(19) 中华人民共和国国家知识产权局

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101857858 A
(43) 申请公布日 2010.10.13

(21) 申请号 201010145645.6

(22) 申请日 2001.07.12

(30) 优先权数据
200001160 2000.08.01 DK
200001354 2000.09.12 DK
200001687 2000.11.10 DK
200100655 2001.04.26 DK

(62) 分案原申请数据
01815680.0 2001.07.12

(71) 申请人 诺维信公司
地址 丹麦鲍斯韦

(72) 发明人 托马斯·西斯特德 索伦·杰鲁尔夫
卡斯滕·安德森
克劳斯·C·富格尔桑

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
代理人 史悦

(51) Int.Cl.
C12N 9/28 (2006.01)
C12N 15/56 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C11D 3/386 (2006.01)
C12P 19/14 (2006.01)
C12P 7/06 (2006.01)
D06M 16/00 (2006.01)
C12S 11/00 (2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 26 页 序列表 44 页
附图 2 页

(54) 发明名称

具有改变特性的 α - 淀粉酶突变体

(57) 摘要

本发明涉及具有改变特性的 α - 淀粉酶突变体，具体地涉及亲本 Termamyl 样 α - 淀粉酶的变体（突变体），其中相对于亲本 α - 淀粉酶该变体具有 α - 淀粉酶的活性并且显示改变的稳定性，尤其是在高温和 / 或低 pH 条件，和 / 或低 Ca^{2+} 浓度下。

1. 一种亲本 Termamyl 样 α-淀粉酶的变体，所述变体包含位点 207 的改变：

其中

(a) 所述改变分别是

(i) 在紧邻该位点的氨基酸下游的氨基酸插入，

(ii) 占据该位点的氨基酸的缺失，或

(iii) 以不同的氨基酸取代占据该位点的氨基酸，

(b) 变体具有 α-淀粉酶活性，和

(c) 每个位点相应于具有 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列的亲本 Termamyl 样 α-淀粉酶的氨基酸序列的位点。

2. 权利要求 1 所述的变体，其中该变体具有下述的突变：

D207V，L，G；使用 SEQ ID NO:8 的编号。

3. 权利要求 1 或 2 所述的变体，其中该变体具有下述的突变：K170Q+D207V+N280S；E132A+D207V；D207V+L318M；D60N+D207V+L318M；T49I+K176R+D207V+Y402F；使用 SEQ ID NO:8 的编号。

4. 权利要求 1-3 中任一项所述的变体，其中亲本 Termamyl 样 α-淀粉酶具有 SEQ ID NO:8 所示氨基酸序列且衍生于地衣芽孢杆菌的菌株，亲本 Tcrmamyl 样 α-淀粉酶具有 SEQ ID NO:10 所示氨基酸序列且衍生于解淀粉芽孢杆菌的菌株，亲本 Termamyl 样 α-淀粉酶具有 SEQ ID NO:6 所示氨基酸序列且衍生于嗜热脂肪芽孢杆菌的菌株。

5. 权利要求 1-4 中任一项所述的变体，其中亲本 Termamyl 样 α-淀粉酶是：LE174；LE174+G48A+T49I+G107A+I201F；LE174+M197L；或 LE174+G48A+T49I+G107A+M197L+I201F。

6. 权利要求 1 中所述的变体，其中该变体在下述位点发生突变：X212V，L，G；使用 SEQ ID NO:4 的编号。

7. 权利要求 1 或 6 中所述的变体，该变体具有下述的突变：E212V+N285S；D134A+E212V；E212V+X323M；D62N+E212V+X323M；T51I+K179R+E212V+Y404F；或 N195F+X212V+K269S，使用 SEQ ID NO:4 的编号。

8. 权利要求 1-7 中任一项所述的变体，其中亲本 Termamyl 样 α-淀粉酶选自：SP690(SEQ ID NO:2)；SP722(SEQ ID NO:4)；AA560(SEQ ID NO:12)；#707 α-淀粉酶 (SEQ ID NO:13)；和 KSM-AP1378。

9. 权利要求 1-8 中任一项所述的变体，其中亲本 Termamyl 样 α-淀粉酶是下述任何一种：SP722+D183*+G184*；SP722+D183*+G184*+N195F；SP722+D183*+G184*+M202L；SP722+D183*+G184*+N195F+M202L；BSG+I181*+G182*；BSG+I181*+G182*+N193F；BSG+I181*+G182*+M200L；BSG+I181*+G182*+N193F+M200L；AA560+D183*+G184*；AA560+D183*+G184*+N195F；AA560+D183*+G184*+M202L；和 AA560+D183*+G184*+N195F+M202L。

10. 权利要求 1-9 中任一项所述的变体，其中亲本 Termamyl 样 α-淀粉酶由核酸序列编码，该核酸序列与 SEQ ID NO:7 的核酸序列可在低严谨度条件下、中度严谨度条件下或高严谨度条件下杂交。

11. 权利要求 1-10 中任一项所述的变体，其中变体在 70-120℃高温和/或 pH 4-6 的低 pH 条件下具有改变的稳定性。

12. 一种DNA构建体，包含编码权利要求1-11中任一项所述的α-淀粉酶变体的DNA序列。

13. 一种重组表达载体，其携带权利要求12的DNA构建体。

14. 一种由权利要求12的DNA构建体或权利要求13的载体转化的细胞。

15. 权利要求14的细胞，其是微生物。

16. 权利要求15的细胞，其是细菌或真菌。

17. 权利要求16的细胞，其是革兰氏阳性细菌。

18. 权利要求17的细胞，所述革兰氏阳性细菌是枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、短芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、嗜碱芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、灿烂芽孢杆菌、或苏云金芽孢杆菌。

19. 一种组合物，其包含权利要求1-11中任一项所述的α-淀粉酶变体。

20. 权利要求19的组合物，其中所述α-淀粉酶是SP961。

21. 权利要求19-20中任一项所述的组合物，其中组合物进一步包括葡糖淀粉酶、支链淀粉酶和/或植酸酶。

22. 一种洗涤剂组合物，包含权利要求1-11中任一项所述的α-淀粉酶变体。

23. 权利要求22的洗涤剂组合物，还包含另一种酶。

24. 权利要求23的洗涤剂组合物，其中所述另一种酶是脂酶、过氧化物酶、另一种淀粉分解酶、葡糖淀粉酶、麦芽糖淀粉酶、环糊精糖基转移酶、甘露聚糖酶、角质酶、漆酶、和/或纤维素酶。

25. 权利要求1-11中任一项所述α-淀粉酶变体或权利要求19-24中任一项所述的组合物在淀粉液化中的用途。

26. 权利要求1-11中任一项所述α-淀粉酶变体或权利要求19-24中任一项所述组合物在乙醇生产中的用途。

27. 权利要求1-11中任一项所述α-淀粉酶变体或权利要求19-24中任一项所述组合物在清洗和/或餐具清洗中的用途。

28. 权利要求1-11中任一项所述α-淀粉酶变体或权利要求19-24中任一项所述组合物在纺织品退浆中的用途。

具有改变特性的α-淀粉酶突变体

[0001] 本发明申请是基于申请日为2001年7月12日，申请号为01815680.0(国际申请号为PCT/DK01/00488)，发明名称为“具有改变特性的α-淀粉酶突变体”的专利申请的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明涉及亲本Termamyl样(Termamyl-like)α-淀粉酶的变体(突变体)，变体具有α-淀粉酶的活性，并且相对于所述亲本α-淀粉酶其显示出下述性质中至少一种性质的改变：例如，高温和/或低pH条件，尤其是低钙浓度下的稳定性。本发明的变体适合于淀粉转化，制备乙醇，洗衣冲洗剂，餐具冲洗剂，硬表面清洗剂，纺织品退浆，和/或制备增甜剂(sweetner)。

背景技术

[0003] α(-淀粉酶(α-1,4-葡聚糖-4-葡聚糖水解酶,EC3.2.1.1)构成这样一组酶，它们催化淀粉和其他线性及分枝1,4-葡萄糖苷寡-糖和多糖的水解。

[0004] 发明简述

[0005] 本发明的目的是提供亲本Termamyl样α-淀粉酶的变体，与相应的亲本α-淀粉酶即未成熟的α-淀粉酶相比，具有α-淀粉酶的活性，并且相对于所述亲本α-淀粉酶其显示出下述性质中至少一种性质的改变：稳定性，例如在高温和/或低pH条件，尤其是低钙浓度下。

[0006] 本发明具体涉及如下方面：

[0007] 1)一种亲本Termamyl样α-淀粉酶的变体，所述变体包含一个或多个选自下述位点的改变：

[0008] 49,60,104,132,161,170,176,179,180,181,183,200,203,204,207,212,237,239,250,280,298,318,374,385,393,402,406,427,430,440,444,447,482,

[0009] 其中

[0010] (a)所述改变分别是

[0011] (i)占据该位点的氨基酸下游的氨基酸插入，

[0012] (ii)占据该位点的氨基酸的缺失，或

[0013] (iii)以不同的氨基酸取代占据该位点的氨基酸，

[0014] (b)变体具有α-淀粉酶活性，和(c)每个位点相应于具有SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的亲本Termamyl样α-淀粉酶的氨基酸序列的位点。

[0015] 2)项1所述的变体，其中该变体具有一个或多个下述的突变：

[0016] T49I;D60N;N104D;E132A,V,P;D161N;K170Q;K176R;G179N;K180T;A181N;D183N;D200N;X203Y;D204S;D207V,E,L,G;X212I;K237P;S239W;E250G,F;N280S;X298Q;L318M;Q374R;E385V;Q393R;Y402F;H406L,W;L427I D430N;V440A;N444R,K;E447Q,K;Q482K,使用SEQ ID NO:8的编号。

[0017] 3) 项 1 或 2 所述的变体，其中该变体具有下述的突变：

[0018] K170Q+D207V+N280S；E132A+D207V；D207E+E250G+H406L+L427I；D207V+L318M；D60N+D207V+L318M；T49I+E132V+V440A；T49I+K176R+D207V+Y402F；Q374R+E385V+Q393R；N190F+A209V+Q264S；G48A+T49I+G107A+I201F；T49I+G107A+I201F；G48A+T49I+I201F；G48A+T49I+G107A；T49I+I201F；T49I+G107A；G48A+T49I；

[0019] N104D+D161N+G179N+K180T+A181N+D183N+D200N+D204S+K237P+S239W+H406W+D430N+N444K+E447Q+Q482K；

[0020] D161N+G179N+K180T+A181N+D183N+D200N+D204S+K237P+S239W+H406W+D430N+N444K+E447Q+Q482K；

[0021] D161N+A181N+D 183N+D200N+D204S+K237P+S239W+H406W+D430N+N444K+E447Q+Q482K；

[0022] D161N+A181N+D183N+D200N+D204S+K237P+S239W+H406W+D430N+E447Q+Q482K；

[0023] N104D+D161N+G179N+K180T+A181N+D183N+D200N+D204S+K237P+S239W+H406W+D430N+E447Q+Q482K；

[0024] D161N+G179N+K180T+A181N+D183N+D200N+D204S+K237P+S239W+H406W+D430N+E447Q+Q482K；

[0025] N104D+D161N+G179N+K180T+A181N+D183N+D200N+D204S+K237P+S239W+H406W+D430N；

[0026] D161N+G179N+K180T+A181N+D183N+D200N+D204S+K237P+S239W+H 406W+D430N；

[0027] H406W+D430N；N444K+E447Q+Q482K；E447Q+Q482K；

[0028] N104D+D161N+G179N+K180T+A181N+D183N+D200N+D204S+K237P+S239W+H406W+D430N+N444R+N444K+E447K+Q482K；

[0029] D161N+G179N+K180T+A181N+D183N+D200N+D204S+K237P+S239W+H406W+D430N+N444R+N444K+E447K+Q482K；

[0030] N104D+D161N+G179N+K180T+A181N+D183N+D200N+D204S+K237P+S239W；

[0031] D161N+G179N+K180T+A181N+D183N+D200N+D204S+K237P+S239W；

[0032] H406W+D430N；N444K+E447K+Q482K；E447K+Q482K；

[0033] N104D+D161N+A181N+D183N+D200N+D204S+K237P+S239W；

[0034] N104D+D161N+A181N+D183N+D200N+D204S+K237P；

[0035] N104D+D161N+A181N+D183N+D200N+D204S；

[0036] D161N+A181N+D183N+D200N+D204S+K237P+S239W；

[0037] D161N+A181N+D183N+D200N+D204S+K237P；

[0038] D161N+A181N+D183N+D200N+D204S；K237P+S239W，使用 SEQ ID NO：8 的编号。

[0039] 4) 项 1-3 中任一项所述的变体，其中亲本 Termamyl 样 α-淀粉酶衍生于地衣芽孢杆菌（SEQ ID NO：8），解淀粉芽孢杆菌（SEQ ID NO：10），嗜热脂肪芽孢杆菌（SEQ ID NO：6）的菌株。

[0040] 5) 项 1-4 中任一项所述的变体，其中亲本 Termamyl 样 α-淀粉酶是：LE174；LE174+G48A+T49I+G107A+I201F；LE174+M197L；或 LE174+G48A+T49I+G107A+M197L+I201F。

[0041] 6) 项 1 中所述的变体，其中该变体在下述一或多个位点发生突变：T51I；D62N；

N106D；D134A，V，P；D163N；X172Q；K179R；G184N；K185T；A186N；D188N；D205N；M208Y；D209S；X212V，E，L，G；L217I，K242P，S244W，N255G，F，N285S，S303Q，X323M；D387V，N395R；Y404F；H408L，W；X429I；D432N；V442A；X446R，K；X449Q，K；X484K，使用 SEQ ID NO：4(SP722) 的编号。

[0042] 7）项 1 或 6 中所述的变体，该变体具有下述的突变：E212V+N285S；D134A+E212V；N255G+H408L+X429I；E212V+X323M；D62N+E212V+X323M；T51I+D 134V+V442A；T51I+K179R+E212V+Y404F；D387V+N395R；N195F+X212V+K269S，使用 SEQ ID NO：4(SP722) 的编号。

[0043] 8）项 1-7 中任一项所述的变体，其中亲本 Termamyl 样 α-淀粉酶选自：SP690(SEQ ID NO：2)；SP722(SEQ ID NO：4；AA560(SEQ ID NO：12)；#707 α-淀粉酶 (SEQ ID NO：13)；KSM-AP1378。

[0044] 9）项 1-8 中任一项所述的变体，其中亲本 Termamyl 样 α-淀粉酶是下述任何一种：SP722+D183*+G184*；SP722+D183*+G184*+N195F；SP722+D183*+G184*+M202L；SP722+D183*+G184*+N195F+M202L；BSG+I181*+G182*；BSG+I181*+G182*+N193F；BSG+I181*+G182*+M200L；BSG+I181*+G182*+N193F+M200L；AA560+D183*+G184*；AA560+D183*+G184*+N195F；AA560+D183*+G184*+M202L；AA560+D183*+G184*+N195F+M202L。

[0045] 10）项 1-9 中任一项所述的变体，其中亲本 Termamyl 样 α-淀粉酶具有与 SEQ ID NO：8 有至少 60％相同的氨基酸序列，优选 70％，更优选至少 80％，甚至更优选至少约 90％，甚至更优选至少 95％，甚至更优选至少 97％，甚至更优选至少 99％。

[0046] 11）项 1-10 中任一项所述的变体，其中亲本 Termamyl 样 α-淀粉酶由核酸序列编码，该核酸序列与 SEQ ID NO：7 的核酸序列可在低严谨度条件下，优选中度严谨度条件下，更优选高严谨度条件下杂交。

[0047] 12）项 1-11 中任一项所述的变体，其中变体具有改变的稳定性，尤其在 70-120℃高温下和/或 pH 4-6 的低 pH 下。

[0048] 13）一种 DNA 构建体，包含编码项 1-12 中任一项所述的 α-淀粉酶变体的 DNA 序列。

[0049] 14）一种重组表达载体，其携带项 13 的 DNA 构建体。

[0050] 15）一种由项 13 的 DNA 构建体或项 14 的载体转化的细胞。

[0051] 16）项 15 的细胞，其是微生物，优选是细菌或真菌。

[0052] 17）项 16 的细胞，该细胞是革兰氏阳性细菌，比如枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、短芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、嗜碱芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、灿烂芽孢杆菌、或苏云金芽孢杆菌。

[0053] 18）一种组合物，其包含项 1-12 中任一项所述的 α-淀粉酶变体。

[0054] 19）项 18 的组合物，进一步包括嗜热脂肪芽孢杆菌 (BSG) α-淀粉酶，尤其是 SP961，尤其比例为 1：10-10：1，优选 1：2。

[0055] 20）项 18 或 19 的组合物，其中组合物进一步包括葡糖淀粉酶，支链淀粉酶和/或植酸酶。

[0056] 21）一种洗涤剂组合物，包含项 1-12 中任一项所述的 α-淀粉酶变体。

[0057] 22) 项 21 的洗涤剂组合物，还包含另一种酶，例如蛋白酶、脂酶、过氧化物酶，另一种淀粉分解酶、葡糖淀粉酶、麦芽糖淀粉酶、CGTase、甘露聚糖酶、角质酶、漆酶、和／或纤维素酶。

[0058] 23) 项 1-12 中任一项所述 α-淀粉酶变体或项 18-20 中任一项所述的组合物在淀粉液化中的用途。

[0059] 24) 项 1-12 中任一项所述 α-淀粉酶变体或项 18-20 中任一项所述组合物在乙醇生产中的用途。

[0060] 25) 项 1-12 中任一项所述 α-淀粉酶变体或项 18-20 中任一项所述组合物在冲洗和／或餐具清洗中的用途。

[0061] 26) 项 1-12 中任一项所述 α-淀粉酶变体或项 18-20 中任一项所述组合物在纺织品退浆中的用途。

[0062] 命名法则

[0063] 在本说明书和权利要求书中，使用了氨基酸残基的常规单字母和三字母编码。为了便于参考，采用以下命名法则来描述本发明的 α-淀粉酶变体：

[0064] 原氨基酸：位点：取代氨基酸

[0065] 根据这一命名原则，例如在第 30 位丙氨酸到天冬酰胺的取代应表示为：

[0066] Ala30Asn 或 A30N

[0067] 在同一位点的丙氨酸缺失表示为：

[0068] Ala30* 或 A30*

[0069] 添加的氨基酸残基，比如赖氨酸插入表示为：

[0070] Ala30AlaLys 或 A30AK

[0071] 连续的氨基酸残基片段，比如 30-33 位氨基酸残基缺失表示为 (30-33)* 或 Δ(A30-N33)。

[0072] 当特定 α-淀粉酶与其他 α-淀粉酶相比含有一个“缺失”，并且在该位点做了一个插入，这种情况表示为（对于 36 位插入了一个天冬氨酸）：

[0073] *36Asp 或 *36D

[0074] 多重突变用加号隔开，即：

[0075] Ala30Asp+Glu34Ser 或 A30N+E34S

[0076] 代表在 30 和 34 位分别将丙氨酸和谷氨酸取代为天冬氨酸和丝氨酸。

[0077] 当在一个给定位点可以插入 1 或多个可选择的氨基酸残基时，将其表示为：

[0078] A30N,E 或

[0079] A30N 或 A30E

[0080] 另外，当本文中确定了一个适合进行修饰的位点而没有建议具体的修饰方式，应当理解为可以用任何氨基酸残基来取代该位点的氨基酸残基。因此，例如，如果提及 30 位的丙氨酸修饰，但没有具体化，应当理解可以将该丙氨酸缺失或用任何其他氨基酸来取代它，即下列之一的氨基酸：R、N、D、A、C、Q、E、G、H、I、L、K、M、F、P、S、T、W、Y、V。

[0081] 而且，“A30X”表示下述的任何一个取代：A30R，A30N，A30D，A30C；A30Q，A30E，A30G，A30H，A30I，A30L，A30K，A30M，A30F，A30P，A30S，A30T，A30W，A30Y，或 A30V；或简写为：A30R，N，D，C，Q，E，G，H，I，L，K，M，F，P，S，T，W，Y，V。

[0082] 若所用编号的亲本酶已经含有在该位置取代的所研究氨基酸残基，则用下面的命名：

[0083] 这种情况中″ X30N″或″ X30N，V″其中例如一或 N 或 V 表示野生型。

[0084] 因此，其它相应的亲本酶在位点 30 被取代为″ Asn″或″ Val″。

[0085] 附图简述

[0086] 图 1 是 5 个亲本 Termamyl 样 α－淀粉酶的氨基酸序列对比。最左端的数字代表下列各氨基酸序列：

[0087] 1：SEQ ID NO：4（SP722）

[0088] 2：SEQ ID NO：2（SP690）

[0089] 3：SEQ ID NO：10（BAN）

[0090] 4：SEQ ID NO：8（BLA）

[0091] 5：SEQ ID NO：6（BSG）

[0092] 发明详述

[0093] 本发明的目的是提供 Termamyl 样 α－淀粉酶，该变体具有 α－淀粉酶的活性，并且其在高温和／或低 pH 条件，尤其是低钙浓度下显示改变的稳定性。

