



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112481237 A

(43) 申请公布日 2021.03.12

(21) 申请号 202011427117.X

C12R 1/84 (2006.01)

(22) 申请日 2020.12.09

(71) 申请人 山东隆科特酶制剂有限公司

地址 276400 山东省临沂市沂水县城北工业园

(72) 发明人 王兴吉 钱娟娟 曹世源 郭庆文
王金余 王克芬

(74) 专利代理机构 北京瑞盛铭杰知识产权代理
事务所(普通合伙) 11617

代理人 栗华楠

(51) Int. Cl.

C12N 9/20 (2006.01)

C12N 15/55 (2006.01)

C12N 15/81 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

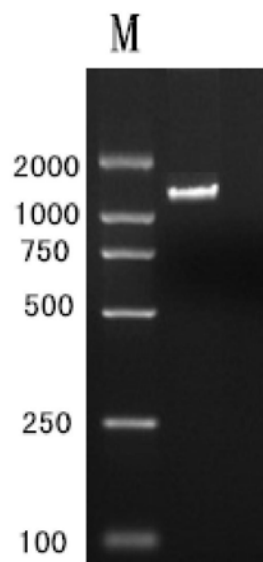
权利要求书1页 说明书6页
序列表6页 附图2页

(54) 发明名称

一种耐碱性脂肪酶

(57) 摘要

本发明属于生物技术领域,具体涉及一种耐碱性脂肪酶。本发明通过PCR获得来自根霉菌突变菌的耐碱脂肪酶突变基因B-2,并将B-2构建到pPIC9质粒上,得到重组质粒pPIC9-B-2,并转化到毕赤酵母GS200,筛选得到高表达碱性脂肪酶的重组菌C-2,其碱性脂肪酶发酵酶活可达85000U/ml。C-2所表达的碱性脂肪酶在pH 11.5的条件下处理9h,该酶相对活性仍剩余80%左右,具有较好的耐碱性。



1. 一种耐碱性脂肪酶,其特征在于,所述脂肪酶氨基酸序列如序列表SEQ ID NO.4所示。
2. 权利要求1所述脂肪酶的编码基因。
3. 如权利要求2所述的编码基因,其特征在于,如序列表SEQ ID NO.3所示。
4. 权利要求1所述耐碱性脂肪酶的应用。

一种耐碱性脂肪酶

技术领域：

[0001] 本发明涉及生物技术领域，具体涉及一株高产耐碱脂肪酶的毕赤酵母工程菌及其所产的脂肪酶。

背景技术：

[0002] 脂肪酶是能够将长链脂肪酸甘油酯水解为甘油和长链脂肪酸(或逆反应)的生物酶。脂肪酶可在水油界面或者非水溶剂系统中发生酯交换、水解、酯化等化学反应，具有底物专一性和位点选择性等特点。脂肪酶能够应用到油脂加工、食品加工、皮革加工以及饲料和生物能源等行业，具有比较广泛的应用价值。

[0003] 碱性脂肪酶是在碱性条件下水解脂肪中的酯键的酶，碱性脂肪酶是一种新型洗涤剂用酶，主要用途是作为洗涤剂的新酶种。它的特性能分解衣物油污成甘油二酯、甘油单酯及脂肪酸等较易溶于水的物质，从而显著提高洗衣粉的洗涤效果，尤其是去除黄斑的效果。我们常用各种含酶洗衣粉，其中的酶制剂主要有碱性蛋白酶和碱性脂肪酶。碱性蛋白酶用于分解蛋白质类污物，如汗渍、血渍等。碱性脂肪酶则主要作用于脂肪酸及其酯类污物，也就是我们通常所指的油污类。

[0004] 脂肪酶主要来源于植物、动物、微生物，其微生物脂肪酶广泛存在于细菌、酵母和霉菌中，具有种类多、周期短、繁殖快、易发生遗传变异的特点，且有比动植物脂肪酶更广的作用温度、作用pH和底物特异性，其可以在不需要辅酶的条件下催化酯类化合物的水解、醇解、酸解、酯交换及合成等，催化条件温和、能耗低、副产物少，具有高效、高选择性、环境友好等特点，改变了传统的酯化或转酯化反应所需要的高温、强酸、强碱等相对苛刻的条件。尽管自然界中有多种脂肪酶可供选择，但这些天然酶往往不能满足生物催化的需求，包括底物选择的范围、pH、温度特性和稳定性(长时间反应的稳定性、有机溶剂耐受性)等。

[0005] 随着基因工程技术的不断发展，利用基因工程手段结合所需脂肪酶基因构建毕赤酵母工程菌，使其更好的表达，对满足工业生产的需求，降低生产成本具有重大意义。

发明内容：

[0006] 本发明的目的在于提供一种耐碱性提高的脂肪酶突变体及其毕赤酵母工程菌菌株。所述脂肪酶突变体具体为脂肪酶突变体B-2，来自一株经紫外诱变获得的根霉菌ZF056，将脂肪酶突变体编码基因从ZF056中克隆并构建重组质粒后，在毕赤酵母GS200中进行表达，从而获得毕赤酵母工程菌菌株。

