

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02107150.0

[51] Int. Cl.

C12N 9/04 (2006.01)

A21D 8/04 (2006.01)

A21D 2/08 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 6 月 3 日

[11] 授权公告号 CN 100494363C

[22] 申请日 1998.12.22 [21] 申请号 02107150.0
分案原申请号 98812540.4

[30] 优先权

[32] 1997.12.22 [33] DK [31] 9701505

[32] 1998.6.4 [33] DK [31] 9800763

[73] 专利权人 诺维信公司

地址 丹麦鲍斯韦

[72] 发明人 帕利·施耐德 索伦·克里斯坦森
朗·戴布达尔

克劳斯·C·富格尔桑 徐 丰

伊丽莎白·戈莱特利

[56] 参考文献

WO9639851A1 1996.12.19

WO9722257A1 1997.6.26

审查员 王慧梅

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
代理人 封新琴 巫肖南

权利要求书 2 页 说明书 60 页 附图 3 页

[54] 发明名称

糖氧化酶及其在焙烤中的用途

[57] 摘要

通过加入糖氧化酶可以改善面团或面包的性能，其中比起相应的单糖而言所述糖氧化酶可以更加有效地氧化寡糖的还原端，例如优先于葡萄糖而氧化麦芽糖糊精或纤维糊精。从 *Microdochium* 的菌株、特别是从 *M. nivale* 中可以得到一种具有比氧化葡萄糖更有效地氧化麦芽糖糊精和纤维糊精能力的新的糖氧化酶。这种新的糖氧化酶的氨基酸序列与已知的氨基酸序列之间具有非常低的同源性 (< 20% 的同一性)。

1. 一种用于制备面团和/或由面团制得的焙烤制品的方法，该方法包括向所述面团中加入糖氧化酶，其中所述糖氧化酶是 a)或 b)

a) 由 SEQ ID NO: 2 中所示氨基酸序列所表示的多肽，或

b) SEQ ID NO: 2 经过 1-5 个氨基酸的添加、缺失或取代得到的多肽，其保留糖氧化酶活性。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述糖氧化酶在 SEQ ID NO: 2 中所示氨基酸序列具有 1-5 个氨基酸的添加、缺失或取代，其保留糖氧化酶活性。

3. 权利要求 1 或 2 的方法，其中所述的糖氧化酶可得自 *Microdochium* 或支顶孢属的菌株。

4. 权利要求 3 的方法，其中所述的糖氧化酶可得自白小羊蹄菌 (*Microdochium nivale*)的菌株。

5. 权利要求 4 的方法，其中所述白小羊蹄菌的菌株是白小羊蹄菌 NRRL B-30034。

6. 一种包括糖氧化酶的面粉、面团或焙烤制品，其中所述糖氧化酶是 a)或 b)

a) 由 SEQ ID NO: 2 中所示氨基酸序列所表示的多肽，或

b) SEQ ID NO: 2 经过 1-5 个氨基酸的添加、缺失或取代得到的多肽，其保留糖氧化酶活性。

7. 一种面团和/或面包的改善添加剂，所述添加剂包括：

1) 一种糖氧化酶，其中所述糖氧化酶是 a)或 b)

a) 由 SEQ ID NO: 2 中所示氨基酸序列所表示的多肽，或

b) SEQ ID NO: 2 经过 1-5 个氨基酸的添加、缺失或取代得到的多肽，其保留糖氧化酶活性；和

2) 第二种酶，所述第二种酶选自淀粉酶、纤维素酶、半纤维素酶、脂肪酶和磷脂酶。

8. 权利要求 7 的添加剂，其中所述第二种酶为淀粉酶，该酶水解淀粉导致形成寡糖作为主要产物。

9. 权利要求 8 的添加剂，其中所述淀粉酶为嗜热脂肪芽孢杆菌的产麦芽糖型 α -淀粉酶、米曲霉的 α -淀粉酶或 β -淀粉酶。

10. 一种呈颗粒或聚结粉末形式的面团和/或面包改善添加剂，所述添加剂包含一种糖氧化酶的活性，其中所述糖氧化酶是 a)或 b)

a) 由 SEQ ID NO: 2 中所示氨基酸序列所表示的多肽，或

b) SEQ ID NO: 2 经过 1-5 个氨基酸的添加、缺失或取代得到的多肽，其保留糖氧化酶活性。

11. 权利要求 10 的添加剂，其中超过 95 % 重量的添加剂具有介于 25 与 500 μm 之间的粒度。

糖氧化酶及其在焙烤中的用途

本申请是国际申请日为 1998 年 12 月 22 日的中国申请 98812540.4 的分案申请。

发明背景

本发明涉及糖氧化酶在焙烤中的用途并且涉及一种新的糖氧化酶。

相关现有技术的描述

在制作面包的过程中，已知向面包面团中加入改善面包的和/或改善面团的添加剂，其中所述添加剂的作用特别导致面包的结构、体积、风味和新鲜度的改善以及面团机械加工性能和稳定性的改善。

用于强化谷蛋白和改善面团流变学和加工性能的面团“调节剂”在工业中是众所周知的并且已被长期使用。如碘酸盐、过氧化物、抗坏血酸、溴酸钾和偶氮二酰胺这样的非特异性氧化剂具有谷蛋白强化作用。已经有人提出这些调节剂诱导了强化谷蛋白并从而强化面团的蛋白质之间键的形成。

同样已知使用葡萄糖氧化酶来强化谷蛋白并改善面团的流变学和加工性能。因此，US 2,783,150 公开了葡萄糖氧化酶在面粉中的用途，以改善面团的强度以及焙烤的面包的结构和外观。EP 321 811 和 EP 338 452 公开了与其它酶(硫氢基氧化酶、半纤维素酶、纤维素酶)结合的葡萄糖氧化酶在焙烤中的用途。但是，由于在制备焙烤制品中所用的谷物面粉中通常葡萄糖的含量低，因此葡萄糖氧化酶作为面团和/或面包改善添加剂的效力是有限的。

因此，已经对鉴定出作用于除葡萄糖以外的底物的氧化还原酶产生了兴趣。WO 96/39851 公开了己糖氧化酶的用途，该氧化酶能够将 D-葡萄糖以及包括麦芽糖、乳糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖和纤维二糖在内的几种其它还原糖氧化成其各自的内酯，随后水解成各自的醛糖二糖酸。WO 97/22257 公开了吡喃糖氧化酶在焙烤中的用途。该酶催化几种单糖在 C2 位置上的氧化，其间伴随着过氧化氢的释放。尽管呈其吡喃糖形式的葡萄糖

倾向于优选的底物，但是该酶能够氧化其它的底物，例如如木糖这样的呋喃糖。

尽管催化葡萄糖和其它糖直接氧化成相应醛糖酸的酶似乎广泛分布在自然界中，但大多数已知的糖氧化酶对单糖具有特异性。Lin 等人(1991, 《Biochim. Biophys. Acta》1118: 41-47)已经描述了从分离自土壤的 *Acremonium strictum* 菌株 T1 的麦麸培养物中分离和纯化的寡糖氧化酶。该酶具有氧化在还原端上带有葡萄糖残基的寡糖的能力。该酶显示出针对麦芽糖、乳糖、纤维二糖以及由多达 7 个葡萄糖单位组成的麦芽寡糖的反应性。JP-A 5-84074 公开了该酶作为分析试剂的用途。

发明概述

本发明人已经发现面团或面包的性能可以通过加入糖氧化酶来加以改善，其中比起相应的单糖而言所述糖氧化酶可以更有效地氧化寡糖的还原端，例如优先于葡萄糖而氧化麦芽糖糊精或纤维糊精。这可以导致面团的坚硬度、粘性、稳定性和强度的改善。针对混合时间、发酵时间和水含量的增加，它也可以增加面团的耐受性。

本发明人还发现了一种具有比氧化葡萄糖更有效地氧化麦芽糖糊精和纤维糊精能力的新的糖氧化酶。这种新的氧化酶可以从 *Microdochium*、特别是从 *M. nivale* 中得到。本发明人已经分离并保藏了这样的一个菌株 *M. nivale* CBS 100236。这种新的糖氧化酶的氨基酸序列与已知的氨基酸序列之间具有非常低的同源性(<20%的同一性)。

因此，本发明提供了一种用于制备面团和/或由面团制得的焙烤制品的方法，该方法包括向所述面团中加入一种糖氧化酶，所述糖氧化酶对作为底物的聚合度为 2 或者更高的寡糖要比对相应的单糖具有更高的活性。本发明还提供了一种包括所述糖氧化酶的面包改善添加剂。该面包改善添加剂可以包括第二种酶(淀粉酶、纤维素酶、半纤维素酶、脂肪酶或磷脂酶)，并且它可以呈聚结的粉末或颗粒的形式。

本发明进一步提供了一种新的糖氧化酶。这种糖氧化酶可以由白小羊蹄菌(*Microdochium nivale*) CBS 100236 产生的或具有如 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列的多肽，或者该酶可以是其类似物。这种糖氧化酶也可以从 *Microdochium* 的菌株中衍生而来并且对麦芽四糖具有氧化活性，在底物浓度为 0.83 mM 的情况下该氧化活性至少是对葡萄糖的氧化活性的两倍。

本发明还提供了一种通过培养 *Microdochium* 来生产所说的糖氧化酶的方法。本发明进一步提供了一种包括编码本发明糖氧化酶的核酸序列的核酸构建体,以及在本发明糖氧化酶的重组生产中有利地使用的重组表达载体和重组宿主细胞。在另一方面,本发明提供了用于生产本发明糖氧化酶的重组方法,该方法包括在有助于生产所述糖氧化酶的条件下培养宿主细胞以及从细胞和/或培养基中回收所述的糖氧化酶。

附图的简要描述

图 1-3 分别图解说明了质粒 pBANe15、pEJG33 和 pEJG35。在实施例中描述了细节。

发明详述

糖氧化酶在焙烤中的用途

本发明提供了向面团中加入糖氧化酶,该糖氧化酶对作为底物的聚合度为 2 或者更高的寡糖要比对相应的单糖具有更高的活性。可以以如下所述的面团和/或面包改善添加剂的形式加入所述的糖氧化酶。

该糖氧化酶通常是以这样的数量加入的,即对于在面团和/或焙烤制品的至少一个目标性能方面提供可测量的效果而言,该加入量是有效的。在面团中,通常在面团中以对应于 0.01-5% 的量、具体地讲以 0.1-3% 的量包含有面包改善和/或面团改善添加剂。通常以每千克面粉对应着 0.01-100 毫克酶蛋白的量加入所述的酶,其中优选 0.1-25 毫克/千克、更优选 0.1-10 毫克/千克、并且最优选 0.5-5 毫克/千克。

面团中寡糖的水平可以通过加入淀粉酶来提高,其中该淀粉酶水解淀粉以形成作为主要产物的寡糖,例如嗜热脂肪芽孢杆菌生麦芽糖 α -淀粉酶(可以以 Novamyl^(R)购得)、米曲霉 α -淀粉酶(可以以 Fungamyl^(R)购得)或 β -淀粉酶。

寡糖氧化酶的使用可以导致焙烤制品体积的增加和面包屑结构与柔软性的改善,以及面团强度与稳定性的增加和粘性的下降,从而导致机械加工性能的改善。这一作用可能是下面所讨论的谷蛋白强化作用的结果或者是除此以外的结果。当使用劣质面粉时,这种对面团的作用可能特别有利。就将在工业中加工的面团来说,这种改善的机械加工性能特别重要。

面团的稳定性是焙烤面团的最重要的特性之一,并且对大规模和小规模应用来说都是重要的。稳定的或硬的面团能够更大程度地耐受混合时

间、醒发时间以及在面团运输过程中的机械振动，而软的或不太稳定的面团则不太能耐受这些处理。既然具有高的谷蛋白含量和良好的谷蛋白质量的面粉有助于形成硬的面团，含有低的蛋白含量或具有劣质的谷蛋白质量的面粉导致形成软的面团。因此，具有优良的流变学和加工性能的硬面团是由含有坚固的谷蛋白网络的面粉所产生的。

可以将寡糖氧化酶加入到面团物质的任何混合物中或面团中或者加入到面团中所含的任何物质中；即在合适的并且避免所述酶暴露于强烈的化学品或条件之中(在这种情况下，该酶可能会变得失活)的情况下，寡糖氧化酶可以在制备面团的任何步骤中加入或者可以分一步、两步或多个步骤加入。

底物的特异性

在底物浓度为 10 mM 或更低的情况下，所述的糖氧化酶优选对聚合度为 2-6 的寡糖(尤其是麦芽糖、麦芽三糖或麦芽四糖)要比对葡萄糖具有更高的活性。这一比较可以在 1 mM 或者更低的底物浓度下进行，并且对麦芽四糖的活性优选是对葡萄糖的活性的两倍以上。糖氧化酶可能对麦芽糖糊精、纤维糊精或麦芽四糖具有氧化活性，其中在 0.83 mM 的底物浓度下该活性至少是对葡萄糖氧化活性的两倍。

这样的底物浓度代表着根据普通焙烤实践制得的普通面团的浓度。因此，例如在由面团制得的提取物中，发现麦芽糖的浓度为 4.1 mM，这对应于如 Poulsen, C.等人(1996.《谷物化学》75: 51-57)所述的在 40℃下以 1: 10 的比例提取 1 小时所得的 41 毫摩尔/千克的面团。进一步提到的是如果面粉中存在着足够的内源淀粉分解活性(例如 β -淀粉酶)或者正如时常在实践中通常采用的那样，向面团或面粉中加入外源淀粉分解酶的话，那么可提取的麦芽糖的量可能会更高。WO 96/39851 类似地公开了麦芽糖在面团中是以 1.4% (w/w)的水平存在着的。因此，可以利用的底物(例如麦芽糖)的量可能根据面粉的种类和质量、配方、混合和发酵方法以及其它添加剂的存在而有所不同。

在 pH 6 和 50 mM 下，来自 *M. nivale* 的优选糖氧化酶具有下列优先顺序(降序)：纤维二糖 > 麦芽糖 > 葡萄糖 > 木糖 > 乳糖。在 Michaeli-Menten 动力学的基础上，针对优选底物的表观 K_m 值为：59 mM(纤维二糖)，11 mM(麦芽糖)，42 mM(葡萄糖)；对葡萄糖和麦芽糖而言， V_{max} 是相似的。因

此, 所述氧化酶显示出优先选择麦芽糖而不是葡萄糖, 特别是在低的底物浓度下(低于 10 mM)更是如此。

在底物浓度为 0.83 mM 的情况下, 来自 *M. nivale* 的优选糖氧化酶能够以比氧化相应的单糖更高的速率来氧化聚合度(DP)为 DP2 - DP5 的寡糖。因此, 该酶能够以比水解葡萄糖更高的速率水解麦芽糖糊精和纤维糊精两者, 其中单糖的单元分别是通过 α -1,4 或 β -1,4 糖苷键连接的。糖氧化酶能够同样好地并且以比水解单糖葡萄糖高出大约 10 倍的水平来水解所有的具有 DP2 - DP5 的纤维糊精。当以麦芽糖糊精作为底物时, 所述糖氧化酶的活性在比起针对单糖高出 $1\frac{1}{2}$ 倍(对麦芽六糖来说)到几乎高出 5 倍(对麦芽四糖来说)的范围内变化。

糖氧化酶的性质

所述的糖氧化酶在 pH 为 5 - 7 的范围内优选是有活性的并且是稳定的, 例如在该范围内具有大于 40 % 的活性, 并且最优选在该范围内具有最佳的活性。优选来自 *M. nivale* 的糖氧化酶在 pH 大约为 6 时具有最佳的活性, 并且在 pH 范围为 5 - 7 时显示出至少 80 % 的活性(相对于最大的活性)。在 40°C 下, 在 pH 范围为 4 - 9 时所述的酶是稳定的, 但当 pH 为 3 时该酶是不稳定的。

所述的糖氧化酶在 20 - 45°C 时优选是有活性的并且是稳定的, 例如在该范围内具有大于 50 % 的活性, 并且最优选在该范围内具有最佳的活性。来自 *M. nivale* 的优选糖氧化酶在大约 40°C 时具有最佳的活性, 并且在 30 - 60°C 的范围内显示出至少 70 % 的活性(相对于最大的活性)。在 pH 为 6 时, 该酶在 60°C 以下是稳定的, 但在 70°C 时该酶失活。它的变性温度为 73 °C。

所述糖氧化酶能够氧化在还原端带有葡萄糖残基的还原性寡糖。它氧化 1 - 位上的葡萄糖残基以形成相应的酸。因此, 它氧化麦芽糖以形成麦芽糖酸并氧化乳糖以形成乳糖酸。

可以分离出所述糖氧化酶的活性, 例如基本上不含其它非糖氧化酶的多肽, 比如正如由 SDS-PAGE 测定的以蛋白质为基础的纯度大于大约 80 %、并且更优选纯度大于大约 90 %。

来自 *M. nivale* 的优选糖氧化酶具有由 SDS-PAGE 测定的约为 52 kDa 的分子量以及约为 8.9 的等电点。它表现为一种脱氢酶, 它具有携带电子受

体(诸如铁氰化钾、亚甲蓝、苯醌和 2,6-二氯苯酚-靛酚(DCPIP))的附带的(side)活性。

糖氧化酶的来源

所述的寡糖氧化酶可以从微生物的来源获得, 诸如从真菌中获得, 例如丝状真菌或酵母, 具体地讲为 Ascomycota 的真菌, 例如真子囊菌纲, 尤其是核菌类。

所述糖氧化酶可以来源于例如产有丝分裂孢子的核菌类, 诸如支顶孢属, 具体地讲为 *A. strictum*, 比如 ATCC 34717 或 T1; *A. fusidioides*, 比如 IFO 6813; 或 *A. potronii*, 比如 IFO 31197。在一个优选的实施方案中, 寡糖氧化酶是从由 Lin 等人(1991, 《Biochim. Biophys. Acta》1118: 41-47)以及在 JP-A 5-84074 中公开的来源得到的。

