



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105472994 A

(43) 申请公布日 2016. 04. 06

(21) 申请号 201480045983. 9

(22) 申请日 2014. 06. 19

(30) 优先权数据

61/837, 755 2013. 06. 21 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2016. 02. 19

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2014/062925 2014. 06. 19

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/202711 EN 2014. 12. 24

(71) 申请人 杜邦营养生物科学有限公司

地址 丹麦哥本哈根

(72) 发明人 L·F·罗梅罗米兰 S·于

M·沃尔什 S·兰茨 S·阿伦特

S·达尔斯伽德

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 张朔 黄革生

(51) Int. Cl.

A23K 10/30(2016. 01)

A23K 10/37(2016. 01)

A23K 20/189(2016. 01)

权利要求书3页 说明书64页

序列表56页 附图18页

(54) 发明名称

制备饲料添加剂的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种制备饲料添加剂组合物的方法,所述方法包括:a. 用物理和/或化学和/或生物方法处理木质纤维素生物质;以及 b. 将来自步骤 a 的经物理和/或化学和/或生物方法处理过的木质纤维素生物质与至少一种饲用中糖基水解酶混合;c. 以及任选地进行包装。本发明还涉及一种饲料添加剂组合物或饲料成分,以及所述饲料添加剂组合物或饲料成分用于改善动物的生物物理特性的用途,所述饲料添加剂组合物或饲料成分包含与至少一种饲用中糖基水解酶组合的用物理和/或化学和/或生物方法处理过的木质纤维素生物质。

1. 一种制备饲料添加剂组合物的方法,所述方法包括:
 - a. 用物理和/或化学和/或生物方法预处理木质纤维素生物质;以及
 - b. 将来自步骤a的经物理和/或化学和/或生物方法预处理过的木质纤维素生物质与至少一种饲用中(in-feed)糖基水解酶混合;
 - c. 以及任选地进行包装。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述方法还包括给动物饲喂所述饲料添加剂组合物。
3. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,当向所述经预处理的生物质中添加所述饲用中酶时,所述经预处理的生物质包含至少70%的经处理的生物质糖单元(例如,可溶性单糖,如葡萄糖单元),所述生物质糖单元以可由所述饲用中酶在动物的胃肠道中释放的低聚物或聚合物形式存在。
4. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中在将经物理和/或化学和/或生物方法预处理过的木质纤维素生物质与至少一种饲用中糖基水解酶混合之前,使用至少一种预消化酶来进一步处理经物理和/或化学和/或生物方法预处理过的木质纤维素生物质。
5. 根据权利要求4所述的方法,其中当向已使用至少一种预消化酶进一步处理的所述经预处理的生物质中添加所述饲用中酶时,所述生物质包含至少70%的经处理的生物质糖单元(例如,可溶性单糖,如葡萄糖单元),所述生物质糖单元以可由所述饲用中酶在动物的胃肠道中释放的低聚物或聚合物形式存在。
6. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述饲用中酶在所述动物的胃肠道内起作用,或主要在所述动物的胃肠道内起作用。
7. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中在将所述饲料添加剂组合物饲喂给动物之前,所述饲用中酶在所述饲料添加剂组合物中和/或对所述木质纤维素生物质(任选地用至少一种预消化酶预处理)是非活性(或基本上非活性)的。
8. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中当经物理和/或化学和/或生物方法预处理过的木质纤维素生物质(任选地用至少一种预消化酶预处理)、所述饲用中酶或两者处于干燥状态或基本上干燥状态时,将所述饲用中酶与经物理和/或化学和/或生物方法预处理过的木质纤维素生物质(任选地用至少一种预消化酶预处理)混合。
9. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述方法包括,在将经物理和/或化学和/或生物方法预处理过的木质纤维素生物质(任选地用至少一种预消化酶预处理)与至少一种饲用中糖基水解酶混合之前、期间或之后(优选在混合之前),干燥所述生物质。
10. 根据权利要求9所述的方法,其中在添加所述至少一种饲用中糖基水解酶之前或之后,经物理和/或化学和/或生物方法预处理过的生物质(任选地用至少一种预消化酶预处理)的含水量小于15重量%。
11. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述至少一种饲用中糖基水解酶在与所述木质纤维素生物质混合之前被封装或以其它方式失活。
12. 根据权利要求11所述的方法,其中通过向动物饲喂所述至少一种饲用中糖基水解酶来激活所述至少一种饲用中糖基水解酶。
13. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中在临近向动物饲喂所述饲料添加剂组合物之前,将所述至少一种饲用中糖基水解酶与经物理和/或化学和/或生物方法预处理

过的木质纤维素生物质(任选地用至少一种预消化酶预处理)混合。

14.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶至少具有以下酶活性:纤维素酶活性和半纤维素酶活性。

15.根据权利要求14所述的方法,其中至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶至少具有以下酶活性:内切葡聚糖酶活性、内切木聚糖酶活性和 β -葡萄糖苷酶活性。

16.根据权利要求14或权利要求15所述的方法,其中所述至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶包括另外的酶,所述另外的酶具有以下活性中的一者或两者:外切葡萄糖苷酶活性和/或溶解性多糖单加氧酶活性。

17.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述木质纤维素生物质为任意纤维素或木质纤维素材料,例如农业残余物、生物能作物、工业固体废物、市政固体废物、来自造纸的淤渣、庭院废物、木材废料、林业废料以及它们的组合。

18.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述木质纤维素生物质选自玉米秸秆、小麦秸秆、玉米轴、甘蔗渣、柳枝稷、饲用高粱、稻秆、木屑、纸废弃物、粉碎树木获得的组分、树枝、根、叶和锯末。

19.一种饲料添加剂组合物,所述饲料添加剂组合物可通过根据权利要求1至18中任一项所述的方法获得(例如,通过所述方法获得)。

20.一种饲料添加剂组合物或饲料成分,所述饲料添加剂组合物或饲料成分包含与至少一种饲用中糖基水解酶组合的用物理和/或化学和/或生物方法预处理过的木质纤维素生物质(任选地用至少一种预消化酶预处理)。

21.一种饲料添加剂套装件,所述套装件包括第一容器、第二容器和共施用这两个容器的说明书,所述第一容器包含用物理和/或化学和/或生物方法预处理过的木质纤维素生物质(任选地用至少一种预消化酶预处理),所述第二容器包含至少一种饲用中糖基水解酶。

22.根据权利要求19至21中任一项所述的饲料添加剂组合物或饲料添加剂套装件,其中所述至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶至少具有以下酶活性:纤维素酶活性和半纤维素酶活性。

23.根据权利要求19至22中任一项所述的饲料添加剂组合物或饲料添加剂套装件,其中所述至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶至少具有以下酶活性:内切葡聚糖酶活性、内切木聚糖酶活性和 β -葡萄糖苷酶活性。

24.根据权利要求22或权利要求23所述的饲料添加剂组合物或饲料添加剂套装件,其中所述至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶还包括具有以下活性中的一者或两者的酶:外切葡萄糖苷酶活性和/或溶解性多糖单加氧酶活性。

25.一种饲料或饲料原料,所述饲料或饲料原料包含根据权利要求19至20或权利要求22至24中任一项所述的饲料添加剂组合物或饲料成分,或包含可通过根据权利要求1至18中任一项所述的方法获得(优选通过所述方法获得)的饲料添加剂组合物。

26.一种预混物,所述预混物包含根据权利要求19至20或权利要求22至24中任一项所述的饲料添加剂组合物或饲料成分或可通过根据权利要求1至18中任一项所述的方法获得(优选通过所述方法获得)的饲料添加剂组合物以及至少一种矿物质和/或至少一种维生素。

27.一种用于改善动物的生物物理特性的方法,所述方法包括将用物理和/或化学和/

或生物方法预处理过的木质纤维素生物质(任选地用至少一种预消化酶预处理)与饲用中糖基水解酶和任选的至少一种饲料组分和/或至少一种矿物质和/或至少一种维生素组合施用于受施用者。

28. 用物理和/或化学和/或生物方法预处理过的木质纤维素生物质(任选地用至少一种预消化酶预处理)与饲用中糖基水解酶组合用于改善动物的生物物理特性的用途。

29. 一种用于改善动物的生物物理特性的方法,所述方法包括将可通过根据权利要求1至18中任一项所述的方法获得(例如,通过所述方法获得)的饲料添加剂组合物或根据权利要求19至20或权利要求22至24中任一项所述的饲料添加剂组合物或根据权利要求25所述的饲料或根据权利要求26所述的预混物施用于受施用者。

30. 根据权利要求19至20或权利要求22至24中任一项所述的饲料添加剂组合物或饲料成分或可通过根据权利要求1至18中任一项所述的方法获得(优选通过所述方法获得)的饲料添加剂组合物或根据权利要求25所述的饲料或根据权利要求26所述的预混物用于改善动物的生物物理特性的用途。

31. 根据权利要求27至29中任一项所述的方法或用途,其中所述生物物理特性选自以下中的一种或多种:动物的性能、动物的生长性能、饲料转化率(FCR)、消化原材料的能力(例如,营养物质消化率,包括淀粉消化率、脂肪消化率、蛋白质消化率、纤维消化率)、氮保留率、屠体收率、生长速率、增重、体重、质量、饲料效率、体脂百分比、体脂分布、生长、蛋尺寸、蛋重量、蛋质量、产蛋率以及环境影响,例如肥料输出和/或氮排泄。

32. 根据权利要求1至18中任一项所述的方法,其中所述方法还包括使饲料组分与所述饲料添加剂组合物接触。

33. 一种制备饲料原料的方法,所述方法包括使饲料组分与根据权利要求19至20或权利要求22至24中任一项所述的饲料添加剂组合物或饲料成分或可通过根据权利要求1至28中任一项所述的方法获得(优选通过所述方法获得)的饲料添加剂组合物接触。

制备饲料添加剂的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及提高动物饲料(尤其是单胃动物的饲料)中木质纤维素生物质营养价值的方法和组合物。本发明涉及的方法和组合物可使木质纤维素生物质成为动物饲料中惯常使用的谷物淀粉的适宜替代品。

背景技术

[0002] 动物,例如单胃动物如猪和家禽,无法将纤维成分(例如农业废料)中的木质纤维素消化并吸收其中的葡萄糖,例如达到允许替代动物饮食中的谷物的程度。动物,尤其是单胃动物,并不具备消化纤维素需要的酶;即便具备此类酶,在肠内的停留时间也会成为纤维素转化为葡萄糖的限制因素。

[0003] 动物(尤其是单胃动物)的小肠直接吸收来自纤维素的葡萄糖,是有效利用纤维素能量替代谷物能量的途径。

[0004] 使动物能够利用较廉价纤维素材料中的碳水化合物作为能量源从而替代动物饲料中传统上使用的玉米和谷物,是实现下列目的的重要因素:例如,降低动物饲料的成本,腾出肥沃的土地种植其它非饲料作物。

发明内容

[0005] 根据第一方面,本发明提供了一种制备饲料添加剂组合物的方法,该方法包括:

[0006] a.用物理和/或化学和/或生物方法预处理木质纤维素生物质;以及

[0007] b.将来自步骤a的经物理和/或化学和/或生物方法预处理过的木质纤维素生物质与至少一种饲用中糖基水解酶混合;

[0008] c.以及任选地进行包装。

[0009] 在另一方面,提供了一种制备饲料添加剂组合物的方法,该方法包括:

[0010] a.用物理和/或化学方法预处理木质纤维素生物质;以及

[0011] b.将来自步骤a的经物理和/或化学方法预处理过的木质纤维素生物质与至少一种饲用中糖基水解酶混合;

[0012] c.以及任选地进行包装。

[0013] 在一方面,本发明的方法还可包括用至少一种预消化糖基水解酶处理的可选步骤。

[0014] 在又一方面,本发明提供了可采用本发明的方法获得(例如,通过所述方法获得)的饲料添加剂组合物。

[0015] 在另一方面,本发明提供了饲料添加剂组合物或饲料成分,其包含与至少一种饲用中糖基水解酶组合的用物理和/或化学和/或生物方法预处理过的木质纤维素生物质。

[0016] 本发明还提供了饲料添加剂套装件,该套装件包括第一容器、第二容器和共施用这两个容器的内容物的说明书,其中第一容器包含用物理和/或化学和/或生物方法预处理过的木质纤维素生物质,第二容器包含至少一种饲用中糖基水解酶。

[0017] 本发明还提供了饲料或饲料原料,其包含根据本发明的饲料添加剂组合物或饲料成分,或可采用本发明的方法获得(优选通过所述方法获得)的饲料添加剂组合物。

[0018] 本发明还提供了预混物,其包含根据本发明的饲料添加剂组合物或饲料成分或可采用本发明的方法获得(优选通过所述方法获得)的饲料添加剂组合物以及至少一种矿物质和/或至少一种维生素。

[0019] 在又一方面,本发明提供了一种用于改善动物的生物物理特性的方法,该方法包括将用物理和/或化学和/或生物方法预处理过的与饲用中糖基水解酶组合的木质纤维素生物质施用于受施用者。

[0020] 在一方面,本发明提供了一种改善动物的生物物理特性的方法,该方法包括将可采用本发明的方法获得(例如,通过所述方法获得)的饲料添加剂组合物或本发明的饲料添加剂组合物施用于受施用者。

[0021] 本发明还提供了用物理和/或化学和/或生物方法预处理过的木质纤维素生物质与饲用中糖基水解酶组合用于改善动物的生物物理特性的用途。

[0022] 在又一方面,本发明提供了根据本发明的饲料添加剂组合物或饲料成分或可采用本发明的方法获得(优选通过所述方法获得)的饲料添加剂组合物用于改善动物的生物物理特性的用途。

[0023] 在另一方面,本发明提供了一种制备饲料原料的方法,该方法包括将饲料组分与根据本发明的饲料添加剂组合物或饲料成分或可采用本发明的方法获得(优选通过所述方法获得)的饲料添加剂组合物混合。

附图说明

[0024] 图1示出鸡近端胃肠道(GIT)体外消化的过程。

[0025] 图2示出编码内切木聚糖酶(FoxXyn6)的核苷酸序列(SEQ ID No.1)。信号序列以黑体(大写体)示出。

[0026] 图3示出编码内切木聚糖酶(FoxXyn6)的核苷酸序列(SEQ ID No.2)。

[0027] 图4示出内切木聚糖酶(FoxXyn6)的多肽序列(SEQ ID No.3)。该序列为酶的活性形式(如,酶的成熟形式)。

[0028] 图5示出编码内切木聚糖酶(FoxXyn4)的核苷酸序列(SEQ ID No.4)。信号序列以黑体(大写体)示出。

[0029] 图6示出编码内切木聚糖酶(FoxXyn4)的核苷酸序列(SEQ ID No.5)。

[0030] 图7示出内切木聚糖酶(FoxXyn4)的多肽序列(SEQ ID No.6)。该序列为酶的活性形式(如,酶的成熟形式)。

[0031] 图8示出编码来自黑曲霉(*Aspergillus niger*)(CBS513.88)的内切葡聚糖酶(EG1)的核苷酸序列(SEQ ID No.7)。

[0032] 图9示出编码来自黑曲霉(CBS513.88)的内切葡聚糖酶(EG1)的多肽序列(SEQ ID No.8)。

[0033] 图10示出编码来自黑曲霉CBS513.88的内切葡聚糖酶(EG2)的核苷酸序列(SEQ ID No.9)。

[0034] 图11示出编码来自黑曲霉CBS513.88的内切葡聚糖酶(EG2)的多肽序列(SEQ ID

No.10)。

[0035] 图12示出编码内切木聚糖酶的核苷酸序列(SEQ ID No.11)。

[0036] 图13示出内切木聚糖酶的多肽序列(SEQ ID No.12)。

[0037] 图14示出编码来自黑曲霉CBS513.88的 β -葡萄糖苷酶的核苷酸序列(SEQ ID No.13)。

[0038] 图15示出编码来自黑曲霉CBS513.88的 β -葡萄糖苷酶的多肽序列(SEQ ID No.14)。

[0039] 图16示出编码来自黑曲霉CBS513.88的溶解性多糖单加氧酶的核苷酸序列(SEQ ID No.15)。

[0040] 图17示出编码来自黑曲霉CBS513.88的溶解性多糖单加氧酶的多肽序列(SEQ ID No.16)。

[0041] 图18示出编码来自黑曲霉(CBS513.88)的CHB1A的核苷酸序列(SEQ ID No.17)。

[0042] 图19示出编码来自黑曲霉(CBS513.88)的CHB1A的多肽序列(SEQ ID No.18)。

[0043] 图20示出编码来自黑曲霉(CBS513.88)的CHB1B的核苷酸序列(SEQ ID No.19)。

[0044] 图21示出编码来自黑曲霉(CBS513.88)的CHB1B的多肽序列(SEQ ID No.20)。

[0045] 图22示出编码来自里氏木霉(*Trichoderma reesei*)的CHB1的核苷酸序列(SEQ ID No.21)。

[0046] 图23示出编码来自里氏木霉的CHB1的多肽序列(SEQ ID No.22)。

[0047] 图24示出编码来自里氏木霉的CHB2的核苷酸序列(SEQ ID No.23)。

[0048] 图25示出编码来自里氏木霉的CHB2的多肽序列(SEQ ID No.24)。

[0049] 图26示出编码来自里氏木霉的内切葡聚糖酶(EG1)的核苷酸序列(SEQ ID No.25)。

[0050] 图27示出编码来自里氏木霉的内切葡聚糖酶(EG1)的多肽序列(SEQ ID No.26)。

[0051] 图28示出编码来自里氏木霉的内切葡聚糖酶(EG2)的核苷酸序列(SEQ ID No.27)。

[0052] 图29示出编码来自里氏木霉的内切葡聚糖酶(EG2)的多肽序列(SEQ ID No.28)。

[0053] 图30示出编码来自里氏木霉的内切葡聚糖酶(EG3)的核苷酸序列(SEQ ID No.29)。

[0054] 图31示出编码来自里氏木霉的内切葡聚糖酶(EG3)的多肽序列(SEQ ID No.30)。

[0055] 图32示出编码来自里氏木霉的溶解性多糖单加氧酶的核苷酸序列(SEQ ID No.31)。

[0056] 图33示出编码来自里氏木霉的溶解性多糖单加氧酶的多肽序列(SEQ ID No.32)。

[0057] 图34示出编码来自里氏木霉的内切木聚糖酶的核苷酸序列(SEQ ID No.33)。

[0058] 图35示出编码来自里氏木霉的内切木聚糖酶的多肽序列(SEQ ID No.34)。

[0059] 图36示出编码来自里氏木霉的 β -葡萄糖苷酶的核苷酸序列(SEQ ID No.35)。

[0060] 图37示出编码来自里氏木霉的 β -葡萄糖苷酶的多肽序列(SEQ ID No.36)。

具体实施方式

[0061] 本发明人惊讶地发现,将物理方法预处理、化学方法预处理、物理化学方法预处理、生物方法预处理(或它们的组合)木质纤维素生物质,与用至少一种饲用中酶的处理组

合起来,能出乎意料地显著提高木质纤维素生物质对动物(尤其是单胃动物)的营养价值,这是本发明的开创性发现。

[0062] 本发明意味着,可用木质纤维素生物质替代动物饲料中惯常使用的淀粉(如,来自谷物的淀粉)。这一做法有明显的好处。例如,利用本发明意味着,无需再按惯例在动物饲料应用中以较大比例使用谷物来供给动物营养。本发明能使制备动物饲料的成本降低。除此之外或作为另外一种选择,本发明减轻了长期以来由于人口规模增加和化石燃料供应限制而对供应链造成的资源压力。

[0063] 每年供给动物营养的谷物约有7.5亿吨。如本文所教导的,使用木质纤维素生物质替代这些谷物的一部分会使全人类受益匪浅。

[0064] 将谷物(如玉米)替换为较廉价的纤维素材料(如木质纤维素生物质)会深刻影响动物饲料市场,并/或在一段时间内增加人类食品和能源市场的稳定性。

[0065] 所要求保护的本发明与单胃动物和反刍动物皆有关联。例如,就反刍动物来说,可使用根据本发明的饲料补充剂、或通过本发明制备的饲料补充剂替代谷物,来集约化生产反刍动物的肉类和乳品,并/或增加系统效率。

[0066] 因此,本发明的一个优点是可提高木质纤维素生物质的营养价值。

[0067] 因此在一方面,本发明提供了一种制备饲料添加剂组合物的方法,该方法包括:

[0068] a. 用物理和/或化学和/或生物方法预处理木质纤维素生物质;以及

[0069] b. 将来自步骤a的预处理过的木质纤维素生物质与至少一种饲用中糖基水解酶混合;

[0070] c. 以及任选地进行包装。

[0071] 本发明的方法还可包括给动物饲喂饲料添加剂组合物。

[0072] 在一些实施例中,将用物理和/或化学和/或生物方法预处理过的木质纤维素生物质与至少一种饲用中糖基水解酶混合后,立即将经物理和/或化学和/或生物方法预处理过的木质纤维素生物质与至少一种饲用中糖基水解酶组合饲喂给动物。

[0073] 在其它实施例中,饲用中糖基水解酶在进入动物胃肠道(GIT)之前,一直保持对用物理和/或化学和/或生物方法预处理过的木质纤维素生物质非活性的形式。在此类情况下,当这种酶进入动物胃肠道时,酶便被激活(如,变得有活性)。

[0074] 本文使用的术语“饲用中”,意味着酶在动物胃肠道内起作用,优选主要在动物胃肠道内起作用,更优选只在动物胃肠道内起作用。换句话说,本文使用的术语“饲用中”,意味着在将饲料添加剂组合物饲喂给动物之前,酶在饲料添加剂组合物中和/或对木质纤维素生物质基本上是非活性(或非活性)的。

[0075] 术语“主要起作用”意味着,这种酶主要在进入胃肠道后,才对其底物起作用。换句话说,这种酶在进入胃肠道之前的酶活性水平(被定义成生物质材料溶解得到的低聚糖和单糖量)与酶进入胃肠道后(尤其是进入胃肠道中的小肠后)的酶活性水平相比,小于后一活性的20%,适宜情况是小于后一活性的10%,优选小于后一活性的5%。

[0076] 本文使用的术语“只起作用”意味着,这种酶在进入胃肠道之前是非活性的,一旦进入胃肠道便被激活。

[0077] 本文使用的术语“非活性”,是指酶没有活性。这可能意味着酶的活性受某种因素抑制;或者酶处于使其为非活性的环境中;或者酶在临近向动物饲喂之前才呈递给其底物,

导致没有足够的时间来活化。一旦酶进入动物胃肠道,其“非活性”状态在任何情况下都是可逆的。

[0078] 本文使用的术语“基本上非活性的”,意味着酶的活性比其进入胃肠道(如,动物小肠中)后的活性低。例如,“基本上非活性的”可能意味着,酶在饲料添加剂组合物中和/或对木质纤维素生物质的活性与酶在胃肠道内(尤其是胃肠道中的小肠内)的活性相比,小于后一活性的10%。

[0079] 可采用本领域技术人员已知的多种方法,使“饲用中”酶在饲料添加剂组合物中和/或对木质纤维素生物质保持非活性或基本上非活性的状态。

[0080] 仅举例来说,保持木质纤维素生物质和/或饲用中酶和/或饲料添加剂组合物的含水量(重量百分比)小于15%、优选小于10%,就足以确保饲用中酶在饲料添加剂组合物中和/或对木质纤维素生物质是非活性的或基本上非活性的。

[0081] 因此,在一个实施例中,在用物理和/或化学和/或生物方法预处理过的木质纤维素生物质和/或饲用中酶处于干燥状态或基本干燥状态的情况下,可将这种用物理和/或化学和/或生物方法预处理过的木质纤维素生物质和饲用中酶混合起来。

[0082] 在一个实施例中,在将木质纤维素生物质和饲用中酶混合之后,木质纤维素生物质和/或饲用中酶和/或饲料添加剂组合物(保持和/或存储)在干燥状态或基本干燥状态。

[0083] 本文使用的术语“干燥状态”,意味着木质纤维素生物质和/或饲用中酶和/或饲料添加剂组合物不含水,或只含极少量的水。换句话说,本文使用的术语“干燥状态”可能意味着,木质纤维素生物质和/或饲用中酶和/或饲料添加剂组合物的含水量(重量百分比)小于5%、优选小于1%。

[0084] 本文使用的术语“基本干燥状态”,意味着木质纤维素生物质和/或饲用中酶和/或饲料添加剂组合物只含极少量的水。换句话说,本文使用的术语“基本干燥状态”可能意味着,木质纤维素生物质和/或饲用中酶和/或饲料添加剂组合物的含水量(重量百分比)小于15%、优选小于10%。

[0085] 在一个实施例中,根据本发明的方法可包括,在将用物理和/或化学和/或生物方法预处理过的木质纤维素生物质与至少一种饲用中糖基水解酶混合之前、期间或之后(优选在混合之前),干燥该生物质。

[0086] 在另一个实施例中,在添加至少一种饲用中糖基水解酶之前或之后,用物理和/或化学和/或生物方法预处理过的木质纤维素生物质的含水量小于15重量%。

[0087] 在另一个实施例中,在添加至少一种饲用中糖基水解酶之前或之后,用物理和/或化学和/或生物方法预处理过的木质纤维素生物质的含水量小于10重量%。

[0088] 在另一个实施例中,在添加至少一种饲用中糖基水解酶之前或之后,用物理和/或化学和/或生物方法预处理过的木质纤维素生物质的含水量小于5重量%。

[0089] 在另一个实施例中,在添加至少一种饲用中糖基水解酶之前或之后,用物理和/或化学和/或生物方法预处理过的木质纤维素生物质的含水量小于1重量%。

[0090] 采用物理方式防止“饲用中”酶与其底物相互作用,就可使该酶在饲料添加剂组合物中和/或对木质纤维素生物质保持非活性或基本上非活性的状态。例如,在与木质纤维素生物质混合之前,可先封装饲用中酶。

[0091] 如果采用物理方式防止饲用中酶与木质纤维素生物质中的这种酶的底物相互作

用,那么,一旦该物理屏障在胃肠道中被移除,饲用中酶就可与其底物相互作用。

[0092] 仅举例来说,使封装好的酶经过动物胃部,便可移除封装。动物胃部的pH值非常低(酸性pH,如pH 2-4)。可利用此酸度激活封装好的酶。

[0093] 在一个实施例中,可用聚合物封装酶,所述聚合物例如甲壳素或壳聚糖、明胶、阿拉伯树胶或蜡。仅举例来说,该聚合物可以是明胶或阿拉伯树胶,Xue等人,Food Funct.2013, Apr 25;6Feb(epub);4(4)610-7(该文献以引用方式并入本文)中提出了这一点。或者,该聚合物可以是壳聚糖基水凝胶,Zhang等人,Biomacromolecules 2011,12, 2894-2901(该文献以引用方式并入本文)中提出了这一点。

[0094] 在一个实施例中,向动物饲喂至少一种饲用中糖基水解酶,就可激活这种酶。

[0095] 本文使用的术语“非活性”可能意味着,酶在临近向动物饲之前才呈递给其底物,导致酶进入动物胃肠道之前没有足够的时间来活化。

[0096] 在一个实施例中,在临近向动物饲喂该饲料添加剂组合物之前,可以将至少一种饲用中糖基水解酶与用物理和/或化学和/或生物方法预处理过的木质纤维素生物质混合。

[0097] 在一个优选的实施例中,保持饲料添加剂组合物处于干燥状态或基本干燥状态,由此使饲用中酶保持非活性或基本上非活性的状态。这一做法有多种额外的好处,原因是处理(例如,加工、包装、储存和运输)干燥组合物比处理非干燥制剂(如液体)容易。

[0098] 然而,也可设想将用物理和/或化学和/或生物方法预处理过的生物质和饲用中酶物理分离(如,放在独立的容器中)的套装件,将使最终用户(如农民)能够在临近向动物饲喂该混合物之前将用物理和/或化学和/或生物方法预处理过的生物质与饲用中酶混合。在这种情况下,用物理和/或化学和/或生物方法预处理过的生物质和/或饲用中酶可以是任何形式的制剂,例如固体、半固体或液体形式。

[0099] 本发明人首次发现,要是将用化学和/或物理和/或生物方法预处理过的木质纤维素生物质与饲用中酶组合,这种生物质就可能有足够的营养价值来用作饲料。令人惊讶的是,这种生物质在动物胃肠道内的相对较短时间段也使(一种或多种)饲用中酶有充分的时间来显著提高这类生物质的营养价值。

[0100] 优选的是,用物理和/或化学和/或生物方法预处理过的木质纤维素生物质包含至少70%、优选至少80%、更优选至少90%的在材料中以低聚物或聚合物形式存在的单糖。

[0101] 在本发明中,饲用中酶优选在动物胃肠道中,从用物理和/或化学和/或生物方法处理过(如,预处理过)的木质纤维素生物质产生和/或释放单糖(优选C6单糖)。

[0102] 适宜的是,饲用中酶所产生的单糖为可溶性单糖,例如C6糖,如葡萄糖、半乳糖、果糖或甘露糖中的一种或多种。

[0103] 因此优选的是,至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶饲用中酶具有一种或多种形成碳水化合物单体(优选C6单体)的活性。

[0104] 糖基水解酶是一组分布广泛的酶,其水解两个或更多个碳水化合物之间的糖苷键,或碳水化合物与非碳水化合物部分之间的糖苷键。这些酶中的许多种是微生物所产生的用于降解植物细胞壁中的多糖的酶。

[0105] 优选的是,至少一种饲用中酶为糖基水解酶。根据国际生物化学与分子生物学联合会(IUBMB)命名委员会(NC)的推荐(依据酶所催化反应的类型对酶进行命名和分类),将糖基水解酶归类为E.C.分类3.2.1.4;下列文献公布了推荐的酶命名和分类法:Enzyme

Nomenclature 1992[Academic Press, San Diego; 0-12-227165-3]的增刊1(1993)、增刊2(1994)、增刊3(1995)、增刊4(1997)和增刊5(分别公布于Eur. J. Biochem. 1994, 223, 1-5; Eur. J. Biochem. 1995, 232, 1-6; Eur. J. Biochem. 1996, 237, 1-5; Eur. J. Biochem. 1997, 250, 1-6和Eur. J. Biochem. 1999, 264, 610-650)。

[0106] 适宜的是,至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶可为多糖降解酶。

[0107] 优选的是,至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶水解 β -1,4-糖苷键。

[0108] 在一个实施例中,至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶可具有下列酶活性(或基本上由下列酶活性组成,或由下列酶活性组成):纤维素酶活性和/或半纤维素酶活性。

[0109] 在一个优选的实施例中,至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶可至少具有纤维素酶活性和半纤维素酶活性(或基本上由至少纤维素酶活性和半纤维素酶活性组成,或由至少纤维素酶活性和半纤维素酶活性组成)。

[0110] 在一个优选的实施例中,纤维素酶活性可包括至少下列酶活性(或基本上由至少下列酶活性组成,或由至少下列酶活性组成):内切葡聚糖酶活性和 β -葡萄糖苷酶活性。

[0111] 在一个优选的实施例中,半纤维素酶活性可包括至少内切木聚糖酶活性(或由至少内切木聚糖酶活性组成,或基本上由至少内切木聚糖酶活性组成)。

[0112] 适宜的是,具有纤维素酶活性和/或半纤维素酶活性中的至少一者或两者的至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶还可具有下列活性中的一者或两者:外切葡糖苷酶活性和/或溶解性多糖单加氧酶活性。

[0113] 在一个实施例中,至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶具有下列酶活性中的一者或多者(或基本上由下列酶活性中的一者或多者组成,或由下列酶活性中的一者或多者组成):内切葡聚糖酶活性、内切木聚糖酶活性或 β -葡萄糖苷酶活性。

[0114] 适宜的是,具有内切葡聚糖酶活性、内切木聚糖酶活性或 β -葡萄糖苷酶活性这些酶活性中的至少一者的至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶,还可具有外切葡糖苷酶活性和/或溶解性多糖单加氧酶活性这些活性中的一者或两者。

[0115] 在一个实施例中,至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶具有下列酶活性中的两者或更多者(如,适宜的是三者)(或基本上由下列酶活性中的两者或更多者组成,或由下列酶活性中的两者或更多者组成):内切葡聚糖酶活性、内切木聚糖酶活性或 β -葡萄糖苷酶活性。

[0116] 适宜的是,具有内切葡聚糖酶活性、内切木聚糖酶活性或 β -葡萄糖苷酶活性这些酶活性中的两者或更多者(如,适宜的是三者)的至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶,还可具有外切葡糖苷酶活性和/或溶解性多糖单加氧酶活性这些活性中的一者或两者。

[0117] 在一个实施例中,至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶是包含一种以上酶的酶组合物。所述包含一种以上酶的酶组合物优选具有至少一种纤维素酶和至少一种半纤维素酶。

[0118] 在另一个实施例中,所述包含一种以上酶的酶组合物优选具有下列酶中的至少一种:内切葡聚糖酶、内切木聚糖酶或 β -葡萄糖苷酶。

[0119] 在一个实施例中,这种酶组合物包含至少两种(适宜的是至少三种)酶。所述包含至少两种(适宜的是至少三种)酶的酶组合物优选具有以下酶中的至少两种(适宜的是至少三种):内切葡聚糖酶、内切木聚糖酶或 β -葡萄糖苷酶。

[0120] 适宜的是,这种酶组合物还可具有下列活性中的一者或两者:外切葡糖苷酶活性和/或溶解性多糖单加氧酶活性。

[0121] 在一个优选的实施例中,这种酶组合物可至少具有下列酶活性(或基本上由至少下列酶活性组成,或由至少下列酶活性组成):内切葡聚糖酶活性、内切木聚糖酶活性和 β -葡萄糖苷酶活性。

[0122] 在一个实施例中,至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶(或酶组合物)可用其酶活性来表征。

[0123] 在一个实施例中,本发明所用的至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶(或酶组合物)至少具有下列酶活性(或基本上由至少下列酶活性组成,或由至少下列酶活性组成):如通过“内切葡聚糖酶活性测定法”测得的内切葡聚糖酶活性,如使用“内切木聚糖酶活性测定法”测得的内切木聚糖酶活性,以及如使用“ β -葡萄糖苷酶活性测定法”测得的 β -葡萄糖苷酶活性。下面的表格和段落列出了存在于所述酶组合物中的这些活性的范围:

[0124]

	组合物中每种酶活性的以单位/克(U/g)计的活性范围
内切葡聚糖酶活性	500-4000 CMC U/g ¹
内切木聚糖酶活性	1500-6000 ABX U/g ²
β -葡萄糖苷酶活性	200-3500 pNPG U/g ³

[0125]

	组合物中每种酶活性的以单位/克(U/g)计的活性范围
内切葡聚糖酶活性	1000-3500CMC U/g ¹ (优选约2000-2600CMC U/g)
内切木聚糖酶活性	2000-6000ABX U/g ² (优选大于3000ABX U/g)
β -葡萄糖苷酶活性	300-3000pNPG U/g ³ (优选大于2000pNPG U/g)

[0126] ¹一个CMC活性单位在50℃及pH 4.8的条件下,在一分钟内释出1 μ mol还原糖(以葡萄糖当量表示)。

[0127] ²一个ABX单位被定义为在50℃及pH 5.3的条件下,每分钟产生1 μ mol木糖还原糖当量所需的酶量。

[0128] ³一个pNPG单位表示在50℃及pH 4.8的条件下,每分钟从对硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷释放1 μ mol硝基苯酚。

[0129] 在一个实施例中,本发明所用的至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶(或酶组合物)可具有约2000至2600CMC U/g的内切葡聚糖酶活性,超过约3000ABX U/g的内切木聚糖酶活性和超过2000pNPG U/g的 β -葡萄糖苷酶活性。

[0130] 适宜的是,本发明所用的至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶(或酶组合物)可具有如下活性(或基本上由如下活性组成,或由如下活性组成):至少1000CMC U/g内切葡聚糖酶活性(适宜的是至少1500CMC U/g活性,适宜的是至少2000CMC U/g活性),其中内切葡聚糖酶活性是使用“内切葡聚糖酶活性测定法”测得的。

[0131] 适宜的是,本发明所用的至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶(或酶组合物)可具有如下活性(或基本上由如下活性组成,或由如下活性组成):至少2000ABX U/g内切木聚糖

酶活性(适宜的是至少2500ABX U/g活性,适宜的是至少3000ABX U/g活性),其中内切木聚糖酶活性是使用“内切木聚糖酶活性测定法”测得的。

[0132] 适宜的是,本发明所用的至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶(或酶组合)可具有如下活性(或基本上由如下活性组成,或由如下活性组成):至少300pNPG U/g β -葡萄糖苷酶活性(适宜的是至少500pNPG U/g活性,适宜的是至少1000pNPG U/g活性,或适宜的是至少2000pNPG U/g活性),其中 β -葡萄糖苷酶活性是使用“ β -葡萄糖苷酶活性测定法”测得的。

[0133] 适宜的是,本发明所用的至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶(或酶组合)可具有如下活性(或基本上由如下活性组成,或由如下活性组成):至少1000CMC U/g内切葡聚糖酶活性(适宜的是至少1500CMC U/g活性,适宜的是至少2000CMC U/g活性),其中内切葡聚糖酶活性是使用“内切葡聚糖酶活性测定法”测得的;以及至少2000ABX U/g内切木聚糖酶活性(适宜的是至少2500ABX U/g活性,适宜的是至少3000ABX U/g活性),其中内切木聚糖酶活性是使用“内切木聚糖酶活性测定法”测得的;以及至少300pNPG U/g β -葡萄糖苷酶活性(适宜的是至少500pNPG U/g活性,适宜的是至少1000pNPG U/g活性,或适宜的是至少2000pNPG U/g活性),其中 β -葡萄糖苷酶活性是使用“ β -葡萄糖苷酶活性测定法”测得的。

[0134] 适宜的是,本发明所用的至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶(或酶组合)可具有如下活性(或基本上由如下活性组成,或由如下活性组成):约600至约4000CMC U/g内切葡聚糖酶活性(适宜的是至少约1000至约3000CMC U/g活性,适宜的是至少约1500至约2600CMC U/g活性),其中内切葡聚糖酶活性是使用“内切葡聚糖酶活性测定法”测得的。

[0135] 适宜的是,本发明所用的至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶(或酶组合)可具有如下活性(或基本上由如下活性组成,或由如下活性组成):约2000至约5000ABX U/g内切木聚糖酶活性(适宜的是至少约2500至约4000ABX U/g活性,适宜的是至少约3000至约4000ABX U/g活性),其中内切木聚糖酶活性是使用“内切木聚糖酶活性测定法”测得的。

[0136] 适宜的是,本发明所用的至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶(或酶组合)可具有如下活性(或基本上由如下活性组成,或由如下活性组成):约200至约4000pNPG U/g β -葡萄糖苷酶活性(适宜的是至少约300至约3000pNPG U/g活性,适宜的是至少约1000至约3000pNPG U/g活性,或适宜的是至少约2000至约3000pNPG U/g活性),其中 β -葡萄糖苷酶活性是使用“ β -葡萄糖苷酶活性测定法”测得的。

[0137] 适宜的是,本发明所用的至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶(或酶组合)可具有如下活性(或基本上由如下活性组成,或由如下活性组成):约600至约4000CMC U/g内切葡聚糖酶活性(适宜的是至少约1000至约3000CMC U/g活性,适宜的是至少约1500至约2600CMC U/g活性),其中内切葡聚糖酶活性是使用“内切葡聚糖酶活性测定法”测得的;以及约2000至约5000ABX U/g内切木聚糖酶活性(适宜的是至少约2500至约4000ABX U/g活性,适宜的是至少约3000至约4000ABX U/g活性),其中内切木聚糖酶活性是使用“内切木聚糖酶活性测定法”测得的;以及约200至约4000pNPG U/g β -葡萄糖苷酶活性(适宜的是至少约300至约3000pNPG U/g活性,适宜的是至少约1000至约3000pNPG U/g活性,或适宜的是至少约2000至约3000pNPG U/g活性),其中 β -葡萄糖苷酶活性是使用“ β -葡萄糖苷酶活性测定法”测得的。

[0138] 在一个实施例中,受权利要求保护的每种酶活性必须占本发明的至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶(或酶组合)的总酶活性的至少4%,优选至少5%,优选至少10%。

[0139] 内切葡聚糖酶可以是内切-1,4- β -D-葡聚糖酶。内切葡聚糖酶是催化纤维素、地衣聚糖和谷类 β -D-葡聚糖中的(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-糖苷键内切水解的酶。换句话讲,本文定义的内切葡聚糖酶活性是指将纤维素、地衣聚糖和谷类 β -D-葡聚糖中的(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-糖苷键内切水解的酶的活性。根据E.C.分类法,可将内切葡聚糖酶活性归类为E.C.3.2.1.4。内切葡聚糖酶的别名是 β -葡聚糖酶。

[0140] 本发明所用的至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶中使用的内切葡聚糖酶可为包含选自下列的一种或多种核苷酸序列(或由选自下列的一种或多种核苷酸序列组成,或基本上由选自下列的一种或多种核苷酸序列组成)的核酸所编码的一种或多种内切葡聚糖酶:SEQ ID No.29、SEQ ID No.27、SEQ ID No.25、SEQ ID No.9和SEQ ID No.7。

[0141] 本发明所用的至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶中使用的内切葡聚糖酶可为包含选自下列的一种或多种多肽序列(或由选自下列的一种或多种多肽序列组成,或基本上由选自下列的一种或多种多肽序列组成)的一种或多种内切葡聚糖酶:SEQ ID No.30、SEQ ID No.28、SEQ ID No.26、SEQ ID No.10和SEQ ID No.8。

[0142] “内切葡聚糖酶活性测定法”(CMC U/g)

[0143] 移取1mL 1%羧甲基纤维素钠盐(CMC)溶液(使用0.05M醋酸钠缓冲液配制),分别加入样品管和空白管中。将各管置于50℃水浴温育10分钟。每隔15秒移取1mL酶稀释液,加入各样品管。每次加入酶稀释液后摇匀样品管。10分钟后,按照与向各样品管添加酶相同的顺序和时间安排,加入3mL 1%3,5-二硝基水杨酸钠盐(DNS)。向样品空白管添加3mL DNS。添加DNS后,将各试管转移到不处于50℃水浴中的另一试管架上。将1mL经稀释的酶加入相应样品空白管中。为各管加盖,煮沸5分钟整。从100℃水浴中取出各管,在冰浴中放置10分钟。留在室温下10至15分钟。转移到3mL比色皿中。使用试剂空白将分光光度计调零,以去离子水为参比,在540nm处读取每个样品。该过程测定的酶活性是相对具有指定CMC单位的酶标准物的活性。

[0144] 一个CMC活性单位在50℃及pH 4.8的条件下,在一分钟内释出1 μ mol还原糖(以葡萄糖当量表示)。

[0145] 内切木聚糖酶活性可为内切-1,4- β -木聚糖酶活性。优选的是,内切木聚糖酶内切水解木聚糖中的(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-木糖苷键。优选的是,内切木聚糖酶被归类为E.C.3.2.1.8。

[0146] 本发明所用的至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶中使用的内切木聚糖酶可为包含选自下列的一种或多种核苷酸序列(或由选自下列的一种或多种核苷酸序列组成,或基本上由选自下列的一种或多种核苷酸序列组成)的核酸所编码的一种或多种内切木聚糖酶:SEQ ID No.33、SEQ ID No.11、SEQ ID No.5、SEQ ID No.4、SEQ ID No.2和SEQ ID No.1。

[0147] 本发明所用的至少一种饲用中糖基水解酶中使用的内切木聚糖酶可为包含选自下列的一种或多种多肽序列(或由选自下列的一种或多种多肽序列组成,或基本上由选自下列的一种或多种多肽序列组成)的一种或多种内切木聚糖酶:SEQ ID No.34、SEQ ID No.12、SEQ ID No.6和SEQ ID No.3。

[0148] “内切木聚糖酶活性测定法”(ABX U/g)

[0149] 移取1.8mL 1%桦木4-O-甲基葡萄糖醛酸木聚糖底物溶液,加入每根试管中。50℃温育10至15分钟,使底物溶液平衡。使用正位移移液管或等效设备移取0.2mL酶稀释液。涡旋

混匀。50℃温育每份样品5分钟整。添加3mL 1%3,5-二硝基水杨酸钠盐(DNS)溶液并混合。用盖子盖住各试管的顶部,防止蒸发。将试管放于沸水浴中,停留5分钟整。将各试管置于冰/水浴中冷却10分钟。室温温育试管10分钟。将试管内容物转移到比色皿中,以去离子水为参比,在540nm处测量。扣除相应酶空白的吸光度值,来校正背景色的吸光度。该测定法测量内切木聚糖酶作用于桦木木聚糖底物所释放还原糖的速率。使用DNS测量的还原糖释放速率与酶活性成正比。

[0150] 一个ABX单位被定义为在50℃及pH 5.3的条件下,每分钟产生1μmol木糖还原糖当量所需的酶量。

[0151] 本文定义的β-葡萄糖苷酶活性,为水解末端非还原性β-D-葡萄糖基残基并释出β-D-葡萄糖的活性。根据E.C.分类法,可将β-葡萄糖苷酶活性归类为E.C.3.2.1.21。

[0152] 本发明所用的至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶中使用的β-葡萄糖苷酶可为包含选自下列的一种或多种核苷酸序列(或由选自下列的一种或多种核苷酸序列组成,或基本上由选自下列的一种或多种核苷酸序列组成)的核酸所编码的一种或多种β-葡萄糖苷酶:SEQ ID No.35和SEQ ID No.13。

[0153] 本发明所用的至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶中使用的β-葡萄糖苷酶可为包含选自下列的一种或多种多肽序列(或由选自下列的一种或多种多肽序列组成,或基本上由选自下列的一种或多种多肽序列组成)的一种或多种β-葡萄糖苷酶:SEQ ID No.36和SEQ ID No.14。

[0154] “β-葡萄糖苷酶活性测定法”(pNPG U/g)

[0155] 移取1mL 3%硝基苯基-β-D-吡喃葡萄糖苷(pNPG)溶液(使用0.05M醋酸钠缓冲液配制),分别加入每份样品和对照的平行试管中。将各管置于50℃水浴中,停留5分钟。每隔15至30秒,将200μL对照或样品加入相应的平行管中。将200μL醋酸钠缓冲液加入试剂空白管中。加入样品后,涡旋各管。温育各管10分钟整。温育10分钟后,加入500μL 1M碳酸钠溶液,使反应停止。加入碳酸钠溶液后,涡旋各管,并将试管置于水浴外的试管架上。向各管添加10mL milli-Q水,涡旋混匀。使用试剂空白将分光光度计调零,在400nm处读取每个样品,由此测出4-硝基酚的浓度。

[0156] 一个pNPG单位表示在50℃及pH 4.8的条件下,每分钟从对硝基苯基-β-D-吡喃葡萄糖苷释放1μmol硝基苯酚。

[0157] 在一个实施例中,至少一种饲用中酶可另外具有下列一种或多种酶活性:外切葡萄糖苷酶活性或溶解性多糖单加氧酶活性。

[0158] 在一个实施例中,至少一种饲用中酶可另外包含另一种酶,这种酶包括(或具有)下列一种或多种酶活性:外切葡萄糖苷酶活性或溶解性多糖单加氧酶活性。

[0159] 在一个实施例中,本发明所用的至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶中使用的溶解性多糖单加氧酶可为以下文献中提出的溶解性多糖单加氧酶:Levasseur等人,Biotechnology for Biofuels 2013,6:41;Kittle等人,Biotechnology for Biofuels 2012,5:79;这些文献以引用方式并入本文。