[0094] Termamyl 样 α－淀粉酶

[0095] 许多由芽孢杆菌类制备的 α－淀粉酶在氨基酸水平上具有高度同源性（同一性）。下表显示了许多已知的芽孢杆菌属 α－淀粉酶的同一性：

[0096] 表 1

[0097] 百分比

[0098] 同一性

		707	AP1378	BAN	BSG	SP690	SP722	AA560	Termamyl
[0101]	707	100.0	86.4	66.9	66.5	87.6	86.2	95.5	68.1
[0102]	AP1378	86.4	100.0	67.1	68.1	95.1	86.6	86.0	69.4
[0103]	BAN	66.9	67.1	100.0	65.6	67.1	68.8	66.9	80.7
[0104]	BSG	66.5	68.1	65.6	100.0	67.9	67.1	66.3	65.4
[0105]	SP690	87.6	95.1	67.1	67.9	100.0	87.2	87.0	69.2
[0106]	SP722	86.2	86.6	68.8	67.1	87.2	100.0	86.8	70.8
[0107]	AA560	95.5	86.0	66.9	66.3	87.0	86.8	100.0	68.3
[0108] [0109]	Termamyl	68.1	69.4	80.7	65.4	69.2	70.8	68.3	100.0

[0110] 例如，发现包含 SEQ ID NO：8 所示氨基酸序列的地衣芽孢杆菌 α－淀粉酶（商品名为 Termamyl^{TM}）与包含 SEQ ID NO：10 所示氨基酸序列的解淀粉芽孢杆菌 α－淀粉酶大约 81％同源，与包含 SEQ ID NO：6 所示氨基酸序列的嗜热脂肪芽孢杆菌 α－淀粉酶（BSG）大约 65％同源。另外同源的 α－淀粉酶包括公开于 WO 95/26397 的 SP690 和 SP722，并进一步分别在 SEQ ID NO：2 和 SEQ ID NO：4 中描述。本文中其它的淀粉酶有衍生于芽孢杆菌属的 AA560 α－淀粉酶并表示为 SEQ ID NO：12，以及在 SEQ ID NO：13 中显示并由 Tsukamoto 等（生物化学和生物物理研究通讯，151（1988），25-31 页）描述过的衍生于芽孢杆菌的

#707 α - 淀粉酶。

[0111] KSM AP1378 α - 淀粉酶公开于 WO 97/00324(自 KAO Corporation)。

[0112] 其他同源 α - 淀粉酶包括 EP0252666 中描述的地衣芽孢杆菌菌株 (ATCC27811) 产生的 α - 淀粉酶,以及 WO91/00353 和 WO94/18314 中鉴定到的 α - 淀粉酶。在产品 Optitherm™ 和 Takatherm™(Solvay 有售)、Maxamyl™(Gist-brocades/Genencor 有售)、Spezym AA™ 和 Spezym Delta AATM(Genencor 有售)以及 Keistase™(Daiwa 有售),Dex lo,GC 521(Genencor 有售)和 Ultraphlow(得自 Enzyme Biosystems) 中含有其他一些商品 Termamyl 样 α - 淀粉酶。

[0113] 由于发现这些 α - 淀粉酶之间有极大的同源性,可以认为它们属于同类 α - 淀粉酶,即"Termamyl 样 α - 淀粉酶"类。

[0114] 因此,在本文中,术语"Termamyl 样 α - 淀粉酶"意指一种 α - 淀粉酶,具体是芽孢杆菌属 α - 淀粉酶,它在氨基酸水平上与 Termamyl™(即具有文中 SEQ ID NO :8 所示氨基酸序列的地衣芽孢杆菌 α - 淀粉酶)有极大的同源性。

[0115] 换句话说,以下所有具有 SEQ ID NO :2、4、6、8、10、12 或 13 所示氨基酸序列的 α - 淀粉酶都被认为是"Termamyl 样 α - 淀粉酶"。其他的 Termamyl 样 α - 淀粉酶是这样一些 α - 淀粉酶 :i) 与 SEQ ID NO :2、4、6、8、10、12 和 13 所示氨基酸序列中的至少一个有至少 60%、比如至少 70%(例如至少 75%),或至少 80%,至少 85%,至少 90%,至少 95%,至少 97%,至少 99%同源(同一性),和 / 或由这样一种 DNA 序列编码,这些序列能与编码以上的 α - 淀粉酶的 DNA 序列进行杂交,其很明显于 SEQ ID NO :1、3、5、7、9 和本说明书(分别编码此处 SEQ ID NO :2、4、6、8、10、12 和 13 所示的氨基酸序列)。

[0116] 同源性

[0117] 同源性可以测定为两序列间表示第一序列衍生自第二序列的同一性的程度。同源性可以通过本领域已知的计算机程序诸如 GCG 程序包的 GAP 程序(上述)。因此,Gap GCGv8 可用用于同一性的默认得分矩阵 (scoringmatrix) 和下述默认参数 :对于核酸序列比较,分别是 GAP 生成罚分为 5.0,GAP 延伸罚分为 0.3,以及对于蛋白质序列比较分别是 GAP 生成罚分为 3.0,GAP 延伸罚分为 0.1。GAP 用 Needleman 和 Wunsch,(1970),J.Mol.Biol.48,p.443-453 的方法进行序列对比并推断出同一性。

[0118] 可以利用 Termamyl(SEQ ID NO :8) 和,例如另一 α - 淀粉酶之间的结构对比来鉴定其他 Termamyl 样 α - 淀粉酶中的等同 / 相应位点。获得所述结构对比的一个方法是利用 GCG 程序包中的 Pile Up 程序,该程序中 GAP 罚分采用默认值,即 GAP 生成罚分为 3.0,GAP 延伸罚分为 0.1。其他结构对比方法包括疏水簇分析 (Gaboriaud 等,(1987),FEBS 快报 224,149-155 页)和反相成丝技术 (reverse threading)(Huber T,Torda,AE,蛋白质科学,7 卷,1 期 :142-149(1998))。

[0119] 杂交

[0120] 基于所研究 α - 淀粉酶的全部或部分核苷酸或氨基酸序列,适当地制备上述 Termamyl 样 α - 淀粉酶特征中所用到的寡核苷酸探针。

[0121] 检测杂交的适宜条件包括在 5×SSC 中预浸泡,于 40℃在含有 20%甲酰胺、5×Denhardt′s 溶液、50mM 磷酸钠 (pH6.8) 以及 50mg 超声变性小牛胸腺 DNA 的溶液中预杂交 1 小时,然后于 40℃在补充有 100mM ATP 的同一溶液中杂交 18 小时,随之将滤膜洗 3

次，每次在 2×SSC、0.2％ SDS 中于 40℃（低严谨性），优选 50℃（中等严谨性），更优选 65℃（高严谨性），还要优选的是 75℃（极高严谨性）洗 30 分钟。有关杂交方法的其他细节可见 Sambrook 等，分子克隆 ：实验手册，第 2 版，Cold Spring Harbor，1989。

[0122] 在本文中，“衍生于”不仅是指由所研究的微生物菌株产生或能产生的 α－淀粉酶，也指分离自该菌株的 DNA 序列所编码的、并在用所述 DNA 序列转化的宿主微生物中产生的 α－淀粉酶。最后，该术语意指这样的 α－淀粉酶，它由合成的和／或 cDNA 来源的 DNA 序列编码并且具备所述 α－淀粉酶的鉴定特征。该术语还用来表示亲本 α－淀粉酶可以是天然存在的 α－淀粉酶的变异体，即由天然存在的 α－淀粉酶的 1 或多个氨基酸残基经过修饰（插入、取代、缺失）所产生的变体。

[0123] <u>亲本 Termamyl 样 α－淀粉酶</u>

[0124] 本发明所有上述的定义的 Termamyl 样 α－淀粉酶可用作亲本（即主链）α－淀粉酶。在本发明优选的实施方案中，亲本 α－淀粉酶衍生于地衣芽孢杆菌，例如，上述所指的其中之一诸如具有如 SEQ ID NO ：8 所示氨基酸序列的地衣芽孢杆菌 α－淀粉酶。

[0125] <u>亲本杂种 α－淀粉酶</u>

[0126] 亲本 α－淀粉酶（即主链 α－淀粉酶）可以是一种杂种 α－淀粉酶，即包含组合在一起的衍生于至少两个 α－淀粉酶的部分氨基酸序列。

[0127] 亲本杂种 α－淀粉酶可以是这样的酶，在氨基酸同源性（同一性）和／或 DNA 杂交（如上所述）的基础上可以确定它属于 Termamyl 样 α－淀粉酶家族。在这种情况中，杂种 α－淀粉酶通常包含 Termamyl 样 α－淀粉酶的至少一部分和 1 或多个其他 α－淀粉酶的 1 个或多个部分，后者选自微生物（细菌或真菌）和／或哺乳动物来源的 Termamyl 样 α－淀粉酶或非 Termamyl 样 α－淀粉酶。

[0128] 因此，亲本杂种 α－淀粉酶可以包括来源于至少两个 Termamyl 样 α－淀粉酶，或者来源于至少一个 Termamyl 样 α－淀粉酶和至少一个非 Termamyl 样细菌 α－淀粉酶，或者来源于至少一个 Termamyl 样和至少一个真菌 α－淀粉酶的部分氨基酸序列的组合。部分氨基酸序列衍生自的 Termamyl 样 α－淀粉酶可以是，例如文中提到的那些特定 Termamyl 样 α－淀粉酶中的任何一个。

[0129] 例如，亲本 α－淀粉酶可以包括衍生于地衣芽孢杆菌菌株的 α－淀粉酶的 C- 末端部分和来源于解淀粉芽孢杆菌菌株或嗜热脂肪芽孢杆菌菌株的 α－淀粉酶的 N- 末端部分。例如，亲本 α－淀粉酶可以包括地衣芽孢杆菌 α－淀粉酶的 C- 末端部分的至少 430 个氨基酸残基，还可以，例如，包括 a) 与具有 SEQ ID NO ：10 所示氨基酸序列的解淀粉芽孢杆菌 α－淀粉酶的 37 个 N- 末端氨基酸残基相对应的氨基酸片段和与具有 SEQ ID NO ：8 所示氨基酸序列的地衣芽孢杆菌 α－淀粉酶的 445 个 C- 末端氨基酸残基相对应的氨基酸片段，或者与 Termamyl 序列（即 SEQ ID NO ：8 所示的地衣芽孢杆菌 α－淀粉酶）相同的杂种 Termamyl 样 α－淀粉酶，除了 N- 末端（成熟蛋白质）的 35 个氨基酸残基被 BAN（成熟蛋白质）（即 SEQ ID NO ：10 所示的解淀粉芽孢杆菌 α－淀粉酶 ；）的 N- 末端 33 个残基（成熟蛋白质）取代 ；或者 b) 与具有 SEQ ID NO ：6 所示氨基酸序列的嗜热脂肪芽孢杆菌 α－淀粉酶的 68 个 N- 末端氨基酸残基相对应的氨基酸片段和与具有 SEQ ID NO ：8 所示氨基酸序列的地衣芽孢杆菌 α－淀粉酶的 415 个 C- 末端氨基酸残基相对应的氨基酸片段。

[0130] 另一合适的亲本杂种 α－淀粉酶是先前在 WO96/23874（Novo Nordisk 申请）中描

述的酶，该酶由 BAN（解淀粉芽孢杆菌 α-淀粉酶）的 N-末端（成熟蛋白质的 1-300 位氨基酸）和 Termamyl 的 C-末端（成熟蛋白质的 301-483 位氨基酸）构成。

[0131] 本发明优选的实施方案中亲本 Termamyl 样 α-淀粉酶是 SEQ ID NO：8 和 SEQ ID NO：10 的 α-淀粉酶的杂种。特别是，亲本 Termamyl 样 α-淀粉酶的杂种可以是杂种 α-淀粉酶，该 α-淀粉酶包含 SEQ ID NO：8 所示的地衣芽孢杆菌 α-淀粉酶的 445 个 C-末端氨基酸残基和 SEQ ID NO：10 所示的解淀粉芽孢杆菌 α-淀粉酶的 37 个 N-末端氨基酸残基，其进一步适合含有下面的突变：H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S（使用 SEQ ID NO：8 中的编号）。后面所提到的杂种用在下述的实施例中，并指定为 LE174。

[0132] 其它需要特定考虑的亲本 α-淀粉酶包括具有较少突变的 LE174，即恰上述的具有下面突变的杂种：A181T+N190F+A209V+Q264S；N190F+A209V+Q264S；A209V+Q264S；Q264S；H 156Y+N190F+A209V+Q264S；H156Y+A209V+Q264S；H156Y+Q264S；H156Y+A181T+A209V+Q264S；H156Y+A181T+Q264S；H156Y+Q264S；H156Y+A181T+N190F+Q264S；H156Y+A181T+N190F；H156Y+A181T+N190F+A209V。这些杂交也被认为是本发明的部分。

[0133] 在优选的实施方案中，亲本 Termamyl 样 α-淀粉酶是 LE174，SP722，或 AA560 包括任何 LE174+G48A+T49I+G107A+I201F；LE174+M197L；LE174+G48A+T49I+G107A+M197L+I201F，or SP722+D183*+G184*；SP722+D183*+G184*+N195F；SP722+D183*+G184*+M202L；SP722+D183*+G184*+N195F+M202L；BSG+I181*+G182*；BSG+I181*+G182*+N193F；BSG+I181*+G182*+M200L；BSG+I181*+G182*+N193F+M200L；AA560+D183*+G184*；AA560+D183*+G184*+N195F；AA560+D183*+G184*+M202L；AA560+D183*+G184*+N195F+M202L。

[0134] 其它要考虑的亲本 α-淀粉酶包括 LE429，其是具有 I201F 的附加取代的 LE174。基于本发明 LE335 是这样的 α-淀粉酶，其与 LE429 相比，在 T49I+G107A 中有附加的取代；LE399 是 LE335+G48A，即 LE174，具有 G48A+T49I+G107A+I201F。

[0135] 改变特性

[0136] 以下讨论存在于本发明的变体中的突变与可能由该突变导致的希望的性质变化（相对亲本 Termamyl 样 α-淀粉酶的这些性质）之间的关系。

[0137] 如上所述本发明涉及具有改变特性（上述）的亲本 Termamyl 样 α-淀粉

[0138] 酶，尤其是在高温和/或在低 pH 下，特别是低钙浓度下。

[0139] 本发明中“高温”指的是 70-120℃，优选 80-100℃，尤其是 85-95℃。

[0140] 本发明中“低 pH”指的是 pH 的范围为 4-6，优选 4.2-5.5，尤其是 4.5-5。

[0141] 本发明中“高 pH”指的是 pH 的范围为 8-11，优选 8.5-10.6。

[0142] 本发明中“低钙浓度”指的是低于 60ppm 的游离钙的水平，优选 40ppm，更优选 25ppm，尤其 5ppm。

[0143] 特别值得研究的亲本 Termamyl 样 α-淀粉酶具有经过特别研究的改变特性，是上述所提到的亲本 Termamyl 样 α-淀粉酶和亲本杂种 Termamyl 样 α-淀粉酶。

[0144] Termamyl® α-淀粉酶用作起始点，但在例如 SP722，BS G，BAN，AA560，SP690，KSM AP1378，和 #707 中的相应位点应被理解为公开的并特别考虑的。

[0145] 在优选的实施方案中，本发明的变体尤其在具有高温和/或低 pH 下。

[0146]　本发明一方面涉及具有上述的改变特性的变体。

[0147]　第一方面亲本 Termamyl 样 α-淀粉酶包含在选自下述的一或更多的位点改变（采用 SEQ ID NO:8 用于氨基酸编号）:49,60,104,132,161,170,176,179,180,181,183,200,203,204,207,212,237,239,250,280,298,318,374,385,393,402,406,427,430,440,444,447,482,其中

[0148]　(a) 改变分别是

[0149]　(i) 在占据该位点的氨基酸下游的氨基酸插入,

[0150]　(ii) 占据该位点的氨基酸的缺失,或

[0151]　(iii) 以不同的氨基酸取代占据该位点的氨基酸,

[0152]　(b) 变体具有 α-淀粉酶活性 (c) 每个位点相应于具有 SEQ ID NO:8 中所

[0153]　示的氨基酸序列的亲本 Termamyl 样 α-淀粉酶氨基酸序列的位点。

[0154]　在Termamyl® (SEQ ID NO:8),所述相应的位点是:

[0155]　T49;D60;N104;E132;D161;K170;K176;G179;K180;A181;D183;D200;Y203;D204;D207;I212;K237;S239;E250;N280;Q298;L318;Q374;E385;Q393;Y402;H406;L427D430;V440;N444;E447;Q482。

[0156]　SP722(SEQ ID NO:4) 中相应的位点是:T51;D62;N106;D134;D163;Q172;K179;G184;K185;A186;D188;D205;M208;D209;X212;L217,K242,S244,N255,N285,S303,M323;D387,N395;Y404;H408;I429;D432;V442;K446;Q449;K484。

[0157]　通过如上所述的序列对比和在图 1 所示的排列发现其它亲本 α-淀粉酶相应的位点。

[0158]　在优选的实施方案中,本发明的变体（用 SEQ ID NO:8(Termamyl™) 编号）具有下述的一或多个取代:

[0159]　T49I;D60N;N104D;E132A, V, P;D161N;K170Q;K176R;G179N;K180T;A181N;D183N;D200N;X203Y;D204S;D207V,E,L,G;X212I;K237P;S239W;E250G,F;N280S;X298Q;L318M;Q374R;E385V;Q393R;Y402F;H406L, W;L427I D430N;V440A;N444R, K;E447Q, K;Q482K.

[0160]　在优选的实施方案中,本发明的变体（使用 SEQ ID NO:4(SP722) 编号）具有下述的一或多个取代:

[0161]　T51I;D62N;N106D;D134A, V, P;D163N;X172Q;K179R;G184N;K185T;A186N;D188N;D205N;M208Y;D209S;X212V,E,L,G;L217I,K242P,S244W,N255G,F,N285S,S303Q,X323M;D387V,N395R;Y404F;H408L,W;X429I;D432N;V442A;X446R,K;X449Q,K;X484K,使用 SEQ ID NO:4(SP722) 编号。

[0162]　优选的是,二重,三重或多重突变-使用 SEQ ID NO:8 作为编号基础-所述突变选自:T49I+D60N;T49I+D60N+E132A;T49I+D60N+E132V;

[0163]　T49I+D60N+E132V+K170Q;T49I+D60N+E132A+K170Q;

[0164]　T49I+D60N+E132V+K170Q+K176R;T49I+D60N+E132A+K170Q+K176R;

[0165]　T49I+D60N+E132V+K170Q+K176R+D207V;

[0166]　T49I+D60N+E132A+K170Q+K176R+D207V;

[0167]　T49I+D60N+E132V+K170Q+K176R+D207E;

[0168] T49I+D60N+E132A+K170Q+K176R+D207E；

[0169] T49I+D60N+E132V+K170Q+K176R+D207V+E250G；

[0170] T49I+D60N+E132A+K170Q+K176R+D207V+E250G；

[0171] T49I+D60N+E132V+K170Q+K176R+D207E+E250G；

[0172] T49I+D60N+E132A+K170Q+K176R+D207E+E250G；

[0173] T49I+D60N+E132V+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S；

[0174] T49I+D60N+E132A+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S；

[0175] T49I+D60N+E132V+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S；

[0176] T49I+D60N+E132A+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S；

[0177] T49I+D60N+E132V+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M；

[0178] T49I+D60N+E132A+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M；

[0179] T49I+D60N+E132V+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M；

[0180] T49I+D60N+E132A+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M；

[0181] T49I+D60N+E132V+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q374R；

[0182] T49I+D60N+E132A+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q374R；

[0183] T49I+D60N+E132V+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R；

[0184] T49I+D60N+E132A+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R；

[0185] T49I+D60N+E132V+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V；

[0186] T49I+D60N+E132A+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V；

[0187] T49I+D60N+E132V+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V；

[0188] T49I+D60N+E132A+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V；

[0189] T49I+D60N+E132V+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q373R+E385V+Q393R；

[0190] T49I+D60N+E132A+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R；

[0191] T49I+D60N+E132V+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R；

[0192] T49I+D60N+E132A+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R；

[0193] T49I+D60N+E132V+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q373R+E385V+Q393R+Y402F；

[0194] T49I+D60N+E132A+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F；

[0195] T49I+D60N+E132V+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F；

[0196] T49I+D60N+E132A+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F；

[0197] T49I+D60N+E132V+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q373R+E385V+Q393R+Y402F+H406L；

[0198] T49I+D60N+E132A+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L；

[0199] T49I+D60N+E132V+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L；

[0200] T49I+D60N+E132A+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L；

[0201] T49I+D60N+E132V+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q373R+E385V+Q393R+Y402F+H406L+L427I；

[0202] T49I+D60N+E132A+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L+L427I；

[0203] T49I+D60N+E132V+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L+L427I；

[0204] T49I+D60N+E132A+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L+L427I；

[0205] T49I+D60N+E132V+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q373R+E385V+Q393R+Y402F+H406L+L427I+V440A；

[0206] T49I+D60N+E132A+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L+L427I+V440A；

[0207] T49I+D60N+E132V+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L+L427I+V440A；

[0208] T49I+D60N+E132A+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L+L427I+V440A；D60N+E132A；

[0209] D60N+E132V；D60N+E132V+K170Q；D60N+E132A+K170Q；

[0210] D60N+E132V+K170Q+K176R；T49I+D60N+E132A+K170Q+K176R；

[0211] D60N+E132V+K170Q+K176R+D207V；

[0212] T49I+D60N+E132A+K170Q+K176R+D207V；

[0213] D60N+E132V+K170Q+K176R+D207E；

[0214] T49I+D60N+E132A+K170Q+K176R+D207E；

[0215] D60N+E132V+K170Q+K176R+D207V+E250G；

[0216] D60N+E132A+K170Q+K176R+D207V+E250G；

[0217] D60N+E132V+K170Q+K176R+D207E+E250G；

[0218] D60N+E132A+K170Q+K176R+D207E+E250G；

[0219] D60N+E132V+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S；

[0220] D60N+E132A+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S；

[0221] D60N+E132V+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S；

[0222] D60N+E132A+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S；

[0223] D60N+E132V+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M；

[0224] D60N+E132A+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M；

[0225] D60N+E132V+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M；

[0226] D60N+E132A+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M；

[0227] D60N+E132V+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q374R；

[0228] D60N+E132A+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q374R；

[0229] D60N+E132V+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R；

[0230] D60N+E132A+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R；

[0231] D60N+E132V+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V；

[0232] D60N+E132A+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V；

[0233] D60N+E132V+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V；

[0234] D60N+E132A+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V；D60N+E132V+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q373R+E385V+Q393R+Y402F；