[0007] 所述脂肪酶突变体B-2的酶学性质如下：

[0008] (1) pH:pH 10.0-11.5酶活稳定，最适作用pH 10.5。

[0009] (2) 温度:45℃-60℃酶活稳定，最适作用温度为50℃。

[0010] (3) 耐碱性:该酶在pH 11.5的条件下，9h后酶活力仍存留80%以上。

[0011] 在本发明中采用如下定义：

[0012] 1. 氨基酸和DNA核酸序列的命名法

[0013] 使用氨基酸残基的公认IUPAC命名法,用三字母代码形式。DNA核酸序列采用公认IUPAC命名法。

[0014] 2. 脂肪酶突变体的标识

[0015] 在本发明中,B-1表示野生型脂肪酶,B-2表示脂肪酶突变体,信息如下表。

[0016] 所述野生型脂肪酶B-1的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.2所示;

[0017] 所述野生型脂肪酶B-1编码基因的核苷酸序列为SEQ ID No.1所示;

[0018] 所述脂肪酶突变体B-2的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.4所示;

[0019] 所述脂肪酶突变B-2编码基因的核苷酸序列为SEQ ID No.3所示。

[0020] 本发明还提供包含所述突变体基因的表达载体或重组菌株;

[0021] 优选地,用于表达所述突变体的表达载体为pPIC9,物宿主细胞为毕赤酵母GS200。

[0022] 优选地,所述重组菌株是将脂肪酶突变编码基因B-2连接表达载体pPIC9,并在毕赤酵母GS200中表达所得。

[0023] 所述重组菌株的构建方法如下:

[0024] 1、将脂肪酶突变体的编码基因B-2进行酶切,连接至表达载体pPIC9,得到重组载体;

[0025] 2、将重组载体转化入毕赤酵母GS200中,得到新型脂肪酶的生产菌株GS200/pPIC9-B-2。

[0026] 本发明还提供所述重组菌株在发酵生产脂肪酶种的应用,特别是GS200/pPIC9-B-2重组菌作为生产菌株发酵生产脂肪酶中的应用。

[0027] 具体地,采用所述重组菌发酵生产脂肪酶(50L发酵罐)的方法为:

[0028] 种子罐培养:培养温度30-31℃,转速200-800rpm,风量2m³/h-6m³/h,通风搅拌培养,pH 5.0-5.5,溶氧20-30%,湿重增长至60-80g/L移种;

[0029] 发酵罐培养:接种量10-15%,培养温度30-31℃,转速200-800rpm,风量2m³/h-6m³/h,通风搅拌培养,pH 5.0-5.5,周期0-20h,流加碳源40-50%葡萄糖,流加速度为600-800g/h,溶氧20-30%,培养20h至菌体湿重160-180g/L;停补碳源,溶氧反弹至80%以上,保持1小时;流加甲醇,流加速度为50-200g/h,控制溶氧20-30%,培养130h左右至发酵结束。

[0030] 种子罐培养基配方:4-5%甘油,1-2%磷酸二氢铵,0.5-1%磷酸二氢钾,0.5-1%硫酸镁,0.5-0.8%硫酸钾,0.05-0.1%硫酸钙,0.2-0.5%氢氧化钾,其余为水,pH5.0-5.5;

[0031] 发酵罐培养基配方:4-5%甘油,1-2%磷酸二氢铵,0.5-1%磷酸二氢钾,0.5-1%硫酸镁,0.5-0.8%硫酸钾,0.05-0.1%硫酸钙,0.2-0.5%氢氧化钾,其余为水,pH5.0-5.5。

[0032] 有益效果:

[0033] 1、本发明公布了一种全新的脂肪酶突变体,该突变体具有酶活高,耐碱性高的特点。该突变体发酵液酶活可达85000U/mL以上;

[0034] 2、本发明获得的脂肪酶在pH 11.5的条件下,9h后酶活力仍存留80%以上,与野生型脂肪酶B-1相比,耐碱性显著提高。

附图说明:

[0035] 图1菌落PCR鉴定电泳图;

[0036] 图2碱性脂肪酶最适pH曲线;

[0037] 图3碱性脂肪酶最适温度曲线；

[0038] 图4碱性脂肪酶耐碱性曲线。

具体实施方式：

[0039] 通过具体实施例对本发明作出更详尽的说明，仅作为举例说明，而不作为对本发明实施范围的限定。对于本领域技术人员，在本发明原理基础上还可做出的改进，这些改进也应视为本发明保护的范围。本实施例中未作具体说明的分子生物学实验方法，可参照《分子克隆实验指南》。

[0040] 以下通过具体实施方式对本发明作进一步地解释说明。

[0041] 实施例1脂肪酶突变体B-2编码基因的获得

[0042] 本公司保藏的一株产碱性脂肪酶的根霉菌LD037，经紫外诱变筛选得到一株具有耐碱脂肪酶活性的菌株ZF056，根据来自根霉菌LD037的野生型脂肪酶B-1编码基因的核苷酸序列设计PCR引物，5'端加入酶切位点Xho I，3'端加入酶切位点Not I，通过PCR得到突变基因B-2，经过测序得到其核苷酸序列为SEQ ID No.3。

[0043] 在本发明中，通过野生型和突变体的核苷酸序列的比较，得到突变位点信息如下表。

脂肪酶	氨基酸突变位点	基因突变位点	氨基酸 SEQ ID No.	核苷酸 SEQ ID No.
野生型 B-1	Asn12	A34	2	1
	Arg40	G119		
突变体 B-2	Asn12Leu	A34G	4	3
	Arg40Gln	G119A		

