(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 102146362 A
(43)申请公布日 2011.08.10

(21)申请号 200910253758.5

(22)申请日 1996.03.18

(30)优先权数据
0272/95 1995.03.17 DK
0888/95 1995.08.08 DK
0885/95 1995.08.08 DK
0886/95 1995.08.08 DK
0887/95 1995.08.08 DK
0137/96 1996.02.12 DK

(62)分案原申请数据
96193494.8 1996.03.18

(83)生物保藏信息
CBS 282.96 1996.03.12
CBS 283.96 1996.03.12
DSM 10588 1996.03.13
CBS 284.96 1996.03.12
DSM 10587 1996.03.13
CBS 285.96 1996.03.12
CBS 478.94 1994.09.28
DSM 9770 1995.02.24
DSM 10080 1995.06.30
DSM 10081 1995.06.30
DSM 10082 1995.06.30
DSM 10511 1996.02.02
DSM 10512 1996.02.02
DSM 10571 1996.03.06
DSM 10576 1996.03.12
DSM 10583 1996.03.13
DSM 10584 1996.03.13
DSM 10585 1996.03.13
DSM 10586 1996.03.13
CBS 270.96 1996.03.12
CBS 271.96 1996.03.12
CBS 272.96 1996.03.12
CBS 273.96 1996.03.12
CBS 274.96 1996.03.12
CBS 275.96 1996.03.12
CBS 276.96 1996.03.12
CBS 277.96 1996.03.12
CBS 278.96 1996.03.12
CBS 279.96 1996.03.12
CBS 280.96 1996.03.12
CBS 281.96 1996.03.12

(71)申请人 诺沃奇梅兹有限公司
地址 丹麦鲍斯韦

(72)发明人 M·肖莱恩 L·N·安德森 S·F·拉森 M·S·考皮宁 L·朗厄 R·I·尼尔森 M·伊哈拉 S·塔卡基

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038
代理人 罗菊华

(51)Int.Cl.
C12N 9/42(2006.01)
C12N 15/56(2006.01)
C12N 15/63(2006.01)
C12N 1/15(2006.01)
C12N 1/19(2006.01)
C12N 1/21(2006.01)
C12N 5/10(2006.01)

(续)

权利要求书 1 页 说明书 145 页 附图 8 页

CN 102146362 A

(54)发明名称

新的内切葡聚糖酶

(57)摘要

一种在洗涤剂,洗涤,纺织和造纸纸浆应用中性能良好的酶制剂,该制剂实质上由具有溶纤活性的酶组成,所述酶包含具有序列Thr Arg X3 X4 AspCys Cys X8 X9 X10 Cys X12 Trp X14(其中X3和X4各自分别是Trp、Tyr或Phe;X8是Arg、Lys或His;X9、X10、X12和X13各自是20个天然氨基酸残基中的任何一个)的14个残基的第一氨基酸序列和具有序列TrpCys Cys XX4 Cys(其中XX4是20个天然氨基酸残基中的任何一个)的5个残基的第二氨基酸序列,其条件是在第一氨基酸序列中,(i)当X12是Ser时,X14不是Ser,和(ii)当X12是Gly时,X14不是Ala。

[转续页]

[接上页]

(51)Int.Cl.

C11D 3/386(2006.01)
D06M 16/00(2006.01)
D06P 5/02(2006.01)
D06P 5/15(2006.01)
D21H 11/20(2006.01)
D21C 9/00(2006.01)
C12S 3/04(2006.01)
C12S 3/08(2006.01)
C12S 11/00(2006.01)

1. 一种显示内切葡聚糖酶活性的酶，该酶

a) 具有 SEQ ID NO.17 所示的氨基酸序列；

b) 与 SEQ ID NO.17 所示氨基酸序列有至少 90％的等同性

c) 通过对 SEQ ID NO.17 所示氨基酸序列进行一个或多个氨基酸的取代，缺失或添加而获得的氨基酸序列；或

d) 在于 5×SSC 中 45℃下杂交和于 2×SSC 中 70℃下洗涤的条件下，与下列序列杂交的核酸序列所编码的多肽：

i) SEQ ID NO：16 中所示的 DNA 序列，

ii) 从大肠杆菌 DSM 10571 中的质粒获得的 DNA 序列，或

iii) 所述 i) 或 ii) 的序列的互补链。

2. 权利要求 1 所述的酶，其中该酶由 SEQ ID NO.17 所示的氨基酸序列组成，或由 SEQ ID NO.17 所示氨基酸序列经过一个或几个氨基酸的取代，缺失或添加而获得的氨基酸序列组成。

3. 权利要求 1 或 2 所述的酶，其中该酶得自 Volutellacolletotrichoides 的菌株。

4. 一种编码权利要求 1-3 任一项所述的酶的 DNA 序列。

5. 一种 DNA 构建体，该构建体包含权利要求 4 所述的 DNA 序列。

6. 一种重组表达载体，该载体包含权利要求 5 所述的 DNA 构建体。

7. 一种细胞，该细胞包含权利要求 5 所述的 DNA 构建体或权利要求 6 的重组表达载体。

8. 一种用于制备权利要求 1-3 任一项所述的酶的方法，该方法包括在可以产生所述酶的条件下，培养按照权利要求 7 所述的细胞，并从培养物中回收所述的酶。

9. 一种使要洗的衣物颜色澄清的方法，该方法包括用包含权利要求 1-3 任一项所述的酶的制剂的浸泡、洗涤或冲洗液体处理要洗的衣物。

10. 权利要求 9 的方法，其中所说的内切葡聚糖酶在机器循环使用条件下，以每升液体 1 到 1000S-CEVU 的有效量存在于浸泡、洗涤或冲洗液体中。

11. 一种洗衣组合物，该组合物包含用权利要求 1-3 任一项所述酶的制剂，以及选自表面活性剂、助洗剂化合物和织物软化剂的化合物。

12. 权利要求 1-3 任一项所述的酶在降解或修饰植物材料上的用途。

13. 权利要求 1-3 任一项所述的酶在处理织物原料或织物中的用途。

14. 权利要求 1-3 任一项所述的酶在处理纸浆中的用途。

新的内切葡聚糖酶

[0001] 本申请是申请日为 1996 年 3 月 18 日、申请号为 96193494.8、发明名称为“新的内切葡聚糖酶”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 本发明涉及新的酶制剂，该酶制剂包含显示内切葡聚糖酶活性的酶，其在工业应用（如洗衣组合物、生物抛光 (biopolishing) 新制造的织物、提供纤维素织物或衣物磨损的外观和处理纸浆）中性能良好。此外，本发明涉及编码这种酶的 DNA 构建体、提供编码这种酶的基因的方法、产生所述酶的方法、包含这种酶的酶制剂以及这些酶在许多工业应用中的用途。

[0003] 发明背景

[0004] 纤维素酶或溶纤酶是涉及纤维素水解的酶。在天然纤维素的水解中，已知涉及三种主要类型的纤维素酶，即纤维二糖水解酶 (1,4-β-D- 葡聚糖纤维二糖水解酶 EC 3.2.1.91)、内切 -β-1,4- 葡聚糖酶（内切 1,4-β-D- 葡聚糖 4- 葡聚糖水解酶 EC 3.2.1.4) 和 β- 葡萄糖苷酶 (EC 3.2.1.21)。

[0005] 纤维素酶由大量微生物（包括真菌，放线菌，粘细菌和真细菌）合成，也由植物合成。已鉴别了各种特异性的特定的内切葡聚糖酶。

[0006] 溶纤酶的一种十分重要的工业用途是用来处理纤维素织物原料或织物，例如作为洗涤剂组合物或织物软化剂组合物中的组分、用于生物 - 抛光新织物（衣物修饰）和用于获得含纤维素织物（尤其斜纹粗棉布）的 " 石洗 (stone-washing)" 外观。在例如下列文献中提出了几种这样的处理方法 :GB-A-1368599，EP-A-O 307564 和 EP-A-O 435876，WO 91/172431WO 91/10732，WO 91/17244，PCT/DK95/000108 和 PCT/DK95/00132。

[0007] 溶纤酶的另一个重要的工业用途是用于纸浆处理，例如为了改善导液 (drainage) 或使再利用纸脱墨。

[0008] 尤其是，对所论及的工业用途而言，内切葡聚糖酶 (EC 3.2.1.4) 构成了有意义的一组水解酶。内切葡聚糖酶催化下列键的内切水解 :纤维素、纤维素衍生物（如羧基甲基纤维素和羟乙基纤维素）、地衣淀粉中的 1,4-β-D- 配糖键 ;混合的 β-1,3 葡聚糖（如谷类 β-D- 葡聚糖或木糖葡聚糖）和其它含纤维素部分的植物材料中的 β-1,4 键。公认的名称是内切 -1,4-β-D- 葡聚糖 4- 葡聚糖基 (glucano) 水解酶，本发明中使用缩写术语内切葡聚糖酶 (endoglucanase)。可以参见 T.-M.Enveri，" 微生物纤维素酶 " W.M.Fogarty，微生物酶和生物技术，应用科学出版社，p.183-224(1983) ;酶学方法，(1988)Vol.160，p.200-391(Wood,W.A. 和 Kellogg,S.T. 编）;Béguin,P.，" 纤维素降解的分子生物学，微生物学年评 (1990)，Vol.44，pp.219-248 ;Béguin,P. 和 Aubert,J-P.，" 纤维素的生物降解 "，FEMS 微生物学回顾 13(1994)p.25-58 ;Henrissat,B.，" 纤维素酶和它们与纤维素的相互作用 "，纤维素 (1994)，Vol.1，pp.169-196。

[0009] 许多出版物中已描述了真菌内切葡聚糖酶，特别是来源于例如尖镰孢、Trichoderma reesei，Trichoderma longibrachiatum，棘孢曲霉，Neocallimastix patriciarum 和例如 Piromyces、腐质霉属，毁丝霉属，Geotricum，青霉属，耙菌属，鬼伞属的种的那些内切葡聚糖酶。

[0010] 例如，真菌内切葡聚糖酶已由下列文献描述：Sheppard P.O.，等，用保守纤维素酶家族－特异性的序列从尖镰孢克隆纤维素酶同系物 cDNA，基因，(1994)，vol.15，pp.163-167；Saloheimo，A.，等，″在酵母中表达的 Trichoderma reesei 的新小内切葡聚糖酶基因 egl5″，分子微生物学，(1994)vol.13(2)，pp.219-228；van Arsdell，J.N. 等，(1987)，Trichoderma reesei 在啤酒糖酵母内切葡聚糖酶 I 的克隆，特征确定和表达，生物／技术 5：60-64；Penttilä，M. 等，(1986)，″ Trichoderma reesei 纤维素酶基因之间的同源性：内切葡聚糖酶 I 基因的完整的核苷酸序列″，基因 45：253263；Saloheimo，M. 等，(1988)，″ EGIII，一种新的 Trichoderma reesei 内切葡聚糖酶：基因和酶两者的鉴定″，基因 63：1121；Gonzales，R. 等.，″ Trichoderma longibrachiatum egl1 基因的克隆、序列分析和酵母表达″，应用微生物学和生物技术，(1992)，vol.38，pp.370-375；Ooi，T. 等棘孢曲霉纤维素酶 (FI-CMCase)cDNA 的克隆和序列分析″，Curr.Genet.，(1990)，vol.18，pp.217222；Ooi，T. 等，编 码棘孢曲霉纤维素酶 (FI-CMCase) 的基因的完整的核苷酸序列″，核酸研究，(1990)，vol.18，No.19，P.5884；Xue，G. 等，″ 多种厌氧瘤胃真菌 Neocallimastix patriciarum 纤维素酶 cDNA 在大肠杆菌中的克隆和表达″，J.Gen.Microbiol.，(1992)，vol.138，pp.1413-1420；Xue G. 等，″ 编码具有高内切葡聚糖酶、纤维二糖水解酶和木聚糖酶活性的三个多功能催化区的 Neocallimastix patriciarum 的新的多糖类水解酶 cDNA(celD)″，J.Gen.Microbiol.，(1992)，vol.138，pp.2397-2403；Zhou，L. 等，″ 来源于厌氧真菌 Neocallimastix patriciarum 的编码模式家族内切葡聚糖酶的无内含子 celB″，生物化学杂志，(1994)，vol.297，pp.359364；Dalbφge，H. 和 Heldt-Hansen，H.P.，″ 有效表达克隆真菌酶基因的新方法″，Mol.Gen.Genet.，(1994)，vol.243，pp.253260；Ali，B.R.S. 等，″ 厌氧真菌 Piromyces 纤维素酶和半纤维素酶构成多蛋白纤维素－结合复合物和由多基因族编码″，FEMS 微生物学通讯，(1995)，vol.125，No,1，pp.15′ -21。此外，日本 DNA 数据库（公众可从 Internet 上获得的 DDBJ 数据库）包括从微紫青霉克隆的编码内切葡聚糖酶的两个 DNA 序列（分别由 A.Koch 和 G.Mernitz 克隆）和从灰腐质霉变种 thermoidea 克隆的编码内切葡聚糖酶 DNA 序列（由 T.Uozumi 克隆）。两种 Macrophomina phaseolina 的内切葡聚糖酶已被克隆和测序，参见 Wang，H.Y. 和 Jones，R.W.：″ 植物致病真菌 Macrophomina phaseolina 的内切葡聚糖酶－编码基因的克隆，特征确定和功能性表达″，基因，158：125128，1995；和 Wang，H.Y. 和 Jones，R.W.：″ 从植物致病真菌 Macrophomina phaseolina 克隆的单一内切葡聚糖酶－编码基因″，应用和环境微生物学，61：2004-2006，1995。这些内切葡聚糖酶中的一个显示与真菌 Trichoderma reesei egl3 内切葡聚糖酶的高同源性，另一个显示与微生物植物病原体 Pseudomonas solanacearum egl1 的同源性，说明两种内切葡聚糖酶都属于糖基水解酶 5 族 (B.Henrissat，生物化学 J 280：309-316(1991))。Schauwecker F. 等 (1995) 公开了二态真菌玉米黑粉菌的纤维素酶基因的丝－特异性 (filament-specific) 表达。

[0011] WO 91/17243(Nordisk A/S) 公开了一种纤维素酶制剂，该制剂由与抗高度纯化的 43kDa 内切葡聚糖酶（得自 Humicola insolens DSM1800）的抗体免疫反应性的同源内切葡聚糖酶组成。WO 91/17244(Nordisk A/S) 公开了一种新的（半）纤维素降解酶，如内切葡聚糖酶、纤维二糖水解酶或 β－葡糖苷酶，其可以来源于非木霉属和展齿革菌属的真菌；WO 93/2019321 公开了可以从棘孢曲霉获得的内切葡聚糖酶；WO 94/21801(Genencor 公司）涉

及一种纤维素酶系统，该系统是从显示内切葡聚糖酶活性的 Trichodermalongibrachiatum 分离到的；WO 94/26880(Gist Brocades N.V.) 公开了一种分离的纤维素降解酶混合物（优选地是从木霉属、Rspergillus 或 Disporotrichum 获得的），其具有内切葡聚糖酶，纤维二糖水解酶和木糖葡聚糖酶活性；WO 95/02043(Nordisk A/S) 描述了一种具有内切葡聚糖酶活性的来源于 Trichoderma harzianum 的酶，该酶可以用于许多目的，包括例如植物细胞壁的降解或修饰。

[0012] 已知纤维素酶可以也可以不具有纤维素结合域 (CBD)。CBD 增加酶对包含纤维素纤维的结合，并增加酶的催化活性部分的功效。

[0013] 仍然需要提供可以用于需要纤维素酶尤其是内切葡聚糖酶活性的场合的新的纤维素酶制剂。

[0014] 本发明的目的是提供新的酶制剂，该酶制剂实质上在酸性、中性或碱性条件下具有溶纤活性，并在纸浆处理，织物处理和洗衣过程中或者在动物饲养中具有改进的功效，优选地是新的纤维素酶，更优选地是性能良好的内切葡聚糖酶的酶制剂，所述酶被尝试由重组技术生产或产生。

[0015] 发明概述

[0016] 令人惊奇地是，现已发现一组内切葡聚糖酶具有某些独特的特征，在通常使用内切葡聚糖酶的那些工业应用中性能良好。这些独特的特征可以以酶蛋白质氨基酸序列的保守区进行描述，本发明发现，具有某些保守区的溶纤酶（即显示溶纤活性的酶）在处理要洗的衣物、处理新制造的织物和处理造纸纸浆中十分有效。

[0017] 因此，本发明第一方面涉及一种酶制剂，该制剂实质上由具有溶纤活性的酶组成，所述酶包含具有以下序列的由 14 个氨基酸残基组成的第一氨基酸序列

[0018] Thr Arg Xaa Xaa Asp Cys Cys Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Trp Xaa

[0019] 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

[0020] 和具有以下序列的由 5 个氨基酸残基组成的第二氨基酸序列

[0021] Trp Cys Cys Xaa Cys

[0022] 1 2 3 4 5

[0023] 其中，

[0024] 在第一序列的 3 号位置上，氨基酸是 Trp、Tyr 或 Phe；

[0025] 在第一序列的 4 号位置上，氨基酸是 Trp、Tyr 或 Phe；

[0026] 在第一序列的 8 号位置上，氨基酸是 Arg、Lys 或 His；

[0027] 在第一序列 9、10、12 和 14 号的各位置上，在第二序列的 4 号位置上，氨基酸是 20 个天然氨基酸残基中的任何一个，其条件是在第一氨基酸序列中，(i) 当 12 号位置上的氨基酸残基是 Ser 时，14 号位置上的氨基酸残基不是 Ser，和 (ii) 当 12 号位置上的氨基酸残基是 Gly 时，14 号位置上的氨基酸残基不是 Ala。

[0028] 尽管在性能良好的内切葡聚糖酶内发现其它相当显著的变异，但可清楚识别保守区的这一惊人的发现是大量真菌 DNA 序列研究的结果，所述 DNA 序列编码具有有效的溶纤（尤其是内切葡聚糖酶）活性之酶的特定氨基酸序列。

[0029] 基于这一发现，开发了一种用于特异性筛选以编码本发明的酶为特征的基因组 DNA 或 cDNA 的分子方法。构建了作为其工具的三套简并引物。因此，本发明在其第二方面

涉及提供编码具有上述保守区之溶纤酶基因的方法。

[0030] 通过使用这种方法(即供基因组DNA PCR筛选的引物套),令人惊奇地发现编码所述酶的DNA可以从宽范围的真菌中发现,所述真菌属于分类学上很不相同的生物体,并且栖息于生态学上十分不同的小生境中。

[0031] 进一步地,通过使用这一方法,发现编码所述酶核心区(催化活性区或域)而无任何连接的纤维素结合域(CBD)之DNA序列已经可能,所述酶的核心区将不通过采用基于筛选方法的常规手段来选择。发明人经实验证实CBD区与本发明的酶核心区(包括所述酶的催化活性区或域)的连接导致多域酶的功效明显改善,例如,高出50倍的功效。

[0032] 因此,本发明提供了新的纤维素酶,尤其内切葡聚糖酶,以其天然形式或者同源或异源形式产生的这些酶在工业应用中具有改善的功效。

[0033] 另一方面,本发明涉及新的溶纤酶制剂,该制剂是可以从分类学上的特定门(phyli)、纲、目、科、属和种产生的,例如可以从担子菌门的(Basidiomycotous)层菌纲(Hymenomycetes)、接合菌门(Zygomycota)、壶菌门(Chytridiomycota);或从纲盘菌纲(Discomycetes)、腔菌纲(腔菌纲)、不整囊菌纲(Plectomycetes);Archaeascomycetes、半子囊菌纲(Hemiascomycetes)或者从间座壳目、炭角菌目(Xylariales)、假毛球壳目(Trichosphaeriales)、黑痣菌目(Phyllachorales)或从科丛赤壳科(Nectriaeae)、粪壳科(SordariaCeae)、毛壳科(Chaetomiaceae,)、Ceratostomaceae、毛球壳科(Lasiosphaeriaceae);或从属柱孢属(Cylindrocarpon)、粘帚霉属(Gliocladium)、周刺座霉属(Volutella)、Scytalidium、顶孢霉属(Acremonium)、或从种番茄镰孢(Fusariumlycopersicl)、Fusarium passiflora、腐皮镰孢(Fusarium solani)、蛇形镰孢(Fusarium anguioides)、早熟禾镰孢(Fusarium poae)、黑腐质霉(Humicola nigrescens)、灰腐质霉(Humicola grisea)产生的,尤其是实质上由包含选自以下序列的氨基酸序列的酶组成的那些:

[0034] Xaa Thr Arg Xaa Phe Asp Xaa

[0035] 1 2 3 4 5 6 7 ;

[0036] Xaa Thr Arg Xaa Tyr Asp Xaa

[0037] 1 2 3 4 5 6 7 ;和

[0038] Xaa Thr Arg Xaa Trp Asp Xaa

[0039] 1 2 3 4 5 6 7

[0040] 其中,在4号位置上,Xaa是Trp、Tyr或Phe;和

[0041] 在1和7号位置上,Xaa是20个天然氨基酸残基中的任何一个。

[0042] 更具体地说,本发明的酶制剂优选地是可以从以上提到的分类学上的特定门(phyli)、纲、目、科、属和种产生的,所述的所有微生物都产生内切葡聚糖酶,该酶包含具有以下序列的由13个氨基酸残基组成的第一肽

[0043] Thr Arg Xaa Xaa Asp Cys Cys Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Trp

[0044] 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

[0045] 和具有以下序列的由5个氨基酸残基组成的第二肽

[0046] Trp Cys Cys Xaa Cys

[0047] 1 2 3 4 5

[0048] 其中，在第一序列的 3 号位置上，氨基酸是 Trp、Tyr 或 Phe ；在第一序列的 4 号位置上，氨基酸是 Trp、Tyr 或 Phe ；在第一序列的 8 号位置上，氨基酸是 Arg、Lys 或 His ；在第一序列 9、10 和 12 号的各位置上，在第二序列的 4 号位置上，氨基酸是 20 个天然氨基酸残基中的任何一个。

[0049] 本发明另一方面提供了包含编码显示内切葡聚糖酶活性的酶的 DNA 序列之 DNA 构建体，所述 DNA 序列包含分别在 SEQ ID NO ：1、4、5、10、12、16 和 19 中所示的 DNA 序列或者它们的类似物。

[0050] 本发明也涉及包含本发明 DNA 构建体的重组表达载体 ；涉及包含本发明 DNA 构建体或重组表达载体的细胞 ；涉及产生本发明酶（例如，重组体酶）的方法 ；涉及通过使用本发明的酶使要洗的衣物颜色澄清的方法 ；涉及包含本发明的酶的洗衣组合物 ；涉及本发明的酶在降解或改性植物材料（例如细胞壁），处理织物原料、织物或衣物，处理纸浆中的用途 ；并涉及富含本发明的酶的酶制剂。

[0051] 附图简要描述

[0052] 图 1 是下列微生物的推定编码的氨基酸序列的序列对比 ：Acremoniumsp.(I)，Volutella colletotrichoides，Crinipellis scabella，Acremonium sp.(II)，Myceliophthora thermophila，Thielaviaterrestris，Macrophomina phaseolina。 用 Pileup 程序 (Feng 和 Doolittle 1987)(GCG 包，版本 8.0) 产生最好的序列对比。在至少四个序列中相同的残基（方框中）在相应的氨基酸周围表示出来。

[0053] 图 2 图 2a，b，c 说明在真菌界内的本文所讨论的所有微生物（其能够产生本发明的酶制剂和酶）的分类学分类。

[0054] 本文使用的分类学分类基于用于 ：NIH 数据库 (Entrez 1996 春天版）的系统，该系统可以从 World Wide Web ：(http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/htbin/ef/entrez TAX) 获得。

[0055] 对未包含在 Entrez 数据库中的生物体的分类，使用了下列一般可获得的和世界范围内接受的参考书 ：

[0056] 对于子囊菌纲 (Ascomycetes) ：Eriksson，O.E.&Hawksworth，D.L. ：子囊菌纲系统，vol 12(1993)。

[0057] 对于担子菌纲 (Basidiomycetes) ：Jülich，W，：担子菌纲的较高分类群，Bibliotheca Mycologia 85，485pp(1981)。

[0058] 对于接合菌纲 ：O′ Donnell，K. ：培养中的接合菌纲，佐治亚大学，美国，257pp(1979)。

[0059] 一般性的微生物学参考书 ：

[0060] Hawksworth，D.L.，Kirk，P.M.，Sutton，B.C. 和 Pegler，D.N. ：真菌词典，国际真菌学研究所，616pp(1995) ；

[0061] Von Arx，J.A，：培养中形成孢子的真菌属，424pp(1981)。

[0062] 迄今仍不清楚腐质霉属 (Humicola) 的分类学位置 (implacement)。然而，粪壳目 (Sordariales) 广泛选择的 18SRNA 的研究已给出腐质霉属归于粪壳目的有力的提示 (Taylor，Clausen&Oxenbφll，未发表）。此外，这些数据表明腐质霉属与蛾柱霉属 (Scytalidium) 一起与粪壳科、毛壳科，长喙壳科 (Ceratostomataceae) 和毛球壳科仅有相

当远的关系。依据上述，在这里将腐质霉属和 Scytalidium 置于粪壳目内，科未知。

[0063] 图 3 是推定的部分氨基酸序列的序列对比，所述序列来源于实施例 5 中描述的 46 种微生物中选择的 26 种。

[0064] 发明详述

[0065] 在本文中，术语“20 种天然氨基酸残基”指通常在蛋白质中发现的 20 种氨基酸残基，照惯例被认为是丙氨酸 (Ala 或 A)、缬氨酸 (Val 或 V)、亮氨酸 (Leu 或 L)、异亮氨酸 (Ile 或 I)、脯氨酸 (Pro 或 P)、苯丙氨酸 (Phe 或 F)、色氨酸 (Trp 或 W)、甲硫氨酸 (Met 或 M)、甘氨酸 (Gly 或 G)、丝氨酸 (Ser 或 5)、苏氨酸 (Thr 或 T)、半胱氨酸 (Cys 或 C)、酪氨酸 (Tyr 或 Y)、天冬酰胺 (Asn 或 N)、谷氨酰胺 (Gln 或 Q)、天门冬氨酸 (Asp 或 D)、谷氨酸 (Glu 或 E)、赖氨酸 (Lys 或 K)、精氨酸 (Arg 或 R)、和组氨酸 (His 或 H)。

[0066] 按照本发明，本发明提供了新的性能良好的内切葡聚糖酶，其包含保守氨基酸序列区，尤其是具有以下序列的由 14 个氨基酸残基组成的第一氨基酸序列

[0067] Thr Arg Xaa xaa Asp Cys Cys Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Trp Xaa

[0068] 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

[0069] 和具有以下序列的由 5 个氨基酸残基组成的第二氨基酸序列

[0070] Trp Cys Cys Xaa Cys

[0071] 1 2 3 4 5

[0072] 其中，

[0073] 在第一序列的 3 号位置上，氨基酸是 Trp、Tyr 或 Phe ；

[0074] 在第一序列的 4 号位置上，氨基酸是 Trp、Tyr 或 Phe ；

[0075] 在第一序列的 8 号位置上，氨基酸是 Arg、Lys 或 His ；

[0076] 在第一序列 9、10、12 和 14 号的各位置上，在第二序列的 4 号位置上，氨基酸是 20 个天然氨基酸残基中的任何一个，其条件是在第一氨基酸序列中，(i) 当 12 号位置上的氨基酸残基是 Ser 时，14 号位置上的氨基酸残基不是 Ser，和 (ii) 当 12 号位置上的氨基酸残基是 Gly 时，14 号位置上的氨基酸残基不是 Ala。

[0077] 优选地，本发明的酶是微生物来源的，即是可以从微生物（如真菌）获得的。

[0078] 在一个优选的实施方案中，在第一序列的 9 号位置上的氨基酸残基选自脯氨酸、苏氨酸、缬氨酸、丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、半胱氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、酪氨酸、丝氨酸、甲硫氨酸和色氨酸，优选地选自脯氨酸和苏氨酸。

[0079] 在另一个优选的实施方案中，在第一序列的 10 号位置上的氨基酸残基选自脯氨酸、苏氨酸、缬氨酸、丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、半胱氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、酪氨酸、丝氨酸、甲硫氨酸和色氨酸，优选地是丝氨酸。

[0080] 在另一个优选的实施方案，在第一序列的 12 号位置上氨基酸残基选自脯氨酸、苏氨酸、缬氨酸、丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、半胱氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、酪氨酸、丝氨酸、甲硫氨酸和色氨酸，优选地选自丙氨酸和甘氨酸。

[0081] 在另一个优选的实施方案中，在第一序列的 14 号位置上的氨基酸残基选自脯氨酸、苏氨酸、缬氨酸、丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、半胱氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、酪氨酸、丝氨酸、甲硫氨酸、色氨酸、谷氨酸和天冬氨酸，优选地选自脯氨酸、苏氨酸、丝氨酸、丙氨酸、谷氨酸和天冬氨酸。

[0082] 优选地，在第二序列的 4 号位置上的氨基酸残基选自脯氨酸、苏氨酸、缬氨酸、丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、半胱氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、酪氨酸、丝氨酸、甲硫氨酸、色氨酸、谷氨酸和天冬氨酸，更优选地选自丙氨酸、甘氨酸和谷氨酰胺。

[0083] 更优选的实施方案的例子是这样的一些，其中，在第一序列中，第 3 号位置上的氨基酸残基是酪氨酸；或在第 4 号位置上的氨基酸残基是色氨酸；

[0084] 或在第 8 号位置上的氨基酸残基是赖氨酸。

[0085] 在一个特别优选的实施方案中，本发明的酶包括选自以下序列的氨基酸序列：

[0086] Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys Ala Trp

[0087] 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 ，

[0088] Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Thr Ser Cys Ala Trp

[0089] 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 ，

[0090] 和

[0091] Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys Gly Trp

[0092] 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 .

[0093] 在第二方面，本发明提供了用于发现和克隆编码这种酶的基因的方法，该方法包括在标准条件下与来源于任何保守区的寡核苷酸杂交（例如 PCR 扩增），如图 1 所说明的。

[0094] 一种有用的寡核苷酸包含编码包含在选自以下序列的肽中的至少五肽的核苷酸序列：

[0095] a.

[0096] Thr Arg Xaa Xaa Asp Cys Cys Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Trp Xaa

[0097] 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

[0098] 在 3 或 4 在号位置上的氨基酸是 Trp、Tyr 或 Phe；在 8 号位置上的氨基酸是 Arg、Lys 或 His；在 9、10、12 和 14 号位置上的氨基酸分别是 20 个天然氨基酸残基中的任何一个；和

[0099] b.

[0100] Trp Cys Cys Xaa Cys Tyr

[0101] 1 2 3 4 5 6

[0102] 在 4 号位置上的氨基酸是 20 个天然氨基酸残基中的任何一个；和

[0103] c.

[0104] Xaa Pro Gly Gly Gly Xaa Gly Xaa Phe

[0105] 1 2 3 4 5 6 7 8 9

[0106] 1 号位置上的氨基酸是 Met 或 Ile；6 和 8 号位置上的氨基酸分别是 Leu、

[0107] Ile 或 Val；和

[0108] d.

[0109] Gly Cys Xaa Xaa Arg Xaa Asp Trp Xaa

[0110] 1 2 3 4 5 6 7 8 9

[0111] 在 3 号位置上的氨基酸是 20 个天然氨基酸残基中的任何一个；在 4 和 6 号位置上的氨基酸分别是 Trp、Tyr 或 Phe；并且

[0112] 在 9 号位置上的氨基酸是 Phe 或 Met。

[0113] 所述有用的寡核苷酸也包括与以上所述序列互补的核苷酸序列。

[0114] 在本发明的方法的一个优选的实施方案中，所述寡核苷酸相应于选自以下 PCR 引物的 PCR 引物：

[0115] 有义，

[0116] 5’-CCCCAAGCTTACI$^{A}/_{C}$GITA$^{C}/_{T}$TGGGA$^{C}/_{T}$TG$^{C}/_{T}$TG$^{C}/_{T}$AA$^{A}/_{G}{}^{A}/_{C}$C-3’

[0117] 反义 1，

[0118] 5’CTAGTCTAGATA$^{A}/_{G}$CAIGC$^{A}/_{G}$CA$^{A}/_{G}$CACC-3’；

[0119] 反义 2，

[0120] CTAGTCTAGAAAIA$^{A}/_{G}/^{T}$ICCIA$^{A}/^{C}/^{G}$ICCICCICCIGG-3’；和

[0121] 反义 3，

[0122] 5’CTAGTCTAGAIAACCA$^{A}/_{G}$TCA$^{A}/_{G}{}^{A}/_{T}$ATC$^{G}/_{T}$CC-3.

[0123] 在第三方面，本发明提供了一种酶制剂，该制剂实质上由具有溶纤活性和具有发明人所发现的保守区的酶组成，该酶包含具有下列序列的由 7 个氨基酸序列组成的肽：

[0124] Xaa Thr Arg Xaa Phe Asp Xaa

[0125] 1 2 3 4 5 6 7

[0126] Xaa Thr Arg Xaa Tyr Asp Xaa

[0127] 1 2 3 4 5 6 7 ；和

[0128] Xaa Thr Arg Xaa Trp Asp Xaa

[0129] 1 2 3 4 5 6 7

[0130] 其中，

[0131] 在 4 号位置上，Xaa 是 Trp、Tyr 或 Phe；和

[0132] 在 1 和 7 号位置上，Xaa 是 20 个天然氨基酸残基中的任何一个。

[0133] 这种酶是可以从属于担子菌门的层菌纲菌株优选地属于蘑菇目、木耳目和非褶菌目的菌株，更优选的属于黑耳科、口蘑科、鬼伞科、裂褶菌科、烟管菌科和多孔菌科的菌株，特别是属于黑耳属、毛皮伞属、层孔菌属、斑褶菇属、栓菌属、裂褶菌属和绵皮孔菌属的菌株获得的（参见图 2）。

[0134] 特定的例子是可以从属于黑胶耳、Crinipellis scabella、木蹄层孔菌和 Spongipellis sp. 的菌株，特别是可以从黑胶耳 CBS 277.96、Crinipellis scabella CBS 280.96、木蹄层孔菌 CBS 276.96 和 Spongipellis sp.CBS 283.96 获得的内切葡聚糖酶。

[0135] 按照布达佩斯条约，黑胶耳于 1996 年 3 月 12 日以保藏号 CBS 277.96 保藏在真菌菌种保藏中心，Oosterstraat 1，Postbus 273，NL-3740AGBaarn，荷兰；Crinipellis scabella 于 1996 年 3 月 12 日以保藏号 CBS280.96 保藏在真菌菌种保藏中心，Oosterstraat 1，Postbus 273，NL-3740AG Baarn，荷兰；木蹄层孔菌于 1996 年 3 月 12 日以保藏号 CBS276.96 保藏在真菌菌种保藏中心，Oosterstraat 1，Postbus 273，NL-3740AG Baarn，荷兰；Spongipellis sp. 于 1996 年 3 月 12 日以保藏号 CBS 283.96 保藏在真菌菌种保藏中心，Oosterstraat1，Postbus273，NL-3740AG Baarn，荷兰。

[0136] 本发明的酶制剂是也可以从属于壶菌门的菌株，优选地属于壶菌纲的菌株，更优选地属于 Spizellomycetales 目的菌株，特别优选地属于 Spizellomycetaceae 科的菌株，尤其是属于囊壶菌属的菌株获得的。所说菌株的特定的例子是属于红根囊壶菌的菌株，尤

其是红根囊壶菌 CBS282.96。

[0137] 按照布达佩斯条约，红根囊壶菌于 1996 年 3 月 12 日以保藏号 CBS282.96 保藏在真菌菌种保藏中心，Oosterstraat1，Postbus 273，NL-3740AG Baarn，荷兰。

[0138] 本发明的酶制剂也可以从属于接合菌门的菌株，优选地从属于接合菌纲的菌株，更优选地从毛霉目的菌株，尤其是从属于毛霉科和枝霉科的菌株，尤其是属于根毛霉属、须霉属和刺枝霉属的菌株获得。特定菌株的例子是属于 Rhizomucor pusillus，闪光须霉和弗雷生刺枝霉的菌株，特别是 Rhizomucor pusillus IFO 4578、闪光须霉 IFO 4814 和弗雷生刺枝霉 NRRL2305。

[0139] 此外，本发明的酶制剂也可以从属于 Archaeascomycetes、盘菌纲，半子囊菌亚纲，腔菌纲和不整囊菌纲的菌株，优选地从属于由盘菌目、斑痣盘菌目 (Rhytismatales)、座囊菌目和散囊菌目的菌株获得。尤其是所述酶可以从属于葫芦霉科、粪盘菌科、斑痣盘菌科和发菌科的菌株，优选地从属于色二孢属、Microsphaeropsis、Ulospora、壳球孢属，粪盘菌属，Saccobolus、青霉属和 Thermomyces 的菌株获得。特定的例子是可以从以下菌株获得的酶，所述菌株是属于由棉色二孢、Microsphaeropsis sp.、Ulospora bilgramii、Aureobasidium sp.、Macrophomina phaseolina、Ascobolus stictoides、Saccobolus dilutellus、盘菌属 (Peziza)、疣孢青霉、产黄青霉和 Thermomyces verrucosus 的菌株，特别是棉色二孢 CBS274.96、Ulospora bilgramii NKBC 1444、Macrophomina phaseolina CBS281.96、Saccobolus dilutellus CBS 275.96、疣孢青霉 ATCC 62396、产黄青霉 ATCC 9480 和 Thermomyces verrucosus CBS 285.96。

[0140] 按照布达佩斯条约，棉色二孢于 1996 年 3 月 12 日以保藏号 CBS 274.96 保藏在真菌菌种保藏中心；Macrophomina phaseolina 于 1996 年 3 月 12 日以保藏号 CBS 281.96 保藏在真菌菌种保藏中心；Saccobolus dilutellus 于 1996 年 3 月 12 以保藏号 CBS 275.96 保藏在真菌菌种保藏中心；Thermomyces verrucosus 于 1996 年 3 月 12 日以保藏号 CBS 285.96 保藏在真菌菌种保藏中心。

[0141] 此外，所述酶可以从属于间座壳目、炭角菌目、假毛球壳目和黑痣菌目的菌株，优选地从属于炭角菌科、黑腐皮壳科和 Phyllachoraceae 的菌株，更优选地从属于由间座壳属、刺盘孢属、黑孢属、炭角菌属、Nodulisporum 和孔座壳属的菌株获得。特定的菌株的例子是属于 Diaporthesyngenesia、葫芦科刺盘孢、鹿角团炭角菌、Nigrospora sp.、Nodulisporum sp. 和点孔座壳的菌株，特别是 Diaporthe syngenesia CBS278.96、葫芦科刺盘孢 ATCC 52609、Nigrospora sp.CBS 272.96、鹿角团炭角菌 CBS 284,96。

[0142] 按照布达佩斯条约，Diaporthe syngenesia 于 1996 年 3 月 12 日以保藏号 CBS 278.96 保藏在真菌菌种保藏中心；Nigrospora sp. 于 1996 年 3 月 12 日以保藏号 CBS 272.96 保藏在真菌菌种保藏中心；鹿角团炭角菌于 1996 年 3 月 12 日以保藏号 CBS 284.96 保藏在真菌菌种保藏中心。

[0143] 所述酶也可从按照布达佩斯于 1996 年 3 月 12 日分别以保藏号 CBS270.96、CBS 271.96 和 CBS273.96 保藏在真菌菌种保藏中心的未鉴别的真菌（有丝分裂孢子的，coleomycetous）获得。

[0144] 所述酶也可从以下菌株获得，所述菌株是属于柱孢属、粘帚霉属、赤壳属、周刺座霉属、粪壳属、Scytalidium、梭孢壳属、Syspastospora、Cladorrhinum、毛壳

属、Myceliphthora 和顶孢霉属的菌株，特别是属于 Cylindrocarpon sp.、Neetria pinea、Volutella colletotrichoides、粪生粪壳、大孢粪壳、Thielavia terrestris、Thielavia thermophila、Syspastospora boninensis、Cladorrhinum foecundissimum、墙毛壳、Chaetomium virescens、Chaetomium brasiliensis、Chaetomiumcunicolorum、Myceliophthora thermophila、链孢粘帚霉、Scytalidiumthermophila 和 Acremonium sp 的菌株，尤其是 Nectria pinea CBS 279.96、Volutella colletotrichoides CBS 400.58、粪生粪壳 ATCC 52644、大孢粪壳 ATCC 60255、Thielavia terrestris NRRL 8126、Thielaviathermophila CBS 174.70、墙毛壳 CBS 163.52、Chaetomium virescensCBS 547.75、Chaetomium brasiliensis CBS 122.65、Chaetomiumcunicolorum CBS 799.83、Syspastospora boninensis NKBC 1515、Cladorrhinum foecrundissimum ATCC 62373、Myceliophthorathermophila CBS 117.65、Scytalidium thermophila ATCC 28085、链孢粘帚霉 ATCC 10523 和 Acremonium sp. CBS 478.94。

[0145] 按照布达佩斯条约，Nectria pinea 于 1996 年 3 月 12 日以保藏号 CBS279.96 保藏在真菌菌种保藏中心；Acremonium sp. 于 1994 年 9 月 28 日以保藏号 CBS 478.94 保藏。

[0146] 所述酶也可以从属于腐皮镰孢、蛇形镰孢、早熟禾镰孢、尖镰孢 ssp. lycopersici、尖镰孢 ssp. passiflora、黑腐质霉和灰腐质霉的菌株，尤其是番茄尖镰孢 ssp lycopersici CBS 645.78、尖镰孢 ssppassiflora CBS 744.79、腐皮镰孢 IMI 107.511、蛇形镰孢 IFO 4467、早熟禾镰孢 ATCC 60883、黑腐质霉 CBS 819.73 和灰腐质霉 ATCC 22726 获得。应当注意灰腐质霉不同于灰腐质霉 thermoidea 变种。

[0147] 在一个优选的实施方案中，本发明的酶制剂来源于所公开的纲、目、科、属和种，并且实质上由下述酶组成，所述酶包含具有以下序列的由 13 个氨基酸残基组成的第一肽

[0148] Thr Arg Xaa Xaa Asp Cys Cys Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Trp

[0149] 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

[0150] 和具有以下序列的由 5 个氨基酸残基组成的第二肽

[0151] Trp Cys Cys Xaa Cys

[0152] 1 2 3 4 5

[0153] 其中，在第一序列的 3 号位置上，氨基酸是 Trp、Tyr 或 Phe；在第一序列的 4 号位置上，氨基酸是 Trp、Tyr 或 Phe；在第一序列的 8 号位置上，氨基酸是 Arg、Lys 或 Hi s；在第一序列 9、10 和 12 号的各位置上，在第二序列的 4 号位置上，氨基酸是 20 个天然氨基酸残基中的任何一个。

[0154] 优选地，在第一序列的 9 号位置上的氨基酸残基选自脯氨酸、苏氨酸、缬氨酸、丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、半胱氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、酪氨酸、丝氨酸、甲硫氨酸和色氨酸，更优选地选自脯氨酸和苏氨酸；在第一序列的 10 号位置上的氨基酸残基选自脯氨酸、苏氨酸、缬氨酸、丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、半胱氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、酪氨酸、丝氨酸、甲硫氨酸和色氨酸，优选地是丝氨酸；在第一序列的 12 号位置上的氨基酸残基选自脯氨酸、苏氨酸、缬氨酸、丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、半胱氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、酪氨酸、丝氨酸、甲硫氨酸和色氨酸，优选地选自丙氨酸和甘氨酸；在第二序列的 4 号位置上的氨基酸残基选自脯氨酸、苏氨酸、缬氨酸、丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、半胱氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、酪氨酸、

丝氨酸、甲硫氨酸、色氨酸、谷氨酸和天冬氨酸，更优选地选自丙氨酸、甘氨酸和谷氨酰胺。

[0155] 另一方面，本发明提供了一种 DNA 构建体，该构建体包含编码显示内切葡聚糖酶活性之酶的 DNA 序列，所述 DNA 序列包括

[0156] a) 分别在 SEQ ID NO :1、4、6、8、10、12、16 或 19 中所示的 DNA 序列和 / 或可以分别从啤酒糖酵母 DSM9770、DSM10082、DSM10080、DSM10081，大肠杆菌 DSM10512、DSM10511、DSM10571、DSM10576 中的质粒获得的 DNA 序列，或者

[0157] b) 分别在 SEQ ID NO :1、4、6、8、10、12、16 或 19 中所示的 DNA 序列的类似物或可以分别从啤酒糖酵母 DSM 9770、DSM 10082、DSM10080、DSM 10081，大肠杆菌 DSM 10512、DSM 10511、DSM 10571、DSM 10576 中的质粒获得的 DNA 序列的类似物，该类似物

[0158] i) 同源于分别在 SEQ ID NO :1、4、6、8、10、12、16 或 19 中所示的 DNA 序列和 / 或可以分别从啤酒糖酵母 DSM 9770、DSM 10082、DSM10080、DSM 10081，大肠杆菌 DSM 10512、DSM 10511、DSM 10571、DSM 10576 中的质粒获得的 DNA 序列，

[0159] ii) 与分别在 SEQ ID NO :1、4、6、8、10、12、16 或 19 中所示的 DNA 序列和 / 或可以分别从啤酒糖酵母 DSM 9770、DSM 10082、DSM10080、DSM 10081，大肠杆菌 DSM 10512、DSM 10511、DSM 10571、DSM 10576 中的质粒获得的 DNA 序列的相同核苷酸探针杂交，

[0160] iii) 编码一种多肽，该多肽同源于由一种 DNA 序列编码的多肽，所述 DNA 序列包含分别在 SEQ ID NO :1、4、6、8、10、12、16 或 19 中所示的 DNA 序列和 / 或可以分别从啤酒糖酵母 DSM 9770、DSM 10082、DSM10080、DSM 10081，大肠杆菌 DSM 10512、DSM 10511、DSM 10571、DSM 10576 中的质粒获得的 DNA 序列，

[0161] iv) 编码一种多肽，该多肽是与一种抗纯化内切葡聚糖酶的抗体免疫学反应性的，所述内切葡聚糖酶由分别在 SEQ ID NO :1、4、6、8、10、12、16 或 19 中所示的 DNA 序列或可以分别从啤酒糖酵母 DSM 9770、DSM10082、DSM 10080、DSM 10081，大肠杆菌 DSM 10512、DSM 10511、DSM 10571、DSM 10576 中的质粒获得的 DNA 序列编码。

[0162] 按照布达佩斯条约，大肠杆菌 DSM 10512 已于 1996 年 2 月 2 日保藏在 DSM(德意志微生物保藏中心，Mascheroder Weg 16，D-38124Braunschweig，德国)。

[0163] 按照布达佩斯条约，大肠杆菌 DSM 10511 已于 1996 年 2 月 2 日保藏在 DSM(德意志微生物保藏中心，Mascheroder Weg 16，D-38124Braunschweig，德国)。

[0164] 按照布达佩斯条约，大肠杆菌 DSM 10571 已于 1996 年 3 月 6 日保藏在 DSM(德意志微生物保藏中心，Mascheroder Weg 16，D-38124Braunschweig，德国)。

[0165] 按照布达佩斯条约，大肠杆菌 DSM 10576 已于 1996 年 3 月 12 日保藏在 DSM(德意志微生物保藏中心，Mascheroder Weg 16，D-38124Braunschweig，德国)。

[0166] 按照布达佩斯条约，大肠杆菌 DSM 10583 已于 1996 年 3 月 13 日保藏在 DSM(德意志微生物保藏中心，Mascheroder Weg 16，D-38124Braunschweig，德国)。

[0167] 按照布达佩斯条约，大肠杆菌 DSM 10584 已于 1996 年 3 月 13 日保藏在 DSM(德意志微生物保藏中心，Mascheroder Weg 16，D-38124Braunschweig，德国)。

[0168] 按照布达佩斯条约，大肠杆菌 DSM 10585 已于 1996 年 3 月 13 日保藏在 DSM(德意志微生物保藏中心，Mascheroder Weg 16，D-38124Braunschweig，德国)。

[0169] 按照布达佩斯条约，大肠杆菌 DSM 10586 已于 1996 年 3 月 13 日保藏在 DSM(德意志微生物保藏中心，Mascheroder Weg 16，D-38124Braunschweig，德国)。

[0170] 按照布达佩斯条约，大肠杆菌 DSM 10587 已于 1996 年 3 月 13 日保藏在 DSM（德意志微生物保藏中心，Mascheroder Weg 16，D-38124Braunschweig，德国）。

[0171] 按照布达佩斯条约，大肠杆菌 DSM 10588 于 1996 年 3 月 13 日保藏在 DSM（德意志微生物保藏中心，Mascheroder Weg 16，D-38124Braunschweig，德国）。

[0172] 按照布达佩斯条约，啤酒糖酵母 DSM 9770 已于 1995 年 2 月 24 日保藏在 DSM（德意志微生物保藏中心，Mascheroder Weg 16，D-38124Braunschweig，德国）。

[0173] 按照布达佩斯条约，啤酒糖酵母 DSM 10082 已于 1995 年 6 月 30 日保藏在 DSM（德意志微生物保藏中心，Mascheroder Weg 16，D-38124Braunschweig，德国）。

[0174] 按照布达佩斯条约，啤酒糖酵母 DSM 10080 已于 1995 年 6 月 30 日保藏在 DSM（德意志微生物保藏中心，Mascheroder Weg 16，D-38124Braunschweig，德国）。

[0175] 按照布达佩斯条约，啤酒糖酵母 DSM 10081 已于 1995 年 6 月 30 日保藏在 DSM（德意志微生物保藏中心，Mascheroder Weg 16，D-38124Braunschwe ig，德国）。

[0176] 与 SEQ ID NO：1 有关的本发明 DNA 构建体可以从毁丝霉属的菌株，特别是 M. thermophila 的菌株，尤其是 M. thermophilaCBS 117.65 的 DNA 文库分离或者基于该文库产生。

[0177] 与 SEQ ID NO：4 和 6 有关的本发明 DNA 构建体可以从顶孢霉属的菌株，尤其是 Acremonium sp. CBS 478.94 的 DNA 文库分离或者基于该文库产生。

[0178] 与 SEQ ID NO：8 有关的本发明 DNA 构建体可以从梭孢壳属的菌株，特别是 Thiela viaterrestris 的菌株，尤其是 Thiela viaterrestris NRRL8126 的 DNA 文库分离或者基于该文库产生。

[0179] 与 SEQ ID NO：10 有关的本发明 DNA 构建体可以从壳球孢属的菌株，特别是 M. phaseolina 的菌株，尤其是 M. phaseolina CBS 281.96 的 DNA 文库分离或者基于该文库产生。

[0180] 与 SEQ ID NO：12 有关的本发明 DNA 构建体可以从毛皮伞属的菌株，特别是 C. scabella 的菌株，尤其是 C. scabellaCBS 280.96 的 DNA 文库分离或者基于该文库产生。

[0181] 与 SEQ ID NO：19 有关的本发明 DNA 构建体可以从粪壳属的菌株，特别是粪生粪壳的菌株的 DNA 文库分离或者基于该文库产生。

[0182] 在本发明中，分别在 SEQ ID NO：1、4、6、8、10、12、16 或 19 中所示的 DNA 序列的"类似物"意指任何编码显示内切葡聚糖酶活性的酶的 DNA 序列，其具有性质 i)-iv) 的任一或全部。

[0183] 类似的 DNA 序列

[0184] a) 可以基于分别在 SEQ ID NO：1、4、6、8、10、12、16 或 19 中所示的 DNA 序列，采用例如本文所公开的方法，从产生具有内切葡聚糖酶活性之酶的其它或者相关（例如，相同）生物体分离；同系物可以是包含本文所示的 DNA 序列的 DNA 序列的等位变体，即经突变产生的基因的另一种形式。突变可以是沉默的（在编码的酶上无变化）或可以编码具有改变的氨基酸序列的酶；所述 DNA 序列的同系物也可以是属或种同系物，编码来源于另一个种的具有类似性质的酶。

[0185] b) 可以基于分别在 SEQ ID NO：1、4、6、8、10、12、16 或 19 中所示的 DNA 序列构建，例如通过引入不产生另一个由所述 DNA 序列编码的内切葡聚糖酶的氨基酸序列（但其相应

于用于产生所述酶的生物体的密码子使用）的核苷酸取代，和能够产生一种不同的氨基酸序列的核苷酸取代。然而，在后一种情况下，氨基酸的变化优选地是次要性质的改变（其是保守氨基酸取代，不明显地影响蛋白质的折叠或活性）、小的缺失（典型地是 1 到约 30 个氨基酸）；小的氨基 - 或羧基 - 末端延伸（如氨基 - 末端甲硫氨酸残基），至大约 20-25 个残基的小的接头肽或有利于纯化的小的延伸（如聚 - 组氨酸束，抗原表位或结合域），总的情况参见 Ford 等，蛋白质表达和纯化，2 :95-107，1991。保守取代的例子在下列氨基酸的范围内 :碱性氨基酸（如精氨酸，赖氨酸，组氨酸），酸性氨基酸（如谷氨酸和天冬氨酸），极性氨基酸（如谷氨酰胺和天冬酰胺），疏水氨基酸（如亮氨酸，异亮氨酸，缬氨酸），芳族氨基酸（如苯丙氨酸，色氨酸，酪氨酸）和小氨基酸（如甘氨酸，丙氨酸，丝氨酸，苏氨酸，甲硫氨酸）。

[0186] 对本领域技术人员明显的是，可以进行这样的取代，其在对所述分子的功能关键性的区域之外，并且仍然产生活性多肽。可以按照本领域已知的方法鉴别对本发明的 DNA 构建体编码的多肽之活性必需的氨基酸，所述方法例如定向诱变或丙氨酸 - 扫描诱变 (Cunningham 和 Wells，科学 244，1081-1085，1989)。在后一技术中，在分子中的任何残基上引入突变，试验形成的突变体分子的生物学（即内切葡聚糖酶）活性，以鉴别对所说分子活性关键性的氨基酸残基。底物 - 酶相互作用的位点也可以通过晶体结构（由核磁共振、结晶学或光亲和性标记法之类的技术测定的）分析测定。参见例如 de Vos 等，科学 255 :306-312，1992 ;Smith 等，分子生物学杂志 . 224 :899-904，1992 ;Wlodaver 等，FEBS Lett. 309 :59-64，1992。

[0187] 由本发明的 DNA 构建体的 DNA 序列编码的内切葡聚糖酶可以包括纤维素结合域 (CBD)，以编码 完整酶一部分存在，或者其它来源的 CBD 可以引入进内切葡聚糖酶酶，由此产生酶杂合体。在本文中，术语 " 纤维素 - 结合域 " 应如 Peter Tomme 等 “不溶性碳水化合物的酶促降解” 中的 “纤维素 - 结合域 :分类和性质”，John N. Saddler and Michael H. Penner（编者），ACS 专题研讨系列 No. 618，1996 所定义的来理解。这一定义把 120 种以上的纤维素 - 结合域 (CBD) 分类成 10 个家族 (I-X)，并且其说明 CBD 在各种酶中发现，如纤维素酶，木聚糖酶，甘露聚糖酶，阿拉伯呋喃糖苷酶，乙酰酯酶和壳多糖酶。CBD 也在藻类中发现，例如，作为 - 非水解多糖类 - 结合的红藻 Porphyra purpurea 蛋白质，参见 Peter Tomme 等，同上。然而，大多数 CBD 来源于纤维素酶和木聚糖酶。CBD 在蛋白质的 N 或 C 末端或内部发现。酶杂合体在本领域是已知的，参见例如 WO 90/00609 和 WO95/16782，并且可以通过将包含至少一种编码纤维素 - 结合域的 DNA 片段（其带有或不带有接头，与编码目的酶的 DNA 序列连接）的 DNA 构建体转化进宿主细胞中，并培养该宿主细胞以表达融合基因来制备。酶杂合体可以用下式来描述 :

[0188] CBD-MR-X，

[0189] 其中 CBD 是相应于至少纤维素 - 结合域的氨基酸序列的 N- 末端或 C- 末端区 ;MR 是中间区（接头），和可以是化学键或者短的连接基团，这些基团优选地具有约 2 至 100 个碳原子，更优选地具有 2 至 40 碳原子 ;或者优选地是约 2 至约 100 个氨基酸，更优选地是 2 至 40 个氨基酸 ;X 是由本发明的 DNA 序列编码的多肽的 N- 末端或者 C- 末端区。

[0190] 以两种序列之间的等同性的程度测定以上 i) 中提及的同源性，表示第一序列和第二序列的差别。同源性可以用本领域已知的计算机程序合适地测定，例如在 GCG 程序包

