



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104394708 A

(43) 申请公布日 2015. 03. 04

(21) 申请号 201380032135. X

代理人 顾小曼

(22) 申请日 2013. 06. 19

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

12172756. 4 2012. 06. 20 EP

A23K 1/165(2006. 01)

C12N 9/52(2006. 01)

C11D 3/386(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 12. 18

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2013/062716 2013. 06. 19

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/189972 EN 2013. 12. 27

(71) 申请人 诺维信公司

地址 丹麦鲍斯韦

(72) 发明人 T·霍夫 R·P·奥林斯基

C·舍霍尔姆 P·R·厄斯特高

K·蓬托皮丹 A·贝宁 M·耶蒙森

(74) 专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限

公司 11322

权利要求书3页 说明书76页

序列表32页 附图3页

(54) 发明名称

具有蛋白酶活性的多肽在动物饲料和洗涤剂中的用途

(57) 摘要

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

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

(a) 一种多肽,该多肽与 SEQ ID NO:3 的多肽具有至少 80%,例如至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 序列一致性;

(b) 一种多肽,该多肽由在中严谨度条件、中-高严谨度条件、高严谨度条件或非常高严谨度条件下与以下各项杂交的多核苷酸编码:

(i) SEQ ID NO:1 的成熟多肽编码序列,和 / 或

(ii) (i) 的全长互补链;

(c) 一种多肽,该多肽由与 SEQ ID NO:1 的成熟多肽编码序列具有至少 80%,例如至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 序列一致性的多核苷酸编码;

(d) SEQ ID NO:3 的多肽的一种变体,该变体在一个或多个(例如若干个)位置处包含取代、缺失和 / 或插入;以及

(e) (a)、(b)、(c) 或 (d) 的多肽的一个片段,该片段具有蛋白酶活性在动物饲料和洗涤剂组合物中的用途。

2. 根据权利要求 1 所述的用途,其中该多肽包括 SEQ ID NO:2 或由其组成。

3. 根据权利要求 1 所述的用途,其中该多肽包括 SEQ ID NO:3 或由其组成。

4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的用途,其是 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的一种变体,该变体包含一个或多个(例如若干个)氨基酸的取代、缺失和 / 或插入。

5. 一种具有蛋白酶活性并且与 SEQ ID NO:3 具有至少 85%,例如至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99% 序列一致性的变体多肽,该变体多肽包含 SEQ ID NO:3 的至少一个或多个(若干个)氨基酸的至少一个取代、缺失和 / 或插入。

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

(a) 一种多肽,该多肽与 SEQ ID NO:3 具有至少 80%,例如至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 序列一致性;

(b) 一种多肽,该多肽由在中严谨度条件、中-高严谨度条件、高严谨度条件或非常高严谨度条件下与以下各项杂交的多核苷酸编码:

(i) SEQ ID NO:1 的成熟多肽编码序列;和 / 或

(ii) (i) 的全长互补链;

(c) 一种多肽,该多肽由与 SEQ ID NO:3 的成熟多肽编码序列具有至少 80%,例如至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 序列一致性的多核苷酸编码;

(d) 一种变体,该变体包含 SEQ ID NO:3 的一个或多个(若干个)氨基酸的取代、缺失

和 / 或插入 ; 以及

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

7. 根据权利要求 6 所述的组合物, 其中该多肽包括 SEQ ID NO:2 或由其组成。

8. 根据权利要求 6 所述的组合物, 其中该多肽包括 SEQ ID NO:3 或由其组成。

9. 根据权利要求 6-8 中任一项所述的组合物, 其是 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的一种变体, 该变体包含一个或多个 (例如若干个) 氨基酸的取代、缺失和 / 或插入。

10. 一种编码如权利要求 1-9 中任一项表明的多肽的分离的多核苷酸, 其条件是它与 SEQ ID NO:1 或其成熟多肽编码部分不 100% 相同。

11. 一种核酸构建体或表达载体, 该核酸构建体或表达载体包含如权利要求 10 所述的多核苷酸, 该多核苷酸可操作地连接至在表达宿主细胞内指导该多肽产生的一个或多个 (若干个) 控制序列上。

12. 一种重组表达宿主细胞, 该重组表达宿主细胞包括如权利要求 11 所述的一种多核苷酸, 该多核苷酸可操作地连接至指导该多肽产生的一个或多个控制序列上。

13. 如权利要求 12 所述的宿主细胞, 其中该宿主是一种细菌, 如芽孢杆菌属或链霉菌属; 一种真菌, 如曲霉属; 或一种酵母菌, 如假丝酵母属、克鲁维酵母属、毕赤酵母属、酵母属、裂殖酵母属或亚罗酵母属。

14. 如权利要求 13 所述的宿主细胞, 其中该宿主是一种芽孢杆菌, 例如枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、克劳氏芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、或苏云金芽孢杆菌。

15. 如权利要求 13 所述的宿主细胞, 其中该宿主是一种链霉菌, 例如变铅青链霉菌、天蓝色链霉菌、阿维链霉菌、或灰色链霉菌。

16. 一种多肽, 该多肽具有蛋白酶活性并且由一种根据权利要求 10 所述的多核苷酸编码或通过如权利要求 11 至 15 中任一项所述的核酸构建体或宿主细胞产生, 其条件是该多肽与 SEQ ID NO:3 不 100% 相同。

17. 一种产生如权利要求 1 至 9 中任一项表明的多肽的方法, 该方法包括:

(a) 培养一种细胞, 该细胞在其野生型形式中在有益于产生该多肽的条件下产生该多肽; 并且

(b) 回收该多肽。

18. 一种产生如权利要求 1 至 9 中任一项表明的多肽的方法, 该方法包括:

(a) 在有益于产生该多肽的条件下培养如权利要求 9 至 12 中任一项所述的一种宿主细胞; 并且

(b) 回收该多肽。

19. 如权利要求 1 至 9 中任一项表明的至少一种多肽在以下各项中的用途:

在动物饲料中;

在动物饲料添加剂中;

在用于在动物饲料中使用的组合物的制备中;

用于改善动物饲料的营养价值;

用于增加动物饲料中的可消化和 / 或可溶性蛋白;

用于增加动物饮食中的蛋白的水解程度; 和 / 或

用于处理蛋白。

20. 一种用于改善动物饲料的营养价值的方法,其中向该饲料中添加至少一种如权利要求 1 至 9 中任一项表明的多肽。

21. 一种动物饲料添加剂,包括

至少一种如权利要求 1 至 9 中任一项表明的多肽;以及

至少一种脂溶性维生素,和/或

至少一种水溶性维生素,和/或

至少一种微量矿物质。

22. 如权利要求 21 所述的动物饲料添加剂,其中该动物饲料包括一种或多种另外的酶,其中这些另外的酶选自下组,该组由以下各项组成:淀粉酶;植酸酶;木聚糖酶;半乳糖酶; α -半乳糖苷酶;蛋白酶,磷脂酶;以及 β -葡聚糖酶,或其任何混合物。

23. 一种动物饲料,具有 50 至 800g/kg 的粗蛋白含量并且包括如权利要求 1 至 9 中任一项表明的至少一种多肽。

24. 一种用于处理蛋白的方法,该方法包括将至少一种如权利要求 1 至 9 中任一项表明的多肽添加至至少一种蛋白或蛋白来源中的步骤。

25. 如权利要求 24 所述的方法,其中大豆或大豆粉被包括在该至少一种蛋白来源中。

26. 一种洗涤剂组合物,该洗涤剂组合物包括至少一种如在权利要求 1 至 9 中表明的多肽以及一种或多种洗涤剂组分。

27. 如权利要求 26 所述的洗涤剂组合物用于在衣物洗涤、湿洗、硬表面清洁和/或餐具洗涤中的用途。

28. 如权利要求 26 至 27 中任一项所述的洗涤剂组合物,其中该组合物包括一种或多种另外的选自下组的酶,该组包括蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶、角质酶、纤维素酶、内切葡聚糖酶、木葡聚糖酶、果胶酶、果胶裂解酶、黄原胶酶、过氧化物酶、卤代过氧酶、过氧化氢酶和甘露聚糖酶、或其任何混合物。

具有蛋白酶活性的多肽在动物饲料和洗涤剂中的用途

[0001] 对序列表的引用

[0002] 本申请包括一个计算机可读形式的序列表,将其通过引用结合在此。

[0003] 发明背景

发明领域

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

[0005] 相关技术说明

[0006] 分离自糖单孢菌属的 S1 组的蛋白酶在本领域中是已知的。帕蒂 (Pati) 等人已经在“绿色糖单孢菌模式菌株 (P101) 的全基因组序列 (Complete genome sequence of *Saccharomonospora viridis* type strain (P101))”, 2009, 基因组科学标准 (Stand. Genomic Sci.) 1:141-149 中披露了一种来自绿色糖单孢菌的丝氨酸蛋白酶, 该丝氨酸蛋白酶已经在登录号 CP001683 下被提交至 EMBL/GenBank(在本文中是 SEQ ID NO:1)。氨基酸序列以 Uniprot 编号 C7MV18 登记(在本文中 SEQ ID NO:2) 并且成熟氨基酸序列披露于 SEQ ID NO:3 中。该菌株在爱尔兰分离自泥炭沼。

[0007] 卢卡斯 (Lucas) 等人已经提交了一种来自深蓝糖单孢菌 NA-134 的蛋白酶 (Uniprot :H5XE4, SEQ ID NO:7), 该蛋白酶与 SEQ ID NO:3 具有 91.3% 序列一致性。科赛普雷格 (Csepregi) 等人已经提交了一种来自运青糖单孢菌 (*Saccharomonospora azurea*) SZMC 14600 的胰蛋白酶酶原 (Uniprot :H0K7C9, SEQ ID NO:8), 该酶原与 SEQ ID NO:3 具有 89.4% 一致性。卢卡斯 (Lucas) 等人已经向 EMBL/GenBank/DDBJ 数据库提交了一种来自青色糖单孢菌 (*Saccharomonospora glauca*) K62 的内肽酶 (Uniprot :H1JPF3, SEQ ID NO:9), 该内肽酶与 SEQ ID NO:3 具有 86.9% 序列一致性。

[0008] 卢卡斯 (Lucas) 等人还已经向 EMBL/GenBank/DDBJ 数据库提交了两种来自弱代谢糖单孢菌的内肽酶(分别是 Uniprot :G4J6Q2 和 G4IXC2, SEQ ID NO:10 和 11), 这两种内肽酶与 SEQ ID NO:3 分别具有 81.8% 和 80.0% 序列一致性。奥利尼克 (Oliynyk) 等人已经在“产红霉素细菌红色糖多孢菌 NRRL23338 的全基因组序列 (Complete genome sequence of the erythromycin-producing bacterium *Saccharopolyspora erythraea* NRRL23338)”, 2007, 自然生物技术 (Nat. Biotechnol.) 25:447-453 中披露了一种来自红色糖多孢菌, 与 SEQ ID NO:3 具有 81.0% 序列一致性的丝氨酸蛋白酶 (Uniprot :A4FNQ0, SEQ ID NO:12)。

[0009] 卢卡斯 (Lucas) 等人已经向 EMBL/GenBank/DDBJ 数据库提交一种来自新疆糖单孢菌 XJ-54 的 α -裂解蛋白酶 (Uniprot :I0V8H8, SEQ ID NO:13), 该蛋白酶与 SEQ ID NO:3 具有 91.3% 序列一致性, 并且向 EMBL/GenBank/DDBJ 数据库提交了一种来自运青糖单孢菌 NA-128 的膜蛋白 (Uniprot :H8GAL4, SEQ ID NO:14), 该膜蛋白与 SEQ ID NO:3 具有 89.4%

序列一致性。其他已知的蛋白酶具有低于 80% 的序列一致性。

[0010] WO 05/052146 和 WO 05/052161 描述了一种用于动物饲料的丝氨酸蛋白酶, 该丝氨酸蛋白酶与 SEQ ID NO:3 的蛋白酶具有 71.3% 一致性。US 2008/0004186 描述了与 SEQ ID NO:3 的蛋白酶具有 70.0% 一致性的蛋白酶、纤维素酶等作为洗涤剂的用途。US 2010/095987、US 2009/111161 和 US 2011/081711 披露了一种来自链霉菌属 1AG3 的蛋白酶用于动物饲料和用于餐具洗涤的用途, 该蛋白酶与 SEQ ID NO:3 具有 69.4% 一致性。与 SEQ ID NO:3 具有 69.4% 一致性的丝氨酸蛋白酶用于清洁的用途披露于 WO 08/048392 中。WO 08/153925 和 WO 2008/153934 描述了使用与 SEQ ID NO:3 具有 69.4% 一致性的蛋白酶作为洗涤剂。

[0011] WO 95/28850 披露了一种植酸酶与一种或多种微生物蛋白水解酶组合以改善植物性蛋白的溶解度。WO 01/58275 披露了枯草杆菌蛋白酶家族的酸稳定性蛋白酶在动物饲料中的用途。WO 01/58276 披露了衍生自拟诺卡氏菌属 NRRL 18262 的酸稳定性蛋白酶 (10R 蛋白酶) 连同一种衍生自拟诺卡氏菌 DSM 14010 的蛋白酶在动物饲料中的用途。WO 04/072221、WO 04/111220、WO 04/111223、WO 05/035747 以及 WO 05/123911 披露了与 10R 蛋白酶相关的蛋白酶及其在动物饲料中的用途。WO 04/072279 披露了其他蛋白酶在动物饲料中的用途。WO 04/034776 披露了一种枯草杆菌蛋白酶 / 角蛋白酶, 来自地衣芽孢杆菌的 PWD-1, 在家禽饲料中的用途。WO 04/077960 披露了一种通过采用一种细菌或真菌蛋白酶来增加草料或谷物在反刍动物中的消化率的方法。

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

[0013] 发明概述

[0014] 发明背景

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

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

[0017] 动物的胃肠道是由一系列各自呈现不同 pH 环境的段组成。在单胃动物如猪和家禽以及许多类型的鱼中, 胃是具有潜在地低至 1-2 的 pH 的强酸性的, 而肠具有一个 6-7.5 左右的更中性的 pH。除胃和肠之外, 家禽在胃之前还具有一个嗉囊。嗉囊中的 pH 主要由消化的饲料决定并且因此典型地位于 pH 4-6 的范围内。通过一种蛋白酶消化蛋白可发生在整个消化道中, 其条件是该蛋白酶是有活性的并存活于该消化道的条件下。因此, 以下这样的蛋白酶是特别令人希望的: 它们是高度地酸稳定的并且所以可以在胃环境中存活, 并且同时在靶动物的消化道的宽范围的生理 pH 下是有效地有活性的。

[0018] 由于动物饲料通常以丸状形式配制,其中在造丸过程中应用蒸汽,因此在暴露于所述蒸汽处理之后用于动物饲料中的蛋白酶仍能够保持是有活性的也是令人希望的。

[0019] 多年以来,蛋白酶也已经被用在洗涤剂组合物中,以用于水解纺织品、硬质表面和其他表面(例如皮肤等)上的肮材料。这类洗涤剂组合物可以使用粉末、片或肥皂条以手洗的方式、以自动洗衣机的方式用于纺织品的清洁中,以及使用粉末、液体或片通过手工或机器的方式用在餐具洗涤中。本发明的新颖的 S1 蛋白酶对于这些目的也是有用的。

[0020] 为了生产用于工业使用的蛋白酶,重要的是生产高产量的蛋白酶,使得可获得足够量的该产品以能够以有利的价格提供该蛋白酶。

[0021] 本发明涉及选自下组的具有蛋白酶活性的分离的多肽,该组由以下各项组成:

[0022] (a) 与 SEQ ID NO:3 的多肽具有至少 80% 序列一致性的一种多肽;

[0023] (b) 一种多肽,该多肽由在中严谨度条件、中-高严谨度条件、高严谨度条件或非常高严谨度条件下与以下各项杂交的多核苷酸编码:

[0024] (i) SEQ ID NO:1 的成熟多肽编码序列,和/或

[0025] (ii) (i) 的全长互补链;

[0026] (c) 一种多肽,该多肽由与 SEQ ID NO:1 的成熟多肽编码序列具有至少 80% 序列一致性的多核苷酸编码;

[0027] (d) SEQ ID NO:3 的多肽的一种变体,该变体在一个或多个(例如若干个)位置处包含取代、缺失和/或插入;以及

[0028] (e) (a)、(b)、(c) 或 (d) 的多肽的一个片段,该片段具有蛋白酶活性,在动物饲料和洗涤剂组合物中的用途。

[0029] 本发明还涉及具有蛋白酶活性并且与 SEQ ID NO:3 具有至少 85%,例如至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 序列一致性、包含 SEQ ID NO:3 的至少一个或多个(若干个)氨基酸的至少一个取代、缺失和/或插入的变体多肽。

[0030] 本发明进一步涉及包含选自下组的具有蛋白酶活性的分离的多肽的组合物,该组由以下各项组成:

[0031] (a) 一种多肽,该多肽与 SEQ ID NO:3 具有至少 80%,例如至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 序列一致性;

[0032] (b) 一种多肽,该多肽由在中严谨度条件、中-高严谨度条件、高严谨度条件或非常高严谨度条件下与以下各项杂交的多核苷酸编码:

[0033] (i) SEQ ID NO:1 的成熟多肽编码序列;和/或

[0034] (ii) (i) 的全长互补链;

[0035] (c) 一种多肽,该多肽由与 SEQ ID NO:3 的成熟多肽编码序列具有至少 80%,例如至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 序列一致性的多核苷酸编码;

[0036] (d) 一种变体,该变体包含 SEQ ID NO:3 的一个或多个(若干个)氨基酸的取代、缺失和/或插入;以及

[0037] (e) (a)、(b)、(c) 或 (d) 的多肽的一个片段,该片段具有蛋白酶活性。

[0038] 这些组合物可以是洗涤剂组合物或动物饲料组合物。本发明还涉及编码本发明的多肽的分离的多核苷酸,包含这些多核苷酸的核酸构建体、重组表达载体、重组宿主细胞,并且涉及重组地产生这些多肽的方法。本发明还涉及用于制备一种用于在动物饲料中使用的组合物的方法,用于提高动物饲料的营养价值的方法,以及处理蛋白以在动物饲料组合物中使用的方法。

[0039] 序列表综述

[0040] SEQ ID NO:1 是如分离自绿色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1 的 DNA 序列。

[0041] SEQ ID NO:2 是如从 SEQ ID NO:1(Uniprot :C7MV18) 推导的氨基酸序列。

[0042] SEQ ID NO:3 是成熟绿色糖单孢菌蛋白酶的氨基酸序列。

[0043] SEQ ID NO:4 是克劳氏芽孢杆菌 C360 分泌信号。

[0044] SEQ ID NO:5 是 10R 蛋白酶 (WO 05/035747, SEQ ID NO:1) 的 DNA 序列。

[0045] SEQ ID NO:6 是 10R 蛋白酶 (WO 05/035747, SEQ ID NO:2) 的氨基酸序列。

[0046] SEQ ID NO:7 是来自深蓝糖单孢菌 NA-134 的蛋白酶 (Uniprot :H5XEH4) 的氨基酸序列。

[0047] SEQ ID NO:8 是来自运青糖单孢菌 SZMC 14600 的胰蛋白酶酶原 (Uniprot :H0K7C9) 的氨基酸序列。

[0048] SEQ ID NO:9 是来自青色糖单孢菌 K62 的内肽酶 (Uniprot :H1JPF3) 的氨基酸序列。

[0049] SEQ ID NO:10 是来自弱代谢糖单孢菌的内肽酶 (Uniprot :G4J6Q2) 的氨基酸序列。

[0050] SEQ ID NO:11 是来自弱代谢糖单孢菌的内肽酶 (Uniprot :G4IXC2) 的氨基酸序列。

[0051] SEQ ID NO:12 是来自红色糖多孢菌的丝氨酸蛋白酶 (Uniprot :A4FNQ0) 的氨基酸序列。

[0052] SEQ ID NO:13 是来自新疆糖单孢菌 XJ-54 的 α -裂解蛋白酶 (Uniprot :I0V8H8) 的氨基酸序列。

[0053] SEQ ID NO:14 是来自运青糖单孢菌 NA-128 的膜蛋白 (Uniprot :H8GAL4) 的氨基酸序列。

[0054] 序列的一致性矩阵:

[0055]

	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 2	100	100	50.0	73.3	70.6	72.3	70.1	67.4	64.7	73.8	71.4
SEQ ID NO: 3	100	100	67.1	91.3	88.8	86.9	81.8	80.0	81.0	91.3	89.4
SEQ ID NO: 6	50.0	67.1	100	51.2	50.0	48.9	48.5	48.9	49.7	49.7	50.0
SEQ ID NO: 7	73.3	91.3	51.2	100	87.6	87.2	72.5	70.3	63.6	89.4	87.3
SEQ ID NO: 8	70.6	88.8	50.0	87.6	100	83.0	70.4	67.6	60.4	86.2	99.2
SEQ ID NO: 9	72.3	86.9	48.9	87.2	83.0	100	70.9	69.8	61.8	84.0	82.2
SEQ ID NO: 10	70.1	81.8	48.5	72.5	70.4	70.9	100	78.9	63.7	73.1	70.4
SEQ ID NO: 11	67.4	80.0	48.9	70.3	67.6	69.8	78.9	100	63.0	70.8	67.4
SEQ	64.7	81.0	49.7	63.6	60.4	61.8	63.7	63.0	100	62.0	61.3

[0056]

ID NO: 12												
SEQ ID NO: 13	73.8	91.3	49.7	89.4	86.2	84.0	73.1	70.8	62.0	100	86.2	
SEQ ID NO: 14	71.4	89.4	50.0	87.3	99.2	82.2	70.4	67.4	61.3	86.2	100	

[0057] 附图简要说明

[0058] 图 1 示出了来自绿色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1 和 10R 蛋白酶在 25℃ 下、对 Suc-AAPF-pNA 底物的 pH- 活性曲线。

[0059] 图 2 示出了来自绿色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1 和 10R 蛋白酶的 pH- 稳定性曲线（在 37℃ 下 2 小时后的残余活性）。

[0060] 图 3 示出了来自绿色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1 和 10R 蛋白酶在 pH7.0 下、对 Protazyme AK 的温度活性曲线。

[0061] 图 4 示出了来自绿色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1 和 10R 蛋白酶在 pH9.0、25℃ 下、对 10 种 Suc-AAPX-pNA 底物的 P1- 特异性。

[0062] 图 5 示出了来自绿色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1 和 10R 蛋白酶在 40℃ 下、对大豆-玉米粉的 pH- 活性曲线。

[0063] 定义

[0064] 等位基因变体：术语“等位基因变体”意指占用同一染色体位点的一种基因的两个或更多个替代形式中的任一者。等位基因变异由突变天然产生，并且可以导致群体内的多态性。基因突变可以是沉默的（在所编码的多肽中没有改变）或可编码具有改变的氨基酸序列的多肽。多肽的等位基因变体是由基因的等位基因变体编码的多肽。

[0065] cDNA：术语“cDNA”意指可以通过从成熟的剪接的 mRNA 分子逆转录制备的 DNA 分子，该 mRNA 分子是从真核细胞中获得。cDNA 缺少可存在于相应基因组 DNA 中的内含子序列。早先的初始 RNA 转录本是 mRNA 的前体，其在呈现为成熟的剪接的 mRNA 之前要经一系列的步骤进行加工，包括剪接。

[0066] 编码序列：术语“编码序列”意指直接指定一个多肽的氨基酸序列的多核苷酸。编码序列的边界一般由开放阅读框架决定，该开放阅读框架通常以 ATG 起始密码子或替代性起始密码子（例如 GTG 和 TTG）开始，并且以终止密码子（例如 TAA、TAG、和 TGA）结束。编码序列可以是 DNA、cDNA、合成或重组的多核苷酸。

[0067] 颜色澄清：在洗涤和穿着过程中，松动或破损纤维可以在织物的表面上积聚。一种

后果是由于表面污染,织物的颜色看起来不太亮或不太强烈。从纺织品上除去松动或断裂的纤维将部分地恢复该纺织品的初始颜色和外观。如在此使用,术语“颜色澄清”意指纺织品的原始颜色的部分恢复。

[0068] 控制序列:术语“控制序列”意指表达编码本发明的多肽的多核苷酸所需的所有元件。每个控制序列对于编码该多肽的多核苷酸而言可以是天然的或外来的,或对于彼此而言是天然的或外来的。此类控制序列包括但不限于前导子、聚腺苷酸化序列、前肽序列、启动子、信号肽序列、以及转录终止子。至少,控制序列包括启动子,以及转录和翻译终止信号。出于引入有利于将这些控制序列与编码一种多肽的多核苷酸的编码区连接的特异性限制酶切位点的目的,这些控制序列可以提供有多个接头。

[0069] 洗涤剂组分:在此将术语“洗涤剂组分”定义为意指可以用于洗涤剂组合物中的化学品的类型。洗涤剂组分的实例是表面活性剂、助水溶剂、助洗剂、共助洗剂、螯合剂(chelator)或螯合试剂(chelating agent)、漂白系统或漂白组分、聚合物、织物调色剂、织物调理剂、增泡剂、抑泡剂、分散剂、染料转移抑制剂、荧光增白剂、香料、光增亮剂、杀细菌剂、杀真菌剂、污垢悬浮剂、污物释放聚合物、抗再沉积剂、酶抑制剂或稳定剂、酶激活剂、抗氧化剂、以及增溶剂。该洗涤剂组合物可以包括一种或多种任何类型的洗涤剂组分。

[0070] 洗涤剂组合物:术语“洗涤剂组合物”是指用于从有待清洁的物品(例如纺织品、餐具和硬表面)除去不希望的化合物的组合物。该洗涤剂组合物可以用于例如清洁纺织品、餐具以及硬表面,用于家用清洁剂和工业清洁二者。这些术语涵盖选择用于希望的具体类型的清洁组合物和产品的形式(例如、液体、凝胶、粉末、颗粒、糊状、或喷雾组合物)的任何材料/化合物,并且包括但不限于洗涤剂组合物(例如,液体和/或固体衣物洗涤剂和精细织物洗涤剂;硬表面清洁配制品,例如用于玻璃、木材、陶瓷以及金属台面和窗户;地毯清洁剂;炉灶清洁剂;织物清新剂;织物柔软剂;以及纺织品和衣物预去污剂,连同餐具洗涤剂)。除了包含本发明的蛋白酶之外,该洗涤剂配制品还可以包含一种或多种另外的酶(例如其他蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶、角质酶、纤维素酶、内切葡聚糖酶、木葡聚糖酶、果胶酶、果胶裂解酶、黄原胶酶、过氧化物酶、卤代过氧酶(haloperoxygenase)、过氧化氢酶以及甘露聚糖酶,或其任何混合物),和/或组分,例如表面活性剂、助洗剂、螯合剂或螯合试剂、漂白系统或漂白组分、聚合物、织物调理剂、增泡剂、抑泡剂、染料、香料、酶暗抑制剂、光增亮剂、杀细菌剂、杀真菌剂、污垢悬浮剂、防蚀剂、酶抑制剂或稳定剂、酶激活剂、一种或多种转移酶、水解酶、氧化还原酶、上蓝剂以及荧光染料、抗氧化剂、和增溶剂。

[0071] 餐具洗涤:术语“餐具洗涤”是指所有形式的洗涤餐具,例如手动或自动化餐具洗涤。洗涤餐具包括但不限于,清洁所有形式的陶器,例如盘子、杯子、玻璃杯、碗,所有形式的刀具,例如匙、刀、叉,以及上菜用具连同陶瓷,塑料,金属,瓷器,玻璃及丙烯酸酯。

[0072] 餐具洗涤组合物:术语“餐具洗涤组合物”是指用于清洁硬表面的所有形式的组合物。本发明不局限于任何具体类型的餐具洗涤组合物或任何具体洗涤剂。

[0073] 酶洗涤益处:在此将术语“酶洗涤益处”定义为将一种酶添加至洗涤剂中与不具有该酶的同一种洗涤剂相比的有利效果。可以由酶提供的重要的洗涤益处是在洗涤和或清洁之后没有或有非常少的可见污垢的污物去除,预防或减少在洗涤过程中释放的污垢的再沉积(一种也被称作抗再沉积的效果),完全或部分恢复纺织品的白度(一种也被称作增白的效果),这些纺织品初始是白色的但是在重复使用和洗涤后获得浅灰色或浅黄色的外观。不直

接与污垢的催化去污或其再沉积的预防相关的纺织品护理益处对于酶洗涤益处而言也是重要的。此类纺织品护理益处的实例是预防或减少染料从一织物转移至另一织物或同一织物的另一部分（一种也被称作染料转移抑制或抗返染的效果），从织物表面去除突出或断裂的纤维以减少起球倾向或去除已经存在的绒球或绒毛（一种也被称作抗起球的效果），改善织物柔软性，织物的颜色澄清以及去除陷在织物或服装的纤维中的微粒状污垢。酶漂白是一种另外的酶洗涤益处，其中通常将催化活性用于催化漂白组分（例如过氧化氢或其他过氧化物）的形成。

[0074] 表达：术语“表达”包括在多肽的产生中涉及的任何步骤，包括但不限于，转录、转录后修饰、翻译、翻译后修饰、以及分泌。

[0075] 表达载体：术语“表达载体”是指包括编码多肽的多核苷酸并且可操作地与提供了其表达的额外的核苷酸相连接的线性或环状 DNA 分子。

[0076] 片段：术语“片段”意指使一个或多个（若干个）氨基酸从成熟多肽的氨基和 / 或羧基末端缺失的多肽，其中该片段具有蛋白酶活性。在一个方面，一个片段包含至少 130 个氨基酸残基（例如，SEQ ID NO:2 的氨基酸 15 至 144）；在另一个方面，一个片段包含至少 140 个氨基酸残基（例如，SEQ ID NO:2 的氨基酸 10 至 149）；在一个另外的方面，一个片段包含至少 150 个氨基酸残基（例如，SEQ ID NO:2 的氨基酸 5 至 154）。在另一个方面，一个片段包含至少 130 个氨基酸残基（例如，SEQ ID NO:3 的氨基酸 15 至 144）；在另一个方面，一个片段包含至少 140 个氨基酸残基（例如，SEQ ID NO:3 的氨基酸 10 至 149）；在一个另外的方面，一个片段包含至少 150 个氨基酸残基（例如，SEQ ID NO:3 的氨基酸 5 至 154）。

[0077] 硬表面清洁：在此将术语“硬表面清洁”定义为清洁硬表面，其中硬表面可以包括地板、桌子、墙壁、屋顶等，连同硬物体的表面，例如汽车（汽车洗涤）和餐具（餐具洗涤）。餐具洗涤包括但不限于，清洁盘子、杯子、玻璃杯、碗、及刀具（例如匙、刀、叉）、上菜用具、陶瓷、塑料、金属、瓷器、玻璃及丙烯酸酯。

[0078] 宿主细胞：术语“宿主细胞”意指对于用包含本发明多核苷酸的核酸构建体或表达载体进行的转化、转染、转导等是易感的任何细胞类型。术语“宿主细胞”涵盖由于复制期间发生的突变而与亲本细胞不同的亲本细胞的任何后代。

[0079] 改进的洗涤性能：在此将术语“改进的洗涤性能”定义为一种（变体）酶（还有酶的共混物，不只是变体还有骨架，以及与某种清洁组合物组合，等）相对于亲本蛋白酶变体的洗涤性能展示出一种蛋白质变体的洗涤性能的改变，例如增加的去污。术语“洗涤性能”包括在衣物洗涤并且例如在餐具洗涤中的洗涤性能。

[0080] 分离的多核苷酸：术语“分离的多核苷酸”意指一种处于自然界中不存在的形式或环境中的多核苷酸，例如（1）任何非天然存在的多核苷酸，（2）至少部分地从与其天然相关联的天然存在的组分中的一个或多个或全部中去除的任何多核苷酸；（3）通过相对于如在自然界中发现的那一多核苷酸进行人工修饰的任何多核苷酸或（4）通过相对于与其天然相关联的其他组分而增加多核苷酸的量来修饰的任何多核苷酸（例如，宿主细胞中的重组产生；编码该物质的基因的多重拷贝；以及使用比与编码该物质的基因天然相关联的启动子更强的启动子）。在一个方面，该分离的多核苷酸是至少 1% 纯的，例如至少 5% 纯的，更多至少 10% 纯的，至少 20% 纯的，至少 40% 纯的，至少 60% 纯的，至少 80% 纯的，至少 90% 纯的，以及至少 95% 纯的，如通过琼脂糖电泳所确定的。该多核苷酸可以是基因组、cDNA、

RNA、半合成、合成来源的,或其任意组合。

[0081] 分离的多肽:术语“分离的多肽”意指一种处于自然界中不存在的形式或环境中的多肽,例如(1)任何非天然存在的多肽,(2)至少部分地从与其天然相关联的天然存在的组分中的一个或多个或全部中去除的任何多肽;(3)通过相对于如在自然界中发现的那一多肽(在与其他组分例如其他多肽、次级代谢产物、盐等的掺合物中)进行人工修饰的任何多肽或(4)通过相对于与其天然相关联的其他组分而增加多肽的量来修饰的任何多肽。在一个方面,该多肽是至少1%纯的,例如至少5%纯的,至少10%纯的,至少20%纯的,至少40%纯的,至少60%纯的,至少80%纯的,以及至少90%纯的,如通过SDS-PAGE所确定的。

[0082] 湿洗(laundering):术语“湿洗”涉及家用湿洗和工业湿洗两者并且意指用一种包含本发明的清洁或洗涤剂组合物的溶液处理纺织品的过程。湿洗过程可以例如使用例如家用或工业洗衣机进行或可以手动进行。

[0083] 成熟多肽:术语“成熟多肽”意指呈现其在翻译以及任何翻译后修饰之后的最终形式的多肽,所述修饰如N-末端加工、C-末端截短、糖基化、磷酸化等。在一个方面,该成熟多肽是在SEQ ID NO:2的编号中的氨基酸1至160;在SEQ ID NO:2的编号中的氨基酸-198至-167是一个信号肽。

[0084] 成熟多肽编码序列:术语“成熟多肽编码序列”意指编码具有蛋白酶活性的成熟多肽的多核苷酸。在一个方面,成熟多肽编码序列是在SEQ ID NO:1的编号中的核苷酸595-1074。在SEQ ID NO:1的编号中的其他核苷酸1至96编码一种信号肽。

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

[0086] 可操作地连接:术语“可操作地连接”意指一种配置,其中一个控制序列相对于一种多核苷酸的编码序列放置在一个适当位置处,以使得控制序列指引编码序列的表达。

[0087] 具有蛋白酶活性的多肽:具有蛋白酶活性的多肽或蛋白酶有时还被指定为肽酶、胰酶、肽水解酶或蛋白水解酶。蛋白酶可以是始于任一端的水解肽的外切型蛋白酶或在多肽链内部发挥作用的内切型蛋白酶(内肽酶)。内肽酶对N-和C-末端封闭的肽底物显示出活性,这些底物与所讨论蛋白酶的特异性有关。

[0088] 术语“蛋白酶”在此被定义为水解肽键的酶。蛋白酶的定義也适用于如在此使用的术语“亲本蛋白酶”和“蛋白酶变体”的蛋白酶部分。术语“蛋白酶”包括属于EC 3.4 酶组(包括其十八个亚类中的每一个)的任何酶。EC编号参考加利福尼亚州(California)的圣迭戈(San Diego)的NC-IUBMB学术出版社(Academic Press)的1992年酶命名法,分别包括出版于1994,欧洲生物化学杂志(Eur. J. Biochem.) 223:1-5;1995,欧洲生物化学杂志 232:1-6;1996,欧洲生物化学杂志 237:1-5;1997,欧洲生物化学杂志 250:1-6;以及1999,欧洲生物化学杂志 264:610-650的增刊1-5。命名定期得以增补和更新;参见例如万维网(WWW)于<http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme/index.html>。

[0089] 本发明提供了具有蛋白酶活性的多肽在动物饲料和洗涤剂组合物中的用途。本发明还提供了编码这些多肽的多核苷酸。本发明的蛋白酶是S1肽酶家族的丝氨酸蛋白酶。本发明的蛋白酶展现了出人意料的pH特性,这使得它们成为用于在动物饲料中使用的感兴

趣的候选物。本发明的蛋白酶因此在 5-11 的广 pH 范围内对 Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA 具有活性,在 7-11 的 pH 范围中展现尤其高的活性,在 pH 3-7 的广生理 pH 范围内对饲料相关的大豆粉-玉米粉底物具有活性并且在经受低至 3 的 pH 2 小时后保留 100%活性并且在经受低至 2 的 pH 2 小时后保留多于 40%活性。

[0090] 本发明和根据本发明使用的蛋白酶选自下组,该组由以下各项组成:

[0091] (a) 属于 EC 3.4.21 酶组的蛋白酶;和/或

[0092] (b) S1 肽酶家族的丝氨酸蛋白酶;

[0093] 如在 1993,生物化学杂志 (Biochem.) J. 290:205-218 和在 MEROPS 蛋白酶数据库,发行 9.4(2011 年 1 月 31 日)(www.merops.ac.uk)中所述的。该数据库描述于罗林斯 (Rawlings), N. D., 巴雷特 (Barrett), A. J. 和贝特曼 (Bateman), A., 2010,“MEROPS: 肽酶数据库 (MEROPS: the peptidase database)”,核酸研究 (Nucl. Acids Res.) 38:D227-D233 中。

[0094] 本发明的蛋白酶是内肽酶 (EC 3.4.21)。存在若干蛋白酶活性类型:三种主要的活性类型是:胰蛋白酶样,其中在 Arg 或 Lys 后在 P1 处存在酰胺底物的切割;糜蛋白酶样,其中切割发生在 P1 处,在疏水性氨基酸中的一个之后;以及弹性蛋白酶样,具有在 P1 处 Ala 之后的切割。

[0095] 本发明的这些多肽具有 SEQ ID NO:2 的成熟多肽的至少 20%,例如至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 以及至少 100% 的蛋白酶活性。

[0096] 更确切地说,在本发明中使用的这些蛋白酶是在位置 P1 处优选疏水性芳香族氨基酸残基的那些。

[0097] 为了测定给定蛋白酶是否为丝氨酸蛋白酶和 S1 家族的蛋白酶,可参考上述手册和其中述及的原理。可对所有蛋白酶类型进行确定,而不论其是天然或野生型蛋白酶,还是经基因工程改造或合成的蛋白酶。

[0098] S1 家族的肽酶以该顺序含有催化三联体 His、Asp 和 Ser。催化三联体的任何氨基酸的突变将导致酶活性的损失。来自绿色糖单孢菌 (SEQ ID NO:3) 的 S1 蛋白酶 1 的催化三联体的氨基酸可能是位置 His-32、Asp-56 和 Ser-137。

