



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101978050 A

(43) 申请公布日 2011. 02. 16

(21) 申请号 200980109654. 5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009. 03. 20

C12N 9/24 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/038, 520 2008. 03. 21 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 09. 19

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/037853 2009. 03. 20

(87) PCT申请的公布数据

W02009/117689 EN 2009. 09. 24

(71) 申请人 丹尼斯科美国公司

地址 美国加利福尼亚

(72) 发明人 S · D · 鲍尔 R · M · 考德威尔

S · E · 兰兹 E · A · 拉雷纳斯

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 林柏楠

权利要求书 3 页 说明书 26 页

(54) 发明名称

用于增加生物量水解的富含半纤维素酶的组合物

(57) 摘要

描述了涉及纤维素酶 / 半纤维素酶的酶混合物的组合物和方法, 用于提高常见于生物量中的纤维素和半纤维素材料的酶促水解。

1. 用于水解纤维素和半纤维素材料的混合物的酶混合组合物, 包含:

(a) 第一种酶组合物, 其包含纤维素酶;

(b) 第二种酶组合物, 其包含至少一种选自 GH10 或 GH11 木聚糖酶的木聚糖酶, 和

(c) 第三种酶组合物, 其包含至少一种其它的半纤维素酶, 所述半纤维素酶不是 GH10 或 GH11 木聚糖酶, 或者不是与 (b) 中相同的 GH10 或 GH11 木聚糖酶,

其中与缺少至少一种其它的半纤维素酶等同的酶混合组合物相比, 上述酶混合组合物提供了至少一种 (i) 增加的葡聚糖转化或 (ii) 增加的木聚糖转化。

2. 权利要求 1 的组合物, 其中第一种酶组合物是来自丝状真菌的全纤维素酶混合物。

3. 权利要求 1 的组合物, 其中第一种酶组合物是补充了额外量的 β - 葡糖苷酶的来自丝状真菌的全纤维素酶混合物。

4. 前述权利要求任一项的组合物, 其中第二种酶组合物包含来自里氏木霉的木聚糖酶 XYN2。

5. 前述权利要求任一项的组合物, 其中第二种酶组合物包含来自里氏木霉的木聚糖酶 XYN3。

6. 前述权利要求任一项的组合物, 其中至少一种木聚糖酶具有与选自 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列有至少 80% 同一性的氨基酸序列。

7. 前述权利要求任一项的组合物, 其中至少一种其它的半纤维素酶选自 GH54 半纤维素酶、GH62 半纤维素酶、GH27 半纤维素酶、GH36 半纤维素酶、GH5 半纤维素酶、GH74 半纤维素酶、GH67 半纤维素酶、GH28 半纤维素酶、GH11 半纤维素酶、GH10 半纤维素酶、GH3 半纤维素酶和 CE5 半纤维素酶。

8. 前述权利要求任一项的组合物, 其中至少一种其它的半纤维素酶是 β - 木糖苷酶或阿拉伯呋喃糖苷酶。

9. 权利要求 8 的组合物, 其中 β - 木糖苷酶是来自里氏木霉的 BXL1 并且阿拉伯呋喃糖苷酶是来自里氏木霉的 ABF1、ABF2 或 ABF3。

10. 前述权利要求任一项的组合物, 其中至少一种其它的半纤维素酶是 β - 木糖苷酶和阿拉伯呋喃糖苷酶的组合。

11. 权利要求 10 的组合物, 其中 β - 木糖苷酶是来自里氏木霉的 BXL1 并且阿拉伯呋喃糖苷酶是来自里氏木霉的 ABF1、ABF2 或 ABF3。

12. 前述权利要求任一项的组合物, 其中第一种酶组合物是补充了额外量的 β - 葡糖苷酶的来自丝状真菌的全纤维素酶混合物, 第二种酶组合物包含木聚糖酶, 且至少一种其它的半纤维素酶是 β - 木糖苷酶和阿拉伯呋喃糖苷酶的组合。

13. 前述权利要求任一项的组合物, 其中至少一种其它的半纤维素酶是里氏木霉半纤维素酶, 其选自 α - 阿拉伯呋喃糖苷酶 I (ABF1)、 α - 阿拉伯呋喃糖苷酶 II (ABF2)、 α - 阿拉伯呋喃糖苷酶 III (ABF3)、 α - 半乳糖苷酶 I (AGL1)、 α - 半乳糖苷酶 II (AGL2)、 α - 半乳糖苷酶 III (AGL3)、乙酰木聚糖酯酶 I (AXE1)、乙酰木聚糖酯酶 III (AXE3)、内切葡聚糖酶 VI (EG6)、内切葡聚糖酶 VIII (EG8)、 α - 葡糖醛酸糖苷酶 I (GLR1)、 β - 甘露聚糖酶 (MAN1)、多聚半乳糖醛酸酶 (PEC2)、木聚糖酶 I (XYN1)、木聚糖酶 II (XYN2)、木聚糖酶 III (XYN3), 和 β - 木糖苷酶 (BXL1)。

14. 前述权利要求任一项的组合物, 其中至少一种其它的半纤维素酶具有与选自 SEQ

ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12、SEQ ID NO :13、SEQ ID NO :14、SEQ ID NO :15、SEQ ID NO :16 和 SEQ ID NO :17 的氨基酸序列至少 80% 同一性的氨基酸序列。

15. 用于水解纤维素和半纤维素材料的混合物的方法,包括将纤维素和半纤维素材料的混合物与下列物质接触:

(a) 第一种酶组合物,其包含纤维素酶;

(b) 第二种酶组合物,其包含至少一种选自 GH10 或 GH11 木聚糖酶的木聚糖酶,和

(c) 第三种酶组合物,其包含至少一种其它的半纤维素酶,所述半纤维素酶不是 GH10 或 GH11 木聚糖酶,或者不是与 (b) 中相同的 GH10 或 GH11 木聚糖酶,

从而水解纤维素和半纤维素材料的混合物,

其中,与在缺少至少一种其它的半纤维素酶的条件下等价的接触相比,所述接触导致至少一种 (i) 增加的葡聚糖转化或 (ii) 增加的木聚糖转化。

16. 权利要求 15 的方法,其中第一种酶组合物是来自丝状真菌的全纤维素酶混合物。

17. 权利要求 15 的方法,其中第一种酶组合物是补充了额外量的 β -葡糖苷酶的来自丝状真菌的全纤维素酶混合物。

18. 权利要求 15-17 任一项的方法,其中第二种酶组合物包含来自里氏木霉的木聚糖酶 XYN2。

19. 权利要求 15-17 任一项的方法,其中第二种酶组合物包含来自里氏木霉的木聚糖酶 XYN3。

20. 权利要求 15-17 任一项的方法,其中所述至少一种木聚糖酶具有与选自 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列至少 80% 同一性的氨基酸序列。

21. 权利要求 15-17 任一项的方法,其中至少一种其它的半纤维素酶选自 GH54 半纤维素酶、GH62 半纤维素酶、GH27 半纤维素酶、GH36 半纤维素酶、GH5 半纤维素酶、GH74 半纤维素酶、GH67 半纤维素酶、GH28 半纤维素酶、GH11 半纤维素酶、GH10 半纤维素酶、GH3 半纤维素酶和 CE5 半纤维素酶。

22. 权利要求 15-17 任一项的方法,其中至少一种其它的半纤维素酶是 β -木糖苷酶或阿拉伯呋喃糖苷酶。

23. 权利要求 22 的方法,其中所述 β -木糖苷酶是来自里氏木霉的 BXL1,并且阿拉伯呋喃糖苷酶是来自里氏木霉的 ABF1、ABF2 或 ABF3。

24. 权利要求 15-17 任一项的方法,其中所述至少一种其它的半纤维素酶是 β -木糖苷酶和阿拉伯呋喃糖苷酶的组合。

25. 权利要求 24 的方法,其中所述 β -木糖苷酶是来自里氏木霉的 BXL1,并且阿拉伯呋喃糖苷酶是来自里氏木霉的 ABF1、ABF2 或 ABF3。

26. 权利要求 15-25 任一项的方法,其中所述第一种酶组合物是补充了额外量的 β -葡糖苷酶的来自丝状真菌的全纤维素酶混合物,第二种酶组合物包含木聚糖酶,且至少一种其它的半纤维素酶是 β -木糖苷酶和阿拉伯呋喃糖苷酶的组合。

27. 权利要求 15-17 任一项的方法,其中所述至少一种其它的半纤维素酶是里氏木霉半纤维素酶,其选自 α -阿拉伯呋喃糖苷酶 I (ABF1)、 α -阿拉伯呋喃糖苷酶 II (ABF2)、 α -阿拉伯呋喃糖苷酶 III (ABF3)、 α -半乳糖苷酶 I (AGL1)、 α -半乳糖苷酶 II (AGL2)、

α -半乳糖苷酶 III (AGL3)、乙酰木聚糖酯酶 I (AXE1)、乙酰木聚糖酯酶 III (AXE3)、内切葡聚糖酶 VI (EG6)、内切葡聚糖酶 VIII (EG8)、 α -葡萄糖醛酸糖苷酶 I (GLR1)、 β -甘露聚糖酶 (MAN1)、多聚半乳糖醛酸酶 (PEC2)、木聚糖酶 I (XYN1)、木聚糖酶 II (XYN2)、木聚糖酶 III (XYN3), 和 β -木糖苷酶 (BXL1)。

28. 权利要求 15-17 任一项的方法, 其中所述至少一种其它的半纤维素酶具有与选自 SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12、SEQ ID NO :13、SEQ ID NO :14、SEQ ID NO :15、SEQ ID NO :16 和 SEQ ID NO :17 的氨基酸序列至少 80% 同一性的氨基酸序列。

29. 权利要求 15-28 任一项的方法, 其中纤维素和半纤维素材料的混合物与第一种酶组合物、第二种酶组合物和第三种酶组合物的接触同时进行。

30. 权利要求 15-28 任一项的方法, 其中在单一组合物酶混合物中提供第一种酶组合物、第二种酶组合物和第三种酶组合物。

用于增加生物量水解的富含半纤维素酶的组合物

[0001] 优先权

[0002] 本申请要求于 2008 年 3 月 21 日提交的美国临时申请系列号 61/038,520 的优先权,其通过引用全文并入到本文中。

技术领域

[0003] 本组合物和方法涉及用于改善纤维素材料酶促水解的纤维素酶 / 半纤维素酶的酶混合物。

[0004] 背景

[0005] 生物量的主要组分是纤维素和半纤维素。纤维素由 β -1,4- 连接的葡萄糖残基的聚合物组成,这些残基装配成更高级的纤维状结构。半纤维素是杂多糖,包括除葡萄糖以外的单糖,例如 D- 木糖、L- 阿拉伯糖、D- 甘露糖、D- 葡萄糖、D- 半乳糖和 4-O- 甲基 -D- 葡萄糖醛酸,不仅通过糖苷键而且还通过酯键相连接。半纤维素的组成和结构比纤维素更复杂,在多种木本植物物种、草本植物和谷类中可以定量且定性的改变。

[0006] 纤维素可以转化为糖,例如葡萄糖,并被多数微生物用作能源,所述微生物包括用于工业目的的细菌、酵母和真菌。纤维素材料还可由可商购的酶转化为糖,所获得的糖可用作工业微生物的原料,来生产产品例如塑料和乙醇。然而,目前的纤维素酶产品通常缺少水解半纤维素材料的能力,半纤维素仍未消耗地保留在生物量组合物中,可以干扰生物量的处理和处置。