[0160] 本发明所用的至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶中使用的溶解性多糖单加氧酶可为包含选自下列的一种或多种核苷酸序列(或由选自下列的一种或多种核苷酸序列组成,或基本上由选自下列的一种或多种核苷酸序列组成)的核酸所编码的一种或多种溶解

性多糖单加氧酶:SEQ ID No.31和SEQ ID No.15。

[0161] 本发明所用的至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶中使用的溶解性多糖单加氧酶可为包含选自下列的一种或多种多肽序列(或由选自下列的一种或多种多肽序列组成,或基本上由选自下列的一种或多种多肽序列组成)的一种或多种溶解性多糖单加氧酶:SEQ ID No.32和SEQ ID No.16。

[0162] 外切葡萄糖苷酶活性可被归类为E.C.3.2.1.74。外切葡萄糖苷酶水解(1→4)-β-D-葡聚糖中的(1→4)键,从而脱去连续的葡萄糖单元。

[0163] 在一些实施例中,本发明所用的至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶可具有纤维二糖水解酶活性(或基本上由纤维二糖水解酶活性组成,或由纤维二糖水解酶活性组成)。

[0164] 纤维二糖水解酶(CBH)活性可为CBH I类(CBH I)活性或CBH II类(CBH II)活性,或CBH I与CBH II的组合。适宜的是,纤维二糖水解酶可水解纤维素和纤维四糖中的(1→4)-β-D-糖苷键,从链的非还原末端释放纤维二糖。纤维二糖水解酶活性的另一个术语可为外切纤维二糖水解酶活性或纤维素1,4β-纤维二糖苷酶活性。根据E.C.分类法,可将纤维二糖水解酶II类活性归类为E.C.3.2.1.91。根据E.C.分类法,可将纤维二糖水解酶I类活性归类为E.C.3.2.1.176。

[0165] 本发明所用的至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶中使用的纤维二糖水解酶(CBH)可为包含选自下列的一种或多种核苷酸序列(或由选自下列的一种或多种核苷酸序列组成,或基本上由选自下列的一种或多种核苷酸序列组成)的核酸所编码的一种或多种纤维二糖水解酶:SEQ ID No.23、SEQ ID No.21、SEQ ID No.19和SEQ ID No.17。

[0166] 本发明所用的至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶中使用的纤维二糖水解酶(CBH)可为包含选自下列的一种或多种多肽序列(或由选自下列的一种或多种多肽序列组成,或基本上由选自下列的一种或多种多肽序列组成)的一种或多种纤维二糖水解酶:SEQ ID No.24、SEQ ID No.22、SEQ ID No.20和SEQ ID No.18。

[0167] 在一个实施例中,本发明所用的至少一种饲用中糖基水解酶能够水解结晶状态的木质纤维素生物质。

[0168] 适宜的是,本发明所用的至少一种饲用中糖基水解酶能够水解结晶状态的纤维素。

[0169] 仅举例来说,下列酶可能适合根据本发明使用。

[0170]

酶	公司	商品名
某些纤维素酶活性诸如内切葡聚糖酶活性和 β -葡萄糖苷酶活性), 以及某种半纤维素酶活性诸如内切木聚糖酶活性。	Danisco	Accellerase [®] Trio
β -葡萄糖苷酶	Danisco	Accellerase [®] BG [™]
内切葡聚糖酶、半纤维素酶 (包括内切木聚糖酶) 和 β -葡萄糖苷酶	Danisco	Accellerase [®] Duet [™]
内切葡聚糖酶、半纤维素酶 (包括内切木聚糖酶) 和 β -葡萄糖苷酶	Danisco	Accellerase 1500
具有内切葡聚糖酶活性和内切木聚糖酶活性的纤维素酶	Sigma	C1184—来自黑曲霉的纤维素酶
包括内切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶的纤维素酶	Novozyme (Sigma-Aldrich)	Celluclast [®]
β -葡萄糖苷酶	Novozyme	Novozyme 188
具有 β -葡萄糖苷酶和 GH61 活性的纤维素酶和半纤维素酶	Novozyme	Cellic CTec3
包括内切木聚糖酶和 β -木糖苷酶的半纤维素酶	Novozyme	Cellic HTec3
β -葡聚糖酶	ABVista	Econase [®] BG
木聚糖酶	ABVista	Econase [®] XT
内切木聚糖酶和 β -葡聚糖酶	Adisseo	Rovabio [™] Excel
内切木聚糖酶和 β -葡聚糖酶	BASF	Natugrain [®] TS/L
内切木聚糖酶和 β -葡聚糖酶	Danisco	AXTRA [®] XB
内切木聚糖酶和 β -葡聚糖酶	Danisco	Avizyme [®] 1110
内切木聚糖酶	Danisco	Danisco Xylanase [™] (参见 EP1222256, 该专利以引用方式并入本文)

[0171]

内切木聚糖酶和 β -葡聚糖酶	DSM	Bio-Feed Plus [™]
β -葡聚糖酶	DSM	Ronozyme [®] VP
内切木聚糖酶和 β -葡聚糖酶	DSM	Roxazyme [®] G2
β -葡聚糖酶	Huvepharma	Hostazym C [®]
β -葡聚糖酶、淀粉酶、蛋白酶和内切木聚糖酶	Kemin	Kemzyme W [™] (干燥)
β -葡聚糖酶、淀粉酶和内切木聚糖酶	Kemin	Kemzyme W [™] (液体)
α -半乳糖苷酶和 β -葡聚糖酶	Kerry Ingredients	Biogalactosidase BL
β -葡聚糖酶	Le Saffre	Safizyme G
β -葡聚糖酶	Lyven	Feedlyve AGL
内切-1,4- β -木聚糖酶	Danisco	Avizyme 1100
内切-1,4- β -木聚糖酶	Danisco	Axtra [®] XB
内切-1,4- β -木聚糖酶	Danisco	Axtra [®] XAP
内切-1,4- β -木聚糖酶	DSM	Biofeed Plus [™]

[0172] 在一个实施例中,至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶可为单种酶或多种酶的组合(例如酶混合物)。

[0173] 在一个优选的实施例中,至少一种饲用中糖基水解酶是酶混合物。

[0174] 优选的是,根据本发明的饲用中酶在动物胃肠道(GIT)内是稳定并有活性的。在一个实施例中,饲用中酶耐受胃蛋白酶。在一个实施例中,饲用中酶耐受胆汁盐。在一个实施例中,饲用中酶耐受低pH。在一个实施例中,饲用中酶可耐受制粒温度(70℃至95℃)。在一个实施例中,饲用中酶在37℃至40℃范围内有活性。在一个实施例中,饲用中酶在37℃至40℃范围内有活性。

[0175] 至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶活性的语境中所用的术语“基本上由……组成”或“由……组成”,意味着所述(一种或多种)饲用中糖基水解酶具有经表征的一种或多种活性,而不具有其它糖基水解酶活性并且/或者不具有其它能够消化木质纤维素生物质的酶活性。

[0176] 在一个实施例中,本文定义的每一种不同的酶活性优选由单独的蛋白质提供。换句话说讲,每种酶活性属于不同的酶蛋白。定义的酶活性优选地是蛋白质的主要(或唯一)活性。换句话说讲,定义的酶活性优选地不是蛋白质的副活性。

[0177] 生物质

[0178] 术语“木质纤维素”是指包含木质素和纤维素的组合物。木质纤维素材料也可包含半纤维素。

[0179] 术语“纤维素”是指包含纤维素和附加组分(包括半纤维素在内)的组合物。

[0180] 在一个实施例中,木质纤维素生物质为任一种纤维素或木质纤维素材料。术语“木质纤维素生物质”是指任一种木质纤维素材料,并包括含有纤维素的材料。木质纤维素生物质任选地还可包括半纤维素、木质素、淀粉、低聚糖和/或单糖。

[0181] 生物质也可包含附加组分,例如蛋白质、脂质、灰分和/或提取物。生物质可源自单一来源,或者生物质可包括源自一种以上来源的混合物;例如,生物质可包括玉米轴和玉米秸秆的混合物,或草和叶片的混合物。

[0182] 优选的是,木质纤维素生物质包含至少15%纤维素。

[0183] 在一个实施例中,木质纤维素生物质包含至少20%纤维素。

[0184] 木质纤维素生物质可为任一种纤维素或木质纤维素材料,例如农业残余物、生物能作物、工业固体废物、市政固体废物、来自造纸的淤渣、庭院废物、木材废料、林业废料和这些物质的组合。

[0185] 在一个实施例中,木质纤维素生物质可选自玉米轴、作物残余物如玉米皮、玉米秸秆、草、甜菜浆、小麦秸秆、小麦壳、燕麦秸秆、小麦次粉(wheat middlings)、小麦粉头(wheat shorts)、米糠、稻壳、小麦糠、燕麦壳、棕榈仁、柑橘渣、棉花、木质素、大麦秸秆、干草、稻秆、稻壳、柳枝稷、芒草、大米草、草芦、纸废弃物、甘蔗渣、高粱渣、饲用高粱、高粱秸秆、大豆秸秆、大豆、粉碎树木获得的组分、树枝、根、叶、木屑、锯末、灌木和灌木丛、蔬菜、水果、花。

[0186] 在一个实施例中,木质纤维素生物质可选自湿饲料饼、玉米纤维、玉米胚芽粕、玉米麸皮、玉米糝渣、玉米蛋白饲料、谷类面筋粉、小麦粉头、小麦次粉,基于(例如)玉米、小麦、高粱的干酒糟(DDG)和干酒糟可溶物(DDGS),或这些物质的组合。

[0187] 在另一个实施例中,木质纤维素生物质可选自玉米秸秆、小麦秸秆、玉米轴、甘蔗渣、柳枝稷、饲用高粱和稻秆。

[0188] 在一个实施例中,可用于本发明的生物质包括具有相对高碳水化合物值的生物质,这种生物质相对致密,并且/或者相对易于收集、运输、贮存和/或处理。

[0189] 在一个实施例中,木质纤维素生物质可包含少于50%淀粉,优选少于40%淀粉。

[0190] 在一个实施例中,木质纤维素生物质可包含少于30%淀粉,优选少于10%淀粉。

[0191] 在一个实施例中,木质纤维素生物质可包含少于3%淀粉。

[0192] 在一个实施例中,木质纤维素生物质可包含少于1%淀粉。

[0193] 适宜的是,木质纤维素生物质不包含淀粉。

[0194] 在一个实施例中,木质纤维素生物质不包含谷物。

[0195] 预处理

[0196] 在一个实施例中,采用本领域已知的任何预处理方法预处理木质纤维素生物质,这能够破坏木质纤维素生物质的致密结构,暴露纤维素纤维,并/或导致生物质结晶度(例如纤维素结晶度)下降,并/或增大酶活性的可及表面积。

[0197] 在过去几十年里,已开发出多种预处理方法。一般来讲,这些预处理可分为机械/物理预处理、物理化学预处理、化学预处理和生物预处理,或这些预处理的组合。各种预处理的概述可见于(例如)X Zhao,L Zhang,D Liu Review:Fundamentals of different pretreatments to increase the enzymatic digestibility of lignocelluloses, Biofuels,Bioprod.Bioref.6:561-579(2012),该文献的教导内容以引用方式并入本文。

[0198] 预处理可为本领域已知的任何处理,所述处理要么导致纤维素结晶度降低,如采用Segal的方法(Segal等人,“An Emprical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer”,Textile Research Journal,Oct.1959,Vol.29,No.10,786-794,该文献的教导内容以引用方式并入本文)测得;要么增大酶活性的可及表面积;或者同时实现这两种效果。

[0199] 在一个实施例中,所述预处理是降低木质纤维素生物质中纤维素的结晶度的预处理。

[0200] 在一个实施例中,所述预处理是在使用Segal方法(前述)测量时将木质纤维素生物质中纤维素的结晶度降低至少约20%的预处理。

[0201] 在一个实施例中,所述预处理是增大木质纤维素生物质中酶活性的可及表面积的预处理。

[0202] 在一个实施例中,所述预处理是将木质纤维素生物质中的可及表面积增大至少约20%、适宜地至少约30%、适宜地至少约40%的预处理。可及表面积可采用BET(Brunauer、Emmett和Teller)测定,Guo等人,Bioresource Technology 99(2008)6046-6053(该参考文献以引用方式并入本文)讲述了该测定法。

[0203] 采用Brunauer、Emmett和Teller(BET)分析来测量木质纤维素生物质的可用表面积,其中所述方法包括(i)称量0.5g干样品;(ii)使用室温(例如25℃)高纯氮气(99.999%)对样品脱气过夜;以及(iii)使用表面积分析仪(Quantachrome NOVA2000)执行BET分析。

[0204] 在一个实施例中,木质纤维素生物质可经受(或经受了)物理和/或化学和/或生物处理。该处理在本文中可称为物理和/或化学和/或生物方法预处理。

[0205] 在一个实施例中,根据本发明的物理和/或化学预处理可为物理处理或化学处理或物理化学处理。

[0206] 术语“物理和化学处理”与“物理化学处理”在本文中可互换使用。

[0207] 在一个实施例中,木质纤维素生物质可经受(或经受了)物理和/或化学预处理。

[0208] 在一个实施例中,木质纤维素生物质可经受(或经受了)物理预处理。

[0209] 在一个实施例中,木质纤维素生物质可经受(或经受了)化学预处理。

[0210] 在一个实施例中,木质纤维素生物质可经受(或经受了)物理化学预处理。

[0211] 物理和/或化学和/或生物处理可为本领域已知的任何物理和/或化学和/或生物处理(例如,预处理)。

[0212] 机械/物理预处理

[0213] 机械/物理预处理是指将切屑、磨削、干磨、湿磨、振动球磨、旋转球磨组合起来的机械粉碎过程。原料在切屑后的尺寸通常为10mm至30mm,在磨削或研磨后的尺寸通常为0.2mm至2mm,并且纤维素结晶度下降并且/或者可及表面积增大。用热水、酸或硫酸氢钠对生物质固体进行前期预处理以软化原料,可使研磨耗能更少。在本发明的一个实施例中,采用机械去结晶的方法预处理生物质。

[0214] 术语“物理预处理”与“机械预处理”在本文中可互换使用。

[0215] 物理化学预处理

[0216] 物理化学预处理将生物质组合物的化学改性与细胞壁结构的物理断裂组合起来。一种实用的物理化学预处理为蒸汽爆破。在这种预处理中,用高压饱和蒸汽(高压和高温)处理生物质,任选地包括酸、碱或其它化学品的添加;然后迅速降压,使材料经受爆炸性减压。

[0217] 在一个实施例中,物理和/或化学处理(例如,预处理)可为水热解或湿法氧化,并包括:用液态水和/或蒸汽提供的高压和/或高温,任选地包括酸、碱或其它化学品的添加。

[0218] 在一个实施例中,压力在300psi至600psi范围内,优选在350psi至550psi范围内,优选在400psi至500psi范围内。

[0219] 在一个实施例中,高温意味着温度在约100℃至300℃范围内,优选在约140℃至240℃范围内,例如在约170℃至200℃范围内。

[0220] 仅举例来说,预处理可为包括蒸汽爆破的物理处理。

[0221] 就纤维素结晶度来说,蒸汽爆破后,底物的结晶度指数(CrI)增大。Segal的文献(前述)中讲述了结晶度指数(CrI)。

[0222] 物理化学预处理的另一个例子是氨纤维爆破(AFEX),其中木质纤维素材料经液氨浸透,然后升温至约90℃。不希望被理论束缚,形成的氨气与生物质在压力下(例如17巴至20巴持续5分钟至10分钟)相互作用,然后迅速释放压力,这可能导致纤维素去结晶、半纤维素预水解和木质素结构改变以及/或者可及表面积增大。

[0223] AFEX预处理条件略微改变会导致形成不同的纤维素晶体结构,所以结晶度指数(CrI)可能受AFEX预处理条件影响。

[0224] 另一种实用的物理化学预处理方法是液态热水预处理,该预处理使用水作为媒介在压力下预处理生物质,提升压力的目的是使水在高温下仍保持液态。通常也将这种预处理称为水热解或水热预处理。这种预处理可溶解总生物质的约40%至60%,形成液态可溶性低聚糖,这些溶解的总生物质包括4%至22%纤维素和几乎全部半纤维素。因此,可观察到可及表面积增大。除此之外或作为另外一种选择,可观察到纤维素结晶度下降、纤维素

与木质素的缔合程度降低以及纤维素解聚,这些因素都有助于提升纤维素可及度。

[0225] 在一个实施例中,预处理可为包括水热解或水热处理的物理化学预处理。

[0226] 在一个实施例中,木质纤维素生物质为小麦秸秆,并且预处理包括使用水热处理。适宜的是,根据本发明的预处理可包括W02011/125056(IBICON)中提出的水热处理,该专利的教导内容以引用方式并入本文。

[0227] 辐射预处理涉及使用 γ 辐射、超声、电子束或微波预处理木质纤维素生物质的多种方法。辐射预处理还可与其它预处理搭配使用,以便进一步提高纤维素的可及性。不希望被理论束缚,由于纤维素、半纤维素和木质素在高辐射剂量下发生辐射降解,所以底物变得易碎。纤维素结晶度可能被 γ 辐射破坏到一定程度。微波预处理通常在有水、有机溶剂、碱或稀酸溶液的环境中进行。

[0228] 化学预处理

[0229] 化学预处理涉及在各种条件下使用不同化学品预处理生物质的多种方法。根据使用的化学品和预处理条件不同,这些预处理的机制有所不同。适宜的化学预处理方法的例子包括但绝不限于稀酸预处理、碱预处理、亚硫酸盐预处理、氧化预处理(例如湿法氧化)、纤维素溶剂预处理、氨渗滤(APR)和有机溶剂预处理。

[0230] 在一个实施例中,预处理可为包括使用酸或碱处理的化学处理。

[0231] 仅举例来说,物理和/或化学处理可为添加碱催化剂,或本领域已知的其它方法。

[0232] 在一个实施例中,木质纤维素生物质为玉米秸秆,并且物理和/或化学处理包括使用酸处理。

[0233] 在一个实施例中,预处理为稀酸预处理。例如,可将木质纤维素生物质材料与稀酸(通常为 H_2SO_4)和水混合以形成浆液,用蒸汽加热至所需温度(通常介于 160°C 和 220°C 之间),并且在一段停留时间后,闪蒸到大气压。

[0234] 在一个具体的实施例中,预处理可包括以下几个步骤:a)使用0.2% H_2SO_4 浸渍木质纤维素生物质(例如小麦秸秆),例如以浸泡方式处理;b)压制材料,使干物质含量介于40%至50%之间;以及c)用 190°C 蒸汽预处理10min。任选地压制所得浆液,滤除液体;并任选地清洗固体残余物两至三次,之后进行压制,使最终固体含量变为约40%至50%。

[0235] 在另一个具体的实施例中,预处理可包括以下几个步骤:a)用1%醋酸以浸泡方式浸渍木质纤维素生物质(例如小麦秸秆);b)压制材料,使干物质含量介于40%至50%之间;以及c)用 200°C 蒸汽预处理10min。任选地压制后续浆液,滤除液体;并任选地清洗固体残余物两至三次,之后进行压制,使最终固体含量变为约40%至50%。

[0236] 碱预处理可能涉及使用各种碱,例如 NaOH 、 KOH 、 CaOH_2 、氨水、过氧化物和石灰(利用 CaOH_2),来处理木质纤维素生物质,以对木质纤维素生物质进行预处理。不希望被理论束缚,据信在碱预处理期间,交联木聚糖半纤维素和木质素的分子间酯键发生皂化,从而导致生物质脱木质化。据文献记载,碱是用来溶胀纤维素并改变纤维素结晶多晶型物,从而影响纤维素消化率的合适试剂,其中纤维素结晶多晶型物改变表明结晶氢键网络改变。

[0237] 在一个实施例中,物理和/或化学处理可为包括使用碱(例如氨)处理的化学处理。

[0238] 在一个实施例中,预处理为无水氨预处理。

[0239] 在一个具体的实施例中,预处理可为无水氨预处理,包括以下步骤:a)将木质纤维素生物质材料(例如玉米秸秆)放入容器中,为使无水氨能更顺畅地渗透生物质材料,已施

压排空该容器;b)在140℃下,实施生物质材料与包含12%氨的水溶液的接触;c)氨预处理可持续最多25h,但也可可能在较短的时间(如15分钟)后就观察到葡萄糖和木糖的最佳释放;d)施加真空,除去额外的氨水溶液,得到最终固体含量为50%至60%的干物质。

[0240] 或者,物理化学处理可为WO 2006/110891、WO 2006/11899、WO 2006/11900和WO2006/110901(DuPont)中所述的使用氨(例如,稀氨)的预处理方法,这些文献的教导内容以引用方式并入本文。

[0241] 在一个实施例中,预处理过的生物质为用稀氨预处理过的玉米秸秆(DaCS)。

[0242] 在一个实施例中,预处理为苛性脱木质化。

[0243] 在一个实施例中,预处理可为苛性脱木质化预处理,包括以下步骤:1)在25℃至200℃之间且pH在9至11范围内的条件下,用0.5%至3%之间的亲核碱(例如氢氧化钠(NaOH)、氢氧化锂、氢氧化钾、氢氧化铯、氢氧化镁或它们的组合)处理生物质0.25h至20h;2)回收预处理过的生物质滤液,并使用去离子水清洗,除去任何过量的碱和溶解的副产物。

[0244] 在一个具体的实施例中,预处理可为苛性脱木质化预处理,包括以下步骤:1)在约121℃且pH在9至11范围内的条件下,用0.5%至3%之间的氢氧化钠(NaOH)处理生物质0.25h至1.5h;2)回收预处理过的生物质滤液,并使用去离子水清洗,除去任何过量的碱和溶解的副产物。

[0245] Xu等人(2011)Bioresources 6(1)707-720(该参考文献以引用方式并入本文)讲述了执行苛性脱木质化的一种方法。在一个实施例中,预处理过的生物质可为用前述Xu等人(2011)中提出的苛性脱木质化方法处理过的生物质。

[0246] 在一个实施例中,预处理过的生物质为苛性脱木质化玉米秸秆(DLcs)和/或苛性脱木质化柳枝稷(DLswg)。

[0247] 在一个实施例中,亚硫酸盐预处理或亚硫酸盐制浆方法包括在酸性条件下对生物质材料进行亚硫酸盐处理,随后用圆盘精制(disk refining)来机械性降低尺寸。亚硫酸盐预处理使得相当大一部分半纤维素被去除,纤维素聚合度降低,并使木质素磺化,增大了木质素亲水性。

[0248] 另一种化学预处理可为氧化预处理,是指使用氧化剂除去木质素和还原性物质的方法。常用于氧化脱木质化的氧化剂包括臭氧、过氧化氢、氧气和过乙酸。该处理任选地可与其它化学或水热处理相组合。根据使用的氧化剂和反应条件(例如pH)不同,木质素氧化降解的机制有所不同。就臭氧分解、湿法氧化和过酸脱木质化来说,芳香族和烯族结构降解涉及氧化剂最初的亲电攻击,然而在碱性H₂O₂预处理期间,这些结构被氢过氧化物阴离子的亲核攻击破坏。

[0249] 在一个实施例中,物理和/或化学处理为湿法氧化。

[0250] 在一个可用的实施例中,湿法氧化涉及用液态水和/或蒸汽提供的高压和/或高温,任选地包括酸、碱或其它化学品的添加。

[0251] 高压可能意味着压力在300psi至600psi范围内,优选在400psi至500psi范围内,例如大约450psi。

[0252] 高温可能意味着温度在约100℃至300℃范围内、优选在约180℃至200℃范围内保持5分钟至15分钟(Schmidt and Thomsen,1998,Bioresource Technol.64:139-151,该文献的教导内容以引用方式并入本文)。在一个实施例中,高温可能是约140℃至235℃。

[0253] 适宜的是,湿法爆破是湿法氧化预处理方法的修改形式,其中组合了如上所述的湿法氧化和蒸汽爆破。在湿法爆破中,在预处理期间在特定停留时间后引入氧化剂。然后通过闪蒸到大气压,来终止处理(WO 2006/032282,该专利以引用方式并入本文)。

[0254] 仅以举例的方式,在一个实施例中,物理和/或化学预处理可涉及用液态水提供的高压和/或高温,其中水以液态和蒸汽混合物存在,任选地包括酸、碱或其它化学品的添加。此实施例中的高压可处于50psi至300psi的范围内,合适地为100psi至200psi的范围内,例如为约150psi。此实施例中的高温可处于约100℃至300℃的范围内,合适地为约170℃至220℃,例如从约170℃至200℃。

[0255] 另一可用的化学预处理为有机溶剂预处理,其通过使用含水乙醇(例如40%至60%乙醇)在160–200℃下萃取30–60分钟而将纤维素生物质材料脱木质化。可添加硫酸作为催化剂。在有机溶剂预处理中,可去除大部分的半纤维素。

[0256] 纤维素溶剂型预处理也是基于纤维素溶剂(例如磷酸(CPA)和离子液体(IL))对木质纤维素生物质进行处理的化学预处理。

[0257] 生物预处理

[0258] 在一个实施例中,可对木质纤维素生物质进行生物处理(例如生物预处理)。此类生物处理可以是本领域已知的任何生物处理。

[0259] 在生物预处理中,可利用微生物对生物质进行预处理以提高剩余固体的酶消化率。所使用的微生物通常能够降解木质素和碳水化合物聚合物。例如,一些类型的真菌能够产生木质纤维素酶(这些酶能够协同降解植物细胞壁),而其它类型的真菌能够产生过氧化氢。

[0260] 生物预处理后,可及表面积可增加,从而提高纤维素的消化率。

[0261] 仅以举例的方式,生物预处理可包括使用白腐真菌进行处理。已知一些白腐真菌例如黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)、虫拟蜡菌(*Ceriporiopsis subvermispora*)、*Phlebia subserialis*和糙皮侧耳菌(*Pleurotus ostreatus*)能够有效代谢多种木质纤维素材料中的木质素(见于,例如Singh D和Chen S. “The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: conditions for the production of lignin-degrading enzymes.”, “Applied Microbiology Biotechnology”, 2008年,第81卷,第399–417页,该文献的教导内容以引用的方式并入本文)。

[0262] 在预处理之前(例如经物理和/或化学和/或生物方法预处理之前),也可使用本领域已知的方法对纤维素材料进行粒度减小、预浸泡、润湿、洗涤、或调理等处理。

[0263] 预消化酶

[0264] 在一个实施例中,在将木质纤维素生物质与至少一种饲用中糖基水解酶进行混合之前,经物理和/或化学和/或生物处理(例如预处理)的木质纤维素生物质可被至少一种与其混合的预消化糖基水解酶(本文中称为预消化酶)进一步处理(例如预处理),所述预消化酶利用纤维素作为(如用于水解的)底物。

[0265] 优选地,预消化酶与木质纤维素生物质一起温育。

[0266] 优选地,预消化酶与木质纤维素生物质一起温育最少3小时,优选至少4小时,优选至少6小时。

[0267] 优选地,预消化酶与木质纤维素生物质一起温育约3小时至约120小时,优选约4小

时至约90小时,优选约6小时至约48小时。

[0268] 本领域的技术人员将会理解,温育时间取决于诸如酶活性、酶浓度、温度等因素。温育期的目的是使酶降解生物质。本领域的技术人员可通过例如测定由水解产生的可溶性糖(例如单体糖单元,例如葡萄糖单元)的量而测定生物质降解量。

[0269] 在本发明中,(一种或多种)预消化酶优选地在生物质中生成低聚物。

[0270] 优选地,木质纤维素生物质与预消化酶一起温育一段合适的时间以确保与预消化酶温育后的生物质包含至少70%、合适地至少60%、合适地至少50%处理过的生物质糖单元(例如葡萄糖单元),该糖单元以可由饲用中酶在动物的胃肠道中释放的低聚物或聚合物(优选为低聚物)的形式存在。

[0271] 在一个实施例中,优选地,干燥木质纤维素生物质之前,将预消化酶加入木质纤维素生物质。优选地,在与至少一种饲用中糖基水解酶混合之前,经预消化酶处理的木质纤维素生物质先被干燥。

[0272] 在一个实施例中,优选地,在形成物理屏障(例如包封生物质)之前将预消化酶加入木质纤维素生物质中。在一个实施例中,将经预消化酶处理的木质纤维素生物质与所述至少一种饲用中酶物理地分开。

[0273] 优选地,根据本发明的预消化酶在动物胃肠道中是未激活的,并且/或者一进入动物胃肠道就立即失活(例如由胃内的pH引起失活)。

[0274] 适宜地,所述至少一种预消化酶可为超过一种酶、优选超过两种酶的混合物。

[0275] 在另一个实施例中,预消化酶可包括形成碳水化合物低聚物的酶、或基本上由形成碳水化合物低聚物的酶组成(或由形成碳水化合物低聚物的酶组成)。

[0276] 根据本发明的预消化酶可包括任何木质纤维素解聚活性(或基本上由任何木质纤维素解聚活性组成,或由任何木质纤维素解聚活性组成)。

[0277] 在一个实施例中,预消化酶可包括下列酶活性中的至少一者(或基本上由下列酶活性中的至少一者组成,或由下列酶活性中的至少一者组成):纤维素酶活性和半纤维素酶活性。在一个优选的实施例中,预消化酶可包括至少下列酶活性(或基本上由至少下列酶活性组成,或由至少下列酶活性组成):纤维素酶活性和半纤维素酶活性。

[0278] 在另一个实施例中,预消化酶可包括下列酶活性中的至少一者(或基本上由下列酶活性中的至少一者组成,或由下列酶活性中的至少一者组成):内切葡聚糖酶活性、内切木聚糖酶活性或 β -葡萄糖苷酶活性。在一个优选的实施例中,预消化酶可包括至少下列酶活性(或基本上由至少下列酶活性组成,或由至少下列酶活性组成):内切葡聚糖酶活性、内切木聚糖酶活性或 β -葡萄糖苷酶活性。

[0279] 在一些实施例中,预消化酶可进一步包括下列酶活性中的一者或两者(或基本上由下列酶活性中的一者或两者组成,或由下列酶活性中的一者或两者组成):内切葡聚糖酶活性和溶解性多糖单加氧酶活性。

[0280] 在一个实施例中,设想本发明的方法进一步包括将饲料组分与饲料添加剂组合物混合的步骤,从而例如得到一种饲料或饲料原料。

[0281] 本发明涉及通过将有效量的根据本发明的饲料添加剂组合物、或有效量的由本发明的方法制备的饲料添加剂组合物、或有效量的包括此类饲料添加剂组合物的饲料原料施用于动物,从而改善动物生物物理特性的用途和方法。

[0282] 本文所用的术语“生物物理特性”是指选自以下的组中的一者或多者：动物性能、动物生长性能、饲料转化率(FCR)、原材料消化能力(例如营养物质消化率,包括淀粉消化率、脂肪消化率、蛋白质消化率、纤维消化率)、氮保留率、屠体收率、生长速率、增重、体重、质量、饲料效率、体脂百分比、体脂分布、生长、蛋尺寸、蛋重量、蛋质量、产蛋率 and 环境影响,例如粪肥产量和/或氮排泄率。

[0283] 本文所用的术语“改善”是指相比于给动物饲喂未根据本发明处理的木质纤维素生物质而有所改善。

[0284] 在一个方面,本发明涉及通过将有效量的根据本发明的饲料添加剂组合物、或有效量的由本发明的方法制备的饲料添加剂组合物、或有效量的包括此类饲料添加剂组合物的饲料原料施用于动物,从而改善动物生物物理特性的方法,其中动物的生物物理特性与相等用量的未根据本发明处理的木质纤维素生物质相比有所改善。

[0285] 在一些实施例中,(一种或多种)饲用中酶的添加剂量可以在每吨预处理的生物质中添加大约2.5g至5kg活性蛋白的范围内,合适地为每吨预处理的生物质中添加大约5g至1kg活性蛋白。

[0286] 仅以举例的方式,假设每公吨(MT)饲料中添加5%至60%生物质,则每公吨饲料中活性蛋白为每公吨饲料0.125g至3kg。

[0287] 在一个实施例中,饲料中(一种或多种)饲用中酶的量可介于每公吨饲料中约0.125g至约3kg之间(合适地为每公吨饲料中约100g至约2.5kg之间,合适地为每公吨饲料中约500g至约2kg之间)。

[0288] 设想饲料原料中经处理的生物质含量能够是变化的。在一个实施例中,饲料中经处理的生物质含量为低于总饲料原料的90重量%、优选地为低于80重量%、合适地为低于70重量%、合适地为低于60重量%、合适地为低于50重量%、合适地为低于40重量%。优选地,饲料原料中经处理的生物质含量低于60重量%。

[0289] 在一个实施例中,饲料中经处理的生物质含量高于总饲料原料的30重量%。在一个实施例中,饲料中经处理的生物质含量优选地高于5重量%、优选地高于10重量%、优选地高于20重量%、优选地高于30重量%、优选地高于40重量%、合适地高于50重量%、合适地高于60重量%。在一个实施例中,饲料原料中经处理的生物质含量高于5重量%或10重量%。在一个实施例中,经处理的生物质可占总饲料原料的至少60重量%。

[0290] 在另一个实施例中,饲料中经处理的生物质含量在总饲料原料的约5重量%至70重量%的范围内,合适地在5重量%至60重量%的范围内,合适地在5重量%至50重量%的范围内,合适地在10重量%至40重量%的范围内。

[0291] 在另一个实施例中,饲料中经处理的生物质含量在10重量%至70重量%的范围内。

[0292] 在另一个实施例中,饲料中经处理的生物质含量在10重量%至40重量%的范围内。

[0293] 在一个实施例中,本文所用的“混合”包括任何混合方法,例如混合、合并、喷洒等。

[0294] 在一个实施例中,所述至少一种饲用中糖基水解酶在与经物理和/或化学以及/或者生物预处理的生物质混合之前,可为干性酶制剂(例如颗粒剂形式或位于载体上(例如小麦载体))。在另一个实施例中,所述至少一种饲用中糖基水解酶在与经物理和/或化学以

及/或者生物预处理的生物质混合之前,可为液体制剂。

[0295] 当酶在与经物理和/或化学和/或生物预处理的生物质混合之前为液体制剂时,可通过例如喷洒酶制剂或将生物质浸入酶制剂中来混合该酶。

[0296] 优选地,在将所述至少一种(或多种)饲用中酶与经物理和/或化学以及/或者生物预处理的生物质混合之时,生物质是干燥的并且/或者是固体。

[0297] (酶处理之前或之后的)经物理和/或化学以及/或者生物预处理的生物质可经研磨和/或制粉并且/或者形成粗粉。

[0298] 动物

[0299] 本文所用的术语“动物”是指要施用或已经施用根据本发明的饲料添加剂组合物或包括根据本发明的所述饲料添加剂组合物的饲料原料的动物。

[0300] 优选地,动物为哺乳动物、反刍动物、单胃动物、鱼或甲壳类动物,包括诸如牲畜或驯养动物(例如宠物)。

[0301] 在一个实施例中,“动物”为牲畜。

[0302] 本文所用的术语“牲畜”是指任何养殖动物。优选地,牲畜为以下动物中的一者或多者:奶牛或公牛(包括小牛)、猪(包括仔猪、生猪)、家禽(包括肉鸡、小鸡、蛋鸡和火鸡)、鸟、鱼(包括淡水鱼,例如鲑鱼、鳕鱼、鳟鱼和鲤鱼(例如锦鲤)和海鱼,例如黑鲈)、甲壳类动物(例如虾、贻贝和扇贝)、马(包括赛马)、绵羊(包括羔羊)。

[0303] 在另一个实施例中,“动物”为驯养动物或宠物或动物园环境中饲养的动物。

[0304] 本文所用的术语“驯养动物或宠物或动物园环境中饲养的动物”是指任何相关动物,包括犬科动物(如狗)、猫科动物(如猫)、啮齿类动物(如豚鼠、大鼠、小鼠)、鸟、鱼(包括淡水鱼和海鱼),和马。

[0305] 在一个实施例中,动物为单胃动物。在一个优选的实施例中,单胃动物可为家禽或猪(或它们的组合)。

[0306] 在另一个实施例中,动物为反刍动物。

[0307] 包装

[0308] 在一个实施例中,对根据本发明的饲料添加剂组合物和/或预混物和/或饲料或饲料原料进行包装。

[0309] 在一个优选的实施例中,饲料添加剂组合物和/或预混物和/或饲料或饲料原料包装在袋(例如纸袋)中。

[0310] 在一个可供选择的实施例中,可将饲料添加剂组合物和/或预混物和/或饲料或饲料原料密封于容器中。可使用任何合适的容器。

[0311] 饲料

[0312] 本发明的饲料添加剂组合物可用作饲料,或者可用于制备饲料。

[0313] 本文所用的术语“饲料”与“饲料原料”是同义的。

[0314] 饲料可为溶液或固体的形式,这取决于其用途和/或应用模式和/或施用模式。

[0315] 当本发明的组合物用作饲料或用于制备饲料(例如功能化饲料)时,该组合物可与如下一者或多者结合使用:营养上可接受的载体、营养上可接受的稀释剂、营养上可接受的辅料、营养上可接受的佐剂、营养活性成分。

[0316] 在一个优选的实施例中,本发明的饲料添加剂组合物与饲料组分混合形成饲料原

料。

[0317] 本文所用的术语“饲料组分”是指全部或部分饲料原料。部分饲料原料可指饲料原料的一种组成部分或饲料原料的超过一种组成部分,例如2种或3种或4种组成部分。在一个实施例中,术语“饲料组分”涵盖预混物或预混物组成部分。

[0318] 优选地,饲料为秣料或其预混物,配合饲料或其预混物。在一个实施例中,可根据本发明的饲料添加剂组合物与配合饲料、配合饲料组分进行混合,或将根据本发明的饲料添加剂组合物混入配合饲料的预混物或混入秣料、秣料组分、或秣料预混物。

[0319] 本文所用的术语“秣料”是指提供给动物的任何食物(而不是动物必须自己觅食)。秣料涵盖已被切碎的植物。

[0320] 术语“秣料”包括干草、秸秆、青贮饲料、压缩饲料和颗粒饲料、油和混合给养,也包括发芽谷物和豆类。

[0321] 秣料可得自选自以下的一种或多种植物:苜蓿(紫苜蓿)、大麦、百脉根、芸苔属、*Chau moellier*、羽衣甘蓝、油菜籽(卡诺拉)、芜菁甘蓝(瑞典甘蓝)、萝卜、三叶草、杂种三叶草、红三叶草、地下三叶草、白三叶草、草、燕麦草、羊茅草、绊根草、雀麦草、石南荒原草、草地早熟禾(来自自然混合的草原草地)、野茅、黑麦草、猫尾草、玉米(玉蜀黍)、谷子、燕麦、高粱、大豆、树(用作树干草的修剪下的树嫩枝)、小麦、和豆科植物。

[0322] 术语“配合饲料”是指为粗粉、粒料、坚果、饲料饼或碎屑形式的商用饲料。配合饲料可由多种原材料和添加剂混合而成。这些共混物可根据目标动物的特定需求进行配制。

[0323] 配合饲料可为提供所有日常所需的营养物质的完全饲料,提供部分给养(蛋白、能量)的浓缩物,或者仅提供附加微量营养素如矿物质和维生素的补充剂。

[0324] 用于配合饲料的主要成分是饲料谷物,其包括玉米、小麦、裸麦、玉蜀黍、大豆、高粱、燕麦、和大麦。

[0325] 适宜地,本文所指的预混物可为由微量成分诸如维生素、矿物质、化学防腐剂、抗生素、发酵产品、和其它必需成分组成的组合物。预混物通常为适合混入商业给养的组合物。

[0326] 本发明的任何饲料原料可包括一种或多种选自包含以下各项的组的饲料材料:a)谷类,例如小粒谷类(如小麦、大麦、裸麦、燕麦和它们的组合)和/或大粒谷类,如玉蜀黍或高粱;b)来自植物的副产物,诸如干酒糟可溶物(DDGS)、小麦糠、小麦次粉、小麦粉头、米糠、稻壳、燕麦壳、棕榈仁、柑橘渣、玉米纤维、玉米胚芽粗粉、玉米麸皮、玉米粉渣、玉米蛋白饲料、谷蛋白粗粉、小麦粉头、小麦次粉或它们的组合;c)从诸如大豆、向日葵、花生、羽扇豆、豌豆、蚕豆、棉花、卡诺拉、鱼肉粉、干燥血浆蛋白、肉骨粉、马铃薯蛋白、乳清粉、干椰肉、芝麻来源获得的蛋白;d)从植物和动物来源获得的油脂和脂肪;e)矿物质和维生素。

[0327] 本发明的饲料原料可包含至少30重量%、至少40重量%、至少50重量%或至少60重量%的玉米和豆粕、或玉米和全脂大豆、或小麦粗粉、或向日葵粗粉。

[0328] 除此之外或作为另外一种选择,本发明的饲料原料可包括至少一种高纤维饲料材料和/或至少一种高纤维饲料材料的至少一种副产物,以提供高纤维饲料原料。高纤维饲料材料的例子包括:小麦、大麦、裸麦、燕麦、来自植物(例如谷类)的副产物(诸如干酒糟可溶物(DDGS))、小麦糠、小麦次粉、小麦粉头、米糠、稻壳、燕麦壳、棕榈仁、柑橘渣、玉米纤维、玉米胚芽粗粉、玉米麸皮、玉米粉渣、玉米蛋白饲料、谷蛋白粗粉、小麦粉头、麦麸或它们的组

合。也可认为一些蛋白质来源富含纤维：例如从诸如向日葵、羽扇豆、蚕豆和棉花的来源获得的蛋白质。

[0329] 在本发明中，饲料可为以下一种或多种：配合饲料和预混物，包括粒料、坚果或(家畜)饲料饼；以下作物或作物残余物：玉米、大豆、高粱、燕麦、大麦、玉米秸秆、干椰肉、秸秆、谷壳、糖用甜菜废物；鱼粉；新割的草和其它饲用植物；肉骨粉；糖蜜；油饼和滤饼；低聚糖；保藏的饲用植物；干草和青贮饲料；海藻；完整的或者经压碎、研磨等处理过的种子和谷物；发芽的谷物和豆类；酵母提取物。

[0330] 本发明中的术语“饲料”在一些实施例中也涵盖宠物食品。宠物食品是旨在由宠物食用的植物或动物材料，例如狗粮或猫粮。宠物食品(例如狗粮或猫粮)可为干燥形式(例如粗磨狗粮)，或湿罐头形式。猫粮可包含氨基酸牛磺酸。

[0331] 本发明中的术语“饲料”在一些实施例中也涵盖鱼食。鱼食通常包含使养殖鱼保持良好健康状态所必需的宏量营养素、痕量元素和维生素。鱼食可以为薄片状、颗粒或片剂的形式。颗粒形式(其中一些会迅速下沉)通常用于饲喂较大的鱼或底层鱼类。一些鱼食也包含添加剂，例如 β -胡萝卜素或性激素，以人工提高观赏鱼的色泽。

[0332] 本发明中的术语“饲料”在一些实施例中也涵盖鸟食。鸟食包括用于喂鸟器和喂养宠物鸟的食物。鸟食通常包括多种种子，也可含有板油(牛脂或羊脂)。

[0333] 本文所用的术语“接触”指的是间接或直接本发明的组合物应用到产品(如饲料)中。可使用的应用方法的例子包括，但不限于，在包括饲料添加剂组合物的材料中处理产品、将饲料添加剂组合物与产品混合而直接应用、将饲料添加剂组合物喷洒到产品表面或将产品浸入饲料添加剂组合物制剂中。

[0334] 在一个实施例中，优选地将本发明的饲料添加剂组合物与产品(如饲料原料)进行混合。作为另外一种选择，饲料原料的乳液或原材料中可包括饲料添加剂组合物。

[0335] 对于一些应用，重要的是使组合物在待影响/待处理的产品表面之上或之处可供使用。这使得组合物赋予动物以下一种或多种有利的特性：生物物理特性，例如，其中生物物理特性选自以下一种或多种：动物性能、动物生长性能、饲料转化率(FCR)、原材料消化能力(例如营养物质消化率，包括淀粉消化率、脂肪消化率、蛋白质消化率、纤维消化率)、氮保留率、屠体收率、生长速率、增重、体重、质量、饲料效率、体脂百分比、体脂分布、生长、蛋尺寸、蛋重量、蛋质量、产蛋率和环境影响，例如粪肥产量和/或氮排泄率。

[0336] 可将本发明的饲料添加剂组合物和受控量的(一种或多种)酶散布、涂布和/或浸渍产品(例如饲料原料或饲料原料的原材料)。

[0337] 优选地，同时使用经物理和/或化学和/或生物处理的木质纤维素生物质以及至少一种饲用中糖基水解酶(如当它们同时存在于混合物中或当它们通过不同途径提供时)。在一个实施例中，同时应用经物理和/或化学和/或生物处理的木质纤维素生物质以及至少一种饲用中糖基水解酶。优选地，在递送到饲料原料或饲料原料的原材料之前，先将经物理和/或化学和/或生物处理的木质纤维素生物质以及至少一种饲用中糖基水解酶混合。

[0338] 优选地，本发明的饲料添加剂组合物对高达约70℃、高达约85℃或高达约95℃的热处理是热稳定的。可进行长达约1分钟、长达约5分钟、长达约10分钟、长达约30分钟、长达约60分钟的热处理。术语“热稳定”是指加热至特定温度前添加剂中存在/有效的酶组分的至少约75%在冷却至室温之后仍存在/有效。优选地，加热至特定温度前添加剂中存在且有

效的酶组分的至少约80%在冷却至室温之后仍存在且有效。

[0339] 在一个特别优选的实施例中,将饲料添加剂组合物均化,以制成粉末。

[0340] 在一个可供选择的优选实施例中,将饲料添加剂组合物配制成如W02007/044968中所述的颗粒剂(称为TPT颗粒剂),该文献以引用的方式并入本文。

[0341] 在另一个优选的实施例中,当将饲料添加剂组合物配制成颗粒剂时,颗粒剂包括涂覆在蛋白芯上的水合屏障盐。这类盐涂层的优势在于耐热性改善、贮存稳定性改善并且免于受到其它饲料添加剂对酶造成的不利影响。

[0342] 优选地,用于盐涂层的盐在20℃下具有大于0.25的水活度,或大于60%的恒定湿度。

[0343] 优选地,盐涂层包含 Na_2SO_4 。

[0344] 制备饲料添加剂组合物的方法也可包括将粉末制成粒料的进一步步骤。可将粉末与本领域已知的其它组分进行混合。可施力使粉末、或包括粉末的混合物强行通过模具,并将所得线料切割成适宜的不同长度的粒料。

[0345] 任选地,形成粒料之前,制粒步骤可包括蒸汽处理或调理阶段。可将包括粉末的混合物置于调理器中,例如带有蒸汽注射的搅拌器。在调理器中将混合物加热至特定温度,例如从60℃至100℃,典型的温度为70℃、80℃、85℃、90℃或95℃。停留时间可从数秒变化至数分钟甚至数小时。例如5秒、10秒、15秒、30秒、1分钟、2分钟、5分钟、10分钟、15分钟、30分钟和1小时。

[0346] 应当理解,本发明的饲料添加剂组合物适于加入至任何适宜的饲料材料中。

[0347] 本文所用的术语“饲料材料”是指由动物食用的基本饲料材料。还应当理解,饲料材料可能包括,例如至少一种或多种未加工的谷物和/或加工过的植物和/或动物材料(例如豆粕或骨粉)。