[0235] D60N+E132A+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F；

[0236] D60N+E132V+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F；

[0237] D60N+E132A+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F；

[0238] D60N+E132V+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q373R+E385V+Q393R+Y402F+H406L；

[0239] D60N+E132A+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L；

[0240] D60N+E132V+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L；

[0241] D60N+E132A+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L；

[0242] D60N+E132V+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q373R+E385V+Q393R+Y402F+H406L+L427I；

[0243] D60N+E132A+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L+L427I；

[0244] D60N+E132V+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L+L427I；

[0245] D60N+E132A+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L+L427I；

[0246] D60N+E 132V+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q373R+E385V+Q393R+Y402F+H406L+L427I+V440A；

[0247] D60N+E132A+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L+L427I+V440A；

[0248] D60N+E132V+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L+L427I+V440A；

[0249] D60N+E132A+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L+L427I+V440A；E132V+K170Q；E132A+K170Q；

[0250] E132V+K170Q+K176R；E132A+K170Q+K176R；

[0251] E132V+K170Q+K176R+D207V；E132A+K170Q+K176R+D207V；

[0252] E132V+K170Q+K176R+D207E；E132A+K170Q+K176R+D207E；

[0253] E132V+K170Q+K176R+D207V+E250G；

[0254] E132A+K170Q+K176R+D207V+E250G；

[0255] E132V+K170Q+K176R+D207E+E250G；

[0256] E132A+K170Q+K176R+D207E+E250G；

[0257] E132V+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S；

[0258] E132A+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S；

[0259] E132V+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S；

[0260] E132A+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S；

[0261] E132V+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M；

[0262] E132A+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M；

[0263] E132V+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M；

[0264] E132A+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M；

[0265] E132V+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q374R；

[0266] E132A+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q374R；

[0267] E132V+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R；

[0268] E132A+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R；

[0269] E132V+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V；

[0270] E132A+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V；

[0271] E132V+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V；

[0272] E132A+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V；

[0273] E132V+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q373R+E385V+Q393R；

[0274] E132A+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R；

[0275] E132V+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R；

[0276] E132A+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R；

[0277] E132V+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q373R+E385V+Q393R+Y402F；

[0278] E132A+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F；

[0279] E132V+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F；

[0280] E132A+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F；

[0281] E132V+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q373R+E385V+Q393R+Y402F+H406L；

[0282] E132A+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L；

[0283] E132V+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L；

[0284] E132A+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L；

[0285] E132V+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q373R+E385V+Q393R+Y402F+H406L+L427I；

[0286] E132A+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L+L427I；

[0287] E132V+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L+L427I；

[0288] E132A+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L+L427I；

[0289] E132V+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q373R+E385V+Q393R+Y402F+H406L+L427I+V440A；

[0290] E132A+K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L+L427I+V440A；

[0291] E132V+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L+L427I+V440A；

[0292] E132A+K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L+L427I+V440A；K170Q+K176R；

[0293] K170Q+K176R+D207V；K170Q+K176R+D207E；

[0294] K170Q+K176R+D207V+E250G；K170Q+K176R+D207E+E250G；

[0295] K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S；

[0296] K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S；

[0297] K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M；

[0298] K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M；

[0299] K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R；

[0300] K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q374R；

[0301] K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V；

[0302] K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V；

[0303] K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R；

[0304] K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R；

[0305] K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F；

[0306] K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F；

[0307] K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q373R+385V+Q393R+Y402F+H406L；

[0308] K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L；

[0309] K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q373R+E385V+Q393R+Y402F+H406L+L427I；

[0310] K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L+L427I；

[0311] K170Q+K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q373R+E385V+Q393R+Y402F+H406L+L427I+V440A；

[0312] K170Q+K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L+L427I+V440A；

[0313] K176R+D207V；K176R+D207E；K176R+D207V+E250G；

[0314] K176R+D207E+E250G；K176R+D207V+E250G+N280S；

[0315] K176R+D207E+E250G+N280S；K176R+D207E+E250G+N280S+L318M；

[0316] K176R+D207V+E250G+N280S+L318M；

[0317] K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R；

[0318] K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q374R；

[0319] K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V；

[0320] K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V；

[0321] K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R；

[0322] K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R；

[0323] K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F；

[0324] K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F；K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L；

[0325] K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L+L427I；

[0326] K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L+L427I；

[0327] K176R+D207V+E250G+N280S+L318M+Q373R+E385V+Q393R+Y402F+H406L+L427I+V440A；

[0328] K176R+D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L+L427I+V440A；D207V+E250G；

[0329] D207E+E250G；D207V+E250G+N280S；D207E+E250G+N280S+L318M；

[0330] D207V+E250G+N280S+L318M；D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R；

[0331] D207V+E250G+N280S+L318M+Q374R；

[0332] D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V；

[0333] D207V+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V；

[0334] D207V+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R；

[0335] D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R；

[0336] D207V+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F；

[0337] D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F；

[0338] D207V+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L；

[0339] D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L；

[0340] D207V+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L+L427I；

[0341] D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L+L427I；

[0342] D207V+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L+L427I+V440A；

[0343] D207E+E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L+L427I+V440A；E250G+N280S；E250G+N280S+L318M；

[0344] E250G+N280S+L318M+Q374R；

[0345] E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V；

[0346] E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R；

[0347] E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F；

[0348] E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L；

[0349] E250G+N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L+L427I；

[0350] E250G+N280S+L318M+Q373R+E385V+Q393R+Y402F+H406L+L427I+V440A；N280S+L318M；N280S+L318M+Q374R；N280S+L318M+Q374R+E385V；

[0351] N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R；

[0352] N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F；

[0353] N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L；

[0354] N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L+L427I；

[0355] N280S+L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L+L427I+V440A；

[0356] L318M+Q374R；L318M+Q374R+E385V；L318M+Q374R+E385V+Q393R；

[0357] L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F；

[0358] L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L；

[0359] L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L+L427I；

[0360] L318M+Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L+L427I+V440A；

[0361] Q374R+E385V；Q374R+E385V+Q393R；Q374R+E385V+Q393R+Y402F；

[0362] Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L；

[0363] Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L+L427I；

[0364] Q374R+E385V+Q393R+Y402F+H406L+L427I+V440A；

[0365] E385V+Q393R；E385V+Q393R+Y402F；E385V+Q393R+Y402F+H406L；

[0366] E385V+Q393R+Y402F+H406L+L427I；

[0367] E385V+Q393R+Y402F+H406L+L427I+V440A；

[0368] Q393R+Y402F；Q393R+Y402F+H406L；Q393R+Y402F+H406L+L427I；

[0369] Q393R+Y402F+H406L+L427I+V440A；Y402F+H406L；

[0370] Y402F+H406L+L427I；Y402F+H406L+L427I+V440A；H406L+L427I；H406L+L427I+V440A；L427I+V440A；

[0371] N104D+D161N+G179N+K180T+A181N+D183N+D200N+D204S+K237P+S239W+H406W+D430N+N444K+E447Q+Q482K；

[0372] D161N+G179N+K180T+A181N+D183N+D200N+D204S+K237P+S239W+H406W+D430N+N444K+E447Q+Q482K；

[0373] D161N+A181N+D183N+D200N+D204S+K237P+S239W+H406W+D430N+N444K+E447Q+Q482K；

[0374] D161N+A181N+D183N+D200N+D204S+K237P+S239W+H406W+D430N+E447Q+Q482K；

[0375] N104D+D161N+G179N+K180T+A181N+D183N+D200N+D204S+K237P+S239W+H406W+D430N+E447Q+Q482K；

[0376] D161N+G179N+K180T+A181N+D183N+D200N+D204S+K237P+S239W+H406W+D430N+E447Q+Q482K；

[0377] N104D+D161N+G179N+K180T+A181N+D183N+D200N+D204S+K237P+S239W+H406W+D430N；

[0378] D161N+G179N+K180T+A181N+D183N+D200N+D204S+K237P+S239W+H406W+D430N；H406W+D430N；N444K+E447Q+Q482K；E447Q+Q482K；

[0379] N104D+D161N+G179N+K180T+A181N+D183N+D200N+D204S+K237P+S239W+H406W+D430N+N444R+N444K+E447K+Q482K；

[0380] D161N+G179N+K180T+A181N+D183N+D200N+D204S+K237P+S239W+H406W+D430N+N444R+N444K+E447K+Q482K；

[0381] N104D+D161N+G179N+K180T+A181N+D183N+D200N+D204S+K237P+S239W；

[0382] D161N+G179N+K180T+A181N+D183N+D200N+D204S+K237P+S239W；

[0383] H406W+D430N；N444K+E447K+Q482K；E447K+Q482K；

[0384] N104D+D161N+A181N+D183N+D200N+D204S+K237P+S239W；

[0385] N104D+D161N+A181N+D183N+D200N+D204S+K237P；

[0386] N104D+D161N+A181N+D183N+D200N+D204S；

[0387] D161N+A181N+D183N+D200N+D204S+K237P+S239W；

[0388] D161N+A181N+D183N+D200N+D204S+K237P；

[0389] D161N+A181N+D183N+D200N+D204S；K237P+S239W，使用 SEQ ID NO：8 编号。

[0390] 优选的实施方案中变体具有下述取代：K170Q+D207V+N280S；E132A+D207V；D207E+E250G+H406L+L427I；D207V+L318M；D60N+D207V+L318M；T49I+E132V+V440A；T49I+K176R+D207V+Y402F；Q374R+E385V+Q393R；N190F+A209V+Q264S；G48A+T49I+G107A+I201F；T49I+G107A+I201F；G48A+T49I+I201F；G48A+T49I+G107A；T49I+I201F；T49I+G107A；G48A+T49I；

[0391] D161N+G179N+K180T+A181N+D183N+D200N+D204S+K237P+S239W+H406W+D430N+N444K+E447Q+Q482K 使用 SEQ ID NO：8 编号。特定的变体包括：LE399；LE174+G48A+T49I+G107A；LE174+G48A+T49I+I201F；LE174+G48A+G107A+I201F；LE174+T49I+G107A+I201F；LE174+G48A+T49I；LE174+G48A；LE174+G107A+I201F；LE174+I201F，是本发明具体考虑的变体。

[0392] 稳定性

[0393] 本发明中，重要的突变（包括氨基酸）以达到改变的稳定性，尤其是改进的稳定性（即高或低），尤其是高温（即 70-120℃）和/或极端 pH（即低或高 pH，即分别为 pH4-6 或 pH8-11），尤其是在游离的（即未结合的，在溶液中）低于 60ppm 钙浓度，包括“改变特性”那节所列的任何突变。稳定性可按照“材料和方法”那节所述进行测定。

[0394] 本发明变体的一般突变

[0395] 本发明的变体在一实施方案中可包括除了上述那些之外的一或多个突变。因此，将被修饰的 α-淀粉酶变体某部分存在的 1 或多个脯氨酸取代为非脯氨酸残基可能是有益的，所述非脯氨酸可以是任何可能的、天然非脯氨酸残基，优选是 Ala、Gly、Ser、Thr、Val 或 Leu。

[0396] 类似地，可以优选将亲本 α-淀粉酶被修饰的那些氨基酸残基中存在的 1 或多个 Cys 残基取代为非半胱氨酸残基，比如 Ser、Ala、Thr、Gly、Val 或 Leu。

[0397] 另外，可以将本发明的变体进行修饰—作为唯一的修饰或者结合上面概括的任何修饰—以便将与 SEQ ID NO：10 中的 185-209 位氨基酸片段所对应的氨基酸片段中存在的 1 或多个 Asp 和/或 Glu 分别取代为 Asn 或 Gln。同样有意义的是在 Termamyl 样 α-淀粉酶中，将与 SEQ ID NO：10 中的 185-209 位氨基酸片段所对应的氨基酸片段中存在的 1 或多个 Lys 残基取代为 Arg。

[0398] 应当明白，本发明涵盖了含有两个或多个上述修饰的变体。

[0399] 另外，向此处描述的一或多个位点导入突变可能是有益的（使用 SEQ IDNO：8(Termamyl) 编号）。

[0400] M15，V128，A111，H133，W138，T149，M197，N188，A209，A210，H405，T412，尤其是下述的单一的，两重或三重或多重突变：

[0401] M15X，尤其是 M15T，L；

[0402] V128X，尤其是 V128E；

[0403] H133X，尤其是 H133Y；

[0404] N188X，尤其是 N188S，T，P；

[0405] M197X，尤其是 M197T，L；

[0406] A209X，尤其是 A209V；M197T/W138F；M197T/W138Y；M15T/H133Y/N188S；M15/V128E/H133Y/N188S；E119C/S130C；D124C/R127C；H133Y/T149I；G475R，H133Y/S187D；H133Y/A209V.

[0407] 制备本发明 α-淀粉酶变体的方法

[0408] 几种将突变导入基因的方法是本领域已知的。简要讨论 α-淀粉酶-编码 DNA 序列之后，将讨论在 α-淀粉酶-编码序列中的特定位点产生突变的方法。

[0409] 克隆编码 α-淀粉酶的 DNA 序列

[0410] 可以利用多种本领域的公知方法，从任何能产生目的 α-淀粉酶的细胞或微生物中分离编码亲本 α-淀粉酶的 DNA 序列。首先，应当利用得自能产生目的 α-淀粉酶的有机体的染色体 DNA 或信使 RNA 来构建基因组 DNA 和/或 cDNA 文库。然后，如果 α-淀粉酶的氨基酸序列是已知的，可以合成并合成并用同源的、标记的寡核苷酸来由从目的有机体制备的基因组文库鉴定 α-淀粉酶-编码克隆。另外，可以使用标记的寡核苷酸探针（该

探针含有与已知 α－淀粉酶基因同源的序列）作为探针，采用低严谨性杂交和洗涤条件来鉴定 α－淀粉酶－编码克隆。

[0411] 另一种鉴定 α－淀粉酶－编码克隆的方法包括将基因组 DNA 片段插入表达载体（比如质粒），用所得基因组 DNA 文库转化 α－淀粉酶阴性的细菌，以及随后将转化细菌铺到含有 α－淀粉酶底物的琼脂上，从而能鉴定表达 α－淀粉酶的克隆。

[0412] 或者，可以通过已确立的标准方法来合成制备编码酶的 DNA 序列，例如 S.L.Beaucage 和 M.H.Caruthers，Terahedron Letters，22，1981，PP.1859-1869 描述的磷酸脒方法或 Matthes 等 The EMBO J.3，1984，pp.801-805 描述的方法。在磷酸脒方法中，在例如自动 DNA 合成仪中合成寡核苷酸，将其纯化、退火、连接和克隆到合适的载体中。

[0413] 最后，DNA 序列可以是基因组和合成来源混合的、合成和 cDNA 来源混合的，或者基因组和 cDNA 来源混合的，其是依照标准技术，将合成的、基因组或 cDNA 来源的片段连接在一起而制备的（在合适时，对应完整 DNA 序列各部分的片段）。还可以如 US4683202 或 R.K.Saiki 等 Science 239，1988，pp.487-491 描述的，使用特异引物通过聚合酶链反应 (PCR) 来制备 DNA 序列。

[0414] 定点突变

[0415] 一旦分离出 α－淀粉酶编码的 DNA 序列，利用合成的寡核苷酸引入突变，鉴定用于突变的所希望的位点。这些寡核苷酸包含侧接目的突变位点的核苷酸序列。将突变的核苷酸在寡核苷酸合成期间插入。在特定方法中，DNA 单链缺口，连接 (bridging) α－淀粉酶编码序列，在携带有 α－淀粉酶基因的载体中产生。然后含有目的突变的合成核苷酸退火至单链 DNA 的同源部分。所保留的缺口利用 DNA 聚合酶 I（Klenow 片段）填充，利用 T4 连接酶连接构建体。该方法的特异性实施例在 Morinaga 等 (1984) 中描述。US4760025 公开了通过实施较小改变盒寡编码多重突变核苷酸。然而，由于多数各种长度的寡核苷酸可被引入甚至更多的突变可通过 Morinaga 等方法在任何时候引入。

[0416] 将突变引入编码 α－淀粉酶的 DNA 序列的另一种方法在 Nelson 和 Long(1989) 中描述。其涉及 PCR 片段的 3- 步产生 (3-step generation)，该 PCR 片段含有导入的目的突变，利用化学合成的 DNA 链作为 PCR 反应中的之一引物。PCR 生成的片段，通过限制性内切酶的切割分离出携带突变的 DNA 片段并将其重新插入到表达质粒。

[0417] 本发明提供变体的可选的方法，例如，如 WO 95/22625（自 AffymaxTechnologies N.V.）或 WO96/00343(Novo Nordisk A/S) 或其它相应的技术导致包含该要研究的突变例如取代和／或缺失的杂交酶，包括基因改组。亲本 α－淀粉酶变体的实施例可以合适地用于提供具有所述突变的杂交，根据本发明包括的在 EP1022334 中公开的 KSM-K36 和 KSM-K38 α－淀粉酶（在此引入作为参考）。

[0418] 表达 α－淀粉酶变体

[0419] 根据本发明，可以利用表达载体将通过上述方法，或者通过本领域已知的任何替代方法制备的编码变体的 DNA 序列表达为酶的形式，载体通常包括调控序列，该序列编码启动子、操纵子、核糖体结合位点、翻译起始信号以及任选地，阻遏子基因或各种激活子基因。

[0420] 携带编码本发明所述 α－淀粉酶变体之 DNA 序列的重组表达载体可以是任何能方便地进行重组 DNA 操作的载体，且载体的选择通常取决于它将要导入的宿主细胞。因此，载

体可以是自主复制的载体，即以染色体外个体存在的载体，其复制独立于染色体的复制，例如质粒、噬菌体或染色体外元件、微小染色体或人工染色体。可选择地，载体可以是这样的，当被导入宿主细胞时，它会整合到宿主基因组中，并与所整合到其中的染色体一起复制。

[0421] 在所述载体中，DNA 序列应当可操纵地连接到合适的启动子序列。该启动子可以是在所选宿主细胞中显示转录活性的任何 DNA 序列，并可以来源于编码宿主细胞的同源或异源蛋白质的基因。适于引导编码本发明所述 α-淀粉酶变体的 DNA 序列进行转录（特别是在细菌宿主中）的启动子的例子是大肠杆菌 lac 操纵子的启动子、天蓝色链霉菌琼脂糖酶基因 dagA 启动子、地衣芽孢杆菌 α-淀粉酶 (amyL) 的启动子、嗜热脂肪芽孢杆菌麦芽糖淀粉酶 (maltogenic amylase) 基因 (amyM) 的启动子、解淀粉芽孢杆菌 α-淀粉酶 (amyQ) 的启动子、枯草芽孢杆菌 xylA 和 xylB 基因的启动子等。在真菌宿主中进行转录时，有用的启动子的例子是来源于这样一些基因的启动子，所述基因编码米曲霉 TAKA 淀粉酶、米赫氏根霉天冬氨酸蛋白酶、黑曲霉中性 α-淀粉酶、黑曲霉酸稳定 α-淀粉酶、黑曲霉葡糖淀粉酶、米赫氏根霉脂酶、米曲霉碱性蛋白酶、米曲霉丙糖磷酸异构酶或构巢曲霉乙酰胺酶。

[0422] 本发明的表达载体还可以包含合适的转录终止子以及，在真核细胞中时的多腺苷酸化序列，它们与编码发明所述 α-淀粉酶变体的 DNA 序列可操纵地连接在一起。终止和多腺苷酸化序列可以适当地来自与启动子相同的来源。

[0423] 载体还可以包含能使载体在目的宿主细胞中进行复制的 DNA 序列。这类序列的例子是质粒 pUC19、pACYC177、pUB110、pE194、pAMB1 和 pIJ702 的复制原点。

[0424] 载体还可以包含选择标记，例如一个其产物能补偿宿主细胞缺陷的基因，比如来自枯草芽孢杆菌或地衣芽孢杆菌的 dal 基因；或者赋予抗生素抗性（比如氨苄青霉素、卡那霉素、氯霉素或四环素抗性）的基因。另外，载体可以包含曲霉选择标记，比如 amdS、argB、niaD 和 sC，产生潮霉素抗性的标记，或者可以通过共转化（例如 WO91/17243 中描述的）来实现选择。

[0425] 胞内表达在某些方面可能是有益的，例如用某种细菌作为宿主细胞时，但通常优选表达是胞外的。总之，此处提及的芽孢杆菌 α-淀粉酶包含一个允许被表达的蛋白酶分泌到培养基中的前导区。如果需要，可以方便地通过取代编码该前区的 DNA 序列来将该前区替换为不同的前导区或信号序列。

[0426] 用于分别将编码 α-淀粉酶变体、启动子、终止子和其他元件的本发明所述 DNA 构建体连接在一起，并将其插入合适的包含复制所用的必要信息之载体的步骤是本领域技术人员所熟知的（参考，例如，Sambrook 等，分子克隆：实验指南，第 2 版，Cold Spring Harbor，1989）。