[0007] 因此,仍然需要开发用于同时水解纤维素和半纤维素的有效的酶系统,包括优化的酶组合的共同产生或混合物,所述酶组合用于将半纤维素寡聚物和聚合物转化为游离戊糖用于发酵。此类优化的酶系统对提高生物量的效率和经济是理想的。

[0008] 概述

[0009] 本教导内容提供了优化的生物转化酶混合物,生产所述酶混合物的方法,以及使用优化的生物转化酶混合物将生物量转化为糖的方法。生物转化酶混合物包括完整的纤维素酶和一种或多种半纤维素酶的混合物,所述酶的选择由预期的生物量底物和处理条件决定。

[0010] 在一个方面,提供了用于水解纤维素和半纤维素材料的混合物的酶混合组合物,包含:

[0011] (a) 第一种酶组合物,包含纤维素酶;

[0012] (b) 第二种酶组合物,包含至少一种选自 GH10 或 GH11 木聚糖酶的木聚糖酶,和

[0013] (c) 第三种酶组合物,包含至少一种其它的半纤维素酶,所述半纤维素酶不是 GH10 或 GH11 木聚糖酶,或者不是与 (b) 中相同的 GH10 或 GH11 木聚糖酶,

[0014] 其中,与缺少至少一种其它的半纤维素酶的等价的酶混合组合物相比,上述酶混合组合物提供至少一种的 (i) 增加的葡聚糖转化或 (ii) 增加的木聚糖转化。

[0015] 在一些实施方案中,第一种酶组合物是来自丝状真菌的全纤维素酶混合物。在一些实施方案中,第一种酶组合物是补充了额外量的 β - 葡萄糖苷酶的来自丝状真菌的全纤维

素酶混合物。

[0016] 在一些实施方案中,第二种酶组合物包含来自里氏木霉的木聚糖酶 XYN2。在一些实施方案中,第二种酶组合物包含来自里氏木霉的木聚糖酶 XYN3。

[0017] 在一些实施方案中,至少一种木聚糖酶具有与选自 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列至少 80% 同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,至少一种木聚糖酶具有与选自 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或甚至至少 99% 氨基酸序列同一性的氨基酸序列。在特定的实施方案中,至少一种木聚糖酶具有选自 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列。

[0018] 在一些实施方案中,至少一种其它的半纤维素酶是选自 GH54 半纤维素酶、GH62 半纤维素酶、GH27 半纤维素酶、GH36 半纤维素酶、GH5 半纤维素酶、GH74 半纤维素酶、GH67 半纤维素酶、GH28 半纤维素酶、GH11 半纤维素酶、GH10 半纤维素酶、GH3 半纤维素酶和 CE5 半纤维素酶。

[0019] 在一些实施方案中,至少一种其它的半纤维素酶是 β -木糖苷酶或阿拉伯呋喃糖苷酶。在特定的实施方案中, β -木糖苷酶是来自里氏木霉的 BXL1,阿拉伯呋喃糖苷酶是来自里氏木霉的 ABF1、ABF2 或 ABF3。在一些实施方案中,至少一种其它的半纤维素酶是 β -木糖苷酶和阿拉伯呋喃糖苷酶的组合。

[0020] 在一些实施方案中,第一种酶组合物是补充了额外量的 β -葡糖苷酶的来自丝状真菌的全纤维素酶混合物,第二种酶组合物包含木聚糖酶,且至少一种其它的半纤维素酶是 β -木糖苷酶和阿拉伯呋喃糖苷酶的组合。

[0021] 在一些实施方案中,至少一种其它的半纤维素酶是里氏木霉半纤维素酶,其选自 α -阿拉伯呋喃糖苷酶 I (ABF1)、 α -阿拉伯呋喃糖苷酶 II (ABF2)、 α -阿拉伯呋喃糖苷酶 III (ABF3)、 α -半乳糖苷酶 I (AGL1)、 α -半乳糖苷酶 II (AGL2)、 α -半乳糖苷酶 III (AGL3)、乙酰木聚糖酯酶 I (AXE1)、乙酰木聚糖酯酶 III (AXE3)、内切葡聚糖酶 VI (EG6)、内切葡聚糖酶 VIII (EG8)、 α -葡糖醛酸糖苷酶 I (GLR1)、 β -甘露聚糖酶 (MAN1)、多聚半乳糖醛酸酶 (PEC2)、木聚糖酶 I (XYN1)、木聚糖酶 II (XYN2)、木聚糖酶 III (XYN3), 和 β -木糖苷酶 (BXL1)。

[0022] 在一些实施方案中,至少一种其它的半纤维素酶具有与选自 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16 和 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列至少 80% 同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,至少一种其它的半纤维素酶具有与上述氨基酸序列之一至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或甚至至少 99% 氨基酸序列同一性的氨基酸序列。在特定的实施方案中,至少一种其它的半纤维素酶具有对应上述氨基酸序列之一的氨基酸序列。

[0023] 在另一个方面,提供了用于水解纤维素和半纤维素材料的混合物的方法,包括将纤维素和半纤维素材料的混合物与下列物质接触:

[0024] (a) 第一种酶组合物,包含纤维素酶;

[0025] (b) 第二种酶组合物,包含至少一种选自 GH10 或 GH11 木聚糖酶的木聚糖酶,和

[0026] (c) 第三种酶组合物, 包含至少一种其它的半纤维素酶, 所述半纤维素酶不是 GH10 或 GH11 木聚糖酶, 或者不是与 (b) 中相同的 GH10 或 GH11 木聚糖酶,

[0027] 从而水解纤维素和半纤维素材料的混合物,

[0028] 其中, 与在缺少至少一种其它的半纤维素酶的条件下等同的接触相比, 上述接触导致至少一种的 (i) 增加的葡聚糖转化或 (ii) 增加的木聚糖转化。

[0029] 在一些实施方案中, 第一种酶组合物是来自丝状真菌的全纤维素酶混合物。在一些实施方案中, 第一种酶组合物是补充了额外量的 β -葡糖苷酶的来自丝状真菌的全纤维素酶混合物。

[0030] 在一些实施方案中, 第二种酶组合物包含来自里氏木霉的木聚糖酶 XYN2。在一些实施方案中, 第二种酶组合物包含来自里氏木霉的木聚糖酶 XYN3。

[0031] 在一些实施方案中, 至少一种木聚糖酶具有与选自 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列至少 80% 同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, 至少一种木聚糖酶具有与选自 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或甚至至少 99% 氨基酸序列同一性的氨基酸序列。在特定的实施方案中, 至少一种木聚糖酶具有选自 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列。

[0032] 在一些实施方案中, 至少一种其它的半纤维素酶选自 GH54 半纤维素酶、GH62 半纤维素酶、GH27 半纤维素酶、GH36 半纤维素酶、GH5 半纤维素酶、GH74 半纤维素酶、GH67 半纤维素酶、GH28 半纤维素酶、GH11 半纤维素酶、GH10 半纤维素酶、GH3 半纤维素酶和 CE5 半纤维素酶。

[0033] 在一些实施方案中, 至少一种其它的半纤维素酶是 β -木糖苷酶或阿拉伯呋喃糖苷酶。在特定的实施方案中, β -木糖苷酶是来自里氏木霉的 BXL1, 阿拉伯呋喃糖苷酶是来自里氏木霉的 ABF1、ABF2 或 ABF3。在一些实施方案中, 至少一种其它的半纤维素酶是 β -木糖苷酶和阿拉伯呋喃糖苷酶的组合。

[0034] 在一些实施方案中, 第一种酶组合物是补充了额外量的 β -葡糖苷酶的来自丝状真菌的全纤维素酶混合物, 第二种酶组合物包含木聚糖酶, 且至少一种其它的半纤维素酶是 β -木糖苷酶和阿拉伯呋喃糖苷酶的组合。

[0035] 在一些实施方案中, 至少一种其它的半纤维素酶是里氏木霉半纤维素酶, 选自 α -阿拉伯呋喃糖苷酶 I (ABF1)、 α -阿拉伯呋喃糖苷酶 II (ABF2)、 α -阿拉伯呋喃糖苷酶 III (ABF3)、 α -半乳糖苷酶 I (AGL1)、 α -半乳糖苷酶 II (AGL2)、 α -半乳糖苷酶 III (AGL3)、乙酰木聚糖酯酶 I (AXE1)、乙酰木聚糖酯酶 III (AXE3)、内切葡聚糖酶 VI (EG6)、内切葡聚糖酶 VIII (EG8)、 α -葡糖醛酸糖苷酶 I (GLR1)、 β -甘露聚糖酶 (MAN1)、多聚半乳糖醛酸酶 (PEC2)、木聚糖酶 I (XYN1)、木聚糖酶 II (XYN2)、木聚糖酶 III (XYN3), 和 β -木糖苷酶 (BXL1)。

[0036] 在一些实施方案中, 至少一种其它的半纤维素酶具有与选自 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16 和 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列至少 80% 同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, 至少一种其它的半纤维素酶具有与上述氨基酸序列之一至少 85%、至少 90%、至少 91%、

至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%，或甚至至少 99% 氨基酸序列同一性的氨基酸序列。在特定的实施方案中，至少一种其它的半纤维素酶具有对应于上述氨基酸序列的氨基酸序列。

[0037] 在一些实施方案中，纤维素和半纤维素材料的混合物与第一种酶组合物、第二种酶组合物和第三种酶组合物的接触同时进行。

[0038] 在一些实施方案中，以单一组合物酶混合物提供第一种酶组合物、第二种酶组合物和第三种酶组合物。

[0039] 根据下列说明，本组合物和方法的这些和其他方面和实施方案是显而易见的。

[0040] 详细说明

[0041] I. 定义

[0042] 除非在本文中另外定义，本文使用的所有的技术和科学术语都具有本领域普通技术人员通常理解的含义。本文提供的小标题不是对发明的各个方面的限制，在一处小标题下的实施方案可以作为整体用于组合物和方法。前文的概括描述和后文的详细描述都是示例性的和解释性的，而不是对本文所述组合物和方法的限制。除非另外特定地说明，使用的单数包括了复数，除非另外特定地说明，使用“或”意指“和 / 或”。术语“包括”、“包括的”、“包含了”、“包含”、“包含的”和“包含了”并非意在限制。本文提及的所有专利和出版物，包括此类专利和出版物中公开的所有氨基酸和核苷酸序列，都通过引用清楚地并入本文中。出于澄清，定义下列术语：

[0043] 如本文中使用的，术语“纤维素”指由 β (1 $\rightarrow$ 4) 连接的 D- 葡萄糖单位组成的多糖，具有通式 $(C_6H_{10}O_5)_n$ 。纤维素是绿色植物、多种类型的藻类和卵菌的初生细胞壁的主要组分。

[0044] 如本文中使用的，术语“纤维素酶”指能够将纤维素聚合物水解成较短的寡聚物和 / 或葡萄糖的酶。

[0045] 如本文中使用的，术语“全纤维素酶组合物 / 制剂 / 混合物”或类似说法指天然存在的和非天然存在的组合物，所述组合物包括由生物体（例如丝状真菌）生产的多种纤维素酶。全纤维素酶组合物的一个实例是培养丝状真菌的培养基，其包括分泌的纤维素酶，例如预定比例的一种或多种纤维二糖水解酶，一种或多种内切葡聚糖酶，和一种或多种 β - 葡糖苷酶。

