[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12N 9/88 (2006.01)
C12R 1/10 (2006.01)
C11D 3/386 (2006.01)

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 98812801.2

[45] 授权公告日 2006 年 3 月 8 日

[11] 授权公告号 CN 1244695C

[22] 申请日 1998.11.24 [21] 申请号 98812801.2

[30] 优先权

[32] 1997.11.24 [33] DK [31] 1343/97

[32] 1997.11.24 [33] DK [31] 1344/97

[32] 1998.11. 2 [33] US [31] 09/184,217

[32] 1998. 5. 6 [33] US [31] 09/073,684

[86] 国际申请 PCT/DK1998/000515 1998.11.24

[87] 国际公布 WO1999/027084 英 1999.6.3

[85] 进入国家阶段日期 2000.6.29

[71] 专利权人 诺沃奇梅兹有限公司

地址 丹麦鲍斯韦

[72] 发明人 L·N·安德森 M·舒莱恩
N·E·K·兰吉
M·E·布约恩瓦德 S·莫勒
S·O·S·格拉德
M·S·考比南 K·施诺尔
L·康格斯巴克

审查员 欧阳石文

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所

代理人 黄革生

权利要求书 5 页 说明书 81 页 附图 3 页

[54] 发明名称

新的果胶酸裂解酶

[57] 摘要

一组新的包含氨基酸序列 Asn Leu Asn Ser Arg Val Pro(NLNSRVP)的果胶酸裂解酶，这组酶属于第 1 族多糖裂解酶，在中性或碱性条件下的工业工艺中于比如洗衣和纺织品处理等中有良好效果。 所述果胶酸裂解酶可以来源于芽孢杆菌菌种。

1. 一种果胶酸裂解酶，它是

i)包含 SEQ ID NO: 2 中 27-359 位所示氨基酸序列的多肽，或者

ii) i)中限定的多肽的类似物，其与所述多肽至少 80%同源；或者

iii)经取代、缺失或添加一或几个氨基酸而衍生自所述多肽，条件是保留 240 位的精氨酸，任选保留 245 位的精氨酸，并且衍生的多肽与所述多肽至少 80%同源。

2. 一种编码具有果胶酸裂解酶活性之多肽的分离的多核苷酸分子，其选自下组:

(a)包含 SEQ ID NO: 1 中 79 到 1077 位核苷酸所示核苷酸序列的多核苷酸分子;

(b)编码与 SEQ ID NO: 2 中 27 到 359 位氨基酸残基之序列至少 80%相同的多肽的多核苷酸分子;

(c)(a)或(b)的简并核苷酸序列。

3. 一种果胶酸裂解酶，它是

i)包含 SEQ ID NO: 4 中 28-341 位所示氨基酸序列的多肽，或者

ii) i)中限定的多肽的类似物，其与所述多肽至少 80%同源；或者

iii)经取代、缺失或添加一或几个氨基酸而衍生自所述多肽，条件是保留 233 位的精氨酸，任选还保留 238 位的精氨酸，并且衍生的多肽与所述多肽至少 80%同源。

4. 一种编码具有果胶酸裂解酶活性之多肽的分离的多核苷酸分子，其选自下组:

(a)包含 SEQ ID NO: 3 中 82 到 1026 位核苷酸所示核苷酸序列的多核苷酸分子;

(b)编码与 SEQ ID NO: 4 中 28 到 341 位氨基酸残基之序列至少 80%相同的多肽的多核苷酸分子；和

(c)(a)或(b)的简并核苷酸序列。

5. 一种果胶酸裂解酶，它是

i)包含 SEQ ID NO: 6 中 181-509 位所示的氨基酸序列的多肽；或

ii）i）中限定的多肽的类似物，其与所述多肽至少 80%同源，或

iii）经取代、缺失或添加一或几个氨基酸而衍生自所述多肽，条件是保留 390 位的精氨酸，任选还保留 395 位的精氨酸，并且衍生的多肽与所述多肽至少 80%同源。

6. 一种编码具有果胶裂解酶活性之多肽的分离的多核苷酸分子，其选自下组：

(a)包含 SEQ ID NO: 5 中 541 到 1530 位核苷酸所示核苷酸序列的多核苷酸分子；

(b)编码与 SEQ ID NO: 6 中 181 到 509 位氨基酸残基之序列至少 80%相同的多肽的多核苷酸分子；和

(c) (a)或(b)的简并核苷酸序列。

7. 一种果胶酸裂解酶，它是

i）包含 SEQ ID NO: 8 中 42-348 位所示氨基酸序列的多肽；或者

ii）i)中限定的多肽的类似物，其与所述多肽至少 80%同源，或者

iii）经取代、缺失或添加一或数个氨基酸而衍生自所述多肽，条件是保留 240 位的精氨酸，任选还保留 245 位的精氨酸，并且衍生的多肽与所述多肽至少 80%同源。

8. 权利要求 7 的果胶酸裂解酶，其中所述多肽是由保藏号为 DSM12419 的芽孢杆菌 KJ59 产生的。

9. 一种编码具有果胶酸裂解酶活性之多肽的分离的多核苷酸分子，其选自下组：

(a)包含 SEQ ID NO: 7 中 124 到 1047 位核苷酸所示核苷酸序列的多核苷酸分子；

(b)编码与 SEQ ID NO: 8 中 42 到 348 位氨基酸残基之序列至少 80%相同的多肽的多核苷酸分子；以及

(c) (a)或(b)的简并核苷酸序列。

10.一种果胶酸裂解酶，它是

i)包含 SEQ ID NO: 10 中 25-335 位所示的氨基酸序列的多肽；或者

ii）i)中限定的多肽的类似物，其与所述多肽至少 80%同源，或者

iii）经取代、缺失或添加一或数个氨基酸而衍生自所述多肽，条件是保留 227 位的精氨酸，任选还保留 232 位的精氨酸，并且衍生的多肽与所述多肽至少 80%同源。

11.一种编码具有果胶酸裂解酶活性之多肽的分离的多核苷酸分子，其选自下组：

(a)包含 SEQ ID NO: 9 中 73 到 1008 位核苷酸所示核苷酸序列的多核苷酸分子；

(b)编码与 SEQ ID NO: 10 中 25 到 335 位氨基酸残基之序列至少 80%相同的多肽的多核苷酸分子；和

(c) (a)或(b)的简并核苷酸序列。

12. 权利要求 2、4、6、9 或 11 的分离的多核苷酸分子，其中所述多核苷酸是 DNA。

13. 一种表达载体，其中包含下列可操纵地连接在一起的元件：转录启动子；DNA 区段，其选自下组：(a)编码具有果胶酸裂解酶活性之多肽，并包含 SEQ ID NO: 1 中 79 到 1077 位核苷酸所示核苷酸序列，或 SEQ ID NO: 3 中 82 到 1026 位核苷酸所示核苷酸序列，或 SEQ ID NO: 5 中 541 到 1530 位核苷酸所示核苷酸序列，或 SEQ ID NO: 7 中 124 到 1047 位核苷酸所示核苷酸序列，或 SEQ ID NO: 9 中 73 到 1008 位核苷酸所示核苷酸序列的多核苷酸分子；(b)编码具有果胶酸裂解酶活性之多肽的多核苷酸分子，所述多肽与 SEQ ID NO: 2 中 27 到 359 位氨基酸残基之序列，或者与 SEQ ID NO: 4 中 28 到 341 位氨基酸残基之序列，或者与 SEQ ID NO: 6 中 181 到 509 位氨基酸残基之序列，或者与 SEQ ID NO: 8 中 42 到 348 位氨基酸残基之序列，

或者与 SEQ ID NO: 10 中 25 到 335 位氨基酸残基之序列至少 80%相同；和(c)(a)或(b)的简并核苷酸序列；以及转录终止子。

14. 导入了权利要求 13 的表达载体的培养细胞，该细胞表达所述 DNA 区段编码的多肽。

15. 一种酶制品，其中包含权利要求 1、3、5、7 和 10 中任一项所述的果胶酸裂解酶。

16. 权利要求 15 的酶制品，其中还包含一或多种选自下组的酶：蛋白酶、纤维素酶、内切葡聚糖酶、β-葡聚糖酶、半纤维素酶、脂酶、过氧化物酶、漆酶、α-淀粉酶、葡糖淀粉酶、角质酶、果胶酶、还原酶、氧化酶、酚氧化酶、木质素酶、支链淀粉酶、阿拉伯糖苷酶、甘露聚糖酶、木葡聚糖酶、木聚糖酶、果胶乙酰酯酶、多聚半乳糖醛酸酶、鼠李糖半乳糖醛酸酶、半乳聚糖酶、果胶裂解酶、其他果胶酸裂解酶、多聚半乳糖醛酸酶、果胶甲酯酶、纤维二糖水解酶、转谷氨酰胺酶；或者这些酶的混合物。

17. 一种制备具有果胶酸裂解酶活性的多肽的方法，该方法包括培养其中已导入权利要求 13 所述表达载体的细胞，从而所述细胞表达该 DNA 区段所编码的多肽；以及回收多肽。

18. 一种具有果胶酸裂解酶活性的分离的酶，其特征在于该酶(i)不含同源杂质，并且(ii)由权利要求 17 的方法产生。

19. 包含纤维素结合结构域和果胶酸裂解酶的融合多肽的制备方法，该方法包括培养其中已经导入了表达载体的细胞，所述表达载体包含一或多个编码纤维素结合结构域的 DNA 序列以及与之可操作连接的、编码权利要求 1、3、5、7 或 10 中任一项的果胶酸裂解酶的 DNA 序列，从而所述细胞表达融合多肽；和回收所述融合多肽。

20. 权利要求 19 的方法，其中所述编码纤维素结合结构域的 DNA 序列得自热纤维梭菌（*Clostridium thermocellum*）菌株 YS。

21. 由权利要求 19 的方法生产的多肽。

22. 权利要求 21 的多肽，所述多肽具有 SEQ ID NO: 12 之氨基酸序列，或者其具有果胶酸裂解酶活性的突变体或变异体，条件是保

留 206 和 211 位的精氨酸，并且所述突变体或变异体与所述多肽部分至少 80%同源。

23. 一种洗涤剂组合物，其中包含权利要求 15 所述酶制品，或者权利要求 1、3、5、7 和 10 中任一项所述果胶酸裂解酶，以及表面活性剂。

24. 一种清洁硬表面的方法，包括用含有权利要求 15 所述酶制品，或者权利要求 1、3、5、7 和 10 中任一项所述果胶酸裂解酶的清洁溶液处理硬表面。

25. 一种机械处理织物的方法，该方法包括在机洗工序中的一个洗涤循环中用含有权利要求 15 所述酶制品，或者权利要求 1、3、5、7 和 10 中任一项所述果胶酸裂解酶的洗涤溶液处理织物。

26. 一种改善纤维素纤维、纱线、机织或非机织织物特性的方法，该方法中用有效量的权利要求 15 所述酶制品，或者权利要求 1、3、5、7 和 10 中任一项所述果胶酸裂解酶处理纤维、纱线或织物。

27. 权利要求 26 的方法，其中所述酶制品或果胶酸裂解酶在精练工艺步骤中使用。

28. 一种降解或改变植物材料的方法，该方法中用有效量的权利要求 15 所述酶制品，或者权利要求 1、3、5、7 和 10 中任一项所述果胶酸裂解酶处理植物材料。

29. 权利要求 28 的方法，其中所述植物材料是循环废纸、机械造纸纸浆或者进行浸解处理的纤维。

30. 一种制备动物饲料的方法，其中将有效量的权利要求 16 所述酶制品，或者权利要求 1、3、5、7 和 10 中任一项所述果胶酸裂解酶作为动物饲料添加剂加入普通动物饲料成分中。

31. 一种加工酒类或果汁的方法，该方法中用有效量的权利要求 16 所述酶制品，或者权利要求 1、3、5、7 和 10 中任一项所述酶处理酒类或果汁。

新的果胶酸裂解酶

本发明涉及微生物果胶酸裂解酶(pectate lyase)；更具体来说是在中性和碱性 pH 范围内显示出其主要酶活性是果胶酸裂解酶活性的微生物酶；本发明还涉及制备这些酶的方法；以及将这些酶用于纺织品、洗涤剂和纤维素纤维加工工业的方法。

发明背景

果胶聚合物是植物细胞壁的重要组成成分。果胶是一种主链由交替的同聚半乳糖醛酸(平滑区)和鼠李糖半乳糖醛酸聚糖(毛状区)组成的杂多糖。所述平滑区是 1，4-连接的α-D-半乳糖醛酸的线性聚合物。半乳糖醛酸残基可以在羧基基团被不同程度地甲酯化，通常是以非随机方式将聚半乳糖醛酸区完全甲酯化。

可以将果胶酶根据其优选底物(高度甲酯化的果胶或低甲酯化的果胶和聚半乳糖醛酸(果胶酸))以及反应机制(β-消除或水解)进行分类。果胶酶可以主要是内切作用，即在链内随机位置切割聚合物产生寡聚物混合物，或者它们可以是外切作用，从聚合物的一端进行攻击并产生单体或二聚体。酶命名法（1992）给出的酶分类中包括几种作用于果胶平滑区的果胶酶活性，比如果胶酸裂解酶(EC4.2.2.2)、果胶裂解酶(EC4.2.2.10)、多聚半乳糖醛酸酶(EC3.2.1.15)、外切多聚半乳糖醛酸酶(EC3.2.1.67)、外切多聚半乳糖醛酸裂解酶(EC4.2.2.9)和外切多聚α-半乳糖醛酸糖苷酶(EC3.2.1.82)。

已克隆了来自不同属细菌的果胶酸裂解酶，比如欧文氏杆菌、假单胞菌属、克雷伯氏菌属和黄单胞菌属。还描述过从枯草芽孢杆菌(Nasser等(1993)FEBS335: 319-326)和芽孢杆菌 YA-14(Kim 等，(1994)生物科学、生物技术及生物化学 58: 947-949)克隆果胶酸裂解酶。已经报道过短小芽孢杆菌(Dave 和 Vaughn(1971)，细菌学杂志 108: 166-174)、多粘芽孢

杆菌(Nagel 和 Vaughn(1961)，生物化学和生物物理学文献 93: 344-352)、嗜热脂肪芽孢杆菌(Karbassi 和 Vaughn(1980)，加拿大微生物学杂志 26: 377-384)、一株芽孢杆菌(Hasegawa 和 Nagel(1966)，食品科学杂志 31: 838-845)、芽孢杆菌 RK9(Kelly 和 Fogarty(1978)，加拿大微生物学杂志 24: 1164-1172)所产生的在 pH8-10 的范围内具有最佳活性的果胶酸裂解酶的纯化，但是没有发现关于自这些生物克隆果胶酸裂解酶编码基因的出版物。所有描述过的果胶酸裂解酶都需要二价阳离子以达到最大活性，钙离子是最具激活作用的。

WO98/45393 公开了含有原果胶酶的洗涤剂组合物，对泥渍有显著的清洁力。

一般来说，产生果胶酶的微生物显示有广范围的果胶降解酶或修饰酶。这些微生物还经常产生纤维素酶和/或半纤维素酶，可能难以将得自这些微生物的复杂的多组分酶制品优化以用于各种用途，它们甚至可能含有具有害作用的酶。因此，本发明的一个目的是提供一种在例如洗涤剂或不同工业工艺中只显示期望效果的果胶降解酶。

发明概述

本发明人发现并鉴定了几种新的具有显著果胶酸裂解酶活性的酶，这些酶在不同工业工艺于中性或碱性条件下效果显著，发明人并且成功地鉴定到编码这些酶的 DNA 序列，这些酶形成一类新的果胶酸裂解酶，具有至少部分相同的氨基酸序列的保守区。

相应地，本发明第一个方面涉及一种果胶酸裂解酶，其中包含由具有以下序列的 7 个氨基酸残基(Asn Leu Asn Ser Arg Val Pro(NLNSRVP))构成的第一氨基酸序列。在另外的实施方案中，所述果胶酸裂解酶可以还具有由 6 个氨基酸残基构成的第二氨基酸序列，其选自: Trp Val Asp His Asn Glu(WVDHNE)和 Trp Ile Asp His Asn Glu(WIDHNE)；任选还含有由 3 个氨基酸残基: Ser Trp Asn(SWN)构成的第三氨基酸序列。

本发明的 5 种果胶酸裂解酶的 DNA 序列分别以 SEQ ID NO: 1、3、

5、7和9列于序列表中，推测出的氨基酸序列分别以SEQ ID NO: 2、4、6、8和10列于序列表中。可以相信这些新酶根据酶命名法则应分类到EC4.2.2.2酶类中。但是，应当注意到本发明的酶除了EC4.2.2.2酶类常规的对果胶酸和多聚半乳糖醛酸类的活性之外，还显示出对果胶(可以是酯化的)的催化活性。

本发明第二个方面涉及果胶酸裂解酶，该酶是 i)由 *Bacillus agaradhaerens* NCIMB40482 或 DSM8721 产生的多肽，或者 ii)包含 SEQ ID NO: 2 中 27-359 位所示氨基酸序列的多肽，或者 iii)i)或 ii)中限定的多肽的类似物，其与所述多肽至少 45%同源；或者 iv)经取代、缺失或添加 1 或几个氨基酸而衍生自所述多肽，条件是保留 240 位的精氨酸，任选保留 245 位的精氨酸，并且衍生的多肽与所述多肽至少 42%同源，或者 v)与针对纯化形式的所述多肽产生的多克隆抗体有免疫反应性。

本发明在一个方面内提供了一种分离的多核苷酸分子，其选自(a)编码具有果胶酸裂解酶活性之多肽，并包含 SEQ ID NO: 1 中 79 到 1077 位核苷酸所示核苷酸序列的多核苷酸分子；(b)(a)的物种同系物；(c)编码具有果胶酸裂解酶活性、与 SEQ ID NO: 2 中 27 到 359 位氨基酸残基之序列至少 45%相同的多肽的多核苷酸分子；(d)与(a)、(b)或(c)互补的分子；以及(e)(a)、(b)、(c)或(d)的简并核苷酸序列。

包含编码本发明所述果胶酸裂解酶的多核苷酸分子(DNA 序列)的质粒 pSJ1678 已被转化到一株大肠杆菌中，该菌根据“用于专利程序的国际认可的微生物保藏布达佩斯条约”于 1997 年 9 月 25 日保藏在 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, 联邦德国，保藏号 DSM11788。

本发明的第三个方面涉及一种果胶酸裂解酶，它是 i)由地衣芽孢杆菌 ATCC14580 产生的多肽，或者 ii)包含 SEQ ID NO: 4 中 28-341 位所示氨基酸序列的多肽，或者 iii)i)或 ii)中限定的多肽的类似物，其与所述多肽至少 45%同源；或者 iv)经取代、缺失或添加 1 或几个氨

基酸而衍生自所述多肽，条件是保留233位的精氨酸，任选还保留238位的精氨酸，并且衍生的多肽与所述多肽至少42%同源，或者v)与针对纯化形式的所述多肽产生的多克隆抗体有免疫反应性。

本发明在一个方面内提供了一种分离的多核苷酸分子，其选自(a)编码具有果胶酸裂解酶活性之多肽，并包含SEQ ID NO: 3中82到1026位核苷酸所示核苷酸序列的多核苷酸分子；(b)(a)的物种同系物；(c)编码具有果胶酸裂解酶活性、与SEQ ID NO: 4中28到341位氨基酸残基之序列至少45%相同的多肽的多核苷酸分子；(d)与(a)、(b)或(c)互补的分子；以及(e)(a)、(b)、(c)或(d)的简并核苷酸序列。

包含编码本发明所述果胶酸裂解酶的多核苷酸分子(DNA 序列)的质粒pSJ1678已被转化到一株大肠杆菌中，该菌根据“用于专利程序的国际认可的微生物保藏布达佩斯条约”于1997年9月25日保藏在Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, 联邦德国，保藏号DSM11789。

本发明第四个方面涉及一种果胶酸裂解酶，它是i)由具有SEQ ID NO: 14之16S rDNA的芽孢杆菌菌种产生的多肽或者由具有与SEQ ID NO: 14同源性在97.3%以上的16S rDNA的芽孢杆菌菌种产生的多肽；ii)包含SEQ ID NO: 6中181-509位所示的氨基酸序列的多肽；或者iii) i）或ii）中限定的多肽的类似物，其与所述多肽至少50%同源，或者iv)经取代、缺失或添加1或几个氨基酸而衍生自所述多肽，条件是保留390位的精氨酸，任选还保留395位的精氨酸，并且衍生的多肽与所述多肽至少44%同源，或者v)与针对纯化形式的所述多肽产生的多克隆抗体有免疫反应性。

本发明在一个方面内提供了一种分离的多核苷酸分子，其选自(a)编码具有果胶酸裂解酶活性之多肽，并包含SEQ ID NO: 5中541到1530位核苷酸所示核苷酸序列的多核苷酸分子；(b)(a)的物种同系物；(c)编码具有果胶酸裂解酶活性、与SEQ ID NO: 6中181到509位氨基酸残基之序列至少50%相同的多肽的多核苷酸分子；(d)与(a)、(b)

或(c)互补的分子；以及(e)(a)、(b)、(c)或(d)的简并核苷酸序列。

包含编码本发明所述果胶酸裂解酶的多核苷酸分子(DNA 序列)的质粒 pSJ1678 已被转化到一株大肠杆菌中，该菌根据“用于专利程序的国际认可的微生物保藏布达佩斯条约”于 1998 年 9 月 8 日保藏在 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig，联邦德国，保藏号 DSM12403。

本发明第五个方面涉及一种果胶酸裂解酶，它是 i)由 *Bacillus halodurans* 的一株菌，优选芽孢杆菌 KJ59，DSM12419 产生的多肽，或者 ii)包含 SEQ ID NO: 8 中 42-348 位所示氨基酸序列的多肽；或者 iii) i）或 ii）中限定的多肽的类似物，其与所述多肽至少 45%同源，或者 iv)经取代、缺失或添加 1 或几个氨基酸而衍生自所述多肽，条件是保留 240 位的精氨酸，任选还保留 245 位的精氨酸，并且衍生的多肽与所述多肽至少 40%同源，或者 v)与针对纯化形式的所述多肽产生的多克隆抗体有免疫反应性。

据信芽孢杆菌 KJ59 属于已知菌种 *B. halodurans* 或者至少是与之非常相关的菌株，发明人已根据“用于专利程序的国际认可的微生物保藏布达佩斯条约”于 1998 年 9 月 21 日将其保藏在 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig，联邦德国，保藏号 DSM12419。

本发明在一个方面内提供了一种分离的多核苷酸分子，其选自(a)编码具有果胶酸裂解酶活性之多肽，并包含 SEQ ID NO: 7 中 124 到 1047 位核苷酸所示核苷酸序列的多核苷酸分子；(b)(a)的物种同系物；(c)编码具有果胶酸裂解酶活性、与 SEQ ID NO: 8 中 42 到 348 位氨基酸残基之序列至少 45%相同的多肽的多核苷酸分子；(d)与(a)、(b)或(c)互补的分子；以及(e)(a)、(b)、(c)或(d)的简并核苷酸序列。

本发明第六个方面涉及一种果胶酸裂解酶，它是 i)由具有 SEQ ID NO: 13 之 16S rDNA 的芽孢杆菌菌种产生的多肽或者由具有与 SEQ ID NO: 13 同源性在 98.1%以上的 16S rDNA 序列的芽孢杆菌菌种产生的多

肽; ii)包含 SEQ ID NO: 10 中 25-335 位所示的氨基酸序列的多肽; 或者 iii) i) 或 ii) 中限定的多肽的类似物, 其与所述多肽至少 45% 同源, 或者 iv)经取代、缺失或添加 1 或几个氨基酸而衍生自所述多肽, 条件是保留 227 位的精氨酸, 任选还保留 232 位的精氨酸, 并且衍生的多肽与所述多肽至少 41%同源, 或者 v)与针对纯化形式的所述多肽产生的多克隆抗体有免疫反应性。

本发明在一个方面内提供了一种分离的多核苷酸分子, 其选自: (a)编码具有果胶酸裂解酶活性之多肽, 并包含 SEQ ID NO: 9 中 73 到 1008 位核苷酸所示核苷酸序列的多核苷酸分子; (b)(a)的物种同系物; (c)编码具有果胶酸裂解酶活性、与 SEQ ID NO: 10 中 25 到 335 位氨基酸残基之序列至少 45%相同的多肽的多核苷酸分子; (d)与(a)、(b)或(c)互补的分子; 或(e)(a)、(b)、(c)或(d)的简并核苷酸序列。

包含编码本发明所述果胶酸裂解酶的多核苷酸分子(DNA 序列)的质粒 pSJ1678 已被转化到一株大肠杆菌中, 发明人已根据“用于专利程序的国际认可的微生物保藏布达佩斯条约”于 1998 年 9 月 8 日将该菌保藏在 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, 联邦德国, 保藏号 DSM12404。

本发明在另一个方面内提供了一种表达载体, 其中包含下列可操纵地连接在一起的元件: 转录启动子; DNA 片段, 其选自: (a)编码具有果胶酸裂解酶活性之多肽, 并包含 SEQ ID NO: 1 中 79 到 1077 位核苷酸所示核苷酸序列, 或 SEQ ID NO: 3 中 82 到 1026 位核苷酸所示核苷酸序列, 或 SEQ ID NO: 5 中 541 到 1530 位核苷酸所示核苷酸序列, 或 SEQ ID NO: 7 中 124 到 1047 位核苷酸所示核苷酸序列, 或 SEQ ID NO: 9 中 73 到 1008 位核苷酸所示核苷酸序列的多核苷酸分子; (b)编码具有果胶酸裂解酶活性之多肽的多核苷酸分子, 所述多肽与 SEQ ID NO: 2 中 27 到 359 位氨基酸残基, 或者 SEQ ID NO: 4 中 28 到 341 位氨基酸残基, 或者 SEQ ID NO: 6 中 181 到 509 位氨基酸残基, 或者 SEQ ID NO: 8 中 42 到 348 位氨基酸残基, 或者 SEQ ID NO: 10 中 25