中提供的 GAP(Needleman, S.B. 和 Wunsch, C.D.,分子生物学杂志,48 :443-453,1970)。采用 GAP 和下列设置进行 DNA 序列比较 :GAP 产生罚分 5.0 和 GAP 延伸罚分 0.3,所述 DNA 序列的编码区显示与分别在 SEQ ID NO :1、4、6、8、10、12、16 或 19 中所示的 DNA 序列或者可以分别从啤酒糖酵母 DSM 9770、DSM 10082、DSM 10080、DSM10081,大肠杆菌 DSM 10512、DSM 10511、DSM 10571 或 DSM 10576 中的质粒获得的 DNA 序列具有优选地至少 60%,更优选地至少 65%,更优选地 70%,更优选地至少 80%,尤其是至少 90%的等同性程度。

[0191] 以上 ii) 中提及的杂交意指在某些特点的条件下(在此后的材料和方法中详细描述),类似的 DNA 序列杂交到编码内切葡聚糖酶的 DNA 序列的相同探针上。所使用的寡核苷酸探针是相应于分别在 SEQ ID NO :1、4、6、8、10、12、16 或 19 中所示的 DNA 序列或者可以分别从啤酒糖酵母 DSM9770、DSM 10082、DSM 10080、DSM 10081,大肠杆菌 DSM 10512、DSM 10511、DSM 10571 或 DSM 10576 中的质粒获得的 DNA 序列之内切葡聚糖酶编码部分的 DNA 序列。

[0192] 以两种序列之间的等同性的程度测定以上 iii) 中提及的同源性,表示第一序列和第二序列的差别。同源性可以用本领域已知的计算机程序合适地测定,例如在 GCG 程序包中提供的 GAP(Needleman, S.B. 和 Wunsch, C.D.,分子生物学杂志,48 :443-453,1970)。采用 GAP 和下列设置进行多肽序列比较 :GAP 产生罚分 3.0 和 GAP 延伸罚分 0.1,类似 DNA 序列编码的多肽显示与包含分别在 SEQ ID NO :1、4、6、8、10、12、16 或 19 中所示的 DNA 序列或者可以分别从啤酒糖酵母 DSM 9770、DSM 10082、DSM10080、DSM 10081,大肠杆菌 DSM 10512、DSM 10511、DSM 10571 或 DSM10576 中的质粒获得的 DNA 序列的 DNA 构建体所编码的酶具有优选地至少 55%,更优选地至少 60%,更优选地 65%,更优选地至少 70%,更优选地至少 80%,尤其是至少 90%的等同性程度。

[0193] 关于以上 iv) 提及的性质,意指分别由从啤酒糖酵母 DSM 9770、DSM10082、DSM 10080、DSM 10081,大肠杆菌 DSM 10512、DSM 10511、DSM 10571 或 DSM 10576 分离的 DNA 序列编码和由用所说 DNA 序列转化的宿主生物体产生的内切葡聚糖酶酶,或者分别由 Myceliophthora thermophila、Acremonium sp.、Thielavia terrestris、Macrophomina phaseolina、Crinipellis scabella、Volutella colletotrichoides 或粪生粪壳天然内切葡聚糖酶。可以用以下材料和方法部分描述的方法测定免疫学反应性。

[0194] 本发明的另一方面涉及具有本发明的 DNA 构建体的表达载体、包含所说 DNA 构建体和表达载体的细胞以及产生显示内切葡聚糖酶活性之酶的方法,该方法包括在可以产生所说酶的条件下培养所说的细胞,并从培养物回收所说的酶。

[0195] 本发明的另一方面涉及一种显示内切葡聚糖酶活性的酶,这种酶

[0196] a) 由本发明的 DNA 构建体编码

[0197] b) 用本发明的方法产生

[0198] c) 与一种抗纯化内切葡聚糖酶的抗体是免疫学反应性的,所述内切葡聚糖酶由分别在 SEQ ID NO :1、4、6、8、10、12、16 或 19 中所示的 DNA 序列或者可以分别从啤酒糖酵母 DSM 9770、DSM 10082、DSM 10080、DSM 10081,大肠杆菌 DSM 10512、DSM 10511、DSM 10571 或 DSM 10576 中的质粒获得的 DNA 序列编码。

[0199] 以上 c) 中提及的内切葡聚糖酶可以是由从啤酒糖酵母 DSM 9770、DSM10082、DSM 10080、DSM 10081,大肠杆菌 DSM 10512、DSM 10511、DSM 10571 或 DSM 10576 分

离的 DNA 序列编码和由用所说 DNA 序列转化的宿主生物体产生的内切葡聚糖酶，或者分别由 Myceliophthorathermophila、Acremonium sp.、Thielavia terrestris、Macrophominaphaseolina、Crinipellis scabella、Volutella colletotrichoides 或粪生粪壳天然相应的内切葡聚糖酶。

[0200] 一般地，在本文中，术语″酶″被理解为包括成熟蛋白质或其前体形式以及其实质上具有全长酶活性的功能性片段。此外，术语″酶″旨在包括所说酶的同系物。

[0201] 所述酶的同系物可以具有一个或多个氨基酸取代，缺失或者添加。这些变化优选地是次要性质的改变（其是保守氨基酸取代，不明显地影响蛋白质的折叠或活性）、小的缺失（典型地是 1 到约 30 个氨基酸）；小的氨基 - 或羧基 - 末端延伸（如氨基 - 末端甲硫氨酸残基），多至大约 20-25 个残基的小的接头肽或有利于纯化的小的延伸（如聚 - 组氨酸束，抗原表位或结合域），总的情况参见 Ford 等，蛋白质表达和纯化，2 :95-107，1991。保守取代的例子在下列氨基酸的范围内 :碱性氨基酸（如精氨酸，赖氨酸，组氨酸），酸性的氨基酸（如谷氨酸和天冬氨酸），极性氨基酸（如谷氨酰胺和天冬酰胺），疏水氨基酸（如亮氨酸，异亮氨酸，缬氨酸），芳族氨基酸（如苯丙氨酸，色氨酸，酪氨酸）和小氨基酸（如甘氨酸，丙氨酸，丝氨酸，苏氨酸，甲硫氨酸）。

[0202] 对本领域技术人员明显的是，可以进行这样的取代，其在对所述分子的功能关键性的区域之外，并且仍然产生活性酶。可以按照本领域已知的方法鉴别对本发明的 DNA 构建体编码的酶之活性必需的氨基酸，所述方法例如定向诱变或丙氨酸 - 扫描诱变 (Cunningham 和 Wells，科学 244，1081-1085，1989)。在后一技术中，在分子中的任何残基上引入突变，试验形成的突变体分子的生物学（即内切葡聚糖酶）活性，以鉴别对所说分子活性关键性的氨基酸残基。配体 - 受体相互作用的位点也可以通过晶体结构（由核磁共振、结晶学或光亲和性标记法之类的技术测定的）分析测定。参见例如 de Vos 等，1992 ;Smith 等，1992 ;Wlodaver 等，1992。

[0203] 同系物可以是等位变体，即经突变产生的基因的另一种形式或可以是由突变基因编码的改变的酶（但具有与本发明的酶实质上相同的活性）。由此突变可以是沉默的（编码的酶无改变）或者可以编码具有改变的氨基酸序列的酶。

[0204] 所述酶的同系物也可以是属或种同系物，即来源于另一物种的具有类似性质的酶。

[0205] 所述酶的同系物可以通过本文描述的方法分离。

[0206] 经聚合酶链反应分子筛选和克隆

[0207] 使用从合适的来源（例如任何本文提及的生物体）分离的基因组 DNA 或者双链 cDNA 和基于本文公开的 DNA 序列和氨基酸序列制备的合成寡核苷酸引物，经聚合酶链反应 (PCR) 进行本发明的 DNA 序列的分子筛选。例如，合适的寡核苷酸引物可以是在材料和方法部分中所描述的引物。

[0208] 依据众所周知的方法，在分子筛选中所产生的 PCR 片段可以被分离和亚克隆进合适的载体中。经例如菌落或者噬斑杂交，PCR 片段可以用于筛选 DNA 文库。

[0209] 酵母中的克隆表达

[0210] 可以通过一般性的方法分离编码显示内切葡聚糖酶活性的酶的本发明的 DNA 序列，所述方法包括

[0211] - 在合适的载体中从合适的来源（例如任何本文提及的生物体）克隆 DNA 文库，

[0212] - 用所说的载体转化合适的酵母宿主细胞，

[0213] - 在合适的条件之下培养所说宿主细胞，以表达由 DNA 文库中的克隆编码的任何兴趣酶，

[0214] - 通过测定由这些克隆产生的酶的任何内切葡聚糖酶活性筛选阳性克隆，

[0215] - 从这些克隆分离编码所述酶的 DNA。

[0216] 在 WO 94/14953 中进一步公开了一般性的方法，该文献的内容本文一并参考。筛选方法更详细的描述在以下实施例 1 中给出。

[0217] 可以分离编码酶的 DNA 序列，所述分离是例如通过筛选 Macrophominaphaseolina、Crinipellis scabella、粪生粪壳或 Volutellacolletotrichoides 的 cDNA 文库，并选择表达合适的酶活性（即内切葡聚糖酶活性）的克隆进行分离；或者从按照布达佩斯条约于 1996 年 2 月 2 日保藏在 DSM（德意志微生物保藏中心，Mascheroder Weg 16，D-38124Braunschweig，德国）的大肠杆菌 DSM 10512 分离；或者从按照布达佩斯条约于 1996 年 2 月 2 日保藏在 DSM 的大肠杆菌 DSM10511 分离；或者从按照布达佩斯条约于 1996 年 3 月 12 日保藏在 DSM 的大肠杆菌 DSM 10576 分离；或者从按照布达佩斯条约于 1996 年 3 月 6 日保藏在 DSM 的大肠杆菌 DSM10571 分离；或者通过筛选 Myceliphthora thermophila CBS 117.65、Acremonium sp.CBS 478.94 或 Thielavia terrestris NRRL 8126 的 cDNA 文库，并选择表达合适的酶活性（即内切葡聚糖酶活性）的克隆进行分离；或者从按照布达佩斯条约于 1995 年 2 月 24 日保藏在 DSM（德意志微生物保藏中心，Mascheroder Weg 16，D-38124Braunschweig，德国）的啤酒糖酵母 DSM 9770 分离；或者从按照布达佩斯条约于 1995 年 6 月 30 日保藏在 DSM 的啤酒糖酵母 DSM 10082 分离；或者从按照布达佩斯条约于 1995 年 6 月 30 日保藏在 DSM 的啤酒糖酵母 DSM 10080 分离；或者从按照布达佩斯条约于 1995 年 6 月 30 日保藏在 DSM 的啤酒糖酵母 DSM 10081 分离。

[0218] 然后，可以用标准方法（如实施例 1 中所描述的）从所述克隆分离合适的 DNA 序列。

[0219] 核酸构建体

[0220] 本文使用的术语″核酸构建体″旨在指任何 cDNA、基因组 DNA、合成 DNA 或者 RNA 来源的核酸分子。术语″构建体″旨在指核酸区段，其可以是单链或双链，并且其可以是基于编码兴趣酶的全部或部分天然核苷酸序列。所述构建体可以含有可以不含有其它核酸区段。

[0221] 编码本发明酶的核酸构建体可以是基因组或 cDNA 来源的，例如通过制备基因组或者 cDNA 文库，并按照标准技术（参见 Sambrook 等，1989）使用合成寡核苷酸探针经杂交筛选编码全部或部分酶的 DNA 序列获得。

[0222] 编码酶的核酸构建体也可以用已建立的标准的方法经合成制备，所述方法例如由 Beaucage 和 Caruthers(1981) 描述的氨基亚磷酸酯方法，或 Matthes 等 (1984) 描述的方法。按照氨基亚磷酸酯方法，在例如自动 DNA 合成仪中合成寡核苷酸，纯化，退火，连接和在合适的载体中克隆。

[0223] 此外，所述核酸构建体可以是合成和基因组，合成和 cDNA 或基因组和 cDNA 混合来源的，其是经按照标准技术连接合成、基因组或者 cDNA 来源的片段（相应于完整的核酸构

建体的各种部分的片段）制备（以合适的方式）的。

[0224] 也可以采用特定的引物经聚合酶链反应制备所述的核酸构建体，例如按照美国专利 4,683,202 或 Saiki 等 (1988) 描述的方法制备。

[0225] 核酸构建体优选地是 DNA 构建体，这一术语将一直用于本说明书与权利要求书中。

[0226] 重组载体

[0227] 包含编码本发明的酶的 DNA 构建体的重组载体可以是任何易于进行 DNA 操作的载体，载体的选择常常取决于其所要引入的宿主细胞。这样，载体可以是自主复制载体，即作为染色体外实体存在的载体，其复制不依赖于染色体复制，例如质粒。另外，载体可以是这样一种，当其被引入宿主细胞时，整合进宿主细胞基因组，并且与其整合进的染色体一道复制。

[0228] 所述载体优选地是表达载体，在其中编码本发明的酶的 DNA 序列可操作地连接到该 DNA 转录所需的附加区段上。一般来说，表达载体是来自质粒或病毒 DNA 的或可以包含它们的成分。术语″可操作连接″指所述区段排列得使它们对预期的目的协调起作用，例如转录在启动子开始，并且经由编码酶的 DNA 序列进行。

[0229] 启动子可以是任何 DNA 序列，其在所选择的宿主细胞中显示转录活性，并且可以来源于编码与宿主细胞同源或异源的蛋白质的基因。

[0230] 用于酵母宿主细胞的合适的启动子的例子包括来源于酵母糖解基因 (Hitzeman 等，生物化学杂志 .255(1980),12073-12080 ;Alber 和 Kawasaki，分子应用遗传学杂志，1(1982),419-434) 或酒精脱氢酶基因 (Young 等，化学品的基因工程和微生物学 (Hollaender 等，编者），Plenum 出版社，纽约，1982) 的启动子，或者 TPI1(US 4,599,311) 或 ADH2-4c(Russell 等，自然，304(1983),652-654) 启动子。

[0231] 用于丝状真菌细胞的合适的启动子是例如 ADH3 启动子 (McKnight 等，The EMBO J.4(1985),2093-2099) 或 tpiA 启动子。其它有用的启动子的例子是来源于编码下列酶的基因的那些，所述酶是米曲霉 TAKA 淀粉酶、Rhizomucor miehei 天冬氨蛋白酶、黑曲霉中性 α- 淀粉酶、黑曲霉酸稳定 α- 淀粉酶、黑曲霉或泡盛曲霉葡糖淀粉酶 (gluA)、Rhizomucor miehei 脂酶、米曲霉碱性蛋白酶、米曲霉磷酸丙糖异构酶或构巢曲霉乙酰胺酶。优选的是 TAKA- 淀粉酶和 gluA 启动子。

[0232] 用于细菌宿主细胞的合适的启动子的例子包括嗜热脂肪芽孢杆菌生麦淀粉酶基因、地衣形芽孢杆菌 α- 淀粉酶基因、液解化淀粉杆菌 BAN 淀粉酶基因、枯草杆菌碱性蛋白酶基因或短小芽孢杆菌木糖苷酶基因的启动子或噬菌体 λ P_R 或 P_L 启动子或者大肠杆菌 lac、trp 或 tac 启动子。

[0233] 如果需要，编码本发明的酶的 DNA 序列也可以可操作地与合适的终止子连接。

[0234] 本发明的重组载体还可以包含使得所述载体在所说的宿主细胞中复制的 DNA 序列。

[0235] 所述载体也可以包含选择性标记，例如，其产物补充宿主细胞缺陷的基因，如编码二氢叶酸还原酶 (DHFR) 的基因或粟酒裂殖酵母 TPI 基因（由 P.R.Russell，基因 40,1985，pp.125-130 描述）。对于丝状真菌，选择性标记包括 amdS、pyrG、argB、niaD、sC。

[0236] 为了引导本发明的酶进入宿主细胞的分泌途径，也可以在重组载体中包含分泌信

号序列（也称作前导序列、前序列原或前序列），将分泌信号序列在正确的读框中与编码酶的 DNA 序列连接。分泌信号序列一般被置于编码酶的 DNA 序列的 5′ 。分泌信号序列可以是通常与所述酶相关的或者可以是来源于编码另一个分泌蛋白质的基因的。

[0237] 为了从酵母细胞分泌，分泌信号序列可以编码任何信号肽，该肽确保所表达的酶以有效的方向进入细胞的分泌途径。信号肽可以是天然信号肽或其功能性部分，或者其可以是合成肽。已发现合适的信号肽是 α-因子信号肽（参见美国专利 4,870,008），小鼠唾液淀粉酶信号肽（参见 O.Hagenbuchle 等，自然 2891981，pp.643-646），修饰的羧肽酶信号肽（参见 L.A.Vails 等，细胞 48，1987，pp.887-897），酵母 BAR1 信号肽（参见 WO 87/02670）或酵母天冬氨蛋白酶 3（YAP3）信号肽（参见 M.Egel-Mi tani 等，酵母，6，1990，pp.127-137）。

[0238] 为了在酵母中有效地分泌，也可以将编码前导肽的序列插入到信号序列的下游和编码酶的 DNA 序列的上游。前导肽的功能在于允许所表达的酶从内质网被引导到达高尔基体，并进一步到达分泌泡以便分泌到培养基中（即酶穿过细胞壁或至少穿过细胞膜进入酵母细胞的周质空间的输出）。前导肽可以是酵母 α-因子前导肽（其用途在例如 US 4,546,082，EP 16201，EP123294，EP 123544 和 EP 163529 中描述）。另外，前导肽可以是合成的前导肽，这就是说前导肽不是天然发现的。合成的前导肽可以按照例如 WO 89/02463 或 WO 92/11378 中的描述构建。

[0239] 对于在丝状真菌中的使用，所述信号肽可以方便地来源于编码 Aspergillus sp. 淀粉酶或葡糖淀粉酶的基因，编码 Rhizomucor miehei 脂酶或蛋白酶，Humicola lanuginosa 脂酶的基因。所述信号肽优选地是来源于编码米曲霉 TAKA 淀粉酶，黑曲霉中性 α-淀粉酶，黑曲霉酸-稳定淀粉酶或黑曲霉葡糖淀粉酶的基因。

[0240] 分别用于连接编码所述酶的 DNA 序列、启动子以及可操作的终止子和 / 或分泌信号序列的方法和将它们插入到包含复制所需信息的合适载体中的方法是本领域技术人员已知的（参见，例如，Sambrook 等，以上引用的）。

[0241] 宿主细胞

[0242] 引入到宿主细胞的编码所述酶的 DNA 序列对所说的宿主细胞而言可以是同源的或者是异源的。如果对宿主细胞是同源的，即由宿主细胞天然，则其典型地被可操作连接到另一启动子或者（可用的话）另一分泌信号序列和 / 或终止子序列上，而不是在其天然环境中。术语″同源的″旨在包括编码所说宿主细胞天然酶的 cDNA 序列。术语″异源的″旨在包括所说宿主细胞天然不表达的 DNA 序列。这样，所说的 DNA 序列可以来源于另一个生物体，或者其可以是合成的序列。

[0243] 本发明的 DNA 构建体或重组载体引入其中的宿主细胞可以是能够产生本发明的酶的任何细胞，包括细菌，酵母，真菌和高等真核细胞。

[0244] 经培养能够产生本发明的酶的细菌宿主细胞的例子是革兰氏-阳性菌，例如芽胞杆菌属的菌株（如枯草芽胞杆菌、地衣形芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、短芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、Bacillus alkalophilus、液解化淀粉杆菌、凝结芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、灿烂芽孢杆菌、巨大芽胞杆菌或苏云金芽孢杆菌菌株）或链霉菌属的菌株（例如浅青紫链霉菌或鼠灰链霉菌的菌株），或者革兰氏-阴性菌，例如大肠杆菌。可以用已知方法经原生质体转化或者使用感受态细胞进行细菌的转化（参见 Sambrook 等，同上）。

[0245] 当在细菌（如大肠杆菌）中表达酶时，酶可以被保留在细胞质中（典型地是以被

称作包含体的不溶性颗粒）或由细菌分泌序列引导到周质空间中。在前一种情况下，裂解细胞，回收颗粒并变性，此后经稀释变性剂使酶再折叠。在后一种情况下，可以经裂解细胞从周质空间回收所说酶，如通过超声波或渗透冲击以释放周质空间的内含物并回收酶。

[0246] 合适的酵母细胞的例子包括 Saccharomyces spp. 或 Schizosaccharomyces spp. 的细胞，啤酒糖酵母或者克鲁弗酵母的特定菌株。用于用异源 DNA 转化酵母细胞并且从此产生异源酶的方法在例如 US4,599,311，US 4,931,373，US 4,870,008,5,037,743，和 US 4,845,075（所有这些本文一并参考）中有描述。转化细胞由通过选择性标记确定的表型选择。所述选择性标记一般是对药物的抗性或者在缺少特殊营养物（例如亮氨酸）的情况下的生长能力。用于酵母的一个优选的载体是 US 4,931,373 中公开的 POT1 载体。编码本发明的酶的 DNA 序列可以在信号序列和可有可无的前导序列之前，例如如以上所述的。合适的酵母细胞的例子是克鲁维酵母属（如乳酸克鲁维酵母）、汉逊酵母属（例如多形汉逊酵母）或毕赤酵母属（如巴斯德毕赤酵母）的菌株（参见 Gleeson 等，遗传微生物学杂志 1321986，pp.34593465 ；US 4,882,279）。

[0247] 其它真菌细胞的例子是丝状真菌的细胞，例如 Aspergillus spp.，Neurospora spp.，Fusarium spp. 或 Trichoderma spp.，尤其是米曲霉，构巢曲霉，黑曲霉或禾谷镰孢的菌株。EP 272277 和 EP 230023 中描述了 Aspergillus spp. 用于表达蛋白质的用途。尖镰孢的转化可以例如按照 Malardier 等，1989，基因 78 ：147-156 的描述进行。

[0248] 当丝状真菌用作宿主细胞时，其可以用本发明的构建体转化，通常是将所说 DNA 构建体整合进宿主染色体中以获得重组体宿主细胞。这一整合一般被认为是有利的，因为所述 DNA 构建体很可能稳定保持在细胞中。可以按照常规方法（如同源或者异源重组）将所述 DNA 构建体整合进染色体中。

[0249] 然后在可以表达所说酶的条件下在合适的营养培养基中培养以上描述的转化或转染宿主细胞，接着从培养物中回收所形成的酶。

[0250] 用于培养所说细胞的培养基可以是任何常规的适于培养所说宿主细胞的培养基，例如含有适当补充物的最小或复合培养基。合适的培养基可以从供应商获得或者可以按照出版的（例如美国典型培养物保藏中心目录中）配方制备。然后，由所述细胞产生的酶可以用常规方法从培养基回收，所述方法包括经离心和过滤从培养基分离宿主细胞，借助盐（如硫酸铵）沉淀上层清液或滤液中的蛋白质组份，依据所述酶的类型，用各种色谱分离方法（如离子交换色谱，凝胶色谱，亲合色谱）纯化等。

[0251] 另一方面，本发明涉及产生按照本发明的酶的方法，其中在可以产生所述酶的条件下培养合适的用编码酶的 DNA 序列转化的宿主细胞，并从培养物中回收所形成的酶。

[0252] 用分类学和生态学进行的酶筛选

[0253] 设计来检测和选择所说类型的兴趣酶的象分子筛选之类的强有力的工具其自身仍不能满足需要。为了使兴趣发现的机会最大，在这一研究中将分子筛选方法与小心选择待筛选的真菌组合。通过全面考虑真菌的鉴别法、分类学类别和种系发生关系进行选择。

[0254] 如果包括生态学方法，则可以仅进一步地充分探讨溶纤酶产生的分类学热点。设计聪明的筛选和取得成功的选择菌株和待研究的生态小生境需要适应各种底物的全面的知识（尤其植物材料的腐生、神经营养或活体营养降解）。

[0255] 本文所公开的分类学和生态学方法两者的目标都是在分子筛选程序中最多地发

现所述酶。然而，仍然有几百（或者如果包括了所有初期工作）几千种真菌被培养，以便检测本文报道的所说类型的溶纤酶的 53 个目标。

[0256] 可以按以下所述进行筛选和克隆：

[0257] 材料和方法

[0258] 生物体列表：

[0259] 啤酒糖酵母 DSM 9770、DSM 10082、DSM 10080、DSM 10081 或大肠杆菌 DSM 10512、DSM 10511、DSM 10571、DSM 10576 分别含有质粒，该质粒包含在穿梭载体 pYES 2.0 中的编码本发明的内切葡聚糖酶的全长 DNA 序列。

[0260] 大肠杆菌 DSM 10583、10584、10585、10586、10587 和 10588。

[0261] 棉色二孢 Cooke

[0262] 菌株的保藏：保藏号 CBS 274.96

[0263] 分类位置：子囊菌门 (Ascomycota)，腔菌纲，座囊菌目，葫芦霉科

[0264] Ulospora bilgramii(Hawksw 等)Hawksw 等

[0265] 菌株的保藏号：NKBC 1444，日本大学，(Prof. Tubaki 保藏中心)

[0266] 分类位置：子囊菌门，腔菌纲，座囊菌目，（科未分类）

[0267] Microsphaeropsis sp.

[0268] 分离自：在中国云南省昆明植物园中生长的山茶的叶片（茶科，Guttiferales)

[0269] 分类位置：子囊菌门，腔菌纲腔菌纲，座囊菌目，（科未分类）

[0270] Macrophomina phaseolina(Tassi)Goidannich

[0271] 别名：Rhizoctonia bataticola

[0272] 菌株的保藏：保藏号 CBS 281.96

[0273] 分离自在泰国生长的 Glycine max(Leguminosa)cv CMM 60 的种子，1990

[0274] 分类位置：子囊菌门，盘菌纲，斑痣盘菌目，斑痣盘菌科

[0275] Rscobolus stictoideus SPeg.

[0276] 分离自挪威，Svalbard，鹅粪

[0277] 分类位置：子囊菌门，盘菌纲，盘菌目，粪盘菌科

[0278] Saccobolus dilutellus(Fuck.)Sacc.

[0279] 菌株的保藏：保藏号 CBS 275.96

[0280] 分类位置：子囊菌门，盘菌纲，盘菌目，粪盘菌科

[0281] 疣孢青霉 Peyronel

[0282] 物种的保藏号：ATCC 62396

[0283] 分类位置：子囊菌门，不整囊菌纲，散囊菌目，发菌科

[0284] 产黄青霉 Thom

[0285] 菌株的保藏号：ATCC 9480

[0286] 分类位置：子囊菌门，不整囊菌纲，散囊菌目，发菌科

[0287] Thermomyces verrucosus Pugh 等

[0288] 菌株的保藏：保藏号 CBS 285.96

[0289] 分类位置：子囊菌门，不整囊菌纲，散囊菌目，（科未分类；affiliation 基于 18S RNA，测序以及同源性）

[0290] 鹿角团炭角菌 L.ex Greille

[0291] 菌株的保藏 :保藏号 CBS 284.96

[0292] 分类位置 :子囊菌门,Pyrenomycetes,炭角菌目,炭角菌科

[0293] 点孔座壳 (Fr.ex L.)Fr.

[0294] 分类位置 :子囊菌门,Pyrenomycetes,炭角菌目,炭角菌科

[0295] Nodulisporum sp.

[0296] 分离自在中国云南省昆明植物园中生长的山茶的叶片 (茶科,Guttiferales)

[0297] 分类位置 :子囊菌门,Pyrenomycetes,炭角菌目,炭角菌科

[0298] Cylindrocarpon sp.

[0299] 分离自海上样品,Bahamas

[0300] 分类位置 :子囊菌门,Pyrenomycetes,肉座菌目,(科未分类)

[0301] Acremonium sp

[0302] 菌株的保藏 :保藏号 CBS 478.94

[0303] 分类位置 :子囊菌门,Pyrenomycetes,肉座菌目,肉座菌科

[0304] 蛇形镰孢 Sherbakoff

[0305] 菌株的保藏号 :IFO 4467

[0306] 分类位置 :子囊菌门,Pyrenomycetes,肉座菌目,肉座菌科

[0307] 早熟禾镰孢 (Peck)Wr.

[0308] 物种的保藏号 :ATCC 60883

[0309] 分类位置 :子囊菌门,Pyrenomycetes,肉座菌目,肉座菌科

[0310] 腐皮镰孢 (Mart.)Sacc.emnd.Snyd&Hans.

[0311] 菌株的保藏号 :IMI 107.511

[0312] 分类位置 :子囊菌门,Pyrenomycetes,肉座菌目,肉座菌科

[0313] 番茄尖镰孢 ssp lycopersici(Sacc.)Snyd.&Hans.

[0314] 菌株的保藏号 :CBS 645.78

[0315] 分类位置 :子囊菌门,Pyrenomycetes,肉座菌目,肉座菌科

[0316] 尖镰孢 ssp passiflora

[0317] 菌株的保藏号 :CBS 744.79

[0318] 分类位置 :子囊菌门,Pyrenomycetes,肉座菌目,肉座菌科

[0319] 链孢粘帚霉 Gillman&Abbott

[0320] 菌株的保藏号 :CBS 227.48

[0321] 分类位置 :子囊菌门,Pyrenomycetes,肉座菌目,肉座菌科

[0322] Nectria pinea Dingley

[0323] 菌株的保藏 :保藏号 CBS 279.96

[0324] 分类位置 :子囊菌门,Pyrenomycetes,肉座菌目,小赤壳科

[0325] Volutella colletotrichoides

[0326] 菌株的保藏号 :CBS 400.58

[0327] 分类位置 :子囊菌门,Pyrenomycetes,肉座菌目,(科未分类)

[0328] 大孢粪壳 Auerswald

[0329] 物种的保藏号 :ATCC 60255

[0330] 分类位置 :子囊菌门,Pyrenomycetes,粪壳目,粪壳科

[0331] 粪生粪壳 (Roberge)Cesati et De Notaris

[0332] 物种的保藏号 :ATCC 52644

[0333] 分离自 H.Dissing 的粪,ISP,KU,丹麦

[0334] 分类位置 :子囊菌门,Pyrenomycetes,粪壳目,粪壳科

[0335] 灰腐质霉 Traeen

[0336] 物种的保藏号 :ATCC 22726

[0337] 来源 :Hatfield Polytechnic

[0338] 分类位置 :子囊菌门,Pyrenomycetes,粪壳目,(科未分类)

[0339] 黑腐质霉 Omvik

[0340] 菌株的保藏号 :CBS 819.73

[0341] 分类位置 :子囊菌门,Pyrenomycetes,粪壳目,(科未分类)

[0342] Scytalidium thermophilum(Cooney et Emerson)Austwick

[0343] 菌株的保藏号 :ATCC 28085

[0344] 分类位置 :子囊菌门,Pyrenomycetes,粪壳目,(科未分类)

[0345] Thielavia thermophila Fergus et Sinden(别名 Corynascusthermophilus)

[0346] 菌株的保藏号 :CBS 174.70,IMI 145.136

[0347] 分类位置 :子囊菌门,Pyrenomycetes,粪壳目,毛壳科

[0348] 分离自蘑菇堆肥

[0349] Thielavia terrestris(Appinis)Malloch et Cain

[0350] 菌株的保藏号 :NRRL8126

[0351] 分类位置 :子囊菌门,Pyrenomycetes,粪壳目,毛壳科

[0352] Cladorrhinum foecundissimum Saccardo et Marchal

[0353] 物种的保藏号 :ATCC 62373

[0354] 分类位置 :子囊菌门,Pyrenomycetes,粪壳目,毛球壳科

[0355] 分离自牙买加达拉斯山 Selandin sp(Compositaceae,Asterales) 的叶片

[0356] Syspastospora boninensis

[0357] 菌株的保藏号 :NKBC 1515(日本大学,profe Tubaki 保藏中心)

[0358] 分类位置 :子囊菌门,Pyrenomycetes,粪壳目,Cerastoma taceae

[0359] 管毛壳 Fuckel

[0360] 菌株的保藏号 :CBS 799.83

[0361] 分类位置 :子囊菌门,Pyrenomycetes,粪壳目,毛壳科

[0362] 巴西毛壳 Batista et Potual

[0363] 菌株的保藏号 :CBS 122.65

[0364] 分类位置 :子囊菌门,Pyrenomycetes,粪壳目,毛壳科

[0365] 墙毛壳 Corda

[0366] 菌株的保藏号 :CBS 163.52

[0367] 分类位置 :子囊菌门,Pyrenomycetes,粪壳目,毛壳科

[0368] Chaetomium virescens(von Arx)Udagawa

[0369] 菌株的保藏号 :CBS 547.75

[0370] 分类位置 :子囊菌门,Pyrenomycetes,粪壳目,毛壳科

[0371] Myceliophthora thermophila(Apinis)Oorschot

[0372] 菌株的保藏 :保藏号 CBS 117.65

[0373] 分类位置 :子囊菌门,Pyrenomycetes,粪壳目,毛壳科

[0374] Nigrospora sp

[0375] 菌株的保藏 :保藏号 CBS 272.96

[0376] 分离自在牙买加 Christiana 中生长的 Artocarpus altilis 的叶片,Moraceae,Urticales

[0377] 分类位置 :子囊菌门,Pyrenomycetes,Trichosphaeriales,(科未分类)

[0378] Nigrospora sp

[0379] 分离自云南昆明植物园的 Pinus yuannanensis 的叶片

[0380] 分类位置 :子囊菌门,Pyrenomycetes,假毛球壳目,Abietaceae,Pinales。

[0381] Diaporthe syngenesia

[0382] 菌株的保藏 :保藏号 CBS 278.96

[0383] 分类位置 :子囊菌门,Pyrenomycetes,Diaporthales,黑腐皮壳科

[0384] 葫芦科刺盘孢 (Passerini)Ellis et Halsted 别名围小丛壳 orbiculare 变种 Jenkins et Winstead

[0385] 物种的保藏号 :ATCC 52609

[0386] 分类位置 :子囊菌门,Pyrenomycetes,黑痣菌目

[0387] 黑胶耳 Fr.

[0388] 菌株的保藏 :保藏号 CBS 277.96

[0389] 分类位置 :担子菌门,层菌纲,木耳目,黑耳科

[0390] Crinipellis scabella(ALb.Schw. :Fr.)Murr

[0391] 菌株的保藏号 :CBS 280.96

[0392] 分类位置 :担子菌门,层菌纲,蘑菇目

[0393] 网纹斑褶菇 (Fr.)Gill.

[0394] 菌株的保藏号 :CBS 275.47

[0395] 分类位置 :担子菌门,层菌纲,蘑菇目,鬼伞科

[0396] 木蹄层孔菌 (L.)Fr.

[0397] 菌株的保藏 :保藏号 CBS 276.96

[0398] 分类位置 :担子菌门,层菌纲,非褶菌目,Fomitaceae

[0399] Spongipellis sp.

[0400] 菌株的保藏 :保藏号 CBS 283.96

[0401] 分类位置 :担子菌门,层菌纲,非褶菌目,烟管菌科(由 18S 序列和同源性分类学鉴别和相联系)

[0402] 血红栓菌 (Fr.)Lloyd 别名 :血红多孔菌 ;血红密孔菌 (L. :Fr.)

[0403] 菌株的保藏号 :AKU 5062(京都大学培养物保藏中心)

[0404] 分类位置 :担子菌门,非褶菌目,多孔菌科

[0405] Schizophyllum commune Fr.

[0406] 物种的保藏号 :ATCC 38548

[0407] 分类位置 :担子菌门,非褶菌目,裂褶菌科

[0408] 红根囊壶菌 (de Bary&Wor)Fischer

[0409] 菌株的保藏号 :CBS 282.96

[0410] 分类位置 :壶菌门,壶菌纲,Spizellomycetales,Spizellomycetaceae

[0411] Rhizomucor pusillus(Lindt)Schipper 别名 :微小毛霉

[0412] 菌株的保藏号 :IFO 4578

[0413] 物种的保藏号 :ATCC 46883

[0414] 分类位置 :接合菌门,接合菌纲,毛霉目,毛霉科

[0415] 闪光须霉 (Kunze)vanTieghem&Le Monnier

[0416] 菌株的保藏号 :IFO 4814

[0417] 物种的保藏号 :ATCC 16327

[0418] 分类位置 :接合菌门,接合菌纲,毛霉目,毛霉科

[0419] 弗雷生刺枝霉 vanTieghem&Le Monnier 别名 .Helicostylum fresenii

[0420] 菌株的保藏号 :NRRL 2305

[0421] 分类位置 :接合菌门,接合菌纲,毛霉目,rhamnidiaceae

[0422] 未分类的 :

[0423] 粉红单端孢

[0424] 菌株的保藏号 :IFO 5372

[0425] Coniothecium sp

[0426] 植物内寄生菌,分离自在中国云南省昆明的未鉴别的高等植物的叶片

[0427] 未分类和未鉴别的 :

[0428] 菌株的保藏 :保藏号 CBS 271.96

[0429] 分离自牙买加 Christiana 生长 Artocarpus altilis(桑科,Urticales) 的叶片

[0430] 菌株的保藏 :保藏号 CBS 273.96

[0431] 分离自牙买加达拉斯山生长的 Pimenta dioica(桃金娘科,Myrtales) 的叶片

[0432] 菌株的保藏号 :CBS 270.96

[0433] 分离自牙买加达拉斯山生长的 Pseudocalymma alliaceum(紫葳科,Solanales) 叶片

[0434] 其它菌株 :

[0435] 大肠杆菌 MC1061 和 DH10B。

[0436] 酵母菌株 :所使用的啤酒糖酵母菌株是 W3124(MAT α ;ura 3-52 ;leu2-3,112 ; his3-D200 ;pep4-1137 ;prc1 : :HIS3 ;prb1 : :LEU2 ;cir+)。

[0437] 质粒 :

[0438] 曲霉属表达载体 pHD414 是质粒 p775(在 EP 238023 中描述) 的衍生物。pHD414 的构建在 WO 93/11249 中有进一步的描述。

[0439] pYES 2.0(Invitrogen)。

[0440] pA2C477，pA2C193，pA2C357，pA2C371，pA2C385，pA2C475，pA2C488，pA2C502（参见实施例 1、2、3 和 4）。

[0441] 分别在 SEQ ID NO：1、4、6、8、10、12、16 或 19 中所示的 DNA 序列的分离：

[0442] 通过用本领域已知的方法 (Sambrook 等 (1989) 分子克隆：实验室手册，冷泉港实验室，冷泉港，纽约）经抽提质粒，可以分别从保藏的生物体啤酒糖酵母 DSM 9770、DSM 10082、DSM 10080、DSM 10081、大肠杆菌 DSM 10512、DSM 10511、DSM 10571 或 DSM 10576 获得全长 DNA 序列，这些全长 DNA 序列包含分别在 SEQ ID NO：1、4、6、8、10、12、16 或 19 中所示的编码本发明的内切葡聚糖酶的 cDNA 序列。

[0443] 分子筛选本发明的纤维素酶的 PCR 引物：

[0444] 四个简并的含脱氧肌苷的寡核苷酸引物（有义；s 和反义；as1、as2 和 as3）相应于四个高度保守氨基酸区，这些区在 Thielavia terrestris 纤维素酶、Myceliophthora thermophilum 纤维素酶和两种来源于 Acremonium sp. 的纤维素酶的推定的氨基酸序列中发现，按照 Myceliophthora thermophilum 序列对残基编号。在引物序列中脱氧肌苷由 I 表示，限制位点上有下划线。

[0445] 27 35

[0446] NH_2 -Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro/Thr-COOH

[0447] s 5-CCCC<u>AAGCTT</u> ACI AGI TAC TGG GAC TGC TGC AAA AC-3′

[0448] HindIII C T T T T G C

[0449] 106 111

[0450] NH_2 -Trp Cys Cys Ala Cys Tyr-COOH

[0451] as1 3′ - CC ACA ACA CGI ACA AT <u>AGATCT</u>GATC-5′

[0452] G G G XbaI

[0453] 145 152

[0454] NH_2 -Pro Gly Gly Gly Leu/Val Gly Ile/Leu Phe- COOH

[0455] as2 3′ - GGI CCI CCI CCI AAI CCI AAI AA <u>AGATCT</u>GATC-5′

[0456] C G XbaI

[0457] G T

[0458] 193 198

[0459] NH_2 -Trp Arg Phe/Tyr Asp Trp Phe- COOH

[0460] as3 3′ - CC GCI AAA CTA ACC AAA <u>AGATCT</u>GATC-5′

[0461] T TG G G XbaI

[0462] 经聚合酶链反应 (PCR) 进行分子筛选：

[0463] 基因组 DNA 和双链 cDNA 的体外扩增

[0464] 按照以下描述从 5 微克 poly(A)$^+$RNA 定向合成双链 cDNA。按照 Yelton 等的描述分离基因组 DNA。

[0465] 在 PCR 缓冲液中经 PCR 扩增约 10 至 20ng 双链纤维素酶 - 诱导的 cDNA 或 100 至 200ng 选择的真菌菌株的基因组 DNA，所说缓冲液 (10mMTris-HCl(pH8.3)、50mM KCl、1.5mM$MgCl_2$、0.01％ (w/v) 明胶）包含 200μM 各 dNTP 和 100pmol 按以下组合的各简并引物：

[0466] 1)

[0467] 有义，

[0468] 5’-CCCCAAGCTTACI$^{A}/_{C}$GITA$^{C}/_{T}$TGGGA$^{C}/_{T}$TG$^{C}/_{T}$TG$^{C}/_{T}$AA$^{A}/_{G}{}^{A}/_{C}$C-3’

[0469] 反义 1，

[0470] 5’-CTAGTCTAGATA$^{A}/_{G}$CAIGC$^{A}/_{G}$CA$^{A}/_{G}$CACC-3’；或

[0471] 2)

[0472] 有义，

[0473] 5’-CCCCAAGCTTACI$^{A}/_{C}$GITA$^{C}/_{T}$TGGGA$^{C}/_{T}$TG$^{C}/_{T}$TG$^{C}/_{T}$AA$^{A}/_{G}{}^{A}/_{C}$C-3’

[0474] 反义 2，

[0475] CTAGTCTAGAAAIA$^{A}/_{G}/^{T}$ICCIA$^{A}/^{C}/^{G}$ICCICCICCIGG-3；或

[0476] 3)

[0477] 有义，

[0478] 5’-CCCCAAGCTTACI$^{A}/_{C}$GITA$^{C}/_{T}$TGGGA$^{C}/_{T}$TG$^{C}/_{T}$TG$^{C}/_{T}$AA$^{A}/_{G}{}^{A}/_{C}$C-3’

[0479] 反义 3，

[0480] 5’CTAGTCTAGAIAACCA$^{A}/_{G}$TCA$^{A}/_{G}{}^{A}/_{T}$AIC$^{G}/_{T}$CC-3；

[0481] 一种 DNA 热循环仪 (Landgraf，德国) 和 2.5 单位 Taq 聚合酶 (Perkin-Elmer，Cetus，US)。采用以下循环方式进行 PCR 的三十个循环：在 94℃变性 1 分钟，64℃退火 2 分钟，72℃延伸 3 分钟。以 HaeIII- 消化的 ΦX174RF DNA 为大小标记，通过在 3％琼脂糖凝胶 (NuSieve，FMC) 中的电泳分析扩增产物的 10 微升等分试样。

[0482] PCR 产物的直接测序

[0483] 按照制造商的说明使用 QIAquick PCR 纯化试剂盒 (Qiagen，US) 纯化 PCR 产物的 80 微升等分试样。经双脱氧链 - 终止方法，使用 50-150ng 模板，Taq 尾端脱氧循环测序试剂盒 (Perkin-Elmer，USA)，荧光标记的终止剂，和 5pmol 有义引物：5′ -CCCCAAGCTTACI$^{A}/_{C}$GITA$^{C}/_{T}$TGGGA$^{C}/_{T}$TG$^{C}/_{T}$TG$^{C}/_{T}$AA$^{A}/_{C}{}^{A}/_{C}$C-3′ 直接在纯化的 PCR 产物上测定扩增的 PCR 片段的核苷酸序列。按照 Devereux 等的描述对序列数据进行分析。

[0484] 经聚合酶链反应 (PCR) 克隆：PCR 片段的亚克隆

[0485] 将如以上所述所产生的 PCR 产物 25 微升等分试样在 0.8％低胶凝温度琼脂糖 (SeaP laque GTG，FMC) 凝胶上进行电泳，从凝胶上切下相关的片段。通过添加 0.1 体积 10× 琼脂糖酶缓冲液 (New England Biolabs) 和 2 单位 /100 微升熔化的琼脂糖到样品中，接着在 45℃温育 1.5 小时，经琼脂糖酶处理回收。用酚和三氯甲烷抽提样品，经添加 2 体积 96％ EtOH 和 0.1 体积 3M NaAc(pH5.2) 沉淀。经离心回收 PCR 片段，在 70％ EtOH 中洗涤，干燥和再悬浮于 20 微升限制酶缓冲液 (10mM Tris-HCl，10mM $MgCl_2$，50mMNaCl，1mM DTT) 中。以 HindIII 和 XbaI 消化片段，用酚和三氯甲烷提取，经 2 体积 96％ EtOH 和 2 体积 NaAc(pH 5.2) 沉淀回收，并亚克隆进 HindIII/XbaI- 切割的 pYES 2.0 载体中。

[0486] 筛选 cDNA 文库和阳性克隆的特征确定。以相应的随机引导的 (Feinberg 和 Vogelstein) ^{32}P- 标记的 (＞ 1×10cpm/ 微克)PCR 产物作为探针，经菌落杂交 (Sambrook，1989) 筛选按以下所说构建的啤酒糖酵母和大肠杆菌的 cDNA 文库。于 65℃在 2xSSC(Sambrook，1989)、5xDenhardt′ s 溶液 (Sambrook，1989)、0.5％ (w/v)SDS、100μg/ml 变性鲑精 DNA 中进行杂交 20 小时，接着于 25℃在 5xSSC(2x15 分钟) 中、于 65℃在 2xSSC、

0.5％ SDS(30 分钟）中、于 65℃在 0.2xSSC、0.5％ SDS(30 分钟），最后于 25℃在 5xSSC(2x15 分钟）中洗涤。采用以下方法确定阳性 cDNA 克隆的特征，所述方法是用 pYES 2.0 多接头引物 (Invi trogen,USA) 测序 cDNA 插入物的末端，用双脱氧链终止法 (Sanger 等）采用荧光标记的终止剂测定两条链的最长 cDNA 的核苷酸序列。按照制造商的说明，采用应用生物系统 373A 自动测序仪，用 Taq 脱氧末端循环测序试剂盒 (Perkin Elmer USA) 和 pYES 2.0 多接头引物 (Invitrogen，USA) 或合成寡核苷酸引物测序 Qiagen 纯化的质粒 DNA(Qiagen USA)。按照 Devereux 等描述的方法进行序列数据分析。

[0487] 用硫氰酸胍进行总 RNA 的抽提，接着经 5.7M CsCl 垫层超离心法，采用 WO 94/14953 中描述的方法经寡 (dT)- 纤维素亲合色谱法进行 poly(A)$^+$RNA 的分离。

[0488] cDNA 合成：采用 RNase H 方法 (Gubler 和 Hoffman(1983) 基因 25：263-269，Sambrook 等 (1989) 分子克隆：实验室手册，冷泉港实验室，冷泉港，NY) 用 F.S.Hagen(pers.comm.）开发的发夹修饰从 5 微克 poly(A)$^+$RNA 合成双链 cDNA。在预硅烷化的无核糖核酸酶的 Eppendorph 试管中于 70℃加热 poly(A)$^+$RNA（在 5μl DEPC 处理的水中的 5μg)8 分钟，在冰上骤冷，添加逆转录酶缓冲液至终体积 50 微升，所述逆转录酶缓冲液 (50mM Tris-Cl(pH8.3)、75mM KCl、3mM $MgCl_2$，10mM DTT，Bethesda 研究实验室）包含 imM dATP、dGTP 和 dTTP；0.5mM 5′ - 甲基 -dCTP(Pharmacia)；40 单位人类胎盘核糖核酸酶抑制剂 (RNasin,Promega)；1.45 微克 oligo$(dT)_{18}$-Not I 引物 (Pharmacia) 以及 1000 单位 SuperScript II 核糖核酸酶 H 逆转录酶 (Bethesda 研究实验室）。通过在 45℃温育反应混合物 1 小时合成第一链 cDNA。在合成之后，将 mRNA：cDNA 杂交混合物按照制造者的说明经 MicroSpin S-400HR(Pharmacia) 旋转柱凝胶过滤。

[0489] 在凝胶过滤之后，将杂交体用第二链缓冲液稀释，所述缓冲液 (20mMTris-HCl(pH7.4)、90mM KCl、4.6mM $MgCl_2$、10mM $(NH_4)_2SO_4$、0.16mM(NAD+) 包含 200μM 各种 dNTP、60 单位大肠杆菌 DNA 聚合酶 I(Pharmacia)、5.25 单位核糖核酸酶 H(Promega) 和 15 单位大肠杆菌 DNA 连接酶 (Boehringer 曼海姆）。通过在 16℃下温育反应试管 2 小时和在 25℃下温育 15 分钟进行第二链 cDNA 合成。由添加乙二胺四乙酸至最终浓度 20mM 终止反应，其后用酚和三氯甲烷抽提。

[0490] Mung 大豆核酸酶处理：通过于 -20℃下添加 2 体积的 96％ EtOH、0.2 体积的 10M NH_4Ac 沉淀双链 cDNA 12 小时，离心回收，用 70％ EtOH 洗涤，干燥并再悬浮于 30 微升 Mung 大豆核酸酶缓冲液中，该缓冲液 (30mM NaAc(pH4.6)、300mM NaCl，1mM $ZnSO_4$，0.35mM DTT，2％甘油）包含 25 单位 Mung 大豆核酸酶 (Pharmacia)。通过在 30℃温育反应物 30 分钟，接着添加 70 微升 10mM Tris-HCl(pH7.5)、1mM 乙二胺四乙酸，苯酚抽提以及在冰上用 2 体积 96％乙醇和 0.1 体积 3M NaAc(pH 5.2) 沉淀来剪切单链发夹 DNA。用 T4DNA 聚合酶钝化末端：离心回收双链 cDNA，在 30 微升含 0.5mM 各种 dNTP 和 5 单位 T4DNA 聚合酶 (New England Biolabs) 的 T4DNA 聚合酶缓冲液中 16℃温育 1 小时，使末端钝化。加入 EDTA 至终浓度 20mM，然后用苯酚和氯仿提取，加入 2 体积 96％ EtOH 和 0.1 体积 3M NaAc(pH5.2) 于 -20℃沉淀 12 小时。

[0491] 衔接子连接，Not I 消化和大小选择：在填充反应完成后，经离心回收 cDNA，用 70％ EtOH 洗涤并干燥。将 cDNA 沉淀重悬于 25 微升连接缓冲液中，所述缓冲液 (30mM Tris-HCl(pH7.8)、10mM$MgCl_2$、10mM DTT、0.5mMATP) 包含 2.5 微克非回文 BstXI 衔接子

(Invitrogen) 和 30 单位 T4 连接酶 (Promega)，在 16℃温育 12 小时。通过在 65℃加热 20 分钟然后在冰上冷却终止反应。连接的 cDNA 用 NotI 限制酶消化，其是通过添加 20 微升水，5 微升 10×NotI 限制酶缓冲液 (New England Biolabs) 和 50 单位 NotI(NewEngland Biolabs)，接着在 37℃温育 2.5 小时进行的。65℃加热 10 分钟终止反应。经凝胶电泳在 1×TBE 中的 0.8％ SeaPlaque GTP 低熔化温度琼脂糖凝胶 (FMC) 上大小分级分离 cDNA，以分离未连接的衔接子和小的 cDNA。按照制造者的说明，由切下 0.7kb 并用 β－琼脂糖酶 (New EnglandBiolabs) 从凝胶救援出，并且于 -20℃添加 2 体积 96％ EtOH 和 0.1 体积 3MNaAc(pH5.2) 沉淀 12 小时来进行 cDNA 的大小选择。

[0492] 文库的构建：通过离心回收定向的、选择了大小的 cDNA，在 70％ EtOH 中洗涤，干燥并悬浮在 30μl 的 10mM Tris-HCl(pH 7.5)，1mM EDTA 中。按照制造厂商的说明通过 MicroSpin S-300HR(Pharmacia) 旋转柱进行凝胶过滤使 cDNA 脱盐。在 10μl 包含 5μl 双链 cDNA（反应试管 #1 和 #2）、15 单位的 T4 连接酶 (Promega) 以及 30ng（试管 #1）、40ng（试管 #2) 和 40ng（试管 #3，载体背景对照）的 Bs tXI-NotI 裂解的 pYES 2.0 载体的连接缓冲液 (30mMTris-HCl(pH7.8)、10mM $MgCl_2$、10mM DTT、0.5mM ATP) 中进行三种试验连接。通过在 16℃下温育 12 小时、在 70℃下加热 20 分钟、然后向每个试管添加 10μl 的水进行连接反应。如上所述把 1μl 的每种连接混合物电穿孔进 40μl 电感受态的 (electrocompetent) 大肠杆菌 DH10B 细胞 (Bethesda 研究实验室）中 (Sambrook 等，(1989) 分子克隆：实验室手册，冷泉港实验室，冷泉港，NY)。使用最优条件在包含库的大肠杆菌中建立文库。各库通过在 LB+ 氨苄青霉属素琼脂平板涂布转化的大肠杆菌并在 37℃下培养 24 小时产生 15000-30000 克隆 / 平板制作。把 20mi LB+ 氨苄青霉素添加到平板上并悬浮细胞。使细胞悬浮液于 37℃下在 50ml 试管中振荡 1 小时。使用 QIAGEN 质粒试剂盒按照按照制造厂商的说明从细胞分离质粒 DNA 并在 -20℃下保存。

[0493] 把得自各个库的 1μl 纯化质粒 DNA(100ng/μl) 的等分试样通过电穿孔转化进啤酒糖酵母 W3124 中 (Becker 和 Guarante(1991) 酶学方法，194：182-187)，把转化体平板接种于包含 2％葡萄糖的 SC 琼脂上并在 30℃下培养。

[0494] 阳性菌落的鉴别：在生长 3-5 天之后，把琼脂平板复制接种于一组包含 0.1％ AZCL HE 纤维素的 SC+ 半乳糖－尿嘧啶琼脂平板上。将这些平板在 30℃下培养 3-7 天。内切葡聚糖酶阳性菌落鉴定为蓝环围绕的菌落。

[0495] 为了在琼脂上分离单个菌落，涂布得自酶－阳性菌落的细胞，为了鉴别产生内切葡聚糖酶的菌落，选择产生酶的单个菌落。

[0496] 阳性克隆的鉴定：阳性克隆作为单个菌落获得，使用生物素化的多接头引物直接从酵母菌落扩增 cDNA 插入片段，通过磁性小珠 (Dynabead M-280，Dynal) 系统纯化，并通过使用链－末端方法 (Sanger 等 (1977) 美国科学院学报，74：5463-5467) 和 Sequenase 系统（美国生物化学）测定每个 cDNA 克隆的 5′ －末端序列单个地确定其特征。

[0497] 使用荧光标记的终止子通过双脱氧链终止方法 (Sanger 等）测定得自两条链的最长 cDNA 的核苷酸序列。通过如下所述转化进大肠杆菌救援 (rescue) 质粒 DNA。使用 Applied Biosystems 373A 自动测序仪按照制造厂商的说明用 Taq 脱氧末端循环测序试剂盒 (Perkin Elmer，US) 和 pYES 2.0 多接头引物 (Invitrogen，USA) 或合成的寡核苷酸引物测定 Qiagen 纯化的质粒 DNA(Qiagen，USA) 的序列。序列数据的分析按照 Devereux 等进

行。

[0498] 在曲霉中表达的 cDNA 基因的分离：把产生内切葡聚糖酶的酵母菌落接种于在 50ml 玻璃试管中的 20ml YPD 培养液中。试管在 30℃下振荡 2 天。通过在 3000rpm 下离心 10 分钟收获细胞。

[0499] 按照 WO 94/14953 分离 DNA 并将其溶解在 50μl 水中。通过标准方法把 DNA 转化进大肠杆菌。使用标准方法从大肠杆菌分离质粒 DNA 并通过限制酶分析进行分析。使用适当的限制酶切除 cDNA 插入片段并连接进曲霉表达载体中。