[0099] 可以使用任何测定来测量蛋白酶活性,其中采用一种底物,该底物包括与所讨论的蛋白酶的特异性相关的肽键。pH 测定和温度测定同样适用于所讨论的蛋白酶。pH 值测定的实例是 pH 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、或 12。温度测定的实例是 15°C、20°C、25°C、30°C、35°C、37°C、40°C、45°C、50°C、55°C、60°C、65°C、70°C、80°C、90°C、或 95°C。普通蛋白酶底物的实例是酪蛋白、牛血清白蛋白以及血红蛋白。在经典的安森 (Anson) 和米尔斯基 (Mirsky) 方法中,将变性的血红蛋白用作底物并且在用所讨论的蛋白酶孵育测定后,确定三氯乙酸可溶的血红蛋白的量用作蛋白酶活性的量度(安森 (Anson), M. L. 和米尔斯基 (Mirsky), A. E., 1932,普通生理学杂志 (J. Gen. Physiol.) 16:59 以及安森 (Anson), M. L., 1938,普通生理学杂志 (J. Gen. Physiol.) 22:79)。

[0100] 出于本发明的目的,使用描述于“材料与方法”中的测定确定蛋白酶活性,如 Suc-AAPF-pNA 测定、Protazyme AK 测定、Suc-AAPX-pNA 测定以及邻苯二甲醛 (OPA)。对于 Protazyme AK 测定,当用该蛋白酶孵育时,不可溶 Protazyme AK (天青精-交联的酪蛋白)

底物释放蓝色并且确定该颜色作为蛋白酶活性的量度。对于 Suc-AAPF-pNA 测定,当用该蛋白酶孵育时,无色的 Suc-AAPF-pNA 底物释放黄色的对硝基苯胺并且确定该黄色作为蛋白酶活性的量度。

[0101] 序列一致性:两个氨基酸序列之间或两个核苷酸序列之间的相关性由参数“序列一致性”描述。

[0102] 出于本发明的目的,使用如在 EMBOSS 包 (EMBOSS:欧洲分子生物学开放软件套件 (The European Molecular Biology Open Software Suite),赖斯 (Rice) 等人,2000,遗传学趋势 (Trends Genet.)16:276-277) (优选 3.0.0 版或更新版本) 的尼德尔 (Needle) 程序中所实施的尼德尔曼-翁施 (Needleman-Wunsch) 算法 (尼德尔曼和翁施,1970,分子生物学杂志 (J. Mol. Biol.)48:443-453) 来测定两个氨基酸序列之间的序列一致性的程度。使用版本 6.1.0。所使用的这些任选参数是空位开放罚分 10、空位延伸罚分 0.5,及 EBLOSUM62 (BLOSUM62 的 EMBOSS 版本) 取代矩阵。尼德尔标注的“最长的一致性”的输出 (使用 -非简化选项获得) 被用作百分比一致性,并且如下计算:

[0103] $(\text{一致的残基} \times 100) / (\text{比对长度} - \text{比对中的空位总数})$ 。

[0104] 出于本发明的目的,使用如在 EMBOSS 包 (EMBOSS:欧洲分子生物学开放软件套件 (The European Molecular Biology Open Software Suite),赖斯 (Rice) 等人,2000,同上) (优选 3.0.0 版或更新版本) 的尼德尔 (Needle) 程序中所实施的尼德尔曼-翁施 (Needleman-Wunsch) 算法 (尼德尔曼和翁施,1970,同上) 来测定两个脱氧核糖核苷酸序列之间的序列一致性的程度。使用版本 6.1.0。所使用的这些任选参数是空位开放罚分 10、空位延伸罚分 0.5,及 EDNAFULL (NCBI NUC4.4 的 EMBOSS 版本) 取代矩阵。尼德尔标注的“最长的一致性”的输出 (使用 -非简化选项获得) 被用作百分比一致性,并且如下计算:

[0105] $(\text{一致的脱氧核糖核苷酸} \times 100) / (\text{比对长度} - \text{比对中的空位总数})$

[0106] 严谨度条件:不同的严谨度条件定义如下。

[0107] 术语“非常低严谨度条件”意指对于长度为至少 100 个核苷酸的探针而言,遵循标准 DNA 印迹 (Southern blotting) 程序,在 42°C 下在 5X SSPE、0.3% SDS、200 微克 /ml 剪切并变性的鲑鱼精子 DNA 和 35% 甲酰胺中预杂交和杂交 12 至 24 小时。载体材料最终使用 1.5XSSC、0.2% SDS,在 65°C 下洗涤三次,每次 15 分钟。

[0108] 术语“低严谨度条件”意指对于长度为至少 100 个核苷酸的探针而言,遵循标准 DNA 印迹程序,在 42°C 下在 5X SSPE、0.3% SDS、200 微克 /ml 剪切并变性的鲑鱼精子 DNA 和 35% 甲酰胺中预杂交和杂交 12 至 24 小时。载体材料最终使用 0.8X SSC、0.2% SDS,在 65°C 下洗涤三次,每次 15 分钟。

[0109] 术语“中严谨度条件”意指对于长度为至少 100 个核苷酸的探针而言,遵循标准 DNA 印迹程序,在 42°C 下在 5X SSPE、0.3% SDS、200 微克 /ml 剪切并变性的鲑鱼精子 DNA 和 35% 甲酰胺中预杂交和杂交 12 至 24 小时。载体材料最终使用 0.4x SSC、0.2% SDS,在 65°C 下洗涤三次,每次 15 分钟。

[0110] 术语“中-高严谨度条件”意指对于长度为至少 100 个核苷酸的探针而言,遵循标准 DNA 印迹程序,在 42°C 下在 5X SSPE、0.3% SDS、200 微克 /ml 剪切并变性的鲑鱼精子 DNA 和 35% 甲酰胺中预杂交和杂交 12 至 24 小时。载体材料最终使用 0.2X SSC、0.2% SDS,在 65°C 下洗涤三次,每次 15 分钟。

[0111] 术语“高严谨度条件”意指对于长度为至少 100 个核苷酸的探针而言,遵循标准 DNA 印迹程序,在 42℃下在 5X SSPE、0.3% SDS、200 微克/ml 剪切并变性的鲑鱼精子 DNA 和 35% 甲酰胺中预杂交和杂交 12 至 24 小时。载体材料最终使用 0.2X SSC、0.2% SDS,在 70℃下洗涤三次,每次 15 分钟。

[0112] 术语“非常高严谨度条件”意指对于长度为至少 100 个核苷酸的探针而言,遵循标准 DNA 印迹程序,在 42℃下在 5X SSPE、0.3% SDS、200 微克/ml 剪切并变性的鲑鱼精子 DNA 和 35% 甲酰胺中预杂交和杂交 12 至 24 小时。载体材料最终使用 0.1X SSC、0.2% SDS,在 70℃下洗涤三次,每次 15 分钟。

[0113] 子序列:术语“子序列”意指使一个或多个(若干个)核苷酸从成熟多肽编码序列的 5' 端和 / 或 3' 端缺失的多核苷酸,其中该子序列编码具有蛋白酶活性的一个片段。在一个方面,一个子序列包含至少 390 个核苷酸(例如,SEQ ID NO:1 的核苷酸 637 至 1026),例如,以及至少 420 个核苷酸(例如,SEQ ID NO:1 的核苷酸 622 至 1041);例如,以及至少 450 个核苷酸(例如,SEQ ID NO:1 的核苷酸 607 至 1056)。

[0114] 基本上纯的多核苷酸:术语“基本上纯的多核苷酸”意指不含其他外部或不想要的核苷酸并且处在适用于基因工程化多肽生产系统内部的形式多核苷酸制剂。因而,基本上纯的多核苷酸包含按重量计最多 10%、最多 8%、最多 6%、最多 5%、最多 4%、最多 3%、最多 2%、最多 1% 和最多 0.5% 与该多核苷酸天然或重组结合的其他多核苷酸物质。然而,基本上纯的多核苷酸可以包含天然存在的 5' 和 3' 非翻译区,如启动子和终止子。优选地,该多核苷酸是按重量计至少 90% 纯的,例如至少 92% 纯的、至少 94% 纯的、至少 95% 纯的、至少 96% 纯的、至少 97% 纯的、至少 98% 纯的、至少 99% 纯的、以及至少 99.5% 纯的、以及 100% 纯的。本发明的多核苷酸优选以一种基本上纯的形式存在。

[0115] 基本上纯的多肽:术语“基本上纯的多肽”意指按重量计包含最多 10%、最多 8%、最多 6%、最多 5%、最多 4%、最多 3%、最多 2%、最多 1% 和最多 0.5% 与该多肽天然或重组结合的其他多肽物质的制剂。优选地,按在该制剂中存在的总多肽物质的重量计,该多肽是至少 92% 纯的,例如至少 94% 纯的、至少 95% 纯的、至少 96% 纯的、至少 97% 纯的、至少 98% 纯的、至少 99%、至少 99.5% 纯的、和 100% 纯的。本发明的多肽优选地处于基本上纯的形式。这可以例如通过熟知的重组方法或通过经典纯化方法制备该多肽来实现。

[0116] 纺织品:术语“纺织品”意指包括纱线、纱线中间体、纤维、非机织物材料、天然材料、合成材料、以及任何其他纺织品材料的任何纺织品材料,这些材料制造的织物和由这些织物制成的产品(例如服装和其他物品)。该纺织品或织物可以处于针织品、机织物、牛仔布、非机织物、毡、纱线、以及毛巾布的形式。这些纺织品可以是纤维素基的,如天然纤维素,包括棉布、亚麻 / 亚麻布、黄麻、苧麻、剑麻或椰壳纤维或者人造纤维素(例如,来源于木浆),包括纤维胶 / 人造丝、苧麻、醋酸纤维素纤维(三胞)、莱赛尔纤维(Lyocell)或其共混物。纺织品或织物也可以不基于纤维素,如天然聚酰胺,包括羊毛、驼毛、羊绒、马海毛、兔毛和蚕丝或合成聚合物如尼龙、芳族聚酰胺、聚酯、丙烯酸、聚丙烯和氨纶 / 弹性纤维(spandex/elastane)、或其共混物其以及基于纤维素和不基于纤维素的纤维的共混物。共混物的例子是棉和 / 或人造丝 / 纤维胶与一种或几种伴随材料的共混物,该伴随材料例如是羊毛、合成纤维(例如聚酰胺纤维、丙烯酸纤维、聚酯纤维、聚乙烯醇纤维、聚氯乙烯纤维、聚亚胺酯纤维、聚脲纤维、芳族聚酰胺纤维)以及含纤维素的纤维(例如人造丝 / 纤维

胶、苧麻、亚麻 / 亚麻布、黄麻、醋酸纤维素纤维、莱赛尔纤维)。织物可以是常规的可洗涤衣物,例如玷污的家居衣物。当使用术语织物或衣服时,旨在也包括广义术语纺织品。

[0117] 纺织品护理益处:不直接与污垢的催化去污或其再沉积的预防相关的“纺织品护理益处”对于酶洗涤益处而言也是重要的。此类纺织品护理益处的实例是预防或减少染料从一纺织品转移至另一纺织品或同一纺织品的另一部分(一种也被称作染料转移抑制或抗返染的效果),从纺织品表面去除突出或断裂的纤维以减少起球倾向或去除已经存在的绒球或绒毛(一种也被称作抗起球的效果),改善纺织品柔软性,纺织品的颜色澄清以及去除陷在纺织品的纤维中的微粒状污垢。酶漂白是一种另外的酶洗涤益处,其中通常将催化活性用于催化漂白组分(例如过氧化氢或其他过氧化物或其他漂白种类)的形成。

[0118] 变体:术语“变体”意指在一个或多个(若干个)位置包含改变(即,一个或多个(若干个)氨基酸残基取代、插入和/或缺失)的具有蛋白酶活性的多肽。取代意指将占据某个位置的氨基酸替换为不同的氨基酸;缺失意指去除占据某个位置的氨基酸;并且插入意指邻近占据某个位置的氨基酸添加1、2或3个氨基酸。

[0119] 洗涤性能:术语“洗涤性能”被用作酶在例如洗涤或硬表面清洁过程中除去存在于有待清洁的物体上的污物的能力。

[0120] 白度:在此将术语“白度”定义为在不同领域并且针对不同顾客具有不同含义的广义术语。白度的损失可以例如归因于灰化、黄化、或光增亮剂/调色剂的去除。灰化和黄化可归因于污垢再沉积、身体污垢、来自例如铁和铜离子或染料转移的着色。白度可包括来自以下列表的一个或若干问题:着色剂或染料作用、不完全污渍去除(例如身体污垢、皮脂等)、再沉积(该物体的灰化、黄化或其他变色)(去除的污垢与纺织品的其他部分(弄脏的或未弄脏的)再关联)、在应用中纺织品的化学变化、以及颜色的澄清或淡色化。

[0121] 发明详细说明

[0122] 具有蛋白酶活性的多肽

[0123] 本发明涉及具有蛋白酶活性的分离的多肽在动物饲料或洗涤剂中的用途,这些分离的多肽选自下组,该组由以下各项组成:

[0124] (a) 与 SEQ ID NO:3 的多肽具有至少 80% 序列一致性的一种多肽;

[0125] (b) 一种多肽,该多肽由在中严谨度条件、中-高严谨度条件、高严谨度条件或非常高严谨度条件下与以下各项杂交的多核苷酸编码:

[0126] (i) SEQ ID NO:1 的成熟多肽编码序列,和/或

[0127] (ii) (i) 的全长互补链;

[0128] (c) 一种多肽,该多肽由与 SEQ ID NO:1 的成熟多肽编码序列具有至少 80% 序列一致性的多核苷酸编码;

[0129] (d) SEQ ID NO:3 的多肽的一种变体,该变体在一个或多个(例如若干个)位置处包含取代、缺失和/或插入;以及

[0130] (e) (a)、(b)、(c) 或 (d) 的多肽的一个片段,该片段具有蛋白酶活性。

[0131] 本发明涉及分离的多肽在动物饲料或洗涤剂中的用途,这些分离的多肽与 SEQ ID NO:3 的多肽具有至少 80%,例如至少 85%,例如至少 87%、至少 89%、至少 90%、至少 93%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 序列一致性,这些分离的多肽具有蛋白酶活性。在一个方面,这些多肽与 SEQ ID NO:3 的多肽相差不多于三十二

个氨基酸,例如相差三十个氨基酸、相差二十五个氨基酸、相差二十个氨基酸、相差十五个氨基酸、相差十个氨基酸、相差八个氨基酸、相差七个氨基酸、相差六个氨基酸、相差五个氨基酸、相差四个氨基酸、相差三个氨基酸、相差两个氨基酸以及相差一个氨基酸。

[0132] 确切地说,具有蛋白酶活性的用于在动物饲料或洗涤剂中使用的这些分离的多肽应该选自下组,该组由以下各项组成:

[0133] (a) 与 SEQ ID NO:3 的多肽具有至少 85% 序列一致性的一种多肽;

[0134] (b) 一种多肽,该多肽由在中严谨度条件、中-高严谨度条件、高严谨度条件或非常高严谨度条件下与以下各项杂交的多核苷酸编码:

[0135] (i) SEQ ID NO:1 的成熟多肽编码序列,和/或

[0136] (ii) (i) 的全长互补链;

[0137] (c) 一种多肽,该多肽由与 SEQ ID NO:1 的成熟多肽编码序列具有至少 85% 序列一致性的多核苷酸编码;

[0138] (d) SEQ ID NO:3 的多肽的一种变体,该变体在一个或多个(例如若干个)位置处包含取代、缺失和/或插入;以及

[0139] (e) (a)、(b)、(c) 或 (d) 的多肽的一个片段,该片段具有蛋白酶活性。

[0140] 具有蛋白酶活性并且用于在动物饲料或洗涤剂中使用的另外的分离的多肽应该选自下组,该组由以下各项组成:

[0141] (a) 与 SEQ ID NO:3 的多肽具有至少 90% 序列一致性的一种多肽;

[0142] (b) 一种多肽,该多肽由在中严谨度条件、中-高严谨度条件、高严谨度条件或非常高严谨度条件下与以下各项杂交的多核苷酸编码:

[0143] (i) SEQ ID NO:1 的成熟多肽编码序列,和/或

[0144] (ii) (i) 的全长互补链;

[0145] (c) 一种多肽,该多肽由与 SEQ ID NO:1 的成熟多肽编码序列具有至少 90% 序列一致性的多核苷酸编码;

[0146] (d) SEQ ID NO:3 的多肽的一种变体,该变体在一个或多个(例如若干个)位置处包含取代、缺失和/或插入;以及

[0147] (e) (a)、(b)、(c) 或 (d) 的多肽的一个片段,该片段具有蛋白酶活性。

[0148] 确切地说,具有蛋白酶活性的用于在动物饲料或洗涤剂中使用的这些分离的多肽应该选自下组,该组由以下各项组成:

[0149] (a) 与 SEQ ID NO:3 的多肽具有至少 95% 序列一致性的一种多肽;

[0150] (b) 一种多肽,该多肽由在中严谨度条件、中-高严谨度条件、高严谨度条件或非常高严谨度条件下与以下各项杂交的多核苷酸编码:

[0151] (i) SEQ ID NO:1 的成熟多肽编码序列,和/或

[0152] (ii) (i) 的全长互补链;

[0153] (c) 一种多肽,该多肽由与 SEQ ID NO:1 的成熟多肽编码序列具有至少 95% 序列一致性的多核苷酸编码;

[0154] (d) SEQ ID NO:3 的多肽的一种变体,该变体在一个或多个(例如若干个)位置处包含取代、缺失和/或插入;以及

[0155] (e) (a)、(b)、(c) 或 (d) 的多肽的一个片段,该片段具有蛋白酶活性。

[0156] 具有蛋白酶活性并且用于在动物饲料或洗涤剂中使用的另外的分离的多肽应该选自下组,该组由以下各项组成:

[0157] (a) 与 SEQ ID NO:3 的多肽具有至少 97% 序列一致性的一种多肽;

[0158] (b) 一种多肽,该多肽由在中严谨度条件、中-高严谨度条件、高严谨度条件或非常高严谨度条件下与以下各项杂交的多核苷酸编码:

[0159] (i) SEQ ID NO:1 的成熟多肽编码序列,和 / 或

[0160] (ii) (i) 的全长互补链;

[0161] (c) 一种多肽,该多肽由与 SEQ ID NO:1 的成熟多肽编码序列具有至少 97% 序列一致性的多核苷酸编码;

[0162] (d) SEQ ID NO:3 的多肽的一种变体,该变体在一个或多个(例如若干个)位置处包含取代、缺失和 / 或插入;以及

[0163] (e) (a)、(b)、(c) 或 (d) 的多肽的一个片段,该片段具有蛋白酶活性。

[0164] 确切地说,具有蛋白酶活性的用于在动物饲料或洗涤剂中使用的这些分离的多肽应该选自下组,该组由以下各项组成:

[0165] (a) 与 SEQ ID NO:3 的多肽具有至少 98% 序列一致性的一种多肽;

[0166] (b) 一种多肽,该多肽由在中严谨度条件、中-高严谨度条件、高严谨度条件或非常高严谨度条件下与以下各项杂交的多核苷酸编码:

[0167] (i) SEQ ID NO:1 的成熟多肽编码序列,和 / 或

[0168] (ii) (i) 的全长互补链;

[0169] (c) 一种多肽,该多肽由与 SEQ ID NO:1 的成熟多肽编码序列具有至少 98% 序列一致性的多核苷酸编码;

[0170] (d) SEQ ID NO:3 的多肽的一种变体,该变体在一个或多个(例如若干个)位置处包含取代、缺失和 / 或插入;以及

[0171] (e) (a)、(b)、(c) 或 (d) 的多肽的一个片段,该片段具有蛋白酶活性。

[0172] 具有蛋白酶活性并且用于在动物饲料或洗涤剂中使用的另外的分离的多肽应该选自下组,该组由以下各项组成:

[0173] (a) 与 SEQ ID NO:3 的多肽具有至少 99% 序列一致性的一种多肽;

[0174] (b) 一种多肽,该多肽由在中严谨度条件、中-高严谨度条件、高严谨度条件或非常高严谨度条件下与以下各项杂交的多核苷酸编码:

[0175] (i) SEQ ID NO:1 的成熟多肽编码序列,和 / 或

[0176] (ii) (i) 的全长互补链;

[0177] (c) 一种多肽,该多肽由与 SEQ ID NO:1 的成熟多肽编码序列具有至少 99% 序列一致性的多核苷酸编码;

[0178] (d) SEQ ID NO:3 的多肽的一种变体,该变体在一个或多个(例如若干个)位置处包含取代、缺失和 / 或插入;以及

[0179] (e) (a)、(b)、(c) 或 (d) 的多肽的一个片段,该片段具有蛋白酶活性。

[0180] 本发明的一个实施例是一种用于在动物饲料或洗涤剂中使用的分离的多肽,该多肽与 SEQ ID NO:3 的多肽具有至少 85% 序列一致性。

[0181] 本发明的一个实施例是一种用于在动物饲料或洗涤剂中使用的分离的多肽,该多

肽与 SEQ ID NO:3 的多肽具有至少 86% 序列一致性。

[0182] 本发明的一个实施例是一种用于在动物饲料或洗涤剂中使用的分离的多肽, 该多肽与 SEQ ID NO:3 的多肽具有至少 87% 序列一致性。

[0183] 本发明的一个实施例是一种用于在动物饲料或洗涤剂中使用的分离的多肽, 该多肽与 SEQ ID NO:3 的多肽具有至少 88% 序列一致性。

[0184] 本发明的一个实施例是一种用于在动物饲料或洗涤剂中使用的分离的多肽, 该多肽与 SEQ ID NO:3 的多肽具有至少 89% 序列一致性。

[0185] 本发明的一个实施例是一种用于在动物饲料或洗涤剂中使用的分离的多肽, 该多肽与 SEQ ID NO:3 的多肽具有至少 90% 序列一致性。

[0186] 本发明的一个实施例是一种用于在动物饲料或洗涤剂中使用的分离的多肽, 该多肽与 SEQ ID NO:3 的多肽具有至少 91% 序列一致性。

[0187] 本发明的一个实施例是一种用于在动物饲料或洗涤剂中使用的分离的多肽, 该多肽与 SEQ ID NO:3 的多肽具有至少 92% 序列一致性。

[0188] 本发明的一个实施例是一种用于在动物饲料或洗涤剂中使用的分离的多肽, 该多肽与 SEQ ID NO:3 的多肽具有至少 93% 序列一致性。

[0189] 本发明的一个实施例是一种用于在动物饲料或洗涤剂中使用的分离的多肽, 该多肽与 SEQ ID NO:3 的多肽具有至少 94% 序列一致性。

[0190] 本发明的一个实施例是一种用于在动物饲料或洗涤剂中使用的分离的多肽, 该多肽与 SEQ ID NO:3 的多肽具有至少 95% 序列一致性。

[0191] 本发明的一个实施例是一种用于在动物饲料或洗涤剂中使用的分离的多肽, 该多肽与 SEQ ID NO:3 的多肽具有至少 96% 序列一致性。

[0192] 本发明的一个实施例是一种用于在动物饲料或洗涤剂中使用的分离的多肽, 该多肽与 SEQ ID NO:3 的多肽具有至少 97% 序列一致性。

[0193] 本发明的一个实施例是一种用于在动物饲料或洗涤剂中使用的分离的多肽, 该多肽与 SEQ ID NO:3 的多肽具有至少 98% 序列一致性。

[0194] 本发明的一个实施例是一种用于在动物饲料或洗涤剂中使用的分离的多肽, 该多肽与 SEQ ID NO:3 的多肽具有至少 99% 序列一致性。

[0195] 本发明的一个实施例是一种用于在动物饲料或洗涤剂中使用的分离的多肽, 该多肽与 SEQ ID NO:3 的多肽具有 100% 序列一致性。

[0196] 有待用于本发明的多肽优选地包括 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列或其等位基因变体或由其组成; 或是其具有蛋白酶活性的片段。在另一个方面, 该多肽包括 SEQ ID NO:2 的成熟多肽或由其组成。在一个另外的方面, 该多肽包括 SEQ ID NO:3 的多肽或由其组成。在另一个方面, 该多肽包括 SEQ ID NO:2 的氨基酸 1 至 160、SEQ ID NO:2 的氨基酸 5 至 154 或 SEQ ID NO:2 的氨基酸 10 至 149 或由其组成。在另一个方面, 该多肽包括 SEQ ID NO:3 的氨基酸 1 至 160、SEQ ID NO:3 的氨基酸 5 至 154 或 SEQ ID NO:3 的氨基酸 10 至 149 或由其组成。

[0197] 本发明还涉及具有蛋白酶活性的、由以下多核苷酸编码的分离的多肽, 这些多核苷酸在中严谨度条件、中-高严谨度条件、高严谨度条件或非常高严谨度条件下与 (i) SEQ ID NO:1 的成熟多肽编码序列和 / 或 (ii) (i) 的全长互补链杂交 (J. 萨姆布鲁克

(Sambrook), E. F. 弗里奇 (Fritsch) 和 T. 马尼亚蒂斯 (Maniatis), 1989, 分子克隆实验手册 (Molecular Cloning, A Laboratory Manual), 第 2 版, 冷泉港 (Cold Spring Harbor, 纽约)。

[0198] 可以使用 SEQ ID NO:1 的多核苷酸或其子序列、连同 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列或其片段来设计核酸探针, 以根据本领域熟知的方法来鉴定并克隆对来自不同属或种的菌株的、具有蛋白酶活性的多肽进行编码的 DNA。具体地说, 这类探针可以用于按照标准 DNA 印迹程序与感兴趣的属或种的基因组或 cDNA 杂交, 以便鉴定并分离其中的相应基因。这类探针可以明显短于完整序列, 但是长度应为至少 14, 例如至少 25、至少 35、或至少 70 个核苷酸。优选地, 该核酸探针的长度为至少 100 个核苷酸, 例如长度为至少 200 个核苷酸、至少 300 个核苷酸、至少 400 个核苷酸、至少 500 个核苷酸、至少 600 个核苷酸、至少 700 个核苷酸、至少 800 个核苷酸、或至少 900 个核苷酸。DNA 和 RNA 探针都可使用。典型地将探针进行标记 (例如, 用 ^{32}P 、 ^3H 、 ^{35}S 、生物素、或抗生物素蛋白), 以检测相应的基因。本发明涵盖此类探针。

[0199] 可以筛选从这类其他菌株制备的基因组 DNA 或 cDNA 文库的与上述探针杂交并编码具有蛋白酶活性的多肽的 DNA。来自这类其他菌株的基因组 DNA 或其他 DNA 可以通过琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳, 或其他分离技术来分离。来自文库的 DNA 或分离的 DNA 可转移到并固定在硝酸纤维素或其他适合的载体材料上。为鉴定与 SEQ ID NO:1 或其子序列同源的克隆或 DNA, 在 DNA 印迹法中优选使用载体材料。

[0200] 出于本发明的目的, 杂交表明多核苷酸在非常低到非常高严谨度条件下与一种被标记的核酸探针杂交, 该探针对应于 SEQ ID NO:1 的成熟多肽编码序列; 其全长互补链; 或其子序列。在这些条件下, 核酸探针杂交的分子可以使用例如 X 射线胶片而进行检测。

[0201] 在一个方面, 该核酸探针是 SEQ ID NO:1 的成熟多肽编码序列。在另一个方面, 该核酸探针是其片段。在另一个方面, 该核酸探针是编码 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的多肽或其片段的一种多核苷酸。在另一个优选方面, 该核酸探针是 SEQ ID NO:1。

[0202] 对于长度为至少 100 个核苷酸的长探针而言, 高至非常高严谨度条件被定义为最佳地, 遵循标准 DNA 印迹程序, 在 42°C 下在 $5\times$ SSPE、 0.3% SDS、 200 微克 /ml 剪切并变性的鲑鱼精子 DNA 和 35% 甲酰胺中预杂交和杂交 12 至 24 小时。将载体材料在 65°C 下 (低至中 - 高严谨度), 以及在 70°C 下 (高和非常高严谨度), 使用 $1.5\times$ SSC (非常低严谨度), $0.8\times$ SSC (低严谨度), $0.4\times$ SSC (中低严谨度), $0.2\times$ SSC (中 - 高和高严谨度) 或 $0.1\times$ SSC (非常高严谨度), 0.2% SDS 下最终洗涤三次, 每次 15 分钟。

[0203] 对于长度为约 15 个核苷酸至约 70 个核苷酸的短探针而言, 严谨度条件被定义为最佳地, 遵循标准 DNA 印迹程序, 在比使用根据博尔顿 (Bolton) 和麦卡锡 (McCarthy) (1962, 美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 48:1390) 的计算所计算的 T_m 低约 5°C 至约 10°C 下, 在 0.9M NaCl、 0.09M Tris-HCl (pH 7.6)、 6mM EDTA、 0.5% NP-40、 $1\times$ 登哈特氏溶液 (Denhardt's solution)、 1mM 焦磷酸钠、 1mM 磷酸二氢钠、 0.1mM ATP、以及每 ml 0.2mg 的酵母 RNA 中预杂交和杂交 12 至 24 小时。最后将载体材料在所计算的 T_m 以下 5°C 至 10°C , 在 $6\times$ SSC 加 0.1% SDS 中洗涤 1 次 (持续 15 分钟) 并且使用 $6\times$ SSC 洗涤 2 次 (每次 15 分钟)。

[0204] 本发明还涉及分离的多肽在动物饲料或洗涤剂中的用途, 这些分离的多肽具有

蛋白酶活性,由与 SEQ ID NO:1 的成熟多肽编码序列具有至少 80%,例如至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%或 100%序列一致性的多核苷酸编码。

[0205] 在具体实施例中,本发明和根据本发明使用的亲本蛋白酶和 / 或蛋白酶变体选自下组,该组由以下各项组成:

[0206] (a) 属于 EC 3.4.21 酶组的蛋白酶;以及

[0207] (b) S1 肽酶家族的丝氨酸蛋白酶;如在生物化学杂志 (Biochem. J.) 290:205-218(1993) 和在 MEROPS 蛋白酶数据库,发行 9.5(www.merops.ac.uk) 中所述的。该数据库描述于罗林斯 (Rawlings), N. D., 巴雷特 (Barrett), A. J. 和贝特曼 (Bateman), A. (2010) MEROPS: 肽酶数据库 (MEROPS: the peptidase database), 核酸研究 (Nucleic Acids Res) 38, D227-D233 中。

[0208] 为了确定给定蛋白酶是否为丝氨酸蛋白酶和 S1 家族的蛋白酶,可参考上述手册和其中述及的原理。可对所有蛋白酶类型进行这样的确定,而不论其是天然或野生型蛋白酶,还是经基因工程改造或合成的蛋白酶。

[0209] 在一个具体实施例中,本发明还涉及一种用于制备动物饲料或饲料添加剂的方法,该方法包括制备一种动物饲料或饲料添加剂组合物,该组合物包含一种动物饲料和一种选自下组的蛋白酶,该组由以下各项组成:

[0210] (i) SEQ ID NO:3 的多肽;

[0211] (ii) 一种多肽,该多肽与 SEQ ID NO:3 的多肽具有至少 80%,例如至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%或 100%序列一致性,并且该多肽具有蛋白酶活性。

[0212] 本发明还涉及一种动物饲料或饲料添加剂组合物,该组合物包含一种动物饲料和一种选自下组的蛋白酶,该组由以下各项组成:

[0213] (i) SEQ ID NO:3 的多肽;

[0214] (ii) 一种多肽,该多肽与 SEQ ID NO:3 的多肽具有至少 80%,例如至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%或 100%序列一致性,并且该多肽具有蛋白酶活性。

[0215] 在一个方面,这些多肽与 SEQ ID NO:3 的多肽相差不多于三十二个氨基酸,例如相差三十个氨基酸、相差二十五个氨基酸、相差二十个氨基酸、相差十五个氨基酸、相差十个氨基酸、相差八个氨基酸、相差七个氨基酸、相差六个氨基酸、相差五个氨基酸、相差四个氨基酸、相差三个氨基酸、相差两个氨基酸以及相差一个氨基酸。

[0216] 在具体实施例中,这些动物饲料组合物可以处于丸状、糊状 (mash) 或液体组合物的形式,如在此进一步描述的。

[0217] 本发明还涉及具有蛋白酶活性并且与 SEQ ID NO:3 具有至少 85%,例如至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%序列一致性、包含 SEQ ID NO:3

或其同源序列的至少一个或多个（若干个）氨基酸的至少一个取代、缺失和 / 或插入的变体多肽。

[0218] 在一个实施例中,本发明的变体多肽可以与 SEQ ID NO:3 具有至少 86% 序列一致性。

[0219] 在一个实施例中,本发明的变体多肽可以与 SEQ ID NO:3 具有至少 87% 序列一致性。

[0220] 在一个实施例中,本发明的变体多肽可以与 SEQ ID NO:3 具有至少 88% 序列一致性。

[0221] 在一个实施例中,本发明的变体多肽可以与 SEQ ID NO:3 具有至少 89% 序列一致性。

[0222] 在一个实施例中,本发明的变体多肽可以与 SEQ ID NO:3 具有至少 90% 序列一致性。

[0223] 在一个实施例中,本发明的变体多肽可以与 SEQ ID NO:3 具有至少 91% 序列一致性。

[0224] 在一个实施例中,本发明的变体多肽可以与 SEQ ID NO:3 具有至少 92% 序列一致性。

[0225] 在一个实施例中,本发明的变体多肽可以与 SEQ ID NO:3 具有至少 93% 序列一致性。

[0226] 在一个实施例中,本发明的变体多肽可以与 SEQ ID NO:3 具有至少 94% 序列一致性。

[0227] 在一个实施例中,本发明的变体多肽可以与 SEQ ID NO:3 具有至少 95% 序列一致性。

[0228] 在一个实施例中,本发明的变体多肽可以与 SEQ ID NO:3 具有至少 96% 序列一致性。

[0229] 在一个实施例中,本发明的变体多肽可以与 SEQ ID NO:3 具有至少 97% 序列一致性。

[0230] 在一个实施例中,本发明的变体多肽可以与 SEQ ID NO:3 具有至少 98% 序列一致性。

[0231] 在一个实施例中,本发明的变体多肽可以与 SEQ ID NO:3 具有至少 99% 序列一致性。

[0232] 在另一个实施例中,具有氨基酸取代、缺失和 / 或插入的本发明的变体多肽 (SEQ ID NO:3) 的位置总数不多于 24, 例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 或 24。氨基酸变化可以是一种次要性质的变化, 即并不显著影响蛋白质的折叠和 / 或活性的保守氨基酸取代或插入 ; 典型地具有一个到约 30 个氨基酸的小缺失 ; 小氨基或羧基 - 末端延伸, 如一种氨基 - 末端蛋氨酸残基 ; 具有多达约 20-25 个残基的一种小连接肽 ; 或通过改变净电荷促进纯化或另一种功能的一种小延伸, 如一种聚组氨酸段 (poly-histidine tract)、一种抗原表位或一种结合域。

[0233] 本发明还涉及用于在动物饲料或洗涤剂中使用的变体, 这些变体包括 SEQ ID NO:2 的成熟多肽或其同源序列的一个或多个 (或若干个) 氨基酸的取代、缺失和 / 或插入。

在 SEQ ID NO:2 的成熟多肽中具有氨基酸取代、缺失和 / 或插入的位置总数不多于 32, 例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31 或 32。优选地, 氨基酸变化是一种次要性质的变化, 即并不显著影响蛋白质的折叠和 / 或活性的保守氨基酸取代、插入或缺失; 典型地具有一个到约 30 个氨基酸的小缺失; 小氨基 - 或羧基 - 末端延伸, 如一种氨基 - 末端甲硫氨酸残基; 具有多达约 20-25 个残基的一种小连接肽; 或通过改变净电荷促进纯化或另一种功能的一种小延伸, 如一种聚组氨酸段、一种抗原表位或一种结合域。

[0234] 本发明还涉及用于在动物饲料或洗涤剂中使用的变体, 这些变体包括 SEQ ID NO:3 或其同源序列的一个或多个 (或若干个) 氨基酸的取代、缺失和 / 或插入。在 SEQ ID NO:3 中具有氨基酸取代、缺失和 / 或插入的位置总数不多于 32, 例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31 或 32。优选地, 氨基酸变化是一种次要性质的变化, 即并不显著影响蛋白质的折叠和 / 或活性的保守氨基酸取代、插入或缺失; 典型地具有一个到约 30 个氨基酸的小缺失; 小氨基 - 或羧基 - 末端延伸, 如一种氨基 - 末端甲硫氨酸残基; 具有多达约 20-25 个残基的一种小连接肽; 或通过改变净电荷促进纯化或另一种功能的一种小延伸, 如一种聚组氨酸段、一种抗原表位或一种结合域。

[0235] 保守取代的实例是在下组的范围内: 碱性氨基酸 (精氨酸、赖氨酸及组氨酸)、酸性氨基酸 (谷氨酸和天冬氨酸)、极性氨基酸 (谷氨酰胺和天冬酰胺)、疏水性氨基酸 (亮氨酸、异亮氨酸及缬氨酸)、芳香族氨基酸 (苯丙氨酸、色氨酸及酪氨酸) 及小氨基酸 (甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸及甲硫氨酸)。一般不会改变特异性活性的氨基酸取代是本领域已知的并且例如由 H. 诺伊拉特 (Neurath) 和 R. L. 希尔 (Hill), 1979 在蛋白质 (The Proteins), 学术出版社 (Academic Press), 纽约中描述。预期不会实质上改变特异性活性的最常发生的交换是 Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Tyr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu、以及 Asp/Gly。

[0236] 可替代地, 氨基酸改变具有这样一种性质: 改变多肽的物理化学特性。例如, 氨基酸改变可以提高多肽的热稳定性、改变底物特异性、改变最适 pH, 等等。一种母体多肽中的必需氨基酸可以根据本领域中已知的程序来识别, 如定点诱变或丙氨酸扫描诱变 (坎宁安 (Cunningham) 和韦尔斯 (Wells), 1989, 科学 (Science) 244:1081-1085)。在后一项技术中, 在该分子中的每个残基处引入单个丙氨酸突变, 并且对所得突变体分子的蛋白酶活性进行测试以鉴别对于该分子的活性至关重要的氨基酸残基。还参见, 希尔顿 (Hilton) 等人, 1996, 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.) 271:4699-4708。也可结合假定接触位点氨基酸的突变, 如通过以下技术例如核磁共振、结晶学、电子衍射、或光亲和标记进行确定的对结构进行物理学分析, 从而确定酶的活性位点或其他生物学相互作用。参见例如德沃斯 (de Vos) 等人, 1992, 科学 (Science) 255:306-312; 史密斯等人, 1992, 分子生物学杂志 (J. Mol. Biol.) 224:899-904; 沃德弗 (Wlodaver) 等人, 1992, 欧洲生物化学学会联盟简讯 (FEBS Lett.) 309:59-64。还可以从与亲本多肽相关的多肽的一致性分析推断必需氨基酸的一致性。

[0237] 使用已知的诱变、重组和 / 或改组方法、随后进行一个相关的筛选程序可以做出

单一或多种氨基酸取代、缺失和 / 或插入并对其进行测试, 该相关的筛选程序例如由瑞德哈尔-奥尔森 (Reidhaar-Olson) 和萨奥尔 (Sauer), 1988, 科学 (Science) 241:53-57; 鲍依 (Bowie) 和萨奥尔, 1989, 美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci.) 86:2152-2156; WO 95/17413; 或者 WO 95/22625 所描述的那些。可以使用的其他方法包括易错 PCR、噬菌体展示 (例如洛曼 (Lowman) 等人, 1991, 生物化学 (Biochemistry) 30:10832-10837; 美国专利号 5, 223, 409; WO92/06204) 以及区域定向突变诱发 (德贝夏 (Derbyshire) 等人, 1986, 基因 (Gene) 46:145; 内尔 (Ner) 等人, 1988, DNA 7:127)。