到 335 位氨基酸残基的氨基酸序列至少 50%相同；或者(c)(a)或(b)的简并核苷酸序列；以及转录终止子。

在本发明另一个方面内提供了一种培养细胞，其中导入了如上公开的表达载体，该细胞表达所述 DNA 片段编码的多肽。

本发明的再一个方面提供了一种分离的具有果胶酸裂解酶活性的多肽，其选自：(a)具有果胶酸裂解酶活性并包含 SEQ ID NO: 2 中 27 到 359 位氨基酸残基所示氨基酸序列的多肽分子；(b)具有果胶酸裂解酶活性并与 SEQ ID NO: 2 中 27 到 359 位氨基酸残基所示氨基酸序列至少 45%相同的多肽分子；(c)具有果胶酸裂解酶活性并包含 SEQ ID NO: 4 中 28 到 241 位氨基酸残基所示氨基酸序列的多肽分子；(d)具有果胶酸裂解酶活性并与 SEQ ID NO: 4 中 28 到 241 位氨基酸残基所示氨基酸序列至少 45%相同的多肽分子；(e)具有果胶酸裂解酶活性并包含 SEQ ID NO: 6 中 181 到 509 位氨基酸残基所示氨基酸序列的多肽分子；(f)具有果胶酸裂解酶活性并与 SEQ ID NO: 6 中 181 到 509 位氨基酸残基所示氨基酸序列至少 50%相同的多肽分子；(g)具有果胶酸裂解酶活性并包含 SEQ ID NO: 8 中 42 到 348 位氨基酸残基所示氨基酸序列的多肽分子；(h)具有果胶酸裂解酶活性并与 SEQ ID NO: 8 中 42 到 348 位氨基酸残基所示氨基酸序列至少 45%相同的多肽分子；(i)具有果胶酸裂解酶活性并包含 SEQ ID NO: 10 中 25 到 335 位氨基酸残基所示氨基酸序列的多肽分子；(k)具有果胶酸裂解酶活性并与 SEQ ID NO: 10 中 25 到 335 位氨基酸残基所示氨基酸序列至少 45%相同的多肽分子；或(l)(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)、(i)或(k)的物种同系物。

在本发明的另一个方面内，提供了一种包含本发明所述纯化果胶酸裂解酶与其他具有酶活性的多肽的组合物。

在本发明的另一个方面内，提供了一种制备本发明所述多肽的方法，该方法包括培养其中已导入以上公开的表达载体的细胞，据此所述细胞表达该 DNA 片段所编码的多肽，以及回收多肽。

本发明的新型果胶酸裂解酶可用于处理纤维素材料，尤其是含有

纤维素的纤维、纱线、机织或非机织物，处理机械造纸纸浆或循环废纸，以及浸解织物。所述处理过程可以在将纤维素材料加工为准备制作衣物或制作织物的材料时进行，例如在退浆或精练步骤进行；或者在工业或家庭洗涤这些织物或衣物时进行。

相应地，本发明的另一个方面涉及包含具有显著果胶酸裂解酶活性的酶的洗涤剂组合物；以及本发明的酶用于处理含有纤维素的纤维、纱线、机织或非机织织物的用途。

本发明的果胶酸裂解酶能非常有效地用于制备纤维素材料的酶促精练工艺中，以便例如在随后的染色操作中达到适当的响应。另外，预计包含该新果胶酸裂解酶的洗涤剂组合物能去除或漂白衣物上的某些污垢或污渍，尤其是含有半乳聚糖或阿拉伯半乳聚糖的食物、植物等造成的污垢和斑点。还预计用包含该新酶的洗涤剂组合物进行的处理能防止某些污垢结合到纤维素材料上。本发明的酶还可用作硬表面清洁组合物的成分，所述组合物具有从需要清洗的硬表面上去除或协助去除某些污垢或污渍的效能。

附图简述

图 1 显示 SEQ ID NO: 2、4、6、8 和 10 之氨基酸序列的成熟部分的序列比对，比对编号 1 至 344。例如，比对编号的 223 位对应 SEQ ID NO: 2 的 240 位， SEQ ID NO: 4 的 233 位、SEQ ID NO: 6 的 390 位、SEQ ID NO: 8 的 240 位和 SEQ ID NO: 10 的 227 位。

图 2 的曲线图表明 pH 和温度对用热稳定性果胶酸裂解酶从棉织物上去除果胶效果的影响。果胶的去除表示为%残存果胶。果胶酸裂解酶以 100μmol/min/kg 织物的量施加给织物。

图 3 的曲线图表明热稳定性果胶酸裂解酶的用量对从棉织物上去除果胶效果的影响。果胶的去除表示为%残存果胶，用量为 μmol/min/kg 纤维。将果胶酸裂解酶在 pH9 和 80℃施加给织物。

定义

在更详细讨论本发明之前，首先定义以下术语:

术语“正同系物”(ortholog)(或“物种同系物”)代表从一个物种得到的，与得自一个不同物种的类似多肽或蛋白质有同源性的多肽或蛋白质。

术语“副同系物”(paralog)表示从一个给定物种得到的，与得自相同物种的不同多肽或蛋白质有同源性的多肽或蛋白质。

术语“表达载体”表示线性或环形的DNA分子，其中包含一个编码目的多肽的片段及与之可操纵地连接在一起用于其转录的附加片段。所述附加片段可以包括启动子和终止子序列，还可以任选包括1或多个复制原点、1或多个选择标记、增强子、多聚腺苷酸化信号等。表达载体通常来源于质粒或病毒DNA，或者可以含有这两类元件。本发明的表达载体可以是能方便地进行重组DNA操作的任何表达载体，载体的选择经常取决于该载体将要导入的宿主细胞。因此，载体可以是自主复制的载体，即以染色体外个体存在的载体，其复制独立于染色体的复制，例如质粒。可选择地，载体可以是当导入宿主细胞时，能整合到宿主细胞基因组中并与所整合的染色体一起复制的载体。

用于本文与多肽或蛋白质的表达相关的术语“重组体表达的”或“重组地表达的”是根据本领域的标准定义来限定的。重组地表达蛋白质通常是利用如上面刚刚描述的表达载体进行的。

术语“分离的”，用于多核苷酸分子时，表示该多核苷酸已被移离其天然遗传环境，因此不含其他外源或不需要的编码序列，并处于一种适用于基因工程化蛋白质表达系统的形式。这种分离的分子是那些脱离天然环境的分子，包括cDNA和基因组克隆。本发明的分离的DNA分子不含在通常情况下与之相关联的其他基因，但可以包括天然的5'和3'非翻译区，比如启动子和终止子。相关联区域的鉴定对本领域技术人员是显而易见的(参见例如，Dynan和Tijan，自然316: 774-78，1985)。术语“分离的多核苷酸”可以替代地称为“克隆的多核苷酸”。

当用于蛋白质/多肽时，术语“分离的”表示该蛋白质存在于其天然环境以外的情况下。在优选状态下，分离的蛋白质实质上不含其他蛋

白质，尤其是其他同源蛋白质(即同源杂质，见下文)。优选以纯度在40%以上的形式提供蛋白质，更优选纯度在60%以上的形式。

甚至更优选的是以高度纯化形式提供所述蛋白质，即由 SDS-PAGE 确定的80%以上纯，更优选95%以上纯，还要优选的是99%以上纯。

术语“分离的蛋白质/多肽”可以替代地称为“纯化的蛋白质/多肽”。

术语“同源杂质”意味着任何来源于最初获得本发明所述多肽的同源细胞的杂质（如本发明多肽以外的其它多肽）。

用于本文与特定微生物来源联系在一起的术语“得自”，意味着多核苷酸和/或多肽由该特异来源产生，或者由其中插入了该来源的基因的细胞产生。

用于本文与特定微生物来源联系在一起的术语“内源”意味着多肽是由该特定来源中存在的一个天然基因，即一个并非重组地插入该来源的细胞中的基因而产生的。

术语“可操纵地连接在一起”指示 DNA 片段时，表示这些片段被排列成能一致地发挥其预期目的的形式，例如，在启动子内起始转录并通过编码片段到达终止子。

术语“多核苷酸”表示脱氧核糖核酸或核糖核酸碱基的从 5’到 3’读码的单或双链聚合物。多核苷酸包括 RNA 和 DNA，可以分离自天然来源，体外合成或者由天然和合成分子的组合形式来制备。

术语“多核苷酸分子的互补物”表示与参照序列相比，具有互补碱基序列并方向相反的多核苷酸分子。例如，序列 5’ATGCACGGG3’与 5’CCCGTGCAT3’互补。

术语“简并核苷酸序列”表示包括 1 或多个简并密码子的核苷酸序列(与编码多肽的多核苷酸参照序列相比)。简并密码子含有不同的核苷酸三联体，但编码相同的氨基酸残基(即 GAU 和 GAC 三联体均编码 Asp)。

术语“启动子”表示基因的一部分，它含有提供 RNA 聚合酶结合和起始转录的 DNA 序列。启动子序列通常，但并不总是，位于基因的 5’非编码区。

术语“分泌信号序列”表示编码多肽(“分泌肽”)的 DNA 序列，该

多肽作为一更大多肽的一个成分，引导该更大多肽通过多肽在其中进行合成的细胞的分泌途径。通常更大的多肽在经过分泌途径转运的过程中被切割以去除分泌肽。

术语“果胶”表示果胶酸、多聚半乳糖醛酸和可能被更高或更低程度酯化的果胶。

术语 “果胶酶”表示根据本领域定义的果胶酶酶类，它们是能切割果胶类物质(主要是多聚 1，4-α-D-半乳糖醛酸和它们的衍生物)中糖苷键的一组酶(参见 Sakai 等，果胶、果胶酶和原果胶酶：生产、性质和应用，213-294 页，应用微生物学进展，39，1993)。

优选本发明的果胶酶是一种催化经反式消除来随机切割果胶酸(又称为多聚半乳糖醛酸)中的α-1，4 糖苷键的果胶酶，比如多聚半乳糖醛酸裂解酶类(EC4.2.2.2)(PGL)，又称为多聚(1，4-α-D-半乳糖醛酸酐)裂解酶，又称为果胶酸裂解酶。

发明详述

如何用本发明的序列得到其他相关序列：本文公开的涉及编码发明所述果胶酸裂解酶的多核苷酸序列的序列信息可以用来作为鉴定其他同源果胶酸裂解酶的工具。例如，可以用聚合酶链反应(PCR)从各种微生物来源，尤其是不同的芽孢杆菌菌种来扩增编码其他同源果胶酸裂解酶的序列。

多核苷酸:

在本发明的优选实施方案中，本发明所述分离的多核苷酸能在至少是中等严谨条件下与 SEQ ID NO: 1、3、5、7 或 9 中的类似大小的区域分别杂交，或者与其互补序列杂交。

具体来说，本发明的多核苷酸能在至少中度严谨条件下，但优选能在以下描述的高严谨条件下，与包含 SEQ ID NO: 1 中 79-1077 位、SEQ ID NO: 3 中 82-1026 位、SEQ ID NO: 5 中 541-1530 位、SEQ ID NO: 7 中 124-1047 位或 SEQ ID NO: 9 中 73-1008 位所示的全长序列(编码多肽的成熟部分)的变性双链 DNA 探针杂交，或者与包含 SEQ ID NO:

1、3、5、7 或 9 的亚序列的任何探针杂交，测定核苷酸探针和同源 DNA 或 RNA 序列之间在中等或高严谨度条件下的杂交情况的合适实验条件包括将含有待杂交的 DNA 片段或 RNA 的膜在 5 ×SSC(氯化钠/柠檬酸钠，Sambrook 等，1989)中预浸泡 10 分钟，并将膜在 5 ×SSC、5 ×Denhardt's 溶液(Sambrook 等，1989)、0.5%SDS 和 100μg/ml 超声变性鲑精 DNA（SambrooR 等，1989）的溶液中预杂交，然后于约 45℃在含有浓度为 10ng/ml 的随机引发（Feinberg A.P.和 Vogelstin B.(1983)分析生化 132: 6-13）、^{32}P-dCTP 标记的探针（比活度高于 1 ×10^9cpm/μg）的相同溶液中杂交 12 小时。然后将膜在 2 ×SSC、0.5%SDS 中于至少 60℃(中等严谨度)，更优选在至少 65℃(中等/高严谨度)、更优选在至少 70℃(高严谨度)，还要优选的是在至少 75℃(极高严谨度)洗两次，每次 30 分钟。

用 X-光胶片检测寡核苷酸探针在这些条件下杂交上的分子。

如先前提到的，本发明的分离的多核苷酸包括 DNA 和 RNA。分离 DNA 和 RNA 的方法是本领域公知的。可以利用本领域已知的方法从 Gene Banks 或 DNA 文库中克隆目的 DNA 和 RNA 编码基因。

然后可以通过例如杂交或 PCR 来鉴定和分离本发明所述编码具有果胶酸裂解酶活性之多肽的多核苷酸。

本发明还提供了来自不同细菌菌株的相应多肽和多核苷酸(正同系物或副同系物)。尤其有意义的是来自革兰氏阳性嗜碱菌株，包括芽孢杆菌菌种的果胶酸裂解酶多肽。

可以利用本发明提供的信息和组合物，结合常规克隆技术来克隆具有本发明所述果胶酸裂解酶活性的多肽的物种同系物。例如，可以用得自表达该蛋白质的细胞类型的染色体 DNA 克隆 DNA。可以通过用从本文公开的序列设计的探针检测 Northern 印迹来鉴定合适的 DNA 来源。然后从阳性细胞系的染色体 DNA 制备文库。然后可以通过多种方法，比如用完整或部分 DNA 或者基于公开序列的 1 或多组简并探针进行探测来分离出编码具有本发明所述果胶酸裂解酶活性之多肽的 DNA。还可以用由本文公开的序列设计的引物，利用聚合酶链反应或 PCR(Mullis，美国专利 4683202)来克隆 DNA。在另外的方法中，可以用 DNA 文库转化或转染宿主细胞，并

可以用抗克隆自地衣芽孢杆菌 ATCC14580 的果胶酸裂解酶、克隆自 *B. agaradhaerens* NCIMB40482 的果胶酸裂解酶、或者克隆自芽孢杆菌菌种 AAI12(根据其列于 SEQ ID NO: 14 的 16S rDNA 序列鉴定）的果胶酸裂解酶、或者克隆自芽孢杆菌 KJ59、DSM12419 的果胶酸裂解酶、或者克隆自芽孢杆菌 I534(根据其列于 SEQ ID NO: 13 的 16S rDNA 序列鉴定）的果胶酸裂解酶（所有这些果胶酸裂解酶如材料与方法以及实施例所述进行表达和纯化)的抗体(单克隆或多克隆)来检测目的 DNA 的表达，或者通过与具有果胶酸裂解酶活性的多肽相关的活性测定来检测表达。类似的技术也可以应用于分离基因组克隆。

克隆到存在于大肠杆菌 DSM11789 中的 pSJ1678 质粒中的本发明 DNA 序列之多肽编码部分和/或类似 DNA 序列可以克隆自能产生果胶酸裂解酶的地衣芽孢杆菌菌株，优选是菌株 ATCC14580，或者如本文描述的另外一个或相关生物。

类似地，克隆到存在于大肠杆菌 DSM11789 中的质粒 pSJ1678 中的本发明所述 DNA 序列的多肽编码部分和/或类似 DNA 序列可以克隆自产生果胶酸裂解酶的芽孢杆菌菌种 *B. agaradhaerens*，其典型菌株是 DSM8721，或者克隆自如本文描述的另外一个或相关生物。同样，分别克隆到存在于大肠杆菌 DSM12403 和 DSM12404 中的质粒 pSJ1678 中的本发明所述 DNA 序列的多肽编码部分和/或类似 DNA 序列可以克隆自产生果胶酸裂解酶的芽孢杆菌 AAI12、芽孢杆菌 KJ59 欺欺人 DSM12419 或芽孢杆菌 I534，或者如本文描述的另外一个或相关生物。

可选择地，可以在可从大肠杆菌 DSM11788、11789、DSM12403 以及 12404 中存在的质粒获得的 DNA 序列的基础上构建类似序列，例如其亚序列，和/或通过导入不会使 DNA 序列编码果胶酸裂解酶的另一氨基酸序列，但符合预期用于产生所述酶的宿主生物的密码子使用习惯的核苷酸取代，或者通过导入可以产生不同氨基酸序列(即本发明所述果胶酸裂解酶的变体)的核苷酸取代构建类似序列。

基于本文公开的序列信息，可以克隆一个编码本发明所述果胶酶，并分别包含 SEQ ID NO: 1、3、5、7 或 9 所示 DNA 序列的全长 DNA 序

列。

通过本领域已知的标准操作进行克隆，比如通过

从芽孢杆菌菌株制备基因组文库;

将该文库铺适当的底物平板;

鉴定包含本发明所述多核苷酸序列的克隆: 方法是利用分别基于 SEQ ID NO: 1、3、5、7 或 9 的探针通过标准杂交技术; 或者通过利用分别基于 SEQ ID NO: 1、3、5、7 或 9 的序列信息的探针经反向 PCR 策略鉴定来自地衣芽孢杆菌 ATCC14580 或 *B. agaradhaerens* DSM8721 或高度相关的芽孢杆菌基因组文库的克隆。涉及反向 PCR 的细节可参考 M. J. MCPherson 等("PCR 实用方法"Information Press Ltd, Oxford England)。

基于本文公开的序列信息(SEQ ID NO: 1、2、3、4、5、6、7、8、9 和 10)，对本领域技术人员来说，通过类似的策略，使用来自相关微生物的基因组文库，尤其是来自芽孢杆菌属其他菌株 (比如枯草芽孢杆菌) 的基因组文库来分离编码本发明所述同源果胶酶的同源多核苷酸序列是一项常规工作。

可选择地，根据公知步骤，通过使用合成寡核苷酸探针可以从合适的来源(比如任何以下提及的生物)克隆编码本发明所述果胶酸裂解酶的 DNA，所述探针是在可得自大肠杆菌 DSM11788、11789、DSM12403 或 DSM12404 中的质粒之 DNA 序列的基础上制备的。

相应地，可以从大肠杆菌 DSM11788、DSM11789、DSM12403 或 DSM12404 中分离本发明的多核苷酸分子，在这些菌中保藏了如上所述通过克隆得到的质粒。此外，本发明涉及大肠杆菌 DSM11788、DSM11789、DSM12403 以及 DSM12404 的各自分离的基本上纯的培养物。

多肽:

SEQ ID NO: 2 的 27-359 位氨基酸序列是成熟的果胶酸裂解酶序列; 1-26 位是前肽; SEQ ID NO: 4 的 28-341 位氨基酸序列是成熟的果胶酸裂解酶序列; 1-27 位是前肽。SEQ ID NO: 6 的 181-509 位氨基酸

序列是成熟的果胶酸裂解酶序列；1-31 位是转运肽、32-86 位是第 1 个凝集素结构域、87-134 位是第 2 个凝集素结构域、135-180 是第 3 个凝集素结构域。SEQ ID NO: 8 的 42-348 位氨基酸序列是成熟的果胶酸裂解酶序列；1-41 位是前肽。SEQ ID NO: 10 的 25-335 位氨基酸序列是成熟的果胶酸裂解酶序列、1-24 位是前肽。据信本发明的果胶酸裂解酶属于多糖裂解酶家族 1。

本发明还提供了与 SEQ ID NO: 2 、4 、6、8 和 10 的多肽以及它们的物种同系物(副同系物或正同系物)基本上同源的果胶酸裂解酶多肽。术语“基本上同源”用于本文表示与 SEQ ID NO: 2 、4 、6、8 和 10 所示序列，或者这些序列的副同系物或正同系物具有至少 45%、优选至少 50%，优选至少 60%，更优选至少 70%，更优选至少 85%，还要优选的是至少 90%序列相同性的多肽。更优选这些多肽与 SEQ ID NO: 2 、4 、6、8 和 10 所示序列，或者这些序列的副同系物或正同系物至少 95%相同，最优选 98%或更多相同。序列相同百分比是通过常规方法，利用本领域已知的计算机程序，比如 GCG 程序包(Program Manual for Wisconsin Package, 8 版, 1994 年 8 月, Genetic Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA53711)中提供的 GAP，按照 Needleman S.B.和 Wunsch, C.D.(1970)(分子生物学杂志 48: 443-453，该文此处全文引作参考)公开的进行测定的。使用参数如下的 GAP 进行多肽序列比较：GAP 形成罚分 3.0，GAP 延伸罚分 0.1。

通过类似方法，利用参数如下的 GAP 进行 DNA 序列比较来确定多核苷酸分子的序列相同性：GAP 形成罚分 5.0，GAP 延伸罚分 0.3。

包含独特的第一氨基酸序列 NLNSRVP(该序列被认为是独特的，因此足够用来鉴定任何属于本发明所述新果胶酸裂解酶族的果胶酸裂解酶)，在纺织品处理和洗涤衣物等工业工艺中效果良好的本发明果胶酸裂解酶，优选来自微生物，更优选来自细菌、古细菌（archea）或真菌，特别是来自属于芽孢杆菌、优选嗜碱芽孢杆菌菌株的细菌，所述菌株选自地衣芽孢杆菌、*B. agaradhaerens*、*B. halodurans* 和芽孢杆菌菌种 I543 和 AAI12(通过分别列为 SEQ ID NO: 13 和 14 的 16S rDNA

序列鉴定的)、以及基于以下解释的 16S rDNA 序列比对与这些菌种中任一高度相关的其它芽孢杆菌菌种，优选与这些菌种中任一个至少97%、更优选至少 98%同源的菌种。

这些高度相关的芽孢杆菌菌种是在利用已公开的 16S rDNA 序列比对(可以通过 ARB 序列数据库获得，97 年 3 月 4 日公开，可从 http://www.biol.chemie.tumuenchen.de/pub/ARB/data/获得)鉴定的系统发生关系的基础上发现的。利用 ARB 程序包(Strunck,O 和 Ludwig, W.1995, ARB--一种用于序列数据的软件环境，微生物学系，Munich 大学，Munich，德国。Email 地址 arb@mikro.biologie.tu-muenchen.de, 或者可以经 www 在 http://www.biol.chemie.tumuenchen.de/pub/ARB/获得)进行序列分析。比对依据的是二级结构，利用 ARB 比对(ARB-EDIT4)包括人工评价的自动比对功能(2.0 版)进行。

利用 ARB 程序包中带有的 Phylip Distance Matrix option(缺省设置，即无校正值)，通过将距离转换为序列相似百分比来建立序列相似性。相应地，与地衣芽孢杆菌 ATCC14580 最相关的菌种是枯草芽孢杆菌；与芽孢杆菌 KJ59，DSM12419 最相关的菌种是 *B.halodurans*, DSM8718(16S 数据 X76442)，这两个菌株非常相近，以至认为菌株 KJ59 是该种的一个菌株；与芽孢杆菌 AAI12 最相关的菌种是 B.alcalophilus DSM485(16S 数据 X76436)，它显示 16S 同源性为 97.3%；与芽孢杆菌 I534 最相关的菌种是芽孢杆菌 PN1；DSM8714(16S 数据 X76438)，显示 16S 同源性为 98.1%。

使用缺省值(没有筛选程序（filter）和加权掩码（weighting mask)),利用 ARB 程序通过最大可能性法(FastDnaML 算法,G.J.Olsen, H.Matsuda, R.Hagstrom 和 R.Overbeek. fastDNAml:利用最大可能性构建 DNA 序列系统发生树的工具，计算机应用生物学 10(1): 41-48, 1994)来计算系统发生树。

基本上同源的蛋白质和多肽特征在于有 1 或多个氨基酸取代、缺失或添加。优选这些变化是较小的变化，即保守性取代(见表 2)和其

他不会显著影响蛋白质或多肽折叠或活性的取代；小的缺失，通常是1至大约30个氨基酸的缺失；以及小的氨基端和羧基端延伸，比如氨基端甲硫氨酸残基，多达约20-25个残基的小连接肽，或者协助纯化的小延伸(亲合标记)，比如多组氨酸序列段，蛋白A(Nilsson等，EMBO杂志4：1075，1985；Nilsson等，酶学方法198：3，1991)。总的参见Ford等，蛋白质表达和纯化2：95-107，1991，该文此处全文引作参考。编码亲合标记的DNA可从供应商(例如，Pharmacia、Biotech、Piscataway，NJ；New England Biolabs，Beverly，MA)那里获得。

但是，虽然以上描述的变化优选是小的变化，但这种变化也可以是更大的变化，比如高达300个氨基酸或以上的更大多肽作为氨基或羧基端延伸与本发明所述果胶酸裂解酶多肽融合在一起。

表1

保守性氨基酸取代

碱性氨基酸：	精氨酸
	赖氨酸
	组氨酸
酸性氨基酸：	谷氨酸
	天冬氨酸
极性氨基酸：	谷氨酰胺
	天冬酰胺
疏水性氨基酸：	亮氨酸
	异亮氨酸
	缬氨酸
芳香族氨基酸：	苯丙氨酸
	色氨酸
	酪氨酸
小氨基酸：	甘氨酸
	丙氨酸
	丝氨酸

苏氨酸

甲硫氨酸

除了 20 种标准氨基酸外，还可以用非标准氨基酸(比如 4-羟基脯氨酸、6-N-甲基赖氨酸、2-氨基异丁酸、异缬氨酸和α-甲基丝氨酸)取代本发明所述多肽的氨基酸残基。氨基酸残基可以被少数非保守性氨基酸、不由遗传密码编码的氨基酸以及非天然氨基酸取代。“非天然氨基酸”在蛋白质合成后被修饰过，和/或在其侧链有与标准氨基酸不同的化学结构。非天然氨基酸可以化学合成，或者优选有商品销售，包括六氢吡啶羧酸、噻唑烷羧酸、脱氢脯氨酸、3-和 4-甲基脯氨酸以及 3，3-二甲基脯氨酸。

