



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118715318 A

(43) 申请公布日 2024.09.27

(21) 申请号 202280091454.7

(22) 申请日 2022.12.15

(30) 优先权数据

63/290067 2021.12.16 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.08.09

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/081697 2022.12.15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/114932 EN 2023.06.22

(71) 申请人 丹尼斯科美国公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 V·Y·阿列克塞耶夫 L·贝贝

L·丹克梅耶 F·古德格布尔

R·吉尼卡尔 T·卡普尔

H·穆尔德 N·H·雷德斯蒂格

S·范斯蒂格坦斯

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

专利代理师 权陆军 王伦伟

(51) Int.Cl.

C12N 9/54 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

权利要求书3页 说明书51页

(54) 发明名称

枯草杆菌蛋白酶变体及其用途

(57) 摘要

本文公开了一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体、编码其的核酸以及与其生产和使用有关的组合和方法,该一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体包括与一种或多种参比枯草杆菌蛋白酶相比具有改善的稳定性和/或污垢去除性的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体。

1. 一种枯草杆菌蛋白酶变体,其包含在选自由以下组成的组的位置处的两个或更多个取代:39、74、99、126、127、128、198、211、212和242,其中所述位置根据SEQ ID NO:1进行编号,并且其中所述变体与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少80%同一性。

2. 根据权利要求1所述的枯草杆菌蛋白酶变体,其中所述两个或更多个取代选自X039E、X074D、X099R、X126A、X127E、X128G、X198A、X198G、X211Q、X212Q和X242D。

3. 根据权利要求1或2所述的枯草杆菌蛋白酶变体,其中所述变体包含:

(i) 在位置99和211处的取代,以及在选自由以下组成的组的位置处的至少两个另外的取代:39、74、126、127、128、198、212和242;或

(ii) 在位置126、198和212处的取代,以及在选自由以下组成的组的位置处的至少一个或多个另外的取代:39、74、99、127、128、211和242;或

(iii) 取代S099R+L211Q,以及选自由以下组成的组的至少两个另外的取代:P039E、N074D、S126A、P127E、S128G、N198A、N198G、N212Q和N242D;或

(iv) 取代S126A+N198A/G+N212Q,以及选自由以下组成的组的至少一个或多个另外的取代:P039E、N074D、S099R、P127E、S128G、L211Q和N242D;

其中所述位置根据SEQ ID NO:1进行编号,并且其中所述变体与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少80%同一性。

4. 根据任一前述权利要求所述的枯草杆菌蛋白酶变体,其中所述变体包含以下取代:

N074D-S099R-S126A-S128G-L211Q-N212Q;S099R-P127E-S128G-L211Q;P039E-S099R-S126A-S128G-N198G-N212Q-N242D;N074D-S099R-S126A-S128G-N198G-L211Q-N212Q;S099R-P127E-N198G-L211Q-N212Q;S126A-N198G-L211Q-N212Q;S099R-S126A-P127E-N198G-L211Q-N212Q;S099R-S126A-P127E-L211Q-N212Q;S128G-L211Q;P039E-N198G-N212Q;S099R-S126A-P127E-S128G-N198G-N212Q;S099R-S126A-P127E-L211Q;P039E-S099R-S126A-S128G-N198G;P039E-S126A-S128G-N198G-N212Q;P039E-S099R-S126A-P127E;P039E-S126A-N198G-L211Q;P039E-L211Q-N212Q;P039E-S126A-N198G;P039E-S099R-S128G-N198G-L211Q-N212Q-N242D;N074D-S128G-N198G-N212Q;P039E-S099R-S126A-P127E-S128G-N212Q;P039E-S126A-N198G-L211Q-N212Q;P039E-N074D-S099R-S128G-N198G-N212Q;P039E-S126A-N198G-N212Q;P039E-S126A-L211Q-N212Q;P039E-N074D-S099R-S126A-S128G-N198G-N212Q;P039E-S099R-S126A-S128G-N198G-L211Q-N212Q-N242D;P039E-S099R-S126A-N198G-L211Q-N212Q-N242D;S126A-N212Q-N242D;P039E-S099R-P127E-L211Q-N212Q;N074D-S099R-S126A-L211Q-N212Q-N242D;P039E-S099R-P127E-N198G-L211Q;P039E-N074D-S099R-S126A-S128G-N198G-N242D;P039E-N198G-L211Q-N242D;P039E-N074D-S099R-P127E-S128G-N198G-N212Q;P039E-N074D-S099R-S128G-N198G-L211Q-N212Q-N242D;P039E-N074D-S099R-S126A-P127E-S128G-N198G-N212Q;P039E-N074D-S126A-N198G-L211Q;P039E-S099R-S126A-L211Q-N212Q-N242D;S099R-S126A-P127E-N198G-L211Q-N242D;P039E-S099R-P127E-S128G-N198G-N212Q-N242D;P039E-N074D-S099R-S126A-S128G-N212Q-N242D;P039E-S099R-P127E-N198G-L211Q-N212Q;N074D-S099R-P127E-S128G-L211Q;N074D-S099R-P127E-S128G-N198A;N074D-S099R-P127E-S128G-N198A-L211Q-N212Q;N074D-S099R-P127E-S128G-N212Q;N074D-S099R-S126A-P127E-S128G-L211Q;N074D-S099R-S126A-P127E-S128G-

N198G-N212Q;N074D-S099R-S126A-S128G-L211Q-N212Q-N242D;N074D-S099R-S126A-S128G-N212Q;N074D-S099R-S128G-N198G-L211Q-N212Q;N074D-S126A-L211Q-N212Q;N074D-S126A-N198A-L211Q;P039E-L211Q;P039E-N074D-S099R-S126A-S128G-L211Q-N212Q;P039E-S099R-P127E-S128G-L211Q;P039E-S099R-P127E-S128G-L211Q-N212Q;P039E-S099R-S126A-S128G-L211Q;P039E-S099R-S126A-S128G-L211Q-N242D;P039E-S099R-S126A-S128G-N198A-L211Q;P039E-S099R-S126A-S128G-N198A-L211Q-N212Q-N242D;P039E-S099R-S126A-S128G-N198G-L211Q;P039E-S099R-S126A-S128G-N198G-L211Q-N212Q;P039E-S099R-S128G-L211Q-N212Q;P039E-S126A-N198A-N212Q;P039E-S126A-S128G、P039E-S126A-S128G-N198A;P039E-S128G;P039E-S128G-N198A-L211Q-N212Q;P039E-S128G-N198A-N212Q;S099R-P127E-S128G;S099R-S126A-S128G-L211Q-N212Q-N242D;S126A-S128G;以及S126A-S128G-N242D,其中所述位置根据SEQ ID NO:1进行编号,并且其中所述变体与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少80%同一性。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的枯草杆菌蛋白酶变体,其中所述变体

- (i) 衍生自迟缓芽孢杆菌(*Bacillus lentus*)枯草杆菌蛋白酶;
- (ii) 具有蛋白水解活性;或
- (iii) 包含(i)和(ii)的组合。

6. 根据任一前述权利要求所述的枯草杆菌蛋白酶变体,其中所述变体衍生自与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:8具有80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸序列同一性的亲本多肽或参比多肽。

7. 根据任一前述权利要求所述的枯草杆菌蛋白酶变体,其中所述变体包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:8具有85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或小于100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

8. 根据任一前述权利要求所述的枯草杆菌蛋白酶变体,其中当与亲本枯草杆菌蛋白酶或参比枯草杆菌蛋白酶相比时,所述变体具有一种或多种改善的性质;其中所述改善的性质选自改善的洗涤剂清洁性能、改善的稳定性、及其组合。

9. 根据权利要求8所述的枯草杆菌蛋白酶变体,其中所述改善的性质是

(i) 改善的洗涤剂清洁性能,其中所述变体与具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的枯草杆菌蛋白酶相比具有 ≥ 1.1 的法式焦糖布丁污渍、烘焙奶酪和/或蛋污渍清洁PI;和/或

(ii) 改善的洗涤剂清洁性能,其中所述变体与具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的枯草杆菌蛋白酶相比具有 ≥ 1.1 的BMI清洁PI;和/或

(iii) 改善的稳定性,其中当根据实例2的稳定性测定进行测量时,与具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的枯草杆菌蛋白酶相比,所述变体具有更高的残余活性。

10. 根据权利要求8或9中任一项所述的枯草杆菌蛋白酶变体,其中所述

- (i) 洗涤剂清洁性能根据实例2的ADW洗涤剂测定中的清洁性能进行测量;和/或
- (ii) 洗涤剂清洁性能根据实例2的衣物清洁测定中的清洁性能进行测量;和/或
- (iii) 稳定性根据实例2的稳定性测定进行测量。

11. 一种酶组合物,其包含一种或多种根据任一前述权利要求所述的枯草杆菌蛋白酶变体。

12. 根据权利要求11所述的酶组合物,其中所述组合物是酶颗粒。

13. 根据权利要求11或12中任一项所述的酶组合物,所述酶组合物进一步包含选自以下的一种或多种其他酶:酰基转移酶、淀粉酶、 α -淀粉酶、 β -淀粉酶、 α -半乳糖苷酶、阿拉伯聚糖酶、阿拉伯糖苷酶、芳基酯酶、 β -半乳糖苷酶、 β -葡聚糖酶、角叉菜胶酶、过氧化氢酶、纤维素酶、软骨素酶、角质酶、分散蛋白、内切- β -甘露聚糖酶、外切- β -甘露聚糖酶、酯酶、外切-甘露聚糖酶、半乳聚糖酶、葡糖淀粉酶、半纤维素酶、氨基己糖苷酶、透明质酸酶、角蛋白酶、漆酶、乳糖酶、木质酶、脂肪酶、脂肪分解酶、脂加氧酶、甘露聚糖酶、金属蛋白酶、核酸酶、氧化酶、氧化还原酶、果胶酸裂合酶、果胶乙酰酯酶、果胶酶、戊聚糖酶、过水解酶、过氧化物酶、酚氧化酶、磷酸酶、磷酸二酯酶、磷脂酶、植酸酶、聚酯酶、聚半乳糖醛酸酶、另外的蛋白酶、支链淀粉酶、还原酶、鼠李糖半乳糖醛酸酶、鞣酸酶、转谷氨酰胺酶、黄原胶裂解酶、木聚糖乙酰酯酶、木聚糖酶和木糖苷酶;及其组合。

14. 根据权利要求13所述的酶组合物,其中所述一种或多种酶包含淀粉酶及其变体、及所述淀粉酶和其变体的组合,所述淀粉酶选自由以下组成的组:AA707、AA560、AAI10、BspAmy24、SP722和CspAmy1。

15. 一种多核苷酸,其包含编码根据权利要求1-10中任一项所述的变体的核酸序列,其中所述多核苷酸是任选地分离的。

16. 根据权利要求15所述的多核苷酸,其中所述核酸序列可操作地连接到启动子。

17. 一种表达载体或表达盒,其包含根据权利要求15或16所述的多核苷酸。

18. 一种重组宿主细胞,其包含根据权利要求15或16所述的多核苷酸或如权利要求17所述的载体或盒。

枯草杆菌蛋白酶变体及其用途

[0001] 本申请要求于2021年12月16日提交的美国临时申请号63/290,067的权益,并且将该临时申请通过引用以其全文并入。

[0002] 本文公开了一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体、编码其的核酸以及与其生产和使用有关的组合物和方法,该一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体包括与一种或多种参比枯草杆菌蛋白酶相比具有改善的稳定性和/或污垢去除性的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体。

背景技术

[0003] 蛋白酶(也称为胰酶)是指具有分解其他蛋白质的能力的酶。蛋白酶具有通过在形成蛋白质的肽或多肽链中将氨基酸连接在一起的肽键的水解来开始蛋白质分解代谢以进行蛋白水解的能力。蛋白酶作为蛋白质消化酶的这种活性被称为蛋白水解活性。存在许多熟知的程序用于测量蛋白水解活性(Kalisz,“Microbial Proteinases[微生物胰酶],”在:Fiechter(编辑),*Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*[生化工程/生物技术进展],(1988)中)。例如,蛋白水解活性可以通过分析各个蛋白酶水解商业底物的能力的比较测定来确定。可用于分析蛋白酶或蛋白水解活性的示例性底物包括但不限于二甲基酪蛋白(西格玛公司C-9801)、牛胶原(西格玛公司C-9879)、牛弹性蛋白(西格玛公司E-1625)和天青角蛋白(Keratin Azure)(西格玛-奥德里奇公司K8500)。使用这些底物的比色测定是本领域熟知的(参见例如W0 99/34011和美国专利号6,376,450,这两者都通过引用并入本文)。

[0004] 丝氨酸蛋白酶是具有启动蛋白质肽键水解的活性位点丝氨酸的酶(EC编号3.4.21)。丝氨酸蛋白酶包含种类繁多的具有广泛特异性和生物学功能的酶,基于这些酶的结构,这些酶被进一步划分为胰凝乳蛋白酶样(胰蛋白酶样)和枯草杆菌蛋白酶样。原型枯草杆菌蛋白酶(EC编号3.4.21.62)最初从枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)获得。枯草杆菌蛋白酶及其同源物是MEROPS分类方案的S8肽酶家族的成员(Rawlings,N.D等人(2016) Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors[蛋白水解酶及其底物和抑制剂的二十年MEROPS数据库].*Nucleic Acids Res*[核酸研究]44,D343-D350)。S8家族的成员在其氨基酸序列中具有顺序为Asp、His和Ser的催化三联体。尽管已经开发了许多可用于清洁应用的变体蛋白酶,但是仍然需要改善的蛋白酶变体。

发明内容

[0005] 一个实施例涉及枯草杆菌蛋白酶变体,该枯草杆菌蛋白酶变体包含在选自由以下组成的组的位置处的一个、两个、三个、四个、五个或更多个氨基酸取代:39、74、99、126、127、128、198、211、212和242,其中这些氨基酸位置通过与SEQ ID NO:1的氨基酸序列相对应来编号。在一些实施例中,枯草杆菌蛋白酶变体与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少80%同一性。在另一个实施例中,提供了枯草杆菌蛋白酶变体,这些枯草杆菌蛋白酶变体包含选自由以下组成的组的一个、两个、三个、四个、五个或更多个氨基酸取代:X039E、X074D、

X099R、X126A、X127E、X128G、X198A、X198G、X211Q、X212Q和X242D,其中这些氨基酸位置通过与SEQ ID NO:1的氨基酸序列相对应来编号。在另一个实施例中,提供了枯草杆菌蛋白酶变体,这些枯草杆菌蛋白酶变体包含选自由以下组成的组的一个、两个、三个、四个、五个或更多个氨基酸取代:P039E、N074D、S099R、S126A、P127E、S128G、N198A、N198G、L211Q、N212Q和N242D,其中这些氨基酸位置通过与SEQ ID NO:1的氨基酸序列相对应来编号,并且其中该枯草杆菌蛋白酶变体与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少80%同一性。

[0006] 在另一个实施例中,包含一个、两个、三个、四个、五个或更多个氨基酸取代的枯草杆菌蛋白酶变体包含:(i)在位置99和211处的取代,以及在选自由以下组成的组的位置处的至少两个另外的取代:39、74、126、127、128、198、212和242;(ii)在位置126、198和212处的取代,以及在选自由以下组成的组的位置处的至少一个或多个另外的取代:39、74、99、127、128、211和242;(iii)取代S099R+L211Q,以及选自由以下组成的组的至少两个另外的取代:P039E、N074D、S126A、P127E、S128G、N198A、N198G、N212Q和N242D;(iv)取代S126A+N198A或G+N212Q,以及选自由以下组成的组的至少一个或多个另外的取代:P039E、N074D、S099R、P127E、S128G、L211Q和N242D;其中这些位置根据SEQ ID NO:1进行编号,并且其中该变体与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少80%同一性。

[0007] 仍其他的实施例涉及用于生产本文所述的变体的方法,该方法包括用包含编码本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体的多核苷酸的表达载体稳定地转化宿主细胞。仍另外的实施例涉及包含编码本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体的核酸序列的多核苷酸。

具体实施方式

[0008] 在一个实施例中,本公开提供了一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体,该变体包含如下更详细地描述的一个或多个氨基酸取代。在一些实施例中,当与具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的枯草杆菌蛋白酶相比时,本文提供的变体表现出一种或多种改善的性质,例如改善的清洁性能、或改善的稳定性、或改善的清洁性能和改善的稳定性两者。本文提供的枯草杆菌蛋白酶变体可用于制备清洁组合物(例如,自动餐具洗涤组合物)。此外,本文提供的枯草杆菌蛋白酶变体还可用于使用这样的变体或包含这样的枯草杆菌蛋白酶变体的组合物的清洁方法(例如餐具洗涤方法)中。

[0009] 除非本文另有指示,否则本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体可通过用于分子生物学、微生物学、蛋白质纯化、蛋白质工程、蛋白质和DNA测序、重组DNA领域和工业酶使用和开发的各种技术制备和使用。未定义的术语和缩写应当符合其在本领域中所使用的常规含义。除非本文另有定义,否则本文所使用的所有科技术语都具有如本领域普通技术人员通常理解的相同含义。本文提供的任何定义将在说明书的上下文中作为整体进行解释。除非上下文另有明确指示,否则如本文所使用的,单数“一个/一种(a/an)”和“所述(the)”包括复数。除非另有指示,否则核酸序列从左至右以5'至3'方向书写;并且氨基酸序列从左至右以氨基至羧基方向书写。本文使用的每一数值范围包括落入这样的较宽数值范围内的每一较窄数值范围,如同这样的较窄数值范围在本文中全部明确写出一样。

[0010] 如本文与数值结合所使用的,术语“约”是指数值的 ± 0.5 的范围,除非该术语在上下文中另有特别定义。例如,短语“约6的pH值”是指pH值为5.5至6.5,除非该pH值另有特

别定义。

[0011] 本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体的氨基酸取代的命名法使用以下一项或多项:位置;位置:一种或多种氨基酸取代;或一个或多个起始氨基酸:位置:一个或多个取代的氨基酸。对“位置”(例如5、8、17、22等)的提及涵盖了可能存在于这样的位置处的任何起始氨基酸,以及可能存在于这样的位置处的任何取代。对“位置:一种或多种氨基酸取代”(例如1S/T/G、3G、17T等)的提及涵盖了可能存在于这样的位置处的任何起始氨基酸和可能取代这样的起始氨基酸的一种或多种氨基酸。对位置的提及可以列举几种形式,例如,位置003也可以称为位置03或3。对起始或经取代的氨基酸的提及可以进一步表示为由斜线(foreslash) (“/”)分开的几个起始或经取代的氨基酸。例如,D275S/K表示位置275被丝氨酸(S)或赖氨酸(K)取代,并且P/S197K表示位置197处的起始氨基酸脯氨酸(P)或丝氨酸(S)被赖氨酸(K)取代。对X作为位置上的氨基酸的提及是指所列举位置处的任何氨基酸。

[0012] 给定的氨基酸序列中的氨基酸残基的位置通过与SEQ ID NO:1的氨基酸序列相对应来编号。即,SEQ ID NO:1的氨基酸序列用作对氨基酸残基的位置进行编号的参比序列。例如,使用如本文所述的比对算法将本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体的氨基酸序列与SEQ ID NO:1的氨基酸序列进行比对,并且与SEQ ID NO:1中的氨基酸残基比对(优选地,最佳比对)的给定的氨基酸序列中的每个氨基酸残基通过参考相应氨基酸残基的数字位置而方便地编号。当与查询序列(有时也称为“参比序列”)相比时,例如像本文所述的序列比对算法将鉴定在主题序列中发生插入或缺失的一个或多个位置。与其他枯草杆菌蛋白酶氨基酸序列的序列比对可以使用氨基酸比对来确定,例如,如2018年11月28日提交的PCT申请号PCT/US2018/062768的图1中提供的氨基酸比对,该PCT申请要求于2017年11月29日提交的标题为“Highly Stable Subtilisin Enzymes[高度稳定的枯草杆菌蛋白酶]”的美国临时申请号62/591,976的优先权。

[0013] 术语“蛋白酶”(protease)和“肽酶”(proteinase)是指具有分解蛋白质和肽的能力的酶。蛋白酶具有通过在形成蛋白质的肽或多肽链中将氨基酸连接在一起的肽键的水解进行“蛋白水解”的能力。蛋白酶作为蛋白质消化酶的这种活性被称为“蛋白水解活性”。存在许多熟知的程序用于测量蛋白水解活性。例如,蛋白水解活性可以通过分析各自蛋白酶水解合适底物的能力的比较测定来确定。可用于分析蛋白酶或蛋白水解活性的示例性底物包括但不限于二甲基酪蛋白(西格玛公司C-9801)、牛胶原(西格玛公司C-9879)、牛弹性蛋白(西格玛公司E-1625)和天青角蛋白(Keratin Azure)(西格玛-奥德里奇公司K8500)。利用这些底物的比色测定是本领域熟知的(参见例如,WO 99/34011和US 6,376,450)。pNA肽基测定(参见例如,DeI Mar等人,Anal Biochem[分析生物化学],99:316-320,1979)还可用于确定活性酶浓度。该测定测量当酶水解可溶性合成底物如琥珀酰-丙氨酸-丙氨酸-脯氨酸-苯丙氨酸-对硝基苯胺(suc-AAPF-pNA)时释放对硝基苯胺的速率。在分光光度计上在405或410nm处测量来自水解反应的黄色的生成速率并且该速率与活性酶浓度成比例。另外,在280纳米(nm)处的吸光度测量可以用于确定纯化的蛋白质样品中的总蛋白质浓度。底物除以蛋白质浓度的活性给出了酶比活性。

[0014] 如本文所使用的,“芽孢杆菌属(Bacillus)”包括如本领域技术人员已知的“芽孢杆菌属”内的所有物种,包括但不限于:枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌(B.licheniformis)、迟缓芽孢杆菌(B.lentus)、短芽孢杆菌(B.brevis)、嗜热脂肪芽孢杆菌

(*B. stearothermophilus*)、嗜碱芽孢杆菌(*B. alkalophilus*)、解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)、克劳氏芽孢杆菌(*B. clausii*)、耐盐芽孢杆菌(*B. halodurans*)、巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*)、凝结芽孢杆菌(*B. coagulans*)、环状芽孢杆菌(*B. circulans*)、吉氏芽孢杆菌(*B. gibsonii*)、芽孢杆菌属(*B.*)物种TY145、巴塔哥尼亚芽孢杆菌(*B. patagoniensis*)和苏云金芽孢杆菌(*B. thuringiensis*)。应认识到,芽孢杆菌属不断进行分类学重组。因此,该属旨在包括已重新分类的物种,包括但不限于:如嗜热脂肪芽孢杆菌(现在命名为“嗜热脂肪土芽孢杆菌(*Geobacillus stearothermophilus*)”)或多黏芽孢杆菌(*B. polymyxa*) (现在是“多黏类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*)”)等生物体。在胁迫环境条件下的抗性内生孢子的产生被认为是芽孢杆菌属的定义性特性,尽管这个特征也适用于最近命名的脂环酸芽孢杆菌属(*Alicyclobacillus*)、双芽孢杆菌属(*Amphibacillus*)、硫胺素芽孢杆菌属(*Aneurinibacillus*)、厌氧芽孢杆菌属(*Anoxybacillus*)、短芽孢杆菌属(*Brevibacillus*)、线性杆菌属(*Filobacillus*)、薄壁芽孢杆菌属(*Gracilibacillus*)、喜盐芽孢杆菌属(*Halobacillus*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、需盐芽孢杆菌属(*Salibacillus*)、耐热芽孢杆菌属(*Thermobacillus*)、脲芽孢杆菌属(*Ureibacillus*)、嗜碱盐芽孢杆菌属(*Alkalihalobacillus*)、喜微温菌属(*Peribacillus*)、胞囊杆菌属(*Cytobacillus*)、属间芽孢杆菌(*Mesobacillus*)、新颖芽孢杆菌属(*Neobacillus*)、副芽孢杆菌属(*Metabacillus*)和枝芽孢杆菌属(*Virgibacillus*),以及最近提出的属:交替杆菌属(*Alteribacter*)、外芽孢杆菌属(*Ectobacillus*)、*Evansella*、*Ferdinandcohnia*、*Gottfriedia*、*Heyndrickxia*、*Lederbergia*、*Litchfieldia*、*Margalitia*、*尼氏芽孢杆菌属(Niallia)*、*普里斯特氏菌属(Priestia)*、*Robertmurraya*、*海水罗塞略莫拉氏菌属(Rossellomorea)*、*Schinkia*、*Siminovitchia*、*Sutcliffeiella*和*魏茨曼氏菌属(Weizmannia)* (Gupta等人, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* [国际系统与进化微生物学杂志] 2020;70:5753-5798)。

