



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117062909 A

(43) 申请公布日 2023. 11. 14

(21) 申请号 202180094606.4

J·萨沃莱宁 K·朗德菲尔德

(22) 申请日 2021.12.23

T·普拉宁

(30) 优先权数据

20217335.7 2020.12.28 EP

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

专利代理师 黄登高 张华

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.08.24

(51) Int.Cl.

C12N 9/24 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/FI2021/050911 2021.12.23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/144500 EN 2022.07.07

(71) 申请人 生化酶股份有限公司

地址 芬兰拉亚马基

(72) 发明人 M·帕洛海莫 K·俊图宁

O·图鲁宁 P·阿霍拉

P·泰帕鲁斯 E·穆勒

权利要求书2页 说明书37页

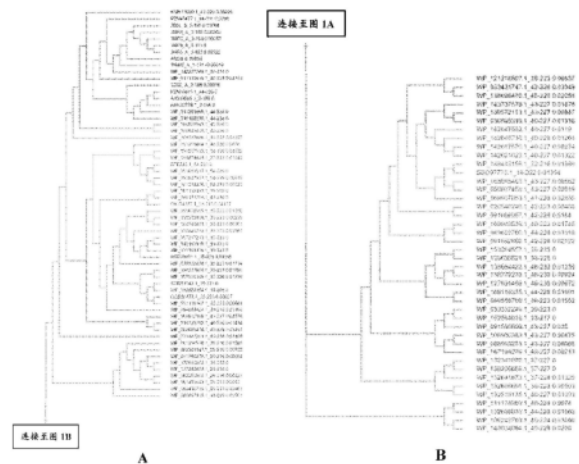
序列表65页 附图7页

(54) 发明名称

木聚糖酶变体

(57) 摘要

公开了木聚糖酶的变体多肽,以及包含所述变体多肽的融合蛋白和酶组合物、用于生产所述变体多肽的重组宿主细胞、使用它的方法及其用途,所述变体多肽包含与SEQ ID NO:1的氨基酸1-191具有至少79%,但小于100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列具有木聚糖酶活性,至少一个在1-191氨基酸区域中的两个Cys残基之间的二硫桥,和在位置23或28处或在位置23和28处的氨基酸取代,所述位置对应于SEQ ID NO:1的位置23和28。



1. 变体多肽,其包含与SEQ ID NO:1的氨基酸1-191具有至少79%,但小于100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列具有:

木聚糖酶活性,

在1-191氨基酸区域中的两个Cys残基之间的至少一个二硫桥,和

在位置23或28处,或在位置23和28处的氨基酸取代,所述位置对应于SEQ ID NO:1的位置23和28。

2. 权利要求1所述的变体多肽,其中所述氨基酸序列与SEQ ID NO:1的氨基酸1-191具有至少84%、优选地至少85%、更优选地至少86%、更优选地至少87%、更优选地至少88%、甚至更优选地至少89%、最优选地至少90%,但小于100%氨基酸序列同一性。

3. 权利要求1或2所述的变体多肽,其中所述变体多肽包含残基3C和30C,位置对应于SEQ ID NO:1的位置3和30,并且在残基3C和30C之间形成所述变体多肽的二硫桥。

4. 权利要求1-3中的任一项所述的变体多肽,所述变体多肽包含在位置A23、S23或S28处,或在位置A23或S23和S28处的至少一个氨基酸取代。

5. 权利要求1-4中的任一项所述的变体多肽,所述变体多肽包含:

在位置23处的氨基酸取代为H、M、P、S、T、R、W或Y;或

在位置28处的氨基酸取代为I、L、M、N、P、Q、R、T、V、W或Y;或

它们的任何组合。

6. 权利要求1-5中的任一项所述的变体多肽,其中与具有序列SEQ ID NO:1的多肽相比,所述变体多肽具有改善的热稳定性和/或pH-稳定性。

7. 融合蛋白,其包含根据权利要求1-6所述的变体多肽的氨基酸序列和以下至少一个:提供分泌信号序列的氨基酸序列;

促进纯化的氨基酸序列,诸如亲和标签或His-标签;

控制和增强重组多肽的生产的氨基酸序列,诸如载体多肽;

编码蛋白酶切割位点的氨基酸序列;

具有酶活性的氨基酸序列;和/或

给融合蛋白提供结合亲和力的氨基酸序列,诸如碳水化合物结合部分。

8. 酶组合物,其包含权利要求1-6中的任一项所述的变体多肽或权利要求7所述的融合蛋白。

9. 权利要求8所述的酶组合物,所述酶组合物进一步包含:

a. 至少一种稳定剂,其选自多元醇、丙二醇、聚乙二醇、己二醇、甘油、糖、糖醇、多糖、乳酸、肽、表面活性剂或它们的组合;或至少一种防腐剂或缓冲剂,其选自有机酸、柠檬酸、抗坏血酸、苯甲酸及其盐和衍生物、苯甲酸钠、苯甲酸盐、羟基苯甲酸盐和衍生物、磷酸盐、山梨酸、山梨酸钠、山梨酸盐、盐、氯化钠或氯化钾、1,2-苯并异噻唑啉-3-酮(BIT)或它们的组合;

b. 任选的至少一种抑制剂,其选自硼酸、硼酸衍生物、芳族硼酸酯、4-甲酰基苯基硼酸、苯基硼酸衍生物、具有抑制功能的肽化合物或它们的组合;

c. 任选的至少一种酶,其选自有或没有介质的蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶、脂肪酶、木聚糖酶、甘露聚糖酶、角质酶、酯酶、植酸酶、核酸酶、果胶酶、果胶分解酶、果胶酸裂解酶、糖酶、阿拉伯糖酶、半乳聚糖酶、黄原胶酶、木糖葡聚糖酶、漆酶、过氧化物酶和氧化酶或它们

的组合;和

d. 任选的至少一种填充剂,其选自麦芽糊精、面粉、氯化钠、硫酸盐、硫酸钠或它们的组合。

10. 权利要求8或9所述的酶组合物,所述酶组合物呈液体组合物或固体组合物的形式,诸如溶液、分散体、糊剂、粉末、颗粒、团粒、包衣团粒、片剂、饼、晶体、晶体浆、凝胶或丸粒。

11. 包含遗传元件的重组宿主细胞,所述遗传元件允许产生至少一种包含权利要求1-6中的任一项所述的变体多肽或权利要求7所述的融合蛋白的重组多肽。

12. 权利要求11所述的重组宿主细胞,其中所述宿主细胞选自:

a. 丝状真菌细胞,其来自于子囊菌门、盘菌亚门;优选地来自粪壳菌纲或散囊菌纲、肉座菌亚纲或粪壳菌亚纲或散囊菌亚纲、肉座菌目或粪壳菌目或散囊菌目、肉座菌科或丛赤壳科或毛壳菌科或曲霉科、木霉属(肉座菌属的无性型)或镰刀菌属或支顶孢属或腐质霉属或 *Thermothelomyces* 或毁丝霉属或曲霉属的成员;

更优选地来自物种里氏木霉(红褐肉座菌)、桔绿木霉、长枝木霉、绿木霉、哈茨木霉、棘孢木霉、黄绿木霉、拟里氏木霉、尖孢镰刀菌、禾谷镰刀菌、假禾谷镰刀菌、威尼斯镰刀菌、产黄支顶孢(产黄头孢霉)和黑曲霉、泡盛曲霉、米曲霉、特异腐质霉、灰腐质霉、*Thermothelomyces thermophilus*、嗜热毁丝霉、黑曲霉、黑曲霉泡盛变种和米曲霉;

b. 细菌细胞,优选革兰氏阳性杆菌诸如枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、短小芽孢杆菌,革兰氏阴性细菌诸如大肠杆菌、放线菌目诸如链霉菌属;和

c. 酵母,诸如酿酒酵母、巴斯德毕赤酵母、解脂耶氏酵母;

优选地,所述宿主细胞选自丝状真菌细胞诸如木霉属,或选自革兰氏阳性杆菌诸如芽孢杆菌属;最优选地选自里氏木霉或选自枯草芽孢杆菌或短小芽孢杆菌或地衣芽孢杆菌。

13. 用于生产权利要求1-6中的任一项所述的变体多肽或权利要求7所述的融合蛋白的方法,所述方法包含:

a. 在允许产生所述重组多肽的条件下培养权利要求11-12中的任一项所述的重组宿主细胞;和任选地

b. 回收所述重组多肽。

14. 用于降解或修饰含有木聚糖的材料的方法,所述方法包含用有效量的权利要求1-6中的任一项所述的变体多肽、权利要求7所述的融合蛋白或权利要求8-10中的任一项所述的酶组合物处理所述含有木聚糖的材料。

15. 权利要求1-6中的任一项所述的变体多肽或权利要求6所述的融合蛋白或权利要求8-10中的任一项所述的酶组合物在工业工艺或商业应用诸如纸浆或青贮饲料加工中的用途。

16. 权利要求1-6中的任一项所述的变体多肽或权利要求6所述的融合蛋白或权利要求8-10中的任一项所述的酶组合物在饲料或食品原料制备中的用途。

## 木聚糖酶变体

### 技术领域

[0001] 本公开内容总体上涉及酶技术的领域。本公开内容具体地但非排他地涉及木聚糖酶变体,其在不同的化学和热环境中表现出改善的木聚糖降解性能和稳定性,使得它们可用于需要降解木聚糖的各种应用,诸如纸浆或青贮饲料加工以及饲料或食品原料制备。

[0002] 背景

[0003] 本部分解释了有用的背景信息,但不承认本文描述的任何技术代表现有技术。

[0004] 植物细胞壁主要由多糖的复杂混合物组成,主要是纤维素、木质素和半纤维素。木聚糖是大多数源自植物的材料中的主要半纤维素组分,由经常带有乙酰基、阿拉伯糖基和葡糖醛酸基取代基的 $\beta$ -1,4-连接的木糖残基的多糖主链组成。内切- $\beta$ -1,4-木聚糖酶(EC3.2.1.8)是作用于木聚糖和低聚木糖的酶,通过降解直链多糖,产生较小的低聚木糖和木糖(单糖)的混合物。

[0005] 工业上适用的水解木聚糖的木聚糖酶的需求已经显著增加,并且对具有改进性能的酶存在持续需求。在高温和碱性pH下具有活性和稳定性的木聚糖酶在许多工业工艺中是特别合乎需要的。这样的过程包括例如纸浆的酶辅助漂白,其中木聚糖酶被用作有毒含氯化学品的简单且有成本效益的替代品。

[0006] 因为它们在提高饲料养分利用中的有益效果,木聚糖酶还可用作动物饲料添加剂。基于植物的动物饲料含有木聚糖,大量的木聚糖可能影响家畜的养分消化、微生物定殖和生长。在动物饲料中添加木聚糖酶具有有益的效果,诸如提高的家畜生长速率、提高的饲料转化率和提高的饲料效率。木聚糖酶对木聚糖的溶解和降解导致家畜肠道粘度降低和养分从谷物胚乳和糊粉层中的释放增加。此外,已经提示糖寡聚体即由木糖单元组成的低聚木糖(XOS)充当益生元,为家畜动物带来多种健康益处。

[0007] 其中利用木聚糖酶的其他工业或商业应用是例如青贮饲料加工,用于生物燃料生产的生物质转化,以及淀粉、食品、烘焙(诸如面包制作)和饮料(诸如果汁和酒的澄清,或酒精发酵)行业。

[0008] 已知放线菌产生木聚糖酶,并且其中一些产生非常热稳定的耐碱木聚糖酶。嗜热放线菌菌株是用于工业工艺的木聚糖酶的有用来源。木聚糖酶多肽包含催化模块(核心),并且它们中的许多也含有通过接头区域与核心分开的碳水化合物结合模块(CBM)。具有上面定义的模块结构的木聚糖降解酶由真菌和细菌产生,诸如放线菌菌株,包括柔曲马杜拉放线菌(*Actinomadura flexuosa*) (柔曲野野村氏菌(*Nonomuraea flexuosa*)) (例如柔曲野野村氏菌(*N. flexuosa*) Xyn11A和Xyn10A由核心、接头和CBM组成)。

[0009] 本公开内容描述了放线菌木聚糖酶的变体,和截短的柔曲马杜拉放线菌(柔曲野野村氏菌) Xyn11木聚糖酶(NfXyn11A,也命名为AM35)的变体,命名为AM24。AM24木聚糖酶及其生产方法描述在EP 1737951 B1中。AM24是源自柔曲马杜拉放线菌(柔曲野野村氏菌)的全长木聚糖酶AM35的截短木聚糖酶。AM24与全长木聚糖酶AM35的差别在于,碳水化合物结合结构域(CBM)以及核心与CBM之间的接头部分已经在遗传上除去。之前也已经描述了全长柔曲马杜拉放线菌(柔曲野野村氏菌) Xyn11A(Nf Xyn11A,AM35)木聚糖酶蛋白(EP 1737951

B1)。

[0010] 本公开内容的一个目的是提供木聚糖酶的变体,其表现出木聚糖酶活性并且具有允许其在工业工艺中使用的性能和稳定性。本公开内容的另一个目的是提供当用于工业工艺中时具有改善的性能的木聚糖酶变体。本公开内容的又一个目的是提供可以在用于木聚糖降解或修饰的酶组合物中使用的变体。

## 发明内容

[0011] 本申请涉及在所附独立权利要求中限定的发明以及在下面公开的其实施方案。

[0012] 本发明是基于通过修饰亲本木聚糖酶多肽AM24或与AM24同源的另一种放线菌木聚糖酶多肽来开发木聚糖酶变体。发明人已经令人惊讶地发现,并在下面的实施例中证实,通过在亲本木聚糖酶变体多肽中掺入至少一个二硫桥,以及在对应于位置23或28的位置处或在位置23和28两者处的氨基酸取代,可能获得具有与亲本木聚糖酶AM24或亲本AM24木聚糖酶同系物相比改善的(即增加的)木聚糖降解性能以及改善的稳定性的变体。特别是当反应条件需要高温时,性能和稳定性得到改善。木聚糖酶的新变体多肽在广泛的工业工艺中具有高性能和稳定性,并因此为在那些过程中用于木聚糖降解和修饰的酶组合物提供改善的性能。

[0013] 根据第一方面,提供了一种变体多肽,其包含与SEQ ID NO:1的氨基酸1-191具有至少79%但小于100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列具有:

[0014] 木聚糖酶活性,

[0015] 在1-191氨基酸区域中的两个Cys残基之间的至少一个二硫桥,和

[0016] 在位置23或28处或在位置23和28处的氨基酸取代,所述位置对应于SEQ ID NO:1的位置23和28。

[0017] 本发明的变体多肽的优点在于具有改善的热稳定性、pH稳定性和性能,即木聚糖降解活性,这些特征可以如在实施例4和5中所述进行测量。

[0018] 在一个实施方案中,提供了本发明的木聚糖酶变体多肽的功能片段。

[0019] 根据第二方面,提供了一种融合蛋白,其包含第一方面的变体多肽的氨基酸序列,和以下至少一个:

[0020] 提供分泌信号序列的氨基酸序列;

[0021] 促进纯化的氨基酸序列,诸如亲和标签或His-标签;

[0022] 控制和增强重组多肽的生产的氨基酸序列,诸如载体多肽;

[0023] 编码蛋白酶切割位点的氨基酸序列;

[0024] 具有酶活性的氨基酸序列;和/或

[0025] 给融合蛋白提供结合亲和力的氨基酸序列,诸如碳水化合物结合部分。

[0026] 根据第三方面,提供了一种酶组合物,其包含第一方面的变体多肽,或第二方面的融合蛋白。

[0027] 该酶组合物特别适用于纸浆加工,诸如促进纸浆的漂白过程和提高纸浆的精制效率,以及工业饲料或食品原料制备,因为木聚糖酶变体在这样的过程中在用于降解木聚糖时具有良好的稳定性和比活性。

[0028] 根据第四方面,提供了一种包含遗传元件的重组宿主细胞,所述遗传元件允许产

生至少一种包含第一方面的变体多肽或第二方面的融合蛋白的重组多肽。

[0029] 根据本公开内容的变体多肽具有使得变体多肽可用于工业应用的酶组合物中的性能。

[0030] 在一个实施方案中,提供了包含变体多肽的酶制品,所述变体多肽具有木聚糖酶活性并且可通过使用本发明的宿主细胞获得。

[0031] 根据第五方面,提供了一种用于生产第一方面的变体多肽或第二方面的融合蛋白的方法,所述方法包含:

[0032] a. 在允许产生所述重组多肽的条件下培养第四方面的重组宿主细胞;和任选地

[0033] b. 回收所述重组多肽。

[0034] 所述方法提供了生产木聚糖酶变体多肽或包含木聚糖酶变体多肽和至少一个根据第二方面的氨基酸序列的融合蛋白的有效方式。因为在重组宿主细胞中生产变体多肽,所以提供了可以以期望的方式优化、定制和控制的生产系统。通过该方法生产的变体多肽在结构和功能水平上不同于亲本木聚糖酶。

[0035] 根据第六方面,提供了一种用于降解或修饰含有木聚糖的材料的方法,其包含用有效量的第一方面的变体多肽、第二方面的融合蛋白或第三方面的酶组合物处理所述含有木聚糖的材料。在一个实施方案中,所述处理包含使含有木聚糖的材料与所述变体多肽、所述融合蛋白或所述酶组合物在水性介质中接触。

[0036] 根据第七方面,提供了第一方面的变体多肽或第二方面的融合蛋白或第三方面的酶组合物在工业工艺或商业应用(诸如纸浆或青贮饲料加工)中的用途。

[0037] 根据第八方面,提供了第一方面的变体多肽或第二方面的融合蛋白或第三方面的酶组合物在饲料或食品原料制备中的用途。

[0038] 在一个实施方案中,提供了第一方面的变体多肽或第二方面的融合蛋白或第三方面的酶组合物在纸浆加工(诸如促进木质素除去和/或纤维素水解和增强纸浆对精制的敏感性)中的用途。

[0039] 在一个实施方案中,提供了第一方面的变体多肽或第二方面的融合蛋白或第三方面的酶组合物在动物饲料中的用途,其中所述饲料任选地用于饲养动物、改善体重增加以及动物的饲养效率。

[0040] 在一个实施方案中,提供了第一方面的变体多肽或第二方面的融合蛋白或第三方面的酶组合物在食品原料制备中的用途。所述变体多肽可以用于咖啡提取、植物油或淀粉加工、植物纤维源脱胶、烘焙、生面团调理、面包制作和饮料工业(诸如果汁和酒的澄清或酒精发酵)。

[0041] 本发明的木聚糖酶变体的优点在于在需要稳定性增加的工艺条件下具有改善的降解木聚糖的性能。如下面提供的实施例所示,要求保护的木聚糖酶变体多肽具有与亲本AM24木聚糖酶或亲本AM24木聚糖酶同系物相比改善的性能和稳定性,取决于变体的来源。

[0042] 前面已经解释了不同的非约束性示例方面和实施方案。前述实施方案仅用于解释可以在不同实现中使用的选定方面或步骤。一些实施方案可以仅参考某些示例方面而呈现。应当理解,相应的实施方案也可以应用于其它示例方面。

## 附图说明

[0043] 将参考附图描述一些示例实施方案,其中:

[0044] 图1A和1B显示了AM24核心序列及其同系物的系统树。该树分为两部分图1A和1B,箭头代表两个图之间的连接环节。家族树来自100种与AM24核心最接近的同系物,使用blastp检索(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>)和Clustal Omega多序列比对程序(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)中的系统树选项进行设计。AM24的氨基酸序列(Nf\_Xyn11A核心,SEQ ID NO:1的氨基酸1-191,根据Leskinen等人,2005的核心区域)用作查询序列。在实施例2中更详细地解释了所使用的算法参数。

[0045] 图2显示了AM24的氨基酸序列与选择用于在里氏木霉(*Trichoderma reesei*)中生产的其密切同系物的成熟推导核心区域的比对。使用Clustal Omega (1.2.4) 多序列比对进行序列比对。AM24的成熟核心区域由SEQ ID NO:1的氨基酸1-191组成,基于在Leskinen等人(2005)中公开的信息。图2的比对显示了以下符号,其表示在每个垂直列中观察到的保守程度:\* (星号)表示具有单个完全保守残基的位置。:(冒号)表示在性能强相似的组之间具有保守的位置。.(句号)表示在性能弱相似的组之间具有保守的位置。

[0046] 图3A和3B显示了AM24及其变体在pH 7时的相对热稳定性。使用5分钟和60分钟反应时间,在温度70、80、90和96°C进行木聚糖酶活性分析。图3A:5分钟反应时间测定的结果;图3B:60分钟反应时间测定的结果。活性值与使用5分钟反应时间在80°C分析的相应木聚糖酶的活性相关。该活性设定为100。给出的值是两个平行反应的平均值。AM24表示亲本木聚糖酶,其它样品表示不同的AM24变体。

[0047] 图4A、4B、4C和4D显示了AM24及其变体C31-4在pH 8和9的相对热稳定性。在70、80、90和96°C用5分钟反应时间和在70和80°C用60分钟反应时间进行木聚糖酶活性分析。图4A:反应条件pH 8,5分钟反应;图4B:反应条件pH 8,60分钟反应;图4C:反应条件pH 9,5分钟反应;图4D:反应条件pH 9,60分钟反应。活性值与使用5分钟反应时间在pH 7、80°C分析的相应木聚糖酶的活性相关。该值设定为100。值是两个平行反应的平均值。

[0048] 图5. AM24及其变体C31-4在pH 11、90°C温育60分钟以后的残留木聚糖酶活性。使用5分钟反应时间在pH 7、70°C分析残留木聚糖酶活性占样品中原始活性的百分比。结果来自两种不同的分析,每种分析有两个平行反应。BR, Britton-Robinson缓冲液;NaP,磷酸钠缓冲液。使用5分钟反应时间在pH 7、70°C温育之前分析的木聚糖酶活性设定为100。

[0049] 序列表

[0050] SEQ ID NO:1AM24,柔曲野野村氏菌Xyn11A蛋白(AM35)的截短形式的氨基酸序列。

[0051] AM24含有全长野生型NfXyn11A的氨基酸D44-L263,由am24核苷酸序列编码。

[0052] SEQ ID NO:2包含突变T3C、A23S、S28I、T30C的AM24变体C31-4的氨基酸序列

[0053] SEQ ID NO:3包含突变T3C、T30C的AM24变体的氨基酸序列

[0054] SEQ ID NO:4包含突变T3C、A23S、T30C的AM24变体的氨基酸序列

[0055] SEQ ID NO:5包含突变T3C、S28I、T30C的AM24变体的氨基酸序列

[0056] SEQ ID NO:6包含突变A23S的AM24变体的氨基酸序列

[0057] SEQ ID NO:7包含突变S28I的AM24变体的氨基酸序列

[0058] SEQ ID NO:8包含突变A23S、S28I的AM24变体的氨基酸序列

[0059] SEQ ID NO:9包含突变T3C、A23Y、S28I、T30C的AM24变体的氨基酸序列

- [0060] SEQ ID NO:10包含突变T3C、A23H、S28I、T30C的AM24变体的氨基酸序列
- [0061] SEQ ID NO:11包含突变T3C、A23T、S28I、T30C的AM24变体的氨基酸序列
- [0062] SEQ ID NO:12包含突变T3C、A23M、S28I、T30C的AM24变体的氨基酸序列
- [0063] SEQ ID NO:13包含突变T3C、A23R、S28I、T30C的AM24变体的氨基酸序列
- [0064] SEQ ID NO:14包含突变T3C、A23S、S28L、T30C的AM24变体的氨基酸序列
- [0065] SEQ ID NO:15包含突变T3C、A23S、S28R、T30C的AM24变体的氨基酸序列
- [0066] SEQ ID NO:16包含突变T3C、A23S、S28M、T30C的AM24变体的氨基酸序列
- [0067] SEQ ID NO:17包含突变T3C、A23S、S28Q、T30C的AM24变体的氨基酸序列
- [0068] SEQ ID NO:18包含突变T3C、A23S、S28Y、T30C的AM24变体的氨基酸序列
- [0069] SEQ ID NO:19包含突变T3C、A23S、S28W、T30C的AM24变体的氨基酸序列
- [0070] SEQ ID NO:20包含突变T3C、A23S、S28T、T30C的AM24变体的氨基酸序列
- [0071] SEQ ID NO:21包含突变T3C、A23S、S28N、T30C的AM24变体的氨基酸序列
- [0072] SEQ ID NO:22包含突变T3C、A23S、S28V、T30C的AM24变体的氨基酸序列
- [0073] SEQ ID NO:23包含突变T3C、A23R、S28L、T30C的AM24变体的氨基酸序列
- [0074] SEQ ID NO:24包含突变T3C、A23R、S28Q、T30C的AM24变体的氨基酸序列
- [0075] SEQ ID NO:25包含突变T3C、A23H、S28L、T30C的AM24变体的氨基酸序列
- [0076] SEQ ID NO:26包含突变T3C、A23T、S28L、T30C的AM24变体的氨基酸序列
- [0077] SEQ ID NO:27包含突变T3C、A23W、S28I、T30C的AM24变体的氨基酸序列
- [0078] SEQ ID NO:28包含突变T3C、A23P、S28I、T30C的AM24变体的氨基酸序列
- [0079] SEQ ID NO:29包含突变T3C、A23S、S28P、T30C的AM24变体的氨基酸序列
- [0080] SEQ ID NO:30XB1,AM24的第一种木聚糖酶同系物的氨基酸序列,包含修剪的氨基酸26-219
- [0081] SEQ ID NO:31XB1M1,包含突变A3C、E30C的XB1的第一种木聚糖酶同系物变体的氨基酸序列
- [0082] SEQ ID NO:32XB1M2,包含突变A3C、A23S、S28I、E30C的XB1的第一种木聚糖酶同系物变体的氨基酸序列
- [0083] SEQ ID NO:33XB2,AM24的第二种木聚糖酶同系物的氨基酸序列,包含修剪的氨基酸39-229
- [0084] SEQ ID NO:34XB2M1,包含突变A3C、E30C的XB2的第二种木聚糖酶同系物变体的氨基酸序列
- [0085] SEQ ID NO:35XB2M2,包含突变A3C、S28I、E30C的XB2的第二种木聚糖酶同系物变体的氨基酸序列
- [0086] SEQ ID NO:36XB3,AM24的第三种木聚糖酶同系物的氨基酸序列,包含修剪的氨基酸37-231
- [0087] SEQ ID NO:37XB3M1,包含突变A3C、E30C的XB3的第三种木聚糖酶同系物变体的氨基酸序列
- [0088] SEQ ID NO:38XB3M2,包含突变A3C、A23S、S28I、E30C的XB3的第三种木聚糖酶同系物变体的氨基酸序列
- [0089] SEQ ID NO:39XB4,AM24的第四种木聚糖酶同系物的氨基酸序列,包含修剪的氨基

## 酸35-225

[0090] SEQ ID NO:40XB4M1,包含突变V3C、T30C的XB4的第四种木聚糖酶同系物变体的氨基酸序列

[0091] SEQ ID NO:41 XB4M2,包含突变V3C、A23S、S28I、T30C的XB4的第四种木聚糖酶同系物变体的氨基酸序列

[0092] SEQ ID NO:42 XB5,AM24的第五种木聚糖酶同系物的氨基酸序列,包含修剪的氨基酸43-236

[0093] SEQ ID NO:43 XB5M1,包含突变P3C、E30C的XB5的第五种木聚糖酶同系物变体的氨基酸序列

[0094] SEQ ID NO:44 XB5M2,包含突变P3C、A23S、S28I、E30C的XB5的第五种木聚糖酶同系物变体的氨基酸序列

[0095] SEQ ID NO:45 XB6,AM24的第六种木聚糖酶同系物的氨基酸序列,包含修剪的氨基酸3-193

[0096] SEQ ID NO:46 XB6M1,包含突变T3C、T30C的XB6的第六种木聚糖酶同系物变体的氨基酸序列

[0097] SEQ ID NO:47 XB6M2,包含突变T3C、A23S、S28I、T30C的XB6的第六种木聚糖酶同系物变体的氨基酸序列

[0098] SEQ ID NO:48 am24\*,Nfxyn11A的截短形式的核苷酸序列,其编码NfXyn11A蛋白(AM35)的截短形式(AM24)。与野生型Nfxyn11A相比,am24\*具有九个密码子变化,更详细地描述在Paloheimo等人(2007)。

[0099] SEQ ID NO:49包含突变T3C、A23S、S28I、T30C的编码AM24变体C31-4的核苷酸序列  
SEQ ID NO:50包含突变T3C、T30C的编码AM24变体的核苷酸序列

[0100] SEQ ID NO:51包含突变T3C、A23S、T30C的编码AM24变体的核苷酸序列

[0101] SEQ ID NO:52包含突变T3C、S28I、T30C的编码AM24变体的核苷酸序列

[0102] SEQ ID NO:53包含突变A23S的编码AM24变体的核苷酸序列

[0103] SEQ ID NO:54包含突变S28I的编码AM24变体的核苷酸序列

[0104] SEQ ID NO:55包含突变A23S、S28I的编码AM24变体的核苷酸序列

[0105] SEQ ID NO:56 am24\*\*,Nfxyn11A的截短形式的核苷酸序列,其编码NfXyn11A蛋白(AM35)的截短形式(AM24)。am24\*\*具有与野生型Nfxyn11A相比SEQ ID NO:48的九个密码子变化中的六个,并且另外通过将位置218中的丙氨酸密码子从GCG变为GCC而已经除去内部NruI位点。与野生型Nfxyn11A相比的这些相同密码子差异和内部NruI位点的除去也被包括在SEQ ID NO:57-78的AM24变体编码序列中。

[0106] SEQ ID NO:57包含突变T3C、A23S、S28I、T30C的编码AM24变体C31-4的核苷酸序列

[0107] SEQ ID NO:58包含突变T3C、A23Y、S28I、T30C的编码AM24变体的核苷酸序列

[0108] SEQ ID NO:59包含突变T3C、A23H、S28I、T30C的编码AM24变体的核苷酸序列

[0109] SEQ ID NO:60包含突变T3C、A23T、S28I、T30C的编码AM24变体的核苷酸序列

[0110] SEQ ID NO:61包含突变T3C、A23M、S28I、T30C的编码AM24变体的核苷酸序列

[0111] SEQ ID NO:62包含突变T3C、A23R、S28I、T30C的编码AM24变体的核苷酸序列

[0112] SEQ ID NO:63包含突变T3C、A23S、S28L、T30C的编码AM24变体的核苷酸序列

- [0113] SEQ ID NO:64包含突变T3C、A23S、S28R、T30C的编码AM24变体的核苷酸序列
- [0114] SEQ ID NO:65包含突变T3C、A23S、S28M、T30C的编码AM24变体的核苷酸序列
- [0115] SEQ ID NO:66包含突变T3C、A23S、S28Q、T30C的编码AM24变体的核苷酸序列
- [0116] SEQ ID NO:67包含突变T3C、A23S、S28Y、T30C的编码AM24变体的核苷酸序列
- [0117] SEQ ID NO:68包含突变T3C、A23S、S28W、T30C的编码AM24变体的核苷酸序列
- [0118] SEQ ID NO:69包含突变T3C、A23S、S28T、T30C的编码AM24变体的核苷酸序列
- [0119] SEQ ID NO:70包含突变T3C、A23S、S28N、T30C的编码AM24变体的核苷酸序列
- [0120] SEQ ID NO:71包含突变T3C、A23S、S28V、T30C的编码AM24变体的核苷酸序列
- [0121] SEQ ID NO:72包含突变T3C、A23R、S28L、T30C的编码AM24变体的核苷酸序列
- [0122] SEQ ID NO:73包含突变T3C、A23R、S28Q、T30C的编码AM24变体的核苷酸序列
- [0123] SEQ ID NO:74包含突变T3C、A23H、S28L、T30C的编码AM24变体的核苷酸序列
- [0124] SEQ ID NO:75包含突变T3C、A23T、S28L、T30C的编码AM24变体的核苷酸序列
- [0125] SEQ ID NO:76包含突变T3C、A23W、S28I、T30C的编码AM24变体的核苷酸序列
- [0126] SEQ ID NO:77包含突变T3C、A23P、S28I、T30C的编码AM24变体的核苷酸序列
- [0127] SEQ ID NO:78包含突变T3C、A23S、S28P、T30C的编码AM24变体的核苷酸序列
- [0128] SEQ ID NO:79编码AM24的第一种木聚糖酶同系物XB1的氨基酸26-219的核苷酸序列
- [0129] SEQ ID NO:80包含突变A3C、E30C的编码第一种木聚糖酶同系物变体XB1M1的核苷酸序列
- [0130] SEQ ID NO:81包含突变A3C、A23S、S28I、E30C的编码第一种木聚糖酶同系物变体XB1M2的核苷酸序列
- [0131] SEQ ID NO:82编码AM24的第二种木聚糖酶同系物XB2的氨基酸39-229的核苷酸序列
- [0132] SEQ ID NO:83包含突变A3C、E30C的编码第二种木聚糖酶同系物变体XB2M1的核苷酸序列
- [0133] SEQ ID NO:84包含突变A3C、S28I、E30C的编码第二种木聚糖酶同系物变体XB2M2的核苷酸序列
- [0134] SEQ ID NO:85编码AM24的第三种木聚糖酶同系物XB3的氨基酸37-231的核苷酸序列
- [0135] SEQ ID NO:86包含突变A3C、E30C的编码第三种木聚糖酶同系物变体XB3M1的核苷酸序列
- [0136] SEQ ID NO:87包含突变A3C、A23S、S28I、E30C的编码第三种木聚糖酶同系物变体XB3M2的核苷酸序列
- [0137] SEQ ID NO:88编码AM24的第四种木聚糖酶同系物XB4的氨基酸35-225的核苷酸序列
- [0138] SEQ ID NO:89包含突变V3C、T30C的编码第四种木聚糖酶同系物变体XB4M1的核苷酸序列
- [0139] SEQ ID NO:90包含突变V3C、A23S、S28I、T30C的编码第四种木聚糖酶同系物变体XB4M2的核苷酸序列
- [0140] SEQ ID NO:91编码AM24的第五种木聚糖酶同系物XB5的氨基酸43-236的核苷酸序列
- [0141] SEQ ID NO:92包含突变P3C、E30C的编码第五种木聚糖酶同系物变体XB5M1的核苷酸序列
- [0142] SEQ ID NO:93包含突变P3C、A23S、S28I、E30C的编码第五种木聚糖酶同系物变体XB5M2的核苷酸序列
- [0143] SEQ ID NO:94包含突变P3C、A23S、S28I、E30C的编码第五种木聚糖酶同系物变体XB5M3的核苷酸序列