所述糖氧化酶还可以从 Xylariales 的微生物中得到; 尤其是产有丝分裂孢子的 Xylariales, 诸如 *Microdochium* 属, 特别是 *M. nivale* 的种。公众在培养物保藏所中可以容易地获得这些菌株, 诸如美国模式培养物保藏所(ATCC)、德意志微生物保藏中心(DSM)和真菌菌种保藏中心(CBS)。

在 *Microdochium* Syd(Samuels 与 Hallett, 1983, 《TBMS》81: 473)中描述了 *Microdochium* 属。在与 *Gerlachia*、*G. nivalis*、*G. oryzae*、雪腐病镰孢或 *Rhynchosporium oryzae* 同义的情况下已经描述了 *Microdochium* 的一些菌株。通过专著(*Hyponea*)fide(Muller, 1977, 《Rev. mycol.》41: 129)进一步描述了这些菌株。

优选的菌株为 *M. nivale*, NN008551。该菌株是从在印度选取的天然来源分离出来的, 并且将该菌株于 1997 年 12 月 4 日按照国际承认用于专利程序目的的微生物保藏布达佩斯条约以登记入册号 CBS 100236 保藏在真菌菌种保藏中心。

本发明人已经分离出编码来自 *M. nivale* CBS 100236 的糖氧化酶的基因并且已将其插入大肠杆菌中。在 1998 年 6 月 12 日按照国际承认用于专利程序目的的微生物保藏布达佩斯条约, 将包含所述基因的大肠杆菌菌株保藏在位于 IL 州 Peoria 市 1815 大学北街的农业研究服务保藏所(NRRL)并且命名为 NRRL B-30034。

附加的酶

可以将所述的糖氧化酶作为唯一的酶加入面团中, 或者该酶可以与一

种或多种附加的酶结合起来使用。附加的酶可以是淀粉酶(如上所述)、环糊精葡聚糖转移酶、肽酶(具体地讲为外肽酶、转谷氨酰胺酶)、脂肪酶、磷脂酶、纤维素酶、半纤维素酶(具体地讲为戊聚糖酶,诸如木聚糖酶)、蛋白酶、蛋白质二硫化物异构酶(例如 WO 95/00636 中公开的蛋白质二硫化物异构酶)、糖基转移酶以及氧化还原酶(例如过氧化物酶、漆酶、葡糖氧化酶、吡喃糖氧化酶、脂肪氧合酶、L-氨基酸氧化酶或附加的糖氧化酶)等等。

附加的酶可以是包括哺乳动物和植物在内的任何来源的,优选是微生物(细菌、酵母或真菌)来源的并且可以通过本领域通常采用的技术得到。

所述的淀粉酶可以来源于细菌或真菌,具体地讲可以来源于曲霉属的菌株(优选黑色曲霉或米曲霉的菌株)或来源于芽孢杆菌属的菌株。一些实例为 α -淀粉酶(例如来自解淀粉芽孢杆菌)和淀粉葡糖苷酶(例如来自黑色曲霉)。商业产品包括 BAN 和 AMG(丹麦 Novo Nordisk A/S 公司的产品)、Grindamyl A 1000 或 A 5000(可以从丹麦 Grindsted Products 公司得到)以及淀粉酶 H 和淀粉酶 P(荷兰 Gist-Brocades 公司的产品)。

所述的蛋白酶可以是 Neutrase(可以从丹麦 Novo Nordisk A/S 公司得到)。

所述的脂肪酶可以来源于 Thermomyces(腐质霉属)、Rhizomucor、假丝酵母属、曲霉属、根霉属或假单胞菌属的菌株,具体地讲可以来自 T. lanuginosus(H. lanuginosa, EP 305,216)、Rhizomucor miehei(EP 238,023)、南极假丝酵母(例如 WO 88/02775 中所述的脂肪酶 A 或脂肪酶 B)、黑色曲霉、德列马根霉、无根根霉或葱头假单胞菌(EP 214,761 与 WO 89/01032)。

面团

面团通常是包括小麦粉或小麦面粉和/或其它类型的粗粉、面粉或淀粉(诸如玉米粉、玉米淀粉、黑麦粗粉、黑麦粉、燕麦粉、燕麦粗粉、大豆粉、高粱粗粉、高粱粉、米淀粉、米粉、马铃薯粗粉、马铃薯粉或马铃薯淀粉)的面粉面团。

所述面团可以是新鲜的、冷冻的或是预先焙烤的(par-baked)。

所述面团通常是发酵的面团或者是将要进行发酵处理的面团。可以以多种方式使面团发酵,比如通过加入化学膨松剂(例如碳酸氢钠)或者通过加入发酵剂(发酵的面团),但是优选通过加入合适的酵母培养物来使面团发酵,所述的培养物诸如啤酒糖酵母(面包酵母)的培养物,而所述啤酒糖酵母

例如为市售的啤酒糖酵母的菌株。

所述面团也可以包括其它常规的面团成分,例如:蛋白质,比如牛奶或奶粉、谷蛋白和大豆;鸡蛋(或是完整的鸡蛋、蛋黄或是蛋清);起酥油,诸如颗粒状的脂肪或油;氧化剂,诸如抗坏血酸、溴酸钾、碘酸钾、偶氮二酰胺(ADA)或过硫酸铵;还原剂,诸如L-半胱氨酸;糖;盐,诸如氯化钠、醋酸钙、硫酸钠或硫酸钙。所述面团还可以包括乳化剂,诸如甘油单酯或甘油二酯、甘油单酯或甘油二酯的二乙酰酒石酸酯、脂肪酸的糖酯、脂肪酸的聚甘油酯、甘油单酯的乳酸酯、甘油单酯的醋酸酯、聚氧乙烯硬脂酸盐、磷脂、卵磷脂与溶血卵磷脂。

所述面团可以是面食制品的面团,其中该面团优选是由硬粒小麦粉或者具有相当质量的面粉制得的。当在制备面食制品和面条的过程中使用时,所述的糖氧化酶可以使得谷蛋白的结构得以增强,并从而使面团的粘性减小、面团的强度增加以及面团产品的结构得以改善。

焙烤制品

本发明的方法可以用于由面团制备的任意种类的焙烤制品,所述制品或具有柔软的特性或具有松脆的特性,它或是白色的、浅色的或是深色的类型。实例为面包(具体地讲为白色的全麦面包或黑麦面包),一般说来该面包呈枕形面包或小白面包的形状,还有法式 baguette 型面包、pita 面包、未经发酵的玉米饼、蛋糕、薄烤饼、饼干、曲奇饼、脆皮松饼、大馅饼皮、瑞典黑麦面包干、馒头、比萨饼等。

预混物

本发明进一步涉及面团和/或由面团制得的焙烤制品的预混物,例如呈面粉组合物形式的预混物,其中预混物包括所述糖氧化酶和如上具体描述的可选择的其它酶。可以通过将有关的酶与诸如面粉、淀粉、糖或盐之类的合适载体混合在一起来制备预混物。预混物可以含有其它的面团改善和/或面包改善添加剂,例如包括以上提及的酶在内的任何添加剂。

面团和/或面包改善添加剂

可以以颗粒或聚结的粉末的形式来提供作为面团和/或面包改善添加剂的所述糖氧化酶。面团和/或面包改善添加剂优选具有很窄的粒度分布,其中超过 95%(重量)的颗粒在 25 至 500 μm 的范围内。

颗粒和聚结的粉末可以通过常规的方法制备,例如通过在流化床制粒

机中将淀粉酶喷洒到载体上来制备。所述载体可以由具有合适粒度的微粒核心组成。载体可以是可溶的或是不溶的,该载体例如有盐(比如氯化钠或硫酸钠)、糖(比如蔗糖或乳糖)、糖醇(比如山梨醇)、淀粉、大米、玉米糝或大豆。

氨基酸序列

所述糖氧化酶可以是一种多肽,该多肽是由 *Microdochium nivale* CBS 100236 产生的,它具有如 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列,或者它是由存在于大肠杆菌 NRRL B-30034 中的基因编码的;或者它可以是其类似物。类似物可以具有至少 50% 的同一性,可以具有免疫交叉反应性,可以是等位基因变体或具有氧化酶活性的片段。糖氧化酶还可以是由在严格性差的条件下与 SEQ ID NO: 1 的核酸序列杂交的核酸序列编码的多肽、其互补链或其至少有 100 个核苷酸的亚序列。

SEQ ID NO: 2 中所示的氨基酸序列与已知的序列之间具有小于 20% 的同一性。它与来自加利福尼亚罂粟的网硬蛋白氧化酶前体的氨基酸序列(GenPept 登记入册号为 2897944)有 13.6% 是相同的,与来自氧化节杆菌的 6-羟基-D-烟碱氧化酶的氨基酸序列(GenPept 登记入册号为 122805)有 17.8% 是相同的。

采用用于获得肽以及测定肽序列的标准方法,例如由 IRL 出版社于 1989 年出版的 Findlay 与 Geisow 编辑的《蛋白质测序-实用方法》所述的方法,可以测定多肽的氨基酸序列。与现有技术氨基酸序列的比较已经表明 SEQ ID NO: 2 与任何现有技术的氨基酸序列之间仅仅具有极少的同源性(<20%)。

所述多肽可以是具有相差不超过 3 个氨基酸的氨基酸序列的变体,其中优选相差不超过 2 个氨基酸、且更优选相差不超过 1 个氨基酸。

所述糖氧化酶可以包括至少一个部分序列,该部分序列为 SEQ ID NO: 2 的第 1-24 位所示的 N-末端氨基酸序列或者为 SEQ ID NO: 2 的第 229-266、249-271、303-322、336-347、383-404、405-414 以及 420-440 位所示的内部序列。另一方面,糖氧化酶可以与所说部分序列的至少一个序列之间至少有 50% 是相同的,其中优选至少有 60%、更优选至少有 70%、甚至更优选至少有 80%、甚至更优选至少有 90% 并且最优选至少有 97% 是相同的,这些序列都定性地保留着所述糖氧化酶的活性(在下文中称作

“同源糖氧化酶”)及其等位基因形式和片段的活性,其中的片段保留着糖氧化酶的活性。

在一个优选的实施方案中,同源糖氧化酶包括一种氨基酸序列,该序列与所说部分氨基酸序列的至少一个序列之间相差5个氨基酸、优选相差4个氨基酸、更优选相差3个氨基酸、甚至更优选相差2个氨基酸、且最优选相差1个氨基酸。糖氧化酶可以包括其等位基因形式或片段,其中该片段保留着糖氧化酶的活性。

同源糖氧化酶的氨基酸序列可以通过插入或缺失一个或多个氨基酸残基和/或以不同的氨基酸残基取代一个或多个氨基酸残基来区别于任意的部分氨基酸序列。氨基酸的改变优选在本质上是不重要的,即并不显著地影响糖氧化酶的三级结构和/或活性的保守性氨基酸的取代。不重要的氨基酸的改变也可以包括小的缺失,一般说来为1至大约30个氨基酸的缺失;小的氨基-或羧基-末端的延伸,诸如氨基-末端甲硫氨酸残基的延伸;在大约20-25个残基以内的小接头肽;或者通过改变净电荷或另一种功能来促进纯化的小的延伸反应,诸如聚组氨酸序列、抗原表位或结合域的延伸。

保守性取代的例子有在碱性氨基酸(如精氨酸、赖氨酸和组氨酸)、酸性氨基酸(如谷氨酸和天冬氨酸)、极性氨基酸(如谷氨酰胺和天冬酰胺)、疏水性氨基酸(如亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸)、芳族氨基酸(如苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸)以及小分子氨基酸(如甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸和苏氨酸)小组内的取代。一般不改变特异性活性的氨基酸的取代在本领域中是公知的并且例如由纽约州的学术出版社于1979年出版的H. Neurath和R.L. Hill编著的《蛋白质》一书中有所描述。最常发生的置换为: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, Asp/Gly并且也可以反过来置换。

核酸序列

本发明提供了一种包括编码所述糖氧化酶的核酸序列的核酸序列。编码糖氧化酶的核酸序列可以包括:

- a) 克隆到存在于大肠杆菌 NRRL B-30034 中的质粒中的编码糖氧化酶的 DNA 序列的一部分, 或
- b) 在 SEQ ID NO: 1 的第 67-1550 位中所示的 DNA 序列, 或
- c) a)或 b)中所限定的 DNA 序列的类似物, 该类似物

- i) 与所说的 DNA 序列之间具有至少 50 % 的同一性, 或
- ii) 在严格性差的条件下与所说的 DNA 序列杂交的序列、其互补链或其亚序列。

同一性的程度可以至少为 60 %、优选大约 70 %、优选大约 80 %、更优选大约 90 %、甚至更优选大约 95 %、且最优选大约为 97 %。

等位基因变体指的是占据了同一染色体基因座的两种或多种可替换形式基因的任意一种。等位基因变异是通过突变自然发生的, 并且可以在群体中造成多态性。基因的突变可以是沉默的(在编码的多肽中没有变化)或者可以编码具有改变了的氨基酸序列的多肽。多肽的等位基因变体是由基因的等位基因变体所编码的多肽。

杂交是指按照标准的 Southern 印迹方法, 在严格性差、中等或严格性强的条件下类似的核酸序列与所述的寡核苷酸探针进行杂交(例如在 42℃ 下在 5X SSPE、0.3 % SDS、200 mg/ml 剪切(sheared)并变性的鲑精 DNA 以及针对严格性强、中等和严格性差而言分别为 50 %、35 % 或 25 % 的甲酰胺中进行预杂交和杂交)。在一个优选的实施方案中, 该核酸序列能够在严格性强的条件下与糖氧化酶的编码区杂交, 所述编码区位于编码包含于 CBS 100236 之中的本发明糖氧化酶的核酸序列、其互补链或其亚序列上。

编码糖氧化酶的 DNA 序列可以从产生所述糖氧化酶的任何细胞或微生物中分离出来, 其中采用本领域众所周知的各种方法以便将来自其天然位置的核酸序列重新确定到不同的位置上, 而在该新的位置上将会复制所述的核酸序列。

根据本领域众所周知的方法, 可以将包含于 CBS 100236 之中的核酸序列或其亚序列的糖氧化酶编码区用于设计寡核苷酸探针, 以便从不同属或种的其它菌株中分离出编码糖氧化酶的同源基因。因此, 为了鉴定和分离出其中相应的基因, 可以按照标准的 Southern 印迹方法针对与所述探针杂交的 DNA 来筛选由所述其它微生物制得的基因组或 cDNA 文库。该探针可以比整个序列短许多, 但长度应当至少为 15 个核苷酸、优选至少为 25 个核苷酸、且更优选至少为 40 个核苷酸。也可以使用更长的探针, 优选其长度不超过 1200 个核苷酸。既可以使用 DNA 探针, 又可以使用 RNA 探针。通常将探针进行标记以用于检测相应的基因(例如用 ^{32}P 、 ^3H 、生物素或抗生物素蛋白标记)。根据本发明, 可以在 SEQ ID NO: 1 的基础上构建优选的

探针。

通过琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳或其它本领域公知的分离技术，可以分离出来自所述其它微生物的基因组或其它 DNA。可以将来自文库或分离的 DNA 的 DNA 转移并固定在硝酸纤维素或其它合适的载体物质上。为了鉴定出与编码包含于 CBS 100236 之中的本发明糖氧化酶的核酸序列同源的克隆或 DNA，在 Southern 印迹中使用载体物质，其中最后优选在不高于 40℃ 下每次都使用 2X SSC、0.2% SDS 洗涤载体物质，洗涤 3 次 30 分钟，所述温度更优选不高于 45℃、更优选不高于 50℃、更优选不高于 55℃、甚至更优选不高于 60℃、尤其是不高于 65℃。采用 X-光片检测在这些条件下与寡核苷酸探针杂交的分子。

能够与寡核苷酸探针杂交的本发明分离的核酸序列可以从任何属的微生物中、例如从细菌或真菌来源中得到，其中所述寡核苷酸探针与编码包含于 CBS 100236 之中的本发明的糖氧化酶的核酸序列、其互补链或其亚序列杂交。

所述糖氧化酶可以从给定的微生物来源中获得(或是内部生成的)。因此，糖氧化酶可以由来源生物体或由细胞生产，其中在该细胞中已经插入了来自所述来源的基因。

此外，使用上面提到的探针，可以从包括由自然界(例如土壤、堆肥、水等)分离出的微生物在内的其它来源鉴定并得到同源基因。用于从自然栖息地中分离微生物的技术是本领域众所周知的。然后，通过类似地筛选另一种微生物的基因组或 cDNA 文库，可以得到核酸序列。

一旦用上述探针已经检测出核酸序列，于是通过采用那些本领域普通技术人员众所周知的技术(例如参见 Sambrook 等人, 1989, 出处同上)，可以分离或克隆所述的序列。用于分离或克隆核酸序列的公知技术包括从基因组 DNA 中分离、从 cDNA 中制备、或它们的结合。例如通过采用使用特异性引物的众所周知的聚合酶链式反应(PCR)，例如在 US 4,683,202 或 R.K. Saiki 等人(1988, 《科学》239: 487-491)中所述的方法，可以实现由所述基因组 DNA 克隆出本发明的核酸序列。另外可以参见例如 Innis 等人, 1990, 《PCR 方案：方法与应用指南》，学术出版社，纽约。从产生糖氧化酶的生物体或者另一种或有关的生物体中可以克隆出核酸序列，因此该核酸序列例如可以是核酸序列的糖氧化酶编码区的等位基因变体或物种变体。

