



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118043454 A

(43) 申请公布日 2024. 05. 14

(21) 申请号 202280043433.8

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所  
11247

(22) 申请日 2022.06.17

专利代理师 张莉 黄革生

(66) 本国优先权数据

PCT/CN2021/100928 2021.06.18 CN

(51) Int. Cl.

C12N 9/48 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.12.18

C12N 9/62 (2006.01)

C12H 1/00 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/034013 2022.06.17

A23L 2/84 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/266456 EN 2022.12.22

(71) 申请人 国际N&H丹麦有限公司

地址 丹麦灵比

(72) 发明人 J·F·克拉米尔 顾晓岗 黄超

唐辛悦

权利要求书3页 说明书42页

序列表3页 附图16页

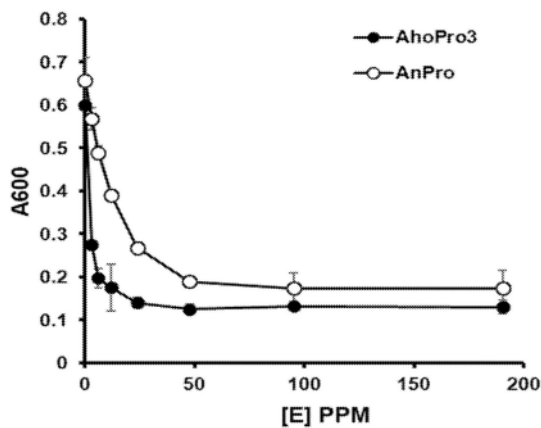
(54) 发明名称

用于啤酒浑浊减少的蛋白酶

(57) 摘要

本发明涉及内切蛋白酶。更特别地,本发明涉及内切蛋白酶用于减少或消除啤酒浑浊的用途。

纯化的AhoPro3和AnPro响应于3至190 ppm的酶浓度的浑浊减少性能,显示为OD600



1. 一种用于减少或防止饮料中浑浊的方法,所述方法包括向所述饮料中添加内切蛋白酶,其中所述内切蛋白酶是与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:16具有至少75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或100%序列同一性的酶或其内切蛋白酶活性片段如成熟蛋白质。

2. 如权利要求1所述的方法,其中所述内切蛋白酶活性片段是成熟蛋白质。

3. 如权利要求1或2所述的方法,其中所述饮料含有蛋白质。

4. 如权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述饮料含有多酚。

5. 如权利要求1至4所述的方法,其中所述饮料是啤酒。

6. 如权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述饮料是葡萄酒。

7. 如权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述饮料是果汁。

8. 如权利要求5所述的方法,其中将所述内切蛋白酶添加到麦芽汁中。

9. 如权利要求5所述的方法,其中浑浊形成后将所述内切蛋白酶添加到啤酒中。

10. 如权利要求5所述的方法,其中浑浊形成前将所述内切蛋白酶添加到啤酒中。

11. 如权利要求5或8至10中任一项所述的方法,其中所述啤酒具有增加的相对泡沫稳定性和增加的相对浑浊减少。

12. 如权利要求11所述的方法,其中所述增加的相对泡沫稳定性是高于100%、101%、102%、103%、104%、105%、106%、107%、108%、109%或110%。

13. 如权利要求11或12所述的方法,其中如通过90°散射所测量,所述增加的相对浑浊减少高于73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%。

14. 如权利要求8所述的方法,其中所述麦芽汁中所述内切蛋白酶的量为4至300mg蛋白酶/hL麦芽汁、10至250mg蛋白酶/hL麦芽汁、20至200mg蛋白酶/hL麦芽汁、30至150mg蛋白酶/hL麦芽汁或40至100mg蛋白酶/hL麦芽汁。

15. 如前述权利要求中任一项所述的方法,所述方法进一步包括添加ALDC酶、葡糖淀粉酶、生麦芽糖 $\alpha$ -淀粉酶、支链淀粉酶、过氧化氢酶或转葡糖苷酶中的一种或多种。

16. 如权利要求15所述的方法,其中所述ALDC酶是如EC 4.1.1.5中所述的乙酰乳酸脱羧酶。

17. 如权利要求15所述的方法,其中所述葡糖淀粉酶是如EC 3.2.1.3中所述的1,4- $\alpha$ -葡糖苷酶。

18. 如权利要求15所述的方法,其中所述生麦芽糖 $\alpha$ -淀粉酶是如EC 3.3.1.133中所述的葡聚糖1,4- $\alpha$ -麦芽糖水解酶。

19. 如权利要求15所述的方法,其中所述支链淀粉酶是如EC 3.2.1.41中所述的 $\alpha$ -糊精内切-1,6- $\alpha$ -葡糖苷酶、限制糊精酶、支链淀粉6-葡聚糖水解酶、脱支酶。

20. 如权利要求16所述的方法,其中所述转葡糖苷酶是如EC 2.4.1.24中所述的1,4- $\alpha$ -葡聚糖-分支酶、寡葡聚糖-分支葡糖基转移酶。

21. 一种用于增加啤酒中相对泡沫稳定性的方法,所述方法包括向所述饮料中添加内切蛋白酶,其中所述内切蛋白酶是与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:16具有至少75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或100%序列同一性的酶或其内切蛋白酶活性片段如成熟蛋白质。

22. 如权利要求21所述的方法,其中所述增加的相对泡沫稳定性高于100%、101%、

102%、103%、104%、105%、106%、107%、108%、109%或110%。

23. 如权利要求21或22所述的方法,其中所述内切蛋白酶活性片段是成熟蛋白质。

24. 如权利要求21至23中任一项所述的方法,其中将所述内切蛋白酶添加到麦芽汁中。

25. 如权利要求24所述的方法,其中所述麦芽汁中所述内切蛋白酶的量为4至300mg蛋白酶/hL麦芽汁、10至250mg蛋白酶/hL麦芽汁、20至200mg蛋白酶/hL麦芽汁、30至150mg蛋白酶/hL麦芽汁或40至100mg蛋白酶/hL麦芽汁。

26. 如权利要求21至23中任一项所述的方法,其中浑浊形成后将所述内切蛋白酶添加到啤酒中。

27. 如权利要求21至23中任一项所述的方法,其中浑浊形成前将所述内切蛋白酶添加到啤酒中。

28. 如权利要求21至27中任一项所述的方法,其中所述啤酒具有增加的相对泡沫稳定性和增加的相对浑浊减少。

29. 如权利要求28所述的方法,其中如通过90°散射所测量,所述增加的相对浑浊减少高于73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%。

30. 如权利要求21至29中任一项所述的方法,所述方法进一步包括添加ALDC酶、葡糖淀粉酶、生麦芽糖 $\alpha$ -淀粉酶、支链淀粉酶、过氧化氢酶或转葡糖苷酶中的一种或多种。

31. 如权利要求30所述的方法,其中所述ALDC酶是如EC 4.1.1.5中所述的乙酰乳酸脱羧酶。

32. 如权利要求30所述的方法,其中所述葡糖淀粉酶是如EC 3.2.1.3中所述的1,4- $\alpha$ -葡糖苷酶。

33. 如权利要求30所述的方法,其中所述生麦芽糖 $\alpha$ 淀粉酶是如EC 3.3.1.133中所述的葡聚糖1,4- $\alpha$ -麦芽糖水解酶。

34. 如权利要求30所述的方法,其中所述支链淀粉酶是如EC 3.2.1.41中所述的 $\alpha$ -糊精内切-1,6- $\alpha$ -葡糖苷酶、限制糊精酶、支链淀粉6-葡聚糖水解酶、脱支酶。

35. 如权利要求30所述的方法,其中所述转葡糖苷酶是如EC2.4.1.24中所述的1,4- $\alpha$ -葡聚糖-分支酶、寡葡聚糖-分支葡糖基转移酶。

36. 一种分离的多肽,其包含内切蛋白酶,其中所述内切蛋白酶是与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:16具有至少75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或100%序列同一性的酶或其内切蛋白酶活性片段。

37. 一种分离的多核苷酸,其包含编码如权利要求36所述的多肽的核酸序列。

38. 一种核酸构建体,其包含如权利要求37所述的多核苷酸,所述多核苷酸可操作地连接到一个或多个控制序列上,所述控制序列指导所述多肽在合适的表达宿主中的产生。

39. 一种重组表达载体,其包含如权利要求38所述的核酸构建体。

40. 一种重组宿主细胞,其包含如权利要求38所述的核酸构建体或如权利要求39所述的载体。

41. 一种用于产生如权利要求36所述的多肽的方法,所述方法包括培养如权利要求40所述的重组宿主细胞以产生包含所述多肽的上清液和/或细胞;以及回收所述多肽。

42. 一种通过如权利要求41所述的方法产生的多肽。

43. 从通过如权利要求41所述的方法获得的发酵液获得的滤液在防止或减少饮料中的

浑浊中的用途。

44. 一种组合物,其包含如权利要求37至40或42中任一项所述的多肽、分离的多核苷酸、核酸构建体、重组表达载体或重组宿主细胞。

45. 如权利要求37至40或42中任一项所述的多肽、分离的多核苷酸、核酸构建体、重组表达载体或重组宿主细胞用于增加饮料中的相对泡沫稳定性的用途。

46. 如权利要求37至40或42中任一项所述的多肽、分离的多核苷酸、核酸构建体、重组表达载体或重组宿主细胞用于增加饮料中的浑浊减少的用途。

47. 一种用于减少饮料中浑浊的方法,所述方法包括向所述饮料中添加谷氨酰胺内切蛋白酶,其中所述饮料含有具有谷氨酰胺残基的蛋白质或肽,所述谷氨酰胺残基被蛋白酶切割从而减少浑浊。

48. 如权利要求47所述的方法,其中所述谷氨酰胺内切蛋白酶还切割脯氨酸残基。

49. 如权利要求47或48所述的方法,其中所述饮料是果汁、葡萄酒、或啤酒。

50. 如权利要求49所述的方法,其中所述饮料是啤酒。

51. 如权利要求47至50中任一项所述的方法,其中所述谷氨酰胺内切蛋白酶包含与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:16具有至少80%、85%、90%、95%、98%、或99%同源性的多肽或其内切蛋白酶活性片段,如缺乏信号序列的成熟蛋白质。

52. 如权利要求51所述的方法,其中所述谷氨酰胺内切蛋白酶包含含有SEQ ID NO:16的多肽。

## 用于啤酒浑浊减少的蛋白酶

### 技术领域

[0001] 本发明涉及内切蛋白酶。更特别地,本发明涉及内切蛋白酶用于减少或消除啤酒浑浊(haze)以及稳定啤酒泡沫的用途。

### 背景技术

[0002] 啤酒浑浊(啤酒中的浑浊外观)是由疏水性蛋白质(例如大麦中的大麦醇溶蛋白)和多酚的聚集引起的,导致啤酒具有不希望混浊(cloudy)或浑浊外观。啤酒中出现浑浊现象最常见于啤酒冷藏储存时。这种现象有时被称为冷却浑浊(chill-haze)。葡萄酒和果汁中也可能会形成浑浊。

[0003] 已知使用酸性蛋白酶例如木瓜蛋白酶来蛋白水解疏水性蛋白质并因此防止混浊形成。然而,已发现木瓜蛋白酶等广谱蛋白酶会损害啤酒泡沫的形成。更具选择性的蛋白酶例如脯氨酸特异性内切蛋白酶也已被用来减少啤酒浑浊。然而,目前的商业产品过于昂贵并且不能完全去除啤酒浑浊。在这方面,目前的啤酒浑浊蛋白酶的特异性不足以实现完全水解,并且需要额外的步骤,例如由PVPP(聚乙烯吡咯烷酮)或硅胶辅助的过滤。因此,持续需要能够以合理的成本用于更彻底地防止冷却浑浊、具有增加的特异性并且在酿造过程中不能存活的蛋白酶。

[0004] 此外,还需要可以减少啤酒浑浊,但不会对泡沫形成和稳定性产生不利影响的内切蛋白酶。

### 发明内容

[0005] 根据本发明的一个方面,呈现了一种用于减少或防止饮料中浑浊的方法,其具有向饮料中添加内切蛋白酶的步骤,其中内切蛋白酶是与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:16具有至少75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或100%序列同一性的酶或其内切蛋白酶活性片段如成熟蛋白质。

[0006] 任选地,内切蛋白酶活性片段是成熟蛋白质。任选地,饮料含有蛋白质。任选地,饮料含有多酚。任选地,饮料是啤酒。任选地,饮料是葡萄酒。任选地,饮料是果汁。

[0007] 任选地,内切蛋白酶添加到麦芽汁中。任选地,浑浊形成后将内切蛋白酶添加到啤酒中。任选地,浑浊形成前将内切蛋白酶添加到啤酒中。

[0008] 任选地,啤酒具有增加的相对泡沫稳定性和增加的相对浑浊减少。任选地,增加的相对泡沫稳定性高于100%、101%、102%、103%、104%、105%、106%、107%、108%、109%或110%。任选地,如通过90°散射所测量,增加的相对浑浊减少高于73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%。

[0009] 任选地,麦芽汁中内切蛋白酶的量为4至300mg蛋白酶/hL麦芽汁、任选地10至250mg蛋白酶/hL麦芽汁、任选地20至200mg蛋白酶/hL麦芽汁、任选地30至150mg蛋白酶/hL麦芽汁或任选地40至100mg蛋白酶/hL麦芽汁。

[0010] 任选地,该方法具有添加ALDC酶、葡糖淀粉酶、生麦芽糖 $\alpha$ -淀粉酶、支链淀粉酶、过

氧化氢酶或转葡萄糖苷酶中的一种或多种的另外步骤。

[0011] 任选地,ALDC酶是如EC 4.1.1.5中所述的乙酰乳酸脱羧酶。任选地,葡萄糖淀粉酶是如EC 3.2.1.3中所述的1,4- $\alpha$ -葡萄糖苷酶。任选地,生麦芽糖 $\alpha$ -淀粉酶是如EC 3.3.1.133中所述的葡聚糖1,4- $\alpha$ -麦芽糖水解酶。任选地,支链淀粉酶是如EC 3.2.1.41中所述的 $\alpha$ -糊精内切-1,6- $\alpha$ -葡萄糖苷酶、限制糊精酶、支链淀粉6-葡聚糖水解酶、脱支酶。任选地,转葡萄糖苷酶是如EC 2.4.1.24中所述的1,4- $\alpha$ -葡聚糖-分支酶、寡葡聚糖-分支葡萄糖基转移酶。

[0012] 在本发明的另一方面,呈现了增加啤酒中相对泡沫稳定性的方法,该方法具有向饮料中添加内切蛋白酶的步骤,其中内切蛋白酶是与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:16具有至少75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或100%序列同一性的酶或其内切蛋白酶活性片段如成熟蛋白质。

[0013] 任选地,增加的相对泡沫稳定性高于100%、101%、102%、103%、104%、105%、106%、107%、108%、109%或110%。任选地,内切蛋白酶活性片段是成熟蛋白质。

[0014] 任选地,内切蛋白酶添加到麦芽汁中。任选地,浑浊形成后将内切蛋白酶添加到啤酒中。任选地,浑浊形成前将内切蛋白酶添加到啤酒中。

[0015] 任选地,麦芽汁中内切蛋白酶的量为4至300mg蛋白酶/hL麦芽汁、任选地10至250mg蛋白酶/hL麦芽汁、任选地20至200mg蛋白酶/hL麦芽汁、任选地30至150mg蛋白酶/hL麦芽汁或任选地40至100mg蛋白酶/hL麦芽汁。

[0016] 任选地,该方法具有添加ALDC酶、葡萄糖淀粉酶、生麦芽糖 $\alpha$ -淀粉酶、支链淀粉酶、过氧化氢酶或转葡萄糖苷酶中的一种或多种的另外步骤。

[0017] 任选地,ALDC酶是如EC 4.1.1.5中所述的乙酰乳酸脱羧酶。任选地,葡萄糖淀粉酶是如EC 3.2.1.3中所述的1,4- $\alpha$ -葡萄糖苷酶。任选地,生麦芽糖 $\alpha$ -淀粉酶是如EC 3.3.1.133中所述的葡聚糖1,4- $\alpha$ -麦芽糖水解酶。任选地,支链淀粉酶是如EC 3.2.1.41中所述的 $\alpha$ -糊精内切-1,6- $\alpha$ -葡萄糖苷酶、限制糊精酶、支链淀粉6-葡聚糖水解酶、脱支酶。任选地,转葡萄糖苷酶是如EC 2.4.1.24中所述的1,4- $\alpha$ -葡聚糖-分支酶、寡葡聚糖-分支葡萄糖基转移酶。

[0018] 任选地,啤酒具有增加的相对泡沫稳定性和增加的相对浑浊减少。任选地,如通过90°散射所测量,增加的相对浑浊减少高于73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%。

[0019] 在本发明的另一方面,呈现了包含内切蛋白酶的分离的多肽,其中所述内切蛋白酶是与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:16具有至少75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或100%序列同一性的酶或其内切蛋白酶活性片段。

[0020] 在本发明的另一方面,呈现了分离的多核苷酸,该分离的多核苷酸具有编码上述多肽的核酸序列。

[0021] 在本发明的另一方面,呈现了核酸构建体,该核酸构建体具有可操作地连接到一个或多个控制序列上的上述多核苷酸,该控制序列指导该多肽在合适的表达宿主中的产生。

[0022] 在本发明的另一方面,呈现了具有上述核酸构建体的重组表达载体。

[0023] 在本发明的另一方面,呈现了具有上述核酸构建体或上述载体的重组宿主细胞。

[0024] 在本发明的另一方面,呈现了用于生产上述多肽的方法,该方法具有以下步骤:培养上述重组宿主细胞,以产生具有多肽的上清液和/或细胞;以及回收多肽。

- [0025] 在本发明的另一方面,呈现了通过上述方法产生的多肽。
- [0026] 在本发明的另一方面,呈现了从通过上述方法获得的发酵液获得的滤液在防止或减少饮料中浑浊的用途。
- [0027] 在本发明的另一方面,呈现了具有如上所述的多肽、分离的多核苷酸、核酸构建体、重组表达载体、或重组宿主细胞的组合物。
- [0028] 在本发明的另一方面,呈现了如上所述的多肽、分离的多核苷酸、核酸构建体、重组表达载体、或重组宿主细胞用于增加饮料中的相对泡沫稳定性的用途。
- [0029] 在本发明的另一方面,呈现了如上所述的多肽、分离的多核苷酸、核酸构建体、重组表达载体、或重组宿主细胞用于增加饮料中的相对浑浊减少的用途。
- [0030] 在本发明的另一方面,呈现了用于减少饮料中浑浊的方法,该方法具有以下步骤:向饮料中添加谷氨酰胺内切蛋白酶,其中该饮料含有具有谷氨酰胺残基的蛋白质或肽,该谷氨酰胺残基被蛋白酶切割从而减少浑浊。任选地,谷氨酰胺内切蛋白酶还切割脯氨酸残基。任选地,饮料是果汁、葡萄酒、或啤酒。任选地,饮料是啤酒。
- [0031] 任选地,谷氨酰胺内切蛋白酶包含与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:16具有至少80%、85%、90%、95%、98%、或99%同源性的多肽或其内切蛋白酶活性片段,如缺乏信号序列的成熟蛋白质。任选地,谷氨酰胺内切蛋白酶包含根据SEQ ID NO:16的多肽。
- [0032] 生物序列说明
- [0033] SEQ ID NO:1是AbePro2前体蛋白。
- [0034] SEQ ID NO:2是AniPro\_2前体蛋白。
- [0035] SEQ ID NO:3是AtrPro1前体蛋白。
- [0036] SEQ ID NO:4是AhoPro3前体蛋白。
- [0037] SEQ ID NO:5是ApsPro1前体蛋白。
- [0038] SEQ ID NO:6是AnePro2前体蛋白。
- [0039] SEQ ID NO:7是Aa1Pro2前体蛋白。
- [0040] SEQ ID NO:8是AcoPro2前体蛋白。
- [0041] SEQ ID NO:9是AwePro2前体蛋白。
- [0042] SEQ ID NO:10是AbrPro1前体蛋白。
- [0043] SEQ ID NO:11是AscPro5前体蛋白。
- [0044] SEQ ID NO:12是全长MorPro1 DNA。
- [0045] SEQ ID NO:13是全长MorPro1前体。
- [0046] SEQ ID NO:14是MorPro1预测的成熟酶。
- [0047] SEQ ID NO:15是编码全长MorPro1的合成核苷酸序列。
- [0048] SEQ ID NO:16是AniPro\_2成熟蛋白质。

#### 附图说明

- [0049] 图1是AbePro2前体蛋白。
- [0050] 图2是AniPro\_2前体蛋白。
- [0051] 图3是AtrPro1前体蛋白。
- [0052] 图4是AhoPro3前体蛋白。

[0053] 图5显示了纯化的AhoPro3和AnPro响应于3至190ppm的酶浓度的浑浊减少性能,显示为OD600。

[0054] 图6显示了纯化的AtrPro1、AbePro2和AnPro响应于3至190ppm的酶浓度的浑浊减少性能,显示为OD600。

[0055] 图7显示了纯化的AniPro\_2和AnPro响应于0.625至20ppm的酶浓度的浑浊减少性能,显示为OD600。

[0056] 图8是ApsPro1前体蛋白。

[0057] 图9是AnePro2前体蛋白。

[0058] 图10是AalPro2前体蛋白。

[0059] 图11是AcoPro2前体蛋白。

[0060] 图12是AwePro2前体蛋白。

[0061] 图13是AbrPro1前体蛋白。

[0062] 图14是AscPro5前体蛋白。

[0063] 图15显示了纯化的ApsPro1、AnePro2、AalPro2、AcoPro2、AwePro2、AbrPro1、AscPro5和AnPro响应于3至200ppm的酶浓度的浑浊减少性能,显示为A600。

[0064] 图16显示了AhoPro3、ApsPro1、AnePro2、AalPro2、AcoPro2、AwePro2、AbrPro1、AscPro5和AnPro响应于0至10ppm的酶浓度的蛋白酶活性,显示为A405。

[0065] 图17显示了全长MorPro1 DNA。

[0066] 图18显示了全长MorPro1前体。

[0067] 图19显示了MorPro1预测的成熟酶。

[0068] 图20显示了编码全长MorPro1的合成核苷酸序列。

[0069] 图21A显示了蛋白酶底物特异性的命名法。底物中的氨基酸残基从蛋白酶切割位点向外编号为:P3、P2、P1、P1'、P2'、P3',并且切割位点通过P1和P1'之间的黑色箭头突出显示。

[0070] 图21B描绘了从具有或不具有内切蛋白酶以1hL规模生产的麦芽啤酒产生的肽以及通过蛋白酶切割对应于P3'-P3的肽末端位置处的相对氨基酸含量。P1位置处的肽的相对氨基酸含量如左侧图所示,为对照(没有酶)、MorPro1、AnPro和AniPro2。右侧显示了与P3-P3'相应的肽位置处的相对氨基酸含量,图表显示了给定位置处每种氨基酸的累积含量,从而显示了详细的蛋白酶特异性偏好。

[0071] 图22显示通过LC-MS分析来自以1hL规模生产的具有或不具有内切蛋白酶的麦芽啤酒的肽,并且由如实例31中所述鉴定的超过300个独特的肽来计算平均肽长度(氨基酸残基的数量)。计算具有AniPro2、AnPro、MorPro1和对照(没有酶)生产的啤酒的平均肽长度。

[0072] 图23显示AniPro\_2成熟蛋白质。

## 具体实施方式

[0073] 除非另有说明,否则本发明教导的实践将使用在本领域技术范围内的分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学和生物化学的常规技术。此类技术在以下文献中得到充分解释,例如,Molecular Cloning: A Laboratory Manual[分子克隆:实验室手册],第二版(Sambrook等人,1989);Oligonucleotide Synthesis[寡核苷酸合成](M.J.Gait编辑,

1984; Current Protocols in Molecular Biology[分子生物学当前方案](F.M.Ausubel等人,编辑,1994); PCR: The Polymerase Chain Reaction[PCR:聚合酶链式反应](Mullis等人,编辑,1994); Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual[基因转移和表达:实验室手册](Kriegler,1990),和 The Alcohol Textbook[醇教科书](Ingledew等人,编辑,第五版,2009),以及 Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry[碳水化合物化学与生物化学基础](Lindhorste,2007)。