[0046] 如本文中使用的，“半纤维素”是植物材料的聚合物组分，含有葡萄糖以外的糖单体，与只含葡萄糖的纤维素不同。除葡萄糖以外，半纤维素可以包括木糖、甘露糖、半乳糖、鼠李糖和阿拉伯糖，而木糖是最常见的糖单体。半纤维素含有大量的 D- 戊糖，偶尔含少量的 L- 糖。半纤维素中的糖可以通过酯键和糖苷键连接。半纤维素的示例性形式包括但不限于半乳聚糖、甘露聚糖、木聚糖、阿拉伯聚糖、阿拉伯木聚糖、葡甘露聚糖、半乳甘露聚糖等。

[0047] 如本文中使用的，术语“半纤维素酶”指能够将半纤维素分裂成其组分糖或较短聚合物的一类酶，包括内切作用的水解酶、外切作用的水解酶和各种酯酶。

[0048] 如本文中使用的，术语“木聚糖酶”指源自微生物（例如，真菌、细菌）或来自植物或动物的蛋白质或多肽的蛋白质或多肽结构域，并具有催化在木聚糖的碳水化合物骨架的一个或多个不同位置切割木聚糖的能力，包括分枝的木聚糖和低聚木糖。注意木聚糖酶是一类半纤维素酶。

[0049] 如本文中使用的,“生物量底物”是既含纤维素又含半纤维素的材料。

[0050] 如本文中使用的,“天然存在的”组合物是自然产生的,或由自然界存在的生物产生的组合物。

[0051] 如本文中使用的,“变体”蛋白质不同于“亲本”蛋白质,其源自少数氨基酸残基,例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 或更多个氨基酸残基的取代、缺失或添加。在一些情况下,亲本蛋白质是“野生型”、“天然的”或“天然存在的”多肽。变体蛋白质可以描述为与亲本蛋白质具有一定百分比序列同一性,例如至少 80%、至少 81%、至少 82%、至少 83%、至少 84%、至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%,甚至至少 99% 同一性,其可以使用本领域已知的任何合适的软件程序确定,例如在 CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel 等人, (编著) 1987, Supplement 30, section 7.7.18) 中描述的。

[0052] 优选的程序包括 Vector NTI Advance™ 9.0 (Invitrogen Corp. Carlsbad, CA), GCG Pileup 程序, FASTA (Pearson 等人, (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-2448) 和 BLAST (BLAST Manual, Altschul 等人, Natl. Cent. Biotechnol. Inf., Natl. Lib. Med. (NCIB NLM NIH), Bethesda, Md., 和 Altschul 等人, (1997) NAR 25:3389-3402)。另一个优选的比对程序是 ALIGN Plus (Scientific and Educational Software, PA), 优选使用缺省参数。另一种可使用的序列软件程序是可从 Sequence Software Package Version 6.0 中获得的 TFASTA Data Searching Program (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI)。

[0053] II. 生物转化酶混合物组合物及其使用方法

[0054] 纤维素是脱水纤维二糖的均聚物,因此是线性的 β -(1,4)-D-葡聚糖。相反,半纤维素包括复杂分枝结构的多种化合物,例如木聚糖、木葡聚糖、阿拉伯木聚糖和甘露聚糖,并具有多种取代基。由于半纤维素,特别是阿拉伯木聚糖的复杂分枝和异源组成的结果,植物材料的酶促降解需要一组脱枝和解聚活性的作用。此外,植物材料的降解需要作用于半纤维素的酶,所述半纤维素同时含有五碳糖(戊糖),例如木糖和阿拉伯糖,和六碳糖(己糖),例如甘露糖和葡萄糖。

[0055] 半纤维素酶促水解为其单体需要具有不同功能的若干半纤维素酶的参与。半纤维素酶可分为三类一般类别:攻击多糖内部键的内切作用酶,从多糖链的还原端或非还原端持续作用的外切作用酶,以及附属的酶,水解木质素糖苷键的乙酰酯酶和酯酶,例如香豆酸酯酶和阿魏酸酯酶。

[0056] 尽管一些真菌产生完整的纤维素酶系统,包括外切纤维二糖水解酶(或 CBH-型纤维素酶)、内切葡聚糖酶(或 EG-型纤维素酶)和 β -葡糖苷酶(或 BG-型纤维素酶),已知的纤维素酶及其混合物通常对半纤维素具有有限的活性,在水解植物材料中具有有限的价值。本生物转化酶混合组合物和方法是部分基于这样的观察结果,即纤维素酶和半纤维素酶的一些组合显著地提高了植物材料水解的效率,主要通过监测葡聚糖和木聚糖的转化而确定。

[0057] 用于鉴别增加葡聚糖和/或木聚糖水解的纤维素酶/半纤维素酶组合物的示例性纤维素酶组合物是由丝状真菌(如,里氏木霉)生产的全纤维素酶组合物。组合物包括一

些外切纤维二糖水解酶和内切葡聚糖酶,并补充了其它的 β -葡糖苷酶来增加葡萄糖的释放。该组合物是可商购的,如 ACCELLERASE 1000™(Danisco A/S, Genencor Division, Palo Alto, CA)。ACCELLERASE 1000™包括外切纤维二糖水解酶(即,约 50% (wt/wt) CBHI (CEL7A) 和约 14% CBHII (CEL6A))、内切葡聚糖酶(即,约 12% EGI (CEL7B) 和约 10% EGII (CEL5A)), 和 β -葡糖苷酶(即,约 5% BGLI (CEL3A))。还可以存在少量的 XYN2(即,少于约 1%)。其他未鉴别的组分也以少于约 1% 的量存在。

[0058] 可以使用其它的纤维素酶组合物,包括其它的全纤维素酶混合物和由多种分别分离的纤维素酶组合成的纤维素酶混合物。优选的纤维素酶组合物包括各至少一种的外切纤维二糖水解酶、内切葡聚糖酶和 β -葡糖苷酶。在一些实施方案中,从生物制备包括多种纤维素酶的完整培养液,所述生物例如支顶孢 (*Acremonium*)、曲霉 (*Aspergillus*)、裸孢壳 (*Emericella*)、镰孢 (*Fusarium*)、腐质霉 (*Humicola*)、毛霉 (*Mucor*)、毁丝霉 (*Myceliophthora*)、链孢霉 (*Neurospora*)、小柱孢 (*Scytalidium*)、梭孢壳 (*Thielavia*)、*Tolypocladium*、青霉 (*Penicillium*) 或木霉 (*Trichoderma*),或源自它们的种。

[0059] 组合物还包括至少一种,在一些情况下至少 2、3 或更多种半纤维素酶。合适的其它半纤维素酶的实例包括木聚糖酶、阿拉伯呋喃糖苷酶、乙酰木聚糖酯酶、葡糖醛酸糖苷酶、内切半乳聚糖酶、甘露聚糖酶、内切或外切阿拉伯聚糖酶、外切半乳聚糖酶,及其混合物。合适的内切作用的半纤维素酶的实例包括内切阿拉伯聚糖酶、内切阿拉伯半乳聚糖酶、内切葡聚糖酶、内切甘露聚糖酶、内切木聚糖酶和 feraxan 内切木聚糖酶。合适的外切作用的半纤维素酶的实例包括 α -L-阿拉伯糖苷酶、 β -L-阿拉伯糖苷酶、 α -1,2-L-岩藻糖苷酶、 α -D-半乳糖苷酶、 β -D-半乳糖苷酶、 β -D-葡糖苷酶、 β -D-葡糖醛酸糖苷酶、 β -D-甘露糖苷酶、 β -D-木糖苷酶、外切葡糖苷酶、外切纤维二糖水解酶、外切甘露二糖水解酶、外切甘露聚糖酶、外切木聚糖酶、木聚糖 α -葡糖醛酸糖苷酶,和 coniferin β -葡糖苷酶。合适的酯酶的实例包括乙酰酯酶(乙酰木聚糖酯酶、乙酰半乳聚糖酯酶、乙酰甘露聚糖酯酶和乙酰木聚糖酯酶)和芳基酯酶(香豆酸酯酶和阿魏酸酯酶)。

[0060] 优选的,本组合物和方法包括至少一种木聚糖酶,木聚糖酶是特定类型的半纤维素酶,其切割半纤维素的木聚糖主链。优选的,木聚糖酶是内切-1,4-木聚糖酶(E. C. 3. 2. 1. 8)。已经鉴别和表征了来自真菌和细菌微生物的多种木聚糖酶(参见例如,美国专利号 5,437,992;Coughlin, M. P. 见上文;Biely, P. 等人,(1993)Proceedings of the second TRICEL symposium on *Trichoderma reesei* Cellulases and Other Hydrolases, Espoo 1993;Souminen, P. 和 Reinikainen, T. (编著), in Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research 8:125-135)。在里氏木霉中已经鉴别了三种特定的木聚糖酶(XYN1、XYN2 和 XYN3)(Tenkanen 等人,(1992)Enzyme Microb. Technol. 14:566;Torronen 等人,(1992)Bio/Technology 10:1461;和 Xu 等人,(1998)Appl. Microbiol. Biotechnol. 49:718)。在标题为“Xylanase from *Trichoderma reesei* (来自里氏木霉的木聚糖酶)”的 Saloheimo 等人的美国专利号 6,555,335 和 6,768,001 中,描述了分离自里氏木霉的第四种木聚糖酶(XYN4),以及使用该酶的方法,其通过引用全文并入到本文中。

[0061] 用于本组合物和方法的示例性木聚糖酶是 XYN2 和 XYN3。XYN2 和 XYN3 的合适的变体,以及来自其它生物的合适的相关酶,与 XYN2 或 XYN3(即分别是 SEQ ID NO:1 和 2)具

有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%，或甚至至少 99% 的氨基酸序列同一性。

[0062] 除纤维素酶组合物和木聚糖酶外，组合物和方法可以包括一种或多种其它的半纤维素酶，例如内切作用的半纤维素酶、外切作用的半纤维素酶，和 / 或酯酶。

[0063] 合适的内切作用的半纤维素酶包括但不限于甘露聚糖 - 内切 -1,4- β -甘露糖苷酶 (E. C. 3. 2. 1. 78, 也称为 β -甘露聚糖酶 (mannase) 和 β -甘露聚糖酶 (mannanase)), 其催化甘露聚糖、半乳甘露聚糖、葡甘露聚糖中的 1,4- β -D-甘露糖苷键的随机内切水解; α -淀粉酶 (E. C. 3. 2. 1. 1), 其催化含有三个或多个 1,4- α -连接的 D-葡萄糖单位的多糖中的 1,4- α -D-葡萄糖苷键的内切水解; 木聚糖 α -1,2-葡糖醛酸糖苷酶 (E. C. 3. 2. 1. 131, 也称为 α -葡糖醛酸糖苷酶), 其催化硬木木聚糖主链中的 α -D-1,2-(4-O-甲基) 葡糖醛酸基连接的水解; 和内切葡聚糖酶 (E. C. 3. 2. 1. 4), 其催化纤维素、木质素和谷类的 β -D-葡聚糖中的 1,4- β -D-葡糖苷键的内切水解。已经鉴别了适合用于组合物和方法的多种亚型的内切葡聚糖酶, 例如内切葡聚糖酶 I、内切葡聚糖酶 II、内切葡聚糖酶 III、内切葡聚糖酶 V 和内切葡聚糖酶 VI。

