



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109642226 A

(43)申请公布日 2019.04.16

(21)申请号 201780052704.5

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所

(22)申请日 2017.06.22

11247

(66)本国优先权数据

PCT/CN2016/087852 2016.06.30 CN

(51)Int.Cl.

C12N 9/64(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.02.27

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/038746 2017.06.22

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/005225 EN 2018.01.04

(71)申请人 丹尼斯科美国公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 顾晓岗 Z·邹 Z·谢 H·郝

S·于 S·希普夫斯科夫

权利要求书2页 说明书52页

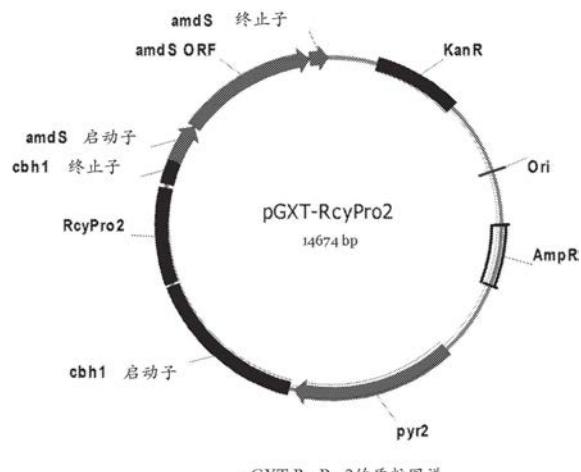
序列表18页 附图10页

(54)发明名称

天冬氨酸蛋白酶

(57)摘要

公开了新颖的天冬氨酸蛋白酶、含有这些蛋白酶的组合物及其用途。



pGXT-RcyPro2的质粒图谱

1. 一种重组构建体,所述重组构建体包含在生产宿主中起作用的调节序列,所述调节序列有效地连接到编码天冬氨酸蛋白酶的核苷酸序列,所述天冬氨酸蛋白酶选自由以下组成的组:

- (a) 与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:7具有至少75%序列同一性的天冬氨酸蛋白酶;
- (b) 与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:9具有至少78%序列同一性的天冬氨酸蛋白酶;以及
- (c) 与SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:8具有至少95%序列同一性的天冬氨酸蛋白酶。

2. 如权利要求1所述的生产宿主,其中所述宿主选自由以下组成的组:真菌、细菌、酵母和藻类。

3. 如权利要求1或2所述的生产宿主,其中天冬氨酸蛋白酶构建体是经染色体表达的或经染色体外表达的。

4. 一种产生天冬氨酸蛋白酶的方法,所述方法包括:

- (a) 用如权利要求1所述的重组构建体转化生产宿主;以及
- (b) 在产生所述天冬氨酸蛋白酶的条件下培养步骤(a)的生产宿主。

5. 如权利要求4所述的方法,其中任选地从所述生产宿主回收所述天冬氨酸蛋白酶。

6. 一种含有天冬氨酸蛋白酶的培养物上清液,所述培养物上清液通过如权利要求4或5中任一项所述的方法获得。

7. 一种用于表达天冬氨酸蛋白酶的重组微生物生产宿主,所述重组微生物生产宿主包含如权利要求1所述的重组构建体。

8. 如权利要求7所述的生产宿主,其中所述宿主选自由以下组成的组:细菌、真菌、酵母和藻类。

9. 如权利要求7或权利要求8所述的生产宿主,其中所述天冬氨酸蛋白酶构建体是经染色体表达的或经染色体外表达的。

10. 天冬氨酸蛋白酶在饲料、喂养料、饲料添加剂组合物或预混物中的用途,其中所述天冬氨酸蛋白酶选自由以下组成的组:

- (a) 与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:7具有至少75%序列同一性的天冬氨酸蛋白酶;
- (b) 与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:9具有至少78%序列同一性的天冬氨酸蛋白酶;以及
- (c) 与SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:8具有至少95%序列同一性的天冬氨酸蛋白酶,

其中所述天冬氨酸蛋白酶可以(i)单独地使用或(ii)与包含至少一种细菌菌株的直接饲喂微生物组合使用或(iii)与至少一种其他酶一起使用或(iv)与包含至少一种细菌菌株的直接饲喂微生物以及至少一种其他酶组合使用。

11. 一种动物饲料,所述动物饲料包含选自由以下组成的组的天冬氨酸蛋白酶:

- (a) 与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:7具有至少75%序列同一性的天冬氨酸蛋白酶;
- (b) 与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:9具有至少78%序列同一性的天冬氨酸蛋白酶;以及
- (c) 与SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:8具有至少95%序列同一性的天冬氨酸蛋白酶,

其中所述天冬氨酸蛋白酶以1-20g/吨饲料的量存在,并且进一步地其中所述天冬氨酸蛋白酶可以(i)单独地使用或(ii)与包含至少一种细菌菌株的直接饲喂微生物组合使用或(iii)与至少一种其他酶一起使用或(iv)与包含至少一种细菌菌株的直接饲喂微生物以及至少一种其他酶组合使用。

12. 一种具有蛋白酶活性的分离的多肽,所述多肽包含选自由以下组成的组的氨基酸

序列蛋白酶：

- (a) 与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:7具有至少75%序列同一性的天冬氨酸蛋白酶；
- (b) 与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:9具有至少78%序列同一性的天冬氨酸蛋白酶；以及
- (c) 与SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:8具有至少95%序列同一性的天冬氨酸蛋白酶。

13. 一种多核苷酸序列，所述多核苷酸序列编码如权利要求13所述的多肽。

14. 一种用于在动物饲料中使用的饲料添加剂组合物，所述饲料添加剂组合物包含如权利要求12所述的多肽，以及至少一种选自由以下组成的组的组分：蛋白质、肽、蔗糖、乳糖、山梨醇、甘油、丙二醇、氯化钠、硫酸钠、乙酸钠、柠檬酸钠、甲酸钠、山梨酸钠、氯化钾、硫酸钾、乙酸钾、柠檬酸钾、甲酸钾、乙酸钾、山梨酸钾、氯化镁、硫酸镁、乙酸镁、柠檬酸镁、甲酸镁、山梨酸镁、焦亚硫酸钠、对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯。

15. 一种用于在动物饲料中使用的颗粒状饲料添加剂组合物，所述颗粒状饲料添加剂组合物包含如权利要求12所述的多肽，其中所述颗粒状饲料添加剂组合物包含通过选自由以下组成的组的工艺产生的颗粒：高剪切制粒、鼓式制粒、挤出、滚圆、流化床附聚、流化床喷涂、喷雾干燥、冷冻干燥、造粒、喷雾冷却、旋转式圆盘雾化、凝聚、压片或上述工艺的任何组合。

16. 如权利要求15所述的颗粒状饲料添加剂组合物，其中这些颗粒的平均直径大于50微米并且小于2000微米。

17. 如权利要求14所述的饲料添加剂组合物，其中所述组合物呈液体形式。

18. 如权利要求17所述的饲料添加剂组合物，其中所述组合物呈适合于在饲料丸粒上喷雾干燥的液体形式。

天冬氨酸蛋白酶

[0001] 本申请要求2016年6月30日提交的PCT/CN2016/087852的权益,所述申请通过引用以其全文并入本文中。

[0002] 通过引用并入序列表

[0003] 将于2016年6月23日创建并同时提交的、以大小为60.5KB、名称为“NB40988_pct_seq_listing.txt”的文件形式提供的序列表通过引用以其全文并入本文中。

技术领域

[0004] 技术领域涉及新颖的天冬氨酸蛋白酶、包含这些蛋白酶的组合物及其用途。

背景技术

[0005] 蛋白酶(protease) (也称为肽酶或胰酶(proteinase))是一种能够切割肽键的酶。蛋白酶经过多次进化,且不同种类的蛋白酶可以通过完全不同的催化机制进行相同的反应。蛋白酶可以在动物、植物、细菌、古细菌和病毒中找到。

[0006] 蛋白质水解可通过目前被分为以下六大组的酶实现:天冬氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、苏氨酸蛋白酶、谷氨酸蛋白酶和金属蛋白酶。

[0007] 天冬氨酸蛋白酶(EC 3.4.23),也称为天冬氨酸内肽酶和天冬氨酰蛋白酶,其使用与一个或多个催化性天冬氨酸残基结合的活化水分子来水解多肽底物中的肽键。与丝氨酸或半胱氨酸蛋白酶不同,天冬氨酸蛋白酶在切割过程中不形成共价中间体。因此,蛋白水解是一步完成的。通常,它们在活性位点上有两个高度保守的天冬氨酸,并且在酸性pH下最具活性。几乎所有已知的天冬氨酰蛋白酶都受到胃酶抑素的抑制。最新的蛋白酶进化超家族的分类可以在MEROPS数据库中找到 [<http://merops.sanger.ac.uk>; Rawlings, N.D., Waller, M., Barrett, A.J. 和 Bateman, A. (2014) MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. [MEROPS:蛋白质水解酶及其底物和抑制剂的数据库] Nucleic Acids Res [核酸研究] 42, D503-D509]。在该数据库中,蛋白酶首先基于结构、机制和催化性残基的顺序按照“族”(超家族)进行分类。在每个“族”中,蛋白酶基于序列相似性被划分为多个家族。每个家族可能含有数百种相关的蛋白酶。

[0008] 目前已知天冬氨酸蛋白酶的五个超家族(族),每一个都代表着同一活性位点和机制的独立进化。每个超家族都包含几个具有相似序列的家族。所述族如下:族AA(例如胃蛋白酶家族)、族AC(例如信号肽酶家族)、族AD(例如早老素家族)、族AE(例如GPR内肽酶家族)、和族AF(例如Ompatin家族)。

[0009] 酸性蛋白酶广泛应用于工业领域,包括但不限于食品、动物饲料、酒精制造、葡萄酒生产、酿造、以及织物产品和家居护理。

[0010] 然而,在许多不同的应用,特别是在食品和饲料工业中,仍然需要蛋白酶。

发明内容

[0011] 在一个方面,本公开提供了一种重组构建体,该重组构建体包含至少一个在生产

宿主中起作用的调控序列,该调控序列有效地连接到编码天冬氨酸蛋白酶的核苷酸序列,该天冬氨酸蛋白酶选自由以下组成的组:

- [0012] (a) 与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:7具有至少75%序列同一性的天冬氨酸蛋白酶;
- [0013] (b) 与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:9具有至少78%序列同一性的天冬氨酸蛋白酶;以及
- [0014] (c) 与SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:8具有至少95%序列同一性的天冬氨酸蛋白酶。
- [0015] 生产宿主可以选自由以下组成的组:细菌、真菌、酵母和藻类。在又另一方面,携带天冬氨酸蛋白酶基因的重组构建体可以在生产宿主中经染色体表达或经染色体外表达。
- [0016] 在另一方面,公开了一种产生天冬氨酸蛋白酶的方法,该方法包括:
- [0017] (a) 用本文所述的重组构建体转化生产宿主;以及
- [0018] (b) 在产生天冬氨酸蛋白酶的条件下培养步骤(a)的生产宿主。
- [0019] 此外,任选地从生产宿主回收天冬氨酸蛋白酶。
- [0020] 在又另一方面,可以通过本文提供的方法获得含有天冬氨酸蛋白酶的培养物上清液。
- [0021] 还公开了一种用于表达天冬氨酸蛋白酶的重组微生物生产宿主,其中重组微生物生产宿主包含本文提供的重组构建体。微生物生产宿主可以选自由以下组成的组:细菌、真菌、酵母和藻类。
- [0022] 在另一方面,提供了天冬氨酸蛋白酶在饲料、喂养料、饲料添加剂组合物或预混物中的用途,其中天冬氨酸蛋白酶选自由以下组成的组:
- [0023] (a) 与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:7具有至少75%序列同一性的天冬氨酸蛋白酶;
- [0024] (b) 与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:9具有至少78%序列同一性的天冬氨酸蛋白酶;以及
- [0025] (c) 与SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:8具有至少95%序列同一性的天冬氨酸蛋白酶
- [0026] 其中天冬氨酸蛋白酶可以(i)单独地使用或(ii)与包含至少一种细菌菌株的直接饲喂微生物组合使用或(iii)与至少一种其他酶一起使用或(iv)与包含至少一种细菌菌株的直接饲喂微生物以及至少一种其他酶组合使用。
- [0027] 还提供了包含天冬氨酸蛋白酶的动物饲料,该天冬氨酸蛋白酶选自由以下组成的组:(a)与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:7具有至少75%序列同一性的天冬氨酸蛋白酶;
- [0028] (b)与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:9具有至少78%序列同一性的天冬氨酸蛋白酶;以及
- [0029] (c)与SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:8具有至少95%序列同一性的天冬氨酸蛋白酶,
- [0030] 其中天冬氨酸蛋白酶以1-20g/吨饲料的量存在,并且进一步地其中天冬氨酸蛋白酶可以(i)单独地使用或(ii)与包含至少一种细菌菌株的直接饲喂微生物组合使用或(iii)与至少一种其他酶一起使用或(iv)与包含至少一种细菌菌株的直接饲喂微生物以及至少一种其他酶组合使用。
- [0031] 在另一方面,一种具有蛋白酶活性的分离的多肽,所述多肽包含氨基酸序列蛋白酶
- [0032] (a)与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:7具有至少75%序列同一性的天冬氨酸蛋白酶;
- [0033] (b)与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:9具有至少78%序列同一性的天冬氨酸蛋白酶;

以及

- [0034] (c) 与SEQ ID N0:4或SEQ ID N0:8具有至少95%序列同一性的天冬氨酸蛋白酶。
- [0035] 在仍另一方面,提供了编码本文所述多肽的多核苷酸序列。
- [0036] 在又另一个实施例中,公开了一种用于在动物饲料中使用的饲料添加剂组合物,所述饲料添加剂组合物包含本文所述的多肽,以及至少一种选自由以下组成的组的组分:蛋白质、肽、蔗糖、乳糖、山梨醇、甘油、丙二醇、氯化钠、硫酸钠、乙酸钠、柠檬酸钠、甲酸钠、山梨酸钠、氯化钾、硫酸钾、乙酸钾、柠檬酸钾、甲酸钾、乙酸钾、山梨酸钾、氯化镁、硫酸镁、乙酸镁、柠檬酸镁、甲酸镁、山梨酸镁、焦亚硫酸钠、对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯。
- [0037] 此外,该组合物还可以是用于在动物饲料中使用的颗粒状饲料添加剂组合物,其包含本文所述的多肽,其中颗粒状饲料添加剂组合物包含通过选自由以下组成的组的工艺产生的颗粒:高剪切制粒、鼓式制粒、挤出、滚圆、流化床附聚、流化床喷涂、喷雾干燥、冷冻干燥、造粒、喷雾冷却、旋转式圆盘雾化、凝聚、压片或上述工艺的任何组合。
- [0038] 这些颗粒的平均直径大于50微米并且小于2000微米。
- [0039] 此外,该酶组合物可以呈液体形式,并且更确切地说,可以呈适合于在饲料丸粒上喷雾干燥的液体形式。
- [0040] 附图与序列说明
- [0041] 图1为pGXT-RcyPro2的质粒图谱。
- [0042] 图2为经纯化的RcyPro2、RcoPro2和GcyPro1的剂量反应曲线。
- [0043] 图3为经纯化的RcyPro2、RcoPro2和GcyPro1的pH曲线。
- [0044] 图4为经纯化的RcyPro2、RcoPro2和GcyPro1的温度曲线。
- [0045] 图5为使用OPA测定,在pH 3时,经纯化的真菌天冬氨酸蛋白酶的大豆玉米粉水解。
- [0046] 图6为使用BCA测定,在pH 3时,经纯化的真菌天冬氨酸蛋白酶的大豆玉米粉水解。
- [0047] 图7示出了经纯化的RcyPro2、RcoPro2和GcyPro1的胃蛋白酶稳定性。
- [0048] 图8示出了经纯化的RcyPro2、RcoPro2和GcyPro1雾度降低性能。
- [0049] 图9是RcyPro2、RcoPro2、GcyPro1和多种同源天冬氨酸真菌蛋白酶成熟区域的Clustal W多序列比对。
- [0050] 图10是显示Rcypro2、RcoPro2和GcyPro1以及多种天冬氨酸真菌蛋白酶的系统发育树。
- [0051] 以下序列遵循37C.F.R. §§1.821-1.825 (“Requirements for Patent Applications Containing Nucleotide Sequences and/or Amino Acid Sequence Disclosures—the Sequence Rules[包含核苷酸序列和/或氨基酸序列公开的专利申请的要求-序列规则]”) 并符合世界知识产权组织(WIPO) 标准ST.25(2009) 和欧洲专利公约(EPC) 以及专利合作条约(PCT) 法规第5.2和49.5(a-bis) 条,以及行政章程第208款和附件C关于序列表的要求。用于核苷酸和氨基酸序列数据的符号和格式遵循如37C.F.R. §1.822中所述的条例。
- [0052] 表1.核苷酸和氨基酸SEQ ID号的汇总

[0053]

说明	基因序列的生物体来源	核苷酸 SEQ ID NO.	全长氨基酸 SEQ ID NO.	成熟蛋白酶氨基酸 (从里氏木霉培养物中分离的) SEQ ID NO.
RcyPro2	柱孢篮状菌 (<i>Rasamsonia cylindrospora</i>) CBS549.62	1	2	7
RcoPro2	堆肥篮状菌 (<i>Rasamsonia composticola</i>) CBS549.92	3	4	8
GcyPro1	<i>Geosmithia cylindrospora</i> NRRL2673	5	6	9

具体实施方式

[0054] 引用的所有专利、专利申请和出版物均通过引用将其全文并入本文中。

[0055] 在本公开中,使用了许多术语和缩写。除非另有特别说明,以下定义适用。

[0056] 在元素或组分前的冠词“一个/种(a/an)”和“所述(the)”在关于所述元素或组分的实例(即,出现)的数目旨在是非限制性的。因此,“一个/种(a/an)”和“所述(the)”应理解为包括一个/种或至少一个/种,并且元素或组分的单数词语形式还包括复数,除非该数字明显意指单数。

[0057] 术语“包含”意指如权利要求书中所提及的说明的特征、整数、步骤或组分的存在,而并未排除一个或多个其他特征、整数、步骤、组分或其组的存在或添加。术语“包含”旨在包括术语“基本上由…组成”和“由…组成”所涵盖的实施例。类似地,术语“基本上由…组成”旨在包括由术语“由…组成”涵盖的实施例。

[0058] 在存在的情况下,所有范围是包含端值的和可组合的。例如,当列举“1至5”的范围时,所列举的范围应解释为包括“1至4”、“1至3”、“1至2”、“1至2和4至5”、“1至3和5”等范围。

[0059] 术语“蛋白酶”意指源自微生物(例如真菌、细菌)或衍生自植物或动物的蛋白质或多肽结构域,且其具有催化肽键在蛋白质主链的一个或多个不同位置的切割的能力(如E.C.3.4)。

[0060] 术语“酸性蛋白酶”是指在酸性条件下能够水解蛋白质的蛋白酶。

[0061] 术语“天冬氨酸蛋白酶(aspartic protease)”和“天冬氨酸蛋白酶(aspartic acid protease)”在本文中可互换地使用,是一种酸性蛋白酶。天冬氨酸蛋白酶(EC 3.4.23),也称为天冬氨酰蛋白酶,是使用一个活化的水分子与一个或多个催化天冬氨酸残基结合,以水解多肽底物中的肽键。通常,它们在活性位点上有两个高度保守的天冬氨酸,并且在酸性pH下最具活性。

[0062] 缩写“AFP”是指一种天冬氨酸真菌蛋白酶,是一种来自真菌微生物来源的天冬氨酸蛋白酶。

[0063] 如本文所使用的,术语“直接饲喂微生物”(“DFM”)是活的(有活力的)天然发生的微生物的来源。DFM可以包含一个或多个这样的天然发生的微生物,例如细菌菌株。DFM的类别包括芽孢杆菌属(*Bacillus*)、乳酸菌和酵母菌。因此,术语DFM涵盖以下一种或多种:直接饲喂细菌、直接饲喂酵母、直接饲喂酵母及其组合。

[0064] 芽孢杆菌属(*Bacilli*)是独特的、形成孢子的革兰氏阳性杆菌。这些孢子非常稳定,并且可以承受环境条件,如热、湿气和一定范围的pH。这些孢子当被动物摄入后会萌发成有活性的营养细胞,并可用于粗粉和压成丸粒的饮食中。乳酸菌是革兰氏阳性球菌,可产生对病原体有拮抗作用的乳酸。由于乳酸菌似乎有点对热敏感,所以它们不能用于压成丸粒的饮食中。乳酸菌的种类包括双歧杆菌、乳杆菌和链球菌。

[0065] 术语“益生菌”意指通过选择性地刺激一种或有限数量的有益细菌的生长和/或活性来有益地影响宿主的不可消化食物成分。

[0066] 如本文所使用的,术语“益生菌培养物”定义了当例如以足够数量摄取或局部应用时,有益地影响宿主生物体(即通过赋予宿主生物体一个或多个可证明的健康益处)的活的微生物(包括例如细菌或酵母)。益生菌可以改善一个或多个粘膜表面的微生物平衡。例如,粘膜表面可以是肠、泌尿道、呼吸道或皮肤。如本文所使用的,术语“益生菌”还涵盖可以刺激免疫系统的有益分支并同时减少在粘膜表面(例如肠)中的炎症反应的活的微生物。虽然没有益生菌摄入的下限或上限,但是已经表明,至少 10^6 – 10^{12} ,优选至少 10^6 – 10^{10} ,优选 10^8 – 10^9 cfu作为日剂量将在受试者中有效地实现有益的健康效果。

[0067] 如本文所使用的,术语“CFU”意指“菌落形成单位”并且是代表衍生自单个祖细胞的细胞聚集的菌落中的活细胞的测量。

[0068] 术语“分离的”意指处于在自然界中不存在的形式或环境中的物质。分离物质的非限制性实例包括(1)任何非天然发生的物质,(2)任何物质,包括但不限于,任何宿主细胞、酶、变体、核酸、蛋白质、肽或辅因子,其至少部分地从与其天然相关的天然发生的成分中的一种或多种或全部中除去;(3)任何经人手修饰的物质(相对于自然界中发现的物质);或(4)通过相对于与其天然相关的其他组分增加物质的量而修饰的任何物质。术语“分离的核酸分子”、“分离的多核苷酸”、和“分离的核酸片段”将可互换使用并是指单链或双链的RNA或DNA的聚合物,任选地含有合成的、非-天然的或改变的核苷酸碱基。呈DNA聚合物形式的分离的核酸分子可由cDNA、基因组DNA或合成的DNA的一个或多个区段构成。

[0069] 术语“经纯化的”如应用于核酸或多肽时通常表示基本上不含其他组分的核酸或多肽,如通过本领域熟知的分析技术确定的(例如,纯化的多肽或多核苷酸在电泳凝胶、色谱洗脱液和/或经历密度梯度离心的介质中形成离散的带)。例如,在电泳凝胶中产生基本

上一条带的核酸或多肽是“经纯化的”。经纯化的核酸或多肽是至少约50%纯的,通常是至少约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%、约99.5%、约99.6%、约99.7%、约99.8%或更加纯的(例如,在摩尔基础上按重量计的百分比)。在相关意义上,当在应用纯化或富集技术之后存在分子的浓度的大幅度增加时,对于该分子而言组合物被富集了。术语“富集”是指化合物、多肽、细胞、核酸、氨基酸或其他特定物质或组分以高于起始组合物的相对或绝对浓度存在于组合物中。

[0070] 如本文所使用的,术语“功能测定”是指提供蛋白质活性指示的测定法。在一些实施例中,该术语是指其中针对以其通常的能力发挥功能的能力来分析蛋白质的测定系统。例如,在蛋白酶的情况下,功能测定涉及确定蛋白酶水解蛋白质底物的有效性。

[0071] 术语“肽”、“蛋白质”和“多肽”在此可互换使用,并且指通过肽键连接在一起的氨基酸的聚合物。“蛋白质”或“多肽”包含氨基酸残基的聚合序列。贯穿本公开使用了遵照IUPAC-IUB生物化学术语联合委员会(Joint Commission on Biochemical Nomenclature, JCBN)定义的氨基酸的单字母和3字母代码。单字母X是指二十个氨基酸中的任一个。还应当理解,由于遗传密码的简并性,多肽可以由多于一种核苷酸序列编码。突变可以由亲本氨基酸的单个字母代码命名,随后是位置编号,然后是变体氨基酸的单个字母代码。例如,将在位置87处的甘氨酸(G)突变为丝氨酸(S)表示为“G087S”或“G87S”。当描述修饰时,位置后面在括号中列出的氨基酸表示由任何列出的氨基酸在该位置处的取代清单。例如,6(L,I)意指位置6可以被亮氨酸或异亮氨酸取代。有时,在序列中,将斜线(/)用于定义取代,例如,F/V表示特定位置,在该位置处可以具有苯丙氨酸或缬氨酸。

[0072] “前导序列”或“前导肽序列”是指在信号肽序列与成熟蛋白酶序列之间的、蛋白酶的正确折叠和分泌所必需的氨基酸序列;它们有时被称为分子内伴侣。前导序列或前导肽序列的切割产生成熟的活性蛋白酶。蛋白酶通常表达为前酶。

[0073] 术语“信号序列”和“信号肽”是指可以参与蛋白质的成熟或前体形式的分泌或定向转运的氨基酸残基序列。典型地,信号序列位于前体或成熟蛋白序列的N-末端。信号序列可以是内源的或外源的。成熟蛋白中一般不存在信号序列。典型地,在蛋白质转运后,信号序列通过信号肽酶从蛋白质切割。

[0074] 术语“成熟”形式的蛋白质、多肽或肽是指没有信号肽序列和前肽序列的蛋白质、多肽或酶的功能形式。

[0075] 术语“前体”形式的蛋白质或肽是指具有有效地连接到该蛋白质的氨基或羧基末端的前导序列的成熟形式的蛋白质。前体还可以具有有效地连接到前导序列的氨基末端的“信号”序列。前体还可以具有涉及翻译后活性的另外的多肽(例如,从其切割以留下成熟形式的蛋白质或肽的多肽)。

[0076] 关于氨基酸序列或核酸序列,术语“野生型”表示氨基酸序列或核酸序列是天然的或天然存在的序列。如本文所使用的,术语“天然存在的”是指在自然界中发现的任何物质(例如蛋白质、氨基酸或核酸序列)。相反,术语“非天然存在”是指在自然界中没有发现的任何物质(例如,在实验室中生产的重组核酸和蛋白质序列、或野生型序列的修饰)。

[0077] 如本文所使用的,关于氨基酸残基位置,“对应于”(corresponding to或corresponds to)或“对应”是指在蛋白质或肽中所列举位置处的氨基酸残基,或类似于、同

源于或等同于蛋白质或肽中所列举残基的氨基酸残基。如本文所使用的，“对应区域”通常是指相关蛋白质或参比蛋白质中的类似位置。

[0078] 术语“衍生自”和“获自”不仅是指由所讨论的生物体的菌株生产或可以由其生产的蛋白质，而且是指由从此类菌株分离的DNA序列编码并且在含有此类DNA序列的宿主生物体中生产的蛋白质。另外，该术语是指由合成的和/或cDNA来源的DNA序列编码并且具有所讨论的蛋白质的鉴定特征的蛋白质。

[0079] 术语“氨基酸”是指蛋白质或多肽的基本化学结构单元。在表2中可以找到本文中使用的缩写以鉴定特定氨基酸。

[0080] 表2. 单个字母和三个字母的氨基酸缩写

<u>氨基酸</u>	<u>三个字母</u>	<u>单个字母</u>
	<u>缩写</u>	<u>缩写</u>
丙氨酸	Ala	A
精氨酸	Arg	R
天冬酰胺	Asn	N
天冬氨酸	Asp	D
半胱氨酸	Cys	C
谷氨酰胺	Gln	Q
谷氨酸	Glu	E
甘氨酸	Gly	G
[0081] 组氨酸	His	H
异亮氨酸	Ile	I
亮氨酸	Leu	L
赖氨酸	Lys	K
甲硫氨酸	Met	M
苯丙氨酸	Phe	F
脯氨酸	Pro	P
丝氨酸	Ser	S
苏氨酸	Thr	T
色氨酸	Trp	W
酪氨酸	Tyr	Y
缬氨酸	Val	V
[0082] 任意氨基酸或如在本文定义的氨基酸	Xaa	X

[0083] 本领域技术人员将认识到，在保留与公开的氨基酸序列相关的功能的同时，可以对本文公开的氨基酸序列进行修改。例如，基因的改变导致给定位点处产生化学上等价的氨基酸但不影响所编码蛋白质的功能特性是常见的，这是本领域所熟知的。例如，本文公开

的氨基酸序列中的任何特定氨基酸都可以替代另一种功能上等价的氨基酸。出于本公开的目的,取代被定义为以下五组中的一组中的交换:

- [0084] 1. 小的脂肪族、非极性或轻微极性残基:Ala、Ser、Thr (Pro、Gly) ;
- [0085] 2. 极性、带负电荷的残基及其酰胺:Asp、Asn、Glu、Gln;
- [0086] 3. 极性、带正电荷的残基:His、Arg、Lys;
- [0087] 4. 大的脂肪族、非极性残基:Met、Leu、Ile、Val (Cys) ;以及
- [0088] 5. 大的芳香族残基:Phe、Tyr、和Trp。

[0089] 因此,氨基酸丙氨酸(疏水性氨基酸)的密码子可以被编码另一个疏水性较弱的残基(例如甘氨酸)或疏水性较强的残基(例如缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸)的密码子取代。类似地,导致一个带负电荷的残基取代另一个带负电荷的残基(例如,天冬氨酸取代谷氨酸)或者一个带正电荷的残基取代另一个带正电荷的残基(例如,赖氨酸取代精氨酸)的改变也可以预期产生功能上等效的产物。在许多情况下,导致蛋白分子的N-末端和C-末端部分改变的核苷酸变化也将预计不会改变所述蛋白的活性。所提出的修饰中的每一种均完全在本领域常规技术内,如测定所编码的产物的生物活性的保留情况。

[0090] 术语“密码子优化的”,如它是指用于转化各种宿主的核酸分子的基因或编码区域,是指核酸分子的基因或编码区域中密码子的改变,以反映宿主生物体的典型密码子使用,而不改变DNA编码的多肽。

[0091] 术语“基因”是指表达特定蛋白质的核酸分子,包括所述编码序列之前(5' 非编码序列)和之后(3' 非编码序列)的调控序列。“天然基因”是指自然界中发现的具有其自身调控序列的基因。“嵌合基因”是指不是天然基因的任何基因,其包含不是在自然界中一起被发现的调节和编码序列。因此,嵌合基因可以包含衍生自不同来源的调控序列和编码序列,或者包含衍生自同一来源但以不同于天然发生的方式排列的调控序列和编码序列。“内源基因”是指位于生物体基因组的天然位置中的天然基因。“外来”基因是指通常不在宿主生物体中被发现,但通过基因转移引入宿主生物体中的基因。外来基因可以包含插入非天然生物体中的天然基因或嵌合基因。“转基因”是通过转化程序引入基因组中的一种基因。

[0092] 术语“编码序列”是指编码特异性氨基酸序列的核苷酸序列。“合适的调控序列”是指位于编码序列的上游(5' 非编码序列)、内部或下游(3' 非编码序列),并且影响相关编码序列的转录、RNA加工或稳定性、或者翻译的核苷酸序列。调控序列可以包括启动子、翻译前导序列、RNA加工位点、效应子结合位点和茎环结构。

[0093] 术语“有效地连接”是指核酸序列在单个核酸分子上的缔合,使得一个核酸片段的功能受到另一个的影响。例如,当启动子能够影响编码序列的表达(即,该编码序列在启动子的转录控制下)时,启动子与该编码序列有效地连接。编码序列可以在正义或反义方向上有效地连接到调控序列上。

[0094] 术语“调控序列”或“控制序列”在此可互换使用,并且是指能够增加或减少生物体内特定基因表达的核苷酸序列区段。调控序列的实例包括但不限于启动子、信号序列、操纵子等。如上所述,调控序列可以以正义或反义方向有效地连接至目的编码序列/基因。

[0095] “启动子”或“启动子序列”是指定义在何处RNA聚合酶开始基因转录的DNA序列。启动子序列通常直接位于转录起始位点的上游或5' 末端。启动子可以全部衍生自天然或天然发生的序列,或者由衍生自在自然界发现的不同启动子的不同元件构成,或者甚至包含合

成的DNA区段。本领域技术人员应当理解,不同的启动子可能引导基因在不同组织或细胞类型中、或在不同发育阶段、或者响应于不同环境或生理条件的表达(“诱导型启动子”)。

[0096] 所述“3’非编码序列”是指位于编码序列下游的DNA序列,并包括编码能够影响mRNA加工或基因表达(例如转录终止)的调控信号的序列。

[0097] 如本文所使用的,术语“转化”是指将核酸分子转移或引入到宿主生物体中。所述核酸分子可以作为线性或环状形式的DNA引入。所述核酸分子可以是自主复制的质粒,或者它可以整合进生产宿主的基因组中。含有转化的核酸的生产宿主被称为“转化的”或“重组的”或“转基因的”生物体或“转化体”。

[0098] 如本文所使用的,术语“重组”是指例如通过化学合成或者通过经基因工程技术操纵分离的核酸区段来将两个原本分离的核酸序列区段进行人工组合。例如,其中一个或多个区段或基因已经被插入的DNA,其自然地或通过实验室操作,从不同的分子、同一分子的另一部分或人工序列插入,导致在基因中引入新的序列并随后在生物体中引入。术语“重组”、“转基因”、“转化”、“工程化”或“外源基因表达修饰”在此可互换地使用。