[0074] 除非在本文中另有定义,否则本文所用的全部技术术语和科学术语具有与本发明教导所属领域的普通技术人员通常所理解的相同含义。Singleton等人,Dictionary of Microbiology and Molecular Biology[微生物学和分子生物学词典],第二版,John Wiley and Sons[约翰威利父子公司],纽约(1994),以及Hale和Markham,The Harper Collins Dictionary of Biology[哈珀柯林斯生物学词典],Harper Perennial[哈珀永久出版社],纽约(1991)为技术人员提供了本发明中所使用的许多术语的通用词典。与本文所述的那些类似或等效的任何方法和材料可用于本发明教导的实践或测试中。

[0075] 本文提供的数值范围包括限定该范围的数值在内。

[0076] 定义和缩写

[0077] 关于多肽,术语“野生型”、“亲本”或“参照”是指在一个或多个氨基酸位置处不包含人为取代、插入或缺失的天然存在的多肽。类似地,关于多核苷酸,术语“野生型”、“亲本”或“参照”是指不包括人为核苷变化的天然存在的多核苷酸。然而,注意编码野生型、亲本、或参照多肽的多核苷酸不限于天然存在的多核苷酸,并且涵盖编码野生型、亲本、或参照多肽的任何多核苷酸。

[0078] 关于多肽,术语“变体”是指与指定的野生型、亲本或参照多肽不同的多肽,因为它包括一个或多个天然存在的或人为的氨基酸取代、插入或缺失。类似地,关于多核苷酸的术语“变体”是指在核苷酸序列方面与指定的野生型、亲本或参比多核苷酸不同的多核苷酸。野生型、亲本或参比多肽或多核苷酸的特性将从上下文中显而易见。

[0079] 术语“重组”当用于提及主题细胞、核酸、蛋白质或载体时,表明受试者已经从其天然状态被修饰。因此,例如,重组细胞表达在天然(非重组)形式的细胞内没有发现的基因,或者以不同于在自然界发现的水平或在不同于在自然界发现的条件下表达天然基因。重组核酸与天然序列相差一个或多个核苷酸,和/或可操作地连接到异源序列,例如,表达载体中的异源启动子。重组蛋白可以与天然序列相差一个或多个氨基酸,和/或与异源序列融合。包含编码内切蛋白酶的核酸的载体是重组载体。

[0080] 术语“回收的”、“分离的”和“单独的”是指从自然界发现的与其天然相关的至少一种其他材料或成分中除去的化合物、蛋白质(多肽)、细胞、核酸、氨基酸、或者其他指定的材料或成分。其“分离的”多肽包括但不限于含有在异源宿主细胞中表达的分泌多肽的培养液。

[0081] 术语“纯化的”是指处于相对纯状态的材料(例如,分离的多肽或多核苷酸),例如,至少约90%纯、至少约95%纯、至少约

[0082] 术语“氨基酸序列”与术语“多肽”、“蛋白质”和“肽”同义,并且可互换地使用。当此类氨基酸序列显示出活性时,它们可以被称为“酶”。使用针对氨基酸残基的常规单字母或三字母密码,其中氨基酸序列以标准氨基端-至-羧基端取向(即N→C)呈现。

[0083] 术语“核酸”涵盖能够编码多肽的DNA、RNA、异源双链体、以及合成分子。核酸可以是单链的或双链的,并且可以是化学修饰。术语“核酸”和“多核苷酸”可互换地使用。由于遗传密码是简并的,因此可以使用多于一种密码子来编码特定氨基酸,并且本发明的组合物和方法涵盖编码特定氨基酸序列的核苷酸序列。除非另有说明,否则核酸序列以5'-至-3'取向呈现。

[0084] 关于细胞使用的术语“转化”、“稳定转化”和“转基因”意指细胞包含整合到其基因组中或作为通过多代维系的附加体而携带的非天然(例如,异源)核酸序列。

[0085] 在将核酸序列插入细胞的上下文中,术语“引入”意指本领域已知的“转染”、“转化”或“转导”。

[0086] “宿主菌株”或“宿主细胞”是已经引入了表达载体、噬菌体、病毒或其他DNA构建体,包括编码目的多肽(例如,内切蛋白酶)的多核苷酸的生物。示例性宿主菌株是能够表达目的多肽的微生物细胞(例如,细菌、丝状真菌和酵母)。术语“宿主细胞”包括从细胞产生的原生质体。

[0087] 关于多核苷酸或蛋白质的术语“异源”是指不是天然存在于宿主细胞中的多核苷酸或蛋白质。

[0088] 关于多核苷酸或蛋白质的术语“内源”是指天然存在于宿主细胞中的多核苷酸或蛋白质。

[0089] 术语“表达”是指基于核酸序列产生多肽的过程。该过程包括转录和翻译两者。

[0090] “载体”是指设计用于将核酸引入一种或多种细胞类型中的多核苷酸序列。载体包括克隆载体、表达载体、穿梭载体、质粒、噬菌体颗粒、盒等。

[0091] “表达载体”是指包含编码目的多肽的DNA序列的DNA构建体,该编码序列可操作地连接到能够在合适的宿主中实现DNA表达的合适的控制序列。此类控制序列可包括实现转录的启动子、控制转录的任选操纵子序列、编码mRNA上合适的核糖体结合位点的序列、增强子以及控制转录和翻译终止的序列。

[0092] 如本文所使用的,“序列同一性百分比”意指当使用具有默认参数的CLUSTAL W算法比对时,特定序列具有与指定的参照序列中的氨基酸残基相同的至少一定百分比的氨基酸残基。参见Thompson等人(1994)Nucleic Acids Res.[核酸研究]22:4673-4680。CLUSTAL W算法的默认参数是:

	空位开放罚分:	10.0
	空位延伸罚分:	0.05
	蛋白质权重矩阵:	BLOSUM 系列
	DNA 权重矩阵:	IUB
	延迟发散序列%:	40
[0093]	空位分隔距离:	8
	DNA 转换权重:	0.50
	列表亲水残基:	GPSNDQEKR
	使用负性矩阵:	关
	切换特殊残基罚分:	开
	切换亲水罚分:	开
	切换结束空位分隔罚分	关。

[0094] 与参照序列相比,缺失被视为不相同的残基。包括在任一末端发生的缺失。

[0095] 术语“约”是指参考值的 $\pm 5\%$ 。

[0096] 如本文所用,术语“啤酒”传统上是指衍生自麦芽(其衍生自大麦)和任选的辅料(例如谷粒)的、并且用啤酒花调味的酒精饮料。然而,“啤酒”也可以来源于大米、高粱等辅料。可以通过基本相同的工艺由多种谷物制作啤酒。所有谷物淀粉都是葡萄糖均聚物,其中葡萄糖残基通过 $\alpha$ -1,4-键或 $\alpha$ -1,6-键连接,前者占主导地位。制作发酵的麦芽饮料的工艺通常称为酿造。制造这些饮料所使用的主要原料为水、啤酒花和麦芽。此外,辅料例如普通玉米糝、精制玉米糝、稻、高粱、精制玉米淀粉、大麦、大麦淀粉、去壳大麦、小麦、小麦淀粉、烘焙谷类、谷类片、黑麦、燕麦、马铃薯、树薯、和糖浆,例如玉米糖浆、甘蔗糖浆、转化糖浆、大麦和/或小麦糖浆等可以用作淀粉或可发酵糖类型的来源。淀粉最终被转化为糊精和可发酵糖。出于多种原因,主要由选定品种的大麦产生的麦芽对啤酒的整体特征和质量具有最大的影响。第一,麦芽是啤酒中主要的风味剂。第二,麦芽提供可发酵糖的主要部分。第三,麦芽提供蛋白质,这将有助于啤酒的酒体和泡沫特征。第四,麦芽提供淀粉糖化期间必需的酶活性。

[0097] “制作啤酒的工艺”是本领域熟知的工艺,但是简言之,其涉及五个步骤:(a) 辅料蒸煮和/或淀粉糖化,(b) 麦芽汁分离和提取,(c) 麦芽汁的煮沸和投酒花(hopping),(d) 冷却、发酵和储存,以及(e) 熟化、加工和包装。在第一步中,将研磨或压碎的麦芽与水混合并且在受控的温度下保持一段时间,例如以使麦芽中存在的酶将麦芽中存在的淀粉转化为可发酵糖。在第二步中,将麦芽浆(mash)转移至“滤桶(lauter tun)”或麦芽浆过滤器中,其中液体与谷物残余物分离。这一甜味液体称为“麦芽汁”,剩余的谷物残余物称为“麦糟(spent grain)”。在麦芽浆分离期间,通常将麦芽浆进行提取,这涉及将水添加至麦芽浆中以从麦糟回收残余的可溶性提取物。在第三步中,将麦芽汁猛烈煮沸。这会对麦芽汁进行杀菌并有

助于形成颜色、风味和气味。在煮沸期间的某个时刻添加啤酒花。在第四步中,将麦芽汁冷却并转移至发酵罐中,该发酵罐含有酵母或向其中添加酵母。酵母通过发酵将糖转化为醇和二氧化碳气体;在发酵结束时将发酵罐冷却,或可以将发酵罐冷却以停止发酵。除去酵母絮凝物。在最后一步中,将啤酒冷却并储存一段时间,在此期间啤酒变得澄清并产生风味,并且可能损害啤酒的外观、风味和保质期的任何材料都会沉淀下来。在包装之前,对啤酒充二氧化碳气体并任选地将其过滤和巴氏杀菌。发酵后,获得通常含有约2重量%至约10重量%的醇的饮料。在发酵期间非可发酵碳水化合物不会被转化,并且形成最终啤酒中的大部分溶解固体。这种残余物的存留是因为麦芽酶无法水解淀粉的 $\alpha$ -1,6-键并完全降解非淀粉多糖。

[0098] 如本文所用,“浑浊”是指饮料如果汁、葡萄酒和啤酒中不溶物质的出现。据了解,当蛋白质(通常是富含脯氨酸和谷氨酰胺的蛋白质)与多酚相互作用形成不溶性复合物时,会出现浑浊。这种复合物在啤酒酿造中是熟知的,特别是在啤酒冷藏储存的情况下。这种现象有时还被称为冷却浑浊。

[0099] 术语“谷氨酰胺内切蛋白酶”是指优先在一个或多个谷氨酰胺残基处切割底物蛋白或肽的内切蛋白酶。

[0100] 如本文所用,“增加的相对泡沫稳定性”意指与没有内切蛋白酶的发酵麦芽汁相比,通过在内切蛋白酶的存在下发酵相同的麦芽汁中实现的最终啤酒的泡沫稳定性增加。

[0101] 泡沫稳定性可以通过如实例15中所述的NIBEM泡沫稳定性测试来测量。可以通过测量来自通过在内切蛋白酶的存在下在发酵麦芽汁中产生的啤酒的NIBEM泡沫测试塌陷时间(30mm)并测量通过发酵相同的麦芽汁但没有内切蛋白酶产生的啤酒的NIBEM泡沫测试塌陷时间(30mm),来计算相对泡沫稳定性。相对泡沫稳定性可按下式计算:(具有PEP酶的塌陷时间NIBEM 30mm)/(不具有PEP酶的塌陷时间NIBEM30mm) x100%。

[0102] 优选地,增加的相对泡沫稳定性高于100%、101%、102%、103%、104%、105%、106%、107%、108%、109%、和110%。

[0103] 如本文所用,“增加的相对浑浊减少”意指与没有内切蛋白酶的发酵麦芽汁相比,通过在内切蛋白酶的存在下发酵相同的麦芽汁中实现的最终啤酒的浑浊减少增加。

[0104] 相对浑浊减少可以通过如实例13中所述的EBC TOHA强制浑浊(forced haze)方法来测量。可以通过测量来自通过在内切蛋白酶的存在下在发酵麦芽汁中产生的啤酒的EBC TOHA强制浑浊90°EBC散射并测量通过发酵相同的麦芽汁然而没有内切蛋白酶产生的啤酒的EBC TOHA强制浑浊90°EBC散射,来计算相对浑浊减少。使用内切蛋白酶的相对浑浊减少可以针对没有任何PEP酶的啤酒如下进行计算:
$$\frac{(\text{EBC}_{\text{浊度}90^{\circ}\text{没有酶}} - \text{EBC}_{\text{浊度}90^{\circ}\text{具有PEP酶}})}{\text{EBC}_{\text{浊度}90^{\circ}\text{没有酶}}} \times 100\%$$
。相似地,可以通过测量来自通过在内切蛋白酶的存在下在发酵麦芽汁中产生的啤酒的使用25°EBC散射的EBC TOHA强制浑浊并测量通过发酵相同的麦芽汁但没有内切蛋白酶产生的啤酒的EBC TOHA强制浑浊25°EBC散射,来计算相对浑浊减少。使用内切蛋白酶的相对浑浊减少可以针对没有任何PEP酶的啤酒如下进行计算:
$$\frac{(\text{EBC}_{\text{浊度}25^{\circ}\text{没有酶}} - \text{EBC}_{\text{浊度}25^{\circ}\text{具有PEP酶}})}{\text{EBC}_{\text{浊度}25^{\circ}\text{没有酶}}} \times 100\%$$
。

[0105] 优选增加的相对浑浊减少(90°)高于67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%或83%。

[0106] 本发明的内切蛋白酶可以是“前体”、“未成熟”或“全长”的,在这种情况下,它们包

含信号序列;或“成熟”的,在这种情况下,它们缺乏信号序列。成熟形式的多肽通常是最有用的。只要所得多肽保留内切蛋白酶活性,本发明的内切蛋白酶多肽也可被截短以去除N-末端或C-末端。此外,内切蛋白酶可以是来源于更长的氨基酸序列的活性片段。活性片段的特征在于保留全长酶的一些或全部活性,但具有来自N-末端、来自C-末端或其内部或组合的缺失。成熟蛋白质可以被认为是前体的活性片段、不成熟的或全长蛋白质。

[0107] 本发明的内切蛋白酶可以是“嵌合”或“杂合”多肽,因为其包括第一内切蛋白酶多肽的至少一部分和第二内切蛋白酶多肽的至少一部分。本发明的内切蛋白酶可进一步包含异源信号序列,即允许跟踪或纯化等的表位。示例性异源信号序列来自地衣芽孢杆菌(*B.licheniformis*)淀粉酶(LAT)、枯草芽孢杆菌(*B.subtilis*) (AmyE或AprE)、和链霉菌属(*Streptomyces*)Cela。

[0108] 内切蛋白酶的产生

[0109] 本发明的内切蛋白酶可以在宿主细胞中产生,例如通过分泌、通过表面显示或细胞内表达。在将内切蛋白酶分泌到细胞培养基中后,可以获得包含内切蛋白酶的培养细胞材料(例如,全细胞培养液)。任选地,内切蛋白酶可以从宿主细胞中分离,或甚至从细胞培养液中分离,这取决于最终内切蛋白酶所希望的纯度。可替代地,内切蛋白酶可以在宿主细胞表面表达。

[0110] 可以根据本领域熟知的方法克隆和表达编码内切蛋白酶的基因。合适的宿主细胞包括细菌、真菌(包括酵母和丝状真菌)和植物细胞(包括藻类)。特别有用的宿主细胞包括酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、巴氏酵母(*Saccharomyces pastorianus*)、酒香酵母(*Brettanomyces*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)或里氏木霉(*Trichoderma reesei*)。其他宿主细胞包括细菌细胞,例如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)或地衣芽孢杆菌(*B.licheniformis*),以及链霉菌属(*Streptomyces*)、大肠杆菌(*E.Coli*)。

[0111] 在本发明的一方面,表达内切蛋白酶的酵母细胞可以直接用于啤酒生产中进行发酵。在本发明的这个方面,不必添加外源内切蛋白酶。将由酵母表达的内切蛋白酶提供浑浊减少。

[0112] 宿主细胞还可以表达编码同源或异源内切蛋白酶(即,与宿主细胞不同物种的内切蛋白酶)或一种或多种其他酶的核酸。内切蛋白酶可以是变体内切蛋白酶。另外,宿主可以表达一种或多种辅酶、蛋白质、肽。

[0113] 载体

[0114] 可以构建包含编码内切蛋白酶的核酸的DNA构建体,以在宿主细胞中表达。由于遗传密码中熟知的简并性,编码相同氨基酸序列的变体多核苷酸可以用常规技术进行设计和制备。针对特定宿主细胞优化密码子使用也是本领域熟知的。编码内切蛋白酶的核酸可以掺入载体中。可以使用熟知的转化技术(例如以下公开的那些)将载体转移至宿主细胞中。

[0115] 载体可以是可被转化到宿主细胞中并在其中复制的任何载体。例如,包含编码内切蛋白酶的核酸的载体可以在细菌宿主细胞中转化和复制,作为使载体繁殖和扩增的手段。载体也可以被转化到表达宿主中,使得编码核酸可以被表达为功能性内切蛋白酶。用作表达宿主的宿主细胞可以包括,例如,丝状真菌。美国真菌遗传学库存中心(FGSC)的菌株目录列出了适合在真菌宿主细胞中表达的载体。参见FGSC,菌株目录,密苏里大学,网址为

www.fgsc.net (最新修改时间为2007年1月17日)。代表性的载体是pJG153,其是可在细菌宿主中复制的无启动子Cre表达载体。参见Harrison等人, (2011年6月) *Applied Environ. Microbiol* [应用和环境微生物学] 77:3916-22。pJG153可以用常规技术进行修饰以包含并表达编码内切蛋白酶的核酸。

[0116] 编码内切蛋白酶的核酸可以可操作地连接到合适的启动子,从而允许在宿主细胞中进行转录。启动子可以是在所选宿主细胞中显示转录活性的任何DNA序列,并且可以衍生自编码与宿主细胞同源或异源的蛋白质的基因。用于指导编码内切蛋白酶的DNA序列的转录(尤其是在细菌宿主中)的示例性启动子是大肠杆菌的lac操纵子的启动子、天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*) 琼脂酶基因dagA或celA启动子、地衣芽孢杆菌 $\alpha$ -淀粉酶基因(amyL)的启动子、嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*) 生麦芽糖淀粉酶基因(amyM)的启动子、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)  $\alpha$ -淀粉酶(amyQ)的启动子、枯草芽孢杆菌xy1A和xy1B基因的启动子等。对于在真菌宿主中的转录,有用的启动子的实例是衍生自编码米曲霉TAKA淀粉酶、米黑根毛霉(*Rhizomucor miehei*) 天冬氨酸蛋白酶、黑曲霉中性 $\alpha$ -淀粉酶、黑曲霉酸稳定性 $\alpha$ -淀粉酶、黑曲霉葡糖淀粉酶、米黑根毛霉脂肪酶、米曲霉碱性蛋白酶、米曲霉磷酸三糖异构酶或构巢曲霉(*A.nidulans*) 乙酰胺酶的基因的那些启动子。当编码内切蛋白酶的基因在细菌物种(如大肠杆菌)中表达时,可以从,例如,包括T7启动子和噬菌体 $\lambda$ 启动子的噬菌体启动子中选择适合的启动子。用于在酵母物种中表达的适合的启动子的实例包括但不限于酿酒酵母的Gal 1和Gal 10启动子以及毕赤酵母(*Pichia pastoris*) AOX1或AOX2启动子。cbh1是来自里氏木霉的内源诱导型启动子。参见Liu等人(2008) “Improved heterologous gene expression in *Trichoderma reesei* by cellobiohydrolase I gene(cbh1) promoter optimization [纤维二糖水解酶I基因(cbh1)启动子优化改善里氏木霉中的异源基因表达],” *Acta Biochim. Biophys. Sin (Shanghai)* [生物化学与生物物理学报(上海)] 40(2):158-65。

[0117] 编码序列可以可操作地连接到信号序列。编码信号序列的DNA可以是与待表达的内切蛋白酶基因天然相关或来自不同属或物种的DNA序列。可以将包含DNA构建体或载体的信号序列和启动子序列引入真菌宿主细胞,并且它们可以衍生自相同的来源。例如,信号序列是可操作地连接到cbh1启动子的cbh1信号序列。

[0118] 表达载体还可以包含合适的转录终止子,以及在真核生物中,包含可操作地连接到编码变体内切蛋白酶的DNA序列的聚腺苷酸化序列。终止序列和聚腺苷酸化序列可以适当地衍生自与启动子相同的来源。

[0119] 载体可以进一步包含使载体能够在宿主细胞中复制的DNA序列。此类序列的实例是质粒pUC19、pACYC177、pUB110、pE194、pAMB1和pIJ702的复制起点。

[0120] 载体还可以包含可选择标记,例如其产物弥补分离的宿主细胞中的缺陷的基因,如来自枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*) 或地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*) 的dal基因,或者赋予抗生素抗性(如例如氨苄青霉素、卡那霉素、氯霉素或四环素抗性)的基因。此外,载体可以包含曲霉属(*Aspergillus*) 选择标记,如amdS、argB、niaD和xxsC,引起潮霉素抗性的标记,或者选择可以通过共转化(如本领域已知的)实现。

[0121] 宿主细胞的转化和培养

[0122] 包含DNA构建体或表达载体的分离的细胞有利地用作重组产生内切蛋白酶的宿主

细胞。通过将DNA构建体(以一或多个拷贝)整合到宿主染色体中,可以方便地用编码酶的DNA构建体转化细胞。通常认为这种整合是有利的,因为DNA序列更可能在细胞中稳定保持。可以根据常规方法,例如,通过同源或异源重组,将DNA构建体整合到宿主染色体中。可替代地,可以用如上所述的与不同类型的宿主细胞相关的表达载体转化细胞。

[0123] 适合的酵母宿主生物可以选自生物技术相关的酵母物种,如但不限于酵母物种,如毕赤酵母属物种(*Pichia* sp.),汉逊酵母属物种(*Hansenulasp.*)或克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)、耶氏酵母属(*Yarrowinia*)、裂殖酵母属(*Schizosaccharomyces*)物种或者酵母属(*Saccharomyces*)物种,包括酿酒酵母,或者属于裂殖酵母属的物种,如例如,粟酒裂殖酵母(*S.pombe*)物种。甲基营养型酵母物种菌株毕赤酵母可以用作宿主生物。可替代地,宿主生物可以是汉逊酵母属物种。丝状真菌中合适的宿主生物包括曲霉属的物种,例如,黑曲霉、米曲霉、塔宾曲霉(*Aspergillus tubigensis*)、泡盛曲霉(*Aspergillus awamori*)或构巢曲霉。可替代地,镰刀菌属(*Fusarium*)物种(例如,尖孢镰刀菌(*Fusariumoxysporum*))的菌株或根毛霉属(*Rhizomucor*)物种(如米黑根毛霉)的菌株可以用作宿主生物。其他合适的菌株包括嗜热菌属(*Thermomyces*)和毛霉菌属(*Mucor*)物种。此外,木霉属物种(*Trichoderma* sp.)可以用作宿主。转化曲霉属宿主细胞的合适的程序包括,例如,EP 238023中描述的程序。真菌宿主细胞表达的内切蛋白酶可以被糖基化,即将含糖基部分。糖基化模式可以与野生型内切蛋白酶中存在的相同或不同。糖基化的类型和/或程度可能改变酶和/或生物化学特性。

[0124] 从表达宿主缺失基因是有利的,其中可以通过转化的表达载体治愈基因缺陷。已知方法可用于获得具有一种或多种失活基因的真菌宿主细胞。可以通过完全或部分缺失,通过插入失活或通过使基因对其预期目的不起作用的其他任何方式使得该基因被阻止表达功能性蛋白来完成基因灭活。已克隆的、来自木霉属物种或其他丝状真菌宿主的任何基因均可以缺失,例如,*cbh1*、*cbh2*、*egl1*和*leg12*基因。基因缺失可通过本领域已知方法通过将待失活的所需基因的形式插入质粒中来完成。

[0125] 将DNA构建体或载体引入宿主细胞中包括以下技术,例如转化;电穿孔;核显微注射;转导;转染,例如脂质转染介导的和IDEAE-糊精介导的转染;与磷酸钙DNA沉淀一起孵育;用DNA涂覆的微粒高速轰击;以及原生质体融合。通用转化技术是本领域已知的。参见,例如Sambrook等人(2001),同上。异源蛋白质在木霉属中的表达描述于例如美国专利号6,022,725中。对于曲霉属菌株的转化,还参考了Cao等人(2000) *Science* [科学]9:991-1001。可以用载体系统构建遗传稳定的转化体,由此编码内切蛋白酶的核酸被稳定整合到宿主细胞染色体中。然后通过已知技术选择并纯化转化体。

