 (B. gibsonii)

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1)..(1149)
 <223> 编码DSM 9731枯草杆菌蛋白酶I的核苷酸序列

[0015]

<400> 20
 atgaaaagaa gagtaggaaa gctttagtg gggcttgttt gtgtaacagc tctagtaact 60
 gtaacagatt ctgcactcgc agcagaagaa aaggtaaaat acttaatagg gtttgaagaa 120
 gaagcagaac ttgaagcctt cactgagaa attgaccaag ttgggtgttt tctgttgaa 180
 gaacaaagt tagctgagga tacgttagat attgatgtag acattattga tgaatatgat 240
 tatattgat tattagctgt agaattagat cctgaggatg tagatgcgtt aagtaagaa 300
 gcaggtatct catttattga agaagacatt gaacigtcta ttcaacaac ggttccttgg 360
 ggcattactc gtgtacaagc tccagctgtg cataaccgag gagtaacagg gctctgtgta 420
 agagtagcga ttctagattc aggaatctct acacatagtg atttaacgat tccggttggg 480
 gctagctttg taccgggtga accaacaacg gctgatttaa atggtcattgg gactcacgtt 540
 gcaggaacag tggcagctct taataattca attggtgtga ttgggtggc accaagtgct 600
 gatctatagc ctgtaaaagt acttgagca aatgtagag gaagcgttag tggaaattgct 660
 caaggtctag agtggcctgc agcaataac atgcatattg ctaacatgag tctogtagt 720
 gatgcaccta gtactacact tgagcgtgca gtaactatg cgacaagcca aggttacta 780
 gttattgagc cgactggtaa caacggttct ggttcagttg gctatcctgc tcttatgca 840
 aacgcaatgg ctgtagagc gactgaccaa aacaacagac gcgcaaaact tctcaatat 900
 ggttcagaa ttgatattgt agcaccagga gttaacgtac aaagtacgta tccaggaaac 960
 cgttatgta gtatgaatgg tacatctatg gccactccac acgtagctgg tgcgctgag 1020
 cttgtaaagc aacgctatcc atcttggaa gcgactcaaa ttgcgaatca tctgaaaaat 1080
 acagcgacaa atctagaaa ctcttcgcaa ttggtagtg gcctagttaa cgcagaagca 1140
 gcaacacgt 1149

<210> 21
 <211> 383
 <212> PRT
 <213> 吉氏芽孢杆菌 (B. gibsonii)

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1)..(383)
 <223> DSM 9731前酶原的氨基酸序列

<400> 21
 Met Lys Arg Arg Val Gly Lys Leu Val Val Gly Leu Val Cys Val Thr
 1 5 10 15

Ala Leu Val Thr Val Thr Asp Ser Ala Ser Ala Ala Glu Glu Lys Val
 20 25 30

Lys Tyr Leu Ile Gly Phe Glu Glu Glu Ala Glu Leu Glu Ala Phe Thr
 35 40 45

Glu Glu Ile Asp Gln Val Gly Val Phe Ser Val Glu Glu Gln Ser Val
 50 55 60

Ala Glu Asp Thr Leu Asp Ile Asp Val Asp Ile Ile Asp Glu Tyr Asp
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Glu Leu Ser Ile Gln Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Thr
85 90 95

Arg Val Gln Ala Pro Ala Val His Asn Arg Gly Val Thr Gly Ser Gly
100 105 110

Val Arg Val Ala Ile Leu Asp Ser Gly Ile Ser Thr His Ser Asp Leu
115 120 125

Thr Ile Arg Gly Gly Ala Ser Phe Val Pro Gly Glu Pro Thr Thr Ala
130 135 140

Asp Leu Asn Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu
145 150 155 160

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

Ala Val Lys Val Leu Gly Ala Asn Gly Arg Gly Ser Val Ser Gly Ile
180 185 190

Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala Ala Ala Asn Asn Met His Ile Ala Asn
195 200 205

Met Ser Leu Gly Ser Asp Ala Pro Ser Thr Thr Leu Glu Arg Ala Val
210 215 220

Asn Tyr Ala Thr Ser Gln Gly Val Leu Val Ile Ala Ala Thr Gly Asn
225 230 235 240

Asn Gly Ser Gly Ser Val Gly Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met
245 250 255

Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln Asn Asn Arg Arg Ala Asn Phe Ser Gln
260 265 270

Tyr Gly Ser Gly Ile Asp Ile Val Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser
275 280 285

[0017] Thr Tyr Pro Gly Asn Arg Tyr Val Ser Met Asn Gly Thr Ser Met Ala
290 295 300

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

Ser Trp Asn Ala Thr Gln Ile Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr
325 330 335

Asn Leu Gly Asn Ser Ser Gln Phe Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu
340 345 350

Ala Ala Thr Arg
355

<210> 23
<211> 269
<212> PRT
<213> 吉氏芽孢杆菌 (B. gibsonii)

<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1)..(269)
<223> DSM 9731枯草杆菌蛋白酶成熟形式的预测氨基酸序列

<400> 23

Gln Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Thr Arg Val Gln Ala Pro Ala Val
1 5 10 15

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

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

Phe Val Pro Gly Glu Pro Thr Thr Ala Asp Leu Asn Gly His Gly Thr
50 55 60

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

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

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

Ala Ala Asn Asn Met His Ile Ala Asn Met Ser Leu Gly Ser Asp Ala
115 120 125

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Leu Val Lys Gln Arg Tyr Pro Ser Trp Asn Ala Thr Gln Ile
225 230 235 240

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

Phe Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
260 265

<210> 24
<211> 269
<212> FRT
<213> 吉氏芽孢杆菌 (B. gibsonii)

<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1)..(269)
<223> W02007131657-CAS91385

[0018]

<400> 24
Gln Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Thr Arg Val Gln Ala Pro Ala Val
1 5 10 15

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

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

Phe Ile Pro Gly Glu Pro Thr Thr Ala Asp Leu Asn Gly His Gly Thr
50 55 60

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

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

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

Ala Ala Asn Asn Met His Ile Ala Asn Met Ser Leu Gly Ala Asp Ala
115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
 260 265

<210> 25
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> 吉氏芽孢杆菌 (B. gibsonii)

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1)..(269)
 <223> W003054184-CAE48421

<400> 25

Gln Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Thr Arg Val Gln Ala Pro Ala Val
 1 5 10 15

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

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

Phe Val Pro Gly Glu Pro Thr Thr Ala Asp Leu Asn Gly His Gly Thr
 50 55 60

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

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

[0019] Asn Gly Arg Gly Ser Val Ser Gly Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala
 100 105 110

Ala Ala Asn Asn Met His Ile Ala Asn Met Ser Leu Gly Ser Asp Ala
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Leu Val Lys Gln Arg Tyr Pro Ser Trp Asn Ala Thr Gln Ile
 225 230 235 240

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

Phe Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
 260 265

<210> 26
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> 吉氏芽孢杆菌 (B. gibsonii)

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1)..(269)
 <223> W02008086916-CAV33594

<400> 26
 Gln Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Thr Arg Val Gln Ala Pro Ala Val
 1 5 10 15
 His Asn Arg Gly Val Thr Gly Ser Gly Val Arg Val Ala Ile Leu Asp
 20 25 30
 Ser Gly Ile Ser Gln His Ser Asp Leu Thr Ile Arg Gly Gly Ala Ser
 35 40 45
 Phe Val Pro Gly Glu Pro Thr Thr Glu Asp Leu Asn Gly His Gly Thr
 50 55 60
 His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Asn Ser Phe Gly Val Ile
 65 70 75 80
 Gly Val Ala Pro Ser Ala Asp Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala
 85 90 95
 Gly Gly Arg Gly Ser Val Ser Gly Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala
 100 105 110
 Ala Ala Asn Asn Met His Ile Ala Asn Met Ser Leu Gly Ala Asp Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Thr Leu Glu Arg Ala Val Asn Tyr Ala Thr Ser Arg Gly
 130 135 140
 Val Leu Val Ile Ala Ala Thr Gly Asn Asn Gly Ser Gly Ser Val Gly
 145 150 155 160
 Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln
 165 170 175
 Asn Asn Arg Arg Ala Asn Phe Ser Gln Tyr Gly Thr Gly Ile Asp Ile
 180 185 190
 Val Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Asn Arg Tyr
 195 200 205
 Ala Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Val
 210 215 220
 Ala Ala Leu Val Lys Gln Arg Asn Pro Ser Trp Asn Ala Thr Gln Ile
 225 230 235 240
 Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Asn Leu Gly Asn Ser Ser Gln
 245 250 255
 Phe Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Ile Arg
 260 265

[0020]

<210> 27
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> 吉氏芽孢杆菌 (B. gibsonii)

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1)..(269)
 <223> W003054185-CAE48424

<400> 27
 Gln Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Thr Arg Val Gln Ala Pro Thr Val
 1 5 10 15
 His Asn Arg Gly Ile Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Ile Leu Asp
 20 25 30
 Thr Gly Ile Ala Gln His Ser Asp Leu Thr Ile Arg Gly Gly Ala Ser
 35 40 45
 Phe Val Pro Gly Glu Ser Thr Thr Ala Asp Leu Asn Gly His Gly Thr
 50 55 60
 His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Ile
 65 70 75 80
 Gly Val Ala Pro Ser Ala Asp Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala
 85 90 95
 Asn Gly Arg Gly Ser Val Ser Gly Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala

100 105 110

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

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

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

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

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

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

Ala Ser Met Pro Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Val
210 215 220

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

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

Phe Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Asp Ala Ala Thr Arg
260 265

<210> 28
<211> 269
<212> FRT
<213> 芽孢杆菌 (Bacillus sp.) 菌株EP655

<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1)..(269)
<223> US7642080-0004

[0021] <400> 28

Gln Gln Ser Val Pro Trp Gly Ile Thr Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Asn Gly Arg Gly Ser Ile Gly Gly Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala
100 105 110

Ala Ala Asn Asn Met His Ile Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Asp Ala
115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

<210> 29
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> 芽孢杆菌 (Bacillus sp.) 菌株p203

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1)..(269)
 <223> US7642080-0006

<400> 29
 Gln Gln Ser Val Pro Trp Gly Ile Thr Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

Asn Gly Arg Gly Ser Ile Gly Gly Ile Ala Gln Gly Leu Gly Trp Ala
 100 105 110

Ala Ala Asn Asn Met His Ile Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Asp Ala
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Leu Val Lys Gln Arg Tyr Pro Ser Trp Ser Ala Ser Gln Ile
 225 230 235 240

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

Tyr Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Asp Ala Ala Ser Arg
 260 265

<210> 30
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> 芽孢杆菌 (Bacillus sp.) 菌株Zi344

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1)..(269)
 <223> US7642080-0002

<400> 30

[0022]

Gln Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Gln Arg Val Gln Ala Pro Ala Val
 1 5 10 15
 Ile Asn Arg Gly Ile Asn Gly Ser Gly Val Arg Val Ala Val Leu Asp
 20 25 30
 Ser Gly Ile Ser Ser His Ser Asp Leu Ser Ile Ser Gly Gly Val Ser
 35 40 45
 Phe Val Pro Gly Glu Pro Thr Ile Ala Asp Gly Asn Gly His Gly Thr
 50 55 60
 His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Val
 65 70 75 80
 Gly Val Ala Pro Asn Ala Gln Ile Tyr Gly Val Lys Val Leu Gly Ala
 85 90 95
 Asn Gly Arg Gly Ser Val Ser Gly Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala
 100 105 110
 Ala Thr Asn Asn Met Asp Ile Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Asp Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Thr Leu Glu Gln Ala Val Asn Phe Ala Thr Ser Arg Gly
 130 135 140
 Val Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Asn Gly Ser Gly Asn Val Gly
 145 150 155 160
 Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln
 165 170 175
 Asn Asn Arg Arg Ala Asn Phe Ser Gln Tyr Gly Ala Gly Leu Asp Ile
 180 185 190
 Val Ala Pro Gly Val Gly Val Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Asn Arg Tyr
 195 200 205
 Val Ser Met Asn Gly Thr Ser Met Ala Ser Pro His Val Ala Gly Ala
 210 215 220
 Ala Ala Leu Val Lys Gln Arg Tyr Pro Ser Trp Ser Asn Thr Gln Ile
 225 230 235 240
 Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Asn Leu Gly Asn Thr Asn Gln
 245 250 255
 Phe Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Asp Ala Ala Thr Arg
 260 265

[0023]

<210> 31
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> 迟缓芽孢杆菌 (B. lentus)
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1)..(269)
 <223> 迟缓芽孢杆菌 (B_lentus) P29600
 <400> 31

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 32
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> 芽孢杆菌 (Bacillus sp.) G-825-6

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1), (269)
 <223> 芽孢杆菌 (B_sp) Sendai_BAA06157

<400> 32

[0024]

Asn Gln Val Thr Pro Trp Gly Ile Thr Arg Val Gln Ala Pro Thr Ala
 1 5 10 15

Trp Thr Arg Gly Tyr Thr Gly Thr Gly Val Arg Val Ala Val Leu Asp
 20 25 30

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

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

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

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

Asn Gly Ser Gly Ser Val Ser Ser Ile Ala Gln Gly Leu Gln Trp Thr
 100 105 110

Ala Gln Asn Asn Ile His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Pro Val
 115 120 125

Gly Ser Gln Thr Leu Glu Leu Ala Val Asn Gln Ala Thr Asn Ala Gly
 130 135 140

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

Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Leu Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln
 165 170 175

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

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

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

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

Arg Gln His Leu Thr Ser Thr Ala Thr Ser Leu Gly Asn Ser Asn Gln
 245 250 255

Phe Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
 260 265

<210> 33
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> 芽孢杆菌 (Bacillus sp.) G-825-6

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1)..(269)
 <223> 芽孢杆菌 (Bacillus_sp) BAA05540

<400> 33

Ser Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Ser Phe Ile Asn Thr Gln Gln Ala
 1 5 10 15

His Asn Arg Gly Ile Phe Gly Asn Gly Ala Arg Val Ala Val Leu Asp
 20 25 30

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

Phe Ile Ser Ser Glu Pro Ser Tyr His Asp Asn Asn Gly His Gly Thr
 50 55 60

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

Gly Val Ala Pro Ser Ala Asp Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Asp Arg
 85 90 95

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

Ile Asn Asn Asn Met His Ile Ile Asn Met Ser Leu Gly Ser Thr Ser
 115 120 125

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

Ile Leu Leu Val Gly Ala Ala Gly Asn Thr Gly Arg Gln Gly Val Asn
 145 150 155 160

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

Asn Gly Gln Arg Ala Ser Phe Ser Thr Tyr Gly Pro Glu Ile Glu Ile
 180 185 190

Ser Ala Pro Gly Val Asn Val Asn Ser Thr Tyr Thr Gly Asn Arg Tyr
 195 200 205

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

Ala Ala Leu Val Lys Ser Arg Tyr Pro Ser Tyr Thr Asn Asn Gln Ile
 225 230 235 240

Arg Gln Arg Ile Asn Gln Thr Ala Thr Tyr Leu Gly Ser Pro Ser Leu
 245 250 255

Tyr Gly Asn Gly Leu Val His Ala Gly Arg Ala Thr Gln
 260 265

<210> 34
 <211> 275
 <212> PRT
 <213> 解淀粉芽孢杆菌 (B. amyloliquefaciens)

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1)..(275)
 <223> 解淀粉芽孢杆菌 (B_amyloliquefaciens) CAA24990

<400> 34

Ala Gln Ser Val Pro Tyr Gly Val Ser Gln Ile Lys Ala Pro Ala Leu
 1 5 10 15

[0025]

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 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
 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> 35
 <211> 275
 <212> PRT
 <213> 嗜热脂肪芽孢杆菌 (*G. stearothermophilus*)
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1)..(275)
 <223> 嗜热脂肪芽孢杆菌 (*G. stearothermophilus*) ABY25856
 <400> 35
 Ala Gln Ser Val Pro Tyr Gly Val Ser Gln Ile Lys Ala Pro Ala Leu
 1 5 10 15
 His Ser Gln Gly Phe 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 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 Val 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 Tyr 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 Ile Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Glu Gly Thr Ser Gly
 145 150 155 160

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

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

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

Ala Ala Gln
 275

<210> 36
 <211> 275
 <212> PRT
 <213> 萎缩芽孢杆菌 (B. atrophaeus)

[0027]

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1) . (275)
 <223> 萎缩芽孢杆菌 (B_atrophaeus) YF003972439

<400> 36

Ala Gln Ser Val Pro Tyr Gly Ile Ser Gln Ile Lys Ala Pro Ala Val
 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 Ser Gly Gly Ala
 35 40 45

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

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

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

Ser Ser Ser Gly Ser Gly Asp Tyr Ser Trp Ile Ile Asn Gly Ile Glu
 100 105 110

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

Pro Gln Gly Ser Thr Ala Leu Lys Ala Val Val Asp Lys Ala Val Ser
 130 135 140

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

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

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

Gly Ser Glu Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr
 195 200 205

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

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

Trp Thr Asn Ser Gln Val Arg Asn Ser Leu Glu Ser Thr Ala Thr Asn
 245 250 255

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

Ala Ala Gln
 275

<210> 37
 <211> 275
 <212> PRT
 <213> 枯草芽孢杆菌 (B. subtilis)

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1)..(275)
 <223> 枯草芽孢杆菌 (B_subtilis) BAN09118