另一方面，通过确定的标准方法，例如通过由 S.L. Beaucage 和 M.H. Caruthers(1981,《四面体通讯》22: 1859-1869)所述的 phosphoramidite 方法或者通过由 Matthes 等人(1984,《EMBO 杂志》3: 801-805)所述的方法，可以合成制备出编码所述酶的 DNA 序列。在前面提到的 phosphoramidite 方法中，例如在 DNA 自动合成仪中合成出寡核苷酸，将寡核苷酸纯化、退火、连接并且克隆到合适的载体中。

对于与所述糖氧化酶基本类似的糖氧化酶的合成而言，编码所述糖氧化酶的核酸序列的修饰可能是必须的。术语与所述糖氧化酶“基本类似”是指所述糖氧化酶的非天然存在的形式。这种糖氧化酶与从其天然来源分离出的糖氧化酶的区别可能在于一些人工改造的方式。例如，可能使人感兴趣的是合成出所述糖氧化酶的变体，其中所述变体在如使用位点诱变的特异活性、热稳定性、氧化稳定性、最佳 pH 或类似方面有所不同。在编码包含于 CBS 100236 之中的本发明糖氧化酶的核酸序列或其亚序列的糖氧化酶编码区的基础上，和/或通过引入核苷酸的取代，其中该取代并不产生由所述核酸序列编码的糖氧化酶的另一氨基酸序列但却对应着打算生产所述酶的宿主生物体的密码子使用，或者通过引入可能产生不同氨基酸序列的核苷酸的取代，便可以构建类似的序列。对于核苷酸取代的一般性描述，例如参见 Ford 等人, 1991,《蛋白质的表达与纯化》2: 95-107。

这种取代可以在对所述分子的功能至关重要的区域之外进行并且仍然生成了具有活性的糖氧化酶。根据本领域公知的方法，比如定点诱变或丙氨酸扫描诱变(例如参见 Cunningham 与 Wells, 1989,《科学》244: 1081-1085)，可以鉴定出对由分离出的核酸序列编码的糖氧化酶的活性而言是必须的并因而优选不进行取代的氨基酸残基。在另一技术中，在所述分子中每个带正电的残基上引入突变，并且检测所得突变分子的蛋白酶活性以鉴定出对所述分子的活性至关重要的氨基酸残基。通过分析晶体结构也可以测定底物-酶相互作用的位点，其中晶体结构是通过诸如核磁共振分析、结晶学或光亲和标记(例如参见 de Vos 等人, 1992,《科学》255: 306-312; Smith 等人, 1992,《分子生物学杂志》224: 899-904; Wlodaver 等人, 1992,《FEBS 通讯》309: 59-64)之类的技术测定的。

所述的糖氧化酶可以是一种融合多肽，其中将另一种多肽融合到所述多肽或其片段的 N-末端或 C-末端。融合多肽是通过将编码另一种多肽的

核酸序列(或其部分)融合到本发明核酸序列(或其部分)中来产生的。用于生产融合多肽的技术是本领域公知的,并且包括将编码所述多肽的编码序列连接起来,从而使得它们位于框架中,并且融合多肽的表达处于同一启动子和终止子的控制之下。

还有另一种用于鉴定糖氧化酶编码克隆的方法涉及将基因组 DNA 的片段插入表达载体(比如质粒)中,用所得的基因组 DNA 文库转化糖氧化酶阴性细菌,然后将转化的细菌涂布到含有糖氧化酶底物的琼脂上,从而使得鉴定出表达糖氧化酶的克隆。

最后,所述的 DNA 序列可以是基因组与合成来源混合的,可以是合成与 cDNA 来源混合的或是基因组与 cDNA 来源混合的,所述序列是根据标准的技术在适宜的情况下通过将合成的、基因组的或 cDNA 来源的片段连接在一起制得的,其中所述片段对应于整个 DNA 序列的各个区域。

氨基酸或核酸序列的同一性

本说明书与权利要求书中所指的多肽的同一性被确定为表明由第二个序列衍生出的第一个序列的该两个序列之间相同的程度。根据在 Needleman, S.B.与 Wunsch, C.D. (1970)《分子生物学杂志》48: 443-45 中所述的方法并按照用于多肽序列比较的如下设置: 缺口(gap)产生罚分(penalty)为 3.0 且缺口延伸罚分为 0.1, 便可以适当地测定出同一性。通过公知的计算机程序,比如 GCG 程序包中提供的 GAP(威斯康星软件包程序手册,第 8 版,1994 年 8 月,遗传学计算机小组,575 科学道,麦迪逊市,威斯康星州,美国 53711)可以进行测定。

另一方面,通过 Clustal 方法(Higgins, 1989,《CABIOS》5: 151-153)使用 LASERGENE™ MEGALIGN™ 软件(DNASTAR 公司,麦迪逊市,威斯康星州)可以测定同一性的程度,其中所述软件带有同一性的平台(table)并按照如下的多个对比(alignment)参数: 缺口罚分为 10、缺口长度罚分为 0。成对的对比参数为 Ktuple = 1、缺口罚分 = 3、窗口 = 5、且对角线 = 5。

类似多肽的成熟区与上述糖氧化酶序列之间的同一性程度表现为优选至少 60%、更优选至少 70%、更优选至少 80%、更优选至少 90%、尤其是至少为 95%。

对本发明来说,通过带有同一性平台、缺口罚分为 10 以及缺口长度罚分为 10 的 Clustal 方法(Higgins, 1989,《CABIOS》5: 151-153)来测定两个核

酸序列之间同一性的程度。

免疫化学特性

所述糖氧化酶与天然的 *M. nivale* 菌株或其表达糖氧化酶活性的有性型 (teleomorph) 的糖氧化酶之间具有免疫化学同一性或部分的免疫化学同一性。在这一实施方案中, 将所说的糖氧化酶用于生产具有免疫反应性或结合到所述多肽表位上的抗体。

与天然 *M. nivale* 的多肽之间具有免疫化学同一性的多肽是指含有抗天然 *M. nivale* 多肽的抗体的抗血清是否以相同的方式与其它多肽发生反应, 比如采用具体的免疫化学技术来观察沉淀是否完全融合、沉淀的形态是否相同和/或电泳迁移率是否相同。对免疫化学同一性的进一步解释由 Axelsen、Bock 与 Kroll 在 Blackwell 科学出版社于 1973 年出版的 N.H. Axelsen、J. Kroll 与 B. Weeks 编辑的《定量免疫电泳手册》第 10 章中进行了描述。

部分的免疫化学同一性是指含有抗天然 *M. nivale* 多肽的抗体的抗血清以部分相同的方式与其它的多肽反应, 比如采用具体的免疫化学技术来观察沉淀是否部分融合、沉淀的形态是否部分相同和/或电泳迁移率是否部分相同。对部分免疫化学同一性的进一步解释由 Bock 与 Axelsen 在 Blackwell 科学出版社于 1973 年出版的 N.H. Axelsen、J. Kroll 与 B. Weeks 编辑的《定量免疫电泳手册》第 11 章中进行了描述。

免疫化学特性可以通过免疫交叉反应同一性试验来测定, 比如众所周知的 Ouchterlony 免疫双扩散方法。具体地讲, 根据下列文献所述的方法通过免疫接种兔子(或啮齿类动物)便产生了抗所述多肽的抗血清: Harboe 与 Ingild 在 Blackwell 科学出版社于 1973 年出版的 N.H. Axelsen、J. Kroll 与 B. Weeks 编辑的《定量免疫电泳手册》第 23 章中, 或者 Johnstone 与 Thorpe 在 Blackwell 科学出版社于 1982 年出版的《实用免疫化学》中(更具体地讲在第 27-31 页中)。

优选地, 所述抗体为单克隆抗体。例如根据在纽约冷泉港的冷泉港出版社于 1988 年出版的 E. Harlow 与 D. Lane 编辑的《抗体-实验指南》中所述的方法, 可以制备出单克隆抗体。例如通过硫酸铵沉淀、接下来通过透析和离子交换层析(例如 DEAE-Sephadex), 可以从抗血清中获得纯化的免疫球蛋白。

糖氧化酶的生产

采用本领域公知的方法,通过在含有合适的碳源和氮源以及无机盐的营养培养基上发酵以上提到的微生物菌株,便可以生产出所述的糖氧化酶(例如 Bennett, J.W.与 La Sure, L.编辑《真菌附加基因操作》学术出版社, CA, 1991)。合适的培养基可以通过商业途径从供应商处得到或者可以根据出版的组成来制备(例如在美国模式培养物保藏所的目录中)。在 20℃至 30℃范围内的温度适合于糖氧化酶的生长和生产。

发酵可以是培养细胞以便使所说的糖氧化酶表达或分离的任何方法。因此,可以将发酵理解为包括在合适的培养基中并且在使得糖氧化酶表达或分离的条件下进行的摇瓶培养、在实验室或工业发酵罐中进行的小规模或大规模的发酵(包括连续、分批、补料分批或固态发酵)。

由上述方法生产得到的糖氧化酶可以通过常规的方法从发酵培养基中进行回收,其中包括、但却不限于:离心、过滤、喷雾干燥、蒸发或沉淀。然后将回收的蛋白质通过各种层析工艺进一步纯化,例如离子交换层析、凝胶过滤层析、亲和层析等。

所述的糖氧化酶可以通过下列方法生产,该方法包括(a)培养表达糖氧化酶的野生型生物体,以便生产出包括糖氧化酶的上清液;以及(b)回收糖氧化酶。

另一方面,所述糖氧化酶也可以通过需氧培养转化的宿主生物体来生产,其中所述生物体含有来自以上提到的菌株的合适的遗传信息。这种转化体可以通过如下所述的本领域公知的方法进行制备和培养。

核酸构建体

本发明还涉及核酸构建体,它包括可操作地连接到一个或多个控制序列上的本发明的核酸序列,其中所述控制序列能够在与所述控制序列相适应的条件下在合适的宿主细胞中指导编码序列的表达。

核酸构建体可以是单链的或是双链的核酸分子,它是从天然存在的基因中分离出来的或是已经进行了修饰以便含有核酸的区段,所述核酸区段以在自然界中不以其它方式存在的一种方式结合与并置的。当核酸构建体含有为表达本发明编码序列所需的所有的控制序列时,所述的核酸构建体可以是表达盒。编码序列可以是这样的一种序列,其中当处于合适的控制序列的控制之下时,该序列被转录成 mRNA 并且被翻译成本发明的糖

氧化酶。通常通过位于 5' - 端的翻译起始密码子 ATG 和位于 3' - 端的翻译终止密码子来确定编码序列的边界。编码序列可以包括、但却不限于 DNA、cDNA 和重组的核酸序列。

可以以多种方式操作本发明分离的核酸序列，以便提供糖氧化酶的表达。取决于表达载体，在核酸序列插入载体之前该序列的操作可能是人们希望的或是必须的。利用克隆方法用于修饰核酸序列的技术是本领域众所周知的。

控制序列可以包括对表达核酸序列的编码序列而言是必须的或是有利的所有的元件。每个控制序列对于编码糖氧化酶的核酸序列来说可以是天然的或是外源的。所述的控制序列包括、但却不限于前导序列、启动序列、信号序列以及转录终止子。控制序列至少包括启动子以及转录和翻译终止信号。为了引入有助于将控制序列与编码糖氧化酶的核酸序列的编码区连接在一起的特异性限制位点，可以使控制序列具备多个接头。

控制序列可以为合适的启动序列，即一种由用于表达所述核酸序列的宿主细胞识别的核酸序列。启动序列含有介导糖氧化酶表达的转录控制序列。所述启动子可以是在所选的宿主细胞中表现出转录活性的任何的核酸序列，并且可以从编码胞外的或胞内的糖氧化酶的基因中得到，其中所述基因对宿主细胞而言或是同源的或是异源的。

用于指导本发明核酸构建体转录的合适的启动子的例子(尤其是在细菌宿主中)为由下列来源得到的启动子：大肠杆菌的乳糖操纵子、天蓝色链霉菌的琼脂糖酶基因(dagA)、枯草芽孢杆菌的蔗糖 6-果糖基转移酶基因(sacB)、地衣芽孢杆菌的 α -淀粉酶基因(amyL)、嗜热脂肪芽孢杆菌的生麦芽糖淀粉酶基因(amyM)、解淀粉芽孢杆菌的 α -淀粉酶基因(amyQ)、地衣芽孢杆菌的青霉素酶基因(penP)、枯草芽孢杆菌的 xylA 与 xylB 基因和原核生物的 β -内酰胺酶基因(Villa-Kamaroff 等人, 1978, 《美国国家科学院学报》75: 3727-3731)以及 tac 启动子(DeBoer 等人, 1983, 《美国国家科学院学报》80: 21-25)。其它的启动子在下列文献中进行了描述：《美国科学》中的“来自重组细菌的有用蛋白质”1980, 242: 74-94; 以及 Sambrook 等人, 1989, 出处同上。

对于在真菌宿主中的转录来说，有用的启动子的例子包括那些可以由编码下列酶的基因衍生出来的启动子：米曲霉的 TAKA 淀粉酶、Rhizomucor

miehei 的天冬氨酸蛋白酶、黑色曲霉的中性 α -淀粉酶、黑色曲霉的酸稳定性 α -淀粉酶、黑色曲霉的葡糖淀粉酶、Rhizomucor miehei 的脂肪酶、米曲霉的碱性蛋白酶、米曲霉的丙糖磷酸异构酶以及构巢曲霉的乙酰胺酶。

控制序列也可以为合适的转录终止序列，即一种由所选的宿主细胞识别的用于终止转录的序列。可以将终止序列可操作地连接到编码糖氧化酶的核酸序列的 3' 端。在本发明中可以使用任何在所选的宿主细胞中起作用的终止子。

控制序列也可以为合适的前导序列，即对宿主细胞的翻译来说很重要的 mRNA 的非翻译区。可以将前导序列可操作地连接到编码糖氧化酶的核酸序列的 5' 端。在本发明中可以使用任何在所选的宿主细胞中起作用的前导序列。

控制序列还可以为信号肽的编码区，该编码区编码与糖氧化酶的氨基末端相连的氨基酸序列，它可以指导所表达的糖氧化酶进入细胞的分泌途径。信号肽的编码区对糖氧化酶而言可以是天然的或者可以从外源来源中获得。核酸序列的编码序列的 5' 端本来就可以含有信号肽的编码区，其中在翻译读框中该编码区天然地与编码分泌性糖氧化酶的编码区的区段相连。另一方面，编码序列的 5' 端可以含有这样的信号肽编码区，该编码区对于编码分泌性糖氧化酶的编码序列的部分而言是外源的。在编码序列通常不含信号肽的编码区的情况下，可能需要外源的信号肽编码区。另一方面，相对于通常和编码序列相连的天然信号肽的编码区来说，为了获得糖氧化酶分泌的增强，外源信号肽的编码区可以简单地替换天然信号肽的编码区。在本发明中可以使用能够指导所表达的糖氧化酶进入所选宿主细胞分泌途径中的任何信号肽的编码区。

针对细菌宿主细胞、具体地讲为芽孢杆菌属的有效的信号肽编码区为由下列来源得到的信号肽的编码区：来自芽孢杆菌 NCIB 11837 的生麦芽糖淀粉酶基因、嗜热脂肪芽孢杆菌的 α -淀粉酶基因、地衣芽孢杆菌的枯草蛋白酶基因、地衣芽孢杆菌的 β -内酰胺酶基因、嗜热脂肪芽孢杆菌的中性蛋白酶基因(nprT, nprS, nprM)以及枯草芽孢杆菌的 prsA 基因。由 Simonen 与 Palva(1993,《微生物学回顾》57: 109-137)描述了其它的信号肽。

表达载体

本发明还涉及重组表达载体，它包括本发明的核酸序列、启动子、以

及转录和翻译的终止信号。可以将上述各种核酸序列与控制序列连接在一起以生产出重组表达载体，所述表达载体可以包括一个或多个方便的限制位点以便可以使得在所述位点插入或取代编码糖氧化酶的核酸序列。另一方面，通过将核酸序列或包括本发明核酸序列的核酸构建体插入到合适的表达载体中，便可以表达本发明的核酸序列。在创建表达载体的过程中，使编码序列位于载体中，以便将编码序列可操作地与合适的用于表达的并且有可能用于分泌的控制序列相连。

在真核生物中，所述表达载体还可以包括可操作地与编码糖氧化酶的DNA序列相连的聚腺苷酸化序列。终止序列和聚腺苷酸化序列可以适当地来源于与启动子相同的来源。

重组表达载体可以是能够方便地经历重组DNA的步骤并且能够进行所述核酸序列表达的任何载体。载体的选择通常取决于载体与该载体将被引入的宿主细胞之间的相容性。载体可以是线性的或闭环的质粒。载体可以为自主复制的载体，即该载体以染色体外的实体的形式存在并且其复制不依赖于染色体的复制，例如质粒、染色体外元件、微型染色体或人工染色体。载体可以含有任何用于确保自复制的元件。另一方面，所述载体可以是这样的一种载体，即当将其引入宿主细胞中时，该载体被整合到基因组中并且与已被整合到基因组中的所述染色体一起复制。载体系统可以是单一的载体或质粒或者是两个或多个载体或质粒，它们共同含有将被引入到宿主细胞的基因组中的总DNA或转座子。

本发明的载体优选含有一个或多个允许容易地选择转化细胞的选择标记。选择标记是一种基因，其产物提供了抗微生物剂的抗性、对重金属的抗性以及对营养缺陷体的原养型等。细菌选择标记的例子有来自枯草芽孢杆菌或地衣芽孢杆菌的 *dal* 基因，或者为赋予了抗生素抗性(比如氨苄青霉素、卡那霉素、红霉素、氯霉素或四环素的抗性)的标记。此外，通过例如在 WO 91/09129 中所述的共转化也可以实现选择，其中选择标记位于单独的载体上。