- [0144] SEQ ID NO:94编码AM24的第六种木聚糖酶同系物XB6的氨基酸3-193的核苷酸序列
- [0145] SEQ ID NO:95包含突变T3C、T30C的编码第六种木聚糖酶同系物变体XB6M1的核苷酸序列
- [0146] SEQ ID NO:96包含突变T3C、A23S、S28I、T30C的编码第六种木聚糖酶同系物变体
- [0147] XB6M2的核苷酸序列
- [0148] SEQ ID NO:97AM35,由am35核苷酸序列编码的全长成熟NfXyn11A蛋白的氨基酸序列
- [0149] (包含全长Nt Xyn11A的氨基酸44-344;Leskinen等人,2005)
- [0150] SEQ ID NO:98am35,编码全长成熟NfXyn11A AM35蛋白的核苷酸序列

### 具体实施方式

[0151] 本发明涉及在其氨基酸序列中引入取代的木聚糖酶的变体多肽,从而导致改善的性能,诸如改善的热稳定性和pH稳定性。

[0152] 本文中使用的术语“同系物”或“木聚糖酶同系物”表示木聚糖酶的DNA、RNA或氨基酸序列,其具有一定水平的生物同源性,即与另一种木聚糖酶的DNA、RNA或氨基酸序列的相似性,其中所述相似性表示为序列中相同残基的百分比,或序列同一性/相似性的百分比。在一个实施方案中,所述木聚糖酶同系物是AM24木聚糖酶同系物。

[0153] 术语“木聚糖”表示由重复的 $\beta$ -1,4-连接的木糖残基主链和各种侧链基团组成的基质多糖或杂聚物。基于取代的侧链基团,木聚糖多糖可以分为类别O-乙酰基葡萄糖醛酸木聚糖(AcGX)、O-乙酰基阿拉伯木聚糖(AcAX)、O-乙酰基葡萄糖醛酸阿拉伯木聚糖(AcGAX)和阿拉伯葡萄糖醛酸木聚糖(AGX)。含有木聚糖的材料包括基于植物的或源自植物的材料。

[0154] 本文中使用的术语“木聚糖酶”表示根据本领域已知的知识定义为内切-1,4- $\beta$ -木聚糖酶或4- $\beta$ -D-木聚糖木聚糖水解酶的木聚糖酶,已知其催化木聚糖中的(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-木糖苷键的内切水解。木聚糖具有替代名称内切-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -木聚糖4-木聚糖水解酶、内切-1,4-木聚糖酶、木聚糖酶、 $\beta$ -1,4-木聚糖酶、内切-1,4-木聚糖酶、内切- $\beta$ -1,4-木聚糖酶、内切-1,4- $\beta$ -D-木聚糖酶、1,4- $\beta$ -木聚糖木聚糖水解酶、 $\beta$ -木聚糖酶、 $\beta$ -1,4-木聚糖木聚糖水解酶、内切-1,4- $\beta$ -木聚糖酶和 $\beta$ -D-木聚糖酶。根据酶命名法将木聚糖酶归类为EC 3.2.1.8。

[0155] 本文中使用的Nfxyn11A表示柔曲野野村氏菌木聚糖酶基因,其编码来自家族11的木聚糖酶NfXyn11A,也命名为AM35。

[0156] 本文中使用的AM35表示野生型成熟木聚糖酶,其为用于AM24多肽的亲本多肽。成熟AM35蛋白的氨基酸对应于SEQ ID NO:97的氨基酸序列。

[0157] 本文中使用的AM24(在本文中也称为AM24蛋白)是根据本公开内容的AM24变体多肽的亲本多肽。AM24由编码木聚糖酶AM35(Nf Xyn11A)的截短形式的缩短DNA序列编码。AM24蛋白包含催化模块(核心),并且缺乏碳水化合物结合模块(CBM)以及核心与CBM之间的接头区域的部分。AM24的成熟多肽的氨基酸对应于SEQ ID NO:1的氨基酸序列,包含氨基酸D1-L220,而AM24的“成熟核心多肽”包含SEQ ID NO:1的氨基酸D1-G191。

[0158] 本文中使用的术语“变体”是指被插入、取代或删除一个或多个核苷酸/氨基酸或

者被化学修饰的序列或序列(核苷酸或氨基酸)的片段。在一些实施方案中,术语变体还可以包括木聚糖酶变体多肽、包括木聚糖酶变体多肽的融合蛋白,或重组木聚糖酶。

[0159] 术语“木聚糖酶变体”和“变体木聚糖酶”和“木聚糖酶的变体”是指通过定位或随机诱变、插入、取代、删除、重组和/或任何其它蛋白质工程方法获得的任何木聚糖酶分子,其导致在其氨基酸序列上不同于亲本木聚糖酶的木聚糖酶,所述亲本木聚糖酶是野生型木聚糖酶或木聚糖酶变体本身。根据本公开内容的术语“野生型木聚糖酶”、“野生型酶”、“野生型”或“wt”描述具有在自然界中发现的氨基酸序列或其片段的木聚糖酶。使用遗传方法,例如通过定位诱变(一种在编码亲本多肽的多核苷酸中的一个或多个确定位点处引入一个或超过一个突变的技术),可以合成变体编码基因或修饰亲本基因。

[0160] 根据第一方面的术语木聚糖酶的“变体多肽”也可以通过使用赋予变体的名称来指代,例如C31-4或变体C31-4。

[0161] 本文中使用的术语“同系物变体”或“同系物的变体”表示来自AM24木聚糖酶同系物的任何变体分子,其如下获得:通过合成相应的基因或通过定位或随机诱变、插入、取代、删除、重组和/或任何其它蛋白质工程方法来修饰亲本基因,这产生在其氨基酸序列上不同于亲本木聚糖酶同系物的AM24木聚糖酶同系物变体,所述亲本木聚糖酶同系物是野生型木聚糖酶或木聚糖酶变体本身。在一个实施方案中,表述“XB1的木聚糖酶同系物变体”或类似表述表示AM24木聚糖酶同系物的变体,该同系物是XB1。

[0162] 本文中使用的术语“成熟多肽”是指任何多肽,其中至少一个信号序列或信号肽或信号肽和推定的前肽被切掉。例如,AM24的“成熟多肽”包含SEQ ID NO:1的氨基酸D1-L220,并且AM24的“成熟核心多肽”包含SEQ ID NO:1的氨基酸D1-G191。

[0163] 本文中使用的“肽”和“多肽”是包括多个连续聚合的氨基酸残基的氨基酸序列。为了本公开内容的目的,肽是包括至多20个氨基酸残基的分子,并且多肽包括超过20个氨基酸残基。所述肽或多肽可以包括修饰的氨基酸残基、不由密码子编码的天然存在的氨基酸残基和非天然存在的氨基酸残基。本文中使用的“蛋白”可以表示任何大小的肽或多肽。蛋白可以是酶、蛋白、抗体、膜蛋白、肽激素、调节剂或任何其它蛋白。

[0164] 本文中使用的“序列同一性”是指两个最佳比对的序列之间的氨基酸残基的精确匹配占两个序列中存在残基的位置的数目的百分比。当一个序列具有一个残基而在另一序列中没有相应的残基时,比对程序允许在比对中存在缺口,并且该位置不计入同一性计算的分母中。

[0165] 本文中使用的氨基酸序列的“序列比对”是指,使用Sievers等人2011描述的Clustal Omega (1.2.4)多序列比对程序(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)并使用默认设置来比对序列。

[0166] 除非另外指出,否则所有对某个氨基酸位置的提及表示在所述位置中的SEQ ID NO:1的氨基酸,或表示在与SEQ ID NO:1比对的氨基酸序列的相应位置中存在或缺失的氨基酸。

[0167] 本文中使用的术语“二硫桥”或“二硫键”或“SS桥”表示在多肽或蛋白中的半胱氨酸残基的硫原子之间形成的键。二硫桥可以是天然存在的或非天然存在的,并且例如通过氨基酸取代引入。

[0168] 本文中使用的术语“相应位置”或“相应氨基酸位置”是指,根据所鉴定的相似性或

同一性区域以逐对比对或多序列比对的方式比对至少两个氨基酸序列,从而配对相应的氨基酸。在图2中给出了相应位置的一个例子,其中在同一垂直列中呈现的氨基酸是对应的氨基酸。例如,在位置1处,AM24的氨基酸D1和XB1的Q1是相应的氨基酸。

[0169] 本文中使用的“氨基酸取代”是指在该特定取代位置处用与原始氨基酸不同的氨基酸残基进行的氨基酸残基替换。术语“氨基酸取代”可以表示保守氨基酸取代和非保守氨基酸取代,这意味着氨基酸残基被具有与该位置的原始氨基酸残基相似的侧链(保守的)或不同的侧链(非保守的)的氨基酸残基替换。

[0170] 术语“功能片段”是指木聚糖酶的当前变体多肽的片段或部分,其保留大约相同的酶功能或效应。

[0171] 本文中使用的“木聚糖酶活性”表示木聚糖降解活性。本文中使用的降解或修饰是指,木聚糖多糖被木聚糖酶水解成木糖寡糖或二糖。根据本领域已知的试验程序,可以试验根据本公开内容的多肽的木聚糖降解活性。实施例4和5提供了测定木聚糖酶活性的方法的实施例。术语“木聚糖酶活性保留”是指该酶在暴露于特定工艺条件时保留其木聚糖酶活性的能力。在一个实施方案中,增加的木聚糖酶的活性保留是指,与在相同条件下的亲本木聚糖酶AM24相比,木聚糖酶在指定的工艺条件下更好地保留其木聚糖酶活性。

[0172] 在一个实施方案中,术语“酶组合物”是指可能从单一微生物物种中分离和纯化的酶促发酵产物。所述酶组合物通常包含由微生物生产的许多不同的酶活性。在另一个实施方案中,所述酶组合物是单组分酶的混合物,优选通过使用常规重组技术从细菌或真菌物种衍生出的酶。所述酶源自一种或多种微生物的发酵,并且可能被分离和纯化。在混合物中的酶可能源自不同的物种,优选真菌或细菌物种,或者它们存在于微生物的发酵产物中,所述微生物充当其生产的宿主细胞,诸如当在重组木聚糖酶的生产中所述微生物同时产生除重组木聚糖酶之外的其它酶时。

[0173] 在酶或木聚糖酶稳定性的上下文中,术语“稳定性”描述了该酶在对于所讨论的酶的活性和功能而言不是最佳的工艺条件下耐受和/或起作用的性质,这样的工艺条件是例如高温、pH或辐射、某种浓度的无机盐或有机溶剂,或包含例如蛋白酶、稳定剂、增效剂(builders)、表面活性剂等特定反应混合物组合物。

[0174] 术语“稳定性”反映了根据本公开内容的木聚糖酶随时间变化的稳定性,例如当木聚糖酶暴露于对于所讨论的酶的活性和功能而言不是最佳的工艺条件时,保留多少活性。使用不同的方法来分析木聚糖酶变体的稳定性。可以测量木聚糖酶的解折叠温度以评估木聚糖酶的热稳定性,如在实施例5中所述。此外,使用“活性测定”并调整参数,可以测量木聚糖酶稳定性和残余活性,如在实施例4和5中所述。术语“稳定性”包括在高温条件下的工艺中使用期间的稳定性。

[0175] 本文中使用的“宿主细胞”是指对用包含多核苷酸的核酸构建体或表达载体进行的转化、转染、转导、交配、杂交等敏感的任何细胞类型。术语“宿主细胞”涵盖由于在复制期间发生的突变而不相同的任何后代。宿主细胞的非限制性例子是真菌细胞,优选丝状真菌细胞(例如木霉属(*Trichoderma*)或里氏木霉、曲霉属(*Aspergillus*)或米曲霉(*Aspergillus oryzae*)或黑曲霉(*Aspergillus niger*)、*Thermothelomyces*或*Thermothelomyces heterothallica*或腐质霉属(*Humicola*)或特异腐质霉(*Humicola insolens*)或镰刀菌属(*Fusarium*)或威尼斯镰刀菌(*Fusarium venenatum*)),细菌细胞,优选

革兰氏阳性芽孢杆菌(例如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、地衣芽孢杆菌(*B.licheniformis*)、巨大芽孢杆菌(*B.megaterium*)、解淀粉芽孢杆菌(*B.amyloliquefaciens*)、短小芽孢杆菌(*B.pumilus*))、革兰氏阴性细菌(例如大肠杆菌(*Escherichia coli*)),放线菌目(*actinomycetales*) (例如链霉菌属(*Streptomyces sp.*)、柔曲野野村氏菌)和酵母(例如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*))。

[0176] 术语“启动子”表示含有DNA序列的基因的一部分,其提供RNA聚合酶的结合和转录的起始。启动子序列通常(但并非总是)存在于基因的5'非编码区中。

[0177] 术语“分泌信号序列”或“信号序列”或“分泌肽”表示这样的氨基酸序列:其为更大的多肽的组分或一部分,并且其指导更大的多肽通过在其中生产它的宿主细胞的分泌途径。分泌信号序列可以是天然的,或者它可以从另一种来源获得。取决于宿主细胞,更大的多肽可以在通过分泌途径的运输过程中从分泌肽上切割,从而形成缺乏分泌肽的成熟多肽。

[0178] 术语“前肽(propeptide/pro-peptide)”是在成熟或活化过程中被切割的蛋白的一部分。一旦被切割,前肽通常不具有独立的生物学功能。

[0179] 本文中使用的术语“结构域”和“区域”可以与术语“模块”互换使用。

[0180] 术语“催化结构域”或“催化模块”或“核心”表示酶的结构域,其可能已经或尚未被修饰或改变,但其已经保留其原始活性的至少部分。根据本公开内容的木聚糖酶的变体多肽的催化模块区域对应于与SEQ ID NO:1的氨基酸1-191比对的氨基酸。

[0181] 术语“接头”或“间隔物”是指包含至少两个氨基酸的多肽,其可以存在于多结构域蛋白的结构域之间,例如包含催化结构域和结合结构域诸如碳水化合物结合模块(CBM)的酶,或任何其它酶杂合体,或在作为融合多肽生产的两个蛋白或多肽之间,例如包含两个核心酶的融合蛋白。例如,通过将编码催化结构域的DNA序列、编码接头的DNA序列和编码CBM的DNA序列依次融合进一个开放读码框中并表达该构建体,提供催化结构域与CBM的融合蛋白。

[0182] 为氨基酸使用以下缩写:

[0183] A Ala丙氨酸

[0184] C Cys半胱氨酸

[0185] D Asp天冬氨酸

[0186] E Glu谷氨酸

[0187] F Phe苯丙氨酸

[0188] G Gly甘氨酸

[0189] H His组氨酸

[0190] I Ile异亮氨酸

[0191] K Lys赖氨酸

[0192] L Leu亮氨酸

[0193] M Met甲硫氨酸

[0194] N Asn天冬酰胺

[0195] P Pro脯氨酸

[0196] Q Gln谷氨酰胺

[0197] R Arg精氨酸

[0198] S Ser丝氨酸

[0199] T Thr苏氨酸

[0200] V Val缬氨酸

[0201] W Trp色氨酸

[0202] Y Tyr酪氨酸

[0203] 使用以下命名法描述取代:蛋白支架中的氨基酸残基;位置;取代的氨基酸残基。根据该命名法,例如,在位置23处的丙氨酸向酪氨酸残基的单个残基取代被表示为Ala23Tyr或A23Y。

[0204] 本文中使用的术语“包含”包括“包括”、“含有”和“包含”的更广含义,以及更狭窄的表述“由……组成”和“仅由……组成”。

[0205] 本文中使用的“表达”包括涉及在宿主细胞中生产多肽的任何步骤,包括但不限于转录、翻译、翻译后修饰和分泌。表达后可以收获(即回收)宿主细胞或表达的产物。

[0206] 本文中使用的术语“青贮饲料”是由已经保存的植物基材料制成的一类饲料或动物饲料。

[0207] 在一个实施方案中,所述变体多肽具有木聚糖酶活性,和与SEQ ID NO:1的氨基酸1-191具有至少79%、至少81%、至少82%、至少84%、至少87%、至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述变体多肽与SEQ ID NO:1的氨基酸1-191不具有100%序列同一性。在一个实施方案中,所述变体多肽的氨基酸编号对应于SEQ ID NO:1的氨基酸编号。在一个替代实施方案中,所述变体多肽的氨基酸编号部分地对应于SEQ ID NO:1的氨基酸编号。

[0208] 在一个实施方案中,所述变体多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:1的氨基酸1-191具有至少84%、优选地至少85%、更优选地至少86%、更优选地至少87%、更优选地至少88%、甚至更优选地至少89%、最优选地至少90%但小于100%氨基酸序列同一性。

[0209] 在一个实施方案中,公开了一种变体多肽,其包含与SEQ ID NO:1的氨基酸1-191具有至少84%但小于100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列具有:木聚糖酶活性,在1-191氨基酸区域中的两个Cys残基之间的至少一个二硫桥,和在位置23或28处或在位置23和28处的氨基酸取代,所述位置对应于SEQ ID NO:1的位置23和28。

[0210] 在一个实施方案中,公开了一种变体多肽,其包含与SEQ ID NO:1的氨基酸1-191具有至少85%但小于100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列具有:木聚糖酶活性,在1-191氨基酸区域中的两个Cys残基之间的至少一个二硫桥,和在位置23或28处或在位置23和28处的氨基酸取代,所述位置对应于SEQ ID NO:1的位置23和28。

[0211] 在一个实施方案中,公开了一种变体多肽,其包含与SEQ ID NO:1的氨基酸1-191具有至少86%但小于100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列具有:木聚糖酶活性,在1-191氨基酸区域中的两个Cys残基之间的至少一个二硫桥,和在位置23或28处或在位置23和28处的氨基酸取代,所述位置对应于SEQ ID NO:1的位置23和28。

[0212] 在一个实施方案中,公开了一种变体多肽,其包含与SEQ ID NO:1的氨基酸1-191具有至少87%但小于100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列具有:木

聚糖酶活性,在1-191氨基酸区域中的两个Cys残基之间的至少一个二硫桥,和在位置23或28处或在位置23和28处的氨基酸取代,所述位置对应于SEQ ID NO:1的位置23和28。

[0213] 在一个实施方案中,公开了一种变体多肽,其包含与SEQ ID NO:1的氨基酸1-191具有至少88%但小于100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列具有:木聚糖酶活性,在1-191氨基酸区域中的两个Cys残基之间的至少一个二硫桥,和在位置23或28处或在位置23和28处的氨基酸取代,所述位置对应于SEQ ID NO:1的位置23和28。

[0214] 在一个实施方案中,公开了一种变体多肽,其包含与SEQ ID NO:1的氨基酸1-191具有至少89%但小于100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列具有:木聚糖酶活性,在1-191氨基酸区域中的两个Cys残基之间的至少一个二硫桥,和在位置23或28处或在位置23和28处的氨基酸取代,所述位置对应于SEQ ID NO:1的位置23和28。

[0215] 在一个实施方案中,公开了一种变体多肽,其包含与SEQ ID NO:1的氨基酸1-191具有至少90%但小于100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列具有:木聚糖酶活性,在1-191氨基酸区域中的两个Cys残基之间的至少一个二硫桥,和在位置23或28处或在位置23和28处的氨基酸取代,所述位置对应于SEQ ID NO:1的位置23和28。

[0216] 在一个实施方案中,公开了一种变体多肽,其包含与SEQ ID NO:1的氨基酸1-191具有至少91%、92%、93%、94%或95%但小于100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列具有:木聚糖酶活性,在1-191氨基酸区域中的两个Cys残基之间的至少一个二硫桥,和在位置23或28处或在位置23和28处的氨基酸取代,所述位置对应于SEQ ID NO:1的位置23和28。

[0217] 在一个实施方案中,所述变体多肽包含与SEQ ID NO:1的氨基酸1-191具有至少79%、优选地至少82%、更优选地至少84%、甚至更优选地至少87%、最优选地至少90%但小于100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中与SEQ ID NO:1的氨基酸31-191对应的变体多肽的氨基酸与SEQ ID NO:1的氨基酸31-191具有至少90%、优选地至少95%、更优选地至少99%、甚至更优选地100%序列同一性。

[0218] 在一个实施方案中,所述变体多肽具有:木聚糖酶活性;SEQ ID NO:1的氨基酸1-191,其中在位置23或28处或在位置23和28处的氨基酸被取代,所述位置对应于SEQ ID NO:1的位置23和28;和

[0219] 至少一种其它氨基酸取代,其产生在1-191氨基酸区域中在两个Cys残基之间的二硫桥。

[0220] 在一个实施方案中,所述变体多肽具有木聚糖酶活性,和与亲本AM24木聚糖酶多肽的SEQ ID NO:1的氨基酸D1-L220具有至少79%、至少81%、至少82%、至少84%、至少87%、至少90%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述变体多肽具有木聚糖酶活性,和与亲本AM24木聚糖酶多肽的SEQ ID NO:1的氨基酸D1-L220具有小于79%序列同一性的氨基酸序列。

[0221] 在一个实施方案中,所述变体多肽包含残基3C和30C,所述位置对应于SEQ ID NO:1的位置3和30,并且在残基3C和30C之间形成所述变体多肽的二硫桥。

[0222] 在一个实施方案中,所述变体多肽包含氨基酸取代T3C或T30C,所述位置对应于SEQ ID NO:1的位置3和30,并且在所述取代的残基之间形成所述变体多肽的至少一个二硫桥。

[0223] 在一个实施方案中,所述变体多肽包含以下氨基酸取代的组合:

[0224] T3C和T30C,或T3C和N30C,或T3C和E30C,或T3C和Y30C,或T3C和D30C,或V3C和T30C,或V3C和N30C,或V3C和E30C,或V3C和Y30C,或V3C和D30C,或A3C和T30C,或A3C和N30C,或A3C和E30C,或A3C和Y30C,或A3C和D30C,或P3C和T30C,或P3C和N30C,或P3C和E30C,或P3C和Y30C,或P3C和D30C,其中所述取代的位置对应于SEQ ID NO:1的位置3和30,并且在所述两个取代的残基之间形成所述变体多肽的至少一个二硫桥。

[0225] 在另一个实施方案中,所述变体多肽包含在所述变体多肽的1-191氨基酸区域中的Cys残基之间的二硫桥,所述Cys残基的位置不同于与SEQ ID NO:1的位置3和30对应的位置。

[0226] 在一个实施方案中,所述变体多肽包含在所述变体多肽的1-30氨基酸区域中的Cys残基之间的至少一个二硫桥,所述氨基酸区域的位置对应于SEQ ID NO:1的位置1和30。

[0227] 在一个实施方案中,例如,通过变体基因合成,得到与SEQ ID NO:1的氨基酸1-191具有至少79%但小于100%氨基酸序列同一性的变体多肽的氨基酸区域中的半胱氨酸残基,在所述半胱氨酸残基之间如此得到的二硫桥是非天然存在的。在一个实施方案中,通过亲本基因的遗传修饰得到所述半胱氨酸残基。例如利用定位诱变,在所述半胱氨酸残基之间如此得到的二硫桥也是非天然存在的。许多蛋白质工程方案或可替换地基因合成可以用于在氨基酸链中的特定位置处产生氨基酸取代,从而允许在特定位置处的天然或野生型氨基酸被另一种氨基酸残基取代。在一个实施方案中,变体多肽1-191氨基酸区域的至少两个氨基酸残基被半胱氨酸取代,从而能够在取代基半胱氨酸残基的硫原子之间形成二硫键。在另一个实施方案中,所述变体多肽包含能够在所述变体多肽的1-191氨基酸区域中的至少两个替代位置中形成二硫桥的半胱氨酸残基。在又一个实施方案中,所述变体多肽包含能够在所述变体多肽的1-191氨基酸区域中形成超过一个二硫桥的半胱氨酸残基。

[0228] 在一个实施方案中,在1-191氨基酸区域中的至少一个二硫桥会稳定所述变体多肽,从而与不具有二硫桥的变体AM24相比增加所述变体多肽的pH稳定性和热稳定性。

[0229] 在一个实施方案中,所述变体多肽包含在位置23或28处,或在位置23和28处的至少一个氨基酸取代。

[0230] 在一个实施方案中,所述变体多肽包含在所述变体多肽的1-30氨基酸区域中的Cys残基之间的至少一个二硫桥,和在位置23或28处,或在位置23和28处的至少一个氨基酸取代,所述位置对应于SEQ ID NO:1的位置1-30。

[0231] 在一个实施方案中,所述变体多肽包含在位置A23、S23或S28处或在位置A23或S23和S28处的至少一个氨基酸取代。

[0232] 在一个实施方案中,与在1-191区域中的两个Cys残基之间的至少一个二硫桥一起,所述变体多肽包含在位置A23或S28处,或在位置A23和S28处的至少一个氨基酸取代,所述位置对应于SEQ ID NO:1的位置23和28。

[0233] 在一个替代实施方案中,与在1-191区域中的两个Cys残基之间的至少一个二硫桥一起,所述变体多肽包含在位置S23或S28处,或在位置S23和S28处的至少一个氨基酸取代,所述位置对应于SEQ ID NO:1的位置23和28。

[0234] 在一个实施方案中,在位置23或28处,或在位置23和28处的取代的氨基酸残基不同于在这些位置中的原始氨基酸残基。在一个实施方案中,所述取代基氨基酸选自H、I、L、

M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y,前提条件是,所述取代基氨基酸残基不同于在该位置的天然存在的氨基酸残基。

[0235] 在一个实施方案中,所述变体多肽包含:

[0236] 位置23处的氨基酸取代为H、M、P、S、T、R、W或Y;或

[0237] 位置28处的氨基酸取代为I、L、M、N、P、Q、R、T、V、W或Y;或

[0238] 它们的任何组合。

[0239] 在一个实施方案中,所述变体多肽包含:

[0240] 位置23处的氨基酸取代为H、M、P、S、T、R、W或Y;或

[0241] 位置28处的氨基酸取代为I、L、M、N、Q、R、T、V、W或Y;或

[0242] 它们的任何组合。

[0243] 在一个实施方案中,所述变体多肽包含氨基酸取代A23H、A23M、A23P、A23S、A23T、A23R、A23W或A23Y。

[0244] 在一个实施方案中,所述变体多肽包含氨基酸取代S23H、S23M、S23P、S23T、S23R、S23W或S23Y。

[0245] 在一个实施方案中,所述变体多肽包含氨基酸取代S28I、S28L、S28M、S28N、S28P、S28Q、S28R、S28T、S28V、S28W或S28Y。

[0246] 在一个实施方案中,所述变体多肽包含以下氨基酸取代的组合:

[0247] A23H和S28I, A23H和S28L, A23H和S28M, A23H和S28N, A23H和S28P, A23H和S28Q, A23H和S28R, A23H和S28T, A23H和S28V, A23H和S28W, A23H和S28Y,

[0248] A23M和S28I, A23M和S28L, A23M和S28M, A23M和S28N, A23M和S28P, A23M和S28Q, A23M和S28R, A23M和S28T, A23M和S28V, A23M和S28W, A23M和S28Y,

[0249] A23P和S28I, A23P和S28L, A23P和S28M, A23P和S28N, A23P和S28P, A23P和S28Q, A23P和S28R, A23P和S28T, A23P和S28V, A23P和S28W, A23P和S28Y,

[0250] A23S和S28I, A23S和S28L, A23S和S28M, A23S和S28N, A23S和S28P, A23S和S28Q, A23S和S28R, A23S和S28T, A23S和S28V, A23S和S28W, A23S和S28Y,

[0251] A23T和S28I, A23T和S28L, A23T和S28M, A23T和S28N, A23T和S28P, A23T和S28Q, A23T和S28R, A23T和S28T, A23T和S28V, A23T和S28W, A23T和S28Y,

[0252] A23R和S28I, A23R和S28L, A23R和S28M, A23R和S28N, A23R和S28P, A23R和S28Q, A23R和S28R, A23R和S28T, A23R和S28V, A23R和S28W, A23R和S28Y,

[0253] A23W和S28I, A23W和S28L, A23W和S28M, A23W和S28N, A23W和S28P, A23W和S28Q, A23W和S28R, A23W和S28T, A23W和S28V, A23W和S28W, A23W和S28Y,

[0254] A23Y和S28I, A23Y和S28L, A23Y和S28M, A23Y和S28N, A23Y和S28P, A23Y和S28Q, A23Y和S28R, A23Y和S28T, A23Y和S28V, A23Y和S28W, A23Y和S28Y,

[0255] S23H和S28I, S23H和S28L, S23H和S28M, S23H和S28N, S23H和S28P, S23H和S28Q, S23H和S28R, S23H和S28T, S23H和S28V, S23H和S28W, S23H和S28Y,

[0256] S23M和S28I, S23M和S28L, S23M和S28M, S23M和S28N, S23M和S28P, S23M和S28Q, S23M和S28R, S23M和S28T, S23M和S28V, S23M和S28W, S23M和S28Y,

[0257] S23P和S28I, S23P和S28L, S23P和S28M, S23P和S28N, S23P和S28P, S23P和S28Q, S23P和S28R, S23P和S28T, S23P和S28V, S23P和S28W, S23P和S28Y,

[0258] S23T和S28I, S23T和S28L, S23T和S28M, S23T和S28N, S23T和S28P, S23T和S28Q, S23T和S28R, S23T和S28T, S23T和S28V, S23T和S28W, S23T和S28Y,

[0259] S23R和S28I, S23R和S28L, S23R和S28M, S23R和S28N, S23R和S28P, S23R和S28Q, S23R和S28R, S23R和S28T, S23R和S28V, S23R和S28W, S23R和S28Y,

[0260] S23W和S28I, S23W和S28L, S23W和S28M, S23W和S28N, S23W和S28P, S23W和S28Q, S23W和S28R, S23W和S28T, S23W和S28V, S23W和S28W, S23W和S28Y,

[0261] S23Y和S28I, S23Y和S28L, S23Y和S28M, S23Y和S28N, S23Y和S28P, S23Y和S28Q, S23Y和S28R, S23Y和S28T, S23Y和S28V, S23Y和S28W, 或S23Y和S28Y。

[0262] 在一个优选的实施方案中,所述变体多肽在高温具有改善的稳定性。

[0263] 在一个优选的实施方案中,所述变体多肽在高温具有改善的热稳定性和/或pH-稳定性。

[0264] 在一个优选的实施方案中,所述变体多肽包含氨基酸取代A23S和S28I以及在1-191氨基酸区域中的两个Cys残基之间的至少一个二硫桥,并且具有与亲本木聚糖酶AM24相比改善的稳定性和/或活性。

[0265] 在一个优选的实施方案中,所述变体多肽包含氨基酸取代A23S和S28I以及在1-191氨基酸区域中的两个Cys残基之间的至少一个二硫桥,并且具有与亲本木聚糖酶AM24相比改善的热稳定性和/或pH-稳定性。在一个实施方案中,所述变体多肽包含氨基酸取代A23S和S28I以及在1-191氨基酸区域中的两个Cys残基之间的至少一个二硫桥,并且当与亲本木聚糖酶AM24相比时,在至少70°C、优选地至少80°C、更优选地至少90°C的高温具有更高的木聚糖酶活性。在一个实施方案中,所述变体多肽包含氨基酸取代A23S和S28I以及在1-191氨基酸区域中的两个Cys残基之间的至少一个二硫桥,并且当与亲本木聚糖酶AM24相比时,在至少7的pH和至少70°C、优选地至少80°C、更优选地至少90°C的温度具有改善的木聚糖酶活性保留。

[0266] 在一个优选的实施方案中,所述变体多肽包含氨基酸取代A23S和S28I以及在1-30氨基酸区域中的两个Cys残基之间的至少一个二硫桥,并且具有与亲本木聚糖酶AM24相比改善的稳定性和/或活性。在一个优选的实施方案中,所述变体多肽包含氨基酸取代A23S和S28I以及在1-30氨基酸区域中的两个Cys残基之间的至少一个二硫桥,并且具有与亲本木聚糖酶AM24相比改善的热稳定性和/或pH-稳定性。在一个优选的实施方案中,所述变体多肽包含氨基酸取代A23S和S28I以及在1-30氨基酸区域中的两个Cys残基之间的至少一个二硫桥,并且当与亲本木聚糖酶AM24相比时,在至少70°C、优选地至少80°C、更优选地至少90°C的高温具有更高的木聚糖酶活性。在一个实施方案中,所述变体多肽包含氨基酸取代A23S和S28I以及在1-30氨基酸区域中的两个Cys残基之间的至少一个二硫桥,并且当与亲本木聚糖酶AM24相比时,在至少7的pH和至少70°C、优选地至少80°C、更优选地至少90°C的温度具有改善的木聚糖酶活性保留。

[0267] 在一个实施方案中,所述变体多肽包含仅一个氨基酸取代A23S或S28I以及在1-191氨基酸区域中的两个Cys残基之间的至少一个二硫桥,并且具有与亲本木聚糖酶AM24相比改善的稳定性和/或活性。在一个实施方案中,所述变体多肽包含仅一个氨基酸取代A23S或S28I以及在1-191氨基酸区域中的两个Cys残基之间的至少一个二硫桥,并且具有与亲本木聚糖酶AM24相比改善的热稳定性和/或pH-稳定性。在一个实施方案中,所述变体多肽包

含仅一个氨基酸取代A23S或S28I以及在1-191氨基酸区域中的两个Cys残基之间的至少一个二硫桥,并且当与亲本木聚糖酶AM24相比时,在至少70°C、优选地至少80°C、更优选地至少90°C的高温具有更高的木聚糖酶活性。在一个实施方案中,所述变体多肽包含仅一个氨基酸取代A23S或S28I以及在1-191氨基酸区域中的两个Cys残基之间的至少一个二硫桥,并且当与亲本木聚糖酶AM24相比时,在至少7的pH和至少70°C、优选地至少80°C、更优选地至少90°C的温度具有改善的木聚糖酶活性保留。

[0268] 在一个实施方案中,所述变体多肽包含在位置23和/或28处的氨基酸取代,并且缺少在1-191氨基酸区域中的二硫桥,并且具有与亲本木聚糖酶AM24相比改善的稳定性和/或活性。在一个实施方案中,所述变体多肽包含在位置23和/或28处的氨基酸取代,并且缺少在1-191氨基酸区域中的二硫桥,并且具有与亲本木聚糖酶AM24相比改善的热稳定性和/或pH-稳定性。在一个实施方案中,所述变体多肽包含在位置23和/或28处的氨基酸取代,并且缺少在1-191氨基酸区域中的二硫桥,并且当与亲本木聚糖酶AM24相比时,在至少70°C、优选地至少80°C、更优选地至少90°C的高温具有更高的木聚糖酶活性。在一个实施方案中,所述变体多肽包含在位置23和/或28处的氨基酸取代,并且缺少在1-191氨基酸区域中的二硫桥,并且当与亲本木聚糖酶AM24相比时,在至少7的pH和至少70°C、优选地至少80°C、更优选地至少90°C的温度具有改善的木聚糖酶活性保留。