<400> 37

Ala Gln Ser Val Pro Tyr Gly Ile 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 Asn Val Arg Gly Gly Ala
 35 40 45

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

Gly Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Asn Thr 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

Asp Ser Thr Gly Ser Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Asn Gly Ile Glu
 100 105 110

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

Pro Thr Gly Ser Thr Ala Leu Lys Thr Val Val Asp Lys Ala Val Ala
 130 135 140

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

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

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

Gly Ser Glu Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr
 195 200 205

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

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

Trp Ser Asn Ala Gln Val Arg Asp Arg Leu Glu Ser Thr Ala Thr Asn
 245 250 255

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

Ala Ala Gln
 275

<210> 38
 <211> 275
 <212> PRT

[0028]

<213> 环状芽孢杆菌 (B. circulans)

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1)..(275)
 <223> 环状芽孢杆菌 (B_circulans) ADN04910

<400> 38

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

His Ala Gln Gly Tyr Lys Gly Ala Asn Val Lys Val Ala Val Leu Asp
 20 25 30

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

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

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

Asp Arg Asn Gly Asp Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Ser Gly Ile Glu
 100 105 110

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

Pro Asn Gly Ser Thr Ala Leu Lys Asn Ala Val Asp Thr Ala Asn Asn
 130 135 140

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

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

Val Ala Asn Val Asn Ser Ser Asn Val Arg Asn Ser Ser Ser Ser Ala
 180 185 190

Gly Pro Glu Leu Asp Val Ser Ala Pro Gly Thr Ser Ile Leu Ser Thr
 195 200 205

Val Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Ser Tyr Thr Gly Thr Ser Met Ala Ser
 210 215 220

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

Leu Ser Asn Ser Gln Val Arg Gln Arg Leu Glu Asn Thr Ala Thr Pro
 245 250 255

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

Ala Ser Asn
 275

[0029]

<210> 39
 <211> 275
 <212> PRT
 <213> 同温层芽孢杆菌 (B. stratosphericus)

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1)..(275)
 <223> 同温层芽孢杆菌 (B_stratosphericus) WP_007497196

<400> 39

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

His Ala Gln Gly Tyr Lys Gly Ala Asn Val Lys Val Ala Val Leu Asp
 20 25 30

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

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

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

Asp Arg Asn Gly Asp Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Ser Gly Ile Glu
100 105 110

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

Pro Ser Gly Ser Thr Ala Leu Lys Asn Ala Val Asp Thr Ala Asn Asn
130 135 140

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

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

Val Ala Asn Val Asn Ser Asn Asn Val Arg Asn Ser Ser Ser Ala
180 185 190

Gly Pro Glu Leu Asp Val Ser Ala Pro Gly Thr Ser Ile Leu Ser Thr
195 200 205

Val Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Thr Gly Thr Ser Met Ala Ser
210 215 220

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

Leu Ser Thr Ser Gln Val Arg Gln Arg Leu Glu Asn Thr Ala Thr Pro
245 250 255

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

[0030]

Ala Ser Asn
275

<210> 40
<211> 274
<212> PRT
<213> 地衣芽孢杆菌 (B. licheniformis)

<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1)..(274)
<223> 地衣芽孢杆菌 (B_licheniformis) CAJ70731.1

<400> 40

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 Ser Tyr Ser Gly Ile Val Ser Gly Ile Glu Trp
100 105 110

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

Ser Gly Ser Thr Ala Met Lys Gln Ala Val Asp Asn Ala Tyr Ala Arg
130 135 140

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

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

Ala Gln

<210> 41
 <211> 275
 <212> PRT
 <213> 短小芽孢杆菌 (B. pumilus)

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1)..(275)
 <223> 短小芽孢杆菌 (B_pumilus) ADK11996

<400> 41

Ala Gln Thr Val Pro Tyr Gly Ile Pro Gln Ile Lys Ala Pro Ala Val
 1 5 10 15
 His Ala Gln Gly Tyr Lys Gly Ala Asn Val Lys Val Ala Val Leu Asp
 20 25 30
 Thr Gly Ile His Ala Ala His Pro Asp Leu Asn Val Ala Gly Gly Ala
 35 40 45
 Ser Phe Val Pro Ser Glu Pro Asn Ala Thr Gln Asp Phe Gln Ser His
 50 55 60
 Gly Thr His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asp Asn Thr 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
 Asp Arg Asn Gly Asp Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Ser Gly Ile Glu
 100 105 110
 Trp Ala Val Ala Asn Asn Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly
 115 120 125
 Ala Ser Gly Ser Thr Ala Leu Lys Asn Ala Val Asp Thr Ala Asn Asn
 130 135 140
 Arg Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Ser Gly Ser Ser Gly
 145 150 155 160
 Ser Arg Ser Thr Val Gly Tyr Pro Ala Lys Tyr Glu Ser Thr Ile Ala
 165 170 175
 Val Ala Asn Val Asn Ser Asn Asn Val Arg Asn Ser Ser Ser Ser Ala
 180 185 190
 Gly Pro Glu Leu Asp Val Ser Ala Pro Gly Thr Ser Ile Leu Ser Thr
 195 200 205
 Val Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Thr Gly Thr Ser Met Ala Ser
 210 215 220
 Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys Asn Pro Asn
 225 230 235 240
 Leu Thr Asn Ser Gln Val Arg Gln Arg Leu Glu Asn Thr Ala Thr Pro
 245 250 255

[0031]

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

Ala Ser Asn
 275

<210> 42
 <211> 276
 <212> PRT
 <213> 芽孢杆菌 (Bacillus sp.)

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1)..(276)
 <223> 芽孢杆菌 (B_sp) sprD_AAC43581

<400> 42

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

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

Thr Gly Ile Asp Ala Ser His Glu Asp Leu Arg Val Val Gly Gly Ala
 35 40 45

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

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

Val Leu Gly Val Ser Tyr Asp Val Asp Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu
 85 90 95

Ser Ala Gly Gly Ser Gly Thr Leu Ala Gly Ile Ala Gln Gly Ile Glu
 100 105 110

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

[0032]

Ser Thr Gly Ser Thr Thr Leu Lys Gln Ala Ser Asp Asn Ala Tyr Asn
 130 135 140

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

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

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

Val Gly Ser Gln Leu Glu Val Met Ala Pro Gly Val Ala Ile Asn Ser
 195 200 205

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

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

Asn Leu Thr Asn Val Gln Val Arg Glu Arg Leu Arg Asp Thr Ala Thr
 245 250 255

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

Arg Ala Leu Gln
 275

<210> 43
 <211> 275
 <212> PRT
 <213> 芽孢杆菌 (Bacillus sp.)

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1)..(275)
 <223> 芽孢杆菌 (Bacillus_sp) LG12sprC_AAC43580

<400> 43

Ala Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Pro His Ile Lys Ala Asp Lys Ala

1 5 10 15
 His Ala Ala Gly Val Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Ile Leu Asp
 20 25 30
 Thr Gly Ile Asp Ala Asn His Ala Asp Leu Asn Val Lys Gly Gly Ala
 35 40 45
 Ser Phe Val Ser Gly Glu Pro Asn Ala Leu Gln Asp Gly Asn Gly His
 50 55 60
 Gly Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Asn Thr Thr Gly
 65 70 75 80
 Val Leu Gly Val Ala Tyr Asn Ala Asp Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu
 85 90 95
 Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Leu Ser Gly Ile Ala Gln Gly Ile Glu
 100 105 110
 Trp Ser Ile Ser Asn Gly Met Asn Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly
 115 120 125
 Ser Ser Gly Ser Thr Ala Leu Gln Gln Ala Cys Asn Asn Ala Tyr Asn
 130 135 140
 Arg Gly Ile Val Val Ile Ala Ala Ala Gly Asn Ser Gly Ser Ser Gly
 145 150 155 160
 Asn Arg Asn Thr Met Gly Tyr Pro Ala Arg Tyr Ser Ser Val Ile Ala
 165 170 175
 Val Gly Ala Val Ser Ser Asn Asn Thr Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val
 180 185 190
 Gly Ser Glu Leu Glu Val Met Ala Pro Gly Val Asn Ile Leu Ser Thr
 195 200 205
 Thr Pro Gly Asn Asn Tyr Ala Ser Phe Asn Gly Thr Ser Met Ala Ala
 210 215 220
 Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Lys Ala Lys Tyr Pro Ser
 225 230 235 240
 Met Thr Asn Val Gln Ile Arg Glu Arg Leu Lys Asn Thr Ala Thr Asn
 245 250 255
 Leu Gly Asp Pro Phe Phe Tyr Gly Lys Gly Val Ile Asn Val Glu Ser
 260 265 270
 Ala Leu Gln
 275
 <210> 44
 <211> 275
 <212> PRT
 <213> 芽孢杆菌 (Bacillus sp.)
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1), (275)
 <223> 芽孢杆菌 (Bacillus_sp) BAD11988
 <400> 44
 Ala Gln Thr Thr Pro Trp Gly Val Thr His Ile Asn Ala His Arg Ala
 1 5 10 15
 His Ser Ser Gly Val Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Ile Leu Asp
 20 25 30
 Thr Gly Ile His Ala Ser His Pro Asp Leu Asn Val Arg Gly Gly Ala
 35 40 45
 Ser Phe Ile Ser Gly Glu Ser Asn Pro Tyr Ile Asp Ser Asn Gly His
 50 55 60
 Gly Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Asn Thr Val Gly
 65 70 75 80
 Val Leu Gly Val Ala Tyr Asn Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu
 85 90 95
 Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Leu Ser Gly Ile Ala Gln Gly Val Glu

[0033]

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

 Ala Leu Gln
 275

 <210> 45
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成序列: 共有序列

 <400> 45
 Ala Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Ile Ala Pro Ala Val His Arg Gly
 1 5 10 15
 Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp Thr Gly Ile His Pro
 20 25 30
 Asp Leu Arg Gly Gly Ala Ser Phe Val Pro Gly Glu Pro Thr Asp Asn
 35 40 45
 Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Asn Ser
 50 55 60
 Ile Gly Val Leu Gly Val Ala Pro Ser Ala Leu Tyr Ala Val Lys Val
 65 70 75 80
 Leu Gly Ala Asn Gly Ser Gly Ser Ser Gly Ile Ala Gln Gly Ile Glu
 85 90 95
 Trp Ala Ala Asn Asn Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Gly
 100 105 110
 Ser Thr Leu Glu Ala Val Asn Ala Arg Gly Val Val Val Ala Ala Ala
 115 120 125
 Gly Asn Gly Ser Gly Thr Val Gly Tyr Pro Ala Arg Tyr Ser Ile Ala
 130 135 140
 Val Gly Ala Val Asp Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Ser Tyr Gly Glu
 145 150 155 160
 Leu Asp Ala Pro Gly Val Ile Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Asn Tyr Ala
 165 170 175
 Ser Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala
 180 185 190
 Leu Val Lys Lys Pro Ser Trp Asn Gln Ile Arg Asn Leu Asn Thr Ala
 195 200 205

[0034]

Thr Asn Leu Gly Ser Phe Tyr Gly Gly Leu Asn Ala Ala Ala
 210 215 220

<210> 46
 <400> 46
 000

<210> 47
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列: 吉氏芽孢杆菌 (B. gibsonii) -进化枝枯草杆菌蛋白酶基序

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa可以是任意天然存在的氨基酸。

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (5)..(6)
 <223> Xaa可以是任意天然存在的氨基酸。

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (11)..(13)
 <223> Xaa可以是任意天然存在的氨基酸。

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (18)..(22)
 <223> Xaa可以是任意天然存在的氨基酸。

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任意天然存在的氨基酸。

<400> 47
 Asp Xaa Gly Ile Xaa Xaa His Ser Asp Leu Xaa Xaa Xaa Gly Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Thr Thr Ala Asp Leu Asn Xaa His Gly
 20 25 30

[0035]

Thr His

<210> 48
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列: 接头序列

<400> 48
 ggatcctgac tgacctgagct t 21

<210> 49
 <211> 268
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列: DSM 9728枯草杆菌蛋白酶的经加工成熟形式 (268个氨基酸) 的氨基酸序列

<400> 49
 Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Thr Arg Val Gln Ala Pro Ala Val His
 1 5 10 15

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

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

Val Pro Gly Glu Pro Thr Thr Ala Asp Leu Asn Gly His Gly Thr His
 50 55 60

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

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

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

Ala Asn Asn Met His Ile Ala Asn Met Ser Leu Gly Ser Asp Ala Pro
 115 120 125

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

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

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

Asn Arg Arg Ala Asn Phe Ser Gln Tyr Gly Thr Gly Ile Asp Ile Val
 180 185 190

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

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

Ala Leu Val Lys Gln Arg Tyr Pro Ser Trp Asn Ala Thr Gln Ile Arg
 225 230 235 240

Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Asn Leu Gly Asn Ser Ser Gln Phe
 245 250 255

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

<210> 50
 <211> 268
 <212> FRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列: DSM 9729枯草杆菌蛋白酶的经加工成熟形式(268个氨基酸)的氨基酸序列

<400> 50

[0036]

Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Thr Arg Val Gln Ala Pro Ala Val His
 1 5 10 15

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

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

Val Pro Gly Glu Pro Thr Thr Ala Asp Leu Asn Gly His Gly Thr His
 50 55 60

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

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

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

Thr Asn Asn Met His Ile Ala Asn Met Ser Leu Gly Ser Asp Phe Pro
 115 120 125

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

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

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

Asn Arg Arg Ala Asn Phe Ser Gln Tyr Gly Thr Gly Ile Asp Ile Val
 180 185 190

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

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

Ala Leu Val Lys Gln Arg Tyr Pro Ser Trp Asn Ala Thr Gln Ile Arg
 225 230 235 240

Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Asn Leu Gly Asn Ser Ser Gln Phe

245 250 255
 Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
 260 265

 <210> 51
 <211> 268
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成序列: DSM 9730枯草杆菌蛋白酶的经加工成熟形式(268个氨基酸)的氨基酸序列

 <400> 51
 Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Thr Arg Val Gln Ala Pro Ala Val His
 1 5 10 15

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

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

 Val Pro Gly Glu Pro Thr Thr Ala Asp Leu Asn Gly His Gly Thr His
 50 55 60

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

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

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

 Ala Asn Asn Met His Ile Ala Asn Met Ser Leu Gly Ser Asp Ala Pro
 115 120 125

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

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

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

 Asn Arg Arg Ala Asn Phe Ser Gln Tyr Gly Thr Gly Ile Asp Ile Val
 180 185 190

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

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

 Ala Leu Val Lys Gln Arg Tyr Pro Ser Trp Asn Ala Thr Gln Ile Arg
 225 230 235 240

 Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Asn Leu Gly Asn Ser Ser Gln Phe
 245 250 255

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

 <210> 52
 <211> 268
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成序列: DSM 9731枯草杆菌蛋白酶的经加工成熟形式(268个氨基酸)的氨基酸序列

 <400> 52
 Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Thr Arg Val Gln Ala Pro Ala Val His
 1 5 10 15

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

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

 Val Pro Gly Glu Pro Thr Thr Ala Asp Leu Asn Gly His Gly Thr His
 50 55 60

[0037]

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

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

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

Ala Asn Asn Met His Ile Ala Asn Met Ser Leu Gly Ser Asp Ala Pro
115 120 125

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

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

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

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

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

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

Ala Leu Val Lys Gln Arg Tyr Pro Ser Trp Asn Ala Thr Gln Ile Arg
225 230 235 240

Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Asn Leu Gly Asn Ser Ser Gln Phe
245 250 255

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

[0038]

<210> 53
<211> 810
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列: 编码Bgi02446枯草杆菌蛋白酶I的核苷酸序列

<400> 53
caacaaacag tgccatgggg aattactcgt gtgcaagccc cagctgttca taaccgtgga 60
attacaggtt ctgggtaag agttgctatc ctcgattcag gtatttccgc ccatagtgac 120
ttaaatttc gtggtggcgc tagctttgta ccaggggaac caacgactgc tgatttaaat 180
gggcatggca cgcattgtgc tgggacggta gctgctttaa acaattcgat tggcgttatt 240
ggcgtagcac cgaacgcgga actatacctc gttaaagiat tagggcgaa tggttcaggt 300
tcggtcagcg ggattgccc aggattggaa tggcgagcaa ccaataacat gcacattgct 360
aatatgatt taggaagcga ttttccaagt tctacacttg agcgtgctgt taattatgcg 420
acttctagag atgttcttgt tattgcgcca actgggaata acggttctgg ctcagtaggc 480
tatccgccc gttatgcgaa cgcaatggca gtccggacta ctgacaaaa caacagacgc 540
gccaactttt cacagtatgg cacgggatt gacattgtcg caccaggtgt aaacgtgcag 600
agcacatacc caggtaaccc ttatgtgagc atgaacggta catcgatgac tactctcat 660
gttcaggtg cagcagccct tgttaaacia cgctatccat cttggaatgc gactcaaatc 720
cgcaatcacc taaagaatac ggcaacgaat ttaggaaact cttcacaatt tgggaagcga 780
cttgtcaatg cagaagcgcg aacacgctaa 810

<210> 54
<211> 810
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列: 编码DSM-9728枯草杆菌蛋白酶I的核苷酸序列