[0044] 实施例2重组载体pPIC9-B-2的构建

[0045] 分别对B-2编码基因和质粒pPIC9进行Xho I和Not I酶切，回收产物，将回收后的B-2编码基因和pPIC9按比例混合，用T4连接酶在16℃条件下连接过夜，连接产物转化大肠杆菌DH5α感受态细胞，转化产物涂布在LB(含氨苄霉素)固体平板上，37℃倒置培养过夜，挑取单菌落至LB液体培养基，37℃培养，菌液进行菌落PCR，电泳鉴定结果如图1，测序结果显示序列正确，序列大小1.6kb。抽提重组质粒pPIC9-B-2待用。

[0046] 实施例3重组质粒转化毕赤酵母

[0047] 1. 毕赤酵母GS200感受态细胞的制备

[0048] 1) 挑取毕赤酵母平板单菌落，接种于5mL的YPD培养基，30℃，220r/min振荡过夜；

[0049] 2) 取0.5mL的过夜培养的菌液，接种于50mL新鲜配制的YPD培养基，30℃，220r/min振荡培养，使OD600值达到1.3-1.5；

[0050] 3) 取上述培养液于4℃，3000r/min，离心5min；

[0051] 4) 弃去上清液，加入50mL冰上预冷的无菌水，振荡重悬菌体；

[0052] 5) 4℃，3000r/min，离心5min，弃去上清液，吸干管壁残余液体，加入25mL冰上预冷的无菌水，振荡重悬菌体；

[0053] 6) 4℃，3000r/min，离心5min，弃去上清液，吸干管壁残余液体，加入10mL冰上预冷

的1mol/L的无菌山梨醇溶液,重悬菌体;

[0055] 7) 4℃,3000r/min,离心5min,弃去上清液,吸干管壁残余液体,加入1mL冰上预冷的1mol/L的无菌山梨醇溶液(预先加入甘油至终浓度15%),振荡混匀。

[0056] 8) 分装100μL/管至无菌EP罐,-70℃冰箱冰冻保藏(新鲜制备的感受态细胞效果更佳)。

[0057] 2. 线性化质粒的转化

[0058] 抽提得到的重组质粒pPIC9-B-2用Sal I进行单酶切,得到线性化质粒。取新鲜制备的(或-70℃冻存的)感受态细胞置于冰浴中,使其完全解冻。

[0059] 1) 将100μL感受态细胞移出至一新的无菌EP管中,加入10μL线性化质粒,轻吹混匀,吸出转移到0.2cm型的电穿孔转化杯中;

[0060] 2) 转化杯置于冰浴中5-10分钟,保持低温。

[0061] 3) 电穿孔转化电击条件:1500V,200Ω,25μF,放电时间5ms左右,一次电击。

[0062] 4) 电击后,马上在电击转化杯中加入1mL 4℃预冷的1mol/L的山梨醇溶液,用移液枪吹打均匀,置于冰浴中;

[0063] 5) 在超净工作台上无菌操作涂布MD培养基(1.34%YNB;4×10⁻⁵%生物素;2%葡萄糖平板),100-200μL/板,涂好的平板30℃倒置培养3-4天;

[0064] 6) 在MD平板上筛选得到两株重组菌,经菌落PCR得到目的序列,测序比对显示为目的基因B-2的核苷酸序列,即所得菌株为含有pPIC9-B-2的重组菌,分别命名为C-1,C-2。

[0065] 实施例4含有重组质粒pPIC9-B-2的酵母菌的诱导表达

[0066] BMGY培养基配方:1%酵母浸出物,2%蛋白胨,0.1mol/L pH6.0磷酸盐缓冲液,1.34%YNB,4×10⁻⁵%生物素,1%甘油。

[0067] BMMY培养基配方:1%酵母浸出物,2%蛋白胨,0.1mol/L pH6.0磷酸盐缓冲液,1.34%YNB,4×10⁻⁵%生物素,0.5%甲醇。

[0068] 将重组菌C-1,C-2,以及用同样方法以野生型脂肪酶B-1编码基因构建的重组菌株YB-1分别接种于装有30mL BMGY培养基的三角瓶中,30℃,220r/min培养至OD600为10左右,离心收集菌体,用35mL的BMMY诱导培养基重悬菌体,并在30℃,220r/min条件下继续培养48h,发酵液离心后测定上清中的脂肪酶酶活,结果如下表。

[0069] 菌株	脂肪酶酶活/U·mL ⁻¹
YB-1	5412
C-1	12215
C-2	12209

[0070] 实施例5重组菌C-2发酵性能验证

[0071] 种子罐培养:培养温度30℃,转速300rpm,风量2.5m³/h,通风搅拌培养,pH5.1,溶氧25%,湿重增长至75g/L移种;

[0072] 发酵罐培养:接种量12%,培养温度30℃,转速300rpm,风量2.5m³/h,通风搅拌培养,pH 5.1,周期0-20h,流加碳源45%葡萄糖,流加速度为700g/h,溶氧25%,培养20h至菌体湿重170g/L;停补碳源,溶氧反弹至80%以上,保持1小时;流加甲醇,流加速度为150g/h,控制溶氧25%,培养130h左右至发酵结束。