[0126] 用于转化的木霉属物种的制备例如可以涉及从真菌菌丝体制备原生质体。参见Campbell等人(1989) *Curr. Genet.* [当代遗传学]16:53-56。菌丝体可以从发芽的营养孢子获得。使用消化细胞壁的酶处理菌丝体,产生原生质体。通过悬浮培养基中渗透稳定剂的存在来保护原生质体。这些稳定剂包括山梨糖醇、甘露糖醇、氯化钾、硫酸镁等。通常,这些稳定剂的浓度在0.8M与1.2M之间变化,例如山梨糖醇的1.2M溶液可以用于悬浮培养基中。

[0127] 取决于钙离子浓度,将DNA摄取到宿主木霉属物种菌株中。一般情况下,在摄取溶液中使用在约10mM至50mM之间的CaCl<sub>2</sub>。额外的合适的化合物包括缓冲系统,例如TE缓冲液(10mM Tris, pH 7.4; 1mMEDTA)或10mM MOPS (pH 6.0)和聚乙二醇。据信聚乙二醇使细胞膜

融合,从而允许培养基的内容物被递送至木霉属物种菌株的细胞质中。这种融合经常留下整合到宿主染色体中的质粒DNA的多个拷贝。

[0128] 通常,使用已经进行了渗透性处理的原生质体或细胞转化木霉属物种,通常以 $10^5$ 至 $10^7$ /mL、特别是 $2 \times 10^6$ /mL的密度进行。可以将100 $\mu$ L体积的在合适的溶液(例如1.2M山梨糖醇和50mM CaCl<sub>2</sub>)中的这些原生质体或细胞与所希望的DNA混合。通常,向摄取溶液中添加高浓度的PEG。可以将从0.1至1体积的25%PEG 4000添加到原生质体悬浮液中;然而,向原生质体悬浮液中添加约0.25体积是有用的。也可以将添加剂诸如二甲亚砜、肝素、亚精胺、氯化钾等添加到摄取溶液中以促进转化。类似的程序可用于其他真菌宿主细胞。参见,例如美国专利号6,022,725。

[0129] 表达

[0130] 产生内切蛋白酶的方法可以包括在有利于产生所述酶的条件下如上所述培养宿主细胞,并从细胞和/或培养基中回收所述酶。

[0131] 用于培养细胞的培养基可以是适合于所考虑的宿主细胞生长并获得内切蛋白酶表达的任何常规培养基。合适的培养基和培养基成分可从商业供应商获得或可以根据公开的配方(例如,如在美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)的目录中所述)制备。

[0132] 从宿主细胞中分泌的酶可以用于全培养液制剂中。在本发明的方法中,可以使用本领域已知的任何培养方法来实现重组微生物的用过的全发酵液的制备,从而导致内切蛋白酶的表达。因此,发酵可以理解为包括在实验室或工业发酵罐中在合适的培养基和允许内切蛋白酶被表达或分离的条件下进行的摇瓶培养、小规模或大规模发酵(包括连续发酵、分批发酵、补料分批发酵或固态发酵)。术语“用过的全发酵液”在本文中被定义为包括培养基、细胞外蛋白质(例如,酶)和细胞生物质的发酵材料的未分级内容物。应当理解,术语“用过的全发酵液”还涵盖已使用本领域熟知的方法裂解或透化的细胞生物质。

[0133] 从宿主细胞中分泌的酶可方便地通过熟知的程序从培养基中回收,这些程序包括通过离心或过滤从培养基中分离细胞,并借助于盐(例如硫酸铵)沉淀培养基的蛋白质成分,然后使用色谱程序,例如离子交换色谱法、亲和色谱法等。

[0134] 可以将载体中编码内切蛋白酶的多核苷酸可操作地连接到控制序列,该控制序列可以通过宿主细胞提供编码序列的表达,即改载体是表达载体。可以例如通过添加其他转录调控元件来修饰控制序列,以使由控制序列指导的转录水平对转录调节因子更有应答。控制序列可特别地包含启动子。

[0135] 宿主细胞可以在允许表达内切蛋白酶的合适条件下培养。这些酶的表达可以是组成型的,使得它们能被连续产生,或诱导型的,需要刺激来启动表达。在诱导型表达的情况下,当需要时可通过例如向培养基中添加诱导物质,例如地塞米松或IPTG或槐糖来启动蛋白质生产。多肽也可以在体外无细胞系统(例如TNT™(普洛麦格公司(Promega))兔网织红细胞系统)中重组生产。

[0136] 表达宿主也可以在有氧条件下在对于宿主来说适当的培养基中培养。可以提供摇动或搅动和通气的组合,其中生产在对所述宿主来说适当的温度下(例如从约25°C至约75°C(例如30°C至45°C),这取决于宿主的需要和所需内切蛋白酶的生产)发生。培养可以发生从约12至约100小时或更长时间(以及其间的任何小时值,例如从24至72小时)。通常,培养

液的pH为约4.0至约8.0,同样取决于宿主相对于内切蛋白酶的生产所需的培养条件。

[0137] 富集和纯化内切蛋白酶的方法

[0138] 发酵、分离和浓缩技术是本领域熟知的,并且可使用常规方法来制备含内切蛋白酶多肽的溶液。

[0139] 发酵后,获得发酵液,通过常规分离技术除去微生物细胞和各种悬浮固体(包括剩余的粗发酵材料),以便获得内切蛋白酶溶液。通常使用过滤、离心、微滤、旋转真空鼓式过滤、超滤、离心后超滤、萃取或色谱法等。

[0140] 期望浓缩含内切蛋白酶多肽的溶液以优化回收。使用未浓缩的溶液需要增加孵育时间以便收集经富集或纯化的酶沉淀物。

[0141] 使用常规浓缩技术浓缩含酶溶液,直至获得期望的酶水平。含酶溶液的浓缩可通过在本文中所讨论的技术中的任一种来实现。富集和纯化的示例性方法包括但不限于旋转真空过滤和/或超滤。

[0142] 将酶溶液浓缩成浓缩的酶溶液,直至浓缩的含内切蛋白酶多肽的溶液的酶活性达到所希望的水平。

[0143] 可以使用例如沉淀剂,如金属卤化物沉淀剂进行浓缩。金属卤化物沉淀剂包括但不限于碱金属氯化物、碱金属溴化物和这些金属卤化物中的两种或更多种的共混物。示例性金属卤化物包括氯化钠、氯化钾、溴化钠、溴化钾和这些金属卤化物中的两种或更多种的共混物。金属卤化物沉淀剂氯化钠也可用作防腐剂。

[0144] 金属卤化物沉淀剂以有效沉淀内切蛋白酶的量使用。常规测试后,选择至少有效量和最佳量的金属卤化物以有效引起酶的沉淀,以及用于使回收最大化的沉淀条件,包括孵育时间、pH、温度和酶浓度,对于本领域普通技术人员来说将是显而易见的。

[0145] 通常,向浓缩的酶溶液中添加至少约5%w/v(重量/体积)至约25%w/v的金属卤化物,并且通常为至少8%w/v。一般情况下,向浓缩的酶溶液中添加不超过约25%w/v的金属卤化物,并且通常不超过约20%w/v。金属卤化物沉淀剂的最佳浓度除其他事项之外,将取决于特定内切蛋白酶多肽的性质和其在浓缩的酶溶液中的浓度。

[0146] 沉淀酶的另一替代方式是使用有机化合物。示例性有机化合物沉淀剂包括:4-羟基苯甲酸、4-羟基苯甲酸的碱金属盐、4-羟基苯甲酸的烷基酯、以及这些有机化合物中的两种或更多种的共混物。有机化合物沉淀剂的添加可在添加金属卤化物沉淀剂之前、与之同时或之后进行,并且两种沉淀剂、有机化合物和金属卤化物的添加可依次或同时进行。

[0147] 通常,有机沉淀剂选自以下组成的组:4-羟基苯甲酸的碱金属盐(诸如钠盐或钾盐),和4-羟基苯甲酸的直链或支链烷基酯,其中该烷基基团含有1至12个碳原子,以及这些有机化合物中的两种或更多种的共混物。有机化合物沉淀剂可以是例如4-羟基苯甲酸的直链或支链烷基酯,其中所述烷基基团含有1至10个碳原子,以及这些有机化合物中的两种或更多种的共混物。示例性有机化合物是4-羟基苯甲酸的直链烷基酯,其中所述烷基基团含有1至6个碳原子,以及这些有机化合物中的两种或更多种的共混物。还可以使用4-羟基苯甲酸的甲酯、4-羟基苯甲酸的丙酯、4-羟基苯甲酸的丁酯、4-羟基苯甲酸的乙酯和这些有机化合物中的两种或更多种的共混物。额外的有机化合物还包括但不限于4-羟基苯甲酸甲酯(称为对羟基苯甲酸甲酯)、4-羟基苯甲酸丙酯(称为对羟基苯甲酸丙酯),它们也都是防腐剂。对于进一步的描述,参见例如美国专利号5,281,526。

[0148] 有机化合物沉淀剂的添加提供了沉淀条件在pH、温度、内切蛋白酶浓度、沉淀剂浓度和孵育时间方面的高度灵活性的优点。

[0149] 有机化合物沉淀剂以有效地通过金属卤化物沉淀剂的方式改善酶的沉淀的量使用。常规测试后,根据本公开,选择至少有效量和最佳量的有机化合物沉淀剂,连同为了最大化回收的沉淀的条件,包括孵育时间、pH、温度和酶浓度,对于本领域普通技术人员来说将是显而易见的。

[0150] 一般情况下,向浓缩的酶溶液中添加至少约0.01%w/v的有机化合物沉淀剂,并且通常至少约0.02%w/v。一般情况下,向浓缩的酶溶液中添加不超过约0.3%w/v的有机化合物沉淀剂,并且通常不超过约0.2%w/v。

[0151] 可以将含有金属卤化物沉淀剂和有机化合物沉淀剂的浓缩多肽溶液调节至某一pH,这将必然取决于待富集或纯化的酶。一般情况下,将pH调节至接近内切蛋白酶的等电点的水平。可以在从低于等电点(pI)约2.5个pH单位上至高于等电点约2.5个pH单位的pH范围内调节pH。

[0152] 获得富集或纯化的酶沉淀物所需的孵育时间取决于特定酶的性质、酶的浓度和一种或多种特定的沉淀剂及其浓度。一般情况下,有效沉淀酶的时间在约1至约30小时之间;通常不超过约25小时。在有机化合物沉淀剂存在下,孵育时间仍可减少至小于约10小时,并且在大多数情况下甚至约6小时。

[0153] 通常,孵育期间的温度在约4°C和约50°C之间。通常,该方法在约10°C和约45°C之间(例如,在约20°C和约40°C之间)的温度下进行。用于诱导沉淀的最佳温度根据溶液条件和所用的酶或一种或多种沉淀剂而变化。

[0154] 通过搅拌包含所述酶、添加的金属卤化物和添加的有机化合物的溶液来改善富集或纯化的酶沉淀物的总体回收率以及用其进行该工艺的效率。在添加金属卤化物和有机化合物期间以及随后的孵育期间均进行搅拌步骤。适合的搅拌方法包括机械搅拌或摇动、剧烈通气或任何类似技术。

[0155] 孵育期后,经富集或纯化的酶然后与解离的色素和其他杂质分离,并通过常规分离技术诸如过滤、离心、微滤、旋转真空过滤、超滤、压滤、交叉膜微滤、交叉流膜微滤等收集。通过用水洗涤沉淀物可获得酶沉淀物的进一步富集或纯化。例如,用含有金属卤化物沉淀剂的水、或用含有金属卤化物和有机化合物沉淀剂的水洗涤经富集或纯化的酶沉淀物。

[0156] 在发酵期间,内切蛋白酶多肽在培养液中积累。为了分离、富集或纯化所需的内切蛋白酶,将培养液离心或过滤以消除细胞,并且将所得的无细胞液体用于酶富集或纯化。在一个实施例中,使用硫酸铵以约70%饱和度对无细胞培养液进行盐析;然后将70%饱和度的沉淀级分溶解在缓冲液中并施加到柱(如Sephadex G-100柱)上,并且洗脱以回收酶活性级分。为了进一步富集或纯化,可以使用常规程序,例如离子交换色谱法。富集或纯化的酶可以制成为液体(溶液,浆料)或固体(颗粒,粉末)的最终产品。

[0157] 优选的实施例的详细描述

[0158] 根据本发明的一个方面,呈现了一种用于减少或防止饮料中浑浊的方法,其具有向饮料中添加内切蛋白酶的步骤,其中内切蛋白酶是与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:16具有至少75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或100%序列同一性的酶或其内切蛋白酶活性片段如成熟蛋白质。

[0159] 优选地,内切蛋白酶活性片段是成熟蛋白质。优选地,饮料含有蛋白质。优选地,饮料含有多酚。优选地,饮料是啤酒。优选地,饮料是葡萄酒。优选地,饮料是果汁。

[0160] 优选地,内切蛋白酶添加到麦芽汁中。优选地,浑浊形成后将内切蛋白酶添加到啤酒中。优选地,浑浊形成前将内切蛋白酶添加到啤酒中。

[0161] 优选地,啤酒具有增加的相对泡沫稳定性和增加的相对浑浊减少。优选地,增加的相对泡沫稳定性高于100%、101%、102%、103%、104%、105%、106%、107%、108%、109%或110%。优选地,如通过90°散射所测量,增加的相对浑浊减少高于73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%。

[0162] 优选地,麦芽汁中内切蛋白酶的量为4至300mg蛋白酶/hL麦芽汁、优选地10至250mg蛋白酶/hL麦芽汁、优选地20至200mg蛋白酶/hL麦芽汁、优选地30至150mg蛋白酶/hL麦芽汁或优选地40至100mg蛋白酶/hL麦芽汁。

[0163] 优选地,该方法具有添加ALDC酶、葡糖淀粉酶、生麦芽糖 $\alpha$ -淀粉酶、支链淀粉酶、过氧化氢酶或转葡萄糖苷酶中的一种或多种的另外步骤。

[0164] 优选地,ALDC酶是如EC 4.1.1.5中所述的乙酰乳酸脱羧酶。优选地,葡糖淀粉酶是如EC 3.2.1.3中所述的1,4- $\alpha$ -葡糖苷酶。优选地,生麦芽糖 $\alpha$ -淀粉酶是如EC 3.3.1.133中所述的葡聚糖1,4- $\alpha$ -麦芽糖水解酶。优选地,支链淀粉酶是如EC 3.2.1.41中所述的 $\alpha$ -糊精内切-1,6- $\alpha$ -葡糖苷酶、限制糊精酶、支链淀粉6-葡聚糖水解酶、脱支酶。优选地,转葡萄糖苷酶是如EC 2.4.1.24中所述的1,4- $\alpha$ -葡聚糖-分支酶、寡葡聚糖-分支葡萄糖基转移酶。

[0165] 在本发明的另一方面,呈现了增加啤酒中相对泡沫稳定性的方法,该方法具有向饮料中添加内切蛋白酶的步骤,其中内切蛋白酶是与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:16具有至少75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或100%序列同一性的酶或其内切蛋白酶活性片段如成熟蛋白质。

[0166] 优选地,增加的相对泡沫稳定性高于100%、101%、102%、103%、104%、105%、106%、107%、108%、109%或110%。优选地,内切蛋白酶活性片段是成熟蛋白质。

[0167] 优选地,内切蛋白酶添加到麦芽汁中。优选地,浑浊形成后将内切蛋白酶添加到啤酒中。优选地,浑浊形成前将内切蛋白酶添加到啤酒中。

[0168] 优选地,麦芽汁中内切蛋白酶的量为4至300mg蛋白酶/hL麦芽汁、优选地10至250mg蛋白酶/hL麦芽汁、优选地20至200mg蛋白酶/hL麦芽汁、优选地30至150mg蛋白酶/hL麦芽汁或优选地40至100mg蛋白酶/hL麦芽汁。

[0169] 优选地,该方法具有添加ALDC酶、葡糖淀粉酶、生麦芽糖 $\alpha$ -淀粉酶、支链淀粉酶、过氧化氢酶或转葡萄糖苷酶中的一种或多种的另外步骤。

[0170] 优选地,ALDC酶是如EC 4.1.1.5中所述的乙酰乳酸脱羧酶。优选地,葡糖淀粉酶是如EC 3.2.1.3中所述的1,4- $\alpha$ -葡糖苷酶。优选地,生麦芽糖 $\alpha$ -淀粉酶是如EC 3.3.1.133中所述的葡聚糖1,4- $\alpha$ -麦芽糖水解酶。优选地,支链淀粉酶是如EC 3.2.1.41中所述的 $\alpha$ -糊精内切-1,6- $\alpha$ -葡糖苷酶、限制糊精酶、支链淀粉6-葡聚糖水解酶、脱支酶。优选地,转葡萄糖苷酶是如EC 2.4.1.24中所述的1,4- $\alpha$ -葡聚糖-分支酶、寡葡聚糖-分支葡萄糖基转移酶。

[0171] 优选地,啤酒具有增加的相对泡沫稳定性和增加的相对浑浊减少。优选地,如通过90°散射所测量,增加的相对浑浊减少高于73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%。

[0172] 在本发明的另一方面,呈现了包含内切蛋白酶的分离的多肽,其中所述内切蛋白

酶是与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:16具有至少75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或100%序列同一性的酶或其内切蛋白酶活性片段。

[0173] 在本发明的另一方面,呈现了分离的多核苷酸,该分离的多核苷酸具有编码上述多肽的核酸序列。

[0174] 在本发明的另一方面,呈现了核酸构建体,该核酸构建体具有可操作地连接到一个或多个控制序列上的上述多核苷酸,该控制序列指导该多肽在合适的表达宿主中的产生。

[0175] 在本发明的另一方面,呈现了具有上述核酸构建体的重组表达载体。

[0176] 在本发明的另一方面,呈现了具有上述核酸构建体或上述载体的重组宿主细胞。

[0177] 在本发明的另一方面,呈现了用于生产上述多肽的方法,该方法具有以下步骤:培养上述重组宿主细胞,以产生具有多肽的上清液和/或细胞;以及回收多肽。

[0178] 在本发明的另一方面,呈现了通过上述方法产生的多肽。

[0179] 在本发明的另一方面,呈现了从通过上述方法获得的发酵液获得的滤液在防止或减少饮料中浑浊的用途。

[0180] 在本发明的另一方面,呈现了具有如上所述的多肽、分离的多核苷酸、核酸构建体、重组表达载体、或重组宿主细胞的组合物。

[0181] 在本发明的另一方面,呈现了如上所述的多肽、分离的多核苷酸、核酸构建体、重组表达载体、或重组宿主细胞用于增加饮料中的相对泡沫稳定性的用途。

[0182] 在本发明的另一方面,呈现了如上所述的多肽、分离的多核苷酸、核酸构建体、重组表达载体、或重组宿主细胞用于增加饮料中的相对浑浊减少的用途。

[0183] 在本发明的另一方面,呈现了用于减少饮料中浑浊的方法,该方法具有以下步骤:向饮料中添加谷氨酰胺内切蛋白酶,其中该饮料含有具有谷氨酰胺残基的蛋白质或肽,该谷氨酰胺残基被蛋白酶切割从而减少浑浊。优选地,谷氨酰胺内切蛋白酶还切割脯氨酸残基。优选地,饮料是果汁、葡萄酒、或啤酒。更优选地,饮料是啤酒。

[0184] 优选地,谷氨酰胺内切蛋白酶包含与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:16具有至少80%、85%、90%、95%、98%、或99%同源性的多肽或其内切蛋白酶活性片段,如缺乏信号序列的成熟蛋白质。更优选地,谷氨酰胺内切蛋白酶包含根据SEQ ID NO:16的多肽。

[0185] 实例

[0186] 本公开在以下实例中进一步详细描述,这些实例不意欲以任何方式限制本公开所要求保护的公开内容。附图意在被视为本公开的说明书和描述的组成部分。提供以下实例以说明但不限制所要求保护的公开内容。

[0187] 实例1

[0188] 作为来自黑曲霉 (AnPro) 的脯氨酸特异性内切蛋白酶的商业样品的示例,使用来自DSM的Brewers Clarex™ (5PPU/g产品)。脯氨酸特异性内切蛋白酶 (PEP) 的确定活性基于合成肽Z-Gly-Pro-pNA在37°C在柠檬酸盐/磷酸二钠缓冲液 (pH 4.6) 中的水解。在405nm处用分光光度法监测反应产物,1个单位 (1PPU) 定义为在这些测试条件下每分钟释放1mmol对硝基苯胺的酶量。

[0189] 实例2

[0190] 同形曲霉CBS 101889蛋白酶AhoPro3(CRC21077-WT)的克隆

[0191] 同形曲霉(*Aspergillus homomorphus*)CBS 101889被选为可用于各种工业应用的酶的潜在来源。同形曲霉CBS 101889中鉴定的基因之一(命名为AhoPro3(CRC21077-WT))编码与从BLAST搜索确定的蛋白酶具有同源性的蛋白质(Altschul等人,J Mol Biol[分子生物学杂志],215:403-410,1990)。由AhoPro3基因编码的蛋白质如SEQ ID NO:4中所示(NCBI参考序列:XP\_025547970.1)。在N-末端,蛋白质具有如通过SignalP 4.0版本(Nordahl Petersen等人(2011)Nature Methods[自然方法],8:785-786)预测的长度为22个氨基酸的信号肽。信号序列的存在表明AhoPro3是分泌的酶。

[0192] 实例3

[0193] 跨山曲霉CBS 130015蛋白酶AtrPro1(CRC21068-WT)的克隆

[0194] 跨山曲霉(*Aspergillus transmontanensis*)CBS 130015被选为可用于各种工业应用的酶的潜在来源。跨山曲霉CBS 130015中鉴定的基因之一(命名为AtrPro1(CRC21068-WT))编码与从BLAST搜索确定的蛋白酶具有同源性的蛋白质(Altschul等人,J Mol Biol[分子生物学杂志],215:403-410,1990)。由AtrPro1基因编码的蛋白质如SEQ ID NO:3中所示(JGI参考序列:Asptral\_564990)。在N-末端,蛋白质具有如通过SignalP 4.0版本(Nordahl Petersen等人(2011)Nature Methods[自然方法],8:785-786)预测的长度为22个氨基酸的信号肽。信号序列的存在表明AtrPro1是分泌的酶。

[0195] 实例4

[0196] 巴西曲霉IBT 29228蛋白酶AbePro2(CRC21079-WT)的克隆

[0197] 巴西曲霉(*Aspergillus bertholletius*)IBT 29228被选为可用于各种工业应用的酶的潜在来源。巴西曲霉IBT 29228中鉴定的基因之一(命名为AbePro2(CRC21079-WT))编码与从BLAST搜索确定的蛋白酶具有同源性的蛋白质(Altschul等人,J Mol Biol[分子生物学杂志],215:403-410,1990)。由AbePro2基因编码的蛋白质如SEQ ID NO:1中所示(JGI参考序列:Aspber1\_278881)。在N-末端,蛋白质具有如通过SignalP4.0版本(Nordahl Petersen等人(2011)Nature Methods[自然方法],8:785-786)预测的长度为22个氨基酸的信号肽。信号序列的存在表明AbePro2是分泌的酶。

[0198] 实例5

[0199] 黑曲霉ATCC 1015蛋白酶AniPro\_2(CRC02753-WT)的克隆

[0200] 黑曲霉ATCC 1015被选为可用于各种工业应用的酶的潜在来源。黑曲霉ATCC 1015中鉴定的基因之一(命名为AniPro\_2(CRC02753-WT))编码与从BLAST搜索确定的蛋白酶具有同源性的蛋白质(Altschul等人,J Mol Biol[分子生物学杂志],215:403-410,1990)。由AniPro\_2基因编码的蛋白质如SEQ ID NO:2中所示(JGI参考序列:Aspni5\_52703)。在N-末端,蛋白酶蛋白质具有如通过SignalP 4.0版本(Nordahl Petersen等人(2011)Nature Methods[自然方法],8:785-786)预测的长度为21个氨基酸的信号肽,并且源自红褐肉座菌天冬氨酸蛋白酶(uniport id.G0R8T0)。信号序列的存在指示AniPro\_2是分泌的酶。