<400> 54
caacaaacag tgccatgggg aattactcgt gtgcaagccc cagctgttca taaccgtgga 60
gttacaggtt ctgggtaag agttgctatc ctcgattcag gtatttccac acatagtgac 120
ttaaacaatc gtggtggcgc tagctttgta ccaggggaac caacgactgc tgatttaaat 180
gggcatggca cgcattgtgc tgggacggta gctgctttaa acaattcgat tggcgttatt 240

```

ggcgtagcac cgcagcggg tctatacgt gttaaagtat tagggcgaa tggtagagt 300
tcggtcagcg ggattgccca aggattggaa tgggcagcag caataacat gcacattgct 360
aataatgatt taggaagcga tgcaccaagt acaacacttg agcgtgctgt taattatgcg 420
acttctcaag cgttcttgt tattcggca actgggaata acggttctgg ctcagtaggc 480
tatccggccc gttatgcgaa cgcaatggca gtcggagcta ctgaccaaaa caacagacgc 540
gccaactttt cacagtatgg caggggatt gacattgtcg caccaggtgt aaacgtgcag 600
agcacatacc caggtaaccg ttaigtgagc atgaacgcta catcgatgac tactctcat 660
gttcagagtg cagcagccct tgttaacaa cgctatccat ctggaaatgc gactcaaatc 720
cgcaatcacc taaagaatac ggcaacgaat ttaggaaact ctccacaatt tggaaagcga 780
cttgtcaatg cagaagcggc aacacgctaa 810
    
```

<210> 55
 <211> 810
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列：编码DSM-9731枯草杆菌蛋白酶的核苷酸序列

```

<400> 55
caaccaacag tgcattgggg aattactcgt gtgcaagccc cagctgttca taaccgtgga 60
gttacaggtt ctgggtgaag agttgctatc ctcgattcag gtatttccac acatagtgac 120
ttaacaattc gtggggcgc tagctttgta ccaggggaac caacgactgc tgatttfaat 180
gggcatggca cgcattgggc tgggacgcta gctgctttaa acaattcgat tggcgttatt 240
ggcgtagcac cgcagcggg tctatacgt gttaaagtat tagggcgaa tggtagagt 300
tcggtcagcg ggattgccca aggattggaa tgggcagcag caataacat gcacattgct 360
aataatgatt taggaagcga tgcaccaagt acaacacttg agcgtgctgt taattatgcg 420
acttctcaag cgttcttgt tattcggca actgggaata acggttctgg ctcagtaggc 480
tatccggccc gttatgcgaa cgcaatggca gtcggagcta ctgaccaaaa caacagacgc 540
gccaactttt cacagtatgg ctcagggatt gacattgtcg caccaggtgt aaacgtgcag 600
agcacatacc caggtaaccg ttaigtgagc atgaacgcta catcgatgac tactctcat 660
gttcagagtg cagcagccct tgttaacaa cgctatccat ctggaaatgc gactcaaatc 720
cgcaatcacc taaagaatac ggcaacgaat ttaggaaact ctccacaatt tggaaagcga 780
cttgtcaatg cagaagcggc aacacgctaa 810
    
```

[0039]

<210> 56
 <211> 807
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列：编码BG5-F02枯草杆菌蛋白酶的核苷酸序列

```

<400> 56
caaccaacag tgcattgggg aattactcgt gtgcaagccc cagctgttca taaccgtgga 60
attacaggtt ctgggtgaag agttgctatc ctcgattcag gtatttccgc ccatagtgac 120
ttaaatattc gtggggcgc tagctttgta ccaggggaac caacgactgc tgatttfaat 180
gggcatggca cgcattgggc tgggacgcta gctgctttaa acaattcgat tggcgttatt 240
ggcgtagcac cgaacggga actatacgt gttaaagtat tagggcgaa tggtagagt 300
tcggtcagcg ggattgccca aggattggaa tgggcagcaa caataacat gcacattgct 360
aataatgatt taggaagcga tttccaagt tctacacttg agcgtgctgt taattatgcg 420
acttctcaag cgttcttgt tattcggca actgggaata acggttctgg ctcagtaggc 480
tatccggccc gttatgcgaa cgcaatggca gtcggagcta ctgaccaaaa caacagacgc 540
gccaactttt cacagtatgg caggggaatt gacattgtcg caccaggtgt aaacgtgcag 600
agcacatacc caggtaaccg ttaigtgagc atgaacgcta catcgatgac tactctcat 660
gttcagagtg cagcagccct tgttaacaa cgctatccat ctggaaatgc gactcaaatc 720
cgcaatcacc tgaanaatac ggcaacgaat ttaggaaact ctccacaatt tggaaagcga 780
cttgtcaatg cagaagcggc aacacgc 807
    
```

<210> 57
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列：BG5-F02枯草杆菌蛋白酶的成熟形式的预测氨基酸序列

```

<400> 57
Gln Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Thr Arg Val Gln Ala Pro Ala Val
1 5 10 15
    
```

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

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

Phe Val Pro Gly Glu Pro Thr Thr Ala Asp Leu Asn Gly His Gly Thr
 50 55 60

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

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

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

Ala Thr Asn Asn Met His Ile Ala Asn Met Ser Leu Gly Ser Asp Phe
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Leu Val Lys Gln Arg Tyr Pro Ser Trp Asn Ala Thr Gln Ile
 225 230 235 240

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

Phe Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
 260 265

[0040]

<210> 58
 <211> 807
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列：编码BG5-E05枯草杆菌蛋白酶I的核苷酸序列

<400> 58
 caacaacag tgccatgggg aattactcgt gtgcaagccc cagctgttca taaccgtgga 60
 attacaggtt ctggtgtaag agttgctatc ctcgattcag gtatttccgc ccatagtac 120
 ttaaatatc gtggtggcgc tagctttgta ccaggggaac caacgactgc tgattaaat 180
 gggcaatgca cgcattgtgc tgggacgcta gctgctttaa acaattcgat tggcgttatt 240
 ggcgtagcac cgaacgcgga actatacgcg gttaaagtat tagggcgcaa tggttcaggt 300
 tcggtcagcg ggattgccca aggattggaa tgggcagcaa ccaataacat gcacattgct 360
 aatatgagtt taggaagcga ttttccaagt tctacacttg agcgtgctgt taattatgcg 420
 acttctagag atgttcttgt tatfgegcca actgggaata acggttctgg ctccagtagc 480
 tatccggccc gttatgcgaa cgcaatggca gtcggagcta ctgacaaaa caacagacgc 540
 gccaactttt cacagtatgg cgcaggcgtg gacattgtcg caccaggtgt aaacgtgcag 600
 agcacatacc caggtaaccc ttaatgtgagc atgaacgcta catcgatggc tactcctcat 660
 gttcaggtg cagcagccct tgttaaacia cgctatccat cttggaatgc gactcaaatc 720
 cgcaatcacc taaagaatac ggcaacgaat ttaggaaact cttcacaatt tggaaagcga 780
 cttgtcaatg cagaagcgc aacacgc 807

<210> 59
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列: B65-E05枯草杆菌蛋白酶的成熟形式的预测氨基酸序列
 <400> 59
 Gln Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Thr Arg Val Gln Ala Pro Ala Val
 1 5 10 15
 His Asn Arg Gly Ile Thr Gly Ser Gly Val Arg Val Ala Ile Leu Asp
 20 25 30
 Ser Gly Ile Ser Ala His Ser Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser
 35 40 45
 Phe Val Pro Gly Glu Pro Thr Thr Ala Asp Leu Asn Gly His Gly Thr
 50 55 60
 His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Ile
 65 70 75 80
 Gly Val Ala Pro Asn Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala
 85 90 95
 Asn Gly Ser Gly Ser Val Ser Gly Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala
 100 105 110
 Ala Thr Asn Asn Met His Ile Ala Asn Met Ser Leu Gly Ser Asp Phe
 115 120 125
 Pro Ser Ser Thr Leu Glu Arg Ala Val Asn Tyr Ala Thr Ser Arg Asp
 130 135 140
 Val Leu Val Ile Ala Ala Thr Gly Asn Asn Gly Ser Gly Ser Val Gly
 145 150 155 160
 Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln
 165 170 175
 Asn Asn Arg Arg Ala Asn Phe Ser Gln Tyr Gly Ala Gly Leu Asp Ile
 180 185 190
 Val Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Asn Arg Tyr
 195 200 205
 Val Ser Met Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala
 210 215 220
 Ala Ala Leu Val Lys Gln Arg Tyr Pro Ser Trp Asn Ala Thr Gln Ile
 225 230 235 240
 Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Asn Leu Gly Asn Ser Ser Gln
 245 250 255
 Phe Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
 260 265

[0041]

<210> 60
 <211> 807
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成序列: 编码B61-C05枯草杆菌蛋白酶的核苷酸序列
 <400> 60
 caacaacag tgccatgggg aattactcgt gtgcaagccc cagctgttca taacctgga 60
 attacaggtt ctggtgtaag agttctatc ctcgattcag gtatttcgc ccatagtagc 120
 ttaaatattc gtggtggcgc tagctttgta ccaggggaac caacgactgc tgatttaaat 180
 ggcgatggca cgcattgtgc tgggacgta gctgctttaa acaattcgat tggcgttatt 240
 ggcgtagcac cgaacgcgga actatacgtc gttaaagtat tagggcgaa tggtagaggt 300
 tggctcagcg ggattgccca aggattgtaa tggcgagcaa ccaataacat gcacattgct 360
 aatatgagtt taggaagcga tgcaccaagt actacaattg agcgtgctgt taattatgcg 420
 acttctagag atgttcttgt tattgcgca actgggaata acggttctgg ctcagtaggc 480
 tatccggccc gttatgcgaa cgcaatggca gtccgagcta ctgaccaaaa caacagacgc 540
 gccaatcttt cacagtatgg cacggggatt gacattgtcg caccaggtgt aaactgtagc 600
 agcacatacc caggaaccg ttatgtgagc atgaacggta catcgatgga tactctcat 660
 gttgcaggtg cagcagccct tgttaacaa cgctatccat cttggaatgc gactcaaatc 720
 cgcaatcctc taaagaatac ggcaacgaat ttaggaaact cttcacaatt tggaaagcga 780
 cttgtcaatg cagaagcggc aacacgc 807

<210> 61
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列: BG1-C05枯草杆菌蛋白酶的成熟形式的预测氨基酸序列

<400> 61
 Gln Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Thr Arg Val Gln Ala Pro Ala Val
 1 5 10 15
 His Asn Arg Gly Ile Thr Gly Ser Gly Val Arg Val Ala Ile Leu Asp
 20 25 30
 Ser Gly Ile Ser Ala His Ser Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser
 35 40 45
 Phe Val Pro Gly Glu Pro Thr Thr Ala Asp Leu Asn Gly His Gly Thr
 50 55 60
 His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Ile
 65 70 75 80
 Gly Val Ala Pro Asn Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala
 85 90 95
 Asn Gly Arg Gly Ser Val Ser Gly Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala
 100 105 110
 Ala Thr Asn Asn Met His Ile Ala Asn Met Ser Leu Gly Ser Asp Ala
 115 120 125
 Pro Ser Thr Thr Leu Glu Arg Ala Val Asn Tyr Ala Thr Ser Arg Asp
 130 135 140
 Val Leu Val Ile Ala Ala Thr Gly Asn Asn Gly Ser Gly Ser Val Gly
 145 150 155 160
 Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln
 165 170 175
 Asn Asn Arg Arg Ala Asn Phe Ser Gln Tyr Gly Thr Gly Ile Asp Ile
 180 185 190
 Val Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Asn Arg Tyr
 195 200 205
 Val Ser Met Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala
 210 215 220
 Ala Ala Leu Val Lys Gln Arg Tyr Pro Ser Trp Asn Ala Thr Gln Ile
 225 230 235 240
 Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Asn Leu Gly Asn Ser Ser Gln
 245 250 255
 Phe Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
 260 265

[0042]

<210> 62
 <211> 807
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列: 编码BC2-D10枯草杆菌蛋白酶的核苷酸序列

<400> 62
 caacaaacag tgccatgggg aattactcgt gtgcaagccc cagctgttca taaccgtgga 60
 attacaggtt ctgggtgaag agttgctatc ctcgattcag gtatttcgcg ccatagtgac 120
 ttaaatattc gtggtggcgc tagctttgta ccaggggaac caacgactgc tgatttaaat 180
 gggcatggca cgcaigtggc tgggacggtg gctgctttaa acaattcgat tggcgttatt 240
 ggcgtagcac cgaacgcgga actatacgct gttaaagtat tagggcgcaa tgggtcaggt 300
 tcggtcagcg ggattgccca aggattggaa tgggcagcaa ccaataacat gcacattgct 360
 aatatgagtt taggaagcga tgcaccaagt acaacacttg agcgtgetgt taattatgcg 420
 acttctcaag cgttcttctg tattgaggca actgggaata acggttctgg ctccagtaggc 480
 tatccgcccc gttatgcgaa cgcaatggca gtcggageta ctgacaaaa caacagacgc 540
 gccaactttt cacagtatgg caccgggatt gacattgtcg caccaggtgt aaacgtgcag 600

```

agcacatacc caggtaaccg ttatgtgagc atgaacggta catcgatggc tactctctcat    660
gttgcaggtg cagcagccct tgtaaacaac cgctatccat cttggaatgc gactcaaatc    720
cgcaatcctc taaagaatac ggcaacgaat ttaggaaact cttcacaatt tggaaagcga    780
cttgtcaatg cagaagcggc aacacgc                                          807

```

```

<210> 63
<211> 269
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列: BG2-D10枯草杆菌蛋白酶成熟形式的预测氨基酸序列

<400> 63

```

```

Gln Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Thr Arg Val Gln Ala Pro Ala Val
1      5      10     15

```

```

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

```

```

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

```

```

Phe Val Pro Gly Glu Pro Thr Thr Ala Asp Leu Asn Gly His Gly Thr
50     55     60

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

Ala Ala Leu Val Lys Gln Arg Tyr Pro Ser Trp Asn Ala Thr Gln Ile
225    230    235    240

```

```

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

```

```

Phe Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
260    265

```

```

<210> 64
<211> 807
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列: 编码BC1-B08枯草杆菌蛋白酶的核苷酸序列

<400> 64

```

```

caacaacag tgccatgggg aattactcgt gtgcaagccc cagctgttca taaccgtgga    60

```

```

attacaggtt ctggtgtaag agttgctatc ctcgattcag gtatttccgc ccatagtgac    120

```

```

ttaaataattc gtggtggcgc tagctttgta ccagggaac caacgactgc tgatttaaat    180

```

```

gggcatggca cgcgatgtgc tgggacgcta gctgctttaa acaattcgat tggcgttatt    240

```

```

ggcgtagcac cgaacgcgga actatacgtt gttaaagtat tagggcgaa tgggtcaggt    300

```

```

tcggtcagcg ggattgccca aggattggaa tgggcagcaa ccaataacat gcacattgct    360

```

```

aatatgagtt taggaagcga ttttccaagt tctacacttg agcgtgctgt taattatgct    420

```

[0043]

```

actctcaag gcgtcttctgt tattgcggca actgggaata acggttctgg ctcagtaggc 480
tatccggccc gttatgcgaa cgcaatggca gtcggagcta ctgaccaaaa caacagacgc 540
gccaactttt cacagtatgg cacggggatt gacattgtcg caccaggtgt aaacgtgcag 600
agcacatacc caggtaacgc ttatgtgagc atgaacgcta catcgatggc tactctctcat 660
gttcaggtg cagcagccct tgtaaacaac cgtatccat cttggaatgc gactcaaatc 720
cgcaatcacc taaagaatac ggcaacgaat ttaggaaaca caaatctgta tggaagcgga 780
cttgtcaatg cagaagcggc aacacgc 807
    
```

```

<210> 65
<211> 269
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列: BG1-B08枯草杆菌蛋白酶的成熟形式的预测氨基酸序列

<400> 65
    
```

```

Gln Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Thr Arg Val Gln Ala Pro Ala Val
1      5      10      15

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

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

Phe Val Pro Gly Glu Pro Thr Thr Ala Asp Leu Asn Gly His Gly Thr
50     55     60

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

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

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

Ala Thr Asn Asn Met His Ile Ala Asn Met Ser Leu Gly Ser Asp Phe
115    120    125

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Leu Val Lys Gln Arg Tyr Pro Ser Trp Asn Ala Thr Gln Ile
225    230    235    240

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

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

[0044]

```

<210> 66
<211> 807
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列: 编码BC4-A09枯草杆菌蛋白酶的核苷酸序列

<400> 66
caacaaacag tgccatgggg aattactcgt gtgcaagccc cagctgttca taaccgtgga 60
gttacaggtt ctgggtgaag agttgctgtt ctcgatacag gtatttccgc ccatagtgac 120
ttaaattatc gtggtggcgc tagctttgta ccaggggaac caacgactgc tgattttaa 180
    
```

```

gggcatggca cgcattgggc tgggacgga gctgctttaa acaattcgat tggcgttatt      240
ggcgtagcac cgaacgcgga actatacgct gttaaagat tagggcgaa tgggtcaggt      300
tcggtcagcg ggattgccca aggattgaa tgggcagcaa ccaataacat tcacattgct      360
aatatgagtt taggaacaga tgcaccaagt acaacacttg agcgtgctgt taattatgcg      420
acttctcaag cggttcttgt tattgcgca actgggaata acggttctgg cacaatttca      480
tatccggccc gttatgcgaa cgcaatggca gtcggagcta ctgaccaaaa caacaatcgc      540
gccctathtt cacagtatgg cgcaggctg gacattgtcg caccaggtgt aaacgtcagc      600
agcacatacc caggtaaccg ttatgtgagc atgaacgga catcgatgac tactctctcat      660
gttcagagtg cagcagccct gtttaacaa cgctatccat cttggaatgc gactcaaatc      720
cgcaatcacc taaagaatac ggcaacgaat ttaggaaact cttcacaatt tgggaagcga      780
cttgtcaatg cagaagcggc aacacgc      807

```

<210> 67
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列：BC4-A09枯草杆菌蛋白酶的成熟形式的预测氨基酸序列
 <400> 67

