



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0025268

(51)⁷ C12N 15/09; C12N 1/15; C12N 1/19; (13) B
C12N 9/54; C12N 5/10; C11D 3/386;
C12N 1/21

(21) 1-2019-00099

(22) 07/06/2017

(86) PCT/JP2017/021079 07/06/2017

(87) WO2017/213168 14/12/2017

(30) 2016-115734 09/06/2016 JP; 2017-103390 25/05/2017 JP

(45) 25/08/2020 389

(43) 25/04/2019 373A

(73) KAO CORPORATION (JP)

14-10, Nihonbashi Kayabacho 1-chome, Chuo-ku, Tokyo 1038210 (JP)

(72) YAMADA, Kozo (JP); SATO, Tsuyoshi (JP).

(74) Công ty Cổ phần Hỗ trợ phát triển công nghệ Detech (DETECH)

(54) THỂ ĐỘT BIẾN PROTEAZA KIỀM, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT THỂ ĐỘT BIẾN NÀY VÀ CHẾ PHẨM BAO GỒM THỂ ĐỘT BIẾN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến việc cung cấp thể đột biến proteaza kiềm với độ bền cải thiện cho chất tạo chelat. Thể đột biến proteaza kiềm, trong đó gốc axit amin ở vị trí tương ứng với vị trí 294 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 được thể trong trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2, hoặc trình tự axit amin có tính đồng nhất là ít nhất 95% trình tự này. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất thể đột biến proteaza kiềm và chế phẩm bao gồm thể đột biến này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến thể đột biến proteaza kiềm.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Chất tẩy sạch có thể được phân loại thành chất tẩy sạch dạng bột và chất tẩy sạch dạng lỏng, dựa vào dạng của chúng. Chất tẩy sạch dạng lỏng có ưu điểm vượt trội về độ hòa tan, khi so sánh với chất tẩy sạch dạng bột. Ngoài ra, chất tẩy sạch dạng lỏng có lợi ở chỗ chất tẩy sạch không bị pha loãng có thể được áp dụng trực tiếp lên các vết bẩn. Mặt khác, trong trường hợp chất tẩy sạch dạng lỏng này, do enzym như proteaza phải được duy trì ở nhiệt độ bình thường trong chất lỏng, có khó khăn về mặt kỹ thuật trong việc duy trì sự ổn định của enzym, khác với chất tẩy sạch dạng bột.

Hơn nữa, do chất tẩy sạch dạng lỏng chứa chất có hoạt tính bề mặt, axit béo, dung môi, chất tạo chelat và tương tự, nên nó phải chịu các điều kiện vô cùng nghiêm ngặt đối với enzym. Ví dụ, đã được biết đến thông thường để bổ sung các ion canxi như một phương pháp để làm ổn định enzym trong chất tẩy sạch dạng lỏng. Tuy nhiên, do chất tạo chelat được bao gồm trong chất tẩy sạch dạng lỏng này có đặc tính chiếm giữ các ion canxi được phối hợp với enzym, nó làm giảm hiệu quả tác dụng ổn định các ion canxi và do đó làm mất ổn định enzym.

Mục đích của việc trộn proteaza trong chất tẩy sạch là để phân hủy các vết bẩn protein trên quần áo thành các phân tử thấp, và do đó, để thúc đẩy việc loại

bỏ các vết bẩn. Như một chất tẩy sạch proteaza, proteaza kiềm với trọng lượng phân tử xấp xỉ 43.000, có hiệu quả giặt trên các vết bẩn hỗn hợp chứa các lipid cũng như các protein, đã được phát triển cho đến nay (xem Tài liệu Patent 1). Hơn nữa, các nghiên cứu đã được thực hiện để cải thiện hiệu suất giặt bằng cách biến đổi proteaza kiềm để cải thiện hoạt tính cụ thể, hoặc độ bền, v.v., do đó làm tăng hiệu quả giặt của chúng (các Tài liệu Patent 2 và 3).

(Tài liệu Patent 1) WO 99/18218

(Tài liệu Patent 2) JP-A-2010-273673

(Tài liệu Patent 3) JP-B-5202690

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế cung cấp thể đột biến proteaza kiềm bao gồm trình tự axit amin đã thu được bằng cách thay thế gốc axit amin ở vị trí tương ứng với vị trí 294 trong trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO:2 với threonin trong trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO:2 hoặc trình tự axit amin có tính đồng nhất là ít nhất 95% trình tự này.

Theo khía cạnh khác, sáng chế cung cấp polynucleotit mã hóa thể đột biến proteaza kiềm nêu trên.

Theo khía cạnh khác, sáng chế cung cấp vật truyền bao gồm polynucleotit nêu trên.

Theo khía cạnh khác, sáng chế cung cấp thể biến nạp bao gồm polynucleotit nêu trên hoặc vật truyền nêu trên.

Theo khía cạnh khác, sáng chế cung cấp phương pháp sản xuất thể đột biến proteaza kiềm, sử dụng thể biến nạp nêu trên.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế cung cấp chế phẩm tẩy sạch bao gồm thể đột biến proteaza kiềm nêu trên.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế cung cấp phương pháp sản xuất thể đột biến proteaza kiềm, bao gồm việc thay thế gốc axit amin ở vị trí tương ứng với vị trí 294 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 với threonin, trong trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2, hoặc trình tự axit amin có tính đồng nhất là ít nhất 95% trình tự này.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế cung cấp phương pháp cải thiện độ bền của proteaza kiềm cho chất tạo chelat, bao gồm việc thay thế gốc axit amin ở vị trí tương ứng với vị trí 294 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 với threonin, trong trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2, hoặc trình tự axit amin có tính đồng nhất là ít nhất 95% trình tự này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện hoạt tính còn lại tương đối của thể đột biến proteaza kiềm trong dung dịch chứa nước xitrat.

Fig. 2 thể hiện hoạt tính còn lại tương đối của thể đột biến proteaza kiềm trong dung dịch chứa nước EDTA.

Fig. 3 thể hiện hoạt tính còn lại tương đối của thể đột biến proteaza kiềm trong dung dịch chứa nước EDTA.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo sáng chế, thuật ngữ "gốc axit amin" đề cập đến 20 loại gốc axit amin cấu tạo nên protein, cụ thể là, alanin (Ala hoặc A), arginin (Arg hoặc R), Asparagin (Asn hoặc N), axit aspartic (Asp hoặc D), xystein (Cys hoặc C),

glutamin (Gln hoặc Q), axit glutamic (Glu hoặc E), Glyxin (Gly hoặc G), Histidin (His hoặc H), isoLeuxin (Ile hoặc I), Leuxin (Leu hoặc L), lyzin (Lys hoặc K), Methionin (Met hoặc M), phenylalanin (Phe hoặc F), Prolin (Pro hoặc P), Serin (Ser hoặc S), threonin (Thr hoặc T), tryptophan (Trp hoặc W), tyrosin (Tyr hoặc Y), và Valin (Val hoặc V).

Theo sáng chế, sự đồng nhất giữa các trình tự nucleotit hoặc giữa các trình tự axit amin có thể được tính theo phương pháp Lipman-Pearson (Science, 1985, 227: 1435-41). Cụ thể là, bằng cách sử dụng chương trình phân tích tính tương đồng (Search homology) của phần mềm xử lý thông tin gen Genetyx-Win (phiên bản 5.1.1; Software Development), sự đồng nhất này có thể được tính bằng cách thực hiện sự phân tích, thiết lập kích cỡ đơn vị để so sánh (ktup) ở 2.

Theo sáng chế, "trình tự axit amin trong đó một hoặc nhiều axit amin được xóa bỏ, được chèn, được thế hoặc được bổ sung" có thể là trình tự axit amin trong đó 1 hoặc nhiều hơn và 20 hoặc ít hơn, tốt hơn là 1 hoặc nhiều hơn và 10 hoặc ít hơn, tốt hơn nữa là 1 hoặc nhiều hơn và 5 hoặc ít hơn, tốt hơn nữa là 1 hoặc nhiều hơn và 3 hoặc ít hơn các axit amin được xóa bỏ, được chèn, được thế hoặc được bổ sung. Ngoài ra, theo sáng chế, "trình tự nucleotit trong đó một hoặc nhiều nucleotit được xóa bỏ, được chèn, được thế hoặc được bổ sung" có thể là trình tự nucleotit trong đó 1 hoặc nhiều hơn và 60 hoặc ít hơn, tốt hơn là 1 hoặc nhiều hơn và 30 hoặc ít hơn, tốt hơn nữa là 1 hoặc nhiều hơn và 15 hoặc ít hơn, tốt hơn nữa là 1 hoặc nhiều hơn và 10 hoặc ít hơn nucleotit được xóa bỏ, được chèn, được thế hoặc được bổ sung. Hơn nữa, theo sáng chế, "sự bổ sung" của các axit amin hoặc nucleotit bao gồm sự bổ sung của một hoặc nhiều axit

amin hoặc nucleotit đến một điểm cuối cùng hoặc cả hai điểm cuối cùng của trình tự.

Theo sáng chế, "tương ứng vị trí" trên trình tự axit amin hoặc trình tự nucleotit có thể được xác định bằng cách sắp xếp thẳng hàng trình tự đích và trình tự tham khảo (ví dụ, trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2) như vậy chúng cung cấp sự đồng nhất tối đa cho các gốc axit amin hoặc nucleotit đã bảo tồn có mặt trong mỗi trình tự axit amin hoặc trình tự nucleotit. Sự sắp xếp thẳng hàng này có thể được thực hiện sử dụng thuật toán đã biết, và các thủ tục của chúng là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Ví dụ, sự sắp xếp thẳng hàng có thể được thực hiện thủ công dựa vào phương pháp Lipman-Pearson nêu trên, v.v.. Ngoài ra, sự sắp xếp thẳng hàng có thể được thực hiện sử dụng Clustal W Multiple Alignment Program (Thompson, J. D. et al, 1994, Nucleic Acids Res, 22: 4673-4680) với sự thiết lập mặc định. Ngoài ra, Clustal W2 hoặc Clustal omega, mà là sự sửa đổi của Clustal W, cũng có thể được sử dụng. Clustal W, Clustal W2, và Clustal omega này là có sẵn, ví dụ, Viện tin sinh học châu Âu (European Bioinformatics Institute) (EBI [www.ebi.ac.uk/index.html]), hoặc trang web của ngân hàng dữ liệu ADN của Nhật Bản (DDBJ [www.ddbj.nig.ac.jp/Welcome-j.html]) được giám sát bởi Viện di truyền quốc gia (National Institute of Genetics).

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể điều chỉnh tinh vi hơn nữa sự sắp xếp thẳng hàng đã thu được ở trên của các trình tự axit amin, do đó nó có thể được tối ưu hóa. Sự sắp xếp thẳng hàng tối ưu này tốt hơn là được xác định, trong khi thực hiện việc xem xét sự giống nhau của các trình

tự axit amin, tần số của các khoảng trống được chèn v.v.. Trong bản mô tả sáng chế này, sự giống nhau của các trình tự axit amin nghĩa là tỷ lệ (%) của số các vị trí, ở đó các gốc axit amin giống hệt hoặc tương tự có mặt trong hai trình tự axit amin, tương ứng với số các gốc axit amin toàn bộ chiều dài, khi hai trình tự axit amin được sắp xếp thẳng hàng với nhau. Các gốc axit amin tương tự là các gốc axit amin, mà có các đặc tính giống nhau theo chiều phân cực và điện tích và căn nguyên, mà được gọi là, sự thay thế bảo tồn, trong số 20 loại axit amin cấu tạo nên protein. Các nhóm bao gồm các gốc axit amin tương tự này là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, và các ví dụ về các nhóm này bao gồm: arginin và lyzin hoặc glutamin; axit glutamic và axit aspartic hoặc glutamin; serin và threonin hoặc alanin; glutamin và asparagin hoặc arginin; và leuxin và isoleuxin, tuy nhiên các ví dụ không bị giới hạn ở đó.

Vị trí của gốc axit amin của trình tự axit amin gốc, mà được sắp xếp thẳng hàng với vị trí tương ứng với vị trí tùy ý của trình tự tham khảo theo sự sắp xếp thẳng hàng nêu trên, được coi là "vị trí tương ứng với" vị trí tùy ý, và gốc axit amin được đề cập đến như "gốc axit amin ở tương ứng vị trí."

Theo sáng chế, polynucleotit hoặc polypeptit "gốc" của polynucleotit hoặc polypeptit đột biến nhất định là polynucleotit hoặc polypeptit, mà được chuyển hóa thành sự đột biến polynucleotit hoặc polypeptit bằng cách đưa vào sự đột biến đã biết trong nucleotit hoặc gốc axit amin của chúng.

Ngoài ra, theo sáng chế, "liên kết có thể thực hiện được" của một vùng điều hòa cho một gen nghĩa là gen được liên kết với vùng điều hòa để gen có thể được biểu hiện dưới sự điều chỉnh của vùng điều hòa. Các thủ tục đối với "liên

kết có thể thực hiện được" của gen với vùng điều hòa là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật.

Theo sáng chế, các thuật ngữ "ngược hướng" và "xuôi hướng" được sử dụng đối với một gen nghĩa là sự ngược hướng và xuôi hướng của gen theo hướng sao chép, trừ khi được quy định khác.

Theo sáng chế, "chất tạo chelat" nghĩa là hợp chất có khả năng liên kết phối trí với các ion kim loại. Chất tạo chelat được bổ sung cho chế phẩm tẩy sạch có hoạt động ngăn chặn các ion kim loại mà tác động tiêu cực đến việc giặt, ví dụ, các ion canxi hoặc các ion magiê tồn tại trong nước giặt hoặc vết bẩn. Các ví dụ về chất tạo chelat được bổ sung cho chế phẩm tẩy sạch bao gồm: các axit aminopolyaxetic như axit nitrilotriaxetic, axit iminodioxetic, axit etylen-diaminaxetic, axit dietylen-triamine-pentaaxetic, axit glycol ete diamintetraaxetic, axit hydroxyetyliminodioxetic, axit trietylen-tetramin hexaaxetic, và axit đienkolic, hoặc các muối của chúng; các axit hữu cơ như axit diglycolic, axit oxydisuxinic, axit carboxymetyloxysuxinic, axit xitric, axit lactic, axit tartaric, axit oxalic, axit malic, axit gluconic, axit carboxymetylsuxinic, và axit carboxymetyltartaric, hoặc các muối của chúng; aminotri(axit metylenphosphonic), axit 1-hydroxyetylidene-1,1-diphosphonic, etylen-diamintetra(axit metylenphosphonic), dietylen-triamine-penta(axit metylenphosphonic); và các muối của chúng của các kim loại kiềm hoặc các amin thấp hơn.

Sáng chế liên quan đến việc cung cấp thể đột biến proteaza kiềm với độ bền cải thiện cho chất tạo chelat.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng độ bền của proteaza kiềm KP43 có trọng lượng phân tử là 43.000 trong chất lỏng chứa chất tạo chelat được cải thiện bằng cách thay thế gốc axit amin ở vị trí cụ thể trong trình tự axit amin của chúng với gốc axit amin khác.

Thể đột biến proteaza kiềm theo sáng chế có độ bền cao cho chất tạo chelat, và do đó, tốt hơn là như một enzym được trộn trong chế phẩm chứa chất tạo chelat (ví dụ, chế phẩm tẩy sạch). Do chế phẩm tẩy sạch chứa thể đột biến proteaza kiềm theo sáng chế có thể duy trì ổn định hoạt tính proteaza trong chất tẩy sạch chất lỏng, nó có thể biểu hiện hiệu suất giặt tuyệt vời đối với các vết bẩn hỗn hợp chứa các protein và các lipid.

Sáng chế cung cấp thể đột biến proteaza kiềm. Thể đột biến proteaza kiềm theo sáng chế bao gồm trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO:2 hoặc trình tự axit amin có tính đồng nhất là ít nhất 95% trình tự này, trong đó gốc axit amin ở vị trí tương ứng với vị trí 294 trong trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO:2 được thế.

Các ví dụ về gốc proteaza kiềm của thể đột biến proteaza kiềm theo sáng chế bao gồm proteaza kiềm bao gồm trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2, và proteaza kiềm bao gồm trình tự axit amin có tính đồng nhất là ít nhất 95% so với trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2, trong đó gốc axit amin ở vị trí tương ứng với vị trí 294 không phải là threonin. Proteaza kiềm bao gồm trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 là, ví dụ, proteaza kiềm bắt nguồn từ KP43 [*Bacillus* sp. KSM-KP43 (FERM BP-6532)] (xem Tài liệu Patent 1).

Một ví dụ về proteaza kiềm bao gồm trình tự axit amin có tính đồng nhất là ít nhất 95% so với trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 là proteaza kiềm có tính đồng nhất là 95% hoặc nhiều hơn, tốt hơn là 96% hoặc nhiều hơn, tốt hơn nữa là 97% hoặc nhiều hơn, tốt hơn nữa là 98% hoặc nhiều hơn, còn tốt hơn nữa là 99% hoặc nhiều hơn, so với trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2. Ví dụ khác về proteaza kiềm bao gồm trình tự axit amin có tính đồng nhất là ít nhất 95% so với trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 là proteaza kiềm bao gồm trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 trong đó một hoặc nhiều axit amin được xóa bỏ, được chèn, được thế hoặc được bổ sung.

Các ví dụ khác nữa về proteaza kiềm bao gồm trình tự axit amin có tính đồng nhất là ít nhất 95% so với trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 bao gồm proteaza KP9860 [bắt nguồn từ *Bacillus* sp. KSM-KP9860 (FERM BP-6534); WO99/18218; GenBank Accession No. AB046403] và proteaza 9865 [bắt nguồn từ *Bacillus* sp. KSM-9865 (FERM P-18566); GenBank Accession No. AB084155].

Protease kiềm bao gồm trình tự axit amin có tính đồng nhất là ít nhất 95% so với trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2, mà được sử dụng như một gốc proteaza kiềm trong sáng chế, có thể là thể đột biến proteaza kiềm bắt nguồn từ proteaza kiềm bao gồm trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2. Các ví dụ về sự đột biến proteaza kiềm bao gồm các sự đột biến proteaza kiềm đã thu được bằng cách đưa vào một hoặc nhiều trong số các đột biến được mô tả trong JP-B-5202690, JP-A-2002-218989, JP-A-2002-306176,

JP-A-2004-000122, JP-A-2004-305176, JP-A-2006-129865, JP-A-2007-061101, JP-A-2008-212084, JP-A-2009-034062, JP-A-2010-273672, JP-A-2010-273673, JP-A-2012-228216 và JP-A-2013-233141, trong proteaza kiềm bắt nguồn từ dòng KP-43 nêu trên.

Các ví dụ được ưu tiên về thể đột biến proteaza kiềm nêu trên được sử dụng như một gốc proteaza kiềm trong sáng chế bao gồm các sự đột biến proteaza kiềm bao gồm trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 và có một hoặc nhiều đột biến được chọn từ nhóm bao gồm (a) đến (ds) dưới đây:

- (a) sự thay thế của G ở vị trí 6 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, Q, Y, R, K, H, A, V, L, I, M, W hoặc F;
- (b) sự thay thế của K ở vị trí 9 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với Q;
- (c) sự thay thế của D ở vị trí 11 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, S hoặc N;
- (d) sự thay thế của S ở vị trí 15 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với H, C, Q, D, E, R, A, V, M, W hoặc F;
- (e) sự thay thế của S ở vị trí 16 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với T, Q, V, C, Y, D, E, R, K, H, L, I, M, W hoặc F;
- (f) sự thay thế của Y ở vị trí 20 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với F hoặc A;
- (g) sự thay thế của Q ở vị trí 22 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với W;
- (h) sự thay thế của G ở vị trí 23 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với N;
- (i) sự thay thế của R ở vị trí 37 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với T;

- (j) sự thay thế của S ở vị trí 40 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với V, L, I, W hoặc F;
- (k) sự thay thế của S ở vị trí 41 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với I;
- (l) sự thay thế của F ở vị trí 46 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, N, Q, Y, E, K, H, A, V, L, I, M hoặc W;
- (m) sự thay thế của K ở vị trí 49 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với Q;
- (n) sự thay thế của A ở vị trí 52 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G hoặc S;
- (o) sự thay thế của L ở vị trí 53 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với A, V hoặc I;
- (p) sự thay thế của Y ở vị trí 54 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, S, T, C, N, Q, D, E, R, H, A, V, M, W, F hoặc P;
- (q) sự thay thế của L ở vị trí 56 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với V;
- (r) sự thay thế của G ở vị trí 57 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, Q, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;
- (s) sự thay thế của T ở vị trí 59 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với V, L, I, M, W hoặc F;
- (t) sự thay thế của N ở vị trí 60 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với V, L, I, W hoặc F;
- (u) sự thay thế của N ở vị trí 63 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, D hoặc L;
- (v) sự thay thế của T ở vị trí 65 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với W hoặc P;

- (w) sự thay thế của N ở vị trí 66 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, S, T, C, Q, D, E, H, A, V, L, I, M hoặc W;
- (x) sự thay thế của G ở vị trí 80 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với H hoặc A;
- (y) sự thay thế của S ở vị trí 81 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với Q, Y, L, I, W hoặc F;
- (z) sự thay thế của T ở vị trí 82 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, S, C, Q, D, E, R, K, H, A hoặc M;
- (aa) sự thay thế của N ở vị trí 83 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, C hoặc A;
- (ab) sự thay thế của K ở vị trí 84 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với R;
- (ac) sự thay thế của Q ở vị trí 89 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với H;
- (ad) sự thay thế của N ở vị trí 91 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với C;
- (ae) sự thay thế của S ở vị trí 100 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với L, I, W hoặc F;
- (af) sự thay thế của G ở vị trí 101 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, N, Q, Y, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;
- (ag) sự thay thế của G ở vị trí 102 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, Q, Y, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;
- (ah) sự thay thế của G ở vị trí 103 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, Q, Y, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;
- (ai) sự thay thế của L ở vị trí 104 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, Q, Y, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;

(aj) sự thay thế của G ở vị trí 105 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, Q, Y, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;

(ak) sự thay thế của G ở vị trí 106 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, Q, Y, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;

(al) sự thay thế của L ở vị trí 107 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, R, K hoặc A;

(am) sự thay thế của S ở vị trí 109 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với L, I hoặc F;

(an) sự thay thế của T ở vị trí 113 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với L hoặc W;

(ao) sự thay thế của Y ở vị trí 119 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, S, T, C, N, Q, D, E, R, K, H, A, V, M, W, F hoặc P;

(ap) sự thay thế của S ở vị trí 120 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với Y, R, I, W hoặc F;

(aq) sự thay thế của R ở vị trí 124 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với K hoặc A;

(ar) sự thay thế của A ở vị trí 132 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, N, Q, D, I hoặc M;

(as) sự thay thế của A ở vị trí 133 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, S, T, C, N, Q, D, E, R, K, H, V, L, I, M, W, F hoặc P;

(at) sự thay thế của V ở vị trí 134 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, S, T hoặc A;

(au) sự chèn của G, S, T, N, Q, Y, R, K, H, A, L, I, M hoặc W giữa vị trí 133 hoặc A vị trí tương ứng của trình tự này và vị trí 134 hoặc A vị trí tương ứng của trình tự này;

(av) sự thay thế của N ở vị trí 135 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với R, A, L hoặc M;

(aw) sự thay thế của G ở vị trí 136 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, Q, Y, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;

(ax) sự thay thế của Y ở vị trí 138 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, S, C, N, Q, D, E, R, K, H, A, V, M, W, F hoặc P;

(ay) sự thay thế của T ở vị trí 140 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với L, W hoặc F;

(az) sự thay thế của Y ở vị trí 148 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, S, T, C, N, Q, D, E, R, K, H, A, M, W, F hoặc P;

(ba) sự thay thế của K ở vị trí 151 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với F;

(bb) sự thay thế của E ở vị trí 163 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, N, Q, D, K, H, V, L, I hoặc F;

(bc) sự thay thế của N ở vị trí 166 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, V, L, I, W hoặc F;

(bd) sự thay thế của G ở vị trí 167 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với V;

(be) sự thay thế của I ở vị trí 170 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với V hoặc L;

(bf) sự thay thế của S ở vị trí 171 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, T, E hoặc A;

(bg) sự thay thế của N ở vị trí 187 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S;

(bh) sự thay thế của S ở vị trí 191 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với V, L, I, W hoặc F;

(bi) sự thay thế của G ở vị trí 193 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, Q, Y, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;

(bj) sự thay thế của S ở vị trí 194 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với Y, R hoặc K;

(bk) sự thay thế của Y ở vị trí 195 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, S, T, C, N, Q, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;

(bl) sự thay thế của N ở vị trí 200 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với W;

(bm) sự thay thế của Q ở vị trí 204 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, N, D, E, R, K, H, V, L, I, M, W hoặc P;

(bn) sự thay thế của F ở vị trí 205 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, N, Q, Y, E, K, H, A, V, L, I, M hoặc W;

(bo) sự thay thế của K ở vị trí 212 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với N, Q, R, V, L hoặc W;

(bp) sự thay thế của F ở vị trí 226 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với Y;

(bq) sự thay thế của S ở vị trí 233 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với L, I hoặc W;

(br) sự thay thế của D ở vị trí 237 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với N;

- (bs) sự thay thế của S ở vị trí 238 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với L;
- (bt) sự thay thế của N ở vị trí 243 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với Y, L hoặc I;
- (bu) sự thay thế của D ở vị trí 245 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với N;
- (bv) sự thay thế của S ở vị trí 246 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với Y, V, L, W hoặc F;
- (bw) sự thay thế của K ở vị trí 247 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, N, Q, E, H, A, V, L, I, M, W hoặc F;
- (bx) sự thay thế của Y ở vị trí 248 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với F;
- (by) sự thay thế của Y ở vị trí 250 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với F;
- (bz) sự thay thế của M ở vị trí 251 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, T, N, Q, D, A, V, L hoặc I;
- (ca) sự thay thế của M ở vị trí 256 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, Q, Y, D, E, R, K, H, A, V, L, I, W, F hoặc P;
- (cb) sự thay thế của A ở vị trí 257 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với V hoặc I;
- (cc) sự thay thế của N ở vị trí 264 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, S, T, C, Q, D, E, A, V, L, I hoặc M;
- (cd) sự thay thế của V ở vị trí 273 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, T hoặc I;
- (ce) sự thay thế của N ở vị trí 275 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với L, W hoặc F;

- (cf) sự thay thế của G ở vị trí 277 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với V, L, I hoặc F;
- (cg) sự thay thế của K ở vị trí 281 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với R;
- (ch) sự thay thế của I ở vị trí 296 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với V;
- (ci) sự thay thế của G ở vị trí 297 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với L, W hoặc F;
- (cj) sự thay thế của N ở vị trí 304 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S;
- (ck) sự thay thế của D ở vị trí 313 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với N;
- (cl) sự thay thế của A ở vị trí 319 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, N, Q, Y, D, E, R, K, H, V, L, I, M, W, F hoặc P;
- (cm) sự thay thế của Y ở vị trí 320 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, T, V, L, I hoặc F;
- (cn) sự thay thế của S ở vị trí 326 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với W;
- (co) sự thay thế của S ở vị trí 330 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với M, W hoặc F;
- (cp) sự thay thế của K ở vị trí 332 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, T hoặc V;
- (cq) sự thay thế của T ở vị trí 334 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với L;
- (cr) sự thay thế của Y ở vị trí 335 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với F;
- (cs) sự thay thế của F ở vị trí 337 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, S, T, C, Q, R, K, H, A hoặc V;

(ct) sự thay thế của G ở vị trí 342 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, Q, Y, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;

(cu) sự thay thế của K ở vị trí 343 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với T;

(cv) sự thay thế của K ở vị trí 346 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với R;

(cw) sự thay thế của S ở vị trí 357 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với L;

(cx) sự thay thế của T ở vị trí 359 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, S, Q, V, L, I hoặc F;

(cy) sự thay thế của S ở vị trí 361 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với V, I hoặc W;

(cz) sự thay thế của D ở vị trí 369 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với N;

(da) sự thay thế của N ở vị trí 376 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với W;

(db) sự thay thế của T ở vị trí 378 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với L hoặc W;

(dc) sự thay thế của Q ở vị trí 379 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với D, E, R hoặc K;

(dd) sự thay thế của Y ở vị trí 380 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với F;

(de) sự thay thế của F ở vị trí 385 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với Y, M hoặc P;

(df) sự thay thế của T ở vị trí 386 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với A, L, I hoặc M;

(dg) sự thay thế của S ở vị trí 387 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, với Q, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W hoặc F;

(dh) sự thay thế của N ở vị trí 390 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, S, T, Y hoặc F;

(di) sự thay thế của W ở vị trí 393 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với Q;

(dj) sự thay thế của R ở vị trí 396 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G;

(dk) sự thay thế của F ở vị trí 403 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với T hoặc K;

(dl) sự thay thế của N ở vị trí 405 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với D, V, L, I, W, F hoặc P;

(dm) sự thay thế của A ở vị trí 406 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với V, W hoặc F;

(dn) sự thay thế của P ở vị trí 407 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G hoặc C;

(do) sự thay thế của Q ở vị trí 408 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với N, Y, I hoặc W;

(dp) sự thay thế của S ở vị trí 409 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với Y hoặc W;

(dq) sự thay thế của T ở vị trí 411 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với A, V, L hoặc P;

(dr) sự thay thế của T ở vị trí 427 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với R hoặc V; và

(ds) sự thay thế của V ở vị trí 433 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với L.

