



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118240671 A

(43) 申请公布日 2024.06.25

(21) 申请号 202410503273.1

C07K 14/37 (2006.01)

(22) 申请日 2019.07.29

C12P 21/02 (2006.01)

(30) 优先权数据

C12N 9/42 (2006.01)

2018-142425 2018.07.30 JP

C12R 1/885 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

201980050357.1 2019.07.29

(71) 申请人 东丽株式会社

地址 日本

(72) 发明人 加川雄介 平松绅吾 山田胜成

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

专利代理师 曾祯 段承恩

(51) Int. Cl.

C12N 1/15 (2006.01)

C12N 15/31 (2006.01)

权利要求书1页 说明书12页

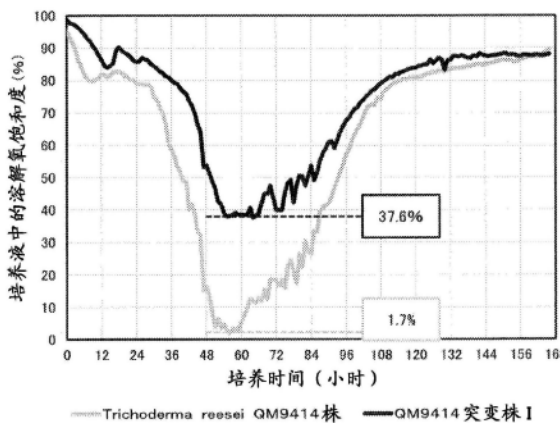
序列表(电子公布) 附图4页

(54) 发明名称

木霉属丝状菌的突变株和蛋白质的制造方法

(57) 摘要

本发明是具有 β -衔接蛋白大亚基的功能缺损或降低的突变、或者构成 β -衔接蛋白大亚基的氨基酸序列中具有突变的木霉属丝状菌的突变株,以及使用该突变株在将培养中的培养液的粘度保持得较低的同时生产蛋白质的方法。



1. 木霉属丝状菌突变株,其特征在于,具有 β -衔接蛋白大亚基的功能缺失或降低的突变,该突变株的培养液的粘度与不具有 β -衔接蛋白大亚基的功能缺失或降低的突变的亲本株相比降低,

构成所述 β -衔接蛋白大亚基的氨基酸序列是序列号2~10所示的氨基酸序列的任一者。

2. 根据权利要求1所述的木霉属丝状菌突变株,所述木霉属丝状菌是里氏木霉(*Trichoderma reesei*)。

3. 蛋白质的制造方法,包括:培养权利要求1或2所述的木霉属丝状菌突变株的工序。

4. 纤维素酶的制造方法,包括:培养权利要求1或2所述的木霉属丝状菌突变株的工序。

木霉属丝状菌的突变株和蛋白质的制造方法

[0001] 本申请是申请日为2019年7月29日、申请号为201980050357.1、发明名称为“木霉属丝状菌的突变株和蛋白质的制造方法”的专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及能够将培养液的粘度保持得较低的木霉属丝状菌的突变株和使用该突变株的蛋白质的制造方法。

背景技术

[0003] 已知木霉属丝状菌具有高的蛋白质制造能力,一直以来进行了使用木霉属丝状菌的蛋白质的制造的研究。具体地,木霉属丝状菌以纤维素、乳糖、纤维二糖等作为诱导物质,在蛋白质之中特别是制造被分类为糖化酶的纤维素酶。为了强化纤维素酶制造量,自古以来对于以控制纤维素酶制造的因子的过表达、缺损为代表的基因的改变、培养条件的最优化等进行了大量研究。

[0004] 另一方面,木霉属丝状菌属于生长繁殖、蛋白质的制造需要氧的好氧性丝状菌。另外,木霉属丝状菌具有如果在液体培养基中培养,则随着增殖而培养液的粘度提高这样的特征。如果培养液的粘度提高,则氧、营养素的分布变得不均匀,在培养木霉属丝状菌时,需要搅拌培养液、增加氧供应量来防止培养中的溶解氧饱和度的降低,将其维持在一定以上。另外,如果培养槽大型化,则氧体积传递系数降低,因此为了将培养中的溶解氧饱和度保持一定以上,需要进一步增加搅拌数、氧供应量。然而,如果增加搅拌数,则存在付与菌体以大的剪切损伤这样的课题,还存在为了增加氧供应量而需要大的能量这样的课题。

[0005] 专利文献1~6中分别公开了通过使木霉属丝状菌的Sfb3、Mpg1、Gas1、Seb1、Crz1和Tps1的蛋白质的破坏或生成减少,与亲本株相比能够以更低的搅拌数维持深层培养中的好氧性发酵时的溶解氧量。另外,专利文献7中记载,如果破坏木霉属丝状菌的BXL1基因,则能够抑制培养液的溶解氧饱和度的降低。

[0006] 现有技术文献

[0007] 专利文献

[0008] 专利文献1:日本特表2013-533751号公报

[0009] 专利文献2:日本特表2014-513529号公报

[0010] 专利文献3:日本特表2014-513530号公报

[0011] 专利文献4:日本特表2014-513531号公报

[0012] 专利文献5:日本特表2014-513532号公报

[0013] 专利文献6:日本特表2014-513533号公报

[0014] 专利文献7:国际公开第2017/170917号

发明内容

[0015] 发明要解决的课题

[0016] 如上所述,使用木霉属丝状菌制造蛋白质时,抑制培养液中的溶解氧浓度的降低、将其保持在一定以上是非常重要的。本发明中,考虑到如果在使用木霉属丝状菌利用液体培养制造蛋白质时,能够将培养液的粘度保持得较低,则即使在将培养规模大型化的情况下,也能够降低搅拌所需的能量,并能够抑制培养液中的溶解氧饱和度的降低,因此本发明以获得使培养液的粘度降低的木霉属丝状菌的突变株和提供使用该木霉属丝状菌的突变株的蛋白质的制造方法为课题。

[0017] 用于解决课题的手段

[0018] 本发明者为了特定能够将培养液的粘度保持得较低的木霉属丝状菌的基因而进行了深入研究,结果发现, β -衔接蛋白大亚基(beta-adaptin large subunit)的突变能够将培养液的粘度保持得较低,进而能够抑制培养液中的溶解氧饱和度的降低,从而完成了本发明。

[0019] 即,本发明由以下(1)~(8)构成。

[0020] (1) 木霉属丝状菌突变株,其特征在于,具有 β -衔接蛋白大亚基的功能缺失或降低的突变,该突变株的培养液的粘度与不具有 β -衔接蛋白大亚基的功能缺失或降低的突变的亲本株相比降低。

[0021] (2) 木霉属丝状菌突变株,其特征在于,构成 β -衔接蛋白大亚基的氨基酸序列中具有突变,该突变株的培养液的粘度与构成 β -衔接蛋白大亚基的氨基酸序列中不具有突变的亲本株相比降低。