[0427] 本发明的细胞，它包含如上所述的本发明 DNA 构建体或表达载体，可以有效地作为重组制备本发明 α-淀粉酶变体的宿主细胞。可以用本发明编码变体的 DNA 构建体，方便地通过将该构建体（以 1 或多拷贝）整合到宿主染色体中来转化所述细胞。通常认为整合是有益的，因为这样 DNA 序列更可能稳定地保持在细胞中。可以依照常规方法，例如通过同源或异源重组将 DNA 构建体整合到宿主染色体中。可选择地，可以根据宿主细胞的不同类型用上面描述过的表达载体来转化细胞。

[0428] 本发明的细胞可以是更高等的生物，比如哺乳动物或昆虫的细胞，但优选是微生物细胞，比如细菌或真菌（包括酵母）细胞。

[0429] 合适的细菌的例子是革兰氏阳性细菌，比如枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、短芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、嗜碱芽孢杆菌（Bacillcus alkalophilus）、解淀粉芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、灿烂芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌，或者浅青紫链霉菌或鼠灰链霉菌，或者是革兰氏阴性细菌，比如大肠杆菌。可以通过例如原生质体转化或利用竞争细胞以已知方式来实现细菌的转化。

[0430] 可以有利地从酵母属或裂殖酵母属中选择酵母微生物，例如酿酒酵母。丝状真菌最好是属于曲霉属的种，例如米曲霉或黑曲霉。可以通过一个包括原生质体形成和转化，以及随后以已知方式再生细胞壁的方法来转化真菌细胞。在EP238023中描述了转化曲霉宿主细胞的适用步骤。

[0431] 再一方面，本发明涉及制备发明所述 α-淀粉酶变体的方法，该方法包括在有助于变体生产的条件下培养以上描述的宿主细胞，以及从细胞和/或培养基中回收变体。

[0432] 用于培养细胞的培养基可以是任何适合目的宿主细胞生长以及本发明所述 α-淀粉酶变体进行表达的常规培养基。可以从供应商那里获得合适的培养基或者可以根据公开的配方（例如，美国典型培养物保藏中心的目录中所描述的）来制备。

[0433] 可以通过公知方法从培养基中方便地回收宿主细胞所分泌的 α-淀粉酶变体，这些方法包括通过离心或过滤从培养基中分离细胞，以及借助盐（比如硫酸铵）来沉淀培养基中的蛋白类成分，然后利用层析操作，比如离子交换层析、亲合层析等。

[0434] 工业应用

[0435] 本发明的 α-淀粉酶变体具备适合多种工业应用的有价值的特性。具体来说，本发明的酶变体可以作为洗涤、餐具清洗和硬表面清洁的洗涤剂组合物的成分。

[0436] 本发明具有改变特性的变体可用于淀粉加工，尤其是淀粉转化，特别是淀粉液化作用（参见，例如US3912590，EP专利252730和63909，WO99/19467，WO96/28567此处所有的文献引入作为参考）。还要考虑的是用于淀粉转化的组合物，除了本发明的变体外还包括AMG，支链淀粉酶和其它 α-淀粉酶。

[0437] 而且，本发明的变体还在由淀粉生产增甜剂和乙醇（参见例如在此引入参考的美国专利5231017），例如燃料，饮料和工业乙醇，来自淀粉或全部谷物。

[0438] 本发明的变体还在纺织品退浆时有用（参见例如在此引入参考的，WO95/21247，美国专利4643736，EP119920）。

[0439] 洗涤剂组合物

[0440] 如上所述，可以适当地将本发明的变体加入洗涤剂组合物中。涉及洗涤剂组合物相关成分（如洗衣洗涤剂或餐具洗涤剂）的进一步的细节、在这类洗涤剂组合物中配制变体的合适方法以及洗涤剂组合物的有关类型，可以参考例如，WO96/23874和WO97/07202。

[0441] 包含本发明变体的洗涤剂组合物可以另外含有一或多种其他酶，比如蛋白酶、脂酶、过氧化物酶，另一种淀粉分解酶、葡糖淀粉酶、麦芽糖淀粉酶、CGTase和/或纤维素酶、甘露聚糖酶（如自Novozymes的Mannaway^{TM}，Denmark)），果胶酶，pectine裂解酶，角质酶、漆酶，和/或另一种 α 淀粉酶。

[0442] 可以将本发明的 α-淀粉酶变体以常规使用的浓度加入洗涤剂中。目前考虑可以将本发明的变体以相当于每升使用常规剂量水平洗涤剂的洗涤/餐具清洗液中含0.00001-1mg α-淀粉酶的用量（以纯品计算，活性酶蛋白）加入。

[0443] 组合物

[0444] 本发明还涉及包含本发明变体的组合物，在优选的实施方案中还有嗜热脂肪芽孢杆菌α-淀粉酶(BSG)，特别是其变体。

[0445] 在另一实施方案中，组合物除了本发明葡糖淀粉酶变体，包括尤其是衍生于黑曲霉的葡糖淀粉酶(例如公开于Boel et al.(1984)，G1或G2黑曲霉AMG"衍生于黑曲霉的葡糖淀粉酶G1和G2合成自两种不同但很相关的mRNA"EMBO J.3(5)，P.1097-1102，或其变体，尤其公开于WO 00/04136或WO 01/04273或公开于WO 99/28448Talaromyces emersonii AMG。

[0446] 特定组合是LE399和公开于WO 00/04136或WO 01/04273的变体，尤其是具有下述一或更多个取代的变体：

[0447] N9A，S56A，V59A，S119P，A246T，N313G，E342T，A393R，S394R，Y402F，E408R，尤其是具有所有突变的变体。

[0448] 在实施方案中，本发明的组合物还包括支链淀粉酶，尤其是芽孢杆菌属的支链淀粉酶。

[0449] 材料和方法

[0450] 酶

[0451] SEQ ID NO:8所示的地衣芽孢杆菌α-淀粉酶，也可从Novozyme获得。

[0452] AA560:SEQ ID NO:12；公开于WO 00/60060；于1999年1月25日在DSMZ保藏并且保藏号为DSMZ.12649。本发明人将AA560保藏于国际承认用于专利程序的微生物保藏布达佩斯条约下的德意志微生物和细胞培养物保藏中心(Deutshe Sammmlung von Microorganismen und ZellkulturenGmbH(DSMZ))，Mascheroder Weg lb，D-38124Braunschweig DE。

[0453] LB培养基(1升H20中:10g bacto-胰蛋白胨e，5g bactoyeast提取物，10g NaCl，pH调为7.0w.NaOH，高压灭菌)。

[0454] TY琼脂板(1升H20:16g bacto-胰蛋白胨，10g bacto-yeast提取物，5gNaCl，pH调为7.0w.NaOH，和高压灭菌前添加15g bacto-agar)。

[0455] 10％Lugol溶液(碘/碘化钾溶液；通过储藏的H20稀释(dil.)10倍制备:Sigma Cat.no.L6146)。

[0456] 枯草芽孢杆菌SHA273:见WO 95/10603

[0457] 质粒

[0458] pDN1528包含编码Termamyl的完整基因，amyL，其自身启动子指导其表达。而且，该质粒还包含来自质粒pUB110的复制原点，ori，以及来自质粒pUC194的cat基因，赋予对氯霉素的抗性。pDN1528在WO 96/23874的图9中显示。

[0459] 方法

[0460] 低pH滤膜检测

[0461] 将芽孢杆菌文库铺在含有10μg/ml氯霉素的TY琼脂板上的醋酸纤维素(OE67，Schleicher&Schuell，Dassel，Germany)和硝酸纤维素滤膜(Protran-Ba85，Schleicher&Schuell，Dassel，Germany)夹心上，于37℃保持至少21小时。将醋酸纤维素层放在TY琼脂板上。

[0462] 铺板之后，但要在保温之前用针将每个滤膜夹心特异地标记，以便能够确定阳性变体在滤膜上的位置，并将结合了变体的硝酸纤维素滤膜转移到盛有柠檬酸盐缓冲液(pH4.5)的容器中，于80℃温育20分钟（筛选野生型主链变体时）或85℃ 60分钟（筛选LE399主链变体时）。将带有菌落的醋酸纤维素滤膜于室温保存在TY平板上待用。温育后，在含有1％琼脂糖、0.2％淀粉的柠檬酸盐缓冲液(pH6.0)的平板上检测残存的活性。用与滤膜夹心相同的方式标记带有硝酸纤维素滤膜的检测平板，并于50℃培养2小时。移去滤膜后，用10％ Lugol溶液将检测平板染色。降解淀粉的变体检测为深蓝色背景上的白色斑点，然后在保存平板上鉴定。在与第一次筛选相同的条件下将阳性变体重筛两次。

[0463] 次级筛选

[0464] 将在筛选后的阳性转化体自储藏板中挑起并在次级板试验中检测。阳性转化体在5ml LB+氯霉素于37℃生长22小时。芽胞杆菌属每个阳性转化体和作为对照的表达相应主链的克隆在柠檬酸盐缓冲液，pH 4.5中90℃培养，样品于0，10，20，30，40，60和80分钟时取出。3微升样品在试验板上点样。试验板用10％ Lugol溶液染色。观察到改进的变体具有比主链高的残留活性（试验板上检测为晕圈）。通过核苷酸测序测定改进的变体。

[0465] 未纯化变体的稳定试验

[0466] 要分析的表达变体的芽孢杆菌属培养物在10ml LB+氯霉素中37℃生长21小时。800微升培养物与200微升柠檬酸盐缓冲液pH 4.5混合。相应于大量样品时间点的多个70微升等分试样在PCR管中制备，并于PCR仪器70℃培养((wt主链(backbone)变体）或90℃（对于LE399的变体）各时间点（通常5，10，15，20，25和30分钟）培养。0分钟样品未在高温培养。样品的活性通过转移20微升到200微升α-淀粉酶PNP-G7底物MPR3的(BoehringerMannheim Cat.no.1660730)，如下“α-淀粉酶活性的试验”所述。结果显示为百分比活性（相对与0时间点）对时间作图，或表述为培养一段时间之后百分比剩余活性。

[0467] α-淀粉酶变体的发酵和纯化

[0468] 携带相关表达质粒的枯草芽孢杆菌菌株在自-80℃储藏的有10微克/ml卡那霉素的LB-琼脂板上接种，将菌斑转移到100ml PS-1添有chloamphinicol 10micro g/ml培养基的500ml摇瓶中。

[0469] PS-1培养基组合物：

[0470] Pearl sugar 100g/l

[0471] Soy Bean Meal 40g/l

[0472] Na_2HPO_4，$12H_2O$ 10g/l

[0473] PluronicTM PE 6100 0.1g/l

[0474] $CaCO_3$ 5g/l

[0475] 培养物在37℃于270rpm振荡5天。

[0476] 通过4500rpm离心20-25分钟从发酵液中除去细胞或细胞碎片。然后将上清过滤，以获得彻底清晰的溶液。浓缩滤液并在UF-过滤器(10000cut off膜）冲洗。缓冲液变为20mM醋酸盐pH 5.5。将UF-滤过液应用到S-sepharose F.F.上并且通过用0.2M NaCl的相同缓冲液进行分步洗脱。10mMTris，pH 9.0透析洗脱液并应用到Q-sepharose F.F.，用线性梯度0-0.3M NaCl6柱体积洗脱。含有活性的（由Phadebas试验测定）级分被汇集，调pH到pH 7.5通过5分钟内0.5％ W/vol.活性炭处理除去剩余的颜色。

[0477] 纯化变体的稳定性测定

[0478] 全部纯化变体稳定性实验使用相同的设置进行。方法是：

[0479] 在相应条件(1-4)下温育酶。于不同时刻取样品，例如0、5、10、15和30分钟后，将样品在检测缓冲液(0.1M 50mM Britton缓冲液pH7.3)中稀释25倍(所有取样稀释度相同)，并采用Phadebas检测法(Pharmacia)在标准条件(pH7.3，37℃)下测量活性。

[0480] 以温育前(0分钟)测量的活性作为对照(100％)。将下降的百分比作为温育时间的函数来计算活性。表中显示在温育例如30分钟后的残存活性。

[0481] 比活性测定

[0482] 采用Phadebas检测法(Pharmacia)将比活性确定为活性/mg酶。测定依照产品说明书进行(还可见以下“α-淀粉酶活性检测”)。

[0483] α-淀粉酶活性检测法

[0484] 1.Phadebas检测法

[0485] 通过一种采用Phadebas®片剂作为底物的方法来测定α-淀粉酶的活性。Phadebas片剂(Phadebas® Amylase Test，由Pharmacia Diagnostic提供)含有一种交联的不溶性兰色淀粉聚合物，该聚合物与牛血清白蛋白和缓冲物质混合在一起并做成片剂。

[0486] 进行每次测量时，将一个药片悬浮于含有5ml 50mM Britton-Robinson缓冲液(50mM醋酸、50mM磷酸、50mM硼酸、0.1mM $CaCl_2$、用NaOH调至所需pH)的试管中。于所需温度在水浴中进行实验。将待测α-淀粉酶在xml 50mM Britton-Robinson缓冲液中进行稀释。将1ml该α-淀粉酶溶液加入5ml 50mM Britton-Robinson缓冲液中。α-淀粉酶水解淀粉产生水溶性兰色碎片。在620nm比色测定到的所得兰色溶液的吸光度是α-淀粉酶活性的函数。

[0487] 重要的是温育10或15分钟后测量的620nm吸光度应在0.2到2.0吸收单位内。在这样的吸光度范围内，活性和吸光度是线性关系(Lambert-Beer定律)。因此，必须调节酶的稀释度以便符合该法则。在特别设置的条件(温度、pH、反应时间、缓冲液条件)下，1mg给定α-淀粉酶将水解一定量的底物并产生兰色。在620nm测量色度。在给定条件下，所测得的吸光度与受测α-淀粉酶的特异活性直接成比例(活性/毫克纯α-淀粉酶蛋白质)。

[0488] 2.替代方法

[0489] 通过一种采用PNP-G7作为底物的方法来确定α-淀粉酶的活性。PNP-G7(邻-硝基苯-α，D-麦芽庚糖苷的缩写)是一种被封闭的寡糖，可以被内-淀粉酶切割。切割之后，试剂盒中包含的α-葡糖苷酶消化底物释放出游离的PNP分子，它呈现黄色，因此可以在λ＝405nm(400-420nm)的可见光处比色测量。包含PNP-G7底物和α-葡糖苷酶的试剂盒由Boehringer-Mannheim cat.No.1054635)制造。

[0490] 按照生产商所推荐将10ml底物/冲液加入50ml酶/缓冲液来制备试剂缓冲液，该试验是通过下述进行的：将20μl酶溶液转移到一个96孔微量滴定板上并于25℃温育来进行检测。加入200μl试剂溶液(25℃)。将溶液混匀，预保温1分钟，并在ELISA reader上4分钟内每30秒测量一次OD405nm处的吸光度。

[0491] 在给定条件设置下，随时间变化的吸光度曲线的斜率与受测α-淀粉酶活性(活性/毫克酶)成正比。

[0492] 实施例

[0493] 实施例 1

[0494] 与亲本酶相比，在高温和低钙离子浓度，低 pH 下具有在改进稳定性的地衣芽孢杆菌 α-淀粉酶变体通过易错 RCR 诱变构建。

[0495] 易错 PCR 诱变和文库构建

[0496] 为改进在高温和低钙离子浓度，低 pH 下地衣芽孢杆菌 α-淀粉酶变体的稳定性，实施易错 PCR 诱变。利用编码野生型地衣芽孢杆菌 α-淀粉酶基因的质粒 PDN1528 作为模板，以用下面引物在 PCR 条件下扩增该基因，22149：5′ -CGA TTG CTG ACG CTG TTA TTT GCG3′ (SEQID NO：14) 和 24814：5′ -GAT CAC CCG CGA TAC CGT C-3′ (SEQ ID NO：15)。其中升高的错率导致引入随机点突变。所用的 PCR 条件是：10mM Tris-HCl，pH 8.3，50mM KCl，4mM MgCl2，0.3mM MnCl2，0.1mM dGTP/dATP，0.5mMdTTP/dCTP，和每 100 微升 (micro 1) 反应液 2.5 单位的 Taq 聚合酶。

[0497] 所得的 PCR 片段在胶上纯化，并在基于 PCR 多聚化步骤中使用，通过下述引物的 pDN1528PCR 扩增产生的胶纯化载体片段，#24：5′ -GAA TGTATG TCG GCC GGC AAA ACG CCG GTG A-3′ (SEQ ID NO：16) 和 #27：5-GCC GCC GCT GCT GCA GAA TGA GGC AGC AAG-3′ (SEQ ID NO：17)，由此形成重叠以插入片段。多聚化反应随后被引入枯草芽孢杆菌 (Shafikhaniet al.，Biotechniques，23(1997)，304 ～ 310)。

[0498] 筛选

[0499] 上述易错文库在低 pH 滤膜试验中筛选（见″材料与方法″）。对重筛选阳性的克隆检测进行“材料与方法”的液体试验中其稳定性次级筛选。

[0500] 结果

[0501] 在 pH 4.5，5ppm 钙下于 90℃温育升高的稳定性

[0502]

名称	wt	LE488	LE489	7.19.1	8.9.1
突变	-	D207V	K170Q D207V N280S	E132A D207V	D207E E250G H406L L427I
稳定性	-	+	+	+	+

[0503] 1) “+”表示相对于野生型 (wt) 稳定性显著升高

[0504] 在 pH 4.5，5ppm 钙下于 90℃温育升高的稳定性

[0505]

名称	wt	LE491	LE492	LE493	LE494	19.3.1
突变	-	D60N D207V L318M	T49I E132V V440A	T49I K176R D207V Y402F	Q374R E385V Q393R	N190F A209V Q264S
稳定性	-	+	+	+	+	+

[0506] 1）“+”表示相对于野生型稳定性显著升高

[0507] 在 pH4.5，5ppm 钙下于 90℃温育升高的稳定性

[0508]

名称	wt	E132-1	D207-7	D207-6	E250-8
突变	-	E132P	D207L	D207G	E250F
稳定性	-	+	+	+	+

[0509] 1）“+”表示相对于野生型稳定性显著升高

[0510] 实施例 2

[0511] 通过定点诱变，与亲本酶从实施例 1 到新（非野生型）主链的进行选择以改进在低 pH 和低钙离子浓度稳定性。

[0512] 定点诱变

[0513] 将自 LE493(K176R+D207V+Y402F) 突变转移到 LE399 生产的 LE495。这是通过重叠 PCR 方法 (Kirchhoff 和 Desrosiers，PCR Methods andApplications，2(1993)，301-304)。通过下述引物及 LE399 模板产生 2 个重叠 PCR 片段，片段 A：#312Mut1765′ -CCC GAAAGC TGAACC GCA TCT ATAGGT TTC AAG GGA AGA CTT GGG ATT-3′ (SEQ ID NO：18)（粗体表示突变密码子）和 #290D207 重叠 5′ -AGG ATG GTC ATA ATC AAA GTC GG-3′ (SEQ ID NO：19)；片段 B：#313Mut2075′ -CCG ACT TTG ATT ATG ACCATC CTG TTG TCG TAG CAG AGA TTA AGA GAT GGG G-3′ (SEQ ID NO：20) 和 #314Mut4025′ -CGA CAA TGT CAT GGT GGT CGA AAA AAT CATGCT GTG CTC CGT ACG-3′ (SEQ ID NO：21)。片段 A 和 B 等克分子的比例混合并接着用下面外引物扩增全长片段，#312Mut176 和 #314Mut402。该片段用下述引物产生的载体 PCR 片段用于多聚化反应。#296Y402multi5′ -TTT CGA CCA CCA TGA CAT TGT CG-3′ (SEQ ID NO：22) 和 #305399Multi1765′ -TAT AGA TGC GGT TCA GCT TTC GGG-3′ (SEQ ID NO：23)，用上述的模板 LE399。接着用多聚化反应转化入枯草芽孢杆菌。对于上述试验中的稳定性筛选克隆。一些克隆中具有改进稳定性自 LE493 的突变存在通过测序证实。

[0514] 以相似的方式通过采用利用引物 #312Mut176 和 #314Mut402 扩增 LE399 编码模板获得 LE 497，并在采用载体片段多聚化反应中使用所得 PCR 片段，而载体片段是通过 LE399PCR 扩增，采用引物 #296Y402multi 和 #305399Multi176 获得。

[0515] 结果

[0516] LE399 变体在 pH4.5,5ppm 钙于 90℃培养升高的稳定性

[0517]

名称	LE399	LE495	LE497
突变	- （主链）	K176R D207V Y402F	K176R Y402F
稳定性	-	+	+

[0518] 1）“+”表示相对于主链稳定性显著升高

序列表

<110> 诺维信公司 (Novozymes A/S)

<120> 具有改变特性的 α-淀粉酶突变体

<130>

<160>28

<170>PatentIn Ver.2.1

<210>1

<211>1455

<212>DNA

<213> 芽孢杆菌属菌种 (Bacillus sp.)