[0348] 本文所用的术语“饲料原料”是指已添加一种或多种饲料添加剂组合物的饲料材料。

[0349] 技术人员应当理解,不同动物需要不同的饲料原料,并且根据饲养动物的目的不同,即使同一种动物也可能需要不同的饲料原料。

[0350] 优选地,饲料原料可包括饲料材料,该饲料材料包括玉蜀黍或玉米、小麦、大麦、黑小麦、裸麦、稻、木薯、高粱、和/或前述各者的任意副产物,以及高蛋白组分,像豆粕、油菜籽粗粉、卡诺拉粗粉、棉花籽粗粉、葵花籽粗粉、动物副产物粗粉和它们的混合物。更优选地,饲料原料可包括动物脂肪和/或植物油。

[0351] 任选地,饲料原料也可包括附加的矿物质,例如,钙和/或附加的维生素。

[0352] 优选地,饲料原料为玉米豆粕混合物。

[0353] 在另一个方面,提供了制备饲料原料的方法。饲料原料通常在饲料加工厂中制备,在饲料加工厂中首先将原材料研磨至合适粒径大小,然后将研磨后的原材料与合适的添加剂混合。接下来,可将饲料原料制成糊状或粒状,后者通常涉及这样的方法,通过该方法将温度升高至目标水平,然后使饲料通过模具从而制备出特定大小的粒料。使粒料冷却。随后可加入液体添加剂(例如脂肪和酶)。制备饲料原料也可涉及额外的步骤,该步骤包括制粒之前的挤出或膨化,尤其是通过至少可包括使用蒸汽的适宜技术进行的挤出或膨化。

[0354] 饲料原料可为饲喂单胃动物的饲料原料,诸如家禽(例如肉鸡、蛋鸡、肉种鸡、火

鸡、鸭子、鹅、水禽)、生猪(所有年龄段)、宠物(例如狗、猫)或鱼,优选地,饲料原料为家禽饲料原料。

[0355] 仅举例来说,鸡(如肉鸡)的饲料原料在例如下表给出的阶段中可由下表列出的一种或多种成分(%)组成:

[0356]	成分	育雏(%)	育成(%)
	玉蜀黍	46.2	46.7
[0357]	小麦次粉	6.7	10.0
	玉蜀黍干酒糟可溶物	7.0	7.0
	含 48%粗蛋白的豆粕	32.8	26.2
	动物/植物脂肪共混物	3.0	5.8
	L-赖氨酸盐酸盐	0.3	0.3
	DL-甲硫氨酸	0.3	0.3
	L-苏氨酸	0.1	0.1
	盐	0.3	0.4
	石灰石	1.1	1.1
	磷酸二钙	1.2	1.2
	家禽维生素和微量矿物质	0.3	0.3

[0358] 仅举例来说,鸡(如肉鸡)的饮食标准可如下表所示:

[0359]

饮食标准		
粗蛋白(%)	23.00	20.40
家禽代谢能(kcal/kg)	2950	3100
钙(%)	0.85	0.85
可利用磷(%)	0.38	0.38
钠(%)	0.18	0.19
可消化赖氨酸(%)	1.21	1.07
可消化甲硫氨酸(%)	0.62	0.57
可消化甲硫氨酸+半胱氨酸(%)	0.86	0.78
可消化苏氨酸(%)	0.76	0.68

[0360] 仅举例来说,产蛋鸡的饲料原料在例如下表给出的阶段中可由下表列出的一种或多种成分(%)组成:

[0361]	成分	产蛋期(%)
	玉蜀黍	10.0
	小麦	53.6
	玉蜀黍干酒糟可溶物	5.0
	含48%粗蛋白的豆粕	14.9
	小麦次粉	3.0
	大豆油	1.8
	L-赖氨酸盐酸盐	0.2
	DL-甲硫氨酸	0.2
	L-苏氨酸	0.1
	盐	0.3
[0362]	磷酸二钙	1.6
	石灰石	8.9
	家禽维生素和微量矿物质	0.6

[0363] 仅举例来说,蛋鸡的饮食标准可如下表所示:

[0364]

饮食标准	
粗蛋白(%)	16.10
家禽代谢能(kcal/kg)	2700
赖氨酸(%)	0.85
甲硫氨酸(%)	0.42
甲硫氨酸+半胱氨酸(%)	0.71
苏氨酸(%)	0.60
钙(%)	3.85
可利用磷(%)	0.42
钠(%)	0.16

[0365] 仅举例来说,火鸡的饲料原料在例如下表给出的阶段中可由下表列出的一种或多种成分(%)组成:

[0366]

成分	阶段1(%)	阶段2(%)	阶段3(%)	阶段4(%)
小麦	33.6	42.3	52.4	61.6
玉蜀黍干酒糟可溶物	7.0	7.0	7.0	7.0
含48%粗蛋白的豆粕	44.6	36.6	27.2	19.2
菜籽粕	4.0	4.0	4.0	4.0
大豆油	4.4	4.2	3.9	3.6
L-赖氨酸盐酸盐	0.5	0.5	0.4	0.4
DL-甲硫氨酸	0.4	0.4	0.3	0.2
L-苏氨酸	0.2	0.2	0.1	0.1
盐	0.3	0.3	0.3	0.3

石灰石	1.0	1.1	1.1	1.0
磷酸二钙	3.5	3.0	2.7	2.0
家禽维生素和微量矿物质	0.4	0.4	0.4	0.4

[0367] 仅举例来说,火鸡的饮食标准可如下表所示:

[0368]	饮食标准				
	粗蛋白(%)	29.35	26.37	22.93	20.00
	家禽代谢能(kcal/kg)	2.850	2.900	2.950	3.001
	钙(%)	1.43	1.33	1.22	1.02
	可利用磷(%)	0.80	0.71	0.65	0.53
[0369]	钠(%)	0.16	0.17	0.17	0.17
	可消化赖氨酸(%)	1.77	1.53	1.27	1.04
	可消化甲硫氨酸(%)	0.79	0.71	0.62	0.48
	可消化甲硫氨酸+半胱氨酸(%)	1.12	1.02	0.90	0.74
	可消化苏氨酸(%)	1.03	0.89	0.73	0.59

[0370] 仅举例来说,仔猪的饲料原料在例如下表给出的阶段中可由下表列出的一种或多种成分(%)组成:

[0371]

成分	阶段1(%)	阶段2(%)
玉蜀黍	20.0	7.0
小麦	25.9	46.6
裸麦	4.0	10.0
小麦次粉	4.0	4.0
玉蜀黍干酒糟可溶物	6.0	8.0
含48%粗蛋白的豆粕	25.7	19.9
乳清粉	10.0	0.0
大豆油	1.0	0.7
L-赖氨酸盐酸盐	0.4	0.5
DL-甲硫氨酸	0.2	0.2
L-苏氨酸	0.1	0.2
L-色氨酸	0.03	0.04
石灰石	0.6	0.7
磷酸二钙	1.6	1.6
生猪维生素和微量矿物质	0.2	0.2
盐	0.2	0.4

[0372] 仅举例来说,仔猪的饮食标准可如下表所示:

[0373]	饮食标准		
	粗蛋白(%)	21.50	20.00
	生猪消化能(kcal/kg)	3380	3320
	生猪净能(kcal/kg)	2270	2230
	钙(%)	0.80	0.75
	可消化磷(%)	0.40	0.35

[0374]	钠(%)	0.20	0.20
	可消化赖氨酸(%)	1.23	1.14
	可消化甲硫氨酸(%)	0.49	0.44
	可消化甲硫氨酸+半胱氨酸(%)	0.74	0.68
	可消化苏氨酸(%)	0.80	0.74

[0375] 仅举例来说,生长猪/育肥猪的饲料原料在例如下表给出的阶段中可由下表列出的一种或多种成分(%)组成:

[0376]

成分	生长/育肥(%)
玉蜀黍	27.5
含48%粗蛋白的豆粕	15.4
玉蜀黍干酒糟可溶物	20.0
小麦糠	11.1
米糠	12.0
芥花籽粗粉	10.0
石灰石	1.6
磷酸二钙	0.01
盐	0.4
生猪维生素和微量矿物质	0.3
赖氨酸盐酸盐	0.2
植物油	0.5

[0377] 仅举例来说,生长猪/育肥猪的饮食标准可如下表所示:

[0378]

饮食标准	
粗蛋白(%)	22.60
生猪代谢能(kcal/kg)	3030
钙(%)	0.75
可利用磷(%)	0.29
可消化赖氨酸(%)	1.01
可消化甲硫氨酸+半胱氨酸(%)	0.73
可消化苏氨酸(%)	0.66

[0379] 形式

[0380] 可以任何适宜的形式使用本发明的饲料添加剂组合物和其它组分和/或包括该饲

料添加剂组合物和其它组分的饲料原料。

[0381] 可以固体或液体制剂的形式或它们的替代形式使用本发明的饲料添加剂组合物。固体制剂的例子包括可湿润的、喷雾干燥或冷冻干燥的粉末、糊剂、大丸剂、胶囊、粒剂、片剂、粉剂和颗粒剂。液体制剂的例子包括,但不限于水性、有机或水性有机溶液、悬浮液和乳液。

[0382] 在一些应用中,本发明的饲料添加剂组合物可与饲料混合,或施用于饮水中。

[0383] 针对速释型、迟释型、调释型、缓释型、脉冲释放型或控释型应用的形式的适宜例子包括粉末、糊剂、大丸剂、粒剂、片剂、丸剂、胶囊、珠剂、溶液或悬浮液中的一种或多种,且可包含调味剂或染色剂。

[0384] 举例来说,如果本发明的组合物以固体形式(例如粒料形式)使用,该组合物也可包含以下一者或多者:赋形剂,例如微晶纤维素、乳糖、柠檬酸钠、碳酸钙、磷酸二氢钙和甘氨酸;崩解剂,例如淀粉(优选地为玉米、马铃薯或木薯淀粉)、羧基乙酸淀粉钠、交联羧甲基纤维素钠和某些复杂的硅酸盐;造粒粘结剂,例如聚乙烯吡咯烷酮、羟丙基甲基纤维素(HPMC)、羟丙基纤维素(HPC)、蔗糖、明胶和阿拉伯胶;润滑剂,例如硬脂酸镁、硬脂酸、甘油二十二烷酸酯和滑石粉。

[0385] 制备上述形式所用的营养上可接受的载体的例子包括,例如水、盐溶液、醇、硅树脂、蜡、凡士林、植物油、聚乙二醇、丙二醇、脂质体、糖、明胶、乳糖、直链淀粉、硬脂酸镁、滑石粉、表面活性剂、硅酸、粘性石蜡、芳香油、单脂肪酸甘油酯和脂肪酸甘油二酯、石油醚脂肪酸酯、羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮等等。

[0386] 上述形式优选的赋形剂包括乳糖(lactose)、淀粉、纤维素、乳糖(milk sugar)、或高分子量聚乙二醇。

[0387] 对于水悬浮液和/或酞剂,可将本发明的组合物与不同的甜味剂和调味剂、色素或染料进行组合,与乳化剂和/或悬浮剂进行组合,以及与稀释剂(例如水、丙二醇和甘油、和它们的组合)进行组合。

[0388] 与其它组分组合

[0389] 本发明的饲料添加剂组合物、或饲料成分、或饲料或饲料原料、或预混物可与其它组分组合使用。

[0390] 将本发明的饲料添加剂组合物、或饲料成分、或饲料或饲料原料、或预混物与适于动物食用的另一种组分相组合能够为消费者提供医疗或生理机能益处。

[0391] 在一个实施例中,“另一种组分”可为一种或多种酶。

[0392] 本发明所用的合适的附加酶可为选自以下酶类的一种或多种酶:内切葡聚糖酶(E.C.3.2.1.4)、纤维二糖水解酶(E.C.3.2.1.91)、 β -葡萄糖苷酶(E.C.3.2.1.21)、纤维素酶(E.C.3.2.1.74)、地衣多糖酶(E.C.3.1.1.73)、脂肪酶(E.C.3.1.1.3)、脂质酰基转移酶(通常被归类为E.C.2.3.1.x)、磷脂酶(E.C.3.1.1.4、E.C.3.1.1.32或E.C.3.1.1.5)、植酸酶(例如6-植酸酶(E.C.3.1.3.26)或3-植酸酶(E.C.3.1.3.8))、 α -淀粉酶(E.C.3.2.1.1)、木聚糖酶(E.C.3.2.1.8、E.C.3.2.1.32、E.C.3.2.1.37、E.C.3.1.1.72、E.C.3.1.1.73)、葡糖淀粉酶(E.C.3.2.1.3)、蛋白酶(例如枯草杆菌蛋白酶(E.C.3.4.21.62)或枯草芽孢杆菌中性蛋白酶(E.C.3.4.24.28)或碱性丝氨酸蛋白酶(E.C.3.4.21.x)或角蛋白酶(E.C.3.4.x.x))和/或甘露聚糖酶(例如 β -甘露聚糖酶(E.C.3.2.1.78))。

[0393] 在一个实施例中(尤其是饲料应用的实施例),其它组分可为选自以下酶类的一种或多种酶:木聚糖酶(E.C.3.2.1.8、E.C.3.2.1.32、E.C.3.2.1.37、E.C.3.1.1.72、E.C.3.1.1.73)、淀粉酶(包括 α -淀粉酶(E.C.3.2.1.1)、G4-形成淀粉酶(E.C.3.2.1.60)、 β -淀粉酶(E.C.3.2.1.2)和 γ -淀粉酶(E.C.3.2.1.3))、和/或蛋白酶(例如枯草杆菌蛋白酶(E.C.3.4.21.62)或枯草芽孢杆菌中性蛋白酶(E.C.3.4.24.28)或碱性丝氨酸蛋白酶(E.C.3.4.21.x)或角蛋白酶(E.C.3.4.x.x))。

[0394] 在一个实施例中(尤其是饲料应用的实施例),其它组分可为淀粉酶(例如 α -淀粉酶(E.C.3.2.1.1))和蛋白酶(例如枯草杆菌蛋白酶(E.C.3.4.21.62))的组合。

[0395] 在一个实施例中(尤其是饲料应用的实施例),其它组分可为 β -葡聚糖酶,例如内切-1,3(4)- β -葡聚糖酶(E.C.3.2.1.6)。

[0396] 在一个实施例中(尤其是饲料应用的实施例),其它组分可为甘露聚糖酶(例如 β -甘露聚糖酶(E.C.3.2.1.78))。

[0397] 在一个实施例中(尤其是饲料应用的实施例),其它组分可为脂肪酶(E.C.3.1.1.3)、脂质酰基转移酶(通常归类为E.C.2.3.1.x)、或磷脂酶(E.C.3.1.1.4、E.C.3.1.1.32或E.C.3.1.1.5)、合适地为脂肪酶(E.C.3.1.1.3)。

[0398] 在一个实施例中(尤其是饲料应用的实施例),其它组分可为蛋白酶(例如枯草杆菌蛋白酶(E.C.3.4.21.62)或枯草芽孢杆菌中性蛋白酶(E.C.3.4.24.28)或碱性丝氨酸蛋白酶(E.C.3.4.21.x)或角蛋白酶(E.C.3.4.x.x))。

[0399] 在一个实施例中,附加组分可为稳定剂、或乳化剂、或粘结剂、或载体、或赋形剂、或稀释剂、或崩解剂。

[0400] 本文所用的术语“稳定剂”被定义为防止产品(如饲料产品)随时间推移发生变化的成分或成分组合。

[0401] 本文所用的术语“乳化剂”是指防止乳液发生分离的成分(如饲料成分)。乳液是两种不相溶的物质,其中一种以液滴形式存在的物质包含于另一种物质之中。乳液可包括水包油型乳液或油包水型乳液,在水包油型乳液中,液滴或分散相为油,连续相为水;而在油包水型乳液中,水变成分散相,连续相为油。也可通过使用乳化剂而使泡沫(即气体分散于液体中)和悬浮液(即固体分散于液体中)稳定。

[0402] 本文所用的术语“粘结剂”是指通过物理或化学反应而将产品粘结到一起的成分(如饲料成分)。例如在“凝胶化”过程中,水被吸收,从而产生粘结效果。然而,粘结剂可吸收其它液体(例如油),并将其保持在产品之内。在本发明的语境中,粘结剂通常将用于固体产品或低水分含量的产品,例如烘培产品:酥皮糕点、甜甜圈、面包及其它产品。造粒粘结剂的例子包括以下物质中的一者或多者:聚乙烯吡咯烷酮、羟丙基甲基纤维素(HPMC)、羟丙基纤维素(HPC)、蔗糖、麦芽糖、明胶和阿拉伯胶。

[0403] “载体”是指适用于施用酶的材料,并且包括本领域已知的任何此类材料,例如任何液体、凝胶、溶剂、液体稀释剂、增溶剂等,此类材料无毒且不与组合物的任何组分以有害的方式相互作用。

[0404] 本发明提供了制备组合物(例如饲料添加剂组合物)的方法,该方法包括将本发明的饲料添加剂(以及优选地玉米或玉米副产物)与至少一种生理上可接受的载体混合,该载体选自以下物质中的至少一者:麦芽糖糊精、石灰石(碳酸钙)、环糊精、小麦或小麦组分、蔗

糖、淀粉、 Na_2SO_4 、滑石粉、PVA、山梨醇、苯甲酸盐、山梨酸盐、甘油、蔗糖、丙二醇、1,3-丙二醇、葡萄糖、对羟基苯甲酸酯、氯化钠、柠檬酸盐、醋酸盐、磷酸盐、钙、偏亚硫酸氢盐、甲酸盐和它们的混合物。

[0405] “赋形剂”的例子包括以下物质中的一者或多者：微晶纤维素和其它纤维素、乳糖(lactose)、柠檬酸钠、碳酸钙、磷酸二氢钙、甘氨酸、淀粉、乳糖(milk sugar)和高分子量聚乙二醇。

[0406] “崩解剂”的例子包括以下物质中的一者或多者：淀粉(优选地为玉米、马铃薯或木薯淀粉)、羟基乙酸淀粉钠、交联羧甲基纤维素钠和某些复杂的硅酸盐。

[0407] “稀释剂”的例子包括以下物质中的一者或多者：水、乙醇、丙二醇和甘油、及它们的组合。

[0408] 其它组分可同时(如当其它组分同时存在于混合物中或者哪怕当它们通过不同途径提供时)或依次(如其它组分可通过不同途径提供)用于本发明的饲料添加剂中。

[0409] 在一个实施例中,优选地,根据本发明的饲料添加剂组合物、或饲料成分、或饲料或饲料原料、或预混物不包含铬或有机铬。

[0410] 在一个实施例中,优选地,根据本发明的饲料添加剂组合物、或饲料成分、或饲料或饲料原料、或预混物不包含山梨酸。

[0411] 生物物理特性

[0412] 本文所用的“生物物理特性”是指改善动物健康和/或性能以及/或者产量的任何动物生物物理性质。举例来说,所关注的生物物理特性可为选自以下特性的一种或多种特性:动物性能、动物生长性能、饲料转化率(FCR)、原材料消化能力(例如营养物质消化率,包括淀粉消化率、脂肪消化率、蛋白质消化率、纤维消化率)、氮保留率、屠体收率、生长速率、增重、体重、质量、饲料效率、体脂百分比、体脂分布、生长、蛋尺寸、蛋重量、蛋质量、产蛋率和环境影响,例如粪肥产量和/或氮排泄率。

[0413] 在一个实施例中,动物的生物物理特性是指动物性能。

[0414] 性能

[0415] 本文所用的“动物性能”可由饲料效率和/或动物增重和/或饲料转化率和/或饲料中营养物质消化率(例如氨基酸的消化率)和/或饲料中消化能或代谢能及/或氮保留率而确定。

[0416] 优选地,“动物性能”由饲料效率和/或动物增重和/或饲料转化率而确定。

[0417] “动物性能改善”是指相比于给动物饲喂未根据本发明处理的木质纤维素生物质,使用本发明的饲料添加剂组合物使得受施用者的饲料效率提高、并且/或者增重变大、并且/或者饲料转化率减小、并且/或者饲料中营养物质或能量消化率增大并且/或者氮保留率增加。

[0418] 优选地,“动物性能改善”是指饲料效率提高和/或增重变大和/或饲料转化率减小。

[0419] 本文所用的术语“饲料效率”是指在一段时间内给动物无限制地喂食或饲喂规定量的食物时出现的动物体重的增加量。

[0420] “饲料效率提高”是指相比于饲喂未根据本发明处理的木质纤维素生物质的动物,在饲料中使用根据本发明的饲料添加剂组合物会使每单位饲料摄入量所致的增重变大。

[0421] 饲料转化率(FCR)

[0422] 本文所用的术语“饲料转化率”是指为使动物体重增加特定的量而饲喂给动物的饲料的量。

[0423] 饲料转化率改善是指饲料转化率降低。

[0424] “饲料转化率降低”或“饲料转化率改善”是指相比于当未根据本发明处理的木质纤维素生物质用于饲料中或用作饲料时为使动物增加特定量的体重所需的饲料量,在饲料中使用饲料添加剂组合物会使动物增加等量体重所需的饲喂动物的饲料量更少。

[0425] 营养物质消化率

[0426] 本文所用的营养物质消化率是指从胃肠道或胃肠道特定区段(例如小肠)消失的营养物质的比率。营养物质消化率可通过施用给受施用者的营养物质施用量和受施用者粪便中该营养物质的排出量之间的差值来测量,或通过施用给受施用者的营养物质施用量和胃肠道特定区段(例如回肠)里消化物中该营养物质的保留量之间的差值来测量。

[0427] 本文所用的“营养物质消化率”可由在一段时间内营养物质的摄入量和通过排泄物完全收集而得出的营养物质排出量之间的差值来测量;或通过使用未被动物吸收的惰性标记物来测量,此标记物使研究人员能够计算出在整个胃肠道或胃肠道区段消失的营养物质含量。此类惰性标记物可为二氧化钛、氧化铬或酸不溶性灰分。消化率可表示为饲料中营养物质的百分比、或表示为饲料中每质量单位的营养物质中所含可消化的营养物质的质量单位数。

[0428] 本文所用的“营养物质消化率”涵盖淀粉消化率、脂肪消化率、蛋白质消化率和氨基酸消化率。

[0429] 本文所用的“能量消化率”是指所食用饲料的总能量减去粪便的总能量,或所食用饲料的总能量减去动物胃肠道特定区段(例如回肠)中剩余消化物的总能量。本文所用的“代谢能”是指表观代谢能,并意指所食用饲料的总能量减去包含在消化产生的粪便、尿液、和气体产物中的总能量。可使用与测定营养物质消化率相同的方法,通过总能量的摄入量与粪便排出的总能量之间的差值,或与胃肠道特定区段(例如回肠)中存在的消化物总能量之间的差值来测量能量消化率和代谢能,同时对氮排泄进行适当校正来计算饲料的代谢能。

[0430] 氮保留率

[0431] 本文所用的氮保留率是指受施用者将饮食中的氮保有为体重的能力。当氮排泄量超过每日摄入量时,会出现负的氮平衡,肌肉减少时通常会观察到此现象。正的氮平衡常常与肌肉生长相关,尤其是对于生长期动物来说。

[0432] 氮保留率可由在一段时间内氮的摄入量与通过排泄物和尿液完全收集而得出的氮排出量之间的差值来测量。应当理解,排出的氮包括饲料中未消化的蛋白质、内源性蛋白质的分泌物、微生物蛋白质和尿氮。

[0433] 屠体收率和产肉量

[0434] 本文所用的术语“屠体收率”是指经过商业或实验宰杀过程之后,作为活体重量一部分的屠体的量。术语“屠体”是指为食用而已被宰杀,并去除头部、内脏、四肢部分、和羽毛或皮的动物躯体。本文所用的术语“产肉量”是指作为活体重量一部分的可食用肉量,或作为活体重量一部分的特定肉块量。

[0435] 增重

[0436] 本发明还提供了增加受施用者(如家禽或生猪)体重的方法,该方法包括向所述受施用者饲喂包括根据本发明的饲料添加剂组合物的饲料原料。

[0437] “增重变大”是指相比于饲喂包括未根据本发明处理的木质纤维素生物质的饲料或饲喂由未根据本发明处理的木质纤维素生物质组成的饲料的动物,饲喂包括饲料添加剂组合物的饲料的动物体重增加。

[0438] 除非另外定义,本文所用的所有科技术语的含义与本公开所属领域的普通技术人员通常理解的一样。Singleton等人,DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY,20ED.,John Wiley and Sons,New York(1994)和Hale&Marham,THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY,Harper Perennial,NY(1991)为技术人员提供了本公开中所用的许多术语的通用词典。

[0439] 本公开不受本文所公开的示例性方法和材料的限制,与本文所述的方法和材料相似或等同的任何方法和材料均可用于本公开的实施例的实践或测试中。数值范围包括限定范围数值的端值在内。除非另外指明,任何核酸序列均以5'至3'取向从左到右书写,氨基酸序列以氨基至羧基取向从左到右书写。

[0440] 把说明书作为一个整体时,本文所用的标题并非是对本公开不同方面或实施例的限制。因此,把说明书作为一个整体时,下面即将定义的术语就定义得更全面。

[0441] 本文中使用氨基酸名称、三字母缩写或单个字母缩写来表示氨基酸。

[0442] 本文所用的术语“蛋白质”包括蛋白质、多肽和肽。

[0443] 本文所用的术语“氨基酸序列”与术语“多肽”和/或术语“蛋白质”是同义的。在一些情况下,术语“氨基酸序列”与术语“肽”是同义的。在一些情况下,术语“氨基酸序列”与术语“酶”是同义的。

[0444] 术语“蛋白”和“多肽”在本文中互换使用。在本公开和权利要求书中,对于氨基酸残基可使用传统单字母和三字母代码。该三字母代码是依照IUPACIUB生化命名联合委员会(JCBN)所定义的氨基酸三字母代码。还应当理解,由于遗传密码的简并性,多肽可由不止一个核苷酸序列编码。

[0445] 必须注意,如本文所用,以及在所附的权利要求书中,单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数涵义,除非上下文中清楚地另有指明。因此,例如,“一种酶”的涵义包括多种此类候选试剂,并且“所述饲料”的涵义包括一种或多种饲料的涵义及本领域的技术人员已知的它们的等同物,等等。

[0446] 本文所述的出版物仅仅是出于参考其在本专利提交日之前的公开内容而提供的。本文中的内容都不应理解为承认该类出版物可作为所附权利要求书中的现有技术。

[0447] 本发明也涉及由以下编号的段落定义的以下方面:

[0448] 1.一种制备饲料添加剂组合物的方法,该方法包括:

[0449] a.用物理和/或化学和/或生物方法预处理木质纤维素生物质;以及

[0450] b.将来自步骤a的经物理和/或化学和/或生物方法预处理过的木质纤维素生物质与至少一种饲用中糖基水解酶混合;

[0451] c.以及任选地进行包装。

[0452] 2.根据段落1所述的方法,其中该方法还包括给动物饲喂前述饲料添加剂组合物。

[0453] 3. 根据段落1或段落2所述的方法,其中当将饲用中酶加入预处理过的生物质时,预处理过的生物质包含至少70%(合适地至少90%)预处理过的生物质糖单元(例如葡萄糖单元),该生物质糖单元以可由所述饲用中酶在动物的胃肠道中释放的低聚物或聚合物形式存在。

[0454] 4. 根据段落3所述的方法,其中单糖为可溶性单糖,例如C6糖,如葡萄糖、半乳糖、果糖或甘露糖中的一种或多种。

[0455] 5. 根据前述段落中任一项所述的方法,其中饲用中酶在动物胃肠道内起作用,或主要在动物胃肠道内起作用。

[0456] 6. 根据前述段落中任一项所述的方法,其中在将饲料添加剂组合物饲喂给动物之前,饲用中酶在饲料添加剂组合物中和/或对木质纤维素生物质是非活性(或基本上非活性)的。

[0457] 7. 根据前述段落中任一项所述的方法,其中当用物理和/或化学和/或生物方法预处理过的木质纤维素生物质、饲用中酶或两者处于干燥状态或基本干燥状态时,可将这种用物理和/或化学和/或生物方法预处理过的木质纤维素生物质和饲用中酶混合起来。

[0458] 8. 根据前述段落中任一项所述的方法,其中该方法包括,在将用物理和/或化学和/或生物预处理的木质纤维素生物质与至少一种饲用中糖基水解酶混合之前、期间或之后(优选在混合之前),干燥该生物质。

[0459] 9. 根据段落7或段落8所述的方法,其中在添加至少一种饲用中糖基水解酶之前或之后,前述用物理和/或化学和/或生物方法预处理过的生物质的含水量小于15重量%。

[0460] 10. 根据前述段落中任一项所述的方法,其中在与木质纤维素生物质混合之前,将所述至少一种饲用中糖基水解酶封装或使其以其它方式失活。

[0461] 11. 根据段落10所述的方法,其中向动物饲喂至少一种饲用中糖基水解酶,就可激活该至少一种饲用中糖基水解酶。

[0462] 12. 根据前述段落中任一项所述的方法,其中在临近向动物饲喂该饲料添加剂组合物之前,将至少一种饲用中糖基水解酶与用物理和/或化学和/或生物方法预处理过的木质纤维素生物质混合。

[0463] 13. 根据前述段落中任一项所述的方法,其中至少一种(或多种)糖基水解酶饲用中酶具有一种或多种形成碳水化合物单体的活性。

[0464] 14. 根据前述段落中任一项所述的方法,其中至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶为多糖降解酶。

[0465] 15. 根据前述段落中任一项所述的方法,其中至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶水解 β -1,4-糖苷键。

[0466] 16. 根据前述段落中任一项所述的方法,其中至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶至少具有以下酶活性:纤维素酶活性和半纤维素酶活性。

[0467] 17. 根据段落16所述的方法,其中至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶至少具有以下酶活性:内切葡聚糖酶活性、内切木聚糖酶活性和 β -葡萄糖苷酶活性。

[0468] 18. 根据段落16或段落17所述的方法,其中至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶包括具有以下酶活性中的一者或两者的另一种酶:外切葡糖苷酶活性和/或溶解性多糖单加氧酶活性。

[0469] 19. 根据前述段落中任一项所述的方法, 其中木质纤维素生物质为任意纤维素或木质纤维素材料, 例如农业残余物、生物能作物、工业固体废物、市政固体废物、来自造纸的淤渣、庭院废物、木材废料、林业废料和它们的组合。

[0470] 20. 根据前述段落中任一项所述的方法, 其中木质纤维素生物质选自玉米轴、作物残余物例如玉米皮、玉米秸秆、草、甜菜浆、小麦秸秆、小麦壳、燕麦秸秆、小麦次粉、小麦粉头、米糠、稻壳、小麦糠、燕麦壳、棕榈仁、柑橘渣、棉花、木质素、大麦秸秆、干草、稻秆、稻壳、柳枝稷、芒草、大米草、草芦、纸废弃物、甘蔗渣、高粱渣、饲用高粱、高粱秸秆、大豆秸秆、大豆、粉碎树木获得的组分、树枝、根、叶、木屑、锯末、灌木和灌木丛、蔬菜、水果、花。

[0471] 21. 根据前述段落中任一项所述的方法, 其中木质纤维素生物质选自玉米秸秆、小麦秸秆、玉米轴、甘蔗渣、柳枝稷、饲用高粱和稻秆。

[0472] 22. 根据前述段落中任一项所述的方法, 其中物理和/或化学和/或生物预处理为包括蒸汽爆破的处理。

[0473] 23. 根据前述段落中任一项所述的方法, 其中物理和/或化学和/或生物预处理为包括使用酸或碱处理的处理。

[0474] 24. 一种可通过根据段落1至23中任一项所述的方法获得(例如通过所述方法获得)的饲料添加剂组合物。

[0475] 25. 一种饲料添加剂组合物或饲料成分, 其包含与至少一种饲用中糖基水解酶组合的用物理和/或化学和/或生物方法预处理过的木质纤维素生物质。

[0476] 26. 一种饲料添加剂套装件, 该套装件包括第一容器、第二容器和共施用这两个容器的内容物的说明书; 其中第一容器包含用物理和/或化学和/或生物方法预处理过的木质纤维素生物质, 第二容器包含至少一种饲用中糖基水解酶。

[0477] 27. 根据段落25或段落26所述的饲料添加剂组合物或饲料添加剂套装件, 其中至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶具有一种或多种形成碳水化合物单体的活性。

[0478] 28. 根据段落25至27中任一项所述的饲料添加剂组合物或饲料添加剂套装件, 其中至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶为多糖降解酶。

[0479] 29. 根据段落25至28中任一项所述的饲料添加剂组合物或饲料添加剂套装件, 其中至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶水解 β -1, 4-糖苷键。

[0480] 30. 根据段落25至29中任一项所述的饲料添加剂组合物或饲料添加剂套装件, 其中至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶至少具有以下酶活性: 纤维素酶活性和半纤维素酶活性。

[0481] 31. 根据段落25至30中任一项所述的饲料添加剂组合物或饲料添加剂套装件, 其中至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶至少具有以下酶活性: 内切葡聚糖酶活性、内切木聚糖酶活性和 β -葡萄糖苷酶活性。

[0482] 32. 根据段落30或段落31所述的饲料添加剂组合物或饲料添加剂套装件, 其中至少一种(或多种)饲用中糖基水解酶还包括具有以下一种或两种活性的酶: 外切葡糖苷酶活性和/或溶解性多糖单加氧酶活性。

[0483] 33. 一种饲料或饲料原料, 其包括根据段落24至32中任一项所述的饲料添加剂组合物或饲料成分或可通过段落1至23中任一项所述的方法获得(优选通过所述方法获得)的饲料添加剂组合物。

[0484] 34.一种预混物,其包括根据段落24至32中任一项所述的饲料添加剂组合物或饲料成分或可通过段落1至23中任一项所述的方法获得(优选通过所述方法获得)的饲料添加剂组合物,以及至少一种矿物质和/或至少一种维生素。

[0485] 35.一种改善动物生物物理特性的方法,该方法包括将与饲用中糖基水解酶组合的用物理和/或化学和/或生物方法预处理过的木质纤维素生物质,以及任选的至少一种饲料组分和/或至少一种矿物质和/或至少一种维生素施用于受施用者。

[0486] 36.一种改善动物生物物理特性的方法,该方法包括将可通过段落1至23中任一项所述的方法获得(例如通过所述方法获得)的饲料添加剂组合物或将根据段落24至32中任一项所述的饲料添加剂组合物或将根据段落32的饲料或将根据段落34的预混物施用于受施用者。

[0487] 37.根据段落35或段落36所述的方法,其中生物物理特性选自以下一者或多者:动物性能、动物生长性能、饲料转化比率(FCR)、原材料消化能力(例如营养物质的消化率,包括淀粉消化率、脂肪消化率、蛋白质消化率、纤维消化率)、氮保留率、屠体收率、生长速率、增重、体重、质量、饲料效率、体脂百分比、体脂分布、生长、蛋尺寸、蛋重量、蛋质量、产蛋率和环境影响,例如粪肥产量和/或氮排泄率。

[0488] 38.与饲用中糖基水解酶组合的用物理和/或化学和/或生物方法预处理过的木质纤维素生物质用于改善动物的生物物理特性的用途。

[0489] 39.根据段落24至32中任一项所述的饲料添加剂组合物或饲料成分,或者可通过段落1至23中任一项所述的方法获得(优选通过所述方法获得)的饲料添加剂组合物或根据段落33的饲料或根据段落34的预混物用于改善动物的生物物理特性的用途。

[0490] 40.根据段落38或段落39所述的用途,其中生物物理特性选自以下一者或多者:动物性能、动物生长性能、饲料转化比率(FCR)、原材料消化能力(例如营养物质的消化率,包括淀粉消化率、脂肪消化率、蛋白质消化率、纤维消化率)、氮保留率、屠体收率、生长速率、增重、体重、质量、饲料效率、体脂百分比、体脂分布、生长、蛋尺寸、蛋重量、蛋质量、产蛋率和环境影响,例如粪肥产量和/或氮排泄率。

[0491] 41.根据段落1至23中任一项所述的方法,其中该方法还包括将饲料组分与饲料添加剂组合物接触的步骤。

[0492] 42.一种制备饲料原料的方法,该方法包括将饲料组分与根据段落24至32中任一项所述的饲料添加剂组合物或饲料成分或可通过段落1至23中任一项所述的方法获得(优选通过所述方法获得)的饲料添加剂组合物接触。

[0493] 43.本文中通常参照实例和附图提出的方法、或饲料添加剂组合物、或用途、或套装件、或饲料、或饲料原料、或预混物。

[0494] 现仅以举例的方式参照以下附图和实例来描述本发明。

[0495] 实例

[0496] 实例1:使用体外模型模拟鸡的上消化道所得 Accellerase[®]BG和 Accellerase[®]Trio[™]对存在于经稀氨水预处理过的玉米秸秆中纤维的消化率的影响

[0497] 材料和方法

[0498] 包含玉米秸秆生物质材料的模拟饲料的体外消化

[0499] 表1示出体外消化处理样的组成。为模仿鸡饲料,将70%生物质材料与30%豆粕

(SBM)混合。对于生物质样品,进行两种类型的上胃肠道(GIT)消化。首先,制备未经 **Accellerase**[®] Trio[™]处理或者未经 **Accellerase**[®] BG处理的样品(样品称为“未处理样”)。其次,制备在uGIT体外消化过程中用 **Accellerase**[®] Trio[™]和 **Accellerase**[®] BG处理过的样品(样品称为“饲用中样”)。此外,制备基于纯玉米和SBM的饲料且未添加生物质材料的两个对照样品:经 **Accellerase**[®] Trio[™]和 **Accellerase**[®] BG消化,称为“饲用中对照样”或者未经 **Accellerase**[®] Trio[™]和 **Accellerase**[®] BG消化,称为“对照样”。

[0500] **Accellerase**[®] Trio[™]是可得自Danisco(现属于DuPont)的商业酶,并含有某些纤维素酶活性,诸如内切葡聚糖酶活性和 β -葡萄糖苷酶活性,以及某种半纤维素酶活性例如内切木聚糖酶活性。

[0501] **Accellerase**[®] BG是可得自Danisco(现属于DuPont)的商业酶,并具有 β -葡萄糖苷酶活性。

[0502] 表1. 体外消化处理样的组成。

[0503]

样品名称	处理样的组成
对照样	玉米饲料(70%玉蜀黍和30%豆粕,无维生素/矿物质)
饲用中对照样	玉米饲料(70%玉蜀黍和30% SBM) + Accellerase [®] Trio [™] ¹ 和 Accellerase [®] BG ²
CS 未处理样	经稀氨水预处理过的玉米秸秆 HP90-HP93 (70% CS 和 30% SBM)
CS 饲用中样	CS HP90-HP93 (70%和 30% SBM) + Accellerase [®] Trio [™] & Accellerase [®] BG

[0504] ¹ **Accellerase**[®] Trio[™]:组合了包括内切葡聚糖酶活性和 β -葡萄糖苷酶活性的纤维素酶活性与包括内切木聚糖酶活性的半纤维素酶活性

[0505] ² **Accellerase**[®] BG: β -葡萄糖苷酶

[0506] 使用图1所示的步骤进行鸡上GIT体外消化。根据小肠消化步骤中目标干物质含量(最终DM%),在每个模拟单元中称量共计1克、2克、或3克干物质(DM)。将饲料与水混合并使用HCl调节其pH之后,分别添加0.2mL/1g DM和0.05mL/1g DM的饲料酶 **Accellerase**[®] Trio[™]和 **Accellerase**[®] BG。体外消化结束时,以30,000g离心30分钟(10℃)从而将液相分开,并且在分析可溶性碳水化合物组合物之前始终储存于-20℃下。

[0507] 根据模拟单元中的DM量,将固体残余物在75℃下在烘箱中干燥24至48小时。称重后的干燥粒料(不消化性干物质)经压碎均质化处理,以用于分析不溶性非淀粉多糖(NSP)、中性洗涤纤维(NDF)和酸性洗涤纤维(ADF)。

[0508] 对纤维的消化和可溶性糖的释放的评估

[0509] 测定体外消化后的可溶性糖

[0510] 离心后的上清液样品经C18固相萃取柱纯化,并如以下所述使用HPLC分析游离的单糖。上清液在100℃烘箱中经1M H₂SO₄酸水解3小时之后,测定总可溶性糖。经水稀释并过滤后,如下文所述使用HPLC分析单糖。样品溶液中可溶性聚合糖(低聚糖和多糖)的量按照下式计算:低聚糖和多糖=总可溶性糖-游离可溶性单糖

[0511] 测定体外消化后的不溶性NSP(非淀粉多糖)

[0512] 将干粒料的等分试样分散于0.05M磷酸盐缓冲溶液(pH=6)中,并且通过将样品在95℃至100℃水浴中温育30min而用耐热 α -淀粉酶(Sigma-Aldrich)降解淀粉。之后,将pH调至4.5,加入淀粉转葡萄糖苷酶,并且将样品在60℃水浴中温育60min。然后加入乙醇并将样品离心。弃去上清液,并将粒料在50℃烘箱中干燥。

[0513] 为水解聚合糖,将干燥后的残余物分散于12M H_2SO_4 中并在35℃水浴中温育60min。然后,加水将 H_2SO_4 浓度从12M稀释至1M,并且将样品在100℃烘箱中温育两个小时。样品用水稀释后过滤,并如下文所述使用HPLC测定单糖。

[0514] 使用HPLC测定单糖

[0515] 使用高pH阴离子交换色谱和脉冲电化学检测来分离和检测单糖(鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、甘露糖)。前置柱为CarboPac PA1(4mm×40mm),分析柱为CarboPac PA1(4mm×250mm)。流速是1mL/min,流动相由A:水和B:0.2M NaOH组成,梯度如下:

	时间(min)	A (%)	B (%)
	0	90	10
	1.1	90	10
	5	100	0
[0516]	29	100	0
	30	0	100
	40	0	100
	41	90	107
	58	90	10

[0517] 体外消化后对中性洗涤纤维(NDF)和酸性洗涤纤维(ADF)的分析

[0518] 对于饲料和体外消化残余物而言,通过在105℃下烘箱干燥18小时,来测定干物质值。采用的NDF和ADF重量分析方法由MTT Agrifood Research Finland使用Fibertec TM System M(FOSS Analytical,Denmark)萃取系统开展。对于NDF量的测定,使用月桂基硫酸钠和EDTA的中性溶液进行萃取(Van Soest等人,1991)。通过使用包含CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)的1N硫酸萃取而回收酸性洗涤纤维(纤维素、木质素)(AOAC973.18,1990)。在100℃下过夜干燥之后,将剩余样品称重,并以干物质含量百分比计算纤维量。

[0519] 统计分析

[0520] 使用单因素方差分析(Graphpad Prism 6.01版)与Turkey事后多重比较法进行统计分析。P值 $P<0.05$ 被认为在统计意义上是显著的。

[0521] 示出了所有数值的平均值+SD。

[0522] 结果

[0523] 来自生物质材料的纤维的消化和可溶性糖的释放

[0524] 为研究单独物理化学预处理(未处理样)或物理化学预处理与饲用中酶相组合(Accellerase® Trio™和 Accellerase® BG饲用中样)在模拟上GIT消化过程中对碳水化合物水解的影响,进行了多个分析。示出了饲料对照样和玉米秸秆处理样中不消化性干物质残余物、释放的可溶性糖、不溶性NSP糖组成以及NDF和ADF量的结果。表2至表4示出了饮食对照样(玉米70%-SBM 30%)的数据,表5至表7示出了包含经稀氨水预处理过的玉米秸秆的

处理样(CS 70%-SBM 30%)的数据。

[0525] 饮食对照样(玉米70%-SBM 30%)

[0526] 体外消化之后,对照样和饲用中对照样 Accellerase[®] Trio[™]和 Accellerase[®] BG 之间的不消化性残余物(%)量没有差别(表2)。

[0527] 表2. 在对3g(DM)测试材料进行体外消化之后所得的饮食对照样(玉米70%-SBM 30%)的不消化性干物质残余物(n=4)。

	处理样	不消化性残余物	
		(%)	SD
[0528]	对照样	77	1.3
	饲用中对照样 Accellerase [®] Trio [™] 和 Accellerase [®] BG ²	76	2.1

[0529] ¹ Accellerase[®] Trio[™]:组合了包括内切葡聚糖酶活性和β-葡萄糖苷酶活性的纤维素酶活性与包括内切木聚糖酶活性的半纤维素酶活性

[0530] ² Accellerase[®] BG:β-葡萄糖苷酶

[0531] 表3示出了对照处理样经体外消化后的总可溶性糖、游离单糖、可溶性低聚糖和聚合糖以及不溶性NSP糖的量,以及消化之前的近似总NSP糖组成。

[0532]

表 3.饮食对照样(玉米 70%-SBM 30%): 在对 3g (DM)测试材料 and 不同处理样进行体外消化后分析糖。消化前的近似 NSP 糖组成。										
	葡萄糖		木糖		阿拉伯糖		半乳糖		甘露糖	
消化后的总可溶性糖	mg/g	SD	mg/g	SD	mg/g	SD	mg/g	SD	mg/g	SD
对照样	115 ^b	14	0 ^b	0	1.2 ^b	0	15 ^b	1.6	1.2 ^b	0
饲用中对照样 Accellerase [®] Trio [™] ¹ 和 Accellerase [®] BG ²	138 ^a	8.8	2.3 ^a	0.2	3.2 ^a	0.4	16 ^a	0.5	6.4 ^a	0.8
消化后的游离可溶性单糖										
对照样	12 ^b	3	0	0	0 ^b	0	0.2 ^b	0.1	0 ^b	0
饲用中对照样 Accellerase [®] Trio [™] 和 Accellerase [®] BG	35 ^a	8.9	0	0	0.6 ^a	0.2	0.4 ^a	0.1	0.2 ^a	0.2
消化后的可溶性低聚糖 和聚合糖										
对照样	104	13	0 ^b	0	1.2 ^b	0.1	15	1.4	1.2 ^b	0.2
饲用中对照样 Accellerase [®] Trio [™] 和 Accellerase [®] BG	102	15	2.3 ^a	0.2	2.7 ^a	0.2	16	0.4	6.2 ^a	0.8

[0533]

消化后的不溶性 NSP 糖										
对照样	42 ^a	4	19	3	15	2	12	2	13	1
饲用中对照样 Accellerase [®] Trio [™] 和 Accellerase [®] BG	34 ^b	3	17	2	15	1	12	1	12	1
消化前的近似总 NSP 糖										
对照样	46		18		19		16		8	
饲用中对照样 Accellerase [®] Trio [™] 和 Accellerase [®] BG	46		18		19		16		8	

[0534] ¹ Accellerase[®]Trio[™]:组合了包括内切葡聚糖酶活性和β-葡萄糖苷酶活性的纤维素酶活性与包括内切木聚糖酶活性的半纤维素酶活性

[0535] ² Accellerase[®]BG:β-葡萄糖苷酶

[0536] ^{a,b}—列内带不同上标字母的平均值之间具有显著差异(P<0.05;方差分析,之后进行Turkey事后多重比较)。

[0537] 表4.对饮食对照样进行体外消化后中性洗涤纤维和酸性洗涤纤维的量(干物质%)。

[0538]

处理样	NDF		ADF	
	% DM	SD	% DM	SD
对照样	22.46	3.60	5.81	0.70
饲用中对照样 Accellerase [®] Trio [™] 和 Accellerase [®] BG ²	22.50	3.23	6.04	0.62