[0022] (3) 根据(2)所述的木霉属丝状菌突变株,所述氨基酸序列的突变是构成 β -衔接蛋白大亚基的氨基酸序列的从N末端侧起第300位的谷氨酰胺残基向除谷氨酰胺以外的氨基酸残基的突变。

[0023] (4) 根据(3)所述的木霉属丝状菌突变株,所述除谷氨酰胺以外的氨基酸残基是赖氨酸。

[0024] (5) 根据(1)~(4)的任一项所述的木霉属丝状菌突变株,所述构成 β -衔接蛋白大亚基的氨基酸序列是序列号2~10所示的氨基酸序列的任一者。

[0025] (6) 根据(1)~(5)的任一项所述的木霉属丝状菌突变株,所述木霉属丝状菌是里氏木霉(*Trichoderma reesei*)。

[0026] (7) 蛋白质的制造方法,包括:培养(1)~(6)的任一项所述的木霉属丝状菌突变株的工序。

[0027] (8) 纤维素酶的制造方法,包括:培养(1)~(6)的任一项所述的木霉属丝状菌突变株的工序。

[0028] 发明的效果

[0029] 本发明的木霉属丝状菌突变株与突变导入前的亲本株相比能够将培养液的粘度保持得较低,还能够抑制培养液中的溶解氧饱和度的降低。进而,还得到了蛋白质、特别是纤维素酶的制造量也提高这样的预料外的效果。

附图说明

[0030] 图1-1:构成木霉属丝状菌所具有的 β -衔接蛋白大亚基的全长氨基酸序列的比较。

[0031] 图1-2:构成木霉属丝状菌所具有的 β -衔接蛋白大亚基的全长氨基酸序列的比较。

[0032] 图2:将里氏木霉(*Trichoderma reesei*)QM9414株和QM9414突变株I使用Arbocel B800培养时的培养液中的溶解氧饱和度的经时变化。

[0033] 图3:将里氏木霉(*Trichoderma reesei*)QM9414株和QM9414突变株I使用Arbocel B800培养时的培养液中的粘度的经时变化。

[0034] 图4:将里氏木霉(*Trichoderma reesei*)QM9414株和QM9414突变株II使用Arbocel B800培养时的培养液中的溶解氧饱和度的经时变化。

[0035] 图5:将里氏木霉(*Trichoderma reesei*)QM9414株和QM9414突变株II使用Arbocel B800培养时的培养液中的粘度的经时变化。

具体实施方式

[0036] 本发明具有通过在作为本来蛋白质的制造能力优异的微生物的木霉属丝状菌的亲本株中导入突变,而能够将培养液的粘度保持得较低的特征。因此,本发明中使用的木霉属丝状菌的亲本株不限于野生株,以蛋白质制造能力提高的方式进行了改良的木霉属丝状菌的突变株也优选作为亲本株使用。例如,木霉属丝状菌的突变株中,可以利用通过诱变剂、紫外线照射等施加突变处理从而蛋白质的制造性提高了的突变株作为上述亲本株。

[0037] 作为所述亲本株的具体例,可列举相当于里氏木霉(*Trichoderma reesei*)的祖先的*Trichoderma parareesei*(ATCC MYA-4777)、作为属于里氏木霉(*Trichoderma reesei*)的公知的突变株的QM6a株(NBRC31326)、QM9123株(ATCC24449)、QM9414株(NBRC31329)、PC-3-7株(ATCC66589)、QM9123株(NBRC31327)、RutC-30株(ATCC56765)、CL-847株(*Enzyme.Microbiol.Technol.*10,341-346(1988))、MCG77株(*Biotechnol.Bioeng.Symp.*8,89(1978))、MCG80株(*Biotechnol.Bioeng.*12,451-459(1982))、橘绿木霉(*Trichoderma citrinoviride*)(ATCC24961)、长枝木霉(*Trichoderma longibrachiatum*)(ATCC18648)、绿木霉(*Trichoderma virens*)(ATCC9645)、深绿木霉(*Trichoderma atroviride*)(ATCC20476)、盖姆斯木霉(*Trichoderma gamsii*)(NFCCI2177)、棘孢木霉(*Trichoderma asperellum*)(ATCC52438)、哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)(ATCC20846)、生防木霉(*Trichoderma guizhouense*)等。此外,QM6a株、QM9414株、QM9123株从NBRC(NITE Biological Resource Center)获得,PC-3-7株、RutC-30株、橘绿木霉(*Trichoderma citrinoviride*)、长枝木霉(*Trichoderma longibrachiatum*)、绿木霉(*Trichoderma virens*)、深绿木霉(*Trichoderma atroviride*)、棘孢木霉(*Trichoderma asperellum*)、哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)从ATCC(American Type Culture Collection)获得,盖姆斯木霉(*Trichoderma gamsii*)从NFCCI(National Fungal Culture Collection of India)获得。这些具体例中,作为亲本株特别优选使用的是属于里氏木霉(*Trichoderma reesei*)的菌株。

[0038] β -衔接蛋白大亚基是构成衔接体蛋白质复合物的蛋白质之一,该衔接体蛋白质复合物由4聚体构成。衔接体蛋白质复合物在真核生物中广泛保守。已知该衔接体蛋白质与网格蛋白结合,构成参与细胞内外、菌体内外的运输的囊泡(*Proc.Nati.Acad.Sci.USA.*101,14108-14113(2004))。

[0039] 作为木霉属丝状菌所具有的 β -衔接蛋白大亚基的具体例,优选为包含序列号2~10的任一项所示的氨基酸序列的多肽。序列号2所示的氨基酸序列是里氏木霉

(*Trichoderma reesei*) 来源, 序列号3所示的氨基酸序列是橘绿木霉 (*Trichoderma citrinoviride*) 来源, 序列号4所示的氨基酸序列是长枝木霉 (*Trichoderma longibrachiatum*) 来源, 序列号5所示的氨基酸序列是绿木霉 (*Trichoderma virens*) 来源, 序列号6所示的氨基酸序列是深绿木霉 (*Trichoderma atroviride*) 来源, 序列号7所示的氨基酸序列是盖姆斯木霉 (*Trichoderma gamsii*) 来源, 序列号8所示的氨基酸序列是棘孢木霉 (*Trichoderma asperellum*) 来源, 序列号9所示的氨基酸序列是哈茨木霉 (*Trichoderma harzianum*) 来源, 序列号10所示的氨基酸序列是生防木霉 (*Trichoderma guizhouense*) 来源。其中, 将序列号2~10所示的氨基酸序列的比对结果示于图1-1和图1-2。如图1-1和图1-2所示可知, 序列号2~10的序列同一性为90%以上, β -衔接蛋白大亚基在木霉属丝状菌中氨基酸的序列保守性高。另外, 如图1-1所示, 作为序列号2~10所示的氨基酸序列的从N末端侧起第300位的氨基酸残基, 谷氨酰胺残基共同地保守。以下, 以序列号2为例进一步说明其特征。