本发明所述果胶酸裂解酶多肽中的关键氨基酸可以根据本领域已知步骤来鉴定，比如定点诱变或者丙氨酸扫描诱变(Cunningham 和 Wells，科学 244: 1081-1085，1989)。在后一项技术中，在分子的每个残基处导入单个丙氨酸突变，并检测所得突变分子的生物活性(即果胶酸裂解酶活性)，从而鉴定到对分子活性比较重要的氨基酸残基。还可参见，Hilton 等，生物学化学杂志 271: 4699-4708，1996。也可以通过对结构进行物理分析来确定酶或其他生物学相互作用的活性部位，比如通过核磁共振、晶体学、电子衍射或光亲合标记等技术，结合对推测接触部位的氨基酸进行的突变来确定。参见，例如 de Vos 等，科学 255: 306-312，1992; Smith 等，分子生物学杂志 224: 899-904，1992; Wlodaver 等，FEBS 快报 309: 59-64，1992。关键氨基酸的鉴定也可以从对与本发明所述多肽有关的多肽进行的同源性分析来推断。

可以利用已知的诱变、重组和/或重排方法以及随后的适当筛选措施来制备和检测多重氨基酸取代，比如 Reidhaar-Olson 和 Sauer(科学 241: 53-57，1988)、Bowie 和 Sauer(美国科学院学报 86: 2152-2156，1989)、WO95/17413 或者 WO95/22625 中公开的方法。简而言之，这些作者公开了同时使多肽中的 2 或多个位点随机化的方法，或者不同突变的重组/重排方法(WO95/17413、WO95/22625)，随后选择功能多肽，然后将突变的多肽进行测序以便确定每个位点的可行取代范围。其他可用的方

法包括噬菌体展示(例如，Lowman 等，生物化学 30: 10832-10837，1991; Ladner 等，美国专利 5223409; Huse，WIPO 公开文本 WO92/06204)和区域定向诱变(Derbyshire 等，基因 46: 145，1986; Ner 等，DNA7: 127，1988)。

以上公开的诱变/重排方法可以与高通量的自动筛选方法结合起来以检测宿主细胞中已克隆、诱变的多肽的活性。可以从宿主细胞中回收编码活性多肽的突变 DNA 分子并用现代仪器快速测序。这些方法使得能迅速确定目的多肽中单个氨基酸残基的重要性，并能用于结构未知的多肽。

使用上面讨论的方法，本领域技术人员可以鉴定和/或制备多种多肽，所述多肽与 SEQ ID NO: 2 的 27 到 359 位残基、SEQ ID NO: 4 的 28 到 341 位残基、SEQ ID NO: 6 的 181 到 509 位残基、SEQ ID NO: 8 的 42 到 348 位残基以及 SEQ ID NO: 10 的 25 到 335 位残基之序列基本上同源，并且保留野生型蛋白质的果胶酸裂解酶活性。

本发明的这种变体是在相对图 1 中序列比对的编号的 223 位具有精氨酸的果胶酸裂解酶。在一个优选实施方案中，这种变体在相对图 1 中序列比对之编号的 228 位还有一个保守精氨酸。相应地，本发明涉及果胶酸裂解酶，该酶具有经缺失、取代或添加 1 或多个氨基酸残基(以下称为突变)而衍生自 SEQ ID NO: 2、4、6、8 或 10 氨基酸序列的氨基酸序列，条件是该果胶酸裂解酶活性未被失活并且突变保留了图 1 中比对的序列编号 223 位的精氨酸，任选还保留 228 位的精氨酸。这些位置对应于 SEQ ID NO: 2 中的 240 和 245 位，SEQ ID NO: 4 中的 233 和 238 位，SEQ ID NO: 6 中的 390 和 395 位，SEQ ID NO: 8 中的 240 和 245 位，SEQ ID NO: 10 中的 227 和 232 位的精氨酸(R)。

另外，除了以上的保守精氨酸，优选突变保留了第 169 位的天冬氨酸(D)和/或 173 位的天冬氨酸(D)和/或 193 位的赖氨酸(K)(图 1 之比对的序列编号)。这些位置对应于 SEQ ID NO: 2 中 186 和 190 位的天冬氨酸(D)以及 210 位的赖氨酸(K)，SEQ ID NO: 4 中的 D180、D184 和 K204，SEQ ID NO: 6 中的 D336、D340 和 K360 位，SEQ ID NO: 8

中的 D187、D191 和 K211 位，SEQ ID NO: 10 中的 D174、D178 和 K198 位。在本发明另外一个实施方案中，提供了 SEQ ID NO: 2、4、6、8 和 10 列出的任何氨基酸序列之亲本成熟多肽的突变体，这些突变体是活性果胶酸裂解酶，并且以上指定位置的天冬氨酸被选自谷氨酸(E)、丝氨酸(S)和苏氨酸(T)的氨基酸残基取代，即具有下列突变：D169E、D169S、D169T、D173E、D173S、D173T(图 1 对比编号)。

同时，突变程度没有具体限定，条件是保留上述 223 位的精氨酸。优选地，这些天然或亲本果胶酸裂解酶的突变变体之间的同源性(由 SEQ ID NO: 2、4、6、8 和 10 任一序列计算得到)为 40%或更高：与 SEQ ID NO: 2 的 39 到 359 位氨基酸之间以及与 SEQ ID NO: 4 的 46 到 341 位氨基酸之间同源性为 42%或更高；与 SEQ ID NO: 6 的 187 到 509 位氨基酸之间同源性为 44%或更高；与 SEQ ID NO: 8 的 50 到 348 位氨基酸之间同源性为 40%或更高；与 SEQ ID NO: 10 的 40 到 335 位氨基酸之间同源性为 41%或更高。优选，同源性至少 45%，优选至少 50%，更优选至少 55%，更优选至少 60%，还要优选的是至少 70%，更优选至少 75%，更优选至少 80%，更优选至少 85%，更优选至少 90%，更优选至少 95%，特别是至少 98%。

除了包含催化结构域的酶核心，本发明的果胶酸裂解酶还可以含有纤维素结合结构域(CBD)，所述纤维素结合结构域与酶核心(催化活性结构域)可操纵地连接在一起。纤维素结合结构域可以以所编码酶的组成部分而存在，或者可以将另一来源的 CBD 导入果胶降解酶从而形成杂合酶。在本文中，术语“纤维素结合结构域”应按照 Peter Tomme 等(“纤维素结合结构域：分类和特性”，《不溶性碳水化合物的酶法降解》，John N. Saddler 和 Michael H. Penner(编)，ACS 论文集，No. 618，1996)的定义来理解。该定义方法将 120 多个纤维素结合结构域分为 10 个家族(I-X)，并表明在各种酶，比如纤维素酶、木聚糖酶、甘露聚糖酶、阿拉伯呋喃糖苷酶、乙酰酯酶和几丁质酶中都发现了 CBD。CBD 还可见于藻类，例如在红藻 Porphyra purpurea 中是一种非水解性的多糖结合蛋白质，见 Tomme 等，出处同前。但是，大多数 CBD 来自纤维素酶和木聚糖酶，CBD

存在于蛋白质的氨基或羧基端或者在内部。杂合酶是本领域已知的，参见例如WO90/00609和WO95/16782，还可以这样来制备：将包含至少一个编码纤维素结合结构域的DNA片段以及通过或不通过接头与之连接在一起的果胶降解酶编码DNA序列的DNA构建体转化到宿主细胞中，培养宿主细胞以表达融合基因。杂合酶可以用下式描述：

CBD-MR-X

其中CBD是对应至少纤维素结合结构域的氨基酸序列的氨基或羧基端区域；MR是中间区域(接头)，也可以是一个键，或者短的连接基团，该基团优选大约2到100个碳原子，更优选2到40个碳原子；或者优选是大约2到100个氨基酸，更优选2到40个氨基酸；X是本发明所述果胶降解酶的氨基或羧基端区域。

优选本发明的酶在pH至少为8时有最佳催化活性，更优选在pH8.5以上，更优选在pH9以上，更优选在pH9.5以上，更优选在pH10以上，还要优选的是在pH10.5以上，尤其是pH11以上时有最佳催化活性；并且优选在至少50℃，更优选在至少55℃达到酶的最佳活性。

蛋白质制备

本发明的多肽，包括全长蛋白质，其片段和融合蛋白质，可以依照常规技术在基因工程化的宿主细胞中产生。合适的宿主细胞是那些能用外源DNA转化或转染并培养生长的细胞类型，包括细菌、真菌细胞和培养的更高等真核细胞。优选细菌细胞，尤其是革兰氏阳性生物的培养细胞。尤其优选来自芽孢杆菌属的革兰氏阳性细胞，比如枯草芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、短芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、嗜碱芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、环形芽孢杆菌、灿烂芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、*B. agaradhaerens*或地衣芽孢杆菌。

Sambrook等，分子克隆：实验指南，第2版，Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989; Ausubel 等(编)，现代分子生物学方法，John Wiley和Sons, Inc. NY, 1987；以及“枯草芽孢杆菌和其他革兰氏阳性细菌”Sonensheim 等, 1993, 美国微生物学

会，Washington D.C.(此处全文引作参考)公开了操作克隆DNA分子和将外源DNA导入各种宿主细胞的技术。

一般来说，编码本发明所述果胶酸裂解酶的DNA序列与其他为其表达所需的遗传元件在表达载体中可操纵地连接在一起，通常包括转录启动子和终止子。尽管本领域技术人员会认识到在某些系统中，选择标记可以在不同载体上提供，并且外源DNA的复制可以由整合到宿主细胞基因组来提供，但载体通常还含有1或多个选择标记和1或多个复制原点。启动子、终止子、选择标记、载体以及其他元件的选择对本领域技术人员来说是一项常规工作。许多这种元件在文献中已有描述，并可由供应商提供。

为了引导多肽进入宿主细胞的分泌途径，可在表达载体中提供一个分泌信号序列(又称为前导序列、前原序列或前序列)。分泌信号序列可以是多肽的序列，或者可以来源于另一分泌蛋白质或者是从头合成的。许多合适的分泌信号序列是本领域已知的，关于合适的分泌信号序列，尤其是用于芽孢杆菌宿主细胞中进行分泌的信号序列的更详细描述参见“枯草芽孢杆菌和其他革兰氏阳性细菌”(Sonensheim等,1993，美国微生物学会，Washington D.C.)和Cutting，S.M.(编)“芽孢杆菌的分子生物学方法”(John Wiley和Sons,1990)。分泌信号序列以正确读框与DNA序列连接。尽管某些信号序列可以位于目的DNA序列的其他位置，但通常它位于编码目的多肽的DNA序列的5'(参见例如，Welch等，美国专利5037743；Holland等，美国专利5143830)。

根据常规操作，将被转化或转染的宿主细胞培养在含有营养物和为所选宿主细胞生长所需的其他成分的培养基中。各种合适的培养基，包括确定成分培养基和复合培养基，是本领域已知的，通常包括碳源、氮源、基本氨基酸、维生素和矿物质。根据需要，培养基还可以含有生长因子或血清等成分。通常利用生长培养基选择含有外源加入的DNA的细胞，这是通过例如药物选择或者在培养基中缺乏可被表达载体携带或共转染到宿主细胞的选择标记所补偿的必需营养物达到的。

本发明的多肽还可以通过发酵属于芽孢杆菌属的野生型菌株来制

备，优选所述菌株选自地衣芽孢杆菌、*B. agaradhaerens* 及其高度相关的芽孢杆菌菌种，其中所有菌种与地衣芽孢杆菌至少 95%同源(基于 16S rDNA 序列比对)。具体和极其优选的实例是地衣芽孢杆菌 ATCC14580 和 *B. agaradhaerens* DSM8721。

另外，本发明的多肽可以通过发酵由以上提及的菌株衍生的突变体或变异体来制备。可以使用常规诱变技术，通过将研究菌株用诱变剂(例如 NTG(N-甲基-N-硝基-N-亚硝基胍))或紫外线处理，例如按照普通细菌学方法指南，ASM1981，13 章所描述的来获得所述突变体。进行这些诱变以便刺激菌株的突变。诱变后，利用常规的铺板检测或液体检测法有可能筛选到果胶酶产量更高的突变体。

可以通过于有氧条件下，在含有碳和氮源以及其他必要营养物质的营养基质中培养所述菌株来进行发酵，该培养基可根据已知工艺配制。培养基可以是复合丰富培养基或基本培养基。氮源可以是无机和/或有机种类的。合适的无机氮源是硝酸盐和铵盐。有机氮源中有许多经常用于发酵。实例是大豆粉、酪蛋白、玉米、玉米浸液、酵母提取物、尿素和白蛋白。合适的碳源是碳水化合物或含有碳水化合物的物质。优选营养基质中含有果胶酸、多聚半乳糖醛酸和/或更高或更低程度酯化的果胶作为碳源，和/或果胶酶产生诱导物。可选择地，培养基含有富含果胶的物质，比如大豆粉、苹果浆或柑橘皮。

由于本发明的芽孢杆菌菌种是嗜碱的，故优选在碱性 pH 值进行培养，比如在至少 pH 8 或至少 pH 9 进行，这可以通过在将生长培养基灭菌后添加合适的缓冲液(比如碳酸钠或碳酸钠和碳酸氢钠的混合物)来实现。

预计野生型菌株或突变体在合适培养基中的发酵能得到至少是 0.5g 果胶酶蛋白质/升培养液，或者甚至至少 1g/l 或 2g/l。

蛋白质分离:

如果被表达的重组多肽被分泌出来，则可以从生长基质中纯化多肽。优选在纯化多肽前从培养基中除去表达宿主细胞(例如通过离心)。

如果被表达的重组多肽不被分泌到宿主细胞之外，则优选将宿主细

胞破碎，多肽释放到提取液中，这是这类纯化技术的第一个阶段。优选在破碎细胞前从培养基中取出表达宿主细胞(例如通过离心)。

可以通过常规技术来破碎细胞，比如通过溶菌酶消化或使细胞受到高压。这类细胞破碎技术细节参见Robert K. Scobes,蛋白质纯化，第2版，Springer-Verlag。

无论被表达的重组多肽(或嵌合多肽)是否被分泌，都可以利用分级分离和/或常规的纯化方法和介质来纯化。

可以使用硫酸铵沉淀和酸或离液剂抽提来分级分离样品。典型的纯化步骤可以包括羟磷灰石、体积排阻、FPLC和反相高效液相层析。合适的阴离子交换介质包括衍生化葡聚糖、琼脂糖、纤维素、聚丙烯酰胺、特殊性能硅石等。优选PEI、DEAE、QAE和Q衍生物，尤其优选DEAE Fast-Flow Sepharose(Pharmacia, Piscataway, NJ)。典型的层析介质包括那些由苯基、丁基或辛基基团衍生的介质，比如Phenyl-Sepharose FF(Pharmacia)、Toyopearl butyl 650(Toso Haas, Montgomeryville, PA)、Octyl-Sepharose(Pharmacia)等；或者聚丙烯类树脂，比如Amberchrom CG71(Toso Haas)等。合适的固体载体包括玻璃珠、硅基树脂、纤维素树脂、琼脂糖珠、交联琼脂糖珠、聚苯乙烯珠、交联聚丙烯酰胺树脂等在使用条件下不溶的载体。可以用反应基团来修饰这些载体，所述基团能使蛋白质通过氨基、羧基、巯基、羟基和/或糖类部分进行附着。偶联化学反应的例子包括溴化氰活化、N-羟基琥珀酰亚胺活化、环氧化物活化、巯基活化、酰肼活化以及用于碳化二亚胺偶联反应的羧基和氨基衍生物。这些以及其他固体介质是本领域公知和广泛使用的，并可从供应商获得。

选择一种特定的方法是一项常规设计，部分取决于所选载体的特性。参见例如，亲合层析：原理和方法，Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden, 1988。

本发明的多肽或其片段还可以通过化学合成来制备。本发明所述多肽可以是单体或多聚体；糖基化或非糖基化的；PEG化或非PEG化的；可以包括或不包括起始甲硫氨酸残基。

转基因植物

本发明还涉及转基因植物、植物部分或植物细胞，它们已转化了编码本发明所述果胶降解酶的 DNA 序列从而表达和产生可回收量的酶。可以从植物或植物部分中回收该酶。可选择地，可以使用含有重组酶的植物或植物部分本身。

所述转基因植物可以是双子叶植物或单子叶植物，简称为双子叶或单子叶。单子叶的实例是禾本科植物，比如牧草(莓系属牧草、早熟禾属)；饲用牧草比如羊茅、黑麦草；寒地型牧草如剪股颖，以及谷类植物，例如小麦、燕麦、黑麦、大麦、稻、高粱和玉米。

双子叶植物的实例是烟草、豆类(比如羽扇豆)、马铃薯、甜菜、豌豆、菜豆和大豆，以及十字花科，比如花椰菜、油籽油菜以及密切相关的模型生物拟南芥。

植物部分的实例是茎、愈伤组织、叶、根、果实、种子和块茎。在本文中，特殊的植物组织，比如叶绿体、质外体、线粒体、液泡、过氧化物酶体和细胞质也被认为是植物部分。另外，无论何种组织来源的任何植物细胞，也看作是植物部分。

本发明的范围内还包括这些植物、植物部分和植物细胞的后代。

表达本发明所述酶的转基因植物或植物细胞可以根据本领域已知方法来构建。简而言之，通过将 1 或多个编码本发明所述酶的表达构建体引入植物宿主基因组中，并使所得改变的植物或植物细胞繁殖为转基因植物或植物细胞来构建所述植物或植物细胞。

比较方便的是，表达构建体是一个 DNA 构建体，其中包含编码本发明所述酶的基因，以及与之可操作连接在一起的为在所选植物或植物部分中表达该基因所需要的合适的调控序列。另外，表达构建体可以包含选择标记(可用于鉴定其中已整合了表达构建体的宿主细胞)和将构建体导入目标植物必要的 DNA 序列(后者取决于所用的 DNA 导入方法)。

调控序列的选择，比如启动子和终止子序列以及任选的信号或转运序列是根据例如希望何时、何处以及如何表达酶来确定的。例如，编码

本发明所述酶的基因的表达可以是组成型或诱导型的，或者是发育、阶段或组织特异性的，并且基因产物可能是定向到特定组织或植物部分比如种子或叶片中的。例如 Tague 等，植物生理学 86: 506，1988 描述了这样的调控序列。

对于组成型表达，可以使用 35S-CaMV 启动子(Franck 等，1980，细胞 21: 285-294)。器官特异性启动子可以是例如来自储藏累积组织比如种子、马铃薯块茎和果实(Edwards&Coruzzi，1990，遗传学年评 24: 275-303)或者来自代谢累积组织比如分生组织(Ito 等，1994，植物分子生物学 24: 863-878)的启动子；种子特异性启动子比如来自水稻的谷蛋白、醇溶谷蛋白、球蛋白或白蛋白启动子(Wu 等，植物和细胞生理学 39(8): 885-889(1998))，来自豆球蛋白 B4 以及 Conrad U.(植物生理学杂志 152(6)；708-711(1998))等描述的来自蚕豆的未知种子蛋白质基因的蚕豆启动子，来自菜籽油体蛋白的启动子(Chen 等，植物和细胞生理学，39(9): 935-941(1998))、来自蔓菁的储存蛋白 napA 启动子或者任何其他本领域已知的种子特异性启动子，例如 WO91/14772 中所描述的。另外，所述启动子可以是叶特异性启动子，比如来自水稻或番茄的 rbcs 启动子(Kyozuka 等，植物生理学 102(3):991-1000(1993))，绿藻病毒腺嘌呤甲基转移酶基因启动子(Mitra，A.和 Higgins，DW，植物分子生物学 26(1):85-93(1994))，或者来自水稻的 aldP 基因启动子(Kagaya 等，分子与普通遗传学 248(6): 668-674(1995))，或者创伤诱导启动子，比如马铃薯 pin2 启动子(Xu 等，植物分子生物学 22(4): 573-588(1993))。

可以利用启动子增强子元件在植物中获得酶的更高表达。例如，启动子增强子元件可以是插在启动子和编码酶的核苷酸序列之间的内含子。例如，Xu 等(前引文章)公开了利用水稻肌动蛋白 1 基因的第一个内含子来增强表达。

选择标记基因以及表达构建体的任何其他部分可以从本领域现有的进行选择。

依照本领域已知的常规技术，包括农杆菌介导的转化、病毒介导的转化、显微注射、颗粒轰击、基因枪转化以及电穿孔(Gasser 等，科学

244: 1293; Potrykus, 生物/技术 8: 535, 1990; Shimamoto 等, 自然 338: 274, 1989)将 DNA 构建体引入植物基因组。

目前,根癌农杆菌介导的基因转移(综述见 Hooykas&Schilperoort, 1992.植物分子生物学 19: 15-38)是产生转基因双子叶植物的首选方法,但是也可以利用它转化单子叶植物,尽管对这些植物通常优选其他转化方法。目前,产生转基因单子叶植物的首选方法是颗粒轰击(涂覆转化 DNA 的微小金颗粒或钨颗粒)胚性愈伤组织或发育的胚(Christou, 1992, 植物杂志 2: 275-281; Shimamoto, 1994, 生物技术最新观点 5: 158-162; Vasil 等, 1992, 生物/技术学 10: 667-674)。转化单子叶植物的一个替代方法基于 Omirulleh S 等 (植物分子生物学 21(3): 415-428(1993)) 描述的原生质体转化。

转化后,挑选出引入了表达构建体的转化子并根据本领域的公知方法再生为完整植株。

酶制品

在本发明文中,术语“酶制品”意味着常规的酶发酵产物,可能分离并纯化自微生物的一个种,这种制剂通常含有多种不同酶活性;或者意味着各单组分酶的混合物,优选通过利用常规重组技术来源于细菌或真菌菌种的酶,这些酶已经过发酵并且可能是独立地分离和纯化的,它们可能来源于不同菌种,优选真菌或细菌菌种;或者是作为表达重组果胶酸裂解酶的宿主细胞之微生物的发酵产物,但这些微生物同时产生其他酶,例如果胶裂解酶,蛋白酶或纤维素酶,它们是该微生物的天然发酵产物,即相应天然微生物常规产生的酶复合物。

本发明的果胶酸裂解酶制品还可以包含 1 或多种选自下述的酶: 蛋白酶、纤维素酶(内切-β-1, 4-葡聚糖酶)、β-葡聚糖酶(内切-β-1, 3(4)-葡聚糖酶)、脂酶、角质酶、过氧化物酶、漆酶、淀粉酶、葡糖淀粉酶、果胶酶、还原酶、氧化酶、酚氧化酶、木质素酶(ligninase)、支链淀粉酶、阿拉伯聚糖酶、半纤维素酶、甘露聚糖酶、木葡聚糖酶(xyloglucanase)、木聚糖酶、果胶乙酰酯酶、鼠李糖半乳糖醛酸聚糖

乙酰酯酶、多聚半乳糖醛酸酶、鼠李糖半乳糖醛酸酶(rhamnogalacturonase)、半乳聚糖酶(galactanase)、果胶裂解酶、果胶甲酯酶、纤维二糖水解酶、转谷氨酰胺酶；或者这些酶的混合物。在一个优选实施方案中，利用重组技术产生酶制品中的 1 或多种或者全部酶，即酶是单组分酶，与其他酶混合形成一种具有所需酶配比的酶制品。

免疫交叉反应:

可以利用纯化的果胶酸裂解酶来制备用于测定免疫交叉反应的多克隆抗体(对给定酶蛋白质是单一特异性的)。更具体地说，可以依照 N.Axelsen 等(定量免疫电泳指南，Blackwell Scientific Publications,1973,23 章)或者 A.Johnstone 和 R.Thorpe(实用免疫化学，Blackwell Scientific Publications,1982，尤其是 27-31 页)描述的步骤通过免疫兔子(或其他啮齿类动物)来制备抗本发明所述果胶酸裂解酶的抗血清。纯化的免疫球蛋白可以由抗血清获得，例如通过盐析($(NH_4)_2SO_4$)，随后经透析和离子交换层析(例如在 DEAE-Sephadex 上)获得。蛋白质的免疫化学鉴定可以通过 Outcherlony 双向扩散分析(O.Outcherlony,实验免疫学手册(D.M.Weir 编)，Blackwell Scientific Publications,1967,655-706 页)、交叉免疫电泳(N.Axelsen 等，同前，3 和 4 章)或者火箭免疫电泳(N.Axelsen 等，2 章)进行。

在洗涤剂或清洁工业中的用途

在另外的方面，本发明涉及一种包含本发明所述果胶酸裂解酶或酶制品的洗涤剂组合物，涉及织物的机械处理方法，包括用含有本发明所述果胶酸裂解酶或酶制品的洗涤液在机洗过程的一个洗涤循环中处理织物，还涉及清洁组合物，包括衣物、硬表面清洁剂、个人清洁和口腔/牙齿组合物，这些组合物中包含本发明所述果胶酸裂解酶或酶制品，能提供优良的清洁效果，即优良的去污效果。

不局限于这一理论，相信本发明的甘露聚糖酶能有效地降解或水解任何含有半乳糖甘露聚糖的污渍或斑点，因此也能清洁带有这种污渍或

斑点的衣物。

本发明的清洁组合物必须含有至少一种附加洗涤剂成分。这些附加成分的确切特性及其掺入水平取决于组合物的物理形态和它将用于何种清洁操作。

优选本发明的清洁组合物还包含选自表面活性剂、另一种酶、助洗剂和/或漂白体系的洗涤剂成分。

根据本发明的清洁组合物可以是液体、糊状、胶状、条状、片状、雾液、泡沫状、粉末或颗粒。颗粒组合物还可以是致密形式的，液体组合物也可以是浓缩形式的。

本发明的组合物可以配制成例如手工和机械洗碗组合物；手工和机械衣物洗涤组合物，其中包括洗衣添加组合物和适用于浸泡和/或预处理污损织物的组合物；漂洗添加的织物柔顺剂组合物以及用于一般家庭硬表面清洁操作的组合物。含有这些糖酶的组合物还可以配制成卫生产品，隐形眼镜清洗剂和健康及美容保健产品，比如口腔/牙齿保健和个人清洁组合物。

当配制成用于人工洗碗方法的组合物时，本发明的组合物优选含有表面活性剂，最好还含有选自有机多聚化合物、增泡剂、II 族金属离子、溶剂、助溶物和另外的酶的其他去污化合物。