[0201] 实例6

[0202] AhoPro3、AtrPro1、AbePro2和AniPro\_2的表达、发酵、纯化和鉴定

[0203] 化学合成编码AhoPro3、AtrPro1、AbePro2或AniPro\_2的DNA序列,并将其插入上海捷瑞生物工程有限公司(Generay)(中国上海)的里氏木霉表达载体pGXT(与公开的PCT申请

WO 2015/017256中描述的pTTTpyr2载体相同,通过引用并入本文)。将所得质粒分别标记为pGXT-AhoPro3、pGXT-AtrPro1、pGXT-AbePro2或pGXT-AniPro2。

[0204] 然后,使用原生质体转化(Te'o等人(2002)J.Microbiol.Methods[微生物方法杂志]51:393-99)将每个独立的表达质粒转化到合适的里氏木霉菌株中(描述于公开的PCT申请WO 05/001036中)。在含有乙酰胺(作为唯一氮源)的培养基上选择转化体。在乙酰胺板上生长5天后,收集转化体并经由DASGIP(艾本德公司(Eppendorf),德国于利希)进行发酵。

[0205] 为了启动AhoPro3、AtrPro1、AbePro2或AniPro\_2的发酵,使种子培养物在1L摇瓶中生长,每个摇瓶含有100mL限定培养基(灭菌前pH5.5),该培养基由50g/L一水葡萄糖、6g/L甘氨酸、5g/L(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、4.5g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1g/L CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O、1g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、2g/L Mazu 6000K和2.5mL 400×里氏木霉痕量金属(400×痕量金属原液(约pH 1)含有175g/L C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>·H<sub>2</sub>O、200g/L FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、16g/L ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、3.2g/L CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O、1.4g/L MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O和0.8g/L H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>)组成。将种子培养物在250rpm和30°C下摇动48小时。孵育完成后,将200mL种子培养物转移至2L生物反应器(DASGIP)中。

[0206] 2L生物反应器(DASGIP)中的发酵培养基含有60g/L右旋糖、6g/L甘氨酸、1g/L CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O、4.5g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、4g/L(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、1g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、1.2g/L Mazu 6000K和2.5ml 400×里氏木霉痕量金属。制备每kg含有250g葡萄糖/槐糖的诱导溶液并灭菌。

[0207] 接种后,以1L的工作体积开始分批发酵,并控制在pH 3.5和34°C。整个发酵过程中通过调节气流速度、供氧量和搅拌,将溶解氧水平控制在35%以上。发酵时间经过22小时后,发酵液中的葡萄糖耗尽,此时开始进料250g(葡萄糖/槐糖)/kg溶液。分别以22-46小时和46-72小时的时间间隔应用4mL进料/小时和6mL进料/小时的逐步进料速率。随着补料分批阶段的开始,pH线性变化至4.0,并且温度调节至28°C。运行72小时后发酵完成,通过离心收获发酵液、过滤并随后浓缩。

[0208] 为了纯化AhoPro3,使用VivaFlow 200超滤装置(赛多利斯斯泰迪公司(Sartorius Stedium))浓缩来自1L Dasegip发酵罐的粗产物,并添加硫酸铵至1M的终浓度。将溶液加载到用20mM NaAc(pH5.0)预平衡的HiPrep™ Phenyl FF柱上,并额外补充1M硫酸铵。用0.25M硫酸铵从柱洗脱靶蛋白。然后将所得的活性蛋白级分合并,并经由10KAmicon Ultra装置浓缩,并且在-20°C在40%甘油中储存直至使用。

[0209] 为了纯化AtrPro1和AbePro2,将来自1L Dasegip发酵罐的粗产物浓缩并添加硫酸铵至1M的终浓度。将溶液加载到HiPrep™ Phenyl FF16/10柱上,该柱用补充有额外的1M硫酸铵的20mM NaAc(pH 5.0)预平衡。用0.5M硫酸铵从柱洗脱靶蛋白。然后将所得的活性蛋白级分合并,浓缩并经由10K Amicon Ultra装置将缓冲液交换为20mM NaAc(pH5.0)、150mM NaCl,并且在-20°C在40%甘油中储存直至使用。

[0210] 为了纯化AniPro\_2,将来自1L Dasegip发酵罐的粗产物浓缩,并添加硫酸铵至1M的终浓度。将溶液加载到用20mM NaAc(pH5.0)预平衡的HiPrep™ Phenyl FF 16/10柱,并额外补充1M硫酸铵(缓冲液A)。用0.75M硫酸铵从柱洗脱靶蛋白。将相应的级分合并、浓缩,并且使用VivaFlow 200超滤装置(赛多利斯斯泰迪公司)将缓冲液交换为20mMNaPi(pH7.0)(缓冲液B)。将所得溶液应用至用缓冲液B预平衡的HiLoad™ Q FF 16/10柱。将靶蛋白用0.3M NaCl从柱中洗脱。将含有活性蛋白的级分合并,浓缩并经由10K Amicon Ultra装置将缓冲液交换为20mM NaAc(pH5.0)、150mM NaCl,并且在-20°C在40%甘油中储存直至使用。

[0211] 令人惊奇的是,与SEQ ID NO:2所示的前体变体和该序列的预测成熟形式相比,在发酵结束时的最终发酵液中发现AniPro\_2被蛋白水解修饰。如下文详细描述使用质谱法验证生成的变体。因此,与SignalP版本4.0预测的21个氨基酸切割相比,最终表达的变体在N端被进一步加工,导致36个氨基酸的最终N端截短,这对应于具有SEQ ID NO:16的多肽序列的AniPro\_2的成熟版本如图23所示。AniPro\_2的此成熟变体已用于本文讨论的所有实例中。

[0212] 为了获得AniPro\_2的成熟变体的精确多肽序列,从SDS-PAGE凝胶上切下蛋白质的蛋白条带,并使用三种不同的酶(胰蛋白酶、A-胰凝乳蛋白酶和Glu-C)进行消化,以制备样品用于质谱分析。胰蛋白酶特异性水解精氨酸I和赖氨酸(K)残基的羧基侧的肽键,当脯氨酸(P)位于羧基侧时除外。A-胰凝乳蛋白酶特异性水解酪氨酸(Y)、苯丙氨酸(F)、色氨酸(W)和亮氨酸(L)羧基侧的肽键,当脯氨酸(P)位于羧基侧时除外。在pH 8的碳酸氢铵缓冲液中,Glu-C优先在谷氨酰胺(E)的羧基侧裂解,但如果在pH 8的磷酸盐缓冲液中进行水解,也会在天冬氨酰胺(D)的羧基侧裂解。

[0213] 为了检测精确的C末端,使用IFF程序进行蛋白质表征(A2963)来准备目的蛋白质进行分析,其中一项更改使用消化缓冲液中的40%  $^{18}\text{O}$ -水。蛋白水解切割将因此将 $^{18}\text{O}$ -水和 $^{16}\text{O}$ -水合并到所得肽中,从而在MS谱中显示为双峰。然而,蛋白质C末端只会以带有 $^{16}\text{O}$ -水的单个肽出现,因为它没有被切割,而只是蛋白质留下的“最后一个肽”。以这种方式,使用MS/MS分析来映射C末端。为了检测精确的蛋白质N末端,在蛋白水解消化之前对完整蛋白质的N末端进行乙酰化标记(IFFA手册3448)。赖氨酸的胍基化将赖氨酸转化为高精氨酸并保护赖氨酸(侧链)不被乙酰化。只有源自蛋白质N末端的肽才会被乙酰化,并据此明确鉴定。

[0214] 实例7

[0215] AhoPro3、AtrPro1、AbePro2和AniPro\_2的蛋白水解活性

[0216] 使用Ala-Ala-Ala-Pro-对硝基苯胺(AAAP-pNA)(由吉尔生化公司(GL Biochem),中国上海合成)作为底物,在25mM柠檬酸盐/磷酸盐缓冲液(pH 5)中测量纯化的AhoPro3、AtrPro1、AbePro2或AniPro\_2的蛋白水解活性。反应前,将酶用水稀释到特定浓度。将AAAP-pNA底物溶解在100%二甲基亚砜(DMSO)中,终浓度为10mM。为了启动反应,将5 $\mu\text{L}$ 底物与85 $\mu\text{L}$ 柠檬酸盐/磷酸盐缓冲液在非结合96孔微量滴定板(96-MTP)(康宁生命科学公司(Corning Life Sciences),#3641)中混合,并在恒温混匀仪(艾本德公司)中在37 $^{\circ}\text{C}$ 下预孵育5min后,添加10 $\mu\text{l}$ 适当稀释的纯化酶(或水作为空白)。密封96-MTP后,使反应在恒温混匀仪中在37 $^{\circ}\text{C}$ 和650rpm下进行10min,并使用SpectraMax190在405nm处测量所得溶液的吸光度( $A_{405}$ )。通过从酶的 $A_{405}$ 中减去空白对照的 $A_{405}$ 来计算净 $A_{405}$ ,并且然后绘制出相对于不同蛋白质浓度的图。每个值为两次重复测定的平均值。蛋白水解活性显示为净 $A_{405}$ 。以AAAP-pNA为底物的蛋白水解测定表明AhoPro3、AtrPro1、AbePro2和AniPro\_2都是活性蛋白酶。

[0217] 实例8

[0218] AhoPro3、AtrPro1、AbePro2和AniPro\_2的pH曲线

[0219] 以AAAP-pNA为底物,在25mM NaAc/甘氨酸/HEPES缓冲液(pH值范围为3至10)中研究AhoPro3、AtrPro1、AbePro2或AniPro\_2的pH曲线。为了开始测定,首先将具有特定pH的85 $\mu\text{l}$ 的NaAc/甘氨酸/HEPES缓冲液与5 $\mu\text{l}$ 的10mM AAAP-pNA在96-MTP中混合,并在37 $^{\circ}\text{C}$ 下预孵育5min,然后添加10 $\mu\text{l}$ 水稀释酶(AhoPro3和AtrPro1为25ppm;AbePro2和AniPro\_2为

100ppm)或水(空白对照)。反应的进行和分析如实例7所述。各pH下的酶活性报告为相对活性,其中最佳pH下的活性为100%。测试的pH值为3、4、5、6、7、8、9和10。每个值为三次重复测定的平均值。确定AhoPro3、AtrPro1、AbePro2和AniPro\_2均为酸性蛋白酶。

[0220] 实例9

[0221] AhoPro3、AtrPro1、AbePro2和AniPro\_2的温度曲线

[0222] 使用AAAP-pNA作为底物,在25mM柠檬酸盐/磷酸盐缓冲液(pH5)中分析AhoPro3、AtrPro1、AbePro2或AniPro\_2的温度曲线。如实例7中制备酶样品和AAAP-pNA底物。反应前,将85 $\mu$ l柠檬酸盐/磷酸盐缓冲液和5 $\mu$ l 10mM AAAP-pNA在200 $\mu$ l PCR管中混合,然后在Peltier热循环仪(BioRad)中在所需温度(即30 $^{\circ}$ C至80 $^{\circ}$ C)下孵育5min。孵育后,向溶液中添加10 $\mu$ l稀释的酶(AhoPro3和AtrPro1为25ppm;AbePro2和AniPro\_2为100ppm)或水(空白对照),反应在不同温度下在Peltier热循环中进行10min。如实例7中进行随后的吸光度测量。报告的活性为相对活性,其中最佳温度下的活性被设为100%。每个值为三次重复测定的平均值。数据表明,AhoPro3、AtrPro1、AbePro2和AniPro\_2的最佳温度分别为60 $^{\circ}$ C、57 $^{\circ}$ C、53 $^{\circ}$ C和64 $^{\circ}$ C。

[0223] 实例10

[0224] AhoPro3、AtrPro1、AbePro2和AniPro\_2的热稳定性

[0225] 使用50mM乙酸盐/磷酸盐缓冲液(pH 4.5)作为孵育缓冲液,并使用AAAP-pNA作为剩余活性测量的底物,对AhoPro3、AtrPro1、AbePro2或AniPro\_2进行热稳定性分析。纯化的AhoPro3、AtrPro1、AbePro2或AniPro\_2(或纯化的AnPro(Brewers Clarex<sup>TM</sup>值)作为基准)在1mL孵育缓冲液中稀释至终浓度为1mg/mL,并随后在65 $^{\circ}$ C下孵育0、10、20、30、45或60min。每个孵育时期结束时,将100 $\mu$ l的酶缓冲液混合物转移到96-MTP置于冰中。整个孵育完成后,用缓冲液进一步稀释酶-缓冲液混合物,以达到下游活性测定的特定酶浓度(AhoPro3和AtrPro1为25ppm;AbePro2和AniPro\_2为100ppm)。如实例7中测量活性。报告的活性为相对活性,其中0min孵育时间的活性被设为100%;并且每个值为三次重复测定的平均值。如表2所示,AhoPro3、AtrPro1和AbePro2在65 $^{\circ}$ C孵育10min后完全失去活性,而AniPro\_2在1hr孵育后仍能保留约64%的活性。

[0226] 表2 65 $^{\circ}$ C下AhoPro3、AtrPro1、AbePro2或AniPro\_2的热稳定性

[0227]	时间 (min)	相对活性 (%)				
		AhoPro3	AtrPro1	AbePro2	AniPro_2	AnPro
	0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
	10	0.78	1.09	1.10	87.01	45.27
[0228]	20	0.16	0.67	0.73	81.88	26.51
	30	0.13	0.47	0.62	75.55	15.37
	45	0.13	0.50	0.49	67.41	6.81
	60	0.12	0.38	0.41	63.54	3.78

[0229] 实例11

[0230] AhoPro3、AtrPro1、AbePro2和AniPro\_2的浑浊减少性能

[0231] 使用麦醇溶蛋白-儿茶素测定计算AhoPro3、AtrPro1、AbePro2或AniPro\_2的浑浊减少性能。反应前,将酶用水稀释到特定浓度。将麦醇溶蛋白底物(西格玛公司(Sigma),目录号G3375)溶解在20mM乙酸盐/磷酸盐缓冲液(pH 4.5)中,并补充有额外的0.2%乙醇至最终浓度为2mg/mL,并将儿茶素底物(西格玛公司,目录号C1251)溶解在20mM柠檬酸盐/磷酸盐缓冲液(pH 4.5)中,并补充有额外的0.2%乙醇至终浓度为2mg/mL。为了开始测定,在96-MTP中将100 $\mu$ L麦醇溶蛋白溶液与5 $\mu$ L适当稀释的AhoPro3、AtrPro1、AbePro2或AniPro\_2(或纯化的AnPro(Brewer's Clarex<sup>TM</sup>)作为基准)混合;在恒温混匀仪中在45 $^{\circ}$ C下孵育90min后,然后将所得96-MTP置于冰中5min,随后添加100 $\mu$ L儿茶素溶液。在室温下30min形成浑浊。使用SpectraMax 190测量600nm处产生的浑浊的吸光度( $A_{600}$ ),然后针对不同的酶浓度进行绘图。每个值为三次重复测定的平均值。如图5、6和7所示,当与基准相比,AhoPro3、AtrPro1、AbePro2或AniPro\_2在减少麦醇溶蛋白-儿茶素浑浊方面更有效。

[0232] 实例12

[0233] 蛋白质测定方法

[0234] 通过标准无染料成像仪(Stain Free Imager Criterion)进行蛋白质测定

[0235] 使用Gel Doc<sup>TM</sup>EZ成像系统通过SDS-PAGE凝胶和光密度法对蛋白质进行定量。测定中使用的试剂:经浓缩的(2x)Laemmlli样品缓冲液(伯乐公司(Bio-Rad),目录号161-0737);26孔XT 4-12%Bis-Tris凝胶(伯乐公司,目录号345-0125);蛋白质标志物“Precision Plus Protein标准品”(伯乐公司,目录号161-0363);蛋白质标准品BSA(赛默飞世尔科技公司(Thermo Scientific),目录号23208)和SimplyBlue Safestain(英杰公司,目录号LC 6060)。如下进行测定:在96孔PCR板中,将50 $\mu$ L经稀释的酶样品与含有2.7mg DTT的50 $\mu$ L样品缓冲液混合。将板用来自伯乐公司的Microseal 'B'膜密封并放入PCR机器中加热至70 $^{\circ}$ C,持续10分钟。之后,通过运行缓冲液填充腔室,设置凝胶盒。然后将10 $\mu$ L的各个样品和标准品(0.125-1.00mg/mL BSA)加载在凝胶上,并加5 $\mu$ L的标志物。之后,在200V下运行电泳45min。电泳后,将凝胶在水中冲洗3次5min,然后在Safe-stain中染色过夜,最后在水中脱色。然后,将凝胶转移到成像仪中。使用Image Lab软件来计算每个条带的强度。使用BSA(赛默飞世尔科技公司,目录号23208)制作校准曲线,并且通过条带强度和校准曲线确定目标蛋白的量。采用蛋白质定量方法来制备用于随后实例的酶样品。蛋白酶蛋白浓度:纯化的AhoPro3样品确定为8.1mg/ml、纯化的AbePro2样品确定为2.3mg/ml、纯化的AtrPro1样品确定为8.2mg/ml、纯化的AniPro\_2样品确定为2.4mg/ml并且AnPro的样品确定为41mg/ml。

[0236] 实例13

[0237] 来自同形曲霉的蛋白酶在浑浊敏感啤酒中的浑浊减少性能。

[0238] 浑浊敏感啤酒底物

[0239] 为了测试蛋白酶的性能,使用瓶装啤酒作为底物。2hL试点啤酒厂酿造的啤酒经过过滤(未使用二氧化硅或PVPP),但未稳定的全麦芽比尔森型啤酒具有大约66% RDF并且醇含量为4.7%(v/v)。如表3中所述,使用具有8个板的硅藻土过滤器以及预涂层和主体进料进行啤酒过滤。经过硅藻土过滤后,啤酒先通过1.2 $\mu$ m薄膜过滤器,然后通过0.45 $\mu$ m薄膜过滤器。

[0240] 表3流量为160l/hr的硅藻土过滤的准备。

	硅藻土			硅胶	
	纤维素	粗糙的	精细的		
[0241] 第一预涂层	80	400			8 个板
第二预涂层		200	200	0	8 个板
主体进料/hl		150	300	0	8 个板
Pall SeitzSchenk	FH	超	额外	BK 3800	
	150	1200	70	X 二氧化硅	

[0242] 孵育和巴氏灭菌

[0243] 通过打开胶囊添加酶溶液,将酶应用到瓶装啤酒中,并立即用新胶囊重新封闭瓶子。类似地制备对照啤酒样品,添加与酶溶液等量的milliQ水(ddH<sub>2</sub>O)。如以下表4所示,基于ppm蛋白酶,以低和高剂量应用酶。

[0244] 表4. 浑浊敏感啤酒中的蛋白酶添加。

	低剂量	高剂量	低剂量	高剂量
	ppm	ppm	μL样品	μL稀释的酶
AnPro	0.205	0.82	21	83
AhoPro3	0.205	0.82	21	83
没有酶(参考)	0	0	21 (ddH <sub>2</sub> O)	83 (ddH <sub>2</sub> O)

[0246] 将啤酒样品在14℃下保存5天,以便酶发挥作用。此后,通过将温度加热至63℃(60分钟)并将温度在63℃保持60分钟,在水浴中将样品巴氏灭菌至大约30PU,然后关闭热源并且温度下降至室温(大约20℃)。

[0247] 啤酒样品中浑浊可能性的评估

[0248] 啤酒样品中浑浊发展的预测通过基于EBC Analytica方法9.30“啤酒保质期的预测”的强制浑浊方法来评估,在下文中称为EBC TOHA强制浑浊方法。根据供应商的说明进行仪器校准,浑浊测量结果以EBC单位表示。

[0249] 强制浑浊EBC TOHA方法

[0250] 使用Sigrist Labscat2测量啤酒的浊度。在90°散射角下测量浊度(S90/S0 EBC)以检测小颗粒的存在,并将在25°散射角下测量的浊度作为有关较大颗粒的附加信息。在对瓶装样品进行交替冷却和加热循环之前,在20℃下测量浊度,称为盲值。

[0251] 然后将样品放入恒温水浴(Julabo,德国)中,并将温度降至0℃并保持24小时。在0℃下测量浊度,称为初始总浑浊。

[0252] 将啤酒样品放入恒温水浴中,并将温度升至60℃保持48小时,然后降温至0℃保持24小时。在0℃下测量浊度,称为最终总浑浊。结果在表5示出。

[0253] 从测量的初始和最终总浑浊可以清楚地看出,与没有蛋白酶的参考相比,两种内切蛋白酶都大大降低了啤酒的浊度。同样清楚的是,与AnPro相比,AhoPro3的低剂量和高剂量分别导致最终总浑浊的令人惊讶地显著增加的浊度降低。这是在90°和25°散射(小颗粒

和大颗粒)下测量的浊度观察到的。

[0254] 表5.添加和未添加蛋白酶的啤酒的浊度(EBC 90°和25°)。根据EBC TOHA方法测量强制浑浊,并显示盲值、初始总浑浊和最终总浑浊。由2次测定确定标准偏差。

20°C 第 0 天盲值				
	平均	Std.	平均	Std.
	90°	90°	25°	25°
	EBC	EBC	EBC	EBC
[0255] 没有酶 (21 μL)	3.00	0.06	0.53	0.01
没有酶 (83 μL)	2.88	0.00	0.51	0.01
AnPro 低剂量	2.95	0.02	0.49	0.01
AnPro_高剂量	2.88	0.01	0.49	0.00
AhoPro3_低剂量	2.87	0.00	0.50	0.01
AhoPro3_高剂量	3.05	0.03	0.53	0.02

0°C 第 1 天初始总浑浊				
	平均	Std.	平均	Std.
	90°	90°	25°	25°
	EBC	EBC	EBC	EBC
[0256] 没有酶 (21 μL)	6.16	0.04	5.62	0.02
没有酶 (83 μL)	5.51	0.01	5.60	0.02
AnPro_低剂量	4.38	0.01	0.79	0.02
AnPro_高剂量	4.47	0.04	0.83	0.01
AhoPro3_低剂量	4.22	0.09	0.77	0.00
AhoPro3_高剂量	4.73	0.02	0.87	0.01

0°C 第 5 天结束最终总浑浊				
	平均	Std.	平均	Std.
	90°	90°	25°	25°
	EBC	EBC	EBC	EBC
[0256] 没有酶 (21 μL)	9.22	0.08	8.79	0.03
没有酶 (83 μL)	8.78	0.01	8.32	0.00
AnPro_低剂量	5.34	0.05	1.07	0.04
AnPro_高剂量	5.66	0.07	1.16	0.01
AhoPro3_低剂量	5.25	0.04	1.04	0.02
AhoPro3_高剂量	5.26	0.04	1.10	0.03

[0257] 实例14

[0258] 啤酒发酵期间具有各种内切蛋白酶生产的啤酒中的浑浊形成

[0259] 在2hL半工业化试点啤酒厂中,采用相同的糖化方案生产纯麦芽汁。使用比尔森麦

芽 (Fuglsang, 丹麦, 批次 21.08.2020) 并将其在标准设置下在进行糖化之前进行研磨, 并以初始 2.8:1 的水麦芽比进行应用。用 90% 乳酸将水中的  $\text{CaCl}_2$  含量调节至 40ppm 并将 pH 调节至 5.5。将 LAMINEX® MaxFlow 4G (杜邦营养生物科学公司 (Dupont Nutrition Bioscience), 丹麦) 以 0.10kg/t 麦芽的剂量进行添加。应用以下糖化协议: 在 63°C 糖化 25 分钟; 保持在 63°C 持续 45 分钟; 升至 72°C 持续 9 分钟 (1°C/分钟); 保持在 72°C 持续 20 分钟; 在糖化过程中, 将温度升至 78°C 持续 6 分钟 (1°C/分钟), 并在 78°C 下保持 10 分钟。在 72°C 的麦芽汁下进行碘阴性测试, 以确保碘阴性。在将麦芽浆从糖化锅转移至过滤桶期间添加水, 以留下最终的 3.2:1 的水与麦芽糖比例。

[0260] 过滤期间使用的关于添加的水、收集的体积和 HGB 的流速的条件如下表 6 所示。

[0261] 表 6. 过滤条件。

	添加的水, L	体积 L	速度
再循环	0	0	80
[0262] 第一麦芽汁	0	120	80
第一次鼓泡	30	150	80
第二次鼓泡	30	180	90
第三次鼓泡	30	210	100
第四次鼓泡	25	240	120