Các đột biến (a) đến (ds) nêu trên có thể được áp dụng riêng rẽ như một việc sử dụng riêng rẽ của bất kỳ một loại, hoặc cũng có thể được áp dụng theo sự kết hợp của hai hoặc nhiều loại bất kỳ. Các ví dụ được ưu tiên bao gồm: (ar); sự kết hợp của (as), (at) và (au); (bk); (cz); sự kết hợp của (v), (cd), (cx), và (dg); sự kết hợp của (bc) và (bd); sự kết hợp của (e) và (aa); sự kết hợp của (j), (s), (y), (bh), và (dl); sự kết hợp của (e), (v), (aa), (bc), (bd), (bk), (cd), (cx), (cz), và (dg); sự kết hợp của (e), (v), (aa), (ar), (bc), (bd), (bk), (cd), (cx), (cz), và (dg); sự kết hợp của (v), (as), (at), (au), (bc), (bd), (bk), (cd), (cx), (cz), và (dg); sự kết hợp của (j), (s), (v), (y), (as), (at), (au), (bc), (bd), (bh), (bk), (cd), (cx), (cz), (dg), và (dl); sự kết hợp của (v), (aa), (ar), (bc), (bd), (bk), (cd), (cx), (cz), và (dg); sự kết hợp của (v), (as), (at), (au), (bc), (bd), (bk), (cd), (cx), (cz), và (dg); sự kết hợp của (e), (v), (aa), (bc), (bd), (bk), (bm), (cd), (cl), (cx), (cz), và (dg); và sự kết hợp của (v), (as), (at), (au), (bc), (bd), (bj), (bk), (bo), (cd), (cx), (cz), (dc), và (dg).

Trong trình tự axit amin của proteaza kiềm gốc của thể đột biến theo sáng chế, được ưu tiên là gốc axit amin ở vị trí tương ứng với vị trí 30 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 là axit aspartic, gốc axit amin ở vị trí tương ứng với vị trí 68 của chúng là histidin, và gốc axit amin ở vị trí tương ứng với vị trí 255 của chúng là serin. Tốt hơn nữa là, proteaza kiềm gốc của thể đột biến theo sáng chế có các gốc axit amin được thể hiện trong Bảng 1 dưới đây (ii) ở các vị trí được thể hiện trong Bảng 1 dưới đây (i) trong trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2. Các gốc axit amin được thể hiện trong Bảng 1 là các gốc axit amin, mà được bảo tồn cao trong số các gốc proteaza kiềm như

được đưa ra làm ví dụ ở trên (Saeki et al., Journal of bioscience and Bioengineering, 2007, 103: 501-508).

[Bảng 1]

(i) Vị trí	(ii) Gốc axit amin	(i) Vị trí	(ii) Gốc axit amin
10	Alanin	161	Glyxin
18	Glyxin	162	Asparagin
21	Glyxin	173	Prolin
26	Valin	182	Valin
27	Alanin	183	Glyxin
28	Valin	184	Alanin
30	Axit aspartic	203	Alanin
32	Glyxin	205	Phenylalanin
43	Histidin	206	Serin
52	Alanin	209	Glyxin
64	Axit aspartic	222	Alanin
66	Asparagin	223	Prolin
68	Histidin	224	Glyxin
69	Glyxin	225	Threonin
70	Threonin	229	Serin
71	Histidin	253	Glyxin
72	Valin	254	Threonin

73	Alanin	255	Serin
74	Glyxin	256	Methionin
85	Glyxin	257	Alanin
87	Alanin	259	Prolin
88	Prolin	261	Valin
92	Leuxin	262	Alanin
106	Glyxin	263	Glyxin
118	Alanin	266	Alanin
129	Serin	289	Leuxin
131	Glyxin	297	Glyxin
145	Valin	303	Glyxin
159	Alanin		

Tốt hơn là, proteaza kiềm gốc của thể đột biến theo sáng chế có bất kỳ trong số các đặc tính enzym dưới đây được chiếm giữ bởi proteaza kiềm bao gồm trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 (Tài liệu Patent 1): 1) Proteaza kiềm có sự kháng các chất oxy hóa, hoạt động trong điều kiện kiềm (độ pH là 8 hoặc nhiều hơn), và là ổn định. Ở đây, cụm từ "proteaza kiềm có sự kháng các chất oxy hóa" có nghĩa rằng, sau khi proteaza kiềm đã được lấy đi trong 50mM dung dịch hydro peroxit (chứa 5mM canxi clorua) (20mM đệm Britton-Robinson, độ pH là 10) ở 20°C trong 20 phút, hoạt tính còn lại (phương pháp chất nền tổng hợp) là 50% hoặc nhiều hơn. 2) Khi proteaza kiềm đã được xử lý ở 50°C ở độ pH là 10 trong 10 phút, hoạt tính dư là 80% hoặc nhiều hơn.

3) Proteaza kiềm được ức chế bằng diisopropyl flophosphat (DFP) và phenylmetansulfonyl florit (PMSF). 4) Trọng lượng phân tử là 43.000 ± 2.000 theo SDS-PAGE. Gốc proteaza kiềm tốt hơn nữa là có tất cả các đặc tính enzym 1) đến 4) nêu trên.

Proteaza kiềm gốc của thể đột biến proteaza kiềm theo sáng chế tốt hơn là có alanin ở vị trí tương ứng với vị trí 294 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2.

Các ví dụ được ưu tiên về proteaza kiềm gốc của thể đột biến theo sáng chế bao gồm proteaza kiềm bao gồm trình tự axit amin như được thể hiện ở bất kỳ trong số từ SEQ ID NO: 2 đến 11. Các trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 và 11 có sự đồng nhất là 99,8%, 97,7%, 97,5%, 97,5%, 96,3%, 97,7%, 97,5%, 97,2% và 96,8%, tương ứng, với trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2. Cần lưu ý rằng các gốc axit amin trong các trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NOS: 3 đến 11, mà tương ứng với alanin ở vị trí 294 trong trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2, là alanin ở vị trí 294 (SEQ ID NO: 3 đến 5, 8, và 10) và alanin ở vị trí 295 (SEQ ID NO: 6, 7, 9, và 11).

Thể đột biến proteaza kiềm theo sáng chế có thể được sản xuất bằng cách thay thế gốc axit amin ở vị trí tương ứng với vị trí 294 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 với threonin, trong trình tự axit amin của gốc proteaza kiềm nêu trên. Vì vậy, trong thể đột biến proteaza kiềm theo sáng chế, gốc axit amin ở vị trí tương ứng với vị trí 294 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 là threonin. Thể đột biến proteaza kiềm theo sáng chế

có độ bền cải thiện cho chất tạo chelat, khi so sánh với proteaza kiềm gốc của chúng. Do đó, khi so sánh với proteaza kiềm gốc, sự đột biến proteaza kiềm theo sáng chế là ổn định hơn trong dung dịch chứa chất tạo chelat, ví dụ, trong dung dịch tẩy giặt, và, kết quả là, có thể giữ lại hoạt tính proteaza kiềm cao hơn trong dung dịch chứa chất tạo chelat.

Tốt hơn là, trong thể đột biến proteaza kiềm theo sáng chế, gốc axit amin ở vị trí tương ứng với vị trí 294 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 là threonin, và trình tự sự đồng nhất của chúng là ít nhất 95% so với trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2. Tốt hơn nữa là, trong sự đột biến proteaza kiềm theo sáng chế trình tự đồng nhất của chúng là ít nhất 95% so với trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2, gốc axit amin ở vị trí tương ứng với vị trí 294 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 là threonin, gốc axit amin ở vị trí tương ứng với vị trí 30 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 là axit aspartic, gốc axit amin ở vị trí tương ứng với vị trí 68 của chúng là histidin, và gốc axit amin ở vị trí tương ứng với vị trí 255 của chúng là serin.

Trong số các proteaza kiềm gốc nêu trên, gốc axit amin ở vị trí tương ứng với vị trí 294 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 được coi là có mặt ở vị trí tương ứng với alanin ở vị trí 294 của proteaza kiềm như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 trong cấu trúc ba chiều của các protein này. Vì vậy, được thừa nhận rằng các đột biến trong các gốc axit amin có mặt ở các vị trí tương ứng với vị trí 294 trong proteaza kiềm gốc sẽ có các hiệu quả giống với các đột biến khác về các chức năng cụ thể của chúng.

Hơn nữa, khi một gốc axit amin được chèn vào trong proteaza kiềm gốc, như trong trường hợp (au) nêu trên, vị trí tương ứng với vị trí sau khi vị trí 134 trong SEQ ID NO: 2 của proteaza kiềm gốc được định vị xuôi hướng, khi so sánh với SEQ ID NO: 2.

Ngoài thể đột biến nêu trên ở vị trí tương ứng với vị trí 294, thể đột biến proteaza kiềm theo sáng chế cũng có thể có sự đột biến (ví dụ, sự xóa bỏ, sự thay thế, sự bổ sung hoặc sự chèn) ở vị trí bất kỳ khác trong proteaza kiềm gốc, với điều kiện là sự đột biến này không làm suy yếu hiệu quả cải thiện độ bền trong dung dịch chứa chất tạo chelat. Thể đột biến này có thể hoặc là thể đột biến xảy ra tự nhiên, hoặc thể đột biến được đưa vào nhân tạo.

Ví dụ, thể đột biến proteaza kiềm theo sáng chế có thể có một hoặc nhiều gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các gốc axit amin được thể được mô tả trong (a) đến (ds) nêu trên. Ví dụ, thể đột biến proteaza kiềm theo sáng chế có thể có (các) gốc axit amin dưới đây: gốc axit amin được thể được mô tả trong (ar); gốc axit amin được thể được mô tả trong (as), (at) và (au); gốc axit amin được thể được mô tả trong (bk); gốc axit amin được thể được mô tả trong (cz); gốc axit amin được thể được mô tả trong (v), (cd), (cx) và (dg); gốc axit amin được thể được mô tả trong (bc) và (bd); gốc axit amin được thể được mô tả trong (e) và (aa); gốc axit amin được thể được mô tả trong (j), (s), (y), (bh) và (dl); gốc axit amin được thể được mô tả trong (e), (v), (aa), (bc), (bd), (bk), (cd), (cx), (cz) và (dg); gốc axit amin được thể được mô tả trong (e), (v), (aa), (ar), (bc), (bd), (bk), (cd), (cx), (cz) và (dg); gốc axit amin được thể được mô tả trong (v), (as), (at), (au), (bc), (bd), (bk), (cd), (cx), (cz) và (dg); gốc axit amin được

thể được mô tả trong (j), (s), (v), (y), (as), (at), (au), (bc), (bd), (bh), (bk), (cd), (cx), (cz), (dg) và (dl); gốc axit amin được thể được mô tả trong (v), (aa), (ar), (bc), (bd), (bk), (cd), (cx), (cz) và (dg); gốc axit amin được thể được mô tả trong (v), (as), (at), (au), (bc), (bd), (bk), (cd), (cx), (cz) và (dg); gốc axit amin được thể được mô tả trong (e), (v), (aa), (bc), (bd), (bk), (bm), (cd), (cl), (cx), (cz) và (dg); hoặc gốc axit amin được thể được mô tả trong (v), (as), (at), (au), (bc), (bd), (bj), (bk), (bo), (cd), (cx), (cz), (dc) và (dg). Các thể đột biến proteaza kiềm này có thể đã thu được bằng cách thay thế alanin ở vị trí tương ứng với vị trí 294 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 với threonin, trong proteaza kiềm gốc có một hoặc nhiều đột biến bất kỳ được mô tả trong (a) đến (ds) nêu trên. Ngoài ra, các thể đột biến proteaza kiềm này cũng có thể đã thu được bằng cách đưa vào một hoặc nhiều đột biến bất kỳ được mô tả trong (a) đến (ds) nêu trên, cũng như thể đột biến A294T, trong proteaza kiềm gốc của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2.

Các ví dụ về thể đột biến proteaza kiềm theo sáng chế bao gồm đột biến A294T của proteaza kiềm bao gồm trình tự axit amin như được thể hiện ở bất kỳ trong số SEQ ID NO: 2 đến 5, 8, và 10, và đột biến A295T của proteaza kiềm bao gồm trình tự axit amin như được thể hiện ở bất kỳ trong số SEQ ID NO: 6, 7, 9, và 11.

Theo sáng chế, như các phương pháp để làm biến đổi (các) gốc axit amin trong gốc proteaza kiềm, các loại khác nhau của các kỹ thuật đưa vào đột biến, mà đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật hiện nay, có thể được sử dụng. Ví dụ, trong polynucleotit mã hóa trình tự axit amin của gốc proteaza kiềm (sau đây

cũng được đề cập đến như "gen gốc"), trình tự nucleotit mã hóa gốc axit amin cần được biến đổi được biến đổi thành trình tự nucleotit mã hóa gốc axit amin được biến đổi, và sau đó protein được cho biểu hiện từ gen đột biến, do đó sự đột biến proteaza kiểm quan tâm có thể đã thu được.

Cơ bản là, việc đưa vào thể đột biến quan tâm trong gen gốc có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách thực hiện các phương pháp đột biến hướng vị trí khác nhau, mà là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, dựa vào sự khuếch đại PCR sử dụng gen gốc như ADN mẫu hoặc phản ứng sao chép sử dụng các loại khác nhau của các AND polymeraza. Phương pháp đột biến hướng vị trí này có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách áp dụng phương pháp bất kỳ như phương pháp PCR ngược hoặc phương pháp ủ (được phát hành bởi Muramatsu et al., "Revised 4th edition, "New Gene Engineering Handbook", Yodosha, trang 82-88). Cũng có thể sử dụng các loại khác nhau của bộ lắp ráp có sẵn trên thị trường đối với sự đột biến hướng vị trí, như Quick Change II Site-Directed Mutagenesis Kit hoặc Quick Change Multi Site-Directed Mutagenesis Kit từ Stratagene.

Sự đột biến hướng vị trí trong gen gốc có thể được thực hiện, thông thường nhất, sử dụng các gốc đơn nguyên tố đột biến chứa thể đột biến nucleotit để được đưa vào. Các gốc đơn nguyên tố đột biến có thể được thiết kế, như vậy chúng ủ một vùng chứa trình tự nucleotit mã hóa gốc axit amin cần được biến đổi trong gen gốc, và chứa trình tự nucleotit có trình tự nucleotit (codon) mã hóa gốc axit amin được biến đổi, thay cho trình tự nucleotit (codon) mã hóa gốc axit amin cần được biến đổi. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có

thể nhận biết và lựa chọn các trình tự nucleotit (các codon) thích hợp mã hóa các gốc axit amin không được biến đổi và được biến đổi, dựa vào sách giáo khoa thông thường và tương tự. Ngoài ra, sự đột biến hướng vị trí có thể được thực hiện bằng phương pháp sử dụng hai gốc đơn nguyên tố riêng rẽ bổ sung cho nhau chứa sự đột biến nucleotit để được đưa vào để khuếch đại các đoạn ADN của phía ngược hướng và phía xuôi hướng của vị trí đột biến và thắt các đoạn ADN thành một đoạn, theo SOE (nối bằng sự mở rộng chùng chéo) - PCR (Horton et al, Gene, 1989, 77(1): trang 61-68).

ADN mẫu chứa gen gốc có thể được điều chế từ vi khuẩn như *Bacillus* sp. KSM-KP43 (FERM BP-6532), *Bacillus* sp. KSM-KP9860 (FERM BP-6534) hoặc *Bacillus* sp. KSM-9865 (FERM P-18566) nêu trên, hoặc các dòng đột biến của chúng bằng cách tách chiết ADN hệ gen theo phương pháp thông thường, hoặc bằng cách tách chiết ARN và sau đó tổng hợp ADN bổ sung (cDNA) bằng sự sao chép ngược. Ngoài ra, dựa vào trình tự axit amin của proteaza kiềm gốc, trình tự nucleotit tương ứng có thể được tổng hợp hóa học, và sau đó có thể được sử dụng như một ADN mẫu.

Sự điều chế ADN hệ gen từ chi *Bacillus* có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách áp dụng phương pháp được mô tả trong Pitcher et al, Lett Appl Microbiol, 1989, 8: 151-156 và tương tự. ADN mẫu chứa gen gốc có thể được điều chế bằng cách chèn một ADN bổ sung được chuẩn bị, hoặc đoạn ADN chứa gen gốc được tách ra từ ADN hệ gen được chèn vào trong vật truyền bất kỳ.

Các môi đột biến có thể được sản xuất theo phương pháp tổng hợp oligonucleotit đã biết công khai, như phương pháp phosphoramidite (Nucleic

Acids Research, 1989, 17: 7059-7071). Sự tổng hợp mồi này cũng có thể được thực hiện, ví dụ, sử dụng thiết bị tổng hợp oligonucleotit có sẵn trên thị trường (được sản xuất bởi ABI, etc.). Bằng cách sử dụng bộ mồi chứa mồi đột biến và thực hiện đột biến định hướng vị trí như mô tả ở trên với gen gốc làm ADN mẫu, gen proteaza kiểm đột biến có thể thu được mà đột biến đích đã được đưa vào.

Vì vậy, sáng chế cũng cung cấp gen proteaza kiểm đột biến. Gen proteaza kiểm đột biến theo sáng chế là polynucleotit mã hóa thể đột biến proteaza kiểm theo sáng chế. Polynucleotit theo sáng chế có thể bao gồm ADN, ADN bổ sung (cDNA), ARN sợi đơn hoặc sợi kép, và các axit nucleic nhân tạo khác. ADN, ADN bổ sung (cDNA) và ARN cũng có thể được tổng hợp hóa học. Hơn nữa, polynucleotit theo sáng chế có thể chứa trình tự nucleotit của vùng không dịch mã (UTR), thêm vào khung đọc mở (ORF).

Sáng chế cũng cung cấp vật truyền chứa polynucleotit mã hóa thể đột biến proteaza kiểm theo sáng chế. Vật truyền có thể được sản xuất bằng cách chèn polynucleotit theo sáng chế vào vật truyền bất kỳ, và do đó thất chúng theo phương pháp thông thường. Loại vật truyền không bị giới hạn cụ thể, và nó có thể là vật truyền bất kỳ như plasmid, thể thực khuẩn, phagemid, cosmid, virus, vật truyền YAC hoặc vật truyền con thoi. Hơn nữa, vật truyền tốt hơn là vật truyền có khả năng khuếch đại trong vi khuẩn, cụ thể là trong vi khuẩn *Bacillus*, tốt hơn nữa là vật truyền biểu hiện có khả năng gây ra sự biểu hiện của gen được đưa vào trong vi khuẩn *Bacillus*, mặc dù vật truyền không bị giới hạn thêm. Trong số chúng, vật truyền con thoi, mà có thể sao chép trong bất kỳ trong số vi khuẩn *Bacillus* và sinh vật khác, có thể tốt hơn là được sử dụng trong sự sản

xuất tái tổ hợp của thể đột biến proteaza kiểm theo sáng chế. Các ví dụ về vật truyền được ưu tiên bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở: các vật truyền con thoi như pHA3040SP64, pHSP64R hoặc PASP64 (JP-B-3492935), pHY300PLK (vật truyền biểu hiện có khả năng biến đổi cả *E. coli* và *Bacillus subtilis*; Ishikawa and Shibahara, Jpn J Genet, 1985, 60: 235-243), và PAC3 (Moriyama et al, Nucleic Acids Res, 1988, 16: 8732); các plasmid có sẵn cho sự biến đổi của vi khuẩn *Bacillus* như pUB110 (Gryczan et al, J Bacteriol, 1978, 134: 318-329) hoặc PTA10607 (Bron et al, Plasmid, 1987, 18: 8-15); và các vật truyền bài tiết có khả năng cung cấp các tín hiệu bài tiết cho các protein tái tổ hợp (Yamane et al., " Fusion Proteins Using *Bacillus subtilis* Secretion Vectors," Starch Science, 34. (1987), 163-170). Hơn thế nữa, các plasmid bắt nguồn từ *E. coli* (ví dụ, pET22b(+), pBR322, pBR325, pUC118, pUC119, pUC18, pUC19, pBluescript, v.v..) cũng có thể được sử dụng.

Khi thể đột biến proteaza kiểm theo sáng chế được sản xuất bằng sự tái tổ hợp, vật truyền tốt hơn là vật truyền biểu hiện. Vật truyền biểu hiện có thể chứa, khi cần, các trình tự có ích bao gồm các loại khác nhau của các phần tử cần thiết cho sự biểu hiện trong các vật chủ sinh vật, như chất hoạt hóa phiên mã, vùng kết thúc, hoặc vị trí gắn kết ribosom; các phần tử cis như đoạn đa cắt nối hoặc chất hỗ trợ; tín hiệu đa bổ sung; trình tự gắn kết ribosom (trình tự SD); và các gen chỉ thị chọn lọc như gen kháng thuốc (ví dụ, ampicillin, neomycin, kanamycin, tetracyclin, chloramphenicol, v.v..).

Sáng chế còn cung cấp thể biến nạp chứa polynucleotit mã hóa thể đột biến proteaza kiểm theo sáng chế hoặc vật truyền chứa polynucleotit này. Thể

biến nạp có thể được sản xuất bằng cách đưa vào một polynucleotit mã hóa thể đột biến proteaza kiềm theo sáng chế hoặc vật truyền chứa polynucleotit này (tốt hơn là, vật truyền biểu hiện tái tổ hợp) trong một vật chủ.

Các ví dụ về vật chủ cho thể biến nạp bao gồm: vi khuẩn như *E. coli* hoặc *Bacillus subtilis*; các vi sinh vật bao gồm các tế bào nấm men như các ví dụ điển hình; và các tế bào bất kỳ như các tế bào côn trùng, các tế bào động vật (ví dụ, các tế bào động vật có vú), hoặc các tế bào thực vật. Vật chủ tốt hơn là vi khuẩn *Bacillus*, tốt hơn nữa là *Bacillus subtilis* hoặc dòng đột biến của chúng. Do đó, thể biến nạp theo sáng chế là vi khuẩn tái tổ hợp của vi khuẩn *Bacillus*, và tốt hơn nữa là thể tái tổ hợp *Bacillus subtilis* hoặc dòng đột biến của chúng.

Đối với sự biến đổi của vật chủ, các kỹ thuật biến đổi đã biết rộng rãi, như phương pháp canxi phosphat, phương pháp điện di, phương pháp chuyển nạp liposom, phương pháp súng bắn hạt, hoặc phương pháp PEG, có thể được áp dụng. Các ví dụ về phương pháp biến đổi có thể áp dụng cho vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*, bao gồm phương pháp biến đổi tế bào khả biến (J Bacteriol, 1967, 93: 1925-1937), phương pháp điện di (Brigidi et al, FEMS Microbiol Lett, 1990, 55: 135-138), phương pháp biến đổi tế bào trần (protoplast) (Chang and Cohen, Mol Gen Genet, 1979, 168: 111-115), và phương pháp Tris-PEG (Takahashi et al, J Bacteriol, 1983, 156: 1130-1134).