```

Gln Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Thr Arg Val Gln Ala Pro Ala Val
1      5      10      15
His Asn Arg Gly Val Thr Gly Ser Gly Val Arg Val Ala Val Leu Asp
20     25     30
Thr Gly Ile Ser Ala His Ser Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser
35     40     45
Phe Val Pro Gly Glu Pro Thr Thr Ala Asp Leu Asn Gly His Gly Thr
50     55     60
His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Ile
65     70     75     80
Gly Val Ala Pro Asn Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala
85     90     95
Asn Gly Ser Gly Ser Val Ser Gly Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala
100    105   110
Ala Thr Asn Asn Ile His Ile Ala Asn Met Ser Leu Gly Thr Asp Ala
115   120   125
Pro Ser Thr Thr Leu Glu Arg Ala Val Asn Tyr Ala Thr Ser Gln Gly
130   135   140
Val Leu Val Ile Ala Ala Thr Gly Asn Asn Gly Ser Gly Thr Ile Ser
145   150   155   160
Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln
165   170   175
Asn Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Ala Gly Leu Asp Ile
180   185   190
Val Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Asn Arg Tyr
195   200   205
Val Ser Met Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala
210   215   220
Ala Ala Leu Val Lys Gln Arg Tyr Pro Ser Trp Asn Ala Thr Gln Ile
225   230   235   240
Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Asn Leu Gly Asn Ser Ser Gln
245   250   255
Phe Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
260   265

```

[0045]

<210> 68
 <211> 807
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列：编码BC4-D10枯草杆菌蛋白酶的核苷酸序列

```

<400> 68
caacaaacag tgcgatggg aattactgt gtgcaagccc cagctgttca taaccgtgga      60
tttacaggtt ctggigtgta agttgtctatc ctgcattcag gtatttccac acatagtgc      120
ttaacaattc gtgggtggcg tagcttttga ccaggsgaac caacgactgc tgattttaa      180
gggcatggca cgcaigtggc tgggacggta gctgctttaa acaattcgat tggcgttcg      240
ggcgtagcac cgaacgcgga actatacgtc gttaaagtat tagggcgaa tggttcaggt      300
tcgattagcg ggattgccc aggattggaa tgggcagcag caaataacat gcacattgct      360
aatatgagtt taggaacaga tgcaccaagt tctacacttg agcgtgctgt taattatgcg      420
actttcaag gcgttcttgt tattgcgga actgggaata acggttcg cacaatttca      480
tatccggccc gttatgcgaa cgcaatggca gtcggagcta ctgacaaaa caacagacgc      540
gccaactttt cacagtatgg ctgaggatt gacattgtcg caccaggtgt aaacgtgcag      600
agcacatacc caggtaacgc ttatgcaagc ctgtcaggta catcgatggc tactcctcat      660
gttgcaggtg cagcagccct tgtaaaca cgcctatccat cttggaatgc gactcaaatc      720
cgcaatcctc taaagaatac ggcaacgaat ttaggaaact cttcacaatt tggaagcgga      780
cttgtcaatg cagaagcggc aacacgc      807

```