[0015] “迟缓芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶”包括获得自或衍生自迟缓芽孢杆菌(例如 *Lederbergia lentus*) 来源的任何枯草杆菌蛋白酶,包括P29600。在一个实施例中,本发明提供了“GG36变体”(或“P29600变体”或“GG36枯草杆菌蛋白酶变体”),其中这些突变存在于SEQ ID NO:1中所示的成熟GG36氨基酸序列中。在其他实施例中,迟缓芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶及其变体包括具有如下氨基酸序列的那些多肽,该氨基酸序列与SEQ ID NO:1具有至少80%序列同一性。

[0016] 在一些实施例中,本文的枯草杆菌蛋白酶变体包括获得自或衍生自巴塔哥尼亚芽孢杆菌(巴塔哥尼亚嗜碱盐芽孢杆菌(*Alkalihalobacillus patagoniensis*))来源的任何变体枯草杆菌蛋白酶,包括Bpan01744(WO 201669563, WO 2020112559)。在一些这样的实施例中,本文提供的枯草杆菌蛋白酶变体包括与SEQ ID NO:8具有至少80%序列同一性的那些多肽。

[0017] 术语“载体”是指用于将一个或多个核酸引入或转移到靶细胞或靶组织中的核酸构建体。典型地,载体用于将外源DNA引入细胞或组织中。载体包括质粒、克隆载体、噬菌体、病毒(例如,病毒载体)、黏粒、表达载体、穿梭载体等。典型地,载体包括复制起点、多克隆位点和选择性标记。典型地,将载体插入靶细胞的过程被称为转化。在一些实施例中,本发明包括:包含可操作地连接到合适的前序列(例如分泌、信号肽序列等)的编码丝氨酸蛋白酶

多肽(例如,前体或成熟丝氨酸蛋白酶多肽)的DNA序列的载体,该载体能够在合适的宿主中实现DNA序列的表达,以及重组多肽链的折叠和易位。

[0018] 如本文所使用的,在将核酸序列引入细胞中的上下文中,术语“引入”是指适合于将核酸序列转移到细胞中的任何方法。这样的引入方法包括但不限于:原生质体融合、转染、转化、电穿孔、转导和转导。转化是指由摄取、任选的基因组掺入和遗传物质(例如DNA)的表达引起的细胞的遗传改变。

[0019] 术语“表达”是指衍生自本公开的核酸分子的正义(mRNA)或反义RNA的转录和稳定积累。表达也可指将mRNA翻译成多肽。因此,术语“表达”包括“多肽的生产”中涉及的任何步骤,包括但不限于转录、转录后修饰、翻译、翻译后修饰、分泌等。

[0020] 短语“表达盒”或“表达载体”是指重组或合成产生的用于在靶细胞中表达目的核酸(例如外源核酸或转基因)的核酸构建体或载体。典型地,目的核酸表达目的蛋白。典型地,表达载体或表达盒包含驱动或促进外源核酸表达的启动子核苷酸序列。典型地,表达载体或表达盒还包括其他的允许特定核酸在靶细胞中转录的指定核酸元件。重组表达盒可以掺入质粒、染色体、线粒体DNA、质体DNA、病毒或核酸片段中。一些表达载体具有在宿主细胞或宿主细胞基因组中掺入并表达异源DNA片段的能力。许多原核和真核表达载体是可商购的。从掺入表达载体的核酸序列中选择用于表达蛋白质的适当的表达载体和盒在本领域技术人员知识范围内。

[0021] 如本文所使用的,当将核酸与另一个核酸序列一起置于功能关系时,该核酸与另一个核酸序列“可操作地连接”。例如,如果启动子影响编码序列的转录,则启动子或增强子可操作地连接到核苷酸编码序列。如果核糖体结合位点被定位以便促进编码序列的翻译,则该核糖体结合位点可以可操作地连接到编码序列。典型地,“可操作地连接的”DNA序列是连续的。然而,增强子不必是连续的。通过在方便的限制位点处连接来实现连接。如果这样的位点不存在,则可以根据常规实践使用合成的寡核苷酸衔接子或接头。

[0022] 术语“基因”是指编码多肽并且包括编码区之前和之后的区域的多核苷酸(例如,DNA区段)。在一些情况下,基因包括个体编码区段(外显子)之间的间隔序列(内含子)。

[0023] 当关于细胞使用时,术语“重组”典型地指示细胞已经通过引入外源核酸序列而被修饰,或者细胞衍生自己如此修饰的细胞。例如,重组细胞可以包含天然(非重组)形式的细胞中不以相同形式存在的基因,或者重组细胞可以包含已经被修饰并且重新引入细胞中的天然基因(发现于细胞的天然形式中)。重组细胞可以包含对于如下细胞来说是内源的核酸,该细胞已经被修饰但未从该细胞中去除该核酸;这样的修饰包括通过基因置换、位点特异性突变以及本领域普通技术人员已知的相关技术获得的那些。重组DNA技术包括用于在体外生产重组DNA并且将该重组DNA转移到其可以被表达或传播的细胞中从而生产重组多肽的技术。多核苷酸或核酸的“重组(recombination和recombining)”通常是指装配或组合两个或更多个核酸或多核苷酸链或片段以产生新的多核苷酸或核酸。

[0024] 如果在天然状态下或当通过本领域技术人员已知的方法操纵时,核酸或多核苷酸可以被转录和/或翻译以生产多肽或其片段,那么可称该核酸或多核苷酸“编码”该多肽。也可称这样的核酸的反义链编码序列。

[0025] 术语“宿主菌株”和“宿主细胞”是指对于包含目的DNA序列的表达载体或表达盒而言合适的宿主。

[0026] “蛋白质”或“多肽”包含氨基酸残基的聚合序列。术语“蛋白质”和“多肽”在本文中可互换地使用。贯穿本公开使用了遵照IUPAC-IUB生物化学术语联合委员会(Joint Commission on Biochemical Nomenclature, JCBN)定义的氨基酸的单字母和3字母代码。单字母X是指二十个氨基酸中的任一个。还应当理解,由于遗传密码的简并性,多肽可以由多于一种核苷酸序列编码。

[0027] 术语“前序列”或“前肽序列”是指在信号肽序列与成熟蛋白酶序列之间的、蛋白酶的正确折叠和分泌所必需的氨基酸序列;它们有时被称为分子内伴侣。前序列或前肽序列的切割产生成熟的活性蛋白酶。细菌丝氨酸蛋白酶通常表示为前酶。例如,在WO 2016/205710中提供了经修饰的前肽的实例。

[0028] 术语“信号序列”和“信号肽”是指可以参与蛋白质的成熟或前体形式的分泌或定向转运的氨基酸残基序列。典型地,信号序列位于前体或成熟蛋白序列的N-末端。信号序列可以是内源的或外源的。成熟蛋白中一般不存在信号序列。典型地,在蛋白转运后,信号序列通过信号肽酶从该蛋白切割。

[0029] 术语“成熟”形式的蛋白质、多肽或肽是指没有信号肽序列和前肽序列的功能形式的蛋白质、多肽或肽。

[0030] 术语“前体”形式的蛋白质或肽是指具有可操作地连接到该蛋白质的氨基或羰基末端的前序列的成熟形式的蛋白质。前体还可以具有可操作地连接到前序列的氨基末端的“信号”序列。前体还可以具有翻译后活性中涉及的另外的多肽(例如,从其切割以留下成熟形式的蛋白质或肽的多肽)。

[0031] 关于多肽,术语“野生型”是指在一个或多个氨基酸位置处不包括人为的取代、插入或缺失的天然存在的多肽。类似地,关于多核苷酸,术语“野生型”是指在一个或多个核苷酸处不包括人为的取代、插入或缺失的天然存在的多核苷酸。然而,编码野生型多肽的多核苷酸不限于天然存在的多核苷酸,并且涵盖编码野生型或亲本多肽的任何多核苷酸。

[0032] 关于多肽,术语“亲本”包括提及天然存在的或野生型的多肽,或其中在一个或多个氨基酸位置处进行了人为取代、插入或缺失的天然存在的多肽。关于多肽,术语“亲本”还包括具有蛋白酶活性的任何多肽,该多肽充当用于改变(如取代、添加和/或缺失)的起始多肽,以产生与该起始多肽相比具有一个或多个改变的变体。即,亲本或参比多肽不限于天然存在的野生型多肽,并且涵盖任何野生型、亲本或参比多肽。类似地,关于多核苷酸,术语“亲本”可以指天然存在的多核苷酸或确实包括在一个或多个核苷酸处的人为取代、插入或缺失的多核苷酸。关于多核苷酸,术语“亲本”还包括编码具有蛋白酶活性的多肽的任何多核苷酸,该多核苷酸充当用于改变的起始多核苷酸,从而产生与该起始多核苷酸相比具有诸如取代、添加和/或缺失等修饰的变体蛋白酶。即,编码野生型、亲本或参比多肽的多核苷酸不限于天然存在的多核苷酸,并且涵盖编码野生型、亲本或参比多肽的任何多核苷酸。在一些实施例中,本文的亲本多肽包含具有SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列的多肽。

[0033] 术语“天然存在的”是指,例如,自然界中发现的序列和其中含有的残基(例如,多肽序列和其中含有的氨基酸或核苷酸序列和其中含有的核苷酸)。相反,术语“非天然存在的”是指,例如,自然界中未发现的序列和其中含有的残基(例如,多肽序列和其中含有的氨基酸或核苷酸序列和其中含有的核酸)。

[0034] 如本文所使用的,关于氨基酸残基位置,“对应于(corresponding to或

corresponds to)”或“对应”是指在蛋白质或肽中所列举位置处的氨基酸残基,或类似于、同源于或等同于蛋白质或肽中所列举残基的氨基酸残基。如本文所使用的,“对应区域”通常是指相关蛋白质或参比蛋白质中的类似位置。

[0035] 术语“衍生自”和“获得自”不仅是指由所讨论的生物体的菌株产生或可由其产生的蛋白质,而且还指由从这样的菌株分离的DNA序列编码并在含有这样的DNA序列的宿主生物体中产生的蛋白质。另外,该术语是指由合成的和/或cDNA来源的DNA序列编码并且具有所讨论的蛋白质的鉴定特征的蛋白质。举例来说,“衍生自芽孢杆菌属的蛋白酶”是指由芽孢杆菌属天然生产的具有蛋白水解活性的那些酶,以及丝氨酸蛋白酶,如由芽孢杆菌属来源生产但是通过使用遗传工程技术由用编码丝氨酸蛋白酶的核酸转化的其他宿主细胞生产的那些。

[0036] 在两个多核苷酸或多肽序列的上下文中,术语“同一性”是指在两个序列中的核苷酸或氨基酸在比对最大对应关系时相同,如使用以下描述的和本领域已知的序列比较或分析算法测量的。

[0037] 短语“%同一性”或“百分比同一性”或“PID”是指蛋白质序列同一性。百分比同一性可以使用本领域已知的标准技术来确定。可以通过比对序列以直接比较序列信息(例如通过使用诸如BLAST、MUSCLE或CLUSTAL等程序)来确定目的序列共有的百分比氨基酸同一性。BLAST算法描述于例如,Altschul等人,J Mol Biol[分子生物学杂志],215:403-410(1990)和Karlin等人,Proc Natl Acad Sci USA[美国国家科学院院报],90:5773-5787(1993)。氨基酸序列同一性百分比(%)值由匹配相同残基的数目除以“参比”序列的残基总数(包括由程序为最佳/最大比对创建的任何空位)来确定。BLAST算法将“参比”序列称为“查询”序列。

[0038] 如本文所使用的,“同源蛋白质”或“同源蛋白酶”是指在一级、二级和/或三级结构中具有不同相似性的蛋白质。当比对蛋白质时,蛋白质源性可以是指线性氨基酸序列的相似性。源性可以通过例如使用诸如BLAST、MUSCLE或CLUSTAL的程序进行的氨基酸序列比对来确定。蛋白序列的同源搜索可以使用来自NCBI BLAST的BLASTP和PSI-BLAST使用阈值(E值截止值)0.001进行。(Altschul等人,“Gapped BLAST and PSI BLAST a new generation of protein database search programs[空位BLAST和PSI BLAST:新一代蛋白质数据库搜索程序]”,Nucleic Acids Res[核酸研究],第1组;25(17):3389-402(1997))。BLAST程序使用几个搜索参数,其中大部分设置为默认值。NCBI BLAST算法按照生物相似性找到最相关的序列,但是不推荐用于小于20个残基的查询序列(Altschul等人,Nucleic Acids Res[核酸研究],25:3389-3402,1997和Schaffer等人,Nucleic Acids Res[核酸研究],29:2994-3005,2001)。用于核酸序列搜索的示例性默认BLAST参数包括:相邻字长阈值=11;E值截止值=10;评分矩阵(Scoring Matrix)=NUC.3.1(匹配=1,错配=-3);空位开放=5;以及空位延伸=2。氨基酸序列搜索的示例性默认BLAST参数包括:字长=3;E值截止值=10;评分矩阵=BLOSUM62;空位开放=11;以及空位延伸=1。使用该信息,可以将蛋白质序列分组和/或从中构建系统发生树。可以在例如VectorNTI Advance套件等程序中输入氨基酸序列,并且可以使用邻接(Neighbor Joining(NJ))法创建引导树(Saitou和Nei,Mol Biol Evol[分子生物学与进化],4:406-425,1987)。可以使用针对序列距离的Kimura校正并且忽略具有空位的位置来计算树结构。程序例如AlignX可以在系统发生树上

显示的分子名称之后的括号内显示计算的距离值。

[0039] 了解分子之间的同源性可以揭示分子的进化历史以及它们的功能信息;如果新测序的蛋白质与已经表征的蛋白质同源,则存在新蛋白质的生化功能的强烈指示。如果两个分子衍生自共同的祖先,则它们被称为是同源的。同源分子或同源物可以分为两类:旁系同源物和直系同源物。旁系同源物是存在于一个物种内的同源物。旁系同源物在它们的详细生化功能上往往不同。直系同源物是存在于不同物种内并且具有非常相似或相同功能的同源物。蛋白质超家族是可以推断出共同祖先的蛋白质的最大分组(进化枝)。通常这个共同祖先是基于序列比对和机械相似性。典型地,超家族含有几个在家族内显示序列相似性的蛋白质家族。基于MEROPS蛋白酶分类系统,术语“蛋白质宗族”通常用于蛋白酶超家族。如本文所使用的,术语“枯草杆菌蛋白酶”包括如在MEROPS-肽酶数据库中描述的S8丝氨酸蛋白酶家族的任何成员(Rawlings,N.D.等人(2016) Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors [蛋白水解酶及其底物和抑制剂的二十年MEROPS数据库]. *Nucleic Acids Res* [核酸研究] 44, D343-D350)。

[0040] CLUSTAL W算法是序列比对算法的另一个实例(参见Thompson等人, *Nucleic Acids Res* [核酸研究] 22:4673-4680, 1994)。CLUSTAL W算法的默认参数包括:空位开放罚分=10.0;空位延伸罚分=0.05;蛋白质权重矩阵=BLOSUM系列;DNA权重矩阵=IUB;延迟发散序列%=40;空位分隔距离=8;DNA转换权重=0.50;列表亲水残基=GPSNDQEKR;使用负性矩阵=关;切换特殊残基罚分=开;切换亲水罚分=开;以及切换结束空位分隔罚分=关。在CLUSTAL算法中,包括在任一末端发生的缺失。例如,在500个氨基酸的多肽的任一末端处(或多肽内)具有五个氨基酸缺失的变体相对于“参比”多肽将具有99% (495/500个同一的残基×100)的百分比序列同一性。这样的变体将由与该多肽具有“至少99%序列同一性”的变体所涵盖。

[0041] 当核酸或多核苷酸至少部分或完全地与其他组分(包括但不限于例如其他蛋白质、核酸、细胞等)分离时,该核酸或多核苷酸是“分离的”。类似地,当多肽、蛋白质或肽至少部分或完全地与其他组分(包括但不限于例如其他蛋白质、核酸、细胞等)分离时,该多肽、蛋白质或肽是“分离的”。以摩尔计,在组合物中分离的物种比其他物种更丰富。例如,分离的物种可以占存在的所有大分子物种的至少约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%、或约100%(以摩尔计)。优选地,将目的物种纯化至基本均一性(即,通过常规检测方法不能在组合物中检测到污染物物种)。可以分别使用本领域熟知的许多技术如核酸或蛋白质样品的琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳,接着通过染色后可视化来确定纯度和均一性。如果需要,可以使用高分辨率技术如高效液相色谱法(HPLC)或类似方法来纯化物质。

[0042] 术语“经纯化的”如应用于核酸或多肽时通常表示基本上不含其他组分的核酸或多肽,如通过本领域熟知的分析技术确定的(例如,纯化的多肽或多核苷酸在电泳凝胶、色谱洗脱液和/或经受密度梯度离心的介质中形成离散的带)。例如,在电泳凝胶中产生基本上一条带的核酸或多肽是“纯化的”。纯化的核酸或多肽是至少约50%纯的,通常是至少约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%、约99.5%、约99.6%、约99.7%、约99.8%或更加纯的(例如,按重量计或以摩尔计的百分比)。在相关意义上,当在应用纯化或富集技术之后存

在分子的浓度的大幅度增加时,对于该分子而言组合物被富集了。术语“富集”是指化合物、多肽、细胞、核酸、氨基酸或其他特定物质或组分以高于在起始组合物中的相对或绝对浓度存在于组合物中。

[0043] 术语“餐具”是指所有形式的餐具,包括所有形式的餐用器皿(例如盘子、杯子、玻璃杯、碗等);所有形式的刀具(例如勺子、刀、叉和上菜用具);所有形式的陶瓷;所有形式的塑料(例如三聚氰胺);以及所有的金属、瓷器、玻璃和丙烯酸制品(acrylics)。

[0044] 术语“清洁活性”是指在本公开的蛋白水解、水解、清洁或其他过程期间主要的条件下由丝氨酸蛋白酶多肽、变体或参比枯草杆菌蛋白酶实现的清洁性能。在一些实施例中,丝氨酸蛋白酶或参比枯草杆菌蛋白酶的清洁性能可以通过使用用于清洁在物品或表面上的一种或多种酶敏感性污渍(例如,由食物、草、血液、墨汁、奶、油和/或卵蛋白质(egg protein)引起的污渍)的各种测定来确定。本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体或参比枯草杆菌蛋白酶的清洁性能可以通过使在物品或表面上的污渍经受一个或多个标准洗涤条件并且通过使用各种色谱法、分光光度法或其他定量方法来评估污渍去除的程度来确定。示例性清洁测定和方法是本领域已知的,并且包括但不限于在WO 99/34011和US 6,605,458中描述的那些,以及包括在下面所提供的实例中的那些清洁测定和方法。

[0045] 本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体或参比枯草杆菌蛋白酶的术语“有效量”是指在特定清洁组合物中达到希望的酶活性水平的蛋白酶的量。这样的有效量可以由本领域普通技术人员容易地确定,并且基于许多因素,如所使用的特定蛋白酶、清洁应用、清洁组合物的特定组成、以及是否需要液体或干燥(例如,颗粒、片剂、棒状)组合物等。

[0046] 术语“辅助材料”是指除了本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体之外清洁组合物中包含的任何液体、固体或气体物质,或重组多肽或其活性片段。在一些实施例中,本公开的清洁组合物包括一种或多种清洁辅助材料。典型地,取决于清洁组合物的特定类型和形式(例如液体、颗粒、粉末、棒状、糊剂、喷雾、片剂、凝胶、泡沫或其他组合物)来选择每种清洁辅助材料。优选地,每种清洁辅助材料与在组合物中使用的蛋白酶相容。

[0047] 清洁组合物和清洁制剂包括适合于清洁、漂白、消毒和/或灭菌任何物体、物品和/或表面的任何组合物。这样的组合物和制剂包括但不限于例如液体和/或固体组合物,包括清洁或洗涤剂组合物(例如液体、片剂、凝胶、棒状、颗粒和/或固体衣物清洁或洗涤剂组合物和精细织物洗涤剂组合物);硬表面清洁组合物和制剂,例如用于玻璃、木材、陶瓷和金属台面和窗户;地毯清洁剂;烘箱清洁剂;织物清新剂;织物柔顺剂;以及纺织品、衣物增效清洁或洗涤剂组合物,衣物添加剂清洁组合物和衣物预去污(pre-spotter)清洁组合物;餐具洗涤组合物,包括手洗或手动餐具洗涤组合物(例如“手洗”或“手动”餐具洗涤剂)和自动餐具洗涤组合物(例如“自动餐具洗涤剂”)。本发明还可使用单一剂量单位形式,包括但不限于丸剂、片剂、胶囊锭(gelcap)或其他单一剂量单位如预先测量的粉末或液体。

[0048] 除非另有指示,否则如本文所使用的清洁组合物或清洁制剂包括颗粒或粉末形式的通用的或重垢洗涤剂,特别是清洁洗涤剂;液体、颗粒、凝胶、固体、片剂、糊剂或单位剂型的通用洗涤剂,特别是所谓的重垢液体(HDL)洗涤剂或重垢干洗(HDD)洗涤剂类型;液体精细织物洗涤剂;手洗或手动餐具洗涤剂,包括高起泡类型的那些;手洗或手动餐具洗涤剂、自动餐具洗涤剂、或餐具或桌面器具洗涤剂,包括用于家庭和机构使用的各种片剂、粉末、固体、颗粒、液体、凝胶和漂洗助剂类型;液体清洁和消毒剂,包括抗菌手洗类型、清洁棒、漱

口水、假牙清洁剂、洗车香波、地毯香波、浴室清洁剂；用于人类和其他动物的毛发香波和/或毛发漂洗剂；沐浴露和泡沫浴和金属清洁剂；以及清洁助剂，如漂白添加剂和“去污棒”或预处理类型。在一些实施例中，颗粒组合物是呈“紧密”形式；在一些实施例中，液体组合物是呈“浓缩”形式。

[0049] 关于旨在用于清洁污染或肮脏物体（包括特定织物和/或非织物物体或物品）的洗涤介质中使用的组合物，使用术语“洗涤剂组合物”或“洗涤剂制剂”。在一些实施例中，本公开的洗涤剂包含本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体，另外还包含一种或多种表面活性剂、一种或多种转移酶、水解酶、氧化还原酶、助洗剂（例如助洗剂盐）、漂白剂、漂白活化剂、上蓝剂、荧光染料、结块抑制剂、掩蔽剂、酶稳定剂、钙、酶活化剂、抗氧化剂、污垢释放聚合物和/或增溶剂。在一些情况下，助洗剂盐是硅酸盐和磷酸盐的混合物，优选具有比磷酸盐（例如三聚磷酸钠）更多的硅酸盐（例如偏硅酸钠）。一些实施例涉及不含有任何磷酸盐（例如磷酸盐或磷酸盐助洗剂）的清洁组合物或洗涤剂组合物。

[0050] 短语“一种或多种基本上不含硼的组合物”或“一种或多种基本上不含硼的洗涤剂”分别是指含有痕量硼（例如，小于约1000ppm（1mg/kg或1mg/L等于1ppm）、小于约100ppm、小于约50ppm、小于约10ppm、或小于约5ppm、或小于约1ppm）的一种或多种组合物或一种或多种洗涤剂，该硼可能来自其他组合物或洗涤剂成分。

[0051] 术语“漂白”是指在足够长的时间内和/或在适当的pH和/或温度条件下处理材料（例如织物、衣物、纸浆等）或表面以实现该材料的增白（即变白）和/或清洁。适合于漂白的化学品的实例包括但不限于例如 ClO_2 、 H_2O_2 、过酸、 NO_2 等。漂白剂还包括酶促漂白剂例如过水解酶和芳基酯酶。另一个实施例涉及包含本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体和一种或多种过水解酶的组合物，例如像描述于WO 2005/056782、WO 2007/106293、WO 2008/063400、WO 2008/106214、和WO 2008/106215中的过水解酶。

[0052] 术语蛋白酶（例如，本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体、或其重组多肽或活性片段）的“洗涤性能”是指与不添加本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体至组合物的洗涤剂相比，本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体对洗涤提供另外的清洁性能的清洁贡献。在相关洗涤条件下比较洗涤性能。在一些测试系统中，其他相关因素，如洗涤剂组合物、泡沫浓度（sud concentration）、水硬度、洗涤力学、时间、pH和/或温度能按以下这样的方式进行控制：模仿在某些细分市场（例如手洗或手动餐具洗涤、自动餐具洗涤、餐具清洁、桌面器具清洁、织物清洁等）中对于家庭应用典型的一种或多种条件。

[0053] 本文使用短语“相关洗涤条件”来指示在手洗餐具洗涤、自动餐具洗涤或衣物洗涤剂细分市场中实际用于家庭中的条件，特别是洗涤温度、时间、洗涤力学、泡沫浓度、洗涤剂类型和水硬度。

[0054] 术语“餐具洗涤”是指家用餐具洗涤和工业餐具洗涤，并且涉及自动餐具洗涤（例如用餐具洗涤机器洗涤）和手动餐具洗涤（例如用手洗涤）两者。

[0055] 术语“消毒”是指从表面去除污染物，以及在物品表面上抑制或杀死微生物。

[0056] 本文中清洁组合物的术语“紧密”形式最好通过密度来反映，并且就组合物而言通过无机填料盐的量来反映。无机填充剂盐是呈粉末形式的洗涤剂组合物的常规成分。在常规洗涤剂组合物中，填充剂盐以基本量存在，典型地为按总组合物的重量计约17%至约35%。相比之下，在紧密的组合物中，填充剂盐以不超过总组合物的约15%的量存在。在一