[0073] 种子罐培养基配方:4.5%甘油,1.5%磷酸二氢铵,0.7%磷酸二氢钾,0.7%硫酸

镁,0.6%硫酸钾,0.07%硫酸钙,0.3%氢氧化钾,pH 5.1;

[0074] 发酵罐培养基配方:4.5%甘油,1.5%磷酸二氢铵,0.6%磷酸二氢钾,0.6%硫酸镁,0.6%硫酸钾,0.07%硫酸钙,0.3%氢氧化钾,pH 5.1;

[0075] 采用以上发酵方法进行50L放大发酵罐验证实验,总发酵周期150h,其3批次的发酵产酶情况,平均产酶水平为85470U/mL,下表说明菌株不仅高产脂肪酶而且其发酵性能以及其所产的脂肪酶的酶活均具有一定的稳定性。

[0076] 3批次高产碱性脂肪酶菌株的发酵产酶情况

批次	发酵周期 (h)	发酵活力 (U/mL)
1	150	85825
2	150	85560
3	150	85025

[0078] 实施例6酶活测定方法

[0079] 参考GB/T23535-2009方法,橄榄油与4% (w/v) 聚乙烯醇 (PVA) 以1:3 (v/v) 的比例混合,用高速匀浆机处理后得到乳白色的乳化液。以乳化后的橄榄油作为脂肪酶水解底物。每个反应体系包括4mL橄榄油乳化液、5mL 50mmol/L缓冲液和1mL稀释的酶液。在40℃中反应15min后,该反应被15mL 95%乙醇溶液终止。同时设置空白组,将预先灭活的酶液加入反应体系中作为空白。于实验组与空白组中分别加入2滴酚酞指示剂,采用0.1mol/L NaOH标准溶液进行滴定,直至液体呈微红色并保持30s内不褪色,记录消耗的0.1mol/L NaOH标准溶液的体积。取三次实验的平均值。

[0080] 单位脂肪酶活力的定义:一定反应条件下每分钟产生1 μ mol脂肪酸的酶量。

[0081] 计算酶活 $X = (B - A) * C * 100 * n / 0.1 / 15$

[0082] 式中,X:样品的酶活力,U/mL;B:滴定样品所消耗的NaOH的体积,mL;A:滴定空白样所消耗的NaOH的体积;C:NaOH标准液的浓度,mol/L;100:0.1mol/L NaOH标准溶液消耗1mL相当于产生100 μ mol的脂肪酸;n,样品稀释倍数;0.1:NaOH标准液浓度换算系数;15:反应时间为15min。

[0083] 实施例7脂肪酶的酶学性质

[0084] (1) 最适作用pH

[0085] 以实施例5所得C-2发酵液上清液为样品,以测得的脂肪酶最高酶活为基准,在50℃的条件下,测定不同pH条件下的酶活力。由图2可知,该脂肪酶在pH范围10.0-11.5酶活稳定,最适作用pH 10.5。

[0086] (2) 最适作用温度

[0087] 以实施例5所得C-2发酵液上清液为样品,以测得的脂肪酶最高酶活为基准,在pH 10.5的条件下,测定不同温度条件下的酶活力,计算相对酶活,结果如图3所示,C-2所产脂肪酶45℃-60℃酶活稳定,最适作用温度为50℃。

[0088] (3) 耐碱性

[0089] 分别以实施例5所得YB-1和C-2发酵液上清液为样品,以不作处理的脂肪酶酶活为100%基准,样品分别在pH 11.5的条件下进行50℃保温处理,每隔1h,测酶活,计算剩余酶活,从图4中可以看出,在9h后,C-2所产酶相对活性仍存留80%以上,与原始脂肪酶B-1编码基因构建的重组菌YB-1所产脂肪酶相比,耐碱性有很大提高,说明该重组菌C-2所产脂肪酶

具有良好的耐碱性。

[0090] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但不能因此而理解为对专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本专利构思的前提下,上述各实施方式还可以做出若干变形、组合和改进,这些都属于本专利的保护范围。因此,本专利的保护范围应以权利要求为准。