[0040] 包含序列号2所示的氨基酸序列的多肽如上所述是里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 所具有的多肽, 在National Center for Biotechnology Information (NCBI, 美国国家生物信息中心) 中, 作为里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) QM6a株所具有的衔接体蛋白质 (AP-1) 复合物 β -衔接蛋白大亚基 (EGR48910) 登记。另外, 根据National Center for Biotechnology Information的Conserved Domain Architecture Retrieval Tool (保守结构域功能区检索工具), 公开了从N末端侧起第14~531位的氨基酸残基具有衔接蛋白N末端区结构域。

[0041] 本发明中的构成 β -衔接蛋白大亚基的氨基酸序列中具有突变, 可以是氨基酸的缺失、替换、或添加的任一种。优选为序列号2~10的任一项所示的氨基酸序列的从N末端侧起第300位的谷氨酰胺残基突变为除谷氨酰胺以外的氨基酸残基, 特别优选突变为赖氨酸。

[0042] 作为编码包含序列号2所示的氨基酸序列的多肽的基因的具体例, 可列举序列号1所示的碱基序列。

[0043] 作为编码序列号2所示的氨基酸序列的从N末端侧起第300位的谷氨酰胺残基突变为除谷氨酰胺以外的氨基酸残基的氨基酸序列的碱基序列的具体例, 可列举序列号1所示的碱基序列中作为第1080位碱基的胞嘧啶突变为腺嘌呤的序列。通过该突变, 序列号2所示的氨基酸序列的从N末端侧起第300位的氨基酸残基从谷氨酰胺突变为赖氨酸。

[0044] 另外, 本发明的木霉属丝状菌的突变株可以是 β -衔接蛋白大亚基的功能缺损或降低的突变株。

[0045] β -衔接蛋白大亚基的功能缺损是指其多肽全部消失、一部分消失、全部变成不同的氨基酸、一部分变成不同的氨基酸、或这些的组合。更具体地, 是指在序列号2所示的氨基酸序列中, 与上述所示的 β -衔接蛋白大亚基的氨基酸序列的序列同一性变为80%以下, 优选为50%以下, 进一步优选为20%以下, 进一步优选为10%以下, 进一步优选为5%以下, 进一步优选为3%以下, 进一步优选为1%以下, 最优选为0%。作为使 β -衔接蛋白大亚基的全部缺损、一部分缺损、全部变成不同的氨基酸、一部分变成不同的氨基酸的方法, 可列举针对编码包含序列号2所示的氨基酸序列的多肽的基因序列由碱基的缺失、插入、替换等产生的移码或终止密码子突变。

[0046] 作为 β -衔接蛋白大亚基的功能降低, 可列举 β -衔接蛋白大亚基全部缺损、一部分

缺损,另外,通过导入使 β -衔接蛋白大亚基的表达量降低或表达量消失的突变,也能够降低 β -衔接蛋白大亚基的功能。 β -衔接蛋白大亚基的表达量的降低或表达消失通过编码 β -衔接蛋白大亚基的基因的启动子、终止子区域的突变来进行。一般地,启动子和终止子区域相当于参与转录的基因的前后数百碱基的区域。已知即使在构成 β -衔接蛋白大亚基的氨基酸序列自身不发生氨基酸的缺失、替换、或添加等突变的情况下,通过位于 β -衔接蛋白大亚基外的氨基酸序列中发生氨基酸的缺失、替换、或添加等突变,从而蛋白质的功能也降低。另外,已知即使在编码 β -衔接蛋白大亚基的基因自身不发生碱基的缺失、替换、或添加等突变的情况下,通过位于编码 β -衔接蛋白大亚基的基因外的碱基序列中发生碱基的缺失、替换、或添加等突变,蛋白质的功能也降低。

[0047] β -衔接蛋白大亚基的功能缺损或降低的突变、或者在构成 β -衔接蛋白大亚基的氨基酸序列中导入突变的方法可以使用对于本领域技术人员来说公知的利用诱变剂或紫外线照射等的突变处理、使用选择标志物的同源重组等基因重组、利用转座子的突变等公知的基因突变方法。

[0048] 本发明的木霉属丝状菌的突变株与该突变导入前的亲本株相比,培养液的粘度降低,培养液中的溶解氧饱和度的降低也能够被抑制。由此,能够降低通气搅拌所需的能量、旋转数。另外,因为能够将搅拌的旋转数设定得较低,所以也能够降低对菌丝的剪切损伤。特别是在大规模下培养时,能够实现通气所需的鼓风机、搅拌电动机的容量、搅拌能量的削减。

[0049] 本发明中,培养液的粘度使用在以下条件下测定的值,粘度的比较将在以下条件下测定的值中的最大值彼此比较。首先,将作为评价对象的木霉属丝状菌的突变株和亲本株的孢子以每1mL预培养培养基中 1.0×10^5 孢子的方式接种到预培养培养基(具体的培养基组成的一例如实施例中的表1)中,用振荡培养机在28℃、120rpm的条件下进行培养直到菌体量为11g/L左右。接下来,相对于以100g/L(w/v)添加了Arbocel1 B800(レッテンマイヤー社制)的表2所示的主培养培养基,以10%(v/v)接种预培养培养基,使用5L缸式发酵槽进行深层培养。培养条件是,在主培养培养基中接种预培养培养基后,以28℃、700rpm、通气量100mL/min的培养条件一边控制pH5.0一边进行深层培养。培养液的粘度的测定使用数字型旋转粘度计。数字型旋转粘度计预先进行0点校准。将从培养开始起39、48、62、72、86、96、111小时后的刚刚采集之后的培养液分别在指定容器中采集16mL,在培养液浸入转轴(spindle)以0.3rpm的旋转数使其旋转,在室温条件下测定作为此时的转轴工作的粘性阻抗的扭矩,从而测定培养液的粘度。粘度的单位为厘泊(cP)。1泊定义为当流体内对于1cm有1cm/秒的速度梯度时,在与该速度梯度的方向垂直的面上对于速度的方向 1cm^2 产生1达因的力的大小的应力的粘度。数字型旋转粘度计使用DV2T(BROOKFIELD社)、转轴使用UL ADAPTOR(BROOKFIELD社)等。

[0050] 如果将本发明的木霉属丝状菌的突变株与将该突变导入前的亲本株在同样的条件下培养时相比较,则突变株与亲本株相比,培养液的粘度变低,培养中的粘度的最大值优选降低100cP以上、更优选降低200cP以上、更优选降低400cP以上、更优选降低500cP以上、进一步优选降低600cP以上、进一步优选降低700cP以上、进一步优选降低800cP以上、进一步优选降低900cP以上、特别优选降低1000cP以上。

[0051] 培养液中的溶解氧饱和度可以通过测定培养液中的氧利用速率来计算出。本发明

中的氧利用速率 (mM/L/hr) 是指培养开始24小时后的每单位时间、每1L培养液的氧消耗速率。具体的计算方法是,将培养条件保持一定进行培养,在培养开始后24小时的时刻停止氧的供应,每隔10秒将溶解氧 (mg/L) 的值 (D0值) 绘图,对于在该曲线中对数地减少的3点以上的绘图点,求出其斜率 (A) (单位;D0/sec)。氧利用速率的计算中,公式使用以下所示的式1。