本发明的载体含有这样的元件，所述元件允许将载体稳定地整合到宿主细胞的基因组中或者允许在细胞中不依赖于细胞基因组的载体的自主复制。

当将本发明的载体引入宿主细胞时，可以将该载体整合到宿主细胞的

基因组中。对整合来说,载体可以依靠编码糖氧化酶的核酸序列或该载体的任何其它的元件,以便通过同源重组将载体稳定地整合到基因组中。另一方面,载体可以含有用于指导通过同源重组整合到宿主细胞基因组中的附加的核酸序列。附加的核酸序列可以使载体在染色体的精确位置上整合到宿主细胞的基因组中。为了提高在精确位置上整合的可能性,整合元件优选应当含有足够数量的核酸,比如 100 至 1,500 个碱基对、优选 400 至 1,500 个碱基对并且最优选 800 至 1,500 个碱基对,其中它们与相应的靶序列之间是高度同源的以便提高同源重组的可能性。整合元件可以是与宿主细胞基因组中的靶序列同源的任何序列。此外,整合元件可以是非编码的或编码的核酸序列。

对自主复制而言,载体可以进一步包括一个可以使该载体在目的宿主细胞中自主复制的复制起点。细菌复制起点的例子有允许在大肠杆菌中复制的质粒 pBR322、pUC19、pACYC177 和 pACYC184 的复制起点,以及允许在芽孢杆菌中复制的质粒 pUB110、pE194、pTA1060 和 pAM β 1 的复制起点。复制起点可以是一种具有突变以在芽孢杆菌细胞中发挥其对温度敏感功能的复制起点(例如参见 Ehrlich, 1978,《美国国家科学院学报》75: 1433)。

可以将超过一个拷贝的编码本发明糖氧化酶的核酸序列插入宿主细胞中,以扩增该核酸序列的表达。通过采用本领域众所周知的方法将至少一个添加拷贝的核酸序列整合到宿主细胞基因组中并选择转化体,便可以实现所述核酸序列的稳定扩增。在 WO 94/14968 中描述了用于实现基因组 DNA 序列扩增的方便方法。

适合于构建编码糖氧化酶并分别含有启动子、终止子和其它元件的载体的方法是本领域普通技术人员众所周知的(例如参见 Sambrook 等人,出处同上)。

此外,理想的是加入相对于宿主细胞的生长而言可以调节糖氧化酶表达的调节序列。调节系统的例子为那些随化学或物理刺激而导致基因的表达开始或停止的系统,其中包括存在着调节化合物。原核生物系统中的调节系统包括 lac, tac 和 trp 操纵系统。调节序列的其它例子为那些可以使得基因扩增的序列。在这些情况下,编码糖氧化酶的核酸序列将会被可操作地与调节序列相连。

虽然在一些情况下胞内的表达可能是有利的,例如当使用某些细菌作

宿主细胞时，但通常优选的是，所表达的糖氧化酶是胞外分泌的。

宿主细胞

本发明还涉及重组宿主细胞，所述宿主细胞或者包括如上所述的 DNA 构建体或者包括表达载体，它们可以有利地用于重组生产糖氧化酶的过程中。宿主细胞可以是亲代细胞的任何后代，由于复制过程中发生的突变，后代细胞与亲代细胞是不同的。

优选包括核酸序列的载体转化细胞，接下来将该载体整合到宿主染色体中。“转化”是指将包括本发明核酸序列的载体引入宿主细胞中，以便将该载体保持为染色体的整合体或作为自复制的染色体外的载体。通常认为整合是有利的，这是因为在细胞中更有可能稳定地保持所述的核酸序列。通过如上所述的同源或非同源重组发生载体向宿主染色体中的整合。

宿主细胞的选择在很大程度上取决于编码糖氧化酶的基因及其来源。宿主细胞可以是高等生物体、比如哺乳动物或昆虫的细胞，但优选微生物的细胞、例如细菌或真菌(包括酵母)的细胞。

合适的细菌细胞的例子有革兰氏阳性细菌，其中包括、但却不限于芽孢杆菌属的细胞，例如嗜碱芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、短芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、强固芽孢杆菌、灿烂芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌以及苏云金芽孢杆菌；或链霉菌属的细胞，例如变青链霉菌或鼠灰链霉菌；或者为革兰氏阴性细菌，比如大肠杆菌以及假单胞菌种。在一个优选的实施方案中，细菌宿主细胞为迟缓芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌或枯草芽孢杆菌的细胞。

细菌宿主细胞的转化例如可以通过下列方法来实现：原生质体转化(例如参见 Chang 与 Cohen, 1979, 《普通分子遗传学》168: 111-115)、使用感受态细胞(例如参见 Young 与 Spizizin, 1961, 《细菌学杂志》81: 823-829；或者 Dubnau 与 Davidoff-Abelson, 1971, 《分子生物学杂志》56: 209-221)；电穿孔(例如参见 Shigekawa 与 Dower, 1988, 《生物技术》6: 742-751)；或接合(例如参见 Koehler 与 Thorne, 1987, 《细菌学杂志》169: 5771-5278)。

宿主细胞也可以是真核生物，比如哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞或真菌细胞。有用的哺乳动物的细胞包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、海拉(HeLa)细胞、幼小仓鼠肾(BHK)细胞、COS 细胞、或可以得到的任何编号的

其它无限增殖化细胞系(例如可以从美国模式培养物保藏所得到)。

在一个优选的实施方案中, 宿主细胞为真菌细胞。正如本文中所用的那样, “真菌” 包括门(phyla): Ascomycota、Basidiomycota、Chytridiomycota 和 Zygomycota [如 Hawksworth 等人在《Ainsworth 与 Bisby 氏真菌字典》第 8 版(1995, CAB 国际, 大学出版社, 剑桥, 英国)中所定义的] 以及 Oomycota(如在 Hawksworth 等人, 1995, 出处同上, 第 171 页中引用的)和所有的产有丝分裂孢子的真菌(Hawksworth 等人, 1995, 出处同上)。代表性的 Ascomycota 的小组例如包括链孢霉属、Eupenicillium(= 青霉属)、Emericella(= 曲霉属)、Eurotium(= 曲霉属)以及以上所列举的真酵母。Basidiomycota 的例子包括蘑菇、锈菌和黑粉菌。代表性的 Chytridiomycota 的小组例如包括 Allomyces、小芽枝霉属、雕蚀菌属以及水生真菌。代表性的 Oomycota 的小组例如包括 Saprolegniomycetous 的水生真菌(水霉)、比如绵霉属。产有丝分裂孢子的真菌的例子包括曲霉属、青霉属、假丝酵母属以及链格孢属。代表性的 Zygomycota 的小组例如包括根霉属和毛霉属。

在一个优选的实施方案中, 真菌宿主细胞为酵母细胞。本文中所用的“酵母” 包括产子囊酵母(Endomycetales)、产担孢子酵母以及属于半知菌类(酵母菌)的酵母。产子囊酵母被划分为蚀精霉科和糖酵母科。后者由四个亚科组成, 即裂殖糖酵母亚科(例如裂殖糖酵母属)、拿逊氏酵母亚科、油脂酵母亚科以及糖酵母亚科(例如毕赤氏酵母属、克鲁维氏酵母属和糖酵母属)。产担孢子酵母包括 Leucosporidium 属、红冬孢属、锁掷酵母属、Filobasidium 属与线黑粉菌属。属于半知菌类的酵母被划分为掷孢酵母科(例如 Sorbolomyces 属和布氏弹孢酵母属)与隐球酵母科(例如假丝酵母属)这两科。酵母可以为比如在《酵母生物学与活性》(Skinner, F.A., Passmore, S.M. 与 Davenport, R.R.编辑的应用细菌学协会的专题论文集系列 9, 1980)中描述的那样。酵母生物学和酵母遗传学操作是本领域众所周知的(例如参见《酵母生物化学与遗传学》Bacil, M., Horecker, B.J.与 Stopani, A.O.M.编辑, 第 2 版, 1987; 《酵母》Rose, A.H.与 Harrison, J.S.编辑, 第 2 版, 1987; 以及《糖酵母的分子生物学》Strathern 等人编辑, 1981)。

在更为优选的实施方案中, 酵母宿主细胞为假丝酵母属、克鲁维氏酵母属、糖酵母属、裂殖糖酵母属、毕赤氏酵母属或 Yarrowia 属的种的细胞。

在最优选的实施方案中, 酵母宿主细胞为卡尔斯伯糖酵母、啤酒糖酵

母、糖化糖酵母、道格拉斯氏糖酵母、克鲁维氏糖酵母、*Saccharomyces norbensis* 或卵形糖酵母的细胞。在另一个最优选的实施方案中，酵母宿主细胞为乳克鲁维氏酵母的细胞。在另一个最优选的实施方案中，酵母宿主细胞为 *Yarrowia lipolytica* 的细胞。

在一个优选的实施方案中，真菌宿主细胞为丝状真菌细胞。“丝状真菌”包括 *Eumycota* 和 *Oomycota* 亚门(如 Hawksworth 等人, 1995, 出处同上所定义的)的所有的丝状体。丝状真菌的特征在于由壳多糖、纤维素、葡聚糖、脱乙酰壳多糖、甘露聚糖和其它复合多糖组成的营养菌丝壁。营养生长是通过菌丝的延伸，并且碳的分解代谢是专性需氧的。相比之下，比如啤酒糖酵母之类的酵母的营养生长是通过单细胞菌体的芽殖，并且碳的分解代谢可能是发酵型的。在一个更优选的实施方案中，丝状真菌宿主细胞为支顶孢属、曲霉属、镰孢属、腐质霉属、毛霉属、毁丝霉属、链孢霉属、青霉属、草根霉属、*Tolypocladium* 和木霉属的种的细胞、但并不限于这些属的种的细胞。

在最优选的实施方案中，丝状真菌宿主细胞为泡盛曲霉、臭曲霉、日本曲霉、构巢曲霉、黑色曲霉或米曲霉的细胞。在另一个最优选的实施方案中，丝状真菌宿主细胞为 *Fusarium cerealis*、*Fusarium crookwelense*、禾谷镰孢、尖孢镰孢、接骨木镰孢、硫色镰孢或 *Fusarium venenatum* 的细胞。在另一个最优选的实施方案中，丝状真菌宿主细胞为 *Humicola insolens* 或 *Humicola lanuginosa* 的细胞。在另一个最优选的实施方案中，丝状真菌宿主细胞为米赫毛霉的细胞。在另一个最优选的实施方案中，丝状真菌宿主细胞为嗜热毁丝霉的细胞。在另一个最优选的实施方案中，丝状真菌宿主细胞为粗糙链孢霉的细胞。在另一个最优选的实施方案中，丝状真菌宿主细胞为产紫青霉的细胞。在另一个最优选的实施方案中，丝状真菌宿主细胞为 *Thielavia terrestris* 的细胞。在另一个最优选的实施方案中，木霉属的细胞为 *Trichoderma harzianum*、康宁氏木霉、*Trichoderma longibrachiatum*、*Trichoderma reesei* 或绿色木霉的细胞。

以本身公知的方式通过涉及原生质体形成、原生质体转化以及细胞壁再生的方法可以转化真菌细胞。在 EP 238 023 以及 Yelton 等人的论文(1984, 《美国国家科学院学报》81: 1470-1474)中描述了用于转化曲霉属宿主细胞的合适的方法。由 Malardier 等人(1989, 《基因》78: 147-156)或者在共同未

决的系列号为 08/269,449 的美国专利申请中描述了转化镰孢属的种的合适方法。可以使用由下列文献所述的方法来转化酵母: Becker 与 Guarente 在 Abelson, J.N.与 Simon, M.I.编辑的《酶学方法》(纽约学术出版社公司)第 194 卷第 182 - 187 页中的“酵母遗传学与分子生物学指南”; Ito 等人, 1983,《细菌学杂志》153: 163; 与 Hinnen 等人, 1978,《美国国家科学院学报》75: 1920。通过采用 Graham 与 Van der Eb(1978,《病毒学》52: 546)的磷酸钙沉淀方法进行直接的摄取可以转化哺乳动物的细胞。

生产的重组方法

所述糖氧化酶可以通过重组的方法来生产, 该方法包括在有助于生产所说糖氧化酶的条件下培养如上所述的宿主细胞以及从细胞和/或培养基中回收该糖氧化酶。

在这些方法中, 采用本领域公知的方法在适合于糖氧化酶生产的营养培养基中培养细胞。例如, 在合适的培养基中并且在使得糖氧化酶表达和/或分离的条件下对细胞进行摇瓶培养、在实验室或工业发酵罐中进行小规模或大规模的发酵(包括连续、分批、补料分批或固态发酵)。采用本领域公知的方法, 在包括碳源和氮源以及无机盐的合适的营养培养基中进行培养(例如参见 M.V. Arbige 等人在 Abraham L. Sonenshein, James A. Hoch 与 Richard Losick 编辑的《枯草芽孢杆菌与其它革兰氏阳性细菌》美国微生物协会, 华盛顿特区, 1993, 第 871-895 页中)。合适的培养基可以通过商业途径从供应商处得到或者可以根据出版的组成来制备(例如在美国模式培养物保藏所的目录中)。如果糖氧化酶是分泌到营养培养基中的话, 那么可以直接从培养基中回收糖氧化酶。如果糖氧化酶是不分泌的, 那么从细胞裂解物中回收糖氧化酶。

采用本领域公知的方法可以检测对所述多肽具有特异性的糖氧化酶。这些检测方法可以包括特异性抗体的使用、酶产物的生成或酶底物的消失。例如, 可以将酶测定用于测定所述多肽的活性。

得到的糖氧化酶可以通过本领域公知的方法回收。例如, 糖氧化酶可以通过常规的方法从营养培养基中回收, 其中包括、但却不限于离心、过滤、提取、喷雾干燥、蒸发或沉淀。

本发明的糖氧化酶可以通过本领域公知的各种方法来纯化, 其中包括、但却不限于层析(例如离子交换层析、亲和层析、疏水层析、层析聚焦

和大小排阻层析)、电泳方法(例如制备等电聚焦(IEF))、溶解度之差(例如硫酸铵沉淀)或提取(例如参见《蛋白质的纯化》J.C. Janson 与 Lars Ryden 编辑, VCH 出版社, 纽约, 1989)。

工业应用

除了以上所讨论的在焙烤中的用途以外, 例如还可以将所述的糖氧化酶以起到抗菌剂作用的有效量用于个人护理产品中, 诸如牙膏(具体地讲在希望使牙齿变白的情况下的牙膏)、漱口剂、假牙清洁剂、液体皂、皮肤护理霜和护肤液、头发护理与身体护理制剂以及用于清洁隐形眼镜的溶液。所述糖氧化酶也可以为衣物洗涤剂组合物或餐具洗涤剂组合物的组分, 并且可以用于产生过氧化氢。衣物洗涤剂组合物可以包括表面活性剂、所说的糖氧化酶以及该糖氧化酶的底物。餐具洗涤剂组合物可以包括所说的糖氧化酶和漂白剂前体或过氧酸以及糖氧化酶的底物。

所述的糖氧化酶可以用作分析试剂, 例如用于测定给定样品中存在的还原糖的数量, 或者可以将该酶固定化并插入到电极中以便提供对淀粉或纤维素水解的连续测量。

此外, 可以将本发明的糖氧化酶用于把在还原端带有葡萄糖残基的寡糖氧化成相应的酸, 例如用于由乳糖生产乳糖酸。

用于测定糖氧化酶活性的方法

DMAB/MBTH 测定

预混物:

7.2 mM 3 - 二甲基氨基苯甲酸(DMAB)

0.33 mM 3 - 甲基 - 2 - 苯并噻唑啉酮脒(MBTH)

4 mg/ml 重组的 *Coprinus cinereus* 过氧化物酶(rCiP)

0.4M/0.4M 磷酸盐/柠檬酸盐缓冲液(pH 6)

培养混合物:

180 μ l 500 mM 葡萄糖 25 mM 柠檬酸盐 25 mM 磷酸盐 pH 6.0

20 μ l 样品

使培养混合物在 30°C 下培养 20 分钟。然后, 将 100 ml 的培养混合物与 100 ml 的预混物混合在一起。30 秒钟后, 读取 540(或 490)nm 下的吸光度。其中包括 0.2 mM H₂O₂ 的标准样品。

4AA-TOPS 测定

测定是在 96 孔微量滴定板中进行的。将 100 μl 0.1M 的磷酸盐/柠檬酸盐缓冲液(pH 6)与 50 μl 0.24M 的葡萄糖和 50 μl 预混物(3 mM 4-氨基安替比林(4AA)、7 mM N-乙基-N-磺丙基-m-甲苯胺(TOPS)、40 PODU/ml rCiP)混合, 并且通过加入 40 μl 经过了适当稀释的氧化酶溶液来启动反应。采用易于从分子设备公司得到的 Vmax 微量滴定板, 在 490nm 下测量作为时间函数的吸收值, 并且以吸收值线性增加的斜率作为活性。

实施例

实施例 1: 来自野生型 *M. nivale* 的糖氧化酶的生产

M. nivale 的培养

采用下列完全培养基来发酵 *M. nivale* CBS 100236 的菌株:

摇瓶培养基: BA

Rofec(Roquette)	10 克
NH_4NO_3 (Merck)	10 克
KH_2PO_4 (Merck)	10 克
Solcafloc(Dicacel)	40 克
$\text{MgSO}_4 \cdot 7(\text{H}_2\text{O})$	0.75 克
Pluronic 100 % (BASF)	0.1 ml

