



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102057042 B

(45) 授权公告日 2014. 07. 16

(21) 申请号 200980121086. 0

C12N 15/56 (2006. 01)

(22) 申请日 2009. 06. 04

C12N 1/15 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C12N 1/21 (2006. 01)

08157769. 4 2008. 06. 06 EP

C11D 3/386 (2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2010. 12. 06

CN 1230987 A, 1990. 09. 06, 全文.

(86) PCT国际申请的申请数据

CN 1272880 A, 2000. 11. 08, 全文.

PCT/EP2009/056875 2009. 06. 04

EP 1136892 A1, 2001. 09. 26, 全文.

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/147210 EN 2009. 12. 10

审查员 黄丽君

(73) 专利权人 诺维信公司

地址 丹麦鲍斯韦

(72) 发明人 沃纳·贝森马特

艾斯本·P·弗里伊斯

基思·吉布森

弗兰克·W·拉斯马森

迈克尔·斯克乔特

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 史悦

(51) Int. Cl.

C12N 9/42 (2006. 01)

权利要求书3页 说明书80页

序列表9页 附图2页

(54) 发明名称

家族 44 木葡聚糖酶变体

(57) 摘要

本发明涉及亲本木葡聚糖酶的变体。本发明还涉及编码所述变体木葡聚糖酶的多核苷酸, 和包含所述多核苷酸的构建体、载体和宿主细胞。

1. 一种亲本木葡聚糖酶的分离的变体,所述变体在所述亲本木葡聚糖酶的位置 68 包含氨基酸取代,所述亲本木葡聚糖酶是 SEQ ID NO :3,且其中所述变体在位置 68 的氨基酸用组氨酸取代;其中所述变体为选自下述的改变组合:

K13A+Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P ;
D33V+Q68H+N168H+V450I ;
Q68H ;
Q68H+G200P+N331F ;
Q68H+K118A+K129A+R156Y + G200P+N331F ;
Q68H+K118A+R156V+G200P+N331F ;
Q68H+K118A+R156Y+H193T+D366H ;
Q68H+K118R+R156F, Y ;
Q68H+K118R+R156Y+G200P ;
Q68H+K118S+R156F+G200P+G274D+N331F ;
Q68H+K129A, T+R156K+G200P+N331F ;
Q68H+R156F, V, Y+G200P+N331F ;
Q68H+R156Y ;
Q68H+R156Y+H193T ;
Q68H+R156Y+H193T+D366H ;
Q68H+R156Y+H193T+G200P+M310V ;
Q68H+S76W+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+N331F ;
Q68H+T92A, D, I, S, V, Y+K118A+K129A+R156Y+G200P + N331F ;
Q68H+T92N+D97N+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F ;
Q68H+T92S+K118A+K129A+R156Y+G200P+G274D+N331F ;
Q68H+T92V+G200P+M310V ;
Q68H+T92V+G200P+M310V+N331F ;
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+A224P+N331F ;
Q68H+T92V+K118A+K129A + Q137E + R156Y + G200P+N331F ;
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T ;
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+D366H ;
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+G200P+M310V+E446K ;
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+N331H, K, Q ;
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T ;
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T+D366H ;
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T+G200P+M310V ;
Q68H+T92V+K118A+Q137E+N140F+R156Y+G200P+K470T ;
Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+D324N ;
Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+K470T ;
Q68H+T92V + K118A + Q137E + R156Y+G200P+M310L ;
Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+N331F ;

Q68H+T92V+K118R+R156F ;
Q68H+T92V+K118A+R156Y ;
Q68H+T92V+K118A+S123P, T+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F ;
Q68H+T92V+K118R+R156Y+H193T+D366H ;
Q68H+T92V+R156F+G200P+M310V+S484C ;
Q68H+T92V+R156F, V, Y+G200P+M310V ;
Q68H+T92V+R156F, V, Y+G200P+M310V+N331F ;
Q68H + T92V + R156F, Y + H193T ;
Q68H+T92V+R156F, Y+H193T+D366H ;
Q68H+T92V+R156F, Y+H193T+G200P+M310V ;
Q68H+T92V+R156Y。

2. 一种分离的多核苷酸序列,其编码权利要求 1 所述的变体。

3. 权利要求 2 的多核苷酸序列,其中所述多核苷酸序列通过定点突变对应于 SEQ ID NO :1 的亲本多核苷酸序列来制备。

4. 一种包含表达载体的重组宿主细胞,所述表达载体包含权利要求 2 或 3 的多核苷酸序列。

5. 一种产生亲本木葡聚糖酶变体的方法,其中所述变体具有木葡聚糖酶活性,所述方法包括:

- a) 在适于所述变体表达的条件下培养权利要求 4 的宿主细胞;和
- b) 从培养基回收所述变体。

6. 一种改善木葡聚糖酶的洗涤剂稳定性的方法,其包括在亲本木葡聚糖酶的位置 68 的氨基酸取代,所述亲本木葡聚糖酶是 SEQ ID NO :3,且其中所述变体在位置 68 的氨基酸用组氨酸取代;其中所述变体为选自下述的改变组合:

K13A+Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P ;
D33V+Q68H+N168H+V450I ;
Q68H ;
Q68H+G200P+N331F ;
Q68H+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F ;
Q68H+K118A+R156V+G200P+N331F ;
Q68H+K118A+R156Y+H193T+D366H ;
Q68H+K118R+R156F, Y ;
Q68H+K118R+R156Y+G200P ;
Q68H+K118S+R156F+G200P+G274D+N331F ;
Q68H+K129A, T+R156K+G200P+N331F ;
Q68H+R156F, V, Y+G200P+N331F ;
Q68H+R156Y ;
Q68H+R156Y+H193T ;
Q68H+R156Y+H193T+D366H ;
Q68H+R156Y+H193T+G200P+M310V ;

Q68H+S76W+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+N331F ;
Q68H+T92A, D, I, S, V, Y+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F ;
Q68H+T92N+D97N+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F ;
Q68H+T92S+K118A+K129A+R156Y+G200P+G274D+N331F ;
Q68H+T92V+G200P+M310V ;
Q68H+T92V+G200P+M310V+N331F ;
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+A224P+N331F ;
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F ;
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T ;
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+D366H ;
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+G200P+M310V+E446K ;
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+N331H, K, Q ;
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T ;
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T+D366H ;
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T+G200P+M310V ;
Q68H+T92V+K118A+Q137E+N140F+R156Y+G200P+K470T ;
Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+D324N ;
Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+K470T ;
Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+M310L ;
Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+N331F ;
Q68H+T92V+K118R+R156F ;
Q68H+T92V+K118A+R156Y ;
Q68H+T92V+K118A+S123P, T+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F ;
Q68H+T92V+K118R+R156Y+H193T+D366H ;
Q68H+T92V+R156F+G200P+M310V+S484C ;
Q68H+T92V+R156F, V, Y+G200P+M310V ;
Q68H+T92V+R156F, V, Y+G200P+M310V+N331F ;
Q68H+T92V+R156F, Y+H193T ;
Q68H+T92V+R156F, Y+H193T+D366H ;
Q68H + T92V + R156F, Y + H193T+G200P+M310V ;
Q68H+T92V+R156Y。

7. 一种配制物,其包含权利要求 1 所述的变体。

8. 权利要求 7 的配制物,其中所述配制物是液体配制物。

家族 44 木葡聚糖酶变体

[0001] 涉及序列表

[0002] 本申请含有计算机可读形式的序列表,所述计算机可读形式通过提述并入本文。

发明领域

[0003] 本发明涉及属于家族 44 糖苷水解酶的木葡聚糖酶变体,编码所述变体的多核苷酸和产生所述变体的方法。

[0004] 发明背景

[0005] 木葡聚糖是在植物的初级(生长的)细胞壁中主要的结构多糖。在结构上,木葡聚糖由纤维素-样 β -1,4- 键的葡萄糖骨架组成,所述葡萄糖骨架经常以多种侧链取代。据信木葡聚糖在植物初级细胞壁中通过交联纤维素微纤维形成纤维素-木葡聚糖网络(network)而起作用。

[0006] 木葡聚糖酶能够催化木葡聚糖溶解(solubilization)为木葡聚糖寡糖(xyloglucan oligosaccharide)。一些木葡聚糖酶仅显示木葡聚糖酶活性,而其他显示木葡聚糖酶活性和纤维素酶活性。木葡聚糖酶可归类为 EC 3.2.1.4 或 EC3.2.1.151。具有木葡聚糖酶活性的酶,例如,在 Vincken 等(1997)CarbohydrateResearch 298(4):299-310 中描述,其中表征了来自绿色木霉(*Trichoderma viride*)(类似于里氏木霉 *T.reesei*)的三种不同的内切葡聚糖酶 EndoI、EndoV 和 EndoVI。EndoI、EndoV 和 EndoVI 分别属于糖苷水解酶的家族 5、7 和 12,参见 Henrissat, B. (1991)Biochem. J. 280:309-316 以及 Henrissat, B. 和 Bairoch, A. (1993)Biochem. J. 293:781-788。WO 94/14953 公开了从真菌棘孢曲霉(*Aspergillus aculeatus*)克隆的家族 12 木葡聚糖酶(EG II)。WO 99/02663 公开了分别从地衣芽孢杆菌(*Bacillus lichenioformis*)和 *Bacillus agaradhaerens* 克隆的家族 12 和家族 5 木葡聚糖酶。WO 01/062903 公开了家族 44 木葡聚糖酶。

[0007] 具体而言,WO 99/02663 和 WO 01/062903 表明木葡聚糖酶可用于洗涤剂。

[0008] 本发明的一个目的是提供属于糖苷水解酶的家族 44 的木葡聚糖酶变体,与其亲本酶相比具有改善的特性。

发明内容

[0009] 本发明涉及亲本木葡聚糖酶分离的变体,在选自下组的位置编号的一个或多个(几个)位置处包含改变:68、123、156、118、200、129、137、193、92、83、149、34、340、332、9、76、331、310、324、498、395、366、1、374、7、140、8、14、21、211、37、45、13、78、87、436、101、104、111、306、117、119、414、139、268、142、159、164、102、168、176、180、482、183、202、206、217、4、222、19、224、228、232、2、240、244、5、247、249、328、252、259、406、267、269、275、179、166、278、281、288、298、301、18、302、165、80、303、316、169、322、120、146、342、348、147、353、380、468、382、383、38、384、389、391、10、392、396、177、397、399、409、237、413、253、415、418、40、443、445、148、449、225、450、454、3、455、456、299、461、470、204、476、488、347 和 507,所述位置对应于氨基酸序列 SEQ ID NO:3 中的位置,且其中所述改变独立地为

[0010] i) 在占据所述位置的氨基酸下游插入氨基酸,

[0011] ii) 缺失占据所述位置的氨基酸,或

[0012] iii) 用不同的氨基酸取代占据所述位置的氨基酸;和

[0013] 所述亲本木葡聚糖酶是家族 44 木葡聚糖酶;且所述变体具有木葡聚糖酶活性。

[0014] 本发明还涉及编码所述变体木葡聚糖酶的分离的多核苷酸或具有木葡聚糖酶活性的多肽,包含所述多核苷酸的核酸构建体、载体和宿主细胞,以及产生亲本木葡聚糖酶变体或具有木葡聚糖酶活性的多肽的方法。

[0015] 发明的详细说明

[0016] 本发明涉及亲本家族 44 木葡聚糖酶的变体,其包含改变,优选为在一个或多个(几个)位置取代和/或插入和/或缺失的形式,其中所述位置的编号对应于 SEQ ID NO:3 中位置的编号。本发明的变体具有木葡聚糖酶活性并潜在地还具有纤维素分解活性。本发明的变体与亲本木葡聚糖酶相比具有改进的性质。在一个方面,所述变体在液体洗涤剂中,特别是在液体洗衣洗涤剂(laundry detergent)组合物中具有改善的稳定性。

[0017] 定义

[0018] 木葡聚糖酶活性:

[0019] 本文中术语“木葡聚糖酶活性”定义为催化木葡聚糖水解脱的酶。所述反应涉及木葡聚糖酶中 1,4- β -D- 葡萄糖苷键的内水解。就本发明而言,木葡聚糖酶活性使用 AZCL- 木葡聚糖(来自 Megazyme)作为反应底物来确定。所述测定法可以以几种方式进行,例如,如本申请实施例 2 中描述的,或如 W001/62903 中描述的。一个木葡聚糖酶活性单位(XylOU)参照描述于 W001/62903 第 60 页第 3-17 行的测定方法来定义。

[0020] 纤维素酶活性:本文中术语“纤维素酶活性”定义为催化 β -1,4- 葡聚糖(纤维素)中 1,4- β -D- 葡萄糖苷键的水解的酶。就本发明而言,纤维素酶活性使用 AZCL-HE- 纤维素(来自 Megazyme)作为反应底物来确定。

[0021] 变体:术语“变体”在本文中定义为具有木葡聚糖酶活性的多肽,其包含改变,如在一个或多个(几个)特定位置的氨基酸残基的取代、插入和/或缺失,所述位置对应于在 SEQ ID NO:3 中的氨基酸位置。本发明的变体还可具有纤维素酶活性。改变的多肽(变体)经人为干预(human intervention)通过修饰编码亲本酶的多核苷酸序列来获得。所述亲本酶可由 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:6 或下述序列编码,所述序列与这些序列之一具有至少 65%、更优选至少 70%、更优选至少 75%、更优选至少 80%、更优选至少 85%、甚至更优选至少 90%、最优选至少 95% 的同一性,且其编码活性多肽。所述变体多肽序列优选为自然界未发现的。

[0022] 野生型酶:术语“野生型”木葡聚糖酶指由天然存在的微生物(如在自然界发现的细菌、酵母或丝状真菌)表达的木葡聚糖酶。术语野生型可与术语“天然存在的”互换使用。

[0023] 亲本酶:本文中使用的术语“亲本”木葡聚糖酶或“亲本的”木葡聚糖酶意为下述木葡聚糖酶,对其进行修饰(例如,取代、插入、缺失和/或截短)以产生本发明的酶变体。该术语还指与变体相比较和比对的多肽。所述亲本可为天然存在的(野生型)多肽,如 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:5 或 SEQ ID NO:7 的酶或与这些序列之一具有至少 65%、更优选至少 70%、更优选至少 75%、更优选至少 80%、更优选至少 85%、甚至更优选至少 90%、最优选至少 95% 的同一性的多肽。所述亲本多肽还可以是天然存在的多肽的变

体,其氨基酸序列经修饰或改变。亲本还可以是等位变体,其为由占据相同染色体基因座的基因的两种或更多种可选形式编码的多肽。

[0024] 分离的变体或多肽:本文中使用的术语“分离的变体”或“分离的多肽”指从下述来源分离的变体或多肽,所述来源例如表达所述变体或多肽的宿主细胞,或其中所述变体或多肽通常存在的酶复合物。优选地,所述多肽如通过 SDS-PAGE 所确定的为至少 40%纯、更优选至少 60%纯、甚至更优选至少 80%纯、更优选至少 90%纯,且甚至最优选至少 95%纯。

[0025] 基本上纯的变体或多肽:本文中术语“基本上纯的变体”或“基本上纯的多肽”指多肽制备物,其按重量计,包含最多 10%、优选最多 8%、更优选最多 6%、更优选最多 5%、更优选最多 4%、更优选最多 3%、甚至更优选最多 2%、最优选最多 1%、且甚至最优选最多 0.5%的与其天然或重组结合的其他多肽物质。因此,优选所述基本上纯的变体或多肽按存在于所述制备物中的总多肽物质的重量计,为至少 92%纯、优选至少 94%纯、更优选至少 95%纯、更优选至少 96%纯、更优选至少 96%纯、更优选至少 97%纯、更优选至少 98%纯、甚至更优选至少 99%纯、最优选至少 99.5%纯,且甚至最优选 100%纯。本发明的变体和多肽优选为基本上纯的形式。这可通过,例如,以公知的重组方法或经典的(classical)纯化方法制备变体或多肽来完成。

[0026] 成熟多肽:本文中术语“成熟多肽”定义为具有木葡聚糖酶活性的多肽,其为翻译和任何翻译后修饰(如 N 端加工、C 端截短、糖基化、磷酸化等)之后的最终形式。对于由 SEQ ID NO:2 定义的多肽,成熟木葡聚糖酶序列理论上可在 SEQ ID NO:2 的 28 位起始。所述成熟序列在 SEQ ID NO:2 的 551 位结束。理论的成熟木葡聚糖酶序列示于 SEQ ID NO:3。取决于表达系统,实际的成熟多肽长度可基于理论的成熟多肽有 1-10 个氨基酸长度的变动。成熟多肽可,例如,在 SEQ ID NO:2 的 33 位起始,并在 SEQ ID NO:2 的 551 位结束。

[0027] 成熟多肽编码序列:本文中术语“成熟多肽编码序列”定义为编码具有木葡聚糖酶活性的成熟多肽的核苷酸序列。在一个方面,所述成熟多肽编码序列是 SEQ ID NO:1 的 82-1653。所述成熟多肽编码序列在长度上可有 3-30 个核苷酸的变动,取决于表达系统。成熟多肽编码序列可,例如,对应于 SEQ ID NO:1 的核苷酸 97-1653。

[0028] 同一性:两个氨基酸序列或两个核苷酸序列之间的相关性(relatedness)可以由参数“同一性”来定义。

[0029] 就本发明而言,两个氨基酸序列之间的同一性程度使用如在 EMBOSS 程序包(EMBOSS:The European Molecular Biology Open Software Suite,Rice 等,2000,Trends in Genetics 16:276-277;<http://emboss.org>)中的 Needle 程序(优选 3.0.0 或其后版本)所执行的 Needleman-Wunsch 算法(Needleman 和 Wunsch,1970,J. Mol. Biol. 48:443-453)来确定。使用的任选参数为缺口开放罚分为 10,缺口延伸罚分为 0.5,以及 EBLOSUM62(BLOSUM62 的 EMBOSS 版本)取代矩阵。标记为“最长同一性”的 Needle 输出(使用 -nobrief 选项获得)用作所述百分比同一性,并如下计算:

[0030] $(\text{相同的残基} \times 100) / (\text{比对长度} - \text{比对中缺口的总数})$

[0031] 就本发明而言,两个脱氧核糖核苷酸序列间的同一性程度使用如在 EMBOSS 程序包(EMBOSS:The European Molecular Biology Open Software Suite,Rice 等,2000,Trends in Genetics 16:276-277;<http://emboss.org>)中的 Needle 程序(优选 3.0.0 或

其后版本)所执行的Needleman-Wunsch算法(Needleman和Wunsch,1970,J. Mol. Biol. 48 : 443-453)来确定。使用的任选参数为缺口开放罚分为10,缺口延伸罚分为0.5,以及EDNAFULL(NCBINUC4.4的EMBOSS版本)取代矩阵。标记为“最长同一性”的Needle输出(使用-nobrief选项获得)用作所述百分比同一性,并如下计算:

[0032] (相同的脱氧核糖核苷酸 x 100)/(比对长度 - 比对中缺口总数)

[0033] 功能性片段:术语“功能性片段”用于描述来源于更长多肽(例如,成熟多肽)的多肽,所述更长多肽在其N端区或C端区或在两个区中经截短以生成所述亲本多肽的片段。为了成为功能性多肽,所述片段必需保持全长/成熟多肽的木葡聚糖酶活性的至少20%、优选至少40%、更优选至少50%、更优选至少60%、更优选至少70%、更优选至少80%、更优选至少90%、更优选至少95%,且甚至更优选至少100%。

[0034] 等位变体:本文中术语“等位变体”指占据相同染色体基因座的基因的两种或更多种可选形式中的任一种。等位变异通过突变天然地出现,且可导致种群中的多态性。基因突变可为沉默的(在编码多肽中无变化)或可编码具有改变的氨基酸序列的多肽。多肽的等位变体是由基因等位变体编码的多肽。

[0035] 分离的多核苷酸:本文中术语“分离的多核苷酸”指从来源分离的多核苷酸。在一个方面,所述分离的多核苷酸如通过琼脂糖电泳确定为至少40%纯、更优选至少60%纯、甚至更优选至少80%纯,且最优选至少90%纯,且甚至最优选至少95%纯。

[0036] 基本上纯的多核苷酸:本文中使用的术语“基本上纯的多核苷酸”指下述的多核苷酸制备物,其不含其他外源的或不需要的核苷酸,并为适于在经遗传工程改造的多肽产生系统中使用的形式。因此,基本上纯的多核苷酸按重量计,包含最多10%、优选最多8%、更优选最多6%、更优选最多5%、更优选最多4%、更优选最多3%、甚至更优选最多2%、最优选最多1%、且甚至最优选最多0.5%的与其天然或重组结合的其他多核苷酸物质。然而,基本上纯的多核苷酸可包括天然存在的5'或3'未翻译区,如启动子或终止子。优选所述基本上纯的多核苷酸按重量计为至少90%纯、优选至少92%纯、更优选至少94%纯、更优选至少95%纯、更优选至少96%纯、更优选至少97%纯、甚至更优选至少98%纯、最优选至少99%纯、甚至最优选至少99.5%纯。本发明的多核苷酸优选为基本上纯的形式,即,所述多核苷酸制备物基本上不含与其天然或重组结合的其他多核苷酸物质。所述多核苷酸可为基因组、cDNA、RNA、半合成或合成来源的,或其任意组合。

[0037] 编码序列:当在本文中使用术语“编码序列”意为多核苷酸,其直接指明其多肽产物的氨基酸序列。编码序列的边界通常由开放阅读框确定,其通常以ATG起始密码子或替代的起始密码子(如GTG和TTG)开始,并以终止密码子(如TAA、TAG和TGA)结束。所述编码序列可为DNA、cDNA、合成或重组的多核苷酸。

[0038] 可操作地连接:本文中术语“可操作地连接”指下述构型(configuration),其中调控序列相对于多核苷酸序列的编码序列置于合适位置,从而使得所述调控序列指导多肽编码序列的表达。

[0039] 宿主细胞:本文中使用的术语“宿主细胞”包括任何细胞类型,其对用包含本发明多核苷酸的核酸构建体或载体的转化、转染、转导等是易感的。术语“宿主细胞”涵盖任何亲本细胞的子代,其由于在复制中发生的突变而与亲本细胞不同。

[0040] 改善的化学稳定性:本文中术语“改善的化学稳定性”定义为变体酶在减少亲本酶

的酶活性的化学品（天然存在的或合成的）的存在下温育一段时间后，显示酶活性的保留。改善的化学稳定性还可导致能够在上述化学品存在下更佳地催化反应的变体。在本发明的一个具体方面，所述改善的化学稳定性是在洗涤剂，特别是液体洗涤剂中改善的稳定性。特别地，所述改善的洗涤剂稳定性是，当本发明的木葡聚糖酶变体混合入液体洗涤剂配制物中，并在 15-50℃ 的温度储存时，木葡聚糖酶活性的改善的稳定性。