[0238] 可以结合诱变 / 改组方法与高通量自动化筛选方法来检测由宿主细胞表达的克隆的、诱变的多肽的活性 (内斯 (Ness) 等人, 1999, 自然生物技术 (Nature Biotechnology) 17:893-896)。编码活性多肽的诱变的 DNA 分子可以回收自宿主细胞, 并且使用本领域的标准方法对其进行迅速测序。这些方法允许迅速确定多肽中单个氨基酸残基的重要性。

[0239] SEQ ID NO:2 的成熟多肽的氨基酸取代、缺失和 / 或插入的总数不超过 10 个, 例如 1、2、3、4、5、6、7、8 或 9。SEQ ID NO:3 中的氨基酸取代、缺失和 / 或插入的总数不超过 10 个, 例如 1、2、3、4、5、6、7、8 或 9。该多肽可以是杂合多肽, 其中一种多肽的一部分在另一种多肽的一部分的 N 末端或 C 末端处融合。

[0240] 该多肽可以是一种融合的多肽或可裂解的融合多肽, 其中另一个多肽是在本发明多肽的 N 末端或 C 末端处融合。通过将编码另一种多肽的多核苷酸与本发明多核苷酸融合而产生融合多肽。用于产生融合多肽的技术在本领域是已知的, 并包括连接编码多肽的编码序列, 这样使得它们在框内并且使得融合多肽的表达处于相同的一个或多个启动子和终止子的控制下。融合蛋白还可以使用内含肽技术构建, 其中融合在翻译后产生 (库珀 (Cooper) 等人, 1993, 欧洲分子生物学学会杂志 (EMBO J.) 12:2575-2583; 道森 (Dawson) 等人, 1994, 科学 (Science) 266:776-779)。

[0241] 融合多肽可以在两个多肽之间进一步包括一个切割位点。在融合蛋白分泌之时, 该位点被切割, 从而释放出这两个多肽。切割位点的实例包括但不限于以下各项中披露的位点: 马丁 (Martin) 等人, 2003, 工业微生物学与生物技术杂志 (J. Ind. Microbiol. Biotechnol.) 3:568-576; 斯韦蒂纳 (Svetina) 等人, 2000, 生物技术杂志 (J. Biotechnol.) 76:245-251; 拉斯马森 (Rasmussen)-威尔逊 (Wilson) 等人, 1997, 应用环境微生物学 (Appl. Environ. Microbiol.) 63:3488-3493; 华德 (Ward) 等人, 1995, 生物技术 (Biotechnology) 13:498-503; 以及孔特拉斯 (Contreras) 等人, 1991, 生物技术 9:378-381; 伊顿 (Eaton) 等人, 1986, 生物化学 (Biochemistry) 25:505-512; 柯林斯 (Collins)-莱斯 (Racie) 等人, 1995, 生物技术 13:982-987; 卡特 (Carter) 等人, 1989, 蛋白质:结构、功能和遗传学 (Proteins:Structure, Function, and Genetics) 6:240-248; 以及史蒂文斯 (Stevens), 2003, 世界药物发现 (Drug Discovery World) 4:35-48。

[0242] 实施方式

[0243] 在本发明的某些实施例中, 本发明的蛋白酶展现了有益的热特性如热稳定性、蒸汽稳定性等, 和 / 或 pH 特性如酸稳定性、pH 最佳值等。

[0244] 本发明的一个实施例是与 10R 蛋白酶相比, 在 25°C 在 pH 7 与 9 之间, 例如在 pH 7.0、pH 8.0 或 pH 9.0 下具有改进的蛋白酶活性的分离的多肽。

[0245] 本发明的一个另外的实施例是与 pH 6.5 下的 10R 蛋白酶相比,在 pH 7.0,例如 60°C 或以下,如 50°C 或以下、37°C 或以下、或 25°C 与 60°C 之间、或 37°C 与 60°C 之间或在 37°C 下、或在 50°C 下或在 60°C 下具有改进的蛋白酶活性的分离的多肽。

[0246] 酸度 / 碱度特性

[0247] 在本发明的某些实施例中,就 pH 而言,本发明的蛋白酶展现了有益的特性,例如酸稳定性、pH 最佳值等。蛋白酶在一个低的 pH 下的稳定性是有益的,这是因为该蛋白酶可以在穿越胃之后在肠中具有活性。在本发明的一个实施例中,该蛋白酶在 pH 3 下 2 小时之后保留 >95% 的活性,如使用实例 3 中所述的方法确定的。

[0248] 温度 - 活性

[0249] 可如在实例 3 中所述的确定该蛋白酶的温度 - 活性曲线。高温 (例如 60°C) 下的活性对于例如洗涤衣物来说可以是有益的,而低温 (20°C -40°C) 下的活性对于低温洗涤或对于动物消化蛋白来说可以是有利的。

[0250] 在一个实施例中,本发明包含一种蛋白酶,当与在 70°C 下的蛋白酶的活性 (比较实例 3) 相比时,该蛋白酶具有在 37°C 下 0.15 或更高的相对活性、在 50°C 下 0.50 或更高的相对活性、或在 60°C 下 0.80 或更高的相对活性的 pH 7.0 下的温度活性曲线。

[0251] 热稳定性

[0252] 可如在实例 10 中所述的确定热稳定性,即使用 DSC 测量来确定经纯化的蛋白酶蛋白的变性温度 (T_d)。Td 指示了该蛋白的热稳定性: T_d 越高,热稳定性越高。因此,在一个优选的实施例中,本发明的蛋白酶具有一个 T_d ,该 T_d 高于参照蛋白酶的 T_d ,其中 T_d 是对经纯化的蛋白酶样品 (优选地具有至少 90% 或 95% 的纯度,如通过 SDS-PAGE 确定的) 确定的。

[0253] 在优选实施例中,如通过残余活性,变性温度 T_d 所提供的这些热特性 (例如加热稳定性、温度稳定性、热稳定性、蒸汽稳定性和 / 或造丸稳定性),或本发明的蛋白酶的其他参数高于 SEQ ID NO:3 的蛋白酶的相应的值 (如残余活性或 T_d),更优选地是其至少 101%,或者是其至少 102%、103%、104%、105%、106%、107%、108%、109%、或至少 110%。甚至更优选地,本发明的蛋白酶的参数 (如残余活性或 T_d) 的值是 SEQ ID NO:3 的蛋白酶的值的至少 120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、或至少 190%。

[0254] 在仍另外的具体实施例中,本发明的热稳定蛋白酶具有至少 50°C 的熔解温度 T_m (或变性温度 T_d),如使用实例 10 (即在 20mM 乙酸钠中,pH 值 4.0) 中所述的差示扫描量热法 (DSC) 所确定的。在仍另外的具体实施例中,该 T_m 是至少 51°C、52°C、53°C、54°C、55°C、56°C、57°C、58°C、59°C、60°C、61°C、62°C、63°C、64°C、65°C、66°C、67°C、68°C、69°C、70°C、71°C、72°C、73°C、74°C、75°C、76°C、77°C、78°C、79°C、80°C、81°C、82°C、83°C、84°C、85°C、86°C、87°C、88°C、89°C、90°C、91°C、92°C、93°C、94°C、95°C、96°C、97°C、98°C、99°C 或至少 100°C。

[0255] 蒸汽稳定性

[0256] 蒸汽稳定性可以如在实例 11 中所述的,通过确定在 85°C 或 90°C 下蒸汽处理一个短的时间之后蛋白酶分子的残余活性来确定。

[0257] 造丸稳定性

[0258] 造丸稳定性可如在实例 12 中所述的,通过使用与饲料预混合的酶颗粒来确定。由该混合器用蒸汽将该饲料调节至 95°C。在调节之后,将该饲料加压成丸并确定残余活性。

[0259] 具有蛋白酶活性的多肽的来源

[0260] 可以从任何属的微生物获得具有蛋白酶活性且有待根据本发明而使用的多肽。出于本发明的目的,如在此结合一种给定的来源使用的术语“从...中获得”应意指由多核苷酸编码的多肽是由该来源或者由其中已经插入来自该来源的多核苷酸的一种菌株产生的。在一个方面,获得自给定来源的多肽被分泌到细胞外。

[0261] 该多肽可以是细菌多肽。例如,该多肽可以是具有蛋白酶活性的、来自如放线菌门内的一种革兰氏阳性细菌或来自如变形菌门内的一种革兰氏阴性细菌的多肽。

[0262] 在一个方面,该多肽是来自放线菌纲的细菌的蛋白酶,例如来自放线菌目,或来自丙酸杆菌亚目,或来自类诺卡氏菌科,或来自韩国生工菌属。在另一个方面,该多肽是来自假诺卡氏菌亚目,或来自假诺卡氏菌科,或来自糖单孢菌属、糖多孢菌属;或拟无枝酸菌的蛋白酶。

[0263] 这些分类单位的菌株在许多培养物保藏中心对于公众来说是容易获得的,这些保藏中心如美国典型培养物保藏中心(ATCC)、德意志微生物和细胞培养物保藏中心(DSM)、真菌菌种保藏中心(CBS)、以及农业研究机构专利培养物保藏中心北区研究中心(NRRL)。

[0264] 可以使用上述探针,从其他来源,包括从自然界(例如,土壤、堆肥、水,等等)分离的微生物鉴定并获得该多肽。用于从自然生境分离微生物的技术是本领域熟知的。随后可以通过类似地筛选另一种微生物的基因组或cDNA文库或混合DNA样品获得编码该多肽的多核苷酸。一旦用这种或这些探针检测到编码一种多肽的多核苷酸,就可以通过使用本领域普通技术人员众所周知的的技术分离或克隆该多核苷酸(参见,例如,萨姆布鲁克(Sambrook)等人,1989,见上文)。

[0265] 多核苷酸

[0266] 本发明还涉及编码本发明的多肽且用于重组产生该多肽的分离的多核苷酸。

[0267] 用来分离或克隆编码多肽的多核苷酸的技术是本领域已知的,并且包含从基因组DNA分离、从cDNA制备或其组合。可以例如通过使用熟知的聚合酶链反应(PCR)或表达文库的抗体筛选来检测具有共有结构特征的克隆DNA片段,实现从这样的基因组DNA克隆多核苷酸。参见例如,伊尼斯(Innis)等人,1990,PCR:方法和应用指南(PCR:A Guide to Methods and Application),学术出版社(Academic Press),纽约。可以使用其他核酸扩增程序例如连接酶链式反应(LCR)、连接激活转录(LAT)和基于多核苷酸的扩增(NASBA)。多核苷酸可以从糖多孢菌属菌株或来自放线菌目的另一种相关生物中克隆,并且因此,例如可以是多核苷酸的多肽编码区的等位基因变体或物种变体。

[0268] 本发明还涉及包含与SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列具有至少80%,例如至少85%,例如至少87%、至少89%、至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列一致性程度(其条件是它与SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列不100%相同)并且编码具有蛋白酶活性的多肽的多核苷酸或由其组成的分离的多核苷酸。

[0269] 修饰编码本发明多肽的多核苷酸对于合成与该多肽基本上相似的多肽可能是必需的。术语“基本上类似于”该多肽是指该多肽的非天然存在的形式。这些多肽可能以某种工程化方式而不同于从其天然来源分离的多肽,例如在比活性、热稳定性、pH最佳值等方面不同的变体。该变体可以基于以SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列(例如其子序列)形

式呈现的多核苷酸,和/或通过引入不会改变该多肽的氨基酸序列,但对应于预定用于产生该酶的宿主有机体的密码子使用的核苷酸取代,或通过引入可能产生不同氨基酸序列的核苷酸取代来构建。对于核苷酸取代的一般描述,参见例如福德(Ford)等人,1991,蛋白表达与纯化(Protein Expression and Purification)2:95-107。

[0270] 本发明还涉及编码本发明的多肽的分离的多核苷酸,这些多核苷酸在非常低严谨度条件、低严谨度条件、中严谨度条件、中-高严谨度条件、高严谨度条件、或非常高严谨度条件下与(i)SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列、(ii)包含SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列的基因组DNA序列或(iii)(i)或(ii)的全长互补链;或其等位基因变体及子序列杂交(萨姆布鲁克(Sambrook)等人,1989,同上),如在此所定义。

[0271] 在一个方面,该多核苷酸包括SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列或SEQ ID NO:1的子序列或由其组成,该子序列编码具有蛋白酶活性的SEQ ID NO:2的一个片段,例如SEQ ID NO:1的核苷酸595-1074的多核苷酸。

[0272] 核酸构建体

[0273] 本发明还涉及包括与一个或多个(若干个)控制序列可操作地连接的本发明多核苷酸的核酸构建体,其中该控制序列指导编码序列在适合的宿主细胞中在与该控制序列相容的条件下的表达。

[0274] 可以按多种方式操纵多核苷酸,以提供多肽的表达。取决于表达载体,在其插入载体以前操纵多核苷酸可以是希望的或必需的。用于利用重组DNA方法修饰多核苷酸的技术是本领域熟知的。

[0275] 控制序列可以是启动子序列,即,被宿主细胞识别以对编码本发明的多肽的多核苷酸进行表达的一种多核苷酸。启动子序列包括介导多肽表达的转录控制序列。该启动子可以是在选择的宿主细胞中显示出转录活性的任何多核苷酸,包括突变型、截短型及杂合型启动子,并且可以由编码与该宿主细胞同源或异源的细胞外或细胞内多肽的基因获得。

[0276] 用于在细菌宿主细胞中指导本发明的核酸构建体转录的适合启动子的实例是从以下获得的启动子:解淀粉芽孢杆菌 α -淀粉酶基因(amyQ)、地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶基因(amyL)、地衣芽孢杆菌青霉素酶基因(penP)、嗜热脂肪芽孢杆菌产麦芽淀粉酶基因(amyM)、枯草芽孢杆菌果聚糖蔗糖酶基因(sacB)、枯草芽孢杆菌xy1A和xy1B基因、大肠杆菌lac操纵子、天蓝链霉菌琼脂糖酶基因(dagA)、以及原核 β -内酰胺酶基因(维拉-科马罗夫(Villa-Kamaroff)等人,1978,美国国家科学院院刊(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)75:3727-3731),以及tac启动子(德波尔(DeBoer)等人,1983,美国国家科学院院刊(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)80:21-25)。另外的启动子描述于吉尔伯特(Gilbert)等人,1980,科学美国人(Scientific American)242:74-94中的“来自重组细菌的有用蛋白”(“Useful proteins from recombinant bacteria”)、以及萨姆布鲁克(Sambrook)等人,1989,见上文。

[0277] 用于在丝状真菌宿主细胞中指导本发明的核酸构建体转录的适合启动子的实例是从以下基因获得的启动子:构巢曲霉乙酰胺酶、黑曲霉中性 α -淀粉酶、黑曲霉酸性稳定性 α -淀粉酶、黑曲霉或泡盛曲霉葡糖淀粉酶(g1aA)、米曲霉TAKA淀粉酶、米曲霉碱性蛋白酶、米曲霉丙糖磷酸异构酶、尖镰孢胰蛋白酶样蛋白酶(WO 96/00787)、镶片镰孢淀粉葡糖

苷酶 (WO 00/56900)、镶片镰孢达莉亚 (*Daria*) (WO 00/56900)、镶片镰孢奎恩 (*Quinn*) (WO 00/56900)、米黑根毛霉 (*Rhizomucor miehei*) 脂肪酶、米黑根毛霉天冬氨酸蛋白酶、里氏木霉 β -葡糖苷酶、里氏木霉纤维二糖水解脱酶 I、里氏木霉纤维二糖水解脱酶 II、里氏木霉内切葡聚糖酶 I、里氏木霉内切葡聚糖酶 II、里氏木霉内切葡聚糖酶 III、里氏木霉内切葡聚糖酶 IV、里氏木霉内切葡聚糖酶 V、里氏木霉木聚糖酶 I、里氏木霉木聚糖酶 II、里氏木霉 β -木糖苷酶、以及 NA2tpi 启动子 (一种修饰的启动子, 包含曲霉中一种编码中性 α -淀粉酶的基因, 其中未翻译的前导子由曲霉中一种编码丙糖磷酸异构酶的基因的未翻译的前导子替代; 非限制性实例包含修饰的启动子, 包含黑曲霉中编码中性 α -淀粉酶的基因, 其中未翻译的前导子由构巢曲霉或米曲霉中编码丙糖磷酸异构酶的基因的未翻译的前导子替代); 及其突变的、截短的、以及杂合的启动子。

[0278] 在酵母宿主中, 有用的启动子获得自以下各项的基因: 酿酒酵母烯醇酶 (ENO-1)、酿酒酵母半乳糖激酶 (GAL1)、酿酒酵母醇去氢酶 / 甘油醛 -3- 磷酸去氢酶 (ADH1、ADH2/GAP)、酿酒酵母丙糖磷酸异构酶 (TPI1)、酿酒酵母金属硫蛋白 (CUP1)、以及酿酒酵母 3- 磷酸甘油酸激酶。罗马诺斯 (Romanos) 等人, 1992, 酵母 (*Yeast*) 8:423-488 描述了酵母宿主细胞的其他有用的启动子。

[0279] 控制序列也可以是被宿主细胞识别以终止转录的合适转录终止子序列。该终止子序列可操作地连接至编码该多肽的多核苷酸的 3' 末端。在选择的宿主细胞中有功能的任何终止子可以用于本发明中。

[0280] 丝状真菌宿主细胞的优选终止子是从以下各项的基因中获得的: 构巢曲霉邻氨基苯甲酸合酶、黑曲霉葡糖淀粉酶、黑曲霉 α -葡萄糖苷酶、米曲霉 TAKA 淀粉酶以及尖孢镰刀菌胰蛋白酶样蛋白酶。

[0281] 酵母宿主细胞的优选终止子是从以下各项的基因中获得的: 酿酒酵母烯醇酶、酿酒酵母细胞色素 C (CYC1)、以及酿酒酵母甘油醛 -3- 磷酸去氢酶。。用于酵母宿主细胞的其他有用的终止子由罗马努斯等人, 1992, 见上文描述。

[0282] 控制序列还可以是一个适合的前导子序列, 当被转录时是对于通过宿主细胞来翻译而言重要的 mRNA 的一个非翻译区。该前导序列可操作地连接至编码该多肽的多核苷酸的 5' 末端。可以使用在选择的宿主细胞中具有功能的任何前导子序列。

[0283] 用于丝状真菌宿主细胞的优选前导子从以下基因获得: 米曲霉 TAKA 淀粉酶和构巢曲霉丙糖磷酸异构酶。

[0284] 酵母宿主细胞的适合的前导子是从以下各项的基因中获得的: 酿酒酵母烯醇酶 (ENO-1)、酿酒酵母 3- 磷酸甘油酸激酶、酿酒酵母 α -因子、和酿酒酵母醇去氢酶 / 甘油醛 -3- 磷酸去氢酶 (ADH2/GAP)。

[0285] 控制序列还可以是一种多腺苷酸化序列, 可操作地连接至该多核苷酸的 3' - 末端并且当转录时由宿主细胞识别为将多腺苷酸残基添加至所转录的 mRNA 的信号的序列。可以使用在选择的宿主细胞中具有功能的任何聚腺苷酸化序列。

[0286] 丝状真菌宿主细胞的优选的聚腺苷酸化序列是从以下各项的基因中获得的: 米曲霉 TAKA 淀粉酶、黑曲霉葡糖淀粉酶、构巢曲霉邻氨基苯甲酸合酶、尖孢镰刀菌胰蛋白酶样蛋白酶、和黑曲霉 α -葡萄糖苷酶。

[0287] 有用于酵母宿主细胞的多腺苷酸化序列在郭 (Guo) 和谢尔曼 (Sherman), 1995, 分

子细胞生物学 (Mol. Cellular Biol.) 15:5983-5990 中描述。

[0288] 控制序列还可以是编码连接至多肽的 N 末端的信号肽并指导该多肽进入细胞的分泌途径的信号肽编码区域。该多核苷酸的编码序列的 5'-端可以固有地包含在翻译读码框内与编码该多肽的编码序列的区段天然地连接的信号肽编码序列。可替代地, 编码序列的 5'-端可以包含对编码序列是外源的信号肽编码序列。在编码序列不天然地包含信号肽编码序列的情况下, 可能需要外来信号肽编码序列。可替代地, 外来信号肽编码序列可以单纯地替代天然信号肽编码序列以便增强多肽的分泌。然而, 可以使用指导表达的多肽进入选择的宿主细胞的分泌途径中的任何信号肽编码序列。

[0289] 用于细菌宿主细胞的有效信号肽编码序列是从以下各项的基因获得的信号肽编码序列: 芽孢杆菌属 NCIB 11837 产麦芽糖淀粉酶、地衣芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶、地衣芽孢杆菌 β -内酰胺酶、嗜热脂肪芽孢杆菌 α -淀粉酶、嗜热脂肪芽孢杆菌中性蛋白酶 (nprT、nprS、nprM)、克劳氏芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶以及枯草芽孢杆菌 prsA。西蒙纳 (Simonen) 和帕尔瓦 (Palva), 1993, 微生物学评论 (Microbiological Reviews) 57:109-137 描述了另外的信号肽。

[0290] 用于丝状真菌宿主细胞的有效信号肽编码序列是获得自以下项的基因的信号肽编码序列: 黑曲霉中性淀粉酶、黑曲霉葡糖淀粉酶、米曲霉 TAKA 淀粉酶、特异腐质霉 (*Humicola insolens*) 纤维素酶、特异腐质霉内切葡聚糖酶 V、柔毛腐质霉 (*Humicola lanuginosa*) 脂肪酶以及米黑根毛霉天冬氨酸蛋白酶。

[0291] 对于酵母宿主细胞有用的信号肽获得自以下项的基因: 酿酒酵母 α -因子和酿酒酵母转化酶。见上文, 罗马诺斯等人 (1992) 描述了其他有用的信号肽编码序列。

[0292] 控制序列还可以是编码位于多肽的 N 末端的前肽的前肽编码序列。生成的多肽被称为前体酶 (proenzyme) 或多肽原 (或者在一些情况下被称为酶原 (zymogen))。多肽原通常是无活性的并且可以通过从该多肽原上催化切割或自动催化切割前肽而被转化成一种活性多肽。前肽编码序列可以从以下各项的基因获得: 枯草芽孢杆菌碱性蛋白酶 (aprE)、枯草芽孢杆菌中性蛋白酶 (nprT)、嗜热毁丝霉漆酶 (WO 95/33836)、米黑根毛霉天冬氨酸蛋白酶、以及酿酒酵母 α 因子。

[0293] 在多肽的 N 末端处信号肽序列和前肽序列都存在的情况下, 前肽序列定位成紧邻多肽的 N 末端并且信号肽序列定位成紧邻前肽序列的 N 末端。

[0294] 也可能令人希望的是添加调节序列, 该调节序列允许相对于宿主细胞的生长而调节多肽的表达。调节系统的实例是引起将响应于化学或物理刺激 (包含调节性化合物的存在) 而开启或关闭的基因表达的那些系统。原核系统中的调节系统包括 lac、tac、以及 trp 操纵子系统。在酵母中, 可以使用 ADH2 系统或 GAL1 系统。在丝状真菌中, 可以使用黑曲霉葡糖淀粉酶启动子、米曲霉 TAKA α -淀粉酶启动子、以及米曲霉葡糖淀粉酶启动子。调节序列的其他实例是允许基因扩增的那些。在真核系统中, 这些调节序列包括在氨甲蝶呤存在下被扩增的二氢叶酸还原酶基因以及用重金属扩增的金属硫蛋白基因。在这些情况下, 编码该多肽的多核苷酸将与调节序列可操作地连接。

[0295] 表达载体

[0296] 本发明还涉及包括本发明的多核苷酸、启动子、以及转录和翻译终止信号的重组表达载体。各种核苷酸和控制序列可以连接在一起以产生重组表达载体, 该重组表达载体

可以包含一个或多个（若干个）合宜的限制性位点以允许在这样的位点插入或取代编码多肽的多核苷酸。可替代地，通过将该多核苷酸或者包括该序列的核酸构建体插入到用于表达的适当载体中可以表达该多核苷酸。在产生表达载体时，编码序列是位于该载体中，以使得该编码序列与用于表达的适当控制序列可操作地连接。

[0297] 重组表达载体可以是任何载体（例如，质粒或病毒），其能够方便地进行重组 DNA 程序，并且能够引起多核苷酸的表达。载体的选择将典型地取决于该载体与有待引入该载体的宿主细胞的相容性。该载体可以是一种线性的或闭合的环状质粒。

[0298] 载体可以是自主复制载体，即，作为染色体外实体存在的载体，其复制独立于染色体复制，例如，质粒、染色体外元件、微染色体、或人工染色体。该载体可以包含用于确保自我复制的任何装置。可替代地，该载体可以是这样一种载体，当它被引入该宿主细胞中时，被整合到基因组中并且与其中已整合了它的一个或多个染色体一起复制。此外，可以使用单一载体或质粒或两个或更多个载体或质粒（这些载体或质粒共同包含有待引入到宿主细胞的基因组中的总 DNA）或转座子。

[0299] 载体优选地包含允许便于选择转化细胞、转染细胞、转导细胞等的一个或多个（若干个）选择性标记。选择性标记是一种基因，该基因的产物提供了杀生物剂抗性、病毒抗性、重金属抗性、营养缺陷型的原养型、等。

[0300] 细菌选择性标记的实例是来自枯草芽孢杆菌或地衣芽孢杆菌的 *da1* 基因，或赋予抗生素抗性（例如氨基青霉素、氯霉素、卡那霉素、或四环素抗性）的标记。酵母宿主细胞的适合的标记是 *ADE2*、*HIS3*、*LEU2*、*LYS2*、*MET3*、*TRP1*、以及 *URA3*。用于在一个丝状真菌宿主细胞中使用的选择性标记包括但不限于 *amdS*（乙酰胺酶）、*argB*（鸟氨酸氨甲酰基转移酶）、*bar*（草胺膦乙酰转移酶）、*hph*（潮霉素磷酸转移酶）、*niaD*（硝酸还原酶）、*pyrG*（乳清苷 -5' - 磷酸脱羧酶）、*sC*（硫酸腺苷基转移酶）和 *trpC*（邻氨基苯甲酸合酶）及其等效物。优选用于曲霉细胞中的是构巢曲霉或米曲霉的 *amdS* 和 *pyrG* 基因以及吸水链霉菌的 *bar* 基因。

[0301] 载体优选含有允许载体整合到宿主细胞的基因组中或载体在细胞中独立于基因组自主复制的一个或多个元件。

[0302] 对于整合到该宿主细胞基因组中，该载体可以依靠编码该多肽的多核苷酸序列或者通过同源或非同源重组整合到该基因组中的该载体的任何其他元件。可替代地，该载体可以包含用于指导通过同源重组而整合到宿主细胞基因组中的一个或多个染色体中的一个或多个精确位置处的另外的多核苷酸。为了增加在精确位置处整合的可能性，这些整合的元件应包含足够数量的核酸，例如 100 至 10,000 个碱基对、400 至 10,000 个碱基对、以及 800 至 10,000 个碱基对，这些碱基对与对应的靶序列具有高度的序列一致性以提高同源重组的可能性。这些整合元件可以是与宿主细胞的基因组内的靶序列同源的任何序列。此外，这些整合元件可以是非编码多核苷酸或编码多核苷酸。另一方面，该载体可以通过非同源重组整合到宿主细胞的基因组中。

[0303] 对于自主复制，载体可以进一步包含使该载体能够在所讨论的宿主细胞中自主复制的复制起点。复制起点可以是在细胞中起作用的、介导自主复制的任何质粒复制子。术语“复制起点”或“质粒复制子”意指使质粒或载体能够在体内复制的多核苷酸。

[0304] 细菌复制起点的实例是允许在大肠杆菌中复制的质粒 *pBR322*、*pUC19*、*pACYC177*、

以及 pACYC184 的复制起点,以及允许在芽孢杆菌中复制的质粒 pUB110、pE194、pTA1060、以及 pAM β 1 的复制起点。

[0305] 用于在酵母宿主细胞中使用的复制起点的实例是 2 微米复制起点 ARS1、ARS4、ARS1 与 CEN3 的组合、以及 ARS4 与 CEN6 的组合。

[0306] 在丝状真菌细胞内有用的复制起点的实例是 AMA1 和 ANS1 (格姆斯 (Gems) 等人,1991, 基因 (Gene)98:61-67; 卡伦 (Cullen) 等人,1987, 核酸研究 (Nucleic Acids Res.)15:9163-9175; WO 00/24883)。AMA1 基因的分离和包括该基因的质粒或载体的构建可根据 WO 00/24883 披露的方法完成。

[0307] 可以将本发明的多核苷酸的多于一个的拷贝插入到宿主细胞中以增加多肽的产生。通过将序列的至少一个另外的拷贝整合到宿主细胞基因组中或者通过包含一个与该多核苷酸一起的可扩增的选择性标记基因可以获得多核苷酸的增加的拷贝数目,其中通过在适当的选择性试剂的存在下培养细胞可以选择包含选择性标记基因的经扩增的拷贝的细胞、以及由此该多核苷酸的另外的拷贝。

[0308] 用于连接以上所描述的元件以构建本发明的重组表达载体的程序是本领域的普通技术人员熟知的 (参见,例如,萨姆布鲁克等人,1989,同上文)。

[0309] 宿主细胞

[0310] 本发明还涉及重组宿主细胞,这些重组宿主细胞包括与指导本发明多肽产生的一个或多个 (若干个) 控制序列可操作地连接的本发明多核苷酸。将包含多核苷酸的构建体或载体引入到宿主细胞中,这样使得该构建体或载体被维持作为染色体整合体或作为自主复制的染色体外载体,如早前所描述。术语“宿主细胞”涵盖由于复制期间发生的突变与亲本细胞不同的亲本细胞的任何后代。宿主细胞的选择在很大程度上取决于编码该多肽的基因及其来源。

[0311] 该宿主细胞可以是有用于重组产生本发明的多肽的任何细胞,例如原核细胞或真核细胞。

[0312] 原核宿主细胞可以是任何革兰氏阳性或革兰氏阴性细菌。革兰氏阳性细菌包括但不限于:芽孢杆菌属、短芽孢杆菌属、梭菌属、土芽孢杆菌属、乳杆菌属、乳球菌属、类芽孢杆菌属、以及链霉菌属。革兰氏阴性细菌包括但不限于大肠杆菌和假单胞菌属。

[0313] 细菌宿主细胞可以是任何芽孢杆菌的细胞,包括但不限于嗜碱芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、短芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、克劳氏芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、坚强芽孢杆菌、灿烂芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、以及苏云金芽孢杆菌的细胞。特别优选的宿主细胞是枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌细胞。

[0314] 细菌宿主细胞还可以是任何链球菌属细胞,包括但不限于似马链球菌、酿脓链球菌、乳房链球菌、以及马链球菌兽瘟亚种细胞。

[0315] 细菌宿主细胞还可以是任何链霉菌属细胞,包括但不限于:产色链霉菌、阿维链霉菌、天蓝色链霉菌、灰色链霉菌以及变铅青链霉菌细胞。

[0316] 例如通过原生质体转化 (参见例如,常 (Chang) 和科恩 (Cohen),1979,分子和普通遗传学 (Mol. Gen. Genet.)168:111-115),使用感受态细胞 (参见,例如,杨格 (Young) 和斯皮宰曾 (Spizizen),1961,细菌学杂志 (J. Bacteriol.)81:823-829;或者杜博楠

(Dubnau) 和大卫多夫 - 阿贝尔森 (Davidoff-Abelson), 1971, 分子生物学杂志 (J. Mol. Biol.) 56:209-221)、通过电穿孔 (参见, 例如, 茂川 (Shigekawa) 和道尔 (Dower), 1988, 生物技术 (Biotechniques) 6:742-751)、或者通过轭合 (参见, 例如凯勒 (Koehler) 和索恩 (Thorne), 1987, 细菌学杂志 (J. Bacteriol.) 169:5271-5278) 可以实现将 DNA 引入到芽孢杆菌属细胞中。例如通过原生质体转化 (参见例如, 哈那汗 (Hanahan), 1983, 分子生物学杂志 (J. Mol. Biol.) 166:557-580) 或电穿孔 (参见, 例如, 道尔 (Dower) 等人, 1988, 核酸研究 (Nucleic Acids Res.) 16:6127-6145) 可以实现将 DNA 引入到大肠杆菌细胞中。例如通过原生质体转化和电穿孔 (参见, 例如贡 (Gong) 等人, 2004, 微生物学报 (Folia Microbiol.) (布拉格 (Praha)) 49:399-405)、通过轭合 (参见, 例如马卓德 (Mazodier) 等人, 1989, 细菌学杂志 (J. Bacteriol.) 171:3583-3585) 或通过转导 (参见, 例如伯克 (Burke) 等人, 2001, 美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 98:6289-6294) 可以实现将 DNA 引入到链霉菌属细胞中。例如通过电穿孔 (参见, 例如崔 (Choi) 等人, 2006, 微生物学方法杂志 (J. Microbiol. Methods) 64:391-397) 或通过轭合 (参见, 例如皮内多 (Pinedo) 和斯梅茨 (Smets), 2005, 应用与环境微生物学 (Appl. Environ. Microbiol.) 71:51-57) 可以实现将 DNA 引入到假单胞菌属细胞中。例如通过天然感受态 (参见, 例如佩里 (Perry) 和藏满 (Kuramitsu), 1981, 传染与免疫 (Infect. Immun.) 32:1295-1297)、通过原生质体转化 (参见, 例如卡特 (Catt) 和约里克 (Jollick), 1991, 微生物 (Microbios) 68:189-207)、通过电穿孔 (参见, 例如布克莱 (Buckley) 等人, 1999, 应用与环境微生物学 (Appl. Environ. Microbiol.) 65:3800-3804) 或通过轭合 (参见, 例如克莱怀尔 (Clewell), 1981, 微生物学综述 (Microbiol. Rev.) 45:409-436) 可以实现将 DNA 引入到链球菌属细胞中。然而, 可以使用本领域已知的用于将 DNA 引入宿主细胞中的任何方法。

[0317] 宿主细胞还可以是真核细胞, 如哺乳动物、昆虫、植物、或真菌细胞。

[0318] 宿主细胞可以是真菌细胞。如在此所用的“真菌”包括子囊菌门、担子菌门、壶菌门和接合菌门 (如霍克斯沃思 (Hawksworth) 等人在安 - 倍氏菌物辞典 (Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi), 第 8 版, 1995, 国际 CAB, 大学出版社, 剑桥 (Cambridge), 英国中所定义的) 以及卵菌门 (Oomycota) (如在霍克斯沃思 (Hawksworth) 等人, 1995, 见上文, 第 171 页中所引用的) 和所有有丝分裂孢子真菌 (霍克斯沃思 (Hawksworth) 等人, 1995, 见上文)。

[0319] 该真菌宿主细胞可以是酵母细胞。如在此使用的“酵母”包括产子囊酵母 (内孢霉目)、产担子酵母和属于半知菌类 (芽孢纲) 的酵母。由于酵母的分类在将来可能改变, 出于本发明的目的, 酵母应如在酵母生物学与活性 (Biology and Activities of Yeast) (斯金纳 (Skinner), F. A., 帕斯莫尔 (Passmore), S. M. 和达文波特 (Davenport), R. R. 编著, 应用细菌学研讨会系列第 9 期 (Soc. App. Bacteriol. Symposium Series No. 9), 1980) 中所述进行定义。

[0320] 酵母宿主细胞可以是假丝酵母属、汉逊酵母属、克鲁维酵母属、毕赤酵母属、酵母属、裂殖酵母属或亚罗酵母属细胞, 如乳酸克鲁维酵母 (*Kluyveromyces lactis*)、卡氏酵母、酿酒酵母、糖化酵母、道格拉斯酵母、克鲁维酵母、诺地酵母、卵形酵母、或亚罗解脂酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 细胞。

[0321] 真菌宿主细胞可以是丝状真菌细胞。“丝状真菌”包括真菌门 (Eumycota) 和卵菌

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

[0322] 丝状真菌宿主细胞可以是枝顶孢霉属、曲霉属、短梗霉属、烟管菌属、拟蜡菌属、金孢子菌属、鬼伞菌属、革盖菌属、隐球菌属、线黑粉酵母属、镰刀菌属、腐质霉属、稻瘟菌属、毛霉属、毁丝霉属、新考玛脂霉属、脉孢菌属、拟青霉属、青霉属、平革菌属、白腐菌属、瘤胃壶菌属、侧耳属、裂褶菌属、踝节菌属、嗜热子囊菌属、梭孢壳菌属、弯颈霉属、栓菌属、或木霉属的细胞。

[0323] 例如，丝状真菌宿主细胞可以是泡盛曲霉、臭曲霉、烟曲霉、日本曲霉、构巢曲霉、黑曲霉、米曲霉、烟管菌、干拟蜡菌、卡内基拟蜡菌 (*Ceriporiopsis caregia*)、浅黄拟蜡孔菌、潘诺希塔拟蜡菌 (*Ceriporiopsis pannocinta*)、环带拟蜡菌 (*Ceriporiopsis rivulosa*)、微红拟蜡菌 (*Ceriporiopsis subrufa*)、虫拟蜡菌、狭边金孢子菌 (*Chrysosporium inops*)、嗜角质金孢子菌、拉克淖金孢子菌 (*Chrysosporium lucknowense*)、粪状金孢子菌 (*Chrysosporium merdarium*)、毡金孢子菌、女王杜香金孢子菌 (*Chrysosporium queenslandicum*)、热带金孢子菌、褐薄金孢子菌、灰盖鬼伞、毛云芝菌、杆孢状镰孢、禾谷镰孢、库威镰孢、黄色镰刀菌、禾谷镰刀菌、禾赤镰孢、异孢镰孢、合欢木镰孢、尖孢镰刀菌、多枝镰孢、粉红镰孢菌、接骨木镰孢、肤色镰孢、拟分枝孢镰刀菌、硫色镰孢、圆镰孢、拟丝孢镰刀菌、镶片镰孢菌、特异腐质霉、疏棉状腐质霉、米黑毛霉、嗜热毁丝霉、粗糙脉孢菌、产紫青霉、黄孢原毛平革菌、射纹革菌、杏鲍菇、太瑞斯梭孢壳霉、长绒毛栓菌、韩国白腐菌、哈茨木霉、康宁木霉、长枝木霉、里氏木霉或绿色木霉细胞。

[0324] 可以将真菌细胞通过涉及原生质体形成、原生质体转化、以及细胞壁再生的方法以本身已知的方式转化。用于转化曲霉属和木霉属宿主细胞的适合程序在 EP 238023 和约尔顿 (Yelton) 等人，1984，美国国家科学院院刊 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*) 81:1470-1474 中描述。用于转化镰刀菌属物种的适合方法由马拉迪尔 (Malardier) 等人，1989，基因 (*Gene*) 78:147-156、以及 WO 96/00787 描述。可以使用由如以下文献描述的程序转化酵母：贝克尔 (Becker) 和瓜伦特 (Guarente)，在阿贝尔森 (Abelson)，J. N. 和西蒙 (Simon)，M. I. 编，酵母遗传学与分子生物学指南，酶学方法 (*Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology*)，第 194 卷，第 182-187 页，学术出版社有限公司 (Academic Press, Inc.)，纽约；伊藤 (Ito) 等人，1983，细菌学杂志 (*J. Bacteriol.*) 153:163；以及哈尼恩 (Hinnen) 等人，1978，美国科学院院刊 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*) 75:1920。

