

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910141258.2

[51] Int. Cl.

C12N 9/34 (2006.01)
C12N 15/56 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 10 月 7 日

[11] 公开号 CN 101550410A

[51] Int. Cl. (续)

C12N 1/19 (2006.01)

C12P 19/20 (2006.01)

C12P 7/06 (2006.01)

C12R 1/66 (2006.01)

C12R 1/685 (2006.01)

C12R 1/665 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

[22] 申请日 2000.7.7

[21] 申请号 200910141258.2

分案原申请号 00810132.9

[30] 优先权

[32] 1999.7.9 [33] DK [31] PA199900999

[71] 申请人 诺维信公司

地址 丹麦鲍斯韦

[72] 发明人 比贾恩·R·尼尔森

艾伦·斯文德森 亨里克·彼得森

杰斯珀·文德

汉尼·V·亨德里克森

托本·P·弗兰德森

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 史悦

权利要求书 2 页 说明书 43 页 附图 1 页

[54] 发明名称

葡糖淀粉酶变体

[57] 摘要

本发明涉及亲本真菌葡糖淀粉酶的变体，其表现出特性改变，具体是热稳定性和/或比活提高。

1. 亲本葡糖淀粉酶的变体, 其包含在下列一个或多个位置的改变: 59, 66, 72, 119, 189, 223, 227, 313, 340, 342, 352, 379, 386, 393, 395, 402, 408, 416, 425, 427, 444, 486, 490, 494,

其中(a) 所述改变独立地为

(i) 在占据所述位置的氨基酸下游插入氨基酸,

(ii) 占据所述位置的氨基酸的缺失, 或

(iii) 将占据所述位置的氨基酸用另一氨基酸取代,

(b) 所述变体具有葡糖淀粉酶活性且(c)每一位置对应于具有 SEQ ID NO: 2 之氨基酸序列的亲本葡糖淀粉酶氨基酸序列的位置。

2. 亲本葡糖淀粉酶的变体, 其包含下列的一个或多个改变: V59A, L66V/R, T72I, S119P, I189T, Y223F, F227Y, N313G, S340G, K352R, S356G, T379A, S386K, N, R, P, A393R, S395R, Y402F, E408R, T416A, R, D, N, C, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, E, W, Y, V, 优选 T416H, A425T, N427S/M, S444G S486G, T490A, T494P/A, 其中(a)所述变体具有葡糖淀粉酶活性且(b)每一位置对应于具有 SEQ ID NO: 2 之氨基酸序列的亲本葡糖淀粉酶氨基酸序列的位置。

3. 权利要求 1 或 2 的变体, 其中所述亲本葡糖淀粉酶具有氨基酸序列, 所述氨基酸序列与 SEQ ID NO: 2 之氨基酸序列有至少 65% 的同一性程度。

4. 权利要求 1-3 的变体, 其中所述亲本葡糖淀粉酶由核酸序列编码, 所述核酸序列与 SEQ ID NO: 1 的核酸序列或其互补链在高严格条件下杂交。

5. 权利要求 1-4 中任一项的变体, 其中所述亲本葡糖淀粉酶从曲霉属或踝节菌属得到。

6. DNA 构建体, 其包含编码权利要求 1-5 中任一项的葡糖淀粉酶变体的 DNA 序列。

7. 重组表达载体, 其携带有权利要求 6 的 DNA 构建体。

8. 用权利要求 6 的 DNA 构建体或权利要求 7 的载体转化的细胞。

9. 将淀粉或部分水解的淀粉转化为含葡萄糖的糖浆的方法, 该方法包括在权利要求 1-5 中任一项的葡糖淀粉酶变体存在下糖化淀粉水解产物的步骤。

10. 权利要求 1-5 中任一项的葡糖淀粉酶变体在淀粉转化方法中的用途。

11. 权利要求 1-5 中任一项的葡糖淀粉酶变体在产生燃料乙醇或食用乙醇的方法中的用途。

12. 通过在权利要求 1-5 中限定的一个或多个位置进行改变来改进亲本葡糖淀粉酶的热稳定性和/或比活的方法。

葡糖淀粉酶变体

本申请是申请日为 2000 年 07 月 07 日、申请号为 00810132.9(国际申请号为 PCT/DK00/00373)、发明名称为“葡糖淀粉酶变体”的发明申请的分案申请。

发明领域

本发明涉及亲本 AMG 的特性改变的新葡糖淀粉酶变体(突变体),所述特性改变具体是改善了热稳定性和/或提高了比活,所述变体适用于如淀粉转化,具体适于从淀粉生产葡萄糖,和醇类生产,甜味剂生产。更特定地,本发明涉及葡糖淀粉酶变体和此变体酶的应用。

发明背景

葡糖淀粉酶(1,4- α -D-葡聚糖葡萄糖水解酶, EC3.2.1.3)可以催化从淀粉或相关的寡糖和多糖分子的非还原末端释放 D-葡萄糖。葡糖淀粉酶可从几种丝状真菌或酵母产生,其中曲霉属在商业上是最重要的。

在商业上,葡糖淀粉酶用于将被 α -淀粉酶部分水解的玉米淀粉转化为葡萄糖。葡萄糖进一步被葡萄糖异构酶转化为含几乎等量的葡萄糖和果糖的混合物。此混合物或果糖含量更高的混合物是通常使用于全世界商业用途的高果糖玉米浆。此糖浆是世界上由酶方法生产的最大产量的产品。在由淀粉转化为果糖中有关的三种酶是生产的最重要的工业用酶。

考虑到在高果糖玉米浆生产中葡糖淀粉酶的商业用途,其中一个主要问题是葡糖淀粉酶的热稳定性相对较低。葡糖淀粉酶不象 α -淀粉酶或葡萄糖异构酶一样热稳定,它最活跃和稳定的 pH 值比 α -淀粉酶或葡萄糖异构酶要低。相应地,它必须用于较低温度和 pH 值的单独的容器中。

黑曲霉的葡糖淀粉酶具有催化活性结构域(氨基酸 1-440)和淀粉结合结构域(氨基酸 509-616),此二者被一段较长且高度 O-糖基化的接头所分隔

(Svensson 等(1983), Carlsberg Res. Commun.48, 529-544, 1983 和(1986), 欧洲生物化学杂志(Eur.J.Biochem), 154, 497-502)。泡盛曲霉 X100 的葡糖淀粉酶的催化活性结构域(氨基酸 1-471)具有 $(\alpha/\alpha)_6$ -折叠, 其中六个保守的 $\alpha \rightarrow \alpha$ 环片段与内桶和外桶相连(Aleshin 等(1992), 生物学化学杂志(J. Biol. Chem.)167, 19291-19298)。葡糖淀粉酶与 1-脱氧野尻霉素(Harris 等(1993), 生物化学, 32, 1618-1626)和假四糖抑制因子阿卡波糖及 D-葡萄糖-二氢阿卡波糖(Aleshin 等(1996), 生物化学 35, 8319-8328)的复合物的晶体结构进一步与分别作为全酸和全碱的谷氨酸 179 和 400 相符合。已利用蛋白工程对这些残基在催化中的关键作用进行了研究(Sierks 等(1990), 蛋白质工程(Protein Engng.)3, 193-198; Frandsen 等(1994), 生物化学, 33, 13808-13816)。在葡糖淀粉酶复合物结构中强调了在四个糖基残基结合亚点, -1, +1, +2, 和+3 处葡糖淀粉酶-糖的相互作用, 利用定点诱变突变体结合动力学分析广泛地调查对结合和催化作用重要的残基(Sierks 等(1989), 蛋白质工程, 2, 621-625; Sierks 等(1990), 蛋白质工程, 3, 193-198; Berland 等(1995), 生物化学, 34, 10153-10161; Frandsen 等(1995), 生物化学, 34, 10162-10169)。

黑曲霉葡糖淀粉酶中可以增强热稳定性的几种取代描述如下: i) 取代 α -螺旋甘氨酸: G137A 和 G139A(Chen 等(1996), 蛋白质工程, 9, 499-505); ii) 去除脆弱的 Asp-X 肽键, D257E 和 D293E/Q(Chen 等(1995), 蛋白质工程, 8, 575-582); 阻止在 N182 的脱氨基作用(Chen 等(1994), 生物化学杂志, 301, 275-281); iv) 通过工程化方法添加二硫键, A246C(Fierobe 等(1996), 生物化学, 35, 8698-8704; 和 v) 在 A435 和 S436 中引入 Pro 残基(Li 等(1997), 蛋白质工程, 10, 1199-1204)。此外, Clark Ford 于 1997 年 10 月 17 日发表的论文, 酶工程 14, 北京/中国 10 月 12-17 日, 1997, 文摘号码: 文摘第 0-61 页。此文摘提出在泡盛曲霉葡糖淀粉酶位置 G137A, N20C/A27C, 和 S30P(未公开))进行突变以改进其热稳定性。

有关葡糖淀粉酶的有关信息可在国际互联网主页(<http://www.public.iastate.edu/~pedro/glase/glase.html>)上由 Pedro M.Coutinho 负责的“葡糖淀粉酶 WWW 网页”(最后一次更新 97/10/08)披露了有关葡糖淀粉酶的信息, 其中包括得自曲霉属菌株的葡糖淀粉酶。列出了在黑曲霉葡糖淀粉酶中的化学修饰和定点修饰。

发明简述

本发明的目的是提供适用于，例如淀粉转化过程中的糖化步骤的葡糖淀粉酶变体。

术语“热稳定的葡糖淀粉酶变体”在本发明中指与相应的亲本葡糖淀粉酶相比有较高 $T_{1/2}$ (半衰期)的葡糖淀粉酶变体。在下面的“材料和方法”部分描述了 $T_{1/2}$ 的测定(方法 I 和方法 II)。

术语“比活提高的葡糖淀粉酶变体”在本发明中指提高了对所述糖分子中 α -1,4 键的比活。比活测定为 k_{cat} 或 AGU/mg(按下文“材料和方法”部分所述测定)。提高比活意味着 k_{cat} 或 AGU/mg 值分别相对于相应地亲本葡糖淀粉酶有了提高。

本发明人提供了亲本葡糖淀粉酶的几种改进了热稳定性和/或提高了比活的变体。热稳定性的改进可通过突变，例如在亲本葡糖淀粉酶所选位置上的取代和/或缺失，插入来实现。下面有对此的详述。

命名法

在本说明书和权利要求书中，使用传统的一字母和三字母代码表示氨基酸残基。

为便于引用，本发明的 AMG 变体采用下述的命名法：

原氨基酸：位置：用于取代的氨基酸

根据该命名法，用天冬酰胺取代第 30 位的丙氨酸示为：Ala30Asn 或 A30N，在相同位置处缺失丙氨酸示为：Ala30*或 A30*，而插入另一个氨基酸残基，如赖氨酸示为：Ala30AlaLys 或 A30AK。缺失一段连续的氨基酸残基，如氨基酸残基 30-33 示为(30-33)*或 Δ (A30-N33)。

当特定的 AMG 相对于其它 AMG 而言含有“缺失”，并在该位置插入某个氨基酸，例如在第 36 位插入天冬氨酸时，示为*36Asp 或*36D。

多个突变由加号隔开，即：Ala30Asp+Glu34Ser 或 A30N+E34S 表示分别将第 30 和 34 位的丙氨酸和谷氨酸用天冬酰胺和丝氨酸取代。多个突变也可以如下隔开，其意义与加号相同：Ala30Asp /Glu34Ser 或 A30N/E34S。

当在给定的位置插入一个或多个其它氨基酸残基时，示为 A30N, E 或 A30N/E 或 A30N 或 A30E。

另外,当本文鉴定出适于修饰的位置,而没有暗示任何具体的修饰时,应理解为可用任一氨基酸残基取代该位置存在的氨基酸残基。因此,例如,当提到修饰第30位的丙氨酸,但未具体说明时,应理解为丙氨酸可缺失,或用任一其它氨基酸,即下列任一氨基酸所取代: R, N, D, A, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V。

本发明还涉及:

1. 亲本葡糖淀粉酶的变体,其包含在下列一或多个位置的改变: 59, 66, 72, 119, 189, 223, 227, 313, 340, 342, 352, 379, 386, 393, 395, 402, 408, 416, 425, 427, 444, 486, 490, 494,

其中(a)所述每一改变是

- (i)在占据此位置的氨基酸下游插入氨基酸,
- (ii)占据此位置的氨基酸的缺失,或
- (iii)占据此位置的氨基酸用另一氨基酸取代,

(b)所述变体具有葡糖淀粉酶活性且(c)每一位置对应于具有 SEQ ID NO:2 之氨基酸序列的亲本葡糖淀粉酶氨基酸序列的位置。

2. 亲本葡糖淀粉酶的变体,其包含下列的一或多个改变: V59A, L66V/R, T72I, S119P, I189T, Y223F, F227Y, N313G, S340G, K352R, S356G, T379A, S386K, N, R, P, A393R, S395R, Y402F, E408R, T416A, R, D, N, C, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, E, W, Y, V, 优选 T416H, A425T, N427S/M, S444G, S486G, T490A, T494P/A, 其中(a)所述变体具有葡糖淀粉酶活性且(b)每一位置对应于具有 SEQ ID NO:2 之氨基酸序列的亲本葡糖淀粉酶氨基酸序列的位置。