[0041] 在本发明中，液体洗涤剂作为液体洗衣洗涤剂是特别有用的。

[0042] 变体命名规则：

[0043] 就本发明而言，公开于 SEQ ID NO :3 中的木葡聚糖酶的氨基酸序列用于确定在其他木葡聚糖酶中对应的氨基酸残基。将其他木葡聚糖酶的氨基酸序列与公开于 SEQ ID NO :3 中的木葡聚糖酶的氨基酸序列进行比对，并基于该比对，可以确定 SEQ ID NO :3 所公开的木葡聚糖酶的氨基酸序列中任何氨基酸残基对应的氨基酸位置编号。

[0044] 多肽序列的比对可使用，例如，“ClustalW” (Thompson, J.D., Higgins, D.G. 和 Gibson, T.J., 1994, CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice, Nucleic Acids Research 22:4673-4680) 进行。DNA 序列的比对可以使用所述多肽比对作为模板，将氨基酸用来自所述 DNA 序列的对应密码子替代来进行。

[0045] 在描述本发明的多种木葡聚糖酶变体时，为了参照方便起见，采用了下面所述的命名法。在所有情况下，使用通用的 IUPAC 单字母或三字母氨基酸缩写。

[0046] 取代。对于氨基酸取代，使用下述命名法：初始氨基酸 / 位置 / 取代氨基酸。相应地，在 226 位用丙氨酸取代苏氨酸命名为“Thr226Ala”或“T226A”。多个突变用加号（“+”）分开，例如，“G205R+S411F”，代表在 205 和 411 位分别用精氨酸 (R) 取代甘氨酸 (G)，以及用苯丙氨酸 (F) 取代丝氨酸 (S) 的突变。当初始氨基酸可由选自一组的氨基酸取代时，其命名为，如“K129R, S, A, I, F, Q”，表示用选自下组的氨基酸取代 129 位的赖氨酸 (K)：精氨酸 (R)、丝氨酸 (S)、丙氨酸 (A)、异亮氨酸 (I)、苯丙氨酸 (F) 和谷氨酰胺 (Q)。或者，“K129R, S, A, I, F, Q”可写作 K129R 或 K129S 或 K129A 或 K129I 或 K129F 或 K129Q。

[0047] 缺失。对于氨基酸缺失，使用下述命名法：起始氨基酸 / 位置 / 星号 (*)。相应地，在 195 位缺失甘氨酸命名为“Gly195*”或“G195*”。多个缺失用加号（“+”）分开，例如，G195*+S411*。

[0048] 插入。对于氨基酸插入，使用下述命名法：星号 (*) / 位置 / 小写字母 / 插入的氨基酸，其中所述小写字母表明在所述位置编号下游添加氨基酸。相应地，在 10 位下游添加谷氨酸 (E) 命名为“*10aE”。如果第二个氨基酸，例如缬氨酸 (V)，在所述谷氨酸 (E) 之后插入到 10 位的下游，则其命名为“*10aE+*10bV”。添加至多肽的 N 端以 0 命名。将谷氨酸 (E) 和缬氨酸 (V) 添加至多肽的 N 端氨基酸的添加命名为“*0aE+*0bV”。“下游”插入还可描述为在指明的位置和紧接着指明位置之后的位置之间添加一个或多个氨基酸，例如，在 195 位下游插入导致在 195 位和 196 位之间添加一个或多个氨基酸，由此生成新的位置 *195a, *195b 等。

[0049] 亲本木葡聚糖酶

[0050] 在本发明中，所述亲本木葡聚糖酶是 (a) 属于家族 44 的糖苷水解酶（也称为家族

44 木葡聚糖酶) 的木葡聚糖酶 ; 或 (b) 选自下组的多肽 : SEQ ID NO : 3、SEQ ID NO : 5 和 SEQ ID NO : 7 ; 或 (c) 包含与 SEQ ID NO : 3 的成熟多肽具有 75% 同一性的氨基酸序列的多肽 ; 或 (d) 由在至少中等严格条件下与下述序列杂交的多核苷酸编码的多肽 : (i) SEQ ID NO : 1 或 SEQ ID NO : 4 或 SEQ ID NO : 6 的成熟多肽编码序列、(ii) 包含 SEQ ID NO : 1 或 SEQ ID NO : 4 或 SEQ ID NO : 6 的成熟多肽编码序列的基因组 DNA 序列或 (iii) (i) 或 (ii) 的全长互补链 ; 或 (e) 由包含与 SEQ ID NO : 1 的成熟多肽编码序列具有至少 70% 同一性的核苷酸序列的多核苷酸编码的多肽。

[0051] 在第一个方面, 所述亲本木葡聚糖酶包含下述氨基酸序列, 其与 SEQ ID NO : 3 的成熟多肽具有至少 70%、更优选至少 75%、更优选至少 80%、更优选至少 85%、更优选至少 90%、更优选至少 95%、更优选至少 96%、甚至更优选至少 97%、最优选至少 98%、甚至最优选至少 99% 的同一性程度, 且其具有木葡聚糖酶活性 (在下文中称为“同源多肽”)。在一个方面, 所述同源多肽具有下述氨基酸序列, 其与 SEQ ID NO : 3 的成熟多肽相差十个氨基酸、优选九个、更优选八个、更优选七个、更优选六个、更优选五个氨基酸、更优选四个氨基酸、甚至更优选三个氨基酸、最优选两个氨基酸、甚至最优选一个氨基酸。

[0052] 基本上同源的亲本木葡聚糖酶可具有一个或多个 (几个) 氨基酸改变, 如取代、缺失和 / 或插入。这些变化优选为对性质较不重要的 (of a minor nature), 其为保守氨基酸取代, 或其他并不显著影响所述蛋白质或多肽三维折叠或活性的氨基酸取代 ; 小缺失, 通常为 1 到约 9 个氨基酸, 优选 1 到约 15 个氨基酸, 且最优选 1 到约 30 个氨基酸 ; 以及小的氨基或羧基端延伸, 如氨基端甲硫氨酸残基, 多至约五到十个残基、优选 10 到 15 个残基且最优选 20 到 25 个残基的小接头肽, 或促进纯化的小延伸 (亲和标签), 如多组氨酸标签或蛋白质 A (Nilsson 等, 1985, EMBO J. 4 : 1075 ; Nilsson 等, 1991, Methods Enzymol. 198 : 3. 还可参见, 一般地, Ford 等, 1991, Protein Expression and Purification 2 : 95-107。

[0053] 尽管上述变化优选为性质较不重要的, 上述变化也可为对性质重要的 (of a substantive nature), 如作为氨基端或羧基端的延伸的多至 300 个或更多个氨基酸的较大多肽的融合体。

[0054] 保守取代的实例为在碱性氨基酸 (精氨酸、赖氨酸和组氨酸)、酸性氨基酸 (谷氨酸和天冬氨酸)、极性氨基酸 (谷氨酰胺和天冬酰胺)、疏水氨基酸 (亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸)、芳族氨基酸 (苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸) 以及小氨基酸 (甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸和甲硫氨酸) 组内的取代。通常不改变比活的氨基酸取代在本领域是已知的, 并由, 例如, Neurath 和 Hill, 1979 在 The Proteins, Academic Press, New York 中描述。最通常发生的交换为 Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Tyr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu 和 Asp/Gly。

[0055] 在本发明的木葡聚糖酶多肽中的必需氨基酸 (essential amino acid) 可根据本领域已知方法, 如定点诱变或丙氨酸扫描诱变 (alanine-scanning mutagenesis) (Cunningham 和 Wells, Science 244 : 1081-1085, 1989)。对于后一技术, 将单一丙氨酸突变引入分子中的每个残基, 并就生物学活性 (即, 木葡聚糖酶活性) 测试所得到的突变分子以鉴定对所述分子的活性至关重要的氨基酸残基。亦参见 Hilton 等, J. Biol. Chem. 271 : 4699-4708, 1996。所述酶或其他生物学相互作用的活性部位还可通过对结构的物理分析来确定, 如由下述技术确定 : 核磁共振、晶体学 (crystallography)、电子衍射或光亲和标

记,连同对推定的接触位点(contract site)氨基酸进行突变。参见,例如,de Vos等,Science 255:306-312,1992;Smith等,J.Mol.Biol. 224:899-904,1992;Wlodaver等,FEBS Lett. 309:59-64,1992。必需氨基酸的身份还可以从与本发明多肽相关的多肽的同源性分析推出。属于家族 44 糖苷水解酶的酶的晶体结构由 Kitago 等, J. Biol. Chem. Vol. 282:35703-35711,2007 所公开。基于该结构,用计算机模拟(in silico)生成所述亲本木葡聚糖酶(SEQ ID NO:3)的三维结构是可能的。基于与公开的结构相比较,SEQ ID NO:3 中下述残基被鉴定为对酶功能是至关重要的:E187(催化-酸/碱)、E358(催化-亲核)、E56(羧基基团对 Ca^{2+} 配位)和 D154(羧基基团对 Ca^{2+} 配位)。因此,这些位置在亲本酶中优选不突变。

[0056] 亲本木葡聚糖酶优选包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列或其等位变体;或其具有木葡聚糖酶活性的片段。在一个方面,所述亲本木葡聚糖酶包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列。在另一个方面,所述亲本木葡聚糖酶包含 SEQ ID NO:2 的成熟多肽。在另一个方面,所述亲本木葡聚糖酶由 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列或其等位变体组成;或其具有木葡聚糖酶活性的片段。在另一个方面,所述亲本木葡聚糖酶包含 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列,或其等位变体;或其具有木葡聚糖酶活性的片段。在另一个方面,所述亲本木葡聚糖酶包含 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列,或其等位变体;或其具有木葡聚糖酶活性的片段。在另一个方面,所述亲本木葡聚糖酶包含与 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:5 至少 65%、更优选至少 70%、更优选至少 75%、更优选至少 80%、更优选至少 85%、更优选至少 90%、最优选至少 95% 相同的氨基酸序列。SEQ ID NO:3 的成熟多肽的片段是从该氨基酸序列的氨基和/或羧基端缺失一个或多个(几个)氨基酸,并仍旧保持木葡聚糖酶活性的多肽。

[0057] 在第二个方面,所述亲本木葡聚糖酶由在非常低严格条件、优选低严格条件、更优选中等严格条件、更优选中高严格条件、甚至更优选高严格条件,且最优选非常高严格条件下与下述序列杂交的多核苷酸编码:(i) SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:6 的成熟多肽编码序列、(ii) 包含 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:6 的成熟多肽编码序列的基因组 DNA 序列、(iii) (i) 或 (ii) 的亚序列,或 (iv) (i)、(ii) 或 (iii) 的全长互补链(J. Sambrook, E. F. Fritsch 和 T. Maniatis,1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2dedition, Cold Spring Harbor, New York)。所述亚序列可编码具有木葡聚糖酶活性的多肽片段。在一个方面,所述互补链是 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:6 的成熟多肽编码序列的全长互补链。

[0058] SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:6 的成熟多肽编码序列的亚序列,或其同源物,是从 5'-和/或 3'-端缺失一个或多个(几个)核苷酸的核苷酸序列,其中由所述亚序列编码的多肽具有木葡聚糖酶活性。

[0059] 亲本酶还可为具有木葡聚糖酶活性的多肽的等位变体。

[0060] SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:6 的多核苷酸;或其亚序列;以及 SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:5 或 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列;或其片段;可用于根据本领域公知方法设计核酸探针以从不同属或种的株鉴定并克隆编码亲本木葡聚糖酶的 DNA。具体而言,上述探针可用于遵循标准 Southern 印迹法,与目标属或种的基因组或 cDNA 杂交,从而鉴定并分离其中相应的基因。上述探针可显著地短于整个序列,但应为至少 14 个、优选至少 25 个、更优选至少 35 个且最优选至少 70 个核苷酸的长度。然而,优选所述核酸探针为至

少 100 个核苷酸的长度。举例而言,所述核酸探针可为至少 200 个核苷酸,优选至少 300 个核苷酸,更优选至少 400 个核苷酸,或最优选至少 500 个核苷酸的长度。可使用甚至更长的探针,例如优选至少 600 个核苷酸、更优选至少 700 个核苷酸、甚至更优选至少 800 个核苷酸、优选至少 900 个核苷酸的长度,优选至少 1000 个核苷酸的长度、优选至少 1100 个核苷酸的长度、优选至少 1200 个核苷酸的长度、优选至少 1300 个核苷酸的长度、优选至少 1400 个核苷酸的长度、优选至少 1500 个核苷酸的长度或最优选至少 1600 个核苷酸的长度的核酸探针。DNA 探针和 RNA 探针两者都可以使用。所述探针通常经标记以供检测其相应的基因(举例而言,用 ^{32}P 、 ^3H 、 ^{35}S 、生物素或抗生物素蛋白标记)。本发明涵盖上述探针。

[0061] 可针对与上述探针杂交并编码亲本木葡聚糖酶的 DNA,筛选从其他生物制备的基因组 DNA 文库。来自其他生物的基因组或其他 DNA 可通过琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳或其他分离技术来分离。来自文库的 DNA 或经分离的 DNA 可转移至并固定于硝酸纤维素或其他合适的载体材料。为了鉴定与 SEQ ID NO:1 或其亚序列同源的克隆或 DNA,将所述载体材料用于 Southern 印迹。就本发明而言,杂交表明所述多核苷酸与标记的核苷酸探针在低到非常高严格条件下杂交,所述探针对应于 SEQ ID NO:1 所示的多核苷酸、其互补链或其亚序列。与探针杂交的分子可使用,例如,X 射线片(X-rayfilm)或本领域已知的其他任何检测手段来检测。

[0062] 在一个方面,所述核酸探针是 SEQ ID NO:1 的成熟多肽编码序列。在另一个方面,所述核酸探针是 SEQ ID NO:1 的核苷酸 82-1653,或 SEQ ID NO:1 的核苷酸 97-1653。在另一个方面,所述核酸探针是编码 SEQ ID NO:2 的多肽或其亚序列的多核苷酸序列。在另一个方面,所述核酸探针是 SEQ ID NO:1。

[0063] 对于至少 100 个核苷酸长度的长探针,非常低到非常高严格条件定义为在 42°C 在 5X SSPE,0.3% SDS,200 毫克/ml 经剪切和变性的鲑精 DNA,以及(对于非常低和低严格条件)25%甲酰胺、(对于中等和中-高严格条件)35%甲酰胺或(对于高和非常高严格条件)50%甲酰胺下,遵循标准 Southern 印迹方法进行预杂交和杂交最佳 12 到 24 小时。

[0064] 对于至少 100 个核苷酸长度的长探针,所述载体材料最终洗涤三次,每次 15 分钟,使用 2X SSC,0.2% SDS,优选在 45°C (非常低严格条件)、更优选在 50°C (低严格条件),更优选在 55°C (中等严格条件),更优选在 60°C (中-高严格条件),且最优选在 70°C (非常高严格条件)进行。

[0065] 对于约 15 个核苷酸到 70 个核苷酸长度的短探针,严格条件定义为根据 Bolton 和 McCarthy(1962, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 48:1390)在 0.9M NaCl,0.09M Tris-HCl pH 7.6,6mM EDTA,0.5% NP-40,1X Denhardt's 溶液,1mM 焦磷酸钠,1mM 磷酸二氢钠,0.1mM ATP 和 0.2mg 每 ml 酵母 RNA 中,在比计算的 T_m 低约 5°C 到约 10°C 遵循标准 Southern 印迹法进行预杂交、杂交和杂交后洗涤最佳 12-24 小时。

[0066] 对于约 15 个核苷酸到 70 个核苷酸长度的短探针,所述载体材料在 6XSSC 加 0.1% SDS 中洗涤一次 15 分钟,并使用 6X SSC 在比计算的 T_m 低 5°C 到 10°C 洗涤两次,每次 15 分钟。

[0067] 在第三个方面,亲本木葡聚糖酶由下述多核苷酸编码,所述多核苷酸包含与 SEQ ID NO:1 的成熟多肽编码序列具有优选至少 65%、更优选至少 70%、更优选至少 75%、更优选至少 80%、更优选至少 85%、甚至更优选至少 90%、最优选至少 95%、且甚至最优选

96%、97%、98%或99%的同一性程度的核苷酸序列,或由上述核苷酸序列组成,且所述多核苷酸编码活性多肽。在一个方面,所述成熟多肽编码序列是 SEQ ID NO:1 的核苷酸 82-1653,或 SEQ ID NO:1 的核苷酸 97-1653。

[0068] 所述亲本木葡聚糖酶可从任何属的微生物获得。在一个方面,所述亲本木葡聚糖酶是胞外分泌的。

[0069] 在另一个方面,所述亲本木葡聚糖酶可为细菌木葡聚糖酶。举例而言,所述木葡聚糖酶可为革兰氏阳性细菌多肽,如芽孢杆菌属 (*Bacillus*),优选来自芽孢杆菌/乳杆菌 (*Lactobacillus*) 亚门,优选来自类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus*),特别是多粘类芽孢杆菌 (*Paenibacillus polymyxa*),例如,多粘类芽孢杆菌 ATCC832,优选所述木葡聚糖酶是家族 44 木葡聚糖酶,例如,如 WO 01/62903 所述的,更优选 SEQ ID NO:5 的木葡聚糖酶,更优选 SEQ ID NO:7 的木葡聚糖酶,且最优选 SEQ ID NO:2 的木葡聚糖酶或其成熟多肽。

[0070] 变体的产生

[0071] 亲本木葡聚糖酶的变体可根据任何本领域已知的诱变方法来制备,如随机和/或定点诱变、合成基因构建 (synthetic gene construction)、半合成基因构建 (semi-synthetic gene construction)、随机诱变、改组等。

[0072] 合成基因构建涉及在体外合成设计为编码目标多肽分子的多核苷酸分子。基因合成可利用多种技术,如由 Tian 等 (Tian 等, *Nature* 432:1050-1054) 所述基于多重微芯片的技术 (multiplex microchip-based) 和类似技术来进行,其中合成寡核苷酸并在光-可编程的微流芯片 (photo-programmable microfluidic chip) 上组装。

[0073] 半合成基因构建通过组合合成基因构建,和/或定点诱变,和/或随机诱变,和/或改组的方面 (aspect) 来达成。半合成构建的代表为利用合成的多核苷酸片段结合 PCR 技术的方法。因而可从头合成 (synthesize de novo) 基因的给定区,而其他区可使用定点特异性突变引物来扩增,而还可对其他区进行易错 PCR 或非易错 PCR 扩增。然后可将多核苷酸片段改组。

[0074] 定点诱变是在编码所述亲本木葡聚糖酶的多核苷酸分子中给定位点创建一种或几种突变的技术。所述技术可在体外或体内进行。

[0075] 定点诱变可在体外通过 PCR 达成,其涉及使用含有所需突变的寡核苷酸引物。定点诱变也可在体外通过盒式诱变 (cassette mutagenesis) 来进行,其涉及由限制性酶在所述质粒上的位点进行切割,所述质粒包含编码所述亲本木葡聚糖酶的多核苷酸,并随后将含有所述突变的寡核苷酸连接于 (ligation) 所述多核苷酸。通常对质粒和寡核苷酸进行消化的限制性酶是同一个,从而使得所述质粒和插入物的粘性末端彼此连接。对于合适技术的进一步描述,参见 Sambrook 等 (1989), *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor lab., Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, F.M. 等 (编) "Current protocols in Molecular Biology". John Wiley and Sons, 1995; Harwood, C.R., 和 Cutting, S.M. (编) "Molecular Biological Methods for *Bacillus*". John Wiley and Sons, 1990) 以及 WO 96/34946; Scherer 和 Davis, 1979, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4949-4955; 以及 Barton 等, 1990, *Nucleic Acids Research* 18: 7349-4966。

[0076] 在所述连接酶反应之后,连接混合物可用于转化宿主细胞,就克隆而言,经常使用大肠杆菌细胞,如 Ausubel, F.M. 等中所述。转化的大肠杆菌细胞可在液体培养基或固体琼

脂糖平板上增殖,质粒可从所述转化细胞中回收,并用来转化枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 细胞。可如 WO 03/095658 中所述进行转化合适的感受态芽孢杆菌属细胞,如 MB1510,衍生自 168 (例如,可从 BGSC 以登录号 1A1168trpC2 得到)。供文库构建的由大肠杆菌质粒携带的整合盒可用于芽孢杆菌属的转化。所述方法详细描述于 WO 03/095658。或者,可使用体外扩增的 PCR-SOE- 产物 (Melnikov 和 Youngman, *Nucleic Acid Research* 27,1056)。

[0077] 定点诱变可在体内通过本领域已知方法来达成。参见,例如,美国专利公开号 2004/0171154;Storici 等,2001, *Nature Biotechnology* 19 :773-776;Kren 等,1998, *Nat. Med.* 4 :285-290;以及 Calissano 和 Macino,1996, *Fungal Genet. Newslett.* 43 :15-16。

[0078] 任何定点诱变方法可用于本发明。存在许多可用于制备亲本木葡聚糖酶变体的商业试剂盒。

[0079] 单一或多重氨基酸取代、缺失和 / 或插入可使用已知的诱变、重组和 / 或改组方法,然后进行相关的筛选方法来制备并测试,所述筛选方法如 Reidhaar-Olson 和 Sauer, 1988, *Science* 241 :53-57;Bowie 和 Sauer,1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 :2152-2156; WO 95/17413 或 WO 95/22625 所公开的。其他可使用的方法包括易错 PCR,噬菌体展示 (例如, Lowman 等,1991, *Biochem.* 30 :10832-10837;美国专利号 5,223,409;WO 92/06204) 和区域定向的 (region-directed) 诱变 (Derbyshire 等,1986, *Gene* 46 :145;Ner 等,1988, *DNA* 7 :127)。

[0080] 如上所述的诱变 / 改组方法可与高通量、自动化的筛选方法组合以检测由宿主细胞 (例如,如上所述的芽孢杆菌属) 表达的克隆的、经诱变的多肽的活性。编码具有木葡聚糖酶活性的多肽的经诱变的 DNA 分子可从宿主细胞回收,并使用本领域的标准方法快速地测序。