[0263] 麦芽汁煮沸: 将麦芽汁煮沸 80 分钟, 每小时蒸发 10% 达到 16.0°P。最终酿造的啤酒中添加的啤酒花达到 20BU, 由 50%  $\text{CO}_2$  提取啤酒花 (德国哈勒陶圣约翰 (St. Johann, Hallertauer Germany)) 和标准多酚含量 50% 啤酒花 (P90 啤酒花) (德国哈勒陶圣约翰) 组成。煮沸结束时, 用 90% 乳酸将麦芽汁 pH 调节至 5.2。将麦芽汁分入 100L 的两个发酵罐, 并以  $\text{ZnCl}_2$  将 0.10ppm  $\text{Zn}^{2+}$  添加到漩涡。根据杜邦标准酿造说明 23.8580-B09, 使用安东帕 (DMA 5000) 测量糖化后麦芽汁样品的原始提取物 (OE), 表明所有实验都相似。此外, 按照杜邦标准酿造说明 23.8580-B15 测量麦芽汁中游离  $\alpha$ -氨基氮 (毫克/升) 的含量, 并且所有实验都相似。

[0264] 发酵: 所有实验均在麦芽汁中 13-16ppm 的标准氧浓度下进行。用乙酸将酵母接种用麦芽汁 (Pitching wort) 的 pH 调节至  $5.00 \pm 0.05$ 。使用啤酒酵母 (Brewer's yeast)。酵母接种 (Pitching) 率: 25-30 研磨细胞/ml。发酵后进行冷熟化/稳定化和随后的过滤。主发酵温度设定为 12°C, 熟化温度设定为 15°C, 发酵结束时冷却至 1°C。基于每 hL 的 mg 蛋白酶 (Pro) 应用酶, 如下表 7 所示。

[0265] 表 7. 发酵罐内的酶添加。

[0266]	剂量
	mg Pro/hL
AnPro	82

AniPro_2	82
AhoPro3	57
MorPro1 (低)	82
MorPro1 (高)	164
没有酶	-

[0267] 啤酒过滤:应用8个板且流量为160l/hr,使用表8中给出的以下量助滤剂进行维护。过滤前进行酵母细胞计数。

[0268] 表8.流量为160l/hr的硅藻土过滤的准备。

	纤维素	硅藻土		硅胶	
		粗糙的	精细的		
[0269] 第一预涂层	80	400			8个板
第二预涂层		200	200	0	8个板
主体进料/hl		150	300	0	8个板
Pall SeitzSchenk	FH 1500	超 1200	额外 70	BK 3800 X 二氧化硅	

[0270] 将过滤后的啤酒的全部量装入33cL的瓶子中,并将所有瓶子在62℃下巴氏灭菌20分钟(大约30PU)。使用Sigrist Labscat2测量啤酒样品的浊度。在90°散射角下测量浊度(S90/S0 EBC)以检测小颗粒的存在,并将在25°散射角下测量的浊度作为有关较大颗粒的附加信息。在对瓶装样品进行交替冷却和加热循环之前,在20℃下测量浊度,称为盲值。

[0271] 然后将样品放入恒温水浴(Julabo,德国)中,并将温度降至0℃并保持24小时。在0℃下测量浊度,称为初始总浑浊。将啤酒样品放入恒温水浴中,并将温度升至60℃保持48小时,然后降温至0℃保持24小时。在0℃下测量浊度,称为最终总浑浊。结果在表9示出。

[0272] 表9.具有各种蛋白酶添加产生的啤酒的浊度(EBC 90°和25°)。根据EBC TOHA方法测量强制浑浊,并显示盲值、初始总浑浊和最终总浑浊。由2次测定确定标准偏差(Std.)。

[0273]

20°C 第 0 天盲值				
	平均	Std.	平均	Std.
	90°	90°	25°	25°
	EBC	EBC	EBC	EBC
AnPro	0.70	0.01	0.14	0.01
AniPro_2	0.56	0.01	0.18	0.02
AhoPro3	0.65	0.01	0.16	0.01
MorPro1 (低)	1.41	0.03	0.43	0.02
MorPro1 (高)	0.46	0.02	0.17	0.03
没有酶	1.39	0.02	0.27	0.01

[0274]

0°C 第 1 天初始总浑浊				
	平均	Std.	平均	Std.
	90°	90°	25°	25°
	EBC	EBC	EBC	EBC
AnPro	1.49	0.02	1.20	0.02
AniPro_2	0.81	0.04	0.26	0.05
AhoPro3	0.89	0.01	0.25	0.01
MorPro1 (低)	2.18	0.06	0.72	0.05
MorPro1 (高)	1.75	0.03	1.30	0.07
没有酶	3.27	0.03	7.24	0.05

0°C 第 5 天结束最终总浑浊				
	平均	Std.	平均	Std.

	90°	90°	25°	25°
	EBC	EBC	EBC	EBC
[0275] AnPro	4.49	0.03	4.95	0.11
AniPro_2	1.89	0.04	0.77	0.04
AhoPro3	1.63	0.06	0.53	0.13
MorPro1 (低)	5.20	0.10	1.71	0.08
c	6.17	0.12	3.65	0.11
没有酶	13.78	0.60	30.91	0.83

[0276] 从所有浊度测量中可以清楚地看出:与没有蛋白酶的啤酒参考相比,盲值、初始和最终总浑浊所有蛋白酶都大大降低了啤酒的浊度。同样清楚的是,与AnPro相比,添加AhoPro3和AniPro\_2均会导致浊度显著降低(由所有浑浊值(包括最终总浑浊)确定)。这是在90°和25°散射(小颗粒和大颗粒)下测量的浊度观察到的。

[0277] 相对浑浊减少可以针对没有任何酶的啤酒如下进行计算: $(EBC_{\text{浊度}90/25^{\circ}\text{没有酶}} - EBC_{\text{浊度}90/25^{\circ}\text{具有酶}}) / EBC_{\text{浊度}90/25^{\circ}\text{没有酶}} \times 100\%$ ,并且对于AnPro、AhoPro3和AniPro\_2如下表10所示。据观察,与AnPro和MorPro1相比,AhoPro3和AniPro\_2均能够实现高于37%至67%(通过90°EBC测量)和高于84%至94%(通过25°EBC测量)的相对浑浊减少。

[0278] 表10. 相对浑浊减少根据未添加酶的浊度(EBC 90°和25°)计算,并以百分比给出。

	针对没有酶的相对浑浊减少并以%给出	
	90° EBC	25° EBC
[0279] AnPro	67	84
MorPro1 (低)	44	88
MorPro1 (高)	37	94
AhoPro3	88	98
AniPro_2	86	98

[0280] 此外,根据啤酒行业常用的MEBAK-Analytica(方法2.14.2.1.Forciermethode, **Mitteleuropäische Brautechnische Analysen Methoden**),通过在高温下储存对瓶中啤酒样品进行加速老化。在90°散射角下测量浊度(S90/S0 EBC)以检测小颗粒的存在,并将在25°散射角下测量的浊度作为有关较大颗粒的附加信息(使用Sigrist Labscat2)。在对瓶装样品进行交替冷却和加热循环之前,在20°C下测量浊度,称为盲值。

[0281] 然后将样品放入恒温水浴(Julabo,德国)中,并将温度升至40°C并保持24小时随后降至0°C并保持24小时。在0°C下测量浊度,称为总浑浊。重复该循环并且将 $\Delta$ 浑浊计算为循环(n)之后的浑浊,例如(总浑浊) - (盲值)。

[0282] 结果在表11示出。从所有浊度测量中可以清楚地看出:通过循环1和2的盲值和总浑浊,与没有蛋白酶的啤酒参考相比,所有蛋白酶都大大降低了啤酒的浊度。再次同样清楚

的是,与AnPro相比,添加AhoPro3或AniPro\_2令人惊讶地导致了显著更高的浊度减少(通过所有浑浊值(包括最终总浑浊)进行测量)。

[0283] 表11. 具有各种蛋白酶添加产生的啤酒的浊度(EBC 90°和25°)。强制浑浊根据MEBAK方法测量,盲值和总浑浊从循环1和2计算。由2次测定确定标准偏差(Std.)。

		第 0 天-20°C 盲值			
		平均	Std.	平均	Std.
		90°	90°	25°	25°
		EBC	EBC	EBC	EBC
[0284]	AnPro	0.68	0.02	0.13	0.01
	AniPro_2	0.55	0.01	0.13	0.01
	AhoPro3	0.65	0.03	0.14	0.00
	没有酶	1.38	0.03	0.25	0.00
		第 2 天-0°C □ 浑浊 - 周期 1			
		平均	Std.	平均	Std.
		90°	90°	25°	25°
		EBC	EBC	EBC	EBC
[0285]	AnPro	2.47	0.38	3.23	0.53
	AniPro_2	0.97	0.04	0.30	0.05
	AhoPro3	1.20	0.09	0.40	0.04
	没有酶	11.25	0.47	27.62	1.16

第 4 天-0°C □ 浑浊 - 周期 2				
平均		Std.	平均	
90°		90°	25°	
EBC		EBC	EBC	
[0286] AnPro	2.53	0.58	3.24	1.00
AniPro_2	0.99	0.01	0.28	0.00
AhoPro3	1.17	0.16	0.32	0.08
没有酶	9.33	0.60	23.08	1.74

[0287] 与EBC TOHA测试一样,可以针对没有任何酶的啤酒(循环2值)从MEBAK测试如下计算相对浑浊减少: $(EBC_{\text{浊度}90/25^{\circ}\text{没有酶}} - EBC_{\text{浊度}90/25^{\circ}\text{具有酶}}) / EBC_{\text{浊度}90/25^{\circ}\text{没有酶}} \times 100\%$ ,并且对于AnPro、AhoPro3和AniPro\_2如下表12所示。据观察,与AnPro相比,AhoPro3和AniPro\_2均能够实现高于73%(通过90°EBC测量)和高于86%(通过25°EBC测量)的相对浑浊减少。

[0288] 表12. 相对浑浊减少根据未添加酶的浊度(EBC 90°和25°)计算,并以百分比给出。

相比与没有酶的相对浑浊减少并以%给出		
	90° EBC	25° EBC
[0289] AnPro	73	86
AhoPro3	89	99
AniPro_2	87	99

[0290] 实例15

[0291] 发酵期间具有内切蛋白酶生产的啤酒的泡沫稳定性

[0292] 如实例14所述,在半工业化试点啤酒厂生产啤酒,并在如实例14所述的啤酒发酵过程开始时添加蛋白酶AnPro、AniPro\_2和AhoPro3。取决于给定蛋白酶的底物特异性,在啤酒生产过程中,蛋白酶可能最不希望地降解各种泡沫稳定蛋白。因此,将具有蛋白酶AnPro、AhoPro3生产的啤酒的泡沫稳定性与在发酵期间不添加任何酶的类似啤酒进行比较。使用NIBEM-T计(使用来自Pentair的Haffmans Nibem泡沫稳定性测试仪)并根据EBC Analytica方法9.42.1“使用NIBEM-T计的啤酒的泡沫稳定性-2004”确定啤酒的泡沫稳定性。

[0293] 瓶装啤酒在水浴中温控至 $20^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。啤酒通过泡沫闪蒸装置分配,其中啤酒在大约2巴的二氧化碳压力下通过孔口被强制到达内径 $60 \pm 1.2\text{mm}$ 、内部高度 $120 \pm 1.9\text{mm}$ 的彻底清洁的标准玻璃杯。这产生了一玻璃杯标准的啤酒/泡沫。

[0294] 将啤酒/泡沫的标准玻璃杯放置在校准的NIBEM-T计的针电极系统(needle electrode system)下方,因此参考位置对应于满边杯。

[0295] 电极向下移动,直到四个外部针之一接触到泡沫表面。当泡沫塌陷时,接触被破

坏,并将电极系统向下移动直到四个外部针之一再次接触泡沫表面。当泡沫塌陷到参考位置以下时,开始计时并测量泡沫塌陷进一步设定的30mm距离的时间。确定塌陷时间(以秒为单位)并示于下表13中。清楚的是,与AnPro相比,通过添加AhoPro3或AniPro\_2啤酒泡沫稳定性得到改善,显示出与没有酶对照啤酒相似的稳定性。令人惊讶的是,与没有酶对照啤酒相比,通过添加AhoPro3或AniPro\_2,泡沫稳定性得到显著改善。

[0296] 表13. 具有各种蛋白酶添加产生的啤酒的NIBEM泡沫稳定性。

Nibem 啤酒泡沫稳定性						
1 个测量 (sec.)	温度 (°C)	2 个测量 (sec.)	温度 (°C)	泡沫稳定性 平均	Std	
				(sec.)		
AnPro	221	23	215	22	218	4.2
AniPro_2	227	22	221	23	224	3.0
AhoPro3	228	23	222	23	225	4.2
没有酶	218	23	219	23	219	0.7

[0299] 相对泡沫稳定性可以针对没有任何酶的啤酒从NIBEM泡沫测试(30mm)如下进行计算: $(\text{塌陷时间}_{\text{NIBEM 30mm具有酶}}) / (\text{塌陷时间}_{\text{NIBEM 30mm没有酶}}) \times 100\%$ ,并且对于AnPro、AhoPro3和AniPro\_2如下表14所示。据观察,与AnPro相比,AhoPro3和AniPro\_2均能够提高泡沫稳定性,且泡沫稳定性高于99.5%。

[0300] 表14. 针对不添加酶计算的相对泡沫稳定性(NIBEM-30mm)并以百分比给出。

	相比与没有酶的相对泡沫稳定性并以%给出
AnPro	99.5
AhoPro3	102.7
AniPro_2	102.3

[0302] 实例16

[0303] 来自巴西曲霉、跨山曲霉和黑曲霉的蛋白酶在浑浊敏感啤酒中的浑浊减少性能。

[0304] 如实例13中所述,使用瓶装浑浊敏感啤酒来测试蛋白酶的性能。通过打开胶囊添加酶溶液,将酶应用到瓶装啤酒中,并立即用新胶囊重新封闭瓶子。类似地制备对照啤酒样品,添加与酶溶液等量的milliQ水(ddH<sub>2</sub>O)。来自巴西曲霉(AbePro2)、跨山曲霉(AtrPro1)、黑曲霉(AniPro\_2)或AnPro的酶基于ppm蛋白酶以低剂量和高剂量应用,如下表15中给出。

[0305] 表15. 浑浊敏感啤酒中的酶添加。

	低剂量	高剂量	低剂量	高剂量
	ppm	ppm	μL 样品	μL 稀释的酶
AnPro	0.205	0.82	21	83
AniPro_2	0.205	0.82	17	68

[0307]	AbePro2	0.205	0.82	29	119
	AtrPro1	0.205	0.82	21	83
	没有酶 (参考)	0	0	21 (ddH <sub>2</sub> O)	(ddH <sub>2</sub> O)

[0308] 将啤酒样品在14℃下保存5天,以便酶发挥作用。此后,通过将温度加热至63℃ (60分钟)并将温度在63℃保持60分钟,在水浴中将样品巴氏灭菌至大约30PU,然后关闭热源并且温度下降至大约20℃。根据实例13中描述的EBC TOHA方法进行酶处理后啤酒中浑浊潜力的评价。结果在表16示出。

[0309] 表16.添加和未添加蛋白酶的啤酒的浊度 (EBC 90°和25°)。根据EBC TOHA方法测量强制浑浊,并显示盲值、初始总浑浊和最终总浑浊。由2次测定确定标准偏差 (Std.)。

		20℃ 第 0 天盲值			
		平均	Std.	平均	Std.
		90°	90°	25°	25°
		EBC	EBC	EBC	EBC
[0310]	没有酶 (21 μL)	3.00	0.06	0.53	0.01
	没有酶 (83 μL)	2.88	0.00	0.51	0.01
	AnPro_低剂量	2.95	0.02	0.49	0.01
	AnPro_高剂量	2.88	0.01	0.49	0.00
	AniPro_2_低剂量	3.00	0.05	0.61	0.03
	AniPro_2_高剂量	3.03	0.03	0.56	0.01
	AbePro2_低剂量	3.04	0.02	0.53	0.01
	AbePro2_高剂量	3.12	0.01	0.54	0.00
	AtrPro1_低剂量	2.83	0.02	0.50	0.01
	AtrPro1_高剂量	2.83	0.02	0.49	0.01
			0℃ 第 1 天初始总浑浊		
平均			Std.	平均	Std.
90°			90°	25°	25°
EBC			EBC	EBC	EBC

	没有酶 (21 $\mu$ L)	6.16	0.04	5.62	0.02
	没有酶 (83 $\mu$ L)	5.51	0.01	5.60	0.02
	AnPro_低剂量	4.38	0.01	0.79	0.02
	AnPro_高剂量	4.47	0.04	0.83	0.01
	AniPro_2_低剂量	4.60	0.13	0.96	0.05
	AniPro_2_高剂量	4.87	0.07	1.01	0.06
	AbePro2_低剂量	4.53	0.02	0.84	0.02
	AbePro2_高剂量	4.80	0.02	0.91	0.02
	AtrPro1_低剂量	4.67	0.03	1.49	0.02
	AtrPro1_高剂量	4.21	0.01	0.79	0.02
	0°C 第 5 天结束最终总浑浊				
	平均	Std.	平均	Std.	
	90°	90°	25°	25°	
	EBC	EBC	EBC	EBC	
[0311]	没有酶 (21 $\mu$ L)	9.22	0.08	8.79	0.03
	没有酶 (83 $\mu$ L)	8.78	0.01	8.32	0.00
	AnPro_低剂量	5.34	0.06	1.07	0.04
	AnPro_高剂量	5.66	0.07	1.16	0.01
	AniPro_2_低剂量	5.45	0.10	1.54	0.16
	AniPro_2_高剂量	5.65	0.07	1.38	0.02
	AbePro2_低剂量	5.52	0.02	1.11	0.01
	AbePro2_高剂量	5.45	0.00	1.22	0.06
	AtrPro1_低剂量	6.61	0.04	3.54	0.04
	AtrPro1_高剂量	5.07	0.04	1.02	0.03

[0312] 从测量的初始和最终总浑浊可以清楚地看出,与没有蛋白酶的参考相比,所有白酶均大大降低了啤酒的浊度。同样清楚的是,来自巴西曲霉、跨山曲霉和黑曲霉(AniPro\_2)的蛋白酶在高剂量下,与AnPro相比,所有这些都导致最终总浑浊的浊度减少令人惊讶地显著增加。这是在90°散射(小颗粒)下测量的浊度观察到的。

[0313] 实例17

[0314] 发酵期间具有内切蛋白酶生产的啤酒保质期内的泡沫稳定性

[0315] 如实例14中所述,在半工业化试点啤酒厂生产啤酒,并在如实例14中所述的啤酒发酵过程开始时添加蛋白酶AnPro和AniPro2,使用剂量为20.5mg蛋白酶/hL麦芽汁的剂量。取决于给定蛋白酶的底物特异性,在啤酒生产过程中,蛋白酶可能地影响各种泡沫稳定蛋

白。因此,将具有蛋白酶AnPro和AniPro2生产的啤酒的泡沫稳定性与在发酵期间不添加任何酶的类型啤酒进行比较。在啤酒保质期内(储存在12°C-14°C下长达9个月)测试,并且使用NIBEM-T计(使用来自Pentair的HaffmansNibem泡沫稳定性测试仪)并根据EBC Analytica方法9.42.1“使用NIBEM-T计的啤酒的泡沫稳定性-2004”确定啤酒的泡沫稳定性。结果在表17示出。

[0316] 清楚的是,与AnPro相比,通过添加AniPro\_2啤酒泡沫稳定性得到改善,显示出与没有酶对照啤酒相似的稳定性。令人惊讶的是,与没有酶对照啤酒相比,添加AniPro\_2后的泡沫稳定性显著改善,如啤酒储存1个月后观察到的,储存9个月后甚至更加清澈。

[0317] 表17.0-9个月后,具有各种蛋白酶添加产生的啤酒的NIBEM泡沫稳定性(在19°C-22°C测量)。

0 个月				
Nibem 啤酒泡沫稳定性				
	1 个测量 (sec.)	2 个测量 (sec.)	泡沫稳定性 平均 (sec.)	Std
[0318] AnPro	236	234	235	1
AniPro_2	238	235	236.5	1.5
没有酶	235	236	235.5	0.5
1 个月				
Nibem 啤酒泡沫稳定性				
	1 个测量 (sec.)	2 个测量 (sec.)	泡沫稳定性 平均	Std

			(sec.)		
	AnPro	224	226	225	1
	AniPro_2	234	232	233	1
	没有酶	231	233	232	1
	2 个月				
	Nibem 啤酒泡沫稳定性				
	1 个测量 (sec.)	2 个测量 (sec.)	泡沫稳定性 平均 (sec.)	Std	
[0319]	AnPro	221	222	221.5	0.5
	AniPro_2	232	233	232.5	0.5
	没有酶	221	220	220.5	0.5
	9 个月				
	Nibem 啤酒泡沫稳定性				
	1 个测量 (sec.)	2 个测量 (sec.)	泡沫稳定性 平均 (sec.)	Std	
	AnPro	216	217	216.5	0.5
	AniPro_2	234	229	231.5	2.5
	没有酶	216	217	216.5	0.5

[0320] 9个月后相对泡沫稳定性可以针对没有任何酶的啤酒从NIBEM泡沫测试(30mm)如下进行计算： $(\text{塌陷时间}_{\text{NIBEM 30mm具有酶}}) / (\text{塌陷时间}_{\text{NIBEM 30mm没有酶}}) \times 100\%$ ，并且对于AnPro和AniPro\_2如下表18所示。与AnPro相比，观察到AniPro\_2均能够提高泡沫稳定性，且泡沫稳定性高于100.0%。因此，AniPro\_2的添加令人惊讶地增加了泡沫的稳定性。

[0321] 表18. 针对不添加酶计算的相对泡沫稳定性(NIBEM-30mm)并以百分比给出。

	相比与没有酶的相对泡沫稳定性并以%给出	
[0322]	AnPro	100.0
	AniPro_2	106.9

[0323] 实例18假柄曲霉CBS 117616蛋白酶ApsPro1(CRC21071-WT)的克隆

[0324] 假柄曲霉(*Aspergillus pseudocaelatus*) CBS 117616被选为可用于各种工业应用的酶的潜在来源。假柄曲霉CBS 117616中鉴定的基因之一(命名为ApsPro1(CRC21071-WT))编码与从BLAST搜索确定的蛋白酶具有同源性的蛋白质(Altschul等人, J Mol Biol [分子生物学杂志], 215:403-410, 1990)。由ApsPro1基因编码的蛋白质如SEQ ID NO:5中所

示(JGI参考序列:Asppsec1\_294119)。在N-末端,蛋白质具有如通过SignalP 4.0版本(Nordahl Petersen等人(2011)Nature Methods[自然方法],8:785-786)预测的长度为22个氨基酸的信号肽。信号序列的存在表明ApsPro1是分泌的酶。

[0325] 实例19金头曲霉CBS 112787蛋白酶AnePro2(CRC21072-WT)的克隆

[0326] 金头曲霉(*Aspergillus neauricomus*) CBS 112787被选为可用于各种工业应用的酶的潜在来源。金头曲霉CBS 112787中鉴定的基因之一(命名为AnePro2(CRC21072-WT))编码与从BLAST搜索确定的蛋白酶具有同源性的蛋白质(Altschul等人,J Mol Biol[分子生物学杂志],215:403-410,1990)。由AnePro2基因编码的蛋白质如SEQ ID NO:6中所示(JGI参考序列:Aspneoal\_131875)。在N-末端,蛋白质具有如通过SignalP 4.0版本(Nordahl Petersen等人(2011)Nature Methods[自然方法],8:785-786)预测的长度为22个氨基酸的信号肽。信号序列的存在表明AnePro2是分泌的酶。

[0327] 实例20艾伯特曲霉蛋白酶AalPro2(CRC21076-WT)的克隆

[0328] 艾伯特曲霉(*Aspergillus albertensis*)被选为可用于各种工业应用的酶的潜在来源。艾伯特曲霉中鉴定的基因之一(命名为AalPro2(CRC21076-WT))编码与从BLAST搜索确定的蛋白酶具有同源性的蛋白质(Altschul等人,J Mol Biol[分子生物学杂志],215:403-410,1990)。由ApsPro1基因编码的蛋白质如SEQ ID NO:7中所示(JGI参考序列:Aspalbel\_152875)。在N-末端,蛋白质具有如通过SignalP 4.0版本(Nordahl Petersen等人(2011)Nature Methods[自然方法],8:785-786)预测的长度为19个氨基酸的信号肽。信号序列的存在表明AalPro2是分泌的酶。