当配制成适用于洗衣机洗涤方法的组合物时，本发明的组合物优选含有表面活性剂和助洗剂化合物，以及附加的 1 或多种洗涤剂成分，其优选选自有机多聚化合物、漂白剂、附加的酶、抑泡剂、分散剂、钙皂分散剂、污垢悬浮和防再污染剂以及防腐蚀剂。洗衣组合物还可以含有柔顺剂作为附加的洗涤剂成分。这些含有糖酶的组合物被配制成衣物洗涤剂组合物时，可以提供织物清洁、去污、维持亮白、柔顺、彩色外观、抑制染料转移和卫生的作用。

本发明的组合物还可以作成固体或液体形式的去污添加产品使用。这些添加产品用来补充或促进传统洗涤剂组合物的效果，可以在清洁过程的任何阶段加入。

如果需要的话，此处所述衣物洗涤剂组合物的密度在 20℃测量为

400 到 1200g/l，优选在 500 到 950g/l 组合物。

此处所述“致密”形式的组合物最好地反映在密度上，就组合物来说，反映在无机填充盐的量上；无机填充盐是粉末形式的洗涤剂组合物的常规成分；在常规洗涤剂组合物中，填充盐大量存在，通常是组合物总重量的 17-35%。在致密组合物中，填充盐的量不超过组合物总重量的 15%，优选不超过 10%，最优选不超过 5%。无机填充盐，例如本发明组合物中所称的填充盐，选自碱和碱土金属的硫酸盐和氯化物。一种优选的填充盐是硫酸钠。

根据本发明的液体洗涤剂组合物可以处于一种浓缩形式，在这种情况中，本发明的液体洗涤剂组合物与常规液体洗涤剂相比含有较低量的水。通常浓缩液体洗涤剂的水含量优选低于洗涤剂组合物重量的 40%，更优选低于 30%，最优选低于 20%。

可用于此处的合适的特定洗涤剂化合物选自 WO97/01629(此处全文引作参考文献)中描述的特定化合物。

优选以纯酶为组合物重量的 0.0001%到 2%、更优选 0.0005%到 0.5%、最优选 0.001%到 0.1%的水平将甘露聚糖酶加入本发明清洁组合物中。

可用于本发明的纤维素酶包括细菌或真菌纤维素酶。优选地，它们的最佳 pH 在 5 到 12 之间，比活在 50CEVU/mg(纤维素粘度单位)以上。合适的纤维素酶公开于美国专利 4435307、JP61078384 和 WO96/02653 中，其中公开了由 *Humicola insolens*、木霉属、梭孢壳属和侧孢属产生的真菌纤维素酶。EP739982 描述了分离自一种新芽孢杆菌菌种的纤维素酶。在 GB-A-2075028、GB-A-2095275、DE-OS-2247832 和 WO95/26398 中还公开了合适的纤维素酶。

这类纤维素酶的实例是由一株 *Humicola insolens*(灰色腐质霉变种 thermoidea)，尤其是 *Humicola insolens DSM1800* 产生的纤维素酶。其他的合适的纤维素酶是来源于 *Humicola insolens*，分子量大约 50KD，等电点 5.5，含有 415 个氨基酸的纤维素酶；以及来源于 *Humicola insolens* DSM1800 的约 43KD 内切-β-1，4-葡聚糖酶；一种优选的纤维素酶具有 PCT 专利申请 WO91/17243 中公开的氨基酸序列。同样合适的纤

维素酶是 WO94/21801 中描述的来自 Trichoderma longibrachiatum 的 EGIII 纤维素酶。特别合适的纤维素酶是有护色作用的纤维素酶。这类纤维素酶的实例是 WO96/29397、EP-A-0495257、WO91/17243、WO91/17244 和 WO91/21801 中描述的纤维素酶。其他适用于织物保养和/或清洁的纤维素酶有 WO96/34092、WO96/17994 和 WO95/24471 中描述的酶。

所述纤维素酶通常以纯酶为洗涤剂组合物重量的 0.0001%到 2%的水平加入洗涤剂组合物中。

优选用于本发明目的的纤维素酶是碱性纤维素酶，即在 pH7 到 12 具有最大活性的至少 25%，更优选至少 40%的酶。更优选的纤维素酶是在 pH7 到 12 具有最大活性的酶。优选的碱性纤维素酶是 Novo Nordisk A/S 以 Carezyme®商品名出售的纤维素酶。

可以包括淀粉酶(α和/或β)以便去除基于碳水化合物的污渍。公开于 1994 年 2 月 3 日的 WO94/02597(Novo Nordisk A/S)描述了一种加有淀粉酶变体的清洁组合物。还可参见公开于 1995 年 4 月 20 日的 WO95/10603(Novo Nordisk A/S)。其他已知用于清洁组合物的淀粉酶包括α和β-淀粉酶。α-淀粉酶是本领域已知的，包括美国专利 5003257、EP252666、WO91/00353、FR2676456、EP285123、EP525610、EP368341 和英国专利说明书 1296839(Novo)中公开的α-淀粉酶。其他合适的淀粉酶是 1994 年 8 月 18 日公开的 WO94/18314 和 1996 年 2 月 22 日公开的 WO96/05295(Genencor)中描述的稳定性提高的淀粉酶，以及公开于 1995 年 4 月的 WO95/10603 中公开的在 Novo Nordisk A/S 销售的直接亲本中带有附加修饰的淀粉酶变体。同样合适的是在 EP277216、WO95/26397 和 WO96/23873(均为 Novo Nordisk 提出的申请)中描述的淀粉酶。

商品α-淀粉酶的实例是来自 Genencor 的 Purafect Ox Am®，Novo Nordisk A/S(丹麦)销售的 Termamyl®、Ban®、Fungamyl®、Duramyl®。WO95/26397 描述了其他的合适淀粉酶：特征在于在 25℃到 55℃的温度范围内、pH 在 8 到 10 时，通过 Phadebas®α-淀粉酶活性检测法测定，该淀粉酶的比活比 Termamyl®比活至少高 25%。合适的有 WO96/23873(Novo Nordisk)中描述的上述酶的变体。其他的在活性水平方面以及热稳定性

和高活性水平两方面都提高的淀粉水解酶在WO95/35382中有描述。

用于本发明目的的优选淀粉酶是以商品名 Termamyl、Duramyl 和 Maxamyl 出售的淀粉酶，和/或在WO96/23873中以SEQ ID NO: 2公开的表现出热稳定性增强的α-淀粉酶变体。

优选用于特定用途的淀粉酶是碱性淀粉酶，即在 pH7 到 12，具有最大活性的至少 10%，优选至少 25%，更优选至少 40%酶活的酶。更优选的淀粉酶是在 pH7 到 12 具有最大活性的酶。

以纯酶为组合物重量的 0.0001%到 2%，优选 0.00018%到 0.06%，更优选 0.00024%到 0.048%的水平将淀粉水解酶加入本发明洗涤剂组合物。

术语木葡聚糖酶包括Wageningen大学Vincken和Voragen(Vincken等(1994)植物生理学104:99-107)描述的一族酶，如Hayashi等在(1989，植物生理与植物分子生物学40: 139-168)中描述的，它们能降解木葡聚糖。Vincken 等表明纯化自绿色木霉的木葡聚糖酶(内切-IV-葡聚糖酶)能从分离的苹果细胞壁的纤维素上去除木葡聚糖包被。该酶促进对细胞壁包埋的纤维素的酶促降解，并与果胶酶协同作用。得自 Gist-Brocades 的 Rapidase LIQ+含有木葡聚糖酶活性。

以纯酶为组合物重量的 0.0001%到 2%，更优选 0.0005%到 0.5%，最优选 0.001%到 0.1%的水平将木葡聚糖酶加入本发明的清洁组合物中。

优选用于特定应用的木葡聚糖酶是碱性木葡聚糖酶，即在 pH7 到 12，具有最大活性的至少 10%，优选至少 25%，更优选至少 40%酶活的酶。更优选的木葡聚糖酶是在 pH7 到 12 具有最大活性的酶。

上述酶可以来自任何合适的来源，比如蔬菜、动物、细菌、真菌和酵母来源。酶来源还可以是嗜温或极端细菌(嗜寒、嗜冷、嗜热、嗜压、嗜碱、嗜酸、嗜盐等)。可以使用这些酶的纯化或非纯化形式。目前，经蛋白质或遗传工程技术来修饰野生型酶以便优化其在本发明所述清洁组合物中的效力是一种普通作法。例如，可以设计变体以使酶与这类组合物中的常用成分的相容性提高。或者，可以设计变体以使酶变体的最适 pH、漂白或螯合剂稳定性、催化活性等适合具体的清洁用途。

尤其是，在漂白稳定性的情况中，应当把注意力集中在氨基酸对氧

化的敏感性上，对于表面活性剂相容性，应当把注意力集中在表面电荷上。可以通过取代某些带电氨基酸来改变这些酶的等电点，例如等电点增加可能有助于提高与阴离子表面活性剂的相容性。可以通过产生例如附加的盐桥和加强金属结合位点从而提高螯合剂稳定性来进一步增加酶的稳定性。

在纺织品和纤维素纤维加工工业中的用途

本发明的果胶酸裂解酶可以单独或者与其他碳水化合物降解酶(例如阿拉伯聚糖酶、木葡聚糖酶、果胶酶)联合用于生物制备纤维或者与洗涤剂联合用来清洁纤维。棉纤维由含有果胶的初生细胞壁层和主要含有纤维素的次生细胞壁层组成。在棉制备或棉精炼时，部分初生细胞壁被去除。本发明涉及在棉精炼过程帮助去除初生细胞壁，或者在棉清洗过程去除残存的果胶物质并防止纺织品变灰。

在本发明文中，术语“纤维素类材料”意指纤维、缝制或未缝制的织物，包括从棉、混合棉或者天然或人工纤维素(例如来源于含有木聚糖的纤维素纤维，比如来源于木浆）或者它们的混合物制得的针织物、机织物、粗斜纹布、纱线和毛巾布。混合物的实例是棉或人造丝/粘胶纤维与1或多种伴生材料，比如毛、合成纤维(例如，聚酰胺纤维、丙烯酸类纤维、聚酯纤维、聚乙烯醇纤维、聚氯乙烯纤维、聚偏二氯乙烯纤维、聚氨酯纤维、聚脲纤维、芳族聚酰胺纤维)和含有纤维素的纤维(例如，人造丝/粘胶纤维、苎麻、大麻、亚麻/亚麻布、黄麻、乙酸纤维素纤维、lyocell)的混合物。

本发明的酶制品可以用来在纤维素纤维加工工业中预处理或从大麻、亚麻或亚麻布中浸解纤维。

纺织工业中纤维素材料，例如棉纤维加工为适于制衣的材料，包括几个步骤：将纤维纺成纱线；由纱线编织成机织织物或针织织物以及后续的准备、染色和整理操作。机织物品是通过在一系列经纱间织入纬纱来构造的；所述纱线可以是两种不同类型的。针织物品是通过由一根连续纱线形成双罗纹环来构造的。纤维素纤维还可以用于非机织织物。

准备工序使纺织品在染色操作中产生良好的反应。准备工序包括的次级步骤是:

a. 在纺织前加入类似聚合物大小的物质,例如淀粉、CMC 或 PVA 来进行退浆(对于机织物品),以便提高经纱速度;在进一步加工前必须将这些材料去除。

b. 精练,其目的是从棉纤维中去除非纤维素材料,尤其是表皮(主要含有蜡)和初生细胞壁(主要由果胶、蛋白质和木葡聚糖组成)。恰当地去除蜡是得到高吸湿力所必须的,是取得良好染色效果的一个量度。去除初生细胞壁-尤其是果胶能提高蜡去除性,并保证更均匀的染色。另外该步骤能提高漂白过程中的亮白度。用于精炼的主要化学物质是浓度高达 70g/kg 棉的氢氧化钠,并在高温(80-95℃)进行;以及

c. 漂白;通常精练后要进行漂白,以过氧化氢作为氧化剂以便得到完全漂白的织物或者保证染料色泽清晰。

工业上还使用将精练/漂白工艺组合在一起的一步法。虽然准备工序最普遍是在织物阶段进行,但也可以在纤维或纱线阶段进行精练、漂白和染色操作。

对于平幅或绳状形式,处理过程可以通过处理液流间歇或连续地与织物接触。连续操作通常使用饱和器,在此按每份织物重量近似等量的化学液体将其施加给织物,随后在一个加热的停留室中进行化学反应。然后由洗涤区预备织物进入下一个处理步骤。间歇操作通常在一个处理浴中进行,在此用近似织物重量 8-15 倍的化学浴与织物进行接触。一段反应时间后,排出化学品,冲洗织物并加上下一种化学品。非连续的浸轧-堆放回苏工序涉及饱和器,在此按每份织物重量近似等量的化学液体将其施加给织物,随后停留一段时期,对于冷浸轧-堆放回苏工序,停留时间可能是 1 或多天。

机织物品是纺织织物构造的普遍形式。机织过程需要将经线上浆以防止磨损。因其供应量和价格,淀粉、聚乙烯醇(PVA)、羧甲基纤维素、蜡和丙烯酸粘合剂是通常使用的上浆化学品的实例。浆料必须在机织过

程后，作为制备机织物品的第一步去除。将上过浆的平幅或绳状织物与含有退浆剂的处理液接触。采用的退浆剂取决于要去除的浆料的类型。对于 PVA 浆料，经常使用热水或氧化型处理方法。最常用于棉织物的上浆剂基于淀粉。因此最经常地，将热水、水解淀粉的α-淀粉酶与润湿剂或表面活性剂联合起来给机织棉织物退浆。使纤维素材料与退浆化学品保持足够长的“持续时间”以便完成退浆。持续时间取决于处理方式的类型和温度，可以在 15 分钟到 2 小时，或者在某些情况中达到几天。通常，将退浆化学品加入饱和器浴中，后者一般在大约 15 到 55℃。然后将织物盛在能提供充足热量(通常在大约 55 到 100℃)的装置中，比如 J 型箱中，从而提高退浆剂的活性。持续期结束后将化学品，包括被去除的浆料从织物上洗去。

为了保证高白度或良好的吸湿力以及由此导致的可染性，必须彻底清除浆料化学品和其他使用的化学物质。一般认为充分的退浆对以下的准备工序：精练和漂白非常重要。

精练过程能去除棉纱中天然存在的大多数非纤维素化合物。除了天然的非纤维素杂质，精练还可以去除尘土、污垢和制造过程引入的残存物质比如纺纱、络筒或浆纱润滑剂。精练工序使用氢氧化钠或相关的苛性剂比如碳酸钠、氢氧化钾或其混合液。通常该过程要加入一种碱性稳定的表面活性剂以便提高疏水化合物的溶解性和/或防止它们再次沉积在织物上。该处理通常在高温(80-100℃)进行，采用强碱溶液(pH13-14)作为精练剂。由于化学品处理的非特异属性，不仅是杂质，纤维素本身也会被作用，导致织物的强度或其他理想特性被损害。纤维素织物的柔软性是残存天然棉蜡的函数。高温强碱性精练方法的非特异性不能区分所需的天然棉润滑剂和制造过程引入的润滑剂。另外，传统的精练方法由于来自这些过程的强碱性废水会导致环境问题。精练阶段为织物在漂白过程达到最佳响应做准备。没有充分精练的织物在随后的漂白阶段会需要更大量的漂白化学品。

漂白工序脱去天然棉色素并去除所有在轧花、梳理或精练过程中没有完全去除的残留天然木质棉杂质成分。目前主要使用的方法是碱性过

氧化氢漂白。在许多情况中，特别是不需要非常高的白度时，可以将漂白与精练结合进行。

在以下实施例中，显示了可以用本发明的果胶酸裂解酶或果胶酸裂解酶制品在大约 50 到 80℃，约 pH7-11 进行精练步骤，从而取代或补充那些高度腐蚀试剂的作用。经过优化的酶促过程可确保达到高的果胶去除效果和饱满的吸湿性。

植物材料的降解或改变

由于本发明所述果胶酸裂解酶具有高植物细胞壁降解活性，故优选用本发明的酶或酶制品降解或改变植物细胞壁或任何来源于植物细胞壁的含有果胶的材料。

本发明的果胶酸裂解酶可以单独或与其他酶如葡聚糖酶、果胶酶和/或半纤维素酶联合使用，以便提高从富含油的植物材料中提取油，如从大豆中提取豆油，从橄榄中提取橄榄油，或从油菜籽中提取菜籽油，或从向日葵中提取葵花油。

本发明的果胶酸裂解酶可以用于分离植物细胞材料的成分。尤其有意义的是将富含糖或淀粉的植物材料分离为非常有经济价值的成分(如从甜菜中分离蔗糖或从马铃薯中分离淀粉)和价值低的成分(如果渣或壳部分)。同样，很有意义的是将富含蛋白质或富含油的作物分离为有价值的蛋白质和油以及无价值的壳部分。可以采用本领域的已知方法进行分离操作。

本发明的果胶酸裂解酶还可以用于制备水果或蔬菜汁制品以便提高产量，用于酶促水解例如酒或果汁生产中各种来源于植物细胞壁的材料或废料，或者农业残余物比如蔬菜壳、豆壳、甜菜渣、橄榄渣、马铃薯渣等。

可以将植物材料降解以便改善不同种类的加工过程，协助纯化或提取半乳聚糖以外的其他成分，如从柑橘中纯化果胶，提高食用价值，降低结合水的能力，提高废水车间的降解力，提高植物材料转化为青储饲料等。

利用本发明的酶制品，就有可能调节加工过的水果或蔬菜的稠度和外观。已经证明稠度和外观是加工所用酶的实际组合方式的结果，即与本发明所述果胶酸裂解酶组合的酶的特异性有关。实例包括由例如苹果、梨或草莓制备的澄清果汁；例如由苹果、梨、草莓、柑橘或西红柿制备的稳定絮状果汁；以及例如由胡萝卜和西红柿制备的果酱。

本发明的果胶酸裂解酶可以用于改变来源于植物细胞壁的材料的粘度。例如，可以用果胶酸裂解酶降低含有半乳聚糖的饲料的粘度，并促进含有半乳聚糖的粘性材料的加工。可以通过用本发明的酶制品，在适于完全或部分降解含有半乳聚糖的材料的条件下处理所述植物材料从而降低其粘度。

可以将果胶酸裂解酶例如与其他酶联合使用来从植物纤维中去除果胶物质。该去除步骤在例如生产纺织品纤维或其他纤维素材料时非常重要。为此，用适当量的本发明所述果胶酸裂解酶在适于完全或部分降解与植物纤维材料相关的果胶物质的条件下处理植物纤维材料。

动物饲料添加剂

本发明的果胶酸裂解酶可以用于改变动物饲料，并且可以在体外(通过改变饲料成分)或体内发挥作用。所述果胶酸裂解酶尤其适合添加到含有大量阿拉伯半乳聚糖或半乳聚糖的动物饲料组合物中，例如，含有来自大豆、油菜籽、羽扇豆等的植物材料的饲料中。当加入饲料中时，果胶酸裂解酶可显著地提高植物细胞壁物质在体内的降解，从而使动物能更好地利用植物养分。因此，能提高动物的生长率和/或饲料转化率(即摄取的饲料重量比上动物增重)。例如，果胶酸裂解酶与例如β-半乳糖苷酶联合使用，可将动物不能消化的半乳聚糖降解为能被动物消化的半乳糖或半乳糖寡聚物，从而提高饲料的可用能量。同样，通过降解半乳聚糖，果胶酸裂解酶能提高非碳水化合物饲料组分，比如蛋白质、脂肪和矿物质的消化力和吸收。

进一步的描述可以参考 PCT/DK 96/00443 以及本文的实施例。

酒类和果汁加工

本发明的酶或酶制品可以用于蔬菜汁或果汁，尤其是苹果或梨汁的脱果胶化和降低粘度。通过用本发明的酶制品(其用量能有效降解水果或蔬菜汁所含的含有果胶的物质)处理水果或蔬菜汁可以达到该目的。

可以用所述酶或酶制品处理水果和蔬菜泥以便提高它们的提取或降解力。例如，可以将酶制品用于生产果汁中处理苹果和梨泥，用于酒类生产中处理葡萄泥。

果胶酸裂解酶的催化活性测定

粘性检测法 APSU

APSU 单位: APSU 单位检测是一种使用多聚半乳糖醛酸作为底物，不加钙的粘度测量法。

将底物 5%多聚半乳糖醛酸钠盐(Sigma P-1879)溶解在 0.1M 甘氨酸缓冲液(pH10)中。将 4ml 底物于 40℃预保温 5 分钟。加入酶(250μl 体积)并在混合器上以最大转速混合 10 秒钟，然后于 40℃温育 20 分钟。做标准曲线时，将浓度为 5APSU/ml 到 100APSU/ml 以上范围内的酶稀释溶液测定两次，最少有 4 个浓度在 10 到 60APSU/ml 之间。用 Sofraser 公司，45700 Villemandeur, France 的 MIVI600 测定粘度。10 秒后，以 mV 测定粘度。

为了计算 APSU 单位，使用上述酶标准溶液来制得标准曲线:

APSU/ml	mV
0.00	300
4.00	276
9.00	249
14.00	227
19.00	206
24.00	188
34.00	177
49.00	163
99.00	168

用 GrafPad Prism 程序进行计算，该程序使用单相指数衰减并有坪值的非线性拟合。坪值加跨度是不含酶得到的 mV。坪值是酶浓度 100APSU 以上的 mV，在两个实例中都发现粘度的半减值是 12APSU 单位，标准误差为 1.5APSU。

裂解酶检测(于 235nm)

为了测定β-消除，用溶解在 0.1M 甘氨酸缓冲液(pH10)中的 0.1%多聚半乳糖醛酸钠盐(Sigma P-1879)作为底物测量 235nm 处吸收值的增加。计算催化速率时，每分钟 235nm 处吸收值增加 5.2 对应着形成 1μmol 不饱和产物(Nasuna 和 Starr(1966)，生物学化学杂志 241: 5298-5306; 以及 Bartling、Wegener 和 Olsen(1995)微生物学 141: 873-881)。

稳定态条件为在 HP 二极管阵列比色仪上的 1cm 光路中，使用温控比色杯架中的 0.5ml 比色杯连续测量 235 nm 处吸收值。对于稳定态，用至少 200 秒的线性增加来计算催化速率。用它转换为每分钟形成的μmol 产物。

琼脂检测法

可以通过向琼脂平板(比如，例如 LB 琼脂)上制成的 4mm 小孔中加入含有 0.7% w/v 多聚半乳糖醛酸钠(Sigma P1879)的检测溶液来测量果胶酸裂解酶活性。然后将平板于特定温度(比如，例如 75℃)保温 6 小时。然后将平板在(i)1M $CaCl_2$ 中浸 0.5 小时或者(i i)1%混合溴化烷基三甲基铵(MTAB，Sigma M-7635)中浸 1 小时。这两个过程均导致多聚半乳糖醛酸盐在琼脂中沉积。通过在沉积的多聚半乳糖醛酸盐背景中出现透明区来检测果胶酸裂解酶活性。用果胶酸裂解酶标准品的稀释溶液可以校正该检测方法的灵敏度。

端点分析-235nm 处果胶酸裂解酶的反式消除(高钙法：在最终的保温体系中有 1mM 钙)

在本方法中，将底物和酶于 37℃保温 20 分钟，然后测量 235nm 处

双键的形成。最后，在摩尔消光系数的基础上，计算降解速率，以 Trans Unit 表示。

步骤:

将 0.5ml 酶稀释液与 0.5ml 2*底物溶液混匀。

底物: 购自 Sigma P-1879、批号为 77H3784 的多聚半乳糖醛酸盐。

缓冲液 2X: 0.1 M 甘氨酸 pH10+2.0 mmol $CaCl_2$

终止试剂: 0.02 M H_3PO_4

保温温度: 37℃

反应时间: 20 分钟

反式消除的消光系数: 0.0052 μmol cm^{-1}。

将酶在无离子水中稀释至 0.5 到 5 APSU/ml。实验主值两份各 0.5ml。两种溶液于 37℃水浴中预保温 5 分钟后，将 2% w/v 底物于 2X 缓冲液中的溶液与 0.5ml 稀释过的酶混匀。保温 20 分钟。用 5ml 终止试剂终止反应，并混匀。空白中首先将酶与终止试剂混匀，然后加入相同体积的底物。

酶 0.5ml

底物 0.5ml

终止试剂 5ml

总体积 6ml

在 1cm 比色杯中于 235nm 测量光吸收值。

使用消光系数 0.0052 μmol cm^{-1} 计算每分钟反式消除的形成量。

公式: [(主值加主值)/2-空白] 0.0052*6*2*酶稀释度/20 分钟/1000ml=μmol/分钟。

材料与方法

菌株和供体生物

地衣芽孢杆菌 ATCC14580，包含 SEQ ID NO: 3 所示的果胶酸裂解酶编码 DNA 序列。

B. agaradhaerens, NCIMB40482 或 DSM8721，包含 SEQ ID NO: 1

所示的果胶酸裂解酶编码 DNA 序列。

芽孢杆菌 AAI12，包含 SEQ ID NO: 5 所示的果胶酸裂解酶编码 DNA 序列。

芽孢杆菌 KJ59，DSM12419，包含 SEQ ID NO: 7 所示的果胶酸裂解酶编码 DNA 序列。

芽孢杆菌 I534，包含 SEQ ID NO: 9 所示的果胶酸裂解酶编码 DNA 序列。

大肠杆菌 DSM12403，包含其中含有 SEQ ID NO: 5 所示的果胶酸裂解酶编码 DNA 序列的质粒。

大肠杆菌 DSM12404，包含其中含有 SEQ ID NO: 9 所示的果胶酸裂解酶编码 DNA 序列的质粒。

大肠杆菌 DSM11789，包含其中含有 SEQ ID NO: 3 所示的果胶酸裂解酶编码 DNA 序列的质粒。

大肠杆菌 DSM11788，包含其中含有 SEQ ID NO: 1 所示的果胶酸裂解酶编码 DNA 序列的质粒。

枯草芽孢杆菌 PL2306。该菌株是 apr 和 npr 基因被破坏的枯草芽孢杆菌 DN1885 (Diderichsen, B., Wedsted, U., Hedegaard, L., Jensen, B.R., Sjoholm, C.(1990) "编码α-乙酰乳酸脱羧酶：来自短芽孢杆菌的胞外酶的 aldB 的克隆"，细菌学杂志 172: 4315-4321)，上述基因在已知的枯草芽孢杆菌纤维素酶基因转录单元中被破坏，形成纤维素酶阴性细胞。破坏方法基本上按照(A.L.Sonenshein, J.A.Hoch 和 Richard Losick(1993)编，枯草芽孢杆菌及其他革兰氏阳性细菌，美国微生物学会，618 页)中描述的进行。按照 Yasbin, R.E., Wilson, G.A.和 Young, F.E.(1975)(枯草芽孢杆菌溶源菌株中的转化和转染：前噬菌体在感受态细胞中的选择性诱导的证据，细菌学杂志 121: 296-304)的描述制备感受态细胞并进行转化。