[0325] 产生方法

[0326] 本发明还涉及产生本发明多肽的方法，该方法包括：(a) 培养细胞，该细胞处于其野生型形式，在有益于产生该多肽的条件下产生该多肽；以及 (b) 回收该多肽。在一个方面，该细胞属于糖单孢菌属。在一个更优选方面，该细胞是绿色糖单孢菌细胞。

[0327] 本发明还涉及产生本发明多肽的方法，该方法包括：(a) 在有益于产生该多肽的条件下培养本发明的重组宿主细胞；以及 (b) 回收该多肽。

[0328] 使用本领域熟知的方法，在适合产生该多肽的营养培养基中培养宿主细胞。例如，

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

[0329] 在上面的部分以及以下关于“核酸构建体、表达载体、重组宿主细胞和用于生产蛋白酶的方法”的部分中提供了更多的细节。

[0330] 可以使用特异性针对该多肽的本领域已知的方法来检测该多肽。这些检测方法可包括使用特异抗体、形成酶产物、或酶底物的消失。例如,可以使用酶测定来确定该多肽的活性。

[0331] 可以使用本领域已知的方法来回收多肽。例如,可以通过常规程序,包括,但不局限于离心、过滤、提取、喷雾干燥、蒸发、或沉淀,从营养培养基中回收该多肽。

[0332] 可以通过本领域已知的多种方法纯化该多肽,该方法包括但不限于色谱法(例如,离子交换色谱法、亲和色谱法、疏水色谱法、聚焦色谱法和大小排阻色谱法)、电泳方法(例如,制备性等电聚焦)、差别溶解度(例如,硫酸铵沉淀)、SDS-PAGE 或提取(参见,例如,蛋白纯化(Protein Purification),编者 J.-C. 詹森(Janson)和拉尔斯赖登(Lars Ryden),VCH 出版公司,纽约,1989),以便获得基本上纯的多肽。

[0333] 在一个可替代的方面中,不回收多肽,而是使用表达多肽的本发明宿主细胞作为多肽的来源。

[0334] 植物

[0335] 本发明还涉及植物,例如,转基因植物、植物部分、或植物细胞,其包含本发明的分离的多核苷酸,以便以可回收的量表达和产生该多肽。该多肽可以从植物或植物部分回收。可替代地,可以按原样将包含该多肽的植物或植物部分用于改善食品或饲料的质量,例如,改善营养价值、适口性、以及流变性质,或用以破坏抗营养因子。

[0336] 转基因植物可以是双子叶的(双子叶植物)或单子叶的(单子叶植物)。单子叶植物的实例是草,如草甸草(蓝草,早熟禾属);饲草,如羊茅属(*Festuca*)、黑麦草属(*Lolium*);温带草,如翦股颖属(*Agrostis*);以及谷类,例如小麦、燕麦、黑麦、大麦、稻、高粱、以及玉蜀黍(玉米)。

[0337] 双子叶植物的实例是烟草、豆类(如羽扇豆、马铃薯、糖甜菜(sugar beet)、豌豆、豆和大豆)、以及十字花科植物(十字花科(family Brassicaceae))(如花椰菜、油菜籽、以及紧密相关的模式生物拟南芥)。

[0338] 植物部分的实例是茎、愈伤组织、叶、根、果实、种子、以及块茎、以及包括这些部分的独立组织,例如,表皮、叶肉、薄壁组织(parenchyme)、维管组织、分生组织。特定植物细胞区室,如叶绿体、质外体(apoplast)、线粒体、液泡、过氧化物酶体以及细胞质也被认为是植物部分。此外,任何植物细胞,无论是何种组织来源,都被认为是植物部分。同样地,植物部分,如分离以促进本发明的利用的特定组织和细胞也被认为是植物部分,例如胚、胚乳、糊粉层和种皮。

[0339] 同样包含于本发明范围内的是这类植物、植物部分以及植物细胞的子代。

[0340] 表达多肽的转基因植物或植物细胞可以根据本领域已知的方法构建。简而言之，通过如下方法构建该植物或植物细胞：将编码多肽的一个或多个（若干个）表达构建体并入到植物宿主基因组或叶绿体基因组中，并且使所得的修饰植物或植物细胞繁殖为转基因植物或植物细胞。

[0341] 表达构建体宜为包含编码多肽的多核苷酸的核酸构建体，该多核苷酸与在选择的植物或植物部分中表达该多核苷酸所需的适当的调节序列可操作地连接。而且，表达构建体可包含用于鉴别整合了此表达构建体的宿主细胞的选择性标记，并将此构建体引入所讨论的植物所必需的 DNA 序列（后者取决于所用的引入 DNA 的方法）。

[0342] 调节序列（如启动子和终止子序列以及任选地信号或转运序列）的选择（例如）基于期望何时、何处以及如何表达多肽而确定。例如，编码多肽的基因的表达可以是组成性的或可诱导的，或可以为发育、阶段或组织特异性的，并且可以使基因产物靶向特定组织或植物部分，例如种子或叶。调控序列由例如塔格 (Tague) 等人，1988，植物生理学 (Plant Physiology) 86:506 描述。

[0343] 对于组成型表达，可以使用 35S-CaMV、玉米泛素 1、和稻肌动蛋白 1 启动子（弗兰克 (Franck) 等人，1980，细胞 (Cell) 21:285-294；克里斯滕森 (Christensen) 等人，1992，植物分子生物学 (Plant Mol. Biol.) 18:675-689；张 (Zhang) 等人，1991，植物细胞 (Plant Cell) 3:1155-1165)。器官特异性启动子可以是例如：来自贮藏库组织 (storage sink tissue)（如种子、马铃薯块茎、以及果实）（爱德华兹 (Edwards) 和科鲁兹 (Coruzzi)，1990，遗传学年度综述 (Ann. Rev. Genet.) 24:275-303)、或来自代谢库组织 (metabolic sink tissue)（如分生组织）的启动子（伊托 (Ito) 等人，1994，植物分子生物学 (Plant Mol. Biol.) 24:863-878)；种子特异性启动子，如来自稻的谷蛋白、醇溶蛋白 (prolamin)、球蛋白 (globulin)、或白蛋白启动子（吴 (Wu) 等人，1998，植物细胞生理学 (Plant Cell Physiol.) 39:885-889)；来自豆球蛋白 B4 和来自蚕豆的未知种子蛋白基因的蚕豆启动子（康拉德 (Conrad) 等人，1998，植物生理学杂志 (J. Plant Physiol.) 152:708-711)；来自种子油体蛋白的启动子（陈 (Chen) 等人，1998，植物细胞生理学 (Plant Cell Physiol.) 39:935-941)；来自欧洲油菜 (*Brassica napus*) 的贮藏蛋白 napA 启动子、或本技术领域已知的任何其他种子特异性启动子，例如，如在 W091/14772 中所描述。此外，启动子可以是叶特异性启动子，如来自稻或番茄的 *rbcs* 启动子（京冢 (Kyojuka) 等人，1993，植物生理学 (Plant Physiol.) 102:991-1000)、小球藻病毒腺嘌呤甲基转移酶基因启动子（麦卓 (Mittra) 和希金斯 (Higgins)，1994，植物分子生物学 (Plant Mol. Biol.) 26:85-93)、来自稻的 *aldP* 基因启动子（加贺屋 (Kagaya) 等人，1995，分子遗传学与基因组学 (Mol. Gen. Genet.) 248:668-674)、或伤口诱导型启动子（如马铃薯 *pin2* 启动子）（许 (Xu) 等人，1993，植物分子生物学 (Plant Mol. Biol.) 22:573-588)。同样地，该启动子可以通过非生物处理来诱导，如温度、干旱、或盐度变化，或通过外源施加的激活该启动子的物质来诱导，例如乙醇、雌激素、植物激素（如乙烯、脱落酸和赤霉素）、以及重金属。

[0344] 启动子增强子元件也可以用于实现多肽在植物中的更高表达。例如，启动子增强子元件可以是置于启动子与编码多肽的多核苷酸之间的内含子。例如，许 (Xu) 等人，1993，见上文，披露了使用稻肌动蛋白 1 基因的第一内含子以增强表达。

[0345] 该选择性标记基因及该表达构建体的任何其他部分可以选自本领域中可用的那些。

[0346] 可以根据本领域中已知的常规技术将核酸构建体结合到植物基因组中,这些常规技术包括农杆菌介导的转化、病毒介导的转化、微注射、粒子轰击、生物射弹转化、以及电穿孔(加塞尔(Gasser)等人,1990,科学(Science)244:1293;波特里库斯(Potrykus),1990,生物/技术(Bio/Technology)8:535;岛本(Shimamoto)等人,1989,自然(Nature)338:274)。

[0347] 目前,根癌农杆菌介导的基因转移是用于产生转基因双子叶植物的所选方法(关于综述,请参见霍伊卡(Hooykas)和施尔伯鲁特(Schilperoort),1992,植物分子生物学(Plant Mol.Biol.)19:15-38),并且还可被用于转化单子叶植物,虽然对于这些植物常常使用其他的转化方法。目前,用于产生转基因单子叶植物的所选方法是粒子(用转化DNA涂覆的微观的金或钨粒子)轰击胚愈伤组织或发育中的胚(克里斯托(Christou),1992,植物杂志(Plant J.)2:275-281;岛本,1994,生物技术当前述评(Curr.Opin.Biotechnol.)5:158-162;瓦西尔(Vasil)等人,1992,生物/技术(Bio/Technology)10:667-674)。用于转化单子叶植物的替代方法是基于原生质体转化,如由奥米儒勒(Omirulleh)等人,1993,植物分子生物学(Plant Mol.Biol.)21:415-428所描述。根据本披露使用的另外的转化方法包括美国专利号6,395,966和7,151,204中所述的那些(这二者都通过引用以其全文结合在此)。

[0348] 在转化后,根据本领域熟知的方法选出已并入了表达构建体的转化体,并使其再生成为完整植物。通常设计转化程序用于通过如下方法在再生期间或在后续世代中选择性消除选择基因:例如,使用带有两个独立的T-DNA构建体的共转化或利用特异性重组酶位点特异性地切除选择基因。

[0349] 除用根据本发明制备的构建体直接转化具体植物基因型之外,还可以通过将具有构建体的植物与缺乏该构建体的第二植物杂交来制备转基因植物。例如,可以将编码多肽的构建体通过杂交引入具体植物品种,而根本无需直接转化那个给定品种的植物。因此,本发明不仅涵盖了从根据本发明已经转化的细胞直接再生的植物,而且还涵盖了这类植物的后代。如在此使用的,后代可以是指根据本发明制备的亲本植物的任何代的后代。这种后代可以包含根据本发明制备的DNA构建体或根据本发明制备的DNA构建体的一部分。杂交导致通过供体植物系与起始系交叉授粉,将转基因引入植物系。这类步骤的非限制性实例进一步在美国专利号7,151,204中明确地表达。

[0350] 植物可以通过回交转化方法生成。例如,植物包含被称为回交转化的基因型、种系、近交体、或杂交体的植物。

[0351] 可以使用遗传标记以协助本发明的一种或多种转基因从一个遗传背景渗入到另一个。标记协助的选择提供了相对于常规育种的优点,在于其可以用于避免由表型变异导致的错误。另外,遗传标记可以在具体杂交的个别后代中提供有关良种种质相对程度的数据。例如,当具有所希望性状并且另外具有非农艺学所希望的遗传背景的植物与良种亲本杂交时,可以使用遗传标记来选择不仅具有感兴趣的性状,还具有相对较大比例所希望种质的后代。以此方式,使一种或多种性状渗入特定遗传背景所需的世代数得以最小化。

[0352] 本发明还涉及产生本发明多肽的方法,该方法包含:(a)在有益于产生多肽的条

件下,培养包含编码该多肽的多核苷酸的转基因植物或植物细胞,并且 (b) 回收该多肽。

[0353] 组合物

[0354] 本发明还涉及包含本发明的蛋白酶的组合物。优选地,这些组合物富集了这样一种蛋白酶。术语“富含”指示该组合物的蛋白酶活性已经增加,例如,以至少 1.1 的一个富集因子。

[0355] 在一个方面,该组合物包含选自下组的、具有蛋白酶活性的分离的多肽,该组由以下各项组成:

[0356] (a) 一种多肽,该多肽与 SEQ ID NO:3 具有至少 80%,例如至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 序列一致性;

[0357] (b) 一种多肽,该多肽由在中严谨度条件、中-高严谨度条件、高严谨度条件或非常高严谨度条件下与以下各项杂交的多核苷酸编码:

[0358] (i) SEQ ID NO:1 的成熟多肽编码序列;和 / 或

[0359] (ii) (i) 的全长互补链;

[0360] (c) 一种多肽,该多肽由与 SEQ ID NO:3 的成熟多肽编码序列具有至少 80%,例如至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 序列一致性的多核苷酸编码;

[0361] (d) 一种变体,该变体包含 SEQ ID NO:3 的一个或多个(若干个)氨基酸的取代、缺失和 / 或插入;以及

[0362] (e) (a)、(b)、(c) 或 (d) 的多肽的一个片段,该片段具有蛋白酶活性。

[0363] 本发明的一个实施例是一种组合物,该组合物包含一种分离的多肽,该多肽与 SEQ ID NO:3 的多肽具有至少 85% 序列一致性。

[0364] 本发明的一个实施例是一种组合物,该组合物包含一种分离的多肽,该多肽与 SEQ ID NO:3 的多肽具有至少 86% 序列一致性。

[0365] 本发明的一个实施例是一种组合物,该组合物包含一种分离的多肽,该多肽与 SEQ ID NO:3 的多肽具有至少 87% 序列一致性。

[0366] 本发明的一个实施例是一种组合物,该组合物包含一种分离的多肽,该多肽与 SEQ ID NO:3 的多肽具有至少 88% 序列一致性。

[0367] 本发明的一个实施例是一种组合物,该组合物包含一种分离的多肽,该多肽与 SEQ ID NO:3 的多肽具有至少 89% 序列一致性。

[0368] 本发明的一个实施例是一种组合物,该组合物包含一种分离的多肽,该多肽与 SEQ ID NO:3 的多肽具有至少 90% 序列一致性。

[0369] 本发明的一个实施例是一种组合物,该组合物包含一种分离的多肽,该多肽与 SEQ ID NO:3 的多肽具有至少 91% 序列一致性。

[0370] 本发明的一个实施例是一种组合物,该组合物包含一种分离的多肽,该多肽与 SEQ ID NO:3 的多肽具有至少 92% 序列一致性。

[0371] 本发明的一个实施例是一种组合物,该组合物包含一种分离的多肽,该多肽与 SEQ ID NO:3 的多肽具有至少 93% 序列一致性。

[0372] 本发明的一个实施例是一种组合物,该组合物包含一种分离的多肽,该多肽与 SEQ ID NO:3 的多肽具有至少 94%序列一致性。

[0373] 本发明的一个实施例是一种组合物,该组合物包含一种分离的多肽,该多肽与 SEQ ID NO:3 的多肽具有至少 95%序列一致性。

[0374] 本发明的一个实施例是一种组合物,该组合物包含一种分离的多肽,该多肽与 SEQ ID NO:3 的多肽具有至少 96%序列一致性。

[0375] 本发明的一个实施例是一种组合物,该组合物包含一种分离的多肽,该多肽与 SEQ ID NO:3 的多肽具有至少 97%序列一致性。

[0376] 本发明的一个实施例是一种组合物,该组合物包含一种分离的多肽,该多肽与 SEQ ID NO:3 的多肽具有至少 98%序列一致性。

[0377] 本发明的一个实施例是一种组合物,该组合物包含一种分离的多肽,该多肽与 SEQ ID NO:3 的多肽具有至少 99%序列一致性。

[0378] 本发明的一个实施例是一种组合物,该组合物包含一种分离的多肽,该多肽与 SEQ ID NO:3 的多肽具有 100%序列一致性。

[0379] 在一个方面,该组合物包括 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列或其等位基因变体或由其组成;或是其具有蛋白酶活性的片段。在另一个方面,该组合物包括 SEQ ID NO:2 的成熟多肽或由其组成。在一个另外的方面,该组合物包括 SEQ ID NO:3 的多肽或由其组成。在另一个方面,该组合物包括 SEQ ID NO:2 的氨基酸 1 至 160、SEQ ID NO:2 的氨基酸 5 至 154 或 SEQ ID NO:2 的氨基酸 10 至 149 或由其组成。在另一个方面,该多肽包括 SEQ ID NO:3 的氨基酸 1 至 160、SEQ ID NO:3 的氨基酸 5 至 154 或 SEQ ID NO:3 的氨基酸 10 至 149 或由其组成。

[0380] 在一个实施例中,包含 SEQ ID NO:3 的一个或多个(若干个)氨基酸的取代、缺失和/或插入的该变体与 SEQ ID NO:3 具有至少 80%,例如至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%,但小于 100%序列一致性。

[0381] 本发明还涉及包含分离的多肽的组合物,这些分离的多肽具有蛋白酶活性并且是由以下多核苷酸编码,这些多核苷酸在中严谨度条件、中-高严谨度条件、高严谨度条件或非常高严谨度条件下与 (i) SEQ ID NO:1 的成熟多肽编码序列和/或 (ii) (i) 的全长互补链杂交(J. 萨姆布鲁克(Sambrook), E.F. 弗里奇(Fritsch) 和 T. 马尼亚蒂斯(Maniatis), 1989, 分子克隆实验手册(Molecular Cloning, A Laboratory Manual), 第 2 版, 冷泉港(Cold Spring Harbor), 纽约)。

[0382] 本发明进一步涉及包含分离的多肽的组合物,这些多肽与 SEQ ID NO:3 的多肽相差不多于三十二个氨基酸,例如相差三十个氨基酸、相差二十五个氨基酸、相差二十个氨基酸、相差十五个氨基酸、相差十个氨基酸、相差八个氨基酸、相差七个氨基酸、相差六个氨基酸、相差五个氨基酸、相差四个氨基酸、相差三个氨基酸、相差两个氨基酸以及相差一个氨基酸。

[0383] 本发明还涉及包含变体的组合物,这些变体包含 SEQ ID NO:3 或其同源序列的一个或多个(或若干个)氨基酸的取代、缺失和/或插入。在 SEQ ID NO:3 中具有氨基酸取代、缺失和/或插入的位置总数不多于 32,例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、

17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31 或 32。优选地,氨基酸变化是一种次要性质的变化,即并不显著影响蛋白质的折叠和 / 或活性的保守氨基酸取代、插入或缺失;典型地具有一个到约 30 个氨基酸的小缺失;小氨基 - 或羧基 - 末端延伸,如一种氨基 - 末端甲硫氨酸残基;具有多达约 20-25 个残基的一种小连接肽;或通过改变净电荷促进纯化或另一种功能的一种小延伸,如一种聚组氨酸段、一种抗原表位或一种结合域。

[0384] 在一个优选实施例中,该组合物是一种动物饲料组合物或添加剂,包含至少一种脂溶性维生素。在另一个优选实施例中,该组合物是一种动物饲料组合物或添加剂,包含至少一种水溶性维生素。在一个进一步优选的实施例中,该组合物是一种动物饲料组合物或添加剂,包含至少一种微量矿物质。在另一个实施例中,该动物饲料组合物包括一种或多种另外的酶,其中这些另外的酶选自下组,该组由以下各项组成:淀粉酶;植酸酶;木聚糖酶;半乳聚糖酶; α -半乳糖苷酶;蛋白酶,磷脂酶;以及 β -葡聚糖酶,或其任何混合物。在另一个实施例中,该动物饲料添加剂包括一种或多种另外的酶,其中这些另外的酶选自下组,该组由以下各项组成:淀粉酶;植酸酶;木聚糖酶;半乳聚糖酶; α -半乳糖苷酶;蛋白酶,磷脂酶;以及 β -葡聚糖酶,或其任何混合物。

[0385] 在另一个优选实施例中,该组合物是一种洗涤剂组合物,其可用于衣物洗涤、湿洗、硬表面清洁和 / 或餐具洗涤。在一个实施例中,该洗涤剂组合物包括一种或多种如在此定义的洗涤剂组分。在另一个实施例中,该洗涤剂组合物包括一种或多种选自下组的另外的酶,该组由以下各项组成:蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶、角质酶、纤维素酶、内切葡聚糖酶、木葡聚糖酶、果胶酶、果胶裂解酶、黄原胶酶、过氧化物酶、卤代过氧酶、过氧化氢酶以及甘露聚糖酶,或其任何混合物。在一个另外的实施例中,该洗涤剂组合物包括一种或多种如在此定义的洗涤剂组分以及一种或多种选自下组的另外的酶,该组由以下各项组成:蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶、角质酶、纤维素酶、内切葡聚糖酶、木葡聚糖酶、果胶酶、果胶裂解酶、黄原胶酶、过氧化物酶、卤代过氧酶、过氧化氢酶以及甘露聚糖酶,或其任何混合物。

[0386] 该组合物可以包含本发明的蛋白酶作为主要酶组分,例如单组分组合物。可替代地,该组合物可以包含多种酶活性,如氨肽酶、淀粉酶、碳水化合物酶、羧肽酶、过氧化氢酶、纤维素酶、壳多糖酶、角质酶、环糊精糖基转移酶、脱氧核糖核酸酶、酯酶、 α -半乳糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、 α -葡糖苷酶、 β -葡糖苷酶、卤素过氧化物酶、转化酶、漆酶、脂肪酶、甘露糖苷酶、氧化酶、果胶分解酶、肽谷氨酰胺酶、过氧化物酶、植酸酶、多酚氧化酶、蛋白水解酶、核糖核酸酶、转谷氨酰胺酶或木聚糖酶。可以例如通过微生物(如细菌或真菌)或通过植物或通过动物产生另外的一种或多种酶。这些组合物可根据本领域已知的方法制备并且可以是液体或干燥组合物的形式。例如,组合物可以处于颗粒或微颗粒的形式。该蛋白酶可以根据本领域中已知的方法稳定化。

[0387] 洗涤剂组合物

[0388] 在一个实施例中,本发明针对洗涤剂组合物,这些洗涤剂组合物包含与一种或多种洗涤剂组分组合的本发明的酶。洗涤剂组分的选择在普通技术人员技术内并且包括常规成分,包括以下列出的示例性、非限制性组分。

[0389] 对于纺织品保养,组分的选择可以包括以下考虑:有待清洁的纺织品的类型、污物的类型和 / 或程度、进行清洁时的温度、以及洗涤剂产品的配制。尽管根据一种具体的功能性对以下提及的组分由通用标题进行分类,但是这并不被解释为限制,因为如将被普通技

术人员所理解,一种组分可以包括另外的功能性。

[0390] 清洁过程或者纺织品保养过程可以例如是衣物洗涤过程、餐具洗涤过程或硬表面(如浴室砖、地板、桌面、排水管、水槽以及脸盆)清洁。衣物洗涤过程可以例如是家用洗涤,但是它也可以是工业洗涤。此外,本发明涉及一种用于洗涤织物和/或衣物的方法,其中该方法包括用包含一种洗涤剂组合物和至少一种本发明的蛋白酶的洗涤溶液处理织物。例如,可以在机器洗涤过程中或者在手动洗涤过程中进行清洁过程或纺织品保养过程。洗涤溶液可以例如是含有洗涤剂组合物的水洗溶液。

[0391] 经过洗涤、清洁的织物和/或衣物或者本发明的纺织品保养过程可以是常规的可洗涤衣物洗涤,例如家用洗涤。优选地,衣物洗涤的主要部分是衣物和织物,包括针织品、编织物、斜纹粗棉布、非编织物、毛毡、纱线、以及毛巾。这些织物可以是纤维素基的,如天然纤维素,包括棉布、亚麻、亚麻布、黄麻、苧麻、剑麻或椰壳纤维;或者人造纤维素(例如,来源于木浆),包括纤维胶/人造丝、苧麻、醋酸纤维素纤维(三胞)、莱赛尔纤维或其共混物。这些织物还可以是非纤维素基的,如天然聚酰胺,包括羊毛、骆驼毛、羊绒、马海毛、兔毛或丝;或者合成聚合物,如尼龙、芳族聚酰胺、聚酯、丙烯酸、聚丙烯和氨纶/弹性纤维;或其共混物以及纤维素基和非纤维素基纤维的共混物。共混物的例子是棉和/或人造丝/纤维胶与一种或几种伴随材料的共混物,该伴随材料例如是羊毛、合成纤维(例如聚酰胺纤维、丙烯酸纤维、聚酯纤维、聚乙烯醇纤维、聚氯乙烯纤维、聚亚胺酯纤维、聚脲纤维、芳族聚酰胺纤维)以及含纤维素的纤维(例如人造丝/纤维胶、苧麻、亚麻、亚麻布、黄麻、醋酸纤维素纤维、莱赛尔纤维)。

[0392] 最近几年,人们对替换洗涤剂中的组分的兴趣逐渐增加,这源于用可再生生物组分如酶和多肽替换石油化学产品而不损害洗涤性能。当洗涤剂组合物的组分改变新酶活性或者相比于常用洗涤剂酶(如蛋白酶)具有替代和/或改进的特性的新酶时,需要脂肪酶和淀粉酶来实现与传统洗涤剂组合物相比时相似或改进的洗涤剂性能。

[0393] 本发明进一步涉及本发明的蛋白酶在除去蛋白质污物过程中的用途。蛋白质污物可能是如食品污物等污物,如婴儿食品、皮脂、可可、蛋、血、奶、墨水、草、或其组合。

[0394] 典型的洗涤剂组合物包括除酶之外的各种组分,这些组分具有不同的作用,一些组分像表面活性剂降低洗涤剂的表面张力,这允许正清洁的污物被提起和分散并随后被洗涤出来,其他组分像漂白系统通常通过氧化除去颜色并且许多漂白剂还具有强杀菌特性,并且用于消毒和灭菌。其他组分像助洗剂和螯合剂例如通过从液体中除去金属离子来软化洗涤水。

[0395] 在一个具体实施例中,本发明涉及包括本发明的蛋白酶的一种组合物在衣物或餐具洗涤中的用途,其中所述酶组合物进一步包括以下各项中的至少一种或多种:表面活性剂、助洗剂、螯合剂或螯合试剂、漂白系统或漂白组分。

[0396] 在本发明的一个实施例中,可以将本发明的多肽以对应于以下的量添加至一种洗涤剂组合物中:每升的洗涤液 0.001-200mg 的蛋白,例如 0.005-100mg 的蛋白,优选 0.01-50mg 的蛋白,更优选 0.05-20mg 的蛋白,甚至更优选 0.1-10mg 的蛋白。

[0397] 用于在自动洗碗机(ADW)中使用的组合物例如可以包含按该组合物的重量计 0.0001%-50%,例如 0.001%-20%,例如 0.01%-10%,例如 0.05%-5%的酶蛋白。

[0398] 用于在洗衣造粒(laundry granulation)中使用的组合物例如可以包含按该组合

物的重量计 0.0001% -50%，例如 0.001% -20%，例如 0.01% -10%，例如 0.05% -5% 的酶蛋白。

[0399] 用于在洗衣液中使用的组合物例如可以包含按该组合物的重量计 0.0001% -10%，例如 0.001-7%，例如 0.1% -5% 的酶蛋白。

[0400] 可以使用常规稳定剂稳定本发明的洗涤剂组合物的一种或多种酶，这些常规稳定剂例如是多元醇，例如丙二醇或甘油、糖或糖醇、乳酸、硼酸或硼酸衍生物，例如芳香族硼酸酯，或苯基硼酸衍生物，例如 4-甲酰苯基硼酸，并且可以如在例如 WO 92/19709 和 WO 92/19708 中所述配制该组合物。

[0401] 在某些市场中，不同洗涤条件并且就其本身而言，使用不同类型的洗涤剂。这披露于例如 EP 1 025 240 中。例如，在亚洲（日本）使用低的洗涤剂浓度体系，而美国使用中等洗涤剂浓度体系，并且欧洲使用高的洗涤剂浓度体系。

[0402] 低的洗涤剂浓度体系包含以下洗涤剂，其中在洗涤水中存在少于约 800ppm 的洗涤剂组分。日本洗涤剂典型地被认为是低的洗涤剂浓度体系，因为它们具有存在于洗涤水中的大约 667ppm 的洗涤剂组分。

[0403] 中等洗涤剂浓度体系包含以下洗涤剂，其中在洗涤水中存在约 800ppm 与约 2000ppm 之间的洗涤剂组分。北美洗涤剂通常被认为是中等洗涤剂浓度体系，因为它们具有存在于洗涤水中的大约 975ppm 的洗涤剂组分。

[0404] 高的洗涤剂浓度体系包含以下洗涤剂，其中在洗涤水中存在多于约 2000ppm 的洗涤剂组分。欧洲洗涤剂通常被认为是高的洗涤剂浓度体系，因为在洗涤水中它们具有大约 4500-5000ppm 的洗涤剂组分。

[0405] 拉丁美洲洗涤剂通常是高泡沫磷酸盐助洗剂洗涤剂并且在拉丁美洲使用的洗涤剂的范围可以落入中等和高的洗涤剂浓度两者中，因为在洗涤水中它们的洗涤剂组分的范围从 1500ppm 至 6000ppm。此类洗涤剂组合物都是本发明的实施例。

[0406] 本发明的多肽还可以结合到 WO 97/07202 中所披露的洗涤剂配制品中，通过引用将其结合在此。

[0407] 表面活性剂

[0408] 洗涤剂组合物可以包括一种或多种表面活性剂，它们可以是阴离子的和 / 或阳离子的和 / 或非离子的和 / 或半极性的和 / 或兼性离子的，或其混合物。在一个具体实施例中，洗涤剂组合物包括一种或多种非离子型表面活性剂和一种或多种阴离子表面活性剂的混合物。这种或这些表面活性剂典型地以按重量计从约 0.1% 至 60% 的水平存在，例如约 1% 至约 40%、或约 3% 至约 20%、或约 3% 至约 10%。基于所希望的清洁应用来选择这种或这些表面活性剂，并且这种或这些表面活性剂包括本领域中已知的任何一种或多种常规表面活性剂。可以利用本领域中已知的用于在洗涤剂中使用的任何表面活性剂。

[0409] 当被包括在其中时，洗涤剂将通常包括按重量计从约 1% 至约 40%，例如从约 5% 至约 30%（包括从约 5% 至约 15%）、或从约 20% 至约 25% 的阴离子表面活性剂。阴离子表面活性剂的非限制性实例包括硫酸盐和磺酸盐，具体地说是直链烷基苯磺酸盐 (LAS)、LAS 的异构体、支链烷基苯磺酸盐 (BABS)、苯基链烷磺酸盐、 α -烯烴磺酸盐 (AOS)、烯烴磺酸盐、链烯烴磺酸盐、链烷-2,3-二基双（硫酸盐）、羟基链烷磺酸盐以及二磺酸盐、烷基硫酸盐 (AS)（如十二烷基硫酸钠 (SDS)）、脂肪醇硫酸盐 (FAS)、伯醇硫酸盐 (PAS)、醇醚硫酸盐

(AES 或 AEOS 或 FES, 也被称为醇乙氧基硫酸盐或脂肪醇醚硫酸盐)、仲链烷磺酸盐 (SAS)、石蜡烃磺酸盐 (PS)、酯磺酸盐、磺化的脂肪酸甘油酯、 α -磺酸基脂肪酸甲酯 (α -SFMe 或 SES) (包括甲酯磺酸盐 (MES))、烷基琥珀酸或烯基琥珀酸、十二烯基 / 十四烯基琥珀酸 (DTSA)、氨基酸的脂肪酸衍生物、磺酸基琥珀酸或皂的二酯和单酯、及其组合。

[0410] 当被包括在其中时, 洗涤剂将通常包括按重量计从约 0% 至约 10% 的阳离子表面活性剂。阳离子表面活性剂的非限制性实例包括烷基二甲基乙醇季胺 (ADMEAQ)、十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB)、二甲基二硬脂酰氯化铵 (DSDMAC)、以及烷基苄基二甲基铵、烷基季铵化合物、烷氧基化季铵 (AQA) 化合物、及其组合。

[0411] 当被包括在其中时, 洗涤剂将通常包含按重量计从约 0.2% 至约 40% 的非离子型表面活性剂, 例如从约 0.5% 至约 30%, 特别是从约 1% 至约 20%、从约 3% 至约 10%, 例如从约 3% 至约 5%、或从约 8% 至约 12%。非离子型表面活性剂的非限制性实例包括醇乙氧基化物 (AE 或 AEO)、醇丙氧基化物、丙氧基化的脂肪醇 (PFA), 烷氧基化的脂肪酸烷基酯 (例如乙氧基化的和 / 或丙氧基化的脂肪酸烷基酯), 烷基酚乙氧基化物 (APE), 壬基酚乙氧基化物 (NPE), 烷基多糖苷 (APG), 烷氧基化胺, 脂肪酸单乙醇酰胺 (FAM), 脂肪酸二乙醇酰胺 (FADA), 乙氧基化的脂肪酸单乙醇酰胺 (EFAM), 丙氧基化的脂肪酸单乙醇酰胺 (PFAM), 多羟基烷基脂肪酸酰胺, 或葡萄糖胺的 N-酰基 N-烷基衍生物 (葡糖酰胺 (GA), 或脂肪酸葡糖酰胺 (FAGA)), 连同在 SPAN 和 TWEEN 商品名下可获得的产品, 及其组合。

[0412] 当被包括在其中时, 洗涤剂将通常包括按重量计从约 0% 至约 10% 的半极性表面活性剂。半极性表面活性剂的非限制性实例包括氧化胺 (AO), 例如烷基二甲胺氧化物、N-(椰油基烷基)-N, N-二甲胺氧化物和 N-(牛油-烷基)-N, N-双(2-羟乙基)胺氧化物、脂肪酸链烷醇酰胺和乙氧基化的脂肪酸链烷醇酰胺, 及其组合。

[0413] 当被包括在其中时, 洗涤剂将通常包括按重量计从约 0% 至约 10% 的兼性离子表面活性剂。兼性离子表面活性剂的非限制性实例包括甜菜碱、烷基二甲基甜菜碱、磺基甜菜碱、及其组合。

[0414] 助水溶剂

[0415] 助水溶剂是一种化合物, 该化合物在水性溶液中溶解疏水化合物 (或相反地, 在非极性环境中的极性物质)。典型地, 助水溶剂同时具有亲水的和疏水的特征 (如从表面活性剂已知的所谓两亲特性); 然而助水溶剂的分子结构一般并不有利于自发自聚集, 参见例如霍奇登 (Hodgdon) 和卡勒 (Kaler) 的综述 (2007), 胶体 & 界面科学新见 (Current Opinion in Colloid & Interface Science), 12:121-128。助水溶剂并不显示一个临界浓度, 高于该浓度就会发生如对表面活性剂而言所发现的自聚集以及脂质形成胶束、薄层或其他很好地定义的中间相。很多助水溶剂反而示出一个连续型聚集过程, 其中聚集体的大小随着浓度增加而增长。然而, 很多助水溶剂改变了包括极性和非极性特征的物质的系统 (包括水、油、表面活性剂、和聚合物的混合物) 的相行为、稳定性、和胶体特性。经典地从制药、个人护理、食品跨行业至技术应用使用助水溶剂。助水溶剂在洗涤剂组合物中的使用允许例如更浓的表面活性剂配制品 (如在通过除去水而压缩液体洗涤剂的过程中) 而不引起不希望的现象, 例如相分离或高黏度。

[0416] 洗涤剂可以包括按重量计 0% -5%, 例如约 0.5% 至约 5%、或约 3% 至约 5% 的助水溶剂。可以利用本领域中已知的用于在洗涤剂中使用的任何助水溶剂。助水溶剂的非限

制性实例包括苯磺酸钠、对甲苯磺酸钠 (STS)、二甲苯磺酸钠 (SXS)、枯烯磺酸钠 (SCS)、伞花烃磺酸钠、氧化胺、醇和聚乙二醇醚、羟基萘甲酸钠、羟基萘磺酸钠、乙基己基磺酸钠、及其组合。

[0417] 助洗剂和共助洗剂

[0418] 洗涤剂组合物可以包含按重量计约 0% -65%，例如约 5% 至约 45% 的洗涤剂助洗剂或共助洗剂、或其混合物。在洗涤餐具洗涤剂中，助洗剂的水平典型地是 40% -65%，特别是 50% -65%。助洗剂和 / 或共助洗剂可以具体是形成具有 Ca 和 Mg 的水溶性复合物的螯合剂。可以利用本领域中已知的用于在衣物洗涤剂中使用的任何助洗剂和 / 或共助洗剂。助洗剂的非限制性实例包括沸石、二磷酸盐（焦磷酸盐）、三磷酸盐例如三磷酸钠 (STP 或 STPP)、碳酸盐例如碳酸钠、可溶性硅酸盐例如硅酸钠、层状硅酸盐（例如来自赫斯特公司 (Hoechst) 的 SKS-6）、乙醇胺例如 2-氨基乙-1-醇 (MEA)、二乙醇胺 (DEA, 也称为亚氨基二乙醇)、三乙醇胺 (TEA, 也称为 2, 2', 2''-次氨基三乙醇)、以及羧甲基菊粉 (CMI)、及其组合。

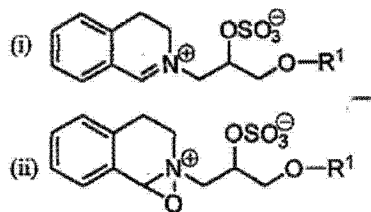
[0419] 洗涤剂组合物还可以包含按重量计 0% -20%，例如约 5% 至约 10% 的洗涤剂共助洗剂、或其混合物。洗涤剂组合物可以单独地包括一种共助洗剂，或与一种助洗剂，例如沸石助洗剂组合。共助洗剂的非限制性实例包括聚丙烯酸酯的均聚物或其共聚物，例如聚（丙烯酸）(PAA) 或共聚（丙烯酸 / 马来酸）(PAA/PMA)。另外的非限制性实例包括柠檬酸盐，螯合剂，例如氨基羧酸盐、氨基多羧酸盐和膦酸盐，以及烷基-或链烯基琥珀酸。另外的具体实例包括 2, 2', 2''-次氨基三乙酸 (NTA)、乙二胺四乙酸 (EDTA)、二亚乙基三胺五乙酸 (DTPA)、亚氨基二丁二酸 (iminodisuccinic acid) (IDS)、乙二胺-N, N'-二丁二酸 (EDDS)、甲基甘氨酸二乙酸 (MGDA)、谷氨酸-N, N-二乙酸 (GLDA)、1-羟基乙烷-1, 1-二膦酸 (HEDP)、乙二胺四-(亚甲基膦酸) (EDTMPA)、二亚乙基三胺五(亚甲基膦酸) (DTPMPA 或 DTMPA)、N-(2-羟乙基)亚氨基二乙酸 (EDG)、天冬氨酸-N-单乙酸 (ASMA)、天冬氨酸-N, N-二乙酸 (ASDA)、天冬氨酸-N-单丙酸 (ASMP)、亚氨基二丁二酸 (iminodisuccinic acid) (IDA)、N-(2-磺甲基)-天冬氨酸 (SMAS)、N-(2-磺乙基)-天冬氨酸 (SEAS)、N-(2-磺甲基)-谷氨酸 (SMGL)、N-(2-磺乙基)-谷氨酸 (SEGL)、N-甲基亚氨基二乙酸 (MIDA)、 α -丙氨酸-N, N-二乙酸 (α -ALDA)、丝氨酸-N, N-二乙酸 (SEDA)、异丝氨酸-N, N-二乙酸 (ISDA)、苯丙氨酸-N, N-二乙酸 (PHDA)、邻氨基苯甲酸-N, N-二乙酸 (ANDA)、磺胺酸-N, N-二乙酸 (SLDA)、牛磺酸-N, N-二乙酸 (TUDA) 以及磺甲基-N, N-二乙酸 (SMDA)、N-(2-羟乙基)-亚乙基二胺-N, N', N'-三乙酸盐 (HEDTA)、二乙醇甘氨酸 (DEG)、二亚乙基三胺五(亚甲基膦酸) (DTPMP)、氨基三(亚甲基膦酸) (ATMP)、及其组合和盐。另外的示例性助洗剂和 / 或共助洗剂描述于例如 WO 09/102854、US 5977053 中。