[0329] 实例21核心曲霉CBS 553.77蛋白酶AcoPro2(CRC21078-WT)的克隆

[0330] 核心曲霉(*Aspergillus coremiiformis*) CBS 553.77被选为可用于各种工业应用的酶的潜在来源。核心曲霉CBS 553.77中鉴定的基因之一(命名为AcoPro2(CRC21078-WT))编码与从BLAST搜索确定的蛋白酶具有同源性的蛋白质(Altschul等人,J Mol Biol[分子生物学杂志],215:403-410,1990)。由AcoPro2基因编码的蛋白质如SEQ ID NO:8中所示(JGI参考序列:Aspcor1\_141732)。在N-末端,蛋白质具有如通过SignalP4.0版本(Nordahl Petersen等人(2011)Nature Methods[自然方法],8:785-786)预测的长度为22个氨基酸的信号肽。信号序列的存在表明AcoPro2是分泌的酶。

[0331] 实例23温特曲霉蛋白酶AwePro2(CRC21080-WT)的克隆

[0332] 温特曲霉(*Aspergillus wentii*)被选为可用于各种工业应用的酶的潜在来源。温特曲霉中鉴定的基因之一(命名为AwePro2(CRC21080-WT))编码与从BLAST搜索确定的蛋白酶具有同源性的蛋白质(Altschul等人,J Mol Biol[分子生物学杂志],215:403-410,1990)。由AwePro2基因编码的蛋白质如SEQ ID NO:9中所示(JGI参考序列:Aspwe1\_188244)。在N-末端,蛋白质具有如通过SignalP 4.0版本(Nordahl Petersen等人(2011)Nature Methods[自然方法],8:785-786)预测的长度为20个氨基酸的信号肽。信号序列的存在表明AwePro2是分泌的酶。

[0333] 实例24黑曲霉蛋白酶AbrPro1(CRC21202-WT)的克隆

[0334] 黑曲霉(*Aspergillus brasiliensis*)被选为可用于各种工业应用的酶的潜在来源。黑曲霉中鉴定的基因之一(命名为AbrPro1(CRC21202-WT))编码与从BLAST搜索确定的蛋白酶具有同源性的蛋白质(Altschul等人,J Mol Biol[分子生物学杂志],215:403-410,

1990)。由AbrPro1基因编码的蛋白质如SEQ ID NO:10中所示(JGI参考序列:Aspbr1\_41430)。在N-末端,蛋白质具有如通过SignalP 4.0版本(Nordahl Petersen等人(2011) Nature Methods[自然方法],8:785-786)预测的长度为22个氨基酸的信号肽。信号序列的存在表明AbrPro1是分泌的酶。

[0335] 实例25菌盘曲霉CBS115572蛋白酶AscPro5(CRC21204-WT)的克隆

[0336] 菌盘曲霉(*Aspergillus sclerotioniger*) CBS115572被选为可用于各种工业应用的酶的潜在来源。菌盘曲霉CBS115572中鉴定的基因之一(命名为AscPro5(CRC21204-WT))编码与从BLAST搜索确定的蛋白酶具有同源性的蛋白质(Altschul等人,J Mol Biol[分子生物学杂志],215:403-410,1990)。由AscPro5基因编码的蛋白质如SEQ ID NO:11中所示(JGI参考序列:Aspscl1\_500682)。在N-末端,蛋白质具有如通过SignalP 4.0版本(Nordahl Petersen等人(2011) Nature Methods[自然方法],8:785-786)预测的长度为22个氨基酸的信号肽。信号序列的存在表明AscPro5是分泌的酶。

[0337] 实例26ApsPro1、AnePro2、AalPro2、AcoPro2、AwePro2、AbrPro1和AscPro5的表达、发酵和纯化

[0338] 化学合成编码ApsPro1、AnePro2、AalPro2、AcoPro2、AwePro2、AbrPro1或AscPro5的DNA序列,并将其插入上海捷瑞生物工程有限公司(中国上海)的里氏木霉表达载体pGXT(与公开的PCT申请W0 2015/017256中描述的pTTTpyr2载体相同,通过引用并入本文)。将所得质粒分别标记为pGXT-ApsPro1、pGXT-AnePro2、pGXT-AalPro2、pGXT-AcoPro2、pGXT-AwePro2、pGXT-AbrPro1或pGXT-AscPro5。

[0339] 然后,使用原生质体转化(Te'o等人(2002) J.Microbiol.Methods[微生物方法杂志]51:393-99)将每个独立的表达质粒转化到合适的里氏木霉菌株中(描述于公开的PCT申请W0 05/001036中)。在含有乙酰胺(作为唯一氮源)的培养基上选择转化体。在乙酰胺板上生长5天后,收集转化体并经由DASGIP(艾本德公司,德国于利希)进行发酵。

[0340] 为了启动ApsPro1、AnePro2、AalPro2、AcoPro2、AwePro2、AbrPro1或AscPro5的发酵,使种子培养物在1L摇瓶中生长,每个摇瓶含有100mL限定培养基(灭菌前pH5.5),该培养基由50g/L一水葡萄糖、6g/L甘氨酸、5g/L(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、4.5g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1g/L CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O、1g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、2g/L Mazu 6000K和2.5mL 400×里氏木霉痕量金属(400×痕量金属原液(约pH 1)含有175g/L C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>·H<sub>2</sub>O、200g/L FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、16g/L ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、3.2g/L CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O、1.4g/L MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O和0.8g/LH<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>)组成。将种子培养物在250rpm和30℃下摇动48小时。孵育完成后,将200mL种子培养物转移至2L生物反应器(DASGIP)中。

[0341] 2L生物反应器(DASGIP)中的发酵培养基含有60g/L右旋糖、6g/L甘氨酸、1g/L CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O、4.5g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、4g/L(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、1g/LMgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、1.2g/L Mazu 6000K和2.5ml 400×里氏木霉痕量金属。制备每kg含有250g葡萄糖/槐糖的诱导溶液并灭菌。

[0342] 接种后,以1L的工作体积开始分批发酵,并控制在pH 3.5和34℃。整个发酵过程中通过调节气流速度、供氧量和搅拌,将溶解氧水平控制在35%以上。发酵时间经过22小时后,发酵液中的葡萄糖耗尽,此时开始进料250g(葡萄糖/槐糖)/kg溶液。分别以22-46小时和46-72小时的时间间隔应用4mL进料/小时和6mL进料/小时的逐步进料速率。随着补料分批阶段的开始,pH线性变化至4.0,并且温度调节至28℃。运行72小时后发酵完成,通过离心收获发酵液、过滤并随后浓缩。

[0343] 为了纯化ApsPro1、AnePro2、AalPro2、AcoPro2、AwePro2、AbrPro1和AscPro5,将来自1L Dasgip发酵罐的粗产物浓缩,并添加硫酸铵至1M的终浓度。将溶液加载到用20mM NaAc (pH5.0) 预平衡的HiPrep™Phenyl FF 16/10柱,并额外补充1M硫酸铵。用0.5M硫酸铵从柱洗脱靶蛋白。然后将所得的活性蛋白级分合并,浓缩并经由10K Amicon Ultra装置将缓冲液交换为20mM NaAc (pH5.0)、150mM NaCl,并且在-20℃在40%甘油中储存直至使用。

[0344] 实例27

[0345] ApsPro1、AnePro2、AalPro2、AcoPro2、AwePro2、AbrPro1和AscPro5的浑浊减少性能

[0346] 使用麦醇溶蛋白-儿茶素测定计算ApsPro1、AnePro2、AalPro2、AcoPro2、AwePro2、AbrPro1和AscPro5的浑浊减少性能。反应前,将酶用水稀释到特定浓度。将麦醇溶蛋白底物(西格玛公司(Sigma),目录号G3375)溶解在20mM乙酸盐/磷酸盐缓冲液(pH 4.5)中,并补充有额外的0.2%乙醇至最终浓度为2mg/mL,并将儿茶素底物(西格玛公司,目录号C1251)溶解在20mM柠檬酸盐/磷酸盐缓冲液(pH 4.5)中,并补充有额外的0.2%乙醇至终浓度为2mg/mL。为了开始测定,在96-MTP中将100μL麦醇溶蛋白溶液与5μL适当稀释的ApsPro1、AnePro2、AalPro2、AcoPro2、AwePro2、AbrPro1和AscPro5(或纯化的AnPro (Brewer's Clarex™)作为基准)混合;在恒温混匀仪中在45℃下孵育90min后,然后将所得96-MTP置于冰中5min,随后添加100μL儿茶素溶液。在室温下30min形成浑浊。使用SpectraMax 190测量600nm处产生的浑浊的吸光度( $A_{600}$ ),然后针对不同的酶浓度进行绘图。每个值为三次重复测定的平均值。如图15所示,当与基准(AnPro)相比,ApsPro1、AnePro2、AalPro2、AcoPro2和AwePro2在减少麦醇溶蛋白-儿茶素浑浊方面均更有效。

[0347] 实例28

[0348] AhoPro3、ApsPro1、AnePro2、AalPro2、AcoPro2、AwePro2、AbrPro1、AscPro5和AnPro的蛋白水解活性

[0349] 使用Ala-Ala-Ala-Pro-对硝基苯胺(AAAP-pNA)(由吉尔生化公司(GL Biochem),中国上海合成)作为底物,在25mM柠檬酸盐/磷酸盐缓冲液(pH 5)中测量纯化的AhoPro3、ApsPro1、AnePro2、AalPro2、AcoPro2、AwePro2、AbrPro1、AscPro5和AnPro的蛋白水解活性。反应前,将酶用水稀释到特定浓度。将AAAP-pNA底物溶解在100%二甲基亚砜(DMSO)中,终浓度为10mM。为了启动反应,将5μL底物与85μL柠檬酸盐/磷酸盐缓冲液在非结合96孔微量滴定板(96-MTP)(康宁生命科学公司(Corning Life Sciences),#3641)中混合,并在恒温混匀仪(艾本德公司)中在37℃下预孵育5min后,添加10μL适当稀释的纯化酶(或水作为空白)。密封96-MTP后,使反应在恒温混匀仪中在37℃和650rpm下进行10min,并使用SpectraMax 190在405nm处测量所得溶液的吸光度( $A_{405}$ )。通过从酶的 $A_{405}$ 中减去空白对照的 $A_{405}$ 来计算净 $A_{405}$ ,并且然后绘制出相对于不同蛋白质浓度的图。每个值为两次重复测定的平均值。蛋白水解活性显示为净 $A_{405}$ 。如图16所示,当与基准(AnPro)相比,ApsPro1、AhoPro3、AnePro2、AalPro2、AcoPro2、AbrPro1和AwePro2均是对于脯氨酸特异性底物(AAAP-pNA)更有效的蛋白酶。以AAAP-pNA为底物的蛋白水解测定表明ApsPro1、AhoPro3、AnePro2、AalPro2、AcoPro2、AbrPro1和AwePro2都是高活性蛋白酶。

[0350] 实例29

[0351] MorPro1的克隆

[0352] 真菌菌株(稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*) 70-15) 被选为可用于各种工业应用的酶的潜在来源。BLAST搜索(Altschul等人, *J Mol Biol* [分子生物学杂志], 215:403-410, 1990) 导致鉴定出编码与真菌蛋白酶(来自稻瘟病菌70-15的MorPro1) 同源的蛋白质的基因。

[0353] 从NCBI数据库鉴定的全长MorPro1基因的核酸序列(NCBI参考序列:NC\_017851.1 从2214046到2215835;互补体) 提供于SEQ ID NO:12。由MorPro1基因编码的相应全长蛋白质如SEQ ID NO:13中所示(NCBI参考序列:XP\_003716615.1)。如通过SignalP版本4.0预测的(Nordahl Petersen等人, (2011) *Nature Methods* [自然方法]8:785-786), MorPro1具有N-末端信号肽, 这表明它是分泌酶。MorPro1的相应的、预测的、成熟酶序列提供于SEQ ID NO:14中。

[0354] 实例30

[0355] MorPro1的表达

[0356] 化学合成编码全长MorPro1 (SEQ ID NO:12) 的DNA序列并将其插入上海捷瑞生物工程有限公司(中国上海) 的里氏木霉的表达载体pTrex3gM(美国公开申请2011/0136197A1 中描述)。全长MorPro1的合成核苷酸序列如SEQ ID NO:15所示。pTrex3gM表达载体含有里氏木霉cbhI衍生的启动子(cbhI) 和cbhI终止子区域, 这允许目的基因的强烈诱导表达。构巢曲霉amdS选择标记使转化体以乙酰胺作为唯一氮源生长。将所得质粒标记为pGX256 (Trex3gM-MorPro1), 然后使用生物射弹方法(Teo VS等人, *J Microbiol Methods* [微生物学方法杂志], 51:393-9, 2002) 将表达质粒转化为四缺失里氏木霉菌株(描述于W0 05/001036)。在含有乙酰胺作为唯一氮源的培养基上选择转化体(乙酰胺0.6g/L; 氯化铯1.68g/L; 葡萄糖20g/L; 磷酸二氢钾15g/L; 七水硫酸镁0.6g/L; 二水氯化钙0.6g/L; 硫酸铁(II) 5mg/L; 硫酸锌1.4mg/L; 氯化钴(II) 1mg/L; 硫酸锰(II) 1.6mg/L; 琼脂20g/L; pH 4.25)。约1周内出现转化的菌落(约50-100)。在乙酰胺平板上生长后, 挑取转化体并分别转移到乙酰胺琼脂平板上。在乙酰胺平板上生长5天后, 将表现出稳定形态的转化体接种到96孔微量滴定板中的200 $\mu$ L葡萄糖/槐糖确定成分培养基中。将微量滴定板在氧气生长室中于28 $^{\circ}$ C 孵育5天。通过SDS-PAGE分析, 将来自这些培养物的上清液用于确认蛋白质表达。选择具有最高蛋白质表达的稳定菌株, 并在250mL摇瓶中用葡萄糖/槐糖确定成分培养基对其进行发酵。

[0357] 实例31

[0358] 发酵期间具有内切蛋白酶生产的啤酒的肽分析和蛋白酶特异性分析

[0359] 如实例14中所述, 在半工业化试点啤酒厂生产啤酒, 其中在如实例14中所述的啤酒发酵过程开始时添加蛋白酶AnPro、AniPro2、AhoPro和MorPro1, 使用表7所示的剂量。2hL 试点啤酒厂酿造的啤酒经过过滤(未使用二氧化硅或PVPP), 但未稳定的全麦芽比尔森型啤酒具有大约66% RDF并且醇含量为4.7% (v/v)。如实例13中所述, 用硅藻土过滤器进行啤酒过滤。将15ml最终啤酒在10kDa旋转过滤器(Vivaspin 20, 赛多利斯公司(Sartorius)) 中离心, 并将100 $\mu$ l滤液添加至脱盐柱(Oasis HLB 1cc (10mg) 提取盒, 材料编号186000383, 沃特斯公司(Waters), 美国) 上。在加载脱盐柱之前, 用0.5mL MeOH进行活化, 并用0.5mL 0.1% TFA进行调节。向样品中添加0.5mL 0.1% TFA和100 $\mu$ l样品(缓慢加载约1min), 并用0.5mL 0.1% TFA洗涤两次。用0.5mL 50% ACN、0.1% TFA进行洗脱, 收集洗脱级分并冷冻干燥过夜。

如下所述,将干燥的样品送去进行MS分析。

#### [0360] LC-MS数据采集

[0361] 使用UltiMate™3000RSLCnano系统(赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific),马萨诸塞州,美国)与Q Exactive™HF Hybrid Quadrupole-Orbitrap™质谱仪(赛默飞世尔科技公司,马萨诸塞州,美国)连接进行Nano LC-MS/MS分析。将样品溶解在0.1%TFA中,并加载到与250mm分析柱(PepSep、ReproSil 1.9 $\mu$ m C18珠、孔径120Å,内径0.075mm)相连的20mm nanoViper Trap柱(Acclaim™PepMap™100C18,粒度3 $\mu$ m,内径0.075mm)上。使用2%-41%溶剂B(100%ACN,0.1%FA)的20min梯度进入Nanospray Flex离子源(赛默科技公司(Thermo Scientific)),以300nL/min的流速进行分离。使用HCD碎片在数据依赖型MS/MS中操作Q Exactive HF仪器。通过Orbitrap(在m/z 200下获得分辨率为60,000的MS扫描)测量肽质量。选择前7个最强离子并进行碎裂。使用带分离窗的2.0Da通过四极杆分离离子。Orbitrap中记录的碎片光谱分辨率为60,000。启用动态排除,排除持续时间为10s,排除质量容差宽度相对于列表上的质量为 $\pm 10$ ppm。

#### [0362] 多肽数据分析

[0363] 使用Proteome Discoverer(2.4版,赛默科技公司)处理LC-MS/MS数据(平滑、背景减除和质心化)。处理后的LC-MS/MS数据被提交到数据库,使用内部Mascot服务器以GreenPlants作为分类法,针对SwissProt数据库进行搜索。选择无特异性作为酶。甲硫氨酸的氧化被设定为可变修饰。用 $\pm 10$ ppm的肽离子质量公差, $\pm 0.2$ Da的碎片离子质量公差搜索MS/MS结果。过滤器(Percolator)(Kall,Canterbury等人2007)用于计算FDR。仅考虑被鉴定为1级肽且置信值为1%( $q < 0.01$ )的肽进行进一步分析。使用内置定量模块对肽进行相对定量。将丰度总和缩放至相同水平并用于计算。

[0364] 对啤酒中的肽进行了分析,并通过蛋白酶切割确定了对应于P3'-P3的肽末端位置的相对氨基酸含量。MorPro1、AnPro和AniPro\_2的肽相应P1位置的相对氨基酸含量如图21所示。右侧显示了与P3-P3'相应的肽位置处的相对氨基酸含量,图表显示了给定位置处每种氨基酸的累积含量,从而显示了详细的蛋白酶特异性偏好。用具有MorPro1、AnPro和AniPro\_2的通过蛋白酶切割定位到P3'-P3的啤酒中肽的相对氨基酸含量如表19至21所示。肽相应的P1位置。清楚的是,P1位上两种脯氨酸的相对含量都非常高,并且支持脯氨酸特异性蛋白酶的作用。发现AnPro的脯氨酸(P)特异性最高(52%),其次是AniPro\_2(47%)和MorPro1(36%)。然而,令人惊讶的是,P1中AniPro\_2(12%)和AnPro(11%)也观察到相对较高的谷氨酰胺(Q)特异性,而MorPro1仅显示(3%)。通过P3'-P3位置的含量相对总和观察到对脯氨酸(P)和谷氨酰胺(Q)的同样高度偏好,其中AniPro\_2具有141%Q和108%P,AnPro具有134%Q和101%P并且MorPro1具有53%Q和70%P。这清楚地表明AniPro\_2是最具特异性的谷氨酰胺和脯氨酸特异性内切蛋白酶,其次是AnPro和MorPro1。这也支持和解释了AniPro\_2优越的浑浊减少性能。增加的谷氨酰胺和脯氨酸特异性可以更有效地降解已知具有高含量脯氨酸和谷氨酰胺的麦芽或小麦啤酒中的浑浊敏感蛋白。从鉴定的300多个独特肽计算了具有蛋白酶生产的啤酒中鉴定的肽的平均肽长度(氨基酸残基数),结果如图22所示。计算具有AniPro2(12.1个残基)、AnPro(12.2个残基)、MorPro1(12.7个残基)和对照(14.2个残基)生产的啤酒观察到的平均肽长度。这显然支持啤酒中分离蛋白的更有效降解,导致用具有增加的谷氨酰胺和脯氨酸特异性的蛋白酶生产的啤酒中的肽更短。在具有

AniPro2生产的啤酒中发现了平均最短的肽,其次是由AnPro和MorPro1生产的啤酒,以及具有最长平均肽长度的对照。因此,具有增加的谷氨酰胺和脯氨酸特异性的蛋白酶在啤酒中产生较短的肽,从而更有效地降解麦芽啤酒中的浑浊敏感蛋白。

[0365] 表19.对具有内切蛋白酶以1hL规模生产的麦芽啤酒进行肽分析,并通过蛋白酶切割得到对应于P3'-P3的肽末端位置的相对氨基酸(AA)含量。通过蛋白酶切割,显示了具有MorPro1制成的啤酒中肽中P3'-P3位置的相对氨基酸含量。每个氨基酸从P3'到P3的相对氨基酸含量总和以SUM形式给出。

AA	MorPro1						SUM
	P3	P2	P1	P'1	P'2	P'3	
A	6	4	4	14	9	21	58
R	3	4	5	2	1	2	16
N	2	20	1	14	3	4	44
D	2	0	2	1	2	9	15
C	0	0	0	0	0	0	1
Q	21	11	3	4	9	22	70
E	2	3	2	5	1	8	22
G	6	9	3	12	6	7	44
H	27	2	1	2	1	0	34
I	4	1	0	1	38	5	50
L	4	5	20	7	0	6	42
K	2	18	13	0	0	1	35
M	2	0	1	0	1	0	4
F	0	3	1	18	1	2	25
P	3	2	36	2	6	4	53
S	2	4	1	8	2	2	18
T	1	6	2	4	1	4	18
W	0	0	0	0	16	0	17
Y	3	2	1	1	0	0	7
V	10	4	5	4	1	3	27

[0366]

[0367] 表20.对具有内切蛋白酶以1hL规模生产的麦芽啤酒进行肽分析,并通过蛋白酶切割得到对应于P3'-P3的肽末端位置的相对氨基酸(AA)含量。通过蛋白酶切割,显示了具有AnPro制成的啤酒中肽中P3'-P3位置的相对氨基酸含量。每个氨基酸从P3'到P3的相对氨基酸含量总和以SUM形式给出。

[0368]

		AnPro					
AA	P3	P2	P1	P'1	P'2	P'3	SUM
A	4	4	3	13	6	7	38
R	2	2	3	2	6	2	16
N	2	5	2	4	2	3	18
D	2	0	1	2	1	9	14
C	0	0	1	0	0	0	1
Q	30	24	11	14	22	33	134
E	1	1	1	3	1	2	10
G	4	9	2	5	4	4	28
H	5	2	0	2	0	1	11
I	9	5	2	2	17	5	39
L	2	5	8	4	0	3	22
K	1	29	4	0	0	1	36
M	3	0	0	1	0	0	5
F	0	1	1	38	1	4	44
P	20	2	52	1	7	20	101
S	2	4	1	3	2	2	14
T	2	3	2	2	1	2	12
W	0	0	0	0	26	0	27
Y	1	1	1	1	0	0	4
V	10	3	4	5	2	3	26

[0369] 表21.对具有内切蛋白酶以1hL规模生产的麦芽啤酒进行肽分析,并通过蛋白酶切割得到对应于P3'-P3的肽末端位置的相对氨基酸(AA)含量。通过蛋白酶切割,显示了具有AniPro2制成的啤酒中肽中P3'-P3位置的相对氨基酸含量。每个氨基酸从P3'到P3的相对氨基酸含量总和以SUM形式给出。

[0370]

		AniPro2					
AA	P3	P2	P1	P'1	P'2	P'3	SUM
A	3	3	3	10	6	10	35
R	1	2	2	1	9	1	18
N	1	10	1	7	2	3	24

[0371]

D	1	0	1	1	1	6	10
C	0	0	1	0	0	0	1
Q	25	31	12	17	24	31	141
E	1	3	1	4	1	4	13
G	4	6	2	6	3	3	25
H	15	1	1	2	0	1	19
I	11	8	4	1	20	5	48
L	3	3	11	4	0	4	25
K	1	17	6	0	1	1	26
M	3	0	0	1	0	0	4
F	0	1	1	29	1	3	34
P	21	4	47	2	14	21	108
S	1	4	1	4	3	1	13
T	1	3	2	2	1	3	13
W	0	0	1	0	12	0	14
Y	1	0	1	1	0	0	3
V	7	3	3	8	2	3	26

## 序列表

- <110> 杜邦营养生物科学公司(Dupoont Nutrition Bioscences APS)  
 <120> 用于啤酒浑浊减少的蛋白酶  
 <130> NB41925-W0-PCT2  
 <150> PCT/CN2021/100928  
 <151> 2021-06-18  
 <160> 1  
 <170> PatentIn 3.5版  
 <210> 1  
 <211> 527  
 <212> PRT  
 <213> 巴西曲霉(*Aspergillus bertholletius*)  
 <400> 1

```

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