[0269] 在一个实施方案中,所述变体多肽包含在1-191氨基酸区域中的两个Cys残基之间的至少一个二硫桥,在氨基酸链中没有任何其它取代,并且具有与亲本木聚糖酶AM24相比改善的稳定性和/或活性。与在位置23或28处,或在位置23和28处包含另外取代的变体多肽相比,这样的变体可以具有更低的稳定性和/或活性。在一个实施方案中,所述变体包含在取代的残基T3C、T30C之间的二硫桥,并且具有与亲本木聚糖酶AM24相比改善的稳定性和/或活性。在一个实施方案中,所述变体多肽包含在1-191氨基酸区域中的两个Cys残基之间的至少一个二硫桥,在氨基酸链中没有任何其它取代,并且具有与亲本木聚糖酶AM24相比改善的热稳定性和/或pH-稳定性。在一个实施方案中,所述变体多肽包含在1-191氨基酸区域中的两个Cys残基之间的至少一个二硫桥,在氨基酸链中没有任何其它取代,并且当与亲本木聚糖酶AM24相比时,在至少70°C、优选地至少80°C、更优选地至少90°C的高温具有更高的木聚糖酶活性。在一个实施方案中,所述变体多肽包含在1-191氨基酸区域中的两个Cys残基之间的至少一个二硫桥,在氨基酸链中没有任何其它取代,并且当与亲本木聚糖酶AM24相比时,在至少7的pH和至少70°C、优选地至少80°C、更优选地至少90°C的温度具有改善的木聚糖酶活性保留。

[0270] 在一个实施方案中,所述变体多肽具有木聚糖酶活性并且在除了位置23或28以外的位置处包含至少一种其它氨基酸取代。在一个实施方案中,所述至少一种其它取代进一步改善所述变体多肽的稳定性和/或活性。因而,声明的在氨基酸链中的位置23和/或28处的取代以及在1-191区域中的两个Cys残基之间的二硫桥可以就这样使用,或与另外的取代的位置一起使用以改善亲本木聚糖酶AM24的性能和稳定性。在一个实施方案中,所述变体多肽具有木聚糖酶活性并且在除了位置23或28以外的位置处包含至少一种其它氨基酸取代,其中所述至少一种其它取代进一步改善所述变体多肽的热稳定性和/或pH-稳定性和/或木聚糖酶活性保留。因而,声明的在氨基酸链中的位置23和/或28处的取代以及在1-191区域中的两个Cys残基之间的二硫桥可以就这样使用,或与另外的取代的位置一起使用以

改善亲本木聚糖酶AM24的性能和热稳定性和/或pH-稳定性。

[0271] 在一个实施方案中,与SEQ ID NO:1相比在所述变体多肽中的取代总数是3-10或4-10。在一个实施方案中,所述变体具有3个取代,或所述变体具有4个取代,或所述变体具有5个取代,或所述变体具有6个取代,或所述变体具有7个取代,或所述变体具有8个取代,或所述变体具有9个取代,或所述变体具有10个取代。

[0272] 在一个实施方案中,所述变体多肽或功能片段具有19至26kDa之间、优选地20至25kDa之间的预测分子量,包含构成所述变体多肽的核心区域的氨基酸,并且不包括从分泌型变体多肽切掉的信号序列和在所述变体多肽的成熟过程中被切掉的推定前序列。通过计算所述变体多肽或其功能片段中各个氨基酸的分子量的总和,可以确定预测的分子量。

[0273] 在一个实施方案中,与具有序列SEQ ID NO:1的多肽相比,所述变体多肽具有改善的热稳定性和/或pH-稳定性。在一个实施方案中,当与具有序列SEQ ID NO:1的多肽相比时,所述变体多肽具有改善的热稳定性和pH-稳定性。在一个实施方案中,当与具有序列SEQ ID NO:1的多肽相比时,所述变体多肽具有改善的热稳定性或改善的pH-稳定性。

[0274] 在一个实施方案中,当与具有序列SEQ ID NO:1的多肽相比时,所述变体多肽具有更高的木聚糖酶活性。在一个实施方案中,当与具有序列SEQ ID NO:1的多肽相比时,所述变体多肽具有改善的木聚糖酶活性保留。在一个实施方案中,当与具有序列SEQ ID NO:1的多肽相比时,所述变体多肽具有改善的pH和温度依赖性的木聚糖酶活性保留。

[0275] 在一个实施方案中,在1-191氨基酸区域中的两个Cys残基之间的至少一个二硫桥,以及在所述变体多肽的位置23或28处或在位置23和28处的氨基酸取代导致当与具有序列SEQ ID NO:1的多肽相比时,所述变体多肽的改善的热稳定性和/或pH-稳定性。在一个实施方案中,在所述变体多肽的1-191氨基酸区域中的两个Cys残基之间的至少一个二硫桥导致当与具有序列SEQ ID NO:1的多肽相比时,所述变体多肽的改善的热稳定性和/或pH-稳定性。

[0276] 在一个实施方案中,在所述变体多肽的位置23或28处,或在位置23和28处的氨基酸取代导致当与具有序列SEQ ID NO:1的多肽相比时,所述变体多肽的改善的热稳定性和/或pH-稳定性。

[0277] 在一个实施方案中,在1-191氨基酸区域中的两个Cys残基之间的至少一个二硫桥,以及在所述变体多肽的位置23或28处或在位置23和28处的氨基酸取代导致当与具有序列SEQ ID NO:1的多肽相比时,所述变体多肽的改善的木聚糖酶活性保留。

[0278] 在一个实施方案中,在反应条件下,其中温度为至少70°C、优选地至少80°C、更优选地至少90°C、最优选地至少96°C,与具有序列SEQ ID NO:1的多肽相比,所述变体多肽具有改善的稳定性和/或活性。在一个实施方案中,在反应条件下,其中温度为至少70°C、优选地至少80°C、更优选地至少90°C、最优选地至少96°C,当与具有序列SEQ ID NO:1的多肽相比时,所述变体多肽具有改善的热稳定性和/或pH-稳定性。在一个实施方案中,在反应条件下,其中温度为至少70°C、优选地至少80°C、更优选地至少90°C、最优选地至少96°C,当与具有序列SEQ ID NO:1的多肽相比时,所述变体多肽具有改善的木聚糖酶活性保留。在一个实施方案中,在反应条件下,其中pH为至少2、至少3、至少3.5、至少4、至少4.5、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10或至少11,与具有序列SEQ ID NO:1的多肽相比,所述变体多肽具有改善的稳定性和/或活性。在一个实施方案中,在反应条件下,其中pH为至少2、至少3、

至少3.5、至少4、至少4.5、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10或至少11,当与具有序列SEQ ID NO:1的多肽相比时,所述变体多肽具有改善的热稳定性和/或pH-稳定性。在一个实施方案中,在反应条件下,其中pH为至少2、至少3、至少3.5、至少4、至少4.5、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10或至少11,当与具有序列SEQ ID NO:1的多肽相比时,所述变体多肽具有改善的木聚糖酶活性保留。在一个实施方案中,在至少90°C的温度和/或在至少7的pH,当与亲本木聚糖酶AM24相比时,所述变体多肽具有改善的热稳定性和/或pH-稳定性。

[0279] 提供在高于环境温度的温度下保持活性的木聚糖酶对于其中在这样的工艺条件下需要木聚糖降解的应用而言是有利的。木聚糖酶的耐高温性具有增加的比活性和酶稳定性的益处。高反应温度的应用也例如防止污染物的生长,并提高质量传递速率,因为当底物浓度高时,流体粘度降低。使用具有高稳定性的木聚糖酶减少或避免了改变常用工艺条件的需要。

[0280] 此外,根据公开内容的木聚糖酶在酸性和/或中性和/或碱性条件下具有改善的稳定性和木聚糖酶活性,这例如在碱性或酸性工艺条件下的纸浆漂白中是有利的。在一个实施方案中,根据公开内容的木聚糖酶在酸性和/或中性和/或碱性条件下具有改善的热稳定性和/或pH-稳定性和/或改善的木聚糖酶活性保留,这例如在碱性或酸性工艺条件下的纸浆漂白中是有利的。

[0281] 在一个实施方案中,在木聚糖酶显示活性的水性环境中进行木聚糖降解或修饰。

[0282] 在一个实施方案中,所述木聚糖酶变体多肽随机地水解可接近的 $\beta$ -1,4-D-木糖苷键。

[0283] 在一个实施方案中,根据第一方面的变体多肽的亲本木聚糖酶是图1A和1B的AM24木聚糖酶同系物之一。在一个实施方案中,与SEQ ID NO:1的氨基酸1-191具有至少79%但小于100%氨基酸序列同一性的变体多肽的亲本木聚糖酶是图1A和1B的木聚糖酶AM24的同系物中的任一种。

[0284] 在一个实施方案中,根据第一方面的变体多肽也包含AM24木聚糖酶同系物的变体,其中所述AM24木聚糖酶同系物的变体与SEQ ID NO:1的氨基酸1-191具有至少79%但小于100%氨基酸序列同一性。

[0285] 在一个实施方案中,AM24木聚糖酶同系物的变体与SEQ ID NO:1的氨基酸1-191具有至少79%但小于100%氨基酸序列同一性,AM24木聚糖酶同系物的变体的氨基酸序列具有木聚糖酶活性,在1-191氨基酸区域中的两个Cys残基之间的至少一个二硫桥,和在位置23或28处或在位置23和28处的氨基酸取代,所述位置对应于SEQ ID NO:1的位置23和28。

[0286] 在一个实施方案中,所述AM24木聚糖酶同系物的变体具有与亲本AM24木聚糖酶同系物相比改善的稳定性和/或木聚糖酶活性。在一个实施方案中,与具有序列SEQ ID NO:1的多肽相比,所述AM24木聚糖酶同系物的变体具有改善的稳定性和/或木聚糖酶活性。在一个实施方案中,当与亲本AM24木聚糖酶同系物相比时,所述AM24木聚糖酶同系物的变体具有改善的热稳定性和/或pH-稳定性和/或改善的木聚糖酶活性保留。在一个实施方案中,当与具有序列SEQ ID NO:1的多肽相比时,所述AM24木聚糖酶同系物的变体具有改善的热稳定性和/或pH-稳定性和/或改善的木聚糖酶活性保留。

[0287] 在一个实施方案中,在反应条件下,其中温度为至少70°C、优选地至少80°C、更优

选地至少90℃、最优选地至少96℃,与具有序列SEQ ID NO:1的多肽相比和/或与亲本AM24木聚糖酶同系物相比,所述AM24木聚糖酶同系物的变体具有改善的稳定性和/或木聚糖酶活性。在一个实施方案中,在反应条件下,其中pH为至少2、至少3、至少3.5、至少4、至少4.5、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10或至少11,与具有序列SEQ ID NO:1的多肽相比和/或与亲本AM24木聚糖酶同系物相比,所述AM24木聚糖酶同系物的变体具有改善的稳定性和/或木聚糖酶活性。在一个实施方案中,在反应条件下,其中温度为至少70℃、优选地至少80℃、更优选地至少90℃、最优选地至少96℃,当与具有序列SEQ ID NO:1的多肽相比时和/或当与亲本AM24木聚糖酶同系物相比时,所述AM24木聚糖酶同系物的变体具有改善的热稳定性和/或pH-稳定性和/或改善的木聚糖酶活性保留。在一个实施方案中,在反应条件下,其中pH为至少2、至少3、至少3.5、至少4、至少4.5、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10或至少11,当与具有序列SEQ ID NO:1的多肽相比时和/或当与亲本AM24木聚糖酶同系物相比时,所述AM24木聚糖酶同系物的变体具有改善的热稳定性和/或pH-稳定性和/或改善的木聚糖酶活性保留。

[0288] 在本公开内容的第二方面的一个实施方案中,本发明的木聚糖酶变体多肽是重组多肽的一部分,所述重组多肽是融合蛋白。除了木聚糖酶的活性之外,所述融合蛋白还可以具有其它催化或结合活性。在一个实施方案中,所述木聚糖酶的变体多肽用接头连接至另外的肽和/或多肽。

[0289] 在一个实施方案中,所述融合蛋白包含有利于重组多肽在宿主细胞内和外易位的信号序列。在一个实施方案中,所述信号序列具有或不具有载体多肽序列。在一个实施方案中,所述融合蛋白包含碳水化合物结合部分(CBM)作为载体多肽,其任选地是源自与木聚糖酶变体多肽相同的或不同的生物体的另一种蛋白或酶的片段。所述信号序列和载体多肽可以源自相同宿主,或可替换地源自不同宿主。在一个实施方案中,所述融合蛋白包含源自相同宿主细胞的信号序列,在所述宿主细胞中生产包含木聚糖酶变体多肽的融合蛋白。在一个实施方案中,所述信号序列源自相同的丝状真菌宿主,在其中生产包含木聚糖酶变体多肽的融合蛋白。在另一个实施方案中,所述信号序列源自另一个生物体。

[0290] 在一个实施方案中,所述融合蛋白包含促进纯化的氨基酸序列,诸如His-标签或聚组氨酸标签,其中在标签中包含一串组氨酸残基。

[0291] 在一个实施方案中,所述融合蛋白包含具有酶活性的氨基酸序列,所述具有酶活性的序列不是与编码具有木聚糖酶活性的变体多肽的氨基酸序列相同的序列。

[0292] 在一个实施方案中,所述融合蛋白包含碳水化合物结合部分氨基酸序列,其提供了具有结合亲和力的融合蛋白。

[0293] 在一个实施方案中,所述酶组合物进一步包含:

[0294] a. 至少一种稳定剂,其选自多元醇、丙二醇、聚乙二醇、己二醇、甘油、糖、糖醇、多糖、乳酸、肽、表面活性剂或它们的组合;或至少一种防腐剂或缓冲剂,其选自有机酸、柠檬酸、抗坏血酸、苯甲酸及其盐和衍生物、苯甲酸钠、苯甲酸盐、羟基苯甲酸盐和衍生物、磷酸盐、山梨酸、山梨酸钠、山梨酸盐、盐、氯化钠或氯化钾、1,2-苯并异噻唑啉-3-酮(BIT)或它们的组合;

[0295] b. 任选的至少一种抑制剂,其选自硼酸、硼酸衍生物、芳族硼酸酯、4-甲酰基苯基硼酸、苯基硼酸衍生物、具有抑制功能的肽化合物或它们的组合;

[0296] c.任选的至少一种酶,其选自蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶、脂肪酶、木聚糖酶、甘露聚糖酶、角质酶、酯酶、植酸酶、核酸酶、果胶酶、果胶分解酶、果胶酸裂解酶、糖酶、阿拉伯糖酶、半乳聚糖酶、黄原胶酶、木糖葡聚糖酶、漆酶、过氧化物酶和氧化酶(有或没有介质)或它们的组合;和

[0297] d.任选的至少一种填充剂,其选自麦芽糊精、面粉、氯化钠、硫酸盐、硫酸钠或它们的组合。

[0298] 组分a-d为本发明的酶组合物提供改善的性能。所述酶组合物与组分a-d相容并改善所述酶组合物在各种用途中的适用性。盐诸如氯化钠和硫酸钠充当干燥助剂。

[0299] 在一个实施方案中,包含木聚糖酶变体多肽和另外的酶的酶组合物有利于提供协同效应。当包含木聚糖酶变体多肽的本发明酶组合物用于例如纸浆或青贮饲料加工或饲料或食品原料制备时,需要这样的另外的酶。在纸浆或青贮饲料加工中与木聚糖酶一起起作用的特别有利的协同酶是纤维素酶、半纤维素酶、植酸酶和淀粉酶。在饲料或食品原料制备一起起作用的特别有利的协同酶是纤维素酶、半纤维素酶、植酸酶和淀粉酶。

[0300] 在一个实施方案中,所述酶组合物以液体组合物或固体组合物的形式提供,诸如溶液、分散体、糊剂、粉末、颗粒、团粒、包衣团粒、片剂、饼、晶体、晶体浆、凝胶或丸粒。

[0301] 在一个实施方案中,所述酶制品或所述酶组合物进一步包含其它合适的添加剂,其选自漂白剂、抗腐蚀剂、增效剂、抗再沉积剂、光学增亮剂、染料、颜料、香料、苛性剂、研磨剂和防腐剂。

[0302] 本公开内容进一步涉及使用本文公开的酶组合物降解木聚糖的用途和方法。

[0303] 在一个实施方案中,提供了一种重组宿主细胞,其中所述宿主细胞选自:

[0304] a.丝状真菌细胞,其来自于子囊菌门(Ascomycota)、盘菌亚门(Pezizomycotina);优选地来自粪壳菌纲(Sordariomycetes)或散囊菌纲(Eurotiomycetes)、肉座菌亚纲(Hypocreomycetidae)或粪壳菌亚纲(Sordariomycetidae)或散囊菌亚纲(Eurotiomycetidae)、肉座菌目(Hypocreales)或粪壳菌目(Sordariales)或散囊菌目(Eurotiales)、肉座菌科(Hypocreaceae)或丛赤壳科(Nectriaceae)或毛壳菌科(Chaetomiaceae)或曲霉科(Aspergillaceae)、木霉属(*Trichoderma*) (肉座菌属的无性型)或镰刀菌属(*Fusarium*)或支顶孢属(*Acremonium*)或腐质霉属(*Humicola*)或*Thermothelomyces*或毁丝霉属(*Myceliophthora*)或曲霉属(*Aspergillus*)的成员;

[0305] 更优选地来自物种里氏木霉(红褐肉座菌(*Hypocrea jecorina*))、桔绿木霉(*T.citrinoviridae*)、长枝木霉(*T.longibrachiatum*)、绿木霉(*T.virens*)、哈茨木霉(*T.harzianum*)、棘孢木霉(*T.asperellum*)、黄绿木霉(*T.atroviridae*)、拟里氏木霉(*T.parareesei*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、禾谷镰刀菌(*F.graminearum*)、假禾谷镰刀菌(*F.pseudograminearum*)、威尼斯镰刀菌(*F.venenatum*)、产黄支顶孢(*Acremonium chrysogenum*) (产黄头孢霉(*Cephalosporium chrysogenum*))、特异腐质霉(*Humicola insolens*)、灰腐质霉(*Humicola grisea*)、*Thermothelomyces thermophilus*、嗜热毁丝霉(*Myceliophthora thermophila*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、黑曲霉泡盛变种(*Aspergillus niger* var. *awamori*)和米曲霉(*Aspergillus oryzae*);

[0306] b.细菌细胞,优选革兰氏阳性杆菌诸如枯草芽孢杆菌(*B.subtilis*)、地衣芽孢杆菌(*B.licheniformis*)、巨大芽孢杆菌(*B.megaterium*)、解淀粉芽孢杆菌

(*B. amyloliquefaciens*)、短小芽孢杆菌 (*B. pumilus*)，革兰氏阴性细菌诸如大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、放线菌目 (*actinomycetales*) 诸如链霉菌属 (*Streptomyces*)；和

[0307] c. 酵母，诸如酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、巴斯德毕赤酵母 (*Pichiapastoris*)、解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*)；

[0308] 优选地，所述宿主细胞选自丝状真菌细胞诸如木霉属，或选自革兰氏阳性杆菌诸如芽孢杆菌属；最优选地选自里氏木霉或选自枯草芽孢杆菌或短小芽孢杆菌或地衣芽孢杆菌。

[0309] 在一个实施方案中，所述重组宿主细胞选自丝状真菌细胞 (例如木霉属或里氏木霉、曲霉属或米曲霉或黑曲霉、*Thermothelomyces* 或 *Thermothelomyces heterothallica* 或腐质霉属或特异腐质霉或镰刀菌属或镶片镰刀菌)、细菌细胞、优选革兰氏阳性芽孢杆菌 (例如枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、短小芽孢杆菌)、革兰氏阴性细菌 (例如大肠杆菌)、放线菌目 (例如链霉菌属、柔曲野野村氏菌) 或酵母 (例如酿酒酵母、巴斯德毕赤酵母、解脂耶氏酵母)。

[0310] 所述重组宿主细胞可以用于生产木聚糖酶变体多肽并含有编码它的多核苷酸。所述重组宿主细胞可以可操作地连接至一种或多种指导木聚糖酶变体多肽的生产的控制序列。所述重组宿主细胞还可用于制备具有不同性能的木聚糖酶变体。例如，可以选择宿主细胞，其提供有利于稳定性或活性的翻译后修饰，或者其有利于在宿主细胞中生产的木聚糖酶变体多肽的后加工。

[0311] 在一个实施方案中，所述宿主细胞是非致病性的。这对于将宿主细胞或其产物用于动物饲料是特别有利的。

[0312] 在第六方面的一个实施方案中，所述含有木聚糖的材料是基于植物的材料或部分地基于植物的材料。在另一个实施方案中，所述含有木聚糖的材料是回收的废纸；机械纸浆、化学纸浆、半化学纸浆、牛皮纸或其它造纸纸浆、木材纸浆或非木材纸浆，或经过沤麻工艺的纤维；或含有瓜尔胶或槐豆胶的材料。

[0313] 在一个实施方案中，将本发明的木聚糖酶变体多肽或本发明的酶组合物用于纸浆加工，如纸浆漂白、促进纤维素水解和提高纸浆的精制效率。本发明的木聚糖酶变体多肽可用于促进木质素从纸浆中的释放并减少有害漂白剂诸如基于氯的化学品和亚硫酸氢钠的使用。

[0314] 在一个实施方案中，将根据本公开内容的木聚糖酶变体多肽或融合蛋白或酶组合物用于生物质加工和生物质水解以及用于排水改进。本发明的木聚糖酶变体多肽的用途可用于产生生物燃料，其中木聚糖酶可以用于将木质纤维素原料从木质纤维素生物质转化为生物燃料诸如乙醇。

[0315] 在一个实施方案中，其中将本发明的木聚糖酶变体多肽或本发明的酶用于动物饲料中，所述动物是单胃动物或反刍动物。在另一个实施方案中，所述动物是肉鸡、产蛋鸡、猪、仔猪、火鸡或水产养殖生物诸如鱼。

[0316] 在一个实施方案中，所述饲料是动物饲料并且包含谷物和谷类诸如玉米和豆粕，或小麦、燕麦、大麦和/或稻米或由其组成。在一个实施方案中，其中将本发明的木聚糖酶变体多肽或本发明的酶用于动物饲料中，在饲料中提供至少一种含有木聚糖的产物或副产物。与不含木聚糖酶变体多肽的饲料相比，在其中使用本发明的木聚糖酶变体多肽或本发

明的酶的饲料具有改善的营养价值。本发明的酶组合物和本发明的木聚糖酶变体多肽会降解在饲料中存在的木聚糖,并从而使其更容易被动物消化。具体地,本发明的酶组合物和本发明的木聚糖酶变体多肽可以消化在饲料(例如含有玉米大豆的饲料)中存在的木聚糖,这对肠道微生物具有有益作用,并因此对动物的性能具有有益作用。在其中使用本发明的木聚糖酶变体多肽或本发明的酶的动物饲料可以配制为湿组合物或干组合物的形式。

[0317] 在一个实施方案中,其中将根据本公开内容的变体多肽或融合蛋白或酶组合物用于食品工业工艺或商业应用,所述过程或应用包括例如咖啡、植物油、木糖(用于转化为木糖醇)和淀粉的提取、植物纤维源的脱胶、烘焙和生面团调节工业(例如面包制作)和饮料工业(酒精发酵)。

[0318] 使用本发明的变体多肽、本发明的融合蛋白和本发明的酶组合物是有利的,例如,在烘焙中,其中它将水不溶性木聚糖转化为可溶形式,增加水的结合,导致生面团硬度降低和体积增加。本发明的融合蛋白和本发明的酶组合物例如在加工和制造豆奶产品中也是有利的,因为它会改善豆奶产品的产量、颜色、蛋白含量和味道。使用本发明的变体多肽、本发明的融合蛋白和本发明的酶组合物在饮料工业中是有利的,因为它会改善饮料诸如果汁和酒的澄清过程。

[0319] 实施例

[0320] 实施例1.AM24(截短的Nf\_Xyn11A)变体设计

[0321] 从嗜热AM24木聚糖酶(SEQ ID NO:1)设计变体,目的是进一步提高其稳定性。AM24是柔曲野野村氏菌Xyn11A(Nf\_Xyn11A)的截短形式的名称。AM24含有全长野生型Nf\_Xyn11A的氨基酸D44-L263,且因此其碳水化合物结合结构域(CBM)和全长野生型Nf\_Xyn11A的大部分接头区域已经被删除(Leskinen等人,2005;Paloheimo等人,2007)。

[0322] 在变体中,在AM24的位置3和30处的天然氨基酸被改为半胱氨酸(C),以在N-末端构建二硫(SS)桥。在分子N-端部分中的另外两个位置也设计了突变,即氨基酸位置23和/或28处。

[0323] 表1含有设计的变体的列表,包括变体的名称、与AM24相比的变体突变以及氨基酸和核苷酸序列的SEQ ID NO。表达质粒/盒的构建细节描述于实施例3中。

[0324] 表1.设计的AM24变体

[0325]

木聚糖酶/变体代码	氨基酸序列 SEQ ID NO:	核苷酸序列 SEQ ID NO:	突变
AM24	1	48 <sup>(a)</sup>	无
C31-4	2	49	T3C、A23S、S28I、T30C
AM24-CC	3	50	T3C、T30C
AM24-CC+AS	4	51	T3C、A23S、T30C
AM24-CC+SI	5	52	T3C、T30C、S28I
AM24-AS	6	53	A23S
AM24-SI	7	54	S28I
AM24-AS+SI	8	55	A23S、S28I
AM24	1	56 <sup>(b)</sup>	无
C31-4	2	57	T3C、A23S、S28I、T30C
NFX1	9	58	T3C、A23Y、S28I、T30C
NFX2	10	59	T3C、A23H、S28I、T30C
NFX3	11	60	T3C、A23T、S28I、T30C
NFX4	12	61	T3C、A23M、S28I、T30C
NFX5	13	62	T3C、A23R、S28I、T30C
NFX6	14	63	T3C、A23S、S28L、T30C
NFX7	15	64	T3C、A23S、S28R、T30C
NFX8	16	65	T3C、A23S、S28M、T30C
NFX9	17	66	T3C、A23S、S28Q、T30C
NFX10	18	67	T3C、A23S、S28Y、T30C
NFX11	19	68	T3C、A23S、S28W、T30C
NFX12	20	69	T3C、A23S、S28T、T30C
NFX13	21	70	T3C、A23S、S28N、T30C
NFX14	22	71	T3C、A23S、S28V、T30C
NFX15	23	72	T3C、A23R、S28L、T30C
NFX16	24	73	T3C、A23R、S28Q、T30C
NFX17	25	74	T3C、A23H、S28L、T30C
NFX18	26	75	T3C、A23T、S28L、T30C
NFX21	27	76	T3C、A23W、S28I、T30C

[0326]	NFX22	28	77	T3C、A23P、S28I、T30C
	NFX23	29	78	T3C、A23S、S28P、T30C

[0327] <sup>(a)</sup>从盒pALK1502表达核苷酸序列SEQ ID NO:48,详细描述于Paloheimo等人(2007)。

[0328] <sup>(b)</sup>与SEQ ID NO:48相比,核苷酸序列SEQ ID NO:56含有在密码子中的一些微小修饰,但从SEQ ID NO:48和SEQ ID NO:56编码的氨基酸序列是相同的。

[0329] 实施例2.近NfXyn11A同系物的变体设计

[0330] 从非冗余蛋白序列的NCBI蛋白数据库(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>)中对与Nf Xyn11A(AM24)核心区域具有最接近同源性的序列进行blastp(蛋白-蛋白BLAST)搜索.Nf\_Xyn11A核心的氨基酸序列(来自SEQ ID NO:1的氨基酸1-191,代表根据Leskinen等人,2005的成熟核心区域)用作查询序列。算法参数如下:最大目标序列:100;期望阈值:10;字长:6;矩阵BLOSUM62;缺口成本:存在:11,延伸:1;组成调整:条件组成评分矩阵调整。下载100种同系物的序列,并使用Clustal Omega多序列比对用默认设置(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)进行比对。该序列与AM24核心序列的最低同一性为79.0%。

[0331] 从AM24核心和AM24的100种最接近同系物制备同一性矩阵(系统树)。使用Clustal Omega网站(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)中的系统树程序从比对的序列制备系统树,并显示在图1A和1B中。包括每个木聚糖酶序列的数据库代码。在比对中使用了默认设置。

[0332] 从100种AM24木聚糖酶同系物中,选择6种木聚糖酶在里氏木霉中生产。此外,设计了六种AM24同系物中每一种的两种变体。选择用于生产的木聚糖酶如表2所示。基于以上六种氨基酸序列与AM24序列(SEQ ID NO:1)的比对,从N和/或C端末端修剪六种AM24同系物的氨基酸序列以代表每种木聚糖酶的推定核心区域。AM24与选择进行生产的六种AM24木聚糖酶同系物的修剪(核心)序列的比对如图2所示。AM24核心序列包括来自SEQ ID NO:1的氨基酸1-191。

[0333] 从上述六种木聚糖酶中的每一种的核心序列设计了两种类型的AM24木聚糖酶同系物变体。在第一种类型的变体中,通过将位置3和30中的天然氨基酸改为半胱氨酸,将SS桥加入木聚糖酶的N-端末端中。使用与AM24变体C31-4的设计相同的策略来设计第二种类型的变体(实施例1,表1)。这些AM24同系物变体含有SS桥(在位置3和30中的C),并且另外,将位置23处的氨基酸改为丝氨酸并将位置28处的氨基酸改为异亮氨酸,当这些不是在这些位置处的最初天然氨基酸时。设计的变体和所做的突变的细节列于表2中。

[0334] 表2.选择用于生产的AM24同系物以及由它们设计的变体。列出了木聚糖酶/变体代码、数据库登录号、选择用于生产的木聚糖酶氨基酸序列(核心区域)的SEQ ID NO,和在表达盒中包含的核苷酸序列的SEQ ID NO以及在变体序列中的突变。

[0335]

木聚糖酶/变体 代码	数据库登录号	生产的氨基酸序列 SEQ ID NO:	表达的核苷酸 序列 SEQ ID NO:	突变
XB1	WP_161479642	30	79	无
XB1M1		31	80	A3C、E30C
XB1M2		32	81	A3C、A23S、S28I、E30C
XB2	WP_159945040	33	82	无
XB2M1		34	83	A3C、E30C
XB2M2		35	84	A3C、S28I、E30C
XB3	WP_132341876	36	85	无
XB3M1		37	86	A3C、E30C
XB3M2		38	87	A3C、A23S、S28I、E30C
XB4	WP_053672865	39	88	无
XB4M1		40	89	V3C、T30C
XB4M2		41	90	V3C、A23S、S28I、T30C
XB5	WP_119728792	42	91	无
XB5M1		43	92	P3C、E30C
XB5M2		44	93	P3C、A23S、S28I、E30C
XB6	3MF6_A	45	94	无
XB6M1		46	95	T3C、T30C
XB6M2		47	96	T3C、A23S、S28I、T30C

[0336] 以上氨基酸序列 (SEQ ID NO: 30、33、36、39、42和45) 与AM24核心区域 (来自SEQ ID NO: 1的氨基酸1-191) 的同一性百分比为79.0至96.3%。使用EMBOSS Needle逐对序列比对程序 ([https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\\_needle/](https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/)) 用默认设置 (矩阵BLOSUM62, 缺口开放10, 缺口延伸0.5, 末端缺口罚分为假, 末端缺口开放10, 末端缺口延伸0.5) 创建同一性矩阵。同一性百分比矩阵如表3所示。

[0337] 表3. 选择用于生产的AM24同系物的同一性百分比Needle逐对序列比对矩阵和作为变体设计的主链。显示了序列之间的同一性百分比。将AM24的核心区域 (SEQ ID NO: 1的氨基酸1-191) 与选择用于在里氏木霉中生产的同系物的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 30、33、36、39、42、45) 进行比对。

[0338]

	AM24	XB1	XB2	XB3	XB4	XB5	XB6
1: AM24	100.0	79.4	81.7	79.0	79.2	81.4	96.3
2: XB1	79.4	100.0	79.9	87.2	79.0	87.1	75.8
3: XB2	81.7	79.9	100.0	83.1	78.6	86.1	78.0
4: XB3	79.0	87.2	83.1	100.0	81.6	88.2	75.4
5: XB4	79.2	79.0	78.6	81.6	100.0	83.6	75.5
6: XB5	81.4	87.1	86.1	88.2	83.6	100.0	77.8
7: XB6	96.3	75.8	78.0	75.4	75.5	77.8	100.0

[0339] 实施例3.用于生产木聚糖酶和木聚糖酶变体的表达盒和质粒的构建

[0340] 从两种构建体表达AM24.SEQ ID NO:48的核苷酸序列对应于在表达盒pALK1502中包含的核苷酸序列(Paloheimo等人,2007)。在SEQ ID NO:56中,AM24编码基因中的内部NruI位点已经被沉默,并且在密码子中也存在少量其它修饰(更多细节,参见序列列表)。但是,SEQ ID NO:48和SEQ ID NO:56编码相同的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)。使用pALK1502作为模板并使用限制/连接方法通过PCR合成AM24变体,或者作为合成基因订购AM24变体。所有编码AM24同系物及其变体的基因都作为合成基因订购。基于里氏木霉密码子使用来选择在订购的合成的AM24变体的氨基酸取代(即突变)中使用的密码子。根据里氏木霉密码子使用对编码AM24同系物的基因的核苷酸序列进行密码子优化。为了提高细菌木聚糖酶的收率,将成熟木聚糖酶编码序列与表达构建体中的载体多肽编码序列融合。使用的载体是里氏木霉纤维二糖水解酶II(CBHII)CBD(A)和来自天然CBHII的铰链(B)区域,如在Paloheimo等人(2007)中对pALK1502所描述。将编码Kex2蛋白酶切割位点(RDKR)的序列插入载体和木聚糖酶编码序列之间。在表达盒中包含的木聚糖酶核苷酸序列的SEQ ID NO列于表1和2中。使用里氏木霉cbh1(纤维二糖水解酶1)启动子表达遗传构建体。使用里氏木霉cbh1或cbh2终止子来终止转录。编码构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)乙酰胺酶的天然基因或合成基因作为转化标志物被包含在表达构建体中。