大肠杆菌 SJ2(Diderichsen, B., Wedsted, U, Hedegaard,L., Jensen, B.R., Sjoholm, C.(1990) "编码α-乙酰乳酸脱羧酶：来自短芽孢杆菌的胞外酶的 aldB 的克隆"，细菌学杂志 172: 4315-4321)。

用 Bio-Rad GenePulser™按照制造商的建议制备电感受态细胞并进行转化。

质粒

pBK-CAMV(Stratagene inc., La Jolla Ca.)

pSJ1678(参见 WO94/19454, 此处全文引作参考文献)

pMOL944:

该质粒是 pUB110 的衍生质粒, 基本上含有使质粒能在枯草芽孢杆菌中增殖的元件、卡那霉素抗性基因并有一个克隆自地衣芽孢杆菌 ATCC14580 的 amyL 基因的强启动子和信号肽。所述信号肽含有 SacII 位点, 使它便于克隆编码蛋白质的成熟部分的 DNA 以与信号肽融合在一起。这会导致表达一个被引导到细胞外的前蛋白质。

利用以下简单描述的常规遗传工程技术构建该质粒。

构建 pMOL944:

用单切点限制酶 NciI 消化 pUB110 质粒(McKenzie, T. 等, 1986, 质粒 15: 93-103)。由质粒 pDN1981(P. L. Jorgensen 等, 1990, 基因 96: 37-41)上编码的 amyL 启动子扩增到的 PCR 片段用 NciI 消化并插入 NciI 消化过的 pUB110 中, 得到质粒 pSJ2624。

所用的两个 PCR 引物具有以下序列:

```
# LWN5494 5´-GTCGCCGGGGCGGCCGCTATCAATTGGTAACTGTATCTCAGC -3´
# LWN5495 5´-GTCGCCCGGGAGCTCTGATCAGGTACCAAGCTTGTCGACCTGCAGAA
          TGAGGCAGCAAGAAGAT -3´
```

引物#LWN5494 向质粒插入了 NotI 位点。

然后用 SacI 和 NotI 消化质粒 pSJ2624, 并用 SacI 和 NotI 消化由质粒 pDN1981 上编码的 amyL 启动子扩增到的一个新 PCR 片段, 将这个 DNA 片段插入 SacI -NotI 消化过的 pSJ2624 中, 得到质粒 pSJ2670。

该克隆过程将第一个 amyL 启动子替换为相反方向的相同启动子。用于 PCR 扩增的两个引物具有以下序列:

```
#LWN5938  5`-GTCGGCGGCCGCTGATCACGTACCAAGCTTGTCGACCTGCAGAATG
AGGCAGCAAGAAGAT -3´
#LWN5939  5`-GTCGGAGCTCTATCAATTGGTAACTGTATCTCAGC -3´
```

用限制酶 PstI 和 BclI 消化质粒 pSJ2670，并用 PstI 和 BclI 消化由编码碱性淀粉酶 SP722 的克隆 DNA 序列(在公开为 WO95/26397(此处全文引作参考文献)的国际申请中公开)扩增到的一个 PCR 片段，插入质粒得到 pMOL944。用于 PCR 扩增的两个引物具有以下序列:

#LWN7864 5` -AACAGCTGATCACGACTGATCTTTTAGCTTGGCAC-3´
#LWN7901 5` -AACTGCAGCCGCGGCACATCATAATGGGACAAATGGG -3´

引物#LWN7901 向质粒中插入了 SacII 位点。

一般分子生物学方法

除非特别提及，采用标准的分子生物学方法(Sambrook 等，(1989) 分子克隆: 实验指南，Cold Spring Harbor lab.，Cold Spring Harbor, NY; Ausubel,F.M. 等，(编)“分子生物学通用方案”，John Wiley 和 Sons,1995,;Harwood, C.R. 和 Cutting, S.M.(编)“芽孢杆菌的分子生物学方法” John Wiley 和 Sons，1990)进行 DNA 操作和转化。

根据供应商的说明使用 DNA 操作酶(例如限制性内切核酸酶，连接酶等可从 New England Biolabs，Inc. 购买)。

供体菌株的增殖

按照 ATCC(美国典型培养物保藏中心,美国)的规定在液体培养基 3 中增殖菌株地衣芽孢杆菌 ATCC14580。于 37℃、300rpm 中保温 18 小时后，收集细胞，通过以下描述的方法分离基因组 DNA。

B.agaradherens NCIMB No.40482，芽孢杆菌 AAI12、芽孢杆菌 KJ59，DSM12419 和芽孢杆菌 I534 均在 TY 中生长，其中每 500ml TY 中通过加入 50ml 1M 倍半碳酸钠将 pH 调至大约 9.7。于 30℃、300rpm 中保温 24 小时后，收集细胞，通过以下描述的方法分离基因组 DNA。

基因组 DNA 的制备

将上述作为供体生物的芽孢杆菌菌株在液体培养基中按照以上描述进行增殖。收集细胞，通过 Pitcher 等描述的方法(Pitcher,D.G.,

Saunders, N.A., Owen, R.J;用异硫氰酸胍快速提取细菌基因组 DNA,应用微生物学快报 1989, 8: 151-156)分离基因组 DNA。

由耐碱芽孢杆菌菌种制备λ噬菌体文库

为了使我们能以指示培养基上的噬斑来筛选糖酶，我们选择购自 Stratagene 的 LambdaZAP 表达克隆试剂盒和用 BamHI 消化过并去磷酸化的连接臂。通过 Pitcher 等的方法分离芽孢杆菌 DNA。用 Sau3A 部分消化分离的 DNA，并在 1% DNA 琼脂糖凝胶上进行大小分级分离。利用 Qiaspin DNA 片段纯化方法(Qiagen GmBH)将 2 到 6kb 间的 DNA 从琼脂糖凝胶上切下并纯化。将 100ng 纯化过并分级分离的 DNA 与 1μg BamHI 去磷酸化的 ZAPexpress 载体臂进行连接(4 度过夜)。根据制造商的说明(Stratagene)用 GigaPackIII Gold 将连接反应直接包装。用 XL1 blue mrf-(Stratagene)测定噬菌体文库的滴度。

制备衍生自初级噬菌体文库的质粒文库

从碱性芽孢杆菌 ZAPexpress 文库切下噬粒文库:

制备 XL1-blue 细胞(Stratagene,La Jolla Ca.)并按照 Stratagene ZAPexpress 手册中的大量切割方案将其重悬于 10Mm MgSO4。将来自每个文库的 40, 000 噬斑形成单位移入 Falcon2059 试管中。将样品与 400μl XL1- blue 细胞、$>10^{10}$ pfus/ml 的 Exassist M13 辅助噬菌体(Stratagene)一起于 37℃温育 15 分钟。向每个试管中加入 6ml NZY 培养液，然后将试管于 37℃振荡 2.5 小时。然后将样品于 65℃加热 20 分钟以便杀死大肠杆菌细胞和λ噬菌体;而噬粒耐热。将样品 3000g 旋转以去除细胞残余物，注入干净的 Falcon 2059 试管中。将单链噬粒文库样品调整到 10%甘油中(冷冻保藏)并根据 Stratagene 方案测定滴度。基本上来说，用 10μl 处理过的上清液 1/10 稀释的上清液去感染 200μl XLOLR 细胞(细胞在 10mM $MgSO_4$ 中)。样品在 37℃培养箱中放置 15 分钟。向样品中加入 50μl 5X NZY 培养液，将它们于 37℃振荡 45 分钟。取 100μl 样品铺 LB 卡那霉素平板，并保温过夜。获得其滴度后，对于每个文库，将 10, 000 个集落形成单位与 400μl XLOLR

细胞混匀，于室温不振荡培养 20 分钟。XLOLR 细胞是按照 Stratagene ZAPexpress 手册(Stratagene inc.，La Jolla CA)中的描述制备的。20 分钟后，将 200μl 5X NZY 培养基、3ml 1X NZY 培养基加入样品中。将样品于 37℃、200rpm 振荡 90 分钟。加入甘油至终浓度为 10%，并将细胞于-80℃冷冻待用。

文库的筛选

如下在 LB 琼脂平板上进行标准的果胶酶筛选：将 XLOLR 大肠杆菌细胞中的质粒文库铺在 LB 卡那霉素平板上，密度为 5000 集落形成单位/140mm 直径培养皿。将平板于 37℃保温过夜，然后用 1%果胶 DE35%或 DE75%和 1%琼脂糖覆盖。将平板于 37℃保温过夜之后用 1%MTAB 溶液覆盖。2 小时后，倒出 MTAB，由集落周围的清晰地带可鉴定出阳性重组子克隆。在新鲜的 LB 培养基上划线并再次检测从而确认阳性分离物。

培养基

TY(如 Ausubel,F.M.等(编)“分子生物学通用方案”,John Wiley 和 Sons,1995 中描述的)。

LB 琼脂(如 Ausubel,F.M.等(编)“分子生物学通用方案”，John Wiley 和 Sons,1995 中描述的)。

LBPG 是补充 0.5%葡萄糖和 0.05 M 磷酸钾(pH7.0)的 LB 琼脂。

BPX 培养基在 EP0506780(WO91/09129)中有描述。

以下实施例用于阐述本发明。

实施例 1

来自 *B. agaradhaerens* 的果胶酸裂解酶的克隆、表达、纯化和鉴定

分离编码本发明果胶酸裂解酶的 DNA 序列

可以利用本领域已知的方法(Sambrook 等，(1989)分子克隆：实验指南，Cold Spring Harbor lab.，Cold Spring Harbor，NY)通过提取质粒 DNA 从保藏生物大肠杆菌 DSM11788 中获得包含 SEQ ID NO: 1

所示 DNA 序列并编码本发明所述果胶酸裂解酶的 DNA 序列。

构建 *B. agaradhaerens* 的基因组文库

用限制酶 Sau3A 部分消化 *B. agaradhaerens* NCIMB40482 的基因组 DNA，并通过在 0.7%琼脂糖凝胶上电泳来进行大小分级分离。通过在 DEAE-纤维素滤纸上电泳来分离 2 到 7kb 间的片段(Dretzen, G., Bellard, M., Sassone-Corsi, P., Chambon, P.(1981)一种从琼脂糖和丙烯酰胺凝胶上回收 DNA 片段的可行方法。分析生物化学 112: 295-298)。

将分离过的 DNA 片段连接到用 BamHI 消化过的 pSJ1678 质粒 DNA 上，并用连接体系转化大肠杆菌 SJ2。将来自 *B. agaradhaerens* NCIMB40482 基因组文库的转化细胞铺在含有 10μg/ml 氯霉素和 0.7%多聚半乳糖醛酸钠(SIGMA P-1879)的 LB 琼脂平板上。将铺板的细胞于 37℃培养 16 小时。将菌落影印到新鲜的含有 10μg/ml 氯霉素和 0.7%多聚半乳糖醛酸钠(SIGMA P-1879)的 LB 琼脂平板上，将这些平板于 37℃培养 8 小时。用 5ml 1M CaCl2 注满开始的主板，5 到 30 分钟后，在推测的多聚半乳糖醛酸钠降解克隆周围出现明显的浑浊晕圈。挑出相应的主板克隆做进一步鉴定。这些克隆的进一步鉴定是通过从大肠杆菌克隆的 30℃过夜液体 TY 培养物中制备质粒 DNA 并用 Qiagen Qiaspin Prep Kit 按照制造商的说明(Qiagen, Germany)制备质粒 DNA 进行的。

B. agaradhaerens NCIMB40482 基因文库的果胶酸裂解酶阳性克隆保藏为 DSM11788。在大肠杆菌 DSM11788 的质粒上进行引物步移后，鉴定到来自 *B. agaradhaerens* NCIMB40482 的 SEQ ID NO: 1 之果胶酸裂解酶编码 DNA。

通过活性鉴定阳性克隆

菌落在平板上培养后，将其影印到一组 LB+6CAM 琼脂平板上，然后进一步于 37℃保温大约 20 小时。在影印平板上倾注一层含有 1% HSB 琼脂糖、0.7%多聚半乳糖醛酸钠盐的适当缓冲液，并于 40℃保温大约

20 小时。用 MTA3 沉淀后，通过在存在果胶酸裂解酶阳性克隆的位置出现清晰的晕圈来鉴定果胶酸裂解酶阳性菌落。

将来自果胶酸裂解酶阳性菌落的细胞在琼脂上分离单菌落，对鉴定出的每个果胶酸裂解酶产生菌落都挑选出一个产果胶酸裂解酶单菌落。

鉴定阳性克隆

从重新划线平板获得单菌落的果胶酶阳性克隆，用 Qiagen Qiaspin Prep Kit 按照制造商(Qiagen, Germany)的教导提取质粒。通过重转化大肠杆菌 SJ2 证实表型，质粒通过限制酶消化来鉴定。

在枯草芽孢杆菌中表达编码果胶酸裂解酶的克隆基因

用 pSJ1678(一个大肠杆菌/枯草芽孢杆菌穿梭载体)上含有该克隆基因的大肠杆菌 DSM11788 的质粒制备物转化枯草芽孢杆菌 PL2306。按照 Yasbin 等(Yasbin R E, Wilson G A&Young F E; 枯草芽孢杆菌溶源菌株中的转化和转染：前噬菌体在感受态细胞中的选择性诱导的证据，细菌学杂志 1975, 121: 296-304)的描述制备感受态细胞并进行转化。

分离和检测枯草芽孢杆菌转化子

将转化过的细胞铺在含有 6mg/ml 氯霉素、0.4%葡萄糖、10mM KH_2PO_4 的 LB 琼脂平板上，并于 37℃培养 18 小时。与以上对大肠杆菌的相同方法鉴定果胶酸裂解酶阳性菌落。

将每个阳性转化子接种到 10ml 含有 6mg/ml 氯霉素的 TY 培养基中。于 37℃，250rpm 振荡培养 1 天后，移出 50μl 上清液。通过将 10μl 上清液加入含有 0.7%多聚果胶酸钠(Sigma, US)的 LB 琼脂平板上穿出的孔中来鉴定果胶酸裂解酶活性。

于 37℃培养 16 小时后，将平板在 1M $CaCl_2$ 中浸 5 到 30 分钟。对于含有来自表达果胶酸裂解酶的克隆的果胶酸裂解酶的上清液，会出现明显的浑浊晕圈。将一个这样的克隆称为 MB464。

通过离心去除细胞，剩余的上清液用作纯化果胶酸裂解酶的来源。

纯化和鉴定

将按照以上描述得到的枯草芽孢杆菌转化子接种到 100ml 含有 6mg/ml 氯霉素的 TY 培养基中。于 37℃、250rpm 振荡培养过夜，将培养物作为种子接到 11 个含有 100ml 复合生长培养基(美国专利 5371198，实施例 1，此处全文引作参考文献)的摇瓶中。

用 1ml 培养物作接种，于 37℃、250 rpm 振荡培养 4 天。

用 NaOH 将发酵培养基调至 pH7.5，并用阳离子絮凝剂 C521(10%溶液)和 0.1%阴离子试剂 A130 进行絮凝：于室温向 6500ml 发酵培养基中边搅拌边同时加入 306ml C521(10%)和 608ml A130。絮凝的物质使用 Sorval RC 3B 离心机于 10000rpm 离心 30 分钟来分离。上清液用 F 号 Whatman 玻璃滤器澄清，总共得到 7200 ml 清亮溶液。

用 MW 截留值为 10kDa 的 filtron 超滤法将液体浓缩成分别为 500ml 和 840ml 的两份。

用醋酸将 pH 调至 5.3，将浓缩液上样到用 50mM 醋酸钠缓冲液(pH 5.3)平衡过的 200ml S-Sepharose 柱子上。用 NaCl 终浓度为 0.5M 的 21 线性梯度洗脱本发明的果胶酸裂解酶（*B. agarad haerens*）。在这个 pH 下，来自枯草芽孢杆菌的果胶酸裂解酶也会结合到 Sepharose 上，但其 pI 更高(7.6 对 6.0)。因此克隆的本发明所述果胶酸裂解酶首先被洗脱，分析流分的 APSU 单位及其与针对枯草芽孢杆菌果胶酸裂解酶产生的抗血清的反应性。

用带有截留值为 20kDa 的 GR61 膜的 Amicon 超滤池浓缩 *B. agaradhaerens* 果胶酸裂解酶。

总共得到 90000APSU 单位。该样品不含蛋白酶，并且用针对枯草芽孢杆菌果胶酸裂解酶产生的抗血清确定出它不含枯草芽孢杆菌果胶酸裂解酶。

在 SDS-PAGE 中可以容易地看到本发明的果胶酸裂解酶是一个 MW 为 36kDa 的条带。将该条带电印迹后确定出其氨基端为：Ser-Asn-Gly-Pro-Gln-Gly-Tyr-Ala-Ser-Met-Asn-Gly-Gly-Thr。

这与由 SEQ ID NO: 1 所示 DNA 序列推测的 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列是一致的，其中带有 33 个氨基酸前序列。从推测序列计算的

MW 是 36kDa，pI 是 6。280nm 的摩尔消光系数为 48，930。

于 40℃测定不同 pH 值下的 β-反式消除活性(用 235nm 处裂解酶检测法)作为稳态动力学。相对比率计算为最大活性的百分比，得到以下结果:

pH	活性%
6.5	0
7	5
7.5	8
8	21
8.5	32
9	38
9.5	39
10	52
10.5	47
11	100
11.2	66
11.5	3

该 pH 关系图是用以下缓冲液测定的:

pH 6.0: Na-MES 0.1M

pH 6.5、7.0&7.5: Na-MOPS 0.1M

pH 8.0&8.5: Tris 0.1M

pH 9.0、9.5、10.0&10.5: 甘氨酸钠 0.1M

pH: 11-11.5: 碳酸钠 0.1M

MES 是 2[N-吗啉代] 乙烷磺酸(Sigma 编号 M-8250)

MOPS 是 3[N-吗啉代]丙烷磺酸(Sigma 编号 M-1254)

Tris: (Merck No.1.08382)

甘氨酸(Merck)，碳酸钠(Merck No.6392).

相应地，在不同温度的相对活性(在 pH10)为:

温度℃	活性%
40	69
50	100
55	97
60	68
65	71

在枯草芽孢杆菌中的亚克隆

用以下两个寡核苷酸的 PCR 引物组对本发明所述果胶酸裂解酶编码 DNA 序列(SEQ ID NO: 1)做 PCR 扩增:

Pecl.B.aga.upper.SacII
5′-CTG CAG CCG CGG CAG CTG CTT CAA ATC AGC CAA CTT C-3′

Pecl.B.aga.lower.NotI
5′-GCG TTG AGA CGC GCG GCC GCT TTA CTC TGC ACA CAG GCA GAG C-3′.

限制位点 SacII 和 NotI 加有下划线。

用如上所述分离自 *B. agaradhaerens* NCIMB 40482 的染色体 DNA 作为 PCR 反应的模板，反应依照制造商的说明使用 Amplitaq DNA 聚合酶(Perkin Elmer)。在含有 200μM 各种 dNTP、2.5 单位 Amplitaq DNA 聚合酶（Perkin-Elmer, Cetus, USA）和 100 pmol 每种引物的 PCR 缓冲液(10mM Tris-HCl, pH8.3, 50mM KCl, 1.5mM $MgCl_2$, 0.01%(w/v)明胶)中进行 PCR 反应。

用 DNA 热循环仪(Landgraf, Germany)进行 PCR 反应。于 94℃保温 1 分钟，然后做 30 个 PCR 循环，所用循环方案是 94℃变性 30 秒，60℃退火 1 分钟，72℃延伸 2 分钟。在 0.7%琼脂凝糖胶(Nusieve, FMC)中经电泳分析 5μl 扩增产物试样。出现一个 1.0kb 大小的 DNA 片段表明基因片段被正确扩增。

PCR 片段的亚克隆

用 QIAquick PCR 纯化试剂盒(Qiagen, USA)依照制造商的说明提

纯如上制得的45μl PCR产物试样。将纯化了的DNA稀释到50μl 10mM Tris-HCl(pH8.5)中。用SacII和NotI消化5μg pMOL944和25μl纯化过的PCR片段，在0.8%低凝结温度琼脂糖(SeaPlague GTG, FMC)凝胶中电泳，从胶上切下相关的片段，用QIAquick凝胶提取试剂盒(Qiagen, USA)依照制造商的说明进行纯化。然后将分离的PCR DNA片段连接到用SacII-NotI消化过并纯化了的pMOL944上。于16℃用0.5μg各DNA片段、1U T4 DNA连接酶和T4连接酶缓冲液(Boehringer Mannheim, Germany)连接过夜。

用连接体系转化感受态枯草芽孢杆菌PL2306。转化后的细胞铺在LBPG-10μg/ml卡那霉素平板上。于37℃培养18小时后，将几个克隆在新鲜琼脂板上划线，同时在含有10μg/ml卡那霉素的液体TY培养基中生长，于37℃保温过夜。第二天用Qiaprep Spin质粒微量制备试剂盒#27106，依照制造商对枯草芽孢杆菌质粒制备的建议用1ml细胞来分离质粒。这些质粒DNA用作DNA测序的模板。

保留一个含有果胶酸裂解酶基因的克隆，该克隆命名为MB504。

经引物步移法通过DNA测序来鉴定与果胶酸裂解酶成熟部分对应的DNA，测序使用Taq脱氧终止循环测序试剂盒(Perkin-Elmer,USA)、荧光标记的终止试剂和适当的寡核苷酸作为引物。

按照Devereux等(1984，核酸研究12: 387-395)对序列资料进行分析。在枯草芽孢杆菌中表达克隆的DNA序列，在上清液中出现的蛋白质对应SEQ ID NO: 2所示成熟蛋白质。

纯化和鉴定

5000ml如上获得的枯草芽孢杆菌转化子（MB504）培养液用125ml 10% C521(阳离子)和200ml 0.1% A130(阴离子)于pH7.5进行絮凝，然后进行离心和过滤。在截留值为10kDa的filtronUF膜上将清亮的上清液浓缩至终体积720ml。

为了获得高纯度的酶，用NaOH将40ml调至pH8.0，然后上样到50ml用25mM Tris HCl(pH8.0)平衡过的Q-Sepharose柱子。利用NaCl梯度从柱子上洗脱果胶酸裂解酶。用带有截留值为10kDa的膜的

Amicon 超滤池将洗脱下来的果胶酸裂解酶(共 150ml)浓缩。将浓缩液上样到 Superdex200 柱子上，得到纯的果胶酸裂解酶，其 MW 为 38kDa，等电点在 6.1 左右。

将纯酶于 pH8.0(20mM Tris pH8.0)和 pH10(20mM 甘氨酸 pH10)对 EDTA 透析，并做圆二色性分析：有或没有 EDTA 的光谱未见差别。

4 个样品的差式扫描量热法 DSC 显示酶在 pH8.0 最稳定，在 Tris(pH8.0)中的熔解温度为 61℃左右，对 EDTA 透析后为 62℃。在 pH10，有和没有 EDTA 时酶均在 59℃熔解。

果胶酸裂解酶的催化活性在与底物温育时被 EDTA 抑制，但如果在与底物温育时将 EDTA 清除，对 EDTA 透析过的酶仍有活性。二价阳离子，如 Fe++、Li++、Mg++、Cu++、Mn++对催化活性没有影响。

在洗涤剂中的活性

用商品洗涤剂代替缓冲液，与多聚半乳糖醛酸钠盐(Sigma P-1879)于 40℃温育 20 分钟，随后测定还原糖，相对在甘氨酸缓冲液中测定的活性，在欧洲商品粉末洗涤剂 Ariel Futur™ 中酶有 37%的相对活性，在美国 Tide 商品洗涤剂粉末中酶有 58%相对活性，在市售美国 Tide™ 液体洗涤剂中酶有 37%相对活性。洗涤剂浓度与洗涤剂包装上推荐家用的浓度相同，所用自来水为德国硬度 18 度(欧洲洗涤剂/ 欧洲条件)和德国硬度 9 度(美国洗涤剂/美国条件)。

免疫学特性

在 Danish 公司 DAKO，用常规技术培育抗高度纯化的果胶酸裂解酶的兔多克隆单一特异性血清。血清与本发明的果胶酸裂解酶在琼脂糖凝胶中形成完好的单一沉淀物。

实施例 2

来自地衣芽孢杆菌的果胶酸裂解酶的克隆、表达、纯化和鉴定

地衣芽孢杆菌 ATCC14580 基因组文库的构建按实施例 1 对 *B. agaradhaerens* 的描述进行。地衣芽孢杆菌 ATCC14580 基因文库的果胶酸裂解酶阳性克隆保藏为 DSM11789。在大肠杆菌 DSM11789 的质粒上进行引物步移后，鉴定到来自地衣芽孢杆菌 ATCC14580 的果胶酸

裂解酶编码DNA，即SEQ ID NO: 3。

在枯草芽孢杆菌中进行亚克隆

用以下两个寡核苷酸的PCR引物组PCR扩增本发明所述果胶酸裂解酶(氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示)的DNA编码序列:

Pecl.B.lich.upper.SacII
5′-CTA ACT GCA GCC GCG GCA GCT TCT GCC TTA AAC TCG GGC -3′

Pecl.B.lich.lower.NotI
5′-GCG TTG AGA CGC GCG GCC GCT GAA TGC CCC GGA CGT TTC ACC -3′