[0081] 变体

[0082] 在本发明中,亲本木葡聚糖酶的分离的变体在选自下组位置编号的一个或多个 (几个) 位置包含改变 :68、123、156、118、200、129、137、193、92、83、149、34、340、332、9、76、331、310、324、498、395、366、1、374、7、140、8、14、21、211、37、45、13、78、87、436、101、104、111、306、117、119、414、139、268、142、159、164、102、168、176、180、482、183、202、206、217、4、222、19、224、228、232、2、240、244、5、247、249、328、252、259、406、267、269、275、179、166、278、281、288、298、301、18、302、165、80、303、316、169、322、120、146、342、348、147、353、380、468、382、383、38、384、389、391、10、392、396、177、397、399、409、237、413、253、415、418、40、443、445、148、449、225、450、454、3、455、456、299、461、470、204、476、488、347 和 507,其中所述具有木葡聚糖酶活性的变体包含与所述亲本木葡聚糖酶的氨基酸序列具有至少 70%、更优选至少 75%、更优选至少 80%、更优选至少 85%、甚至更优选至少 90%、更优选至少 95%、更优选至少约 97%、最优选至少 98% 且甚至最更优选至少 99% 的同一性程度的氨基酸序列。这些位置的编号是相对于 SEQ ID NO :3 的氨基酸序列的。优选地,在上述一个或多个经鉴定的位置包含改变的变体在洗涤剂中,优选在液体洗涤剂中,与所述亲本木葡聚糖酶相比,具有增加的稳定性。

[0083] 在一个优选实施方案中,所述变体包含一个或多个 (几个) 下述的改变组合 :

[0084] V1*+V2*+H3* ;

[0085] V1Q*+1aE*+1bV ;

- [0086] H3A ;
- [0087] H3A+H436A ;
- [0088] K8A, Q, S ;
- [0089] T9D ;
- [0090] T9D+L34F+A83E+Q149E+H193T+S332P+R340T ;
- [0091] I10V+D33E+M40L+A41T+Q67M+Y73F+S76D+G78A+Q82K+T92A+L102Q+Q137E+I222V+V228I+D249N+S269N+V272A+E333A+I337L+M356L+T374A+S416A+D444Y+A469E+K470T+I473G+T517A+S522* ;
- [0092] I10V+F17S+D33E+M40L+A41T+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+Q137E+V219A+D249N+V272A+I337L+M356L+V397A+S416A+T421I+S424N+N441D+D444Y+V450I+K470T+I473S+V477I ;
- [0093] I10V+F17S+D33E+M40L+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+T92A+L102Q+Q137E+H164N+N168K+T172A+V219A+I222V+V228I+D249N+S269N+V272A+E333A+I337L+M356L+N415S+T421I+S424H+N441D+D444Y+S522P+P523V+V524E ;
- [0094] I10V+F17S+D33E+M40L+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+T92A+L102Q+Q137E+I222V+V228I+D249N+V272A+I337L+M356L+T374A+V397A+S416A+T421I+S424N+N441D+D444Y+V450I+A469E+K470T+I473G+T517A+S522P+P523V+V524E ;
- [0095] I10V+F17S+D33E+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+T92A+L102Q+Q137E+N168K+T172A+I222V+V228I+D249N+V272A+E333A+I337L+M356L+V397A+S416A+T421I+S424H+N441D+D444Y+A469E+K470T+I473S+V477I+E489A+A490V+T517A+S522* ;
- [0096] I10V+F17S+M40L+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+T92A+L102Q+Q137E+I222V+V228I+D249N+S269N+V272A+T320A+I337L+M356L+T374A+V397A+N415S+T421I+S424H+N441D+D444Y+A469E+K470T+I473S+V477I+T517A+S522P+P523V+V524E ;
- [0097] I10V+F17S+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+T104A+Q137E+N153K+R156Q+V219A+I222V+V228I+D249N+S269N+V272A+E333A+I337L+M356L+V397A+N415S+D420G+T421I+S424H+N441D+D444Y+V450I+A469E+K470T+I473G+T517A+S522* ;
- [0098] I10V+F17S+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+T92A+T104A+Q137E+R156Q+V159A+H164N+N168K+T172A+I222V+V228I+D249N+V272A ;
- [0099] I10V+F17S+Y53H+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+T92A+L102Q+Q137E+T172V+A177T+I222V+V228I+D249N+S269N+I337L+M356L+V397A+S416A+T421I+S424H+N441D+D444Y+A469E+K470T+I473G+T517A+S522* ;
- [0100] K13A+K129A ;
- [0101] K13A+Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P ;
- [0102] K13A, R ;
- [0103] K18R ;
- [0104] R20A ;
- [0105] K21Q+K129A ;
- [0106] K21Q, R, T ;
- [0107] Q32H+M40L+R49G+D65E+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+T92A+L102Q+T104A+Q137E+H

164N+K202E+I222V+V228I+D249N+M356L+T374A ;

[0108] D33V+Q68H+N168H+V450I ;

[0109] L34F, I, M, V ;

[0110] L34I+K129A ;

[0111] D37G, N+K129A+R156Y ;

[0112] E38I, V ;

[0113] M40L+A41T+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+Q137E+N153K+H164N+D249N+V272A+I337
L+M356L+V397A+N415S+T421I+S424N+N441D+V450I+E489A+A490V+T517A+S522* ;

[0114] M40V ;

[0115] L45I ;

[0116] Q68H, M, N ;

[0117] Q68H+G200P+N331F ;

[0118] Q68H+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F ;

[0119] Q68H+K118A+R156V+G200P+N331F ;

[0120] Q68H+K118A+R156Y+H193T+D366H ;

[0121] Q68H+K118R+R156F, Y ;

[0122] Q68H+K118R+R156Y+G200P ;

[0123] Q68H+K118S+R156F+G200P+G274D+N331F ;

[0124] Q68H+K129A, T+R156K+G200P+N331F ;

[0125] Q68H+R156F, V, Y+G200P+N331F ;

[0126] Q68H+R156Y ;

[0127] Q68H+R156Y+H193T ;

[0128] Q68H+R156Y+H193T+D366H ;

[0129] Q68H+R156Y+H193T+G200P+M310V ;

[0130] Q68H+S76W+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+N331F ;

[0131] Q68H+T92A, D, I, S, V, Y+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F ;

[0132] Q68H+T92N+D97N+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F ;

[0133] Q68H+T92S+K118A+K129A+R156Y+G200P+G274D+N331F ;

[0134] Q68H+T92V+G200P+M310V ;

[0135] Q68H+T92V+G200P+M310V+N331F ;

[0136] Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+A224P+N331F ;

[0137] Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F ;

[0138] Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T ;

[0139] Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+D366H ;

[0140] Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+G200P+M310V+E446K ;

[0141] Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+N331H, K, Q ;

[0142] Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T ;

[0143] Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T+D366H ;

[0144] Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T+G200P+M310V ;

- [0145] Q68H+T92V+K118A+Q137E+N140F+R156Y+G200P+K470T ;
- [0146] Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+D324N ;
- [0147] Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+K470T ;
- [0148] Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+M310L ;
- [0149] Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+N331F ;
- [0150] Q68H+T92V+K118A, R+R156Y, F ;
- [0151] Q68H+T92V+K118A+S123P, T+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F ;
- [0152] Q68H+T92V+K118R+R156Y+H193T+D366H ;
- [0153] Q68H+T92V+R156F+G200P+M310V+S484C ;
- [0154] Q68H+T92V+R156F, V, Y+G200P+M310V ;
- [0155] Q68H+T92V+R156F, V, Y+G200P+M310V+N331F ;
- [0156] Q68H+T92V+R156F, Y+H193T ;
- [0157] Q68H+T92V+R156F, Y+H193T+D366H ;
- [0158] Q68H+T92V+R156F, Y+H193T+G200P+M310V ;
- [0159] Q68H+T92V+R156Y ;
- [0160] S76E, I, K, M, R, T, V, W ;
- [0161] S76W+G200P ;
- [0162] S76W+G200P+A224P ;
- [0163] G78A+K118A++K129A+R156Y ;
- [0164] G78A+K118A+K129A+R156Y ;
- [0165] G78A+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F ;
- [0166] G78A+K118A+K129A+R156Y+K169A ;
- [0167] G78A, N, S ;
- [0168] G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y ;
- [0169] G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F ;
- [0170] G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y+K169A ;
- [0171] L80V ;
- [0172] A83D, E, H, I, L, N, R, S, T, Y ;
- [0173] K87Q ;
- [0174] K87V+K129A+K169A ;
- [0175] T92I, V ;
- [0176] T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F ;
- [0177] T92V+K118A+K129A+R156Y ;
- [0178] T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F ;
- [0179] T92V+K118A+K129A+R156Y+H164N+G200P+N331F ;
- [0180] T92V+K129A+R156Y ;
- [0181] K101A+K129A ;
- [0182] K101R ;
- [0183] K101R+L102I ;

- [0184] T104A+P111Q+A117S+K129A+R156Y ;
[0185] P111Q ;
[0186] K118A+K129A ;
[0187] K118A+K129A+F146L+R156Y+G200P+N331F ;
[0188] K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F ;
[0189] K118A+K129A+R156Y ;
[0190] K118A+K129A+R156Y+A224P ;
[0191] K118A+K129A+R156Y+G200P ;
[0192] K118A+K129A+R156Y+G200P+M310V+N331F ;
[0193] K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F ;
[0194] K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F+N399I ;
[0195] K118A+K129A+R156Y+K169A+G200P+N331F ;
[0196] K118A+K129A+R156Y+K470T ;
[0197] K118A, R ;
[0198] K118A+R156Y ;
[0199] K118A+R156Y+G200P ;
[0200] D119L ;
[0201] G120A ;
[0202] S123P, T ;
[0203] S123T+K129A+R156Y ;
[0204] K129A, F, I, K, R, S, T ;
[0205] K129A+K169A ;
[0206] K129A+K176P ;
[0207] K129A+K275Q ;
[0208] K129A+K445S ;
[0209] K129A+K470T ;
[0210] K129A+Q137E+R156Y ;
[0211] K129A+Q137E+R156Y+G200P ;
[0212] K129A+Q 137E+R156Y+K470T ;
[0213] K129A+Q137E+V139K+N140F+Q147S+R156Y ;
[0214] K129A+R156Y ;
[0215] K129A+R156Y+A177T+V179I+A183S ;
[0216] K129A+R156Y+A328G ;
[0217] K129A+R156Y+D247G ;
[0218] K129A+R156Y+D249G, N, S ;
[0219] K129A+R156Y+D303I, K, S, V ;
[0220] K129A+R156Y+D324N ;
[0221] K129A+R156Y+D366H+T374A ;
[0222] K129A+R156Y+D461N, Q, T ;

- [0223] K129A+R156Y+E288Q ;
- [0224] K129A+R156Y+G200P ;
- [0225] K129A+R156Y+G200P+G204T+R211K ;
- [0226] K129A+R156Y+H164N ;
- [0227] K129A+R156Y+H436Y ;
- [0228] K129A+R156Y+I10V+V14I+D19E ;
- [0229] K129A+R156Y+I222V+A224P+V228I+V232A ;
- [0230] K129A+R156Y+K176P, S ;
- [0231] K129A+R156Y+K275T ;
- [0232] K129A+R156Y+K322I+K454Q ;
- [0233] K129A+R156Y+K406N+N415G ;
- [0234] K129A+R156Y+K454Q ;
- [0235] K129A+R156Y+L380F+N383Y+D384G+N389T ;
- [0236] K129A+R156Y+N298F+E299N+G301T ;
- [0237] K129A+R156Y+N302K+D303L, S ;
- [0238] K129A+R156Y+N331F ;
- [0239] K129A+R156Y+P507A ;
- [0240] K129A+R156Y+R267H ;
- [0241] K129A+R156Y+R409L, T ;
- [0242] K129A+R156Y+S443D+K445S+L449I+V450I+S455N+M456Y ;
- [0243] K129A+R156Y+T244D ;
- [0244] K129A+R156Y+V159M+H164N+F165Y ;
- [0245] K129A+R156Y+V259I+R267K+L268K+S269A ;
- [0246] Q137D, E ;
- [0247] N140F ;
- [0248] K142A, Q, R ;
- [0249] F146C+H164C ;
- [0250] F146K, L ;
- [0251] F146L+K322I ;
- [0252] L148K+N168D ;
- [0253] Q149E ;
- [0254] R156A, D, E, F, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y ;
- [0255] R156Y+N331F ;
- [0256] V159M ;
- [0257] H164A, N ;
- [0258] L166I ;
- [0259] N168D ;
- [0260] K169A, Q, R ;
- [0261] K176P ;

- [0262] A177E, T ;
- [0263] K180R ;
- [0264] H193A, D, S, T ;
- [0265] R197A, L ;
- [0266] H199A ;
- [0267] G200A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y ;
- [0268] G200P+A224P ;
- [0269] K202N, Q, R ;
- [0270] S214E ;
- [0271] K217A ;
- [0272] A221K ;
- [0273] G225S ;
- [0274] V232A ;
- [0275] G237A, S, V ;
- [0276] K240A, Q, R ;
- [0277] K252A, Q, R ;
- [0278] G253A ;
- [0279] R267A ;
- [0280] L268I ;
- [0281] K275A, Q, R ;
- [0282] L278I ;
- [0283] F281L ;
- [0284] M290R ;
- [0285] R295A ;
- [0286] K306A, R ;
- [0287] K307Q ;
- [0288] M310I, L, V ;
- [0289] M310V+N399I ;
- [0290] R314A ;
- [0291] G316I ;
- [0292] K322A, R ;
- [0293] D324N ;
- [0294] N331A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y ;
- [0295] S332M, P ;
- [0296] S332P+V397I ;
- [0297] R340A, N, T ;
- [0298] K342A ;
- [0299] V345I ;
- [0300] K347A, Q, R ;

[0301] D348G ;
[0302] K353Q, R ;
[0303] D366H ;
[0304] M373Q ;
[0305] T374A ;
[0306] L380F ;
[0307] K382A ;
[0308] N383Y ;
[0309] N389A, F, N, V ;
[0310] W391V ;
[0311] K392G, Q ;
[0312] D395G ;
[0313] G396P ;
[0314] V397S ;
[0315] N399I ;
[0316] K406N ;
[0317] G413A, S ;
[0318] K414A ;
[0319] N415S ;
[0320] T417K ;
[0321] F418I ;
[0322] V431E ;
[0323] H436A ;
[0324] N441G+A442E+S443D ;
[0325] S443E, K, Q ;
[0326] K445A, R, S ;
[0327] K445C+K470C ;
[0328] H448A ;
[0329] K454R ;
[0330] S467R+G468S+A469T ;
[0331] G468S, Y ;
[0332] K470P, R, T ;
[0333] I473T ;
[0334] K476Q ;
[0335] K482A, Q, R ;
[0336] K488A, Q, R, T ;
[0337] A490R ;
[0338] G498A, D, S ;
[0339] R500A, T, V ;

[0340] H512A ;

[0341] T517A+G518D ;或

[0342] G518D。

[0343] 在一个方面,在本发明的变体中氨基酸改变的数目包括优选总数为 55、优选 52、更优选 50、更优选 40、更优选 30、更优选 20、更优选 15、更优选十、更优选九、更优选八、甚至更优选七、甚至更优选六、甚至更优选五、甚至更优选四、甚至更优选三、且最优选两个改变、且最优选一个改变。在另一个方面改变的总数为一、优选二、更优选三、甚至更优选四、甚至更优选五、甚至更优选六、甚至更优选七、甚至更优选八、甚至更优选九、最优选十。所述改变可为下述形式:i) 在占据所述位置的氨基酸下游插入氨基酸,ii) 缺失占据所述位置的氨基酸,或 iii) 用不同的氨基酸取代占据所述位置的氨基酸。可使所述改变彼此互相独立,例如,与亲本木葡聚糖酶相比较,在一个位置有插入,而在第二个位置有取代,而在第三个位置有缺失。在一个优选实施方案中,所述变体仅包含取代。

[0344] 在本发明的一个方面,基于共有序列分析来鉴定待突变的位置。所述分析通过将 SEQ ID NO:3 与 SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:7,以及其他来自 uniprot 数据库,与 SEQ ID NO:3 的家族 44 糖苷水解酶区 30% 相同的序列加以比对来进行。所得的共有序列示于图 1。共有序列 1 是包含在比对中给定位置最多的 (most abundant) 氨基酸的序列,共有序列 2 是在给定位置具有第二多的氨基酸的序列,依此类推。在本发明的一个方面,SEQ ID NO:3 的一个或多个 (几个) 残基由来自共有序列 1 或共有序列 2 或共有序列 3 或共有序列 4 的相应残基所替代。在本发明的一个方面,所述变体在选自所述共有序列分析鉴定的 52 个位置组成的组中的一个或多个 (几个) 位置包含改变,所述组由位置编号 10、19、68、80、89、104、111、117、123、129、137、139、140、147、156、159、164、165、177、179、183、200、204、211、222、224、225、228、232、259、267、268、269、281、328、345、366、374、380、383、384、406、415、436、443、445、449、450、455、456、488 和 507 组成。在一个优选实施方案中,所述改变是选自下组的取代,或几个取代:I10V、D19E、Q68H、L80V、G89A、T104A、P111Q、A117S、S123P、K129T、Q137E、V139K、N140F、Q147S、R156Y、V159M、H164N、F165Y、A177T、V179I、A183S、G200P、G204T、R211K、I222V、A224P、G225S、V228I、V232A、V259I、R267K、L268K、S269A、F281L、A328G、V345I、D366H、T374A、L380F、N383Y、D384G、K406N、N415G、H436Y、S443D、K445S、L449I、V450I、S455N、M456Y、K488T 和 P507A。

[0345] 在本发明的另一个方面,所述变体通过将亲本肽中荷正电,且位于钙离子 20 Å 之内的氨基酸改变为中性或荷负电的氨基酸来生成。本发明的优选变体包括下述变体,其中使得所述钙离子 20 Å 之内的总电荷更加负 (more negative)。在上述变体中,在应用条件 (application conditions) 下,荷正电的氨基酸可由中性或荷负电的氨基酸所替代。与此一致,可将优选的变体中在“化学稳定性”或应用条件下部分或全部荷正电的氨基酸 (即, Lys、Arg 或 His) 替换为荷负电或中性的氨基酸。优选的替代氨基酸可为荷负电的氨基酸,如 Asp 或 Glu,或中性氨基酸如 Ala、Asn、Gln、Tyr、Trp 和 Phe。本发明的优选变体在选自下组的位置编号中的一个或多个位置包含改变:49、87、118、129、134、142、156、169 和 197。在一个优选实施方案中,所述改变为在选自下组的位置编号中的一个或多个位置的取代:87、118、129、134、142、156 或 169。在一个优选实施方案中,所述取代选自下组:K87A;K129A, S, F, I;K118A;K142A, Q, R156Y, F, V, I, K, W, L, M 和 K169Q, A。

[0346] 在一个方面,亲本木葡聚糖酶的变体在对应于 68 或 123 或 156 或 118 或 200 或 129 或 137 或 193 或 92 或 76 或 331 位的一个或多个(几个)位置包含改变。优选地,所述变体在 68 位包含取代,并在一个或多个其他位置包含一个或多个取代,所述位置选自下组的位置编号:123、156、118、200、129、137、193、92、83、149、34、340、332、9、76、331、310、324、498、395 和 366。

[0347] 在另一个方面,变体在 156 位包含取代,并在一个或多个其他位置包含一个或多个取代,所述位置选自下组的位置编号:10、13、14、19、37、68、78、92、118、123、129、137、139、140、147、159、164、165、169、176、177、179、183、200、204、211、222、224、244、247、249、259、267、268、269、275、288、299、301、302、303、310、324、328、331、366、380、383、384、389、406、409、415、436、443、445、449、450、454、455、456、461、470 和 507。

[0348] 在另一个方面,亲本木葡聚糖酶的变体在对应于 68 或 123 或 156 或 118 或 200 或 129 或 137 或 193 或 92 或 76 或 331 位的两个或更多个(几个)位置包含改变。优选地,所述变体在 68 或 123 或 156 或 118 或 200 或 129 位包含取代。甚至更优选地,所述变体在 129 位和 156 位包含取代。

[0349] 在另一个方面,亲本木葡聚糖酶的变体在对应于 68 或 123 或 156 或 118 或 200 或 129 或 137 或 193 或 92 或 76 或 331 的三个或更多个(几个)位置包含改变。

[0350] 在另一个方面,亲本木葡聚糖酶的变体在对应于 68 或 123 或 156 或 118 或 200 或 129 或 137 或 193 或 92 或 76 或 331 的四个或更多个(几个)位置包含改变。

[0351] 在另一个方面,亲本木葡聚糖酶的变体在对应于 68 或 123 或 156 或 118 或 200 或 129 或 137 或 193 或 92 或 76 或 331 的五个或更多个(几个)位置包含改变。

[0352] 在另一个方面,亲本木葡聚糖酶的变体在对应于 68 或 123 或 156 或 118 或 200 或 129 或 137 或 193 或 92 或 76 或 331 的六个或更多个(几个)位置包含改变。

[0353] 在另一个方面,亲本木葡聚糖酶的变体在对应于 68 或 123 或 156 或 118 或 200 或 129 或 137 或 193 或 92 或 76 或 331 的七个或更多个(几个)位置包含改变。

[0354] 在另一个方面,亲本木葡聚糖酶的变体在对应于 129 和 156 和 331 和 200 和 118 位的位置包含改变。

[0355] 在另一个方面,亲本木葡聚糖酶的变体在对应于 68 和 129 和 156 和 331 和 200 和 118 位的位置包含改变。

[0356] 在另一个方面,亲本木葡聚糖酶的变体在对应于 68 和 92 和 129 和 156 和 331 和 200 和 118 位的位置包含改变。

[0357] 在另一个方面,所述变体包含选自下组的一个或多个(几个)取代:Q68H, N, L; S123P, T; R156Y, F, V, I, K, W, L, M; K118A, R; G200P, E, S, D; K129T, A, S; Q137E; H193T, S, D; T92V, I, A, S; A83E; Q149E; L34F, I, V; R340T, N; S332P; T9D; S76W, V, I, K, R, T; N331F, C; M310I, V, L; D324N; G498A, D; D395G 和 D366H。优选地,所述取代选自下组:Q68H; S123P; R156Y, F; K118A; G200P, E; K129T, A; Q137E; H193T; T92V 和 N331F。更优选地,所述取代选自下组:Q68H; S123P; R156Y, F; K118A; G200P, E; K129T, A; Q137E; T92V 和 N331F。更优选地,所述变体在九或八,七或六或五或四或三或两个或一个位置包含取代,其中所述取代选自下组:Q68H; S123P; R156Y, F; K118A; G200P, E; K129T, A; Q137E; T92V 和 N331F。

[0358] 在另一个方面,所述变体包含一个或多个(几个)下述的取代组合:

- [0359] Q68H ;
- [0360] S123P ;
- [0361] R156Y ;
- [0362] Q68H+R156Y ;
- [0363] K129A+R156Y ;
- [0364] S123T+K129A+R156Y ;
- [0365] K129A+R156Y+G200P ;
- [0366] Q68H+K118R+R156F ;
- [0367] Q68H+R156Y+H193T ;
- [0368] Q68H+R156F+G200P+N331F ;
- [0369] Q68H+T92V+K118A+R156Y ;
- [0370] K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F ;
- [0371] G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y ;
- [0372] Q68H+K129T+R156K+G200P+N331F ;
- [0373] K118A+K129A+R156Y+K169A+G200P+N331F ;
- [0374] T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F ;
- [0375] G78A+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F ;
- [0376] G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y+K169A ;
- [0377] Q68H+T92V+Q137E+R156Y+G200P+N331F ;
- [0378] Q68H+T92V+K118A+Q 137E+R156Y+N331F ;
- [0379] Q68H+T92V+R156Y+G200P+M310V+N331F ;
- [0380] Q68H+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F ;
- [0381] Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F ;
- [0382] Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+N331F ;
- [0383] Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T+D366H ;
- [0384] Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+D366H ;
- [0385] Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F ;
- [0386] Q68H+T92V+K118A+S123P, T+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F ;或
- [0387] Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+A224P+N331F。

[0388] 在一个优选实施方案中,所有如上所述的变体均为属于家族 44 糖苷水解酶的亲本木葡聚糖酶的变体,更优选地,所述亲本木葡聚糖酶选自与 SEQ ID NO :3 的氨基酸序列具有至少 65%、更优选至少 70%、更优选至少 75%、更优选至少 80%、更优选至少 85%、甚至更优选至少 90%、最优选至少 95% 同一性的木葡聚糖酶,更优选地,所述亲本木葡聚糖酶选自下组 :SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :5 和 SEQ ID NO :7,且最优选地,所述亲本木葡聚糖酶由 SEQ ID NO :3 组成。

[0389] 多核苷酸

[0390] 本发明还涉及分离的多核苷酸,其编码本发明的亲本木葡聚糖酶的变体。具体而言,本发明涵盖编码如上面在变体部分中所述的木葡聚糖酶变体的多核苷酸。本发明的多核苷酸会在至少中等严格条件下,但优选在高严格条件下与下述变性的双链 DNA 探针杂

交,所述双链 DNA 包含对应于 SEQ ID NO :1 的 82-1653 位或 SEQ ID NO :1 的 97-1653 位的全变体序列(其具有对应于变体中实际的氨基酸改变的适当序列改变),或者包含下述任何探针,所述探针包含其变体亚序列并具有至少约 100 碱基对的长度。本发明的变体多核苷酸除了包含引起上面变体部分中描述的氨基酸改变的突变之外,还可包含沉默突变。沉默突变为在三字母密码中不引起氨基酸改变的突变,例如 GTT 变为 GAT,其均编码缬氨酸。

[0391] 编码本发明的木葡聚糖酶变体的多核苷酸包括 DNA 和 RNA。分离 DNA 和 RNA 的方法在本领域是公知的。编码目标基因的 DNA 和 RNA 可在 GeneBanks 或 DNA 文库中通过本领域已知的方法来克隆。然后,鉴定本发明编码具有木葡聚糖酶活性的多肽的多核苷酸,并通过,例如,杂交或 PCR 进行分离。

[0392] 表达载体

[0393] 本发明还涉及包含本发明的核酸构建体的表达载体,特别是,重组表达载体。本发明的核酸构建体包含编码本发明的变体木葡聚糖酶的分离的多核苷酸,优选可操作地连接于一个或多个调控序列,后者在合适的宿主细胞中在与所述调控序列相容的条件下指导编码序列的表达。在构建所述表达载体时,所述编码序列位于所述载体中,从而使得所述编码序列与合适的表达调控序列可操作地连接。所述调控序列可由所述载体提供,或由插入载体的核酸构建体提供。

[0394] 所述调控序列可为合适的启动子序列,其为由供表达编码本发明多肽的多核苷酸的宿主细胞所识别的核苷酸序列。所述启动子可为下述任何核苷酸序列,所述核苷酸序列在所选的宿主细胞中显示转录活性,其包括突变的、截短的和杂合的启动子,且可从下述基因获得,所述基因编码对于宿主细胞为内源的或外源的胞外或胞内多肽。上述启动子在本领域是公知的。所述调控序列还可为合适的转录终止子序列,其为由宿主细胞识别以终止转录的序列。所述终止子序列可操作地连接于编码所述多肽的核苷酸序列的 3' 端。任何在所选的宿主细胞中有功能的终止子可用于本发明,上述终止子在本领域是公知的。所述调控序列还可为合适的前导序列,其为由宿主细胞的翻译重要的 mRNA 的非翻译区。所述前导序列可操作地连接于编码所述多肽的核苷酸序列的 5' 端。任何在所选的宿主细胞中有功能的前导序列可用于本发明。上述前导序列在本领域是公知的。所述调控序列还可为信号肽编码区,其编码连接于多肽的氨基端的氨基酸序列,并指导所述编码的多肽进入细胞的分泌途径。所述核苷酸序列的编码序列的 5' 末端可固有地(inherently)包含信号肽编码区,其天然地与编码所述分泌多肽的编码区部分在翻译阅读框内连接。或者,所述编码序列的 5' 末端可包含对所述编码序列为外源的信号肽编码区。当所述编码序列并不天然地包含信号肽编码区时,可能需要所述外源信号肽编码区。或者,所述外源信号肽编码区可简单地替代所述天然的信号肽编码区,从而增强所述多肽的分泌。然而,任何指导所述表达的多肽进入所选宿主细胞的分泌途径的信号肽编码区可用于本发明。所述调控序列还可为聚腺苷酸化序列,其可为可操作地连接于所述核苷酸序列 3' 端的序列,且当其转录时,由所述宿主细胞识别为将多聚腺苷酸残基添加至转录的 mRNA 的信号。任何在所选宿主细胞中有功能的多腺苷酸化信号可用于本发明。还可能添加下述调节序列,其允许相对于所述宿主细胞的生长调节所述多肽的表达。调节系统的实例为响应化学或物理刺激(包括调节化合物的存在),引起基因表达被开启或关闭(turned on or off)的那些。

[0395] 本发明编码变体木葡聚糖酶的分离的多核苷酸可以以多种方式操作

(manipulate) 以提供所述多肽的表达。在插入载体前对所述多核苷酸序列的操作可为合意的或必需的,取决于表达载体。利用重组 DNA 方法修饰多核苷酸序列在本领域是公知的。而且,可帮助纯化或固定化所述多肽的标签(tag)可添加至所述多肽。上述标签可例如为多组氨酸标签(His tag)。优选地,所述标签位于所述多肽的 N 端或 C 端,且可由所述载体编码。或者,所述标签可位于所述多肽内部,只要其不影响所述多肽的功能。

[0396] 所述重组表达载体可为任何载体(例如,质粒、噬菌粒、噬菌体或病毒),其可方便地进行重组 DNA 方法,且可造成所述核苷酸序列的表达。对所述载体的选择通常取决于所述载体与要引入该载体的宿主细胞的相容性。

[0397] 所述载体可为线性的或闭环的质粒。所述载体可为自主复制的载体,即,作为染色体外实体存在的载体,其复制独立于染色体复制,例如,质粒、染色体外元件、微型染色体或人工染色体。

[0398] 所述载体可包含任何确保自复制的手段。或者,所述载体可为下述载体,当其引入宿主细胞时,整合入基因组,并与整合入该载体的染色体一起复制。此外,可使用单一载体或质粒,或两个或更多个载体或质粒(其合在一起包含待引入宿主细胞基因组的总 DNA),或者转座子。

[0399] 本发明的载体优选包含一个或多个可选的标志物(selectable marker),其允许容易地选择转化细胞。可选的标志物为下述基因,其产物提供对杀生物剂(biocide)或病毒的抗性,对重金属的抗性,对营养缺陷型的原养性(prototrophy)等。细菌可选的标志物的实例为来自枯草芽孢杆菌或地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)的 dal 基因,或赋予抗生素抗性(如氨苄青霉素、卡那霉素、氯霉素或四环素抗性)的标志物。对于酵母宿主细胞合适的标志物是 ADE2、HIS3、LEU2、LYS2、MET3、TRP1 和 URA3。供在丝状真菌宿主细胞中使用的可选的标志物包括但不限于,amdS(乙酰胺酶)、argB(鸟氨酸氨甲酰转移酶)、bar(草铵膦乙酰基转移酶)、hygB(潮霉素磷酸转移酶)、niaD(硝酸还原酶)、pyrG(乳清酸核苷-5'-磷酸脱羧酶)、sC(硫酸腺苷酰基转移酶)、trpC(邻氨基苯甲酸合酶),以及其等同物。优选用于曲霉属细胞的是构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)或米曲霉(*Aspergillus oryzae*)的 amdS 和 pyrG 基因,以及吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*)的 bar 基因。

[0400] 本发明的载体可包含下述元件,其允许所述载体稳定整合入所述宿主细胞的基因组或所述载体在所述细胞中独立于基因组的自主复制。

[0401] 超过一个拷贝的本发明核苷酸序列可插入所述宿主细胞以增加基因产物的产生。所述核苷酸序列的拷贝数的增加可通过下述方法来获得,将所述序列至少一个额外的拷贝整合入宿主细胞基因组,或使所述核苷酸序列包括可扩增的可选的标志物基因,此时可通过在所述合适的选择剂存在下培养所述细胞来选择包含可选的标志物基因的扩增拷贝,从而包含核苷酸序列的额外拷贝的细胞。

[0402] 用于连接上述元件以构建本发明的重组表达载体的方法对于本领域技术人员是公知的(参见,例如, Sambrook 等,1989,见上)。

[0403] 在本发明的一个实施方案中,所述质粒载体可包含下述元件:

[0404] i) 信号肽编码区(例如获自芽孢杆菌属 NCIB 11837 产麦芽糖淀粉酶(maltogenic amylase)、嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*) α -淀粉酶、地衣芽孢杆菌

(*Bacillus licheniformis*) 枯草杆菌蛋白酶、地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶、嗜热脂肪芽孢杆菌中性蛋白酶 (*nprT*、*nprS*、*nprM*) 的基因和枯草芽孢杆菌 *prsA*), 然后是编码所述成熟木葡聚糖酶变体的多核苷酸序列。该序列可在下述序列之后并与其可操作性连接:

[0405] ii) 包含 mRNA 稳定区段 (例如衍生自 *CryIIIa* 基因, 如 WO 99/043835 中所示) 的 DNA 序列;

[0406] iii) 标志物基因 (例如氯霉素抗性基因); 和

[0407] iv) 分别作为多核苷酸上游和下游 5' 和 3' 侧翼区段的来自枯草芽孢杆菌的基因组 DNA, 以通过侧翼区段与芽孢杆菌属基因组间的同源重组实现基因组整合。

[0408] 上述载体还可用于使用前述诱变方法生成并筛选变体。

[0409] 宿主细胞

[0410] 本发明还涉及包含编码本发明变体木葡聚糖酶的多核苷酸的重组宿主细胞, 其有利地用于重组产生所述多肽。将包含本发明多核苷酸序列的载体引入宿主细胞使得所述载体作为染色体整合体或如前所述作为自体复制的染色体外载体而维持。

[0411] 所述宿主细胞可为原核细胞如细菌细胞、古细菌 (*archaea*) 或真核细胞如真菌细胞、植物细胞、昆虫细胞或哺乳动物细胞。

[0412] 有用的原核细胞为细菌细胞, 如革兰氏阳性菌, 包括但不限于芽孢杆菌属细胞, 例如嗜碱芽孢杆菌 (*Bacillus alkalophilus*)、解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)、短芽孢杆菌 (*Bacillus brevis*)、环状芽孢杆菌 (*Bacillus circulans*)、克劳氏芽孢杆菌 (*Bacillus clausii*)、凝结芽孢杆菌 (*Bacillus coagulans*)、耐盐芽孢杆菌 (*Bacillus halodurans*)、灿烂芽孢杆菌 (*Bacillus lautus*)、迟缓芽孢杆菌 (*Bacillus lentus*)、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)、巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)、嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 细胞, 或链霉菌属细胞, 例如, 浅青紫链霉菌 (*Streptomyces lividans*) 或鼠灰链霉菌 (*Streptomyces murinus*) 多肽; 或革兰氏阴性菌, 如大肠杆菌或假单胞菌属菌种 (*Pseudomonas* sp.) 细胞。在一个优选实施方案中, 所述细菌宿主细胞是迟缓芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌或枯草芽孢杆菌细胞。在另一个优选实施方案中, 所述芽孢杆菌属细胞是嗜碱的芽孢杆菌。

[0413] 将载体引入细菌宿主细胞可, 例如, 通过原生质体转化 (参见, 例如, Chang 和 Cohen, 1979, *Molecular General Genetics* 168:111-115), 使用感受态细胞 (参见, 例如, Young 和 Spizizin, 1961, *Journal of Bacteriology* 81:823-829 或者 Dubnau 和 Davidoff-Abelson, 1971, *Journal of Molecular Biology* 56:209-221)、电穿孔 (参见, 例如, Shigekawa 和 Dower, 1988, *Biotechniques* 6:742-751) 或接合 (参见, 例如, Koehler 和 Thorne, 1987, *Journal of Bacteriology* 169:5771-5278) 来实现。

[0414] 在一个优选实施方案中, 所述宿主细胞是真菌细胞。本文中使用的“真菌”包括子囊菌门 (*Ascomycota*)、担子菌门 (*Basidiomycota*)、壶菌门 (*Chytridiomycota*) 和接合菌门 (*Zygomycota*) (如由 Hawksworth 等, 于 Ainsworth and Bisby's *Dictionary of The Fungi*, 第八版, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UK 中所定义) 以及卵菌门 (*Oomycota*) (如 Hawksworth 等, 于 Ainsworth and Bisby's *Dictionary of The*

Fungi, 第八版, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UK 中所引用), 和所有有丝分裂孢子真菌 (mitosporicfungi) (Hawksworth 等, 于 Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 第八版, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UK 中)。在一个更优选的实施方案中, 所述真菌宿主细胞是酵母细胞。本文中使用的“酵母”包括产子囊酵母 (ascosporogenous yeast) (内孢霉目 (Endomycetales))、产担孢子囊酵母 (basidiosporogenous yeast) 和属于半知菌类 (Fungi Imperfecti) (芽孢纲 (Blastomycetes)) 的酵母。由于酵母的分类在将来可能有所改变, 就本发明而言, 酵母将如 Biology and Activities of Yeast (Skinner, F. A., Passmore, S. M. 和 Davenport, R. R. 编, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series No. 9, 1980) 中所述定义。

[0415] 在甚至更优选的实施方案中, 所述酵母宿主细胞是念珠菌属 (*Candida*)、汉逊酵母属 (*Hansenula*)、克鲁维酵母属 (*Kluyveromyces*)、毕赤酵母属 (*Pichia*)、酵母属 (*Saccharomyces*)、裂殖酵母属 (*Schizosaccharomyces*) 或西洋蓍霉属 (*Yarrowia*) 细胞。在一个最优选的实施方案中, 所述酵母宿主细胞是卡尔酵母 (*Saccharomyces carlsbergensis*,)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、糖化酵母 (*Saccharomyces diastaticus*)、道格拉氏酵母 (*Saccharomyces douglasii*)、克鲁弗酵母 (*Saccharomyces kluyveri*)、诺地酵母 (*Saccharomyces norbensis*) 或卵形酵母 (*Saccharomyces oviformis*) 细胞。在另一个最优选的方面, 酵母宿主细胞是乳克鲁维酵母 (*Kluyveromyces lactis*) 细胞。在另一个最优选的方面, 酵母宿主细胞是解脂西洋蓍霉 (*Yarrowia lipolytica*) 细胞。

[0416] 在另一个更优选的方面, 真菌宿主细胞是丝状真菌细胞。“丝状真菌”包括真菌 (Eumycota) 和卵菌 (Oomycota) 亚门的所有丝状形式 (如由 Hawksworth 等, 于 Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 第八版, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UK 中所定义)。丝状真菌的特征在于由几丁质、纤维素、葡聚糖、壳聚糖、甘露聚糖和其它复杂多糖组成的菌丝壁。通过菌丝延伸进行营养生长, 而碳分解代谢是专性需氧的。相反, 酵母例如酿酒酵母的营养生长通过单细胞菌体的出芽生殖 (budding) 进行, 而碳分解代谢可以是发酵的。在一个甚至更优选的方面, 丝状真菌宿主细胞是枝顶孢霉属 (*Acremonium*)、曲霉属 (*Aspergillus*)、镰孢属 (*Fusarium*)、腐质霉属 (*Humicola*)、毛霉属 (*Mucor*)、毁丝霉属 (*Myceliophthora*)、脉孢菌属 (*Neurospora*)、青霉属 (*Penicillium*)、梭孢壳属 (*Thielavia*)、弯颈霉属 (*Tolypocladium*) 或木霉属 (*Trichoderma*) 菌种的细胞, 但不仅限于此。在一个最优选的实施方案中, 所述丝状真菌宿主细胞是泡盛曲霉 (*Aspergillus awamori*)、臭曲霉 (*Aspergillus foetidus*)、日本曲霉 (*Aspergillus japonicus*)、构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 或米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 细胞。在另一个最优选的实施方案中, 所述丝状真菌宿主细胞是杆孢状镰孢 (*Fusarium bactridioides*)、禾谷镰孢 (*Fusarium cerealis*)、库威镰孢 (*Fusarium crookwellense*)、大刀镰孢 (*Fusarium culmorum*)、禾本科镰孢 (*Fusarium graminearum*)、禾赤镰孢 (*Fusarium graminum*)、异孢镰孢 (*Fusarium heterosporum*)、合欢木镰孢 (*Fusarium negundi*)、尖镰孢 (*Fusarium oxysporum*)、多枝镰孢 (*Fusarium reticulatum*)、粉红镰孢 (*Fusarium roseum*)、接骨木镰孢 (*Fusarium sambucinum*)、肤色镰孢 (*Fusarium sarcochroum*)、拟分枝孢镰孢 (*Fusarium*

sporotrichioides)、硫色镰孢 (*Fusarium sulphureum*)、圆镰孢 (*Fusarium torulosum*)、拟丝孢镰孢 (*Fusarium trichothecioides*)、镶片镰孢 (*Fusarium venenatum*) 细胞。在一个甚至最优选的实施方案中,所述丝状真菌亲本细胞是镶片镰孢 (*Nirenberg sp. nov.*) 细胞。在另一个最优选的实施方案中,所述丝状真菌宿主细胞是特异腐质霉 (*Humicola insolens*)、疏棉状腐质霉 (*Humicolalanuginosa*)、米黑毛霉 (*Mucor miehei*)、嗜热毁丝霉 (*Myceliophthora thermophila*)、粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*)、产紫青霉 (*Penicillium purpurogenum*)、土生梭孢霉 (*Thielavia terrestris*)、哈茨木霉 (*Trichoderma harzianum*)、康宁木霉 (*Trichoderma koningii*)、长枝木霉 (*Trichoderma longibrachiatum*)、里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 或绿色木霉 (*Trichoderma viride*) 细胞。

[0417] 真菌细胞可通过涉及原生质体形成、原生质体转化和细胞壁再生的方法以本身公知的方式转化。用于转化曲霉属宿主细胞的合适方法在 EP 238023 和 Yelton 等,1984, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 81:1470-1474 中描述。用于转化镰孢属菌种的合适方法由 Malardier 等,1989, *Gene* 78:147-156 和 WO 96/00787 描述。可以使用由如下文献描述的方法转化酵母:Becker 和 Guarente, 于 Abelson, J. N. 和 Simon, M. I. (编), *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology*, Volume 194, 182-187 页, Academic Press, Inc., New York; Ito 等,1983, *Journal of Bacteriology* 153:163; 和 Hinnen 等,1978, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 75:1920。

[0418] 本发明的一个具体实施方案为用编码本发明的变体木葡聚糖酶的多核苷酸转化的重组宿主细胞。优选地,上述宿主细胞并不包含固有的木葡聚糖酶编码基因,或上述基因已被破坏。从而使得所述重组变体木葡聚糖酶是本发明的重组宿主细胞产生的唯一的木葡聚糖酶。

[0419] 产生方法

[0420] 本发明还涉及产生木葡聚糖酶变体的方法,包括:(a) 在适于所述变体表达的条件下培养本发明的宿主细胞;和 (b) 从培养基中回收所述变体。

[0421] 在本发明的产生方法中,宿主细胞在适于产生所述木葡聚糖酶变体的营养培养基中使用本领域已知方法培养。举例而言,所述细胞可通过在合适的培养基以及在使得所述多肽能够被表达和/或分离的条件下进行的摇瓶培养、或者实验室或工业发酵罐中的小规模或大规模发酵(包括连续、分批、补料分批或固态发酵)来培养。培养在合适的营养培养基中使用本领域已知方法进行,所述培养基包含碳源和氮源和无机盐。合适的培养基可从商业供应商获得或可以根据公开的组成(例如,在美国典型培养物保藏中心的目录中)制备。如果多肽分泌到营养培养基中,该多肽可从所述培养基中直接回收。如果多肽不分泌,其可从细胞裂解物回收。

[0422] 本发明的一个实施方案是产生亲本木葡聚糖酶变体的方法,其中所述变体具有木葡聚糖酶活性,所述方法包括:a) 在适于表达所述变体的条件下培养细胞,其中所述细胞包含编码亲本木葡聚糖酶变体的多核苷酸序列,其中所述变体在一个或多个(几个)选自下组的位置的氨基酸位置中改变:68、123、156、118、200、129、137、193、92、83、149、34、340、332、9、76、331、310、324、498、395、366、1、374、7、140、8、14、21、211、37、45、13、78、87、436、

101、104、111、306、117、119、414、139、268、142、159、164、102、168、176、180、482、183、202、206、217、4、222、19、224、228、232、2、240、244、5、247、249、328、252、259、406、267、269、275、179、166、278、281、288、298、301、18、302、165、80、303、316、169、322、120、146、342、348、147、353、380、468、382、383、38、384、389、391、10、392、396、177、397、399、409、237、413、253、415、418、40、443、445、148、449、225、450、454、3、455、456、299、461、470、204、476、488、347 和 507,且所述多核苷酸序列通过对选自下组的亲本多核苷酸序列进行诱变来制备: SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:6,或与 SEQ ID NO:1 的核苷酸序列具有至少 65%、更优选至少 70%、更优选至少 75%、更优选至少 80%、更优选至少 85%、甚至更优选至少 90%、最优选至少 95% 同一性的亲本多核苷酸序列;和 b) 从所述培养基中回收所述木葡聚糖酶变体。

[0423] 在另一个方面,不回收木葡聚糖酶变体,而是使用本发明表达变体的宿主细胞作为变体的来源。

[0424] 所述木葡聚糖酶变体可使用本领域已知的特异于所表达多肽的方法来检测。这些检测方法可包括使用特异性抗体,酶产物形成,或酶底物的消失。举例而言,酶测定法可用于确定变体木葡聚糖酶的活性,如本文实施例中所述。