[0099] 术语“重组构建体”、“表达构建体”、“重组表达构建体”和“表达盒”在此可互换使用。重组构建体包含核酸片段,例如在自然界中未全部一起发现的调控序列和编码序列的人工组合。例如,构建体可以包含衍生自不同来源的调控序列和编码序列,或者包含衍生自相同来源但以不同于天然发生的方式排列的调控序列和编码序列。这样一个构建体可以单独使用或可以与载体结合使用。如果使用载体,则载体的选择取决于如本领域技术人员熟知的将用于转化宿主细胞的方法。例如,可以使用质粒载体。技术人员充分了解必须存在于载体上以便成功转化,选择和繁殖宿主细胞的遗传元件。技术人员还将认识到,不同的独立转化事件可以导致不同水平和模式的表达(Jones等人,(1985)EMBO J[欧洲分子生物学学会杂志]4:2411-2418;De Almeida等人,(1989)Mol Gen Genetics[分子和普通遗传学]218:78-86),并且因此通常筛选多个事件,从而获得显示希望的表达水平和模式的品系。此类筛选可以是完成的标准分子生物学测定、生物化学测定以及其他测定,这些测定包括DNA的印迹分析、mRNA表达的Northern分析、PCR、实时定量PCR(qPCR)、逆转录PCR(RT-PCR)、蛋白表达的免疫印迹分析、酶测定或活性测定、和/或表型分析。

[0100] 术语“生产宿主”、“宿主”和“宿主细胞”在此可互换使用,并且指任何生物体或其细胞,无论是人类还是非人类,其中重组构建体可以稳定或瞬时引入以表达基因。该术语涵盖了亲本细胞的任何后代,由于在繁殖过程中发生的突变,其与亲本细胞不同。

[0101] 术语“百分比同一性”是如通过比较这些序列所确定的两个或更多个多肽序列或者两个或更多个多核苷酸序列之间的关系。在本领域中,“同一性”也意指多肽或多核苷酸序列之间的序列相关性程度,视情况而定,如通过这类序列的串之间的匹配核苷酸或氨基酸的数目所确定的。可通过已知方法容易地计算“同一性”和“相似性”,所述方法包括但不限于以下文献中所述的那些:Computational Molecular Biology[计算分子生物学](Lesk,A.M.编辑),牛津大学出版社(Oxford University Press),纽约州(1988);Biocomputing:Informatics and Genome Projects[生物计算:信息学和基因组工程](Smith,D.W.编辑),学术出版社,纽约州(1993);Computer Analysis of Sequence Data,Part I[序列数据的计算机分析,第一部分](Griffin,A.M.和Griffin,H.G.编辑),胡玛纳出版社(Humana Press),新泽西州(1994);Sequence Analysis in Molecular Biology[分

子生物学中的序列分析] (von Heijne, G. 编辑), 学术出版社 (1987); 和 Sequence Analysis Primer [引物序列分析] (Gribskov, M. 和 Devereux, J. 编辑), 斯托克顿出版社 (Stockton Press), 纽约州 (1991)。确定同一性和相似性的方法被编入公开可用的计算机程序中。

[0102] 如本文所使用的, “%同一性”或“百分比同一性”或“PID”是指蛋白质序列同一性。百分比同一性可以使用本领域已知的标准技术来确定。有用的算法包括BLAST算法 (参见 Altschul 等人, J Mol Biol [分子生物学杂志], 215:403-410, 1990; 以及 Karlin 和 Altschul, Proc Natl Acad Sci USA [美国科学院院报], 90:5873-5787, 1993)。BLAST程序使用若干个搜索参数, 其中大部分设置为默认值。NCBI BLAST算法按照生物相似性找到最相关的序列, 但是不推荐用于少于20个残基的查询序列 (Altschul 等人, Nucleic Acids Res [核酸研究], 25:3389-3402, 1997; 以及 Schaffer 等人, Nucleic Acids Res. [核酸研究] 29:2994-3005, 2001)。核酸序列搜索的示例性默认BLAST参数包括: 相邻字长阈值=11; E值截止值=10; 打分矩阵 (Scoring Matrix) =NUC.3.1 (匹配=1, 错配=-3); 空位开放 (Gap Opening) =5; 以及空位延伸=2。氨基酸序列搜索的示例性默认BLAST参数包括: 字长大小=3; E值截止值=10; 打分矩阵=BLOSUM62; 空位开放=11; 以及空位延伸=1。百分比 (%) 氨基酸序列同一性值由匹配相同残基的数值除以“参比”序列的残基总数 (包括由程序为最佳/最大比对创建的任何空位) 来确定。BLAST算法将“参比”序列称为“查询”序列。

[0103] 如本文所使用的, “同源蛋白质”或“同源蛋白酶”是指在一级、二级和/或三级结构中具有不同相似性的蛋白质。当比对蛋白质时, 蛋白质同源性可以是指线性氨基酸序列的相似性。蛋白质序列的同源搜索可以使用来自NCBI BLAST的BLASTP和PSI-BLAST使用阈值 (E值截止值) 0.001进行。(Altschul SF, Madde TL, Shaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ, Gapped BLAST and PSI BLAST: a new generation of protein database search programs [空位BLAST和PSI BLAST: 新一代蛋白质数据库搜索程序], Nucleic Acids Res [核酸研究] 1997年第1组; 25 (17) :3389-402)。使用该信息, 可以将蛋白质序列分组。可以使用氨基酸序列构建系统发育树。

[0104] 可以使用LASERGENE生物信息计算包的Megalign程序 (DNASTAR公司, 麦迪逊, 威斯康星州)、Vector NTI v.7.0的AlignX程序 (Informax公司, 贝塞斯达, 马里兰州) 或EMBOSS开放软件包 (EMBL-EBI; Rice等人, Trends in Genetics [遗传学趋势] 16, (6) :276-277 (2000)) 进行序列比对和百分比同一性计算。可以使用具有默认参数的Clustal比对方法 (例如CLUSTALW; 例如版本1.83) (Higgins和Sharp, CABIOS, 5:151-153 (1989); Higgins等人, Nucleic Acids Res. [核酸研究] 22:4673-4680 (1994); 和Chenna等人, Nucleic Acids Res [核酸研究] 31 (13) :3497-500 (2003)) (其可通过欧洲生物信息学研究所从欧洲分子生物学实验室获得) 来执行序列的多重比对。用于CLUSTALW蛋白比对的合适参数包括GAP存在罚分=15、GAP延伸=0.2、矩阵=Gonnet (例如, Gonnet250)、蛋白ENDGAP=-1、蛋白GAPDIST=4和KTUPLE=1。在一个实施例中, 在慢比对情况下, 使用快或慢比对以及默认设置。可替代地, 可以修饰使用CLUSTALW方法 (例如版本1.83) 的参数以同样使用KTUPLE=1、空位罚分=10、GAP延伸=1、矩阵=BLOSUM (例如BLOSUM64)、窗口 (WINDOW) =5和顶部存储的对角线 (TOP DIAGONALS SAVED) =5。

[0105] 作为某些方面的特征, 在此公开了各种多肽氨基酸序列和多核苷酸序列。在某些实施例中可以使用与在此公开的序列具有至少约70%-85%、85%-90%、或90%-95%同一

性的这些序列的变体。可替代地,某些实施例中的变体多肽序列或多核苷酸序列可以与在此公开的序列具有至少60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。所述变体氨基酸序列或多核苷酸序列具有与所公开的序列相同的功能,或具有所公开的序列的功能的至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%。

[0106] 关于多肽,术语“变体”是指与指定的野生型、亲本或参比多肽不同的多肽,因为它包括一种或多种天然发生的或人造的氨基酸取代、插入或缺失。类似地,关于多核苷酸,术语“变体”是指在核苷酸序列中与指定的野生型、亲本或参比多核苷酸不同的多核苷酸。野生型、亲本或参比多肽或多核苷酸的身份将从上下文中显而易见。

[0107] 术语“质粒”、“载体”和“盒”意指染色体外元件,其通常携带非细胞中心代谢的一部分的基因,并且通常呈双链DNA的形式。这样的元件可以是衍生自任何来源的、单链或双链DNA或RNA的、处于直链或环状形式的自主复制序列、基因组整合序列、噬菌体、或核苷酸序列,其中许多核苷酸序列已经被连接或重组成能够将目的多核苷酸引入细胞中的独特构造。“转化盒”是指包含基因并具有促进特定宿主细胞转化的基因之外的元件的特定载体。术语“表达盒”和“表达载体”在此可互换使用,并且是指含有基因并具有允许在宿主中表达该基因的基因之外的元件的特定载体。

[0108] 如本文所使用的,术语“表达”是指处于前体抑或成熟形式的功能性终产物(例如, mRNA或蛋白质)的产生。表达也可指将mRNA翻译成多肽。

[0109] 基因的表达涉及该基因的转录并将mRNA翻译成前体或成熟蛋白。“反义抑制”是指能够抑制靶蛋白表达的反义RNA转录物的产生。“共抑制”是指能够抑制相同的或基本上相似的外源或内源基因的表达的正义RNA转录物的产生(美国专利号5,231,020)。“成熟”蛋白指经翻译后加工的多肽;即已经去除了存在于初级翻译产物中的任何前肽或原肽的多肽。“前体”蛋白质指mRNA的翻译初级产物;即具有仍然存在的前肽和原肽。前肽或原肽可以是但不限于细胞内定位信号。“稳定转化”是指将核酸片段转移至宿主生物体的基因组中,包括细胞核的和细胞器的基因组,导致遗传稳定的遗传。相比之下,“瞬时转化”是指将核酸片段转移至宿主生物体的细胞核中或含有DNA的细胞器中,导致基因表达而无整合或稳定的遗传。含有经转化的核酸片段的宿主生物体被称为“转基因的”生物体。

[0110] 所述表达载体可以是用于转化本领域已知的合适的生产宿主的任何数量的载体或盒中的一种。通常,所述载体或盒将包括引导相关基因的转录和翻译的序列、可选择标记、和允许自主复制或染色体整合的序列。合适的载体通常包括含有转录起始对照的基因的5'区域和控制转录终止的DNA片段的3'区域。两个对照区域都可以衍生自与转化的生产宿主细胞的基因同源的基因和/或对所述生产宿主来说是天然的基因,尽管这样的控制区域不需要如此衍生。

[0111] 可以包含在表达载体中的可能的起始控制区或启动子是众多的并且是本领域技术人员熟悉的。实际上任何能够驱动这些基因的启动子都是合适的,包括但不限于CYC1、HIS3、GAL1、GAL10、ADH1、PGK、PH05、GAPDH、ADC1、TRP1、URA3、LEU2、ENO、TPI(用于在酵母属中表达);AOX1(用于在毕赤酵母属中表达);以及lac、araB、tet、trp、1P_L、1P_R、T7、tac、和trc

(用于在大肠杆菌中表达)以及用于在芽孢杆菌中表达的amy、apr、npr启动子和各种噬菌体启动子。在一些实施例中,该启动子是组成型或诱导型启动子。“组成型启动子”是一种在大多数环境和发育条件下具有活性的启动子。“诱导型”或“阻抑型”启动子是指在环境调节或发育调节下具有活性的启动子。在一些实施例中,启动子是诱导型或阻抑型的,原因是环境因素的变化,这些环境因素包括但不限于碳、氮或其他可利用的营养素、温度、pH值、渗透压、一种或多种重金属的存在、抑制剂的浓度、应力或上述因素的组合,如在本领域中已知的。在一些实施例中,诱导型或阻抑型的启动子是通过代谢因素诱导或抑制的,例如某些碳源的水平、某些能量源的水平、某些分解代谢物的水平、或上述因素的组合,如在本领域中已知的。在一个实施例中,该启动子是对宿主细胞天然的启动子。例如,当里氏木霉为宿主时,启动子是天然的里氏木霉启动子,例如cbh1启动子,其保藏在GenBank中的登录号D86235下。

[0112] 合适的启动子的非限制性实例包括cbh1、cbh2、eg11、eg12、eg13、eg14、eg15、xyn1、和xyn2,产黄青霉菌的阻抑型酸性磷酸酶基因(phoA)启动子(参见例如Graessle等人,(1997)Appl. Environ. Microbiol.[应用与环境微生物学],63:753-756)、葡萄糖阻抑型PCK1启动子(参见例如Leuker等人,(1997),Gene[基因],192:235-240)、麦芽糖诱导型、葡萄糖阻抑型MET3启动子(参见Liu等人,(2006),Eukary. Cell[真核细胞],5:638-649)、pKi启动子和cpc1启动子。其他有用启动子的实例包括来自泡盛曲霉和黑曲霉葡萄糖淀粉酶基因的启动子(参见Nunberg等人,(1984)Mol. Cell Biol.[分子与细胞生物学]15 4:2306-2315和Boe1等人,(1984)EMBO J.[欧洲分子生物学学会杂志]3:1581-1585)。此外,里氏木霉xln1基因的启动子可能是有用的(参见EPA 137280A1)。

[0113] 控制转录终止的DNA片段也可以衍生自对优选的生产宿主细胞来说是天然的各种基因。在某些实施例中,包括终止控制区域是任选的。在某些实施例中,所述表达载体包括衍生自优选的宿主细胞的终止控制区域。

[0114] 所述表达载体可以包括在所述生产宿主中,特别是在微生物生产宿主的细胞中。所述生产宿主细胞可以是在真菌或细菌家族中发现的微生物宿主,并且其在大范围的温度、pH值和溶剂耐受性下生长。例如,预期细菌、藻类和真菌(例如丝状真菌和酵母)中的任何一种可以合适地容纳所述表达载体。

[0115] 在所述生产宿主细胞中包括所述表达载体可以用于表达目的蛋白质,使得其可以存在于细胞内、细胞外或细胞内和细胞外的组合中。与用于回收细胞内表达所产生的蛋白质的方法相比,细胞外表达使从发酵产物中回收所需蛋白质更容易。

[0116] 本公开的某些实施例涉及一种重组构建体,该重组构建体包含至少一个在生产宿主中起作用的调控序列,该调控序列有效地连接到编码天冬氨酸蛋白酶的核苷酸序列,该天冬氨酸蛋白酶选自由以下组成的组:

- [0117] (a) 与SEQ ID N0:2或SEQ ID N0:7具有至少75%序列同一性的天冬氨酸蛋白酶;
 - [0118] (b) 与SEQ ID N0:6或SEQ ID N0:9具有至少78%序列同一性的天冬氨酸蛋白酶;以及
 - [0119] (c) 与SEQ ID N0:4或SEQ ID N0:8具有至少95%序列同一性的天冬氨酸蛋白酶。
- [0120] 表达将被理解为包括产生天冬氨酸蛋白酶所涉及的任何步骤,包括但不限于转录、转录后修饰、翻译、翻译后修饰和分泌。编码天冬氨酸蛋白酶的核酸序列的操作,例如

- [0121] (a) 与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:7具有至少75%序列同一性的天冬氨酸蛋白酶；
[0122] (b) 与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:9具有至少78%序列同一性的天冬氨酸蛋白酶；
以及
[0123] (c) 与SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:8具有至少95%序列同一性的天冬氨酸蛋白酶。

[0124] 利用克隆方法对核酸序列进行修饰的技术是本领域中众所周知的。
[0125] 上文定义了调控序列。它们包括表达天冬氨酸蛋白酶所必需或有利的所有成分。每种控制序列对于编码天冬氨酸蛋白酶的核酸序列或可以是天然的或外来的。这种调控序列包括但不限于前导区、聚腺苷酸化序列、前肽序列、启动子、信号序列和转录终止子。可以提供带接头的调控序列以引入的特定的限制性位点便于调控序列与编码天冬氨酸蛋白酶的核苷酸序列的编码区连接。

[0126] 调控序列可以是适当的启动子序列，该启动子序列可被生产宿主识别用于核苷酸序列的表达。启动子序列含有介导天冬氨酸蛋白酶表达的转录控制序列。启动子可以是在生产宿主中显示转录活性的任何核苷酸序列，包括突变、截短和杂交启动子，也可以从编码与生产宿主同源或异源的细胞外或细胞内天冬氨酸蛋白酶的基因中获得。优选的启动子是衍生自里氏木霉的cbhI。

[0127] 调控序列可以是合适的转录终止子，是生产宿主识别的终止转录的序列。终止子序列有效地连接到编码天冬氨酸蛋白酶的核苷酸序列的3' 端。可以使用任何在所选择的生产宿主中起作用的终止子。在一些实施例中，终止序列和启动子序列衍生自相同的来源。在另一个实施例中，终止序列与宿主细胞是同源的。一个特别合适的终止子序列是cbh1，其衍生自木霉属菌株，尤其是里氏木霉。其他有用的真菌终止子包括来自黑曲霉或泡盛曲霉葡萄糖淀粉酶基因的终止子(参见例如Nunberg等人(1984)同上和Boe1等人，(1984)同上)。

[0128] 也可以提到调控序列，这也是一个合适的前导序列。5' 非翻译区(5' UTR) (也称为前导序列或前导RNA)是直接位于起始密码子上游的mRNA的区域。这个区域对于转录物的翻译的调节很重要转录物是通过生产宿主翻译所需要的。

[0129] 前导序列有效地连接到编码天冬氨酸蛋白酶的核苷酸序列的5' 端。可以使用任何在所选择的生产宿主中起作用的前导序列。

[0130] 调控序列也可以是聚腺苷酸化序列，该序列有效地连接到核苷酸序列的3' 端，转录时被生产宿主识别为向转录的mRNA中添加聚腺苷酸化序列的信号。可以使用任何在所选择的生产宿主中起作用的聚腺苷酸化序列。

[0131] 调控序列可以是信号肽编码区域，编码与天冬氨酸蛋白酶的氨基末端相连的氨基酸序列，该氨基酸序列可引导编码的蛋白酶至细胞的分泌途径。任何引导表达的天冬氨酸蛋白酶至生产宿主分泌途径的信号肽编码区域都可以使用。

[0132] 调节序列可以是一个前肽编码区域，它编码位于多肽氨基末端的氨基酸序列。产生的多肽在某些情况下被称为前酶或酶原。前酶通常是无活性的，可以通过催化或自催化将前肽从前酶中切割而转化为成熟的活性多肽以产生成熟的活性酶。

[0133] 重组构建体还可以包含一个或多个核苷酸序列，这些核苷酸序列编码一个或多个有利于引导天冬氨酸蛋白酶表达的因子，例如转录激活因子，如反式作用因子、分子伴侣和加工蛋白酶。可以使用任何在所选择的生产宿主中起作用的因子。编码一个或多个这些因子的核苷酸序列不一定与编码天冬氨酸蛋白酶的核苷酸序列串联。

[0134] 还可期望添加调控序列,使允许相对于生产宿主的生长的天冬氨酸蛋白酶的表达的调控。调控系统的实例是那些导致基因表达通过化学或物理刺激响应被关闭或打开的系统,所述化学或物理刺激包括调控化合物的存在。

[0135] 例如,对于木霉属菌株,化合物(如槐糖、槐糖类似物、木糖和乳糖)可以用来诱导表达。

[0136] 同样令人感兴趣的是包含本文所述的核苷酸序列的重组表达载体:

[0137] (a) 与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:7具有至少75%序列同一性的天冬氨酸蛋白酶;

[0138] (b) 与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:9具有至少78%序列同一性的天冬氨酸蛋白酶;以及

[0139] (c) 与SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:8具有至少95%序列同一性的天冬氨酸蛋白酶,

[0140] 以及启动子和转录和翻译终止信号。

[0141] 各种核酸和调控序列是本领域技术人员熟知的。这些序列可以结合在一起产生一个重组表达载体,该表达载体可能包含一个或多个方便的限制性位点,以便作为此类位点插入或取代编码天冬氨酸蛋白酶的核苷酸序列。可替代地,编码本文所述天冬氨酸蛋白酶的核苷酸序列可以通过将此类核苷酸序列或包含该序列的重组构建体插入合适的用于表达的载体中进行表达。在创建表达载体时,编码序列位于该载体中,以便该编码序列有效地与合适的用于表达的调控序列连接。

[0142] 重组表达载体可以是任何载体,如质粒或病毒,其可以方便地进行重组DNA程序并导致核苷酸序列的表达。载体选择通常取决于载体与所述载体待引入的生产宿主的相容性。所述载体可以是线性或闭环质粒。所述载体可以是自主复制载体,即作为染色体外实体存在的载体,其复制独立于染色体复制,例如质粒、染色体外元件、微染色体或人工染色体。所述载体可以含有用于确保自我复制的任何手段。可替代地,所述载体可以是当被引入生产宿主时整合到基因组中并与已整合到其中的染色体一起复制的载体。这类载体的一些非限制性实例提供于Fungal Genetics Stock Center Catalogue of Strains[真菌遗传学库存中心菌株目录](FGSC,〈www.fgsc.net〉)中,合适的表达和/或整合载体的另外实例提供于Sambrook等人,(1989),同上,Ausubel(1987),同上,van den Hondel等人,(1991),Bennett和Lasure(编辑),MORE GENE MANIPULATIONS IN FUNGI[真菌中更多的基因操作],学术出版社(Academic Press),396-428和美国专利号5,874,276中。特别有用的载体包括pTREX、pFB6、pBR322、PUC18、pUC100和pENTR/D。适用于细菌细胞的质粒包括允许在大肠杆菌中复制的pBR322和pUC19,和例如允许在芽孢杆菌中复制的pE194。

[0143] 简言之,就在真菌生产宿主细胞中天冬氨酸蛋白酶生产而言,可以参考Sambrook等人,(1989),同上,Ausubel(1987),同上,van den Hondel等人,(1991),在:Bennett和Lasure(编辑),MORE GENE MANIPULATIONS IN FUNGI[真菌中更多的基因操作],学术出版社(Academic Press)(1991),第70-76和396-428页;Nunberg等人,(1984),Mol.Cell Biol.[分子细胞生物学]4:2306-2315;Boel等人,(1984)30EMBO J.[欧洲分子生物学学会杂志]3:1581-1585;Finkelstein,在:BIOTECHNOLOGY OF FILAMENTOUS FUNGI[丝状真菌的生物技术],Finkelstein等人,编辑,巴特沃斯海涅曼出版社(Butterworth-Heinemann),波士顿,马萨诸塞州(1992),第6章;Kinghorn等人,(1992)APPLIED MOLECULAR GENETICS OF FILAMENTOUS FUNGI[丝状真菌的应用分子遗传学],Blackie Academic and Professional

[黑人的学术和专业],C-H出版社(Chapman and Hall),伦敦;Kelley等人,(1985)EMBO J.[欧洲分子生物学学会杂志]4:475-479;Penttila等人,(1987)Gene[基因]61:155-164;和美国专利号5,874,276。合适载体的列表可以在Fungal Genetics Stock Center Catalogue of Strains[真菌遗传学库存中心菌株目录](FGSC, www at fgsc.net)中找到。合适的载体包括从例如英杰公司(Invitrogen)、生命技术公司(Life Technologies)和普洛麦格公司(Promega)获得的那些载体。适合用于真菌宿主细胞的特定载体包括载体例如pFB6、pBR322、pUC 18、pUC100、pDONTM201、pDONRTM221、pENTRTM、pGEM[®]3Z和pGEM[®]4Z。

[0144] 所述载体系统可以是单个载体或质粒,或者两个或更多个载体或质粒,它们一起含有待引入宿主细胞基因组的总DNA,或转座子。

[0145] 所述载体还可以含有一个或多个可选择标记以允许容易选择转化的细胞。可选择标记是基因,其产物提供杀生物剂或病毒抗性等。可选择标记的实例包括赋予抗微生物抗性的标记。营养标记也可用于本发明,包括本领域作为amdS、argB和pyr4已知的那些标记。可用于转化木霉的标记是本领域已知的(参见例如,Finkelstein,第6章,在Biotechnology of Filamentous Fungi[丝状真菌的生物技术],Finkelstein等人编辑,巴特沃斯海涅曼出版社(Butterworth-Heinemann),波士顿,马萨诸塞州(1992)和Kinghorn等人,(1992)Applied Molecular Genetics of Filamentous Fungi[丝状真菌的应用分子遗传学],Blackie Academic and Professional[布莱基学术与专业],C-H出版社(Chapman and Hall),伦敦)。在一些实施例中,所述表达载体也包括复制子、编码允许选择携带重组质粒的细菌的抗生素抗性的基因、和在质粒的非必需区域中的允许插入异源序列的独特限制性位点。所选择的特定抗生素抗性基因不是决定性的;本领域已知的许多抗性基因中的任一种都是合适的。优选地选择原核序列,使得它们不干扰DNA在里氏木霉中的复制或整合。

[0146] 所述载体还可以含有允许所述载体稳定整合到产物宿主基因组中或者允许载体在独立于所述细胞基因组的生产宿主中的自主复制的一种或多种元件。为了整合到宿主细胞基因组中,所述载体可以依赖于编码天冬氨酸蛋白酶的核苷酸序列或所述载体的任何其他元件,用于通过同源或非同源重组将载体稳定整合到所述基因组中。

[0147] 对于自主复制,所述载体可以进一步包含使所述载体能够在生产宿主中自主复制的复制起点。

[0148] 可将编码天冬氨酸蛋白酶的核苷酸序列的多于一个拷贝插入生产宿主中以增加天冬氨酸蛋白酶的产生。核苷酸序列拷贝数的增加可以通过将至少一个额外的序列拷贝整合到生产宿主的基因组中或通过包括可扩增的可选择标记基因来获得,并且因此可以通过在合适的选择剂存在下培养生产宿主细胞来选择核苷酸序列的额外拷贝。

[0149] 将包含编码天冬氨酸蛋白酶的核苷酸序列的载体引入生产宿主中,使得所述载体维持为染色体整合体或维持为自我复制的染色体外载体。一般认为整合是一个优点,因为所述核苷酸序列更可能稳定地维持在生产宿主中。如上所讨论的,将载体整合到生产宿主染色体中可以通过同源或非同源重组发生。

[0150] 示例性载体包括但不限于pGXT(与公开的PCT申请WO 2015/017256中所述的pTTTpyr2载体相同)。还可以提及标准的细菌表达载体,包括噬菌体λ和M13,以及质粒如基

于pBR322的质粒, pSKF, pET23D和融合表达系统如MBP、GST和LacZ。也可以将表位标签, 例如c-myc, 添加到重组蛋白中以提供便利的分离方法。

[0151] 合适的表达和/或整合载体的实例提供于Sambrook等人, (1989), 同上, Bennett和Lasure (编辑) *More Gene Manipulations in Fungi* [真菌中更多的基因操作], (1991) 学术出版社 (Academic Press), 第70-76页和第396-428页和其中引用的文章; USP 5,874,276 和 Fungal Genetic Stock Center Catalogue of Strains [真菌遗传学库存中心菌株目录] (FGSC, www.fgsc.net.) 中。有用的载体可以从普洛麦格公司和英杰公司获得。一些特定的有用载体包括pBR322、pUC18、pUC100、pDONTM201、pENTRTM、pGEN[®]3Z和pGEN[®]4Z。然而, 也可以使用发挥等效功能并且在本领域中已知或变得已知的其他形式的表达载体。因此, 可以在表达在此所公开的DNA序列中使用多种宿主/表达载体组合。例如, 有用的表达载体可以由染色体、非染色体和合成的DNA序列的区段组成, 如SV40的各种已知衍生物和已知的细菌质粒, 例如来自大肠杆菌的质粒, 这些质粒包括col E1、pCR1、pBR322、pMb9、pUC 19 及其衍生物, 更广泛的宿主范围质粒, 例如RP4, 噬菌体DNA, 例如噬菌体λ的多种衍生物, 例如NM989, 和其他DNA噬菌体, 例如M13和丝状单链DNA噬菌体, 酵母质粒, 例如2.μ质粒或其衍生物。

[0152] 生产宿主的选择可以是任何合适的微生物, 如细菌、真菌、酵母和藻类。

[0153] 通常, 选择将取决于编码天冬氨酸蛋白酶的基因及其来源, 例如, 如果衍生自细菌或真菌, 例如丝状真菌。

[0154] 术语“丝状真菌”是指所有丝状形式的真菌亚门 (参见Alexopoulos, C. J. (1962), *Introductory Mycology* [菌物学概论], 威利出版社 (Wiley), 纽约和Ainsworth and Bisby *Dictionary of the Fungi*, 9th Ed. (2001) Kirk et al., Eds., CAB International University Press, Cambridge UK [真菌的安斯沃思和拜斯比词典, 第9版, 2001年, Kirk等人编辑, 英国剑桥CAB国际集团, 大学出版社])。这些真菌的特征在于具有由几丁质、纤维素和其他复合多糖组成的细胞壁的营养菌丝体。本发明的丝状真菌在形态学、生理学和遗传学上与酵母不同。丝状真菌的营养生长是通过菌丝延伸, 而碳分解代谢是专性需氧的。

[0155] 丝状真菌宿主细胞的非限制性实例包括木霉属物种 (例如绿色木霉和里氏木霉、红褐肉座菌的无性变形、以前分类为长梗木霉)、青霉属、腐质霉属 (例如特异腐质霉和灰腐质霉)、曲霉属 (例如黑曲霉、构巢曲霉、米曲霉和泡盛曲霉)、镰刀菌属 (禾谷镰刀菌)、脉孢菌属、肉座菌属和毛霉菌属。

[0156] 还可以提及, 如在美国专利号6,015,707, 美国专利号6,573,086和专利PCT/NL2010/000045中详细讨论的, 根据该微生物的形态特征和生长特征, 菌株C1最初被分类为卢克诺文思金孢子菌。基于遗传测试, 该C1菌株随后被重新分类为嗜热毁丝霉 (*Myceliophthora thermophila*)。在该文献中, 卢克诺文思金孢子菌也作为嗜热侧孢霉 (*Sporotrichum thermophile*) 出现。

[0157] 如本文所使用的, 术语“木霉菌”或“木霉物种”是指先前或目前归类为木霉菌的任何真菌属。

[0158] 在某些实施例中, 该真菌宿主细胞可以是酵母细胞。可以选择合适的酵母宿主生物体从生物技术相关的酵母物种, 例如但不限于酵母物种如毕赤酵母属、汉逊酵母属、或克鲁维酵母菌属、耶氏酵母属、裂殖酵母物种或酵母属的物种 (包括酿酒酵母) 或属于裂殖酵

母属的物种(例如比如粟酒裂殖酵母)。甲基营养酵母菌株毕赤酵母可以作为宿主生物体使用。可替代地,宿主生物体可以是汉逊酵母物种、假丝酵母物种或耶氏酵母物种。在某些实施例中,细菌宿主菌株包括埃希氏菌属、芽孢杆菌属、克鲁维酵母属和假单胞菌属。在一些实施例中,细菌宿主细胞是枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)或大肠杆菌(*Escherichia coli*)。另外的宿主细胞可能包括芽孢杆菌属物种(例如枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌和短芽孢杆菌)和链霉菌属物种(例如天蓝色链霉菌(*S. coelicolor*)和变铅青链霉菌(*S. lividans*)(TK23和TK21))。

[0159] 藻类宿主的实例包括但不限于绿色藻类莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)和蓝绿色藻类细长聚球藻(*Synechococcus elongatus*)、红色藻类*Cyanidioschyzon merolae*、和棕色藻类*Ectocarpus siliculosus*。同样令人感兴趣的是一种产生天冬氨酸蛋白酶的方法,该方法包括:

[0160] (a) 用本文所述的重组构建体转化生产宿主;以及

[0161] (b) 在产生天冬氨酸蛋白酶的条件下培养步骤(a)的生产宿主。

[0162] 将DNA构建体或载体引入宿主细胞中包括技术例如转化;电穿孔;核显微注射;转导;转染,(例如脂质转染介导的和DEAE-右旋糖酐介导的转染);与磷酸钙DNA沉淀一起孵育;用DNA包被的微粒高速轰击;和原生质体融合。

[0163] 公开了可以使用的一般方法的基本文献包括Sambrook等人,Molecular Cloning, A Laboratory Manual[分子克隆:实验室手册](第2版,1989);Kriegler, Gene Transfer and Expression:A Laboratory Manual[基因转移和表达:实验室手册](1990);以及Ausubel等人编辑,Current Protocols in Molecular Biology[分子生物学现代方法](1994))。本发明的转化的方法可以导致转化载体的全部或一部分稳定整合到宿主细胞(例如丝状真菌宿主细胞)的基因组中。然而,还考虑了导致维持自主复制的染色体外转化载体的转化。

[0164] 许多标准转染方法可以用于产生表达大量蛋白酶的细菌和丝状真菌(例如曲霉或木霉)细胞系。用于将DNA构建体引入产生纤维素酶的木霉菌株的一些公开方法包括:Lorito, Hayes, DiPietro和Harman, (1993) Curr. Genet. [现代遗传学]24:349-356; Goldman, VanMontagu和Herrera-Estrella, (1990) Curr. Genet. [现代遗传学]17:169-174; 和Penttila, Nevalainen, Ratto, Salminen和Knowles, (1987) Gene [基因]6:155-164,还参见USP 6,022,725; USP 6,268,328和Nevalainen等人, "The Molecular Biology of Trichoderma and its Application to the Expression of Both Homologous and Heterologous Genes[木霉属的分子生物学及其在同源和异源基因表达中的应用]",在:Molecular Industrial Mycology[分子工业真菌学],编辑,Leong和Berka,马塞尔德克尔公司(Marcel Dekker Inc.),纽约州(1992),第129-148页;针对曲霉属,包括Yelton, Hamer和Timberlake, (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA[美国科学院院报]81:1470-1474,针对镰刀菌属,包括Bajar, Podila和Kolattukudy, (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA[美国科学院院报]88:8202-8212,针对链霉菌属,包括Hopwood等人, 1985, Genetic Manipulation of Streptomyces:Laboratory Manual[链霉菌属的遗传操作:实验室手册],[约翰英纳斯基基金会],诺维奇,英国和Fernandez-Abalos等人, Microbiol[微生物学]149:1623-1632(2003),并且针对芽孢杆菌属,包括Brigidi, DeRossi, Bertarini, Riccardi和Matteuzzi, (1990)