[0064] 合适的外切作用的半纤维素酶包括但不限于 α -阿拉伯呋喃糖苷酶、 α -半乳糖苷酶和 β -木糖苷酶。 α -阿拉伯呋喃糖苷酶也称为 α -N-阿拉伯呋喃糖苷酶 (E. C. 3. 2. 1. 55), 催化末端非还原的 α -L-阿拉伯呋喃糖苷残基水解为 α -L-阿拉伯糖苷。可以使用至少三种已知的 α -阿拉伯呋喃糖苷酶亚型 (即, abf1、abf2 和 abf3) 中的任一种。 α -半乳糖苷酶 (E. C. 3. 2. 1. 22) 催化 α -D-半乳糖苷 (包括半乳糖寡糖和半乳甘露聚糖) 中末端非还原的 α -D-半乳糖残基水解。可以使用三种已知亚型中的任一种, 即, α -半乳糖苷酶 I (agl1)、 α -半乳糖苷酶 II (agl2) 和 α -半乳糖苷酶 III (agl3)。葡糖淀粉酶也称为葡聚糖 1,4- α -葡糖苷酶 (E. C. 3. 2. 1. 3), 催化末端 1,4-连接的 α -D-葡萄糖残基从链的非还原端连续水解, 释放 β -D-葡萄糖。 β -葡糖苷酶 (E. C. 3. 2. 1. 21) 催化末端非还原的 β -D-葡萄糖残基水解释放 β -D-葡萄糖。 β -木糖苷酶也称为木聚糖 1,4- β -木糖苷酶 (E. C. 3. 2. 1. 37), 催化 1,4- β -D-木聚糖水解, 从非还原末端依次去除 D-木糖残基。包括全纤维素酶混合物, 以及木聚糖酶和 α -阿拉伯呋喃糖苷酶或者 β -木糖苷酶的组合物对葡聚糖和 / 或木聚糖转化是特别有效的。

[0065] 合适的酯酶包括但不限于阿魏酸酯酶和乙酰木聚糖酯酶。阿魏酸酯酶也称为阿魏酸盐酯酶 (E. C. 3. 1. 1. 73), 催化从酯化的糖水解 4-羟基-3-甲氧基肉桂酰 (阿魏酸) 基团, 所述糖在“天然”底物中通常是阿拉伯糖。已知的微生物阿魏酸酯酶分泌到培养基中。在本组合物和方法中可以使用阿魏酸酯酶的三种已知亚型 (fae1、fae2 和 fae3) 的任一种。乙酰木聚糖酯酶 I (E. C. 3. 1. 1. 72) 催化木聚糖和木-寡糖的去乙酰化, 也可用于组合物和方法。DeGraaff 等人的美国专利号 5,426,043 和 5,681,732 描述了从真菌来源克隆和表达乙酰木聚糖酯酶。EP 507 369 公开了编码分离自黑曲霉的乙酰木聚糖酯酶的 DNA 序列。Christgau 等人的美国专利号 5,830,734, 名称为“Enzyme with acetyl esterase activity (具有乙酰酯酶活性的酶)”, 描述了分离多种酯酶用于食品工业。

[0066] 在一些实施方案中, 至少一种其它的半纤维素酶选自 GH54 半纤维素酶、GH62 半纤维素酶、GH27 半纤维素酶、GH36 半纤维素酶、GH5 半纤维素酶、GH74 半纤维素酶、GH67 半纤维素酶、GH28 半纤维素酶、GH11 半纤维素酶、GH10 半纤维素酶、GH3 半纤维素酶和 CE5

半纤维素酶。在一些实施方案中,至少一种其它的半纤维素酶选自 α -阿拉伯呋喃糖苷酶 I (ABF1)、 α -阿拉伯呋喃糖苷酶 II (ABF2)、 α -阿拉伯呋喃糖苷酶 III (ABF3)、 α -半乳糖苷酶 I (AGL1)、 α -半乳糖苷酶 II (AGL2)、 α -半乳糖苷酶 III (AGL3)、乙酰木聚糖酯酶 I (AXE1)、乙酰木聚糖酯酶 III (AXE3)、内切葡聚糖酶 VI (EG6)、内切葡聚糖酶 VIII (EG8)、 α -葡糖醛酸糖苷酶 I (GLR1)、 β -甘露聚糖酶 (MAN1)、多聚半乳糖醛酸酶 (PEC2)、木聚糖酶 I (XYN1)、木聚糖酶 II (XYN2)、木聚糖酶 III (XYN3),和 β -木糖苷酶 (BXL1),其可来自丝状真菌,例如里氏木霉。在一些实施方案中,至少一种其它的半纤维素酶具有的氨基酸序列与选自 SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12、SEQ ID NO :13、SEQ ID NO :14、SEQ ID NO :15、SEQ ID NO :16 和 SEQ ID NO :17 的氨基酸序列有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%,或甚至至少 99%的氨基酸序列同一性。

[0067] 半纤维素酶(包括木聚糖酶)的变体可包括基本不影响功能,或者给酶增加了有利特征的取代、插入或缺失。在一些实施方案中,取代、插入或缺失不在保守基序中,而是限于保守基序以外的氨基酸序列。示例性取代是保守取代,其保留了相对于亲本氨基酸序列的电荷、疏水性或侧基大小。保守取代的实例提供在下表中:

[0068]

初始氨基酸残基	编码	可接受的取代
丙氨酸	A	D-Ala, Gly, β -Ala, L-Cys, D-Cys
精氨酸	R	D-Arg, Lys, D-Lys, 高-Arg, D-高-Arg, Met, Ile, D-Met, D-Ile, Orn, D-Orn
天冬酰胺	N	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
天冬氨酸	D	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
半胱氨酸	C	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr
谷氨酰胺	Q	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
谷氨酸	E	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
甘氨酸	G	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, β -Ala, Acp
异亮氨酸	I	D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
亮氨酸	L	D-Leu, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
赖氨酸	K	D-Lys, Arg, D-Arg, 高-Arg, D-高-Arg, Met, D-Met, Ile, D-Ile, Orn, D-Orn
甲硫氨酸	M	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
苯丙氨酸	F	D-Phe, Tyr, D-Thr, L-多巴, His, D-His, Trp, D-Trp, 反式-3,4, 或 5-苯基脯氨酸、顺式-3,4,或 5-苯基脯氨酸

[0069]

脯氨酸	P	D-Pro, L-I-噁唑烷-4-羧酸、D-或 L-1-噁唑烷-4-羧酸
丝氨酸	S	D-Ser, Thr, D-Thr, allo-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), L-Cys, D-Cys
苏氨酸	T	D-Thr, Ser, D-Ser, 别-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), Val, D-Val
酪氨酸	Y	D-Tyr, Phe, D-Phe, L-多巴, His, D-His
缬氨酸	V	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met

[0070] 通过改变编码多肽的核酸的编码序列,可以将天然存在的氨基酸引入到多肽中,

而通常通过化学修饰表达的多肽产生非天然存在的氨基酸,这是显而易见的。

[0071] 在本组合物和方法的生物转化酶混合物中,还可以包括其他的附属的酶,例如漆酶 (E. C. 1. 10. 3. 2),其催化芳香化合物的氧化,随后还原氧气为水。

[0072] 在一些实施方案中,可以从一种或多种丝状真菌的菌株中制备用于本生物转化酶混合物的酶。合适的丝状真菌包括真菌亚门和卵菌亚门的成员,包括但不限于下列属:曲霉属、支顶孢属 (*Acremonium*)、短梗霉属 (*Aureobasidium*)、白僵菌属 (*Beauveria*)、头孢菌属 (*Cephalosporium*)、拟蜡菌属 (*Ceriporiopsis*)、毛壳菌属 (*Chaetomium*)、金孢子菌属 (*Chrysosporium*)、麦角菌属 (*Claviceps*)、旋孢腔菌属 (*Cochiobolus*)、隐球菌属 (*Cryptococcus*)、白腐菌属 (*Cyathus*)、*Endothia*、毛霉属 (*mucor*)、镰孢属 (*Fusarium*)、粘帚霉属 (*Gilocladium*)、腐质霉属 (*Humicola*)、稻瘟病菌属 (*Magnaporthe*)、毁丝霉属 (*Myceliophthora*)、漆斑菌属 (*Myrothecium*)、毛霉属 (*Mucor*)、链孢霉属 (*Neurospora*)、*Phanerochaete*、柄孢壳菌属 (*Podospora*)、拟青霉属 (*Paecilomyces*)、梨孢霉属 (*Pyricularia*)、根毛霉属 (*Rhizomucor*)、根霉属 (*Rhizopus*)、裂褶菌属 (*Schizophyllum*)、*Stagonospora*、踝节菌属 (*Talaromyces*)、木霉属 (*Trichoderma*)、嗜热真菌属 (*Thermomyces*)、嗜热子囊菌属 (*Thermoascus*)、梭孢壳属 (*Thielavia*)、弯颈霉属 (*Tolypocladium*)、发癣菌属 (*Trichophyton*) 和栓菌属 (*Trametes*)。在一些实施方案中,丝状真菌包括但不限于下列:构巢曲霉 (*A. nidulans*)、黑曲霉 (*A. niger*)、泡盛曲霉 (*A. awomari*)、棘孢曲霉 (*A. aculeatus*)、*A. kawachi*, 例如, NRRL 3112、ATCC22342 (NRRL 3112)、ATCC 44733、ATCC 14331 和菌株 UVK 143f;米曲霉,例如 ATCC 11490;粗糙链孢霉 (*N. crassa*);里氏木霉 (*Trichoderma reesei*), 例如 RRL 15709、ATCC 13631、56764、56765、56466、56767;和绿色木霉 (*Trichoderma viride*), 例如 ATCC 32098 和 32086。在优选的实现中,丝状真菌是木霉物种。用于本发明的特别优选的品种和菌株是里氏木霉 RL-P37。

[0073] 在特定的实施方案中,单个改造的菌株以理想的比例过表达组分酶,使得不需要额外的纯化或补充。在备选的实施方案中,从两种或多种天然存在的或改造的丝状真菌菌株中获得生物转化酶混合物。通过改变终混合物中酶的相对量,可以实现组分酶的理想比例。甚至当使用两种或多种生产菌株时,通过补充纯化的或部分纯化的酶,也可以实现组分酶的理想比例。

[0074] 在特定的实施方案中,从以下菌株制备半纤维素酶:棘孢曲霉、泡盛曲霉、臭曲霉 (*Aspergillus foetidus*)、日本曲霉 (*Aspergillus japonicus*)、构巢曲霉、黑曲霉或米曲霉。在另一个方面,从以下菌株制备全培养液:杆孢状镰孢 (*Fusarium bactridioides*)、*Fusarium cerealis*、*Fusarium crookwellense*、大刀镰孢 (*Fusarium culmorum*)、禾本科镰孢 (*Fusarium graminearum*)、禾赤镰孢 (*Fusarium graminum*)、异孢镰孢 (*Fusarium heterosporum*)、合欢木镰孢 (*Fusarium negundi*)、尖镰孢 (*Fusarium oxysporum*)、多枝镰孢 (*Fusarium reticulatum*)、粉红镰孢 (*Fusarium roseum*)、接骨木镰孢 (*Fusarium sambucinum*)、肤色镰孢 (*Fusarium sarcochroum*)、拟分枝孢镰孢 (*Fusarium sporotrichioides*)、硫色镰孢 (*Fusarium sulphureum*)、(*Fusarium torulosum*)、拟丝孢镰孢 (*Fusarium trichothecioides*)、*Fusarium venenatum* 或轮状镰孢 (*Fusarium verticilloides*)。在另一个方面,半纤维素酶复合物是从孤独腐质霉