[0500] 米曲霉或黑曲霉的转化

[0501] 如 WO 95/02043 的 16 页，21 行 -17 页，12 行（本文一并参考）所述制备原生质体。

[0502] 把 100μl 的原生质体悬浮液和 5-25μg 在 10μl STC(1.2M 山梨醇，10mMTris-HCl，pH ＝ 7.5，10mM$CaCl_2$) 中的适当 DNA 混合。将原生质体与 p3SR2（携带 A.nidulans amdS 基因的质粒）混合。混合物在室温下放置 25 分钟。添加 0.2ml 60％ PEG 4000(BDH 29576)、10mM $CaCl_2$、10mM Tris-HCl(pH 7.5) 并小心地混合（两次），最后添加 0.85ml 的相同溶液并小心地混合。混合物在室温下放置 25 分钟，在 2500g 下旋转 15 分钟，把沉淀悬浮在 2ml 的 1.2M 山梨醇中。在再次沉淀之后把原生质体涂布在最小的包含 1.0M 蔗糖 (pH 7.0)，10mM 乙酰胺作为氮源以及 20mM CsCl 以抑制背景生长的平板上 (Cove，生物化学学报，113(1966)51-56)。于 37℃下培养 4-7 天之后，选择孢子并涂布以形成单个菌落。重复该过程，保存第二次再分离之后的单个菌落的孢子作为所定义的转化体。

[0503] 米曲霉转化体的试验

[0504] 把每个转化体接种在 10ml 的 YPM 中并繁殖。在于 37℃下接种 2-5 天之后，除去 10ml 的上清液。如上所述通过 AZCL HE 纤维素鉴别内切葡聚糖酶活性。

[0505] 用于评价本发明的 DNA 构建体的性质 ii) 的杂交条件：

[0506] 测定核苷酸探针和同源 DNA 或 RNA 序列之间的杂交的合适条件包括：在 5×SSC（标准柠檬酸盐）中预浸渍包含待杂交 DNA 片段或 RNA 的滤膜 10 分钟，滤膜在 5×SSC(Sambrook 等 1989)、5×Denhardt ′ s 溶液 (Sambrook 等 1989)、0.5 ％ SDS 和 100μg/ml 变性的声处理的鲑精 DNA(Sambrook 等 1989) 中预杂交，然后在包含随机引物的 (Feinberg，A.P. 和 Vogelstein，B.(1983) 生物化学年评，132：6-13)、^{32}P-dCTP- 标记的（比活＞ 1×10^9cpm/μg) 的探针的相同溶液中于约 45℃下杂交 12 小时。然后滤膜在 2×SSC、0.5％ SDS 中洗涤两次 30 分钟，温度优选地不高于 50℃，更优选地不高于 55℃，更优选地是不高于 60℃，更优选地是不高于 70℃，尤其是不高于 75℃。用于杂交的核苷酸探针是对应于分别在 SFQ ID NO：1、4、6、8，、10、12 或 16 中所示的 DNA 序列和 / 或分别可以从在啤酒糖酵母 DSM 9770、DSM 10082、DSM 10080、DSM 10081，大肠杆菌 DSM 10512、DSM 10511、DSM 10571 或 DSM 10576 中的质粒获得的 DNA 序列的内切葡聚糖酶编码部分的 DNA 序列。

[0507] 免疫交叉反应：用于测定免疫交叉反应的抗体可以通过使用纯化的纤维素酶制备。更具体地说，抗本发明的纤维素酶的抗血清可通过按照 N.Axelsen 在“定量免疫电泳手册”，Blackwell 科学出版社，1973，23 章中或 A.Johnstone 和 R.Thorpe，实践免疫化学，Blackwell 科学出版社，1982（更具体地说在 27-31 页）中描述的方法制备。纯化的免疫球蛋白可从抗血清获得，如通过盐沉淀 ($(NH_4)_2SO_4$) 并进行渗析和离子交换色谱（如在 DEAE-Sephadex 上）。蛋白质的免疫化学定性可通过 Outcherlony 双扩散分析

(O.Ouchteriony :试验免疫学手册 (D.M.Weir,Ed.),Blackwell 科学出版社,1967,655-706 页)、交叉免疫电泳 (N.Axelsen 等,同上,第 3 和 4 章) 或火箭免疫电泳 (N.Axelsen 等,第 2 章) 完成。

[0508] 培养基

[0509] YPD :10g 酵母提取物,20g 蛋白胨,加 H_2O 至 900ml。高压灭菌,添加 100ml 20%的葡萄糖 (无菌过滤的)。

[0510] YPD :10g 酵母提取物,20g 蛋白胨,加 H_2O 至 900ml。高压灭菌,添加 100ml 20%的麦芽糖糊精 (无菌过滤的)。

[0511] 10× 碱盐 (basel salt) :75g 酵母氮碱 (nitrogen base),113g 琥珀酸,68g NaOH,加 H_2O 至 1000ml,无菌过滤。

[0512] SC-URA :100ml 10× 碱盐,28ml 无维生素的 20%酪蛋氨基酸,10ml 1%的色氨酸,加 H_2O 至 900ml,高压灭菌,添加 3.6ml 5%苏氨酸以及 100ml 20%葡萄糖或 20%半乳糖。

[0513] SC-URA 琼脂 :SC-URA,添加 20g/l 琼脂。

[0514] PD 琼脂 :39g 马铃薯右旋糖琼脂,DIFCO 0013 ;添加去离子水至 1000ml ;高压灭菌 (121℃下 15-20 分钟)。

[0515] PC 琼脂 :马铃薯和胡萝卜 (研磨,每种 20g),添加水至 1000ml,煮沸 1 小时 ;琼脂 (20g/l Merck 1614) ;高压灭菌 (121℃下 20 分钟)。

[0516] PC 液态培养基 :如 PC 琼脂,但没有琼脂。

[0517] PD 液态培养基 :24g 马铃薯右旋糖培养液,Difco 0549,添加去离子水至 1000ml ;高压灭菌 (121℃下 15-20 分钟)。

[0518] 具有纤维素的 PC 和 PD 液态培养基 :每 1000ml 添加 30g Solcafloc(Dicacel 可从 Dicalite-Europe-Nord,9000Gent,比利时获得)。

[0519] PB-9 液态培养基 :把 12g Rofec(Roquette 101-0441) 和 24g 葡萄糖添加至 1000ml 水中 ;把 pH 值调整到 5.5 ;每 1000ml 添加 5ml 矿物油和 5g$CaCO_3$。高压灭菌 (121℃下 40 分钟)。

[0520] YPG 液态培养基 :4g 酵母提取物 (Difco 0127),1gKH_2PO_4(Merck4873),0.5g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ Merck 5886,15g 右旋糖,Roquette101-0441,0.1ml Pluronic(101-3088) ;添加去离子水至 1000ml ;高压灭菌 (121℃下 20 分钟)

[0521] 稀释盐溶液 (DS) :制备两种母液 :

[0522] P- 母液 :13.61g KH_2PO_4 ;13.21g$(NH_4)_2PO_4$,17.42g KH_2PO_4 ;添加去离子水至 100ml。

[0523] Ca/Mg 母液 :7.35g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$,10.17g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$,添加去离子水至 100ml ;把 pH 值调整至 7.0 ;高压灭菌 (121℃ ;20 分钟)

[0524] 把 0..5mlP- 母液和 0.1ml Ca/Mg 母液混合

[0525] 添加去离子水至 1000ml

[0526] AZCL HE 纤维素 (Megazyme,澳大利亚)。

[0527] 用途

[0528] 在洗涤和穿着过程中,染色的织物或衣物的染料通常渗色,从而使衣物看起来已褪色和穿旧。从织物表面除去纤维将部分地恢复织物初始的颜色和外观。本文所使用的术语“颜色澄清”是指通过多次洗涤循环织物或衣物的初始颜色部分地恢复。

[0529] 术语“除去丸状物”指从织物表面除去丸状物。

[0530] 术语“浸泡液体”指这样的一种含水的液体，要洗的衣物在进行常规洗涤过程前要浸泡在其中。浸泡液体可包含一种或多种通常用于洗涤或洗涤方法的组分。

[0531] 术语“洗液”指这样的一种含水的液体，在其中要洗的衣物进行洗涤过程，即通常是一种手工或在洗衣机中的化学或机械结合的作用。通常，洗液是粉剂或液体洗涤剂组合物的水溶液。

[0532] 术语“冲洗液体”指这样的一种含水的液体，为了冲洗要洗的衣物，即实质上从要洗的衣物中除去洗涤剂溶液，在其中浸泡并处理要洗的衣物，通常是在洗涤过程之后立即进行。冲洗液体可包含织物条理或软化组合物。

[0533] 按照本发明的方法要洗的衣物可以是常规的可洗的衣物。优选地，要洗的衣物的主要部分是缝合或未缝合的织物，包括从棉制造的编织物 (knits)、编织物 (wovens)、斜纹粗棉布、纱线和毛巾、棉混纺物或天然或人造纤维素（如制自包含木聚糖的纤维素织物，如制自木浆）或其混合物。混合物的例子是具有一种或多种辅助材料的棉或人造纤维 / 纤维胶（如羊毛、合成纤维（如聚酰胺纤维、丙烯酸纤维、聚酯纤维、聚乙烯醇纤维、聚氯乙烯纤维、聚偏二氯乙烯纤维、聚氨甲酸乙酯纤维、聚脲纤维、aramid 纤维）以及包含纤维素的纤维（如人造纤维 / 纤维胶、苎麻、亚麻 / 亚麻布、黄麻、乙酸纤维素纤维、lyocell）。

[0534] 洗涤剂组合物

[0535] 按照本发明的一个方面，本发明的内切葡聚糖酶可典型地是洗涤剂组合物的组分。同样地，它们可以以非尘状粒剂、稳定液体或受保护的酶形式包括在洗涤剂组合物中。非尘状粒剂可按照，如在 US 4,106,991 和 4,661,452 所（二者都属于 Novo Industri A/S）公开的方法产生并可有可无地按照本领域的方法包衣。蜡状的表面盖覆剂的例子是平均分子量为 1000 至 20000 的聚（环氧乙烷）产物（聚乙二醇，PEG）；具有 16 至 50 个环氧乙烷单位的乙氧基化的壬基酚；乙氧基化的脂肪醇（其中醇包含 12 至 20 个碳原子，具有 15 至 80 个环氧乙烷单位）；脂肪醇；脂肪酸；脂肪酸的甘油单、双和三酸酯。在专利 GB 1483591 中给出了通过流化床技术制成的适于应用的形成薄片的表面盖覆剂的例子。如液态酶制剂可按照已制定的方法通过添加多羟基化合物（如丙二醇、糖或糖醇、乳酸或硼酸）稳定。其它酶稳定剂在本领域中是已知的。受保护的酶按照在 EP 238,216 中公开的方法制备。

[0536] 本发明的洗涤剂组合物可以是任何方便的形式，如粉剂、粒剂、糊剂或液体。液体洗涤剂可是水溶液，典型地包含多达 70％的水和 0-30％的有机溶剂，或非水溶液。

[0537] 洗涤剂组合物包含一种或多种表面活性剂，每种活化剂可以是阴离子、非离子、阳离子或两性离子的。洗涤剂通常包含 0-50％阴离子表面活性剂，如线性烷基苯磺酸盐 (LAS)、α - 烯烃磺酸盐 (AOS)、烷基硫酸盐（脂肪醇硫酸酯）(AS)、脂肪醇乙氧基硫酸盐 (AEOS 或 AES)、仲烷烃磺酸盐 (SAS)、α - 硫代脂肪酸甲基酯、烷基或烯基琥珀酸或皂。它可以包含 0-40％的非离子表面活性剂，如脂肪醇乙氧基化物 (AEO 或 AE)、羧化的脂肪醇乙氧基化物、壬基酚乙氧基化物、烷基聚苷、烷基二甲胺氧化物、乙氧基化的脂肪酸单乙醇酰胺、脂肪酸单乙醇酰胺或聚羟烷脂肪酸酰胺（如如在 WO 92/06154 中所描述的）。

[0538] 洗涤剂组合物还可包含一种或多种其它酶，如淀粉酶、脂酶、角质酶、蛋白酶、过氧化物酶和氧化酶，如漆酶。

[0539] 洗涤剂可包含 1-65％洗涤剂助洗剂或配位剂，如沸石、二磷酸盐、三磷酸盐、膦酸

酯、柠檬酸盐、次氨基三乙酸 (NTA)、乙二氨四乙酸 (EDTA)、二乙三胺五乙酸 (DTMPA)、烷基或烯基琥珀酸、可溶性硅酸盐或层硅酸盐（如得自 Hoechst 的 SKS-6）。洗涤剂也可无助洗剂，即实质上不含洗涤剂助洗剂。

[0540] 洗涤剂可包含一种或多种聚合物。例子是羧甲基纤维素 (CMC)、聚（乙烯吡咯烷酮）(PVP)、聚乙二醇 (PEG)、聚（乙烯醇）(PVA)、聚羧酸酯，如聚丙烯酸酯、马来酸 / 丙烯酸共聚物和甲基丙烯酸月桂基酯 / 丙烯酸共聚物。

[0541] 洗涤剂可包含漂白系统，该系统包含 H_2O_2 源，如与形成过酸的漂白活化剂（如四乙基乙二胺 (TAED) 或壬酰氧苯磺酸盐 (NOBS)）结合的过硼酸盐或过碳酸盐。另外，漂白系统可包含过酸，如酰胺、酰亚胺或砜型。

[0542] 本发明的洗涤剂组合物的酶可以使用常规的稳定剂稳定，如多羟基化合物（如丙二醇或甘油）、糖或糖醇、乳酸、硼酸或硼酸衍生物，如芳族硼酸酯，组合物可按照在如 WO 92/19708 和 WO 92/19709 中所述制成制剂。

[0543] 洗涤剂也可包含其它常规的洗涤剂组份，如织物调理剂，包括粘土、泡沫辅助剂、抑泡剂、抗腐蚀剂、污物悬浮剂、抗污物再沉积剂、染料、杀菌剂、荧光增白剂或香料。

[0544] pH（于使用浓度下在水溶液中测量）通常是中性或碱性的，如在 7-11 的范围内。

[0545] 在本发明的范围之内洗涤剂组合物的具体形式包括：

[0546] 1）一种制成粒剂的具有至少 600g/l 的堆密度的洗涤剂组合物，该组合物包含

[0547]

线性烷基苯磺酸盐（按酸计）	7-12%
乙氧基脂肪醇硫酸酯（如 C_{12-18} 醇，1-2EO）或烷基硫酸盐（如 C_{16-18}）	1-4%
乙氧基脂肪醇（如 C_{14-15} 醇，7EO）	5-9%
碳酸钠（计为 Na_2CO_3）	14-20%
可溶性硅酸盐（计为 $Na_2O,2SiO_2$）	2-6%
沸石（计为 $NaAlSiO_4$）	15-22%
硫酸钠（计为 Na_2SO_4）	0-6%
柠檬酸钠 / 柠檬酸（计为 $C_6H_5Na_3O_7/C_6H_8O_7$）	0-15%
过硼酸钠（计为 $NaBO_3 \cdot H_2O$）	11-18%
TAED	2-6%
羧甲基纤维素	0-2%

聚合物（如马来酸 / 丙烯酸的共聚物，PVP，PEG）	0-3%
酶（以纯化的酶蛋白质计算）	0.0001-0.1%
小组分（如抑泡剂，香料，光学增亮剂，光漂白剂）	0-5%

[0548] 2）一种制成粒剂的具有至少 600g/l 的堆密度的洗涤剂组合物，该组合物包含

[0549]

线性烷基苯磺酸盐（以酸计）	6-11%
乙氧基脂肪醇硫酸酯（如 C_{12-18} 醇，1-2EO）或烷基硫酸盐（如 C_{16-18}）	1-3%
乙氧基脂肪醇（如 C_{14-15} 醇，7EO）	5-9%
碳酸钠（计为 Na_2CO_3）	15-21%
可溶性硅酸盐（计为 Na_2O，$2SiO_2$）	1-4%
沸石（计为 $NaAlSiO_4$）	24-34%
硫酸钠（计为 Na_2SO_4）	4-10%
柠檬酸钠 / 柠檬酸（计为 $C_6H_5Na_3O_7/C_6H_8O_7$）	0-15%
羧甲基纤维素	0-2%
聚合物（如马来酸 / 丙烯酸的共聚物，PVP，PEG）	1-6%
酶（以纯化的酶蛋白质计算）	0.0001-0.1%
小组分（如抑泡剂，香料）	0-5%

[0550] 3）一种制成粒剂的具有至少 600g/l 的堆密度的洗涤剂组合物，该组合物包含

[0551]

线性烷基苯磺酸盐（以酸计）	5-9%
乙氧基脂肪醇（如 C_{12-15} 醇，7EO）	7-14%
脂肪酸皂（如 C_{16-22} 脂肪酸）	1-3%

碳酸钠（计为 Na_2CO_3）	10-17%
可溶性硅酸盐（计为 $Na_2O,2SiO_2$）	3-9%
沸石（计为 $NaAlSiO_4$）	23-33%
硫酸钠（计为 Na_2SO_4）	0-4%
过硼酸钠（计为 $NaBO_3 \cdot H_2O$）	8-16%
TAED	2-8%
膦酸盐（如 EDTMPA）	0-1%
羧甲基纤维素	0-2%
聚合物（如马来酸 / 丙烯酸的共聚物，PVP，PEG）	0-3%
酶（以纯化的酶蛋白质计算）	0.0001-0.1%
小组分（如抑泡剂，香料，光学增亮剂）	0-5%

[0552]

[0553] 4）一种制成粒剂的具有至少 600g/l 的堆密度的洗涤剂组合物，该组合物包含

[0554]

线性烷基苯磺酸盐（以酸计）	8-12%
乙氧基脂肪醇（如 C_{12-15} 醇，7EO）	10-25%
碳酸钠（计为 Na_2CO_3）	14-22%
可溶性硅酸盐（计为 $Na_2O,2SiO_2$）	1-5%
沸石（计为 $NaAlSiO_4$）	25-35%
硫酸钠（计为 Na_2SO_4）	0-10%
羧甲基纤维素	0-2%
聚合物（如马来酸 / 丙烯酸的共聚物，PVP，PEG）	1-3%
酶（以纯化的酶蛋白质计算）	0.0001-0.1%
小组分（如抑泡剂，香料）	0-5%

[0555] 5）一种水溶液洗涤剂组合物，该组合物包含

[0556]

线性烷基苯磺酸盐（以酸计）	15-21%
乙氧基脂肪醇（如 C_{12-15} 醇，7EO 或 C_{12-15} 醇，5EO）	12-18%
脂肪酸皂（如油酸）	3-13%
烯基琥珀酸（C_{12-14}）	0-13%
氨基乙醇	8-18%
柠檬酸	2-8%
膦酸盐	0-3%
聚合物（如 PVP，PEG）	0-3%
硼酸盐（计为 B_4O_7）	0-2%
乙醇	0-3%
丙二醇	8-14%
酶（以纯化的酶蛋白质计算）	0.0001-0.1%
小组分（如分散剂，抑泡剂，香料，光学增亮剂）	0-5%

[0557]

[0558] 6）一种含水结构化液体洗涤剂组合物，该洗涤剂包含：

[0559]

线性烷基苯磺酸盐（以酸计）	15-21%
乙氧基脂肪醇（如 C_{12-15} 醇，7EO 或 C_{12-15} 醇，5EO）	3-9%
脂肪酸皂（如油酸）	3-10%
沸石（计为 $NaAlSiO_4$）	14-22%
柠檬酸钾	9-18%
硼酸盐（计为 B_4O_7）	0-2%

羧甲基纤维素	0-2%
聚合物（如 PVP，PEG）	0-3%
锚定聚合物，如甲基丙烯酸月桂酯 / 丙烯酸共聚物；摩尔比 25 ： 1；MW 3800	0-3%
甘油	0-5%
酶（以纯化的酶蛋白质计算）	0.0001-0.1%
小组分（如分散剂，抑泡剂，香料，光学增亮剂）	0-5%

[0560] 7）一种制成粒剂的具有至少 600g/l 的堆密度的洗涤剂组合物，该组合物包含

[0561]

脂肪醇硫酸盐	5-10%
乙氧基化的脂肪酸单乙醇酰胺	3-9%
脂肪酸皂	0-3%
碳酸钠（计为 Na_2CO_3）	5-10%
可溶性硅酸盐（计为 $Na_2O,2SiO_2$）	1-4%
沸石（计为 $NaAlSiO_4$）	20-40%
硫酸钠（计为 Na_2SO_4）	2-8%
过硼酸钠（计为 $NaBO_3 \cdot H_2O$）	12-18%
TAED	2-7%
聚合物（如马来酸 / 丙烯酸的共聚物，PEG）	1-5%
酶（以纯化的酶蛋白质计算）	0.0001-0.1%
小组分（如光学增亮剂，抑泡剂，香料）	0-5%

[0562]

[0563] 8）一种制成粒剂的洗涤剂组合物，该组合物包含

[0564]

线性烷基苯磺酸盐（以酸计）	8-14%
乙氧基化的脂肪酸单乙醇酰胺	5-11%
脂肪酸皂	0-3%
碳酸钠（计为 Na_2CO_3）	4-10%
可溶性硅酸盐（计为 $Na_2O,2SiO_2$）	1-4%
沸石（计为 $NaAlSiO_4$）	30-50%
硫酸钠（计为 Na_2SO_4）	3-11%
柠檬酸钠（计为 $C_6H_5Na_3O_7$）	5-12%
聚合物（如马来酸 / 丙烯酸的共聚物，PEG）	1-5%
酶（以纯化的酶蛋白质计算）	0.0001-0.1%
小组分（如抑泡剂，香料）	0-5%

[0565] 9）一种制成粒剂的洗涤剂组合物，该组合物包含

[0566]

线性烷基苯磺酸盐（以酸计）	6-12%
非离子表面活性剂	1-4%
脂肪酸皂	2-6%
碳酸钠（计为 Na_2CO_3）	14-22%
沸石（计为 $NaAlSiO_4$）	18-32%
硫酸钠（计为 Na_2SO_4）	5-20%
柠檬酸钠（计为 $C_6H_5Na_3O_7$）	3-8%
过硼酸钠（计为 $NaBO_3 \cdot H_2O$）	4-9%
漂白活化剂（如 NOBS 或 TAED）	1-5%
羧甲基纤维素	0-2%
聚合物（如聚羧酸或 PEG）	1-5%

酶（以纯化的酶蛋白质计算）	0.0001-0.1%
小组分（如光学增亮剂，香料）	0-5%

[0567]

[0568] 10）一种液体洗涤剂组合物，该组合物包含

[0569]

线性烷基苯磺酸盐（以酸计）	15-23%
乙氧基醇硫酸酯（如 C_{12-15} 醇，2-3EO）	8-15%
乙氧基化醇（如 C_{12-15} 醇，7EO 或 C_{12-15} 醇，5EO）	3-9%
脂肪酸皂（如月桂酸）	0-3%
氨基乙醇	1-5%
柠檬酸钠	5-10%
水溶助剂（如甲苯磺酸钠）	2-6%
硼酸盐（计为 B_4O_7）	0-2%
羧甲基纤维素	0-1%
乙醇	1-3%
丙二醇	2-5%
酶（以纯化的酶蛋白质计算）	0.0001-0.1%
小组分（如聚合物，分散剂，香料，光学增亮剂）	0-5%

[0570] 11）一种液体洗涤剂组合物，该组合物包含

[0571]

线性烷基苯磺酸盐（以酸计）	20-32%
乙氧基化醇（如 C_{12-15} 醇，7EO 或 C_{12-15} 醇，5EO）	6-12%
氨基乙醇	2-6%
柠檬酸钠	8-14%

硼酸盐（计为 B_4O_7）	1-3%
聚合物（如马来酸 / 丙烯酸聚合物，锚定聚合物如甲基丙烯酸月桂酯 / α - 丙烯酸共聚物）	0-3%
甘油	3-8%
酶（以纯化的酶蛋白质计算）	0.0001-0.1%
小组分（如水溶助剂，分散剂，香料，光学增亮剂）	0-5%

[0572] 12）一种制成粒剂的具有至少 600g/l 的堆密度的洗涤剂组合物，该组合物包含

[0573]

非离子表面活性剂（线性烷基苯磺酸盐，烷基硫酸盐，α - 烯烃磺酸盐，α - 硫代脂肪酸甲基酯，烷磺酸盐，肥皂）	25-40%
非离子表面活性剂（乙氧基化醇）	1-10%
碳酸钠（计为 Na_2CO_3）	8-25%
可溶性硅酸盐（计为 $Na_2O,2SiO_2$）	5-15%
硫酸钠（计为 Na_2SO_4）	0-5%
沸石（计为 $NaAlSiO_4$）	15-28%
过硼酸钠（计为 $NaBO_3 \cdot 4H_2O$）	0-20%
漂白活化剂（TAED 或 NOBS）	0-5%
酶（以纯化的酶蛋白质计算）	0.0001-0.1%
小组分（如香料，光学增亮剂）	0-5%

[0574]

[0575] 13）如在 1)-12）中所述的洗涤剂制剂，其中线性烷基苯磺酸盐全部或部分由（C_{12}-C_{18}）烷基硫酸盐取代。

[0576] 14）一种制成粒剂的具有至少 600g/l 的堆密度的洗涤剂组合物，该组合物包含

[0577]

（C_{12}-C_{18}）烷基硫酸盐	9-15%

乙氧基化醇	3-6%
聚羟烷基脂肪酸酰胺	1-5%
沸石（计为 $NaAlSiO_4$）	10-20%
层焦硅酸钾（如得自 Hoechst 的 SK56）	10-20%
碳酸钠（计为 Na_2CO_3）	3-12%
可溶性硅酸盐（计为 $Na_2O,2SiO_2$）	0-6%
柠檬酸钠	4-8%
过碳酸钠	13-22%
TAED	3-8%
聚合物（如聚羧酸盐和 PVP）	0-5%
酶（以纯化的酶蛋白质计算）	0.0001-0.1%
小组分（如光学增亮剂，光漂白剂，香料，抑泡剂）	0-5%

[0578] 15）一种制成粒剂的具有至少 600g/l 的堆密度的洗涤剂组合物，该组合物包含

[0579]

（C_{12}-C_{18}）烷基硫酸盐	4-8%
乙氧基化醇	11-15%
肥皂	1-4%
沸石 MAP 或沸石 A	35-45%
碳酸钠（计为 Na_2CO_3）	2-8%
可溶性硅酸盐（计为 $Na_2O,2SiO_2$）	0-4%
过碳酸钠	13-22%
TAED	1-8%
羧甲基纤维素	0-3%
聚合物（如聚羧酸盐和 PVP）	0-3%

酶（以纯化的酶蛋白质计算）	0.0001-0.1%
小组分（如光学增亮剂，磷酸盐，香料）	0-3%

[0580]

[0581] 16) 如在 1)-15) 中所述的洗涤剂制剂，该制剂包含作为另外的组分或作为已经指出的漂白系统的替代物的稳定或胶囊化的过酸。

[0582] 17) 如在 1)、3)、7)、9) 和 12) 中所述的去垢组合物，其中所说的过硼酸盐被过碳酸盐替代。

[0583] 18) 如在 1)、3)、7)、9)、12)、14) 和 15) 中所述的去垢组合物，该组合物还包含锰催化剂。锰催化剂可以是，例如在“用于低温漂白的有效的锰催化剂”，自然 369，1994，637-639 中所描述的一种化合物。

[0584] 19) 制成非水溶液洗涤剂液体的去垢组合物，该组合物包含液态非离子表面活性剂如线性的烷氧基化伯醇、助洗剂系统（如磷酸盐）、酶和碱。洗涤剂也可以包含阴离子表面活性剂和 / 或漂白系统。

[0585] 内切葡聚糖酶可以以通常用于洗涤剂的浓度掺入。它包含在本发明的洗衣组合物中，纤维素酶可以以对应于每升洗液中 0.0001-10mg（以纯化的酶蛋白质计算）的纤维素酶添加。

[0586] 按照本发明的另一个方面，内切葡聚糖酶可典型地是织物调节剂或软化组合物的组分。通常的软化组合物的例子在例如 EP 0233910 中公开。

[0587] 纺织中的应用

[0588] 在另一个实施方案中，本发明涉及本发明的内切葡聚糖酶在生物抛光过程的用途。生物抛光是纱表面的特异性处理，这种处理改进了织物的手感和外观的质量，而不失去织物可湿性。生物抛光最重要的作用可通过很少起毛和形成丸状物、增加光彩 / 光泽、改进的织物手感、增加的耐用软度以及改变的吸水能力表征。生物抛光通常发生在针织和编织的织物制造的湿处理之中。湿处理包含如下步骤：脱浆、冲洗、漂白、洗涤、染色 / 印花和涂饰。在每个这样的步骤期间，织物或多或少地进行机械作用。通常，在针织和编织织物之后，织物进行到脱浆阶段，其后为冲洗阶段等。脱浆是从织物除去浆糊的作用。在机械织机上编织之前，为了增加弯曲的纱线的抗张强度，常常用浆糊淀粉或淀粉衍生物包被。在编织之后，浆糊包被物在进一步处理织物之前必须除去以确保均匀和防洗效果。已知为了达到生物抛光的效果，需要溶纤和机械作用的组合。还已知当用纤维素酶处理和用软化剂的常规处理结合时可达到“超软化”。可以设想本发明的内切葡聚糖酶用于纤维素织物的生物抛光是有优势的，如可达到更彻底的抛光。生物抛光可通过应用例如在 WO 93/20278 中所描述的方法获得。

[0589] 石洗

[0590] 已知可通过在浮石存在下洗涤斜纹粗棉布或从这样的织物制造的牛仔裤以提供所需的织物颜色的局部发亮或通过酶促处理织物（具体来说是用溶纤酶）在染色的织物（具体来说是在斜纹粗棉布织物或牛仔裤中）上提供“石洗的”外观（局部颜色磨损）。可以单独（如在 US 4,832,864 中所公开的）或与比在传统的方法较少量的浮石一起或与珍珠岩一起（如在 WO95/09225 中公开的）进行本发明的内切葡聚糖酶的处理。

[0591] 纸浆和纸上的应用

[0592] 在造纸纸浆工业中，本发明的内切葡聚糖酶有利地应用到如下方面：

[0593] -用于剥树皮：在机械转筒中剥树皮之前，用内切葡聚糖酶的预处理可降解形成层，从而有利于节能。

[0594] -用于脱纤维：因为纤维素酶对内部纤维表面的水解作用，在精制或打浆之前用内切葡聚糖酶处理含纤维素纤维的材料可导致能量消耗的减少。使用内切葡聚糖酶与使用已知的酶相比可导致改进的节能，因为人们相信：本发明的酶组合物具有更高的穿透纤维壁的能力。

[0595] -用于纤维改性，即纤维性质的改进，其中需要跨纤维壁的部分水解，这需要更深的穿透酶（如为了使粗糙的纤维更柔韧）。迄今为止，纤维的深度处理对高产量的纸浆（如机械纸浆或再循环纸浆的混合物）是不可能的。这归结于纤维壁结构的性质（因为纤维壁的孔基质的物理限制，该性质阻止酶分子的通过）。设想本发明的内切葡聚糖酶能渗入纤维壁。

[0596] -排水改进。造纸纸浆的排水能力可通过用水解酶（如纤维素酶）处理纸浆得到改进。木素纤维素纸浆的处理可按照例如在 WO 91/14819、WO91/14822、WO 92/18688 和 WO 92/17573 中的描述进行。

[0597] 植物材料的降解

[0598] 在另一个实施方案中，本发明涉及按照本发明的内切葡聚糖酶和 / 或酶制剂用于植物材料（如细胞壁）降解的用途。

[0599] 本发明涉及为了增加产量在酒、水果或蔬菜汁中应用本发明新内切葡聚糖酶和 / 或酶制剂。按照本发明的内切葡聚糖酶也可用于各种植物细胞衍生的材料或废材料的酶促水解，如农业残余物，如麦秸杆、玉米穗轴、整株玉米植物、核果壳、草、蔬菜壳、豆壳、谷壳、甜菜浆等。为了改进不同种类的加工、促进其它组分的纯化或提取（如从谷物中纯化 β-葡聚糖或 β-葡聚糖低聚物）、改进食物价值、减少水结合量、在废水植物中提高降解、提高（如秣草保藏法的草和谷类的）转化等，可以降解植物材料。

[0600] 下列实施例说明本发明。

[0601] 实施例 1

[0602] 通过表达克隆检测了 4 种真菌的溶纤酶，这 4 种真菌属于子囊菌纲的两个目之内的 3 个科；测定了相应的 DNA 序列；异源表达和通过液体发酵产生的酶在颜色澄清测定中进行特征分析，表明其具有良好的性能。

[0603] 使分离物 CBS 117.65、CBS 478.94、NRRL 8126 和 ATCC 10523 在振荡烧瓶培养器中在富含纤维素的马铃薯右旋糖培养液中生长，在 26℃下培养 5 天（振荡条件，150rpm）。

[0604] A.Myceliophthora thermophila、Acremonium sp.、Thielaviaterrestris 和 Volutella colletotrichoides 的内切葡聚糖酶的克隆和表达

[0605] 分别分离 Myceliophthora thermophila、Acremoniumsp.、Thielaviaterrestris 和 Volutella colletotrichoides 的 mRNA，这些生物体生长在含有纤维素的发酵培养基（振荡培养基以确保充分换气）中。在生长 3-5 天后收获菌丝，立即把菌丝在液氮中冷冻，并且储存在 -80℃下。在所描述的大肠杆菌中利用 1％的载体背景分别构建 Myceliophthora、thermophilaAcremonium sp.，Thielavia terrestris 和 Volutellacolletotrichoides 的

文库，每个文库中含有大约 10^6 个单个克隆。

[0606] 把每一个文库的一些集合的质粒 DNA 转化到酵母中，从每一个集合中得到了含有 250-400 个酵母菌落的 50-100 个平板。

[0607] 利用 AZCL HE 纤维素测定法在 SC- 琼脂平板上鉴别和分离内切葡聚糖酶 - 阳性菌落。从酵母菌落直接扩增 cDNA 插入物，并且利用以上材料和方法部分中描述的方法进行性质分析。

[0608] SEQ ID NO :1 显示了编码 Myceliophthora thermophila 的内切葡聚糖酶的 cDNA 的 DNA 序列，SEQ ID NO :1 也显示了相应氨基酸序列。从 DSM 9770 的质粒中可以获得此 cDNA。

[0609] 编码 Acremonium sp. 的内切葡聚糖酶的 cDNA 的 DNA 序列列于 SEQ ID NO :4 中，相应氨基酸序列列于 SEQ ID NO :5 中。从 DSM 10082 的质粒中可以获得此 cDNA。

[0610] 编码 Thielavia terrestris 的内切葡聚糖酶的 cDNA 的 DNA 序列列于 SEQID NO : 8 中，相应氨基酸序列列于 SEQ ID NO :9 中。从 DSM 10081 的质粒中可以获得此 cDNA。

[0611] 编码 Volutella colletotrichoides 的内切葡聚糖酶的 cDNA 的 DNA 序列列于 SEQ ID NO :16 中，相应氨基酸序列列于 SEQ ID NO :17 中。从 DSM 10571 的质粒中可以获得该 cDNA。

[0612] 从酵母菌落分离出总 DNA，并且通过转化以上所述的大肠杆菌救援质粒 DNA。为了在米曲霉属中表达内切葡聚糖酶，用适当的限制性内切酶消化 DNA，在凝胶上进行片断分级分离，分别纯化与 Myceliophthorathermophila、Acremonium sp.、Thielavia terrestris 如 Volutellacolletotrichoides 内切葡聚糖酶基因相应的片段，其后把基因连接到用适当的限制性内切酶消化的 pHD414 中，分别形成了质粒 pA2C357、pA2C193、pA2C385 和 pA2C488。

[0613] 在大肠杆菌中扩增 DNA 之后，把质粒转化到以上所述的米曲霉中。

[0614] 米曲霉转化体试验

[0615] 如上所述试验每个转化体的内切葡聚糖酶的活性。一些转化体比米曲霉背景具有更大的内切葡聚糖酶活性。这表明了在米曲霉中内切葡聚糖酶的有效表达。利用 YPM 培养基在 500ml 摇瓶中选择和接种了具有最高的内切葡聚糖酶活性的转化体。在发酵（为确保良好的通气进行充分的搅拌）3-5 天后，把培养液以 2000g 离心 10 分钟，并且回收上清液。

[0616] B. 内切葡聚糖酶活性的测定

[0617] 可以测定内切葡聚糖酶相当于分析标准物的溶纤活性，并且以单位 S-CEVU 表示。

[0618] 溶纤酶水解 CMC，因此减少了培养混合物的粘度。可以通过振动粘度计（例如法国 Sofraser，MIVI 3000）测定产生的粘度减弱。

[0619] 可以按照 AF 301.1 分析方法进行以 S-CEVU 测量的溶纤活性的测定。这种方法可以向本申请人索取。

[0620] 通过测量样品的减少羧甲基纤维素 (CMC) 溶液粘度的能力，S-CEVU 测定方法量化了样品中的催化活性。测定在 40℃、pH7.5 的条件下进行，同时利用了降低 CMC 底物粘度的相关的酶标准物。

[0621] 利用磷酸饱和纤维素 (PASC) 以 SAVI 单位测定内切葡聚糖酶活性的测定方法：

[0622] 定义：

[0623] 1SAVI-U 是形成一定量的还原碳水化合物（相当于每分钟 1 μ mol 的葡萄糖）的酶量。

[0624] 测定条件：

[0625] 酶溶液：0.5ml

[0626] 0.1M 缓冲液中的 4g/PASC：2.0ml

[0627] 20 分钟，40℃

[0628] 敏感性：

[0629] 最大 0.1SAVIU/ml ＝大约 1S-CEVU/ml(CMC 粘度）

[0630] 最小 0.01SAVIU/ml ＝大约 0.1S-CEVU/ml

[0631] 还原糖形成的测定：

[0632] 按照 Lever，M. 比色法测定碳水化合物的一种新反应（生物化学年报 1972.vol 47(273-279)）进行还原基团的测定。通过把 1.5 克对羟苯甲酸氢酸 (PHBILH) 和 5 克酒石酸钠在 100ml 的 2％氢氧化钠中混合制备试剂混合物。

[0633] 底物：

[0634] 利用冰冻丙酮和磷酸按照下面的方式制备 PASC 贮液。把 5 克纤维素 (Avicel) 用水湿润，加入 150ml 85％的冰冻正磷酸。把混合物放置在冰浴中，缓慢搅拌 1 小时。然后加入 100ml 冰冻丙酮并且搅拌。把浆液转移到带有烧结的 3 号 pyrex 盘的 Buchner 过滤器中，并且用冰冻丙酮洗涤三次，每次洗涤之后尽可能吸干。最后把滤饼用 500m 1 水洗涤两次，每次洗涤之后尽可能吸干。把 PASC 与去离子水混合，使总体积达到 300ml，均匀混合（使用超 Turrax 均化器），并且保存在冰箱中（达一个月）。

[0635] 用缓冲液平衡底物：20 克磷酸饱和的纤维素 PASC 贮液以 5000rpm. 离心 20 分钟，倒出上清液；沉淀在 30ml 缓冲液中再悬浮并在 5000rpm. 下离心 20 分钟。倒出上清液，将总共 60 克的沉淀以 5 克纤维素 / 升的浓度悬浮在缓冲液中。

[0636] pH 8.5 的测定缓冲液：0.1M 巴比妥。

[0637] pH 10 的测定缓冲液：0.1M 甘氨酸。

[0638] 方法：

[0639] 1. 酶样品的稀释

[0640] 将酶溶液在与底物相同的缓冲液中稀释。

[0641] 2. 酶反应

[0642] 将缓冲溶液中的底物在 42℃下预热 5 分钟 (2ml)。然后加入 0.5ml 酶溶液（稀释至 0.2-1S-CEVU/ml)，混合 5 秒钟。通过在酶溶液中添加终止试剂获得酶空白。40℃下培养 20 分钟。通过加入 0.5ml 2％ NaOH 溶液并混合 5 秒钟终止反应。

[0643] 将样品以 5000rpm. 离心 20 分钟。将 1ml 上清液与 0.5ml PHBAH 试剂混合，并且煮沸 10 分钟。试管在冰水浴中冷却。

[0644] 3. 还原末端基团的确定

[0645] 使用分光光度计在 410nm 测量吸收率。通过在加入酶溶液之前加入氢氧化钠制备空白。利用在相同缓冲液中的 5，10，15 和 25mg/l 浓度的葡萄糖和在煮沸之前加入 PHBAH 试剂获得葡萄糖标准曲线。利用标准曲线计算释放的还原葡萄糖当量。

[0646] 4. 催化活性的计算

[0647] 测量 410nm 的吸收率

[0648] 1) 标准曲线

[0649] (葡萄糖)-(H_2O) 对葡萄糖的浓度

[0650] 2) 酶样品

[0651] (样品)-(空白)

[0652] 按照标准曲线计算葡萄糖浓度

[0653] 活性 (SAVIU/ml) :

[0654]

$$\frac{X(\text{mg 葡萄糖/l})*\text{稀释液}}{180.16(\text{葡萄糖的分子量})*20(\text{分钟})}$$

[0655] C.M.termophila 的内切葡聚糖酶的纯化和性质分析

[0656] 将 pA2C193 转化的米曲霉在 YPM 培养基上培养 4 天。然后将液体离心并无菌过滤。

[0657] 利用 20kD 阈值的 DOW 膜 GR61PP 通过在 AMICON 室中的超滤作用浓缩样品。分析超滤浓缩物的 S-CEVU/ml 和 SaviU/ml,得到下列结果 :

[0658]

Uf- 浓缩物	S-CEVU/ml	SayiU/ml
9.25ml	570	41

[0659] 纯化 :

[0660] 把 2 毫升 UF- 浓缩物稀释 5 倍,以降低其离子强度,并通过 0.22μm 圆板过滤器过滤。将样品加入到用 50mM Tris/HCl 缓冲液 (pH 7.5) 平衡的 Mono Q HR/5Pharmacia 柱上,流速为 1 毫升 / 分钟。在用缓冲液 A 洗脱到基线时,用含有 1M NaCl(缓冲液 B) 的 Tris/HCl 缓冲液 (pH7.5) 洗脱,梯度洗脱是在 1 小时之内缓冲液 B 从 0-50% 变化。

[0661] 36 分钟后,出现高峰复合物,收集每份 1ml 的流份,将最初的 10 个流份在羧甲基纤维素 / 琼脂糖 / 刚果红的平板上显示纤维素酶活性。

[0662] 合并这些流份,并利用 20kD 阈值的 DOW 膜 GR61PP 通过在 AMICON 室中的超滤作用浓缩至 3 毫升。

[0663] 将样品加入到用 100mM Tris/HCl 缓冲液 (pH 6.35) 平衡的 HiLoad 2660Superdex 75™ prep 梯度 Pharmacia 柱上,流速为 1 毫升 / 分钟。

[0664] 82 分钟后,出现高峰,每份 1ml 收集流份,最初的 10 个流份在羧甲基纤维素 / 琼脂糖 / 刚果红的平板上显示纤维素酶活性。

[0665] 合并这些流份,得到的结果如下 :

[0666] A_{280} = 0.15

[0667] A_{280}/A_{260} = 1.62

[0668] Mw(SDS) = 22kD

[0669] pI = 3.5-5

[0670] SDS-PAGE 上的纯度= 100%

[0671] S-CEVU/ml = 28.5

[0672] S-CEVU/A_{280} = 188

[0673] S-CEVU/mg = 436

[0674] 消光系数= 54880(计算的)

[0675] Mw(计算的) = 22kD

[0676] 消光系数是以由所附的SEQ ID NO:1(氨基酸序列)的序列计算的酪氨酸、色氨酸和半胱氨酸的含量为基础。在NOVEX Pre-Cast凝胶4-20% Tris-甘氨酸凝胶1.0mm×10孔上进行SDS-Page。

[0677] 在Pharmacia PAG板(pH3.5-9.5)上进行IEF,由羧甲基纤维素-刚果红覆盖显现出活性。

[0678] K_M和K_{cat}的测定:

[0679] 在pH 8.5和底物浓度多达8克/毫升的情况下,以与测定SAVI单位相同的方式测定K_m和K_{cat}。

[0680] 得到下列结果:

[0681] K_{cat}为38/每秒,

[0682] K_m为5g/l,

[0683] 磷酸饱和纤维素,pH 8.5。

[0684] 在pH 7.5时对羧甲基纤维素的比活性:每毫克蛋白质436S-CEVU。

[0685] D.M.thermophila的内切葡聚糖酶的pH和温度分布图的确定

[0686] 在下列条件下测定pH的分布图:

[0687] 通过把0.1M Tri-磷酸钠与0.1M柠檬酸混合制备pH值在2.5-10.0之间的缓冲液。稀释纯化的内切葡聚糖酶以便确保测定反应在测定的线性范围内。底物是0.4% AZCL-HE-纤维素(MegaZyme)的悬液,其以1:1和柠檬酸/磷酸盐缓冲液混合,使最终的底物浓度为0.2% AZCL-HE-纤维素。向Eppendorf®1.5ml聚丙烯管中的1ml底物加入10μl酶溶液,并在Eppendorf®控温热混合仪(Thermomixer)中培养15分钟,然后将酶在另一热混合仪中95℃下热灭活20分钟。离心,并将200μl的各上清液转移到96孔微量滴定板的各个孔中,通过ELISA读数仪(Labsystems Multiskan®MCC/340)在620nm测量OD。最适pH的培养温度是30℃。对于每个pH值,三个管中都加入了酶并在热灭活之前培养,而一个管(空白)加入酶并立即热灭活。计算了三个培养样品的平均值,并减去空白值。

[0688] 测定了下列pH下分布:

[0689]

pH	相对活性
2.5	< 10%
3	< 10%
3.5	22%
4	87%

4.5	89%
5	100%
6	94%
6.5	86%
7	78%
7.5	73%
8	68%
8.5	54%
9	31%
10	18%

[0690] 可以看出内切葡聚糖酶在 pH4.0 和 8.0 之间有 60％以上的活性，最佳活性在 pH5.0-6.0

[0691] 温度分布：

[0692] 在 pH 5.5 下以相同的方式确定最佳温度。温度范围从 30℃到 80℃。对于每种温度，进行三个培养，并计算平均值。通过酶的即刻热灭活产生三个空白，并从培养的样品值减去空白的平均值。

[0693] 可以看出内切葡聚糖酶在 50-70℃时具有最佳活性。

[0694]

温度（℃）	30	40	50	60	70	80
相对活性	74%	77%	99%	100%	93%	62%

[0695] 在 pH 5.5 和 30℃下，以相同的方式测定温度稳定性，并将所说的酶溶液在此温度下预热 1 小时。下表显示没有预热的酶样品的百分活性：

[0696]

温度（℃）	40	50	60	70	80
相对活性	95%	84%	92%	86%	24%

[0697] E. 以毁丝霉属纤维素酶（SEQ ID NO.1）除去表面纤丝和从含有纤维素纤维的织物中突出的纤维为指标测量其对颜色的净化

[0698] 仪器：Terg-O-tometer

[0699] 液体体积：100ml

[0700] 搅拌：150 次 / 分钟的垂直搅拌器

[0701] 冲洗时间：自来水 5 分钟

[0702] 洗涤温度：40℃

[0703] 洗涤液体：0.05M 磷酸盐缓冲液

[0704] pH：7.0

[0705] 洗涤时间：30 分钟

[0706] 重复：2 次

[0707] 酶：毁丝霉属 SEQ ID NO.1B

[0708] 剂量：500 和 2500S-CEVU/l

[0709] 织物：2 块旧的黑色 100％棉布样品，5×6cm(0.9 克）

[0710] 干燥：滚动干燥

[0711] 评价：由 Datacolor Elrepho 反射分光光度计测量光反射 (Remission)。将反射值计算成 ΔL(Hanter 实验室值）。当纤维素酶除去表面纤丝和从纱中突出的纤维时，黑色织物的表面看起来更黑，并得到更低的 L 值。

[0712] 将所说的样品和对照样品（即没有酶洗涤的样品）比较：

[0713] 没有纤维素酶 500ECU/l 2500ECU/l

[0714] 0.00 -1.41 -1.91

[0715] ΔL 值和对照样品比较。

[0716] 所得的数据显示在试验的条件下，没有 CBD 的毁丝霉属纤维素酶给出很好的颜色澄清作用。

[0717] F.Myceliophthora thermophila 的内切葡聚糖酶和 Humicola insolens 的 43kD 内切葡聚糖酶的基因融合体的构建

[0718] 这两种构建的目的在于制造 M.thermophila 的内切葡聚糖酶的衍生物，这种衍生物具有接头和 H.insolens（在 WO 91/17243 中公开）的 43kD 内切葡聚糖酶的 CBD。M.thermophila 的天然内切葡聚糖酶没有接头和 / 或纤维素结合域 (CBD)。

[0719] CM1：构建体 1 由 M.thermophila 的内切葡聚糖酶 (225 个氨基酸）和 H.insolens 的 43kD 内切葡聚糖酶的 72 个 C- 末端氨基酸组成。

[0720] CM2：构建体 2 由 M.thermophila 的内切葡聚糖酶 (225 个氨基酸）和 H.insolens 的 43kD 内切葡聚糖酶的 83 个 C- 末端氨基酸组成。

[0721] 以从 Taka- 启动子转录内切葡聚糖酶基因的方法将 H.insolens 的 43kD 内切葡聚糖酶 cDNA 克隆到 pHD414 中。形成的质粒命名为 pCaHj418。

[0722] 以相似的方法将 M.thermophila 的内切葡聚糖酶的 cDNA 克隆到 pHD414 中，形成的质粒命名为 pA2C193。

[0723] 引物 1：5′ -

[0724] CGGAGCTCACGTCCAAGAGCGGCTGCTCCCGTCCCTCCAGCAGCACCAGCTCTCCGG

[0725] -3′

[0726] 引物 2：5′

[0727] CCGGAGAGCTGGTGCTGCTGGAGGGACGGGAGCAGCCGCTCTTGGACGTGAGCTCCG

[0728] -3′

[0729] 引物 3：5′ -

[0730] CGGAGCTCACGTCCAAGAGCGGCTGCTCCCGTAACGACGACGGCAACTTCCCTGCCG

[0731] -3′

[0732] 引物 4 :5′ -

[0733] CGGCAGGGAAGTTGCCGTCGTCGTTACGGGAGCAGCCGCTCTTGGACGTGAGCTCCG

[0734] -3′

[0735] Taka-pro. 引物 :5′ CAACATCACATCAAGCTCTCC-3′

[0736] AMG-term. 引物 :5′ CCCCATCCTTTAACTATAGCG-3′

[0737] 通过如 Higuchi 等 (1988) 描述的 PCR 重叠延伸方法构建内切葡聚糖酶融合体。

[0738] 构建体 1 :

[0739] 反应 A :利用聚合酶链反应 (PCR) 扩增引物 1 和 AMG-term. 引物之间的 pCaHj418 的片段 (H. insolens 的 43kD 内切葡聚糖酶的接头和 CBD 部分)。

[0740] 反应 B :pA2C193 中的 Taka-pro 引物和引物 2 之间的片段 (M. thermophila 的内切葡聚糖酶基因) 的 PCR 扩增。

[0741] 反应 C :在整个侧翼区引物 (即 Taka-pro 引物和 AMG-term. 引物) 存在的情况下,在第三个 PCR 中利用前面的两个纯化的片断。

[0742] 构建体 2 :

[0743] 利用同样的方法,其中引物 3 和引物 4 分别替代引物 1 和引物 2。

[0744] 纯化反应 C 中扩增的片段,以限制酶 Xba I 和 BsstE II 消化。将纯化的消化片段连接在以限制酶 Xba I 和 BsstE II 消化的 pA2C193 上。

[0745] 用连接的质粒转化大肠杆菌菌株 DH5αF′ (新英格兰生物实验室) 的感受态细胞,并分离包含基因融合体的克隆。通过 DNA 测序验证克隆部分的序列。

[0746] SEQ ID NO :2A 和 SEQ ID NO. 3A 显示了两个构建体的基因序列。

[0747] 在如 Perkin-Elmer 推荐的标准条件下进行聚合酶链反应。

[0748] 反应 A 和 B 以 94℃ 2 分钟开始,之后是 20 个循环 (30 秒钟,94℃ ;30 秒钟,50℃ ;1 分钟,72℃),并以 72℃ 4 分钟结束。

[0749] 反应 C 以 (2 分钟,94℃ ;1 分钟,52℃ ;和 2 分钟,72℃) 开始,之后是 15 个循环 (30 秒钟,94℃ ;30 秒钟,52℃ ;90 秒钟,72℃),并以 72℃ 4 分钟结束。

[0750] 如上面所述,将这两个构建体转化到米曲霉中。

[0751] G. 克隆的带有纤维素结合域的纤维素酶的纯化和性质分析

[0752] 发酵后,从生产菌的胞外液分离回收克隆产物。

[0753] 然后,在含 pH 7.5 的 20mM 磷酸钠的浆液中使用 150 克的微晶纤维素,通过亲合层析高度纯化大约 1 克的纤维素酶。

[0754] 将所说的微晶纤维素与共含约 1 克纤维素酶的粗发酵液混合。在 4℃下混合 20 分钟后,将所说的微晶纤维素酶装入大小为 50×200mm 的总体积 400 毫升的柱中。

[0755] 将柱用 200ml 缓冲液洗涤,然后在相同的缓冲液中以 0.5M NaCl 洗涤直到不再有蛋白质洗脱涂。然后以 500ml 20mm 的 Tris(pH 8.5) 洗涤。最后以 1%三乙胺 (pH 11.8) 洗脱纯化的全长酶。

[0756] 将洗脱下来的酶溶液调至 pH 8,并利用带有膜 DOW GR61PP(阈值为 20kD 的聚丙烯) 的 Amicon 室浓缩至每毫升含有 5mg 以上的蛋白质。

[0757] 纯化的纤维素酶性质分析如下：

[0758]		Mw	PI	摩尔 E.280	S-CEVU
[0759]		SDS-PAGE			/A.280
[0760]	毁丝霉属 (SEQ ID No.2)	43kD	4	74.950	135
[0761]	顶孢霉属 (SEQ ID No.5)	40kD	5	68.020	185
[0762]	梭孢壳属 (SEQ ID No.9)	35kD	4.3	52.470	75

[0763]		活性超过 50%	N 末端	热稳定性 DSC
[0764]		的 pH		
[0765]	毁丝霉属 (SEQ ID No.2)	5.0-9.0	封阻的	80℃
[0766]	顶孢霉属 (SEQ ID No.5)	6.0-9.5	封阻的	61℃
[0767]	梭孢壳属 (SEQ ID No.9)	5.0-9.0	ASGSG---	83℃

[0768] 通过 SDS-PAGE 分析纤维素酶的分子量，并利用 Pharmacia 的标准 LMW 蛋白质标记试剂盒计算纤维素酶的分子量。分子量明显高于编码氨基酸的组成的分子量，这是因为接头区是 O- 糖基化的，结果导致高分子量。使用 Pharmacia 两性电解质 PAG 板 (pH3.5 至 9.5) 并再使用带有已知 PI 的蛋白质的 Pharmacia 试剂盒确定 PI。

[0769] 利用已知吸收率的色氨酸、酪氨酸和半胱氨酸以氨基酸组成为基础计算摩尔消光系数。

[0770] 利用羧甲基纤维素作为底物，以 0.5pH 为间隔在 40℃下培养 20 分钟并计算还原糖的形成而获得 pH 活性分布图。计算了不同 pH 下的相对活性，表中包含有超过 50％相对活性的间隔点。

[0771] 利用应用生物系统模型 473A 测序仪确定了纯化的纤维素酶的 N- 末端。按照制造商的说明操作此蛋白质测序仪。

[0772] 两个纤维素酶被封阻，这是因为形成致热谷氨酸盐的 N- 末端谷氨酰胺，无法检测致热谷氨酸盐，并且其阻断了进一步的测序。

[0773] 利用 MicroCalc 公司的具有连续扫描速率的 MC 热量计 (calorimeter)，并将温度以每小时 90℃的速率从 20℃升至 90℃，在中性 pH(7.0) 下进行 DSC 差示扫描量热法。

[0774] 产生抗体。利用毁丝霉属、顶孢霉属和梭孢壳属的纤维素酶在兔中产生抗体。将 0.1 毫克纯化的溶解在 0.9％ NaCl 溶液中的纤维素酶在注射前与弗氏佐剂混合。以一周间隔将兔免疫 10 次。通过硫酸铵沉淀 (25％饱和) 纯化免疫球蛋白 G 组分 (IgG)。在水中溶解沉淀，然后对乙酸钠缓冲液 (pH5.0，50mM)(随去离子水的改变而改变) 进行彻底透析。过滤后，IgG 组分由叠氮化钠 (0.01％) 稳定。