FEMS Microbiol.Lett.[FEMS微生物学快报]55:135-138。

[0165] 然而,可以使用用于将外源核苷酸序列引入宿主细胞的任何熟知的程序。这些包括使用磷酸钙转染、聚凝胺、原生质体融合、电穿孔、基因枪法、脂质体、显微注射、原生质载体、病毒载体,以及用于将克隆的基因组DNA、cDNA、合成DNA、或其他外源遗传材料引入宿主细胞的任何其他熟知方法(参见例如,Sambrook等人,同上)。还使用的是美国专利号6,255,115中描述的农杆菌介导的转染方法。只需要使用能够成功地将至少一个基因引入能够表达该基因的宿主细胞中的具体遗传工程化程序。

[0166] 用于曲霉属和木霉属的转化方法描述于例如Yelton等人,(1984) Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国科学院院报]81:1470-1474;Berka等人,(1991), Applications of Enzyme Biotechnology[酶生物技术的应用],编辑Kelly和Baldwin,普莱纽姆出版社(Plenum Press)(纽约州);Cao等人,(2000) Sci.[科学]9:991-1001; Campbell等人,(1989) Curro Genet.[当代遗传学]16:53-56;Pentilla等人,(1987) Gene [基因]61:155-164;de Groot等人,(1998) Nat.Biotechnol.[自然生物技术]16:839-842; USP 6,022,725;USP 6,268,328和EP 238 023。以下文献中描述了异源蛋白质在木霉中的表达:USP 6,022,725;USP 6,268,328;Harkki等人(1991),Enzyme Microb.Technol.[酶微生物技术]13:227-233;Harkki等人,(1989),Bio Technol.[生物技术]7:596-603;EP 244,234;EP 215,594;以及Nevalainen等人,“The Molecular Biology of Trichoderma and its Application to the Expression of Both Homologous and Heterologous Genes [木霉属的分子生物学及其在同源和异源基因表达中的应用]”,MOLECULAR INDUSTRIAL MYCOLOGY[分子工业真菌学]中,编辑Leong和Berka,马塞尔德克尔公司(Marcel Dekker Inc.),纽约州(1992)第129-148页。关于镰刀菌菌株的转化还可以参考以下文献: W096100787和Bajar等人,(1991),Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国科学院院报]88:8202-28212。

[0167] 将表达载体引入细胞后,在有利于表达在启动子序列控制下的基因的条件下培养转染或转化的细胞。在一些情况下,所述启动子序列是cbh1启动子。大批量的转化细胞可以如Ilmen等人1997中所述进行培养(“Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus Trichoderma reesei.[丝状真菌里氏木霉中纤维素酶基因表达的调控]”Appl.Envir.Microbiol.[应用与环境微生物学]63:1298-1306)。

[0168] 取决于钙离子浓度,将DNA摄取到宿主木霉属物种菌株中。通常,在摄取溶液中使用在约10-50mM之间的CaCl₂。另外的合适的化合物包括缓冲系统,例如TE缓冲液(10mM Tris,pH 7.4;1mM EDTA)或10mM MOPS (pH 6.0)和聚乙二醇。据信聚乙二醇使细胞膜融合,从而允许培养基的内容物被递送至木霉属物种菌株的细胞质中。此融合时常留下多个拷贝的宿主染色体。

[0169] 通常,使用已经进行了渗透性处理的原生质体或细胞转化木霉属物种,通常以10⁵至10⁷/mL、特别是2x10⁶/mL的密度进行。可以将质粒DNA的体积整合至100μL的在合适的溶液(例如1.2M山梨糖醇和50mM CaCl₂)中的这些原生质体或细胞与所希望的DNA混合。通常,向摄取溶液中添加高浓度的PEG。可以将从0.1至1体积的25%PEG 4000添加到原生质体悬浮液中;然而,向原生质体悬浮液中添加约0.25体积是有用的。也可以将添加剂例如二甲亚砜、肝素、亚精胺、氯化钾等添加到摄取溶液中以促进转化。类似的程序可用于其他真菌宿

主细胞。参见,例如美国专利号6,022,725。

[0170] 用于培养细胞的培养基可以是适合于使宿主细胞生长和获得天冬氨酸蛋白酶多肽的表达的任何常规培养基。适合的培养基和培养基组分可从商业供应商获得或可以根据公开的配方(例如,如在美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)的目录中所述)来制备。

[0171] 可以使用从宿主细胞中分泌的天冬氨酸多肽,最少的后期处理,作为全肉汤配制品。

[0172] 取决于所使用的宿主细胞,可以进行转录后和/或翻译后修饰。转录后和/或翻译后修饰的一个非限制性实例是多肽的“剪切”或“截短”。例如,这可以导致使天冬氨酸蛋白酶从无活性或基本上无活性的状态变为活性状态,如前肽在进行进一步的翻译后加工后成为具有酶活性的成熟肽的情况一样。在另一个情况下,该剪切可导致获得如天冬氨酸蛋白酶多肽并且进一步去除N或C-末端氨基酸以产生截短形式的保留酶活性的天冬氨酸蛋白酶。

[0173] 转录后或翻译后修饰的其他实例包括但不限于肉豆蔻酰化、糖基化、截短、脂化和酪氨酸、丝氨酸或苏氨酸磷酸化。本领域技术人员将认识到蛋白质可能经历的转录后或翻译后修饰的类型可取决于表达蛋白质的宿主生物体。

[0174] 在一些实施例中,可以使用本领域已知的任何培养方法来实现重组微生物的所消耗的全发酵液的制备,从而导致目的多肽的表达。因此,发酵可以理解为包括在实验室或工业发酵罐中在合适的培养基和天冬氨酸蛋白酶多肽(例如天冬氨酸蛋白酶)能够被表达或分离的条件下进行的摇瓶培养、小规模或大规模发酵(包括连续发酵、分批发酵、分批补料发酵或固态发酵)。术语“所消耗的全发酵液”在此定义为包括培养基、胞外蛋白质(例如,酶)和细胞生物质的发酵材料的未分级内容物。应该理解,术语“所消耗的全发酵液”还涵盖已经使用本领域熟知的方法裂解或透化的细胞生物质。

[0175] 宿主细胞可以在允许表达天冬氨酸蛋白酶的合适条件下培养。这些酶的表达可以是组成型的,使得它们能被连续产生,或诱导型的,需要刺激来启动表达。在诱导型表达的情况下,当需要时可通过例如向培养基中添加诱导物质,例如地塞米松或IPTG或槐糖来启动蛋白质生产。

[0176] 多肽也可以在体外无细胞系统(例如TNTTM(普洛麦格公司)兔网织红细胞系统)中重组生产。表达宿主也可以在有氧条件下在对于宿主来说适当的培养基中培养。可以提供摇动或搅动和通气的组合,其中在对该宿主来说适当的温度下(例如从约25°C至约75°C(例如30°C至45°C),这取决于宿主的需要和所需天冬氨酸蛋白酶的生产)使生产发生。培养可以发生从约12至约100小时或更长时间(以及其间的任何小时值,例如从24至72小时)。典型地,培养肉汤的pH为约4.0至约8.0,同样取决于宿主相对于天冬氨酸蛋白酶的生产所需的培养条件。因为可以在常规营养培养基中培养生产宿主和转化细胞。用于转化的宿主细胞的培养基可以适当地修饰以激活启动子并选择转化的细胞。特定培养条件(例如温度、pH等)可以是用于所选择的宿主细胞的表达的那些条件,并且对于本领域技术人员将是显而易见的。此外,优选的培养条件可以在科学文献中找到,例如Sambrook, (1982) 同上; Kieser, T, MJ. Bibb, MJ. Buttner, KF Chater, 和 D.A. Hopwood (2000), Practical Streptomyces Genetics[实用链霉菌属遗传学], John Innes Foundation[约翰·内斯基

金会], 诺维奇, 英国; Harwood 等人, (1990), Molecular Biological Methods for *Bacillus* [芽孢杆菌的分子生物学方法], 约翰威利公司 (John Wiley) 和/或来自美国典型培养物保藏中心 (ATCC; www.atcc.org)。

[0177] 本领域熟知的任何发酵方法都可以合适用来使如上所述的转化的或衍生的真菌菌株发酵。在一些实施例中, 真菌细胞在分批或连续发酵条件下生长。

[0178] 经典的分批发酵是封闭的系统, 其中在发酵开始时设定培养基的组成, 并且该组成在发酵期间不改变。在发酵开始时, 用一种或多种所希望的生物体接种培养基。换言之, 整个发酵过程发生而自始至终没有向发酵系统添加任何组分。

[0179] 可替代地, 分批发酵符合关于添加碳源的“分批”的资格。此外, 通常在整个发酵过程中进行尝试来控制因素例如pH和氧气浓度。典型地, 分批系统的代谢物和生物质组成不断变化直到发酵停止的时间。在分批培养中, 细胞通过静态停滞期进展到高生长对数期, 最后进入生长速率减少或停止的稳定期。不经处理, 稳定期中的细胞将最终死亡。通常, 在对数期的细胞负责产物的大量生产。标准分批系统的合适的变体是“补料分批发酵”系统。在典型的分批系统的这种变化中, 随着发酵的进展, 将底物以增量添加。当已知分解代谢物抑制将抑制细胞的代谢时和/或在发酵培养基中希望具有有限量的底物的情况下, 补料分批系统是有用的。在补料分批系统中实际底物浓度的测量是困难的, 并且因此基于可测量因素(例如pH、溶解的氧和废气(例如CO₂)的分压)的变化对其进行估计。分批和补料分批发酵是本领域熟知的。

[0180] 连续发酵是另一种已知的发酵方法。它是开放的系统, 在该系统中, 将定义的发酵培养基连续添加到生物反应器中, 同时除去等量的条件培养基以用于处理。连续发酵通常将培养物保持在恒定的密度, 其中将细胞主要维持在对数期生长。连续发酵允许对一种或多种影响细胞生长和/或产物浓度的因素进行调节。例如, 限制营养素(例如碳源或氮源)可以维持在固定的速率, 并允许调节所有其他参数。在其他系统中, 影响生长的许多因素可以不断改变, 而通过培养基浊度测量的细胞浓度保持不变。连续系统努力保持稳定态的生长条件。因此, 由于转移培养基而引起的细胞损失应当与发酵中的细胞生长速率相平衡。调节用于连续发酵过程的营养素和生长因子的方法以及最大化产物形成速率的技术在工业微生物学领域中是众所周知的。

[0181] 分离和浓缩技术是本领域已知的, 并且常规方法可用于制备包含本发明的天冬氨酸蛋白酶的浓缩溶液或肉汤。

[0182] 发酵后, 获得发酵液, 通过常规分离技术除去微生物细胞和各种悬浮固体(包括剩余的粗发酵材料), 以便获得天冬氨酸蛋白酶溶液。通常使用过滤、离心、微滤、旋转真空鼓式过滤、超滤、离心然后超滤、提取或色谱法等。

[0183] 有时可能需要浓缩包含 α -葡萄糖苷酶多肽的溶液或肉汤以优化回收。使用未浓缩的溶液或肉汤通常会增加孵育时间, 以便收集富集或纯化的酶沉淀。

[0184] 可以使用常规浓缩技术浓缩含酶溶液直至获得所需酶水平。含酶溶液的浓缩可以通过在此所讨论的技术中的任一种来实现。富集和纯化方法的实例包括但不限于旋转真空过滤和/或超滤。

[0185] 含有溶液或肉汤的天冬氨酸蛋白酶可以浓缩至浓缩的含有溶液或肉汤的天冬氨酸蛋白酶多肽的酶活性达到所希望的水平。

[0186] 可以使用例如沉淀剂,如金属卤化物沉淀剂进行浓缩。金属卤化物沉淀剂包括但不限于碱金属氯化物、碱金属溴化物和这些金属卤化物中的两种或更多种的共混物。

[0187] 示例性金属卤化物包括氯化钠、氯化钾、溴化钠、溴化钾和这些金属卤化物中的两种或更多种的共混物。金属卤化物沉淀剂,氯化钠,也可用作防腐剂。对于生产规模的回收,可以如上一般情况下所述通过用聚合物絮凝除去细胞来富集或部分纯化天冬氨酸蛋白酶多肽。或者,可以通过微滤富集或纯化酶,然后使用可用的膜和设备通过超滤进行浓缩。然而,对于一些应用,酶不需要富集或纯化,并且可以裂解和使用全肉汤培养物而无需进一步处理。然后可以将酶加工成例如颗粒。

[0188] 天冬氨酸蛋白酶能以本领域技术人员已知的各种方式被分离或纯化,这取决于样品中存在的其他组分。标准纯化方法包括但不限于色谱法(例如离子交换、亲和力、疏水性、色谱聚焦、免疫学和尺寸排阻)、电泳(例如,制备型等电聚焦)、差异溶解度(例如,硫酸铵沉淀)、提取微量过滤、两相分离。例如,目的蛋白质可以使用标准抗目的蛋白质抗体柱进行纯化。超滤和渗滤技术联合蛋白质浓缩也是有用的。对于合适的纯化技术中的一般指导,请参见Scopes, *Protein Purification*[蛋白质纯化] (1982)。所需的纯化程度将根据目的蛋白质的用途而变化。在一些情况下,将不需要纯化。

[0189] 用于检测和测量酶的酶活性的测定法,例如本发明的真菌天冬氨酸蛋白酶多肽是熟知的。用于检测和测量蛋白酶(例如本发明的真菌天冬氨酸蛋白酶多肽)的活性的各种测定法也是本领域普通技术人员已知的。具体地,测定可用于测量基于从酪蛋白或血红蛋白释放酸可溶性肽的蛋白酶活性,其作为280nm下的吸光度测量或使用Folin方法进行比色测量并且染料标记偶氮酪蛋白的水解,其作为440-450nm下的吸光度测量。

[0190] 其他示例性测定涉及显色底物的溶解(参见例如,Ward, "Proteinases[蛋白酶]", 在Fogarty(编辑), *Microbial Enzymes and Biotechnology*[微生物酶与生物技术], 应用科学出版社(Applied Science), 伦敦, [1983], 第251-317页中)。一种使用高标记荧光素异硫氰酸酯(FITC)酪蛋白作为底物的蛋白酶检测方法,也可以使用所述程序的修饰的版本,其描述于Twining[Twining, S.S., (1984) "Fluorescein Isothiocyanate-Labeled Casein Assay for Proteolytic Enzymes" [荧光素异硫氰酸酯标记酪蛋白酶蛋白水解测定] *Anal.Biochem.* [生物化学年鉴]143:30-34]。

[0191] 其他示例性测定包括但不限于:酪蛋白切割成三氯乙酰酸溶性肽,其含有酪氨酸和色氨酸残基,随后通过与福林酚试剂反应并在660nm进行产品的比色检测,内部淬灭FRET(荧光共振能量转移)多肽底物的切割,随后使用荧光计检测产品。荧光共振能量转移(FRET)是由一个被激发的荧光团(或供体)向合适的猝灭剂(或受体)分子的非辐射能量转移。FRET用于各种应用,包括含有底物的蛋白酶活性测定,其中荧光团通过含有酶切割位点的短肽序列从猝灭剂中分离出来。当荧光团和猝灭剂分离时,肽的蛋白水解产生荧光。

[0192] 许多本领域技术人员已知的附加参考文献提供了合适的方法(参见,例如, Wells等人, *Nucleic Acids Res.* [核酸研究], 11:7911-7925 [1983]; Christianson等人, *Anal.Biochem.* [分析生物化学], 223:119-129 [1994]; 以及Hsia等人, *Anal Biochem.* [分析生物化学], 242:221-227 [1999])。

[0193] 在仍另一方面,本文所述的天冬氨酸蛋白酶在饲料、喂养料、饲料添加剂组合物或预混物中任一项中的用途,其中天冬氨酸蛋白酶选自由以下组成的组:

- [0194] (a) 与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:7具有至少75%序列同一性的天冬氨酸蛋白酶；
- [0195] (b) 与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:9具有至少78%序列同一性的天冬氨酸蛋白酶；以及
- [0196] (c) 与SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:8具有至少95%序列同一性的天冬氨酸蛋白酶
- [0197] 其中天冬氨酸蛋白酶可以 (i) 单独地使用或 (ii) 与包含至少一种细菌菌株的直接饲喂微生物组合使用或 (iii) 与至少一种其他酶一起使用或 (iv) 与包含至少一种细菌菌株的直接饲喂微生物以及至少一种其他酶组合使用。
- [0198] 至少一个DFM可以包括至少一个活的微生物,例如活的细菌菌株或活的酵母或活的真菌。优选地,DFM包含至少一个活细菌。
- [0199] DFM可能是一种形成孢子的菌株,因此术语DFM可能由孢子组成或包含孢子,例如细菌孢子。因此,如在本文使用的“活的微生物”可能包括微生物孢子,例如内孢子或分生孢子。可替代地,本文所述饲料添加剂组合物中的DFM可能不由微生物孢子组成或不包含微生物孢子,例如内孢子或分生孢子。
- [0200] 微生物可以是自然发生的微生物,也可以是转化的微生物。
- [0201] 本文所述的DFM可包含如下一个或多个属的微生物:乳酸菌、乳球菌、链球菌、芽孢杆菌、须球菌、肠球菌、白念珠菌、肉芽杆菌、丙酸杆菌、双歧杆菌、梭菌和大孢子虫及其组合。
- [0202] 优选地,DFM包含一种或多种选自如下芽孢杆菌属物种的细菌菌株:枯草芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、短小芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌。
- [0203] 如在此所用的“芽孢杆菌属”包括如本领域技术人员已知的“芽孢杆菌”属内的所有物种,包括但不限于:枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、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、克劳氏芽孢杆菌、耐盐芽孢杆菌(*B. halodurans*)、巨大芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、吉氏芽孢杆菌、短小芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌。据认识,芽孢杆菌属继续经历分类学重组。因此,该属旨在包括已重新分类的物种,包括但不限于:例如嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*) (现在称为“嗜热脂肪土芽孢杆菌(*Geobacillus stearothermophilus*)”)或多黏芽孢杆菌(*Bacillus polymyxa*) (现在是“多黏类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*)”)的此类生物体。在胁迫环境条件下的抗性内生孢子的产生被认为是芽孢杆菌属的定义性特性,尽管这个特征也适用于最近命名的脂环酸芽孢杆菌属、双芽孢杆菌属(*Amphibacillus*)、硫胺素芽孢杆菌属(*Aneurinibacillus*)、厌氧芽孢杆菌属(*Anoxybacillus*)、短芽孢杆菌属、线性杆菌属(*Filobacillus*)、薄壁芽孢杆菌属(*Gracilibacillus*)、喜盐芽孢杆菌属(*Halobacillus*)、类芽孢杆菌属、需盐芽孢杆菌属(*Salibacillus*)、耐热芽孢杆菌属(*Thermobacillus*)、脲芽孢杆菌属(*Ureibacillus*)和枝芽孢杆菌属(*Virgibacillus*)。
- [0204] 在另一方面,DFM可以进一步与如下乳杆菌物种组合:乳脂链球菌和乳酸乳球菌及其组合。
- [0205] DFM可以进一步与如下乳杆菌物种组合:布氏乳杆菌、嗜酸乳杆菌、干酪乳酸杆菌、开菲尔乳杆菌、双叉乳酸杆菌、短乳杆菌、瑞士乳杆菌、副干酪乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、唾液乳杆菌、弯曲乳杆菌、保加利亚乳杆菌、清酒乳杆菌、罗伊氏乳杆菌、发酵乳杆菌、香肠乳杆菌、乳酸乳杆菌、戴耳布吕克氏乳杆菌(*Lactobacillus delbreuckii*)、植物乳杆菌、类植物

乳杆菌、香肠乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、卷曲乳杆菌、加氏乳杆菌、约氏乳杆菌和詹氏乳杆菌及其任何组合。

[0206] 在仍另一方面,DFM可以进一步与如下双歧杆菌物种组合:乳酸双歧杆菌、*Bifidobacterium bifidum*、长双歧杆菌、动物双歧杆菌、短双歧杆菌、婴儿双歧杆菌、链状双歧杆菌、假小链双歧杆菌、青春双歧杆菌和角双歧杆菌及其任何组合。

[0207] 可以提到的细菌有以下几个物种:枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、肠球菌、肠球菌物种和片球菌物种、乳杆菌物种、双歧杆菌物种、嗜酸乳杆菌、乳酸片球菌、乳酸乳球菌、两歧双歧杆菌、枯草芽孢杆菌、*Propionibacterium thoenii*、香肠乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、埃氏巨型球菌、丁酸梭菌、动物双歧杆菌、罗伊氏乳杆菌、蜡样芽孢杆菌、唾液乳杆菌、丙酸杆菌物种及其组合。

[0208] 本文所述的直接饲喂微生物包含一种或多种细菌菌株,可以是同一类型的(属、种和菌株),也可以包含属、种和/或菌株的混合物。

[0209] 可替代地,DFM可以与WO 2012110778中公开的一种或多种产品或这些产品中包含的微生物相结合,总结如下:

[0210] 枯草芽孢杆菌菌株2084登录号NRR1 B-50013、枯草芽孢杆菌菌株LSSA01登录号NRR1 B-50104、和枯草芽孢杆菌菌株15A-P4ATCC登录号PTA-6507(来自Enviva Pro®.(以前称为Avicorr®);枯草芽孢杆菌菌株C3102(来自Calsporin®);枯草芽孢杆菌菌株PB6(来自Clostat®);短小芽孢杆菌(8G-134);肠球菌NCIMB 10415(SF68)(来自Cylactin®);枯草芽孢杆菌菌株C3102(来自Gallipro®&GalliproMax®);地衣芽孢杆菌(来自Gallipro®Tect®);肠球菌和片球菌(来自Poultrystar®);乳杆菌、双歧杆菌和/或肠球菌来自Protexin®);枯草芽孢杆菌菌株QST 713(来自Proflora®);解淀粉芽孢杆菌CECT-5940(来自Ecobiol®&Ecobiol®Plus);屎肠球菌SF68(来自Fortiflora®);枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌(来自BioPlus2B®);乳酸菌7屎肠球菌(来自Lactiferm®);芽孢杆菌菌株(来自CSI®);酿酒酵母(来自Yea-Sacc®);肠球菌(来自Biomin IMB52®);乳酸片球菌、肠球菌、动物双歧杆菌乳酸亚种、罗伊氏乳杆菌、唾液乳杆菌亚种(来自Biomin C5®);香肠乳杆菌(来自Biaction®);肠球菌(来自Oralin E1707®);肠球菌(2个菌株)、乳酸乳球菌DSM 1103(来自Probios-pioneer PDFM®);鼠李糖乳杆菌和(来自Sorbiflore®);枯草芽孢杆菌(来自Animavit®);肠球菌(来自Bonvital®);酿酒酵母(来自Levucell SB20®);酿酒酵母(来自Levucell SC 0&SC10®ME);乳酸片球菌(来自Bactocell);酿酒酵母(来自ActiSaf®(以前称为BioSaf®));酿酒酵母NCYC Sc47(来自Actisaf®SC47);丁酸梭菌(来自Miya-Gold®);肠球菌(来自Fecinor and Fecinor Plus®);酿酒酵母NCYC R-625(来自InteSwine®);酿酒酵母(来自BioSprint®);肠球菌和鼠李糖乳杆菌(来自Provita®);枯草芽孢杆菌和米曲霉(来自PepSoyGen-C®);蜡样芽孢杆菌(来自Toyocerin®);蜡样芽孢杆菌变体toyoi NCIMB 40112/CNCM I-1012(来自TOYOCERIN®)、或其他DFM,例如地衣芽孢杆菌和枯草芽孢

杆菌(来自BioPlus®YC)和枯草芽孢杆菌(来自GalliPro®)。

[0211] DFM可能与Enviva®PRO结合,Enviva®PRO可商购自丹尼斯科公司。Enviva Pro®是一个芽孢杆菌菌株2084登录号NRR1 B-50013、芽孢杆菌菌株LSSA01登录号NRRL B-50104和芽孢杆菌菌株15A-P4ATCC登录号PTA-6507的组合(如在US 7,754,469B中所教导的-通过引用并入本文中)。

[0212] 也可以将本文所述的DFM与来自以下属的酵母结合:假单胞菌属物种

[0213] 优选地,本文所述的DFM包括通常被认为是安全(GRAS)的微生物,优选地是经GRAS批准的微生物。

[0214] 本领域普通技术人员将容易地知道来自本文所述属中的特定微生物物种和/或菌株,其用于食品和/或农业工业中并且其通常被认为适合于动物消费。

[0215] 在某些实施例中,重要的是DFM具有对热的耐受性,即耐热性。当饲料粒化时尤其如此。因此,在另一个实施例中,DFM可能是耐热微生物,例如耐热细菌,包括例如芽孢杆菌属物种。

[0216] 在其他方面,可能需要DFM包括产孢子细菌,例如芽孢杆菌纲(Bacilli),例如芽孢杆菌属物种。芽孢杆菌能在生长不利的条件下形成稳定的内生孢子,对热、pH、水分和消毒剂有很强的抵抗力。

[0217] 本文所述的DFM可减少或阻止致病性微生物(如产气荚膜梭菌和/或大肠杆菌和/或沙门氏菌物种和/或弯曲杆菌物种)在肠道内的建立。换句话说,DFM可能具有抗病原性。本文所使用的术语“抗病原性”,是指DFM抵抗病原体的作用(负作用)。

[0218] 如上所述,DFM可以是任何合适的DFM。例如,下面的测定“DFM测定”可以用来确定微生物是否适合成为DFM。本文所使用的DFM测定在US2009/0280090中有更详细的说明。为了避免疑问,根据本文所讲授的“DFM测定”,选择作为抑制性菌株(或抗病原性DFM)的DFM,是一种适合于根据本公开使用的DFM,即根据本公开的饲料添加剂组合物中使用的DFM。

[0219] 每根试管中都植入了来自代表性簇的代表性病原体(如细菌)。

[0220] 来自潜在DFM的上清液,经好氧或厌氧培养,被添加到接种的管中(不添加上清液的对照组除外)并孵育。孵育后,对每一种病原菌分别测定对照和处理的上清的管的光密度(OD)。

[0221] 与对照组(不含任何上清液)相比,产生了较低的OD的(潜在的DFM)菌株的菌落可以将其分类为抑制性菌株(或抗病原性DFM)。因此,本文所使用的DFM测定在US 2009/0280090中有更详细的说明。

[0222] 优选地,本DFM测定中使用的代表性病原体可以是下列一种(或多种):梭菌属,例如产气荚膜梭菌和/或艰难梭状芽孢杆菌、和/或大肠杆菌和/或沙门氏菌物种和/或弯曲杆菌物种。在一个优选的实施例中,该测定用一个或多个产气荚膜梭菌和/或艰难梭状芽孢杆菌和/或大肠杆菌,优选地产气荚膜梭菌和/或艰难梭状芽孢杆菌,更优选地产气荚膜梭菌进行。

[0223] 抗病原性DFM包括以下一种或多种细菌,并描述于W02013029013:

[0224] 枯草芽孢杆菌菌株3BP5登录号NRRL B-50510、

[0225] 枯草芽孢杆菌菌株918ATCC登录号NRRL B-50508、和

[0226] 枯草芽孢杆菌菌株1013ATCC登录号NRRL B-50509。

[0227] DFM可以作为一种或多种培养物和一种或多种载体制备(如果使用的话),并可以将它们添加到条带或桨式混合器中,并且混合约15分钟,尽管时间可以增加或减少。将组分混合,这样使得导致培养物和载体的均匀混合物。最终产物优选为干燥的可流动粉末。DFM包括含一种或多种菌株,然后可以将其添加到动物饲料或饲料预混物,添加到动物的水,或以其他本领域已知的途径给予(优选与本文所述的酶同时)。

[0228] 在DFM混合物中包含单个菌株的比例可以从1%到99%不等,优选从25%到75%不等。

[0229] 动物饲料中DFM的适合剂量范围为约 1×10^3 CFU/g饲料至约 1×10^{10} CFU/g饲料,适当地在约 1×10^4 CFU/g饲料至约 1×10^8 CFU/g饲料之间,适当地在约 7.5×10^4 CFU/g饲料至约 1×10^7 CFU/g饲料之间。

[0230] 在另一方面,喂养料中DFM的剂量超过约 1×10^3 CFU/g饲料,适当地超过约 1×10^4 CFU/g饲料,适当地超过约 5×10^4 CFU/g饲料,或适当地超过约 1×10^5 CFU/g饲料。

[0231] 饲料添加剂组合物中DFM的剂量从约 1×10^3 CFU/g组合物至约 1×10^{13} CFU/g组合物,优选 1×10^5 CFU/g组合物至约 1×10^{13} CFU/g组合物,更优选在约 1×10^6 CFU/g组合物至约 1×10^{12} CFU/g组合物之间,并且最优选在约 3.75×10^7 CFU/g组合物至约 1×10^{11} CFU/g组合物之间。在另一方面,饲料添加剂组合物中DFM的剂量大于约 1×10^5 CFU/g组合物,优选大于约 1×10^6 CFU/g组合物,并且最优选大于约 3.75×10^7 CFU/g组合物。在一个实施例中,饲料添加剂组合物中DFM的剂量大于约 2×10^5 CFU/g组合物,适当地大于约 2×10^6 CFU/g组合物,适当地大于约 3.75×10^7 CFU/g组合物。

[0232] 至少一种酶可以选自,但不限于,酶例如,α-淀粉酶、淀粉葡萄糖苷酶、植酸酶、支链淀粉酶、β-葡萄糖酶、纤维素酶、木聚糖酶等。

[0233] 使用这些酶中任一的量范围从0.5至500微克/g饲料或进料。

[0234] α-淀粉酶(α-1,4-葡萄糖-4-葡萄糖水解酶,EC 3.2.1.1.)水解淀粉内的α-1,4-糖苷键,主要是随机产生更小的分子量的葡萄糖。这些多肽主要用于淀粉加工和酒精生产。可以使用任何α-淀粉酶,例如美国专利号8,927,250和7,354,752中所述。

[0235] 淀粉葡萄糖苷酶催化末端1,4-连接的α-D-葡萄糖残基相继从麦芽寡糖和多糖的非还原末端的水解,并伴随β-D-葡萄糖的释放。可以使用任何淀粉葡萄糖苷酶。

[0236] 植酸酶是指能够催化植酸盐水解为(1)肌醇和/或(2)其一、二、三、四和/或五磷酸盐及(3)无机磷酸盐的蛋白质或多肽。例如,具有催化活性的酶如在酶委员会EC编号3.1.3.8或EC编号3.1.3.26中定义的。可以使用任何植酸酶,例如美国专利号8,144,046、8,673,609和8,053,221中所述。

[0237] 支链淀粉酶(EC 3.2.1.41)是一种特殊的葡萄糖酶,是降解支链淀粉(一种由麦芽糖单元组成的多糖聚合物,也称为α-1,4-;α-1,6-葡萄糖)的淀粉分解内切酶。因此,这是脱支酶的一个实例。支链淀粉酶又称出芽短梗霉聚糖-6-葡萄糖水解酶。支链淀粉酶通常由芽孢杆菌属物种分泌。例如,脱支芽孢杆菌(Bacillus deramificans)(美国专利号5,817,498;1998)、嗜酸性普鲁兰芽孢杆菌(Bacillus acidopullulyticus)(欧洲专利号0 063 909)和长野芽孢杆菌(美国专利号5,055,403)。生产商业使用的具有支链淀粉酶活性的酶,例如,来自芽孢杆菌物种(来自杜邦-杰能科公司的商品名OPITMAX®1-100和来自诺维信的Promozyme®D2)。脱支酶的其他实例包括但不限于,来自磺矿硫化叶菌、假单

胞菌物种的异淀粉酶,来自结状闪烁杆菌 (*Fervidobacterium nodosum*) 热稳定支链淀粉酶 (e.f., WO 2010/76113)。来自假单胞菌物种的异淀粉酶可作为来自麦格酶国际公司的纯化的酶使用。可以使用任何支链淀粉酶。

[0238] 葡聚糖酶是分解葡聚糖的酶,是葡萄糖亚单位组成的多糖。当它们进行糖苷键的水解时,它们是水解酶。

[0239] β -葡聚糖酶 (EC 3.2.1.4) 消化纤维。它有助于植物细胞壁 (纤维素) 的分解。

[0240] 纤维素酶是由真菌、细菌和原生动物产生的几种酶的一种,它能催化溶纤作用、纤维素和一些相关多糖的分解。这个名称也用于任何自然发生的混合物或各种此类酶的复合物,这些酶连续或协同作用以分解纤维素材料。可以使用任何纤维素酶。

[0241] 木聚糖酶 (EC 3.2.1.8) 是向直链多糖 β -1,4-木聚糖降解为木糖,其分解半纤维素 (植物细胞壁的主要组分之一) 的一类酶给出的名称。可以使用任何木聚糖酶。

[0242] 动物饲料可以包括植物材料,例如玉米,小麦,高粱,大豆,低芥酸菜籽,向日葵,或针对家禽、猪、反刍动物、水产养殖和宠物的这些植物材料或植物蛋白源中的任何的混合物。预期动物性能参数,例如生长、采食量和饲料效率,但同时改善的均匀性、降低的动物房内的氨浓度以及因此改善的动物的福利和健康状况,都将得到改善。更具体地,如在此所用的“动物性能”可以通过动物的饲料效率和/或增重和/或通过饲料转化率和/或通过饲料中的营养物质的消化率 (例如氨基酸消化率) 和/或饲料中的可消化能或代谢能和/或通过氮保留量和/或通过动物避免坏死性肠炎的负面影响的能力和/或通过受试者的免疫应答来确定。

[0243] 优选地,“动物性能”通过饲料效率和/或动物增重和/或饲料转化率来确定。

[0244] “改善的动物性能”意指与不包含本发明的饲料添加剂组合物的饲料相比,由于使用所述饲料添加剂组合物,受试者中的饲料效率增加和/或增重增加和/或饲料转化率降低和/或饲料中的营养物质或能量的消化率改善和/或氮保留量改善和/或避免坏死性肠炎的负面影响的能力改善和/或免疫应答改善。