[0052] 氧利用速率 (mM/L/hr) = $(-A) \times (1/32) \times 60 \times 60 \dots$ (式1)。

[0053] D0值的测定使用市售的D0计。对所使用的D0计不特别限制,只要能够正确地测定D0值即可。作为例子,可列举密闭型D0电极 (エイブル株式会社制)、溶解氧传感器 (メトラー・トレド株式会社制) 等。D0计预先进行0点校准和量程校准。0点校准使用亚硫酸钠2%溶液进行。量程校准在实际培养的条件下在不存在菌体的状态下进行通气、搅拌,等待至溶解氧饱和,然后确认计器的指示值稳定,根据该温度下的饱和溶解氧进行校准。另外,在将培养槽加压进行D0测定时,需要进行压力修正。进而,在培养槽较大的情况下需要进行静水压力修正。进行修正时,使用以下所示的式2进行计算。

[0054] $D = D0(1 + \alpha + \beta) \dots$ (式2)

[0055] D: 修正后的饱和溶解氧

[0056] D0: 1大气压、纯水中的饱和溶解氧

[0057] α : 表压 (kg/cm²)

[0058] β : 静水压 (D0计安装位置的液深 (m) / 10)。

[0059] 溶解氧饱和度使用不含菌的培养基,将pH、温度设定为培养条件,将以通气空气时的溶解氧的饱和状态作为100%的情况下的、培养期间的溶解氧相对于饱和溶解氧的比例作为溶解氧饱和度计算出。溶解氧 (mg/L) 表示溶解在水中的氧的浓度。饱和溶解氧是指在实际进行培养的培养条件下,在不存在菌体的状态下进行通气、搅拌,溶解氧变为一定的状态下的溶解氧。另外,在计算溶解氧饱和度时,培养期间不要使通气条件等培养条件变化。如果氧需求性降低,则溶解氧饱和度增加。溶解氧饱和度按照以下式3计算。

[0060] 溶解氧饱和度 (%) = $(\text{培养中的溶解氧}) / (\text{培养开始前的饱和溶解氧}) \times 100 \dots$ (式3)。

[0061] 在比较溶解氧饱和度时,将最小值彼此比较。

[0062] 在比较氧利用速率、溶解氧饱和度时,使用使培养基、氧供应量、搅拌速度、温度、培养容量、接菌量等培养条件一致而测定的结果。测定时的接菌量相对于主培养液优选为10% (v/v) 左右。

[0063] 如果将本发明的木霉属丝状菌的突变株和该突变导入前的亲本株的溶解氧在同样的条件培养,则突变株与亲本株相比溶解氧饱和度的最小值变高,优选变高5%以上、进一步优选变高6%以上、进一步优选变高7%以上、进一步优选变高8%以上、进一步优选变高9%以上、进一步优选变高10%以上、进一步优选变高11%以上、进一步优选变高12%以上、进一步优选变高13%以上、进一步优选变高14%以上、特别优选变高15%以上。

[0064] 本发明的木霉属丝状菌的突变株优选与该突变导入前的亲本株相比增殖能力不降低。增殖能力的差异可以通过测定菌体量来比较。菌体量作为干燥菌体重量测定。将培养液10mL使用定性滤纸 (等级4、GEヘルスケア社) 进行抽吸过滤,使残渣与滤纸一起在100°C干燥。然后测定重量,将过滤前后的滤纸的重量差作为干燥菌体重量。

[0065] 本发明的木霉属丝状菌的突变株除了 β -衔接蛋白大亚基的功能缺损或降低的突

变、或者构成 β -衔接蛋白大亚基的氨基酸序列的突变以外,还可以具有蛋白质制造量提高的基因突变。具体地,可列举序列号11和/或序列号13所示的多肽的功能降低的基因突变。

[0066] 包含序列号11所示的氨基酸序列的多肽是里氏木霉(*Trichoderma reesei*)所具有的多肽,在National Center for Biotechnology Information(NCBI,美国国家生物信息中心)中,也作为里氏木霉(*Trichoderma reesei*)QM6a株所具有的预测蛋白(predicted protein)EGR50654登记。包含序列号11所示的氨基酸序列的多肽是功能未知的多肽,但根据National Center for Biotechnology Information的Conserved Domain Architecture Retrieval Tool(保守结构域功能区检索工具),公开了从N末端侧起第95~277位的氨基酸残基具有Middledomain of eukaryotic initiation factor 4G结构域(真核起始因子4G的中间结构域,以后记载为MIF4G结构域),从N末端侧起第380~485位的氨基酸残基具有MA-3结构域。已知MIF4G和MA-3这两个结构域具有与DNA或RNA结合的功能(Biochem.44,12265-12272(2005),Mol.Cell.Biol.1,147-156(2007))。根据这些记载推定包含序列号11所示的氨基酸序列的多肽至少具有与DNA和/或RNA结合的功能。

[0067] 作为编码包含序列号11所示的氨基酸序列的多肽的基因的具体例,可列举序列号12所示的碱基序列。作为EGR50654的功能降低的基因突变,可列举EGR50654所具有的MIF4G结构域和/或MA-3结构域的全部缺损、MIF4G结构域和/或MA-3结构域的一部分缺损、MIF4G结构域与MA-3结构域的立体构型关系变化的基因突变。进而,通过导入使包含序列号11所示的氨基酸序列的多肽的表达量降低、消失的突变也能够使该多肽的功能降低。作为包含序列号11所示的氨基酸序列的多肽的功能缺损的具体例,可列举在序列号12所示的碱基序列中第1039位至第1044位的任一碱基缺失的突变。

[0068] 包含序列号13所示的氨基酸序列的多肽是里氏木霉(*Trichoderma reesei*)所具有的多肽,在National Center for Biotechnology Information(NCBI,美国国家生物信息中心)中,也作为里氏木霉(*Trichoderma reesei*)QM6a株所具有的预测蛋白(predicted protein)EGR44419登记。包含序列号13所示的氨基酸序列的多肽是功能未知的多肽,但根据National Center for Biotechnology Information的Conserved Domain Architecture Retrieval Tool(保守结构域功能区检索工具),公开了从N末端侧起第26~499位的氨基酸残基具有糖(及其他)转运蛋白结构域。由该记载推定包含序列号13所示的氨基酸序列的多肽至少参与菌体的内侧与外侧之间的糖的运输。

[0069] 作为编码包含序列号13所示的氨基酸序列的多肽的基因的具体例,可列举序列号14所示的碱基序列。作为EGR44419的功能降低的基因突变,可列举EGR44419所具有的糖(及其他)转运蛋白结构域的全部缺损、糖(及其他)转运蛋白结构域的一部分缺损、糖(及其他)转运蛋白结构域的构型关系变化的基因突变。进而,通过导入使包含序列号13所示的氨基酸序列的多肽的表达量降低、消失的突变也能够使该多肽的功能降低。作为包含序列号13所示的氨基酸序列的多肽的功能缺损的具体例,可列举在序列号14所示的碱基序列中第1415位插入11个碱基的突变。