加入自来水至最终体积为 1000 ml。

将 pH 调节到 pH 6.5, 然后加入 1 片 500 mg 的碳酸钙。将 100 ml 的完全培养基加入每个体积为 500 ml 的带有 2 个档板的摇瓶中。然后将摇瓶在 121 $^{\circ}\text{C}$ 下高压灭菌 40 分钟。由孢子悬浮液制备接种物, 其中孢子悬浮液是由在 26 $^{\circ}\text{C}$ 下培养了 7 天、然后在 20 ml 无菌水和 Tween 80(ICI)中进行了洗涤的 5 PDA 斜面培养物制得的。以 2 ml 的孢子悬浮液接种每个摇瓶, 然后在 26 $^{\circ}\text{C}$ 下并且在 125 rpm 的恒定振荡下培养 10 天。在培养结束时, 使细胞成为片状, 并从上清液中纯化所述的酶。

纯化

从 5 升的发酵中, 使用截止分子量为 10 kDa 的过滤器(Filtron)通过超滤将 4300 ml 经过离心的发酵肉汤过滤并浓缩至 660 ml。用介于 200 与 400 mg/ml 之间的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀该酶。在将沉淀溶解在 25 mM Tris(pH 7.5)之后, 通过超滤洗涤样品, 直至导电率与 25 mM Tris(pH 7.5)相同为止。使样品通过体积为 300 ml 的用同一缓冲液平衡过的 Q-Sepharose XL 柱

(Pharmacia)并收集流出物。在加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至 100 mg/ml 时,使样品通过用 25 mM Tris(pH 7.5)与 100 mg $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /ml 平衡过的 HIC 柱(Toyopearl - 丁基 650)(TosoHaas)。用 25 mM 醋酸盐缓冲液(pH 5.0)洗涤流出物,并将其加入用同一缓冲液平衡过的 SP-Sepharose 柱(Pharmacia)中。使用线性盐梯度来洗脱被结合的酶,使得超过 10 个柱的体积时达到溶于 25 mM 醋酸盐缓冲液(pH 5.0)的 1 M NaCl。汇集活性组分。通过在苯基 - superose 柱上的 HIC 层析来最终完善该制备过程,使用在超过 20 个柱的体积时线性梯度由 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 进行至 0 M 的 25 mM 醋酸盐缓冲液(pH 5.0)的缓冲液。汇集活性级分并在 25 mM 醋酸盐缓冲液(pH 5.0)中透析 24 小时。

鉴定

由 SDS-PAGE 纯化的蛋白质的分析表明分子量约为 52 kDa,并且通过等电聚焦测定 pI 约为 8.9。

纯化的 *M. nivale* 的氧化酶还呈现出明显的黄色,这表明存在着作为辅因子的 FAD。对酶的吸光度的仔细研究揭示出 385 和 440 nm 处的两个吸收的最大值,这是该酶中存在 FAD 的特征。在存在葡萄糖的情况下,440 nm 处的峰消失了,这表明 FAD 被还原了。

实施例 2: 来自 *M. nivale* 的糖氧化酶的氨基酸序列

还原并使 *M. nivale* 的高度纯化的制品进行烷基化。然后用赖氨酰基内肽酶(Wako)或 TPCK - 胰蛋白酶(Promega)降解该酶的样品。通过在 Vydac 218TP 柱(Vydac)上的 RP-HPLC 以 TFA(三氟乙酸)/异丙醇分离出肽,并且在 Vydac 218TP 柱上以 TFA/乙腈对肽重新纯化。通过 Edman 降解分析所选择的肽。通过测定在 PVDF 膜上电印迹的纯化酶的序列来测定 N - 末端序列。

所得到的部分序列为在 SEQ ID NO: 2 的第 1 - 24 位所示的 N - 末端序列,以及如在 SEQ IN NO:2 的第 229 - 266、249 - 271、303 - 322、336 - 347、383 - 404、405 - 414、420 - 440 位所示的内部序列。当在 Swissprot 与 EMBL 数据库中进行检索时,来自所述糖氧化酶的序列中没有一个序列显示出与任何相关的序列是同源的。

实施例 3: *Microdochium nivale* 的基因组 DNA 的提取

用 10 ml 无菌的 0.008 % Tween 20 漂洗 *Microdochium nivale*(NN008551, CBS 100236)菌丝体的琼脂斜面培养物。将体积为 2 ml 的菌丝体溶液接种到含有 50 ml MY50 pH 6.0 培养基的 250 ml 摇瓶中。MY50 pH 6.0 培养基每升

由下列物质组成：50 克麦芽糖糊精、2 克 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、10 克 KH_2PO_4 、2 克 K_2SO_4 、2 克柠檬酸、10 克酵母提取物、2 克脲和 0.5 ml 的 AMG 痕量元素原液。AMG 痕量金属溶液每升由下列物质组成：14.3 克 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、2.5 克 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.5 克 $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、13.8 克 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、8.5 克 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 和 3 克柠檬酸。在 26℃、125 rpm 下培养摇瓶 6 天。

通过 Miracloth(Calbiochem, La Jolla, CA)收集培养了 6 天的菌丝体，用大约 50 ml 的 10 mM Tris - 1 mM EDTA pH 8.0(TE)漂洗两次并挤压干。然后将菌丝体在液氮中冷冻并且在用干冰预冷的咖啡电研磨机中磨成细粉。将 2 克的粉末样品转移到无菌的一次性 50 ml 锥形试管中，并缓慢地加入体积为 20 ml 的裂解缓冲液(100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, 500 mM 盐酸胍, 200 mM NaCl, pH 8.0)，之后再加入 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 不含 DNA 酶的 RNA 酶 A。在 37℃ 下培养该混合物 30 分钟。然后以 0.8 mg/ml 的浓度加入蛋白酶 K，并且在 50℃ 下再培养该混合物 2 小时。在 12 - 15,000 $\times g$ 下离心裂解的混合物 20 分钟，以便使不溶的碎片沉淀下来。

将裂解物上清液转移到用 10 ml QBT 缓冲液(Qiagen, Santa Clarita, CA)预先平衡过的 Qiagen-tip 500 Maxi 柱(Qiagen, Santa Clarita, CA)中，并用 30 ml 的 QC 缓冲液(Qiagen, Santa Clarita, CA)洗涤该柱。用 15 ml 的 QF 缓冲液(Qiagen, Santa Clarita, CA)洗脱 DNA，并将 7 倍体积的经过滤器灭菌的异丙醇加入洗脱的 DNA 溶液中。轻轻地混合该溶液，然后在 15,000 $\times g$ 下离心 20 分钟以便使 DNA 沉淀。用 5 ml 冰冷的 70% 乙醇洗涤成沉淀的 DNA，将 DNA 进行空气干燥并重新悬浮在 500 μl 的 TE 中。

实施例 4: *Microdochium nivale* 糖氧化酶基因的 PCR 扩增

将来自实施例 2 中所述的纯化 *Microdochium nivale* 糖氧化酶 N - 末端和内部片段的一级氨基酸序列的数据用于创建下列简并的 PCR 引物，以便由实施例 3 中制备的 *Microdochium nivale* 基因组 DNA 扩增所述糖氧化酶的基因：

正向引物(N - 末端肽序列)：GCIGCIGGIGTICCIATHGAYAT(SEQ ID NO: 3)

反向引物(内部肽序列)：IGGRTCIGCRTARTTDTATRTACAT(SEQ ID NO: 4)。

根据制造商的说明，使用 Hot Wax OptistartTM 试剂盒(Invitrogen, San

Diego, CA)完成扩增。安排了 6 个反应，其彼此不同之处在于如下表所示的 pH 和 Mg^{2+} 的浓度：

	1.5 mM $MgCl_2$	2.5 mM $MgCl_2$	3.5 mM $MgCl_2$
pH 8.5	反应 1	反应 2	反应 3
pH 9		反应 4	
pH 9.5		反应 5	
pH 10		反应 6	

扩增反应液(50 μ l)含有 1.62 μ g 作为模板的 *Microdochium nivale* 基因组 DNA、50 皮摩尔的各种引物、1 $\times$ PCR 缓冲液、5 μ l 10 mM dNTP 混合物以及含有适当数量 Mg^{2+} 的 HotWax™ Mg^{2+} 珠。将反应液在如下设置的 Perkin Elmer 480 循环变温加热器中循环：循环 1 为在 94℃ 下 2.5 分钟并在 72℃ 下 2 分钟；循环 2–37 各为在 94℃ 下 45 秒钟、在 50℃ 下 45 秒钟并在 72℃ 下 2 分钟；并且循环 38 为在 94℃ 下 45 秒钟、在 50℃ 下 45 秒钟并在 72℃ 下 10 分钟。循环 39 为 4℃ 下的保温(soak)循环。

将体积为 9 μ l 的各种反应液在 1% 琼脂糖凝胶上使用 50 mM Tris – 50 mM 硼酸 – 1 mM EDTA(TBE)缓冲液进行电泳。反应液 4、5 和 6 显示出位于 1335 bp 处的主要带。汇集反应液 4、5 和 6，并将它们在如上所述的 1% 琼脂糖凝胶上电泳。从凝胶中切下 1335 bp 的带，并使用 Qiaex II 凝胶提取试剂盒(Qiagen, Santa Clarita, CA)纯化。然后根据制造商的说明，将纯化的 1335 bp 的 PCR 产物克隆到 pCR2.1-TOPO(Invitrogen, San Diego, CA)中，并且转化到大肠杆菌 TOP10 细胞(Invitrogen, Carlsbad, CA)中。使用 Wizard Maxi 制备试剂盒(Promega, 麦迪逊市，威斯康星州)，从转化体中分离出质粒 DNA。根据制造商的说明，使用应用生物系统公司的 Prism 377 DNA 测序仪以及 377XL 采集与分析软件(Perkin Elmer, 应用生物系统公司, Foster 市, CA)测定分离的质粒 DNA 的序列。序列的数据证实了 1335 bp 的片段编码 *Microdochium nivale* 糖氧化酶基因的一部分。

实施例 5: *Microdochium nivale* 基因组 DNA 的 Southern 印迹

通过 Southern 杂交分析实施例 3 中制得的基因组 DNA 的样品(Maniatis 等人, 1982,《分子克隆：实验手册》，冷泉港出版社，冷泉港，纽约)。用 EcoRI、KpnI、NotI、SacI、SphI 或 XbaI(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)消化

大约 3 μg 的基因组 DNA, 并在 0.6% 琼脂糖凝胶上使用 TBE 缓冲液通过大小来进行分级分离。在波长短的紫外光下给凝胶拍照, 并将其在 0.5 M NaOH - 1.5 M NaCl 中浸泡 30 分钟, 接下来在 1 M Tris-HCl pH 8 - 1.5 M NaCl 中浸泡 15 分钟。采用 Turbo 印迹方法(Schleicher 与 Schuell, Keene, New Hampshire)通过在 20X SSPE(3M 氯化钠 - 0.2 M 磷酸二氢钠 - 0.02 M EDTA 二钠)中的毛细管印迹, 将凝胶中的 DNA 转移到 Hybond N 杂交膜(Amersham Life Science, Arlington Height, IL)上。使膜与 UV(UV Stratalinker 2400, Stratagene, La Jolla, CA)交联, 然后在 45°C 下将其在温和的搅拌下在下列杂交缓冲液中浸泡 2 小时: 5X SSPE、50% 甲酰胺(v/v)、0.3% SDS 与 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 变性并剪切的鲑睾丸 DNA。

通过随机引发 (Prime it II, Stratagene, La Jolla, CA) 用 $\alpha[^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (Amersham, Arlington Heights, IL)对实施例 4 中所述的含有 *Microdochium nivale* 糖氧化酶的部分编码序列的 1335 bp 片段进行放射性标记。将 $\alpha[^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ - 标记的片段以每毫升缓冲液约为 1×10^6 cpm 的活性加入到杂交缓冲液中。在振荡的水浴中, 在 45°C 下将混合物与膜培养过夜。在培养后, 在 45°C 下洗涤该膜 3 次共 15 分钟, 其中每次都是在含有 0.2% SDS 的 2X SSC(0.3 M NaCl, 30 mM 柠檬酸钠, pH 7.0)中进行的。将膜在纸巾上干燥 15 分钟, 然后包裹在塑料包装物中, 并且在 -70°C 下借助增感屏(柯达公司, Rochester, NY)将该膜在 X-光片下曝光 3 小时。

Southern 印迹表明在含有 SacI 消化物的泳道中存在着 3 kb 的带。由于 SacI 消化物产生了大小小到足以扩增并且大到足以含有全长基因的带, 因此将其用于通过反向 PCR 来分离完全序列。

实施例 6: *Microdochium nivale* 糖氧化酶基因的编码序列的反向 PCR

采用反向 PCR 来得到 1335 bp 片段的 5' 与 3' 侧翼 DNA, 以便分离出 *Microdochium nivale* 糖氧化酶基因的整个编码序列。将 6 μg 的 *Microdochium nivale* 基因组 DNA(实施例 3)的样品用 SacI 消化完全, 然后根据制造商的说明使用 QIAquick 核苷酸去除试剂盒(Qiagen, Santa Clarita, CA)进行纯化。在 14-16°C 下, 借助溶于最终体积为 500 μl 的 10 个单位的 T4 连接酶(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)与 1X 连接酶的缓冲液, 使 1 μg 纯化的消化 DNA 样品进行自身连接过夜。然后通过 65°C 下培养反应液 15 分钟来加热灭活所述的连接酶。使用 Microcon 30(Millipore, Bedford,

MA)浓缩反应液。使用 QIAquick 核苷酸去除试剂盒来纯化反应产物。然后将自身连接的产物用作反向 PCR 的模板。

将下列引物以与常规的聚合酶链式反应相反的方向创建到糖氧化酶基因的 5' 和 3' 端, 以便由 1335 bp 的 PCR 产物的已知区域进行扩增:

靠上的 1199 bp: TCCAGTTCTACGACCGCTACG(SEQ ID NO: 5)

靠下的 158 bp: CAGACTTGGCAGAGACCTTGA(SEQ ID NO: 6)。

扩增反应液(100 μ l)含有 100 皮摩尔的各种引物、1 μ g SacI 消化的并自身连接的基因组 DNA、10 μ l 的 10 mM dNTP 混合物、1x Taq 聚合酶缓冲液(Perkin Elmer, Foster 市, CA)和 5 个单位的 Taq 聚合酶(Perkin Elmer, Foster 市, CA)。将无菌的矿物油平铺在反应液的顶部, 并放入如下设置的 Perkin Elmer 480 型循环变温加热器中: 循环 1 为在 94°C 下 2.5 分钟并在 72°C 下 2 分钟; 循环 2 - 11 各为在 94°C 下 30 秒钟、在 55°C 下 45 秒钟并在 72°C 下 2 分钟; 循环 12 - 28 各为在 94°C 下 30 秒钟、在 55°C 下 45 秒钟并在 72°C 下 2 分钟, 其中每个循环都延长 20 秒钟; 并且循环 29 为在 72°C 下 10 分钟。循环 30 为 4°C 下的保温循环。

将反应液在 1% 琼脂糖凝胶上使用 TBE 缓冲液进行电泳, 其间显现出 3 kb 的带。将 3 kb 的带从凝胶中切下, 并使用 Qiaex II 凝胶提取试剂盒进行纯化。然后将纯化的 3 kb 的 PCR 产物克隆到 pCR2.1-TOPO 中并转化到大肠杆菌 TOP10 细胞中, 以生成大肠杆菌 pEJG40/TOP10。按照国际承认用于专利程序目的的微生物保藏布达佩斯条约, 将大肠杆菌 pEJG40/TOP10 的转化体于 1998 年 6 月 12 日保藏在位于 IL 州 Peoria 市 1815 大学北街的农业研究服务保藏所(NRRL)并且命名为 NRRL B-30034。

使用 Wizard Maxi 制备试剂盒从该转化体中分离出质粒 DNA。根据借助染料 - 终止子化学(Giesecke 等人, 1992, 《病毒学方法杂志》38: 47-60)的引物步行技术, 使用应用生物系统公司的 Prism 377 DNA 测序仪以及 377XL 采集与分析软件, 对分离的质粒 DNA 进行测序。除了 lac - 正向和 lac - 反向引物以外, 可以使用下列寡核苷酸测序引物进行测序:

1335 bp 片段的测序引物:

IACRTCRAARTARTARTCIACRAARTT (SEQ ID NO:7)

RTTIACCCAICCRTC (SEQ ID NO:8)

IGGRTCIGCRTARTTDTATRTACAT (SEQ ID NO:9)

DATRAARTCIACRTGRTCRAARTT (SEQ ID NO:10)

CCAYTGYTCIGGIGTICCRTARTA (SEQ ID NO:11)

CTCGCCACTTTCCCTGCTCCC (SEQ ID NO:12)

CTCGGTCACCAAGGCTCTCCC (SEQ ID NO:13)

GACCGCTACGACAACAACCAG (SEQ ID NO:14)

Sequencing primers for Inverse PCR product:

反向 PCR 产物的测序引物:

TCGGAGAAATGAGAGCAACCA (SEQ ID NO:15)

AGCCGACGTCCAGCATAGCAG (SEQ ID NO:16)

ACCCTACCATACGAGTTCACG (SEQ ID NO:17)

GGTCGAATCGTCACAAAGTAT (SEQ ID NO:18)

CACTGGACTGCCGACTGGATG (SEQ ID NO:19)

CAACAACCAGACCTACCC (SEQ ID NO:20)

CTCAGCAGCACTTCTTTTCAT (SEQ ID NO:21)

测序表明核酸序列具有一个 1448 bp(SEQ ID NO: 1)的开放读框(ORF), 其中含有一个 65 bp 的内含子。该 ORF 的 G+C 的含量为 58.33 %。翻译起点的 -3 位为腺嘌呤, 这符合其中的 -3 位总为腺嘌呤的 Kozak 氏规则。推定的 TATA 基元也存在于 -122, TATAAA 处。