[0775] 利用琼脂平板中的免疫扩散，三个纤维素酶都和其同源的抗血清形成单一的免疫沉淀物，在 3 个克隆的纤维素酶和抗其它两种纤维素酶产生的抗血清之间没有见到沉淀。

[0776] H-I. 在缓冲液中测量构建体 1 内切葡聚糖酶 (SEQ ID No.2) 除去表面纤丝和除去含纤维素纤维的织物中突出的纤维的性能

[0777] 仪器 :Terg-O-tometer

[0778] 液体体积 :100ml

[0779] 搅拌 :150 次 / 分钟 (rpm)

[0780] 冲洗时间 :自来水 5 分钟

[0781] 洗涤温度 :40℃

[0782] 水硬度 :1mM $CaCl_2$

[0783] 洗涤液体 :0.05M 磷酸盐缓冲液

[0784] pH :7.0

[0785] 洗涤时间 :30 分钟

[0786] 重复 :2 次

[0787] 织物 :2 块旧黑色 100％棉布样品,5×6cm

[0788] 干燥 :滚动干燥

[0789] 评价 :

[0790] 由 Macbeth Color Eye7000 反射分光光度计测量光的反射。将反射值计算成 ΔL(Hanter 实验室值)。当由纤维素酶除去表面纤丝和除去纱中突出的纤维时,黑色织物的表面看起来更亮,并得到更低的 L 值。

[0791] 结果 :

[0792]

S-CEVU/l	0	250	1000
本发明酶	0	-1.4	-1.6

[0793] 所得的数据显示在试验条件下,本发明的酶给出很好的颜色澄清度。

[0794] H-II. 在缓冲液中测定克隆的梭孢壳属的内切葡聚糖酶 (SEQ ID No.9) 除去表面纤丝和除去含纤维素纤维的织物中突出的纤维的性能

[0795] 仪器 :Terg-O-tometer

[0796] 液体体积 :100ml

[0797] 搅拌 :150 次 / 分钟,垂直搅拌

[0798] 冲洗时间 :自来水 10 分钟

[0799] 洗涤温度 :40℃

[0800] 洗涤液体 :0.05M 磷酸盐缓冲液

[0801] pH :7.0

[0802] 洗涤时间 :30 分钟

[0803] 重复 :2 次

[0804] 织物 :2 块旧黑色 100％棉布样品,5×6cm

[0805] 干燥 :滚动干燥

[0806] 评价 :

[0807] 由 Macbeth Color Eye7000 反射分光光度计测量光的反射。将反射值计算成 ΔL(Hanter 实验室值)。当由纤维素酶除去表面纤丝和除去纱中突出的纤维时,黑色织物的表面看起来更黑和更好,并得到更低的 L 值。

[0808] 结果 :

[0809]

S-CEVU/l	0	50	1200

本发明酶	0	-0.66±0.10	-1.32±0.06

[0810] 所得的数据显示在试验的条件下，本发明的酶给出很好的颜色澄清度。

[0811] H-III. 在缓冲液中测定 Volutella colletrichoides 的内切葡聚糖酶 (SEQ ID No.17) 除去表面纤丝和除去含有纤维素纤维的织物中突出的纤维的性能

[0812] 仪器 :Terg-O-tometer

[0813] 液体体积 : :100ml

[0814] 搅拌 :150 次 / 分钟，垂直搅拌

[0815] 冲洗时间 :自来水 5 分钟

[0816] 洗涤温度 :40℃

[0817] 洗涤液体 :0.05M 磷酸盐缓冲液

[0818] pH :7.0

[0819] 洗涤时间 :30 分钟

[0820] 重复 :2 次

[0821] 剂量 :2.5S-CEVU/ml

[0822] 织物 :2 块旧黑色 100％棉布样品，5×6cm(0.9 克)

[0823] 干燥 :滚动干燥

[0824] 评价 :

[0825] 由 Datacolor Elrepho 反射分光光度计测量光的反射。将反射值计算成 ΔL(Hanter 实验室值)。当由纤维素酶除去表面纤丝和除去纱中突出的纤维时，黑色织物的表面看起来更黑，并得到更低的 L 值。

[0826] 将此样品和对照样品 (即没有酶洗涤的样品) 比较 :

[0827] 没有纤维素酶 有纤维素酶

[0828] 0.00 -0.57

[0829] 和对照样品比较的 ΔL 反射值。

[0830] 所得的数据显示在试验条件下，Volutellh colletrichoides 纤维素酶给出很好的颜色澄清度。

[0831] H-IV. 在高 pH 高载洗涤剂中测量克隆的 Thielavia terrestris 和 Aclemonium sp.CBS 478.94 的纤维素酶除去表面纤丝和除去含有纤维素纤维的织物中突出的纤维的性能

[0832] 仪器 :Terg-O-tometer

[0833] 液体体积 :150ml

[0834] 搅拌 :150 次 / 分钟，垂直搅拌

[0835] 冲洗时间 :自来水 10 分钟

[0836] 洗涤温度 :35℃

[0837] 洗涤液体 :1.0g/l 的 US 型 HDG(沸石 / 苏打助剂，阴离子 / 非离子重量比 > 2.5)

[0838] pH :10.0

[0839] 硬度 :1.0mM$CaCl_2$

[0840] 0.34mM $MgCl_2$

[0841] 洗涤时间 :12 分钟

[0842] 重复 :6 次

[0843] 织物 :2 块旧黑色棉布样品,5×6cm(约 150g/m^2)

[0844] 2 块深色针织棉布样品,5×6cm(约 600g/m^2)

[0845] 干燥 :滚动干燥

[0846] 评价 :

[0847] 由 Datacolor Elrepho 反射分光光度计测量光的反射。将反射值计算成 ΔL(Hanter 实验室值)。当由纤维素酶除去表面纤丝和除去纱中突出的纤维时,黑色织物的表面看起来更黑和更好,并得到更低的 L 值。分别试验了 Thielavia teryestris(SEQ ID NO :9) 和 Acremonium sp.CBS 478.94(SEQID NO :5) 的克隆纤维素酶的不同剂量 (分别称为 A 和 B)。

[0848] 结果 :

[0849]

S-CEVU/l	0	500	2000
A	0	-2.09 ±0.22	-2.86 ±0.19
B	0	-0.60 ±0.36	-1.96 ±0.23

[0850] 所得的数据显示在试验条件下,两种纤维素酶都给出很好的颜色澄清度。

[0851] H-V. 测量从 Thielavia terrestris 和 Aclemonium sp.CBS 478.94 以及构建体 1(SEQ ID No.2) 克隆的纤维素酶除去表面纤丝和除去含纤维素纤维的织物中突出的纤维的性能

[0852] 仪器 :Terg-O-tometer

[0853] 液体体积 :150ml

[0854] 搅拌 :150 次 / 分钟,垂直搅拌

[0855] 冲洗时间 :自来水 10 分钟

[0856] 洗涤温度 :35℃

[0857] 硬度 :1.0mM $CaCl_2$

[0858] 0.34mM $MgCl_2$

[0859] 洗涤液体 :2.0g/l 的 HDL(中性,柠檬酸助剂 HDL,非离子 / 阴离子重量比 > 0.5)

[0860] pH :7.0

[0861] 洗涤时间 :30 分钟

[0862] 重复 :2 次

[0863] 织物 :2 块旧黑色棉布样品,5×6cm(约 150g/m^2)

[0864] 2 块深色针织棉布样品,4×7cm(约 600g/m^2)

[0865] 干燥 :滚动干燥

[0866] 评价 :

[0867] 由 Datacolor Elrepho 反射分光光度计测量光的反射。将反射值计算成 ΔL(CIE 实验室值)。当由纤维素酶除去表面纤丝和除去纱中突出的纤维时,黑色织物的表面看起来更黑和更好,并得到更低的 L 值。分别试验了 Thielavia terrestris(SEQ ID NO:9) 和 Acremonium sp.CBS 478.94(SEQID NO:5) 及构建体 1(SEQ ID NO:2) 的克隆纤维素酶的不同剂量(分别称为 A 和 B 及 C)。

[0868] 结果:

[0869]

S-CEVU/l	0	100	200	400
A	0	-3.06 ±0.24	-3.15 ±0.27	-3.92 ±0.26
B	0	-1.75 ±0.27	-3.08 ±0.32	-3.51 ±0.44
C	0	-1.84 ±0.39	-1.70 ±0.47	-2.30 ±0.61

[0870] 所得的数据显示在试验条件下,所有的纤维素酶都给出很好的颜色澄清度。

[0871] I. 应用 Thielavia terrestris 和 Acremonium sp. 及构建体 1(SEQ ID NO.2) 的内切葡聚糖酶对斜纹粗棉布修整

[0872] 实验

[0873] 仪器:洗涤机 Wascator FL 120

[0874] 液体体积:20 升

[0875] 织物:1.1kg 斜纹粗棉布织物,14.5 OZ 100%棉布

[0876] 脱浆:10 分钟,55℃,pH 7

[0877] 50ml Aquazyme 120L

[0878] 2.5g/l 磷酸盐缓冲液

[0879] 磨蚀:2 小时;

[0880] pH 和温度根据下表变化:

[0881]

酶	活性	pH/ 温度	缓冲液系统
SFQ ID No.2	1400S-CEVU/g	6/55℃	2.5g/l 磷酸盐缓冲液
No.9	292S-CEVU/g	5/65℃	1g/l 柠檬酸缓冲液
No.5	782S-CEVU/g	7/45℃	2.5g/l 磷酸盐缓冲液

[0882] 灭活:15 分钟,80℃

[0883] 1g/l 碳酸钠

[0884] 冲洗:在冷的自来水中,三个冲洗循环,各 5 分钟

[0885] 评价：

[0886] 利用 Texflash 2000 作为磨蚀水平的测量手段，在 420nm 下测定织物的反射。

[0887] 用本发明的不同内切葡聚糖酶处理斜纹粗棉布织物，结果列于下表：

[0888]

酶	剂量	实验条件	磨蚀 420nm
空白	0S-CEVU/g 织物	pH 6,55℃	9.96
SEQ ID No.2	10S-CEVU/g 织物	pH 6,55℃	14.37
空白	0S-CEVU/g 织物	pH 5,65℃	9.26
SEQ ID No.9	10S-CEVU/g 织物	pH 5,65℃	16.86
空白	0S-CEVU/g 织物	pH 7,45℃	9.47
SEQ ID No.5	10S-CEVU/g 织物	pH 7,45℃	14.08

[0889]

[0890] 在斜纹粗棉布实验中，所有试验纤维素酶都显示极好的性能，尽管每一种酶有其自身的作用方式。当在斜纹粗棉布实验中应用 SEQ ID NO:2 的酶时，可能达到较高的磨蚀水平，同时强度损失很小。当使用 SEQ ID NO:9 的酶处理斜纹粗棉布时，可以达到非常高的洗褪效果，几乎使织物达到漂白的外观。当使用 SEQ ID NO:5 的酶进行斜纹粗棉布实验时，在较低的最佳温度下，能达到很高的磨蚀水平，这使得可能减少加热并节约能源。J. Acremonium sp. 和 Thielavia terrestris 的克隆纤维素酶用于 Lyocell 纤维的生物抛光

[0891] 以商品名 Tencel 出售的 Lyocell 纤维是在以水为基础的溶剂中由木浆纤维素纺成的，所用的溶剂较用于正常粘胶纤维产生的溶剂更有利于环保。然而，当把此种纤维加工成织物时，其有形成纤丝的趋势，这种情况在织物表面可见，并称为“绒毛”。利用纤维素酶，有可能永久地除去这种暴露的绒毛状的纤维，极大地改进成品织物的外观，这种处理一般称为“生物抛光”。本发明的内切葡聚糖酶尤其适于除去 Lyocell 表面的纤维。

[0892] 材料和方法

[0893] 纺织底物或者是 100％编织的或者是不同种的深蓝色的针织运动衫的 Tencel。为了提高视觉效果，黑色的和编织的运动衫是优选的，这使评价简单化。编织的 70/30Tencel/Rayon 也可以限量使用。

[0894] 或者以 200ml 的规模，利用 Launder-O-meter 完成测定；或者以 20 升的规模，利用 Wascator 完成测定。处理时间是 wascator 中 55℃，60 分钟；LOM 中 60-90 分钟。缓冲液为 2g/l 的乙酸钠（用醋酸调整 pH 至 5）。织物和液体的比率是 1 ： 10，但是在 Launder-O-meter 中，使用了 20 个直径 14mm 的钢球（每个 11 克），以获得足够的机械磨蚀效果。生物抛光后，立即在 2g/l 的碳酸钠中 80℃下进行灭活 15 分钟，之后用冷水冲洗。

[0895] 利用从 1 到 5 的绒毛分值评价所得的结果，其中 1 代表起始材料的纤丝的外观，5 代表高质量的外观，其表面上没有可见的纤维。既然内切纤维素酶是特别针对表面处理的，

重量的损失低于2%，因此此项不包括在评价的指标中。评价了两种纤维素酶：Acremonium sp.(SEQ ID NO.5)和Thielavia terrestris (SEQ ID NO.9)的克隆纤维素酶。

[0896] 两种纤维素酶对Tencel及Tencel混合的织物都能去纤丝。利用本发明的内切葡聚糖酶，除去的只是很小的纤丝，而当利用木霉属的酸性纤维素酶混合物时，除去的是整个纤维。因此，利用本发明的内切葡聚糖酶时，被处理织物的强度损失保持在最小水平。

[0897] 下列剂量给出了良好的去纤丝作用，即绒毛分值为4或者以上：

[0898] 每克织物15 S-CEVU的Acremonium sp.纤维素酶(SEQ ID NO:5)；和

[0899] 每克织物10 S-CEVU的Thelavia terrestris纤维素酶(SEQ ID NO:9)。

[0900] 实施例2

[0901] 通过表达克隆以及通过PCR克隆检测由植物病原体产生的新的溶纤酶，这种植物病原体从大豆种子中分离出来，并鉴定为Macrophominaphaseolina。

[0902] 产生供PCR的生物量和表达克隆的方法：

[0903] 使CBS 281.96的分离物在振荡烧瓶培养器中在富含纤维素马铃薯右旋糖培养液中生长，，在26℃下培养5天(振荡条件：150rpm)。

[0904] A.Macrophomina phaseolina的内切葡聚糖酶的克隆和表达

[0905] 从Macrophomina phaseolina分离mRNA，这种病原体生长在包含纤维素的发酵培养基中，搅拌以确保通气良好。在生长3-5天之后收获菌丝，立即在液氮中冷冻，并保存在-80℃。按所述方法，用1%的载体背景在大肠杆菌中构建Macrophomina phaseolina的含有大约10^6单个克隆的文库。

[0906] 用一些库的质粒DNA转化酵母，并从每一个库中获得包含250-400个酵母菌落的50-100个平板。

[0907] 鉴定内切葡聚糖酶阳性菌落，并通过AZCL HE纤维素测定方法在SC琼脂平板上分离。从酵母菌落上直接扩增cDNA插入物，并如上面的材料和方法部分的描述进行其性质分析。SEQ ID NO:10中显示了编码内切葡聚糖酶的cDNA的DNA序列，SEQ ID NO:11中显示了相应的氨基酸序列。

[0908] 从DSM 10512质粒中能够获得该cDNA。

[0909] 从酵母菌落分离总DNA，并通过转化如上述的大肠杆菌救援质粒DNA。为了在曲霉属中表达所说的内切葡聚糖酶，用适当的限制酶消化所说的DNA，在凝胶上对各个片断进行分级分离，将相应于内切葡聚糖酶基因的片段纯化。将得到的基因连接到用适当的限制酶消化的pHD414上，结果形成质粒pA2C477。

[0910] 在大肠杆菌中进行DNA扩增之后，用所说的质粒转化上述的米曲霉。通过杂交筛选cDNA文库和阳性克隆的特征分析

[0911] 利用随机引物^{32}P-标记的M.phaseolina的PCR产物作为杂交探针筛选大肠杆菌中的Macrophomina phaseolina cDNA文库的大约6000克隆形成单位(c.f.u.)。如材料和方法部分中的描述产生PCR产物。通过对cDNA插入物末端进行测序和通过确定两条链中最长的cDNA的核苷酸序列而确定阳性cDNA克隆。SEQ ID NO:10显示了编码内切葡聚糖酶的cDNA的DNA序列，SEQ ID NO:11显示了相应的氨基酸序列。

[0912] B.Macrophomina phaseolina的内切葡聚糖酶和Humicola insolens的43kD内切葡聚糖酶基因融合体的构建

[0913] 制备一种构建体的目的是制造 M. phaseolina 的内切葡聚糖酶的衍生物，这种衍生物具有 H. insolens（在 WO 91/17243 中公开）的 43kD 内切葡聚糖酶的接头和 CBD。M. phaseolina 的天然内切葡聚糖酶没有接头和 / 或纤维素结合域 CBD。

[0914] 此构建体由 M. phaseolina 的内切葡聚糖酶（223 个氨基酸）和 H. insolens 的 43kD 内切葡聚糖酶的 72 个 C- 末端氨基酸组成。

[0915] 将 H. insolens 的 43kD 内切葡聚糖酶的 cDNA 以此内切葡聚糖酶基因从 Taka- 启动子转录的方式克隆到 pHD414 中。形成的质粒命名为 pCaHj418。

[0916] 将编码 M. phaseolina 的内切葡聚糖酶的 cDNA 作为 BstX I/Not I 片段克隆到 pYES2.0 中，形成的质粒命名为 pC1C477。

[0917] 引物：

[0918] 引物 1：

[0919] 5′ -GGTCGCCCGGACTGGCTGTTCCCGTACCCCCTCCAGCAGCACCAGCTCTCCGG-3′

[0920] 引物 2：

[0921] 5′ -CCGGAGAGCTGGTGCTGCTGGAGGGGGTACGGGAACAGCCAGTCCGGGCGACC-3′

[0922] pYES2.0F.HT 引物：5′ -CGGACTACTAGCAGCTGTAATACG-3′

[0923] AMG-term. 引物：5′ -CCCCATCCTTTAACTATAGCG-3′

[0924] 通过如 Higuchi 等 (1988) 描述的 PCR 重叠延伸方法构建内切葡聚糖酶融合体。

[0925] 反应 A：利用聚合酶链反应 (PCR) 扩增引物 1 和 AMG-term. 引物之间的 pCaHj418 的片段 (H. insolens 的 43kD 内切葡聚糖酶的接头与 CBD 部分）。

[0926] 反应 B：pYES2.0F.HT 引物和引物 2 之间的 pC1C477 的片段 (M. phaseolina 的内切葡聚糖酶基因）的 PCR 扩增。

[0927] 反应 C：在整个侧翼区引物（即 pYES2.0F.HT 引物和 AMG-term. 引物）存在的情况下，在第三个 PCR 中利用前面的两个纯化的片段。

[0928] 纯化反应 C 中扩增的片段，以限制酶 Xba I 和 BamH I 消化。将纯化的消化片段连接在以限制酶 Xba I 和 BamH I 消化的 pHD414 上。

[0929] 用连接的质粒转化大肠杆菌菌株 DH5αF′（新英格兰生物实验室）的感受态细胞，并分离包含基因融合体的菌落。通过 DNA 测序验证克隆部分的序列。

[0930] 在如 Perkin-Elmet 推荐的标准条件下进行聚合酶链反应。

[0931] 反应 A 和 B 以 94℃ 2 分钟开始，之后是 20 个循环 (30 秒钟，94℃；30 秒钟，52℃；1 分钟，72℃），并以 72℃ 4 分钟结束。

[0932] 反应 C 以 (2 分钟，94℃；1 分钟，52℃；和 2 分钟，72℃）开始，之后是 20 个循环 (30 秒钟，94℃；30 秒钟，52℃；90 秒钟，72℃），并以 72℃ 4 分钟结束。

[0933] 如上面所述，将此构建体转化到米曲霉中。

[0934] 实施例 3

[0935] Acremonium sp. 和粪生粪壳的内切葡聚糖酶的克隆和表达。

[0936] 表达克隆的生物量的产生方法：

[0937] 使 CBS 478.94 的分离物和 ATCC 52644 分别在振荡烧瓶培养器中在富含纤维素的马铃薯右旋糖培养液中生长，在 26℃下培养 5 天（振荡条件：150rpm）。

[0938] 分别从 Acremonium sp. CBS 478.94 和粪生粪壳 ATCC 52644 中分离 mRNA，这两种

生物体生长在包含纤维素的发酵培养基中，搅拌以确保通气良好。在生长 3-5 天之后收获菌丝，立即在液氮中冷冻，并保存在 -80℃。如上所述，用 1％的载体背景在大肠杆菌中分别构建 Acremonium sp.CBS478.94 和粪生粪壳 ATCC 52644（每个含有大约 10^6 单个克隆）的文库。

[0939] 用每一个文库中一些集合质粒 DNA 转化酵母，并从每一个集合中获得包含 250-400 个酵母菌落的 50-100 个平板。

[0940] 鉴定内切葡聚糖酶阳性菌落，并通过 AZCL HE 纤维素测定方法在 SC 琼脂平板上分离。从酵母菌落上直接扩增 cDNA 插入物，并如上面的材料和方法部分的描述进行其性质分析。

[0941] SEQ ID NO :6 中显示了编码 Acremonium sp. 的内切葡聚糖酶的 cDNA 的 DNA 序列，SEQ ID NO :7 中显示了相应的氨基酸序列。从 DSM 10080 的质粒中能够获得此 cDNA。

[0942] SEQ ID NO :19 中显示了编码粪生粪壳的内切葡聚糖酶之 cDNA 的部分 DNA 序列（cDNA 的 5′ 末端的核苷酸序列），SEQ ID NO :20 显示了相应的氨基酸序列。从 DSM 10576 的质粒中能够获得此 cDNA。

[0943] 从酵母菌落分离总 DNA，并通过转化如上述的大肠杆菌救援质粒 DNA。为了在曲霉属中表达所说的内切葡聚糖酶，用适当的限制酶消化所说的 DNA，在凝胶上对各个片断进行分级分离，将分别相应于 Acremonium sp. 和粪生粪壳的内切葡聚糖酶基因的片段纯化。将得到的基因连接到用适当的限制酶消化的 pHD414 上，结果分别形成质粒 pA2C371 和 pA2C502。

[0944] 在大肠杆菌中进行 DNA 扩增之后，用所说的质粒转化上述的米曲霉。

[0945] 实施例 4

[0946] A. 由 PCR 克隆 Crinipellis scabella CBS 280.96 的内切葡聚糖酶

[0947] 使 CBS 280.96 的分离物在静态的烧瓶培养器中含小麦麸的培养基（每烧瓶 :300g 小麦麸添加 450ml 的盐溶液）上生长，其中，在 26℃下培养 6 天。培养后，以蒸馏水抽提小麦麸（每烧瓶 300ml），并在 1％琼脂糖 (Litex 琼脂糖 Medinova) 中检验提取物的内切葡聚糖酶活性 (0.1％ AZCL-HE- 纤维素 (megazyme))。在 pH 为 3.0，7.0 和 9.5 的平板上观察活性。

[0948] 从如上所述生长的 Crinipellis scabella 中分离 mRNA。在生长 3-5 天之后收获菌丝，立即在液氮中冷冻，并保存在 -80℃。如上所述，用 1％载体背景，在大肠杆菌中构建 Crinipellis scabella（每个含有大约 10^6 单个克隆）的文库。

[0949] 利用随机引物 ^{32}P- 标记的 C. scabella 的 PCR 产物作为杂交探针，筛选大肠杆菌中的 Grinipellis scabellacDNA 文库的大约 10000 克隆形成单位 (c.f.u.)。如材料和方法部分中的描述产生 PCR 产物。通过对 cDNA 插入物末端进行测序和通过确定两条链中最长的 cDNA 的核苷酸序列而确定阳性 cDNA 克隆。

[0950] SEQ ID NO :12 显示了编码内切葡聚糖酶的 cDNA 的 DNA 序列，SEQ ID NO :13 显示了相应的氨基酸序列。

[0951] 可以从 DSM 10511 中的质粒获得此 cDNA。

[0952] 从酵母菌落分离总 DNA，并通过转化如上述的大肠杆菌救援质粒 DNA。为了在曲霉属中表达所说的内切葡聚糖酶，用适当的限制酶消化所说的 DNA，在凝胶上对各个片段进行

分级分离，将分别相应于所说的内切葡聚糖酶基因的片段纯化。接下来将得到的基因连接到用适当的限制酶消化的 pHD414 上，结果形成质粒 pA2C475。

[0953] 在大肠杆菌中进行 DNA 扩增之后，用所说的质粒转化上述的米曲霉。Crinipellis scabella 的内切葡聚糖酶和 Humicola insolensinsolens 的 43kDa 的内切葡聚糖酶的接头 /CBD 区的基因融合体的构建

[0954] Crinipellis scabella 的天然内切葡聚糖酶既没有接头也没有纤维素结合域 (CBD)。此外，全长 cDNA 在编码内切葡聚糖酶的开放读框 (ORF) 的上游包含 ATG 起始密码子，这可能导致基于异源 cDNA 表达的混杂翻译的起始，如在酵母（啤酒酵母）和丝状真菌（米曲霉）中。这样，利用通过重叠延伸的剪接 (SOE) 已经构建了 Crinipellis scabella 的内切葡聚糖酶和 Humicolainsolens 的 43kD 的内切葡聚糖酶的接头 /CBD 区（在 WO 91/17243 中公开）的两个基因融合体 (Horton 等，1989)。

[0955] 构建体 1 由编码 C. scabella 的内切葡聚糖酶的 226 个残基的 cDNA 组成，此 cDNA 通过 PCR 与 H. insolens 的编码位于 H. insolens 43kD 内切葡聚糖酶的 COOH- 末端的接头和 CBD 区 (72 个氨基酸）的 cDNA 的 3′ - 末端连接。第二个杂交构建体和前述的基因构建体相同，只是通过 PCR 缺失了推定的信号肽的前 5′ 个残基，结果使信号肽变短，此信号肽从第二个框内起始密码子开始。

[0956] 质粒构建体

[0957] 质粒 pC1C475 包含 C. scabella 的全长 cDNA，将其克隆到 BstXI/NotI- 切口酵母表达载体 pYES 2.0 中；质粒 pC1C144 包含 H. insolens 的全长 cDNA，将其克隆到 pYES 2.0 的 BstXI 位点上。

[0958] 经重叠延伸的剪接

[0959] 利用 50-100ng 的 pC1C475 为模板，各 300-350pmol 的正向引物（正向引物 1：5′ -CCCCAAGCTTGACTTGGAACCAATGGTCCATCC-3′；正向引物 2：5′ -CCCCAAGCTTCCATCCAAACATGCTTAAAACGCTCG-3′），250pmol 的反向引物 (5′ -GACCGGAGAGCTGGTGCTGCTGGAGGGTTTACGAACACAGCCCGAGATATTAGTG-3′），DNA 热循环仪 (Landgraf，德国）和 2.5 单位的 Taq 聚合酶 (Perkin-Elmer，Cetus，USA)，在 PCR 缓冲液 (10mM Tris-HCl，pH8.3；50mM KCl；1.5mM $MgCl_2$；0.01％明胶；包含每种 dNTP 200μM) 中产生编码 C. scabella 的内切葡聚糖酶的核心区的两个 PCR 片段。利用循环方式 (94℃变性 1 分钟；55℃退火 2 分钟；72℃延伸 3 分钟）进行三十个 PCR 循环。利用 100ng 的 pC1C144 作为模板，250pmol 的正向引物 (5′ -CACTAATATCTCGGGC-TGTGTTCGTAAACCCTCCAGCAGCACCA-GCTCTCCGGTC-3′），250pmol 的 pYES 2.0 反向引物 (5′ -GGGCGTGAATGTAAGCGTGACATA-3′），DNA 热循环仪 (Landgraf，德国）和 2.5 单位的 Taq 聚合酶 (Perkin-Elmer，USA)，在 PCR 缓冲液 (10mMTris-HCl，pH8.3；50mM KCl；1.5mM $MgCl_2$；0.01％明胶；包含每种 dNTP200(μM) 中产生编码 H. insolens 的内切葡聚糖酶的接头和 CBD 的 PCR 片段。如上文进行三十个 PCR 循环。将 PCR 产物在 0.7％低胶凝温度的琼脂糖凝胶 (SeaPlaque，FMC) 中进行电泳，从凝胶中切割目的片段，并按照制造商的说明通过琼脂糖酶（新英格兰生物实验室，美国）处理，之后是苯酚抽提和在 -20℃下通过加入 2 体积的 96％ EtOH 和 0.1 体积的 3M NaAc 乙醇沉淀 12 小时回收目的片段。

[0960] 通过在两种组合的 PCR 缓冲液 (10mM Tris-HCl，pH8.3；50mM KCl；1.5mM $MgCl_2$；0.01％明胶；包含每种 dNTP 200μM) 中组合上述的重叠 PCR 片段（每个模板约 50ng) 产生

Crinipellis scabella 的内切葡聚糖酶和 Humicolainsolen 的 43kD 的内切葡聚糖酶的接头 /CBD 区的重组杂合基因。利用 DNA 热循环仪 (Landgraf,德国) 和 2.5 单位的 Taq 聚合酶 (Perkin-Elmer,Cetus,USA) 进行 SOE 反应。利用循环方式 (94℃变性 1 分钟 ;55℃退火 2 分钟 ;72℃延伸 3 分钟) 进行二个 PCR 循环,终止反应,向反应混合物中加入各末端引物 (正向引物 1 :5′ -CCCCAAGCTTGACTTGGAACCAATGGTCCATCC-3′ ;正向引物 2 :5′ -CCCCAAGC TTCCATCCAAACATGCTTAAAACGCTCG-3′ ;反向引物 :5′ -GGGCGTGAATGTAAGCGTGACATA-3′),利用循环方式 (94℃变性 1 分钟 ;55℃退火 2 分钟 ;72℃延伸 3 分钟) 进行另外三十个 PCR 循环。

[0961] 用于米曲霉中异源表达的表达盒的构建

[0962] 将 PCR 产生的重组片段在 0.7％低胶凝温度的琼脂糖凝胶 (SeaPlaque,FMC) 中进行电泳,从凝胶中切割目的片段,并按照制造商的说明通过琼脂糖酶 (新英格兰生物实验室,美国) 处理,之后是苯酚抽提和在 -20℃下乙醇沉淀 12 小时回收目的片段。以 HindIII 和 XbaI 进行 DNA 片段消化,将 DNA 片段连接在 HindIII/XbaI- 切割的 pHD414 载体上,之后按照制造商的说明将构建体电穿孔到大肠杆菌 DH10B 细胞 (生命技术,美国) 中。

[0963] 如材料和方法部分所描述的,从两条链测定形成的基因融合体的核苷酸序列,SEQ ID NO :14A 和 15A。如所描述的,这些构建体可以转化米曲霉。

[0964] 实施例 5

[0965] 从 46 个丝状真菌和单轴真菌 (monocentric fungi) 中用 PCR 检测所说的溶纤酶类型,这些真菌代表 23 个科的 32 个属,属于 7 个纲的 15 个目,总而言之包括真菌的所有 4 个组 :子囊真菌、担子真菌、壶真菌和接合真菌

[0966] 5.1 材料

[0967] 1. 棉色二孢

[0968] 菌株的保藏,保藏号 :CBS 274.96

[0969] 2.Ulospora bilgramii(Hawksw 等)Hawksw 等

[0970] 菌株的保藏号 :NKBC 1444,

[0971] 3.Microsphaeropsis sp

[0972] 4.Ascobolus stictoideus Speg.

[0973] 菌株的保藏号 :Q026(Novo Nordisk 保藏中心)

[0974] 分离自鹅粪,Svalbard,挪威

[0975] 5.Saccobolus dilutellus(Fuck)Sacc.

[0976] 菌株的保藏 :保藏号 CBS 275.96

[0977] 6. 疣孢青霉 Peyronel

[0978] 物种的保藏号 :ATCC 62396

[0979] 7. 产黄青霉 Thom

[0980] 菌株的保藏号 :ATCC 9480

[0981] 8.Thermomyces verrucosus Pugh 等

[0982] 菌株的保藏 :保藏号 CBS 285.96

[0983] 9. 鹿角团炭角菌 L.ex Greville

[0984] 菌株的保藏 :保藏号 CBS 284.96

[0985] 10. 点孔座壳 (Fr.ex L.)Fr.

[0986] 参见 :A.Munk :丹麦 Pyrenomycetes,Dansk Botanisk Arkiv,Vol17,1 1957

[0987] 11.Nodulisporum sp

[0988] 分离自在中国云南省昆明植物园中生长的山茶的叶片 (茶科,Guttiferales)

[0989] 12.Cylindrocarpon sp

[0990] 分离自海上样品,Bahamas

[0991] 13. 蛇形镰孢 Sherbakoff

[0992] 菌株的保藏号 :IFO 4467

[0993] 14. 早熟禾镰孢 (Peck)Wr.

[0994] 物种的保藏号 :ATCC 60883

[0995] 15. 腐皮镰孢 (Mart.)Sacc.emnd.Snyd&Hans.

[0996] 菌株的保藏号 :IMI 107.511

[0997] 16. 番茄尖镰孢 (Sacc.)Snyd.&Hans.

[0998] 菌株的保藏号 :CBS 645.78

[0999] 17. 尖镰孢 ssp passiflora

[1000] 菌株的保藏号 :CBS 744.79

[1001] 18. 链孢粘帚霉 Gillman&Abbott

[1002] 菌株的保藏号 :ATCC 10523

[1003] 19.Nectria pinea Dingley

[1004] 菌株的保藏,保藏号 CBS 279.96

[1005] 20. 大孢粪壳 Auerswald

[1006] 物种的保藏号 :ATCC 60255

[1007] 21. 灰腐质霉 Traeen

[1008] 物种的保藏号 :ATCC 22726

[1009] 22. 黑腐质霉 omvik

[1010] 菌株的保藏号 :CBS 819.73

[1011] 23.Scytalidium thermophilum(Cooney et Emerson)Austwick

[1012] 菌株的保藏号 :ATCC 28085

[1013] 24.Thielavia thermophila Fergus et Sinden(别名 Corynascusthermophilus)

[1014] 菌株的保藏号 :CBS 174.70,IMI 145.136

[1015] 25.Cladorrhinum foecundissimum Saccardo et Marchal

[1016] 物种的保藏号 :ATCC 62373

[1017] 26.Syspastospora boninensis

[1018] 菌株的保藏号 :NKBC 1515(日本大学,profe Tubaki 保藏中心)

[1019] 27. 管毛壳 Fuckel

[1020] 菌株的保藏号 :CBS 799.83

[1021] 28. 巴西毛壳 Batista et Potual

[1022] 菌株的保藏号 :CBS 122.65

[1023] 29. 墙毛壳 Corda

[1024] 菌株的保藏号 :CBS 163.52

[1025] 30.Chaetomium virescens(von Arx)Udagawa

[1026] 菌株的保藏号 :CBS 547.75

[1027] 31.Nigrospora sp

[1028] 菌株的保藏 :保藏号 CBS 272.96

[1029] 32.Nigrospora sp

[1030] 分离自 :

[1031] 33.Diaporthe syngenesia

[1032] 菌株的保藏 :保藏号 CBS 278.96

[1033] 34. 葫芦科刺盘孢 (Passerini)Ellis et Halsted

[1034] 别名围小丛壳 Var orbiculare Jenkins et Winstead

[1035] 物种的保藏号 :ATCC 52609

[1036] 35. 黑胶耳 Fr.

[1037] 菌株的保藏 :保藏号 CBS 277.96

[1038] 36. 木蹄层孔菌 (L.)Fr.

[1039] 菌株的保藏 :保藏 CBS 276.96

[1040] 37. 绵皮孔菌属 (?)

[1041] 菌株的保藏号 :CBS 283.96

[1042] 38. 红根囊壶菌 (de Bary&Wor)Fischer

[1043] 菌株的保藏 :保藏号 :CBS 282.96

[1044] 39.Rhizomucor pusillus(Lindt)Schipper

[1045] 别名 :微小毛霉

[1046] 菌株的保藏号 :IFO 4578

[1047] 40. 闪光须霉 (Kunze)vanTieghem&Le Monnier

[1048] 菌株的保藏号 :IFO 4814

[1049] 41 弗雷生刺枝霉 vanTieghem & Le Monnier

[1050] 别名 :Helicostylum fresenii

[1051] 菌株的保藏号 :NRRL2305

[1052] 42. 粉红单端孢

[1053] 菌株的保藏号 :IFO 5372

[1054] 43.Coniotheciim sp Endophyte

[1055] 分离自中国云南省昆明的鲜花植物的叶片

[1056] 44. 菌株的保藏物 :保藏号 CBS 271.96

[1057] Coelomycete,分离自牙买加 Christiana 的 Artocarpus altilis 的叶片 (桑科, Urticales)

[1058] 45. 菌株的保藏物 :保藏号 CBS 273.96

[1059] Coelomycete,分离自牙买加达拉斯山的 Pimenta dioica(桃金娘科, Myrtales) 的叶片

[1060] 46. 菌株的保藏号 :CBS 270.96

[1061] Coelomycete，分离自生长在牙买加达拉斯山的 Pseudocalymmaalliaceum(Bignoniaceae，Solanales) 的叶片

[1062] 5.2 方法

[1063] 菌株的保持和生物量的产生：

[1064] 将菌株保持在培养皿 (9cm) 中的琼脂或斜面上（参见培养基表：PCA 和 PDA)。在以下生长条件之下在摇瓶中培养 44 种菌株：如 PC、PD 和 PB9 或 YPG 的普通培养基（参见培养基表）；培养时间 3 至 9 天；温度 26℃；rpm 在 175-150 之间。使 14 号菌株 (F.poae) 在小麦麸上生长 15 天 (26℃；静态)。使 38 号菌株在加有 1cm^2 高压灭菌滤纸片的稀释的盐溶液 (DS/2) 中生长。

[1065] 活性试验：

[1066] 在由 1％琼脂糖 (HSB，Litex 琼脂糖，Medinova) 制成的 0.1％ AZCL-HE- 纤维素 (Megazyme) 平板 (14cm 培养皿）上试验活性。所有试验均以 3 份进行，即将 AZCL-HE- 纤维素溶解在三种缓冲液中，调节至 pH 3，7 或 9.5（使用各种比例的以下两种组分：一水柠檬酸单水合物，Merck 产品号 100244(21.0g)，溶解在水中，使总体积为 1000 毫升；0.1Mdodecabrohydrate 三钠，Merck 产品号 6578(38g)，溶解在水中，使总体积为 1000 毫升。在临用前混合。

[1067] 收获生物量：

[1068] 通过过滤（根据真菌的生长调节滤器网眼，最细的用于具有高度孢子形成菌丝体的真菌，例如 Fusarium spp.）收获生物量。将在滤器上的生物量刮至无菌塑料袋中，并立即冷冻（掩没到液氮中）。

[1069] 5.3 结果

[1070] I. 使用材料和方法中描述的 PCR 筛选与扩增技术，获得了下列部分 cDNA 序列：

[1071] Saccobolus dilutellus(Fuck)Sacc.CBS 275.96：SEQ ID NO：21（和在 SEQID NO：22 中的推定的氨基酸序列）；

[1072] Thermomyces verrucosus CBS 285.96：SEQ ID NO：23（和在 SEQ ID NO：24 中的推定的氨基酸序列）；

[1073] 鹿角团炭角菌 CBS 284，96：SEQ ID NO：25（和在 SEQ ID NO：26 中的推定的氨基酸序列）；

[1074] 番茄尖镰孢 CBS 645.78：SEQ ID NO：27（和在 SEQ ID NO：28 中的推定的氨基酸序列）；

[1075] Nectria pinea CBS 279.96：SEQ ID NO：29（和在 SEQ ID NO：30 中的推定的氨基酸序列）；

[1076] 灰腐质霉 ATCC 22726：SEQ ID NO：31（和在 SEQID NO：32 中的推定的氨基酸序列）；

[1077] 黑腐质霉 CBS 819.73：SEQ ID NO：33（和在 SEQ ID NO：34 中的推定的氨基酸序列）；

[1078] Cladorrhinum foecundissimum ATCC 62373：SEQ ID NO：35（和在 SEQID NO：36 中的推定的氨基酸序列）；

[1079] Syspastospora boninensis NKBC 1515：SEQ ID NO：37（和在 SEQ IDNO：38 中的

推定的氨基酸序列）；

[1080] Nigrospora sp.CBS 272.96 :SEQ ID NO :39（和在 SEQ ID NO :40 中的推定的氨基酸序列）；

[1081] 弗雷生刺枝霉 :SEQ ID NO :41（和在 SEQ ID NO :42 中的推定的氨基酸序列）；

[1082] 黑胶耳 CBS 277.96 :SEQ ID NO :43（和在 SEQ ID NO :44 中的推定的氨基酸序列）；

[1083] Coniothecium sp. :SEQ ID NO :45（和在 SEQ ID NO :46 中的推定的氨基酸序列）；

[1084] 保藏物 CBS 271.96 :SEQ ID NO :47（和在 SEQ ID NO :48 中的推定的氨基酸序列）；

[1085] 保藏物 CBS 270.96 :SEQ ID NO :49（和在 SEQ ID NO :50 中的推定的氨基酸序列）；

[1086] 棉色二孢 CBS 274.96 :SEQ ID NO :51（和在 SEQ ID NO :52 中的推定的氨基酸序列）；

[1087] Ulospora bilgramii NKBC 1444 :SEQ ID NO :53（和在 SEQ ID NO :54 中的推定的氨基酸序列）；

[1088] 疣孢青霉 ATCC 62396 :SEQ ID NO :55（和在 SEQ ID NO :56 中的推定的氨基酸序列）；

[1089] 点孔座壳 :SEQ ID NO :57（和在 SEQ ID NO :58 中的推定的氨基酸序列）；

[1090] 蛇形镰孢，IFO 4467 :SEQ ID NO :59（和在 SEQID NO :60 中的推定的氨基酸序列）；

[1091] Thielavia thermophila CBS 174.70 :SEQ ID NO :61（和在 SEQ ID NO :62 中的推定的氨基酸序列）；

[1092] 管毛壳 CBS 799.83 :SEQ ID NO :63（和在 SEQ ID NO :64 中的推定的氨基酸序列）；

[1093] Chaetomium virescens :SEQ ID NO :65（和在 SEQ ID NO :66 中的推定的氨基酸序列）；

[1094] 葫芦科刺盘孢 :SEQ ID NO :67（和在 SEQ ID NO :68 中的推定的氨基酸序列）；

[1095] 闪光须霉 :SEQ ID NO :69（和在 SEQ ID NO :70 中的推定的氨基酸序列）；和

[1096] 粉红单端孢 :SEQID NO :71（和在 SEQ ID NO :72 中的推定的氨基酸序列）。

[1097] II. 使用材料和方法中描述的 PCR 筛选与扩增技术，获得了部分编码本发明的酶的部分 cDNA 序列，按照布达佩斯条约保藏了质粒：

[1098] 大肠杆菌，DSM 10583，保藏日 1996 年 3 月 13 日；

[1099] 来源于粉红单端孢的 cDNA；

[1100] 大肠杆菌，DSM 10584，保藏日 1996 年 3 月 13 日；

[1101] 来源于 Syspastospora boninensis 的 cDNA；

[1102] 大肠杆菌，DSM 10585，保藏日 1996 年 3 月 13 日；

[1103] 来源于 Cheatomium murorum 的 cDNA；

[1104] 大肠杆菌，DSM 10587，保藏日 1996 年 3 月 13 日；

[1105] 来源于粪生粪壳的 cDNA；

[1106] 大肠杆菌，DSM 10588，保藏日 1996 年 3 月 13 日；

[1107] 来源于未鉴别的菌株 CBS 273.96 的 cDNA；

[1108] 大肠杆菌，DSM 10586，保藏日 1996 年 3 月 13 日；

[1109] 来源于 Spongipellis sp 的 cDNA。

[1110] 粗上清液的颜色澄清作用

[1111] 在正常的洗涤期间，织物常常褪色。然而，如果织物用使颜色澄清的纤维素酶洗涤则织物的外观得到改善，原来的颜色得到更好地保持或保留。以除去含纤维素纤维的织物纱突出的表面纤丝和纤维的作用测定颜色的澄清作用。

[1112] 装置：Terg-o-tometer

[1113] 液体体积：100 毫升

[1114] 搅拌：用垂直搅拌器 150 次 / 分钟

[1115] 冲洗时间：在自来水中 5 分钟

[1116] 洗涤温度：40℃

[1117] 洗涤液：0.05M 磷酸盐缓冲液

[1118] pH：7.0

[1119] 洗涤时间：30 分钟

[1120] 重复：2 次

[1121] 酶：以下所示菌株的粗上清液

[1122] 剂量：200，500，1000 或 2500S-CEVU/1 的两种剂量

[1123] 织物：2 块旧黑 100％棉布，5x6cm(0.9 克）

[1124] 干燥：滚动干燥

[1125] 评价：

[1126] 经 Datacolor Elrepho 反射分光光度测量反发射。以 ΔL(Hunter 实验值）计算反射。当从纱突出的表面纤丝和纤维被纤维素酶除去时，黑色的织物的表面显得更黑，获得更低的 L 值。

[1127] 将样品与一种对照样品（即不用酶洗涤）比较。以下显示了与对照样品比较的 ALR 反射值。

[1128]

	ECU/1			
[1129] 菌株	200	500	2000	2500
[1130] 13. 蛇形镰孢	n.t.	-0.71	n.t.	-1.28
[1131] 15. 腐皮镰孢	n.t.	-0.96	n.t.	-1.37
[1132] 24.Thieiavia thermophila	-0.30	n.t.	-1.25	n.t.
[1133] 25.Cladorrhinum foecun.	n.t	-1.79	n.t.	-2.18
[1134] 37.Spongipeliis(？)	n.t.	-1.01	n.t.	-1.63
[1135] 39.Rhizomucor pusillus	n.t.	-1.90	n.t.	-2.66
[1136] 41. 弗雷生刺枝霉	n.t.	-0.17	n.t.	-1.33
[1137] 45. 保藏号：CBS273.96	n.t.	-1.31	n.t.	-1.20

[1138] 数据表明，在试验条件下，所有菌株都给出良好的澄清作用（n.t. ＝在这一剂量下未试验）。

[1139] 序列表

[1140] (1) 一般信息 :

[1141] (i) 申请人 :

[1142] (A) 姓名 :Novo Nordisk A/S

[1143] (B) 街道 :Nova Aile

[1144] (C) 城市 :DK-2880Bagsvaerd

[1145] (E) 国家 :丹麦

[1146] (F) 邮区代码 (ZIP) :DK-2880

[1147] (G) 电话 :+45 44 44 88 88

[1148] (H) 传真 :+45 44 49 32 56

[1149] (ii) 发明名称 :新的内切葡聚糖酶

[1150] (iii) 序列数 :72

[1151] (iv) 计算机可读形式 :

[1152] (A) 介质类型 :软盘

[1153] (B) 计算机 :IBM-PC 兼容机

[1154] (C) 操作系统 :PC-DOS/MS-DOS

[1155] (D) 软件 :Patentln Release#1.0,版本 #1.30(EPO)

[1156] (2)SEQ ID NO :1A 的信息 :

[1157] (i) 序列特征 :

[1158] (A) 长度 :891 个碱基对

[1159] (B) 类型 :核酸

[1160] (C) 链型 :单链

[1161] (D) 拓扑结构 :线性

[1162] (ii) 分子类型 :cDNA

[1163] (vi) 原始来源 :

[1164] (A) 生物体 :啤酒糖酵母

[1165] (B) 菌株 :DSM 9770

[1166] (xi) 序列描述 :SEQ ID NO :1A :

[1167] AAAGAAAGGC TCTCTGCTGT CGTCGCTCTC GTCGCTCTCG TCGGCATCCT

[1168] CCATCCGTCC 60

[1169] GCCTTTGATA ACCCGCTCCC CGACTCAGTC AAGACGACGC ATACTTGGCA

[1170] CCATGCATCT 120

[1171] CTCCGCCACC ACCGGGTTCC TCGCCCTCCC GGTCCTGGCC CTGGACCAGC

[1172] TCTCGGGCAT 180

[1173] CGGCCAGACG ACCCGGTACT GGGACTGCTG CAAGCCGAGC TGCGCCTGGC

[1174] CCGGCAAGGG 240

[1175] CCCCTCGTCT CCGGTGCAGG CCTGCGACAA GAACGACAAC CCGCTCAACG

[1176] ACGGCGGCTC 300

[1177] CACCCGGTCC GGCTGCGACG CGGGCGGCAG CGCCTACATG TGCTCCTCCC

[1178] AGAGCCCCTG 360

[1179] GGCCGTCAGC GACGAGCTGT CGTACGGCTG GGCGGCCGTC AAGCTCGCCG

[1180] GCAGCTCCGA 420

[1181] GTCGCAGTGG TGCTGCGCCT GCTACGAGCT GACCTTCACC AGCGGGCCGG

[1182] TCGCGGGCAA 480

[1183] GAAGATGATT GTGCAGGCGA CCAACACCGG TGGCGACCTG GGCGACAACC

[1184] ACTTTGACCT 540

[1185] GGCCATCCCC GGTGGCGGTG TCGGTATTTT CAACGCCTGC ACCGACCAGT

[1186] ACGGCGCTCC 600

[1187] CCCGAACGGC TGGGGCGACC GCTACGGCGG CATCCATTCC AAGGAAGAGT

[1188] GCGAATCCTT 660

[1189] CCCGGAGGCC CTCAAGCCCG GCTGCAACTG GCGCTTCGAC TGGTTCCAAA

[1190] ACGCCGACAA 720

[1191] CCCGTCGGTC ACCTTCCAGG AGGTGGCCTG CCCGTCGGAG CTCACGTCCA

[1192] AGAGCGGCTG 780

[1193] CTCCCGTTAA GAGGGAAGAG AGGGGGCTGG AAGGACCGAA AGATTCAACC

[1194] TCTGCTCCTG 840

[1195] CTGGGGAAGC TCGGGCGCGA GTGTGAAACT GGTGTAAATA TTGTGGCACA

[1196] CACAAGCTAC 900

[1197] TACAGTCCGT CTCGCCGTCC GGCTAACTAG CCTTGCTGCG GATCTGTCCA

[1198] AAAAAAAAAA 960

[1199] (2)SEQ ID NO:1B 的信息：

[1200] (i) 序列特征：

[1201] (A) 长度：225 个氨基酸

[1202] (B) 类型：氨基酸

[1203] (C) 链型：单链

[1204] (D) 拓扑结构：线性

[1205] (ii) 分子类型：蛋白质

[1206] (xi) 序列描述：SEQ ID NO:1B：

[1207] Met His Leu Ser Ala Thr Thr Gly Phe Leu Ala Leu Pro Val Leu Ala

[1208] 1 5 10 15

[1209] Leu Asp Gln Leu Ser Gly Ile Gly Gln Thr Thr Arg Tyr Trp Asp Cys

[1210] 20 25 30

[1211] Cys Lys Pro Ser Cys Ala Trp Pro Gly Lys Gly Pro Ser Ser Pro Val

[1212] 35 40 45

[1213] Gln Ala Cys Asp Lys Asn Asp Asn Pro Leu Asn Asp Gly Gly Ser Thr

[1214] 50 55 60

[1215] Arg Ser Gly Cys Asp Ala Gly Gly Ser Ala Tyr Met Cys Ser Ser Gln

[1216] 65 70 75 80

[1217] Ser Pro Trp Ala Val Ser Asp Glu Leu Ser Tyr Gly Trp Ala Ala Val
[1218] 85 90 95
[1219] Lys Leu Ala Gly Ser Ser Glu Ser Gln Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Glu
[1220] 100 105 110
[1221] Leu Thr Phe Thr Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Lys Met Ile Val Gln
[1222] 115 120 125
[1223] Ala Thr Asn Thr Gly Gly Asp Leu Gly Asp Asn His Phe Asp Leu Ala
[1224] 130 135 140
[1225] Ile Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asn Ala Cys Thr Asp Gln Tyr
[1226] 145 150 155 160
[1227] Gly Ala Pro Pro Asn Gly Trp Gly Asp Arg Tyr Gly Gly Ile His Ser
[1228] 165 170 175
[1229] Lys Glu Glu Cys Glu Ser Phe Pro Glu Ala Leu Lys Pro Gly Cys Asn
[1230] 180 185 190
[1231] Trp Arg Phe Asp Trp Phe Gln Asn Ala Asp Asn Pro Ser Val Thr Phe
[1232] 195 200 205
[1233] Gln Glu Val Ala Cys Pro Ser Glu Leu Thr Ser Lys Ser Gly Cys Ser
[1234] 210 215 220
[1235] arg
[1236] 225
[1237] (2)SEQ ID NO:2A 的信息：
[1238] (i) 序列特征：
[1239] (A) 长度：894 个碱基对
[1240] (B) 类型：核酸
[1241] (C) 链型：单链
[1242] (D) 拓扑结构：线性
[1243] (ii) 分子型：cDNA
[1244] (vi) 原始来源：
[1245] (A) 生物体：“构建体 1”
[1246] (xi) 序列描述：SEQ ID NO:2A：
[1247] ATGCATCTCT CCGCCACCAC CGGGTTCCTC GCCCTCCCGG TCCTGGCCCT GGACCAGCTC
[1248] 60
[1249] TCGGGCATCG GCCAGACGAC CCGGTACTGG GACTGCTGCA AGCCGAGCTG CGCCTGGCCC
[1250] 120
[1251] GGCAAGGGCC CCTCGTCTCC GGTGCAGGCC TGCGACAAGA ACGACAACCC GCTCAACGAC
[1252] 180
[1253] GGCGGCTCCA CCCGGTCCGG CTGCGACGCG GGCGGCAGCG CCTACATGTG CTCCTCCCAG
[1254] 240
[1255] AGCCCCTGGGCCGTCAGCGA CGAGCTGTCG TACGGCTGGG CGGCCGTCAA GCTCGCCGGC

[1256] 300

[1257] AGCTCCGAGT CGCAGTGGTG CTGCGCCTGC TACGAGCTGA CCTTCACCAG CGGGCCGGTC

[1258] 360

[1259] GCGGGCAAGA AGATGATTGT GCAGGCGACC AACACCGGTG GCGACCTGGG CGACAACCAC

[1260] 420

[1261] TTTGACCTGG CCATCCCCGG TGGCGGTGTC GGTATTTTCA ACGCCTGCAC CGACCAGTAC

[1262] 480

[1263] GGCGCTCCCC CGAACGGCTG GGGCGACCGC TACGGCGGCA TCCATTCCAA GGAAGAGTGC

[1264] 540

[1265] GAATCCTTCC CGGAGGCCCT CAAGCCCGGC TGCAACTGGC GCTTCGACTG GTTCCAAAAC

[1266] 600

[1267] GCCGACAACC CGTCGGTCAC CTTCCAGGAG GTGGCCTGCCCGTCGGAGCT CACGTCCAAG

[1268] 660

[1269] AGCGGCTGCT CCCGTCCCTC CAGCAGCACC AGCTCTCCGG TCAACCAGCC TACCAGCACC

[1270] 720

[1271] AGCACCACGT CCACCTCCAC CACCTCGAGC CCGCCAGTCC AGCCTACGAC TCCCAGCGGC

[1272] 780

[1273] TGCACTGCTG AGAGGTGGGC TCAGTGCGGC GGCAATGGCT GGAGCGGCTG CACCACCTGC

[1274] 840

[1275] GTCGCTGGCA GCACTTGCAC GAAGATTAAT GACTGGTACC ATCAGTGCCT GTAG

[1276] 894

[1277] (2)SEQ ID NO:2B 的信息：

[1278] (i) 序列特征：

[1279] (A) 长度：297 个氨基酸

[1280] (B) 类型：氨基酸

[1281] (C) 链型：单链

[1282] (D) 拓扑结构：线性

[1283] (ii) 分子类型：蛋白质

[1284] (xi) 序列描述：SEQ ID NO:2B：

[1285] Met His Leu Ser Ala Thr Thr Gly Phe Leu Ala Leu Pro Val Leu Ala

[1286] 1 5 10 15

[1287] Leu Asp Gln Leu Ser Gly Ile Gly Gln Thr Thr Arg Tyr Trp Asp Cys

[1288] 20 25 30

[1289] Cys Lys Pro Ser Cys Ala Trp Pro Gly Lys Gly Pro Ser Ser Pro Val

[1290] 35 40 45

[1291] Gln Ala Cys Asp Lys Asn Asp Asn Pro Leu Asn Asp Gly Gly Ser Thr

[1292] 50 55 60

[1293] Arg Ser Gly Cys Asp Ala Gly Gly Ser Ala Tyr Met Cys Ser Ser Gln

[1294] 65 70 75 80

[1295] Ser Pro Trp Ala Val Ser Asp Glu Leu Ser Tyr Gly Trp Ala Ala Val
[1296] 85 90 95
[1297] Lys Leu Ala Gly Ser Ser Glu Ser Gln Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Glu
[1298] 100 105 110
[1299] Leu Thr Phe Thr Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Lys Met Ile Val Gln
[1300] 115 120 125
[1301] Ala Thr Asn Thr Gly Gly Asp Leu Gly Asp Asn His Phe Asp Leu Ala
[1302] 130 135 140
[1303] Ile Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asn Ala Cys Thr Asp Gln Tyr
[1304] 145 150 155 160
[1305] Gly Ala Pro Pro Asn Gly Trp Gly Asp Arg Tyr Gly Gly Ile His Ser
[1306] 165 170 175
[1307] Lys Glu Glu Cys Glu Ser Phe Pro Glu Ala Leu Lys Pro Gly Cys Asn
[1308] 180 185 190
[1309] Trp Arg Phe Asp Trp Phe Gln Asn Ala Asp Asn Pro Ser Val Thr Phe
[1310] 195 200 205
[1311] Gln Glu Val Ala Cys Pro Ser Glu Leu Thr Ser Lys Ser Gly Cys Ser
[1312] 210 215 220
[1313] Arg Pro Ser Ser Ser Thr Ser Ser Pro Val Asn Gln Pro Thr Ser Thr
[1314] 225 230 235 240
[1315] Ser Thr Thr Ser Thr Ser Thr Thr Ser Ser Pro Pro Val Gln Pro Thr
[1316] 245 250 255
[1317] Thr Pro Ser Gly Cys Thr Ala Glu Arg Trp Ala Gln Cys Gly Gly Asn
[1318] 260 265 270
[1319] Gly Trp Ser Gly Cys Thr Thr Cys Val Ala Gly Ser Thr Cys Thr Lys
[1320] 275 280 285
[1321] Ile Asn Asp Trp Tyr His Gln Cys Leu
[1322] 290 295
[1323] (2)SEQ ID NO:3A 的信息：
[1324] (i) 序列特征：
[1325] (A) 长度：927 个碱基对
[1326] (B) 类型：核酸
[1327] (C) 链型：单链
[1328] (D) 拓扑结构：线性
[1329] (ii) 分子型：cDNA
[1330] (vi) 原始来源：
[1331] (A) 生物体：“构建体 2”
[1332] (xi) 序列描述：SEQ ID NO:3A：
[1333] ATGCATCTCT CCGCCACCAC CGGGTTCCTC GCCCTCCCGG TCCTGGCCCT GGACCAGCTC