些实施例中,填充剂盐以按组合物的重量计不超过约10%、或更优选地约5%的量存在。在一些实施例中,无机填充剂盐选自硫酸盐和氯化物的碱盐和碱土金属盐。在一些实施例中,填充剂盐是硫酸钠。

[0057] 本文公开了可用于清洁应用和清洁方法以及各种工业应用的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体。本文还公开了一种或多种分离的、重组的、基本上纯的或非天然存在的枯草杆菌蛋白酶变体。在一些实施例中,本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体可用于清洁应用中,并且可以掺入可用于清洁有需要的物品或表面的方法中的清洁组合物中。

[0058] 在一个实施例中,提供了枯草杆菌蛋白酶变体,其中该变体包含在选自由以下组成的组的位置处的一个、两个、三个、四个或更多个氨基酸取代:39、74、99、126、127、128、198、211、212和242,其中这些位置根据SEQ ID NO:1进行编号,并且其中该变体与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少80%同一性。

[0059] 在一个实施例中,提供了枯草杆菌蛋白酶变体,其中该变体包含在选自由以下组成的组的位置处的一个、两个、三个、四个、五个或更多个氨基酸取代:X039E、X074D、X099R、X126A、X127E、X128G、X198A、X198G、X211Q、X212Q和X242D,其中这些位置根据SEQ ID NO:1进行编号,并且其中该变体与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少80%同一性。在一个实施例中,提供了枯草杆菌蛋白酶变体,其中该变体包含在选自由以下组成的组的位置处的一个、两个、三个、四个、五个或更多个氨基酸取代:P039E、N074D、S099R、S126A、P127E、S128G、N198A、N198G、L211Q、N212Q和N242D,其中这些位置根据SEQ ID NO:1进行编号,并且其中该变体与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少80%同一性。

[0060] 在另一个实施例中,枯草杆菌蛋白酶变体包含选自由以下组成的组的一个、两个、三个、四个、五个或更多个氨基酸取代:i) X099R+X211Q以及选自由以下组成的组的至少一个、两个、三个或更多个另外的取代的组合:X039E、X074D、X126A、X127E、X128G、X198A、X198G、X212Q和X242D; ii) 选自X126A+X198A/G+X212Q的取代以及选自由以下组成的组的至少一个、两个、三个或更多个另外的取代的组合:X039E、X074D、X099R、X127E、X128G、X211Q和X242D; iii) S099R+L211Q以及选自由以下组成的组的至少一个、两个、三个或更多个另外的取代的组合:P039E、N074D、S126A、P127E、S128G、N198A、N198G、N212Q和N242D; iv) 选自S126A+N198A/G+N212Q的取代以及选自由以下组成的组的至少一个、两个、三个或更多个另外的取代的组合:P039E、N074D、S099R、P127E、S128G、L211Q和N242D,其中这些氨基酸位置通过与SEQ ID NO:1的氨基酸序列相对应来编号,并且其中该变体与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少80%同一性。

[0061] 在另一个实施例中,提供了枯草杆菌蛋白酶变体,其中该变体包含选自由以下组成的组的一个、两个、三个或更多个取代:P039E、N074D、S099R、S126A、P127E、S128G、N198A、N198G、L211Q、N212Q和N242D,其中这些氨基酸位置通过与SEQ ID NO:1的氨基酸序列相对应来编号,该变体在血液奶墨水(BMI)、PAS-38、烘焙奶酪和法式焦糖布丁测定(如实例2中提供的)中的一种、两种、三种或全部中表现出改善的性能(PI值 \geq 1.1),或在Tris-EDTA缓冲液中与具有SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列的亲本/参比枯草杆菌蛋白酶相比表现出改善的稳定性,或既在BMI、PAS-38、烘焙奶酪和法式焦糖布丁测定(如实例2中提供的)中的一种、两种、三种或全部中表现出改善的性能(PI值 \geq 1.1),又在Tris-EDTA缓冲液中与具有SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列的亲本/参比枯草杆菌蛋白酶相比表现出改善的稳定性。

[0062] 在另一个实施例中,提供了枯草杆菌蛋白酶变体,其中该变体包含选自以下的氨基酸取代的组合:N074D-S099R-S126A-S128G-L211Q-N212Q;S099R-P127E-S128G-L211Q;P039E-S099R-S126A-S128G-N198G-N212Q-N242D;N074D-S099R-S126A-S128G-N198G-L211Q-N212Q;S099R-P127E-N198G-L211Q-N212Q;S126A-N198G-L211Q-N212Q;S099R-S126A-P127E-N198G-L211Q-N212Q;S099R-S126A-P127E-L211Q-N212Q;S128G-L211Q;P039E-N198G-N212Q;S099R-S126A-P127E-S128G-N198G-N212Q;S099R-S126A-P127E-L211Q;P039E-S099R-S126A-S128G-N198G;P039E-S126A-S128G-N198G-N212Q;P039E-S099R-S126A-P127E;P039E-S126A-N198G-L211Q;P039E-L211Q-N212Q;P039E-S126A-N198G;P039E-S099R-S128G-N198G-L211Q-N212Q-N242D;N074D-S128G-N198G-N212Q;P039E-S099R-S126A-P127E-S128G-N212Q;P039E-S126A-N198G-L211Q-N212Q;P039E-N074D-S099R-S128G-N198G-N212Q;P039E-S126A-N198G-N212Q;P039E-S126A-L211Q-N212Q;P039E-N074D-S099R-S126A-S128G-N198G-N212Q;P039E-S099R-S126A-S128G-N198G-L211Q-N212Q-N242D;P039E-S099R-S126A-N198G-L211Q-N212Q-N242D;S126A-N212Q-N242D;P039E-S099R-P127E-L211Q-N212Q;N074D-S099R-S126A-L211Q-N212Q-N242D;P039E-S099R-P127E-L211Q-N212Q;N074D-S099R-S126A-L211Q-N212Q-N242D;P039E-S099R-P127E-N198G-L211Q;P039E-N074D-S099R-S126A-S128G-N198G-N242D;P039E-N198G-L211Q-N242D;P039E-N074D-S099R-P127E-S128G-N198G-N212Q;P039E-N074D-S099R-S128G-N198G-L211Q-N212Q-N242D;P039E-N074D-S099R-S126A-P127E-S128G-N198G-N212Q;P039E-N074D-S126A-N198G-L211Q;P039E-S099R-S126A-L211Q-N212Q-N242D;S099R-S126A-P127E-N198G-L211Q-N242D;P039E-S099R-P127E-S128G-N198G-N212Q-N242D;P039E-N074D-S099R-S126A-S128G-N212Q-N242D;N074D-S099R-P127E-S128G-L211Q;N074D-S099R-P127E-S128G-N198A;N074D-S099R-P127E-S128G-N198A-L211Q-N212Q;N074D-S099R-P127E-S128G-N212Q;N074D-S099R-S126A-P127E-S128G-L211Q;N074D-S099R-S126A-P127E-S128G-N198G-N212Q;N074D-S099R-S126A-S128G-L211Q-N212Q-N242D;N074D-S099R-S126A-S128G-N212Q;N074D-S099R-S128G-N198G-L211Q-N212Q;N074D-S126A-L211Q-N212Q;N074D-S126A-N198A-L211Q;P039E-L211Q;P039E-N074D-S099R-S126A-S128G-L211Q-N212Q;P039E-S099R-P127E-S128G-L211Q;P039E-S099R-P127E-S128G-L211Q-N212Q;P039E-S099R-S126A-S128G-L211Q;P039E-S099R-S126A-S128G-L211Q-N242D;P039E-S099R-S126A-S128G-N198A-L211Q;P039E-S099R-S126A-S128G-N198A-L211Q-N212Q-N242D;P039E-S099R-S126A-S128G-N198G-L211Q;P039E-S099R-S126A-S128G-N198G-L211Q-N212Q;P039E-S099R-S128G-L211Q-N212Q;P039E-S126A-N198A-N212Q;P039E-S126A-S128G;P039E-S126A-S128G-N198A;P039E-S128G;P039E-S128G-N198A-L211Q-N212Q;P039E-S128G-N198A-N212Q;S099R-P127E-S128G;S099R-S126A-S128G-L211Q-N212Q-N242D;S126A-S128G、S126A-S128G-N242D;以及P039E-S099R-P127E-N198G-L211Q-N212Q,其中这些位置根据SEQ ID NO:1进行编号,并且其中该变体与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少80%同一性。

[0063] 另一个实施例涉及本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体,条件是一个或多个取代是非天然存在的。又甚至另外的实施例涉及本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体,其中所述变体(i)衍生自迟缓芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶;(ii)是分离的;(iii)具有蛋白水解活性;或(iv)包含(i)至(iii)的组合。仍又另一个实施例涉及本文所述的一种或

多种枯草杆菌蛋白酶变体,其中所述变体衍生自如下亲本多肽或参比多肽,该亲本多肽或参比多肽(i)与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%氨基酸序列同一性;或者(ii)与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有100%氨基酸序列同一性。在仍另一个实施例中,亲本包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。甚至另外的实施例涉及本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体,其中所述变体包含如下氨基酸序列,该氨基酸序列(i)与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或小于100%氨基酸序列同一性;(ii)与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或小于100%氨基酸序列同一性;(iii)与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有96%、97%、98%、99%或小于100%氨基酸序列同一性。

[0064] 在一个实施例中,提供了枯草杆菌蛋白酶变体,其中该变体包含在选自由以下组成的组的位置处的一个、两个、三个、四个、五个或更多个氨基酸取代:X039E、X074D、X099R、X126A、X127E、X128G、X198G、X211Q、X212Q和X242D,并且该变体进一步包含选自由以下组成的组的一个、两个、三个、四个、五个或更多个另外的取代:X003Q/T/V、X009C/D/E/Q、X024Q、X042A/C/L/R/W、X044D/E/Q、X054N、X056L/W/Y、X057D/M/N/T、X059D/R、X067S、X070A/V、X076D/N、X085D/E、X095S、X096D/E/R、X099E、X102F、X104A/W、X112V、X113T/W、X115E、X116R、X118D/I/K/N/T/V、X122I/M、X126Q/R/S、X127D/P、X128S、X134Q、X135H、X141W、X143R、X145W、X147C/N、X154D、X156E、X157D/P、X158C/E/T、X160A/D/G/Q、X165L、X166S、X176C/E、X179C/E/Q、X182C/D/E、X185N、X193M、X198D/V、X199I、X200C/E/I/K/L/T/V/W、X203W、X204I、X205P、X206A/D/G/N、X210I/T/V、X211C/L/M、X212S/T、X216C/Q/R、X219A、X232H、X238T、X249C/E、X250A/C/D/V/Y、X253D/P、X254E/P、X255C/D/E/F/L/M/T/V/W/Y、以及X256C/D/E/N/Q,其中这些位置根据SEQ ID NO:1进行编号,并且其中该变体与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少80%同一性。

[0065] 本公开包括枯草杆菌蛋白酶变体,这些变体在表面暴露的氨基酸上具有一个或多个修饰。通过具有针对洗涤性能、洗涤剂组合物中的酶的稳定性和酶的热稳定性的最低性能指数,同时具有相对于亲本枯草杆菌蛋白酶改进的这些特征中的至少一个,酶变体的表面修饰可以用于洗涤剂组合物中。在一些实施例中,表面修饰使在那个位置处的氨基酸的疏水性和/或电荷发生改变。疏水性可以使用本领域已知的技术确定,例如White和Wimley描述的那些(White, S.H.和Wimley, W.C., (1999) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* [生物物理学与生物分子结构年评] 28: 319-65)。如本文所使用的,“表面性质”可用于指静电电荷、以及例如蛋白质表面展现的疏水性和亲水性等性质。在甚至仍另外的实施例中,本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体当与参比枯草杆菌蛋白酶或亲本枯草杆菌蛋白酶相比时具有一种或多种改善的性质;其中该改善的性质选自改善的洗涤剂清洁性能、改善的稳定性、及其组合。在另一个实施例中,亲本枯草杆菌蛋白酶包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。在另一个实施例中,亲本枯草杆菌蛋白酶是具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的多肽。在又另一个实施例中,改善的性质是(i)改善的洗涤剂清洁性能,其中所述变体具有 ≥ 1.1 的BMI、烘焙奶酪、法式焦糖布丁和/或蛋污渍清洁PI;和/或(ii)改善的稳定性,其中所述变体

与亲本或参比枯草杆菌蛋白酶相比具有更高的残余活性。在仍又一个实施例中,洗涤剂清洁性能根据实例2的ADW或衣物洗涤剂测定中的清洁性能进行测量;和/或稳定性根据实例2的稳定性测定进行测量。

[0066] 在氧化、螯合剂、变性剂、表面活性剂、热和/或pH稳定的蛋白酶的上下文中,术语“增强的稳定性”或“改善的稳定性”是指与参比蛋白酶(例如,野生型蛋白酶或亲本蛋白酶)相比,随时间推移的较高地保留的蛋白水解活性。自溶已经被鉴定为液体洗涤剂中枯草杆菌蛋白酶活性丧失的一种模式。(Stoner等人,2004 *Protease autolysis in heavy-duty liquid detergent formulations: effects of thermodynamic stabilizers and protease inhibitors* [重垢液体洗涤剂制剂中的蛋白酶自溶:热力学稳定剂和蛋白酶抑制剂的作用], *Enzyme and Microbial Technology* [酶和微生物技术] 34:114-125)。

[0067] 关于蛋白酶变体,术语“热稳定(thermally stable)”和“热稳定的(thermostable)”和“热稳定性(thermostability)”是指在蛋白水解、水解、清洁或其他过程中普遍存在的条件(或“胁迫条件”)下,在给定的时间段内暴露于变化的温度后,与亲本或参比蛋白酶相比保留更大量的残余活性的蛋白酶。残余活性是测试后与该样品的初始活性相比残余的活性量,可以以百分比形式报告,例如残余活性%。“改变的温度”涵盖温度升高或降低。在一些实施例中,本文提供的变体蛋白酶在40°C至80°C的温度下暴露给定的时间段(例如,至少约5分钟、至少约20分钟、至少约60分钟、约90分钟、约120分钟、约180分钟、约240分钟、约300分钟、约360分钟、约420分钟、约480分钟、约540分钟、约600分钟、约660分钟、约720分钟、约780分钟、约840分钟、约900分钟、约960分钟、约1020分钟、约1080分钟、约1140分钟或约1200分钟)后保留至少约5%、约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约85%、约90%、约92%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%蛋白水解活性。在一些实施例中,使用实例2中所示的方法,本文提供的变体枯草杆菌蛋白酶的残余活性比亲本或参比蛋白酶的残余活性高。

[0068] 本文提供的枯草杆菌蛋白酶变体可用于生产各种组合物,例如酶组合物和清洁组合物或洗涤剂组合物。酶组合物包含如本文提供的枯草杆菌蛋白酶变体。酶组合物可以呈任何形式,例如颗粒、液体制剂、或酶浆料。

[0069] 酶颗粒可以通过以下方式制成:例如旋转雾化、湿法造粒、干法造粒、喷雾干燥、圆盘造粒、挤出、锅涂层、滚圆、转鼓造粒、流化床结块、高剪切造粒、流化床喷雾涂层、结晶、沉淀、乳液胶凝、旋转盘式雾化和其他浇铸方法以及球形化工艺。颗粒的核可以是颗粒本身或者是分层颗粒的内核。

[0070] 核可以包含一种或多种水溶性剂或一种或多种水分散性剂,包括但不限于硫酸钠、氯化钠、硫酸镁、硫酸锌和硫酸铵、柠檬酸、糖(例如,蔗糖、乳糖、葡萄糖、粒状蔗糖、麦芽糖糊精和果糖)、增塑剂(例如,多元醇、尿素、邻苯二甲酸二丁酯和邻苯二甲酸二甲酯)、纤维材料(例如,纤维素和纤维素衍生物,诸如羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素和羟乙基纤维素)、磷酸盐、钙、蛋白酶抑制剂及其组合。合适的分散性剂包括但不限于粘土、糖丸(糖和淀粉的组合;例如,淀粉-蔗糖糖丸-ASNP)、滑石、硅酸盐、羧甲基纤维素、淀粉及其组合。

[0071] 在一些实施例中,核主要包含硫酸钠。在一些实施例中,核基本上由硫酸钠组成。在特定的实施例中,核仅由硫酸钠组成。

[0072] 在一些实施例中,核包含如本文提供的枯草杆菌蛋白酶变体。在其他实施例中,核

除了蛋白酶之外还包含一种或多种酶。在其他实施例中,核是惰性的并且不包含酶。

[0073] 在一些实施例中,核是酶粉,包括含有酶的UFC。可以将酶粉喷雾干燥,并且可以任选地与本文列出的任何水溶性剂或水分散性剂掺和。酶可以是或可以包括待稳定的蛋白酶,在这种情况下,酶粉应进一步包括稳定剂。

[0074] 在一些实施例中,核被至少一个涂层涂覆。在特定的实施例中,核被至少两个涂层涂覆。在另一个特定的实施例中,核被至少三个涂层涂覆。用于一个或多个涂层的材料可以适合用于清洁组合物和/或洗涤剂组合物中(参见,例如US20100124586、WO 9932595和US 5324649)。

[0075] 在一些实施例中,涂层包含以下材料中的一种或多种:无机盐(例如,硫酸钠、氯化钠、硫酸镁、硫酸锌和硫酸铵)、柠檬酸、糖(例如,蔗糖、乳糖、葡萄糖和果糖)、增塑剂(例如,多元醇、尿素、邻苯二甲酸二丁酯和邻苯二甲酸二甲酯)、纤维材料(例如,纤维素和纤维素衍生物,诸如羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素和羟乙基纤维素)、粘土、糖丸(糖和淀粉的组合)、硅酸盐、羧甲基纤维素、磷酸盐、淀粉(例如,玉米淀粉)、脂肪、油(例如,菜籽油和石蜡油)、脂质、乙烯基聚合物、乙烯基共聚物、聚乙烯醇(PVA)、增塑剂(例如,多元醇、尿素、邻苯二甲酸二丁酯、邻苯二甲酸二甲酯和水)、抗结块剂(例如,滑石、粘土、无定形二氧化硅和二氧化钛)、消泡剂(诸如FOAMBLAST 882[®]和EROL 6000K[®])和滑石。US 20100124586、WO 9932595和US 5324649详述了用于涂层的合适组分。

[0076] 在一些实施例中,涂层含糖(例如,蔗糖、乳糖、葡萄糖、粒状蔗糖、麦芽糖糊精和果糖)。在一些实施例中,涂层包含聚合物,诸如聚乙烯醇(PVA)。用于掺入多层颗粒的一个或多个涂层中的合适的PVA包括具有低度至高度粘性的部分水解的、完全水解的和中度水解的PVA。在一些实施例中,涂层包含无机盐,诸如硫酸钠。

[0077] 在一些实施例中,至少一个涂层是酶涂层。在一些实施例中,核被至少两个酶层涂覆。在另一个实施例中,核被至少三个或更多个酶层涂覆。

[0078] 在一些实施例中,酶是与选自由以下组成的组的一种或多种另外的酶组合的蛋白酶:酰基转移酶、 α -淀粉酶、 β -淀粉酶、 α -半乳糖苷酶、阿拉伯糖苷酶、芳基酯酶、 β -半乳糖苷酶、角叉菜胶酶、过氧化氢酶、纤维二糖水解酶、纤维素酶、软骨素酶、角质酶、分散蛋白、内切- β -1,4-葡聚糖酶、内切- β -甘露聚糖酶、酯酶、外切-甘露聚糖酶、半乳聚糖酶、葡糖淀粉酶、半纤维素酶、氨基己糖苷酶、透明质酸酶、角蛋白酶、漆酶、乳糖酶、木质酶、脂肪酶、脂加氧酶、甘露聚糖酶、金属蛋白酶、核酸酶(例如DNA酶和/或RNA酶)、氧化酶、氧化还原酶、果胶裂合酶、果胶乙酰酯酶、果胶酶、戊聚糖酶、过水解酶、过氧化物酶、酚氧化酶、磷酸酶、磷酸二酯酶、磷脂酶、植酸酶、聚半乳糖醛酸酶、聚酯酶、另外的蛋白酶、支链淀粉酶、还原酶、鼠李糖半乳糖醛酸酶、 β -葡聚糖酶、鞣酸酶、转谷氨酰胺酶、黄原胶裂解酶、木聚糖乙酰酯酶、木聚糖酶、木葡聚糖酶、木糖苷酶、及其任何组合或混合物。通常,至少一个酶涂层包含至少一种蛋白酶。

[0079] 以上酶列表仅是实例,并不意味着排他性。任何酶都可以用于本文所述的颗粒中,包括细菌、真菌、酵母来源的野生型酶、重组酶和变体酶,以及酸性酶、中性酶或碱性酶。

[0080] 另一个实施例涉及清洁表面的方法,其中该方法包括使需要清洁的表面或物品与有效量的如本文提供的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体或如本文提供的含有一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体的组合物接触。在一些实施例中,需要清洁的表面或物品包含表面上

的蛋白质污渍。在一些实施例中,需要清洁的表面或物品包含蛋白质污渍或法式焦糖布丁污渍、或BMI污渍或蛋污渍或烘焙奶酪污渍。术语“污渍”包含物品(例如硬表面物品(例如餐具)或纺织品)的表面上的任何类型的污垢。在一些实施例中,污渍是蛋白质污渍。如本文所使用的,“蛋白质污渍”是含有蛋白质的污渍或污垢。

[0081] 另外的实施例涉及清洁蛋白质污渍的方法,该方法包括使需要清洁的表面或物品与有效量的如本文提供的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体或如本文提供的含有一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体的组合物接触。

[0082] 另一个实施例涉及清洁法式焦糖布丁污渍的方法,该方法包括使需要清洁的表面或物品与有效量的如本文提供的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体或如本文提供的含有一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体的组合物接触。

[0083] 另一个实施例涉及清洁蛋污渍或蛋黄污渍的方法,该方法包括使需要清洁的表面或物品与有效量的如本文提供的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体或含有一种或多种这样的枯草杆菌蛋白酶变体的组合物接触。

[0084] 另一个实施例涉及清洁烘焙奶酪污渍的方法,该方法包括使需要清洁的表面或物品与有效量的如本文提供的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体或含有一种或多种这样的枯草杆菌蛋白酶变体的组合物接触。

[0085] 另一个实施例涉及清洁BMI污渍的方法,该方法包括使需要清洁的表面或物品与有效量的如本文提供的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体或含有一种或多种这样的枯草杆菌蛋白酶变体的组合物接触。

[0086] 在甚至另外的实施例中,本文所述的方法中使用的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体包含如下氨基酸序列,该氨基酸序列与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或小于100%氨基酸序列同一性。在又一个实施例中,当与SEQ ID NO:1相比时,本文所述的清洁法式焦糖布丁污渍的方法中使用的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体具有 ≥ 1.1 的法式焦糖布丁污渍清洁PI。在仍又一个实施例中,当与SEQ ID NO:1相比时,本文所述的清洁法式焦糖布丁污渍的方法中使用的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体具有 ≥ 1.1 的法式焦糖布丁污渍清洁PI,其中所述变体的法式焦糖布丁污渍清洁性能根据实例2中描述的法式焦糖布丁测定进行测量。仍又一个实施例涉及清洁本文所述的法式焦糖布丁污渍的方法,条件是用于所述方法中的一种或多种枯草杆菌蛋白酶包含一种或多种非天然存在的取代。在又一个实施例中,当与SEQ ID NO:1相比时,本文所述的清洁烘焙奶酪污渍的方法中使用的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体具有 ≥ 1.1 的烘焙奶酪污渍清洁PI。在仍又一个实施例中,当与SEQ ID NO:1相比时,本文所述的清洁烘焙奶酪污渍的方法中使用的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体具有 ≥ 1.1 的烘焙奶酪污渍清洁PI,其中该变体的烘焙奶酪污渍清洁性能根据实例2中描述的烘焙奶酪测定进行测量。仍又一个实施例涉及清洁本文所述的烘焙奶酪污渍的方法,条件是用于所述方法中的一种或多种枯草杆菌蛋白酶包含一种或多种非天然存在的取代。在又一个实施例中,当与SEQ ID NO:1相比时,本文所述的清洁蛋黄污渍的方法中使用的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体具有 ≥ 1.1 的蛋黄污渍清洁PI。在仍又一个实施例中,当与SEQ ID NO:1相比时,本文所述的清洁蛋黄污渍的方法中使用的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体具有 ≥ 1.1 的蛋黄污渍清洁PI,其中该变体的蛋黄污渍