[0539] ¹ Accellerase[®]Trio[™]:组合了包括内切葡聚糖酶活性和β-葡萄糖苷酶活性的纤维素酶活性与包括内切木聚糖酶活性的半纤维素酶活性

[0540] ² Accellerase[®]BG:β-葡萄糖苷酶

[0541] 表5.对3g(DM)测试材料和不同处理样进行体外消化之后所得的玉米秸秆-SBM(70%-30%)的不消化性干物质残余物(n=4)。

处理样	不消化性残余物	
	(%)	SD
CS 未处理样	87 ^b	0.8
CS 饲用中样 Accellerase [®] Trio [™] 和 Accellerase [®] BG ²	72 ^a	1.6

[0543] ¹ Accellerase[®]Trio[™]:组合了包括内切葡聚糖酶活性和β-葡萄糖苷酶活性的纤维素酶活性与包括内切木聚糖酶活性的半纤维素酶活性

[0544] ² Accellerase[®]BG:β-葡萄糖苷酶

[0545] ^{a,b}—列内带不同上标字母的平均值之间具有显著差异(P<0.05;方差分析,之后进行Turkey事后多重比较)。

[0546] 表6.玉米秸秆-SBM(70%-30%):对3g(DM)测试材料和不同处理样进行体外消化后分析糖.消化前的近似NSP糖组成。

[0547]

	葡萄糖		木糖		阿拉伯糖		半乳糖		甘露糖	
消化后的总可溶性糖	mg/g	SD	mg/g	SD	mg/g	SD	mg/g	SD	mg/g	SD
CS 未处理样	22 ^b	4.2	14 ^b	2.2	7 ^b	1.3	16 ^{ab}	2.7	1.5 ^b	0.2
CS 饲用中样 Accellerase [®] Trio TM 和 Accellerase [®] BG ²	87 ^a	1.8	69 ^a	1.2	16 ^a	0.5	19 ^a	0.5	6.0 ^a	0.2
消化后的游离可溶性单糖										
CS 未处理样	0.9 ^b	0.4	0 ^b	0	0 ^b	0	0	0	0	0
CS 饲用中样 Accellerase [®] Trio TM 和 Accellerase [®] BG	60 ^a	1.4	44 ^a	1.2	5.6 ^a	0.2	0	0	0	0
消化后的可溶性低聚糖 和聚合糖										
CS 未处理样	21	4	14 ^b	2.2	7 ^a	1.2	16	2.8	1.5 ^b	0.2
CS 饲用中样 Accellerase [®] Trio TM 和 Accellerase [®] BG	27	2.4	25 ^a	2.2	11 ^b	0.4	19	0.7	6.0 ^a	0.2
消化后的不溶性 NSP 糖										
CS 未处理样	239 ^a	7.9	127 ^a	3.1	22 ^a	0.5	15 ^a	0.7	12 ^a	1.4
CS 饲用中样 Accellerase [®] Trio TM 和 Accellerase [®] BG	171 ^b	9.6	67 ^b	3.8	11 ^b	0.5	12 ^b	0.9	12 ^a	1
消化前的近似总 NSP 糖										
CS 未处理样	229		127		27		19		13	
CS 饲用中样 Accellerase [®] Trio TM 和 Accellerase [®] BG	229		127		27		19		13	

[0548] ¹ Accellerase[®] TrioTM: 组合了包括内切葡聚糖酶活性和β-葡萄糖苷酶活性的纤维素酶活性与包括内切木聚糖酶活性的半纤维素酶活性

[0549] ² Accellerase[®] BG: β-葡萄糖苷酶

[0550] ^{a,b} 一列内带不同上标字母的平均值之间具有显著差异(P<0.05; 方差分析, 之后进行Turkey事后多重比较)。

[0551] 表7. 对包含玉米秸秆的处理样进行体外消化后中性洗涤纤维和酸性洗涤纤维的量(干物质%)。

[0552]

处理样	NDF		ADF	
	% DM	SD	% DM	SD
CS 未处理样	49.78 ^a	1.18	39.88 ^a	1.08
CS 饲用中样 Accellerase [®] Trio TM 和 Accellerase [®] BG ²	40.55 ^b	1.66	38.90 ^a	1.31

[0553] ¹ Accellerase[®] TrioTM: 组合了包括内切葡聚糖酶活性和β-葡萄糖苷酶活性的纤维

素酶活性与包括内切木聚糖酶活性的半纤维素酶活性

[0554] ² Accellerase[®] BG:β-葡萄糖苷酶

[0555] ^{a,b}—列内带不同上标字母的平均值之间具有显著差异(P<0.05)。

[0556] 讨论

[0557] 对纤维消化率的评估

[0558] 由于包含70%玉米的饮食对照样中添加了饲用中酶(饲用中 Accellerase[®] Trio[™]和 Accellerase[®] BG),不消化性DM残余物、NDF或ADF的纤维消化参数之间没有显著的差异。相比之下,不溶性NSP葡萄糖的量明显偏低(-19%),这与添加“饲用中 Accellerase[®] Trio[™]和 Accellerase[®] BG”检测到的更多游离葡萄糖的释放是一致的。对于包含CHO结构的木糖、阿拉伯糖和甘露糖,主要观察到体外消化过程中低聚糖和聚合糖的溶解。

[0559] 与单独对玉米秸秆进行经稀氨水预处理相比(CS未处理样),将饲用中酶(饲用中 Accellerase[®] Trio[™]和 Accellerase[®] BG)添加至经稀氨水预处理过的玉米秸秆中引起葡萄糖、木糖、阿拉伯糖和甘露糖的溶解显著提高(P<0.05)。此外,检测到在饲用中酶(饲用中 Accellerase[®] Trio[™]和 Accellerase[®] BG)作用下,大多数可溶性糖以单糖形式释放,但甘露糖除外,其中聚合物型甘露糖的释放解释了甘露糖的溶解提高的原因。与“CS未处理样”相比,同样由于添加“饲用中 Accellerase[®] Trio[™]和 Accellerase[®] BG”,中性洗涤纤维的残余量更低,但酸性洗涤纤维未因不同处理样而变化。与NDF结果一致,由于添加饲用中酶(饲用中 Accellerase[®] Trio[™]和 Accellerase[®] BG),不消化性DM残余物的量和不溶性NSP糖的量降低。

[0560] 结论

[0561] 经稀氨水预处理过的玉米秸秆的体外消化分别引起10%和11%的总NSP糖级分转化成可溶性葡萄糖和木糖。然而,在体外消化过程中,将 Accellerase[®] Trio[™]和 Accellerase[®] BG添加至预处理过的玉米秸秆中进一步使葡萄糖和木糖的转化率提高至38%和54%的总NSP糖级分。当ADF级分保持不变时相应NDF级分降低,这表明经稀氨水预处理过的玉米秸秆中饲用中酶的加入使总NSP中半纤维素酶级分溶解。

[0562] 实例2:内切木聚糖酶和 Accellerase[®] Trio[™]对饲喂饮食中包含30%经稀氨水预处理过的玉米秸秆作为玉米的部分替代物的猪消化道营养物质总消化率的影响

[0563] 材料和方法

[0564] 动物和实验方案的使用经动物实验委员会批准。将按实际喂食计算的基础饮食配制成能量和蛋白平衡的饮食,并且超出该年龄生长期猪对营养物质需要的15%(表1)。在饮食中以6g/kg添加通用消化率标记(氧化铬)以测定膳食组分的消化率。饮食中添加低含量的合成抗菌剂(维吉尼霉素)以平衡经氨水预处理过的玉米秸秆中可能存在的任何痕量的抗菌剂,并且饮食以糊状物形式供应。根据表2中详述的处理样,将处理样2和3中30%基础饮食替换为玉米秸秆粉或经稀氨水预处理过的玉米秸秆(基于干物质)。

[0565] 将基础饮食分成不同部分,然后各部分饮食用表2中标识的酶处理。饲料混合过程

中,冲洗混合器以防止饮食的交叉污染。在每批处理开始、中间、以及结束时从每份处理饮食中收集样品并混合到一起,以确定饲料中的酶活性。混合过程中将来自每份处理饮食的样品保留下来并在需要前始终储存于-20℃下。

[0566] 表1:体重为25至60kg的猪的基础饮食组成(% ,按实际喂食计算)的例子

[0567]	成分	基础饮食(%)
[0568]	玉米	56.65
	豆粕—48%	38.75
	豆油	1.00
	石灰石	0.95
	磷酸二钙	1.20
	盐	0.40
	不消化性标记(氧化铬)	0.60
	抗菌剂	0.05
	维生素矿物质预混物	0.4
	计算的营养成分表	
	可消化磷(%)	0.36
	代谢能(Kcal kg ⁻¹)	3284
	粗蛋白(%)	22.8
	标准回肠可消化赖氨酸(%)	1.13

[0569] 表2:试验饮食标识

[0570]

处理样	描述	酶
1	对照样(基础饮食)	无
2	基础饮食+30%玉米秸秆粉	无
3	基础饮食+30%经稀氨水预处理过的玉米秸秆(基于干物质)	Accellerase [®] Trio [™] 1+内切木聚糖酶

[0571] ¹ Accellerase[®] Trio[™]:组合了包括内切葡聚糖酶活性和β-葡萄糖苷酶活性的纤维素酶活性与包括内切木聚糖酶活性的半纤维素酶活性

[0572] 根据生长阶段(≤25kg至约60kg体重)制定并进行实验。

[0573] 生长期阉公猪(起初体重为30kg)被圈养在环境受控室的单独圈中(1.2m×1.5m)。每个猪圈均配有饲喂器和乳头式饮水器以及完全板条式混凝土地板。设计并进行实验使每个处理样至少重复12次。给所有猪饲喂维持其能量需求(197kcal代谢能/kg MW⁶⁰;NRC, 2012)所需的3倍水平的饲料,并且分成两等份分别在08:00和17:00时提供。允许动物通过碗形饮水器自由饮用水。记录每一周期开始时及结束时猪的体重,并记录每天提供的饲料量。实验周期持续14天。每个周期的最初10天被认为是对饮食的适应期。使用标准操作程序在第11天和12天时收集新鲜粪便样品。收集之后,粪便样品立即在-20℃冷冻以便用于后续分析。

[0574] 将粪便样品解冻,混于动物和饮食内,并收集子样品用于化学分析。同样收集并分析基础饮食样品。粪便样品在烘箱中干燥并经细磨用于分析。根据标准程序(AOAC, 2005)分

析所有样品的干物质、消化率标记、总能量、粗蛋白、脂肪和中性洗涤纤维。

[0575] 能量和营养物质的总消化率值如前所述计算(Stein等人,2007.J.Anim.Sci.85:172-180)。猪圈是实验单元。使用SAS的MIXED程序处理数据。确定具有显著性, $P<0.05$ 。

[0576] 结果

[0577] 可以预知,饲喂玉米大豆饮食对照样的猪中的干物质、有机物质、粗蛋白、总能量和纤维的消化道表观总消化率(ATTD)均高于其它所有处理样,因为该饮食中不包含任何高纤维生物质材料(表3: $P<0.01$)。饲喂内切木聚糖酶加上 Accellerase[®]Trio[™]以及30%经稀氨水预处理过的玉米秸秆的整个组合的猪处理组与饲喂饮食包含30%未经任何预处理过程处理或未添加饲用中酶的玉米秸秆粉的猪相比,具有更高的干物质、有机物质、粗蛋白、总能量和纤维的消化道表观总消化率。

[0578] 表3.来自试验BMN1204的饲喂添加或未添加外源酶的高纤维饮食的生长期猪的能量和营养物质的表观总消化率(ATTD)。

项(%)	饮食			SEM	P 值
	对照样	玉米秸秆粉	DAcs ¹ +酶 ²		
[0579] 干物质	87.53 ^a	72.04 ^c	77.68 ^b	0.65	<0.01
有机物质	89.36 ^a	73.84 ^c	79.47 ^b	0.64	<0.01
粗蛋白	87.58 ^a	75.79 ^c	78.74 ^b	0.93	<0.01
总能量	86.64 ^a	72.36 ^c	76.47 ^b	0.74	<0.01
粗纤维	68.93 ^a	48.04 ^c	57.64 ^b	2.14	<0.01
ADF	61.16 ^a	43.12 ^c	51.60 ^b	2.82	<0.01
NDF	60.08 ^a	1.69 ^c	33.25 ^b	2.31	<0.01

[0580] ¹DAcs—经稀氨水预处理的玉米秸秆

[0581] ²酶—以4400U/kg添加的内切木聚糖酶以及 Accellerase[®]Trio[™]—以12,500BGU/kg添加的由DuPont研发的纤维素酶、半纤维素酶组合

[0582] abc—一行内带不同上标的平均值之间具有显著差异($P<0.05$)

[0583] 讨论

[0584] 一般来讲,物理化学预处理技术通过降低纤维素的结晶度并且最大化纤维素酶对纤维素可及度(CAC)而将酶活性最大化。稀氨水预处理成功将纤维素结构打开,从而增加供酶起作用的表面积。这在本研究中是非常明显的,其中当在猪中评估时,与单独的玉米秸秆粉相比,稀氨水预处理与饲用中酶的组合使玉米秸秆的干物质和营养物质的消化率提高。

[0585] 实例3:当使用精确饲喂模型将经物理化学预处理的生物质材料饲喂给普通公鸡时,内切木聚糖酶和 Accellerase[®]Trio[™]对经物理化学预处理的生物质材料的真代谢能的影响。

[0586] 动物和实验方案的使用经动物实验委员会批准。

[0587] 处理样包括添加了酶和未添加酶的饲喂用生物质材料(在表4中列出)。将公鸡圈养在配有排泄物收集盘的单独丝网笼中。在插管强饲每个处理样(30g)之前24小时不予饲喂,并在插管强饲每个处理样之后48小时不予饲喂。设计并进行实验使每个处理样至少重复8次。在48小时内收集、称重、冷冻干燥并使用研钵和研杵研磨总排泄物。分析排泄物的总能量和氮。将禁食公鸡的排泄物用于计算内源性氮损失。将由内源性损失引起的氮值用作

校正系数并用于计算经氮校正的真代谢能(TME_n)。

[0588] 表4:试验饮食标识

[0589]	处理样	生物质材料	物理化学预处理	酶
	1.	玉米秸秆	无	无
	2.	玉米秸秆	苛性脱木质化	无
	3.	玉米秸秆	苛性脱木质化	Accellerase [®] Trio [™] + 内切木聚糖酶

[0590] ¹ Accellerase[®] Trio[™]:组合了包括内切葡聚糖酶活性和β-葡萄糖苷酶活性的纤维素酶活性与包括内切木聚糖酶活性的半纤维素酶活性

[0591] 结果

[0592] 结果表明与饲喂不含酶的经物理化学预处理的生物质或未处理生物质(研磨的玉米秸秆—处理样1)的公鸡相比,饲喂与酶(内切木聚糖酶加上 Accellerase[®] Trio[™])组合的经物理化学预处理的生物质材料的处理组具有更高的能量(TME_n)消化率。

[0593] 表5.通过使用公鸡模型¹进行的试验所得的含有或不含外源酶的经预处理生物质材料的真代谢能值。

[0594]	生物质材料	TME _n (kcal/kg DM) ²
	研磨的玉米秸秆	980
	DLcs ³	917
	DLcs + 酶 ⁴	1056

[0595] ¹所有测试材料以30%测试材料和70%玉米的混合物的形式饲喂,以便易于饲喂。玉米的GE值用于分析玉米对混合物的能量贡献。

[0596] ²TME_n平均值为8次观察的平均值

[0597] ³DLcs—苛性脱木质化玉米秸秆

[0598] ⁴酶—内切木聚糖酶以2500U/kg添加, Accellerase[®] Trio[™]以12,500BGU/kg添加

[0599] 实例4:利用体外反刍消化率模型研究Danisco Xylanase[™]和Accellerase[®] Trio[™]对经物理化学预处理的生物质材料中所存在的纤维的消化率的影响

[0600] 材料和方法

[0601] 使用由Adesogan等人(2005)此前提出的测定饲料成分发酵产气动力学的新颖、无线、自动系统,在添加或未添加酶的情况下,对测试成分的单独发酵(表1)或添加到反刍动物完全饮食中的发酵(表2)过程进行测定。设计并进行实验对每个处理样进行五次平行测定,且温育持续24小时。发酵之后,定量测定总产气量。发酵之后剩下的残余物根据其酸性洗涤纤维(ADF)和中性洗涤纤维(NDF)组成来表征。

[0602] 表1.实验1所进行的处理

[0603]

	生物质材料	物理化学预处理	酶
1	玉米秸秆	无	无
2	玉米秸秆	稀氨水	无
3	玉米秸秆	苛性脱木质化	无
4	柳枝稷	苛性脱木质化	无
5	玉米秸秆	无	Accellerase [®] Trio [™] + Danisco xylanase [™]
6	玉米秸秆	稀氨水	Accellerase [®] Trio [™] + Danisco xylanase [™]
7	玉米秸秆	苛性脱木质化	Accellerase [®] Trio [™] + Danisco xylanase [™]
8	柳枝稷	苛性脱木质化	Accellerase [®] Trio [™] + Danisco xylanase [™]

[0604] ¹ Accellerase[®] Trio[™]:组合了纤维素酶活性(包括内切葡聚糖酶活性和β-葡萄糖苷酶活性)和半纤维素酶活性(包括内切木聚糖酶活性和具有内切木聚糖酶活性的Danisco xylanase[™])。

[0605] 表2.实验2所进行的处理

[0606]

	处理	酶
1	基础饮食(反刍动物的完全饮食)	无
2	基础饮食+70%氨水预处理 cs	无
3	基础饮食+70%氨水预处理 cs	Accellerase [®] Trio [™] + Danisco xylanase [™]
4	基础饮食+70%苛性脱木质化 cs	无
5	基础饮食+70%苛性脱木质化 cs	Accellerase [®] Trio [™] + Danisco xylanase [™]
6	基础饮食+70%苛性脱木质化 swg	无
7	基础饮食+70%苛性脱木质化 swg	Accellerase [®] Trio [™] + Danisco xylanase [™]

[0607] ¹ Accellerase[®] Trio[™]:组合了纤维素酶活性(包括内切葡聚糖酶活性和β-葡萄糖苷酶活性)和半纤维素酶活性(包括内切木聚糖酶活性和具有内切木聚糖酶活性的Danisco xylanase[™])。

[0608] 结果

[0609] 单独评估生物质材料的实验1的结果表明,将酶(Accellerase[®] Trio[™]和Danisco Xylanase[™])添加至经稀氨水预处理的玉米秸秆以及苛性脱木质化玉米秸秆和柳枝稷中导致干物质和有机物质的消化率更高,也引起通过酸性和中性洗涤纤维的消化率测得的纤维消化率增大(表3)。加入饲用中酶后,经预处理的生物质材料的产气量也提高了。

[0610] 表3:经预处理的生物质材料的干物质(DMD)、有机物质(OMD)、酸性洗涤纤维(ADFD)和中性洗涤纤维(NDFD)的体外表观消化率。

[0611]

处理样	DMD (%)	OMD (%)	NDFD (%)	ADFD (%)	产气量 (mL)
玉米秸秆 (未处理的 CS)	19.8	20.4	0.7	-4.3	262
经稀氨水预处理的 CS (DAcs)	35.7	35.8	19.7	14.4	422
DAcs + 酶 ¹	44.9	46.1	30.4	24.7	558
苛性脱木质化 CS	35.7	35.6	43.1	39.6	540
苛性脱木质化 CS + 酶 ¹	46.2	45.6	49.7	45.9	763
苛性脱木质化柳枝稷(SGW)	25.0	24.2	30.6	26.4	346
苛性脱木质化 SGW + 酶 ¹	33.8	33.4	37.3	33.4	572

[0612] ¹酶: Accellerase® Trio™: 组合了纤维素酶活性(包括内切葡聚糖酶活性和β-葡萄糖苷酶活性)和半纤维素酶活性(包括内切木聚糖酶活性和具有内切木聚糖酶活性的Danisco xylanase™)。

[0613] 在实验2中,由经预处理的生物质构成反刍动物完全饮食的60%,结果表明,当加入饲用中酶时,根据中性和酸性洗涤纤维消化率评估的干物质消化率及纤维消化率增大了。同样,与仅经过预处理的生物质相比,当作为反刍动物完全饮食的一部分添加的经预处理的生物质与饲用中酶组合时,产气量更高。

[0614] 表4:实验饮食¹的干物质(DMD)、酸性洗涤纤维(ADFD)和中性洗涤纤维(NDFD)的体外表观消化率,以及发酵产气量。

[0615]

处理样	DMD (%)	NDFD (%)	ADFD (%)	产气量, psi
基础饮食	59.3	32.7	32.7	549
基础饮食+ 70% DAcs	45.9	25.9	19.9	372
基础饮食+ 70% DAcs + 酶 ¹	55.6	38.6	39.8	448
基础饮食+ 70% DLcs	51.7	48.2	43.5	479
基础饮食+ 70% DLcs + 酶	51.9	50.3	43.7	485
基础饮食+ 70% DLswg	41.6	39.7	38.5	156
基础饮食+ 70% DLswg + 酶	44.1	44.2	41.2	500

[0616] ¹酶: Accellerase® Trio™: 组合了纤维素酶活性(包括内切葡聚糖酶活性和β-葡萄糖苷酶活性)和半纤维素酶活性(包括内切木聚糖酶活性和具有内切木聚糖酶活性的Danisco xylanase™)。

[0617] DAcs—经稀氨水预处理的玉米秸秆;DLcs—苛性脱木质化玉米秸秆;DLswg—苛性脱木质化柳枝稷

[0618] 讨论

[0619] 如实验1中所观察到的,仅进行物理化学预处理会增加生物质材料的纤维消化率和产气量;然而,当在消化物中加入 Accellerase® Trio™和Danisco xylanase™形式的饲用中酶时,这些响应进一步得到提高。

[0620] 实例5:利用模拟鸡上消化道的体外模型研究 Accellerase® 1500和 Econase® XT 对经稀氨水预处理的玉米秸秆中存在的纤维的消化率的影响

[0621] 材料和方法

[0622] 含有玉米秸秆生物质材料的模拟饲料的体外消化

[0623] 表1示出了体外消化处理样的组成。为了模拟鸡饲料,将70%的生物质材料与30%的大豆粉(SBM)混合。对于生物质样品,进行两种类型的上胃肠道(GIT)消化。首先,制备未用 Accellerase[®] 1500或 Econase[®] XT处理的样品(样品称为“未处理样品”)。其次,制备在上胃肠道体外消化过程中用 Accellerase[®] 1500和 Econase[®] XT处理的样品(样品称为“饲用中样品”)。另外,制备基于纯玉米和大豆粉且不含生物质材料的两个对照饲料样品:用 Accellerase[®] 1500和 Econase[®] XT消化(称为“对照饲用中样品”),或未用 Accellerase[®] 1500和 Econase[®] XT消化(称为“对照样品”)。

[0624] Accellerase[®] 1500是可得自Danisco(现属于DuPont)的商业酶,并且具有某些纤维素酶活性例如内切葡聚糖酶活性、β-葡萄糖苷酶活性,以及某种半纤维素酶活性例如内切木聚糖酶活性。

[0625] Econase[®] XT是得自AB Vista的商业酶,并且具有内切1-4β木聚糖酶活性。

[0626] 表1:体外消化处理样的组成。

[0627]

样品名称	处理样的组成
对照样品	玉米饲料(70%的玉蜀黍和30%的大豆粉;不含维生素/矿物质)
对照饲用中样品	玉米饲料(70%的玉蜀黍和30%的大豆粉)+Accellerase [®] 1500 ¹ 和Econase [®] XT ²
CS 未处理样品	经稀氨水预处理的玉米秸秆 HP90-HP93(70%的CS和30%的SBM)
CS 饲用中样品	CS HP90-HP93(70%和30%的SBM)+Accellerase [®] 1500和Econase [®] XT

[0628] ¹ Accellerase[®] 1500:组合了纤维素酶活性(包括内切葡聚糖酶活性、纤维二糖水解酶活性和β-葡萄糖苷酶活性)和半纤维素酶活性(包括内切木聚糖酶活性)

[0629] ² Econase[®] XT:内切木聚糖酶

[0630] 使用图1所示的程序进行鸡的上胃肠道体外消化。根据小肠消化步骤中的目标干物质(DM)含量(最终DM%),每个模拟单元总共称取1、2或3g的干物质。将饲料和水混合,用HCl调节pH,然后分别以0.3mL/1g干物质和4.6μL/g干物质的剂量施用饲料酶 Accellerase[®] 1500和 Econase[®] XT。体外消化结束时,在30000xg、10℃下离心30min以分离液相,然后储存于-20℃下,直到分析可溶性碳水化合物组合物时取出。

[0631] 通过实例1所述方法评估体外消化后可溶性糖的释放、不溶性非淀粉多糖的测定、中性和酸性洗涤纤维的分析。

[0632] 结果

[0633] 生物质材料的纤维消化和可溶性糖的释放

[0634] 初步结果表明,与仅经过稀氨水预处理的玉米秸秆相比,在经稀氨水预处理的玉

米秸秆中添加 **Accellerase**[®] 1500 和 **Econase**[®] XT 增加了可溶性糖的释放, 减少了中性洗涤纤维的残留量、未消化干物质的残留量和不溶性 NSP 糖量。

[0635] 实例6: 利用模拟鸡上消化道的体外模型研究 **Celluclast**[®]、**Danisco Xylanase**[™] 和 **Accellerase**[®] BG[™] 对经稀氨水预处理的玉米秸秆中存在的纤维的消化率的影响

[0636] 材料和方法

[0637] 含有玉米秸秆生物质材料的模拟饲料的体外消化

[0638] 表1示出了体外消化处理样的组成。为了模拟鸡饲料, 将70%的生物质材料与30%的大豆粉(SBM)混合。对于生物质样品, 进行两种类型的上胃肠道(GIT)消化。首先, 制备未用 **Celluclast**[®]、**Danisco Xylanase**[™] 和 **Accellerase**[®] BG[™] 处理的样品(样品称为“未处理样品”)。其次, 制备在上胃肠道体外消化过程中用 **Celluclast**[®]、**Danisco Xylanase**[™] 和 **Accellerase**[®] BG[™] 处理的样品(样品称为“饲用中样品”)。另外, 制备基于纯玉米和大豆粉且不含生物质材料的两个对照饲料样品: 用 **Celluclast**[®]、**Danisco Xylanase**[™] 和 **Accellerase**[®] BG[™] 消化(称为“对照饲用中样品”), 或未用 **Celluclast**[®]、**Danisco Xylanase**[™] 和 **Accellerase**[®] BG[™] 消化(称为“对照样品”)。

[0639] **Celluclast**[®] 是得自Sigma-Aldrich的商业酶(C2730), 并且具有某些纤维素酶活性, 包括内切葡聚糖酶活性和β-葡糖苷酶活性。

[0640] **Danisco Xylanase**[™] 是得自Dansico(现属于DuPont)的商业酶并且具有内切木聚糖酶活性。

[0641] **Accellerase**[®] BG[™] 是得自Danisco(现属于DuPont)的商业酶并且具有β-葡糖苷酶活性。

[0642] 表1: 体外消化处理样的组成。

[0643]

样品名称	处理样的组成
对照样品	玉米饲料(70%的玉蜀黍和30%的大豆粉; 不含维生素/矿物质)
对照饲用中样品	玉米饲料(70%的玉蜀黍和30%的SBM) + Celluclast ^{®1} 、 Danisco Xylanase ^{™2} 和 Accellerase [®] BG ^{™3}
CS 未处理样品	经稀氨水预处理的玉米秸秆 HP90-HP93 (70%的CS和30%的SBM)
CS 饲用中样品	CS HP90-HP93 (70%和30%的SBM) + Celluclast [®] 、 Danisco Xylanase [™] 和 Accellerase [®] BG [™]

[0644] ¹ **Celluclast**[®]: 具有纤维素酶活性, 包括内切葡聚糖酶活性、纤维二糖水解酶活性和β-葡糖苷酶活性。

[0645] ² **Danisco Xylanase**[™]: 内切木聚糖酶

[0646] ³ **Accellerase**[®] BG[™]: β-葡糖苷酶

[0647] 使用图1所示的程序进行鸡的上胃肠道体外消化。根据小肠消化步骤中的目标干

物质(DM)含量(最终DM%),每个模拟单元总共称取1、2或3g的干物质。将饲料和水混合,用HCl调节pH,然后分别以0.1mL/g干物质、2.3μL/g干物质(40,000U/g)和0.15mL/g干物质的剂量施用饲料酶 **Celluclast**[®]、Danisco Xylanase[™]和 **Accellerase**[®] BG[™]。体外消化结束时,在30000xg、10℃下离心30min以分离液相,然后储存于-20℃下,直到分析可溶性碳水化合物组合物时取出。

[0648] 通过实例1所述方法评估体外消化后可溶性糖的释放、不溶性非淀粉多糖的测定、中性和酸性洗涤纤维的分析。

[0649] 结果

[0650] 生物质材料的纤维消化和可溶性糖的释放

[0651] 初步结果表明,与仅经过稀氨水预处理的玉米秸秆相比,在经稀氨水预处理的玉米秸秆中添加 **Celluclast**[®]、Danisco Xylanase[™]和 **Accellerase**[®] BG[™]增加了可溶性糖的释放,减少了中性洗涤纤维的残留量、未消化干物质的残留量和不溶性NSP糖量。

[0652] 实例7:利用模拟鸡上消化道的体外模型研究来自黑曲霉的纤维素酶(C1184-Sigma)以及 **Accellerase**[®] BG[™]对经稀氨水预处理的玉米秸秆中存在的纤维的消化率的影响

[0653] 材料和方法

[0654] 含有玉米秸秆生物质材料的模拟饲料的体外消化

[0655] 表1示出了体外消化处理样的组成。为了模拟鸡饲料,将70%的生物质材料与30%的大豆粉(SBM)混合。对于生物质样品,进行两种类型的上胃肠道(GIT)消化。首先,制备未用纤维素酶或 **Accellerase**[®] BG[™]处理的样品(样品称为“未处理样品”)。然后,制备在上胃肠道体外消化过程中用纤维素酶或 **Accellerase**[®] BG[™]处理的样品(样品称为“饲用中样品”)。另外,制备基于纯玉米和大豆粉且不含生物质材料的两个对照饲料样品:用纤维素酶或 **Accellerase**[®] BG[™]消化(称为“对照饲用中样品”),或未用纤维素酶或 **Accellerase**[®] BG[™]消化(称为“对照样品”)。

[0656] 来自黑曲霉的纤维素酶是得自Sigma-Aldrich的商业酶(C1184),并且具有包括内切葡聚糖酶活性在内的某些纤维素酶活性以及内切木聚糖酶活性。

[0657] **Accellerase**[®] BG[™]是得自Danisco(现属于DuPont)的商业酶并且具有β-葡糖苷酶活性。

[0658] 表1:体外消化处理样的组成。

[0659]

样品名称	处理样的组成
对照样品	玉米饲料(70%的玉蜀黍和30%的大豆粉;不含维生素/矿物质)
对照饲用中样品	玉米饲料(70%的玉蜀黍和30%的SBM)+纤维素酶 ¹ 或 Accellerase [®] BG ^{™2}
CS 未处理样品	经稀氨水预处理的玉米秸秆 HP90-HP93(70%的CS和30%的SBM)
CS 饲用中样品	CS HP90-HP93(70%和30%的SBM)+纤维素酶或 Accellerase [®] BG [™]

[0660] ¹来自黑曲霉的纤维素酶:组合了纤维素酶活性(包括内切葡聚糖酶活性)和内切

木聚糖酶活性。

[0661] ² Accellerase[®] BG[™]:β-葡萄糖苷酶

[0662] 使用图1所示的程序进行鸡的上胃肠道体外消化。根据小肠消化步骤中的目标干物质(DM)含量(最终DM%),每个模拟单元总共称取1、2或3g的干物质。将饲料和水混合,用HCl调节pH,然后分别以0.2mL/1g干物质和0.15mL/1g干物质的剂量施用饲料酶纤维素酶(C1184)或 Accellerase[®] BG[™]。体外消化结束时,在30000xg、10℃下离心30min以分离液相,然后储存于-20℃下,直到分析可溶性碳水化合物组合物时取出。

[0663] 通过实例1所述方法评估体外消化后可溶性糖的释放、不溶性非淀粉多糖的测定、中性和酸性洗涤纤维的分析。

[0664] 结果

[0665] 生物质材料的纤维消化和可溶性糖的释放

[0666] 初步结果表明,与仅经过稀氨水预处理的玉米秸秆相比,在经稀氨水预处理的玉米秸秆中添加纤维素酶(来自黑曲霉)和 Accellerase[®] BG[™]增加了可溶性糖的释放,减少了中性洗涤纤维的残留量、未消化干物质的残留量和不溶性NSP糖量。

[0667] 实例8:利用模拟猪上消化道的体外模型研究 Accellerase[®] 1500和 Econase[®] XT对经物理化学预处理的生物质材料中存在的纤维的消化率的影响

[0668] 材料和方法

[0669] 含有经物理化学预处理的生物质材料的模拟饲料的体外消化

[0670] 表1示出了体外消化处理样的组成。在碳水化合物酶 Accellerase[®] 1500和 Econase[®] XT存在或不存在的条件下,模拟猪的上消化道条件,对三种经物理化学预处理的生物质(DAcs:经稀氨水预处理的玉米秸秆;DLcs:苛性脱木质化玉米秸秆;DLswg:苛性脱木质化柳枝稷)和玉米进行消化。

[0671] Accellerase[®] 1500是可得自Danisco(现属于DuPont)的商业酶,并且具有某些纤维素酶活性例如内切葡聚糖酶活性、β-葡萄糖苷酶活性,以及某种半纤维素酶活性例如内切木聚糖酶活性。

[0672] Econase[®] XT是得自AB Vista的商业酶,并且具有内切1-4β木聚糖酶活性。

[0673] 表1:体外消化处理样的组成。

[0674]	处理样	处理样的组成
	对照样品	玉米粉
	对照样品+酶	玉米粉+Accellerase [®] 1500 ¹ 和 Econase [®] XT ²
	Dacs ³	经稀氨水预处理的玉米秸秆
	DAcs +酶	经稀氨水预处理的玉米秸秆+ Accellerase [®] 1500和 Econase [®] XT
	DLswg ⁴	苛性脱木质化柳枝稷
	DLswg +酶	苛性脱木质化柳枝稷+ Accellerase [®] 1500和 Econase [®] XT
	DLcs ⁵	苛性脱木质化玉米秸秆
	DLcs +酶	苛性脱木质化玉米秸秆+ Accellerase [®] 1500和 Econase [®] XT

[0675] ¹ Accellerase[®] 1500:组合了纤维素酶活性(包括内切葡聚糖酶活性、纤维二糖水解酶活性和β-葡萄糖苷酶活性)和半纤维素酶活性(包括内切木聚糖酶活性)

[0676] ² Econase[®] XT:内切木聚糖酶

[0677] ³ DAcS—经稀氨水预处理的玉米秸秆

[0678] ⁴ DLswg—苛性脱木质化柳枝稷

[0679] ⁵ DLcs—苛性脱木质化玉米秸秆

[0680] 在批次试验中模拟胃和小肠条件,评估消化系统的上部中不同酶对饲料成分的发酵特性的影响。向3g试验材料和酶(干物质)中加入28mL含有粘蛋白和胃蛋白酶的胃液(pH 3.5),然后放入设置为90rpm的振荡培养箱内,在39℃下温育2小时。分别以0.3mL/g干物质和1.4mg/g干物质的剂量施用 Accellerase[®] 1500和 Econase[®] XT 5P。在胃温育期间,以固定的时间间隔测量pH值,并调节pH至3.5。完成胃温育后,加入12mL胰液,其中含有牛胆汁(6g/L)、胰酶(6g/L)、碳酸氢钠(12.5g/L)和磷酸盐缓冲液(pH 6.8),在39℃下温育消化液6h同时伴以振荡。在小肠温育期间,定期测量pH值,并根据需要调节pH至6.8。使用HPAE-PAD(高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测器)(Dionex Technical Note 20)测定可溶性糖的释放(总糖:葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖)。按照Englyst等人(1992)所述对可溶性和不溶性非淀粉多糖的测定进行评估。

[0681] 结果

[0682] 经物理化学预处理的生物质材料的NSP消化和可溶性糖的释放

[0683] 结果表明,与仅经过物理化学预处理相比,在经物理化学预处理的生物质(经稀氨水预处理的玉米秸秆、苛性脱木质化玉米秸秆和苛性脱木质化柳枝稷)中添加 Accellerase[®] 1500和 Econase[®] XT增加了总的可溶性糖(阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、木糖和甘露糖)的释放(表2)。

[0684] 表2:模拟猪的上消化道条件,在添加或不添加饲用中 Accellerase[®] 1500和 Econase[®] XT的情况下,用3g(干物质)测试材料进行体外消化后对可溶性糖的分析。

[0685]

	阿拉伯糖		半乳糖		葡萄糖		木糖		甘露糖	
消化后的总可溶性糖	μM	SD	μM	SD	mM	SD	μM	SD	μM	SD

[0686]

玉米	21.6	1.1	830.5	9.5	47.1	1.0	ND	ND	ND	ND
玉米+ Accellerase [®] 1500 ¹ 和 Econase [®] XT ²	54.3	1.8	828.9	21.3	52.0	2.7	1.3	1.2	236.1	17.1
DAcs ³	44.9	16.1	14.9	0.3	2.8	0.2	243.5	7.8	ND	ND
DAcs + Accellerase [®] 1500 ¹ 和 Econase [®] XT ²	1010.1	35.0	40.3	3.6	33.2	1.1	2116.0	46.4	334.7	28.1
DLcs ⁴	66.4	53.6	8.3	4.9	1.7	0.1	ND	ND	ND	ND
DLcs + Accellerase [®] 1500 ¹ 和 Econase [®] XT ²	1259.1	28.6	201.7	18.4	45.2	2.2	1789.5	38.3	40.1	3.8
DLswg ⁵	130.7	13.8	6.4	0.5	0.3	0.3	710.3	39.0	ND	ND
DLswg + Accellerase [®] 1500 ¹ 和 Econase [®] XT ²	1495.0	209.8	184.9	27.6	49.6	4.8	4113.7	486.4	780.2	143.0

[0687] ND—低于检测限

[0688] ¹ Accellerase[®] 1500:组合了纤维素酶活性(包括内切葡聚糖酶活性、纤维二糖水解酶活性和β-葡萄糖苷酶活性)和半纤维素酶活性(包括内切木聚糖酶活性)

[0689] ² Econase[®] XT:内切木聚糖酶

[0690] ³ DAcs—经稀氨水预处理的玉米秸秆

[0691] ⁴ DLcs—苛性脱木质化玉米秸秆

[0692] ⁵ DLswg—苛性脱木质化柳枝稷

[0693] 模拟猪的上消化道条件进行体外消化后分析NSP糖,结果表明,与仅经过物理化学预处理相比,添加饲用中 Accellerase[®] 1500和 Econase[®] XT增加了经稀氨水预处理的玉米秸秆、苛性脱木质化玉米秸秆和苛性脱木质化柳枝稷中总NSP糖的释放(表3)。这样的减少主要包括不溶性葡萄糖、木糖和阿拉伯糖释放的减少。

[0694] 表3:模拟猪的上消化道条件,在添加或不添加饲用中 Accellerase[®] 1500和 Econase[®] XT的情况下,用3g(干物质)测试材料进行体外消化后对非淀粉多糖(NSP)的分析。

[0695]

	葡萄糖	木糖	阿拉伯糖	半乳糖	合计
消化后的可溶性 NSP 糖	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g
玉米	0.8	0.3	0.2	0.2	2.2
玉米+ Accellerase [®] 1500 ¹ 和 Econase [®] XT ²	0.3	0.1	0.1	0.2	1.3
DAcs ³	0.5	3.0	1.1	0.7	6.3
DAcs + Accellerase [®] 1500 ¹ 和 Econase [®] XT ²	0.4	2.1	1.0	0.8	5.2
DLcs ⁴	0.4	0.9	0.2	0.3	2.3
DLcs + Accellerase [®] 1500 ¹ 和 Econase [®] XT ²	0.9	1.4	0.5	0.4	3.8

[0696]

DLswg ⁵	2.3	3.2	0.7	0.4	7.1
DLswg + Accellerase [®] 1500 ¹ 和 Econase [®] XT ²	2.8	0.5	0.4	0.4	4.6
消化后的不溶性 NSP 糖					
玉米	1.5	1.7	1.2	0.4	4.9
玉米+ Accellerase [®] 1500 ¹ 和 Econase [®] XT ²	2.2	2.7	1.6	0.5	7.2
DAcs	24.8	10.7	1.3	0.4	37.4
DAcs + Accellerase [®] 1500 ¹ 和 Econase [®] XT ²	18.3	5.5	0.6	0.2	24.9
DLcs	45.5	19.2	2.5	0.5	68.0
DLcs + Accellerase [®] 1500 ¹ 和 Econase [®] XT ²	31.8	8.5	0.9	0.3	41.8
DLswg	35.5	14.8	1.8	0.4	52.4
DLswg + Accellerase [®] 1500 ¹ 和 Econase [®] XT ²	29.9	11.5	1.3	0.4	43.1
消化后的总 NSP 糖					
玉米	2.3	2.1	1.4	0.6	7.1
玉米+ Accellerase [®] 1500 ¹ 和 Econase [®] XT ²	2.5	2.7	1.7	0.7	8.5
DAcs	25.3	13.6	2.4	1.1	43.6
DAcs + Accellerase [®] 1500 ¹ 和 Econase [®] XT ²	18.8	7.6	1.6	1.1	30.1
DLcs	45.9	20.1	2.7	0.7	70.3
DLcs + Accellerase [®] 1500 ¹ 和 Econase [®] XT ²	32.7	9.9	1.4	0.7	45.6
DLswg	37.8	18.0	2.4	0.8	59.6
DLswg + Accellerase [®] 1500 ¹ 和 Econase [®] XT ²	32.8	12.0	1.6	0.7	47.7

[0697] ¹ Accellerase[®]1500:组合了纤维素酶活性(包括内切葡聚糖酶活性、纤维二糖水解酶活性和β-葡萄糖苷酶活性)和半纤维素酶活性(包括内切木聚糖酶活性)

[0698] ² Econase[®] XT:内切木聚糖酶

[0699] ³ DAcs—经稀氨水预处理的玉米秸秆

[0700] ⁴ DLcs—苛性脱木质化玉米秸秆

[0701] ⁵ DLswg—苛性脱木质化柳枝稷

[0702] 结论

[0703] 在模拟的猪上消化道条件(上GIT)下,与仅经过物理化学预处理相比,向经物理化学预处理的生物质中添加至少具有内切葡聚糖酶、内切木聚糖酶和β-葡萄糖苷酶活性的饲用中酶增加了可溶性糖的释放,减少了总非淀粉多糖,特别是不溶性级分的释放。由于动物不能在体内消化这些多糖,因此总非淀粉多糖(NSP)的减少是有利的。所以,添加能够分解NSP(特别是不溶性级分)的饲用中酶对于向动物释放营养物质具有重要意义。

[0704] 实例9:利用模拟猪上消化道的体外模型研究 **Celluclast[®]**、Danisco **Xylanase[™]**和 **Accellerase[®] BG[™]**对经物理化学预处理的生物质材料中存在的纤维的消化率的影响

[0705] 材料和方法

[0706] 含有经物理化学预处理的生物质材料的模拟饲料的体外消化

[0707] 表1示出了体外消化处理样的组成。在碳水化合物酶 **Celluclast[®]**、Danisco **Xylanase[™]**和 **Accellerase[®] BG[™]**存在或不存在的条件下,模拟猪的上消化道条件,对三种经物理化学预处理的生物质(DAcs:经稀氨水预处理的玉米秸秆;DLcs:苛性脱木质化玉米秸秆;DLswg:苛性脱木质化柳枝稷)和玉米进行消化。

[0708] **Celluclast[®]**是得自Sigma-Aldrich的商业酶(C2730),并且具有某些纤维素酶活性,包括内切葡聚糖酶活性和 β -葡糖苷酶活性。

[0709] **Danisco Xylanase[™]**是得自Danisco(现属于DuPont)的商业酶并且具有内切木聚糖酶活性。

[0710] **Accellerase[®] BG[™]**是得自Danisco(现属于DuPont)的商业酶并且具有 β -葡糖苷酶活性。

[0711] 表1:体外消化处理样的组成。

[0712]

处理样	处理样的组成
对照样品	玉米粉
对照样品+酶	玉米粉+Celluclast ^{®1} 、Danisco Xylanase ^{™2} 和 Accellerase [®] BG ^{™3} 。
Dacs ⁴	经稀氨水预处理的玉米秸秆
DACS +酶	经稀氨水预处理的玉米秸秆+Celluclast ^{®1} 、Danisco Xylanase ^{™2} 和 Accellerase [®] BG ^{™3} 。
DLswg ⁵	苛性脱木质化柳枝稷
DLswg +酶	苛性脱木质化柳枝稷+Celluclast ^{®1} 、Danisco Xylanase ^{™2} 和 Accellerase [®] BG ^{™3} 。
DLcs ⁶	苛性脱木质化玉米秸秆
DLcs +酶	苛性脱木质化玉米秸秆+ Celluclast ^{®1} 、Danisco Xylanase ^{™2} 和 Accellerase [®] BG ^{™3} 。

[0713] ¹ **Celluclast[®]**:组合了多种纤维素酶活性,包括内切葡聚糖酶活性、纤维二糖水解酶活性和 β -葡糖苷酶活性。

[0714] ² **Danisco Xylanase[™]**:内切木聚糖酶

[0715] ³ **Accellerase[®] BG[™]**: β -葡糖苷酶

[0716] ⁴ **DACS**—经稀氨水预处理的玉米秸秆

[0717] ⁵ **DLswg**—苛性脱木质化柳枝稷

[0718] ⁶ **DLcs**—苛性脱木质化玉米秸秆

[0719] 在批次试验中模拟胃和小肠条件,评估消化系统的上部中不同酶对饲料成分的发酵特性的影响,如实例8所述。分别以0.1mL/g干物质、3.5 μ L/g干物质和0.15mL/g干物质的剂量施用**Celluclast[®]**、**Danisco Xylanase[™]**和**Accellerase[®] BG**。

[0720] 评估可溶性糖(总糖:葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖)和可溶性和不溶性非淀粉多糖的释放,如实例8所述。

[0721] 结果

[0722] 经物理化学预处理的生物质材料的NSP消化和可溶性糖的释放

[0723] 结果表明,与仅经过物理化学预处理相比,在经物理化学预处理的生物质(经稀氨水预处理的玉米秸秆、苛性脱木质化玉米秸秆和苛性脱木质化柳枝稷)中添加**Celluclast[®]**、**Danisco Xylanase[™]**和**Accellerase[®] BG**增加了总的可溶性糖(阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、木糖和甘露糖)的释放(表2)。

[0724] 表2. 模拟猪的上消化道条件, 以3g干物质为测试材料进行体外消化后, 对比添加和未添加饲用中酶的可溶性糖分析结果。

[0725]

	阿拉伯糖		半乳糖		葡萄糖		木糖		甘露糖	
消化后的总可溶性糖	μM	SD	μM	SD	mM	SD	μM	SD	μM	SD
玉米	21.6	1.1	830.5	9.5	47.1	1.0	ND	ND	ND	ND
玉米+ Celluclast ^{®1} 、 Danisco Xylanase ^{™2} 以及 Accellerase [®] BG ^{™3}	693.4	84.6	1066.6	67.8	67.0	0.6	126.6	7.3	ND	ND
DAcs ⁴	44.9	16.1	14.9	0.3	2.8	0.2	243.5	7.8	ND	ND
DAcs + Celluclast ^{®1} 、 Danisco Xylanase ^{™2} 以及 Accellerase [®] BG ^{™3}	7454.3	208.5	295.2	6.4	59.4	3.0	15689.2	1076.2	2189.5	250.7