[1334] 60

[1335] TCGGGCATCG GCCAGACGAC CCGGTACTGG GACTGCTGCA AGCCGAGCTG CGCCTGGCCC

[1336] 120

[1337] GGCAAGGGCC CCTCGTCTCC GGTGCAGGCC TGCGACAAGA ACGACAACCC GCTCAACGAC

[1338] 180

[1339] GGCGGCTCCA CCCGGTCCGG CTGCGACGCG GGCGGCAGCG CCTACATGTG CTCCTCCCAG

[1340] 240

[1341] AGCCCCTGGG CCGTCAGCGA CGAGCTGTCG TACGGCTGGG CGGCCGTCAA GCTCGCCGGC

[1342] 300

[1343] AGCTCCGAGT CGCAGTGGTG CTGCGCCTGC TACGAGCTGA CCTTCACCAG CGGGCCGGTC

[1344] 360

[1345] GCGGGCAAGA AGATGATTGT GCAGGCGACC AACACCGGTG GCGACCTGGG CGACAACCAC

[1346] 420

[1347] TTTGACCTGG CCATCCCCGG TGGCGGTGTC GGTATTTTCA ACGCCTGCAC CGACCAGTAC

[1348] 480

[1349] GGCGCTCCCC CGAACGGCTG GGGCGACCGC TACGGCGGCA TCCATTCCAA GGAAGAGTGC

[1350] 540

[1351] GAATCCTTCC CGGAGGCCCT CAAGCCCGGC TGCAACTGGC GCTTCGACTG GTTCCAAAAC

[1352] 600

[1353] GCCGACAACC CGTCGGTCAC CTTCCAGGAG GTGGCCTGCC CGTCGGAGCT CACGTCCAAG

[1354] 660

[1355] AGCGGCTGCT CCCGTAACGA CGACGGCAAC TTCCCTGCCG TCCAGATCCC CTCCAGCAGC

[1356] 720

[1357] ACCAGCTCTC CGGTCAACCA GCCTACCAGC ACCAGCACCA CGTCCACCTC CACCACCTCG

[1358] 780

[1359] AGCCCGCCAG TCCAGCCTAC GACTCCCAGC GGCTGCACTG CTGAGAGGTG GGCTCAGTGC

[1360] 840

[1361] GGCGGCAATG GCTGGAGCGG CTGCACCACC TGCGTCGCTG GCAGCACTTG CACGAAGATT

[1362] 900

[1363] AATGACTGGT ACCATCAGTG CCTGTAG

[1364] 927

[1365] (2)SEQ ID NO:3B 的信息：

[1366] (i) 序列特征：

[1367] (A) 长度：308 个氨基酸

[1368] (B) 类型：氨基酸

[1369] (C) 链型：单链

[1370] (D) 拓扑结构：线性

[1371] (ii) 分子类型：蛋白质

[1372] (xi) 序列描述：SEQ ID NO:3B：

[1373] Met His Leu Ser Ala Thr Thr Gly Phe Leu Ala Leu Pro Val Leu Ala
[1374] 1 5 10 15
[1375] Leu Asp Gln Leu Ser Gly Ile Gly Gln Thr Thr Arg Tyr Trp Asp Cys
[1376] 20 25 30
[1377] Cys Lys Pro Ser Cys Ala Trp Pro Gly Lys Gly Pro Ser Ser Pro Val
[1378] 35 40 45
[1379] Gln Ala Cys Asp Lys Asn Asp Asn Pro Leu Asn Asp Gly Gly Ser Thr
[1380] 50 55 60
[1381] Arg Ser Gly Cys Asp Ala Gly Gly Ser Ala Tyr Met Cys Ser Ser Gln
[1382] 65 70 75 80
[1383] Ser Pro Trp Ala Val Ser Asp Glu Leu Ser Tyr Gly Trp Ala Ala Val
[1384] 85 90 95
[1385] Lys Leu Ala Gly Ser Ser Glu Ser Gln Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Glu
[1386] 100 105 110
[1387] Leu Thr Phe Thr Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Lys Met Ile Val Gln
[1388] 115 120 125
[1389] Ala Thr Asn Thr Gly Gly Asp Leu Gly Asp Asn His Phe Asp Leu Ala
[1390] 130 135 140
[1391] Ile Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asn Ala Cys Thr Asp Gln Tyr
[1392] 145 150 155 160
[1393] Gly Ala Pro Pro Asn Gly Trp Gly Asp Arg Tyr Gly Gly Ile His Ser
[1394] 165 170 175
[1395] Lys Glu Glu Cys Glu Ser Phe Pro Glu Ala Leu Lys Pro Gly Cys Asn
[1396] 180 185 190
[1397] Trp Arg Phe Asp Trp Phe Gln Asn Ala Asp Asn Pro Ser Val Thr Phe
[1398] 195 200 205
[1399] Gln Glu Val Ala Cys Pro Ser Glu Leu Thr Ser Lys Ser Gly Cys Ser
[1400] 210 215 220
[1401] Arg Asn Asp Asp Gly Asn Phe Pro Ala Val Gln Ile Pro Ser Ser Ser
[1402] 225 230 235 240
[1403] Thr Ser Ser Pro Val Asn Gln Pro Thr Ser Thr Ser Thr Thr Ser Thr
[1404] 245 250 255
[1405] Ser Thr Thr Ser Ser Pro Pro Val Gln Pro Thr Thr Pro Ser Gly Cys
[1406] 260 265 270
[1407] Thr Ala Glu Arg Trp Ala Gln Cys Gly Gly Asn Gly Trp Ser Gly Cys
[1408] 275 280 285
[1409] Thr Thr Cys Val Ala Gly Ser Thr Cys Thr Lys Ile Asn Asp Trp Tyr
[1410] 290 295 300
[1411] His Gln Cys Leu

[1412] 305

[1413] (2)SEQ ID NO:4 的信息：

[1414] (i) 序列特征：

[1415] (A) 长度：888 个碱基对

[1416] (B) 类型：核酸

[1417] (C) 链型：单链

[1418] (D) 拓扑结构：线性

[1419] (ii) 分子型：cDNA

[1420] (vi) 原始来源：

[1421] (A) 生物体：啤酒糖酵母，DSM 10082

[1422] (xi) 序列描述：SEQ ID NO:4：

[1423] CCAGTGTGCT GGAAAGCCTT CGTGCTGTCC CCGACGTATC CCTGACCGCC ATGCGTTCCA

[1424] 60

[1425] CCAGCATCTT GATCGGCCTT GTTGCCGGCG TCGCTGCTCA GAGCTCTGGC TCTGGCCATA

[1426] 120

[1427] CAACCAGGTA CTGGGACTGC TGCAAGCCCT CATGCGCCTG GGATGAGAAG GCGGCTGTCA

[1428] 180

[1429] GCCGGCCGGT CACAACATGC GACAGGAACA ACAGCCCCCT TTCGCCCGGC GCTGTGAGCG

[1430] 240

[1431] GCTGCGACCC CAACGGCGTT GCATTCACCT GCAACGACAA CCAGCCTTGG GCCGTAAACA

[1432] 300

[1433] ACAATGTCGC CTACGGTTTT GCGGCTACCG CCTTCCCTGG TGGCAATGAG GCGTCGTGGT

[1434] 360

[1435] GCTGTGCCTG CTATGCTCTT CAATTCACAT CCGGCCCCGT TGCTGGCAAG ACGATGGTTG

[1436] 420

[1437] TGCAATCCAC CAACACTGGC GGAGATCTCA GCGGCACTCA CTTCGATATC CAGATGCCCG

[1438] 25 480

[1439] GTGGAGGTCT CGGCATCTTC GACGGCTGCA CCCCGCAGTT CGGCTTCACG TTCCCCGGCA

[1440] 540

[1441] 30 ACCGCTACGG CGGTACCACG AGCCGCAGCC AGTGCGCCGA GCTGCCCTCC GTCCTCCGTG

[1442] 600

[1443] ACGGCTGCCA CTGGCGTTAC GACTGGTTCA ACGATGCCGA CAACCCCAAC GTCAACTGGC

[1444] 660

[1445] 35

[1446] GCCGCGTCCG ATGCCCGGCG GCCCTCACGA ACCGCTCCGG CTGCGTCCGC AACGACGACA

[1447] 720

[1448] ACAGCTACCC CGTCTTCGAG CCCGGCACGG GCACCCCGCC GACCCCCACG ACCACGACTA

[1449] 40 780

[1450] CCAGCTCCCC TCCTCAGCCC ACCAACGGCG GAGGCGGCGG CACTTCTCCT CACTGGGGCC

[1451] 840

[1452] AGTGCGGCGG CCAGGGCTGG TCTGGCCCGA CGGCCTGTGC CGGTGGGTCG ACCTGCAACC

[1453] 900

[1454] TGATCAACCC GTGGTACTCC CAGTGCATTC CCAACTAAGT GATCCGGGCA TTGCGGTCGA

[1455] 5 960

[1456] AAGGGGACCG TTAGTCGACA AGGCCCAGCC AGACCTCAGG CAGGTGGCTG CCATGGCAGA

[1457] 1020

[1458] 10 TTGTATATAG TCTTCCGAGT ACATACTATT GAATGAAAAT AAGAGCGGCT CGGACCATGA

[1459] 1080

[1460] GCAGATGCCA TTTGATAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

[1461] 1140

[1462] 15

[1463] AAAAAAAAAA AAAA

[1464] 1154

[1465] (2)SEQ ID NO:5 的信息：

[1466] (i) 序列特征：

[1467] (A) 长度:295 个氨基酸

[1468] (B) 类型:氨基酸

[1469] (C) 链型:单链

[1470] (D) 拓扑结构:线性

[1471] (ii) 分子类型:肽

[1472] (xi) 序列描述:SEQ ID NO:5：

[1473] Met Arg Ser Thr Ser Ile Leu Ile Gly Leu Val Ala Gly Val Ala Ala

[1474] 1 5 10 15

[1475] Gln Ser Ser Gly Ser Gly His Thr Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys

[1476] 20 25 30

[1477] Pro Ser Cys Ala Trp Asp Glu Lys Ala Ala Val Ser Arg Pro Val Thr

[1478] 35 40 45

[1479] Thr Cys Asp Arg Asn Asn Ser Pro Leu Ser Pro Gly Ala Val Ser Gly

[1480] 50 55 60

[1481] Cys Asp Pro Asn Gly Val Ala Phe Thr Cys Asn Asp Asn Gln Pro Trp

[1482] 65 70 75 80

[1483] Ala Val Asn Asn Asn Val Ala Tyr Gly Phe Ala Ala Thr Ala Phe Pro

[1484] 85 90 95

[1485] Gly Gly Asn Glu Ala Ser Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Ala Leu Gln Phe

[1486] 100 105 110

[1487] Thr Ser Gly Pro Val Ala Gly Lya Thr Met Val Val Gln Ser Thr Asn

[1488] 115 120 125

[1489] Thr Gly Gly Asp Leu Ser Gly Thr His Phe Asp Ile Gln Met Pro Gly

[1490] 130 135 140

[1491] Gly Gly Leu Gly Ile Phe Asp Gly Cys Thr Pro Gln Phe Gly Phe Thr

[1492] 145 150 155 160

[1493] Phe Pro Gly Asn Arg Tyr Gly Gly Thr Thr Ser Arg Ser Gln Cys Ala

[1494] 165 170 175

[1495] Glu Leu Pro Ser Val Leu Arg Asp Gly Cys His Trp Arg Tyr Asp Trp

[1496] 180 185 190

[1497] Phe Asn Asp Ala Asp Asn Pro Asn Val Asn Trp Arg Arg Val Arg Cys

[1498] 195 200 205

[1499] Pro Ala Ala Leu Thr Asn Arg Ser Gly Cys Val Arg Asn Asp Asp Asn

[1500] 210 215 220

[1501] Ser Tyr Pro Val Phe Glu Pro Gly Thr Gly Thr Pro Pro Thr Pro Thr

[1502] 225 230 235 240

[1503] Thr Thr Thr Thr Ser Ser Pro Pro Gln Pro Thr Asn Gly Gly Gly Gly

[1504] 245 250 255

[1505] Gly Thr Ser Pro His Trp Gly Gln Cys Gly Gly Gln Gly Trp Ser Gly

[1506] 260 265 270

[1507] Pro Thr Ala Cys Ala Gly Gly Ser Thr Cys Asn Leu Ile Asn Pro Trp

[1508] 275 280 285

[1509] Tyr Ser Gln Cys Ile Pro Asn

[1510] 290 295

[1511] (2)SEQ ID NO:6 的信息：

[1512] (i) 序列特征：

[1513] (A) 长度：1423 个碱基对

[1514] (B) 类型：核酸

[1515] (C) 链型：单链

[1516] (D) 拓扑结构：线性

[1517] (ii) 分子型：cDNA

[1518] (vi) 原始来源：

[1519] (A) 生物体：啤酒糖酵母，DSM 10080

[1520] (xi) 序列描述：SEQ ID NO:6：

[1521] AAAGTTCTGG CCGGAACAGA TCTCCGTTGT CGATCTTCGA TTTTCCAGAC TCAGTCTGTG

[1522] 60

[1523] ACACTCCTTC AATCCACATT CCTTTACTTC TTCGTCACTC ATTCACATCA TGATTTCAGC

[1524] 120

[1525] TTGGATTCTC CTGGGGCTGG TAGGCGCCGT GCCCTCCTCC GTCATGGCCG CCTCGGGCAA

[1526] 180

[1527] AGGCCACACC ACCCGCTACT GGGATTGCTG CAAGACTTCT TGCGCATGGG AGGGCAAGGC

[1528] 240

[1529] ATCCGTCTCC GAGCCTGTCC TGACCTGTAA CAAGCAGGAC AACCCCATCG TCGATGCCAA

[1530] 300

[1531] CGCCAGAAGC GGCTGCGACG GCGGCGGGGC ATTTGCCTGT ACCAACAATT CCCCTTGGGC

[1532] 360

[1533] CGTGAGCGAG GACCTGGCCT ACGGATTTGC TGCCACAGCC CTCAGCGGCG GCACTGAGGG

[1534] 420

[1535] CAGCTGGTGC TGCGCGTGTT ACGCCATCAC ATTCACGAGT GGCCCTGTGG CTGGCAAGAA

[1536] 480

[1537] GATGGTCGTC CAGTCCACGA ACACGGGAGG CGACCTGTCC AACAACCACT TTGACCTGAT

[1538] 540

[1539] GATTCCCGGT GGAGGCCTCG GCATCTTTGA CGGTTGCTCG GCTCAGTTCG GACAACTTCT

[1540] 600

[1541] TCCCGGCGAG CGTTACGGAG GTGTTTCGTC CCGCTCTCAA TGCGATGGCA TGCCCGAGCT

[1542] 660

[1543] CTTGAAAGAC GGTTGCCAGT GGCGCTTCGA CTGGTTCAAG AACTCAGACA ACCCTGACAT

[1544] 720

[1545] CGAGTTCGAG CAGGTCCAGT GTCCCAAAGA GCTCATTGCG GTCTCTGGGT GCGTCCGTGA

[1546] 780

[1547] CGACGATAGC AGCTTTCCCG TCTTCCAAGG TTCGGGCTCA GGAGATGTCA ACCCACCTCC

[1548] 840

[1549] CAAGCCGACT ACGACTACGA CCTCGTCAAA GCCGAAAACA ACCTCTGCAC CATCCACTCT

[1550] 900

[1551] CTCGAACCCA TCCGCCCCTC AACAGCCAGG GAACACTGAT AGACCTGCCG AGACAACCAC

[1552] 960

[1553] TACCAAGCTG CCTGCCCTGC CGGCCACGAC GAGCAGCCCT GCTGTCTCAG TTCCTTCGTC

[1554] 1020

[1555] CAGCGCTCGC GTGCCTTTGT GGGGGCAATG CGACTCGGAA GCTTCATGGG ACGCACCTAA

[1556] 1080

[1557] GAAGTGTGCA AAGGGCACCA AGTGTGTCTA CGTCAACGAC TGGTACTCTC AATGCCAGCC

[1558] 1140

[1559] GAAGAACTCT TGTGCTTGAG AAGCAATGCT CACAGCATGT CCTCTTGTCA CCCCTTCTTT

[1560] 1200

[1561] TCATTCCCAA ACATACTTAC TGTATTATTA TTTCCGATGC TTCATTTCTT GCTTGTTTCT

[1562] 1260

[1563] GTCTTTCCTG CACGCAGCTT TCAACGATAC CCTTCATGCG ATTGCCCTAC GATCAGATGA

[1564] 1320

[1565] TGGGCACGAC ATGGAGGATG GTTTGGGCAC TCACGCGTTC AGGACGGGAA AATTTATTAG

[1566] 1380

[1567] GGCTGAGATC CGTGAATTGA CTTCATTTCG GCGGAATGTC TGC

[1568] 1423

[1569] (2)SEQ ID NO:7 的信息：

[1570] (i) 序列特征：

[1571] (A) 长度：349 个氨基酸

[1572] (B) 类型：氨基酸

[1573] (C) 链型：单链

[1574] (D) 拓扑结构：线性

[1575] (ii) 分子类型：蛋白质

[1576] (xi) 序列描述：SEQ ID NO:7：

[1577] Met Ile Ser Ala Trp Ile Leu Leu Gly Leu Val Gly Ala Val Pro Ser

[1578] 1 5 10 15

[1579] Ser Val Met Ala Ala Ser Gly Lys Gly His Thr Thr Arg Tyr Trp Asp

[1580] 20 25 30

[1581] Cys Cys Lys Thr Ser Cys Ala Trp Glu Gly Lys Ala Ser Val Ser Glu

[1582] 35 40 45

[1583] Pro Val Leu Thr Cys Asn Lys Gln Asp Asn Pro Ile Val Asp Ala Asn

[1584] 50 55 60

[1585] Ala Arg Ser Gly Cys Asp Gly Gly Gly Ala Phe Ala Cys Thr Asn Asn

[1586] 65 70 75 80

[1587] Ser Pro Trp Ala Val Ser Glu Asp Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala Thr

[1588] 85 90 95

[1589] Ala Leu Ser Gly Gly Thr Glu GIy Ser Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Ala

[1590] 100 105 110

[1591] Ile Thr Phe Thr Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Lys Met Val Val Gln

[1592] 115 120 125

[1593] Ser Thr Asn Thr Gly Gly Asp Leu Ser Asn Asn His Phe Asp Leu Met

[1594] 130 135 140

[1595] Ile Pro Gly Gly Gly Leu Gly Ile Phe Asp Gly Cys Ser Ala Gln Phe

[1596] 145 150 155 160

[1597] Gly Gln Leu Leu Pro Gly Glu Arg Tyr Gly Gly Val Ser Ser Arg Ser

[1598] 165 170 175

[1599] Gln Cys Asp Gly Met Pro Glu Leu Leu Lys Asp Gly Cys Gln Trp Arg

[1600] 180 185 190

[1601] Phe Asp Trp Phe Lys Asn Ser Asp Asn Pro Asp Ile Glu Phe Glu Gln

[1602] 195 200 205

[1603] Val Gln Cys Pro Lys Glu Leu Ile Ala Val Ser Gly Cys Val Arg Asp

[1604] 210 215 220

[1605] Asp Asp Ser Ser Phe Pro Val Phe Gln Gly Ser Gly Ser Gly Asp Val

[1606] 225 230 235 240

[1607] Asn Pro Pro Pro Lys Pro Thr Thr Thr Thr Thr Ser Ser Lys Pro Lys
[1608] 245 250 255
[1609] Thr Thr Ser Ala Pro Ser Thr Leu Ser Asn Pro Ser Ala Pro Gln Gln
[1610] 260 265 270
[1611] Pro Gly Asn Thr Asp Arg Pro Ala Glu Thr Thr Thr Thr Lys Leu Pro
[1612] 275 280 285
[1613] Ala Leu Pro Ala Thr Thr Ser Ser Pro Ala Val Ser Val Pro Ser Ser
[1614] 290 295 300
[1615] Ser Ala Arg Val Pro Leu Trp Gly Gln Cys Asp Ser Glu Ala Ser Trp
[1616] 305 310 315 320
[1617] Asp Ala Pro Lys Lys Cys Ala Lys Gly Thr Lys Cys Val Tyr Val Asn
[1618] 325 330 335
[1619] Asp Trp Tyr Ser Gln Cys Gln Pro Lys Asn Ser Cys Ala
[1620] 340 345

[1621] (2)SEQ ID NO:8 的信息：
[1622] (i) 序列特征：
[1623] (A) 长度:1174 个碱基对
[1624] (B) 类型:核酸
[1625] (C) 链型:单链
[1626] (D) 拓扑结构:线性
[1627] (ii) 分子型:cDNA
[1628] (vi) 原始来源：
[1629] (A) 生物体:啤酒糖酵母,DSM 10081
[1630] (xi) 序列描述:SEQ ID NO:8：
[1631] GAGCAGCACC CCTCAAGCTG TACAGTTTCC ACCCCGCTCT CTTTTCTTCG GCCCCCAGGA
[1632] 60
[1633] TGCGCTCTAC TCCCGTTCTT CGCACAACCC TGGCCGCTGC ACTTCCTCTG GTCGCCTCCG
[1634] 120
[1635] CGGCCAGTGG CAGTGGCCAG TCCACGAGAT ACTGGGACTG CTGCAAGCCG TCGTGCGCTT
[1636] 180
[1637] GGCCCGGGAA GGCCGCCGTC AGCCAACCGG TCTACGCGTG CGATGCCAAC TTCCAGCGCC
[1638] 240
[1639] TGTCCGACTT CAATGTCCAG TCGGGCTGCA ACGGCGGCTC GGCCTACTCC TGCGCCGACC
[1640] 300
[1641] AGACTCCCTG GGCGGTGAAC GACAATCTCG CCTACGGCTT CGCCGCGACG AGCATCGCCG
[1642] 360
[1643] GCGGGTCCGA ATCCTCGTGG TGCTGCGCCT GCTACGCGCT CACCTTCACT TCCGGTCCCG
[1644] 420
[1645] TCGCCGGCAA GACAATGGTG GTGCAGTCAA CGAGCACTGG CGGCGACCTG GGAAGTAACC

[1646] 480

[1647] AGTTCGATAT CGCCATGCCC GGCGGCGGCG TGGGCATCTT CAACGGCTGC AGCTCGCAGT

[1648] 540

[1649] TCGGCGGCCT CCCCGGCGCT CAATACGGCG GCATTTCGTC GCGCGACCAG TGCGATTCCT

[1650] 600

[1651] TCCCCGCGCC GCTCAAGCCC GGCTGCCAGT GGCGGTTTGA CTGGTTCCAG AACGCCGACA

[1652] 660

[1653] ACCCGACGTT CACGTTCCAG CAGGTGCAGT GCCCCGCCGA GATCGTTGCC CGCTCCGGCT

[1654] 720

[1655] GCAAGCGCAA CGACGACTCC AGCTTCCCCG TCTTCACCCC CCCAAGCGGT GGCAACGGTG

[1656] 780

[1657] GCACCGGGAC GCCCACGTCG ACTGCGCCTG GGTCGGGCCA GACGTCTCCC GGCGGCGGCA

[1658] 840

[1659] GTGGCTGCAC GTCTCAGAAG TGGGCTCAGT GCGGTGGCAT CGGCTTCAGC GGATGCACCA

[1660] 900

[1661] CCTGTGTCTC TGGCACCACC TGCCAGAAGT TGAACGACTA CTACTCGCAG TGCCTCTAAA

[1662] 960

[1663] CAGCTTTTCG CACGAGGTGG CGGGACGGAG CAAGGAGACC GTCAACTTCG TCATGCATAT

[1664] 1020

[1665] TTTTTGAGCG CTCAATACAT ACATAACCTT CGATTCTTGT ACATAGCACG CCGGTACACA

[1666] 1080

[1667] TCTCACACCG ACTTTGGGGG CGGAATCAGG CCCGTTTTAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

[1668] 1140

[1669] AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAA

[1670] 1174

[1671] (2)SEQ ID NO:9 的信息：

[1672] (i) 序列特征：

[1673] (A) 长度：299 个氨基酸

[1674] (B) 类型：氨基酸

[1675] (C) 链型：单链

[1676] (D) 拓扑结构：线性

[1677] (ii) 分子类型：肽

[1678] (xi) 序列描述：SEQ ID NO:9：

[1679] Met Arg Ser Thr Pro Val Leu Arg Thr Thr Leu Ala Ala Ala Leu Pro

[1680] 1 5 10 15

[1681] Leu Val Ala Ser Ala Ala Ser Gly Ser Gly Gln Ser Thr Arg Tyr Trp

[1682] 20 25 30

[1683] Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys Ala Trp Pro Gly Lys Ala Ala Val Ser

[1684] 35 40 45

[1685] Gln Pro Val Tyr Ala Cys Asp Ala Asn Phe Gln Arg Leu Ser Asp Phe
[1686] 50 55 60
[1687] Asn Val Gln Ser Gly Cys Asn Gly Gly Ser Ala Tyr Ser Cys Ala Asp
[1688] 65 70 75 80
[1689] Gln Thr Pro Trp Ala Val Asn Asp Asn Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala
[1690] 85 90 95
[1691] Thr Ser Ile Ala Gly Gly Ser Glu Ser Ser Trp Cys Cys Ala Cys Tyr
[1692] 100 105 110
[1693] Ala Leu Thr Phe Thr Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Thr Met Val Val
[1694] 115 120 125
[1695] Gln Ser Thr Ser Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Asn Gln Phe Asp Ile
[1696] 130 135 140
[1697] Ala Met Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asn Gly Cys Ser Ser Gln
[1698] 145 150 155 160
[1699] Phe Gly Gly Leu Pro Gly Ala Gln Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Arg Asp
[1700] 165 170 175
[1701] Gln Cys Asp Ser Phe Pro Ala Pro Leu Lys Pro Gly Cys Gln Trp Arg
[1702] 180 185 190
[1703] Phe Asp Trp Phe Gln Asn Ala Asp Asn Pro Thr Phe Thr Phe Gln Gln
[1704] 195 200 205
[1705] Val Gln Cys Pro Ala Glu Ile Val Ala Arg Ser Gly Cys Lys Arg Asn
[1706] 210 215 220
[1707] Asp Asp Ser Ser Phe Pro Val Phe Thr Pro Pro Ser Gly Gly Asn Gly
[1708] 225 230 235 240
[1709] Gly Thr Gly Thr Pro Thr Ser Thr Ala Pro Gly Ser Gly Gln Thr Ser
[1710] 245 250 255
[1711] Pro Gly Gly Gly Ser Gly Cys Thr Ser Gln Lys Trp Ala Gln Cys Gly
[1712] 260 265 270
[1713] Gly Ile Gly Phe Ser Gly Cys Thr Thr Cys Val Ser Gly Thr Thr Cys
[1714] 275 280 285
[1715] Gln Lys Leu Asn Asp Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu
[1716] 290 295
[1717] (2)SEQ ID NO:10 的信息：
[1718] (i) 序列特征：
[1719] (A) 长度：913 个碱基对
[1720] (B) 类型：核酸
[1721] (C) 链型：单链
[1722] (D) 拓扑结构：线性
[1723] (ii) 分子型：cDNA

[1724] (vi) 原始来源 :

[1725] (A) 生物体 :大肠杆菌,DSM 10512

[1726] (xi) 序列描述 :SEQ ID NO :10 :

[1727] GCACTATTCT CAGCTCCATT CTCCCTTGAA GTAATTCACC ATGTTCTCTC CGCTCTGGGC

[1728] 60

[1729] CCTGTCGGCT CTGCTCCTAT TTCCTGCCAC TGAAGCCACT AGCGGCGTGA CAACCAGGTA

[1730] 120

[1731] CTGGGACTGC TGCAAGCCGT CTTGTGCTTG GACGGGCAAA GCATCCGTCT CCAAGCCCGT

[1732] 180

[1733] CGGAACCTGC GACATCAACG ACAACGCCCA GACGCCGAGC GATCTGCTCA AGTCGTCCTG

[1734] 240

[1735] TGATGGCGGC AGCGCCTACT ACTGCAGCAA CCAGGGCCCA TGGGCCGTGA ACGACAGCCT

[1736] 300

[1737] TTCCTACGGC TTCGCTGCCG CCAAGCTGTC CGGAAAGCAG GAGACTGATT GGTGCTGTGG

[1738] 360

[1739] CTGCTACAAG CTCACATTCA CCTCCACCGC CGTTTCCGGC AAGCAAATGA TCGTGCAAAT

[1740] 420

[1741] CACGAACACG GGCGGCGACC TCGGCAACAA CCACTTCGAC ATCGCCATGC CGGGCGGCGG

[1742] 480

[1743] CGTCGGCATC TTCAACGGGT GCTCCAAGCA ATGGAACGGC ATCAATCTGG GCAACCAGTA

[1744] 540

[1745] TGGCGGCTTC ACTGACCGCT CGCAATGTGC GACGCTCCCG TCCAAGTGGC AGGCCAGCTG

[1746] 600

[1747] CAACTGGCGC TTCGACTGGT TCGAGAATGC CGACAACCCC ACCGTCGATT GGGAGCCTGT

[1748] 660

[1749] CACTTGCCCA CAGGAATTGG TCGCCCGGAC TGGCTGTTCC CGTACCTAAG TGGGGGTGGA

[1750] 720

[1751] ACCTCCATGT GAATTGGTGT ATATAGCTCC TGCCTGAGCA TCCACCAGTT CGCATGTGTT

[1752] 780

[1753] GATCAGGAGT TGTGTTGCCT TGCTAGGAAA GACTTTGTTG GAAACTTGCG TGTTTATTCC

[1754] 840

[1755] AATTGAATAA CCCTGTATAG ACCGGTCACA TTTTTCTCTG AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

[1756] 900

[1757] AAAAAAAAAA AAA

[1758] 913

[1759] (2)SEQ ID NO :11 的信息 :

[1760] (i) 序列特征 :

[1761] (A) 长度 :222 个氨基酸

[1762] (B) 类型 :氨基酸

[1763] (C) 链型 :单链

[1764] (D) 拓扑结构 :线性

[1765] (ii) 分子类型 :蛋白质

[1766] (xi) 序列描述 :SEQ ID NO :11 :

[1767] Met Phe Ser Pro Leu Trp Ala Leu Ser Ala Leu Leu Leu Phe Pro Ala

[1768] 1 5 10 15

[1769] Thr Glu Ala Thr Ser Gly Val Thr Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys

[1770] 20 25 30

[1771] Pro Ser Cys Ala Trp Thr Gly Lys Ala Ser Val Ser Lys Pro Val Gly

[1772] 35 40 45

[1773] Thr Cys Asp Ile Asn Asp Asn Ala Gln Thr Pro Ser Asp Leu Leu Lys

[1774] 50 55 60

[1775] Ser Ser Cys Asp Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Cys Ser Asn Gln Gly Pro

[1776] 65 70 75 80

[1777] Trp Ala Val Asn Asp Ser Leu Ser Tyr Gly Phe Ala Ala Ala Lys Leu

[1778] 85 90 95

[1779] Ser Gly Lys Gln Glu Thr Asp Trp Cys Cys Gly Cys Tyr Lys Leu Thr

[1780] 100 105 110

[1781] Phe Thr Ser Thr Ala Val Ser Gly Lys Gln Met Ile Val Gln Ile Thr

[1782] 115 120 125

[1783] Asn Thr Gly Gly Asp Leu Gly Asn Asn His Phe Asp Ile Ala Met Pro

[1784] 130 135 140

[1785] Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asn Gly Cys Ser Lys Gln Trp Asn Gly

[1786] 145 150 155 160

[1787] Ile Asn Leu Gly Asn Gln Tyr Gly Gly Phe Thr Asp Arg Ser Gln Cys

[1788] 165 170 175

[1789] Ala Thr Leu Pro Ser Lys Trp Gln Ala Ser Cys Asn Trp Arg Phe Asp

[1790] 180 185 190

[1791] Trp Phe Glu Asn Ala Asp Asn Pro Thr Val Asp Trp Glu Pro Val Thr

[1792] 195 200 205

[1793] Cys Pro Gln Glu Leu Val Ala Arg Thr Gly Cys Ser Arg Thr

[1794] 210 215 220

[1795] (2)SEQ ID NO :12 的信息 :

[1796] (i) 序列特征 :

[1797] (A) 长度 :808 个碱基对

[1798] (B) 类型 :核酸

[1799] (C) 链型 :单链

[1800] (D) 拓扑结构 :线性

[1801] (ii) 分子型 :cDNA

[1802] (vi) 原始来源 :

[1803] (A) 生物体 :大肠杆菌,DSM 10511

[1804] (xi) 序列描述 :SEQ ID NO :12 :

[1805] CCGCTGCTGG GTATATAATG CTCAGACTTG GAACCAATGG TCCATCCAAA CATGCTTAAA

[1806] 60

[1807] ACGCTCGCTC CATTGATCAT CTTGGCCGCC TCGGTCACAG CGCAAACAGC AGGAGTTACG

[1808] 120

[1809] ACCCGCTACT GGGACTGCTG CAAGCCAAGC TGTGGATGGA GTGGAAAGGC TTCTGTTTCT

[1810] 180

[1811] GCTCCAGTCA GAACTTGCGA TCGTAATGGA AATACACTTG GCCCAGACGT GAAAAGCGGA

[1812] 240

[1813] TGTGATAGCG GTGGAACGTC ATTCACTTGC GCGAACAATG GTCCATTTGC GATTGACAAT

[1814] 300

[1815] AACACTGCAT ATGGTTTTGC TGCAGCCCAC TTAGCGGGCT CTAGCGAAGC AGCCTGGTGT

[1816] 360

[1817] TGCCAGTGCT ACGAATTGAC GTTTACGAGT GGACCCGTAG TTGGGAAGAA ACTGACCGTT

[1818] 420

[1819] CAAGTCACAA ACACGGGAGG TGACCTCGGA AATAATCACT TTGACCTGAT GATCCCCGGT

[1820] 480

[1821] GGAGGTGTTG GCCTCTTCAC ACAAGGATGT CCTGCTCAGT TTGGGAGCTG GAACGGGGGT

[1822] 540

[1823] GCTCAATACG GGGGTGTGTC CAGCCGTGAC CAATGCTCCC AACTTCCAGC AGCTGTGCAA

[1824] 600

[1825] GCTGGATGTC AATTCCGTTT CGACTGGATG GGTGGCGCGG ATAACCCCAA CGTCACCTTC

[1826] 660

[1827] CGACCTGTGA CCTGCCCAGC GCAGCTCACT AATATCTCGG GCTGTGTTCG TAAATGATTC

[1828] 720

[1829] ACGAATATGT AGTGTCGAAT ATGTACATGT GTATGTACTA TAGCTTCAAA GATGGAGGGT

[1830] 780

[1831] CTGTTTAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAA

[1832] 808

[1833] (2)SEQ ID NO :13 的信息 :

[1834] (i) 序列特征 :

[1835] (A) 长度 :226 个氨基酸

[1836] (B) 类型 :氨基酸

[1837] (C) 链型 :单链

[1838] (D) 拓扑结构 :线性

[1839] (ii) 分子类型 :蛋白质

[1840] (xi) 序列描述 :SEQ ID NO :13 :

[1841] Met Val His Pro Asn Met Leu Lys Thr Leu Ala Pro Leu Ile Ile Leu
[1842] 1 5 10 15
[1843] Ala Ala Ser Val Thr Ala Gln Thr Ala Gly Val Thr Thr Arg Tyr Trp
[1844] 20 25 30
[1845] Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys Gly Trp Ser Gly Lys Ala Ser Val Ser
[1846] 35 40 45
[1847] Ala Pro Val Arg Thr Cys Asp Arg Asn Gly Asn Thr Leu Gly Pro Asp
[1848] 50 55 60
[1849] Val Lys Ser Gly Cys Asp Ser Gly Gly Thr Ser Phe Thr Cys Ala Asn
[1850] 65 70 75 80
[1851] Asn Gly Pro Phe Ala Ile Asp Asn Asn Thr Ala Tyr Gly Phe Ala Ala
[1852] 85 90 95
[1853] Ala His Leu Ala Gly Ser Ser Glu Ala Ala Trp Cys Cys Gln Cys Tyr
[1854] 100 105 110
[1855] Glu Leu Thr Phe Thr Ser Gly Pro Val Val Gly Lys Lys Leu Thr Val
[1856] 115 120 125
[1857] Gln Val Thr Asn Thr Gly Gly Asp Leu Gly Asn Asn His Phe Asp Leu
[1858] 130 135 140
[1859] Met Ile Pro Gly Gly Gly Val Gly Leu Phe Thr Gln Gly Cys Pro Ala
[1860] 145 150 155 160
[1861] Gln Phe Gly Ser Trp Asn Gly Gly Ala Gln Tyr Gly Gly Val Ser Ser
[1862] 165 170 175
[1863] Arg Asp Gln Cys Ser Gln Leu Pro Ala Ala Val Gln Ala Gly Cys Gln
[1864] 180 185 190
[1865] Phe Arg Phe Asp Trp Met Gly Gly Ala Asp Asn Pro Asn Val Thr Phe
[1866] 195 200 205
[1867] Arg Pro Val Thr Cys Pro Ala Gln Leu Thr Asn Ile Ser Gly Cys Val
[1868] 210 215 220
[1869] Arg Lys
[1870] 225

[1871] (2)SEQ ID NO:14-A 的信息：
[1872] (i) 序列特征：
[1873] (A) 长度：1048 个碱基对
[1874] (B) 类型：核酸
[1875] (C) 链型：单链
[1876] (D) 拓扑结构：线性
[1877] (ii) 分子型：cDNA
[1878] (xi) 序列描述：SEQ ID NO:14-A：
[1879] GACTTGGAAC CAATGGTCCA TCCAAACATG CTTAAAACGC TCGCTCCATT GATCATCTTG

[1880] 60

[1881] GCCGCCTCGGTCACAGCGCA AACAGCAGGA GTTACGACCC GCTACTGGGA CTGCTGCAAG

[1882] 120

[1883] CCAAGCTGTG GATGGAGTGG AAAGGCTTCT GTTTCTGCTC CAGTCAGAAC TTGCGATCGT

[1884] 180

[1885] AATGGAAATA CACTTGGCCC AGACGTGAAA AGCGGATGTG ATAGCGGTGG AACGTCATTC

[1886] 240

[1887] ACTTGCGCGA ACAATGGTCC ATTTGCGATT GACAATAACA CTGCATATGG TTTTGCTGCA

[1888] 300

[1889] GCCCACTTAG CGGGCTCTAG CGAAGCAGCC TGGTGTTGCC AGTGCTACGA ATTGACGTTT

[1890] 360

[1891] ACGAGTGGAC CCGTAGTTGG GAAGAAACTG ACCGTTCAAG TCACAAACAC GGGAGGTGAC

[1892] 420

[1893] CTCGGAAATA ATCACTTTGA CCTGATGATC CCCGGTGGAG GTGTTGGCCT CTTCACACAA

[1894] 480

[1895] GGATGTCCTG CTCAGTTTGG GAGCTGGAAC GGGGGTGCTC AATACGGGGG TGTGTCCAGC

[1896] 540

[1897] CGTGACCAAT GCTCCCAACT TCCAGCAGCT GTGCAAGCTG GATGTCAATT CCGTTTCGAC

[1898] 600

[1899] TGGATGGGTG GCGCGGATAA CCCCAACGTC ACCTTCCGAC CTGTGACCTG CCCAGCGCAG

[1900] 660

[1901] CTCACTAATA TCTCGGGCTG TGTTCGTAAA CCCTCCAGCA GCACCAGCTC TCCGGTCAAC

[1902] 720

[1903] CAGCCTACCA GCACCAGCAC CACGTCCACC TCCACCACCT CGAGCCCGCC AGTCCAGCCT

[1904] 780

[1905] ACGACTCCCA GCGGCTGCAC TGCTGAGAGG TGGGCTCAGT GCGGCGGCAA TGGCTGGAGC

[1906] 840

[1907] GGCTGCACCA CCTGCGTCGC TGGCAGCACT TGCACGAAGA TTAATGACTG GTACCATCAG

[1908] 900

[1909] TGCCTGTAGA CGCAGGGCAG CTTGAGGGCC TTACTGGTGG CGCAACGAAA TGACACTCCC

[1910] 960

[1911] AATCACTGTA TTAGTTCTTG TACATAATTT CGTCATCCCT CCAGGGATTG TCACATAAAT

[1912] 1020

[1913] GCAATGAGGA ACAATGAGTA CAGAATTC

[1914] 1048

[1915] (2)SEQ ID NO:14-B 的信息：

[1916] (i) 序列特征：

[1917] (A) 长度：298 个氨基酸

[1918] (B) 类型：氨基酸

[1919] (C) 链型 :单链

[1920] (D) 拓扑结构 :线性

[1921] (ii) 分子类型 :肽

[1922] (xi) 序列描述 :SEQ ID NO :14-B :

[1923] Met Val His Pro Asn Met Leu Lys Thr Leu Ala Pro Leu Ile Ile Leu

[1924] 1 5 10 15

[1925] Ala Ala Ser Val Thr Ala Gln Thr Ala Gly Val Thr Thr Arg Tyr Trp

[1926] 20 25 30

[1927] Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys Gly Trp Ser Gly Lys Ala Ser Val Ser

[1928] 35 40 45

[1929] Ala Pro Val Arg Thr Cys Asp Arg Asn Gly Asn Thr Leu Gly Pro Asp

[1930] 50 55 60

[1931] Val Lys Ser Gly Cys Asp Ser Gly Gly Thr Ser Phe Thr Cys Ala Asn

[1932] 65 70 75 80

[1933] Asn Gly Pro Phe Ala Ile Asp Asn Asn Thr Ala Tyr Gly Phe Ala Ala

[1934] 85 90 95

[1935] Ala His Leu Ala Gly Ser Ser Glu Ala Ala Trp Cys Cys Gln Cys Tyr

[1936] 100 105 110

[1937] Glu Leu Thr Phe Thr Ser Gly Pro Val Val Gly Lys Lys Leu Thr Val

[1938] 115 120 125

[1939] Gln Val Thr Asn Thr Gly Gly Asp Leu Gly Asn Asn His Phe Asp Leu

[1940] 130 135 140

[1941] Met Ile Pro Gly Gly Gly Val Gly Leu Phe Thr Gln Gly Cys Pro Ala

[1942] 145 150 155 160

[1943] Gln Phe Gly Ser Trp Asn Gly Gly Ala Gln Tyr Gly Gly Val Ser Ser

[1944] 165 170 175

[1945] Arg Asp Gln Cys Ser Gln Leu Pro Ala Ala Val Gln Ala Gly Cys Gln

[1946] 180 185 190

[1947] Phe Arg Phe Asp Trp Met Gly Gly Ala Asp Asn Pro Asn Val Thr Phe

[1948] 195 200 205

[1949] Arg Pro Val Thr Cys Pro Ala Gln Leu Thr Asn Ile Ser Gly Cys Val

[1950] 210 215 220

[1951] Arg Lys Pro Ser Ser Ser Thr Ser Ser Pro Val Asn Gln Pro Thr Ser

[1952] 225 230 235 240

[1953] Thr Ser Thr Thr Ser Thr Ser Thr Thr Ser Ser Pro Pro Val Gln Pro

[1954] 245 250 255

[1955] Thr Thr Pro Ser Gly Cys Thr Ala Glu Arg Trp Ala Gln Cys Gly Gly

[1956] 260 265 270

[1957] Asn Gly Trp Ser Gly Cys Thr Thr Cys Val Ala Gly Ser Thr Cys Thr

[1958] 275 280 285

[1959] Lys Ile Asn Asp Trp Tyr His Gln Cys Leu

[1960] 290 295

[1961] (2)SEQ ID NO:15-A 的信息：

[1962] (i) 序列特征：

[1963] (A) 长虎：1031 个碱基对

[1964] (B) 类型：核酸

[1965] (C) 链型：单链

[1966] (D) 拓扑结构：线性

[1967] (ii) 分子型：cDNA

[1968] (xi) 序列描述：SEQ ID NO:15-A：

[1969] CCATCCAAAC ATGCTTAAAA CGCTCGCTCC ATTGATCATC TTGGCCGCCT CGGTCACAGC

[1970] 60

[1971] GCAAACAGCA GGAGTTACGA CCCGCTACTG GGACTGCTGC AAGCCAAGCT GTGGATGGAG

[1972] 120

[1973] TGGAAAGGCT TCTGTTTCTG CTCCAGTCAG AACTTGCGAT CGTAATGGAA ATACACTTGG

[1974] 180

[1975] CCCAGACGTG AAAAGCGGAT GTGATAGCGG TGGAACGTCA TTCACTTGCG CGAACAATGG

[1976] 240

[1977] TCCATTTGCG ATTGACAATA ACACTGCATA TGGTTTTGCT GCAGCCCACT TAGCGGGCTC

[1978] 300

[1979] TAGCGAAGCA GCCTGGTGTT GCCAGTGCTA CGAATTGACG TTTACGAGTG GACCCGTAGT

[1980] 360

[1981] TGGGAAGAAA CTGACCGTTC AAGTCACAAA CACGGGAGGT GACCTCGGAA ATAATCACTT

[1982] 420

[1983] TGACCTGATG ATCCCCGGTG GAGGTGTTGG CCTCTTCACA CAAGGATGTC CTGCTCAGTT

[1984] 480

[1985] TGGGAGCTGG AACGGGGGTG CTCAATACGG GGGTGTGTCC AGCCGTGACC AATGCTCCCA

[1986] 540

[1987] ACTTCCAGCA GCTGTGCAAG CTGGATGTCA ATTCCGTTTC GACTGGATGG GTGGCGCGGA

[1988] 600

[1989] TAACCCCAAC GTCACCTTCC GACCTGTGAC CTGCCCAGCG CAGCTCACTA ATATCTCGGG

[1990] 660

[1991] CTGTGTTCGT AAACCCTCCA GCAGCACCAG CTCTCCGGTC AACCAGCCTA CCAGCACCAG

[1992] 720

[1993] CACCACGTCC ACCTCCACCA CCTCGAGCCC GCCAGTCCAG CCTACGACTC CCAGCGGCTG

[1994] 780

[1995] CACTGCTGAG AGGTGGGCTC AGTGCGGCGG CAATGGCTGG AGCGGCTGCA CCACCTGCGT

[1996] 840

[1997] CGCTGGCAGC ACTTGCACGA AGATTAATGA CTGGTACCAT CAGTGCCTGT AGACGCAGGG

[1998] 900

[1999] CAGCTTGAGG GCCTTACTGG TGGCGCAACG AAATGACACT CCCAATCACT GTATTAGTTC

[2000] 960

[2001] TTGTACATAA TTTCGTCATC CCTCCAGGGA TTGTCACATA AATGCAATGA GGAACAATGA

[2002] 1020

[2003] GTACAGAATT C

[2004] 1031

[2005] (2)SEQ ID NO:15-B 的信息：

[2006] (i) 序列特征：

[2007] (A) 长度：293 个氨基酸

[2008] (B) 类型：氨基酸

[2009] (C) 链型：单链

[2010] (D) 拓扑结构：线性

[2011] (ii) 分子类型：肽

[2012] (xi) 序列描述：SEQ ID NO:15-B：

[2013] Met Leu Lys Thr Leu Ala Pro Leu Ile Ile Leu Ala Ala Ser Val Thr

[2014] 1 5 10 15

[2015] Ala Gln Thr Ala Gly Val Thr Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro

[2016] 20 25 30

[2017] Ser Cys Gly Trp Ser Gly Lys Ala Ser Val Ser Ala Pro Val Arg Thr

[2018] 35 40 45

[2019] Cys Asp Arg Asn Gly Asn Thr Leu Gly Pro Asp Val Lys Ser Gly Cys

[2020] 50 55 60

[2021] Asp Ser Gly Gly Thr Ser Phe Thr Cys Ala Asn Asn Gly Pro Phe Ala

[2022] 65 70 75 80

[2023] Ile Asp Asn Asn Thr Ala Tyr Gly Phe Ala Ala Ala His Leu Ala Gly

[2024] 85 90 95

[2025] Ser Ser Glu Ala Ala Trp Cys Cys Gln Cys Tyr Glu Leu Thr Phe Thr

[2026] 100 105 110

[2027] Ser Gly Pro Val Val Gly Lys Lys Leu Thr Val Gln Val Thr Asn Thr

[2028] 115 120 125

[2029] Gly Gly Asp Leu Gly Asn Asn His Phe Asp Leu Met Ile Pro Gly Gly

[2030] 130 135 140

[2031] Gly Val Gly Leu Phe Thr Gln Gly Cys Pro Ala Gln Phe Gly Ser Trp

[2032] 145 150 155 160

[2033] Asn Gly Gly Ala Gln Tyr Gly Gly Val Ser Ser Arg Asp Gln Cys Ser

[2034] 165 170 175

[2035] Gln Leu Pro Ala Ala Val Gln Ala Gly Cys Gln Phe Arg Phe Asp Trp

[2036] 180 185 190

[2037] Met Gly Gly Ala Asp Asn Pro Asn Val Thr Phe Arg Pro Val Thr Cys

[2038] 195 200 205

[2039] Pro Ala Gln Leu Thr Asn Ile Ser Gly Cys Val Arg Lys Pro Ser Ser

[2040] 210 215 220

[2041] Ser Thr Ser Ser Pro Val Asn Gln Pro Thr Ser Thr Ser Thr Thr Ser

[2042] 225 230 235 240

[2043] Thr Ser Thr Thr Ser Ser Pro Pro Val Gln Pro Thr Thr Pro Ser Gly

[2044] 245 250 255

[2045] Cys Thr Ala Glu Arg Trp Ala Gln Cys Gly Gly Asn Gly Trp Ser Gly

[2046] 260 265 270

[2047] Cys Thr Thr Cys Val Ala Gly Ser Thr Cys Thr Lys Ile Asn Asp Trp

[2048] 275 280 285

[2049] Tyr His Gln Cys Leu

[2050] 290

[2051] (2)SEQ ID NO:16 的信息：

[2052] (i) 序列特征：

[2053] (A) 长度：1132 个碱基对

[2054] (B) 类型：核酸

[2055] (C) 链型：单链

[2056] (D) 拓扑结构：线性

[2057] (ii) 分子型：cDNA

[2058] (vi) 原始来源：

[2059] (A) 生物体：大肠杆菌，DSM 10571

[2060] (xi) 序列描述：SEQ ID NO:16：

[2061] CAACAGTTCA AACACCTACA AGGTCCCGTG CCCTGTAGAC CATGCGTTCC TCTGCAGTCC

[2062] 60

[2063] TCATCGGCCT CGTGGCCGGT GTGGCCGCCC AGTCCTCTGG CACCGGCCGC ACCACCAGAT

[2064] 120

[2065] ACTGGGACTG CTGCAAGCCG TCCTGCGGGT GGGACGAAAA GGCCTCCGTC AGCCAGCCCG

[2066] 180

[2067] TCAAGACGTG CGATAGGAAC AACAACCCTC TCGCGTCCAC GGCCAGGAGC GGCTGCGATT

[2068] 240

[2069] CCAACGGCGT CGCCTACACG TGCAACGATA ACCAGCCGTG GGCTGTCAAC GATAACCTGG

[2070] 300

[2071] CCTATGGTTT TGCTGCCACG GCTTTCAGTG GTGGATCGGA GGCCAGCTGG TGCTGTGCCT

[2072] 360

[2073] GCTATGCCCT TCAGTTCACC TCCGGCCCTG TTGCGGGAAA GACCATGGTC GTCCAGTCGA

[2074] 420

[2075] CAAACACCGG CGGCGACCTC AGCGGCAACC ACTTTGACAT CCTCATGCCC GGCGGCGGCC

[2076] 480

[2077] TGGGCATCTT CGACGGCTGC ACCCCGCAAT GGGGCGTCAG CTTCCCCGGA AACCGCTACG

[2078] 540

[2079] GCGGCACCAC CAGCCGCAGC CAGTGCTCCC AAATCCCCTC GGCCCTGCAG CCCGGCTGCA

[2080] 600

[2081] ACTGGCGGTA CGACTGGTTC AACGACGCCG ACAACCCCGA CGTCTCGTGG CGCCGCGTCC

[2082] 660

[2083] AGTGCCCCGC CGCACTCACC GACCGCACCG GCTGCCGCCG CTCCGATGAC GGGAACTATC

[2084] 720

[2085] CCGTCTTCCA GCCCGCTCCG CCCCCGGCCA CGACGATCAG GACATCGACT ACCATCACAG

[2086] 780

[2087] CCTCATCGTC GTCTTCGTCT TCGTCGTCGT CGACTACGGC TGGTAGCCCG CCTGTGCCGA

[2088] 840

[2089] CTGGTGGTGG TAGTGGGCCA ACGTCGCCTG TCTGGGGACA GTGCGGCGGT CAGGGATGGA

[2090] 900

[2091] GTGGTCCTAC GCGTTGTGTT GCTGGGTCGA CATGCAGTGT GGTCAACCCG TGGTACTCGC

[2092] 960

[2093] AGTGTTTTCC TTAAGGAGCC TCTGGCTGAG CAGATCCTTT CGAAGAGGAG GGTCTCTCTG

[2094] 1020

[2095] CTCTTTCAGT CTGTTCAGGG AACGGCCGTC TCGGCTACAT TGTACATATC CCACCTCGTA

[2096] 1080

[2097] TATAGCTAGC TCATCTACAC TTGTGATCTC CAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AA

[2098] 1132

[2099] (2)SEQ ID NO:17 的信息：

[2100] (i) 序列特征：

[2101] (A) 长度:310 个氨基酸

[2102] (B) 类型:氨基酸

[2103] (C) 链型:单链

[2104] (D) 拓扑结构:线性

[2105] (ii) 分子类型:肽

[2106] (xi) 序列描述:SEQ ID NO:17：

[2107] Met Arg Ser Ser Ala Val Leu Ile Gly Leu Val Ala Gly Val Ala Ala

[2108] 1 5 10 15

[2109] Gln Ser Ser Gly Thr Gly Arg Thr Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys

[2110] 20 25 30

[2111] Pro Ser Cys Gly Trp Asp Glu Lys Ala Ser Val Ser Gln Pro Val Lys

[2112] 35 40 45

[2113] Thr Cys Asp Arg Asn Asn Asn Pro Leu Ala Ser Thr Ala Arg Ser Gly

[2114] 50 55 60

[2115] Cys Asp Ser Asn Gly Val Ala Tyr Thr Cys Asn Asp Asn Gln Pro Trp

[2116] 65 70 75 80

[2117] Ala Val Asn Asp Asn Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala Thr Ala Phe Ser

[2118] 85 90 95

[2119] Gly Gly Ser Glu Ala Ser Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Ala Leu Gln Phe

[2120] 100 105 110

[2121] Thr Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Thr Met Val Val Gln Ser Thr Asn

[2122] 115 120 125

[2123] Thr Gly Gly Asp Leu Ser Gly Asn His Phe Asp Ile Leu Met Pro Gly

[2124] 130 135 140

[2125] Gly Gly Leu Gly Ile Phe Asp Gly Cys Thr Pro Gln Trp Gly Val Ser

[2126] 145 150 155 160

[2127] Phe Pro Gly Asn Arg Tyr Gly Gly Thr Thr Ser Arg Ser Gln Cys Ser

[2128] 165 170 175

[2129] Gln Ile Pro Ser Ala Leu Gln Pro Gly Cys Asn Trp Arg Tyr Asp Trp

[2130] 180 185 190

[2131] Phe Asn Asp Ala Asp Asn Pro Asp Val Ser Trp Arg Arg Val Gln Cys

[2132] 195 200 205

[2133] Pro Ala Ala Leu Thr Asp Arg Thr Gly Cys Arg Arg Ser Asp Asp Gly

[2134] 210 215 220

[2135] Asn Tyr Pro Val Phe Gln Pro Gly Pro Pro Pro Ala Thr Thr Ile Arg

[2136] 225 230 235 240

[2137] Thr Ser Thr Thr Ile Thr Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser

[2138] 245 250 255

[2139] Ser Thr Thr Ala Gly Ser Pro Pro Val Pro Thr Gly Gly Gly Ser Gly

[2140] 260 265 270

[2141] Pro Thr Ser Pro Val Trp Gly Gln Cys Gly Gly Gln Gly Trp Ser Gly

[2142] 275 280 285

[2143] Pro Thr Arg Cys Val Ala Gly Ser Thr Cys Ser Val Val Asn Pro Trp

[2144] 290 295 300

[2145] Tyr Ser Gln Cys Phe Pro

[2146] 305 310

[2147] (2)SEQ ID NO:18-A 的信息：

[2148] (i) 序列特征：

[2149] (A) 长度：885 个碱基对

[2150] (B) 类型：核酸

[2151] (C) 链型：单链

[2152] (D) 拓扑结构：线性

[2153] (ii) 分子型 :cDNA

[2154] (vi) 原始来源 :

[2155] (A) 生物体 :来源于壳球孢属的构建体

[2156] (xi) 序列描述 :SEQ ID NO :18-A :

[2157] ATG TTC TCT CCG CTC TGG GCC CTG TCG GCT CTG CTC CTA TTT CCT GCC

[2158] 48

[2159] Met Phe Ser Pro Leu Trp Ala Leu Ser Ala Leu Leu Leu Phe Pro Ala

[2160] 145 150 155

[2161] ACT GAA GCC ACT AGC GGC GTG ACA ACC AGG TAC TGG GAC TGC TGC AAG

[2162] 96

[2163] Thr Glu Ala Thr Ser Gly Val Thr Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys

[2164] 160 165 170

[2165] CCG TCT TGT GCT TGG ACG GGC AAA GCA TCC GTC TCC AAG CCC GTC GGA

[2166] 144

[2167] Pro Ser Cys Ala Trp Thr Gly Lys Ala Ser Val Ser Lys Pro Val Gly

[2168] 175 180 185

[2169] ACC TGC GAC ATC AAC GAC AAC GCC CAG ACG CCG AGC GAT CTG CTC AAG

[2170] 192

[2171] Thr Cys Asp Ile Asn Asp Asn Ala Gln Thr Pro Ser Asp Leu Leu Lys

[2172] 190 195 200 205

[2173] TCG TCC TGT GAT GGC GGC AGC GCC TAC TAC TGC AGC AAC CAG GGC CCA

[2174] 240

[2175] Ser Ser Cys Asp Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Cys Ser Asn Gln Gly Pro

[2176] 210 215 220

[2177] TGG GCC GTG AAC GAC AGC CTT TCC TAC GGC TTC GCT GCC GCC AAG CTG

[2178] 288

[2179] Trp Ala Val Asn Asp Ser Leu Ser Tyr Gly Phe Ala Ala Ala Lys Leu

[2180] 225 230 235

[2181] TCC GGA AAG CAG GAG ACT GAT TGG TGC TGT GGC TGC TAC AAG CTC ACA

[2182] 336

[2183] Ser Gly Lys Gln Glu Thr Asp Trp Cys Cys Gly Cys Tyr Lys Leu Thr

[2184] 240 245 250

[2185] TTC ACC TCC ACC GCC GTT TCC GGC AAG CAA ATG ATC GTG CAA ATC ACG

[2186] 384

[2187] Phe Thr Ser Thr Ala Val Ser Gly Lys Gln Met Ile Val Gln Ile Thr

[2188] 255 260 265

[2189] 20 AAC ACG GGC GGC GAC CTC GGC AAC AAC CAC TTC GAC ATC GCC ATG CCG

[2190] 432

[2191] Asn Thr Gly Gly Asp Leu Gly Asn Asn His Phe Asp Ile Ala Met Pro

[2192] 270 275 280 285

[2193] GGC GGC GGC GTC GGC ATC TTC AAC GGG TGC TCC AAG CAA TGG AAC GGC

[2194] 480

[2195] Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asn Gly Cys Ser Lys Gln Trp Asn Gly

[2196] 290 295 300

[2197] ATC AAT CTG GGC AAC CAG TAT GGC GGC TTC ACT GAC CGC TCG CAA TGT

[2198] 528

[2199] Ile Asn Leu Gly Asn Gln Tyr Gly Gly Phe Thr Asp Arg Ser Gln Cys

[2200] 305 310 315

[2201] GCG ACG CTC CCG TCC AAG TGG CAG GCC AGC TGC AAC TGG CGC TTC GAC

[2202] 576

[2203] Ala Thr Leu Pro Ser Lys Trp Gln Ala Ser Cys Asn Trp Arg Phe Asp

[2204] 320 325 330

[2205] TGG TTC GAG AAT GCC GAC AAC CCC ACC GTC GAT TGG GAG CCT GTC ACT

[2206] 624

[2207] Trp Phe Glu Asn Ala Asp Asn Pro Thr Val Asp Trp Glu Pro Val Thr

[2208] 335 340 345

[2209] TGC CCA CAG GAA TTG GTC GCC CGG ACT GGC TGT TCC CGT ACC CCC TCC

[2210] 672

[2211] Cys Pro Gln Glu Leu Val Ala Arg Thr Gly Cys Ser Arg Thr Pro Ser

[2212] 350 355 360 365

[2213]

[2214] AGC AGC ACC AGC TCT CCG GTC AAC CAG CCT ACC AGC ACC AGC ACC ACG

[2215] 720

[2216] Ser Ser Thr Ser Ser Pro Val Asn Gln Pro Thr Ser Thr Ser Thr Thr

[2217] 370 375 380

[2218]

[2219] TCC ACC TCC ACC ACC TCG AGC CCG CCA GTC CAG CCT ACG ACT CCC AGC

[2220] 768

[2221] Ser Thr Ser Thr Thr Ser Ser Pro Pro Val Gln Pro Thr Thr Pro Ser

[2222] 385 390 395

[2223]

[2224] GGC TGC ACT GCT GAG AGG TGG GCT CAG TGC GGC GGC AAT GGC TGG AGC

[2225] 816

[2226] Gly Cys Thr Ala Glu Arg Trp Ala Gln Cys Gly Gly Asn Gly Trp Ser

[2227] 400 405 410

[2228]

[2229] GGC TGC ACC ACC TGC GTC GCT GGC AGC ACT TGC ACG AAG ATTAAT GAC

[2230] 864

[2231] Gly Cys Thr Thr Cys Val Ala Gly Ser Thr Cys Thr Lys Ile Asn Asp

[2232] 415 420 425

[2233] TGG TAC CAT CAG TGC CTG TAG

[2234] 885

[2235] Trp Tyr His Gln Cys Leu *

[2236] 430 435

[2237] (2)SEQ ID NO:18-B 的信息：

[2238] (i) 序列特征：

[2239] (A) 长度:295 个氨基酸

[2240] (B) 类型:氨基酸

[2241] (C) 链型:单链

[2242] (D) 拓扑结构:线性

[2243] (ii) 分子类型:蛋白质

[2244] (xi) 序列描述:SEQ ID NO:18-B：

[2245] Met Phe Ser Pro Leu Trp Ala Leu Ser Ala Leu Leu Leu Phe Pro Ala

[2246] 1 5 10 15

[2247] Thr Glu Ala Thr Ser Gly Val Thr Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys

[2248] 20 25 30

[2249] Pro Ser Cys Ala Trp Thr Gly Lys Ala Ser Val Ser Lys Pro Val Gly

[2250] 35 40 45

[2251] Thr Cys Asp Ile Asn Asp Asn Ala Gln Thr Pro Ser Asp Leu Leu Lys

[2252] 50 55 60

[2253] Ser Ser Cys Asp Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Cys Ser Asn Gln Gly Pro

[2254] 65 70 75 80

[2255] Trp Ala Val Asn Asp Ser Leu Ser Tyr Gly Phe Ala Ala Ala Lys Leu

[2256] 85 90 95

[2257] Ser Gly Lys Gln Glu Thr Asp Trp Cys Cys Gly Cys Tyr Lys Leu Thr

[2258] 100 105 110

[2259] Phe Thr Ser Thr Ala Val Ser Gly Lys Gln Met Ile Val Gln Ile Thr

[2260] 115 120 125

[2261] Asn Thr Gly Gly Asp Leu Gly Asn Asn His Phe Asp Ile Ala Met Pro

[2262] 130 135 140

[2263] Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asn Gry Cys Ser Lys Gln Trp Asn Gly

[2264] 145 150 155 160

[2265] Ile Asn Leu Gly Asn Gln Tyr Gly Gly Phe Thr Asp Arg Ser Gln Cys

[2266] 165 170 175

[2267] Ala Thr Leu Pro Ser Lys Trp Gln Ala Ser Cys Asn Trp Arg Phe Asp

[2268] 180 185 190

[2269] Trp Phe Glu Asn Ala Asp Asn Pro Thr Val Asp Trp Glu Pro Val Thr

[2270] 195 200 205

[2271] Cys Pro Gln Glu Leu Val Ala Arg Thr Gly Cys Ser Arg Thr Pro Ser

[2272] 210 215 220

[2273] Ser Ser Thr Ser Ser Pro Val Asn Gln Pro Thr Ser Thr Ser Thr Thr

[2274] 225 230 235 240

[2275] Ser Thr Ser Thr Thr Ser Ser Pro Pro Val Gln Pro Thr Thr Pro Ser

[2276] 245 250 255

[2277] Gly Cys Thr Ala Glu Arg Trp Ala Gln Cys Gly Gly Asn Gly Trp Ser

[2278] 260 265 270

[2279] Gly Cys Thr Thr Cys Val Ala Gly Ser Thr Cys Thr Lys Ile Asn Asp

[2280] 275 280 285

[2281] Trp Tyr His Gln Cys Leu *

[2282] 290 295

[2283] (2)SEQ ID NO:19 的信息：

[2284] (i) 序列特征：

[2285] (A) 长度：425 个碱基对

[2286] (B) 类型：核酸

[2287] (C) 链型：单链

[2288] (D) 拓扑结构：线性

[2289] (ii) 分子型：cDNA

[2290] (vi) 原始来源：

[2291] (A) 生物体：大肠杆菌，DSM 10576

[2292] (ix) 特征：

[2293] (A) 名称 / 关键词：CDS

[2294] (B) 位置：1...425

[2295] (xi) 序列描述：SEQ ID NO:19：

[2296] CAAGATACAA TATGCGTTCC TCCACTATTT TGCAAACCGG CCTGGTGGCC GTTCTCCCCT

[2297] 60

[2298] TCGCCGTCCA GGCCGCCTCA GGATCCGGCA AGTCCACCAG ATATTGGGAC TGCTGCAAAC

[2299] 120

[2300] CATCTTGTGC CTGGTCCGGC AAGGCTTCTG TCAACCGCCC TGTTCTCGCC TGCAACGCAA

[2301] 180

[2302] ACAACAACCC GCTGAACGAC GCCAACGTCA AGTCAGGATG TGATGGCGGT TCTGCATACA

[2303] 240

[2304] CCTGTGCCAA CAACTCTCCC TGGGCAGTGA ATGACAATCT GGCCTACGGC TTCGCGGCCA

[2305] 300

[2306] CAAAACTCAG CGGGGGGACC GAGTCATCTT GGTGCTGCGC CTGTTATGCC CTCACATTCA

[2307] 360

[2308] CATCGGGTCC TGTTTCTGGC AAAACCTTGG TTGTCCAGTC TACCAGTACC GGTGGTGATC

[2309] 420

[2310] TTGGC

[2311] 425

[2312] (2)SEQ ID NO:20 的信息：

[2313] (i) 序列特征：

[2314] (A) 长度：141 个氨基酸

[2315] (B) 类型：氨基酸

[2316] (C) 链型：单链

[2317] (D) 拓扑结构：线性

[2318] (ii) 分子类型：蛋白质

[2319] (xi) 序列描述：SEQ ID NO:20：

[2320] Met Arg Ser Ser Thr Ile Leu Gln Thr Gly Leu Val Ala Val Leu Pro

[2321] 1 5 10 15

[2322] Phe Ala Val Gln Ala Ala Ser Gly Ser Gly Lys Ser Thr Arg Tyr Trp

[2323] 20 25 30

[2324] Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys Ala Trp Ser Gly Lys Ala Ser Val Asn

[2325] 35 40 45

[2326] Arg Pro Val Leu Ala Cys Asn Ala Asn Asn Asn Pro Leu Asn Asp Ala

[2327] 50 55 60

[2328] Asn Val Lys Ser Gly Cys Asp Gly Gly Ser Ala Tyr Thr Cys Ala Asn

[2329] 65 70 75 80

[2330] Asn Ser Pro Trp Ala Val Asn Asp Asn Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala

[2331] 85 90 95

[2332] Thr Lys Leu Ser Gly Gly Thr Glu Ser Ser Trp Cys Cys Ala Cys Tyr

[2333] 100 105 110

[2334] Ala Leu Thr Phe Thr Ser Gly Pro Val Ser Gly Lys Thr Leu Val Val

[2335] 115 120 125

[2336] Gln Ser Thr Ser Thr Gly Gly Asp Leu Gly

[2337] 130 135

[2338] (2)SEQ ID NO:21 的信息：

[2339] (i) 序列特征：

[2340] (A) 长度：108 个碱基对

[2341] (B) 类型：核酸

[2342] (C) 链型：单链

[2343] (D) 拓扑结构：线性

[2344] (ii) 分子型：cDNA

[2345] (vi) 原始来源：

[2346] (A) 生物体：Saccobolus dilutellus

[2347] (B) 菌株：CBS 275.96

[2348] (ix) 特征 :

[2349] (A) 名称 / 关键词 :CDS

[2350] (B) 位置 :1...108

[2351] (xi) 序列描述 :SEQ ID NO :21 :

[2352] TCG GCT TGC GAT AAC GGT GGT GGC ACT GCA TAC ATG TGT GCC AGC CAG

[2353] Ser Ala Cys Asp Asn Gly Gly Gly Thr Ala Tyr Met Cys Ala Ser Gln

[2354] 1 5 10 15

[2355] GAG CCG TGG GCA GTG AGC TCC AAC GTC GCG TAC GGC TTT GCT GCA GTT

[2356] Glu Pro Trp Ala Val Ser Ser Asn Val Ala Tyr Gly Phe Ala Ala Val

[2357] 20 25 30

[2358] AGA ATC AGC GGA

[2359] Arg Ile Ser Gly

[2360] 35

[2361] (2)SEQ ID NO :22 的信息 :

[2362] (i) 序列特征 :

[2363] (A) 长度 :36 个氨基酸

[2364] (B) 类型 :氨基酸

[2365] (C) 链型 :单链

[2366] (D) 拓扑结构 :线性

[2367] (ii) 分子类型 :蛋白质

[2368] (xi) 序列描述 :SEQ ID NO :22 :

[2369] Ser Ala Cys Asp Asn Gly Gly Gly Thr Ala Tyr Met Cys Ala Ser Gln

[2370] 1 5 10 15

[2371] Glu Pro Trp Ala Val Ser Ser Asn Val Ala Tyr Gly Phe Ala Ala Val

[2372] 20 25 30

[2373] Arg Ile Ser Gly

[2374] 35

[2375] (2)SEQ ID NO :23 的信息 :

[2376] (i) 序列特征 :

[2377] (A) 长度 :99 个碱基对

[2378] (B) 类型 :核酸

[2379] (C) 链型 :单链

[2380] (D) 拓扑结构 :线性

[2381] (ii) 分子型 :cDNA

[2382] (vi) 原始来源 :

[2383] (A) 生物体 :Thermonyces Verrucosus

[2384] (B) 菌株 :CBS 285.96

[2385] (ix) 特征 :

[2386] (A) 名称 / 关键词 :CDS

[2387] (B) 位置 :1...99

[2388] (xi) 序列描述 :SEQ ID NO :23 :

[2389] GCC TGC AAC GCA AAC TTC CAG CGC ATC AGT GAC CCC AAC GCC AAG TCG

[2390] Ala Cys Asn Ala Asn Phe Gln Arg Ile Ser Asp Pro Asn Ala Lys Ser

[2391] GGC TGC GAT GGT GGC TCG GCC TTC TCT TGC GCC AAA CAA ACC CCT TGG

[2392] Gly Cys Asp Gly Gly Ser Ala Phe Ser Cys Ala Lys Gln Thr Pro Trp

[2393] GCC

[2394] Ala

[2395] (2)SEQ ID NO :24 的信息 :

[2396] (i) 序列特征 :

[2397] (A) 长度 :33 个氨基酸

[2398] (B) 类型 :氨基酸

[2399] (C) 链型 :单链

[2400] (D) 拓扑结构 :线性

[2401] (ii) 分子类型 :蛋白质

[2402] (xi) 序列描述 :SEQ ID NO :24 :

[2403] Ala Cys Asn Ala Asn Phe Gln Arg Ile Ser Asp Pro Asn Ala Lys Ser

[2404] 1 5 10 15

[2405] Gly Cys Asp Gly Gly Ser Ala Phe Ser Cys Ala Lys Gln Thr Pro Trp

[2406] 20 25 30

[2407] Ala

[2408] (2)SEQ ID NO :25 的信息 :

[2409] (i) 序列特征 :

[2410] (A) 长度 :225 个碱基对

[2411] (B) 类型 :核酸

[2412] (C) 链型 :单链

[2413] (D) 拓扑结构 :线性

[2414] (ii) 分子型 :cDNA

[2415] (vi) 原始来源 :

[2416] (A) 生物体 :鹿角团炭角菌

[2417] (B) 菌株 :CBS 284.96

[2418] (ix) 特征 :

[2419] (A) 名称 / 关键词 :CDS

[2420] (B) 位置 :1...225

[2421] (xi) 序列描述 :SEQ ID NO :25 :

[2422] GAC CAG CCG CTC GGC GGA CAA CGG ACG CGA CCA AGG AGC GCG TGC GAC

[2423] 48

[2424] Asp Gln Pro Leu Gly Gly Gln Arg Thr Arg Pro Arg Ser Ala Cys Asp

[2425] 35 40 45

[2426] AAT GGC GGC TCT GCA TAC ATG TGC AGC AAC CAG AGC CCG TGG GCC GTC

[2427] 96

[2428] Asn Gly Gly Ser Ala Tyr Met Cys Ser Asn Gln Ser Pro Trp Ala Val

[2429] 50 55 60 65

[2430] GAC GAT TCT CTC AGT TAC GGA TGG GCT GCC GTT AGG ATC TAT GGA CAT

[2431] 144

[2432] Asp Asp Ser Leu Ser Tyr Gly Trp Ala Ala Val Arg Ile Tyr Gly His

[2433] 70 75 80

[2434] ACC GAA ACT ACT TGG TGC TGC GCT TGC TAC GAG TTG ACT TTT ACC AGC

[2435] 192

[2436] Thr Glu Thr Thr Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Glu Leu Thr Phe Thr Ser

[2437] 85 90 95

[2438] GGT CCG GTT AGC GGC AAG AAG ATG ATT GTT CAG

[2439] 225

[2440] Gly Pro Val Ser Gly Lys Lys Met Ile Val Gln

[2441] 100 105

[2442] (2)SEQ ID NO:26 的信息：

[2443] (i) 序列特征：

[2444] (A) 长度:75 个氨基酸

[2445] (B) 类型:氨基酸

[2446] (C) 链型:单链

[2447] (D) 拓扑结构:线性

[2448] (ii) 分子类型:蛋白质

[2449] (xi) 序列描述:SEQ ID NO:26：

[2450] Asp Gln Pro Leu Gly Gly Gln Arg Thr Arg Pro Arg Ser Ala Cys Asp

[2451] 1 5 10 15

[2452] Asn Gly Gly Ser Ala Tyr Met Cys Ser Asn Gln Ser Pro Trp Ala Val

[2453] 20 25 30

[2454] Asp Asp Ser Leu Ser Tyr Gly Trp Ala Ala Val Arg Ile Tyr Gly His

[2455] 35 40 45

[2456] Thr Glu Thr Thr Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Glu Leu Thr Phe Thr Ser

[2457] 50 55 60

[2458] Gly Pro Val Ser Gly Lys Lys Met Ile Val Gln

[2459] 65 70 75

[2460] (2)SEQ ID NO:27 的信息：

[2461] (i) 序列特征：

[2462] (A) 长度:177 个碱基对

[2463] (B) 类型:核酸

[2464] (C) 链型:单链

[2465] (D) 拓扑结构 :线性

[2466] (ii) 分子型 :cDNA

[2467] (vi) 原始来源 :

[2468] (A) 生物体 :尖镰孢 ssp lycopersici

[2469] (B) 菌株 :CBS 645.78

[2470] (ix) 特征 :

[2471] (A) 名称 / 关键词 :CDS

[2472] (B) 位置 :1...177

[2473] (xi) 序列描述 :SEQ ID NO :27 :

[2474] AGA AAC GAC AAC CCC ATC TCC AAC ACC AAC GCT GTC AAC GGT TGT GAG

[2475] 48

[2476] Arg Asn Asp Asn Pro Ile Ser Asn Thr Asn Ala Val Asn Gly Cys Glu

[2477] 30 35 40 45

[2478] GGT GGT GGT TCT GCT TAT GCT TGC ACC AAC TAC TCT CCC TGG GCT GTC

[2479] 96

[2480] Gly Gly Gly Ser Ala Tyr Ala Cys Thr Asn Tyr Ser Pro Trp Ala Val

[2481] 50 55 60

[2482] AAC GAT GAG CTT GCC TAC GGT TTC GCT GCTACC AAG ATC TCC GGT GGC

[2483] 144

[2484] Asn Asp Glu Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala Thr Lys Ile Ser Gly Gly

[2485] 65 70 75

[2486] TCC GAG GCC AGC TGG TGC TGT GCC TGC TAT CTA

[2487] 177

[2488] Ser Glu Ala Ser Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Leu

[2489] 80 85

[2490] (2)SEQ ID NO :28 的信息 :

[2491] (i) 序列特征 :

[2492] (A) 长度 :59 个氨基酸

[2493] (B) 类型 :氨基酸

[2494] (C) 链型 :单链

[2495] (D) 拓扑结构 :线性

[2496] (ii) 分子类型 :蛋白质

[2497] (xi) 序列描述 :SEQ ID NO :28 :

[2498] Arg Asn Asp Asn Pro Ile Ser Asn Thr Asn Ala Val Asn Gly

[2499] Cys Glu

[2500] 1 5 10

[2501] 15

[2502] Gly Gly Gly Ser Ala Tyr Ala Cys Thr Asn Tyr Ser Pro Trp

[2503] Ala Val

[2504] 20 25 30

[2505] Asn Asp Glu Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala Thr Lys Ile Ser

[2506] Gly Gly

[2507] 35 40 45

[2508] Ser Glu Ala Ser Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Leu

[2509] 50 55

[2510] (2)SEQ ID NO:29 的信息：

[2511] (i) 序列特征：

[2512] (A) 长度:63 个碱基对

[2513] (B) 类型:核酸

[2514] (C) 链型:单链

[2515] (D) 拓扑结构:线性

[2516] (ii) 分子型:cDNA

[2517] (vi) 原始来源：

[2518] (A) 生物体:Nectria pinea

[2519] (B) 菌株:CBS 279.96

[2520] (ix) 特征：

[2521] (A) 名称 / 关键词:CDS

[2522] (B) 位置:1...63

[2523] (xi) 序列描述:SEQ ID NO:29：

[2524] AGC GGC TGT GAC GGT GGT TCT GCC TAC GCC TGT GCA AAC AAC

[2525] TCC CCT 48

[2526] Ser Gly Cys Asp Gly Gly Ser Ala Tyr Ala Cys Ala Asn Asn

[2527] Ser Pro

[2528] 60 65 70

[2529] 75

[2530] TGG GCT GTC AAC GAT

[2531] 63

[2532] Trp Ala Val Asn Asp

[2533] 80

[2534] (2)SEQ ID NO:30 的信息：

[2535] (i) 序列特征：

[2536] (A) 长度:21 个氨基酸

[2537] (B) 类型:氨基酸

[2538] (C) 链型:单链

[2539] (D) 拓扑结构:线性

[2540] (ii) 分子类型:蛋白质

[2541] (xi) 序列描述:SEQ ID NO:30：

[2542] Ser Gly Cys Asp Gly Gly Ser Ala Tyr Ala Cys Ala Asn Asn

[2543] Ser pro

[2544] 1 5 10

[2545] 15

[2546] Trp Ala Val Asn Asp

[2547] 20

[2548] (2)SEQ ID NO:31 的信息：

[2549] (i) 序列特征：

[2550] (A) 长度：177 个碱基对

[2551] (B) 类型：核酸

[2552] (C) 链型：单链

[2553] (D) 拓扑结构：线性

[2554] (ii) 分子型：cDNA

[2555] (vi) 原始来源：

[2556] (A) 生物体：灰腐质霉 Traeen

[2557] (B) 菌株：ATCC 22726

[2558] (ix) 特征：

[2559] (A) 名称 / 关键词：CDS

[2560] (B) 位置：1...177

[2561] (xi) 序列描述：SEQ ID NO:31：

[2562] AAC CAG CCT GTC TTC ACT TGC GAC GCC AAA TTC CAG CGC ATC

[2563] ACC GAC 48

[2564] Ash Gln Pro Val Phe Thr Cys Asp Ala Lys Phe Gln Arg Ile

[2565] Thr Asp

[2566] 25 30 35

[2567] CCC AAT ACC AAG TCG GGC TGC GAT GGC GGC TCG GCC TTT TCG

[2568] TGT GCT 96

[2569] Pro Asn Thr Lys Ser Gly Cys Asp Gly Gly Ser Ala Phe Ser

[2570] Cys Ala

[2571] 40 45 50

[2572] GAC CAA ACC CCC TGG GCT CTG AAC GAC GAT TTC GCC TAT GGC

[2573] TTC GCT 144

[2574] Asp Gln Thr Pro Trp Ala Leu Asn Asp Asp Phe Ala Tyr Gly

[2575] Phe Ala

[2576] 55 60 65

[2577] GCC ACG GCT ATT TCG GGT GGA TCG GAA GCC TCG

[2578] 177

[2579] Ala Thr Ala Ile Ser Gly Gly Ser Glu Ala Ser

[2580] 70 75 80

[2581] (2)SEQ ID NO:32 的信息：

[2582] (i) 序列特征 :

[2583] (A) 长度 :59 个氨基酸

[2584] (B) 类型 :氨基酸

[2585] (C) 链型 :单链

[2586] (D) 拓扑结构 :线性

[2587] (ii) 分子类型 :蛋白质

[2588] (xi) 序列描述 :SEQ ID NO :32 :

[2589] Asn Gln Pro Val Phe Thr Cys Asp Ala Lys Phe Gln Arg Ile

[2590] Thr Asp

[2591] 1 5 10

[2592] 15

[2593] Pro Asn Thr Lys Ser Gly Cys Asp Gly Gly Ser Ala Phe Ser

[2594] Cys Ala

[2595] 20 25 30

[2596] Asp Gln Thr Pro Trp Ala Leu Asn Asp Asp Phe Ala Tyr Gly

[2597] Phe Ala

[2598] 35 40 45

[2599] Ala Thr Ala Ile Ser Gly Gly Ser Glu Ala Ser

[2600] 50 55

[2601] (2)SEQ ID NO :33 的信息 :

[2602] (i) 序列特征 :

[2603] (A) 长度 :153 个碱基对

[2604] (B) 类型 :核酸

[2605] (C) 链型 :单链

[2606] (D) 拓扑结构 :线性

[2607] (ii) 分子型 :cDNA

[2608] (vi) 原始来源 :

[2609] (A) 生物体 :黑腐质霉 Omvik

[2610] (B) 菌株 :CBS 819.73

[2611] (ix) 特征 :

[2612] (A) 名称 / 关键词 :CDS

[2613] (B) 位置 :1...153

[2614] (xi) 序列描述 :SEQ ID NO :33 :

[2615] GTC TAC GCC TGC AAC GCA AAC TTC CAG CGC ATC ACC GAC GCC

[2616] AAC GCC 48

[2617] Val Tyr Ala Cys Asn Ala Asn Phe Gln Arg Ile Thr Asp Ala

[2618] Asn Ala

[2619] 60 65 70

[2620] 75

[2621] AAG TCC GGC TGC GAT GGC GGC TCC GCC TTC TCG TGC GCC AAC
[2622] CAG ACC 96
[2623] Lys Ser Gly Cys Asp Gly Gly Ser Ala Phe Ser Cys Ala Asn
[2624] Gln Thr
[2625] 80 85
[2626] 90
[2627] CCG TGG GCC GTG AGC GAC GAC TTT GCC TAC GGT TTC GCG GCT
[2628] ACG GCG 144
[2629] Pro Trp Ala Val Ser Asp Asp Phe Ala Tyr Gly Phe Ala Ala
[2630] Thr Ala
[2631] 95 100 105
[2632] CTC GCC GGC
[2633] 153
[2634] Leu Ala Gly
[2635] 110
[2636] (2)SEQ ID NO:34 的信息：
[2637] (i) 序列特征：
[2638] (A) 长度：51 个氨基酸
[2639] (B) 类型：氨基酸
[2640] (C) 链型：单链
[2641] (D) 拓扑结构：线性
[2642] (ii) 分子类型：蛋白质
[2643] (xi) 序列描述：SEQ ID NO:34：
[2644] Val Tyr Ala Cys Asn Ala Asn Phe Gln Arg Ile Thr Asp Ala
[2645] Asn Ala
[2646] 1 5 10
[2647] 15
[2648] Lys Ser Gly Cys Asp Gly Gly Ser Ala Phe Ser Cys Ala Asn
[2649] Gln Thr
[2650] 20 25 30
[2651] Pro Trp Ala Val Ser Asp Asp Phe Ala Tyr Gly Phe Ala Ala
[2652] Thr Ala
[2653] 35 40 45
[2654] Leu Ala Gly
[2655] 50
[2656] (2)SEQ ID NO:35 的信息：
[2657] (i) 序列特征：
[2658] (A) 长度：181 个碱基对
[2659] (B) 类型：核酸

[2660] (C) 链型 :单链

[2661] (D) 拓扑结构 :线性

[2662] (ii) 分子型 :cDNA

[2663] (vi) 原始来源 :

[2664] (A) 生物体 :Cladorrhinum forcundissimun

[2665] (B) 菌株 :ATCC 62373

[2666] (ix) 特征 :

[2667] (A) 名称 / 关键词 :CDS

[2668] (B) 位置 :1...181

[2669] (xi) 序列描述 :SEQ ID NO :35 :

[2670] GTC AAC CGC CCT GTC CTC GCC TGC GAC GCA AAC AAC AAC CCT

[2671] CTG ACC 48

[2672] Val Asn Arg Pro Val Leu Ala Cys Asp Ala Asn Asn Asn Pro

[2673] Leu Thr

[2674] 1 5 10

[2675] 15

[2676] GAC GCC GGC GTC AAG TCC GGA TGT GAT GGC GGT TCT GCA TAC

[2677] ACC TGT 96

[2678] Asp Ala Gly Val Lys Ser Gly Cys Asp Gly Gly Ser Ala Tyr

[2679] Thr Cys

[2680] 20 25 30

[2681] GCC AAC AAC TCC CCA TGG GCA GTG AAC GAC CAG CTC GCC TAC

[2682] GGC TTT 144

[2683] Ala Asn Asn Ser Pro Trp Ala Val Asn Asp Gln Leu Ala Tyr

[2684] Gly Phe

[2685] 35 40 45

[2686] GCC GCC ACC AAA CTG AGC GGC GGA ACT GAG TCG TCA

[2687] 180

[2688] Ala Ala Thr Lys Leu Ser Gly Gly Thr Glu Ser Ser

[2689] 50 55 60

[2690] (2)SEQ ID NO :36 的信息 :

[2691] (i) 序列特征 :

[2692] (A) 长度 :60 个氨基酸

[2693] (B) 类型 :氨基酸

[2694] (C) 链型 :单链

[2695] (D) 拓扑结构 :线性

[2696] (ii) 分子类型 :蛋白质

[2697] (xi) 序列描述 :SEQ ID NO :36 :

[2698] Val Asn Arg Pro Val Leu Ala Cys Asp Ala Asn Asn Asn Pro

[2699] Leu Thr

[2700] 1 5 10

[2701] 15

[2702] Asp Ala Gly Val Lys Ser Gly Cys Asp Gly Gly Ser Ala Tyr

[2703] Thr Cys

[2704] 20 25 30

[2705] Ala Asn Asn Ser Pro Trp Ala Val Asn Asp Gln Leu Ala Tyr

[2706] Gly Phe

[2707] 35 40 45

[2708] Ala Ala Thr Lys Leu Ser Gly Gly Thr Glu Ser Ser

[2709] 50 55 60

[2710] (2)SEQ ID NO:37 的信息：

[2711] (i) 序列特征：

[2712] (A) 长度：64 个碱基对

[2713] (B) 类型：核酸

[2714] (C) 链型：单链

[2715] (D) 拓扑结构：线性

[2716] (ii) 分子型：cDNA

[2717] (vi) 原始来源：

[2718] (A) 生物体：Syspastospora boninensis

[2719] (B) 菌株：NKBC 1515

[2720] (ix) 特征：

[2721] (A) 名称 / 关键词：CDS

[2722] (B) 位置：1...64

[2723] (xi) 序列描述：SEQ ID NO:37：

[2724] GGC TGC GAC GGC GGC AGC GCC TTC ACC TGC TCC AAC AAC TCT

[2725] CCA TGG 48

[2726] Gly Cys Asp Gly Gly Ser Ala Phe Thr Cys Ser Asn Asn Ser

[2727] Pro Trp

[2728] GCT GTG AAC GAA GAT

[2729] 63

[2730] Ala Val Asn Glu Asp

[2731] (2)SEQ ID NO:38 的信息：

[2732] (i) 序列特征：

[2733] (A) 长度：21 个氨基酸

[2734] (B) 类型：氨基酸

[2735] (C) 链型：单链

[2736] (D) 拓扑结构：线性

[2737] (ii) 分子类型：蛋白质

[2738] (xi) 序列描述 :SEQ ID NO :38 :

[2739] Gly Cys Asp Gly Gly Ser Ala Phe Thr Cys Ser Asn Asn Ser

[2740] Pro Trp

[2741] Ala Val Asn Glu Asp

[2742] (2)SEQ ID NO :39 的信息 :

[2743] (i) 序列特征 :

[2744] (A) 长度 :153 个碱基对

[2745] (B) 类型 :核酸

[2746] (C) 链型 :单链

[2747] (D) 拓扑结构 :线性

[2748] (ii) 分子型 :cDNA

[2749] (vi) 原始来源 :

[2750] (A) 生物体 :Nigrospora sp.

[2751] (B) 菌株 :CBS 272.96

[2752] (ix) 特征 :

[2753] (A) 名称 / 关键词 :CDS

[2754] (B) 位置 :1...153

[2755] (xi) 序列描述 :SEQ ID NO :39 :

[2756] ACA AGA AAC GAC GGG CCC CTG TCC AGC CCC GAT GCC GCC TCC

[2757] GGC TGT 48

[2758] Thr Arg Asn Asp Gly Pro Leu Ser Ser Pro Asp Ala Ala Ser

[2759] Gly Cys

[2760] 25 30 35

[2761] GAT GGC GGC GAA GCC TTT GCC TGT TCT AAT ACC TCG CCT TGG

[2762] GCC GTC 96

[2763] Asp Gly Gly Glu Ala Phe Ala Cys Ser Asn Thr Ser Pro Trp

[2764] Ala Val

[2765] 40 45 50

[2766] AGC GAC CAG CTC GCG TAC GGA TAC GTC GCC ACG TCC ATC TCC

[2767] GGC GGC 144

[2768] Ser Asp Gln Leu Ala Tyr Gly Tyr Val Ala Thr Ser Ile Ser

[2769] Gly Gly

[2770] 55 60 65

[2771] ACC GAG TCA

[2772] 153

[2773] Thr Glu Ser

[2774] 70

[2775] (2)SEQ ID NO :40 的信息 :

[2776] (i) 序列特征 :

[2777] (A) 长度 :51 个氨基酸
[2778] (B) 类型 :氨基酸
[2779] (C) 链型 :单链
[2780] (D) 拓扑结构 :线性
[2781] (ii) 分子类型 :蛋白质
[2782] (xi) 序列描述 :SEQ ID NO :40 :
[2783] Thr Arg Asn Asp Gly Pro Leu Ser Ser Pro Asp Ala Ala Ser
[2784] Gly Cys
[2785] 1 5 10
[2786] 15
[2787] Asp Gly Gly Glu Ala Phe Ala Cys Ser Asn Thr Ser Pro Trp
[2788] Ala Val
[2789] 20 25 30
[2790] Ser Asp Gln Leu Ala Tyr Gly Tyr Val Ala Thr Ser Ile Ser
[2791] Gly Gly
[2792] 35 40 45
[2793] Thr Glu Ser
[2794] 50
[2795] (2)SEQ ID NO :41 的信息 :
[2796] (i) 序列特征 :
[2797] (A) 长度 :159 个碱基对
[2798] (B) 类型 :核酸
[2799] (C) 链型 :单链
[2800] (D) 拓扑结构 :线性
[2801] (ii) 分子型 :cDNA
[2802] (vi) 原始来源 :
[2803] (A) 生物体 :弗雷生刺枝霉
[2804] (ix) 特征 :
[2805] (A) 名称 / 关键词 :CDS
[2806] (B) 位置 :1...159
[2807] (xi) 序列描述 :SEQ ID NO :41 :
[2808] GTC CGA ACG TGT AGT GCC AAC GAC TCG CCC TTG TCC GAC CCA
[2809] AAT GCC 48
[2810] Val Arg Thr Cys Ser Ala Asn Asp Ser Pro Leu Ser Asp Pro
[2811] Asn Ala
[2812] 55 60 65
[2813] CCA AGT GGG TGT GAC GGT GGT AGC GCC TTC ACT TGT TCC AAC
[2814] AAC TCC 96
[2815] Pro Ser Gly Cys Asp Gly Gly Ser Ala Phe Thr Cys Ser Asn

[2816] Asn Ser

[2817] 70 75 80

[2818] CCG TGG GCA GTC GAT GAC CAG ACA GCT TAT GGC TTT GCG GCA

[2819] ACA GCC 144

[2820] Pro Trp Ala Val Asp Asp Gln Thr Ala Tyr Gly Phe Ala Ala

[2821] Thr Ala

[2822] 85 90 95

[2823] ATC AGT GGC CAG TCC

[2824] 159

[2825] Ile Ser Gly Gln Ser

[2826] 100

[2827] (2)SEQ ID NO:42 的信息：

[2828] (i) 序列特征：

[2829] (A) 长度：53 个氨基酸

[2830] (B) 类型：氨基酸

[2831] (C) 链型：单链

[2832] (D) 拓扑结构：线性

[2833] (ii) 分子类型：蛋白质

[2834] (xi) 序列描述：SEQ ID NO:42：

[2835] Val Arg Thr Cys Ser Ala Asn Asp Ser Pro Leu Ser Asp Pro

[2836] Asn Ala

[2837] 1 5 10

[2838] 15

[2839] Pro Ser Gly Cys Asp Gly Gly Ser Ala Phe Thr Cys Ser Asn

[2840] Asn Ser

[2841] 20 25 30

[2842] Pro Trp Ala Val Asp Asp Gln Thr Ala Tyr Gly Phe Ala Ala

[2843] Thr Ala

[2844] 35 40 45

[2845] Ile Ser Gly Gln Ser

[2846] 50

[2847] (2)SEQ ID NO:43 的信息：

[2848] (i) 序列特征：

[2849] (A) 长度：153 个碱基对

[2850] (B) 类型：核酸

[2851] (C) 链型：单链

[2852] (D) 拓扑结构：线性

[2853] (ii) 分子型：cDNA

[2854] (vi) 原始来源：

[2855] (A) 生物体 :Ecidia glanduloSa

[2856] (B) 菌株 : CBS 277.96

[2857] (ix) 特征 :

[2858] (A) 名称 / 关键词 :CDS

[2859] (B) 位置 :1...153

[2860] (xi) 序列描述 :SEQ ID NO :43 :

[2861] TGT GAG AAG AAC GAC AAC CCC TTA GCT GAC TTC AGC ACG AAA

[2862] TCC GGG 48

[2863] Cys Glu Lys Asn Asp Asn Pro Leu Ala Asp Phe Ser Thr Lys

[2864] Ser Gly

[2865] 55 60 65

[2866] TGT GAA AGC GGA GGT TCG GCT TAT ACG TGT AAC AAC CAA TCA

[2867] CCA TGG 96

[2868] Cys Glu Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Thr Cys Asn Asn Gln Ser

[2869] Pro Trp

[2870] 70 75 80

[2871] 85

[2872] GCC GTC AAT GAC TTG GTG TCG TAT GGC TTC GCC GCC ACA GCG

[2873] ATC AAT 144

[2874] Ala Val Asn Asp Leu Val Ser Tyr Gly Phe Ala Ala Thr Ala

[2875] Ile Asn

[2876] 90 95

[2877] 100

[2878] GGT GGC AAT

[2879] 153

[2880] Gly Gly Asn

[2881] (2)SEQ ID NO :44 的信息 :

[2882] (i) 序列特征 :

[2883] (A) 长度 :51 个氨基酸

[2884] (B) 类型 :氨基酸

[2885] (C) 链型 :单链

[2886] (D) 拓扑结构 :线性

[2887] (ii) 分子类型 :蛋白质

[2888] (xi) 序列描述 SEQ ID NO :44 :

[2889] Cys Glu Lys Asn Asp Asn Pro Leu Ala Asp Phe Ser Thr Lys

[2890] Ser Gly

[2891] 1 5 10

[2892] 15

[2893] Cys Glu Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Thr Cys Asn Asn Gln Ser

[2894] Pro Trp

[2895] 20 25 30

[2896] Ala Val Asn Asp Leu Val Ser Tyr Gly Phe Ala Ala Thr Ala

[2897] Ile Asn

[2898] 35 40 45

[2899] Gly Gly Asn

[2900] 50

[2901] (2)SEQ ID NO:45 的信息：

[2902] (i) 序列特征：

[2903] (A) 长度：171 个碱基对

[2904] (B) 类型：核酸

[2905] (C) 链型：单链

[2906] (D) 拓扑结构：线性

[2907] (ii) 分子型：cDNA

[2908] (vi) 原始来源：

[2909] (A) 生物体：Coniothecium sp.

[2910] (ix) 特征：

[2911] (A) 名称 / 关键词：CDS

[2912] (B) 位置：1...171

[2913] (xi) 序列描述：SEQ ID NO:45：

[2914] AGC CGC CCC GTC GGA ACC TGC AAG AGG AAC GAC AAC CCC CTC

[2915] TCC GAC 48

[2916] Ser Arg Pro Val Gly Thr Cys Lys Arg Asn Asp Asn Pro Leu

[2917] Ser Asp

[2918] 55 60 65

[2919] CCC GAT GCC AAG TCC GGC TGC GAC GGC GGC GGC GCC TTC ATG

[2920] TGC TCC 96

[2921] Pro Asp Ala Lys Ser Gly Cys Asp Gly Gly Gly Ala Phe Met

[2922] Cys Ser

[2923] 70 75 80

[2924] ACC CAG CAG CCG TGG GCC GTC AAC GAC AAT CTG GCA TAT GGC

[2925] TTC GCC 144

[2926] Thr Gln Gln Pro Trp Ala Val Asn Asp Asn Leu Ala Tyr Gly

[2927] Phe Ala

[2928] 85 90 95

[2929] GCC ACG GCC ATC AGC GGC GGC AAC GAG

[2930] 171

[2931] Ala Thr Ala Ile Ser Gly Gly Asn Glu

[2932] 100 105

[2933] (2)SEQ ID NO:46 的信息：

[2934] (i) 序列特征：

[2935] (A) 长度:57 个氨基酸

[2936] (B) 类型:氨基酸

[2937] (C) 链型:单链

[2938] (D) 拓扑结构:线性

[2939] (ii) 分子类型:蛋白质

[2940] (xi) 序列描述:SEQ ID NO:46：

[2941] Ser Arg Pro Val Gly Thr Cys Lys Arg Asn Asp Asn Pro Leu

[2942] Ser Asp

[2943] 1 5 10

[2944] 15

[2945] Pro Asp Ala Lys Ser Gly Cys Asp Gly Gly Gly Ala Phe Met

[2946] Cys Ser

[2947] 20 25 30

[2948] Thr Gln Gln Pro Trp Ala Val Asn Asp Asn Leu Ala Tyr Gly

[2949] Pne Ala

[2950] 35 40 45

[2951] Ala Thr Ala Ile Ser Gly Gly Asn Glu

[2952] 50 55

[2953] (2)SEQ ID NO:47 的信息：

[2954] (i) 序列特征：

[2955] (A) 长度:159 个碱基对

[2956] (B) 类型:核酸

[2957] (C) 链型:单链

[2958] (D) 拓扑结构:线性

[2959] (ii) 分子型:cDNA

[2960] (vi) 原始来源：

[2961] (B) 菌株:CBS 271.96

[2962] (ix) 特征：

[2963] (A) 名称 / 关键词:CDS

[2964] (B) 位置:1...159

[2965] (xi) 序列描述:SEQ ID NO:47：

[2966] ACT TGC AAC AAG AAC GAC GGG CCC CTG TCC AGC CCC GAT GCC

[2967] GCC TCC 48

[2968] Thr Cys Asn Lys Asn Asp Gly Pro Leu Ser Ser Pro Asp Ala

[2969] Ala Ser

[2970] 60 65 70

[2971] GGC TGT GAT GGC GGC GAA GCC TTT GCC TGT TCT AAT ACC TCG

[2972] CCT TGG 96

[2973] Gly Cys Asp Gly Gly Glu Ala Phe Ala Cys Ser Asn Thr Ser

[2974] Pro Trp

[2975] 75 80 85

[2976] GCC GTC AGC GAC CAG CTC GCG TAC GGA TAC CTC GCC ACG TCC

[2977] ATC TCC 144

[2978] Ala Val Ser Asp Gln Leu Ala Tyr Gly Tyr Leu Ala Thr Ser

[2979] Ile Ser

[2980] 90 95 100

[2981] 105

[2982] GGC GGC ACC GAG TCG

[2983] 159

[2984] Gly Gly Thr Glu Ser

[2985] 110

[2986] (2)SEQ ID NO:48 的信息：

[2987] (i) 序列特征：

[2988] (A) 长度：个氨基酸

[2989] (B) 类型：氨基酸

[2990] (C) 链型：单链

[2991] (D) 拓扑结构：线性

[2992] (ii) 分子类型：蛋白质

[2993] (xi) 序列描述：SEQ ID NO:48：

[2994] Thr Cys Asn Lys Asn Asp Gly Pro Leu Ser Ser Pro Asp Ala

[2995] Ala Ser

[2996] 1 5 10

[2997] 15

[2998] Gly Cys Asp Gly Gly Glu Ala Phe Ala Cys Ser Asn Thr Ser

[2999] Pro Trp

[3000] 20 25 30

[3001] Ala Val Ser Asp Gln Leu Ala Tyr Gly Tyr Leu Ala Thr Ser

[3002] Ile Ser

[3003] 35 40 45

[3004] Gly Gly Thr Glu Ser

[3005] 50

[3006] (2)SEQ ID NO:49 的信息：

[3007] (i) 序列特征：

[3008] (A) 长度：84 个碱基对

[3009] (B) 类型：核酸

[3010] (C) 链型：单链

[3011] (D) 拓扑结构 :线性

[3012] (ii) 分子型 :cDNA

[3013] (vi) 原始来源 :

[3014] (B) 菌株 :CBS 270.96

[3015] (ix) 特征 :

[3016] (A) 名称 / 关键词 :CDS

[3017] (B) 位置 :1...84

[3018] (xi) 序列描述 :SEQ ID NO :49 :

[3019] CCA GTT TTC TCC TGT GAC AAG TAC GAC AAC CCT CTA CCT GAC

[3020] GCC AAT 48

[3021] Pro Val Phe Ser Cys Asp Lys Tyr Asp Asn Pro Leu Pro Asp

[3022] Ala Asn

[3023] 55 60 65

[3024] GCT GTG TCC GGG TGT GAC CCC GGA GGT ACT GCC TTC

[3025] 84

[3026] Ala Val Ser Gly Cys Asp Pro Gly Gly Thr Ala Phe

[3027] 70 75 80

[3028] (2)SEQ ID NO :50 的信息 :

[3029] (i) 序列特征 :

[3030] (A) 长度 :28 个氨基酸

[3031] (B) 类型 :氨基酸

[3032] (C) 链型 :单链

[3033] (D) 拓扑结构 :线性

[3034] (ii) 分子类型 :蛋白质

[3035] (xi) 序列描述 :SEQ ID NO :50 :

[3036] Pro Val Phe Ser Cys Asp Lys Tyr Asp Asn Pro Leu Pro Asp

[3037] Ala Asn

[3038] 1 5 10

[3039] 15

[3040] Ala Val Ser Gly Cys Asp Pro Gly Gly Thr Ala Phe

[3041] 20 25

[3042] (2)SEQ ID NO :51 的信息 :

[3043] (i) 序列特征 :

[3044] (A) 长度 :147 个碱基对

[3045] (B) 类型 :核酸

[3046] (C) 链型 :单链

[3047] (D) 拓扑结构 :线性

[3048] (ii) 分子型 :cDNA

[3049] (vi) 原始来源 :

[3050] (B) 菌株 :棉色二孢,CBS 274.96

[3051] (xi) 序列描述 :SEQ ID NO :51 :

[3052] ACCTGCGACG CCTGCGACAG CCCCCTCAGC GACTACGACG CCAAGTCCGG

[3053] CTGCGACGGC 60

[3054] GGTAGCGCAT ACACCTGCAC CTACTCTACC CCCTGGGCCG TCGACGACAA

[3055] CCTCTCCTAC 120

[3056] GGTTTCGCCG CCGCCAAGCT GAGCGGA

[3057] 147

[3058] (2)SEQ ID NO :52 的信息 :

[3059] (i) 序列特征 :

[3060] (A) 长度 :49 个氨基酸

[3061] (B) 类型 :氨基酸

[3062] (C) 链型 :单链

[3063] (D) 拓扑结构 :线性

[3064] (ii) 分子类型 :肽

[3065] (xi) 序列描述 :SEQ ID NO :52 :

[3066] Thr Cys Asp Ala Cys Asp Ser Pro Leu Ser Asp Tyr Asp

[3067] Ala Lys Ser

[3068] 1 5 10

[3069] 15

[3070] Gly Cys Asp Gly Gly Ser Ala Tyr Thr Cys Thr Tyr Ser

[3071] Thr Pro Trp

[3072] 20 25

[3073] 30

[3074] Ala Val Asp Asp Asn Leu Ser Tyr Gly Phe Ala Ala Ala

[3075] Lys Leu Ser

[3076] 35 40 45

[3077] Gly

[3078] (2)SEQ ID NO :53 的信息 :

[3079] (i) 序列特征 :

[3080] (A) 长度 :135 个碱基对

[3081] (B) 类型 :核酸

[3082] (C) 链型 :单链

[3083] (D) 拓扑结构 :线性

[3084] (ii) 分子型 :cDNA

[3085] (vi) 原始来源 :

[3086] (B) 菌株 :Ulospora bilgramii,NKBC 1444

[3087] (xi) 序列描述 :SEQ ID NO :53 :

[3088] CCACTAGCAG ATTTCACCGG TGGAACCGGC TGTAATGGCG GTTCGACATT

[3089] CTCATGCTCA 60

[3090] AACCAACAAC CATGGGCGGT CAACGACACA TTCTCGTACG GCTTTGCGGG

[3091] CATCTTTATC 120

[3092] ACAGGCCATG TCGAG

[3093] 135

[3094] (2)SEQ ID NO:54 的信息：

[3095] (i) 序列特征：

[3096] (A) 长度:45 个氨基酸

[3097] (B) 类型:氨基酸

[3098] (C) 链型:单链

[3099] (D) 拓扑结构:线性

[3100] (ii) 分子类型:肽

[3101] (xi) 序列描述:SEQ ID NO:54：

[3102] Pro Leu Ala Asp Phe Thr Gly Gly Thr Gly Cys Asn Gly

[3103] Gly Ser Thr

[3104] 1 5 10

[3105] 15

[3106] Phe Ser Cys Ser Asn Gln Gln Pro Trp Ala Val Asn Asp

[3107] Tnr Phe Ser

[3108] 20 25

[3109] 30

[3110] Tyr Gly Phe Ala Gly Ile Phe Ile Thr Gly His Val Glu

[3111] 35 40 45

[3112] (2)SEQ ID NO:55 的信息：

[3113] (i) 序列特征：

[3114] (A) 长度:114 个碱基对

[3115] (B) 类型:核酸

[3116] (C) 链型:单链

[3117] (D) 拓扑结构:线性

[3118] (ii) 分子型:cDNA

[3119] (vi) 原始来源：

[3120] (B) 菌株:疣孢青霉,ATCC 62396

[3121] (xi) 序列描述:SEQ ID NO:55：

[3122] GCCAAATCTG GATGTGATGC TGGTGGAGGT CAAGCCTACA TGTGCTCCAA

[3123] CCAACAACCT 60

[3124] TGGGTAGTCA ACGACAACCT CGCCTACGGT TTCGCCGCAG TCAACATTGC

[3125] CGGC 114

[3126] (2)SEQ ID NO:56 的信息：

[3127] (i) 序列特征：

[3128] (A) 长度 :38 个氨基酸

[3129] (B) 类型 :氨基酸

[3130] (C) 链型 :单链

[3131] (D) 拓扑结构 :线性

[3132] (ii) 分子类型 :肽

[3133] (xi) 序列描述 :SEQ ID NO :56 :

[3134] Ala Lys Ser Gly Cys Asp Ala Gly Gly Gly Gln Ala Tyr

[3135] Met Cys Ser

[3136] 1 5 10

[3137] 15

[3138] Asn Gln Gln Pro Trp Val Val Asn Asp Asn Leu Ala Tyr

[3139] Gly Phe Ala

[3140] 20 25

[3141] 30

[3142] Ala Val Asn Ile Ala Gly

[3143] 35

[3144] (2)SEQ ID NO :57 的信息 :

[3145] (i) 序列特征 :

[3146] (A) 长度 :113 个碱基对

[3147] (B) 类型 :核酸

[3148] (C) 链型 :单链

[3149] (D) 拓扑结构 :线性

[3150] (ii) 分子型 :cDNA

[3151] (vi) 原始来源 :

[3152] (B) 菌株 :点孔座壳

[3153] (xi) 序列描述 :SEQ ID NO :57 :

[3154] TTCGACGTCC GGGTGCGACA ATGGCGGCAG CGCCTTCATG TGCTCTAACC

[3155] AAAGCCCCTG 60

[3156] GGCCGTCAAC GACGATCTGG CCTACGGCTG GGCCGCCGTC TCAATCGCGG

[3157] GCC 113

[3158] (2)SEQ ID NO :58 的信息 :

[3159] (i) 序列特征 :