(*Humicola insolens*)、柔毛腐质霉 (*Humicola lanuginosa*)、米黑根霉 (*Mucor miehei*)、嗜热毁丝霉 (*Myceliophthora thermophila*)、粗糙链孢霉 (*Neurospora crassa*)、嗜热革节孢菌 (*Scytalidium thermophilum*) 或太瑞斯梭孢壳霉 (*Thielavia terrestris*) 制备的。在其他实施方案中,半纤维素酶是从哈茨木霉 (*Trichoderma harzianum*)、康宁木霉 (*Trichoderma koningii*)、长枝木霉 (*Trichoderma longibrachiatum*)、里氏木霉 (例如, RL-P37 [Sheir-Neiss 等人, (1984) *Appl. Microbiol. Biotechnology* 20 :46-53; 美国专利号 4,797,361; 可作为生物纯培养物从 Northern Regional Research Laboratory, U. S. Department of Agriculture, Peoria, Ill., U. S. A. (NRRL 15709) 的永久保藏中心获得; ATCC 13631、56764、56466、56767]) 或绿色木霉 (例如, ATCC32098 和 32086) 制备的。

[0075] 在一些实施方案中,通过表达编码半纤维素酶的基因来生产组分半纤维素酶。例如,木聚糖酶可以分泌到胞外空间中,例如革兰氏阳性生物,如芽孢杆菌或放线菌;或真核生物,如木霉、曲霉、酵母或毕赤酵母的胞外空间。可以理解,在一些实施方案中,可以在重组微生物中相对于天然水平过表达一种或多种半纤维素酶。可以遗传改造宿主细胞以降低细胞的一种或多种内源蛋白质的表达。在一个实施方案中,细胞可以含有一种或多种被缺失或失活的天然基因,特别是编码分泌蛋白的基因。例如,可以缺失或失活一种或多种蛋白酶-编码基因 (例如,天冬氨酰蛋白酶编码基因; 参见 Berka 等人, (1990) *Gene* 86 :153-162 和美国专利号 6,509,171), 或纤维素酶编码基因。编码半纤维素酶的核酸可以存在于生物的基因组中,或由在生物中复制的质粒携带。当从基因组表达半纤维素酶时,基因和与其相关的调控序列可以通过随机的或同源整合引入基因组中。在一些情况下,例如当需要特别高的表达水平时,可以同时使用随机和同源整合。

[0076] 用作使用本组合物和方法水解的纤维素和半纤维素来源的生物量底物可以是,例如草本材料、农业残渣、林业残渣、城市固体废弃物、废纸、纸浆和造纸残渣等。生物量底物的常见形式包括但不限于树、灌木和草本植物、小麦、小麦秸秆、甘蔗渣、玉米、玉米皮、玉米种子包括种子的纤维、研磨 (包括湿磨和干磨) 谷粒如玉米的产物和副产物,以及城市固体废弃物、废纸和家庭废弃物。可以从“原始生物量” (例如树、灌木、草本植物、果实、花、草本农作物、硬木和软木)、“非原始生物量” (例如农业副产物、商业有机废物、建筑业和拆除残骸、城市固体废弃物和家庭废弃物) 或原始和非原始生物量的“混合生物量”中获得生物量底物。生物量底物可以包括例如木头、木浆、造纸淤泥、纸浆废液、刨花板、玉米秆、玉米纤维、水稻、纸和纸浆加工废弃物、木本或草本植物、果肉块、蔬菜浆、浮石、酒糟、草、谷壳、甘蔗渣、棉花、黄麻、大麻、亚麻、竹子、剑麻、马尼拉麻、稻草、玉米穗轴、酒糟、叶、小麦秸秆、椰棕、藻类、柳枝稷,及其混合物。

[0077] 生物量底物可直接使用,或者使用本领域已知的常规方法进行预处理。此类预处理包括化学的、物理的和生物的预处理。例如,物理的预处理技术包括但不限于各类型的研磨、破碎、蒸煮 / 蒸汽暴露、辐射和水热解。化学的预处理技术包括但不限于稀酸、碱性试剂、有机溶剂、氨、二氧化硫、二氧化碳和 pH 受控的水热解。生物预处理技术包括但不限于使用溶解木质素的微生物。

[0078] 生物转化酶混合物,和其中的纤维素酶和半纤维素酶的优化剂量水平根据所使用的生物量底物和预处理技术而改变。操作条件例如 pH、温度和反应时间也可以影响乙醇生产的速率。优选地,反应组合物含有 0.1-200mg 生物转化酶混合物 / 克生物量,更优选的,

1-100mg 生物转化酶混合物 / 克生物量, 最优的, 10-50mg 生物转化酶混合物 / 克生物量。示例的量是 0. 1-50、1-40、20-40、1-30、2-40 和 10-20mg 生物转化酶混合物 / 克生物量。备选地, 可以根据系统中底物的量确定酶量。在此类情况下, 反应组合物优选含有 0. 1-50mg 生物转化酶混合物 / 克总糖类, 更优选的, 1-30mg 生物转化酶混合物 / 克总糖类, 最优的, 10-20mg 生物转化酶混合物 / 克总糖类。备选地, 可以根据系统中的纤维素底物的量确定酶量。在此类情况下, 反应组合物优选含有 0. 2-100mg 生物转化酶混合物 / 克总葡聚糖, 更优选的, 2-60mg 生物转化酶混合物 / 克总葡聚糖, 最优的, 20-40mg 生物转化酶混合物 / 克总葡聚糖。相似的, 可以通过底物生物量中的半纤维素的量确定所使用的生物转化酶混合物的量。因此, 反应组合物优选含有 0. 2-100mg 生物转化酶混合物 / 克半纤维素, 更优选的, 2-60mg 生物转化酶混合物 / 克半纤维素, 最优的, 20-40mg 生物转化酶混合物 / 克半纤维素。

[0079] 在一些实施方案中, 本组合物的形式是增强了半纤维素酶的全纤维素酶组合物, 包含全纤维素酶制剂和至少一种半纤维素酶, 其中半纤维素酶的量的范围是总蛋白质的 1% 至 50%, 全纤维素酶的量的范围是低于总蛋白质的 99% 至 50%。例如, 半纤维素酶可以代表 1% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 99% 的总蛋白质; 半纤维素酶可以代表 2% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 98% 的总蛋白质; 半纤维素酶可以代表 3% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 97% 的总蛋白质; 半纤维素酶可以代表 4% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 96% 的总蛋白质; 半纤维素酶可以代表 5% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 95% 的总蛋白质; 半纤维素酶可以代表 6% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 94% 的总蛋白质; 半纤维素酶可以代表 7% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 93% 的总蛋白质; 半纤维素酶可以代表 8% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 92% 的总蛋白质; 半纤维素酶可以代表 9% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 91% 的总蛋白质; 半纤维素酶可以代表 10% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 90% 的总蛋白质; 半纤维素酶可以代表 11% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 89% 的总蛋白质; 半纤维素酶可以代表 12% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 88% 的总蛋白质; 半纤维素酶可以代表 13% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 87% 的总蛋白质; 半纤维素酶可以代表 14% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 86% 的总蛋白质; 半纤维素酶可以代表 15% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 85% 的总蛋白质; 半纤维素酶可以代表 16% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 84% 的总蛋白质; 半纤维素酶可以代表 17% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 83% 的总蛋白质; 半纤维素酶可以代表 18% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 82% 的总蛋白质; 半纤维素酶可以代表 19% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 81% 的总蛋白质; 半纤维素酶可以代表 20% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 80% 的总蛋白质; 半纤维素酶可以代表 21% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 79% 的总蛋白质; 半纤维素酶可以代表 22% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 78% 的总蛋白质; 半纤维素酶可以代表 23% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 77% 的总蛋白质; 半纤维素酶可以代表 24% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 76% 的总蛋白质; 半纤维素酶可以代表 25% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 75% 的总蛋白质; 半纤维素酶可以

代表 26% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 74% 的总蛋白质; 半纤维素酶可以代表 27% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 73% 的总蛋白质; 半纤维素酶可以代表 28% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 72% 的总蛋白质; 半纤维素酶可以代表 29% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 71% 的总蛋白质; 半纤维素酶可以代表 30% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 70% 的总蛋白质; 半纤维素酶可以代表 31% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 69% 的总蛋白质; 半纤维素酶可以代表 32% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 68% 的总蛋白质; 半纤维素酶可以代表 33% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 67% 的总蛋白质; 半纤维素酶可以代表 34% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 66% 的总蛋白质; 半纤维素酶可以代表 35% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 65% 的总蛋白质; 半纤维素酶可以代表 36% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 64% 的总蛋白质; 半纤维素酶可以代表 37% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 63% 的总蛋白质; 半纤维素酶可以代表 38% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 62% 的总蛋白质; 半纤维素酶可以代表 39% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 61% 的总蛋白质; 半纤维素酶可以代表 40% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 60% 的总蛋白质; 半纤维素酶可以代表 41% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 59% 的总蛋白质; 半纤维素酶可以代表 42% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 58% 的总蛋白质; 半纤维素酶可以代表 43% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 57% 的总蛋白质; 半纤维素酶可以代表 44% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 56% 的总蛋白质; 半纤维素酶可以代表 45% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 55% 的总蛋白质; 半纤维素酶可以代表 46% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 54% 的总蛋白质; 半纤维素酶可以代表 47% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 53% 的总蛋白质; 半纤维素酶可以代表 48% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 52% 的总蛋白质; 半纤维素酶可以代表 49% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 51% 的总蛋白质; 或者半纤维素酶可以代表 50% 的总蛋白质, 并且全纤维素酶组合物可以代表 50% 的总蛋白质;

[0080] 在使用中, 生物转化酶混合物组合物可以分别添加到合适的底物材料中, 即, 作为分离的酶组合物, 或作为单一的酶混合物, 其中在添加到底物中之前存在所有的纤维素酶和半纤维素酶。当纤维素酶和半纤维素酶是分离的酶组合物时, 它们可以依次或同时添加到底物中。当纤维素酶和半纤维素酶存在于单一的混合物中时, 它们是同时添加的。

[0081] 根据下列实施例, 可以进一步理解组合物和方法的其它方面和实施方案, 但所述实施例不应视为限制。本领域技术人员的显而易见是, 可以对材料和方法进行多种修饰而不背离本文的教导。

实施例

[0082] 使用 ACCELLERASE 1000™ (Danisco A/S, Genencor Division, Palo Alto, CA) 作为纤维素酶的来源, 其是被杀死的细胞材料的全培养液, 包括里氏木霉的全纤维素酶混合物, 补充了里氏木霉 BGLU1 β -葡萄糖苷酶。使用 MULTIFECT® 木聚糖酶 (Danisco A/S, Genencor Division, Palo Alto, CA) 作为 XYN2 的来源, 其是木聚糖酶 II, 高 pI, 经配制的产品。

[0083] 在里氏木霉菌株中分别过表达里氏木霉半纤维素酶, 在所述菌株中缺失了编码

CBHI、CBHII、EG1 和 EG2 的基因,以避免在所获得的细胞材料中(例如,条件培养基或“培养液”)存在这些纤维素酶。在培养液中,目标半纤维素酶的范围是总蛋白质的< 10%至 85%。在许多情况下,直接使用培养液;然而,进一步纯化了一些半纤维素酶,以证实观察到的活性不是培养液中存在的其它蛋白质的结果。

[0084] 表 1 中提供了特定酶的简称、多肽 SEQ ID NOs,和碳水化合物-活性酶(CAZY)家族以及 clan 命名(若已知)。上述 XYN2 多肽具有 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列,并且是家族 GH11 Clan C 酶。下文还显示了未成熟多肽的氨基酸序列。