[0245] 优选地,“改善的动物性能”意指存在增加的饲料效率和/或增加的增重和/或降低的饲料转化率。如本文所使用的,术语“饲料效率”是指当一段时间内给动物无限制地喂食或饲喂规定量的食物时出现的动物增重的量。

[0246] “增加的饲料效率”意指与在不存在根据本发明的饲料添加剂组合物的情况下饲喂的动物相比,在饲料中使用本发明的饲料添加剂组合物导致每单位饲料摄入量中增重增加。

[0247] 如本文所使用的,术语“饲料转化率”是指饲喂给动物以使动物体重增加的规定量的饲料量。

[0248] 改善的饲料转化率意指较低的饲料转化率。

[0249] “较低的饲料转化率”或“改善的饲料转化率”意指在饲料中使用饲料添加剂组合物导致动物增重指定量饲喂给动物的所需要的饲料量低于饲料添加剂组合物的情况下使动物增重相同量时所需的饲料量。

[0250] 本文所用的营养物质消化率是指从胃肠道或胃肠道特定区段 (例如小肠) 消失的营养物质的比率。营养物消化率可测量为所给予至受试者的营养物与受试者粪便中所排出来的营养物之间的差值、或给予至受试者的营养物与保留在胃肠道指定区段 (例如回肠) 上

的消化物中的营养物之间的差值。

[0251] 如在此使用的,营养物消化率可通过在一段时间期间收集总排泄物,测量所摄入营养物与所排泄的营养物之间的差值;或利用不会被动物吸收,并允许研究者计算整个胃肠道或胃肠道区段中所消失的营养的量的惰性标记物来测量。这样的惰性标记可以是二氧化钛、氧化铬或酸不溶性灰分。消化率可以表示为在饲料中营养物的百分比,或表示为可消化的营养物的质量单位/饲料中的营养物的质量单位。

[0252] 如本文所使用的营养物消化率涵盖淀粉消化率、脂肪消化率、蛋白质消化率和氨基酸消化率。

[0253] 如本文所使用的能量消化率意指所消费的饲料总能量减去粪便的总能量,或所消费的饲料总能量减去动物胃肠道指定区段(例如回肠)中剩余消化物的总能量。如本文所使用的代谢能是指表观代谢能,且意指所消费的饲料总能量减去粪便、尿和消化的气体产物中含有的总能量。可使用与测定营养物质消化率相同的方法,通过总能量的摄入量与粪便排出的总能量之间的差值,或与胃肠道特定区段(例如回肠)中存在的消化物总能量之间的差值来测量能量消化率和代谢能,同时对氮排泄进行适当校正来计算饲料的代谢能。

[0254] 在一些实施例中,本文所述的组合物可提高受试者对膳食半纤维素或纤维的消化率或利用率。在一些实施例中,所述受试者是猪。

[0255] 如本文所使用的氮保留意指受试者将饮食中的氮保有为体重的能力。当氮排泄量超过每日摄入量时,会出现负的氮平衡,肌肉减少时通常会观察到此现象。正的氮平衡常常与肌肉生长相关,尤其是对于生长期动物来说。

[0256] 氮保留可以测量为在一段时间内氮的摄入量与通过排泄物和尿液完全收集而得出的氮排出量之间的差值。应当理解,排出的氮包括饲料中未消化的蛋白质、内源性蛋白质的分泌物、微生物蛋白质和尿氮。

[0257] 如在本文所使用的术语存活率,是指存活的受试者人数。术语“改善的生存率”是“降低的死亡率”的另一种说法。

[0258] 本文所用的术语屠体收率是指经过商业或实验宰杀过程之后,作为活体重量一部分的屠体的量。术语屠体是指为食用而已被宰杀,并去除头部、内脏、四肢部分、和羽毛或皮的动物躯体。如本文所使用的,术语产肉量是指作为活体重量一部分的可食用肉量,或作为活体重量一部分的特定肉块量。

[0259] “增加的增重”是指与饲喂不含所述饲料添加剂组合物的饲料的动物相比,饲喂包含饲料添加剂组合物的饲料时体重增加的动物。

[0260] 如在此所用的术语“动物”包括所有非反刍动物和反刍动物。在具体实施例中,该动物是非反刍动物,例如马和单胃动物。单胃动物的实例包括但不限于:猪(pig and swine),例如仔猪、生长猪、母猪;家禽,例如火鸡、鸭、小鸡、肉仔鸡、蛋鸡;鱼,例如鲤鱼、鳟鱼、罗非鱼、鲶鱼和鲤鱼;以及甲壳类,例如虾和对虾。在一个另外的实施例中,动物是反刍动物,包括但不限于牛、小牛、山羊、绵羊、长颈鹿、北美野牛、驼鹿、麋鹿、牦牛、水牛、鹿、骆驼、羊驼、美洲驼、羚羊、叉角羚和鹿牛羚。

[0261] 在本发明上下文中,术语“宠物食品”旨在被理解为意指用于以下的食物:家庭动物,例如但不限于狗、猫、沙鼠、仓鼠、南美栗鼠、褐鼠、豚鼠;鸟类宠物,例如金丝雀、长尾小鹦鹉和鹦鹉;爬行动物宠物,例如海龟、蜥蜴和蛇;以及水生宠物,例如热带鱼和青蛙。

[0262] 术语“动物饲料组合物”、“饲料”、“喂养料”和“秣料 (fodder)”可互换地使用，并且包含选自下组的一种或多种饲料原料，该组包含：a) 谷类，例如小粒谷物 (例如小麦、大麦、黑麦、燕麦及其组合) 和/或大粒谷物，例如玉米或高粱；b) 来自谷类的副产物，例如玉米谷蛋白粉、具有可溶物的干酒糟 (Distillers Dried Grains with Solubles) (DDGS) (特别是基于玉米的具有可溶物的干酒糟 (cDDGS))、小麦麸、粗小麦粉、次麦粉、米糠、稻壳、燕麦壳、棕榈仁和柑橘渣；c) 获自以下来源的蛋白质：例如大豆、向日葵、花生、羽扇豆、豌豆、蚕豆、棉花、低芥酸菜籽、鱼粉、干血浆蛋白质、肉和骨粉、马铃薯蛋白、乳清、干椰肉、芝麻；d) 获自植物和动物来源的油和脂肪；和/或e) 矿物质和维生素。

[0263] 本文所述的天冬氨酸蛋白酶或饲料添加剂组合物可以用作饲料或用于饲料的制备中。术语“饲料添加剂组合物”和“酶组合物”在本文中可互换地使用。

[0264] 取决于用途和/或应用模式和/或施用模式，饲料可呈溶液形式或呈固体形式或呈半固体形式。

[0265] 当用作或用于制备饲料 (例如功能性饲料) 时，本发明的酶或饲料添加剂组合物可以与以下中的一种或多种结合使用：营养上可接受的载体、营养上可接受的稀释剂、营养上可接受的赋形剂、营养上可接受的辅剂、营养活性成分。例如，提及至少一种选自由以下组成的组的组分：蛋白质、肽、蔗糖、乳糖、山梨醇、甘油、丙二醇、氯化钠、硫酸钠、乙酸钠、柠檬酸钠、甲酸钠、山梨酸钠、氯化钾、硫酸钾、乙酸钾、柠檬酸钾、甲酸钾、乙酸钾、山梨酸钾、氯化镁、硫酸镁、乙酸镁、柠檬酸镁、甲酸镁、山梨酸镁、焦亚硫酸钠、对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯。

[0266] 在一个优选的实施例中，将本发明的酶或饲料添加剂组合物与饲料组分混合以形成喂养料。在此所用的术语“饲料组分”意指喂养料的全部或部分。喂养料的部分可意指喂养料的一种成分或喂养料的一种以上 (例如2种或3种或4种或更多种) 成分。在一个实施例中，术语“饲料组分”涵盖预混物或预混物成分。优选地，饲料可以是秣料或其预混物、复合饲料或其预混物。可将根据本发明的饲料添加剂组合物与复合饲料、复合饲料组分混合或将其混合至复合饲料的预混物或混合至秣料、秣料组分或秣料的预混物中。

[0267] 本文所述的任何喂养料可包含一种或多种选自包含以下的组的饲料材料：a) 谷类，例如小粒谷物 (例如小麦、大麦、黑麦、燕麦、黑小麦以及它们的组合) 和/或大粒谷物例如玉蜀黍或高粱；b) 来自谷类的副产物，例如玉米谷蛋白粉、湿饼 (特别是基于玉米的湿饼)、干酒糟 (DDG) (特别是基于玉米的干酒糟 (cDDG))、具有可溶物的干酒糟 (DDGS) (特别是基于玉米的具有可溶物的干酒糟 (cDDGS))、麦麸、小麦粗粉、小麦次粉、米糠、稻壳、燕麦壳、棕榈仁和柑橘渣；c) 获自以下来源的蛋白质：例如大豆、向日葵、花生、羽扇豆、豌豆、蚕豆、棉花、低芥酸菜籽、鱼粉、干血浆蛋白质、肉和骨粉、马铃薯蛋白、乳清、干椰肉、芝麻；d) 获自植物和动物来源的油和脂肪；e) 矿物质和维生素。

[0268] 在此所用的术语“秣料”意指提供给动物的任何食物 (而不是动物必须自己觅食)。秣料涵盖已经切下的植物。此外，秣料包括青贮饲料、压缩的和压成丸粒的饲料、油和混合给养，也包括发芽谷物和豆类。

[0269] 秣料可以获得自选自以下的植物中的一种或多种：玉米 (玉蜀黍)、苜蓿 (紫苜蓿)、大麦、百脉根、芸苔属、Chaumoellier、羽衣甘蓝、油菜籽 (低芥酸菜籽)、芜菁甘蓝 (瑞典甘蓝)、萝卜、三叶草、杂种三叶草、红三叶草、地下三叶草、白三叶草、羊茅草、雀麦草、粟、燕

麦、高粱、大豆、树(用作树干草的修剪下的树嫩枝)、小麦、和豆科植物。

[0270] 术语“复合饲料”意指呈粗粉、丸粒、球丸(nut)、饼或碎屑形式的商业饲料。复合饲料可由多种原料和添加剂共混而来。根据目标动物的特定需求配制这些共混物。

[0271] 复合饲料可以是提供所有每日所需营养物质的完全饲料、提供口粮(蛋白质、能量)的一部分的浓缩物或仅提供另外的微量营养物质(例如矿物质和维生素)的补充剂。

[0272] 用于复合饲料中的主要成分是饲料谷物,其包括玉米、小麦、低芥酸菜籽粉、油菜籽粉、羽扇豆、大豆、高粱、燕麦和大麦。

[0273] 合适地,在此所提及的预混物可以是由微量成分构成的组合物,该微量成分为例如维生素、矿物质、化学防腐剂、抗生素、发酵产物和其他必需成分。预混物通常是适合于共混进商业口粮内的组合物。

[0274] 在一个实施例中,喂养料包含以下或由以下组成:玉米、DDGS(例如,cDDGS)、小麦、小麦麸、或其任何组合。

[0275] 在一个实施例中,饲料组分可为玉米、DDGS(例如,cDDGS)、小麦、小麦麸、或其组合。在一个实施例中,喂养料包含以下或由以下组成:玉米、DDGS(例如,cDDGS)或其组合。

[0276] 本文所述的喂养料可含有按重量计至少30%、至少40%、至少50%或至少60%的玉米和大豆粉或玉米及全脂大豆、或者小麦粉或向日葵粉。

[0277] 例如,喂养料可以含有约5%至约40%的玉米DDGS。对于家禽,所述喂养料平均可含有约7%至15%的玉米DDGS。对于猪(swine或pig),所述喂养料可含有平均5%至40%的玉米DDGS。它也可以含有玉米作为单一谷物,在这种情况下,所述喂养料可以包含约35%至约80%的玉米。

[0278] 在包含混合谷物(例如包含如玉米和小麦)的喂养料中,所述喂养料可包含至少10%的玉米。

[0279] 另外或可替代地,喂养料也可包含至少一种高纤维饲料材料和/或至少一种高纤维饲料材料的至少一种副产物以提供高纤维喂养料。高纤维饲料材料的实例包括:小麦、大麦、黑麦、燕麦,来自谷类的副产物,例如玉米蛋白粉、玉米蛋白饲料、湿饼、干酒糟(DDG)、具有可溶物的干酒糟(DDGS)、麦麸、小麦粗粉、小麦粉头、米糠、稻壳、燕麦壳、棕榈仁和柑橘果肉。一些蛋白质源也可视为高纤维:获自例如以下来源的蛋白质:向日葵、羽扇豆、蚕豆和棉花。在一个方面,如本文所述的喂养料包含选自由以下组成的组的至少一种高纤维材料和/或至少一种高纤维饲料材料的至少一种副产物,例如:具有可溶物的干酒糟(DDGS)(特别是cDDGS)、湿饼、干酒糟(DDG)(特别是cDDG)、麦麸和小麦。在一个实施例中,本发明的喂养料包含选自由以下组成的组的至少一种高纤维材料和/或至少一种高纤维饲料材料的至少一种副产物,例如:含可溶物干酒糟(DDGS)(特别是cDDGS)、麦麸和小麦。

[0280] 所述饲料可为以下中的一者或二者:复合饲料和预混物,包括丸粒、坚果或(牲畜)饼状物;作物或作物残余物:玉米、大豆、高粱、燕麦、大麦、椰子核、稻草、谷壳、甜菜残渣;鱼粉;肉粉和骨粉;糖蜜;油饼和滤饼;低聚糖;糖渍饲用植物:青贮饲料;海草;种子和谷物,完整的或通过压碎、碾磨等制备;发芽谷物及豆类;酵母提取物。

[0281] 如在此所用的术语“饲料”在一些实施例中涵盖宠物食品。宠物食品是旨在由宠物消费的植物或动物材料,例如狗食品或猫食品。宠物食品(例如狗和猫食品)可以干燥形式(例如用于狗的磨碎食物)或湿罐装形式。猫食品可含有氨基酸牛磺酸。

[0282] 动物饲料还可以包括鱼食。鱼食通常含有使养殖鱼保持良好健康所需的大量营养素、痕量元素和维生素。鱼食可以呈小片、丸粒或片的形式。压成丸粒的形式(其中的一些快速沉降)经常用于较大鱼或底饲物种。一些鱼食还含有添加剂(例如β胡萝卜素或性激素)以人工增强观赏性鱼的颜色。

[0283] 在仍另一方面,动物饲料涵盖鸟食。鸟食包括用于喂鸟器中以及用于饲喂宠物鸟的食物。典型地,鸟食由多种种子组成,但也可涵盖板油(牛肉或羊肉脂肪)。

[0284] 如本文所使用的,术语“接触”指的是间接或直接将天冬氨酸蛋白酶(或包含天冬氨酸蛋白酶的组合物)应用到产品(例如饲料)中。可以使用的施用方法的实例包括但不限于:在包含饲料添加剂组合物的材料中处理产品、通过将饲料添加剂组合物与产品混合而直接应用、将饲料添加剂组合物喷涂至产品表面上或将产品浸入饲料添加剂组合物的配制品中。在一个实施例中,优选将本发明的饲料添加剂组合物与产品(例如喂养料)混合。可替代地,喂养料的乳液或原始成分中可包括饲料添加剂组合物。对于一些应用而言,重要的是,使组合物在待影响/处理的产品表面上可用或可用于待影响/处理的产品表面。这允许所述组合物赋予性能益处。

[0285] 在一些方面,所述的天冬氨酸蛋白酶用于食品或饲料的预处理。例如,饲料具有10%-300%的水分混合并与蛋白酶在5°C-80°C下孵育,优选在25°C-50°C,更优选在30°C-45°C之间在有氧条件下孵育1分钟至72小时或在厌氧条件下孵育1天至2个月。预处理后的材料可以直接饲喂给动物(所谓的液体饲喂)。预处理的材料也可以在升高的温度(60°C-120°C)下蒸汽制粒。蛋白酶可以通过真空包衣机浸渍到饲料或食品材料中。

[0286] 可将天冬氨酸蛋白酶(或包含天冬氨酸蛋白酶的组合物)和受控量的所述酶散布、涂布和/或浸渍产品(例如喂养料或喂养料的原材料)。

[0287] 优选地,将天冬氨酸蛋白酶(或包含天冬氨酸蛋白酶的组合物)对以下温度的热处理是热稳定的:高至约70°C;高至约85°C;或高至约95°C。热处理可以进行长达约1分钟;长达约5分钟;长达约10分钟;长达约30分钟;长达约60分钟。

[0288] 术语“热稳定”意指加热至指定温度之前添加剂中存在/有活性的酶的至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%或98%在冷却至室温之后仍存在/有活性。优选地,加热至指定温度之前添加剂中存在且有活性的酶的至少约80%在冷却至室温之后仍存在且有活性。

[0289] 也可能的是,本文所述的天冬氨酸蛋白酶(或包含天冬氨酸蛋白酶的组合物)可以均化以产生粉末。

[0290] 在一个替代性优选的实施例中,将天冬氨酸蛋白酶(或包含天冬氨酸蛋白酶的组合物)配制成如WO 2007/044968(称作TPT颗粒)或W01997/016076或W01992/012645中所述的颗粒,将这些文献通过引用并入本文中。“TPT”意指热保护技术。

[0291] 在另一方面,当将饲料添加剂组合物配制成颗粒时,这些颗粒包含包覆在蛋白质核心上的水合屏障盐。这样的盐包衣的优点在于使耐热性改善、使保藏稳定性改善和保护免受其他原本会不利影响该酶的饲料添加剂的影响。优选地,用于盐包衣的盐在20°C下具有大于0.25的水活度或大于60%的恒定湿度。在一些实施例中,盐包衣包含Na₂SO₄。

[0292] 制备天冬氨酸蛋白酶(或包含天冬氨酸蛋白酶的组合物)的方法还可以包括将粉末制成粒料的另外步骤。粉末可以与本领域已知的其他组分进行混合。可强加力使粉末、或

包含粉末的混合物通过模具，并将所得线料切成适宜的不同长度的粒料。

[0293] 任选地，制粒步骤可包括在粒料形成之前进行的蒸汽处理或调理阶段。可将包含粉末的混合物置于调节器中，例如带有蒸汽注射的搅拌器。将混合物在达到指定温度的调节器中加热，例如从60°C-100°C，典型的温度将是70°C、80°C、85°C、90°C、或95°C。停留时间可以是从几秒钟到几分钟并且甚至几小时不等。例如5秒钟、10秒钟、15秒钟、30秒钟、1分钟、2分钟、5分钟、10分钟、15分钟、30分钟和1小时。应当理解，本文所述的天冬氨酸蛋白酶（或包含天冬氨酸蛋白酶的组合物）适于添加至任何适宜的饲料材料中。

[0294] 技术人员会认识到，不同的动物要求不同的喂养料，甚至同一种动物也可能要求不同的喂养料，这取决于饲养该动物的目的。

[0295] 任选地，喂养料还可含有另外的矿物质（例如钙）和/或另外的维生素。在一些实施例中，喂养料为玉米大豆粉混合物。

[0296] 喂养料典型地在饲料磨机中生产，在磨机中首先将原料研磨成合适的粒度，然后与适当的添加剂混合。然后，可以将喂养料生产成糊状或丸粒；后者通常涉及这样的方法，通过该方法将温度升高至目标水平，然后使饲料通过模具从而生产出特定大小的丸粒。让丸粒冷却。随后，可添加液体添加剂例如脂肪和酶。制备喂养料也可涉及另外的步骤，该步骤包括制粒之前的挤压或膨化，尤其是通过至少可包括使用蒸汽的适宜技术进行的挤压或膨化。

[0297] 所述喂养料可为用于以下的喂养料：单腹动物，例如家禽（例如肉鸡、下蛋鸡、肉用种鸡、产仔鸡、火鸡、鸭、鹅、水禽）和猪类（所有年龄类别）；反刍动物，例如牛（例如奶牛或公牛（包括牛犊））、马、绵羊、宠物（例如狗、猫）或鱼（例如无胃鱼，有胃鱼，淡水鱼，如鲑鱼、鳕鱼、鳟鱼和鲤鱼（例如锦鲤鱼），海鱼（例如黑鲈）；和甲壳类动物，例如虾、贻贝和扇贝）。优选地，所述喂养料用于家禽。

[0298] 所述饲料添加剂组合物和/或包含其的喂养料可以任何合适的形式使用。所述饲料添加剂组合物能以固体或液体配制品或其替代物形式使用。固体配制品的实例包括粉剂、糊剂、大丸粒、胶囊剂、丸粒、片剂、尘剂和颗粒，其可以是可润湿的、喷雾干燥的或冷冻干燥的。液体配制品的实例包括但不限于水性、有机或水性-有机溶液、悬浮液和乳剂。

[0299] 在一些应用中，可将所述饲料添加剂组合物与饲料混合或在饮用水中施用。

[0300] 饲料添加剂组合物，包含将如在此所教导的蛋白酶与饲料可接受载体、稀释剂或赋形剂混合，并且（任选地）进行包装。

[0301] 可使喂养料和/或饲料添加剂组合物与至少一种矿物质和/或至少一种维生素混合。由此衍生的组合物可在此称为预混物。

[0302] 在一些实施例中，基于纯酶蛋白，天冬氨酸蛋白酶在喂养料中可以以1ppb（十亿分之几）到10%（w/w）的范围存在。在一些实施例中，蛋白酶在喂养料中以1-100ppm（百万分之一）的范围存在。优选剂量可以是每吨饲料产品或饲料组合物1-20g天冬氨酸蛋白酶，或在最终产品中1-20ppm天冬氨酸蛋白酶的最终剂量。

[0303] 在某些情况下，应当理解，一个蛋白酶单位（PU）是在pH 7.5 (40mM Na₂PO₄/乳酸缓冲液) 和40°C下，一分钟内从底物（0.6%酪蛋白溶液）释放一微克酚类化合物（表示为酪氨酸等价物）的酶量。这可被称为确定1PU的测定法。

[0304] 在一个实施例中，合适地使用上述E.C.分类法将酶分类，并且当以本文教导的用

于确定1PU的测定法测试时,E.C.分类法对具有所述活性的酶进行命名。

[0305] 优选地,天冬氨酸蛋白酶可以在喂养料中以至少约200PU/kg或至少约300PU/kg饲料或至少约400PU/kg饲料或至少约500PU/kg饲料或至少约600PU/kg饲料、或至少约700PU/kg饲料、至少约800PU/kg饲料、至少约900PU/kg饲料、或至少约1000PU/kg饲料、或至少约1500PU/kg饲料、或至少约2000PU/kg饲料、或至少约2500PU/kg饲料、或至少约3000PU/kg饲料、或至少约3500PU/kg饲料、或至少约4000PU/kg饲料、或至少约4500PU/kg饲料、或至少约5000PU/kg饲料存在。

[0306] 在另一方面,天冬氨酸蛋白酶可以在喂养料中以低于约60,000PU/kg饲料、或以低于约70,000PU/kg饲料、或以低于约80,000PU/kg饲料、或以低于约90,000PU/kg饲料、或以低于约100,000PU/kg饲料、或以低于约200,000PU/kg饲料、或以低于约60000PU/kg饲料、或以低于约70000PU/kg饲料存在。

[0307] 范围可以包括但不限于上面讨论的较低和较高范围的任何组合。

[0308] 包含天冬氨酸蛋白酶和本文所述的组合物的制剂可以以任何合适的方式制备以确保所述制剂包含活性酶。这类制剂可以是液体、干粉或颗粒。优选地,所述饲料添加剂组合物呈适合于在饲料丸粒上喷雾干燥的液体形式。

[0309] 干粉或颗粒可以通过本领域技术人员已知的手段制备,例如高剪切制粒、鼓式制粒、挤出、滚圆、流化床附聚、流化床喷雾。

[0310] 本文所述的天冬氨酸蛋白酶和组合物可以被包衣,例如被封装。在一个实施例中,包衣保护酶免受热影响并且可视为耐热剂。

[0311] 将本文所述的饲料添加剂组合物配制成干粉或颗粒,如WO 2007/044968(称为TPT颗粒)或WO 1997/016076或WO 1992/012645中所述(所述文献各自通过引用全部并入本文中)。

[0312] 在一个实施例中,可以将饲料添加剂组合物配制成为用于饲料组合物的颗粒,其包括:芯;活性剂;和至少一个包衣,在选自以下中的一种或多种的条件后,颗粒的活性剂保持至少50%活性、至少60%活性、至少70%活性、至少80%活性:a) 饲料制丸工艺,b) 蒸汽加热的饲料预处理工艺,c) 储存,d) 作为未经制丸混合物中的成分储存,和e) 作为包含选自以下的至少一种化合物的饲料基础混合物或饲料预混物中的成分储存:微量矿物质、有机酸、还原糖、维生素、氯化胆碱以及产生酸性或碱性饲料基础混合物或饲料预混物的化合物。

[0313] 关于颗粒,至少一个涂层可包含构成所述颗粒的至少55%w/w的水分水合材料;和/或至少一个包衣可包含两层包衣。所述两层包衣可为水分水合包衣和防潮层包衣。在一些实施例中,所述水分水合包衣可为所述颗粒的25%w/w至60%w/w并且所述防潮层包衣可为所述颗粒的2%w/w至15%w/w。所述水分水合包衣可选自无机盐、蔗糖、淀粉和麦芽糖糊精,并且所述防潮层包衣可选自聚合物、树胶、乳清和淀粉。

[0314] 所述颗粒可使用饲料制丸工艺制备并且所述饲料预处理工艺可在70°C至95°C(例如在85°C至95°C)进行长达若干分钟。

[0315] 可将饲料添加剂组合物配制成为用于动物饲料的颗粒,其包含:芯;活性剂,在储存之后以及在颗粒作为一种成分的蒸汽加热制粒工艺之后,所述颗粒的活性剂保持至少80%活性;防潮层包衣;和水分水合包衣,其至少为所述颗粒的25%w/w,该颗粒在蒸汽加热制粒工艺之前具有小于0.5的水活性。

[0316] 所述颗粒可具有选自聚合物和树胶的防潮层包衣并且所述水分水合材料可为无机盐。所述水分水合包衣可为所述颗粒的25%w/w至45%w/w并且所述防潮层包衣可为所述颗粒的2%w/w至10%w/w。

[0317] 颗粒可使用蒸汽加热制丸工艺制备,该工艺可在85°C至95°C进行长达若干分钟。

[0318] 可替代地,所述组合物处于适合消耗的液体制剂中,优选地,这种液体消费品含有以下中的一种或多种:缓冲剂、盐、山梨糖醇和/或甘油。

[0319] 此外,可通过将一种或多种酶施用(例如喷涂)于载体底物(例如碾碎的小麦)上来配制饲料添加剂组合物。

[0320] 在一个实施例中,饲料添加剂组合物可以被配制成预混物。仅举个实例,该预混物可包含一种或多种饲料组分,例如一种或多种矿物质和/或一种或多种维生素。

[0321] 在一个实施例中,将直接饲喂微生物(“DFM”)和/或天冬氨酸蛋白酶与至少一种生理学上可接受的载体一起配制,该载体选自以下各项中的至少一种:麦芽糖糊精、石灰石(碳酸钙)、环糊精、小麦或小麦组分、蔗糖、淀粉、Na₂SO₄、滑石、PVA、山梨醇、苯甲酸盐、山梨酸盐、甘油、蔗糖、丙二醇、1,3-丙二醇、葡萄糖、对羟基苯甲酸酯、氯化钠、柠檬酸盐、乙酸盐、磷酸盐、钙、偏亚硫酸氢盐、甲酸盐及其混合物。

[0322] 本文所公开的组合物和方法的非限制性实例包括:

[0323] 1. 一种重组构建体,所述重组构建体包含在生产宿主中起作用的调节序列,所述调节序列有效地连接到编码天冬氨酸蛋白酶的核苷酸序列,所述天冬氨酸蛋白酶选自由以下组成的组:

[0324] (a) 与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:7具有至少75%序列同一性的天冬氨酸蛋白酶;

[0325] (b) 与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:9具有至少78%序列同一性的天冬氨酸蛋白酶;以及

[0326] (c) 与SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:8具有至少95%序列同一性的天冬氨酸蛋白酶。

[0327] 2. 如实施方案1所述的生产宿主,其中所述宿主选自由以下组成的组:细菌、真菌、酵母和藻类。

[0328] 3. 如实施方案1或2所述的生产宿主,其中所述天冬氨酸蛋白酶核苷酸序列是经染色体表达的或经染色体外表达的。

[0329] 4. 一种产生天冬氨酸蛋白酶的方法,所述方法包括:

[0330] (a) 用如实施方案1所述的重组构建体转化生产宿主;以及

[0331] (b) 在产生所述天冬氨酸蛋白酶的条件下培养步骤(a)的生产宿主。

[0332] 5. 如实施方案4所述的方法,其中任选地从所述生产宿主回收所述天冬氨酸蛋白酶。

[0333] 6. 一种含有天冬氨酸蛋白酶的培养物上清液,所述培养物上清液通过如权利要求4或5中任一项所述的方法获得。

[0334] 7. 一种用于表达天冬氨酸蛋白酶的重组微生物生产宿主,所述重组微生物生产宿主包含如权利要求1所述的重组构建体。

[0335] 8. 如权利要求7所述的生产宿主,其中所述宿主选自由以下组成的组:细菌、真菌、酵母和藻类。

[0336] 9. 如权利要求7或权利要求8所述的生产宿主,其中所述天冬氨酸蛋白酶构建体是

经染色体表达的或经染色体外表达的。

[0337] 10. 天冬氨酸蛋白酶在饲料、喂养料、饲料添加剂组合物或预混物中的用途, 其中所述天冬氨酸蛋白酶选自由以下组成的组:

[0338] (a) 与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:7具有至少75%序列同一性的天冬氨酸蛋白酶;

[0339] (b) 与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:9具有至少78%序列同一性的天冬氨酸蛋白酶; 以及

[0340] (c) 与SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:8具有至少95%序列同一性的天冬氨酸蛋白酶,

[0341] 其中所述天冬氨酸蛋白酶可以 (i) 单独地使用或 (ii) 与包含至少一种细菌菌株的直接饲喂微生物组合使用或 (iii) 与至少一种其他酶一起使用或 (iv) 与包含至少一种细菌菌株的直接饲喂微生物以及至少一种其他酶组合使用。

[0342] 11. 一种动物饲料, 所述动物饲料包含选自由以下组成的组的天冬氨酸蛋白酶:

[0343] (a) 与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:7具有至少75%序列同一性的天冬氨酸蛋白酶;

[0344] (b) 与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:9具有至少78%序列同一性的天冬氨酸蛋白酶; 以及

[0345] (c) 与SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:8具有至少95%序列同一性的天冬氨酸蛋白酶,

[0346] 其中所述天冬氨酸蛋白酶以1-20g/吨饲料的量存在, 并且进一步地其中所述天冬氨酸蛋白酶可以 (i) 单独地使用或 (ii) 与包含至少一种细菌菌株的直接饲喂微生物组合使用或 (iii) 与至少一种其他酶一起使用或 (iv) 与包含至少一种细菌菌株的直接饲喂微生物以及至少一种其他酶组合使用。

[0347] 12. 一种具有蛋白酶活性的分离的多肽, 所述多肽包含选自由以下组成的组的氨基酸序列蛋白酶:

[0348] (a) 与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:7具有至少75%序列同一性的天冬氨酸蛋白酶;

[0349] (b) 与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:9具有至少78%序列同一性的天冬氨酸蛋白酶; 以及

[0350] (c) 与SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:8具有至少95%序列同一性的天冬氨酸蛋白酶。

[0351] 13. 一种多核苷酸序列, 所述多核苷酸序列编码如权利要求13所述的多肽。

[0352] 14. 一种用于在动物饲料中使用的饲料添加剂组合物, 所述饲料添加剂组合物包含如权利要求12所述的多肽, 以及至少一种选自由以下组成的组的组分: 蛋白质、肽、蔗糖、乳糖、山梨醇、甘油、丙二醇、氯化钠、硫酸钠、乙酸钠、柠檬酸钠、甲酸钠、山梨酸钠、氯化钾、硫酸钾、乙酸钾、柠檬酸钾、甲酸钾、乙酸钾、山梨酸钾、氯化镁、硫酸镁、乙酸镁、柠檬酸镁、甲酸镁、山梨酸镁、焦亚硫酸钠、对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯。

[0353] 15. 一种用于在动物饲料中使用的颗粒状酶组合物, 所述颗粒状酶组合物包含如权利要求12所述的多肽, 其中所述颗粒状饲料添加剂组合物包含通过选自由以下组成的组的工艺产生的颗粒: 高剪切制粒、鼓式制粒、挤出、滚圆、流化床附聚、流化床喷涂、喷雾干燥、冷冻干燥、造粒、喷雾冷却、旋转式圆盘雾化、凝聚、压片或上述工艺的任何组合。

[0354] 16. 如权利要求15所述的颗粒状饲料添加剂组合物, 其中这些颗粒的平均直径大于50微米并且小于2000微米。

[0355] 17. 如权利要求14所述的饲料添加剂组合物, 其中所述组合物呈液体形式。

[0356] 18. 如权利要求17所述的饲料添加剂组合物, 其中所述组合物呈适合于在饲料丸

粒上喷雾干燥的液体形式。

[0357] 实例

[0358] 除非在此另外定义,在此所用的全部技术术语和科学术语具有与本公开所属领域的普通技术人员通常所理解的相同意义.Singleton等人,DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY[微生物学和分子生物学词典],2D版,约翰威利父子公司(John Wiley and Sons),纽约(1994),以及Hale和Marham,THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY[哈珀柯林斯生物学词典],Harper Perennial[哈珀永久出版社],纽约州(1991)为技术人员提供了本公开中所使用的许多术语的通用词典。