推定的氨基酸序列(SEQ ID NO: 2)表明具有 495 个氨基酸的蛋白质的计算分子量为 54,678 道尔顿。在 van Heijne 规则(van Heijne, 1984, 《分子生物学杂志》173: 243-251)的基础上, 头 18 个氨基酸可能包括分泌型信号肽, 它指导新生肽进入内质网中。采用 van Heijne 程序计算得到 30.395 的得分, 以便预测出信号肽。除了由于 N-末端氨基酸序列没有紧跟在信号肽之后而可能有 4 个氨基酸前肽不同之外, 来源于纯化 *Microdochium nivale* 糖氧化酶片段(实施例 2)的部分肽的氨基酸序列与那些在推定的氨基酸序列中发现的是一致的。

实施例 7: *Microdochium nivale* 糖氧化酶表达载体的构建

合成出如下所示的两个合成的寡核苷酸引物, 以便通过 PCR 扩增用于在镰孢属和曲霉属宿主细胞中亚克隆与表达的来自 *Microdochium nivale* 基因组 DNA 的糖氧化酶基因。为了促进基因片段亚克隆到表达载体 pDM181 和 pBANE15 中, 分别在羧肽酶基因的 5' 和 3' 端引入 *Swa*I 和 *Pac*I 限制酶位点。

正向引物：5' - GATTTAAATATGCGTTCTGCATTATCTTG - 3' (SEQ ID NO: 22)

反向引物：5' - GTTAATTAATTATTTGACAGGGCGGACAGC - 3' (SEQ ID NO: 23)。

黑体字(每个都在第 10 - 30 位)表示编码序列。

除了循环参数变化如下以外，PCR、纯化和亚克隆都在如实施例 4 所述的条件下进行：循环 1 为在 94℃下 2 分钟、在 60℃下 4 秒钟以及在 72℃下 45 秒钟；循环 2 - 37 各为在 94℃下 45 秒钟、在 60℃下 45 秒钟以及在 72℃下 2 分钟；以及循环 38 为在 94℃下 45 秒钟、在 60℃下 45 秒钟以及在 72℃下 6 分钟。循环 39 为 4℃下的保温循环。

载体 pDM181 含有尖孢镰孢的类似胰蛋白酶的蛋白酶启动子和终止子作为调节序列并含有吸水链霉菌的 bar 基因作为用于真菌转化的选择标记 (WO 98/20136; de Block 等人, 1987, 《EMBO 杂志》6: 2513-2518)。载体 pBANE15(图 1)含有 TAKA 启动子和 AMG 终止子并含有构巢曲霉的 amdS 基因作为用于真菌转化的选择标记。这两个载体也含有用于在大肠杆菌中进行选择的 amp 基因。

用 *Swa*I 和 *Pac*I 消化以上获得的糖氧化酶的克隆，并使用 TBE 缓冲液通过 0.8% 琼脂糖凝胶电泳和 Qiaex II 凝胶提取试剂盒进行纯化。将消化的片段克隆到事先用 *Swa*I 和 *Pac*I 消化的 pDM181 和 pBANE15 中，于是分别生成了表达质粒 pEJG35 和 pEJG33(图 2 和图 3)。

将所述表达质粒转化到大肠杆菌 XL10 Gold 细胞(Stratagene, La Jolla, CA)中。分离出含有正确质粒的转化体，并使用 Wizard Maxi 制备试剂盒制备质粒 DNA。

实施例 8: 在米曲霉中表达 *Microdochium nivale* 糖氧化酶的基因

采用原生质体转化(Yelton 等人, 1984, 《美国国家科学院学报》81: 1470-1474)，将 pEJG33 转化到蛋白酶缺陷型米曲霉的宿主菌株 JaL142(Christensen 等人, 1988, 《生物/技术》6: 1419-1422)和 JaL228(WO 98/12300)中。将 100 μ l 的原生质体(2×10^6)放入装有大约 5 μ g pEJG33 的 14 ml Falcon 试管中并温和地混合。加入体积为 250 μ l 的溶于 10 mM Tris-HCl pH 7.5 - 10 mM CaCl_2 的 60% PEG 4000，并通过轻柔的翻滚以进行混合。然后将试管在 37℃下培养 30 分钟。加入 3 ml 的 STC(1.2 M 山梨醇, 10 mM

Tris pH 7.5, 10 mM CaCl_2)并通过倒置进行混合。然后将溶液直接涂布到 Cove 平板上,所述 Cove 平板每升由 342.3 克蔗糖、10 ml 的 1.5 M CsCl 、10 ml 的 1 M 乙酰胺、20 ml 的 1X Cove 盐溶液和 1% 的琼脂组成。50X Cove 盐溶液由每升 26 克 KCl 、26 克 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、76 克 KH_2PO_4 和 50 ml 的 Cove 痕量金属原液组成。每升 Cove 痕量金属溶液由 0.04 克 $\text{NaB}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 、0.4 克 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、1.2 克 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.7 克 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、0.8 克 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 10 克 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 组成。在 37°C 下将平板培养 5 天。将转化体转移到培养基相同的平板中并在 37°C 下培养 5 天。在相同的条件下使用相同的平板通过将孢子划线并挑取分离的菌落来纯化转化体。总共回收了 12 个米曲霉 JaL142 转化体和 22 个米曲霉 JaL228 转化体。

在如上所述的单独的 COVE 平板上培养转化体,然后使用 WiHeveen 等人(1990,《应用微生物生物技术》33: 683)所述的指示平板测试其糖氧化酶的活性。将未转化的宿主用作对照。总共鉴定出 11 个阳性转化体。用无菌的去离子水制备每个阳性转化体的孢子原种。将体积为 500 μl 的包括未转化宿主的每种孢子原种接种到含有 25 ml MY50 培养基的 125 ml 的摇瓶中。在 37°C 、200 rpm 下培养摇瓶 7 天。由于 *Microdochium nivale* 的糖氧化酶含有作为辅因子的 FAD,因此一组烧瓶还含有 52 μM 的核黄素-5'-磷酸(Sigma 化学药品公司, St. Louis, MO)。

在第 3、5 和第 7 天时从每个烧瓶中取出 500 μl 的样品并测定其糖氧化酶的活性。糖氧化酶的活性是在 96 孔板中测量的,其中含有 10 μl 上清液,接下来加入 1 μl 的邻-茴香胺、69 μl 的 Britton 与 Robinson 缓冲液(pH 6.0)、10 μl 的 1M D-葡萄糖以及 10 μl 如 WO 92/16634 所述得到的 *Coprinus cinereus* 过氧化物酶(3.76 PODU/ml)。在 405 nm 下,以 mOD/分钟为单位测量活性 10 分钟。所有的转化体都产生了可以检测到的糖氧化酶的活性。向摇瓶中加入核黄素 5'-磷酸对活性的增加具有次要的作用。将来自糖氧化酶最高产者的 20 μl 的样品在验证糖氧化酶生产的 8-16% Tris-甘氨酸凝胶(Novex, San Diego, CA)上操作。

通过将分离的菌落连续两次贴补(patching)到新的 COVE 平板上,将具有最高活性的转化体进行孢子的纯化,然后将其在摇瓶中重新生长并如上所述重新测试糖氧化酶的活性以验证糖氧化酶的生产。

在 34°C 、pH 7 与 1000-1200 rpm 下,在 2 升的实验室发酵罐中使含有

pEJG33 的米曲霉 JaL228 发酵 8 天, 其中发酵罐中含有由 Nutriose、酵母提取物、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、柠檬酸、 K_2SO_4 、 $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 和痕量金属溶液组成的培养基。痕量金属溶液(1000X)每升由 22 克的 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、11 克的 H_3BO_3 、5 克的 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、5 克的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1.6 克的 $\text{CoCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、1.6 克的 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 与 50 克的 Na_4EDTA 组成。一次发酵中补充 $2 \times 10^{-4} \text{M}$ FMN/升(GOX003.8), 而另一发酵却不进行补充(GOX002.8)。

如上所述测定 8 天的样品。结果表明在两种发酵中都存在着糖氧化酶的活性, 但在两种发酵肉汤之间检测不到糖氧化酶活性的差别。

实施例 9: 在 *Fusarium venenatum* 中表达 *Microdochium nivale* 糖氧化酶的基因

采用 Royer 等人(1995, 《生物/技术》13: 1479-1483)的方法借助 BASTATM(腈丝菌素抗性选择), 将 pEJG35 引入 *Fusarium venenatum* 菌株 CC1-3(WO 97/26330)中。除草剂 BASTATM 中的活性成分为腈丝菌素。BASTATM 是从 AgrEvo(Hoechst Schering, Rodovre, 丹麦)得到的, 并且在使用前用苯酚: 氯仿: 异戊醇(25: 24: 1)提取 2 次、再用氯仿: 异戊醇(24: 1)提取 1 次。在存在 BASTATM 下进行生长的基础上, 回收 14 个转化体, 然后将其在室温下在单独的琼脂平板上培养, 所述琼脂平板由补充有 5 mg/ml BASTATM 的 20 ml 的 50X Vogels 培养基(Royer 等人, 1995, 出处同上)、25 克蔗糖、25 克纯净琼脂以及 25 mM NaNO_3 组成。然后使用 WiHeveen 等人(1990, 出处同上)所述的指示平板来测试转化体中糖氧化酶的生产。测试的 5 个转化体呈阳性。将来自每个阳性转化体的填料(plug)接种到单独的 125 ml 摇瓶中, 其中包括以未转化的 *Fusarium venenatum* CC1-3 作为对照, 摇瓶中含有补充了 0.5 g/l CaCl_2 的 30 ml M400Da 培养基, 然后在 30℃ 下在 150 rpm 的搅拌下培养 7 天。M400Da 培养基每升由 50 克的麦芽糖糊精、2 克 MgSO_4 、2 克 KH_2PO_4 、4 克柠檬酸、2 克脲、0.5 g CaCl_2 和 1 ml 的 Cove 痕量金属溶液组成。一组烧瓶还含有 52 μM 的核黄素 5' - 磷酸。

在第 3、5 和第 7 天时, 从每个烧瓶中取出 500 微升培养肉汤并进行离心。如实施例 8 所述, 测定上清液的糖氧化酶的活性。所有的转化体都产生了可以检测到的糖氧化酶的活性。向摇瓶中加入核黄素 5' - 磷酸已经对活性的增加基本上没有影响。将来自糖氧化酶最高产者的 20 μl 的样品在 8 - 16% Tris - 甘氨酸凝胶(Novex, San Diego, CA)上操作, 这证实了糖氧化酶

的生产。将最高产者在 Vogels/ BASTA™ 平板上进行孢子纯化。

在 30℃ 下, 在 2 升发酵罐中将含有 pEJG35 的 *Fusarium venenatum* 菌株 CC1-3 发酵 8 天, 其中发酵罐中含有每升由下列物质组成的培养基: 20 克蔗糖、2.0 克 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、2.0 克 KH_2PO_4 、2.0 克柠檬酸· H_2O 、2.0 克 $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、0.5 ml 的 AMG 痕量金属溶液(在灭菌前将 pH 调节到 4.5)以及每升由 2.5 克脲和 30 ml 大豆维生素混合物组成的经过滤器灭菌的混合物, 其中在培养基灭菌并冷却后再加入所述的灭菌混合物。进料物流为由蔗糖和脲组成的经分批高压灭菌的混合物。

如实施例 8 所述测定 8 天的样品。结果表明存在着糖氧化酶的活性。

实施例 10: 重组 *Microdochium nivale* 糖氧化酶的纯化

将如实施例 8 所述制得的两种米曲霉 JAL228 发酵的 JaL228 肉汤 GOX002.8(1.2 升)和 GOX003.8(1.4 升)结合起来。使用 Whatman #2 滤纸过滤结合的肉汤, 然后进行洗涤并使用配备有 S1Y10 膜的 Amicon 螺旋形浓缩器通过超滤将其浓缩至 512 ml。如实施例 8 所述对糖氧化酶活性的测量表明基本上百分之百地回收了所述的酶。

然后将浓缩液装入用 10 mM Tris-HCl(pH 8)预先平衡的 Q-Sepharose 柱(189 ml; Pharmacia 生物技术公司, Piscataway, NJ)中。用溶于 10 mM Tris-HCl(pH 8)的 2 M NaCl 洗脱糖氧化酶。如上所述对糖氧化酶活性的测量表明大部分的酶没有结合到柱子上。

将来自 Q-Sepharose 柱的流通的级分(flow-through fractions)(760 ml)调节到 pH 5.5, 并将其装入用 10 mM MES(pH 5.5)预先平衡的 SP-Sepharose 柱(176 ml; Pharmacia 生物技术公司, Piscataway, NJ)中。用溶于 10 mM MES(pH 5.5)的 1 M NaCl 洗脱糖氧化酶, 于是产生了根据 SDS-PAGE 具有表观电泳纯度的糖氧化酶制剂。下表总结了重组糖氧化酶的纯化。基于下列氧电极的测定, 总共实现了 14 倍的纯化、回收率为 31%。采用 Hansatech 氧电极、通过由 0.26 ml 的 10 mM MES(pH 5.5)、30 μl 的 1.0 M D-葡萄糖以及 3 μl 的糖氧化酶组成的测试溶液来测量糖氧化酶。

重组糖氧化酶的纯化

	体积	A ₂₈₀	A ₂₈₀ ×V	A ₄₅₀	A ₄₅₀ ×V	A ₂₈₀ / A ₄₅₀	活性	回收率
肉汤	2580	51.3	100	1.9	100	27	8.2	100

超滤	512	44.2	17	2.35	25	19	45	107
Q-	768	20.7	12	1	16	21	24	87
Sepharose								
SP-	144	52.6	5.7	3.7	11	19	45	31
Sepharose								

单位：体积, ml; $A \times V$ 与回收率(活性 $\times$ 体积), %; 活性(过氧化物酶/邻-茴香胺测定), IU/ml。

实施例 11: 重组糖氧化酶的分子特性

采用 Novex 8 - 16% Tris - 甘氨酸 SDS-PAGE 凝胶的 SDS-PAGE 表明如实施例 8 和 9 所述得到的重组糖氧化酶具有约为 55 kDa 的分子量, 这与野生型糖氧化酶的类似。

在应用生物系统公司的 476A 蛋白质测序仪(Perkin Elmer/应用生物系统公司分公司, Foster 市, CA)中, 通过联机的 HPLC 和液相三氟乙酸(TFA)传递(delivery)进行重组糖氧化酶的 N-末端序列的测定。将重组糖氧化酶制剂在还原条件下使用 Novex Nupage MOPS 缓冲液进行 SDS-PAGE, 其中使用了 Novex 10% Bis-Tris-SDS-PAGE 凝胶。在 25 伏下、在 10 mM CAPS 缓冲液(pH 11.0)中, 将凝胶电转移印迹到 PVDF 膜(Novex, San Diego, CA)上 2 小时。在溶于 40% 甲醇/1% 醋酸的 0.1% 考马斯蓝 R250 中对 PVDF 膜进行染色, 并切下观察到的带。采用测序试剂(Perkin Elmer/应用生物系统公司分公司, Foster 市, CA)从印迹软片中测定切下带的序列。乙内酰苯硫脲-氨基酸的检测是通过联机的 HPLC 使用缓冲液 A 和缓冲液 B 来完成的, 其中缓冲液 A 含有 3.5% 的四氢呋喃水溶液以及 18 ml 含有醋酸、醋酸钠和己磺酸钠的预混浓缩物(Perkin Elmer/应用生物系统公司分公司, Foster 市, CA)、而缓冲液 B 含有乙腈。采集数据, 并使用应用生物系统公司的 610 数据分析软件在 Macintosh IIsi 中进行分析。

两种切下的带的 N-末端测序都得到了 SEQ ID NO: 2 的第 1 - 21 位所示的序列, 其中第 6 位是不能确定的, 但基于推定的氨基酸序列为半胱氨酸。N-末端的结果与推定的氨基酸序列相吻合, 这表明由米曲霉和 *Fusarium venenatum* 宿主进行了正确的处理。

正如在用 1 厘米石英杯在 Shimadzu UV160U 分光光度计中记录的那样, 在 10 mM MES-NaCl(pH 5.5)中, 重组的糖氧化酶具有黄素蛋白特有的

紫外可见的光谱。在 280 和 450 nm 下的相对吸光度为 19, 这略微大于野生型酶得到的数值 12。通过氨基酸分析测量 280 nm 下的消光系数为 1.9 g/(l x cm), 而预测值为 2.1(包括 FAD 分子的贡献)。因此, 看起来每种重组的糖氧化酶都含有一个黄素分子(可能为 FAD)。

假定每个 D-葡萄糖分子的氧化都与一分子 O₂ 还原为 H₂O₂ 有关, 那么使用如实施例 10 所述的 Hansatech 氧电极测量重组糖氧化酶的活性。在 pH 5.5 和 20℃ 下, 重组的糖氧化酶以 4.0 IU/A₂₈₀ 的比活或以 116 转换/分钟氧化 D-葡萄糖(0.1 M)。正如由实施例 8 所述的 *Coprinus cinereus* 过氧化物酶/茴香胺方法测定的那样, 重组的糖氧化酶具有与野生型酶相同的比活。

实施例 12: 底物特异性

在 60 mM 底物浓度下底物的特异性

在室温下在微滴板中通过以下列顺序混合来测定来自 *M. nivale* 的糖氧化酶的底物特异性:

- 50 µl 0.4/0.4 M 磷酸盐/柠檬酸盐缓冲液(pH 6)
- 50 µl 底物(360 mM)
- 50 µl 21.6 mM 3-二甲基氨基苯甲酸(DMAB)
- 50 µl 1 mM 3-甲基-2-苯并噻唑啉酮脎(MBTH)
- 50 µl 75 µg/ml, rec. *Coprinus cinereus* 过氧化物酶(rCiP)
- 50 µl 糖氧化酶