3. 项1或2的变体,其中亲本葡糖淀粉酶具有与 SEQ ID NO:2 之氨基酸序列同一性至少约65%,优选至少约70%,更优选至少约80%,更优选至少约90%,最优选至少约95%,还最优选至少约97%的氨基酸序列。

4. 项1-3的变体,其中的亲本葡糖淀粉酶为能在极低严谨条件下与 SEQ ID NO: 1 的核酸序列或互补链杂交的核苷酸序列编码。

5. 项1-4任一项的变体,其中亲本葡糖淀粉酶从曲霉属得到,特别是黑曲霉,或踝节菌属,特别是 *Talaromyces emersonii*。

6. 项1-5任一项的变体,其中亲本葡糖淀粉酶是从黑曲霉得到的黑曲霉 G1 或 G2 葡糖淀粉酶。

7. 项 1-6 任一项的变体, 其中的改变是取代。
8. 项 1-7 任一项的变体, 其中的改变是插入。
9. 项 1-8 任一项的变体, 其中的改变是缺失。
10. 项 1-9 任一项的变体, 其中的变体相对于亲本葡糖淀粉酶具有改进的热稳定性。
11. 项 1-10 任一项的变体, 其中的变体相对于亲本葡糖淀粉酶具有提高的比活。
12. 含有编码项 1-11 任一项的葡糖淀粉酶变体的 DNA 序列的 DNA 构建体。
13. 带有项 12 的 DNA 构建体的重组表达载体。
14. 用项 12 的 DNA 构建体或项 13 的载体转化的细胞。
15. 项 14 的细胞, 它是微生物, 特别是细菌或真菌。
16. 项 18 的细胞, 它是曲霉属菌株, 特别是黑曲霉菌株。
17. 项 17-19 的细胞, 它是踝节菌属菌株, 特别是 *Talaromyces emersonii* 的菌株。
18. 将淀粉或部分水解的淀粉转化为含葡萄糖的糖浆的方法, 该方法包括在项 1-11 任一项的葡糖淀粉酶变体存在下糖化淀粉水解产物的步骤。
19. 项 18 的方法, 其中葡糖淀粉酶变体的用量范围为 0.05-0.5 AGU/g 干物质。
20. 项 18 或 19 的方法, 其中包含至少 30% 干重的淀粉水解产物的糖化。
21. 项 18-20 任一项的方法, 其中在选自支链淀粉酶和异淀粉酶组的脱支酶的存在下进行糖化, 所述脱支酶优选得自 *Bacillus acidopullulyticus* 或 *Bacillus deramificans* 的支链淀粉酶或得自淀粉皮假单胞菌的异淀粉酶。
22. 项 18-21 任一项的方法, 其中糖化条件为: pH3-5.5, 温度 60-80℃, 优选 63-75℃, 进行 24-72 小时, 优选在 pH4-4.5 进行 36-48 小时。
23. 项 1-11 任一项的葡糖淀粉酶变体在淀粉转化过程中的应用。
24. 项 1-11 任一项的葡糖淀粉酶变体在连续淀粉转化过程中的应用。
25. 项 1-11 任一项的葡糖淀粉酶变体在生产寡糖过程中的应用。

26. 项 1-11 任一项的葡糖淀粉酶变体在生产麦芽糖糊精或葡萄糖糖浆过程中的应用。

27. 项 1-11 任一项的葡糖淀粉酶变体在生产燃用或食用醇类过程中的应用。

28. 项 1-11 任一项的葡糖淀粉酶变体在生产饮料中的应用。

29. 项 1-11 任一项的葡糖淀粉酶变体在生产有机化合物，例如柠檬酸，抗坏血酸，赖氨酸，谷氨酸的发酵过程中的应用。

30. 通过将项 1-11 中设定的一或多个位置改变从而改进亲本葡糖淀粉酶热稳定性和/或比活的方法。

附图简述

图 1 表示了含有黑曲霉 G1 葡糖淀粉酶基因的质粒 pCAMG91。

发明详述

本发明旨在改进特定葡糖淀粉酶的热稳定性和/或提高其比活，所述酶得自真菌生物，特别是黑曲霉属的菌株这些酶本身已根据它们在诸如淀粉转化或乙醇发酵中的适当性质进行了筛选。

本发明人从中惊奇地发现通过修饰亲本葡糖淀粉酶的氨基酸序列上的一或多个氨基酸残基确实有可能改进亲本葡糖淀粉酶热稳定性和/或提高比活。本发明就是基于此发现。

因此，本发明的第一个方面涉及亲本葡糖淀粉酶在下述位置包含一或多个突变的变体。

亲本葡糖淀粉酶

本发明考虑的亲本葡糖淀粉酶包括野生型葡糖淀粉酶，真菌葡糖淀粉酶，特别是得自曲霉属菌株，如黑曲霉或泡盛曲霉的真菌葡糖淀粉酶及其变体或突变体，同源葡糖淀粉酶，和其它与 SEQ ID NO: 2 结构和/或功能相似的葡糖淀粉酶。特别予以考虑的是公开于 Boel 等(1984)，“从两个不同但密切相关的 mRNAs 合成的黑曲霉葡糖淀粉酶 G1 和 G2” EMBO J. 3(5)，p.1097-1102 中的黑曲霉葡糖淀粉酶 G1 和 G2。G2 葡糖淀粉酶公开为 SEQ ID

NO: 2。在另一实施方案中, AMG 骨架得自踝节菌属, 特别是公开于 WO 99/28448 的 *Temersonii* (参见 WO 99/28448 的 SEQ ID NO: 7)。

市售亲本葡糖淀粉酶

考虑的市售亲本葡糖淀粉酶包括 Novo Nordisk 的 AMG, 以及 Genencor, Inc. USA 和 Gist-Brocades, Delft, The Netherlands 的葡糖淀粉酶。

本发明的葡糖淀粉酶变体

在第一个方面, 本发明涉及亲本葡糖淀粉酶的变体, 其包括在下列一或多个位置的改变: 59, 66, 72, 119, 189, 223, 227, 313, 340, 342, 352, 379, 386, 393, 395, 402, 408, 416, 425, 427, 444, 486, 490, 494,

其中(a)所述每一改变是

(i)在占据此位置的氨基酸下游插入氨基酸,

(ii)占据此位置的氨基酸的缺失, 或

(iii)占据此位置的氨基酸用另一氨基酸取代,

(b)所述变体具有亲本葡糖淀粉酶活性且(c)每一位置对应于具有 SEQ ID NO:2 之氨基酸序列的亲本葡糖淀粉酶氨基酸序列的位置。

此外, 本发明涉及这样一种葡糖淀粉酶变体, 其亲本葡糖淀粉酶具有与 SEQ ID NO:2 之氨基酸序列至少约 65%, 优选至少约 70%, 更优选至少约 80%, 更优选至少约 90%, 最优选至少约 95%, 还最优选至少约 97%同一性的氨基酸序列。

本发明还涉及亲本葡糖淀粉酶的下述变体, 其包含一或多个下列改变: V59A, L66V/R, T72I, S119P, I189T, Y223F, F227Y, N313G, S340G, E342A, R, D, N, C, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V, 优选 E342T, K352R, S356G, T379A, S386K, N, R, P, A393R, S395R, Y402F, E408R, T416A, R, D, N, C, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, E, W, Y, V, 优选 T416H, A425T, N427S/M, S444G, S486G, T490A, T494P/A, 其中(a)所述变体具有葡糖淀粉酶活性且(b)每一位置对应于具有 SEQ ID NO:2 之氨基酸序列的亲本葡糖淀粉酶的氨基酸序列中位置。

特定的突变组合包括:

L66R+Y402F+N427S+S486G+A1V; N427M+S44G+V470M+T2K+S30P;
T416H+Y402F+312Q+S119P; A425T+E408R+E386K+A495T;
T379A+T2E+S386K+A393R; S386N+E408R; L66V+T2R+S394P+Y402F+RL;
S386R+T2R+A393R; I189T+Y223F+F227Y+S119P+Y402F;
S386P+S340G+D357S+T360V; V59A+S119P; V59A+N313G; V59A+A393R;
V59A+Y402F; V59A+E408R; V59A+S119P+N313G; V59A+N313G+A393R;
V59A+A393R+Y402F; V59A+Y402F+E408R; V59A+S119P+N313G+A393R;
V59A+N313G+A393R+Y402F; V59A+A393R+Y402F+E408R;
V59A+S119P+N313G+A393R+Y402F; V59A+N313G+A393R+Y402F+E408R;
V59A+S119P+L66R; V59A+S119P+S340G; V59A+S119P+S395R;
V59A+S119P+L66R+S340G; V59A+S119P+S340G+S395R;
V59A+S119P+S395R+L66R; V59A+S119P+S395R+L66R+S340G;
V59A+N313G+L66R; V59A+N313G+S340G; V59A+N313G+S395R;
V59A+N313G+L66R+S340G; V59A+N313G+S340G+S395R;
V59A+N313G+S395R+L66R; V59A+N313G+S395R+L66R+S340G;
V59A+A393R+L66R; V59A+A393R+S340G; V59A+A393R+S395R;

V59A+A393R+L66R+S340G; V59A+A393R+S340G+S395R;
 V59A+A393R+S395R+L66R+S340G; V59A+Y402F+L66R;
 V59A+Y402F+S340G; V59A+Y402F+S395R; V59A+Y402F+L66R+S395R;
 V59A+Y402F+L66R+S340G;
 V59A+Y402F+L66R+S395R+S340G; V59A+E408R+L66R;
 V59A+E408R+S395R; V59A+E408R+S340G; V59A+E408R+S395R+S340G;
 V59A+E408R+L66R+S340G; V59A+E408R+L66R+S395R;
 V59A+E408R+L66R+S395R+S340G; V59A+S119P+N313G+L66R;
 V59A+S119P+N313G+L66R+S340G; V59A+S119P+N313G+L66R+S395R;
 V59A+S119P+N313G+L66R+S395R+S340G; V59A+N313G+A393R+ L66R;
 V59A+N313G+A393R+ L66R+S395R; V59A+N313G+A393R+ L66R+S340G;
 V59A+N313G+A393R+ L66R+S340G+S395R; V59A+A393R+Y402F;
 V59A+Y402F+E408R; V59A+S119P+N313G+A393R;
 V59A+N313G+A393R+Y402F; V59A+A393R+Y402F+E408R;
 V59A+S119P+N313G+A393R+Y402F;
 V59A+N313G+A393R+Y402F+E408R;
 S119P+N313G; N313G+A393R; A393R+Y402F; Y402F+E408R;
 S119P+N313G+A393R; N313G+A393R+Y402F; A393R+Y402F+E408R;
 V59A+S119P+N313G+A393R+Y402F; N313G+A393R+Y402F+E408R;
 S119P+L66R; V59A+S119P+S340G; S119P+S395R; S119P+L66R+S340G;
 S119P+S340G+S395R; S119P+S395R+L66R; S119P+S395R+L66R+S340G;
 N313G+L66R; N313G+S340G; N313G+S395R; N313G+L66R+S340G;
 N313G+S340G+S395R; N313G+S395R+L66R; N313G+S395R+L66R+S340G;
 A393R+L66R; A393R+S340G; A393R+S395R; A393R+L66R+S340G;
 A393R+S340G+S395R; A393R+S395R+L66R+S340G; Y402F+L66R;
 Y402F+S340G; Y402F+S395R; Y402F+L66R+S395R; Y402F+L66R+S340G;
 Y402F+L66R+S395R+S340G; E408R+L66R; E408R+S395R; E408R+S340G;
 E408R+S395R+S340G; E408R+L66R+S340G; E408R+L66R+S395R;
 E408R+L66R+S395R+S340G; S119P+N313G+L66R;
 S119P+N313G+L66R+S340G; S119P+N313G+L66R+S395R;
 S119P+N313G+L66R+S395R+S340G; N313G+A393R+L66R;
 N313G+A393R+L66R+S395R; N313G+A393R+ L66R+S340G; N313G+A393R+
 L66R+S340G+S395R; A393R+Y402F; Y402F+E408R;
 V59A+S119P+N313G+A393R; N313G+A393R+Y402F; A393R+Y402F+E408R;
 S119P+N313G+A393R+Y402F; N313G+A393R+Y402F+E408R.
 V59A+S119P+S340G; S119P+S395R; S119P+S340G; S119P+S340G+S395R;
 S119P+S395R; S119P+S395R+S340G; N313G+S340G; N313P+S395R;