[0070] 另外,本发明涉及蛋白质的制造方法,包括培养构成 β -衔接蛋白大亚基的氨基酸序列具有突变的木霉属丝状菌的突变株的工序。

[0071] 在本发明的方法中,能够有效地制造被分泌到菌体外的蛋白质。对所制造的蛋白质无限制,但优选为酶,更优选为纤维素酶、淀粉酶、转化酶、几丁质酶、果胶酶等糖化酶,特

别优选为纤维素酶。

[0072] 本发明中制造的纤维素酶包含各种水解酶,包含具有对木聚糖、纤维素、半纤维素的分解活性的酶等。作为具体例,可列举通过水解纤维素链来制造纤维二糖的纤维二糖水解酶(EC 3.2.1.91)、从纤维素链的中央部分开始水解的内切葡聚糖酶(EC 3.2.1.4)、水解纤维寡糖和纤维二糖的 β -葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.21)、以作用于半纤维素特别是木聚糖为特征的木聚糖酶(EC 3.2.1.8)、水解木寡糖的 β -木糖苷酶(EC 3.2.1.37)等。

[0073] 纤维素酶的蛋白质浓度如下进行测定。将通过用本发明的方法培养木霉属丝状菌而得的培养液以 $15000 \times g$ 离心分离10分钟,将上清作为纤维素酶溶液。在Quick Start Bradford蛋白测定(Bio-Rad社制)250 μ L中添加稀释后的纤维素酶溶液5 μ L,测定室温静置15分钟后在595nm使用的吸光度。以牛血清白蛋白溶液作为标准液,基于标准曲线计算糖化酶溶液所包含的蛋白质浓度。

[0074] 对本发明中培养木霉属丝状菌的培养方法不特别限定,例如,可以通过使用离心沉降管、烧瓶、缸式发酵槽、罐等的液体培养、或使用板等的固体培养等来进行培养。木霉属丝状菌优选在好氧条件下进行培养,这些培养方法中,特别优选在缸式发酵槽、罐内一边进行通气、搅拌一边培养的深层培养。

[0075] 培养工序的培养基组成只要形成木霉属丝状菌能够制造蛋白质那样的培养基组成就不特别限制,可以采用木霉属细菌的周知的培养基组成。作为氮源,可使用例如,多聚胨、肉汁、CSL、大豆粕等。此外,该培养基中可以添加用于制造蛋白质的诱导物质。

[0076] 在通过本发明制造纤维素酶的情况下,可以用在培养基中包含选自乳糖、纤维素和木聚糖组成的组中的至少1种或2种以上的诱导剂的培养基进行培养。另外,纤维素、木聚糖可以添加包含纤维素、木聚糖的生物物质作为诱导物质。作为含有纤维素、木聚糖的生物物质的具体例,可以使用种子植物、蕨类植物、苔藓植物、藻类、水草等植物、以及废建材等。种子植物分类为裸子植物和被子植物,任一种都优选使用。被子植物进一步分类为单子叶植物和双子叶植物,作为单子叶植物的具体例,可列举甘蔗渣、柳枝稷、象草、蔗茅、玉米秸(玉米的茎叶)、玉米棒(玉米的芯)、稻秸、麦秸等,作为双子叶植物的具体例,可列举甜菜浆、桉树、栎树、白桦等。

[0077] 另外,包含纤维素、木聚糖的生物物质可以使用进行了前处理的。前处理方法不特别限定,可以使用例如,酸处理、硫酸处理、稀硫酸处理、碱处理、水热处理、亚临界处理、微粉碎处理、蒸煮处理等公知的手法。作为进行了这样的前处理的包含纤维素、木聚糖的生物物质,可以使用浆。

[0078] 对本发明的木霉属丝状菌的突变株的培养方法不特别限定,例如,可以通过使用离心沉降管、烧瓶、缸式发酵槽、罐等的液体培养、或使用板等的固体培养等来进行培养。在是里氏木霉(*Trichoderma reesei*)的突变株的情况下,优选在好氧条件下进行培养,特别优选在缸式发酵槽、罐内一边进行通气、搅拌一边培养的深层培养。通气量优选为0.1vvm~2.0vvm左右,更优选为0.3vvm~1.5vvm,特别优选为0.5vvm~1.0vvm。培养温度优选为25 $^{\circ}$ C~35 $^{\circ}$ C左右,更优选为25 $^{\circ}$ C~31 $^{\circ}$ C。培养中的pH条件优选为pH3.0~7.0,更优选为pH4.0~6.0。培养时间只要是进行到在能生产蛋白质的条件下回收的量的蛋白质积累的时间就不特别限制,通常为24~288小时、优选为24~240小时、更优选为36~240小时、进一步优选为36~192小时。

[0079] 对培养木霉属丝状菌的突变株而得的培养液所包含的蛋白质进行回收的方法不特别限定,可以从培养液中除去木霉属丝状菌的菌体,回收蛋白质。作为菌体的除去方法,可列举离心分离法、膜分离法、压滤法等为例。

[0080] 另外,在不从培养木霉属丝状菌的突变株而得的培养液除去菌体而制成蛋白质的溶解液利用的情况下,优选进行处理使得木霉属丝状菌的菌体在培养液中不能生长。作为进行处理使得菌体不能生长的方法,可列举热处理、药剂处理、酸/碱处理、UV处理等。

[0081] 在蛋白质是纤维素酶的这样的酶的情况下,可以将如上所述除去菌体或进行处理使得菌体不生长而得的培养液直接作为酶液利用。

[0082] 实施例

[0083] 以下列举实施例具体说明本发明。

[0084] <参考例1>蛋白质浓度测定方法

[0085] 使用蛋白质浓度测定试剂(Quick Start Bradford蛋白分析、Bio-Rad制)。在恢复室温的蛋白质浓度测定试剂250 μ L中添加稀释了的丝状菌的培养液5 μ L,用酶标仪测定室温静置5分钟后的595nm的吸光度。作为标准品使用BSA,根据标准曲线计算出蛋白质浓度。

[0086] <参考例2>溶解氧饱和度的计算

[0087] 溶解氧饱和度使用不含菌的培养基,将pH、温度设定为培养条件,将以通气空气时的溶解氧的饱和状态作为100%的情况下的、培养期间的溶解氧相对于饱和溶解氧的比例作为溶解氧饱和度计算出。DO计使用密闭型溶解氧电极SDOC-12F-L120(エイブル株式会社制)。

[0088] <参考例3>培养液的粘度的测定

[0089] 为了测定采集的培养液的粘度,将培养开始39、48、62、72、86、96、111小时后的培养液,使用数字型旋转粘度计DV2T和转轴UL ADAPTOR(BROOKFIELD社制),求出将旋转数设定为0.3rpm时的粘度(cP)。