```

195	200	205
Ala Ile Asn Asp Phe Trp Gln Tyr Phe Asp Pro Ile Arg Gln Gly Met		
210	215	220
Ala Pro Asn Cys Ser Arg Asp Val Ser Leu Val Ala Thr His Ile Asp		
225	230	235
Arg Val Gly Lys His Gly Ser Ala Ala Glu Gln Leu Ala Leu Lys Glu		
245	250	255
Leu Phe Gly Leu Gly Ala Val Glu His Tyr Asp Asp Phe Ala Ala Ala		
260	265	270
Leu Pro Ile Gly Pro Tyr Lys Trp Gln Ser Asn Thr Phe Val Thr Gly		
275	280	285
Tyr Ser Gly Phe Phe Ala Phe Cys Asp Ala Val Glu Asn Val Lys Ala		
290	295	300
Gly Ala Thr Val Val Pro Gly Pro Glu Gly Val Gly Leu Gln Lys Ala		
305	310	315
Leu Arg Gly Tyr Ala Lys Trp Phe Lys Ser Thr Ile Leu Pro Gly Tyr		
325	330	335
Cys Ala Asn Tyr Gly Tyr Trp Thr Asp Asn Gln Thr Val Ala Cys Phe		
340	345	350
Asp Thr Tyr Asn Pro Ser Ser Ala Ile Phe Thr Asp Thr Ser Val Asp		
355	360	365
Asn Ala Val Asp Arg Gln Trp Gln Trp Phe Leu Cys Asn Glu Pro Phe		
370	375	380
Phe Trp Trp Gln Asp Gly Ala Pro Glu Gly Ile Pro Thr Ile Ile Pro		
385	390	395
Arg Thr Val Asn Ala Ala Tyr Trp Gln Arg Gln Cys Ser Leu Tyr Phe		
405	410	415
Pro Glu Val Asn Gly Tyr Thr Tyr Gly Ser Ala Lys Gly Lys Thr Ala		
420	425	430
Ala Thr Val Asn Gln Trp Thr Gly Gly Trp Ser Ala Thr Arg Asn Thr		
435	440	445
Ser His Leu Leu Trp Val Asn Gly Gln Tyr Asp Pro Trp Arg Asp Ser		
450	455	460
Gly Val Ser Ser Ile Tyr Arg Pro Gly Gly Pro Leu Lys Ser Thr Ala		
465	470	475
Asp Glu Pro Val Gln Val Ile Pro Gly Gly Phe His Cys Ser Asp Leu		
485	490	495
Tyr Leu Lys Asp Tyr Tyr Ala Asn Asp Gly Val Lys Gln Val Ile Asp		
500	505	510

---

Asn Ala Val Ala Gln Ile Lys Ser Trp Val Ala Glu Tyr Tyr Asn  
515 520 525

<SEQ ID NO:1 AbePro2 前体蛋白; PRT; 巴西曲霉 >

MHFLAPLSVVTLLASWPLLGYAIHPPKPVPPPVS RPVSTRSSAVVGEATFDQLLDHHDSS  
KGTFSQRYWWSTEYWGGPGSPVVLFTPGEASADGYQGYLTNTTTLTGRYAQEIQGAVILI  
EHRYWGGSSPYKELTAETLQYLTLEQSILDLTYFAETVSLEFDPSNRSNAPKAPWVLVG  
GSYSGALAAWTA AVAPETFWAYHATSAPVEAINDFWQYFDPIRQGMAPNCSR DVSLV  
ATHIDRVGKHGSA AEQLALKELFGLGAVEHYDDFAAALPIGPYKWQSNTFVTGYS GFF  
AFCDAVENVKAGATVVP GPEGVGLQKALRGYAKWFKSTILPGYCANYGYWTDNQTV  
ACFDTYNPSSAIFTDTSVDNAVDRQWQWFLCNEPFFWWQDGAPEGIPTIIPRTVNAAYW  
QRQCSLYFPEVNGYTYGSAK GKTAATVNQWTGGWSATRNTSHLLWVNGQYDPWRDS  
GVSSIYRPGGPLKSTADEPVQVIPGGFHCS DLYLKDYANDGVKQVIDNAVAQIKSWVA  
EYYN

图1

<SEQ ID NO:2 AniPro\_2 前体蛋白; PRT; 黑曲霉 >

MQTFGAFLVSFLAASGLAAAARPRLVPKPI SRPASSKSAATTGEAYFEQLLDHHNPEKG  
TFSQRYWWSTEYWGGPGSPVVLFPNGEVSADGYEGYLTNDTLTG VYAQEIQGAVILIEH  
RYWGDSSPYEVLNAETLQYLTLDQSILDMTYFAETV KLQFDNSSRSNAQNAPWVMVG  
GSYSGALTAWTESIAPGTFWAYHATSAPVEAIYDFWQYFYPIQQGMAQNCSKDVSLVA  
EYVDKIGKNGTAKEQQELKELFGLGAVEHYDDFAAVLPNGPYLWQDND FVTGYS SFFQ  
FCDAVEGVEAGAAVTPGPEGVGLEKALANYANWFNSTILPNYCASYGYWTDEWSVAC  
FDSYNASSPIFTDTSVGNPVDRQWEWFLCNEPFFWWQDGAPEGTSTIVPRLVSASYWQR  
QCPLYFPEVNGYTYGSAK GKNSATVNSWTGGWDMTRNTTRLIWTNGQYDPWRDSGVS  
STFRPGGPLVSTANEPVQIIPGGFHCS DLYMEDYYANEGVRKVVDNEVKQIKEWVEEYY  
A

图2

<SEQ ID NO:3 AtrPro1 前体蛋白; PRT; 跨山曲霉 >

MQFLPPLSIVTLLASWPSLSRAIHPPRPVPPPVS RPVSTQSLAVEGNATFEQLLDHHDSSK  
GTFSQRYWWSTEYWGGPGSPVVLFTPGEASADGYEGYLTNNTLTGLYAQEIQGAVILIE  
HRYWGDSSPYEELTAETLQYLTLEQSILDLTHFAETVQLEFDTSNSSNAPKAPWVLVGG  
SYSGALAAWTA AVAPETFWAYHATSAPVQAIDDFWQYFDPIRHGMAPNCSR DVSLVA  
NHIDTVGKNGSAADQFALKELFGLALEHYDDFAAALPTGPYLWQSNTFVTGYSDFFA  
FCDAVENVEAGAAVVP GPEGVGLQKALTGYANWFNSTILPGYCASYGYWTDNRTVAC  
FDTHNPSSAIFIDTSVDNAVDRQWQWFLCNEPFFWWQDGAPEGVPTIVPRTINAEYWQR  
QCSLYFPEVNGYTYGSAK GKTAASVNSWTGGWSDSKNTSRLWVNGQYDPWRDSGV  
SSTHRPGGPLASTADEPVQIIPGGFHCS DLYIKDYANAGVKQVVDNAVAQIKSWVAEY  
YK

图3

<SEQ ID NO:4 AhoPro3 前体蛋白; PRT; 同形曲霉 >

MRFCSPVSVVAVTALWASLTAALRPPRLAPRPVTATTQSAVVESTFEQLIDHNDPSKGT  
FSQRYWYSTQYWGGPGSPVVLFTPGEAAADGYGGYLTNRTLTGVY AQQLQGAVVLIE  
HRYWGGSSPYANLTAETLQYLTLEQSVLDLTYFAENVQLGFAKNSTSSNAPHVPWVLV  
GGSYSGALTAWTEHLAPGTFWAYHATSAPMESIYDFW TYFRPIQEGMAKNCSKDVSLV  
AEHV DKGKLGTKAQQKALKKLFGLALEHFDDFAAVLPIGPYLWQDNSFATGYS GFF  
AFCDAVENVEAGAAVTPGAEGVGLEKALKGYANWFKNKILPDYCASTYGYWSDKYTV  
ACFDTYNATSPLFRDTSVRNAVDRQWTWFLCNEPFFWWQDGAPESETSLIPRLVSADY  
WQRQCSLYFPEVNGYTYGSAK GKTA STFNAWTDGWFLTGNSTRLIWTNGQYDPWRDA  
GVSSIFRPGGPLVSTPN EPVQIIPGGFHCS DLYISDAEVNAGVKKVINEVAQIKAWVAEF  
YA

图4

纯化的AhoPro3和AnPro响应于3至190 ppm的酶浓度的浑浊减少性能，显示为OD600

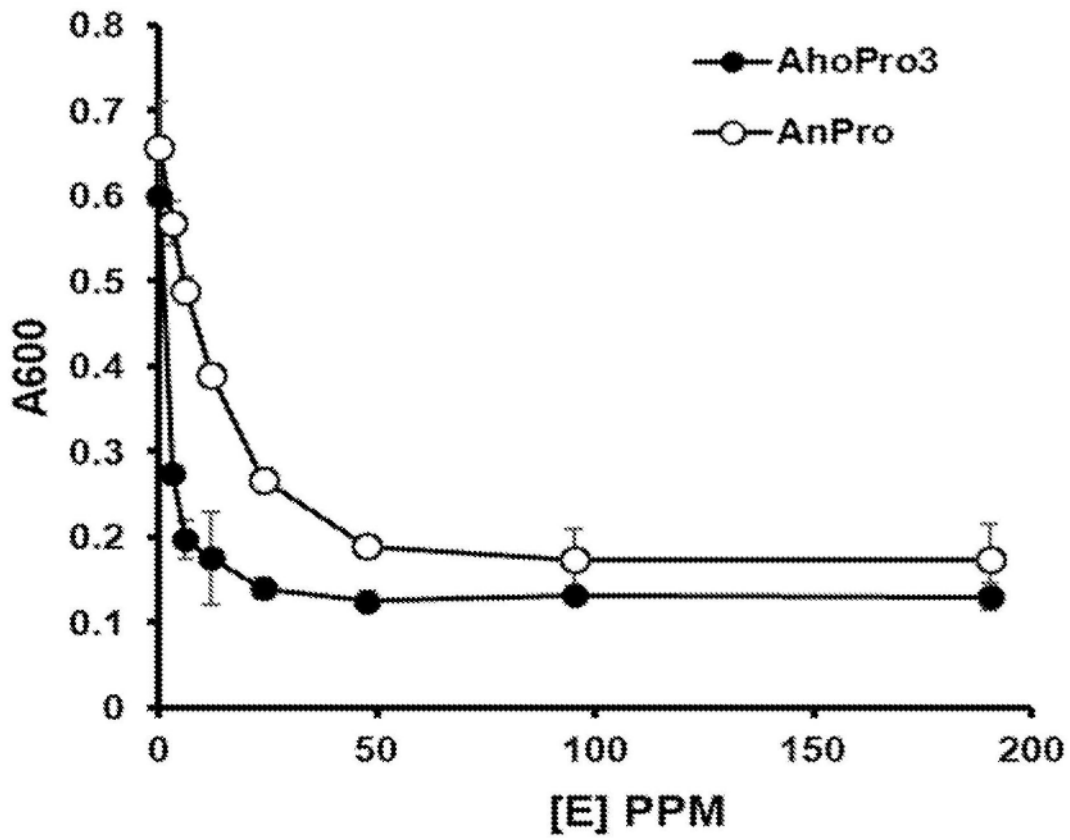


图5

纯化的AtrPro1、AbePro2和AnPro响应于3至190 ppm的酶浓度的浑浊减少性能，显示为OD600

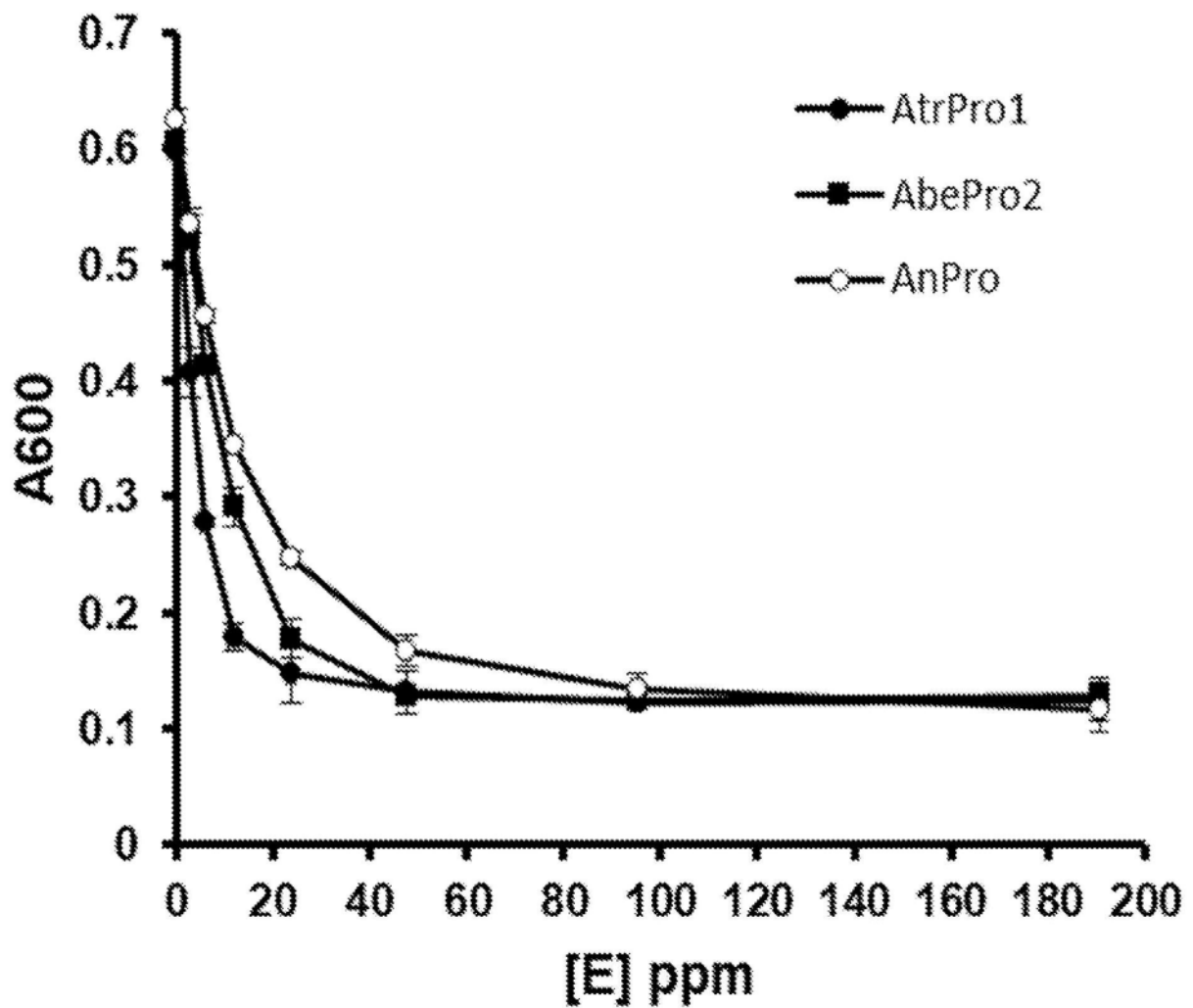


图6

纯化的AniPro\_2和AnPro响应于0.625至20 ppm的酶浓度的浑浊减少性能，显示为OD600

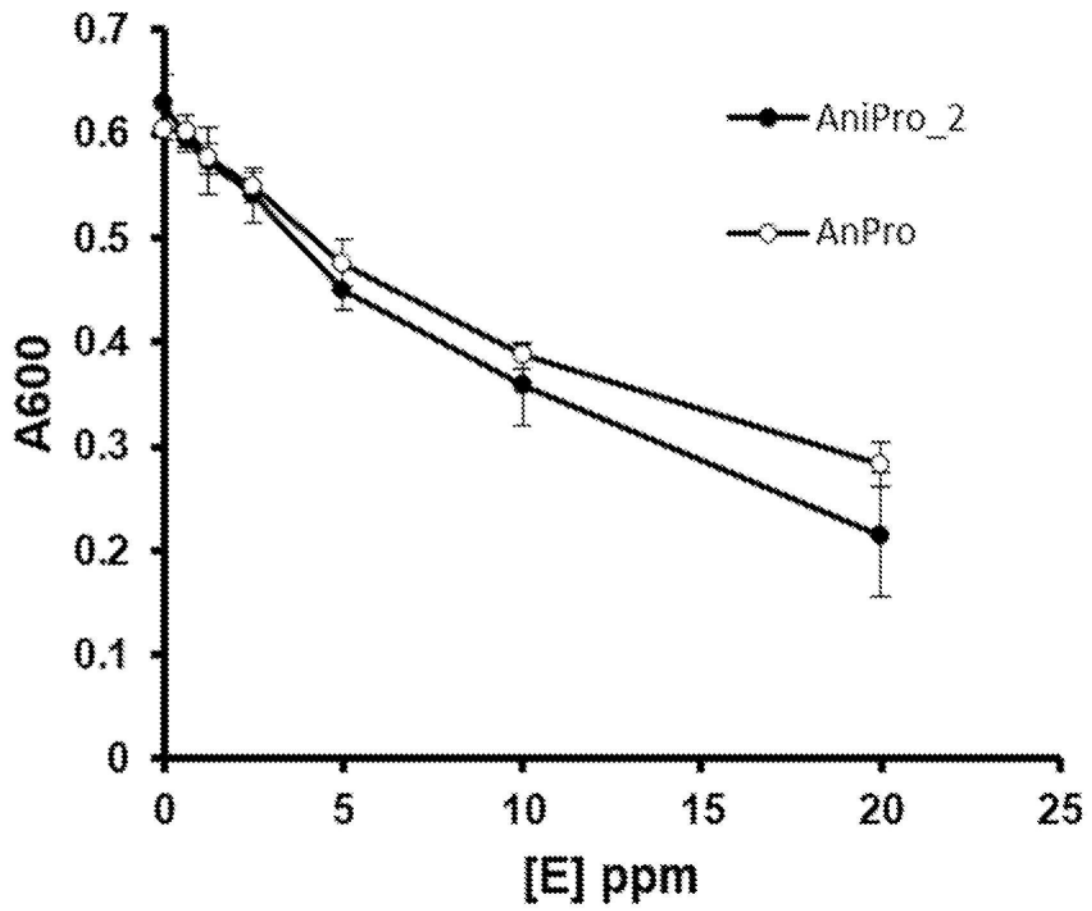


图7

<SEQ ID NO:5 ApsPro1 前体蛋白; PRT; 假柄曲霉 >

MHFLSRISVVTLASWPSLSRAIHPPRPVPPPVTRPASTLSSAVEGEATFEQLVDHHDSSK  
GTFSQRYWWSTEYWGGPGSPVVLFTPGEASADGYEGYLTNNTLTGLYAQEIQGAVILIE  
HRYWGGSSPFEELTAETLQYLTLEQSIQDLTYFAETVQLEFDTSNSSNAPKAPWVLVGG  
SYSGALAAWTA AVAPETFWAYHATSAPVQAINDFWQYFDPIRHGMAPNCSR DVSLVA  
NHIDSVGKNGSIAEQSALKELFGLGALEHYDDFAAALPIGPYLWQDNTFVTGYSGFFAF  
CDAVENVEAGAAVVPGPEGVGLQKALTGYANWFNSTILPGYCANYGYWTDNRTVACF  
DTHNSSSAIFTDTSLNNAVDRQWQWFLCNEPFFWWQDGAPEGVPSIVPRTVNAAYWQR  
QCSLYFPEVNGYTYGSAKGKTAATVNTWTGGWSETKNTSHLLWVNGQYDPWRDSGV  
SSTHRPGGPLASTADEPVQVIPGGFHCSLDLYLKDYHANAGVKQVVDNAVAQIKSWVAE  
YYK

图8

<SEQ ID NO:6 AnePro2 前体蛋白; PRT; 金头曲霉 >

MRFLSVVRLAALVTSWASIAQAIRPIPVPEPVPRPVSLQSTSTQGQATFQQLLDHHDPS  
KGTFSQRYWWSTEFWGGPGSPVILFTPGEVAADGYQG YLTNKTLTGHYAQEVQAAVV  
LVEHRYWGGSSPYKNLTAETLQYLTLEQSILDFTHFAKTVQLQFDNSTRSNAQRAPWVF  
VGGSYSGALAAWTEATAPGTFWAYHATSAPVEAIYDFWQYFEPVREGMPQNC SKDVS  
LVANYIDGLGKNGTTREKQAVKELFGLGDLEYDDFAAIFPIGPWSWQSNSFITGYSDF  
YQFCDSVENVKAGAPVVPGPEGVGLLKALAGYAKWFNSTALPGYCASYGYWTDERSIS  
CFDTHNASSPLFTDTSVANGMDRQWQWFLCNEPFFYWQDGAPEGKTTIVPRTVSAEYW  
QRQCPLFFPTVNGHTYGS AKGKNAATVNAYTGGWSRTNTSRLIWTNGQYDPWLDSGV  
SSRFRPGGPLESTAAAPVQVIPGGFHCSLDLYMTSYAVNDGVKKVVDNEVAQIKAWIGE  
YYK

图9

<SEQ ID NO:7 AalPro2 前体蛋白; PRT; 艾伯特曲霉 >

MHFASSARAVALLASLTHAIRPPRPVPPPVSQVSAQLSAVGGQATFEQLLDHHDASKG  
VFSQRYWWSTEYWGGPGSPVVLFTPGEAADGYEGYLTNNTLTGLYAQEIQGAVVLIE  
HRYWGESSPYDQLTAETLQHLTLEQSILDLTYFAENVNLEFDTTNSNAQDAPWVLVGG  
SYSGALAAWTEAVAPGTFWAYHATSAPVQAIYDFWQYFDPIRHGMAPNCSRVDVSLVA  
NHVDNVGKNGSATQQQALKELFGLGALEHYDDFAAVLPLGPWEWQSNTFVTGYSRFF  
AFCDAVENVEAGAAAVPGPEGVGLQKALTGYAKWFKSTILPGYCANYGYWTDKMSV  
ACFDTHDKSSPLFTDTSVKNAMDRQWQWFLCNEPFFWWQDGAPEGVPTIVPRTVDAA  
YWQRQCSLFFPEVNGFTYGSACKGKTADTVNDWTGGWSDTNNSTHLLWVNGQYDPWL  
DSGVSSTYRPGGPLKSTAEAPVLVIPGSFHCSDLNKNYYANSGVKQVVDSAVAQIKSW  
VDEYYK

图10

<SEQ ID NO:8 AcoPro2 前体蛋白; PRT; 核心曲霉 >

MHFASPLRVVAFLASWPLLTHAFRPPRPVPLVSRPDSTQLLTAGGQATFEQLLDHHDPS  
KGTFAQRYWWSTEHWGGPGSPVILFTPGEAADGYGGYLTNNTLTGLYAQEIQGAVILI  
EHRYWGDSSPYKELTAETLQYLTLEQSILDLTHFAQTVNLEFDPSNRSTASKAPWVLVG  
GSYSGALTAWTEAIAPGTFWAYHATSAPVEAVYDFWQYFDPIRHGMAPNCSRVDVSLVA  
NYVDGVGRNGSATEKQALKELFGLGALEHYDDFAAVLPAGPYLWQSNTFTTGYSDFFA  
FCDAVENVEAGAAIVPGPEGVGLQKALMGYANWFNSTILPGHCADYGYWTDTWSVAC  
YDTYDPHGALFADTSVRNAADRQWQWFLCNEPFFWWQDGAPEGVPTIVPRTVDAAAY  
WQRQCSLFFPEVNGYTYGSACKGKTAATVNDWTGGWFETKNTTRLLWVNGQYDPWRS  
SGVSSINRPGGPLQSTPNPQVIPGGFHCSDLYMNDYHANPGLKTVVDNAVQTIRSWV  
AEYYK