```

<210> 69
<211> 269
<212> PRT
<213> 人工序列

```

```

<220>
<223> 合成序列: BG4-D10枯草杆菌蛋白酶成熟形式的预测氨基酸序列

```

```

<400> 69
Gln Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Thr Arg Val Gln Ala Pro Ala Val      1
1      5      10      15
His Asn Arg Gly Phe Thr Gly Ser Gly Val Arg Val Ala Ile Leu Asp      20
20      25      30
Ser Gly Ile Ser Thr His Ser Asp Leu Thr Ile Arg Gly Gly Ala Ser      35
35      40      45
Phe Val Pro Gly Glu Pro Thr Thr Ala Asp Leu Asn Gly His Gly Thr      50
50      55      60
His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu      65
65      70      75      80
Gly Val Ala Pro Asn Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala      85
85      90      95
Asn Gly Ser Gly Ser Ile Ser Gly Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala      100
100      105      110
Ala Ala Asn Asn Met His Ile Ala Asn Met Ser Leu Gly Thr Asp Ala      115
115      120      125
Pro Ser Ser Thr Leu Glu Arg Ala Val Asn Tyr Ala Thr Ser Gln Gly      130
130      135      140
Val Leu Val Ile Ala Ala Thr Gly Asn Asn Gly Ser Gly Thr Ile Ser      145
145      150      155      160
Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln      165
165      170      175
Asn Asn Arg Arg Ala Asn Phe Ser Gln Tyr Gly Ser Gly Ile Asp Ile      180
180      185      190
Val Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Asn Arg Tyr      195
195      200      205
Ala Ser Leu Ser Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala      210
210      215      220
Ala Ala Leu Val Lys Gln Arg Tyr Pro Ser Trp Asn Ala Thr Gln Ile      225
225      230      235      240
Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Asn Leu Gly Asn Ser Ser Gln      245
245      250      255
Phe Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg      260
260      265

```

[0046]

<210> 70

<211> 807
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列：编码BG2-B08枯草杆菌蛋白酶的核苷酸序列

<400> 70
 caacaaacag tggcatgggg aattactcgt gtgcaagccc cagctgttca taaccgtgga 60
 attacaggtt ctgggtgaag agttgctatc ctgattcag gtatttcgc ccatagtac 120
 ttaaatattc gtggggcgc tagctttgta ccaggggaac caacgactgc tgatttaaat 180
 gggcatggca cgcatgtggc tgggacgta gctgctttaa acaattcgat tggcgttatt 240
 ggcgtagcac cgaacgcgga actatacget gttaaagtat tagggcgctc aggttcaggt 300
 tcgattagcg ggattgccca aggattgcaa tgggcagcaa ccaataacat gcacattgct 360
 aataatgatt taggaagcga tgcaccaagt acaacacttg agcgtgctgt taattatgcg 420
 acttctagag atgttcttgt tattgcgca actgggaata acggttctgg ctcagtaggc 480
 tatccggccc gttatgcgaa cgcaatggca gtcggagcta ctgacaaaa caacagacgc 540
 gccaaacttt cacagtatgg cacggggatt gacattgtcg caccaggtgt aaacgtgcag 600
 agcacatacc caggtaaccg ttaigtgagc atgaacgta catcgatgac tactctcat 660
 gttcaggtg cagcagccct tgtaaacaac cgctatccat ctggaatgc gactcaaatc 720
 cgcaatcacc taaagaatac ggcaacgaat ttaggaact ctccacaatt tggaagcgga 780
 cttgtcaatg cagaagcggc aacacgc 807

<210> 71
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列：BG2-B08枯草杆菌蛋白酶的成熟形式的预测氨基酸序列

<400> 71
 Gln Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Thr Arg Val Gln Ala Pro Ala Val 1
 5 10 15
 His Asn Arg Gly Ile Thr Gly Ser Gly Val Arg Val Ala Ile Leu Asp 20
 25 30
 Ser Gly Ile Ser Ala His Ser Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser 35
 40 45
 Phe Val Pro Gly Glu Pro Thr Thr Ala Asp Leu Asn Gly His Gly Thr 50
 55 60
 His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Ile 65
 70 75 80
 Gly Val Ala Pro Asn Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala 85
 90 95
 Ser Gly Ser Gly Ser Ile Ser Gly Ile Ala Gln Gly Leu Gln Trp Ala 100
 105 110
 Ala Thr Asn Asn Met His Ile Ala Asn Met Ser Leu Gly Ser Asp Ala 115
 120 125
 Pro Ser Thr Thr Leu Glu Arg Ala Val Asn Tyr Ala Thr Ser Arg Asp 130
 135 140
 Val Leu Val Ile Ala Ala Thr Gly Asn Asn Gly Ser Gly Ser Val Gly 145
 150 155 160
 Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln 165
 170 175
 Asn Asn Arg Arg Ala Asn Phe Ser Gln Tyr Gly Thr Gly Ile Asp Ile 180
 185 190
 Val Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Asn Arg Tyr 195
 200 205
 Val Ser Met Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala 210
 215 220
 Ala Ala Leu Val Lys Gln Arg Tyr Pro Ser Trp Asn Ala Thr Gln Ile 225
 230 235 240
 Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Asn Leu Gly Asn Ser Ser Gln 245
 250 255

[0047]

Phe Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
 260 265

<210> 72
 <211> 807
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列: 编码BG8-B03枯草杆菌蛋白酶I的核苷酸序列

<400> 72
 gcacaaacag tgccatgggg aattactcgt gtgcaagccc cagctgttca taaccgtgga 60
 attacagtt ctggtgtaag aggttgctat cctcgattca ggtatttccg cccatagtga 120
 cttaaacaatt cgtggtggcg ctgctttgta ccagggaac caacgactgc tgatttaaat 180
 ggcgatgcca cgcagtggc tgggacgta gctgctttaa acaattcgat tggcgttatt 240
 ggcgtagcac cgtcagcga tctatagct gttaaagtat tagggcgaa tggtagaggt 300
 tcgctagcgc ggattgccca aggattggaa tggcgagcaa ccaataacat gcacattgct 360
 aatatgagti taggaagcga tgcaccaagt acaacacitg agcgtgctgt taattatgcg 420
 acttctcaag cgttcttgt tattgcgca actgggaata acggttctgg cttagtaggc 480
 tatccggccc gttatgcgaa cgcaatggca gtcggagcta ctgacaaaa caacaatgc 540
 gcctcatttt cacagtatgg cgcaggcgtg gacattgtcg caccaggtgt aaacgtcag 600
 agcacatacc caggaaccg ttatgtgagc atgaacgta catcgatgac tactctcat 660
 gttgcaggtg ttgcagccct tgttaaacia cgtatccat cttggaatgc gactcaaatc 720
 cgcaatcacc taaagaatac ggcaacgaat ttaggaaact cttcacaatt tggaagcggg 780
 cttgtcaatg cagaagcggc aacacgc 807

<210> 73
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列: BG8-B03枯草杆菌蛋白酶I的成熟形式的预测氨基酸序列

<400> 73

[0048]

Ala Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Thr Arg Val Gln Ala Pro Ala Val
 1 5 10 15

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

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

Phe Val Pro Gly Glu Pro Thr Thr Ala Asp Leu Asn Gly His Gly Thr
 50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Leu Val Lys Gln Arg Tyr Pro Ser Trp Asn Ala Thr Gln Ile
 225 230 235 240

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

Phe Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
 260 265

<210> 74
 <211> 807
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列: 编码BG6-A10枯草杆菌蛋白酶的核苷酸序列

<400> 74
 caacaaacag tgccatgggg aattactcgt gtcaagccc cagctgttca taaccgtgga 60
 attacaggtt ctggtgtaag agttgctatc ctgcattcag gtatttccgc ccatagtgac 120
 ttaaatattc gtggtggcgc tagctttgta ccagggaac caacgactgc tgattaaat 180
 gggcatggca cgcattgtgc tgggacgcta gctgcittaa acaattcgat tggcgttatt 240
 gscgtagcac cgaacgcgga actatacctt gttaaagtat tagggcgcgc aggttcaggt 300
 tcgctcagcg ggattgcccc aggattggaa tgggcagcaa ccaataacat gcacattgct 360
 aatatgagtt taggaagcga ttttccaagt tctacacttg agcgtgctgt taattatgag 420
 acctctagag atgttcttgt tattgaggca actgggaata acggttctgg ctccagtaggc 480
 tatccggccc gttatgcaaa cgcaatggca gtcggagcta ctgaccaaaa caacagacgc 540
 gccaactttt cacagtatgg cacggggatt gacattgtcg caccagggtg aaacgtgcag 600
 agcacatacc caggtaaccc ttatgtgagc atgaacgcta catcgatgac tactcctcat 660
 gttcaggtg cagcagccct tgttaaacia cgctatccat ctiggaaatgc gactcaaatc 720
 cgcaatcacc taaagaatac ggcaacgaat ttaggaaaca caaatctgta iggaagcaga 780
 cttgtcaatg cagaagcggc aacacgc 807

<210> 75
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列: BG6-A10枯草杆菌蛋白酶的成熟形式的预测氨基酸序列

<400> 75
 Gln Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Thr Arg Val Gln Ala Pro Ala Val
 1 5 10 15

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

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

Phe Val Pro Gly Glu Pro Thr Thr Ala Asp Leu Asn Gly His Gly Thr
 50 55 60

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

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

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

Ala Thr Asn Asn Met His Ile Ala Asn Met Ser Leu Gly Ser Asp Phe
 115 120 125

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

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

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

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

[0049]

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

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

Ala Ala Leu Val Lys Gln Arg Tyr Pro Ser Trp Asn Ala Thr Gln Ile
 225 230 235 240

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

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

<210> 76
 <211> 807
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列：编码BG6-D08枯草杆菌蛋白酶的核苷酸序列

<400> 76
 caacaatcag tgcgatgggg aatttcacgt gtgcaagccc cagctgttca taaccgtgga 60
 attacaggti cagggtgaag agttgctatc ctcgattcag gtatttccgc ccatagtgac 120
 ttaaatattc gtggtagcgc tagctttgta ccaggggaac caacgactgc tgattttaat 180
 ggcgatggca cgcgatgtggc tgggacggta gctgctttaa acaattcgat tggcgttatt 240
 ggcgatgac cgcagcggga tctatacgtt gttaaagtat tagggcgaa tggctcaggt 300
 tcggtcagcg ggattgccca aggatgggaa tgggcagcag caataacat gcacattgct 360
 aatatgagti taggaagcga ttttccaagt tctacacttg agcgtgctgt taattatgcg 420
 acttctagag atgttcttgt tattgoggca actgggaata acggttctgg ctcagtaggc 480
 tatccggccc gttatgcgaa cgcaatggca gtcggagcta ctgacaaaa caacagacgc 540
 gccaaacttti cacagtatgc cagggggatt gacattgtcg caccagggtt aaacgtgcag 600
 agcacatacc caggtaaccg ttatgtgagc atgaacggta catcgatgce tactctccat 660
 gttgcaggtg cagcagccct tgttaaaca cgctatccat cttggaatgc gactcaaatc 720
 cgcaatcacc taaagaatac ggcaacgaat ttaggaaca caaatctgta tggaaagcga 780
 cttgtcaatg cagaagcggc aacacgc 807

[0050]

<210> 77
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列：BG6-D08枯草杆菌蛋白酶的成熟形式的预测氨基酸序列

<400> 77
 Gln Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Thr Arg Val Gln Ala Pro Ala Val
 1 5 10 15

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

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

Phe Val Pro Gly Glu Pro Thr Thr Ala Asp Leu Asn Gly His Gly Thr
 50 55 60

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

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

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

Ala Thr Asn Asn Met His Ile Ala Asn Met Ser Leu Gly Ser Asp Phe
 115 120 125

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

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

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

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

<210> 78
 <211> 807