Thể đột biến proteaza kiềm theo sáng chế có thể được sản xuất bằng cách nuôi cấy thể biến nạp theo sáng chế. Vì vậy, sáng chế cũng cung cấp phương pháp sản xuất thể đột biến proteaza kiềm bao gồm, sử dụng thể biến nạp theo sáng chế. Thể biến nạp đối với sự sản xuất của thể đột biến proteaza kiềm có thể

được nuôi cấy theo phương pháp thông thường đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Ví dụ, môi trường được sử dụng để nuôi cấy thể biến nạp dựa vào vật chủ vi sinh vật như *E. coli* hoặc các tế bào nấm men có chứa nguồn cacbon, nguồn nitơ, các muối vô cơ, v.v. có khả năng được tiêu hóa bởi vật chủ vi sinh vật, và thể biến nạp có thể được nuôi cấy hiệu quả trong đó. Môi trường được sử dụng ở đây có thể hoặc là môi trường tự nhiên hoặc môi trường tổng hợp. Ví dụ, môi trường LB, môi trường 2 x YT, trung gian 2 x L-maltoza, môi trường lên men CSL có thể được sử dụng để nuôi cấy thể biến nạp *Bacillus subtilis* để sản xuất protein tái tổ hợp. Thuốc tương ứng với loại gen kháng thuốc (gen chỉ thị chọn lọc) được đưa vào trong thể biến nạp có thể được thêm vào môi trường. Ngoài ra, trong trường hợp nuôi cấy các vi sinh vật được biến đổi với vật truyền biểu hiện sử dụng chất hoạt hóa cảm ứng, tác nhân gây cảm ứng có thể được bổ sung vào môi trường khi cần thiết. Ví dụ, trong trường hợp nuôi cấy các vi sinh vật được biến đổi với vật truyền biểu hiện sử dụng chất hoạt hóa Lac, isopropyl-1-thio- β -D-galactozit (IPTG), v.v.. có thể được bổ sung cho môi trường. Trong trường hợp nuôi cấy các vi sinh vật được biến đổi với vật truyền biểu hiện sử dụng chất hoạt hóa trp, axit indoleaxetic (IAA), v.v.. có thể được bổ sung cho môi trường.

Ngoài ra, thể đột biến proteaza kiểm theo sáng chế có thể được biểu hiện từ polynucleotit mã hóa thể đột biến proteaza kiểm theo sáng chế hoặc sản phẩm phiên mã của chúng, sử dụng hệ dịch mã phi tế bào. "Hệ dịch mã phi tế bào" đề cập đến hệ dịch chuyển phiên mã *in vitro* hoặc hệ dịch mã *in vitro*, đã thu được bằng cách bổ sung các chất phản ứng cần thiết đối với sự dịch chuyển các

protein, như các axit amin, vào huyền phù thu được từ các tế bào đồng nhất hóa cơ học đóng vai trò như một vật chủ.

Thể đột biến proteaza kiểm theo sáng chế được sản xuất trong thể biến nạp hoặc hệ dịch mã phi tế bào nêu trên có thể đã thu được từ dung dịch nuôi cấy, dung dịch đồng nhất tế bào, dung dịch phản ứng của hệ dịch mã phi tế bào, v.v., bằng cách áp dụng các phương pháp thông thường được sử dụng trong tinh chế protein, như ly tâm, kết tủa amoni sulfat, sắc ký gel, sắc ký trao đổi ion, và sắc ký ái lực riêng rẽ hoặc kết hợp thích hợp. Ngoài ra, dung dịch được tách hoặc được cô đặc sử dụng ly tâm, lọc qua máy siêu lọc và tương tự, như dịch nổi nuôi cấy hoặc dịch nổi phân giải, có thể được sử dụng trực tiếp như một dung dịch enzym thô. Khi thể đột biến proteaza kiểm được biểu hiện không được tiết ra từ các tế bào, các tế bào có thể được đồng nhất, và sau đó, tách và tinh chế của các protein có thể được thực hiện.

Các thử nghiệm được sử dụng trong sáng chế, như sự điều chế mARN, sự sản xuất ADN bổ sung, PCR, RT-PCR, sự sản xuất thư viện, sự thất trong một vật truyền, sự biến đổi của các tế bào, sự xác định của trình tự bazơ trong phân tử ADN, sự tổng hợp hóa học của các axit nucleic, sự xác định trình tự axit amin trên phía đầu tận cùng N của một protein, sự đột biến, và sự chiết của một protein, có thể được thực hiện theo các phương pháp được mô tả trong các hướng dẫn thử nghiệm thông thường. Các ví dụ về các hướng dẫn thử nghiệm này bao gồm Sambrook et al., *Molecular Cloning, A laboratory manual*, 2001, 3rd Ed., Sambrook, J. & Russell, DW., Cold Spring Harb hoặc Laboratory Press. Hơn nữa, trong trường hợp thử nghiệm về sự tái tổ hợp gen của *Bacillus subtilis*,

các hướng dẫn thử nghiệm thông thường đối với công nghệ gen của *Bacillus subtilis*, ví dụ như Hirofumi Yoshikawa, "7.2 *Bacillus subtilis* system," "Continued Biochemical Experiment Seminar 1. Genetic Research Method II," 1986, Tokyo Kagaku Dojin Co., Ltd. (Tokyo), pp,150-169, v.v., có thể được đề cập đến.

Thể đột biến proteaza kiềm đã thu được bằng phương pháp sản xuất theo sáng chế có độ bền cải thiện cho chất tạo chelat, khi so sánh với proteaza kiềm gốc của chúng, và do đó, thể đột biến proteaza kiềm có mặt có thể ổn định hơn trong dung dịch chứa chất tạo chelat, tốt hơn là trong chất tẩy sạch dạng lỏng. Vì vậy, khía cạnh khác của sáng chế có thể là phương pháp cải thiện độ bền của proteaza kiềm cho chất tạo chelat, bao gồm việc thay thế gốc axit amin ở vị trí tương ứng với vị trí 294 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2, trong trình tự axit amin của gốc proteaza kiềm nêu trên.

Do thể đột biến proteaza kiềm theo sáng chế có độ bền cao cho chất tạo chelat, là hữu ích như một enzyme để được trộn trong chất tẩy sạch. Chất tẩy sạch chứa thể đột biến proteaza kiềm theo sáng chế có thể duy trì hoạt tính proteaza cao hơn các chất tẩy sạch thông thường, và kết quả là, nó có thể biểu hiện khả năng tẩy rửa enzyme mạnh hơn. Vì vậy, sáng chế cũng cung cấp chế phẩm tẩy sạch chứa thể đột biến proteaza kiềm theo sáng chế. Chế phẩm tẩy sạch này có thể là chế phẩm tẩy sạch dạng bột, nhưng tốt hơn là chế phẩm chất tẩy sạch dạng lỏng.

Chế phẩm tẩy sạch theo sáng chế chứa chất tạo chelat. Các ví dụ về chất tạo chelat mà có thể được chứa trong chế phẩm tẩy sạch theo sáng chế là giống

như chất tạo chelat nêu trên. Lượng của chất tạo chelat trong chế phẩm tẩy sạch theo sáng chế tốt hơn là từ 0,1% đến 5% theo khối lượng, tốt hơn nữa là từ 0,1% đến 4% theo khối lượng.

Lượng của thể đột biến proteaza kiềm theo sáng chế trong chế phẩm tẩy sạch theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể, với điều kiện là proteaza kiềm biểu hiện hoạt tính của nó. Lượng của thể đột biến proteaza kiềm theo sáng chế tốt hơn là từ 0,1 đến 25000U, tốt hơn nữa là từ 0,1 đến 5000U, tốt hơn nữa là từ 0,1 đến 2500U, dựa vào 1kg của chế phẩm tẩy sạch. Hơn nữa, hoạt tính (U) của proteaza kiềm được đo bằng phương pháp dưới đây. Đó là, 0,9mL của 1/15M đệm phosphat (độ pH là 7,4) và 0,05mL là 40mM dung dịch Glt-Ala-Ala-Pro-Leu-p-nitroanilit/dimetyl sulfoxit được bổ sung trong ống thử nghiệm, và sau đó được giữ ấm ở 30°C trong 5 phút. Cho hỗn hợp đã thu được, 0,05mL của dung dịch enzym được bổ sung, tiếp theo bằng cách thực hiện phản ứng ở 30°C trong 10 phút. Sau đó, 2,0mL của 5% (trọng lượng/thể tích) dung dịch axit xitric chứa nước được bổ sung cho dung dịch phản ứng để kết thúc phản ứng, và độ hấp thụ ở 420nm sau đó được đo sử dụng thiết bị đo ảnh phổ. Ở đây, 1 đơn vị (U) của enzym được xác định là lượng của enzym cần thiết để sản xuất 1 μ mol p-nitroanilin trong 1 phút trong phản ứng nêu trên.

Chế phẩm tẩy sạch theo sáng chế chứa chất có hoạt tính bề mặt và nước, thêm vào thể đột biến proteaza kiềm theo sáng chế. Như các chất có hoạt tính bề mặt này, các chất có hoạt tính bề mặt bất kỳ như chất có hoạt tính bề mặt anion, chất có hoạt tính bề mặt không ion, chất có hoạt tính bề mặt lưỡng tính, và chất có hoạt tính bề mặt cation có thể được sử dụng riêng rẽ hoặc kết hợp hai hoặc

nhiều loại. Lượng của chất có hoạt tính bề mặt trong chế phẩm tẩy sạch theo sáng chế tốt hơn là từ 10% đến 80% theo khối lượng, tốt hơn nữa là từ 30% đến 70% theo khối lượng.

Chất có hoạt tính bề mặt không ion có thể là chất có hoạt tính bề mặt không ion có nhóm hydrocacbon C8 đến C22 và với vài phân tử gam hoặc nhiều hơn của các nhóm oxyalkylen C2 được bổ sung, mà là được trộn chung trong chất tẩy sạch dạng lỏng, và các ví dụ về chất có hoạt tính bề mặt không ion này bao gồm:

$R_1O-(AO)_m-H$ (trong đó R_1 = hydrocacbon C8 đến C22, AO = nhóm oxyalkylen C2 đến C5, và $m = 16$ đến 35) [JP-A-2010-275468];

$R_1O-(EO)_l-(AO)_m-(EO)_n-H$ (trong đó R_1 = hydrocacbon C8 đến C18, EO = nhóm oxyalkylen C2, AO = nhóm oxyalkylen C3 đến C5, $l = 3$ đến 30, $m = 1$ đến 5, và $l + n = 14$ đến 50) [JP-A-2010-265445, JP-A-2011-63784];

$R_1O-(EO)_m/(AO)_n-H$ (trong đó R_1 = hydrocacbon C8 đến C22, EO = nhóm oxyalkylen C2, AO = nhóm oxyalkylen C3 đến C5, $m = 10$ đến 30, $n = 0$ đến 5, và EO và AO là các liên kết khối hoặc ngẫu nhiên) [JP-A-2010-189551];

$R_1(CO)_lO-(EO)_m/(AO)_n-R_2$ (trong đó R_1 = hydrocacbon C8 đến C22, EO = nhóm oxyalkylen C2, AO = nhóm oxyalkylen C3 đến C5, $l = 0$ đến 1, $m = 14$ đến 50, $n = 1$ đến 5, R_2 = hydro ($l = 0$) hoặc nhóm alkyl C1 đến C3, và EO và AO là các liên kết khối hoặc ngẫu nhiên) [JP-A-2010-229385];

$R_1O-(EO)_m-(AO)_n-H$ (trong đó R_1 = hydrocacbon C8 đến C22, EO = nhóm oxyalkylen C2, AO = nhóm oxyalkylen C3 đến C5, $m = 15$ đến 30, và $n = 1$ đến 5) [JP-A-2010-229387];

$R_1O-(AO)_m/(Gly)_n-H$ và/hoặc $R_2-COO-(AO)_p/(Gly)_q-H$ (trong đó R_1 = nhóm hydrocacbon C8 đến C22, R_2 = nhóm hydrocacbon C7 đến C21, AO = nhóm oxyalkylen C2 đến C3, Gly = nhóm glyxerol, $m = 0$ đến 5, $n = 2$ đến 10, $p = 0$ đến 5, $q = 2$ đến 10, và AO và Gly là các liên kết khối hoặc ngẫu nhiên) [JP-A-2010-254881];

$R_1-COO-(PO)_m/(EO)_n-R_2$ (trong đó R_1 = nhóm hydrocacbon C7 đến C21, COO = nhóm cacbonyloxy, R_2 = nhóm alkyl C1 đến C3, PO = nhóm oxypropylen, EO = nhóm oxyetylen, $m = 0,3$ đến 5, $n = 8$ đến 25, và PO và EO là các liên kết khối hoặc ngẫu nhiên) [JP-A-2010-265333];

$R_1O-(EO)_l-(PO)_m-(EO)_n-H$ (trong đó R_1 = hydrocacbon C8 đến C20, EO = nhóm oxyalkylen C2, PO = nhóm oxypropylen, $l \geq 1$, $n \geq 1$, $0 < m < l + n$, và EO và PO là các liên kết khối) [WO98/24865];

$R_1O-(EO)_m-(PO)_n-H$ (trong đó R_1 = nhóm alkyl hoặc nhóm alkenyl C10 đến C16, EO = nhóm etylenoxit, PO = nhóm propylenoxit, $m = 5$ đến 15, và $n = 1$ đến 3) [JP-A-8-157867];

$R_1(CO)-(EO)_m-OR_2$ (trong đó R_1 = nhóm alkyl hoặc nhóm alkenyl C11 đến C13 mạch thẳng hoặc mạch nhánh, R_2 = nhóm alkyl C1 đến C3, EO = nhóm etylenoxit, và $m = 10$ đến 20) [JP-A-2008-7706, JP-A-2009-7451, JP-A-2009-155594, và JP-A-2009-155606];

$R_1(CO)-(AO)_m-OR_2$ (trong đó R_1 = nhóm alkyl hoặc nhóm alkenyl C9 đến C13 mạch thẳng hoặc mạch nhánh, AO = nhóm oxyalkylen C2 đến C4, R_2 = nhóm alkyl C1 đến C3, $m = 5$ đến 30) [JP-A-2009-144002, JP-A-2009-173858, và JP-A-2010-189612]; và

axit béo alkanolamit, axit béo alkanol glucamit, và alkyl polyglucozit.

Các ví dụ về chất có hoạt tính bề mặt anion bao gồm chất có hoạt tính bề mặt anion loại cacboxylat, sulfonat-type hoặc chất có hoạt tính bề mặt anion loại sulfat, chất có hoạt tính bề mặt anion không xà phòng, axit alkylbenzensulfonic mạch thẳng, axit benzensulfonic hoặc muối của chúng, polyoxyaxit benzensulfonic hoặc muối của chúng, muối polyoxyetylen alkyl sulfat, muối của polyoxyalkylen alkyl ete sulfat, α -olefin sulfonat, alkyl benzensulfonat, muối của α -sulfo axit béo, xà phòng axit béo, chất có hoạt tính bề mặt gốc phosphat, axyl alaninat, axyl taurat, alkyl ete cacboxylic axit, và rượu sulfat.

Các ví dụ về chất có hoạt tính bề mặt cation bao gồm muối amoni bộ bốn có nhóm alkyl chuỗi dài, amin bộ ba có một nhóm alkyl chuỗi dài, muối alkyltrimetylamoni, muối dialkyldimetylamoni, và muối của alkyl pyridini. Các ví dụ được ưu tiên về chất có hoạt tính bề mặt cation bao gồm chất có hoạt tính bề mặt loại amoni bộ bốn có một nhóm alkyl chuỗi dài có 8 đến 22 nguyên tử cacbon, và amin bộ ba có một nhóm alkyl chuỗi dài có 8 đến 22 nguyên tử cacbon.

Các ví dụ về chất có hoạt tính bề mặt lưỡng tính bao gồm các chất có hoạt tính bề mặt lưỡng tính loại alkylbetain, loại alkylamidobetain, loại imidazolin, loại alkylaminosulfon, loại axit alkylaminocacboxylic, loại axit alkylamidocacboxylic, và loại axit amidoamino hoặc axit phosphoric, như axit alkylaxetic betain, axit alkanolamido propyl axetic betain, alkyl imidazolin, và alkyl alanin. Các ví dụ được ưu tiên về chất có hoạt tính bề mặt lưỡng tính là sulfobetain hoặc carbobetain có nhóm alkyl có 10 đến 18 nguyên tử cacbon.

Chế phẩm tẩy sạch theo sáng chế còn có thể chứa các thành phần thường được sử dụng trong chế phẩm tẩy sạch, như, ví dụ, polyme hòa tan trong nước, dung môi hữu cơ có thể trộn lẫn với nước, tác nhân kiềm, axit hữu cơ hoặc muối của chúng, enzym khác ngoài thể đột biến proteaza kiềm theo sáng chế, chất ổn định enzym, chất tạo huỳnh quang, chất chống gỉ, chất phân tán, chất ức chế di chuyển màu, tác nhân hoàn thiện, chất tẩy trắng như hydro peroxit, chất chống oxy hóa, chất hòa tan, chất điều chỉnh độ pH, đệm, chất khử trùng, dầu thơm, muối, rượu, và các loại đường.

Các ví dụ về polyme hòa tan trong nước bao gồm: hợp chất polyme, có (i) nửa chuỗi polyete chứa đơn vị được polyme hóa bắt nguồn từ epoxit có 2 đến 5 nguyên tử cacbon, và (ii) nửa chuỗi polyme chứa đơn vị được polyme hóa bắt nguồn từ một hoặc nhiều các đơn phân axit cacboxylic không bão hòa được chọn từ nhóm bao gồm axit acrylic, axit methacrylic và axit maleic, và có cấu trúc ghép trong đó hoặc (i) hoặc (ii) là chuỗi chính, và còn lại là chuỗi được phân nhánh (JP-A-2010-275468 và JP-A-10-060496); và polyme hòa tan trong nước có đơn vị alkylen terephthalat và/hoặc đơn vị alkylen isophthalat, và đơn vị oxyalkylen và/hoặc đơn vị polyoxyalkylen (JP-A-2009-155606). Lượng của polyme hòa tan trong nước trong chế phẩm tẩy sạch theo sáng chế tốt hơn là từ 0,2% đến 10% theo khối lượng, tốt hơn nữa là từ 0,4% đến 5% theo khối lượng.

Các ví dụ về dung môi hữu cơ có thể trộn lẫn với nước bao gồm các alkanol như các alkylen glycol hoặc glyxeryl, các polyalkylen glycol, các (poly)alkylen glycol (mono hoặc di)alkyl ete, các alkyl glyxeryl ete, và các ete thơm của (poly)alkylen glycol. Các ví dụ được ưu tiên về dung môi hữu cơ có

thể trộn lẫn với nước bao gồm các alkylen glycol có từ 2 to 6 nguyên tử cacbon, như etylen glycol, propylen glycol, butylen glycol hoặc hexylen glycol, glyxeryl, polyetylen glycol monophenyl ete, etylen glycol monobenzyl ete, và dietylen glycol monobenzyl ete. Lượng của dung môi hữu cơ có thể trộn lẫn với nước trong chế phẩm tẩy sạch theo sáng chế tốt hơn là từ 1% đến 40% theo khối lượng, tốt hơn nữa là từ 1% đến 35% theo khối lượng.

Các ví dụ về tác nhân kiềm bao gồm các alkanolamin có một đến ba alkanol C2 đến C4, như monoetanolamin, dietanolamin, trietanolamin, polyoxyalkylenamin, hoặc dimetylaminopropylamin. Trong số chúng, monoetanolamin và trietanolamin được ưu tiên. Lượng của tác nhân kiềm trong chế phẩm tẩy sạch theo sáng chế tốt hơn là từ 0% đến 20% theo khối lượng, tốt hơn nữa là từ 0% đến 10% theo khối lượng.

Các ví dụ về axit hữu cơ hoặc muối của chúng bao gồm: các axit cacboxylic đa hóa trị như axit béo bão hòa, axit suxinic, axit maleic, và axit fumaric, hoặc các muối của chúng; và các axit hydroxycacboxylic như axit xitric, axit malic, axit glycolic, và axit P-hydroxybenzoic, hoặc các muối của chúng. Trong số chúng, axit xitric hoặc muối của chúng được ưu tiên. Lượng của axit hữu cơ hoặc muối của chúng trong chế phẩm tẩy sạch theo sáng chế tốt hơn là từ 0% đến 5% theo khối lượng, tốt hơn nữa là từ 0% đến 3% theo khối lượng.

Các ví dụ về chất chống gỉ và chất phân tán bao gồm các chất chống gỉ và các chất làm phân tán như axit polyacrylic, axit polymaleic, carboxymetyl xeluloza, polyetylen glycol có trọng lượng phân tử trung bình khối là 5000 hoặc nhiều hơn, copolyme maleic anhydrit-diisobutylen, maleic anhydrit-metyl vinyl

ete copolyme, copolyme maleic anhydrit-vinyl axetat, phần ngưng naphthalen sulfonat formalin, và các polyme được thể hiện ở các điểm 1 đến 21 yêu cầu bảo hộ của JP-A-59-62614 (trang 1, cột 3, dòng 5 đến trang 3, cột 4, dòng 14). Tuy nhiên, nếu các chất chống gỉ này và các chất phân tán là không phù hợp để được trộn trong chế phẩm tẩy sạch của sáng chế, các tác nhân này có thể được loại bỏ.

Chất ức chế di chuyển màu là, ví dụ, polyvinyl pyrrolidon. Lượng của chất ức chế di chuyển màu trong chế phẩm tẩy sạch theo sáng chế tốt hơn là từ 0,01% đến 10% theo khối lượng.

Chất tẩy trắng như hydro peroxit, percacbonat hoặc perborat được bổ sung ở lượng là 1% đến 10% theo khối lượng trong chế phẩm tẩy sạch này. Trong trường hợp sử dụng chất tẩy trắng này, tetraaxetyletyldiamin (TAED) hoặc chất hoạt hóa tẩy trắng (chất hoạt hóa) được mô tả trong JP-A-6-316700, v.v., có thể được bổ sung ở lượng là từ 0,01% đến 10% theo khối lượng trong chế phẩm tẩy sạch.

Các ví dụ về chất tạo huỳnh quang bao gồm chất tạo huỳnh quang loại biphenyl (Tinopal CBS-X, v.v..) và chất tạo huỳnh quang loại stilben (thuốc nhuộm huỳnh quang loại DM, v.v..). Lượng của chất tạo huỳnh quang trong chế phẩm tẩy sạch theo sáng chế tốt hơn là từ 0,001 đến 2% theo khối lượng.

Các ví dụ về enzyme khác ngoài thể đột biến proteaza kiềm theo sáng chế bao gồm các enzyme thủy phân như các proteaza khác, xelulaza, β -glucanaza, hemixelulaza, lipaza, peroxidaza, laccaza, α -amylaza, glucoamylaza, cutinaza, pectinaza, reductaza, oxidaza, phenol oxidaza, ligninaza, pullulanaza, pectat lyaza, xyloglucanaza, xylanaza, pectin axetyl esteraza, polygalacturonaza,

rhamnogalacturonaza, pectin lyaza, mannanaza, pectin metyl esteraza, cellobiohydrolaza và transglutaminaza, và hỗn hợp của hai hoặc nhiều enzym này.

Các ví dụ về chất ổn định enzym bao gồm hợp chất bo, nguồn ion canxi (hợp chất cung cấp ion canxi), hợp chất hydroxy, và axit formic. Các ví dụ về chất chống oxy hóa bao gồm butylhydroxytoluen, crezola distyren hóa, natri sulfit, và natri hydro sulfit. Các ví dụ về chất hòa tan bao gồm axit p-toluenesulfonic, axit cumenesulfonic, axit m-xylenesulfonic, và benzoat (mà cũng có hiệu quả như một chất khử trùng). Hơn thế nữa, chế phẩm tẩy sạch theo sáng chế cũng có thể chứa: các dung môi hữu cơ không trộn được với nước bao gồm các paraffin như octan, decan, dodecan hoặc tridecan, các olefin như dhexen hoặc dodexen, các alkyl halogen hóa như metylen clorua hoặc 1,1,1-trichloroetan, và các terpen như D-limonen; các chất nhuộm; các dầu thơm; các chất khử trùng kháng vi khuẩn; và các chất kháng tạo bọt như silicon.

Các ví dụ được ưu tiên về chế phẩm tẩy sạch mà có thể chứa thể đột biến proteaza kiềm theo sáng chế bao gồm các chế phẩm chất tẩy sạch dạng lỏng được mô tả trong các ví dụ về JP-A-2010-265333, JP-A-2014-141662, JP-A-2009-191128, JP-A-2012-224652, JP-A-2013-503950, và JP-A-11-512768. Ví dụ, chế phẩm tẩy sạch theo sáng chế có thể được điều chế bằng cách trộn lẫn thể đột biến proteaza kiềm theo sáng chế trong chế phẩm chất tẩy sạch dạng lỏng được mô tả trong ví dụ 4 của JP-A-2014-141662 [tức là, chế phẩm chứa 30% của các chất có hoạt tính bề mặt (20% của chất có hoạt tính bề mặt anion và 10% của chất có hoạt tính bề mặt không ion), 3% của axit xitric, 18% của dung

môi hữu cơ có nhóm hydroxyl (dietylen glycol monobutyl ete), tác nhân kiềm (monoetanolamin) cần thiết để điều chỉnh độ pH của chế phẩm đến độ pH là 8,0, nước trao đổi ion, dầu thơm, v.v..].

Chế phẩm tẩy sạch theo sáng chế không bị giới hạn ở, nhưng tốt hơn là được sử dụng để giặt quần áo hoặc vải (các tấm phủ, màn cửa, thảm, vải dất tường, v.v..). Do chế phẩm tẩy sạch theo sáng chế có thể duy trì ổn định thể đột biến proteaza kiềm theo sáng chế, nó có thể biểu hiện khả năng tẩy rửa enzym cao.