N313G+S340G; N313G+S395R; N313G+S395R+S340G; A393R+S340G;
A393R+S395R+S340G; Y402F+S395R; Y402F+S340G;
Y402F+S395R+S340G; E408R+S340G; E408R+S395R;
E408R+S395R+S340G; S119P+N313G; S119P+N313G+S340G;
S119P+N313G+S395R; S119P+N313G+S395R+S340G; N313G+A393R;
N313G+A393R+S395R; N313G+A393R+S340G; N313G+A393R+
S340G+S395R;
N313G+A393R; V59A+N313G+A393R+Y402F; V59A+S340G; L66R+S340G;
S340G+S395R; S395R+L66R; S395R+L66R+S340G; N313G+L66R;
N313G+L66R+S340G; N313G+L66R+S395R; N313G+L66R+S395R+S340G;
V59A+N313G+A393R; N313G+A393R+Y402F;
S119P+A393R; A393R+Y402F; V59A+S119P+A393R+Y402F;
A393R+Y402F+E408R; S119P+S395R+L66R+S340G; L66R+S340G;
S340G+S395R; S395R+L66R; S395R+L66R+S340G; S119P+L66R;
S119P+L66R+S340G; S119P+L66R+S395R; S119P+L66R+S395R+S340G;
A393R+ L66R; A393R+L66R+S395R; A393R+ L66R+S340G; A393R+
L66R+S340G+S395R; V59A+S119P+A393R; A393R+Y402F;
S119P+A393R+Y402F; A393R+Y402F+E408R;
S119P+N313G; N313G+Y402F; Y402F+E408R; V59A+S119P+N313G+Y402F;
N313G+Y402F+E408R; L66R+S340G; S340G+S395R; S395R+L66R+S340G;
N313G+L66R; N313G+L66R+S395R; N313G+L66R+S340G;
N313G+L66R+S340G+S395R;
V59A+S119P+N313G; N313G+Y402F; Y402F+E408R; S119P+N313G+Y402F;
N313G+Y402F+E408R.
S119P+S340G; S119P+L66R; S119P+L66R+S340G; N313G+S340G;
N313G+L66R; N313G+L66R+S340G; A393R+S340G; A393R+L66R+S340G;
Y402F+L66R; Y402F+L66R+S340G; Y402F+L66R+S340G; E408R+S340G;
E408R+L66R; E408R+L66R+S340G;
S119P+N313G+L66R; S119P+N313G+L66R+S340G; N313G+A393R+L66R;
N313G+A393R+ L66R+S340G;
N313G+A393R; A393R+E408R; V59A+S119P+N313G+A393R;
N313G+A393R+E408R;
L66R+S395R; L66R+S340G; L66R+S395R+S340G; N313G+A393R;
A393R+E408R; S119P+N313G+A393R; N313G+A393R+E408R.
A393R+Y402F; N313G+A393R+Y402F; S395R+S340G; L66R+S340G;
L66R+S395R; L66R+S395R+S340G; A393R+Y402F; N313G+A393R+Y402F.
S119P+L66R; V59A+S119P; S119P+S395R; S119P+L66R; S119P+S395R;

S119P+S395R+L66R; N313G+L66R; N313G+S395R; N313G+S395R+L66R;
 A393R+L66R; A393R+S395R; A393R+S395R+L66R; Y402F+L66R;
 Y402F+L66R+S395R; E408R+S395R; E408R+L66R; E408R+L66R+S395R;
 S119P+N313G+L66R; S119P+N313G+L66R+S395R; N313G+A393R+L66R;
 N313G+A393R+L66R+S395R;
 N9A+S56A+V59A+S119P+A246T+N313G+E342T+A393R+S394R+Y402F+E408R;
 S56A+V59A+S119P+A246T+N313G+E342T+A393R+S394R+Y402F+E408R;
 V59A+S119P+A246T+N313G+E342T+A393R+S394R+Y402F+E408R;
 S119P+A246T+N313G+E342T+A393R+S394R+Y402F+E408R;
 A246T+N313G+E342T+A393R+S394R+Y402F+E408R;
 N313G+E342T+A393R+S394R+Y402F+E408R;
 E342T+A393R+S394R+Y402F+E408R;
 A393R+S394R+Y402F+E408R; S394R+Y402F+E408R; Y402F+E408R;
 V59A+L66R+T72I+S119P+N313G+S340G+S356G+A393R+Y402F+E408R+N427M
 ;
 L66R+T72I+S119P+N313G+S340G+S356G+A393R+Y402F+E408R+N427M;
 T72I+S119P+N313G+S340G+S356G+A393R+Y402F+E408R+N427M;
 S119P+N313G+S340G+S356G+A393R+Y402F+E408R+N427M;
 N313G+S340G+S356G+A393R+Y402F+E408R+N427M;
 S340G+S356G+A393R+Y402F+E408R+N427M;
 S356G+A393R+Y402F+E408R+N427M; A393R+Y402F+E408R+N427M;
 Y402F+E408R+N427M; E408R+N427M;
 I189T+Y223F+F227Y+S119P+Y402F; Y223F+F227Y+S119P+Y402F;
 F227Y+S119P+Y402F; S119P+Y402F; I189T+Y223F+F227Y+Y402F;
 I189T+Y223F+F227Y; I189T+Y223F; I189T+F227Y; I189T+F227Y+S119P;
 I189T+F227Y+Y402F; Y223F+F227Y+Y402F; Y223F+F227Y+S119P.

本发明还涉及这样一种葡糖淀粉酶变体，其亲本酶由在中度，优选在高度严谨条件下与 SEQ ID NO: 1 的核酸序列或其互补链杂交的核酸序列编码。

改进的热稳定性

在另一方面，本发明涉及亲本葡糖淀粉酶改进了热稳定性的变体，具体是在 40-80℃，优选 63-75℃，具体在 pH 4-5，使用麦芽糖糊精为底物时改进了热稳定性，所述变体在表示为 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的下列位置含有一或多个突变：59，66，72，119，189，223，227，313，340，342，352，379，386，393，395，402，408，416，425，427，444，486，490，494，或是与 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列有至少 60%同源性的葡糖淀粉酶中相应位置。

可改进热稳定性的特定取代包括: V59A, L66V/R, T72I, S119P, I189T, Y223F, F227Y, N313G, S340G, E342A, R, D, N, C, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V, 优选 E342T, K352R, S356G, T379A, S386K, N, R, P, A393R, S395R, Y402F, E408R, T416A, R, D, N, C, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, E, W, Y, V, 优选 T416H, A425T, N427S/M, S444G, S486G, T490A, T494P/A。

具体的突变组合包括:

E408R+A425T+S465P+T494A,
A425T+E408R+S386K+A495T,
T379A+T2E+S386K+A393R,
S386N+E408R,
L66V+T2R+S394P+Y402F+RL (N-末端延伸)
S386R+T2R+A393R.
N427S+S486G+A1V+L66R+Y402F,
N427M+S44G+V470M+T2K+S30P,
T490A+V59A++A393R+PLASD (N-末端延伸)

在“本发明葡糖淀粉酶变体”部分列出的所有变体都被认为具有改进的热稳定性。实施例 2 和 4 中显示了本发明所选变体的这方面。

提高的比活

在另一方面, 本发明涉及亲本葡糖淀粉酶比活已提高的变体, 所述变体在表示为 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的下列位置含有一或多个突变: 59, 66, 72, 119, 189, 223, 227, 313, 340, 342, 352, 379, 386, 393, 395, 402, 408, 416, 425, 427, 444, 486, 490, 494, 优选 189, 223, 227 或与 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列有至少 60%同源性的葡糖淀粉酶中相应位置。

可提高比活的具体突变包括: V59A, L66V/R, T72I, S119P, I189T, Y223F, F227Y, N313G, S340G, K352R, S356G, T379A, S386K, N, R, P, A393R, S395R, Y402F, E408R, T416A, R, D, N, C, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, E, W, Y, V 优选 T416H, A425T, N427S/M, S444G, S486G, T490A, T494P/A, 优选 I189T, Y223F, F227Y。

具体的突变组合包括:

I189T+Y223F+F227Y+S119P+Y402F;
Y223F+F227Y+S119P+Y402F; F227Y+S119P+Y402F; S119P+Y402F;
I189T+Y223F+F227Y+Y402F; I189T+Y223F+F227Y; I189T+Y223F;
I189T+F227Y; I189T+F227Y+S119P; I189T+F227Y+Y402F;
Y223F+F227Y+Y402F; Y223F+F227Y+S119P.

在“本发明葡糖淀粉酶变体”部分列出的所有变体都被认为具有已提高的比活。实施例3中显示了本发明所选变体的这方面。

同源性(同一性)

针对上述亲本葡糖淀粉酶的同源性测定为两个蛋白序列之间可指示其中第一个序列衍生自第二个序列的同一性程度。此同源性适于由本领域所熟知的计算机程序测定,如GCG软件包提供的GAP(Wisconsin软件包程序手册,第8版,1994.8,遗传学计算机组,575 Science Drive, Madison, Wisconsin, 美国53711)(Needleman, S. B. Wunsch, C.D., (1970), 分子生物学杂志(Journal of Molecular Biology, 48, p.443-453)). 采用下列设置以GAP进行多肽序列的比对: GAP产生得分为3.0, GAP延伸得分为0.1, 本发明中DNA类似序列编码的多肽的成熟部分显示出与SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的成熟部分优选至少80%, 至少90%, 更优选至少95%, 更优选至少97%, 最优选至少99%的同一性。

在一个实施方案中, 亲本葡糖淀粉酶是黑曲霉G1葡糖淀粉酶(Boel等(1984), EMBO J. 3(5), p.1097-1102(SEQ ID NO:13)。亲本葡糖淀粉酶可以是截短的葡糖淀粉酶, 例如, 黑曲霉G2葡糖淀粉酶(SEQ ID NO:2)。

优选地, 亲本葡糖淀粉酶包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列; 或其等位基因变体; 或其具有葡糖淀粉酶活性的片段。

SEQ ID NO:2的片段是在此氨基酸序列的氨基和/或羧基末端具有一或多个氨基酸缺失的多肽。例如, AMG G2(SEQ ID NO:2)是黑曲霉G1葡糖淀粉酶(Boel等(1984) EMBO J. 3(5), p.1097-1102)的具有葡糖淀粉酶活性的片段。等位基因变体表示占据同一染色体位点的一个基因的两或多个替代形式中的任一种。等位基因变异通过突变自然产生, 可能会产生种群内的多态现象。基因突变可以是沉默的(编码的多肽没有改变)或可以编码氨基酸序列已改变的多肽。多肽的等位基因变体是被基因的等位基因变体编码的多肽。

通过一或多个氨基酸残基的插入或缺失和/或一或多个氨基酸残基被不同氨基酸残基取代，同源的亲本葡糖淀粉酶的氨基酸序列可能与 SEQ ID NO:2 氨基酸序列不同。优选地，氨基酸改变为较小的性质改变，即并不显著影响蛋白质折叠和/或活性的保守氨基酸的取代；小的缺失，通常为 1 到约 30 个氨基酸的缺失；小的氨基-或羧基-末端延伸，如氨基酸末端蛋氨酸残基；最多 20-25 个残基的小接头肽；或通过改变净电荷或另一基团以利于纯化的小的延伸，如多组氨酸段，抗原表位或结合域。

在另一实施方案中，分离的亲本葡糖淀粉酶活性被在极低度严谨，优选低度严谨，更优选中度严谨，更优选中高度严谨，进而更优选高度严谨，最优选极高度严谨条件下与核苷酸探针杂交的核酸编码，所述探针在同样的条件下与(i) SEQ ID NO:1 的核酸序列，(ii) SEQ ID NO:1 的 cDNA 序列，(iii) (i)或(ii)的亚序列，或(iv) (i)，(ii) 或(iii)的互补链杂交(J. Sambrook, E. F. Fritsch, 和 T.Maniatus, 1989, 分子克隆，实验室手册，第二版，冷泉港，纽约)。SEQ ID NO:1 的亚序列是至少 100 个核苷酸或优选至少 200 个核苷酸。而且，亚序列可以编码具有葡糖淀粉酶活性的多肽片段。亲本多肽也可以是具有葡糖淀粉酶活性的多肽的等位基因变体或片段。

可采用 SEQ ID NO:1 的核酸序列或其亚序列，以及 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列或其片段设计核酸探针，以便按照本领域熟知的方法从不同属或种的菌株鉴定和克隆编码具有葡糖淀粉酶活性的多肽的 DNA。具体地，这样的探针可用于经标准的 Southern 印迹方法与目的属或种的基因组 DNA 或 cDNA 杂交，以便鉴定并分离本文中相应基因。所述探针可以比完整序列短很多，但长度至少为 15，优选至少 25，和更优选至少 35 个核苷酸。也可以使用更长的探针。DNA 和 RNA 探针都可使用。通常标记探针以便检测相应基因(例如，用 ^{32}P 、 ^3H 、 ^{35}S 、生物素或抗生物素蛋白标记)。这些探针均包括在本发明中。

因此，可在从所述其他生物制备的基因组 DNA 或 cDNA 文库中筛选与上述探针杂交并编码具有葡糖淀粉酶活性之多肽的 DNA。通过琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳或其它分离技术可分离来自所述其他生物的基因组或其他 DNA。可将来自所述文库的 DNA 或分离的 DNA 转移至并固定在硝酸纤维素或其他适宜的载体材料上。为了鉴定与 SEQ ID NO: 1 或其亚序列同源的克隆或 DNA，在 Southern 印迹中使用该载体材料。为了达到本发明的目