[0341] 实施例4.在里氏木霉中生产木聚糖酶和木聚糖酶变体

[0342] 如Penttilä等人(1987)和Karhunen等人(1993)所述,将木聚糖酶表达构建体转化至里氏木霉原生质体中,作为从表达质粒分离的表达盒或作为表达质粒。从每种转化,挑选3-20个转化体并在马铃薯葡萄糖(PD)斜面中形成孢子。来自PD斜面的孢子用于接种摇瓶培养物(50mL体积)。在纤维素酶诱导培养基中培养7天(30℃,250rpm)。在培养结束后,取样,通过离心(4000rpm,10分钟)除去真菌菌丝体,并收集培养物上清液用于分析。

[0343] 使用SDS-PAGE分析和活性测定来分析木聚糖酶生产。根据Bailey等人(1992)测量木聚糖酶活性,但是使用pH7(而不是5.3)和70℃(而不是50℃)作为反应条件。

[0344] 在SDS-PAGE凝胶中,在所有样品中都可见相应的木聚糖酶和木聚糖酶变体的预期分子量的蛋白带。所有木聚糖酶在凝胶中还可见一种或多种糖基化形式。

[0345] 利用所使用的分析方法,可以从除XB6及其变体之外的所有生产的木聚糖酶和木聚糖酶变体的培养物上清液测量木聚糖酶活性。当从XB6及其变体的培养物上清液测量时,未获得木聚糖酶活性或活性低于检测水平。

[0346] 实施例5.木聚糖酶和木聚糖酶变体的分析

[0347] 使用三种不同的分析方法来研究培养物上清液中的木聚糖酶和木聚糖酶变体的稳定性:

[0348] 1)使用Prometheus NT.48(NanoTemper Technologies GmbH)分析所有木聚糖酶的解折叠温度。从含有在0.2M甘氨酸-NaOH缓冲液(其pH被调至10)中的纯化木聚糖酶的样品进行AM24和AM24变体的分析。样品缓冲液的pH为9.92(样品pH范围为4.32至4.38)。直接从培养物上清液中分析AM24同系物及其变体的解折叠温度。在分析中使用的温度范围为20至110℃(加热速率+1℃/分钟)。此外,还在200mM乙酸钠缓冲液中在低pH(3.5和4.5)分析了AM24和AM24变体的解折叠温度。

[0349] 2)使用改进的Bailey等人(1992)活性测定方法如下分析所选样品的热稳定性:所

用反应时间为5分钟和60分钟,反应pH为7,反应温度为70、80、90和96℃。另外,对AM24和AM24变体样品,使用5分钟反应时间在70、80、90和96℃和60分钟反应时间在70和80℃,在pH 8和9分析热稳定性。

[0350] 3) 将样品在pH 11、90℃温育60分钟以后,使用5分钟反应时间在pH7、70℃,测量AM24和AM24变体样品的残留木聚糖酶活性。

[0351] AM24木聚糖酶在高pH(缓冲液pH调至10)的解折叠温度为84.8℃(表4)。除NFX23外,所有AM24变体具有比AM24更高的解折叠温度。AM24变体在高pH的解折叠温度为87.6-104.3℃(NFX23为67.5℃)。

[0352] 表4. AM24木聚糖酶和AM24木聚糖酶变体的解折叠温度。

木聚糖酶/变体代码	突变	解折叠温度
AM24	无	84.8
C31-4	T3C、A23S、S28I、T30C	104.2
AM24-CC	T3C、T30C	97.4
AM24-CC+AS	T3C、A23S、T30C	100.6
AM24-CC+SI	T3C、T30C、S28I	102.0
AM24-AS	A23S	87.7
AM24-SI	S28I	85.8
AM24-AS+SI	A23S、S28I	88.1
[0353] NFX1	T3C、A23Y、S28I、T30C	95.2
NFX2	T3C、A23H、S28I、T30C	96.3
NFX3	T3C、A23T、S28I、T30C	102.9
NFX4	T3C、A23M、S28I、T30C	99.4
NFX5	T3C、A23R、S28I、T30C	102.0
NFX6	T3C、A23S、S28L、T30C	100.7
NFX7	T3C、A23S、S28R、T30C	101.8
NFX8	T3C、A23S、S28M、T30C	103.0
NFX9	T3C、A23S、S28Q、T30C	101.7
NFX10	T3C、A23S、S28Y、T30C	102.2

[0354]	NFX11	T3C、A23S、S28W、T30C	102.4
	NFX12	T3C、A23S、S28T、T30C	102.5
	NFX13	T3C、A23S、S28N、T30C	97.6
	NFX14	T3C、A23S、S28V、T30C	104.3
	NFX15	T3C、A23R、S28L、T30C	98.6
	NFX16	T3C、A23R、S28Q、T30C	98.8
	NFX17	T3C、A23H、S28L、T30C	92.0
	NFX18	T3C、A23T、S28L、T30C	99.5
	NFX21	T3C、A23W、S28I、T30C	93.9
	NFX22	T3C、A23P、S28I、T30C	87.6
	NFX23	T3C、A23S、S28P、T30C	67.5

[0355] 在pH 3.5,AM24的解折叠温度为61.4℃,在pH 4.5为75.2℃。AM24变体C31-4在低pH的解折叠温度明显优于AM24,在pH 3.5为84.1℃而在pH4.5为105.2℃。该结果表明,所描述的突变提高了亲本木聚糖酶在宽pH范围内的稳定性。

[0356] AM24同系物在高pH(缓冲液pH调至10)的解折叠温度为63.6至78.1℃(表5)。当添加SS桥时,AM24同系物变体的解折叠温度得到改善。但是,当将SS桥和另外的一个或多个突变包含在位置23和/或28处时,获得解折叠温度的甚至更高的改善。与相应的亲本木聚糖酶相比,XB3M2的解折叠温度的最高增量为+26.8℃,XB5M2的解折叠温度的最高增量为+33.5℃(表5)。

[0357] 表5. AM24同系物及其变体的解折叠温度。

木聚糖酶/变体代码	突变	解折叠温度	
[0358]	XB1	无	63.6 <sup>a)</sup>
	XB1M1	A3C、E30C	73.4
	XB1M2	A3C、A23S、S28I、E30C	79.3
	XB2	无	78.1
	XB2M1	A3C、E30C	93.7
	XB2M2	A3C、S28I、E30C	96.2

[0359]	XB3	无	66.2
	XB3M1	A3C、E30C	87.6
	XB3M2	A3C、A23S、S28I、E30C	93.0
	XB4	无	77.4
	XB4M1	V3C、T30C	85.3
	XB4M2	V3C、A23S、S28I、T30C	93.7
	XB5	无	63.7
	XB5M1	P3C、E30C	88.0
	XB5M2	P3C、A23S、S28I、E30C	97.2
	XB6	无	73.1 <sup>b)</sup>
	XB6M1	T3C、T30C	83.0 <sup>b)</sup>
	XB6M2	T3C、A23S、S28I、T30C	92.0 <sup>b)</sup>

[0360] <sup>a)</sup>XB1的生产收率低,这可能导致结果不准确。

[0361] <sup>b)</sup>对于所用方法,没有木聚糖酶活性或活性低于检测水平。

[0362] 从AM24及其一组选定的变体的培养物上清液中分析热稳定性:仅具有SS桥形成突变的变体(T3C和T30C;AM24-CC),没有SS桥形成突变但在位置23和/或28处具有突变的变体(AM24-AS、AM24-SI、AM24-AS+SI),和在位置23和/或28处具有突变并伴有形成SS桥的半胱氨酸突变的变体(AM24-CC+AS、AM24-CC+SI、C31-4)。在pH7并使用5分钟和60分钟反应时间进行的分析的结果分别显示在图3A和3B中。在最高温度(90和/或96°C),检测到AM24及其变体的热稳定性之间的明显差异,AM24变体比AM24更热稳定。在位置23或28处的突变提高了AM24的热稳定性。当这两种突变组合时,得到热稳定性的进一步改善。当在N-末端处包含SS桥时,得到AM24的热稳定性的明显改善。但是,当将位置23或28突变和SS桥组合在一个分子中时,检测到热稳定性的进一步改善。当将位置23和28突变与SS桥组合时,实现了最佳的热稳定性。

[0363] 使用5分钟和60分钟反应时间,在pH 8和9的较高pH值进一步分析AM24和变体C31-4的热稳定性。在5分钟测定中的反应温度为70、80、90和96°C(图4A和4C),在60分钟测定中的反应温度为70和80°C(图4B和4D)。在pH 8进行的分析中,C31-4在5分钟测定中的热稳定性明显优于AM24在最高试验温度90和96°C(图4A)和在60分钟测定中在80°C(图4B)的热稳定性。在pH9分析中,C31-4在5分钟测定中的热稳定性在所有试验温度(图4C)和在60分钟测定中在80°C(图4D)明显更好。在进行的第三个热稳定性试验中,在pH 11、90°C温育样品60分钟以后,从AM24和C31-4培养物上清液中测量残余木聚糖酶活性。使用Britton-Robinson和磷酸钠两种缓冲系统进行分析。使用pH7、70°C、5分钟反应时间测量残留木聚糖酶活性。C31-4比AM24更能抵抗恶劣条件。在Britton-Robinson缓冲液中大约20%(样品BR/1和BR/2)的原始活性和在磷酸钠缓冲液中大约26%(样品NaP/1和NaP/2)的原始活性留在C31-4样品中,而仅2-3%的原始活性留在AM24样品中(图5)。

[0364] 实施例6.用于应用研究的AM24和C31-4木聚糖酶的生产

[0365] 将生产AM24或C31-4的木霉菌株在30L生物反应器中培养以生产用于应用试验的材料。在纤维素酶诱导培养基中进行发酵作为补料分批培养。发酵完成后,通过过滤步骤除去菌丝体,并收集培养物上清液并浓缩。所得酶制品用于漂白试验。

[0366] 所生产的AM24和C31-4的酶制品包含等量的相应木聚糖酶,且所述酶制品中总蛋白的一半以上由各自的木聚糖酶组成。在漂白试验中使用等量的AM24和C31-4木聚糖酶。

[0367] 实施例7.在高pH和温度使用木聚糖酶预处理对桉树牛皮纸纸浆的漂白

[0368] 使用短漂白序列XD<sub>0</sub>E(X,酶;D<sub>0</sub>(D零),二氧化氯(ClO<sub>2</sub>);E,用氢氧化钠提取)来对比AM24和C31-4木聚糖酶在高温(90°C)的预处理的漂白效率。在两个pH值进行预处理:pH~8和pH~10。所用纸浆是来自亚洲工厂的氧脱木质化的桉树牛皮纸纸浆,具有卡伯值15.5和亮度38.0ISO%。使用恒定的ClO<sub>2</sub>剂量(0.2X卡伯值)。在漂白反应器中进行漂白试验。将锚型Kemu反应器(批大小0.15-1.0kg,T最大值90°C,稠度25%)用在X-和E-阶段以及在D<sub>0</sub>-阶段的空气加热的Hellsten反应器(批大小0.3-0.8kg,T最大值85°C,稠度12%)中。

[0369] 每吨纸浆使用大约2g总蛋白。两种木聚糖酶产品含有相似相对量的木聚糖酶蛋白(实施例6)。酶处理时间为60分钟。

[0370] 在酶阶段之后,通过添加热水并立即将纸浆悬浮液的pH调至pH值2.5-3来将酶灭活。在E阶段之后分析亮度和卡伯值。

[0371] 表6.使用桉树纸浆的XD<sub>0</sub>E漂白结果。在REF样品中,未添加酶。在90°C进行酶预处理,使用60分钟反应时间。aCl表示活性氯;ΔBr表示亮度之差;且Δκ表示卡伯值之差。

	pH 8			pH 11		
	REF	AM24	C31-4	REF	AM24	C31-4
X						
初始 pH	8.3	8.3	8.6	11.0	10.6	10.6
最终 pH	8.3	8.3	8.3	10.4	10.4	10.5
卡伯值	15.1	14.4	14.7	14.8	16.6	16.4
亮度, %	41.5	42.2	41.9	42.0	42.6	42.4
D <sub>0</sub>						
ClO <sub>2</sub> 浓度, kg aCl/t	27.9	27.9	27.9	27.9	27.9	27.9
初始 pH	2.7	2.6	2.3	2.6	2.6	2.5
最终 pH	1.8	1.6	1.6	1.9	1.6	1.6
亮度, %	55.6	56.1	57.0	56.1	55.3	57.8
E1						
初始 pH	10.8	11.0	10.9	11.0	11.0	10.9
最终 pH	10.9	10.9	10.9	11.0	10.9	10.9
卡伯值	6.7	6.4	5.7	6.2	6.4	5.9
亮度, %	56.0	57.8	58.8	57.1	56.8	59.8
aCl 浓度/ΔBr, kg/t*	1.53	1.41	1.34	1.46	1.49	1.28
aCl 浓度/Δκ, kg/t*	3.14	3.06	2.86	3.00	3.07	2.91

[0372] 用两种木聚糖酶AM24和C31-4的预处理会提高桉树纸浆的亮度。在pH 8用C31-4预处理的纸浆的亮度比参考纸浆高2.8个单位,并且比用AM24处理的纸浆高1.0个单位。在pH8,C31-4处理的纸浆中每Δκ的活性氯(aCl)用量比AM24处理的纸浆低0.2kg/,并且每ΔBr的活性氯(aCl)用量比AM24处理的纸浆低0.07kg/t,分别比参考纸浆低0.28kg/t和0.19kg/t(表6)。

[0374] 当在pH 11进行木聚糖酶预处理时,与参考纸浆相比,AM24处理没有带来任何好处。但是,C31-4处理的纸浆的亮度比参考纸浆高2.7个单位,并且每Δκ的活性氯(aCl)用量比参考纸浆低0.09kg/t,每ΔBr的活性氯(aCl)用量比参考纸浆低0.18kg/t(表6)。

[0375] 检测到的亮度(%)增加是显著的,并且表明,AM24木聚糖酶变体C31-4可以用于在高pH和温度的纸浆和其它材料的预处理或处理。

[0376] 实施例8. 在高pH和高温使用C31-4漂白针叶树材(SW)牛皮纸纸浆

[0377] 用恒定ClO<sub>2</sub>剂量(0.2X卡伯值),使用短漂白序列XD<sub>0</sub>E(X,酶;D<sub>0</sub>(D零),ClO<sub>2</sub>,二氧化氯;E,用氢氧化钠提取)试验了C31-4在高温和高pH下漂白针叶树材浆的效率。用完整序列在漂白反应器中进行漂白试验。将锚型Kemu反应器(批大小0.15-1.0kg,T最大值90°C,稠度

25%)用在X-和E-阶段以及在D<sub>0</sub>-阶段的空气加热的Hellsten反应器(批大小0.3-0.8kg,T最大值85℃,稠度12%)中。

[0378] 在试验中使用的纸浆是具有以下性能的来自斯堪的纳维亚(Scandinavian)工厂的氧脱木质化的SW牛皮纸:卡伯值25.6,粘度1140ml/g和亮度26.8ISO%。C31-4酶制品的用量为每吨纸浆大约2g总蛋白。不同漂白阶段所用的条件描述于表7-9中。

[0379] 在X-阶段后将纸浆洗涤3次。使用反应温度(90℃)的水进行第一次洗涤,然后使用冷(4℃)水洗涤两次。洗涤步骤以后,进行离心处理(2600rpm,10s)以除去水,并收集约10-15g(以烘干时测量)纸浆样品用于分析。此外,使用红外干燥器对C31-4处理的样品进行干物质分析,以便更好地调整纸浆量。分析纸浆样品的卡伯值和亮度。

[0380] 试验结果详细列于表10中。

[0381] 表7.在X-阶段的条件。在酶处理开始时(目标/初始pH)和以后(最终pH)测量纸浆的pH。

预处理	酶剂量(g/t)	纸浆稠度(%)	温度(°C)	目标/初始pH	反应时间(分钟)	最终pH
[0382] 无酶	0	10	90	10.5/10.6	60	10.7
C31-4	75	9.2	90	10.5/10.8	60	10.6

[0383] 表8.在D<sub>0</sub>阶段的漂白条件。在烘干时测量纸浆的量。

预处理	目标/使用纸浆(g)	D <sub>0</sub> 剂量目标/使用(纸浆的活性Cl%)	纸浆稠度目标/使用(%)	温度(°C)	初始pH/最终pH	反应时间(分钟)	活性Cl消耗(纸浆的%)
[0384] 无酶	215/200.3	5.1/5.5	9/8.4	70	2.6/2.1	30	5.5
C31-4	200/178.2	5.1/5.7	9/8.0	70	3.1/2.1	30	5.6

[0385] 表9.在E阶段的漂白条件。

预处理	目标/使用纸浆量, g(烘干测量)	NaOH剂量目标/使用(纸浆的%)	纸浆稠度, 目标/使用, %	温度(°C)	目标初始pH/最终pH	反应时间, 分钟
[0386] 无酶	200/185.2	2.3/2.5	10/9.3	80	10.8/10.7	90
C31-4	185/159.7	2.3/2.7	10/8.6	80	10.7/10.7	90

[0387] 表10.漂白试验的结果。

[0388]

预处理	在 E-阶段以后的卡伯值	$\Delta$ XDE $\kappa$	$\Delta \kappa/\text{kg}$ 使用的活性 Cl	在 E-阶段以后的亮度, ISO%	$\Delta$ XDE 亮度	$\Delta$ 亮度 %/kg 使用的活性 Cl	用相同的 5.4%活性 Cl 消耗校正的最终卡伯值	用相同的 5.4%活性 Cl 消耗校正的最终亮度
无酶	3.30	22.28	0.41	55.79	29.0	0.53	3.7	55.3
C31-4	2.52	23.06	0.41	59.38	32.6	0.58	3.5	58.0

[0389] 与参考纸浆(未使用酶)相比,在相同的5.4%活性氯消耗下,在pH 10.5用C31-4预处理的针叶树材牛皮纸纸浆具有高了2.7个单位的校正最终亮度。

[0390] 实施例9. 与在中性pH和较低温度的AM24木聚糖酶相比,在高pH和温度使用C31-4对针叶树材(SW)牛皮纸纸浆的漂白

[0391] 使用AM24和C31-4木聚糖酶,重复使用实施例8中类似的针叶树材浆和条件的漂白试验。在其表征和实验之前,将纸浆在pH 11和60°C洗涤约30分钟。洗涤步骤以后,纸浆的卡伯值为16.7,粘度为1050ml/g,和亮度为32.6ISO%。两种酶(C31-4和AM24)的用量为每吨纸浆2g总蛋白。在木聚糖酶处理、漂白和提取阶段中使用的条件描述于表11-13中。在木聚糖酶处理阶段(X-阶段)中,在不同的pH和温度应用两种酶,因为已知AM24木聚糖酶在这样的纸浆厂条件下没有活性,而根据之前进行的实验,预计C31-4变体能够在这些条件(pH 10.5/90°C)下工作。

[0392] 表11.X-阶段条件。在酶处理开始时(目标/初始pH)和以后(最终pH)测量纸浆的pH。

[0393]

酶	酶剂量, g/t	纸浆稠度, %	温度, °C	目标/初始 pH	反应时间, 分钟	最终 pH
1. 无酶	-	10	90	10.5/10.4	60	10.4
2. AM24	75	10	80	7/7.1	60	7.1
3. C31-4	75	10	90	10.5/10.7	60	10.6

[0394] 表12.D<sub>0</sub>-阶段漂白条件

[0395]

酶	D0 剂量 *, 相对于 纸浆的活 性 CI%	纸浆稠 度, %	温度, °C	初始 pH/最 终 pH	反应时 间, 分钟	活性 CI 消 耗, 相对 于纸浆 的%
1. 无酶	3.3	9	70	2.8/2.1	30	3.3
2. AM24	3.3	9	70	2.5/1.6	30	3.3
3. C31-4	3.3	9	70	2.7/1.7	30	3.3

[0396] 表13.E-阶段条件

[0397]

酶	NaOH 剂 量, 相对于	纸浆稠 度, %	温度°C	目标初始 pH/ 最终 pH	反应时间, 分钟
	纸浆的%				
1. 无酶	1.5	10	80	10.6/10.6	90
2. AM24	1.5	10	80	10.5/10.4	90
3. C31-4	1.5	10	80	10.7/10.6	90

[0398]

[0399] 实验结果被包含在表14中。

[0400] 表14. 在E-阶段以后的结果

[0401]

酶	在 E-阶段以 后的卡伯值	$\Delta$ XD0E 卡伯 值	$\Delta$ 卡伯值/kg 使用的活性 CI	在 E-阶段以 后的亮度, ISO%	$\Delta$ XD0E 亮 度, ISO%	$\Delta$ 亮度%/kg 使用的活性 CI
1. 无酶	3.0	13.7	0.41	62.3	29.7	0.89
2. AM24	2.9	13.8	0.41	63.5	30.8	0.92
3. C31-4	2.5	14.2	0.43	65.1	32.4	0.97

[0402] 在整个XD<sub>0</sub>E漂白序列中,在相同条件下,与参考纸浆(未使用酶)相比,在pH 10.5/90°C用C31-4预处理的斯堪的纳维亚针叶树材牛皮纸纸浆具有高了2.8个单位的亮度。结果证实,C31-4在高pH和温度条件提高亮度。在X-阶段的调整条件(pH 7/80°C)以及与D<sub>0</sub>-和E-阶段中C31-4使用的相同条件,AM24木聚糖酶显示出1.2个单位的亮度增益。

[0403] 实施例10.嗜热木聚糖酶变体在饲料应用中的用途

[0404] 所描述的嗜热木聚糖酶变体可以用于饲养动物,例如猪和肉鸡。它们可以单独使

用或者与其它酶(例如植酸酶和/或甘露聚糖酶)组合使用。

[0405] 研究了本发明的重组木聚糖酶变体对肉鸡生长的影响。将包含重组木聚糖酶的发酵液的超滤液干燥,并将目标水平单独地或与商购可得的其它酶组合地应用于颗粒肉鸡饲料。对照组饮食不含木聚糖酶。饮食是基于黑麦和小麦或基于玉米作为谷物。

[0406] 肉鸡的初始重量为38-42g。试验持续5-6周。每种处理至少包含6个各10只肉鸡的重复。在每种情况下,分析饮食的水分、粗蛋白、粗纤维、脂肪、灰分和酶蛋白。

[0407] 制备五种饮食用于试验每种选定的如下所述的木聚糖酶变体。施用亲本木聚糖酶作为处理的参考:

[0408] 1) 无补充对照(BD)

[0409] 2) BD+所选的木聚糖酶亲本酶1-10mg/kg

[0410] 3) BD+以上亲本木聚糖酶的变体,与上面相同的剂量

[0411] 3) BD+所选的木聚糖酶亲本酶1-10mg/kg,与1)相比不同的剂量

[0412] 4) BD+以上亲本木聚糖酶的变体,与上面相同的剂量

[0413] 每天通过目检检查动物的健康状况和死亡率。在第0、14、21和35天,测量体重增加(BW)、饲料摄入(FI)和饲料转化率(FCR)。将FCR计算为消耗的饲料总量除以同一时期的体重增加。重组木聚糖酶变体的作用的确是基于与用相应的野生型木聚糖酶和无补充对照饲料喂养的那些动物的对比。

[0414] 由于其高解折叠温度,C31-4木聚糖酶和使用与本文公开的相同原理设计的其它嗜热木聚糖酶变体适用于其中需要高热稳定性的所有应用,例如,在木材和非木材纸浆应用中以及在制粒阶段使用高温的饲料应用中。本文公开的木聚糖酶变体还适合于耐受对于所讨论的酶的活性和功能来说并非最佳的工艺条件(例如碱性或酸性pH)和/或在所述工艺条件下发挥作用。

[0415] 已经通过特定实现和实施方案的非限制性实施例提供了前面的描述,即发明人目前考虑的用于实施本发明的最佳模式的完整且信息性描述。但是,本领域技术人员清楚,本发明不限于在前述内容中呈现的实施方案的细节,但可以使用等同方式或者以实施方案的不同组合在其它实施方案中实现它,而不背离本发明的特征。

[0416] 此外,可以有利地使用前面公开的示例实施方案的一些特征,而不需要相应地使用其它特征。因此,可以形成实施方案和方面的任何适当组合。还可以做出本文所公开的方面或实施方案的任何组合,而无需在一个方面或实施方案中公开的至少一种非必需特征。

[0417] 所附权利要求限定了保护范围。在说明书或附图中公开的且未被权利要求覆盖的任何方法、工艺、产品或设备被提供作为这样的例子:其不应被理解为所要求保护的发明的实施方案,但是其对于理解所要求保护的发明是有用的。

[0418] 参考文献

[0419] Bailey MJ, Biely P和Poutanen K.1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. J. Biotechnol. 23:257-270.

[0420] Karhunen T, Mäntylä A, Nevalainen KMH和Suominen P.1993. High frequency one-step gene replacement in *Trichoderma reesei*. I. Endoglucanase I overproduction. Mol. Gen. Genet. 241:515-522.

- [0421] Leskinen S, **MäntyläA**, FagerströmR, **VehmaanperäJ**, Lantto R, Paloheimo M和Suominen P.2005. Thermostable xylanases, Xyn10A and Xyn11A, from the actinomycete *Nonomuraea flexuosa*: isolation of the genes and characterization of recombinant Xyn11A polypeptides produced in *Trichoderma reesei*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67:495-505.
- [0422] Paloheimo M., **MäntyläA.**, Kallio J., Puranen T.和Suominen, P. Increased production of xylanase by expression of a truncated version of the xyn11A gene from *Nonomuraea flexuosa* in *Trichoderma reesei*. 2007. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 3215-3224.
- [0423] **PenttiläM.**, Nevalainen H., **RättöM.**, Salminen E和Knowles J.1987. A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Gene* 61:155-164.
- [0424] Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T.J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliamH., RemmertM., **SödingJ.**, Thompson J.D.和Higgins D.G.2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7:539.

## 序列表

- <110> 生化酶股份有限公司  
 <120> 木聚糖酶变体  
 <130> 32016EP-1f  
 <160> 98  
 <170> PatentIn 3.5版  
 <210> 1  
 <211> 220  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 变体  
 <400> 1

```

Asp Thr Thr Ile Thr Gln Asn Gln Thr Gly Tyr Asp Asn Gly Tyr Phe
1           5           10           15
Tyr Ser Phe Trp Thr Asp Ala Pro Gly Thr Val Ser Met Thr Leu His
           20           25           30
Ser Gly Gly Ser Tyr Ser Thr Ser Trp Arg Asn Thr Gly Asn Phe Val
           35           40           45
Ala Gly Lys Gly Trp Ser Thr Gly Gly Arg Arg Thr Val Thr Tyr Asn
           50           55           60
Ala Ser Phe Asn Pro Ser Gly Asn Ala Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Trp
65           70           75           80
Thr Arg Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Ser Trp Gly Thr
           85           90           95
Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Val Thr Thr Asp Gly Gly
           100          105          110
Thr Tyr Asp Ile Tyr Glu Thr Trp Arg Tyr Asn Ala Pro Ser Ile Glu
           115          120          125
Gly Thr Arg Thr Phe Gln Gln Phe Trp Ser Val Arg Gln Gln Lys Arg
           130          135          140
Thr Ser Gly Thr Ile Thr Ile Gly Asn His Phe Asp Ala Trp Ala Arg
145          150          155          160
Ala Gly Met Asn Leu Gly Ser His Asp Tyr Gln Ile Met Ala Thr Glu
           165          170          175
Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser Thr Val Ser Ile Ser Glu Gly Gly
           180          185          190
Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn
  
```

	195		200		205
Pro Gly Asn Pro Gly Gly Gly Cys Val Ala Thr Leu					
	210		215		220
<210>	2				
<211>	220				
<212>	PRT				
<213>	人工序列				
<220>					
<223>	变体				
<400>	2				
Asp Thr Cys Ile Thr Gln Asn Gln Thr Gly Tyr Asp Asn Gly Tyr Phe					
1		5		10	15
Tyr Ser Phe Trp Thr Asp Ser Pro Gly Thr Val Ile Met Cys Leu His					
	20		25		30
Ser Gly Gly Ser Tyr Ser Thr Ser Trp Arg Asn Thr Gly Asn Phe Val					
	35		40		45
Ala Gly Lys Gly Trp Ser Thr Gly Gly Arg Arg Thr Val Thr Tyr Asn					
	50		55		60
Ala Ser Phe Asn Pro Ser Gly Asn Ala Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Trp					
65		70		75	80
Thr Arg Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Ser Trp Gly Thr					
	85		90		95
Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Val Thr Thr Asp Gly Gly					
	100		105		110
Thr Tyr Asp Ile Tyr Glu Thr Trp Arg Tyr Asn Ala Pro Ser Ile Glu					
	115		120		125
Gly Thr Arg Thr Phe Gln Gln Phe Trp Ser Val Arg Gln Gln Lys Arg					
	130		135		140
Thr Ser Gly Thr Ile Thr Ile Gly Asn His Phe Asp Ala Trp Ala Arg					
145		150		155	160
Ala Gly Met Asn Leu Gly Ser His Asp Tyr Gln Ile Met Ala Thr Glu					
	165		170		175
Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser Thr Val Ser Ile Ser Glu Gly Gly					
	180		185		190
Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn					
	195		200		205
Pro Gly Asn Pro Gly Gly Gly Cys Val Ala Thr Leu					
	210		215		220
<210>	3				

<211> 220  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 变体  
 <400> 3  
 Asp Thr Cys Ile Thr Gln Asn Gln Thr Gly Tyr Asp Asn Gly Tyr Phe  
 1 5 10 15  
 Tyr Ser Phe Trp Thr Asp Ala Pro Gly Thr Val Ser Met Cys Leu His  
 20 25 30  
 Ser Gly Gly Ser Tyr Ser Thr Ser Trp Arg Asn Thr Gly Asn Phe Val  
 35 40 45  
 Ala Gly Lys Gly Trp Ser Thr Gly Gly Arg Arg Thr Val Thr Tyr Asn  
 50 55 60  
 Ala Ser Phe Asn Pro Ser Gly Asn Ala Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Trp  
 65 70 75 80  
 Thr Arg Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Ser Trp Gly Thr  
 85 90 95  
 Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Val Thr Thr Asp Gly Gly  
 100 105 110  
 Thr Tyr Asp Ile Tyr Glu Thr Trp Arg Tyr Asn Ala Pro Ser Ile Glu  
 115 120 125  
 Gly Thr Arg Thr Phe Gln Gln Phe Trp Ser Val Arg Gln Gln Lys Arg  
 130 135 140  
 Thr Ser Gly Thr Ile Thr Ile Gly Asn His Phe Asp Ala Trp Ala Arg  
 145 150 155 160  
 Ala Gly Met Asn Leu Gly Ser His Asp Tyr Gln Ile Met Ala Thr Glu  
 165 170 175  
 Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser Thr Val Ser Ile Ser Glu Gly Gly  
 180 185 190  
 Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn  
 195 200 205  
 Pro Gly Asn Pro Gly Gly Gly Cys Val Ala Thr Leu  
 210 215 220  
 <210> 4  
 <211> 220  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>

<223> 变体

<400> 4

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

<210> 5

<211> 220

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 变体

<400> 5

Asp	Thr	Cys	Ile	Thr	Gln	Asn	Gln	Thr	Gly	Tyr	Asp	Asn	Gly	Tyr	Phe
1				5					10					15	

Tyr Ser Phe Trp Thr Asp Ala Pro Gly Thr Val Ile Met Cys Leu His  
 20 25 30  
 Ser Gly Gly Ser Tyr Ser Thr Ser Trp Arg Asn Thr Gly Asn Phe Val  
 35 40 45  
 Ala Gly Lys Gly Trp Ser Thr Gly Gly Arg Arg Thr Val Thr Tyr Asn  
 50 55 60  
 Ala Ser Phe Asn Pro Ser Gly Asn Ala Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Trp  
 65 70 75 80  
 Thr Arg Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Ser Trp Gly Thr  
 85 90 95  
 Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Val Thr Thr Asp Gly Gly  
 100 105 110  
 Thr Tyr Asp Ile Tyr Glu Thr Trp Arg Tyr Asn Ala Pro Ser Ile Glu  
 115 120 125  
 Gly Thr Arg Thr Phe Gln Gln Phe Trp Ser Val Arg Gln Gln Lys Arg  
 130 135 140  
 Thr Ser Gly Thr Ile Thr Ile Gly Asn His Phe Asp Ala Trp Ala Arg  
 145 150 155 160  
 Ala Gly Met Asn Leu Gly Ser His Asp Tyr Gln Ile Met Ala Thr Glu  
 165 170 175  
 Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser Thr Val Ser Ile Ser Glu Gly Gly  
 180 185 190  
 Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn  
 195 200 205  
 Pro Gly Asn Pro Gly Gly Gly Cys Val Ala Thr Leu  
 210 215 220  
 <210> 6  
 <211> 220  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 变体  
 <400> 6  
 Asp Thr Thr Ile Thr Gln Asn Gln Thr Gly Tyr Asp Asn Gly Tyr Phe  
 1 5 10 15  
 Tyr Ser Phe Trp Thr Asp Ser Pro Gly Thr Val Ser Met Thr Leu His  
 20 25 30  
 Ser Gly Gly Ser Tyr Ser Thr Ser Trp Arg Asn Thr Gly Asn Phe Val  
 35 40 45

Ala Gly Lys Gly Trp Ser Thr Gly Gly Arg Arg Thr Val Thr Tyr Asn  
50 55 60

Ala Ser Phe Asn Pro Ser Gly Asn Ala Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Trp  
65 70 75 80

Thr Arg Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Ser Trp Gly Thr  
85 90 95

Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Val Thr Thr Asp Gly Gly  
100 105 110

Thr Tyr Asp Ile Tyr Glu Thr Trp Arg Tyr Asn Ala Pro Ser Ile Glu  
115 120 125

Gly Thr Arg Thr Phe Gln Gln Phe Trp Ser Val Arg Gln Gln Lys Arg  
130 135 140

Thr Ser Gly Thr Ile Thr Ile Gly Asn His Phe Asp Ala Trp Ala Arg  
145 150 155 160

Ala Gly Met Asn Leu Gly Ser His Asp Tyr Gln Ile Met Ala Thr Glu  
165 170 175

Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser Thr Val Ser Ile Ser Glu Gly Gly  
180 185 190

Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn  
195 200 205

Pro Gly Asn Pro Gly Gly Gly Cys Val Ala Thr Leu  
210 215 220

<210> 7  
<211> 220  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 变体  
<400> 7

Asp Thr Thr Ile Thr Gln Asn Gln Thr Gly Tyr Asp Asn Gly Tyr Phe  
1 5 10 15

Tyr Ser Phe Trp Thr Asp Ala Pro Gly Thr Val Ile Met Thr Leu His  
20 25 30

Ser Gly Gly Ser Tyr Ser Thr Ser Trp Arg Asn Thr Gly Asn Phe Val  
35 40 45

Ala Gly Lys Gly Trp Ser Thr Gly Gly Arg Arg Thr Val Thr Tyr Asn  
50 55 60

Ala Ser Phe Asn Pro Ser Gly Asn Ala Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Trp  
65 70 75 80