[0420] 漂白系统

[0421] 该洗涤剂可以包括按重量计 0% -50%，例如约 0.1% 至约 25% 的漂白系统。可以利用本领域中已知的用于在衣物洗涤剂中使用的任何漂白系统。适合的漂白系统组分包括漂白催化剂，光漂白剂 (photobleach)，漂白活化剂，过氧化氢源（例如过碳酸钠和过硼酸钠），预成型的过酸及其混合物。适合的预成型过酸包括，但不限于：过氧羧酸及盐，过碳酸及盐，过白啶酸 (perimidic acid) 及盐，过氧单硫酸及盐（例如过硫酸氢钾 (Oxone (R))），及其混合物。漂白系统的非限制性实例包括基于过氧化物的漂白系统，该系统可以包括例如

一种与过酸形成漂白活化剂组合的无机盐,包括碱金属盐,例如过硼酸盐(通常是单水合物或四水合物)、过碳酸盐、过硫酸盐、过磷酸盐、过硅酸盐的钠盐。术语漂白活化剂在此意指一种与过氧化物漂白剂(像过氧化氢)反应以形成过酸的化合物。以此方式形成的过酸构成活化的漂白剂。有待在此使用的适合漂白活化剂包括属于酯酰胺、酰亚胺或酸酐类别的那些。适合的实例是四乙酰基乙二胺(TAED)、4-[(3,5,5-三甲基己酰)氧基]苯磺酸钠(ISONOBS)、二过氧月桂酸、4-(十二酰基氧基)苯磺酸盐(LOBS)、4-(癸酰基氧基)苯磺酸盐、4-(癸酰基氧基)苯甲酸盐(DOBS)、4-(壬酰基氧基)-苯磺酸盐(NOBS)、和/或披露于WO 98/17767中的那些。感兴趣的漂白活化剂的具体家族披露于EP 624154中,并且在那个家族中特别优选的是乙酰柠檬酸三乙酯(ATC)。ATC或短链甘油三酸酯(像三醋汀)具有以下优点,它是环境友好的,因为它最终降解为柠檬酸和醇。此外,乙酰柠檬酸三乙酯和三醋汀在存储时在产品中具有良好的水解稳定性,并且它是一种有效的漂白活化剂。最后,ATC为洗衣添加剂提供一种良好的助洗能力。可替代地,漂白系统可以包括例如酰胺、酰亚胺、或酞型的过氧酸。漂白系统还可以包括过酸,例如6-(苯二甲酰亚氨基)过己酸(PAP)。漂白系统还可以包括一种漂白催化剂。在一些实施例中,漂白组分可以是选自下组的有机催化剂,该组由以下各项组成:具有下式的有机催化剂:

[0422]



[0423] (iii) 及其混合物;其中每个 R^1 独立地是包含从9至24个碳的支链烷基基团或包含从11至24个碳的直链烷基基团,优选地,每个 R^1 独立地是包含从9至18个碳的支链烷基基团或包含从11至18个碳的直链烷基基团,更优选地,每个 R^1 独立地选自下组,该组由以下各项组成:2-丙基庚基、2-丁基辛基、2-戊基壬基、2-己基癸基、正-十二烷基、正-十四烷基、正-十六烷基、正-十八烷基、异-壬基、异-癸基、异-十三烷基和异-十五烷基。其他示例性漂白系统描述于例如WO 2007/087258、WO 2007/087244、WO 2007/087259以及WO 2007/087242中。适合的光漂白剂可以例如是磺化的酞菁锌

[0424] 聚合物

[0425] 该洗涤剂可以包括按重量计0%-10%,例如0.5%-5%、2%-5%、0.5%-2%或0.2%-1%的一种聚合物。可以利用本领域中已知的用于在洗涤剂中使用的任何聚合物。聚合物可以作为如以上提到的共助洗剂起作用,或可以提供抗再沉积、纤维保护、污物释放、染料转移抑制、油污清洁和/或防沫特性。一些聚合物可以具有多于一种的以上提到的特性和/或多于一种的以下提到的基序(motif)。示例性聚合物包括(羧甲基)纤维素(CMC)、聚(乙烯醇)(PVA)、聚(乙烯吡咯烷酮)(PVP)、聚(乙二醇)或聚(环氧乙烷)(PEG)、乙氧基化的聚(亚乙基亚胺)、羧甲基菊粉(CMI)、和聚羧化物,例如PAA、PAA/PMA、聚-天冬氨酸、和甲基丙烯酸月桂酯/丙烯酸共聚物、疏水改性CMC(HM-CMC)和硅酮、对苯二甲酸和低聚乙二醇的共聚物、聚(对苯二甲酸乙二酯)和聚(氧乙烯对苯二甲酸乙二酯)的共聚物(PET-POET)、PVP、聚(乙烯基咪唑)(PVI)、聚(乙烯吡啶-N-氧化物)(PVPO或PVPNO)以

及聚乙烯吡咯烷酮-乙烯基咪唑 (PVPVI)。另外的示例性聚合物包括磺化的聚羧酸酯、聚环氧乙烷和聚环氧丙烷 (PEO-PPG) 以及乙氧基磺酸二季铵盐。其他示例性聚合物披露于例如 WO 2006/130575 中。也考虑了以上提到的聚合物的盐。

[0426] 织物调色剂

[0427] 本发明的洗涤剂组合物还可以包括织物调色剂,例如染料或色素,当配制在洗涤剂组合物中时,当所述织物与一种洗液接触时织物调色剂可以沉积在织物上,该洗液包括所述洗涤剂组合物,并且因此通过可见光的吸收/反射改变所述织物的色彩。荧光增白剂发射至少一些可见光。相比之下,因为它们吸收至少一部分可见光光谱,所以织物调色剂改变表面的色彩。适合的织物调色剂包括染料和染料-黏土复合物,并且还可以包括色素。适合的染料包括小分子染料和聚合物染料。适合的小分子染料包括选自下组的小分子染料,该组由落入颜色索引 (Colour Index) (C. I.) 分类的以下染料组成:直接蓝、直接红、直接紫、酸性蓝、酸性红、酸性紫、碱性蓝、碱性紫和碱性红、或其混合物,例如描述于 WO 2005/03274、WO 2005/03275、WO 2005/03276 和 EP 1876226 中(将其通过引用结合在此)。洗涤剂组合物优选包括从约 0.00003wt% 至约 0.2wt%、从约 0.00008wt% 至约 0.05wt%、或甚至从约 0.0001wt% 至约 0.04wt% 的织物调色剂。该组合物可以包括从 0.0001wt% 至 0.2wt% 的织物调色剂,当该组合物处于单位剂量袋的形式时,这可以是尤其优选的。适合的调色剂还披露于例如 WO 2007/087257 和 WO 2007/087243 中。

[0428] 另外的酶

[0429] 洗涤剂添加剂连同洗涤剂组合物可以包括一种或多种另外的酶,例如蛋白酶、脂肪酶、角质酶、淀粉酶、碳水化合物酶、纤维素酶、果胶酶、甘露聚糖酶、阿拉伯糖酶、半乳聚糖酶、木聚糖酶、氧化酶,例如漆酶、和/或过氧化物酶。

[0430] 一般而言,一种或多种所选酶的性质应与选定的洗涤剂相容(即,最优 pH,与其他酶和非酶成分的相容性,等等),并且该一种或多种酶应以有效量存在。

[0431] 纤维素酶:适合的纤维素酶包括细菌或真菌来源的那些。包括化学修饰的或蛋白工程化的突变体。适合的纤维素酶包括来自芽孢杆菌属、假单胞菌属、腐质霉属、镰刀菌属、梭孢壳属、枝顶孢霉属的纤维素酶,例如,从在 US 4,435,307、US 5,648,263、US 5,691,178、US 5,776,757 以及 WO 89/09259 中披露的特异腐质霉、嗜热毁丝霉和尖镰孢产生的真菌纤维素酶。

[0432] 尤其适合的纤维素酶是具有颜色保护益处的碱性或中性纤维素酶。此类纤维素酶的实例是描述于 EP 0 495 257、EP 0 531 372、WO 96/11262、WO 96/29397、WO 98/08940 中的纤维素酶。其他实例为纤维素酶变体,例如在 WO 94/07998、EP 0 531 315、US 5,457,046、US 5,686,593、US 5,763,254、WO 95/24471、WO 98/12307 以及 PCT/DK98/00299 中描述的那些。

[0433] 展现内切- β -1,4-葡聚糖酶活性的纤维素酶 (EC 3.2.1.4) 的实例是已经描述于 WO 02/099091 中的那些。

[0434] 纤维素酶的其他实例包括描述于 WO 96/29397 中的家族 45 纤维素酶,并且特别是在对应于 WO 02/099091 的 SEQ ID NO:8 中的以下位置的一个或多个位置处具有取代、插入和/或缺失的其变体:2、4、7、8、10、13、15、19、20、21、25、26、29、32、33、34、35、37、40、42、42a、43、44、48、53、54、55、58、59、63、64、65、66、67、70、72、76、79、80、82、84、86、88、90、

91、93、95、95d、95h、95j、97、100、101、102、103、113、114、117、119、121、133、136、137、138、139、140a、141、143a、145、146、147、150e、150j、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160c、160e、160k、161、162、164、165、168、170、171、172、173、175、176、178、181、183、184、185、186、188、191、192、195、196、200、和 / 或 20, 优选选自 P19A、G20K、Q44K、N48E、Q119H 或 Q146R。

[0435] 可商购的纤维素酶包括 Celluzyme™、和 Carezyme™(诺维信公司)、Clazinase™、和 Puradax HA™(杰能科国际有限公司 (Genencor International Inc.))、以及 KAC-500(B)™(花王株式会社 (Kao Corporation))。

[0436] **蛋白酶**: 适合的蛋白酶包括细菌、真菌、植物、病毒或动物起源的那些, 例如植物或微生物起源。优选微生物起源。包括化学修饰的或蛋白工程化的突变体。它可以是一种碱性蛋白酶, 例如丝氨酸蛋白酶或金属蛋白酶。丝氨酸蛋白酶可以例如是 S1 家族 (如胰蛋白酶) 或 S8 家族 (如枯草杆菌蛋白酶)。金属蛋白酶可以例如是来自例如家族 M4 的嗜热菌蛋白酶或其他金属蛋白酶, 例如来自 M5、M7 或 M8 家族的那些。

[0437] 术语“枯草杆菌酶”是指根据斯艾森 (Siezen) 等人, 蛋白质工程学 (Protein Engng.)4(1991)719-737 和斯艾森 (Siezen) 等人, 蛋白质科学 (Protein Science)6(1997)501-523 的丝氨酸蛋白酶亚组。丝氨酸蛋白酶是特征为在活性位点具有与底物形成共价加合物的丝氨酸的蛋白酶的一个亚类。枯草杆菌酶可以划分为 6 个亚部, 即, 枯草杆菌蛋白酶家族、嗜热蛋白酶 (Thermitase) 家族、蛋白酶 K 家族、羊毛硫抗生素肽酶 (Lantibiotic peptidase) 家族、Kexin 家族和 Pyrolysin 家族。

[0438] 枯草杆菌酶的实例是来源于芽孢杆菌属的那些, 例如描述于 US 7262042 和 WO 09/021867 中的迟缓芽孢杆菌、嗜碱芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、短小芽孢杆菌和吉氏芽孢杆菌; 和描述于 WO 89/06279 中的枯草杆菌蛋白酶 lentus、枯草杆菌蛋白酶 Novo、枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg、地衣芽孢杆菌、枯草杆菌蛋白酶 BPN'、枯草杆菌蛋白酶 309、枯草杆菌蛋白酶 147 和枯草杆菌蛋白酶 168 以及描述于 (WO 93/18140) 中的蛋白酶 PD138。其他有用的蛋白酶可以是描述于 WO 92/175177、WO 01/016285、WO 02/026024 以及 WO 02/016547 中的那些。胰蛋白酶样蛋白酶的实例是胰蛋白酶 (例如猪或牛来源的) 和镰刀菌蛋白酶 (描述于 WO 89/06270、WO 94/25583 和 WO 05/040372 中), 以及衍生自纤维单胞菌 (Cellulomonas) 的胰凝乳蛋白酶 (描述于 WO 05/052161 和 WO 05/052146 中)。

[0439] 进一步优选的蛋白酶是来自迟缓芽孢杆菌 DSM 5483 的碱性蛋白酶 (如在例如 WO 95/23221 中所述)、及其变体 (在 WO 92/21760、WO 95/23221、EP 1921147 以及 EP 1921148 中描述的)。

[0440] 金属蛋白酶的实例是如描述于 WO 07/044993(杰能科国际公司 (Genencor Int.)) 中的中性金属蛋白酶, 例如衍生自解淀粉芽孢杆菌的那些。

[0441] 有用的蛋白酶的实例是于以下各项中的变体: WO 92/19729、WO 96/034946、WO 98/20115、WO 98/20116、WO 99/011768、WO 01/44452、WO 03/006602、WO 04/03186、WO 04/041979、WO 07/006305、WO 11/036263、WO 11/036264, 尤其是在以下位置的一个或多个中具有取代的变体: 3、4、9、15、27、36、57、68、76、87、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、106、118、120、123、128、129、130、160、167、170、194、195、199、205、206、217、218、222、224、232、235、236、245、248、252 以及 274, 使用 BPN' 编号。更优选的枯草杆菌酶变体可以包

括以下突变 :S3T、V4I、S9R、A15T、K27R、*36D、V68A、N76D、N87S、R、*97E、A98S、S99G、D、A、S99AD、S101G、M、R S103A、V104I、Y、N、S106A、G118V、R、H120D、N、N123S、S128L、P129Q、S130A、G160D、Y167A、R170S、A194P、G195E、V199M、V205I、L217D、N218D、M222S、A232V、K235L、Q236H、Q245R、N252K、T274A(使用 BPN' 编号)。

[0442] 适合的可商购蛋白酶包括以下列商品名出售的那些 : **Alcalase®**、**Duralase™**、**Durazym™**、**Relase®**、**Relase® Ultra**、**Savinase®**、**Savinase® Ultra**、**Primase®**、**Polarzyme®**、**Kannase®**、**Liquanase®**、**Liquanase® Ultra**、**Ovozyme®**、**Coronase®**、**Coronase® Ultra**、**Neutrase®**、**Everlase®**

以及 **Esperase®** (诺维信公司), 以下列商品名出售的那些 : **Maxatase®**、**Maxacal®**、**Maxapem®**、**Purafect®**、**Purafect Prime®**、**P r e f e r e n z™**、**Purafect MA®**、**Purafect Ox®**、**Purafect OxP®**、**Puramax®**、**Properase®**、**Effectenz™**、**FN2®**、**FN3®**、**FN4®**、**Excellase®**、**Opticlean®** 以及 **Optimase®** (丹尼斯克 / 杜邦公司 (Danisco/DuPont))、**Axapem™** (吉斯特布罗卡德斯公司 (Gist-Brocades N.V.))、**BLAP** (序列示于 US 5352604 的图 29 中) 及其变体 (汉高股份 (Henkel AG)) 以及来自花王株式会社 (Kao) 的 **KAP** (嗜碱芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶)。

[0443] 脂肪酶和角质酶: 适合的脂肪酶和角质酶包括细菌或真菌起源的那些。包括化学修饰的或蛋白质工程化的突变酶。实例包括来自嗜热真菌属的脂肪酶, 例如如描述于 EP 258068 和 EP 305216 中的来自疏绵状嗜热丝孢菌 (早先命名为疏棉状腐质霉); 来自腐质霉属的角质酶, 例如特异腐质霉 (WO 96/13580); 来自假单胞菌属的菌株的脂肪酶 (这些中的一些现在改名为伯克霍尔氏菌属), 例如产碱假单胞菌或类产碱假单胞菌 (EP 218272)、洋葱假单胞菌 (EP 331376)、假单胞菌属菌株 SD705 (WO 95/06720&WO 96/27002)、*P. wisconsinensis* (WO 96/12012); **GDSL-型链霉菌属脂肪酶** (WO 10/065455); 来自稻瘟病菌的角质酶 (WO 10/107560); 来自门多萨假单胞菌的角质酶 (US 5, 389, 536); 来自褐色嗜热裂孢菌 (*Thermobifida fusca*) 的脂肪酶 (WO 11/084412); 嗜热脂肪土芽孢杆菌脂肪酶 (WO 11/084417); 来自枯草芽孢杆菌的脂肪酶 (WO 11/084599); 以及来自灰色链霉菌 (WO 11/150157) 和始旋链霉菌 (*S. pristinaespiralis*) 的脂肪酶 (WO 12/137147)。

[0444] 其他实例是脂肪酶变体, 例如描述于 EP 407225、WO 92/05249、WO 94/01541、WO 94/25578、WO 95/14783、WO 95/30744、WO 95/35381、WO 95/22615、WO 96/00292、WO 97/04079、WO 97/07202、WO 00/34450、WO 00/60063、WO 01/92502、WO 07/87508 以及 WO 09/109500 中的那些。

[0445] 优选的商业化脂肪酶产品包括 **Lipolase™**、**Lipex™**; **Lipolex™** 和 **Lipoclean™** (诺维信公司), **Lumafast** (来自杰能科公司 (Genencor)) 以及 **Lipomax** (来自吉斯特公司 (Gist-Brocades))。

[0446] 再其他实例是有时称为酰基转移酶或过水解酶的脂肪酶, 例如与南极假丝酵母 (*Candida antarctica*) 脂肪酶 A 具有同源性的酰基转移酶 (WO 10/111143)、来自耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis*) 的酰基转移酶 (WO 05/56782)、来自 CE 7 家族的过水解

酶 (WO 09/67279) 以及耻垢分枝杆菌过水解酶的变体 (特别是来自亨斯迈纺织品染化有限公司 (Huntsman Textile Effects Pte Ltd) 的商业产品 Gentle Power Bleach 中所用的 S54V 变体) (WO 10/100028)。

[0447] 淀粉酶: 可以与本发明的 XX 一起使用的适合的淀粉酶可以是 α -淀粉酶或葡糖淀粉酶并且可以具有细菌或真菌起源。包括化学修饰的或蛋白工程化的突变体。淀粉酶包括例如获得自芽孢杆菌属的 α -淀粉酶, 例如 GB 1, 296, 839 中更详细描述的地衣芽孢杆菌具体菌株的 α -淀粉酶。

[0448] 适合的淀粉酶包括具有 WO 95/10603 中的 SEQ ID NO:3 的淀粉酶或其与 SEQ ID NO:3 具有 90% 序列一致性的变体。优选变体描述于 WO 94/02597、WO 94/18314、WO 97/43424 以及 WO 99/019467 的 SEQ ID NO:4 中, 例如在以下位置的一个或多个中具有取代的变体: 15、23、105、106、124、128、133、154、156、178、179、181、188、190、197、201、202、207、208、209、211、243、264、304、305、391、408 以及 444。

[0449] 不同的适合的淀粉酶包括具有 WO 02/010355 中的 SEQ ID NO:6 的淀粉酶或其与 SEQ ID NO:6 具有 90% 序列一致性的变体。SEQ ID NO:6 的优选变体是在位置 181 和 182 中具有一个缺失并且在位置 193 中具有一个取代的那些。

[0450] 其他适合的淀粉酶是包含示于 WO 2006/066594 的 SEQ ID NO:6 中的来源于解淀粉芽孢杆菌的 α -淀粉酶的残基 1-33 和示于 WO 2006/066594 的 SEQ ID NO:4 中的地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶的残基 36-483 的杂合 α -淀粉酶或其具有 90% 序列一致性的变体。这一杂合 α -淀粉酶的优选变体是在以下位置中的一个或多个中具有取代、缺失或插入的那些: G48、T49、G107、H156、A181、N190、M197、I201、A209 以及 Q264。包含示于 WO 2006/066594 的 SEQ ID NO:6 中的来源于解淀粉芽孢杆菌的 α -淀粉酶的残基 1-33 和 SEQ ID NO:4 的残基 36-483 的杂合 α -淀粉酶的最优选的变体是具有以下取代的那些:

[0451] M197T;

[0452] H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S; 或

[0453] G48A+T49I+G107A+H156Y+A181T+N190F+I201F+A209V+Q264S。

[0454] 适合的另外的淀粉酶是具有 WO 99/019467 中的 SEQ ID NO:6 的淀粉酶或其与 SEQ ID NO:6 具有 90% 序列一致性的变体。SEQ ID NO:6 的优选变体是在以下位置中的一个或多个中具有取代、缺失或插入的那些: R181、G182、H183、G184、N195、I206、E212、E216 以及 K269。特别优选的淀粉酶是在位置 R181 和 G182 或位置 H183 和 G184 中具有缺失的那些。

[0455] 可以使用的另外的淀粉酶是具有 WO 96/023873 的 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:7 的那些或其与 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:7 具有 90% 序列一致性的变体。SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:7 的优选变体是在以下位置中的一个或多个中具有取代、缺失或插入的那些: 140、181、182、183、184、195、206、212、243、260、269、304 以及 476。最优选的变体是在位置 181 和 182 或位置 183 和 184 中具有缺失的那些。SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:7 的最优选的淀粉酶变体是在位置 183 和 184 中具有缺失并且在位置 140、195、206、243、260、304 以及 476 中的一个或多个中具有取代的那些。

[0456] 可以使用的其他淀粉酶是具有 WO 08/153815 中的 SEQ ID NO:2、WO 01/66712 中的 SEQ ID NO:10 的淀粉酶或与 WO 08/153815 的 SEQ ID NO:2 具有 90% 序列一致性或与

WO 01/66712 中的 SEQ ID NO:10 具有 90% 序列一致性的其变体。WO 01/66712 中的 SEQ ID NO:10 的优选变体是在以下位置中的一个或多个中具有取代、缺失或插入的那些：176、177、178、179、190、201、207、211 以及 264。

[0457] 另外的适合的淀粉酶是具有 WO 09/061380 中的 SEQ ID NO:2 的淀粉酶或其与 SEQ ID NO:2 具有 90% 序列一致性的变体。SEQ ID NO:2 的优选变体是在以下位置中的一个或多个中具有 C 末端的截短和 / 或取代、缺失或插入的那些：Q87、Q98、S125、N128、T131、T165、K178、R180、S181、T182、G183、M201、F202、N225、S243、N272、N282、Y305、R309、D319、Q320、Q359、K444 以及 G475。SEQ ID NO:2 的更加优选的变体是在以下位置中的一个或多个中具有取代的那些：Q87E、R、Q98R、S125A、N128C、T131I、T165I、K178L、T182G、M201L、F202Y、N225E、R、N272E、R、S243Q、A、E、D、Y305R、R309A、Q320R、Q359E、K444E 以及 G475K 和 / 或位置 R180 和 / 或 S181 或 T182 和 / 或 G183 的缺失。SEQ ID NO:2 的最优选的淀粉酶变体是具有以下取代的那些：

[0458] N128C+K178L+T182G+Y305R+G475K；

[0459] N128C+K178L+T182G+F202Y+Y305R+D319T+G475K；

[0460] S125A+N128C+K178L+T182G+Y305R+G475K；或

[0461] S125A+N128C+T131I+T165I+K178L+T182G+Y305R+G475K，其中这些变体是 C- 末端截短的并且任选地进一步在位置 243 处包括取代和 / 或在位置 180 和 / 或位置 181 处包括缺失。

[0462] 其他适合的淀粉酶是具有 WO 01/66712 中的 SEQ ID NO:12 的 α -淀粉酶或与 SEQ ID NO:12 具有至少 90% 序列一致性的变体。优选的淀粉酶变体是在 WO 01/66712 中的 SEQ ID NO:12 的以下位置中的一个或多个中具有取代、缺失或插入的那些：R28、R118、N174；R181、G182、D183、G184、G186、W189、N195、M202、Y298、N299、K302、S303、N306、R310、N314；R320、H324、E345、Y396、R400、W439、R444、N445、K446、Q449、R458、N471、N484。特别优选的淀粉酶包括具有 D183 和 G184 的缺失并且具有 R118K、N195F、R320K 及 R458K 的取代的变体，以及另外在选自下组的一个或多个位置中具有取代的变体：M9、G149、G182、G186、M202、T257、Y295、N299、M323、E345 以及 A339，最优选的是另外在所有这些位置中具有取代的变体。

[0463] 其他实例是例如描述于 WO 2011/098531、WO 2013/001078 及 WO2013/001087 中的那些淀粉酶变体。

[0464] 可商购的淀粉酶是 Duramyl™、Termamyl™、Fungamyl™、Stainzyme™、Stainzyme Plus™、Natalase™、Liquozyme X 和 BAN™（来自诺维信公司），以及 Rapidase™、Purastar™/Effectenz™、Powerase 和 Preferenz S100（来自杰能科国际有限公司 / 杜邦）。

[0465] 过氧化物酶 / 氧化酶：适合的过氧化物酶 / 氧化酶包括植物、细菌或真菌来源的那些。包括化学修饰的或蛋白工程化的突变体。有用的过氧化物酶的实例包括来自鬼伞属，例如来自灰盖鬼伞的过氧化物酶，以及其变体，如在 WO 93/24618、WO 95/10602、以及 WO 98/15257 中描述的那些。

[0466] 可商购的过氧化物酶包括 Guardzyme™（诺维信公司）。

[0467] 这一种或多种洗涤剂酶可以通过添加包括一种或多种酶的独立添加剂，或通过添加包括所有这些酶的组合添加剂而被包括于洗涤剂组合物中。本发明的洗涤剂添加剂，即

独立添加剂或组合添加剂,可以被配制为,例如颗粒、液体、浆料等。优选的洗涤剂添加剂配制品是颗粒,尤其是非尘颗粒;液体,尤其是稳定化的液体;或浆料。

[0468] 无尘颗粒可以例如如在 US 4,106,991 和 4,661,452 中所披露而产生,并且可以任选地通过本领域已知的方法进行涂覆。蜡状包衣材料的实例为具有 1000 至 20000 的平均摩尔重量的聚(环氧乙烷)产物(聚乙二醇,PEG);具有从 16 至 50 个环氧乙烷单元的乙氧化壬基苯酚;乙氧化脂肪醇,其中该醇含有 12 至 20 个碳原子,并且其中具有 15 至 80 个环氧乙烷单元;脂肪醇;脂肪酸;以及脂肪酸的甘油单酯、和甘油二酯、以及甘油三酯。适用于通过流化床技术应用的成膜包衣材料的实例在 GB 1483591 中给出。液体酶制剂可以例如通过根据已确立的方法添加多元醇(如丙二醇)、糖或糖醇、乳酸或硼酸而稳定化。受保护的酶可以根据 EP 238,216 中披露的方法制备。

[0469] 辅料

[0470] 还可以利用本领域中已知的用于在衣物洗涤剂中使用的任何洗涤剂组分。其他任选的洗涤剂组分包括防腐剂、防缩剂、抗污物再沉积剂、抗皱剂、杀细菌剂、粘合剂、腐蚀抑制剂、崩解剂(disintegrant)/崩解试剂(disintegration agent)、染料、酶稳定剂(包括硼酸、硼酸盐、CMC、和/或多元醇如丙二醇)、织物整理剂(包括黏土)、填充剂/加工助剂、荧光剂增白剂/光增亮剂、增泡剂、泡沫(泡)调节剂、香料、污物助悬剂、软化剂、抑泡剂、酶暗抑制剂、以及芯吸剂,单独抑或组合使用。可以利用本领域中已知的用于在衣物洗涤剂中使用的任何成分。此类成分的选择完全在普通技术人员的技术范围内。

[0471] 分散剂:本发明的洗涤剂组合物还可以包含分散剂。具体地说,粉状洗涤剂可以包括分散剂。适合的水溶性有机材料包括均聚合或共聚合的酸或其盐,其中多羧酸包括至少两个羧基,这两个羧基被不超过两个碳原子彼此分开。适合的分散剂例如描述于粉状洗涤剂,表面活性剂科学系列(Powdered Detergents, Surfactant science series),第 71 卷中,马塞尔·德克尔公司(Marcel Dekker, Inc.)。

[0472] 染料转移抑制剂:本发明的洗涤剂组合物还可以包括一种或多种染料转移抑制剂。适合的聚合物染料转移抑制剂包括但不限于不限于聚乙烯吡咯烷酮聚合物、多胺 N-氧化物聚合物、N-乙烯吡咯烷酮和 N-乙烯基咪唑的共聚物、聚乙烯噁唑烷酮和聚乙烯咪唑或其混合物。当存在于主题组合物中时,染料转移抑制剂可以按组合物重量计的以下水平存在:从约 0.0001%至约 10%、从约 0.01%至约 5%或甚至从约 0.1%至约 3%。

[0473] 荧光增白剂:本发明的洗涤剂组合物将优选地还包含另外的组分,这些组分可以给正在清洁的物品着色,例如荧光增白剂或光增亮剂。其中增亮剂优选以约 0.01%至约 0.5%的水平存在。在本发明的组合物中可以使用适合用于在衣物洗涤剂组合物中使用的任何荧光增白剂。最常用的荧光增白剂是属于以下类别的那些:二氨基-磺酸衍生物、二芳基吡啶啉衍生物和二苯基-联苯乙烯基衍生物。荧光增白剂的二氨基-磺酸衍生物型的实例包括以下各项的钠盐:4,4'-双-(2-二乙醇氨基-4-苯胺基-s-三嗪-6-基氨基)芪-2,2'-二磺酸盐;4,4'-双-(2,4-二苯胺基-s-三嗪-6-基氨基)芪-2,2'-二磺酸盐;4,4'-双-(2-苯胺基-4(N-甲基-N-2-羟基-乙氨基)-s-三嗪-6-基氨基)芪-2,2'-二磺酸盐;4,4'-双-(4-苯基-2,1,3-三唑-2-基)芪-2,2'-二磺酸盐;4,4'-双-(2-苯胺基-4(1-甲基-2-羟基-乙氨基)-s-三嗪-6-基氨基)芪-2,2'-二磺酸盐和 2-(二苯乙烯基(stilbyl)-4"-萘-1,2':4,5)-1,2,3-三唑-2"-磺酸盐。优选的荧光增白剂是可从

汽巴-嘉基股份有限公司 (Ciba-Geigy AG) (巴塞尔, 瑞士) 获得的天来宝 (Tinopal) DMS 和天来宝 CBS。天来宝 DMS 是 4, 4'-双-(2-吗啉基-4-苯胺基-s-三嗪-6-基氨基) 芪二磺酸盐的二钠盐。天来宝 CBS 是 2, 2'-双-(苯基-苯乙烯基) 二磺酸盐的二钠盐。还优选荧光增白剂, 是可商购的 Parawhite KX, 由派拉蒙矿物与化学 (Paramount Minerals and Chemicals), 孟买 (Mumbai), 印度 (India) 供应。适合用于本发明的其他荧光剂包括 1-3-二芳基吡啶啉和 7-氨基香豆素。适合的荧光增白剂水平包括从约 0.01wt%、从 0.05wt%、从约 0.1wt% 或甚至从约 0.2wt% 的较低水平至 0.5wt% 或甚至 0.75wt% 的较高水平。

[0474] 污物释放聚合物: 本发明的洗涤剂组合物还可以包括一种或多种污物释放聚合物, 这些污物释放聚合物有助于从织物, 例如棉的或聚酯基织物上除去污物, 特别是从聚酯基织物上除去疏水污物。污物释放聚合物可以例如是非离子型或阴离子型对苯二甲酸基聚合物、聚乙烯基己内酰胺和相关共聚物、乙烯基接枝共聚物、聚酯聚酰胺, 参见例如粉状洗涤剂, 表面活性剂科学系列第 71 卷第 7 章, 马塞尔·德克尔公司 (Marcel Dekker, Inc.)。另一种类型的污物释放聚合物是包括一个芯结构和连接至该芯结构的多个烷氧基化基团的两亲性烷氧基化油污清洁聚合物。芯结构可以包括聚烷基亚胺结构或聚烷醇胺结构, 如 WO 2009/087523 中详细描述 (将其通过引用结合在此)。此外, 任意接枝共聚物是适合的污物释放聚合物。适合的接枝共聚物更详细地描述于 WO 2007/138054、WO 2006/108856 以及 WO 2006/113314 中 (将其通过引用结合在此)。其他污物释放聚合物是取代的多糖结构, 尤其是取代的纤维素结构, 例如改性纤维素衍生物, 例如 EP 1867808 或 WO 2003/040279 中描述的那些 (将二者都通过引用结合在此)。适合的纤维素聚合物包括纤维素、纤维素醚、纤维素酯、纤维素酰胺及其混合物。适合的纤维素聚合物包括阴离子改性的纤维素、非离子改性的纤维素、阳离子改性的纤维素、两性离子改性的纤维素、以及其混合物。适合的纤维素聚合物包括甲基纤维素、羧甲基纤维素、乙基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、酯羧甲基纤维素、以及其混合物。

[0475] 抗再沉积剂: 本发明的洗涤剂组合物还可以包括一种或多种抗再沉积剂, 例如羧甲基纤维素 (CMC)、聚乙烯醇 (PVA)、聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)、聚环氧乙烷和 / 或聚乙二醇 (PEG)、丙烯酸的均聚物、丙烯酸和马来酸的共聚物、和乙氧基化的聚乙亚胺。以上在污物释放聚合物下描述的基于纤维素的聚合物的功能还可以是抗再沉积剂。

[0476] 其他适合的辅料包括但不限于防缩剂、抗皱剂、杀细菌剂、粘合剂、载体、染料、酶稳定剂、织物软化剂、填充剂、泡沫调节剂、助水溶剂、香料、色素、抑泡剂、溶剂、和用于液体洗涤剂的结构剂和 / 或结构弹性剂。

[0477] 洗涤剂产品的配制品

[0478] 本发明的洗涤剂组合物可以处于任何常规形式, 例如棒、均匀的片剂、具有两个或更多个层的片剂、具有一个或多个室的袋、规则的或压缩的粉、颗粒、膏、凝胶、或规则压缩的或浓缩的液体。存在多种洗涤剂配制品形式, 例如层 (相同或不同相)、袋以及用于机械给料装置的形式。

[0479] 袋可以被配置为单个或多个的室。它可以具有适合保存该组合物的任何形式、形状和材料, 例如在与水接触之前, 不允许该组合物从袋中释放出来。袋由封装内体积的水溶性膜制成。可以将所述内体积分为袋的室。优选的膜是形成膜或片的聚合材料, 优选是聚合物。优选的聚合物、共聚物或其衍生物选自聚丙烯酸酯、和水溶性丙烯酸酯共聚物、甲基

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

[0480] 可以由水可溶的袋中或片剂的不同层中的室来将洗涤剂成分物理地彼此分开。由此可以避免组分之间的负面的存储相互作用。在洗涤溶液中,每个室的不同溶解曲线还可以引起选择的组分的延迟溶解。

[0481] 非单位剂量的液体或凝胶洗涤剂可以是水性的,典型地包括按重量计至少 20% 并且高达 95% 的水,例如高达约 70% 的水、高达约 65% 的水、高达约 55% 的水、高达约 45% 的水、高达约 35% 的水。包括但不限于链烷醇、胺、二醇、醚以及多元醇的其他类型的液体可以被包括在水性液体或凝胶中。水性液体或凝胶洗涤剂可以包括从 0% -30% 的有机溶剂。液体或凝胶洗涤剂可以是非水性的。

[0482] 洗衣皂条

[0483] 本发明的酶可以被添加至洗衣皂条中并且用于手洗洗衣、织物和/或纺织品。术语洗衣皂条包括洗衣条、皂条、组合条(combo bar)、合成洗涤剂条以及洗涤剂条。条的类型通常区别在于它们包含的表面活性剂的类型,并且术语洗衣皂条包括包含来自脂肪酸的肥皂和/或合成皂的那些。洗衣皂条具有在室温下为固体而非液体、凝胶或粉末的物理形式。术语固体被定义为不随着时间显著变化的物理形式,即如果将一固体物体(例如洗衣皂条)放置于一个容器内部,该固体物体不发生改变来填充它被放置于其中的容器。条典型地是处于条形的固体但是可以处于其他固体形状,例如圆形或卵形。

[0484] 洗衣皂条可以包含一种或多种另外的酶,蛋白酶抑制剂例如肽醛类(或次硫酸盐加合物或半缩醛加合物),硼酸,硼酸盐,硼砂和/或苯基硼酸衍生物例如 4-甲酰基苯基硼酸,一种或多种肥皂或合成表面活性剂,多元醇例如甘油, pH 控制化合物例如脂肪酸、柠檬酸、乙酸和/或甲酸,和/或一价阳离子和有机阴离子的盐,其中该一价阳离子可以是例如 Na^+ 、 K^+ 或 NH_4^+ 并且该有机阴离子可以是例如甲酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐或乳酸盐,这样使得一价阳离子和有机阴离子的盐可以是例如甲酸钠。

[0485] 洗衣皂条还可以包含络合剂像 EDTA 和 HEDP,香料和/或不同类型的填充剂,表面活性剂例如阴离子型合成表面活性剂,助洗剂,聚合的污物释放剂,洗涤剂螯合剂,稳定剂,填充剂,染料,着色剂,染料转移抑制剂,烷氧基化的聚碳酸酯,抑泡剂,结构剂,粘合剂,浸出剂,漂白活化剂,粘土去污剂,抗再沉积剂,聚合分散剂,增白剂,织物柔软剂,香料和/或本领域已知的其他化合物。

[0486] 洗衣皂条可以在常规的洗衣皂条制造设备中进行加工,例如但不限制于:混合器、压条机例如双级真空压条机、挤出机、切割机、标识压模机(logo-stamper)、冷却隧道以及包装机。本发明不局限于通过任何单一方法制备洗衣皂条。可以在过程的不同阶段向肥皂

中添加本发明的预混料。例如,可以制备包含肥皂、酶、任选地一种或多种另外的酶、蛋白酶抑制剂以及一价阳离子和有机阴离子的盐的预混料并且然后将该混合物压条。可以同时添加作为例如处于液态的蛋白酶抑制剂的酶以及任选的另外的酶。除了混合步骤和压条步骤以外,该工艺还可以进一步包括研磨、挤出、切割、压模、冷却和 / 或包装的步骤。