的，杂交指在极低至极高严谨条件下，核酸序列与对应于 SEQ ID NO: 1 或其互补链或其亚序列的核酸序列杂交。用 X 射线胶片检测在这些条件下与所述核酸探针杂交的分子。

对于至少 100 个核苷酸的长探针，用 2 xSSC，0.2% SDS 优选至少在 45°C(极低严谨度)，更优选 50°C(低严谨度)，更优选 55°C(中等严谨度)，更优选至少 60°C(中等偏高严谨度)，更优选至少 65°C(高严谨度)，最优选至少 70°C(极高严谨度)将载体材料最后洗涤 3 次，每次 15 分钟。

对于约 15 个核苷酸至约 70 个核苷酸的短探针，将严谨度定义为在 0.9 M NaCl，0.09 M Tris-HCl pH7.6，6mM EDTA，0.5% NP-40，1 X Denhardt's 溶液，1 mM 焦磷酸钠，1 mM 磷酸氢二钠，0.1mM ATP 和 0.2 mg/ml 酵母 RNA 中，在相对于按照 Bolton 和 McCarthy(1962，美国国家科学院进展 (Proceedings of The National Academy of Sciences USA) 48:1390)计算方法计算的 T_m 低 5°C 至 10°C 的温度下，根据标准 Southern 印迹方法，进行预杂交、杂交和杂交后洗涤。

对于约 15 个核苷酸至约 70 个核苷酸的短探针，在比所计算的 T_m 低 5°C-10°C 的温度下，将载体材料用 6 X SSC 加 0.1% SDS 洗涤一次，15 分钟，用 6 X SSC 洗涤两次，每次 15 分钟。

本发明还涉及分离的核酸序列，其通过(a)在极低，低，中，中高，高，或极高严谨度下与 SEQ ID NO:1 或其互补链，或其亚序列杂交；和(b)分离所述核酸序列而产生。亚序列优选至少 100 个核苷酸的序列，如编码具有葡糖淀粉酶活性的多肽片段的序列。

所涉及的亲本葡糖淀粉酶具有 SEQ ID NO: 2 的成熟葡糖淀粉酶的葡糖淀粉酶活性的至少 20%，优选至少 40%，更优选 60%，更优选 80%，更优选 90%，最优选 100%。

克隆能编码亲本葡糖淀粉酶的 DNA 序列

用本领域熟知的各种方法，从生产所述葡糖淀粉酶的任何细胞或微生物中可分离编码亲本葡糖淀粉酶的 DNA 序列。首先应用来自产所述葡糖淀粉酶的生物体的染色体 DNA 或信使 RNA 构建基因组 DNA 和/或 cDNA 文库。然后，如果所述葡糖淀粉酶的氨基酸序列是已知的，则可合成标记的寡核苷酸探针并用于从制备自目标生物的基因组文库中鉴定编码葡糖淀粉酶的克隆。或者，可用含有与另一种已知葡糖淀粉酶基因同源之序列的标

记型寡核苷酸探针作为探针，利用极低到极高严谨度的杂交和洗涤条件鉴定编码葡糖淀粉酶的克隆。如上述。

用于鉴定葡糖淀粉酶编码克隆的另一种方法涉及将基因组 DNA 的片段插入表达载体，例如质粒中，用所得基因组 DNA 文库转化葡糖淀粉酶阴性细菌，然后将转化的细菌铺板在含葡糖淀粉酶底物(即麦芽糖)的琼脂上，由此鉴定表达葡糖淀粉酶的克隆。

或者，通过现有标准方法，例如 S.L. Beaucage 和 M.H. Caruthers 所述的亚磷酰胺法(1981), Tetrahedron Letters 22, p.1859-1869 或者 Matthes 等(1984), EMBO J. 3, p.801-805 所述的方法合成编码所述酶的 DNA 序列。在亚磷酰胺方法中，用例如自动 DNA 合成仪合成寡核苷酸，使其纯化、退火、连接，然后克隆到适宜的载体中。

最后，所述 DNA 序列可以是按照标准技术通过连接合成的、基因组的或 cDNA 来源的序列(根据需要，对应于完整 DNA 序列各部分的片段)而制备的基因组序列与合成序列的混合序列、合成序列与 cDNA 序列的混合序列或者基因组序列与 cDNA 的混合序列。还可通过聚合酶链反应(PCR)，用特异性引物，按 US4683202 或 R.K. Saiki 等(1988), 科学 239, 1988, pp.487-491 所述制备 DNA 序列。

定点诱变

分离了编码葡糖淀粉酶的 DNA 序列并鉴定了合乎要求的突变位点后，用合成的寡核苷酸导入突变。这些寡核苷酸含有位于所需突变位点侧的核苷酸序列；在寡核苷酸合成的过程中插入突变核苷酸。在具体的方法中，在携带葡糖淀粉酶基因的载体中产生单链 DNA 缺口，编码葡糖淀粉酶的序列。然后，将携带所需突变的合成核苷酸与单链 DNA 的同源部分退火。用 DNA 聚合酶 I(Klenow 片段)填平剩余缺口，用 T4 连接酶连接构建体。Morinaga 等(1984), 生物技术 2, p.646-639 描述了该方法的具体实施例。US4760025 公开了通过对表达盒进行微小改变来导入编码多个突变的寡核苷酸。但是，通过 Morinaga 方法可以在任何时间导入更多种的突变，因为可以导入不同长度的众多寡核苷酸。

Nelson 和 Long(1989), 分析生物化学(Analytical Biochemistry)180, p.147-151 描述了另一种将突变导入编码葡糖淀粉酶的 DNA 序列的方法。该方法包括经 3 步产生 PCR 片段，该片段含有通过用化学合成的 DNA 链

作为 PCR 反应中的一个引物而导入的所需突变。通过用限制核酸内切酶裂解从 PCR-产生的片段中分离携带突变的 DNA 片段，然后再插入到表达质粒中。

此外，Sierks 等(1989)“在泡盛曲霉葡萄糖淀粉酶的活性位点 Trp120 的定点诱变”，蛋白质工程(Protein Eng.)，2，621-625；Sierks 等(1990)“通过在活性位点 Asp176，Glu179，Glu180 进行定点诱变来确定泡盛曲霉葡萄糖淀粉酶的催化机理” 蛋白质工程，32，193-198；还记述了曲霉属葡萄糖淀粉酶中的定点诱变。

定域随机诱变

随机诱变可有利地定域于所述亲代葡萄糖淀粉酶的一部分。例如，当酶的某些区域被鉴定为对酶的给定特性特别重要时，以及当预期修饰能导致具有改良特性的变体时，定域随机诱变较为有利。当亲代酶的三级结构已被阐明，且所述结构与酶的功能相关时，一般可鉴定出所述区域。

通过使用上述的 PCR 产生的诱变技术或本领域已知的任何其它适当的技术，可以方便地进行定域的或区域-特异性的随机诱变。或者，通过例如插入适当的载体来分离编码待修饰的 DNA 序列部分的 DNA 序列，随后可使用上述任何诱变方法对所述部分进行诱变。

提供本发明变体的备选方法包括基因改组，例如 WO 95/22625(来自 Affymax Technologies N.V.)或 WO 96/00343(来自 Novo Nordisk A/S)中所述。

葡萄糖淀粉酶变体的表达

根据本发明，可使用表达载体，以酶的形式表达通过上述方法，或通过本领域已知的任何其它方法产生的编码变体的 DNA 序列，所述表达载体一般包括编码启动子，操纵子，核糖体结合位点，翻译起始信号的控制序列，并任选包括阻抑基因或多种激活基因。

表达载体

带有编码本发明葡萄糖淀粉酶变体 DNA 序列的重组表达载体是任何可以方便地进行重组 DNA 方法的载体，载体的选择取决于将被引入的宿主细胞。载体可以是，当被引入宿主细胞时可整合进宿主细胞基因组并与其所整合进的染色体一起复制的那些。合适的表达载体例子包括 pMT838。

启动子

载体中，DNA 序列应该可操作连接适合的启动子序列。启动子可以是在所选宿主细胞中表现出转录活性的任何 DNA 序列，可以从编码对宿主细胞同源或异源的蛋白的基因获得。

引导编码本发明葡糖淀粉酶变体的 DNA 序列转录，特别是在细菌宿主中，转录的适合的启动子是例如，大肠杆菌 *lac* 操纵子，天蓝色链霉菌琼脂酶基因 *dagA*，地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶基因(*amyL*)、嗜热脂肪芽孢杆菌产麦芽淀粉酶基因(*amyM*)、解淀粉芽孢杆菌 α -淀粉酶基因(*amyQ*)、枯草芽孢杆菌 *xylA* 和 *xylB* 基因等的启动子。对于在真菌宿主中进行转录，可用的启动子的例子有来自米曲霉 TKA 淀粉酶基因，酿酒酵母 TPI(丙糖磷酸异构酶)(Alber 等(1982), J. Mol. Appl. Genet 1, p.419-434, 米赫根毛霉(*Rhizomucor miehei*)天冬氨酸蛋白酶，黑曲霉中性 α -淀粉酶，黑曲霉酸稳定的 α -淀粉酶，黑曲霉葡糖淀粉酶，米赫根毛霉脂肪酶，米曲霉碱性蛋白酶，米曲霉丙糖磷酸异构酶或构巢曲霉乙酰胺酶的启动子。

表达载体

本发明表达载体也含有适当的转录终止子，在真核生物中，还含有与编码本发明 α -淀粉酶变体的 DNA 序列可操作相连的聚-腺苷酸化序列。终止和聚腺苷酸化序列可适当地得自与启动子相同的来源。

载体可进一步含有能使载体在所述宿主细胞中复制的 DNA 序列。所述序列的例子是质粒 pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1 和 pIJ702 的复制起点。

载体也可含有选择标记，例如其产物可以补偿宿主细胞缺陷的基因，如枯草芽孢杆菌或地衣芽孢杆菌的 *dal* 基因，或能赋予抗生素抗性的基因，所述抗生素抗性如氨苄青霉素，卡那霉素，氯霉素或四环素抗性。另外，载体可含有曲霉属选择标记，如 *amdS*, *argB*, *niaD* 和 *sC*，产生潮霉素抗性的标记，或者可通过 WO 91/17243 中所述的共-转化来完成选择。

分别连接编码葡糖淀粉酶变体的本发明 DNA 构建体，启动子，终止子和其它元件，并将它们插入含有复制所需信息的适当载体的方法是本领域技术人员众所周知的(参见例如 Sambrook 等，分子克隆：实验室手册，第 2 版，冷泉港，1989)。

宿主细胞

含有本发明的上述 DNA 构建体或表达载体的本发明的细胞,在本发明葡萄糖淀粉酶变体的重组生产中作为宿主细胞较有利。可以方便地通过将本发明的 DNA 构建体整合进宿主染色体,从而用该 DNA 构建体转化该细胞。由于所述 DNA 序列更可能在细胞中保持稳定,此整合通常被认为是有利的。DNA 构建体整合进入宿主染色体可按照常规方法,例如,同源或异源重组来进行。备选地,可用上述与不同类型宿主细胞有关的表达载体转化细胞。

本发明的细胞可以是较高等生物的细胞,如哺乳动物或昆虫的细胞,但优选是微生物细胞,如细菌或真菌(包括酵母)的细胞。

适当细菌的例子如下:革兰氏阳性细菌,如枯草芽孢杆菌,地衣芽孢杆菌,迟缓芽孢杆菌,短芽孢杆菌,嗜热脂肪芽孢杆菌,嗜碱芽孢杆菌,解淀粉芽孢杆菌,凝结芽孢杆菌,环状芽孢杆菌,灿烂芽孢杆菌,巨大芽孢杆菌,苏云金芽孢杆菌,浅青紫链霉菌或鼠灰链霉菌;或革兰氏阴性细菌,如大肠杆菌。细菌的转化可以,例如,通过原生质体转化或使用感受态细胞以其本身已知的方式进行。

酵母优选选自糖酵母属或裂殖糖酵母属,例如酿酒酵母。

宿主细胞可以是丝状真菌,例如曲霉属某个种的菌株,最优选米曲霉或黑曲霉,或镰孢属菌株,如尖孢镰孢(*Fusarium oxysporium*),禾谷镰孢(完整状态即 *Gibberella zeae*,以前为 *Sphaeria zeae*,又名 *Gibberella roseum* 和 *Gibberella roseum* f.sp. *cerealis*),或疏色镰孢(完整状态即 *Gibberella puricaris*,又名三隔镰孢,杆孢状镰孢,接骨木镰孢,玫瑰色镰孢,玫瑰色镰孢的禾谷镰孢变种),*Fusarium cerealis*(又名 *Fusarium crookwellense*),或 *Fusarium venenatum*。