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列：编码BG5-G10枯草杆菌蛋白酶I的核苷酸序列

<400> 78
 caacaaacag tggcatgggg aattactcgt gtgcaagccc cagctgttca taaccgtgga 60
 attacaggtt ctgggtgaag agttgctate ctcgattcag gtatttccgc ccatagtgac 120
 ttaaatattc gtgggtggcg tagctttgta ccaggggaac caacgactgc tgatttaaat 180
 gggcatggca cgcgatgggc tgggacgcta gctgctttaa acaattcgat tggcgttatt 240
 ggcgtagcac cgtcagcgga tctatacgtt gttaaagtat tagggcgaa tggttcaggt 300
 tcggtcagcg ggattgccca aggattggaa tgggcagcaa ccaataacat gcacattgct 360
 aatatgagtt taggaagcga tttccaagt tctacacttg agcgtgctgt taattatgag 420
 acttctagag atgttcttgt tattgcgca actgggaata acggttcigg ctccagtagc 480
 tatccggccc gttatgcgaa cgcaatggca gtccgagcta ctgacaaaa caacagacgc 540
 gccaaatttt cacagtatgg cacggggatt gacattgtcg caccaggtgt aaacgtgcag 600
 agcacatacc caggttaaccg ttaigtgagc atgaacggta catcgatggc tactctcat 660
 gttgcaggtg cagcagccct tgttaacaa cgctatccat ctgggaatgc gactcaaatc 720
 cgcaatcacc taaagaatac ggcaacgaat ttaggaacaa caaatctgta tggaagcgga 780
 cttgtcaatg cagaagcggc aacacgc 807

[0051]

<210> 79
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列：BG5-G10枯草杆菌蛋白酶I的成熟形式的预测氨基酸序列

<400> 79
 Gln Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Thr Arg Val Gln Ala Pro Ala Val
 1 5 10 15
 His Asn Arg Gly Ile Thr Gly Ser Gly Val Arg Val Ala Ile Leu Asp
 20 25 30
 Ser Gly Ile Ser Ala His Ser Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser
 35 40 45
 Phe Val Pro Gly Glu Pro Thr Thr Ala Asp Leu Asn Gly His Gly Thr
 50 55 60
 His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Ile
 65 70 75 80
 Gly Val Ala Pro Ser Ala Asp Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala
 85 90 95
 Asn Gly Ser Gly Ser Val Ser Gly Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala
 100 105 110
 Ala Thr Asn Asn Met His Ile Ala Asn Met Ser Leu Gly Ser Asp Phe
 115 120 125
 Pro Ser Ser Thr Leu Glu Arg Ala Val Asn Tyr Ala Thr Ser Arg Asp
 130 135 140

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

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

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

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

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

Ala Ala Leu Val Lys Gln Arg Tyr Pro Ser Trp Asn Ala Thr Gln Ile
 225 230 235 240

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

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

<210> 80
 <211> 807
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列：编码BG5-E02枯草杆菌蛋白酶的核苷酸序列

<400> 80
 caacaaacag tgccatgggg aatttcacgt gtgcaagccc cagctgttca taaccgtgga 60
 attacaggtt ctggtgtaag agttgctatc ctcgattcag gtatttcgcg ccatagtgac 120
 ttaaatattc gtggtggcgc tagctttgta ccaggggaac caacgactgc tgatttaaat 180
 gggcatggca cgcattgggc tgggacggtg gctgctttaa acaattcgat tggcgttatt 240
 ggcgtagcac cgaacgcgga actatacgtc gttaaagtat tagggcgcgc aggttcaggt 300
 tcgattagcg ggattgccc aggattggaa tgggcagcaa ccaataacat gcacattgct 360
 aatatgagtt taggaagcga tgcaccaagt acaacacttg agcgtgctgt taattatgcg 420
 acttctagag atgttcttgt tattgcggca actgggaata acggttctgg ctcagtaggc 480
 tatccgcccc gtatgcgaa cgcaatggca gtcggageta ctgacaaaa caacagacgc 540
 gccaaathtt cacagtatgg caccgggatt gacattgtcg caccaggtgt aaacgtgcag 600
 agcacatacc caggtaacgc ttatgtgagc atgaacggtg catcgatggc tactcctcat 660
 gttcaggtg cagcagccct tgttaaacaa cgctatccat cttggaatgc gactcaaatc 720
 cgcaatcctc taaagaatac ggcaacgaat ttaggaaaca caaatctgta tgggaagcga 780
 cttgtcaatg cagaagcggc aacacgc 807

[0052]

<210> 81
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列：BG5-E02枯草杆菌蛋白酶的成熟形式的预测氨基酸序列

<400> 81
 Gln Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Ser Arg Val Gln Ala Pro Ala Val
 1 5 10 15

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

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

Phe Val Pro Gly Glu Pro Thr Thr Ala Asp Leu Asn Gly His Gly Thr
 50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Leu Val Lys Gln Arg Tyr Pro Ser Trp Asn Ala Thr Gln Ile
 225 230 235 240

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

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

<210> 82
 <211> 807
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列: 编码BG2-G08枯草杆菌蛋白酶的核苷酸序列

[0053]

<400> 82
 caacaaacag tgccatgggg aattactcgt gtgcaagccc cagctgttca taaccgtgga 60
 attacaggtt ctggtgtaag agttgctatc ctcgattcag gtatttccgc ccatagtgac 120
 ttaaatatc gtggtgagc tagctttgta ccaggsgaac caacgactgc tgatttaaat 180
 gggcatggca cgcattgggc tgggacgcta gctgctttaa acaattcgat tggcgttatt 240
 ggcgtagcac cgaacgcca actatacgtc gttaaagtat tagggcgaa tggttcaggt 300
 tcggtcagcg ggattgccc aggattgaa tgggcagcaa ccaataacat gcacattgct 360
 aatatgagtt taggaagcga tgcaccaagt acaacacttg agcgtgctgt taattatgag 420
 actctcagc cgttcttgt tgttcgcca actggaata acggtctcgg ctcagtaggc 480
 tatccgccc gttatgcgaa cgcattggca gtcggagcta ctgacaaaa caacagacgc 540
 gccactttt cacagtatgg caggggatt gacattgtcg caccaggtgt aaacgtcga 600
 agcacatacc cagtaaccg ttatgtgagc atgaacgta catcgatgac tactctcat 660
 gttgcagtg cagcagccct tgttaaacia cgtatccat cttggaatgc gactcaaatc 720
 cgcaatcacc taaagaatac ggcaacgaat ttaggaaact ctccacaatt tggaaagcga 780
 cttgtcaatg cagaagcggc aacacgc 807

<210> 83
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列: BG2-G08枯草杆菌蛋白酶的成熟形式的预测氨基酸序列

<400> 83

Gln Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Thr Arg Val Gln Ala Pro Ala Val
 1 5 10 15

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

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

Phe Val Pro Gly Glu Pro Thr Thr Ala Asp Leu Asn Gly His Gly Thr
 50 55 60

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

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

<210> 84
 <211> 274
 <212> FRT
 <213> 地衣芽孢杆菌 (B. licheniformis)

[0054]

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1)..(274)
 <223> 地衣芽孢杆菌 (B. licheniformis) 枯草杆菌蛋白酶BliD02339的成熟形式的氨基酸序列
 <400> 84

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 Asn Val Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Asn
 85 90 95
 Ser Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Ser Gly Ile Val Ser Gly Ile Glu Trp
 100 105 110
 Ala Thr Thr Asn Gly Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Pro
 115 120 125
 Ser Gly Ser Thr Ala Met Lys Gln Ala Val Asp Asn Ala Tyr Ala Arg
 130 135 140
 Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Ser Gly Ser Ser Gly Asn
 145 150 155 160
 Thr Asn Thr Ile Gly Tyr Pro Ala Lys Tyr Asp Ser Val Ile Ala Val
 165 170 175
 Gly Ala Val Asp Ser Asn Ser Asn Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val Gly
 180 185 190

Ala Lys Leu Glu Val Met Ala Pro Gly Ala Gly Val Tyr Ser Thr Tyr
 195 200 205
 Pro Thr Ser Thr Tyr Ala Thr Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Ser Pro
 210 215 220
 His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn Leu
 225 230 235 240
 Ser Ala Ser Gln Val Arg Asn Arg Leu Ser Ser Thr Ala Thr Tyr Leu
 245 250 255
 Gly Ser Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Glu Ala Ala
 260 265 270
 Ala Gln

<210> 85
 <211> 275
 <212> PRT
 <213> 芽孢杆菌 (Bacillus sp.) m3-13
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1), (275)
 <223> 芽孢杆菌 (Bacillus sp.) m3-13枯草杆菌蛋白酶E的成熟形式的氨基酸序列

<400> 85
 Ala Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Pro His Ile Lys Ala Asp Lys Ala
 1 5 10 15
 His Ala Ser Gly Val Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp
 20 25 30
 Thr Gly Ile Asp Ala Asn His Ala Asp Leu Asn Val Lys Gly Gly Ala
 35 40 45
 Ser Phe Val Ser Gly Glu Pro Asn Ala Leu Gln Asp Gly Asn Gly His
 50 55 60

[0055]

Gly Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Asn Thr Thr Gly
 65 70 75 80
 Val Leu Gly Val Ala Tyr Asn Ala Asp Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu
 85 90 95
 Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Leu Ser Gly Ile Ala Gln Gly Ile Glu
 100 105 110
 Trp Ser Ile Ala Asn Asp Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly
 115 120 125
 Ser Thr Gly Ser Thr Ala Leu Gln Gln Ala Cys Asp Asn Ala Tyr Ala
 130 135 140
 Ser Gly Ile Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Ser Gly Ser Lys Gly
 145 150 155 160
 Lys Arg Asn Thr Met Gly Tyr Pro Ala Arg Tyr Ser Ser Val Ile Ala
 165 170 175
 Val Gly Ala Val Asp Ser Ser Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val
 180 185 190
 Gly Ser Glu Leu Glu Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Leu Ser Thr
 195 200 205
 Thr Pro Gly Asn Asn Tyr Ser Ser Phe Asn Gly Thr Ser Met Ala Ser
 210 215 220
 Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Lys Ala Lys Tyr Pro Ser
 225 230 235 240
 Met Thr Asn Val Gln Ile Arg Glu Lys Leu Lys Asn Thr Ala Thr Asn
 245 250 255
 Leu Gly Asp Ala Phe Tyr Tyr Gly His Gly Val Ile Asn Val Glu Ser
 260 265 270
 Ala Leu Gln
 275

<210> 86
 <211> 275
 <212> PRT
 <213> 芽孢杆菌 (Bacillus sp.)

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1)..(275)
 <223> 芽孢杆菌 (Bacillus sp.) LG12 SprC AAC43580的成熟形式的氨基酸序列

<400> 86

Ala Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Pro His Ile Lys Ala Asp Lys Ala
 1 5 10 15

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

Thr Gly Ile Asp Ala Asn His Ala Asp Leu Asn Val Lys Gly Gly Ala
 35 40 45

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

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

Val Leu Gly Val Ala Tyr Asn Ala Asp Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu
 85 90 95

Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Leu Ser Gly Ile Ala Gln Gly Ile Glu
 100 105 110

Trp Ser Ile Ser Asn Gly Met Asn Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly
 115 120 125

Ser Ser Gly Ser Thr Ala Leu Gln Gln Ala Cys Asn Asn Ala Tyr Asn
 130 135 140

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

[0056]

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

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

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

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

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

Met Thr Asn Val Gln Ile Arg Glu Arg Leu Lys Asn Thr Ala Thr Asn
 245 250 255

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

Ala Leu Gln
 275

<210> 87
 <211> 268
 <212> PRT
 <213> 迟缓芽孢杆菌 (B. lentus)

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1)..(268)
 <223> 迟缓芽孢杆菌 (B. lentus) P29600的成熟形式的氨基酸序列