Thr Tyr Asp Ile Tyr Glu Thr Trp Arg Tyr Asn Ala Pro Ser Ile Glu  
 115 120 125  
 Gly Thr Arg Thr Phe Gln Gln Phe Trp Ser Val Arg Gln Gln Lys Arg  
 130 135 140  
 Thr Ser Gly Thr Ile Thr Ile Gly Asn His Phe Asp Ala Trp Ala Arg  
 145 150 155 160  
 Ala Gly Met Asn Leu Gly Ser His Asp Tyr Gln Ile Met Ala Thr Glu  
 165 170 175  
 Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser Thr Val Ser Ile Ser Glu Gly Gly  
 180 185 190  
 Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn  
 195 200 205  
 Pro Gly Asn Pro Gly Gly Gly Cys Val Ala Thr Leu  
 210 215 220  
 <210> 9  
 <211> 220  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 变体  
 <400> 9  
 Asp Thr Cys Ile Thr Gln Asn Gln Thr Gly Tyr Asp Asn Gly Tyr Phe  
 1 5 10 15  
 Tyr Ser Phe Trp Thr Asp Tyr Pro Gly Thr Val Ile Met Cys Leu His  
 20 25 30  
 Ser Gly Gly Ser Tyr Ser Thr Ser Trp Arg Asn Thr Gly Asn Phe Val  
 35 40 45  
 Ala Gly Lys Gly Trp Ser Thr Gly Gly Arg Arg Thr Val Thr Tyr Asn  
 50 55 60  
 Ala Ser Phe Asn Pro Ser Gly Asn Ala Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Trp  
 65 70 75 80  
 Thr Arg Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Ser Trp Gly Thr  
 85 90 95  
 Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Val Thr Thr Asp Gly Gly  
 100 105 110  
 Thr Tyr Asp Ile Tyr Glu Thr Trp Arg Tyr Asn Ala Pro Ser Ile Glu  
 115 120 125  
 Gly Thr Arg Thr Phe Gln Gln Phe Trp Ser Val Arg Gln Gln Lys Arg  
 130 135 140



Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser Thr Val Ser Ile Ser Glu Gly Gly  
 180 185 190  
 Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn  
 195 200 205  
 Pro Gly Asn Pro Gly Gly Gly Cys Val Ala Thr Leu  
 210 215 220  
 <210> 11  
 <211> 220  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 变体  
 <400> 11  
 Asp Thr Cys Ile Thr Gln Asn Gln Thr Gly Tyr Asp Asn Gly Tyr Phe  
 1 5 10 15  
 Tyr Ser Phe Trp Thr Asp Thr Pro Gly Thr Val Ile Met Cys Leu His  
 20 25 30  
 Ser Gly Gly Ser Tyr Ser Thr Ser Trp Arg Asn Thr Gly Asn Phe Val  
 35 40 45  
 Ala Gly Lys Gly Trp Ser Thr Gly Gly Arg Arg Thr Val Thr Tyr Asn  
 50 55 60  
 Ala Ser Phe Asn Pro Ser Gly Asn Ala Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Trp  
 65 70 75 80  
 Thr Arg Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Ser Trp Gly Thr  
 85 90 95  
 Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Val Thr Thr Asp Gly Gly  
 100 105 110  
 Thr Tyr Asp Ile Tyr Glu Thr Trp Arg Tyr Asn Ala Pro Ser Ile Glu  
 115 120 125  
 Gly Thr Arg Thr Phe Gln Gln Phe Trp Ser Val Arg Gln Gln Lys Arg  
 130 135 140  
 Thr Ser Gly Thr Ile Thr Ile Gly Asn His Phe Asp Ala Trp Ala Arg  
 145 150 155 160  
 Ala Gly Met Asn Leu Gly Ser His Asp Tyr Gln Ile Met Ala Thr Glu  
 165 170 175  
 Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser Thr Val Ser Ile Ser Glu Gly Gly  
 180 185 190  
 Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn  
 195 200 205

Pro Gly Asn Pro Gly Gly Gly Cys Val Ala Thr Leu  
 210 215 220  
 <210> 12  
 <211> 220  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 变体  
 <400> 12  
 Asp Thr Cys Ile Thr Gln Asn Gln Thr Gly Tyr Asp Asn Gly Tyr Phe  
 1 5 10 15  
 Tyr Ser Phe Trp Thr Asp Met Pro Gly Thr Val Ile Met Cys Leu His  
 20 25 30  
 Ser Gly Gly Ser Tyr Ser Thr Ser Trp Arg Asn Thr Gly Asn Phe Val  
 35 40 45  
 Ala Gly Lys Gly Trp Ser Thr Gly Gly Arg Arg Thr Val Thr Tyr Asn  
 50 55 60  
 Ala Ser Phe Asn Pro Ser Gly Asn Ala Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Trp  
 65 70 75 80  
 Thr Arg Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Ser Trp Gly Thr  
 85 90 95  
 Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Val Thr Thr Asp Gly Gly  
 100 105 110  
 Thr Tyr Asp Ile Tyr Glu Thr Trp Arg Tyr Asn Ala Pro Ser Ile Glu  
 115 120 125  
 Gly Thr Arg Thr Phe Gln Gln Phe Trp Ser Val Arg Gln Gln Lys Arg  
 130 135 140  
 Thr Ser Gly Thr Ile Thr Ile Gly Asn His Phe Asp Ala Trp Ala Arg  
 145 150 155 160  
 Ala Gly Met Asn Leu Gly Ser His Asp Tyr Gln Ile Met Ala Thr Glu  
 165 170 175  
 Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser Thr Val Ser Ile Ser Glu Gly Gly  
 180 185 190  
 Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn  
 195 200 205  
 Pro Gly Asn Pro Gly Gly Gly Cys Val Ala Thr Leu  
 210 215 220  
 <210> 13  
 <211> 220

<212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 变体  
 <400> 13  
 Asp Thr Cys Ile Thr Gln Asn Gln Thr Gly Tyr Asp Asn Gly Tyr Phe  
 1                   5                   10                   15  
 Tyr Ser Phe Trp Thr Asp Arg Pro Gly Thr Val Ile Met Cys Leu His  
                   20                   25                   30  
 Ser Gly Gly Ser Tyr Ser Thr Ser Trp Arg Asn Thr Gly Asn Phe Val  
                   35                   40                   45  
 Ala Gly Lys Gly Trp Ser Thr Gly Gly Arg Arg Thr Val Thr Tyr Asn  
                   50                   55                   60  
 Ala Ser Phe Asn Pro Ser Gly Asn Ala Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Trp  
 65                   70                   75                   80  
 Thr Arg Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Ser Trp Gly Thr  
                   85                   90                   95  
 Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Val Thr Thr Asp Gly Gly  
                   100                   105                   110  
 Thr Tyr Asp Ile Tyr Glu Thr Trp Arg Tyr Asn Ala Pro Ser Ile Glu  
                   115                   120                   125  
 Gly Thr Arg Thr Phe Gln Gln Phe Trp Ser Val Arg Gln Gln Lys Arg  
                   130                   135                   140  
 Thr Ser Gly Thr Ile Thr Ile Gly Asn His Phe Asp Ala Trp Ala Arg  
 145                   150                   155                   160  
 Ala Gly Met Asn Leu Gly Ser His Asp Tyr Gln Ile Met Ala Thr Glu  
                   165                   170                   175  
 Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser Thr Val Ser Ile Ser Glu Gly Gly  
                   180                   185                   190  
 Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn  
                   195                   200                   205  
 Pro Gly Asn Pro Gly Gly Gly Cys Val Ala Thr Leu  
                   210                   215                   220  
 <210> 14  
 <211> 220  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 变体

<400> 14

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

<210> 15

<211> 220

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 变体

<400> 15

Asp Thr Cys Ile Thr Gln Asn Gln Thr Gly Tyr Asp Asn Gly Tyr Phe  
 1                   5                   10                   15  
 Tyr Ser Phe Trp Thr Asp Ser Pro Gly Thr Val Arg Met Cys Leu His

	20		25		30														
Ser	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ser	Thr	Ser	Trp	Arg	Asn	Thr	Gly	Asn	Phe	Val				
	35		40		45														
Ala	Gly	Lys	Gly	Trp	Ser	Thr	Gly	Gly	Arg	Arg	Thr	Val	Thr	Tyr	Asn				
	50		55		60														
Ala	Ser	Phe	Asn	Pro	Ser	Gly	Asn	Ala	Tyr	Leu	Thr	Leu	Tyr	Gly	Trp				
65			70		75										80				
Thr	Arg	Asn	Pro	Leu	Val	Glu	Tyr	Tyr	Ile	Val	Glu	Ser	Trp	Gly	Thr				
			85		90										95				
Tyr	Arg	Pro	Thr	Gly	Thr	Tyr	Lys	Gly	Thr	Val	Thr	Thr	Asp	Gly	Gly				
			100		105										110				
Thr	Tyr	Asp	Ile	Tyr	Glu	Thr	Trp	Arg	Tyr	Asn	Ala	Pro	Ser	Ile	Glu				
			115		120										125				
Gly	Thr	Arg	Thr	Phe	Gln	Gln	Phe	Trp	Ser	Val	Arg	Gln	Gln	Lys	Arg				
			130		135										140				
Thr	Ser	Gly	Thr	Ile	Thr	Ile	Gly	Asn	His	Phe	Asp	Ala	Trp	Ala	Arg				
145			150		155										160				
Ala	Gly	Met	Asn	Leu	Gly	Ser	His	Asp	Tyr	Gln	Ile	Met	Ala	Thr	Glu				
			165		170										175				
Gly	Tyr	Gln	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Thr	Val	Ser	Ile	Ser	Glu	Gly	Gly				
			180		185										190				
Asn	Pro	Gly	Asn	Pro	Gly	Asn	Pro	Gly	Asn	Pro	Gly	Asn	Pro	Gly	Asn				
			195		200										205				
Pro	Gly	Asn	Pro	Gly	Gly	Gly	Cys	Val	Ala	Thr	Leu								
			210		215										220				
<210>	16																		
<211>	220																		
<212>	PRT																		
<213>	人工序列																		
<220>																			
<223>	变体																		
<400>	16																		
Asp	Thr	Cys	Ile	Thr	Gln	Asn	Gln	Thr	Gly	Tyr	Asp	Asn	Gly	Tyr	Phe				
1			5		10										15				
Tyr	Ser	Phe	Trp	Thr	Asp	Ser	Pro	Gly	Thr	Val	Met	Met	Cys	Leu	His				
			20		25										30				
Ser	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ser	Thr	Ser	Trp	Arg	Asn	Thr	Gly	Asn	Phe	Val				
			35		40										45				
Ala	Gly	Lys	Gly	Trp	Ser	Thr	Gly	Gly	Arg	Arg	Thr	Val	Thr	Tyr	Asn				

50	55	60
Ala Ser Phe Asn Pro Ser Gly Asn Ala Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Trp		
65	70	75
Thr Arg Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Ser Trp Gly Thr		
	85	90
Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Val Thr Thr Asp Gly Gly		
	100	105
Thr Tyr Asp Ile Tyr Glu Thr Trp Arg Tyr Asn Ala Pro Ser Ile Glu		
	115	120
Gly Thr Arg Thr Phe Gln Gln Phe Trp Ser Val Arg Gln Gln Lys Arg		
130	135	140
Thr Ser Gly Thr Ile Thr Ile Gly Asn His Phe Asp Ala Trp Ala Arg		
145	150	155
Ala Gly Met Asn Leu Gly Ser His Asp Tyr Gln Ile Met Ala Thr Glu		
	165	170
Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser Thr Val Ser Ile Ser Glu Gly Gly		
	180	185
Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn		
	195	200
Pro Gly Asn Pro Gly Gly Gly Cys Val Ala Thr Leu		
210	215	220
<210> 17		
<211> 220		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 变体		
<400> 17		
Asp Thr Cys Ile Thr Gln Asn Gln Thr Gly Tyr Asp Asn Gly Tyr Phe		
1	5	10
Tyr Ser Phe Trp Thr Asp Ser Pro Gly Thr Val Gln Met Cys Leu His		
	20	25
Ser Gly Gly Ser Tyr Ser Thr Ser Trp Arg Asn Thr Gly Asn Phe Val		
	35	40
Ala Gly Lys Gly Trp Ser Thr Gly Gly Arg Arg Thr Val Thr Tyr Asn		
50	55	60
Ala Ser Phe Asn Pro Ser Gly Asn Ala Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Trp		
65	70	75
Thr Arg Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Ser Trp Gly Thr		

					85					90					95	
Tyr	Arg	Pro	Thr	Gly	Thr	Tyr	Lys	Gly	Thr	Val	Thr	Thr	Asp	Gly	Gly	
					100					105					110	
Thr	Tyr	Asp	Ile	Tyr	Glu	Thr	Trp	Arg	Tyr	Asn	Ala	Pro	Ser	Ile	Glu	
					115					120					125	
Gly	Thr	Arg	Thr	Phe	Gln	Gln	Phe	Trp	Ser	Val	Arg	Gln	Gln	Lys	Arg	
					130					135					140	
Thr	Ser	Gly	Thr	Ile	Thr	Ile	Gly	Asn	His	Phe	Asp	Ala	Trp	Ala	Arg	
145					150					155					160	
Ala	Gly	Met	Asn	Leu	Gly	Ser	His	Asp	Tyr	Gln	Ile	Met	Ala	Thr	Glu	
					165					170					175	
Gly	Tyr	Gln	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Thr	Val	Ser	Ile	Ser	Glu	Gly	Gly	
					180					185					190	
Asn	Pro	Gly	Asn	Pro	Gly	Asn	Pro	Gly	Asn	Pro	Gly	Asn	Pro	Gly	Asn	
					195					200					205	
Pro	Gly	Asn	Pro	Gly	Gly	Gly	Cys	Val	Ala	Thr	Leu					
					210					215					220	
<210>	18															
<211>	220															
<212>	PRT															
<213>	人工序列															
<220>																
<223>	变体															
<400>	18															
Asp	Thr	Cys	Ile	Thr	Gln	Asn	Gln	Thr	Gly	Tyr	Asp	Asn	Gly	Tyr	Phe	
1				5					10					15		
Tyr	Ser	Phe	Trp	Thr	Asp	Ser	Pro	Gly	Thr	Val	Tyr	Met	Cys	Leu	His	
				20					25				30			
Ser	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ser	Thr	Ser	Trp	Arg	Asn	Thr	Gly	Asn	Phe	Val	
				35				40					45			
Ala	Gly	Lys	Gly	Trp	Ser	Thr	Gly	Gly	Arg	Arg	Thr	Val	Thr	Tyr	Asn	
				50			55					60				
Ala	Ser	Phe	Asn	Pro	Ser	Gly	Asn	Ala	Tyr	Leu	Thr	Leu	Tyr	Gly	Trp	
65				70					75				80			
Thr	Arg	Asn	Pro	Leu	Val	Glu	Tyr	Tyr	Ile	Val	Glu	Ser	Trp	Gly	Thr	
				85					90				95			
Tyr	Arg	Pro	Thr	Gly	Thr	Tyr	Lys	Gly	Thr	Val	Thr	Thr	Asp	Gly	Gly	
				100					105				110			
Thr	Tyr	Asp	Ile	Tyr	Glu	Thr	Trp	Arg	Tyr	Asn	Ala	Pro	Ser	Ile	Glu	

115	120	125
Gly Thr Arg Thr Phe Gln Gln Phe Trp Ser Val Arg Gln Gln Lys Arg		
130	135	140
Thr Ser Gly Thr Ile Thr Ile Gly Asn His Phe Asp Ala Trp Ala Arg		
145	150	155
Ala Gly Met Asn Leu Gly Ser His Asp Tyr Gln Ile Met Ala Thr Glu		
165	170	175
Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser Thr Val Ser Ile Ser Glu Gly Gly		
180	185	190
Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn		
195	200	205
Pro Gly Asn Pro Gly Gly Gly Cys Val Ala Thr Leu		
210	215	220
<210> 19		
<211> 220		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 变体		
<400> 19		
Asp Thr Cys Ile Thr Gln Asn Gln Thr Gly Tyr Asp Asn Gly Tyr Phe		
1 5 10 15		
Tyr Ser Phe Trp Thr Asp Ser Pro Gly Thr Val Trp Met Cys Leu His		
20 25 30		
Ser Gly Gly Ser Tyr Ser Thr Ser Trp Arg Asn Thr Gly Asn Phe Val		
35 40 45		
Ala Gly Lys Gly Trp Ser Thr Gly Gly Arg Arg Thr Val Thr Tyr Asn		
50 55 60		
Ala Ser Phe Asn Pro Ser Gly Asn Ala Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Trp		
65 70 75 80		
Thr Arg Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Ser Trp Gly Thr		
85 90 95		
Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Val Thr Thr Asp Gly Gly		
100 105 110		
Thr Tyr Asp Ile Tyr Glu Thr Trp Arg Tyr Asn Ala Pro Ser Ile Glu		
115 120 125		
Gly Thr Arg Thr Phe Gln Gln Phe Trp Ser Val Arg Gln Gln Lys Arg		
130 135 140		
Thr Ser Gly Thr Ile Thr Ile Gly Asn His Phe Asp Ala Trp Ala Arg		



	180		185		190														
Asn	Pro	Gly	Asn	Pro	Gly	Asn	Pro	Gly	Asn	Pro	Gly	Asn	Pro	Gly	Asn	Pro	Gly	Asn	
	195								200					205					
Pro	Gly	Asn	Pro	Gly	Gly	Gly	Gly	Cys	Val	Ala	Thr	Leu							
	210								215					220					
<210>	21																		
<211>	220																		
<212>	PRT																		
<213>	人工序列																		
<220>																			
<223>	变体																		
<400>	21																		
Asp	Thr	Cys	Ile	Thr	Gln	Asn	Gln	Thr	Gly	Tyr	Asp	Asn	Gly	Tyr	Phe				
1			5						10					15					
Tyr	Ser	Phe	Trp	Thr	Asp	Ser	Pro	Gly	Thr	Val	Asn	Met	Cys	Leu	His				
			20						25				30						
Ser	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ser	Thr	Ser	Trp	Arg	Asn	Thr	Gly	Asn	Phe	Val				
			35						40				45						
Ala	Gly	Lys	Gly	Trp	Ser	Thr	Gly	Gly	Arg	Arg	Thr	Val	Thr	Tyr	Asn				
			50						55				60						
Ala	Ser	Phe	Asn	Pro	Ser	Gly	Asn	Ala	Tyr	Leu	Thr	Leu	Tyr	Gly	Trp				
65							70					75			80				
Thr	Arg	Asn	Pro	Leu	Val	Glu	Tyr	Tyr	Ile	Val	Glu	Ser	Trp	Gly	Thr				
							85							90					
Tyr	Arg	Pro	Thr	Gly	Thr	Tyr	Lys	Gly	Thr	Val	Thr	Thr	Asp	Gly	Gly				
							100							105					
Thr	Tyr	Asp	Ile	Tyr	Glu	Thr	Trp	Arg	Tyr	Asn	Ala	Pro	Ser	Ile	Glu				
							115							120					
Gly	Thr	Arg	Thr	Phe	Gln	Gln	Phe	Trp	Ser	Val	Arg	Gln	Gln	Lys	Arg				
							130							135					
Thr	Ser	Gly	Thr	Ile	Thr	Ile	Gly	Asn	His	Phe	Asp	Ala	Trp	Ala	Arg				
145							150						155		160				
Ala	Gly	Met	Asn	Leu	Gly	Ser	His	Asp	Tyr	Gln	Ile	Met	Ala	Thr	Glu				
							165							170					
Gly	Tyr	Gln	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Thr	Val	Ser	Ile	Ser	Glu	Gly	Gly				
							180							185					
Asn	Pro	Gly	Asn	Pro	Gly	Asn	Pro	Gly	Asn	Pro	Gly	Asn	Pro	Gly	Asn				
							195							200					
Pro	Gly	Asn	Pro	Gly	Gly	Gly	Cys	Val	Ala	Thr	Leu								



<213> 人工序列

<220>

<223> 变体

<400> 23

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

<210> 24

<211> 220

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 变体

<400> 24

Asp Thr Cys Ile Thr Gln Asn Gln Thr Gly Tyr Asp Asn Gly Tyr Phe  
 1                    5                    10                    15  
 Tyr Ser Phe Trp Thr Asp Arg Pro Gly Thr Val Gln Met Cys Leu His  
                   20                    25                    30  
 Ser Gly Gly Ser Tyr Ser Thr Ser Trp Arg Asn Thr Gly Asn Phe Val  
                   35                    40                    45  
 Ala Gly Lys Gly Trp Ser Thr Gly Gly Arg Arg Thr Val Thr Tyr Asn  
                   50                    55                    60  
 Ala Ser Phe Asn Pro Ser Gly Asn Ala Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Trp  
 65                    70                    75                    80  
 Thr Arg Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Ser Trp Gly Thr  
                   85                    90                    95  
 Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Val Thr Thr Asp Gly Gly  
                   100                    105                    110  
 Thr Tyr Asp Ile Tyr Glu Thr Trp Arg Tyr Asn Ala Pro Ser Ile Glu  
                   115                    120                    125  
 Gly Thr Arg Thr Phe Gln Gln Phe Trp Ser Val Arg Gln Gln Lys Arg  
                   130                    135                    140  
 Thr Ser Gly Thr Ile Thr Ile Gly Asn His Phe Asp Ala Trp Ala Arg  
 145                    150                    155                    160  
 Ala Gly Met Asn Leu Gly Ser His Asp Tyr Gln Ile Met Ala Thr Glu  
                   165                    170                    175  
 Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser Thr Val Ser Ile Ser Glu Gly Gly  
                   180                    185                    190  
 Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn  
                   195                    200                    205  
 Pro Gly Asn Pro Gly Gly Gly Cys Val Ala Thr Leu  
                   210                    215                    220  
 <210> 25  
 <211> 220  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 变体  
 <400> 25  
 Asp Thr Cys Ile Thr Gln Asn Gln Thr Gly Tyr Asp Asn Gly Tyr Phe  
 1                    5                    10                    15  
 Tyr Ser Phe Trp Thr Asp His Pro Gly Thr Val Leu Met Cys Leu His  
                   20                    25                    30

Ser Gly Gly Ser Tyr Ser Thr Ser Trp Arg Asn Thr Gly Asn Phe Val  
 35 40 45  
 Ala Gly Lys Gly Trp Ser Thr Gly Gly Arg Arg Thr Val Thr Tyr Asn  
 50 55 60  
 Ala Ser Phe Asn Pro Ser Gly Asn Ala Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Trp  
 65 70 75 80  
 Thr Arg Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Ser Trp Gly Thr  
 85 90 95  
 Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Val Thr Thr Asp Gly Gly  
 100 105 110  
 Thr Tyr Asp Ile Tyr Glu Thr Trp Arg Tyr Asn Ala Pro Ser Ile Glu  
 115 120 125  
 Gly Thr Arg Thr Phe Gln Gln Phe Trp Ser Val Arg Gln Gln Lys Arg  
 130 135 140  
 Thr Ser Gly Thr Ile Thr Ile Gly Asn His Phe Asp Ala Trp Ala Arg  
 145 150 155 160  
 Ala Gly Met Asn Leu Gly Ser His Asp Tyr Gln Ile Met Ala Thr Glu  
 165 170 175  
 Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser Thr Val Ser Ile Ser Glu Gly Gly  
 180 185 190  
 Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn  
 195 200 205  
 Pro Gly Asn Pro Gly Gly Gly Cys Val Ala Thr Leu  
 210 215 220  
 <210> 26  
 <211> 220  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 变体  
 <400> 26  
 Asp Thr Cys Ile Thr Gln Asn Gln Thr Gly Tyr Asp Asn Gly Tyr Phe  
 1 5 10 15  
 Tyr Ser Phe Trp Thr Asp Thr Pro Gly Thr Val Leu Met Cys Leu His  
 20 25 30  
 Ser Gly Gly Ser Tyr Ser Thr Ser Trp Arg Asn Thr Gly Asn Phe Val  
 35 40 45  
 Ala Gly Lys Gly Trp Ser Thr Gly Gly Arg Arg Thr Val Thr Tyr Asn  
 50 55 60



Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Val Thr Thr Asp Gly Gly  
 100 105 110  
 Thr Tyr Asp Ile Tyr Glu Thr Trp Arg Tyr Asn Ala Pro Ser Ile Glu  
 115 120 125  
 Gly Thr Arg Thr Phe Gln Gln Phe Trp Ser Val Arg Gln Gln Lys Arg  
 130 135 140  
 Thr Ser Gly Thr Ile Thr Ile Gly Asn His Phe Asp Ala Trp Ala Arg  
 145 150 155 160  
 Ala Gly Met Asn Leu Gly Ser His Asp Tyr Gln Ile Met Ala Thr Glu  
 165 170 175  
 Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser Thr Val Ser Ile Ser Glu Gly Gly  
 180 185 190  
 Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn  
 195 200 205  
 Pro Gly Asn Pro Gly Gly Gly Cys Val Ala Thr Leu  
 210 215 220  
 <210> 28  
 <211> 220  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 变体  
 <400> 28  
 Asp Thr Cys Ile Thr Gln Asn Gln Thr Gly Tyr Asp Asn Gly Tyr Phe  
 1 5 10 15  
 Tyr Ser Phe Trp Thr Asp Pro Pro Gly Thr Val Ile Met Cys Leu His  
 20 25 30  
 Ser Gly Gly Ser Tyr Ser Thr Ser Trp Arg Asn Thr Gly Asn Phe Val  
 35 40 45  
 Ala Gly Lys Gly Trp Ser Thr Gly Gly Arg Arg Thr Val Thr Tyr Asn  
 50 55 60  
 Ala Ser Phe Asn Pro Ser Gly Asn Ala Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Trp  
 65 70 75 80  
 Thr Arg Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Ser Trp Gly Thr  
 85 90 95  
 Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Val Thr Thr Asp Gly Gly  
 100 105 110  
 Thr Tyr Asp Ile Tyr Glu Thr Trp Arg Tyr Asn Ala Pro Ser Ile Glu  
 115 120 125

Gly Thr Arg Thr Phe Gln Gln Phe Trp Ser Val Arg Gln Gln Lys Arg  
 130 135 140  
 Thr Ser Gly Thr Ile Thr Ile Gly Asn His Phe Asp Ala Trp Ala Arg  
 145 150 155 160  
 Ala Gly Met Asn Leu Gly Ser His Asp Tyr Gln Ile Met Ala Thr Glu  
 165 170 175  
 Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser Thr Val Ser Ile Ser Glu Gly Gly  
 180 185 190  
 Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn  
 195 200 205  
 Pro Gly Asn Pro Gly Gly Gly Cys Val Ala Thr Leu  
 210 215 220  
 <210> 29  
 <211> 220  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 变体  
 <400> 29  
 Asp Thr Cys Ile Thr Gln Asn Gln Thr Gly Tyr Asp Asn Gly Tyr Phe  
 1 5 10 15  
 Tyr Ser Phe Trp Thr Asp Ser Pro Gly Thr Val Pro Met Cys Leu His  
 20 25 30  
 Ser Gly Gly Ser Tyr Ser Thr Ser Trp Arg Asn Thr Gly Asn Phe Val  
 35 40 45  
 Ala Gly Lys Gly Trp Ser Thr Gly Gly Arg Arg Thr Val Thr Tyr Asn  
 50 55 60  
 Ala Ser Phe Asn Pro Ser Gly Asn Ala Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Trp  
 65 70 75 80  
 Thr Arg Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Ser Trp Gly Thr  
 85 90 95  
 Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Val Thr Thr Asp Gly Gly  
 100 105 110  
 Thr Tyr Asp Ile Tyr Glu Thr Trp Arg Tyr Asn Ala Pro Ser Ile Glu  
 115 120 125  
 Gly Thr Arg Thr Phe Gln Gln Phe Trp Ser Val Arg Gln Gln Lys Arg  
 130 135 140  
 Thr Ser Gly Thr Ile Thr Ile Gly Asn His Phe Asp Ala Trp Ala Arg  
 145 150 155 160

Ala Gly Met Asn Leu Gly Ser His Asp Tyr Gln Ile Met Ala Thr Glu  
165 170 175

Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser Thr Val Ser Ile Ser Glu Gly Gly  
180 185 190

Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn  
195 200 205

Pro Gly Asn Pro Gly Gly Gly Cys Val Ala Thr Leu  
210 215 220

<210> 30

<211> 194

<212> PRT

<213> 草状孢菌属NEAU-GS84

<400> 30

Gln Ala Ala Val Thr Thr Asn Gln Thr Gly Thr Asn Asn Gly Tyr Trp  
1 5 10 15

Tyr Ser Phe Trp Thr Asp Ala Gln Gly Thr Val Ser Met Glu Leu Gly  
20 25 30

Ser Gly Gly Asn Tyr Ser Thr Ser Trp Arg Asn Thr Gly Asn Phe Val  
35 40 45

Ala Gly Lys Gly Trp Gln Thr Gly Gly Arg Arg Thr Val Ser Tyr Ser  
50 55 60

Gly Ser Phe Asn Pro Ser Gly Asn Ala Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Trp  
65 70 75 80

Thr Arg Asn Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Ile Val Asp Asn Trp Gly Thr  
85 90 95

Tyr Arg Pro Thr Gly Ser Phe Lys Gly Thr Val Thr Ser Asp Gly Gly  
100 105 110

Thr Tyr Asp Ile Tyr Glu Thr Thr Arg Thr Asn Ala Pro Ser Ile Glu  
115 120 125

Gly Thr Arg Thr Phe Lys Gln Phe Trp Ser Val Arg Gln Gln Lys Lys  
130 135 140

Thr Gly Gly Thr Ile Thr Ala Gly Asn His Phe Asp Ala Trp Ser Arg  
145 150 155 160

Ala Gly Met Gln Leu Gly Asn His Asp Tyr Met Ile Met Ala Thr Glu  
165 170 175

Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser Asn Ile Thr Ile Gly Gly Gly Thr  
180 185 190

Asn Pro  
<210> 31

<211> 194  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 草状孢菌属NEAU-GS84的变体  
 <400> 31  
 Gln Ala Cys Val Thr Thr Asn Gln Thr Gly Thr Asn Asn Gly Tyr Trp  
 1 5 10 15  
 Tyr Ser Phe Trp Thr Asp Ala Gln Gly Thr Val Ser Met Cys Leu Gly  
 20 25 30  
 Ser Gly Gly Asn Tyr Ser Thr Ser Trp Arg Asn Thr Gly Asn Phe Val  
 35 40 45  
 Ala Gly Lys Gly Trp Gln Thr Gly Gly Arg Arg Thr Val Ser Tyr Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Phe Asn Pro Ser Gly Asn Ala Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Trp  
 65 70 75 80  
 Thr Arg Asn Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Ile Val Asp Asn Trp Gly Thr  
 85 90 95  
 Tyr Arg Pro Thr Gly Ser Phe Lys Gly Thr Val Thr Ser Asp Gly Gly  
 100 105 110  
 Thr Tyr Asp Ile Tyr Glu Thr Thr Arg Thr Asn Ala Pro Ser Ile Glu  
 115 120 125  
 Gly Thr Arg Thr Phe Lys Gln Phe Trp Ser Val Arg Gln Gln Lys Lys  
 130 135 140  
 Thr Gly Gly Thr Ile Thr Ala Gly Asn His Phe Asp Ala Trp Ser Arg  
 145 150 155 160  
 Ala Gly Met Gln Leu Gly Asn His Asp Tyr Met Ile Met Ala Thr Glu  
 165 170 175  
 Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser Asn Ile Thr Ile Gly Gly Gly Thr  
 180 185 190  
 Asn Pro  
 <210> 32  
 <211> 194  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 草状孢菌属NEAU-GS84的变体  
 <400> 32  
 Gln Ala Cys Val Thr Thr Asn Gln Thr Gly Thr Asn Asn Gly Tyr Trp

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

Asn Pro

<210> 33

<211> 191

<212> PRT

<213> 拟诺卡氏菌属, 未分类

<400> 33

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





<212> PRT  
 <213> *Nonomuraea longispora*  
 <400> 36  
 Asn Ala Ala Ile Thr Ser Asn Gln Thr Gly Thr Asn Asn Gly Tyr Phe  
 1                   5                   10                   15  
 Tyr Ser Phe Trp Thr Asp Ala Pro Gly Thr Val Ser Met Glu Leu Gly  
                   20                   25                   30  
 Ser Gly Gly Asn Tyr Ser Thr Ser Trp Arg Asn Thr Gly Asn Phe Val  
                   35                   40                   45  
 Ala Gly Lys Gly Trp Ser Thr Gly Gly Arg Arg Thr Val Ser Tyr Ser  
                   50                   55                   60  
 Gly Ser Phe Asn Pro Ser Gly Asn Ala Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Trp  
 65                   70                   75                   80  
 Thr Arg Asn Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Ile Val Asp Asn Trp Gly Thr  
                   85                   90                   95  
 Tyr Arg Pro Thr Gly Glu Tyr Arg Gly Thr Val Thr Ser Asp Gly Gly  
                   100                   105                   110  
 Thr Tyr Asp Ile Tyr Lys Thr Thr Arg Tyr Asp Ala Pro Ser Ile Glu  
                   115                   120                   125  
 Gly Thr Arg Thr Phe Asp Gln Tyr Trp Ser Val Arg Gln Ser Lys Arg  
                   130                   135                   140  
 Thr Gly Gly Ser Ile Thr Ser Gly Asn His Phe Asp Ala Trp Ala Arg  
 145                   150                   155                   160  
 Gln Gly Met Asn Leu Gly Asn His Asp Tyr Met Ile Leu Ala Thr Glu  
                   165                   170                   175  
 Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Asn Ser Asn Ile Thr Ile Gly Ser Gly Gly  
                   180                   185                   190  
 Gly Asn Pro  
                   195  
 <210> 37  
 <211> 195  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> *Nonomuraea longispora*的变体  
 <400> 37  
 Asn Ala Cys Ile Thr Ser Asn Gln Thr Gly Thr Asn Asn Gly Tyr Phe  
 1                   5                   10                   15  
 Tyr Ser Phe Trp Thr Asp Ala Pro Gly Thr Val Ser Met Cys Leu Gly