在本发明优选实施方案中宿主细胞是蛋白酶缺陷型菌株或蛋白酶阴性菌株。

例如碱性蛋白酶基因“alp”缺失的米曲霉 JaL125 就是蛋白酶缺陷型菌株。在 WO 97/35956 (Novo Nordisk),或欧洲专利 429,490 中有此菌株的描述。

丝状真菌细胞可通过涉及原生质体形成和原生质体转化及随后使细胞壁以其本身的方式再生的一种方法来转化。在 EP238023(Novo Nordisk A/S)中描述了用曲霉作宿主微生物,其内容在此引作参考。

生产葡萄糖淀粉酶变体的方法

在更进一步的方面，本发明涉及生产本发明葡糖淀粉酶变体的方法，该方法包括在利于生产变体并从细胞及/或培养液中回收该变体的条件下培养宿主细胞。

用于培养细胞的培养基可以是适于目的宿主细胞生长并表达本发明葡糖淀粉酶变体的任何常规培养基。可用的培养基可从销售商购得或按照已公开的配方(例如按美国典型培养物保藏中心的目录中所述)制备。

通过已熟知的方法从培养液中可以方便地回收宿主细胞分泌的葡糖淀粉酶变体，所述方法包括通过离心或过滤从培养液分离细胞，通过盐如硫酸铵沉淀培养基中的蛋白类成分，然后使用层析的方法，如离子交换层析，亲和层析，等。

淀粉转化

本发明提供一种利用本发明的葡糖淀粉酶变体从淀粉生产葡萄糖及类似物的方法。通常，该方法包括在 α -淀粉酶存在下部分水解前体淀粉，然后在葡糖淀粉酶存在下通过切割 α -(1 $\rightarrow$ 4)和 α -(1 $\rightarrow$ 6)糖苷键从淀粉或相关寡糖和多糖分子的非还原末端进一步水解释放 D-葡萄糖。

利用 α -淀粉酶进行的前体淀粉的部分水解使淀粉分子通过水解内部的 α -(1 $\rightarrow$ 4)键而初步分解。在商业应用中，利用 α -淀粉酶的初步水解在约 105 $^{\circ}$ C 下进行。所处理的淀粉浓度很高，通常 30%-40%固含量。在这种提高的温度下的初步水解一般进行 5 分钟。然后将部分水解的淀粉转移到第二个罐，85-90 $^{\circ}$ C 温育约 1 小时，得到 10-15 的葡萄糖当量值(D.E.)。

通常在一个单独的罐中，在降低至 30-60 $^{\circ}$ C 的温度下，在有葡糖淀粉酶时进一步水解从淀粉或相关寡糖和多糖分子的非还原末端释放出的 D-葡萄糖。该底物液体的温度优选降至 55-60 $^{\circ}$ C 之间。该溶液的 pH 值从 6-6.5 降至 3-5.5。优选 pH 为 4-4.5。将葡糖淀粉酶加入该溶液中，使反应进行 24-72 小时，优选 36-48 小时。

通过使用本发明的热稳定的葡糖淀粉酶变体可以在比传统分批糖化过程更高的温度下进行糖化过程。依照本发明，糖化可在 60-80 $^{\circ}$ C 以上进行，优选 63-75 $^{\circ}$ C。其既可用于传统分批方法(如上所述)也可用于连续糖化。

实际上，包括一或多步膜分离步骤，即过滤步骤的连续糖化过程必须在 60 $^{\circ}$ C 以上进行以保持一个合理的高膜通量。因此，本发明热稳定的葡糖

淀粉酶变体为在工业化糖化过程可接受的合理价格和时间内进行大规模连续糖化处理提供了可能。依照本发明甚至可以缩短糖化时间。

本发明葡糖淀粉酶变体(如 AMG 变体)的活性在 60-80℃比在传统采用的温度范围 30-60℃时通常要高很多。因此,当所述葡糖淀粉酶实施糖化过程时通过提高温度可以缩短时间。

此外,提高热稳定性改善了 $T^{1/2}$ (半衰期,如“材料和方法”部分所定义)。由于本发明葡糖淀粉酶变体改进了热稳定性,所以糖化过程中仅需要添加小量葡糖淀粉酶以替代已失活的酶。依照本发明,更多的葡糖淀粉酶在糖化过程中保持活性。此外,在 63℃以上进行糖化可以减少微生物污染的风险。

在 JP 3-224493; JP1-191693; JP62-272987; EP452,238 中记述了使用本发明葡糖淀粉酶变体进行糖化过程的实例。

在本发明方法中,本发明葡糖淀粉酶变体可与一种能水解至少有 4 个糖基的分子中的 α -(1→6)糖苷键的酶联合使用。优选地,本发明葡糖淀粉酶变体可与支链淀粉酶或异淀粉酶联合使用。在 G.M.A. van Beynum 等,淀粉转化技术, Marcel Dekker, New York, 1985, 101-142 中提出了支链淀粉酶和异淀粉酶的去支链应用,所述酶的分子性质,所述酶和葡糖淀粉酶的潜在用途。

本发明的又一方面涉及本发明葡糖淀粉酶变体在淀粉转化过程中的应用。

此外,本发明葡糖淀粉酶变体可用于包括连续糖化步骤的连续淀粉转化过程。

本发明葡糖淀粉酶变体也可以以固定化形式使用。这适于并经常用于生产麦芽糖糊精或葡萄糖浆,或特定的糖浆,如麦芽糖糖浆,还可用于与果糖浆生产有关的寡糖提余液(raffinate)流。

依照本发明,本发明的 AMG 变体也可用于生产醇类,例如燃用或食用醇类。US 5231017 记述了其中一个方法。

材料和方法

酶:

AMG G1: 公开在 Boel 等, (1984), EMBO J. 3(5), 1097-1102, (SEQ ID NO:13)中的黑曲霉葡萄糖淀粉酶 G1, 可从 Novo Nordisk 得到。

AMG G2: 截短的黑曲霉葡萄糖淀粉酶 G1, 表示为 SEQ ID NO: 2, 可从 Novo Nordisk 得到。

溶液:

缓冲液: 0.05M 乙酸钠(1L milli-Q-water 中 6.8g), pH4.5

终止液: 0.4M NaOH

GOD-perid, 124036, Boehringer Mannheim

底物:

麦芽糖: 29mM(100ml 50mM 乙酸钠中 1g 麦芽糖, pH4.5)(Sigma)

麦芽庚糖: 10mM, 115mg/10ml(Sigma)

宿主细胞:

米曲霉 JaL125: 米曲霉 IFO 4177, 可从发酵研究所, Osaka; 17-25 Juso Hammachi 2-Chome Yodogawa-ku, Osaka, 日本得到, 其采用米曲霉 pyrG 基因作标记, 并通过一步基因取代方法(G.May, “丝状真菌的应用分子遗传学 (Applied Molecular Genetics of Filamentous Fungi” (1982), p.1-25. Eds. J.R. Knghorn 和 G. Turner; Blackie Academic and Professional)使碱性蛋白酶基因 “alp” 缺失(Murakami K 等(1991), Agric. Biol. Chem. 55, p.2807-2811)。WO 97/35956(Novo Nordisk)中进一步公开了菌株 JaL125。

微生物:

菌株: 酿酒酵母 (*S.cerevisiae*) YNG318: MAT α leu2- Δ 2 ura3-52 his4-539 pep4- Δ 1[cir+]

质粒:

pCAMG91: 参见图 1, 包含黑曲霉 G1 葡萄糖淀粉酶(AMG G1)的质粒。Boel 等(1984), EMBO J. 3(7), p1581-1585 中记述了 pCAMG91 的构建。

pMT838: 编码截短的黑曲霉葡萄糖淀粉酶 G2(SEQ ID NO: 2)的质粒

pJSO026: (酿酒酵母表达质粒)(J.S.Okkel, (1996) “pYES 载体中 URA3-启动子的缺失提高了酿酒酵母中真菌脂肪酶的表达水平. DNA 重组生物技术 III: 生物学和工程学的整合, vol.782, Annals of the New York Academy of Sciences”)。更特定地, 通过用来自酿酒酵母的组成型表达的 TPI(丙糖磷酸异构酶)启动子(Albert 和 karwasaki, (1982), J. Mol. Appl. Genet., 1,419-434),

取代 pYES2.0 的诱导型 GAL1-启动子, 并缺失 URA3 启动子的一部分, 可从 pYES2.0 得到表达质粒 pJSO37。

方法:

酿酒酵母 YNG318 的转化

将 DNA 片段和开放型载体混合并通过标准方法转化进入酿酒酵母 YNG318。

测定比活并表示为 $k_{cat}(\text{sec}^{-1})$

750 μL 底物(1%麦芽糖, 50mM 乙酸钠, pH4.3)在所选温度例如 37 $^{\circ}\text{C}$ 或 60 $^{\circ}\text{C}$ 温育 5 分钟。

加入 50 μL 稀释在乙酸钠中的酶。分别在 0、3、6、9、12 分钟后取 100 μL 等份试样, 转移到 100 μL 0.4M 氢氧化钠中终止反应。空白也包括在内。

将 20 μL 移到微滴板上, 加入 200 μL GOD-Perid 溶液。室温下温育 30 分钟后 650nm 测定吸收值。

用葡萄糖作为标准, 比活计算为 $k_{cat}(\text{sec}^{-1})$ 。

测定 AGU 活性并表示为 AGU/mg

一个 Novo 淀粉葡萄糖苷酶单位(AGU)定义为 37 $^{\circ}\text{C}$, pH4.3 下每分钟水解 1 微摩尔麦芽糖的酶量。此分析方法的详述(AEL-SM-0131)可要求 Novo Nordisk 提供。

用 Boehringer Mannheim, 124036 的葡萄糖 GOD-Perid 试剂盒以修饰的 (AEL-SM-0131)方法将活性测定为 AGU/ml。标准品: AMG-标准品, 批次 7-1195, 195 AGU/ml。

375 μL 底物(50mM 乙酸钠中加入 1%麦芽糖, pH4.3)37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 5 分钟。添加 25 μL 的酶的乙酸钠稀释液。10 分钟后, 加入 100 μL 0.25M NaOH 终止反应。取 20 μL 转到 96 孔微滴板上, 加入 200 μL GOD-Perid 溶液。室温 30 分钟后, 测定 650nm 吸光度, 参照 AMG 标准品以 AGU/mg 计算活性。

活性(AGU/ml)除以蛋白浓度(mg/ml)可算得以 AGU/mg 表示的比活。

曲霉的转化(一般方法)

以米曲霉孢子接种 100ml YPD (Sherman 等, (1981), 酵母遗传学方法, 冷泉港实验室), 振荡培养约 24 小时。通过微孔布过滤收集菌丝体, 用 200ml 0.6M MgSO_4 清洗。将菌丝体悬浮在 15ml 1.2M MgSO_4 , 10mM NaH_2PO_4 中, pH5.8 中。将悬浮液于冰上冷却, 加入 1ml 含 120mg NovozymTM 234 的缓冲

液。5 分钟后, 加入 1ml 12mg/ml BSA(Sigma H25 型), 37℃ 下轻微振荡连续培养 1.5-2.5 小时, 直到通过镜检观察到样品中大量原生质体出现。

微孔布过滤悬浮液, 滤液移至无菌试管, 加 5ml 0.6M 山梨糖醇, 100mM Tris-HCl, pH7.0 覆盖。1000g 下离心 5 分钟, 从 MgSO₄ 层上层收集原生质体。2 倍体积的 STC(1.2M 山梨糖醇, 10mM Tris-HCl, pH7.5, 10mM CaCl₂) 加入到该原生质体悬浮液中, 将该混合物 1000g 离心 5 分钟。将原生质体沉淀重悬在 3ml STC 中, 重新沉积。重复该过程。最终, 将原生质体沉淀重悬在 0.2-1ml STC 中。

将 100μL 原生质体悬浮液与 5-25μg p3SR2(Hynes 等, Mol. And Cel. Biol., Vol.3, No.8, 1430-1439, Aug.1983 所述携带构巢曲霉 amdS 基因的质粒)混合在 10μL STC 中。混合液室温静置 25 分钟。加入 0.2ml 60% PEG 4000 (BDH29576), 10 mM CaCl₂, 10mM Tris-HCl, pH7.5, 小心混合(两次), 最终加入 0.85ml 同一溶液, 小心混合。使该混合液室温静置 25 分钟, 2500g 下旋转 15 分钟, 得到的沉淀重悬于 2ml 1.2M 山梨糖醇中。再次沉淀后, 将原生质体铺板在基本平板(Cove, (1996), Biochem. Biophys. Acta 113, 51-56) 上, 该平板中含有 1.0M 蔗糖, pH7.0, 10mM 乙酰胺作氮源, 20 mM CsCl 抑制背景生长。37℃ 培育 4-7 天后, 拣出孢子, 悬在无菌水中, 划线接种以获得单菌落。重复该过程, 第二次再分离后取单菌落保存为确定的转化体。