[0085] 表 1

[0086]

简称	酶	SEQ ID	家族	Clan
ABF1	α -阿拉伯呋喃糖苷酶 I	3	GH54	
ABF2	α -阿拉伯呋喃糖苷酶 II	4	GH62	F
ABF3	α -阿拉伯呋喃糖苷酶 III	5	GH54	
AGL1	α -半乳糖苷酶 I	6	GH27	D
AGL2	α -半乳糖苷酶 II	7	GH36	D
AGL3	α -半乳糖苷酶 III	8	GH27	D
AXE1	乙酰木聚糖酯酶 I	9	CE5	
AXE3	乙酰木聚糖酯酶 III	10	CE5	
EG6	内切葡聚糖酶 VI	11	GH74	
EG8	内切葡聚糖酶 VIII	12	GH5	A
GLR1	α -葡萄糖醛酸糖苷酶 I	13	GH67	
MAN1	β -甘露聚糖酶	14	GH5	A
PEC2	多聚半乳糖醛酸酶	15	GH28	N
XYN1	木聚糖酶 I	16	GH11	C
XYN3	木聚糖酶 III	2	GH10	A
BXL1	β -木糖苷酶	17	GH3	

[0087]

[0088] XYN2(SEQ ID NO:1)

[0089] MVSFTSLAASPPSRASCPAAEVESVAVEKRQTIQPGTGYNNGYFYFSYWNDDGHGGVITYTNGPGGQFSV
NWSNSGNFVGGKGWQPGTKNKVINFSGSPYNGNSYLSVYGWSRNP LIEYYIVENFGTYNPSTGATKLGEVTS DGSV
YDIYRTQRVNQPSIIGTATFYQYWSVRRNHRSSGSVNTANHFNAWAQQGLTLGTMDYQIVAVEGYFSSGSASITVS

[0090] XYN3 (SEQ ID NO :2)

[0091] MKANVILCLLAPLVAALPTETIHLDP ELAALRANL TERTADLWDRQASQSIDQLIKRKGLYFGTATDR
GLLQREKNAATIQADLGQVTPENSMKWQSL ENNQGLNWGDADYLVNFAQQNGKSIRGHTLIWHSQ LPAWVNNINNA
DTLRQVIRTHVSTVVGRYKGIKIRAWDVVNEIFNEDGTLRSSF SRLLGEEFVSI AFRAARDADPSARLYINDYNLDR
ANYGKVNGLKTYVSKWISQGVPI D GIGSQSHLSGGGSGTLGALQQLATVPVTELAITELDIQGAPTTDYTQVVQAC
LSVSKCVGITVWGISDKDSWRASNPLLF DANFNPKPAYNSIVGILQ

[0092] ABF1 (SEQ ID NO :3)

[0093] MLSNARI AAGCIAAGSLVAAGPCDIYSSGGTPCVA AHSTTRALFSAYTGPLYQVKRGSDGATT AISPL
SSGVANAAAQDAFCAGTTCLITIIYDQSGRGNH LTQAPPGGFSGPESNGYDNLASAIGAPVTLNGQKAYGVFVSPGT
GYRNNAASGTAKGDAAEGMYAVLDGTHYNGACCFDYGNAETNSRDTGN GHMEAIFYGDSTVWGTGSGKGPWIMADLE
NGLFSGSSPGNNAGDPSISYRFVTA AIKQPNQWAI RGGNAASGSLSTFYSGARPQVSGYNPMSKEGAI ILGIGGDN
SNGAQGT FYEGVMTSGYPSDATENS VQANIVAARYAVAPLTSGPALTVGSSISLRATTACCTTRYIAHSGSTVNTQV
VSSSSATALKQQASWTVRAGLANNACFSFESRD TSGSYIRHSNFGVLVNANDGSKLFAEDATFCTQAG INQGSSIR
SWSYPTRYFRHYNTLYIASNGGVHVF DATAAFND DVSFVVS GGFA

[0094] ABF2 (SEQ ID NO :4)

[0095] MELKALSAVVLSFVTLVAAAPATCTLPSTYRWNSTGALASPKSGWVSLKDFSHVIYNGQHLVWGSTHD
TGTIWGS MNFLFSDWSNMATASQNKMTPGTVAPT VFYFAPKNIWVLAYQWGPTTFSYLTSSNPSSVNGWSSPQPL
FSGSISGSSPLDQTVIGDSTNMYLFFAGDDGKIYRASMPIGNFPGSFGSTSTVVLSDERNNLFEAVQVYTVSGQK
QYLMIVEAIGANGRYFRSFTATNLGGT WTPQATSE SQPFAGKANSGATWTNDISHGDLIRSNPDQTM TIDPCNLQ
FLYQGRATNSGGDYGLLPYRPGLLTLQR

[0096] ABF3 (SEQ ID NO :5)

[0097] MSPRTDRRRSGLLALGLVAASPLATAGPCDIYASGGTPCVA AHSTTRALYGAYSGPLYQVSRGSDGATT
NIATLSAGGVANAAAQDSFCAGTTCLITVIYDQSGRGNH LTQAPPGGAASGPQPNGYDNLASAIGAPVRLNGQKAYG
VFIAPFTGYRNNQPNGTATGDQPQGMYAIFDGTHYNTGCCFDYGNAETNSLDTGN GHMEAIFYGTGDGSGRGTSGGS
GPWIMADLENGLFSGYDPINNPADPTINFRFVTAVVKGE PGQWAI RGGDATSGTLSTFYSGQRPANGYNPMSKEGAI
ILGIGGDNSNRAQGT FYEGVMTSGYPSDSTENAVQANLVA AKYVYDTSMTSGPALSVGSSISLRATTSCCTNRYIA
HTGATVNTQVVSSSSSTALKQQASWTVRTGLGNSACFSFESRDSPG SFIRHSNYQLMVNANDNSKLFHEDATFCPQA
GLNGQGSNFRSWSYPTRYWRHFNSLGYIAANGGEHDFDTTTLFNDDVSFVVSAGFA

[0098] AGL1 (SEQ ID NO :6)

[0099] MTPHSIDRAARPSVWSGLALLLSTAHAI VMPDGVTKVPSLGWNSWNAYHCDIDESKFLSAAEVIVSSG
LLDAGYNYVNIDDCWSMKDGRVDGHIAVNTTRFPDGI DGLAKKVHDLGLKLGIYSTAGTATCAGYPASLG YEDVDAA
DFADWGV DYLKYDNCNVPDWDQDEYVACAPDAVQTGPNGTCSTALEPNLAPPGYDWSTSKSAERFNAMRNALAKQSR
EIVLSLCIWGVADVFSWGNETGISWRMSGDISPEWGSVTHI INMNSFKMNSVGFWGHNDADILEVGNGNLTA AETRT
HFALWAAMKSPLLIGTDLAQLSQENIELLKNKHLLAFNQDSVYGQPATPYKWGVNPDWTFNYTNPAEYWAGPSSKGH
LVLMMNTLDHTVRKEAKWSEIPGLSAGRYEVRD VWTDKSLGCLSSYKTAVAAHDTAVILVGKKCRNW

[0100] AGL2 (SEQ ID NO :7)

[0101] MLGAPSPRRLADVLA VTAGLVASVRAASPI SVSGKSFALNGDNVSYRFHVDDDSKDLIGDHFGGPATED
GVFPPIIGPIQGWDLI GRQRREFPDLGRGDFRTPAVHIRQAAGYTVSDFQYKSHRVVEGKPALRGLPSTFGDAGDV
STLVVHMYDNYSSVAADLTYSIFPKYDAIVRSVNITNMGKGNITIEKLASLSDLPYEDFDMLELKGDWAREGKRLR
RKVDYGSQGFSTTGYS SHLHNPFFSLITPTTTESQGEAWGFSLVYTG SFSVEVEKGSQGLTRAAIGVNPYQLSWPL
GPGETFSSPEAVAVFSTTGVGMSRK FHNLYRKHLIKSKFATQMHPVLLNSWEG LGFDYNDTTILHLAQESADLG IK
LFVLDDGWFGVKHPRVSDNAGLG DWEANPKRFPQGLPDFISDVT KLKVANSSDHLQFGLWFEPEMVNPNSTLYMEHP
DWA IHAGSYPRTLTRNQLVLNVALPEVQDFIIESLSNILSNASISYKWDNNRG IHEAPYPGLDYAYMLGLYRVFDT
LSSKFPNVRWEGCASGGFRDPGVLQYFPHIWTSDDTDAVERIAIQFGTSLVYPPSAMGAHVS AVPNGQTQRTTSIA
FRAHVAMMGSGFELTPAEMPEDDKAQIPGIIALAEKVNPIVVKGDMWRSLPEESNWPAA LFISQDGSQAVLFYF
QIRANINNAWPVLRQLGLDASAKYKIDGNQTFSGATLMNIGLQYQFNGDYDSKVVFLEKQT

[0102] AGL3 (SEQ ID NO :8)

[0103] MSPSAAVLIPLAAVLLRPVVGQTQCGGNLYTPGTLNFTLECYNAFQDCVAQFEANASQVDCNDG KGN
LFMQQQANLGASPGSQNNDAI IAFQDIRDLCLLSGSTTATWGYS DNQWYWAAAEDACYTNDPTRTDVVKTHPAPFCI
QNRDSSLPECYPQPDATPPGGPLKVIKTAKTRNGFKSSARGWNTYGVQALVNGSQVVP SFAGQSGLFYTQKFVETQC
GVLARPEFKKAGYDLCSLDSGWQATTAVDQHGRIIYNTTRFNLPELASWLHKRDLKLGVIITPGVPCLAHNQTILGT
NIKIKDVLNGNNDQINCDFDRKDG VQQWHDSSVVAQWASWGV DMLKDLFTPGSPSNGANLACDSSDAVRAYQKAIK
KSGRKIRLDISWKL CRNETWLP IWSDLAESMR TDQDL DNYGTNTLMAWQVGQRAIENYRQYIGLQAQRNVPLTIYPD
MDALFTVNPEHLAGVNDTIRYTVQNHWLGAGANLIIGGDMEQVDALGLKLTTSKQSIDAADFFAKYPMQPRNPGTGS
NAAKQLQAWIGGPSDDHEAYVLIVNYGPD LGNGGFSTKLYGKQKVTVSLKDLGISGSAWTFDIWSGKSSRV TGSYS
AWLTEGESQLLR LKRTH

[0104] AXE1 (SEQ ID NO :9)

[0105] MPSVKETLTL LLSQAFLATGSPVDGETTVVKRQCPAIHVFGARETTVSQGYGSSATVVNLV IQAHPGTT
SEAI VYPACGGQASC GGISYANSV VNGTNA AAAAA INNFHNSCPDTQLVLVGY SQGAQIFDNALCGGGDPGEGITNT
AVPLTAGAVSAVKAAIFMGDPRNIHGLPYNVGTCTTQGF DARPA GFVCP SASKIKSYCDAADPYCCTGNDPNVHQ
GYGQEYGGQALAFINSQLSSGGSQPPGGGPTSTSRPTSTRTGSSPGPTQTHWGQCGGQGWGTGPTQCESGTT CQVI
SQWYSQCL

[0106] AXE3 (SEQ ID NO :10)