清洁性能根据实例2中描述的蛋黄测定进行测量。仍又另一个实施例涉及清洁本文所述的蛋黄污渍的方法,条件是用于所述方法中的一种或多种枯草杆菌蛋白酶包含一种或多种非天然存在的取代。在又另一个实施例中,当与SEQ ID NO:1相比时,本文所述的清洁BMI污渍的方法中使用的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体具有 ≥ 1.1 的BMI污渍清洁PI。在仍又另一个实施例中,当与SEQ ID NO:1相比时,本文所述的清洁BMI污渍的方法中使用的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体具有 ≥ 1.1 的BMI污渍清洁PI,其中该变体的BMI污渍清洁性能根据实例2中描述的BMI测定进行测量。仍又另一个实施例涉及清洁本文所述的BMI污渍的方法,条件是用于所述方法中的一种或多种枯草杆菌蛋白酶包含一种或多种非天然存在的取代。在另外的实施例中,本文所述的方法中使用的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体 (i) 是分离的; (ii) 具有蛋白水解活性;或 (iii) 包含 (i) 和 (ii) 的组合。

[0087] 在另一个实施例中,本文提供的变体包含具有选自表4和表5中列出的那些组成的组的氨基酸取代的一种或多种变体,该一种或多种变体在一个或多个清洁测定(包括洗衣和餐具测定,例如,BMI、蛋、法式焦糖布丁、烘焙奶酪测定)中与具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的亲本枯草杆菌蛋白酶相比PI ≥ 1.1 ,或者在Tris EDTA稳定性测定中具有比亲本或参比枯草杆菌蛋白酶的残余活性更高的残余活性。

[0088] 本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体可以进行各种变化,如一个或多个氨基酸插入、缺失、和/或取代(保守或非保守的),包括这样的变化基本上不改变该变体的酶活性的情况。类似地,本发明的核酸也可以进行各种变化,如一个或多个密码子中一个或多个核苷酸的一个或多个取代,使得特定的密码子编码相同或不同的氨基酸,从而产生沉默变化(例如,当编码的氨基酸没有被核苷酸突变改变时)或非沉默变化;序列中一个或多个核苷酸(或密码子)的一个或多个缺失;序列中一个或多个核苷酸(或密码子)的一个或多个添加或插入;和/或序列中一个或多个核苷酸(或密码子)的切割或一个或多个截短。与由原始核酸序列编码的多肽酶相比,核酸序列中的许多这样的变化基本上不会改变所得的编码的多肽酶的酶活性。还可以对本文所述的核酸序列进行修饰以包括一个或多个密码子,这些密码子在表达系统(例如,细菌表达系统)中提供最佳表达,同时,如果需要,所述一个或多个密码子仍编码一个或多个相同的氨基酸。

[0089] 本文描述了一种或多种分离的、非天然存在的或重组的多核苷酸,该多核苷酸包含编码本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体、或重组多肽或其活性片段的核酸序列。本文所述的一种或多种核酸序列可用于本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体的重组生产(例如表达)中,典型地通过表达包含编码本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体或其片段的序列的质粒表达载体。一个实施例提供了编码本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体的核酸,其中该变体是具有蛋白水解活性的成熟形式。在一些实施例中,用同源前肽序列重组表达本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体。在其他实施例中,用异源前肽序列(例如,来自迟缓芽孢杆菌的前肽序列(SEQ ID NO:4)或其变体)重组表达本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体。

[0090] 本文所述的一种或多种核酸序列可以通过使用任何合适的合成、操作和/或分离技术或其组合来产生。例如,本文所述的一种或多种多核苷酸可以使用本领域技术人员熟知的标准核酸合成技术如固相合成技术来产生。在这样的技术中,典型地合成高达50个或更多个核苷酸碱基的片段,然后连接(例如通过酶或化学连接方法)以基本上形成任何希望

的连续核酸序列。还可以通过本领域已知的任何合适的方法来促进本文所述的一种或多种多核苷酸的合成,包括但不限于使用以下方法的化学合成:经典的亚磷酰胺方法(参见例如,Beaucage等人,Tetrahedron Letters[四面体快报]22:1859-69(1981)),或如典型地在自动合成方法中所实践的在Matthes等人,EMBO J.[欧洲分子生物学学会杂志]3:801-805(1984)中描述的方法。本文所述的一种或多种多核苷酸也可以通过使用自动DNA合成仪产生。可以从各种商业来源(例如,ATUM(DNA 2.0),美国加利福尼亚州纽瓦克(Newark,CA,USA);生命技术公司(Life Tech)(GeneArt),美国加利福尼亚州卡尔斯巴德(Carlsbad,CA,USA);金斯瑞公司(GenScript),加拿大安大略省(Ontario,Canada);Base Clear B.V.,荷兰莱顿市(Leiden,Netherlands);集成DNA技术公司(Integrated DNA Technologies),美国伊利诺伊州斯科基(Skokie,IL,USA);银杏生物工作室(Ginkgo Bioworks)(Gen9),美国马萨诸塞州波士顿(Boston,MA,USA);以及特威斯特生物科学公司(TwistBioscience),美国加利福尼亚州旧金山(San Francisco,CA,USA))订购定制核酸。用于合成核酸的其他技术和相关原理由例如,Itakura等人,Ann.Rev.Biochem.[生物化学年鉴]53:323(1984)和Itakura等人,Science[科学]198:1056(1984)描述。

[0091] 用于修饰核酸的重组DNA技术是本领域熟知的,例如像限制性内切酶消化、连接、逆转录和cDNA产生、以及聚合酶链式反应(例如PCR)。本文所述的一种或多种多核苷酸还可以通过使用一个或多个寡核苷酸探针来筛选cDNA文库而获得,这些探针可以与编码本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体、或重组多肽或其活性片段的多核苷酸杂交或对其进行PCR扩增。用于筛选并分离cDNA克隆的程序以及PCR扩增程序是本领域技术人员熟知的并且描述于本领域技术人员已知的标准参考文献中。本文所述的一种或多种多核苷酸可以通过例如已知的诱变程序(例如,定点诱变、位点饱和诱变和体外重组)改变天然存在的多核苷酸主链(例如,编码本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体或参比枯草杆菌蛋白酶的多核苷酸主链)来获得。适合于产生编码本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体的经修饰的本文所述的多核苷酸的多种方法是本领域已知的,所述方法包括但不限于例如位点饱和诱变、扫描诱变、插入诱变、缺失诱变、随机诱变、定点诱变和定向进化、以及各种其他重组方法。

[0092] 另外的实施例涉及一种或多种载体,其包含本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体(例如,编码本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体的多核苷酸);表达载体或表达盒,所述表达载体或表达盒包含本文所述的一种或多种核酸或多核苷酸序列;分离的、基本上纯的、或重组的DNA构建体,所述构建体包含本文所述的一种或多种核酸或多核苷酸序列;分离的或重组的细胞,所述细胞包含本文所述的一种或多种多核苷酸序列;以及组合物,这些组合物包含一种或多种这样的载体、核酸、表达载体、表达盒、DNA构建体、细胞、细胞培养物或其任何组合或混合物。

[0093] 一些实施例涉及一种或多种重组细胞,该一种或多种重组细胞包含本文所述的一种或多种载体(例如表达载体、盒或DNA构建体),该一种或多种载体包含本文所述的一种或多种核酸或多核苷酸序列。一些这样的重组细胞使用这样的至少一种载体转化或转染,尽管其他方法在本领域中是可获得且已知的。这样的细胞典型地称为宿主细胞。一些这样的细胞包含细菌细胞,包括但不限于芽孢杆菌属细胞,如枯草芽孢杆菌细胞。其他实施例涉及包含本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶的重组细胞(例如,重组宿主细胞)。

[0094] 在一些实施例中,本文所述的一种或多种载体是表达载体或表达盒,该表达载体或表达盒包含可操作地连接到有效的基因表达所需的一种或多种另外的核酸区段上(例如,可操作地连接到本文所述的一种或多种多核苷酸序列的启动子)的本文所述的一种或多种多核苷酸序列。载体可以包括转录终止子和/或选择基因(例如抗生素抗性基因),该转录终止子和/或选择基因能够通过含有抗微生物剂的培养基中生长来实现质粒感染的宿主细胞的连续培养维持。

[0095] 表达载体可以衍生自质粒或病毒DNA,或在替代性实施例中,含有这两者的元件。示例性载体包括但不限于pC194、pJH101、pE194、pHP13(参见Harwood和Cutting[编辑],第3章,Molecular Biological Methods for Bacillus[针对芽孢杆菌的分子生物学方法], John Wiley&Sons[约翰威利父子公司](1990));对于枯草芽孢杆菌适合的复制质粒包括第92页列出的那些)。(还参见,Perego,“Integrational Vectors for Genetic Manipulations in Bacillus subtilis[在枯草芽孢杆菌中用于遗传操作的整合载体”]; Sonenshein等人,[编辑];“Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics[枯草芽孢杆菌和其他革兰氏阳性细菌:生物化学、生理学和分子遗传学”, American Society for Microbiology[美国微生物学会], Washington, D.C. [华盛顿](1993),第615-624页;和p2JM103BBI)。

[0096] 为了在细胞中表达和生产目的蛋白(例如,本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体),包含编码本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体的多核苷酸的一种或多种拷贝(并且在一些情况下包含多个拷贝)的一种或多种表达载体或表达盒在适合于变体表达的条件下被转化到细胞中。在一些实施例中,将编码本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体的多核苷酸序列(以及包含在载体中的其他序列)整合到宿主细胞的基因组中;然而在其他实施例中,包含编码本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体的多核苷酸序列的质粒载体在该细胞内保持为自主的染色体外元件。一些实施例提供了染色体外核酸元件以及整合到宿主细胞基因组中的输入性核苷酸序列。本文所述的载体可用于生产本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体。在一些实施例中,编码本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体的多核苷酸构建体存在于整合载体上,该整合载体能够将编码所述变体的多核苷酸整合到宿主染色体中并且任选地在宿主染色体中扩增。整合位点的实例是本领域技术人员熟知的。在一些实施例中,编码本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体的多核苷酸的转录通过如下启动子来实现,该启动子是亲本枯草杆菌蛋白酶的野生型启动子。在一些其他实施例中,启动子与本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体是异源的,但是在宿主细胞中具有功能。用于细菌宿主细胞的示例性启动子包括但不限于amyE、amyQ、amyL、pstS、sacB、pSPAC、pAprE、pVeg、pHpaII启动子;嗜热脂肪芽孢杆菌生麦芽糖淀粉酶基因的启动子;解淀粉芽孢杆菌(BAN)淀粉酶基因;枯草芽孢杆菌碱性蛋白酶基因;克劳氏芽孢杆菌碱性蛋白酶基因;短小芽孢杆菌(*B. pumilis*)木糖苷酶基因;苏云金芽孢杆菌cryIIIA;以及地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶基因。另外的启动子包括但不限于A4启动子,以及噬菌体 λ PR或PL启动子,以及大肠杆菌(*E. coli*) lac、trp或tac启动子,以及芽孢杆菌属rrn启动子(例如rrnB、rrnL和rrnE核糖体RNA启动子)及其变体。

[0097] 本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体可以在任何合适的微生物(包括细菌和真菌)的宿主细胞中产生。在一些实施例中,本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体

可以在革兰氏阳性细菌中产生。在一些实施例中,宿主细胞是芽孢杆菌属物种、链霉菌属(*Streptomyces*)物种、埃希氏菌属(*Escherichia*)物种、曲霉属(*Aspergillus*)物种、木霉属(*Trichoderma*)物种、假单胞菌属(*Pseudomonas*)物种、棒状杆菌属(*Corynebacterium*)物种、酵母属(*Saccharomyces*)物种或毕赤酵母属(*Pichia*)物种。在一些实施例中,本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体由芽孢杆菌属物种宿主细胞产生。可用于本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体的生产的芽孢杆菌属宿主细胞的实例包括但不限于:地衣芽孢杆菌、吉氏芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、短芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、嗜碱芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、克劳氏芽孢杆菌和巨大芽孢杆菌,以及芽孢杆菌属内的其他生物体。在一些实施例中,枯草芽孢杆菌宿主细胞用于生产本文所述的变体。USPN 5,264,366和4,760,025 (RE 34,606)描述了可以用于生产本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体的各种芽孢杆菌属宿主菌株,但是可以使用其他合适的菌株。

[0098] 可以用于生产本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体的几种细菌菌株包括非重组(即野生型)芽孢杆菌属菌株,以及天然存在的菌株和/或重组菌株的变体。在一些实施例中,宿主菌株是重组菌株,其中编码本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体的多核苷酸已经被引入宿主中。在一些实施例中,宿主菌株是枯草芽孢杆菌宿主菌株,特别是重组枯草芽孢杆菌宿主菌株。许多枯草芽孢杆菌菌株是已知的,包括但不限于例如1A6 (ATCC 39085)、168 (1A01)、SB19、W23、Ts85、B637、PB1753至PB1758、PB3360、JH642、1A243 (ATCC 39,087)、ATCC 21332、ATCC 6051、MI113、DE100 (ATCC 39,094)、GX4931、PBT 110、和PEP 211菌株(参见例如Hoch等人,*Genetics*[遗传学]73:215-228(1973);另请参见,US 4,450,235;US 4,302,544;和EP 0134048)。枯草芽孢杆菌作为表达宿主细胞的用途是本领域众所周知的(参见,例如,Palva等人,*Gene*[基因]19:81-87(1982);Fahnestock和Fischer,*J. Bacteriol.*[细菌学杂志],165:796-804(1986);和Wang等人,*Gene*[基因]69:39-47(1988))。

[0099] 在一些实施例中,芽孢杆菌属宿主细胞是包括至少一个以下基因中的突变或缺失的芽孢杆菌属:degU、degS、degR和degQ。在一些实施例中,突变是在degU基因中,并且在一些实施例中,突变为degU(Hy)32(参见例如,Msadek等人,*J. Bacteriol.*[细菌学杂志]172:824-834(1990);以及Olmos等人,*Mol. Gen. Genet.*[分子与普通遗传学]253:562-567(1997))。在一些实施例中,芽孢杆菌属宿主在以下中包含突变或缺失:scoC4(参见,例如,Caldwell等人,*J. Bacteriol.*[细菌学杂志]183:7329-7340(2001));spoIIE(参见,例如,Arigoni等人,*Mol. Microbiol.*[分子微生物学]31:1407-1415(1999));和/或oppA或opp操纵子的其他基因(参见例如,Perego等人,*Mol. Microbiol.*[分子微生物学]5:173-185(1991))。实际上,预期引起与oppA基因中的突变相同的表型的opp操纵子中的任何突变将可用于本文所述的经改变的芽孢杆菌属菌株的一些实施例中。在一些实施例中,这些突变单独发生,而在其他实施例中,存在突变的组合。在一些实施例中,可以用于生产本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体的经改变的芽孢杆菌属宿主细胞菌株是已经包含上述基因中的一个或多个的突变的芽孢杆菌属宿主菌株。另外,可使用包含内源蛋白酶基因的一个或多个突变和/或一个或多个缺失的芽孢杆菌属宿主细胞。在一些实施例中,芽孢杆菌属宿主细胞包含aprE和nprE基因的缺失。在其他实施例中,芽孢杆菌属宿主细胞包含5个蛋

白酶基因的缺失,而在其他实施例中,芽孢杆菌属宿主细胞包含9个蛋白酶基因的缺失(参见例如,US2005/0202535)。

[0100] 使用本领域已知的任何合适的方法用编码本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体的一种或多种核酸序列转化宿主细胞。利用质粒DNA构建体或载体将核酸(例如DNA)引入芽孢杆菌属细胞或大肠杆菌细胞并且将这样的质粒DNA构建体或载体转化到这样的细胞中的方法是熟知的。在一些实施例中,质粒随后从大肠杆菌细胞中分离并且转化到芽孢杆菌属细胞中。然而,使用介入微生物如大肠杆菌不是必需的,并且在一些实施例中,将DNA构建体或载体直接引入芽孢杆菌属宿主中。

[0101] 将本文所述的一种或多种核酸序列引入芽孢杆菌属细胞的示例性方法描述于,例如,Ferrari等人,“Genetics[遗传学]”,在Hardwood等人[编辑],*Bacillus*[芽孢杆菌属], Plenum Publishing Corp.[普莱南出版公司](1989),第57-72页;Saunders等人,*J.Bacteriol.*[细菌学杂志],157:718-726(1984);Hoch等人,*J.Bacteriol.*[细菌学杂志],93:1925-1937(1967);Mann等人,*Current Microbiol.*[现代微生物学],13:131-135(1986);Holubova,*Folia Microbiol.*[福里亚微生物学],30:97(1985);Chang等人,*Mol.Gen.Genet.*[分子与普通遗传学]168:11-115(1979);Vorobjeva等人,*FEMS Microbiol.Lett.*[FEMS微生物学快报]7:261-263(1980);Smith等人,*Appl.Env.Microbiol*[应用与环境微生物]51:634(1986);Fisher等人,*Arch.Microbiol.*[微生物学档案],139:213-217(1981);以及McDonald,*J.Gen.Microbiol*[遗传微生物学杂志]130:203(1984)。实际上,如转化等方法(包括原生质体转化和转染、转导和原生质体融合)是熟知的并且适用于本文。本领域已知的用于转化芽孢杆菌属细胞的方法包括例如质粒标记拯救转化等方法,其涉及通过携带部分同源的驻留质粒的感受态细胞摄取供体质粒(参见,Contente等人,*Plasmid*[质粒]2:555-571(1979);Haima等人,*Mol.Gen.Genet.*[分子与普通遗传学]223:185-191(1990);Weinrauch等人,*J.Bacteriol.*[细菌学杂志],154:1077-1087(1983);和Weinrauch等人,*J.Bacteriol.*[细菌学杂志],169:1205-1211(1987))。在该方法中,进入的供体质粒在模拟染色体转化的过程中与驻留的“辅助”质粒的同源区重组。

[0102] 除了通常使用的方法之外,在一些实施例中,用包含编码本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体的核酸的DNA构建体或载体直接转化宿主细胞(即,在引入宿主细胞之前,中间细胞不用于扩增或以其他方式处理DNA构建体或载体)。将本文所述的DNA构建体或载体引入宿主细胞包括本领域已知的将核酸序列(例如DNA序列)引入宿主细胞而不插入宿主基因组中的那些物理和化学方法。这样的方法包括但不限于氯化钙沉淀、电穿孔、裸DNA和脂质体。在另外的实施例中,DNA构建体或载体与质粒一起共转化而不插入质粒。在进一步的实施例中,通过本领域已知的方法从经改变的芽孢杆菌菌株中缺失选择标记(参见,Stahl等人,*J.Bacteriol.*[细菌学杂志]158:411-418(1984);以及Palmeros等人,*Gene*[基因]247:255-264(2000))。

[0103] 在一些实施例中,将转化细胞在常规营养培养基中培养。合适的特定培养条件,如温度、pH等是本领域技术人员已知的,并且详细描述于科学文献中。一些实施例提供了培养物(例如,细胞培养物),所述培养物包含本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体或核酸序列。

[0104] 在一些实施例中,将用编码本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体的一种或

多种多核苷酸序列转化的宿主细胞在允许所述变体表达的条件下在合适的营养培养基中培养,其后从培养物中回收所得的变体。在一些实施例中,通过常规程序从培养基中回收由细胞生产的变体,这些常规程序包括但不限于例如通过离心或过滤从培养基中分离宿主细胞、借助于盐(例如硫酸铵)沉淀上清液或滤液的蛋白质组分和层析法纯化(例如离子交换、凝胶过滤、亲和等)。

[0105] 在一些实施例中,由重组宿主细胞产生的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体被分泌到培养基中。编码纯化促进结构域的核酸序列可以用于促进该变体的纯化。包含编码本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体的多核苷酸序列的载体或DNA构建体可以进一步包含编码促进变体纯化的纯化促进结构域的核酸序列(参见例如,Kroll等人,DNA Cell Biol. [DNA细胞生物学]12:441-53(1993))。这样的纯化促进结构域包括但不限于例如金属螯合肽,如允许在固定化的金属上纯化的组氨酸-色氨酸模块(参见Porath,Protein Expr.Purif. [蛋白质表达与纯化]3:263-281[1992])、允许在固定化的免疫球蛋白上纯化的蛋白A结构域、以及在FLAGS延伸/亲和纯化系统中采用的结构域。还发现在纯化结构域和异源蛋白之间包含可切割的接头序列如因子XA或肠激酶(例如,可获自加利福尼亚州圣地亚哥的英杰公司(Invitrogen)的序列)可用于促进纯化。

[0106] 可以使用各种方法来确定宿主细胞中本文所述的一种或多种成熟枯草杆菌蛋白酶变体的生产水平。这样的方法包括但不限于例如利用对蛋白酶特异的多克隆或单克隆抗体的方法。示例性方法包括但不限于酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、荧光免疫测定(FIA)和荧光激活细胞分选术(FACS)。这些和其他测定法是本领域熟知的(参见例如,Maddox等人,J.Exp.Med. [实验医学杂志]158:1211(1983))。

[0107] 一些其他实施例提供了用于制备或生产本文所述的一种或多种成熟枯草杆菌蛋白酶变体的方法。成熟的枯草杆菌蛋白酶变体不包括信号肽或前肽序列。一些方法包括在重组细菌宿主细胞(例如像芽孢杆菌属细胞(例如,枯草芽孢杆菌细胞))中制备或生产本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体。其他实施例提供了生产本文描述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体的方法,其中该方法包括在有利于生产该变体的条件下培养包含重组表达载体的重组宿主细胞,该重组表达载体包含编码本文描述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体的核酸序列。一些这样的方法进一步包括从培养物中回收该变体。

[0108] 另外的实施例提供了生产本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体的方法,其中所述方法包括:(a)将包含编码该变体的核酸的重组表达载体或盒引入细胞群(例如,细菌细胞,如枯草芽孢杆菌细胞)中;和(b)在有利于生产由该表达载体或盒编码的变体的条件下在培养基中培养细胞。一些这样的方法进一步包括:(c)从细胞或从培养基中分离该变体。

[0109] 另外的实施例涉及改善枯草杆菌蛋白酶的清洁性能或稳定性的方法,该方法包括将枯草杆菌蛋白酶修饰为包含如本文提供的一个或多个取代、或取代的组合。

[0110] 除非另外指出,否则本文提供的所有组分或组合物水平参考该组分或组合物的活性水平给出,并且不包括可能存在于可商购的来源中的杂质,例如残余溶剂或副产物。酶组分重量是基于总的活性蛋白。除非另有指示,否则所有百分比和比率均按重量计算。除非另有指示,否则所有百分比和比率均基于总组合物计算。本文所述的组合物包括清洁组合物,如洗涤剂组合物。在示例的洗涤剂组合物中,通过按总组合物的重量计的纯酶表达酶水平

并且除非另外指定,否则按总组合物的重量计表达洗涤剂成分。

[0111] 在一个实施例中,本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体可用于清洁应用中,例如像但不限于清洁餐具物品或桌面器具物品、织物、医疗器械和具有硬表面(例如,桌子、桌面、墙、家具物品、地板、天花板的硬表面)的物品。在其他实施例中,本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体可用于消毒应用中,例如像但不限于消毒自动餐具洗涤剂或洗衣机。

[0112] 另一个实施例涉及包含本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体的组合物。在一些实施例中,组合物是清洁组合物。在其他实施例中,组合物是洗涤剂组合物。在又其他实施例中,该组合物选自衣物洗涤剂组合物、自动餐具洗涤(ADW)组合物、手洗(手动)餐具洗涤剂组合物、硬表面清洁组合物、眼镜清洁组合物、医疗器械清洁组合物、消毒剂(例如恶臭或微生物)组合物、和个人护理清洁组合物。在仍其他实施例中,组合物是衣物洗涤剂组合物、ADW组合物、或手洗(手动)餐具洗涤剂组合物。甚至仍进一步的实施例涉及织物清洁组合物,而其他实施例涉及非织物清洁组合物。在一些实施例中,清洁组合物不含硼。在其他实施例中,清洁组合物不含磷酸盐。在仍其他的实施例中,该组合物包含本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体以及一种或多种赋形剂、辅助材料、和/或另外的酶。

[0113] 在另一个实施例中,本公开提供了洗涤剂组合物(例如,ADW组合物),这些组合物包含表面活性剂和如本文提供的至少一种枯草杆菌蛋白酶变体。这样的组合物可进一步包含赋形剂、辅助材料、和/或另外的酶中的一种或多种。

[0114] 在又仍另外的实施例中,本文所述的组合物含有磷酸盐、不含磷酸盐、含有硼、不含硼、或是其组合。在其他实施例中,组合物是不含硼的组合物。在一些实施例中,不含硼的组合物是未添加硼酸盐稳定剂的组合物。在另一个实施例中,不含硼的组合物是含有小于5.5%硼的组合物。在仍另外的实施例中,不含硼的组合物是含有小于4.5%硼的组合物。在又仍另一个实施例中,不含硼的组合物是含有小于3.5%硼的组合物。在又仍另外的实施例中,不含硼的组合物是含有小于2.5%硼的组合物。在甚至另外的实施例中,不含硼的组合物是含有小于1.5%硼的组合物。在另一个实施例中,不含硼的组合物是含有小于1.0%硼的组合物。在仍另外的实施例中,不含硼的组合物是含有小于0.5%硼的组合物。在其他实施例中,组合物是不含或基本上不含酶稳定剂或肽抑制剂的组合物。