[0487] 颗粒洗涤剂配制品

[0488] 如描述于 WO 09/092699、EP 1705241、EP 1382668、WO 07/001262、US 6472364、WO 04/074419 或 WO 09/102854 中的,可以配制颗粒洗涤剂。其他有用的洗涤剂配制品描述于以下各项中:WO 09/124162、WO 09/124163、WO 09/117340、WO 09/117341、WO 09/117342、WO 09/072069、WO 09/063355、WO 09/132870、WO 09/121757、WO 09/112296、WO 09/112298、WO 09/103822、WO 09/087033、WO 09/050026、WO 09/047125、WO 09/047126、WO 09/047127、WO 09/047128、WO 09/021784、WO 09/010375、WO 09/000605、WO 09/122125、WO 09/095645、WO 09/040544、WO 09/040545、WO 09/024780、WO 09/004295、WO 09/004294、WO 09/121725、WO 09/115391、WO 09/115392、WO 09/074398、WO 09/074403、WO 09/068501、WO 09/065770、WO 09/021813、WO 09/030632 以及 WO 09/015951。

[0489] WO 2011025615、WO 2011016958、WO 2011005803、WO 2011005623、WO 2011005730、WO 2011005844、WO 2011005904、WO 2011005630、WO 2011005830、WO 2011005912、WO 2011005905、WO 2011005910、WO 2011005813、WO 2010135238、WO 2010120863、WO 2010108002、WO 2010111365、WO 2010108000、WO 2010107635、WO 2010090915、WO 2010033976、WO 2010033746、WO 2010033747、WO 2010033897、WO 2010033979、WO 2010030540、WO 2010030541、WO 2010030539、WO 2010024467、WO 2010024469、WO 2010024470、WO 2010025161、WO 2010014395、WO 2010044905、WO 2010145887、WO 2010142503、WO 2010122051、WO 2010102861、WO 2010099997、WO 2010084039、WO 2010076292、WO 2010069742、WO 2010069718、WO 2010069957、WO 2010057784、WO 2010054986、WO 2010018043、WO 2010003783、WO 2010003792、WO 2011023716、WO 2010142539、WO 2010118959、WO 2010115813、WO 2010105942、WO 2010105961、WO 2010105962、WO 2010094356、WO 2010084203、WO 2010078979、WO 2010072456、WO 2010069905、WO 2010076165、WO 2010072603、WO 2010066486、WO 2010066631、WO 2010066632、WO 2010063689、WO 2010060821、WO 2010049187、WO 2010031607、WO 2010000636。

[0490] 洗涤方法

[0491] 本发明的洗涤剂组合物理想地适用于在洗衣应用中使用。因此,本发明包括一种洗涤织物的方法。该方法包括将有待洗涤的织物与包含根据本发明的洗涤剂组合物的清洁洗衣溶液接触的步骤。织物可以包括能够在常规消费者使用条件下被洗涤的任何织物。该溶液优选具有从约 5.5 至约 8 的 pH。可以在溶液中按以下浓度使用这些组合物:从约 100ppm,优选 500ppm 至约 15,000ppm。水温的范围典型地是从约 5°C 至约 90°C,包括约 10°C、约 15°C、约 20°C、约 25°C、约 30°C、约 35°C、约 40°C、约 45°C、约 50°C、约 55°C、约 60°C、约 65°C、约 70°C、约 75°C、约 80°C、约 85°C 以及约 90°C。水与织物之比典型地是从约 1:1 至约 30:1。

[0492] 在具体实施例中,在从约 5.0 至约 11.5 的 pH 下执行该洗涤方法,或在替代性实施

例中,甚至从约 6 至约 10.5,例如约 5 至约 11、约 5 至约 10、约 5 至约 9、约 5 至约 8、约 5 至约 7、约 5.5 至约 11、约 5.5 至约 10、约 5.5 至约 9、约 5.5 至约 8、约 5.5 至约 7、约 6 至约 11、约 6 至约 10、约 6 至约 9、约 6 至约 8、约 6 至约 7、约 6.5 至约 11、约 6.5 至约 10、约 6.5 至约 9、约 6.5 至约 8、约 6.5 至约 7、约 7 至约 11、约 7 至约 10、约 7 至约 9 或约 7 至约 8,优选约 5.5 至约 9,并且更优选约 6 至约 8。

[0493] 在具体实施例中,在以下硬度下执行该洗涤方法:从约 0° dH 至约 30° dH,例如约 1° dH、约 2° dH、约 3° dH、约 4° dH、约 5° dH、约 6° dH、约 7° dH、约 8° dH、约 9° dH、约 10° dH、约 11° dH、约 12° dH、约 13° dH、约 14° dH、约 15° dH、约 16° dH、约 17° dH、约 18° dH、约 19° dH、约 20° dH、约 21° dH、约 22° dH、约 23° dH、约 24° dH、约 25° dH、约 26° dH、约 27° dH、约 28° dH、约 29° dH、约 30° dH。在典型欧洲洗涤条件下,硬度是约 15° dH,在典型美国洗涤条件下,是约 6° dH,并且在典型亚洲洗涤条件下,是约 3° dH。

[0494] 本发明涉及一种用包括本发明的蛋白酶的洗涤剂组合物清洁织物、餐具或硬表面的方法。

[0495] 一个优选实施例涉及一种清洁方法,所述方法包括在适合于清洁物体的条件下将所述物体与包含本发明的蛋白酶的清洁组合物接触的步骤。在一个优选实施例中,该清洁组合物是一种洗涤剂组合物并且该过程是一个衣物洗涤或餐具洗涤过程。

[0496] 另一个实施例涉及一种用于从织物上除去污物的方法,该方法包括在适合于清洁所述物体的条件下将所述织物与包含本发明的蛋白酶的组合物接触。

[0497] 在一个优选实施例中,用于在以上方法中使用的组合物进一步包括至少一种如以上“其他酶”部分列出的另外的酶,如选自下组的酶,该组由以下各项组成:碳水化合物酶、肽酶、蛋白酶、脂肪酶、纤维素酶,木聚糖酶或角质酶或其组合。在又一个优选实施例中,这些组合物包括减少的量的以下组分中的至少一种或多种:表面活性剂、助洗剂、螯合剂或螯合试剂、漂白系统或漂白组分或聚合物。

[0498] 还考虑了使用一种或多种本发明的蛋白酶处理织物(例如,使纺织品脱浆)的组合物和方法。可以任何织物处理方法使用蛋白酶,这些方法在本领域是已熟知的(参见,例如,美国专利号 6,077,316)。例如,在一个方面,通过一种方法改善织物的触感和外观,该方法包括将该织物与溶液中的蛋白酶接触。在一个方面,在压力下用该溶液处理该织物。

[0499] 在一个实施例中,在纺织品编织过程中或之后或者在脱浆阶段或一个或多个另外的织物加工步骤过程中应用该蛋白酶。在纺织品编织过程中,螺纹暴露于大量的机械应变中。在机械织布机上进行编织之前,为了提高拉伸强度并防止破裂,经常在经纱上涂上淀粉浆或淀粉衍生物。可以应用该蛋白酶来除去这些蛋白质浆或蛋白质衍生物。在编织完纺织品之后,织物可以进行到脱浆阶段。这之后可以是一个或多个另外的织物加工步骤。脱浆是从纺织品上除去浆料的作用。编织后,为了确保均匀和耐洗效果,应在对织物进行进一步加工之前除去所涂的浆料。还提供了一种脱浆方法,该方法包括通过酶的作用酶促水解浆料。

[0500] 低温用途

[0501] 出人意料地发现,本发明的蛋白酶 - 当在如描述于以下实例中的 AMSA 中测试时,在低温下(例如约 40°C 或以下的温度)比在较高温度下(例如约 60°C 或以上的温度)实

际表现相对要好。

[0502] 此外,在一个特别优选的实施例中,当在如在此描述的 AMSA 中测试时,本发明的蛋白酶比熟知的枯草杆菌蛋白酶(例如赛威蛋白酶(Savinase))在约 40°C 或以下的洗涤温度下表现相对要好。

[0503] 因此,本发明的一个实施例涉及一种进行衣物洗涤、餐具洗涤或工业清洁的方法,该方法包括使有待清洁的表面与本发明的一种蛋白酶接触,并且其中所述衣物洗涤、餐具洗涤、工业或机构清洁在约 40°C 或以下的温度下进行。本发明的一个实施例涉及本发明的蛋白酶在衣物洗涤、餐具洗涤或清洁过程中的用途,其中衣物洗涤、餐具洗涤、工业清洁中的温度是约 40°C 或以下。

[0504] 在另一个实施例中,本发明涉及本发明的蛋白酶在除蛋白过程中的用途,其中除蛋白过程中的温度是约 40°C 或以下。

[0505] 本发明还涉及本发明的蛋白酶在衣物洗涤、餐具洗涤或工业清洁过程中的用途,该蛋白酶与赛威蛋白酶相比具有至少一种改进的特性,并且其中衣物洗涤、餐具洗涤或工业清洁过程中的温度在约 40°C 或以下的温度下进行。

[0506] 在以上确定的方法和用途的每一者中,洗涤温度是约 40°C 或以下,例如约 39°C 或以下、例如约 38°C 或以下、例如约 37°C 或以下、例如约 36°C 或以下、例如约 35°C 或以下、例如约 34°C 或以下、例如约 33°C 或以下、例如约 32°C 或以下、例如约 31°C 或以下、例如约 30°C 或以下、例如约 29°C 或以下、例如约 28°C 或以下、例如约 27°C 或以下、例如约 26°C 或以下、例如约 25°C 或以下、例如约 24°C 或以下、例如约 23°C 或以下、例如约 22°C 或以下、例如约 21°C 或以下、例如约 20°C 或以下、例如约 19°C 或以下、例如约 18°C 或以下、例如约 17°C 或以下、例如约 16°C 或以下、例如约 15°C 或以下、例如约 14°C 或以下、例如约 13°C 或以下、例如约 12°C 或以下、例如约 11°C 或以下、例如约 10°C 或以下、例如约 9°C 或以下、例如约 8°C 或以下、例如约 7°C 或以下、例如约 6°C 或以下、例如约 5°C 或以下、例如约 4°C 或以下、例如约 3°C 或以下、例如约 2°C 或以下、例如约 1°C 或以下。

[0507] 在另一个优选实施例中,洗涤温度在约 5°C -40°C 的范围内,例如约 5°C -30°C、约 5°C -20°C、约 5°C -10°C、约 10°C -40°C、约 10°C -30°C、约 10°C -20°C、约 15°C -40°C、约 15°C -30°C、约 15°C -20°C、约 20°C -40°C、约 20°C -30°C、约 25°C -40°C、约 25°C -30°C 或约 30°C -40°C。在一个特别优选的实施例中,洗涤温度是约 30°C。

[0508] 在具体实施例中,在从约 5.0 至约 11.5 的 pH 下执行该低温洗涤方法,或在替代性实施例中,甚至从约 6 至约 10.5,例如约 5 至约 11、约 5 至约 10、约 5 至约 9、约 5 至约 8、约 5 至约 7、约 5.5 至约 11、约 5.5 至约 10、约 5.5 至约 9、约 5.5 至约 8、约 5.5 至约 7、约 6 至约 11、约 6 至约 10、约 6 至约 9、约 6 至约 8、约 6 至约 7、约 6.5 至约 11、约 6.5 至约 10、约 6.5 至约 9、约 6.5 至约 8、约 6.5 至约 7、约 7 至约 11、约 7 至约 10、约 7 至约 9 或约 7 至约 8,优选约 5.5 至约 9,并且更优选约 6 至约 8。

[0509] 在具体实施例中,在以下硬度下执行该低温洗涤方法:从约 0° dH 至约 30° dH,例如约 1° dH、约 2° dH、约 3° dH、约 4° dH、约 5° dH、约 6° dH、约 7° dH、约 8° dH、约 9° dH、约 10° dH、约 11° dH、约 12° dH、约 13° dH、约 14° dH、约 15° dH、约 16° dH、约 17° dH、约 18° dH、约 19° dH、约 20° dH、约 21° dH、约 22° dH、约 23° dH、约 24° dH、约 25° dH、约 26° dH、约 27° dH、约 28° dH、约 29° dH、约 30° dH。在典型欧洲洗涤条

件下,硬度是约 15° dH,在典型美国洗涤条件下,是约 6° dH,并且在典型亚洲洗涤条件下,是约 3° dH。

[0510] 用途

[0511] 本发明针对用于使用具有蛋白酶活性的多肽或其组合物的方法。本发明可以在纺织品和织物的湿洗(例如家用衣物洗涤和工业衣物洗涤)中使用其组合物。本发明针对用于在硬表面清洁例如自动餐具洗涤(ADW)、汽车洗涤以及工业表面清洁中使用其组合物的方法。

[0512] 本发明还针对在动物饲料中使用具有蛋白酶活性的蛋白酶的方法,以及包含本发明的蛋白酶的饲料组合物和饲料添加剂。

[0513] 本发明的蛋白酶在动物饲料中的用途

[0514] 术语动物包括所有动物。动物的实例为非反刍动物和反刍动物。反刍动物包括例如,动物,如绵羊、山羊、和牛,例如,肉牛、奶牛和牛犊。在具体实施例中,动物为非反刍动物。非反刍动物包括单胃动物,如猪(pig或swine)(包括但不限于小猪、生长中的猪和大母猪);家禽,如火鸡、鸭和鸡(包括但不限于肉仔鸡、蛋鸡);马(包括但不限于热血动物、冷血动物和温血动物),小牛;和鱼(包括但不限于鲑鱼、鳟鱼、罗非鱼、鲶鱼和鲤鱼);和甲壳类动物(包括但不限于河虾和对虾)。

[0515] 术语饲料或饲料组合物意思指适于或者意在由动物摄入的任意化合物、制剂、混合物或组合物。在根据本发明的用途中,可在饮食之前,之后或同时给动物饲喂蛋白酶。优选后者。

[0516] 在具体实施例中,明确限定了往饲料中添加的蛋白酶或包括在饲料添加剂中的蛋白酶。明确限定指的是如经大小排阻色谱法(参见W0 01/58275的实例12)测定的,蛋白酶制剂至少为50%纯。在其他具体实施例中,如经此方法测定的,蛋白酶制剂至少为60%、70%、80%、85%、88%、90%、92%、94%、或至少为95%纯。

[0517] 明确限定的蛋白酶制剂是有利的。例如,对于通常实质上不受其他蛋白酶或其他蛋白干扰或污染的蛋白酶而言,更容易确定它在饲料中的正确剂量。术语正确剂量具体指得到一致和恒定的结果的目标,和基于所希望的效果能够优化剂量。

[0518] 然而,为了在动物饲料中使用,蛋白酶不必那么纯;它可以例如包含其他酶,此时可将其称为蛋白酶制剂。

[0519] 该蛋白酶制剂可以(a)直接加入饲料(或者直接用于蛋白处理过程),或者(b)它可以用于一种或多种随后加入饲料(或者用于处理过程中)的中间组合物,如饲料添加剂或者预混合物的生产。不论是否根据上述(a)或(b)来使用,上文所述的纯度指的都是原始蛋白酶制剂的纯度。

[0520] 具体地说,使用重组生产方法即可获得纯度为上述数量级的蛋白酶制剂,然而,当通过传统的发酵方法生产蛋白酶时,要想获得这些蛋白酶制剂却并非易事,而且,批次与批次之间会有较高的差异。此类蛋白酶制剂当然可以与其他酶混合,以获得具有两种或更多种具有不同或类似活性的、经纯化的酶的制剂。

[0521] 该底物蛋白可以是一种动物性蛋白,如肉和骨粉、羽毛粉、和/或鱼粉;或者它可以是一种植物性蛋白。

[0522] 本文所用术语植物性蛋白指的是包含至少一种衍生自或源自植物的蛋白,包含修

饰的蛋白和蛋白衍生物的任何化合物,组合物,制品或混合物。在具体实施例中,这些植物性蛋白的蛋白含量至少为 10%、20%、30%、40%、50%或 60% (w/w)。

[0523] 植物性蛋白可以衍生自植物性蛋白来源,如豆类和谷类,例如得自蝶形花科(豆科),十字花科,藜科和早熟禾科植物的材料,如大豆粉,羽扇豆粉和油菜籽粉。在具体实施例中,植物性蛋白来源是得自蝶形花科的一种或多种植物,如大豆,羽扇豆,豌豆或蚕豆的材料。在另一个具体实施例中,植物性蛋白来源是得自藜科的一种或多种植物,如甜菜,糖甜菜,菠菜或奎奴亚藜的材料。植物性蛋白来源的其他实例为油菜籽、向日葵籽、棉籽和卷心菜。大豆为优选的植物性蛋白来源。植物蛋白源的其它实例是谷物,如大麦、小麦、黑麦、燕麦、玉蜀黍(玉米)、稻、黑小麦、高粱、具有可溶物的干酒糟(DDGS)和微藻。

[0524] 在处理过程的具体实施例中,所讨论的这种或这些种蛋白酶影响这些蛋白如植物性蛋白或蛋白来源(或对其发挥作用或施加水解或降解影响)。为了达到此目的,一般将蛋白或蛋白来源悬浮于溶剂,例如含水溶剂,如水中,并适当关注所讨论的酶的特征,以调节 pH 和温度值。例如,可在能使实际蛋白酶的活性至少为 5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、或至少为 90% 的 pH 值下进行处理。类似地,例如,可在能使实际蛋白酶的活性至少为 5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、或至少为 90% 的温度下进行处理。上述活性百分比指示是相对于最大活性而言的。持续进行酶促反应直至获得所需结果,然后通过例如热-处理步骤灭活酶来终止反应,或者也可以不终止反应。

[0525] 在本发明处理过程的另一个具体实施例中,蛋白酶作用被维持,这意味着例如将蛋白酶加入这些蛋白,但其水解影响可以说尚未开启,直到后来当有此需求时,一旦建立了适当的水解条件,或一旦灭活了任何酶抑制剂,或不使用何种其他方式延迟了酶的作用,才会开启其水解影响。

[0526] 在一个实施例中,处理是预-处理动物饲料或用于动物饲料的蛋白,即这些蛋白是在摄入之前被水解的。

[0527] 术语改善动物饲料的营养价值指的是提高饲料中的营养的可利用性。在本发明中,改善营养价值具体指的是改善饲料的蛋白部分的可利用性,从而导致蛋白提取的增加,较高的蛋白产量,和/或蛋白利用的改善。当饲料的营养价值增加时,蛋白和/或氨基酸消化率增加,并且该动物的生长速率和/或体重增加量和/或饲料转化(即相对于体重增加的饲料摄取量)可被改善。

[0528] 可以将任何形式的蛋白酶添加至饲料中,只要它是作为相对纯的蛋白酶,或与欲添加至动物饲料的其他组分的混合物,即处于动物饲料添加剂的形式,如所谓的动物饲料预混合物。

[0529] 在另一方面,本发明涉及用于在动物饲料中使用的组合物,如动物饲料和动物饲料添加剂,如预混合物。

[0530] 除本发明的蛋白酶以外,本发明的动物饲料添加剂还包含至少一种脂溶性维生素、和/或至少一种水溶性维生素、和/或至少一种微量矿物质、和/或至少一种大量矿物质。

[0531] 另外,可任选的,饲料添加成分是着色剂例如类胡萝卜素如 β -胡萝卜素、虾青素、和叶黄素;稳定剂;生长改善添加剂和芳香化合物/调味品,例如甲氧甲酚,茴香脑,十一-、十一-和/或十二-内酯,紫罗酮、鸢尾酮、姜辣素、哌啶、亚丙基苯酞、亚丁基苯酞、辣

椒素和 / 或丹宁酸 ; 抗微生物肽 ; 多不饱和脂肪酸 (PUFA) ; 产活性氧种类 ; 另外, 可以使用一种支持物, 其可包含例如按重量计 40% -50% 的木质纤维、按重量计 8% -10% 的硬脂酸、按重量计 4% -5% 的姜黄粉、按重量计 4% -58% 的迷迭香粉、按重量计 22% -28% 的石灰岩、按重量计 1% -3% 的树胶如阿拉伯树胶、按重量计 5% -50% 的糖和 / 或淀粉以及按重量计 5% -15% 的水。

[0532] 本发明的一种饲料或饲料添加剂还可包含选自以下各项之中的至少一种其他的酶: 植酸酶 (EC 3. 1. 3. 8 或 3. 1. 3. 26) ; 木聚糖酶 (EC 3. 2. 1. 8) ; 半乳聚糖酶 (EC 3. 2. 1. 89) ; α -半乳糖苷酶 (EC 3. 2. 1. 22) ; 另外的蛋白酶 (EC 3. 4), 磷脂酶 A1 (EC 3. 1. 1. 32) ; 磷脂酶 A2 (EC 3. 1. 1. 4) ; 溶血磷脂酶 (EC 3. 1. 1. 5) ; 磷脂酶 C (3. 1. 4. 3) ; 磷脂酶 D (EC 3. 1. 4. 4) ; 淀粉酶如, 例如 α -淀粉酶 (EC 3. 2. 1. 1) ; 和 / 或 β -葡聚糖酶 (EC 3. 2. 1. 4 或 EC 3. 2. 1. 6) 。

[0533] 在一个具体实施例中, 本发明的饲料或饲料添加剂还包括一种植酸酶 (EC 3. 1. 3. 8 或 3. 1. 3. 26) 。

[0534] 在一个具体实施例中, 本发明的饲料或饲料添加剂还包括一种木聚糖酶 (EC 3. 2. 1. 8) 。

[0535] 本发明的饲料或饲料添加剂还可以包括至少一种益生菌或直接饲喂微生物 (DFM), 该益生菌或直接饲喂微生物任选地与选自以下各项之中的一种或多种其他的酶一起: 植酸酶 (EC 3. 1. 3. 8 或 3. 1. 3. 26) ; 木聚糖酶 (EC 3. 2. 1. 8) ; 半乳聚糖酶 (EC 3. 2. 1. 89) ; α -半乳糖苷酶 (EC 3. 2. 1. 22) ; 另外的蛋白酶 (EC 3. 4), 磷脂酶 A1 (EC 3. 1. 1. 32) ; 磷脂酶 A2 (EC 3. 1. 1. 4) ; 溶血磷脂酶 (EC 3. 1. 1. 5) ; 磷脂酶 C (3. 1. 4. 3) ; 磷脂酶 D (EC 3. 1. 4. 4) ; 淀粉酶, 例如, 像 α -淀粉酶 (EC 3. 2. 1. 1) ; 和 / 或 β -葡聚糖酶 (EC 3. 2. 1. 4 或 EC 3. 2. 1. 6) 。

[0536] 该直接饲喂微生物可以是一种来自以下属的一种或多种的细菌: 乳杆菌属、乳球菌属、链球菌属、芽孢杆菌属、片球菌属、肠球菌属、明串珠菌属、肉杆菌属、丙酸菌属、双歧杆菌属、梭菌属以及巨球形菌属或其任何组合, 优选来自枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、屎肠球菌、肠球菌属、以及片球菌属、乳杆菌属、双歧杆菌属、嗜酸乳杆菌、嗜酸片球菌 (*Pediococcus acidilactici*)、乳酸乳球菌、两歧双歧杆菌、特氏丙酸杆菌 (*Propionibacterium thoenii*)、香肠乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、丁酸梭菌、动物双歧杆菌动物亚种 (*Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis*)、路氏乳杆菌、蜡样芽孢杆菌、唾液乳杆菌唾液亚种 (*Lactobacillus salivarius* ssp. *salivarius*)、埃氏巨球形菌、丙酸杆菌属并且更优选来自以下枯草芽孢杆菌菌株 3A-P4 (PTA-6506) ; 15A-P4 (PTA-6507) ; 22C-P1 (PTA-6508) ; 2084 (NRRL B-500130) ; LSSA01 (NRRL-B-50104) ; BS27 (NRRL B-50105) ; BS 18 (NRRL B-50633) ; 以及 BS 278 (NRRL B-50634) 。

[0537] 在具体实施例中, 这些其他酶被明确定义 (如上对蛋白酶制剂定义的) 。

[0538] 抗微生物肽 (AMP) 的实例是 CAP18、林可霉素 (Leucocin)A、Tritrpticin、Protegrin-1、死亡素 (Thanatin)、防卫肽、乳铁蛋白、乳铁蛋白肽、和 Ovispirin 如 Novispirin (Robert Lehrer (罗伯特·莱勒), 2000)、菌丝霉素 (Plectasins) 以及他汀类, 包含在 WO 03/044049 和 WO 03/048148 中所披露的化合物和多肽, 以及以上的保留了抗微生物活性的变体或片段。

[0539] 抗真菌多肽 (AFP) 的实例是巨大曲霉 (*Aspergillus giganteus*) 和黑曲霉的肽, 连同其保留了抗真菌活性的变体和片段, 如在 WO 94/01459 和 WO 02/090384 中披露的。

[0540] 多不饱和脂肪酸的实例为 C18、C20 和 C22 多不饱和脂肪酸, 如花生四烯酸、二十二碳六烯酸、二十碳五烯酸和 γ -亚麻酸。

[0541] 产生活性氧的种类的实例为化学品, 如过硼酸盐、过硫酸盐或过碳酸盐; 和酶, 如氧化酶、加氧酶或合成酶。

[0542] 通常, 脂溶性维生素和水溶性维生素, 以及微量矿物质形成意在添加至饲料的所谓的预混物的一部分, 而大量矿物质通常单独添加至饲料中。这些组合物的任一个类型, 当富含于本发明的蛋白酶时, 都是本发明的动物饲料添加剂。

[0543] 在具体实施例中, 本发明的动物饲料添加剂以 0.01% 至 10.0%, 更具体 0.05% 至 5.0% 或 0.2% 至 1.0% (%指 g 添加剂 / 100g 饲料) 的水平包含 (或规定为必须包含) 在动物饮食或饲料中。具体地说, 对预混物也是如此。

[0544] 下文列出了这些组分的非-排他性实例:

[0545] 脂溶性维生素的例子有: 维生素 A, 维生素 D3, 维生素 E 和维生素 K, 如维生素 K3。

[0546] 水溶性维生素的实例是维生素 B12、生物素和胆碱、维生素 B1、维生素 B2、维生素 B6、烟酸、叶酸和泛酸酯, 例如 Ca-D-泛酸酯。

[0547] 微量矿物质的实例为锰、锌、铁、铜、碘、硒和钴。

[0548] 大量矿物质的实例为钙、磷和钠。

[0549] 这些组分的营养需求 (以家禽和小猪 / 猪举例) 列于 WO 01/58275 中的表 A 中。营养需求指的是应在饮食中以所示浓度提供这些组分。

[0550] 在可替代的实施例中, 本发明的动物饲料添加剂包含 WO 01/58275 中的表 A 所详细说明的单个组分中的至少一种。至少一种指的是一种或两种或三种或四种等直至所有十三种, 或直至所有 15 种单个组分中的任一种, 一种或多种。更具体地, 本发明的添加剂包含该至少一种单个组分, 其含量能使其在饲料中的浓度落入表 A 第 4 或第 5 或第 6 栏所示的范围。

[0551] 在仍另外的实施例中, 本发明的动物饲料添加剂包含以下维生素中的至少一种, 优选地以在以下的表 1 中所详细说明的饲料内浓度范围提供 (分别对于小猪饮食和肉仔鸡饮食)。

[0552] 表 1: 一般的维生素建议

[0553]

维生素	小猪饮食	肉仔鸡饮食
维生素 A	10,000-15,000 IU/kg 饲料	8-12,500 IU/kg 饲料
维生素 D3	1800-2000 IU/kg 饲料	3000-5000 IU/kg 饲料
维生素 E	60-100 mg/kg 饲料	150-240 mg/kg 饲料
维生素 K3	2-4 mg/kg 饲料	2-4 mg/kg 饲料
维生素 B1	2-4 mg/kg 饲料	2-3 mg/kg 饲料
维生素 B2	6-10 mg/kg 饲料	7-9 mg/kg 饲料
维生素 B6	4-8 mg/kg 饲料	3-6 mg/kg 饲料
维生素 B12	0.03-0.05 mg/kg 饲料	0.015-0.04 mg/kg 饲料
烟酸 (维生素 B3)	30-50 mg/kg 饲料	50-80 mg/kg 饲料
泛酸	20-40 mg/kg 饲料	10-18 mg/kg 饲料

[0554]

叶酸	1-2 mg/kg 饲料	1-2 mg/kg 饲料
生物素	0.15-0.4 mg/kg 饲料	0.15-0.3 mg/kg 饲料
氯化胆碱	200-400 mg/kg 饲料	300-600 mg/kg 饲料

[0555] 本发明还涉及动物饲料组合物。动物饲料组合物或饮食具有相对高的蛋白含量。家禽和猪饮食的特征如 WO 01/58275, 表 B 第 2-3 栏所示。鱼食可被表征为该表 B 第 4 栏中所示的。此外, 这类鱼食通常具有 200-310g/kg 的粗脂肪含量。WO 01/58275 相当于 US 09/779334, 被列入本文作为参考。

[0556] 根据本发明的动物饲料组合物具有的粗蛋白含量为 50-800g/kg, 此外还包含至少一种本文所要求的蛋白酶。

[0557] 此外, 或替代地 (对于以上所示的粗蛋白含量), 本发明的动物饲料组合物具有 10-30MJ/kg 的可代谢能量含量; 和 / 或 0.1-200g/kg 的钙含量; 和 / 或 0.1-200g/kg 的有效磷含量; 和 / 或 0.1-100g/kg 的甲硫氨酸含量; 和 / 或 0.1-150g/kg 的甲硫氨酸加半胱氨酸含量; 和 / 或 0.5-50g/kg 的赖氨酸含量。

[0558] 在具体实施例中, 可代谢能量、粗蛋白、钙、磷、甲硫氨酸、甲硫氨酸加半胱氨酸、和 / 或赖氨酸的含量落入 WO 01/58275, 表 B, 范围 2、3、4 或 5 中的任何一个中 (R. 2-5)。

[0559] 粗蛋白以氮 (N) 乘以系数 6.25 计算, 即粗蛋白 (g/kg) = N(g/kg) X 6.25。通过凯氏定氮法 (Kjeldahl method) 测定氮含量 (A. O. A. C., 1984, 官方分析方法 (Official Methods of Analysis) 第 14 版, 官方分析化学家集 (Association of Official Analytical Chemists), 华盛顿特区)。

[0560] 可代谢能量可根据 NRC 出版物猪的营养需求 (Nutrient requirements in swine), 第九次再版 1988, 国家研究委员会农业部动物营养协会猪营养分会, 美国国家科学院出版社, 华盛顿特区, 第 2-6 页和欧洲家禽饲养材料能量值表 (European Table of Energy Values for Poultry Feed-stuffs), 斯克得霍特 (Spelderholt) 家禽研究与推广中心, 7361DA 贝克贝亨, 荷兰, Grafisch bedrijf Ponsen&looijen 公司, 瓦赫宁恩, ISBN 90-71463-12-5 计算。

[0561] 完整的动物食料中钙、有效磷和氨基酸的饮食含量根据如 Veevoedertable 1997, gegevens over chemische samenstelling, verteerbaarheid en voederwaarde van voedermiddelen, Central Veevoederbureau, Runderweg 6, 8219pk Lelystad. ISBN 90-72839-13-7 计算。

[0562] 在具体实施例中, 本发明的动物饲料组合物包含如上定义的至少一种植物性蛋白。

[0563] 本发明的动物饲料组合物还可以包含动物性蛋白, 如肉和骨粉、羽毛粉、和 / 或鱼粉, 通常量为 0% -25%。本发明的动物饲料组合物还可以包含具有可溶物的干酒糟 (Dried Distillers Grains), 通常量为 0% -30%。

[0564] 在另一具体实施例中, 本发明的动物饲料组合物包含 0% -80% 的玉米; 和 / 或 0% -80% 的高粱; 和 / 或 0% -70% 小麦; 和 / 或 0% -70% 的大麦; 和 / 或 0% -30% 的燕麦; 和 / 或 0% -40% 的大豆粉; 和 / 或 0% -25% 的鱼粉; 和 / 或 0% -25% 的肉和骨粉; 和 / 或 0% -20% 的乳清。

[0565] 可将动物饮食制备成例如糊状饲料 (非丸状) 或丸状饲料。通常, 混合研磨的饲料并根据所讨论的这些种类的说明加入必需维生素和矿物质的足够量。以固体或液体酶配制品的形式加入酶。例如, 对于糊状饲料, 在成分混合步骤前或期间可加入固体或液体酶配制品。对于丸状饲料, 在饲料成分步骤前或期间还可加入该 (固体或液体) 蛋白酶 / 酶制剂。典型地, 在造丸步骤之后加入一种液体蛋白酶 / 酶制剂。也可以将酶掺入饲料添加剂或预混物。

[0566] 饮食中最终的酶浓度范围为 0.01-200mg 酶蛋白 /kg 饮食, 例如在 0.5-25mg 酶蛋白 /kg 动物饮食的范围内。

[0567] 当然, 应该以有效量, 即足以改善饲料的蛋白水解、蛋白和氨基酸消化率和 / 或改善营养价值的量使用蛋白酶。目前期望以下述量 (剂量范围) 中的一种或多种施用酶: 0.01-200; 0.01-100; 0.5-100; 1-50; 5-100; 10-100; 0.05-50 或 0.10-10, 所有这些范围都是每 kg 饲料中蛋白酶蛋白的 mg 数 (ppm)。

[0568] 为了测定每 kg 饲料中蛋白酶蛋白的 mg 数, 从饲料组合物中纯化蛋白酶, 并且使用相关试验 (参见蛋白酶活性, 底物和试验) 测定经纯化的蛋白酶的比活性。使用相同试验测定该饲料组合物的蛋白酶活性, 并且在这两次测定的基础上计算出以每 kg 饲料中蛋白酶蛋白的 mg 数计的剂量。

[0569] 使用相同的原理测定饲料添加剂中的蛋白酶蛋白 mg 数。当然,如果可获得制备饲料添加剂或饲料所用蛋白酶的样品,可由该样品测定比活性(无需从饲料组合物或添加剂中纯化蛋白酶)。

[0570] 核酸构建体、表达载体、重组宿主细胞和用于生产蛋白酶的方法

[0571] 本发明还涉及包含编码本发明的蛋白酶的这类多核苷酸的核酸构建体、表达载体及重组宿主细胞。

[0572] 本发明还涉及产生蛋白酶的方法,该方法包括:(a)对包括这种多核苷酸的重组宿主细胞进行培养;并且(b)回收该蛋白质。

[0573] 该蛋白质对于宿主细胞来说可以是原生的或异源的。术语“蛋白”在此并不是指特定长度的编码产物并且,因此,包含肽、寡肽和蛋白。术语“蛋白质”还涵盖组合形成编码的产物的两个或更多个多肽。这些蛋白质还包括杂合多肽和融合多肽。

[0574] 优选地,该蛋白是一种蛋白酶。例如,该蛋白可以是一种水解酶,例如蛋白水解酶或蛋白酶。

[0575] 该基因可以从任何原核、真核或其他来源获得。

[0576] 通过以下实例进一步描述本发明,这些实例不应当解释为限制本发明的范围。

[0577] 实例

[0578] 材料与amp;方法

[0579] 洗涤测定

[0580] 用于衣物洗涤的自动机械应力测定 (AMSA)

[0581] 为了评定洗涤性能,使用自动机械应力测定 (AMSA) 进行衣物洗涤实验。使用 AMSA,可以检查大量小体积酶洗涤剂溶液的洗涤性能。AMSA 板具有许多用于测试溶液的缝和盖子,盖子针对所有缝开口强力挤压洗涤样品(有待洗涤的纺织品)。在洗涤时间期间,板、测试溶液、纺织品和盖子剧烈振动从而使测试溶液与纺织品接触并以规则、周期性摆动方式施加机械压力。关于进一步描述,参见 WO 02/42740,尤其是第 23-24 页的“特定方法实施例 (Special method embodiments)”段落。

[0582] 将洗涤性能作为所洗涤纺织品颜色的亮度进行测量。亮度也可以表达为当用白光照射时从样品反射的光的强度。当样品受到污染时,反射光的强度低于干净样品的反射光的强度。因此,反射光的强度可以用于测量洗涤性能。

[0583] 使用专业平板扫描仪 (Kodak iQsmart (柯达 (Kodak)), Midtager 29, DK-2605 Brøndby (丹麦)进行颜色测量,该扫描仪用于捕获所洗涤纺织品的图像。

[0584] 为了从扫描的图像中提取光强度值,将来自图像的 24- 位像素值转化为红、绿以及蓝 (RGB) 的值。通过将 RGB 值作为向量相加在一起并然后考虑所得向量的长度可以计算强度值 (Int):

$$[0585] \quad Int = \sqrt{r^2 + g^2 + b^2} .$$

[0586] 表 2 :标准洗涤剂 and 测试材料的组成

[0587]

洗衣粉标准洗涤剂 A	二水柠檬酸钠 32.3% LAS 钠 24.2% 月桂基硫酸钠 32.2% Neodol 25-7 (醇乙氧基化物) 6.4% 硫酸钠 4.9%
洗衣液标准洗涤剂 B	水 30.63% 氢氧化钠 2.95% 十二烷基苯磺酸 11.52% 脂肪酸 (大豆) 5.50% 丙烷-1,2-二醇 (MPG) 5.05% 水 17.38% C13-醇乙氧基化物, 10.50% 二亚乙基三胺五(亚甲基膦酸) (DTMPA) 3.08% 三乙醇胺 (TEA) 2.22% 脂肪酸 (可可) 4.50% 柠檬酸钠一水合物 1.00%

[0588]

	乙醇 4.63% Syntran 5909 (遮光剂) 0.30% 香料 0.35%
测试材料	PC-03 (在棉布/聚酯上的巧克力-牛奶/油墨) C-10 (在棉布上的油/牛奶/颜料) PC-05 (在棉布/聚酯上的血液/牛奶/油墨) EMPA117EH (在棉布/聚酯上的血液/牛奶/油墨)

[0589] 测试材料获得自测试材料 BV 中心 (Center for Testmaterials BV), 邮政信箱 120, 3133KT 弗拉尔丁恩 (Vlaardingen), 荷兰和 EMPA 测试材料 AG (EMPA Testmaterials AG), **Mövenstrasse** 12, 圣加伦 (Gallen) CH-9015 大街, 瑞士。

[0590] 蛋白酶测定法

[0591] Suc-AAPF-pNA 测定 :

[0592] pNA 底物 : Suc-AAPF-pNA (瑞士巴亨 (Bachem) L-1400)。

[0593] 温度 : 室温 (25°C)

[0594] 测定缓冲液 : 100mM 琥珀酸, 100mM HEPES, 100mM CHES, 100mM CABS, 1mM CaCl₂,

150mM KCl, 0.01% Triton X-100, 用 HCl 或 NaOH 调节至 pH 值 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、及 11.0。

[0595] 将 20 μ l 蛋白酶 (稀释于 0.01% Triton X-100 中) 与 100 μ l 测定缓冲液混合。通过加入 100 μ l pNA 底物 (50mg, 溶解在 1.0ml DMSO 中, 并进一步地用 0.01% Triton X-100 稀释 45 倍) 开始进行测定。监测 OD₄₀₅ 的增加作为蛋白酶活性的量度。