[0090] <参考例4>菌体量的测定

[0091] 为了测定培养液中所含的菌体量,将培养液用滤纸抽吸过滤,将抽吸过滤前后的滤纸的干燥菌体重量的差作为菌体量。

[0092] <实施例1> β -衔接蛋白大亚基的功能降低了的里氏木霉(*Trichoderma reesei*) QM9414突变株I的制作

[0093] 作为包含编码在构成 β -衔接蛋白大亚基的氨基酸序列中插入了突变的包含序列号2所示的氨基酸序列的多肽的基因的DNA片段,制作包含序列号15所示的基因序列的DNA片段,通过将该DNA片段转化到里氏木霉(*Trichoderma reesei*) QM9414株中,从而制作 β -衔接蛋白大亚基的功能降低了的里氏木霉(*Trichoderma reesei*)的突变株。通过该方法,得到了具有在序列号1中第1080位的胞嘧啶变成腺嘌呤、在序列号2中第300位由谷氨酰胺变成赖氨酸的多肽的里氏木霉(*Trichoderma reesei*)的突变株。作为用于DNA片段导入的选择标志物,使用乙酰胺和能够分解乙酰胺的乙酰胺酶(AmdS)基因(amdS)。为了在包含amdS的DNA序列的上游和下游导入包含上述含序列号15所示的碱基序列的DNA片段,以添加与里氏木霉(*Trichoderma reesei*) QM9414株的基因序列同源的部分的方式制作突变导入用质粒。

[0094] 具体地,以将序列号16所示的合成的DNA片段用限制性酶KpnI和NotI处理而得的

DNA片段作为上游DNA片段。另外,使用按照常规方法从里氏木霉(*Trichoderma reesei*) QM9414株提取出的基因组DNA、和序列号17和18所示的寡聚DNA进行PCR,以将所得的扩增片段用限制性酶MluI和SpeI处理而得的DNA片段作为下游DNA片段,将上游和下游DNA片段分别使用KpnI和NotI、MluI和SpeI的限制性酶导入到插入有amdS的质粒中,构建突变导入用质粒。然后,将突变导入用质粒用限制性酶ApaI和AscI处理,用序列号15所示的得到的DNA片段转化里氏木霉(*Trichoderma reesei*) QM9414株(NBRC31329)。将所得的突变株作为QM9414突变株I在以下的实验中使用。

[0095] 此外,分子生物学的手法如Molecular cloning, laboratory manual, 1st, 2nd, 3rd (1989) 记载的那样进行。另外,转化使用作为标准手法的原生质体-PEG法,具体如Gene, 61, 165-176 (1987) 所记载的那样进行。

[0096] <实施例2> 使用QM9414突变株I的蛋白质的制造试验

[0097] (预培养)

[0098] 将实施例1中制作的QM9414突变株I的孢子用生理盐水稀释成 1.0×10^7 /mL,将该稀释孢子溶液2.5mL接种到装入表1所示的1L带挡板的烧瓶中的250mL的预培养培养基中,用振荡培养机在28℃、120rpm的条件下进行72小时培养。

[0099] 表1

	葡萄糖	20 g
	5×マルデルス溶液*	200 mL
	10×酒石酸铵溶液**	100 mL
	玉米浸出液	50 g
[0100]	微量元素溶液***	1 mL
	Tween 80	0.5 mL
	PE-M	1 mL
		(每 1L)

[0101] *5×マルデルス溶液为以下组成。

[0102] 7g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

[0103] 10g/L KH_2PO_4

[0104] 2g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

[0105] 1.5g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

[0106] **10×酒石酸铵溶液包含92g/L酒石酸铵。

[0107] ***微量元素溶液为以下组成。

[0108] 0.3g/L H_3BO_3

[0109] 1.3g/L $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

[0110] 5g/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

[0111] 2g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.4g/L $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

[0112] 10g/L ZnCl_2

[0113] (主培养)

[0114] 将Arbocel I B800 (レッテンマイヤー社) 添加到表2所示的主培养培养基中,使用

5L缸式发酵槽(バイオ社制)进行深层培养研究。将里氏木霉(*Trichoderma reesei*) QM9414株和实施例1中制成的QM9414突变株I的预培养液250mL接种到添加了Arbocel B800的主培养培养基2.5L中。培养条件是,在主培养培养基中接种预培养培养基后,以28℃、700rpm、通气量100mL/min的培养条件一边控制pH5.0一边进行深层培养。

[0115] 表2

Arbocel B800 (レッテンマイヤー社)	100 g
5×マルデルス溶液*	200 mL
玉米浸出液	25 g
[0116] 微量元素溶液***	1 mL
Tween 80	0.5 mL
PE-M	1 mL
	(每 1L)

[0117] *与表1相同。

[0118] ***与表1相同。

[0119] (培养液的采集)

[0120] 在培养开始39、48、62、72、86、96、111小时后分别采集20mL的培养液。将采集的培养液的一部分在15000×g、4℃的条件下进行10分钟离心分离而获得上清。将该上清用0.22 μm的过滤器过滤,以其滤液作为纤维素酶溶液而在以下实验中使用。

[0121] (蛋白质浓度的测定)

[0122] 使用参考例1中记载的手法,测定培养开始第96小时采集的培养液中的纤维素酶的蛋白质浓度。其结果是,与里氏木霉(*Trichoderma reesei*) QM9414株相比,QM9414突变株I的蛋白质浓度作为相对值高1.3倍。

[0123] (培养液中的溶解氧饱和度的测定)

[0124] 使用参考例2中记载的手法,测定培养液中的经时的溶解氧饱和度。其结果如图2所示,里氏木霉(*Trichoderma reesei*) QM9414株在培养开始后60小时左右,培养液中的溶解氧饱和度降低到作为最小值的1.7%;与此相对,QM9414突变株I的培养液中的溶解氧饱和度作为最小值为37.6%。

[0125] (培养液的粘度的测定)

[0126] 使用参考例3中记载的手法,测定培养液中的经时的粘度。其结果如图3所示,里氏木霉(*Trichoderma reesei*) QM9414株的最大粘度为1800cP以上;与此相对里氏木霉(*Trichoderma reesei*)突变株的最大粘度为800cP以下。由这些结果可知,QM9414突变株I能够将培养液中的粘度保持得较低,溶解氧饱和度的降低也被抑制。

[0127] (菌体量的测定)

[0128] 使用参考例4中记载的手法,在实施例2(预培养)的培养中,测定培养开始第72小时的培养液中所含的菌体量。其结果是,里氏木霉(*Trichoderma reesei*) QM9414株的菌体量为11.3g/L,QM9414突变株I的菌体量为11.0g/L,不能在两株间之间确认菌体量的差异。