限制位点SacII和NotII加有下划线。

用如上所述分离自地衣芽孢杆菌ATCC14580的染色体DNA作为PCR反应的模板，反应按照实施例1的描述进行。出现一个1.0kb大小的DNA片段表明基因片段被正确扩增。

PCR片段的亚克隆

按照实施例1的描述进行，只是用SacII和NotII消化纯化过的PCR片段。保留一个含有果胶酸裂解酶基因的克隆，该克隆命名为MB541。

经引物步移法通过DNA测序来鉴定与果胶酸裂解酶成熟部分对应的DNA，测序使用Taq脱氧终止循环测序试剂盒(Perkin-Elmer,USA)、荧光标记的终止试剂和适当的寡核苷酸作为引物进行。

按照Devereux等(1984，核酸研究12: 387-395)对序列资料进行分析。在枯草芽孢杆菌中表达克隆的DNA序列，在上清液中出现的蛋白质对应SEQ ID NO: 4所示成熟蛋白质。

纯化

使MB541在500ml带有双挡板摇瓶内含有10μg/ml卡那霉素的25x 200ml BPX培养基中于37℃、300rpm生长5天，从而得到3500ml培养液。用醋酸将pH调至5.0，并在搅拌过程中加入100ml阳离子试剂(C521)和200ml阴离子试剂(A130)进行絮凝。絮凝的物质使用Sorval RC 3B离心机于6℃、10000rpm离心30分钟来分离。所得的上清液含

有 370APSU/ml，总体积为 3600 ml。

用 Whatman 玻璃滤器 GF/D 和 C 澄清上清液，最后在一个分子截留为 10kDa 的 filtron UF 膜上进行浓缩。将总体积 2000ml 调至 pH8.5。将 50 克 DEAE A-50 Sephadex(Pharmacia)在 2000ml 50mM Tris(pH8.5)中溶胀。弃去多余的缓冲液，将清澈的浓缩酶溶液与浆液混合 15 分钟。在 Buchner 漏斗上通过吸滤从离子交换材料上分离酶。所得溶液在分子截留为 10kDa 的 filtron 上浓缩至终体积为 800ml。

为了得到高度纯化的果胶酸裂解酶，用 S-Sepharose 阳离子交换层析进行一个终步骤。用醋酸将 50ml 950APSU/ml 的溶液(见上文)调至 pH5.0。将它上样到用 50mmol 醋酸钠(pH5.0)平衡过的含有 S-Sepharose(Pharmacia)的 50ml 柱子上。果胶酸裂解酶发生结合，用 0.5M 氯化钠梯度洗脱。

鉴定

纯酶在 SDS-PAGE 中给出 35kDa 的单一条带，等电点在 6.1 左右。

采用摩尔消光系数 57750(基于由序列推测的氨基酸组成)测定蛋白质的浓度。

利用由于形成双键(可以在 235nm 测量)而导致的裂解的检测方法得到以下数据:

1. (条件: pH10; 甘氨酸缓冲液; 不含钙; 多聚半乳糖醛酸 Sigma P-1879 作为底物): 1μmol/min/mg。

2. (条件: pH10; 甘氨酸缓冲液; 不含钙; DE35(35%酯化的果胶)作为底物): 4μmol/min/mg。

将纯酶在 pH8.0(20mM Tris pH8.0)和 pH10(20mM 甘氨酸 pH10)对 EDTA 透析，圆二色性分析酶，有和没有 EDTA 的光谱没有发现差别。

4 份样品的差示扫描量热法 DSC 显示酶在 pH8.0 最稳定，在 Tris(pH8.0)中的熔解温度为 70℃左右，对 EDTA 透析后为 75℃。在 pH10，有和没有 EDTA 时酶在 55℃熔解。

果胶酸裂解酶的催化活性在与底物温育时被 EDTA 抑制，但如果在与底物温育时将 EDTA 清除，对 EDTA 透析过的酶仍有活性。二价阳离

子，如 Fe++、Li++、Mg++、Cu++、Mn++对催化活性没有影响。

用以下缓冲液于 40℃测定不同 pH 值下的β-反式消除活性(用 235nm 处的裂解酶检测法) 作为稳态动力学:

pH6.0:Na-MES 0.1M

pH 6.5、7.0&7.5: Na-MOPS 0.1M

pH 8.0&8.5:Tris 0.1M

pH 9.0、9.5、10.0&10.5: 甘氨酸钠 0.1M

pH: 11-11.5: 碳酸钠 0.1M

MES:购自 Sigma 编号 M-8250(2[N-吗啉代] 乙烷磺酸)

MOPS: 购自 Sigma 编号 M-1254(3[N-吗啉代]丙烷磺酸)

Tris: 购自 Merck No.1.08382

甘氨酸购自 Merck，碳酸钠购自 Merck No.6392.

将相对活性(速率)计为最大活性的百分比，得到以下结果:

pH	活性%
6.5	1
7	5
7.5	4
8	4
8.5	4
9	6
9.5	23
10	100
10.5	n.d.
11	52
11.2	0

相应地，在不同温度的相对活性(在 pH10)为:

温度℃	活性%
40	65
50	87

55	87
60	100
65	90

洗涤剂中的活性：用商品洗涤剂代替缓冲液，通过与多聚半乳糖醛酸钠盐(Sigma P-1879)于 40℃温育 20 分钟，随后测定还原糖，测得相对在甘氨酸缓冲液中测定的活性，在欧洲商品粉末洗涤剂 Ariel Futur 中酶有 44%的相对活性，在美国 Tide 商品粉末中酶有 51%相对活性，在美国 Tide 液体洗涤剂中酶有 30%相对活性。洗涤剂浓度如推荐所用，自来水在欧洲条件下是 18 度(German 硬度)，在美国条件下是 9 度。

免疫学特性：在 Danish 公司 DAKO，用常规技术培育抗高度纯化的果胶酸裂解酶的兔多克隆单一特异性血清。血清与本发明的果胶酸裂解酶在琼脂糖凝胶中形成完好的单一沉淀物，并且对地衣芽孢杆菌粗产物(如购自 Novo Nordisk A/S 的 Pulpzyme HC 批号 CKF0054 或批号 CKN00009)只形成一个沉淀弧。

实施例 3

来自芽孢杆菌 KJ59，DSM12419 的果胶酸裂解酶的克隆、表达、纯化和鉴定

在枯草芽孢杆菌中亚克隆编码果胶酸裂解酶成熟部分的 DNA 序列(SEQ ID NO: 7)。

用与实施例 1 的描述完全相同的步骤，在 pMOL944/PL2306 表达系统中克隆和表达 SEQ ZD NO: 7 所编码的果胶酸裂解酶成熟部分的编码 DNA 序列。唯一的区别是使用以下两个 PCR 引物，并使用分离自芽孢杆菌 KJ59，DSM12419 的基因组 DNA:

#145375

5'-CAT TCT GCA GCC GCG GCA AAT ACG CCA AAT TTC AAC TTA CAA G-3'

#145376

5'-CAG CAG TAG CGG CCG CTT ACG GTT GGA TGA CAC CAA CTC-3'

所得表达果胶酸裂解酶的枯草芽孢杆菌克隆命名为 MB888。在枯草芽孢杆菌中表达克隆到的DNA序列，上清液中出现的蛋白质对应SEQ ID NO: 8所示成熟蛋白质。

纯化

将用该质粒(MB888)转化的枯草芽孢杆菌培养在含有卡那霉素的PS培养基中。

用阳离子絮凝试剂 C521(10%溶液)和 0.1%阴离子试剂 A130 做絮凝：向2000ml发酵培养基中加入2000ml无离子水，其pH值为6.0，然后于室温边搅拌边同时加入 80ml C521(10%)和 40ml A130。使用 Sorval RC 3B 离心机于 10，000rpm 离心 30 分钟来分离絮凝物质。用 F 号 Whatman 玻璃滤器澄清上清液。共获得含有 204000Trans Units 的 4000ml 清亮溶液。

用 MW 截留值为 10kDa 的 filtron 超滤法将液体浓缩至 500 ml。用 25mM Tris(pH8.0)平衡过的 5g DEAE A-50 Sephadex 处理浓缩液 30 分钟，果胶酸裂解酶不发生结合，将其过滤除去离子交换材料。用 HCl 将滤液调至 pH5.0，并上样到用 25 mM 醋酸钠(pH5.0)平衡过的 S-Sepharose 柱子上。果胶酸裂解酶发生结合，用 NaCl 梯度将酶洗脱为纯蛋白质。

鉴定

纯酶 MW 为 36kDa，pI 为 8.98。

酶在 pH10 的最适温度为大约 65℃。

在 40℃时，相对活性在 pH9 和 11 之间高于 50%。

在 pH6.0，果胶酸裂解酶用 DSC 在 0.1M 醋酸钠(pH6.0)中测量得熔解温度为 74℃。

实施例 4

来自芽孢杆菌 I534 的果胶酸裂解酶的克隆、表达、纯化和鉴定

在枯草芽孢杆菌中亚克隆编码果胶酸裂解酶成熟部分的 DNA 序列(SEQ ID NO: 9)

使用与上述完全相同的步骤，在 pMOL944/PL2306 表达系统中克隆和表达编码果胶酸裂解酶成熟部分的 DNA 序列(SEQ ID NO: 9)。唯一的区别是使用以下两个 PCR 引物，并用分离自芽孢杆菌 I534 的基因组 DNA:

#136558
5′-CCT GCA GCC GCG GCA AAA GGT GAA AGC GAT TCC ACT ATG-3′
#136559
5′-GTT GAG AAA AGC GGC CGC AAC GGA CAC TCG GCT TTA GAG-3′

所得表达果胶酸裂解酶的枯草芽孢杆菌克隆命名为 MB746。在枯草芽孢杆菌中表达克隆到的DNA序列，上清液中出现的蛋白质对应 SEQ ID NO: 10 所示成熟蛋白质。

纯化

将用该质粒(MB746)转化的枯草芽孢杆菌培养在含有卡那霉素的 PS 培养基中。

用阳离子絮凝试剂 C521(10%溶液)和 0.1%阴离子试剂 A130 做絮凝: 用 HCl 将 3700ml 发酵培养基调至 pH5.5，然后于室温，边搅拌边同时加入 37ml C521(10%)和 75ml A130。使用 Sorval RC 3B 离心机于 10，000rpm 离心 30 分钟来分离絮凝物质。用 F 号 Whatman 玻璃滤器澄清上清液。共获得含有 1044000Trans Units 的 40000ml 清亮溶液。

用 MW 截留值为 10kDa 的 filtron 超滤将液体浓缩至 550 ml。产物用 50%MPG(批号#9831)稳定后用于应用实验。

利用阴离子层析(HPQ 柱子，pH8.0,使用 25mM Tris 缓冲液)获得高度纯化的酶；用 NaCl 梯度洗脱酶，最后的纯化步骤是在 Superdex200 柱子上于 0.1M 醋酸钠缓冲液中进行尺寸大小层析。

鉴定

纯酶 MW 为 35kDa，pI 为 6.2。

酶在 pH10 的最适温度高于 70℃。

在 40℃时，相对活性在 pH9 和 11 之间高于 50%。

纯化的果胶酸裂解酶氨基端具有氨基酸序列 KGESDSTMNA，该序列始于 SEQ ID NO: 10 氨基酸序列中的 25 位。

实施例 5

来自芽孢杆菌 AAI12 的果胶酸裂解酶的克隆、表达、纯化和鉴定

在枯草芽孢杆菌中亚克隆编码果胶酸裂解酶成熟部分的 DNA 序列(SEQ ID NO: 5)

使用与实施例 1 所述完全相同的步骤，在 pMOL944/PL2306 表达系统中克隆和表达编码果胶酸裂解酶成熟部分的 DNA 序列(SEQ ID NO: 5)。唯一的区别是使用以下两个 PCR 引物，以及分离自芽孢杆菌 AAI12 的基因组 DNA:

#80501D1C12
5′-CAT TCT GCA GCC GCG GCA GCA TCA TTT CAG TCT AAT AAA AAT TAT C-3′
#80501D1B12
5′-GAC GAC GTA CAA GCG GCC GCG CTA CTG TAC AAC CCC TAC ACC-3′

所得表达果胶酸裂解酶的枯草芽孢杆菌克隆命名为 MB644。在枯草芽孢杆菌中表达克隆到的DNA序列，上清液中出现的蛋白质对应SEQ ID NO: 6 所示成熟蛋白质的成熟蛋白部分。

纯化和鉴定

将用该质粒(MB644)转化的枯草芽孢杆菌培养在含有卡那霉素的 PS 培养基中。纯化。

发现该酶氨基端含有 3 个凝集素结合结构域。

实施例 6

用果胶酸裂解酶处理纤维素类材料:

温度对果胶去除和吸湿力的影响

将 100%棉斜纹机织物(脱浆实验织物#428U，代表典型的纤维素类材

料)用包含实施例 2 的地衣芽孢杆菌果胶酸裂解酶的酶溶液（酶用量为 9 APSU/g 织物）在 pH9 以液体比率 15: 1 进行处理。处理时间为 2 小时，温度在 35-75℃之间。酶处理后将织物彻底冲洗，干燥然后用钌红染色。比色法测量染料的吸收，并作为纤维上残存的果胶的量度。将起始材料的染料吸收计作 100%残存果胶，彻底化学法精练和漂白过的织物的染料吸收计作 0%，由此计算残存果胶的百分比。结果示于表 1。另外，测量吸湿力(滴落实验-测量一滴水被织物吸收需要的时间，以秒计)并与不含酶的对照进行比较。结果示于表 2。

表 1(%残存果胶)

温度℃	35	45	55	65	75
不含酶	100	100	93	90	85
酶	52	40	32	28	26

-碱性精练通常留下 20-25%的残存果胶

表 2

温度℃	35	45	55	65	75
不含酶	32	29	29	12	11
酶	15	10	7	5	3

-目标吸湿力通常<5 秒

两个反应中都可以清楚地看出升高温度的有益效果。

实施例 7

用果胶酸裂解酶处理纤维素类材料:

pH 对果胶去除的影响

将 100%棉斜纹机织物(脱浆实验织物#428U，代表典型的纤维素类材料)用包含实施例 2 中的地衣芽孢杆菌果胶酸裂解酶的酶溶液（酶用量为 9 APSU/g 织物）按液体比率 15: 1 进行处理。处理时间为 2 小时，温度为 55℃，pH 在 8-11 之间。酶处理后将织物彻底冲洗，干燥然后用钌红染色。比色法测量染料的吸收，并作为纤维上残存果胶的量度。将起始材料的染料吸收计作 100%残存果胶，彻底化学精炼和漂白过的织物的染

料吸收计作0%，由此计算残存果胶的百分比。结果示于表3。

表3

pH	8	9	10	10.5	11
%残存果胶	35	32	30	48	61

发现酶的最适pH在9.5左右，但在非常宽的碱性区间都显示良好的活性。

实施例8

本发明的酶在洗涤剂中的应用

按照实施例2的描述获得的纯化酶(批号9751)在利用普通商品液体洗涤剂进行的微量洗涤实验中，以1ppm的含量检测时表现出清洁效果的提高。实验在常规北美洗涤条件下进行。

实施例9

糖酶对香蕉污渍的棉纺织品的效果

方法

将3个香蕉捣碎，在一台Ultra Turrax中用40ml水匀浆。将Style 400 cotton(Testfabrics, Inc.)在该溶液中浸泡，在两个辊子间挤压并过夜干燥。

在商品液体洗涤剂品牌Ariel Futur Liquid中于欧洲洗涤条件下洗涤染污的棉纺织品，分别向洗涤剂液体中加入0.1ppm、0.2ppm、1ppm和10ppm实施例2中的果胶酸裂解酶。重复实验。

结果

Ariel液体：香蕉污渍的去除%(100%是污渍被全部去除)

	实验A	实验B
不含酶	26%	32%
10ppm酶，ex2	59%	58%
1ppm酶，ex2	47%	48%
0.1ppm酶，ex2	35%	34%
10ppm酶，ex1	-	45%

实施例 10

构建和表达果胶酸裂解酶和 CBD 的融合蛋白质

用以下两个寡核苷酸的PCR引物组对来自热纤维梭菌菌株YS(Poole D M; Morag E;Lamed R; Bayer EA; Hazlewood GP;Gilbert HJ(1992) 热纤维梭菌菌株 YS 的多纤维素酶体亚单位 S1 之纤维素结合域的鉴定,Fems 微生物学快报 78(2-3): 181-186)的 CipB 基因的 CBD 编码 DNA 序列进行 PCR 扩增:

CIPCBD.upper.PECL.SalI
5′-CGA CAA TGT CGA CAA TGT AAA ATC AAT CGT CAA GCA AAA TGC CGG AGT CGG CAA AAT CCA GCG CAG ACC GCC AAC ACC GAC CCC GAC TTC ACC GCC AAG CGC AAA TAC ACC GGT ATC AGG CAA TTT G -3′

CIPCBD.lower.NotI
5′-GCG TTG AGA CGC GCG GCC GCT ATA CCA CAC TGC CAC CGG GTT CTT TAC-3′

限制位点 SalI 和 NotI 加有下划线。

按照Poole D M; Morag E;Lamed R; Bayer EA; Hazlewood GP;Gilbert HJ(1992) 热纤维梭菌菌株 YS 的多纤维素酶体亚单位 S1 之纤维素结合域的鉴定, Fems 微生物学快报 78(2-3): 181-186 的描述获得编码 CBD 的染色体 DNA。将编码 CBD 的 DNA 样品作为模板如实施例 1 的描述进行 PCR 反应。出现一个近似 0.5kb 大小的 DNA 片段表明该基因区段被正确扩增。

PCR 片段的亚克隆

如实施例 1 所述进行亚克隆, 但用 SalI 和 NotI 消化纯化过的 PCR 片段。通过从过夜培养液中分离质粒 DNA 来对几个克隆进行分析。

将一个这样的阳性克隆在如上使用的琼脂平板上做几次划线, 该克隆称为 MB914。使克隆 MB914 在 TY-10μg/ml 卡那霉素培养基中 37℃生长过夜, 第二天用 Qiaprep Spin 质粒微量制备试剂盒#27106, 依照制造商对制备枯草芽孢杆菌质粒的建议用 1ml 细胞来分离质粒。将这些 DNA 做测序, 显示出有果胶酸裂解酶-接头-cbd 融合蛋白质所对应的 DNA 序列(如 SEQ ID NO: 11 所示), 蛋白质序列示于 SEQ ID NO: 12 中。

表达和检测果胶酸裂解酶-接头-cbd 融合蛋白质

使克隆 MB914 在 TY 培养基中 37℃、250rpm 生长 20 小时。取 1ml 无细胞上清液与 200μl 10%Avicel(Merck, Darmstadt, Germany)的 Millipore 水溶液混匀。将混合物在 0℃放置半小时。果胶酸裂解酶-接头-cbd 融合蛋白质与 Avicel 结合后,将结合有蛋白质的 Avicel 在 5000g 旋转 5 分钟。将沉淀重悬于 100μl SDS-PAGE 缓冲液中，于 95℃煮沸 5 分钟，5000g 旋转 5 分钟，取 25μl 加入 4-20%Laemmli Tris-Glycine, SDS-PAGE NOVEX 胶(Novex, USA)上。在 Xcell™ Mini-Cell(Novex, USA)中按照制造商的建议将样品电泳，以下包括用考马斯蓝染色、脱色和干燥的所有凝胶处理步骤均按制造商的描述进行。

出现近似 55kDa 的蛋白质条带表明在枯草芽孢杆菌中表达了质粒 pMB914 上编码的果胶酸裂解酶-接头-cbd 融合蛋白质。

实施例 11

用果胶酸裂解酶(SEQ ID NO: 10)处理棉织物

进行以下实验来评价 SEQ ID NO: 10 之果胶酸裂解酶用于精练纺织品的用途。

A. 材料:

1) 织物: 使用机织的军用粗梳棉缎绸(质量 428R(242g/m^2))。

2) 仪器: 使用 Labomat(Mathis, Switzerland), 液体比率 12.5:1(12g 织物在 150ml 缓冲液/酶液中)。

3) 果胶酸裂解酶: 在实验 1 中，使用与 SEQ ID NO: 10 对应的果胶酸裂解酶，配制成在含有 0.02M 磷酸缓冲液和 0.4g/L 非离子表面活性剂(购自 Union Carbide 的 Tergitol 15-S-12)中的溶液。在实验 2 中，使用 SEQ ID NO: 4 的果胶酸裂解酶，配制成在含有 0.05M 磷酸/硼酸缓冲液、2.0g/L 非离子表面活性剂(购自 Union Carbide 的 Tergitol 15-S-12)和 1.0g/L 润湿剂(磺基琥珀酸二辛酯)中的溶液。

B. 步骤和结果

在实验 1 中，在 60-80℃之间，pH7-11，用含有果胶酸裂解酶的溶液与检测织物接触 15 分钟，之后将残存的果胶定量。

以下图 3 显示%残存果胶作为 pH 和温度的函数的等高线图，图 3 显示%残存果胶作为酶用量的函数。果胶去除的最适 pH 是 9.2，最适温度在 80℃以上。在实验 2 中，用含有果胶酸裂解酶的水溶液(600APSU/kg 棉)与检测织物接触，在滚筒中挤压使溶液摄取率达到 85%，并在 40-70℃之间保温 60 分钟，之后确定残存果胶的量。下面的表中显示了%残存果胶作为温度的函数。

温度(℃)	残存果胶(%)
40	35
55	28
70	40

文献

Lever, M.(1972)“比色测定碳水化合物的一个新反应”，分析生物化学 47: 273-279。

N.C.Carpita 和 D.M.Gibeaut(1993)植物杂志 3: 1-30。

Diderichsen, B., Wedsted, U., Hedegaard, L., Jensen, B. R., Sjoholm, C.(1990)编码α-乙酰脱羧酶: 来自短芽孢杆菌的胞外酶的 aldB 的克隆，细菌学杂志 172: 4315-4321。

序列表

(1) 一般资料:

(i) 申请人:

(A) 姓名: NOVO NORDISK A/S

(B) 街道: Novo Alle

(C) 城市: Bagsvaerd

(E) 国家: 丹麦

(F) 邮政编码: DK-2880

(G) 电话:+45 44 44 88 88

(H) 传真: +45 44 44 88 88

(ii) 发明题目: 新的果胶酸裂解酶

(iii) 序列数: 14

(v) 计算机可读形式:

(A) 介质类型: 软盘

(B) 计算机: IBM PC 可兼容机

(C) 操作系统: PC-DOS/MS-DOS

(D) 软件: PatentIn Release #1.0, Version #1.30(EPO)

(2) SEQ ID NO: 1 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 1077 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 1:

ATGACTAAAG TCTTTAAATT GTTACTGGCA TTAGCTCTCG TTTTACCAGT TATCTCATTT 60

AGTTCTCCTG CCTCGCAAGC TGCTTCAAAT CAGCCAACTT CTAACGGACC ACAAGGCTAT 120

GCGTCAATGA ATGGAGGGAC AACCGGTGGT GCAGGCGGCC GTGTCGAATA TGCAAGCACC 180

GGAGCGCAAA TTCAGCAATT GATAGATAAT CGCAGCCGAA GTAATAACCC TGATGAACCA 240

TTAACGATTT ATGTAAACGG AACGATTACA CAAGGAAATT CCCCACAGTC CCTTATAGAT 300

GTTAAAAATC ACCGTGGAAA AGCTCATGAA ATTAAAAACA TCTCTATTAT CGGTGTAGGA 360

ACAAATGGAG AGTTTGATGG CATTGGGATA AGACTATCAA ACGCCCATAA TATCATTATC 420

CAAAATGTAT CAATTCATCA TGTGCGAGAG GGAGAAGGCA CGGCTATTGA AGTGACAGAT 480

GAGAGTAAAA ACGTGTGGAT CGATCACAAC GAGTTTTATA GTGAATTTCC AGGTAATGGA 540

GACTCAGATT ATTACGATGG TCTCGTAGAC ATAAAAAGAA ACGCTGAATA TATTACGGTT 600

TCATGGAATA AGTTTGAGAA TCATTGGAAA ACGATGCTCG TCGGTCATAC TGATAATGCC 660

TCATTAGCGC CAGATAAAAT TACGTACCAT CACAATTATT TTAATAATCT TAATTCACGT 720

GTCCCGCTTA TTCGATACGC TGATGTCCAT ATGTTCAATA ACTATTTTAA AGACATTAAC 780

GATACAGCGA TTAACAGTCG TGTAGGGGCC CGTGTCTTTG TAGAAAACAA CTATTTTGAC 840

AACGTAGGAT CAGGACAAGC TGACCCAACG ACTGGTTTTA TTAAAGGGCC TGTTGGTTGG 900

TTCTATGGAA GTCCGAGTAC TGGATATTGG AATTTACGTG GAAATGTATT TGTTAATACA 960

CCGAATAGTC ATTTAAGCTC TACAACAAAC TTTACACCAC CATATAGTTA CAAAGTCCAA 1020

TCAGCTACCC AAGCTAAGTC GTCGGTTGAA CAACATTCGG GAGTAGGTGT TATCAAC 1077

(2) SEQ ID NO:2 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 359 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:2:

```
Met Thr Lys Val Phe Lys Leu Leu Leu Ala Leu Ala Leu Val Leu Pro
1               5                  10                  15

Val Ile Ser Phe Ser Ser Pro Ala Ser Gln Ala Ala Ser Asn Gln Pro
            20                  25                  30

Thr Ser Asn Gly Pro Gln Gly Tyr Ala Ser Met Asn Gly Gly Thr Thr
        35                  40                  45

Gly Gly Ala Gly Gly Arg Val Glu Tyr Ala Ser Thr Gly Ala Gln Ile
    50                  55                  60

Gln Gln Leu Ile Asp Asn Arg Ser Arg Ser Asn Asn Pro Asp Glu Pro
65                  70                  75                  80

Leu Thr Ile Tyr Val Asn Gly Thr Ile Thr Gln Gly Asn Ser Pro Gln
                85                  90                  95

Ser Leu Ile Asp Val Lys Asn His Arg Gly Lys Ala His Glu Ile Lys
            100                 105                 110

Asn Ile Ser Ile Ile Gly Val Gly Thr Asn Gly Glu Phe Asp Gly Ile
        115                 120                 125

Gly Ile Arg Leu Ser Asn Ala His Asn Ile Ile Ile Gln Asn Val Ser
    130                 135                 140
```

```
Ile His His Val Arg Glu Gly Glu Gly Thr Ala Ile Glu Val Thr Asp
145                 150                 155                 160

Glu Ser Lys Asn Val Trp Ile Asp His Asn Glu Phe Tyr Ser Glu Phe
                165                 170                 175

Pro Gly Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr Asp Gly Leu Val Asp Ile Lys
            180                 185                 190

Arg Asn Ala Glu Tyr Ile Thr Val Ser Trp Asn Lys Phe Glu Asn His
        195                 200                 205

Trp Lys Thr Met Leu Val Gly His Thr Asp Asn Ala Ser Leu Ala Pro
    210                 215                 220

Asp Lys Ile Thr Tyr His His Asn Tyr Phe Asn Asn Leu Asn Ser Arg
225                 230                 235                 240

Val Pro Leu Ile Arg Tyr Ala Asp Val His Met Phe Asn Asn Tyr Phe
                245                 250                 255

Lys Asp Ile Asn Asp Thr Ala Ile Asn Ser Arg Val Gly Ala Arg Val
            260                 265                 270

Phe Val Glu Asn Asn Tyr Phe Asp Asn Val Gly Ser Gly Gln Ala Asp
        275                 280                 285

Pro Thr Thr Gly Phe Ile Lys Gly Pro Val Gly Trp Phe Tyr Gly Ser
    290                 295                 300

Pro Ser Thr Gly Tyr Trp Asn Leu Arg Gly Asn Val Phe Val Asn Thr
305                 310                 315                 320

Pro Asn Ser His Leu Ser Ser Thr Thr Asn Phe Thr Pro Pro Tyr Ser
                325                 330                 335

Tyr Lys Val Gln Ser Ala Thr Gln Ala Lys Ser Ser Val Glu Gln His
            340                 345                 350

Ser Gly Val Gly Val Ile Asn
        355
```