<400> 87

Gln Ser Val Pro Trp Gly Ile Ser Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala His
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Ser Leu Gly Ser Thr Asn Leu Tyr
245 250 255

[0057]

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

<210> 88
 <211> 275
 <212> PRT
 <213> 解淀粉芽孢杆菌 (B. amyloliquefaciens)

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1) - (275)
 <223> 解淀粉芽孢杆菌 (B. amyloliquefaciens) CAA24990的成熟形式的氨基酸序列

<400> 88

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

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> 89
 <211> 268
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成序列：共有序列
 <400> 89
 Gln Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Thr Arg Val Gln Ala Pro Ala Val
 1 5 10 15
 His Asn Arg Gly Ile Thr Gly Ser Gly Val Arg Val Ala Ile Leu Asp
 20 25 30
 Ser Gly Ile Ser Ala His Ser Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser
 35 40 45
 Phe Val Pro Gly Glu Pro Thr Thr Ala Asp Leu Asn Gly His Gly Thr
 50 55 60
 His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Ile
 65 70 75 80
 Gly Val Ala Pro Asn Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala
 85 90 95
 Asn Gly Ser Gly Ser Val Ser Gly Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala
 100 105 110
 Ala Thr Asn Asn Met His Ile Ala Asn Met Ser Leu Gly Ser Asp Ala
 115 120 125
 Pro Ser Thr Thr Leu Glu Arg Ala Val Asn Tyr Ala Thr Ser Gly Val
 130 135 140
 Leu Val Ile Ala Ala Thr Gly Asn Asn Gly Ser Gly Ser Val Gly Tyr
 145 150 155 160
 Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln Asn
 165 170 175
 Asn Arg Arg Ala Asn Phe Ser Gln Tyr Gly Thr Gly Ile Asp Ile Val
 180 185 190
 Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Asn Arg Tyr Val
 195 200 205
 Ser Met Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala Ala
 210 215 220
 Ala Leu Val Lys Gln Arg Tyr Pro Ser Trp Asn Ala Thr Gln Ile Arg
 225 230 235 240
 Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Asn Leu Gly Asn Ser Ser Gln Phe
 245 250 255
 Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
 260 265

[0058]

<210> 90
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成序列: 吉氏芽孢杆菌 (*B. gibsonii*)-进化枝枯草杆菌蛋白酶基序

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa可以是任意天然存在的氨基酸。

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (5)..(6)
 <223> Xaa可以是任意天然存在的氨基酸。

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (11)..(13)
 <223> Xaa可以是任意天然存在的氨基酸。

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (18)..(23)
 <223> Xaa可以是任意天然存在的氨基酸。

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (29)..(30)
 <223> Xaa可以是任意天然存在的氨基酸。

<400> 90
 Asp Xaa Gly Ile Xaa Xaa His Ser Asp Leu Xaa Xaa Xaa Gly Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Thr Ala Asp Leu Xaa Xaa His Gly
 20 25 30
 Thr His

[0059]

<210> 91
 <211> 273
 <212> PRT
 <213> 地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*)

<400> 91
 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 Ser Tyr Ser Gly Ile Val Ser Gly Ile Glu Trp
 100 105 110
 Ala Thr Thr Asn Gly Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Ala
 115 120 125
 Ser Gly Ser Thr Ala Met Lys Gln Ala Val Asp Asn Ala Tyr Ala Arg
 130 135 140
 Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Ser Gly Ser Ser Gly Ser
 145 150 155 160
 Thr Asn Thr Ile Gly Tyr Pro Ala Lys Tyr Asp Ser Val Ile Ala Val
 165 170 175
 Gly Ala Val Asp Ser Asn Ser Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val Gly Ala
 180 185 190
 Glu Leu Glu Val Met Ala Pro Gly Ala Gly Val Tyr Ser Thr Tyr Pro
 195 200 205

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

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

[0060]

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

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

Gln

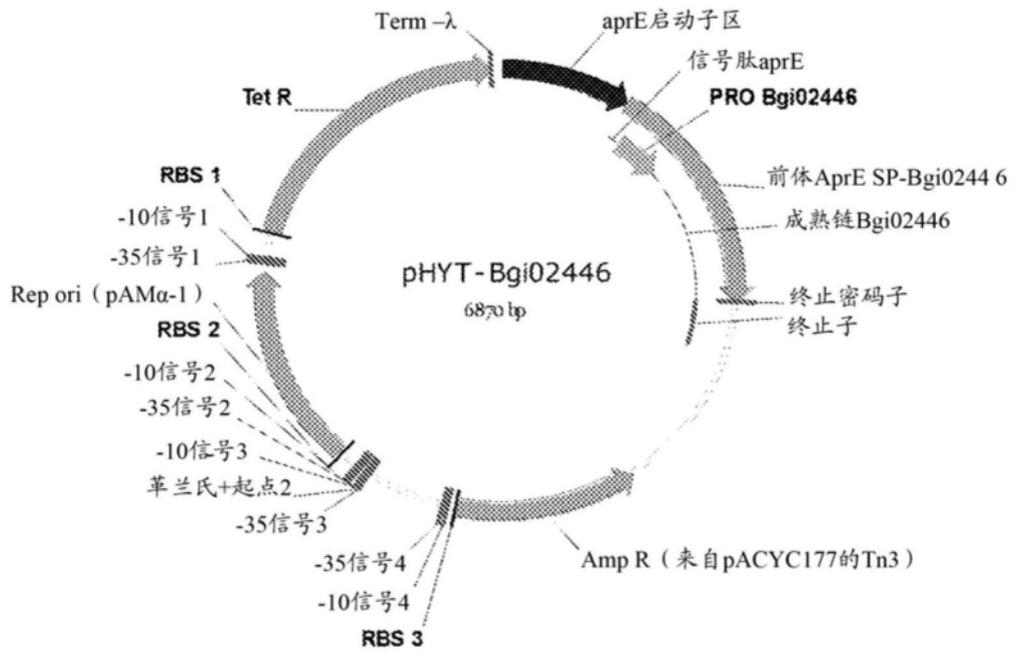


图1

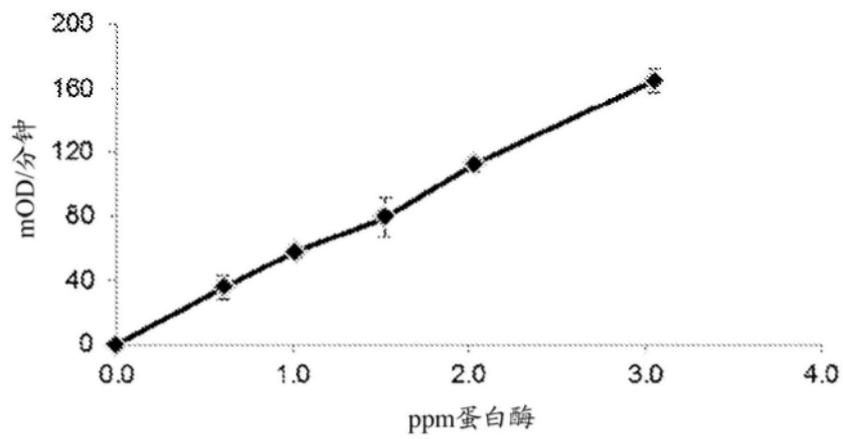


图2

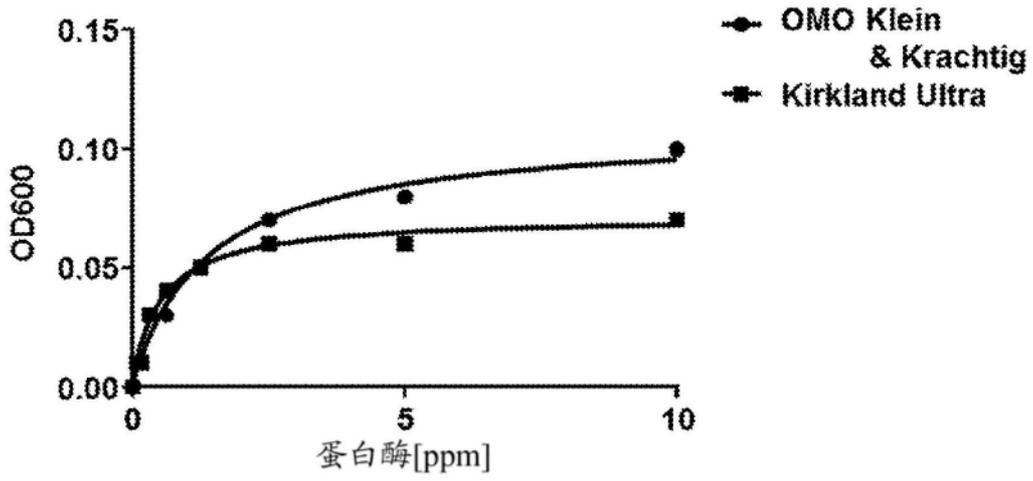


图3A

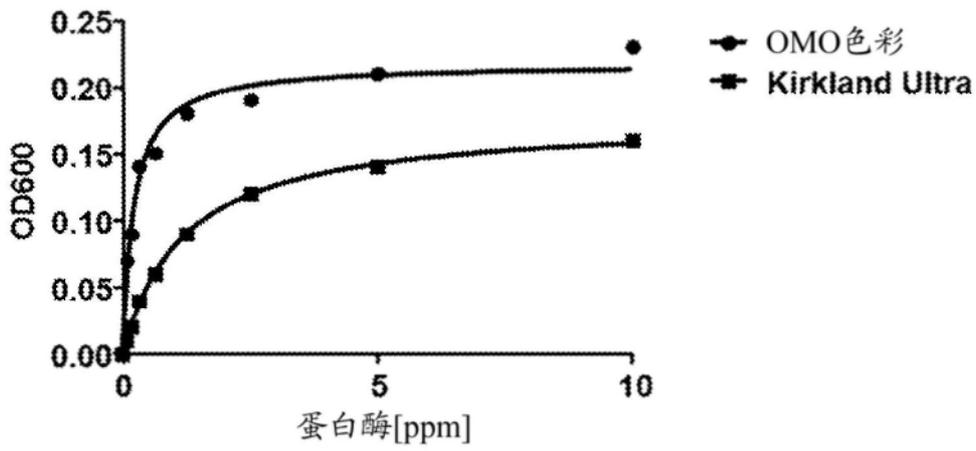


图3B

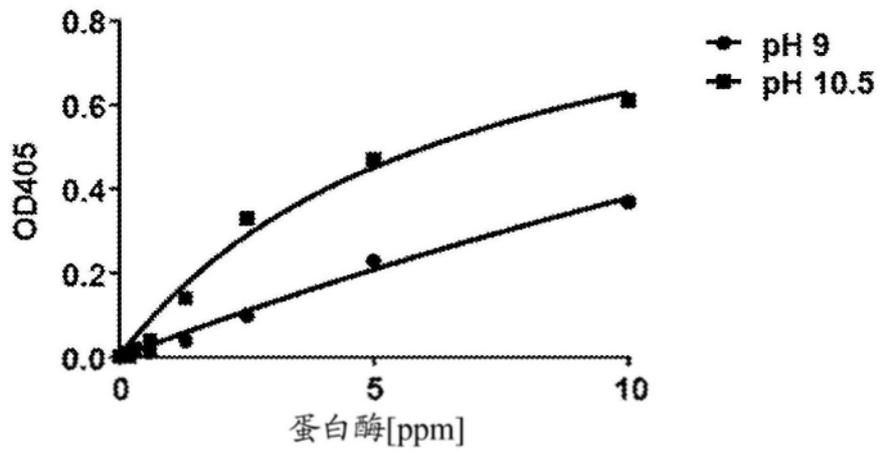


图3C

	201		250
WO2007131657-CAS91385	(194)	APGVNVQSTYPGNRYASLNGTSMATPHVAGAAAALVKQRPFSWNATQIRNH	
WO03054184-CAE48421	(194)	APGVNVQSTYPGNRYASLNGTSMATPHVAGAAAALVKQRPFSWNATQIRNH	
WO2008086916-CAV33594	(194)	APGVNVQSTYPGNRYASLNGTSMATPHVAGAAAALVKQRPFSWNATQIRNH	
Egi02446	(194)	APGVNVQSTYPGNRYVSMNGTSMATPHVAGAAAALVKQRPFSWNATQIRNH	
WO03054185-CAE48424	(194)	APGVGIQSTYLNNSYASMPGTSMATPHVAGAAAALVKQRPFSWNATQIRNH	
US7642080-0004	(194)	APGVGIQSTYPGNRYASLNGTSMATPHVAGAAAALVKQRPFSWSASQIRNH	
US7642080-0006	(194)	APGVGIQSTYPGNRYASLNGTSMATPHVAGAAAALVKQRPFSWSASQIRNH	
US7642080-0002	(194)	APGVGVQSTYPGNRYVSMNGTSMASPHVAGAAAALVKQRPFSWSNTQIRNH	
迟缓芽孢杆菌 (B_lentus) P29600	(194)	APGVNVQSTYPGTYASLNGTSMATPHVAGAAAALVKQKPNFSWSNVQIRNH	
芽孢杆菌 (B_sp) Sendai_BAA06157	(194)	APGVGIQSTYPGNRYASLSGTSMATPHVAGAAAALVKQKPNFSWSNTQIRQH	
芽孢杆菌 (Bacillus_sp) BAA05540	(194)	APGVNVNSTYTGNNRYVSLSGTSMATPHVAGAAAALVKRSRYPSTNNQIRQR	
解淀粉芽孢杆菌 (B_amyloliquefaciens) CAA24990	(200)	APGVSIOSTLPGNKYGAYNGTSMASPHVAGAAAALILSKHPNWTNTQVRSS	
嗜热脂肪芽孢杆菌 (G_stearothermophilus) ABY25856	(200)	APGVSIOSTLPGNKYGAYNGTSMASPHVAGAAAALILSKHPNWTNTQVRSS	
萎缩芽孢杆菌 (B_atropheus) YP003972439	(200)	APGVSIOSTLPGSSYGSYNGTSMASPHVAGAAAALVLSKHPNWTNSQVRNS	
枯草芽孢杆菌 (B_subtilis) BAN09118	(200)	APGVSIOSTLPGGTYGSYNGTSMATPHVAGAAAALILSKHPTWSNAQVRDR	
环状芽孢杆菌 (B_circulans) ADN04910	(200)	APGTSILSTVPSSRGYTSYTGTSMASPHVAGAAAALILSKNPNLSNSQVRQR	
同温层芽孢杆菌 (B_stratosphericus) WP_007497196	(200)	APGTSILSTVPSSRGYTSYTGTSMASPHVAGAAAALILSKYPNLSLTSQVRQR	
地衣芽孢杆菌 (B_licheniformis) CAJ70731.1	(199)	APGAGVYSTYPTNTYATLNGTSMASPHVAGAAAALILSKHPNLSASQVRNR	
短小芽孢杆菌 (B_pumilus) ADK11996	(200)	APGTSILSTVPSSGYTSYTGTSMASPHVAGAAAALILSKNPNLNTNSQVRQR	
芽孢杆菌 (B_sp) sprD_AAC43581	(201)	APGVAINSTLPGNQYGEELNGTSMASPHVAGAAAALLLAQNPNTLNQVRER	
芽孢杆菌 (Bacillus_sp) LG12sprC_AAC43580	(200)	APGVNILSTTPGNNYASFNGTSMAPPHVAGAAAALIKAKYPSMTNVQIRER	
芽孢杆菌 (Bacillus_sp) BAD11988	(200)	APGVSILSTVPSSYASYNNGTSMASPHVAGAAAALIKAKYPNWSAAQIRNK	
		. : ** * **.***; : * . . * : *	
		共有序列	
	(201)	APGV IQSTYPGN YAS NGTSMATPHVAGAAAALVK K PSW N QIRN	

图4C-1

	251		276
WO2007131657-CAS91385	(244)	LKNTATNLGNSSQFGSGLVNAEAATR	(SEQ ID NO:24)
WO03054184-CAE48421	(244)	LKNTATNLGNSSQFGSGLVNAEAATR	(SEQ ID NO:25)
WO2008086916-CAV33594	(244)	LKNTATNLGNSSQFGSGLVNAEAATR	(SEQ ID NO:26)
Egi02446	(244)	LKNTATNLGNSSQFGSGLVNAEAATR	(SEQ ID NO:4)
WO03054185-CAE48424	(244)	LKNTATNLGNSSQFGSGLVNAEAATR	(SEQ ID NO:27)
US7642080-0004	(244)	LKNTSTNLGSSSTLYGSGLVNADAASR	(SEQ ID NO:28)
US7642080-0006	(244)	LKNTSTNLGSSSTLYGSGLVNADAASR	(SEQ ID NO:29)
US7642080-0002	(244)	LKNTATNLGNTNQFGSGLVNAEAATR	(SEQ ID NO:30)
迟缓芽孢杆菌 (B_lentus) P29600	(244)	LKNTATSLGSTNLYGSGLVNAEAATR	(SEQ ID NO:31)
芽孢杆菌 (B_sp) Sendai_BAA06157	(244)	LTSTATSLGNSSQFGSGLVNAEAATR	(SEQ ID NO:32)
芽孢杆菌 (Bacillus_sp) BAA05540	(244)	INQATYLGSPSLYGNGLVHAGRATQ	(SEQ ID NO:33)
解淀粉芽孢杆菌 (B_amyloliquefaciens) CAA24990	(250)	LENTTKLGDSFYGKGLINVQAAAQ	(SEQ ID NO:34)
嗜热脂肪芽孢杆菌 (G_stearothermophilus) ABY25856	(250)	LENTTKLGDAFYGKGLINVQAAAQ	(SEQ ID NO:35)
萎缩芽孢杆菌 (B_atropheus) YP003972439	(250)	LESTATNLGNSFFYGGKGLINVQAAAQ	(SEQ ID NO:36)
枯草芽孢杆菌 (B_subtilis) BAN09118	(250)	LESTATNLGSSFFYGGKGLINVQAAAQ	(SEQ ID NO:37)
环状芽孢杆菌 (B_circulans) ADN04910	(250)	LENTATPLGNSFFYGGKGLINVQAAASN	(SEQ ID NO:38)
同温层芽孢杆菌 (B_stratosphericus) WP_007497196	(250)	LENTATPLGNSFFYGGKGLINVQAAASN	(SEQ ID NO:39)
地衣芽孢杆菌 (B_licheniformis) CAJ70731.1	(249)	LSSTATYLGSSFFYGGKGLINVEAAAQ	(SEQ ID NO:40)
短小芽孢杆菌 (B_pumilus) ADK11996	(250)	LENTATPLGDSFYGKGLINVQAAASN	(SEQ ID NO:41)
芽孢杆菌 (B_sp) sprD_AAC43581	(251)	LRDTATNLGSAFNYGHGVINLERALQ	(SEQ ID NO:42)
芽孢杆菌 (Bacillus_sp) LG12sprC_AAC43580	(250)	LKNTATNLGDPFFFYGKGVINVESALQ	(SEQ ID NO:43)
芽孢杆菌 (Bacillus_sp) BAD11988	(250)	LNSTTYLGSSFFYGGKGVINVERALQ	(SEQ ID NO:44)
		: ** * ** * * * . . .	
	(251)	L NTATNLG SF YG GL NA AA	(SEQ ID NO:45)
		共有序列	

图4C-2

吉氏芽孢杆菌 (B-gibsonii) DSM9728	QQTVPWGITRVQAPAVHNRGVTGSGVRVAAILDSGISTHSDLTIRGGASFVPGPEPTADLN
吉氏芽孢杆菌 (B-gibsonii) DSM9730	QQTVPWGITRVQAPAVHNRGVTGSGVRVAAILDSGISTHSDLTIRGGASFVPGPEPTADLN
吉氏芽孢杆菌 (B-gibsonii) DSM9731	QQTVPWGITRVQAPAVHNRGVTGSGVRVAAILDSGISTHSDLTIRGGASFVPGPEPTADLN
吉氏芽孢杆菌 (B-gibsonii) DSM9729	QQTVPWGITRVQAPAVHNRGITGSGVRVAAILDSGISAHSDLNIRGGASFVPGPEPTADLN
Bgi02446	QQTVPWGITRVQAPAVHNRGITGSGVRVAAILDSGISAHSDLNIRGGASFVPGPEPTADLN
吉氏芽孢杆菌 (B-gibsonii) DSM9728	GHGTHVAGTVAALNNSIGVIGVAPSADLYAVKVLGANGRGSVSGIAQGLEWAAAANNMHIA
吉氏芽孢杆菌 (B-gibsonii) DSM9730	GHGTHVAGTVAALNNSIGVIGVAPSADLYAVKVLGANGRGSVSGIAQGLEWAAAANNMHIA
吉氏芽孢杆菌 (B-gibsonii) DSM9731	GHGTHVAGTVAALNNSIGVIGVAPSADLYAVKVLGANGRGSVSGIAQGLEWAAAANNMHIA
吉氏芽孢杆菌 (B-gibsonii) DSM9729	GHGTHVAGTVAALNNSIGVIGVAPNADLYAVKVLGANGSGSVSGIAQGLEWAAATNNMHIA
Bgi02446	GHGTHVAGTVAALNNSIGVIGVAPNAELYAVKVLGANGSGSVSGIAQGLEWAAATNNMHIA
吉氏芽孢杆菌 (B-gibsonii) DSM9728	NMSLGSDDAPSTTLERAVNYATSQGVLVIAATGNNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRR
吉氏芽孢杆菌 (B-gibsonii) DSM9730	NMSLGSDDAPSTTLERAVNYATSQGVLVIAATGNNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRR
吉氏芽孢杆菌 (B-gibsonii) DSM9731	NMSLGSDDAPSTTLERAVNYATSQGVLVIAATGNNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRR
吉氏芽孢杆菌 (B-gibsonii) DSM9729	NMSLGSDFPSSTLERAVNYATSRDVLVIAATGNNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRR
Bgi02446	NMSLGSDFPSSTLERAVNYATSRDVLVIAATGNNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRR
吉氏芽孢杆菌 (B-gibsonii) DSM9728	ANFSQYGTGIDIVAPGVNVQSTYPCGNRYASLNGTSMATPHVAGAAAALVKQRYPSWNATQI
吉氏芽孢杆菌 (B-gibsonii) DSM9730	ANFSQYGTGIDIVAPGVNVQSTYPCGNRYVSMNGTSMATPHVAGAAAALVKQRYPSWNATQI
吉氏芽孢杆菌 (B-gibsonii) DSM9731	ANFSQYGGIDIVAPGVNVQSTYPCGNRYVSMNGTSMATPHVAGAAAALVKQRYPSWNATQI
吉氏芽孢杆菌 (B-gibsonii) DSM9729	ANFSQYGTGIDIVAPGVNVQSTYPCGNRYVSMNGTSMATPHVAGAAAALVKQRYPSWNATQI
Bgi02446	ANFSQYGTGIDIVAPGVNVQSTYPCGNRYVSMNGTSMATPHVAGAAAALVKQRYPSWNATQI
吉氏芽孢杆菌 (B-gibsonii) DSM9728	RNHLKNTATNLGNSSQFGSGLVNAEAAATR (SEQ ID NO:11)
吉氏芽孢杆菌 (B-gibsonii) DSM9730	RNHLKNTATNLGNSSQFGSGLVNAEAAATR (SEQ ID NO:15)
吉氏芽孢杆菌 (B-gibsonii) DSM9731	RNHLKNTATNLGNSSQFGSGLVNAEAAATR (SEQ ID NO:19)
吉氏芽孢杆菌 (B-gibsonii) DSM9729	RNHLKNTATNLGNSSQFGSGLVNAEAAATR (SEQ ID NO:23)
Bgi02446	RNHLKNTATNLGNSSQFGSGLVNAEAAATR (SEQ ID NO:4)

图5

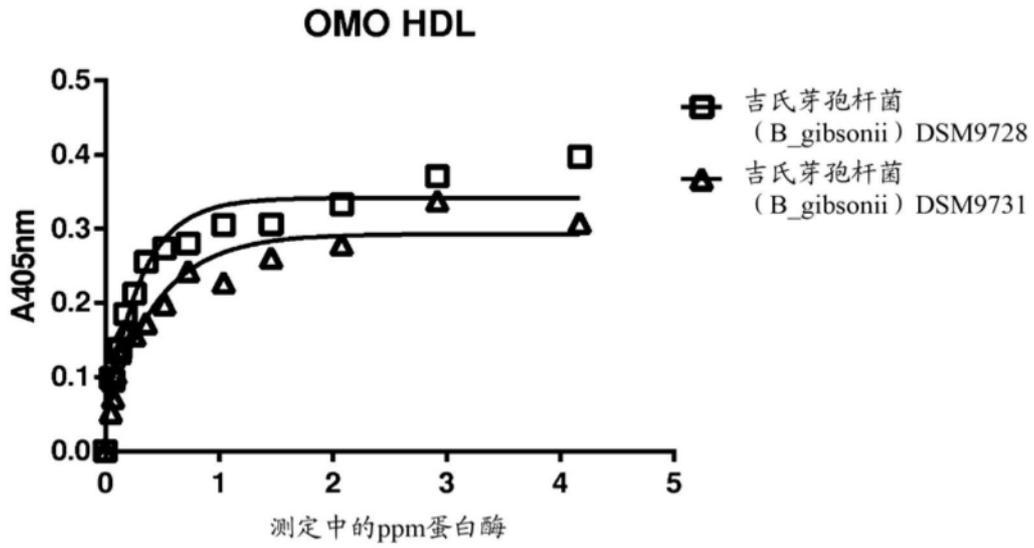


图7A

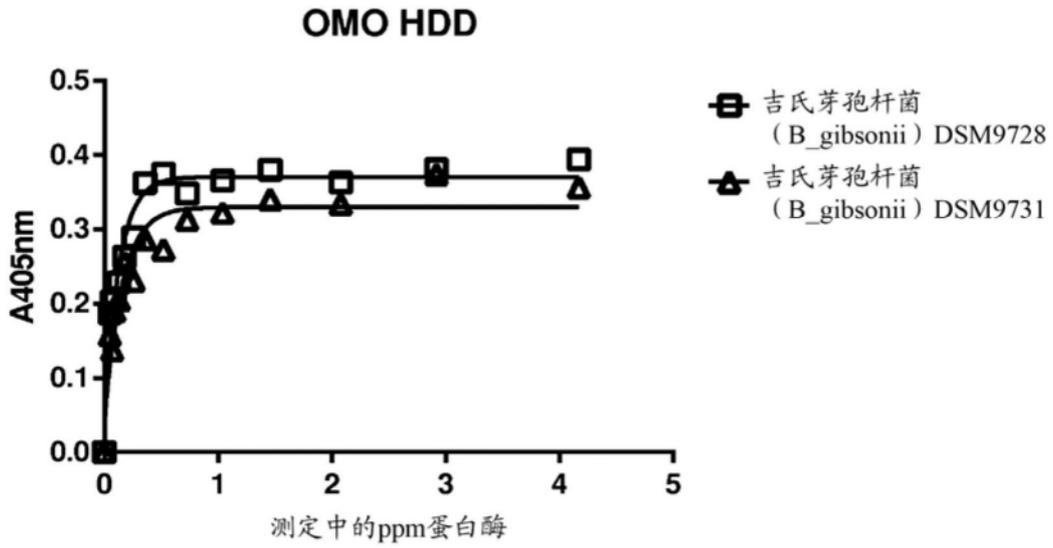


图7B

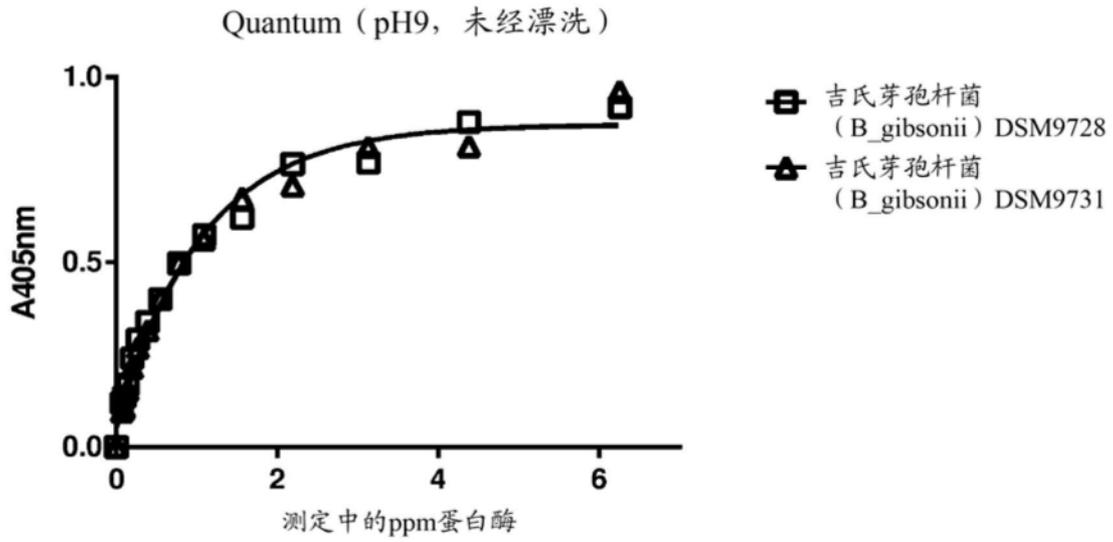


图7C

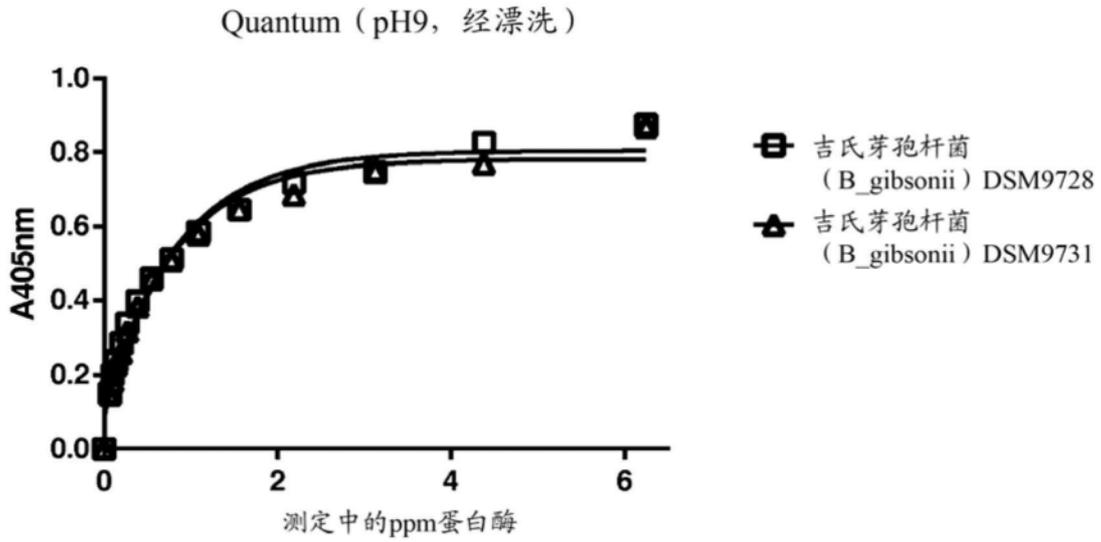


图7D

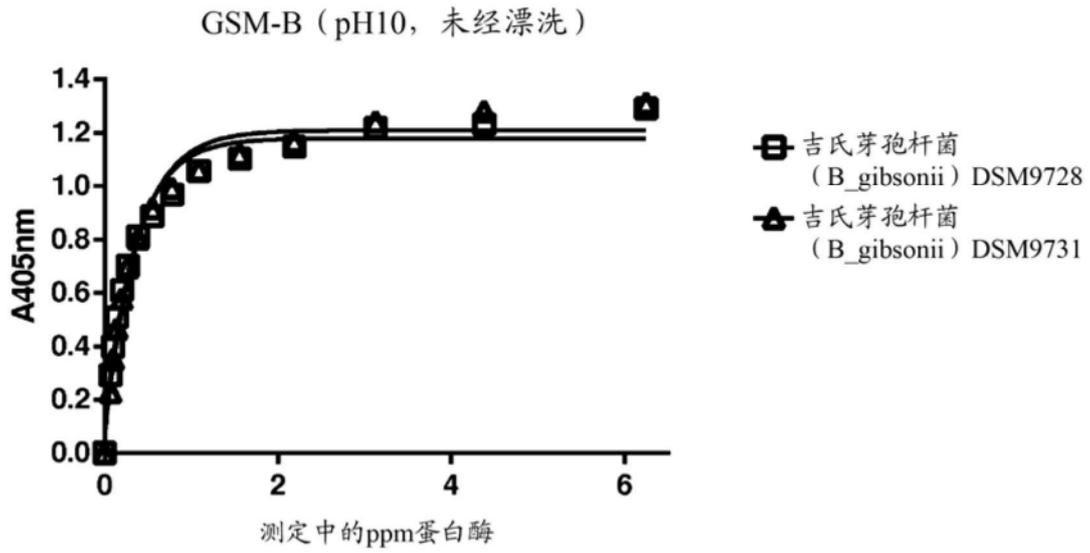