	20		25		30														
	Ser	Gly	Gly	Asn	Tyr	Ser	Thr	Ser	Trp	Arg	Asn	Thr	Gly	Asn	Phe	Val			
			35						40					45					
	Ala	Gly	Lys	Gly	Trp	Ser	Thr	Gly	Gly	Arg	Arg	Thr	Val	Ser	Tyr	Ser			
			50						55					60					
	Gly	Ser	Phe	Asn	Pro	Ser	Gly	Asn	Ala	Tyr	Leu	Thr	Leu	Tyr	Gly	Trp			
	65						70				75					80			
	Thr	Arg	Asn	Pro	Leu	Ile	Glu	Tyr	Tyr	Ile	Val	Asp	Asn	Trp	Gly	Thr			
							85				90					95			
	Tyr	Arg	Pro	Thr	Gly	Glu	Tyr	Arg	Gly	Thr	Val	Thr	Ser	Asp	Gly	Gly			
			100								105					110			
	Thr	Tyr	Asp	Ile	Tyr	Lys	Thr	Thr	Arg	Tyr	Asp	Ala	Pro	Ser	Ile	Glu			
			115								120					125			
	Gly	Thr	Arg	Thr	Phe	Asp	Gln	Tyr	Trp	Ser	Val	Arg	Gln	Ser	Lys	Arg			
			130													140			
	Thr	Gly	Gly	Ser	Ile	Thr	Ser	Gly	Asn	His	Phe	Asp	Ala	Trp	Ala	Arg			
			145													155			
	Gln	Gly	Met	Asn	Leu	Gly	Asn	His	Asp	Tyr	Met	Ile	Leu	Ala	Thr	Glu			
			165													175			
	Gly	Tyr	Gln	Ser	Ser	Gly	Asn	Ser	Asn	Ile	Thr	Ile	Gly	Ser	Gly	Gly			
			180													190			
	Gly	Asn	Pro																
			195																
	<210>		38																
	<211>		195																
	<212>		PRT																
	<213>		人工序列																
	<220>																		
	<223>		Nonomuraea longispora的变体																
	<400>		38																
	Asn	Ala	Cys	Ile	Thr	Ser	Asn	Gln	Thr	Gly	Thr	Asn	Asn	Gly	Tyr	Phe			
	1				5					10					15				
	Tyr	Ser	Phe	Trp	Thr	Asp	Ser	Pro	Gly	Thr	Val	Ile	Met	Cys	Leu	Gly			
			20							25					30				
	Ser	Gly	Gly	Asn	Tyr	Ser	Thr	Ser	Trp	Arg	Asn	Thr	Gly	Asn	Phe	Val			
			35							40					45				
	Ala	Gly	Lys	Gly	Trp	Ser	Thr	Gly	Gly	Arg	Arg	Thr	Val	Ser	Tyr	Ser			
			50							55					60				
	Gly	Ser	Phe	Asn	Pro	Ser	Gly	Asn	Ala	Tyr	Leu	Thr	Leu	Tyr	Gly	Trp			

65	70	75	80
Thr Arg Asn Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Ile Val Asp Asn Trp Gly Thr			
	85	90	95
Tyr Arg Pro Thr Gly Glu Tyr Arg Gly Thr Val Thr Ser Asp Gly Gly			
	100	105	110
Thr Tyr Asp Ile Tyr Lys Thr Thr Arg Tyr Asp Ala Pro Ser Ile Glu			
	115	120	125
Gly Thr Arg Thr Phe Asp Gln Tyr Trp Ser Val Arg Gln Ser Lys Arg			
	130	135	140
Thr Gly Gly Ser Ile Thr Ser Gly Asn His Phe Asp Ala Trp Ala Arg			
145	150	155	160
Gln Gly Met Asn Leu Gly Asn His Asp Tyr Met Ile Leu Ala Thr Glu			
	165	170	175
Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Asn Ser Asn Ile Thr Ile Gly Ser Gly Gly			
	180	185	190
Gly Asn Pro			
	195		
<210>	39		
<211>	191		
<212>	PRT		
<213>	链霉菌属NRRL B-1140		
<400>	39		
Asp Thr Val Val Thr Ser Asn Gln Thr Gly Thr Asn Asn Gly Tyr Tyr			
1	5	10	15
Tyr Ser Phe Trp Thr Asp Ala Pro Gly Thr Val Ser Met Thr Leu Ser			
	20	25	30
Ser Gly Gly Ser Tyr Ser Thr Ser Trp Arg Asn Thr Gly Asn Phe Val			
	35	40	45
Ala Gly Lys Gly Trp Ser Asn Gly Ala Arg Arg Thr Val Thr Tyr Ser			
	50	55	60
Gly Ser Phe Asn Pro Ser Gly Asn Ala Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Trp			
65	70	75	80
Thr Ala Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Asp Asn Trp Gly Thr			
	85	90	95
Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Val Thr Ser Asp Gly Gly			
	100	105	110
Thr Tyr Asp Ile Tyr Lys Thr Thr Arg Tyr Asn Ala Pro Ser Val Glu			
	115	120	125
Gly Val Arg Thr Phe Asp Gln Tyr Trp Ser Val Arg Gln Ser Arg Arg			

130	135	140																	
Thr Gly Gly Thr Ile Thr Ala Gly Asn His Phe Asp Ala Trp Ala Arg																			
145	150	155	160																
Ala Gly Met Pro Leu Gly Asn Phe Lys Tyr Tyr Met Ile Met Ala Thr																			
	165	170	175																
Glu Gly Tyr Arg Ser Ser Gly Asn Ser Ser Ile Arg Val Gly Ser																			
	180	185	190																
<210>	40																		
<211>	191																		
<212>	PRT																		
<213>	人工序列																		
<220>																			
<223>	链霉菌属NRRL B-1140的变体																		
<400>	40																		
Asp Thr Cys Val Thr Ser Asn Gln Thr Gly Thr Asn Asn Gly Tyr Tyr																			
1	5	10	15																
Tyr Ser Phe Trp Thr Asp Ala Pro Gly Thr Val Ser Met Cys Leu Ser																			
	20	25	30																
Ser Gly Gly Ser Tyr Ser Thr Ser Trp Arg Asn Thr Gly Asn Phe Val																			
	35	40	45																
Ala Gly Lys Gly Trp Ser Asn Gly Ala Arg Arg Thr Val Thr Tyr Ser																			
	50	55	60																
Gly Ser Phe Asn Pro Ser Gly Asn Ala Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Trp																			
65	70	75	80																
Thr Ala Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Asp Asn Trp Gly Thr																			
	85	90	95																
Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Val Thr Ser Asp Gly Gly																			
	100	105	110																
Thr Tyr Asp Ile Tyr Lys Thr Thr Arg Tyr Asn Ala Pro Ser Val Glu																			
	115	120	125																
Gly Val Arg Thr Phe Asp Gln Tyr Trp Ser Val Arg Gln Ser Arg Arg																			
	130	135	140																
Thr Gly Gly Thr Ile Thr Ala Gly Asn His Phe Asp Ala Trp Ala Arg																			
145	150	155	160																
Ala Gly Met Pro Leu Gly Asn Phe Lys Tyr Tyr Met Ile Met Ala Thr																			
	165	170	175																
Glu Gly Tyr Arg Ser Ser Gly Asn Ser Ser Ile Arg Val Gly Ser																			
	180	185	190																
<210>	41																		

<211> 191  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 链霉菌属NRRL B-1140的变体  
 <400> 41  
 Asp Thr Cys Val Thr Ser Asn Gln Thr Gly Thr Asn Asn Gly Tyr Tyr  
 1 5 10 15  
 Tyr Ser Phe Trp Thr Asp Ser Pro Gly Thr Val Ile Met Cys Leu Ser  
 20 25 30  
 Ser Gly Gly Ser Tyr Ser Thr Ser Trp Arg Asn Thr Gly Asn Phe Val  
 35 40 45  
 Ala Gly Lys Gly Trp Ser Asn Gly Ala Arg Arg Thr Val Thr Tyr Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Phe Asn Pro Ser Gly Asn Ala Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Trp  
 65 70 75 80  
 Thr Ala Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Asp Asn Trp Gly Thr  
 85 90 95  
 Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Val Thr Ser Asp Gly Gly  
 100 105 110  
 Thr Tyr Asp Ile Tyr Lys Thr Thr Arg Tyr Asn Ala Pro Ser Val Glu  
 115 120 125  
 Gly Val Arg Thr Phe Asp Gln Tyr Trp Ser Val Arg Gln Ser Arg Arg  
 130 135 140  
 Thr Gly Gly Thr Ile Thr Ala Gly Asn His Phe Asp Ala Trp Ala Arg  
 145 150 155 160  
 Ala Gly Met Pro Leu Gly Asn Phe Lys Tyr Tyr Met Ile Met Ala Thr  
 165 170 175  
 Glu Gly Tyr Arg Ser Ser Gly Asn Ser Ser Ile Arg Val Gly Ser  
 180 185 190  
 <210> 42  
 <211> 194  
 <212> PRT  
 <213> Actinomadura amylolytica  
 <400> 42  
 Ala Ala Pro Val Thr Ser Asn Gln Thr Gly Thr His Asp Gly Tyr Phe  
 1 5 10 15  
 Tyr Ser Phe Trp Thr Asp Ala Pro Gly Thr Val Ser Met Glu Leu Gly  
 20 25 30

Ser Gly Gly Asn Tyr Ser Thr Ser Trp Arg Asn Thr Gly Asn Phe Val  
 35 40 45  
 Ala Gly Lys Gly Trp Ser Thr Gly Gly Arg Arg Thr Val Thr Tyr Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Phe Asn Pro Ser Gly Asn Ala Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Trp  
 65 70 75 80  
 Thr Arg Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Asp Asn Trp Gly Thr  
 85 90 95  
 Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Val Thr Ser Asp Gly Gly  
 100 105 110  
 Thr Tyr Asp Ile Tyr Glu Thr Thr Arg Tyr Asn Ala Pro Ser Ile Glu  
 115 120 125  
 Gly Thr Arg Thr Phe Lys Gln Tyr Trp Ser Val Arg Gln Ser Arg Arg  
 130 135 140  
 Thr Gly Gly Thr Ile Thr Ser Gly Asn His Phe Asp Ala Trp Ala Arg  
 145 150 155 160  
 Tyr Gly Met Ser Leu Gly Ser His Asp Tyr Met Ile Met Ala Thr Glu  
 165 170 175  
 Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser Asn Ile Thr Val Gly Gly Ser Ser  
 180 185 190

Asn Pro

<210> 43

<211> 194

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Actinomadura amylolytica的变体

<400> 43

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

	85	90	95
Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Val Thr Ser Asp Gly Gly			
	100	105	110
Thr Tyr Asp Ile Tyr Glu Thr Thr Arg Tyr Asn Ala Pro Ser Ile Glu			
	115	120	125
Gly Thr Arg Thr Phe Lys Gln Tyr Trp Ser Val Arg Gln Ser Arg Arg			
	130	135	140
Thr Gly Gly Thr Ile Thr Ser Gly Asn His Phe Asp Ala Trp Ala Arg			
145	150	155	160
Tyr Gly Met Ser Leu Gly Ser His Asp Tyr Met Ile Met Ala Thr Glu			
	165	170	175
Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser Asn Ile Thr Val Gly Gly Ser Ser			
	180	185	190
Asn Pro			
<210> 44			
<211> 194			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> Actinomadura amylolytica的变体			
<400> 44			
Ala Ala Cys Val Thr Ser Asn Gln Thr Gly Thr His Asp Gly Tyr Phe			
1	5	10	15
Tyr Ser Phe Trp Thr Asp Ser Pro Gly Thr Val Ile Met Cys Leu Gly			
	20	25	30
Ser Gly Gly Asn Tyr Ser Thr Ser Trp Arg Asn Thr Gly Asn Phe Val			
	35	40	45
Ala Gly Lys Gly Trp Ser Thr Gly Gly Arg Arg Thr Val Thr Tyr Ser			
	50	55	60
Gly Ser Phe Asn Pro Ser Gly Asn Ala Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Trp			
65	70	75	80
Thr Arg Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Asp Asn Trp Gly Thr			
	85	90	95
Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Val Thr Ser Asp Gly Gly			
	100	105	110
Thr Tyr Asp Ile Tyr Glu Thr Thr Arg Tyr Asn Ala Pro Ser Ile Glu			
	115	120	125
Gly Thr Arg Thr Phe Lys Gln Tyr Trp Ser Val Arg Gln Ser Arg Arg			
	130	135	140

Thr Gly Gly Thr Ile Thr Ser Gly Asn His Phe Asp Ala Trp Ala Arg  
 145 150 155 160  
 Tyr Gly Met Ser Leu Gly Ser His Asp Tyr Met Ile Met Ala Thr Glu  
 165 170 175  
 Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser Asn Ile Thr Val Gly Gly Ser Ser  
 180 185 190

Asn Pro

<210> 45

<211> 191

<212> PRT

<213> 波曲热多孢菌

<400> 45

Asp Thr Thr Ile Thr Gln Asn Gln Thr Gly Tyr Asp Asn Gly Tyr Phe  
 1 5 10 15  
 Tyr Ser Phe Arg Thr Asp Ala Pro Gly Thr Val Ser Met Thr Leu His  
 20 25 30  
 Ser Gly Gly Ser Tyr Ser Thr Ser Trp Arg Asn Thr Gly Leu Phe Leu  
 35 40 45  
 Ala Gly Lys Gly Trp Ser Thr Gly Gly Arg Arg Thr Val Thr Tyr Asn  
 50 55 60  
 Ala Ser Phe Asn Pro Ser Gly Asn Ala Arg Leu Thr Leu Tyr Gly Trp  
 65 70 75 80  
 Thr Arg Asn Pro Leu Val Ser Tyr His Ile Val Glu Ser Trp Gly Thr  
 85 90 95  
 Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Val Thr Thr Asp Gly Gly  
 100 105 110  
 Thr Tyr Asp Ile Tyr Glu Thr Trp Arg Tyr Asn Ala Pro Ser Ile Glu  
 115 120 125  
 Gly Thr Arg Thr Tyr Gln Gln Phe Trp Ser Val Arg Gln Gln Lys Arg  
 130 135 140  
 Thr Ser Gly Thr Ile Thr Ile Gly Asn His Phe Asp Ala Trp Ala Arg  
 145 150 155 160  
 Ala Gly Met Asn Leu Gly Ser His Asp Tyr Gln Ile Met Ala Thr Glu  
 165 170 175  
 Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser Thr Val Ser Ile Ser Glu Gly  
 180 185 190

<210> 46

<211> 191

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 波曲热多孢菌的变体

<400> 46

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

<210> 47

<211> 191

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 波曲热多孢菌的变体

<400> 47

Asp	Thr	Cys	Ile	Thr	Gln	Asn	Gln	Thr	Gly	Tyr	Asp	Asn	Gly	Tyr	Phe
1				5					10					15	
Tyr	Ser	Phe	Arg	Thr	Asp	Ser	Pro	Gly	Thr	Val	Ile	Met	Cys	Leu	His
			20					25					30		

Ser Gly Gly Ser Tyr Ser Thr Ser Trp Arg Asn Thr Gly Leu Phe Leu  
 35 40 45  
 Ala Gly Lys Gly Trp Ser Thr Gly Gly Arg Arg Thr Val Thr Tyr Asn  
 50 55 60  
 Ala Ser Phe Asn Pro Ser Gly Asn Ala Arg Leu Thr Leu Tyr Gly Trp  
 65 70 75 80  
 Thr Arg Asn Pro Leu Val Ser Tyr His Ile Val Glu Ser Trp Gly Thr  
 85 90 95  
 Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Val Thr Thr Asp Gly Gly  
 100 105 110  
 Thr Tyr Asp Ile Tyr Glu Thr Trp Arg Tyr Asn Ala Pro Ser Ile Glu  
 115 120 125  
 Gly Thr Arg Thr Tyr Gln Gln Phe Trp Ser Val Arg Gln Gln Lys Arg  
 130 135 140  
 Thr Ser Gly Thr Ile Thr Ile Gly Asn His Phe Asp Ala Trp Ala Arg  
 145 150 155 160  
 Ala Gly Met Asn Leu Gly Ser His Asp Tyr Gln Ile Met Ala Thr Glu  
 165 170 175  
 Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser Thr Val Ser Ile Ser Glu Gly  
 180 185 190

- <210> 48
- <211> 663
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> AM24
- <400> 48

gacaccacca tcaccagaa ccagaccggc tacgacaacg gctacttcta ctcgttctgg 60  
 accgacgcc cggcaccgt ctccatgacc ctccactcgg gcggcagcta cagcacctcg 120  
 tggcgcaaca ccggcaactt cgtcgccggc aagggtctgt ccaccggcgg ccgccgcacc 180  
 gtcacctaca acgcctcctt caaccgctcg ggtaacgctt acctcacgct ctacggctgg 240  
 accaggaacc cgctcgtcga gtactacatc gtcgagagct ggggcaccta ccggcccacc 300  
 ggcacctaca agggcaccgt caccaccgac ggcggcacgt acgacatcta cgagacctgg 360  
 cggtacaacg cgccgtccat cgagggcacc cggaccttc agcagttctg gacgctccgg 420  
 cagcagaagc ggaccagcgg caccatcacc atcggaacc acttcgacgc ctgggcccgc 480  
 gccggcatga acctgggcag ccacgaactac cagatcatgg cgaccgagg ctaccagagc 540  
 agcggtagct ccaccgtctc catcagcgag ggtggcaacc ccggcaacc gggtaacccc 600  
 ggcaaccccg gcaaccccgg taacccgggt aaccccggcg gtggctgcgt cgcgacctc 660  
 taa 663

<210>	49								
<211>	663								
<212>	DNA								
<213>	人工序列								
<220>									
<223>	变体								
<400>	49								
		gacacctgca	tcacccagaa	ccagaccggc	tacgacaacg	gctacttcta	ctcgttctgg		60
		accgactccc	ccggcaccgt	catcatgtgc	ctcactcggg	gcggcagcta	cagcacctcg		120
		tggcgcaaca	ccggcaactt	cgtcgccggc	aagggtgtgt	ccaccggcgg	ccgccgcacc		180
		gtcacctaca	acgcctcett	caaccgctcg	ggtaacgctt	acctcacgct	ctacggctgg		240
		accaggaacc	cgctcgtcga	gtactacatc	gtcgagagct	ggggcaccta	ccggcccacc		300
		ggcacctaca	agggcaccgt	caccaccgac	ggcggcacgt	acgacatcta	cgagacctgg		360
		cggtacaacg	cgccgtccat	cgagggcacc	cggaccttcc	agcagttctg	gagcgtccgg		420
		cagcagaagc	ggaccagcgg	caccatcacc	atcggcaacc	acttcgacgc	ctgggcccgc		480
		gccggcatga	acctgggcag	ccacgactac	cagatcatgg	cgaccgaggg	ctaccagagc		540
		agcggtagct	ccaccgtctc	catcagcgag	ggtggcaacc	ccggcaacc	gggtaacccc		600
		ggcaaccccg	gcaaccccgg	taaccgggt	aaccccggcg	gtggctgcgt	cgcgaccctc		660
		taa							663
<210>	50								
<211>	663								
<212>	DNA								
<213>	人工序列								
<220>									
<223>	变体								
<400>	50								
		gacacctgca	tcacccagaa	ccagaccggc	tacgacaacg	gctacttcta	ctcgttctgg		60
		accgacgcgc	ccggcaccgt	ctccatgtgc	ctcactcggg	gcggcagcta	cagcacctcg		120
		tggcgcaaca	ccggcaactt	cgtcgccggc	aagggtgtgt	ccaccggcgg	ccgccgcacc		180
		gtcacctaca	acgcctcett	caaccgctcg	ggtaacgctt	acctcacgct	ctacggctgg		240
		accaggaacc	cgctcgtcga	gtactacatc	gtcgagagct	ggggcaccta	ccggcccacc		300
		ggcacctaca	agggcaccgt	caccaccgac	ggcggcacgt	acgacatcta	cgagacctgg		360
		cggtacaacg	cgccgtccat	cgagggcacc	cggaccttcc	agcagttctg	gagcgtccgg		420
		cagcagaagc	ggaccagcgg	caccatcacc	atcggcaacc	acttcgacgc	ctgggcccgc		480
		gccggcatga	acctgggcag	ccacgactac	cagatcatgg	cgaccgaggg	ctaccagagc		540
		agcggtagct	ccaccgtctc	catcagcgag	ggtggcaacc	ccggcaacc	gggtaacccc		600
		ggcaaccccg	gcaaccccgg	taaccgggt	aaccccggcg	gtggctgcgt	cgcgaccctc		660
		taa							663
<210>	51								

<211>	663	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	变体	
<400>	51	
	gacacctgca tcacccagaa ccagaccggc tacgacaacg gctacttcta ctcgttctgg	60
	accgactccc ccggcaccgt ctccatgtgc ctccactcgg gcggcagcta cagcacctcg	120
	tggcgcaaca ccggcaactt cgtcgccggc aagggtggt ccaccggcgg ccgccgcacc	180
	gtcacctaca acgcctcctt caaccgctcg ggtaacgct acctcacgct ctacggctgg	240
	accaggaacc cgctcgtcga gtactacatc gtcgagagct ggggcaccta ccggcccacc	300
	ggcacctaca agggcaccgt caccaccgac ggcggcacgt acgacatcta cgagacctgg	360
	cggtacaacg cgccgtccat cgagggcacc cggaccttc agcagttctg gacgctccgg	420
	cagcagaagc ggaccagcgg caccatcacc atcggcaacc acttcgacgc ctgggcccgc	480
	gccggcatga acctgggcag ccacgactac cagatcatgg cgaccgagg ctaccagagc	540
	agcggtagct ccaccgtctc catcagcgag ggtggcaacc ccggcaacc gggtaacccc	600
	ggcaaccccg gcaaccccgg taacccgggt aaccccggcg gtggctgcgt cgcgaccctc	660
	taa	663
<210>	52	
<211>	663	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	变体	
<400>	52	
	gacacctgca tcacccagaa ccagaccggc tacgacaacg gctacttcta ctcgttctgg	60
	accgacgcgc ccggcaccgt catcatgtgc ctccactcgg gcggcagcta cagcacctcg	120
	tggcgcaaca ccggcaactt cgtcgccggc aagggtggt ccaccggcgg ccgccgcacc	180
	gtcacctaca acgcctcctt caaccgctcg ggtaacgct acctcacgct ctacggctgg	240
	accaggaacc cgctcgtcga gtactacatc gtcgagagct ggggcaccta ccggcccacc	300
	ggcacctaca agggcaccgt caccaccgac ggcggcacgt acgacatcta cgagacctgg	360
	cggtacaacg cgccgtccat cgagggcacc cggaccttc agcagttctg gacgctccgg	420
	cagcagaagc ggaccagcgg caccatcacc atcggcaacc acttcgacgc ctgggcccgc	480
	gccggcatga acctgggcag ccacgactac cagatcatgg cgaccgagg ctaccagagc	540
	agcggtagct ccaccgtctc catcagcgag ggtggcaacc ccggcaacc gggtaacccc	600
	ggcaaccccg gcaaccccgg taacccgggt aaccccggcg gtggctgcgt cgcgaccctc	660
	taa	663
<210>	53	
<211>	663	

<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	变体	
<400>	53	
	gacaccacca tcaccagaa ccagaccggc tacgacaacg gctacttcta ctcgttctgg	60
	accgactccc ccggcaccgt ctccatgacc ctccactcgg gcggcagcta cagcacctcg	120
	tggcgcaaca ccggcaactt cgtcgccggc aagggtctgt ccaccggcgg ccgccgcacc	180
	gtcacctaca acgcctcctt caaccctcgg ggtaacgcct acctcacgct ctacggctgg	240
	accaggaacc cgctcgtcga gtactacatc gtcgagagct ggggcaccta ccggcccacc	300
	ggcacctaca agggcaccgt caccaccgac ggcggcacgt acgacatcta cgagacctgg	360
	cggtacaacg cgccgtccat cgagggcacc cggaccttc agcagttctg gagcgtccgg	420
	cagcagaagc ggaccagcgg caccatcacc atcggcaacc acttcgacgc ctgggcccgc	480
	gccggcatga acctgggcag ccacgactac cagatcatgg cgaccgagg ctaccagagc	540
	agcggtagct ccaccgtctc catcagcgag ggtggcaacc ccggcaacc gggtaacccc	600
	ggcaaccccg gcaaccccgg taaccgggt aaccccggcg gtggctgcgt cgcgacctc	660
	taa	663
<210>	54	
<211>	663	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	变体	
<400>	54	
	gacaccacca tcaccagaa ccagaccggc tacgacaacg gctacttcta ctcgttctgg	60
	accgacgcgc ccggcaccgt catcatgacc ctccactcgg gcggcagcta cagcacctcg	120
	tggcgcaaca ccggcaactt cgtcgccggc aagggtctgt ccaccggcgg ccgccgcacc	180
	gtcacctaca acgcctcctt caaccctcgg ggtaacgcct acctcacgct ctacggctgg	240
	accaggaacc cgctcgtcga gtactacatc gtcgagagct ggggcaccta ccggcccacc	300
	ggcacctaca agggcaccgt caccaccgac ggcggcacgt acgacatcta cgagacctgg	360
	cggtacaacg cgccgtccat cgagggcacc cggaccttc agcagttctg gagcgtccgg	420
	cagcagaagc ggaccagcgg caccatcacc atcggcaacc acttcgacgc ctgggcccgc	480
	gccggcatga acctgggcag ccacgactac cagatcatgg cgaccgagg ctaccagagc	540
	agcggtagct ccaccgtctc catcagcgag ggtggcaacc ccggcaacc gggtaacccc	600
	ggcaaccccg gcaaccccgg taaccgggt aaccccggcg gtggctgcgt cgcgacctc	660
	taa	663
<210>	55	
<211>	663	
<212>	DNA	

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 变体	
<400> 55	
gacaccacca tcaccagaa ccagaccggc tacgacaacg gctacttcta ctcgttctgg	60
accgactccc ccggcaccgt catcatgacc ctccactcgg gcggcagcta cagcacctcg	120
tggcgcaaca ccggcaactt cgtcgccggc aagggtctgt ccaccggcgg ccgccgcacc	180
gtcacctaca acgcctcctt caaccgtcg ggtaacgctt acctcacgct ctacggctgg	240
accaggaacc cgctcgtcga gtactacatc gtcgagagct ggggcaccta ccggcccacc	300
ggcacctaca agggcaccgt caccaccgac ggcggcacgt acgacatcta cgagacctgg	360
cggtacaacg cgccgtccat cgagggcacc cggaccttc agcagttctg gagcgtccgg	420
cagcagaagc ggaccagcgg caccatcacc atcggcaacc acttcgacgc ctgggcccgc	480
gccggcatga acctgggcag ccacgaactac cagatcatgg cgaccgagg ctaccagagc	540
agcggtagct ccaccgtctc catcagcgag ggtggcaacc ccggcaacc gggtaacccc	600
ggcaaccccg gcaaccccgg taacccgggt aaccccggcg gtggctgcgt cgcgaccctc	660
taa	663
<210> 56	
<211> 663	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 变体	
<400> 56	
gacaccacca tcaccagaa ccagaccggg tacgacaacg gctacttcta ctcgttctgg	60
accgacgcgc ccgggaccgt ctccatgacc ctccactcgg gcggcagcta cagcacctcg	120
tggcgcaaca ccggcaactt cgtcgccggc aagggtctgt ccaccggcgg ccgccgcacc	180
gtcacctaca acgcctcctt caaccgtcg ggtaacgctt acctcacgct ctacggctgg	240
accaggaacc cgctcgtcga gtactacatc gtcgagagct ggggcaccta ccggcccacc	300
ggcacctaca agggcaccgt caccaccgac ggcggcacgt acgacatcta cgagacctgg	360
cggtacaacg cgccgtccat cgagggcacc cggaccttc agcagttctg gagcgtccgg	420
cagcagaagc ggaccagcgg caccatcacc atcggcaacc acttcgacgc ctgggcccgc	480
gccggcatga acctgggcag ccacgaactac cagatcatgg cgaccgagg ctaccagagc	540
agcggtagct ccaccgtctc catcagcgag ggtggcaacc ccggcaacc gggtaacccc	600
ggcaaccccg gcaaccccgg taacccgggt aaccccggcg gtggctgcgt cgcgaccctc	660
taa	663
<210> 57	
<211> 663	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<220>	
<223>	变体
<400>	57
gacacctgca tcaccagaa ccagaccggg tacgacaacg gctacttcta ctcgttctgg	60
accgactccc ccgggaccgt catcatgtgc ctccactcgg gcggcagcta cagcacctcg	120
tggcgcaaca ccggcaactt cgtcgccggc aagggctggt ccaccggcgg ccgccgcacc	180
gtcacctaca acgcctcctt caaccctcgc ggtaacgcct acctcacgct ctacggctgg	240
accaggaacc cgctcgtcga gtactacatc gtcgagagct ggggcaccta ccggcccacc	300
ggcacctaca agggcaccgt caccaccgac ggcggcacgt acgacatcta cgagacctgg	360
cggtacaacg cgccgtccat cgagggcacc cggaccttc agcagttctg gagcgtccgg	420
cagcagaagc ggaccagcgg caccatcacc atcggcaacc acttcgacgc ctgggcccgc	480
gccggcatga acctgggcag ccacgactac cagatcatgg cgaccgagg ctaccagagc	540
agcggtagct ccaccgtctc catcagcgag ggtggcaacc ccggcaacc gggtaacccc	600
ggcaaccccg gcaaccccgg taacccgggt aaccccggcg gtggctgcgt cgccaccctc	660
taa	663
<210>	58
<211>	663
<212>	DNA
<213>	人工序列
<220>	
<223>	变体
<400>	58
gacacctgca tcaccagaa ccagaccggg tacgacaacg gctacttcta ctcgttctgg	60
accgactacc ccgggaccgt catcatgtgc ctccactcgg gcggcagcta cagcacctcg	120
tggcgcaaca ccggcaactt cgtcgccggc aagggctggt ccaccggcgg ccgccgcacc	180
gtcacctaca acgcctcctt caaccctcgc ggtaacgcct acctcacgct ctacggctgg	240
accaggaacc cgctcgtcga gtactacatc gtcgagagct ggggcaccta ccggcccacc	300
ggcacctaca agggcaccgt caccaccgac ggcggcacgt acgacatcta cgagacctgg	360
cggtacaacg cgccgtccat cgagggcacc cggaccttc agcagttctg gagcgtccgg	420
cagcagaagc ggaccagcgg caccatcacc atcggcaacc acttcgacgc ctgggcccgc	480
gccggcatga acctgggcag ccacgactac cagatcatgg cgaccgagg ctaccagagc	540
agcggtagct ccaccgtctc catcagcgag ggtggcaacc ccggcaacc gggtaacccc	600
ggcaaccccg gcaaccccgg taacccgggt aaccccggcg gtggctgcgt cgccaccctc	660
taa	663
<210>	59
<211>	663
<212>	DNA
<213>	人工序列
<220>	

<223> 变体	
<400> 59	
gacacctgca tcaccagaa ccagaccggg tacgacaacg gctacttcta ctcgttctgg	60
accgaccacc ccgggaccgt catcatgtgc ctccactcgg gcggcagcta cagcacctcg	120
tggcgcaaca ccggcaactt cgtcgccggc aagggtggt ccaccggcgg ccgccgcacc	180
gtcacctaca acgcctcctt caaccgtcg ggtaacgctt acctcacgct ctacggctgg	240
accaggaacc cgctcgtcga gtactacatc gtcgagagct ggggcaccta ccggcccacc	300
ggcacctaca agggcaccgt caccaccgac ggcggcacgt acgacatcta cgagacctgg	360
cggtacaacg cgccgtccat cgagggcacc cggaccttc agcagttctg gagcgtccgg	420
cagcagaagc ggaccagcgg caccatcacc atcggcaacc atttcgacgc ctgggcccgc	480
gccggcatga acctgggcag ccacgactac cagatcatgg cgaccgagg ctaccagagc	540
agcggtagct ccaccgtctc catcagcgag ggtggcaacc ccggcaacc gggtaacccc	600
ggcaaccccg gcaaccccgg taacccgggt aaccccggcg gtggctgcgt cgccaccctc	660
taa	663
<210> 60	
<211> 663	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 变体	
<400> 60	
gacacctgca tcaccagaa ccagaccggg tacgacaacg gctacttcta ctcgttctgg	60
accgacacc ccgggaccgt catcatgtgc ctccactcgg gcggcagcta cagcacctcg	120
tggcgcaaca ccggcaactt cgtcgccggc aagggtggt ccaccggcgg ccgccgcacc	180
gtcacctaca acgcctcctt caaccgtcg ggtaacgctt acctcacgct ctacggctgg	240
accaggaacc cgctcgtcga gtactacatc gtcgagagct ggggcaccta ccggcccacc	300
ggcacctaca agggcaccgt caccaccgac ggcggcacgt acgacatcta cgagacctgg	360
cggtacaacg cgccgtccat cgagggcacc cggaccttc agcagttctg gagcgtccgg	420
cagcagaagc ggaccagcgg caccatcacc atcggcaacc atttcgacgc ctgggcccgc	480
gccggcatga acctgggcag ccacgactac cagatcatgg cgaccgagg ctaccagagc	540
agcggtagct ccaccgtctc catcagcgag ggtggcaacc ccggcaacc gggtaacccc	600
ggcaaccccg gcaaccccgg taacccgggt aaccccggcg gtggctgcgt cgccaccctc	660
taa	663
<210> 61	
<211> 663	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 变体	