[0107] MPSIKSTVTFLLSQALLATATPMDLEKRQCPGIHVFGARETTAPPGYGSSATVVNLII NAHPGTTA EAI
NYPACGGQAQCGGISYANSV VAGINAVVQA VTNFHNRC PSTKLVLVGY SQGGQIMDDALCGGGDPAEGYPNTAVPLP
AAAVSAIRAAIFMGDPRYVHGLAYNVGSCQAQGFAPRNVGFVCP SGNKIKSYCDASDPYCCNGNNANTHQGYGQEY G
QQALAFVN SLLG

[0108] EG6 (SEQ ID NO :11)

[0109] MKVSRVLALVLGAVIPAHAAFSWKNVKLGGGGGFVPGIIFHPKTKGVAYARTDIGGLYRLNADDSWTAV
TDGIADNAGWHNWGIDAVALDPQDDQKVYAAVGM YTNSWDPSNGAIIRSSDRGATWSFTNL PFKVGGNMPGRGAGER
LAVDPANSNIIYFGARSGNGLWKSTDGGVTFSKVSSFTATGTIYIPDPSDSNGYNSDKQGLMWVTFDSTSSTTGATS
RIFVGTADNITASVYVSTNAGSTWSAVPGQPGKYFPHKAKLQPAEKALYLTYS DGTGPYDGT LGSVWRYDIAGGTWK
DITPVSGSDLYFGFGGLGLDLQKPGTLVVASLNSWWPDAQLFIRSTDSGTTWSP IAWASYPTETYYYSISTPKAPWI
KNNFIDVTSESPSDGLIKRLGWMIESLEIDPTDSNHWLYGTGMTIFGGHDLTNWDTRHNVSIQSLADGIEEFSVQDL
ASAPGGSELLAAVGDDNGFTFASRNDLGTSPQTVWATPTWATSTSV DYAGNSVKS SVVRVGNTAGTQQVAISSDGGAT

WSIDYAADTSMNGGTVAYSADGDTILWSTASSGVQRSQFQGSFASVSSLPAGAVIASDKKTNSVIFYAGSGSTFYVSK
DTGSSFTRGPKLSAGTIRDIAAHPPTAGTLYVSTDVGIFRSTDSGTTFGQVSTALTNTYQIALGVGSGSNWNLYAF
GTGPSGARLYASGDSGASWTDIQGSQGFSGIDSTKVAGSGSTAGQVYVGTNGRGVFYAQGTVGGGTGGTSSSTKQSS
SSTSSASSSTTLRSSVSTTRASTVTSSRTSSAAGPTGSGVAGHYAQCGGIGWTGPTQCVAPYVCQKQNDYYYYQCV

[0110] EG8 (SEQ ID NO :12)

[0111] MRATSLAAALAVAGDALAGKIKYLGVAIPGIDFGCDIDGSCPTDTSSVPLL SYKGGDGAGQMKHFAED
DGLNVFRI SATWQFVLNNTVDGKLDELNWGSYNKVVNACLETGAYCMIDMHN FARYNGG IIGQGGVSDDI FVDLWVQ
IAKYYEDNDKI IFGLMNEPHDL D IEIWAQTCQKVVT AIRKAGAT SQMILLPGTNFASVETYVSTGSAEALGKITNP
GSTDLLYFDVHKYLD INNSGSHAECTTDNVDAFNDFADWLRQNKRA I ISETGASMEPSCMTAFCAQNKA ISENSDV
YIGFVGWAGSFDTSYILTLTPLGKPGNYTDNKLMECILDQFTLDEKYRPTPTSISTAAEETATATATSDGDAPST
TKPIFREETASPTPNAVTKPSPDTSDDDDKDSAASMSAQGLTGTVLFTVAALGYMLVAF

[0112] GLR1 (SEQ ID NO :13)

[0113] MVIRSLLLLLLAAIVPVFAESGIDAWLRYARLPSSATRGLTSFPDRIVVLNASKNGPLASASSELHKG
IKGILGLDL DVSSRGKHCSTQKSIVISTLD TYQSACGKLSPKLNLKEDGYWLSTKGGSVQ IIGQNERGALYGAFAQY
LSYLGQGD FSGKAFASNP SAPVRWSNQWDLNAATAAHGSIERGYGGPSIFFENGL IKEDLSRVPLYGRLLASVGLN
GIVINN VNADANLLNETNLQGLKRIADLFRPWGVN VGI SLNFASPQVLGDLSTFDPLDDSVIKWWTDKTDRIYQLVP
DLAGYLVKANSEGQPGPLTYNRTLAEGANLFAKAVQPHGGIVVFRA FVYDQLNETDWKADRANA AVDFFKSLDGGQFD
DNVLVQIKYGPIDFQVREPASPLFANLPKTAVSIELEVTQEYLGQQSHLVYLPPLWQTVLGFDMRYNNRQSYVRDI I
SGEVFGHKLGGYAGVINVGMDDTWLGSHLAMS NMFA YGR LAWNPRADSRDIVEEWTRLTFGLDRDVSTIADMSLKS
WPAYEGYSGNLGIQTLTDILYTHYGANPASQDNNGWGQWTRADSKTIGMDRTVSNGTGNAGQYPKEVAARFEHTQTT
PDDLMLWFHHPYTFRLHSGKSVIQHFYDAHYTGAATVQRFPAAWKSLSKSKIDTERYNAVLYKLQYQGTGHSLVWRDA
ITEFYRNLSIPDQLNRVRNHPHRIEAEDMDLSGFTVVNVSPTECASKYKAIATNGTGTATTRLNVP SGKYTVAVNY
YDVINGTASYDVLLNGKSLGKWKG DSETHLGHDFSTFLDCHSAIRITFEGVRI SRGDKLTIRGTGNAQEQA AIDYVS
ILPQGVVD

[0114] MAN1 (SEQ ID NO :14)

[0115] MMLSKSLLSAATAASALAAVLQPVP RASSFVTISGTQFNIDGKVG YFAGTNCYWC SFLT NHADVDSTF
SHISSSGLKVVRVWGFNDVNTQPSPGQIWFQKLSATGSTINTGADGLQTL DYVVQSAEQHNKLKI IPFVNNWSDYGG
INAYVNAFGGNATTWYTNTAAQTQYRKYVQAVVSRYANSTAI FAWELGNEPRCNGCSTDVIVQWATSVSQYVKSLDS
NHLVTLGDEGLGLSTGDGAYPTYGEGTDFAKNVQIKSLDFGTFHLYPDSWGTNYTWGNGWIQTHAAACLAAGKPCV
FEEYGAQQNPCTNEAPWQTSLTTRGMGGDMFWQWGDTFANGAQSN SDPYTVWYNSSNWQCLVKNHVDA INGGTTTP
PPVSSTTTTSSRTSSTPPPPGGSCSPLYGQC GSGYTGPTCCAQGTCTIYSNYWYSQCLNT

[0116] PEC2 (SEQ ID NO :15)

[0117] MLKLSLFLGAVTASLCVQAHA VPPPTVTQAPKLED RATCTFSGSNGASSASKSQKSCATIVLSNVA VP
SGVTLDSLNDGTTVIFEGTTTWGYKEWSGPLLQIEGNDITI QGASGAVLNP DGARWWDGQGGNGGKTKPKFFAAH
DLTSSSITNLYIKNTPVQAVSVNGVNGLTITGMTIDNSAGDSGGHNTDGFDIGSSSNVVISGAKVYNQDDCVAVNS
GTNITFTGGLCSGGHGLSIGSVGGRDDNTVQTVTFSNSQVTKSANGIRIKATAGKTGTIKGVTYTGITLSSITGYGI
LIEQNYDGGDLHGSPTSGIPITNLVLQNISGSNGVVSSGNNIAIVCGSGACSNWTSNVVVTGGKKY GSCQNVPSPA
TC

[0118] XYN1 (SEQ ID NO :16)

[0119] MVAFSSLICALTSIASTLAMPTGLEPESSVNVTERGMYDFVLGAHNDHRRRASINYDQNYQTGGQVSYS
PSNTGFSVNWNTQDDFVVGWTTGSSAPINFGGSFVSNSGTGLLSVYGWSTNPLVEYYIMEDNHNYPAGQTVKGT
TSDGATYTIWENTRVNEPSIQGTATFNQYISVRNSPRTSGTVTVQNHFNWASLGLHLGQMNYQVVAVEGWGSGSA
SQSVSN

[0120] BXL1 (SEQ ID NO :17)

[0121] MVNNAALLAALSALLPTALAQNNQTYANYSAQGQPDLYPETLATLTLSPDCEHGPKNNLVCDSSAGY
VERAQUALISLFTLEELILNTQNSGPGVPRLGLPNYQVWNEALHGLDRANFATKGGQFEWATSFPMPILTAAALNRTL
IHQIADIISTQARAFNSGRYGLDVYAPNVNGFRSPLWGRGQETPGEDAFFLSSAYTYEYITGIQGGVDPEHLKVA
TVKHFAGYDLENWNNQSRLGFDAIITQQDLSEYYTPQFLAAARYAKSRSLMCAYSVNGVPSCANSFFLQTLLRESW
GFPEWGYVSSDCDAVYNVFNPHDYASNQSSAAASSLRAGTDIDCGQTYPWHLNESFVAGEVSRGEIERSVTRLYANL
VRLGYFDKKNQYRSLGWKDVVKTDAWNISYEAAVEGIVLLKNDGTLPLSKKVRISIALIGPWANATTMQQGNYYGPAP
YLISPLEAAKKAGYHVNFEELGTEIAGNSTTGFAKATAAAKSDAI IYLGIDNTIEQEGADRTDIAWPGNQDLIKQ
LSEVGKPLVVLQMGGGQVDSSSLKSNKKVNSLVWGGYPGQSGGVALFDILSGKRAPAGRLVTTQYPAEYVHQFPQND
MNLRPDGKSNPGQTYIWTGKPVY

[0122] EFGSGLFYTTFKETLASHPKSLKFNTSSILSAPHPGYTYSEQIPVFTFEANIKNSGKTESPYTAMLFV
RTSNAGPAPYPNKWLVGFDRLADIKPGHSSKLSIPIPVSALARVD SHGNRIVYPGKYELALNTDESVKLEFELVGE
EVTIENWPLEEQQIKDATPDA

[0123] 在一式三份的混合物中测试表达 ABF1、ABF2、ABF3、AGL1、AGL2、AGL3、AXE1、AXE3、
EG6、EG8、GLR1、MAN1、PEC2、XYN1、XYN3 和 BXL1 的分泌蛋白质培养液。在 96 孔微量滴定板
的每个孔中,添加 150 μ l AFEX- 预处理的玉米秸秆 (31.7% 葡聚糖、19.1% 木聚糖、1.83%
半乳聚糖和 3.4% 的阿拉伯聚糖,基于干重,在 pH5, 50mM 乙酸钠缓冲液中配制成 15.6 或
12% 的固体浆液) (所有数据点都是基于一式三份的孔)。一个实验 (表 9 显示) 使用稀释
的氨水预处理的玉米穗轴 (13.84% 固体) 作为底物。向选定的孔中添加 :仅 20mg/G 纤维
素的 ACCELLERASE1000™ (CEL)、20mg/G 的 ACCELLERASE 1000™+5mg/GMULTIFECT®木聚糖酶,
或者 20mg/G 的 ACCELLERASE 1000™+5mg/G MULTIFECT®木聚糖酶 +1 或 5mg/G 的各半纤维
素酶培养液,所有都为 20 μ l 总酶体积。