Sáng chế cũng bao gồm, như các phương án thể hiện, các chất, các phương pháp sản xuất, việc sử dụng dự kiến, các phương pháp, v.v.. dưới đây. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở các phương án này.

[1] Thể đột biến proteaza kiềm bao gồm trình tự axit amin đã thu được bằng cách thay thế gốc axit amin ở vị trí tương ứng với vị trí 294 trong trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO:2 với threonin trong trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO:2 hoặc trình tự axit amin có tính đồng nhất là ít nhất 95% trình tự này.

[2] Thể đột biến proteaza kiềm theo [1] nêu trên, trong đó trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2, hoặc trình tự axit amin có tính đồng nhất là ít nhất 95% trình tự này tốt hơn là có alanin ở vị trí tương ứng với vị trí 294 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2.

[3] Thể đột biến proteaza kiềm theo [1] hoặc [2] nêu trên, trong đó trình tự axit amin có tính đồng nhất là ít nhất 95% so với trình tự axit amin như được thể

hiện ở SEQ ID NO: 2 tốt hơn là trình tự axit amin của proteaza KP9860 hoặc proteaza 9865.

[4] Thể đột biến proteaza kiểm theo bất kỳ trong số [1] đến [3] nêu trên, trong đó trình tự axit amin có tính đồng nhất là ít nhất 95% so với trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2

(i) tốt hơn là có một hoặc nhiều gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (a') đến (ds') dưới đây:

(a') gốc axit amin ở vị trí 6 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là S, T, C, Q, Y, R, K, H, A, V, L, I, M, W hoặc F;

(b') gốc axit amin ở vị trí 9 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là Q;

(c') gốc axit amin ở vị trí 11 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G, S hoặc N;

(d') gốc axit amin ở vị trí 15 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là H, C, Q, D, E, R, A, V, M, W hoặc F;

(e') gốc axit amin ở vị trí 16 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là T, Q, V, C, Y, D, E, R, K, H, L, I, M, W hoặc F;

(f') gốc axit amin ở vị trí 20 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là F hoặc A;

(g') gốc axit amin ở vị trí 22 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID

NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là W;

(h') gốc axit amin ở vị trí 23 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID

NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là N;

(i') gốc axit amin ở vị trí 37 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID

NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là T;

(j') gốc axit amin ở vị trí 40 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID

NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là V, L, I, W hoặc F;

(k') gốc axit amin ở vị trí 41 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID

NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là I;

(l') gốc axit amin ở vị trí 46 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID

NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là S, T, C, N, Q, Y, E, K, H, A, V, L, I, M hoặc W;

(m') gốc axit amin ở vị trí 49 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID

NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là Q;

(n') gốc axit amin ở vị trí 52 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID

NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G hoặc S;

(o') gốc axit amin ở vị trí 53 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID

NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là A, V hoặc I;

(p') gốc axit amin ở vị trí 54 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID

NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G, S, T, C, N, Q, D, E, R, H, A, V, M, W, F hoặc P;

(q') gốc axit amin ở vị trí 56 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID

NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là V;

(r') gốc axit amin ở vị trí 57 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID

NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là S, T, C, Q, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;

(s') gốc axit amin ở vị trí 59 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID

NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là V, L, I, M, W hoặc F;

(t') gốc axit amin ở vị trí 60 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID

NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là V, L, I, W hoặc F;

(u') gốc axit amin ở vị trí 63 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID

NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là S, D hoặc L;

(v') gốc axit amin ở vị trí 65 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID

NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là W hoặc P;

(w') gốc axit amin ở vị trí 66 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID

NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G, S, T, C, Q, D, E, H, A, V, L, I, M hoặc W;

(x') gốc axit amin ở vị trí 80 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID

NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là H hoặc A;

(y') gốc axit amin ở vị trí 81 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID

NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là Q, Y, L, I, W hoặc F;

(z') gốc axit amin ở vị trí 82 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID

NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G, S, C, Q, D, E, R, K, H, A hoặc M;

(aa') gốc axit amin ở vị trí 83 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID

NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là S, C hoặc A;

(ab') gốc axit amin ở vị trí 84 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID

NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là R;

(ac') gốc axit amin ở vị trí 89 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID

NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là H;

(ad') gốc axit amin ở vị trí 91 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID

NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là C;

(ae') gốc axit amin ở vị trí 100 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là L, I, W hoặc F;

(af') gốc axit amin ở vị trí 101 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là S, T, C, N, Q, Y, D, E,

R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;

(ag') gốc axit amin ở vị trí 102 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là S, T, C, Q, Y, D, E, R,

K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;

(ah') gốc axit amin ở vị trí 103 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là S, T, C, Q, Y, D, E, R,

K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;

(ai') gốc axit amin ở vị trí 104 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là S, T, C, Q, Y, D, E, R,

K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;

(aj') gốc axit amin ở vị trí 105 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là S, T, C, Q, Y, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;

(ak') gốc axit amin ở vị trí 106 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là S, T, C, Q, Y, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;

(al') gốc axit amin ở vị trí 107 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là S, R, K hoặc A;

(am') gốc axit amin ở vị trí 109 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là L, I hoặc F;

(an') gốc axit amin ở vị trí 113 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là L hoặc W;

(ao') gốc axit amin ở vị trí 119 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G, S, T, C, N, Q, D, E, R, K, H, A, V, M, W, F hoặc P;

(ap') gốc axit amin ở vị trí 120 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là Y, R, I, W hoặc F;

(aq') gốc axit amin ở vị trí 124 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là K hoặc A;

(ar') gốc axit amin ở vị trí 132 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là S, T, N, Q, D, I hoặc M;

(as') gốc axit amin ở vị trí 133 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G, S, T, C, N, Q, D, E, R, K, H, V, L, I, M, W, F hoặc P;

(at') gốc axit amin ở vị trí 134 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G, S, T hoặc A;

(au') gốc axit amin giữa vị trí 133 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc A vị trí tương ứng của trình tự này, và vị trí 134 của chúng hoặc A vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G, S, T, N, Q, Y, R, K, H, A, L, I, M hoặc W;

(av') gốc axit amin ở vị trí 135 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là R, A, L hoặc M;

(aw') gốc axit amin ở vị trí 136 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là S, T, C, Q, Y, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;

(ax') gốc axit amin ở vị trí 138 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G, S, C, N, Q, D, E, R, K, H, A, V, M, W, F hoặc P;

(ay') gốc axit amin ở vị trí 140 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là L, W hoặc F;

(az') gốc axit amin ở vị trí 148 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G, S, T, C, N, Q, D, E, R, K, H, A, M, W, F hoặc P;

(ba') gốc axit amin ở vị trí 151 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là F;

(bb') gốc axit amin ở vị trí 163 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là S, T, N, Q, D, K, H, V, L, I hoặc F;

(bc') gốc axit amin ở vị trí 166 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G, V, L, I, W hoặc F;

(bd') gốc axit amin ở vị trí 167 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là V;

(be') gốc axit amin ở vị trí 170 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là V hoặc L;

(bf') gốc axit amin ở vị trí 171 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G, T, E hoặc A;

(bg') gốc axit amin ở vị trí 187 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là S;

(bh') gốc axit amin ở vị trí 191 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là V, L, I, W hoặc F;

(bi') gốc axit amin ở vị trí 193 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là S, T, C, Q, Y, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;

(bj') gốc axit amin ở vị trí 194 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là Y, R hoặc K;

(bk') gốc axit amin ở vị trí 195 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G, S, T, C, N, Q, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;

(bl') gốc axit amin ở vị trí 200 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là W;

(bm') gốc axit amin ở vị trí 204 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là S, T, C, N, D, E, R, K, H, V, L, I, M, W hoặc P;

(bn') gốc axit amin ở vị trí 205 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là S, T, C, N, Q, Y, E, K, H, A, V, L, I, M hoặc W;

(bo') gốc axit amin ở vị trí 212 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là N, Q, R, V, L hoặc W;

(bp') gốc axit amin ở vị trí 226 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là Y;

(bq') gốc axit amin ở vị trí 233 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là L, I hoặc W;

(br') gốc axit amin ở vị trí 237 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là N;

(bs') gốc axit amin ở vị trí 238 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là L;

(bt') gốc axit amin ở vị trí 243 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là Y, L hoặc I;

(bu') gốc axit amin ở vị trí 245 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là N;

(bv') gốc axit amin ở vị trí 246 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là V, L, W hoặc F;

(bw') gốc axit amin ở vị trí 247 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là S, T, C, N, Q, E, H, A,

V, L, I, M, W hoặc F;

(bx') gốc axit amin ở vị trí 248 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là F;

(by') gốc axit amin ở vị trí 250 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là F;

(bz') gốc axit amin ở vị trí 251 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G, T, N, Q, D, A, V, L

hoặc I;

(ca') gốc axit amin ở vị trí 256 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là S, T, C, Q, Y, D, E, R,

K, H, A, V, L, I, W, F hoặc P;

(cb') gốc axit amin ở vị trí 257 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là V hoặc I;

(cc') gốc axit amin ở vị trí 264 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G, S, T, C, Q, D, E, A,

V, L, I hoặc M;

(cd') gốc axit amin ở vị trí 273 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G, T hoặc I;

(ce') gốc axit amin ở vị trí 275 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là L, W hoặc F;

(cf') gốc axit amin ở vị trí 277 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là V, L, I hoặc F;

(cg') gốc axit amin ở vị trí 281 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là R;

(ch') gốc axit amin ở vị trí 296 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là V;

(ci') gốc axit amin ở vị trí 297 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là L, W hoặc F;

(cj') gốc axit amin ở vị trí 304 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là S;

(ck') gốc axit amin ở vị trí 313 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là N;

(cl') gốc axit amin ở vị trí 319 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là S, T, C, N, Q, Y, D, E,

R, K, H, V, L, I, M, W, F hoặc P;

(cm') gốc axit amin ở vị trí 320 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G, T, V, L, I hoặc F;

(cn') gốc axit amin ở vị trí 326 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là W;

(co') gốc axit amin ở vị trí 330 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là M, W hoặc F;

(cp') gốc axit amin ở vị trí 332 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G, T hoặc V;

(cq') gốc axit amin ở vị trí 334 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là L;

(cr') gốc axit amin ở vị trí 335 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là F;

(cs') gốc axit amin ở vị trí 337 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G, S, T, C, Q, R, K, H, A hoặc V;

(ct') gốc axit amin ở vị trí 342 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là S, T, C, Q, Y, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;

(cu') gốc axit amin ở vị trí 343 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là T;

(cv') gốc axit amin ở vị trí 346 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là R;

(cw') gốc axit amin ở vị trí 357 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là L;

(cx') gốc axit amin ở vị trí 359 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G, S, Q, V, L, I hoặc F;

(cy') gốc axit amin ở vị trí 361 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là V, I hoặc W;

(cz') gốc axit amin ở vị trí 369 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là N;

(da') gốc axit amin ở vị trí 376 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là W;

(db') gốc axit amin ở vị trí 378 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là L hoặc W;

(dc') gốc axit amin ở vị trí 379 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là D, E, R hoặc K;

(dd') gốc axit amin ở vị trí 380 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là F;

(de') gốc axit amin ở vị trí 385 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là Y, M hoặc P;

(df') gốc axit amin ở vị trí 386 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là A, L, I hoặc M;

(dg') gốc axit amin ở vị trí 387 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G, Q, E, R, K, H, A, V,

L, I, M, W hoặc F;

(dh') gốc axit amin ở vị trí 390 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G, S, T, Y hoặc F;

(di') gốc axit amin ở vị trí 393 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là Q;

(dj') gốc axit amin ở vị trí 396 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G;

(dk') gốc axit amin ở vị trí 403 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là T hoặc K;

(dl') gốc axit amin ở vị trí 405 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là D, V, L, I, W, F hoặc P;

(dm') gốc axit amin ở vị trí 406 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là V, W hoặc F;

(dn') gốc axit amin ở vị trí 407 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G hoặc C;

(do') gốc axit amin ở vị trí 408 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là N, Y, I hoặc W;

(dp') gốc axit amin ở vị trí 409 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là Y hoặc W;

(dq') gốc axit amin ở vị trí 411 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là A, V, L hoặc P;

(dr') gốc axit amin ở vị trí 427 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là R hoặc V; và

(ds') gốc axit amin ở vị trí 433 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là L,

và

(ii) tốt hơn nữa là có bất kỳ trong số dưới đây:

gốc axit amin được mô tả trong (ar');

các gốc axit amin được mô tả trong (as'), (at'), và (au');

gốc axit amin được mô tả trong (bk');

gốc axit amin được mô tả trong (cz');

các gốc axit amin được mô tả trong (v'), (cd'), (cx'), và (dg');

các gốc axit amin được mô tả trong (bc'), và (bd');

các gốc axit amin được mô tả trong (e'), và (aa');

các gốc axit amin được mô tả trong (j'), (s'), (y'), (bh'), và (dl');

các gốc axit amin được mô tả trong (e'), (v'), (aa'), (bc'), (bd'), (bk'), (cd'), (cx'), (cz'), và (dg');

các gốc axit amin được mô tả trong (e'), (v'), (aa'), (ar'), (bc'), (bd'), (bk'), (cd'), (cx'), (cz'), và (dg');

các gốc axit amin được mô tả trong (v'), (as'), (at'), (au'), (bc'), (bd'), (bk'), (cd'), (cx'), (cz'), và (dg');

các gốc axit amin được mô tả trong (j'), (s'), (v'), (y'), (as'), (at'), (au'), (bc'), (bd'), (bh'), (bk'), (cd'), (cx'), (cz'), (dg'), và (dl');

các gốc axit amin được mô tả trong (v'), (aa'), (ar'), (bc'), (bd'), (bk'), (cd'), (cx'), (cz'), và (dg');

các gốc axit amin được mô tả trong (v'), (as'), (at'), (au'), (bc'), (bd'), (bk'), (cd'), (cx'), (cz'), và (dg');

các gốc axit amin được mô tả trong (e'), (v'), (aa'), (bc'), (bd'), (bk'), (bm'), (cd'), (cl'), (cx'), (cz'), và (dg); và

các gốc axit amin được mô tả trong (v'), (as'), (at'), (au'), (bc'), (bd'), (bj'), (bk'), (bo'), (cd'), (cx'), (cz'), (dc'), và (dg).

[5] Thể đột biến proteaza kiểm theo bất kỳ trong số [1] đến [4] nêu trên, trong đó

trình tự axit amin có tính đồng nhất là ít nhất 95% so với trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 tốt hơn là có axit aspartic ở vị trí tương ứng với vị trí 30 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2, histidin ở vị trí tương ứng với vị trí 68 của chúng, và serin ở vị trí tương ứng với vị trí 255 của chúng,

tốt hơn nữa là có các gốc axit amin được thể hiện trong Bảng 1 nêu trên (ii) ở các vị trí tương ứng với các vị trí được thể hiện trong Bảng 1 nêu trên (i) trong trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2.

[6] Thể đột biến proteaza kiểm theo bất kỳ trong số nêu trên [1] đến [5], mà tốt hơn là đột biến A294T của thể đột biến proteaza kiểm bao gồm trình tự axit amin được thể hiện trong bất kỳ trong số SEQ ID NO: 2 đến 5, 8, và 10, hoặc đột biến A295T của thể đột biến proteaza kiểm bao gồm trình tự axit amin được thể hiện trong bất kỳ trong số SEQ ID NO: 6, 7, 9, và 11.

[7] Polynucleotit mã hóa thể đột biến proteaza kiểm theo bất kỳ trong số [1] đến [6] nêu trên.

[8] Vật truyền bao gồm polynucleotit theo [7] nêu trên.

[9] Thể biến nạp bao gồm polynucleotit theo [7] nêu trên hoặc vật truyền theo [8] nêu trên, mà là tạp chất.

[10] Vật truyền theo [8] nêu trên hoặc thể biến nạp theo [9] nêu trên, trong đó vật truyền tốt hơn là vật truyền biểu hiện có khả năng gây ra sự biểu hiện của gen được đưa vào trong một vi khuẩn của *Bacillus* sp.

[11] Thẻ biến nạp theo [9] hoặc [10] nêu trên, mà tốt hơn là vi khuẩn tái tổ hợp của *Bacillus* sp.

[12] Phương pháp sản xuất thẻ đột biến proteaza kiềm, sử dụng thẻ biến nạp theo bất kỳ trong số [9] đến [11] nêu trên.

[13] Chế phẩm tẩy sạch bao gồm thẻ đột biến proteaza kiềm theo bất kỳ trong số [1] đến [6] nêu trên.

[14] Chế phẩm tẩy sạch theo nêu trên [13], tốt hơn là bao gồm chất tạo chelat.

[15] Chế phẩm tẩy sạch theo [13] hoặc [14] nêu trên, mà là tốt hơn là chế phẩm chất tẩy sạch dạng lỏng.

[16] Chế phẩm tẩy sạch theo [15] nêu trên, trong đó lượng của chất có hoạt tính bề mặt tốt hơn là từ 10% đến 80% theo khối lượng, tốt hơn nữa là từ 30% đến 70% theo khối lượng.

[17] Phương pháp sản xuất thẻ đột biến proteaza kiềm, bao gồm việc thay thế gốc axit amin ở vị trí tương ứng với vị trí 294 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 với threonin, trong trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2, hoặc trình tự axit amin có tính đồng nhất là ít nhất 95% trình tự này.

[18] Phương pháp cải thiện độ bền của proteaza kiềm cho chất tạo chelat, bao gồm việc thay thế gốc axit amin ở vị trí tương ứng với vị trí 294 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 với threonin, trong trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2, hoặc trình tự axit amin có tính đồng nhất là ít nhất 95% trình tự này.

[19] Phương pháp theo [17] hoặc [18] nêu trên, trong đó trình tự axit amin có tính đồng nhất là ít nhất 95% so với trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 tốt hơn là có alanin ở vị trí tương ứng với vị trí 294 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2.

[20] Phương pháp theo bất kỳ trong số [17] đến [19] nêu trên, trong đó trình tự axit amin có tính đồng nhất là ít nhất 95% so với trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 tốt hơn là trình tự axit amin của proteaza KP9860 hoặc proteaza 9865.

[21] Phương pháp theo bất kỳ trong số [17] đến [19] nêu trên, trong đó trình tự axit amin có tính đồng nhất là ít nhất 95% so với trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 tốt hơn là trình tự axit amin có (các) sự đột biến dưới đây trong trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2:

(i) tốt hơn là, một hoặc nhiều đột biến được chọn từ nhóm bao gồm các đột biến

(a) đến (ds) dưới đây:

(a) sự thay thế của G ở vị trí 6 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, Q, Y, R, K, H, A, V, L, I, M, W hoặc F;

(b) sự thay thế của K ở vị trí 9 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với Q;

(c) sự thay thế của D ở vị trí 11 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, S hoặc N;

(d) sự thay thế của S ở vị trí 15 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với H, C, Q, D, E, R, A, V, M, W hoặc F;

(e) sự thay thế của S ở vị trí 16 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với T, Q, V, C, Y, D, E, R, K, H, L, I, M, W hoặc F;

- (f) sự thay thế của Y ở vị trí 20 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với F hoặc A;
- (g) sự thay thế của Q ở vị trí 22 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với W;
- (h) sự thay thế của G ở vị trí 23 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với N;
- (i) sự thay thế của R ở vị trí 37 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với T;
- (j) sự thay thế của S ở vị trí 40 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với V, L, I, W hoặc F;
- (k) sự thay thế của S ở vị trí 41 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với I;
- (l) sự thay thế của F ở vị trí 46 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, N, Q, Y, E, K, H, A, V, L, I, M hoặc W;
- (m) sự thay thế của K ở vị trí 49 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với Q;
- (n) sự thay thế của A ở vị trí 52 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G hoặc S;
- (o) sự thay thế của L ở vị trí 53 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với A, V hoặc I;
- (p) sự thay thế của Y ở vị trí 54 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, S, T, C, N, Q, D, E, R, H, A, V, M, W, F hoặc P;
- (q) sự thay thế của L ở vị trí 56 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với V;
- (r) sự thay thế của G ở vị trí 57 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, Q, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;
- (s) sự thay thế của T ở vị trí 59 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với V, L, I, M, W hoặc F;

- (t) sự thay thế của N ở vị trí 60 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với V, L, I, W hoặc F;
- (u) sự thay thế của N ở vị trí 63 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, D hoặc L;
- (v) sự thay thế của T ở vị trí 65 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với W hoặc P;
- (w) sự thay thế của N ở vị trí 66 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, S, T, C, Q, D, E, H, A, V, L, I, M hoặc W;
- (x) sự thay thế của G ở vị trí 80 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với H hoặc A;
- (y) sự thay thế của S ở vị trí 81 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với Q, Y, L, I, W hoặc F;
- (z) sự thay thế của T ở vị trí 82 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, S, C, Q, D, E, R, K, H, A hoặc M;
- (aa) sự thay thế của N ở vị trí 83 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, C hoặc A;
- (ab) sự thay thế của K ở vị trí 84 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với R;
- (ac) sự thay thế của Q ở vị trí 89 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với H;
- (ad) sự thay thế của N ở vị trí 91 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với C;
- (ae) sự thay thế của S ở vị trí 100 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với L, I, W hoặc F;
- (af) sự thay thế của G ở vị trí 101 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, N, Q, Y, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;

(ag) sự thay thế của G ở vị trí 102 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, Q, Y, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;

(ah) sự thay thế của G ở vị trí 103 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, Q, Y, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;

(ai) sự thay thế của L ở vị trí 104 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, Q, Y, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;

(aj) sự thay thế của G ở vị trí 105 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, Q, Y, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;

(ak) sự thay thế của G ở vị trí 106 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, Q, Y, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;

(al) sự thay thế của L ở vị trí 107 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, R, K hoặc A;

(am) sự thay thế của S ở vị trí 109 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với L, I hoặc F;

(an) sự thay thế của T ở vị trí 113 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với L hoặc W;

(ao) sự thay thế của Y ở vị trí 119 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, S, T, C, N, Q, D, E, R, K, H, A, V, M, W, F hoặc P;

(ap) sự thay thế của S ở vị trí 120 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với Y, R, I, W hoặc F;

(aq) sự thay thế của R ở vị trí 124 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với K hoặc A;

(ar) sự thay thế của A ở vị trí 132 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, N, Q, D, I hoặc M;

(as) sự thay thế của A ở vị trí 133 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, S, T, C, N, Q, D, E, R, K, H, V, L, I, M, W, F hoặc P;

(at) sự thay thế của V ở vị trí 134 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, S, T hoặc A;

(au) sự chèn của G, S, T, N, Q, Y, R, K, H, A, L, I, M hoặc W vào trong một vị trí giữa vị trí 133 hoặc A vị trí tương ứng của trình tự này and vị trí 134 hoặc A vị trí tương ứng của trình tự này;

(av) sự thay thế của N ở vị trí 135 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với R, A, L hoặc M;

(aw) sự thay thế của G ở vị trí 136 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, Q, Y, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;

(ax) sự thay thế của Y ở vị trí 138 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, S, C, N, Q, D, E, R, K, H, A, V, M, W, F hoặc P;

(ay) sự thay thế của T ở vị trí 140 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với L, W hoặc F;

(az) sự thay thế của Y ở vị trí 148 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, S, T, C, N, Q, D, E, R, K, H, A, M, W, F hoặc P;

(ba) sự thay thế của K ở vị trí 151 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với F;

(bb) sự thay thế của E ở vị trí 163 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, N, Q, D, K, H, V, L, I hoặc F;

(bc) sự thay thế của N ở vị trí 166 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, V, L, I, W hoặc F;

(bd) sự thay thế của G ở vị trí 167 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với V;

(be) sự thay thế của I ở vị trí 170 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với V hoặc L;

(bf) sự thay thế của S ở vị trí 171 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, T, E hoặc A;

(bg) sự thay thế của N ở vị trí 187 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S;

(bh) sự thay thế của S ở vị trí 191 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với V, L, I, W hoặc F;

(bi) sự thay thế của G ở vị trí 193 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, Q, Y, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;

(bj) sự thay thế của S ở vị trí 194 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với Y, R hoặc K;

(bk) sự thay thế của Y ở vị trí 195 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, S, T, C, N, Q, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;

(bl) sự thay thế của N ở vị trí 200 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với W;

(bm) sự thay thế của Q ở vị trí 204 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, N, D, E, R, K, H, V, L, I, M, W hoặc P;

(bn) sự thay thế của F ở vị trí 205 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, N, Q, Y, E, K, H, A, V, L, I, M hoặc W;

(bo) sự thay thế của K ở vị trí 212 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với N, Q, R, V, L hoặc W;

(bp) sự thay thế của F ở vị trí 226 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với Y;

(bq) sự thay thế của S ở vị trí 233 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với L, I hoặc W;

(br) sự thay thế của D ở vị trí 237 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với N;

(bs) sự thay thế của S ở vị trí 238 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với L;

(bt) sự thay thế của N ở vị trí 243 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với Y, L hoặc I;

(bu) sự thay thế của D ở vị trí 245 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với N;

(bv) sự thay thế của S ở vị trí 246 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với Y, V, L, W hoặc F;

(bw) sự thay thế của K ở vị trí 247 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, N, Q, E, H, A, V, L, I, M, W hoặc F;

(bx) sự thay thế của Y ở vị trí 248 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với F;

(by) sự thay thế của Y ở vị trí 250 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với F;

(bz) sự thay thế của M ở vị trí 251 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, T, N, Q, D, A, V, L hoặc I;

(ca) sự thay thế của M ở vị trí 256 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, Q, Y, D, E, R, K, H, A, V, L, I, W, F hoặc P;

(cb) sự thay thế của A ở vị trí 257 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với V hoặc I;