[0425] 所得到的木葡聚糖酶变体可通过本领域已知方法回收。举例而言,所述多肽可从营养培养基通过常规方法回收,所述方法包括但不限于,收集、离心、过滤、提取、喷雾干燥、蒸发或沉淀。

[0426] 本发明的木葡聚糖酶变体可通过多种本领域已知方法来纯化,所述方法包括但不限于,层析(例如,离子交换、亲和、疏水、层析聚焦和大小排阻)、电泳方法(例如,制备型等电聚焦)、差示溶解度(例如,硫酸铵沉淀)、SDS-PAGE 或提取(参见,例如,Protein Purification, J.-C. Janson 和 Lars Ryden 编, VCH Publishers, New York, 1989) 以获得基本上纯的木葡聚糖酶变体。

[0427] 组合物

[0428] 本发明还涉及包含本发明的变体木葡聚糖酶或具有木葡聚糖酶活性的多肽的组合物。优选地,所述组合物富集上述变体或多肽。术语“富集”表明所述组合物的木葡聚糖酶活性增加,例如,富集系数为 1.1 或更多。优选地,所述组合物配制为提供合意的特性,如低颜色、低气味和可接受的储存稳定性。

[0429] 所述组合物可包含本发明的变体或多肽作为主要酶组分,例如,单组分组合物。或者所述组合物可包含多种酶活性,如氨肽酶、淀粉酶、糖酶、羧肽酶、过氧化氢酶、纤维素酶、壳多糖酶、角质酶、环糊精葡萄糖基转移酶、脱氧核糖核酸酶、酯酶、 α -半乳糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、 α -葡糖苷酶、 β -葡糖苷酶、卤过氧化物酶(haloperoxidase)、转化酶、漆酶、脂肪酶、甘露糖苷酶、氧化酶、果胶分解酶、肽谷氨酰胺酶(peptidoglutaminase)、过氧化物酶、肌醇六磷酸酶、多酚氧化酶、蛋白水解酶、核糖核酸酶、转谷氨酰胺酶或木聚糖酶。

[0430] 所述多肽组合物可根据本领域已知方法来制备,且可为液体或干配制物的形式存在。举例而言,所述多肽可配制为颗粒(granulate)或微粒(microgranulate)的形式。包含在所述组合物中所述变体或多肽可根据本领域已知方法来稳定化。在一个优选实施方案中,所述变体木葡聚糖酶配制在液体组合物中。

[0431] 用途

[0432] 本发明还涉及使用所述木葡聚糖酶变体的方法。

[0433] 所述变体木葡聚糖酶优选掺入洗涤剂组合物和 / 或与洗涤剂组合物一同使用,例如,用于洗衣洗涤剂组合物中,例如家用洗衣洗涤剂组合物,特别是液体洗衣洗涤剂组合物。所述洗涤剂组合物通常包含常规的洗涤剂成分,如表面活性剂(阴离子、阳离子、非离子、两性离子、两性)、增清剂(builder)、漂白剂、聚合物、其他酶以及其他成分,例如,如 W02007/130562 和 W02007/149806 所描述的,所述文件通过提述以其整体并入本文。

[0434] 所述洗涤剂组合物可为任何形式,如固体、液体、凝胶或其任何组合,优选地,所述组合物为液体形式,优选液体洗衣洗涤剂组合物。

[0435] 本发明的一个方面是将本发明的木葡聚糖酶变体或木葡聚糖酶变体组合物与洗涤剂组合物一同使用,以赋予织物(fabric)或衣服(garment)去球(de-pilling)和 / 或织物柔软性和 / 或颜色澄清(colour clarification)和 / 或污物去除(soil removal)和 / 或抗污物再沉积(soil anti-redeposition)和 / 或抑制染料转移(dye transfer inhibition)的益处。

[0436] 此外,本发明涉及洗涤织物的方法,包括用包含洗涤剂组合物和本发明的木葡聚糖酶变体或木葡聚糖酶变体组合物的洗涤溶液处理织物。所述洗涤处理可,例如,在机器洗涤方法或手工洗涤方法中进行。洗涤溶液可,例如,为包含所述洗涤剂组合物的水性洗涤溶液,其 pH 为 3 到 12。

[0437] 在洗涤和使用中,织物或衣服的表面通常会被断裂的或松动的纤维片段所沾污,其会导致织物具有褪色和磨损的外观。从织物去除这些表面纤维会部分的恢复所述织物原来的颜色和外观,导致颜色澄清和改善的外观。本发明的木葡聚糖酶变体或木葡聚糖酶变体组合物可通过在单一或多重(重复)洗涤循环中使用而用于提供颜色澄清和 / 或改善外观。

[0438] 此外,从织品表面突出的微纤维可积聚为小球,即所谓纤维绒球(pill)或蓬松物(fluff),其附于所述表面而破坏所述织物的外观。本发明的木葡聚糖酶变体或木葡聚糖酶变体组合物可用于去除上述纤维绒球,该作用称为去球。

[0439] 颜色澄清和去球可通过使用测试组面板(test group panel)的目视检查(visual inspection)来评估。所述作用还可通过光反射或通过藉由光学测量手段确定棉蓬松度来测定。这些方法在本领域是通常已知的,并简要地描述于 Marcel Dekker 公开的 Enzymes in Detergency, 1997, 139 页到 140 页。

[0440] 特别地,当洗涤循环数增加时,沉积物,其包括颗粒状污物、可溶性污物、染料和色素以及不可溶的盐,在织物纤维表面积累。这可导致洗涤处理的感知的清洁性能(cleaning performance)发生可见的劣化(deterioration),例如,导致所述织物灰白色或浅黄色的外观。这可在洗涤循环中使用本发明的木葡聚糖酶变体或木葡聚糖酶变体组合物来防止。该作用称为抗再沉积或染料转移抑制或污物去除,并可通过光学测量来评估。

[0441] 陷在所述织物表面和纤维之间的污物或不可溶的盐颗粒可导致所述织物变硬(stiffening)。通过在洗涤循环中包括本发明的木葡聚糖酶变体或木葡聚糖酶变体组合物,可软化所述织物。

[0442] 可由本发明方法进行处理的织物可为常规可洗的衣物(laundry),例如家庭衣物。

优选地,所述衣物的主要部分是衣服和织物,包括针织品 (knits)、机织品 (woven)、粗斜棉布 (denim)、纱线 (yarn) 以及毛巾 (toweling),其由棉、绵混 (cotton blend) 或天然或人造纤维质 (cellulosic) (例如,来源于木浆) 或其混纺物 (blend) 制备。混纺物的实例是棉或人造丝 (rayon)/ 粘胶 (viscose) 与一种或多种伴料 (companion material) 如羊毛、人造纤维 (例如,聚酰胺纤维、丙烯酸 (酯) 纤维、聚酯纤维、聚乙烯醇纤维、聚氯乙烯纤维、聚氨酯纤维、聚脲纤维、芳纶纤维 (aramid fibers)) 以及含纤维素纤维 (例如,人造丝 / 粘胶、苧麻、亚麻 (flax/linen)、黄麻、乙酸纤维素纤维、天丝 (lyocell)) 的混纺物。

[0443] 发现用含有本发明的木葡聚糖酶变体或木葡聚糖酶变体组合物的洗涤剂溶液处理织物和 / 或衣服可与,例如,新纤维和 / 或织物和 / 或衣服的产生特别地相关,还在使用过的织物和 / 或衣服的洗涤过程中,例如,在家用洗衣方法或在机构性 (institutional) 洗衣方法过程中特别地相关。

[0444] 本发明的木葡聚糖酶变体或木葡聚糖酶变体组合物的剂量,以及使用所述组合物的其他条件,包括所述洗涤剂溶液的组成和浓度,可基于本领域已知方法确定。

[0445] 本发明进一步由下述实施例描述,其不应视为对本发明的范围的限定。

[0446] 所述木葡聚糖酶可用于本发明的组合物以实现去除含有纤维素或半纤维素的衍生物的污物,增强抗再沉积和促进污物释放。所述木葡聚糖酶还可用于本发明的组合物以在随后的洗衣方法过程中将污物释放益处赋予棉。所述污物释放益处在于棉纤维和所有类型包含显著量的棉的纤维,如棉 - 合成纤维 (例如,聚酯,聚酰胺,如 Nylon™, 和弹性纤维 (elastane)) 混纺物上观察到。

实施例

[0447] 实施例 1- 木葡聚糖酶变体的产生和纯化

[0448] 本发明的木葡聚糖酶变体通过标准方法制备,简言之:将随机和 / 或定点突变引入基因,用突变的基因转化枯草芽孢杆菌宿主细胞,对经转化的宿主细胞进行发酵,并从发酵液获得所述木葡聚糖酶变体。参照的木葡聚糖酶 (SEQ ID NO:3) 在枯草芽孢杆菌中以类似方式重组产生。

[0449] 通过将含有一个 CaCO_3 片 (0.5g) 的 100ml PS-1 培养基在带挡板的 500ml Erlenmeyer 烧瓶中振荡,发酵在摇瓶培养物中在 37℃ 进行 4 天。所述 PS-1 培养基组合物包含 100g/L 蔗糖、40g/L 大豆粉、10g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.1ml/L Dowfax 63N10 和以 6 $\mu\text{g/ml}$ 氯霉素形式的抗生素。

[0450] 在发酵之后,通过离心 (26000xg, 20 分钟) 收获所述培养液。将小体积的上清通过 0.45 μm 的过滤器灭菌过滤,并冷冻储存。允许将所述试样解冻然后立即开始下述稳定性测定。

[0451] 在一些情况下,纯化所述酶试样然后将它们用于稳定性测试。

[0452] 对于酶纯化,将上清通过 NALGENE 0.2 μm 过滤单元 (产品号 569-0020) 过滤以去除剩余的宿主细胞。将所述 0.2 μm 滤过物的 pH 用 20% CH_3COOH 调整为 pH 5.0,并将滤过物施于在 50mM 琥珀酸 / NaOH, 1mM CaCl_2 , pH 5.0 中平衡的 XpressLine ProA 柱 (UpFront chromatography A/S) 上。在用所述平衡缓冲液充分洗涤 XpressLine ProA 柱之后,通过用 50mM Tris/HCl, pH 9.0 的逐步洗脱来洗脱所述木葡聚糖酶。在洗脱过程中收集级分。

对来自所述柱的级分就木葡聚糖酶活性进行分析（实施例 2），并汇集具有活性的级分。将汇集物的 pH 用 3M Tris 碱调整为 pH 9.0，并用去离子水（demineralised water）稀释汇集物至与 50mM Tris/HCl, pH 9.0 相同（或更低）的传导率。将经调整的溶液施于在 50mM Tris/HCl, pH 9.0 中平衡的 SOURCE Q 柱（GE Healthcare）。在用所述平衡缓冲液充分洗涤 SOURCE Q 柱之后，用在相同缓冲液中的线性 NaCl 梯度（0 → 0.5M）在五个柱容积中将所述酶洗脱。再次对来自柱的级分就木葡聚糖酶活性进行分析，并进一步通过 SDS-PAGE 分析活性的级分。当在经考马斯染色的 SDS-PAGE 凝胶上仅一个条带可见时，将该级分作为经纯化的制备物汇集。

[0453] 实施例 2- 木葡聚糖酶测定法

[0454] 酶试样（例如，从纯化得到的）的木葡聚糖酶活性在 AZCL- 木葡聚糖测定法中测定。

[0455] 将 AZCL- 木葡聚糖（Megazyme）与所述木葡聚糖酶温育，并在 650nm 测定释放出的蓝颜色。木葡聚糖酶活性计算为温育中蓝颜色的增加减去适当的空白值。

[0456] AZCL- 木葡聚糖底物：4mg/ml AZCL- 木葡聚糖（Megazyme），通过搅拌均一地悬于 0.01% Triton X-100 中。

[0457] 测定温度：37℃。

[0458] 测定缓冲液：50mM 琥珀酸 /NaOH, 0.01% Triton X-100, pH 5.0。

[0459] 将 500 μ l AZCL- 木葡聚糖底物悬液在 Eppendorf 管中置于冰上。添加 500 μ l 测定缓冲液，并使混合物变得冰冷。添加 20 μ l 酶试样（稀释于 0.01% TritonX-100）。测定法通过将 Eppendorf 管转移至设定为测定温度的 Eppendorf 热混合器（thermomixer）来起始。将所述试管在 Eppendorf 热混合器以其最高振荡速率（1400rpm）温育 15 分钟。温育通过将试管转移回到冰浴来终止。当试管变得冰冷时，将试管在冰冷的离心机中短暂离心以沉淀未反应的底物。将 200 μ l 上清转移至微滴定板中，并对 A_{650} 进行读数。将缓冲液空白（用 20 μ l 0.01% Triton X-100 替代酶）包括在所述测定法中，并将酶试样与缓冲液空白之间的 A_{650} 差异作为木葡聚糖酶活性的量度。

[0460] 实施例 3- 木葡聚糖酶变体的稳定性

[0461] 本发明木葡聚糖酶变体的洗涤剂稳定性通过在液体洗涤剂中温育之后测定所述变体的活性来评估。

[0462] 所述稳定性测试通过将酶试样添加至液体洗涤剂中，并在升高的温度（例如，35℃或 40℃）下进行储存来进行。在规定的储存时间之后，确定酶活性，并将其与在约 -18℃储存相同时间的等同试样的活性相比较。稳定性测试的结果为：作为冷藏试样中的活性的百分比表示的储存在升高温度的试样中的活性。

[0463] 将在相同的条件下测试的木葡聚糖酶变体的结果与亲本木葡聚糖酶（SEQ ID NO：3）的结果相比较。两个稳定性结果之间的比例为稳定性改善因子（Stability Improvement Factor, SIF）。

[0464] 具有 $SIF > 1$ 的变体在测试条件下与亲本木葡聚糖酶相比更加稳定。优选的变体为那些在该测试中具有高 SIF 的那些。

[0465] 洗涤剂

[0466] 用于稳定性测试的液体洗涤剂具有下述组成：

[0467]	烷基乙氧基硫酸盐 (alkylethoxy sulfate)	20.1%
[0468]	烷基苯磺酸盐 (alkylbenzene sulfonate)	2.7%
[0469]	烷基硫酸酯 (alkyl sulfate)	6.5%
[0470]	烷基乙氧基化物 (alkyl ethoxylate)	0.8%
[0471]	柠檬酸	3.8%
[0472]	脂肪酸	2.0%
[0473]	硼砂 (Borax)	3.0%
[0474]	甲酸钠与甲酸钙 (Na&Ca formate)	0.2%
[0475]	胺乙氧基化物聚合物 (amine ethoxylate polymers)	3.4%
[0476]	二亚乙基三胺五乙酸 (diethylenetriaminepentaacetic acid)	0.4%
[0477]	Tinopal AMS-GX	0.2%
[0478]	乙醇	2.6%
[0479]	丙二醇	4.6%
[0480]	二乙二醇	3.0%
[0481]	聚乙二醇	0.2%
[0482]	单乙醇胺	2.7%
[0483]	NaOH	至 pH 8.3
[0484]	次要成分 (蛋白酶、淀粉酶、香料、染料)	2.3%
[0485]	水	平衡
[0486]	储存测试	
[0487]	使根据实施例 1 制备的酶试样恰在开始储存稳定性测试之前解冻。	
[0488]	将酶试样稀释至每 ml 大约 0.25mg 酶蛋白的浓度。	
[0489]	将液体洗涤剂分散至容积大约为 12ml 的玻璃瓶中, 在每个玻璃瓶中得到 1.0±0.05 克洗涤剂。	
[0490]	对于每个酶试样, 准备两个重复的瓶。将 50 μl 稀释的酶和小磁性搅拌棒添加至瓶中, 并将其紧闭 (以阻止在储存过程中蒸发)。将内容物在磁性搅拌棒的帮助下混合约 5 分钟。将一对瓶中的一个瓶置于大约为 -18℃ 的冰柜 (freezer) 中。将另一个瓶置于在规定的升高温度 (例如, 35℃ 或 40℃) 的合适温育烤箱 (incubator oven) 中进行测试。在规定的储存时间之后, 将温育烤箱中的瓶转移至冰柜。	
[0491]	活性测定法	
[0492]	在洗涤剂中储存后, 酶试样的活性使用下述方法测定。	
[0493]	<u>材料和试剂:</u>	
[0494]	1M 磷酸盐缓冲液 pH 7:	
[0495]	将 138 克 NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O 溶于约 750ml 水。添加 4N NaOH 得到 pH 7.0。然后将终体积为 1000ml。	
[0496]	测定缓冲液 (50mM 磷酸盐 pH 7):	
[0497]	将 950ml 水、50ml 1M 磷酸盐缓冲液 pH 7 和 5ml Bero1 537 (由 AkzoNobel 提供的非离子表面活性剂)。将终 pH 调整至 7.00±0.02。	
[0498]	底物:	

[0499] Cellazyme C 片,由 Megazyme International Irel and Ltd 提供,目录号 T-CCZ。所述片含有交联的染色 HE 纤维素。

[0500] 方法

[0501] 在开始测定法之前约 30 分钟,将瓶从冰柜转移至大约 4℃ 的冷藏箱。恰在开始测定法之前,将瓶从冷藏箱取出,并置于实验台上,打开。

[0502] 将 10ml 测定缓冲液(室温)添加至每个打开的瓶。然后将瓶转移至配有浸没的多点磁性搅拌器的 30℃ 水浴。将内容物轻微地搅拌 5 分钟。

[0503] 向每个瓶添加一个 Cellazyme C 片。使用正好足够保持底物微粒运动并避免沉积的搅拌速度持续搅拌。在添加所述片之后 30 分钟将瓶从水浴移出,然后使其在室温无搅拌静置 15 分钟。

[0504] 用吸液管将大约 1ml 几乎澄清的上清从每个瓶的上部转移至半微量(semi-micro)分光光度计池(cuvette)。然后使用合适的分光光度计测定 590nm 的吸光度。所有的测定在 15 分钟内结束。

[0505] 空白试样,即不含添加的木葡聚糖酶的等同的洗涤剂试样,包括在所述测定法中。

[0506] 计算

[0507] 对每个酶试样进行两次 Abs590 测定:

[0508] ■ A590f,其为储存在 -18℃ 的试样的 Abs590 值

[0509] ■ A590w,其为在升高温度储存的试样的 Abs590 值。

[0510] 将空白值(A590b)从 A590f(得到 A590f-A590b)和 A590w(得到 A590w-A590b)减去。

[0511] 稳定性计算为:

[0512] $\% \text{稳定性} = ((A590w - A590b) / (A590f - A590b)) \times 100\%$ 。

[0513] 对于每个酶(A590f-A590b)结果的范围必需在 0.1-1.2。如果值落在该范围外,对该酶的该结果必需视为不可靠,并应使用酶试样不同的稀释物来重复测试。

[0514] 最后,对于每个酶变体的稳定性改善因子(SIF)如下计算:

[0515] $SIF = \text{酶试样的}\% \text{稳定性} / \text{亲本酶的}\% \text{稳定性 (SEQ ID NO :3)}$

[0516] 结果

[0517] 以下为在不同条件下测试的木葡聚糖酶变体的稳定性结果。

[0518] 表 1:在 40℃ 储存 18 小时的经灭菌过滤的酶试样

[0519]

突变	SIF
K8Q	1.1
K8A	1.2
K13A	1.1
K18R	1.1
K87Q	1.1

K129A	1. 7
K169Q	1. 3
K169R	1. 4
K169A	1. 3
N140F	1. 2
G316I	1. 1
F418I	1. 1
L34I	1. 1

[0520]

突变	SIF
L166I	1. 1
L268I	1. 1
L278I	1. 3
V1*+V2*+H3*	1. 2
*0aE+*0bV	1. 3
F146L	1. 2
Q137E	1. 6
R156Y	2. 2
R156Q	1. 5
K8S	1. 2
K21T	1. 4
K176P	1. 1
K445S	1. 4
K470T	1. 2

[0521] 表 2 :在 40℃储存 18 小时的经纯化的酶试样

[0522]

突变	SIF
K87Q	1.1
K129A	1.8
K169A	1.1
A7T+G200P+A224P+G225K+R267K+L268K+S269A	1.3
H164N+V179I+G200A+R267K	1.2
H164N+V179I+G200A+R211K+G225D+F281L	1.5
H164N+G200A+G225N+R267K	1.2

[0523] 表 3 :在 40℃ 储存 24 小时的经灭菌过滤的酶试样

[0524]

突变	SIF
K101R+L102I	1.1
K217A	1.1
L380F	1.1
N383Y	1.2
G78A	1.2
M310V	1.2

[0525]

突变	SIF
N399I	1.1
G498S	1.1
F146L	1.1
Q137E	1.4
R156Y	2.0

V1*+V2*+H3*+G4*+Q5*	1.1
N331F	1.2
K8S	1.1
T92V	1.3
K176P	1.2
G253A	1.1
K445S	1.3
K470T	1.2

[0526] 表 4 :在 40℃ 储存 24 小时的经纯化的酶试样

[0527]

突变	SIF
T92V	1.2
Q137E	1.5
R156Y	1.7
R156Q	1.2

[0528] 表 5 :在 40℃ 储存 30 小时的经灭菌过滤的酶试样

[0529]

突变	SIF
K118R	1.1
K118A	1.7
K129A+K169A	1.6
G200P	1.5
K129A+R156Y	2.0
K129A+Q137E+R156Y	2.2
K129A+R156Y+H164N	2.1

[0530] 表 6 :在 40℃ 储存 30 小时的经纯化的酶试样

[0531]

突变	SIF
T92V	1.3
R156Y	1.9
K129A+R156Y	2.1

[0532] 表 7 :在 40℃ 储存 48 小时的经灭菌过滤的酶试样

[0533]

突变	SIF
K118A	3.0
K252Q	1.1
K252R	1.2
K252A	1.1
K275Q	1.1
K275R	1.2
K275A	1.1
K306R	1.1
K306A	1.1
K347Q	1.1
K347R	1.1
K347A	1.1
K382A	1.1
K414A	1.2
K445R	1.3
K454R	1.1

K476Q	1. 1
K482Q	1. 1
K482A	1. 1
K488Q	1. 1
K488R	1. 1
K488A	1. 1
M40V	1. 4
R156Y	2. 9
G200P	1. 8
K129A+R156Y	3. 5
K129A+Q137E+R156Y+K470T	3. 7

[0534]