<220>

<221>CDS

<222>(1)..(1455)

<223>SP690

<400>1

```
cat cat aat gga aca aat ggt act atg atg caa tat ttc gaa tgg tat     48
His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr
1               5                   10                  15
ttg cca aat gac ggg aat cat tgg aac agg ttg agg gat gac gca gct     96
Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Asp Asp Ala Ala
            20                  25                  30
aac tta aag agt aaa ggg ata aca gct gta tgg atc cca cct gca tgg    144
Asn Leu Lys Ser Lys Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Trp
        35                  40                  45
aag ggg act tcc cag aat gat gta ggt tat gga gcc tat gat tta tat    192
Lys Gly Thr Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr
    50                  55                  60
gat ctt gga gag ttt aac cag aag ggg acg gtt cgt aca aaa tat gga    240
Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly
65                  70                  75                  80
aca cgc aac cag cta cag gct gcg gtg acc tct tta aaa aat aac ggc    288
Thr Arg Asn Gln Leu Gln Ala Ala Val Thr Ser Leu Lys Asn Asn Gly
                85                  90                  95
att cag gta tat ggt gat gtc gtc atg aat cat aaa ggt gga gca gat    336
Ile Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp
```

```
            100                 105                 110
ggt acg gaa att gta aat gcg gta gaa gtg aat cgg agc aac cga aac   384
Gly Thr Glu Ile Val Asn Ala Val Glu Val Asn Arg Ser Asn Arg Asn
        115                 120                 125
cag gaa acc tca gga gag tat gca ata gaa gcg tgg aca aag ttt gat   432
Gln Glu Thr Ser Gly Glu Tyr Ala Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp
    130                 135                 140
ttt cct gga aga gga aat aac cat tcc agc ttt aag tgg cgc tgg tat   480
Phe Pro Gly Arg Gly Asn Asn His Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr
145                 150                 155                 160
cat ttt gat ggg aca gat tgg gat cag tca cgc cag ctt caa aac aaa   528
His Phe Asp Gly Thr Asp Trp Asp Gln Ser Arg Gln Leu Gln Asn Lys
                165                 170                 175
ata tat aaa ttc agg gga aca ggc aag gcc tgg gac tgg gaa gtc gat   576
Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Thr Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp
            180                 185                 190
aca gag aat ggc aac tat gac tat ctt atg tat gca gac gtg gat atg   624
Thr Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Val Asp Met
        195                 200                 205
gat cac cca gaa gta ata cat gaa ctt aga aac tgg gga gtg tgg tat       672
Asp His Pro Glu Val Ile His Glu Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp Tyr
    210                 215                 220
acg aat aca ctg aac ctt gat gga ttt aga ata gat gca gtg aaa cat       720
Thr Asn Thr Leu Asn Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His
225                 230                 235                 240
ata aaa tat agc ttt acg aga gat tgg ctt aca cat gtg cgt aac acc       768
Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Leu Thr His Val Arg Asn Thr
                245                 250                 255
aca ggt aaa cca atg ttt gca gtg gct gag ttt tgg aaa aat gac ctt       816
Thr Gly Lys Pro Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu
            260                 265                 270
ggt gca att gaa aac tat ttg aat aaa aca agt tgg aat cac tcg gtg       864
Gly Ala Ile Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Ser Trp Asn His Ser Val
        275                 280                 285
ttt gat gtt cct ctc cac tat aat ttg tac aat gca tct aat agc ggt       912
Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Asn Ser Gly
    290                 295                 300
ggt tat tat gat atg aga aat att tta aat ggt tct gtg gtg caa aaa       960
Gly Tyr Tyr Asp Met Arg Asn Ile Leu Asn Gly Ser Val Val Gln Lys
```

```
305                 310                 315                 320
cat cca aca cat gcc gtt act ttt gtt gat aac cat gat tct cag ccc     1008
His Pro Thr His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro
                325                 330                 335
ggg gaa gca ttg gaa tcc ttt gtt caa caa tgg ttt aaa cca ctt gca     1056
Gly Glu Ala Leu Glu Ser Phe Val Gln Gln Trp Phe Lys Pro Leu Ala
            340                 345                 350
tat gca ttg gtt ctg aca agg gaa caa ggt tat cct tcc gta ttt tat     1104
Tyr Ala Leu Val Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr
        355                 360                 365
ggg gat tac tac ggt atc cca acc cat ggt gtt ccg gct atg aaa tct     1152
Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Gly Val Pro Ala Met Lys Ser
    370                 375                 380
aaa ata gac cct ctt ctg cag gca cgt caa act ttt gcc tat ggt acg     1200
Lys Ile Asp Pro Leu Leu Gln Ala Arg Gln Thr Phe Ala Tyr Gly Thr
385                 390                 395                 400
cag cat gat tac ttt gat cat cat gat att atc ggt tgg aca aga gag     1248
Gln His Asp Tyr Phe Asp His His Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu
                405                 410                 415
gga aat agc tcc cat cca aat tca ggc ctt gcc acc att atg tca gat     1296
Gly Asn Ser Ser His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp
            420                 425                 430
ggt cca ggt ggt aac aaa tgg atg tat gtg ggg aaa aat aaa gcg gga     1344
Gly Pro Gly Gly Asn Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Asn Lys Ala Gly
        435                 440                 445
caa gtt tgg aga gat att acc gga aat agg aca ggc acc gtc aca att     1392
Gln Val Trp Arg Asp Ile Thr Gly Asn Arg Thr Gly Thr Val Thr Ile
    450                 455                 460
aat gca gac gga tgg ggt aat ttc tct gtt aat gga ggg tcc gtt tcg     1440
Asn Ala Asp Gly Trp Gly Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser
465                 470                 475                 480
gtt tgg gtg aag caa                                                 1455
Val Trp Val Lys Gln
                485
```

<210>2

<211>485

<212>PRT

<213> 芽孢杆菌属菌种 (Bacillus sp.)

```
<400>2
His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr
1               5                   10                  15
Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Asp Asp Ala Ala
            20                  25                  30
Asn Leu Lys Ser Lys Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Trp
        35                  40                  45
Lys Gly Thr Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr
    50                  55                  60
Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly
65                  70                  75                  80
Thr Arg Asn Gln Leu Gln Ala Ala Val Thr Ser Leu Lys Asn Asn Gly
                85                  90                  95
Ile Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp
            100                 105                 110
Gly Thr Glu Ile Val Asn Ala Val Glu Val Asn Arg Ser Asn Arg Asn
        115                 120                 125
Gln Glu Thr Ser Gly Glu Tyr Ala Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp
    130                 135                 140
Phe Pro Gly Arg Gly Asn Asn His Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr
145                 150                 155                 160
His Phe Asp Gly Thr Asp Trp Asp Gln Ser Arg Gln Leu Gln Asn Lys
                165                 170                 175
Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Thr Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp
            180                 185                 190
Thr Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Val Asp Met
        195                 200                 205
Asp His Pro Glu Val Ile His Glu Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp Tyr
    210                 215                 220
Thr Asn Thr Leu Asn Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His
225                 230                 235                 240
Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Leu Thr His Val Arg Asn Thr
                245                 250                 255
Thr Gly Lys Pro Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu
            260                 265                 270
Gly Ala Ile Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Ser Trp Asn His Ser Val
        275                 280                 285
Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Asn Ser Gly
    290                 295                 300
```

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

<210>3
<211>1455
<212>DNA
<213>芽孢杆菌属菌种(Bacillus sp.)

<220>
<221>CDS
<222>(1)..(1455)
<223>SP722

<400>3
cat cat aat ggg aca aat ggg acg atg atg caa tac ttt gaa tgg cac 48
His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp His
1 5 10 15

```
ttg cct aat gat ggg aat cac tgg aat aga tta aga gat gat gct agt   96
Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Asp Asp Ala Ser
            20                  25                  30
aat cta aga aat aga ggt ata acc gct att tgg att ccg cct gcc tgg   144
Asn Leu Arg Asn Arg Gly Ile Thr Ala Ile Trp Ile Pro Pro Ala Trp
        35                  40                  45
aaa ggg act tcg caa aat gat gtg ggg tat gga gcc tat gat ctt tat   192
Lys Gly Thr Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr
    50                  55                  60
gat tta ggg gaa ttt aat caa aag ggg acg gtt cgt act aag tat ggg   240
Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly
65                  70                  75                  80
aca cgt agt caa ttg gag tct gcc atc cat gct tta aag aat aat ggc   288
Thr Arg Ser Gln Leu Glu Ser Ala Ile His Ala Leu Lys Asn Asn Gly
                85                  90                  95
gtt caa gtt tat ggg gat gta gtg atg aac cat aaa gga gga gct gat   336
Val Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp
            100                 105                 110
gct aca gaa aac gtt ctt gct gtc gag gtg aat cca aat aac cgg aat   384
Ala Thr Glu Asn Val Leu Ala Val Glu Val Asn Pro Asn Asn Arg Asn
        115                 120                 125
caa gaa ata tct ggg gac tac aca att gag gct tgg act aag ttt gat       432
Gln Glu Ile Ser Gly Asp Tyr Thr Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp
    130                 135                 140
ttt cca ggg agg ggt aat aca tac tca gac ttt aaa tgg cgt tgg tat       480
Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp Arg Trp Tyr
145                 150                 155                 160
cat ttc gat ggt gta gat tgg gat caa tca cga caa ttc caa aat cgt       528
His Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Gln Ser Arg Gln Phe Gln Asn Arg
                165                 170                 175
atc tac aaa ttc cga ggt gat ggt aag gca tgg gat tgg gaa gta gat       576
Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Asp Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp
            180                 185                 190
tcg gaa aat gga aat tat gat tat tta atg tat gca gat gta gat atg       624
Ser Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Val Asp Met
        195                 200                 205
gat cat ccg gag gta gta aat gag ctt aga aga tgg gga gaa tgg tat       672
Asp His Pro Glu Val Val Asn Glu Leu Arg Arg Trp Gly Glu Trp Tyr
    210                 215                 220
```

aca aat aca tta aat ctt gat gga ttt agg atc gat gcg gtg aag cat 720
Thr Asn Thr Leu Asn Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His
225 230 235 240

att aaa tat agc ttt aca cgt gat tgg ttg acc cat gta aga aac gca 768
Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Leu Thr His Val Arg Asn Ala
245 250 255

acg gga aaa gaa atg ttt gct gtt gct gaa ttt tgg aaa aat gat tta 816
Thr Gly Lys Glu Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu
260 265 270

ggt gcc ttg gag aac tat tta aat aaa aca aac tgg aat cat tct gtc 864
Gly Ala Leu Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Trp Asn His Ser Val
275 280 285

ttt gat gtc ccc ctt cat tat aat ctt tat aac gcg tca aat agt gga 912
Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Asn Ser Gly
290 295 300

ggc aac tat gac atg gca aaa ctt ctt aat gga acg gtt gtt caa aag 960
Gly Asn Tyr Asp Met Ala Lys Leu Leu Asn Gly Thr Val Val Gln Lys
305 310 315 320

cat cca atg cat gcc gta act ttt gtg gat aat cac gat tct caa cct 1008
His Pro Met His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro
325 330 335

ggg gaa tca tta gaa tca ttt gta caa gaa tgg ttt aag cca ctt gct 1056
Gly Glu Ser Leu Glu Ser Phe Val Gln Glu Trp Phe Lys Pro Leu Ala
340 345 350

tat gcg ctt att tta aca aga gaa caa ggc tat ccc tct gtc ttc tat 1104
Tyr Ala Leu Ile Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr
355 360 365

ggt gac tac tat gga att cca aca cat agt gtc cca gca atg aaa gcc 1152
Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Ser Val Pro Ala Met Lys Ala
370 375 380

aag att gat cca atc tta gag gcg cgt caa aat ttt gca tat gga aca 1200
Lys Ile Asp Pro Ile Leu Glu Ala Arg Gln Asn Phe Ala Tyr Gly Thr
385 390 395 400

caa cat gat tat ttt gac cat cat aat ata atc gga tgg aca cgt gaa 1248
Gln His Asp Tyr Phe Asp His His Asn Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu
405 410 415

gga aat acc acg cat ccc aat tca gga ctt gcg act atc atg tcg gat 1296
Gly Asn Thr Thr His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp
420 425 430

ggg cca ggg gga gag aaa tgg atg tac gta ggg caa aat aaa gca ggt 1344
Gly Pro Gly Gly Glu Lys Trp Met Tyr Val Gly Gln Asn Lys Ala Gly
435 440 445

caa gtt tgg cat gac ata act gga aat aaa cca gga aca gtt acg atc 1392
Gln Val Trp His Asp Ile Thr Gly Asn Lys Pro Gly Thr Val Thr Ile
450 455 460

aat gca gat gga tgg gct aat ttt tca gta aat gga gga tct gtt tcc 1440
Asn Ala Asp Gly Trp Ala Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser
465 470 475 480

att tgg gtg aaa cga 1455
Ile Trp Val Lys Arg
485

<210>4
<211>485
<212>PRT
<213> 芽孢杆菌属菌种（Bacillus sp.）

<400>4
His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp His
1 5 10 15

Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Asp Asp Ala Ser
20 25 30

Asn Leu Arg Asn Arg Gly Ile Thr Ala Ile Trp Ile Pro Pro Ala Trp
35 40 45

Lys Gly Thr Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr
50 55 60

Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly
65 70 75 80

Thr Arg Ser Gln Leu Glu Ser Ala Ile His Ala Leu Lys Asn Asn Gly
85 90 95

Val Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp
100 105 110

Ala Thr Glu Asn Val Leu Ala Val Glu Val Asn Pro Asn Asn Arg Asn
115 120 125

Gln Glu Ile Ser Gly Asp Tyr Thr Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp
130 135 140

Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp Arg Trp Tyr
145 150 155 160

```
His Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Gln Ser Arg Gln Phe Gln Asn Arg
                165                 170                 175
Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Asp Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp
            180                 185                 190
Ser Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Val Asp Met
        195                 200                 205
Asp His Pro Glu Val Val Asn Glu Leu Arg Arg Trp Gly Glu Trp Tyr
    210                 215                 220
Thr Asn Thr Leu Asn Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His
225                 230                 235                 240
Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Leu Thr His Val Arg Asn Ala
                245                 250                 255
Thr Gly Lys Glu Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu
            260                 265                 270
Gly Ala Leu Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Trp Asn His Ser Val
        275                 280                 285
Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Asn Ser Gly
    290                 295                 300
Gly Asn Tyr Asp Met Ala Lys Leu Leu Asn Gly Thr Val Val Gln Lys
305                 310                 315                 320
His Pro Met His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro
                325                 330                 335
Gly Glu Ser Leu Glu Ser Phe Val Gln Glu Trp Phe Lys Pro Leu Ala
            340                 345                 350
Tyr Ala Leu Ile Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr
        355                 360                 365
Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Ser Val Pro Ala Met Lys Ala
    370                 375                 380
Lys Ile Asp Pro Ile Leu Glu Ala Arg Gln Asn Phe Ala Tyr Gly Thr
385                 390                 395                 400
Gln His Asp Tyr Phe Asp His His Asn Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu
                405                 410                 415
Gly Asn Thr Thr His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp
            420                 425                 430
Gly Pro Gly Gly Glu Lys Trp Met Tyr Val Gly Gln Asn Lys Ala Gly
        435                 440                 445
Gln Val Trp His Asp Ile Thr Gly Asn Lys Pro Gly Thr Val Thr Ile
    450                 455                 460
Asn Ala Asp Gly Trp Ala Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser
```

465 470 475 480
Ile Trp Val Lys Arg
485

<210>5
<211>1548
<212>DNA
<213>嗜热脂肪芽孢杆菌(Bacillus stearothermophilus)

<220>
<221>CDS
<222>(1)..(1548)
<223>BSG

<400>5
gcc gca ccg ttt aac ggc acc atg atg cag tat ttt gaa tgg tac ttg 48
Ala Ala Pro Phe Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Leu
1 5 10 15
ccg gat gat ggc acg tta tgg acc aaa gtg gcc aat gaa gcc aac aac 96
Pro Asp Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Ala Asn Glu Ala Asn Asn
20 25 30
tta tcc agc ctt ggc atc acc gct ctt tgg ctg ccg ccc gct tac aaa 144
Leu Ser Ser Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala Tyr Lys
35 40 45
gga aca agc cgc agc gac gta ggg tac gga gta tac gac ttg tat gac 192
Gly Thr Ser Arg Ser Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu Tyr Asp
50 55 60
ctc ggc gaa ttc aat caa aaa ggg acc gtc cgc aca aaa tac gga aca 240
Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr
65 70 75 80
aaa gct caa tat ctt caa gcc att caa gcc gcc cac gcc gct gga atg 288
Lys Ala Gln Tyr Leu Gln Ala Ile Gln Ala Ala His Ala Ala Gly Met
85 90 95
caa gtg tac gcc gat gtc gtg ttc gac cat aaa ggc ggc gct gac ggc 336
Gln Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asp His Lys Gly Gly Ala Asp Gly
100 105 110
acg gaa tgg gtg gac gcc gtc gaa gtc aat ccg tcc gac cgc aac caa 384
Thr Glu Trp Val Asp Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asp Arg Asn Gln
115 120 125

```
gaa atc tcg ggc acc tat caa atc caa gca tgg acg aaa ttt gat ttt      432
Glu Ile Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe Asp Phe
    130                 135                 140
ccc ggg cgg ggc aac acc tac tcc agc ttt aag tgg cgc tgg tac cat      480
Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr His
145                 150                 155                 160
ttt gac ggc gtt gat tgg gac gaa agc cga aaa ttg agc cgc att tac      528
Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Ser Arg Ile Tyr
                165                 170                 175
aaa ttc cgc ggc atc ggc aaa gcg tgg gat tgg gaa gta gac acg gaa      576
Lys Phe Arg Gly Ile Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp Thr Glu
            180                 185                 190
aac gga aac tat gac tac tta atg tat gcc gac ctt gat atg gat cat      624
Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Leu Asp Met Asp His
        195                 200                 205
ccc gaa gtc gtg acc gag ctg aaa aac tgg ggg aaa tgg tat gtc aac      672
Pro Glu Val Val Thr Glu Leu Lys Asn Trp Gly Lys Trp Tyr Val Asn
    210                 215                 220
aca acg aac att gat ggg ttc cgg ctt gat gcc gtc aag cat att aag      720
Thr Thr Asn Ile Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys
225                 230                 235                 240
ttc agt ttt ttt cct gat tgg ttg tcg tat gtg cgt tct cag act ggc      768
Phe Ser Phe Phe Pro Asp Trp Leu Ser Tyr Val Arg Ser Gln Thr Gly
                245                 250                 255
aag ccg cta ttt acc gtc ggg gaa tat tgg agc tat gac atc aac aag      816
Lys Pro Leu Phe Thr Val Gly Glu Tyr Trp Ser Tyr Asp Ile Asn Lys
            260                 265                 270
ttg cac aat tac att acg aaa aca gac gga acg atg tct ttg ttt gat      864
Leu His Asn Tyr Ile Thr Lys Thr Asp Gly Thr Met Ser Leu Phe Asp
        275                 280                 285
gcc ccg tta cac aac aaa ttt tat acc gct tcc aaa tca ggg ggc gca      912
Ala Pro Leu His Asn Lys Phe Tyr Thr Ala Ser Lys Ser Gly Gly Ala
    290                 295                 300
ttt gat atg cgc acg tta atg acc aat act ctc atg aaa gat caa ccg      960
Phe Asp Met Arg Thr Leu Met Thr Asn Thr Leu Met Lys Asp Gln Pro
305                 310                 315                 320
aca ttg gcc gtc acc ttc gtt gat aat cat gac acc gaa ccc ggc caa     1008
Thr Leu Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Glu Pro Gly Gln
                325                 330                 335
```

```
gcg ctg cag tca tgg gtc gac cca tgg ttc aaa ccg ttg gct tac gcc  1056
Ala Leu Gln Ser Trp Val Asp Pro Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala
            340                 345                 350
ttt att cta act cgg cag gaa gga tac ccg tgc gtc ttt tat ggt gac  1104
Phe Ile Leu Thr Arg Gln Glu Gly Tyr Pro Cys Val Phe Tyr Gly Asp
        355                 360                 365
tat tat ggc att cca caa tat aac att cct tcg ctg aaa agc aaa atc  1152
Tyr Tyr Gly Ile Pro Gln Tyr Asn Ile Pro Ser Leu Lys Ser Lys Ile
    370                 375                 380
gat ccg ctc ctc atc gcg cgc agg gat tat gct tac gga acg caa cat  1200
Asp Pro Leu Leu Ile Ala Arg Arg Asp Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln His
385                 390                 395                 400
gat tat ctt gat cac tcc gac atc atc ggg tgg aca agg gaa ggg ggc  1248
Asp Tyr Leu Asp His Ser Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Gly
                405                 410                 415
act gaa aaa cca gga tcc gga ctg gcc gca ctg atc acc gat ggg ccg  1296
Thr Glu Lys Pro Gly Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro
            420                 425                 430
gga gga agc aaa tgg atg tac gtt ggc aaa caa cac gct gga aaa gtg  1344
Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Gln His Ala Gly Lys Val
        435                 440                 445
ttc tat gac ctt acc ggc aac cgg agt gac acc gtc acc atc aac agt  1392
phe Tyr Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile Asn Ser
    450                 455                 460
gat gga tgg ggg gaa ttc aaa gtc aat ggc ggt tcg gtt tcg gtt tgg  1440
Asp Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Trp
465                 470                 475                 480
gtt cct aga aaa acg acc gtt tct acc atc gct cgg ccg atc aca acc  1488
Val Pro Arg Lys Thr Thr Val Ser Thr Ile Ala Arg Pro Ile Thr Thr
                485                 490                 495
cga ccg tgg act ggt gaa ttc gtc cgt tgg acc gaa cca cgg ttg gtg  1536
Arg Pro Trp Thr Gly Glu Phe Val Arg Trp Thr Glu Pro Arg Leu Val
            500                 505                 510
gca tgg cct tga                                                  1548
Ala Trp Pro
        515
```

<210>6

<211>515

<212>PRT

<213>嗜热脂肪芽孢杆菌(Bacillus stearothermophilus)

<400>6

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

275 280 285

Ala Pro Leu His Asn Lys Phe Tyr Thr Ala Ser Lys Ser Gly Gly Ala

290 295 300

Phe Asp Met Arg Thr Leu Met Thr Asn Thr Leu Met Lys Asp Gln Pro

305 310 315 320

Thr Leu Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Glu Pro Gly Gln

325 330 335

Ala Leu Gln Ser Trp Val Asp Pro Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala

340 345 350

Phe Ile Leu Thr Arg Gln Glu Gly Tyr Pro Cys Val Phe Tyr Gly Asp

355 360 365

Tyr Tyr Gly Ile Pro Gln Tyr Asn Ile Pro Ser Leu Lys Ser Lys Ile

370 375 380

Asp Pro Leu Leu Ile Ala Arg Arg Asp Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln His

385 390 395 400

Asp Tyr Leu Asp His Ser Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Gly

405 410 415

Thr Glu Lys Pro Gly Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro

420 425 430

Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Gln His Ala Gly Lys Val

435 440 445

Phe Tyr Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile Asn Ser

450 455 460

Asp Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Trp

465 470 475 480

Val Pro Arg Lys Thr Thr Val Ser Thr Ile Ala Arg Pro Ile Thr Thr

485 490 495

Arg Pro Trp Thr Gly Glu Phe Val Arg Trp Thr Glu Pro Arg Leu Val

500 505 510

Ala Trp Pro

515

<210>7
<211>1920
<212>DNA
<213>地衣芽孢杆菌(Bacillus licheniformis)

<220>
<221>CDS

<222>(421)..(1872)
<223>Termamyl

<400>7

```
cggaagattg gaagtacaaa aataagcaaa agattgtcaa tcatgtcatg agccatgcgg  60
gagacggaaa aatcgtctta atgcacgata tttatgcaac gttcgcagat gctgctgaag 120
agattattaa aaagctgaaa gcaaaaggct atcaattggt aactgtatct cagcttgaag 180
aagtgaagaa gcagagaggc tattgaataa atgagtagaa gcgccatatc ggcgcttttc 240
ttttggaaga aaatataggg aaaatggtac ttgttaaaaa ttcggaatat ttatacaaca 300
tcatatgttt cacattgaaa ggggaggaga atcatgaaac aacaaaaacg gctttacgcc 360
cgattgctga cgctgttatt tgcgctcatc ttcttgctgc ctcattctgc agcagcggcg 420
gca aat ctt aat ggg acg ctg atg cag tat ttt gaa tgg tac atg ccc    468
Ala Asn Leu Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Met Pro
 1               5                  10                  15
aat gac ggc caa cat tgg agg cgt ttg caa aac gac tcg gca tat ttg    516
Asn Asp Gly Gln His Trp Arg Arg Leu Gln Asn Asp Ser Ala Tyr Leu
            20                  25                  30
gct gaa cac ggt att act gcc gtc tgg att ccc ccg gca tat aag gga    564
Ala Glu His Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly
        35                  40                  45
acg agc caa gcg gat gtg ggc tac ggt gct tac gac ctt tat gat tta    612
Thr Ser Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu
    50                  55                  60
ggg gag ttt cat caa aaa ggg acg gtt cgg aca aag tac ggc aca aaa    660
Gly Glu Phe His Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys
65                  70                  75                  80
gga gag ctg caa tct gcg atc aaa agt ctt cat tcc cgc gac att aac    708
Gly Glu Leu Gln Ser Ala Ile Lys Ser Leu His Ser Arg Asp Ile Asn
                85                  90                  95
gtt tac ggg gat gtg gtc atc aac cac aaa ggc ggc gct gat gcg acc    756
Val Tyr Gly Asp Val Val Ile Asn His Lys Gly Gly Ala Asp Ala Thr
            100                 105                 110
gaa gat gta acc gcg gtt gaa gtc gat ccc gct gac cgc aac cgc gta    804
Glu Asp Val Thr Ala Val Glu Val Asp Pro Ala Asp Arg Asn Arg Val
        115                 120                 125
att tca gga gaa cac cta att aaa gcc tgg aca cat ttt cat ttt ccg    852
Ile Ser Gly Glu His Leu Ile Lys Ala Trp Thr His Phe His Phe Pro
    130                 135                 140
ggg cgc ggc agc aca tac agc gat ttt aaa tgg cat tgg tac cat ttt    900
```

```
Gly Arg Gly Ser Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp His Trp Tyr His Phe
145                 150                 155                 160
gac gga acc gat tgg gac gag tcc cga aag ctg aac cgc atc tat aag     948
Asp Gly Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg Ile Tyr Lys
                165                 170                 175
ttt caa gga aag gct tgg gat tgg gaa gtt tcc aat gaa aac ggc aac     996
Phe Gln Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Ser Asn Glu Asn Gly Asn
            180                 185                 190
tat gat tat ttg atg tat gcc gac atc gat tat gac cat cct gat gtc    1044
Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Tyr Asp His Pro Asp Val
        195                 200                 205
gca gca gaa att aag aga tgg ggc act tgg tat gcc aat gaa ctg caa    1092
Ala Ala Glu Ile Lys Arg Trp Gly Thr Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Gln
    210                 215                 220
ttg gac ggt ttc cgt ctt gat gct gtc aaa cac att aaa ttt tct ttt    1140
Leu Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys Phe Ser Phe
225                 230                 235                 240
ttg cgg gat tgg gtt aat cat gtc agg gaa aaa acg ggg aag gaa atg    1188
Leu Arg Asp Trp Val Asn His Val Arg Glu Lys Thr Gly Lys Glu Met
                245                 250                 255
ttt acg gta gct gaa tat tgg cag aat gac ttg ggc gcg ctg gaa aac    1236
Phe Thr Val Ala Glu Tyr Trp Gln Asn Asp Leu Gly Ala Leu Glu Asn
            260                 265                 270
tat ttg aac aaa aca aat ttt aat cat tca gtg ttt gac gtg ccg ctt    1284
Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Phe Asn His Ser Val Phe Asp Val Pro Leu
        275                 280                 285
cat tat cag ttc cat gct gca tcg aca cag gga ggc ggc tat gat atg    1332
His Tyr Gln Phe His Ala Ala Ser Thr Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met
    290                 295                 300
agg aaa ttg ctg aac ggt acg gtc gtt tcc aag cat ccg ttg aaa tcg    1380
Arg Lys Leu Leu Asn Gly Thr Val Val Ser Lys His Pro Leu Lys Ser
305                 310                 315                 320
gtt aca ttt gtc gat aac cat gat aca cag ccg ggg caa tcg ctt gag    1428
Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu
                325                 330                 335
tcg act gtc caa aca tgg ttt aag ccg ctt gct tac gct ttt att ctc    1476
Ser Thr Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu
            340                 345                 350
aca agg gaa tct gga tac cct cag gtt ttc tac ggg gat atg tac ggg    1524
```

Thr Arg Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly
355 360 365

acg aaa gga gac tcc cag cgc gaa att cct gcc ttg aaa cac aaa att 1572
Thr Lys Gly Asp Ser Gln Arg Glu Ile Pro Ala Leu Lys His Lys Ile
370 375 380

gaa ccg atc tta aaa gcg aga aaa cag tat gcg tac gga gca cag cat 1620
Glu Pro Ile Leu Lys Ala Arg Lys Gln Tyr Ala Tyr Gly Ala Gln His
385 390 395 400

gat tat ttc gac cac cat gac att gtc ggc tgg aca agg gaa ggc gac 1668
Asp Tyr Phe Asp His His Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp
405 410 415

agc tcg gtt gca aat tca ggt ttg gcg gca tta ata aca gac gga ccc 1716
Ser Ser Val Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro
420 425 430

ggt ggg gca aag cga atg tat gtc ggc cgg caa aac gcc ggt gag aca 1764
Gly Gly Ala Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Glu Thr
435 440 445

tgg cat gac att acc gga aac cgt tcg gag ccg gtt gtc atc aat tcg 1812
Trp His Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile Asn Ser
450 455 460

gaa ggc tgg gga gag ttt cac gta aac ggc ggg tcg gtt tca att tat 1860
Glu Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Tyr
465 470 475 480

gtt caa aga tag aagagcagag aggacggatt tcctgaagga aatccgtttt 1912
Val Gln Arg

tttatttt 1920

<210>8
<211>483
<212>PRT
<213> 地衣芽孢杆菌 (Bacillus licheniformis)

<400>8
Ala Asn Leu Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Met Pro
1 5 10 15

Asn Asp Gly Gln His Trp Arg Arg Leu Gln Asn Asp Ser Ala Tyr Leu
20 25 30

Ala Glu His Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly
35 40 45

Thr Ser Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu

50 55 60

Gly Glu Phe His Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys

65 70 75 80

Gly Glu Leu Gln Ser Ala Ile Lys Ser Leu His Ser Arg Asp Ile Asn

85 90 95

Val Tyr Gly Asp Val Val Ile Asn His Lys Gly Gly Ala Asp Ala Thr

100 105 110

Glu Asp Val Thr Ala Val Glu Val Asp Pro Ala Asp Arg Asn Arg Val

115 120 125

Ile Ser Gly Glu His Leu Ile Lys Ala Trp Thr His Phe His Phe Pro

130 135 140

Gly Arg Gly Ser Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp His Trp Tyr His Phe

145 150 155 160

Asp Gly Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg Ile Tyr Lys

165 170 175

Phe Gln Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Ser Asn Glu Asn Gly Asn

180 185 190

Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Tyr Asp His Pro Asp Val

195 200 205

Ala Ala Glu Ile Lys Arg Trp Gly Thr Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Gln

210 215 220

Leu Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys Phe Ser Phe

225 230 235 240

Leu Arg Asp Trp Val Asn His Val Arg Glu Lys Thr Gly Lys Glu Met

245 250 255

Phe Thr Val Ala Glu Tyr Trp Gln Asn Asp Leu Gly Ala Leu Glu Asn

260 265 270

Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Phe Asn His Ser Val Phe Asp Val Pro Leu

275 280 285

His Tyr Gln Phe His Ala Ala Ser Thr Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met

290 295 300

Arg Lys Leu Leu Asn Gly Thr Val Val Ser Lys His Pro Leu Lys Ser

305 310 315 320

Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu

325 330 335

Ser Thr Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu

340 345 350

Thr Arg Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly

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

<210>9
<211>2084
<212>DNA
<213>解淀粉芽孢杆菌(Bacillus amyloliquefaciens)

<220>
<221>CDS
<222>(343)..(1794)
<223>BAN

<400>9
gccccgcaca tacgaaaaga ctggctgaaa acattgagcc tttgatgact gatgatttgg 60
ctgaagaagt ggatcgattg tttgagaaaa gaagaagacc ataaaaatac cttgtctgtc 120
atcagacagg gtattttta tgctgtccag actgtccgct gtgtaaaaat aaggaataaa 180
ggggggttgt tattatttta ctgatatgta aaatataatt tgtataagaa aatgagaggg 240
agaggaaaca tgattcaaaa acgaaagcgg acagtttcgt tcagacttgt gcttatgtgc 300
acgctgttat ttgtcagttt gccgattaca aaaacatcag cc gta aat ggc acg 354
Val Asn Gly Thr
1
ctg atg cag tat ttt gaa tgg tat acg ccg aac gac ggc cag cat tgg 402
Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Thr Pro Asn Asp Gly Gln His Trp
5 10 15 20

```
aaa cga ttg cag aat gat gcg gaa cat tta tcg gat atc gga atc act    450
Lys Arg Leu Gln Asn Asp Ala Glu His Leu Ser Asp Ile Gly Ile Thr
                 25                  30                  35
gcc gt ctgg att cct ccc gca tac aaa gga ttg agc caa tcc gat aac    498
Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly Leu Ser Gln Ser Asp Asn
             40                  45                  50
gga tac gga cct tat gat ttg tat gat tta gga gaa ttc cag caa aaa    546
Gly Tyr Gly Pro Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Glu Phe Gln Gln Lys
          5                  560                  65
ggg acg gtc aga acg aaa tac ggc aca aaa tca gag ctt caa gat gcg    594
Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys Ser Glu Leu Gln Asp Ala
     70                  75                  80
atc ggc tca ctg cat tcc cgg aac gtc caa gta tac gga gat gtg gtt    642
Ile Gly Ser Leu His Ser Arg Asn Val Gln Val Tyr Gly Asp Val Val
 85                  90                  95                  100
ttg aat cat aag gct ggt gct gat gca aca gaa gat gta act gcc gtc    690
Leu Asn His Lys Ala Gly Ala Asp Ala Thr Glu Asp Val Thr Ala Val
                105                 110                 115
gaa gtc aat ccg gcc aat aga aat cag gaa act tcg gag gaa tat caa    738
Glu Val Asn Pro Ala Asn Arg Asn Gln Glu Thr Ser Glu Glu Tyr Gln
            120                 125                 130
atc aaa gcg tgg acg gat ttt cgt ttt ccg ggc cgt gga aac acg tac    786
Ile Lys Ala Trp Thr Asp Phe Arg Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr
         135                 140                 145
agt gat ttt aaa tgg cat tgg tat cat ttc gac gga gcg gac tgg gat    834
Ser Asp Phe Lys Trp His Trp Tyr His Phe Asp Gly Ala Asp Trp Asp
    150                 155                 160
gaa tcc cgg aag atc agc cgc atc ttt aag ttt cgt ggg gaa gga aaa    882
Glu Ser Arg Lys Ile Ser Arg Ile Phe Lys Phe Arg Gly Glu Gly Lys
165                 170                 175                 180
gcg tgg gat tgg gaa gta tca agt gaa aac ggc aac tat gac tat tta    930
Ala Trp Asp Trp Glu Val Ser Ser Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu
                185                 190                 195
atg tat gct gat gtt gac tac gac cac cct gat gtc gtg gca gag aca    978
Met Tyr Ala Asp Val Asp Tyr Asp His Pro Asp Val Val Ala Glu Thr
            200                 205                 210
aaa aaa tgg ggt atc tgg tat gcg aat gaa ctg tca tta gac ggc ttc   1026
Lys Lys Trp Gly Ile Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Ser Leu Asp Gly Phe
        215                 220                 225
```

cgt att gat gcc gcc aaa cat att aaa ttt tca ttt ctg cgt gat tgg 1074
Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Lys Phe Ser Phe Leu Arg Asp Trp
230 235 240
gtt cag gcg gtc aga cag gcg acg gga aaa gaa atg ttt acg gtt gcg 1122
Val Gln Ala Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Glu Met Phe Thr Val Ala
245 250 255 260
gag tat tgg cag aat aat gcc ggg aaa ctc gaa aac tac ttg aat aaa 1170
Glu Tyr Trp Gln Asn Asn Ala Gly Lys Leu Glu Asn Tyr Leu Asn Lys
265 270 275
aca agc ttt aat caa tcc gtg ttt gat gtt ccg ctt cat ttc aat tta 1218
Thr Ser Phe Asn Gln Ser Val Phe Asp Val Pro Leu His Phe Asn Leu
280 285 290
cag gcg gct tcc tca caa gga ggc gga tat gat atg agg cgt ttg ctg 1266
Gln Ala Ala Ser Ser Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met Arg Arg Leu Leu
295 300 305
gac ggt acc gtt gtg tcc agg cat ccg gaa aag gcg gtt aca ttt gtt 1314
Asp Gly Thr Val Val Ser Arg His Pro Glu Lys Ala Val Thr Phe Val
310 315 320
gaa aat cat gac aca cag ccg gga cag tca ttg gaa tcg aca gtc caa 1362
Glu Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu Ser Thr Val Gln
325 330 335 340
act tgg ttt aaa ccg ctt gca tac gcc ttt att ttg aca aga gaa tcc 1410
Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu Thr Arg Glu Ser
345 350 355
ggt tat cct cag gtg ttc tat ggg gat atg tac ggg aca aaa ggg aca 1458
Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly Thr Lys Gly Thr
360 365 370
tcg cca aag gaa att ccc tca ctg aaa gat aat ata gag ccg att tta 1506
Ser Pro Lys Glu Ile Pro Ser Leu Lys Asp Asn Ile Glu Pro Ile Leu
375 380 385
aaa gcg cgt aag gag tac gca tac ggg ccc cag cac gat tat att gac 1554
Lys Ala Arg Lys Glu Tyr Ala Tyr Gly Pro Gln His Asp Tyr Ile Asp
390 395 400
cac ccg gat gtg atc gga tgg acg agg gaa ggt gac agc tcc gcc gcc 1602
His Pro Asp Val Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp Ser Ser Ala Ala
405 410 415 420
aaa tca ggt ttg gcc gct tta atc acg gac gga ccc ggc gga tca aag 1650
Lys Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro Gly Gly Ser Lys
425 430 435

```
cgg atg tat gcc ggc ctg aaa aat gcc ggc gag aca tgg tat gac ata   1698
Arg Met Tyr Ala Gly Leu Lys Asn Ala Gly Glu Thr Trp Tyr Asp Ile
            440                 445                 450
acg ggc aac cgt tca gat act gta aaa atc gga tct gac ggc tgg gga   1746
Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Lys Ile Gly Ser Asp Gly Trp Gly
        455                 460                 465
gag ttt cat gta aac gat ggg tcc gtc tcc att tat gtt cag aaa taa   1794
Glu Phe His Val Asn Asp Gly Ser Val Ser Ile Tyr Val Gln Lys
    470                 475                 480
ggtaataaaa aaacacctcc aagctgagtg cgggtatcag cttggaggtg cgtttatttt 1854
ttcagccgta tgacaaggtc ggcatcaggt gtgacaaata cggtatgctg gctgtcatag 1914
gtgacaaatc cgggttttgc gccgtttggc tttttcacat gtctgatttt tgtataatca 1974
acaggcacgg agccggaatc tttcgccttg gaaaaataag cggcgatcgt agctgcttcc 2034
aatatggatt gttcatcggg atcgctgctt ttaatcacaa cgtgggatcc            2084
```

<210>10

<211>483

<212>PRT

<213>解淀粉芽孢杆菌(Bacillus amyloliquefaciens)

<400>10

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

```
Gly Asn Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp His Trp Tyr His Phe Asp Gly
145                 150                 155                 160
Ala Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Ile Ser Arg Ile Phe Lys Phe Arg
                165                 170                 175
Gly Glu Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Ser Ser Glu Asn Gly Asn
            180                 185                 190
Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Val Asp Tyr Asp His Pro Asp Val
        195                 200                 205
Val Ala Glu Thr Lys Lys Trp Gly Ile Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Ser
    210                 215                 220
Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Lys Phe Ser Phe
225                 230                 235                 240
Leu Arg Asp Trp Val Gln Ala Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Glu Met
                245                 250                 255
Phe Thr Val Ala Glu Tyr Trp Gln Asn Asn Ala Gly Lys Leu Glu Asn
            260                 265                 270
Tyr Leu Asn Lys Thr Ser Phe Asn Gln Ser Val Phe Asp Val Pro Leu
        275                 280                 285
His Phe Asn Leu Gln Ala Ala Ser Ser Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met
    290                 295                 300
Arg Arg Leu Leu Asp Gly Thr Val Val Ser Arg His Pro Glu Lys Ala
305                 310                 315                 320
Val Thr Phe Val Glu Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu
                325                 330                 335
Ser Thr Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu
            340                 345                 350
Thr Arg Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly
        355                 360                 365
Thr Lys Gly Thr Ser Pro Lys Glu Ile Pro Ser Leu Lys Asp Asn Ile
    370                 375                 380
Glu Pro Ile Leu Lys Ala Arg Lys Glu Tyr Ala Tyr Gly Pro Gln His
385                 390                 395                 400
Asp Tyr Ile Asp His Pro Asp Val Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp
                405                 410                 415
Ser Ser Ala Ala Lys Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro
            420                 425                 430
Gly Gly Ser Lys Arg Met Tyr Ala Gly Leu Lys Asn Ala Gly Glu Thr
        435                 440                 445
Trp Tyr Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Lys Ile Gly Ser
```

450 455 460

Asp Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Asp Gly Ser Val Ser Ile Tyr

465 470 475 480

Val Gln Lys

<210>11

<211>1458

<212>DNA

<213> 芽孢杆菌属菌种 (Bacillus sp.)