[3160] (A) 长度 :37 个氨基酸

[3161] (B) 类型 :氨基酸

[3162] (C) 链型 :单链

[3163] (D) 拓扑结构 :线性

[3164] (ii) 分子类型 :肽

[3165] (xi) 序列描述 :SEQ ID NO :58 :

[3166] Ser Thr Ser Gly Cys Asp Asn Gly Gly Ser Ala Phe Met

[3167] Cys Ser Asn

[3168] 1 5 10

[3169] 15

[3170] Gln Ser Pro Trp Ala Val Asn Asp Asp Leu Ala Tyr Gly

[3171] Trp Ala Ala

[3172] 20 25

[3173] 30

[3174] Val Ser Ile Ala Gly

[3175] 35

[3176] (2)SEQ ID NO:59 的信息：

[3177] (i) 序列特征：

[3178] (A) 长度：177 个碱基对

[3179] (B) 类型：核酸

[3180] (C) 链型：单链

[3181] (D) 拓扑结构：线性

[3182] (ii) 分子型：cDNA

[3183] (vi) 原始来源：

[3184] (B) 菌株：蛇形镰孢，IFO 4467

[3185] (xi) 序列描述：SEQ ID NO:59：

[3186] TCAACACCGG TGCAGACGTG CGACCGCAAC GACAACCCGC TCTACGACGG

[3187] CGGGTCGACG 60

[3188] CGGTCCGGCT GCGACGCCGG CGGCGGCGCC TACATGTGCT CGTCGCACAG

[3189] CCCGTGGGCC 120

[3190] GTCAGCGACA GCCTCTCGTA CGGCTGGGCG GCCGTCCGCA TCGCCGGCCA

[3191] GTCCGAG 177

[3192] (2)SEQ ID NO:60 的信息：

[3193] (i) 序列特征：

[3194] (A) 长度：59 个氨基酸

[3195] (B) 类型：氨基酸

[3196] (C) 链型：单链

[3197] (D) 拓扑结构：线性

[3198] (ii) 分子类型：肽

[3199] (xi) 序列描述：SEQ ID NO:60：

[3200] Ser Thr Pro Val Gln Thr Cys Asp Arg Asn Asp Asn Pro

[3201] Leu Tyr Asp

[3202] 1 5 10

[3203] 15

[3204] Gly Gly Ser Thr Arg Ser Gly Cys Asp Ala Gly Gly Gly

[3205] Ala Tyr Met

[3206] 20 25

[3207] 30

[3208] Cys Ser Ser His Ser Pro Trp Ala Val Ser Asp Ser Leu

[3209] Ser Tyr Gly

[3210] 35 40 45

[3211] Trp Ala Ala Val Arg Ile Ala Gly Gln Ser Glu

[3212] 55

[3213] (2)SEQ ID NO:61 的信息：

[3214] (i) 序列特征：

[3215] (A) 长度：150 个碱基对

[3216] (B) 类型：核酸

[3217] (C) 链型：单链

[3218] (D) 拓扑结构：线性

[3219] (ii) 分子型：cDNA

[3220] (vi) 原始来源：

[3221] (B) 菌株：Thielavia thermophila, CBS 174.70

[3222] (xi) 序列描述：SEQ ID NO:61：

[3223] AACGACAACC CCATCTCCAA CACCAACGCT GTCAACGGTT GTGAGGGTGG

[3224] TGGTTCTGCT 60

[3225] TACGCTTGCT CCAACTACTC TCCCTGGGCT GTCAACGATG ACCTTGCCTA

[3226] CGGTTTCGCT 120

[3227] GTTACCAAGA TCTCCGGTGG CTCCGAGGCC

[3228] 150

[3229] (2)SEQ ID NO:62 的信息：

[3230] (i) 序列特征：

[3231] (A) 长度：50 个氨基酸

[3232] (B) 类型：氨基酸

[3233] (C) 链型：单链

[3234] (D) 拓扑结构：线性

[3235] (ii) 分子类型：肽

[3236] (xi) 序列描述：SEQ ID NO:62：

[3237] Asn Asp Asn Pro Ile Ser Asn Thr Asn Ala Val Asn Gly

[3238] Cys Glu Gly

[3239] 1 5 10

[3240] 15

[3241] Gly Gly Ser Ala Tyr Ala Cys Ser Asn Tyr Ser Pro Trp

[3242] Ala Val Asn

[3243] 20 25

[3244] 30

[3245] Asp Asp Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Val Thr Lys Ile Ser
[3246] Gly Gly Ser
[3247] 35 40 45
[3248] (2)SEQ ID NO:63 的信息：
[3249] (i) 序列特征：
[3250] (A) 长度：180 个碱基对
[3251] (B) 类型：核酸
[3252] (C) 链型：单链
[3253] (D) 拓扑结构：线性
[3254] (ii) 分子型：cDNA
[3255] (vi) 原始来源：
[3256] (A) 生物体：管毛壳，CBS 799.83
[3257] (xi) 序列描述：SEQ ID NO:63：
[3258] GTCAATCAGC CCATCCGAAC GTGTAGTGCC AACGACTCGC CCTTGTCCGA
[3259] CCCAAATACC 60
[3260] CCAAGTGGCT GTGACGGTGG TAGCGCCTTC ACTTGTTCCA ACAACTCCCC
[3261] GTGGGCAGTC 120
[3262] GATGACCAGA CAGCTTATGG CTTTGCGGCA ACAGCCATCA GTGGCCAGTC
[3263] CGAGAGCAGC 180
[3264] (2)SEQ ID NO:64 的信息：
[3265] (i) 序列特征：
[3266] (A) 长度：60 个氨基酸
[3267] (B) 类型：氨基酸
[3268] (C) 链型：单链
[3269] (D) 拓扑结构：线性
[3270] (ii) 分子类型：肽
[3271] (xi) 序列描述：SEQ ID NO:64：
[3272] Val Asn Gln Pro Ile Arg Thr Cys Ser Ala Asn Asp Ser
[3273] Pro Leu Ser
[3274] 1 5 10
[3275] 15
[3276] Asp Pro Asn Thr Pro Ser Gly Cys Asp Gly Gly Ser Ala
[3277] Phe Thr Cys
[3278] 20 25
[3279] 30
[3280] Ser Asn Asn Ser Pro Trp Ala Val Asp Asp Gln Thr Ala
[3281] Tyr Gly Phe
[3282] 35 40 45
[3283] Ala Ala Thr Ala Ile Ser Gly Gln Ser Glu Ser Ser

[3284] 50 55 60

[3285] (2)SEQ ID NO:65 的信息：

[3286] (i) 序列特征：

[3287] (A) 长度：159 个碱基对

[3288] (B) 类型：核酸

[3289] (C) 链型：单链

[3290] (D) 拓扑结构：线性

[3291] (ii) 分子型：cDNA

[3292] (vi) 原始来源：Chaetomium virescens，CBS 547.75

[3293] (xi) 序列描述：SEQ ID NO:65：

[3294] ACCTGCGACA AGAAGGACAA CCCCATCTCT GATGCCAACG CCAAGAGCGG

[3295] CTGTGATGGC 60

[3296] GGTTCTGCTT TCGCCTGCAC CAACTACTCT CCCTTCGCCG TCAACGACAA

[3297] CCTCGCCTAC 120

[3298] GGTTTCGCTG CCACCAAGCT TGCTGGAGGC TCCGAGGCT

[3299] 159

[3300] (2)SEQ ID NO:66 的信息：

[3301] (i) 序列特征：

[3302] (A) 长度：53 个氨基酸

[3303] (B) 类型：氨基酸

[3304] (C) 链型：单链

[3305] (D) 拓扑结构：线性

[3306] (ii) 分子类型：肽

[3307] (xi) 序列描述：SEQ ID NO:66：

[3308] Thr Cys Asp Lys Lys Asp Asn Pro Ile Ser Asp Ala Asn

[3309] Ala Lys Ser

[3310] 1 5 10

[3311] 15

[3312] Gly Cys Asp Gly Gly Ser Ala Phe Ala Cys Thr Asn Tyr

[3313] Ser Pro Phe

[3314] 20 25

[3315] 30

[3316] Ala Val Asn Asp Asn Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala Thr

[3317] Lys Leu Ala

[3318] 35 40 45

[3319] Gly Gly Ser Glu Ala

[3320] 50

[3321] (2)SEQ ID NO:67 的信息：

[3322] (i) 序列特征：

[3323] (A) 长度 :81 个碱基对

[3324] (B) 类型 :核酸

[3325] (C) 链型 :单链

[3326] (D) 拓扑结构 :线性

[3327] (ii) 分子型 :cDNA

[3328] (vi) 原始来源 :

[3329] (B) 菌株 :葫芦科刺盘孢

[3330] (xi) 序列描述 :SEQ ID NO :67 :

[3331] ACCTGCTACG CCAATGACCA GCGCATCGCC GACCGCAGCA CCAAGTCCGG

[3332] CTGCGACGGC 60

[3333] GGCTCGGCCT ACTCCTGTTC T

[3334] 81

[3335] (2)SEQ ID NO :68 的信息 :

[3336] (i) 序列特征 :

[3337] (A) 长度 :27 个氨基酸

[3338] (B) 类型 :氨基酸

[3339] (C) 链型 :单链

[3340] (D) 拓扑结构 :线性

[3341] (ii) 分子类型 :肽

[3342] (xi) 序列描述 :SEQ ID NO :68 :

[3343] Thr Cys Tyr Ala Asn Asp Gln Arg Ile Ala Asp Arg Ser

[3344] Thr Lys Ser

[3345] 1 5 10

[3346] 15

[3347] Gly Cys Asp Gly Gly Ser Ala Tyr Ser Cys Ser

[3348] 20 25

[3349] (2)SEQ ID NO :69 的信息 :

[3350] (i) 序列特征 :

[3351] (A) 长度 :160 个碱基对

[3352] (B) 类型 :核酸

[3353] (C) 链型 :单链

[3354] (D) 拓扑结构 :线性

[3355] (ii) 分子型 :cDNA

[3356] (vi) 原始来源 :

[3357] (B) 菌株 :闪光须霉

[3358] (xi) 序列描述 :SEQ ID NO :69 :

[3359] ACCTGTGACA AGAAGGACAA CCCCATCTCA AACTTGAACG CTGTCAACGG

[3360] TTGTGAGGGT 60

[3361] GGTGGTTCTG CCTTCGCCTG CACCAACTAC TCTCCTTGGG CGGTCAATGA

[3362] CAACCTTGCC 120

[3363] TACGGCTTCG CTGCAACCAA GCTTGCCGGT GGCTCCGAGG

[3364] 160

[3365] (2)SEQ ID NO:70 的信息：

[3366] (i) 序列特征：

[3367] (A) 长度：53 个氨基酸

[3368] (B) 类型：氨基酸

[3369] (C) 链型：单链

[3370] (D) 拓扑结构：线性

[3371] (ii) 分子类型：肽

[3372] (xi) 序列描述：SEQ ID NO:70：

[3373] Thr Cys Asp Lys Lys Asp Asn Pro Ile Ser Asn Leu Asn

[3374] Ala Val Asn

[3375] 1 5 10

[3376] 15

[3377] Gly Cys Glu Gly Gly Gly Ser Ala Phe Ala Cys Thr Asn

[3378] Tyr Ser Pro

[3379] 20 25

[3380] 30

[3381] Trp Ala Val Asn Asp Asn Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala

[3382] Thr Lys Leu

[3383] 35 40 45

[3384] Ala Gly Gly Ser Glu

[3385] 50

[3386] (2)SEQ ID NO:71 的信息：

[3387] (i) 序列特征：

[3388] (A) 长度：165 个碱基对

[3389] (B) 类型：核酸

[3390] (C) 链型：单链

[3391] (D) 拓扑结构：线性

[3392] (ii) 分子型：cDNA

[3393] (vi) 原始来源：粉红单端孢，IFO 5372

[3394] (xi) 序列描述：SEQ ID NO:71：

[3395] CCAGTAGGCA CCTGCGACGC CGGCAACAGC CCCCTCGGCG ACCCCCTGGC

[3396] CAAGTCTGGC 60

[3397] TGCGAGGGCG GCCCGTCGTA CACGTGCGCC AACTACCAGC CGTGGGCGGT

[3398] CAACGACCAG 120

[3399] CTGGCCTACG GCTTCGCGGC CACGGCCATC AACGGCGGCA CCGAG

[3400] 165

[3401] (2)SEQ ID NO:72 的信息：

[3402] (i) 序列特征：

[3403] (A) 长度:55 个氨基酸

[3404] (B) 类型:氨基酸

[3405] (C) 链型:单链

[3406] (D) 拓扑结构:线性

[3407] (ii) 分子类型:肽

[3408] (xi) 序列描述:SEQ ID NO:72：

[3409] Pro Val Gly Thr Cys Asp Ala Gly Asn Ser Pro Leu Gly

[3410] Asp Pro Leu

[3411] 1 5 10

[3412] 15

[3413] Ala Lys Ser Gly Cys Glu Gly Gly Pro Ser Tyr Thr Cys

[3414] Ala Asn Tyr

[3415] 20 25

[3416] 30

[3417] Gln Pro Trp Ala Val Asn Asp Gln Leu Ala Tyr Gly Phe

[3418] Ala Ala Thr

[3419] 35 40 45

[3420] Ala Ile Asn Gly Gly Thr Glu

[3421] 50 55

[3422] 参考文献

[3423] 本发明的背景

[3424] GB-A-1368599

[3425] EP-A-0 307 564

[3426] EP-A-0 435 876

[3427] WO 91/17243

[3428] WO 91/10732

[3429] WO 91/17244

[3430] WO 95/24471

[3431] WO 95/26398

[3432] 酶学方法,1988,Vol.160,p.200-391(Wood,W.A. 和 Kellogg,S.T. 编).

[3433] Beguin,P.,"纤维素降解的分子生物学",微生物学年评(1990),Vol.44,pp.219-248.

[3434] Henrissat,B.,"纤维素酶和它们与纤维素的相互作用",纤维素(1994),Vol.1,pp.169-196.

[3435] T.-M.Enveri,"微生物纤维素酶",W.M.Fogarty,微生物酶和生物技术,应用科学出版社,183-224(1983).

[3436] Béguin,P. 和 Aubert,J-p.,"纤维素的生物降解",FEMS 微生物学回顾

13(1994)25-58.

[3437] Sheppard, P.O. 等，″保守纤维素酶家族特异性序列在克隆 Fusariumoxysporum 纤维素酶同系物 cDNA 上的用途，基因，(1994)，Vol.15，pp.163-167.

[3438] Saloheimo,A. 等，″经在酵母中表达分离的 Trichoderma reesei 的新的小内切葡聚糖酶基因，egI5″，分子生物学 (1994)，Vol.13(2)，pp.219-228.

[3439] van Arsdell,J.N. 等，(1987)Trichoderma reesei 内切葡聚糖酶 I 在啤酒糖酵母中的克隆、特征确定和表达，生物 / 技术 5 :60-64.

[3440] Penttilä, M. 等，(1986)Trichoderma reesei 纤维素酶基因之间的同源性 :内切葡聚糖酶 I 基因的完整的核苷酸序列，基因 15 :253-263.

[3441] Saloheimo,M. 等，(1988)EGIII，一种新的 Trichoderma reesei 内切葡聚糖酶 :基因和酶两者的特征，基因 63 :11-21.

[3442] Gonzéles,R. 等，″ Trichoderma longibrachiatum egl1 基因的克隆、序列分析和在酵母中的克隆″，应用微生物生物学 (1992)，Vo 1.38，pp.370-375.

[3443] Ooi，T 等″棘孢曲霉的纤维素酶 (FI-CMCase)cDNA 的克隆和序列分析″ Curr. Genet.(1990)，vol.18，pp.217-222.

[3444] Ooi,T 等，″编码 Aspergillus aculeatus 纤维素酶 (FI-CMCase) 的基因的完整的核苷酸序列″核酸研究 (1990)，vol.18，No.19，P.5884.

[3445] Xu，G. 等，″多种厌氧 rumen 真菌 Neocallimastix patriciarum 纤维素酶 cDNA 在大肠杆菌中的克隆和表达″，遗传微生物学杂志 (1992)，vol，138，pp.1413-1420.

[3446] Xu，G. 等，″新的编码具有高的内切葡聚糖酶、纤维二糖水解酶和木聚糖酶活性的三个－多功能催化区的 Neocallimastix patriciarum 多糖类水解酶 cDNA(cel D)″，遗传微生物学 (1992)，vol.138，pp.2397-2403.

[3447] Zhou,L. 等，″厌氧真菌 Neocallimastix patriciarum 的无内含子 celB 编码模式家族内切葡聚糖酶″，生物化学杂志 (1994)，vol.297，pp.359-364.

[3448] DalbΦge，H. 和 Heldt-Hansen，H.P.，″用于真菌酶基因有效表达克隆的新方法″，Mol.Gen.Genet.(1994)，vol.243，pp.253-260.

[3449] Ali，B.R.S 等，″厌氧真菌 Piromyces 的纤维素酶和半纤维素酶构成多蛋白纤维素－结合复合物和被多基因家族编码″，FEMS 微生物学通讯 (1995)，vol.125，No.1，pp.15-21.

[3450] 日本 DNA 数据库 (DDBJ).

[3451] Wang，H.Y. 和 Jones，R.W. :″ phytopathogenic 真菌 MaCrophominaphaseolina 内切葡聚糖酶－编码基因的克隆、特征确定和功能性表达″，基因，158 :125 128，1995.

[3452] Wang,H.Y. 和 Jones,R.W. :″从 phytopathogenic 真菌 Macrophominaphaseolina 克隆的单一内切葡聚糖酶－编码基因″，应用和环境微生物学，61 :20042006，1995.

[3453] Henrissat :生物化学杂志，280 :309316，1991.

[3454] Schauwecker，F.L.S.F.，Wanner，G.，Kahmann，R. :″ dimorphic 真菌 Ustilago maydis 中纤维素酶基因的 filament- 特异性表达″，1995，生物化学 Hoppe-Seyler，376 :617-625.

[3455] WO 93/20193

[3456] WO 94/21801

[3457] WO 94/26880

[3458] WO 95/02043

[3459] 附图：

[3460] Feng 和 Doolittle，1987，J.Mol.Evol.25：351-360.

[3461] NIH 数据库 (Entrez 1996 春天版)，在 World Wrde Web 上可以获得：

[3462] (htt-p://www3.ncbi.nlm.nih.gov/htbin/ef/entrezTAX).

[3463] Eriksson，O.E.&Hawksworth，D，L.：Systema Ascomycetum vol12(1993).

[3464] Jillich，W.：担子菌纲的高级分类，Bibliotheca Mycologia，85485pp(1981).

[3465] O′ Donnell，K.：培养中的接合菌纲，佐治亚大学，US，257pp(1979).Hawksworth，D.L.，Kirk，p.M.，，Sutton，B.C. 和 Pegler，D.N.：真菌辞典，国际 Mycological 研究所，616pp(1995)；

[3466] Von Arx，J.A.：培养中形成孢子的真菌属，424pp(1981).

[3467] 详细描述：

[3468] Ford 等，肽表达和纯化 2：95-107，1991.

[3469] Cunningham 和 Well，科学 244，1081-1085，1989.

[3470] de Vos 等，科学 255：306-312，1992.

[3471] Smith 等，分子生物学杂志 . 224：899-904，1992.

[3472] Wlodaver 等，FEBS Lett.309：59-64，1992.

[3473] Tomme，P 等″纤维素 - 结合域：分类和性质″在″不溶性碳水化合物的酶促降解″中，John N.Saddler 和 Michael H.Penner(编者)，ACS 专题研讨系列 No.618，1996.

[3474] WO 90/00609

[3475] WO 95/16782

[3476] Needleman，S.B. 和 Wunsch，C.D.，分子生物学杂志，48：443-453，1970.WO 94/14953

[3477] Sambrook，J.，Fritsch，E.F.&Maniatis，T.1989. 分子克隆：实验室手册 . 冷泉港实验室，冷泉港，纽约 .

[3478] Beaucage 和 Caruthers，Tetrahed；四面体通讯 22(1981)，1859-1869.Matthes 等，EMBO 杂志 (1984)，801-805

[3479] US 4,683,202

[3480] Saiki 等，科学 239(1988)，487-491.

[3481] Hitzeman 等，生物化学杂志 . 255(1980)，12073-12080.

[3482] Alber 和 Kawasaki，分子应用遗传学杂志 . 1(1982)，419-434.

[3483] Young 等，化学药品的基因工程和微生物学 (Hollaender 等，编者)Plenum 出版社，纽约，1982.

[3484] US 4,599,311

[3485] Russell 等，自然 304(1983)，652-654.

[3486] McKnight 等，The EMBO J.4(1985)，2093-2099

[3487] Russell，基因 40，1985，pp.125-130.

[3488] US 4,870,008

[3489] Hagenbuchle 等,自然 289,1981,pp.643-646.

[3490] Vails 等,细胞 48,1987,pp.887-897.

[3491] WO 87/02670

[3492] Egel-Mitani 等,酵母 6,1990,pp.127-137.

[3493] US 4,546,082

[3494] EP 16 201

[3495] EP 123 294

[3496] EP 123 544

[3497] EP 163 529

[3498] WO 89/02463

[3499] WO 92/11378

[3500] US 4,599,311

[3501] US 4,931,373

[3502] US 4,870,008

[3503] US 5,037,743

[3504] US 4,845,075

[3505] US 4,931,373

[3506] Gleeson 等,遗传微生物学杂志 .132,1986,pp.3459-3465.

[3507] US 4,882,279

[3508] EP 272 277

[3509] EP 230 023

[3510] Malardier 等,1989,基因 78 :147-156.

[3511] WO 93/11249.

[3512] WO 94/14953.

[3513] WO 95/02043.

[3514] Horton,R.M.,Hunt,H.D.,Ho,S.N.,Pullen,J.K. 和 Pease,L.R.(1989) 基因 77,61-68

[3515] Dalbφge,H., 和 Heldt-Hansen,H.(1994)Mel.Gen.Genet.2431253-260Christensen,T.,Wφldike,H.,Boel,E.,Mortensen,S.B.,Hjortshφj,K.,Thim,L.,和 Hansen,M.T.(1988) 生物 / 技术 6,1419-1422

[3516] Sanger,F.,Nicklen,S.,和 Coulson,A.R.(1977) 美国科学院学报 .71,5463-5467

[3517] Devereux,J.,Haeberli,P.,和 Smithies,0.(1984) 核酸研究 .12,387-395

[3518] Becker,D.M.&Guarante,L.1991. 酶学方法 .194 :182-187.

[3519] Gubler,U.&Hoffman,B.J.1983. 基因 25 :263-269.

[3520] Higuchi,B.Krummel 和 R.K,Saiki(1988),体外制备和特定突变 DNA 片段的一般方法 :肽和 DNA 相互作用的研究 . 核酸研究 .16 :7351-7367.

[3521] Sanger,F.,Nicklen,S.&Coul son,A.R.1977. 美国科学院学报 A.74 :5463-5467.

[3522] Axelsen 等,定量免疫电泳手册,Blackwell 科学出版社,1973,第 2,3,4 和 23 章 .

[3523] 在本申请中，按照布达佩斯条约，进行了如下保藏，其中保藏单位分别为：

[3524] 德意志微生物保藏中心，简称 DSM，地址为：Mascheroder Weg 16，D-38124 Braunschweig，德国；

[3525] 真菌菌种保藏中心，简称 CBS，地址为：Oosterstraat1，Postbus 273，NL-3740AG Baarn，荷兰。

[3526]

保藏物	保藏日	保藏号	保藏单位
coleomycetous	1996 年 3 月 12 日	CBS 270.96	CBS
coleomycetous	1996 年 3 月 12 日	CBS 271.96	CBS
Nigrospora sp.	1996 年 3 月 12 日	CBS 272.96	CBS
coleomycetous	1996 年 3 月 12 日	CBS 273.96	CBS
棉色二孢	1996 年 3 月 12 日	CBS 274.96	CBS
Saccobolus dilutellus	1996 年 3 月 12 日	CBS 275.96	CBS
木蹄层孔菌	1996 年 3 月 12 日	CBS 276.96	CBS
黑胶耳	1996 年 3 月 12 日	CBS 277.96	CBS
Diaporthe syngenesia	1996 年 3 月 12 日	CBS 278.96	CBS
Nectria pinea	1996 年 3 月 12 日	CBS 279.96	CBS
Grinipellis scabella	1996 年 3 月 12 日	CBS 280.96	CBS
Macrophomina phaseolina	1996 年 3 月 12 日	CBS 281.96	CBS
红根囊壶菌	1996 年 3 月 12 日	CBS 282.96	CBS
Spongipellis sp.	1996 年 3 月 12 日	CBS 283.96	CBS
鹿角团炭角菌	1996 年 3 月 12 日	CBS 284.96	CBS
Thermomyces verrucosus	1996 年 3 月 12 日	CBS 285.96	CBS
Acremonium sp.	1994 年 9 月 28 日	CBS 478.94	CBS
啤酒糖酵母	1995 年 2 月 24 日	DSM 9770	DSM
啤酒糖酵母	1995 年 6 月 30 日	DSM 10080	DSM

啤酒糖酵母	1995 年 6 月 30 日	DSM 10081	DSM
啤酒糖酵母	1995 年 6 月 30 日	DSM 10082	DSM
大肠杆菌	1996 年 2 月 2 日	DSM 10511	DSM
大肠杆菌	1996 年 2 月 2 日	DSM 10512	DSM
大肠杆菌	1996 年 3 月 6 日	DSM 10571	DSM
大肠杆菌	1996 年 3 月 12 日	DSM 10576	DSM
大肠杆菌	1996 年 3 月 13 日	DSM 10583	DSM
大肠杆菌	1996 年 3 月 13 日	DSM 10584	DSM
大肠杆菌	1996 年 3 月 13 日	DSM 10585	DSM
大肠杆菌	1996 年 3 月 13 日	DSM 10586	DSM
大肠杆菌	1996 年 3 月 13 日	DSM 10587	DSM
大肠杆菌	1996 年 3 月 13 日	DSM 10588	DSM

[3527] 本发明的优选实施方案如下：

[3528] 1. 一种酶制剂，该制剂实质上由具有溶纤活性的酶组成，所述酶包含具有以下序列的由 14 个氨基酸残基组成的第一氨基酸序列

[3529] Thr Arg Xaa Xaa Asp Cys Cys Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Trp Xaa

[3530] 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

[3531] 和具有以下序列的由 5 个氨基酸残基组成的第二氨基酸序列

[3532] Trp Cys Cys Xaa Cys

[3533] 1 2 3 4 5

[3534] 其中，

[3535] 在第一序列的 3 号位置上，氨基酸是 Trp、Tyr 或 Phe；

[3536] 在第一序列的 4 号位置上，氨基酸是 Trp、Tyr 或 Phe；

[3537] 在第一序列的 8 号位置上，氨基酸是 Arg、Lys 或 His；

[3538] 在第一序列 9、10、12 和 14 号的各位置上，在第二序列的 4 号位置上，氨基酸是 20 个天然氨基酸残基中的任何一个，其条件是在第一氨基酸序列中，(i) 当 12 号位置上的氨基酸残基是 Ser 时，14 号位置上的氨基酸残基不是 Ser，和 (ii) 当 12 号位置上的氨基酸残基是 Gly 时，14 号位置上的氨基酸残基不是 Ala。

[3539] 2. 按照实施方案 1 的酶制剂，其中在第一序列的 9 号位置上的氨基酸残基选自脯氨酸、苏氨酸、缬氨酸、丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、半胱氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、酪氨酸、丝氨酸、甲硫氨酸和色氨酸，优选地选自脯氨酸和苏氨酸。

[3540] 3. 按照实施方案 1 或 2 的酶制剂，其中在第一序列的 10 号位置上的氨基酸残基选自脯氨酸、苏氨酸、缬氨酸、丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、半胱氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、酪氨酸、丝氨酸、甲硫氨酸和色氨酸，优选地是丝氨酸。

[3541] 4. 按照实施方案 1-3 之任一的酶制剂，其中在第一序列的 12 号位置上的氨基酸残基选自脯氨酸，苏氨酸，缬氨酸，丙氨酸，亮氨酸，异亮氨酸，苯丙氨酸，甘氨酸，半胱氨酸，天冬酰胺，谷氨酰胺，酪氨酸，丝氨酸，甲硫氨酸和色氨酸，优选地选自丙氨酸和甘氨酸。

[3542] 5. 按照实施方案 1-4 之任一的酶制剂，其中在第一序列的 14 号位置上的氨基酸残基选自脯氨酸，苏氨酸，缬氨酸，丙氨酸，亮氨酸，异亮氨酸，苯丙氨酸，甘氨酸，半胱氨酸，天冬酰胺，谷氨酰胺，酪氨酸，丝氨酸，甲硫氨酸，色氨酸，谷氨酸和天冬氨酸，优选地选自脯氨酸，苏氨酸，丝氨酸，丙氨酸，谷氨酸和天冬氨酸。

[3543] 6. 按照实施方案 1-5 之任一的酶制剂，其中在第二序列的 4 号位置上的氨基酸残基选自脯氨酸，苏氨酸，缬氨酸，丙氨酸，亮氨酸，异亮氨酸，苯丙氨酸，甘氨酸，半胱氨酸，天冬酰胺，谷氨酰胺，酪氨酸，丝氨酸，甲硫氨酸，色氨酸，谷氨酸和天冬氨酸，优选地选自丙氨酸，甘氨酸和谷氨酰胺。

[3544] 7. 按照实施方案 1-6 之任一的酶制剂，其中，在第一序列中，在第 3 号位置上的氨基酸残基是酪氨酸；或在第 4 位置上的氨基酸残基是色氨酸；或在第 8 号位置上的氨基酸残基是赖氨酸。

[3545] 8. 按照实施方案 1-7 之任一的酶制剂，其中所说的第一序列包括选自以下序列的氨基酸序列：

[3546] Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys Ala Trp

[3547] 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 ；

[3548] Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Thr Ser Cys Ala Trp

[3549] 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 ；和

[3550] Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys Gly Trp

[3551] 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 。

[3552] 9. 按照实施方案 1-8 之任一的酶制剂，该酶制剂是微生物来源的，优选地是真菌来源的。

[3553] 10. 一种 DNA 构建体，该构建体编码按照实施方案 1-9 之任一的酶。

[3554] 11. 一种酶制剂，该酶制剂实质上由具有溶纤活性的酶组成，所述酶是可以从属于层菌纲 (Hymenomycetes)（担子菌门 (Basidiomycota)）的菌株获得的，这种酶包含选自以下序列的氨基酸序列：

[3555] Xaa Thr Arg Xaa Phe Asp Xaa

[3556] 1 2 3 4 5 6 7 ；

[3557] Xaa Thr Arg Xaa Tyr Asp Xaa

[3558] 1 2 3 4 5 6 7 ；和

[3559] Xaa Thr Arg Xaa Trp Asp Xaa

[3560] 1 2 3 4 5 6 7

[3561] 其中，

[3562] 在 4 号位置上，Xaa 是 Trp、Tyr 或 Phe；和

[3563] 在 1 和 7 号位置上，Xaa 是 20 个天然氨基酸残基中的任何一个。

[3564] 12. 按照实施方案 11 的酶制剂，其中在 7 号位置上的氨基酸残基是半胱氨酸 (Cys)。

[3565] 13. 按照实施方案 11 的酶制剂，其中在 1 号位置上的氨基酸残基选自天冬氨酸 (Asp)、苏氨酸 (Thr) 和丙氨酸 (Ala)。

[3566] 14. 按照实施方案 11-13 之任一的酶制剂，其中所述的酶包含具有以下序列的由 13 个氨基酸残基组成的第一肽

[3567] Thr Arg Xaa Xaa Asp Cys Cys Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Trp

[3568] 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

[3569] 和具有以下序列的由 5 个氨基酸残基组成的第二肽

[3570] Trp Cys Cys Xaa Cys

[3571] 1 2 3 4 5

[3572] 其中，

[3573] 在第一序列的 3 号位置上，氨基酸是 Trp、Tyr 或 Phe ；

[3574] 在第一序列的 4 号位置上，氨基酸是 Trp、Tyr 或 Phe ；

[3575] 在第一序列的 8 号位置上，氨基酸是 Arg、Lys 或 His ；

[3576] 在第一序列 9、10 和 12 号的各位置上，在第二序列的 4 号位置上，氨基酸是 20 个天然氨基酸残基中的任何一个。

[3577] 15. 按照实施方案 11-14 之任一的酶制剂，其中所说的酶是可以从属于由以下目的菌株获得的：蘑菇目 (Agaricales)、非褶菌目 (Aphyllophorales) 和木耳目 (Auriculariales)。

[3578] 16. 按照实施方案 15 的酶制剂，其中所说的酶是可以从属于由以下科的菌株获得的：黑耳科 (Exidiaceae)、口蘑科 (Tricholomataceae)，鬼伞科 (Coprinaceae)，裂褶菌科 (Schizophyllaceae)，烟管菌科 (Bjerkanderaceae) 和多孔菌科 (Polyporaceae) ；优选地是可以从属于由以下属的菌株获得的：黑耳属 (Exidia)、毛皮伞属 (Crinipellis)，层孔菌属 (Fomes)，斑褶菇属 (Panaeolus)，栓菌属 (Trametes)，裂褶菌属 (Schizophyllum) 和绵皮孔菌属 (Spongipellis)。

[3579] 17. 按照实施方案 16 的酶制剂，其中所说的酶是可以从属于由以下种的菌株获得的：黑胶耳 (Exidia glandulosa)、Grinipellis scabella、木蹄层孔菌 (Fomes fomentarius) 和 Spongipellis sp. ；优选地是可以从以下菌株获得的：黑胶耳 CBS 277.96、Crinipellis scabella CBS280.96、木蹄层孔菌 CBS 276.96 和 Spongipellis sp.CBS 283.96。

[3580] 18. 一种酶制剂，该酶制剂实质上由具有溶纤活性的酶组成，所述酶是可以从属于壶菌门 (Chytridiomycota) 的菌株获得的，这种酶包含选自以下序列的氨基酸序列：

[3581] Xaa Thr Arg Xaa Phe Asp Xaa

[3582] 1 2 3 4 5 6 7 ；

[3583] Xaa Thr Arg Xaa Tyr Asp Xaa

[3584] 1 2 3 4 5 6 7 ；和

[3585] Xaa Thr Arg Xaa Trp Asp Xaa

[3586] 1 2 3 4 5 6 7

[3587] 其中，

[3588] 在 4 号位置上，Xaa 是 Trp、Tyr 或 Phe ；和

[3589] 在 1 和 7 号位置上，Xaa 是 20 个天然氨基酸残基中的任何一个。

[3590] 19. 按照实施方案 18 的酶制剂，其中在 7 号位置上的氨基酸残基是半胱氨酸 (Cys)。

[3591] 20. 按照实施方案 18 的酶制剂，其中在 1 号位置上的氨基酸残基选自天冬氨酸 (Asp)、苏氨酸 (Thr) 和丙氨酸 (Ala)。

[3592] 21. 按照实施方案 18-20 之任一的酶制剂，其中所述的酶包含具有以下序列的由 13 个氨基酸残基组成的第一肽

[3593] Thr Arg Xaa Xaa Asp Cys Cys Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Trp

[3594] 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

[3595] 和具有以下序列的由 5 个氨基酸残基组成的第二肽

[3596] Trp Cys Cys Xaa Cys

[3597] 1 2 3 4 5

[3598] 其中，

[3599] 在第一序列的 3 号位置上，氨基酸是 Tr p、Tyr 或 Phe ；

[3600] 在第一序列的 4 号位置上，氨基酸是 Trp、Tyr 或 Phe ；

[3601] 在第一序列的 8 号位置上，氨基酸是 Arg、Lys 或 His ；

[3602] 在第一序列 9、10 和 12 号的各位置上，在第二序列的 4 号位置上，氨基酸是 20 个天然氨基酸残基中的任何一个。

[3603] 22. 按照实施方案 18-21 之任一的酶制剂，其中所说的酶是可以从属于壶菌纲 (Chytridiomycetes) 的菌株获得的，优选地是可以从属于由以下目的菌株获得的 ：壶菌目 (Chytridiales)、Spizellomycetales、肋壶菌目 (Harpochytriales) 和芽枝霉目 (Blastocladiales)。

[3604] 23. 按照实施方案 22 的酶制剂，其中所说的酶是可以从属于 Spizellomycetaceae 科的菌株获得的，优选的是可以从属于囊壶菌属 (Rhizophlyctis) 的菌株获得的，更优选的是可以从属于红根囊壶菌 (Rhizophlyctis rosea) 的菌株获得的，尤其是可以从红根囊壶菌 CBS282.96 获得的。

[3605] 24. 一种酶制剂，该酶制剂实质上由具有溶纤活性的酶组成，所述酶是可以从属于接合菌门 (Zygomycota) 的菌株获得的，这种酶包含选自以下序列的氨基酸序列 ：

[3606] Xaa Thr Arg Xaa Phe Asp Xaa

[3607] 1 2 3 4 5 6 7 ；

[3608] Xaa Thr Arg Xaa Tyr Asp Xaa

[3609] 1 2 3 4 5 6 7 ；和

[3610] Xaa Thr Arg Xaa Trp Asp Xaa

[3611] 1 2 3 4 5 6 7

[3612] 其中，

[3613] 在 4 号位置上，Xaa 是 Trp、Tyr 或 Phe ；和

[3614] 在 1 和 7 号位置上，Xaa 是 20 个天然氨基酸残基中的任何一个。

[3615] 25. 按照实施方案 24 的酶制剂，其中在 7 号位置上的氨基酸残基是半胱氨酸 (Cys)。

[3616] 26. 按照实施方案 24 的酶制剂，其中在 1 号位置上的氨基酸残基选自天冬氨酸 (Asp)、苏氨酸 (Thr) 和丙氨酸 (Ala)。

[3617] 27. 按照实施方案 24-26 之任一的酶制剂，其中所述的酶包含具有以下序列的由 13 个氨基酸残基组成的第一肽

[3618] Thr Arg Xaa Xaa Asp Cys Cys Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Trp

[3619] 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

[3620] 和具有以下序列的由 5 个氨基酸残基组成的第二肽

[3621] Trp Cys Cys Xaa Cys

[3622] 1 2 3 4 5

[3623] 其中，

[3624] 在第一序列的 3 号位置上，氨基酸是 Trp、Tyr 或 Phe ；

[3625] 在第一序列的 4 号位置上，氨基酸是 Trp、Tyr 或 Phe ；

[3626] 在第一序列的 8 号位置上，氨基酸是 Arg、Lys 或 His ；

[3627] 在第一序列 9、10 和 12 号的各位置上，在第二序列的 4 号位置上，氨基酸是 20 个天然氨基酸残基中的任何一个。

[3628] 28. 按照实施方案 24-27 之任一的酶制剂，其中所说的酶是可以从属于接合菌纲 (Zygomycetes) 的菌株获得的，优选的是可以从属于毛霉目 (Mucorales) 的菌株获得的。

[3629] 29. 按照实施方案 28 的酶制剂，其中所说的酶是可以从属于由毛霉科 (Mucoracea) 和枝霉科 (Thamnidiaceae) 的菌株获得的，优选的是可以从属于由根毛霉属 (Rhizomucor)、须霉属 (Phycomyces) 和刺枝霉属 (Chaetostylum) 的菌株获得的。

[3630] 30. 按照实施方案 29 的酶制剂，其中所说的酶是可以从属于由 Rhizomucor pusillus、闪光须霉 (Phycomyces nitens)、弗雷生刺枝霉 (Chaetostylum fresenii) 的菌株获得的，优选地是可以从属于由以下菌株的菌株获得的 :Rhizomucor pusillus IFO 4578、闪光须霉 IFO 4814 和弗雷生刺枝霉 NRRL 2305。

[3631] 31. 一种酶制剂，该酶制剂实质上由具有溶纤活性的酶组成，所述酶是可以从属于由 Archaeascomycetes、盘菌纲 (Discomycetes)、Hermiascomycetes、腔菌纲 (Loculoascomycetes) 和不整囊菌纲 (Plectomycetes) 的菌株获得的，这种酶包含选自以下序列的氨基酸序列 ：

[3632] Xaa Thr Arg Xaa Phe Asp Xaa

[3633] 1 2 3 4 5 6 7 ；

[3634] Xaa Thr Arg Xaa Tyr Asp Xaa

[3635] 1 2 3 4 5 6 7 ;和

[3636] Xaa Thr Arg Xaa Trp Asp Xaa

[3637] 1 2 3 4 5 6 7

[3638] 其中，

[3639] 在 4 号位置上，Xaa 是 Trp、Tyr 或 Phe ;和

[3640] 在 1 和 7 号位置上，Xaa 是 20 个天然氨基酸残基中的任何一个。

[3641] 32. 按照实施方案 31 的酶制剂，其中在 7 号位置上的氨基酸残基是半胱氨酸 (Cys)。

[3642] 33. 按照实施方案 31 的酶制剂，其中在 1 号位置上的氨基酸残基选自天冬氨酸 (Asp)、苏氨酸 (Thr) 和丙氨酸 (Ala)。

[3643] 34. 按照实施方案 31-33 之任一的酶制剂，其中所述的酶包含具有以下序列的由 13 个氨基酸残基组成的第一肽

[3644] Thr Arg Xaa Xaa Asp Cys Cys Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Trp

[3645] 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

[3646] 和具有以下序列的由 5 个氨基酸残基组成的第二肽

[3647] Trp Cys Cys Xaa Cys

[3648] 1 2 3 4 5

[3649] 其中，

[3650] 在第一序列的 3 号位置上，氨基酸是 Trp、Tyr 或 Phe ；

[3651] 在第一序列的 4 号位置上，氨基酸是 Trp、Tyr 或 Phe ；

[3652] 在第一序列的 8 号位置上，氨基酸是 Arg、Lys 或 His ；

[3653] 在第一序列 9、10 和 12 号的各位置上，在第二序列的 4 号位置上，氨基酸是 20 个天然氨基酸残基中的任何一个。

[3654] 35. 按照实施方案 31-34 之任一的酶制剂，其中所说的酶是可以从属于由以下目的菌株获得的 ：盘菌目 (Pezizales)、Phytismatales、座囊菌目 (Dothideales) 和散囊菌目 (Eurotiales)。

[3655] 36. 按照实施方案 35 的酶制剂，其中所说的酶是可以从属于由以下科的菌株获得的 ：葫芦霉科 (Cucurbitariaceae)、斑痣盘菌科 (Rhytismataceae)、粪盘菌科 (Ascobolaceae) 和发菌科 (Trichocomaceae) ；优选地是由属于由以下属的菌株产生的 ：色二孢属 (Diplodia)、Microsphaeropsis、Ulospora、壳球孢属 (Macrophomina)、粪盘菌属 (Ascobolus)、Saccobolus、青霉属 (Penicillium) 和 Thermomyces。

[3656] 37. 按照实施方案 36 的酶制剂，其中所说的酶是可以从属于由以下种的菌株获得的 ：棉色二孢 (Diplodia gossypina)、Microsphaeropsissp.、Ulospora bilgramii、Macrophomina phaseolina、Rscobolusstictoides、Saccobolus dilutellus、疣孢青霉 (Penicilliumverruculosum)、产黄青霉 (Penicillium chrysogenum) 和 Thermomycesverrucosus ；优选地是可以从属于由以下菌株的菌株获得的 ：棉色二孢 CBS 274.96、Ulospora bilgramiiNKBC 1444、Macrophomina phaseolinaCBS 281.96、Saccobolus dilutellus CBS 275.96、疣孢青霉 ATCC 62396、产黄青霉 ATCC 9480 和 Thermomyces verrucosus CBS 285.96。

[3657] 38. 一种酶制剂，该酶制剂实质上由具有溶纤活性的酶组成，所述酶是可以从属于由间座壳目 (Diaportales)、炭角菌目 (Xylariales)、Trichoaphaeriales 和黑痣菌目 (Phyllachorales) 的菌株获得的，这种酶包含选自以下序列的氨基酸序列 ：

[3658] Xaa Thr Arg Xaa Phe Asp Xaa

[3659] 1 2 3 4 5 6 7 ；

[3660] Xaa Thr ArgXaa Tyr Asp Xaa

[3661] 1 2 3 4 5 6 7 ;和

[3662] Xaa Thr Arg Xaa Trp Asp Xaa

[3663] 1 2 3 4 5 6 7

[3664] 其中，

[3665] 在 4 号位置上，Xaa 是 Trp、Tyr 或 Phe ;和

[3666] 在 1 和 7 号位置上，Xaa 是 20 个天然氨基酸残基中的任何一个。

[3667] 39. 按照实施方案 38 的酶制剂，其中在 7 号位置上的氨基酸残基是半胱氨酸 (Cys)。

[3668] 40. 按照实施方案 38 的酶制剂，其中在 1 号位置上的氨基酸残基选自天冬氨酸 (Asp)、苏氨酸 (Thr) 和丙氨酸 (Ala)。

[3669] 41. 按照实施方案 38-40 之任一的酶制剂，其中所述的酶包含具有以下序列的由 13 个氨基酸残基组成的第一肽

[3670] Thr Arg Xaa Xaa Asp Cys Cys Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Trp

[3671] 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

[3672] 和具有以下序列的由 5 个氨基酸残基组成的第二肽

[3673] Trp Cys Cys Xaa Cys

[3674] 1 2 3 4 5

[3675] 其中，

[3676] 在第一序列的 3 号位置上，氨基酸是 Trp、Tyr 或 Phe ;

[3677] 在第一序列的 4 号位置上，氨基酸是 Trp、Tyr 或 Phe ;

[3678] 在第一序列的 8 号位置上，氨基酸是 Arg、Lys 或 His ;

[3679] 在第一序列 9、10 和 12 号的各位置上，在第二序列的 4 号位置上，氨基酸是 20 个天然氨基酸残基中的任何一个。

[3680] 42. 按照实施方案 38-41 之任一的酶制剂，其中所说的酶是可以从属于由以下科的菌株的菌株获得的：炭角菌科 (Xylariaceae)、黑腐皮壳科 (Valsaceae) 和 Phyllachoraceae，优选地是可以从属于由以下属的菌株获得的：间座壳属 (Diaporthe)、刺盘孢属 (Colletotrichum)、黑孢属 (Nigrospora)、炭角菌属 (Xylaria)、Nodulisporum 和孔座壳属 (Poronia)。

[3681] 43. 按照实施方案 42 的酶，其中所说的酶是可以从属于由以下种的菌株获得的：Diaporthe syngenesia、葫芦科刺盘孢 (Colletotrichumlagenarium)、Nigrospora sp.、鹿角团炭角菌 (Xylaria hypoxylon)、Nodulisporum sp. 和点孔座壳 (Poronia punctata)，优选地是可以从属于由以下菌株的菌株获得的：Diaporthe syngenesia CBS 278.96、葫芦科刺盘孢 ATCC 52609、Nigrospora sp.CBS 272.96 和鹿角团炭角菌 CBS284.96。

[3682] 44. 一种酶制剂，该酶制剂实质上由具有溶纤活性的酶组成，所述酶是可以从属于由小赤壳科 (Nectriaceae)，粪壳科 (Sordariaceae)，毛壳科 (Chaetomiaceae)，Ceratostomaceae，毛球壳科 (Lasiosphaeriaceae) 的菌株和属于顶孢霉属 (Acremonium)，粘帚霉属 (Gliocladium)，Scytalidium，柱孢属 (Cylindrocarpon) 和周刺座霉属 (Volutella) 的菌株获得的，这种酶包含选自以下序列的氨基酸序列：

[3683] Xaa Thr Arg Xaa Phe Asp Xaa

[3684] 1 2 3 4 5 6 7 ;

[3685] Xaa Thr Arg Xaa Tyr Asp Xaa

[3686] 1 2 3 4 5 6 7 ;和

[3687] Xaa Thr Arg Xaa Trp Asp Xaa

[3688] 1 2 3 4 5 6 7

[3689] 其中，

[3690] 在 4 号位置上，Xaa 是 Trp、Tyr 或 Phe ;和

[3691] 在 1 和 7 号位置上，Xaa 是 20 个天然氨基酸残基中的任何一个。

[3692] 45. 按照实施方案 44 的酶制剂，其中在 7 号位置上的氨基酸残基是半胱氨酸 (Cys)。

[3693] 46. 按照实施方案 44 的酶制剂，其中在 1 号位置上的氨基酸残基选自天冬氨酸 (Asp)、苏氨酸 (Thr) 和丙氨酸 (Ala)。

[3694] 47. 按照实施方案 44-46 之任一的酶制剂，其中所述的酶包含具有以下序列的由 13 个氨基酸残基组成的第一肽

[3695] Thr Arg Xaa Xaa Asp Cys Cys Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Trp

[3696] 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

[3697] 和具有以下序列的由 5 个氨基酸残基组成的第二肽

[3698] Trp Cys Cys Xaa Cys

[3699] 1 2 3 4 5

[3700] 其中，

[3701] 在第一序列的 3 号位置上，氨基酸是 Trp、Tyr 或 Phe ;

[3702] 在第一序列的 4 号位置上，氨基酸是 Trp、Tyr 或 Phe ;

[3703] 在第一序列的 8 号位置上，氨基酸是 Arg、Lys 或 His ;

[3704] 在第一序列 9、10 和 12 号的各位置上，在第二序列的 4 号位置上，氨基酸是 20 个天然氨基酸残基中的任何一个。

[3705] 48. 按照实施方案 44-47 之任一的酶制剂，其中所说的酶是可以从属于由以下属的菌株获得的 :柱孢属 (Cylindrocarpon)、丛赤壳属 (Nectria)、周刺座霉属 (Volutella)、粪壳属 (Sordaria)、梭孢壳属 (Thielavia)、Sypastospora、毛壳属 (Chaetomium)、毁丝霉属 (Myceliophthora)、Scytalidium、Cladorrhinum、粘帚霉属 (Gliocladium)、顶孢霉属 (Acremonium)。

[3706] 49. 按照实施方案 48 的酶制剂，其中所说的酶是可以从属于由以下种的菌株获得的 :Cylindrocarpon sp.、Nectria pinea、Volutellacolletotrichoides、粪生粪壳 (Sordaria fimicola)、大孢粪壳 (Sordariamacrospora)、Thielavia terrestrls、Thielavia thermophila、Syspastospora boninensis、Cladorrhinum foecundissimum、墙毛壳 (Chaetomium murorum)、Chaetomium virescens、Chaetomiumbrasiliensis、Chaetomium cunicolorum、Myceliophthora thermophila、链孢粘帚霉 (Gliocladium catenulatum)、Scytalidium thermophila 和 Acremonium sp. ;优选地是可以从属于由以下菌株的菌株获得的 :链孢粘帚霉 ATCC 10523 和 CBS 227.48、Nectria pinea CBS

279.96、Volutella colletotrichoides CBS 400.58、粪生粪壳 ATCC 52644、大孢粪壳 ATCC 60255、Thielavia terrestris NRRL 8126、Thielaviathermophila CBS 174.70、墙毛壳 CBS 163.52、Chaetomium virescensCBS 547.75、Chaetomium brasiliensis CBS 122.65、Chaetomiumcunicolorum CBS 799.83、Syspastospora boninensis NKBC 1515、Cladorrhinum foecundissimum ATCC 62373、Myceliophthorathermophila CBS 117.65、Scytalidium thermophila ATCC 28085 和 Acremonium sp.CBS 478.94。

[3707] 50. 一种酶制剂，该酶制剂实质上由具有溶纤活性的酶组成，所述酶是可以从属于由番茄镰孢 (Fusarium lycopersici)、Fusariumpassiflora、腐皮镰孢 (Fusarium solani)、蛇形镰孢 (Fusariumanguioides)、早熟禾镰孢 (Fusarium poae)、黑腐质霉 (Humicolanigrescens) 和灰腐质霉 (Humicola grisea) 的菌株获得的，这种酶包含选自以下序列的氨基酸序列：

[3708] Xaa Thr Arg Xaa Phe Asp Xaa

[3709] 1 2 3 4 5 6 7 ；

[3710] Xaa Thr Arg Xaa Tyr Asp Xaa

[3711] 1 2 3 4 5 6 7 ;和

[3712] Xaa Thr Arg Xaa Trp Asp Xaa

[3713] 1 2 3 4 5 6 7

[3714] 其中，

[3715] 在 4 号位置上，Xaa 是 Trp、Tyr 或 Phe ;和

[3716] 在 1 和 7 号位置上，Xaa 是 20 个天然氨基酸残基中的任何一个。

[3717] 51. 按照实施方案 50 的酶制剂，其中在 7 号位置上的氨基酸残基是半胱氨酸 (Cys)。

[3718] 52. 按照实施方案 50 的酶制剂，其中在 1 号位置上的氨基酸残基选自天冬氨酸 (Asp)、苏氨酸 (Thr) 和丙氨酸 (Ala)。

[3719] 53. 按照实施方案 50-52 之任一的酶制剂，其中所述的酶包含具有以下序列的由 13 个氨基酸残基组成的第一肽

[3720] Thr Arg Xaa Xaa Asp Cys Cys Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Trp

[3721] 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

[3722] 和具有以下序列的由 5 个氨基酸残基组成的第二肽

[3723] Trp Cys Cys Xaa Cys

[3724] 1 2 3 4 5

[3725] 其中，

[3726] 在第一序列的 3 号位置上，氨基酸是 Trp、Tyr 或 Phe ；

[3727] 在第一序列的 4 号位置上，氨基酸是 Trp、Tyr 或 Phe ；

[3728] 在第一序列的 8 号位置上，氨基酸是 Arg、Lys 或 His ；

[3729] 在第一序列 9、10 和 12 号的各位置上，在第二序列的 4 号位置上，氨基酸是 20 个天然氨基酸残基中的任何一个。

[3730] 54. 按照实施方案 53 之任一的酶制剂，其中所说的酶是可以从属于由以下菌株的菌株获得的：番茄尖镰孢 (Fusarium oxysporum ssplycopersici)CBS 645.78、尖镰孢

ssp passiflora CBS 744.79、腐皮镰孢 IMI 107.511、蛇形镰孢 IFO 4467、早熟禾镰孢 ATCC 60883、黑腐质霉 CBS 819.73 和灰腐质霉 ATCC 22726。

[3731] 55. 按照实施方案 14-17、21-23、27-30、34-37、41-43、47-49、53 和 54 之任一的酶，其中在第一序列的 9 号位置上的氨基酸残基选自脯氨酸、苏氨酸、缬氨酸、丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、半胱氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、酪氨酸、丝氨酸、甲硫氨酸和色氨酸，优选地选自脯氨酸和苏氨酸。

[3732] 56. 按照实施方案 14-17、21-23、27-30、34-37、41-43、47-49、53 和 54 之任一的酶，其中在第一序列的 10 号位置上的氨基酸残基选自脯氨酸、苏氨酸、缬氨酸、丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、半胱氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、酪氨酸、丝氨酸、甲硫氨酸和色氨酸，优选地是丝氨酸。

[3733] 57. 按照实施方案 14-17、21-23、27-30、34-37、41-43、47-49、53 和 54 之任一的酶，其中在第一序列的 12 号位置上的氨基酸残基选自脯氨酸、苏氨酸、缬氨酸、丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、半胱氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、酪氨酸、丝氨酸、甲硫氨酸和色氨酸，优选地选自丙氨酸和甘氨酸。

[3734] 58. 按照实施方案 14-17、21-23、27-30、34-37、41-43、47-49、53 和 54 之任一的酶，其中在第二序列的 4 号位置上的氨基酸残基选自脯氨酸、苏氨酸、缬氨酸、丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、半胱氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、酪氨酸、丝氨酸、甲硫氨酸、色氨酸、谷氨酸和天冬氨酸，选自丙氨酸、甘氨酸和谷氨酰胺。

[3735] 59. 按照实施方案 14-17、21-23、27-30、34-37、41-43、47-49、53 和 54 之任一的酶，其中在第一序列的第 3 号位置上的氨基酸残基是酪氨酸；或在第 4 号位置上的氨基酸残基是色氨酸；或在第 8 号位置上的氨基酸残基是赖氨酸。

[3736] 60. 一种 DNA 构建体，该构建体编码按照实施方案 11-59 之任一的酶。

[3737] 61. 按照实施方案 14-17、21-23、27-30、34-37、41-43、47-49、53 和 54 之任一的酶制剂，其中所说的第一序列包含选自以下序列的氨基酸序列：

[3738] Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys Ala Trp

[3739] 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 ；

[3740] Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Thr Ser Cys Ala Trp

[3741] 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 ；和

[3742] Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys Gly Trp

[3743] 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 。

[3744] 62. 一种提供微生物菌株的方法，所述菌株包含编码存在于按照实施方案 1-9、11-59 和 61 之任一酶制剂中的酶的基因，该方法包括在标准条件下与图 1 所示的任何保守区的寡核苷酸杂交（例如 PCR 扩增）。

[3745] 63. 按照实施方案 62 的方法，其中所说的寡核苷酸包含编码包含在选自以下序列的肽中的至少五肽的核苷酸序列：

[3746] a.