[0359] 本公开在下面的实例中进一步定义。应该理解,这些实例尽管说明了某些实施例,但仅以示例的方式给出。从以上的讨论和所述实例中,本领域的技术人员能够确定本公开的本质特性,并且在不脱离本公开的实质和范围的情况下,可进行各种变化和修改以使其适应各种用途和条件。

[0360] 缩写的含义如下:“sec”或“s”表示秒、“ms”表示毫秒、“min”表示分钟、“h”或“hr”表示小时、“ μL ”表示微升、“mL”表示毫升、“L”表示升;“mL/min”是毫升每分钟;“ $\mu\text{g/mL}$ ”是微克每毫升;“LB”是Luria肉汤;“ μm ”是微米、“nm”是纳米;“OD”是光密度;“IPTG”是异丙基- β -D-硫代半乳糖苷;“g”是引力;“mM”是毫摩尔;“SDS-PAGE”是十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺;“mg/mL”是毫克每毫升;“mT”是公吨,“N”是正常的;“w/v”是体积重量;“DTT”是二硫苏糖醇;“BCA”是二辛可宁酸;“DMAc”是N,N’-二甲基乙酰胺;“LiCl”是氯化锂;“NMR”是核磁共振;“DMSO”是二甲基亚砜;“SEC”是尺寸排阻色谱法;“GI”或“gi”是指GenInfo Identifier,其是由GENBANK®和其他序列数据库使用的系统,用于唯一地鉴定相应数据库内的多核苷酸和/或多肽序列;“DP_x”是指具有“x”个单位长度的葡聚糖聚合度;“ATCC”是指美国典型培养物保藏中心(马纳萨斯,弗吉尼亚州)、“DSMZ”和“DSM”是指莱布尼茨研究所DSMZ-德国微生物和细胞培养物保藏中心(德国布伦瑞克);“EELA”是成品安全局(Finish Food Safety Authority)(芬兰赫尔辛基);“CCUG”是指瑞典哥德堡大学的培养物保藏中心;“Suc.”是指蔗糖;“Gluc.”是指葡萄糖;“Fruc.”是指果糖;“Leuc.”是指明串珠菌二糖;以及“Rxn”是指反应。

[0361] 一般方法

[0362] 本文使用的标准重组DNA和分子克隆技术是在本领域熟知的,并且描述于以下文献中:Sambrook,J.和Russell,D.,Molecular Cloning:A Laboratory Manual[分子克隆:实验室手册],第三版,冷泉港实验室,冷泉港,纽约州(2001);和Silhavy,T.J.,Bennan,M.L.和Enquist,L.W.,Experiments with Gene Fusions[基因融合实验],冷泉港实验室,冷泉港出版社,纽约州(1984);以及Ausubel,F.M.等人,Short Protocols in Molecular Biology[简明分子生物学试验方案],第5版,Current Protocols[当前试验方案],约翰威利父子公司(John Wiley and Sons,Inc),纽约州,2002。

[0363] 适合用于细菌培养物的维持和生长的材料和方法也是本领域熟知的。可以在Manual of Methods for General Bacteriology[普通细菌学的方法手册],Phillipp Gerhardt,R.G.E.Murray,Ralph N.Costilow,Eugene W.Nester,Willis A.Wood,Noel R.Krieg和G.Briggs Phillips编辑,(American Society for Microbiology Press[美国微生物学会出版社]),华盛顿(1994)),Biotechnology:A Textbook of Industrial

Microbiology by Wulf Crueger and Anneliese Crueger (authors) [Wulf Crueger和Anneliese Crueger (作者)的生物技术:工业微生物学的教科书],第二版,(Sinauer协会:桑德兰,马萨诸塞州(1990)),和Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology[工业微生物和生物技术手册],第三版,Richard H.Baltz,Arnold L.Demain,和Julian E.Davis (编辑),(American Society of Microbiology Press[美国微生物学会出版社],华盛顿(2010)可以发现在以下实例中适合使用的技术。

[0364] 除非另有说明,所有试剂、限制酶和用于细菌细胞生长和保持的材料均获得自BD Diagnostic Systems (Sparks, MD)、英杰/生命技术公司(卡尔斯巴德,加利福尼亚州)、生命技术公司(罗克维尔,马里兰州)、凯杰公司(QIAGEN) (瓦伦西亚,加利福尼亚州)、西格玛奥德里奇化学公司(Sigma-Aldrich Chemical Company) (圣路易斯,密苏里州)、或皮尔斯化学公司(Pierce Chemical Co.) (赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific Inc.,伊利诺伊州罗克福德市)的分公司)。IPTG(目录号I6758)、和三苯基四唑氯化物从西格玛公司(密苏里州圣路易斯)获得。Bellco旋转烧瓶获得自贝克尔公司(Bellco Co.,瓦恩兰(Vineland),新泽西州(NJ))。LB培养基获得自Becton、Dickinson and Company(富兰克林湖,新泽西州)。BCA蛋白质测定获得自西格玛奥德里奇公司(圣路易斯,密苏里州)。

[0365] 实例1

[0366] 真菌天冬氨酸蛋白酶的克隆

[0367] 选择三株真菌菌株(柱孢篮状菌CBS432.62、堆肥篮状菌CBS549.92和Geosmithia cylindrospora NRRL2673)作为酶的潜在来源,这些菌株可用于多种工业应用中。柱孢篮状菌CBS432.62和堆肥篮状菌CBS549.92购自CBS-KNAW真菌生物多样性中心(CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre) (Uppsalalaan 8, 3584CT乌特勒支市(Utrecht),荷兰)。Geosmithia cylindrospora NRRL2673购自ARS (NRRL) 培养物保藏中心,美国国家农业研究中心(ARS (NRRL) Culture Collection, National Center for Agricultural Utilization Research) (伊利诺斯州61604皮奥瑞亚市北大学街1815号(1815 North University Street, Peoria, IL, 61604))。从三株菌株中分离出染色体DNA,使用Illumina的下一代测序技术进行测序。对上述3种真菌物种进行注释后,鉴定出编码真菌性天冬氨酸蛋白酶的基因;其核苷酸或氨基酸序列标识符(ID)如表1所列。如通过SignalP软件version 4.0预测的(Nordahl Petersen等人(2011) Nature Methods[自然方法]8:785-786),所有3种蛋白的基因具有N-末端信号肽(表1),这说明它们都分泌酶。

[0368] 实例2

[0369] 经鉴定的真菌天冬氨酸蛋白酶的表达

[0370] 化学合成编码每个全长真菌天冬氨酸蛋白酶(SEQ ID NO:2、4和6)的DNA序列(SEQ ID NO:1、3和5)并将其插入里氏木霉表达载体pGXT(与描述于公布的PCT申请W0 2015/017256的pTTTpyr2载体相同,将该申请通过引用并入本文中)。在pTTTpyr2载体中,构巢曲霉(Aspergillus nidulans)pyrG基因被红褐肉座菌pyr2基因取代。pTTT-pyr2表达载体含有里氏木霉cbhI衍生的启动子(cbhI)和cbhI终止子区域,这允许感兴趣的基因的强烈诱导表达。构巢曲霉amdS和pyr2选择性标记赋予乙酰胺作为唯一氮源的转化体的生长,并且里氏木霉端粒区域允许在真菌细胞中维持非染色体质粒。

[0371] 得到的质粒分别标记为pGXT-RcyPro2、pGXT-RcoPro2和pGXT-GcyPro1。pGXT-

RcyPro2的质粒图谱如图1所示,另外两个质粒除了编码每个天冬氨酸蛋白酶的插入基因外,组成相似。

[0372] 使用原生质体转化 (Te'o等人 (2002) J. Microbiol. Methods [微生物方法杂志] 51: 393-99) 然后将每个独立的表达载体转化到合适的里氏木霉菌株 (方法描述于公开的PCT申请W0 05/001036中)。在含有乙酰胺 (作为唯一氮源) 的培养基上选择转化体。在乙酰胺板上生长5天后,收集转化体并在250mL摇瓶中在含有葡萄糖和槐糖混合物的定义的培养基中发酵。

[0373] 为纯化重组真菌性天冬氨酸蛋白酶,对每个澄清的培养物上清液进行浓缩,将硫酸铵添加至最终浓度为1M。将得到的溶液加载到HiPrepTMPhenyl FF 16/10柱上,用20mM醋酸钠预平衡pH 5.0,并运行梯度高至1M硫酸铵进行蛋白分离。然后将得到的活性蛋白级分进行混合和浓缩。纯化样本调整到40%甘油并存储在-20℃直至使用。

[0374] 实例3

[0375] 经纯化的真菌天冬氨酸蛋白酶的蛋白水解活性

[0376] 使用偶氮酪蛋白作为底物,在50mM醋酸钠缓冲液 (pH 3) 中测定经纯化的天冬氨酸蛋白酶 (RcyPro2 (SEQ ID NO:7)、RcoPro2 (SEQ ID NO:8) 和GcyPro1 (SEQ ID NO:9)) 的蛋白水解活性。反应前,用20mM醋酸钠缓冲液 (pH 5) 将酶样品稀释到指定浓度。偶氮酪蛋白溶解在50mM醋酸钠缓冲液中 (pH为3),直至最终浓度为0.75% (w/v)。为了开始反应,将90μL的0.75%的偶氮酪蛋白添加到非结合96-MTP (目录号3641,康宁生命科学公司) 并在恒温混合器中在40℃在600rpm孵育5分钟,随后添加10μL的稀释酶样品 (或只添加稀释缓冲液作为空白对照)。在40℃下和600rpm在恒温混合器中孵育反应10分钟后,将反应通过添加100μL的10% (w/v) 三氯乙酸 (TCA) 终止。平衡 (在室温下5分钟) 后,然后离心 (在4℃下2000g 10分钟),将100μL上清液转移到一个新的96-MTP并且使用分光光度计在440nm (A₄₄₀) 测量其吸光度。从每个酶检测样品的A₄₄₀中减去空白对照的A₄₄₀来计算净A₄₄₀,并且然后绘制出相对于蛋白浓度 (从0.16ppm到20ppm) 的图。每个值为三次重复测定的平均值。蛋白水解活性子显示为净A₄₄₀。以偶氮酪蛋白为底物的蛋白水解活性检测 (如图2所示) 表明,所有三种经纯化的真菌性天冬氨酸蛋白酶均为活性蛋白酶。

[0377] 实例4

[0378] 经纯化的天冬氨酸蛋白酶的pH曲线

[0379] 以偶氮酪蛋白为底物,在不同pH值 (范围从pH 2至7) 的25mM甘氨酸/醋酸钠/HEPES缓冲液中研究经纯化的天冬氨酸蛋白酶 (RcyPro2、RcoPro2和GcyPro1) 的pH曲线。测定前,特定的pH值的45μL的50mM的甘氨酸/醋酸钠/HEPES缓冲液在96-MTP中首次与45μL的1.5%偶氮酪蛋白 (溶解于蒸馏H₂O中),并且然后添加10μL稀释酶 (1mg/ml于20mM的pH 5醋酸钠缓冲液或只添加稀释缓冲液作为空白对照)。反应的进行和分析如实例3所述。各pH值下的酶活性报告为相对活性,其中最佳pH值下的酶活性为100%。测试的pH值为2、2.5、3、3.5、4、5、6和7。每个值为三次重复测定的平均值。如图3所示,RcyPro2的最佳pH为3,在pH 2.5和3.5之间,其最大活性保持在70%以上;RcoPro2的最佳pH为3.5,在pH 2.5和4之间,其最大活性保持在70%以上;GcyPro1的最佳pH为3,在pH 2.5和4之间,其最大活性保持在70%以上。

[0380] 实例5

[0381] 经纯化的天冬氨酸蛋白酶的温度曲线

[0382] 使用偶氮酪蛋白作为底物,在50mM醋酸钠缓冲液pH 3中测定经纯化的天冬氨酸蛋白酶(RcyPro2、RcoPro2和GcyPro1)的温度曲线。反应前,将90μL的0.75%偶氮酪蛋白溶解在50mM pH值3.0醋酸钠缓冲液中,并添加于200μL PCR管,随后在热循环仪中在所需的温度(即30°C至80°C)下孵育5分钟。孵化后,10μL稀释酶(1mg/ml,于20mM醋酸钠pH5缓冲液中)或只添加稀释缓冲液作为空白对照至底物以启动反应。在不同温度的热循环器中孵育10分钟后,对反应进行淬灭和分析,如实例3所示。报告的活性为相对活性,其中最佳温度下的活性被设为100%。测试的温度为30°C、40°C、50°C、55°C、60°C、65°C、70°C、75°C、和80°C。每个值为三次重复测定的平均值。如图4所示,RcyPro2的最佳温度为50°C,在温度为40°C和60°C之间,其最大活性保持在70%以上;RcoPro2的最佳温度为65°C,在温度为40°C和70°C之间,其最大活性保持在70%以上;GcyPro1的最佳温度为60°C,在温度为30°C和65°C之间,其最大活性保持在70%以上。

[0383] 实例6

[0384] 经纯化的天冬氨酸蛋白酶的热稳定性

[0385] 使用50mM醋酸钠pH 3.0缓冲液为孵育缓冲液进行经纯化的天冬氨酸蛋白酶(RcyPro2、RcoPro2和GcyPro1)的热稳定性分析以及偶氮酪蛋白底物进行活性测定。将经纯化的天冬氨酸蛋白酶样品在0.2mL孵育缓冲液中稀释至最终浓度为1.0mg/mL,然后分别在60°C下孵育0、5、10或30分钟。每个孵育时期结束时,将50μL等分的酶缓冲液混合物转移到96-MTP,并置于冰中。每个样品的剩余活性在pH 3.0测定。为了开始反应,将90μL 0.75%偶氮酪蛋白底物与10μL各蛋白酶孵育溶液于96-MTP中混合。在40°C和600rpm的恒温混合器中孵育10分钟后,反应被淬灭,如实例3所述;并且酶活性测定如实例3所示。活性报告为残余活性百分比,其中在0min的孵育时间的活性设置为100%。结果如表3所示。

[0386] 表3.经纯化的天冬氨酸蛋白酶的热稳定性

	酶名称	残余活性 (%)		
		5 min	10 min	30 min
[0387]	RcyPro2	80	71	45
	RcoPro2	96	94	88
	GcyPro1	93	86	73

[0388] 实例7

[0389] 经纯化的天冬氨酸蛋白酶的大豆玉米粉水解分析

[0390] 使用如下描述的OPA(邻苯二甲酸酯)或BCA(二喹啉甲酸)测定评价经纯化的天冬氨酸蛋白酶样品(RcyPro2、RcoPro2和GcyPro1)的大豆玉米粉水解程度,以测量酶反应后分别后释放到上清液的新产生的N-末端胺基团或可溶性肽的量。为进行测定,将140μL的大豆玉米底物(10%w/w 50mM醋酸钠pH 3缓冲液)与20μL的稀释酶样品(2mg/mL)混合于96-MTP。在培养箱中在40°C孵育2小时后,将板在3700rpm在4°C离心15分钟。将得到的上清液在水中稀释10倍,使用OPA和BCA测定进行后续反应产物检测。RONOZYME®ProAct蛋白酶样品作为商业基准蛋白酶。水作为空白对照(无酶)。

[0391] OPA检测:通过混合30mL的2%磷酸三缓冲液(pH 11)、800μL的4%OPA(目录号P1378,西格玛,溶解于96%乙醇中)、1mL的3.52%二硫苏糖醇(目录号D0632,西格玛)和8.2mL的H₂O来制备OPA试剂。反应由添加10μL 10倍稀释蛋白酶反应物至96-MTP中的175μ

LOPA试剂开始(目录号3635,康宁生命科学)。孵育2分钟后,用分光光度计在340nm(A₃₄₀)处测定所得溶液的吸光度。通过从每个蛋白酶反应的A₃₄₀减去空白(无酶)对照的A₃₄₀来计算净A₃₄₀(图5),以测量每个蛋白酶样品对大豆玉米粉的水解程度。

[0392] BCA检测:BCA显色反应与多肽中至少3个残基的肽键数成正比。更确切地说,BCA反应是由混合10μL 10倍稀释的蛋白酶与200μL BCA试剂进行的。将混合物在恒温混合器中在37°C孵育30分钟。然后使用分光光度计在562nm(A₅₆₂)处测量吸光度。通过从每个蛋白酶反应的A₅₆₂减去空白对照(无酶)的A₅₆₂来计算净A₅₆₂(图6),以确定每个蛋白酶样品对大豆玉米粉的水解程度。

[0393] 如图5和图6所示,纯化后的RcyPro2、RcoPro2和GcyPro1蛋白酶可以有效水解的大豆玉米粉底物。在这些条件下,基准酶的活性的水平非常低。

[0394] 实例8

[0395] RcyPro2和GcyPro1的胃蛋白酶稳定性

[0396] 用高剂量胃蛋白酶(西格玛,目录号No.P7000)孵育后测定RcyPro2和GcyPro1两种酶的残余活性,评价其胃蛋白酶稳定性;并使用Ac-Ala-Ala-Lys-NO₂-Phe-Ala-Ala-酰胺(AAK-NO₂-FAA,购自英杰公司、赛默飞世尔科技公司)作为底物。反应前,将经纯化的酸性蛋白酶(0.05mg/mL,最终浓度)在50mM醋酸钠缓冲液(pH 3.0)中孵育,含有或不含有25mg/mL(最终浓度)胃蛋白酶。在37°C下孵育30分钟后,将所得溶液用水稀释10倍进行下游活性测定。空白对照采用存在或不存在25mg/mL胃蛋白酶的醋酸钠缓冲液。为了保持那些酸性蛋白酶的残余活性测量,首先将10μL的10mM AAK-NO₂-FAA(溶解在H₂O中)与80μL的50mM醋酸钠缓冲液(pH 3.0)混合于96-MTP(目录号3635,康宁生命科学),然后添加10μL上述稀释的溶液。反应在40°C下进行30min,在296nm(A₂₉₆)处用分光光度计测定其吸光度。通过从相应空白对照的A₂₉₆中减去酶的A₂₉₆来计算净A₂₉₆,以代表酶活性。

[0397] 将RONOZYME® ProAct用作基准,并且使用Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA(suc-AAPF-pNA;目录号L-1400,BACHEM)作为底物评估其胃蛋白酶稳定性。所有酶样品用水稀释100倍,用于下游活性测定。为了开始反应,将10μL的稀释溶液与5μL的10mM suc-AAPF-pNA和85μL的50mM HEPES缓冲液(pH 8.0)混合于96-MTP。在恒温混合器中在40°C和600rpm孵育10分钟后,并使用分光光度计测定反应溶液在410nm(A₄₁₀)下的吸光度。通过从相应空白对照的A₄₁₀中减去酶的A₄₁₀来计算净A₄₁₀,以代表基准活性。

[0398] 所有活性均为报告为残余活性,其中未经胃蛋白酶处理的酶活性为100%。从图7的数据可以看出,在外源性胃蛋白酶存在的情况下,两种测试真菌酸性蛋白酶(RcyPro2和GcyPro1)都是稳定的。

[0399] 实例9

[0400] 经纯化的天冬氨酸蛋白酶的雾度降低性能

[0401] 使用麦胶蛋白-儿茶素测定(Michel Lopez和Luppo Edens (2005),J.Agric.Food Chem.[农业与食品化学杂志],53,7944-7949)评价经纯化的真菌天冬氨酸蛋白酶(RcyPro2、RcoPro2和GcyPro1)的雾度降低性能。Brewer Clarex®蛋白酶应用作为基准。反应前,用20mM醋酸钠(pH 5)将酶稀释到指定浓度。小麦麦胶蛋白(目录号G3375,西格玛)和儿茶素(目录号C1251,西格玛)分别溶解在20mM醋酸盐/磷酸盐缓冲液中pH 4.5,添加0.2%乙醇,至最终浓度分别为1.6mg/mL和2mg/mL。100μL的醇溶蛋白溶液与5μL的稀释酶样品混

合于96-MTP以启动测定；在培养箱中在45℃下孵育90分钟后，将96-MTP置于冰中5分钟，随后添加100μL儿茶素溶液。在室温下形成雾30分钟。在分光光度计上在600nm (A₆₀₀) 处测量了发展的雾度的吸光度，然后绘制了不同酶浓度(从1.25ppm到80ppm)下的结果。这些雾度减少的剂量反应曲线如图8所示。这些结果表明，RcyPro2、RcoPro2和GcyPro1真菌性天冬氨酸蛋白酶能有效减少雾度。

[0402] 实例10

[0403] RcyPro2、RcoPro2和GcyPro1与其他真菌天冬氨酸蛋白酶的序列比较

[0404] A. 同源蛋白酶的鉴定

[0405] 通过BLASTP搜索(Altschul等人, Nucleic Acids Res [核酸研究], 25:3389-402, 1997) 针对NCBI非冗余蛋白质数据库(NCBI non-redundant protein database) 和基因组查询专利数据库(Genome Quest Patent database) (搜索参数设置为默认值) 鉴定蛋白质同源物。将RcyPro2 (SEQ ID N0:2)、RcoPro2 (SEQ ID N0:4) 或GcyPro1 (SEQ ID N0:6) 的全长蛋白质氨基酸序列用作查询序列。将两个搜索集的百分比同一性(PID) 定义为相同残基的数量除以成对比对中经比对残基的数量。表4、表5和表6提供了从NCBI非冗余蛋白质数据库中识别出的序列列表，其与RcyPro2、RcoPro2和GcyPro1的百分比同一性分别超过60%。表7提供了从基因组查询专利(Genome Quest Patent) 数据库中识别出的序列列表，其与RcyPro2、RcoPro2和GcyPro1的百分比同一性分别超过60%。

[0406]

表 4. 从 NCBI 非冗余蛋白质数据库中鉴定的 RcyPro2 同源物列表

登录号	查询的百分比同一性 (PID)	生物体	目标序列的氨基酸长度
gb KKK27362.1	71%	<i>Aspergillus rambellii</i>	390
ref XP_013330359.1	70%	埃默森蓝状菌 (<i>Rasamsonia emersonii</i>) CBS 393.64	397
ref XP_002567415.1	70%	鲁本斯青霉威斯康星 54-1255	396
emb CDM30996.1	67%	娄地青霉 FM164	396
gb AAB35849.1	68%	米曲霉, M-9	390
dbj GAA90749.1	65%	川地曲霉 IFO 4308	394
dbj GAQ42734.1	65%	黑曲霉	394
emb CRL26143.1	67%	沙门柏干酪青霉 (<i>Penicillium camemberti</i>)	396
gb KGO67622.1	67%	意大利青霉 (<i>Penicillium italicum</i>)	396
gb EHA27889.1	65%	黑曲霉 ATCC 1015	394
dbj BAA08123.1	65%	黑曲霉	394
ref XP_001401093.1	64%	黑曲霉 CBS 513.88	394
dbj BAA08640.1	64%	黑曲霉	394
dbj BAC97797.1	63%	紫红曲霉 (<i>Monascus purpureus</i>)	396
emb CEJ57934.1	65%	巴西青霉 (<i>Penicillium brasiliense</i>)	391
dbj GAO82919.1	64%	乌达加瓦新萨托菌 (<i>Neosartorya udagawae</i>)	395
gb AAA78947.1	64%	泡盛曲霉	394

[0407]

dbj GAQ09821.1	65%	仑图卢斯曲霉 (<i>Aspergillus lentulus</i>)	395
emb CRG86996.1	66%	岛蓝状菌 (<i>Talaromyces islandicus</i>)	390
gb KGO40965.1	68%	扩展青霉	396
gb KOS47505.1	67%	<i>Penicillium nordicum</i>	396
ref XP_753324.1	63%	烟曲霉 Af293	395
ref XP_001259355.1	63%	费希新萨托菌 NRRL 181	395
gb KJJ28210.1	68%	离生青霉	396
gb EPS32384.1	64%	草酸青霉 114-2	395
emb CEJ58766.1	64%	巴西青霉 (<i>Penicillium brasiliانum</i>)	394
emb CAA59972.1	64%	娄地青霉	397
ref XP_001274608.1	63%	棒曲霉 NRRL 1	394
gb AAB63942.1	62%	微紫青霉	394
dbj GAD93189.1	64%	<i>Byssochlamys spectabilis</i> No. 5	398
gb AAG34660.1	62%	微紫青霉	394
ref XP_014532363.1	66%	指状青霉 Pd1	396
gb KKK19892.1	61%	赭黄褐曲霉 (<i>Aspergillus ochraceoroseus</i>)	396
gb EPS32966.1	63%	草酸青霉 114-2	390
ref XP_002483414.1	66%	柄蓝状菌 ATCC 10500	387
gb KUL83076.1	67%	疣状蓝状菌 (<i>Talaromyces verruculosus</i>)	390
emb CRG92082.1	61%	岛蓝状菌 (<i>Talaromyces islandicus</i>)	393
dbj GAM38640.1	66%	解纤维蓝状菌 (<i>Talaromyces cellulolyticus</i>)	390
gb AAB07619.1	60%	烟曲霉	393
emb CRG91238.1	63%	岛蓝状菌 (<i>Talaromyces islandicus</i>)	681
gb KIW03891.1	60%	<i>Verruconis gallopava</i>	422

[0408]

ref XP_007922458.1	61%	斐济假尾孢菌 (<i>Pseudocercospora fijiensis</i>) CIRAD86	354
--------------------	-----	---	-----

[0409]

表 5. 从 NCBI 非冗余蛋白质数据库中鉴定的 RcoPro2 同源物列表

登录号	查询的百分比同一性(PID)	生物体	目标序列的氨基酸长度
ref XP_013330359.1	94%	埃默森蓝状菌 (<i>Rasamsonia emersonii</i>) CBS 393.64	397
gb KKK15635.1	66%	赭黄褐曲霉	390
dbj GAO82919.1	65%	乌达加瓦新萨托菌 (<i>Neosartorya udagawae</i>)	395
dbj GAQ09821.1	65%	仑图卢斯曲霉	395
ref XP_753324.1	64%	烟曲霉 Af293	395
ref XP_001259355.1	64%	费希新萨托菌 NRRL 181	395
ref XP_002567415.1	66%	鲁本斯青霉威斯康星 54-1255	396
emb CDM30996.1	64%	娄地青霉 FM164	396
gb EPS32384.1	66%	草酸青霉 114-2	395
emb CEJ57934.1	64%	巴西青霉 (<i>Penicillium brasiliense</i>)	391
dbj BAA02994.1	60%	米曲霉	404
gb KJK68602.1	60%	寄生曲霉 (<i>Aspergillus parasiticus</i>) SU-1	404
ref XP_001824175.1	60%	米曲霉 RIB40	404
dbj BAC97797.1	63%	紫红曲霉 (<i>Monascus purpureus</i>)	396
dbj GAA90749.1	64%	川地曲霉 IFO 4308	394
gb EHA27889.1	64%	黑曲霉 ATCC 1015	394
dbj BAA08123.1	64%	黑曲霉	394
gb AAG34660.1	61%	微紫青霉	394
ref XP_001401093.1	64%	黑曲霉 CBS 513.88	394

[0410]

dbj GAQ42734.1	63%	黑曲霉	394
dbj GAD93189.1	64%	<i>Byssochlamys spectabilis</i> No. 5	398
emb CEJ58766.1	63%	巴西青霉 (<i>Penicillium brasiliandum</i>)	394
gb AAB63942.1	66%	微紫青霉	394
gb AAA78947.1	63%	泡盛曲霉	394
gb AAB35849.1	65%	米曲霉, M-9	390
gb KGO67622.1	64%	意大利青霉 (<i>Penicillium italicum</i>)	396
dbj BAA08640.1	63%	黑曲霉	394
gb EPS32966.1	65%	草酸青霉 114-2	390
ref XP_001274608.1	63%	棒曲霉 NRRL 1	394
emb CRL26143.1	63%	沙门柏干酪青霉 (<i>Penicillium camemberti</i>)	396
emb CRG86996.1	65%	島藍狀菌 (<i>Talaromyces islandicus</i>)	390
gb KGO40965.1	62%	扩展青霉	396
gb KOS47505.1	63%	<i>Penicillium nordicum</i>	396
gb KJJ28210.1	64%	离生青霉	396
gb KNG87336.1	60%	<i>Aspergillus nomius</i> NRRL 13137	418
emb CRG92082.1	62%	島藍狀菌 (<i>Talaromyces islandicus</i>)	393
emb CAA59972.1	62%	萎地青霉	397
ref XP_014532363.1	60%	指状青霉 Pd1	396
ref XP_002483414.1	66%	柄藍狀菌 ATCC 10500	387
emb CRG91238.1	62%	島藍狀菌 (<i>Talaromyces islandicus</i>)	681
gb AAB07619.1	62%	烟曲霉	393
gb KUL83076.1	65%	疣狀藍狀菌 (<i>Talaromyces verruculosus</i>)	390
gb KIW03891.1	61%	<i>Verruconis gallopava</i>	422
dbj GAM38640.1	64%	解纤维藍狀菌 (<i>Talaromyces</i>)	390

[0411]

		<i>cellulolyticus</i>)	
gb EME47325.1	64%	<i>Dothistroma septosporum</i> NZE10	397
gb EMF15316.1	61%	<i>Sphaerulina musiva</i> SO2202	353
gb EME85439.1	64%	斐济假尾孢菌 (<i>Pseudocercospora</i> <i>fijiensis</i>) CIRAD86	354
dbj GAM83863.1	61%	真菌物种 No.11243	325

[0412]

表 6. 从 NCBI 非冗余蛋白质数据库中鉴定的 GcyPro1 同源物列表

登录号	查询的百分比同一性(PID)	生物体	目标序列的氨基酸长度
gb KKK15635.1	71%	赭黄褐曲霉	390
ref XP_013330359.1	71%	埃默森蓝状菌 (<i>Rasamsonia</i> <i>emersonii</i>) CBS 393.64	397
emb CDM30996.1	67%	娄地青霉 FM164	396
dbj GAO82919.1	66%	乌达加瓦新萨托菌 (<i>Neosartorya</i> <i>udagawae</i>)	395
ref XP_002567415.1	69%	鲁本斯青霉威斯康星 54-1255	396
dbj GAQ09821.1	65%	仑图卢斯曲霉	395
emb CEJ57934.1	66%	巴西青霉 (<i>Penicillium</i> <i>brasiliense</i>)	391
gb KGO67622.1	68%	意大利青霉 (<i>Penicillium</i> <i>italicum</i>)	396
ref XP_753324.1	64%	烟曲霉 Af293	395
gb EHA27889.1	64%	黑曲霉 ATCC 1015	394
dbj BAA08123.1	64%	黑曲霉	394
dbj GAQ42734.1	64%	黑曲霉	394
emb CEJ58766.1	65%	巴西青霉 (<i>Penicillium</i> <i>brasiliense</i>)	394

[0413]

ref XP_001401093.1	64%	黑曲霉 CBS 513.88	394
gb EPS32384.1	68%	草酸青霉 114-2	395
ref XP_001259355.1	64%	费希新萨托菌 NRRL 181	395
dbj GAA90749.1	64%	川地曲霉 IFO 4308	394
gb AAB63942.1	65%	微紫青霉	394
gb AAB35849.1	68%	米曲霉, M-9	390
emb CRL26143.1	66%	沙门柏干酪青霉 (<i>Penicillium camemberti</i>)	396
dbj BAA08640.1	64%	黑曲霉	394
gb AAA78947.1	64%	泡盛曲霉	394
ref XP_001824175.1	61%	米曲霉 RIB40	404
gb KJK68602.1	61%	寄生曲霉 SU-1	404
gb KKK19892.1	62%	赭黄褐曲霉	396
dbj BAA02994.1	61%	米曲霉	404
dbj BAC97797.1	63%	紫红曲霉 (<i>Monascus purpureus</i>)	396
gb EPS32966.1	63%	草酸青霉 114-2	390
gb KGO40965.1	68%	扩展青霉	gb EPS32384.1
gb KOS47505.1	66%	<i>Penicillium nordicum</i>	396
emb CRG86996.1	67%	岛蓝状菌 (<i>Talaromyces islandicus</i>)	390
gb KJJ28210.1	67%	离生青霉	396
ref XP_002483414.1	70%	柄蓝状菌 ATCC 10500	387
dbj GAD93189.1	65%	<i>Byssochlamys spectabilis</i> No. 5	398
emb CAA59972.1	64%	萎地青霉	397
gb AAG34660.1	61%	微紫青霉	394
ref XP_001274608.1	63%	棒曲霉 NRRL 1	394
gb KNG87336.1	61%	<i>Aspergillus nomius</i> NRRL 13137	418
ref XP_664492.1	60%	构巢曲霉 FGSC A4	386
emb CEL03520.1	60%	<i>Aspergillus calidoustus</i>	386
ref XP_014532363.1	66%	指状青霉 Pd1	396
emb CRG92082.1	63%	岛蓝状菌 (<i>Talaromyces</i>)	393

[0414]

		<i>islandicus</i>)	
ref XP_003176622.1	61%	石膏样小孢子菌 CBS 118893	403
gb KUL83076.1	67%	疣状篮状菌 (<i>Talaromyces verruculosus</i>)	390
gb AAB07619.1	61%	烟曲霉	393
dbj GAM38640.1	66%	解纤维篮状菌 (<i>Talaromyces cellulolyticus</i>)	390
emb CRG91238.1	63%	岛篮状菌 (<i>Talaromyces islandicus</i>)	681
gb KIW03891.1	62%	<i>Verruconis gallopava</i>	422
emb CEJ60851.1	60%	巴西青霉 (<i>Penicillium brasiliatum</i>)	396
ref XP_007922458.1	64%	斐济假尾孢菌 (<i>Pseudocercospora fijiensis</i>) CIRAD86	354
ref XP_007744834.1	61%	<i>Cladophialophora psammophila</i> CBS 110553	399
gb EMF15316.1	63%	<i>Sphaerulina musiva</i> SO2202	353
gb KIW94714.1	61%	斑替枝孢霉 (<i>Cladophialophora bantiana</i>) CBS 173.52	399
gb EME47325.1	64%	<i>Dothistroma septosporum</i> NZE10	397
dbj GAM91036.1	60%	真菌物种 No.11243	328