[0129] <实施例3>β-衔接蛋白大亚基的功能降低了的里氏木霉(*Trichoderma reesei*) QM9414突变株II的制作

[0130] β -衔接蛋白大亚基的功能降低了的里氏木霉(*Trichoderma reesei*)的突变株通过制作包含序列号19所示的基因序列的DNA片段,将该DNA片段转化到里氏木霉(*Trichoderma reesei*)QM9414株中来制作。通过该方法,得到了在序列号1中第791位与第792位之间插入了amdS、 β -衔接蛋白大亚基的功能降低了的里氏木霉(*Trichoderma reesei*)的突变株。为了导入上述包含序列号19的DNA片段,以在包含amdS的DNA片段序列的上游和下游添加了与里氏木霉(*Trichoderma reesei*)QM9414株的基因序列同源的部分的方式,制作突变导入用质粒。

[0131] 具体地,使用按照常规方法从里氏木霉(*Trichoderma reesei*)QM9414株提取出的基因组DNA、和序列号20和21所示的寡聚DNA进行PCR,以将得到的扩增片段用限制性酶AflIII与NotI处理而得的DNA片段作为上游片段。另外,使用基因组DNA、和序列号22和23所示的寡聚DNA进行PCR,以将所得的扩增片段用限制性酶MluI和SpeI处理而得的DNA片段作为下游片段,将上游和下游DNA片段分别使用AflIII和NotI、MluI和SpeI的限制性酶导入到插入有amdS的质粒中,构建突变导入用质粒。然后,将突变导入用质粒用限制性酶AflIII和SpeI处理,用序列号19所示的得到的DNA片段如实施例1所记载那样对里氏木霉(*Trichoderma reesei*)QM9414株进行转化。将得到的里氏木霉(*Trichoderma reesei*)突变株作为QM9414突变株II在以下的实验中使用。

[0132] <实施例4>使用QM9414突变株II的蛋白质的制造试验

[0133] 除了代替实施例1中制作的QM9414突变株I使用QM9414突变株II以外,通过与实施例2同样的操作、条件进行培养,测定培养液中所含的蛋白质的浓度、培养液中的溶解氧饱和度和培养液的粘度。

[0134] (蛋白质浓度的测定)

[0135] 在以培养里氏木霉(*Trichoderma reesei*)QM9414株而得的培养液所含的蛋白质浓度作为1的情况下,QM9414突变株II的培养液所含的蛋白质浓度的相对值为1.4。由该结果可知,通过培养 β -衔接蛋白大亚基的功能降低了的里氏木霉(*Trichoderma reesei*),与不降低该蛋白质的功能的情况相比,能够提高蛋白质的制造量。

[0136] (培养液中的溶解氧饱和度的测定)

[0137] 使用参考例2中记载的手法,测定培养液中的经时的溶解氧饱和度。其结果如图4所示,里氏木霉(*Trichoderma reesei*)QM9414株在培养开始后60小时左右,培养液中的溶解氧饱和度降低到作为最小值的1.9%;与此相对,QM9414突变株II的培养液中的溶解氧饱和度作为最小值为27.7%。

[0138] (培养液的粘度的测定)

[0139] 使用参考例3中记载的手法,测定培养液中的经时的粘度。其结果如图5所示,里氏木霉(*Trichoderma reesei*)QM9414株的最大粘度为1900cP以上;与此相对,QM9414突变株II的最大粘度为1000cP以下。由这些结果可知,QM9414突变株II能够将培养液中的粘度保持得较低,溶解氧饱和度的降低也被抑制。