<220>

<221>CDS

<222>(1)..(1458)

<223>AA560

<400>11

cac cat aat ggt acg aac ggc aca atg atg cag tac ttt gaa tgg tat 48

His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr

1 5 10 15

cta cca aat gac gga aac cat tgg aat aga tta agg tct gat gca agt 96

Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Ser Asp Ala Ser

20 25 30

aac cta aaa gat aaa ggg atc tca gcg gtt tgg att cct cct gca tgg 144

Asn Leu Lys Asp Lys Gly Ile Ser Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Trp

35 40 45

aag ggt gcc tct caa aat gat gtg ggg tat ggt gct tat gat ctg tat 192

Lys Gly Ala Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr

50 55 60

gat tta gga gaa ttc aat caa aaa gga acc att cgt aca aaa tat gga 240

Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Ile Arg Thr Lys Tyr Gly

65 70 75 80

acg cgc aat cag tta caa gct gca gtt aac gcc ttg aaa agt aat gga 288

Thr Arg Asn Gln Leu Gln Ala Ala Val Asn Ala Leu Lys Ser Asn Gly

85 90 95

att caa gtg tat ggc gat gtt gta atg aat cat aaa ggg gga gca gac 336

Ile Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp

100 105 110

gct acc gaa atg gtt agg gca gtt gaa gta aac ccg aat aat aga aat 384

Ala Thr Glu Met Val Arg Ala Val Glu Val Asn Pro Asn Asn Arg Asn

115 120 125

```
caa gaa gtg tcc ggt gaa tat aca att gag gct tgg aca aag ttt gac   432
Gln Glu Val Ser Gly Glu Tyr Thr Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp
    130                 135                 140
ttt cca gga cga ggt aat act cat tca aac ttc aaa tgg aga tgg tat   480
Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr His Ser Asn Phe Lys Trp Arg Trp Tyr
145                 150                 155                 160
cac ttt gat gga gta gat tgg gat cag tca cgt aag ctg aac aat cga   528
His Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Gln Ser Arg Lys Leu Asn Asn Arg
                165                 170                 175
att tat aaa ttt aga ggt gat gga aaa ggg tgg gat tgg gaa gtc gat   576
Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Asp Gly Lys Gly Trp Asp Trp Glu Val Asp
            180                 185                 190
aca gaa aac ggt aac tat gat tac cta atg tat gca gat att gac atg   624
Thr Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Met
        195                 200                 205
gat cac cca gag gta gtg aat gag cta aga aat tgg ggt gtt tgg tat   672
Asp His Pro Glu Val Val Asn Glu Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp Tyr
    210                 215                 220
acg aat aca tta ggc ctt gat ggt ttt aga ata gat gca gta aaa cat   720
Thr Asn Thr Leu Gly Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His
225                 230                 235                 240
ata aaa tac agc ttt act cgt gat tgg att aat cat gtt aga agt gca    768
Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Ile Asn His Val Arg Ser Ala
                245                 250                 255
act ggc aaa aat atg ttt gcg gtt gcg gaa ttt tgg aaa aat gat tta    816
Thr Gly Lys Asn Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu
            260                 265                 270
ggt gct att gaa aac tat tta aac aaa aca aac tgg aac cat tca gtc    864
Gly Ala Ile Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Trp Asn His Ser Val
        275                 280                 285
ttt gat gtt ccg ctg cac tat aac ctc tat aat gct tca aaa agc gga    912
Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Lys Ser Gly
    290                 295                 300
ggg aat tat gat atg agg caa ata ttt aat ggt aca gtc gtg caa aga    960
Gly Asn Tyr Asp Met Arg Gln Ile Phe Asn Gly Thr Val Val Gln Arg
305                 310                 315                 320
cat cca atg cat gct gtt aca ttt gtt gat aat cat gat tcg caa cct   1008
His Pro Met His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro
                325                 330                 335
```

gaa gaa gct tta gag tct ttt gtt gaa gaa tgg ttc aaa cca tta gcg 1056
Glu Glu Ala Leu Glu Ser Phe Val Glu Glu Trp Phe Lys Pro Leu Ala
340 345 350
tat gct ttg aca tta aca cgt gaa caa ggc tac cct tct gta ttt tat 1104
Tyr Ala Leu Thr Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr
355 360 365
gga gat tat tat ggc att cca acg cat ggt gta cca gcg atg aaa tcg 1152
Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Gly Val Pro Ala Met Lys Ser
370 375 380
aaa att gac ccg att cta gaa gcg cgt caa aag tat gca tat gga aga 1200
Lys Ile Asp Pro Ile Leu Glu Ala Arg Gln Lys Tyr Ala Tyr Gly Arg
385 390 395 400
caa aat gac tac tta gac cat cat aat atc atc ggt tgg aca cgt gaa 1248
Gln Asn Asp Tyr Leu Asp His His Asn Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu
405 410 415
ggg aat aca gca cac ccc aac tcc ggt tta gct act atc atg tcc gat 1296
Gly Asn Thr Ala His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp
420 425 430
ggg gca gga gga aat aag tgg atg ttt gtt ggg cgt aat aaa gct ggt 1344
Gly Ala Gly Gly Asn Lys Trp Met Phe Val Gly Arg Asn Lys Ala Gly
435 440 445
caa gtt tgg acc gat atc act gga aat cgt gca ggt act gtt acg att 1392
Gln Val Trp Thr Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ala Gly Thr Val Thr Ile
450 455 460
aat gct gat gga tgg ggt aat ttt tct gta aat gga gga tca gtt tct 1440
Asn Ala Asp Gly Trp Gly Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser
465 470 475 480
att tgg gta aac aaa taa 1458
Ile Trp Val Asn Lys
485

<210>12
<211>485
<212>PRT
<213> 芽孢杆菌属菌种 (Bacillus sp.)

<400>12
His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr
1 5 10 15

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

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

<210>13
<211>485
<212>PRT
<213> 芽孢杆菌属菌种 707(Bacillus sp.707)

<400>13
His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr
1 5 10 15
Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Asn Ser Asp Ala Ser
20 25 30
Asn Leu Lys Ser Lys Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Trp
35 40 45
Lys Gly Ala Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr
50 55 60
Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly
65 70 75 80
Thr Arg Ser Gln Leu Gln Ala Ala Val Thr Ser Leu Lys Asn Asn Gly

85 90 95
Ile Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp
100 105 110
Ala Thr Glu Met Val Arg Ala Val Glu Val Asn Pro Asn Asn Arg Asn
115 120 125
Gln Glu Val Thr Gly Glu Tyr Thr Ile Glu Ala Trp Thr Arg Phe Asp
130 135 140
Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr His Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr
145 150 155 160
His Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Gln Ser Arg Arg Leu Asn Asn Arg
165 170 175
Ile Tyr Lys Phe Arg Gly His Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp
180 185 190
Thr Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Met
195 200 205
Asp His Pro Glu Val Val Asn Glu Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp Tyr
210 215 220
Thr Asn Thr Leu Gly Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His
225 230 235 240
Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Ile Asn His Val Arg Ser Ala
245 250 255
Thr Gly Lys Asn Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu
260 265 270
Gly Ala Ile Glu Asn Tyr Leu Gln Lys Thr Asn Trp Asn His Ser Val
275 280 285
Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Lys Ser Gly
290 295 300
Gly Asn Tyr Asp Met Arg Asn Ile Phe Asn Gly Thr Val Val Gln Arg
305 310 315 320
His Pro Ser His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro
325 330 335
Glu Glu Ala Leu Glu Ser Phe Val Glu Glu Trp Phe Lys Pro Leu Ala
340 345 350
Tyr Ala Leu Thr Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr
355 360 365
Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Gly Val Pro Ala Met Arg Ser
370 375 380
Lys Ile Asp Pro Ile Leu Glu Ala Arg Gln Lys Tyr Ala Tyr Gly Lys
385 390 395 400

```
Gln Asn Asp Tyr Leu Asp His His Asn Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu
                405                 410                 415
Gly Asn Thr Ala His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp
            420                 425                 430
Gly Ala Gly Gly Ser Lys Trp Met Phe Val Gly Arg Asn Lys Ala Gly
        435                 440                 445
Gln Val Trp Ser Asp Ile Thr Gly Asn Arg Thr Gly Thr Val Thr Ile
    450                 455                 460
Asn Ala Asp Gly Trp Gly Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser
465                 470                 475                 480
Ile Trp Val Asn Lys
                485
```

<210>14
<211>27
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物 22149
<400>14
CGATTGCTGA CGCTGTTATT TGCG 24

<210>15
<211>29
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物 24814
<400>15
GATCACCCGC GATACCGTC 29

<210>16
<211>31
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物 #24
<400>16
GAATGTATGT CGGCCGGCAA AACGCCGGTG A 31

<210>17
<211>30
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物 #27
<400>17
GCCGCCGCTG CTGCAGAATG AGGCAGCAAG 30

<210>18
<211>48
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物 #312
<400>18
CCCGAAAGCT GAACCGCATC TATAGGTTTC AAGGGAAGAC TTGGGATT 48

<210>19
<211>23
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物 #290
<400>19
AGGATGGTCA TAATCAAAGT CGG 23

<210>20
<211>52
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物 #313
<400>20
CCGACTTTGA TTATGACCAT CCTGTTGTCG TAGCAGAGAT TAAGAGATGG GG 52

<210>21
<211>45
<212>DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> 引物 #314
<400>21
CGACAATGTC ATGGTGGTCG AAAAAATCAT GCTGTGCTCC GTACG 45

<210>22
<211>23
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物 #296
<400>22
TTTCGACCAC CATGACATTG TCG 23

<210>23
<211>24
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物 #305
<400>23
TATAGATGCG GTTCAGCTTT CGGG 24

<210>24
<211>1650
<212>DNA
<213> 芽孢杆菌属菌种 (Bacillus sp.)
<220>
<221>CDS
<222>(65)..(1567)
<220>
<221> 成熟肽
<222>(128)..()
<220>
<221> 信号肽
<222>(65)..(128)

<400>24

```
cttgaatca ttatttaaagc tggttatgat atatgtaagc gttatcatta aaaggaggta   60
tttg atg aaa aga tgg gta gta gca atg ctg gca gtg tta ttt tta ttt   109
     Met Lys Arg Trp Val Val Ala Met Leu Ala Val Leu Phe Leu Phe
         -20                 -15                 -10
cct tcg gta gta gtt gca gat ggc ttg aat gga acg atg atg cag tat    157
Pro Ser Val Val Val Ala Asp Gly Leu Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr
    -5              -1  1               5                   10
tat gag tgg cat cta gag aat gat ggg caa cac tgg aat cgg ttg cat    205
Tyr Glu Trp His Leu Glu Asn Asp Gly Gln His Trp Asn Arg Leu His
                15                  20                  25
gat gat gcc gaa gct tta agt aat gcg ggt att aca gct att tgg ata    253
Asp Asp Ala Glu Ala Leu Ser Asn Ala Gly Ile Thr Ala Ile Trp Ile
            30                  35                  40
ccc cca gcc tac aaa gga aat agt cag gct gat gtt ggg tat ggt gca    301
Pro Pro Ala Tyr Lys Gly Asn Ser Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala
        45                  50                  55
tac gac ctt tat gat tta ggg gag ttt aat caa aaa ggt acc gtt cga    349
Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg
    60                  65                  70
acg aaa tac ggg aca aag gct cag ctt gag cga gct ata ggg tcc cta    397
Thr Lys Tyr Gly Thr Lys Ala Gln Leu Glu Arg Ala Ile Gly Ser Leu
75                  80                  85                  90
aag tcg aat gat atc aat gtt tat ggg gat gtc gta atg aat cat aaa    445
Lys Ser Asn Asp Ile Asn Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys
                95                  100                 105
tta gga gct gat ttc acg gag gca gtg caa gct gtt caa gta aat cct    493
Leu Gly Ala Asp Phe Thr Glu Ala Val Gln Ala Val Gln Val Asn Pro
            110                 115                 120
tcg aac cgt tgg cag gat att tca ggt gtc tac acg att gat gca tgg    541
Ser Asn Arg Trp Gln Asp Ile Ser Gly Val Tyr Thr Ile Asp Ala Trp
        125                 130                 135
acg gga ttt gac ttt cca ggg cgc aac aat gcc tat tcc gat ttt aaa    589
Thr Gly Phe Asp Phe Pro Gly Arg Asn Asn Ala Tyr Ser Asp Phe Lys
    140                 145                 150
tgg aga tgg ttc cat ttt aat ggc gtt gac tgg gat caa cgc tat caa    637
Trp Arg Trp Phe His Phe Asn Gly Val Asp Trp Asp Gln Arg Tyr Gln
155                 160                 165                 170
gaa aac cat ctt ttt cgc ttt gca aat acg aac tgg aac tgg cga gtg    685
Glu Asn His Leu Phe Arg Phe Ala Asn Thr Asn Trp Asn Trp Arg Val
```

```
                175                 180                 185
gat gaa gag aat ggt aat tat gac tat tta tta gga tcg aac att gac      733
Asp Glu Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Leu Gly Ser Asn Ile Asp
            190                 195                 200
ttt agc cac cca gag gtt caa gag gaa tta aag gat tgg ggg agc tgg      781
Phe Ser His Pro Glu Val Gln Glu Glu Leu Lys Asp Trp Gly Ser Trp
        205                 210                 215
ttt acg gat gag cta gat tta gat ggg tat cga ttg gat gct att aag      829
Phe Thr Asp Glu Leu Asp Leu Asp Gly Tyr Arg Leu Asp Ala Ile Lys
    220                 225                 230
cat att cca ttc tgg tat acg tca gat tgg gtt agg cat cag cga agt      877
His Ile Pro Phe Trp Tyr Thr Ser Asp Trp Val Arg His Gln Arg Ser
235                 240                 245                 250
gaa gca gac caa gat tta ttt gtc gta ggg gag tat tgg aag gat gac      925
Glu Ala Asp Gln Asp Leu Phe Val Val Gly Glu Tyr Trp Lys Asp Asp
                255                 260                 265
gta ggt gct ctc gaa ttt tat tta gat gaa atg aat tgg gag atg tct      973
Val Gly Ala Leu Glu Phe Tyr Leu Asp Glu Met Asn Trp Glu Met Ser
            270                 275                 280
cta ttc gat gtt ccg ctc aat tat aat ttt tac cgg gct tca aag caa     1021
Leu Phe Asp Val Pro Leu Asn Tyr Asn Phe Tyr Arg Ala Ser Lys Gln
        285                 290                 295
ggc gga agc tat gat atg cgt aat att tta cga gga tct tta gta gaa     1069
Gly Gly Ser Tyr Asp Met Arg Asn Ile Leu Arg Gly Ser Leu Val Glu
    300                 305                 310
gca cat ccg att cat gca gtt acg ttt gtt gat aat cat gat act cag     1117
Ala His Pro Ile His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln
315                 320                 325                 330
cca gga gag tca tta gaa tca tgg gtc gct gat tgg ttt aag cca ctt     1165
Pro Gly Glu Ser Leu Glu Ser Trp Val Ala Asp Trp Phe Lys Pro Leu
                335                 340                 345
gct tat gcg aca atc ttg acg cgt gaa ggt ggt tat cca aat gta ttt     1213
Ala Tyr Ala Thr Ile Leu Thr Arg Glu Gly Gly Tyr Pro Asn Val Phe
            350                 355                 360
tac ggt gac tac tat ggg att cct aac gat aac att tca gct aag aag     1261
Tyr Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Asn Asp Asn Ile Ser Ala Lys Lys
        365                 370                 375
gat atg att gat gag ttg ctt gat gca cgt caa aat tac gca tat ggc     1309
Asp Met Ile Asp Glu Leu Leu Asp Ala Arg Gln Asn Tyr Ala Tyr Gly
```

380 385 390

aca caa cat gac tat ttt gat cat tgg gat atc gtt gga tgg aca aga 1357
Thr Gln His Asp Tyr Phe Asp His Trp Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg
395 400 405 410

gaa ggt aca tcc tca cgt cct aat tcg ggt ctt gct act att atg tcc 1405
Glu Gly Thr Ser Ser Arg Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser
415 420 425

aat ggt cct gga gga tca aaa tgg atg tac gta gga cag caa cat gca 1453
Asn Gly Pro Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Gln Gln His Ala
430 435 440

gga caa acg tgg aca gat tta act ggc aat cac gcg gcg tcg gtt acg 1501
Gly Gln Thr Trp Thr Asp Leu Thr Gly Asn His Ala Ala Ser Val Thr
445 450 455

att aat ggt gat ggc tgg ggc gaa ttc ttt aca aat gga gga tct gta 1549
Ile Asn Gly Asp Gly Trp Gly Glu Phe Phe Thr Asn Gly Gly Ser Val
460 465 470

tcc gtg tat gtg aac caa taataaaaag ccttgagaag ggattcctcc 1597
Ser Val Tyr Val Asn Gln
475 480

ct aact caag gct ttctt ta tgtcgtttag ctcaacgctt ctacgaagct tta 1650

<210>25
<211>501
<212>PRT
<213> 芽孢杆菌属菌种 (Bacillus sp.)
<400>25

Met Lys Arg Trp Val Val Ala Met Leu Ala Val Leu Phe Leu Phe Pro
-20 -15 -10

Ser Val Val Val Ala Asp Gly Leu Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Tyr
-5 -1 1 5 10

Glu Trp His Leu Glu Asn Asp Gly Gln His Trp Asn Arg Leu His Asp
15 20 25

Asp Ala Glu Ala Leu Ser Asn Ala Gly Ile Thr Ala Ile Trp Ile Pro
30 35 40

Pro Ala Tyr Lys Gly Asn Ser Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr
45 50 55

Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr
60 65 70 75

Lys Tyr Gly Thr Lys Ala Gln Leu Glu Arg Ala Ile Gly Ser Leu Lys

80 85 90
Ser Asn Asp Ile Asn Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Leu
95 100 105
Gly Ala Asp Phe Thr Glu Ala Val Gln Ala Val Gln Val Asn Pro Ser
110 115 120
Asn Arg Trp Gln Asp Ile Ser Gly Val Tyr Thr Ile Asp Ala Trp Thr
125 130 135
Gly Phe Asp Phe Pro Gly Arg Asn Asn Ala Tyr Ser Asp Phe Lys Trp
140 145 150 155
Arg Trp Phe His Phe Asn Gly Val Asp Trp Asp Gln Arg Tyr Gln Glu
160 165 170
Asn His Leu Phe Arg Phe Ala Asn Thr Asn Trp Asn Trp Arg Val Asp
175 180 185
Glu Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Leu Gly Ser Asn Ile Asp Phe
190 195 200
Ser His Pro Glu Val Gln Glu Glu Leu Lys Asp Trp Gly Ser Trp Phe
205 210 215
Thr Asp Glu Leu Asp Leu Asp Gly Tyr Arg Leu Asp Ala Ile Lys His
220 225 230 235
Ile Pro Phe Trp Tyr Thr Ser Asp Trp Val Arg His Gln Arg Ser Glu
240 245 250
Ala Asp Gln Asp Leu Phe Val Val Gly Glu Tyr Trp Lys Asp Asp Val
255 260 265
Gly Ala Leu Glu Phe Tyr Leu Asp Glu Met Asn Trp Glu Met Ser Leu
270 275 280
Phe Asp Val Pro Leu Asn Tyr Asn Phe Tyr Arg Ala Ser Lys Gln Gly
285 290 295
Gly Ser Tyr Asp Met Arg Asn Ile Leu Arg Gly Ser Leu Val Glu Ala
300 305 310 315
His Pro Ile His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro
320 325 330
Gly Glu Ser Leu Glu Ser Trp Val Ala Asp Trp Phe Lys Pro Leu Ala
335 340 345
Tyr Ala Thr Ile Leu Thr Arg Glu Gly Gly Tyr Pro Asn Val Phe Tyr
350 355 360
Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Asn Asp Asn Ile Ser Ala Lys Lys Asp
365 370 375
Met Ile Asp Glu Leu Leu Asp Ala Arg Gln Asn Tyr Ala Tyr Gly Thr
380 385 390 395

Gln His Asp Tyr Phe Asp His Trp Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu
400 405 410
Gly Thr Ser Ser Arg Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asn
415 420 425
Gly Pro Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Gln Gln His Ala Gly
430 435 440
Gln Thr Trp Thr Asp Leu Thr Gly Asn His Ala Ala Ser Val Thr Ile
445 450 455
Asn Gly Asp Gly Trp Gly Glu Phe Phe Thr Asn Gly Gly Ser Val Ser
460 465 470 475
Val Tyr Val Asn Gln
480