SEQUENCE LISTING

<110> 山东隆科特酶制剂有限公司

<120> 一种耐碱性脂肪酶

<130> 1

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1578

<212> DNA

<213> 根霉菌LD037

<400> 1

```
atgtcccggg ggtccgcggc gactgccact gccaatggcg gggcacctgg tagcagagcc 60
ttcctgcatt ccgtcgttc cggagatccc tggcccgaca gcgtcgtcat ctggaccggg 120
gtgacgccgg tatctcaggc cacgccgggt tccggtgcgg gggatccgac ccgtgtgtac 180
tgggagggtg ccacagacgc cagctttgac gtagccaccg cagctgggga aatgaccacc 240
gaagcggacc gcgaccacac cgtgaaaatc aatgtcacgg gacttgcccc gtccaccacc 300
tactattacc ggttcacggt ggtggacggt ccgtccgcag gtgaggtatc ccgcacgggt 360
cgaacgcgga cgacgccggc ggacgacgcc gcaccggacc acctccgctt cggggtgtgt 420
tcgtgttcga actacgaggc aggacacttc cgtgcctacc gtgagcttgc tgaccgcgac 480
gacgttgagt tcgtcctgca tctcggcgac tacacctatg aatacagatc cggggaatac 540
ggcgcggcct acggcacaac agtacggacc gtggaaccgc gcgaacgtac ccgcacactc 600
gtcggttacc ggatccgaca ggggcactac caccgagacc ctgacctcgc agacctgcat 660
gccgctaagc cgatgatctg catctgggat gaccacgagt ttttcgaaa tgctgtggct 720
gacggtgcca ccggggattc cgactacggc ggggcgcagg agtacgcggc ggtgaggcag 780
gctgcgaccg aggcctacta cgaatggatg ccggttcgtg cgggagaggg gttcggcacg 840
gacggtggac gtcatctcta ccggcaccta cgctacggtg cgctcgaga gctcatcctc 900
cccgaccttc gcacttaccg cgacatgcag agtccccgg ccaccgctgc cgcggacggc 960
cgcacgatga tggacagaa ccagttcgac tggttcgcgg gcgtcctgac gacctcgacg 1020
accacctggc aactggtcgg gaactcgggt atgttcgctc cgatgacttt gcctcactca 1080
ctggatccac ggttgcata gaactcgggt gacaagatcg gcctgccgcc ggacggaatt 1140
gcaactgaata cggaccagtg ggacgggtac atggtggaac gccagcgcac catcgacgctc 1200
atcatgaaca gggggtccgg gcctcacggt cgtggaatga acgtggtctt cctcaccggt 1260
gacatccact cctcgtgggc tgcagatata cccgcgcagg ccggagagta tcggctgggc 1320
cgggacacga ccgtggcggc cgcggagttc atcgtccgtc cggtgaccgc tgcgagcgc 1380
ttcgattcga ttgttccgac cagtcccgcg gcacctcggc tcaggaggc tctgcggctg 1440
ggggaagggt tgctcatgga tgtggacatc tggtacaagt acgtcgacct gagccgacac 1500
ggaatgatgg tggccccggc ggttcgtcct gccggacaag aactcgaccg gtccccgacg 1560
gtctacacc cggcgtga 1578
```

<210> 2
 <211> 530
 <212> PRT
 <213> 根霉菌LD037
 <400> 2
 Met Ser Arg Trp Ser Ala Ala Thr Ala Thr Ala Asn Gly Gly Ala Pro
 1 5 10 15
 Gly Ser Arg Ala Phe Leu His Ser Val Ala Ser Gly Asp Pro Trp Pro
 20 25 30
 Asp Ser Val Val Ile Trp Thr Arg Val Thr Pro Val Ser Gln Ala Thr
 35 40 45
 Pro Gly Ser Gly Ala Gly Asp Pro Thr Arg Val Tyr Trp Glu Val Ser
 50 55 60
 Thr Asp Ala Ser Phe Asp Val Ala Thr Ala Ala Gly Glu Met Thr Thr
 65 70 75 80
 Glu Ala Asp Arg Asp His Thr Val Lys Ile Asn Val Thr Gly Leu Ala
 85 90 95
 Pro Ser Thr Thr Tyr Tyr Tyr Arg Phe Thr Val Val Asp Gly Pro Ser
 100 105 110
 Ala Gly Glu Val Ser Arg Thr Gly Arg Thr Arg Thr Thr Pro Ala Asp
 115 120 125
 Asp Ala Ala Pro Asp His Leu Arg Phe Gly Val Cys Ser Cys Ser Asn
 130 135 140
 Tyr Glu Ala Gly His Phe Arg Ala Tyr Arg Glu Leu Ala Asp Arg Asp
 145 150 155 160
 Asp Val Glu Phe Val Leu His Leu Gly Asp Tyr Thr Tyr Glu Tyr Glu
 165 170 175
 Ser Gly Glu Tyr Gly Ala Ala Tyr Gly Thr Thr Val Arg Thr Val Glu
 180 185 190
 Pro Arg Glu Arg Thr Arg Thr Leu Val Gly Tyr Arg Ile Arg Gln Gly
 195 200 205
 His Tyr His Arg Asp Pro Asp Leu Ala Asp Leu His Ala Ala Lys Pro
 210 215 220
 Met Ile Cys Ile Trp Asp Asp His Glu Phe Phe Asp Asn Ala Trp Arg
 225 230 235 240
 Asp Gly Ala Thr Gly Asp Ser Asp Tyr Gly Gly Ala Gln Glu Tyr Ala
 245 250 255
 Ala Val Arg Gln Ala Ala Thr Glu Ala Tyr Tyr Glu Trp Met Pro Val
 260 265 270