图7E

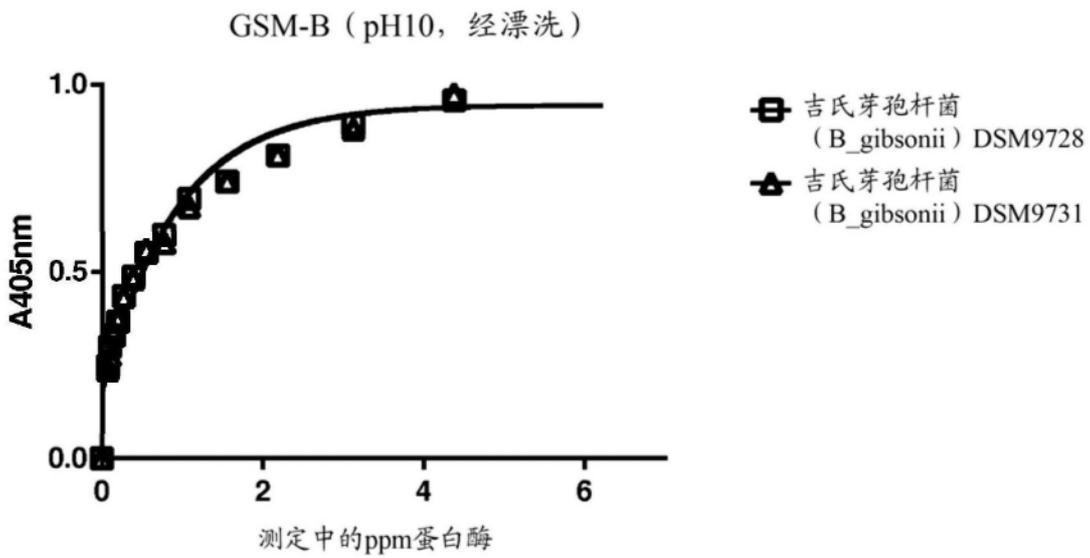


图7F

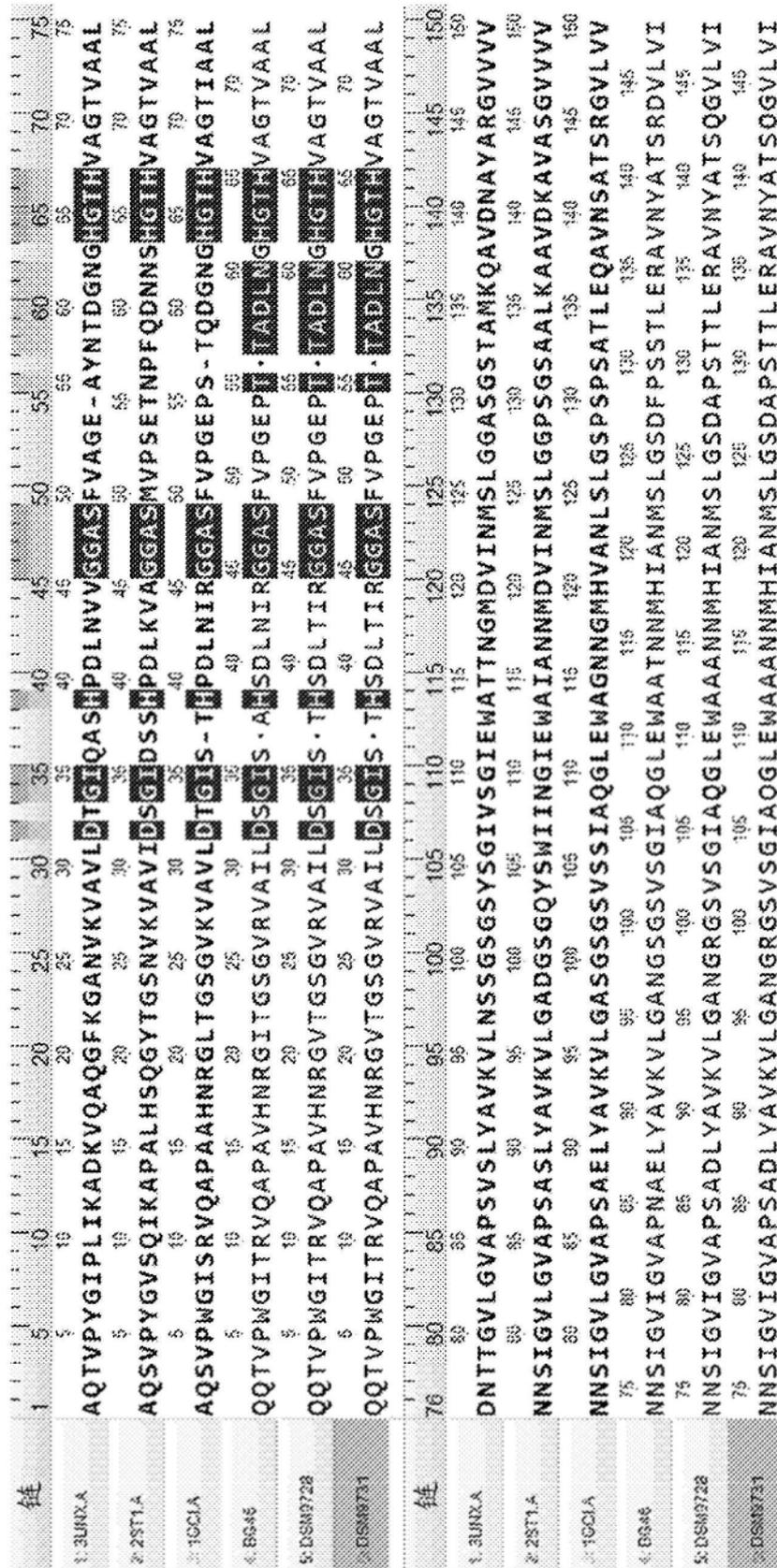


图8A

链	151	155	160	165	170	175	180	185	190	195	200	205	210	215	220	225
1. 3UNXA	155	160	165	170	175	180	185	190	195	200	205	210	215	220	225	
	AAAGNSGSGSTNTIGYPAKYDSVIAVGAVDSNSRRASFSSVGAELVMAPGAGVYSTYPTNTYATLNGTSMASP															
2. 2ST1A	155	160	165	170	175	180	185	190	195	200	205	210	215	220	225	
	AAAGNEGTSQSSSTVGYPGKYPVIAVGAVDSSNRASFSSVGPPELDVMAPGVSIQSTLPGNKYGAYNGTSMASP															
3. 1GCL A	155	160	165	170	175	180	185	190	195	200	205	210	215	220	225	
	AASGNSGA---GSI SYPARYANAMAVGATDQNNRRASFQYGAGLDIVAPGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATP															
4. BG4S	150	155	160	165	170	175	180	185	190	195	200	205	210	215	220	225
	AATGNNGS...GSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYGTGIDIVAPGVNVQSTYPGNRYVSMNGTSMATP															
5. DSM9728	150	155	160	165	170	175	180	185	190	195	200	205	210	215	220	225
	AATGNNGS...GSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYGTGIDIVAPGVNVQSTYPGNRYASLNGTSMATP															
6. DSM9731	150	155	160	165	170	175	180	185	190	195	200	205	210	215	220	225
	AATGNNGS...GSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYGGIDIVAPGVNVQSTYPGNRYVSMNGTSMATP															
链	220	230	235	240	245	250	255	260	265	270	275	280	285	290	295	300
1. 3UNXA	230	235	240	245	250	255	260	265	270	275	280	285	290	295	300	
	HVAGAAALILSKHPNLSAQVRNRLSSTATYLGSSFFYGGKGLINVEAAQ															
2. 2ST1A	230	235	240	245	250	255	260	265	270	275	280	285	290	295	300	
	HVAGAAALILSKHPNWTQVRSSLENTTKLGDSFFYGGKGLINVQAAQ															
3. 1GCL A	230	235	240	245	250	255	260	265	270	275	280	285	290	295	300	
	HVAGAAALVKQKPSMSNVQIRNHLKNTATSLGSTNLVYGGSLVNAEAATR															
4. BG4S	225	230	235	240	245	250	255	260	265	270	275	280	285	290	295	300
	HVAGAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATNLGNSSQFGSGLVNAEAATR															
5. DSM9728	225	230	235	240	245	250	255	260	265	270	275	280	285	290	295	300
	HVAGAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATNLGNSSQFGSGLVNAEAATR															
6. DSM9731	220	225	230	235	240	245	250	255	260	265	270	275	280	285	290	295
	HVAGAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATNLGNSSQFGSGLVNAEAATR															

吉氏芽孢杆菌 (B. Gibsonii) -进化枝基序

D₃₁_XGIXXHSDLXXXGGASXXXPTTADLNXHGTH₆₄

或

D₃₁_XGIXXHSDLXXXGGASXXXPTTADLNXHGTH₆₄

图8B

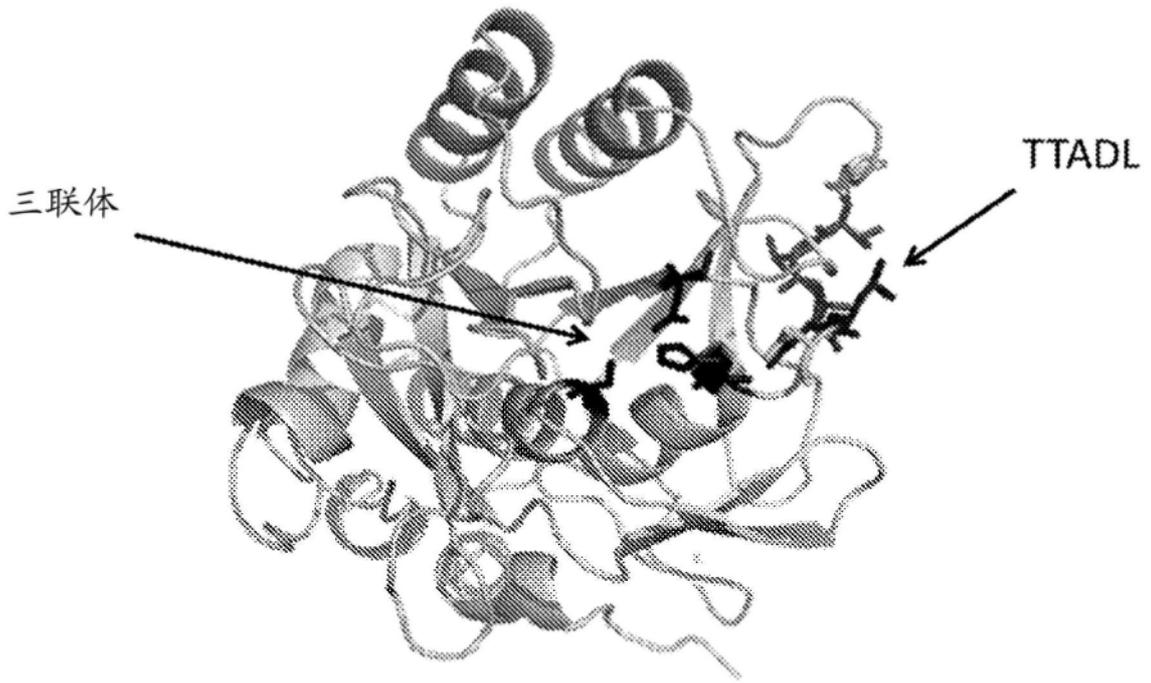


图9

	1	50
BG1-B08	(1) QQTVPWGITRVQAPAVHNRGITGSGVRVAILDSGISAHSDLNIRGGASFV	
BG1-C05	(1) QQTVPWGITRVQAPAVHNRGITGSGVRVAILDSGISAHSDLNIRGGASFV	
BG2-B08	(1) QQTVPWGITRVQAPAVHNRGITGSGVRVAILDSGISAHSDLNIRGGASFV	
BG2-D10	(1) QQTVPWGITRVQAPAVHNRGITGSGVRVAILDSGISAHSDLNIRGGASFV	
BG2-G08	(1) QQTVPWGITRVQAPAVHNRGITGSGVRVAILDSGISAHSDLNIRGGASFV	
BG4-A09	(1) QQTVPWGITRVQAPAVHNRGVTGSGVRVAVLDTGISAHSDLNIRGGASFV	
BG4-D10	(1) QQTVPWGITRVQAPAVHNRGFTGSGVRVAILDSGISTHSDLTIRGGASFV	
BG5-E02	(1) QQTVPWGISRVQAPAVHNRGITGSGVRVAILDSGISAHSDLNIRGGASFV	
BG5-E05	(1) QQTVPWGITRVQAPAVHNRGITGSGVRVAILDSGISAHSDLNIRGGASFV	
BG5-F02	(1) QQTVPWGITRVQAPAVHNRGITGSGVRVAILDSGISAHSDLNIRGGASFV	
BG5-G10	(1) QQTVPWGITRVQAPAVHNRGITGSGVRVAILDSGISAHSDLNIRGGASFV	
BG6-A10	(1) QQTVPWGITRVQAPAVHNRGITGSGVRVAILDSGISAHSDLNIRGGASFV	
BG6-D08	(1) QQSVPWGISRVQAPAVHNRGITGSGVRVAILDSGISAHSDLNIRGGASFV	
BG8-B03	(1) AQTVPWGITRVQAPAVHNRGITGSGVRVAILDSGISAHSDLTIRGGASFV	
Bgi02446	(1) QQTVPWGITRVQAPAVHNRGITGSGVRVAILDSGISAHSDLNIRGGASFV	
DSM9728	(1) QQTVPWGITRVQAPAVHNRGVTGSGVRVAILDSGISTHSDLTIRGGASFV	
DSM9731	(1) QQTVPWGITRVQAPAVHNRGVTGSGVRVAILDSGISTHSDLTIRGGASFV	
共有序列	(1) QQTVPWGITRVQAPAVHNRGITGSGVRVAILDSGISAHSDLNIRGGASFV	
	51	100
BG1-B08	(51) PGEPTTADLNHGTHVAGTVAALNNSIGVIGVAPNAELYAVKVLGANGSG	
BG1-C05	(51) PGEPTTADLNHGTHVAGTVAALNNSIGVIGVAPNAELYAVKVLGANGRG	
BG2-B08	(51) PGEPTTADLNHGTHVAGTVAALNNSIGVIGVAPNAELYAVKVLGASGSG	
BG2-D10	(51) PGEPTTADLNHGTHVAGTVAALNNSIGVIGVAPNAELYAVKVLGANGSG	
BG2-G08	(51) PGEPTTADLNHGTHVAGTVAALNNSIGVIGVAPNAELYAVKVLGANGSG	
BG4-A09	(51) PGEPTTADLNHGTHVAGTVAALNNSIGVIGVAPNAELYAVKVLGANGSG	
BG4-D10	(51) PGEPTTADLNHGTHVAGTVAALNNSIGVLGVAPNAELYAVKVLGANGSG	
BG5-E02	(51) PGEPTTADLNHGTHVAGTVAALNNSIGVIGVAPNAELYAVKVLGASGSG	
BG5-E05	(51) PGEPTTADLNHGTHVAGTVAALNNSIGVIGVAPNAELYAVKVLGANGSG	
BG5-F02	(51) PGEPTTADLNHGTHVAGTVAALNNSIGVIGVAPNAELYAVKVLGANGSG	
BG5-G10	(51) PGEPTTADLNHGTHVAGTVAALNNSIGVIGVAPSADLYAVKVLGANGSG	
BG6-A10	(51) PGEPTTADLNHGTHVAGTVAALNNSIGVIGVAPNAELYAVKVLGASGSG	
BG6-D08	(51) PGEPTTADLNHGTHVAGTVAALNNSIGVIGVAPSADLYAVKVLGANGSG	
BG8-B03	(51) PGEPTTADLNHGTHVAGTVAALNNSIGVIGVAPSADLYAVKVLGANGRG	
Bgi02446	(51) PGEPTTADLNHGTHVAGTVAALNNSIGVIGVAPNAELYAVKVLGANGSG	
DSM9728	(51) PGEPTTADLNHGTHVAGTVAALNNSIGVIGVAPSADLYAVKVLGANGRG	
DSM9731	(51) PGEPTTADLNHGTHVAGTVAALNNSIGVIGVAPSADLYAVKVLGANGRG	
共有序列	(51) PGEPTTADLNHGTHVAGTVAALNNSIGVIGVAPNAELYAVKVLGANGSG	

图10A

		101		150
BG1-B08	(101)	SVSGIAQGLEWAATNNMHIANMSLGSDFPSSTLERAVNYATSQGLVIAA		
BG1-C05	(101)	SVSGIAQGLEWAATNNMHIANMSLGS DAPSTTLERAVNYATSRDVLVIAA		
BG2-B08	(101)	SISGIAQGLQWAATNNMHIANMSLGS DAPSTTLERAVNYATSRDVLVIAA		
BG2-D10	(101)	SVSGIAQGLEWAATNNMHIANMSLGS DAPSTTLERAVNYATSQGLVIAA		
BG2-G08	(101)	SVSGIAQGLEWAATNNMHIANMSLGS DAPSTTLERAVNYATSAGVLVIAA		
BG4-A09	(101)	SVSGIAQGLEWAATNNMHIANMSLGT DAPSTTLERAVNYATSQGLVIAA		
BG4-D10	(101)	SISGIAQGLEWAAANNMHIANMSLGT DAPSTTLERAVNYATSQGLVIAA		
BG5-E02	(101)	SISGIAQGLEWAATNNMHIANMSLGS DAPSTTLERAVNYATSRDVLVIAA		
BG5-E05	(101)	SVSGIAQGLEWAATNNMHIANMSLGS DFPSTTLERAVNYATSRDVLVIAA		
BG5-F02	(101)	SVSGIAQGLEWAATNNMHIANMSLGS DFPSTTLERAVNYATSQGLVIAA		
BG5-G10	(101)	SVSGIAQGLEWAATNNMHIANMSLGS DFPSTTLERAVNYATSRDVLVIAA		
BG6-A10	(101)	SVSGIAQGLEWAAANNMHIANMSLGS DFPSTTLERAVNYATSRDVLVIAA		
BG6-D08	(101)	SVSGIAQGLEWAAANNMHIANMSLGS DFPSTTLERAVNYATSRDVLVIAA		
BG8-B03	(101)	SVSGIAQGLEWAATNNMHIANMSLGS DAPSTTLERAVNYATSQGLVIAA		
Bgi02446	(101)	SVSGIAQGLEWAATNNMHIANMSLGS DFPSTTLERAVNYATSRDVLVIAA		
DSM9728	(101)	SVSGIAQGLEWAAANNMHIANMSLGS DAPSTTLERAVNYATSQGLVIAA		
DSM9731	(101)	SVSGIAQGLEWAAANNMHIANMSLGS DAPSTTLERAVNYATSQGLVIAA		
共有序列	(101)	SVSGIAQGLEWAATNNMHIANMSLGS DAPSTTLERAVNYATS GVLVIAA		
		151		200
BG1-B08	(151)	TGNNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYGTGIDIVAPGVNVQ		
BG1-C05	(151)	TGNNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYGTGIDIVAPGVNVQ		
BG2-B08	(151)	TGNNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYGTGIDIVAPGVNVQ		
BG2-D10	(151)	TGNNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYGTGIDIVAPGVNVQ		
BG2-G08	(151)	TGNNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYGTGIDIVAPGVNVQ		
BG4-A09	(151)	TGNNGSGTISYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYAGLDIVAPGVNVQ		
BG4-D10	(151)	TGNNGSGTISYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYGS GIDIVAPGVNVQ		
BG5-E02	(151)	TGNNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYGTGIDIVAPGVNVQ		
BG5-E05	(151)	TGNNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYAGLDIVAPGVNVQ		
BG5-F02	(151)	TGNNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYGTGIDIVAPGVNVQ		
BG5-G10	(151)	TGNNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYGTGIDIVAPGVNVQ		
BG6-A10	(151)	TGNNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYGTGIDIVAPGVNVQ		
BG6-D08	(151)	TGNNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYGTGIDIVAPGVNVQ		
BG8-B03	(151)	TGNNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYAGLDIVAPGVNVQ		
Bgi02446	(151)	TGNNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYGTGIDIVAPGVNVQ		
DSM9728	(151)	TGNNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYGTGIDIVAPGVNVQ		
DSM9731	(151)	TGNNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYGS GIDIVAPGVNVQ		
共有序列	(151)	TGNNGSGSVGYPARYANAMAVGATDQNNRRANFSQYGTGIDIVAPGVNVQ		

图10B

	201	250
BG1-B08	(201) STYPGNRYVSMNGTSMATPHVAGAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATN	
BG1-C05	(201) STYPGNRYVSMNGTSMATPHVAGAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATN	
BG2-B08	(201) STYPGNRYVSMNGTSMATPHVAGAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATN	
BG2-D10	(201) STYPGNRYVSMNGTSMATPHVAGAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATN	
BG2-G08	(201) STYPGNRYVSMNGTSMATPHVAGAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATN	
BG4-A09	(201) STYPGNRYVSMNGTSMATPHVAGAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATN	
BG4-D10	(201) STYPGNRYASLSGTSMATPHVAGAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATN	
BG5-E02	(201) STYPGNRYVSMNGTSMATPHVAGAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATN	
BG5-E05	(201) STYPGNRYVSMNGTSMATPHVAGAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATN	
BG5-F02	(201) STYPGNRYVSMNGTSMATPHVAGAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATN	
BG5-G10	(201) STYPGNRYVSMNGTSMATPHVAGAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATN	
BG6-A10	(201) STYPGNRYVSMNGTSMATPHVAGAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATN	
BG6-D08	(201) STYPGNRYVSMNGTSMATPHVAGAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATN	
BG8-B03	(201) STYPGNRYVSMNGTSMATPHVAGAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATN	
Bgi02446	(201) STYPGNRYVSMNGTSMATPHVAGAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATN	
DSM9728	(201) STYPGNRYASLNGTSMATPHVAGAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATN	
DSM9731	(201) STYPGNRYVSMNGTSMATPHVAGAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATN	
共有序列	(201) STYPGNRYVSMNGTSMATPHVAGAAALVKQRYPSWNATQIRNHLKNTATN	
	251	269
BG1-B08	(251) LGNTNLYGSGLVNAEEATR	(SEQ ID NO: 65)
BG1-C05	(251) LGNSSQFGSGLVNAEEATR	(SEQ ID NO: 61)
BG2-B08	(251) LGNSSQFGSGLVNAEEATR	(SEQ ID NO: 71)
BG2-D10	(251) LGNSSQFGSGLVNAEEATR	(SEQ ID NO: 63)
BG2-G08	(251) LGNSSQFGSGLVNAEEATR	(SEQ ID NO: 83)
BG4-A09	(251) LGNSSQFGSGLVNAEEATR	(SEQ ID NO: 67)
BG4-D10	(251) LGNSSQFGSGLVNAEEATR	(SEQ ID NO: 69)
BG5-E02	(251) LGNTNLYGSGLVNAEEATR	(SEQ ID NO: 81)
BG5-E05	(251) LGNSSQFGSGLVNAEEATR	(SEQ ID NO: 59)
BG5-F02	(251) LGNSSQFGSGLVNAEEATR	(SEQ ID NO: 57)
BG5-G10	(251) LGNTNLYGSGLVNAEEATR	(SEQ ID NO: 79)
BG6-A10	(251) LGNTNLYGSGLVNAEEATR	(SEQ ID NO: 75)
BG6-D08	(251) LGNTNLYGSGLVNAEEATR	(SEQ ID NO: 77)
BG8-B03	(251) LGNSSQFGSGLVNAEEATR	(SEQ ID NO: 73)
Bgi02446	(251) LGNSSQFGSGLVNAEEATR	(SEQ ID NO: 4)
DSM9728	(251) LGNSSQFGSGLVNAEEATR	(SEQ ID NO: 11)
DSM9731	(251) LGNSSQFGSGLVNAEEATR	(SEQ ID NO: 23)
共有序列	(251) LGNSSQFGSGLVNAEEATR	(SEQ ID NO: 89)

图10C

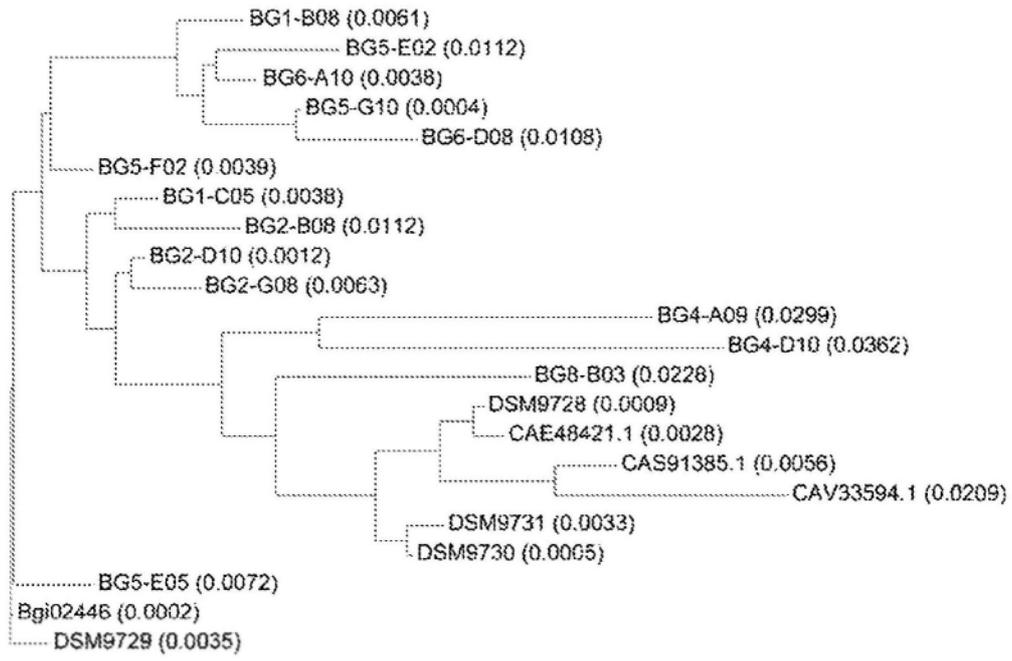


图11