[0115] 在另一个实施例中,本文所述的一种或多种组合物是呈选自凝胶、片剂、粉末、颗粒、固体、液体、单位剂量及其组合的形式。在又另一个实施例中,本文所述的一种或多种组合物是呈选自低水紧密配方、低水HDL或单位剂量(UD)、或高水配方或HDL的形式。在一些实施例中,本文所述的清洁组合物是呈单位剂型。在其他的实施例中,单位剂型选自丸剂、片剂、胶囊、胶囊锭、小药囊、小袋、多隔室小袋和预先测量的粉末或液体。在一些实施例中,单位剂型被设计成在多隔室小袋(或其他单位剂型)内提供对成分的控制释放。合适的单位剂量和控制释放形式描述于例如EP 2100949、WO 02/102955、US 4,765,916、US 4,972,017、和WO 04/111178。在一些实施例中,单位剂型是包含在水溶性膜或小袋中的片剂或粉末。

[0116] 示例性衣物洗涤剂组合物包括但不限于例如液体和粉末衣物洗涤剂组合物。示例性硬表面清洁组合物包括但不限于例如用于清洁非餐具物品、非桌面器具物品、桌子、桌面、家具物品、墙壁、地板和天花板的硬表面的组合物。示例性硬表面清洁组合物描述于例如USPN 6,610,642、6,376,450和6,376,450中。示例性个人护理组合物包括但不限于用于

清洁假牙、牙齿、头发、隐形眼镜和皮肤的组合物。这样的口腔护理组合物的示例性组分包括在例如US 6,376,450中描述的那些。

[0117] 在一些实施例中,本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体在低温下清洁。在其他实施例中,本文所述的一种或多种组合物在低温下清洁。在其他实施例中,本文所述的一种或多种组合物包含有效量的本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体,这些变体对于清洁需要去除蛋白质污渍的表面有用或有效。

[0118] 在一些实施例中,掺入辅助材料,例如,用以辅助或增强清洁性能;用于处理待清洁的底物;或用以改变清洁组合物的美感,如在香水、着色剂、染料等的情况下。一个实施例涉及包含本文所述的一种或多种辅助材料和一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体的组合物。另一个实施例涉及包含本文所述的一种或多种辅助材料和一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体的组合物,其中该辅助材料选自:漂白催化剂、另外的酶、酶稳定剂(包括,例如酶稳定系统)、螯合剂(chelant)、光亮剂、污垢释放聚合物、染料转移剂、分散剂、泡沫抑制剂、染料、香料、着色剂、填充剂、光活化剂、荧光剂、织物调理剂、可水解表面活性剂、防腐剂、抗氧化剂、抗收缩剂、抗皱剂、杀菌剂、杀真菌剂、颜色点缀剂、银护理剂、抗晦暗剂、抗腐蚀剂、碱性来源、增溶剂、载剂、加工助剂、色素、pH控制剂、表面活性剂、助洗剂、螯合剂(chelating agent)、染料转移抑制剂、沉积助剂、催化材料、漂白活化剂、漂白增效剂、过氧化氢、过氧化氢源、预制的过酸、聚合物分散剂、粘土污垢去除剂/抗再沉积剂、结构增弹剂、织物柔顺剂、载剂、水溶助剂、加工助剂、色素及其组合。示例性辅助材料和使用水平可以在USPN 5,576,282、6,306,812、6,326,348、6,610,642、6,605,458、5,705,464、5,710,115、5,698,504、5,695,679、5,686,014和5,646,101中找到。在一种或多种清洁辅助材料与本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体不相容的实施例中,使用将辅助材料和一种或多种变体保持分离(即彼此不接触)的方法,直到两种组分的组合合适为止。这样的分离方法包括本领域已知的任何合适的方法(例如,胶囊锭、包封、片剂、物理分离等)。

[0119] 一些实施例涉及包含本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体的清洁添加剂产品。在一些实施例中,添加剂被包封于用于添加至清洁过程中的剂型中。在一些实施例中,添加剂被包封在用于添加至清洁过程中的剂型中,在该清洁过程中使用过氧化物来源并且增加的漂白效果是希望的。

[0120] 用于颗粒组合物的示例性填充剂或载剂包括但不限于例如硫酸盐、碳酸盐和硅酸盐的各种盐;滑石;和粘土。用于液体组合物的示例性填充剂或载剂包括但不限于例如水或低分子量伯醇和仲醇(包括多元醇和二元醇,例如甲醇、乙醇、丙醇和异丙醇)。在一些实施例中,组合物含有约5%至约90%的这样的填充剂或载剂。在这样的组合物中可包括酸性填充剂以降低清洁方法或应用中所得溶液的pH。

[0121] 在一个实施例中,本文所述的一种或多种清洁组合物包含有效量的本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体,这些变体是单独的或与一种或多种另外的酶组合的。典型地,清洁组合物包含至少约0.0001wt%至约20wt%、从约0.0001wt%至约10wt%、从约0.0001wt%至约1wt%、从约0.001wt%至约1wt%、或从约0.01wt%至约0.2wt%的一种或多种蛋白酶。在另一个实施例中,本文所述的一种或多种清洁组合物包含从约0.01至约10mg、约0.01至约5mg、约0.01至约2mg、约0.01至约1mg、约0.05至约1mg、约0.5至约10mg、约0.5至约5mg、约0.5至约4mg、约0.5至约3mg、约0.5至约2mg、约0.5至约1mg、约0.1至约10mg、

约0.1至约5mg、约0.1至约4mg、约0.1至约3mg、约0.1至约2mg、约0.1至约2mg、约0.1至约1mg、或约0.1至约0.5mg的一种或多种蛋白酶/克组合物。

[0122] 典型地配制本文所述的清洁组合物使得在水性清洁操作中使用期间,洗涤水将具有从约4.0至约11.5、或甚至从约5.0至约11.5、或甚至从约5.0至约8.0、或甚至从约7.5至约10.5的pH。液体产品制剂典型地被配制成具有从约3.0至约9.0或甚至从约3至约5的pH。颗粒洗衣产品典型地被配制成具有从约8至约11的pH。在一些实施例中,本发明的清洁组合物可以被配制成在洗涤条件下具有碱性pH,如从约8.0至约12.0、或从约8.5至约11.0、或从约9.0至约11.0的pH。在一些实施例中,本发明的清洁组合物可以被配制成在洗涤条件下具有中性pH,如从约5.0至约8.0、或从约5.5至约8.0、或从约6.0至约8.0、或从约6.0至约7.5的pH。在一些实施例中,当清洁组合物在20°C以1:100(wt:wt)溶解于去离子水中时,可以测量中性pH条件,使用常规pH计进行测量。用于将pH控制在推荐的使用水平的技术包括使用缓冲液、碱、酸等,并且是本领域技术人员熟知的。

[0123] 在一些实施例中,将本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体包封以在储存期间保护其免于组合物中的其他组分的影响和/或在清洁期间控制变体的可用性。在一些实施例中,包封增强了变体和/或另外的酶的性能。在一些实施例中,包封材料典型地包封本文所述的枯草杆菌蛋白酶变体的至少一部分。典型地,包封材料是水溶性和/或水分散性的。在一些实施例中,包封材料具有0°C或更高的玻璃化转变温度(Tg)。示例性包封材料包括但不限于:碳水化合物、天然或合成胶、甲壳素、壳聚糖、纤维素和纤维素衍生物、硅酸盐、磷酸盐、硼酸盐、聚乙烯醇、聚乙二醇、石蜡及其组合。当包封材料是碳水化合物时,其典型地选自单糖类、寡糖类、多糖类及其组合。在一些实施例中,包封材料是淀粉(参见例如,EP 0922499、US 4,977,252、US 5,354,559、和US 5,935,826)。在一些实施例中,包封材料是由塑料(如热塑性塑料、丙烯腈、甲基丙烯腈、聚丙烯腈、聚甲基丙烯腈及其混合物)制成的微球。示例性的商业微球包括但不限于EXPANCEL[®](Stockviksverken,瑞典);以及PM 6545、PM 6550、PM 7220、PM 7228、EXTENDOSPHERES[®]、LUXSIL[®]、Q-CEL[®]和 SPHERICEL[®](PQ公司(PQ Corp.),宾夕法尼亚州福吉谷(Valley Forge,PA))。

[0124] 存在各种洗涤条件,包括本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体可暴露的不同的洗涤剂制剂、洗涤水体积、洗涤水温度、和洗涤时间的长短。低洗涤剂浓度系统涉及含有小于约800ppm洗涤剂组分的洗涤水。中等洗涤剂浓度系统涉及含有约800ppm至约2000ppm的洗涤剂组分的洗涤水。高洗涤剂浓度系统涉及含有大于约2000ppm洗涤剂组分的洗涤水。在一些实施例中,本发明的“冷水洗涤”利用适合于在从约10°C至约40°C、从约20°C至约30°C、或从约15°C至约25°C、以及在约15°C至约35°C或10°C至40°C范围内的所有其他组合的温度下洗涤的“冷水洗涤剂”。

[0125] 不同的地理位置具有不同的水硬度。硬度是水中钙(Ca²⁺)和镁(Mg²⁺)的量的量度。通常按照颗粒/加仑(gpg)混合的Ca²⁺/Mg²⁺来描述水硬度。在美国,大部分水都是硬水,但是硬度不同。中等硬(60-120ppm)至硬(121-181ppm)水具有60至181ppm(可以将ppm除以17.1将ppm转化为颗粒/美国加仑)的硬度矿物。

[0126]

水	颗粒/加仑	百万分率
软	小于1.0	小于17

略硬	1.0至3.5	17至60
中等硬	3.5至7.0	60至120
硬	7.0至10.5	120至180
非常硬	大于10.5	大于180

[0127] 其他实施例涉及一种或多种清洁组合物,该组合物包含按组合物重量计从约0.00001%至约10%的本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体,和按组合物重量计从约99.999%至约90.0%的一种或多种辅助材料。在另一个实施例中,清洁组合物包含按组合物重量计从约0.0001%至约10%、约0.001%至约5%、约0.001%至约2%、或约0.005%至约0.5%的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体,和按组合物重量计从约99.9999%至约90.0%、约99.999%至约98%、约99.995%至约99.5%的一种或多种辅助材料。

[0128] 在其他实施例中,本文所述的组合物包含本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体和一种或多种另外的酶。一种或多种另外的酶选自酰基转移酶、 α -淀粉酶、 β -淀粉酶、 α -半乳糖苷酶、阿拉伯糖苷酶、芳基酯酶、 β -半乳糖苷酶、角叉菜胶酶、过氧化氢酶、纤维二糖水解酶、纤维素酶、软骨素酶、角质酶、分散蛋白、内切- β -1,4-葡聚糖酶、内切- β -甘露聚糖酶、酯酶、外切-甘露聚糖酶、半乳聚糖酶、葡糖淀粉酶、半纤维素酶、氨基己糖苷酶、透明质酸酶、角蛋白酶、漆酶、乳糖酶、木质酶、脂肪酶、脂加氧酶、溶菌酶、甘露聚糖酶、金属蛋白酶、核酸酶(例如DNA酶和/或RNA酶)、氧化酶、氧化还原酶、果胶酸裂合酶、果胶乙酰酯酶、果胶酶、戊聚糖酶、过水解酶、过氧化物酶、酚氧化酶、磷酸酶、磷酸二酯酶、磷脂酶、植酸酶、聚半乳糖醛酸酶、聚酯酶、另外的蛋白酶、支链淀粉酶、还原酶、鼠李糖半乳糖醛酸酶、 β -葡聚糖酶、鞣酸酶、转谷氨酰胺酶、黄原胶裂解酶、木聚糖乙酰酯酶、木聚糖酶、木葡聚糖酶、木糖苷酶、及其任何组合或混合物。一些实施例涉及包含常规酶(像淀粉酶、脂肪酶、角质酶、甘露聚糖酶和/或纤维素酶)的酶的组合(即“混合物”),这些酶的组合与本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体和/或一种或多种另外的蛋白酶结合。

[0129] 在另一个实施例中,本文所述的一种或多种组合物包含本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体和一种或多种另外的蛋白酶。在一个实施例中,另外的蛋白酶是丝氨酸蛋白酶。在另一个实施例中,另外的蛋白酶是金属蛋白酶、真菌枯草杆菌蛋白酶、或碱性微生物蛋白酶或胰蛋白酶样蛋白酶。合适的另外的蛋白酶包括动物、植物或微生物来源的那些。在一些实施例中,另外的蛋白酶是微生物蛋白酶。在其他实施例中,另外的蛋白酶是化学或遗传修饰的突变体。在另一个实施例中,另外的蛋白酶是碱性微生物蛋白酶或胰蛋白酶样蛋白酶。在其他实施例中,如通过本领域可用的抗体结合或其他测定测量的,另外的蛋白酶不含有与枯草杆菌蛋白酶变体交叉反应的表位。示例性的碱性蛋白酶包括衍生自例如芽孢杆菌属(例如,BPN⁺、嘉士伯(Carlsberg)、枯草杆菌蛋白酶309、枯草杆菌蛋白酶147、吉氏芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、芽孢杆菌属物种TY145、和枯草杆菌蛋白酶168),或真菌来源(例如像美国专利号8,362,222中描述的那些)的枯草杆菌蛋白酶。示例性的另外的蛋白酶包括但不限于WO 92/21760、WO 95/23221、WO 2008/010925、WO 09/149200、WO 09/149144、WO 09/149145、WO 10/056640、WO 10/056653、WO 2010/0566356、WO 11/072099、WO 2011/13022、WO 11/140364、WO 12/151534、WO 2015/038792、WO 2015/089447、WO 2015/089441、WO 2017/215925/美国公开号2008/0090747、US 5,801,039、US 5,340,735、US 5,500,364、US 5,855,625、RE 34,606、US 5,955,340、US 5,700,676、US 6,312,936、US 6,482,628、US

8,530,219、美国临时申请号62/180673和62/161077、以及PCT申请号PCT/US2015/021813、PCT/US2015/055900、PCT/US2015/057497、PCT/US2015/057492、PCT/US2015/057512、PCT/US2015/057526、PCT/US2015/057520、PCT/US2015/057502、PCT/US2016/022282和PCT/US16/32514中描述的那些,以及WO 1999014341、WO 1999033960、WO 1999014342、WO 1999034003、WO 2007044993、WO 2009058303、WO 2009058661、WO 2014071410、WO 2014194032、WO 2014194034、WO 2014194054、WO 2014/194117、EP3380599、WO 2017215925和WO 2016203064中描述的金属蛋白酶。示例性另外的蛋白酶包括但不限于胰蛋白酶(例如猪或牛起源的)和描述于WO 89/06270中的镰孢菌属(*Fusarium*)蛋白酶。示例性商业蛋白酶包括但不限于MAXATASE[®]、MAXACAL[™]、MAXAPEM[™]、OPTICLEAN[®]、OPTIMASE[®]、PROPERASE[®]、PURAFECT[®]、PURAFECT[®] OXP、PURAMAX[™]、EXCELLASE[™]、PREFERENZ[™]蛋白酶(例如P100、P110、P280、P300)、EFFECTENZ[™]蛋白酶(例如P1000、P1050、P2000)、EXCELLENZ[™]蛋白酶(例如P1000)、ULTIMASE[®]、和PURAFAST[™](国际香精香料公司(IFF)); ALCALASE[®]、ALCALASE[®]、ULTRA、BLAZE[®]、BLAZE[®]变体、BLAZE[®] EVITY[®]、BLAZE[®] EVITY[®] 16L、CORONASE[®]、SAVINASE[®]、SAVINASE[®] ULTRA、SAVINASE[®] EVITY[®]、SAVINASE[®] EVERIS[®]、PRIMASE[®]、DURAZYM[™]、POLARZYME[®]、OVOZYME[®]、KANNASE[®]、LIQUANASE[®]、LIQUANASEEVERIS[®]、NEUTRASE[®]、PROGRESS UNO[®]、RELEASE[®]、和ESPERASE[®]、Progress[®] Excel 101L(诺维信公司(Novozymes)); BLAP[™]和BLAP[™]变体(汉高公司(Henkel)); LAVERGY[™]PRO 104L(巴斯夫公司(BASF))、KAP(嗜碱芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶(花王公司(Kao)))和BIOTOUCH[®](AB酶制剂公司(AB Enzymes))。

[0130] 另一个实施例涉及包含本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体和一种或多种脂肪酶的组合物。在一些实施例中,组合物包含按组合物重量计从约0.00001%至约10%、约0.0001%至约10%、约0.001%至约5%、约0.001%至约2%、或约0.005%至约0.5%的脂肪酶。示例性脂肪酶可以是化学或遗传修饰的突变体。示例性脂肪酶包括但不限于例如细菌或真菌来源的那些,例如像绵毛状腐质菌(*H. lanuginosa*)脂肪酶(参见例如,EP 258068和EP 305216)、疏棉状嗜热丝孢菌(*T. lanuginosa*)脂肪酶(参见例如,WO 2014/059360和WO 2015/010009)、米黑根毛霉(*Rhizomucormiehei*)脂肪酶(参见例如,EP 238023)、假丝酵母属(*Candida*)脂肪酶例如南极洲假丝酵母(*C. antarctica*)脂肪酶(例如南极洲假丝酵母脂肪酶A或B)(参见例如,EP 214761)、假单胞菌属脂肪酶例如产碱假单胞菌(*P. alcaligenes*)和假产碱假单胞菌(*P. pseudoalcaligenes*)脂肪酶(参见例如,EP 218272)、洋葱假单胞菌(*P. cepacia*)脂肪酶(参见例如,EP 331376)、施氏假单胞菌(*P. stutzeri*)脂肪酶(参见例如,GB 1,372,034)、荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)脂肪酶、芽孢杆菌属脂肪酶(例如枯草芽孢杆菌脂肪酶(Dartois等人,Biochem.Biophys.Acta[生物化学与生物物理学报]1131:253-260(1993))、嗜热脂肪芽孢杆菌脂肪酶(参见例如,JP 64/744992)、和短小芽孢杆菌脂肪酶(参见例如,WO 91/16422))。示例性克隆的脂肪酶包括但不限于沙门柏干酪青霉(*Penicillium camembertii*)脂肪酶(参见Yamaguchi等人,Gene[基因]103:61-67(1991)); 白地霉(*Geotrichum candidum*)脂肪酶(参见Schimada等人,J.Biochem.[生物化学杂志],106:383-388(1989)); 以及各种根霉属(*Rhizopus*)脂肪酶,如

德氏根霉 (*R. delemar*) 脂肪酶 (参见 Hass 等人, Gene [基因] 109:117-113 (1991))、雪白根霉 (*R. niveus*) 脂肪酶 (Kugimiya 等人, Biosci. Biotech. Biochem. [生物科学、生物技术与生物化学] 56:716-719 (1992)) 和米根霉 (*R. oryzae*) 脂肪酶。其他脂肪分解酶 (例如角质酶) 也可用于本文所述的一种或多种组合物中, 包括但不限于例如衍生自门多萨假单胞菌 (*Pseudomonas mendocina*) (参见 WO 88/09367) 和/或豌豆根腐镰孢菌 (*Fusarium solanipisi*) (参见 WO 90/09446) 的角质酶。示例性商业脂肪酶包括但不限于 M1 LIPASETM、LUMA FASTTM、LIPOMAXTM 和 PREFERENZTM L100 (国际香精香料公司); LIPEX[®]、LIPOCLEAN[®]、LIPOLASE[®] 和 LIPOLASE[®] ULTRA (诺维信公司); 和 LIPASE PTM (天野药业有限公司 (Amano Pharmaceutical Co. Ltd))。

[0131] 仍另外的实施例涉及包含本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体和一种或多种淀粉酶的组合物。在一个实施例中, 组合物包含按组合物重量计从约 0.00001% 至约 10%、约 0.0001% 至约 10%、约 0.001% 至约 5%、约 0.001% 至约 2%、或约 0.005% 至约 0.5% 的淀粉酶。适合用于碱性溶液中的任何淀粉酶 (例如, α 淀粉酶和/或 β 淀粉酶) 可以用于包括在这样的组合物中。示例性淀粉酶可以是化学或遗传修饰的突变体。示例性淀粉酶包括但不限于细菌或真菌来源的那些, 例如像描述于 GB 1,296,839、WO 9100353、WO 9402597、WO 94183314、WO 9510603、WO 9526397、WO 9535382、WO 9605295、WO 9623873、WO 9623874、WO 9630481、WO 9710342、WO 9741213、WO 9743424、WO 9813481、WO 9826078、WO 9902702、WO 9909183、WO 9919467、WO 9923211、WO 9929876、WO 9942567、WO 9943793、WO 9943794、WO 9946399、WO 0029560、WO 0060058、WO 0060059、WO 0060060、WO 0114532、WO 0134784、WO 0164852、WO 0166712、WO 0188107、WO 0196537、WO 02092797、WO 0210355、WO 0231124、WO 2004055178、WO 2004113551、WO 2005001064、WO 2005003311、WO 2005018336、WO 2005019443、WO 2005066338、WO 2006002643、WO 2006012899、WO 2006012902、WO 2006031554、WO 2006063594、WO 2006066594、WO 2006066596、WO 2006136161、WO 2008000825、WO 2008088493、WO 2008092919、WO 2008101894、WO 2008/112459、WO 2009061380、WO 2009061381、WO 2009100102、WO 2009140504、WO 2009149419、WO 2010/059413、WO 2010088447、WO 2010091221、WO 2010104675、WO 2010115021、WO 2010115028、WO 2010117511、WO 2011076123、WO 2011076897、WO 2011080352、WO 2011080353、WO 2011080354、WO 2011082425、WO 2011082429、WO 2011087836、WO 2011098531、WO 2013063460、WO 2013184577、WO 2014099523、WO 2014164777、WO 2015077126、和 WO 2018184004 中的淀粉酶。示例性商业淀粉酶包括但不限于 AMPLIFY[®]、DURAMYL[®]、TERMAMYL[®]、FUNGAMYL[®]、STAINZYME[®]、STAINZYME PLUS[®]、STAINZYME PLUS[®]、STAINZYME ULTRA[®]、EVITY[®]、和 BANTM (诺维信公司); EFFECTENZTM S1000、POWERASETM、PREFERENZTM S100、PREFERENZTM S110、PREFERENZTM S210、EXCELLENZTM S2000、RAPIDASE[®] 和 MAXAMYL[®] P (国际香精香料公司)。在一些实施例中, 本文提供的吉氏芽孢杆菌变体可与一种或多种淀粉酶及其变体、及该一种或多种淀粉酶和其变体的组合进行组合, 该一种或多种淀粉酶选自由以下组成的组: AA707、AA560、AAI10、BspAmy24、SP722 和 CspAmy1。

[0132] 又仍另外的实施例涉及包含本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体和一种或多种纤维素酶的组合物。在一个实施例中, 组合物包含按组合物重量计从约 0.00001% 至

约10%、0.0001%至约10%、约0.001%至约5%、约0.001%至约2%、或约0.005%至约0.5%的纤维素酶。任何合适的纤维素酶可用于本文所述的组合物中。示例性纤维素酶可以是化学或遗传修饰的突变体。示例性纤维素酶包括但不限于细菌或真菌来源的那些,例如像在以下中描述的那些:WO 2005054475、WO 2005056787、US 7,449,318、US 7,833,773、US 4,435,307;EP 0495257;以及美国临时申请号62/296,678。示例性商业纤维素酶包括但不限于CELLUCLEAN[®]、CELLUZYME[®]、CAREZYME[®]、ENDOLASE[®]、RENOZYME[®]、和CAREZYME[®]PREMIUM(诺维信公司);REVITALENZ[™]100、REVITALENZ[™]200/220、和REVITALENZ[®]2000(国际香精香料公司);和KAC-500(B)[™](花王公司)。在一些实施例中,纤维素酶作为成熟野生型或变体纤维素酶(其中N-末端的一部分缺失)的部分或片段掺入(参见例如,US 5,874,276)。

[0133] 甚至仍另外的实施例涉及包含本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体和一种或多种甘露聚糖酶的组合物。在一个实施例中,组合物包含按组合物重量计从约0.00001%至约10%、约0.0001%至约10%、约0.001%至约5%、约0.001%至约2%、或约0.005%至约0.5%的甘露聚糖酶。示例性甘露聚糖酶可以是化学或遗传修饰的突变体。示例性甘露聚糖酶包括但不限于细菌或真菌来源的那些,例如像以下中描述的那些:WO 2016/007929;USPN 6,566,114、6,602,842、和6,440,991;以及美国临时申请号62/251516、62/278383和62/278387。示例性商业甘露聚糖酶包括但不限于MANNAWAY[®] Evity[®] 4.0T、MANNAWAY[®](诺维信公司)和EFFECTENZ[™]M 1000、EFFECTENZ[™]M 2000、PREFERENZ[®]M 100、MANNASTAR[®]和PURABRITE[™](国际香精香料公司)。