- (cc) sự thay thế của N ở vị trí 264 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, S, T, C, Q, D, E, A, V, L, I hoặc M;
- (cd) sự thay thế của V ở vị trí 273 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, T hoặc I;
- (ce) sự thay thế của N ở vị trí 275 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với L, W hoặc F;
- (cf) sự thay thế của G ở vị trí 277 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với V, L, I hoặc F;
- (cg) sự thay thế của K ở vị trí 281 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với R;
- (ch) sự thay thế của I ở vị trí 296 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với V;
- (ci) sự thay thế của G ở vị trí 297 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với L, W hoặc F;
- (cj) sự thay thế của N ở vị trí 304 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S;
- (ck) sự thay thế của D ở vị trí 313 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với N;
- (cl) sự thay thế của A ở vị trí 319 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, N, Q, Y, D, E, R, K, H, V, L, I, M, W, F hoặc P;
- (cm) sự thay thế của Y ở vị trí 320 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, T, V, L, I hoặc F;
- (cn) sự thay thế của S ở vị trí 326 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với W;
- (co) sự thay thế của S ở vị trí 330 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với M, W hoặc F;

(cp) sự thay thế của K ở vị trí 332 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, T hoặc V;

(cq) sự thay thế của T ở vị trí 334 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với L;

(cr) sự thay thế của Y ở vị trí 335 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với F;

(cs) sự thay thế của F ở vị trí 337 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, S, T, C, Q, R, K, H, A hoặc V;

(ct) sự thay thế của G ở vị trí 342 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, Q, Y, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;

(cu) sự thay thế của K ở vị trí 343 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với T;

(cv) sự thay thế của K ở vị trí 346 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với R;

(cw) sự thay thế của S ở vị trí 357 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với L;

(cx) sự thay thế của T ở vị trí 359 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, S, Q, V, L, I hoặc F;

(cy) sự thay thế của S ở vị trí 361 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với V, I hoặc W;

(cz) sự thay thế của D ở vị trí 369 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với N;

(da) sự thay thế của N ở vị trí 376 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với W;

(db) sự thay thế của T ở vị trí 378 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với L hoặc W;

(dc) sự thay thế của Q ở vị trí 379 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với D, E, R hoặc K;

(dd) sự thay thế của Y ở vị trí 380 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với F;

(de) sự thay thế của F ở vị trí 385 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với Y, M hoặc P;

(df) sự thay thế của T ở vị trí 386 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với A, L, I hoặc M;

(dg) sự thay thế của S ở vị trí 387 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, Q, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W hoặc F;

(dh) sự thay thế của N ở vị trí 390 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, S, T, Y hoặc F;

(di) sự thay thế của W ở vị trí 393 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với Q;

(dj) sự thay thế của R ở vị trí 396 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G;

(dk) sự thay thế của F ở vị trí 403 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với T hoặc K;

(dl) sự thay thế của N ở vị trí 405 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với D, V, L, I, W, F hoặc P;

(dm) sự thay thế của A ở vị trí 406 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với V, W hoặc F;

(dn) sự thay thế của P ở vị trí 407 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G hoặc C;

(do) sự thay thế của Q ở vị trí 408 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với N, Y, I hoặc W;

(dp) sự thay thế của S ở vị trí 409 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với Y hoặc W;

(dq) sự thay thế của T ở vị trí 411 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với A, V, L hoặc P;

(dr) sự thay thế của T ở vị trí 427 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với R hoặc V; và

(ds) sự thay thế của V ở vị trí 433 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với L,

(ii) tốt hơn nữa là, bất kỳ trong số dưới đây:

(ar);

sự kết hợp của (as), (at), và (au);

(bk);

(cz);

sự kết hợp của (v), (cd), (cx), và (dg);

sự kết hợp của (bc) và (bd);

sự kết hợp của (e) và (aa);

sự kết hợp của (j), (s), (y), (bh), và (dl);

sự kết hợp của (e), (v), (aa), (bc), (bd), (bk), (cd), (cx), (cz), và (dg);

sự kết hợp của (e), (v), (aa), (ar), (bc), (bd), (bk), (cd), (cx), (cz), và (dg);

sự kết hợp của (v), (as), (at), (au), (bc), (bd), (bk), (cd), (cx), (cz), và (dg);

sự kết hợp của (j), (s), (v), (y), (as), (at), (au), (bc), (bd), (bh), (bk), (cd),

(cx), (cz), (dg), và (dl);

sự kết hợp của (v), (aa), (ar), (bc), (bd), (bk), (cd), (cx), (cz), và (dg);

sự kết hợp của (v), (as), (at), (au), (bc), (bd), (bk), (cd), (cx), (cz), và (dg);

sự kết hợp của (e), (v), (aa), (bc), (bd), (bk), (bm), (cd), (cl), (cx), (cz), và

(dg); và

sự kết hợp của (v), (as), (at), (au), (bc), (bd), (bj), (bk), (bo), (cd), (cx), (cz), (dc), và (dg).

[22] Phương pháp theo bất kỳ trong số [17] đến [21] nêu trên, trong đó

trình tự axit amin có tính đồng nhất là ít nhất 95% so với trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 tốt hơn là có axit aspartic ở vị trí tương ứng với vị trí 30 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2, histidin ở vị trí tương ứng với vị trí 68 của chúng, và serin ở vị trí tương ứng với vị trí 255 của chúng,

tốt hơn nữa là có các gốc axit amin được thể hiện trong (ii) nêu trên của Bảng 1 ở các vị trí tương ứng với các vị trí được thể hiện trong (i) nêu trên của Bảng 1 trong trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2.

[23] Phương pháp theo bất kỳ trong số [17] đến [22] nêu trên, trong đó trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự axit amin có tính đồng nhất là ít nhất 95% thêm vào tốt hơn là trình tự axit amin được thể hiện trong bất kỳ trong số SEQ ID NOS: 2 đến 11.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả cụ thể hơn trong các ví dụ dưới đây. Tuy nhiên, các ví dụ này không nhằm giới hạn phạm vi kỹ thuật của sáng chế.

Ví dụ 1 Sự sản xuất thể đột biến proteaza kiềm

Phương pháp sản xuất thể đột biến proteaza kiềm theo sáng chế sẽ được mô tả dưới đây, sử dụng như một ví dụ, thể sản xuất của đột biến "A294T", trong đó alanin ở vị trí 294 (A294) trong trình tự axit amin (SEQ ID NO: 2) của vùng enzym trưởng thành dạng tự nhiên KP43 proteaza đã được thể với threonin.

Thể đột biến hướng vị trí được đưa vào trong vật truyền tái tổ hợp chứa gen cấu trúc proteaza kiềm có nguồn gốc từ dòng *Bacillus* sp. KSM-KP43 (SEQ ID NO: 1) mã hóa proteaza kiềm như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2, bằng cách thay thế gốc axit amin ở vị trí 294 của SEQ ID NO: 2 với threonin. Các môi đột biến, cụ thể là, A294-F (SEQ ID NO: 12: GGTGCAACTGACATCGGCCTTGGCTAC) và A294-R (SEQ ID NO: 13: GATGTCAGTTGCACCGGCAATCAGTGC) được thiết kế. Sử dụng các môi này, sản phẩm PCR chứa thể đột biến đã thu được theo các giao thức của PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit (Takara). Sản phẩm PCR được tinh chế bằng bộ dụng cụ tinh chế sản phẩm PCR (Roche), và *Bacillus* sp. dòng KSM9865 (FERM P-18566) được sử dụng như một vật chủ vi khuẩn sau đó được biến đổi thêm.

Thể biến nạp đã thu được được cho phát triển trong môi trường agar kiềm chứa sữa không kem [1% (trọng lượng/thể tích) sữa không kem (Difco), 1% bactotripton (Difco), 0,5% phần chiết nấm men (Difco), 1% natri clorua, 1,5% agar, 0,05% natri cacbonat, và 15ppm tetracyclin], và sau đó, sự có mặt hoặc vắng mặt gen proteaza đột biến được đưa vào được xác định dựa vào trạng thái hình thành vòng sáng. Thể biến nạp được cấy trong 5mL của môi trường giống [6,0% (trọng lượng/thể tích) polypepton S, 0,05% phần chiết nấm men, 1,0% maltoza, 0,02% magiê sulfat heptahydrat, 0,1% kali dihydro phosphat, 0,25% natri cacbonat, và 30ppm tetracyclin], và sau đó được cho qua nuôi cấy lắc ở 30°C trong 16 giờ. Sau đó, môi trường nuôi cấy giống (1% (thể tích/thể tích)) được cấy vào trong 20mL của môi trường chính [8% polypepton S, 0,3% phần

chiết nấm men, 10% maltoza, 0,04% magiê sulfat heptahydrat, 0,2% kali dihydro phosphat, 1,5% natri cacbonat khan, và 30 ppm tetracyclin], và sau đó được cho qua nuôi cấy lắc ở 30°C trong 3 ngày. Môi trường nuôi cấy thu được được phân ly để thu được dịch nổi nuôi cấy chứa thể đột biến proteaza kiềm. Khối lượng protein được đo sử dụng Protein Assay Rapid Kit Wako (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

Ví dụ 2 Sự sản xuất của nhiều đột biến proteaza kiềm

Với sự tham khảo các nội dung được mô tả của JP-B-5202690, JP-A-2002-218989, JP-A-2002-306176, JP-A-2004-000122, JP-A-2004-305176, JP-A-2006-129865, JP-A-2007-061101, JP-A-2008-212084, JP-A-2010-273672, JP-A-2010-273673, và JP-A-2013-233141, thể đột biến được đưa vào trong KP43 proteaza dạng tự nhiên (SEQ ID NO: 2) để sản xuất các đột biến KP43 proteaza dưới đây.

(1) Thẻ đột biến đơn lẻ (SEQ ID NO: 3):

Alanin ở vị trí 132 được thế với threonin (JP-B-5202690),

(2) 10-lần đột biến-1 (SEQ ID NO: 4):

Tyrosin ở vị trí 195 được thế với glutamin (JP-A-2002-218989);

axit aspartic ở vị trí 369 được thế với asparagin (JP-A-2002-306176);

threonin ở vị trí 65 được thế với prolin, valin ở vị trí 273 được thế với isoLeuxin, threonin ở vị trí 359 được thế với serin, và serin ở vị trí 387 được thế với alanin (JP-A-2004-000122);

Asparagin ở vị trí 166 được thế với Glyxin, và Glyxin ở vị trí 167 được thế với Valin (JP-A-2004-305176); và

Serin ở vị trí 16 được thế với Valin, và Asparagin ở vị trí 83 được thế với alanin (JP-A-2010-273672, và JP-A-2010-273673),

(3) 11-lần đột biến-1 (SEQ ID NO: 5):

Alanin ở vị trí 132 được thế với threonin (JP-B-5202690);

Tyrosin ở vị trí 195 được thế với glutamin (JP-A-2002-218989);

axit aspartic ở vị trí 369 được thế với Asparagin (JP-A-2002-306176);

threonin ở vị trí 65 được thế với Prolin, Valin ở vị trí 273 được thế với isoLeuxin, threonin ở vị trí 359 được thế với Serin, và Serin ở vị trí 387 được thế với alanin (JP-A-2004-000122);

Asparagin ở vị trí 166 được thế với Glyxin, và Glyxin ở vị trí 167 được thế với Valin (JP-A-2004-305176); và

Serin ở vị trí 16 được thế với Valin, và Asparagin ở vị trí 83 được thế với alanin (JP-A-2010-273672, và JP-A-2010-273673),

(4) 11-lần đột biến-2 (SEQ ID NO: 6):

Tyrosin ở vị trí 195 được thế với glutamin (JP-A-2002-218989);

axit aspartic ở vị trí 369 được thế với Asparagin (JP-A-2002-306176);

threonin ở vị trí 65 được thế với Prolin, Valin ở vị trí 273 được thế với isoLeuxin, threonin ở vị trí 359 được thế với Serin, và Serin ở vị trí 387 được thế với alanin (JP-A-2004-000122);

Asparagin ở vị trí 166 được thế với Glyxin, và Glyxin ở vị trí 167 được thế với Valin (JP-A-2004-305176); và

alanin ở vị trí 133 được thế với Serin, Valin ở vị trí 134 được thế với threonin, và Serin được chèn giữa vị trí 133 và vị trí 134 (JP-A-2006-129865),

(5) 16-lần đột biến (SEQ ID NO: 7):

Tyrosin ở vị trí 195 được thế với glutamin (JP-A-2002-218989);
 axit aspartic ở vị trí 369 được thế với Asparagin (JP-A-2002-306176);
 threonin ở vị trí 65 được thế với Prolin, Valin ở vị trí 273 được thế với isoLeuxin, threonin ở vị trí 359 được thế với Serin, và Serin ở vị trí 387 được thế với alanin (JP-A-2004-000122);

Asparagin ở vị trí 166 được thế với Glyxin, và Glyxin ở vị trí 167 được thế với Valin (JP-A-2004-305176);

alanin ở vị trí 133 được thế với Serin, Valin ở vị trí 134 được thế với threonin, và Serin được chèn giữa vị trí 133 và vị trí 134 (JP-A-2006-129865);
 và

Serin ở vị trí 40 được thế với isoLeuxin, threonin ở vị trí 59 được thế với Valin, Serin ở vị trí 81 được thế với Leuxin, Serin ở vị trí 191 được thế với Leuxin, và Asparagin ở vị trí 405 được thế với Leuxin (JP-A-2013-233141).

(6) 10-lần đột biến-2 (SEQ ID NO: 8):

Alanin ở vị trí 132 được thế với threonin (JP-B-5202690);
 Tyrosin ở vị trí 195 được thế với arginin (JP-A-2002-218989);
 axit aspartic ở vị trí 369 được thế với Asparagin (JP-A-2002-306176);
 threonin ở vị trí 65 được thế với Prolin, Valin ở vị trí 273 được thế với isoLeuxin, threonin ở vị trí 359 được thế với Serin, và Serin ở vị trí 387 được thế với alanin (JP-A-2004-000122);

Asparagin ở vị trí 166 được thế với Glyxin, và Glyxin ở vị trí 167 được thế với Valin (JP-A-2004-305176); và

Asparagin ở vị trí 83 được thế với alanin (JP-A-2010-273672),

(7) 11-lần đột biến-3 (SEQ ID NO: 9):

Tyrosin ở vị trí 195 được thế với arginin (JP-A-2002-218989);

axit aspartic ở vị trí 369 được thế với Asparagin (JP-A-2002-306176);

threonin ở vị trí 65 được thế với Prolin, Valin ở vị trí 273 được thế với isoLeuxin, threonin ở vị trí 359 được thế với Serin, và Serin ở vị trí 387 được thế với alanin (JP-A-2004-000122);

Asparagin ở vị trí 166 được thế với Glyxin, và Glyxin ở vị trí 167 được thế với Valin (JP-A-2004-305176); và

alanin ở vị trí 133 được thế với Serin, Valin ở vị trí 134 được thế với threonin, và Serin được chèn giữa vị trí 133 và vị trí 134 (JP-A-2006-129865),

(8) 12-lần đột biến (SEQ ID NO: 10):

Tyrosin ở vị trí 195 được thế với glutamin (JP-A-2002-218989);

axit aspartic ở vị trí 369 được thế với Asparagin (JP-A-2002-306176);

threonin ở vị trí 65 được thế với Prolin, Valin ở vị trí 273 được thế với isoLeuxin, threonin ở vị trí 359 được thế với Serin, và Serin ở vị trí 387 được thế với alanin (JP-A-2004-000122);

Asparagin ở vị trí 166 được thế với Glyxin, và Glyxin ở vị trí 167 được thế với Valin (JP-A-2004-305176);

Asparagin ở vị trí 83 được thế với alanin, và Alanin ở vị trí 319 được thế với Valin (JP-A-2010-273672), và

Serin ở vị trí 16 được thế với Valin, và Glutamin ở vị trí 204 được thế với axit aspartic (JP-A-2010-273673),

(9) 14-lần đột biến (SEQ ID NO: 11):

Tyrosin ở vị trí 195 được thế với arginin (JP-A-2002-218989);

axit aspartic ở vị trí 369 được thế với Asparagin (JP-A-2002-306176);

threonin ở vị trí 65 được thế với Prolin, Valin ở vị trí 273 được thế với isoLeuxin, threonin ở vị trí 359 được thế với Serin, và Serin ở vị trí 387 được thế với alanin (JP-A-2004-000122);

Asparagin ở vị trí 166 được thế với Glyxin, và Glyxin ở vị trí 167 được thế với Valin (JP-A-2004-305176);

alanin ở vị trí 133 được thế với Serin, Valin ở vị trí 134 được thế với threonin, và Serin được chèn giữa vị trí 133 và vị trí 134 (JP-A-2006-129865), và

Serin ở vị trí 194 được thế với arginin, lyzin ở vị trí 212 được thế với arginin, và Glutamin ở vị trí 379 được thế với arginin (JP-A-2008-212084).

Thế đột biến đơn lẻ (SEQ ID NO: 3), 10-lần đột biến-1 (SEQ ID NO: 4), 11-lần đột biến-1 (SEQ ID NO: 5), 11-lần đột biến-2 (SEQ ID NO: 6), 16-lần đột biến (SEQ ID NO: 7), 10-lần đột biến-2 (SEQ ID NO: 8), 11-lần đột biến-3 (SEQ ID NO: 9), 12-lần đột biến (SEQ ID NO: 10), và 14-lần đột biến (SEQ ID NO: 11) được mô tả ở trên có 99,8%, 97,7%, 97,5%, 97,5%, 96,3%, 97,7%, 97,5%, 97,2%, và 96,8% sự đồng nhất của trình tự axit amin, tương ứng, so với KP43 proteaza dạng tự nhiên (SEQ ID NO: 2).

Trong mỗi polynucleotit mã hóa cho mỗi trong số các đột biến đã thu được nêu trên, sự đột biến này được đưa vào mà alanin ở vị trí tương ứng với vị trí 294 của SEQ ID NO: 2 được thế với threonin (A294T đối với SEQ ID NO: 3

đến 5, 8, và 10, và A295T đối với SEQ ID NO: 6, 7, 9, và 11) theo các quy trình tương tự như các quy trình của Ví dụ 1. Sau đó, vật chủ được biến đổi với từng đột biến, và thể biến nạp đã thu được sau đó được nuôi cấy để thu được dịch nổi nuôi cấy chứa thể đột biến proteaza kiềm. Khối lượng protein của chúng sau đó được đo. Trong các ví dụ dưới đây, các thể đột biến proteaza kiềm đã thu được trong các Ví dụ 1 và 2, mà có T ở vị trí tương ứng với vị trí 294 của SEQ ID NO: 2, được đề cập chung đến như một "đột biến A294T."

Ví dụ 3 Đánh giá về độ bền của thể đột biến proteaza kiềm trong dung dịch chứa chất tạo chelat

(1) Đánh giá về độ bền trong dung dịch chứa nước xitrat

Dịch nổi nuôi cấy của đột biến A294T đã thu được trong Ví dụ 1 được bổ sung 20mM dung dịch đệm Tris-HCl (độ pH là 8,0), chứa hoặc không chứa 2mM 3Na xitrat, và hỗn hợp sau đó được trộn đều để thu được dung dịch enzym (nồng độ cuối cùng của enzym: 0,017mg/mL). Dung dịch enzym được phân đoạn ở lượng là 200 μ L trong mỗi đĩa thử nghiệm 96-lỗ, và 10 μ L của 10mM Glt-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA $\cdot$ H₂O (PEPTIDE INSTITUTE, INC.) sau đó được bổ sung thêm vào. Sau đó, độ hấp thụ ở 405nm được đo theo thời gian, sử dụng đầu đọc vi tấm (Infinite M200Pro; TECAN), trong khi đang lắc ở 30°C trong 15 phút. Tốc độ thay đổi độ hấp thụ (mOD405/phút) được coi là hoạt tính enzym, và giá trị hoạt tính ban đầu đã thu được. Giá trị hoạt tính còn lại của dung dịch enzym, mà đã được nung nóng ở 70°C trong 10 phút, đã thu được bằng phương pháp giống như phương pháp để đo giá trị hoạt tính ban đầu. Theo phương trình dưới đây, hoạt tính dư (%) của proteaza kiềm được tính:

Hoạt tính còn lại (%) = Giá trị hoạt tính còn lại / Giá trị hoạt tính ban đầu
x 100

Sau đó, giá trị tương đối của hoạt tính còn lại (hoạt tính còn lại tương đối (%)) của đột biến A294T đã thu được, khi hoạt tính còn lại của gốc proteaza kiểm (KP43 proteaza dạng tự nhiên; SEQ ID NO: 2) được thiết lập ở 100%.

Tương tự, đối với thể đột biến đơn lẻ (SEQ ID NO: 3), 11-lần đột biến-2 (SEQ ID NO: 6), 14-lần đột biến (SEQ ID NO: 11) và 16-lần đột biến (SEQ ID NO: 7), mà đã thu được trong Ví dụ 2, hoạt tính còn lại (%) của đột biến A294T được tính, và hoạt tính còn lại tương đối (%) của từng đột biến cho gốc proteaza kiểm sau đó đã thu được.

(2) Đánh giá về độ bền trong dung dịch chứa nước EDTA

Dịch nổi nuôi cấy của thể đột biến A294T đã thu được trong Ví dụ 1 được bổ sung 20mM dung dịch đệm Tris-HCl (độ pH là 8,0), chứa hoặc không chứa 1mM EDTA, và hỗn hợp sau đó được trộn đều để thu được dung dịch enzym (nồng độ cuối cùng của enzym: 0,017mg/mL). Sử dụng dung dịch enzym này, hoạt tính còn lại (%) của proteaza kiểm được tính theo các điều kiện giống như ở (1) nêu trên, và hoạt tính còn lại tương đối (%) của thể đột biến so với gốc proteaza kiểm sau đó đã thu được.

Tương tự, đối với thể đột biến đơn lẻ (SEQ ID NO: 3), 10-lần đột biến-1 (SEQ ID NO: 4), 10-lần đột biến-2 (SEQ ID NO: 8), 11-lần đột biến-1 (SEQ ID NO: 5), 11-lần đột biến-2 (SEQ ID NO: 6), 11-lần đột biến-3 (SEQ ID NO: 9), 12-lần đột biến (SEQ ID NO: 10) và 16-lần đột biến (SEQ ID NO: 7), mà đã thu được trong Ví dụ 2, hoạt tính còn lại (%) của đột biến A294T được tính, và hoạt

tính còn lại tương đối (%) của từng đột biến so với gốc proteaza kiềm sau đó đã thu được.

(3) Các kết quả

Các hoạt tính còn lại tương đối của thể đột biến A294T trong dung dịch chứa nước xitrat, mà đã được đo trong (1) nêu trên, được thể hiện ở Fig. 1 và Bảng 2. Các hoạt tính còn lại tương đối của đột biến A294T trong dung dịch chứa nước EDTA, mà đã được đo trong (2) nêu trên, được thể hiện ở các Fig. 2 và 3 và các Bảng 3 và 4. Các hoạt tính còn lại của đột biến A294T là bằng nhau khi so sánh với proteaza kiềm gốc của chúng trong dung dịch không chứa chất tạo chelat, nhưng đột biến A294T có các hoạt tính còn lại cao hơn trong dung dịch chứa chất tạo chelat. Các kết quả này thể hiện rằng độ bền của thể đột biến A294T trong dung dịch chứa chất tạo chelat đã được cải thiện, khi so sánh với độ bền này của proteaza kiềm gốc của chúng.

[Bảng 2]

	Hoạt tính còn lại tương đối (%)	
	Không có 3Na xitrat	Với 2 mM 3Na xitrat
Dạng tự nhiên	100,0	100,0
A294T	110,3	311,1
	Hoạt tính còn lại tương đối (%)	
	Không có 3Na xitrat	Với 2 mM 3Na xitrat
Thể đột biến đơn lẻ	100,0	100,0
Thể đột biến đơn lẻ/A294T	110,5	204,8
	Hoạt tính còn lại tương đối (%)	
	Không có 3Na xitrat	Với 2 mM 3Na xitrat
11-lần đột biến-2	100,0	100,0
11-lần đột biến-2/A294T	109,0	184,5
	Hoạt tính còn lại tương đối (%)	
	Không có 3Na xitrat	Với 2 mM 3Na xitrat
14-lần đột biến	100,0	100,0
14-lần đột biến/A294T	86,2	144,7
	Hoạt tính còn lại tương đối (%)	
	Không có 3Na xitrat	Với 2 mM 3Na xitrat
16-lần đột biến	100,0	100,0
16-lần đột biến/A294T	118,5	393,5

[Bảng 3]

	Hoạt tính còn lại tương đối (%)	
	Không có EDTA	Với 1 mM EDTA
Dạng tự nhiên	100,0	100,0
A294T	98,1	199,5
	Hoạt tính còn lại tương đối (%)	
	Không có EDTA	Với 1 mM EDTA
Thế đột biến đơn lẻ	100,0	100,0
Thế đột biến đơn lẻ/A294T	99,5	324,9
	Hoạt tính còn lại tương đối (%)	
	Không có EDTA	Với 1 mM EDTA
10-lần đột biến-1	100,0	100,0
10-lần đột biến-1/A294T	101,6	473,0
	Hoạt tính còn lại tương đối (%)	
	Không có EDTA	Với 1 mM EDTA
10-lần đột biến-2	100,0	100,0
10-lần đột biến-2/A294T	99,4	1304,2
	Hoạt tính còn lại tương đối (%)	
	Không có EDTA	Với 1 mM EDTA
11-lần đột biến-1	100,0	100,0
11-lần đột biến 1/A294T	93,7	598,3
	Hoạt tính còn lại tương đối (%)	
	Không có EDTA	Với 1 mM EDTA
11-lần đột biến-2	100,0	100,0
11-lần đột biến-2/A294T	101,6	545,4

[Bảng 4]

	Hoạt tính còn lại tương đối (%)	
	Không có EDTA	Với 1 mM EDTA
11-lần đột biến-3	100,0	100,0
11-lần đột biến-3/A294T	143,3	549,6
	Hoạt tính còn lại tương đối (%)	
	Không có EDTA	Với 1 mM EDTA
12-lần đột biến	100,0	100,0
12-lần đột biến/A294T	104,1	309,9
	Hoạt tính còn lại tương đối (%)	
	Không có EDTA	Với 1 mM EDTA
16-lần đột biến	100,0	100,0
16-lần đột biến/A294T	98,9	532,7

Ví dụ 4 Đánh giá về độ bền của thể đột biến proteaza kiềm trong chế phẩm tẩy sạch

Chế phẩm chất tẩy sạch dạng lỏng cho quần áo có sẵn trên thị trường (Ultra Attack Neo; Kao Corporation, được đưa ra bán năm 2015, xitrat được trộn) được nung nóng trong lò vi sóng để khử hoạt tính enzym có trong sản phẩm. Đối với sản phẩm này, đột biến A294T của Ví dụ 1 hoặc KP43 proteaza dạng tự nhiên được bổ sung ở lượng là 1,0% (thể tích/thể tích), và sau đó hỗn hợp đã thu được được trộn đều để thu được chế phẩm tẩy sạch có chứa enzym. Chế phẩm tẩy sạch được pha loãng 10 lần với nước trao đổi ion, và sau đó dung dịch được pha loãng được khuấy đều. Do đó, dung dịch tẩy giặt đã thu được

được chia ở lượng là 200 μ L vào mỗi trong đĩa thử nghiệm 96 lỗ, và 10 μ L của 10mM Glt-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA $\cdot$ H₂O (PEPTIDE INSTITUTE, INC.) sau đó được bổ sung thêm vào. Sau đó, độ hấp thụ ở 405nm được đo theo thời gian, sử dụng đầu đọc vi tấm (Infinite M200Pro; TECAN), trong khi đang lắc ở 30°C trong 15 phút. Tốc độ thay đổi độ hấp thụ (mOD405/phút) được coi là hoạt tính enzym, và giá trị hoạt tính ban đầu đã thu được. Hơn nữa, sau khi chế phẩm tẩy sạch được bảo quản ở 40°C trong 28 ngày, giá trị hoạt tính còn lại đã thu được bằng phương pháp giống như phương pháp để đo giá trị hoạt tính ban đầu. Theo phương trình dưới đây, hoạt tính còn lại (%) của proteaza kiềm được tính:

$$\text{Hoạt tính còn lại (\%)} = \frac{\text{Giá trị hoạt tính còn lại}}{\text{Giá trị hoạt tính ban đầu}} \times 100$$

Sau đó, hoạt tính còn lại tương đối (%) của đột biến A294T đã thu được, khi hoạt tính dư của KP43 proteaza dạng tự nhiên được thiết lập ở 100%.