Arg Ala Gly Glu Gly Phe Gly Thr Asp Gly Gly Arg His Leu Tyr Arg
 275 280 285
 His Leu Arg Tyr Gly Thr Leu Ala Glu Leu Ile Leu Pro Asp Leu Arg
 290 295 300
 Thr Tyr Arg Asp Met Gln Ser Ser Pro Ala Thr Ala Ala Asp Gly
 305 310 315 320
 Arg Thr Met Met Gly Gln Asn Gln Phe Asp Trp Phe Ala Gly Val Leu
 325 330 335
 Thr Thr Ser Thr Thr Thr Trp Gln Leu Val Gly Asn Ser Val Met Phe
 340 345 350
 Ala Pro Met Thr Leu Pro His Ser Leu Asp Pro Arg Leu His Asp Trp
 355 360 365
 Leu Val Asp Lys Ile Gly Leu Pro Pro Asp Gly Ile Ala Leu Asn Thr
 370 375 380
 Asp Gln Trp Asp Gly Tyr Met Val Glu Arg Gln Arg Ile Ile Asp Val
 385 390 395 400
 Ile Met Asn Arg Gly Ser Gly Pro His Gly Arg Gly Met Asn Val Val
 405 410 415
 Phe Leu Thr Gly Asp Ile His Ser Ser Trp Ala Ala Asp Ile Pro Ala
 420 425 430
 Gln Ala Gly Glu Tyr Arg Leu Gly Arg Asp Thr Thr Val Ala Ala Ala
 435 440 445
 Glu Phe Ile Val Pro Ser Val Thr Ala Ala Ser Ala Phe Asp Ser Ile
 450 455 460
 Val Pro Thr Ser Ala Ala Ala Pro Ala Val Arg Glu Ala Leu Arg Leu
 465 470 475 480
 Gly Glu Gly Leu Leu Met Asp Val Asp His Trp Tyr Lys Tyr Val Asp
 485 490 495
 Leu Ser Arg His Gly Met Met Val Val Asp Val Asp Pro Ser Pro Gly
 500 505 510
 Val Arg Pro Ala Gly Gln Glu Leu Asp Arg Ser Arg Thr Val Tyr Thr
 515 520 525
 Pro Ala
 530
 <210> 3
 <211> 1578
 <212> DNA
 <213> 根霉菌ZF056
 <400> 3

atgtcccggg ggtccgcggc gactgccact gccgatggcg gggcacctgg tagcagagcc 60
 ttctgcatt ccgtcgcttc cggagatccc tggccccgaca gcgtcgatcat ctggaccag 120
 gtgacgccgg tatctcaggc cacgccgggt tccggtgcgg gggatccgac ccgtgtgtac 180
 tgggagggtgt ccacagacgc cagctttgac gtagccaccg cagctgggga aatgaccacc 240
 gaagcggacc gcgaccacac cgtgaaaatc aatgtcacgg gacttgcccc gtccaccacc 300
 tactattacc ggttcacggt ggtggacggt ccgtccgcag gtgaggtatc ccgcacgggt 360
 cgaacgcgga cgacgccggc ggacgacgcc gcaccggacc acctccgctt cggggtgtgt 420
 tcgtgttcga actacgaggc aggacacttc cgtgcctacc gtgagcttgc tgaccgcgac 480
 gacgttgagt tcgtcctgca tctcggcgac tacacctatg aatacgagtc cggggaatac 540
 ggcgcggcct acggcacaac agtacggacc gtggaaccgc gcgaacgtac ccgcacactc 600
 gtcggttacc ggatccgaca ggggcaactac caccgagacc ctgacctgc agacctgcat 660
 gccgctaagc cgatgatctg catctgggat gaccacgagt ttttcgaca tgcgtggcgt 720
 gacggtgcca ccggggattc cgactacggc ggggcgcagg agtacgcggc ggtgaggcag 780
 gctgcgaccg aggccacta cgaatggatg ccggttcgtg cgggagaggg gttcggcacg 840
 gacggtggac gtcactctca ccggcaccta cgctacgcta cgctcgaga gtcactctc 900
 cccgaccttc gcaactaccg cgacatgcag agctccccgg ccaccgctgc cgcggacggc 960
 cgcacgatga tgggacagaa ccagttcgac tggttcgcgg gcgtcctgac gacctcgacg 1020
 accacctggc aactggtcgg gaactcgggt atgttcgctc cgatgacttt gcctcactca 1080
 ctggatccac ggttgcata gaactcgggt atgttcgctc cgatgacttt gcctcactca 1140
 gcaactgaata cggaccagtg ggacgggtac atggtggaac gccagcgcac catcgacgctc 1200
 atcatgaaca ggggggtccg gcctcacggt cgtggaatga acgtggtctt cctcaccggt 1260
 gacatccact cctcgtgggc tgcaatatac cccgcgcagg ccggagagta tcggctgggc 1320
 cgggacacga ccgtggcggc cgcggagttc atcgtcccgt cggtgaccgc tgcgagcgc 1380
 ttcgattcga ttgttccgac cagtgcgcgc gcacctgcgg tcaggaggc tctcggctg 1440
 ggggaagggt tgctcatgga tgtggaccat tggtaaatg acgtcgacct gagccgacac 1500
 ggaatgatgg tgggtcccgg ggttcgtcct gccggacaag aactcgaccg gtcccggacg 1560
 gtctacaccc cggcgtga 1578

<210> 4

<211> 530

<212> PRT

<213> 根霉菌ZF056

<400> 4

Met Ser Arg Trp Ser Ala Ala Thr Ala Thr Ala Leu Gly Gly Ala Pro
 1 5 10 15
 Gly Ser Arg Ala Phe Leu His Ser Val Ala Ser Gly Asp Pro Trp Pro
 20 25 30
 Asp Ser Val Val Ile Trp Thr Gln Val Thr Pro Val Ser Gln Ala Thr
 35 40 45
 Pro Gly Ser Gly Ala Gly Asp Pro Thr Arg Val Tyr Trp Glu Val Ser