突变	SIF
K406N	1. 1
K445S	1. 2
K488T	1. 2
T92V+K129A+R156Y	3. 7
K118A+K129A+R156Y	3. 8
T92V+K118A+K129A+R156Y	3. 9
K129A+R156Y+P507A	3. 2
K129A+R156Y+S443D+K445S+L449I+V450I+S455N+M456Y	3. 8
K129A+R156Y+H436Y	3. 9
K129A+R156Y+K406N+N415G	3. 5
K129A+R156Y+L380F+N383Y+D384G+N389T	3. 5

K129A+R156Y+D366H+T374A	3.4
K129A+R156Y+A328G	3.5
K 129A+R156Y+V259I+R267K+L268K+S269A	3.5
K129A+R156Y+T244D	3.4
K129A+R156Y+I222V+A224P +V228I+V232A	2.0
K129A+R156Y+G200P+G204T+R211K	3.6
K129A+R156Y+A177T+V179I+A183S	2.9
K129A+R156Y+V159M+H164N+F165Y	2.8
K129A+R156Y+I10V+V14I+D19E	4.0
T104A+P111Q+A117S+K129A+R156Y	2.1
S123T+K129A+R156Y	3.8
K129A+Q137E+V139K+N140F+Q147S+R156Y	2.9
K129A+R156Y+D324N	3.4
K129A+R156Y+K176P	3.2
K129A+R156Y+D249N	3.2
K129A+R156Y+D249G	3.3
K129A+R156Y+D249S	3.1
K129A+R156Y+D461N	3.6
K129A+R156Y+D461T	3.9
K129A+R156Y+D461Q	4.0
K129A+R156Y+R409T	3.8
K129A+R156Y+R409L	3.6
K129A+R156Y+D247G	1.4

[0535]

突变	SIF
K129A+R156Y+E288Q	2.7
D37G+K129A+R156Y	3.9
D37N+K129A+R156Y	3.6
K129A+R156Y+R267H	3.8
K129A+R156Y+D303I	4.1
K129A+R156Y+D303K	3.7
K129A+R156Y+K275T	3.5
K129A+R156Y+G200P	3.9
K129A+R156Y+N331F	3.8
R156Y+N331F	3.2
K118A+K129A+R156Y+K470T	4.4
K470R	1.1
K470P	1.2
G413A	1.1
K118A+K129A+R156Y+A224P	3.9
D119L	1.3
K87V+K129A+K169A	1.9
K129A+K445S	1.8
K118A+K129A+R156Y+G200P	3.8
K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	4.2
G78A+K118A+K129A+R156Y	3.8
G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y	3.8
T92V+K118A+K129A+R156Y	3.7

M310V+N399I	1. 7
L34I+K129A	1. 9
K101A+K129A	1. 8
K13A+K129A	2. 0
K129A+K470T	1. 8
K129A+K176P	1. 9
G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y+K169A	4. 8
K118A+K129A+R156Y+K169A+G200P+N331F	4. 7
K118A+K129A+R156Y+G200P+M310V+N331F	4. 7
K129A+R156Y+K454Q	3. 8
G78A+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	4. 2

[0536]

突变	SIF
T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	4. 3
K129A+R156Y+N302K+D303S	2. 9
K129A+R156Y+N302K+D303L	2. 7
S332P+V397I	1. 1
K129A+R156Y+K322I+K454Q	2. 3
Q68H+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	4. 1
Q68H+T92S+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	5. 2
Q68H+T92A+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	4. 7
Q68H+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	5. 0
Q68H+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	5. 7
Q68H+T92D+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	3. 3

Q68H+T92I+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	4. 4
Q68H+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	4. 4
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	4. 2
K129S	1. 1
K129A	1. 5
R156M	1. 3
R156F	2. 3
R156W	1. 6
R156L	1. 4
R156V	2. 2
G396P	1. 3
G413S	1. 1
A177T	1. 1
E38I	1. 1
E38V	1. 2
G36V+D37A+E38*+N39*	1. 2
T104A	1. 2
L102A+T104V+*104P	1. 3
Q68L	1. 3
Q68H	3. 6
N389A	1. 1
G468Y	1. 1
G237V	1. 1

[0537] 表 8 :在 40℃ 储存 48 小时的经纯化的酶试样

[0538]

突变	SIF
K118A	2.3
R156Y	2.5
K129A+K169A	1.7
G200P	1.5
K129A+R156Y	1.7
K129A+Q137E+R156Y	3.7
K129A+R156Y+H164N	3.5
K129A+Q137E+R156Y+K470T	4.2
T92V+K129A+R156Y	4.5
K118A+K129A+R156Y	3.8
K129A+R156Y+G200P	4.8
K129A+R156Y+N331F	4.1
R156Y+N331F	3.5
K118A+K129A+R156Y+G200P,	4.2
K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	4.5
G78A+K118A, +K129A+R156Y	4.0
G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y	4.3
Q68H	3.7

[0539] 表 9 :在 40℃ 储存 72 小时的经灭菌过滤的酶试样

[0540]

突变	SIF
K13R	1.3
K206Q	1.1

K129A+R156Y	5.1
K129A+Q137E+R156Y+K470T	6.4
T92V+K129A+R156Y	6.6
K118A+K129A+R156Y	7.2
K129A+R156Y+G200P	7.7
K129A+R156Y+N331F	5.9
R156Y+N331F	5.3

[0541] 表 10 :在 35℃储存一周的经灭菌过滤的酶试样

[0542]

突变	SIF
K8Q	1.4
K8A	1.1
K13Q	1.1
K18Q	1.1
K18A	1.4
K21Q	1.4
K21R	1.4
K21A	1.4
K87Q	1.3
K101R	1.3
K101A	1.6
K118R	1.4
K118A	2.3
K101R+L102I	1.1

K129A	2. 1
K169Q	1. 4
K169R	1. 5
K169A	1. 5
K220Q	1. 3
K220A	1. 2
K252Q	1. 1
K252R	1. 1
K275Q	1. 1
K275R	1. 1
K275A	1. 1
K306R	1. 1
K306A	1. 1
K307Q	1. 2
K307R	1. 1
K454Q	1. 6
K454R	1. 2
K476Q	1. 3
K476R	1. 3

[0543]

突变	SIF
K476A	1. 2
K482Q	1. 2
K482A	1. 2

K488Q	1. 2
K488R	1. 2
K488A	1. 1
N140F	1. 7
G78A	1. 2
M310V	1. 3
G316I	1. 1
W391V	1. 1
N399I	1. 4
L34I	1. 3
L268I	1. 1
L278I	1. 2
G498S	1. 2
*0aE+*0bV	1. 4
F146L	2. 3
Q137E	2. 0
R156Y	3. 2
R156Q	1. 7
N331F	1. 5
K8S	1. 3
K21T	1. 5
K176P	1. 2
G253A	1. 1
K445S	1. 5

K470T	1.6
F146C	1.3
K129A+K169A	1.8
G200P	1.7
A224P	1.1
K129A+R156Y	2.6
K129A+Q137E+R156Y	2.6

[0544]

突变	SIF
K129A+R156Y+H164N	2.6
K406N	1.3
K445S	1.2
K488T	1.2
K129R	1.1
R156F	2.0

[0545] 表 11 :在 35℃储存一周的经纯化的酶试样

[0546]

突变	SIF
K101R	1.1
K101A	1.1
K118A	2.3
K129A	1.8
K169R	1.2
K169A	1.1
T92V	2.0

F418I	1.1
V1*+V2*+H3*+G4*+Q5* ;	1.2
Q137E	1.6
R156Y	2.5
R156Q	1.2
K21T	1.1
G200P	1.7
K129A+R156Y	2.7
K129A+Q137E+R156Y	3.0
K129A+R156Y+H164N	3.1
A7T+G200P+A224P+G225K+R267K+L268K+S269A	1.3
H164N+V179I+G200A+R267K	1.3
H164N+V179I+G200A+R211K+G225D+F281L	1.8
H164N+G200A+G225N+R267K	1.6

[0547] 表 12 :在 44℃ 储存 16 小时的经纯化的酶试样

[0548]

突变	SIF
Q68H	5.8
S123P	4.4
R156Y	4.0
K118A	2.9
G200P	2.6
K129A	2.4
Q137E	2.4

H193T	2.1
T92V	2.0
S76W	1.7

[0549] 实施例 4- 木葡聚糖酶变体的稳定性

[0550] 本实施例的木葡聚糖酶变体的洗涤剂稳定性通过在液体洗涤剂中温育之后测定所述变体的活性来评价

[0551] 所述稳定性测试通过将酶试样添加至液体洗涤剂,并将其在升高的温度(例如 35℃或 46℃)储存来进行。在规定的储存时间后,确定酶活性,并将其与在大约 +5℃冷储存相同时间的相同试样的活性相比较。稳定性测试的结果为:作为等同的冷藏试样(未应激试样)中的活性的百分比表示的储存在升高温度的试样(应激试样)中的活性。

[0552] 在相同的条件下测试后,将木葡聚糖酶变体的结果与亲本木葡聚糖酶(SEQ ID NO:3)的结果相比较。

[0553] 洗涤剂

[0554] 用于稳定性测试的液体洗涤剂具有下述组成:

[0555]	烷基乙氧基硫酸盐(alkylethoxy sulfate)	20.1%
[0556]	烷基苯磺酸盐(alkylbenzene sulfonate)	2.7%
[0557]	烷基硫酸酯(alkyl sulfate)	6.5%
[0558]	烷基乙氧基化物(alkyl ethoxylate)	0.8%
[0559]	柠檬酸	3.8%
[0560]	脂肪酸	2.0%
[0561]	硼砂(Borax)	3.0%
[0562]	甲酸钠与甲酸钙(Na&Ca formate)	0.2%
[0563]	胺乙氧基化物聚合物(amine ethoxylate polymers)	3.4%
[0564]	二亚乙基三胺五乙酸(diethylenetriaminepentaacetic acid)	0.4%
[0565]	Tinopal AMS-GX	0.2%
[0566]	乙醇	2.6%
[0567]	丙二醇	4.6%
[0568]	二乙二醇	3.0%
[0569]	聚乙二醇	0.2%
[0570]	单乙醇胺	2.7%
[0571]	NaOH	至 pH 8.3
[0572]	次要成分(蛋白酶、淀粉酶、香料、染料)	2.3%
[0573]	水平衡	
[0574]	储存测试	
[0575]	使根据实施例 1 制备的酶试样恰在开始储存稳定性测试之前解冻。	
[0576]	使用所述酶试样而无需进一步稀释。	
[0577]	将液体洗涤剂分散至圆底聚苯乙烯 96-孔微滴定板(板 1)中,得到每孔 190 μl	

洗涤剂。

[0578] 将 10 μ l 酶试样和小磁性搅拌棒添加至每个孔中,并使用粘性铝箔盖(aluminium foil lid)(Beckman Coulter)将板紧闭(以阻止蒸发)。将内容物用所述磁性搅拌棒混合约 30 分钟。

[0579] 对于板 1 的每个孔,然后将 20 μ l 洗涤剂-酶混合物转移至相同的新的空板(板 2)中。然后将两个板均封上。

[0580] 将原先的板(板 1)置于在规定的升高温度(例如,35°C或 46°C)的温育烤箱中进行测试。将另一个板(板 2)置于大约 5°C的冷藏箱中。

[0581] 在温育了规定期间之后,将板从冷藏箱和温育烤箱移出。将板置于实验台上至少半小时使所有的孔达到室温。

[0582] 然后将来自板 1 每个孔的 20 μ l 转移至新的空圆底 96 孔板(板 1a)中。

[0583] 此时板 1a 包含 20 μ l 应激试样,而板 2 包含 20 μ l 未应激试样。

[0584] 活性测定法

[0585] 在洗涤剂中储存后的酶试样的活性使用下述方法在室温测定。

[0586] 测定法原理:

[0587] 对硝基苯酚- β -D-纤维四糖苷(pNP- β -D-纤维四糖苷)是由某些木葡聚糖酶的催化作用而水解的合成底物。

[0588] 所述底物本身是无色的;然而在其还原末端糖苷键水解之后,释放对硝基苯酚,其在 pH 8 缓冲液中由于在 405nm 的强吸收而为黄色的。

[0589] pNP- β -D-纤维四糖苷本身在给定测定条件下是非常稳定的。因此 405nm 吸光度的增加是酶活性的标志。

[0590] 我们发现亲本木葡聚糖酶(SEQ ID NO:3)接受 pNP- β -D-纤维四糖苷作为底物,如在 405nm 强烈的吸光度增加所证实。

[0591] 材料和试剂:

[0592] 测定缓冲液:100mM EPPS;0.01% Tween 20;pH 8.0。

[0593] pNP- β -D-纤维四糖苷(CAS-#:129411-62-7;Toronto Research Chemicals;Canada)

[0594] 底物溶液:1mM pNP- β -D-纤维四糖苷于测定缓冲液中。

[0595] 方法:

[0596] 板 1a 包含 20 μ l 应激试样而板 2 包含 20 μ l 未应激试样。

[0597] 将试样通过向板 1a 和板 2 所有孔添加 50 μ l 测定缓冲液来稀释,并将其使用微滴定板振荡器混合一小时。然后向所有孔再添加 50 μ l 测定缓冲液,并再持续振荡 10 分钟。

[0598] 将 20 μ l 6 倍稀释的试样转移至透明的 384 孔聚苯乙烯微滴定板,并向所有孔添加 20 μ l 底物溶液。试样通过短暂振荡微滴定板来混合。立即通过使用 384-孔分光光度计观察在 405nm 吸光度增加的速率来起始对酶活性的动力学测量。

[0599] 确定所述反应的起始速度(Abs/min)。反应的起始速度是试样中酶活性的量度,如通过线性标准曲线在相关的酶浓度范围内所证实的。

[0600] 计算:

[0601] %剩余活性计算为:应激试样中的酶活性除以相同的非应激试样中的酶活性。

[0602] %剩余活性 = “Abs/min(应激试样)” / “Abs/min(未应激试样)” * 100%。

[0603] 结果

[0604] 以下为在不同条件下测试的木葡聚糖酶变体的稳定性结果

[0605] 表 13. 在 +44℃ 储存 16 小时的经灭菌过滤的酶试样

[0606]

突变	%剩余活性
SEQ ID NO :3	7
K118A	24
R156Y	36
K129A+K169A	19
G200P	26
K129A+R156Y	51
K129A+Q137E+R156Y	72
K129A+R156Y+H164N	63

[0607] 表 14. 在 +47℃ 储存 16 小时的经灭菌过滤的酶试样

[0608]

突变	%剩余活性
SEQ ID NO :3	< 5
Q68H+T92S+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	77
Q68H+T92A+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	83
Q68H+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	91
Q68H+T92D+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	49
Q68H+T92Y+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	78
Q68H+T92I+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	89
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	95
Q68H+T92S+K118A+K129A+R156Y+G200P+G274D+N331F	67
Q68H+T92N+D97N+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	81

Q68H	52
K118A+K129A+R156Y	52
T92V+K118A+K129A+R156Y	88
K129A+R156Y+G200P+G204T+R211K	68
S123T+K129A+R156Y	65
K129A+R156Y+G200P	73
K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	90
G78A+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	98
T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	95

[0609] 表 15. 在 +44℃ 储存 16 小时的经灭菌过滤的酶试样

[0610]

突变	%剩余活性
SEQ ID NO :3	22
R156Y	59
K13R	34
K307Q	31
K414A	34
G253A	33
G498S	31
M310V	38
N399I	30
V1*+V2*+H3*+G4*+Q5*	31
F146L	34
K445S	30
K470T	30

[0611] 表 16. 在 +45℃ 储存 16 小时的经灭菌过滤的酶试样

[0612]

突变	%剩余活性
SEQ ID NO :3	6
R156Y	34
K129A+R156Y	55
K101R+L102I	12
K118A+K129A+R156Y	72
K129A+R156Y+P507A	57
K129A+R156Y+D366H+T374A	44
K129A+R156Y+V259I+R267K+L268K+S269A	40
K129A+R156Y+G200P+G204T+R211K	49
K129A+R156Y+V159M+H164N+F165Y	30
T104A+P111Q+A117S+K129A+R156Y	39
S123T+K129A+R156Y	70
K129A+R156Y+D324N	60
K129A+R156Y+D461N	59
K129A+R156Y+D461T	61
K129A+R156Y+D461Q	59

[0613]

突变	%剩余活性
D37G+K129A+R156Y	60
D37N+K129A+R156Y	64
K129A+R156Y+R267H	64
K129A+R156Y+D303I	62
K129A+R156Y+D303K	65

K129A+R156Y+K275T	68
K129A+R156Y+G200P	92
K118A+K129A+R156Y+K470T	80
164N	< 5
K129A+R156Y+N302K+D303S	66
K129A+R156Y+N302K+D303L	64

[0614] 表 17. 在 +44℃ 储存 16 小时的经灭菌过滤的酶试样

[0615]

突变	% 剩余活性
SEQ ID NO :3	26
R156Y	58
K118A+R156Y+G200P	84
K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F	92
K445C+K470C	32
F281L	32
D366H	35
K392G	26
D395G	35
S76W	47
G498D	32
G498A	36
D324N	39
S123T	36
Q68Y	6

Q68C	13
K129A+R156Y	89
K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	100

[0616] 表 18. 在 +44℃ 储存 16 小时的经灭菌过滤的酶试样

[0617]

突变	% 剩余活性
SEQ ID NO :3	34
R156Y	66
R156M	39
R156F	63
R156W	44
R156L	34
R156P	< 5
R156V	50
R156T	35
R156S	27
R156A	36
R156D	34
R156K	52
R156N	29
R156I	50
T92I	39
R156Q	34

[0618] 表 19. 在 +44℃ 储存 16 小时的经灭菌过滤的酶试样

[0619]

突变	%剩余活性
SEQ ID NO :3	25
R156Y	70
R156E	66
R156F	65
T92V	43
R156P	< 5
R156V	53
R156K	38
R156I	31

[0620] 表 20. 在 +44℃储存 16 小时的经灭菌过滤的酶试样

[0621]

突变	%剩余活性
SEQ ID NO :3	31
R156Y	65
N415S	34
S443E	33
S443K	32
S443Q	35
K129T	46
K129A	50
G468Y	32
G237A	34

G237S	34
G237V	25
G468S	32

[0622] 表 21. 在 +44℃储存 16 小时的经灭菌过滤的酶试样

[0623]

突变	%剩余活性
SEQ ID NO :3	21
R156Y	45
S332P	41
K129A+R156Y+K176S	73
K129A+R156Y+D303V	77
K129A+R156Y+D303S	81
R197L	20
R340N	41
R340T	43
H193S	51
H193D	49
H193T	66
L34F	43
Q137D	24
Q149E	48
T9D	40
A83E	49

[0624]

突变	%剩余活性
S214E	25
K129A+R156Y	98
T92V	49
T92I	36

[0625] 表 22. 在 +47℃储存 16 小时的经灭菌过滤的酶试样

[0626]

突变	%剩余活性
SEQ ID NO: 3	< 5
R156Y	29
Q68H+R156V+G200P+N331F	93
Q68H+R156F+G200P+N331F	大约 100
Q68H+G200P+N331F	大约 100
Q68H+T92V+R156V+G200P+M310V	86
Q68H+T92V+R156Y+G200P+M310V	86
Q68H+T92V+R156F+G200P+M310V	91
Q68H+T92V+R156F+G200P+M310V+S484C	82
Q68H+T92V+G200P+M310V	82
Q68H+T92V+R156V+G200P+M310V+N331F	大约 100
Q68H+T92V+R156Y+G200P+M310V+N331F	大约 100
Q68H+T92V+R156F+G200P+M310V+N331F	86
Q68H+T92V+G200P+M310V+N331F	80
D366H	< 5
K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	81
Q68H+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	87
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	80
M40L+A41T+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+Q137E+N153K+H164N+D249N+V272A+I337L+M356L+V397A+N415S+T421I+S424N+N441D+V450I+E489A+A490V+T517A+S522*	41
I10V+F17S+D33E+M40L+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+T92A+L102Q+Q137E+I222V+V228I+D249N+V272A+I337L+M356L+T374A+V397A+S416A+T421I+S424N+N441D+D444Y+V450I+A469E+K470T+I473G+T517A+S522P+P523V+V524E	52
Q32H+M40L+R49G+D65E+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+Q92A+L102Q+T104A+Q137E+H164N+K202E+I222V+V228I+D249N+M356L+T374A	41

[0627]

突变	%剩余活性
I10V+F17S+Y53H+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+T92A+L102Q+Q137E+T172V+A177T+I222V+V228I+D249N+S269N+I337L+M356L+V397A+S416A+T421I+S424H+N441D+D444Y+A469E+K470T+I473G+T517A+S522*	26

[0628] 表 23. 在 +46℃ 储存 64 小时的经灭菌过滤的酶试样

[0629]

突变	%剩余活性
SEQ ID NO :3	< 5
R156Y	< 5
Q68H+R156V+G200P+N331F	80
Q68H+R156F+G200P+N331F	84
Q68H+G200P+N331F	63
Q68H+T92V+R156V+G200P+M310V	52
Q68H+T92V+R156Y+G200P+M310V	67
Q68H+T92V+R156F+G200P+M310V	63
Q68H+T92V+R156F+G200P+M310V+S484C	68
Q68H+T92V+G200P+M310V	48
Q68H+T92V+R156V+G200P+M310V+N331F	93
Q68H+T92V+R156Y+G200P+M310V+N331F	100
Q68H+T92V+R156F+G200P+M310V+N331F	91
Q68H+T92V+G200P+M310V+N331F	80
K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	56
Q68H+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	86
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	88

[0630] 表 24. 在 +44℃ 储存 16 小时的经灭菌过滤的酶试样

[0631]

突变	%剩余活性
SEQ ID NO :3	16
R156Y	52
T374A	27

F146L+K322I	24
K129A+Q137E+R156Y+G200P	87
Q68S	14
Q68T	< 5

[0632]

突变	%剩余活性
K129A+R156Y	71
F146L	26
K129A+R156Y+G200P	82
Q68H	77

[0633] 表 25. 在 +44℃储存 16 小时的经灭菌过滤的酶试样

[0634]

突变	%剩余活性
SEQ ID NO :3	19
R156Y	53
K101A+K129A	47
K129A+K470T	46
S332P	29
G413A	30
K118A+K129A+R156Y+A224P	81
K129A+K176P	50
K118A+K129A+R156Y+K169A+G200P+N331F	89
K118A+K129A+R156Y+G200P+M310V+N331F	86
K129A+R156Y+K454Q	86
K13A+K129A	49

G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y+K169A	93
K129A+R156Y+K322I+K454Q	76
K129A	47
K129A+R156Y	74
K118A+K129A+R156Y	77
K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	大约 100
G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y	93

[0635] 表 26. 在 +46℃ 储存 6 日的经灭菌过滤的酶试样

[0636]