<400> 61	
gacacctgca tcaccagaa ccagaccggg tacgacaacg gctacttcta ctcgttctgg	60
accgacatgc ccgggaccgt catcatgtgc ctccactcgg gcggcagcta cagcacctcg	120
tggcgcaaca ccggcaactt cgtcgccggc aagggtggt ccaccggcgg ccgccgcacc	180
gtcacctaca acgcctcctt caaccctcgc ggtaacgctt acctcacgct ctacggctgg	240
accaggaacc cgctcgtcga gtactacatc gtcgagagct ggggcaccta ccggcccacc	300
ggcacctaca agggcaccgt caccaccgac ggcggcacgt acgacatcta cgagacctgg	360
cggtacaacg cgccgtccat cgagggcacc cggaccttcc agcagttctg gagcgtccgg	420
cagcagaagc ggaccagcgg caccatcacc atcggcaacc acttcgacgc ctgggcccgc	480
gccggcatga acctgggcag ccacgactac cagatcatgg cgaccgaggg ctaccagagc	540
agcggtagct ccaccgtctc catcagcgag ggtggcaacc ccggcaacc ccggtaacccc	600
ggcaaccccg gcaaccccgg taaccgggt aaccccggcg gtggctgcgt cgccaccctc	660
taa	663
<210> 62	
<211> 663	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 变体	
<400> 62	
gacacctgca tcaccagaa ccagaccggg tacgacaacg gctacttcta ctcgttctgg	60
accgaccgcc ccgggaccgt catcatgtgc ctccactcgg gcggcagcta cagcacctcg	120
tggcgcaaca ccggcaactt cgtcgccggc aagggtggt ccaccggcgg ccgccgcacc	180
gtcacctaca acgcctcctt caaccctcgc ggtaacgctt acctcacgct ctacggctgg	240
accaggaacc cgctcgtcga gtactacatc gtcgagagct ggggcaccta ccggcccacc	300
ggcacctaca agggcaccgt caccaccgac ggcggcacgt acgacatcta cgagacctgg	360
cggtacaacg cgccgtccat cgagggcacc cggaccttcc agcagttctg gagcgtccgg	420
cagcagaagc ggaccagcgg caccatcacc atcggcaacc acttcgacgc ctgggcccgc	480
gccggcatga acctgggcag ccacgactac cagatcatgg cgaccgaggg ctaccagagc	540
agcggtagct ccaccgtctc catcagcgag ggtggcaacc ccggcaacc ccggtaacccc	600
ggcaaccccg gcaaccccgg taaccgggt aaccccggcg gtggctgcgt cgccaccctc	660
taa	663
<210> 63	
<211> 663	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 变体	
<400> 63	

gacacctgca tcaccagaa ccagaccggg tacgacaacg gctacttcta ctcgttctgg	60
accgactccc ccgggaccgt cctcatgtgc ctccactcgg gcggcagcta cagcacctcg	120
tggcgcaaca ccggcaactt cgtcgccggc aagggtggt ccaccggcgg ccgccgcacc	180
gtcacctaca acgcctcctt caaccgtcg ggtaacgctt acctcacgct ctacggctgg	240
accaggaacc cgctcgtcga gtactacatc gtcgagagct ggggcaccta ccggcccacc	300
ggcacctaca agggcaccgt caccaccgac ggcggcacgt acgacatcta cgagacctgg	360
cggtacaacg cgccgtccat cgagggcacc cggaccttc agcagttctg gagcgtccgg	420
cagcagaagc ggaccagcgg caccatcacc atcggcaacc acttcgacgc ctgggcccgc	480
gccggcatga acctgggcag ccacgactac cagatcatgg cgaccgagg ctaccagagc	540
agcggtagct ccaccgtctc catcagcgag ggtggcaacc ccggcaacc gggtaacccc	600
ggcaaccccg gcaaccccg taacccgggt aacccggcg gtggctgcgt cgccaccctc	660
taa	663
<210> 64	
<211> 663	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 变体	
<400> 64	
gacacctgca tcaccagaa ccagaccggg tacgacaacg gctacttcta ctcgttctgg	60
accgactccc ccgggaccgt ccgcatgtgc ctccactcgg gcggcagcta cagcacctcg	120
tggcgcaaca ccggcaactt cgtcgccggc aagggtggt ccaccggcgg ccgccgcacc	180
gtcacctaca acgcctcctt caaccgtcg ggtaacgctt acctcacgct ctacggctgg	240
accaggaacc cgctcgtcga gtactacatc gtcgagagct ggggcaccta ccggcccacc	300
ggcacctaca agggcaccgt caccaccgac ggcggcacgt acgacatcta cgagacctgg	360
cggtacaacg cgccgtccat cgagggcacc cggaccttc agcagttctg gagcgtccgg	420
cagcagaagc ggaccagcgg caccatcacc atcggcaacc acttcgacgc ctgggcccgc	480
gccggcatga acctgggcag ccacgactac cagatcatgg cgaccgagg ctaccagagc	540
agcggtagct ccaccgtctc catcagcgag ggtggcaacc ccggcaacc gggtaacccc	600
ggcaaccccg gcaaccccg taacccgggt aacccggcg gtggctgcgt cgccaccctc	660
taa	663
<210> 65	
<211> 663	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 变体	
<400> 65	
gacacctgca tcaccagaa ccagaccggg tacgacaacg gctacttcta ctcgttctgg	60

accgactccc ccgggaccgt catgatgtgc ctccactcgg gcggcagcta cagcacctcg	120
tggcgcaaca ccggcaactt cgtcgccggc aagggtctggt ccaccggcgg ccgccgcacc	180
gtcacctaca acgcctcctt caaccctcgc ggtaacgcct acctcacgct ctacggctgg	240
accaggaacc cgctcgtcga gtactacatc gtcgagagct ggggcaccta ccggcccacc	300
ggcacctaca agggcaccgt caccaccgac ggcggcacgt acgacatcta cgagacctgg	360
cggtacaacg cgccgtccat cgagggcacc cggaccttcc agcagttctg gagcgtccgg	420
cagcagaagc ggaccagcgg caccatcacc atcggcaacc acttcgacgc ctgggcccgc	480
gccggcatga acctgggcag ccacgactac cagatcatgg cgaccgaggg ctaccagagc	540
agcggtagct ccaccgtctc catcagcgag ggtggcaacc ccggcaacc gggtaacccc	600
ggcaaccccc gcaacccccg taacccgggt aacccggcg gtggctgcgt cgccaccctc	660
taa	663
<210> 66	
<211> 663	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 变体	
<400> 66	
gacacctgca tcaccagaa ccagaccggg tacgacaacg gctacttcta ctcgttctgg	60
accgactccc ccgggaccgt ccagatgtgc ctccactcgg gcggcagcta cagcacctcg	120
tggcgcaaca ccggcaactt cgtcgccggc aagggtctggt ccaccggcgg ccgccgcacc	180
gtcacctaca acgcctcctt caaccctcgc ggtaacgcct acctcacgct ctacggctgg	240
accaggaacc cgctcgtcga gtactacatc gtcgagagct ggggcaccta ccggcccacc	300
ggcacctaca agggcaccgt caccaccgac ggcggcacgt acgacatcta cgagacctgg	360
cggtacaacg cgccgtccat cgagggcacc cggaccttcc agcagttctg gagcgtccgg	420
cagcagaagc ggaccagcgg caccatcacc atcggcaacc acttcgacgc ctgggcccgc	480
gccggcatga acctgggcag ccacgactac cagatcatgg cgaccgaggg ctaccagagc	540
agcggtagct ccaccgtctc catcagcgag ggtggcaacc ccggcaacc gggtaacccc	600
ggcaaccccc gcaacccccg taacccgggt aacccggcg gtggctgcgt cgccaccctc	660
taa	663
<210> 67	
<211> 663	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 变体	
<400> 67	
gacacctgca tcaccagaa ccagaccggg tacgacaacg gctacttcta ctcgttctgg	60
accgactccc ccgggaccgt ctacatgtgc ctccactcgg gcggcagcta cagcacctcg	120

tggcgcaaca cgggcaactt cgtcgccggc aagggtggt ccaccggcgg cgcgccacc	180
gtcacctaca acgcctcctt caaccgtcg ggtaacgctt acctacgct ctacggctgg	240
accaggaacc cgctcgtcga gtactacatc gtcgagagct ggggcaccta ccggcccacc	300
ggcacctaca agggcaccgt caccaccgac ggcggcacgt acgacatcta cgagacctgg	360
cggtacaacg cgccgtccat cgagggcacc cggaccttc agcagttctg gagcgtccgg	420
cagcagaagc ggaccagcgg caccatcacc atcggcaacc atttcgacgc ctgggcccgc	480
gccggcatga acctgggcag ccacgactac cagatcatgg cgaccgagg ctaccagagc	540
agcggtagct ccaccgtctc catcagcgag gttggcaacc ccggcaacc gggtaacccc	600
ggcaaccccc gcaacccccg taacccgggt aacccggcg gtggctgcgt cgccaccctc	660
taa	663

<210> 68

<211> 663

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 变体

<400> 68

gacacctgca tcaccagaa ccagaccggg tacgacaacg gctacttcta ctcgttctgg	60
accgactccc ccgggaccgt ctggatgtgc ctccactcgg gcggcagcta cagcacctcg	120
tggcgcaaca cgggcaactt cgtcgccggc aagggtggt ccaccggcgg cgcgccacc	180
gtcacctaca acgcctcctt caaccgtcg ggtaacgctt acctacgct ctacggctgg	240
accaggaacc cgctcgtcga gtactacatc gtcgagagct ggggcaccta ccggcccacc	300
ggcacctaca agggcaccgt caccaccgac ggcggcacgt acgacatcta cgagacctgg	360
cggtacaacg cgccgtccat cgagggcacc cggaccttc agcagttctg gagcgtccgg	420
cagcagaagc ggaccagcgg caccatcacc atcggcaacc atttcgacgc ctgggcccgc	480
gccggcatga acctgggcag ccacgactac cagatcatgg cgaccgagg ctaccagagc	540
agcggtagct ccaccgtctc catcagcgag gttggcaacc ccggcaacc gggtaacccc	600
ggcaaccccc gcaacccccg taacccgggt aacccggcg gtggctgcgt cgccaccctc	660
taa	663

<210> 69

<211> 663

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 变体

<400> 69

gacacctgca tcaccagaa ccagaccggg tacgacaacg gctacttcta ctcgttctgg	60
accgactccc ccgggaccgt caccatgtgc ctccactcgg gcggcagcta cagcacctcg	120
tggcgcaaca cgggcaactt cgtcgccggc aagggtggt ccaccggcgg cgcgccacc	180

gtcacctaca acgcctcctt caaccctcgc ggtaacgcct acctcacgct ctacggctgg 240  
 accaggaacc cgctcgtcga gtactacatc gtcgagagct ggggcaccta ccggcccacc 300  
 ggcacctaca agggcaccgt caccaccgac ggcggcacgt acgacatcta cgagacctgg 360  
 cggtacaacg cgccgtccat cgagggcacc cggaccttcc agcagttctg gagcgtccgg 420  
 cagcagaagc ggaccagcgg caccatcacc atcggcaacc acttcgacgc ctgggcccgc 480  
 gccggcatga acctgggcag ccacgactac cagatcatgg cgaccgaggg ctaccagagc 540  
 agcggtagct ccaccgtctc catcagcgag ggtggcaacc ccggcaacc ggtaacccc 600  
 ggcaaccccc gcaacccccg taaccgggt aacccggcg gtggctgcgt cgccaccctc 660  
 taa 663

<210> 70

<211> 663

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 变体

<400> 70

gacacctgca tcaccagaa ccagaccggg tacgacaacg gctacttcta ctcgttctgg 60  
 accgactccc ccgggaccgt caacatgtgc ctccactcgg gcggcagcta cagcacctcg 120  
 tggcgcaaca ccggcaactt cgtcgccggc aagggtctgt ccaccggcgg ccgccgcacc 180  
 gtcacctaca acgcctcctt caaccctcgc ggtaacgcct acctcacgct ctacggctgg 240  
 accaggaacc cgctcgtcga gtactacatc gtcgagagct ggggcaccta ccggcccacc 300  
 ggcacctaca agggcaccgt caccaccgac ggcggcacgt acgacatcta cgagacctgg 360  
 cggtacaacg cgccgtccat cgagggcacc cggaccttcc agcagttctg gagcgtccgg 420  
 cagcagaagc ggaccagcgg caccatcacc atcggcaacc acttcgacgc ctgggcccgc 480  
 gccggcatga acctgggcag ccacgactac cagatcatgg cgaccgaggg ctaccagagc 540  
 agcggtagct ccaccgtctc catcagcgag ggtggcaacc ccggcaacc ggtaacccc 600  
 ggcaaccccc gcaacccccg taaccgggt aacccggcg gtggctgcgt cgccaccctc 660  
 taa 663

<210> 71

<211> 663

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 变体

<400> 71

gacacctgca tcaccagaa ccagaccggg tacgacaacg gctacttcta ctcgttctgg 60  
 accgactccc ccgggaccgt cgtcatgtgc ctccactcgg gcggcagcta cagcacctcg 120  
 tggcgcaaca ccggcaactt cgtcgccggc aagggtctgt ccaccggcgg ccgccgcacc 180  
 gtcacctaca acgcctcctt caaccctcgc ggtaacgcct acctcacgct ctacggctgg 240

accaggaacc cgctcgtcga gtactacatc gtcgagagct ggggcaccta ccggcccacc 300  
 ggcacctaca agggcaccgt caccaccgac ggcggcacgt acgacatcta cgagacctgg 360  
 cgggtacaacg cgccgtccat cgagggcacc cggaccttcc agcagttctg gagcgtccgg 420  
 cagcagaagc ggaccagcgg caccatcacc atcggcaacc atttcgacgc ctgggcccgc 480  
 gccggcatga acctgggcag ccacgactac cagatcatgg cgaccgaggg ctaccagagc 540  
 agcggtagct ccaccgtctc catcagcgag ggtggcaacc ccggcaacc gggtaacccc 600  
 ggcaaccccc gcaacccccg taacccgggt aaccccgcg gtggctgcgt cgccaccctc 660  
 taa 663

<210> 72

<211> 663

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 变体

<400> 72

gacacctgca tcaccagaa ccagaccggg tacgacaacg gctacttcta ctcgttctgg 60  
 accgaccgcc ccgggaccgt cctcatgtgc ctccactcgg gcggcagcta cagcacctcg 120  
 tggcgcaaca ccggcaactt cgtcgccggc aagggtggt ccaccggcgg ccgccgcacc 180  
 gtcacctaca acgcctcctt caaccgtcg ggtaacgct acctcacgct ctacggctgg 240  
 accaggaacc cgctcgtcga gtactacatc gtcgagagct ggggcaccta ccggcccacc 300  
 ggcacctaca agggcaccgt caccaccgac ggcggcacgt acgacatcta cgagacctgg 360  
 cgggtacaacg cgccgtccat cgagggcacc cggaccttcc agcagttctg gagcgtccgg 420  
 cagcagaagc ggaccagcgg caccatcacc atcggcaacc atttcgacgc ctgggcccgc 480  
 gccggcatga acctgggcag ccacgactac cagatcatgg cgaccgaggg ctaccagagc 540  
 agcggtagct ccaccgtctc catcagcgag ggtggcaacc ccggcaacc gggtaacccc 600  
 ggcaaccccc gcaacccccg taacccgggt aaccccgcg gtggctgcgt cgccaccctc 660  
 taa 663

<210> 73

<211> 663

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 变体

<400> 73

gacacctgca tcaccagaa ccagaccggg tacgacaacg gctacttcta ctcgttctgg 60  
 accgaccgcc ccgggaccgt ccagatgtgc ctccactcgg gcggcagcta cagcacctcg 120  
 tggcgcaaca ccggcaactt cgtcgccggc aagggtggt ccaccggcgg ccgccgcacc 180  
 gtcacctaca acgcctcctt caaccgtcg ggtaacgct acctcacgct ctacggctgg 240  
 accaggaacc cgctcgtcga gtactacatc gtcgagagct ggggcaccta ccggcccacc 300

ggcacctaca agggcaccgt caccaccgac ggcggcacgt acgacatcta cgagacctgg 360  
 cggtacaacg cgccgtccat cgagggcacc cggaccttcc agcagttctg gagcgtccgg 420  
 cagcagaagc ggaccagcgg caccatcacc atcggcaacc acttcgacgc ctgggcccgc 480  
 gccggcatga acctgggcag ccacgactac cagatcatgg cgaccgaggg ctaccagagc 540  
 agcggtagct ccaccgtctc catcagcgag ggtggcaacc cggcaaccc gggtaacccc 600  
 ggcaacccccg gcaacccccg taaccgggt aacccggcg gtggctgcgt cgccaccctc 660  
 taa 663

<210> 74

<211> 663

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 变体

<400> 74

gacacctgca tcaccagaa ccagaccggg tacgacaacg gctacttcta ctgttctgg 60  
 accgaccacc ccgggaccgt cctcatgtgc ctccactcgg gcggcagcta cagcacctcg 120  
 tggcgcaaca ccggcaactt cgtcgccggc aagggtggt ccaccggcgg ccgccgacc 180  
 gtcacctaca acgcctcctt caaccgctc ggtaacgct acctcacgct ctacggctgg 240  
 accaggaacc cgctcgtcga gtactacatc gtcgagagct ggggcaccta ccggcccacc 300  
 ggcacctaca agggcaccgt caccaccgac ggcggcacgt acgacatcta cgagacctgg 360  
 cggtacaacg cgccgtccat cgagggcacc cggaccttcc agcagttctg gagcgtccgg 420  
 cagcagaagc ggaccagcgg caccatcacc atcggcaacc acttcgacgc ctgggcccgc 480  
 gccggcatga acctgggcag ccacgactac cagatcatgg cgaccgaggg ctaccagagc 540  
 agcggtagct ccaccgtctc catcagcgag ggtggcaacc cggcaaccc gggtaacccc 600  
 ggcaacccccg gcaacccccg taaccgggt aacccggcg gtggctgcgt cgccaccctc 660  
 taa 663

<210> 75

<211> 663

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 变体

<400> 75

gacacctgca tcaccagaa ccagaccggg tacgacaacg gctacttcta ctgttctgg 60  
 accgacacc ccgggaccgt cctcatgtgc ctccactcgg gcggcagcta cagcacctcg 120  
 tggcgcaaca ccggcaactt cgtcgccggc aagggtggt ccaccggcgg ccgccgacc 180  
 gtcacctaca acgcctcctt caaccgctc ggtaacgct acctcacgct ctacggctgg 240  
 accaggaacc cgctcgtcga gtactacatc gtcgagagct ggggcaccta ccggcccacc 300  
 ggcacctaca agggcaccgt caccaccgac ggcggcacgt acgacatcta cgagacctgg 360

cggtacaacg cgccgtccat cgagggcacc cggacettcc agcagttctg gagcgtccgg	420
cagcagaagc ggaccagcgg caccatcacc atcggcaacc atttcgacgc ctggggcccgc	480
gccggcatga acctgggcag ccacgactac cagatcatgg cgaccgaggg ctaccagagc	540
agcggtagct ccaccgtctc catcagcgag ggtggcaacc cggcaaccc gggtaacccc	600
ggcaacccccg gcaacccccg taacccgggt aaccccggcg gtggctgcgt cgccaccctc	660
taa	663
<210> 76	
<211> 663	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 变体	
<400> 76	
gacacctgca tcaccagaa ccagaccggg tacgacaacg gctacttcta ctcgttctgg	60
accgactggc ccgggaccgt catcatgtgc ctccactcgg gcggcagcta cagcacctcg	120
tggcgcaaca ccggcaactt cgtcgccggc aagggtctgt ccaccggcgg ccgccgcacc	180
gtcacctaca acgcctcett caaccctcgc ggtaacgcct acctcacgct ctacggctgg	240
accaggaacc cgctcgtcga gtactacatc gtcgagagct ggggcaccta ccggcccacc	300
ggcacctaca agggcaccgt caccaccgac ggcggcacgt acgacatcta cgagacctgg	360
cggtacaacg cgccgtccat cgagggcacc cggacettcc agcagttctg gagcgtccgg	420
cagcagaagc ggaccagcgg caccatcacc atcggcaacc atttcgacgc ctggggcccgc	480
gccggcatga acctgggcag ccacgactac cagatcatgg cgaccgaggg ctaccagagc	540
agcggtagct ccaccgtctc catcagcgag ggtggcaacc cggcaaccc gggtaacccc	600
ggcaacccccg gcaacccccg taacccgggt aaccccggcg gtggctgcgt cgccaccctc	660
taa	663
<210> 77	
<211> 663	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 变体	
<400> 77	
gacacctgca tcaccagaa ccagaccggg tacgacaacg gctacttcta ctcgttctgg	60
accgaccccc ccgggaccgt catcatgtgc ctccactcgg gcggcagcta cagcacctcg	120
tggcgcaaca ccggcaactt cgtcgccggc aagggtctgt ccaccggcgg ccgccgcacc	180
gtcacctaca acgcctcett caaccctcgc ggtaacgcct acctcacgct ctacggctgg	240
accaggaacc cgctcgtcga gtactacatc gtcgagagct ggggcaccta ccggcccacc	300
ggcacctaca agggcaccgt caccaccgac ggcggcacgt acgacatcta cgagacctgg	360
cggtacaacg cgccgtccat cgagggcacc cggacettcc agcagttctg gagcgtccgg	420

cagcagaagc ggaccagcgg caccatcacc atcggcaacc acttcgacgc ctgggcccgc	480
gccggcatga acctgggcag ccacgactac cagatcatgg cgaccgaggg ctaccagagc	540
agcggtagct ccaccgtctc catcagcgag ggtggcaacc ccggcaacc gggtaacccc	600
ggcaacccccg gcaacccccg taacccgggt aaccccggcg gtggctgcgt cgccaccctc	660
taa	663
<210> 78	
<211> 663	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 变体	
<400> 78	
gacacctgca tcaccagaa ccagaccggg tacgacaacg gctacttcta ctcgttctgg	60
accgactccc ccgggaccgt ccccatgtgc ctccactcgg gcggcagcta cagcacctcg	120
tggcgcaaca ccggcaactt cgtcgccggc aagggtctgg ccaccggcgg ccgccgcacc	180
gtcacctaca acgcctcctt caaccctcg ggtaacgctt acctcacgct ctacggctgg	240
accaggaacc cgctcgtcga gtactacatc gtcgagagct ggggcaccta ccggcccacc	300
ggcacctaca agggcaccgt caccaccgac ggcggcacgt acgacatcta cgagacctgg	360
cggtacaacg cgccgtccat cgagggcacc cggaccttc agcagttctg gacgctccgg	420
cagcagaagc ggaccagcgg caccatcacc atcggcaacc acttcgacgc ctgggcccgc	480
gccggcatga acctgggcag ccacgactac cagatcatgg cgaccgaggg ctaccagagc	540
agcggtagct ccaccgtctc catcagcgag ggtggcaacc ccggcaacc gggtaacccc	600
ggcaacccccg gcaacccccg taacccgggt aaccccggcg gtggctgcgt cgccaccctc	660
taa	663
<210> 79	
<211> 585	
<212> DNA	
<213> 草状孢菌属NEAU-GS84	
<400> 79	
caggctgccg tcaccactaa ccagaccggc actaacaacg gctactggta cagcttctgg	60
accgacgcc agggcaccgt ctctatggag ctcggcagcg gcggcaacta cagcacctcg	120
tggcgcaaca ccggcaactt cgtcgctggc aagggtctgg agactggcgg gcgccgcacc	180
gtctcttact cgggtctttt caaccccagc ggcaacgctt acctactct gtacggctgg	240
accgcaacc ctctcatcga gtactacatc gtcgacaact ggggcactta ccgccctacc	300
ggcagcttca agggcactgt caccagcgac ggcggcacct acgacatcta cgagaccact	360
cgcaccaacg ccccttctat cgagggcact cgcacctta agcagttctg gacgctccgc	420
cagcagaaga agactggcgg caccatcact gccggcaacc acttcgacgc ctggtctcgc	480
gccggcatgc agctgggcaa ccacgactac atgatcatgg ccaccgaggg ctaccagagc	540
tctggctcca gcaacatcac catcggcggc ggcacgaacc cttaa	585

<210>	80	
<211>	585	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	草状孢菌属NEAU-GS84的变体	
<400>	80	
	caggcttgcg tcaccactaa ccagaccggc actaacaacg gctactggta cagcttctgg	60
	accgacgcc agggcaccgt ctctatgtgc ctcggcagcg gcggcaacta cagcacctcg	120
	tggcgcaaca ccggcaactt cgtcgtggc aagggtggc agactggcgg gcgccgcacg	180
	gtctcttact cgggctcttt caaccccagc ggcaacgctt acctactct gtacggctgg	240
	accgcaacc ctctcatcga gtactacatc gtcgacaact ggggactta ccgccctacc	300
	ggcagcttca agggcactgt caccagcgac ggcggcactt acgacatcta cgagaccact	360
	cgcaccaacg ccccttctat cgagggcact cgcaccttea agcagttctg gagcgtccgc	420
	cagcagaaga agactggcgg caccatcact gccggcaacc acttcgacgc ctggtctcgc	480
	gccggcatgc agctgggcaa ccacgactac atgatcatgg ccaccgaggg ctaccagagc	540
	tctggctcca gcaacatcac catcggcggc ggcacgaacc ctaa	585
<210>	81	
<211>	585	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	草状孢菌属NEAU-GS84的变体	
<400>	81	
	caggcttgcg tcaccactaa ccagaccggc actaacaacg gctactggta cagcttctgg	60
	accgacagcc agggcaccgt cattatgtgc ctcggcagcg gcggcaacta cagcacctcg	120
	tggcgcaaca ccggcaactt cgtcgtggc aagggtggc agactggcgg gcgccgcacg	180
	gtctcttact cgggctcttt caaccccagc ggcaacgctt acctactct gtacggctgg	240
	accgcaacc ctctcatcga gtactacatc gtcgacaact ggggactta ccgccctacc	300
	ggcagcttca agggcactgt caccagcgac ggcggcactt acgacatcta cgagaccact	360
	cgcaccaacg ccccttctat cgagggcact cgcaccttea agcagttctg gagcgtccgc	420
	cagcagaaga agactggcgg caccatcact gccggcaacc acttcgacgc ctggtctcgc	480
	gccggcatgc agctgggcaa ccacgactac atgatcatgg ccaccgaggg ctaccagagc	540
	tctggctcca gcaacatcac catcggcggc ggcacgaacc ctaa	585
<210>	82	
<211>	576	
<212>	DNA	
<213>	拟诺卡氏菌属, 未分类	
<400>	82	

tctgctgcca	tcacctcaa	ccagactggc	accacaacg	gctacttcta	cagcttctgg	60
actgacagcc	ctggcaccgt	cagcatggag	ctcggcagcg	gcggaacta	cagcacctct	120
tggcgcaaca	ccggcaactt	cgtcgctggc	accggctgga	gcaccggcgg	gcgccgcagc	180
gtcacttact	ccgccagctt	taaccgctcg	ggcaacagct	acctgaccct	ctacggctgg	240
acccgcaacc	ctctggctga	gtactacatc	gtcgacaact	ggggcaccta	ccgccctacc	300
ggcactcaca	tgggactgt	cacgaccgac	ggcggcacgt	acgacatcta	ccgcaactcg	360
cgcaactaacg	cccctagcat	cgagggcact	cgcagcttcg	accagtactg	gagcgtccgc	420
cagtctcgcc	gcagctccgg	caccatcaact	tcgggcaacc	acttcgacgc	ctgggctcgc	480
gccggcatga	acctgggcag	ccacgactac	atgatcatgg	ccactgaggg	ctaccagagc	540
tctggctcga	gcaacgtcac	tctgggctcg	tcttaa			576

<210> 83

<211> 576

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 拟诺卡氏菌属的变体, 未分类

<400> 83

tctgcttga	tcacctcaa	ccagactggc	accacaacg	gctacttcta	cagcttctgg	60
actgacagcc	ctggcaccgt	cagcatgtgc	ctcggcagcg	gcggaacta	cagcacctct	120
tggcgcaaca	ccggcaactt	cgtcgctggc	accggctgga	gcaccggcgg	gcgccgcagc	180
gtcacttact	ccgccagctt	taaccgctcg	ggcaacagct	acctgaccct	ctacggctgg	240
acccgcaacc	ctctggctga	gtactacatc	gtcgacaact	ggggcaccta	ccgccctacc	300
ggcactcaca	tgggactgt	cacgaccgac	ggcggcacgt	acgacatcta	ccgcaactcg	360
cgcaactaacg	cccctagcat	cgagggcact	cgcagcttcg	accagtactg	gagcgtccgc	420
cagtctcgcc	gcagctccgg	caccatcaact	tcgggcaacc	acttcgacgc	ctgggctcgc	480
gccggcatga	acctgggcag	ccacgactac	atgatcatgg	ccactgaggg	ctaccagagc	540
tctggctcga	gcaacgtcac	tctgggctcg	tcttaa			576

<210> 84

<211> 576

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 拟诺卡氏菌属的变体, 未分类

<400> 84

tctgcttga	tcacctcaa	ccagactggc	accacaacg	gctacttcta	cagcttctgg	60
actgacagcc	ctggcaccgt	cattatgtgc	ctcggcagcg	gcggaacta	cagcacctct	120
tggcgcaaca	ccggcaactt	cgtcgctggc	accggctgga	gcaccggcgg	gcgccgcagc	180
gtcacttact	ccgccagctt	taaccgctcg	ggcaacagct	acctgaccct	ctacggctgg	240
acccgcaacc	ctctggctga	gtactacatc	gtcgacaact	ggggcaccta	ccgccctacc	300

ggcactcaca tgggcactgt cacgaccgac ggcggcacgt acgacatcta ccgcactcgc	360
cgcactaacg cccctagcat cgagggcact cgcagcttcg accagtactg gagcgtccgc	420
cagtctcgcc gcagctccgg caccatcact tcgggcaacc acttcgacgc ctgggctcgc	480
gccggcatga acctgggcag ccacgactac atgatcatgg cactgaggg ctaccagagc	540
tctggctcga gcaacgtcac tctgggctcg tcctaa	576
<210> 85	
<211> 588	
<212> DNA	
<213> <i>Nonomuraea longispora</i>	
<400> 85	
aacgccgcca tcaccagcaa ccagaccggc acgaacaacg gctacttcta ctcgttctgg	60
acggacgctc ctggcaccgt ctccatggag ctcggcagcg gcggcaacta ctccaccagc	120
tggcgcaaca cgggcaactt cgtcgtggc aagggtgtgt ccaccggcgg ccgacgcacg	180
gtctcgtact ccggcagctt caaccccgagc ggcaacgctt acctaccct gtacggctgg	240
acgcgcaacc ctctgatcga gtactacatc gtcgacaact ggggcaccta ccgccctacc	300
ggcgagtatc gcggcacggt caccagcgac ggtggcacct acgacatcta caagaccacg	360
cgctacgacg ctccctagcat cgagggcacc cgcacgttcg accagtactg gtcggtccgc	420
cagagcaagc gcaccggcgg ctcgatcacc tcgggcaacc actttgacgc ttgggctcgc	480
cagggcatga acctgggcaa ccacgactac atgatcctgg ccaccgaggg ctaccagagc	540
agcggcaact cgaacatcac catcggcagc ggcggcggca acccttaa	588
<210> 86	
<211> 588	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> <i>Nonomuraea longispora</i> 的变体	
<400> 86	
aacgcctgca tcaccagcaa ccagaccggc acgaacaacg gctacttcta ctcgttctgg	60
acggacgctc ctggcaccgt ctccatgtgc ctcggcagcg gcggcaacta ctccaccagc	120
tggcgcaaca cgggcaactt cgtcgtggc aagggtgtgt ccaccggcgg ccgacgcacg	180
gtctcgtact ccggcagctt caaccccgagc ggcaacgctt acctaccct gtacggctgg	240
acgcgcaacc ctctgatcga gtactacatc gtcgacaact ggggcaccta ccgccctacc	300
ggcgagtatc gcggcacggt caccagcgac ggtggcacct acgacatcta caagaccacg	360
cgctacgacg ctccctagcat cgagggcacc cgcacgttcg accagtactg gtcggtccgc	420
cagagcaagc gcaccggcgg ctcgatcacc tcgggcaacc actttgacgc ttgggctcgc	480
cagggcatga acctgggcaa ccacgactac atgatcctgg ccaccgaggg ctaccagagc	540
agcggcaact cgaacatcac catcggcagc ggcggcggca acccttaa	588
<210> 87	
<211> 588	

<212>	DNA					
<213>	人工序列					
<220>						
<223>	Nonomuraea longispora的变体					
<400>	87					
aacgcctgta	tcaccagcaa	ccagaccggc	acgaacaacg	gctacttcta	ctcgttctgg	60
acggactccc	ctggcaccgt	catcatgtgt	ctcggcagcg	gcggaacta	ctccaccagc	120
tggcgcaaca	cgggcaactt	cgtcgctggc	aagggtgtgt	ccaccggcgg	ccgacgcacg	180
gtctcgtact	ccggcagctt	caaccccagc	ggcaacgcct	acctcacct	gtacggctgg	240
acgcgcaacc	ctctgatega	gtactacatc	gtcgacaact	ggggcaccta	ccgccctacc	300
ggcgagtatc	gcggcacggt	caccagcgac	ggtggcacct	acgacatcta	caagaccacg	360
cgctacgacg	ctcctagcat	cgagggcacc	cgcacgtteg	accagtactg	gtcggctccg	420
cagagcaagc	gcaccggcgg	ctcgatcacc	tcgggcaacc	actttgacgc	ttgggctcgc	480
cagggcatga	acctgggcaa	ccacgactac	atgatcctgg	ccaccgaggg	ctaccagagc	540
agcggcaact	cgaacatcac	catcggcagc	ggcggcggca	acccttaa		588
<210>	88					
<211>	576					
<212>	DNA					
<213>	链霉菌属NRRL B-1140					
<400>	88					
gacaccgtcg	tcactagcaa	ccagaccggc	actaacaacg	gctactacta	cagcttttgg	60
accgacgccc	ctggcaccgt	cagcatgacc	ctgagctctg	gcggcagcta	ctctaccagc	120
tggcgcaaca	ccggcaactt	cgtcgccggc	aagggtgtgt	ctaacggcgc	ccgccgcacc	180
gtcacgtact	ctggcagctt	caaccctagc	ggcaacgcct	acctcacct	gtacggctgg	240
accgctaacc	ccctggtcga	gtactacatc	gtcgacaact	ggggcactta	ccgccccacc	300
ggcacgtaca	agggcaccgt	cacttctgac	ggcggcacct	acgacatcta	caagaccacg	360
cgctacaacg	cccctagcgt	cgagggcgtc	cgcacctttg	accagtactg	gagcgtccgc	420
cagagccgcc	gcaactggcg	caccatcact	gccggcaacc	acttcgacgc	ctgggctcgc	480
gccggcatgc	ctctgggcaa	ctttaagtac	tacatgatca	tggccaccga	gggctaccgc	540
tcgagcggca	actcgtctat	ccgcgtcggc	tcttaa			576
<210>	89					
<211>	576					
<212>	DNA					
<213>	人工序列					
<220>						
<223>	链霉菌属NRRL B-1140的变体					
<400>	89					
gacacctgcg	tcactagcaa	ccagaccggc	actaacaacg	gctactacta	cagcttttgg	60
accgacgccc	ctggcaccgt	cagcatgtgc	ctgagctctg	gcggcagcta	ctctaccagc	120

tggcgcaaca ccggcaactt cgtcgccggc aagggtggt ctaacggcgc ccgccgcacc 180  
 gtcacgtact ctggcagctt caaccctagc ggcaacgcct acctaccct gtacggctgg 240  
 accgctaacc ccctggtcga gtactacatc gtcgacaact ggggcaacta ccgccccacc 300  
 ggcacgtaca agggcaccgt cacttctgac ggcggcacct acgacatcta caagaccacg 360  
 cgctacaacg cccctagcgt cgagggcgtc cgcacctttg accagtactg gagcgtccgc 420  
 cagagccgcc gcaactggcgg caccatcact gccggcaacc acttcgacgc ctgggctcgc 480  
 gccggcatgc ctctgggcaa cttaagtac tacatgatca tggccaccga gggctaccgc 540  
 tcgagcggca actcgtctat ccgcgtcggc tctaa 576