50	55	60
Thr Asp Ala Ser Phe Asp Val Ala Thr Ala Ala Gly Glu Met Thr Thr		
65	70	75
Glu Ala Asp Arg Asp His Thr Val Lys Ile Asn Val Thr Gly Leu Ala		
	85	90
Pro Ser Thr Thr Tyr Tyr Tyr Arg Phe Thr Val Val Asp Gly Pro Ser		
	100	105
Ala Gly Glu Val Ser Arg Thr Gly Arg Thr Arg Thr Thr Pro Ala Asp		
	115	120
Asp Ala Ala Pro Asp His Leu Arg Phe Gly Val Cys Ser Cys Ser Asn		
	130	135
Tyr Glu Ala Gly His Phe Arg Ala Tyr Arg Glu Leu Ala Asp Arg Asp		
	145	150
Asp Val Glu Phe Val Leu His Leu Gly Asp Tyr Thr Tyr Glu Tyr Glu		
	165	170
Ser Gly Glu Tyr Gly Ala Ala Tyr Gly Thr Thr Val Arg Thr Val Glu		
	180	185
Pro Arg Glu Arg Thr Arg Thr Leu Val Gly Tyr Arg Ile Arg Gln Gly		
	195	200
His Tyr His Arg Asp Pro Asp Leu Ala Asp Leu His Ala Ala Lys Pro		
	210	215
Met Ile Cys Ile Trp Asp Asp His Glu Phe Phe Asp Asn Ala Trp Arg		
	225	230
Asp Gly Ala Thr Gly Asp Ser Asp Tyr Gly Gly Ala Gln Glu Tyr Ala		
	245	250
Ala Val Arg Gln Ala Ala Thr Glu Ala Tyr Tyr Glu Trp Met Pro Val		
	260	265
Arg Ala Gly Glu Gly Phe Gly Thr Asp Gly Gly Arg His Leu Tyr Arg		
	275	280
His Leu Arg Tyr Gly Thr Leu Ala Glu Leu Ile Leu Pro Asp Leu Arg		
	290	295
Thr Tyr Arg Asp Met Gln Ser Ser Pro Ala Thr Ala Ala Ala Asp Gly		
	305	310
Arg Thr Met Met Gly Gln Asn Gln Phe Asp Trp Phe Ala Gly Val Leu		
	325	330
Thr Thr Ser Thr Thr Thr Trp Gln Leu Val Gly Asn Ser Val Met Phe		
	340	345
Ala Pro Met Thr Leu Pro His Ser Leu Asp Pro Arg Leu His Asp Trp		
	355	360
		365

Leu Val Asp Lys Ile Gly Leu Pro Pro Asp Gly Ile Ala Leu Asn Thr
 370 375 380
 Asp Gln Trp Asp Gly Tyr Met Val Glu Arg Gln Arg Ile Ile Asp Val
 385 390 395 400
 Ile Met Asn Arg Gly Ser Gly Pro His Gly Arg Gly Met Asn Val Val
 405 410 415
 Phe Leu Thr Gly Asp Ile His Ser Ser Trp Ala Ala Asp Ile Pro Ala
 420 425 430
 Gln Ala Gly Glu Tyr Arg Leu Gly Arg Asp Thr Thr Val Ala Ala Ala
 435 440 445
 Glu Phe Ile Val Pro Ser Val Thr Ala Ala Ser Ala Phe Asp Ser Ile
 450 455 460
 Val Pro Thr Ser Ala Ala Ala Pro Ala Val Arg Glu Ala Leu Arg Leu
 465 470 475 480
 Gly Glu Gly Leu Leu Met Asp Val Asp His Trp Tyr Lys Tyr Val Asp
 485 490 495
 Leu Ser Arg His Gly Met Met Val Val Asp Val Asp Pro Ser Pro Gly
 500 505 510
 Val Arg Pro Ala Gly Gln Glu Leu Asp Arg Ser Arg Thr Val Tyr Thr
 515 520 525
 Pro Ala
 530