(2) SEQ ID NO:3 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 1026 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(vi) 原始来源:

(A)生物: 地衣芽孢杆菌-ATCC14580

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:3:

```
ATGAAGAAAT TAATCAGCAT CATCTTTATC TTTGTATTAG GGGTTGTCGG GTCATTGACA      60

GCGGCGGTTT CGGCAGAAGC AGCTTCTGCC TTAAACTCGG GCAAAGTAAA TCCGCTTGCC     120
```

```
GACTTCAGCT TAAAAGGCTT TGCCGCACTA AACGGCGGAA CAACGGGCGG AGAAGGCGGT     180
CAGACGGTAA CCGTAACAAC GGGAGATCAG CTGATTGCGG CATTAAAAAA TAAGAATGCA     240
AATACGCCTT TAAAAATTTA TGTCAACGGC ACCATTACAA CATCAAATAC ATCCGCATCA     300
AAGATTGACG TCAAAGACGT GTCAAACGTA TCGATTGTCG GATCAGGGAC CAAAGGGGAA     360
CTCAAAGGGA TCGGCATCAA AATATGGCGG GCCAACAACA TCATCATCCG CAACTTGAAA     420
ATTCACGAGG TCGCCTCAGG CGATAAAGAC GCGATCGGCA TTGAAGGCCC TTCTAAAAAC     480
ATTTGGGTTG ATCATAATGA GCTTTACCAC AGCCTGAACG TTGACAAAGA TTACTATGAC     540
GGATTATTTG ACGTCAAAAG AGATGCGGAA TATATTACAT TCTCTTGGAA CTATGTGCAC     600
GATGGATGGA AATCAATGCT GATGGGTTCA TCGGACAGCG ATAATTACAA CAGGACGATT     660
ACATTCCATC ATAACTGGTT TGAGAATCTG AATTCGCGTG TGCCGTCATT CCGTTTCGGA     720
GAAGGCCATA TTTACAACAA CTATTTCAAT AAAATCATCG ACAGCGGAAT TAATTCGAGG     780
ATGGGCGCGC GCATCAGAAT TGAGAACAAC CTCTTTGAAA ACGCCAAAGA TCCGATTGTC     840
TCTTGGTACA GCAGTTCACC GGGCTATTGG CATGTATCCA ACAACAAATT TGTAAACTCT     900
AGGGGCAGTA TGCCGACTAC CTCTACTACA ACCTATAATC CGCCATACAG CTACTCACTC     960
GACAATGTCG ACAATGTAAA ATCAATCGTC AAGCAAAATG CCGGAGTCGG CAAAATCAAT    1020
CCATAA                                                               1026
```

(2) SEQ ID NO:4 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 341 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(vi) 原始来源:

(A)生物: 地衣芽孢杆菌-ATCC14580

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:4:

```
Met Lys Lys Leu Ile Ser Ile Ile Phe Ile Phe Val Leu Gly Val Val
1               5                  10                  15

Gly Ser Leu Thr Ala Ala Val Ser Ala Glu Ala Ala Ser Ala Leu Asn
            20                  25                  30

Ser Gly Lys Val Asn Pro Leu Ala Asp Phe Ser Leu Lys Gly Phe Ala
        35                  40                  45

Ala Leu Asn Gly Gly Thr Thr Gly Gly Glu Gly Gly Gln Thr Val Thr
    50                  55                  60

Val Thr Thr Gly Asp Gln Leu Ile Ala Ala Leu Lys Asn Lys Asn Ala
65                  70                  75                  80
```

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

Thr Ser Ala Ser Lys Ile Asp Val Lys Asp Val Ser Asn Val Ser Ile
            100                 105                 110

Val Gly Ser Gly Thr Lys Gly Glu Leu Lys Gly Ile Gly Ile Lys Ile
        115                 120                 125

Trp Arg Ala Asn Asn Ile Ile Ile Arg Asn Leu Lys Ile His Glu Val
    130                 135                 140

Ala Ser Gly Asp Lys Asp Ala Ile Gly Ile Glu Gly Pro Ser Lys Asn
145                 150                 155                 160

Ile Trp Val Asp His Asn Glu Leu Tyr His Ser Leu Asn Val Asp Lys
                165                 170                 175

Asp Tyr Tyr Asp Gly Leu Phe Asp Val Lys Arg Asp Ala Glu Tyr Ile
            180                 185                 190

Thr Phe Ser Trp Asn Tyr Val His Asp Gly Trp Lys Ser Met Leu Met
        195                 200                 205

Gly Ser Ser Asp Ser Asp Asn Tyr Asn Arg Thr Ile Thr Phe His His
    210                 215                 220
Asn Trp Phe Glu Asn Leu Asn Ser Arg Val Pro Ser Phe Arg Phe Gly
225                 230                 235                 240

Glu Gly His Ile Tyr Asn Asn Tyr Phe Asn Lys Ile Ile Asp Ser Gly
                245                 250                 255

Ile Asn Ser Arg Met Gly Ala Arg Ile Arg Ile Glu Asn Asn Leu Phe
            260                 265                 270

Glu Asn Ala Lys Asp Pro Ile Val Ser Trp Tyr Ser Ser Ser Pro Gly
        275                 280                 285

Tyr Trp His Val Ser Asn Asn Lys Phe Val Asn Ser Arg Gly Ser Met
    290                 295                 300

Pro Thr Thr Ser Thr Thr Thr Tyr Asn Pro Pro Tyr Ser Tyr Ser Leu
305                 310                 315                 320

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

Gly Lys Ile Asn Pro
            340
```

(2) SEQ ID NO:5 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 1530 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(vi) 原始来源:

(A)生物: 芽孢杆菌之种

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:5:

ATGATGAAGA TGAGAAAAGC ATTAAGTGTA TTAGTGATTT TCGGATTATT CGTATCTTTT 60

TTTAGTTTTG GTCATCAAGG AGCAGAAGCG GCATCATTTC AGTCTAATAA AAATTATCAT 120

CTAGTGAATG TGAACAGTGG CAAGTACTTA GAAGTGGGGG CTGCCTCAAC AGAGAACGGT 180

GCAAATGTCC AACAATGGGA AAATACGAAT TGTCATTGTC AACAATGGCG ATTGGTGCAA 240

AATCAGGATG GTTATTATGA GATTGTAAAC CGACATAGTG GCAAAGCATT GGATGTATTT 300

GAACGTTCTT CAGCTGATGG AGCGAACATT GTACAATGGG ATTCGAATGG ACGTAGCAAT 360

CAACAATGGA CGATTCAACA AGTGGGTTCC TCTTATAAAA TAGTTAGCAG ACATAGTGGG 420

AAGGCACTCG AAGTATTTAA CCATTCTAAT CAAAATGGAG CAAATGTCGT ACAGTGGCAA 480

GATTTTGGTA ATCCGAATCA ACTTTGGAAT ATCGTCGAGG TTGGTTCAGG ACAAGCTCAC 540

GATTTCAGTA AGCCGTTGGG GTATGCCTCA ATGAATGGCG GGACCACTGG CGGTCAAGGT 600

GGACGAGTCG AATACGCGAG TACTGGCTCT CAACTACAAA AATTAATCGA TGATCGAAGT 660

CGAAGCAATA ATCCCAATCA ACCACTTACC ATTTATGTAA CTGGGAAAAT CACCCTGCAA 720

AACTCCTCTG ATGATAAAAT TGAAGTGAAA AATCATCGTG GACAAGCTCA TGAAATACGT 780

AATCTGTCTA TCATAGGTCA AGGAACAAGA GGAGAGTTTG ATGGCATTGG TTTACGATTA 840

ATTAATGCGC ACAATGTCAT TGTGCGTAAT CTCTCCATTC ACCATGTACG AGCTGGTTCA 900

GGTGAAGGTA CATCAATTGA AGTTACTCAA GGAAGTAAGA ATATTTGGAT TGATCATAAC 960

GAATTTTATA GTCAACTGGA TGGGAATAAC AACCCTGATC TGTATGATGG TCTTGTCGAT 1020

ATTAAACGGA ATTCGGAGTA CATTACGGTC TCTTGGAACA AGTTTGAGAA TCATTGGAAA 1080

ACGATGCTCG TCGGCCATAC CGATAACGCA TCATTAGCAC CTGATAAAGT TACGTACCAC 1140

CACAACTTTT TCCACAATCT TAATTCCAGA GTTCCGTTAA TTCGATTCGC AGATGTTCAT 1200

ATGGTTAACA ACTATTTCAA AGATATTAAA GATACAGCAA TTAATAGTCG TATGGGAGCA 1260

AGAGTATTTG TAGAAAATAA CTATTTTGAG AATGTAGGAT CAGGTCAACA AGATCCGACC 1320

ACACGACAAA TTAAAACTGC TGTTGGGTGG TTTTATGGTA GTTCTAGCAC TGGATATTGG 1380

AATTTAAGAG GAAATCAATT TATTAACACA CCATCAAGCC ACTTGTCTTC CACAACGAAT 1440

TTCACACCAC CTTATCAGTT CAACGCCCAA TCCGCTCAAG ATGCAAAGCA AGCCGTTGAA 1500

CAGTTTTCGG GTGTAGGGGT TGTACAGTAG 1530

(2) SEQ ID NO:6 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 509 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(vi) 原始来源:

(A)生物: 芽孢杆菌之种

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:6:

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

Phe Val Ser Phe Phe Ser Phe Gly His Gln Gly Ala Glu Ala Ala Ser
            20                  25                  30

Phe Gln Ser Asn Lys Asn Tyr His Leu Val Asn Val Asn Ser Gly Lys
        35                  40                  45

Tyr Leu Glu Val Gly Ala Ala Ser Thr Glu Asn Gly Ala Asn Val Gln
    50                  55                  60

Gln Trp Glu Asn Thr Asn Cys His Cys Gln Gln Trp Arg Leu Val Gln
65                  70                  75                  80

Asn Gln Asp Gly Tyr Tyr Glu Ile Val Asn Arg His Ser Gly Lys Ala
                85                  90                  95

Leu Asp Val Phe Glu Arg Ser Ser Ala Asp Gly Ala Asn Ile Val Gln
            100                 105                 110

Trp Asp Ser Asn Gly Arg Ser Asn Gln Gln Trp Thr Ile Gln Gln Val
        115                 120                 125

Gly Ser Ser Tyr Lys Ile Val Ser Arg His Ser Gly Lys Ala Leu Glu
    130                 135                 140

Val Phe Asn His Ser Asn Gln Asn Gly Ala Asn Val Val Gln Trp Gln
145                 150                 155                 160
Asp Phe Gly Asn Pro Asn Gln Leu Trp Asn Ile Val Glu Val Gly Ser
                165                 170                 175

Gly Gln Ala His Asp Phe Ser Lys Pro Leu Gly Tyr Ala Ser Met Asn
            180                 185                 190

Gly Gly Thr Thr Gly Gly Gln Gly Gly Arg Val Glu Tyr Ala Ser Thr
        195                 200                 205

Gly Ser Gln Leu Gln Lys Leu Ile Asp Asp Arg Ser Arg Ser Asn Asn
    210                 215                 220

Pro Asn Gln Pro Leu Thr Ile Tyr Val Thr Gly Lys Ile Thr Leu Gln
225                 230                 235                 240

Asn Ser Ser Asp Asp Lys Ile Glu Val Lys Asn His Arg Gly Gln Ala
                245                 250                 255

His Glu Ile Arg Asn Leu Ser Ile Ile Gly Gln Gly Thr Arg Gly Glu
            260                 265                 270

Phe Asp Gly Ile Gly Leu Arg Leu Ile Asn Ala His Asn Val Ile Val
        275                 280                 285

Arg Asn Leu Ser Ile His His Val Arg Ala Gly Ser Gly Glu Gly Thr
    290                 295                 300

Ser Ile Glu Val Thr Gln Gly Ser Lys Asn Ile Trp Ile Asp His Asn
305                 310                 315                 320
```

```
Glu Phe Tyr Ser Gln Leu Asp Gly Asn Asn Asn Pro Asp Leu Tyr Asp
                325                 330                 335

Gly Leu Val Asp Ile Lys Arg Asn Ser Glu Tyr Ile Thr Val Ser Trp
            340                 345                 350

Asn Lys Phe Glu Asn His Trp Lys Thr Met Leu Val Gly His Thr Asp
        355                 360                 365

Asn Ala Ser Leu Ala Pro Asp Lys Val Thr Tyr His His Asn Phe Phe
    370                 375                 380

His Asn Leu Asn Ser Arg Val Pro Leu Ile Arg Phe Ala Asp Val His
385                 390                 395                 400

Met Val Asn Asn Tyr Phe Lys Asp Ile Lys Asp Thr Ala Ile Asn Ser
                405                 410                 415

Arg Met Gly Ala Arg Val Phe Val Glu Asn Asn Tyr Phe Glu Asn Val
            420                 425                 430

Gly Ser Gly Gln Gln Asp Pro Thr Thr Arg Gln Ile Lys Thr Ala Val
        435                 440                 445

Gly Trp Phe Tyr Gly Ser Ser Ser Thr Gly Tyr Trp Asn Leu Arg Gly
    450                 455                 460

Asn Gln Phe Ile Asn Thr Pro Ser Ser His Leu Ser Ser Thr Thr Asn
465                 470                 475                 480

Phe Thr Pro Pro Tyr Gln Phe Asn Ala Gln Ser Ala Gln Asp Ala Lys
                485                 490                 495

Gln Ala Val Glu Gln Phe Ser Gly Val Gly Val Val Gln
            500                 505
```

(2) SEQ ID NO:7 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 1047 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(vi) 原始来源:

(A)生物: 芽孢杆菌之种

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:7:

```
ATGGACAAAC TTTATATTGA AAAAGGAAGT GAGAGTATGA TGAGATCAAG CATCGTCAAA      60

CTAGTTGCTT TCAGTATTGT GTTTATGTTA TGGCTCGGTG TATCCTTTCA AACGGCAGAA     120

GCGAATACGC CAAATTTCAA CTTACAAGGC TTTGCCACGT TAAATGGGGG AACAACTGGT     180

GGCGCTGGTG GAGATGTAGT GACGGTTCGT ACAGGGAATG AGTTAATAAA CGCTTTGAAG     240

TCCAAAAACC CTAATCGGCC GTTAACAATT TATGTTAACG GTACGATAAC GCCTAATAAT     300

ACGTCTGATA GTAAGATCGA CATTAAGGAT GTTTCCAATG TATCGATTTT AGGGGTTGGC     360
```

```
ACAAATGGCC GATTAAACGG GATCGGTATT AAAGTATGGC GAGCGAATAA TATCATTATT     420
CGAAACTTGA CAATCCATGA AGTCCATACA GGTGATAAAG ATGCGATTAG CATGATTAGC     480
ATTGAAGGAC CATCTCGAAA CATTTGGGTT GACCATAACG AGCTTTATGC CAGCTTGAAT     540
GTTCATAAAG ATCACTATGA CGGCTTGTTT GACGTAAAGC GCGATGCTTA CAATATTACC     600
TTCTCTTGGA ATTATGTCCA TGATGGCTGG AAAGCGATGC TCATGGGGAA TTCCGATAGT     660
GATAATTATG ACCGAAACAT AACATTCCAC CATAACTACT TCAAAAACTT AAACTCTCGT     720
GTACCTGCGT ACCGTTTTGG AAAGGCGCAC TTGTTTAGCA ATTACTTTGA GAACATTTTA     780
GAAACAGGCA TCAATTCACG GATGGGAGCG GAAATGCTCG TTGAACATAA CGTTTTTGAG     840
AATGCCACCA ACCCGCTAGG ATTCTGGCAT AGCAGTCGAA CAGGTTATTG GAATGTAGCC     900
AATAACCGCT ATATCAATAG CACGGGCAGC ATGCCGACCA CTTCCACGAC CAATTATCGA     960
CCTCCTTACC CCTATACGGT CACACCTGTT GGTGATGTGA AATCAGTTGT CACACGTTAT    1020
GCGGGAGTTG GTGTCATCCA ACCGTAA                                        1047
```

(2) SEQ ID NO:8 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 348 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(vi) 原始来源:

(A)生物: 芽孢杆菌之种

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:8:

```
Met Asp Lys Leu Tyr Ile Glu Lys Gly Ser Glu Ser Met Met Arg Ser
1               5                  10                  15

Ser Ile Val Lys Leu Val Ala Phe Ser Ile Val Phe Met Leu Trp Leu
            20                  25                  30

Gly Val Ser Phe Gln Thr Ala Glu Ala Asn Thr Pro Asn Phe Asn Leu
        35                  40                  45

Gln Gly Phe Ala Thr Leu Asn Gly Gly Thr Thr Gly Gly Ala Gly Gly
    50                  55                  60

Asp Val Val Thr Val Arg Thr Gly Asn Glu Leu Ile Asn Ala Leu Lys
65                  70                  75                  80

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

Thr Pro Asn Asn Thr Ser Asp Ser Lys Ile Asp Ile Lys Asp Val Ser
            100                 105                 110

Asn Val Ser Ile Leu Gly Val Gly Thr Asn Gly Arg Leu Asn Gly Ile
        115                 120                 125

Gly Ile Lys Val Trp Arg Ala Asn Asn Ile Ile Ile Arg Asn Leu Thr
    130                 135                 140
```

```
Ile His Glu Val His Thr Gly Asp Lys Asp Ala Ile Ser Met Ile Ser
145                 150                 155                 160

Ile Glu Gly Pro Ser Arg Asn Ile Trp Val Asp His Asn Glu Leu Tyr
                165                 170                 175

Ala Ser Leu Asn Val His Lys Asp His Tyr Asp Gly Leu Phe Asp Val
            180                 185                 190

Lys Arg Asp Ala Tyr Asn Ile Thr Phe Ser Trp Asn Tyr Val His Asp
        195                 200                 205

Gly Trp Lys Ala Met Leu Met Gly Asn Ser Asp Ser Asp Asn Tyr Asp
    210                 215                 220

Arg Asn Ile Thr Phe His His Asn Tyr Phe Lys Asn Leu Asn Ser Arg
225                 230                 235                 240

Val Pro Ala Tyr Arg Phe Gly Lys Ala His Leu Phe Ser Asn Tyr Phe
                245                 250                 255

Glu Asn Ile Leu Glu Thr Gly Ile Asn Ser Arg Met Gly Ala Glu Met
            260                 265                 270

Leu Val Glu His Asn Val Phe Glu Asn Ala Thr Asn Pro Leu Gly Phe
        275                 280                 285

Trp His Ser Ser Arg Thr Gly Tyr Trp Asn Val Ala Asn Asn Arg Tyr
    290                 295                 300

Ile Asn Ser Thr Gly Ser Met Pro Thr Thr Ser Thr Thr Asn Tyr Arg
305                 310                 315                 320

Pro Pro Tyr Pro Tyr Thr Val Thr Pro Val Gly Asp Val Lys Ser Val
                325                 330                 335

Val Thr Arg Tyr Ala Gly Val Gly Val Ile Gln Pro
            340                 345
```

(2) SEQ ID NO:9 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 1008 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(vi) 原始来源:

(A)生物: 芽孢杆菌之种

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:9:

```
ATGAGAAAAC TCTTATCGAT GATGACTGCG CTTGTACTCA TGTTTGGAAT CATGGTTGTA      60

CCTTCTATAG CCAAAGGTGA AAGCGATTCC ACTATGAATG CTGATTTTTC CATGCAAGGT     120

TTTGCGACAC TTAATGGCGG AACCACAGGA GGAGCCGGCG GGCAAACCGT AACCGTTTCT     180

ACCGGAGACG AACTGCTGGC GGCCTTGAAG AACAAAAACA GCAATACACC CCTGACGATT     240

TATGTAAACG GTACCATAAC GCCATCAAAT ACGTCCGCAA GCAAAATTGA TATTAAAGAC     300
```

```
GTAAACGATG TTTCGATCTT AGGTGTTGGC ACTCAAGGCG AATTTAACGG CATTGGCATT     360

AAAGTATGGC GAGCCAATAA CATTATTCTC CGCAACTTGA AAATACATCA CGTCAATACA     420

GGCGACAAAG ATGCCATTAG CATTGAAGGA CCATCCAAAA ACATATGGGT TGACCACAAT     480

GAGCTCTACA ATAGTCTTGA TGTCCATAAG GATTACTACG ATGGTCTTTT TGATGTCAAA     540

CGGGACGCGG ATTACATTAC ATTCTCGTGG AATTATGTTC ATGATAGCTG GAAGAGCATG     600

CTGATGGGAT CTTCTGATTC CGATTCGTAC AACCGAAAAA TCACATTCCA CAATAACTAC     660

TTTGAAAACC TCAATTCACG TGTACCTTCC ATACGCTTTG GCGAAGCCCA CATCTTCAGC     720

AACTACTACA ATGGCATTAA TGAAACCGGC ATCAACTCCC GCATGGGGGC AAAAGTGCGC     780

ATCGAGGAAA ATCTATTTGA ACGCGCAAAC AACCCGATCG TCAGTCGCGA CAGTCGCCAA     840

GTCGGGTATT GGCACTTGAT AAACAATCAC TTTACTCAAT CAACGGGCGA AATTCCAACG     900

ACTTCAACAA TCACATATAA CCCACCTTAT TCCTATCAAG CTACTCCGGT TGGCCAAGTA     960

AAAGATGTGG TTCGTGCGAA TGCTGGTGTT GGCAAAGTAA CACCTTAA                 1008
```

(2) SEQ ID NO:10 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 335 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(vi) 原始来源:

(A)生物: 芽孢杆菌之种

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:10:

```
Met Arg Lys Leu Leu Ser Met Met Thr Ala Leu Val Leu Met Phe Gly
1               5                  10                  15

Ile Met Val Val Pro Ser Ile Ala Lys Gly Glu Ser Asp Ser Thr Met
            20                  25                  30

Asn Ala Asp Phe Ser Met Gln Gly Phe Ala Thr Leu Asn Gly Gly Thr
        35                  40                  45

Thr Gly Gly Ala Gly Gly Gln Thr Val Thr Val Ser Thr Gly Asp Glu
    50                  55                  60

Leu Leu Ala Ala Leu Lys Asn Lys Asn Ser Asn Thr Pro Leu Thr Ile
65                  70                  75                  80

Tyr Val Asn Gly Thr Ile Thr Pro Ser Asn Thr Ser Ala Ser Lys Ile
                85                  90                  95

Asp Ile Lys Asp Val Asn Asp Val Ser Ile Leu Gly Val Gly Thr Gln
            100                 105                 110
```

Gly Glu Phe Asn Gly Ile Gly Ile Lys Val Trp Arg Ala Asn Asn Ile
115 120 125

Ile Leu Arg Asn Leu Lys Ile His His Val Asn Thr Gly Asp Lys Asp
130 135 140

Ala Ile Ser Ile Glu Gly Pro Ser Lys Asn Ile Trp Val Asp His Asn
145 150 155 160

Glu Leu Tyr Asn Ser Leu Asp Val His Lys Asp Tyr Tyr Asp Gly Leu
165 170 175

Phe Asp Val Lys Arg Asp Ala Asp Tyr Ile Thr Phe Ser Trp Asn Tyr
180 185 190

Val His Asp Ser Trp Lys Ser Met Leu Met Gly Ser Ser Asp Ser Asp
195 200 205

Ser Tyr Asn Arg Lys Ile Thr Phe His Asn Asn Tyr Phe Glu Asn Leu
210 215 220

Asn Ser Arg Val Pro Ser Ile Arg Phe Gly Glu Ala His Ile Phe Ser
225 230 235 240

Asn Tyr Tyr Asn Gly Ile Asn Glu Thr Gly Ile Asn Ser Arg Met Gly
245 250 255

Ala Lys Val Arg Ile Glu Glu Asn Leu Phe Glu Arg Ala Asn Asn Pro
260 265 270

Ile Val Ser Arg Asp Ser Arg Gln Val Gly Tyr Trp His Leu Ile Asn
275 280 285

Asn His Phe Thr Gln Ser Thr Gly Glu Ile Pro Thr Thr Ser Thr Ile
290 295 300

Thr Tyr Asn Pro Pro Tyr Ser Tyr Gln Ala Thr Pro Val Gly Gln Val
305 310 315 320

Lys Asp Val Val Arg Ala Asn Ala Gly Val Gly Lys Val Thr Gly
325 330 335

(2) SEQ ID NO:11 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 1482 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:11:

GCTTCTGCCT TAAACTCGGG CAAAGTAAAT CCGCTTGCCG ACTTCAGCTT AAAAGGCTTT 60

GCCGCACTAA ACGGCGGAAC AACGGGCGGA GAAGGCGGTC AGACGGTAAC CGTAACAACG 120

GGAGATCAGC TGATTGCGGC ATTAAAAAAT AAGAATGCAA ATACGCCTTT AAAAATTTAT 180

GTCAACGGCA CCATTACAAC ATCAAATACA TCCGCATCAA AGATTGACGT CAAAGACGTG 240

TCAAACGTAT CGATTGTCGG ATCAGGGACC AAAGGGGAAC TCAAAGGGAT CGGCATCAAA 300

ATATGGCGGG CCAACAACAT CATCATCCGC AACTTGAAAA TTCACGAGGT CGCCTCAGGC 360

```
GATAAAGACG CGATCGGCAT TGAAGGCCCT TCTAAAAACA TTTGGGTTGA TCATAATGAG     420
CTTTACCACA GCCTGAACGT TGACAAAGAT TACTATGACG GATTATTTGA CGTCAAAAGA     480
GATGCGGAAT ATATTACATT CTCTTGGAAC TATGTGCACG ATGGATGGAA ATCAATGCTG     540
ATGGGTTCAT CGGACAGCGA TAATTACAAC AGGACGATTA CATTCCATCA TAACTGGTTT     600
GAGAATCTGA ATTCGCGTGT GCCGTCATTC CGTTTCGGAG AAGGCCATAT TTACAACAAC     660
TATTTCAATA AAATCATCGA CAGCGGAATT AATTCGAGGA TGGGCGCGCG CATCAGAATT     720
GAGAACAACC TCTTTGAAAA CGCCAAAGAT CCGATTGTCT CTTGGTACAG CAGTTCACCG     780
GGCTATTGGC ATGTATCCAA CAACAAATTT GTAAACTCTA GGGGCAGTAT GCCGACTACC     840
TCTACTACAA CCTATAATCC GCCATACAGC TACTCACTCG ACAATGTCGA CAATGTAAAA     900
TCAATCGTCA AGCAAAATGC CGGAGTCGGC AAAATCCAGC GCAGACCGCC AACACCGACC     960
CCGACTTCAC CGCCAAGCGC AAATACACCG GTATCAGGCA ATTTGAAGGT TGAATTCTAC    1020
AACAGCAATC CTTCAGATAC TACTAACTCA ATCAATCCTC AGTTCAAGGT TACTAATACC    1080
GGAAGCAGTG CAATTGATTT GTCCAAACTC ACATTGAGAT ATTATTATAC AGTAGACGGA    1140
CAGAAAGATC AGACCTTCTG GTGTGACCAT GCTGCAATAA TCGGCAGTAA CGGCAGCTAC    1200
AACGGAATTA CTTCAAATGT AAAAGGAACA TTTGTAAAAA TGAGTTCCTC AACAAATAAC    1260
GCAGACACCT ACCTTGAAAT AAGCTTTACA GGCGGAACTC TTGAACCGGG TGCACATGTT    1320
CAGATACAAG GTAGATTTGC AAAGAATGAC TGGAGTAACT ATACACAGTC AAATGACTAC    1380
TCATTCAAGT CTCGTTCACA GTTTGTTGAA TGGGATCAGG TAACAGCATA CTTGAACGGT    1440
GTTCTTGTAT GGGGTAAAGA ACCCGGTGGC AGTGTAGTAT AG                       1482
```

(2) SEQ ID NO:12 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 493 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:12:

```
Ala Ser Ala Leu Asn Ser Gly Lys Val Asn Pro Leu Ala Asp Phe Ser
1               5                  10                  15

Leu Lys Gly Phe Ala Ala Leu Asn Gly Gly Thr Thr Gly Gly Glu Gly
            20                  25                  30

Gly Gln Thr Val Thr Val Thr Thr Gly Asp Gln Leu Ile Ala Ala Leu
        35                  40                  45

Lys Asn Lys Asn Ala Asn Thr Pro Leu Lys Ile Tyr Val Asn Gly Thr
    50                  55                  60
```

```
Ile Thr Thr Ser Asn Thr Ser Ala Ser Lys Ile Asp Val Lys Asp Val
65                  70                  75                  80

Ser Asn Val Ser Ile Val Gly Ser Gly Thr Lys Gly Glu Leu Lys Gly
                85                  90                  95

Ile Gly Ile Lys Ile Trp Arg Ala Asn Asn Ile Ile Ile Arg Asn Leu
            100                 105                 110

Lys Ile His Glu Val Ala Ser Gly Asp Lys Asp Ala Ile Gly Ile Glu
        115                 120                 125

Gly Pro Ser Lys Asn Ile Trp Val Asp His Asn Glu Leu Tyr His Ser
    130                 135                 140

Leu Asn Val Asp Lys Asp Tyr Tyr Asp Gly Leu Phe Asp Val Lys Arg
145                 150                 155                 160

Asp Ala Glu Tyr Ile Thr Phe Ser Trp Asn Tyr Val His Asp Gly Trp
                165                 170                 175

Lys Ser Met Leu Met Gly Ser Ser Asp Ser Asp Asn Tyr Asn Arg Thr
            180                 185                 190

Ile Thr Phe His His Asn Trp Phe Glu Asn Leu Asn Ser Arg Val Pro
        195                 200                 205

Ser Phe Arg Phe Gly Glu Gly His Ile Tyr Asn Asn Tyr Phe Asn Lys
    210                 215                 220

Ile Ile Asp Ser Gly Ile Asn Ser Arg Met Gly Ala Arg Ile Arg Ile
225                 230                 235                 240

Glu Asn Asn Leu Phe Glu Asn Ala Lys Asp Pro Ile Val Ser Trp Tyr
                245                 250                 255

Ser Ser Ser Pro Gly Tyr Trp His Val Ser Asn Asn Lys Phe Val Asn
            260                 265                 270

Ser Arg Gly Ser Met Pro Thr Thr Ser Thr Thr Thr Tyr Asn Pro Pro
        275                 280                 285

Tyr Ser Tyr Ser Leu Asp Asn Val Asp Asn Val Lys Ser Ile Val Lys
    290                 295                 300

Gln Asn Ala Gly Val Gly Lys Ile Gln Arg Arg Pro Pro Thr Pro Thr
305                 310                 315                 320

Pro Thr Ser Pro Pro Ser Ala Asn Thr Pro Val Ser Gly Asn Leu Lys
                325                 330                 335

Val Glu Phe Tyr Asn Ser Asn Pro Ser Asp Thr Thr Asn Ser Ile Asn
            340                 345                 350

Pro Gln Phe Lys Val Thr Asn Thr Gly Ser Ser Ala Ile Asp Leu Ser
        355                 360                 365

Lys Leu Thr Leu Arg Tyr Tyr Tyr Thr Val Asp Gly Gln Lys Asp Gln
    370                 375                 380

Thr Phe Trp Cys Asp His Ala Ala Ile Ile Gly Ser Asn Gly Ser Tyr
385                 390                 395                 400

Asn Gly Ile Thr Ser Asn Val Lys Gly Thr Phe Val Lys Met Ser Ser
                405                 410                 415

Ser Thr Asn Asn Ala Asp Thr Tyr Leu Glu Ile Ser Phe Thr Gly Gly
            420                 425                 430
```

```
Thr Leu Glu Pro Gly Ala His Val Gln Ile Gln Gly Arg Phe Ala Lys
        435                 440                 445

Asn Asp Trp Ser Asn Tyr Thr Gln Ser Asn Asp Tyr Ser Phe Lys Ser
    450                 455                 460

Arg Ser Gln Phe Val Glu Trp Asp Gln Val Thr Ala Tyr Leu Asn Gly
465                 470                 475                 480

Val Leu Val Trp Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Val Val
                485                 490
```

(2) SEQ ID NO:13 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 1506 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: rRNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:13:

```
GACGAACGCU GGCGGCGUGC CUAAUACAUG CAAGUCGAGC GGAUUGAAGG GAGCUUGCUC      60
CCGGAUAUUA GCGGCGGACG GGUGAGUAAC ACGUGGGCAA CCUGCCCUUU AGACUGGGAU     120
AACUCCGGGA AACCGGUGCU AAUACCGGAU AACACUUUGA ACCUCCUGGU UCGAAGUUGA     180
AAGAUGGCCU UCGUGCUAUC ACUAAAGGAU GGGCCCGCGG CGCAUUAGCU AGUUGGUAAG     240
GUAAUGGCUU ACCAAGGCAA CGAUGCGUAG CCGACCUGAG AGGGUGAUCG GCCACACUGG     300
GACUGAGACA CGGCCCAGAC UCCUACGGGA GGCAGCAGUA GGGAAUCUUC CGCAAUGGAC     360
GAAAGUCUGA CGGAGCAACG CCGCGUGAGU GAGGAAGGCC UUCGGGUCGU AAAGCUCUGU     420
UGUGAGGGAA GAACAAGUAU CGGUUGAAUA AGCCGGUACC UUGACGGUAC CUCACCAGAA     480
AGCCACGGCU AACUACGUGC CAGCAGCCGC GGUAAUACGU AGGUGGCAAG CGUUGUCCGG     540
AAUUAUUGGG CGUAAAGCGC GCGCAGGCGG CUUCUUAAGU CUGAUGUGAA AUCUCGGGGC     600
UCAACCCCGA GCGGCCAUUG GAAACUGGGG AGCUUGAGUG CAGAAGAGGA GAGUGGAAUU     660
CCACGUGUAG CGGUGAAAUG CGUAGAUAUG UGGAGGAACA CCAGUGGCGA AGGCGACUCU     720
CUGGUCUGUA ACUGACGCUG AGGCGCGAAA GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU     780
GGUAGUCCAC GCCGUAAACG AUGAGUGCUA GGUGUUAGGG GUUUCGAUGC CCGUAGUGCC     840
GAAGUAAACA CAUUAAGCAC UCCGCCUGGG GAGUACGACC GCAAGGUUGA AACUCAAAGG     900
AAUUGACGGG GACCCGCACA AGCAGUGGAG CAUGUGGUUU AAUUCGAAGC AACGCGAAGA     960
ACCUUACCAG GUCUUGACAU CCUUUGACCA CUCUGGAGAC AGAGCUUCCC CUUCGGGGGC    1020
AAAGUGACAG GUGGUGCAUG GUUGUCGUCA GCUCGUGUCG UGAGAUGUUG GGUUAAGUCC    1080
CGCAACGAGC GCAACCCUUG AUCUUAGUUG CCAGCAUUUA GUUGGGCACU CUAAGGUGAC    1140
```

UGCCGGUGAC AAACCGGAGG AAGGUGGGGA CGACGUCAAA UCAUCAUGCC CCUUAUGACC 1200

UGGGCUACAC ACGUGCUACA AUGGAUGGUA CAAAGGGUUG CGAAGCCGCG AGGUGAAGCC 1260

AAUCCCAUAA AGCCAUUCUC AGUUCGGAUU GCAGGCUGCA ACUCGCCUGC AUGAAGCCGG 1320

AAUUGCUAGU AAUCGCGGAU CAGCAUGCCG CGGUGAAUAC GUUCCCGGGU CUUGUACACA 1380

CCGCCCGUCA CACCACGAGA GUUUGUAACA CCCGAAGUCG GUGAGGUAAC CUUUUGGAGC 1440

CAGCCGCCUA AGGUGGGACA AAUGAUUGGG GUGAAGUCGU AACAAGGUAG CCGUAUCGGA 1500

AGGUGC 1506

(2) SEQ ID NO:14 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 1508 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: rRNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:14:

GACGAACGCU GGCGGCGUGC CUAAUACAUG CAAGUCGAGC GGACAUUUAG GAGCUUGCUC 60

CUAAAUGUUA GCGGCGGACG GGUGAGUAAC ACGUGGGCAA CCUGCCCUGU AGACUGGGAU 120

AACAUCGAGA AAUCGGUGCU AAUACCGGAU AAUCUUGAGG AUUGCAUAAU CCUCUUGUAA 180

AAGAUGGCUC CGGCUAUCAC UACGGGAUGG GCCCGCGGCG CAUUAGCUAG UUGGUAAGGU 240

AACGGCUUAC CAAGGCGACG AUGCGUAGCC GACCUGAGAG GGUGAUCGGC CACACUGGGA 300

CUGAGACACG GCCCAGACUC CUACGGGAGG CAGCAGUAGG GAAUCUUCCG CAAUGGACGA 360

AAGUCUGACG GAGCAACGCC GCGUGAGUGA UGAAGGGUUU CGGCUCGUAA AGCUCUGUUG 420

UUAGGGAAGA ACAAGUGCCG UUCAAAUAGG GCGGCACCUU GACGGUACCU AACCAGAAAG 480

CCACGGCUAA CUACGUGCCA GCAGCCGCGG UAAUACGUAG GUGGCAAGCG UUGUCCGGAA 540

UUAUUGGGCG UAAAGCGCGC GCAGGCGGUC UUUUAAGUCU GAUGUGAAAU CUCGGGGCUC 600

AACCCCGAGC GGUCAUUGGA AACUGGGAGA CUUGAGUACA GAAGAGGAGA GUGGAAUUCC 660

ACGUGUAGCG GUGAAAUGCG UAGAUAUGUG GAGGAACACC AGUGGCGAAG GCGACUCUCU 720

GGUCUGUAAC UGACGCUGAG GCGCGAAAGC GUGGGGAGCA AACAGGAUUA GAUACCCUGG 780

UAGUCCACGC CGUAAACGAU GAGUGCUAGG UGUUAGGGGU UUCGAUGCCC UUAGUGCCGA 840

AGUUAACACA UUAAGCACUC CGCCUGGGGA GUACGACCGC AAGGUUGAAA CUCAAAGGAA 900

UUGACGGGGG CCCGCACAAG CAGUGGAGCA UGUGGUUUAA UUCGAAGCAA CGCGAAGAAC 960

CUUACCAGGU CUUGACAUCC UUAUGACCUC CCUAGAGAUA GGGAUUUCCC UUCGGGGACA 1020

UAAGUGACAG GUGGUGCAUG GUUGUCGUCA GCUCGUGUCG UGAGAUGUUG GGUUAAGUCC 1080

CGCAACGAGC GCAACCCUUG AUCUUAGUUG CCAGCAUUUA GUUGGGCACU CUAAGGUGAC 1140

UGCCGGUGAU AAACCGGAGG AAGGUGGGGA UGACGUCAAA UCAUCAUGCC CCUUAUGACC 1200

UGGGCUACAC ACGUGCUACA AUGGAUGGUA CAAAGAGCAG CAAAACCGCG AGGUCGAGCC 1260

AAUCUCAUAA AGCCAUUCUC AGUUCGGAUU GUAGGCUGCA ACUCGCCUAC AUGAAGCCGG 1320

AAUUGCUAGU AAUCGCGGAU CAGCAUGCCG CGGUGAAUAC GUUCCCGGGC CUUGUACACA 1380

CCGCCCGUCA CACCACGAGA GUUUGUAACA CCCGAAGUCG GUGGAGUAAC CCUUACGGGA 1440

GCUAGCCGCC UAAGGUGGGA CAGAUGAUUG GGGUGAAGUC GUAACAAGGU AGCCGUAUCG 1500

GAAGGUGC 1508

```
                    1
SEQ ID NO:2         ......AASN QPTSNGPQGY ASMNGGTTGG AGGRVEYAST GAQIQQLIDN
SEQ ID NO:4         ASALNSGKVN PLADFSLKGF AALNGGTTGG EGGQTVTVTT GDQLIAALKN
SEQ ID NO:6         .......... ..DFSKPLGY ASMNGGTTGG QGGRVEYAST GSQLQKLIDD
SEQ ID NO:10        ...KGESDST MNADFSMQGF ATLNGGTTGG AGGQTVTVST GDELLAALKN
SEQ ID NO:8         .......... NTPNFNLQGF ATLNGGTTGG AGGDVVTVRT GNELINALKS

                   51
SEQ ID NO:2         RSRSNNPDEP LTIYVNGTIT QGNSPQSLID VKNHRGKAME IKNISIIGVG
SEQ ID NO:4         K....NANTP LKIYVNGTIT TSNTSASKID VK.......D VSNVSIVGSG
SEQ ID NO:6         RSRSNNPNQP LTIYVTGKIT LQNSSDDKIE VKNHRGQAHE IRNLSIIGQG
SEQ ID NO:8         K....NSNTP LTIYVNGTIT PSNTSASKID IK.......D VNDVSILGVG
SEQ ID NO:10        K....NPNRP LTIYVNGTIT PNNTSDSKID IK.......D VSNVSILGVG

                  101
SEQ ID NO:2         TNGEFDGIGI RLSNAHNIII QNVSIHHVRE G...EGTAIE VTDESKNVWI
SEQ ID NO:4         TKGELKGIGI KIWRANNIII RNLKIHEVAS GDK...DAIG IEGPSKNIWV
SEQ ID NO:6         TRGEFDGIGL RLINAHNVIV RNLSIHHVRA GSG.EGTSIE VTQGSKNIWI
SEQ ID NO:8         TQGEFNGIGI KVWRANNIIL RNLKIHHVNT GDK...DAIS IEGPSKNIWV
SEQ ID NO:10        TNGRLNGIGI KVWRANNIII RNLTIHEVHT GDKDAISMIS IEGPSRNIWV

                  151
SEQ ID NO:2         DHNEFYSEFP GNGDSDYYDG LVDIKRNAEY ITVSWNKFEN HWKTMLVGHT
SEQ ID NO:4         DHNELYHSLN ..VDKDYYDG LFDVKRDAEY ITFSWNYVHD GWKSMLMGSS
SEQ ID NO:6         DHNEFYSQLD GNNNPDLYDG LVDIKRNSEY ITVSWNKFEN HWKTMLVGHT
SEQ ID NO:8         DHNELYNSLD ..VHKDYYDG LFDVKRDADY ITFSWNYVHD SWKSMLMGSS
SEQ ID NO:10        DHNELYASLN ..VHKDHYDG LFDVKRDAYN ITFSWNYVHD GWKAMLMGNS

                  201
SEQ ID NO:2         DNASLAPDKI TYHHNYFNNL NSRVPLIRYA DVHMFNNYFK DINDTAINSR
SEQ ID NO:4         D.SDNYNRTI TFHHNWFENL NSRVPSFRFG EGHIYNNYFN KIIDSGINSR
SEQ ID NO:6         DNASLAPDKV TYHHNFFHNL NSRVPLIRFA DVHMVNNYFK DIKDTAINSR
SEQ ID NO:8         D.SDSYNRKI TFHNNYFENL NSRVPSIRFG EAHIFSNYYN GINETGINSR
SEQ ID NO:10        D.SDNYDRNI TFHHNYFKNL NSRVPAYRFG KAHLFSNYFE NILETGINSR

                  251
SEQ ID NO:2         VGARVFVENN YFDNVGSGQA DPTTGFIKGP VGWFYGSPST GYWNLRGNVF
SEQ ID NO:4         MGARIRIENN LFENAKD... .........P IVSWY.SSSP GYWHVSNNKF
SEQ ID NO:6         MGARVFVENN YFENVGSGQQ DPTTRQIKTA VGWFYGSSST GYWNLRGNQF
SEQ ID NO:8         MGAKVRIEEN LFERANN... .........P IVSRD.SRQV GYWHLINNHF
SEQ ID NO:10        MGAEMLVEHN VFENATN... .........P LGFWH.SSRT GYWNVANNRY

                  301                                                 344
SEQ ID NO:2         VN.TPNSHLS STTNFTPPYS YKVQSATQAK SSVEQHSGVG VIN.
SEQ ID NO:4         VNSRGSMPTT STTTYNPPYS YSLDNVDNVK SIVKQNAGVG KINP
SEQ ID NO:6         IN.TPSSHLS STTNFTPPYQ FNAQSAQDAK QAVEQFSGVG VVQ.
SEQ ID NO:8         TQSTGEIPTT STITYNPPYS YQATPVGQVK DVVRANAGVG KVTG
SEQ ID NO:10        INSTGSMPTT STTNYRPPYP YTVTPVGDVK SVVTRYAGVG VIQP
```

图 1

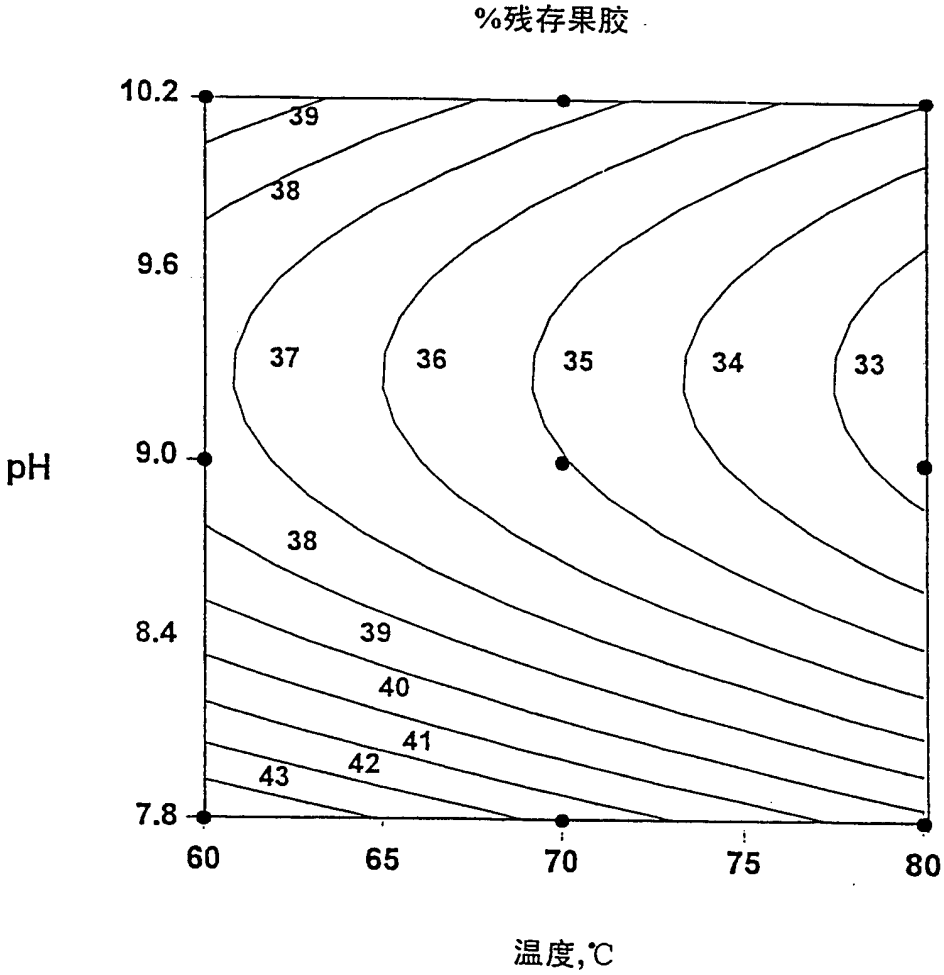

%残存果胶
pH
10.2
9.6
9.0
8.4
7.8
60
65
70
75
80
温度,℃
39
38
37
36
35
34
33
38
39
40
41
42
43

图 2

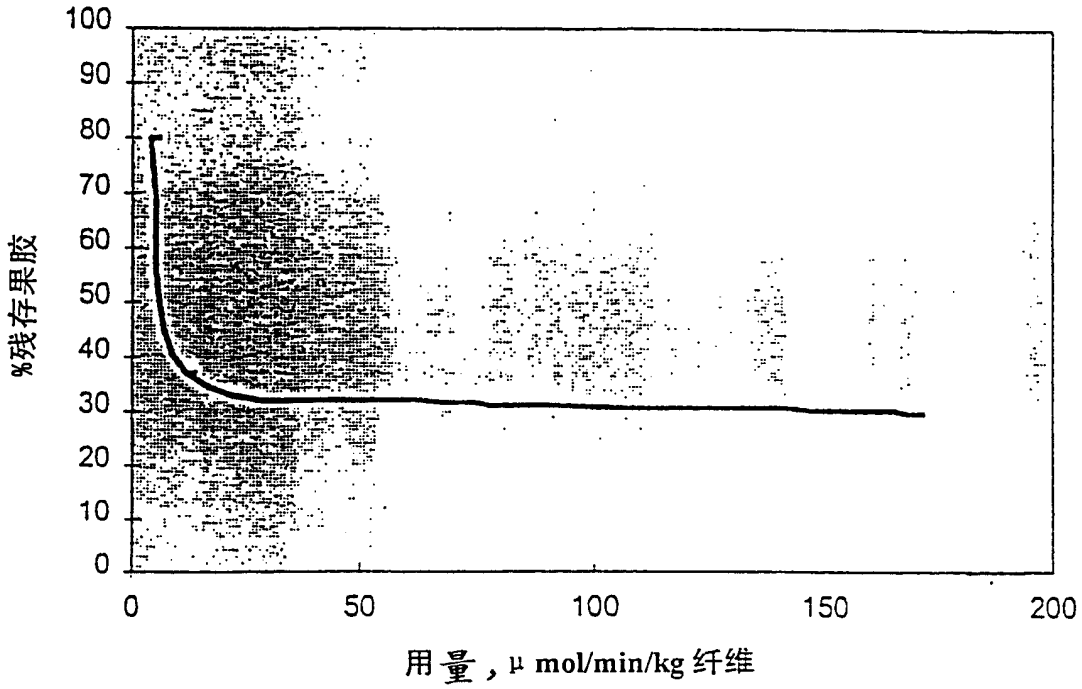

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
%残存果胶
0
50
100
150
200
用量，μ mol/min/kg 纤维

图 3