补料分批发酵

在含有以麦芽糖糊精为碳源, 尿素为氮源, 并含有酵母提取物的培养基中进行补料分批发酵。将所需米曲霉宿主细胞的摇瓶培养液接种到含 3.5%所述碳源和 0.5%所述氮源的培养基中进行补料分批发酵。在 34℃ pH5.0 的条件下培养 24 小时后, 开始连续补加碳源和氮源。保持碳源水平作为限制性因子, 要确保氧过量供应。补料分批培养进行 4 天, 然后通过离心, 超滤, 澄清过滤和除菌过滤来回收酶。

纯化

将培养液过滤, 加入硫酸铵(AMS)到 1.7M, pH 调到 5。离心除去沉淀的物质, 将含有葡糖淀粉酶活性的溶液上样到 Toyo Pearl Butyl 柱, 该柱已用 1.7M AMS, 20mM 乙酸钠, pH5 预平衡。用平衡缓冲液洗出未结合的物质。用 10mM 乙酸钠, pH4.5, 以 10 倍柱体积中 1.7-0M AMS 的线性梯度洗脱结合蛋白。收集含葡糖淀粉酶的级分, 并对 20mM 乙酸钠, pH4.5 透析。然后

将该溶液上样到 Q Sepharose 柱, 该柱已用 10mM Piperazin, Sigma, pH5.5 预平衡。用平衡缓冲液洗下未结合的物质。以在 10mM Piperazin 中 0-0.3M 氯化钠(10 倍柱体积)的线性梯度洗脱结合蛋白。收集含葡糖淀粉酶的级分, 通过 SDS-PAGE 确认纯度。

$T_{1/2}$ (半衰期)方法 I

变体的热稳定性使用下列方法测定为 $T_{1/2}$: 68°C、70°C 或 75°C 下将 950 μ L 50mM 乙酸钠缓冲液(pH4.3)(NaOAc)温育 5 分钟。缓冲液中加入 50 μ L 酶(4AGU/ml)。在, 例如 0, 5, 10, 20, 30 和 40 分钟时取样 2 $\times$ 40 μ L 样品, 冰上冷却。用温育前(0 分钟)测定的活性(AGU/ml)为参照(100%)。稳定性的降低(百分比)计算为保温时间的函数。在不同时间测定葡糖淀粉酶的百分比残余活性。 $T_{1/2}$ 表示相对活性降为 50%所需的时间。

$T_{1/2}$ (半衰期)方法 II

$T_{1/2}$ 测定步骤如下: 在 30%葡萄糖, 50mM 乙酸钠, pH4.5, 所需温度(例如 70°C)下温育目标酶(约 0.2 AGU/ml)。在设定的时间间隔取样, 冰上冷却, 用 pNPG 方法(如下所述)测定残余酶活性。

在不同的时间测定葡糖淀粉酶的百分比残余活性。 $T_{1/2}$ 表示相对活性降为 50%所需的时间。

残余酶活的测定(pNPG 法)

pNPG 试剂:

0.2g pNPG(对-硝基苯葡萄糖吡喃糖苷)溶解在 0.1M 乙酸盐缓冲液(pH4.3)中, 补足 100ml。

硼酸盐溶液:

3.8g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 溶解在 Milli-Q water 中, 补足 100ml。

25 μ L 样品中加入 50 μ L 底物, 50°C 下温育 2 小时。加入 150 μ L 硼酸盐溶液终止反应。405nm 测定光密度, 计算残余活性。

pAMGY 的构建

pAMGY 载体如下构建: 用 AMG 基因取代 pJSO026 中的脂肪酶基因, 所述 AMG 基因是用正向引物 FG2: 5'-CAT CCC CAG GAT CCT TAC TCA GCA ATG-3'(SEQ ID NO:10)和反向引物 RG2: 5'-CTC AAA CGA CTC ACC AGC CTC TAG AGT-3'(SEQ ID NO:11), 以 AMG 基因的质粒 pLAC103 为模板经 PCR 扩增获得。用 XbaI 和 SmaI 在 37°C 消化 pJSO026 质粒 2 小时, 用

Klenow 片段使 PCR 扩增子末端钝化, 然后用 XbaI 消化。连接该载体片段和 PCR 扩增子, 通过电转化作用转化进入大肠杆菌。产生的载体为 pAMGY。

pLaC103 的构建

用黑曲霉 AMGII cDNA 克隆(Boel 等, (1984), 同上)作为构建 pLaC103 的来源以便在酿酒酵母中表达 AMG 的 GII 形式。

构建分几步, 列于下:

用 XbaI 切割 pT7-212(EP37856/US5162498), 用 Klenow DNA 聚合酶和 dNTP 进行末端钝化。用 EcoRI 切割后, 得到的载体片段通过琼脂糖凝胶电泳纯化, 与 pBoel53 的 2.05kb EcoRI-EcoRV 片段连接, 从而在所得质粒 pG2x 的 AMG 编码片段的 EcoRV 末端再造 XbaI 位点。

为除去 AMG cds 上游的 DNA, 以及用适当的限制性内切酶识别位点装饰 AMG 的编码 DNA, 进行下述的构建:

分离 p53 的 930kb EcoRI-PstI 片段并进行 AluI 切割, 将得到的 771bp Alu-PstI 片段与带有末端钝化型 EcoRI 位点的 pBR322 (如上)连接, 再用 PstI 切割。在得到的质粒 pBR-AMG' 中, 在距离 AMG cds 的起始密码子 34bp 处再造 EcoRI 位点。

从 pBR-AMG' 分离得到 775bp 的 EcoRI-PstI 片段, 并在包括 pT7-212 的 XbaI-EcoRI 载体片段的连接反应中与 pG2x 中的 1151 bp PstI-XbaI 片段连接。

得到的质粒 pT7GII 在有碱性磷酸酶的存在下进行 BamHI 切割, 然后在磷酸酶失活后用 SphI 进行部分切割。得到 2489bp 的 SphI-BamHI 片段, 其包括连接到 AMGII cds 的 S.c.TPI 启动子。上述片段与 pT7GII 的 1052bp BamHI 片段一起与经 SphI-BamHI 消化及碱性磷酸酶处理的 pMT743 (EP37856/US5162498)载体片段连接。得到的质粒是 pLaC103。

筛选热稳定的 AMG 变体

在下述热稳定性滤膜分析中筛选文库。

用于热稳定性的滤膜分析

酵母文库铺板在含 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 SCFura 琼脂板上的醋酸纤维素滤膜 (OE 67, Schleicher&Schuell, Dassel, 德国)-和硝酸纤维素滤膜 (Protran-Ba 85, Schleicher&Schuell, Dassel, 德国) 的夹层上, 30 $^{\circ}$ C 下至少 72 小时。将菌落影印到已用甲醇活化 1 分钟的 PVDF 滤膜(Immobilon-P,

Millipore, Bedford), 或 Protran 滤膜(未活化)上, 然后用 0.1M NaAc 洗膜, 再室温下温育 2 小时。用自来水从 PVDF/Protran 滤膜上洗下菌落。温育前用针分别标记每一滤膜夹层和 PVDF/Protran 滤膜, 这样在筛选后可以在滤膜上定位阳性变体。将结合有变体的 PVDF 膜转移到有 0.1M NaAc, pH4.5 的容器中, 47°C 或使用 Protran 膜时可选 67 - 69°C 下温育 15 分钟。将 SC ura- 琼脂平板上的醋酸纤维素和硝酸纤维素滤膜夹层室温保存以备。温育后, 在含 5% 麦芽糖, 1% 琼脂糖, 50mM NaAc, pH4.5 的平板上测定残余活性。含有 PVDF 的试验板如滤膜夹层一样标记, 并 50°C 温育 2 小时。除去 PVDF 滤膜后, 试验板用 Glucose GOD perid (Boehringer Mannheim GmbH, 德国) 染色。具有残余活性的变体在试验板上表现为白色背景上的墨绿点。改进的变体位于保存板上。按照第一次筛选的条件再次筛选改进的变体。

使用 DOPE 程序进行随机诱变的一般方法

随机诱变可按下列步骤进行:

1. 在亲本酶中选择用于修饰的目的区域,
2. 在所选目的区域中确定突变和非突变位点,
3. 确定可以进行何种突变, 例如考虑所要构建的变体的所需稳定性和/或性能,
4. 挑选结构合理的突变,
5. 参照步骤 4 调整经步骤 3 挑选的残基,
6. 通过使用适当的 DOPE 算法分析核苷酸分布,
7. 如果需要, 调整所要残基以满足遗传密码的实用性, 例如考虑由遗传密码引起的约束, 如为避免引入终止密码子所引起的约束; 本领域技术人员可以知道一些密码子组合并不实用, 需要进行调整。
8. 制备引物
9. 使用引物进行随机诱变
10. 通过筛选所需改进的特性来选择所得葡糖淀粉酶变体。

Dope 算法

适用于步骤 6 的 Dope 算法为本领域所熟知。Tomandl, D.等, 1997, 计算机辅助分子设计杂志(Journal of Computer-Aided Molecular Design)11: 29 - 38 记述一种这样的算法。另一算法是 DOPE (Jensen, LJ, Andersen, KV, Sevendsen, A, 和 Kretzschmar, T(1998) 核酸研究 26: 697 - 702)。

实施例

实施例 1

AMG G2 变体的构建

定点诱变

为构建 AMG G2 酶(SEQ ID NO:2)的变体, 参照制造商说明书使用市售试剂盒, Chameleon 双链定点诱变试剂盒。

将编码目的 AMG G2 酶的基因定位在 pMT838 上, 所述质粒是在含 AMG G1 型的质粒 pCAMG91(见图 1)上缺失 G2 nt.1362 和 G2 nt.1530 间的 DNA 而得到的。

参照制造商说明书, 利用下列引物将 pMT838 的氨苄青霉素基因的 ScaI 位点改变为 MluI 位点:

7258: 5'p gaa tga ctt ggt tga cgc gtc acc agt cac 3'(SEQ ID NO:3)

(这样就改变了氨苄青霉素抗性基因中发现并用于切割至 MluI 位点的 ScaI 位点)。然后以含目的 AMG 基因的 pMT838 载体作 DNA 聚合酶的模板并使用 oligo 7258(SEQ ID NO:3)及 21401(SEQ ID NO:4)。

引物 21401(SEQ ID NO:4)用作选择性引物。

21401: 5'p gg gga tca tga tag gac tag cca tat taa tga agg gca tat acc acg cct tgg acc tgc gtt ata gcc 3'

(在未改变氨基酸序列的情况下, 改变了 AMG 基因中发现的 ScaI 位点)。

通过加入含有所要突变的适合的 oligo 可引入所要的突变(例如, 引入半胱氨酸残基)到目的 AMG 基因中。

用引物 107581 引入 T12P

107581: 5'pgc aac gaa gcg ccc gtg gct cgt ac 3'(SEQ ID NO:5)

通过整个基因的测序证实突变。使用上述“材料和方法”部分的方法将质粒转化进入米曲霉。按照上述变体“材料和方法”部分所述进行变体的发酵及纯化。

实施例 2

通过定域随机掺入诱变来构建与亲本酶相比稳定性提高了的黑曲霉

AMG 变体

为改进黑曲霉 AMG 的热稳定性，在预选区域进行随机突变。

残基

区域: L19-G35

区域: A353 - V374

用 DOPE 软件(见材料与方法)在上述区域确定每一所需改变所要掺入的密码子以使终止密码子的数量最少(参见表 1)。在密码子的三个位置计算确切的核苷酸分布以给出建议的氨基酸变化群。所要掺入的区域特别掺入在指定的位置，这可以有较多的机会获得所要残基，但是也有其它可能。

第一列是要突变的氨基酸，第二列是野生型的百分比，第三列是新的氨基酸。

表 1:

在 L19 - G35 中的掺入

L19	90 %	N
N20	95 %	T
N21	不变	
I22	不变	
G23	95%	A
A24	90%	S,T
D25	93%	S,T,R
G26	95%	A
A27	90%	S,T
W28	<80%	R,Y
V29	不变	
S30	93%	T,N
G31	95%	A
A32	95%	V
D33	80%	R,K,H
S34	90%	N
G35	不变	

得到的掺入寡核苷酸链在表 2 中作为有义链表示：表中还有引物序列，野生型核苷酸序列，亲本氨基酸序列和每一掺入位置的核苷酸分布。

表 2:

位点:	19	20	21	22	23	24	25	26	27	
氨基酸序列:	L	N	N	I	G	A	D	G	A	
引物:	12T	A3T	AAC	ATC	G4G	5CG	67C	G4T	8CT	
野生型序列:	CTG	AAT	AAC	ATC	GGG	GCG	GAC	GGT	GCT	
位点(续):	28	29	30	31	32	33	34	35		
氨基酸序列(续):	W	V	S	G	A	D	S	G		
引物:	91010	GTG	1112C	G4C	G13G	141516	1718T	GGC		
野生型序列:	TGG	GTG	TCG	GGC	GCG	GAC	TCT	GGC		