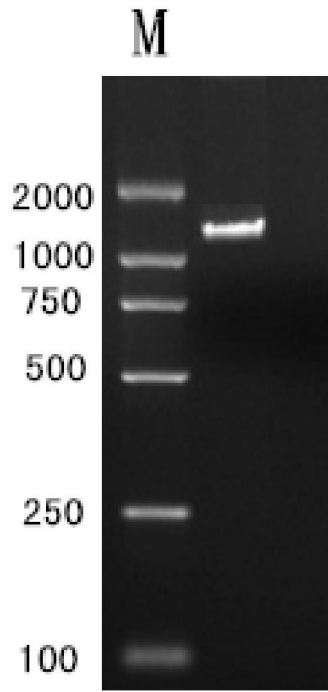


图1

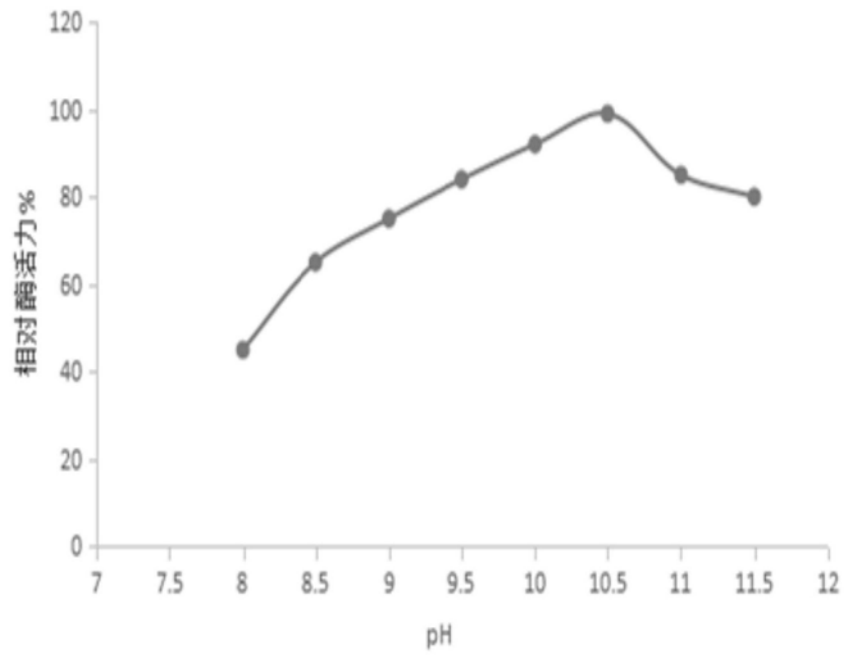


图2

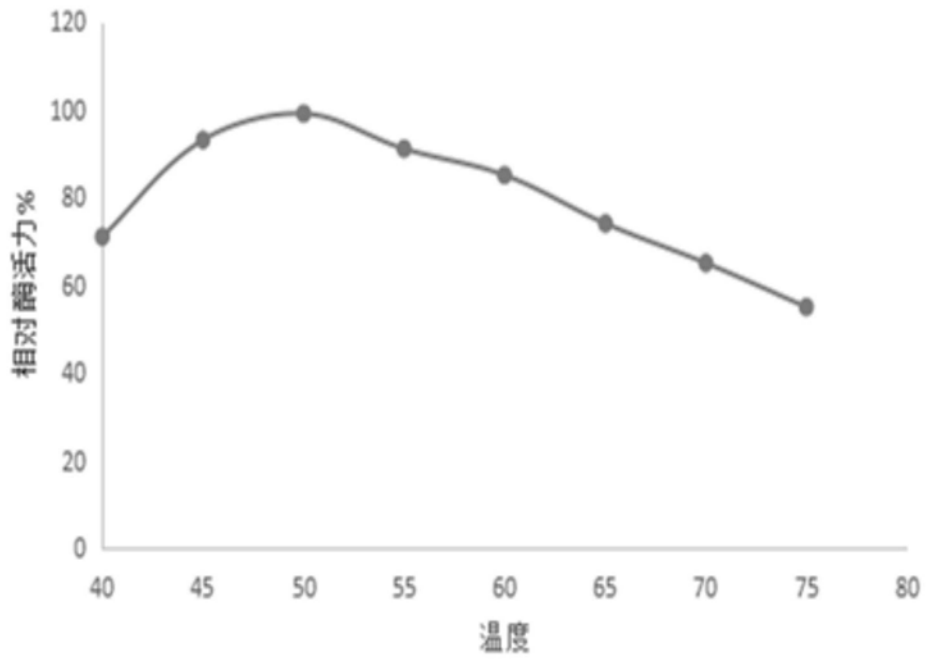


图3

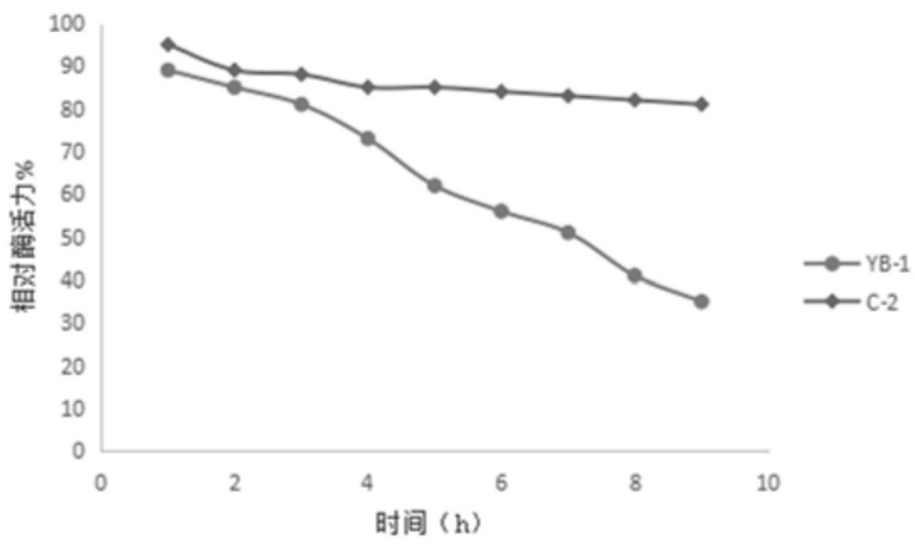


图4