[0726]

DLcs ⁵	66.4	53.6	8.3	4.9	1.7	0.1	ND	ND	ND	ND
DLcs + Celluclast ^{®1} 、 Danisco Xylanase ^{™2} 以及 Accellerase [®] BG ^{™3}	7785.7	276.9	695.1	23.1	71.9	4.8	35832.4	2143.3	1422.8	355.2
DLswg ⁶	130.7	13.8	6.4	0.5	0.3	0.3	710.3	39.0	ND	ND
DLswg + Celluclast ^{®1} 、 Danisco Xylanase ^{™2} 以及 Accellerase [®] BG ^{™3}	6639.3	272.6	465.6	14.1	71.2	1.1	31702.7	287.2	2177.4	477.2

[0727] ND—低于检测限

[0728] ¹Celluclast[®]: 组合了多种纤维素酶活性, 包括内切葡聚糖酶活性、纤维二糖水解酶活性和β-葡萄糖苷酶活性。

[0729] ²Danisco Xylanase[™]: 内切木聚糖酶

[0730] ³Accellerase[®] BG[™]: β-葡萄糖苷酶

[0731] ⁴DAcs—经稀氨水预处理的玉米秸秆

[0732] ⁵DLcs—苛性脱木质化玉米秸秆

[0733] ⁶DLswg—苛性脱木质化柳枝稷

[0734] 模拟猪的上消化道条件的体外消化后分析NSP糖, 结果表明, 相比于仅经过物理化

学预处理,添加饲用中 Celluclast[®]、Danisco XylanaseTM和 Accellerase[®] BG减少了稀氨水预处理后的玉米秸秆、苛性脱木质化玉米秸秆和苛性脱木质化柳枝稷中总NSP糖的释放(表3)。这样的减少主要包括不溶性葡萄糖、木糖和阿拉伯糖释放的减少。

[0735] 表3. 模拟猪的上消化道条件,以3g干物质为测试材料进行体外消化后,对比添加和未添加饲用中酶的非淀粉多糖(NSP)分析结果。

[0736]

	葡萄糖	木糖	阿拉伯糖	半乳糖	合计
消化后的可溶性 NSP 糖	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g
玉米	0.8	0.3	0.2	0.2	2.2
玉米+ Celluclast ^{®1} 、Danisco Xylanase ^{TM2} 以及 Accellerase [®] BG ^{TM3}	0.4	0.0	0.1	0.2	1.4
DAcs ⁴	0.5	3.0	1.1	0.7	6.3

[0737]

DAcs + Celluclast ^{®1} 、Danisco Xylanase ^{™2} 以及 Accellerase [®] BG ^{™3}	0.3	1.0	0.6	0.8	3.7
DLcs ⁵	0.4	0.9	0.2	0.3	2.3
DLcs + Celluclast ^{®1} 、Danisco Xylanase ^{™2} 以及 Accellerase [®] BG ^{™3}	0.2	0.7	0.2	0.4	2.1
DLswg ⁶	2.3	3.2	0.7	0.4	7.1
DLswg + Celluclast ^{®1} 、Danisco Xylanase ^{™2} 以及 Accellerase [®] BG ^{™3}	0.5	0.7	0.2	0.3	2.4
消化后的不溶性 NSP 糖					
玉米	1.5	1.7	1.2	0.4	4.9
玉米 + Celluclast ^{®1} 、Danisco Xylanase ^{™2} 以及 Accellerase [®] BG ^{™3}	2.3	2.9	1.6	0.5	7.5
DAcs	24.8	10.7	1.3	0.4	37.4
DAcs + Celluclast ^{®1} 、Danisco Xylanase ^{™2} 以及 Accellerase [®] BG ^{™3}	18.0	5.4	0.5	0.3	24.3
DLcs	45.5	19.2	2.5	0.5	68.0
DLcs + Celluclast ^{®1} 、Danisco Xylanase ^{™2} 以及 Accellerase [®] BG ^{™3}	28.6	7.3	0.8	0.2	37.1
DLswg	35.5	14.8	1.8	0.4	52.4
DLswg + Celluclast ^{®1} 、Danisco Xylanase ^{™2} 以及 Accellerase [®] BG ^{™3}	30.0	10.2	1.1	0.3	41.6
消化后的总 NSP 糖					
玉米	2.3	2.1	1.4	0.6	7.1
玉米 + Celluclast ^{®1} 、Danisco Xylanase ^{™2} 以及 Accellerase [®] BG ^{™3}	2.8	2.9	1.7	0.8	8.9
DAcs	25.3	13.6	2.4	1.1	43.6
DAcs + Celluclast ^{®1} 、Danisco Xylanase ^{™2} 以及 Accellerase [®] BG ^{™3}	18.3	6.4	1.1	1.0	28.1
DLcs	45.9	20.1	2.7	0.7	70.3
DLcs + Celluclast ^{®1} 、Danisco Xylanase ^{™2} 以及 Accellerase [®] BG ^{™3}	30.5	10.9	1.3	0.6	44.0
DLswg	37.8	18.0	2.4	0.8	59.6
DLswg + Celluclast ^{®1} 、Danisco Xylanase ^{™2} 以及 Accellerase [®] BG ^{™3}	28.7	8.0	1.0	0.6	39.2

[0738] ¹ Celluclast[®]: 组合了多种纤维素酶活性, 包括内切葡聚糖酶活性、纤维二糖水解酶活性和β-葡萄糖苷酶活性。

[0739] ² Danisco Xylanase[™]: 内切木聚糖酶

[0740] ³ Accellerase[®] BG[™]: β-葡萄糖苷酶

[0741] ⁴ DAcs—经稀氨水预处理的玉米秸秆

[0742] ⁵ DLcs—苛性脱木质化玉米秸秆

[0743] ⁶ DLswg—苛性脱木质化柳枝稷

[0744] 结论

[0745] 在猪的模拟消化条件(上GIT)下, 相比于仅经过物理化学预处理, 将至少具有内切葡聚糖酶活性、内切木聚糖酶活性和β-葡萄糖苷酶活性的饲用中酶添加到经过物理化学预

处理的生物质中,增加了可溶性糖的释放,减少了总非淀粉多糖特别是不溶性组分的释放。

[0746] 实例10:利用模拟猪上消化道的体外模型来研究来自黑曲霉的纤维素酶(C1184-Sigma)以及 Accellerase[®] BGTM对物理化学预处理的生物质材料中存在的纤维的消化率的影响

[0747] 材料和方法

[0748] 包含物理化学预处理生物质材料的模拟饲料的体外消化

[0749] 表1示出体外消化处理样的组成。在添加和不添加来自黑曲霉的碳水化合物酶纤维素酶(C1184-Sigma)和 Accellerase[®] BGTM的情况下,模拟猪的上消化道条件对三种经物理化学预处理的生物质(DAcs:经稀氨水预处理的玉米秸秆,DLcs:苛性脱木质化玉米秸秆,DLswg:苛性脱木质化柳枝稷)和玉米进行消化。

[0750] 来自黑曲霉的纤维素酶是可得自Sigma-Aldrich(C1184)的商业酶,并具有某些纤维素酶活性,包括内切葡聚糖酶活性,以及内切木聚糖酶活性。

[0751] Accellerase[®] BGTM是可得自Danisco(现属于DuPont)的商业酶,并具有β-葡萄糖苷酶活性。

[0752] 表1. 体外消化处理样的组成。

[0753]

处理样	处理样的组成
对对照样	玉米粉
对对照样+酶	玉米粉+来自黑曲霉的纤维素酶 ¹ (C1184-Sigma)以及 Accellerase [®] BG ^{TM2}
Dacs ³	经稀氨水预处理的玉米秸秆
DAcs +酶	经稀氨水预处理的玉米秸秆+来自黑曲霉的纤维素酶 ¹ (C1184-Sigma)以及 Accellerase [®] BG ^{TM2}
DLswg ⁴	苛性脱木质化柳枝稷
DLswg +酶	苛性脱木质化柳枝稷+来自黑曲霉的纤维素酶 ¹ (C1184-Sigma)以及 Accellerase [®] BG ^{TM2}
DLcs ⁵	苛性脱木质化玉米秸秆
DLcs +酶	苛性脱木质化玉米秸秆+来自黑曲霉的纤维素酶 ¹ (C1184-Sigma)以及 Accellerase [®] BG ^{TM2}

[0754] ¹来自黑曲霉的纤维素酶:组合了纤维素酶活性(包括内切葡聚糖酶活性)和内切木聚糖酶活性。

[0755] ² Accellerase[®] BGTM:β-葡萄糖苷酶

[0756] ³DAcs—经稀氨水预处理的玉米秸秆

[0757] ⁴DLswg—苛性脱木质化柳枝稷

[0758] ⁵DLcs—苛性脱木质化玉米秸秆

[0759] 在批次实验(如实例8所述)中,模拟胃和小肠条件来评估消化系统的上部中不同酶对饲料原料的发酵特性的影响。分别以0.2g/g干物质、0.15mL/g干物质的剂量施加来自黑曲霉的纤维素酶(C1184-Sigma)和 Accellerase[®] BGTM。根据实例8所述的方法评估可溶性糖(包括:葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖)及可溶性和不溶性非淀粉多糖的释放。

[0760] 结果

[0761] 物理化学预处理生物质材料的纤维消化和可溶性糖的释放

[0762] 结果表明,相比于仅经过物理化学预处理的生物质,在物理化学预处理的生物质(稀氨水预处理后的玉米秸秆、苛性脱木质化玉米秸秆和苛性脱木质化柳枝稷)中添加来自黑曲霉的纤维素酶(C1184-Sigma)和 Accellerase[®] BGTM,增加了可溶性糖(阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、木糖和甘露糖)的总释放量(表2)。

[0763] 表2.模拟猪的上消化道条件,以3g(干物质)测试材料进行体外消化后,对比添加和未添加饲用中酶的可溶性糖分析结果。

[0764]

	阿拉伯糖		半乳糖		葡萄糖		木糖		甘露糖	
消化后的总可溶性糖	μM	SD	μM	SD	mM	SD	μM	SD	μM	SD
玉米	21.6	1.1	830.5	9.5	47.1	1.0	ND	ND	ND	ND
玉米+来自黑曲霉的纤维素酶 ¹ 以及 Accellerase [®] BG ^{TM2}	1378.8	97.4	1563.3	94.4	108.7	2.6	189.2	25.3	ND	ND
DAcs ³	44.9	16.1	14.9	0.3	2.8	0.2	243.5	7.8	ND	ND
DAcs +来自黑曲霉的纤维素酶 ¹	6636.9	398.9	900.3	71.5	79.3	2.2	8130.7	739.7	1504.0	294.7

[0765]

以及 Accellerase [®] BG ^{TM2}										
DLcs ⁴	66.4	53.6	8.3	4.9	1.7	0.1	ND	ND	ND	ND
DLcs +来自黑曲霉的纤维素酶 ¹ 以及 Accellerase [®] BG ^{TM2}	8489.9	374.8	1039.7	46.3	68.3	2.9	22397.4	1298.9	1971.5	174.0
DLswg ⁵	130.7	13.8	6.4	0.5	0.3	0.3	710.3	39.0	ND	ND
DLswg +来自黑曲霉的纤维素酶 ¹ 以及 Accellerase [®] BG ^{TM2}	6931.8	383.0	873.7	50.3	64.5	2.2	21762.0	4534.9	1516.2	413.0

[0766] ND—低于检测限

[0767] ¹来自黑曲霉的纤维素酶:组合了纤维素酶活性(包括内切葡聚糖酶活性)和内切木聚糖酶活性。

[0768] ² Accellerase[®] BGTM:β-葡萄糖苷酶

[0769] ³DAcs—经稀氨水预处理的玉米秸秆

[0770] ⁴DLcs—苛性脱木质化玉米秸秆

[0771] ⁵DLswg—苛性脱木质化柳枝稷

[0772] 模拟猪的上消化道条件的体外消化后分析NSP糖,结果表明,相比于仅经过物理化学预处理,添加来自黑曲霉的饲用中纤维素酶(C1184-Sigma)和 Accellerase® BG™减少了经稀氨水预处理的玉米秸秆、苛性脱木质化玉米秸秆和苛性脱木质化柳枝稷中总NSP糖的释放(表3)。这样的减少主要包括不溶性葡萄糖、木糖和阿拉伯糖释放的减少。

[0773] 表3. 模拟猪的上消化道条件,以3g(干物质)测试材料进行体外消化后,对比添加和未添加饲用中酶的非淀粉多糖(NSP)糖分析结果。

[0774]

	葡萄糖	木糖	阿拉伯糖	半乳糖	合计
消化后的可溶性 NSP 糖	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g
玉米	0.8	0.3	0.2	0.2	2.2
玉米+来自黑曲霉的纤维素酶 ¹ 以及 Accellerase® BG™ ²	0.5	0.1	0.0	0.2	1.2
DACS ³	0.5	3.0	1.1	0.7	6.3

[0775]

DAcs + 来自黑曲霉的纤维素酶 ¹ 以及 Accellerase [®] BG ^{TM2}	0.9	1.0	0.5	0.6	3.5
DLcs ⁴	0.4	0.9	0.2	0.3	2.3
DLcs + 来自黑曲霉的纤维素酶 ¹ 以及 Accellerase [®] BG ^{TM2}	2.0	1.0	0.3	0.4	4.2
DLswg ⁵	2.3	3.2	0.7	0.4	7.1
DLswg + 来自黑曲霉的纤维素酶 ¹ 以及 Accellerase [®] BG ^{TM2}	0.4	0.5	0.2	0.3	2.0
消化后的不溶性 NSP 糖					
玉米	1.5	1.7	1.2	0.4	4.9
玉米 + 来自黑曲霉的纤维素酶 ¹ 以及 Accellerase [®] BG ^{TM2}	2.1	2.4	1.4	0.4	6.5
DAcs	24.8	10.7	1.3	0.4	37.4
DAcs + 来自黑曲霉的纤维素酶 ¹ 以及 Accellerase [®] BG ^{TM2}	19.8	5.4	0.5	0.2	26.0
DLcs	45.5	19.2	2.5	0.5	68.0
DLcs + 来自黑曲霉的纤维素酶 ¹ 以及 Accellerase [®] BG ^{TM2}	36.4	8.3	0.8	0.2	45.9
DLswg	35.5	14.8	1.8	0.4	52.4
DLswg + 来自黑曲霉的纤维素酶 ¹ 以及 Accellerase [®] BG ^{TM2}	36.5	11.2	1.2	0.3	49.5
消化后的总 NSP 糖					
玉米	2.3	2.1	1.4	0.6	7.1
玉米 + 来自黑曲霉的纤维素酶 ¹ 以及 Accellerase [®] BG ^{TM2}	2.6	2.5	1.4	0.6	7.7
DAcs	25.3	13.6	2.4	1.1	43.6
DAcs + 来自黑曲霉的纤维素酶 ¹ 以及 Accellerase [®] BG ^{TM2}	20.6	6.4	1.0	0.8	29.5
DLcs	45.9	20.1	2.7	0.7	70.3
DLcs + 来自黑曲霉的纤维素酶 ¹ 以及 Accellerase [®] BG ^{TM2}	38.5	9.3	1.1	0.6	50.1
DLswg	37.8	18.0	2.4	0.8	59.6
DLswg + 来自黑曲霉的纤维素酶 ¹ 以及 Accellerase [®] BG ^{TM2}	36.9	11.7	1.4	0.6	51.3

[0776] ¹来自黑曲霉的纤维素酶:组合了纤维素酶活性(包括内切葡聚糖酶活性)和内切木聚糖酶活性。

[0777] ² Accellerase[®] BGTM:β-葡萄糖苷酶

[0778] ³DAcs—经稀氨水预处理的玉米秸秆

[0779] ⁴DLcs—苛性脱木质化玉米秸秆

[0780] ⁵DLswg—苛性脱木质化柳枝稷

[0781] 结论

[0782] 在猪的模拟消化条件(上GIT)下,相比于仅经过物理化学预处理,将至少具有内切葡聚糖酶活性、内切木聚糖酶活性和β-葡萄糖苷酶活性的饲用中酶添加到经过物理化学预处理的生物质中,增加了可溶性糖的释放,减少了总非淀粉多糖特别是不溶性级分的释放。

[0783] 以上说明书中提到的所有出版物以引用的方式并入本文。本领域的技术人员应当

能够理解,可在不脱离本发明的范围和精神的前提下,对本发明所述方法和体系进行不同修改和更改。虽然已结合特定的优选实施例对本发明进行了描述,但应该理解,所要求保护的本发明不应不当地局限于这些特定的实施例。实际上,对于生物化学和生物技术或相关领域的技术人员显而易见的用于实施本发明的所述模式的不同修改形式也应该在以下权利要求书范围内。

[0784] 参考文献

[0785] Adesogan AT,Krueger NK,Kim SC(2005).A novel wireless automated system for measuring fermentation gas production kinetics of feeds and its application to feed characterization.Anim.Feed Sci.Technol.,(123-124):211-223.

[0786] Dionex Technical Note 20.Analysis of carbohydrates by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAE-PAD):http://www.dionex.com/en-us/webdocs/5023-TN20_LPN032857-04.pdf.

[0787] Englyst,HN,Quigley ME,Hudson GJ,Cummings JH(1992).Determination of dietary fibre as non-starch polysaccharides by gas chromatography.Analyst.117(11):1707-1714.

序列表

<110>	DuPont 营养生物科学 ApS	
<120>	方法	
<130>	P101997PCT	
<150>	US 61/837755	
<151>	2013-06-21	
<160>	36	
<170>	专利版本 3.5	
<210>	1	
<211>	699	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	编码内切木聚糖酶的序列 (FoxXyn6)	
<400>	1	
[0001]	atggtttcct tcacctctct cctegccgcc gtctcggetg teactgggtg catggccett	60
	ccctccgctc agcccggtga cgcatgagc gtgtcgagc gtgaccctcc cacaacgctc	120
	clegacaagc gcacacagcc cactactggc acaagcggcg gttactactt cttttctcgg	180
	actgatacac ccaactctgt caccacacc aacggcaacg gtggccagtt cagcatgcag	240
	tggagcggca acggcaacca cgtcgggtga aagggttga tgcttggtac ttctgcacc	300
	atcaagtact ctggtttcta caacccaac ggcaacagct acctcgccgt ttacggttgg	360
	acccgcaacc ctctcattga gtactacatc gttgagaact tcggcactta caacccctct	420
	tccggtggcc agaagaaggg tgaggccaat gttgacggat cgtctacga tatctacgic	480
	agcacccggtg tcaacgcccc ctccattgac ggtaacaaga ctttcagca gtactggctc	540
	gtccgaagca acaagcgttc cagcgatcc gtcaataacc gtgtcattt ccaggcctgg	600
	aagaacgtcg gctcaacct tggtaaccac gactatcaga tccttgcgtg tgagggttac	660
	tacagctctg gctctgccag catgactgtc tcccagtaa	699
<210>	2	

<211> 642
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 编码内切木聚糖酶的序列(FoxXyn6)

<400> 2
 ctctccctccg ctccagcccg tgacggcatg agcgttgctg agcgtgaacc tcccacaaac 60
 gtcctcgaca agcgcactca gcccaactact ggcacaagcg gtggttacta cttctcttct 120
 tggactgata caccacaactc tgtcacctac accaacggca acgggtggcca gttcagcatg 180
 cagtggagcg gcaacggcaa ccacgtcggt ggaaagggtt ggatgcctgg tacttctcgc 240
 accatcaagt actctgggtc ttacaacccc aacggcaaca gctacctcgc cgtttacggt 300
 tggaccgca accctctcat tgagtactac atcgttgaga acttcggcac ttacaacccc 360
 tcttccggtg gccagaagaa gggtagggtc aatgttgacg gatctgtcta cgatatctac 420
 gtcagcaccg ggtcaacgc cccctccatt gacggtaaca agacattica gcagtactgg 480
 tctgtccgac geaacaagcg ttccagcgga tccgtcaata ccggtgctca ttccagggc 540
 tggaagaacg tcggcctcaa ccttggtacc cagcactatc agatccttgc tgttgagggt 600
 tactacagct ctggtcttgc cagcatgaet gtctcccagt aa 642

[0002]

<210> 3
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 内切木聚糖酶多肽序列(FoxXyn6)

<400> 3

Leu Pro Ser Ala Gln Pro Val Asp Gly Met Ser Val Val Glu Arg Asp
 1 5 10 15

Pro Pro Thr Asn Val Leu Asp Lys Arg Thr Gln Pro Thr Thr Gly Thr
 20 25 30

Ser Gly Gly Tyr Tyr Phe Ser Phe Trp Thr Asp Thr Pro Asn Ser Val
 35 40 45

Thr Tyr Thr Asn Gly Asn Gly Gly Gln Phe Ser Met Gln Trp Ser Gly
50 55 60

Asn Gly Asn His Val Gly Gly Lys Gly Trp Met Pro Gly Thr Ser Arg
65 70 75 80

Thr Ile Lys Tyr Ser Gly Ser Tyr Asn Pro Asn Gly Asn Ser Tyr Leu
85 90 95

Ala Val Tyr Gly Trp Thr Arg Asn Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Ile Val
100 105 110

Glu Asn Phe Gly Thr Tyr Asn Pro Ser Ser Gly Gly Gln Lys Lys Gly
115 120 125

Glu Val Asn Val Asp Gly Ser Val Tyr Asp Ile Tyr Val Ser Thr Arg
130 135 140

[0003]

Val Asn Ala Pro Ser Ile Asp Gly Asn Lys Thr Phe Gln Gln Tyr Trp
145 150 155 160

Ser Val Arg Arg Asn Lys Arg Ser Ser Gly Ser Val Asn Thr Gly Ala
165 170 175

His Phe Gln Ala Trp Lys Asn Val Gly Leu Asn Leu Gly Thr His Asp
180 185 190

Tyr Gln Ile Leu Ala Val Glu Gly Tyr Tyr Ser Ser Gly Ser Ala Ser
195 200 205

Met Thr Val Ser Gln
210

<210> 4

<211> 987

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码内切木聚糖酶的序列(FoxXyn4)

<400> 4

atgaagctgt cttctttcct ctacaccgcc tcgctggtcg cggccattcc caccgccatc 60

gagcccgcc aggtgccga cagcatcaac aagctgatca agaacaagg caagctctac 120

tacggaacca tcaccgaccc caacctgctc ggcgtcgcaa aggacaccgc catcatcaag 180

gccgactttg gcgccgttac ccccgagaac tcgggcaagt gggacgccac cgagcccagc 240

cagggcaagt tcaacttcgg tagcttcgac caggttgica actttgccc gcagaatggc 300

ctcaaggtec gaggtcacac tctggtctgg cactctcagc tccctcagtg ggttaagaac 360

ataaacgaca aggtactct gaccaaggtc attgagaacc acgtcaccca agtcgttgga 420

cgctacaagg gcaagatcta cgctgggac gtcgtcaacg agatcttcga gtgggacggt 480

acctccgaa aggactctca ctcaacaac gtcttcggca acgacgacta cgttggcatt 540

gccttcggcg ccgcccgcaa ggtgacccc aacgccaaagc tgtacatcaa cgactacagc 600

ctcgactccg gcagcgctc caaggtcacc aagggtatgg ttccctccgt caagaagtgg 660

[0004]

ctcagccagg gegtcccggt cgacggcatt ggtctcaga ctaccttga ccccggtgcc 720

gctggccaaa tccagggtgc tctcactgcc ctgcccaatt ctggtgtcaa ggaggttgcc 780

atcaccgagc tcgacatccg cactgcccc gccaacgact acgtaccgt caccaaggcc 840

tgcccaacg tcccaagtg catggglatc accgctcggg glgctcctga caagaactct 900

tggcgaagg agcacgacag tctctgttc gatgctaact acaaccccaa gcctgcttac 960

actgetgttg tcaacgtct cegctaa 987

<210> 5

<211> 942

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码内切木聚糖酶的序列(FoxXyn4)

<400> 5

attcccacgc ccacgagcc ccgccaggct gccgacagca tcaacaagct gateaagaac 60

aagggaagc tctactacgg aaccatcacc gaccccaacc tgetcggcgt cgcaaaggac 120

	accgccatca tcaaggccga ctttggegcc gtiaccccg agaactcggg caagtgggac	180
	gccaccgagc ccagccaggg caagtccaac ttcggtagct tcgaccaggt tgtcaacttt	240
	gcccagcaga atggcctcaa ggtecgaggt cacactctgg tctggcactc tcagetcct	300
	cagtgggtta agaacatcaa cgacaaggct actctgacca aggtcattga gaaccacgtc	360
	acccaagtcg ttggacgcta caagggcaag atctacgctt gggacgtcgt caacgagatc	420
	ttcgagtggg acggtaccct ccgaaaggac tctcacttca acaacgtctt cggcaacgac	480
	gactacgttg geattgcctt ccgcgcgcc cgcaaggctg accccaacgc caagctgtac	540
	atcaacgact acagcctcga ctccggcagc gcctccaagg tcaccaaggg tatggttccc	600
	tccgtcaaga agtggctcag ccagggcggt cccgtcgacg gcattggctc tcagactcac	660
	cttgaccccg gtgcgcgtgg ccaaattccag ggtgctctca ctgccctcgc caattctggt	720
	gtcaaggagg ttgccatcac cgagctcgac atccgcactg cccccgcaa cgactacgt	780
	accgtcacca aggcctgcct caacgtcccc aagtgcattg gtatcacctg ctgggggtgc	840
[0005]	tetgacaaga actcttggcg caaggagcac gacagtcttc tgttcgatgc taactacaac	900
	cccaagcctg cttacactgc tgttgtcaac gctctccgct aa	942

<210> 6

<211> 305

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 内切木聚糖酶多肽序列(FoxXyn4)

<400> 6

Gln Ala Ala Asp Ser Ile Asn Lys Leu Ile Lys Asn Lys Gly Lys Leu
1 5 10 15

Tyr Tyr Gly Thr Ile Thr Asp Pro Asn Leu Leu Gly Val Ala Lys Asp
20 25 30

Thr Ala Ile Ile Lys Ala Asp Phe Gly Ala Val Thr Pro Glu Asn Ser
35 40 45

	Gly	Lys	Trp	Asp	Ala	Thr	Glu	Pro	Ser	Gln	Gly	Lys	Phe	Asn	Phe	Gly	
	50						55				60						
	Ser	Phe	Asp	Gln	Val	Val	Asn	Phe	Ala	Gln	Gln	Asn	Gly	Leu	Lys	Val	
	65				70					75					80		
	Arg	Gly	His	Thr	Leu	Val	Trp	His	Ser	Gln	Leu	Pro	Gln	Trp	Val	Lys	
					85				90						95		
	Asn	Ile	Asn	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Lys	Val	Ile	Glu	Asn	His	Val	
					100				105					110			
	Thr	Gln	Val	Val	Gly	Arg	Tyr	Lys	Gly	Lys	Ile	Tyr	Ala	Trp	Asp	Val	
					115			120					125				
	Val	Asn	Glu	Ile	Phe	Glu	Trp	Asp	Gly	Thr	Leu	Arg	Lys	Asp	Ser	His	
					130			135				140					
[0006]	Phe	Asn	Asn	Val	Phe	Gly	Asn	Asp	Asp	Tyr	Val	Gly	Ile	Ala	Phe	Arg	
	145				150					155					160		
	Ala	Ala	Arg	Lys	Ala	Asp	Pro	Asn	Ala	Lys	Leu	Tyr	Ile	Asn	Asp	Tyr	
					165					170					175		
	Ser	Leu	Asp	Ser	Gly	Ser	Ala	Ser	Lys	Val	Thr	Lys	Gly	Met	Val	Pro	
					180				185					190			
	Ser	Val	Lys	Lys	Trp	Leu	Ser	Gln	Gly	Val	Pro	Val	Asp	Gly	Ile	Gly	
					195			200					205				
	Ser	Gln	Thr	His	Leu	Asp	Pro	Gly	Ala	Ala	Gly	Gln	Ile	Gln	Gly	Ala	
					210			215				220					
	Leu	Thr	Ala	Leu	Ala	Asn	Ser	Gly	Val	Lys	Glu	Val	Ala	Ile	Thr	Glu	
	225				230					235					240		
	Leu	Asp	Ile	Arg	Thr	Ala	Pro	Ala	Asn	Asp	Tyr	Ala	Thr	Val	Thr	Lys	
					245				250						255		

Ala Cys Leu Asn Val Pro Lys Cys Ile Gly Ile Thr Val Trp Gly Val
260 265 270

Ser Asp Lys Asn Ser Trp Arg Lys Glu His Asp Ser Leu Leu Phe Asp
275 280 285

Ala Asn Tyr Asn Pro Lys Pro Ala Tyr Thr Ala Val Val Asn Ala Leu
290 295 300

Arg
305

<210> 7
<211> 720
<212> DNA
<213> 黑曲霉(Aspergillus niger)

<400> 7
atgaagctcc ctgtgacact tgctatgctt gcggccaccg ccatgggcca gacgatgtgc 60

[0007] tetcaatatg acagtgcctc gageccccca tattcagtga accagaacct ctggggcgag 120

taccaaggca ccggcagcca gtgtgtatat gtcgacaaac tctccagcag tgggtgcatcc 180

tggcacaccg aatggacctg gagcgggtggt gagggaacag tgaaaageta ctctaactct 240

ggcggttacat ttaacaagaa gctcgtgagt gatgtatcaa gcatcccccac ctcggttgaa 300

tggaagcagg acaacaccaa cgtaacgcc gatgtcgcgt atgatctttt caccgcggcg 360

aatgtggacc atgctacttc tagcggcgac tatgaactga tgatttggtt tgcccgtac 420

ggcaacatcc ageccattgg caagcaaatt gccacggcca cagtgggagg caagtctctg 480

gaggtgtggt atggcagcac caccaggcc ggtgcggagc agaggacata cagcttcgtg 540

tcggaaagcc ctatcaactc atacagtggg gacatcaatg catttttcag ctatctaact 600

cagaaccaag gctttccgc cagctctcag tacttgatca atctgcagtt tggaactgag 660

gcgttcaccg ggggcccggc aaccttcacg gttgacaact ggaccgccag tgtcaactag 720

<210> 8
<211> 239

<212> PRT

<213> 黑曲霉

<400> 8

Met Lys Leu Pro Val Thr Leu Ala Met Leu Ala Ala Thr Ala Met Gly
1 5 10 15

Gln Thr Met Cys Ser Gln Tyr Asp Ser Ala Ser Ser Pro Pro Tyr Ser
20 25 30

Val Asn Gln Asn Leu Trp Gly Glu Tyr Gln Gly Thr Gly Ser Gln Cys
35 40 45

Val Tyr Val Asp Lys Leu Ser Ser Ser Gly Ala Ser Trp His Thr Glu
50 55 60

Trp Thr Trp Ser Gly Gly Glu Gly Thr Val Lys Ser Tyr Ser Asn Ser
65 70 75 80

[0008] Gly Val Thr Phe Asn Lys Lys Leu Val Ser Asp Val Ser Ser Ile Pro
85 90 95

Thr Ser Val Glu Trp Lys Gln Asp Asn Thr Asn Val Asn Ala Asp Val
100 105 110

Ala Tyr Asp Leu Phe Thr Ala Ala Asn Val Asp His Ala Thr Ser Ser
115 120 125

Gly Asp Tyr Glu Leu Met Ile Trp Leu Ala Arg Tyr Gly Asn Ile Gln
130 135 140

Pro Ile Gly Lys Gln Ile Ala Thr Ala Thr Val Gly Gly Lys Ser Trp
145 150 155 160

Glu Val Trp Tyr Gly Ser Thr Thr Gln Ala Gly Ala Glu Gln Arg Thr
165 170 175

Tyr Ser Phe Val Ser Glu Ser Pro Ile Asn Ser Tyr Ser Gly Asp Ile
180 185 190

Asn Ala Phe Phe Ser Tyr Leu Thr Gln Asn Gln Gly Phe Pro Ala Ser
195 200 205

Ser Gln Tyr Leu Ile Asn Leu Gln Phe Gly Thr Glu Ala Phe Thr Gly
210 215 220

Gly Pro Ala Thr Phe Thr Val Asp Asn Trp Thr Ala Ser Val Asn
225 230 235

<210> 9

<211> 996

<212> DNA

<213> 黑曲霉

<400> 9

atgaagtttc agagcacitt gcttcttgcc gccgcggctg gttccgcgtt ggctgtgcct 60
catggctccg gacataagaa gagggcgtct gigtittgaat ggttcggatc gaacgagtct 120
gggtgtgaat ttgggaccaa tatcccagge gtctggggaa ccgactacat ctccccgac 180
[0009] ccctcgacca tctctacgtt gattggcaag ggaatgaact tctccgcgtt ccagttcatg 240
atggagaggt tgcttcctga ctgatgact ggttcaaacg acgaggagta tctggccaac 300
ttgacgactg tggtgaaagc ggtcaaggat ggagcgcgcg atcgctcat cgacctcat 360
aactatggca gatacaacgg ggagatcatc tccagtacat cggatttcca gactttctgg 420
cagaatctgg cgggccagta caaagataac gacttggta tgtttgatac caacaacgaa 480
tactacgaca tggaccagga tctegtgtg aatctcaacc aagcagccat taacggcatc 540
cgcgtgcag gtgcaagcca gtacattttc gtcgaaggca actcctggac cggagcttgg 600
acatgggtcg atgtcaacga caatatgaag aatttgaccg acccagaaga caagatcgtc 660
tatgaaatgc accagtacct agactccgac ggttccggca cttcggagac ctgtgtctcc 720
gggacaatcg gaaaggagcg gatcactgat gctacacagt ggtcaagga caataagaag 780
gtcggcttca tcggcgaata tgccgggggg tccaatgatg tgtgtcggag tgccgtgtcc 840
gggatgctag agtacatggc gaacaacacc gacgtatgga aggggtgcgtc gtgggtggga 900
gccgggcat ggtggggaga ctacattttc agcctggagc ccccagatgg aactgcttac 960

acgggtatgc tggatatacct ggagacgtat ctctga

996

<210> 10

<211> 331

<212> PRT

<213> 黑曲霉

<400> 10

Met Lys Phe Gln Ser Thr Leu Leu Leu Ala Ala Ala Gly Ser Ala
1 5 10 15

Leu Ala Val Pro His Gly Ser Gly His Lys Lys Arg Ala Ser Val Phe
20 25 30

Glu Trp Phe Gly Ser Asn Glu Ser Gly Ala Glu Phe Gly Thr Asn Ile
35 40 45

Pro Gly Val Trp Gly Thr Asp Tyr Ile Phe Pro Asp Pro Ser Thr Ile
50 55 60

[0010]

Ser Thr Leu Ile Gly Lys Gly Met Asn Phe Phe Arg Val Gln Phe Met
65 70 75 80

Met Glu Arg Leu Leu Pro Asp Ser Met Thr Gly Ser Tyr Asp Glu Glu
85 90 95

Tyr Leu Ala Asn Leu Thr Thr Val Val Lys Ala Val Thr Asp Gly Gly
100 105 110

Ala His Ala Leu Ile Asp Pro His Asn Tyr Gly Arg Tyr Asn Gly Glu
115 120 125

Ile Ile Ser Ser Thr Ser Asp Phe Gln Thr Phe Trp Gln Asn Leu Ala
130 135 140

Gly Gln Tyr Lys Asp Asn Asp Leu Val Met Phe Asp Thr Asn Asn Glu
145 150 155 160

Tyr Tyr Asp Met Asp Gln Asp Leu Val Leu Asn Leu Asn Gln Ala Ala
165 170 175

Ile Asn Gly Ile Arg Ala Ala Gly Ala Ser Gln Tyr Ile Phe Val Glu
180 185 190

Gly Asn Ser Trp Thr Gly Ala Trp Thr Trp Val Asp Val Asn Asp Asn
195 200 205

Met Lys Asn Leu Thr Asp Pro Glu Asp Lys Ile Val Tyr Glu Met His
210 215 220

Gln Tyr Leu Asp Ser Asp Gly Ser Gly Thr Ser Glu Thr Cys Val Ser
225 230 235 240

Gly Thr Ile Gly Lys Glu Arg Ile Thr Asp Ala Thr Gln Trp Leu Lys
245 250 255

[0011] Asp Asn Lys Lys Val Gly Phe Ile Gly Glu Tyr Ala Gly Gly Ser Asn
260 265 270

Asp Val Cys Arg Ser Ala Val Ser Gly Met Leu Glu Tyr Met Ala Asn
275 280 285

Asn Thr Asp Val Trp Lys Gly Ala Ser Trp Trp Ala Ala Gly Pro Trp
290 295 300

Trp Gly Asp Tyr Ile Phe Ser Leu Glu Pro Pro Asp Gly Thr Ala Tyr
305 310 315 320

Thr Gly Met Leu Asp Ile Leu Glu Thr Tyr Leu
325 330

<210> 11

<211> 678

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码内切木聚糖酶的序列

<400> 11	
atgtctacca agaaccttct cctctgcttt gccgcggeta aggetgctct ggetgttccc	60
cacgactctg tgcgccagcg ttcggatgcc ttgcacatgc tctctgagcg ctcgaccccg	120
agctcgaccg gcgagaacaa cggtttctac tactccttct ggaccgacgg cgggtggcgac	180
gtgacctaca ccaacggaga tgctggtgcc tacactgttg agtgggtcaa cgtgggcaac	240
tttgtcggtg gaaagggctg gaaccccgga agtgcgcagg acatcaccta cagcggcacc	300
ttcaccccta gggcaacgg ctatctctcc gtctatggct ggaccaactga cccctgac	360
gagtactaca tcgtcgagtc ctacggcgac tacaaccccg gcagtggagg cacatacaag	420
ggcaccgtea cctcgagcgg atccgtttac gatatctaca cggtacccg taccaatgct	480
gcttcattc agggaaaccg taccttcaact cagtactggt ccgtccgcca gaacaagaga	540
gttggcgga ctgttaccac ctccaaccac ttcaatgctt gggctaagct gggaatgaac	600
ctgggtactc acaactacca gatcgtggt accgagggt accagagcag tggatcttcg	660
tccatcactg ttcagtaa	678

[0012]

<210> 12
<211> 225
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 内切木聚糖酶多肽序列
<400> 12

Met Leu Thr Lys Asn Leu Leu Leu Cys Phe Ala Ala Ala Lys Ala Ala
1 5 10 15

Leu Ala Val Pro His Asp Ser Val Ala Gln Arg Ser Asp Ala Leu His
20 25 30

Met Leu Ser Glu Arg Ser Thr Pro Ser Ser Thr Gly Glu Asn Asn Gly
35 40 45

Phe Tyr Tyr Ser Phe Trp Thr Asp Gly Gly Gly Asp Val Thr Tyr Thr
50 55 60

Asn Gly Asp Ala Gly Ala Tyr Thr Val Glu Trp Ser Asn Val Gly Asn
65 70 75 80

Phe Val Gly Gly Lys Gly Trp Asn Pro Gly Ser Ala Gln Asp Ile Thr
85 90 95

Tyr Ser Gly Thr Phe Thr Pro Ser Gly Asn Gly Tyr Leu Ser Val Tyr
100 105 110

Gly Trp Thr Thr Asp Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Ser Tyr
115 120 125

Gly Asp Tyr Asn Pro Gly Ser Gly Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Val Thr
130 135 140

Ser Asp Gly Ser Val Tyr Asp Ile Tyr Thr Ala Thr Arg Thr Asn Ala
145 150 155 160

[0013]

Ala Ser Ile Gln Gly Thr Ala Thr Phe Thr Gln Tyr Trp Ser Val Arg
165 170 175

Gln Asn Lys Arg Val Gly Gly Thr Val Thr Thr Ser Asn His Phe Asn
180 185 190

Ala Trp Ala Lys Leu Gly Met Asn Leu Gly Thr His Asn Tyr Gln Ile
195 200 205

Val Ala Thr Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ile Thr Val
210 215 220

Gln
225

<210> 13

<211> 2583

<212> DNA

<213> 黑曲霉

[0014]	<400> 13	
	atgaggttca cttcgatcga ggcgggtggct ctgactgcgc tctcgctgge cagcgctgat	60
	gaattggcct aciccccgcc gtattacecc tcccctiggg ccaatggcca gggtgactgg	120
	gcggaageat accagegcgc tgttgatata gtctgcaga tgacattggc tgagaaggtc	180
	aatttgacta cgggaactgg atgggaattg gaattatgtg ttggtcagac tggagggtgt	240
	ccccgattgg gaattccggg aatgtgtgca caggatagcc ctctgggtgt tctgactcc	300
	gactacaact ctgcgttccc tgccggtgtc aacgtggccg caacctggga caagaatctg	360
	gettaccitc gtggccaggc tatgggtcag gagtttagtg acaagggtgc tgatatccaa	420
	ttgggtccag ctgccggccc tctcggtaga agtcccgacg gcggtcgtaa ctgggagggc	480
	ttctcccccg acccgccct cagtgggtgt ctcttgcag agacaatcaa gggatttcag	540
	gatgtcgttg tggttgcaac ggctaagcac tacatgcct acgagcagga gcatttccgt	600
	caggcgccig aagctcaagg ctacggattc aatattaccg agagtgaag cggaacctc	660
	gacgataaga ctatgatga gctgtacctc tggcccttcg cggatgccat ccgtgcaggc	720
	gccggtgtct tgatgtctc gtacaaccag atcaacaaca gctatggctg ccaaaacagc	780
	tacactctga acaagctgct caaggctgag ctgggtttcc agggctttgt catgagtgat	840
	tgggcgctc accatgccg tgtgagtggc gctttggcgg gattggacat gtctatgccg	900
	ggagacgtcg attacgacag tggcacgtct tactggggta ccaacttgac catcagtgtg	960
	ctcaacggga cggtgcccca atggcgtgtt gatgacatgg ctgtccgcat catggccgcc	1020
	tactacaagg tggccgtga ccgtctgtgg actcctccca acttcagctc atggaccaga	1080
	gatgaatacg gcttcaagta ctactatgtc tcggagggac cgtatgagaa ggtcaaccag	1140
	ttcgtgaacg tgcaacgcaa ccatagcgag ttgatccgcc gtattggagc agacagcacg	1200
	gtgctcctca agaacgatgg cgctcttccc ttgactggaa aggagcgctt ggtcgcectt	1260
	atcggagaag atgcgggttc caatccttat ggtgccaaac gctgcagtga ccgtgggtgc	1320
	gacaatggaa cattggegat gggtgggga agtggcactg ccaactttcc ctaettgtgt	1380
	acccccgagc aggccatctc gaacgaggtg ctcaagaaca agaatggcgt attcactgcg	1440
	accgataact gggctattga tcagattgag gccttgcata agaccgccag tgtctctott	1500

	gtctttgtca acgccgactc tgggtgagggt tatatcaatg tegacggaaa cctgggtgac	1560
	cgcaggaacc tgacctgtg gaggaacggo gacaatgtga tcaaggctgc tgctageaac	1620
	tgeaacaaca cgatcggtat taitcactct gtccggccag tcttgggttaa cgagtggtag	1680
	gacaacccca atgttaccgc tattctctgg ggtggctctc ccggtcagga gtctggcaac	1740
	tccctcgccg acgigtctta cgcccggtgc aaccccggtg ccaagtcgcc ctacacctgg	1800
	ggcaagactc gtgaggccta ccaagattac ttgtacaccg agcccaacaa cggcaacgga	1860
	gcgccccagg aagacttcgt cgaggcgctc ttcatctgact accgcggatt tgacaagcgc	1920
	aacgagactc ctatctatga gtccggctat ggtctgagct acaccacctt caactactcg	1980
	aaecttcagg tggaggttct gagcgccctt gcgtacgagc ctgcttcggg cgagactgag	2040
	gcagcgccga ctctcgga ga ggtcggaaat gcgtcggatt acctctacce cgatggactg	2100
	cagagaatea ccaagttcat ctacccttgg ctcaacagta ccgatcttga ggctcttct	2160
	ggggatgcta gctatgggca ggatgcctca gactatcttc ccgagggagc caccgatggc	2220
	tctgcgaac cgatctgcc tgccggtggt ggtgctggcg gcaacctctg cctgtacgac	2280
[0015]	gagctcatcc gcgtgctggg gactatcaag aacaccggca aggttgcggg tgatgaagtt	2340
	cctcaactgt atgtttctct tggcgccctt aacgaacca agatcgtgct gcgtcaattc	2400
	gagcgtatca cgtgcagcc gtcgaaagag acgcagtga gcacaactct gacgcgccgt	2460
	gaccttgca actggaatgt tgagacgcag gactgggaga ttacgtcgta tcccaagatg	2520
	gtgtttgccg gaagctcttc gcggaagctg ccgctccggg cgtctctgcc tactgttcac	2580
	taa	2583

<210> 14

<211> 860

<212> PRT

<213> 黑曲霉

<400> 14

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

Ala Ser Ala Asp Glu Leu Ala Tyr Ser Pro Pro Tyr Tyr Pro Ser Pro

	20	25	30
	Trp Ala Asn Gly Gln Gly Asp Trp Ala Glu Ala Tyr Gln Arg Ala Val		
	35	40	45
	Asp Ile Val Ser Gln Met Thr Leu Ala Glu Lys Val Asn Leu Thr Thr		
	50	55	60
	Gly Thr Gly Trp Glu Leu Glu Leu Cys Val Gly Gln Thr Gly Gly Val		
	65	70	75 80
	Pro Arg Leu Gly Ile Pro Gly Met Cys Ala Gln Asp Ser Pro Leu Gly		
	85	90	95
	Val Arg Asp Ser Asp Tyr Asn Ser Ala Phe Pro Ala Gly Val Asn Val		
	100	105	110
[0016]	Ala Ala Thr Trp Asp Lys Asn Leu Ala Tyr Leu Arg Gly Gln Ala Met		
	115	120	125
	Gly Gln Glu Phe Ser Asp Lys Gly Ala Asp Ile Gln Leu Gly Pro Ala		
	130	135	140
	Ala Gly Pro Leu Gly Arg Ser Pro Asp Gly Gly Arg Asn Trp Glu Gly		
	145	150	155 160
	Phe Ser Pro Asp Pro Ala Leu Ser Gly Val Leu Phe Ala Glu Thr Ile		
	165	170	175
	Lys Gly Ile Gln Asp Ala Gly Val Val Ala Thr Ala Lys His Tyr Ile		
	180	185	190
	Ala Tyr Glu Gln Glu His Phe Arg Gln Ala Pro Glu Ala Gln Gly Tyr		
	195	200	205
	Gly Phe Asn Ile Thr Glu Ser Gly Ser Ala Asn Leu Asp Asp Lys Thr		
	210	215	220