Các kết quả được thể hiện ở Bảng 5. Khi so sánh với KP43 proteaza dạng tự nhiên, mà là proteaza kiềm gốc của đột biến A294T, độ bền bảo tồn của đột biến A294T được cải thiện xấp xỉ 2 lần trong chế phẩm tẩy sạch.

[Bảng 5]

Enzym	Hoạt tính còn lại tương đối (%) sau khi bảo quản ở 40°C trong 28 ngày
Dạng tự nhiên	100,0
A294T	198,0

Ví dụ tham khảo 1

Thể đột biến đơn lẻ và đa đột biến của KP43 proteaza, mà được sử dụng như proteaza kiểm gốc trong Ví dụ 2, được phân tích, xét về sự kháng axit xitric và sự kháng EDTA, dưới các điều kiện giống như các điều kiện ở các Ví dụ 3 và 4. Các kết quả đối với sự kháng axit xitric được thể hiện ở Bảng 6, và các kết quả đối với sự kháng EDTA được thể hiện ở Bảng 7. Mỗi giá trị được thể hiện ở các Bảng 6 và 7 biểu thị hoạt tính còn lại tương đối (%) của từng đột biến, khi hoạt tính còn lại của KP43 proteaza dạng tự nhiên (SEQ ID NO: 2) được thiết lập ở 100%. Mỗi proteaza kiểm gốc có sự kháng các chất tạo chelat bằng hoặc cao hơn, khi so sánh với KP43 proteaza dạng tự nhiên. Các kết quả này thể hiện rằng sự kháng chất tạo của đột biến A294T được thể hiện ở các Ví dụ 3 và 4 mạnh hơn của bất kỳ trong số proteaza kiểm gốc và proteaza dạng tự nhiên.

[Bảng 6]

2mM 3Na xitrat

Enzym	Hoạt tính còn lại tương đối (%)
Dạng tự nhiên	100,0
Thể đột biến đơn lẻ	115,9
14-lần đột biến	170,7

16-lần đột biến	165,0
-----------------	-------

[Bảng 7]

1mM EDTA

Enzym	Hoạt tính còn lại tương đối (%)
Dạng tự nhiên	100,0
Thể đột biến đơn lẻ	113,3
10-lần đột biến-1	108,3
10-lần đột biến-2	137,3
11-lần đột biến-1	126,5
11-lần đột biến-2	120,4
16-lần đột biến	103,9

Như đã nêu trên, các phương án theo sáng chế được giải thích. Tuy nhiên, cần hiểu rằng các phương án này không nhằm giới hạn sáng chế ở các phương án cụ thể đã giải thích. Các sự sửa đổi và hiệu chỉnh khác nằm trong phạm vi của sáng chế là rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật.

Các công bố và các công bố patent được trích dẫn theo sáng chế được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn toàn bộ.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Thẻ đột biến proteaza kiềm bao gồm trình tự axit amin đã thu được bằng cách thay thế gốc axit amin ở vị trí tương ứng với vị trí 294 trong trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO:2 với threonin trong trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO:2 hoặc trình tự axit amin có tính đồng nhất là ít nhất 95% trình tự này, trong đó sự đột biến proteaza kiềm có độ bền cải thiện cho chất tạo chelat và có thể giữ lại hoạt tính proteaza kiềm cao hơn trong chất tạo chelat, khi so sánh với proteaza kiềm gốc bao gồm trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO:2 hoặc trình tự axit amin có tính đồng nhất là ít nhất 95% trình tự này.

2. Thẻ đột biến proteaza kiềm theo điểm 1, bao gồm một hoặc nhiều gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (a') đến (ds') dưới đây:

(a') gốc axit amin ở vị trí 6 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO:2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là S, T, C, Q, Y, R, K, H, A, V, L, I, M, W hoặc F;

(b') gốc axit amin ở vị trí 9 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO:2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là Q;

(c') gốc axit amin ở vị trí 11 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO:2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G, S hoặc N;

(d') gốc axit amin ở vị trí 15 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO:2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là H, C, Q, D, E, R, A, V, M, W hoặc F;

(e') gốc axit amin ở vị trí 16 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO:2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là T, Q, V, C, Y, D, E, R, K, H, L, I, M, W hoặc F;

(f') gốc axit amin ở vị trí 20 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là F hoặc A;

(g') gốc axit amin ở vị trí 22 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là W;

(h') gốc axit amin ở vị trí 23 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là N;

(i') gốc axit amin ở vị trí 37 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là T;

(j') gốc axit amin ở vị trí 40 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là V, L, I, W hoặc F;

(k') gốc axit amin ở vị trí 41 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là I;

(l') gốc axit amin ở vị trí 46 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là S, T, C, N, Q, Y, E, K, H, A, V, L, I, M hoặc W;

(m') gốc axit amin ở vị trí 49 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là Q;

(n') gốc axit amin ở vị trí 52 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G hoặc S;

(o') gốc axit amin ở vị trí 53 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là A, V hoặc I;

(p') gốc axit amin ở vị trí 54 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G, S, T, C, N, Q, D, E, R, H, A, V, M, W, F hoặc P;

(q') gốc axit amin ở vị trí 56 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là V;

(r') gốc axit amin ở vị trí 57 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là S, T, C, Q, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;

(s') gốc axit amin ở vị trí 59 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là V, L, I, M, W hoặc F;

(t') gốc axit amin ở vị trí 60 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là V, L, I, W hoặc F;

(u') gốc axit amin ở vị trí 63 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là S, D hoặc L;

(v') gốc axit amin ở vị trí 65 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là W hoặc P;

(w') gốc axit amin ở vị trí 66 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G, S, T, C, Q, D, E, H, A, V, L, I, M hoặc W;

(x') gốc axit amin ở vị trí 80 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là H hoặc A;

(y') gốc axit amin ở vị trí 81 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID

NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là Q, Y, L, I, W hoặc F;

(z') gốc axit amin ở vị trí 82 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID

NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G, S, C, Q, D, E, R, K, H, A hoặc M;

(aa') gốc axit amin ở vị trí 83 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID

NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là S, C hoặc A;

(ab') gốc axit amin ở vị trí 84 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID

NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là R;

(ac') gốc axit amin ở vị trí 89 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID

NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là H;

(ad') gốc axit amin ở vị trí 91 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID

NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là C;

(ae') gốc axit amin ở vị trí 100 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là L, I, W hoặc F;

(af') gốc axit amin ở vị trí 101 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là S, T, C, N, Q, Y, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;

(ag') gốc axit amin ở vị trí 102 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là S, T, C, Q, Y, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;

(ah') gốc axit amin ở vị trí 103 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là S, T, C, Q, Y, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;

(ai') gốc axit amin ở vị trí 104 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là S, T, C, Q, Y, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;

(aj') gốc axit amin ở vị trí 105 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là S, T, C, Q, Y, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;

(ak') gốc axit amin ở vị trí 106 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là S, T, C, Q, Y, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;

(al') gốc axit amin ở vị trí 107 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là S, R, K hoặc A;

(am') gốc axit amin ở vị trí 109 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là L, I hoặc F;

(an') gốc axit amin ở vị trí 113 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là L hoặc W;

(ao') gốc axit amin ở vị trí 119 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G, S, T, C, N, Q, D, E, R, K, H, A, V, M, W, F hoặc P;

(ap') gốc axit amin ở vị trí 120 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là Y, R, I, W hoặc F;

(aq') gốc axit amin ở vị trí 124 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là K hoặc A;

(ar') gốc axit amin ở vị trí 132 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là S, T, N, Q, D, I hoặc M;

(as') gốc axit amin ở vị trí 133 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G, S, T, C, N, Q, D, E, R, K, H, V, L, I, M, W, F hoặc P;

(at') gốc axit amin ở vị trí 134 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G, S, T hoặc A;

(au') gốc axit amin giữa vị trí 133 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc A vị trí tương ứng của trình tự này, và vị trí 134 của chúng hoặc A vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G, S, T, N, Q, Y, R, K, H, A, L, I, M hoặc W;

(av') gốc axit amin ở vị trí 135 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là R, A, L hoặc M;

(aw') gốc axit amin ở vị trí 136 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là S, T, C, Q, Y, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;

(ax') gốc axit amin ở vị trí 138 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G, S, C, N, Q, D, E, R, K, H, A, V, M, W, F hoặc P;

(ay') gốc axit amin ở vị trí 140 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là L, W hoặc F;

(az') gốc axit amin ở vị trí 148 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G, S, T, C, N, Q, D, E, R, K, H, A, M, W, F hoặc P;

(ba') gốc axit amin ở vị trí 151 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là F;

(bb') gốc axit amin ở vị trí 163 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là S, T, N, Q, D, K, H, V, L, I hoặc F;

(bc') gốc axit amin ở vị trí 166 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G, V, L, I, W hoặc F;

(bd') gốc axit amin ở vị trí 167 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là V;

(be') gốc axit amin ở vị trí 170 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là V hoặc L;

(bf') gốc axit amin ở vị trí 171 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G, T, E hoặc A;

(bg') gốc axit amin ở vị trí 187 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là S;

(bh') gốc axit amin ở vị trí 191 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là V, L, I, W hoặc F;

(bi') gốc axit amin ở vị trí 193 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là S, T, C, Q, Y, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;

(bj') gốc axit amin ở vị trí 194 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là Y, R hoặc K;

(bk') gốc axit amin ở vị trí 195 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G, S, T, C, N, Q, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;

(bl') gốc axit amin ở vị trí 200 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là W;

(bm') gốc axit amin ở vị trí 204 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là S, T, C, N, D, E, R, K, H, V, L, I, M, W hoặc P;

(bn') gốc axit amin ở vị trí 205 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là S, T, C, N, Q, Y, E, K, H, A, V, L, I, M hoặc W;

(bo') gốc axit amin ở vị trí 212 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là N, Q, R, V, L hoặc W;

(bp') gốc axit amin ở vị trí 226 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là Y;

(bq') gốc axit amin ở vị trí 233 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là L, I hoặc W;

(br') gốc axit amin ở vị trí 237 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là N;

(bs') gốc axit amin ở vị trí 238 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là L;

(bt') gốc axit amin ở vị trí 243 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là Y, L hoặc I;

(bu') gốc axit amin ở vị trí 245 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là N;

(bv') gốc axit amin ở vị trí 246 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là Y, V, L, W hoặc F;

(bw') gốc axit amin ở vị trí 247 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là S, T, C, N, Q, E, H, A,

V, L, I, M, W hoặc F;

(bx') gốc axit amin ở vị trí 248 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là F;

(by') gốc axit amin ở vị trí 250 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là F;

(bz') gốc axit amin ở vị trí 251 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G, T, N, Q, D, A, V, L

hoặc I;

(ca') gốc axit amin ở vị trí 256 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là S, T, C, Q, Y, D, E, R,

K, H, A, V, L, I, W, F hoặc P;

(cb') gốc axit amin ở vị trí 257 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là V hoặc I;

(cc') gốc axit amin ở vị trí 264 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G, S, T, C, Q, D, E, A, V, L, I hoặc M;

(cd') gốc axit amin ở vị trí 273 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G, T hoặc I;

(ce') gốc axit amin ở vị trí 275 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là L, W hoặc F;

(cf') gốc axit amin ở vị trí 277 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là V, L, I hoặc F;

(cg') gốc axit amin ở vị trí 281 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là R;

(ch') gốc axit amin ở vị trí 296 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là V;

(ci') gốc axit amin ở vị trí 297 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là L, W hoặc F;

(cj') gốc axit amin ở vị trí 304 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là S;

(ck') gốc axit amin ở vị trí 313 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là N;

(cl') gốc axit amin ở vị trí 319 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là S, T, C, N, Q, Y, D, E, R, K, H, V, L, I, M, W, F hoặc P;

(cm') gốc axit amin ở vị trí 320 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G, T, V, L, I hoặc F;

(cn') gốc axit amin ở vị trí 326 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là W;

(co') gốc axit amin ở vị trí 330 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là M, W hoặc F;

(cp') gốc axit amin ở vị trí 332 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G, T hoặc V;

(cq') gốc axit amin ở vị trí 334 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là L;

(cr') gốc axit amin ở vị trí 335 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là F;

(cs') gốc axit amin ở vị trí 337 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G, S, T, C, Q, R, K, H, A hoặc V;

(ct') gốc axit amin ở vị trí 342 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là S, T, C, Q, Y, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;

(cu') gốc axit amin ở vị trí 343 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là T;

(cv') gốc axit amin ở vị trí 346 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là R;

(cw') gốc axit amin ở vị trí 357 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là L;

(cx') gốc axit amin ở vị trí 359 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G, S, Q, V, L, I hoặc F;

(cy') gốc axit amin ở vị trí 361 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là V, I hoặc W;

(cz') gốc axit amin ở vị trí 369 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là N;

(da') gốc axit amin ở vị trí 376 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là W;

(db') gốc axit amin ở vị trí 378 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là L hoặc W;

(dc') gốc axit amin ở vị trí 379 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là D, E, R hoặc K;

(dd') gốc axit amin ở vị trí 380 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là F;

(de') gốc axit amin ở vị trí 385 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là Y, M hoặc P;

(df') gốc axit amin ở vị trí 386 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ

ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là A, L, I hoặc M;

(dg') gốc axit amin ở vị trí 387 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G, Q, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W hoặc F;

(dh') gốc axit amin ở vị trí 390 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G, S, T, Y hoặc F;

(di') gốc axit amin ở vị trí 393 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là Q;

(dj') gốc axit amin ở vị trí 396 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G;

(dk') gốc axit amin ở vị trí 403 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là T hoặc K;

(dl') gốc axit amin ở vị trí 405 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là D, V, L, I, W, F hoặc P;

(dm') gốc axit amin ở vị trí 406 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là V, W hoặc F;

(dn') gốc axit amin ở vị trí 407 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là G hoặc C;

(do') gốc axit amin ở vị trí 408 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là N, Y, I hoặc W;

(dp') gốc axit amin ở vị trí 409 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là Y hoặc W;

(dq') gốc axit amin ở vị trí 411 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là A, V, L hoặc P;

(dr') gốc axit amin ở vị trí 427 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là R hoặc V; và

(ds') gốc axit amin ở vị trí 433 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này, mà là L.

3. Thẻ đột biến proteaza kiểm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó proteaza kiểm gốc bao gồm trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự axit amin có tính đồng nhất là ít nhất 95% trình tự này có các đặc tính enzym 1) đến 4) dưới đây:

1) proteaza kiểm hoạt động trong điều kiện kiểm, và thể hiện hoạt tính còn lại là 50% hoặc nhiều hơn sau khi proteaza kiểm đã được lấy đi trong 50mM dung dịch hydro peroxit chứa 5mM canxi clorua và có độ pH là 10 ở 20°C trong 20 phút;

2) proteaza kiểm thể hiện hoạt tính còn lại là 80% hoặc nhiều hơn khi proteaza kiểm đã được xử lý ở 50°C ở độ pH là 10 trong 10 phút;

3) proteaza kiểm được ức chế bằng diisopropyl flophosphat (DFP) và phenylmetansulfonyl florit; và

4) proteaza kiểm có trọng lượng phân tử là 43000 ± 2000 theo SDS-PAGE.

4. Polynucleotit mã hóa thẻ đột biến proteaza kiểm theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 3.

5. Vật truyền bao gồm polynucleotit theo điểm 4.

6. Thẻ biến nạp bao gồm polynucleotit theo điểm 4 hoặc vật truyền theo điểm 5.

7. Phương pháp sản xuất sự đột biến proteaza kiểm bao gồm sử dụng thẻ biến nạp theo điểm 6.

8. Chế phẩm tẩy sạch bao gồm thể đột biến proteaza kiềm theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 3.

9. Phương pháp sản xuất thể đột biến proteaza kiềm bao gồm việc thay thế gốc axit amin ở vị trí tương ứng với vị trí 294 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 với threonin, trong trình tự axit amin của proteaza kiềm gốc bao gồm trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2, hoặc trình tự axit amin có tính đồng nhất là ít nhất 95% trình tự này, trong đó thể đột biến proteaza kiềm có độ bền cải thiện cho chất tạo chelat và có thể giữ lại hoạt tính proteaza kiềm cao hơn trong chất tạo chelat, khi so sánh với proteaza kiềm gốc bao gồm trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự axit amin có tính đồng nhất là ít nhất 95% trình tự này.

10. Phương pháp cải thiện độ bền của proteaza kiềm cho chất tạo chelat bao gồm việc thay thế gốc axit amin ở vị trí tương ứng với vị trí 294 của trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 với threonin, trong trình tự axit amin của proteaza kiềm gốc bao gồm trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2, hoặc trình tự axit amin có tính đồng nhất là ít nhất 95% trình tự này.

11. Phương pháp theo điểm 9 hoặc 10, trong đó trình tự axit amin có tính đồng nhất là ít nhất 95% so với trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 là trình tự axit amin có một hoặc nhiều đột biến được chọn từ nhóm bao gồm các đột biến (a) đến (ds) dưới đây:

(a) sự thay thế của G ở vị trí 6 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, Q, Y, R, K, H, A, V, L, I, M, W hoặc F;

(b) sự thay thế của K ở vị trí 9 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với Q;

- (c) sự thay thế của D ở vị trí 11 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, S hoặc N;
- (d) sự thay thế của S ở vị trí 15 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với H, C, Q, D, E, R, A, V, M, W hoặc F;
- (e) sự thay thế của S ở vị trí 16 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với T, Q, V, C, Y, D, E, R, K, H, L, I, M, W hoặc F;
- (f) sự thay thế của Y ở vị trí 20 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với F hoặc A;
- (g) sự thay thế của Q ở vị trí 22 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với W;
- (h) sự thay thế của G ở vị trí 23 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với N;
- (i) sự thay thế của R ở vị trí 37 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với T;
- (j) sự thay thế của S ở vị trí 40 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với V, L, I, W hoặc F;
- (k) sự thay thế của S ở vị trí 41 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với I;
- (l) sự thay thế của F ở vị trí 46 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, N, Q, Y, E, K, H, A, V, L, I, M hoặc W;
- (m) sự thay thế của K ở vị trí 49 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với Q;
- (n) sự thay thế của A ở vị trí 52 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G hoặc S;
- (o) sự thay thế của L ở vị trí 53 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với A, V hoặc I;
- (p) sự thay thế của Y ở vị trí 54 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, S, T, C, N, Q, D, E, R, H, A, V, M, W, F hoặc P;

- (q) sự thay thế của L ở vị trí 56 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với V;
- (r) sự thay thế của G ở vị trí 57 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, Q, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;
- (s) sự thay thế của T ở vị trí 59 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với V, L, I, M, W hoặc F;
- (t) sự thay thế của N ở vị trí 60 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với V, L, I, W hoặc F;
- (u) sự thay thế của N ở vị trí 63 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, D hoặc L;
- (v) sự thay thế của T ở vị trí 65 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với W hoặc P;
- (w) sự thay thế của N ở vị trí 66 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, S, T, C, Q, D, E, H, A, V, L, I, M hoặc W;
- (x) sự thay thế của G ở vị trí 80 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với H hoặc A;
- (y) sự thay thế của S ở vị trí 81 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với Q, Y, L, I, W hoặc F;
- (z) sự thay thế của T ở vị trí 82 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, S, C, Q, D, E, R, K, H, A hoặc M;
- (aa) sự thay thế của N ở vị trí 83 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, C hoặc A;
- (ab) sự thay thế của K ở vị trí 84 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với R;
- (ac) sự thay thế của Q ở vị trí 89 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với H;

- (ad) sự thay thế của N ở vị trí 91 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với C;
- (ae) sự thay thế của S ở vị trí 100 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với L, I, W hoặc F;
- (af) sự thay thế của G ở vị trí 101 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, N, Q, Y, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;
- (ag) sự thay thế của G ở vị trí 102 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, Q, Y, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;
- (ah) sự thay thế của G ở vị trí 103 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, Q, Y, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;
- (ai) sự thay thế của L ở vị trí 104 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, Q, Y, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;
- (aj) sự thay thế của G ở vị trí 105 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, Q, Y, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;
- (ak) sự thay thế của G ở vị trí 106 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, Q, Y, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;
- (al) sự thay thế của L ở vị trí 107 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, R, K hoặc A;
- (am) sự thay thế của S ở vị trí 109 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với L, I hoặc F;
- (an) sự thay thế của T ở vị trí 113 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với L hoặc W;
- (ao) sự thay thế của Y ở vị trí 119 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, S, T, C, N, Q, D, E, R, K, H, A, V, M, W, F hoặc P;

(ap) sự thay thế của S ở vị trí 120 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với Y, R, I, W hoặc F;

(aq) sự thay thế của R ở vị trí 124 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với K hoặc A;

(ar) sự thay thế của A ở vị trí 132 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, N, Q, D, I hoặc M;

(as) sự thay thế của A ở vị trí 133 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, S, T, C, N, Q, D, E, R, K, H, V, L, I, M, W, F hoặc P;

(at) sự thay thế của V ở vị trí 134 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, S, T hoặc A;

(au) sự chèn của G, S, T, N, Q, Y, R, K, H, A, L, I, M hoặc W vào trong một vị trí giữa vị trí 133 hoặc A vị trí tương ứng của trình tự này và vị trí 134 hoặc A vị trí tương ứng của trình tự này;

(av) sự thay thế của N ở vị trí 135 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với R, A, L hoặc M;

(aw) sự thay thế của G ở vị trí 136 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, Q, Y, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;

(ax) sự thay thế của Y ở vị trí 138 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, S, C, N, Q, D, E, R, K, H, A, V, M, W, F hoặc P;

(ay) sự thay thế của T ở vị trí 140 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với L, W hoặc F;

(az) sự thay thế của Y ở vị trí 148 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, S, T, C, N, Q, D, E, R, K, H, A, M, W, F hoặc P;

- (ba) sự thay thế của K ở vị trí 151 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với F;
- (bb) sự thay thế của E ở vị trí 163 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, N, Q, D, K, H, V, L, I hoặc F;
- (bc) sự thay thế của N ở vị trí 166 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, V, L, I, W hoặc F;
- (bd) sự thay thế của G ở vị trí 167 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với V;
- (be) sự thay thế của I ở vị trí 170 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với V hoặc L;
- (bf) sự thay thế của S ở vị trí 171 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, T, E hoặc A;
- (bg) sự thay thế của N ở vị trí 187 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S;
- (bh) sự thay thế của S ở vị trí 191 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với V, L, I, W hoặc F;
- (bi) sự thay thế của G ở vị trí 193 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, Q, Y, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;
- (bj) sự thay thế của S ở vị trí 194 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với Y, R hoặc K;
- (bk) sự thay thế của Y ở vị trí 195 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, S, T, C, N, Q, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;
- (bl) sự thay thế của N ở vị trí 200 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với W;

(bm) sự thay thế của Q ở vị trí 204 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, N, D, E, R, K, H, V, L, I, M, W hoặc P;

(bn) sự thay thế của F ở vị trí 205 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, N, Q, Y, E, K, H, A, V, L, I, M hoặc W;

(bo) sự thay thế của K ở vị trí 212 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với N, Q, R, V, L hoặc W;

(bp) sự thay thế của F ở vị trí 226 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với Y;

(bq) sự thay thế của S ở vị trí 233 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với L, I hoặc W;

(br) sự thay thế của D ở vị trí 237 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với N;

(bs) sự thay thế của S ở vị trí 238 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với L;

(bt) sự thay thế của N ở vị trí 243 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với Y, L hoặc I;

(bu) sự thay thế của D ở vị trí 245 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với N;

(bv) sự thay thế của S ở vị trí 246 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với Y, V, L, W hoặc F;

(bw) sự thay thế của K ở vị trí 247 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, N, Q, E, H, A, V, L, I, M, W hoặc F;

(bx) sự thay thế của Y ở vị trí 248 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với F;

(by) sự thay thế của Y ở vị trí 250 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với F;

(bz) sự thay thế của M ở vị trí 251 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, T, N, Q, D, A, V, L hoặc I;

- (ca) sự thay thế của M ở vị trí 256 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, Q, Y, D, E, R, K, H, A, V, L, I, W, F hoặc P;
- (cb) sự thay thế của A ở vị trí 257 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với V hoặc I;
- (cc) sự thay thế của N ở vị trí 264 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, S, T, C, Q, D, E, A, V, L, I hoặc M;
- (cd) sự thay thế của V ở vị trí 273 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, T hoặc I;
- (ce) sự thay thế của N ở vị trí 275 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với L, W hoặc F;
- (cf) sự thay thế của G ở vị trí 277 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với V, L, I hoặc F;
- (cg) sự thay thế của K ở vị trí 281 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với R;
- (ch) sự thay thế của I ở vị trí 296 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với V;
- (ci) sự thay thế của G ở vị trí 297 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với L, W hoặc F;
- (cj) sự thay thế của N ở vị trí 304 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S;
- (ck) sự thay thế của D ở vị trí 313 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với N;
- (cl) sự thay thế của A ở vị trí 319 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, N, Q, Y, D, E, R, K, H, V, L, I, M, W, F hoặc P;
- (cm) sự thay thế của Y ở vị trí 320 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, T, V, L, I hoặc F;

(cn) sự thay thế của S ở vị trí 326 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với W;

(co) sự thay thế của S ở vị trí 330 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với M, W hoặc F;

(cp) sự thay thế của K ở vị trí 332 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, T hoặc V;

(cq) sự thay thế của T ở vị trí 334 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với L;

(cr) sự thay thế của Y ở vị trí 335 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với F;

(cs) sự thay thế của F ở vị trí 337 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, S, T, C, Q, R, K, H, A hoặc V;

(ct) sự thay thế của G ở vị trí 342 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với S, T, C, Q, Y, D, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W, F hoặc P;

(cu) sự thay thế của K ở vị trí 343 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với T;

(cv) sự thay thế của K ở vị trí 346 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với R;

(cw) sự thay thế của S ở vị trí 357 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với L;

(cx) sự thay thế của T ở vị trí 359 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, S, Q, V, L, I hoặc F;

(cy) sự thay thế của S ở vị trí 361 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với V, I hoặc W;

(cz) sự thay thế của D ở vị trí 369 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với N;

(da) sự thay thế của N ở vị trí 376 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với W;

- (db) sự thay thế của T ở vị trí 378 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với L hoặc W;
- (dc) sự thay thế của Q ở vị trí 379 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với D, E, R hoặc K;
- (dd) sự thay thế của Y ở vị trí 380 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với F;
- (de) sự thay thế của F ở vị trí 385 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với Y, M hoặc P;
- (df) sự thay thế của T ở vị trí 386 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với A, L, I hoặc M;
- (dg) sự thay thế của S ở vị trí 387 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, Q, E, R, K, H, A, V, L, I, M, W hoặc F;
- (dh) sự thay thế của N ở vị trí 390 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G, S, T, Y hoặc F;
- (di) sự thay thế của W ở vị trí 393 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với Q;
- (dj) sự thay thế của R ở vị trí 396 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G;
- (dk) sự thay thế của F ở vị trí 403 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với T hoặc K;
- (dl) sự thay thế của N ở vị trí 405 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với D, V, L, I, W, F hoặc P;
- (dm) sự thay thế của A ở vị trí 406 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với V, W hoặc F;

(dn) sự thay thế của P ở vị trí 407 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với G hoặc C;

(do) sự thay thế của Q ở vị trí 408 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với N, Y, I hoặc W;

(dp) sự thay thế của S ở vị trí 409 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với Y hoặc W;

(dq) sự thay thế của T ở vị trí 411 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với A, V, L hoặc P;

(dr) sự thay thế của T ở vị trí 427 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với R hoặc V; và

(ds) sự thay thế của V ở vị trí 433 hoặc ở vị trí tương ứng của trình tự này với L.

12. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 9 đến 11, trong đó proteaza kiểm gốc bao gồm trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự axit amin có tính đồng nhất là ít nhất 95% trình tự này có các đặc tính enzym 1) đến 4) dưới đây:

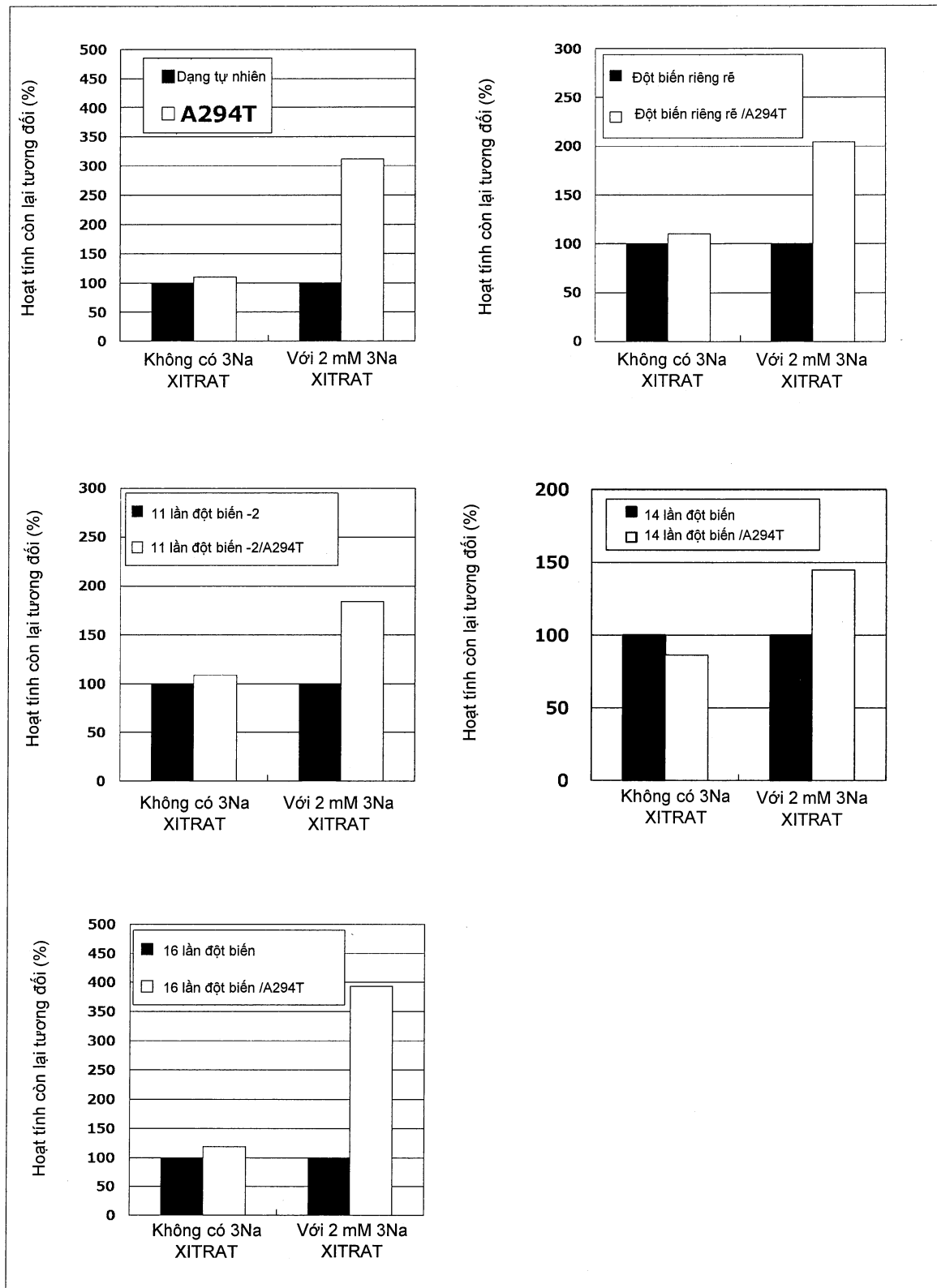
1) proteaza kiểm hoạt động trong điều kiện kiểm, và thể hiện hoạt tính còn lại là 50% hoặc nhiều hơn sau khi proteaza kiểm đã được lấy đi trong 50mM dung dịch hydro peroxit chứa 5mM canxi clorua và có độ pH là 10 ở 20°C trong 20 phút;

2) proteaza kiểm thể hiện hoạt tính còn lại là 80% hoặc nhiều hơn khi proteaza kiểm đã được xử lý ở 50°C ở độ pH là 10 trong 10 phút;

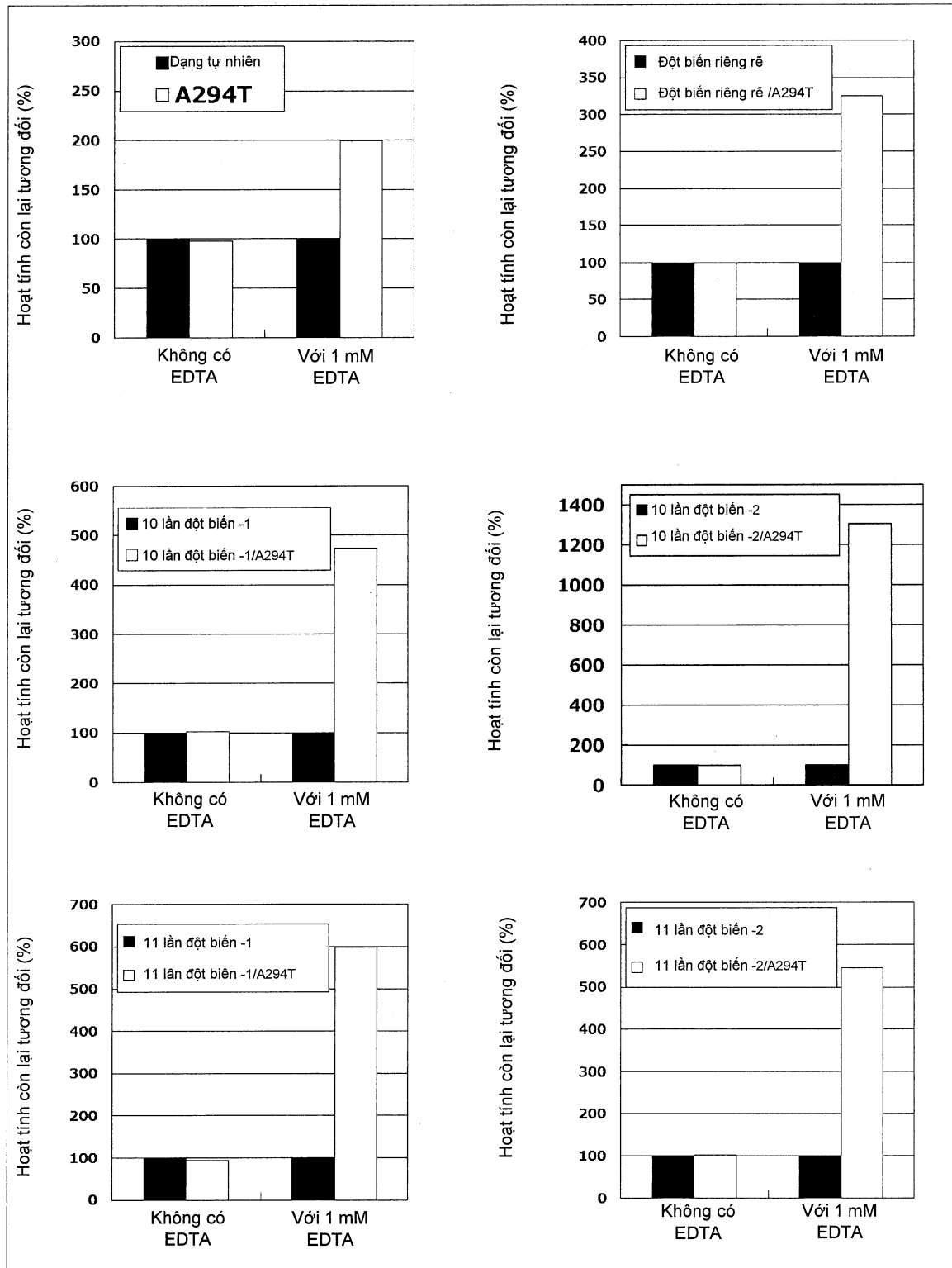
3) proteaza kiểm được ức chế bằng diisopropyl flophosphat (DFP) và phenylmetansulfonyl florit; và

4) proteaza kiem có trọng lượng phân tử là 43.000 ± 2.000 theo SDS-PAGE.

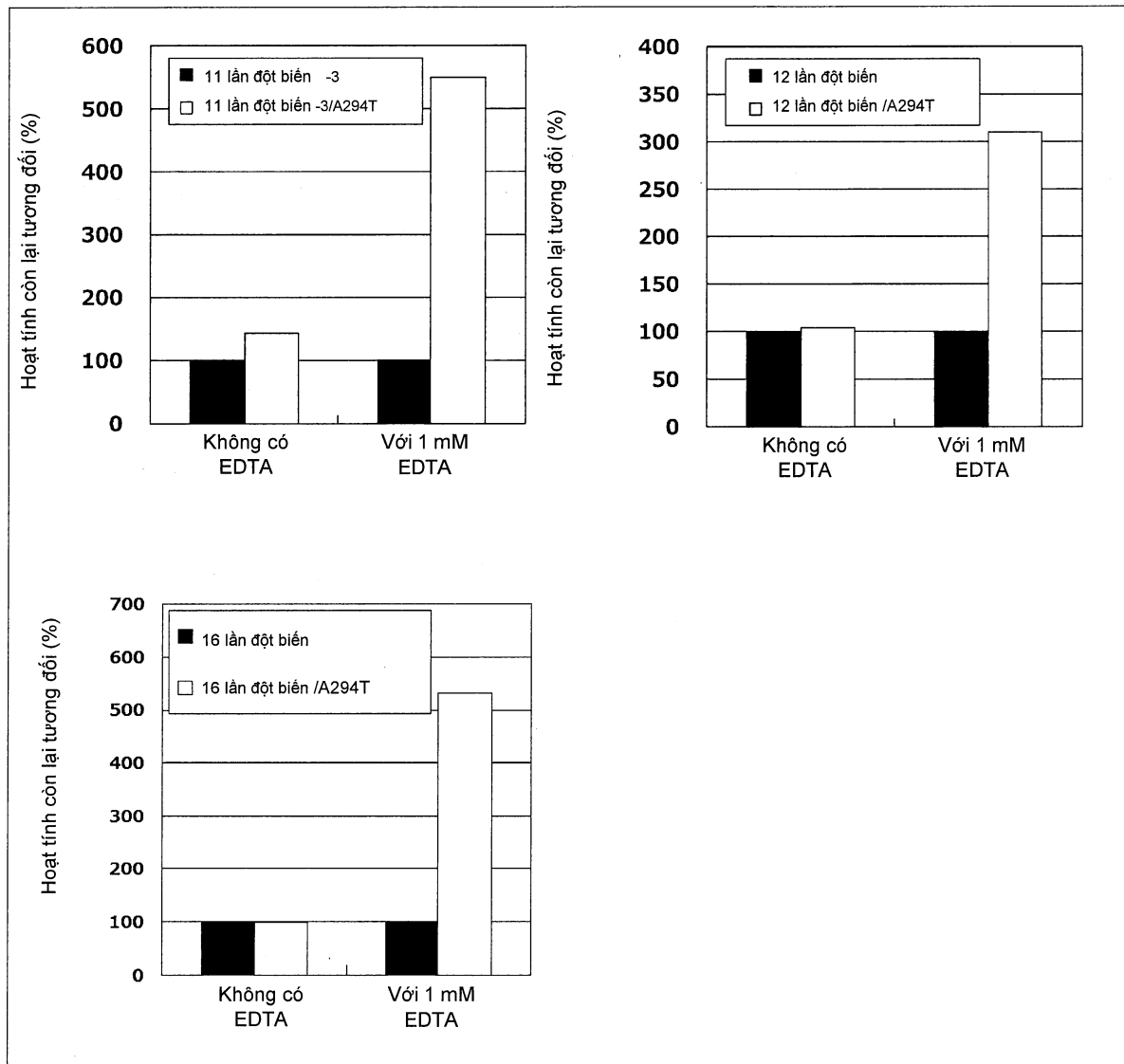
[Fig. 1]



[Fig. 2]



[Fig. 3]



Danh mục trình tự

<110> Kao Corporation

<120> Thẻ đột biến proteaza kiềm, phương pháp sản xuất thẻ đột biến này và chế phẩm bao gồm thẻ đột biến này

<130> KS1491

<150> JP 2016-115734

<151> 2016-06-09

<150> JP 2017-103390

<151> 2017-05-25

<160> 13

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 1302

<212> ADN

<213> Bacillus sp. KSM-KP43

<220>

<223> Dạng tự nhiên

<400> 1

aatgatgttg cgcgtggaat tgtcaaagcg gatgtggctc agagcagcta cgggttgat

60

ggacaaggac agatcgtagc ggttgccgat acagggcctg atacaggtcg caatgacagt	120
tcgatgcatg aagccttccg cgggaaaatt actgcattat atgcattggg acggacgaat	180
aatccaatg atacgaatgg tcatggtacg catgtggctg gctccgtatt aggaaacggc	240
tccactaata aaggaatggc gcctcaggcg aatctagtct tccaatctat catggatagc	300
ggtgggggac ttggaggact accttccaat ctgcaaacct tattcagcca agcatacagt	360
gctggtgcca gaattcatac aaactcctgg ggagcagcag tgaatggggc ttacacaaca	420
gattccagaa atgtggatga ctatgtgcgc aaaaatgata tgacgatcct tttcgtgcc	480
gggaatgaag gaccgaacgg cggaaccatc agtgcaccag gcacagctaa aaatgaata	540
acagtcggag ctacggaaaa cctccgcccc agctttgggt cttatgcgga caatatcaac	600
catgtggcac agttctcttc acgtggaccg acaaaggatg gacggatcaa accggatgtc	660
atggcaccgg gaacgttcat actatcagca agatcttctc ttgcaccgga ttctctcttc	720
tgggcgaacc atgacagtaa atatgcatac atgggtggaa cgtccatggc tacaccgatc	780
gttgctggaa acgtggcaca gcttcgtgag cattttgtga aaaacagagg catcacacca	840
aagccttctc tattaaaagc ggcactgatt gccggtgcag ctgacatcgg ccttggttac	900
ccgaacggta accaaggatg gggacgagtg acattggata aatccctgaa cgttcctat	960

gtgaacgagt ccagttctct atccaccagc caaaaagcga cgtactcgtt tactgctact 1020
 gccggcaagc ctttgaaaat ctccctggta tggctctgatg ccctgcgag cacaactgct 1080
 tccgtaacgc ttgtcaatga tctggacctt gtcattaccg ctccaaatgg cacacagtat 1140
 gtaggaaatg actttacttc gccatacaat gataactggg atggccgcaa taacgtagaa 1200
 aatgtattta ttaatgcacc acaaagcggg acgtatacaa ttgaggtaca ggcttataac 1260
 gtaccggttg gaccacagac ctctcgttg gcaattgtga at 1302

<210> 2

<211> 434

<212> PRT

<213> Bacillus sp. KSM-KP43

<220>

<223> Dạng tự nhiên

<400> 2

Asn Asp Val Ala Arg Gly Ile Val Lys Ala Asp Val Ala Gln Ser Ser

1

5

10

15

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

20

25

30

Leu Asp Thr Gly Arg Asn Asp Ser Ser Met His Glu Ala Phe Arg Gly

35

40

45

Lys Ile Thr Ala Leu Tyr Ala Leu Gly Arg Thr Asn Asn Ala Asn Asp

50

55

60

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

65

70

75

80

Ser Thr Asn Lys Gly Met Ala Pro Gln Ala Asn Leu Val Phe Gln Ser

85

90

95

Ile Met Asp Ser Gly Gly Gly Leu Gly Gly Leu Pro Ser Asn Leu Gln

100

105

110

Thr Leu Phe Ser Gln Ala Tyr Ser Ala Gly Ala Arg Ile His Thr Asn

115

120

125

Ser Trp Gly Ala Ala Val Asn Gly Ala Tyr Thr Thr Asp Ser Arg Asn

130

135

140

Val Asp Asp Tyr Val Arg Lys Asn Asp Met Thr Ile Leu Phe Ala Ala

145

150

155

160

Gly Asn Glu Gly Pro Asn Gly Gly Thr Ile Ser Ala Pro Gly Thr Ala

165

170

175

Lys Asn Ala Ile Thr Val Gly Ala Thr Glu Asn Leu Arg Pro Ser Phe

180

185

190

Gly Ser Tyr Ala Asp Asn Ile Asn His Val Ala Gln Phe Ser Ser Arg

195

200

205

Gly Pro Thr Lys Asp Gly Arg Ile Lys Pro Asp Val Met Ala Pro Gly

210

215

220

Thr Phe Ile Leu Ser Ala Arg Ser Ser Leu Ala Pro Asp Ser Ser Phe

225

230

235

240

Trp Ala Asn His Asp Ser Lys Tyr Ala Tyr Met Gly Gly Thr Ser Met

245

250

255

Ala Thr Pro Ile Val Ala Gly Asn Val Ala Gln Leu Arg Glu His Phe

260

265

270

Val Lys Asn Arg Gly Ile Thr Pro Lys Pro Ser Leu Leu Lys Ala Ala

275

280

285

Leu Ile Ala Gly Ala Ala Asp Ile Gly Leu Gly Tyr Pro Asn Gly Asn

290

295

300

Gln Gly Trp Gly Arg Val Thr Leu Asp Lys Ser Leu Asn Val Ala Tyr

305

310

315

320

Val Asn Glu Ser Ser Ser Leu Ser Thr Ser Gln Lys Ala Thr Tyr Ser

325

330

335

Phe Thr Ala Thr Ala Gly Lys Pro Leu Lys Ile Ser Leu Val Trp Ser

340

345

350

Asp Ala Pro Ala Ser Thr Thr Ala Ser Val Thr Leu Val Asn Asp Leu

355

360

365

Asp Leu Val Ile Thr Ala Pro Asn Gly Thr Gln Tyr Val Gly Asn Asp

370

375

380

Phe Thr Ser Pro Tyr Asn Asp Asn Trp Asp Gly Arg Asn Asn Val Glu

385

390

395

400

Asn Val Phe Ile Asn Ala Pro Gln Ser Gly Thr Tyr Thr Ile Glu Val

405

410

415

Gln Ala Tyr Asn Val Pro Val Gly Pro Gln Thr Phe Ser Leu Ala Ile

420

425

430

Val Asn

<210> 3

<211> 434

<212> PRT

<213> Bacillus sp. KSM-KP43

<220>

<223> Valiant

<400> 3

Asn Asp Val Ala Arg Gly Ile Val Lys Ala Asp Val Ala Gln Ser Ser

1

5

10

15

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

20

25

30

Leu Asp Thr Gly Arg Asn Asp Ser Ser Met His Glu Ala Phe Arg Gly

35

40

45

Lys Ile Thr Ala Leu Tyr Ala Leu Gly Arg Thr Asn Asn Ala Asn Asp

50

55

60

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

65

70

75

80

Ser Thr Asn Lys Gly Met Ala Pro Gln Ala Asn Leu Val Phe Gln Ser

85

90

95

Ile Met Asp Ser Gly Gly Gly Leu Gly Gly Leu Pro Ser Asn Leu Gln

100

105

110

Thr Leu Phe Ser Gln Ala Tyr Ser Ala Gly Ala Arg Ile His Thr Asn

115

120

125

Ser Trp Gly Thr Ala Val Asn Gly Ala Tyr Thr Thr Asp Ser Arg Asn

130

135

140

Val Asp Asp Tyr Val Arg Lys Asn Asp Met Thr Ile Leu Phe Ala Ala

145

150

155

160

Gly Asn Glu Gly Pro Asn Gly Gly Thr Ile Ser Ala Pro Gly Thr Ala

165

170

175

Lys Asn Ala Ile Thr Val Gly Ala Thr Glu Asn Leu Arg Pro Ser Phe

180

185

190

Gly Ser Tyr Ala Asp Asn Ile Asn His Val Ala Gln Phe Ser Ser Arg

195

200

205

Gly Pro Thr Lys Asp Gly Arg Ile Lys Pro Asp Val Met Ala Pro Gly

210

215

220

Thr Phe Ile Leu Ser Ala Arg Ser Ser Leu Ala Pro Asp Ser Ser Phe

225

230

235

240

Trp Ala Asn His Asp Ser Lys Tyr Ala Tyr Met Gly Gly Thr Ser Met

245

250

255

Ala Thr Pro Ile Val Ala Gly Asn Val Ala Gln Leu Arg Glu His Phe

260

265

270

Val Lys Asn Arg Gly Ile Thr Pro Lys Pro Ser Leu Leu Lys Ala Ala

275

280

285

Leu Ile Ala Gly Ala Ala Asp Ile Gly Leu Gly Tyr Pro Asn Gly Asn

290

295

300

Gln Gly Trp Gly Arg Val Thr Leu Asp Lys Ser Leu Asn Val Ala Tyr

305

310

315

320

Val Asn Glu Ser Ser Ser Leu Ser Thr Ser Gln Lys Ala Thr Tyr Ser

325

330

335

Phe Thr Ala Thr Ala Gly Lys Pro Leu Lys Ile Ser Leu Val Trp Ser

340

345

350

Asp Ala Pro Ala Ser Thr Thr Ala Ser Val Thr Leu Val Asn Asp Leu

355

360

365

Asp Leu Val Ile Thr Ala Pro Asn Gly Thr Gln Tyr Val Gly Asn Asp

370

375

380

Phe Thr Ser Pro Tyr Asn Asp Asn Trp Asp Gly Arg Asn Asn Val Glu

385

390

395

400

Asn Val Phe Ile Asn Ala Pro Gln Ser Gly Thr Tyr Thr Ile Glu Val

405

410

415

Gln Ala Tyr Asn Val Pro Val Gly Pro Gln Thr Phe Ser Leu Ala Ile

420

425

430

Val Asn

<210> 4

<211> 434

<212> PRT

<213> Bacillus sp. KSM-KP43

<220>

<223> Valiant

<400> 4

Asn Asp Val Ala Arg Gly Ile Val Lys Ala Asp Val Ala Gln Ser Val

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Asp Thr Gly Arg Asn Asp Ser Ser Met His Glu Ala Phe Arg Gly