[0134] 仍另外的实施例涉及包含本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体和一种或多种核酸酶(例如,DNA酶或RNA酶)的组合物。在一个实施例中,组合物包含按组合物重量计从约0.00001%至约10%、约0.0001%至约10%、约0.001%至约5%、约0.001%至约2%、或约0.005%至约0.5%的核酸酶。示例性核酸酶包括但不限于在WO 2015181287、WO 2015155350、WO 2016162556、WO 2017162836、WO 2017060475(例如,SEQ ID NO:21)、WO 2018184816、WO 2018177936、WO 2018177938、WO2018/185269、WO 2018185285、WO 2018177203、WO 2018184817、WO 2019084349、WO 2019084350、WO 2019081721、WO 2018076800、WO 2018185267、WO 2018185280、WO 2018206553和WO 2020099490中描述的那些。可以在本文提供的组合物和方法中与本文提供的枯草杆菌蛋白酶变体组合使用的其他核酸酶包括以下中描述的那些:Nijland R, Hall MJ, Burgess JG (2010) Dispersal of Biofilms by Secreted, Matrix Degrading, Bacterial DNase[通过分泌、矩阵降解、细菌DNA酶分散生物膜]. PLoS ONE[公共科学图书馆:综合]5(12)和Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P.C., Mattick, J.S. (2002) Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation[细菌生物膜形成所需的细胞外DNA]. Science[科学]295: 1487。

[0135] 又甚至仍另外的实施例涉及包含本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体以及一种或多种过氧化物酶和/或氧化酶的组合物。在一个实施例中,组合物包含按组合物重量计从约0.00001%至约10%、约0.0001%至约10%、约0.001%至约5%、约0.001%至约2%、或约0.005%至约0.5%的过氧化物酶或氧化酶。过氧化物酶可以与过氧化氢或其来源(例如过碳酸盐、过硼酸盐或过硫酸盐)组合使用,并且氧化酶可以与氧气组合使用。将单独

的或与增效剂组合的过氧化物酶和氧化酶用于“溶液漂白”(即当织物在洗涤液中一起洗涤时防止纺织品染料从一种染色的织物转移到另一种织物上)(参见例如WO 94/12621和WO 95/01426)。示例性过氧化物酶和/或氧化酶可以是化学或遗传修饰的突变体。示例性过氧化物酶/氧化酶包括但不限于植物、细菌或真菌来源的那些。

[0136] 另一个实施例涉及包含本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体和一种或多种过水解酶的组合物,例如像描述于WO 2005/056782、WO 2007/106293、WO 2008/063400、WO 2008/106214、和WO 2008/106215中的过水解酶。

[0137] 在又一个实施例中,本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体以及在本文所述的一种或多种组合物中含有的一种或多种另外的酶可以各自独立地变动至按组合物重量计约10%,其中该清洁组合物的余量为一种或多种辅助材料。

[0138] 在一些实施例中,本文所述的一种或多种组合物可用作洗涤剂添加剂,其中所述添加剂呈固体或液体形式。这样的添加剂产品旨在补充和/或提高常规洗涤剂组合物的性能,并且可以在清洁过程的任何阶段添加。在一些实施例中,衣物洗涤剂组合物的密度范围为从约400至约1200g/升,而在其他实施例中,其范围为在20°C测量的约500至约950g/升的组合物。

[0139] 一些实施例涉及衣物洗涤剂组合物,其包含本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体和选自以下的一种或多种辅助材料:表面活性剂、酶稳定剂、助洗剂化合物、聚合化合物、漂白剂、另外的酶、泡沫抑制剂、分散剂、钙皂分散剂、污垢悬浮剂、抗再沉积剂、腐蚀抑制剂及其组合。在一些实施例中,洗衣组合物还含有柔顺剂。

[0140] 另外的实施例涉及手动餐具洗涤组合物,其包含本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体和选自以下的一种或多种辅助材料:表面活性剂、有机聚合化合物、增泡剂、II族金属离子、溶剂、水溶助剂和另外的酶。

[0141] 其他的实施例涉及本文所述的一种或多种组合物,其中所述组合物是用于有色织物洗涤或通过洗涤容量提供柔顺的紧密颗粒状织物清洁组合物,或者是重垢液体(HDL)织物清洁组合物。示例性织物清洁组合物和/或制备方法描述于USPN 6,610,642和6,376,450中。其他示例性清洁组合物描述于例如USPN 6,605,458;6,294,514;5,929,022;5,879,584;5,691,297;5,565,145;5,574,005;5,569,645;5,565,422;5,516,448;5,489,392;和5,486,303;4,968,451;4,597,898;4,561,998;4,550,862;4,537,706;4,515,707;和4,515,705中。

[0142] 在一些实施例中,清洁组合物包含酸化粒子或氨基酸助洗剂。氨基酸助洗剂的实例包括氨基酸、其盐和衍生物。在一些实施例中,氨基酸助洗剂是氨基聚羧酸助洗剂,如甘氨酸-N,N-二乙酸或具有通式 $\text{MOOC-CHR-N}(\text{CH}_2\text{COOM})_2$ (其中R是 C_{1-12} 烷基并且M是碱金属)的衍生物。在一些实施例中,氨基酸助洗剂可以是甲基甘氨酸二乙酸(MGDA)、GLDA(谷氨酸-N,N-二乙酸)、亚氨基二琥珀酸(IDS)、羧甲基菊粉及其盐和衍生物、天冬氨酸-N-单乙酸(ASMA)、天冬氨酸-N,N-二乙酸(ASDA)、天冬氨酸-N-单丙酸(ASMP)、N-(2-磺基甲基)天冬氨酸(SMAS)、N-(2-磺基乙基)天冬氨酸(SEAS)、N-(2-磺基甲基)谷氨酸(SMGL)、N-(2-磺基乙基)谷氨酸(SEGL)、IDA(亚氨基二乙酸)及其盐和衍生物如N-甲基亚氨基二乙酸(MIDA)、 α -丙氨酸-N,N-二乙酸(α -ALDA)、丝氨酸-N,N-二乙酸(SEDA)、异丝氨酸-N,N-二乙酸(ISDA)、苯丙氨酸-N,N-二乙酸(PHDA)、邻氨基苯甲酸-N,N-二乙酸(ANDA)、磺胺酸-N,N-二

乙酸(SLDA)、牛磺酸-N,N-二乙酸(TUDA)和磺基甲基-N,N-二乙酸(SMDA)、以及其碱金属盐和衍生物。在一些实施例中,酸化粒子的重量几何平均粒度为从约400 μ 至约1200 μ ,并且体积密度为至少550g/L。在一些实施例中,酸化粒子包含至少约5%的助洗剂。

[0143] 在一些实施例中,酸化粒子可以包含任何酸,包括有机酸和矿物酸。有机酸可以具有一个或两个羧基,并且在一些情况下可以具有多达15个碳,特别地多达10个碳,如甲酸、乙酸、丙酸、癸酸、草酸、琥珀酸、己二酸、马来酸、富马酸、癸二酸、苹果酸、乳酸、乙醇酸、酒石酸和水合乙醛酸。在一些实施例中,酸是柠檬酸。矿物酸包括盐酸和硫酸。在一些情况下,酸化粒子是包含高水平氨基酸助洗剂的高活性粒子。也已经发现硫酸进一步有助于最终粒子的稳定性。

[0144] 另外的实施例涉及清洁组合物,其包含一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体和一种或多种表面活性剂和/或表面活性剂系统,其中该表面活性剂选自非离子表面活性剂、阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、两性表面活性剂、两性离子表面活性剂、半极性非离子表面活性剂及其混合物。在一些实施例中,以清洁组合物的重量计,表面活性剂以从约0.1%至约60%的水平存在,而在替代性实施例中,该水平为从约1%至约50%,而在又另外的实施例中,该水平为从约5%至约40%。

[0145] 在一些实施例中,本文所述的一种或多种组合物包含一种或多种洗涤剂助洗剂或助洗剂系统。在一个实施例中,组合物包含按组合物重量计从至少约0.1%或更多、或从约0.1%至约90%、从约0.1%至约80%、从约3%至约60%、从约5%至约40%、或从约10%至约50%的助洗剂。示例性助洗剂包括但不限于碱金属;聚磷酸盐的铵盐和链烷醇铵盐;碱金属硅酸盐;碱土金属和碱金属碳酸盐;铝硅酸盐;聚羧酸盐化合物;醚羟基聚羧酸盐;马来酸酐与乙烯或乙烯基甲基醚、1,3,5-三羟基苯-2,4,6-三磺酸、和羧基甲基氧基琥珀酸的共聚物;聚乙酸的铵盐和经取代的铵盐,如乙二胺四乙酸和次氨基三乙酸;聚羧酸盐,如苯六甲酸、琥珀酸、柠檬酸、氧基二琥珀酸、聚马来酸、苯1,3,5-三羧酸、羧甲基氧基琥珀酸;及其可溶性盐。在一些这样的组合物中,助洗剂形成水溶性硬度离子络合物(例如螯合助洗剂),如柠檬酸盐和聚磷酸盐,例如三聚磷酸钠、三聚磷酸钠六水合物、三聚磷酸钾、以及混合的三聚磷酸钠和三聚磷酸钾。示例性助洗剂描述于例如EP 2100949。在一些实施例中,助洗剂包括磷酸盐助洗剂和非磷酸盐助洗剂。在一些实施例中,助洗剂是磷酸盐助洗剂。在一些实施例中,助洗剂是非磷酸盐助洗剂。在一些实施例中,助洗剂包含磷酸盐和非磷酸盐助洗剂的混合物。示例性磷酸盐助洗剂包括但不限于单磷酸盐、二磷酸盐、三聚磷酸盐或低聚磷酸盐,包括这些化合物的碱金属盐,包括钠盐。在一些实施例中,助洗剂可以是三聚磷酸钠(STPP)。另外,该组合物可以包含碳酸盐和/或柠檬酸盐。其他合适的非磷酸盐助洗剂包括聚羧酸及其部分或完全中和盐、单体型聚羧酸和羟基羧酸及其盐的均聚物和共聚物。在一些实施例中,上述化合物的盐包括铵盐和/或碱金属盐,即锂盐、钠盐和钾盐,包括钠盐。合适的聚羧酸包括无环的、脂环族的、杂环的和芳香族的羧酸,其中在一些实施例中,它们可以含有至少两个羧基基团,这些羧基基团在每种情况下彼此分离,在一些情况下被不超过两个碳原子分离。

[0146] 在一些实施例中,本文所述的一种或多种组合物包含一种或多种漂白催化剂。在一个实施例中,组合物包含按组合物重量计从约0.1%至约15%或约3%至约10%的漂白催化剂。示例性漂白催化剂包括但不限于例如铜、铁、锰及其混合物。

[0147] 在一些实施例中,本文所述的一种或多种组合物包含一种或多种沉积助剂。示例性沉积助剂包括但不限于例如聚乙二醇;聚丙二醇;聚羧酸盐;污垢释放聚合物,例如像聚对苯二甲酸;粘土,例如像高岭石、蒙脱石、硅镁土、伊利石、膨润土和多水高岭土;及其混合物。

[0148] 在其他实施例中,本文所述的一种或多种组合物包含一种或多种抗再沉积剂或非离子表面活性剂(其可以防止污垢的再沉积)(参见,例如,EP 2100949)。例如,在ADW组合物中,非离子表面活性剂可用于表面改性目的(特别是对于薄片)以避免成膜和沾上污渍并且改善光泽。这些非离子表面活性剂还可用于防止污垢的再沉积。在一些实施例中,非离子表面活性剂可以是乙氧基化非离子表面活性剂、环氧封端的聚(烷氧基化)醇和氧化胺表面活性剂。

[0149] 在一些实施例中,本文所述的一种或多种组合物包含一种或多种染料转移抑制剂。示例性聚合染料转移抑制试剂包括但不限于聚乙烯吡咯烷酮聚合物、聚胺N-氧化物聚合物、N-乙烯吡咯烷酮与N-乙烯基咪唑的共聚物、聚乙烯噁唑烷酮、聚乙烯咪唑及其混合物。在一个实施例中,组合物包含以组合物重量计从约0.0001%至约10%、约0.01%至约5%、或约0.1%至约3%的染料转移抑制剂。

[0150] 在一些实施例中,本文所述的一种或多种组合物包含一种或多种硅酸盐。示例性硅酸盐包括但不限于硅酸钠,例如,二硅酸钠、偏硅酸钠和结晶页硅酸盐。在一些实施例中,硅酸盐以按该组合物的重量计从约1%至约20%或约5%至约15%的水平存在。

[0151] 在一些仍另外的实施例中,本文所述的一种或多种组合物包含一种或多种分散剂。示例性水溶性有机材料包括但不限于例如均聚合或共聚的酸或其盐,其中聚羧酸包含至少两个被不超过两个碳原子彼此分开的羧基自由基。

[0152] 在一些另外的实施例中,本文所述的一种或多种组合物包含一种或多种酶稳定剂。在一些实施例中,酶稳定剂是钙和/或镁离子的水溶性来源。在一些实施例中,酶稳定剂包括寡糖类、多糖类和无机二价金属盐(包括碱土金属盐,如钙盐)。在一些实施例中,本文使用的酶通过存在于为酶提供以下这样的离子的成品组合物中的锌(II)、钙(II)和/或镁(II)离子的水溶性来源,以及其他金属离子(例如,钡(II)、钪(II)、铁(II)、锰(II)、铝(III)、锡(II)、钴(II)、铜(II)、镍(II)以及氧钒(IV))来稳定。氯化物和硫酸盐也可用于一些实施例中。示例性寡糖类和多糖类(例如,糊精)描述于例如W0 07/145964中。在一些实施例中,可逆蛋白酶抑制剂也可用于例如含硼化合物(例如,硼酸盐、4-甲酰基苯基硼酸、和苯基硼酸衍生物(例如描述于W0 96/41859中的那些))和/或肽醛(例如像进一步描述于W0 2009/118375和W0 2013004636中的)中。

[0153] 如前所述(W0 199813458、W0 2011036153、US20140228274),肽醛可用作洗涤剂制剂中的蛋白酶稳定剂。肽醛稳定剂的实例是肽醛、酮或卤代甲基酮,并且可以是“N-封端的”,例如具有脲基、氨基甲酸酯或脲部分,或“双N-封端的”,例如具有羰基、脲基、草酰胺、硫脲基、二硫代草酰胺或硫代草酰胺部分(EP 2358857 B1)。这些抑制剂与蛋白酶的摩尔比可以是0.1:1至100:1,例如0.5:1-50:1、1:1-25:1或2:1-10:1。蛋白酶稳定剂的其他实例是二苯甲酮或苯甲酸苯胺衍生物,其可含有羧基基团(US 7,968,508 B2)。这些稳定剂与蛋白酶的摩尔比优选地是在1:1至1000:1的范围内,特别是1:1至500:1,尤其优选地从1:1至100:1,最尤其优选地从1:1至20:1。

[0154] 在一些实施例中,本文所述的一种或多种组合物包含一种或多种漂白剂、漂白活化剂、和/或漂白催化剂。在一些实施例中,本文所述的一种或多种组合物包含一种或多种无机和/或有机漂白化合物。示例性无机漂白剂包括但不限于过氧化氢合物盐,例如过硼酸盐、过碳酸盐、过磷酸盐、过硫酸盐和过硅酸盐。在一些实施例中,无机过氧化氢合物盐是碱金属盐。在一些实施例中,包括为结晶固体但没有额外保护的无机过氧化氢合物盐,但是在一些其他实施例中,盐被涂覆。漂白活化剂典型地为有机过酸前体,其在60°C及以下的温度时在清洁过程中增强漂白作用。示例性漂白活化剂包括如下化合物,这些化合物在过水解条件下给出具有从约1至约10个碳原子或从约2至约4个碳原子的脂肪族过氧羧酸、和/或任选地经取代的过氧苯甲酸。示例性漂白活化剂描述于例如EP 2100949中。示例性漂白催化剂包括但不限于锰三氮杂环壬烷和相关络合物,以及钴、铜、锰和铁络合物。另外的示例性漂白催化剂描述于例如US 4,246,612;US 5,227,084;US 4,810,410;WO 99/06521;以及EP 2100949。

[0155] 在一些实施例中,本文所述的一种或多种组合物包含一种或多种催化性金属络合物。在一些实施例中,可使用含金属的漂白催化剂。在一些实施例中,金属漂白催化剂包含一种催化体系,该催化体系包括:具有限定的漂白催化活性的过渡金属阳离子(例如,铜、铁、钛、钇、钨、钼或锰阳离子),具有很少或不具有漂白催化活性的辅助金属阳离子(例如,锌或铝阳离子),以及对于催化性和辅助性金属阳离子具有限定的稳定性常数的螯合物,特别是乙二胺四乙酸、乙二胺四(亚甲基膦酸)及其水溶性盐(参见例如,US 4,430,243)。在一些实施例中,本文所述的一种或多种组合物借助于锰化合物来催化。这样的化合物和使用水平描述于例如US 5,576,282中。在另外的实施例中,钴漂白催化剂可用于并包含于本文所述的一种或多种组合物中。多种钴漂白催化剂描述于例如USPN 5,597,936和5,595,967中。

[0156] 在一些另外的实施例中,本文所述的一种或多种组合物包含大多环刚性配体(MRL)的过渡金属络合物。作为实际问题而并非进行限制,在一些实施例中,对本文所述的组合物和清洁方法进行调节以提供至少一亿分之一数量级的,在洗涤液中约0.005ppm至约25ppm、约0.05ppm至约10ppm、或约0.1ppm至约5ppm的活性MRL。示例性MRL包括但不限于交联桥接的特殊超刚性配体,例如像5,12-二乙基-1,5,8,12-四氮杂双环(6.6.2)十六烷。示例性金属MRL描述于例如WO 2000/32601和US 6,225,464中。

[0157] 在另一个实施例中,本文所述的一种或多种组合物包含一种或多种金属护理剂。在一些实施例中,组合物包含按组合物的重量计从约0.1%至约5%的金属护理剂。示例性金属护理剂包括例如铝、不锈钢和非铁金属(例如,银和铜)。另外的示例性金属护理剂描述于例如EP 2100949、WO 94/26860和WO 94/26859中。在一些组合物中,金属护理剂是锌盐。

[0158] 在一些实施例中,清洁组合物是包含本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体的重垢液体(HDL)组合物。所述HDL液体衣物洗涤剂可以包含清洁型表面活性剂(10%-40%),该清洁型表面活性剂包含选自下组的阴离子清洁型表面活性剂:直链或支链或无规链,经取代的或未经取代的烷基硫酸盐、烷基磺酸盐、烷基烷氧基化硫酸盐、烷基磷酸盐、烷基膦酸盐、烷基羧酸盐、和/或其混合物;以及任选地选自下组的非离子表面活性剂:直链或支链或无规链,经取代的或未经取代的烷基烷氧基化醇,例如C₈-C₁₈烷基乙氧基化醇和/或C₆-C₁₂烷基苯酚烷氧基化物,任选地其中阴离子清洁型表面活性剂(亲水指数(HIc))为从6.0

至9)与非离子清洁型表面活性剂的重量比大于1:1。合适的清洁型表面活性剂还包括阳离子清洁型表面活性剂(选自烷基吡啶鎓化合物、烷基季铵化合物、烷基季磷化合物、烷基叔硫化合物、和/或其混合物);兼性离子和/或两性清洁型表面活性剂(选自链烷醇胺磺基甜菜碱);两性表面活性剂;半极性非离子表面活性剂;及其混合物。

[0159] 在另一个实施例中,清洁组合物是液体或凝胶洗涤剂(其不是单位剂量的),该液体或凝胶洗涤剂可以是水性的,典型地含有按重量计至少20%和高达95%的水,如按重量计高达约70%的水、按重量计高达约65%的水、按重量计高达约55%的水、按重量计高达约45%的水、或按重量计高达约35%的水。在水性液体或凝胶中可包括其他类型的液体(包括但不限于烷醇、胺、二醇、醚和多元醇)。水性液体或凝胶洗涤剂可包含从0至30%的有机溶剂。液体或凝胶洗涤剂可以是非水性的。

[0160] 该组合物可以任选地包含由以下组成的表面活性增强聚合物:两亲烷氧基化油脂清洁聚合物,这些两亲烷氧基化油脂清洁聚合物选自以下组:具有支链亲水和疏水性质的烷氧基化聚合物,例如烷氧基化聚亚烷基胺(在0.05wt% - 10wt%范围内);和/或无规接枝聚合物,所述无规接枝聚合物典型地包含含有选自由以下组成的组的单体的亲水主链:不饱和的C₁-C₆羧酸、醚、醇、醛、酮、酯、糖单元、烷氧基单元、马来酸酐、饱和的多元醇(例如甘油)及其混合物;以及一个或多个疏水侧链,这些疏水侧链选自由以下组成的组:C₄-C₂₅烷基基团、聚丙烯、聚丁烯、饱和的C₂-C₆单羧酸的乙烯酯、丙烯酸或甲基丙烯酸的C₁-C₆烷基酯及其混合物。

[0161] 该组合物可以包含另外的聚合物,如污垢释放聚合物,该污垢释放聚合物包括例如阴离子封端的聚酯,例如SRP1;呈无规或嵌段构型的、包含至少一种单体单元的聚合物,该单体单元选自糖类、二羧酸、多元醇及其组合;呈无规或嵌段构型的、基于对苯二甲酸乙二醇酯的聚合物及其共聚物,例如Repel-o-tex SF、SF-2和SRP6;Texcare SRA100、SRA300、SRN100、SRN170、SRN240、SRN300和SRN325;Marloquest SL;抗再沉积聚合物(0.1wt%至10wt%,包括例如羧酸盐聚合物,例如包含至少一种选自以下的单体的聚合物:丙烯酸、马来酸(或马来酸酐)、富马酸、衣康酸、乌头酸、中康酸、柠康酸、亚甲基丙二酸及其任何混合物;乙烯基吡咯烷酮均聚物;和/或具有在500至100,000Da范围内的分子量的聚乙二醇);纤维素聚合物(包括,例如,烷基纤维素;烷基烷氧基烷基纤维素;羧烷基纤维素;烷基羧烷基纤维素,其实例包括羧甲基纤维素、甲基纤维素、甲基羟乙基纤维素、甲基羧甲基纤维素;及其混合物);以及聚合羧酸酯(例如像马来酸酯/丙烯酸酯无规共聚物或聚丙烯酸酯均聚物)。

[0162] 该组合物可以进一步包含饱和或不饱和脂肪酸,优选饱和或不饱和的C₁₂-C₂₄脂肪酸(0-10wt%);呈无规或嵌段构型的沉积助剂(包括例如多糖类、纤维素聚合物、聚二烯丙基二甲基卤化铵(DADMAC))、以及DADMAC与乙烯基吡咯烷酮的共聚物、丙烯酰胺、咪唑、卤化咪唑啉及其混合物;阳离子瓜耳胶;阳离子纤维素,如阳离子羟乙基纤维素;阳离子淀粉;阳离子聚丙烯酰胺;及其混合物。

[0163] 该组合物可以进一步包含染料转移抑制剂,其实例包括锰酞菁、过氧化物酶、聚乙烯基吡咯烷酮聚合物、聚胺N-氧化物聚合物、N-乙烯基吡咯烷酮和N-乙烯基咪唑的共聚物、聚乙烯基噁唑烷酮和聚乙烯基咪唑和/或其混合物;螯合剂,其实例包括乙二胺四乙酸(EDTA);二亚乙基三胺五亚甲基膦酸(DTPMP);羟基乙烷二膦酸(HEDP);乙二胺N,N'-二琥珀

酸(EDDS);甲基甘氨酸二乙酸(MGDA);二亚乙基三胺五乙酸(DTPA);丙二胺四乙酸(PDT A);2-羟基吡啶-N-氧化物(HPNO);或甲基甘氨酸二乙酸(MGDA);谷氨酸N,N-二乙酸(N,N-二羧甲基谷氨酸四钠盐(GLDA));次氨基三乙酸(NTA);4,5-二羟基间苯二磺酸;柠檬酸及其任何盐;N-羟基乙基乙二胺三乙酸(HEDTA)、三亚乙基四胺六乙酸(TTHA)、N-羟基乙基亚氨基二乙酸(HEIDA)、二羟基乙基甘氨酸(DHEG)、乙二胺四丙酸(EDTP)及其衍生物。

[0164] 该组合物可以进一步包含基于硅酮或基于脂肪酸的泡沫抑制剂;酶稳定剂;调色染料、钙和镁阳离子、视觉信号传导成分、消泡剂(0.001wt%至约4.0wt%)和/或结构剂/增稠剂(0.01wt%-5wt%),该结构剂/增稠剂选自由以下组成的组:甘油二酯、甘油三酯、乙二醇二硬脂酸酯、微晶纤维素、基于纤维素的材料、超细纤维素、生物聚合物、黄原胶、结冷胶、及其混合物。