每一掺入位置的核苷酸分布

- 1: A10,C90
- 2: A6, T94
- 3: A95,C5
- 4:G95,C5
- 5:G91,A3,T3,C3
- 6:G95,A3,C2
- 7:G3,A95,C2
- 8:G92,A4,T4
- 9:A3,T97
- 10:G95,T5
- 11:G3,A97
- 12:G95,A2,C3
- 13:T5,C95
- 14:G88,A8,C4
- 15:G7,A93
- 16:G4,C96
- 17:G4,A96
- 18:G95,A2,C3

正向引物(SEQ ID NO:6):

FAMGII '5-C GAA GCG ACC GTG GCT CGT ACT GCC ATC 12T A3T AAC ATC
G4G 5CG 67C G4T 8CT 91010 GTG 1112C G4C G13G 141516 1718T GGC
ATT GTC GTT GCT AGT CCC AGC ACG GAT AAC-3'

反向引物(SEQ ID NO:7):

RAMG1: 5'-GAT GGC AGT ACG AGC CAC GGT CGC TTC G-3'

表 3

在区域 A353 – V374 中的掺入:

A353	<80%	D,E,Q,N,Y
L354	90%	Q,E
Y355	90%	N,Q
S356	90%	T,D,N
G357	80%	P,A,S,T
A358	93%	S
A359	90%	S,T,N
T360	90%	R,K
G361	85%	A,S,T
T362	90%	S
Y363	不变	
S364	93 %	D
S365	93 %	N,Q,K
S366	93 %	P,D
S367	不变	
S368	93%	D,N,T
Y369	93%	Q,E
Y370	不变	
S371	93 %	N
S372	93%	N,T
I373	不变	
V374	93%	N,Y,H

得到的掺入寡核苷酸链在表 4 中作为有义链表示: 表中还有引物序列, 野生型核苷酸序列, 亲本氨基酸序列和每一掺入位置的核苷酸分布。

表 4:

位点: 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362
氨基酸序列: A L Y S D A A T G T
引物: 123 45A 6AC 78C 910T 11CT 1213T 1415A 1617C 18CC
野生型序列: GCA CTG TAC AGC GAT GCT GCT ACT GGC ACC
位点(续): 363 364 365 366 367 368 369
370
氨基酸序列(续): Y S S S S S T Y
引物(续): TAC 1920T A2122 2324C AGT 1425C 2627G T28T
野生型序列(续): TAC TCT TCG TCC AGT TCG ACT TAT
位点: (续): 371 372 373 374
氨基酸序列(续): S S I V
引物(续): A16T 2930T ATT 313233
野生型序列(续): AGT AGC ATT GTA

每一掺入位置的核苷酸分布

- 1:G91,A3,T3,C3
- 2:A13,C87
- 3:A40,T60
- 4:G3,A3,C94
- 5:A6,T94
- 6:G4,A4,T92
- 7:G2,A96,C2
- 8:G93,A3.5,C3.5
- 9:G87,A8,C5
- 10:A84,C16
- 11:G93,T7
- 12:G92,A5,T3
- 13:A3,C97
- 14:G3,A97
- 15:G2,A2,T4,C92
- 16:G93,A7
- 17:G93,C7
- 18:A90,T10
- 19:G4,A96
- 20:G95,A5
- 21:G96,A4
- 22:G3,C97
- 23:G2,A1,T95,C2
- 24:A3,C97

25:G95,A3,C2
26:G2,A96,C2
27:A5,C95
28:A95,T5
29:G2,A98
30:G94,A4,C2
31:G94,A3,T1,C2
32:A4,T96
33:A20,C80

引物: FAMGIV (SEQ ID NO: 8)

5'-GTG TCG CTG GAC TTC TTC AAG 123 45A 6AC 78C 910T 11CT 1213T
1415A 1617C 18CC TAC 1920T A2122 2324C AGT 1425C 2627G T28T
A16T 2930C ATT 313233 GAT GCC GTG AAG ACT TTC GCC GA-3'

引物 RAMGVI (SEQ ID NO: 9)

5'-ctt gaa gaa gtc cag cga cac-3'

随机诱变

使用表 2 和表 3 中可见的掺入的寡核苷酸(通称 FAMG)和针对 L19 - G35 区域的反向引物 RAMG, 以及, 覆盖了 N - 末端(FG2:5'-CAT CCC CAG GAT CCT TAC TCA GCA ATG-3')(SEQ ID NO:10)和 C - 末端(RG2:5'-CTC AAA CGA CTC ACC AGC CTC TAG AGT(SEQ ID NO:11)的特定 SEQ ID NO: 2 引物, 通过重叠延伸方法(Horton 等, 基因, 77(1989), pp.61-68)产生 PCR-文库片段, 有 21 个碱基对的重叠。质粒 pAMGY 用作聚合酶链式反应的模板。在大肠杆菌/酵母穿梭载体 pAMGY 中通过同源重组克隆 PCR 片段(参见材料和方法)。

筛选

如上述“材料和方法”部分所述, 使用 Protran 膜在热稳定膜分析中筛选文库, 并在 67 - 69°C 下温育。

实施例 3

在 68°C 的热稳定性

使用实施例 1 所述方法构建 AMG G2 变体。

使用“材料和方法”中的方法 I 在 68°C 下测定热稳定性, 以 $T_{1/2}$ 表示, 并与相同条件下的野生型黑曲霉 AMG G2 对比。

酶	T%
AMG G2 野生型	8.5
T72I+A246T	11.3
A495P	11.0
A425T+S465P+E408R+A495T	8.6
T379A+S386K+A393R+T2E	18.4
L66V+S394P+Y402F+T2R+RL	11.1
S386R+A393R+T2R	14.1
S386N+E408R	12.6
A1V+L66R+Y402F+N427S+S486G	

T2K+S30P+N427M+S444G+V470M
A393R+T490A+V59A+PLASD (N-末端延伸)
S119P+Y312Q+Y402F+S416H,
T379A+S386K+A393R+T2E,
S386P+S340G+D357S+T360V.

实施例 4

比活

AMG G2 变体如实施例 1 构建。如“材料和方法”部分所述，在 37℃ pH4.5 下测定比活为 k_{cat} 或 AGU/mg，使用麦芽糖为底物。

酶	AGU/mg	KCat(Sec.-1)
AMG G2(野生型)		5.6
I189T+Y223F+F227Y+Y402F+S119P		9.3

实施例 5

在 75℃ 的热稳定性

采用实施例 1 所述方法构建 AMG G2 变体。

使用“材料和方法”中的方法 I 在 75℃ 和 pH4.5 下测定热稳定性，以 $T_{1/2}$ 表示，并与相同条件下的野生型黑曲霉 AMG G2 对比。

AGR No.	突变	T _{1/2} (分钟)
	G2 (对比)	4
136	V59A+A393R+T490A	6
109	S56A+V59A+N313G+S356G+A393R+S394R+Y402F	9
111	A11E+V59A+T72I+S119P+F237H+S240G+A246T+N313G+S340G+K352R+A393R+S394R+Y402F+E408R	10
120	T2H+A11P+V59A+T72I+S119P+A246T+N313G+D336S+T360V+A393R+Y402F+E408R+N427M	12
122	T2H+V59A+T72I+S119P+S240G+N313G+T360V+S368P+A393R+Y402F+E408R+N427M	10
124	N9A+S56A+V59A+S119P+A246T+N313G+E342T+A393R+S394R+Y402F+E408R	21
130	V59A+L66R+T72I+S119P+N313G+S340G+S356G+A393R+Y402F+E408R+N427M	29
132	T2H+N9A+V59A+S56A+L66R+T72I+S119P+N313G+F318Y+E342T+S356G+T390R+Y402F+E408R+N427M	9
141	T2H+A11E+V59A+S119P+N313G+E342T+S356P+A393R+S394I+Y402F+L410R+N427S	13
142	T2H+A11P+V59A+S119P+N313G+S340G+S356G+E408R+N427M	9
151	T2H+A11E+V59A+L66R+S119P+N313G+S340G+D357S+A393R+S394R+Y402F+E408R	20
154	T2H+N9A+S56A+V59A+L66R+T72I+S119P+S240G+N313G+S340G+K352R+A393R+S394R+Y402F+E408R+N427S	19

实施例 6

AMG 变体 AGR130 的糖化性能

如下所述在 70℃ 测定具有改进的热稳定性的变体 AGR130 (V59A+L66R+T72I+S119P+N313G+S340G+S356G+A393R+Y402F+E408R+N427M) 的糖化性能。

参比酶是野生型黑曲霉 AMG G2。糖化在下列条件下进行：

底物 10 DE 麦芽糖糊精，约 30 % DS(w/w)

温度 70℃

初始 pH 4.3(在 70℃)

酶量 0.24AGU/g DS

糖化

将麦芽糖糊精(从普通淀粉制备)溶解在煮沸的 Milli-Q 水中，制备糖化底物，将干物质调为约 30 % (w/w)。pH 调到 4.3。相当于 15g 干重的底物样品转移到 50ml 蓝盖玻璃烧瓶中，水浴搅拌。加入酶，必要时调 pH。进行平行实验。定时取样，HPLC 分析确定碳水化合物组成。

序列表

<110> 诺维信公司(NOVOZYMES A/S)

<120> 葡糖淀粉酶变体

<130> 5967.204-WO

<160> 13

<170> 适用于Windows Version 3.0的FastSEQ

<210> 1

<211> 1605

<212> DNA

<213> 黑曲霉(*Aspergillus niger*)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)... (72)

<221> mat_peptide

<222> (73)... (1602)

<221> CDS

<222> (1)... (1602)

<400> 1

atg tgc ttc cga tct cta ctc gcc ctg agc ggc ctc gtc tgc aca ggg	48
Met Ser Phe Arg Ser Leu Leu Ala Leu Ser Gly Leu Val Cys Thr Gly	
-20 -15 -10	

tlg gca aat gtg att tcc aag cgc gcg acc tlg gat tca tgg ttg agc	96
Leu Ala Asn Val Ile Ser Lys Arg Ala Thr Leu Asp Ser Trp Leu Ser	
-5 1 5	

aac gaa gcg acc gtg gct cgt act gcc atc ctg aat aac atc ggg gcg	144
Asn Glu Ala Thr Val Ala Arg Thr Ala Ile Leu Asn Asn Ile Gly Ala	
10 15 20	

gac ggt gct tgg gtg tcg ggc gcg gac tct ggc att gtc gtt gct agt	192
Asp Gly Ala Trp Val Ser Gly Ala Asp Ser Gly Ile Val Val Ala Ser	
25 30 35 40	

ccc agc acg gat aac ccg gac tac ttc tac acc tgg act cgc gac tct	240
Pro Ser Thr Asp Asn Pro Asp Tyr Phe Tyr Thr Trp Thr Arg Asp Ser	
45 50 55	

ggt ctc gtc ctc aag acc ctc gtc gat ctc ttc cga aat gga gat acc	288
Gly Leu Val Leu Lys Thr Leu Val Asp Leu Phe Arg Asn Gly Asp Thr	
60 65 70	

agt ctc ctc tcc acc att gag aac tac atc tcc gcc cag gca att gtc	336
Ser Leu Leu Ser Thr Ile Glu Asn Tyr Ile Ser Ala Gln Ala Ile Val	
75 80 85	

cag ggt atc agt aac ccc tct ggt gat ctg tcc agc ggc gct ggt ctc	384
Gln Gly Ile Ser Asn Pro Ser Gly Asp Leu Ser Ser Gly Ala Gly Leu	
90 95 100	

ggt gaa ccc aag ttc aat gtc gat gag act gcc tac act ggt tct tgg	432
Gly Glu Pro Lys Phe Asn Val Asp Glu Thr Ala Tyr Thr Gly Ser Trp	