[0415]

表 7. 基因组查询专利 (Genome Quest Patent) 数据库中鉴定的 RcyPro2 同源物列表

登录号	查询的百分比 同一性 (PID)	生物体	目标序列的氨基酸长度
WO2014138983-1470	75.19%	丝衣霉状拟青霉	396

[0416]

		(<i>Paecilomyces byssochlamydoides</i>)	
US20150197760-0009	72.12%	埃默森蓝状菌 (<i>Rasamsonia emersonii</i>)	397
US20140370546-0492	71.61%	产黄青霉	396
US8815571-0007	69.57%	米曲霉	390
WO2014202616-31569	68.54%	埃默森蓝状菌 (<i>Rasamsonia emersonii</i>)	377
WO2015048332-25808	67.77%	柄蓝状菌	387
US8815571-0001	66.75%	佐氏曲霉 (<i>Aspergillus saitoi</i>)	394
WO2015004241-0493	66.50%	黑曲霉	394
US8815571-0003	66.50%	黑曲霉	394
US20150307562-0687	66.24%	黑曲霉	394
US20150307562-0686	66.24%	黑曲霉	394
US20150307562-0681	65.73%	黑曲霉	394
US8288517-0007	65.47%	人工序列	394
US20150307562-0682	65.47%	棒曲霉	394
US20150307562-0683	65.47%	富密新萨托菌 (<i>Neosartorya fumigata</i>)	395
US20150307562-0691	65.47%	费氏新萨托菌	395
US20150307562-20828	65.47%	娄地青霉	397

[0417]

表 8.基因组查询专利 (Genome Quest Patent) 数据库中鉴定的 RcoPro2 同源物列表

登录号	查询的百分比同一性 (PID)	生物体	目标序列的氨基酸长度
US20150197760-0009	94.19%	埃默森蓝状菌 (<i>Rasamsonia emersonii</i>)	397
WO2014202616-31569	89.14%	埃默森蓝状菌 (<i>Rasamsonia emersonii</i>)	377
WO2014138983-1470	80.3%	丝衣霉状拟青霉 (<i>Paecilomyces byssochlamydoides</i>)	396

[0418]

WO2015048332-25808	66.92%	柄蓝状菌	387
US8815571-0007	66.67%	米曲霉	390
US20140370546-0492	65.66%	产黄青霉	396

[0419]

表 9.基因组查询专利 (Genome Quest Patent) 数据库中鉴定的 GcyPro2 同源物列表

登录号	查询的百分比 同一性 (PID)	生物体	目标序列的氨基酸长度
WO2014138983-1470	77.69%	丝衣霉状拟青霉 (<i>Paecilomyces byssochlamyoides</i>)	396
US20150197760-0009	74.1%	埃默森蓝状菌 (<i>Rasamsonia emersonii</i>)	397
US20140370546-0492	69.23%	产黄青霉	396
US8815571-0007	70.51%	米曲霉	390
WO2014202616-31569	70.77%	埃默森蓝状菌 (<i>Rasamsonia emersonii</i>)	377
WO2015048332-25808	71.03%	柄篮状菌	387
US8815571-0001	67.44%	佐氏曲霉	394
WO2015004241-0493	67.69%	黑曲霉	394
US8815571-0003	67.69%	黑曲霉	394
US20150307562-0687	66.92%	黑曲霉	394
US20150307562-0686	67.44%	黑曲霉	394
US20150307562-0681	67.18%	黑曲霉	394
US8288517-0007	66.92%	人工序列	394
US20150307562-0683	66.15%	富密新萨托菌 (<i>Neosartorya fumigata</i>)	395
US20150307562-0691	66.15%	费氏新萨托菌	395
US20150307562-20828	67.18%	娄地青霉	397
US8815571-0008	67.18%	微紫青霉	394
US8815571-0009	65.12%	紫红曲霉 (<i>Monascus purpureus</i>)	395

[0420] B. 多种蛋白质序列比对

[0421] RcyPro2 (SEQ ID NO:7)、RcoPro2 (SEQ ID NO:8)、GcyPro1 (SEQ ID NO:9) 的预测的成熟形式的氨基酸序列与如下多种蛋白酶的预测的成熟形式的氨基酸序列的比对:XP_753324.1 (SEQ ID NO:10)、GAA90749.1 (SEQ ID NO:11)、GAQ09821.1 (SEQ ID NO:12)、KKK15635.1 (SEQ ID NO:13)、US8815571-0007 (SEQ ID NO:14)、US8815571-0001 (SEQ ID

NO:15)、GA082919.1 (SEQ ID NO:16)、W02014138983-1470 (SEQ ID NO:17)、CRL26143.1 (SEQ ID NO:18)、CDM30996.1 (SEQ ID NO:19)、XP_002567415.1 (SEQ ID NO:20)、US20150197760-0009 (SEQ ID NO:21)、和GAM38640.1 (SEQ ID NO:22)，列于表10中，如图9所示。使用CLUSTALW软件(Thompson等人, Nucleic Acids Research [核酸研究] 22:4673-4680, 1994)用默认参数对这些序列进行比对。

[0422]

表 10. 通过 NCBI 和基因组查询 (Genome Quest) 数据库检索鉴定出的各种真菌天冬氨酸蛋白酶，并用于与 RcyPro2、RcoPro2 和 GcyPro1 进行序列比较

登录号	生物体	SEQ ID NO
ref XP_753324.1	烟曲霉 Af293	10
dbj GAA90749.1	川地曲霉 IFO 4308	11
dbj GAQ09821.1	仓图卢斯曲霉	12
gb KKK15635.1	猪黄褐曲霉	13
US8815571-0007	米曲霉	14
US8815571-0001	佐氏曲霉	15
dbj GAO82919.1	乌达加瓦新萨托菌 (<i>Neosartorya udagawae</i>)	16
WO2014138983-1470	丝衣霉状拟青霉 (<i>Paecilomyces byssochlamydoides</i>)	17
emb CRL26143.1	沙门柏干酪青霉 (<i>Penicillium camemberti</i>)	18
emb CDM30996.1	娄地青霉 FM164	19

[0423]

ref XP_002567415.1	鲁本斯青霉威斯康星 54-1255	20
US20150197760-0009	埃默森蓝状菌 (<i>Rasamonia emersonii</i>)	21
dbj GAM38640.1	解纤维蓝状菌 (<i>Talaromyces cellulolyticus</i>)	22

[0424] C. 系统发育树

[0425] 使用RcyPro2 (SEQ ID NO:7)、RcoPro2 (SEQ ID NO:8)、GcyPro1 (SEQ ID NO:9) 的预测的成熟形式的氨基酸序列和如下多种蛋白酶的预测的成熟形式的氨基酸序列构建图10中所示的系统发育树:XP_753324.1 (SEQ ID NO:10)、GAA90749.1 (SEQ ID NO:11)、GAQ09821.1 (SEQ ID NO:12)、KKK15635.1 (SEQ ID NO:13)、US8815571-0007 (SEQ ID NO:14)、US8815571-0001 (SEQ ID NO:15)、GA082919.1 (SEQ ID NO:16)、W02014138983-1470 (SEQ ID NO:17)、CRL26143.1 (SEQ ID NO:18)、CDM30996.1 (SEQ ID NO:19)、XP_

002567415.1 (SEQ ID NO:20) 、US20150197760-0009 (SEQ ID NO:21) 、和GAM38640.1 (SEQ ID NO:22) ,如图9所示。

[0426] 使用程序MEGA 5 (Koichiro Tamura等人, (2011) Mol Biol Evol. [分子生物学与进化]28 (10) :2731-2739) 构建系统发育树,其应用邻接法 (NJ) (Saitou, N.; 和Nei, M. (1987) . The neighbor-joining (NJ) method:a new method for reconstructing Guide Trees. [邻接 (NJ) 法:构建引导树的新方法]Mol. Biol. Evol. [分子生物学与进化]4, 406-425) 。NJ方法对在待分析的所有序列对之间的距离矩阵产生影响。这些距离与序列之间的散度有关。

序列表

<110>	丹尼斯科美国公司	
<120>	天冬氨酸蛋白酶	
<130>	NB40988PCT	
<160>	22	
<170>	PatentIn 版本 3.5	
<210>	1	
<211>	1349	
<212>	DNA	
<213>	柱孢篮状菌 (Rasamsonia cylindrospora)	
<400>	1	
[0001]		
	atgggcgtct ccaaagcggt cgtgactgct ctctctctgt gctggcctt cgctgccccc	60
	gcccggctc cggcgggac ctctcgctc caccagggtgc cggctccgcg gaccaaggccg	120
	cggcccaatc cggcctccca gtatgcgcgc gcgcgtggca agttccatgc ccccggtggc	180
	gccaatgtcg cggcggccgc cgtcagtgcc accgcgacca acacgcccac ctccggcgc	240
	gaggagtaca tcacggcggt gacggccggc aagagcacgc tgaacctgga ctggacacc	300
	ggatggcggt atctgtaaat acggagacag ctggaccagg gaatgccttg ctgacaccct	360
	ccaggtgggt ctctcgctc cagacgcccac cgtcggaggc cgaggccac tccacactacg	420
	tgccccagctc gtcggccacg aagatgcgcgc gctacagctg gacatctcg tacgggatg	480
	gcagttcggc cagtggcgt gcttaccagg ataccgtac ggtcggcggc gtgacggcct	540
	ccaaaggcaggc cgtggaggcc gccggagaagg tcagctccga gttcacccag gacacggcca	600
	gcatggcct gctgggattg gcttccagca gcatcaacac cggtgagtcg ctttttttt	660
	ccatggcatac cccggaaacgg actccgtaac ggacttcgtg ctaacgggtg ggaatagtct	720
	cggcggaaacc gcaggcagacc ttcttcgaca acgtcaagtc gcagctggac aagccctgt	780
	tttgcgtgac gctgaagcac caggcgcccc gcacccatcg ctccgggtac atcgactcca	840
	gccgctacac gggcagcatac gcttccatcg acgtcgacaa ctgcaggaa ttctggagct	900
	tcacggcgga tgactacgac atccggcggtt gacccatcg acggggatttgc	960
	ctgggtacgtc cgcagaaaag gagaatatcc gtccgctcg taaccagaca gacacggca	1020
	ccacgctctt cctcctcgac gacgacgtcg tctccaaacta ctacagccgc gtggacggcg	1080
	cgcagaactc caactacgccc ggcggctacg tctccctgt tgacgcccac ctggcgcacgt	1140
	tctcgatcac catcgccagc caccaggccg tcgtggcggc cgagttcatac aatttcggcg	1200
	acgacggcac cggcgcacgc aactgttcg gccgcatcca gtcgaactcg ggcacatcgct	1260
	tttgcgtatcc cggcgcacgtc ttccctcaaga gccagttacgt ggttggac tcggaggac	1320
	ctcagctggg ctggccaaag caggcgtaa	1349
<210>	2	
<211>	391	
<212>	PRT	
<213>	柱孢篮状菌 (Rasamsonia cylindrospora)	
<400>	2	
	Met Gly Val Ser Lys Ala Val Val Thr Ala Leu Ser Leu Cys Ser Ala	
1	5	10
	15	
Phe Ala Ala Ala Ala Pro Ala Pro Pro Arg Thr Phe Ser Leu His Gln		
20	25	30
Val Pro Val Pro Arg Thr Lys Pro Arg Pro Asn Pro Ala Ser Gln Tyr		
35	40	45
Ala Arg Ala Leu Gly Lys Phe His Ala Pro Val Pro Ala Asn Val Ala		
50	55	60
Ala Ala Ala Val Ser Gly Thr Ala Thr Asn Thr Pro Thr Ser Gly Asp		
65	70	75
		80
Glu Glu Tyr Ile Thr Pro Val Thr Ala Gly Lys Ser Thr Leu Asn Leu		
85	90	95
Asp Phe Asp Thr Gly Ser Ala Asp Leu Trp Val Phe Ser Ser Gln Thr		
100	105	110
Pro Thr Ser Glu Ala Glu Gly His Ser Thr Tyr Val Pro Ser Ser Ser		
115	120	125
Ala Thr Lys Met Arg Gly Tyr Ser Trp Ser Ile Ser Tyr Gly Asp Gly		
130	135	140
Ser Ser Ala Ser Gly Asp Val Tyr Gln Asp Thr Val Thr Val Gly Gly		

145	150	155	160
Val Thr Ala Ser Lys Gln Ala Val Glu Ala Ala Glu Lys Val Ser Ser			
165	170	175	
Glu Phe Thr Gln Asp Thr Ala Ser Asp Gly Leu Leu Gly Leu Ala Phe			
180	185	190	
Ser Ser Ile Asn Thr Val Ser Pro Glu Pro Gln Gln Thr Phe Phe Asp			
195	200	205	
Asn Val Lys Ser Gln Leu Asp Lys Pro Leu Phe Ala Val Thr Leu Lys			
210	215	220	
His Gln Ala Pro Gly Thr Tyr Asp Phe Gly Tyr Ile Asp Ser Ser Arg			
225	230	235	240
Tyr Thr Gly Ser Ile Ala Tyr Thr Asp Val Asp Asn Ser Gln Gly Phe			
245	250	255	
Trp Ser Phe Thr Ala Asp Asp Tyr Ala Ile Gly Gly Glu Ser Ala Gly			
260	265	270	
Ser Ser Ile Thr Gly Ile Ala Asp Thr Gly Thr Thr Leu Leu Leu Leu			
275	280	285	
Asp Asp Asp Val Val Ser Asn Tyr Tyr Ser Gly Val Asp Gly Ala Gln			
290	295	300	
Asn Ser Asn Tyr Ala Gly Gly Tyr Val Phe Pro Cys Asp Ala Asp Leu			
305	310	315	320
Pro Thr Phe Ser Ile Thr Ile Gly Ser His Gln Ala Val Val Pro Ala			
325	330	335	
Glu Phe Ile Asn Phe Gly Asp Asp Gly Thr Gly Asp Gly Asn Cys Phe			
340	345	350	
Gly Gly Ile Gln Ser Asn Ser Gly Ile Gly Phe Ser Ile Phe Gly Asp			
355	360	365	
Val Phe Leu Lys Ser Gln Tyr Val Val Phe Asp Ser Glu Gly Pro Gln			
370	375	380	
[0002] Leu Gly Phe Ala Lys Gln Ala			
385	390		
<210> 3			
<211> 1294			
<212> DNA			
<213> 堆肥篮状菌 (Rasamsonia composticola)			
<400> 3			
atgggtctgt ccaaaggctt cgtgtctgca ctctcgctgt gctccggcgt cgccgtggcc	60		
gccccggcgc ctgctcccaa cgtgcagttc tctctgaagc aggtcgctgt gccccggagc	120		
aaggcctgtc tccctccagc tgccgagttc ggcgcgcgtc tagccaagta tggcgcggcc	180		
gtgccgtcg ctgtcgccgc cggccgcgtcc ggcacgcaga gccgcgtctgc gccaacacgc	240		
cccgctccgc gtgacagctt gtatctgacc cccgtcaccgc tcggccagag cacgtcaac	300		
ctcgactttg acacgggttc tgccgatctg taagtattgt actagatcac ctgaagacga	360		
acgagaactg acccgtccag ctgggtcttc tccgaggaga cgcgcgtccag cgagcgcggc	420		
aaccacgcca tctacaagcc cagctcccg gccaagaagc tgaacggcta cacctggagc	480		
atctcgatcg ggcacggcag ctccgcgcag ggtgatgtct accaggactc cgttccgtc	540		
ggcggcggtca acgcgtccag ccaggcggtc gagggccca ccaaggtcag ctctgagttc	600		
gagcaggacc cggcgacgg cctgctgggt ctggccttca gcagcatcaa caccgtccag	660		
cccaagccgc agaccaccc ttgcgacacgc gtcaagagct ccctgcacca gccgcgtttc	720		
gcccgtcaccc taaagcacca cgagccggc agctacgact ttggctacat cgacaacacc	780		
aagtacaagg gcagcatcca gtacaccccg gtcgacaact cgcagggttt ctggcagttc	840		
actgcggacg gctactcgat tggcgctcc agcggcaacg gccgcgtccat ttctggcatt	900		
gctggtaagg accccctaat ccaatagata aaagccccat atgctgatca ttccagacac	960		
cggcaccacc ctccctctgc tcgacgacca gatcgtcgag gactactacc agaacgtcga	1020		
cggcgcccg aacgaccaga ggcgggtgg ctacacccgc ccgtgcacgc cgcagctgcc	1080		
cggactgagc ttccacatcg gccagttacac cgccaaacgc cccggcggact acctcaactt	1140		
ccagccgctg tcccaggcga gccagacccgt cttcgccgc ctgcagtcacc accagggtat	1200		
tggcttcctcc atcttcggcg acgtcttcct caagagccag tatgtcgtct ttgactcgaa	1260		
tggccttcag ctgggtcttc ctgtcaggc tttag	1294		

<210> 4
 <211> 396
 <212> PRT
 <213> 堆肥籃狀菌 (Rasamsonia composticola)
 <400> 4
 Met Gly Leu Ser Lys Ala Phe Val Ser Ala Leu Ser Leu Cys Ser Ala
 1 5 10 15
 Val Ala Val Ala Ala Pro Ala Pro Asn Val Gln Phe Ser Leu
 20 25 30
 Lys Gln Val Ala Val Pro Arg Ser Lys Pro Arg Ala Pro Pro Ala Ala
 35 40 45
 Glu Tyr Ala Arg Ala Leu Ala Lys Tyr Gly Ala Pro Val Pro Ser Ser
 50 55 60
 Val Arg Thr Ala Ala Ser Gly Thr Gln Ser Gly Ser Ala Ala Asn Thr
 65 70 75 80
 Pro Val Ala Gly Asp Ser Leu Tyr Leu Thr Pro Val Thr Val Gly Gln
 85 90 95
 Ser Thr Leu Asn Leu Asp Phe Asp Thr Gly Ser Ala Asp Leu Trp Val
 100 105 110
 Phe Ser Glu Glu Thr Pro Ser Ser Glu Arg Gly Asn His Ala Ile Tyr
 115 120 125
 Lys Pro Ser Ser Ser Ala Lys Lys Leu Asn Gly Tyr Thr Trp Ser Ile
 130 135 140
 Ser Tyr Gly Asp Gly Ser Ser Ala Ser Gly Asp Val Tyr Gln Asp Ser
 145 150 155 160
 Val Ser Val Gly Gly Val Asn Ala Ser Ser Gln Ala Val Glu Ala Ala
 165 170 175
 Thr Lys Val Ser Ser Glu Phe Glu Gln Asp Pro Gly Asp Gly Leu Leu
 180 185 190
 Gly Leu Ala Phe Ser Ser Ile Asn Thr Val Gln Pro Lys Pro Gln Thr
 195 200 205
 Thr Phe Phe Asp Thr Val Lys Ser Ser Leu Ala Lys Pro Leu Phe Ala
 210 215 220
 Val Thr Leu Lys His Asn Glu Pro Gly Ser Tyr Asp Phe Gly Tyr Ile
 225 230 235 240
 Asp Asn Thr Lys Tyr Lys Gly Ser Ile Gln Tyr Thr Pro Val Asp Asn
 245 250 255
 Ser Gln Gly Phe Trp Gln Phe Thr Ala Asp Gly Tyr Ser Ile Gly Gly
 260 265 270
 Ser Ser Gly Asn Gly Gly Ser Ile Ser Gly Ile Ala Asp Thr Gly Thr
 275 280 285
 Thr Leu Leu Leu Asp Asp Gln Ile Val Glu Glu Tyr Tyr Gln Asn
 290 295 300
 Val Asp Gly Ala Gln Asn Asp Gln Ser Ala Gly Gly Tyr Thr Phe Pro
 305 310 315 320
 Cys Asp Ala Gln Leu Pro Glu Leu Ser Phe Thr Ile Gly Gln Tyr Thr
 325 330 335
 Ala Asn Val Pro Ala Glu Tyr Leu Asn Phe Gln Pro Leu Ser Gln Gly
 340 345 350
 Ser Gln Thr Cys Phe Gly Gly Leu Gln Ser Asn Gln Gly Ile Gly Phe
 355 360 365
 Ser Ile Phe Gly Asp Val Phe Leu Lys Ser Gln Tyr Val Val Phe Asp
 370 375 380
 Ser Asn Gly Pro Gln Leu Gly Phe Ala Ala Gln Ala
 385 390 395
 <210> 5
 <211> 1366
 <212> DNA

<213> Geosmithia cylindrospora
<400> 5
atgggtgtgt ccaaagctgt cgtgactgtg ctccctctgtc ccgttggc ggccgcagc
cctacttgcg cgcaaacctt ctgttcaac caggtggccg ttccccaaac gaaacctcg
gctctccgg ctgcccggta tgccgtgtc ctgcaactg acaaggccac cgtgcctgc
tccgttagccg ccgctggcg tggtaacacg gcaaccaaca cgccgacgcg agacgatgc
gagtagatca ctccagtgac gcccggcaag agcactctga acctggactt tgacacggg
tcggccgatc tgtaagcaca tatttaaaca cagctgtgaa agaggcttct tcgctgac
tagtatactt ggtgggtt ttcggacgg actccactt ccgaggccca gggccactt
acccatcgatc ccagctcgatc ggccaaagaag atgagtggtt acagctggag catctctt
ggcgacggca gctcgcccg cgccgacgtc taccaggaca ccgtcaccgt cggccggcg
acggccccc agcaggtgtt ggaggccggcc accaagggtca gctccaggat cactcaggat
acgaacaaacg atggctgtt aggattgggtt tttagcagca tcaacacagg tgagctgg
tccctttttt tttttttcc tttttctcg ttttatttgc ttatttcta atggatggta
tatagtctcg cctcaaccgc agaagaccc ttccgacaaac gtcaagtca agctcgacaa
gcccctattt gcggtcacgc tgaagcacca ggccccccggc acgtatgact ttggctaca
cgactccagg cggtacaagg ggcacattgc ctacactgtc gtgcacaact cgcagggt
ctggccttc acggccggatg actactcgat tggggctcc agtcaggccg gctccattaa
tggcattgtt ggtaggtcat ctgcagaga aacaaaaata aataaatcc ggctaatgg
ttatgcagac actggccacca cccctctctt cctggacgac aacgtcgatc acgcctactt
ctcccgaggatc aacagccgcg acgaggacaa cagcgtgtc ggctgggtat ttgactgc
cgacaatctg ccaacatttcc cgtcaccat cggcaactac gaggccgtcg tgccggccg
gttcatcaac ttggggccgg ccgacaacac cgggttccacc tgcttccggc ggatccagg
gaaccaggcc atcggttctt ctatcttgg ggacgttcc ctaagagcc agtacgtcg
gtttgacggcc agtggccctc agctgggttt tgctgctcag cggtga

〈210〉 6

〈211〉 390

<212> PRT

[0004] <213> Geosmithia cylindrospora
(400) 3

<400> 6

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

Gln Ala Pro Gly Thr Tyr Asp Phe Gly Tyr Ile Asp Ser Ser Arg Tyr
 225 230 235 240
 Lys Gly Asp Ile Ala Tyr Thr Ala Val Asp Asn Ser Gln Gly Phe Trp
 245 250 255
 Ser Phe Thr Ala Asp Asp Tyr Ser Ile Gly Gly Ser Ser Gln Gly Ser
 260 265 270
 Ser Ile Thr Gly Ile Ala Asp Thr Gly Thr Thr Leu Leu Leu Leu Asp
 275 280 285
 Asp Asn Val Val Asn Ala Tyr Tyr Ser Gln Val Asn Ser Ala Gln Gln
 290 295 300
 Asp Asn Ser Ala Gly Gly Trp Val Phe Asp Cys Ser Asp Asn Leu Pro
 305 310 315 320
 Thr Phe Ser Val Thr Ile Gly Asn Tyr Glu Ala Val Val Pro Ala Glu
 325 330 335
 Phe Ile Asn Phe Gly Pro Ala Asp Asn Thr Gly Ser Thr Cys Phe Gly
 340 345 350
 Gly Ile Gln Ser Asn Gln Gly Ile Gly Phe Ser Ile Phe Gly Asp Val
 355 360 365
 Phe Leu Lys Ser Gln Tyr Val Val Phe Asp Ala Ser Gly Pro Gln Leu
 370 375 380
 Gly Phe Ala Ala Gln Ala
 385 390
 <210> 7
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> 柱孢篮状菌 (Rasamsonia cylindrospora)
 <400> 7
 Ala Ala Ala Val Ser Gly Thr Ala Thr Asn Thr Pro Thr Ser Gly Asp
 1 5 10 15
 [0005] Glu Glu Tyr Ile Thr Pro Val Thr Ala Gly Lys Ser Thr Leu Asn Leu
 20 25 30
 Asp Phe Asp Thr Gly Ser Ala Asp Leu Trp Val Phe Ser Ser Gln Thr
 35 40 45
 Pro Thr Ser Glu Ala Glu Gly His Ser Thr Tyr Val Pro Ser Ser Ser
 50 55 60
 Ala Thr Lys Met Arg Gly Tyr Ser Trp Ser Ile Ser Tyr Gly Asp Gly
 65 70 75 80
 Ser Ser Ala Ser Gly Asp Val Tyr Gln Asp Thr Val Thr Val Gly Gly
 85 90 95
 Val Thr Ala Ser Lys Gln Ala Val Glu Ala Ala Glu Lys Val Ser Ser
 100 105 110
 Glu Phe Thr Gln Asp Thr Ala Ser Asp Gly Leu Leu Gly Leu Ala Phe
 115 120 125
 Ser Ser Ile Asn Thr Val Ser Pro Glu Pro Gln Gln Thr Phe Phe Asp
 130 135 140
 Asn Val Lys Ser Gln Leu Asp Lys Pro Leu Phe Ala Val Thr Leu Lys
 145 150 155 160
 His Gln Ala Pro Gly Thr Tyr Asp Phe Gly Tyr Ile Asp Ser Ser Arg
 165 170 175
 Tyr Thr Gly Ser Ile Ala Tyr Thr Asp Val Asp Asn Ser Gln Gly Phe
 180 185 190
 Trp Ser Phe Thr Ala Asp Asp Tyr Ala Ile Gly Gly Glu Ser Ala Gly
 195 200 205
 Ser Ser Ile Thr Gly Ile Ala Asp Thr Gly Thr Thr Leu Leu Leu Leu
 210 215 220
 Asp Asp Asp Val Val Ser Asn Tyr Tyr Ser Gly Val Asp Gly Ala Gln
 225 230 235 240
 Asn Ser Asn Tyr Ala Gly Gly Tyr Val Phe Pro Cys Asp Ala Asp Leu

	245	250	255
Pro Thr Phe Ser Ile Thr Ile Gly Ser His Gln Ala Val Val Pro Ala			
260	265	270	
Glu Phe Ile Asn Phe Gly Asp Asp Gly Thr Gly Asp Gly Asn Cys Phe			
275	280	285	
Gly Gly Ile Gln Ser Asn Ser Gly Ile Gly Phe Ser Ile Phe Gly Asp			
290	295	300	
Val Phe Leu Lys Ser Gln Tyr Val Val Phe Asp Ser Glu Gly Pro Gln			
305	310	315	320
Leu Gly Phe Ala Lys Gln Ala			
	325		
<210> 8			
<211> 329			
<212> PRT			
<213> 堆肥篮状菌 (Rasamsonia composticola)			
<400> 8			
Ala Ala Ser Gly Thr Gln Ser Gly Ser Ala Ala Asn Thr Pro Val Ala			
1 5 10 15			
Gly Asp Ser Leu Tyr Leu Thr Pro Val Thr Val Gly Gln Ser Thr Leu			
20 25 30			
Asn Leu Asp Phe Asp Thr Gly Ser Ala Asp Leu Trp Val Phe Ser Glu			
35 40 45			
Glu Thr Pro Ser Ser Glu Arg Gly Asn His Ala Ile Tyr Lys Pro Ser			
50 55 60			
Ser Ser Ala Lys Lys Leu Asn Gly Tyr Thr Trp Ser Ile Ser Tyr Gly			
65 70 75 80			
Asp Gly Ser Ser Ala Ser Gly Asp Val Tyr Gln Asp Ser Val Ser Val			
85 90 95			
Gly Gly Val Asn Ala Ser Ser Gln Ala Val Glu Ala Ala Thr Lys Val			
100 105 110			
Ser Ser Glu Phe Glu Gln Asp Pro Gly Asp Gly Leu Leu Gly Leu Ala			
115 120 125			
Phe Ser Ser Ile Asn Thr Val Gln Pro Lys Pro Gln Thr Thr Phe Phe			
130 135 140			
Asp Thr Val Lys Ser Ser Leu Ala Lys Pro Leu Phe Ala Val Thr Leu			
145 150 155 160			
Lys His Asn Glu Pro Gly Ser Tyr Asp Phe Gly Tyr Ile Asp Asn Thr			
165 170 175			
Lys Tyr Lys Gly Ser Ile Gln Tyr Thr Pro Val Asp Asn Ser Gln Gly			
180 185 190			
Phe Trp Gln Phe Thr Ala Asp Gly Tyr Ser Ile Gly Gly Ser Ser Gly			
195 200 205			
Asn Gly Gly Ser Ile Ser Gly Ile Ala Asp Thr Gly Thr Thr Leu Leu			
210 215 220			
Leu Leu Asp Asp Gln Ile Val Glu Glu Tyr Tyr Gln Asn Val Asp Gly			
225 230 235 240			
Ala Gln Asn Asp Gln Ser Ala Gly Gly Tyr Thr Phe Pro Cys Asp Ala			
245 250 255			
Gln Leu Pro Glu Leu Ser Phe Thr Ile Gly Gln Tyr Thr Ala Asn Val			
260 265 270			
Pro Ala Glu Tyr Leu Asn Phe Gln Pro Leu Ser Gln Gly Ser Gln Thr			
275 280 285			
Cys Phe Gly Gly Leu Gln Ser Asn Gln Gly Ile Gly Phe Ser Ile Phe			
290 295 300			
Gly Asp Val Phe Leu Lys Ser Gln Tyr Val Val Phe Asp Ser Asn Gly			
305 310 315 320			
Pro Gln Leu Gly Phe Ala Ala Gln Ala			
	325		

<210> 9
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Geosmithia cylindrospora
 <400> 9
 Ala Ala Ala Val Ser Gly Thr Ala Thr Asn Thr Pro Thr Gln Asp Asp
 1 5 10 15
 Glu Glu Tyr Ile Thr Pro Val Thr Ala Gly Lys Ser Thr Leu Asn Leu
 20 25 30
 Asp Phe Asp Thr Gly Ser Ala Asp Leu Trp Val Phe Ser Asp Glu Thr
 35 40 45
 Pro Thr Ser Glu Ala Gln Gly His Ser Thr Tyr Val Pro Ser Ser Ser
 50 55 60
 Ala Lys Lys Met Ser Gly Tyr Ser Trp Ser Ile Ser Tyr Gly Asp Gly
 65 70 75 80
 Ser Ser Ala Ser Gly Asp Val Tyr Gln Asp Thr Val Thr Val Gly Gly
 85 90 95
 Val Thr Ala Ser Gln Gln Ala Val Glu Ala Ala Thr Lys Val Ser Ser
 100 105 110
 Gln Phe Thr Gln Asp Thr Asn Asn Asp Gly Leu Leu Gly Leu Ala Phe
 115 120 125
 Ser Ser Ile Asn Thr Val Ser Pro Gln Pro Gln Lys Thr Phe Phe Asp
 130 135 140
 Asn Val Lys Ser Gln Leu Asp Lys Pro Leu Phe Ala Val Thr Leu Lys
 145 150 155 160
 His Gln Ala Pro Gly Thr Tyr Asp Phe Gly Tyr Ile Asp Ser Ser Arg
 165 170 175
 Tyr Lys Gly Asp Ile Ala Tyr Thr Ala Val Asp Asn Ser Gln Gly Phe
 180 185 190
 [0007] Trp Ser Phe Thr Ala Asp Asp Tyr Ser Ile Gly Gly Ser Ser Gln Gly
 195 200 205
 Ser Ser Ile Thr Gly Ile Ala Asp Thr Gly Thr Thr Leu Leu Leu
 210 215 220
 Asp Asp Asn Val Val Asn Ala Tyr Tyr Ser Gln Val Asn Ser Ala Gln
 225 230 235 240
 Gln Asp Asn Ser Ala Gly Gly Trp Val Phe Asp Cys Ser Asp Asn Leu
 245 250 255
 Pro Thr Phe Ser Val Thr Ile Gly Asn Tyr Glu Ala Val Val Pro Ala
 260 265 270
 Glu Phe Ile Asn Phe Gly Pro Ala Asp Asn Thr Gly Ser Thr Cys Phe
 275 280 285
 Gly Gly Ile Gln Ser Asn Gln Gly Ile Gly Phe Ser Ile Phe Gly Asp
 290 295 300
 Val Phe Leu Lys Ser Gln Tyr Val Val Phe Asp Ala Ser Gly Pro Gln
 305 310 315 320
 Leu Gly Phe Ala Ala Gln Ala
 325
 <210> 10
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> 烟曲霉
 <400> 10
 Ala Ala Ala Ser Ser Gly Ser Ala Val Thr Thr Pro Glu Gln Tyr Asp
 1 5 10 15
 Ser Glu Tyr Leu Thr Pro Val Lys Val Gly Gly Thr Thr Leu Asn Leu
 20 25 30
 Asp Phe Asp Thr Gly Ser Ala Asp Leu Trp Val Phe Ser Ser Glu Leu
 35 40 45