[3747] Thr Arg Xaa Xaa Asp Cys Cys Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Trp Xaa

[3748] 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

[3749] 在 3 或 4 在号位置上的氨基酸是 Trp、Tyr 或 Phe；在 8 号位置上的氨基酸是 Arg、

Lys 或 His ;在 9、10、12 和 14 号位置上的氨基酸分别是 20 个天然氨基酸残基中的任何一个 ;和

[3750] b.

[3751] Trp Cys Cys Xaa Cys Tyr

[3752] 1 2 3 4 5 6

[3753] 在 4 号位置上的氨基酸是 20 个天然氨基酸残基中的任何一个 ;和

[3754] c.

[3755] Xaa Pro Gly Gly Gly Xaa Gly Xaa Phe

[3756] 1 2 3 4 5 6 7 8 9

[3757] 1 号位置上的氨基酸是 Met 或 Ile ;6 和 8 号位置上的氨基酸分别是 Leu、Ile 或 Val ;和

[3758] d.

[3759] Gly Cys Xaa Xaa Arg Xaa Asp Trp Xaa

[3760] 1 2 3 4 5 6 7 8 9

[3761] 在 3 号位置上的氨基酸是 20 个天然氨基酸残基中的任何一个 ;在 4 和 6 号位置上的氨基酸分别是 Trp、Tyr 或 Phe ;并且

[3762] 在 9 号位置上的氨基酸是 Phe 或 Met。

[3763] 64. 按照实施方案 62 的方法,其中所说的寡核苷酸包含互补于实施方案 63 的序列的核苷酸序列。

[3764] 65. 按照实施方案 63 的方法,其中所说的寡核苷酸相应于选自以下 PCR 引物的 PCR 引物 :

[3765] 有义,

[3766] 5’-CCCCAAGCTTACI$^{A}/_{C}$GITA$^{C}/_{T}$TGGGA$^{C}/_{T}$TG$^{C}/_{T}$TG$^{C}/_{T}$AA$^{A}/_{G}{}^{A}/_{C}$C-3’

[3767] 反义 1,

[3768] 5’-CTAGTCTAGATA$^{A}/_{G}$CAIGC$^{A}/_{G}$CA$^{A}/_{G}$CACC-3’ ;

[3769] 反义 2,

[3770] 5’ -CTAGTCTAGAAAIA$^{A}/_{G}/^{T}$ICCIA$^{A}/^{C}/^{G}$ICCICCICCIGG-3’ ;和

[3771] 反义 3,

[3772] 5’-CTAGTCTAGAIAACCA$^{A}/_{G}$TCA$^{A}/_{G}{}^{A}/_{T}$AIC$^{G}/_{T}$CC-3。

[3773] 66. 一种 DNA 构建体,该构建体包含编码显示溶纤活性之酶的 DNA 序列,所述 DNA 序列包括

[3774] a) SEQ ID NO :1 中所示的 DNA 序列和 / 或可以从啤酒糖酵母 DSM 9770 中的质粒获得的 DNA 序列,或者

[3775] b) SEQ ID NO :1 中所示的 DNA 序列的类似物或可以从啤酒糖酵母 DSM9770 中的质粒获得的 DNA 序列的类似物,该类似物

[3776] i) 同源于,优选地至少 70% 同源于 SEQ ID NO :1 中所示的 DNA 序列和 / 或可以从啤酒糖酵母 DSM 9770 中的质粒获得的 DNA 序列,

[3777] ii) 在本文所描述的条件下与 SEQ ID NO :1 中所示的 DNA 序列和 / 或可以从啤酒糖酵母 DSM 9770 中的质粒获得的 DNA 序列的相同核苷酸探针杂交,

[3778] iii) 编码一种多肽，该多肽同源于，优选地至少 65％同源于由一种 DNA 序列编码的多肽，所述 DNA 序列包含 SEQ ID NO :1 中所示的 DNA 序列和 / 或可以从啤酒糖酵母 DSM 9770 中的质粒获得的 DNA 序列，

[3779] iv) 编码一种多肽，该多肽是与一种抗纯化内切葡聚糖酶的抗体免疫学反应性的，所述内切葡聚糖酶由 SEQ ID NO :1 中所示的 DNA 序列或可以从啤酒糖酵母 DSM 9770 中的质粒获得的 DNA 序列编码。

[3780] 67. 按照实施方案 66 的 DNA 构建体，其中所述的 DNA 序列是从一种 DNA 文库分离的或者是以该 DNA 文库为基础产生的，所述 DNA 文库是属于毛壳科的菌株，优选地是属于毁丝霉属的菌株，特别是属于 M. thermophila 的菌株，尤其是 M. thermophila CBS 117.65 的文库。

[3781] 68. 一种 DNA 构建体，该构建体包含编码显示内切葡聚糖酶活性之酶的 DNA 序列，所述 DNA 序列包括

[3782] a) SEQ ID NO :4 中所示的 DNA 序列和 / 或可以从啤酒糖酵母 DSM 10082 中的质粒获得的 DNA 序列，或者

[3783] b) SEQ ID NO :4 中所示的 DNA 序列的类似物或可以从啤酒糖酵母 DSM10082 中的质粒获得的 DNA 序列的类似物，该类似物

[3784] i) 同源于，优选地至少 70％同源于 SEQ ID NO :4 中所示的 DNA 序列和 / 或可以从啤酒糖酵母 DSM 10082 中的质粒获得的 DNA 序列，

[3785] ii) 在本文所描述的条件下与 SEQ ID NO :4 中所示的 DNA 序列和 / 或可以从啤酒糖酵母 DSM 10082 中的质粒获得的 DNA 序列的相同核苷酸探针杂交，

[3786] iii) 编码一种多肽，该多肽同源于，优选地至少 60％同源于由一种 DNA 序列编码的多肽，所述 DNA 序列包含 SEQ ID NO :4 中所示的 DNA 序列和 / 或可以从啤酒糖酵母 DSM 10082 中的质粒获得的 DNA 序列，

[3787] iv) 编码一种多肽，该多肽是与一种抗纯化内切葡聚糖酶的抗体免疫学反应性的，所述内切葡聚糖酶由 SEQ ID NO :4 中所示的 DNA 序列或可以从啤酒糖酵母 DSM 10082 中的质粒获得的 DNA 序列编码。

[3788] 69. 按照实施方案 68 的 DNA 构建体，其中所述的 DNA 序列是从一种 DNA 文库分离的或者是以该 DNA 文库为基础产生的，所述 DNA 文库是属于肉座菌科 (Hypocreaceae) 的菌株，优选地是属于顶孢霉属的菌株，特别是 Acremonium sp. CBS 478.94 的文库。

[3789] 70. 一种 DNA 构建体，该构建体包含编码显示内切葡聚糖酶活性之酶的 DNA 序列，所述 DNA 序列包括

[3790] a) SEQ ID NO :6 中所示的 DNA 序列或可以从啤酒糖酵母 DSM 10080 中的质粒获得的 DNA 序列，或者

[3791] b) SEQ ID NO :6 中所示的 DNA 序列的类似物或可以从啤酒糖酵母 DSM10080 中的质粒获得的 DNA 序列的类似物，该类似物

[3792] i) 同源于，优选地至少 65％同源于 SEQ ID NO :6 中所示的 DNA 序列或可以从啤酒糖酵母 DSM 10080 中的质粒获得的 DNA 序列，

[3793] ii) 在本文所描述的条件下与 SEQ ID NO :6 中所示的 DNA 序列或可以从啤酒糖酵母 DSM 10080 中的质粒获得的 DNA 序列的相同核苷酸探针杂交，

[3794] iii) 编码一种多肽，该多肽同源于，优选地至少 70％同源于由一种 DNA 序列编码的多肽，所述 DNA 序列包含 SEQ ID NO :6 中所示的 DNA 序列或可以从啤酒糖酵母 DSM 10080 中的质粒获得的 DNA 序列，

[3795] iv) 编码一种多肽，该多肽是与一种抗纯化内切葡聚糖酶的抗体免疫学反应性的，所述内切葡聚糖酶由 SEQ ID NO :6 中所示的 DNA 序列或可以从啤酒糖酵母 DSM 10080 中的质粒获得的 DNA 序列编码。

[3796] 71. 按照实施方案 70 的 DNA 构建体，其中所述的 DNA 序列是从一种 DNA 文库分离的或者是以该 DNA 文库为基础产生的，所述 DNA 文库是属于 Chaetomiceae 科的菌株，优选地是属于顶孢霉属的菌株，特别是 Acremonium sp. CBS 478.94 的文库。

[3797] 72. 一种 DNA 构建体，该构建体包含编码显示内切葡聚糖酶活性之酶的 DNA 序列，所述 DNA 序列包括

[3798] a) SEQ ID NO :8 中所示的 DNA 序列或可以从啤酒糖酵母 DSM 10081 中的质粒获得的 DNA 序列，或者

[3799] b) SEQ ID NO :8 中所示的 DNA 序列的类似物或可以从啤酒糖酵母 DSM10081 中的质粒获得的 DNA 序列的类似物，该类似物

[3800] i) 同源于，优选地至少 75％同源于 SEQ ID NO :8 中所示的 DNA 序列或可以从啤酒糖酵母 DSM 10081 中的质粒获得的 DNA 序列，

[3801] ii) 在本文所描述的条件下与 SEQ ID NO :8 中所示的 DNA 序列或可以从啤酒糖酵母 DSM 10081 中的质粒获得的 DNA 序列的相同核苷酸探针杂交，

[3802] iii) 编码一种多肽，该多肽同源于，优选地至少 70％同源于由一种 DNA 序列编码的多肽，所述 DNA 序列包含 SEQ ID NO :8 中所示的 DNA 序列或可以从啤酒糖酵母 DSM 10081 中的质粒获得的 DNA 序列，

[3803] iv) 编码一种多肽，该多肽是与一种抗纯化内切葡聚糖酶的抗体免疫学反应性的，所述内切葡聚糖酶由 SEQ ID NO :8 中所示的 DNA 序列或可以从啤酒糖酵母 DSM 10081 中的质粒获得的 DNA 序列编码。

[3804] 73. 按照实施方案 72 的 DNA 构建体，其中所述的 DNA 序列是从一种 DNA 文库分离的或者是以该 DNA 文库为基础产生的，所述 DNA 文库是属于毛壳科的菌株，优选地是属于 Thielavia terrestris 的菌株，特别是 Thielavia terrestris NRRL 8126 的文库。

[3805] 74. 一种 DNA 构建体，该构建体包含编码显示内切葡聚糖酶活性之酶的 DNA 序列，所述 DNA 序列包括

[3806] a) SEQ ID NO :10 中所示的 DNA 序列或可以从大肠杆菌 DSM 10512 中的质粒获得的 DNA 序列，或者

[3807] b) SEQ ID NO :10 中所示的 DNA 序列的类似物或可以从大肠杆菌 DSM10512 中的质粒获得的 DNA 序列的类似物，该类似物

[3808] i) 同源于，优选地至少 65％同源于 SEQ ID NO :10 中所示的 DNA 序列或可以从大肠杆菌 DSM 10512 中的质粒获得的 DNA 序列，

[3809] ii) 在本文所描述的条件下与 SEQ ID NO :10 中所示的 DNA 序列或可以从大肠杆菌 DSM 10512 中的质粒获得的 DNA 序列的相同核苷酸探针杂交，

[3810] iii) 编码一种多肽，该多肽同源于，优选地至少 55％同源于由一种 DNA 序列编码

的多肽，所述 DNA 序列包含 SEQ ID NO：10 中所示的 DNA 序列或可以从大肠杆菌 DSM 10512 中的质粒获得的 DNA 序列，

[3811] iv) 编码一种多肽，该多肽是与一种抗纯化的内切葡聚糖酶的抗体免疫学反应性的，所述内切葡聚糖酶由 SEQ ID NO：10 中所示的 DNA 序列或可以从大肠杆菌 DSM 10512 中的质粒获得的 DNA 序列编码。

[3812] 75. 按照实施方案 74 的 DNA 构建体，其中所述的 DNA 序列是从一种 DNA 文库分离的或者是以该 DNA 文库为基础产生的，所述 DNA 文库是属于斑痣盘菌科的菌株，优选地是属于壳球孢属的菌株，特别是属于 Macrophomina phaseolina 的菌株，尤其是 M. phaseolicola CBS 281.96 的文库。

[3813] 76. 一种 DNA 构建体，该构建体包含编码显示内切葡聚糖酶活性之酶的 DNA 序列，所述 DNA 序列包括

[3814] a) SEQ ID NO：12 中所示的 DNA 序列或可以从大肠杆菌 DSM 10511 中的质粒获得的 DNA 序列，或者

[3815] b) SEQ ID NO：12 中所示的 DNA 序列的类似物或可以从大肠杆菌 DSM10511 中的质粒获得的 DNA 序列的类似物，该类似物

[3816] i) 同源于，优选地至少 60％同源于 SEQ ID NO：12 中所示的 DNA 序列或可以从大肠杆菌 DSM 10511 中的质粒获得的 DNA 序列，

[3817] ii) 在本文所描述的条件下与 SEQ ID NO：12 中所示的 DNA 序列或可以从大肠杆菌 DSM 10511 中的质粒获得的 DNA 序列的相同核苷酸探针杂交，

[3818] iii) 编码一种多肽，该多肽同源于，优选地至少 60％同源于由一种 DNA 序列编码的多肽，所述 DNA 序列包含 SEQ ID NO：12 中所示的 DNA 序列或可以从大肠杆菌 DSM 10511 中的质粒获得的 DNA 序列，

[3819] iv) 编码一种多肽，该多肽是与一种抗纯化内切葡聚糖酶的抗体免疫学反应性的，所述内切葡聚糖酶由 SEQ ID NO：12 中所示的 DNA 序列或可以从大肠杆菌 DSM 10511 中的质粒获得的 DNA 序列编码。

[3820] 77. 按照实施方案 76 的 DNA 构建体，其中所述的 DNA 序列是从一种 DNA 文库分离的或者是以该 DNA 文库为基础产生的，所述 DNA 文库是属于口蘑科的菌株，优选地是属于毛皮伞属的菌株，特别是属于 Crinipellisscabella 的菌株，尤其是 C. scabella CBS 280.96 的文库。

[3821] 78. 一种 DNA 构建体，该构建体包含编码显示内切葡聚糖酶活性之酶的 DNA 序列，所述 DNA 序列包括

[3822] a) SEQ ID NO：16 中所示的 DNA 序列或可以从大肠杆菌 DSM 10571 中的质粒获得的 DNA 序列，或者

[3823] b) SEQ ID NO：16 中所示的 DNA 序列的类似物或可以从大肠杆菌 DSM10571 中的质粒获得的 DNA 序列的类似物，该类似物

[3824] i) 同源于，优选地至少 70％同源于 SEQ ID NO：16 中所示的 DNA 序列或可以从大肠杆菌 DSM 10571 中的质粒获得的 DNA 序列，

[3825] ii) 在本文所描述的条件下与 SEQ ID NO：16 中所示的 DNA 序列或可以从大肠杆菌 DSM 10571 中的质粒获得的 DNA 序列的相同核苷酸探针杂交，

[3826] iii) 编码一种多肽，该多肽同源于，优选地至少 60％同源于由一种 DNA 序列编码的多肽，所述 DNA 序列包含 SEQ ID NO：16 中所示的 DNA 序列或可以从大肠杆菌 DSM 10571 中的质粒获得的 DNA 序列，

[3827] iv) 编码一种多肽，该多肽是与一种抗纯化内切葡聚糖酶的抗体免疫学反应性的，所述内切葡聚糖酶由 SEQ ID NO：16 中所示的 DNA 序列或可以从大肠杆菌 DSM 10571 中的质粒获得的 DNA 序列编码。

[3828] 79. 按照实施方案 78 的 DNA 构建体，其中所述的 DNA 序列是从一种 DNA 文库分离的或者是以该 DNA 文库为基础产生的，所述 DNA 文库是属于周刺座霉属的菌株，优选地是属于 Volutella colletotrichoides 的菌株，特别 V.colletotrochoides CBS 400.58 的文库。

[3829] 80. 一种 DNA 构建体，该构建体包含编码显示内切葡聚糖酶活性之酶的 DNA 序列，所述 DNA 序列包括

[3830] a)SEQ ID NO：19 中所示的 DNA 序列或可以从大肠杆菌 DSM 10576 中的质粒获得的 DNA 序列，或者

[3831] b)SEQID NO：19 中所示的 DNA 序列的类似物或可以从大肠杆菌 DSM10576 中的质粒获得的 DNA 序列的类似物，该类似物

[3832] i) 同源于 SEQ ID NO：19 中所示的 DNA 序列或可以从大肠杆菌 DSM10576 中的质粒获得的 DNA 序列，

[3833] ii) 在本文所描述的条件下与 SEQ ID NO：19 中所示的 DNA 序列或可以从大肠杆菌 DSM 10576 中的质粒获得的 DNA 序列的相同核苷酸探针杂交，

[3834] iii) 编码一种多肽，该多肽同源于由一种 DNA 序列编码的多肽，所述 DNA 序列包含 SEQ ID NO：19 中所示的 DNA 序列或可以从大肠杆菌 DSM10576 中的质粒获得的 DNA 序列，

[3835] iv) 编码一种多肽，该多肽是与一种抗纯化内切葡聚糖酶的抗体免疫学反应性的，所述内切葡聚糖酶由 SEQ ID NO：19 中所示的 DNA 序列或可以从大肠杆菌 DSM 10576 中的质粒获得的 DNA 序列编码。

[3836] 81. 按照实施方案 80 的 DNA 构建体，其中所述的 DNA 序列是从一种 DNA 文库分离的或者是以该 DNA 文库为基础产生的，所述 DNA 文库是属于粪壳科的菌株，优选地是属于粪壳属的菌株，特别属于粪生粪壳的菌株，尤其是粪生粪壳 ATCC 52644 的文库。

[3837] 82. 按照实施方案 66-81 之任一的 DNA 构建体，该构建体还包含编码纤维素－结合域的 DNA 序列。

[3838] 83. 实施方案 82 的 DNA 构建体，该构建体还包含编码纤维素－结合域 (CBD) 的 DNA 序列，所述纤维素－结合域和由所述 DNA 构建体之 DNA 序列编码的酶的酶核心（催化活性域）是可操作连接的。

[3839] 84. 一种重组表达载体，该载体包含按照实施方案 62-83 之任一的 DNA 构建体。

[3840] 85. 一种细胞，该细胞包含按照实施方案 66-83 之任一的的 DNA 构建体或按照实施方案 84 的重组表达载体。

[3841] 86. 按照实施方案 85 的细胞，该细胞是真核细胞，特别真菌细胞，如酵母细胞或丝状真菌细胞，或所述基因所来源的内源性细胞。

[3842] 87. 按照细胞实施方案 86 的细胞，其中所说的细胞属于曲霉属 (Aspergillus)、

镰孢属 (Fusarium) 或木霉属 (Trichoderma) 的菌株，特别是禾谷镰孢 (Fusarium graminearum)、黑曲霉 (Aspergillus niger) 或米曲霉 (Aspergillus oryzae) 的菌株。

[3843] 88. 一种产生显示内切葡聚糖酶活性的酶的方法，该方法包括在可以产生所述酶的条件下，培养按照实施方案 85-87 之任一的细胞，并从培养物中回收所述的酶。

[3844] 89. 一种显示内切葡聚糖酶活性的酶，该酶

[3845] a) 由按照实施方案 66-83 之任一的 DNA 构建体编码，

[3846] b) 由按照实施方案 88 的方法产生，或

[3847] c) 是与一种抗纯化内切葡聚糖酶的抗体免疫学反应性的，所述内切葡聚糖酶由序列表 SEQ ID NO :1、4、6、8、10、12、16、19 之任一所示的 DNA 序列编码。

[3848] 90. 一种使要洗的衣物颜色澄清的方法，该方法包括用包含按照实施方案 1-9、11-61 和 89 之任一的酶制剂的浸泡、洗涤或冲洗液体处理要洗的衣物。

[3849] 91. 按照实施方案 90 的方法，其中所说的要洗的衣物用洗衣机处理。

[3850] 92. 按照实施方案 90 或 91 的方法，其中所说的内切葡聚糖酶在机器循环使用条件下，以每升液体 1 到 1000S-CEVU，优选地是 5 到 200S-CEVU 的有效量存在于浸泡、洗涤或冲洗液体中。

[3851] 93. 按照实施方案 90-92 之任一的方法，其中所说的浸泡、洗涤或冲洗液体的最适 pH 在 4 和 11 之间，优选地在 6 和 10.5 之间。

[3852] 94. 按照实施方案 90-93 之任一的方法，其中温度在 15℃和 60℃之间。

[3853] 95. 按照实施方案 90-94 之任一的方法，其中所说的浸泡、洗涤或冲洗液体还包含一种或多种选自蛋白酶、纤维素酶、木聚糖酶、淀粉酶、脂酶、过氧化物酶和漆酶的酶。

[3854] 96. 一种洗衣组合物，该组合物包含按照实施方案 1-9、11-61 和 89 之任一的酶制剂，以及选自表面活性剂、助洗剂化合物和织物软化剂的化合物。

[3855] 97. 按照权利要 96 的洗衣组合物，该组合物还包含一种或多种选自蛋白酶、淀粉酶、脂酶、纤维素酶、木聚糖酶、过氧化物酶和漆酶的酶。

[3856] 98. 按照实施方案 97 的组合物，其中所说的表面活性剂是非离子、阴离子、阳离子、两性离子、两性或兼性表面活性剂。

[3857] 99. 按照实施方案 98 的组合物，其中所说的织物软化剂是阳离子或非离子软化剂，优选地是季铵化合物，并且其可以进一步包含或不包含一种或多种选自表面活性剂、电解质、缓冲液、抗氧剂和液态载体的化合物。

[3858] 100. 按照实施方案 1-9、11-61 和 89 之任一的酶在降解或修饰植物材料（例如细胞壁）上的用途。

[3859] 101. 按照实施方案 1-9、11-61 和 89 之任一的酶在处理织物原料或织物，优选地是在防止背染、生物抛光或“石洗”纤维素织物中的用途。

[3860] 102 按照实施方案 1-9、11-61 和 89 之任一的酶在处理纸浆，优选地是在剥树皮、脱纤维、纤维改性、酶促脱墨或改善排水中的用途。

[3861] 103. 一种酶制剂，该制剂富含按照实施方案 1-9、11-61 和 89 的显示溶纤活性的酶。

[3862] 104. 按照实施方案 103 的制剂，该制剂还包含一种或多种选自半乳聚糖酶、木聚糖酶、阿拉伯聚糖酶、果胶乙酰酯酶、聚半乳糖醛酸酶、鼠李半乳糖醛酸酶、果胶裂解酶、果

胶酸盐裂解酶、内切葡聚糖酶、果胶甲酯酶、蛋白酶、脂酶、淀粉酶、角质酶、过氧化物酶、漆酶、纤维二糖水解酶和转谷氨酰胺酶的酶。

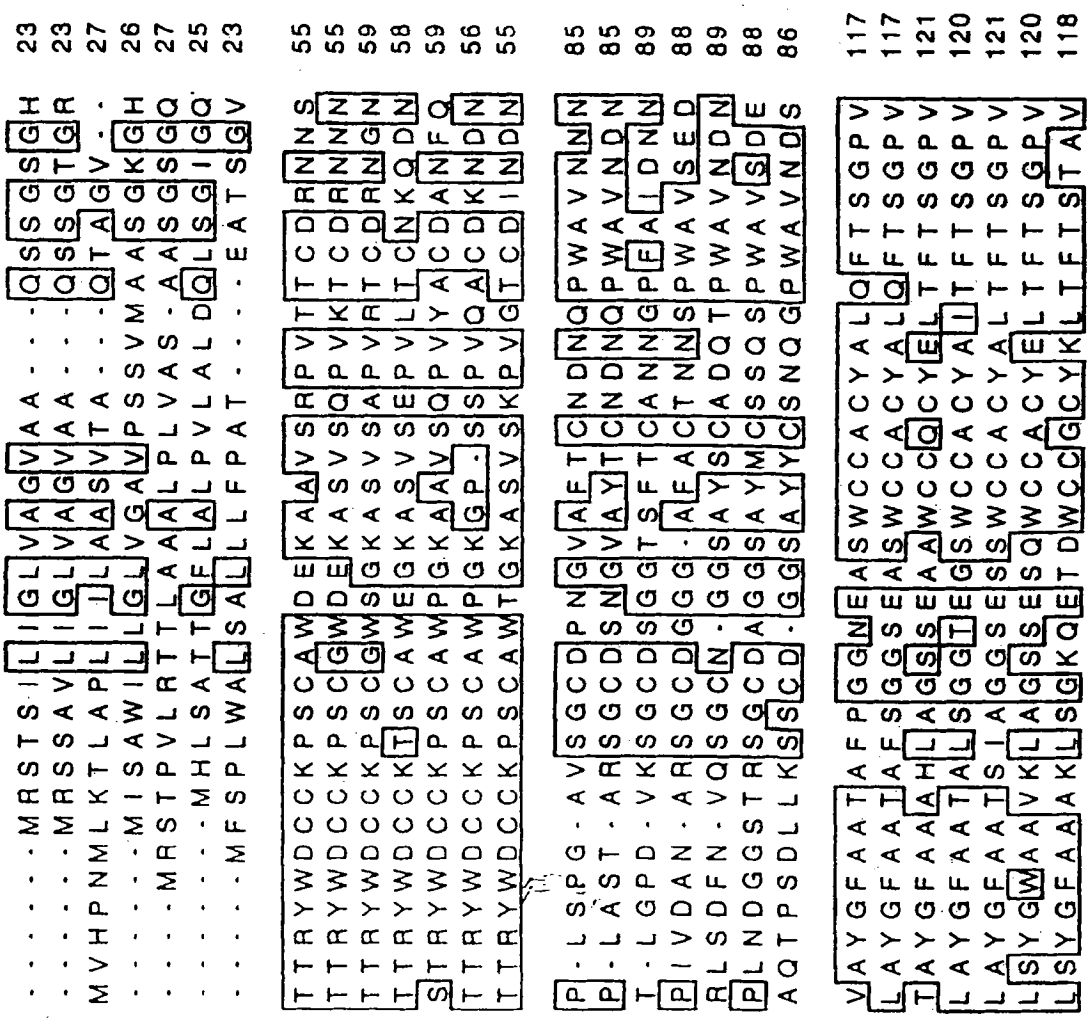

支顶孢属 I
V. colletotrichoides
C. scabella
支顶孢属 II
T. terrestris
M. thermophila
M. phaseolina

图 1A

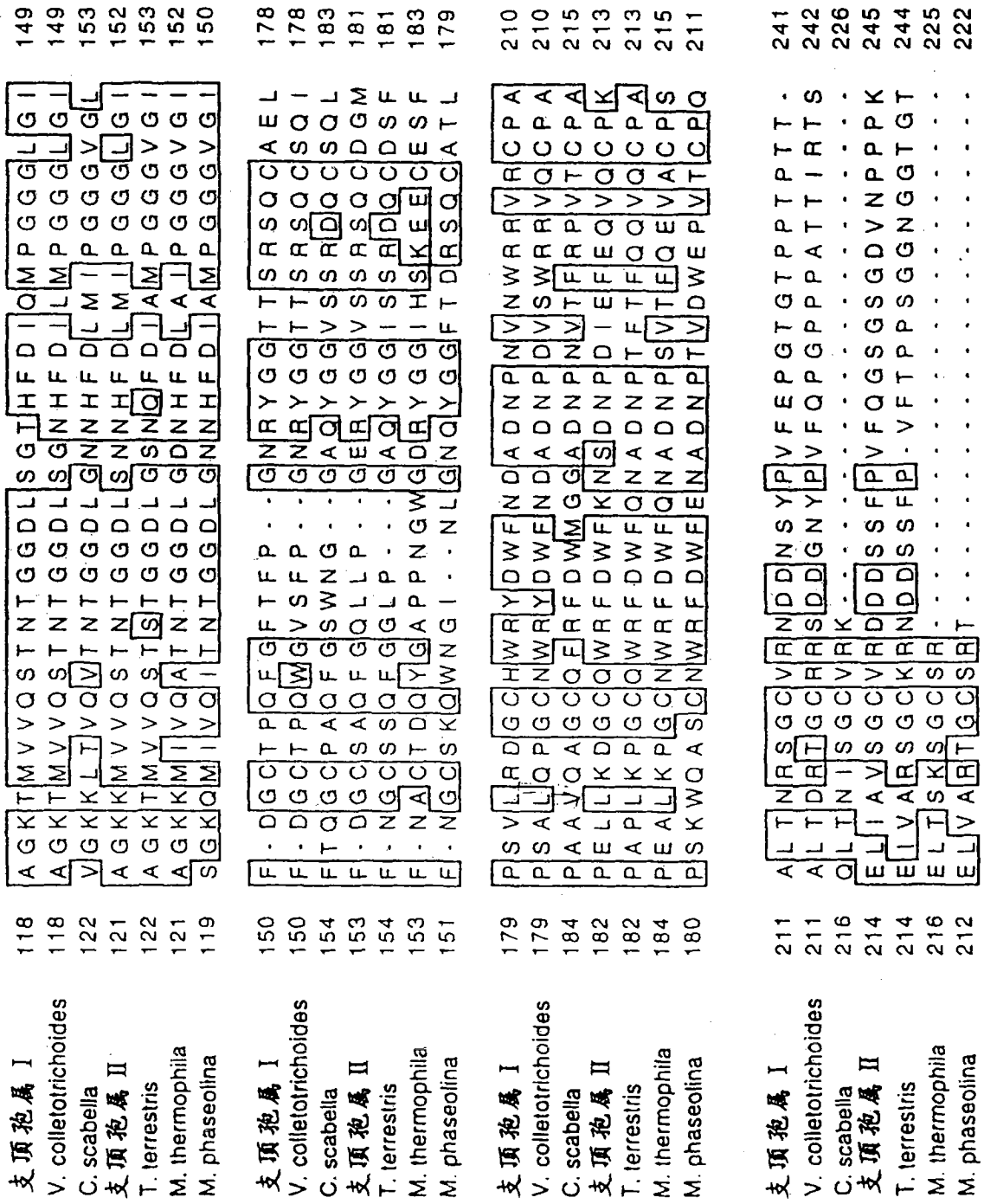
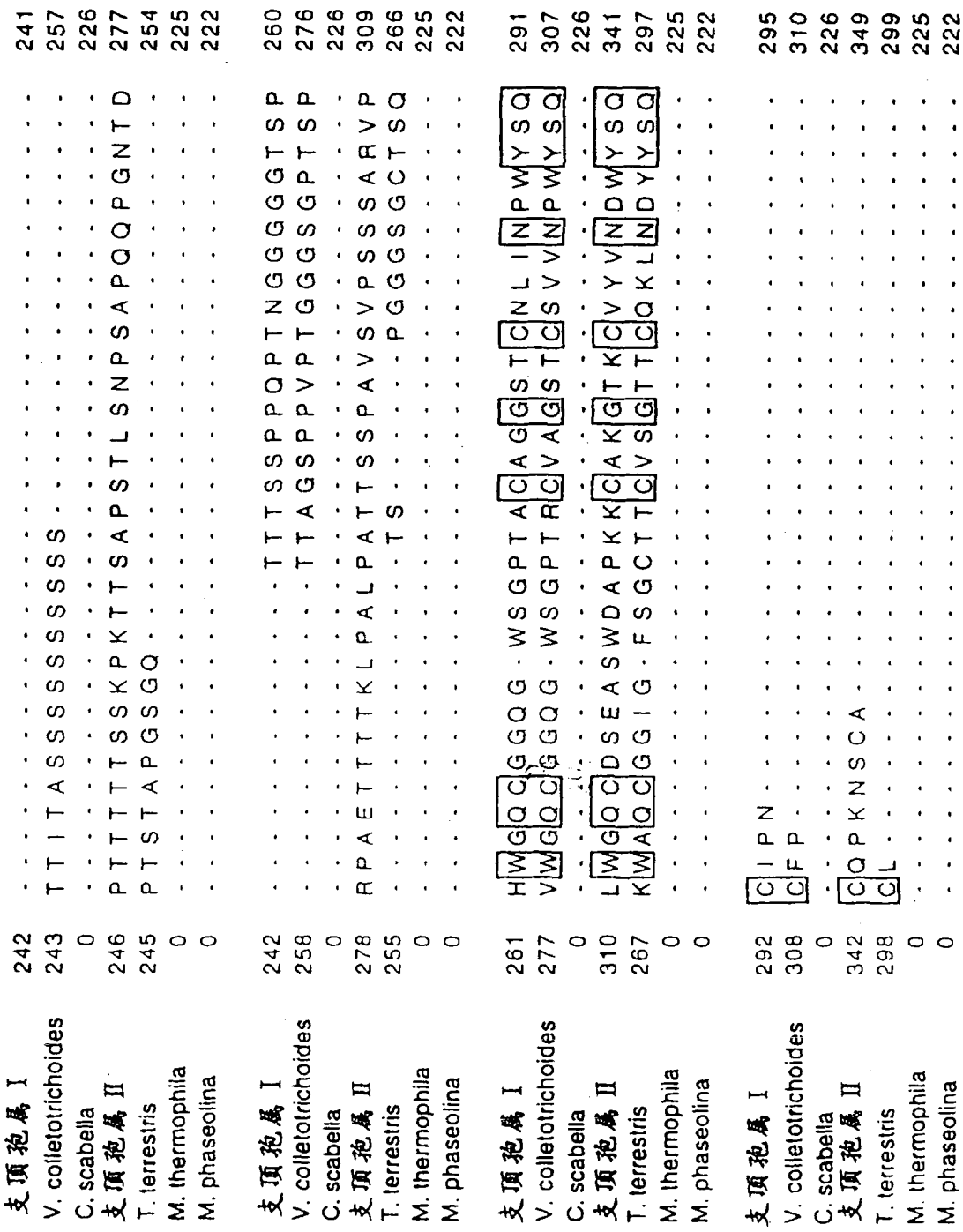

支顶孢属 I
V. colletotrichoides
C. scabella
支顶孢属 II
T. terrestris
M. thermophila
M. phaseolina

图 1B


支顶孢属 I 242 - - -

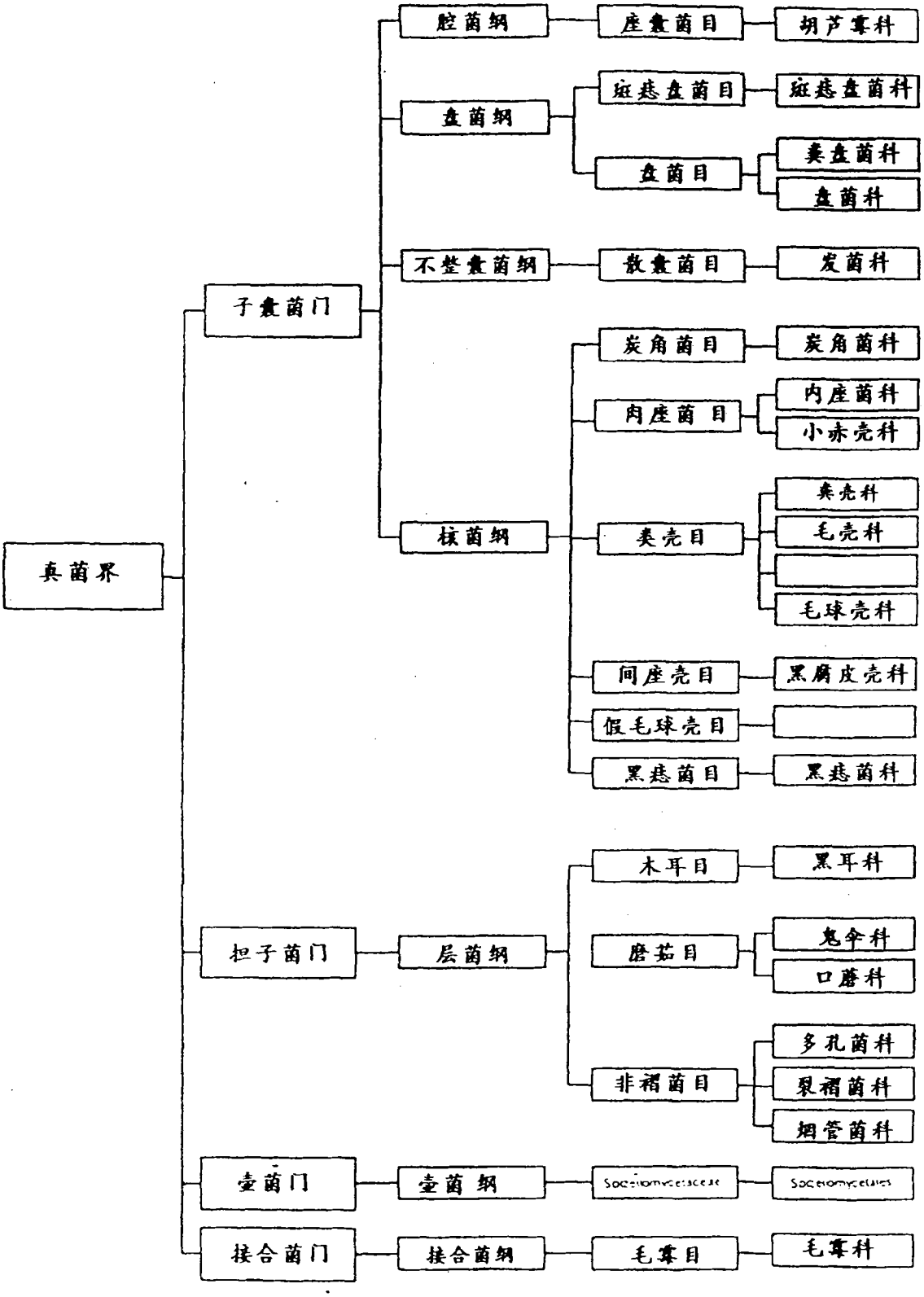

真菌界
子囊菌门
腔菌纲
座囊菌目
胡芦寡科
盘菌纲
斑痣盘菌目
斑痣盘菌科
盘菌目
奏盘菌科
盘菌科
不整囊菌纲
散囊菌目
发菌科
核菌纲
炭角菌目
炭角菌科
肉座菌目
内座菌科
小赤壳科
奏壳目
奏壳科
毛壳科
毛球壳科
间座壳目
黑腐皮壳科
假毛球壳目
黑痣菌目
黑痣菌科
担子菌门
层菌纲
木耳目
黑耳科
磨菇目
鬼伞科
口蘑科
非褶菌目
多孔菌科
裂褶菌科
烟管菌科
壶菌门
壶菌纲
Saccharomycetaceae
Saccharomycetales
接合菌门
接合菌纲
毛霉目
毛霉科

图 2A

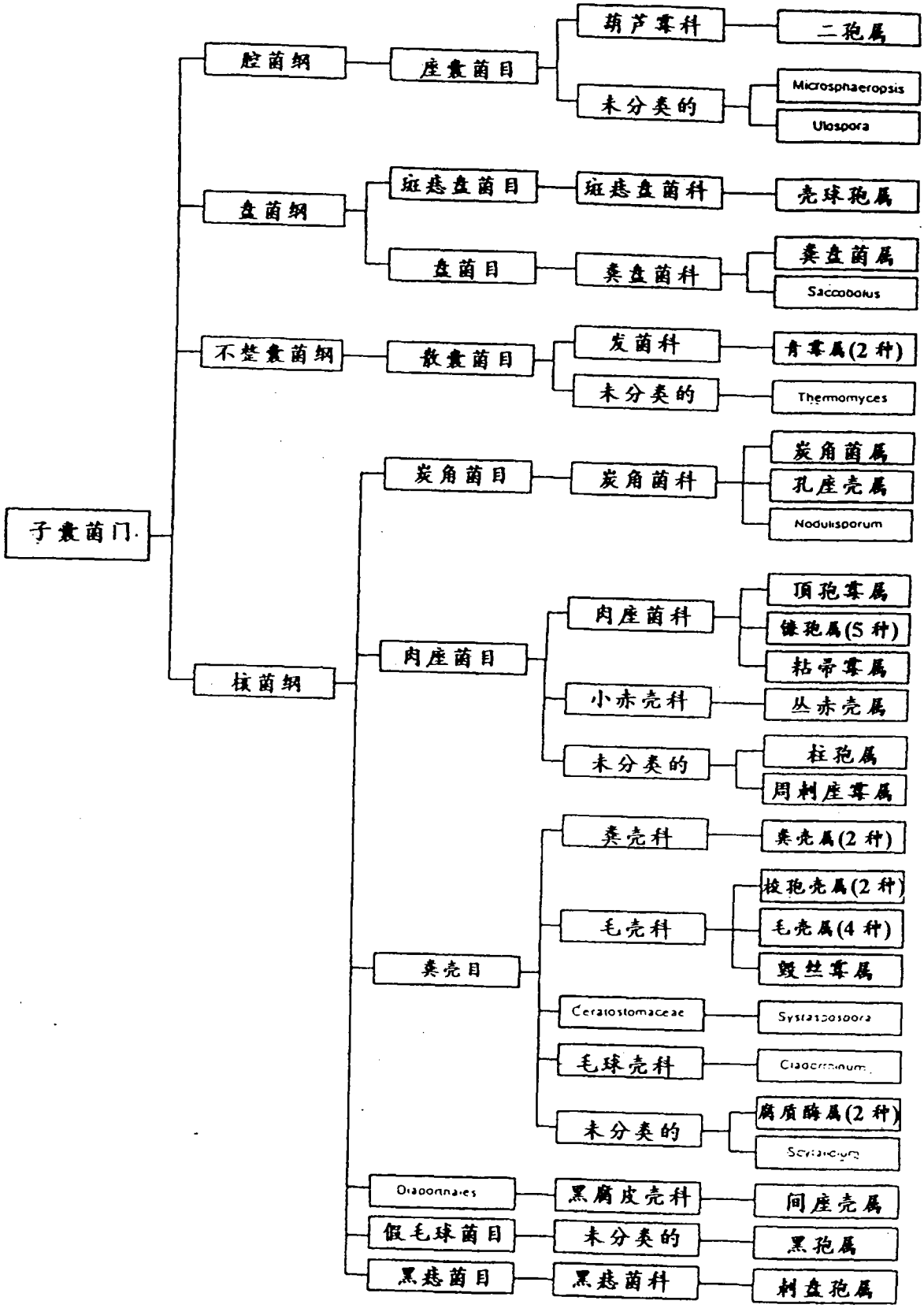

子囊菌门
腔菌纲
座囊菌目
葫芦霉科
二孢属
未分类的
Microsphaeropsis
Ulospora
盘菌纲
斑痣盘菌目
斑痣盘菌科
壳球孢属
盘菌目
粪盘菌科
粪盘菌属
Saccobolus
不整囊菌纲
散囊菌目
发菌科
青霉属(2 种)
未分类的
Thermomyces
核菌纲
炭角菌目
炭角菌科
炭角菌属
孔座壳属
Nodulisporum
肉座菌目
肉座菌科
顶孢霉属
镰孢属(5 种)
粘帚霉属
小赤壳科
丛赤壳属
未分类的
柱孢属
周刺座霉属
粪壳目
粪壳科
粪壳属(2 种)
毛壳科
梭孢壳属(2 种)
毛壳属(4 种)
毁丝霉属
Ceratostomaceae
Systaspospora
毛球壳科
未分类的
腐质酶属(2 种)
Diaporthales
黑腐皮壳科
间座壳属
假毛球菌目
未分类的
黑孢属
黑痣菌目
黑痣菌科
刺盘孢属

图 2B

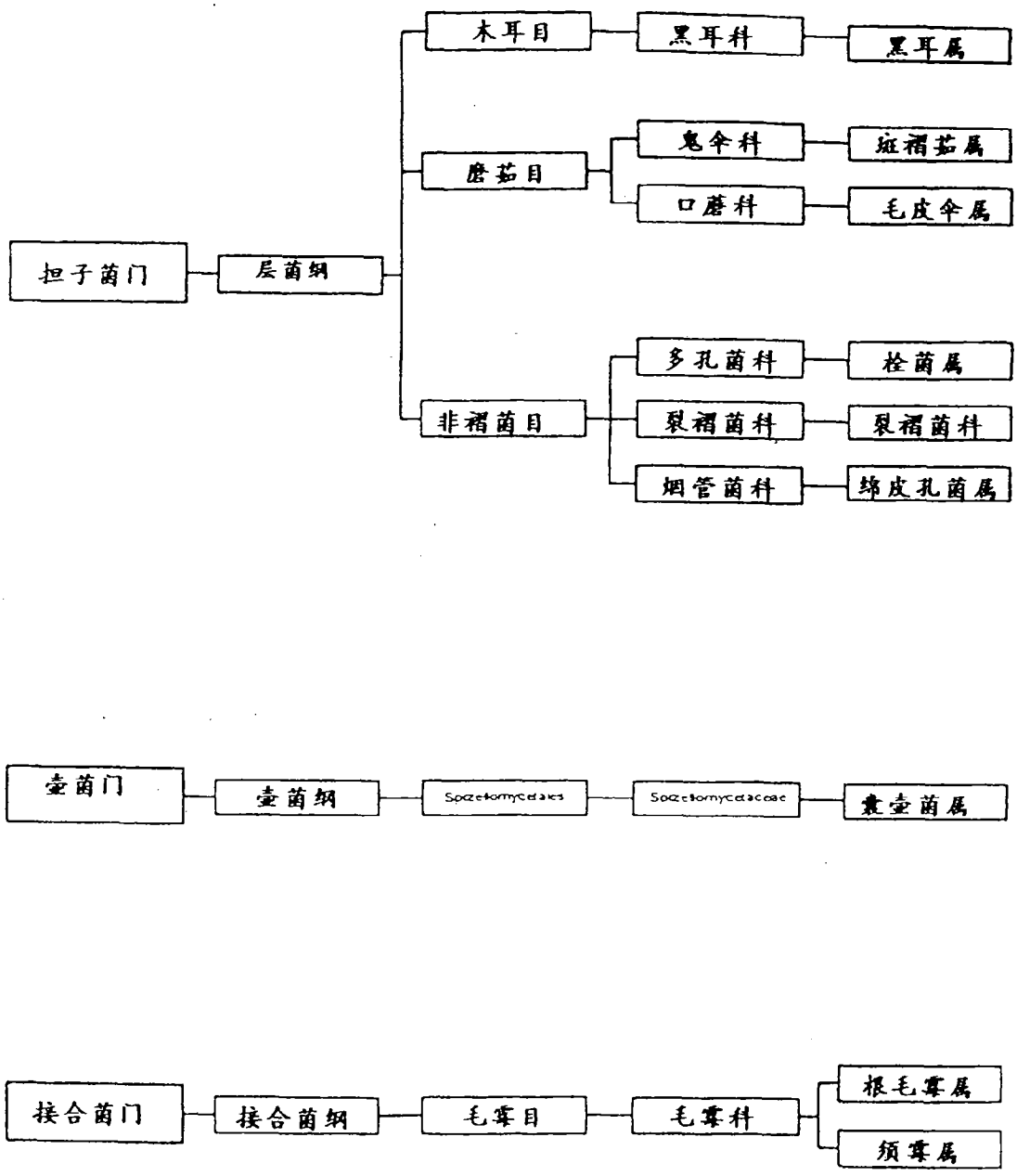

担子菌门
层菌纲
木耳目
黑耳科
黑耳属
蘑菇目
鬼伞科
斑褶菇属
口蘑科
毛皮伞属
非褶菌目
多孔菌科
栓菌属
裂褶菌科
裂褶菌科
烟管菌科
绵皮孔菌属
壶菌门
壶菌纲
Spizellomycetales
Spizellomycetaceae
囊壶菌属
接合菌门
接合菌纲
毛霉目
毛霉科
根毛霉属
须霉属

图 2C

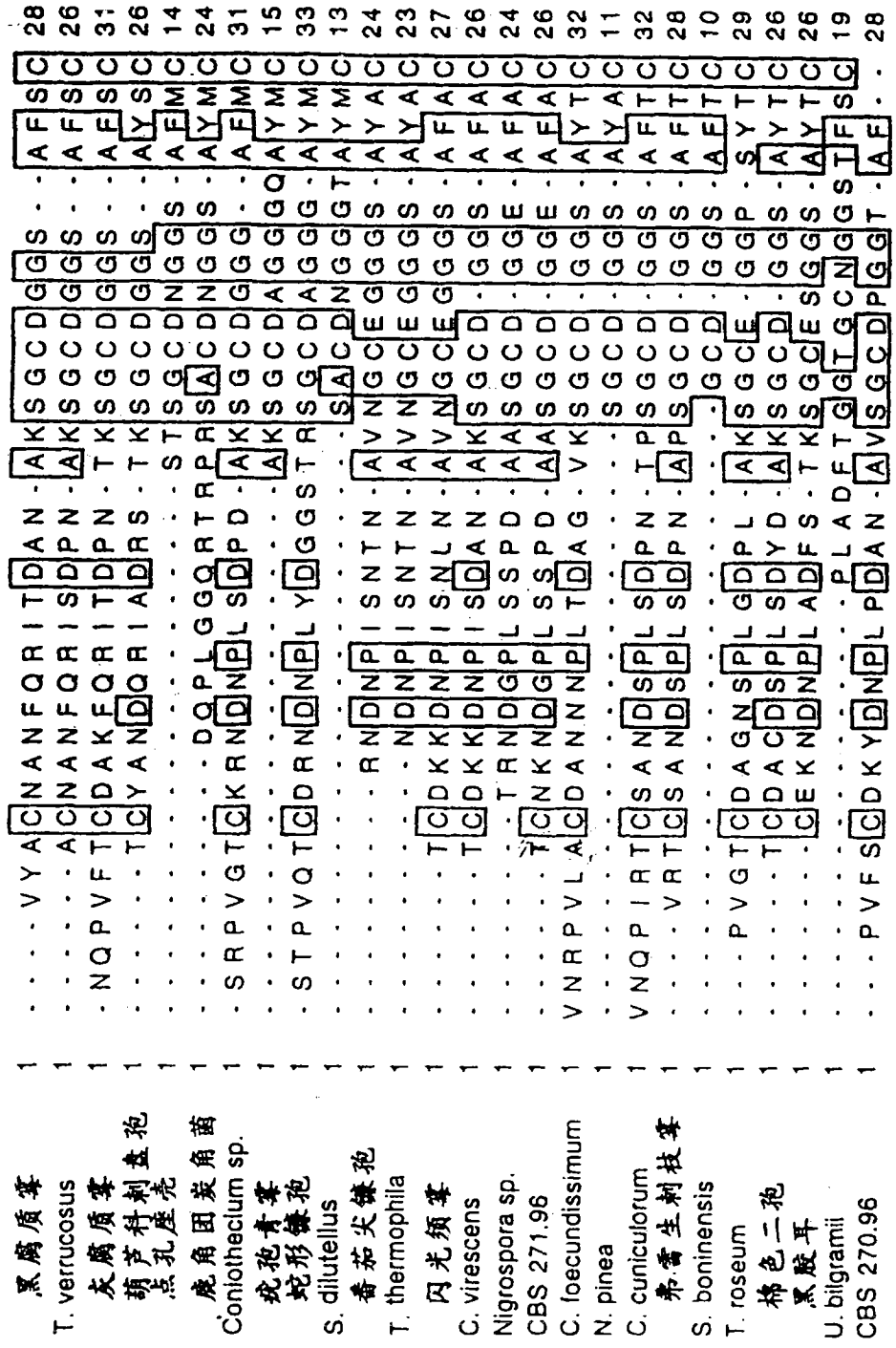

黑腐质霉
T. verrucosus
灰腐质霉
葫芦科刺盘孢
炭孔座壳
鹿角团炭角菌
Coniothecium sp.
疣孢青霉
蛇形镰孢
S. dilutellus
番茄尖镰孢
T. thermophila
闪光须霉
C. virescens
Nigrospora sp.
CBS 271.96
C. foecundissimum
N. pinea
C. cuniculorum
弗雷生刺枝霉
S. boninensis
T. roseum
棉色二孢
黑腚耳
U. bilgramii
CBS 270.96

图 3A

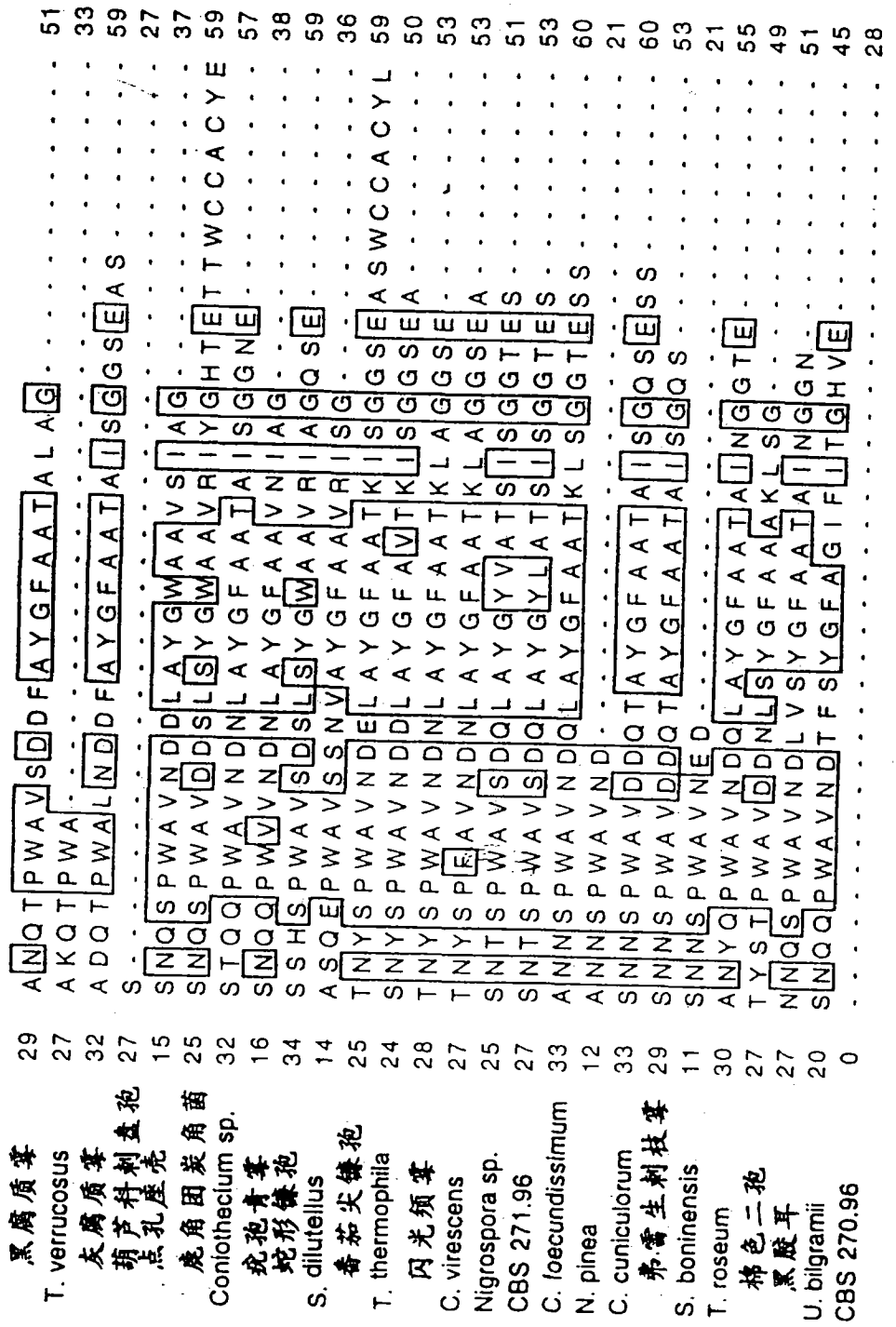

黑腐质霉 29
T. verrucosus 27
灰腐质霉 32
葫芦科刺盘孢 27
点孔座壳 15
鹿角团炭角菌 25
Coniothecium sp. 32
兖孢青霉 16
蛇形镰孢 34
S. dilutellus 14
番茄尖镰孢 25
T. thermophila 24
闪光须霉 28
C. virescens 27
Nigrospora sp. 25
CBS 271.96 27
C. foecundissimum 33
N. pinea 12
C. cuniculorum 33
弗雷生刺枝霉 29
S. boninensis 11
T. roseum 30
棉色二孢 27
黑腚耳 27
U. bilgramii 20
CBS 270.96 0

图 3B