	Met His Glu Leu Tyr Leu Trp Pro Phe Ala Asp Ala Ile Arg Ala Gly	
	225	230 235 240
	Ala Gly Ala Val Met Cys Ser Tyr Asn Gln Ile Asn Asn Ser Tyr Gly	
		245 250 255
	Cys Gln Asn Ser Tyr Thr Leu Asn Lys Leu Leu Lys Ala Glu Leu Gly	
		260 265 270
	Phe Gln Gly Phe Val Met Ser Asp Trp Ala Ala His His Ala Gly Val	
		275 280 285
	Ser Gly Ala Leu Ala Gly Leu Asp Met Ser Met Pro Gly Asp Val Asp	
		290 295 300
	Tyr Asp Ser Gly Thr Ser Tyr Trp Gly Thr Asn Leu Thr Ile Ser Val	
	305	310 315 320
[0017]	Leu Asn Gly Thr Val Pro Gln Trp Arg Val Asp Asp Met Ala Val Arg	
		325 330 335
	Ile Met Ala Ala Tyr Tyr Lys Val Gly Arg Asp Arg Leu Trp Thr Pro	
		340 345 350
	Pro Asn Phe Ser Ser Trp Thr Arg Asp Glu Tyr Gly Phe Lys Tyr Tyr	
		355 360 365
	Tyr Val Ser Glu Gly Pro Tyr Glu Lys Val Asn Gln Phe Val Asn Val	
		370 375 380
	Gln Arg Asn His Ser Glu Leu Ile Arg Arg Ile Gly Ala Asp Ser Thr	
	385	390 395 400
	Val Leu Leu Lys Asn Asp Gly Ala Leu Pro Leu Thr Gly Lys Glu Arg	
		405 410 415
	Leu Val Ala Leu Ile Gly Glu Asp Ala Gly Ser Asn Pro Tyr Gly Ala	
		420 425 430

	Asn Gly Cys Ser Asp Arg Gly Cys Asp Asn Gly Thr Leu Ala Met Gly	
	435	440 445
	Trp Gly Ser Gly Thr Ala Asn Phe Pro Tyr Leu Val Thr Pro Glu Gln	
	450	455 460
	Ala Ile Ser Asn Glu Val Leu Lys Asn Lys Asn Gly Val Phe Thr Ala	
	465	470 475 480
	Thr Asp Asn Trp Ala Ile Asp Gln Ile Glu Ala Leu Ala Lys Thr Ala	
		485 490 495
	Ser Val Ser Leu Val Phe Val Asn Ala Asp Ser Gly Glu Gly Tyr Ile	
	500	505 510
	Asn Val Asp Gly Asn Leu Gly Asp Arg Arg Asn Leu Thr Leu Trp Arg	
	515	520 525
[0018]	Asn Gly Asp Asn Val Ile Lys Ala Ala Ala Ser Asn Cys Asn Asn Thr	
	530	535 540
	Ile Val Ile Ile His Ser Val Gly Pro Val Leu Val Asn Glu Trp Tyr	
	545	550 555 560
	Asp Asn Pro Asn Val Thr Ala Ile Leu Trp Gly Gly Leu Pro Gly Gln	
		565 570 575
	Glu Ser Gly Asn Ser Leu Ala Asp Val Leu Tyr Gly Arg Val Asn Pro	
	580	585 590
	Gly Ala Lys Ser Pro Phe Thr Trp Gly Lys Thr Arg Glu Ala Tyr Gln	
	595	600 605
	Asp Tyr Leu Tyr Thr Glu Pro Asn Asn Gly Asn Gly Ala Pro Gln Glu	
	610	615 620
	Asp Phe Val Glu Gly Val Phe Ile Asp Tyr Arg Gly Phe Asp Lys Arg	
	625	630 635 640

	Asn	Glu	Thr	Pro	Ile	Tyr	Glu	Phe	Gly	Tyr	Gly	Leu	Ser	Tyr	Thr	Thr
	645				650				655							
	Phe	Asn	Tyr	Ser	Asn	Leu	Gln	Val	Glu	Val	Leu	Ser	Ala	Pro	Ala	Tyr
	660				665				670							
	Glu	Pro	Ala	Ser	Gly	Glu	Thr	Glu	Ala	Ala	Pro	Thr	Phe	Gly	Glu	Val
	675				680				685							
	Gly	Asn	Ala	Ser	Asp	Tyr	Leu	Tyr	Pro	Asp	Gly	Leu	Gln	Arg	Ile	Thr
	690				695				700							
	Lys	Phe	Ile	Tyr	Pro	Trp	Leu	Asn	Ser	Thr	Asp	Leu	Glu	Ala	Ser	Ser
	705				710				715				720			
	Gly	Asp	Ala	Ser	Tyr	Gly	Gln	Asp	Ala	Ser	Asp	Tyr	Leu	Pro	Glu	Gly
	725				730				735							
[0019]	Ala	Thr	Asp	Gly	Ser	Ala	Gln	Pro	Ile	Leu	Pro	Ala	Gly	Gly	Gly	Ala
	740				745				750							
	Gly	Gly	Asn	Pro	Arg	Leu	Tyr	Asp	Glu	Leu	Ile	Arg	Val	Ser	Val	Thr
	755				760				765							
	Ile	Lys	Asn	Thr	Gly	Lys	Val	Ala	Gly	Asp	Glu	Val	Pro	Gln	Leu	Tyr
	770				775				780							
	Val	Ser	Leu	Gly	Gly	Pro	Asn	Glu	Pro	Lys	Ile	Val	Leu	Arg	Gln	Phe
	785				790				795				800			
	Glu	Arg	Ile	Thr	Leu	Gln	Pro	Ser	Lys	Glu	Thr	Gln	Trp	Ser	Thr	Thr
	805				810				815							
	Leu	Thr	Arg	Arg	Asp	Leu	Ala	Asn	Trp	Asn	Val	Glu	Thr	Gln	Asp	Trp
	820				825				830							
	Glu	Ile	Thr	Ser	Tyr	Pro	Lys	Met	Val	Phe	Ala	Gly	Ser	Ser	Ser	Arg

	835	840	845	
	Lys Leu Pro Leu Arg Ala Ser Leu Pro Thr Val His			
	850	855	860	
	<210> 15			
	<211> 1209			
	<212> DNA			
	<213> 黑曲霉			
	<400> 15			
	atgtctgtcg ctaagattgc tgggtgctgc ctcggctcgg ccgcccctgt tgcctgcccac		60	
	ggttatgtgt ctgggtgctgt catcgacggc gagtactacg gaggatacat cgtctcctcc		120	
	taccctatg agagtgacct tccggagacc attgcctggc ctaccacagc cactgacctt		180	
	ggcttcgtcg acggctctga atactcggac cctgacatca tctgccacaa gacgcctaag		240	
	cctgggtgcta tctccgtga cgtaaggcc ggtggctactg ttgagcttca gtggactgac		300	
	tggccttcca gccaccaagg tcccgctctg acttaccttg ccaactgcaa cggctgactgc		360	
[0020]	tccgatgtca ccaagaactga ccttgagtgc ttcaagatcg acgagagcgg cctcattagc		420	
	gacactgaag tccccggaac ctgggceact gacaacttga tctccaacaa caacagctgg		480	
	actgtgacca ttccctcgac cctcgaggct ggtaactacg tccctgcgcca cgagatcatt		540	
	gccctgcact ccgctgagaa caaggatggc gcccagaact acccccagtg tctcaacctg		600	
	aaggttaccg gcagtggtag ctccacctac tccggcacca agggatgaag cctctacaag		660	
	gacaccgacc cgggtatcct ggtaacatc tacgagaccc tgagctecta cgacatcccc		720	
	ggctctgcta tgtacaacgc cacttctctc agcagctctt ctggcagetc ctcgggtgcc		780	
	tcttctacca gctccgtgc cgttgccgcc gccactactt ccagtgcttc gacttccagc		840	
	gcttccaccc ccaccaccag cgttgccgct gcgactagct ccgcccgaag cgcaccacc		900	
	actgctgctg ctgccgttgt caccgacgtt gaaaccaccg ttcagactgc ggtcgccact		960	
	gcttaccaga cttcgactga cgttgtgcag gtcactgtca ctggcagcgc cccccagcag		1020	
	accacatcc aggtcgccag ctccagcgcc gctgcttcca cccccagcag ctccagtgtc		1080	
	gccgtctcca gcgacaacct caccagctac ttcagctctc tgagcgccga ccagttctct		1140	

agcgtctctga aggagacctt ctcttggctg gtcactgaga agaagcacgc ccgtgacctc 1200

aacgcctaa 1209

<210> 16

<211> 402

<212> PRT

<213> 黑曲霉

<400> 16

Met Ser Val Ala Lys Ile Ala Gly Val Val Leu Gly Ser Ala Ala Leu
1 5 10 15

Val Ala Gly His Gly Tyr Val Ser Gly Ala Val Ile Asp Gly Glu Tyr
20 25 30

Tyr Gly Gly Tyr Ile Val Ser Ser Tyr Pro Tyr Glu Ser Asp Pro Pro
35 40 45

[0021] Glu Thr Ile Ala Trp Ser Thr Thr Ala Thr Asp Leu Gly Phe Val Asp
50 55 60

Gly Ser Glu Tyr Ser Asp Pro Asp Ile Ile Cys His Lys Ser Ala Lys
65 70 75 80

Pro Gly Ala Ile Ser Ala Asp Val Lys Ala Gly Gly Thr Val Glu Leu
85 90 95

Gln Trp Thr Asp Trp Pro Ser Ser His His Gly Pro Val Leu Thr Tyr
100 105 110

Leu Ala Asn Cys Asn Gly Asp Cys Ser Asp Val Thr Lys Thr Asp Leu
115 120 125

Glu Phe Phe Lys Ile Asp Glu Ser Gly Leu Ile Ser Asp Thr Glu Val
130 135 140

Pro Gly Thr Trp Ala Thr Asp Asn Leu Ile Ser Asn Asn Asn Ser Trp
145 150 155 160

Thr Val Thr Ile Pro Ser Thr Leu Glu Ala Gly Asn Tyr Val Leu Arg		
165	170	175
His Glu Ile Ile Ala Leu His Ser Ala Glu Asn Lys Asp Gly Ala Gln		
180	185	190
Asn Tyr Pro Gln Cys Leu Asn Leu Lys Val Thr Gly Ser Gly Ser Ser		
195	200	205
Thr Tyr Ser Gly Thr Lys Gly Glu Ala Leu Tyr Lys Asp Thr Asp Pro		
210	215	220
Gly Ile Leu Val Asn Ile Tyr Glu Thr Leu Ser Ser Tyr Asp Ile Pro		
225	230	235 240
Gly Pro Ala Met Tyr Asn Ala Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser		
245	250	255
[0022] Ser Ser Gly Ala Ser Ser Thr Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Thr		
260	265	270
Thr Ser Ser Ala Ser Thr Ser Ser Ala Ser Thr Pro Thr Thr Ser Ala		
275	280	285
Ala Ala Ala Thr Ser Ser Ala Val Ser Ala Thr Thr Thr Ala Ala Ala		
290	295	300
Ala Val Val Thr Asp Val Glu Thr Thr Val Gln Thr Ala Val Ala Thr		
305	310	315 320
Ala Tyr Gln Thr Ser Thr Asp Val Val Gln Val Thr Val Thr Gly Ser		
325	330	335
Ala Pro Gln Gln Thr His Ile Gln Val Ala Ser Ser Ser Ala Ala Ala		
340	345	350
Ser Thr Pro Ser Ser Ser Ser Val Ala Val Ser Ser Asp Asn Leu Thr		
355	360	365

Ser Tyr Phe Ser Ser Leu Ser Ala Asp Gln Phe Leu Ser Val Leu Lys
370 375 380

Glu Thr Phe Ser Trp Leu Val Thr Glu Lys Lys His Ala Arg Asp Leu
385 390 395 400

Asn Ala

<210> 17

<211> 1611

<212> DNA

<213> 黑曲霉

<400> 17

atgtcttcct tccaaatcta ccgagcagct ctgtgtctct ctatccttgc cactgccaat 60
gctcagcagg ttggcaceta caccactgag acacatccgt ctctgacctg gcaaacctgc 120
accagcgatg gcagctgcac taccaacgac ggcgagggtg tcatcgacgc caattggcgt 180
[0023] tgggtgcact caacctecag tgccaccaac tgcatactg gcaacgaatg ggacacctca 240
atttgtaccg acgatgtgac ctgcgcgcgc aactgcgcgc ttgacggtgc cacttacgag 300
gcgacctatg gtgtgaccac gtcgggcagc gagctgcgcg tgaacttcgt cactcaaggc 360
tccagcaaga acatcgggtc tcgtttgtac ctcatgagcg acgacagcaa ctatgagctg 420
ttcaagctcc tcggccagga gttcaccitt gatgtcgacg tgtccaacct tccctgcggt 480
ctcaacggcg cgtctacttt cgtcgccatg gacgtgacg gtggcacctc ggagtattcc 540
ggcaacaagg ccggtgccaa atacggaacc ggetactgcg actcgcagtg ccctcgcgac 600
ctgaagtcca tcaacggcga agccaactgc gacggctggg agccgtccag caacaacgtc 660
aacaccggag ttggcgacca cggttcctgc tgcgccgaga tggacgtctg ggaagcgaac 720
agcatctcca acgccttcac cgcgcacccc tgcgactccg tcagccagac aatgtgcgac 780
ggtgactcct gtggtggaac ttacagcgcc agcggcgacc gctacagcgg caacctgcgac 840
cccagcggt ggcactacaa cccctaccgt ctaggcaaca cggactttta cggeccccgc 900
ctgaccgtcg acacgaacag ccccttcacc gtcgtcaccc agttcatcac cgatgacggc 960

```

acctcctccg gcaccttgac cgagatcaag cggttgtacg tgcagaacgg cgaggtcacc 1020
gccaaaggcg cctccaceta ctccagtgtc aacggcagct ctatcacctc cgctttctgt 1080
gaatcagaga agacgtgttt cggcgacgag aacgtcttcg acaagcacgg cggctctcag 1140
ggcatgggcg aggcctatggc caagggcacg gtcttgggtc tgagctcttg ggatgactat 1200
gccgctgaca tgctctggct cgacagcgac taccctgtta actcgtcggc ctcgaccctc 1260
gggtgtggccc gcggtacttg tagcacggac tcgggtgtcc cggctaccgt ggaggcggag 1320
tcaccaaatg cctatgteac gtactcgaac atcaagtccg ggcctattgg ctcgacttac 1380
tccagtggat cttcttcggg gtcgggggtc agctccagct cgagttcgac taccactaag 1440
gccacitcga cgaccttgaa gactacctcg accaccagca gtggaagcag ttcgacatcg 1500
gcggcgcagg cgtatggaca gtgtggtgga cagggtgga ctggtccgac cacttgtgtg 1560
agtgggtaca cttgcacgta tgagaatgcg tactactcgc agtgtttgta g 1611

```

[0024]

<210> 18
 <211> 536
 <212> PRT
 <213> 黑曲霉

 <400> 18

```

Met Ser Ser Phe Gln Ile Tyr Arg Ala Ala Leu Leu Leu Ser Ile Leu
1           5           10          15

```

```

Ala Thr Ala Asn Ala Gln Gln Val Gly Thr Tyr Thr Thr Glu Thr His
          20          25          30

```

```

Pro Ser Leu Thr Trp Gln Thr Cys Thr Ser Asp Gly Ser Cys Thr Thr
          35          40          45

```

```

Asn Asp Gly Glu Val Val Ile Asp Ala Asn Trp Arg Trp Val His Ser
          50          55          60

```

```

Thr Ser Ser Ala Thr Asn Cys Tyr Thr Gly Asn Glu Trp Asp Thr Ser
          65          70          75          80

```

	Ile	Cys	Thr	Asp	Asp	Val	Thr	Cys	Ala	Ala	Asn	Cys	Ala	Leu	Asp	Gly	
					85					90					95		
	Ala	Thr	Tyr	Glu	Ala	Thr	Tyr	Gly	Val	Thr	Thr	Ser	Gly	Ser	Glu	Leu	
				100					105					110			
	Arg	Leu	Asn	Phe	Val	Thr	Gln	Gly	Ser	Ser	Lys	Asn	Ile	Gly	Ser	Arg	
			115					120					125				
	Leu	Tyr	Leu	Met	Ser	Asp	Asp	Ser	Asn	Tyr	Glu	Leu	Phe	Lys	Leu	Leu	
		130						135				140					
	Gly	Gln	Glu	Phe	Thr	Phe	Asp	Val	Asp	Val	Ser	Asn	Leu	Pro	Cys	Gly	
	145					150					155				160		
	Leu	Asn	Gly	Ala	Leu	Tyr	Phe	Val	Ala	Met	Asp	Ala	Asp	Gly	Gly	Thr	
				165						170					175		
[0025]	Ser	Glu	Tyr	Ser	Gly	Asn	Lys	Ala	Gly	Ala	Lys	Tyr	Gly	Thr	Gly	Tyr	
				180					185					190			
	Cys	Asp	Ser	Gln	Cys	Pro	Arg	Asp	Leu	Lys	Phe	Ile	Asn	Gly	Glu	Ala	
			195					200					205				
	Asn	Cys	Asp	Gly	Trp	Glu	Pro	Ser	Ser	Asn	Asn	Val	Asn	Thr	Gly	Val	
		210					215					220					
	Gly	Asp	His	Gly	Ser	Cys	Cys	Ala	Glu	Met	Asp	Val	Trp	Glu	Ala	Asn	
	225					230				235					240		
	Ser	Ile	Ser	Asn	Ala	Phe	Thr	Ala	His	Pro	Cys	Asp	Ser	Val	Ser	Gln	
				245					250					255			
	Thr	Met	Cys	Asp	Gly	Asp	Ser	Cys	Gly	Gly	Thr	Tyr	Ser	Ala	Ser	Gly	
				260					265					270			
	Asp	Arg	Tyr	Ser	Gly	Thr	Cys	Asp	Pro	Asp	Gly	Cys	Asp	Tyr	Asn	Pro	
			275					280					285				

	Tyr	Arg	Leu	Gly	Asn	Thr	Asp	Phe	Tyr	Gly	Pro	Gly	Leu	Thr	Val	Asp	
	290						295					300					
	Thr	Asn	Ser	Pro	Phe	Thr	Val	Val	Thr	Gln	Phe	Ile	Thr	Asp	Asp	Gly	
	305					310				315						320	
	Thr	Ser	Ser	Gly	Thr	Leu	Thr	Glu	Ile	Lys	Arg	Leu	Tyr	Val	Gln	Asn	
					325					330					335		
	Gly	Glu	Val	Ile	Ala	Asn	Gly	Ala	Ser	Thr	Tyr	Ser	Ser	Val	Asn	Gly	
				340					345					350			
	Ser	Ser	Ile	Thr	Ser	Ala	Phe	Cys	Glu	Ser	Glu	Lys	Thr	Leu	Phe	Gly	
		355						360					365				
	Asp	Glu	Asn	Val	Phe	Asp	Lys	His	Gly	Gly	Leu	Glu	Gly	Met	Gly	Glu	
	370						375					380					
[0026]	Ala	Met	Ala	Lys	Gly	Met	Val	Leu	Val	Leu	Ser	Leu	Trp	Asp	Asp	Tyr	
	385					390					395					400	
	Ala	Ala	Asp	Met	Leu	Trp	Leu	Asp	Ser	Asp	Tyr	Pro	Val	Asn	Ser	Ser	
				405						410					415		
	Ala	Ser	Thr	Pro	Gly	Val	Ala	Arg	Gly	Thr	Cys	Ser	Thr	Asp	Ser	Gly	
				420					425					430			
	Val	Pro	Ala	Thr	Val	Glu	Ala	Glu	Ser	Pro	Asn	Ala	Tyr	Val	Thr	Tyr	
			435					440					445				
	Ser	Asn	Ile	Lys	Phe	Gly	Pro	Ile	Gly	Ser	Thr	Tyr	Ser	Ser	Gly	Ser	
	450						455					460					
	Ser	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Thr	Thr	Thr	Lys	
	465				470					475						480	
	Ala	Thr	Ser	Thr	Thr	Leu	Lys	Thr	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	Ser	Gly	Ser	
					485				490						495		

Ser Ser Thr Ser Ala Ala Gln Ala Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Gln Gly
500 505 510

Trp Thr Gly Pro Thr Thr Cys Val Ser Gly Tyr Thr Cys Thr Tyr Glu
515 520 525

Asn Ala Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu
530 535

<210> 19

<211> 1359

<212> DNA

<213> 黑曲霉

<400> 19

atgcatcaac gtgccccttct cttctcagcc ctgctgacgg ctgttcgcgc ccagcaagcc 60
ggaacgctca cggaggaagt ccctccttcc ttgacctggc agaaatgcac ttctgaaggc 120
agctgcactg aacagagtgg ctcagttgtc attgactcga actggcgctg gaccatttcc 180
[0027] gtcaatgaca gcaccaattg ctacaactggc aacacctggg atgcaactct ctgccctgat 240
gatgagacct gtgcggccaa ctgcgccttg gacggagcag actacgagtc cacctacggt 300
gtcaccactg acggtgatte attgacactg aaattcgtea ctggctccaa tgttiggetcg 360
cggttgatc taatggacac gagcgacgag ggataccaga cgttcaactt gcttgacgca 420
gagttcactt tcgacgttga tgtgtetaac ctcccatgtg ggctaaacgg cgcgttgtac 480
ttcactgcaa tggacgccga tgggtggagtc tcaaaatacc ctgccaataa ggettgagcc 540
aagtacggaa caggatactg tgactcccaa tgcctccggg acctgaaatt catcgacgga 600
caagccaacg tcgatggctg ggaaccttct agcaacaatg acaacacagg tateggcaat 660
cacggttctt gctgccctga aatggataac tgggaggcaa acaagatctc gaccgcattg 720
acaccccatc cttgtgacag cagcgaacag accatgtgtg agggtaacga ctgcggtgga 780
acctactcgg atgategcta cggaggaacc tgcgacctg acggctgcga ctccaacct 840
tatcgeatgg gcaacgactc tttctacggt cctggcaaga ccatcgacac cggatccaag 900
atgacggttg tgaccagtt catcactgat ggetctggct cctcagcga gateaagcgt 960

```

tactacgtgc agaacggaaa tggtatagcg aacgtgatt ccaacatctc tggagtgact 1020
ggaaaactega tcacaacgga cttctgcact ggcagaaga aggcctttgg cgacgaggat 1080
atattcgctg agcacaatgg acttgctgga atcagtgatg ccatgtcttc catggttctc 1140
atcttgagct tgtgggatga ttactatgcc agcatggagt ggctcgacag cgactatecc 1200
gagaacgcta ccgtaccga cccaggtggt gcacgggaa catgcgactc ggaatcaggc 1260
gtccctcgca cagtcgaggg ggcgcatecc gattcttcgg tgaccttctc aaacateaa 1320
ttcgggtccc tcaactcgac cttcagcgt tccgcataa 1359

```

<210> 20
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> 黑曲霉

<400> 20

[0028]

```

Met His Gln Arg Ala Leu Leu Phe Ser Ala Leu Leu Thr Ala Val Arg
1          5          10          15

```

```

Ala Gln Gln Ala Gly Thr Leu Thr Glu Glu Val His Pro Ser Leu Thr
          20          25          30

```

```

Trp Gln Lys Cys Thr Ser Glu Gly Ser Cys Thr Glu Gln Ser Gly Ser
          35          40          45

```

```

Val Val Ile Asp Ser Asn Trp Arg Trp Thr His Ser Val Asn Asp Ser
          50          55          60

```

```

Thr Asn Cys Tyr Thr Gly Asn Thr Trp Asp Ala Thr Leu Cys Pro Asp
65          70          75          80

```

```

Asp Glu Thr Cys Ala Ala Asn Cys Ala Leu Asp Gly Ala Asp Tyr Glu
          85          90          95

```

```

Ser Thr Tyr Gly Val Thr Thr Asp Gly Asp Ser Leu Thr Leu Lys Phe
          100          105          110

```


Tyr Tyr Val Gln Asn Gly Asn Val Ile Ala Asn Ala Asp Ser Asn Ile
325 330 335

Ser Gly Val Thr Gly Asn Ser Ile Thr Thr Asp Phe Cys Thr Ala Gln
340 345 350

Lys Lys Ala Phe Gly Asp Glu Asp Ile Phe Ala Glu His Asn Gly Leu
355 360 365

Ala Gly Ile Ser Asp Ala Met Ser Ser Met Val Leu Ile Leu Ser Leu
370 375 380

Trp Asp Asp Tyr Tyr Ala Ser Met Glu Trp Leu Asp Ser Asp Tyr Pro
385 390 395 400

Glu Asn Ala Thr Ala Thr Asp Pro Gly Val Ala Arg Gly Thr Cys Asp
405 410 415

[0030] Ser Glu Ser Gly Val Pro Ala Thr Val Glu Gly Ala His Pro Asp Ser
420 425 430

Ser Val Thr Phe Ser Asn Ile Lys Phe Gly Pro Ile Asn Ser Thr Phe
435 440 445

Ser Ala Ser Ala
450

<210> 21

<211> 1542

<212> DNA

<213> 里氏木霉(Trichoderma reesei)

<400> 21

atgtatcgga agttggccgt catctcggcc ttcttggcca cagctcgtgc tcagtcggcc 60

tgcactctcc aatcggagac tcaccgcct ctgacatggc agaaatgctc gtctgggtggc 120

acgtgcactc aacagacagg ctccgtggtc atcgacgcca actggcgtg gactcacgt 180

acgaacagca gcacgaactg ctacgatggc aacacttggc gctcgaccct atgtcctgac 240

	aacgagacct gcgcgaagaa ctgctgtctg gacggtgccg cctacgcgtc cacgtacgga	300
	gttaccaaga gcggtaacag cctctccatt ggctttgtca cccagtctgc gcagaagaac	360
	gttggcgtc gcctttacct tatggcgagc gacacgacct accaggaatt caccctgctt	420
	ggcaacgagt tctctttcga tgttgatgtt tcgcagctgc cgtgcggtt gaacggagct	480
	ctctacttcg tctccatgga cgcggatggt ggcgtgagca agtatccac caacaccgt	540
	ggcgccaagt acggcacggg gtactgtgac agccagtgtc ccccgatct gaagttcatc	600
	aatggccagg ccaacgttga gggctgggag ccgtcatcca acaacgcgaa cacgggcatt	660
	ggaggacacg gaagctgctg ctctgagatg gatattctggg aggccaaactc catctccgag	720
	gtctttacce cccaccttg cacgactgic ggccaggaga tctgcgagg tgatgggtgc	780
	ggcggaactt actccgataa cagatatggc ggcacttgcg atcccgatgg ctgcgactgg	840
	aaccataacc gcttgggcaa caccagcttc tacggccctg gctcaagctt taccctcgat	900
	accaccaaga aattgaccgt tctcaccag ttcgagacgt cgggtgccat caaccgatac	960
[0031]	tatgtccaga atggcgtaac ttccacgag cccaacgccg agcttggtag ttactctggc	1020
	aacgagctca acgatgatta ctgcacagct gaggaggcag aattcggcgg atcctctttc	1080
	tcagacaagg gcggcctgac tcagttcaag aaggctacct ctggcgcat ggttctgtgc	1140
	atgagtctgt gggatgatta ctacccaac atgctgtggc tggactccac ctaccgcaca	1200
	aacgagacct cctccacacc cgggtccgtg cgcggaagct gctccaccag ctccggtgtc	1260
	ctgtctcagg tcgaattctc gtctcccaac gccaaagtca cttctccaa catcaagttc	1320
	ggaccatttg gcagcaccgg caaccctagc ggcggaacc ctcccgcgcg aaaccgtggc	1380
	accaccacca cccgcgcgcc agccactacc actggaagct ctcccgacc taccagctct	1440
	cactacggcc agtgcggcgg tattggctac agcgccccca cggctctgcg cagcggcaca	1500
	acttgccagg tctgaacce ttactactct cagtgcctgt aa	1542

<210> 22

<211> 513

<212> PRT

<213> 里氏木霉

<400> 22

	Met	Tyr	Arg	Lys	Leu	Ala	Val	Ile	Ser	Ala	Phe	Leu	Ala	Thr	Ala	Arg
	1			5					10					15		
	Ala	Gln	Ser	Ala	Cys	Thr	Leu	Gln	Ser	Glu	Thr	His	Pro	Pro	Leu	Thr
				20					25					30		
	Trp	Gln	Lys	Cys	Ser	Ser	Gly	Gly	Thr	Cys	Thr	Gln	Gln	Thr	Gly	Ser
			35					40					45			
	Val	Val	Ile	Asp	Ala	Asn	Trp	Arg	Trp	Thr	His	Ala	Thr	Asn	Ser	Ser
		50					55					60				
	Thr	Asn	Cys	Tyr	Asp	Gly	Asn	Thr	Trp	Ser	Ser	Thr	Leu	Cys	Pro	Asp
	65					70				75				80		
	Asn	Glu	Thr	Cys	Ala	Lys	Asn	Cys	Cys	Leu	Asp	Gly	Ala	Ala	Tyr	Ala
				85						90				95		
[0032]	Ser	Thr	Tyr	Gly	Val	Thr	Thr	Ser	Gly	Asn	Ser	Leu	Ser	Ile	Gly	Phe
				100					105					110		
	Val	Thr	Gln	Ser	Ala	Gln	Lys	Asn	Val	Gly	Ala	Arg	Leu	Tyr	Leu	Met
			115					120					125			
	Ala	Ser	Asp	Thr	Thr	Tyr	Gln	Glu	Phe	Thr	Leu	Leu	Gly	Asn	Glu	Phe
		130					135					140				
	Ser	Phe	Asp	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Leu	Pro	Cys	Gly	Leu	Asn	Gly	Ala
	145				150					155				160		
	Leu	Tyr	Phe	Val	Ser	Met	Asp	Ala	Asp	Gly	Gly	Val	Ser	Lys	Tyr	Pro
				165						170				175		
	Thr	Asn	Thr	Ala	Gly	Ala	Lys	Tyr	Gly	Thr	Gly	Tyr	Cys	Asp	Ser	Gln
			180						185					190		
	Cys	Pro	Arg	Asp	Leu	Lys	Phe	Ile	Asn	Gly	Gln	Ala	Asn	Val	Glu	Gly
		195					200						205			

	Trp	Glu	Pro	Ser	Ser	Asn	Asn	Ala	Asn	Thr	Gly	Ile	Gly	Gly	His	Gly	
	210						215					220					
	Ser	Cys	Cys	Ser	Glu	Met	Asp	Ile	Trp	Glu	Ala	Asn	Ser	Ile	Ser	Glu	
	225					230					235					240	
	Ala	Leu	Thr	Pro	His	Pro	Cys	Thr	Thr	Val	Gly	Gln	Glu	Ile	Cys	Glu	
					245					250					255		
	Gly	Asp	Gly	Cys	Gly	Gly	Thr	Tyr	Ser	Asp	Asn	Arg	Tyr	Gly	Gly	Thr	
				260					265					270			
	Cys	Asp	Pro	Asp	Gly	Cys	Asp	Trp	Asn	Pro	Tyr	Arg	Leu	Gly	Asn	Thr	
			275					280					285				
	Ser	Phe	Tyr	Gly	Pro	Gly	Ser	Ser	Phe	Thr	Leu	Asp	Thr	Thr	Lys	Lys	
	290						295					300					
[0033]	Leu	Thr	Val	Val	Thr	Gln	Phe	Glu	Thr	Ser	Gly	Ala	Ile	Asn	Arg	Tyr	
	305					310					315					320	
	Tyr	Val	Gln	Asn	Gly	Val	Thr	Phe	Gln	Gln	Pro	Asn	Ala	Glu	Leu	Gly	
					325					330					335		
	Ser	Tyr	Ser	Gly	Asn	Glu	Leu	Asn	Asp	Asp	Tyr	Cys	Thr	Ala	Glu	Glu	
				340					345					350			
	Ala	Glu	Phe	Gly	Gly	Ser	Ser	Phe	Ser	Asp	Lys	Gly	Gly	Leu	Thr	Gln	
			355					360					365				
	Phe	Lys	Lys	Ala	Thr	Ser	Gly	Gly	Met	Val	Leu	Val	Met	Ser	Leu	Trp	
	370						375					380					
	Asp	Asp	Tyr	Tyr	Ala	Asn	Met	Leu	Trp	Leu	Asp	Ser	Thr	Tyr	Pro	Thr	
	385					390					395					400	
	Asn	Glu	Thr	Ser	Ser	Thr	Pro	Gly	Ala	Val	Arg	Gly	Ser	Cys	Ser	Thr	

	405	410	415
Ser Ser Gly Val Pro Ala Gln Val Glu Ser Gln Ser Pro Asn Ala Lys			
	420	425	430
Val Thr Phe Ser Asn Ile Lys Phe Gly Pro Ile Gly Ser Thr Gly Asn			
	435	440	445
Pro Ser Gly Gly Asn Pro Pro Gly Gly Asn Arg Gly Thr Thr Thr Thr			
	450	455	460
Arg Arg Pro Ala Thr Thr Thr Gly Ser Ser Pro Gly Pro Thr Gln Ser			
465	470	475	480
His Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr Ser Gly Pro Thr Val Cys			
	485	490	495
Ala Ser Gly Thr Thr Cys Gln Val Leu Asn Pro Tyr Tyr Ser Gln Cys			
	500	505	510

[0034]

Leu

<210>	23	
<211>	1416	
<212>	DNA	
<213>	里氏木霉	
<400>	23	
atgattgtcg gcattctcac caagctgget acgetggcca cactcgcage tagtgtgect		60
ctagaggagc ggcaagcttg ctcaagcgtc tggggccaat gtggtggcca gaattggtcg		120
ggtcgcactt getgtgcttc cggaagcaca tgcgtctact ccaacgacta ttactcccag		180
tgtcttcccg gcgtgcaag ctcaagctcg tccacgcgcg ccgcgtcgac gaattctcga		240
gtatccccca caacatcccg gtcgagctcc ggcagcctc caactgggtc tactactacc		300
agagtacctc cagtcggatc gggaaccgct acgtattcag gcaacccttt tgttggggtc		360
actccttggg ccaatgcata ttacgectct gaagttagca gctcgetat tectagettg		420

	actggagcca tggccactgc tgcagcagct gtcgcaaagg ttcctcttt tatgtggcta	480
	gatactcttg acaagacccc tctcatggag caaaccttgg ccgacatccg caccgccaac	540
	aagaatggcg gtaactatgc cggacagttt gtggtgtaig acttgccgga tcgcgattgc	600
	gctgcccttg cctcgaaatgg cgaatactct attgccgatg gtggcgtcgc caaatataag	660
	aactatatcg acaccattcg tcaaattgtc gtggaatatt ccgatatccg gacctctctg	720
	gttattgagc ctgactctct tgccaacctg gtgaccaacc tcggtactcc aaagtgtgcc	780
	aatgctcagt cagcctacct tgagtgcate aactacgccg tcacacagct gaaccttcca	840
	aatgttgega tgtatttggg cgttgccat gcaggatggc ttggttggcc ggcaaaccaa	900
	gacctggccg ctcagctatt tgcaaatgtt tacaagaatg catcgtctcc gagagctctt	960
	cgcggattgg caaccaatgt cgccaactac aacgggtgga acattaccag ccccccacg	1020
	tacacgcaag gcaacgctgt ctacaacgag aagctgtaca tccacgctat tggacctctt	1080
	cttgccaatc acggctggtc caacgccttc ttcatcactg atcaaggteg atcgggaaag	1140
	cagctaccg gacagcaaca gtggggagac tggtgcaatg tgatcggcac cggatttggg	1200
[0035]	attcgcccat ccgcaaacac tggggactcg ttgctggatt cgtttgtctg ggtcaagcca	1260
	ggcggcgagt gtgacggcac cagcgacagc agtgcgccac gatttgactc ccactgtgcg	1320
	ctcccagatg cettgcaacc ggcgctcaa gctggtgctt ggttccaagc ctactttgtg	1380
	cagcttctca caaacgcaaa cccatcgttc ctgtaa	1416

<210> 24

<211> 471

<212> PRT

<213> 里氏木霉

<400> 24

Met Ile Val Gly Ile Leu Thr Thr Leu Ala Thr Leu Ala Thr Leu Ala
1 5 10 15

Ala Ser Val Pro Leu Glu Glu Arg Gln Ala Cys Ser Ser Val Trp Gly
20 25 30

Gln Cys Gly Gly Gln Asn Trp Ser Gly Pro Thr Cys Cys Ala Ser Gly

	35	40	45
	Ser Thr Cys Val Tyr Ser Asn Asp Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu Pro Gly		
	50	55	60
	Ala Ala Ser Ser Ser Ser Ser Thr Arg Ala Ala Ser Thr Thr Ser Arg		
	65	70	75 80
	Val Ser Pro Thr Thr Ser Arg Ser Ser Ser Ala Thr Pro Pro Pro Gly		
		85	90 95
	Ser Thr Thr Thr Arg Val Pro Pro Val Gly Ser Gly Thr Ala Thr Tyr		
	100	105	110
	Ser Gly Asn Pro Phe Val Gly Val Thr Pro Trp Ala Asn Ala Tyr Tyr		
	115	120	125
[0036]	Ala Ser Glu Val Ser Ser Leu Ala Ile Pro Ser Leu Thr Gly Ala Met		
	130	135	140
	Ala Thr Ala Ala Ala Ala Val Ala Lys Val Pro Ser Phe Met Trp Leu		
	145	150	155 160
	Asp Thr Leu Asp Lys Thr Pro Leu Met Glu Gln Thr Leu Ala Asp Ile		
		165	170 175
	Arg Thr Ala Asn Lys Asn Gly Gly Asn Tyr Ala Gly Gln Phe Val Val		
	180	185	190
	Tyr Asp Leu Pro Asp Arg Asp Cys Ala Ala Leu Ala Ser Asn Gly Glu		
	195	200	205
	Tyr Ser Ile Ala Asp Gly Gly Val Ala Lys Tyr Lys Asn Tyr Ile Asp		
	210	215	220
	Thr Ile Arg Gln Ile Val Val Glu Tyr Ser Asp Ile Arg Thr Leu Leu		
	225	230	235 240

	Val	Ile	Glu	Pro	Asp	Ser	Leu	Ala	Asn	Leu	Val	Thr	Asn	Leu	Gly	Thr	
							245										255
	Pro	Lys	Cys	Ala	Asn	Ala	Gln	Ser	Ala	Tyr	Leu	Glu	Cys	Ile	Asn	Tyr	
							260										270
	Ala	Val	Thr	Gln	Leu	Asn	Leu	Pro	Asn	Val	Ala	Met	Tyr	Leu	Asp	Ala	
							275										285
	Gly	His	Ala	Gly	Trp	Leu	Gly	Trp	Pro	Ala	Asn	Gln	Asp	Pro	Ala	Ala	
							290										300
	Gln	Leu	Phe	Ala	Asn	Val	Tyr	Lys	Asn	Ala	Ser	Ser	Pro	Arg	Ala	Leu	
	305						310					315					320
	Arg	Gly	Leu	Ala	Thr	Asn	Val	Ala	Asn	Tyr	Asn	Gly	Trp	Asn	Ile	Thr	
							325					330					335
[0037]	Ser	Pro	Pro	Ser	Tyr	Thr	Gln	Gly	Asn	Ala	Val	Tyr	Asn	Glu	Lys	Leu	
							340										350
	Tyr	Ile	His	Ala	Ile	Gly	Pro	Leu	Leu	Ala	Asn	His	Gly	Trp	Ser	Asn	
							355										365
	Ala	Phe	Phe	Ile	Thr	Asp	Gln	Gly	Arg	Ser	Gly	Lys	Gln	Pro	Thr	Gly	
							370										380
	Gln	Gln	Gln	Trp	Gly	Asp	Trp	Cys	Asn	Val	Ile	Gly	Thr	Gly	Phe	Gly	
	385						390										400
	Ile	Arg	Pro	Ser	Ala	Asn	Thr	Gly	Asp	Ser	Leu	Leu	Asp	Ser	Phe	Val	
							405										415
	Trp	Val	Lys	Pro	Gly	Gly	Glu	Cys	Asp	Gly	Thr	Ser	Asp	Ser	Ser	Ala	
							420										430
	Pro	Arg	Phe	Asp	Ser	His	Cys	Ala	Leu	Pro	Asp	Ala	Leu	Gln	Pro	Ala	
							435										445

Pro Gln Ala Gly Ala Trp Phe Gln Ala Tyr Phe Val Gln Leu Leu Thr
 450 455 460

Asn Ala Asn Pro Ser Phe Leu
 465 470

<210> 25

<211> 1380

<212> DNA

<213> 里氏木霉

<400> 25

atggcgcct cagttacact gccgttgacc acggccatcc tggccattgc ccggctcgtc 60

gccgccagc aaccgggtac cagcaccccc gaggtccatc ccaagttgac aacctacaag 120

tgtacaaagt ccgggggggtg cgtggcccag gacacctcgg tggtccttga ctggaactac 180

cgttgatgc acgacgcaaa ctacaactcg tgcaccgtca acggcggcgt caacaccacg 240

ctctgccctg acgaggcgac ctgtggcaag aactgcttca tcgaggcggt cgactacgcc 300

[0038] gcctegggcg tcacgacctc gggcagcagc ctcaccatga accagtacat gcccagcagc 360

tctggcggct acagcagcgt ctctcctcgg ctgtatctcc tggactctga cggtgagtac 420

gtgatgctga agctcaacgg ccaggagctg agcttcgacg tcgacctctc tgccttgccg 480

tgtggagaga acggctcgct ctacctgtct cagatggacg agaacggggg cgccaaccag 540

tataacacgg ccggtgccaa ctacgggagc ggtacttgcg atgctcagtg ccccgctcag 600

acatggagga acggcaccct caacactagc caccagggtt tctgttgcaa cgagatggat 660

atcctggagg gcaactcgag ggcgaaatgc ttgacctctc actcttgcac ggccacggcc 720

tgcgactctg ccggttgccg cttcaacccc tatggcagcg gctacaaaag ctactacgga 780

cccgagata ccggttgacac ctccaagacc ttcaccatca tcaccagtt caacacggac 840

aacggctcgc cctcgggcaa ccttgtgagc atcacccgca agtaccagca aaacggcgtc 900

gacatcccca gcgccagcc cggcggcgac accatctcgt cctgcccgtc cgcctcagcc 960

tacggcggcc tcgccaccat gggcaaggcc ctgagcagcg gcatggtgct cgtgttcage 1020

atttggaacg acaacagcca gtacatgaac tggctcgaca gcggcaacgc cggccctgc 1080

agcagcaccg agggcaaccc atccaacatc ctggccaaca accccaacac gcacgtcgtc 1140
 ttctccaaca tccgtgggg agacatiggg tctactacga actcgactgc gccccgcgcc 1200
 ccgcctgcgt ccagcaegac gttttcgact acacggagga gctcgacgac ttcgagcagc 1260
 ccgagctgca cgcagactca ctgggggcag tgcggtggca ttgggtacag cgggtgcaag 1320
 acgtgcacgt cgggcactac gtgccagtat agcaacgact actactcgca atgcctttag 1380

<210> 26

<211> 459

<212> PRT

<213> 里氏木霉

<400> 26

Met Ala Pro Ser Val Thr Leu Pro Leu Thr Thr Ala Ile Leu Ala Ile
 1 5 10 15

Ala Arg Leu Val Ala Ala Gln Gln Pro Gly Thr Ser Thr Pro Glu Val
 20 25 30

[0039]

His Pro Lys Leu Thr Thr Tyr Lys Cys Thr Lys Ser Gly Gly Cys Val
 35 40 45

Ala Gln Asp Thr Ser Val Val Leu Asp Trp Asn Tyr Arg Trp Met His
 50 55 60

Asp Ala Asn Tyr Asn Ser Cys Thr Val Asn Gly Gly Val Asn Thr Thr
 65 70 75 80

Leu Cys Pro Asp Glu Ala Thr Cys Gly Lys Asn Cys Phe Ile Glu Gly
 85 90 95

Val Asp Tyr Ala Ala Ser Gly Val Thr Thr Ser Gly Ser Ser Leu Thr
 100 105 110

Met Asn Gln Tyr Met Pro Ser Ser Ser Gly Gly Tyr Ser Ser Val Ser
 115 120 125

Pro Arg Leu Tyr Leu Leu Asp Ser Asp Gly Glu Tyr Val Met Leu Lys

	130	135	140	
	Leu Asn Gly Gln Glu Leu Ser Phe Asp Val Asp Leu Ser Ala Leu Pro			
	145	150	155	160
	Cys Gly Glu Asn Gly Ser Leu Tyr Leu Ser Gln Met Asp Glu Asn Gly			
		165	170	175
	Gly Ala Asn Gln Tyr Asn Thr Ala Gly Ala Asn Tyr Gly Ser Gly Tyr			
		180	185	190
	Cys Asp Ala Gln Cys Pro Val Gln Thr Trp Arg Asn Gly Thr Leu Asn			
		195	200	205
	Thr Ser His Gln Gly Phe Cys Cys Asn Glu Met Asp Ile Leu Glu Gly			
		210	215	220
[0040]	Asn Ser Arg Ala Asn Ala Leu Thr Pro His Ser Cys Thr Ala Thr Ala			
	225	230	235	240
	Cys Asp Ser Ala Gly Cys Gly Phe Asn Pro Tyr Gly Ser Gly Tyr Lys			
		245	250	255
	Ser Tyr Tyr Gly Pro Gly Asp Thr Val Asp Thr Ser Lys Thr Phe Thr			
		260	265	270
	Ile Ile Thr Gln Phe Asn Thr Asp Asn Gly Ser Pro Ser Gly Asn Leu			
		275	280	285
	Val Ser Ile Thr Arg Lys Tyr Gln Gln Asn Gly Val Asp Ile Pro Ser			
		290	295	300
	Ala Gln Pro Gly Gly Asp Thr Ile Ser Ser Cys Pro Ser Ala Ser Ala			
	305	310	315	320
	Tyr Gly Gly Leu Ala Thr Met Gly Lys Ala Leu Ser Ser Gly Met Val			
		325	330	335

Leu Val Phe Ser Ile Trp Asn Asp Asn Ser Gln Tyr Met Asn Trp Leu
340 345 350

Asp Ser Gly Asn Ala Gly Pro Cys Ser Ser Thr Glu Gly Asn Pro Ser
355 360 365

Asn Ile Leu Ala Asn Asn Pro Asn Thr His Val Val Phe Ser Asn Ile
370 375 380

Arg Trp Gly Asp Ile Gly Ser Thr Thr Asn Ser Thr Ala Pro Pro Pro
385 390 395 400

Pro Pro Ala Ser Ser Thr Thr Phe Ser Thr Thr Arg Arg Ser Ser Thr
405 410 415

Thr Ser Ser Ser Pro Ser Cys Thr Gln Thr His Trp Gly Gln Cys Gly
420 425 430

[0041] Gly Ile Gly Tyr Ser Gly Cys Lys Thr Cys Thr Ser Gly Thr Thr Cys
435 440 445

Gln Tyr Ser Asn Asp Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu
450 455