跟踪记录 595 nm 下的吸光度至少 3 分钟。计算出每分钟吸光度的增加并将该值用作相对活性的测量值。

本发明糖氧化酶对各种单糖和二糖底物的氧化活性的结果总结在下表中, 并且该结果表明所述糖氧化酶能够氧化大部分的还原糖而且对麦芽糖和纤维二糖要比对相应的单糖葡萄糖表现出更高的活性。该酶对诸如果糖、蔗糖、海藻糖和甲基-β-D-吡喃葡萄糖苷之类的非还原糖没有活性。将结果表示为相对于 D-纤维二糖的最佳活性的 *M. nivale* 酶的底物特异性。

底物	活性 %
D-葡萄糖	69
2-脱氧-D-葡萄糖	4.2
D-半乳糖	31.3

D - 甘露糖	3.2
D - 木糖	55.6
D - 麦芽糖	83.5
D - 纤维二糖	“100”
乳糖	52.5

0.83 mM 下的底物特异性

对底物特异性进一步的分析表明来自 *M. nivale* 的糖氧化酶能够氧化所测试的所有聚合度(DP)、即 DP2 - DP5 的寡糖，其中除了将底物浓度改变为 0.83 mM 之外使用的测定条件与上述相同。而且，该酶能够水解其中的单糖单元分别由 α - 1,4 或 β - 1,4 糖苷键连接的麦芽糖糊精和纤维糊精两者。糖氧化酶同样好地并且以比水解单糖高出大约 10 倍的水平来水解所有测试的纤维糊精。当以麦芽糖糊精为底物时，所述糖氧化酶的活性在比起针对单糖高出 1¹/₂ 倍(对麦芽六糖来说)到几乎高出 5 倍(对麦芽四糖来说)的范围内变化。结果总结在下表中，该结果表明相对于 DP 1(D - 葡萄糖)而言的聚合度与 1,4 键的类型对糖氧化酶活性的影响。

DP	活性 %	
	α - 1,4	β - 1,4
1	“100”	
2	211	949
3	348	1147
4	477	1111
5	161	1014

在 1% 底物浓度下的底物特异性

当采用 1% 的底物浓度在上述测定条件下进行测定时，即使在通过透析除去小分子的寡糖和单糖之后，对来自 *M. nivale* 的糖氧化酶对多糖氧化活性的分析表明该酶能够显对羧甲基纤维素(CMC)有显著的活性。结果总结在下表中，该结果显示出相对于 D - 纤维二糖的糖氧化酶对羧甲基纤维素的活性。

底物	活性 %
----	------

D-纤维二糖	“100”
CMC	17.7
CMC, 透析过的	8.8

在 10 mM 底物浓度下的底物特异性

在 pH 7.8(50 mM Tris-HCl 缓冲液)、10 mM 底物下, 测量来自 *M. nivale* 的糖氧化酶对各种底物的氧化活性。其中包括来自支顶孢属的糖氧化酶的类似数据以便用于比较(如 BBA(1991)1118: 41-47 中所述)。

	Microdochium	支顶孢属
麦芽糖	76.1	100
麦芽三糖	84.9	94
麦芽四糖	100.0	74
麦芽五糖	58.6	46
麦芽六糖	41.2	66
麦芽七糖	32.5	56
乳糖	67.0	59
葡萄糖	39.6	64
纤维二糖	65.7	47

实施例 13: 麦芽糖的氧化

为了证明来自 *M. nivale* 的糖氧化酶氧化 1-位上的还原基团, 通过层析的方法在下列条件下跟踪记录麦芽糖的氧化: 在加入 50 μ l 纯化的 *M. nivale* 糖氧化酶之前, 将 125 μ l 的 0.2 M 柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液(pH 6)加入到 250 μ l 的 10 mM 麦芽糖和 75 μ l 的水中。在 40 $^{\circ}$ C 下在恒定的振荡下培养样品不超过 30 分钟。通过将 100 μ l 的样品加入到 900 μ l 95 $^{\circ}$ C 的水中来终止反应。然后采用下列条件在 Dionex DX-500 系统中通过阴离子交换层析(CarboPac PA1 柱, Dionex)、接下来通过脉冲电流检测(Dionex)来分析 50 μ l 的反应混合物:

流速:	1 ml/分钟
A-缓冲液:	0.1 M NaOH(在氦气中脱气)
B-缓冲液:	0.1 M NaOH, 0.6 mM 醋酸钠(在氦气中脱气)

梯度:	0 - 3 分钟, 5 % 的 B - 缓冲液
	3 - 19 分钟, 5 - 30 % 的 B - 缓冲液
	19 - 21 分钟, 30 - 100 % 的 B - 缓冲液
	21 - 23 分钟, 100 % 的 B - 缓冲液
	23 - 24 分钟, 100 - 5 % 的 B - 缓冲液

从 Sigma 化学药品公司购买标准的麦芽糖糊精(DP1 - 7)。根据 Fitting & Putman(1952)《生物化学杂志》199: 573 所述制备麦芽糖酸。

使用以上的方法, 检测出麦芽糖为保留时间约为 8.0 分钟的峰, 同时检测出麦芽糖酸为保留时间约为 13.3 分钟的峰。在上述条件下, 在存在 *M. nivale* 糖氧化酶的情况下, 由麦芽糖生成了麦芽糖酸, 这是因为在大约 13.3 分钟时展开了一个峰。因此, 糖氧化酶氧化麦芽糖中游离的还原端基。下面以反应混合物中麦芽糖酸的 μM 浓度给出了所产生的麦芽糖酸的量:

培养时间(分钟)	麦芽糖酸(μM)
0	0
5	150
10	370
30	880

实施例 14: 结合常数 K_m

通过改变糖底物的浓度并由 4AA-TOPS 测定方法测定糖氧化酶的活性来进行稳态动力学的研究。尽管该反应不是简单的一底物 - 一产物的机理($E + S \leftrightarrow ES \rightarrow E + P$), 但仍将其假设为简单的 Michaelis-Menten 动力学反应。

使用一些优选的底物来研究针对 *M. nivale* 的糖氧化酶的稳态动力学。由 Lineweaver-Burke 作图法得到动力学常数, 其中假设为简单的 Michaelis-Menten 动力学反应(尽管这是一种相当不好的假设)以便得到各种底物的表观值 " K_m " 和 " V_m "。" K_m " 的结果为:

葡萄糖:	42 mM
麦芽糖:	11 mM

纤维二糖: 59 mM。

所述的糖氧化酶对纤维二糖表现出最高的活性。但是，纤维二糖的“K_m”要比麦芽糖的几乎高出 6 倍。同样地，葡萄糖的“K_m”明显高于麦芽糖的，而这两种底物的“V_m”却大体相同。因此，以前所显示的在低的底物浓度下对麦芽糖的优选可以由麦芽糖较低的“K_m”值加以解释。

实施例 15: pH 与温度的活性分布

在室温下采用以上实施例 12 中所述的方法、但是要用调节到待测 pH 值的缓冲液并在反应混合物中测量实际的 pH，在微滴板中测定在某一 pH 范围内来自 *M. nivale* 糖氧化酶的活性。下面的结果(相对于 pH 6.32 时的最佳值的活性)表明所述糖氧化酶在 pH 5 - 7 时具有最佳的活性，并且该酶具有相当宽 pH 的活性分布。

pH	活性 %
3.38	5.58
4.28	27.69
5.31	88.97
6.32	100.00
7.15	96.20
8.05	57.25

通过在玻璃试管中混合缓冲液与底物并且在不同的温度下(30 - 80℃)预培养至少 5 分钟来测定糖氧化酶的温度活性分布:

- 150 ml 0.4/0.4 M 磷酸盐/柠檬酸盐(pH 6)
- 150 ml 180 mM 麦芽糖
- 150 ml 氧化酶稀释液

通过加入氧化酶来启动反应，并且在恒温浴槽中在设置的合适的温度下培养样品。5 分钟后将样品放在冰上，通过加入 450 µl 的 DMAB: MBTH: rCiP(1: 1: 1)在如实施例 12 所述的各种浓度下测定过氧化氢的产生，并且在 HP 8452A 二极管阵列分光光度计(惠普公司)上处理 10 秒钟后测量 590 nm 下吸光度的增加。其中包括没有进行培养的盲试。下面所示的结果(相对于

50℃下的最佳值)表明该酶在至少 60℃以下是有活性的,其中在 50℃下具有最佳的活性。

℃	活性 %
30	86.28
40	90.98
50	100.00
60	79.95
70	2.27

实施例 16: 由 DSC 测定的热稳定性

使用来自 Pharmacia 公司的 NAP-5 柱,将来自 *M. nivale* 的糖氧化酶样品脱盐入 0.1 M MES(pH 6)中。将样品(含有 6.5 mg/ml 的氧化酶)装入 VP-DSC 装置(MicroCal)中,并以 90°/小时的扫描速度进行由 20℃至 90℃的线性扫描。

发现变性温度为 73℃。

实施例 17: 温度和 pH 的稳定性

温度稳定性:

在通过 4AA-TOPS 检测测量残留活性之前,在 pH 6 下在不同的温度下预培养来自 *M. nivale* 的糖氧化酶 10 分钟:

温度℃:	残留活性%:
40	81
50	78
60	100
70	19
80	2

结果表明该酶在 60℃以下是稳定的,但在 70℃及 70℃以上是不稳定的。这与由 DSC 实验得到的结果是一致的。

pH - 稳定性:

在通过 4AA-TOPS 检测测量残留活性之前,在 40℃下在不同的 pH 下培养来自 *M. nivale* 的糖氧化酶 2 小时:

pH:	残留活性 %:
3	2
4	100
5	95
6	93
7	99
8	97
9	93

结果表明该酶在 pH 4-9 的范围内是稳定的,但当 pH 为 3 时是不稳定的。

实施例 18: 糖氧化酶对谷蛋白流变学特性的影响

面包面团的配方

小麦面粉	100 % (= 10 克)
水	58 % (包括酶溶液)
盐	1.5 %
糖	1.5 %

小麦面粉为 Meneba 型面粉。该面粉不含抗坏血酸。

将面团在 10 g Micro Mixer(NSI-33R 型,来自国家生产公司)中混合 2:30 分钟。在混合前加入来自 *M. nivale* 的糖氧化酶。在混合后,使面团在 32℃ 和 85 % 的相对湿度下静置 90 分钟。用 2 % 的 NaCl 溶液从面团中洗出谷蛋白(在 Perten 仪器公司的 Glutomatic 2200 中处理 7 分钟),然后在谷蛋白指标离心机 2015(Perten 仪器公司)中离心 1 分钟。

为了评价在振动下面团的强度,在 Bohlin VOR 流变仪系统(Bohlin 仪器公司)中分析谷蛋白的流变学特性,其中以恒定的频率(1 Hz)进行着发生应力形变的摆动(sweep)。在该方法中,将面团的粘弹特性划分为两个部分、即动力剪切储能模量 G' 和动力剪切损耗模量 G'' 。损耗模量与储能模量之比在数值上等于粘弹性相角 d 的正切值。储能模量 G' 的增加以及相角 d 的减小表明面团更硬并更有弹性。

糖氧化酶	G'	G''	d
------	------	-------	-----

无(参考)	349.5	166.4	25.46
50 U/kg 面粉	397.9	176.3	23.89*
100 U/kg 面粉	456.3*	193.7*	23.02*
200 U/kg 面粉	523.0*	207.4*	21.77*
500 U/kg 面粉	554.7*	207.3*	20.49*
1000 U/kg 面粉	708.5*	249.4*	19.40*

结果表明 G' 储能模量与加入到面团中的糖氧化酶的用量成正比地增加。就相角 d 而言, 所有经糖氧化酶处理的面团都与参考物的不同, 并且相角随加入酶的量成比例地减小。因此, 糖氧化酶提高了弹性模量, 从而以依赖于用量的方式提高了面团的弹性。图表为三次独立测量的平均值。通过在 5% 的显著水平上进行 ANOVA 分析, 用星号表示的数据在统计上是显著的。

实施例 19: 糖氧化酶对面团坚度的影响

烘焙步骤

基本配方:

面粉(Meneba)	12 g(°100%)
水	60%(包括酶溶液)
酵母	4%
糖	1.5%
NaCl	1.5%

面粉不含抗坏血酸。

步骤: 将面团在 10 g Micro Mixer(NSI-33R 型, 来自国家生产公司)中混合 2¹/₂ 分钟。在混合前加入来自 M. nivale 的糖氧化酶。混合后面团的最终温度约为 27°C。在混合后立即对面团进行评价。

对面团的评价

根据经验按照下列标度测量面团的粘性和坚硬度:

评分系统	1	2	3	4	5	6
坚硬度:	非常软	太软	软/良好	正常	硬	太硬
粘性:	几乎为液体	太粘	粘	良好	干	太干

在 2 天的时间里进行评价，其中每天针对每个用量采用 3 次重复实验。下表中总结的数据代表 6 种评价的平均值。结果表明面团的坚硬度和粘性都表现出相同的所述糖氧化酶产生具有极佳面团坚度的面团的能力随用量而增加的趋势。在 200 和 300 单位/千克下，熟练的面包师评价该面团具有极佳的坚硬度和柔软性并具有非常通风的坚度。

糖氧化酶	坚硬度	粘性
无(参考)	3.0	2.3
10 U/kg 面粉	3.0	3.0
50 U/kg 面粉	3.5	3.4
100 U/kg 面粉	4.0	4.0
200 U/kg 面粉	4.0	3.8
300 U/kg 面粉	4.1	4.1
500 U/kg 面粉	4.8	4.8
溴酸盐	4.0	3.5

实施例 20

为了测试 *Microdochium nivale* 的糖氧化酶(MCO)对不同加工参数中变化的耐受性，已经在“欧洲直接面团法”这种标准尺度焙烤试验(2 千克面粉)中测试了 MCO。与标准的焙烤步骤(ABF-SP.1217.01/01)相比，通过增加水含量、通过增加混合时间和/或通过增加发酵时间来使面团变形。试验的目的在于澄清 MCO 是否能使面团对这些变化具有更强的抗性。为了模拟实际的焙烤工艺，结合芬加密尔 Super MA(木聚糖酶与淀粉酶)来测试 MCO。方案是以不完全的统计设计为基础的。与不含 MCO 的对照相比，MCO 的加入导致面团/面包的强度更好。比如当评价状态(=“底部(foot)”的面积)时，例如可以断定在 MCO 的用量(0 - 200 U)与水加入量增加了 1.5 % 和混合时间增加了 + 2 分钟之间没有观察到明显的相互作用。

序列表

<110> 诺维信公司(Novozymes A/S)

<120> 糖氧化酶及其在焙烤中的用途

<130> 5421-WO, SLK

<140>

<141>

<160> 23

<170> PatentIn 2.0 版

<210> 1

<211> 1553

<212> DNA

<213> 白小羊蹄菌(Microdochium nivale)

<220>

<221> 内含子

<222> (1012)..(1076)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1011)

<220>

<221> CDS

<222> (1077)..(1553)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (67)..(1550)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(54)