<210>26
<211>1745
<212>DNA
<213>芽孢杆菌属菌种(Bacillus sp.)
<220>
<221>CDS
<222>(190)..(1692)
<220>
<221>成熟肽
<222>(253)..()
<220>
<221>信号肽
<222>(190)..(253)
<400>26
aactaagtaa catcgattca ggataaaagt atgcgaaacg atgcgcaaaa ctgcgcaact 60
actagcactc ttcagggact aaaccacctt ttttccaaaa atgacatcat ataaacaaat 120
ttgtctacca atcactattt aaagctgttt atgatatatg taagcgttat cattaaaagg 180
aggtatttg atg aga aga tgg gta gta gca atg ttg gca gtg tta ttt tta 231
Met Arg Arg Trp Val Val Ala Met Leu Ala Val Leu Phe Leu
-20 -15 -10
ttt cct tcg gta gta gtt gca gat gga ttg aac ggt acg atg atg cag 279
Phe Pro Ser Val Val Val Ala Asp Gly Leu Asn Gly Thr Met Met Gln
-5 -1 1 5
tat tat gag tgg cat ttg gaa aac gac ggg cag cat tgg aat cgg ttg 327
Tyr Tyr Glu Trp His Leu Glu Asn Asp Gly Gln His Trp Asn Arg Leu
10 15 20 25

```
cac gat gat gcc gca gct ttg agt gat gct ggt att aca gct att tgg    375
His Asp Asp Ala Ala Ala Leu Ser Asp Ala Gly Ile Thr Ala Ile Trp
                30                  35                  40
att ccg cca gcc tac aaa ggt aat agt cag gcg gat gtt ggg tac gtt    423
Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly Asn Ser Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly
            45                  50                  55
gca tac gat ctt tat gat tta gga gag ttc aat caa aag ggt act gtt    471
Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val
        60                  65                  70
cga acg aaa tac gga act aag gca cag ctt gaa cga gct att ggg tcc    519
Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys Ala Gln Leu Glu Arg Ala Ile Gly Ser
    75                  80                  85
ctt aaa tct aat gat atc aat gta tac gga gat gtc gtg atg aat cat    567
Leu Lys Ser Asn Asp Ile Asn Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His
90                  95                  100                 105
aaa atg gga gct gat ttt acg gag gca gtg caa gct gtt caa gta aat    615
Lys Met Gly Ala Asp Phe Thr Glu Ala Val Gln Ala Val Gln Val Asn
                110                 115                 120
cca acg aat cgt tgg cag gat att tca ggt gcc tac acg att gat gcg    663
Pro Thr Asn Arg Trp Gln Asp Ile Ser Gly Ala Tyr Thr Ile Asp Ala
            125                 130                 135
tgg acg ggt ttc gac ttt tca ggg cgt aac aac gcc tat tca gat ttt    711
Trp Thr Gly Phe Asp Phe Ser Gly Arg Asn Asn Ala Tyr Ser Asp Phe
        140                 145                 150
aag tgg aga tgg ttc cat ttt aat ggt gtt gac tgg gat eag cgc tat    759
Lys Trp Arg Trp Phe His Phe Asn Gly Val Asp Trp Asp Gln Arg Tyr
    155                 160                 165
caa gaa aat cat att ttc cgc ttt gca aat acg aac tgg aac tgg cga    807
Gln Glu Asn His Ile Phe Arg Phe Ala Asn Thr Asn Trp Asn Trp Arg
170                 175                 180                 185
gtg gat gaa gag aac ggt aat tat gat tac ctg tta gga tcg aat atc    855
Val Asp Glu Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Leu Gly Ser Asn Ile
                190                 195                 200
gac ttt agt cat cca gaa gta caa gat gag ttg aag gat tgg ggt agc    903
Asp Phe Ser His Pro Glu Val Gln Asp Glu Leu Lys Asp Trp Gly Ser
            205                 210                 215
tgg ttt acc gat gag tta gat ttg gat ggt tat cgt tta gat gct att    951
Trp Phe Thr Asp Glu Leu Asp Leu Asp Gly Tyr Arg Leu Asp Ala Ile
        220                 225                 230
```

```
aaa cat att cca ttc tgg tat aca tct gat tgg gtt cgg cat cag cgc      999
Lys His Ile Pro Phe Trp Tyr Thr Ser Asp Trp Val Arg His Gln Arg
    235                 240                 245
aac gaa gca gat caa gat tta ttt gtc gta ggg gaa tat tgg aag gat     1047
Asn Glu Ala Asp Gln Asp Leu Phe Val Val Gly Glu Tyr Trp Lys Asp
250                 255                 260                 265
gac gta ggt gct ctc gaa ttt tat tta gat gaa atg aat tgg gag atg     1095
Asp Val Gly Ala Leu Glu Phe Tyr Leu Asp Glu Met Asn Trp Glu Met
                270                 275                 280
tct cta ttc gat gtt cca ctt aat tat aat ttt tac cgg gct tca caa     1143
Ser Leu Phe Asp Val Pro Leu Asn Tyr Asn Phe Tyr Arg Ala Ser Gln
            285                 290                 295
caa ggt gga agc tat gat atg cgt aat att tta cga gga tct tta gta     1191
Gln Gly Gly Ser Tyr Asp Met Arg Asn Ile Leu Arg Gly Ser Leu Val
        300                 305                 310
gaa gcg cat ccg atg cat gca gtt acg ttt gtt gat aat cat gat act     1239
Glu Ala His Pro Met His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr
    315                 320                 325
cag cca ggg gag tca tta gag tca tgg gtt gct gat tgg ttt aag cca     1287
Gln Pro Gly Glu Ser Leu Glu Ser Trp Val Ala Asp Trp Phe Lys Pro
330                 335                 340                 345
ctt gct tat gcg aca att ttg acg cgt gaa ggt ggt tat cca aat gta     1335
Leu Ala Tyr Ala Thr Ile Leu Thr Arg Glu Gly Gly Tyr Pro Asn Val
                350                 355                 360
ttt tac ggt gat tac tat ggg att cct aac gat aac att tca gct aaa     1383
Phe Tyr Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Asn Asp Asn Ile Ser Ala Lys
            365                 370                 375
aaa gat atg att gat gag ctg ctt gat gca cgt caa aat tac gca tat     1431
Lys Asp Met Ile Asp Glu Leu Leu Asp Ala Arg Gln Asn Tyr Ala Tyr
        380                 385                 390
ggc acg cag cat gac tat ttt gat cat tgg gat gtt gta gga tgg act     1479
Gly Thr Gln His Asp Tyr Phe Asp His Trp Asp Val Val Gly Trp Thr
    395                 400                 405
aag gaa gga tct tcc tcc aga cct aat tca ggc ctt gcg act att atg    1527
Arg Glu Gly Ser Ser Ser Arg Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met
410                 415                 420                 425
tcg aat gga cct ggt ggt tcc aag tgg atg tat gta gga cgt cag aat    1575
Ser Asn Gly Pro Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn
                430                 435                 440
```

gca gga caa aca tgg aca gat tta act ggt aat aac gga gcg tcc gtt 1623
Ala Gly Gln Thr Trp Thr Asp Leu Thr Gly Asn Asn Gly Ala Ser Val
445 450 455
aca att aat ggc gat gga tgg ggc gaa ttc ttt acg aat gga gga tct 1671
Thr Ile Asn Gly Asp Gly Trp Gly Glu Phe Phe Thr Asn Gly Gly Ser
460 465 470
gta tcc gtg tac gtg aac caa taacaaaaag ccttgagaag ggattcctcc 1722
Val Ser Val Tyr Val Asn Gln
475 480
ctaactcaag gctttcttta tgt 1745

<210>27
<211>501
<212>PRT
<213> 芽孢杆菌属菌种(Bacillus sp.)
<400>27
Met Arg Arg Trp Val Val Ala Met Leu Ala Val Leu Phe Leu Phe Pro
-20 -15 -10
Ser Val Val Val Ala Asp Gly Leu Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Tyr
-5 -1 1 5 10
Glu Trp His Leu Glu Asn Asp Gly Gln His Trp Asn Arg Leu His Asp
15 20 25
Asp Ala Ala Ala Leu Ser Asp Ala Gly Ile Thr Ala Ile Trp Ile Pro
30 35 40
Pro Ala Tyr Lys Gly Asn Ser Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr
45 50 55
Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr
60 65 70 75
Lys Tyr Gly Thr Lys Ala Gln Leu Glu Arg Ala Ile Gly Ser Leu Lys
80 85 90
Ser Asn Asp Ile Asn Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Met
95 100 105
Gly Ala Asp Phe Thr Glu Ala Val Gln Ala Val Gln Val Asn Pro Thr
110 115 120
Asn Arg Trp Gln Asp Ile Ser Gly Ala Tyr Thr Ile Asp Ala Trp Thr
125 130 135
Gly Phe Asp Phe Ser Gly Arg Asn Asn Ala Tyr Ser Asp Phe Lys Trp
140 145 150 155
Arg Trp Phe His Phe Asn Gly Val Asp Trp Asp Gln Arg Tyr Gln Glu

```
                160                 165                 170
Asn His Ile Phe Arg Phe Ala Asn Thr Asn Trp Asn Trp Arg Val Asp
            175                 180                 185
Glu Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Leu Gly Ser Asn Ile Asp Phe
        190                 195                 200
Ser His Pro Glu Val Gln Asp Glu Leu Lys Asp Trp Gly Ser Trp Phe
    205                 210                 215
Thr Asp Glu Leu Asp Leu Asp Gly Tyr Arg Leu Asp Ala Ile Lys His
220                 225                 230                 235
Ile Pro Phe Trp Tyr Thr Ser Asp Trp Val Arg His Gln Arg Asn Glu
                240                 245                 250
Ala Asp Gln Asp Leu Phe Val Val Gly Glu Tyr Trp Lys Asp Asp Val
            255                 260                 265
Gly Ala Leu Glu Phe Tyr Leu Asp Glu Met Asn Trp Glu Met Ser Leu
        270                 275                 280
Phe Asp Val Pro Leu Asn Tyr Asn Phe Tyr Arg Ala Ser Gln Gln Gly
    285                 290                 295
Gly Ser Tyr Asp Met Arg Asn Ile Leu Arg Gly Ser Leu Val Glu Ala
300                 305                 310                 315
His Pro Met His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro
                320                 325                 330
Gly Glu Ser Leu Glu Ser Trp Val Ala Asp Trp Phe Lys Pro Leu Ala
            335                 340                 345
Tyr Ala Thr Ile Leu Thr Arg Glu Gly Gly Tyr Pro Asn Val Phe Tyr
        350                 355                 360
Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Asn Asp Asn Ile Ser Ala Lys Lys Asp
    365                 370                 375
Met Ile Asp Glu Leu Leu Asp Ala Arg Gln Asn Tyr Ala Tyr Gly Thr
380                 385                 390                 395
Gln His Asp Tyr Phe Asp His Trp Asp Val Val Gly Trp Thr Arg Glu
                400                 405                 410
Gly Ser Ser Ser Arg Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asn
            415                 420                 425
Gly Pro Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly
        430                 435                 440
Gln Thr Trp Thr Asp Leu Thr Gly Asn Asn Gly Ala Ser Val Thr Ile
    445                 450                 455
Asn Gly Asp Gly Trp Gly Glu Phe Phe Thr Asn Gly Gly Ser Val Ser
460                 465                 470                 475
```

```
Val Tyr Val Asn Gln
                480

<210>28
<211>1920
<212>DNA
<213>地衣芽孢杆菌(Bacillus licheniformis)
<220>
<221>CDS
<222>(421)..(1872)
<400>28
cggaagattg gaagtacaaa aataagcaaa agattgtcaa tcatgtcatg agccatgcgg     60
gagacggaaa aatcgtctta atgcacgata tttatgcaac gttcgcagat gctgctgaag    120
agattattaa aaagctgaaa gcaaaaggct atcaattggt aactgtatct cagcttgaag    180
aagtgaagaa gcagagaggc tattgaataa atgagtagaa gcgccatatc ggcgcttttc    240
ttttggaaga aaatataggg aaaatggtac ttgttaaaaa ttcggaatat ttatacaaca    300
tcatatgttt cacattgaaa ggggaggaga atcatgaaac aacaaaaacg gctttacgcc    360
cgattgctga cgctgttatt tgcgctcatc ttcttgctgc ctcattctgc agcagcggcg    420
gca aat ctt aat ggg acg ctg atg cag tat ttt gaa tgg tac atg ccc    468
Ala Asn Leu Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Met Pro
1               5                   10                  15
aat gac ggc caa cat tgg agg cgt ttg caa aac gac tcg gca tat ttg    516
Asn Asp Gly Gln His Trp Arg Arg Leu Gln Asn Asp Ser Ala Tyr Leu
            20                  25                  30
gct gaa cac ggt att act gcc gtc tgg att ccc ccg gca tat aag gga    564
Ala Glu His Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly
        35                  40                  45
acg agc caa gcg gat gtg ggc tac ggt gct tac gac ctt tat gat tta    612
Thr Ser Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu
    50                  55                  60
ggg gag ttt cat caa aaa ggg acg gtt cgg aca aag tac ggc aca aaa    660
Gly Glu Phe His Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys
65                  70                  75                  80
gga gag ctg caa tct gcg atc aaa agt ctt cat tcc cgc gac att aac    708
Gly Glu Leu Gln Ser Ala Ile Lys Ser Leu His Ser Arg Asp Ile Asn
                85                  90                  95
gtt tac ggg gat gtg gtc atc aac cac aaa ggc ggc gct gat gcg acc    756
Val Tyr Gly Asp Val Val Ile Asn His Lys Gly Gly Ala Asp Ala Thr
            100                 105                 110
```

```
gaa gat gta acc gcg gtt gaa gtc gat ccc gct gac cgc aac cgc gta     804
Glu Asp Val Thr Ala Val Glu Val Asp Pro Ala Asp Arg Asn Arg Val
        115                 120                 125
att tca gga gaa cac cta att aaa gcc tgg aca cat ttt cat ttt ccg     852
Ile Ser Gly Glu His Leu Ile Lys Ala Trp Thr His Phe His Phe Pro
    130                 135                 140
ggg cgc ggc agc aca tac agc gat ttt aaa tgg cat tgg tac cat ttt     900
Gly Arg Gly Ser Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp His Trp Tyr His Phe
145                 150                 155                 160
gac gga acc gat tgg gac gag tcc cga aag ctg aac cgc atc tat aag     948
Asp Gly Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg Ile Tyr Lys
                165                 170                 175
ttt caa gga aag gct tgg gat tgg gaa gtt tcc aat gaa aac ggc aac     996
Phe Gln Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Ser Asn Glu Asn Gly Asn
            180                 185                 190
tat gat tat ttg atg tat gcc gac atc gat tat gac cat cct gat gtc    1044
Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Tyr Asp His Pro Asp Val
        195                 200                 205
gca gca gaa att aag aga tgg ggc act tgg tat gcc aat gaa ctg caa    1092
Ala Ala Glu Ile Lys Arg Trp Gly Thr Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Gln
    210                 215                 220
ttg gac ggt ttc cgt ctt gat gct gtc aaa cac att aaa ttt tct ttt    1140
Leu Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys Phe Ser Phe
225                 230                 235                 240
ttg cgg gat tgg gtt aat cat gtc agg gaa aaa acg ggg aag gaa atg    1188
Leu Arg Asp Trp Val Asn His Val Arg Glu Lys Thr Gly Lys Glu Met
                245                 250                 255
ttt acg gta gct gaa tat tgg cag aat gac ttg ggc gcg ctg gaa aac    1236
Phe Thr Val Ala Glu Tyr Trp Gln Asn Asp Leu Gly Ala Leu Glu Asn
            260                 265                 270
tat ttg aac aaa aca aat ttt aat cat tca gtg ttt gac gtg ccg ctt    1284
Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Phe Asn His Ser Val Phe Asp Val Pro Leu
        275                 280                 285
cat tat cag ttc cat gct gca tcg aca cag gga ggc ggc tat gat atg   1332
His Tyr Gln Phe His Ala Ala Ser Thr Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met
    290                 295                 300
agg aaa ttg ctg aac ggt acg gtc gtt tcc aag cat ccg ttg aaa tcg   1380
Arg Lys Leu Leu Asn Gly Thr Val Val Ser Lys His Pro Leu Lys Ser
305                 310                 315                 320
```

```
gtt aca ttt gtc gat aac cat gat aca cag ccg ggg caa tcg ctt gag    1428
Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Gln
                325                 330                 335
tcg act gtc caa aca tgg ttt aag ccg ctt gct tac gct ttt att ctc    1476
Ser Thr Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu
            340                 345                 350
aca agg gaa tct gga tac cct cag gtt ttc tac ggg gat atg tac ggg    1524
Thr Arg Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly
        355                 360                 365
acg aaa gga gac tcc cag cgc gaa att cct gcc ttg aaa cac aaa att    1572
Thr Lys Gly Asp Ser Gln Arg Glu Ile Pro Ala Leu Lys His Lys Ile
    370                 375                 380
gaa ccg atc tta aaa gcg aga aaa cag tat gcg tac gga gca cag cat    1620
Glu Pro Ile Leu Lys Ala Arg Lys Gln Tyr Ala Tyr Gly Ala Gln His
385                 390                 395                 400
gat tat ttc gac cac cat gac att gtc ggc tgg aca agg gaa ggc gac    1668
Asp Tyr Phe Asp His His Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp
                405                 410                 415
agc tcg gtt gca aat tca ggt ttg gcg gca tta ata aca gac gga ccc    1716
Ser Ser Val Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro
            420                 425                 430
ggt ggg gca aag cga atg tat gtc ggc cgg caa aac gcc ggt gag aca    1764
Gly Gly Ala Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Glu Thr
        435                 440                 445
tgg cat gac att acc gga aac cgt tcg gag ccg gtt gtc atc aat tcg    1812
Trp His Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile Asn Ser
    150                 455                 460
gaa ggc tgg gga gag ttt cac gta aac ggc ggg tcg gtt tca att tat    1860
Glu Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Tyr
465                 470                 475                 480
gtt caa aga tag aagagcagag aggacggatt tcctgaagga aatccgtttt        1912
Val Gln Arg

tttatttt                                                           1920
```

```
     1                                                      50
1    HHNGTNGTMM QYFEWHLPND GNHWNRLRDD ASNLRNRGIT AIWIPPAWKG
2    HHNGTNGTMM QYFEWYLPND GNHWNRLRDD AANLKSKGIT AVWIPPAWKG
3    ....VNGTLM QYFEWYTPND GQHWKRLQND AEHLSDIGIT AVWIPPAYKG
4    ..ANLNGTLM QYFEWYMPND GQHWRRLQND SAYLAEHGIT AVWIPPAYKG
5    .AAPFNGTMM QYFEWYLPDD GTLWTKVANE ANNLSSLGIT ALWLPPAYKG

     51                                                     100
1    TSQNDVGYGA YDLYDLGEFN QKGTVRTKYG TRSQLESAIH ALKNNGVQVY
2    TSQNDVGYGA YDLYDLGEFN QKGTVRTKYG TRNQLQAAVT SLKNNGIQVY
3    LSQSDNGYGP YDLYDLGEFQ QKGTVRTKYG TKSELQDAIG SLHSRNVQVY
4    TSQADVGYGA YDLYDLGEFH QKGTVRTKYG TKGELQSAIK SLHSRDINVY
5    TSRSDVGYGV YDLYDLGEFN QKGTVRTKYG TKAQYLQAIQ AAHAAGMQVY

     101                                                    150
1    GDVVMNHKGG ADATENVLAV EVNPNNRNQE ISGDYTIEAW TKFDFPGRGN
2    GDVVMNHKGG ADGTEIVNAV EVNRSNRNQE TSGEYAIEAW TKFDFPGRGN
3    GDVVLNHKAG ADATEDVTAV EVNPANRNQE TSEEYQIKAW TDFRFPGRGN
4    GDVVINHKGG ADATEDVTAV EVDPADRNRV ISGEHLIKAW THFHFPGRGS
5    ADVVFDHKGG ADGTEWVDAV EVNPSDRNQE ISGTYQIQAW TKFDFPGRGN

     151                                                    200
1    TYSDFKWRWY HFDGVDWDQS RQFQNRIYKF RGDGKAWDWE VDSENGNYDY
2    NHSSFKWRWY HFDGTDWDQS RQLQNKIYKF RGTGKAWDWE VDTENGNYDY
3    TYSDFKWHWY HFDGADWDES RKI.SRIFKF RGEGKAWDWE VSSENGNYDY
4    TYSDFKWHWY HFDGTDWDES RKL.NRIYKF ..QGKAWDWE VSNENGNYDY
5    TYSSFKWRWY HFDGVDWDES RKL.SRIYKF RGIGKAWDWE VDTENGNYDY
```

图 1

```
    201                                                  250
1   LMYADVDMDH PEVVNELRRW GEWYTNTLNL DGFRIDAVKH IKYSFTRDWL
2   LMYADVDMDH PEVIHELRNW GVWYTNTLNL DGFRIDAVKH IKYSFTRDWL
3   LMYADVDYDH PDVVAETKKW GIWYANELSL DGFRIDAAKH IKFSFLRDWV
4   LMYADIDYDH PDVAAEIKRW GTWYANELQL DGFRLDAVKH IKFSFLRDWV
5   LMYADLDMDH PEVVTELKNW GKWYVNTTNI DGFRLDAVKH IKFSFFPDWL

    251                                                  300
1   THVRNATGKE MFAVAEFWKN DLGALENYLN KTNWNHSVFD VPLHYNLYNA
2   THVRNTTGKP MFAVAEFWKN DLGAIENYLN KTSWNHSAFD VPLHYNLYNA
3   QAVRQATGKE MFTVAEYWQN NAGKLENYLN KTSFNQSVFD VPLHFNLQAA
4   NHVREKTGKE MFTVAEYWQN DLGALENYLN KTNFNHSVFD VPLHYQFHAA
5   SYVRSQTGKP LFTVGEYWSY DINKLHNYIT KTDGTMSLFD APLHNKFYTA

    301                                                  350
1   SNSGGNYDMA KLLNGTVVQK HPMHAVTFVD NHDSQPGESL ESFVQEWFKP
2   SNSGGYYDMR NILNGSVVQK HPTHAVTFVD NHDSQPGEAL ESFVQQWFKP
3   SSQGGGYDMR RLLDGTVVSR HPEKAVTFVE NHDTQPGQSL ESTVQTWFKP
4   STQGGGYDMR KLLNGTVVSK HPLKSVTFVD NHDTQPGQSL ESTVQTWFKP
5   SKSGGAFDMR TLMTNTLMKD QPTLAVTFVD NHDTEPGQAL QSWVDPWFKP

    351                                                  400
1   LAYALILTRE QGYPSVFYGD YYGIPTHS.. .VPAMKAKID PILEARQNFA
2   LAYALVLTRE QGYPSVFYGD YYGIPTHG.. .VPAMKSKID PLLQARQTFA
3   LAYAFILTRE SGYPQVFYGD MYGTKGTSPK EIPSLKDNIE PILKARKEYA
4   LAYAFILTRE SGYPQVFYGD MYGTKGDSQR EIPALKHKIE PILKARKQYA
5   LAYAFILTRQ EGYPCVFYGD YYGIPQYN.. .IPSLKSKID PLLIARRDYA

    401                                                  450
1   YGTQHDYFDH HNIIGWTREG NTTHPNSGLA TIMSDGPGGE KWMYVGQNKA
2   YGTQHDYFDH HDIIGWTREG NSSHPNSGLA TIMSDGPGGN KWMYVGKNKA
3   YGPQHDYIDH PDVIGWTREG DSSAAKSGLA ALITDGPGGS KRMYAGLKNA
4   YGAQHDYFDH HDIVGWTREG DSSVANSGLA ALITDGPGGA KRMYVGRQNA
5   YGTQHDYLDH SDIIGWTREG GTEKPGSGLA ALITDGPGGS KWMYVGKQHA
```

图 1（续）

```
    451                                                  500
1   GQVWHDITGN KPGTVTINAD GWANFSVNGG SVSIWVKR.. ..........
2   GQVWRDITGN RTGTVTINAD GWGNFSVNGG SVSVWVKQ.. ..........
3   GETWYDITGN RSDTVKIGSD GWGEFHVNDG SVSIYVQ... ..........
4   GETWHDITGN RSEPVVINSE GWGEFHVNGG SVSIYVQR.. ..........
5   GKVFYDLTGN RSDTVTINSD GWGEFKVNGG SVSVWVPRKT TVSTIARPIT

    501                 519
1   .......... .........
2   .......... .........
3   .......... .........
4   .......... .........
5   TRPWTGEFVR WTEPRLVAW
```

图 1（续）