<210> 27

<211> 1257

<212> DNA

<213> 里氏木霉

<400> 27

atgaacaagt cegtggctcc attgetgctt gcagcgtcca tactatatgg cggcgcgcgc 60

gcacagcaga ctgtctgggg ccagtgtgga ggtattggtt ggagcggacc tacgaattgt 120

gtctctgget cagcttggtc gacctcaat ccttattatg cgcaatgtat tccgggagcc 180

actactatea ccacttegac ccggccacca tccggtccaa ccaccacca cagggtacc 240

teaacaagct catcaactec acccagcage tetggggctc gatttgccgg cgttaacatc 300

gcgggttttg accttgctg taccacagat ggcacttgcg ttacctcgaa ggtttatcct 360

cgttgaaga acttcaccgg ctcaaacac tacccgatg gcacggcca gatgcagcac 420

	tfcgtcaacg aggacgggat gactattttc cgcttacctg tcggatggca gtacctcgtc	480
	aacaacaatt tgggcggcaa tcttgattcc acgagcattt ccaagtatga tcagcttggt	540
	caggggtgcc tgtctctggg cgcatactgc atcgtcgaca tccacaatta tgctcgatgg	600
	aacggtggga tcattggtea gggcggecct actaatgctc aattcacgag ccttggteg	660
	cagttggcat caaagtacgc atctcagtcg aggggtgtgt tcggcatcat gaatgagccc	720
	cacgacgtga acatcaacac ctgggctgcc acggccaag aggttgtaac cgcaatccgc	780
	aacgctgggtg ctacgtcgca attcatctct ttgcctggaa atgattggca atctgctggg	840
	gcttteatat ccgatggcag tgcagccgcc ctgtctcaag tcacgaacct ggatgggtca	900
	acaacgaatc tgatttttga cgtgcacaaa tacttggact cagacaactc cggactcac	960
	gccgaatgta ctacaaataa catigacggc gcctttctc cgcttgccac ttggtccga	1020
	cagaacaatc gccaggetat cctgacagaa accggtgggt gcaacgttea gtctgcata	1080
	caagacatgt gccagcaaat ccaatatctc aaccagaact cagaigtcta tcttggctat	1140
[0042]	gttggttggg gtgccggatc atttgatagc acgtatgtcc tgacggaaac accgactagc	1200
	agtggtaact catggacgga cacatccttg gtcagctcgt gtctcgcaag aaagtag	1257

<210> 28

<211> 418

<212> PRT

<213> 里氏木霉

<400> 28

Met Asn Lys Ser Val Ala Pro Leu Leu Ala Ala Ser Ile Leu Tyr
 1 5 10 15

Gly Gly Ala Val Ala Gln Gln Thr Val Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile
 20 25 30

Gly Trp Ser Gly Pro Thr Asn Cys Ala Pro Gly Ser Ala Cys Ser Thr
 35 40 45

Leu Asn Pro Tyr Tyr Ala Gln Cys Ile Pro Gly Ala Thr Thr Ile Thr
 50 55 60

Thr Ser Thr Arg Pro Pro Ser Gly Pro Thr Thr Thr Thr Arg Ala Thr
65 70 75 80

Ser Thr Ser Ser Ser Thr Pro Pro Thr Ser Ser Gly Val Arg Phe Ala
85 90 95

Gly Val Asn Ile Ala Gly Phe Asp Phe Gly Cys Thr Thr Asp Gly Thr
100 105 110

Cys Val Thr Ser Lys Val Tyr Pro Pro Leu Lys Asn Phe Thr Gly Ser
115 120 125

Asn Asn Tyr Pro Asp Gly Ile Gly Gln Met Gln His Phe Val Asn Glu
130 135 140

Asp Gly Met Thr Ile Phe Arg Leu Pro Val Gly Trp Gln Tyr Leu Val
145 150 155 160

[0043] Asn Asn Asn Leu Gly Gly Asn Leu Asp Ser Thr Ser Ile Ser Lys Tyr
165 170 175

Asp Gln Leu Val Gln Gly Cys Leu Ser Leu Gly Ala Tyr Cys Ile Val
180 185 190

Asp Ile His Asn Tyr Ala Arg Trp Asn Gly Gly Ile Ile Gly Gln Gly
195 200 205

Gly Pro Thr Asn Ala Gln Phe Thr Ser Leu Trp Ser Gln Leu Ala Ser
210 215 220

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Arg Val Trp Phe Gly Ile Met Asn Glu Pro
225 230 235 240

His Asp Val Asn Ile Asn Thr Trp Ala Ala Thr Val Gln Glu Val Val
245 250 255

Thr Ala Ile Arg Asn Ala Gly Ala Thr Ser Gln Phe Ile Ser Leu Pro

	260	265	270
	Gly Asn Asp Trp Gln Ser Ala Gly Ala Phe Ile Ser Asp Gly Ser Ala 275	280	285
	Ala Ala Leu Ser Gln Val Thr Asn Pro Asp Gly Ser Thr Thr Asn Leu 290	295	300
	Ile Phe Asp Val His Lys Tyr Leu Asp Ser Asp Asn Ser Gly Thr His 305	310	315 320
	Ala Glu Cys Thr Thr Asn Asn Ile Asp Gly Ala Phe Ser Pro Leu Ala 325	330	335
	Thr Trp Leu Arg Gln Asn Asn Arg Gln Ala Ile Leu Thr Glu Thr Gly 340	345	350
[0044]	Gly Gly Asn Val Gln Ser Cys Ile Gln Asp Met Cys Gln Gln Ile Gln 355	360	365
	Tyr Leu Asn Gln Asn Ser Asp Val Tyr Leu Gly Tyr Val Gly Trp Gly 370	375	380
	Ala Gly Ser Phe Asp Ser Thr Tyr Val Leu Thr Glu Thr Pro Thr Ser 385	390	395 400
	Ser Gly Asn Ser Trp Thr Asp Thr Ser Leu Val Ser Ser Cys Leu Ala 405	410	415
	Arg Lys		
<210>	29		
<211>	705		
<212>	DNA		
<213>	里氏木霉		
<400>	29		
	atgaagtcc ttaagtcct cctgcccct ataccggcgc ccctgcccga aaccagctgt		60

gaccagtgagg caaccttcac tggcaacggc tacacagtca gcaacaacct ttggggagca 120
 tcagccggct ctggatttgg ctgcgtgacg gcgggtatgc tcagcggcgg ggctctctgg 180
 caccgcagaact ggcatgtgtc cggcggccag aacaacgtca agtcgtacca gaactctcag 240
 attgccattc ccagaagag gaccgtcaac agcatcagca gcatgcccac cactgccagc 300
 tggagctaca gcgggagcaa catccgcgt aatgttgcgt atgacttggt caccgcagcc 360
 aaccggaatc atgtcacgta ctcgggagac tacgaactca tgatctggct tggcaaatac 420
 ggcatatttg ggccgattgg gtcttcacag ggaacagtca acgtcgggtg ccagagctgg 480
 acgtctcact atggctacaa cggagccatg caagtctatt cctttgtgga ccagaccaac 540
 actaccaact acagcggaga tgtaagaac ttcttcaatt atctccgaga caataaagga 600
 tacaacgtc caggccaata tgttcttagc taccaatttg gtaccgagcc ctacacgggc 660
 agtggaaact tgaacgtgc atcttgacc gcatctatca actaa 705

[0045] <210> 30
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> 里氏木霉

<400> 30

Met Lys Phe Leu Gln Val Leu Pro Ala Leu Ile Pro Ala Ala Leu Ala
 1 5 10 15

Gln Thr Ser Cys Asp Gln Trp Ala Thr Phe Thr Gly Asn Gly Tyr Thr
 20 25 30

Val Ser Asn Asn Leu Trp Gly Ala Ser Ala Gly Ser Gly Phe Gly Cys
 35 40 45

Val Thr Ala Val Ser Leu Ser Gly Gly Ala Ser Trp His Ala Asp Trp
 50 55 60

Gln Trp Ser Gly Gly Gln Asn Asn Val Lys Ser Tyr Gln Asn Ser Gln
 65 70 75 80

Ile Ala Ile Pro Gln Lys Arg Thr Val Asn Ser Ile Ser Ser Met Pro

	85	90	95
	Thr Thr Ala Ser Trp Ser Tyr Ser Gly Ser Asn Ile Arg Ala Asn Val 100 105 110		
	Ala Tyr Asp Leu Phe Thr Ala Ala Asn Pro Asn His Val Thr Tyr Ser 115 120 125		
	Gly Asp Tyr Glu Leu Met Ile Trp Leu Gly Lys Tyr Gly Asp Ile Gly 130 135 140		
	Pro Ile Gly Ser Ser Gln Gly Thr Val Asn Val Gly Gly Gln Ser Trp 145 150 155 160		
	Thr Leu Tyr Tyr Gly Tyr Asn Gly Ala Met Gln Val Tyr Ser Phe Val 165 170 175		
[0046]	Ala Gln Thr Asn Thr Thr Asn Tyr Ser Gly Asp Val Lys Asn Phe Phe 180 185 190		
	Asn Tyr Leu Arg Asp Asn Lys Gly Tyr Asn Ala Ala Gly Gln Tyr Val 195 200 205		
	Leu Ser Tyr Gln Phe Gly Thr Glu Pro Phe Thr Gly Ser Gly Thr Leu 210 215 220		
	Asn Val Ala Ser Trp Thr Ala Ser Ile Asn 225 230		
	<210> 31 <211> 1035 <212> DNA <213> 里氏木霉		
	<400> 31 atgateccaga agctttccaa cctccttgtc accgeactgg cgggtggetac tggegttgtc 60 ggacatggac atattaatga cattgtcatc aacgggggtgt ggtatcagge ctatgatcct 120 acaacgtttc catacgagtc aaaccccccc atagtagtgg gctggacgge tgccgacctt 180		

	gacaacggct tcgtttcace cgaacgatac caaaacctg acatcatctg ccacaagaat	240
	gctacgaatg ccaaggggca cgcgtctgtc aaggccggag acactattct cticcagtgg	300
	gtgccagtgc catggccgca ccttggtccc attgtcgact acctggccaa ctgcaatggt	360
	gactgcgaga ccgttgacaa gacgacgctt gagttcttca agatcgatgg cgttggtctc	420
	ctcagcggcg gggatccggg cacctgggac tcagacgtgc tgatctccaa caacaacacc	480
	tgggtcgtca agatccccga caatcttgcg ccaggcaatt acgtgctccg ccacgagatc	540
	atcgcgttac acagegcggg gcaggcaaac ggcgtcaga actaccccca gtgcttcaac	600
	attgcgtctc caggetcggg ttctctgcag ccacgctggc ttctagggac cgaccttat	660
	caecgacgg accctgggtg tctcatcaac atctacacca gcccgctcaa ctacatcatc	720
	cctggaccta ccgttggtatc aggcctgcca acgagtgtg ccaggggag ctccgccgcg	780
	acggccaccg ccagcgccac tgttcttgga ggcggtagcg gcccgaccag cagaaccacg	840
	acaacggcga ggacgacgca ggcctcaage aggccagct ctacgcctcc cgcaaccacg	900
	tcggcacctg ctggcgcccc aaccagact ctgtacggcc agtgtggtgg cagcggttac	960
[0047]	agcgggecta ctgatgcgc gccgccagcc acttgctcta ccttgaacct ctaetacgcc	1020
	cagtgcctta actag	1035

<210> 32

<211> 344

<212> PRT

<213> 里氏木霉

<400> 32

Met Ile Gln Lys Leu Ser Asn Leu Leu Val Thr Ala Leu Ala Val Ala
1 5 10 15

Thr Gly Val Val Gly His Gly His Ile Asn Asp Ile Val Ile Asn Gly
20 25 30

Val Trp Tyr Gln Ala Tyr Asp Pro Thr Thr Phe Pro Tyr Glu Ser Asn
35 40 45

Pro Pro Ile Val Val Gly Trp Thr Ala Ala Asp Leu Asp Asn Gly Phe

	50	55	60	
	Val Ser Pro Asp Ala Tyr Gln Asn Pro Asp Ile Ile Cys His Lys Asn			
	65	70	75	80
	Ala Thr Asn Ala Lys Gly His Ala Ser Val Lys Ala Gly Asp Thr Ile			
	85	90		95
	Leu Phe Gln Trp Val Pro Val Pro Trp Pro His Pro Gly Pro Ile Val			
	100	105		110
	Asp Tyr Leu Ala Asn Cys Asn Gly Asp Cys Glu Thr Val Asp Lys Thr			
	115	120		125
	Thr Leu Glu Phe Phe Lys Ile Asp Gly Val Gly Leu Leu Ser Gly Gly			
	130	135		140
[0048]	Asp Pro Gly Thr Trp Ala Ser Asp Val Leu Ile Ser Asn Asn Asn Thr			
	145	150	155	160
	Trp Val Val Lys Ile Pro Asp Asn Leu Ala Pro Gly Asn Tyr Val Leu			
	165	170		175
	Arg His Glu Ile Ile Ala Leu His Ser Ala Gly Gln Ala Asn Gly Ala			
	180	185		190
	Gln Asn Tyr Pro Gln Cys Phe Asn Ile Ala Val Ser Gly Ser Gly Ser			
	195	200		205
	Leu Gln Pro Ser Gly Val Leu Gly Thr Asp Leu Tyr His Ala Thr Asp			
	210	215		220
	Pro Gly Val Leu Ile Asn Ile Tyr Thr Ser Pro Leu Asn Tyr Ile Ile			
	225	230	235	240
	Pro Gly Pro Thr Val Val Ser Gly Leu Pro Thr Ser Val Ala Gln Gly			
	245	250		255

Ser Ser Ala Ala Thr Ala Thr Ala Ser Ala Thr Val Pro Gly Gly Gly
260 265 270

Ser Gly Pro Thr Ser Arg Thr Thr Thr Thr Ala Arg Thr Thr Gln Ala
275 280 285

Ser Ser Arg Pro Ser Ser Thr Pro Pro Ala Thr Thr Ser Ala Pro Ala
290 295 300

Gly Gly Pro Thr Gln Thr Leu Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Ser Gly Tyr
305 310 315 320

Ser Gly Pro Thr Arg Cys Ala Pro Pro Ala Thr Cys Ser Thr Leu Asn
325 330 335

Pro Tyr Tyr Ala Gln Cys Leu Asn
340

[0049] <210> 33

<211> 669

<212> DNA

<213> 里氏木霉

<400> 33

atggtctcct tcacctccct cctcgccgcg tcgcegccat ctcggggegct ttgccgtccc 60

gccgcccagg tcgaatccgt ggctgtggag aagcgccaga cgattcagcc cggcacgggc 120

tacaacaacg gtactttcta ctcgtactgg aacgatggcc acggcggcgt gacgtacacc 180

aatgggtccc gggggcagtt ctecgtaaac tgggtcaaact cgggcaactt tgtcggcgcc 240

aagggatggc agcccggcac caagaacaag gtcatcaact tctcgggcag ctacaacca 300

aacggcaaca gtaacctc cgtgtacggc tgggtccgca accccctgat cgagtactac 360

atcgicgaga accttggcac ctacaaccgg tcacgggcg ccaccaagct gggegaggct 420

acctccgacg gcagcgteta cgacatttac cgcacgcagc gegtcaacca gccgtccatc 480

atcggcaccg ccacctttta ccagtactgg tccgtccgcc gcaaccaccg ctcgagcgcg 540

tccgtcaaca cggcgaaaca cttaacgcg tgggctcagc aaggcctgac gctcgggaac 600

atggattacc agattgttgc cgtggagggt tacttttagct ctggtctctg tccatcacc 660

gtcagctaa

669

<210> 34

<211> 222

<212> PRT

<213> 里氏木霉

<400> 34

Met Val Ser Phe Thr Ser Leu Leu Ala Ala Ser Pro Pro Ser Arg Ala
1 5 10 15

Ser Cys Arg Pro Ala Ala Glu Val Glu Ser Val Ala Val Glu Lys Arg
20 25 30

Gln Thr Ile Gln Pro Gly Thr Gly Tyr Asn Asn Gly Tyr Phe Tyr Ser
35 40 45

Tyr Trp Asn Asp Gly His Gly Gly Val Thr Tyr Thr Asn Gly Pro Gly
50 55 60

[0050]

Gly Gln Phe Ser Val Asn Trp Ser Asn Ser Gly Asn Phe Val Gly Gly
65 70 75 80

Lys Gly Trp Gln Pro Gly Thr Lys Asn Lys Val Ile Asn Phe Ser Gly
85 90 95

Ser Tyr Asn Pro Asn Gly Asn Ser Tyr Leu Ser Val Tyr Gly Trp Ser
100 105 110

Arg Asn Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Asn Phe Gly Thr Tyr
115 120 125

Asn Pro Ser Thr Gly Ala Thr Lys Leu Gly Glu Val Thr Ser Asp Gly
130 135 140

Ser Val Tyr Asp Ile Tyr Arg Thr Gln Arg Val Asn Gln Pro Ser Ile
145 150 155 160

Ile Gly Thr Ala Thr Phe Tyr Gln Tyr Trp Ser Val Arg Arg Asn His
165 170 175

Arg Ser Ser Gly Ser Val Asn Thr Ala Asn His Phe Asn Ala Trp Ala
180 185 190

Gln Gln Gly Leu Thr Leu Gly Thr Met Asp Tyr Gln Ile Val Ala Val
195 200 205

Glu Gly Tyr Phe Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ile Thr Val Ser
210 215 220

<210> 35

<211> 2235

<212> DNA

<213> 里氏木霉

<400> 35

[0051]

atgcgttacc gaacagcagc tgcgctggca ctigccactg ggcctttgc tagggcagac	60
agtcactcaa catcgggggc ctcggtgag gcagttgtac ctctgcagg gactccatgg	120
ggaaccggt acgacaaggc gaaggccgca ttggcaaagc tcaatctcca agataaggtc	180
ggcatcgtga gcggtgtcgg ctggaacggc ggtccttgcg ttggaaacac atctccggcc	240
tccaagatca getatccatc getatgcctt caagacggac cctcgggtgt tcgatactcg	300
acaggcagca cagcctttac gccgggcgtt caagcggcct cgacgtggga tgtcaatttg	360
atccgcgaac gtggacagtt catcggtgag gaggtgaagg cctcggggat tcatgtcata	420
cttggctctg tggctgggcc gctgggaaag actccgcagg ggggtcgcaa ctgggagggc	480
ttcggtgtcg atccatatct cacgggcatt gccatgggtc aaaccatcaa cggcatccag	540
tcggtaggcg tgcaggcgac agcgaagcac tatatcttca acgagcagga gcicaaicga	600
gaaaccattt cgagcaacce agatgaccga actctccatg agctgtatac ttggccattt	660
gccgacggg ttcaggccaa tgctgcttct gtcattgtgt cgtacaacaa ggtcaatacc	720
acctgggcct gcgaggatca gtacacgtg cagactgtgc tgaaagacca gctgggggtc	780
ccaggetatg tcatgacgga ctggaacgca cagcacagca ctgtccaaag cgcgaattct	840
gggcttgaca tgtcaatgcc tggcacagac ttcaacggta acaatcggct ctggggtcca	900

	gctctcacca atgcggtaaa tagcaatcag gteccccacga gcagagtcga cgatatgggtg	960
	actcgtatcc tegccgcgatg gtacttgaca ggccaggacc aggcaggcta tccgtcgttc	1020
	aacatcagca gaaatgttca aggaaaccac aagaccaatg tcagggaat tgcaggggac	1080
	ggcctcgttc tgcacaagaa tgacgccaac atcctgccgc tcaagaagcc cgctagcatt	1140
	gccgtcgttg gatctgccgc aatcattggt aaccacgcca gaaactcgcc ctctgtcaac	1200
	gacaaaggct gcgacgacgg ggccctgggc atgggttggg gttccggcgc cgtcaactat	1260
	ccgtacttcg tcgcgcccta cgaigccatc aataccagag cgtcttcgca gggcaccag	1320
	gttaccttga gcaacaccga caacacgtcc tcaggcgcat ctgcagcaag aggaaaggac	1380
	gtcgccatcg tcttcatac cgcgactcg ggtgaaggct acatcacctg ggagggaac	1440
	gcgggcgac gcaacaacct ggatccgtgg cacaacggca atgccctggt ccaggcggtg	1500
	gccggtgcca acagcaacgt cattgttgtt gteactccg ttggcgccat cattctggag	1560
	cagattcttg ctcttcgca ggtaaggcc gttgtctggg cgggtcttcc ttctcaggag	1620
[0052]	agcggcaatg cgctcgtga cgtgctgttg ggagatgta gcccttcttg caagctggtg	1680
	tacaccattg cgaagagccc caatgactat aacactcgca tcgtttccgg cggcagtgac	1740
	agcttcagcg agggactgtt catcgactat aagcacttcg acgacgcaa tatcacccg	1800
	cggtagcagt tcggctatgg actgtcttac accaagtta actactcac cctctccgtc	1860
	ttgtcgaccg ccaagtcttg tcttcgact ggggccgttg tgccgggagg cccgagtgat	1920
	ctgttccaga atgtcgcgac agtcaccgtt gacatcgcaa actctggcca agtgactggt	1980
	gccgaggtag ccagctgta catcacctac ccattctcag caccaggaac ccctccgaag	2040
	cagctgcgag gctttgcca getgaacctc acgcttggtc agagcggaac agcaacgttc	2100
	aacatccgac gacgagatct cagctacttg gacacggctt cgcagaaatg ggtggtgccg	2160
	tcggggtcgt ttggcatcag cgtgggagcg agcagccggg atatcaggct gacgagcact	2220
	ctgtcggtag cgtag	2235

<210> 36

<211> 744

<212> PRT

<213> 里氏木霉

<400> 36

Met Arg Tyr Arg Thr Ala Ala Ala Leu Ala Leu Ala Thr Gly Pro Phe
1 5 10 15

Ala Arg Ala Asp Ser His Ser Thr Ser Gly Ala Ser Ala Glu Ala Val
20 25 30

Val Pro Pro Ala Gly Thr Pro Trp Gly Thr Ala Tyr Asp Lys Ala Lys
35 40 45

Ala Ala Leu Ala Lys Leu Asn Leu Gln Asp Lys Val Gly Ile Val Ser
50 55 60

Gly Val Gly Trp Asn Gly Gly Pro Cys Val Gly Asn Thr Ser Pro Ala
65 70 75 80

[0053]

Ser Lys Ile Ser Tyr Pro Ser Leu Cys Leu Gln Asp Gly Pro Leu Gly
85 90 95

Val Arg Tyr Ser Thr Gly Ser Thr Ala Phe Thr Pro Gly Val Gln Ala
100 105 110

Ala Ser Thr Trp Asp Val Asn Leu Ile Arg Glu Arg Gly Gln Phe Ile
115 120 125

Gly Glu Glu Val Lys Ala Ser Gly Ile His Val Ile Leu Gly Pro Val
130 135 140

Ala Gly Pro Leu Gly Lys Thr Pro Gln Gly Gly Arg Asn Trp Glu Gly
145 150 155 160

Phe Gly Val Asp Pro Tyr Leu Thr Gly Ile Ala Met Gly Gln Thr Ile
165 170 175

Asn Gly Ile Gln Ser Val Gly Val Gln Ala Thr Ala Lys His Tyr Ile
180 185 190

	Leu	Asn	Glu	Gln	Glu	Leu	Asn	Arg	Glu	Thr	Ile	Ser	Ser	Asn	Pro	Asp
	195						200						205			
	Asp	Arg	Thr	Leu	His	Glu	Leu	Tyr	Thr	Trp	Pro	Phe	Ala	Asp	Ala	Val
	210						215					220				
	Gln	Ala	Asn	Val	Ala	Ser	Val	Met	Cys	Ser	Tyr	Asn	Lys	Val	Asn	Thr
	225					230					235				240	
	Thr	Trp	Ala	Cys	Glu	Asp	Gln	Tyr	Thr	Leu	Gln	Thr	Val	Leu	Lys	Asp
				245						250					255	
	Gln	Leu	Gly	Phe	Pro	Gly	Tyr	Val	Met	Thr	Asp	Trp	Asn	Ala	Gln	His
			260						265					270		
	Thr	Thr	Val	Gln	Ser	Ala	Asn	Ser	Gly	Leu	Asp	Met	Ser	Met	Pro	Gly
		275						280					285			
[0054]	Thr	Asp	Phe	Asn	Gly	Asn	Asn	Arg	Leu	Trp	Gly	Pro	Ala	Leu	Thr	Asn
	290						295					300				
	Ala	Val	Asn	Ser	Asn	Gln	Val	Pro	Thr	Ser	Arg	Val	Asp	Asp	Met	Val
	305					310					315				320	
	Thr	Arg	Ile	Leu	Ala	Ala	Trp	Tyr	Leu	Thr	Gly	Gln	Asp	Gln	Ala	Gly
				325						330					335	
	Tyr	Pro	Ser	Phe	Asn	Ile	Ser	Arg	Asn	Val	Gln	Gly	Asn	His	Lys	Thr
			340					345					350			
	Asn	Val	Arg	Ala	Ile	Ala	Arg	Asp	Gly	Ile	Val	Leu	Leu	Lys	Asn	Asp
		355						360					365			
	Ala	Asn	Ile	Leu	Pro	Leu	Lys	Lys	Pro	Ala	Ser	Ile	Ala	Val	Val	Gly
	370						375					380				
	Ser	Ala	Ala	Ile	Ile	Gly	Asn	His	Ala	Arg	Asn	Ser	Pro	Ser	Cys	Asn
	385					390				395					400	

	Asp	Lys	Gly	Cys	Asp	Asp	Gly	Ala	Leu	Gly	Met	Gly	Trp	Gly	Ser	Gly	
					405					410						415	
	Ala	Val	Asn	Tyr	Pro	Tyr	Phe	Val	Ala	Pro	Tyr	Asp	Ala	Ile	Asn	Thr	
					420					425						430	
	Arg	Ala	Ser	Ser	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Leu	Ser	Asn	Thr	Asp	Asn	
					435					440						445	
	Thr	Ser	Ser	Gly	Ala	Ser	Ala	Ala	Arg	Gly	Lys	Asp	Val	Ala	Ile	Val	
					450					455						460	
	Phe	Ile	Thr	Ala	Asp	Ser	Gly	Glu	Gly	Tyr	Ile	Thr	Val	Glu	Gly	Asn	
					465					470						480	
	Ala	Gly	Asp	Arg	Asn	Asn	Leu	Asp	Pro	Trp	His	Asn	Gly	Asn	Ala	Leu	
[0055]	Val	Gln	Ala	Val	Ala	Gly	Ala	Asn	Ser	Asn	Val	Ile	Val	Val	Val	His	
					500					505						510	
	Ser	Val	Gly	Ala	Ile	Ile	Leu	Glu	Gln	Ile	Leu	Ala	Leu	Pro	Gln	Val	
					515					520						525	
	Lys	Ala	Val	Val	Trp	Ala	Gly	Leu	Pro	Ser	Gln	Glu	Ser	Gly	Asn	Ala	
					530					535						540	
	Leu	Val	Asp	Val	Leu	Trp	Gly	Asp	Val	Ser	Pro	Ser	Gly	Lys	Leu	Val	
					545					550						560	
	Tyr	Thr	Ile	Ala	Lys	Ser	Pro	Asn	Asp	Tyr	Asn	Thr	Arg	Ile	Val	Ser	
					565					570						575	
	Gly	Gly	Ser	Asp	Ser	Phe	Ser	Glu	Gly	Leu	Phe	Ile	Asp	Tyr	Lys	His	
					580					585						590	
	Phe	Asp	Asp	Ala	Asn	Ile	Thr	Pro	Arg	Tyr	Glu	Phe	Gly	Tyr	Gly	Leu	

595

600

605

Ser Tyr Thr Lys Phe Asn Tyr Ser Arg Leu Ser Val Leu Ser Thr Ala
610 615 620

Lys Ser Gly Pro Ala Thr Gly Ala Val Val Pro Gly Gly Pro Ser Asp
625 630 635 640

Leu Phe Gln Asn Val Ala Thr Val Thr Val Asp Ile Ala Asn Ser Gly
645 650 655

Gln Val Thr Gly Ala Glu Val Ala Gln Leu Tyr Ile Thr Tyr Pro Ser
660 665 670

[0056]

Ser Ala Pro Arg Thr Pro Pro Lys Gln Leu Arg Gly Phe Ala Lys Leu
675 680 685

Asn Leu Thr Pro Gly Gln Ser Gly Thr Ala Thr Phe Asn Ile Arg Arg
690 695 700

Arg Asp Leu Ser Tyr Trp Asp Thr Ala Ser Gln Lys Trp Val Val Pro
705 710 715 720

Ser Gly Ser Phe Gly Ile Ser Val Gly Ala Ser Ser Arg Asp Ile Arg
725 730 735

Leu Thr Ser Thr Leu Ser Val Ala
740

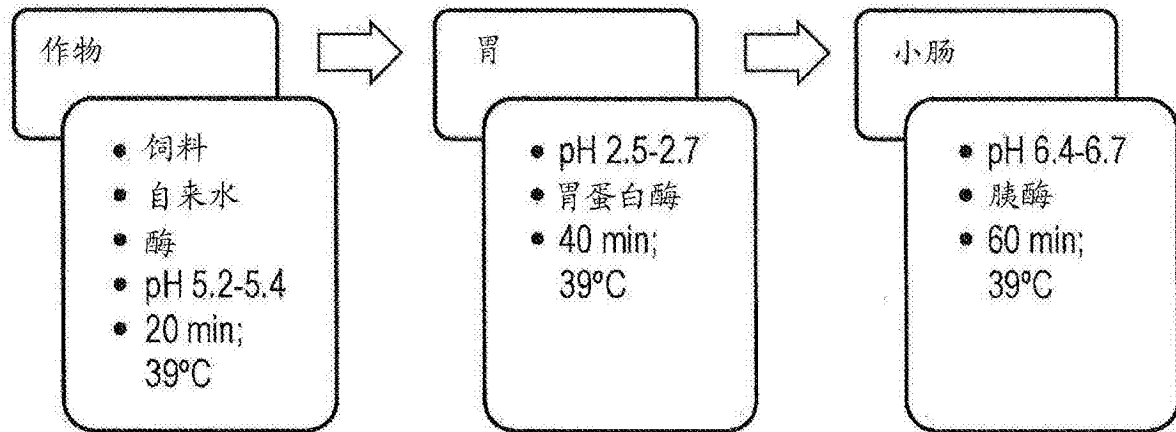


图1

(SEQ ID No. 1)

ATGGTTTCCTTCACCTCTCTCCTCGCCGCCGTCTCGGCTGTCACTGGTGTCATGGCCCT
 TCCCTCCGCTCAGCCCGTTGACGGCATGAGCGTTGTGCGAGCGTGACCCTCCCACAAAC
 GTCCTCGACAAGCGCACTCAGCCCACTACTGGCACAAGCGGTGGTTACTACTTCTCTTT
 CTGGACTGATACACCCAACCTCTGTACCTACACCAACGGCAACGGTGGCCAGTTCAGC
 ATGCAGTGAGCGGCAACGGCAACCACGTCGGTGGAAAGGGTTGGATGCCTGGTACTT
 CTCGCACCATCAAGTACTCTGGTTCTTACAACCCCAACGGCAACAGCTACCTCGCCGTT
 TACGGTTGGACCCGCAACCCTCTCATTGAGTACTACATCGTTGAGAACTTCGGCACTTA
 CAACCCCTCTTCCGGTGGCCAGAAGAAGGGTGAGGTCAATGTTGACGGATCTGTCTAC
 GATATCTACGTCAGCACCCGTGTCAACGCCCCCTCCATTGACGGTAACAAGACCTTTCA
 GCAGTACTGGTCTGTCCGACGCAACAAGCGTTCCAGCGGATCCGTCAATACCGGTGCT
 CATTTCCAGGCCTGGAAGAACGTCGGCCTCAACCTTGGTACCCACGACTATCAGATCCT
 TGCTGTTGAGGGTTACTACAGCTCTGGCTCTGCCAGCATGACTGTCTCCAGTAA

图2

(SEQ ID No 2)

CTTCCCTCCGCTCAGCCCGTTGACGGCATGAGCGTTGTCGAGCGTGACCCTCCCACAA
ACGTCCTCGACAAGCGCACTCAGCCCACTACTGGCACAAGCGGTGGTTACTACTTCTCT
TTCTGGACTGATACACCCAACTCTGTACCTACACCAACGGCAACGGTGGCCAGTTCAG
CATGCAGTGGAGCGGCAACGGCAACCACGTCGGTGGAAAGGGTTGGATGCCTGGTAC
TTCTCGCACCATCAAGTACTCTGGTTCTTACAACCCCAACGGCAACAGCTACCTCGCCG
TTTACGGTTGGACCCGCAACCCTCTCATTGAGTACTACATCGTTGAGAACTTCGGCACT
TACAACCCCTCTTCCGGTGGCCAGAAGAAGGGTGAGGTCAATGTTGACGGATCTGTCTA
CGATATCTACGTCAGCACCCGTGTCAACGCCCCCTCCATTGACGGTAACAAGACCTTTC
AGCAGTACTGGTCTGTCCGACGCAACAAGCGTTCCAGCGGATCCGTCAATACCGGTGC
TCATTTCCAGGCCTGGAAGAAGCTCGGCCTCAACCTTGGTACCCACGACTATCAGATCC
TTGCTGTTGAGGGTTACTACAGCTCTGGCTCTGCCAGCATGACTGTCTCCCAGTAA

图3

(SEQ ID No. 3)

LPSAQPV~~D~~GMSVVERDPPTNVLDKRTQPTTGTSGGYF~~S~~FWTDPNSVTYTNGNGGQFS
MQWSGNGNHVGGKGWMPGTSRTIKYSGSYNPNGNSYLAVYGWTRNPLIEYYIVENFGTY
NPSSGGQKKGEVNV~~D~~GSVYDIYVSTRVNAPSIDGNKTFQQYWSVRRNKRSSGSVNTGAHF
QAWKNVGLNLGTHDYQILAVEGYYS~~S~~GSASMTVSQ

图4

(SEQ ID NO. 4)

ATGAAGCTGTCTTCTTTCTCTACACCGCCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCA
TCGAGCCCCGCCAGGCTGCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCT
CTACTACGGAACCATCACCGACCCCAACCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACACCGCCATC
ATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTTACCCCCGAGAACTCGGGCAAGTGGGACGCCACC
GAGCCCAGCCAGGGCAAGTTCAACTTCGGTAGCTTCGACCAGGTTGTCAACTTTGCCC
AGCAGAATGGCCTCAAGGTCCGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACTCTCAGCTCCCTCA
GTGGGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCA
CCCAAGTCGTTGGACGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGACGTCGTCAACGAGAT
CTTCGAGTGGGACGGTACCCTCCGAAAGGACTCTCACTTCAACAACGTCTTCGGCAAC
GACGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCCCGCCCGCAAGGCTGACCCCAACGCCAAGC
TGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGGCAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGTAT
GGTTCCCTCCGTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCT
CAGACTCACCTTGACCCCGGTGCCGCTGGCCAAATCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCG
CCAATTCTGGTGTCAAGGAGGTTGCCATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCCGC
CAACGACTACGCTACCGTCACCAAGGCCTGCCTCAACGTCCCCAAGTGCATTGGTATCA
CCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAAGCTTTGGCGCAAGGAGCACGACAGTCTTCTGTT
CGATGCTAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACACTGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA

图5

(SEQ ID NO. 5)

ATTCCCACCGCCATCGAGCCCCGCCAGGCTGCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGA
ACAAGGGCAAGCTCTACTACGGAACCATCACCGACCCCAACCTGCTCGGCGTCGCAAA
GGACACCGCCATCATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTTACCCCCGAGAACTCGGGCAAG
TGGGACGCCACCGAGCCCAGCCAGGGCAAGTTCAACTTCGGTAGCTTCGACCAGGTTG
TCAACTTTGCCCAGCAGAATGGCCTCAAGGTCCGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACTCT
CAGCTCCCTCAGTGGGTAAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTGA
GAACCACGTCACCCAAGTCGTTGGACGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGACGTC
GTCAACGAGATCTTCGAGTGGGACGGTACCCTCCGAAAGGACTCTCACTTCAACAACGT
CTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCCGCCGCAAGGCTGACCCC
AACGCCAAGCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGGCAGCGCCTCCAAGGTCA
CCAAGGGTATGGTTCCCTCCGTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGG
CATTGGCTCTCAGACTCACCTTGACCCCGGTGCCGCTGGCCAAATCCAGGGTGCTCTC
ACTGCCCTCGCCAATTCTGGTGTCAAGGAGGTTGCCATCACCGAGCTCGACATCCGCA
CTGCCCCCGCCAACGACTACGCTACCGTCACCAAGGCCTGCCTCAACGTCCCCAAGTG
CATTGGTATCACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAACTCTTGGCGCAAGGAGCACGAC
AGTCTTCTGTTTCGATGCTAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACACTGCTGTTGTCAACGCT
CTCCGCTAA

图6

(SEQ ID No. 6)

QAADSINKLIKNGKLYYGTITDPNLLGVAKDTAIKADFGAVTPENSGKWDATEPSQGKFNF
GSFDQVVNFAQQNGLKVRGHTLVWHSQLPQWVKNINDKATLTKVIENHVTQVVGRYKGKIY
AWDVVNEIFEWDGTLRKDSHFNNVFGNDDYVGIAFRAARKADPNKLYINDYSLDSGSASK
VTKGMVPSVKKWLSQGV PVDGIGSQTHLDPGAAGQIQGALTALANSVKEVAITELDIRTAP
ANDYATVTKACLNVPKCIGITVWGVSDKNSWRKEHDSLLFDANYNPKPAYTAVVNALR

图7

(SEQ ID No. 7)

ATGAAGCTCCCTGTGACACTTGCTAIGCTTGCGGCCACCGCCATGGGCCAGACGATGTGCTCTCAATATG
ACAGTGCCTCGAGCCCCCATATTTCAGTGAACCAGAACCTCTGGGGCGAGTACCAAGGCACCGGCAGCCA
GTGTGTATATGTCGACAACTCTCCAGCAGTGGTGCATCCTGGCACACCGAATGGACCTGGAGCGGTGGT
GAGGGAACAGTGAAAAGCTACTCTAACTCTGGCGTTACATTTAACAAGAAGCTCGTGAAGTATGTATCAA
GCATCCCCACCTCGGTGGAATGGAAGCAGGACAACACCAACGTCAACGCCGATGTGCGGTATGATCTTTT
CACCGCGGCGAATGTGGACCATGCTACTTCTAGCGGCGACTATGAACTGATGATTTGGCTTGCCCGCTAC
GGCAACATCCAGCCCATTTGGCAAGCAAATTGCCACGGCCACAGTGGGAGGCAAGTCTTGGGAGGTGTGGT
ATGGCAGCACCCAGGCCGGTGCGGAGCAGAGGACATACAGCTTCGTGTGCGAAAGCCCTATCAACTC
ATACAGTGGGGACATCAATGCATTTTTTTCAGCTATCTAACTCAGAACCAAGGCTTTCCCGCCAGCTCTCAG
TACTTGATCAATCTGCAGTTTGGAACTGAGGCGTTACCGGGGGCCCGGCAACCTTCACGGTTGACAACT
GGACCGCCAGTGTCAACTAG

图8

(SEQ ID No. 8)

MKLPVTLAMLAATAMGQTMCSQYDSASSPPYSVNQNLWGEYQGTGSQCYYVDKLSSSGASWHTETWWSGG
EGTVKSYSNSGVTFNKKLVSDVSSIPTSVIEWKQDNTNVNADVAYDLFTAANVDHATSSGDYELMIWLARY
GNIQPIGKQIATATVGKSWEVWYGSTTQAGAEQRTYSFVSESPINSYSGDINAFESYLTQNOGFPAASSQ
YLINLQEGTEAFTGGPATFTVDNWTASVN

图9

(SEQ ID No. 9)

ATGAAGTTTCAGAGCACTTTGCTTCTTGCCGCCGCCGGCTGGTTCCCGCCTTGCTGTGCCTCATGGCTCCG
GACATAACAAGAGGGCGTCTGTGTTTGAATGGTTCCGGATCGAACGAGTCTGGTGCTGAATTTGGGACCAA
TATCCCAGGCGTCTGGGGAACCGACTACATCTTCCCCGACCCCTCGACCATCTCTACGTTGATTGGCAAG
GCAATGAACCTCTTCCGCGTCCAGTTCATGATGGAGAGGTTGCTTCCTGACTCGATGACTGGTTCATACG
ACGAGGAGTATCTGGCCAACTTGACGACTGTGGTGAAAGCCGTCACGGATGGAGGCGCGCATGCGCTCAT
CGACCCTCATAACTATGGCAGATACAACGGGGAGATCACTCCAGTACATCGGATTTCCAGACTTTCTGG
CAGAATCTGGCGGGCCAGTACAAAGATAACGACTTGGTCATGTTTGATACCAACAACGAATACTACGACA
TGGACCAGCATCTCGTGCTGAATCTCAACCAAGCAGCCATTAACGGCATCCGCGCTGCAGGTGCAAGCCA
GTACATTTTCGTCGAAGGCCAACTCCTGGACCGGAGCTTGGACATGGGTGATGTCAACGACAATATGAAG
AATTTGACCGACCCAGAAGACAAGATCGTCTATGAAATGCACCAGTACCTAGACTCCGACGGTTCCGGCA
CTTCGGAGACCTGTGTCTCCGGGACAATCGGAAAGGAGCGGATCACTGATCTACACAGTGGCTCAAGGA
CAATAAGAAGGTCCGCTTCATCGGCGAATATGCCGGGGGGTCCAATGATGTGTGTCCGAGTCCCGTGTCC
GGGATGCTAGAGTACATGGCGAACAACACCGACGATGGAAGGGTGGTGGTGGTGGGAGCCGGGCCAT
GGTGGGGAGACTACATTTTCAGCCTGGAGCCCCCAGATGGAACTGCTTACACGGGTATGCTGGATATCCT
GGAGACGTATCTCTGA

图10

(SEQ ID No. 10)

MKFQSTLLLLAAAAGSALAVPHGSGHKKRASVFEWFGSNESGAEFGTNIPGVWGTDYIFPDPSTISTLIGK
GMNFFRVQFMMERLLPDSMTGSYDEEYLANLTTVVKAVIDGGAHALIDPHNYGRNGEIISSTSDFQTFW
QNLAGQYKDNLDVMFDINNEYDMDQDLVLNLNQAAINGIRAAGASQYIFVEGNSWTGAWTWVDVNDNMK
NLTDPEDKIVYEMHQYLDSDGSGTSETCVSGTIGKERITDATQWLKDNKKVGFIGEYAGGSNDVCRSAVS
GMLEYMANNTDVWKGASWWAAGFWWGDYIFSLEPPDGTAYTGMLDILETYL

图11

(SEQ ID No. 11)

ATGCTACCAAGAACCTTCTCCTCTGCTTTGCCGCGGCTAAGGCTGCTCTGGCTGTTCCCCACGACTCTG
TCGCCCAGCGTTTCGGATGCCTTGACATGCTCTCTGAGCGCTCGACCCCGAGCTCGACCGGCGAGAACAA
CGGCTTCTACTACTCCTTCTGGACCGACGGCGGTGGCGACGTGACCTACACCAACGGAGATGCTGGTGCC
TACACTGTTGAGTGGTCCAACGTGGGCAACTTTGTGGTGGAAGGGCTGGAACCCCGGAAGTGCGCAGG
ACATCACCTACAGCGGCACCTTCACCCCTAGCGGCAACGGCTATCTCTCCGTCTATGGCTGGACCACTGA
CCCCCTGATCGAGTACTACATCGTCGAGTCCTACGGCGACTACAACCCCGGCAGTGGAGGCACATACAAG
GGCACCGTCACCTCGGACGGATCCGTTTACGATATCTACACGGCTACCCGTACCAATGCTGCTTCCATT
AGGGAACCGCTACCTTCACTCAGTACTGGTCCGTCCGCCAGAACAAGAGAGTTGGCGGAAGTGTACCA
CTCCAACCACTTCAATGCTTGGGCTAAGCTGGGAATGAACCTGGGTACTCACAACCTACCAGATCGTGGCT
ACCGAGGGTTACCAGAGCAGTGGATCTTCGTCCATCACTGTTTCAGTAA

图12

(SEQ ID No. 12)

MLTKNLLLCFAAAKAALAVPHDSVAQRSDALHMLSERSTPSSTGENNGFYYSFWTDGGGDVITYNGDAGA
YTVESNVGNFVGGKGNPQSAQDITYSGTFTPSGNGYLSVYGWTTDPLIEYYIVESYGDYNPGSGGTYK
GTVTSDGSVYDIYTATRTNAASIQGTATFTQYWSVRQNKRVGGTVTTSNHFNAWAKLGMNLGTHNYQIVA
TEGYQSSGSSSITVQ

图13

(SEQ ID No. 13)

ATGAGGTTCACTTCGATCGAGGCGGTGGCTCTGACTGCCGCTCTCGCTGGCCAGCGCTGATGAATTGGCCT
ACTCCCCGCCGTATTACCCCTCCCTTGGGCCAATGGCCAGGGTGACTGGGCGGAAGCATACCAGCGCGC
TGTTGATATCGTCTCGCAGATGACATTGGCTGAGAAGGTCAATTTGACTACGGGAACCTGGATGGGAATTG
GAATTATGTGTTGGTCAGACTGGAGGTGTTCCCGGATTGGGAATTCGCGGAATGTGTGCACAGGATAGCC
CTCTGGGTGTTTCGTGACTCCGACTACAACCTCTGCGTTCCCTGCCGGTGTCAACGTGGCCGCAACCTGGGA
CAAGAATCTGGCTTACCTTCGTGGCCAGGCTATGGGTGAGGAGTTTAGTGACAAGGGTGCTGATATCCAA
TTGGGTCCAGCTGCCGGCCCTCTCGGTAGAAGTCCCGACGGCGGTGTAACCTGGGAGGGCTTCTCCCCCG
ACCCGGCCCTCAGTGGTGTGCTCTTTGCAGAGACAATCAAGGGTATTCAGGATGCTGGTGTGGTTGCAAC
GGCTAAGCACTACATCGCCTACGAGCAGGAGCATTTCCGTGAGGCGCCTGAAGCTCAAGGCTACGGATTC
AATATTACCGAGAGTGGAAGCGCGAACCTCGACGATAAGACTATGCATGAGCTGTACCTCTGGCCCTTCG
CGGATGCCATCCGTGCAGGTGCCGGTGCTGTGATGTGCTCGTACAACCAGATCAACAACAGCTATGGCTG
CCAAAACAGCTACACTCTGAACAAGCTGCTCAAGGCTGAGCTGGGTTTCCAGGGCTTTGTGATGAGTGAT
TGGGCGGCTCACCATGCCGGTGTGAGTGGTGTCTTTGGCGGGATTGGACATGTCTATGCCGGGAGACGTG
ATTACGACASTGGCACGTCTTACTGGGGTACCAACTTGACCATCAGTGTGCTCAACGGGACGGTGGCCCA
ATGGCGTGTGATGACATGGCTGTCCGCATCATGGCCGCCTACTACAAGGTCCGGCCGTGACCGTCTGTGG
ACTCCTCCCAACTTCAGCTCATGGACCAGAGATGAATACGGCTTCAAGTACTACTATGTCTCGGAGGGAC
CGTATGAGAAGSTCAACCAGTTCTGTAACGTGCAACGCAACCATAGCGAGTTGATCCGCCGTATTGGAGC
AGACAGCACGGTGCTCCTCAAGAACGATGGCGCTCTTCCCTTGACTGGAAAGGAGCGCTTGGTCCGCCCTT
ATCGGAGAAGATGCCGGTTCCAATCCTTATGGTGCCAACGGCTGCAGTGACCSTGGGTGCGACAATGGAA
CATTGGCGATGGGCTGGGGAAGTGGCACTGCCAACTTTCCCTACTTGGTGACCCCGGAGCAGGCCATCTC
GAACGAGGTGCTCAAGAACAAGAATGGCGTATTCACTGCGACCGATAACTGGGCTATTGATCAGATTGAG
GCGCTTGCTAAGACCGCCAGTGTCTCTCTTGTCTTTGTCAACGCCGACTCTGGTGAGGGTTATATCAATG
TCGACGGAAACCTGGGTGACCGCAGGAACCTGACCCTGTGGAGGAACGGCGACAATGTGATCAAGGCTGC
TGCTAGCAACTGCAACAACACGATCGTTATTATTCACTCTGTGCGGCCAGTCTTGGTTAACGAGTGGTAC
GACAACCCCAATGTTACCGCTATTCTCTGGGGTGGTCTTCCCGGTGAGGAGTCTGGCAACTCCCTCGCCG
ACGTGCTCTACGGCCGTGTCAACCCCGGTGCCAAGTCCCCCTTACCTGGGGCAAGACTCGTGAGGGCCTA
CCAAGATTACTTGTACACCGAGCCCAACAACGGCAACGGAGCGCCCCAGGAAGACTTCGTGAGGGCGCTC
TTCATTGACTACCGCGGATTTGACAAGCGCAACGAGACTCCTATCTATGAGTTCGGCTATGGTCTGAGCT
ACACCACCTTCAACTACTCGAACCTTCAGGTGGAGGTTCTGAGCGCCCCCTGCGTACGAGCCTGCTTCGGG
CGAGACTGAGGCGAGCGCCGACTTTCCGAGAGGTCGGAAATGCGTCGGATTACCTCTACCCCCATGGAATG
CAGAGAATCACCAAGTTCATCTACCCCTGGCTCAACAGTACCGATCTTGAGGCGTCTTCTGGGGATGCTA
GCTATGGGCAGGATGCCTCAGACTATCTTCCCGAGGGAGCCACCGATGGCTCTGCGCAACCGATCCTGCC
TGCCGGTGTGTTGCTGCTGGCGGCAACCTTCGCCTGTACGACGAGCTCATCCGCGTGTGCGTCACTATCAAG
AACACCGGCAAGGTTGCGGGTGATGAAGTTCCTCAACTGTATGTTTCTCTTGGCGGCCCTAACGAACCCA
AGATCGTGCTGCGTCAATTCGAGCGTATCACGCTGCAGCCGTCGAAAGAGACGCGAGTGAGCACAACTCT
GACGCGCCGTGACCTTGCGAACTGGAATGTTGAGACGCGAGGACTGGGAGATTACGTGCTATCCCAAGATG
GTGTTTGCCGGAAGCTCCTCGCGGAAGCTGCCGCTCCGGGCGTCTCTGCCTACTGTTCACTAA