<400> 1

atg cgt tct gca ttt atc ttg gcc ctc ggc ctt atc acc gcc agc gct 48

Met Arg Ser Ala Phe Ile Leu Ala Leu Gly Leu Ile Thr Ala Ser Ala
 -20 -15 -10

gac gct tta gtc act cgc ggt gcc atc gag gcc tgc ctg tct gct gct 96

Asp Ala Leu Val Thr Arg Gly Ala Ile Glu Ala Cys Leu Ser Ala Ala
 -5 -1 1 5 10

ggc gtc ccg atc gat att cct ggc act gcc gac tat gag cgc gat gtc 144

Gly Val Pro Ile Asp Ile Pro Gly Thr Ala Asp Tyr Glu Arg Asp Val
 15 20 25

gag ccc ttc aac atc cgc ctg cca tac att ccc acc gcc att gct cag 192

Glu Pro Phe Asn Ile Arg Leu Pro Tyr Ile Pro Thr Ala Ile Ala Gln
 30 35 40

acg cag act act gct cac atc cag tcg gca gtc cag tgc gcc aag aag 240

Thr Gln Thr Thr Ala His Ile Gln Ser Ala Val Gln Cys Ala Lys Lys
 45 50 55

ctc aac ctc aag gtc tct gcc aag tct ggt ggt cac agc tac gcc tcg 288

Leu Asn Leu Lys Val Ser Ala Lys Ser Gly Gly His Ser Tyr Ala Ser
 60 65 70

ttc ggc ttt ggt ggc gag aac ggt cac ctc atg gtc cag ctc gac cgc 336

Phe Gly Phe Gly Gly Glu Asn Gly His Leu Met Val Gln Leu Asp Arg
 75 80 85 90

atg att gat gtc atc tcg tac aat gac aag act ggc att gcc cat gtt 384

Met Ile Asp Val Ile Ser Tyr Asn Asp Lys Thr Gly Ile Ala His Val
 95 100 105

gag ccc ggt gcc cgc ctc gga cat ctc gcc acc gtc ctc aac gac aag 432

Glu Pro Gly Ala Arg Leu Gly His Leu Ala Thr Val Leu Asn Asp Lys
 110 115 120

tac ggc cgt gcc atc tcc cac ggt aca tgc cct ggt gtc ggc atc tcc 480

Tyr Gly Arg Ala Ile Ser His Gly Thr Cys Pro Gly Val Gly Ile Ser
 125 130 135
 ggc cac ttt gcc cac ggc ggc ttc ggc ttc agc tcg cac atg cac ggt 528
 Gly His Phe Ala His Gly Gly Phe Gly Phe Ser Ser His Met His Gly
 140 145 150
 ctg gct gtc gac tcg gtc gtc ggt gtc act gtt gtt ctt gct gat gga 576
 Leu Ala Val Asp Ser Val Val Gly Val Thr Val Val Leu Ala Asp Gly
 155 160 165 170
 cgc atc gtt gag gct tct gcc act gag aat gct gac ctc ttc tgg ggt 624
 Arg Ile Val Glu Ala Ser Ala Thr Glu Asn Ala Asp Leu Phe Trp Gly
 175 180 185
 atc aag ggc gct ggc tcc aac ttc ggc atc gtt gct gtc tgg aag ctc 672
 Ile Lys Gly Ala Gly Ser Asn Phe Gly Ile Val Ala Val Trp Lys Leu
 190 195 200
 gcc act ttc cct gct ccc aag gtt ctc acc cgc ttt ggc gtc acc ctc 720
 Ala Thr Phe Pro Ala Pro Lys Val Leu Thr Arg Phe Gly Val Thr Leu
 205 210 215
 aac tgg aag aac aag acc tct gcc ctc aag ggc atc gag gct gtt gag 768
 Asn Trp Lys Asn Lys Thr Ser Ala Leu Lys Gly Ile Glu Ala Val Glu
 220 225 230
 gac tac gcc cgc tgg gtc gcc ccc cgc gag gtc aac ttc cgc att gga 816
 Asp Tyr Ala Arg Trp Val Ala Pro Arg Glu Val Asn Phe Arg Ile Gly
 235 240 245 250
 gac tac ggc gct ggt aac ccg ggt atc gag ggt ctc tac tac ggc act 864
 Asp Tyr Gly Ala Gly Asn Pro Gly Ile Glu Gly Leu Tyr Tyr Gly Thr
 255 260 265

```

ccc gag caa tgg cgt gcg gct ttc caa cct ctg ctc gac act ctg cct 912

Pro Glu Gln Trp Arg Ala Ala Phe Gln Pro Leu Leu Asp Thr Leu Pro
      270              275              280

gct gga tac gtt gtc aac ccg acc acc tcc ttg aac tgg atc gag tcg 960

Ala Gly Tyr Val Val Asn Pro Thr Thr Ser Leu Asn Trp Ile Glu Ser
      285              290              295

gtg ctc agc tac tcc aac ttt gac cat gtc gac ttc att act cct cag 1008

Val Leu Ser Tyr Ser Asn Phe Asp His Val Asp Phe Ile Thr Pro Gln
      300              305              310

cct gtaagtgttc accgactttg cgctgggaga atgttttatg tcggetttac 1061

Pro
315

tgactccctc tacag gtc gag aac ttc tat gcc aag agc ttg acg ctc aag 1112

      Val Glu Asn Phe Tyr Ala Lys Ser Leu Thr Leu Lys
              320              325

agt atc aag ggc gac gcc gtc aag aac ttt gtc gac tac tac ttt gac 1160

Ser Ile Lys Gly Asp Ala Val Lys Asn Phe Val Asp Tyr Tyr Phe Asp
      330              335              340

gtg tcc aac aag gtt aag gac cgc ttc tgg ttc tac cag ctc gac gtc 1208

Val Ser Asn Lys Val Lys Asp Arg Phe Trp Phe Tyr Gln Leu Asp Val
      345              350              355

cac ggc ggc aag aac tcg caa gtc acc aag gtc acc aac gcc gag aca 1256

His Gly Gly Lys Asn Ser Gln Val Thr Lys Val Thr Asn Ala Glu Thr
      360              365              370              375

gcc tac cct cac cgc gac aag ctc tgg ctg atc cag ttc tac gac cgc 1304

Ala Tyr Pro His Arg Asp Lys Leu Trp Leu Ile Gln Phe Tyr Asp Arg
      380              385              390

```

tac gac aac aac cag acc tac ccg gag acc tca ttc aag ttc ctc gac 1352

Tyr Asp Asn Asn Gln Thr Tyr Pro Glu Thr Ser Phe Lys Phe Leu Asp
395 400 405

ggc tgg gtc aac teg gtc acc aag gct ctc ccc aag tcc gac tgg ggc 1400

Gly Trp Val Asn Ser Val Thr Lys Ala Leu Pro Lys Ser Asp Trp Gly
410 415 420

atg tac atc aac tac gcc gac ccc cgc atg gac cgc gac tac gcc acc 1448

Met Tyr Ile Asn Tyr Ala Asp Pro Arg Met Asp Arg Asp Tyr Ala Thr
425 430 435

aag gtc tac tac ggt gag aac ctc gcc agg ctc cag aag ctc aag gcc 1496

Lys Val Tyr Tyr Gly Glu Asn Leu Ala Arg Leu Gln Lys Leu Lys Ala
440 445 450 455

aag ttt gat ccc acc gac cgt ttc tac tac cct cag gct gtc cgc cct 1544

Lys Phe Asp Pro Thr Asp Arg Phe Tyr Tyr Pro Gln Ala Val Arg Pro
460 465 470

gtc aaa taa 1553

Val Lys

<210> 2

<211> 495

<212> PRT

<213> 白小羊蹄菌(Microdochium nivale)

<400> 2

Met Arg Ser Ala Phe Ile Leu Ala Leu Gly Leu Ile Thr Ala Ser Ala
1 5 10 15

Asp Ala Leu Val Thr Arg Gly Ala Ile Glu Ala Cys Leu Ser Ala Ala
20 25 30

Gly Val Pro Ile Asp Ile Pro Gly Thr Ala Asp Tyr Glu Arg Asp Val

35	40	45	
Glu Pro Phe Asn Ile Arg Leu Pro Tyr Ile Pro Thr Ala Ile Ala Gln			
50	55	60	
Thr Gln Thr Thr Ala His Ile Gln Ser Ala Val Gln Cys Ala Lys Lys			
65	70	75	80
Leu Asn Leu Lys Val Ser Ala Lys Ser Gly Gly His Ser Tyr Ala Ser			
85	90	95	
Phe Gly Phe Gly Gly Glu Asn Gly His Leu Met Val Gln Leu Asp Arg			
100	105	110	
Met Ile Asp Val Ile Ser Tyr Asn Asp Lys Thr Gly Ile Ala His Val			
115	120	125	
Glu Pro Gly Ala Arg Leu Gly His Leu Ala Thr Val Leu Asn Asp Lys			
130	135	140	
Tyr Gly Arg Ala Ile Ser His Gly Thr Cys Pro Gly Val Gly Ile Ser			
145	150	155	160
Gly His Phe Ala His Gly Gly Phe Gly Phe Ser Ser His Met His Gly			
165	170	175	
Leu Ala Val Asp Ser Val Val Gly Val Thr Val Val Leu Ala Asp Gly			
180	185	190	
Arg Ile Val Glu Ala Ser Ala Thr Glu Asn Ala Asp Leu Phe Trp Gly			
195	200	205	
Ile Lys Gly Ala Gly Ser Asn Phe Gly Ile Val Ala Val Trp Lys Leu			
210	215	220	
Ala Thr Phe Pro Ala Pro Lys Val Leu Thr Arg Phe Gly Val Thr Leu			
225	230	235	240
Asn Trp Lys Asn Lys Thr Ser Ala Leu Lys Gly Ile Glu Ala Val Glu			
245	250	255	
Asp Tyr Ala Arg Trp Val Ala Pro Arg Glu Val Asn Phe Arg Ile Gly			
260	265	270	

Asp Tyr Gly Ala Gly Asn Pro Gly Ile Glu Gly Leu Tyr Tyr Gly Thr
275 280 285

Pro Glu Gln Trp Arg Ala Ala Phe Gln Pro Leu Leu Asp Thr Leu Pro
290 295 300

Ala Gly Tyr Val Val Asn Pro Thr Thr Ser Leu Asn Trp Ile Glu Ser
305 310 315 320

Val Leu Ser Tyr Ser Asn Phe Asp His Val Asp Phe Ile Thr Pro Gln
325 330 335

Pro Val Glu Asn Phe Tyr Ala Lys Ser Leu Thr Leu Lys Ser Ile Lys
340 345 350

Gly Asp Ala Val Lys Asn Phe Val Asp Tyr Tyr Phe Asp Val Ser Asn
355 360 365

Lys Val Lys Asp Arg Phe Trp Phe Tyr Gln Leu Asp Val His Gly Gly
370 375 380

Lys Asn Ser Gln Val Thr Lys Val Thr Asn Ala Glu Thr Ala Tyr Pro
385 390 395 400

His Arg Asp Lys Leu Trp Leu Ile Gln Phe Tyr Asp Arg Tyr Asp Asn
405 410 415

Asn Gln Thr Tyr Pro Glu Thr Ser Phe Lys Phe Leu Asp Gly Trp Val
420 425 430

Asn Ser Val Thr Lys Ala Leu Pro Lys Ser Asp Trp Gly Met Tyr Ile
435 440 445

Asn Tyr Ala Asp Pro Arg Met Asp Arg Asp Tyr Ala Thr Lys Val Tyr
450 455 460

Tyr Gly Glu Asn Leu Ala Arg Leu Gln Lys Leu Lys Ala Lys Phe Asp
465 470 475 480

Pro Thr Asp Arg Phe Tyr Tyr Pro Gln Ala Val Arg Pro Val Lys
485 490 495

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<220>

<221> modified_base

<222> (3)

<223> i

<220>

<221> modified_base

<222> (6)

<223> i

<220>

<221> modified_base

<222> (9)

<223> i

<220>

<221> modified_base

<222> (12)

<223> i

<220>

<221> modified_base

<222> (15)

<223> i

<400> 3

gcgcgcgcgc tcccnathga yat

23

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<220>

<221> modified_base

<222> (1)

<223> i

<220>

<221> modified_base

<222> (7)

<223> i

<400> 4

nggrlenger tarttdatrt acat

24

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 5

tecagttcta cgaccgctac g

21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 6

cagacttggc agagaccttg a

21

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<220>

<221> modified_base

<222> (1)

<223> i

<220>

<221> modified_base

<222> (19)

<223> i

<400> 7

nacrtcraar tartartcna craartt

27

<210> 8

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<220>

<221> modified_base

<222> (4)

<223> i

<220>

<221> modified base

<222> (10)

<223> i

<400> 8

rttnaccan ccrtc

15

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 9

ggrtcgcrtat rttatrtac at

22

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 10

datraartca crlgrtcras rtt

23

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 11

ccaytgytcg ggtecertart a

21

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 12

ctcgccactt tccctgetcc c

21

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 13

ctcggtcacc aaggetctcc c

21

<210> 14

<211> 21

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 14
gaccgctacg acaacaacca g 21

<210> 15
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 15
tcggagaaat gagagcaacc a 21

<210> 16
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 16
agccgacgtc cagcatagca g 21

<210> 17
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 17
accctaccai acgagttcac g 21

<210> 18
<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 18

ggtcgaatcg tcacaaagta t

21

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 19

cactggactg ccgactggat g

21

<210> 20

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 20

caacaaccag acctaccc

18

<210> 21

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 21

ctcagcagca cttcttttca t

21

<210> 22

<211> 30

<212> DNA
<213> 人工序列

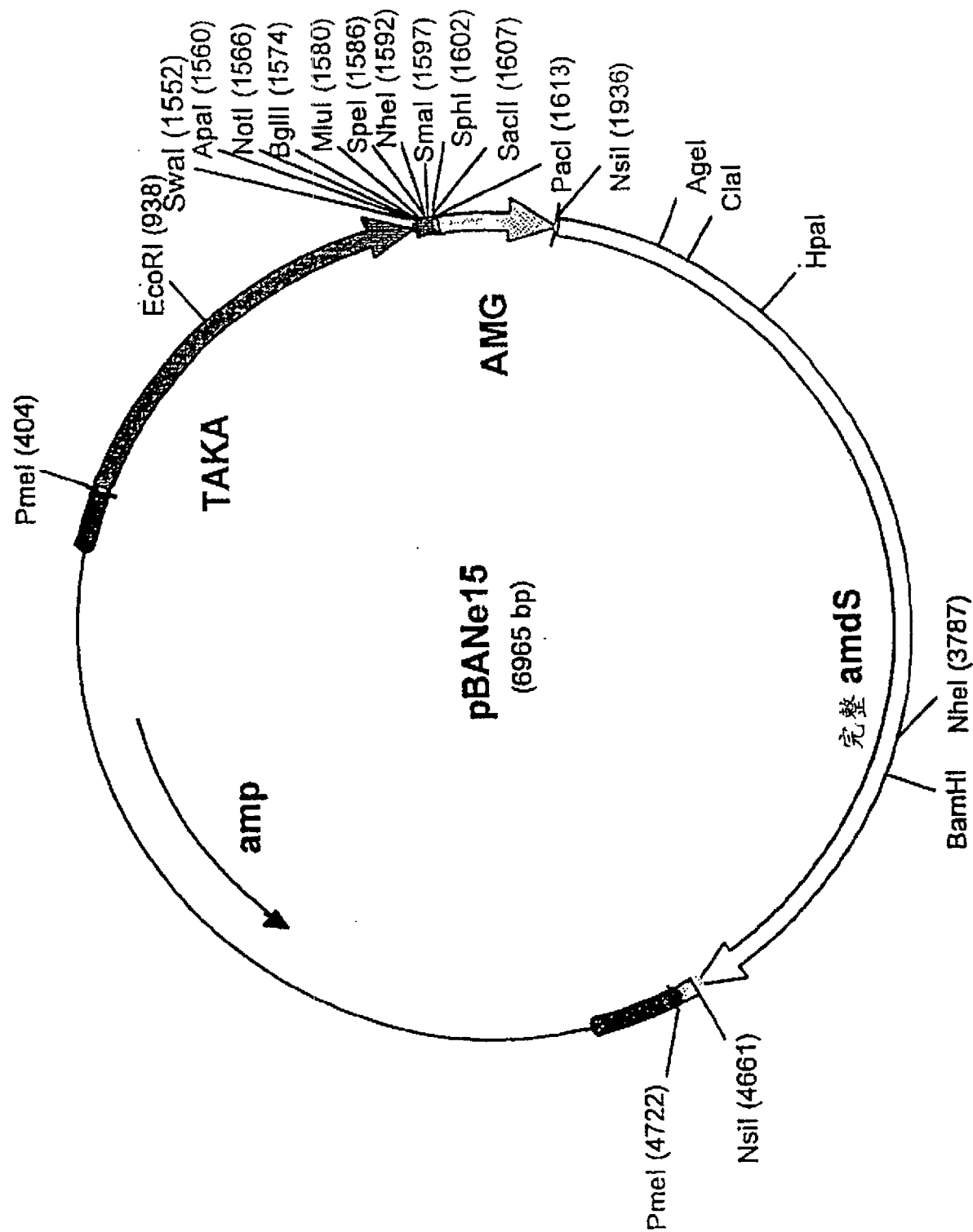
<220>
<223> 引物

<400> 22
gatttaaata tgcgttctgc atttatcttg 30

<210> 23
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

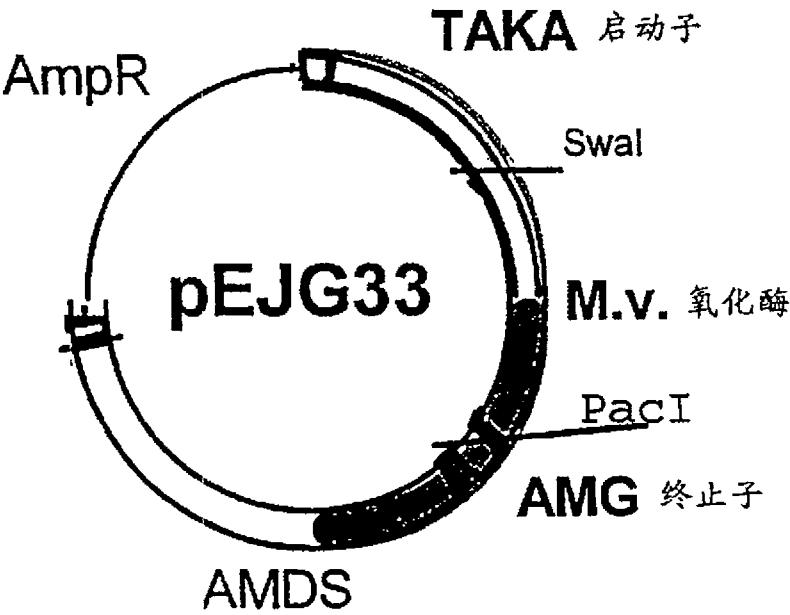
<220>
<223> 引物

<400> 23
gttaattaat tatttgacag ggcggacagc 30



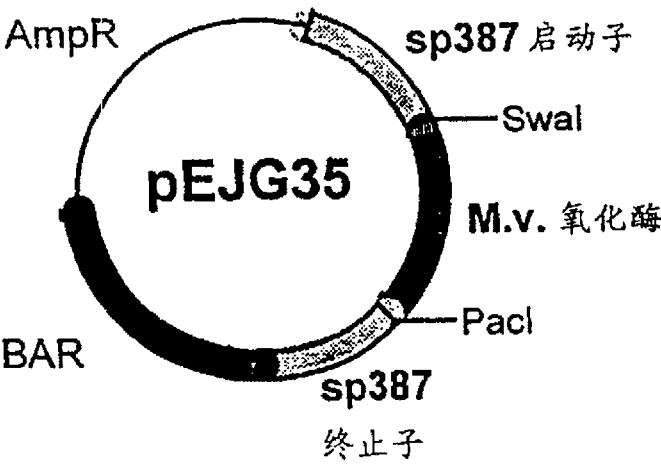
质粒 pBANE15

图 1



质粒 **pEJG33**

图 2



质粒 pEJG35

图 3