Ser Ala Ser Gln Ser Ser Gly His Ala Ile Tyr Lys Pro Ser Ala Asn
 50 55 60
 Ala Gln Lys Leu Asn Gly Tyr Thr Trp Lys Ile Gln Tyr Gly Asp Gly
 65 70 75 80
 Ser Ser Ala Ser Gly Asp Val Tyr Lys Asp Thr Val Thr Val Gly Gly
 85 90 95
 Val Thr Ala Gln Ser Gln Ala Val Glu Ala Ala Ser His Ile Ser Ser
 100 105 110
 Gln Phe Val Gln Asp Lys Asp Asn Asp Gly Leu Leu Gly Leu Ala Phe
 115 120 125
 Ser Ser Ile Asn Thr Val Ser Pro Arg Pro Gln Thr Thr Phe Phe Asp
 130 135 140
 Thr Val Lys Ser Gln Leu Asp Ser Pro Leu Phe Ala Val Thr Leu Lys
 145 150 155 160
 Tyr His Ala Pro Gly Thr Tyr Asp Phe Gly Tyr Ile Asp Asn Ser Lys
 165 170 175
 Phe Gln Gly Glu Leu Thr Tyr Thr Asp Val Asp Ser Ser Gln Gly Phe
 180 185 190
 Trp Met Phe Thr Ala Asp Gly Tyr Gly Val Gly Asn Ala Pro Asn
 195 200 205
 Ser Asn Ser Ile Ser Gly Ile Ala Asp Thr Gly Thr Thr Leu Leu Leu
 210 215 220
 Leu Asp Asp Ser Val Val Ala Asp Tyr Tyr Arg Gln Val Ser Gly Ala
 225 230 235 240
 Lys Asn Ser Asn Gln Tyr Gly Gly Tyr Val Phe Pro Cys Ser Thr Lys
 245 250 255
 Leu Pro Ser Phe Thr Thr Val Ile Gly Gly Tyr Asn Ala Val Val Pro
 260 265 270
 Gly Glu Tyr Ile Asn Tyr Ala Pro Val Thr Asp Gly Ser Ser Thr Cys
 275 280 285
 Tyr Gly Gly Ile Gln Ser Asn Ser Gly Leu Gly Phe Ser Ile Phe Gly
 290 295 300
 Asp Ile Phe Leu Lys Ser Gln Tyr Val Val Phe Asp Ser Gln Gly Pro
 305 310 315 320
 Arg Leu Gly Phe Ala Pro Gln Ala
 325
 <210> 11
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> 川地曲霉
 <400> 11
 Ala Ala Ser Lys Gly Ser Ala Val Thr Thr Pro Gln Asn Asn Asp Glu
 1 5 10 15
 Glu Tyr Leu Thr Pro Val Thr Val Gly Lys Ser Thr Leu His Leu Asp
 20 25 30
 Phe Asp Thr Gly Ser Ala Asp Leu Trp Val Phe Ser Asp Glu Leu Pro
 35 40 45
 Ser Ser Glu Arg Thr Gly His Asp Val Tyr Thr Pro Ser Ser Ser Ala
 50 55 60
 Thr Lys Leu Ser Gly Tyr Ser Trp Asp Ile Ser Tyr Gly Asp Gly Ser
 65 70 75 80
 Ser Ala Ser Gly Asp Val Tyr Arg Asp Thr Val Thr Val Gly Gly Val
 85 90 95
 Thr Thr Asn Lys Gln Ala Val Glu Ala Ala Ser Lys Ile Ser Ser Glu
 100 105 110
 Phe Val Gln Asp Thr Ala Asn Asp Gly Leu Leu Gly Leu Ala Phe Ser
 115 120 125
 Ser Ile Asn Thr Val Gln Pro Lys Ala Gln Thr Thr Phe Phe Asp Thr

130	135	140
Val Lys Ser Gln Leu Asp Ser Pro Leu Phe Ala Val Gln Leu Lys His		
145	150	155
Asp Ala Pro Gly Val Tyr Asp Phe Gly Tyr Ile Asp Asp Ser Lys Tyr		
165	170	175
Thr Gly Ser Ile Thr Tyr Thr Asp Ala Asp Ser Ser Gln Gly Tyr Trp		
180	185	190
Gly Phe Asn Pro Asp Gly Tyr Ser Ile Gly Asp Ser Ser Ser Ser Ser		
195	200	205
Ser Gly Phe Ser Ala Ile Ala Asp Thr Gly Thr Thr Leu Ile Leu Leu		
210	215	220
Asp Asp Glu Ile Val Ser Ala Tyr Tyr Glu Gln Val Asp Gly Ala Gln		
225	230	235
Glu Ser Asn Glu Ala Gly Gly Tyr Val Phe Ser Cys Ser Thr Thr Pro		
245	250	255
Pro Asp Phe Thr Val Ile Ile Gly Asp Tyr Lys Ala Val Val Pro Gly		
260	265	270
Lys Tyr Ile Asn Tyr Ala Pro Ile Ser Thr Gly Ser Ser Thr Cys Phe		
275	280	285
Gly Gly Ile Gln Ser Asn Ser Gly Leu Gly Leu Ser Ile Leu Gly Asp		
290	295	300
Val Phe Leu Lys Ser Gln Tyr Val Val Phe Asn Ser Glu Gly Pro Lys		
305	310	315
Leu Gly Phe Ala Ala Gln Ala		
325		
<210> 12		
<211> 328		
<212> PRT		
[0009] <213> 企图卢斯曲霉 (Aspergillus lentulus)		
<400> 12		
Ala Ala Ala Ser Ser Gly Ser Ala Val Thr Thr Pro Glu Gln Tyr Asp		
1 5 10 15		
Ser Glu Tyr Leu Thr Pro Val Lys Val Gly Gly Thr Thr Leu Asn Leu		
20 25 30		
Asp Phe Asp Thr Gly Ser Ala Asp Leu Trp Val Phe Ser Ser Glu Leu		
35 40 45		
Ser Ala Ser Glu Ser Ser Gly His Ala Ile Tyr Lys Pro Ser Thr Ser		
50 55 60		
Ala Gln Lys Leu Asn Gly Tyr Thr Trp Lys Ile Gln Tyr Gly Asp Gly		
65 70 75 80		
Ser Gly Ala Ser Gly Asp Val Tyr Lys Asp Thr Val Thr Val Gly Gly		
85 90 95		
Val Thr Ala Lys Ser Gln Ala Val Glu Ala Ala Ser Gln Ile Ser Ser		
100 105 110		
Gln Phe Val Gln Asp Lys Asp Asn Asp Gly Leu Leu Gly Leu Ala Phe		
115 120 125		
Ser Ser Ile Asn Thr Val Ser Pro Arg Pro Gln Thr Thr Phe Phe Asp		
130 135 140		
Thr Val Lys Ser Gln Leu Asp Ser Pro Leu Phe Ala Val Thr Leu Lys		
145 150 155 160		
Tyr His Ala Pro Gly Thr Tyr Asp Phe Gly Tyr Ile Asp Asn Ser Lys		
165 170 175		
Phe Gln Gly Gln Leu Thr Tyr Thr Asp Val Asp Asn Ser Gln Gly Phe		
180 185 190		
Trp Met Phe Thr Ala Asp Gly Tyr Gly Val Gly Asp Gly Ala Pro Asn		
195 200 205		
His Asn Gln Ile Ser Gly Ile Ala Asp Thr Gly Thr Thr Leu Leu Leu		
210 215 220		

Leu Asp Asp Ser Val Val Ala Ala Tyr Tyr Arg Gln Val Ser Gly Ala
 225 230 235 240
 Lys Asn Ser Asn Glu Tyr Gly Gly Tyr Val Phe Pro Cys Ser Thr Lys
 245 250 255
 Leu Pro Ser Phe Thr Thr Val Ile Gly Gly Tyr Asn Ala Val Val Pro
 260 265 270
 Gly Glu Tyr Ile Asn Phe Ala Pro Val Thr Asp Gly Ser Ser Thr Cys
 275 280 285
 Phe Gly Gly Ile Gln Ser Asn Ser Gly Leu Gly Phe Ser Ile Phe Gly
 290 295 300
 Asp Ile Phe Leu Lys Ser Gln Tyr Val Val Phe Asp Ser Gln Gly Pro
 305 310 315 320
 Arg Leu Gly Phe Ala Pro Gln Ala
 325
 <210> 13
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> 赭黄褐曲霉 (Aspergillus ochraceoroseus)
 <400> 13
 Ala Ala Ala Glu Ser Gly Thr Ala Thr Asn Asn Pro Ser Ser Gly Asp
 1 5 10 15
 Glu Glu Tyr Val Val Gln Val Thr Val Gly Gly Ser Lys Leu Asn Leu
 20 25 30
 Asp Phe Asp Thr Gly Ser Ala Asp Leu Trp Val Phe Ser Thr Glu Thr
 35 40 45
 Pro Ser Ser Glu Ser Thr Gly His Asn Ile Tyr Lys Pro Ser Ser Ser
 50 55 60
 Ala Glu Lys Leu Ser Gly Tyr Thr Trp Ser Ile Ser Tyr Gly Asp Gly
 65 70 75 80
 Ser Ser Ala Ser Gly Asn Val Tyr Gln Asp Ser Val Thr Val Gly Gly
 85 90 95
 Val Thr Ala Thr Lys Gln Ala Val Glu Ala Ala Glu Thr Val Ser Ser
 100 105 110
 Glu Phe Thr Glu Asp Thr Ser Asn Asp Gly Leu Leu Gly Leu Ala Phe
 115 120 125
 Ser Ser Ile Asn Thr Val Glu Pro Thr Ala Gln Ile Thr Phe Phe Asp
 130 135 140
 Thr Val Lys Thr Gln Leu Ala Ser Pro Leu Phe Ala Val Thr Leu Lys
 145 150 155 160
 His Asp Ala Pro Gly Tyr Tyr Asp Phe Gly Phe Ile Asp Ser Ser Arg
 165 170 175
 Tyr Thr Gly Asn Leu Val Tyr Thr Glu Val Asp Asn Ser Asp Gly Phe
 180 185 190
 Trp Ser Phe Thr Ser Asp Ser Tyr Ser Ile Gly Gly Glu His Ala Gly
 195 200 205
 Ser Gly Leu Thr Gly Ile Ala Asp Thr Gly Thr Thr Leu Leu Leu
 210 215 220
 Asp Asp Ser Val Val Ser Ala Tyr Tyr Ala Gln Val Ser Gly Ser Glu
 225 230 235 240
 Asp Ser Ser Ser Asn Gly Gly Tyr Thr Phe Pro Cys Thr Ala Asp Leu
 245 250 255
 Pro Asp Phe Ser Ile Thr Ile Ser Gly Tyr Glu Ala Val Val Pro Gly
 260 265 270
 Lys Tyr Ile Asn Phe Glu Ala Thr Asp Ser Ser Asn Lys Thr Cys Phe
 275 280 285
 Gly Gly Ile Gln Ser Asn Ser Gly Ile Gly Phe Ser Ile Phe Gly Asp
 290 295 300
 Val Phe Leu Lys Ser Gln Tyr Ile Val Phe Asp Ser Ser Val Pro Gln

305	310	315	320
Leu Gly Phe Ala Ala Gln Ser			
325			
<210> 14			
<211> 326			
<212> PRT			
<213> 米曲霉			
<400> 14			
Ala Ala Ala Ala Ala Thr Gly Ser Val Thr Thr Asn Pro Thr Ser Asn			
1	5	10	15
Asp Glu Glu Tyr Ile Thr Gln Val Thr Val Gly Asp Asp Thr Leu Gly			
20	25	30	
Leu Asp Phe Asp Thr Gly Ser Ala Asp Leu Trp Val Phe Ser Ser Gln			
35	40	45	
Thr Pro Ser Ser Glu Arg Ser Gly His Asp Tyr Tyr Thr Pro Gly Ser			
50	55	60	
Ser Ala Gln Lys Ile Asp Gly Ala Thr Trp Ser Ile Ser Tyr Gly Asp			
65	70	75	80
Gly Ser Ser Ala Ser Gly Asp Val Tyr Lys Asp Lys Val Thr Val Gly			
85	90	95	
Gly Val Ser Tyr Asp Ser Gln Ala Val Glu Ser Ala Glu Lys Val Ser			
100	105	110	
Ser Glu Phe Thr Gln Asp Thr Ala Asn Asp Gly Leu Leu Gly Leu Ala			
115	120	125	
Phe Ser Ser Ile Asn Thr Val Gln Pro Thr Pro Gln Lys Thr Phe Phe			
130	135	140	
Asp Asn Val Lys Ser Ser Leu Ser Glu Pro Ile Phe Ala Val Ala Leu			
145	150	155	160
Lys His Asn Ala Pro Gly Val Tyr Asp Phe Gly Tyr Thr Asp Ser Ser			
165	170	175	
Lys Tyr Thr Gly Ser Ile Thr Tyr Thr Asp Val Asn Ser Gln Gly			
180	185	190	
Phe Trp Gly Phe Thr Ala Asp Gly Tyr Ser Ile Gly Ser Asp Ser Ser			
195	200	205	
Ser Asp Ser Ile Thr Gly Ile Ala Asp Thr Gly Thr Thr Leu Leu			
210	215	220	
Leu Asp Asp Ser Ile Val Asp Ala Tyr Tyr Glu Gln Val Asn Gly Ala			
225	230	235	240
Ser Tyr Asp Ser Ser Gln Gly Gly Tyr Val Phe Pro Ser Ser Ala Ser			
245	250	255	
Leu Pro Asp Phe Ser Val Thr Ile Gly Asp Tyr Thr Ala Thr Val Pro			
260	265	270	
Gly Glu Tyr Ile Ser Phe Ala Asp Val Gly Asn Gly Gln Thr Phe Gly			
275	280	285	
Gly Ile Gln Ser Asn Ser Gly Ile Gly Phe Ser Ile Phe Gly Asp Val			
290	295	300	
Phe Leu Lys Ser Gln Tyr Val Val Phe Asp Ala Ser Gly Pro Arg Leu			
305	310	315	320
Gly Phe Ala Ala Gln Ala			
325			
<210> 15			
<211> 327			
<212> PRT			
<213> 佐氏曲霉			
<400> 15			
Ala Ala Ser Lys Gly Ser Ala Val Thr Thr Pro Gln Asn Asn Asp Glu			
1	5	10	15
Glu Tyr Leu Thr Pro Val Thr Val Gly Lys Ser Thr Leu His Leu Asp			

Gln Phe Val Gln Asp Lys Asp Asn Asp Gly Leu Leu Gly Leu Ala Phe
 115 120 125
 Ser Ser Ile Asn Thr Val Ser Pro Arg Pro Gln Thr Thr Phe Phe Asp
 130 135 140
 Thr Val Lys Ser Gln Leu Asp Ser Pro Leu Phe Ala Val Thr Leu Lys
 145 150 155 160
 Tyr His Ala Pro Gly Thr Tyr Asp Phe Gly Tyr Ile Asp Asn Ser Lys
 165 170 175
 Tyr Lys Gly Gln Leu Thr Tyr Thr Asp Val Asp Ser Ser Gln Gly Phe
 180 185 190
 Trp Met Phe Thr Ala Asp Gly Tyr Gly Val Gly Asn Gly Thr Pro Asn
 195 200 205
 Ser Asn Gln Ile Ser Gly Ile Ala Asp Thr Gly Thr Thr Leu Leu Leu
 210 215 220
 Leu Asp Asp Ser Val Val Ala Asp Tyr Tyr Arg His Val Thr Gly Ala
 225 230 235 240
 Lys Asn Ser Asn Gln Tyr Gly Gly Tyr Val Phe Pro Cys Ser Thr Ser
 245 250 255
 Leu Pro Ser Phe Thr Thr Val Ile Gly Gly Tyr Lys Ala Val Ile Pro
 260 265 270
 Gly Asn Tyr Ile Asn Phe Ala Pro Val Thr Asp Gly Ser Ser Thr Cys
 275 280 285
 Phe Gly Gly Ile Gln Ser Asn Ser Gly Leu Gly Phe Ser Ile Phe Gly
 290 295 300
 Asp Ile Phe Leu Lys Ser Gln Tyr Val Val Phe Asp Ser Gln Gly Pro
 305 310 315 320
 Arg Leu Gly Phe Ala Ala Gln Ala
 325
 [0013] <210> 17
 <211> 329
 <212> PRT
 <213> 丝衣霉状拟青霉
 <400> 17
 Ala Ala Ala Gly Ser Val Thr Gly Ser Ala Thr Asn Gln Pro Ile Thr
 1 5 10 15
 Gly Asp Glu Glu Tyr Val Thr Pro Val Ile Ala Gly Gln Ser Thr Leu
 20 25 30
 His Leu Asp Phe Asp Thr Gly Ser Ala Asp Leu Trp Val Phe Ser Ser
 35 40 45
 Gln Thr Pro Arg Ser Glu Arg Gly Asn His Ser Ile Tyr Thr Pro Ser
 50 55 60
 Ala Ser Ala Lys Lys Leu Asn Gly Tyr Thr Trp Ser Ile Ser Tyr Gly
 65 70 75 80
 Asp Gly Ser Ser Ala Ser Gly Asp Val Tyr Leu Asp Thr Ile Ser Val
 85 90 95
 Gly Gly Val Asn Ala Ser Ser Gln Ala Val Glu Ala Ala Thr Gln Val
 100 105 110
 Ser Ser Glu Phe Thr Gln Asp Thr Gly Ser Asp Gly Leu Leu Gly Leu
 115 120 125
 Ala Phe Ser Ser Ile Asn Thr Val Gln Pro Gln Arg Gln Thr Thr Phe
 130 135 140
 Phe Asp Thr Val Lys Ser Gln Leu Ala Lys Pro Leu Phe Ala Val Thr
 145 150 155 160
 Leu Lys His Asn Ala Pro Gly Ser Tyr Asp Phe Gly Phe Ile Asp Pro
 165 170 175
 Asn Lys Tyr Asn Gly Ser Ile Ala Tyr Thr Gln Val Asp Asn Ser Gln
 180 185 190
 Gly Phe Trp Gln Phe Thr Ala Asp Asp Tyr Ala Ile Gly Gly Ser Ser

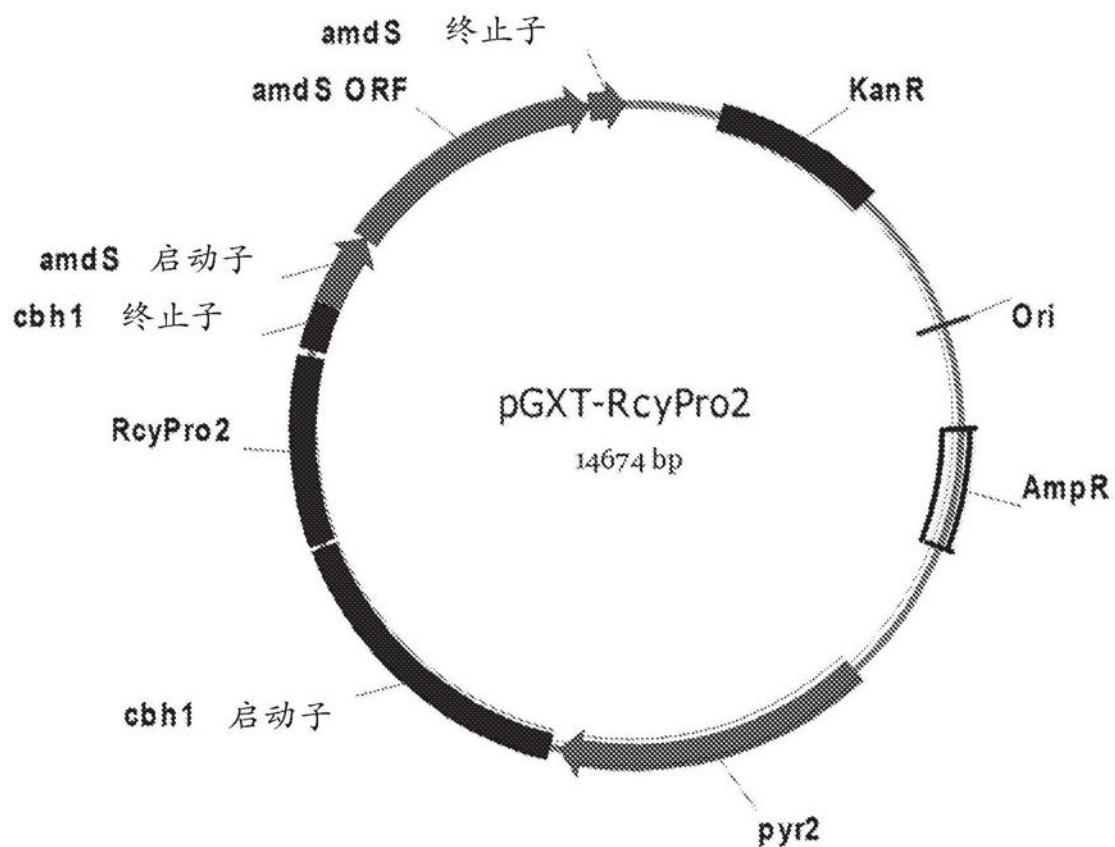
195 200 205
 Gly Gly Ser Ser Ile Asn Gly Ile Ala Asp Thr Gly Thr Thr Leu Leu
 210 215 220
 Leu Leu Asp Asn Ser Ile Val Asn Ala Tyr Tyr Gln Gln Val Gln Gly
 225 230 235 240
 Ala Gln Asn Asp Gln Asn Ala Gly Gly Tyr Val Phe Pro Cys Asn Ala
 245 250 255
 Gln Leu Pro Thr Phe Ser Ile Thr Ile Gly Asn Tyr Glu Ala Val Val
 260 265 270
 Pro Ala Glu Phe Leu Asn Phe Gln Pro Val Asp Gln Thr Gly Gln Thr
 275 280 285
 Cys Phe Gly Gly Leu Gln Ser Asn Gln Gly Val Gly Phe Ser Ile Phe
 290 295 300
 Gly Asp Val Phe Leu Lys Ser Gln Tyr Val Val Phe Asp Ser Asn Gly
 305 310 315 320
 Pro Arg Leu Gly Phe Ala Ala Gln Ala
 325
 <210> 18
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> 沙门柏干酪青霉
 <400> 18
 Ala Ala Ala Val Ser Gly Ser Ala Ile Thr Thr Pro Glu Asp Asn Asp
 1 5 10 15
 Val Glu Tyr Leu Thr Pro Val Lys Val Gly Asp Thr Thr Leu Asn Leu
 20 25 30
 Asp Phe Asp Thr Gly Ser Ala Asp Leu Trp Val Phe Ser Ser Glu Leu
 35 40 45
 Pro Ser Ser Glu Gln Thr Gly His Asp Val Tyr Lys Val Gly Ala Ser
 50 55 60
 Gly Lys Lys Leu Thr Gly Ala Ser Trp Gln Ile Ser Tyr Gly Asp Gly
 65 70 75 80
 Ser Gly Ala Ser Gly Asp Val Tyr Lys Asp Thr Val Val Val Gly Gly
 85 90 95
 Val Lys Ala Thr Ser Gln Ala Val Glu Ala Ala Lys Lys Ile Ser Gln
 100 105 110
 Gln Phe Val Glu Asp Lys Ser Asn Asp Gly Leu Leu Gly Leu Ala Phe
 115 120 125
 Ser Ser Ile Asn Thr Val Ser Pro Asn Pro Gln Thr Thr Phe Phe Asp
 130 135 140
 Thr Val Lys Asp Asp Leu Asp Lys Pro Leu Phe Ala Val Thr Leu Lys
 145 150 155 160
 His Gly Ala Pro Gly Thr Phe Asp Phe Gly Phe Ile Asp Ser Glu Lys
 165 170 175
 Phe Thr Gly Ser Val Ala Tyr Thr Asp Val Asp Ser Asp Gly Phe
 180 185 190
 Trp Ser Phe Thr Ala Asp Ser His Ile Gly Ser Gly Ser Ala Gly
 195 200 205
 Ser Ser Ile Thr Gly Ile Ala Asp Thr Gly Thr Thr Leu Leu Leu
 210 215 220
 Pro Asp Ser Val Val Ser Ala Tyr Tyr Gly Lys Val Thr Gly Ala Lys
 225 230 235 240
 Asn Ser Gln Thr Gln Gly Gly Tyr Ile Phe Pro Cys Ser Ala Asp Leu
 245 250 255
 Pro Asp Phe Thr Val Thr Ile Gly Asp Tyr Asp Ala Val Val Pro Gly
 260 265 270
 Lys His Ile Asn Tyr Ala Pro Val Ser Thr Gly Ser Ser Ser Cys Phe
 275 280 285

Gly Gly Ile Gln Ser Asn Ser Gly Leu Gly Phe Ser Ile Phe Gly Asp
 290 295 300
 Ile Phe Leu Lys Ser Gln Tyr Val Val Phe Asp Ser Glu Gly Pro Arg
 305 310 315 320
 Leu Gly Phe Ala Ala Gln Ala
 325
 <210> 19
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> 娄地青霉
 <400> 19
 Ala Ala Ala Val Ser Gly Ser Ala Ile Thr Thr Pro Glu Ala Asp Asp
 1 5 10 15
 Val Glu Tyr Leu Thr Pro Val Thr Ile Gly Ser Ser Thr Leu Asn Leu
 20 25 30
 Asp Phe Asp Thr Gly Ser Ala Asp Leu Trp Val Phe Ser Ser Glu Leu
 35 40 45
 Thr Ser Ser Gln Gln Ser Gly His Asp Val Tyr Asn Val Gly Ser Ser
 50 55 60
 Gly Thr Lys Leu Ser Gly Ala Ser Trp Ser Ile Ser Tyr Gly Asp Gly
 65 70 75 80
 Ser Ser Ala Ser Gly Asp Val Tyr Lys Asp Thr Val Thr Val Gly Gly
 85 90 95
 Val Lys Ala Thr Gly Gln Ala Val Glu Ala Ala Lys Lys Ile Ser Ser
 100 105 110
 Gln Phe Leu Gln Asp Lys Asn Asn Asp Gly Leu Leu Gly Leu Ala Phe
 115 120 125
 Ser Ser Ile Asn Thr Val Ser Pro Thr Pro Gln Lys Thr Phe Phe Asp
 130 135 140
 [0015] Thr Val Lys Ser Ser Leu Gly Glu Pro Leu Phe Ala Val Thr Leu Lys
 145 150 155 160
 His Gly Ala Pro Gly Thr Tyr Asp Phe Gly Tyr Ile Asp Ser Asp Lys
 165 170 175
 Tyr Thr Gly Thr Leu Ala Tyr Ala Asp Val Asp Asp Ser Asp Gly Phe
 180 185 190
 Trp Ser Phe Thr Ala Asp Ser Tyr Lys Ile Gly Thr Gly Ala Ala Gly
 195 200 205
 Lys Ser Ile Thr Gly Ile Ala Asp Thr Gly Thr Thr Leu Leu Leu
 210 215 220
 Asp Ser Ser Ile Val Thr Ala Tyr Tyr Lys Lys Val Thr Gly Ser Gln
 225 230 235 240
 Asn Ser Ser Ser Ala Gly Gly Tyr Ile Phe Pro Cys Ser Ala Thr Leu
 245 250 255
 Pro Asp Phe Thr Val Thr Ile Asn Gly Tyr Asp Ala Val Val Pro Gly
 260 265 270
 Lys Tyr Ile Asn Phe Ala Pro Val Ser Thr Gly Ser Ser Ser Cys Tyr
 275 280 285
 Gly Gly Ile Gln Ser Asn Ser Gly Ile Gly Phe Ser Ile Phe Gly Asp
 290 295 300
 Ile Phe Leu Lys Ser Gln Tyr Val Val Phe Asp Ser Glu Gly Pro Arg
 305 310 315 320
 Leu Gly Phe Ala Ala Gln Ala
 325
 <210> 20
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> 鲁本斯青霉威斯康星
 <400> 20

Ala Ala Ala Val Ser Gly Ser Ala Ile Thr Thr Pro Glu Glu Asn Asp
 1 5 10 15
 Val Glu Tyr Leu Thr Pro Val Lys Ile Gly Glu Ser Thr Leu Asn Leu
 20 25 30
 Asp Phe Asp Thr Gly Ser Ala Asp Leu Trp Val Phe Ser Thr Glu Leu
 35 40 45
 Ser Ser Ala Glu Gln Ser Gly His Asp Val Tyr Asp Val Ser Ser Ser
 50 55 60
 Gly Lys Lys Leu Thr Gly Ala Ser Trp Ser Ile Ser Tyr Gly Asp Gly
 65 70 75 80
 Ser Gly Ala Ser Gly Asp Val Tyr Lys Asp Thr Val Thr Val Gly Gly
 85 90 95
 Val Lys Ala Thr Gly Gln Ala Val Glu Ala Ala Lys Lys Ile Ser Gln
 100 105 110
 Gln Phe Val Gln Asp Lys Ser Asn Asp Gly Leu Leu Gly Leu Ala Phe
 115 120 125
 Ser Ser Ile Asn Thr Val Ser Pro Lys Pro Gln Thr Thr Phe Phe Asp
 130 135 140
 Thr Val Lys Ser Asp Leu Asp Lys Pro Leu Phe Ala Val Thr Leu Lys
 145 150 155 160
 His Gly Ala Pro Gly Thr Tyr Asp Phe Gly Tyr Ile Asp Lys Lys Lys
 165 170 175
 Phe Thr Gly Ser Leu Thr Tyr Thr Asp Val Asp Asn Ser Gln Gly Phe
 180 185 190
 Trp Ser Phe Thr Ala Asp Ser Tyr Lys Val Gly Thr Gly Ser Ala Gly
 195 200 205
 Pro Ser Ile Glu Gly Ile Ala Asp Thr Gly Thr Thr Leu Leu Leu
 210 215 220
 Asp Asp Gly Val Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Lys Val Asp Gly Ala Lys
 225 230 235 240
 Asn Asn Tyr Ser Ala Gly Gly Tyr Val Phe Pro Cys Asp Ala Asp Leu
 245 250 255
 Pro Asp Phe Thr Val Thr Ile Gly Ser Tyr Asp Ala Val Val Pro Gly
 260 265 270
 Lys His Ile Lys Tyr Ala Pro Val Thr Thr Gly Ser Ser Ser Cys Phe
 275 280 285
 Gly Gly Ile Gln Ser Asn Ser Gly Ile Gly Phe Ser Ile Phe Gly Asp
 290 295 300
 Ile Phe Leu Lys Ser Gln Tyr Val Val Phe Asp Ala Glu Gly Pro Arg
 305 310 315 320
 Leu Gly Phe Ala Ala Gln Ala
 325
 <210> 21
 <211> 329
 <212> PRT
 <213> 埃默森蓝状菌
 <400> 21
 Ala Ala Ser Gly Thr Gln Ser Gly Ser Ala Ala Asn Thr Pro Val Ala
 1 5 10 15
 Gly Asp Ser Leu Tyr Leu Thr Pro Val Thr Ile Gly Gln Ser Thr Leu
 20 25 30
 Asn Leu Asp Phe Asp Thr Gly Ser Ala Asp Leu Trp Val Phe Ser Asn
 35 40 45
 Glu Thr Pro Ser Ser Glu Arg Gly Asn His Ala Ile Tyr Lys Pro Ser
 50 55 60
 Ser Thr Ala Lys Lys Leu Asn Gly Tyr Thr Trp Ser Ile Ser Tyr Gly
 65 70 75 80
 Asp Gly Ser Ser Ala Gly Gly Asp Val Tyr Gln Asp Ser Val Ser Val