105	110	115	120	
gga cgg ccg cag cga gat ggt ccg gct ctg aga gca act gct atg atc				480
Gly Arg Pro Gln Arg Asp Gly Pro Ala Leu Arg Ala Thr Ala Met Ile				
	125	130	135	
ggc ttc ggg cag tgg ctg ctt gac aat ggc tac acc agc acc gca acg				528
Gly Phe Gly Gln Trp Leu Leu Asp Asn Gly Tyr Thr Ser Thr Ala Thr				
	140	145	150	
gac att gtt tgg ccc ctc gtt agg aac gac ctg tcg tat gtg gct caa				576
Asp Ile Val Trp Pro Leu Val Arg Asn Asp Leu Ser Tyr Val Ala Gln				
	155	160	165	
tac tgg aac cag aca gga tat gat ctc tgg gaa gaa gtc aat ggc tcg				624
Tyr Trp Asn Gln Thr Gly Tyr Asp Leu Trp Glu Glu Val Asn Gly Ser				
	170	175	180	
tct ttc ttt acg att gct gtg caa cac cgc gcc ctt gtc gaa ggt agt				672
Ser Phe Phe Thr Ile Ala Val Gln His Arg Ala Leu Val Glu Gly Ser				
	185	190	200	
gcc ttc gcg acg gcc gtc ggc tcg tcc tgc tcc tgg tgt gat tct cag				720
Ala Phe Ala Thr Ala Val Gly Ser Ser Cys Ser Trp Cys Asp Ser Gln				
	205	210	215	
gca ccc gaa att ctc tgc tac ctg cag tcc ttc tgg acc ggc agc ttc				768
Ala Pro Glu Ile Leu Cys Tyr Leu Gln Ser Phe Trp Thr Gly Ser Phe				
	220	225	230	
att ctg gcc aac ttc gat agc agc cgt tcc ggc aag gac gca aac acc				816
Ile Leu Ala Asn Phe Asp Ser Ser Arg Ser Gly Lys Asp Ala Asn Thr				
	235	240	245	
ctc ctg gga agc atc cac acc ttt gat cct gag gcc gca tgc gac gac				864
Leu Leu Gly Ser Ile His Thr Phe Asp Pro Glu Ala Ala Cys Asp Asp				
	250	255	260	
tcc acc ttc cag ccc tgc tcc ccg cgc gcg ctc gcc aac cac aag gag				912
Ser Thr Phe Gln Pro Cys Ser Pro Arg Ala Leu Ala Asn His Lys Glu				
	265	270	275	280
gtt gta gac tct ttc cgc tca atc tat acc ctc aac gat ggt ctc agt				960
Val Val Asp Ser Phe Arg Ser Ile Tyr Thr Leu Asn Asp Gly Leu Ser				
	285	290	295	
gac agc gag gct gtt gcg gtg ggt cgg tac cct gag gac acg tac tac				1008
Asp Ser Glu Ala Val Ala Val Gly Arg Tyr Pro Glu Asp Thr Tyr Tyr				
	300	305	310	
aac ggc aac ccg tgg ttc ctg tgc acc ttg gct gcc gca gag cag ttg				1056
Asn Gly Asn Pro Trp Phe Leu Cys Thr Leu Ala Ala Ala Glu Gln Leu				
	315	320	325	
tac gat gct cta tac cag tgg gac aag cag ggg tcg ttg gag gtc aca				1104
Tyr Asp Ala Leu Tyr Gln Trp Asp Lys Gln Gly Ser Leu Glu Val Thr				
	330	335	340	
gat gtg tcg ctg gac ttc ttc aag gca ctg tac agc gat gct gct act				1152
Asp Val Ser Leu Asp Phe Phe Lys Ala Leu Tyr Ser Asp Ala Ala Thr				
	345	350	355	360

ggc acc tac tct tcg tcc agt tcg act tat agt agc att gta gat gcc Gly Thr Tyr Ser Ser Ser Ser Thr Tyr Ser Ser Ile Val Asp Ala 365 370 375	1200
gtg aag act ttc gcc gat ggc ttc gtc tct att gtg gaa act cac gcc Val Lys Thr Phe Ala Asp Gly Phe Val Ser Ile Val Glu Thr His Ala 380 385 390	1248
gca agc aac ggc tcc atg tcc gag caa tac gac aag tct gat ggc gag Ala Ser Asn Gly Ser Met Ser Glu Gln Tyr Asp Lys Ser Asp Gly Glu 395 400 405	1296
cag ctt tcc gct cgc gac ctg acc tgg tct tat gct gct ctg ctg acc Gln Leu Ser Ala Arg Asp Leu Thr Trp Ser Tyr Ala Ala Leu Leu Thr 410 415 420	1344
gcc aac aac cgt cgt aac tcc gtc gtg cct gct tct tgg ggc gag acc Ala Asn Asn Arg Arg Asn Ser Val Val Pro Ala Ser Trp Gly Glu Thr 425 430 435 440	1392
tct gcc agc agc gtg ccc ggc acc tgt gcg gcc aca tct gcc att ggt Ser Ala Ser Ser Val Pro Gly Thr Cys Ala Ala Thr Ser Ala Ile Gly 445 450 455	1440
acc tac agc agt gtg act gtc acc tcg tgg ccg agt atc gtg gct act Thr Tyr Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Trp Pro Ser Ile Val Ala Thr 460 465 470	1488
ggc ggc acc act acg acg gct acc ccc act gga tcc ggc agc gtg acc Gly Gly Thr Thr Thr Thr Ala Thr Pro Thr Gly Ser Gly Ser Val Thr 475 480 485	1536
tcg acc agc aag acc acc gcg act gct agc aag acc agc acc acg acc Ser Thr Ser Lys Thr Thr Ala Thr Ala Ser Lys Thr Ser Thr Thr Thr 490 495 500	1584
cgc tct ggt atg tca ctg tga Arg Ser Gly Met Ser Leu 505 510	1605

<210> 2
 <211> 534
 <212> PRT
 <213> 黑曲霉(Aspergillus niger)

<220>
 <221> 信号
 <222> (1)... (24)

<400> 2
 Met Ser Phe Arg Ser Leu Leu Ala Leu Ser Gly Leu Val Cys Thr Gly
 -20 -15 -10
 Leu Ala Asn Val Ile Ser Lys Arg Ala Thr Leu Asp Ser Trp Leu Ser
 -5 1 5
 Asn Glu Ala Thr Val Ala Arg Thr Ala Ile Leu Asn Asn Ile Gly Ala
 10 15 20
 Asp Gly Ala Trp Val Ser Gly Ala Asp Ser Gly Ile Val Val Ala Ser
 25 30 35 40
 Pro Ser Thr Asp Asn Pro Asp Tyr Phe Tyr Thr Trp Thr Arg Asp Ser
 45 50 55
 Gly Leu Val Leu Lys Thr Leu Val Asp Leu Phe Arg Asn Gly Asp Thr

$\langle 210 \rangle$	3
$\langle 211 \rangle$	30
$\langle 212 \rangle$	DNA

<213> 人工序列 <220> <223> 引物7258 <400> 3 gaatgacttg gttgacgcgt caccagtcac	30
<210> 4 <211> 68 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 引物21401 <400> 4 ggggatcatg ataggactag ccatattaat gaagggcata taccacgcct tggacctgcg ttatagcc	60 68
<210> 5 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 引物107581 <400> 5 gcaacgaagc gcccggtggct cgtac	25
<210> 6 <211> 88 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 引物FAMGII <400> 6 cgaagcgacc gtggctcgta ctgccatcta taacatcggc gcgtctgtgc gcggtggcat tgtcgttgct aglccagca cggataac	60 88
<210> 7 <211> 28 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 引物RAMG1 <400> 7 gatggcagta cgagccacgg tcgcttcg	28
<210> 8 <211> 75 <212> DNA	

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物FAMGIV	
<400> 8	
gtgtcgtcgg acttcttcaa gaacctctta ccctactaca gtcgttatca ttgatgccgt	60
gaagactttc gccga	75
<210> 9	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 引物RAMGVI	
<400> 9	
cttgaagaag tccagcgaca c	21
<210> 10	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物FG2	
<400> 10	
catccccagg atccttactc agcaatg	27
<210> 11	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物RG2	
<400> 11	
ctcaaacgac tcaccagcct ctagagt	27
<210> 12	
<211> 2602	
<212> DNA	
<213> 黑曲霉(ASPERGILLUS NIGER)	
<400> 12	
ttcgtcgcct aatgtctcgt ccgttcacaa actgaagagc ttgaagtggc gagatgtctc	60
tgcaggaatt caagctagat gctaagcgat attgcatggc aatatgtgtt gatgcatgtg	120
cttcttccct cagcttcccc tcgtgcgagt gaggtttggc tataaattga agtggttggg	180
cggggttccg tgaggggctg aagtgttcc tcccttttag gcgcaactga gaccctgagc	240
ttcatcccca gcatcattac acctcagcaa tgtcgttccg atctctactc gccctgagcg	300
gcctcgtctg cacagggttg gcaaatgtga ttccaagcg cgcgacctg gattcatggt	360
tgagcaacga agcgaccgtg gctcgtactg ccacctgaa taacatcggg gcggacgggtg	420
cttgggtgtc gggcgcggac tctggcattg tcgttgctag tcccagcacg gataacccgg	480
actgtatgtt tcgagctcag atttagtatg agtgtgtcat tgattgattg atgctgactg	540
gcgtgtcgtt tgtttagac ttctacacct ggactcgcga ctctgggtctc gtcctcaaga	600
ccctcgtcga tctcttccga aatggagata ccagtctcct ctccaccatt gagaactaca	660
tctccgccca ggcaattgtc cagggtatca gtaacccctc tggatgatctg tccagcggcg	720
ctgggtctcgg tgaacccaag ttcaatgtcg atgagactgc ctacactggg tcttggggac	780

```

ggccgcagcg agatgggtccg gctctgagag caactgctat gatcggttc gggcagtggc 840
tgcttgtagt ttctccacc ccttgctgt gatctgtgac atatgtagct gactggtcag 900
gacaatggct acaccagcac cgcaacggac attgtttggc ccctcgtag gaacgacctg 960
tcgtatgtgg ctcaatactg gaaccagaca ggatatggtg tgtttgtttt attttaaatt 1020
tcaaagatg cgccagcaga gtaacccgc gatcgagat ctctgggaag aagtcaatgg 1080
ctcgtctttc tttacgattg ctgtgcaaca ccgcgccctt gtcgaaggta gtgccttcgc 1140
gacggccgtc ggctcgtcct gctcctggtg tgattctcag gcacccgaaa ttctctgcta 1200
cttcgagtc ttctggaccg gcagcttcat tctggccaac ttcgatagca gccgttccgg 1260
caaggacgca aacacccctc tgggaagcat ccacacctl gatcctgagg ccgcatgcga 1320
cgactccacc ttccagccct gctccccgc cgcgctcgcc aaccacaagg aggttgtaga 1380
ctcttccgc lcaatctata cctcaacga tggctcagtg gacagcgagg ctgttgcggt 1440
gggtcggtac cctgaggaca cgtactacaa cggcaaccg tggttcctgt gcaccttggc 1500
tgccgcagag cagttgtacg atgctctata ccagtgggac aagcaggggt cgttggaggt 1560
cacagatgtg tcgttgact tcttcaaggc actgtacagc gatgctgcta ctggcaccta 1620
ctctcgtcc agttcgactt atagtagcat ttagatgcc gtgaagactt tcgccgatgg 1680
cttcgtctct attgtggtaa gtctacgcta gacaagcgt catgttgaca gagggtgcgt 1740
actaacagaa glaggaaact cacgcgcga gcaacggctc catgtccgag caatacgaca 1800
agctgatgg cgagcagctt tccgctcgcg acctgacctg gtcttatgct gctctgctga 1860
ccgccaacaa ccgtcgtaac tccgtcgtgc ctgcttcttg gggcgagacc tctgccagca 1920
gcgtgccggg caccigtgcg gccacatctg ccatttggtac ctacagcagl gtgactgla 1980
cctcgtggcc gatlctgtg gctactggcg gcaccactac gacggctacc cccactggat 2040
ccggcagcgt gacctcgacc agcaagacca ccgcgactgc tagcaagacc agcaccagta 2100
cgtcalcaac ctctgtacc actcccaccg ccgtggctgt gactttcgat ctgacagcta 2160
ccaccacctt cggcgagaac atctacctgg tggatcgat ctctcagctg ggtgactggg 2220
aaaccagcga cggcatagct ctgagtgtcg acaagtacac ttccagcgac ccgctctggt 2280
atgctactgt gactctgccg gctgggtgagt cgtttgagta caagtttctc cgcatgaga 2340
gcatgactc cgtggagtgg gagagtgat ccaaccgaga atacaccgtt cctcaggcgt 2400
gcggaacgtc gaccgcgacg gtgactgaca cctggcggtg acaatcaatc catttcgcta 2460
tagttaaagg atggggatga gggcaattgg ttatatgatc atgtatgtag tgggtgtgca 2520
taatagtagt gaaatggaag ccaagtcatg tgattgtaat cgaccgacgg aattgaggat 2580
atccggaaat acagacaccg gg 2602

```

<210> 13

<211> 640

<212> PRT

<213> 黑曲霉(ASPERGILLUS NIGER)

<400> 13

```

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

```

46

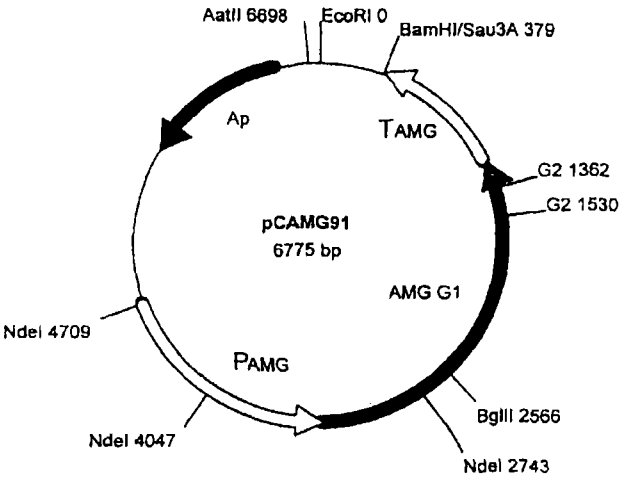


图 1