<210> 90

<211> 576

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 链霉菌属NRRL B-1140的变体

<400> 90

gacacctgcg tcactagcaa ccagaccggc actaacaacg gctactacta cagcttttgg 60  
 accgacagcc ctggcaccgt cattatgtgc ctgagctctg gcggcagcta ctctaccagc 120  
 tggcgcaaca ccggcaactt cgtcgccggc aagggtggt ctaacggcgc ccgccgcacc 180  
 gtcacgtact ctggcagctt caaccctagc ggcaacgcct acctaccct gtacggctgg 240  
 accgctaacc ccctggtcga gtactacatc gtcgacaact ggggcaacta ccgccccacc 300  
 ggcacgtaca agggcaccgt cacttctgac ggcggcacct acgacatcta caagaccacg 360  
 cgctacaacg cccctagcgt cgagggcgtc cgcacctttg accagtactg gagcgtccgc 420  
 cagagccgcc gcaactggcgg caccatcact gccggcaacc acttcgacgc ctgggctcgc 480  
 gccggcatgc ctctgggcaa cttaagtac tacatgatca tggccaccga gggctaccgc 540  
 tcgagcggca actcgtctat ccgcgtcggc tctaa 576

<210> 91

<211> 585

<212> DNA

<213> *Actinomadura amylolytica*

<400> 91

gctgctcctg tcaccagcaa ccagacgggc acgcacgacg gctacttcta ctcttctgg 60  
 acggacgctc ctggcaccgt ctccatggag ctgggcagcg gcggcaacta cagcacctcg 120  
 tggcgcaaca cgggcaactt cgtcgtcggc aagggtgga gcaccggcgg ccgacgcacc 180  
 gtcacgtact ccggcagctt caaccctcgg ggcaacgcct acctaccct gtacggctgg 240  
 acgcgcaacc ctctggtcga gtactacatc gtcgacaact ggggcaccta ccgccctacg 300  
 ggcacctaca agggcaccgt cacgtccgac ggtggcagct acgacatcta cgagaccacg 360  
 cgctacaacg ctctagcat cgagggcacc cgcacgttca agcagtactg gtcggtccgc 420  
 cagtcgcgcc gcaccggcgg caccatcacc tcgggcaacc actttgacgc ttgggctcgc 480  
 tacggcatga gcctcggctc ccacgactac atgatcatgg ctacggaggg ctaccagagc 540

agcggctcca gcaacatcac ggtcggcggc tcgtccaacc ctaa	585
<210> 92	
<211> 585	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> Actinomadura amylolytica的变体	
<400> 92	
gctgcttgcg tcaccagcaa ccagacgggc acgcacgacg gctacttcta ctccttctgg	60
acggacgctc ctggcaccgt ctccatgtgc ctgggcagcg gcggcaacta cagcacctcg	120
tggcgcaaca cgggcaactt cgtcgtggc aagggtgga gcaccggcgg ccgacgcacc	180
gtcacgtact ccggcagett caaccctcg ggcaacgctt acctcaccct gtacggctgg	240
acgcgcaacc ctctggtcga gtactacatc gtcgacaact ggggcaccta ccgccctacg	300
ggcacctaca agggcaccgt cacgtccgac ggtggcacgt acgacatcta cgagaccacg	360
cgctacaacg ctcttagcat cgagggcacc cgcacgttea agcagtactg gtcggtcgcg	420
cagtcgcgcc gcaccggcgg caccatcacc tcgggcaacc actttgacgc ttgggctcgc	480
tacggcatga gcctcggtc ccacgactac atgatcatgg ctacggaggg ctaccagagc	540
agcggctcca gcaacatcac ggtcggcggc tcgtccaacc ctaa	585
<210> 93	
<211> 585	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> Actinomadura amylolytica的变体	
<400> 93	
gctgcttggtg tcaccagcaa ccagacgggc acgcacgacg gctacttcta ctccttctgg	60
acggactccc ctggcaccgt catcatgtgt ctgggcagcg gcggcaacta cagcacctcg	120
tggcgcaaca cgggcaactt cgtcgtggc aagggtgga gcaccggcgg ccgacgcacc	180
gtcacgtact ccggcagett caaccctcg ggcaacgctt acctcaccct gtacggctgg	240
acgcgcaacc ctctggtcga gtactacatc gtcgacaact ggggcaccta ccgccctacg	300
ggcacctaca agggcaccgt cacgtccgac ggtggcacgt acgacatcta cgagaccacg	360
cgctacaacg ctcttagcat cgagggcacc cgcacgttea agcagtactg gtcggtcgcg	420
cagtcgcgcc gcaccggcgg caccatcacc tcgggcaacc actttgacgc ttgggctcgc	480
tacggcatga gcctcggtc ccacgactac atgatcatgg ctacggaggg ctaccagagc	540
agcggctcca gcaacatcac ggtcggcggc tcgtccaacc ctaa	585
<210> 94	
<211> 576	
<212> DNA	
<213> 波曲热多孢菌	

<400> 94	
gacaccacga tcaccagaa ccagaccggc tacgacaacg gctacttcta cagcttccgc	60
actgacgccc ctggcaccgt ctctatgacc ctccactcgg gcggctetta ctcgacctct	120
tggcgcaaca ctggcctctt tctggccggc aagggctgga gcaccggcgg gcgccgcacc	180
gtcacgtaca acgcctcctt taaccctagc ggcaacgccc gcctcacct gtacggctgg	240
acccgcaacc ctctcgtcag ctaccacatc gtcgagagct ggggcacgta ccgcccaact	300
ggcacctaca agggcaccgt cacgactgac ggcggcacct acgacatcta cgagacctgg	360
cgctacaacg ccccttctat cgagggcacg cgcacttacc agcagttctg gtctgtccgc	420
cagcagaagc gcacctcggg cacgatacc atcggcaacc acttcgacgc ttgggcccgc	480
gctggcatga acctcggctc ccacgactac cagatcatgg ccaccgaggg ctaccagtcc	540
tcgggcagct ctaccgtcag catctctgag ggctaa	576
<210> 95	
<211> 576	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 波曲热多孢菌的变体	
<400> 95	
gacacctgca tcaccagaa ccagaccggc tacgacaacg gctacttcta cagcttccgc	60
actgacgccc ctggcaccgt ctctatgtgc ctccactcgg gcggctetta ctcgacctct	120
tggcgcaaca ctggcctctt tctggccggc aagggctgga gcaccggcgg gcgccgcacc	180
gtcacgtaca acgcctcctt taaccctagc ggcaacgccc gcctcacct gtacggctgg	240
acccgcaacc ctctcgtcag ctaccacatc gtcgagagct ggggcacgta ccgcccaact	300
ggcacctaca agggcaccgt cacgactgac ggcggcacct acgacatcta cgagacctgg	360
cgctacaacg ccccttctat cgagggcacg cgcacttacc agcagttctg gtctgtccgc	420
cagcagaagc gcacctcggg cacgatacc atcggcaacc acttcgacgc ttgggcccgc	480
gctggcatga acctcggctc ccacgactac cagatcatgg ccaccgaggg ctaccagtcc	540
tcgggcagct ctaccgtcag catctctgag ggctaa	576
<210> 96	
<211> 576	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 波曲热多孢菌的变体	
<400> 96	
gacacctgca tcaccagaa ccagaccggc tacgacaacg gctacttcta cagcttccgc	60
actgacagcc ctggcaccgt cattatgtgc ctccactcgg gcggctetta ctcgacctct	120
tggcgcaaca ctggcctctt tctggccggc aagggctgga gcaccggcgg gcgccgcacc	180
gtcacgtaca acgcctcctt taaccctagc ggcaacgccc gcctcacct gtacggctgg	240

acccgcaacc ctctcgtcag ctaccacatc gtcgagagct ggggcacgta ccgccaact	300
ggcacctaca agggcacctg cacgactgac ggcgccacct acgacatcta cgagacctgg	360
cgctacaacg ccccttctat cgagggcacg cgcacttacc agcagttctg gtctgtccgc	420
cagcagaagc gcacctcggg cagatcacc atcggcaacc acttcgacgc ttgggcccgc	480
gctggcatga acctcggctc ccacgactac cagatcatgg ccaccgaggg ctaccagtcc	540
tcgggcagct ctaccgtcag catctctgag ggctaa	576
<210> 97	
<211> 301	
<212> PRT	
<213> Actinomadura flexuosa	
<400> 97	
Asp Thr Thr Ile Thr Gln Asn Gln Thr Gly Tyr Asp Asn Gly Tyr Phe	
1 5 10 15	
Tyr Ser Phe Trp Thr Asp Ala Pro Gly Thr Val Ser Met Thr Leu His	
20 25 30	
Ser Gly Gly Ser Tyr Ser Thr Ser Trp Arg Asn Thr Gly Asn Phe Val	
35 40 45	
Ala Gly Lys Gly Trp Ser Thr Gly Gly Arg Arg Thr Val Thr Tyr Asn	
50 55 60	
Ala Ser Phe Asn Pro Ser Gly Asn Ala Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Trp	
65 70 75 80	
Thr Arg Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Ser Trp Gly Thr	
85 90 95	
Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Val Thr Thr Asp Gly Gly	
100 105 110	
Thr Tyr Asp Ile Tyr Glu Thr Trp Arg Tyr Asn Ala Pro Ser Ile Glu	
115 120 125	
Gly Thr Arg Thr Phe Gln Gln Phe Trp Ser Val Arg Gln Gln Lys Arg	
130 135 140	
Thr Ser Gly Thr Ile Thr Ile Gly Asn His Phe Asp Ala Trp Ala Arg	
145 150 155 160	
Ala Gly Met Asn Leu Gly Ser His Asp Tyr Gln Ile Met Ala Thr Glu	
165 170 175	
Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser Thr Val Ser Ile Ser Glu Gly Gly	
180 185 190	
Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn	
195 200 205	
Pro Gly Asn Pro Gly Gly Gly Cys Val Ala Thr Leu Ser Ala Gly Gln	
210 215 220	



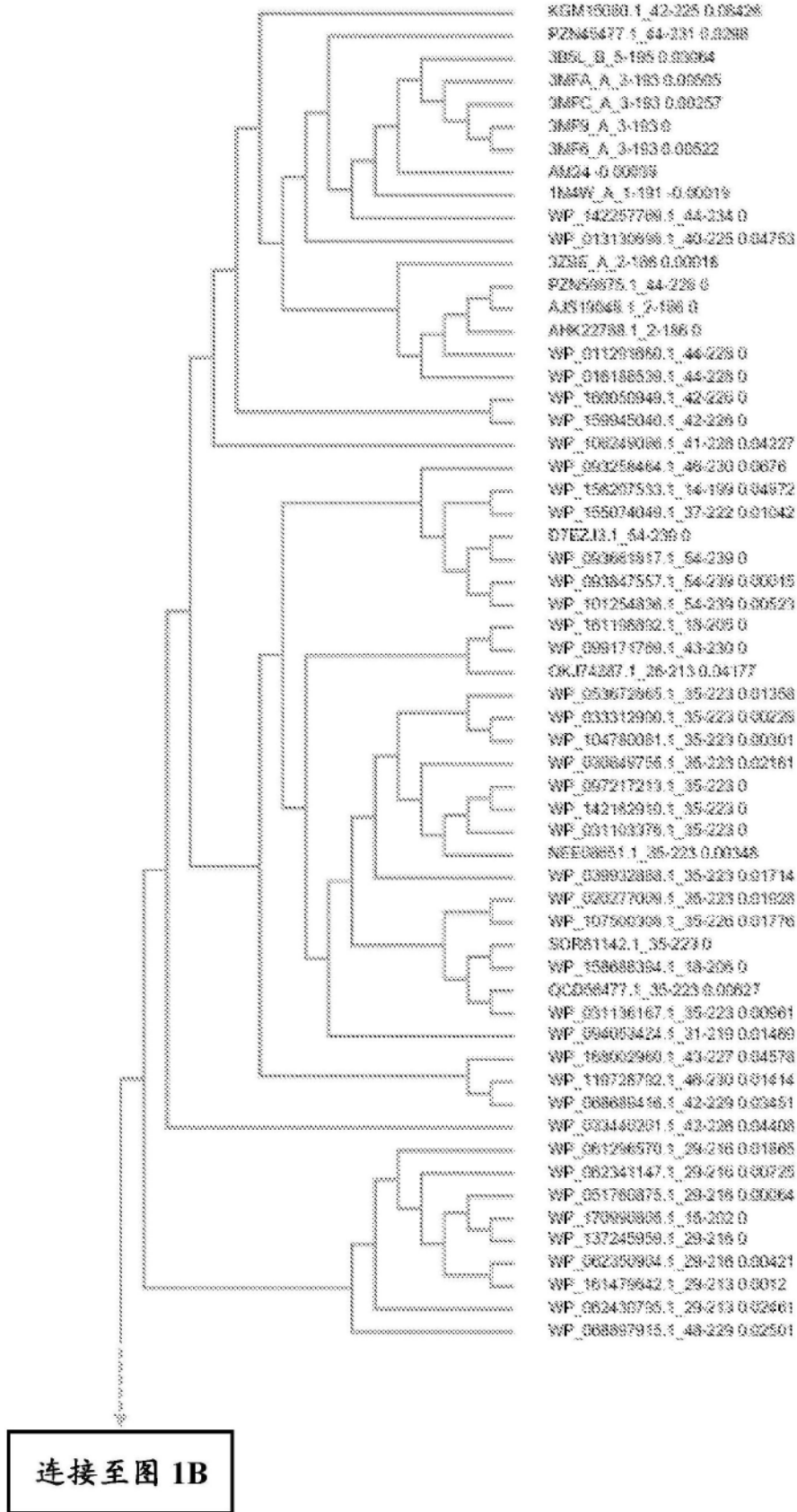


图1A

连接至图 1A

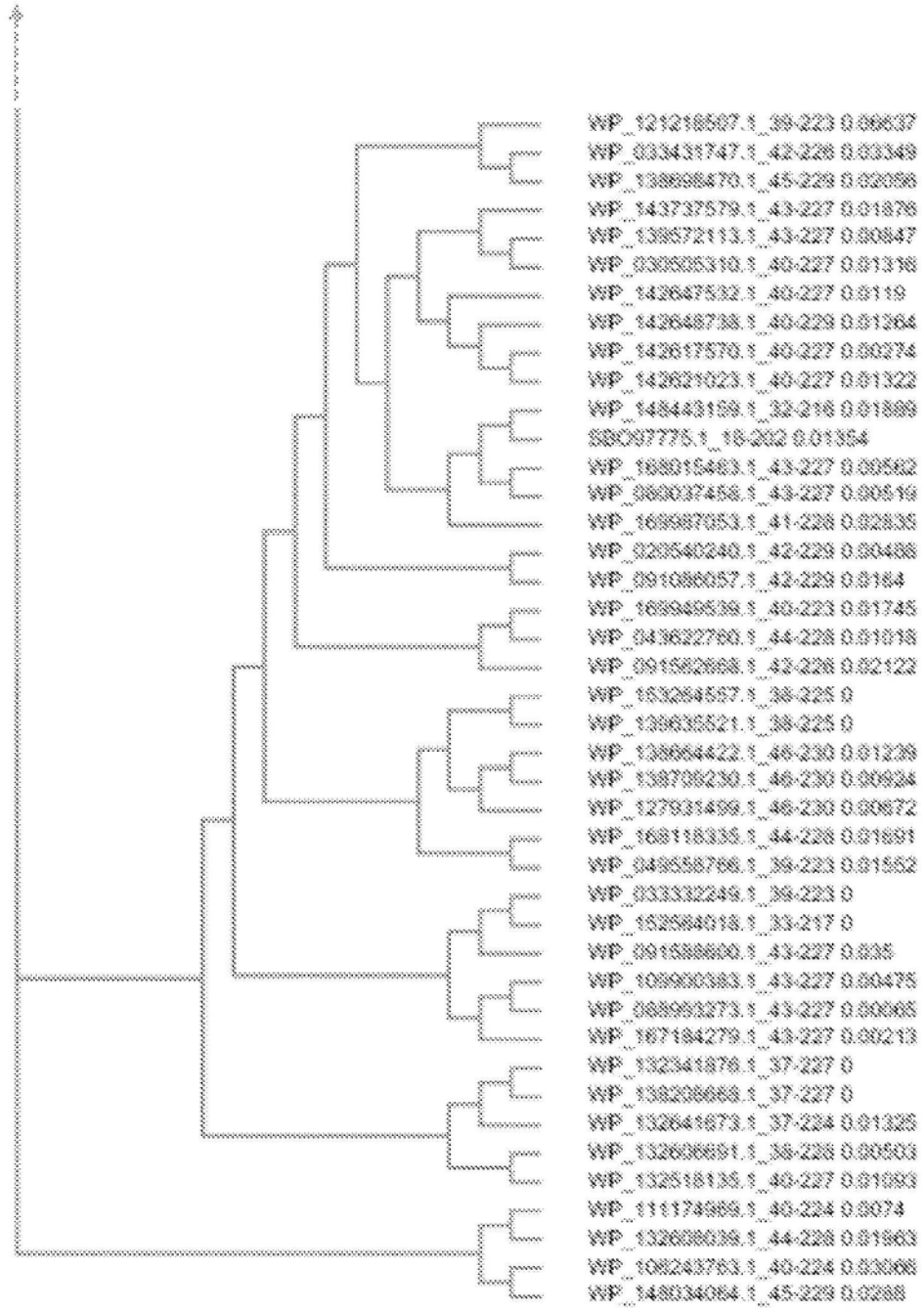


图1B

AM24	DTTITQNTQGYDNGYFYFWSFWTDAPGTVSMTLHSGGSYSTSWRNTGNFVAGKGWSTGGRRT	60
XB1	QAAVTTNQTGTNNGYWYFWSFWTDAQGTVSMELGSGGNYSTSWRNTGNFVAGKGWQTGGRRT	60
XB2	SAAITSNQGTGTHNGYFYFWSFWTDSPTVSMELGSGGNYSTSWRNTGNFVAGTGWSTGGRRS	60
XB3	NAAITSNQGTGTNNGYFYFWSFWTDAPGTVSMELGSGGNYSTSWRNTGNFVAGKGWSTGGRRT	60
XB4	DTVVTSNQTGTNNGYFYFWSFWTDAPGTVSMTLSSGGSYSTSWRNTGNFVAGKGWSNGARRT	60
XB5	AAPVTSNQTGTGHDGYFYFWSFWTDAPGTVSMELGSGGNYSTSWRNTGNFVAGKGWSTGGRRT	60
XB6	DTTITQNTQGYDNGYFYFRTDAPGTVSMTLHSGGSYSTSWRNTGLFLAGKGWSTGGRRT	60
	: :* **** .:*** ** : ***** * **_.***** *:*.**.*.***:	
AM24	VTYNASFNPSTGNAYLTLYGWTRNPLVEYYIVESWGTYRPTGTYKGTVTTDGGTYDIYETW	120
XB1	VSYSGSFNPSGNAYLTLYGWTRNPLIEYYIVDNWGTYPRTGSFKGTVTSDDGGTYDIYETT	120
XB2	VTYSASFNPSTGNAYLTLYGWTRNPLVEYYIVDNWGTYPRTGTHMGTVTTDGGTYDIYRTR	120
XB3	VSYSGSFNPSGNAYLTLYGWTRNPLIEYYIVDNWGTYPRTGEYRGTVTSDDGGTYDIYKTT	120
XB4	VTYSGSFNPSGNAYLTLYGWTANPLVEYYIVDNWGTYPRTGTYKGTVTSDDGGTYDIYKTT	120
XB5	VTYSGSFNPSGNAYLTLYGWTRNPLVEYYIVDNWGTYPRTGTYKGTVTSDDGGTYDIYETT	120
XB6	VTYNASFNPSTGNARLTLYGWTRNPLVSYHIVESWGTYRPTGTYKGTVTTDGGTYDIYETW	120
	*:*.*****: ***** **:.:***:***** . *****:*****.*	
AM24	RYNAPSIEGTRTFQFWSVRQQKRTSGTITIGNHFDWARAGMNLGSHD-YQIMATEGYQ	179
XB1	RTNAPSIEGTRTFKQFWSVRQQKKTGGTITAGNHFDWARSRAGMQLGNHD-YMIMATEGYQ	179
XB2	RTNAPSIEGTRSFQYWSVRQSRSSGTITSGNHFDWARAGMNLGSHD-YMIMATEGYQ	179
XB3	RYDAPSIEGTRTFDQYWSVRQSKRTGGSITSGNHFDWARQGMNLGNHD-YMILATEGYQ	179
XB4	RYNAPSVQVTRTFDQYWSVRQSRRTGGTITAGNHFDWARAGMPLGNFKYYMIMATEGYR	180
XB5	RYNAPSIEGTRTFKQYWSVRQSRRTGGTITSGNHFDWARYGMSLGSHD-YMIMATEGYQ	179
XB6	RYNAPSIEGTRTYQFWSVRQQKRTSGTITIGNHFDWARAGMNLGSHD-YQIMATEGYQ	179
	* :***:*.*:.*:***:*****.:***:*** *****:*** ** **.. * *:*****:	
AM24	SSGSSTVSISEGGNPGNPGNPGNPGNPGNPGGGCVATL	220
XB1	SSGSSNITIGGGTNP-----	194
XB2	SSGSSNVTLGSS-----	191
XB3	SSGNSNITIGSGGPN-----	195
XB4	SSGNSSIRVGS-----	191
XB5	SSGSSNITVGGSSNP-----	194
XB6	SSGSSTVSISEG-----	191
	***.*.: :.	

图2

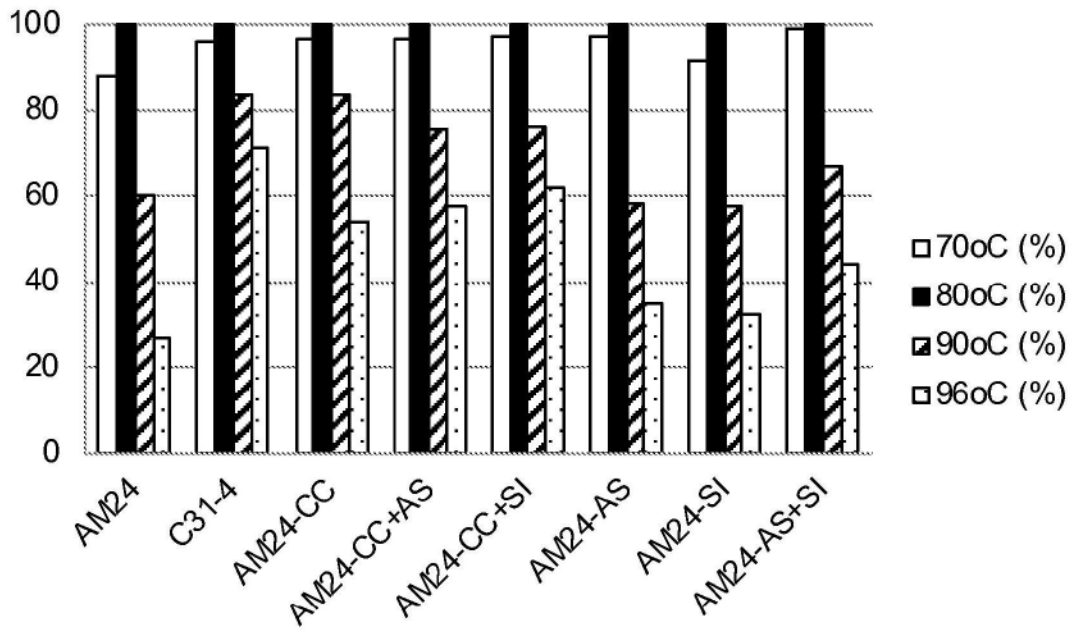


图3A

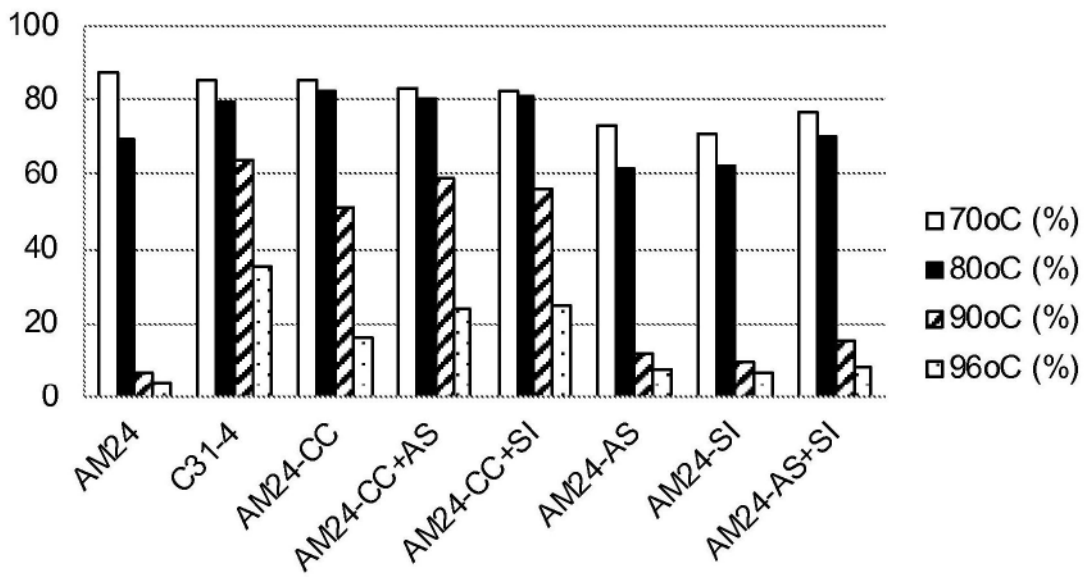


图3B

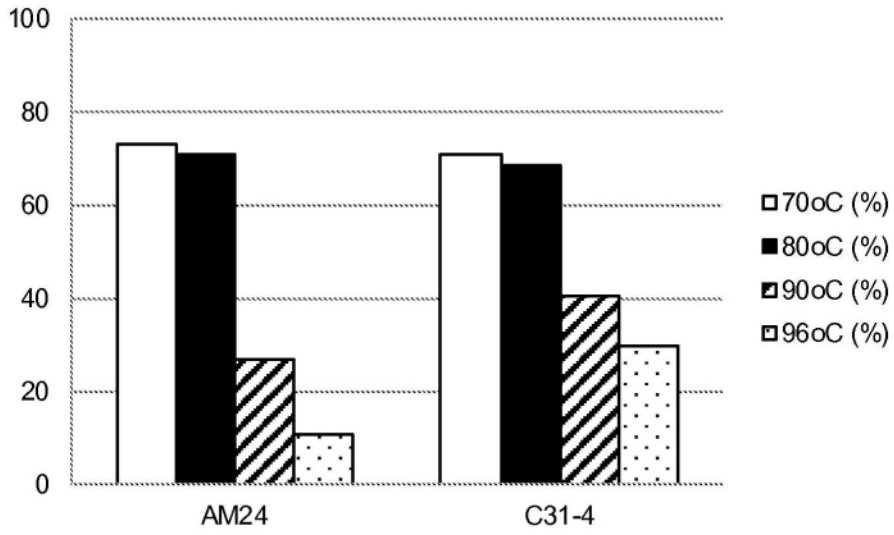


图4A

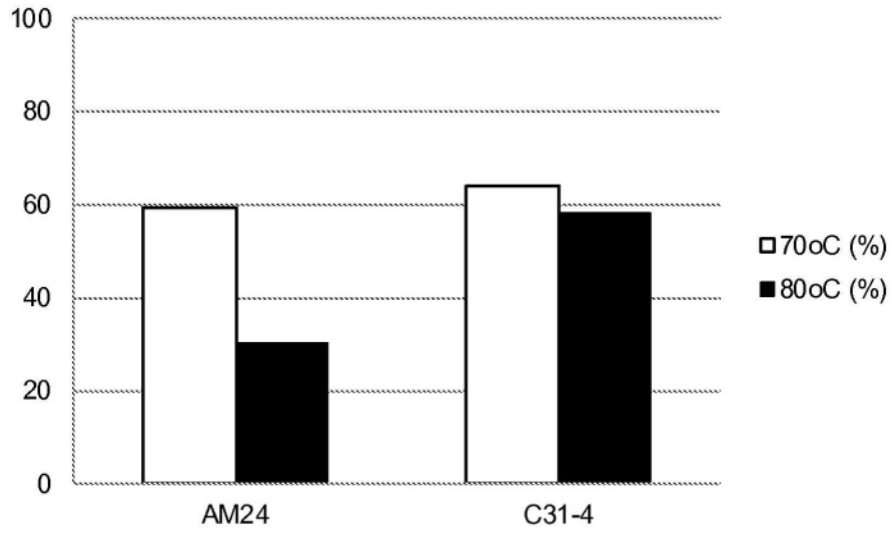


图4B

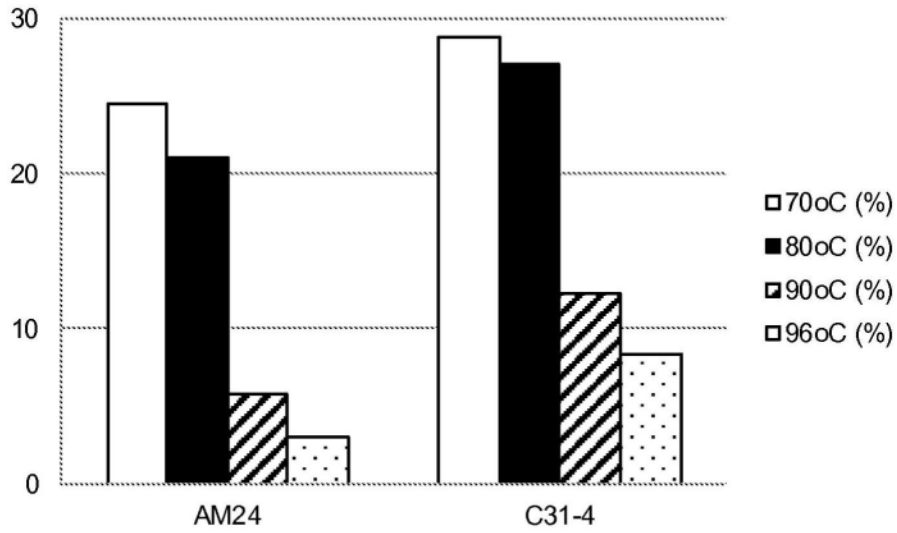


图4C

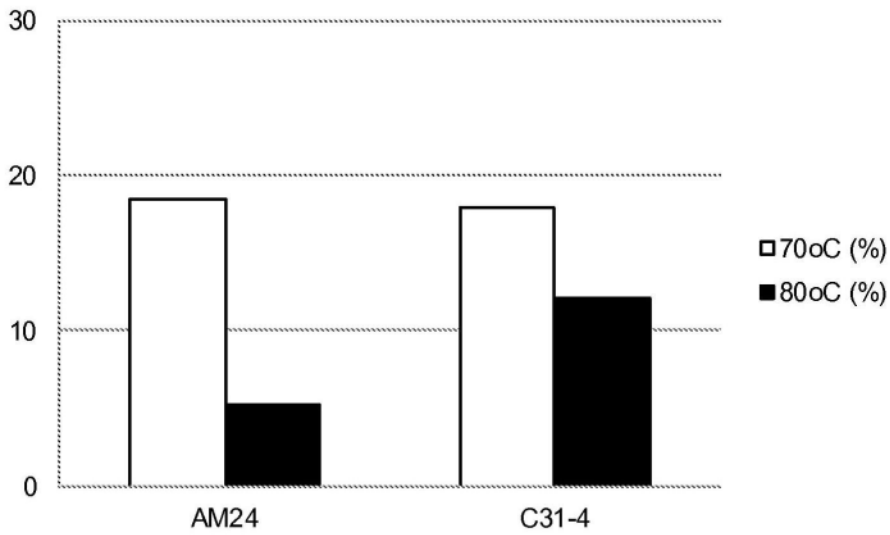


图4D

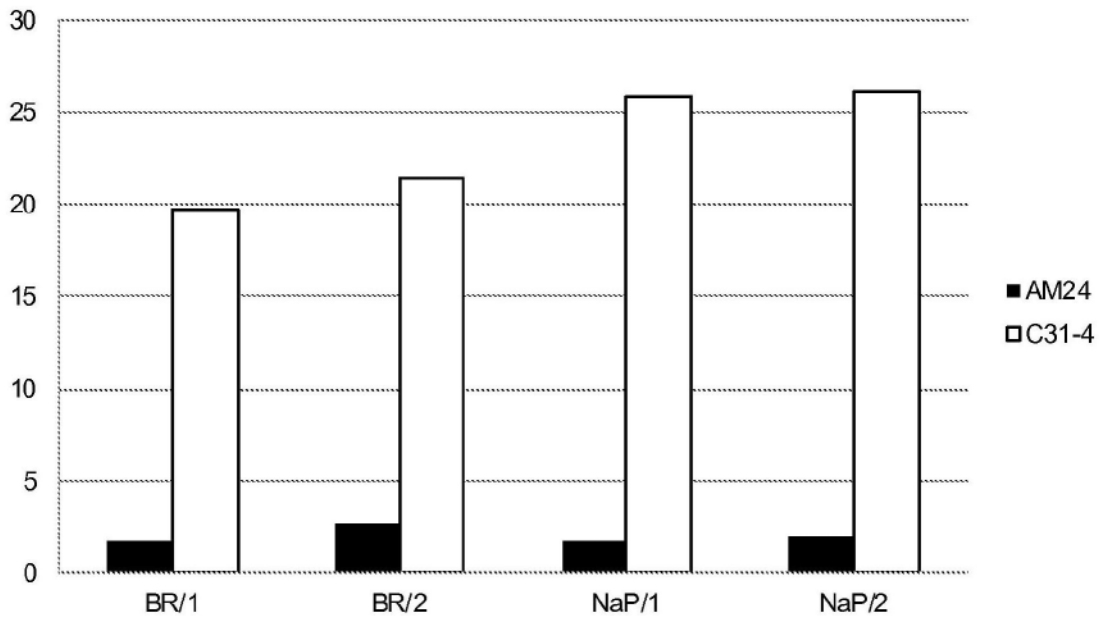


图5