[0165] 在一些实施例中,清洁组合物是包含本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体的重垢粉末(HDD)组合物。该HDD粉末衣物洗涤剂可以包含清洁型表面活性剂,其包括阴离子清洁型表面活性剂(选自直链或支链或无规链、经取代或未经取代的烷基硫酸盐、烷基磺酸盐、烷基烷氧基化硫酸盐、烷基磷酸盐、烷基膦酸盐、烷基羧酸盐和/或其混合物);非离子清洁型表面活性剂(选自直链或支链或无规链、经取代或未经取代的C₈-C₁₈烷基乙氧基化物 and/或C₆-C₁₂烷基苯酚烷氧基化物);阳离子清洁型表面活性剂(选自烷基吡啶鎓化合物、烷基季铵化合物、烷基季磷化合物、烷基叔硫化合物及其混合物);两性离子和/或两性清洁型表面活性剂(选自链烷醇胺磺基甜菜碱);两性表面活性剂;半极性非离子表面活性剂及其混合物;助洗剂(无磷酸盐助洗剂,例如沸石助洗剂,其实例包括在0wt%至小于10wt%范围内的沸石A、沸石X、沸石P和沸石MAP);磷酸盐助洗剂,例如在0至小于10wt%范围内的三聚磷酸钠;在小于15wt%范围内的柠檬酸、柠檬酸盐和次氨基三乙酸或其盐;硅酸盐(在0wt%至小于10wt%范围内的硅酸钠或硅酸钾或偏硅酸钠或层状硅酸盐(SKS-6));碳酸盐(在0wt%至小于10wt%范围内的碳酸钠和/或碳酸氢钠);以及漂白剂(光漂白剂,例如磺化锌酞菁、磺化铝酞菁、咕吨染料及其混合物);疏水或亲水漂白活化剂(例如,十二烷基氧基苯磺酸盐、癸酰基氧基苯磺酸盐、癸酰基氧基苯甲酸或其盐、3,5,5-三甲基己酰基氧基苯磺酸盐、四乙酰基乙二胺-TAED、和壬酰基氧基苯磺酸盐-NOBS、腈季铵盐(nitrile quats)、及其混合物);过氧化氢;过氧化氢源(无机过氧化氢化合物盐,例如过硼酸盐、过碳酸盐、过硫酸盐、过磷酸盐或过硅酸盐的单或四水合钠盐);预制的亲水和/或疏水过酸(选自过羧酸和盐、过碳酸和盐、过亚氨酸和盐、过氧单硫酸和盐及其混合物);和/或漂白催化剂(例如亚胺漂白增效剂,如亚胺阳离子和聚离子;亚胺两性离子;改性胺;改性胺氧化物;N-磺酰基亚胺;N-膦酰基亚胺;N-酰基亚胺;噻二唑二氧化物;全氟亚胺;环状糖酮及其混合物);含金属的漂白催化剂(例如铜、铁、钛、钆、钨、钼或锰阳离子以及辅助金属阳离子(如锌或铝)和螯合物(如乙二胺四乙酸、乙二胺四(亚甲基膦酸)及其水溶性盐)。

[0166] 该组合物可以进一步包含另外的洗涤剂成分,包括香料微胶囊、淀粉包封的香料协调剂、酶稳定剂、调色剂、另外的聚合物(包括织物完整性和阳离子聚合物)、染料锁定成分、织物柔顺剂、增亮剂(例如C.I.荧光增亮剂)、絮凝剂、螯合剂、烷氧基化聚胺、织物沉积助剂和/或环糊精。

[0167] 在一些实施例中,清洁组合物是包含本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体的ADW洗涤剂组合物。该ADW洗涤剂组合物可以包含两种或更多种选自以下的非离子表面活

性剂:乙氧基化非离子表面活性剂、醇烷氧基化表面活性剂、环氧封端的聚(烷氧基化)醇和胺氧化物表面活性剂,它们按重量计以0-10%的量存在;在按重量计5%-60%范围内的助洗剂,这些助洗剂包括:磷酸盐助洗剂(单磷酸盐、二磷酸盐、三聚磷酸盐或低聚磷酸盐),三聚磷酸钠-STPP或无磷酸盐助洗剂(基于氨基酸的化合物,例如MGDA(甲基-甘氨酸-二乙酸)及其盐和衍生物、GLDA(谷氨酸-N,N-二乙酸)及其盐和衍生物、IDS(亚氨基二琥珀酸)及其盐和衍生物、羧甲基菊粉及其盐和衍生物及其混合物、次氨基三乙酸(NTA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)、和B-丙氨酸二乙酸(B-ADA)及其盐),多元羧酸及其部分或完全中和盐的均聚物和共聚物,单体多元羧酸和羟基羧酸及其盐(它们按重量计在0.5%-50%的范围内);磺化/羧化聚合物(为产品提供尺寸稳定性),其按重量计在约0.1%至约50%的范围内;按重量计在约0.1%至约10%的范围内的干燥助剂(选自聚酯,特别是任选地与有利于缩聚作用的具有3-6个官能团(特别是酸、醇或酯官能团)的另外的单体一起的阴离子聚酯,聚碳酸酯-、聚氨酯-和/或聚脲-聚有机硅氧烷化合物或其反应性环状碳酸酯和脲型的前体化合物);按重量计在从约1%至约20%的范围内的硅酸盐(硅酸钠或硅酸钾,例如二硅酸钠、偏硅酸钠和结晶页硅酸盐);无机漂白剂(例如,过氧化氢合物盐例如过硼酸盐、过碳酸盐、过磷酸盐、过硫酸盐和过硅酸盐)和有机漂白剂(例如有机过氧酸,包括二酰基和四酰基过氧化物,尤其是二过氧十二烷二酸、二过氧十四烷二酸、和二过氧十六烷二酸);漂白活化剂-有机过氧酸前体,其按重量计在从约0.1%至约10%的范围内;漂白催化剂(选自锰三氮杂环壬烷及相关络合物,Co、Cu、Mn和Fe双吡啶胺及相关络合物、以及五胺乙酸钴(III)及相关络合物);按重量计在约0.1%-5%的范围内的金属护理剂(选自苯并三氮唑、金属盐和络合物、和硅酸盐);在约0.01-5.0mg活性酶/克ADW洗涤剂组合物范围内的酶(酰基转移酶、 α -淀粉酶、 β -淀粉酶、 α -半乳糖苷酶、阿拉伯糖苷酶、芳基酯酶、 β -半乳糖苷酶、角叉菜胶酶、过氧化氢酶、纤维二糖水解酶、纤维素酶、软骨素酶、角质酶、分散蛋白、内切- β -1,4-葡聚糖酶、内切- β -甘露聚糖酶、酯酶、外切-甘露聚糖酶、半乳聚糖酶、葡糖淀粉酶、半纤维素酶、氨基己糖苷酶、透明质酸酶、角蛋白酶、漆酶、乳糖酶、木质酶、脂肪酶、脂加氧酶、甘露聚糖酶、核酸酶、氧化酶、氧化还原酶、果胶酸裂合酶、果胶乙酰酯酶、果胶酶、戊聚糖酶、过氧化物酶、酚氧化酶、磷酸二酯酶、磷酸酶、磷脂酶、植酸酶、聚酯酶、聚半乳糖醛酸酶、另外的蛋白酶、支链淀粉酶、还原酶、鼠李糖半乳糖醛酸酶、 β -葡聚糖酶、鞣酸酶、转谷氨酰胺酶、黄原胶裂解酶、木聚糖乙酰酯酶、木聚糖酶、木葡聚糖酶、木糖苷酶、及其混合物);以及酶稳定剂组分(选自寡糖类、多糖类和无机二价金属盐)。

[0168] 示例性ADW组合物在以下实例2中或在以下表中提供。

[0169] 示例性ADW组合物

成分	重量 (单位为克)
漂白活化剂 (四乙酰基乙二胺 (TAED))	0.22
SKS-6 二硅酸钠 ($\text{Na}_2\text{Si}_2\text{O}_5$)	0.8
HEDP	0.93
碳酸钠	1.5
MGDA	7.01
[0170] 含磺酸基团的聚合物 (Acusol™ 588)	0.80
过碳酸钠	3.50
漂白催化剂(锰 1,4,7--三氮杂环壬烷; MnTACN)	0.256
LUTENSOL® TO7	0.90
PLURAFAC® SLF 180	0.75
二丙二醇	0.40
微量成分	余量
全部剂量的总%	100

[0171] 更多实施例涉及使用本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体来处理织物(例如,使纺织品脱浆)的组合物和方法。织物处理方法是本领域中熟知的(参见例如,US 6,077,316)。例如,可以通过包括使织物与溶液中的本文所述的变体接触的方法来改善织物的手感和外观。织物可以在压力下用溶液进行处理。

[0172] 可以在纺织品的编织期间或之后、在脱浆阶段期间或一个或多个另外的织物加工步骤中应用本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体。在纺织品的编织期间,线暴露于相当大的机械应变。在机械织机上编织之前,通常用上浆淀粉或淀粉衍生物涂覆经纱以增加其抗张强度并防止断开。可在编织期间或之后应用本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体以除去上浆淀粉或淀粉衍生物。编织之后,可以在进一步处理织物之前使用变体来去除浆涂层以确保均一和耐洗的结果。本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体可以单独使用或与其他脱浆化学试剂和/或脱浆酶一起使用,以作为洗涤剂添加剂(例如在水性组合物中)使织物(包括含棉的织物)脱浆。淀粉酶还可以与枯草杆菌蛋白酶变体组合在靛蓝染色的牛仔织物和服装上生产石磨的外观的组合物和方法中使用。对于衣服生产而言,织物可被裁剪和缝制成衣服或服装,其随后被精整(finish)。特别地,对于牛仔布的生产,开发了不同的酶促精整方法。牛仔服装的精整加工通常是以酶脱浆步骤开始的,其中使服装经受蛋白水解酶的作用以为织物提供柔软性,并且使棉更易于进行随后的酶促精整加工步骤。本文所述的一种或多种枯草杆菌蛋白酶变体可用于下列方法中:精整牛仔服装(例如“生物磨砂方法”)、酶促脱浆并为织物提供柔软性和/或精整方法。

[0173] 本公开还提供了用于清洁物品表面的方法,这些方法包括使物品与本文提供的至

少一种枯草杆菌蛋白酶变体(或包含这样的枯草杆菌蛋白酶变体的组合物)接触。在一些实施例中,物品可能在例如其表面上有蛋白质污渍。在一些实施例中,蛋白质污渍可以包含蛋或基于蛋的污渍,例如法式焦糖布丁、烘焙奶酪、BMI或其他含有蛋白质的物质。

[0174] 提供以下实例以证明和说明本公开的某些优选实施例和方面,并且不应被解释为限制性的。

[0175] 实例

[0176] 实例1

[0177] GG36枯草杆菌蛋白酶变体的表达

[0178] SEQ ID NO:1中提供了迟缓芽孢杆菌P29600枯草杆菌蛋白酶(GG36)成熟蛋白质序列。将该GG36枯草杆菌蛋白酶野生型用作在位置39、74、99、126、127、128、198、211、212和242处进一步取代的变体的工程化的起点。所有GG36枯草杆菌蛋白酶变体使用如下DNA片段表达,该DNA片段依次包含:5' AprE侧翼区,其含有枯草芽孢杆菌rrnIp2启动子序列的变体(SEQ ID NO:2)(枯草芽孢杆菌rrnIp2启动子和经工程化的变体更全面地描述于专利申请WO 2020112609中);编码aprE信号肽序列的核苷酸序列(SEQ ID NO:3);编码迟缓芽孢杆菌前肽的核苷酸序列(SEQ ID NO:4);与编码成熟GG36枯草杆菌蛋白酶的基因相对应的序列(SEQ ID NO:5);BPN'终止子(SEQ ID NO:6);包括卡那霉素基因表达盒的3' AprE侧翼序列(SEQ ID NO:7)。该DNA片段使用标准分子生物技术组装。使用表达盒的线性DNA转化合适菌株的感受态枯草芽孢杆菌细胞。

[0179] 将转化混合物铺板到含有1.6%脱脂奶和1.8ppm卡那霉素的LA板上,并在37°C孵育过夜。挑取单菌落并使其在抗生素选择下在Luria肉汤中于37°C生长。

[0180] 为了进行蛋白表达实验,将转化的细胞在96孔微量滴定板(MTP)中的培养基(基于MOPS缓冲液的富集的半限定培养基,尿素为主要氮源,葡萄糖为主要碳源,补充1%大豆胨用于稳健细胞生长,含有抗生素选择)中,在振荡孵育器中在32°C、300rpm、80%湿度下生长3天。离心和过滤后,将含有目的蛋白酶的澄清培养物上清液用于测定。

[0181] 实例2

[0182] 测定

[0183] 蛋白质确定

[0184] 通过UHPLC使用Zorbax 300SB-C3柱以及0.1%三氟乙酸(溶液A)和在乙腈中的0.07%三氟乙酸(溶液B)的线性梯度,并在220nm处检测,确定GG36枯草杆菌蛋白酶变体在培养物上清液中的浓度。将培养物上清液稀释于10mM NaCl、0.1mM CaCl₂、0.005% Tween®-80中以加载到柱上。使用纯化的亲本酶的标准曲线计算样品的蛋白质浓度。

[0185] 蛋白酶活性

[0186] 通过测量AAPF-pNA合成肽底物的水解来测试GG36枯草杆菌蛋白酶变体的蛋白酶活性。

[0187] 对于AAPF测定,使用的试剂溶液为:100mM Tris pH 8.6,10mM CaCl₂,0.005% Tween®-80(Tris/Ca缓冲液)和在DMSO中的160mM suc-AAPF-pNA(suc-AAPF-pNA原液)(西格玛公司:S-7388)。为了制备工作溶液,将1mL suc-AAPF-pNA原液添加到100mL Tris/Ca缓冲液中并混合。将酶样品添加到含有1mg/mL suc-AAPF-pNA工作溶液的微量滴定板(MTP)中,并且使用SpectraMax读板器以动力学方式在室温(RT)下经3-5min在405nm处测定活性。

将蛋白酶活性表示为mOD/min。

[0188] Tris-EDTA的稳定性测定

[0189] 本文所述的GG36枯草杆菌蛋白酶变体的稳定性通过以下来测量:将这些变体在胁迫缓冲液中稀释并使用如上所述的AAPF测定在加热孵育步骤之前和之后测量变体的蛋白水解活性。选择加热孵育步骤的温度和持续时间,使得参比蛋白酶显示约15%-40%的残余活性。在384孔热循环仪中在50℃或52℃孵育样品5min。在Tris-EDTA(50mM Tris pH 9;5mM EDTA;0.005% Tween®-80)缓冲的条件下测量稳定性。稳定性结果计算为每个酶样品的残余活性剩余活性的百分比(%),计算方式为取针对有胁迫条件相比无胁迫条件的mOD/min的比率并乘以100。

[0190] 自动餐具洗涤清洁测定

[0191] 法式焦糖布丁污渍:如本文所示,通过使用由CFT(测试材料BV中心(Center for Testmaterials BV),符拉尔丁根,荷兰)制备的定制订购的三聚氰胺洗碗机监测器(砖(tile))测试GG36枯草杆菌蛋白酶变体对法式焦糖布丁污渍的清洁性能,并标记为DM110Gs。本研究中使用的DM110Gs砖使用相同的污渍但不是在150℃,而是在140℃烤2小时而制备,该相同的污渍用于制备可商购的DM10监测器(法式焦糖布丁Debic.com产品)。

[0192] 将DM110Gs三聚氰胺砖用作盖子并紧紧压在微量滴定板(MTP)上。将3.8g/L的MGDA-柠檬酸盐洗涤剂溶液(表2中所示的组合物)调节至374ppm水硬度,并将每种酶样品添加到MTP中,然后将三聚氰胺砖盖附着于MTP。MTP的体积容量以及因此添加到其中的溶液体积可以变化,其中应将最小体积的溶液添加到MTP中,该最小体积的溶液使溶液与污渍表面之间能够发生接触。在该实例中,将300μL体积的含有酶的洗涤剂溶液添加到铝96孔MTP的每个孔中。除非另外指定,否则将MTP在Infors热振荡器中在40℃时以250rpm孵育45min。孵育后,将砖从MTP中去除,用自来水简单漂洗,并风干。

[0193] 烘焙奶酪污渍:如本文所示,通过使用由CFT(符拉尔丁根,荷兰)制备的定制订购的三聚氰胺洗碗机监测器(砖)测试GG36枯草杆菌蛋白酶变体对烘焙奶酪的清洁性能,并标记为DM06Gs。本研究中使用的DM06Gs砖使用相同的污渍制备,该相同的污渍用于制备可商购的DM06监测器。

[0194] 将DM06Gs三聚氰胺砖用作盖子并紧紧压在微量滴定板(MTP)上。将3.8g/L的MGDA-柠檬酸盐洗涤剂溶液(表2中所示的组合物)调节至374ppm水硬度,并将每种酶样品添加到MTP中,然后将三聚氰胺砖盖附着于MTP。MTP的体积容量以及因此添加到其中的溶液体积可以变化,其中应将最小体积的溶液添加到MTP中,该最小体积的溶液使溶液与污渍表面之间能够发生接触。在该实例中,将300μL体积的含有酶的洗涤剂溶液添加到铝96孔MTP的每个孔中。除非另外指定,否则将MTP在Infors热振荡器中在40℃时以250rpm孵育45min。孵育后,将砖从MTP中去除,用自来水简单漂洗,并风干。

[0195] 通过拍摄这些砖并使用定制软件测量来自每个污渍区域的RGB值来量化DM110Gs和DM06Gs砖的污渍去除。通过使用以下公式中的RGB值计算经洗涤的砖的污垢去除百分比(%SRI)值:

$$[0196] \quad \% \text{SRI} = (\Delta E / \Delta E_{\text{初始}}) * 100$$

$$[0197] \quad \text{其中 } \Delta E = \text{SQR}((R_{\text{之后}} - R_{\text{之前}})^2 + (G_{\text{之后}} - G_{\text{之前}})^2 + (B_{\text{之后}} - B_{\text{之前}})^2)$$

$$[0198] \quad \text{其中 } \Delta E_{\text{初始}} = \text{SQR}((R_{\text{白色}} - R_{\text{之前}})^2 + (G_{\text{白色}} - G_{\text{之前}})^2 + (B_{\text{白色}} - B_{\text{之前}})^2)$$

[0199] 通过从每个样品值中减去空白对照(无酶)的值来获得清洁性能(以下为“减去空白的清洁度”)。对于每种条件和GG36枯草杆菌蛋白酶变体,通过将减去空白的清洁度除以相同浓度的亲本蛋白酶的清洁度来计算性能指数(PI)。从亲本蛋白酶的标准曲线确定亲本蛋白酶PI的值,该亲本蛋白酶包括在测试中并拟合至朗缪尔(Langmuir)拟合或希尔(Hill)S形拟合(视情况而定)。

[0200] 蛋黄污渍:GG36枯草杆菌蛋白酶变体对蛋黄微样本(PAS-38,测试材料BV中心,符拉尔丁根,荷兰)的清洁性能在预漂洗或未漂洗样本上进行测量。为了制备漂洗过的PAS38样本,将180 μ l的10mM CAPS缓冲液(pH 11)添加到含有PAS38微样本的MTP中。将板密封并在iEMS培养箱中在60 $^{\circ}$ C下伴随1100rpm振荡孵育30min。在这次孵育后,去除缓冲液,并用去离子水漂洗样本以去除任何残余的缓冲液。然后在用于性能测定之前将板风干。在添加酶之前,用调节至374ppm水硬度的ADW洗涤剂溶液(参见表1和表2)填充含有PAS-38样本的微样本板,最终酶浓度在0.05与10ppm之间。

[0201] 在PAS-38样本与洗涤剂 and 酶一起在40 $^{\circ}$ C时孵育30分钟后,将等分试样转移到空的MTP中,并使用SpectraMax读板器在405nm处读取吸光度。通过从每个样品值中减去空白对照(无酶)的值来获得吸光度结果(以下为“减去空白的吸光度”)。对于每种条件和GG36枯草杆菌蛋白酶变体,通过将减去空白的吸光度除以相同浓度的GG36野生型(SEQ ID NO:1)亲本蛋白酶的吸光度来计算性能指数(PI)。

[0202] 衣物清洁测定

[0203] 血液奶墨水污渍:使用C-05样本(订单代码:C-05,测试材料BV中心,符拉尔丁根,荷兰)测量GG36枯草杆菌蛋白酶变体在血液/奶/墨水(BMI)棉花微样本上的清洁性能。在添加酶之前,用ECE-2衣物洗涤剂溶液(如下文在“洗涤剂”下所述制备的,并调节至374ppm水硬度)填充含有C-05样本的微量滴定板,最终酶浓度在0.05与10ppm之间。

[0204] 在C-05样本与洗涤剂 and 酶伴随1150rpm振荡在30 $^{\circ}$ C下孵育25分钟后,将等分试样转移到空的MTP中,并使用SpectraMax读板器在600nm处读取吸光度。通过从每个样品值中减去空白对照(无酶)的值来获得吸光度结果(以下为“减去空白的吸光度”)。对于每种条件和GG36枯草杆菌蛋白酶变体,通过将减去空白的吸光度除以相同浓度的GG36野生型(SEQ ID NO:1)亲本蛋白酶的吸光度来计算性能指数(PI)。

[0205] 洗涤剂

[0206] 使用了如下所列的各种洗涤剂配方。使用最终浓度如括号中示出的以下洗涤剂进行自动餐具洗涤(ADW)清洁测定:GSM-B洗涤剂(3g/L)(不含酶的GSM-B无磷酸盐ADW洗涤剂,从德国布鲁克格根的WFK Testgewebe公司(WFK Testgewebe GmbH,Brüggen,Deutschland)(www.testgewebe.de)购买,表1显示了组成)以及MGDA-柠檬酸盐洗涤剂(3.8g/L)(表2显示了组成)。将用于清洁测定的ADW洗涤剂溶液调节至374ppm水硬度。使用ECE-2HDD洗涤剂溶液进行衣物清洁测定。在下文所示的表3中更全面的描述了购买自WFT Testgewebe公司的ECE-2洗涤剂。将150g的TAED和25g的过碳酸钠添加到825g的ECE-2洗涤剂(来自WFT Testgewebe公司)中并将其混合。制备该混合物的水溶液(6.5g/L终浓度),将其调节至374ppm水硬度,并在衣物清洁测定中用作ECE-2HDD洗涤剂溶液。

组分	重量%
柠檬酸钠脱水物	30.0
马来酸/丙烯酸共聚物钠盐 (SOKALAN [®] CP5; 巴斯夫公司)	12.0
过硼酸钠一水合物	5.0

TAED	2.0
二硅酸钠: Protil A (科宁公司 (Cognis))	25.0
直链脂肪醇乙氧基化物	2.0
无水碳酸钠	添加至 100

组分	重量%
MGDA (CG795, PQ 公司)	15
三柠檬酸钠	15
二硅酸钠 (H265HP, PQ 公司)	4
低泡非离子表面活性剂 (Pluronic 6800, 巴斯夫公司)	3
柠檬酸铋	0.3
Dequest 2016 (Cublen K 8514 GR, Zschimmer & Schwarz 公司)	5
聚合物 (Acusol 588, 陶氏公司 (Dow))	7
PEG1500	4
过碳酸钠	13
TAED	3
碳酸钠	27
硫酸钠	3.5
消泡剂 (XIAMETER APW-4503, 陶氏公司)	0.2
	总计
	100

表 3.ECE-2 HDD 成分		
	重量%	
[0210]	直链烷基苯磺酸钠	9.7
	乙氧基化脂肪醇 C12-18 (7 EO)	5.2
	钠皂	3.6
	消泡剂 DC2-4248S	4.5
	硅酸铝钠沸石 4A	32.5
	碳酸钠	11.8
	丙烯酸和马来酸共聚物的钠盐 (Sokalan CP5)	5.2
[0211]	硅酸钠 (SiO ₂ : Na ₂ O = 3,3 : 1)	3.4
	羧甲基纤维素	1.3
	二亚乙基三胺五(亚甲基磷酸)	0.8
	硫酸钠	9.8
	水	12.2

[0212] 实例3

[0213] GG36枯草杆菌蛋白酶变体的自动餐具和衣物清洁性能和稳定性

[0214] 迟缓芽孢杆菌P29600枯草杆菌蛋白酶 (GG36) 野生型亲本 (SEQ ID NO:1) 用作参比酶。实例1描述了这些蛋白的表达。使用实例2中描述的洗涤剂 and 测定, 测量这些GG36枯草杆菌蛋白酶变体对蛋黄 (PAS-38)、烘焙奶酪 (DM06Gs) 和法式焦糖布丁 (DM110Gs) 技术污渍的ADW清洁性能, 对血液/奶/墨水 (BMI) 技术污渍的衣物清洁性能和这些变体的稳定性 (在 Tris/EDTA中)。表4和表5报告了结果。清洁表示为相对于GG36野生型亲本酶的PI值。稳定性表示为残余活性百分比。