[0124] 根据各底物浆液中的总纤维素 (15.6% 或 12% 固体) 调整酶剂量。密封板,并在
50℃ 振荡下孵育 72 小时。然后,用 100 μ l 的 100mM 甘氨酸, pH 10 终止反应。过滤该混合
物,再稀释 6x (20 μ l+100 μ l 蒸馏 H₂O),在 Agilent Chem Station HPLC 仪器的 HPLC-Aminex
HPX-87P 柱上分析糖含量。根据纤维二糖和葡萄糖的纤维二糖标准曲线或根据木糖的木糖
标准曲线,将 HPLC 峰面积转换为糖浓度。计算基于起始纤维素含量的百分比转化以包括三
种糖聚合物每种的水解 H₂O。还计算了一式三份的标准差。

[0125] 表 2 和 3 提供了每种酶混合物的葡聚糖和木聚糖的平均转化 ($\pm$ 标准差),如由
两份独立执行的程序确定。用两种不同的 AFEX 底物浆液来实施上述独立的运行,所述底物
浆液是 15.6% (表 2) 和 12% (表 3) 的固体,从而包括纤维素不同的总毫克数,虽然作为
mg/G 纤维素的剂量是相同的。

[0126] 表 2

[0127]

酶	%转化葡聚糖(± SD)	%转化木聚糖(± SD)
20 mg/G CEL	56.31 (0.88)	39.47 (0.66)

[0128]

20 mg/G CEL + 5 mg/G XYN2	25 mg/G CEL	61.12 (0.99)	41.82 (1.6)
	30 mg/G CEL	66.48 (1.9)	46.69 (0.98)
	---	67.92 (1.1)	61.02 (1.3)
	+ 5 mg/G ABF1	68.84 (2.1)	62.31 (0.67)
	+ 5 mg/G ABF2	74.84 (2.4)	62.36 (1.2)
	+ 5 mg/G ABF3	72.96 (1.4)	63.35 (3.7)
	+ 5 mg/G AXE1	71.93 (1.4)	64.78 (0.83)
	+ 5 mg/G BXL1	78.45 (2.8)	79.29 (4.9)
	+ 5 mg/G EG6	70.15 (2.1)	58.82 (2.7)
	+ 5 mg/G GLR1	67.81 (1.8)	65.70 (2.9)
	+ 5 mg/G MAN1	74.58 (0.80)	66.84 (0.64)
	+ 5 mg/G PEC2	72.94 (4.3)	61.99 (5.5)
	+ 5 mg/G XYN1	67.33 (1.1)	62.22 (0.44)
	+ 5 mg/G XYN3	78.82 (0.64)	73.63 (0.50)
	+ 1 mg/G XYN3 + 1 mg/G BXL1	77.37 (2.6)	74.44 (2.3)

[0129] 表 3

[0130]

酶		%转化葡聚糖(± SD)	%转化木聚糖(± SD)
20 mg/G CEL		55.08 (1.8)	35.95 (0.94)
30 mg/G CEL		62.63 (0.96)	40.99 (0.30)
20 mg/G CEL + 5 mg/G XYN2	---	63.96 (0.58)	55.06 (2.0)
	+ 5 mg/G AGL1	67.52 (1.7)	56.00 (1.2)
	+ 5 mg/G AGL2	69.80 (2.7)	55.02 (1.8)
	+ 5 mg/G AGL3	66.51 (0.12)	55.93 (0.59)
	+ 5 mg/G AXE3	68.32 (1.4)	55.89 (0.67)
	+ 5 mg/G EG8	70.68 (3.9)	55.40 (2.7)

[0131] 添加 XYN2 对增加木聚糖转化是有效的。与含 XYN2 的纤维素酶相比,具有第三种组分(即,XYN3、AGL2、EG8、BXL1、ABF3 或 PEC2)的六种酶混合物在葡聚糖和/或木聚糖转化方面表现出进一步的优势。根据上述程序运行一式四份的酶混合物。表 4 提供了每种酶混合物的葡聚糖和木聚糖的平均转化(± 标准差)

[0132] 表 4

[0133]

酶	%转化葡聚糖(± SD)	%转化木聚糖(± SD)
20 mg/G CEL	55.43 (6.5)	42.29 (2.3)
20 mg/G CEL + 5 mg/G XYN2	71.27 (0.67)	63.96 (1.2)
20 mg/G CEL + 5 mg/G XYN3	85.07 (3.1)	68.69 (2.6)

[0134]

20 mg/G CEL + 5 XYN2 + 5 mg/G XYN3		86.82 (1.2)	80.68 (0.33)
20 mg/G CEL + 5 mg/G XYN2 + 2.5 XYN3	---	76.57 (0.94)	72.70 (0.64)
	+ 5 mg/G ABF3	81.58 (0.76)	75.89 (0.73)
	+ 5 mg/G AGL2	78.66 (2.7)	72.49 (2.3)
	+ 5 mg/G BXL1	72.80 (6.7)	78.60 (2.1)
	+ 5 mg/G EG8	74.72 (6.0)	73.29 (2.8)
	+ 5 mg/G PEC2	78.18 (2.4)	73.90 (2.9)

[0135] 在另一个实验中,将 ACCELLERASE 1000™ 与纯化的 XYN2 和 / 或 XYN3 混合,并测定 (表 5)。XYN2 和 XYN3 的组合产生更有效的葡聚糖和木聚糖转化。

[0136] 表 5

酶		%转化葡聚糖 (± SD)	%转化木聚糖 (± SD)
10 mg/G CEL	---	43.97 (1.4)	28.41 (1.0)
	+ 10 mg/G XYN2	59.22 (4.3)	56.83 (5.7)
	+ 10 mg/G XYN3	51.44 (8.6)	43.53 (1.6)
20 mg/G	---	60.29 (1.7)	40.02 (0.33)

[0138]

CEL	+ 5 mg/G XYN2 + 5 mg/G XYN3	73.73 (0.79)	61.81 (1.2)
	+ 10 mg/G XYN2 + 10 mg/G XYN3	74.71 (1.6)	65.20 (1.4)
30 mg/G CEL		67.05 (0.74)	43.74 (0.14)

[0139] 在其他实例中,如上述,在含有 20mg/G ACCELLERASE 1000™+5mg/G MULTIFECT® Xylanase XYN2 的混合物中,测试了 XYN4、XYN5、FAE1,和新一批的含~50%目标蛋白质的 ABF3(前一批为<10%)。结果显示在表 6 中。添加 XYN4、XYN5 或 FAE1 对增加葡聚糖和木聚糖的转化是有效的。

[0140] 表 6

[0141]

酶		%转化葡 聚糖(± SD)	%转化木 聚糖(± SD)
20 mg/G CEL		57.52 (1.08)	38.37 (0.38)
30 mg/G CEL		66.21 (1.37)	44.15 (0.70)
20 mg/G CEL + 5 mg/G XYN2	---	68.44 (0.23)	60.46 (0.48)
	+ 5 mg/G ABF3	66.22 (5.99)	67.46 (3.97)
	+ 5 mg/G XYN4	72.17 (0.66)	63.47 (0.44)

[0142]

	+ 5 mg/G XYN5	71.91 (3.74)	62.73 (3.37)
	+ 5 mg/G FAE1	70.98 (1.47)	67.02 (1.59)

[0143] 在另一个实验中,如上述,混合 ACCELLERASE 1000™和纯化的 Bx11 和 XYN2 和 / 或 XYN3,并测定。结果显示在表 7 中。一些酶组合对增加葡聚糖和 / 或木聚糖的转化是有效的。

[0144] 表 7

[0145]

酶	%转化葡聚糖 (± SD)	%转化木聚糖 (± SD)
35 mg/G CEL	67.95 (0.67)	40.36 (0.36)
30 mg/G CEL	66.51 (1.99)	38.63 (0.56)
20 mg/G CEL	58.03 (3.19)	32.28 (1.41)
10 mg/g CEL	45.01 (0.59)	23.85 (0.42)
10 mg/g CEL + 10 mg/G BXL1	46.89 (4.16)	48.85 (2.94)
20 CEL + 5 XYN2 + 5 BXL1	69.45 (4.88)	60.15 (1.17)
20 CEL + 5 XYN3 + 5 BXL1	65.17 (8.37)	65.36 (1.14)
20 CEL + 5 XYN2 + 5 XYN3 + 5 BXL1	75.13 (1.20)	66.97 (1.07)

[0146] 在另一个实例中,ABF1、ABF2 和 ABF3 (具有 < 10 % 目标蛋白质的 ABF3 样品批次) 以单个的、成对的和三个一组的组合,添加到 20mg/GACCELLERASE 1000™+5mg/G 纯化的 XYN3+5mg/G 纯化的 BXL1 的背景中。结果显示在表 8 中。一些酶组合对增加葡聚糖和 / 或木聚糖的转化是有效的。

[0147] 表 8

[0148]

酶		%转化葡聚糖(± SD)	%转化木聚糖(± SD)
30 mg/G CEL		67.55 (0.18)	45.05 (6.67)
45 mg/G CEL		79.39 (4.66)	56.05 (2.31)
20 mg/G CEL + 5 mg/GXYN3 + 5 mg/G BXL1	---	73.24 (4.39)	79.88 (4.72)
	+ 5 mg/G ABF1	58.21 (0.55)	86.84 (0.47)
	+ 5 mg/G ABF2	84.39 (1.01)	87.15 (1.32)
	+ 5 mg/G ABF3	65.07 (3.68)	73.46 (4.13)
	+ 5 mg/GABF1 +5 mg/G ABF2	87.65 (3.11)	87.08 (2.31)
	+ 5 mg/GABF1 +5 mg/G ABF3	67.62 (5.01)	87.77 (2.91)
	+ 5 mg/GABF2 +5 mg/G ABF3	91.21 (1.82)	89.98 (1.08)
	+ 5 mg/GABF1 +5 mg/G ABF2 + 5 mg/G ABF3	99.67 (3.45)	96.73 (4.74)

[0149] 在另一个实例中,将 3.4mg/G 木聚糖的纯化 ABF1、ABF2 和 / 或 ABF3 添加到 20.7mg/G 葡聚糖的 ACCELLERASE 1000™+5.1mg/G 木聚糖的每种纯化的 XYN3 和 BXL1 中。结果显示在表 9 中。一些酶组合对增加葡聚糖和 / 或木聚糖的转化是有效的。

[0150] 表 9

[0151]

酶	%转化葡聚糖(± SD)	%转化木聚糖(± SD)
---	--------------	--------------

[0152]

			SD)
	30.9 mg/G CEL	66.45 (1.64)	33.84 (0.83)
	41.3 mg/G CEL	67.99 (0.57)	35.95 (0.11)
	---	76.67 (0.30)	63.86 (0.08)
	+3.4 mg/G ABF1	76.37 (1.32)	64.18 (1.77)
	+3.4 mg/G ABF2	77.84(1.48)	66.59 (2.07)
	+3.4 mg/G ABF3	77.53 (1.94)	66.86 (1.84)
	+3.4 mg/G ABF1 +3.4 mg/G ABF2	78.32 (1.56)	67.65 (2.31)
	+ 3.4 mg/G ABF1 +3.4 mg/G ABF3	77.53 (1.04)	66.89 (0.51)
	+3.4mg/GABF2 +3.4 mg/G ABF3	79.92 (0.27)	68.96 (0.03)
	+ 3.4mg/G ABF1 +3.4 mg/G ABF2 + 3.4 mg/G ABF3	80.22 (1.98)	68.76 (2.22)

20.7 mg/G
CEL
+
5.1
mg/GXYN3
+
5.1 mg/G
BXL1