[0596] Protazyme AK 测定:

[0597] 底物: Protazyme AK 片 (交联和染色的酪蛋白; 来自麦格酶公司 (Megazyme))

[0598] 温度: 受控的 (分析温度)。

[0599] 测定缓冲液: 100mM 琥珀酸, 100mM HEPES, 100mM CHES, 100mM CABS, 1mM CaCl₂, 150mM KCl, 0.01% Triton X-100, pH 6.5 或 pH 7.0。

[0600] 通过温和搅拌, 将一片 Protazyme AK 悬浮于 2.0ml 0.01% Triton X-100 中。将 500 μ l 的这种悬液和 500 μ l 的测定缓冲液分散在艾本德离心管 (Eppendorf tube) 中并置于冰上。添加 20 μ l 蛋白酶样品 (稀释在 0.01% Triton X-100 中)。通过将艾本德离心管转移至设定为测定温度的艾本德恒温混匀仪 (Eppendorf thermomixer) 来启动测定。将管在艾本德恒温混匀仪上在最高振摇速率 (1400 转 / 分钟) 下孵育 15 分钟。通过转移该管返回至冰浴停止孵育。随后将管在冰冷的离心机中离心数分钟并将 200 μ l 上清液转移至微量滴定板。读取 OD₆₅₀ 作为蛋白酶活性的量度。在测定法中包含空白缓冲液 (buffer blind) (代替酶)。

[0601] Suc-AAPX-pNA 测定:

[0602] pNA 底物: Suc-AAPA-pNA (瑞士巴亨 (Bachem)L-1775)

[0603] Suc-AAPR-pNA (瑞士巴亨 (Bachem)L-1720)

[0604] Suc-AAPD-pNA (瑞士巴亨 (Bachem)L-1835)

[0605] Suc-AAPI-pNA (瑞士巴亨 (Bachem)L-1790)

[0606] Suc-AAPM-pNA (瑞士巴亨 (Bachem)L-1395)

[0607] Suc-AAPV-pNA (瑞士巴亨 (Bachem)L-1770)

[0608] Suc-AAPL-pNA (瑞士巴亨 (Bachem)L-1390)

[0609] Suc-AAPE-pNA (瑞士巴亨 (Bachem)L-1710)

[0610] Suc-AAPK-pNA (瑞士巴亨 (Bachem)L-1725)

[0611] Suc-AAPF-pNA (瑞士巴亨 (Bachem)L-1400)

[0612] 温度: 室温 (25°C)

[0613] 测定缓冲液: 100mM 琥珀酸, 100mM HEPES, 100mM CHES, 100mM CABS, 1mM CaCl₂, 150mM KCl, 0.01% Triton X-100, pH 9.0。

[0614] 将 20 μ l 蛋白酶 (稀释于 0.01% Triton X-100 中) 与 100 μ l 测定缓冲液混合。通过加入 100 μ l pNA 底物 (50mg, 溶解在 1.0ml DMSO 中, 并进一步地用 0.01% Triton X-100 稀释 45 倍) 开始进行测定。监测 OD₄₀₅ 的增加作为蛋白酶活性的量度。

[0615] 邻苯二甲醛 (OPA) 测定法:

[0616] 这一测定检测伯胺并且因此可以将肽键由一种蛋白酶的切割测量为蛋白酶处理的样品与对照样品之间的吸光度的差异。基本上根据尼尔森 (Nielsen) 等人 (尼尔森 (Nielsen), PM, 彼得森 (Petersen), D, 达姆麦妮 (Dampmann), C. 用于确定食物蛋白

水解程度的改进方法 (Improved method for determining food protein degree of hydrolysis), 食品科学杂志 (J Food Sci), 2001, 66:642-646) 进行该测定。

[0617] 将 500 μ l 样品通过 100kDa 微量浓缩 (Microcon) 离心过滤器 (60min, 11,000rpm, 5 $^{\circ}$ C) 过滤。将这些样品在去离子水中稀释大约 (例如 10 倍、50 倍或 100 倍), 并将 25 μ l 的每份样品装载到 96 孔微量滴定板中 (5 个重复)。将 200 μ l OPA 试剂 (100mM 四硼酸二钠十水合物, 3.5mM 十二烷基硫酸钠 (SDS), 5.7mM 二硫苏糖醇 (DDT), 6mM 邻苯二甲醛) 分配在所有孔中, 振荡该板 (10sec, 750rpm) 并且在 340nm 下测量吸光度。

[0618] 菌株

[0619] 菌株绿色糖单孢菌 DSM 43017 获得自 DSMZ (德意志微生物和细胞培养物保藏中心, 布伦瑞克 - 德国)。根据帕蒂 (Pati) 等人, 2009, 基因组科学标准 (Stand. Genomic Sci.) 1:141-149, 在 1963 年之前从爱尔兰泥炭中收集该菌株。

[0620] 实例 1: 来自绿色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1 (SEQ ID NO:1) 的表达

[0621] 为了来自绿色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1 (SEQ ID NO:1) 的表达克隆, 使用一种线性整合载体系统。线性整合构建体是一种 PCR 融合产物, 该融合产物由两个枯草芽孢杆菌同源染色体区域之间的基因连同强启动子与氯霉素抗性标记的融合制备。通过 SOE PCR 进行融合 (霍顿 (Horton), R. M., 亨特 (Hunt), H. D., 胡 (Ho), S. N., 皮伦 (Pullen), J. K. 以及皮斯 (Pease), L. R. (1989), 不使用限制酶, 通过重叠延伸的基因剪接的工程化杂种基因 (Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes, gene splicing by overlap extension) 基因 (Gene) 77:61-68)。专利申请 WO 2003/095658 中也描述了 SOEPCR 方法。在三联启动子系统 (如 WO 1999/43835 中所述) 的控制下表达该基因, 该启动子系统由包含稳定化序列的地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶基因 (amyL) 启动子、解淀粉芽孢杆菌 α -淀粉酶基因 (amyQ) 启动子和苏云金芽孢杆菌 cryIIIA 启动子组成。编码氯霉素乙酰基转移酶的基因被用作标记物 (描述于例如戴德瑞奇森 (Diderichsen), B.; 波尔森 (Poulsen), G. B.; 约根森 (Joergensen), S. T., 1993, 质粒 (Plasmid), “枯草芽孢杆菌的一种有用的克隆载体” (A useful cloning vector for *Bacillus subtilis*) 30:312)。在芽孢杆菌属染色体上通过同源重组将最终的基因构建体整合到果胶酸裂解酶位点中。

[0622] 将基因特异性引物包含至两个侧翼片段的突出端, 从菌株绿色糖单孢菌 DSM 43017 的染色体 DNA 扩增编码来自绿色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1 的基因。从菌株 iMB1361 的基因组 DNA 扩增上游和下游侧翼片段 (描述于专利申请 WO 2003095658 中)。用克劳氏芽孢杆菌分泌信号 (具有以下氨基酸序列: MKKPLGKIVASTALLISVAFSSSIASA) 代替天然的分泌信号来表达该 S1 蛋白酶 1。

[0623] 通过重叠延伸 (SOE) PCR 反应使这 2 个载体片段和基因片段经受剪接, 以将这 3 个片段装配进一个线性载体构建体中。将等分部分的该 PCR 产物转化到枯草芽孢杆菌中。在每 ml 补充有 6 μ g 氯霉素的 LB 板上选择转化体。将包含该整合表达构建体的重组枯草芽孢杆菌克隆在液体培养基中进行生长。采集包含酶的上清液并如实例 2 中所描述的将该酶进行纯化。

[0624] 实例 2: 来自绿色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1 的纯化

[0625] 将培养肉汤进行离心 (20000 \times g, 20min), 并且将上清液小心地从沉淀物倒出。将上清液通过 Nalgene 0.2 μ m 过滤单元进行过滤, 以便去除其余的芽孢杆菌宿主细胞。用

20% CH₃COOH将0.2 μ m滤液的pH调节至pH 4.5并且通过用去离子水稀释将电导率调节至与20mM CH₃COOH/NaOH、50mM H₃BO₃、1mM CaCl₂(pH 4.5)的电导率相同的电导率。将调节的滤液施加至SP-琼脂糖FF柱(来自GE医疗公司(GE Healthcare)),该柱在20mM CH₃COOH/NaOH、50mM H₃BO₃、1mM CaCl₂(pH 4.5)中平衡。在将柱用平衡缓冲液充分地洗涤之后,将蛋白酶用在相同的缓冲液中的线性NaCl梯度(0→0.5M)洗脱超过五个柱体积。将来自柱的级分针对蛋白酶活性进行分析(使用在pH9下的Suc-AAPF-pNA测定法),并且合并峰级分。将蛋白酶合并物用去离子水稀释10x并且用3M Tris-碱将pH调节至pH 9。将经调节的合并物施加至MEP Hypercel柱(来自颇尔集团(Pall Corporation)),该柱在50mM Tris/HCl、2mM CaCl₂(pH 9.0)中平衡。在将柱用平衡缓冲液充分地洗涤之后,将蛋白酶用50mM CH₃COOH/NaOH、2mM CaCl₂(pH 4.5)逐步洗脱。将来自柱的级分针对蛋白酶活性进行分析(使用在pH 9下的Suc-AAPF-pNA测定),并且通过SDS-PAGE来对峰级分进行进一步分析。将级分(在考马斯染色的SDS-PAGE凝胶上的仅见到一条带)合并并且用于进一步表征。

[0626] 实例3:来自绿色糖单孢菌的S1蛋白酶1的表征

[0627] 将Suc-AAPF-pNA测定法用于获得pH-活性曲线和pH-稳定性曲线(在指示的pH值下2小时之后的残余活性)。对于pH-稳定性曲线,将蛋白酶在不同测定缓冲液中稀释10x以达到这些缓冲液的pH值并且然后在37°C下孵育2小时。在孵育之后,通过稀释于pH 9.0测定缓冲液中,将蛋白酶孵育物的pH调节至相同的pH值。在pH 9.0下,测量相对于样品的残余活性,将该样品在稳定条件(5°C,pH 9.0)下保持。使用Protazyme AK测定法以获得在pH 7.0下的温度-活性曲线。使用Suc-AAPX-pNA测定法和十种不同的Suc-AAPX-pNA底物以获得这些酶在pH 9.0下的P1-特异性。结果示于表3-6和图1-4中。

[0628] 表3:25°C下的pH-活性曲线

[0629]

pH	来自绿色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1	10R 蛋白酶
2	0.00	-
3	0.00	0.00
4	0.00	0.02
5	0.03	0.07
6	0.15	0.21
7	0.56	0.44
8	1.00	0.67
9	1.00	0.88
10	0.92	1.00
11	0.84	0.93

[0630] 注释：活性是相对于酶的最佳 pH 而言。

[0631] 表 4：pH- 稳定性曲线（在 37°C 下 2 小时之后的残余活性）

[0632]

pH	来自绿色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1	10R 蛋白酶
2	0.46	0.78
3	1.02	1.03
4	1.06	0.99
5	1.05	1.00
6	1.02	1.03
7	1.05	1.01
8	1.06	0.98
9	1.03	0.99
10	1.00	0.99
11	1.06	0.86
在 5°C 下 2 小时之后	1.00 (在 pH 9 处)	1.00 (在 pH 9 处)

[0633] 注释：活性是相对于样品的残余活性，将该样品保持在稳定条件（5°C，pH 9.0）下。

[0634] 表 5：在 pH 7.0 或 pH 6.5 处的温度活性曲线

[0635]

温度 (°C)	来自绿色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1 (pH 7)	10R 蛋白酶 (pH 6.5)
15	0.00	0.01
25	0.06	0.02
37	0.20	0.06
50	0.57	0.13
60	0.93	0.35
70	1.00	0.96
80	0.22	1.00
90	-	0.18

[0636] 注释:活性是相对于该酶在 pH 7.0 或 pH 6.5 下的最适温度而言。

[0637] 表 6:在 pH 9.0 下对 10 种 Suc-AAPX-pNA 底物的 P1- 特异性 (25°C)

[0638]

Suc-AAPX-pN A	来自绿色糖单孢菌的 S1 蛋 白酶 1	10R 蛋白 酶
Suc-AAPA-pNA	0.03	0.13
Suc-AAPR-pNA	0.04	0.09
Suc-AAPD-pNA	0.00	0.00
Suc-AAPI-pNA	0.00	0.00
Suc-AAPM-pN A	0.45	0.78
Suc-AAPV-pNA	0.00	0.01
Suc-AAPL-pNA	0.20	0.18
Suc-AAPE-pNA	0.00	0.00
Suc-AAPK-pNA	0.02	0.08
Suc-AAPF-pNA	1.00	1.00

[0639] 注释:活性是相对于该酶的最佳底物 (Suc-AAPF-pNA) 而言。

- [0640] 来自绿色糖单孢菌的 S1A 蛋白酶 1 的其他特征
- [0641] 抑制剂 :CI-2A 和 SSI。
- [0642] 通过埃德曼降解确定 N 末端序列为 :MDVIGGN。
- [0643] 通过 SDS-PAGE 确定的相对分子量是大约 $M_r = 20\text{kDa}$ 。
- [0644] 通过完整分子量分析确定的分子量是 16027.3Da。
- [0645] 成熟序列 (来自质谱数据和埃德曼降解数据和 DNA 测序) :
- [0646] MDVIGGNAYYMGNNGRCSVGFVTVQGGFVTAGHCGTTGTSTSSPSGTFAGSSFPGN DYAFVRTGSGDTL
RPWVNM YNGSARVVSGSSVAPVGS S ICRSGSTTGWHCGVQVQAFNQTVRYAEGTVTGLTRTNVCAEPGDSGGSFISG
NQAQGMTSGSGNCTF (SEQ ID NO:3)
- [0647] 来自这一成熟序列的计算的分子量是 16027.4Da。
- [0648] 实例 4 :大豆 - 玉米粉活性测定法
- [0649] 采用使用大豆 - 玉米粉作为底物的终点测定以获得在 pH 3-7 时该蛋白酶的 pH- 活性曲线。
- [0650] 底物 :将大豆粉 - 玉米粉以 30:70 比例混合物。
- [0651] 测定缓冲液 :制备包含 100mM 琥珀酸,100mM HEPES,100mM CHES,100mM CAPS,1mM CaCl_2 ,150mM KCl,0.01% Triton X-100 的 9 种缓冲液并使用 HCl 或 NaOH 调节至一 pH 值这样使得在将大豆 - 玉米粉底物 (1g) 与测定缓冲液 (10mL) 混合之后给出一种浆体,该浆体的终 pH 是以下 pH 之一 :3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 以及 11.0。
- [0652] 在添加蛋白酶并在 40 °C 下孵育 (500rpm)3 小时之前将底物浆体 (2mL) 混合 30min。将蛋白酶 (200mg 酶蛋白 /kg 干物质) 溶解于 100 μl 100mM 乙酸钠缓冲液 (9.565g/L NaOAc,1.75g/L 乙酸,5mM CaCl_2 ,0.01% BSA,0.01% 吐温 20,pH 6.0) 中并且添加。将样品离心 (10min,4000rpm,0 °C) 并且将收集的上清液使用邻苯二甲醛 (OPA) 测定法进行分析。
- [0653] 结果示于下表 7 和图 5 中。来自绿色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1 对大豆 - 玉米粉的蛋白水解活性随着 pH 从 pH 3 增加至 pH 7 而增高。pH 6-7 下的活性稍许高于 10R 蛋白酶,表明来自绿色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1 在 pH 为 7 左右的猪和家禽的小肠中、在 pH 位于范围 4-6 内的家禽的嗉囊中以及在饲喂后很短时间 pH 即可高达 pH 6-7 的猪的胃中的蛋白水解方面可能具有更有效的潜力。
- [0654] 表 7 :在 pH 3.0、4.0、5.0、6.0 及 7.0 下对大豆 - 玉米粉的蛋白酶活性 ($\text{OD}_{340\text{x}}$ 稀释因子) (40 °C)
- [0655]

pH	来自绿色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1		10R 蛋白酶	
	平均数	标准差	平均数	标准差
3.0	0.13	0.01	0.22	0.06
4.0	0.37	0.03	0.30	0.10
5.0	0.79	0.08	0.71	0.01
6.0	2.00	0.04	1.81	0.14
7.0	3.32	0.23	2.92	0.11

[0656] 实例 5 :体外消化测定

[0657] 使用体外消化测定,在被设计为模拟在单胃动物中消化的设置中,评估来自绿色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1 对饲料底物(以 30:70 比例混合的大豆粉-玉米粉)的作用。

[0658] 该孵育过程由以下组成:在 pH 3 下用猪胃蛋白酶的胃消化阶段(SP7000,西格玛奥德里奇(Sigma-Aldrich),圣路易斯,密苏里州,美国),接着是在 pH 3.8 下的短十二指肠孵育以及在 pH 7.0 下用胰酶的小肠孵育(8xUSB, P-7545,西格玛奥德里奇(Sigma-Aldrich),圣路易斯,密苏里州,美国)。

[0659] 该体外消化是使用了一种基于吉尔森(Gilson)液体处理机(生物实验室公司(Biolab),丹麦)的自动化系统进行的。对于每份样品,将 0.8g 饲料称取到一个管中,并且将所有管放置在液体处理机中(40°C,500rpm)。溶液添加以及 pH 测量是自动进行的。在 0min 的时间,添加 4.1mL HCl(24mM CaCl₂) 以在该溶液达到 pH 3.0。在 30min 的时间,添加 0.5ml HCl(24mM CaCl₂,3000U 胃蛋白酶/g 饲料)以及 100 μL 的 100mM 乙酸钠缓冲液(258.6g NaOAc 每升,0.57%乙酸,pH 6.0)。在 90min 的时间,添加 900 μL NaOH 以达到 pH 约 3.8 并且在 120min 的时间添加包含 6.5mg 胰酶/g 饲料的 400 μL 的 1MNaHCO₃ 溶液以使得在该溶液达到 pH 6.8。在 30、60、90、115、120 和 180min 的时间测量 pH。在 30min 的时间经由 100 μL NaOAc 缓冲液添加测试蛋白酶(100mg 酶蛋白/kg 饲料)。

[0660] 在测定中,将使用 LECO FP-528 蛋白质/氮分析仪测量的可溶粗蛋白水平(N×6.25)用作蛋白酶效力的指示。使用邻苯二甲醛(OPA)测定法分析伯胺并且使用吸光度值根据下式计算蛋白水解度(DH):

$$[0661] \quad DH(\%) = 100 \times h/h_{tot},$$

[0662] 其中 h_{tot} 是每蛋白等效物的肽键的总数,在此根据安德尔-尼森(Adler-Nissen)(食物蛋白的酶水解(J.Enzymic Hydrolysis of Food Proteins),爱思唯尔应用科学出版社,1986)使用大豆的值(7.8g 等效物/kg 蛋白)。h 是水解的键的数目,表示为:

$$[0663] \quad h = (\text{丝氨酸}-\text{NH}_2-\beta) / \alpha \text{ 毫当量/g 蛋白},$$

[0664] 其中 $\alpha = 0.970$ 并且 $\beta = 0.342$,根据安德尔-尼森(Adler-Nissen)(通过三硝基苯磺酸确定食物蛋白水解产物的水解度(Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid),农业与食品化学杂志(Journal of Agricultural and Food Chemistry),27:1256-1262.1979)。丝氨酸-NH₂

计算为：

[0665] 丝氨酸-NH₂ = (OD_{空白} - OD_{样品}) / (OD_{标准} - OD_{空白}) × 0.9516 毫当量 / L × 0.1 × 100 / X × P,

[0666] 其中丝氨酸-NH₂ = 毫当量丝氨酸-NH₂ / g 蛋白 ; X = g 样品 ; P = 在样品中蛋白% , 并且 0.1 是以升计的样品体积 (L)。

[0667] 结果示于下表 8 和 9 中。来自绿色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1 在这些样品中数值地增加可溶蛋白的量以及蛋白水解度, 表明在该测定中, 来自绿色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1 的蛋白水解活性在内源蛋白酶之上。不可能统计地区别这两种蛋白酶并且因此必须认为它们在该测定中表现同样良好, 也表明在体内水解蛋白的潜力相等。

[0668] 表 8 : 使用来自绿色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1 或蛋白酶 10R 处理之后, 作为体外消化样品中的全部蛋白的百分比的可溶性蛋白水平

[0669]

酶 (mg 酶蛋白/kg 饲料)	可溶性蛋白占全部的 (%)	
	平均数	标准差
没有酶	91.30 ^b	1.36
绿色糖单孢菌 (100)	94.41 ^{ab}	2.15
蛋白酶 10R (100)	96.18 ^a	2.67

[0670] 没有通过相同的上标字母连贯的^{a, b}值是通过图基克雷默 (Tukey Kramer) 检验 ($\alpha = 0.05$) (由 ANOVA 程序 (SAS 研究所有限公司) (SAS Institute Inc.) 提供) 确定的具有统计性差异 ($P < 0.05$)。

[0671] 表 9 : 在来自绿色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1 或蛋白酶 10R 处理之后, 体外消化样品中的蛋白水解度 (DH)

[0672]

酶 (mg 酶蛋白/kg 饲料)	DH (%)	
	平均数	标准差
没有酶	29.90 ^{bc}	0.42

[0673]

绿色糖单孢菌 (100)	30.38 ^{ab}	1.16
蛋白酶 10R (100)	31.90 ^a	0.69

[0674] 没有通过相同的上标字母连贯的^{a, b, c}值是通过图基克雷默检验 ($\alpha = 0.05$) (由 ANOVA 程序 (SAS 研究所有限公司) 提供) 确定的具有统计性差异 ($P < 0.05$)。

[0675] 实例 6 : 嗦囊、砂囊和回肠消化物的蛋白水解活性

[0676] 收集来自喂食玉米 - 大豆饮食的 21 天大的肉仔鸡的嗦囊、砂囊和回肠消化物材料 ; 冻干并用小型磨咖啡机进行研磨。将这些研磨的样品悬浮 (47% w/v) 于以下的缓冲液中并且使其在 4°C 与水化合过夜 (不搅拌) :

[0677] 嗦囊缓冲液 : 100mM HEPES, 1mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 150mM KCl, 0.01% Triton X-100, 使用 HCl 调节至 pH 5

[0678] 砂囊缓冲液 : 100mM 琥珀酸, 1mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 150mM KCl, 0.01% Triton X-100, 使用 HCl 调节至 pH 1.67

[0679] 回肠缓冲液 : 100mM HEPES, 1mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 150mM KCl, 0.01% Triton X-100, 使用 HCl 调节至 pH 7.2

[0680] 过夜水合后, 所得 pH 是 : 在嗦囊样品中 pH 5 ; 在砂囊样品中 pH3 ; 以及在回肠样品中 pH 7。将悬浮液拿至 40°C 并分配到试管中。将代表空白 (T_0) 的三个管即刻离心 (3000x g, 0°C, 10min) 并冷冻上清液。向这些管中添加在 50 μ L 100mM 乙酸钠缓冲液 (9.565g/1NaOAc, 1.75g/1 乙酸, 5mM CaCl_2 , 0.01% BSA, 0.01% 吐温 20, pH6.0) 中的酶 (200mg 酶蛋白/kg 底物) 或针对空白样品仅添加乙酸钠缓冲液 (50 μ L), 并且在 40°C 下伴随振荡 (500rpm), 将嗦囊和回肠样品孵育 3 小时 (T_3) 而将砂囊样品孵育 1 小时 (T_1)。将这些样品离心 (3000x g, 0°C, 10min) 并且回收上清液并冷冻。使用邻苯二甲醛 (OPA) 测定法通过分析伯胺确定蛋白水解活性。

[0681] 这些结果示于表 10 中。对于这些消化物类型 (嗦囊、砂囊和回肠) 中的每种, 在空白 T_0 样品中的伯胺的水平之间具有显著差异, 并将这些空白样品孵育 1 或 3 小时 (表 9)。这一差异可归于底物中存在的以及源自饮食原料或动物的蛋白酶的活性。在孵育该嗦囊消化物期间, 与孵育 3 小时的空白样品相比, 来自绿色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1 进一步提高了伯胺的水平, 证明了在给定的条件下该蛋白酶对该底物具有蛋白水解活性。不可能将来自绿色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1 与蛋白酶 10R 的活性区别开来, 表明两种蛋白酶具有相同的降解肉仔鸡的嗦囊中的蛋白的潜力。在砂囊消化物上不能显示出蛋白水解效果, 这也是未预料到的, 归因于这两种蛋白酶的 pH- 活性特性。使用回肠消化物作为底物, 显示了来自绿色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1 和蛋白酶 10R 两者的数值作用, 表明两种蛋白酶可能都能够降解未被肉仔鸡消化和利用的蛋白。

[0682] 表 10 : 与蛋白酶 10R 相比, 当用肉仔鸡消化物孵育时, 来自绿色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1 的蛋白水解活性, 并表示为由 OPA 测定法所测量的伯胺的水平 ($\text{OD}_{340} \times$ 稀释因子)

[0683]

处理	嗦囊 (3 小时)	砂囊 (1 小时)	回肠 (3 小时)
空白 T_0	2.21 \pm 0.02 ^c	2.95 \pm 0.02 ^b	9.37 \pm 0.08 ^b
空白	3.54 \pm 0.02 ^b	3.85 \pm 0.08 ^a	14.40 \pm 1.03 ^a
绿色糖单孢菌	3.77 \pm 0.02 ^a	3.78 \pm 0.06 ^a	14.83 \pm 0.45 ^a
蛋白酶 10R	3.85 \pm 0.09 ^a	3.87 \pm 0.21 ^a	14.74 \pm 0.12 ^a

[0684] 在一栏中的没有通过相同的上标字母连贯的^{a,b,c}值是通过图基克雷默检验($\alpha = 0.05$) (由 ANOVA 程序 (SAS 研究所有限公司) 提供) 确定的具有统计性差异。

[0685] 实例 7: 使用液体和粉末洗涤剂, 来自绿色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1 的 AMSA 洗涤性能

[0686] 使用自动机械应力测定, 使用一种液体洗涤剂和一种粉末洗涤剂, 在 2 种不同的洗涤温度下, 在 3 种不同的技术污物上, 测试来自绿色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1 的洗涤性能。

[0687] 如在 AMSA 中针对衣物洗涤方法所描述的, 使用单循环洗涤程序, 用描述于表 2 中的洗涤剂组合物和小块布样执行实验, 并且实验条件如下表 11 中所指定。

[0688] 表 11: 用于表 12 和 13 的 AMSA 的实验条件。

[0689]

测试溶液	2.5g/L 粉末标准洗涤剂 A 或 8g/L 液体
	标准洗涤剂 B
测试溶液体积	160 μ L
pH	按原来的情况
洗涤时间	20 分钟
温度	20°C 或 40°C
水硬度	15° dH
蛋白酶浓度	0 (空白) 或 30nM
小块布样	PC-03, C-10, PC-05

[0690]

[0691] 通过将 CaCl_2 、 MgCl_2 、以及 NaHCO_3 ($\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}:\text{CO}_3^{2-} = 4:1:7.5$) 添加到测试系统中将水硬度调节至 15° dH。在洗涤之后, 将纺织品用自来水冲洗并干燥。

[0692] 表 12: 与不具有蛋白酶的洗涤剂相比, 包含来自绿色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1 的洗涤剂的 Δ 强度值

[0693]

小块布样	洗涤剂 A (2.5 g/L), 在 20°C 下	洗涤剂 B (8 g/L), 在 20°C 下	洗涤剂 A (2.5 g/L), 在 40°C 下	洗涤剂 B (8 g/L), 在 40°C 下
PC-03	9	8	36	30
C-10	10	7	28	22
PC-05	43	37	40	70

[0694] 结果显示与不具有任何蛋白酶的洗涤剂相比, 包含来自绿色糖单孢菌的 S1 蛋白

酶 1 的洗涤剂在去污方面更有效。来自绿色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1 甚至在 20°C 下,在去除血液 / 牛奶 / 油墨污物方面也是非常有效的。

[0695] 表 13 :与包含蛋白酶 10R 的洗涤剂相比,包含来自绿色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1 的洗涤剂的相对洗涤性能值

[0696]

小块布样	洗涤剂 A (2.5 g/L),	洗涤剂 B (8 g/L),	洗涤剂 A (2.5 g/L),	洗涤剂 B (8 g/L),
------	---------------------	-------------------	---------------------	-------------------

[0697]

	在 20°C 下	在 20°C 下	在 40°C 下	在 40°C 下
PC-03	108%	120%	118%	112%
C-10	128%	154%	105%	98%
PC-05	92%	103%	107%	104%

[0698] 结果显示与包含蛋白酶 10R 的洗涤剂相比,包含来自绿色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1 的洗涤剂在去污方面通常是更有效的,并且在 20°C 下,在去除油 / 牛奶 / 颜料污物方面是尤其更有效的。

[0699] 实例 8 :使用液体洗涤剂的来自绿色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1 在不同水硬度和蛋白酶浓度中的 AMSA 洗涤性能

[0700] 使用自动机械应力测定,使用一种液体洗涤剂,在 3 种不同水硬度和 2 种不同的酶浓度下,在 3 种不同的技术污物上,测试来自绿色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1 的洗涤性能。

[0701] 如在 AMSA 中针对衣物洗涤方法所描述的,使用单循环洗涤程序,用描述于表 2 中的洗涤剂组合物和小块布样执行实验,并且实验条件如下表 14 中所指定。

[0702] 表 14 :用于表 15、16 和 17 的 AMSA 的实验条件。

[0703]

测试溶液	2g/L 液体标准洗涤剂 B
测试溶液体积	160 μ L
pH	按原来的情况
洗涤时间	20 分钟
温度	40°C
蛋白酶浓度	0(空白)、5nM 或 30nM
小块布样	EMPA117EH, PC-03, C-10

[0704] 通过将 CaCl_2 和 MgCl_2 ($\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+} = 5:1$) 添加到测试系统中,将水硬度调节至 6、16 或 24° dH。在洗涤之后,将纺织品用自来水冲洗并干燥。

[0705] 表 15 :在 40℃下,与不具有蛋白酶的洗涤剂相比,包含来自绿色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1 或赛威蛋白酶的洗涤剂对 EMPA117EH 小块布样的 Δ 强度酶值

[0706]

酶浓度	5nM	5nM	5nM	30nM	30nM	30nM
水硬度	6° dH	16° dH	24° dH	6° dH	16° dH	24° dH
赛威蛋白酶	-1	2	14	21	21	51
绿色糖单孢菌	28	21	17	67	58	52

[0707] 结果显示与不具有蛋白酶的洗涤剂以及与包含赛威蛋白酶的洗涤剂两者相比,在低至中等的水硬度下,包含来自绿色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1 的洗涤剂在去除棉布 / 聚酯上的血液 / 牛奶 / 油墨污物方面是尤其有效的。

[0708] 表 16 :在 40℃下,与不具有蛋白酶的洗涤剂相比,包含来自绿色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1 或赛威蛋白酶的洗涤剂对 PC-03 小块布样的 Δ 强度酶值

[0709]

酶浓度	5nM	5nM	5nM	30nM	30nM	30nM
水硬度	6° dH	16° dH	24° dH	6° dH	16° dH	24° dH
赛威蛋白酶	2	5	1	13	18	18
绿色糖单孢菌	9	8	13	24	20	28

[0710] 结果显示与不具有蛋白酶的洗涤剂以及与包含赛威蛋白酶的洗涤剂两者相比,在低至中等的水硬度下,包含来自绿色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1 的洗涤剂在去除棉布 / 聚酯上的巧克力 - 牛奶 / 油墨污物方面是尤其有效的。

[0711] 表 17 :在 40℃下,与不具有蛋白酶的洗涤剂相比,包含来自绿色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1 或赛威蛋白酶的洗涤剂对 C-10 小块布样的 Δ 强度酶值

[0712]

酶浓度	5nM	5nM	5nM	30nM	30nM	30nM
水硬度	6° dH	16° dH	24° dH	6° dH	16° dH	24° dH
赛威蛋白酶	1	2	2	8	13	15
绿色糖单孢菌	11	6	6	21	18	18

[0713]

[0714] 结果显示与不具有蛋白酶的洗涤剂以及与包含赛威蛋白酶的洗涤剂两者相比,在低至中等的水硬度下,包含来自绿色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1 的洗涤剂在去除油 / 牛奶 / 颜料污物方面是有效的。

[0715] 实例 9 :使用 AMSA 评估来自绿色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1 在液体洗涤剂中的稳定

性

[0716] 使用自动机械应力测定,通过检查具有蛋白酶的洗涤剂在 2 种不同洗涤温度下的洗涤性能来测试来自绿色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1 在洗涤剂中的稳定性。测试以下 3 种不同的稳定性条件:

[0717] 在洗涤之前立即将该蛋白酶添加至洗涤剂组合物中;

[0718] 将该蛋白酶在 25°C 下与洗涤剂预孵育 48 小时;以及

[0719] 在开始洗涤之前,将洗涤液在 40°C 下预孵育 30 分钟。

[0720] 如在自动机械应力测定 (AMSA) 中针对衣物洗涤方法所描述的,使用单循环洗涤程序,用描述于表 2 中的洗涤剂组合物和小块布样执行实验,并且实验条件如下表 18 中所指定。

[0721] 表 18:用于表 19 的 AMSA 的实验条件。

[0722]

测试溶液	8g/L 液体标准洗涤剂 B
测试溶液体积	160 μ L
pH	按原来的情况
洗涤时间	20 分钟
温度	20°C 或 40°C
水硬度	15° dH
蛋白酶浓度	0(空白) 或 30nM
小块布样	PC-05

[0723] 通过将 CaCl_2 、 MgCl_2 、以及 NaHCO_3 ($\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}:\text{CO}_3^{2-} = 4:1:7.5$) 添加到测试系统中将水硬度调节至 15° dH。在洗涤之后,将纺织品用自来水冲洗并干燥。

[0724] 表 19:与不具有蛋白酶的洗涤剂相比,包含来自绿色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1 的洗涤剂对 PC-05 小块布样的 Δ 强度值

[0725]

	20°C 下的 Δ 洗涤性能			40°C 下的 Δ 洗涤性能		
	新鲜酶	在 40°C 下预孵育 ½ 小时	25°C 下的 48 小时洗涤剂中稳定性	新鲜酶	在 40°C 下预孵育 ½ 小时	25°C 下的 48 小时洗涤剂中稳定性
<i>绿色糖单孢菌</i>	33 ± 9	41 ± 1	33 ± 0	81 ± 3	94 ± 3	77 ± 3

[0726] 结果显示包含来自绿色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1 的洗涤剂在液体洗涤剂中在 20°C 下存储 48 小时后具有与在洗涤之前立即添加至洗涤剂中的新鲜酶相同的洗涤性能。这显示在这些条件下,来自绿色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1 显示出洗涤剂稳定性。

[0727] 此外,结果显示包含来自绿色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1 的洗涤剂在 40°C 下的洗涤液的 30 分钟预孵育后具有与在洗涤之前立即添加至洗涤剂中的用新鲜酶制备的洗涤液相同的洗涤性能。这显示在这些条件下,来自绿色糖单孢菌的 S1 蛋白酶 1 显示出洗涤中稳定性。

[0728] 实例 10 :热稳定性

[0729] 将蛋白酶的蛋白样品的等分部分(如实例 2 中所述的经过纯化的)脱盐或使用预装 PD-10 柱改变缓冲液为 20mM 乙酸钠, pH 4.0 或在 4°C 下以 2-3h 步骤针对 2x 500ml 20mM 乙酸钠, pH 4.0 进行透析,随后是一个过夜步骤。将该样品进行 0.45 μ m 过滤并用缓冲液稀释至大约 2A280 单位。在差示扫描量热法(DSC)中使用该透析缓冲液作为参照。使用真空吸引器对这些样品进行脱气并搅拌大约 10 分钟。

[0730] 以 1.5°C/min 的恒定扫描速率从 20°C -90°C 在 MicroCal VP-DSC 上进行 DSC 扫描。使用 MicroCal 原点软件(Origin software)(4.10 版本)进行数据处理,并将变性温度 T_d (也称为熔解温度 T_m) 定义为温度自记曲线的峰尖端的温度。

[0731] 实例 11 :蒸汽稳定性

[0732] 可以使用以下测定法评价蒸汽处理后该蛋白酶的残余活性。

[0733] 在这些试验中,使用修改设置从而该蒸汽是从蒸汽发生器中提供的并被导入到箱中。当温度达到约 93°C -94°C 时,通过抽屉将放置在板上的这些样品插入到该箱中。插入这些样品后,温度即降低 4°C。当温度停留在大约恒定的 90°C 时,孵育 30 秒。其后,将该板快速从该箱中移出,将这些样品放置在冰上,重悬浮并针对蛋白酶活性使用 Suc-AAPF-pNA 或邻苯二甲醛(OPA)测定法进行评价。将每个酶样品与未经过蒸汽处理的相似样品进行对比以计算残余活性。

[0734] 实例 12 :造丸稳定性测试

[0735] 如美国专利号 4,106,991,实例 1 中所述的方式进行酶粒化。将获得的颗粒在流化床中干燥至含水量低于 1% 并过筛以获得具有 250 μ m 至 850 μ m 粒子范围的产物。最终,将该产物用棕榈油和碳酸钙以如在美国专利号 4,106,991,实例 22 中所述的方式进行包衣。

[0736] 在小型卧式搅拌器中,大致地将 50g 酶颗粒与 10kg 饲料预混合 10 分钟。在大型卧

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

[0737] 使用 Suc-AAPF-pNA 测定法,在造丸之前测量蛋白酶活性,并在造丸之后测量该饲料丸中的蛋白酶活性。通过将丸状饲料中的蛋白酶活性相对于非丸状饲料中的活性相对比以确定造丸稳定性。

[0001]

序列表

<110> 诺维信公司

<120> 具有蛋白酶活性的多肽在动物饲料和洗涤剂中的用途

<130> 12163

<150> EP12172756.4

<151> 2012-06-20

<160> 14

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 1146

<212> DNA

<213> 绿色糖单孢菌

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1143)

<220>

<221> 信号肽

<222> (1)..(96)

<220>

<221> 成熟肽

<222> (595)..(1074)

<400> 1

atg cta ccg aag	aag cac aga ctc gtc	gct cgg atg acc gcg acc	45
Met Leu Pro Lys	Lys His Arg Leu Val	Ala Arg Met Thr Ala Thr	
	-195	-190	-185

gcg atg ctg gct	gcg gga acg gcc gcg	gcg gtc gcc ctg ccc gcg	90
Ala Met Leu Ala	Ala Gly Thr Ala Ala	Ala Val Ala Leu Pro Ala	
	-180	-175	-170

acc gcg gaa acg	gtg aca ceg cag acg	gaa gtc acg gcc gag gcg	135
-----------------	---------------------	-------------------------	-----

[0002]