表4: 各种GG36枯草杆菌蛋白酶变体与GG36野生型相比的ADW和衣物清洁性能（报告为性能指数（PI）值）和稳定性（报告为残余活性百分比）。PI结果大于3.0报告为> 3.0。

[0215]

与GG36 WT相比的突变	残余活性(%), TRIS-EDTA, 50°C, 5分钟	PAS38蛋黄未漂洗ADW GSM-B, PI	PAS38蛋黄漂洗ADW MGD A 柠檬酸盐, PI	PAS38蛋黄未漂洗ADW MGD A 柠檬酸盐, PI	DM06Gs烘焙奶酪ADW MGD A 柠檬酸盐, PI	DM110Gs法式焦糖布丁ADW MGD A 柠檬酸盐, PI	BMI HDD ECE2, PI
无 (GG36 WT)	39	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
N074D-S099R-S126A-S128G-L211Q-N212Q	44	1.9	1.5	2.1	1.5	1.0	0.8
S099R-P127E-S128G-L211Q	15	1.5	1.2	1.7	1.3	1.3	1.0

[0216]

P039E-S099R-S126A-S128G-N198G-N212Q-N242D	31	2.3	1.4	2.4	1.3	1.4	1.0
N074D-S099R-S126A-S128G-N198G-L211Q-N212Q	42	2.0	1.5	2.2	1.3	1.1	1.0
S099R-P127E-N198G-L211Q-N212Q	7	2.1	1.3	2.1	1.3	1.3	1.0
S126A-N198G-L211Q-N212Q	9	1.3	1.1	1.3	1.3	1.3	1.0
S099R-S126A-P127E-N198G-L211Q-N212Q	14	2.3	1.3	2.2	1.2	1.2	1.1
S099R-S126A-P127E-L211Q-N212Q	8	1.9	1.3	1.9	1.2	1.2	1.0
S128G-L211Q	13	1.2	1.2	1.3	1.2	1.4	1.0
P039E-N198G-N212Q	33	1.1	1.1	1.2	1.2	1.6	0.8
S099R-S126A-P127E-S128G-N198G-N212Q	8	1.8	1.2	1.8	1.1	1.3	0.9
S099R-S126A-P127E-L211Q	12	1.8	1.3	1.8	1.1	1.1	1.1
P039E-S099R-S126A-S128G-N198G	36	2.1	1.5	2.3	1.1	1.0	1.1
P039E-S126A-S128G-N198G-N212Q	34	1.2	1.0	1.4	1.1	1.6	1.0
P039E-S099R-S126A-P127E	37	1.8	1.1	1.9	1.1	1.4	1.0
P039E-S126A-N198G-L211Q	37	1.3	1.2	1.5	1.1	1.3	1.1
P039E-L211Q-N212Q	39	1.7	1.1	1.5	1.1	1.5	1.1
P039E-S126A-N198G	33	1.0	1.1	1.3	1.1	1.4	1.0
P039E-S099R-S128G-N198G-L211Q-N212Q-N242D	46	2.6	1.5	2.5	1.1	1.2	1.0
N074D-S128G-N198G-N212Q	44	1.0	1.0	1.0	1.0	1.6	0.9
P039E-S099R-S126A-P127E-S128G-N212Q	35	1.9	1.1	2.1	1.0	1.9	1.0
P039E-S126A-N198G-L211Q-N212Q	35	1.7	1.2	1.8	1.0	1.8	1.1
P039E-N074D-S099R-S128G-N198G-N212Q	72	2.1	1.4	2.2	1.0	1.1	1.0
P039E-S126A-N198G-N212Q	31	1.2	1.1	1.4	1.0	2.2	0.9
P039E-S126A-L211Q-N212Q	37	1.4	1.1	1.4	1.0	1.5	1.0
P039E-N074D-S099R-S126A-	71	2.2	1.5	2.5	1.0	1.1	0.9

[0217]

S128G-N198G-N212Q							
P039E-S099R-S126A-S128G-N198G-L211Q-N212Q-N242D	31	2.8	1.5	> 3.0	0.9	1.0	0.9
P039E-S099R-S126A-N198G-L211Q-N212Q-N242D	36	> 3.0	1.5	> 3.0	0.9	1.2	0.9
S126A-N212Q-N242D	13	1.0	1.0	1.0	0.9	1.7	0.9
P039E-S099R-P127E-L211Q-N212Q	41	2.1	1.3	2.1	0.9	1.4	0.9
N074D-S099R-S126A-L211Q-N212Q-N242D	47	1.7	1.2	1.7	0.9	1.1	0.8
P039E-S099R-P127E-N198G-L211Q	38	2.2	1.3	2.1	0.9	1.2	0.9
P039E-N074D-S099R-S126A-S128G-N198G-N242D	74	1.9	1.3	2.1	0.8	1.0	0.7
P039E-N198G-L211Q-N242D	38	1.4	1.0	1.5	0.8	1.4	0.9
P039E-N074D-S099R-P127E-S128G-N198G-N212Q	60	2.0	1.1	2.1	0.8	1.5	0.9
P039E-N074D-S099R-S128G-N198G-L211Q-N212Q-N242D	74	2.2	1.4	2.3	0.7	1.0	0.8
P039E-N074D-S099R-S126A-P127E-S128G-N198G-N212Q	69	2.5	1.0	2.5	0.7	1.4	0.9
P039E-N074D-S126A-N198G-L211Q	72	1.4	1.0	1.5	0.7	1.3	0.9
P039E-S099R-S126A-L211Q-N212Q-N242D	39	2.1	1.4	2.3	0.7	1.5	0.9
S099R-S126A-P127E-N198G-L211Q-N242D	9	1.6	1.3	1.9	0.6	1.0	1.0
P039E-S099R-P127E-S128G-N198G-N212Q-N242D	34	2.1	1.0	2.2	0.6	1.4	0.8
P039E-N074D-S099R-S126A-S128G-N212Q-N242D	70	1.8	1.2	2.1	0.6	1.0	0.8
P039E-S099R-P127E-N198G-L211Q-N212Q	37	> 3.0	1.4	2.7	0.6	1.0	1.0

表5.各种另外的GG36枯草杆菌蛋白酶变体与GG36野生型相比的ADW和衣物清洁性能（报告为性能指数（PI）值）和稳定性（报告为残余活性百分比）。PI结果大于3.0报告为> 3.0。

	TRIS-EDTA, 52°C, 5 min	在MGDA柠檬酸盐ADW洗涤剂中的性能				HDD, ECE-2
与GG36 WT相比的突变	残余活性 (%)	PAS-38蛋黄, 漂洗过, PI	PAS-38蛋黄, 未漂洗, PI	DM106Gs烘焙奶酪, PI	DM110Gs法式焦糖布丁, PI	BMI, PI
无	20	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
N074D-S099R-P127E-S128G-L211Q	53	1.0	> 3	1.2	2.0	1.0
N074D-S099R-P127E-S128G-N198A	57	1.0	> 3	1.0	1.5	1.0
N074D-S099R-P127E-S128G-N198A-L211Q-N212Q	53	0.9	> 3	1.2	2.3	1.1
N074D-S099R-P127E-S128G-N212Q	55	1.0	> 3	1.2	1.4	1.0
N074D-S099R-S126A-P127E-S128G-L211Q	53	1.0	> 3	1.1	1.9	1.1
N074D-S099R-S126A-P127E-S128G-N198G-N212Q	48	1.0	> 3	1.3	1.5	1.0
N074D-S099R-S126A-S128G-L211Q-N212Q-N242D	49	1.4	> 3	1.1	1.3	0.9
N074D-S099R-S126A-S128G-N212Q	32	1.2	> 3	1.1	1.0	1.0
N074D-S099R-S128G-N198G-L211Q-N212Q	21	1.3	> 3	1.1	1.1	0.9
N074D-S126A-L211Q-N212Q	54	0.9	1.3	1.1	1.6	1.1
N074D-S126A-N198A-L211Q	51	1.0	1.4	1.0	1.3	1.1
P039E-L211Q	48	1.0	1.4	1.0	1.4	1.0

[0218]

	P039E-N074D-S099R-S126 A-S128G-L211Q-N212Q	78	1.2	> 3	1.2	1.4	0.9
	P039E-S099R-P127E-S128G -L211Q	46	1.0	> 3	1.2	2.0	1.1
	P039E-S099R-P127E-S128G -L211Q-N212Q	45	0.9	> 3	1.2	2.4	1.1
	P039E-S099R-S126A-S128G -L211Q	25	1.5	> 3	1.2	1.0	1.0
	P039E-S099R-S126A-S128G -L211Q-N242D	46	1.3	> 3	1.0	1.4	1.1
	P039E-S099R-S126A-S128G -N198A-L211Q	27	1.6	> 3	1.2	0.9	1.0
	P039E-S099R-S126A-S128G -N198A-L211Q-N212Q-N24 2D	37	1.3	> 3	1.0	1.5	1.0
	P039E-S099R-S126A-S128G -N198G-L211Q	20	1.4	> 3	1.0	1.0	1.0
[0219]	P039E-S099R-S126A-S128G -N198G-L211Q-N212Q	22	1.4	> 3	0.9	1.1	1.1
	P039E-S099R-S128G-L211Q -N212Q	22	1.3	> 3	1.3	1.2	0.9
	P039E-S126A-N198A-N212 Q	32	1.0	1.2	1.1	1.4	1.1
	P039E-S126A-S128G	40	0.9	1.5	1.2	1.6	1.1
	P039E-S126A-S128G-N198 A	36	0.9	1.2	1.1	1.5	1.1
	P039E-S128G	39	1.0	1.5	1.6	1.5	1.0
	P039E-S128G-N198A-L211 Q-N212Q	42	0.9	1.8	1.1	1.8	1.1
	P039E-S128G-N198A-N212 Q	39	0.9	0.9	1.3	1.9	1.0
	S099R-P127E-S128G	22	1.2	> 3	1.4	1.2	1.1
	S099R-S126A-S128G-L211 Q-N212Q-N242D	35	1.3	> 3	1.3	1.4	0.9
	S126A-S128G	16	1.1	1.3	1.6	1.6	1.1
	S126A-S128G-N242D	26	0.9	1.1	1.0	2.2	1.1

[0220] 如上文表4和表5所示,在本研究评估的条件下,具有以下取代中的两个或更多个的枯草杆菌蛋白酶变体:P039E、N074D、S099R、S126A、P127E、S128G、N198A、N198G、L211Q、

N212Q和N242D在清洁性能和/或稳定性方面展现出益处。

[0221] 尽管已经结合本公开的特定实施例描述了本公开,但是显而易见的是,许多替代方案、修改和变化对于本领域技术人员将是显而易见的。因此,本公开意图涵盖落入所附权利要求书的精神和广泛范围内的所有这样的替代方案、修改和变化。

[0222] 本说明书中提到的所有出版物、专利和专利申请通过引用以其整体在本文并入本说明书,其程度就像明确且单独地指出每一份单独的出版物、专利或专利申请通过引用并入本文一样。另外,在本申请中对任何参考文献的引用或标识均不应被解释为承认该参考文献可作为本公开的现有技术获得。就使用章节标题而言,不应将其解释为必然的限制。

[0223] 序列表

[0224] SEQ ID NO:1:蛋白质:生物体:迟缓芽孢杆菌(迟缓芽孢杆菌GG36蛋白的氨基酸序列)

[0225] AQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTSGVKVAVLDTGISTHPDLNIRG

[0226] GASFVPGEPSTQDGNHGHVAGTIAALNNSIGVLGVAPSAELYA

[0227] VKVLGASGSGSVSSIAQGLEWAGNNGMHVANLSLGSPSPSATLEQ

[0228] AVNSATSRGVLVVAASGNSGAGSISYPARYANAMAVGATDQNNN

[0229] RASFSQYGAGLDIVAPGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGA

[0230] AALVKQKNPSWSNVQIRNHLKNTATSLGSTNLYGSLVNAEAAT

[0231] R

[0232] SEQ ID NO:2:DNA:生物体:枯草芽孢杆菌(含有枯草芽孢杆菌rrnIp2启动子序列的5'AprE侧翼序列)

[0233] CTGACGATATTGCCTCCTGCTTTTCCGGCCAGACCATCTTTGTA

[0234] ATTAATGCCGGAATAAGCAACTTTAATCAGGACACCATCCTTCG

[0235] GCAAATCCTCTGTTGATATGGTTTTTCACATGGACTGAAACATCA

[0236] TCGGCATTTTTTTCTGCCTGCAAGGCTTGAAATAACGTTGACAT

[0237] TCGGCACACTCCTTTTCATTTATATCGTAACCGAAGAACGTTCA

[0238] AAAAACCAAATCATCAAGCCGCCATTTTCACTTCGCCGGCACAT

[0239] TGAGACAATAATGGACAAATCCGGTATCCTCTTCATAGCCGTTT

[0240] TGCTCATAACAAGCTTCTTGCCCTCCGGTTGTGGTGCTCAGTCTG

[0241] AAGTGTTAAACATTTTGCCCCGTTTTGCCCTGCATAATCCTTTGC

[0242] GGCAGAAAGCAGCCGGCCGGCTCCCTTTGTACGCGCATGA

[0243] GGAACGACAAATAAGTCATTTAATATGTATATCCTTTTCATTGA

[0244] CACAGAAGAAAACGTTGGATAGAGCTGGGTAAAGCCTATGAAT

[0245] TCTCCATTTTCTTCTGCTATCAAAATAACAGACTCGTGATTTTCC

[0246] AAACGAGCTTTCAAAAAGCCTCTGCCCTTGCAAATCGGATG

[0247] CCTGTCTATAAAATTCCCGATATTGGTTAAACAGCGGCGCAATG

[0248] GCGGCCGCATCTGATGTCTTTGCTTGGCGAATGTTTCATCTTATTT

[0249] CTTCTCCCTCTCAATAATTTTTTTCATTCTATCCCTTTTCTGTAA

[0250] AGTTTATTTTTTCAATAACTTTTATCATCATGCTTTGAAAAAAT

[0251] ATCACGATAATATCCATTGTTCTCACGGAAGCACACGCGCTGAT

- [0252] AAACAGCTGACATCAACTAAAAGTTTCATTAATACTTTGAAA
- [0253] AAAGTTGTTGACTTAAAAGAAGCTAAATGTTATAGTAATTGTAC
- [0254] AGAATAGTCTTTTAAGTAAGTCTACTCTGAATTTTTTTAAAAGG
- [0255] AGAGGGTAAAGA
- [0256] SEQ ID NO:3:DNA:生物体:枯草芽孢杆菌(来自枯草芽孢杆菌的aprE信号肽的核酸序列)
- [0257] GTGAGAAGCAAAAAATTGTGGATCAGCTTGTGTTTTCGTTAAC
- [0258] GTTAATCTTTACGATGGCGTTCAGCAACATGTCTGCGCAGGCTSEQ ID NO:4:DNA:生物体:迟缓芽孢杆菌(迟缓芽孢杆菌前序列的核酸序列)
- [0259] GCTGAAGAAGCAAAAGAAAAATATTTAATTGGCTTTAATGAGC
- [0260] AGGAAGCTGTCAGTGAGTTTGTAGAACAAGTAGAGGCAAATGA
- [0261] CGAGGTCGCCATTCTCTCTGAGGAAGAGGAAGTCGAAATTGAA
- [0262] TTGCTTCATGAATTTGAAACGATTCTGTTTTATCCGTTGAGTTA
- [0263] AGCCCAGAAGATGTGGACGCGCTTGAACGATCCAGCGATTT
- [0264] CTTATATTGAAGAGGATGCAGAAGTAACGACAATG
- [0265] SEQ ID NO:5:DNA:生物体:迟缓芽孢杆菌(编码GG36成熟蛋白的DNA序列)
- [0266] GCGCAATCAGTGCCATGGGGAATTAGCCGTGTGCAAGCCCCAG
- [0267] CTGCCATAACCGTGGATTGACAGGTTCTGGTGTAAGTTGCT
- [0268] GTCCTCGATACAGGTATTTCCACTCATCCAGACTTAAATATTCG
- [0269] TGGTGGCGTAGCTTTGTACCAGGGGAACCATCCACTCAAGAT
- [0270] GGAATGGGCATGGCACGCATGTGGCCGGGACGATTGCTGCTT
- [0271] TAAACAATTCGATTGGCGTTCTTGGCGTAGCGCCGAGCGCGGA
- [0272] ACTATACGCTGTAAAGTATTAGGGGCGAGCGGTTCAAGTTTCG
- [0273] GTCAGCTCGATTGCCCAAGGATTGGAATGGGCAGGGAACAATG
- [0274] GCATGCACGTTGCTAATTTGAGTTTAGGAAGCCCTTCGCCAAGT
- [0275] GCCACACTTGAGCAAGCTGTAAATAGCGCGACTTCTAGAGGCG
- [0276] TTCTTGTTGTAGCGGCATCTGGAAATTCAGGTGCAGGCTCAATC
- [0277] AGCTATCCGGCCCGTTATGCGAACGCAATGGCAGTCGGAGCTA
- [0278] CTGACCAAAACAACAACCGCGCCAGCTTTTCACAGTATGGCGC
- [0279] AGGGCTTGACATTGTGCGACCAGGTGTAAACGTGCAGAGCACA
- [0280] TACCCAGGTTCAACGTATGCCAGCTTAAACGGTACATCGATGG
- [0281] CTACTCCTCATGTTGCAGGTGCAGCAGCCCTTGTTAAACAAAAG
- [0282] AACCCATCTTGGTCCAATGTACAAATCCGCAATCATCTAAAGA
- [0283] ATACGGCAACGAGCTTAGGAAGCACGAACCTGTATGGAAGCGG
- [0284] ACTTGTCAATGCAGAAGCTGCAACTCGTTAA
- [0285] SEQ ID NO:6:DNA:生物体:解淀粉芽孢杆菌(BPN'终止子) TCTAGATACATAAAAAACC
GGCCTTGCCCCGCGGTTTTTTATTATTTTCTTCTCCGCATGTTCAATCCGCTCCATAATCGACGGATGGCTCC
CTCTGAAAATTTTAAACGAGAAACGGCGGGTTGACCCGGCTCAGTCCCGTAACGGCCAAGTCTGAAACGTCTCAATC
GCCGCTTCCCGTTTTCCGGTCAGCTCAATGCCGTAACGGTCGGCGCGTTTTTCTGATACCGGGAGACGGCATTTCGT

AATC

[0286] SEQ ID NO:7:DNA:生物体:人工序列(包括卡那霉素标记的3'AprE侧翼序列)

[0287] TAGGAATTAGCTGCGATCCGCGGCCGCTCTAGATACATAAAAA

[0288] ACCGGCCTTGGCCCCGCGGTTTTTTATTATTTTTCTTCCCTCCGC

[0289] ATGTTCAATCCGCTCCATAATCGACGGATGGCTCCCTCTGAAAA

[0290] TTTTAACGAGAAACGGCGGGTTGACCCGGCTCAGTCCCGTAAC

[0291] GGCCAAGTCTGAAACGTCTCAATCGCCGCTTCCCGGTTTCCGG

[0292] TCAGCTCAATGCCGTAACGGTCGGCGGCGTTTTCTGATACCGG

[0293] GAGACGGCATTTCGTAATCAGTCTTTCGACTGAGCCTTTCGTTTT

[0294] ATTTGATGCCTCAAGCTAGAGAGTCATTACCAGATCTCACTGCA

[0295] GTCATAAAAACAATTCATCCAGTAAAATATAATATTTTATTTTC

[0296] TCCCAATCAGGCTTGATCCCCAGTAAGTCAAAAAATAGCTCGA

[0297] CATACTGTTCTTCCCCGATATCCTCCCTGATCGACCGGACGCAG

[0298] AAGGCAATGTCATAACCACTTGTCCGCCCTGCCGCTTCTCCCAAG

[0299] ATCAATAAAGCCACTTACTTTGCCATCTTTCACAAAGATGTTGC

[0300] TGTCTCCAGGTGCGCGTGGGAAAAGACAAGTTCTCTTCGGGC

[0301] TTTTCCGTCTTTAAAAAATCATACAGCTCGCGCGGATCTTTAAA

[0302] TGGAGTGTCTTCTTCCAGTTTTTCGCAATCCACATCGGCCAGAT

[0303] CGTTATTCAGTAAGTAATCCAATTCGGCTAAGCGGCTGTCTAAG

[0304] CTATTCGTATAGGGACAATCCGATATGTGCGATGGAGTGAAAGA

[0305] GCCTGATGCACTCCGCATACAGCTCGATAATCTTTTCAGGGCTT

[0306] TGTTTCATCTTCATACTCTTCCGAGCAAAGGACGCCATCGGCCTC

[0307] ACTCATGAGCAGATTGCTCCAGCCATCATGCCGTTCAAAGTGCA

[0308] GGACCTTTGGAACAGGCAGCTTTCCTTCCAGCCATAGCATCATG

[0309] TCCTTTTCCCGTTCACATCATAGGTGGTCCCTTTATAACCGGCTG

[0310] TCCGTCATTTTTAAATATAGGTTTTTCATTTTCTCCCACCAGCTTA

[0311] TATACCTTAGCAGGAGACATTCCTTCCGTATCTTTTACGCAGCG

[0312] GTATTTTTTCGATCAGTTTTTTCAATTCCGGTGATATTCTCATTTT

[0313] AGCCATTTATTATTTCTTCTCTTTTCTACAGTATTTAAAGATA

[0314] CCCCAGAAGCTAATTATAACAAGACGAACTCCAATTCAGTGT

[0315] TCCTTGCATTCTAAAACCTTAAATACCAGAAAACAGCTTTTTCA

[0316] AAGTTGTTTTGAAAGTTGGCGTATAACATAGTATCGACGGAGC

[0317] CGATAACGCCTCACTCCTCACATCAACCCGTTACTTCTATTGTA

[0318] ATCATAAATTCAAATTCCTTAGAACCAAGCTGTGTTCCGCACTTT

[0319] TCCACCCTTTTAAGCATGGAAACCCCGATCGCTGGGAAAATA

[0320] ACAATGTTTGGAGTGATGCAAATGAAAAAATAGTGGCAGCCA

[0321] TCGTGGTAATCGGTCTTGTGTTTATCGCATTTTTTTTATCTTTACA

[0322] GCCGATCAGGCATGTGTATCAATCGGTAGACGCGGATTTGAT

[0323] CACACTGTCTTCAAGCGGCCAGGAAGATATCGAGATTGAAAAA

[0324] AGACAGCACGTCAAAGATATGCTGGATATTATGAATCAGGGAA
[0325] AACAGGTGAAGACAGAAAAACATCAGCCCCTGATTACGAAG
[0326] GGACAATCAAGTTTCATAAAGACCGGTATGACTCATTGACT
[0327] ATGGATTGACGGCAGCCAGCAAGCCGTTTTTTTTGAAGGATGGC
[0328] ACATACTACAAATTAAGCAAAAATGATACAAAGGCGCTGCTAA
[0329] ATATTATTAAGAAAGCAAAAGGATTGAAAATGAAAAAGCG
[0330] AAGCTAACCGCTTCGCTTTTTTCATTTTATTGGGGCAAAATATCT
[0331] CTCAGTGCCCGTCTGAGCATTTTCCCCGTCGCATTTTTCGGAAT
[0332] ATCGTCAAGAAACGTAATGGCGGCAGGCCGCTTGTATTTTGGC
[0333] AGATGCTTTTTCGAGTGCTGCATGATGTCTCTCTGTTACCCC
[0334] AGAGCGTTTTTCGGCACCACATATCCCTTTACCGCTTCCCCGCTTT
[0335] GGGGGTCCGGCACGCCGATGACAACCGCCTCCTTGACGTCCGG
[0336] ATGGCTGTACAGCACCTCCTCCACCTCCCGCGGATACACATTGT
[0337] ATCCTCTACAATGATCATGTCTTTTTTCCGGTCAACAATGTAA
[0338] AAATAGCCGTCCTCATCCCGTCTTGCCAAGTCCCCGTATAAAG
[0339] CCACCCGTCTTTTA

[0340] SEQ ID NO:8:蛋白质:生物体:巴塔哥尼亚芽孢杆菌(巴塔哥尼亚芽孢杆菌) DSM 16117 (成熟蛋白酶Bpan01744的氨基酸序列) AQSVPWGISRVQAQSAHNRGITGSGVKVAVLDTGISTH EDLNVRGGASFVAGEPGYQDGNHGHVAGTIAALNNSIGVLGVAPNAELYAVKVLGASGSGSISGIAQGLQWAGNN GMHIANMSLGTSAAPSATLEQAVNAATSRGVLVIAASGNSGAGSVGYPARYANAMAVGATDQNNNRASFSQYGAGLDI VAPGVGVQSTYPGNRYASLNGTSMATPHVAGVAALVKQKNPSWSNVQVRNHLKNTATNLGNTNLYGSGLVNAEAATR