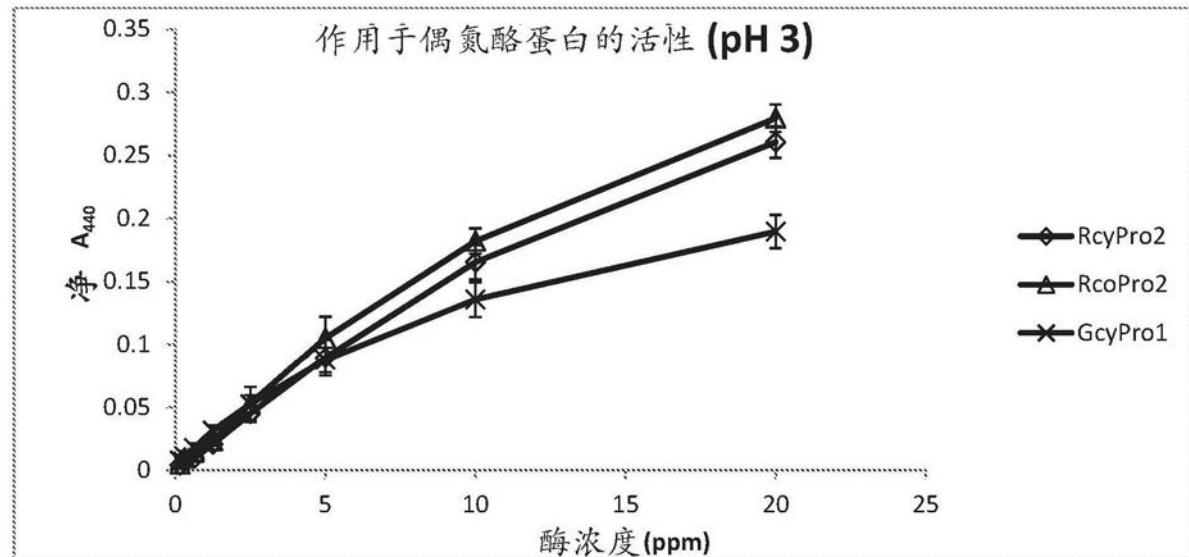
	85	90	95													
Gly	Gly	Val	Asn	Ala	Ser	Asn	Gln	Ala	Val	Glu	Ala	Ala	Thr	Lys	Val	
	100		105		110											
Ser	Ser	Glu	Phe	Thr	Gln	Glu	Pro	Gly	Asp	Gly	Leu	Leu	Gly	Leu	Ala	
	115		120		125											
Phe	Ser	Ser	Ile	Asn	Thr	Val	Lys	Pro	Lys	Pro	Gln	Thr	Thr	Phe	Phe	
	130		135		140											
Asp	Thr	Val	Lys	Ser	Ser	Leu	Ala	Lys	Pro	Leu	Phe	Ala	Val	Thr	Leu	
	145		150		155											
Lys	His	Asn	Glu	Pro	Gly	Ser	Tyr	Asp	Phe	Gly	Tyr	Ile	Asp	Ser	Ser	
	165		170		175											
Lys	Tyr	Lys	Gly	Ser	Ile	Gln	Tyr	Thr	Gln	Val	Asp	Asn	Ser	Gln	Gly	
	180		185		190											
Phe	Trp	Gln	Phe	Thr	Ala	Asp	Gly	Tyr	Ser	Ile	Gly	Gly	Ser	Ser	Gly	
	195		200		205											
Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Gly	Ile	Ala	Asp	Thr	Gly	Thr	Thr	Leu	Leu	
	210		215		220											
Leu	Leu	Asp	Asp	Gln	Ile	Val	Asn	Glu	Tyr	Tyr	Gln	Gln	Val	Gln	Gly	
	225		230		235											
Ala	Gln	Asn	Asp	Gln	Asn	Ala	Gly	Gly	Tyr	Thr	Phe	Pro	Cys	Asp	Ala	
	245		250		255											
Gln	Leu	Pro	Glu	Leu	Ser	Phe	Thr	Ile	Gly	Gln	Tyr	Thr	Ala	Thr	Val	
	260		265		270											
Pro	Ala	Glu	Tyr	Leu	Asn	Phe	Gln	Pro	Val	Ser	Gln	Gly	Ser	Gln	Thr	
	275		280		285											
Cys	Phe	Gly	Gly	Leu	Gln	Ser	Asn	Gln	Gly	Ile	Gly	Phe	Ser	Ile	Phe	
	290		295		300											
Gly	Asp	Val	Phe	Leu	Lys	Ser	Gln	Tyr	Val	Val	Phe	Asp	Ser	Asp	Gly	
	305		310		315											
Pro	Gln	Leu	Gly	Phe	Ala	Ala	Gln	Ala								
	325															
[0017]	<210>	22														
	<211>	326														
	<212>	PRT														
	<213>	解纤维篮状菌														
	<400>	22														
	Ala	Ala	Ala	Ser	Ala	Gln	Ser	Gly	Ser	Ala	Thr	Asn	Gln	Pro	Thr	Gln
	1					5					10					15
	Asp	Asp	Glu	Glu	Tyr	Val	Thr	Pro	Val	Thr	Ala	Gly	Asp	Ser	Thr	Leu
						20					25					30
	Asn	Leu	Asp	Phe	Asp	Thr	Gly	Ser	Ala	Asp	Leu	Trp	Thr	Tyr	Ser	Ser
						35					40					45
	Ser	Thr	Lys	Gly	Val	Gly	Ser	His	Asn	Thr	Tyr	Asp	Thr	Ser	Thr	Gly
						50					55					60
	Thr	Lys	Val	Ser	Gly	Ala	Thr	Trp	Gln	Ile	Ser	Tyr	Gly	Asp	Gly	Ser
						65					70					80
	Ser	Ala	Ser	Gly	Asn	Val	Tyr	Lys	Asp	Thr	Val	Val	Val	Gly	Gly	Val
						85					90					95
	Thr	Ala	Thr	Ser	Gln	Ala	Val	Glu	Val	Ala	Thr	Thr	Val	Ser	Ser	Glu
						100					105					110
	Phe	Ser	Gln	Asp	Thr	Ser	Asn	Asp	Gly	Leu	Leu	Gly	Leu	Ala	Phe	Ser
						115					120					125
	Ser	Ile	Asn	Thr	Val	Ser	Pro	Thr	Gln	Gln	Lys	Thr	Phe	Tyr	Asp	Asn
						130					135					140
	Val	Lys	Ser	Ser	Leu	Asp	Thr	Pro	Val	Phe	Ala	Val	Thr	Leu	Lys	His
						145					150					160
	Gln	Ala	Pro	Gly	Thr	Tyr	Asp	Phe	Gly	Phe	Ile	Asp	Asp	Ser	Lys	Tyr
						165					170					175

Thr Gly Ser Leu Thr Tyr Thr Ser Val Asp Asn Ser Gln Gly Phe Trp
 180 185 190
 Gln Phe Thr Ala Asp Gly Tyr Ser Val Gly Ser Ser Gly Ser Gly Gly
 195 200 205
 Ser Ser Phe Ser Ala Ile Ala Asp Thr Gly Thr Thr Leu Val Leu Leu
 210 215 220
 Asp Asp Ser Ile Val Ser Asp Tyr Tyr Ser Gln Val Asp Gly Ala Glu
 225 230 235 240
 Asn Ser Ser Ser Asp Gly Gly Tyr Val Phe Asp Cys Ser Ala Thr Leu
 245 250 255
 [0018] Pro Asp Phe Thr Val Gln Ile Gly Asp Tyr Ser Ala Val Ile Pro Gly
 260 265 270
 Asp Tyr Ile Asn Tyr Ala Ser Thr Gly Ser Gly Ser Asn Cys Phe Gly
 275 280 285
 Gly Ile Gln Ser Asn Ser Gly Ile Gly Phe Ser Ile Leu Gly Asp Val
 290 295 300
 Phe Leu Lys Ser Gln Tyr Val Val Phe Asp Gly Asp Asn Leu Gln Leu
 305 310 315 320
 Gly Phe Ala Pro Gln Ala
 325



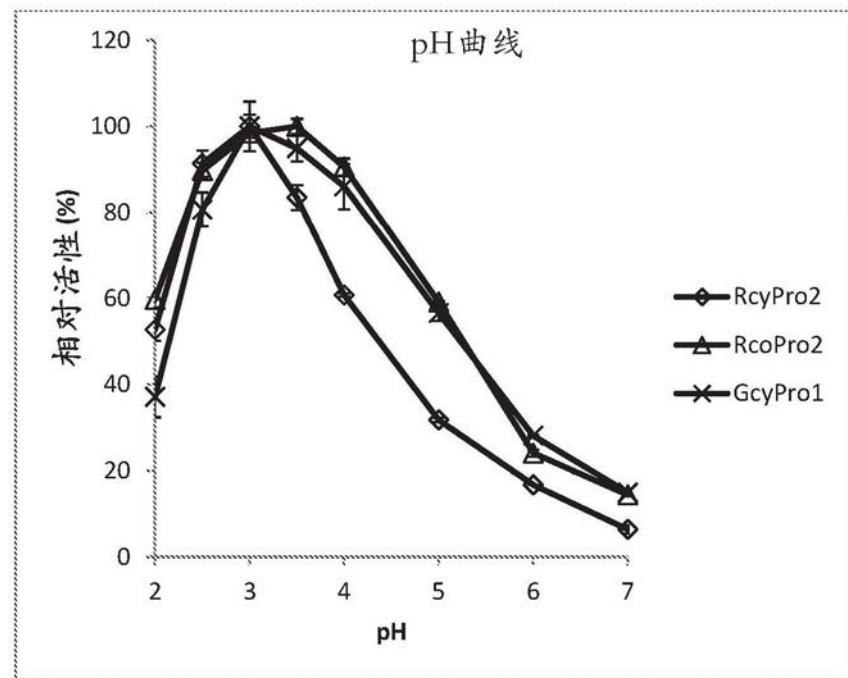
pGXT-RcyPro2的质粒图谱

图1



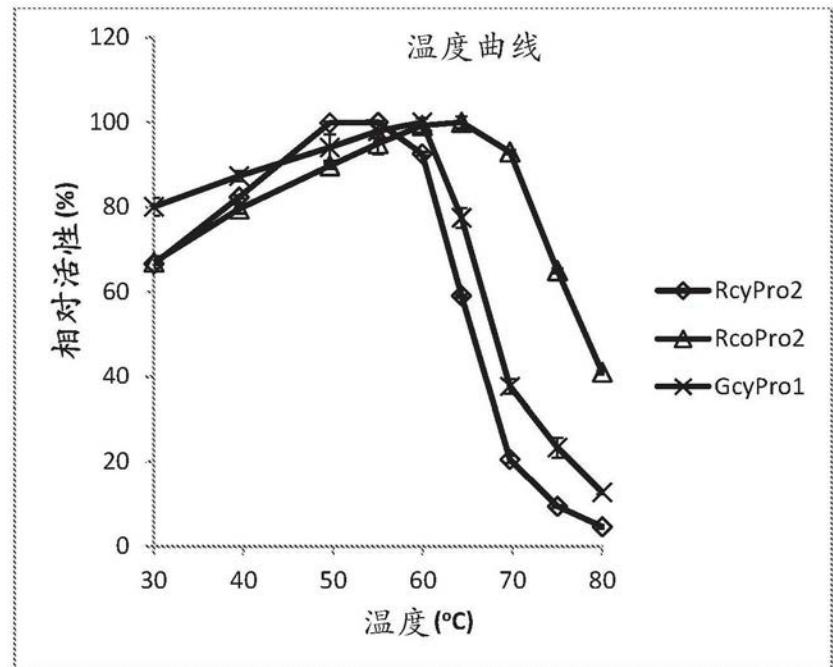
经纯化的RcyPro2、RcoPro2和GcyPro1的剂量反应曲线

图2



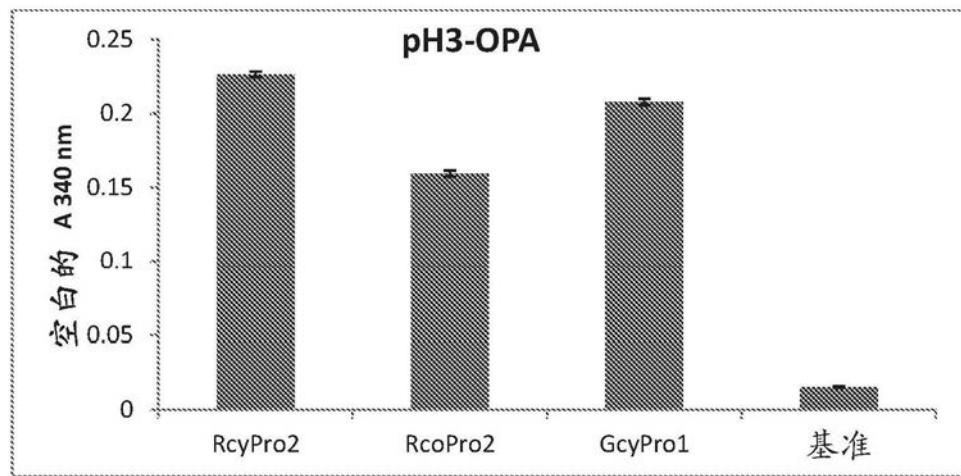
经纯化的RcyPro2、RcoPro2和GcyPro1的pH曲线

图3



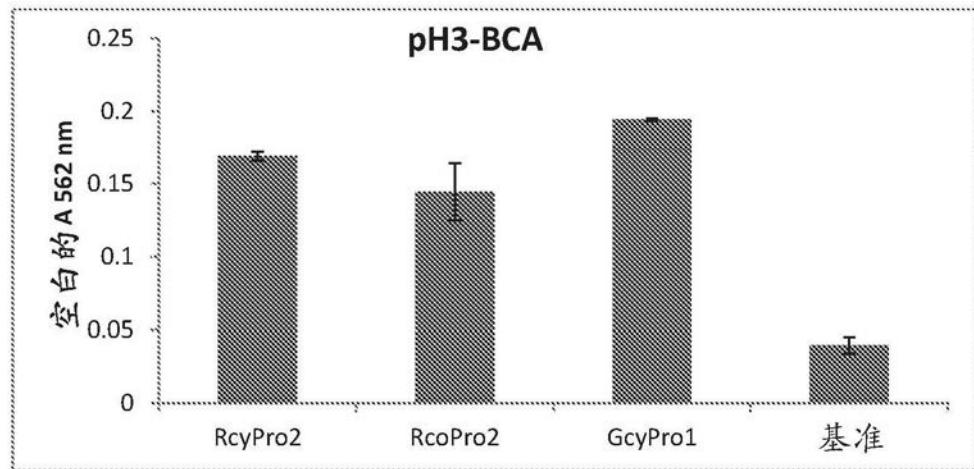
经纯化的RcyPro2、RcoPro2和GcyPro1的温度曲线

图4



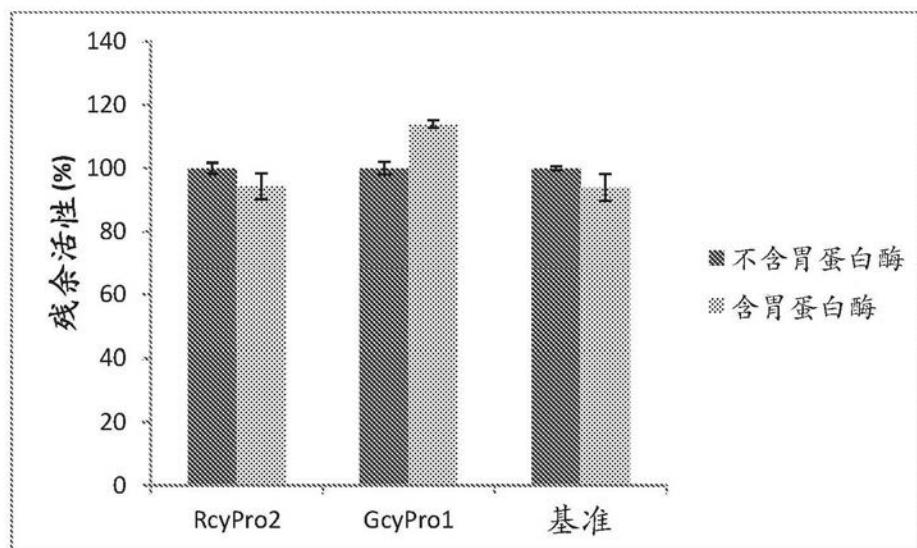
使用OPA测定，在pH3时，经纯化的真菌天冬氨酸蛋白酶的大豆玉米粉水解

图5



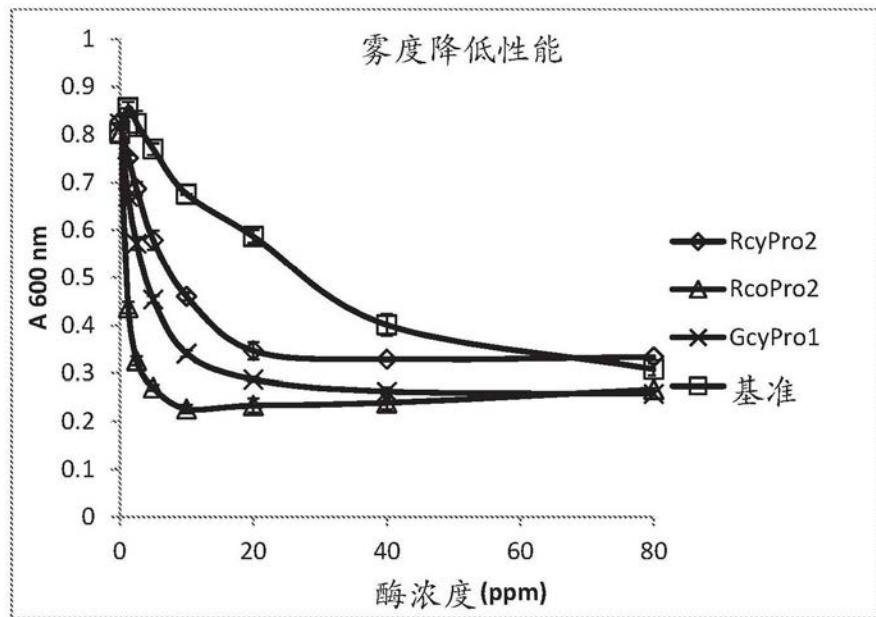
使用BCA测定，在pH3时，经纯化的真菌天冬氨酸蛋白酶的大豆玉米粉水解

图6



经纯化的RcyPro2和GcyPro1的胃蛋白酶稳定性

图7



经纯化的RcyPro2、RcoPro2和GcyPro1的雾度降低性能

图8

GcyProl	--AAAVSGTATNTPTQDDEEYITPVTAGKSTLNLDFTGSADLWVFSDETPTSEAQGHST
RcyPro2	--AAAVSGTATNTPTSGDEEYITPVTAGKSTLNLDFTGSADLWVFSSQTPTSEAEGHST
RcoPro2	AASGTQSGSAANTPVAGDSLTLTPTVQSTLNLDFTGSADLWVFSEETPSSERGNHAI
US20150197760-0009	AASGTQSGSAANTPVAGDSLTLTPTVQSTLNLDFTGSADLWVFSNETPSSERGNHAI
WO2014138983-1470	AAAGSVTGSATNQPIGDEEYVTPVIAGQSTLHLDFTGSADLWVFSSQTPSERGNHSI
gb KKK15635.1	--AAAESGTATNNPSSGDEEYVVQTVGGSKLNLDFTGSADLWVFSTETPSSESTGHNI
US8815571-0007	--AAAAATGSVTTNPTSNDDEEYITQTVGDDTLGLDFDTGSADLWVFSSQTPSSERGHDY
dbj GAM38640.1	AAASAQSGSATNQPTQDDEEYVTPVTAGDSTLNLDFTGSADLWTYSSSTKG--VGSHNT
ref XP_753324.1	--AAASSGSAVTTPEQYDSEYLTPVKVGTTLNLDFTGSADLWVFSSSELSASQSSGHAI
dbj GAQ09821.1	--AAASSGSAVTTPEQYDSEYLTPVKVGTTLNLDFTGSADLWVFSSSELSASQSSGHAI
dbj GAO82919.1	--AAASSGSAVTTPEQYDTEYLTPVKVGTTLNLDFTGSADLWVFSSSELSASQSSGHAI
emb CRL26143.1	--AAAVSGSAITTPEDNDVEYLTPVKVGDTTLNLDFTGSADLWVFSSSELTSSAEQSGHDV
ref XP_002567415.1	--AAAVSGSAITTPENDVEYLTPVKIGESTLNLDFTGSADLWVFSTELSSAEQSGHDV
emb CDM30996.1	--AAAVSGSAITTPEADDVEYLTPVTIGSSTLNLDFTGSADLWVFSSSELTSSQQSGHDV
dbj GAA90749.1	--AASKGSAVTTPQNNDEEYLTPVTVGKSTLHLDFTGSADLWVFSDelpssertghdV
US8815571-0001	--AASKGSAVTTPQNNDEEYLTPVTVGKSTLHLDFTGSADLWVFSDelpsseqtghdL
. : . * : . . * * * : . * * . * * * * * * * . : * . . . *	

GcyProl	YVPSSSAKKMSGYSWSISYGDGSSASGDVYQDTVTGGVTASQQAVERAATKVSSQFTQDT
RcyPro2	YVPSSSATKMRGYSWSISYGDGSSASGDVYQDTVTGGVTASKQAVEAAEVKSSEFTQDT
RcoPro2	YKPSSSAKKLNGYTWSISYGDGSSASGDVYQDSVSVGGVNASQAVEAATKVSSEFEQDP
US20150197760-0009	YKPSSTAKKLNGYTWSISYGDGSSAGGDVYQDSVSVGGVNASQAVEAATKVSSEFTQEP
WO2014138983-1470	YTPSASAKKLNGYTWSISYGDGSSASGDVYLDTISVGGVNASSQAVEAATQVSSEFTQDT
gb KKK15635.1	YKPSSSAEKLNGYTWSISYGDGSSASGNVYQDSVTGGVTATKQAVEAAETVSSEFTEDT
US8815571-0007	YTPGSSAQKIDGATWSISYGDGSSASGDVYKDKVTGGVSYDSQAVESAEVKSSEFTQDT
dbj GAM38640.1	YD-TSTGTVSGATWQISYGDGSSASGNVYKDTVVGGVTATSQAVEVATTVSSEFSQDT
ref XP_753324.1	YKPSANAQKLNGYTWKIQYGDGSSASGDVYKDTVTGGVTAQSQAVEAASHISSQFVQDK

dbj GAQ09821.1	YKPSTSAQKLNQYTWKIQYGDGSGASGDVYKDTVTGGVTAKSQAVEAASQISSQFVQDK
dbj GAO82919.1	YKPSSTAKKLSGYSWQISYGDGSSASGDVYKDTVTGGVTAQSQAVEAASQISSQFVQDK
emb CRL26143.1	YKVGASGKKLTGASWQISYGDGSGASGDVYKDTVVVGGVKATSQAVEAAKKISQQFVEDK
ref XP_002567415.1	YDVSSSGKKLTGASWSISYGDGSGASGDVYKDTVTGGVATGQAVEAAKKISQQFVQDK
emb CDM30996.1	YNVGSSGTTKLSGASWSISYGDGSSASGDVYKDTVTGGVATGQAVEAAKKISQQFLQDK
dbj GAA90749.1	YTPSSSATKLSGYSWDISYGDGSSASGDVYRDTVTGGVTTNKQAVEAASKISSEFVQDT
US8815571-0001	YTPSSSATKLSGYSWDISYGDGSSASGDVYRDTVTGGVTTNKQAVEAASKISSEFVQDT

GcyPro1	NNDGLLGLAFSSINTVSPQPQKTFDNVKSQLDKPLFAVTLKHQAPGTYDFGYIDSSRYK
RcyPro2	ASDGLLGLAFSSINTVSPEPQQTFFDTVDNVKSQDKPLFAVTLKHQAPGTYDFGYIDSSRYT
RcoPro2	G-DGLLGLAFSSINTVQPKPQTTFFDTVKSSLAKPLFAVTLKHNEPGSYDFGYIDNTKYK
US20150197760-0009	G-DGLLGLAFSSINTVKPKPQTTFFDTVKSSLAKPLFAVTLKHNEPGSYDFGYIDSSKYK
WO2014138983-1470	GSDGLLGLAFSSINTVQPQRQTTFFDTVKSQLAKPLFAVTLKHNAPGSYDFGFIDPNKYN
gb KKK15635.1	SNDGLLGLAFSSINTVEPTAQITFFDTVKTQLASPLFAVTLKHDAPGYYDFGFIDSSRYT
US8815571-0007	ANDGLLGLAFSSINTVQPTPQKTFDNVKSSLSEPIFAVALKHNAPGVYDFGYTDSSKYT
dbj GAM38640.1	SNDGLLGLAFSSINTVSPTQQKTFYDNVKSSLDTPVFAVTLKHQAPGTYDFGFIDDSKYT
ref XP_753324.1	DNDGLLGLAFSSINTVSPRPQTTFFDTVKSQLDSPLFAVTLKYHAPGTYDFGYIDNSKFQ
dbj GAQ09821.1	DNDGLLGLAFSSINTVSPRPQTTFFDTVKSQLDSPLFAVTLKYHAPGTYDFGYIDNSKFQ
dbj GAO82919.1	DNDGLLGLAFSSINTVSPRPQTTFFDTVKSQLDSPLFAVTLKYHAPGTYDFGYIDNSKYK
emb CRL26143.1	SNDGLLGLAFSSINTVSPNPQTTFFDTVKDDLDKPLFAVTLKHGAPGTDFGFIDSEKFT
ref XP_002567415.1	SNDGLLGLAFSSINTVSPKPQTTFFDTVKSDLDKPLFAVTLKHGAPGTYDFGYIDKKKFT
emb CDM30996.1	NNNDGLLGLAFSSINTVSPTPQKTFDTVKSSLGEPLFAVTLKHGAPGTYDFGYIDSDKYT
dbj GAA90749.1	ANDGLLGLAFSSINTVQPKAQTTFFDTVKSQLDSPLFAVQLKHDAPGVYDFGYIDDSKYT
US8815571-0001	ANDGLLGLAFSSINTVQPKAQTTFFDTVKSQLDSPLFAVQLKHDAPGVYDFGYIDDSKYT

GcyPro1	GDIAYTAVDNSQGFWSFTADDYSIGGSSQ-GSSITGIADTGTLLLDNVNAYYSQVN
RcyPro2	GSIAYTDVDNSQGFWSFTADDYAIGGESA-GSSITGIADTGTLLLDDDVVSNYYSGVD
RcoPro2	GSIQYT PVDNSQGFWQFTADGYSIGGSSGNGGSISGIA DTGTLLLDQIV EEEYYQNVD

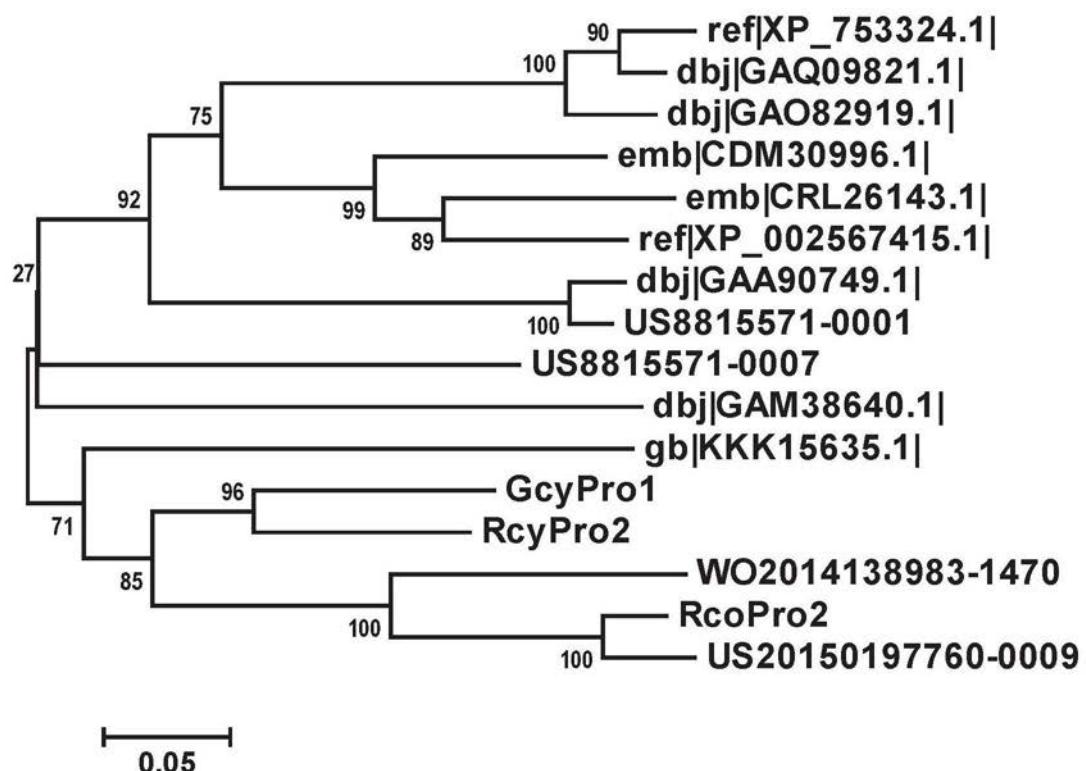
US20150197760-0009	GSIQYTQVDNSQGFQFTADGYSIGGSSGSSISGIADTGTLLLLDDQIVNEYQQVQ
WO2014138983-1470	GSIAYTQVDNSQGFQFTADYAIIGGSSG-GSSINGIADTGTLLLLDNSIVNAYYQQVQ
gb KKK15635.1	GNLVYTEVDNSDGFWSFTSDSYSIGGEHA-GSLGTGIAVTGTTLLLLDDSVSAYYAQVS
US8815571-0007	GSITYTDVDNSQGFQFTADGYSIGSDSS-SDSITGIAVTGTTLLLLDDSVDAYEQVN
dbj GAM38640.1	GSLTYTSVDNSQGFQFTADGYSVGSSGSSFSAIADTGTTLVLLDDSVSDYYSQVD
ref XP_753324.1	GELTYTDVDSSQGFWMFTADGYGVNGAPNSNSISGIADTGTLLLLDDSVADYYRQVS
dbj GAQ09821.1	GQLTYTDVDNSQGFWMFTADGYGVGDGAPHNQISGIADTGTLLLLDDSVAAAYYRQVS
dbj GAO82919.1	GQLTYTDVDSSQGFWMFTADGYGVGNTPNSNQISGIADTGTLLLLDDSVADYYRHVT
emb CRL26143.1	GSVAYTDVDDSDGFWSFTADSHKIGSGSAG-SSITGIAVTGTTLLLPDSVVSAYYGKVT
ref XP_002567415.1	GSLTYTDVDNSQGFWSFTADSYKVGTSAG-PSIEGIAVTGTTLLLLDDGVVSDYKKVD
emb CDM30996.1	GTLAYADVDDSDGFWSFTADSYKIGTGAAG-KSITGIAVTGTTLLLDSSIVTAYYKKVT
dbj GAA90749.1	GSITYTDADSSQGYWGFNPDGYSIGDSSSSSGFSAIADTGTTLILLDDEIVSAYYEQVD
US8815571-0001	GSITYTDADSSQGYWGFSTDGYSIGDGSSSSGFSAIADTGTTLILLDDEIVSAYYEQVS
* : *: .*.*: *: * . *. : * : . *****: * . : * ** * *	

GcyProl	SAQQDNSAGGWVFDCSDNLPTFSVTIGNYEAVVPAEFINFPAFNTGSTCFGQIQSNGI
RcyPro2	GAQNSNYAGGYVFPCTADLPTFSITIGSHQAVVPAEFINFQDDGTGDNCFCGGIQSNSGI
RcoPro2	GAQNDQSAGGYTFPCDAQLPELSFTIGQYTANVPAEYLNQPLSQGSQTCFGGLQSNQGI
US20150197760-0009	GAQNDQNAGGYTFPCDAQLPELSFTIGQYTATVPAEYLNQFQVSQGSQTCFGGLQSNQGI
WO2014138983-1470	GAQNDQNAGGYVFPCTAQLPTFSITIGNYEAVVPAEFLNFQPVQDQTCFGGLQSNQGV
gb KKK15635.1	GSEDSSNNGGYTFPCADLPDFSIISGYEAVVPGKYINFEATDSSNKTCFGGIQSNSGI
US8815571-0007	GASYDSSQGGYVFPSSASLPDFSVTIGDYTATVPGYISFADVGNG--QTFGGIQSNSGI
dbj GAM38640.1	GAENSSSDGGYVFDCSATLPDFTVQIGDYSAVIPGDYINYASTGSGS-NCFGQIQSNSGI
ref XP_753324.1	GAKNSNQYGGYVFPCKLPSFTVIGGYNAVVPGEYINYAPVTDGSSTCYGGIQSNSGL
dbj GAQ09821.1	GAKNSNEYGGYVFPCKLPSFTVIGGYNAVVPGEYINFAPVTDGSSTCFGQIQSNSGL
dbj GAO82919.1	GAKNSNQYGGYVFPCKLPSFTVIGGYKAVIPGNYINFAPVTDGSSTCFGQIQSNSGL
emb CRL26143.1	GAKNSQTQGGYIFPCSAADLPDFTVIGDYDAVVPGKHINYAPVSTGSSCFGGIQSNSGL
ref XP_002567415.1	GAKNNYSAGGYVFPCKLPSFTVIGSYDAVVPGKHINYAPVTTGSSCFGGIQSNSGI
emb CDM30996.1	GSQNSSSAGGYIFPCSATLPDFTVTINGYDAVVPGKYINFAPVSTGSSCYGGIQSNSGI
dbj GAA90749.1	GAQESNEAGGYVFSCSTTPDFTVIIGDYKAVVPGKYINYAPISTGSSTCFGQIQSNSGL

	GAQESYEAGGYVFSCSTDLPDFTVVGDYKAVVPGKYINYAPVSTGSSTCYGGIQNSGL
 * : * . * : * . : * : *
GcyProl	GFSIFGDVFLKSQYVVFDAASGPQLGFAAQAA
RcyPro2	GFSIFGDVFLKSQYVVFDSSEG PQLGFAQAA
RcoPro2	GFSIFGDVFLKSQYVVFDSNGPQLGFAAQAA
US20150197760-0009	GFSIFGDVFLKSQYVVFDS DGPQLGFAAQAA
WO2014138983-1470	GFSIFGDVFLKSQYVVFDSNGPRLGFAAQAA
gb KKK15635.1	GFSIFGDVFLKSQYIVFDSSVPQLGFAAQQS
US8815571-0007	GFSIFGDVFLKSQYVVFDAASGPRLGFAAQAA
dbj GAM38640.1	GFSILG DVFLKSQYVVF DGDNLQLGFAQPA
ref XP_753324.1	GFSIFGDIFLKSQYVVFDSQGPRLGFAQPA
dbj GAQ09821.1	GFSIFGDIFLKSQYVVFDSQGPRLGFAQPA
dbj GAO82919.1	GFSIFGDIFLKSQYVVFDSQGPRLGFAAQAA
emb CRL26143.1	GFSIFGDIFLKSQYVVFDSSEG PRLGFAAQAA
ref XP_002567415.1	GFSIFGDIFLKSQYVVFDAEGPRLGFAAQAA
emb CDM30996.1	GFSIFGDIFLKSQYVVFDSSEG PRLGFAAQAA
dbj GAA90749.1	GLSILG DVFLKSQYVVF NSEGPKLGFAAQAA
US8815571-0001	GLSILG DVFLKSQYVVF NSEGPKLGFAAQAA

RcyPro2、RcoPro2、GcyPro1和多种同源天冬氨酸真菌蛋白酶成熟区域的 Clustal W多序列比对

图9



显示Rcypro2、RcoPro2和GcyPro1以及多种同源天冬氨酸真菌蛋白酶的系统发育树

图10