突变	%剩余活性
SEQ ID NO ;3	< 5
R156Y	< 5
Q68H+R156V+G200P+N331F	50
Q68H+R156Y+G200P+N331F	60

[0637]

突变	%剩余活性
Q68H+R156F+G200P+N331F	64
Q68H+G200P+N331F	40
Q68H+T92V+R156V+G200P+M310V	32
Q68H+T92V+R156Y+G200P+M310V	42
Q68H+T92V+R156F+G200P+M310V	43
Q68H+T92V+R156F+G200P+M310V+S484C	34
Q68H+T92V+G200P+M310V	27
Q68H+T92V+R156F+G200P+M310V+N331F	93

Q68H+T92V+G200P+M310V+N331F	58
K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	27
Q68H+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	75
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	70

[0638] 表 27. 在 +44℃ 储存 64 小时的经灭菌过滤的酶试样

[0639]

突变	% 剩余活性
SEQ ID NO :3	< 5
R156Y	9
K101A+K129A	6
K129A+K470T	4
S332P	< 5
G413A	< 5
K118A+K129A+R156Y+A224P	51
K129A+K176P	6
K118A+K129A+R156Y+K169A+G200P+N331F	67
K118A+K129A+R156Y+G200P+M310V+N331F	63
K129A+R156Y+K454Q	52
K13A+K129A	5
G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y+K169A	72
K129A	5
K129A+R156Y	32
K118A+K129A+R156Y	30
K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	63
G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y	72

[0640] 表 28. 在 +46℃ 储存 64 小时的经灭菌过滤的酶试样

[0641]

突变	%剩余活性
SEQ ID NO :3	< 5
R156Y	4
G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	71
K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F+N399I	59
K118A+K129A+F146L+R156Y+G200P+N331F	62
T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F	74
T92V+K118A+K129A+R156Y+H164N+G200P+N331F	70
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F	87
Q68H+T92V+K118A+S123T+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F	90
T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	66
K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	68
Q68H T92V K118A K129A R156Y G200P N331F	83

[0642] 表 29. 在 +44℃ 储存 16 小时的经灭菌过滤的酶试样

[0643]

突变	%剩余活性
SEQ ID NO :3	19
R156Y	51
S123P	69
V159M	21
V345I	34
G225S	30
V232A	< 10

[0644] 表 30. 在 +46℃ 储存 10 日的经灭菌过滤的酶试样

[0645]

突变	%剩余活性
SEQ ID NO :3	< 5
R156Y	< 5
G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	32
K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F+N399I	16
K118A+K129A+F146L+R156Y+G200P+N331F	23

[0646]

突变	%剩余活性
T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F	34
T92V+K118A+K129A+R156Y+H164N+G200P+N331F	31
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F	67
Q68H+T92V+K118A+S123T+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F	81
T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	23
K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	25
Q68H T92V K118A K129A R156Y G200P N331F	61

[0647] 表 31. 在 +44℃ 储存 16 小时的经灭菌过滤的酶试样

[0648]

突变	%剩余活性
SEQ ID NO :3	15
R156Y	51
Q68F	< 5
Q68N	69
Q68Y	< 5
Q68D	< 10
Q68C	< 10

Q68G	< 10
Q68S	< 10
Q68E	< 5
Q68A	< 5
Q68M	27
Q68W	< 10
Q68H	82

[0649] 表 32. 在 +46℃ 储存 7 日的经灭菌过滤的酶试样

[0650]

突变	%剩余活性
SEQ ID NO :3	< 5
R156Y	< 5
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+A224P+N331F	81
Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+N331F	74
Q68H+T92V+Q137E+R156Y+G200P+N331F	80

[0651]

突变	%剩余活性
Q68H+T92V+K118A+Q137E+G200P+N331F	65
Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+N331F	80
Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P	67
G78A+K118A+K129A+R156Y+K169A	14
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F	73
K129A+R156Y	< 5
G78A+K118A+K129A+R156Y	7

[0652] 表 33. 在 +46℃ 储存 48 小时的经灭菌过滤的酶试样

[0653]

突变	%剩余活性
SEQ ID NO: 3	< 5
R156Y	9
K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	67
Q68H+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	79
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	85
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T+D366H	73
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+D366H	72
Q68H+T92V+R156Y+H193T+D366H	78
Q68H+T92V+R156F+H193T+D366H	78
Q68H+R156Y+H193T+D366H	68
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T	67
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T	80
Q68H+T92V+R156Y+H193T	84
Q68H+T92V+R156F+H193T	66
Q68H+R156Y+H193T	66
Q68H+R156Y+H193T+G200P+M310V	93
Q68H+T92V+R156F+H193T+G200P+M310V	82
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+G200P+M310V+E446K	76
Q68H+T92V+R156Y+H193T+G200P+M310V	73

[0654]

突变	%剩余活性
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T+G200P+M310V	89
Q68H+K129T+R156K+G200P+N331F	95
Q68H+K129A+R156K+G200P+N331F	86
Q68H+K118A+R156V+G200P+N331F	81
Q68H+K118S+R156F+G200P+G274D+N331F	68

[0655] 表 34. 在 +44℃ 储存 16 小时的经灭菌过滤的酶试样

[0656]

突变	%剩余活性
SEQ ID NO :3	22
R156Y	61
S123T+K129A+R156Y	83
H193T	44
G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y	91
S123T	55
S123P	73
V232A	< 10
K129A+R156Y	64
K118A+K129A+R156Y	68

[0657] 表 35. 在 +44℃ 储存 16 小时的经灭菌过滤的酶试样

[0658]

突变	%剩余活性
SEQ ID NO :3	17
R156Y	60
N140F	25
H164A	7
H193A	23
R500T	30
R500A	33
R500V	29
H199A	< 10

H3A	26
H436A	26

[0659]

突变	%剩余活性
H448A	< 10
H512A	25
H96A	14
H3A+H436A	27

[0660] 表 36. 在 +44℃ 储存 16 小时的经灭菌过滤的酶试样

[0661]

突变	%剩余活性
SEQ ID NO :3	27
R156Y	66
N399I	33
L34F	35
Q149E	35
S332P	36
K129A	50
K21Q+K129A	54
K129A+K275Q	56
Q68F	6
T9D+L34F+A83E+Q149E+H193T+S332P+R340T	53

[0662] 表 37. 在 +37℃ 储存 12 日的经灭菌过滤的酶试样

[0663]

突变	%剩余活性
SEQ ID NO :3	< 5
R156Y	8
K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	52
Q68H+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	47
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	67
Q68H+R156Y+G200P+N331F	47
Q68H+R156F+G200P+N331F	66
Q68H+T92V+R156Y +G200P+M310V	41
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T+D366H	54
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+D366H	44
Q68H+T92V+R156Y+H193T+D366H	44
Q68H+T92V+R156F+H193T+D366H	37

[0664]

突变	%剩余活性
Q68H+R156Y+H193T+D366H	36
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T	50
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T	56
Q68H+T92V+R156Y+H193T	37
Q68H+T92V+R156F+H193T	37
Q68H+R156Y+H193T	44
Q68H+R156Y+H193T+G200P+M310V	34
Q68H+T92V+R156F+H193T+G200P+M310V	28
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+G200P+M310V+E446K	47
Q68H+T92V+R156Y+H193T+G200P+M310V	47
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T+G200P+M310V	56

[0665] 表 38. 在 +44℃储存 16 小时的经灭菌过滤的酶试样
[0666]

突变	%剩余活性
SEQ ID NO :3	19
R156Y	49
G200S	28
G200D	25
G200Y	12
G200L	< 5
G200P	37
G200W	< 5
G200I	< 5
G200N	9
G200F	< 5
G200V	9
G200H	12
G200Q	19
G200C	17
G200A	24
G200M	6
G200K	11
G200E	48

[0667]

突变	%剩余活性
G200R	< 5
G200T	5

[0668] 表 39. 在 +44℃ 储存 16 小时的经灭菌过滤的酶试样

[0669]

突变	%剩余活性
SEQ ID NO :3	13
R156Y	45
K21Q+K129A	34
K129A+K275Q	39
T9D+L34F+A83E+Q149E+H193T+S332P+R340T	43
N399I	24
L34F	22
Q149E	23
S332P	24
K129A	58
G518D	19
K118A+K129A	73
K118A	48
K129A+K169A	40

[0670] 表 40. 在 +46℃ 储存 5 日的经纯化的酶试样

[0671]

突变	%剩余活性
SEQ ID NO :3	< 5
R156Y	< 5

Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+D366H	73
Q68H+R156Y+H193T	63
Q68H	13
Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+N331F	70
G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y	44
K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	46
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	83
Q68H+K129T+R156K+G200P+N331F	77
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T+D366H	85

[0672] 表 41. 在 +46℃ 储存 5 日的经灭菌过滤的酶试样

[0673]

突变	% 剩余活性
SEQ ID NO :3	< 5
R156Y	< 5
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+N331K	70
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+N331H	42
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+N331Q	24
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T	33
Q68H+K118A+Q137E+R156Y+G200P+N331F	74
Q68H+S76W+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+N331F	87
K13A+Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P	54
Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+D324N	53
Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+K470T	69
Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+N331F	75
Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P	52

[0674] 表 42. 在 +44℃ 储存 16 小时的经灭菌过滤的酶试样

[0675]

突变	%剩余活性
SEQ ID NO :3	13
R156Y	43
S76M	21
S76I	36
S76E	19
S76R	26
S76K	27
S76V	39
S76R	24

[0676] 表 43. 在 +44℃ 储存 16 小时的经灭菌过滤的酶试样

[0677]

突变	%剩余活性
SEQ ID NO :3	20
R156Y	51
K118A+R156Y	62

[0678]

突变	%剩余活性
R197A	< 5
R20A	26
R267A	26
R295A	23
R314A	< 10

R340A	23
A221K	25
M290R	23
M373Q	25
V397S	25
T417K	27
N441G+A442E+S443D	30
S467R+G468S+A469T	29
I473T	24
A490R	32
T517A+G518D	31
V431E	29
S76W+G200P+A224P	58
S76W+G200P	59
G200P+A224P	56
S76T	42
M310V	31
G200P	47
G200E	59
M310V+N399I	< 10
Q68W	< 5

[0679] 表 44. 在 +46℃ 储存 16 小时的经灭菌过滤的酶试样
[0680]

突变	%剩余活性
SEQ ID NO :3	8
R156Y	40
Q68H+T92V+K118A+Q137E+N140F+R156Y+G200P+K470T	89
Q68H+T92V+K118A+S123P+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F	88

[0681]

突变	%剩余活性
T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+N331F	88
S76W+G200P+A224P	44
S76W+G200P	45
G200P+A224P	48
S76T	26
Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+M310L	91
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+G200P+N331F	95
G200P	39

[0682] 表 45. 在 +46℃ 储存 9 日的经灭菌过滤的酶试样

[0683]

突变	%剩余活性
SEQ ID NO :3	< 5
R156Y	< 5
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+N331K	46
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+N331H	19
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+N331Q	9
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T	17
Q68H+K118A+Q137E+R156Y+G200P+N331F	48

Q68H+S76W+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+N331F	65
K13A+Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P	31
Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+D324N	30
Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+K470T	41
Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P+N331F	50
Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+G200P	30

[0684] 表 46. 在 +46℃ 储存 9 日经纯化的酶试样

[0685]

突变	%剩余活性
SEQ ID NO :3	< 5
R156Y	< 5
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+D366H	52
Q68H+R156Y+H193T	34
Q68H+T92V+K118A+Q137E+R156Y+N331F	45
G78A+T92V+K118A+K129A+R156Y	14

[0686]

突变	%剩余活性
K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	18
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	56
Q68H+K129T+R156K+G200P+N331F	47
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T+D366H	52
Q68H+R156Y+H193T	31

[0687] 表 47. 在 +37℃ 储存 30 日经灭菌过滤的酶试样

[0688]

突变	%剩余活性
SEQ ID NO: 3	< 5
R156Y	< 5
K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	33
Q68H+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	42
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	52
Q68H+R156Y+G200P+N331F	41
Q68H+R156F+G200P+N331F	58
Q68H+T92V+R156Y+G200P+M310V	41
Q68H+T92V+R156F+G200P+M310V	42
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T+D366H	50
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+D366H	32
Q68H+T92V+R156Y+H193T+D366H	33
Q68H+T92V+R156F+H193T+D366H	28
Q68H+R156Y+H193T+D366H	25
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T	41
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T	43
Q68H+T92V+R156Y+H193T	27
Q68H+T92V+R156F+H193T	23
Q68H+R156Y+H193T	33
Q68H+R156Y+H193T+G200P+M310V	28
Q68H+T92V+R156F+H193T+G200P+M310V	21
Q68H+T92V+K118A+K129A+Q137E+R156Y+H193T+G200P+M310V+E446K	35
Q68H+T92V+R156Y+H193T+G200P+M310V	35
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+H193T+G200P+M310V	46

[0689] 表 48. 在 +44℃ 储存 16 小时的经灭菌过滤的酶试样

[0690]

突变	%剩余活性
SEQ ID NO :3	15
R156Y	49
A83S	15
A83N	9

A83Y	10
A83H	14
A83I	8
A83L	10
A83R	16
A83D	17
A83T	12
A83E	31
L34V	22
L34M	19
L34I	24
M310I	21
M310V	20
M310L	18

[0691] 表 49. 在 +35℃储存 3 日的经灭菌过滤的酶试样

[0692]

突变	%剩余活性
SEQ ID NO :3	61
R156Y	89
N331K	57
N331R	54

N331L	39
N331H	62
N331G	59
N331M	70
N331W	55
N331S	58

[0693]

突变	%剩余活性
N331V	57
N331T	46
N331Y	55
N331I	47
N331A	87
N331Q	82
N331C	70
N331E	58
N331D	63
N331P	26
N331F	51

[0694] 表 50. 在 +44℃储存 16 小时的经灭菌过滤的酶试样

[0695]

突变	%剩余活性
SEQ ID NO: 3	20
R156Y	58
I10V+F17S+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+T104A+Q137E+N153K+R156Q+V219A+I222V+V228I+D249N+S269N+V272A+E333A+I337L+M356L+V397A+N415S+D420G+T421I+S424H+N441D+D444Y+V450I+A469E+K470T+I473G+T517A+S522*	72
I10V+D33E+M40L+A41T+Q67M+Y73F+S76D+G78A+Q82K+T92A+L102Q+Q137E+I222V+V228I+D249N+S269N+V272A+E333A+I337L+M356L+T374A+S416A+D444Y+A469E+K470T+I473G+T517A+S522*	71
I10V+F17S+D33E+M40L+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+T92A+L102Q+Q137E+H164N+N168K+T172A+V219A+I222V+V228I+D249N+S269N+V272A+E333A+I337L+M356L+N415S+T421I+S424H+N441D+D444Y+S522P+P523V+V524E	78
I10V+F17S+D33E+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+T92A+L102Q+Q137E+N168K+T172A+I222V+V228I+D249N+V272A+E333A+I337L+M356L+V397A+S416A+T421I+S424H+N441D+D444Y+A469E+K470T+I473S+V477I+E489A+A490V+T517A+S522*	74
I10V+F17S+M40L+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+T92A+L102Q+Q137E+I222V+V228I+D249N+S269N+V272A+T320A+I337L+M356L+T374A+V397A+N415S+T421I+S424H+N441D+D444Y+A469E+K470T+I473S+V477I	73

[0696]

突变	%剩余活性
77I+T517A+S522P+P523V+V524E	
I10V+F17S+D33E+M40L+A41T+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+Q137E+V219A+D249N+V272A+I337L+M356L+V397A+S416A+T421I+S424N+N441D+D444Y+V450I+K470T+I473S+V477I	64
I10V+F17S+Q67M+N72S+S76D+G78A+Q82K+T92A+T104A+Q137E+R156Q+V159A+H164N+N168K+T172A+I222V+V228I+D249N+V272A	66
K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	98
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	大约 100

[0697] 表 51. 在 +44℃ 储存 2 日的经灭菌过滤的酶试样

[0698]

突变	%剩余活性
SEQ ID NO :3	< 5
R156Y	20
Q68H+R156Y	61
Q68H+T92V+K118A+R156Y	66
Q68H+T92V+R156Y	68
Q68H+K118A+R156Y+H193T+D366H	74
Q68H+T92V+K118R+R156Y+H193T+D366H	65
Q68H+T92V+K118R+R156F	63
Q68H+K118R+R156Y	68
Q68H+T92V+R156Y+H193T+D366H	69
Q68H+K118R+R156Y+G200P	74
Q68H+K118R+R156F	66
K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	79
Q68H+T92V+K118A+K129A+R156Y+G200P+N331F	91
Q68H	55
D33V+Q68H+N168H+V450I	70
S123T	10
K129A	10

[0001]

序列表

<110> 诺维信公司(NOVOZYMES A/S)

<120> 家族 44 木葡聚糖酶变体

<130> 11363.204-W0

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1695

<212> DNA

<213> 多粘类芽孢杆菌(Paenibacillus polymyxa)

<400> 1

```
atgaagaaac cgttggggaa aattgtcgca agcacgcac tactcatttc tgttgcittt      60
agttcatcga icgcacgcgc ttagttcac ggtcaaacgg caaagactat tactattaaa      120
gtagatacat tcaaggatcg taagcctatt agcccttata tatacggtac aaatcaggat      180
ttggcagcgc atgaaaatat ggctgccaga cgacttggtg gcaaccgaat gaccggatac      240
aactgggaaa acaatatgic caatgcagga agtgactggc agcaatctag cgataactat      300
ttatgcagta atggtggcc1 gacacaagcc gaatgtgaaa agccaggagc ggtgacgact      360
tcgtttcatg accaatcgct gaagcttggc acitattctt tagttacgtt gccgaigggc      420
ggtttatgtg ctaaggatgg aaacggaagt gtgcaggaaa gcgaaaagge cccttcgct      480
cgttggaaic aggtcgtaaa cgccaaaaat gcaccgttcc aactacagcc tgatctgaat      540
gacaatcggg tctatgtgga tgagttcgic cattllltag tgaacaagta cggcaciget      600
tcaacaaagg cgggggtgaa aggatatgcc ctgcacaatg aaccgcctct ctggtcgcat      660
acgcaccac gcattcatgg tgaaaaagtc ggagcgaaag agtttgtaga ccggtcagtc      720
agtttatcca aagctgtgaa agcgatigac gcgggggcag aggttttttg ccggttctt      780
tacggatttg gcgcctataa agatcttcaa actgcacctg attgggactc tgtaaaagge      840
aattatagct ggttcgtaga ctattacctg gatcaaatgc gccttagctc gcaagtcgaa      900
ggcaagagat tgctggatgt attcgacgta cactggtatc ccgaagcgat gggcggagge      960
atacgaatta cgaatgaggt aggcaatgac gaaacgaaga aagccagaat gcaggcacct      1020
cgcacctgtt gggacccgac ctataaggaa gatagttgga tcgtcfaatg gaacagcgag      1080
tttttgccca tactacctcg attgaagcag tcggtggata aatattatcc gggaaccaag      1140
ctggcaatga ccgagtatag ctatggcggc gaaaatgata tttccggcgg gattgcgatg      1200
accgatgtgc tgggtatctt gggcaaaaat gatgtttata tggcaacta ctggaagcta      1260
aaggatgggt tcaacaacta cgttagtgcc gattacaage tttatcgcaa ttatgaagga      1320
aaaaactcta ctttcggtga taccagtggt agtgcgcaa catcgatat tgtcaalagc      1380
tcggtccatg cttctgtaac gaatgcatcc gacaaagaac tgcattctgt tgtcatgaat      1440
aaaagcatgg acagcgcatc cgacgcccc tttgatcttt ccggcgcgaa gacttacatt      1500
tccggtaaa g tatgggggtt cgataaaaac agtcgcgaaa ttaaagaagc agcgccaatc      1560
acgcaaat1t caggcaaccg ttttacttat accgtaccgc ctttgacggc atatcacatt      1620
```

[0002]

```

gtgctgacta ctggcaatga cacgtctcca ggtgaaggcg tacttgtttg gggaaccgag      1680
ccgacagcta attaa                                                                1695

<210> 2
<211> 551
<212> PRT
<213> 多粘类芽孢杆菌(Paenibacillus polymyxa)

<400> 2
Met Lys Lys Pro Leu Gly Lys Ile Val Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ile
1          5          10          15
Ser Val Ala Phe Ser Ser Ser Ile Ala Ser Ala Val Val His Gly Gln
20          25          30
Thr Ala Lys Thr Ile Thr Ile Lys Val Asp Thr Phe Lys Asp Arg Lys
35          40          45
Pro Ile Ser Pro Tyr Ile Tyr Gly Thr Asn Gln Asp Leu Ala Gly Asp
50          55          60
Glu Asn Met Ala Ala Arg Arg Leu Gly Gly Asn Arg Met Thr Gly Tyr
65          70          75          80
Asn Trp Glu Asn Asn Met Ser Asn Ala Gly Ser Asp Trp Gln Gln Ser
85          90          95
Ser Asp Asn Tyr Leu Cys Ser Asn Gly Gly Leu Thr Gln Ala Glu Cys
100         105         110
Glu Lys Pro Gly Ala Val Thr Thr Ser Phe His Asp Gln Ser Leu Lys
115         120         125
Leu Gly Thr Tyr Ser Leu Val Thr Leu Pro Met Ala Gly Tyr Val Ala
130         135         140
Lys Asp Gly Asn Gly Ser Val Gln Glu Ser Glu Lys Ala Pro Ser Ala
145         150         155         160
Arg Trp Asn Gln Val Val Asn Ala Lys Asn Ala Pro Phe Gln Leu Gln
165         170         175
Pro Asp Leu Asn Asp Asn Arg Val Tyr Val Asp Glu Phe Val His Phe
180         185         190
Leu Val Asn Lys Tyr Gly Thr Ala Ser Thr Lys Ala Gly Val Lys Gly
195         200         205
Tyr Ala Leu Asp Asn Glu Pro Ala Leu Trp Ser His Thr His Pro Arg
210         215         220
Ile His Gly Glu Lys Val Gly Ala Lys Glu Leu Val Asp Arg Ser Val
225         230         235         240
Ser Leu Ser Lys Ala Val Lys Ala Ile Asp Ala Gly Ala Glu Val Phe
245         250         255
Gly Pro Val Leu Tyr Gly Phe Gly Ala Tyr Lys Asp Leu Gln Thr Ala
260         265         270
Pro Asp Trp Asp Ser Val Lys Gly Asn Tyr Ser Trp Phe Val Asp Tyr
275         280         285
Tyr Leu Asp Gln Met Arg Leu Ser Ser Gln Val Glu Gly Lys Arg Leu
290         295         300
Leu Asp Val Phe Asp Val His Trp Tyr Pro Glu Ala Met Gly Gly Gly
305         310         315         320
Ile Arg Ile Thr Asn Glu Val Gly Asn Asp Glu Thr Lys Lys Ala Arg