Thr Ala Glu Thr Val Thr Pro Gln Thr Glu Val Thr Ala Glu Ala	
-165	-160 -155
gac ccg atg ctg cag gcc atg cag cgc gac ctg gga ctg acg gcc	180
Asp Pro Met Leu Gln Ala Met Gln Arg Asp Leu Gly Leu Thr Ala	
-150	-145 -140
cag gag gcg caa cag cgg ctg gag cag gag tct gtg gcg cgc acg	225
Gln Glu Ala Gln Gln Arg Leu Glu Gln Glu Ser Val Ala Arg Thr	
-135	-130 -125
ctg gac gag acc ctg cgc gcc aag ttg cag gac aac ttc gga ggc	270
Leu Asp Glu Thr Leu Arg Ala Lys Leu Gln Asp Asn Phe Gly Gly	
-120	-115 -110
tcg tac tac gac gcc gac acc ggg acc ctg gtg gtg ggt gtg acc gag	318
Ser Tyr Tyr Asp Ala Asp Thr Gly Thr Leu Val Val Gly Val Thr Glu	
-105	-100 -95
gcg tcc gcg ttg gac gac gtg cgg gcc gcc ggc gcc aag gcc aag ctc	366
Ala Ser Ala Leu Asp Asp Val Arg Ala Ala Gly Ala Lys Ala Lys Leu	
-90	-85 -80
gtc gac gcc agc atc gac gaa ctc aac acg gcg gtg gac cgg ctc gac	414
Val Asp Ala Ser Ile Asp Glu Leu Asn Thr Ala Val Asp Arg Leu Asp	
-75	-70 -65
cgc aag gaa agc agc gcc ccc gaa tcg gtc acc gcc tgg tac gtc gac	462
Arg Lys Glu Ser Ser Ala Pro Glu Ser Val Thr Gly Trp Tyr Val Asp	
-60	-55 -50 -45
gtc aag aac aac tcg gtg gtc gtc acc acc gcg ccc ggc acg gcc gcg	510
Val Lys Asn Asn Ser Val Val Val Thr Thr Ala Pro Gly Thr Ala Ala	
-40	-35 -30
cag gcc gag aaa ttc gtg gcg gcg tcc ggg gtc gac ggt gac aac gtc	558
Gln Ala Glu Lys Phe Val Ala Ala Ser Gly Val Asp Gly Asp Asn Val	
-25	-20 -15
gag atc gtg gag tcc acc gaa cag ccc cgc acc ttc atg gac gtc atc	606
Glu Ile Val Glu Ser Thr Glu Gln Pro Arg Thr Phe Met Asp Val Ile	
-10	-5 -1 1
ggc gcc aac gcc tac tac atg ggt aat gcc ggt cgt tgc tcg gtc gga	654

[0003]

Gly Gly Asn Ala Tyr Tyr Met Gly Asn Gly Gly Arg Cys Ser Val Gly	
5	10 15 20
ttc acc gtg cag ggc ggc ttc gtg acc gcc ggc cac tgc ggc acc acc	702
Phe Thr Val Gln Gly Gly Phe Val Thr Ala Gly His Cys Gly Thr Thr	
	25 30 35
ggc acc tcc acg teg teg ccc ago ggc acc ttc gcc ggc teg teg ttc	750
Gly Thr Ser Thr Ser Ser Pro Ser Gly Thr Phe Ala Gly Ser Ser Phe	
	40 45 50
ccg ggc aac gac tac gcc ttc gtc cgc acc ggt tcc ggt gac acg ctg	798
Pro Gly Asn Asp Tyr Ala Phe Val Arg Thr Gly Ser Gly Asp Thr Leu	
	55 60 65
cgc ccg tgg gtc aac atg tac aac ggc tcc gct cgc gtc gtc tcc ggc	846
Arg Pro Trp Val Asn Met Tyr Asn Gly Ser Ala Arg Val Val Ser Gly	
	70 75 80
tcc agc gtg gcc ccg gtc ggc teg teg atc tgc cgc teg ggt tcc acc	894
Ser Ser Val Ala Pro Val Gly Ser Ser Ile Cys Arg Ser Gly Ser Thr	
85	90 95 100
acc ggc tgg cac tgc ggc cag gtc cag gcc ttc aac cag acc gtg cgt	942
Thr Gly Trp His Cys Gly Gln Val Gln Ala Phe Asn Gln Thr Val Arg	
	105 110 115
tac gcg gag ggc acc gtc acc ggt ctg acc cgc acc aac gtc tgc gcc	990
Tyr Ala Glu Gly Thr Val Thr Gly Leu Thr Arg Thr Asn Val Cys Ala	
	120 125 130
gag ccg ggt gac teg ggt ggc teg ttc atc teg ggc aac cag gct cag	1038
Glu Pro Gly Asp Ser Gly Gly Ser Phe Ile Ser Gly Asn Gln Ala Gln	
	135 140 145
ggc atg acc tcc ggt ggc tcc ggt aac tgc acc ttc ggt ggc acc acg	1086
Gly Met Thr Ser Gly Gly Ser Gly Asn Cys Thr Phe Gly Gly Thr Thr	
	150 155 160
tac ttc cag ccg gtc aac gaa gta ctg agc gcc tac aac ctg agg ctg	1134
Tyr Phe Gln Pro Val Asn Glu Val Leu Ser Ala Tyr Asn Leu Arg Leu	
165	170 175 180
atc acc ggc tga	1146

[0004]

Ile Thr Gly

<210> 2

<211> 381

<212> PRT

<213> 绿色糖单孢菌

<400> 2

Met Leu Pro Lys Lys His Arg Leu Val Ala Arg Met Thr Ala Thr
 -195 -190 -185

Ala Met Leu Ala Ala Gly Thr Ala Ala Ala Val Ala Leu Pro Ala
 -180 -175 -170

Thr Ala Glu Thr Val Thr Pro Gln Thr Glu Val Thr Ala Glu Ala
 -165 -160 -155

Asp Pro Met Leu Gln Ala Met Gln Arg Asp Leu Gly Leu Thr Ala
 -150 -145 -140

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

Leu Asp Glu Thr Leu Arg Ala Lys Leu Gln Asp Asn Phe Gly Gly
 -120 -115 -110

Ser Tyr Tyr Asp Ala Asp Thr Gly Thr Leu Val Val Gly Val Thr Glu
 -105 -100 -95

Ala Ser Ala Leu Asp Asp Val Arg Ala Ala Gly Ala Lys Ala Lys Leu
 -90 -85 -80

Val Asp Ala Ser Ile Asp Glu Leu Asn Thr Ala Val Asp Arg Leu Asp

[0005]

105 110 115
 Tyr Ala Glu Gly Thr Val Thr Gly Leu Thr Arg Thr Asn Val Cys Ala
 120 125 130
 Glu Pro Gly Asp Ser Gly Gly Ser Phe Ile Ser Gly Asn Gln Ala Gln
 135 140 145
 Gly Met Thr Ser Gly Gly Ser Gly Asn Cys Thr Phe Gly Gly Thr Thr
 150 155 160
 Tyr Phe Gln Pro Val Asn Glu Val Leu Ser Ala Tyr Asn Leu Arg Leu
 165 170 175 180

Ile Thr Gly

<210> 3
 <211> 160
 <212> PRT
 <213> 绿色糖单孢菌

<220>
 <221> 成熟肽
 <222> (1)..(160)

<400> 3

Met Asp Val Ile Gly Gly Asn Ala Tyr Tyr Met Gly Asn Gly Gly Arg
 1 5 10 15

Cys Ser Val Gly Phe Thr Val Gln Gly Gly Phe Val Thr Ala Gly His
 20 25 30

Cys Gly Thr Thr Gly Thr Ser Thr Ser Ser Pro Ser Gly Thr Phe Ala

[0007]

35	40	45
Gly Ser Ser Phe Pro Gly Asn Asp Tyr Ala Phe Val Arg Thr Gly Ser		
50	55	60
Gly Asp Thr Leu Arg Pro Trp Val Asn Met Tyr Asn Gly Ser Ala Arg		
65	70	75
80		
Val Val Ser Gly Ser Ser Val Ala Pro Val Gly Ser Ser Ile Cys Arg		
85	90	95
Ser Gly Ser Thr Thr Gly Trp His Cys Gly Gln Val Gln Ala Phe Asn		
100	105	110
Gln Thr Val Arg Tyr Ala Glu Gly Thr Val Thr Gly Leu Thr Arg Thr		
115	120	125
Asn Val Cys Ala Glu Pro Gly Asp Ser Gly Gly Ser Phe Ile Ser Gly		
130	135	140
Asn Gln Ala Gln Gly Met Thr Ser Gly Gly Ser Gly Asn Cys Thr Phe		
145	150	155
160		
<210> 4		
<211> 27		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 迟缓芽孢杆菌分泌信号		
<220>		
<221> 信号肽		
<222> (1)..(27)		

[0008]

<400> 4

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

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

<210> 5

<211> 1596

<212> DNA

<213> 拟诺卡氏菌属

<220>

<221> CDS

<222> (318)..(1463)

<220>

<221> 信号肽

<222> (318)..(404)

<220>

<221> 成熟肽

<222> (900)..(1463)

<400> 5

```

acgttttgta cgggtaccgg tgtccgcgat tggccagaat gcccccttgc gacagggaac      60
ggattcggtc ggtagcgcac cgactccgac aaccgcgagg tggccgttgc cgtcgcacg      120
ttctgcgacc gtcatgcgac ccacatcagg gtgaccccaac cgagctctga atggtccacc      180
gttctgacgg tctttccctc accaaaacgt gcacctaagg ttaggaagtt gtttaccgaa      240
tgtctcggtg aacgacaggg gccggaacggt atteggeccc gatccccctg tgatcccccc      300
aggagagtag ggacccc atg cga ccc tcc ccc  gtt gtc tcc gcc atc  ggt      350
           Met Arg Pro Ser Pro Val Val Ser Ala Ile Gly
           -190                    -185
acg gga gcg ctg  gcc ttc ggt ctg gcg  ctg tcc ggt acc cgg  ggt      395
    
```

[0009]

Thr Gly Ala Leu Ala Phe Gly Leu Ala Leu Ser Gly Thr Pro Gly	
-180	-175 -170
gcc ctc gcg gcc acc gga gcg ctc ccc cag tca ccc acc ccg gag	440
Ala Leu Ala Ala Thr Gly Ala Leu Pro Gln Ser Pro Thr Pro Glu	
-165	-160 -155
gcc gac gcg gtc tcc atg cag gag gcg ctc cag cgc gac ctc gac	485
Ala Asp Ala Val Ser Met Gln Glu Ala Leu Gln Arg Asp Leu Asp	
-150	-145 -140
ctg acc tcc gcc gag gcc gag gag ctg ctg gcc gcc cag gac acc	530
Leu Thr Ser Ala Glu Ala Glu Glu Leu Leu Ala Ala Gln Asp Thr	
-135	-130 -125
gcc ttc gag gtc gac gag gcc gcg gcc gag gcc gcc ggg gac gcc	575
Ala Phe Glu Val Asp Glu Ala Ala Ala Glu Ala Ala Gly Asp Ala	
-120	-115 -110
tac gcc gcc tcc gtc ttc gac acc gag agc ctg gaa ctg acc gtc ctg	623
Tyr Gly Gly Ser Val Phe Asp Thr Glu Ser Leu Glu Leu Thr Val Leu	
-105	-100 -95
gtc acc gat gcc gcc gcg gtc gag gcc gtg gag gcc acc gcc gcc ggg	671
Val Thr Asp Ala Ala Ala Val Glu Ala Val Glu Ala Thr Gly Ala Gly	
-90	-85 -80
acc gag ctg gtc tcc tac gcc atc gac ggt ctc gac gag atc gtc cag	719
Thr Glu Leu Val Ser Tyr Gly Ile Asp Gly Leu Asp Glu Ile Val Gln	
-75	-70 -65
gag ctc aac gcc gcc gac gcc gtt ccc ggt gtg gtc gcc tgg tac ccg	767
Glu Leu Asn Ala Ala Asp Ala Val Pro Gly Val Val Gly Trp Tyr Pro	
-60	-55 -50 -45
gac gtg gcg ggt gac acc gtc gtc ctg gag gtc ctg gag ggt tcc gga	815
Asp Val Ala Gly Asp Thr Val Val Leu Glu Val Leu Glu Gly Ser Gly	
-40	-35 -30
gcc gac gtc agc gcc ctg ctc gcg gac gcc gcc gtc gac gcc tcg gcc	863
Ala Asp Val Ser Gly Leu Leu Ala Asp Ala Gly Val Asp Ala Ser Ala	
-25	-20 -15
gtc gag gtg acc acg agc gac cag ccc gag ctc tac gcc gac atc atc	911

[0010]

Val Glu Val Thr Thr Ser Asp Gln Pro Glu Leu Tyr Ala Asp Ile Ile	
-10 -5 -1 1	
ggt ggt ctg gcc tac acc atg ggc ggc cgc tgt tcg gtc ggc ttc gcg	959
Gly Gly Leu Ala Tyr Thr Met Gly Gly Arg Cys Ser Val Gly Phe Ala	
5 10 15 20	
gcc acc aac gcc gcc ggt cag ccc ggg ttc gtc acc gcc ggt cac tgc	1007
Ala Thr Asn Ala Ala Gly Gln Pro Gly Phe Val Thr Ala Gly His Cys	
25 30 35	
ggc cgc gtg ggc acc cag gtg acc atc ggc aac ggc agg ggc gtc ttc	1055
Gly Arg Val Gly Thr Gln Val Thr Ile Gly Asn Gly Arg Gly Val Phe	
40 45 50	
gag cag tcc gtc ttc ccc ggc aac gac gcg gcc ttc gtc cgc ggt acg	1103
Glu Gln Ser Val Phe Pro Gly Asn Asp Ala Ala Phe Val Arg Gly Thr	
55 60 65	
tcc aac ttc acg ctg acc aac ctg gtc agc cgc tac aac acc ggc ggg	1151
Ser Asn Phe Thr Leu Thr Asn Leu Val Ser Arg Tyr Asn Thr Gly Gly	
70 75 80	
tac gcc acg gtc gcc ggt cac aac cag gcc ccc atc ggc tcc tcc gtc	1199
Tyr Ala Thr Val Ala Gly His Asn Gln Ala Pro Ile Gly Ser Ser Val	
85 90 95 100	
tgc cgc tcc ggc tcc acc acc ggt tgg cac tgc ggc acc atc cag gcc	1247
Cys Arg Ser Gly Ser Thr Thr Gly Trp His Cys Gly Thr Ile Gln Ala	
105 110 115	
cgc ggc cag tcg gtg agc tac ccc gag ggc acc gtc acc aac atg acc	1295
Arg Gly Gln Ser Val Ser Tyr Pro Glu Gly Thr Val Thr Asn Met Thr	
120 125 130	
cgg acc acc gtg tgc gcc gag ccc ggc gac tcc ggc ggc tcc tac atc	1343
Arg Thr Thr Val Cys Ala Glu Pro Gly Asp Ser Gly Gly Ser Tyr Ile	
135 140 145	
tcc ggc acc cag gcc cag ggc gtg acc tcc ggc ggc tcc ggc aac tgc	1391
Ser Gly Thr Gln Ala Gln Gly Val Thr Ser Gly Gly Ser Gly Asn Cys	
150 155 160	
cgc acc ggc ggg acc acc ttc tac cag gag gtc acc ccc atg gtg aac	1439

[0011]

Arg Thr Gly Gly Thr Thr Phe Tyr Gln Glu Val Thr Pro Met Val Asn
 165 170 175 180

tcc tgg ggc gtc cgt etc cgg acc tgatccccgc ggttccaggc ggaccgacgg 1493
 Ser Trp Gly Val Arg Leu Arg Thr
 185

tcgtgacctg agtaccaggc gtccccgcgg cttccagcgg cgtccgcacc ggggtgggac 1553

cgggcgtggc cacggcccca cccgtgaccg gaccgcccgg cta 1596

<210> 6
 <211> 382
 <212> PRT
 <213> 拟诺卡氏菌属

<400> 6

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

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

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

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

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

Asp Glu Ala Ala Ala Glu Ala Ala Gly Asp Ala Tyr Gly Gly Ser
 -115 -110 -105

Val Phe Asp Thr Glu Ser Leu Glu Leu Thr Val Leu Val Thr Asp Ala

[0012]

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

[0013]

	75		80		85
Ala Gly His Asn Gln Ala Pro Ile Gly Ser Ser Val Cys Arg Ser Gly					
90		95		100	
Ser Thr Thr Gly Trp His Cys Gly Thr Ile Gln Ala Arg Gly Gln Ser					
105		110		115	120
Val Ser Tyr Pro Glu Gly Thr Val Thr Asn Met Thr Arg Thr Thr Val					
		125		130	135
Cys Ala Glu Pro Gly Asp Ser Gly Gly Ser Tyr Ile Ser Gly Thr Gln					
		140		145	150
Ala Gln Gly Val Thr Ser Gly Gly Ser Gly Asn Cys Arg Thr Gly Gly					
		155		160	165
Thr Thr Phe Tyr Gln Glu Val Thr Pro Met Val Asn Ser Trp Gly Val					
		170		175	180
Arg Leu Arg Thr					
185					
<210> 7					
<211> 379					
<212> PRT					
<213> 深蓝糖单孢菌					
<400> 7					
Met Asn Arg Lys Thr Ala Ala Arg Leu Ile Ala Ser Val Thr Leu Ala					
1		5		10	15
Ala Gly Thr Ala Met Ala Phe Thr Leu Pro Ala Thr Ala Ala Pro Ala					
		20		25	30

[0014]

Ala Pro Asp Ser Val Val Pro Thr Thr Glu Ala Asp Pro Val Val Lys
 35 40 45

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

Leu Arg Ser Glu Ala Glu Ala Arg Lys Val His Glu Ala Val Thr Ala
 65 70 75 80

Asp Leu Gly Ala Asp Phe Ala Gly Ala His Tyr Asp Ala Ala Leu Gly
 85 90 95

Lys Leu Val Val Gly Val Thr Asp Ala Ala Glu Phe Asp Glu Val Arg
 100 105 110

Ala Ala Gly Ala Lys Pro Arg Leu Val Glu His Thr Val Ala Asp Leu
 115 120 125

Glu Gln Ala Ala Ala Ala Leu Asp Ala Lys Glu Asn Ser Ala Pro Glu
 130 135 140

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

Thr Thr Ala Val Gly Thr Ala Glu Gln Ala Glu Arg Phe Val Asp Arg
 165 170 175

Ala Gly Val Asp Ala Asp Ala Val Ala Val Val Glu Ser Lys Glu Ser
 180 185 190

Pro Arg Ala Leu Met Asp Ile Ile Gly Gly Asn Ala Tyr Tyr Met Gly
 195 200 205

[0015]

Ser Gly Gly Arg Cys Ser Ile Gly Phe Ala Val Gln Gly Gly Phe Val
 210 215 220

Thr Ala Gly His Cys Gly Thr Thr Gly Thr Ser Thr Ser Ser Pro Thr
 225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0016]

<210> 8
 <211> 378
 <212> PRT
 <213> 运青糖单孢菌

 <400> 8

 Met Asn Arg Lys Ser Ala Val Arg Val Leu Ala Ser Val Thr Met Ala
 1 5 10 15

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

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

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

 Gln Asp Glu Ala Glu Ala Arg Glu Val His Glu Thr Val Thr Ala Lys
 65 70 75 80

 Leu Gly Ala Glu Tyr Ala Gly Ala His Tyr Asp Ala Asp Arg Gly Thr
 85 90 95

 Leu Val Val Gly Val Thr Asp Ala Ala Glu Phe Asp Ala Val Lys Ala
 100 105 110

 Ala Gly Ala Thr Pro Arg Leu Val Glu Tyr Thr Val Thr Glu Leu Glu
 115 120 125

 Ser Ala Ala Ala Lys Leu Asp Ala Lys Glu Ser Ala Ala Pro Glu Ala
 130 135 140

[0017]

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

Thr Ala Pro Gly Thr Ala Glu Lys Ala Glu Arg Phe Val Asp Arg Ala
 165 170 175

Gly Val Asp Ala Asp Ala Val Asp Val Val Glu Ser Lys Glu Ser Pro
 180 185 190

Gln Ala Leu Met Asp Ile Ile Gly Gly Asn Ala Tyr Tyr Met Gly Asn
 195 200 205

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

Ala Gly His Cys Gly Thr Thr Gly Thr Ser Thr Ser Ser Pro Thr Gly
 225 230 235 240

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

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

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

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

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

[0018]

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

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

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

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

<210> 9

<211> 377

<212> PRT

<213> 青色糖单孢菌

<400> 9

Met Asn Arg Lys Thr Ala Ala Arg Leu Ile Ala Ser Val Thr Leu Ala
 1 5 10 15

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

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

Arg Asp Leu Gly Leu Thr Lys Ala Glu Ala Glu Gln Arg Leu Arg Ser
 50 55 60

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

[0019]

Ala Asp Phe Ala Gly Ala His Tyr Asp Ala Ala Leu Gly Lys Leu Val
85 90 95

Val Gly Val Thr Asp Thr Ala Asp Phe Ala Glu Val Arg Ala Ala Gly
100 105 110

Ala Glu Pro Arg Leu Val Glu His Thr Val Ala Glu Leu Glu Lys Ala
115 120 125

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

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

Met Gly Thr Ala Glu Gln Ala Glu Arg Phe Val Thr Arg Ala Gly Val
165 170 175

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

Phe Met Asp Ile Ile Gly Gly Asn Ala Tyr Tyr Ile Gly Thr Gly Ala
195 200 205

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

His Cys Gly Ser Thr Gly Ala Thr Thr Ser Ser Pro Ser Gly Arg Phe
225 230 235 240

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

[0020]

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

Arg Val Val Ser Gly Ser Thr Val Ala Pro Val Gly Ser Ser Val Cys
 275 280 285

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

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

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

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

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

Tyr Asn Leu Arg Leu Val Thr Gly Gly
 370 375

<210> 10
 <211> 375
 <212> PRT
 <213> 弱代谢糖单孢菌

<400> 10

Met Lys Arg Thr Arg Asn Gly Phe Ala Ala Arg Ala Gly Ala Ala Ala
 1 5 10 15

Val Leu Ala Ala Gly Thr Ala Ala Ala Phe Ala Leu Pro Ala Ser Ala

[0021]

	20		25		30
Gln Pro Ala Pro Met Asp Val Asp Pro Gly Met Val Gln Ala Met Glu					
	35		40		45
Arg Asp Leu Gly Leu Ser Gly Thr Gln Ala Glu Gln Arg Leu Arg Ser					
	50		55		60
Glu Ala Thr Ala Arg Ala Val Asp Glu Thr Val Arg Ala Glu Leu Gly					
	65		70		75
Asp Ser Phe Gly Gly Ser Phe Tyr Asp Ala Asp Lys Gly Gly Leu Val					
		85		90	95
Val Ser Val Thr Asp Pro Ala Gln Leu Arg Glu Ala Arg Ala Ala Gly					
	100		105		110
Ala Glu Ala Arg Met Val Asp Asp Ser Ala Ala Glu Leu Glu Ala Ala					
	115		120		125
Ala Asn Arg Leu Asn Arg Ala Glu Ser Arg Ala Pro Gly Ser Val Thr					
	130		135		140
Gly Trp Tyr Val Asp Val Glu Arg Asn Ser Val Val Val Thr Thr Thr					
	145		150		155
Pro Gly Thr Ala Ala Gly Ala Glu Glu Phe Val Ala Ser Ala Gly Val					
		165		170	175
Asp Ala Asp Thr Ala Glu Val Val Glu Ser Ala Glu Arg Pro Arg Ala					
	180		185		190
Leu Met Asp Val Val Gly Gly Asn Ala Tyr Tyr Met Gly Ser Gly Gly					

[0022]

370

375

<210> 11
 <211> 380
 <212> PRT
 <213> 弱代谢糖单孢菌

<400> 11

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

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

Gly Ser Gly Ala Pro Val Thr Pro Ala Gly Asp Asn Asp Pro Met Ile
 35 40 45

Gln Ala Met Gln Arg Asp Leu Gly Val Asn Ala Ala Gln Ala Glu Gln
 50 55 60

Arg Leu Arg Ala Glu Ala Glu Ala Arg Gly Val Ala Asp Thr Val Arg
 65 70 75 80

Ala Glu Leu Gly Asp Ser Phe Gly Gly Ala His Phe Asp Ala Glu Arg
 85 90 95

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

Arg Ala Ala Gly Ala Glu Ala Arg Met Val Asp Ala Ser Ser Ala Glu
 115 120 125

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

[0024]

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

Val Thr Thr Ala Pro Lys Thr Arg Gly Gln Ala Thr Ala Phe Val Asn
 165 170 175

Ser Thr Gly Ala Asp Arg Ser Gln Val Glu Val Val Glu Ser Arg Glu
 180 185 190

Gln Pro Arg Ala Leu Met Asn Ile Tyr Gly Gly Asn Ala Tyr Tyr Met
 195 200 205

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

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

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

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

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

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

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

[0025]

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

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

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

Ala Leu Asn Ala Tyr Gly Leu Ser Leu Val Thr Gly
 370 375 380

<210> 12

<211> 364

<212> PRT

<213> 红色糖多孢菌

<400> 12

Ala Val Leu Ala Ala Gly Thr Ile Ala Ala Ile Gly Ala Pro Thr Val
 1 5 10 15

Gly Ala Glu Pro Val Ser Pro Asp Leu Val Ala Ala Met Glu Arg Asp
 20 25 30

Leu Gly Ile Ser Ala Gln Gln Ala His Ala Arg Leu Ala Gln Glu Ala
 35 40 45

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

Phe Gly Gly Ser Tyr Phe Asp Ala Ala Arg Gly Lys Leu Val Val Gly
 65 70 75 80

[0026]

Val Thr Glu Gln Ala Asp Ala Ala Lys Val Arg Ala Ala Gly Ala Glu
85 90 95

Ala Ala Val Val Pro Asn Ser Leu Arg Glu Leu Asp Ala Thr Lys Ala
100 105 110

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

Tyr Val Asp Val Pro Ser Ser Ser Val Val Val Ser Val Asn Gly Arg
130 135 140

Asp Ala Ala Thr Asp Ala Phe Leu Asp Lys Ala Lys Ala Ala Gly Asp
145 150 155 160

Ser Val Arg Val Gln Glu Val Ala Glu Ser Pro Arg Pro Leu Tyr Asn
165 170 175

Val Val Gly Gly Asp Ala Tyr Tyr Met Gly Gly Arg Cys Ser Val Gly
180 185 190

Phe Ser Val Arg Ser Ser Ser Gly Gln Ala Gly Phe Val Thr Ala Gly
195 200 205

His Cys Gly Thr Arg Gly Thr Ala Val Ser Gly Tyr Asn Gln Val Ala
210 215 220

Met Gly Ser Phe Gln Gly Ser Ser Phe Pro Asn Asn Asp Tyr Ala Trp
225 230 235 240

Val Ser Val Asn Ser Asn Trp Thr Pro Gln Pro Trp Val Asn Leu Tyr
245 250 255

[0027]

Asn Gly Ser Ala Arg Val Val Ser Gly Ser Ser Ala Ala Pro Val Gly
 260 265 270

Ser Ser Ile Cys Arg Ser Gly Ser Thr Thr Gly Trp His Cys Gly Ser
 275 280 285

Val Gln Ala Leu Asn Gln Thr Val Arg Tyr Ala Glu Gly Thr Val Tyr
 290 295 300

Gly Leu Thr Arg Thr Asn Val Cys Ala Glu Pro Gly Asp Ser Gly Gly
 305 310 315 320

Ser Phe Ile Ser Gly Asn Gln Ala Gln Gly Met Thr Ser Gly Gly Ser
 325 330 335

Gly Asn Cys Ser Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Phe Gln Pro Val Asn Glu
 340 345 350

Ala Leu Ser Ala Tyr Gly Leu Ser Leu Val Arg Gly
 355 360

<210> 13

<211> 378

<212> PRT

<213> 新疆糖单孢菌 XJ-54

<400> 13

Met Asn Arg Lys Asn Ala Ala Arg Leu Ile Ala Ser Val Thr Leu Ala
 1 5 10 15

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

[0028]

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

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

Arg Ser Glu Ala Glu Ala Arg Glu Val His Glu Thr Val Ser Glu Arg
 65 70 75 80

Leu Gly Ser Asp Phe Ala Gly Ala His Tyr Asp Ala Glu Arg Gly Thr
 85 90 95

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

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

Ser Ala Ala Glu Lys Leu Asp Ala Lys Glu Ser Arg Ala Pro Glu Ser
 130 135 140

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

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

Gly Val Asp Ala Asp Ala Val Asp Val Val Glu Ser Lys Glu Ser Pro
 180 185 190

Arg Ala Leu Met Asp Ile Ile Gly Gly Asn Ala Tyr Tyr Met Gly Ser
 195 200 205

[0029]

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

Ala Gly His Cys Gly Thr Thr Gly Thr Thr Thr Ser Ser Pro Thr Gly
 225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0030]

<210> 14
 <211> 378
 <212> PRT
 <213> 运青糖单孢菌 NA-128

<400> 14

Met Asn Arg Lys Ser Ala Val Arg Val Leu Ala Ser Val Thr Met Ala
 1 5 10 15

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

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

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

Gln Asp Glu Ala Glu Ala Arg Glu Val His Glu Thr Val Thr Ala Lys
 65 70 75 80

Leu Gly Ala Glu Tyr Ala Gly Ala His Tyr Asp Ala Asp Arg Gly Thr
 85 90 95

Leu Val Val Gly Val Thr Asp Ala Ala Glu Phe Asp Ala Val Lys Ala
 100 105 110

Ala Gly Ala Thr Pro Arg Leu Val Glu Tyr Thr Val Thr Glu Leu Glu
 115 120 125

Ser Ala Ala Ala Lys Leu Asp Ala Lys Glu Ser Ala Ala Pro Glu Ala
 130 135 140

Val Thr Gly Trp Tyr Val Asp Ile Glu Ala Asn Ser Ile Val Val Thr

[0031]

145	150	155	160
Thr Ala Pro Gly	Thr Ala Ala Lys Ala	Glu Arg Phe Val Asp	Arg Ala
	165	170	175
Gly Val Asp Ala	Asp Ala Val Asp	Val Val Glu Ser Lys	Glu Ser Pro
	180	185	190
Gln Ala Leu Met	Asp Ile Ile Gly Gly	Asn Ala Tyr Tyr Met	Gly Asn
	195	200	205
Gly Gly Arg Cys	Ser Val Gly Phe Ala	Val Gln Gly Gly Phe	Val Thr
	210	215	220
Ala Gly His Cys	Gly Thr Thr Gly Thr	Ser Thr Ser Ser Pro	Thr Gly
	225	230	235
Arg Phe Ala Gly	Ser Ser Phe Pro Gly	Asn Asp Tyr Ala Tyr	Val Gln
	245	250	255
Thr Gly Ser Gly	Asp Thr Leu Arg Pro	Trp Val Asn Met Tyr	Asn Gly
	260	265	270
Ser Ala Arg Val	Val Ser Gly Ser Ser	Glu Ala Pro Val Gly	Ser Ser
	275	280	285
Val Cys Arg Ser	Gly Ser Thr Thr Gly	Trp His Cys Gly Thr	Ile Glu
	290	295	300
Ala Lys Asn Gln	Thr Val Arg Tyr Ala	Glu Gly Ser Val Ser	Gly Leu
	305	310	315
Val Arg Thr Asn	Val Cys Ala Glu Pro	Gly Asp Ser Gly Gly	Ser Phe

[0032]

325

330

335

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

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

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

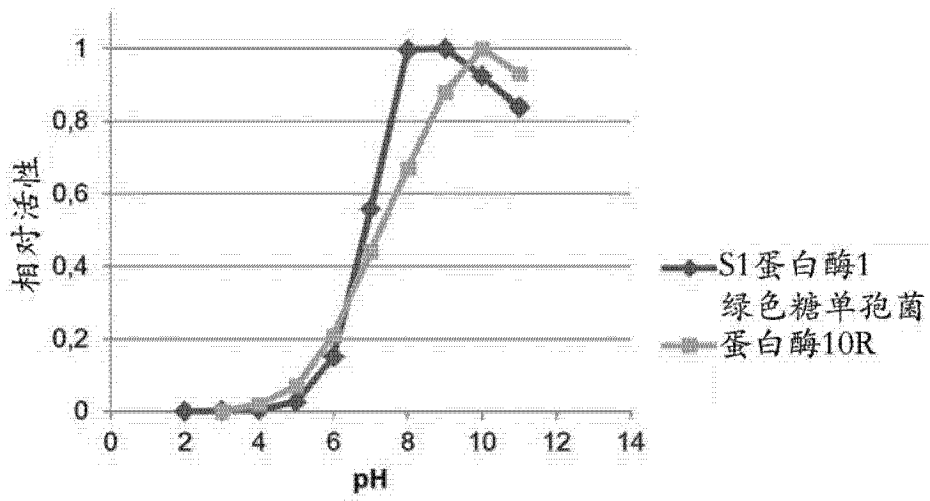


图 1

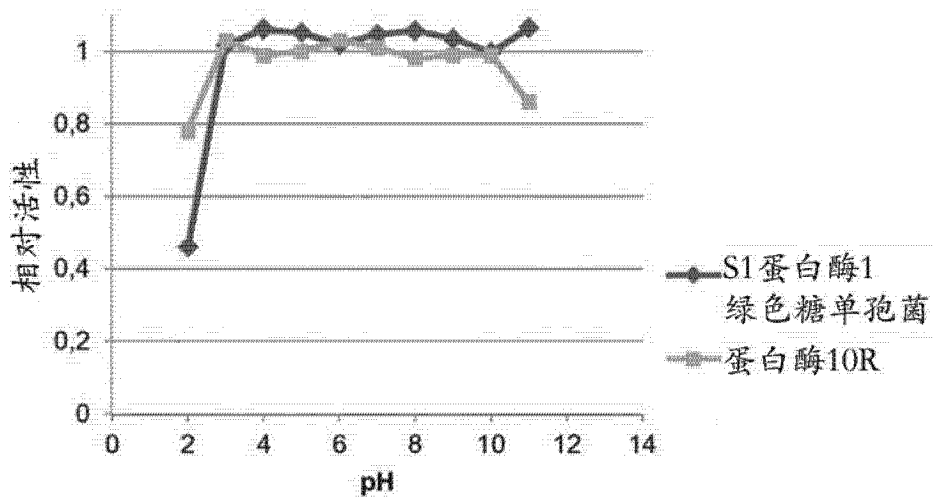


图 2

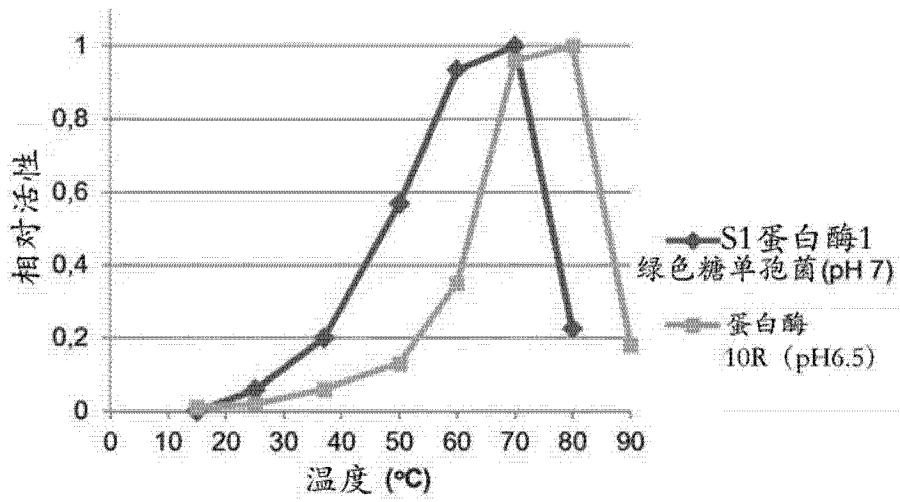


图 3

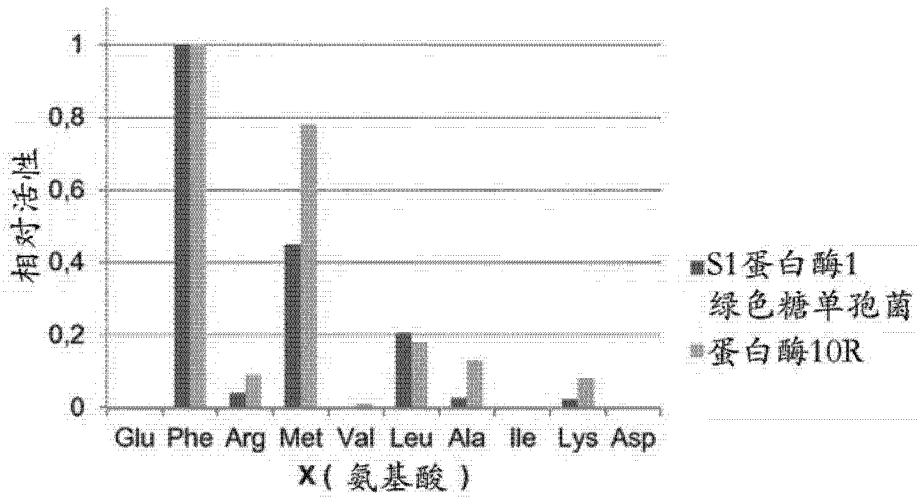


图 4

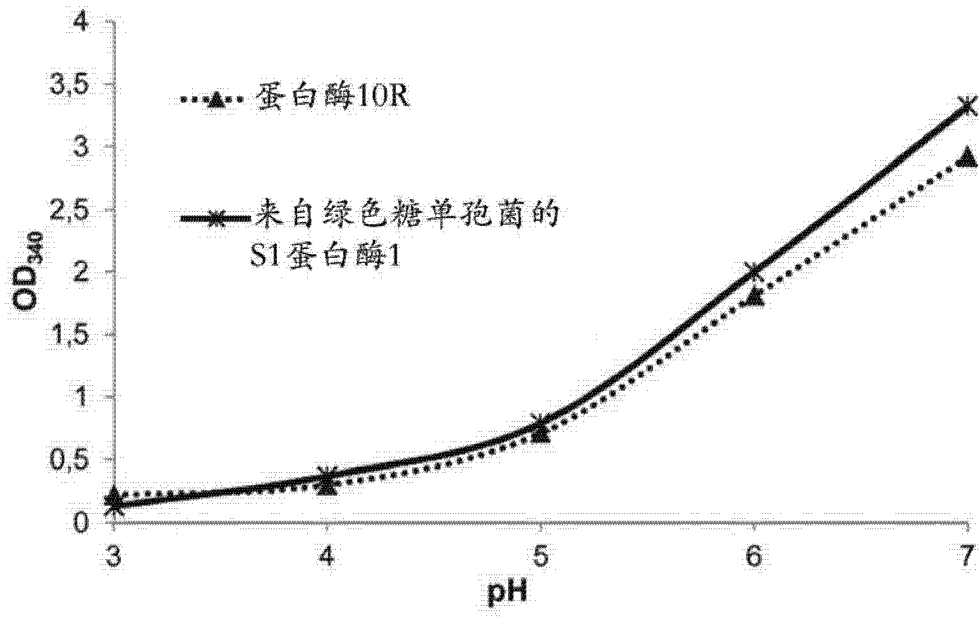


图 5