图11

<SEQ ID NO:9 AwePro2 前体蛋白; PRT; 温特曲霉 >

MRFSAVALLASCTWASLATAIRPPKPVPRPVSRSSTFEGQATFDQLLDHHHPEKG  
TFSQRYWWSTEFWGGPGSPVVLFTPGEESADGYEGYLTNNTLTGVYAQEIQGAVILIEH  
RYWGGSSPYENLTAETLQYLTLEQSILDLTYFAKTVKLEFDNFNGSSNAQKAPWVLVGGSS  
YSGALTAWTEAISPGETFWAYHATSAPVEAIYDFWQYFYPIQQGMAQNCSKDVSLVAEYI  
DHVGKTGSAKEQQDIKELFGLGALEHYNDFAAVLPIGPYLWQENTFSSGYSDFFQFCDS  
VENVEAGAAVVPGPEGVGLEKALKGYAKWFNTTMLPGYCADYGYWKDEWSVACFDT  
HNASSPLFTDTSVENQMDRQWQWFLCNEPFFWWQDGAPENVSTIVPRTVDAAYWQRQ  
CSLFFPETNGYKYGSAKNKTASTVNDWTDGWFLTKNTTRLIWTNGQYDPWRDSGVSS  
AFRPGGPLVSTPNPQIIPGGFHCSDLYIKDATANAGVKKVVDTEVAQIKAWVDEEYK

图12

<SEQ ID NO:10 AbrPro1 前体蛋白; PRT; 黑曲霉 >

MRSFSAVAAAALALSWASLAQAARPLAPKPISRPASSKSAATTGKAYFEQLLDHHNPE  
KGTFSQRYWWSTEYWGPGSPVVLFTPGEVSADGYEGYLTNETLTGVYAQEIQGAVILI  
EHRYWGDSSPYDVLNAETLQYLTLDQSILDMTYFAETVKLQFDNSSRSNAQNAPWVM  
VGGSSYSGALTAWTESIAPGETFWAYHATSAPVEAIYDFWQYFYPIQQGMAQNCSKDVSL  
VAEYVDKVGKNGTAKEQQALKEKFGLGALEHYDDFAAVLPNGPYLWQDNDFATGYSS  
FFEFCDAIEGVEAGAAVTPGPEGVGLEKALANYANWFNSTILPDYCASGYWTDEWSV  
ACFDSYNASSPLFTDTSVDNAVDRQWEWFLCNEPFFWWQDGAPEGTSTIVPRLVSASY  
WQRQCPLYFPEVNGYTYGSAKGKNSATVNSWTGGWDMTRNTTRLIWTNGQYDPWRD  
SGVSSSTRPGGPLVSTANEPVQVIPGGFHCSDLYMQDYVNEGVRKVVNNEVKQIKEW  
VEEYVA

图13

<SEQ ID NO:11 AscPro5 前体蛋白; PRT; 菌盘曲霉 >

MRSFSAVAAAALAVSWASLAQAARPRLAPKPVSRPASSTSAATTGEAYFEQLVDHHNP  
 EKGTFSQRYWWSTEYWGGPGSPVVLFTPGEVSADGYEGYLTNETLTGVYAQEIQGAVI  
 LIEHRYWGDSSPYEVLNAETLQYLTLTDQAVLDMTYFAETVKFQFDNSTRSNAQNAPWV  
 MVGGSYSGALTAWVESVAPGTFWAYHATSAPVEAIYDFWQYFYPI SQGMAQNC SKDV  
 SLVAEHVDKVGKTGTAE EQQKLKELFGLGALEHYDDFAAVLPNGPYLWQDNDFVTGY  
 SEFFQFCDAVEGVEAGAAVTPGPEGVGLKALANYANWFNSTMLPNYCASYGYWSDE  
 WSVACFDSYNASSPLFTDTSVGN AVDRQWEWFLCNEPFFWWQDGAPENVTTIVPRLVS  
 AEYWQRQC SLYFPETNGYTFGSAQNKTAATVNDWTGGWFETRNTTRLIWTNGQYDPW  
 RDSGVSSTFRPGGQLVSTANEPVQIIPGGFHCSDLYMEDYYANAGVRKVVDNEVAQIKK  
 WVAEY YA

图14

GC 测定-剂量曲线

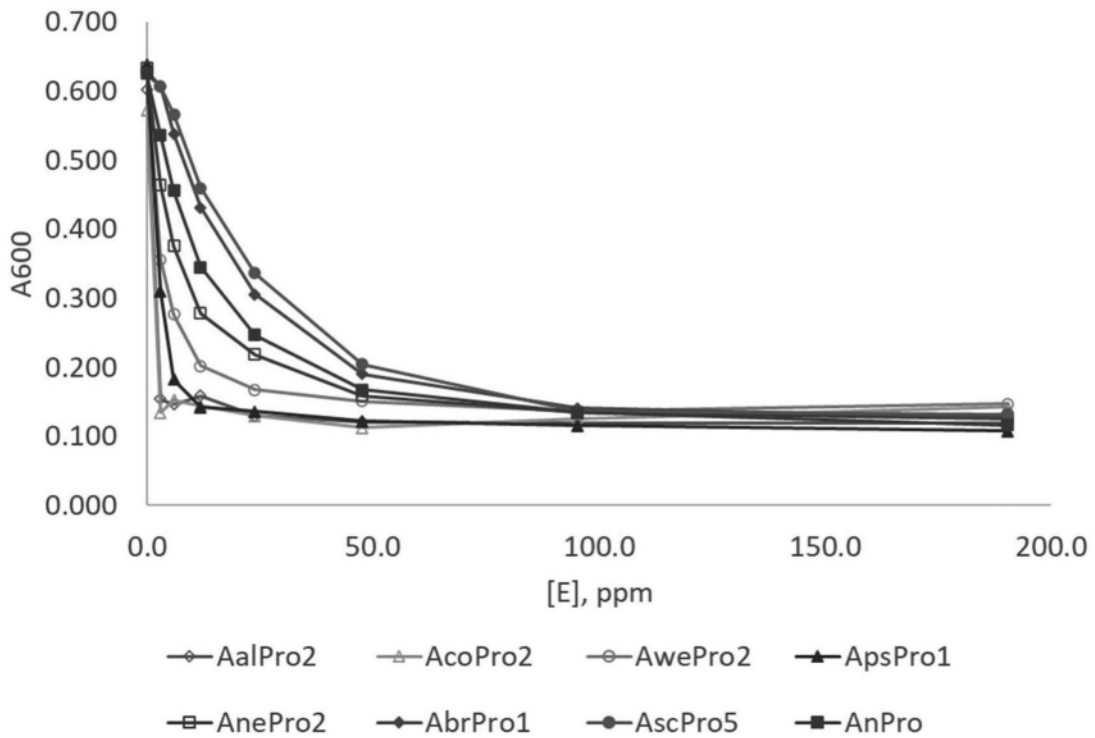


图15

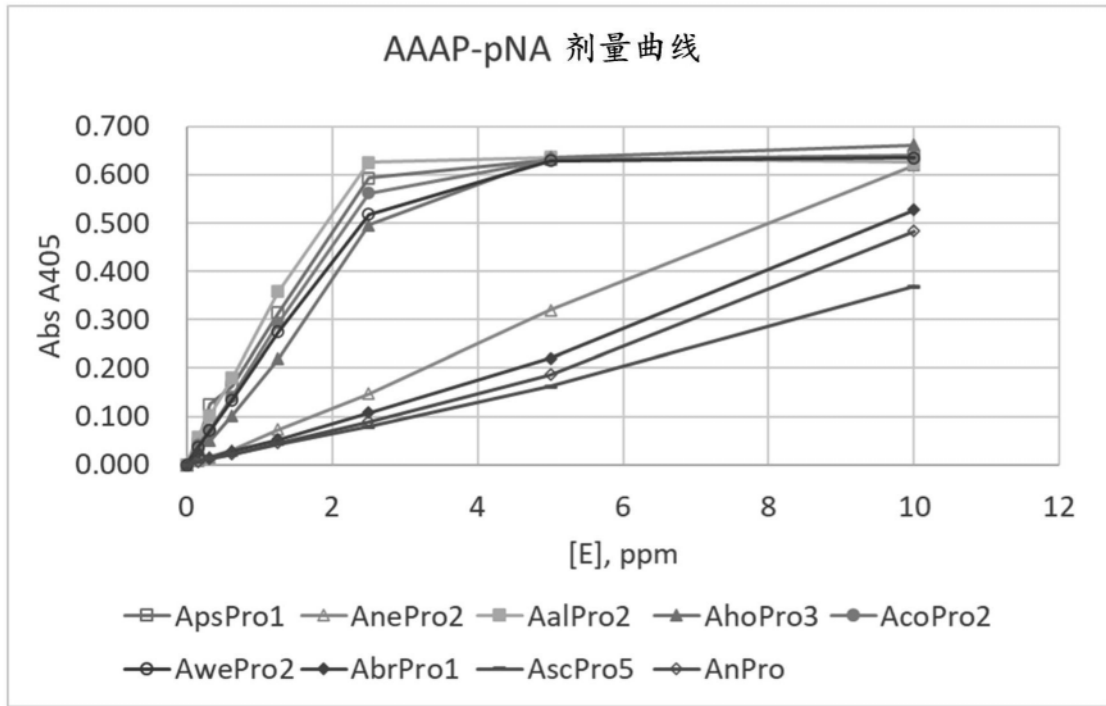


图16



<SEQ ID NO:13 全长 MorPro1 前体 ;PRT; 稻瘟病菌 >  
MLFLSSLLLLALS GAPAYAVRVGNLLEPPMPPPPFAIEDIEDIDPKQLTKRKISSGFFDQYID  
HSNPSLGTFRQKFWWSDEFYKGPSPVILFNPGESRADIYTGYLTLNLTVPGMYAQAVGA  
AVVMLEHRYWGESSPFANLSTKNMQYLTLNNSISDTTRFARQVKLPFDTS GATNAPNA  
PWV FVGGSYPGALAGWVESVAPGTFWAYHASSAVVQDIGDYWRYFSPINEGMPKNCS  
ADIGRVVEHIDKVLGTGSDSDKSALQTAFLGLSLEHDDFVETLANGPYLWQGIDFSTGY  
SDFFKCDYVENVPPKAA TRVPPGVDGVGLEKALTGYQDWIKKEYLPTACDSLGYPKG  
DLGCLSSHNF SAPFYRDQTVLNPGNRQWFWFLCNEPFKFWQNGAPKGEPSIVSRIIGSKY  
FESQCALWFPDEPREGGVYTYGIAEGKDVASVNKFTGGWDHTDTKRLWVNGQFDP  
WLHATVSSPSRPGGPLQSTDKAPVLVIPGGVHCTDLIIRNGDANEGARKVQSQAREI IKK  
WVSEFPKSGKSP

图18

<SEQ ID NO:14 MorPro1 预测的成熟酶; PRT; 稻瘟病菌 >  
VRVGNLLEPPMPPPPFAIEDIEDIDPKQLTKRKISSGFFDQYIDHSNPSLGTFRQKFWWSDE  
FYKGPSPVILFNPGESRADIYTGYLTLNLTVPGMYAQAVGAAVVMLEHRYWGESSPFA  
NLSTKNMQYLTLNNSISDTTRFARQVKLPFDTS GATNAPNAPWV FVGGSYPGALAGWV  
ESVAPGTFWAYHASSAVVQDIGDYWRYFSPINEGMPKNCSADIGRVVEHIDKVLGTGS  
DSDKSALQTAFLGLSLEHDDFVETLANGPYLWQGIDFSTGYSDFFKCDYVENVPPKAA  
TRVPPGVDGVGLEKALTGYQDWIKKEYLPTACDSLGYPKGDLGCLSSHNF SAPFYRDQ  
TVLNPGNRQWFWFLCNEPFKFWQNGAPKGEPSIVSRIIGSKYFESQCALWFPDEPREGG  
GVYTYGIAEGKDVASVNKFTGGWDHTDTKRLWVNGQFDPWLHATVSSPSRPGGPLQ  
STDKAPVLVIPGGVHCTDLIIRNGDANEGARKVQSQAREI IKKWVSEFPKSGKSP

图19

<SEQ ID NO:15 编码全长MorPro1的合成核苷酸序列; DNA; 人工序列 >

ATGCTCTTTCTGAGCTCCCTCCTGCTGCTCGCTCTCAGCGGCGCTCCCGCCTACGCCG  
TT  
CGAGTTGGCAACCTCCTGGAGCCTCCCATGCCTCCTCCCTTTGCTATTGAGGACATC  
GAA  
GACATTGACCCTAAGCAGCTCACCAAGCGAAAAATCAGCAGCGGTTTCTTCGACCA  
GTAC  
ATCGACCACTCCAACCCAGCCTCGGTACTTTCCGCCAAAAGTTTTGGTGGTCCGAC  
GAG  
TTCTACAAGGGCCCCGGTTCCCCCGTCATCCTGTTCAACCCTGGCGAAAGCCGCGCT  
GAT  
ATCTACACCGGCTATCTGACTAACCTACCGTCCCCGGCATGTACGCTCAAGCCGTC  
GGT  
GCTGCCGTTGTCATGCTGGAGCACCGCTATTGGGGCGAGTCCAGCCCCTTCGCCAAT  
CTC  
TCCACCAAGAACATGCAGTACCTGACCCTCAACAACAGCATTAGCGACACCACCCG  
CTTT  
GCCCCGCCAGGTCAAGCTGCCCTTTGACACCTCCGGCGCCACCAATGCTCCTAATGCC  
CCC  
TGGGTCTTTGTCGGTGGTAGCTATCCTGGTGCCCTGGCCGGTTGGGTCGAGAGCGTT  
GCT  
CCTGGCACCTTCTGGGCCTATCATGCCAGCTCCGCCGTCGTTCAAGATATCGGCGAC  
TAT  
TGGCGCTACTTTAGCCCCATCAACGAGGGCATGCCTAAAAACTGCAGCGCCGACAT  
CGGT  
CGCGTCGTCGAACACATCGATAAGGTCCTGGGTACCGGCTCCGACAGCGATAAGAG  
CGCC  
CTGCAGACCGCTTTCGGCCTCGGCAGCCTGGAACACGACGACTTCGTCGAGACCCTC  
GCC

图20

AACGGCCCCTACCTCTGGCAGGGCATCGACTTCAGCACTGGCTACAGCGACTTCTTC  
 AAG  
 TTCTGCGACTACGTGCGAGAATGTCCCTCCCAAGGCCGCCACTCGCGTTCCTCCCGGC  
 GTC  
 GACGGCGTCGGCCTGGAGAAGGCCCTGACCGGTTACCAGGACTGGATCAAGAAGGA  
 GTAC  
 CTCCCACCGCCTGCGATTCCCTCGGCTACCCCAAAGGCGATCTCGGTTGCCTCAGC  
 TCC  
 CACAATTCTCCGCCCCTTTCTACCGCGATCAGACCGTCCTCAACCCCGGTAATCGC  
 CAG  
 TGGTTCTGGTTCCTCTGCAACGAGCCCTTCAAGTTCTGGCAAAACGGCGCCCCCAAG  
 GGC  
 GAGCCCAGCATCGTCAGCCGATTATTGGCAGCAAGTACTTCGAGTCCCAGTGCGCC  
 CTC  
 TGGTTTCCCGATGAGCCCCGCGAGGGCGGCGGTGTTTATACTTACGGCATCGCCGAA  
 GGT  
 AAGGATGTGCGCCAGCGTCAATAAGTTTACTGGCGGCTGGGACCATACTGACACCAA  
 ACGC  
 CTCCTGTGGGTAAACGGCCAGTTCGACCCCTGGCTCCACGCCACTGTCAGCAGCCCT  
 AGC  
 CGACCCGGTGGCCCCCTCCAGAGCACTGACAAGGCCCTGTCTCGTTATTCCCGGC  
 GGC  
 GTCCACTGCACCGATCTCATCATCCGCAACGGCGACGCTAACGAAGGCGCTCGCAA  
 GGTT  
 CAAAGCCAGGCCCGCGAGATCATTAAGAAGTGGGTCAGCGAGTTTCCTAAAAGCGG  
 CAAG  
 TCCCCCTAA

图20-续

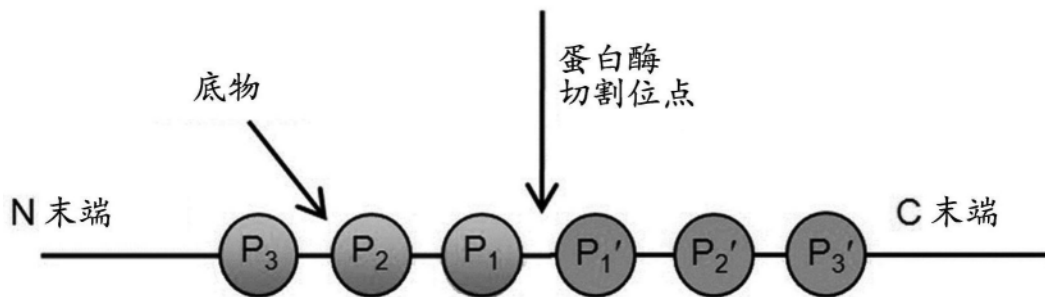


图21A

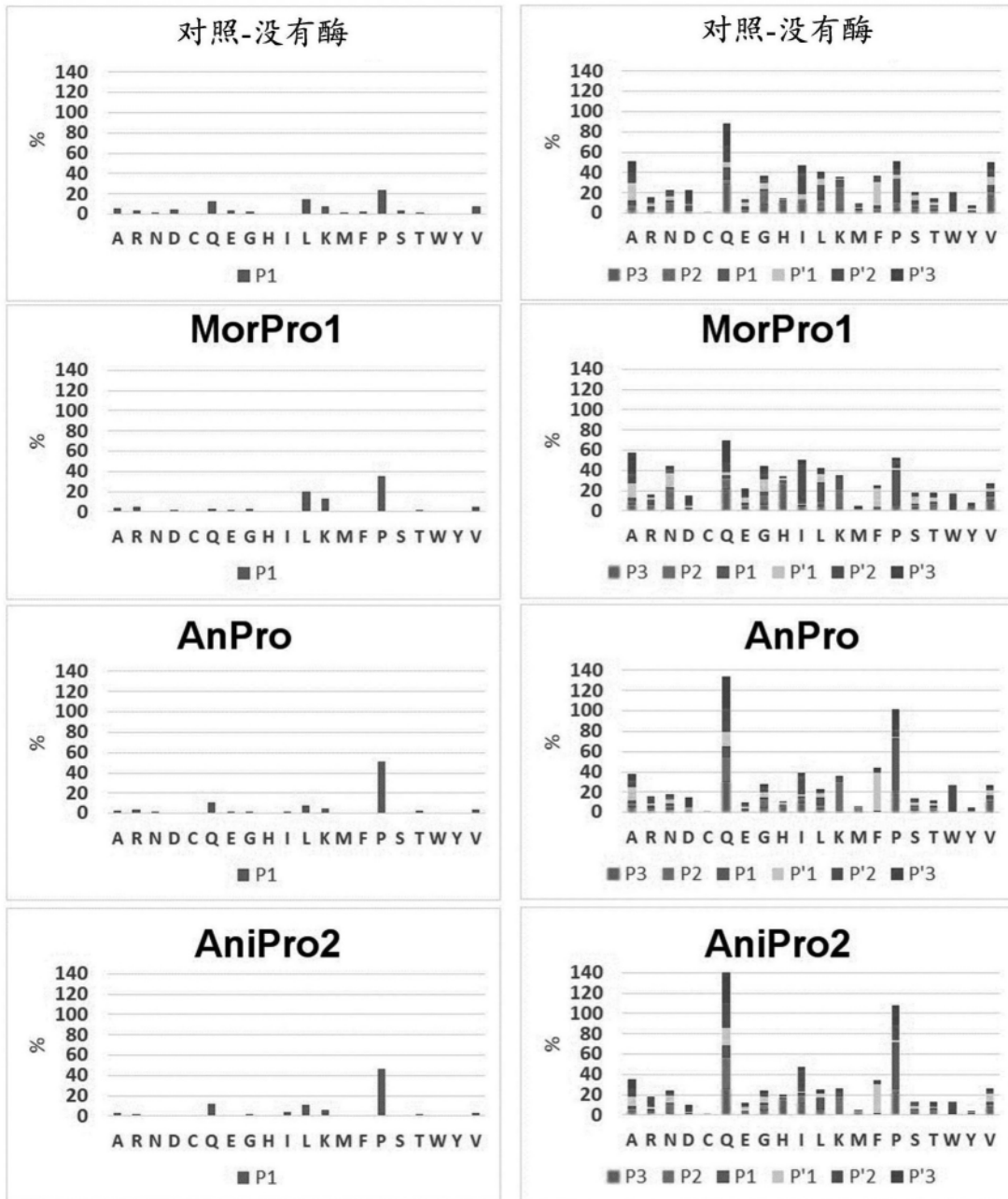


图21B

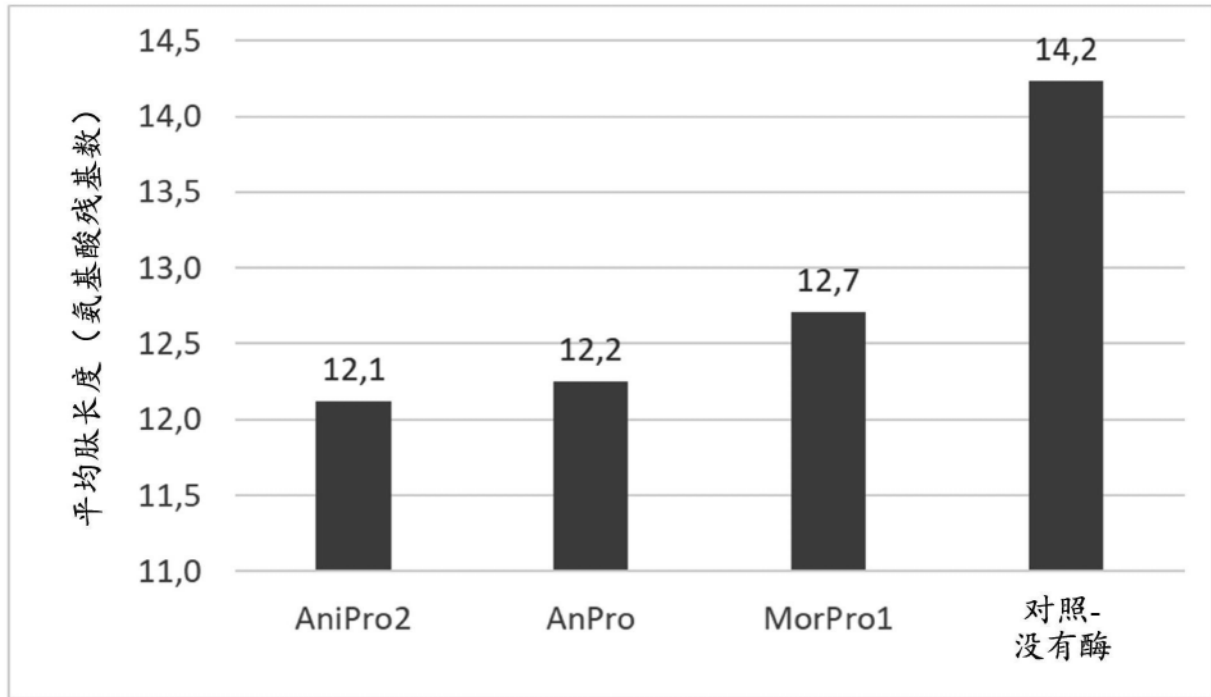


图22

<SEQ ID NO:16 AniPro\_2 成熟蛋白质; PRT; 黑曲霉 >

KSAATTGEAYFEQLLDHHNPEKGTFSQRYWWSTEYWGGPGSPVVLNPNGEVSADGYE  
 GYLNTDLTGAVYAQEIQGAIVLIEHRYWGDSSPYEVLNAETLQYLTLTLDQSILDMTYFAE  
 TVKLQFDNSSRSNAQNAPWVMVGGSYSGALTAWTESIAPGTFWAYHATSAPVEAIYDF  
 WQYFYPIQQGMAQNCSDVSLVAEYVDKIGKNGTAKEQQELKELFGLGAVEHYDDFA  
 AVLPNGPYLWQDNDVFTGYSSFFQFCDAVEGVEAGAAVTPGPEGVGLKALANYANW  
 FNSTILPNYCASYGYWTDEWSVACFDSYNASSPIFTDTSVGNPVDRQWEWFLCNEPFFW  
 WQDGAPEGTSTIVPRLVSASYWQRQCPLYFPEVNGYTYGSAKGKNSATVNSWTGGWD  
 MTRNTTRLIWTNGQYDPWRDSGVSSTFRPGGPLVSTANEPVQIIPGGFHCSDLYMEDYY  
 ANEGVRKVVVDNEVKQIKWVEEYYA

图23