35 40 45

Lys Ile Thr Ala Leu Tyr Ala Leu Gly Arg Thr Asn Asn Ala Asn Asp

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Thr Ala Lys Gly Met Ala Pro Gln Ala Asn Leu Val Phe Gln Ser

85 90 95

Ile Met Asp Ser Gly Gly Gly Leu Gly Gly Leu Pro Ser Asn Leu Gln

100 105 110

Thr Leu Phe Ser Gln Ala Tyr Ser Ala Gly Ala Arg Ile His Thr Asn

115 120 125

Ser Trp Gly Ala Ala Val Asn Gly Ala Tyr Thr Thr Asp Ser Arg Asn

130 135 140

Val Asp Asp Tyr Val Arg Lys Asn Asp Met Thr Ile Leu Phe Ala Ala

145 150 155 160

Gly Asn Glu Gly Pro Gly Val Gly Thr Ile Ser Ala Pro Gly Thr Ala

165 170 175

Lys Asn Ala Ile Thr Val Gly Ala Thr Glu Asn Leu Arg Pro Ser Phe

180 185 190

Gly Ser Gln Ala Asp Asn Ile Asn His Val Ala Gln Phe Ser Ser Arg

195 200 205

Gly Pro Thr Lys Asp Gly Arg Ile Lys Pro Asp Val Met Ala Pro Gly

210 215 220

Thr Phe Ile Leu Ser Ala Arg Ser Ser Leu Ala Pro Asp Ser Ser Phe

225 230 235 240

Trp Ala Asn His Asp Ser Lys Tyr Ala Tyr Met Gly Gly Thr Ser Met

245 250 255

Ala Thr Pro Ile Val Ala Gly Asn Val Ala Gln Leu Arg Glu His Phe

260 265 270

Ile Lys Asn Arg Gly Ile Thr Pro Lys Pro Ser Leu Leu Lys Ala Ala

275 280 285

Leu Ile Ala Gly Ala Ala Asp Ile Gly Leu Gly Tyr Pro Asn Gly Asn

290 295 300

Gln Gly Trp Gly Arg Val Thr Leu Asp Lys Ser Leu Asn Val Ala Tyr

305

310

315

320

Val Asn Glu Ser Ser Ser Leu Ser Thr Ser Gln Lys Ala Thr Tyr Ser

325

330

335

Phe Thr Ala Thr Ala Gly Lys Pro Leu Lys Ile Ser Leu Val Trp Ser

340

345

350

Asp Ala Pro Ala Ser Thr Ser Ala Ser Val Thr Leu Val Asn Asp Leu

355

360

365

Asn Leu Val Ile Thr Ala Pro Asn Gly Thr Gln Tyr Val Gly Asn Asp

370

375

380

Phe Thr Ala Pro Tyr Asn Asp Asn Trp Asp Gly Arg Asn Asn Val Glu

385

390

395

400

Asn Val Phe Ile Asn Ala Pro Gln Ser Gly Thr Tyr Thr Ile Glu Val

405

410

415

Gln Ala Tyr Asn Val Pro Val Gly Pro Gln Thr Phe Ser Leu Ala Ile

420

425

430

Val Asn

<210> 5

<211> 434

<212> PRT

<213> Bacillus sp. KSM-KP43

<220>

<223> Valiant

<400> 5

Asn Asp Val Ala Arg Gly Ile Val Lys Ala Asp Val Ala Gln Ser Val

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Asp Thr Gly Arg Asn Asp Ser Ser Met His Glu Ala Phe Arg Gly

35 40 45

Lys Ile Thr Ala Leu Tyr Ala Leu Gly Arg Thr Asn Asn Ala Asn Asp

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Thr Ala Lys Gly Met Ala Pro Gln Ala Asn Leu Val Phe Gln Ser

85 90 95

Ile Met Asp Ser Gly Gly Gly Leu Gly Gly Leu Pro Ser Asn Leu Gln

100 105 110

Thr Leu Phe Ser Gln Ala Tyr Ser Ala Gly Ala Arg Ile His Thr Asn

115 120 125

Ser Trp Gly Thr Ala Val Asn Gly Ala Tyr Thr Thr Asp Ser Arg Asn

130

135

140

Val Asp Asp Tyr Val Arg Lys Asn Asp Met Thr Ile Leu Phe Ala Ala

145

150

155

160

Gly Asn Glu Gly Pro Gly Val Gly Thr Ile Ser Ala Pro Gly Thr Ala

165

170

175

Lys Asn Ala Ile Thr Val Gly Ala Thr Glu Asn Leu Arg Pro Ser Phe

180

185

190

Gly Ser Gln Ala Asp Asn Ile Asn His Val Ala Gln Phe Ser Ser Arg

195

200

205

Gly Pro Thr Lys Asp Gly Arg Ile Lys Pro Asp Val Met Ala Pro Gly

210

215

220

Thr Phe Ile Leu Ser Ala Arg Ser Ser Leu Ala Pro Asp Ser Ser Phe

225

230

235

240

Trp Ala Asn His Asp Ser Lys Tyr Ala Tyr Met Gly Gly Thr Ser Met

245

250

255

Ala Thr Pro Ile Val Ala Gly Asn Val Ala Gln Leu Arg Glu His Phe

260

265

270

Ile Lys Asn Arg Gly Ile Thr Pro Lys Pro Ser Leu Leu Lys Ala Ala

275

280

285

Leu Ile Ala Gly Ala Ala Asp Ile Gly Leu Gly Tyr Pro Asn Gly Asn

290

295

300

Gln Gly Trp Gly Arg Val Thr Leu Asp Lys Ser Leu Asn Val Ala Tyr

305

310

315

320

Val Asn Glu Ser Ser Ser Leu Ser Thr Ser Gln Lys Ala Thr Tyr Ser

325

330

335

Phe Thr Ala Thr Ala Gly Lys Pro Leu Lys Ile Ser Leu Val Trp Ser

340

345

350

Asp Ala Pro Ala Ser Thr Ser Ala Ser Val Thr Leu Val Asn Asp Leu

355

360

365

Asn Leu Val Ile Thr Ala Pro Asn Gly Thr Gln Tyr Val Gly Asn Asp

370

375

380

Phe Thr Ala Pro Tyr Asn Asp Asn Trp Asp Gly Arg Asn Asn Val Glu

385

390

395

400

Asn Val Phe Ile Asn Ala Pro Gln Ser Gly Thr Tyr Thr Ile Glu Val

405

410

415

Gln Ala Tyr Asn Val Pro Val Gly Pro Gln Thr Phe Ser Leu Ala Ile

420

425

430

Val Asn

<210> 6

<211> 435

<212> PRT

<213> Bacillus sp. KSM-KP43

<220>

<223> Valiant

<400> 6

Asn Asp Val Ala Arg Gly Ile Val Lys Ala Asp Val Ala Gln Ser Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Asp Thr Gly Arg Asn Asp Ser Ser Met His Glu Ala Phe Arg Gly

35 40 45

Lys Ile Thr Ala Leu Tyr Ala Leu Gly Arg Thr Asn Asn Ala Asn Asp

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Thr Asn Lys Gly Met Ala Pro Gln Ala Asn Leu Val Phe Gln Ser

85 90 95

Ile Met Asp Ser Gly Gly Gly Leu Gly Gly Leu Pro Ser Asn Leu Gln

100

105

110

Thr Leu Phe Ser Gln Ala Tyr Ser Ala Gly Ala Arg Ile His Thr Asn

115

120

125

Ser Trp Gly Ala Ser Ser Thr Asn Gly Ala Tyr Thr Thr Asp Ser Arg

130

135

140

Asn Val Asp Asp Tyr Val Arg Lys Asn Asp Met Thr Ile Leu Phe Ala

145

150

155

160

Ala Gly Asn Glu Gly Pro Gly Val Gly Thr Ile Ser Ala Pro Gly Thr

165

170

175

Ala Lys Asn Ala Ile Thr Val Gly Ala Thr Glu Asn Leu Arg Pro Ser

180

185

190

Phe Gly Ser Gln Ala Asp Asn Ile Asn His Val Ala Gln Phe Ser Ser

195

200

205

Arg Gly Pro Thr Lys Asp Gly Arg Ile Lys Pro Asp Val Met Ala Pro

210

215

220

Gly Thr Phe Ile Leu Ser Ala Arg Ser Ser Leu Ala Pro Asp Ser Ser

225

230

235

240

Phe Trp Ala Asn His Asp Ser Lys Tyr Ala Tyr Met Gly Gly Thr Ser

245

250

255

Met Ala Thr Pro Ile Val Ala Gly Asn Val Ala Gln Leu Arg Glu His

260

265

270

Phe Ile Lys Asn Arg Gly Ile Thr Pro Lys Pro Ser Leu Leu Lys Ala

275

280

285

Ala Leu Ile Ala Gly Ala Ala Asp Ile Gly Leu Gly Tyr Pro Asn Gly

290

295

300

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

305

310

315

320

Tyr Val Asn Glu Ser Ser Ser Leu Ser Thr Ser Gln Lys Ala Thr Tyr

325

330

335

Ser Phe Thr Ala Thr Ala Gly Lys Pro Leu Lys Ile Ser Leu Val Trp

340

345

350

Ser Asp Ala Pro Ala Ser Thr Ser Ala Ser Val Thr Leu Val Asn Asp

355

360

365

Leu Asn Leu Val Ile Thr Ala Pro Asn Gly Thr Gln Tyr Val Gly Asn

370

375

380

Asp Phe Thr Ala Pro Tyr Asn Asp Asn Trp Asp Gly Arg Asn Asn Val

385

390

395

400

Glu Asn Val Phe Ile Asn Ala Pro Gln Ser Gly Thr Tyr Thr Ile Glu

405

410

415

Val Gln Ala Tyr Asn Val Pro Val Gly Pro Gln Thr Phe Ser Leu Ala

420

425

430

Ile Val Asn

435

<210> 7

<211> 435

<212> PRT

<213> Bacillus sp. KSM-KP43

<220>

<223> Valiant

<400> 7

Asn Asp Val Ala Arg Gly Ile Val Lys Ala Asp Val Ala Gln Ser Ser

1

5

10

15

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

20

25

30

Leu Asp Thr Gly Arg Asn Asp Ile Ser Met His Glu Ala Phe Arg Gly

35

40

45

Lys Ile Thr Ala Leu Tyr Ala Leu Gly Arg Val Asn Asn Ala Asn Asp

50

55

60

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

65 70 75 80

Leu Thr Asn Lys Gly Met Ala Pro Gln Ala Asn Leu Val Phe Gln Ser

85 90 95

Ile Met Asp Ser Gly Gly Gly Leu Gly Gly Leu Pro Ser Asn Leu Gln

100 105 110

Thr Leu Phe Ser Gln Ala Tyr Ser Ala Gly Ala Arg Ile His Thr Asn

115 120 125

Ser Trp Gly Ala Ser Ser Thr Asn Gly Ala Tyr Thr Thr Asp Ser Arg

130 135 140

Asn Val Asp Asp Tyr Val Arg Lys Asn Asp Met Thr Ile Leu Phe Ala

145 150 155 160

Ala Gly Asn Glu Gly Pro Gly Val Gly Thr Ile Ser Ala Pro Gly Thr

165 170 175

Ala Lys Asn Ala Ile Thr Val Gly Ala Thr Glu Asn Leu Arg Pro Leu

180 185 190

Phe Gly Ser Gln Ala Asp Asn Ile Asn His Val Ala Gln Phe Ser Ser

195 200 205

Arg Gly Pro Thr Lys Asp Gly Arg Ile Lys Pro Asp Val Met Ala Pro

210 215 220

Gly Thr Phe Ile Leu Ser Ala Arg Ser Ser Leu Ala Pro Asp Ser Ser

225 230 235 240

Phe Trp Ala Asn His Asp Ser Lys Tyr Ala Tyr Met Gly Gly Thr Ser

245 250 255

Met Ala Thr Pro Ile Val Ala Gly Asn Val Ala Gln Leu Arg Glu His

260 265 270

Phe Ile Lys Asn Arg Gly Ile Thr Pro Lys Pro Ser Leu Leu Lys Ala

275 280 285

Ala Leu Ile Ala Gly Ala Ala Asp Ile Gly Leu Gly Tyr Pro Asn Gly

290 295 300

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

305 310 315 320

Tyr Val Asn Glu Ser Ser Ser Leu Ser Thr Ser Gln Lys Ala Thr Tyr

325 330 335

Ser Phe Thr Ala Thr Ala Gly Lys Pro Leu Lys Ile Ser Leu Val Trp

340 345 350

Ser Asp Ala Pro Ala Ser Thr Ser Ala Ser Val Thr Leu Val Asn Asp

355 360 365

Leu Asn Leu Val Ile Thr Ala Pro Asn Gly Thr Gln Tyr Val Gly Asn

370 375 380

Asp Phe Thr Ala Pro Tyr Asn Asp Asn Trp Asp Gly Arg Asn Asn Val

385 390 395 400

Glu Asn Val Phe Ile Leu Ala Pro Gln Ser Gly Thr Tyr Thr Ile Glu

405 410 415

Val Gln Ala Tyr Asn Val Pro Val Gly Pro Gln Thr Phe Ser Leu Ala

420 425 430

Ile Val Asn

435

<210> 8

<211> 434

<212> PRT

<213> Bacillus sp. KSM-KP43

<220>

<223> Valiant

<400> 8

Asn Asp Val Ala Arg Gly Ile Val Lys Ala Asp Val Ala Gln Ser Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Asp Thr Gly Arg Asn Asp Ser Ser Met His Glu Ala Phe Arg Gly

35 40 45

Lys Ile Thr Ala Leu Tyr Ala Leu Gly Arg Thr Asn Asn Ala Asn Asp

50

55

60

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

65

70

75

80

Ser Thr Ala Lys Gly Met Ala Pro Gln Ala Asn Leu Val Phe Gln Ser

85

90

95

Ile Met Asp Ser Gly Gly Gly Leu Gly Gly Leu Pro Ser Asn Leu Gln

100

105

110

Thr Leu Phe Ser Gln Ala Tyr Ser Ala Gly Ala Arg Ile His Thr Asn

115

120

125

Ser Trp Gly Thr Ala Val Asn Gly Ala Tyr Thr Thr Asp Ser Arg Asn

130

135

140

Val Asp Asp Tyr Val Arg Lys Asn Asp Met Thr Ile Leu Phe Ala Ala

145

150

155

160

Gly Asn Glu Gly Pro Gly Val Gly Thr Ile Ser Ala Pro Gly Thr Ala

165

170

175

Lys Asn Ala Ile Thr Val Gly Ala Thr Glu Asn Leu Arg Pro Ser Phe

180

185

190

Gly Ser Arg Ala Asp Asn Ile Asn His Val Ala Gln Phe Ser Ser Arg

195

200

205

Gly Pro Thr Lys Asp Gly Arg Ile Lys Pro Asp Val Met Ala Pro Gly

210

215

220

Thr Phe Ile Leu Ser Ala Arg Ser Ser Leu Ala Pro Asp Ser Ser Phe

225

230

235

240

Trp Ala Asn His Asp Ser Lys Tyr Ala Tyr Met Gly Gly Thr Ser Met

245

250

255

Ala Thr Pro Ile Val Ala Gly Asn Val Ala Gln Leu Arg Glu His Phe

260

265

270

Ile Lys Asn Arg Gly Ile Thr Pro Lys Pro Ser Leu Leu Lys Ala Ala

275

280

285

Leu Ile Ala Gly Ala Ala Asp Ile Gly Leu Gly Tyr Pro Asn Gly Asn

290

295

300

Gln Gly Trp Gly Arg Val Thr Leu Asp Lys Ser Leu Asn Val Ala Tyr

305

310

315

320

Val Asn Glu Ser Ser Ser Leu Ser Thr Ser Gln Lys Ala Thr Tyr Ser

325

330

335

Phe Thr Ala Thr Ala Gly Lys Pro Leu Lys Ile Ser Leu Val Trp Ser

340

345

350

Asp Ala Pro Ala Ser Thr Ser Ala Ser Val Thr Leu Val Asn Asp Leu

355

360

365

Asn Leu Val Ile Thr Ala Pro Asn Gly Thr Gln Tyr Val Gly Asn Asp

370

375

380

Phe Thr Ala Pro Tyr Asn Asp Asn Trp Asp Gly Arg Asn Asn Val Glu

385

390

395

400

Asn Val Phe Ile Asn Ala Pro Gln Ser Gly Thr Tyr Thr Ile Glu Val

405

410

415

Gln Ala Tyr Asn Val Pro Val Gly Pro Gln Thr Phe Ser Leu Ala Ile

420

425

430

Val Asn

<210> 9

<211> 435

<212> PRT

<213> Bacillus sp. KSM-KP43

<220>

<223> Valiant

<400> 9

Asn Asp Val Ala Arg Gly Ile Val Lys Ala Asp Val Ala Gln Ser Ser

1

5

10

15

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

20

25

30

Leu Asp Thr Gly Arg Asn Asp Ser Ser Met His Glu Ala Phe Arg Gly

35

40

45

Lys Ile Thr Ala Leu Tyr Ala Leu Gly Arg Thr Asn Asn Ala Asn Asp

50

55

60

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

65

70

75

80

Ser Thr Asn Lys Gly Met Ala Pro Gln Ala Asn Leu Val Phe Gln Ser

85

90

95

Ile Met Asp Ser Gly Gly Gly Leu Gly Gly Leu Pro Ser Asn Leu Gln

100

105

110

Thr Leu Phe Ser Gln Ala Tyr Ser Ala Gly Ala Arg Ile His Thr Asn

115

120

125

Ser Trp Gly Ala Ser Ser Thr Asn Gly Ala Tyr Thr Thr Asp Ser Arg

130

135

140

Asn Val Asp Asp Tyr Val Arg Lys Asn Asp Met Thr Ile Leu Phe Ala

145

150

155

160

Ala Gly Asn Glu Gly Pro Gly Val Gly Thr Ile Ser Ala Pro Gly Thr

165

170

175

Ala Lys Asn Ala Ile Thr Val Gly Ala Thr Glu Asn Leu Arg Pro Ser

180

185

190

Phe Gly Ser Arg Ala Asp Asn Ile Asn His Val Ala Gln Phe Ser Ser

195

200

205

Arg Gly Pro Thr Lys Asp Gly Arg Ile Lys Pro Asp Val Met Ala Pro

210

215

220

Gly Thr Phe Ile Leu Ser Ala Arg Ser Ser Leu Ala Pro Asp Ser Ser

225

230

235

240

Phe Trp Ala Asn His Asp Ser Lys Tyr Ala Tyr Met Gly Gly Thr Ser

245

250

255

Met Ala Thr Pro Ile Val Ala Gly Asn Val Ala Gln Leu Arg Glu His

260

265

270

Phe Ile Lys Asn Arg Gly Ile Thr Pro Lys Pro Ser Leu Leu Lys Ala

275

280

285

Ala Leu Ile Ala Gly Ala Ala Asp Ile Gly Leu Gly Tyr Pro Asn Gly

290

295

300

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

305

310

315

320

Tyr Val Asn Glu Ser Ser Ser Leu Ser Thr Ser Gln Lys Ala Thr Tyr

325

330

335

Ser Phe Thr Ala Thr Ala Gly Lys Pro Leu Lys Ile Ser Leu Val Trp

340

345

350

Ser Asp Ala Pro Ala Ser Thr Ser Ala Ser Val Thr Leu Val Asn Asp

355

360

365

Leu Asn Leu Val Ile Thr Ala Pro Asn Gly Thr Gln Tyr Val Gly Asn

370

375

380

Asp Phe Thr Ala Pro Tyr Asn Asp Asn Trp Asp Gly Arg Asn Asn Val

385

390

395

400

Glu Asn Val Phe Ile Asn Ala Pro Gln Ser Gly Thr Tyr Thr Ile Glu

405

410

415

Val Gln Ala Tyr Asn Val Pro Val Gly Pro Gln Thr Phe Ser Leu Ala

420

425

430

Ile Val Asn

435

<210> 10

<211> 434

<212> PRT

<213> Bacillus sp. KSM-KP43

<220>

<223> Valiant

<400> 10

Asn Asp Val Ala Arg Gly Ile Val Lys Ala Asp Val Ala Gln Ser Val

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

	165	170	175
Lys Asn Ala Ile Thr Val Gly Ala Thr Glu Asn Leu Arg Pro Ser Phe			
	180	185	190
Gly Ser Gln Ala Asp Asn Ile Asn His Val Ala Asp Phe Ser Ser Arg			
	195	200	205
Gly Pro Thr Lys Asp Gly Arg Ile Lys Pro Asp Val Met Ala Pro Gly			
	210	215	220
Thr Phe Ile Leu Ser Ala Arg Ser Ser Leu Ala Pro Asp Ser Ser Phe			
225	230	235	240
Trp Ala Asn His Asp Ser Lys Tyr Ala Tyr Met Gly Gly Thr Ser Met			
	245	250	255
Ala Thr Pro Ile Val Ala Gly Asn Val Ala Gln Leu Arg Glu His Phe			
	260	265	270
Ile Lys Asn Arg Gly Ile Thr Pro Lys Pro Ser Leu Leu Lys Ala Ala			
	275	280	285
Leu Ile Ala Gly Ala Ala Asp Ile Gly Leu Gly Tyr Pro Asn Gly Asn			
	290	295	300
Gln Gly Trp Gly Arg Val Thr Leu Asp Lys Ser Leu Asn Val Val Tyr			
305	310	315	320
Val Asn Glu Ser Ser Ser Leu Ser Thr Ser Gln Lys Ala Thr Tyr Ser			

325

330

335

Phe Thr Ala Thr Ala Gly Lys Pro Leu Lys Ile Ser Leu Val Trp Ser

340

345

350

Asp Ala Pro Ala Ser Thr Ser Ala Ser Val Thr Leu Val Asn Asp Leu

355

360

365

Asn Leu Val Ile Thr Ala Pro Asn Gly Thr Gln Tyr Val Gly Asn Asp

370

375

380

Phe Thr Ala Pro Tyr Asn Asp Asn Trp Asp Gly Arg Asn Asn Val Glu

385

390

395

400

Asn Val Phe Ile Asn Ala Pro Gln Ser Gly Thr Tyr Thr Ile Glu Val

405

410

415

Gln Ala Tyr Asn Val Pro Val Gly Pro Gln Thr Phe Ser Leu Ala Ile

420

425

430

Val Asn

<210> 11

<211> 435

<212> PRT

<213> Bacillus sp. KSM-KP43

<220>

<223> Valiant

<400> 11

Asn Asp Val Ala Arg Gly Ile Val Lys Ala Asp Val Ala Gln Ser Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Asp Thr Gly Arg Asn Asp Ser Ser Met His Glu Ala Phe Arg Gly

35 40 45

Lys Ile Thr Ala Leu Tyr Ala Leu Gly Arg Thr Asn Asn Ala Asn Asp

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Thr Asn Lys Gly Met Ala Pro Gln Ala Asn Leu Val Phe Gln Ser

85 90 95

Ile Met Asp Ser Gly Gly Gly Leu Gly Gly Leu Pro Ser Asn Leu Gln

100 105 110

Thr Leu Phe Ser Gln Ala Tyr Ser Ala Gly Ala Arg Ile His Thr Asn

115 120 125

Ser Trp Gly Ala Ser Ser Thr Asn Gly Ala Tyr Thr Thr Asp Ser Arg

130 135 140

Asn Val Asp Asp Tyr Val Arg Lys Asn Asp Met Thr Ile Leu Phe Ala

145	150	155	160
Ala Gly Asn Glu Gly Pro Gly Val Gly Thr Ile Ser Ala Pro Gly Thr			
	165	170	175
Ala Lys Asn Ala Ile Thr Val Gly Ala Thr Glu Asn Leu Arg Pro Ser			
	180	185	190
Phe Gly Arg Arg Ala Asp Asn Ile Asn His Val Ala Gln Phe Ser Ser			
	195	200	205
Arg Gly Pro Thr Arg Asp Gly Arg Ile Lys Pro Asp Val Met Ala Pro			
	210	215	220
Gly Thr Phe Ile Leu Ser Ala Arg Ser Ser Leu Ala Pro Asp Ser Ser			
225	230	235	240
Phe Trp Ala Asn His Asp Ser Lys Tyr Ala Tyr Met Gly Gly Thr Ser			
	245	250	255
Met Ala Thr Pro Ile Val Ala Gly Asn Val Ala Gln Leu Arg Glu His			
	260	265	270
Phe Ile Lys Asn Arg Gly Ile Thr Pro Lys Pro Ser Leu Leu Lys Ala			
	275	280	285
Ala Leu Ile Ala Gly Ala Ala Asp Ile Gly Leu Gly Tyr Pro Asn Gly			
	290	295	300
Asn Gln Gly Trp Gly Arg Val Thr Leu Asp Lys Ser Leu Asn Val Ala			

305 310 315 320

Tyr Val Asn Glu Ser Ser Ser Leu Ser Thr Ser Gln Lys Ala Thr Tyr

325 330 335

Ser Phe Thr Ala Thr Ala Gly Lys Pro Leu Lys Ile Ser Leu Val Trp

340 345 350

Ser Asp Ala Pro Ala Ser Thr Ser Ala Ser Val Thr Leu Val Asn Asp

355 360 365

Leu Asn Leu Val Ile Thr Ala Pro Asn Gly Thr Arg Tyr Val Gly Asn

370 375 380

Asp Phe Thr Ala Pro Tyr Asn Asp Asn Trp Asp Gly Arg Asn Asn Val

385 390 395 400

Glu Asn Val Phe Ile Asn Ala Pro Gln Ser Gly Thr Tyr Thr Ile Glu

405 410 415

Val Gln Ala Tyr Asn Val Pro Val Gly Pro Gln Thr Phe Ser Leu Ala

420 425 430

Ile Val Asn

435

<210> 12

<211> 27

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Mỗi oligonucleotit A294-F

<400> 12

ggtgcaactg acatcggcct tggctac

27

<210> 13

<211> 27

<212> DNA

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Mỗi oligonucleotit A294-R

<400> 13

gatgtcagtt gcaccggcaa tcagtgc

27