```

[0003]

325	330	335
Met Gln Ala Pro Arg Thr Leu Trp Asp Pro Thr Tyr Lys Glu Asp Ser 340 345 350		
Trp Ile Ala Gln Trp Asn Ser Glu Phe Leu Pro Ile Leu Pro Arg Leu 355 360 365		
Lys Gln Ser Val Asp Lys Tyr Tyr Pro Gly Thr Lys Leu Ala Met Thr 370 375 380		
Glu Tyr Ser Tyr Gly Gly Glu Asn Asp Ile Ser Gly Gly Ile Ala Met 385 390 395 400		
Thr Asp Val Leu Gly Ile Leu Gly Lys Asn Asp Val Tyr Met Ala Asn 405 410 415		
Tyr Trp Lys Leu Lys Asp Gly Val Asn Asn Tyr Val Ser Ala Ala Tyr 420 425 430		
Lys Leu Tyr Arg Asn Tyr Asp Gly Lys Asn Ser Thr Phe Gly Asp Thr 435 440 445		
Ser Val Ser Ala Gln Thr Ser Asp Ile Val Asn Ser Ser Val His Ala 450 455 460		
Ser Val Thr Asn Ala Ser Asp Lys Glu Leu His Leu Val Val Met Asn 465 470 475 480		
Lys Ser Met Asp Ser Ala Phe Asp Ala Gln Phe Asp Leu Ser Gly Ala 485 490 495		
Lys Thr Tyr Ile Ser Gly Lys Val Trp Gly Phe Asp Lys Asn Ser Ser 500 505 510		
Gln Ile Lys Glu Ala Ala Pro Ile Thr Gln Ile Ser Gly Asn Arg Phe 515 520 525		
Thr Tyr Thr Val Pro Pro Leu Thr Ala Tyr His Ile Val Leu Thr Thr 530 535 540		
Gly Asn Asp Thr Ser Pro Val 545 550		
<210> 3		
<211> 524		
<212> PRT		
<213> 多粘类芽孢杆菌(Paenibacillus polymyxa)		
<400> 3		
Val Val His Gly Gln Thr Ala Lys Thr Ile Thr Ile Lys Val Asp Thr 1 5 10 15		
Phe Lys Asp Arg Lys Pro Ile Ser Pro Tyr Ile Tyr Gly Thr Asn Gln 20 25 30		
Asp Leu Ala Gly Asp Glu Asn Met Ala Ala Arg Arg Leu Gly Gly Asn 35 40 45		
Arg Met Thr Gly Tyr Asn Trp Glu Asn Asn Met Ser Asn Ala Gly Ser 50 55 60		
Asp Trp Gln Gln Ser Ser Asp Asn Tyr Leu Cys Ser Asn Gly Gly Leu 65 70 75 80		
Thr Gln Ala Glu Cys Glu Lys Pro Gly Ala Val Thr Thr Ser Phe His 85 90 95		
Asp Gln Ser Leu Lys Leu Gly Thr Tyr Ser Leu Val Thr Leu Pro Met 100 105 110		

[0004]

Ala Gly Tyr Val Ala Lys Asp Gly Asn Gly Ser Val Gln Glu Ser Glu	115	120	125
Lys Ala Pro Ser Ala Arg Trp Asn Gln Val Val Asn Ala Lys Asn Ala	130	135	140
Pro Phe Gln Leu Gln Pro Asp Leu Asn Asp Asn Arg Val Tyr Val Asp	145	150	155
Glu Phe Val His Phe Leu Val Asn Lys Tyr Gly Thr Ala Ser Thr Lys	165	170	175
Ala Gly Val Lys Gly Tyr Ala Leu Asp Asn Glu Pro Ala Leu Trp Ser	180	185	190
His Thr His Pro Arg Ile His Gly Glu Lys Val Gly Ala Lys Glu Leu	195	200	205
Val Asp Arg Ser Val Ser Leu Ser Lys Ala Val Lys Ala Ile Asp Ala	210	215	220
Gly Ala Glu Val Phe Gly Pro Val Leu Tyr Gly Phe Gly Ala Tyr Lys	225	230	235
Asp Leu Gln Thr Ala Pro Asp Trp Asp Ser Val Lys Gly Asn Tyr Ser	245	250	255
Trp Phe Val Asp Tyr Tyr Leu Asp Gln Met Arg Leu Ser Ser Gln Val	260	265	270
Glu Gly Lys Arg Leu Leu Asp Val Phe Asp Val His Trp Tyr Pro Glu	275	280	285
Ala Met Gly Gly Gly Ile Arg Ile Thr Asn Glu Val Gly Asn Asp Glu	290	295	300
Thr Lys Lys Ala Arg Met Gln Ala Pro Arg Thr Leu Trp Asp Pro Thr	305	310	315
Tyr Lys Glu Asp Ser Trp Ile Ala Gln Trp Asn Ser Glu Phe Leu Pro	325	330	335
Ile Leu Pro Arg Leu Lys Gln Ser Val Asp Lys Tyr Tyr Pro Gly Thr	340	345	350
Lys Leu Ala Met Thr Glu Tyr Ser Tyr Gly Gly Glu Asn Asp Ile Ser	355	360	365
Gly Gly Ile Ala Met Thr Asp Val Leu Gly Ile Leu Gly Lys Asn Asp	370	375	380
Val Tyr Met Ala Asn Tyr Trp Lys Leu Lys Asp Gly Val Asn Asn Tyr	385	390	395
Val Ser Ala Ala Tyr Lys Leu Tyr Arg Asn Tyr Asp Gly Lys Asn Ser	405	410	415
Thr Phe Gly Asp Thr Ser Val Ser Ala Gln Thr Ser Asp Ile Val Asn	420	425	430
Ser Ser Val His Ala Ser Val Thr Asn Ala Ser Asp Lys Glu Leu His	435	440	445
Leu Val Val Met Asn Lys Ser Met Asp Ser Ala Phe Asp Ala Gln Phe	450	455	460
Asp Leu Ser Gly Ala Lys Thr Tyr Ile Ser Gly Lys Val Trp Gly Phe	465	470	475
Asp Lys Asn Ser Ser Gln Ile Lys Glu Ala Ala Pro Ile Thr Gln Ile	485	490	495
Ser Gly Asn Arg Phe Thr Tyr Thr Val Pro Pro Leu Thr Ala Tyr His			

[0005]

	500	505	510
Ile Val Leu Thr Thr Gly Asn Asp Thr Ser Pro Val			
	515	520	
<210> 4			
<211> 1590			
<212> DNA			
<213> 多粘类芽孢杆菌(Paenibacillus polymyxa)			
<400> 4			
gtagttcacg gtcacacggc aaagactglt accattaaag tcgatacatc caaggatcgt			60
aagcctatta gcccttatai ttacggtaag aatcaggagt tggcaggcga tgagaatctg			120
actgccagac gacttggtag caatcgatg accggatata actgggaaaa caataigtcc			180
aatgcaggaa ggcactggat gcagtcacgc gatagctatt tatgcgacaa cgcggallg			240
acaaaagccg aatglgaaaa gccaggtagc gtggcaacct cgtttcacga tcaatcgctg			300
aagcagggca catattcttt agtcacactg ccgatggcgc gttatgtggc caaggatgga			360
aacggaagtg tgcaggaaa gaaaaaggt ccttcgcgc ggtggaatga ggtcgtaaac			420
gctaaaaatg cgcggtttca attgcagcct gatctgaaag acaatcaggt ttatgcggat			480
gaattcgica actttttagt gaaaaaglac ggcgttgctt caacaaaaac gggcgtgaaa			540
ggatactcgc tcgacaaiga acccgctcic tggtcgcata cgcacccgcg caticatggt			600
gaaaaggteg gagcgaaaga gttagtagac cggtcggtaa gtttatccaa agccgciaag			660
gcggttagac cgggtgcgga aattttggg cccgttcitt acggttttgg cgcctataaa			720
gatcttcaaa ctgcacctga ttggaaactt glaaaaggca actacagctg gttcglggac			780
tattacctcg atcaaatgcg cctcagctcg caagccgaag gcaagagatt gctggatgtc			840
ttcgaatgac actggtatcc tgaagcgatg ggcggaggca tacgaattac aaatgaggta			900
ggcaacgacg aaacgaagaa agccagaatg caagcgccct gtactttgtg ggalccgacc			960
tacaaggaag atagctggat cgtcaatgg aacagtgaat tcttgccttt actgcctcga			1020
tlaaagcagl cgggtgataa gtattaccgc ggaaccaagc tggcittgac tgagtatagc			1080
tatggtggcg aaaatgatat ttccggcggt atcgetatgg ccgatgtgct gggcaltctg			1140
ggcaaaaacg acgtttatat ggcaaaciac lggaaagtaa aggatgggtc caacaactac			1200
gttagtgccg cttaacaagc ttaccgcaat tatgacggaa aaagctctac ttccggtgat			1260
atcagcgttc atgcgcaaac gtcggatatt gttaatagct cggtgcatgc ttccgtaacg			1320
gatgcacact acaaagaact gcacctcgtt gtcataata aaagcatgga cagtgcattc			1380
gacgcaccaat ttgatcttcc cggcgagacg acttacgggt cgggtaaaat atggggtttc			1440
gacaaaaata gctcgcaaat taaggaagca gcgccaatca cscaaatttc aggcaacogy			1500
ttacctata cagtaccgcc tttagcggtt tatcacatcg tgttgactgc cggcaatgat			1560
acacctgtag aaaatcctga aagctttgcg			1590
<210> 5			
<211> 530			
<212> PRT			
<213> 多粘类芽孢杆菌(Paenibacillus polymyxa)			
<400> 5			

[0006]

Val	Val	His	Gly	Gln	Thr	Ala	Lys	Thr	Val	Thr	Ile	Lys	Val	Asp	Thr	1	5	10	15
Ser	Lys	Asp	Arg	Lys	Pro	Ile	Ser	Pro	Tyr	Ile	Tyr	Gly	Thr	Asn	Gln	20	25	30	
Glu	Leu	Ala	Gly	Asp	Glu	Asn	Leu	Thr	Ala	Arg	Arg	Leu	Gly	Gly	Asn	35	40	45	
Arg	Met	Thr	Gly	Tyr	Asn	Trp	Glu	Asn	Asn	Met	Ser	Asn	Ala	Gly	Ser	50	55	60	
Asp	Trp	Met	Gln	Ser	Ser	Asp	Ser	Tyr	Leu	Cys	Asp	Asn	Ala	Gly	Leu	65	70	75	80
Thr	Lys	Ala	Glu	Cys	Glu	Lys	Pro	Gly	Ala	Val	Ala	Thr	Ser	Phe	His	85	90	95	
Asp	Gln	Ser	Leu	Lys	Gln	Gly	Thr	Tyr	Ser	Leu	Val	Thr	Leu	Pro	Met	100	105	110	
Ala	Gly	Tyr	Val	Ala	Lys	Asp	Gly	Asn	Gly	Ser	Val	Gln	Glu	Ser	Glu	115	120	125	
Lys	Ala	Pro	Ser	Ala	Arg	Trp	Asn	Glu	Val	Val	Asn	Ala	Lys	Asn	Ala	130	135	140	
Pro	Phe	Gln	Leu	Gln	Pro	Asp	Leu	Lys	Asp	Asn	Gln	Val	Tyr	Ala	Asp	145	150	155	160
Glu	Phe	Val	Asn	Phe	Leu	Val	Lys	Lys	Tyr	Gly	Val	Ala	Ser	Thr	Lys	165	170	175	
Thr	Gly	Val	Lys	Gly	Tyr	Ser	Leu	Asp	Asn	Glu	Pro	Ala	Leu	Trp	Ser	180	185	190	
His	Thr	His	Pro	Arg	Ile	His	Gly	Glu	Lys	Val	Gly	Ala	Lys	Glu	Leu	195	200	205	
Val	Asp	Arg	Ser	Val	Ser	Leu	Ser	Lys	Ala	Ala	Lys	Ala	Val	Asp	Ala	210	215	220	
Gly	Ala	Glu	Ile	Phe	Gly	Pro	Val	Leu	Tyr	Gly	Phe	Gly	Ala	Tyr	Lys	225	230	235	240
Asp	Leu	Gln	Thr	Ala	Pro	Asp	Trp	Asn	Ser	Val	Lys	Gly	Asn	Tyr	Ser	245	250	255	
Trp	Phe	Val	Asp	Tyr	Tyr	Leu	Asp	Gln	Met	Arg	Leu	Ser	Ser	Gln	Ala	260	265	270	
Glu	Gly	Lys	Arg	Leu	Leu	Asp	Val	Phe	Asp	Val	His	Trp	Tyr	Pro	Glu	275	280	285	
Ala	Met	Gly	Gly	Gly	Ile	Arg	Ile	Thr	Asn	Glu	Val	Gly	Asn	Asp	Glu	290	295	300	
Thr	Lys	Lys	Ala	Arg	Met	Gln	Ala	Pro	Arg	Thr	Leu	Trp	Asp	Pro	Thr	305	310	315	320
Tyr	Lys	Glu	Asp	Ser	Trp	Ile	Ala	Gln	Trp	Asn	Ser	Glu	Phe	Leu	Pro	325	330	335	
Leu	Leu	Pro	Arg	Leu	Lys	Gln	Ser	Val	Asp	Lys	Tyr	Tyr	Pro	Gly	Thr	340	345	350	
Lys	Leu	Ala	Leu	Thr	Glu	Tyr	Ser	Tyr	Gly	Gly	Glu	Asn	Asp	Ile	Ser	355	360	365	
Gly	Gly	Ile	Ala	Met	Ala	Asp	Val	Leu	Gly	Ile	Leu	Gly	Lys	Asn	Asp	370	375	380	

[0007]

Val Tyr Met Ala Asn Tyr Trp Lys Leu Lys Asp Gly Ala Asn Asn Tyr
 385 390 395 400
 Val Ser Ala Ala Tyr Lys Leu Tyr Arg Asn Tyr Asp Gly Lys Ser Ser
 405 410 415
 Thr Phe Gly Asp Ile Ser Val His Ala Gln Thr Ser Asp Ile Val Asn
 420 425 430
 Ser Ser Val His Ala Ser Val Thr Asp Ala Ser Tyr Lys Glu Leu His
 435 440 445
 Leu Val Val Met Asn Lys Ser Met Asp Ser Ala Phe Asp Ala Gln Phe
 450 455 460
 Asp Leu Ser Gly Glu Thr Thr Tyr Gly Ser Gly Lys Val Trp Gly Phe
 465 470 475 480
 Asp Lys Asn Ser Ser Gln Ile Lys Glu Ala Ala Pro Ile Thr Gln Ile
 485 490 495
 Ser Gly Asn Arg Phe Thr Tyr Thr Val Pro Pro Leu Thr Ala Tyr His
 500 505 510
 Ile Val Leu Thr Ala Gly Asn Asp Thr Pro Val Glu Asn Pro Glu Ser
 515 520 525
 Phe Ala
 530

<210> 6
 <211> 1575
 <212> DNA
 <213> 多粘类芽孢杆菌(Paenibacillus polymyxa)

<400> 6
 gtggttcacg gtcaaacggc aaagaccgtt accattaaag tcgatacatc caaggatcgt 60
 aagcctatta gtccttatat atacggtacg aatcaggatt tggcaggcga tgaaaatctg 120
 gctgccagac gacttgggtg caatcgaatg accggataca actgggaaaa taatatgicc 180
 aatgcgggaa gcgattggca gcaatccagc gataactttt tatgcaacaa tggtagcctg 240
 acaaaagccg aatgtgaaaa gccgggagca gtagcgaatt cgtttcatga tcaatcgtg 300
 aagctgggag cttattcttt agtcacgtg ccgatggcgg gttatgtggc caaggaatga 360
 aacggaagtg tgcaggaaag cgaacaggtt ccttcgcgtc gttggaatca ggtcgtaaat 420
 gccaaaaatg cgcggttcca actacagcct gatctgaatg acaatcaggt atatgcggat 480
 gaattcgtca attttttagt gaaaaagtac ggcgctgctt caacaaagc gggtgtgaaa 540
 ggatatgcgc tcgacaaatg accgcgtctc tggtagcata cgcattccgc cattcatggt 600
 gaaaaggtcg gagcgaaaga gttggttagc cggtaggtta gtttatccaa agctgttaaa 660
 gcggttagc cgggtgcaga aatttttggg cgggttcttt acggttttgg cgcctataca 720
 gatcttcaaa ctgcacctga ttggaactct gtaaaaggca actaragctg gttcgtggac 780
 tattacctgg atcaaatgcg cctcaactcg caagccgarg gcaagagatt gctggaygta 840
 ttgatgtgc actggtatcc cgaagcgatg ggcggaggca tacgaattac aaatgaggta 900
 ggcaatgacg aaacgaagaa agccagaatg caggcgcctc gtacttttgig ggaccgcgac 960
 tacaaggaag atagctggat cgtcaatgg aacagcgcat tcttgccttt actgcctcga 1020
 ttgaagcagt cggtaggaca giattaccgg ggaaccaagc tggctttgac cgagtaatgc 1080

[0008]

```

tacggcgcgcg aaaatgatat ttccggcggt attgctatga ccgatgtgct gggcatcttg 1140
ggcaaaaacg acgtttatat ggcgaactat iggaagttaa aggatgggtc caacaactac 1200
gttagcgceg cttaacaagt ttaccgcaat tatgacgaa aaaacgtac ttccggcgat 1260
atcagcgta atgcgcaaac gtcggatatt gtaatatgt cggtgcatgc ttccgtaacg 1320
gatgcatect acaaagaact gcacctcatt gtcataata aaagcatgga cagcgcatc 1380
gacgccaat tcgatcttc cgcgagacg acttacagtt ccggtaaaat atggggcttc 1440
gataaaaata gtcgcaaat taaggcagta gcgccaatca cgcaatttc aggcaaccgc 1500
ttacctata cagtaccacc ttgacggt tatcacatcg tgtigactgc cgacaatgat 1560
acacctgtgc cataa 1575

```

<210> 7
 <211> 524
 <212> PRT
 <213> 多粘类芽孢杆菌(Paenibacillus polymyxa)

<400> 7

```

Val Val His Gly Gln Thr Ala Lys Thr Val Thr Ile Lys Val Asp Thr
1          5          10          15
Ser Lys Asp Arg Lys Pro Ile Ser Pro Tyr Ile Tyr Gly Thr Asn Gln
20          25          30
Asp Leu Ala Gly Asp Glu Asn Leu Ala Ala Arg Arg Leu Gly Gly Asn
35          40          45
Arg Met Thr Gly Tyr Asn Trp Glu Asn Asn Met Ser Asn Ala Gly Ser
50          55          60
Asp Trp Gln Gln Ser Ser Asp Asn Phe Leu Cys Asn Asn Gly Gly Leu
65          70          75          80
Thr Lys Ala Glu Cys Glu Lys Pro Gly Ala Val Thr Thr Ser Phe His
85          90          95
Asp Gln Ser Leu Lys Leu Gly Ala Tyr Ser Leu Val Thr Leu Pro Met
100         105         110
Ala Gly Tyr Val Ala Lys Asp Gly Asn Gly Ser Val Gln Glu Ser Glu
115         120         125
Gln Ala Pro Ser Ala Arg Trp Asn Gln Val Val Asn Ala Lys Asn Ala
130         135         140
Pro Phe Gln Leu Gln Pro Asp Leu Asn Asp Asn Gln Val Tyr Ala Asp
145         150         155         160
Glu Phe Val Asn Phe Leu Val Lys Lys Tyr Gly Ala Ala Ser Thr Lys
165         170         175
Ala Gly Val Lys Gly Tyr Ala Leu Asp Asn Glu Pro Ala Leu Trp Ser
180         185         190
His Thr His Pro Arg Ile His Gly Glu Lys Val Gly Ala Lys Glu Leu
195         200         205
Val Asp Arg Ser Val Ser Leu Ser Lys Ala Val Lys Ala Val Asp Ala
210         215         220
Gly Ala Glu Ile Phe Gly Pro Val Leu Tyr Gly Phe Gly Ala Tyr Thr
225         230         235         240
Asp Leu Gln Thr Ala Pro Asp Trp Asn Ser Val Lys Gly Asn Tyr Ser
245         250         255

```

[0009]

Trp Phe Val Asp Tyr Tyr Leu Asp Gln Met Arg Leu Asn Ser Gln Ala	260	265	270
Glu Gly Lys Arg Leu Leu Asp Val Phe Asp Val His Trp Tyr Pro Glu	275	280	285
Ala Met Gly Gly Gly Ile Arg Ile Thr Asn Glu Val Gly Asn Asp Glu	290	295	300
Thr Lys Lys Ala Arg Met Gln Ala Pro Arg Thr Leu Trp Asp Pro Thr	305	310	315
Tyr Lys Glu Asp Ser Trp Ile Ala Gln Trp Asn Ser Ala Phe Leu Pro	325	330	335
Leu Leu Pro Arg Leu Lys Gln Ser Val Asp Lys Tyr Tyr Pro Gly Thr	340	345	350
Lys Leu Ala Leu Thr Glu Tyr Ser Tyr Gly Gly Glu Asn Asp Ile Ser	355	360	365
Gly Gly Ile Ala Met Thr Asp Val Leu Gly Ile Leu Gly Lys Asn Asp	370	375	380
Val Tyr Met Ala Asn Tyr Trp Lys Leu Lys Asp Gly Ala Asn Asn Tyr	385	390	395
Val Ser Ala Ala Tyr Lys Leu Tyr Arg Asn Tyr Asp Gly Lys Asn Ala	405	410	415
Thr Phe Gly Asp Ile Ser Val Asn Ala Gln Thr Ser Asp Ile Val Asn	420	425	430
Ser Ser Val His Ala Ser Val Thr Asp Ala Ser Tyr Lys Glu Leu His	435	440	445
Leu Ile Val Met Asn Lys Ser Met Asp Ser Ala Phe Asp Ala Gln Phe	450	455	460
Asp Leu Ser Gly Glu Thr Thr Tyr Ser Ser Gly Lys Ile Trp Gly Phe	465	470	475
Asp Lys Asn Ser Ser Gln Ile Lys Ala Val Ala Pro Ile Thr Gln Ile	485	490	495
Ser Gly Asn Arg Phe Thr Tyr Thr Val Pro Pro Leu Thr Ala Tyr His	500	505	510
Ile Val Leu Thr Ala Asp Asn Asp Thr Pro Val Pro	515	520	

[illegible][illegible][illegible]

图 1

[illegible]

图 1 续