图14

(SEQ ID No. 14)

MRFTSIEAVALTAVSLASADELAYSPFYYPSPWANGQGDWAEAYQRAVDIVSQMTLAEKVNLTGTGWEL
ELCVGQTGGVPERLGIPEMCAQDSPLGVRDSDYNFAFPAGVNVAATWDKNLAYLRGQAMGQEFSDKGADIQ
LGPAAGPLGRSPDGGRNWEFGSPDPALSGVLFAETIKGIQDAGVVATAKHYYIAYEQEHFRQAPEAQCYGF
NITESGSANLDDKTMHELYLWPFADATRAGACAVMCSYNQINNSYGCQNSYTLNKLKLAELGFQGFVMSD
WAAHHAGVSGALAGLDMSPGDVDYDSGTSYWGTNLTISVLNGTVPQWRVDDMAVRIMAAYYKVGRDRLW
TPPNFSSWTRDEYGFKYIYVSEGPIYKVNQFVNVQRNHSSELIRRICADSTVLLKNDGALPLTGKERLVAL
IGEDAGSNPYGANGCSDRGCDNGTILAMGWGSGGTANFPYLVTPAQASNEVLKNKNGVFTATDNWAIQIE
ALAKTASVSLVFVNADSGEGYINVDGNLGDRRNLTWRNGDNVIKAAASNCNNTIVIIHSGVPVLVNEWY
DNPNTAILWGGLPGQESGNSLADVLYGRVNPAGAKSPFTWGKTREAYQDYLYTEPNNGNGAPQEDFVEGV
FIDYRGFDKRNETPIYEFYGLSYTTFNYSNLQVEVLSAPAYEPASGETEAPTFGEVGNASDYLYPDGL
QRITKFIYPWLNSTDLEASSGDASYGQDASDYLPEGATDGSAPFILPAGGGAGGNPRLYDELIRVSVTIK
NTGKVAGDEVPOLYVSLGGPNFPIVLRQFERITLQPSKETQWSTTLTRDLANWNVETQDWEITSYPKM
VFAGSSSRKLPRLRASLPTVH

图15

(SEQ ID No. 15)

ATGCTCTGTCGCTAAGATTGCTGGTGTCTGCTCTCGGCTCGGCCGCCCTTGTTGCTGGCCACGGTTATGTGT
CTGGTGCTGTCTATCGACGCGAGTACTACGGAGGATACATCGTCTCTCTCTACCCCTATGAGAGTGACCC
TCCGGAGACCATTGCCTGGTCTACCCACAGCCACTGACCTTGGCTTCGTGACGGCTCTGAATACTCGGAC
CCTGACATCATCTGCCACAAGAGCGCTAAGCCTGGTGCTATCTCCGCTGACGTCAAGGCCGGTGGTACTG
TTGAGCTTCAGTGGACTGACTGGCCTTCCAGCCACCACGGTCCCGTCTGACTTACCTTGCCAACTGCAA
CGGTGACTGCTCCGATGTCAACAAGACTGACCTTGAGTTCTTCAAGATCGACGAGAGCGGCCTCATTAGC
GACACTGAAGTCCCCGGAACCTGGGCCACTGACAACTTGATCTCCAACAACAACAGCTGGACTGTGACCA
TTCCCTCGACCCTCGAGGCTGGTAACCTACGTCTGCGCCACGAGATCATTGCCCTGCACTCCGCTGAGAA
CAAGGATGGCGCCCGAAGTACCCCCAGTGTCTCAACCTGAAGGTTACCGGCAGTGGTAGCTCCACCTAC
TCCGGCACCAAGGGTGAAGCCCTCTACAAGGACACCGACCCGGGTATCCTGGTCAACATCTACGAGACCC
TGAGCTCCTACGACATCCCCGGTCTGTATGTACAAACGCCACTTCTCCAGCAGCTCTTCTGGCAGCTC
CTCCGGTGCCTCTTCTACAGCTCCGCTGCGCGTGGCGCGGCCACTACTTCCAGTGCCTCGACTTCCAGC
GCTTCCACCCCCACCACCAGCGCTGCCGCTGGGACTAGCTCCGCCGTAAAGCGCCACCACCAGCTGCTGCTG
CTGCCGTTGTACCGACGTTGAAACCACCGTTTCAGACTGCGGTGCGCCACTGCTTACCAGACTTCGACTGA
CGTTGTGCAGGTCACTGTCACTGGCAGCGCCCCCAGCAGACCCACATCCAGGTCCGCCAGCTCCAGCGCC
GCTGCTTCCACCCCCAGCAGCTCCAGTGTGCGCGTCTCCAGCGACAACCTCACCAGCTACTTCAGCTCTC
TGAGCGCCGACCAGTTCCCTCAGCGTCTGAAGGAGACCTTCTCTTGGCTGGTCACTGAGAAGAAGCACGC
CCGTGACCTCAACGCCTAA

图16

(SEQ ID No. 16)

MSVAKIAGVVLGSAALVAGHGYVSGAVIDGEYYGGYIVSSYFYESDPPETIAWSTTATDLGFVDGSEYSD
PDIICHKSAKPGAISADVKAGGTVELQWTDWPSSHHGPVLTLYLANCNGDCSDVTKTDLFFKIDESGLIS
DTEVPGTWATDNLISNNNSWTVTIPSTLEAGNYVLRHEIIALHSAENKDG AQNYPQCLNLKVTGSGSSTY
SGTKGEALYKDTDFGILVNIYETLSSYDIPGPAMYNATSSSSSSSGSSSGASSTSSAAAAAATTSSASTSS
ASTPTTSAAAATSSAVSATTTAAAVVTDVETTQTA VATA YQTSTDVVQVTVTGSA PQQTHIQVASSSA
AASTFSSSSVAVSSDNLT SYFSSLSADQFLSVLKETF SWLVTEKKHARDLNA

图17

(SEQ ID No. 17)

ATGTCTTCCTTCCAAATCTACCGAGCAGCTCTGCTGCTCTCTATCCTTGCCACTGCCAATGCTCAGCAGG
TTGGCACCTACACCACTGAGACACATCCGTCTCTGACCTGGCAAACCTGCACCAGCGATGGCAGCTGCAC
TACCAACGACGGCGAGGTGGTCATCGACGCCAATTGGCGTTGGGTGCACTCAACCTCCAGTGCCACCAAC
TGCTATACTGGCAACGAATGGGACACCTCAATTTGTACCGACGATGTGACCTGCGCCGCGAACTGCGCGC
TTGACGGTGCACCTTACGAGGCGACCTATGGTGTGACCACGTCCGGCAGCGAGCTGCGCCTGAACCTTCGT
CACTCAAGGCTCCAGCAAGAACATCGGGTCTCGTTTGTACCTCATGAGCGACGACAGCAACTATGAGCTG
TTCAAGCTCCTCGGCCAGGAGTTCACCTTTGATGTGACGTGTCCAACCTTCCCTGCGGTCTCAACGGCG
CGCTCTACTTCGTGCGCATGGACGTGACGGTGGCACCTCGGAGTATTCGGGCAACAAGGCCGGTGCCAA
ATACGGAAACGGCTACTGCGACTCGCAGTGCCCTCGCGACCTGAAGTTCATCAACGGCGAAGCCAACTGC
GACGGCTGGGAGCGGTCCAGCAACAACGTCAACACCGGAGTTGGCGACCACGGCTCCTGCTGCGCCGAGA
TGGACGTCTGGGAAGCGAACAGCATCTCCAACGCCCTTACCGCGCAACCCCTGCGACTCCGTGACCCAGAC
AATGTGCGACGGTGA CTCTGTGTTGGA ACTTACAGCGCCAGCGGCGACCGCTACAGCGGCACCTGCGAC
CCCGACGGCTGCGACTACAACCCCTACCGTCTAGGCAACACGGACTTTTACGGCCCCGGCCTGACCGTGG
ACACGAACAGCCCCCTTACCGTCTGTCACCCAGTTCA TCACCGATGACGGCACCTCCTCCGGCACCTTGAC
CGAGATCAAGCGGTTGTACGTGCGAAGCGCGAGGT CATCGCCAACGGCGCCTCCACCTACTCCAGTGTC
AACGGCAGCTCTATCACCTCCGCTTCTGTGAATCAGAGAAGACGCTGTTGCGCGACGAGAACGTCTTCG
ACAAGCACGGCGGTCTCGAGGGCATGGGCGAGGCTATGGCCAAGGGCATGGTCTTGGTCTTGAGTCTTGG
GGATGACTATGCCGCTGACATGCTCTGGCTCGACAGCGACTACCCCGTTAACTCGTTCGGCCTCGACCCCT
GGTGTGGCCCCGGTACTTGTAGCACGGACTCGGGTGTCCCGGCTACCGTGGAGGCGGAGTCACCCAATG
CCTATGTACGTA CTGGAACATCAAGTTCGGGCCCTATTGGCTCGACTTACTCCAGTGGATCTTCTTCGGG
GTCGGGGTCTAGCTCCAGCTCGAGTTCGACTACCACTAAGGCCACTTCGACGACCTTGAAGACTACCTCG
ACCACCAGCAGTGAAGCAGTTCGACATCGGCGGGCGCAGGCCTATGGACAGTGTGGTGGACAGGGCTGGA
CTGGTCCGACCACTTGTGTGAGTGGGTACACTTGCACGTATGAGAATGCGTACTACTCGCAGTGTTTGTA
G

图18

(SEQ ID No. 18)

MSSFQIYRAALLLSIIATANAQQVGYTTTETHPSLTWQTCTSDGSCTTNDGEVVIDANNRWVHSISSATN
CYTGNEWETSICTDDVTCAANCALDGATYEATYGVTTSGSELRLNEVTOGSSKNIGSRLYLMSDDSNYEL
FKLLGQEEFTFDVDEVSNLPCGLNGALYFVAMDADGGTSEYSGNKAGAKYGTGYCDSQCPRDLKFTNGEANC
DGWEPSNNVNTGVGDHGSCCAEMDVWEANSISNAFTAHPCDSVSQTMCDGSDSCGGTYSASGDRYSGTCD
PDGCDYNFYRLGNTDFYGPGLTVDTNSPFTVVVTQFITDDGTSSGTLTEIKRLYVQNGEVIANGASTYSSV
NGSSITSAFCESEKTLFGDENVFDKHGGLEGMEAMAKGMVLVLSLWDDYAADMLWLDSDYPVNSSASTP
GVARGTCSTDGVPATVEAESPNAYVTYSNIKFGPIGSTYSSGSSSGSGSSSSSSSTTTKATSTTLKTTT
TTSSGSSSTSAAQAYGQCGGQGTGPTTCVSGYTCTYENAYYSQCL

图19

(SEQ ID No. 19)

ATGCATCAACGTGCCCTTCTCTTCTCAGCCCTGCTGACGGCTGTTTCGCGCCCAGCAAGCCGGAACGCTCA
CGGAGGAAGTCCATCCTTCTTCTGACCTGGCAGAAATGCACCTTCTGAAGGCAGCTGCCTGAACAGAGTGG
CTCAGTTGTCAATTGACTCGAACTGGCGCTGGACCCATTCCGTCAATGACAGCACCAATTGCTACACTGGC
AACACCTGGGATGCAACTCTCTGCCCTGATGATGAGACCTGTGCGGCCAACTGCGCCCTGGACGGAGCAG
ACTACGAGTCCACCTACGGTGTCAACCACTGACGGTGATTCATTGACACTGAAATTCGTCACTGGCTCCAA
TGTTGGCTCGCGGTTGTATCTAATGGACACGAGCGACGAGGGATACCAGACGTTCAACTTGCTTGACGCA
GAGTTCACTTTTCGACGTTGATGTGTCTAACCTCCCATGTGGGCTAAACGGCGCGTTGTACTTCACTGCAA
TGGACGCCGATGGTGGAGTCTCAAAATACCCTGCCAATAAGGCTGGAGCCAAGTACGGAACAGGATACTG
TGACTCCCAATGCCCGGGGACCTGAAATTCATCGACGGACAAGCCAACGTCGATGGCTGGGAACCTTCT
AGCAACAATGACAACACAGGTATCGGCAATCACGCTTCTTGCTGCCCTGAAATGGATATCTGGGAGGCAA
ACAAGATCTCGACCGCATTEACACCCCATCCTTGTGACAGCAGCGAACAGACCATGTGTGAGGGTAACGA
CTGCGGTGGAACCTACTCGGATGATCGCTACGGAGGAACCTGCGACCCCTGACGGCTGCGACTTCAACCCT
TATCGCATGGGCAACGACTCTTTCTACGGTCCTGGCAAGACCATCGACACCGGATCCAAGATGACGGTTG
TGACCCAGTTTCATCACTGATGGCTCTGGCTCCCTCAGCGAGATCAAGCGTTACTACGTGCAGAACGGAAA
TGTTATAGCGAACGCTGATTCCAACATCTCTGGAGTGACTGGAAACTCGATCACAACGGACTTCTGCACT
GCGCAGAAGAAGGCCCTTTGGCGACGAGGATATATTGCTGAGCACAATGGACTTGCTGGAATCAGTGATG
CCATGTCTTCCATGGTTCTCATCTTGAGCTTGTGGGATGATTACTATGCCAGCATGGAGTGGCTCGACAG
CGACTATCCCGAGAACGCTACCGCTACCGACCCAGGTGTTGCACCGCGAACATGCGACTCGGAATCAGGC
GTCCCTGCGACAGTCGAGGGGGCGCATCCCGATTCTTCGGTGACCTTCTCAAACATCAAGTTCCGGTCCCA
TCAACTCGACCTTCAGCGCTTCCGCATAA

图20

(SEQ ID No. 20)

MHQRALLFSALLTAVRAQQAGTLTEEVHPSLTWQKCTSEGSCTEQSGSVVIDSNWRWTHSVNDSTNCYTG
NTWDATLCPDDETCAANCALDGADYESTYGVTTDGDLSLTLKFVTGSNVGSRLYLMDTSDEGYQTFNLLDA
EFTFDVDVSNLPCGLNGALYFTAMDADGGVSKYPANKAGAKYGTGYCDSQCPRDLKFIDGQANVDGWEPS
SNNDNTGIGNHGSCCPEMDIWEANKISTALTPHPCDSSEQTMCEGNDCCGGTYSDDRYGCTCDPDGCDENP
YRMGNDSFYGPGKTI DTGSKMTVVVTQFITDGSGLSEIKRYVQNGNVIANADSNISGVTGNSITTDFT
AQKKAFGDEDIFAENGLAGISDAMSSMVLILSLWDDYASMEWLDSDPENATATDPGVARGTCDSESG
VPATVEGAHPDSSVTFESNIKFGPINSTFSASA

图21

(SEQ ID No. 21)

ATGTATCGGAAGTTGGCCGTCATCTCGGCCTTCTTGGCCACAGCTCGTGCTCAGTCGGCC
TGCACCTCTCCAATCGGAGACTCACCCGCCTCTGACATGGCAGAAATGCTCGTCTGGTGGC
ACGTGCACTCAACAGACAGGCTCCGTGGTCATCGACGCCAACTGGCGCTGGACTCACGCT
ACGAACAGCAGCACGAAGTGTACGATGGCAACACTTGGAGCTCGACCCCTATGTCTGAC
AACGAGACCTGCGCGAAGAAGTGTGTCTGGACGGTGGCCCTACGCGTCCACGTACGGA
GTTACCACGAGCGGTAACAGCCTCTCCATTGGCTTTGTCAACCCAGTCTGCGCAGAAGAAC
GTTGGCGCTCGCCTTTACCTTATGGCGAGCGACACGACCTACCAGGAATTCACCCGTGCTT
GGCAACGAGTTCTCTTCGATGTTGATGTTTCGCAGCTGCCGTGCGGCTTGAACGGAGCT
CTCTACTTGTGTCCATGGACGCGGATGGTGGCGTSGAGCAAGTATCCCACCAACACCGCT
GGCGCCAAGTACGGCACGGGGTACTGTGACAGCCAGTGTCCCGCGATCTGAAGTTCATC
AATGGCCAGGCCAACGTTGAGGGCTGGGAGCCGTGATCCCAACACGCGAACACGGGCATT
GGAGGACACGSAAGCTGCTGCTCTGAGATGGATATCTGGGAGGCCAACTCCATCTCCGAG
GCTCTTACCCCCCACCCTTGCAAGACTGTGCGCCAGGAGATCTGCGAGGGTGTGGGTGC
GGCGGAACCTTACTCCGATAACAGATATGGCGGCACCTTGGCATCCCGATGGCTGCGACTGG
AACCCATACCGCCTGGGCAACACAGCTTCTACGGCCCTGGCTCAAGCTTTACCCCTCGAT
ACCACCAAGAAATTGACCGTTGTCAACCCAGTTCGAGACGTGGGTGCCATCAACCGATAC
TATGTCCAGAATGGCGTCACTTCCAGCAGCCCAACGCCGAGCTTGGTAGTTACTCTGGC
AACGAGCTCAACGATGATTACTGCACAGCTGAGGAGGCAGAATTCGGCGGATCCTCTTTC
TCAGACAAGGGCGGCCTGACTCAGTTCAAGAAGGCTACCTCTGGCGGCATGGTTCTGGTC
ATGAGTCTGTGGGATGATTACTACGCCAACATGCTGTGGCTGGACTCCACCTACCCGACA
AACGAGACCTCCTCCACACCCGTTGCCGTGCGCGGAAGCTGCTCCACAGCTCCGGTGTCT
CCTGCTCAGGTGGAATCTCAGTCTCCCAACGCCAAGGTCACTTCTCCACATCAAGTTC
GGACCCATTGGCAGCACCGGCAACCTTAGCGGCGGCAACCTTCCGGCGGAAACCGTGGC
ACCACCACACCCGCCGCCAGCCACTACCACTGGAAGCTCTCCCGGACCTACCCAGTCT
CACTACGGCCAGTGGCGGCTATTGGCTACAGCGGCCACCGGTCTGCGCCAGCGGCACA
ACTTGCCAGGTCTGAACCCCTTACTACTCTCAGTGCCTGTAA

图22

(SEQ ID No. 22)

MYRKLAVISAFLATARAQSACTIQSETHPPETWQKCSSGGTCTQQTGSEVVIDANWRWTHATNSSTNCYDGNWSS
TLCPDNETCAKNCCLDGAAYASTYGVTTSGNSLSIGFVTQSAQKNVGARLYLMASDTTYQEFTLLGNEFSFDVDV
SQLPCGLNGALYFVSMADGGSVSKYPTNTAGAKYGTGYCDSQCPRDLKFINGQANVEGWEPSSNNANTGIGGHC
CCSEMDIWEANSISEALTTPHPCTTVGQEIPEGDGGCGGTYSNRYGGTCDPDGCDWNPYRLGNTSFYGPSSFTLD
TTKKLTVVTFQFETSGAINRYVQNGVTFQQFNALGSYSCNELNDEYCTAEAEFGSSFSKGGGLTQPKKATSG
GMVLVMSIWDYYANMLWLDSTYPTNETSSTPGAVRGSCSTSSGVPAQVESQSPNAKVTFPSNIKFGPIGSTGNPS
GGNPPCGNRGTTTTTRRPATTTGSSPGFTQSHYGQCGGIGYSGPTVCASGTTQVNLNPPYSQCL

图23

(SEQ ID No. 23)

ATGATTGTGGCATTCTCACCACGCTGGCTACGCTGGCCACACTCGCAGCTAGTGTGCCT
CTAGAGGAGCGGCAAGCTTGCTCAAGCGTCTGGCGCCAATGTGGTGGCCAGAATTGGTCG
GGTCCGACTTGCTGTGCTTCCGGAAGCACATGCGTCTACTCCAACGACTATTACTCCCAG
TGCTCTCCCGGCGCTGCAAGCTCAAGCTCGTCCACGCGCGCCGCGTCCGACGACTTCTCGA
GTATCCCCCACAAACATCCCGGTGAGCTCCGCGACGCGCTCCACCTGGTTCTACTACTACC
AGAGTACCTCCAGTCGGATCGGGAACCGCTACGTATTCAGGCAACCCTTTTGTTGGGGTC
ACTCCTTGGSCCAATGCATATTACGCCTCTGAAGTTAGCAGCCTCGCTATTCTAGCTTG
ACTGGAGCCATGGCCACTGCTGCAGCAGCTGTGCAAGGTTCCCTCTTTTATGTGGCTA
GATACTCTTGACAAGACCCCTCTCATGGAGCAAACCTTGGCCGACATCCGCACCGCCAAC
AAGAATGGCGGTAACATATGCCGGACAGTTTGTGGTGTATGACTTGCCGGATCGCGATTGC
GCTGCCCTTGCCCTCGAATGGCGAATACTCTATTGCCGATGGTGGCGTCGCCAAATATAAG
AACTATATCGACACCATTTCGTCAAATTGTGCTGGAATATTCGATATCCGGACCCCTCCTG
GTTATTGAGCCTGACTCTCTTGCCAACTGGTGACCAACCTCGGTACTCCAAAGTGTGCC
AATGCTCAGTCAGCCTACCTTGAGTGCATCAACTACGCCGTACACAGCTGAACCTTCCA
AATGTTGCGATGTATTGGACGCTGGCCATGCAGGATGGCTTGGCTGGCCGGCAAACCAA
GACCCGGCGCGCTCAGCTATTGCAAAATGTTTACAAGAATGCATCGTCTCCGAGAGCTCTT
CGCGGATTGGCAAACCAATGTCGCCAACTACAACGGGTGGAACATTACCAGCCCCCATCG
TACACGCAAGGCAACGCTGTCTACAACGAGAAGCTGTACATCCACGCTATTGGACCTCTT
CTTGCCAATCACGGCTGGTCCAACGCTTCTTCATCACTGATCAAGGTCGATCGGGAAAG
CAGCCTACCGGACAGCAACAGTGGGGAGACTGGTGCAATGTGATCGGCACCGGATTGGT
ATTGCGCCATCCGCAACACTGGGGACTCGTTGCTGGATTGCTTGTCTGGGTCAAGCCA
GGCGGCGAGTGTGACGGCACCAGCGACAGCAGTGCGCCACGATTGACTCCCACTGTGCG
CTCCAGATGCCTTGCAACCGCGCCTCAAGCTGGTGGCTTGGTTCCAAGCCTACTTTGTG
CAGCTTCTCACAAACGCAAACCCATCGTTTCCTGTAA

图24

(SEQ ID No. 24)

MTVGILTTLATLATLAASVPLEERQACESVWGQCGGQNWSGPTCCASGSTCVYSNDYYSQCLPGAASSSSSTRAA
STTSRVSPSTSRSSSATPPPGSTTTTRVPPVSGSTATYSGNPFVGVTPWANAYYASEVSSLAIPSLTGAMATAAAA
VAKVPSFMWLDLTKTFLMEQTLADIRTKANKNGGNYAGQFVVDLPDRDCAALASNGEYSIADGGVAKYKNYIDT
IRQIVVEYSDIRTLIVIEPDSLNLVNLGTPKCANAQSAYLECINYAVTQLNLPNVAMYLDAGHAGWLGWPAHQ
DPAAQLFANVYKNASSPRALRGLATNVANYNGWNITSEPSYTQGNVYNEKLYIHAIGPLLANHCWSNAFFITDQ
GRSGKQPTGQQQWGDWCNVIGTGFGIRPSANTGDSLLDSFVWVKPGGECGDTSDSSAPRFDSSHCAFLDALQFAPQ
AGAWFOAYFVQLLTNANPSFL

图25

(SEQ ID No. 25)

ATGGGGCCCTCAGTTACACTGCCGTTGACCACGGCCATCCTGGCCATTGCCCGGCTCGTC
GCCGCCCAGCAACCGGGTACCAGCACCCCGAGGTCCATCCCAAGTTGACAACCTACAAG
TGTACAAAGTCCGGGGGGTGGTGGCCCAGGACACCTCGGTGGTTCCTTGACTGGAACCTAC
CGCTGGATGCACGACGCAAACTACAACCTCGTGACCGTCAACGGCGGGCGTCAACACCACG
CTCTGCCCTGACGAGGCGACCTGTGGCAAGAACTGCTTCATCGAGGGCGTCGACTACGCC
GCCTCGGGGCTCACGACCTCGGGGAGCAGCCTCACCATGAACAGTACATGCCAGCAGC
TCTGGCGGCTACAGCAGCGTCTCTCCTCGGCTGTATCTCCTGGACTCTGACGGTGAGTAC
GTGATGCTGAAGCTCAACGGCCAGGAGCTGAGCTTCGACGTCGACCTCTCTGCTCTGCCG
TGTGGAGAGAACGGCTCGCTCTACCTGTCTCAGATGGACGAGAACGGGGGCGCCAACCAG
TATAACACGGCCGGTGCCAACTACGGGAGCGGCTACTGCGATGCTCAGTGCCCCGTCCAG
ACATGGAGGAACGGCACCCCTCAACACTAGCCACCAGGGCTTCCTGCTGCAACGAGATGGAT
ATCCTGGAGGGCAACTCGAGGGCGAATGCCTTGACCCCTCACTCTTGACGGCCACGGCC
TGCGACTCTGCCGCTTGCGGCTTCAACCCCTATGGCAGCGGCTACAAAAGCTACTACGGC
CCCGGAGATACCGTTGACACCTCCAAGACCTTCACCATCATCACCCAGTTCAACACGGAC
AACGGCTCGCCCTCGGGCAACCTTGTGAGCATCACCCGCAAGTACCAGCAAAACGGCGTC
GACATCCCCAGCGCCAGCCCGCGGCGACACCATCTCGTCTGCCCGTCCGCTCAGCC
TACGGCGGCTCGCCACCATGGGCAAGGCCCTGAGCAGCGGCATGGTGCTCGTGCTCAGC
ATTTGGAACAGACAACAGCCAGTACATGAACCTGGCTCGACAGCGGCAACGCCGGCCCCCTGC
AGCAGCACCGAGGGCAACCCATCCAACATCCTGGCCAACAACCCCAACACGCACGTCGTC
TTCTCCAACATCGGCTGGGGAGACATTGGGTCTACTACGAACCTCGACTGCGCCCCCGCCC
CCGCTCGCTCCAGCACGACCTTTTCGACTACACGGAGGAGCTCGACGACTTCGAGCAGC
CCGAGCTGCACGCAGACTCACTGGGGGAGTGGGTGGCATTGGGTACAGCGGGTGCAAG
ACGTGCACGTCGGGCACTACGTGCCAGTATAGCAACGACTACTACTCGCAATGCCTTTAG

图26

(SEQ ID No. 26)

MAPSVTLPLTTAILAIARLVAAQZPGTSTPEVHPKLTITYKCTKSGGCVAQDTSVVLWDWNYRWMHDANYNSCTVNG
GVNTTLCPEATCGKNCFIGVDYAASGVTTSGSSLTMNQYMPSSSGCYSSVSFRLYLSDSGEYVMLKLNQEL
SFDVLSALPCGENGLYLQMDENGANQYNTAGANYGSGYCDACQEVQTRNGTLNTSHQGFCCNEMDILEGN
SRANALTPHSCTATACDSAGCGFNFGSGYKSYYPGDTVDTSKTFITITQFNTDNGSPSGNLVSIIRKYQONGV
DIPSAQPGGDTISSCPSASAYGGLATMGKALSSGMVLVFSIWNDNSQYMNWLDNAGNAGPCSSTEGNPSNIIANNP
NTHVVSNIIRWGDIGSTINSTAPPPPPASSTTFSTTRRSSTSSSPSCTQTHWGQCGGIGYSGCKTCTSGTTCQY
SNDYYSQCL

图27

(SEQ ID No. 27)

ATGAACAAGTCCGTGGCTCCATTGCTGCTTGCAGCGTCCATACATATATGGCGGCCCGCTC
GCACAGCAGACTGTCTGGGGCCAGTGTGGAGGTATTGGTTGGAGCGGACCTACGAATTGT
GCTCCTGGCTCAGCTTGTTCGACCCCTCAATCCTTATATGCGCAATGTATTCCGGGAGCC
ACTACTATCACCACCTCGACCCGGCCACCATCCGGTCCAACCACCACCACCAGGGCTACC
TCAACAAGCTCATCAACTCCACCCACGAGCTCTGGGGTCCGATTTGCCGCGTAAACATC
GCGGGTTTTGACTTTGGCTGTACCAAGATGGCACTTGCCTTACCTCGAAGGTTTATCCT
CCGTTGAAGAACTTCACCGGCTCAAACAACCTACCCGATGGCATCGGCCAGATGCAGCAC
TTCGTCAACGAGGACGGGATGACTATTTCCGCTTACCTGTGGATGGCAGTACCTCGTC
AACAACAATTTGGGCGGCAATCTTGATTCCACGAGCATTTCCAAGTATGATCAGCTTGTT
CAGGGGTGCCTGTCTCTGGGCGCATACTGCATCGTCGACATCCACAATTATGCTCGATGG
AACGGTGGGATCATTGGTCAGGGCGGCCCTACTAATGCTCAATTCACGAGCCTTTGGTGG
CAGTTGGCATCAAAGTACGCATCTCAGTCGAGGGTGTGGTTCGGCATCATGAATGAGCCC
CACGACGTGAACATCAACACCTGGGCTGCCACGCTCCAAGAGGTTGTAACCGCAATCCGC
AACGCTGGTGCTACGTCCGAATTCATCTCTTTGCTTGGAAATGATTGGCAATCTGCTGGG
GCTTTTCATATCCGATGGCAGTGCAGCCGCCCTGTCTCAAGTCACGAACCCGGATGGGTCA
ACAACGAATCTGATTTTGGAGCTGCACAAATACTTGGACTCAGACAACCTCCGGTACTCAC
GCCGAATGTACTACAAATAACATTGACGGCGCCTTTTCTCCGCTTGCCACTTGGCTCCGA
CAGAACAATCGCCAGGCTATCTGACAGAAACCGGTGGTGGCAACGTTCACTCTGCATA
CAAGACATGTGCCAGCAAAATCCAATATCTCAACCAGAACTCAGATGTCTATCTTGGCTAT
GTTGGTTGGGGTGCCGGATCATTTGATAGCACGTATGTCCTGACGGAACACCGACTAGC
AGTGGTAACTCATGGACGGACACATCCTTGGTCAGCTCGTGTCTCGCAAGAAAGTAG

图28

(SEQ ID No. 28)

MNKSVAPLLLLAASILYGGAVAQQTVMGQCGGIGWSGPTNCAPGSACSTLNPYYAQCI PGATTTTSTRPESGPTT
TTRATSTSSSTPFTSSGVRFAGVNIAGFDGCTTDGTCVTSKVYPPLKNETGSNNYPDGIGQM QHFVNE DGMTIF
RLPVGWQYL VNNNLGGNLDSTISIKYDQLVQGCISLGAYCIVDIHNYARWNGGII GQCGFTNAQFTSLWSQLASK
YASQSRVWFEGIMNEPEOVNINTWAATVQEVVTAIRNAGAT SQFTSLPGNDWQSAGAFISDGSAAALSQVTNP DGS
TTNLI F DVHKYLDSDNSGTHAECTTNNIDGAFSPLATWLRQNNRQAILTETGGGNVQSCIQDMCQIQYLNQNSD
VYLG YV G W G A G S F D S T Y V L I E T P T S S G N S W T D T S L V S S C L A R K

图29

(SEQ ID No. 29)

ATGAAGTTCCTTCAAGTCCTCCCTGCCCTCATACCGGCCGCCCTGGCCCAAACCAGCTGT
GACCAGTGGGCAACCTTCACTGGCAACGGCTACACAGTCAGCAACAACCTTTGGGGAGCA
TCAGCCGGCTCTGGATTTGGCTGCGTGACGGCGGTATCGCTCAGCGGCGGGGCTCCTGG
CACGCAGACTGGCAGTGGTCCGGCGGCCAGAACACSTCAAGTCGTACCAGAACTCTCAG
ATTGCCATTCCCCAGAAGAGGACCGTCAACAGCATCAGCAGCATGCCACCACCTGCCAGC
TGGAGCTACAGCGGGAGCAACATCCGCGCTAATGTTGCGTATGACTTGTTCACCGCAGCC
AACCCGAATCATGTACGTACTCGGGAGACTACGAACCTCATGATCTGGCTTGGCAAATAC
GGCGATATTGGCCGATTCCGCTCCTCACAGGGAACAGTCAACGTCGGTGGCCAGAGCTGG
ACGCTCTACTATGGCTACAACGGAGCCATGCAAGTCTATTCCCTTTGTGGCCAGACCAAC
ACTACCAACTACAGCGGAGATGTCAAGAAGTCTTCAATTATCTCCGAGACAATAAGGA
TACAACGCTGCAGGCCAATATGTTCTTAGCTACCAATTTGGTACCGAGCCCTTCACGGGC
AGTGGAACTCTGAACGTCCCATCCTGGACCGCATCTATCAACTAA

图30

(SEQ ID No. 30)

MKFLQVLPALIPAALAQTS CDQWATFTGNGYTVSNNLWGASAGSGFGCVTAVSLSGGASWHADWQWSSGGQNNVKS
YQNSQIAIPQKRTVNSISSMPTTASWSYSGSNIRANVAYDLFTAANPNHVITYSGDYELMIWLKGYGDI GPIGSSQ
GTVNVGCGSWTLYYGYNGAMQVYSFVAQTNTTNYSGDVKNFFNYLRDNKGYNAAQGYVLSYQFGTEPFTGSGTLN
VASWTASIN

图31

(SEQ ID No. 31)

ATGATCCAGAAGCTTTCCAACCTCCTTGTCACCGCACTGGCGGTGGCTACTGGCGTTGTG
GGACATGGACATATTAATGACATTGTTCATCAACGGGGTGTGGTATCAGGCCTATGATCCT
ACAACGTTTTCCATACGAGTCAAACCCCCCATAGTAGTGGGCTGGACGGCTGCCGACCTT
GACAACGGCTTCGTTTCACCCGACGCATACCAAACCCCTGACATCATCTGCCACAAGAAT
GCTACGAATGCCAAGGGGACCGCTCTGTCAAGGCCGGAGACACTATTCTCTCCAGTGG
GTGCCAGTTCCATGGCCGCACCCTGCTCCCATTTGTGCGACTACCTGGCCAACTGCAATGGT
GACTGCGAGACCGTTGACAAGACGACCGCTTGAGTTCTTCAAGATCGATGGCGTTGGTCTC
CTCAGCGCGGGGATCCGGGCACCTGGGCCTCAGACGTGCTGATCTCCAACAACAACACC
TGGGTCTGTCAGATCCCCGACAATCTTGCGCCAGGCAATTACGTGCTCCGCCACGAGATC
ATGCGGTTACACAGCGCGCGGCGAGGCAACCGCGCTCAGAACTACCCCCAGTGCTTCAAC
ATTGCCGTCTCAGGCTCGGGTCTCTGTCAGCCAGCGGCGTTCTAGGGACCGACCTCTAT
CACGCGACGGACCTTGGTGTCTCATCAACATCTACACCAGCCCGCTCAACTACATCATC
CCTGGACCTACCGTGGTATCAGGCCTGCCAACGAGTGTGCCCAGGGGAGCTCCGCCCGG
ACGGCCACCGCCAGCGCCACTGTTCTTGAGGCGGTAGCGGCCGACCAGCAGAACACG
ACAACGGCGAGGACGACGCGAGGCTCAAGCAGGCCAGCTCTACGCTCCCGCAACCAG
TCGGCACCTGCTGGCGGCCCAACCCAGACTCTGTACGGCCAGTGTGGTGGCAGCGGTTAC
AGCGGGCCTACTCGATGCGCGCCGCGCAGCCACTTGCTCTACCTGAACCCCTACTACGCC
CAGTGCCTTAAC TAG

图32

(SEQ ID No. 32)

MIQKLSNLLVTALAVATGVVGHGHINDIVINGVWYQAYDPTTFPYESNPPIVVGWTAADLUNGFVSPDAYQNPDI
ICHKNATNAKGHASVKAGDTILFQWVPVWPVPHPGPIVDYLANCNGDCETVDBKTTLEFFKIDGVGLLSGGDPGTWA
SDVLISNNNTWVVKIPDNLAPGNYVLRHEIIALHSAGQANGAQNYPQCFNIAVSGSGSLQPSGVLGTDLYHATDP
GVLINIYTSPLNYIIPGPTVVSGLPSTVAQGSSAATATASATVPGGGSGPSTRTTTTARTTQASSRPSSTPPATT
SAPAGGPQTLYGQCGGSGYSGPTRCAPPATCSTLNPYYAQCLN

图33

(SEQ ID No. 33)

```
ATGGTCTCCTTCACCTCCCTCCTCGCCGCGTCCGCGCCATCTCGGGCGTCTTCCCGTCCC  
GCCGCCGAGGTGGAATCCGTGGCTGTGGAGAAGCGCCAGACGATTCAGCCCCGACGGGC  
TACAACAACGGCTACTTCTACTCGTACTGGAACGATGGCCACGGCGCGGTGACGTACACC  
AATGGTCCCGGCCGGGCAGTTCTCCGTCAACTGGTCCAACCTCGGGCAACTTTGTCCGGCGGC  
AAGGGATGGCAGCCCGGCACCAAGAACAAGGTCACTCAACTTCTCGGGCAGCTACAACCCA  
AACGGCAACAGCTACCTCTCCGTGTACGGCTGCTCCCGCAACCCCTGATCGAGTACTAC  
ATCGTCGAGAACTTTGGCACCTACAACCCGTCCACGGGCGCCACCAAGCTGGGCGAGGTC  
ACCTCCGACGGCAGCGTCTACGACATTTACCGCACGCAGCGCGTCAACCAGCCGTCCATC  
ATCGGCACCGCCACCTTTTACCAGTACTGGTCCGTCCGCGCAACCAACCGCTCGAGCGGC  
TCCGTCAACACGGCGAACCCTTCAACGCGTGGGCTCAGCAAGGCCTGACGCTCGGGACG  
ATGGATTACCAGATTGTTGCCGTGGAGGGTTACTTTAGCTCTGGCTCTGCTCCATCACC  
GTCAGCTAA
```

图34

(SEQ ID No. 34)

```
MVSFTSLAASPPSRASCRPAAEVESVAVEKRQTIQPGTGYNNGYFYSYWNDGHGGVITYTNGPGGQFSVNWSNSG  
NFVGGKGWQPGTKNKVINFGSYNPNNGNSYLSVYGWSRNPLIEYYIVENFGTYNPSTGATKLGEVTS DGSVYDLY  
RTQRVNQPSIIGTATFYQYWSVRRNHRSSGSVNTANHFNAWAQQGLTLGTMDYQIVAVEGYFSSGSASITVS
```

图35

(SEQ ID No. 35)

ATGCGTTACCGAACAGCAGCTGCGCTGGCACTTGCCACTGGGCCCTTTGCTAGGGCAGAC
AGTCACTCAACATCGGGGGCCTCGGCTGAGGCAGTTGTACCTCCTGCAGGGACTCCATGG
GGAAACCGGTACGACAAGGCGAAGGCCGCATTGGCAAAGCTCAATCTCCAAGATAAGGTC
GGCATCGTGAGCGGTGTGCGCTGGAACGGCGGTCTTGCGTTGGAAACACATCTCCGGCC
TCCAAGATCAGCTATCCATCGCTATGCCTTCAAGACGGACCCCTCGGTGTTTCGATACTCG
ACAGGCAGCACAGCCTTTACGCGGGCGTTCAAGCGGCCCTCGACGTGGGATGTCAATTTG
ATCCGCGAACGTGGACAGTTTCATCGGTGAGGAGGTGAAGGCCCTCGGGGATTTCATGTCATA
CTTGGTCCTGTGGCTGGGCCGCTGGGAAAGACTCCGCAGGGCGGTGCAACTGGGAGGGC
TTCGGTGTGATCCATATCTCACGGGCATTGCCATGGGICAAACCATCAACGGCATCCAG
TCGGTAGGCGTGCAGGCGACAGCGAAGCACTATATCCTCAACGAGCAGGAGCTCAATCGA
GAAACCATTTCGAGCAACCCAGATGACCGAACTCTCCATGAGCTGTATACTTGGCCATTT
GCCGACGCGGTTTCAGGCCAATGTGCTTCTGTGTCATGTGCTCGTACAACAAGGTCAATACC
ACCTGGGCCTGCGAGGATCAGTACACGCTGCAGACTGTGCTGAAAGACCAGCTGGGGTTC
CCAGGCTATGTGTCATGACGGACTGGAACGCACAGCACGACTGTCCAAAGCGCGAATTCT
GGGCTTGACATGTCAATGCCCTGGCACAGACTTCAACGGTAACAATCGGCTCTGGGGTCCA
GCTCTCACCAATGCGGTAAATAGCAATCAGGTCCCGACGAGCAGAGTCGACGATATGGTG
ACTCGTATCCTCGCCGCATGGTACTTGACAGGCCAGGACCAGGCAGGCTATCCGTGCTTC
AACATCAGCAGAAATGTTCAAGGAAACACAAGACCAATGTTCAGGGCAATTGCCAGGGAC
GGCATCGTTCTGCTCAAGAAATGACGCCAACATCCTGCCGCTCAAGAAGCCCGCTAGCATT
GCCGTCGTTGGATCTGCCGCAATCATTGGTAACCACGCCAGAACTCGCCCTCGTGCAAC
GACAAAGGCTGCGACGACGGGGCCTTGGGCATGGGTGGGGTTCGGCGCGCGTCAACTAT
CCGTACTTCGTGCGGCCCTACGATGCCATCAATACCAGAGCGTCTTCGACAGGGCACCCAG
GTTACCTTGAGCAACACCGACAACACGTCCTCAGGCGCATCTGCAGCAAGAGGAAAGGAC
GTGCGCATCCTCTTCATCACCGCCGACTCGGGTGAAGGCTACATCACCGTGGAGGGCAAC
GCGGGCGATCGCAACAACCTGGATCCGTGGCACAACGGCAATGCCCTGGTCCAGGCGGTG
GCCGGTGCCAAACAGCAACGTCATTGTTGTTGTCCACTCCGTTGGCGCCATCATTCTGGAG
CAGATTCTTGCTCTTCGCGAGSTCAAGGCCGTTGCTGCGGGCGGCTCTTCTCTCAGGAG
AGCGGCAATGCGCTCCTCGACGTGCTGTGGGAGATGTACGCCCTTCTGGCAAGCTGGTG
TACACCATTGCGAAGAGCCCCAATGACTATAAAGCACTCGCATCGTTTCCGGCGCGAGTGAC
AGCTTCAGCGAGGGACTGTTCATCGACTATAAGCACTTCGACGACGCCAATATCACGCCG
CGGTACGAGTTTCGGCTATGGACTGTCTTACACCAAGTTCAACTACTCACGCCCTCTCCGTC
TTGTGCGACCGCCAAGTCTGGTCTCGGACTGGGGCCGTTGTGCCGGGAGGCCCGAGTGAT
CTGTTCCAGAATGTGCGACAGTCACCGTTGACATCGCAAACCTCTGCGCAAGTGACTGGT
GCCGAGGTAGCCCAGCTGTACATCACCTACCCATCTTCAGCACCCAGGACCCCTCCGAAG
CAGCTGCGAGGCTTTGCCAAGCTGAACCTCACGCCCTGGTCAGAGCGGAACAGCAACGTTT
AACATCCGACGACGAGATCTCAGCTACTGGGACACGGCTTCGCAAGAAATGGGTGGTCCG
TCGGGGTCTGTTTGGCATCAGCGTGGGAGCGAGCAGCCGGATATCAGGCTGACGAGCACT
CTGTCCGTAGCGTAG

图36

(SEQ ID No. 36)

MRYRTAAALALATGPFARADSHSTSGASAEAVVFPAGTFWGTAYDKAKAALAKLNLQDKVGIVSGVGNWGGPCVG
NTSPASKISYPCLQDGLGVRYSTGSTAFTPGVQAASWDVNLRERGGFIGEEVKASGIHVILGFPVAGPLGK
TPQGGRNWEGFGVDPYLTGIAMGQTINGIQSVGVQATAKHYILNEQELNRETISSNFDRTLHELYTWPADAVQ
ANVASVMCSYNKVNNTWACEDQYTLQTVLKDQLGTPGYVMTDWNQRTTVQSANSGLDMSMPGTDFFNGNNRLWGP
ALTNVNSNQVPTSRVDDMVTRILAAWYLTGQDQAGYFSEFNISRNVOGNHKTNVRAIARDGIVLLKNDANILFLK
KPASIAVVGSAALIGNHARNSPSCNDKGCDDGALGMGWGSGAVNYPYEVAPYDAINTRASSQGTQVTLSTNTDNTS
SGASAARGKDVAIVFITADSGEGYITVEGNAGDRNNLDPWHNGNALVQAVAGANSNVIVVHVSVAIILEQILAL
PQVKAVVWAGLPSQESGNALVDVLWGDVSPSGKLVYTIKSPNDYNTRIVSGGSDSESEGLFIDYKHFDDANITP
RYEFGYGLSYTKFNYSRLSVLSTAKSGPATGAVVPGGPSDLFQNVATVTVDIANSQQVTGA EVAQLYITYPSSAP
RTPPKQLRGFAKLNLTFCQSGTATFNIRRRULSYWDTASQKWVVPSSGSGFISVGASSRDIRLTSTLSVA

图37