Trichoderma reesei	1	MAVNRIRGAFAPAFRRGETFFELRAGLVGQVAYERRRESIQRTIMANTLGRDVSALFFPFLK	60
Trichoderma citrinoviride	1	MAVNRIRGAFAPAFRRGETFFELRAGLVGQVAYERRRESIQRTIMANTLGRDVSALFFPFLK	60
Trichoderma longibrachiatum	1	MAVNRIRGAFAPAFRRGETFFELRAGLVGQVAYERRRESIQRTIMANTLGRDVSALFFPFLK	60
Trichoderma virens	1	MAVNRIRGAFAPAFRRGETFFELRAGLVGQVAYERRRESIQRTIMANTLGRDVSALFFPFLK	60
Trichoderma atroviride	1	MAVNRIRGAFAPAFRRGETFFELRAGLVGQVAYERRRESIQRTIMANTLGRDVSALFFPFLK	60
Trichoderma gamsii	1	MAVNRIRGAFAPAFRRGETFFELRAGLVGQVAYERRRESIQRTIMANTLGRDVSALFFPFLK	60
Trichoderma asperellum	1	MAVNRIRGAFAPAFRRGETFFELRAGLVGQVAYERRRESIQRTIMANTLGRDVSALFFPFLK	60
Trichoderma harzianum	1	MAVNRIRGAFAPAFRRGETFFELRAGLVGQVAYERRRESIQRTIMANTLGRDVSALFFPFLK	60
Trichoderma guizhouense	1	MAVNRIRGAFAPAFRRGETFFELRAGLVGQVAYERRRESIQRTIMANTLGRDVSALFFPFLK	60
Trichoderma reesei	61	IAASFDLQKRLVYLLMNYAKTHFDLCLAVNFFVQDSEDNPLVRALAIKTHGCIKVDK	120
Trichoderma citrinoviride	61	IAASFDLQKRLVYLLMNYAKTHFDLCLAVNFFVQDSEDNPLVRALAIKTHGCIKVDK	120
Trichoderma longibrachiatum	61	IAASFDLQKRLVYLLMNYAKTHFDLCLAVNFFVQDSEDNPLVRALAIKTHGCIKVDK	120
Trichoderma virens	61	IAASFDLQKRLVYLLMNYAKTHFDLCLAVNFFVQDSEDNPLVRALAIKTHGCIKVDK	120
Trichoderma atroviride	61	IAASFDLQKRLVYLLMNYAKTHFDLCLAVNFFVQDSEDNPLVRALAIKTHGCIKVDK	120
Trichoderma gamsii	61	IAASFDLQKRLVYLLMNYAKTHFDLCLAVNFFVQDSEDNPLVRALAIKTHGCIKVDK	120
Trichoderma asperellum	61	IAASFDLQKRLVYLLMNYAKTHFDLCLAVNFFVQDSEDNPLVRALAIKTHGCIKVDK	120
Trichoderma harzianum	61	IAASFDLQKRLVYLLMNYAKTHFDLCLAVNFFVQDSEDNPLVRALAIKTHGCIKVDK	120
Trichoderma guizhouense	61	IAASFDLQKRLVYLLMNYAKTHFDLCLAVNFFVQDSEDNPLVRALAIKTHGCIKVDK	120
Trichoderma reesei	121	MYVYMEEFLEKRLRDESPYVRETAALCVAKLFDLNEA-CIENGFTIENQEMIGDPPMNV	180
Trichoderma citrinoviride	121	MYVYMEEFLEKRLRDESPYVRETAALCVAKLFDLNEA-CIENGFTIENQEMIGDPPMNV	180
Trichoderma longibrachiatum	121	MYVYMEEFLEKRLRDESPYVRETAALCVAKLFDLNEA-CIENGFTIENQEMIGDPPMNV	180
Trichoderma virens	121	MYVYMEEFLEKRLRDESPYVRETAALCVAKLFDLNEA-CIENGFTIENQEMIGDPPMNV	180
Trichoderma atroviride	121	MYVYMEEFLEKRLRDESPYVRETAALCVAKLFDLNEA-CIENGFTIENQEMIGDPPMNV	180
Trichoderma gamsii	121	MYVYMEEFLEKRLRDESPYVRETAALCVAKLFDLNEA-CIENGFTIENQEMIGDPPMNV	180
Trichoderma asperellum	121	MYVYMEEFLEKRLRDESPYVRETAALCVAKLFDLNEA-CIENGFTIENQEMIGDPPMNV	180
Trichoderma harzianum	121	MYVYMEEFLEKRLRDESPYVRETAALCVAKLFDLNEA-CIENGFTIENQEMIGDPPMNV	180
Trichoderma guizhouense	121	MYVYMEEFLEKRLRDESPYVRETAALCVAKLFDLNEA-CIENGFTIENQEMIGDPPMNV	180
Trichoderma reesei	181	ANSYQALAEISSTAFETRALVTPHLEKLLMAMNCTEWGRITILTFLADYVADPPKES	240
Trichoderma citrinoviride	181	ANSYQALAEISSTAFETRALVTPHLEKLLMAMNCTEWGRITILTFLADYVADPPKES	240
Trichoderma longibrachiatum	181	ANSYQALAEISSTAFETRALVTPHLEKLLMAMNCTEWGRITILTFLADYVADPPKES	240
Trichoderma virens	181	ANSYQALAEISSTAFETRALVTPHLEKLLMAMNCTEWGRITILTFLADYVADPPKES	240
Trichoderma atroviride	181	ANSYQALAEISSTAFETRALVTPHLEKLLMAMNCTEWGRITILTFLADYVADPPKES	240
Trichoderma gamsii	181	ANSYQALAEISSTAFETRALVTPHLEKLLMAMNCTEWGRITILTFLADYVADPPKES	240
Trichoderma asperellum	181	ANSYQALAEISSTAFETRALVTPHLEKLLMAMNCTEWGRITILTFLADYVADPPKES	240
Trichoderma harzianum	181	ANSYQALAEISSTAFETRALVTPHLEKLLMAMNCTEWGRITILTFLADYVADPPKES	240
Trichoderma guizhouense	181	ANSYQALAEISSTAFETRALVTPHLEKLLMAMNCTEWGRITILTFLADYVADPPKES	240
Trichoderma reesei	241	EHICERVIPQFQVNPSTVLAAYVVFIRKSNHNPILVRSYLKMAAPFLVTLVAGSDEVQ	300
Trichoderma citrinoviride	241	EHICERVIPQFQVNPSTVLAAYVVFIRKSNHNPILVRSYLKMAAPFLVTLVAGSDEVQ	300
Trichoderma longibrachiatum	241	EHICERVIPQFQVNPSTVLAAYVVFIRKSNHNPILVRSYLKMAAPFLVTLVAGSDEVQ	300
Trichoderma virens	241	EHICERVIPQFQVNPSTVLAAYVVFIRKSNHNPILVRSYLKMAAPFLVTLVAGSDEVQ	300
Trichoderma atroviride	241	EHICERVIPQFQVNPSTVLAAYVVFIRKSNHNPILVRSYLKMAAPFLVTLVAGSDEVQ	300
Trichoderma gamsii	241	EHICERVIPQFQVNPSTVLAAYVVFIRKSNHNPILVRSYLKMAAPFLVTLVAGSDEVQ	300
Trichoderma asperellum	241	EHICERVIPQFQVNPSTVLAAYVVFIRKSNHNPILVRSYLKMAAPFLVTLVAGSDEVQ	300
Trichoderma harzianum	241	EHICERVIPQFQVNPSTVLAAYVVFIRKSNHNPILVRSYLKMAAPFLVTLVAGSDEVQ	300
Trichoderma guizhouense	241	EHICERVIPQFQVNPSTVLAAYVVFIRKSNHNPILVRSYLKMAAPFLVTLVAGSDEVQ	300
Trichoderma reesei	301	VVALPNIDLLQAKFDLSEKELVFFCKYNDPFTYKQKLEIMVRIANEENYQLDLEL	360
Trichoderma citrinoviride	301	VVALPNIDLLQAKFDLSEKELVFFCKYNDPFTYKQKLEIMVRIANEENYQLDLEL	360
Trichoderma longibrachiatum	301	VVALPNIDLLQAKFDLSEKELVFFCKYNDPFTYKQKLEIMVRIANEENYQLDLEL	360
Trichoderma virens	301	VVALPNIDLLQAKFDLSEKELVFFCKYNDPFTYKQKLEIMVRIANEENYQLDLEL	360
Trichoderma atroviride	301	VVALPNIDLLQAKFDLSEKELVFFCKYNDPFTYKQKLEIMVRIANEENYQLDLEL	360
Trichoderma gamsii	301	VVALPNIDLLQAKFDLSEKELVFFCKYNDPFTYKQKLEIMVRIANEENYQLDLEL	360
Trichoderma asperellum	301	VVALPNIDLLQAKFDLSEKELVFFCKYNDPFTYKQKLEIMVRIANEENYQLDLEL	360
Trichoderma harzianum	301	VVALPNIDLLQAKFDLSEKELVFFCKYNDPFTYKQKLEIMVRIANEENYQLDLEL	360
Trichoderma guizhouense	301	VVALPNIDLLQAKFDLSEKELVFFCKYNDPFTYKQKLEIMVRIANEENYQLDLEL	360
Trichoderma reesei	361	EYALEVMDPFRRAIKAGQVAIKIEGASGKQVCALEDLLATVNYVYVQGVVYIKDILR	420
Trichoderma citrinoviride	361	EYALEVMDPFRRAIKAGQVAIKIEGASGKQVCALEDLLATVNYVYVQGVVYIKDILR	420
Trichoderma longibrachiatum	361	EYALEVMDPFRRAIKAGQVAIKIEGASGKQVCALEDLLATVNYVYVQGVVYIKDILR	420
Trichoderma virens	361	EYALEVMDPFRRAIKAGQVAIKIEGASGKQVCALEDLLATVNYVYVQGVVYIKDILR	420
Trichoderma atroviride	361	EYALEVMDPFRRAIKAGQVAIKIEGASGKQVCALEDLLATVNYVYVQGVVYIKDILR	420
Trichoderma gamsii	361	EYALEVMDPFRRAIKAGQVAIKIEGASGKQVCALEDLLATVNYVYVQGVVYIKDILR	420
Trichoderma asperellum	361	EYALEVMDPFRRAIKAGQVAIKIEGASGKQVCALEDLLATVNYVYVQGVVYIKDILR	420
Trichoderma harzianum	361	EYALEVMDPFRRAIKAGQVAIKIEGASGKQVCALEDLLATVNYVYVQGVVYIKDILR	420
Trichoderma guizhouense	361	EYALEVMDPFRRAIKAGQVAIKIEGASGKQVCALEDLLATVNYVYVQGVVYIKDILR	420

图1-1

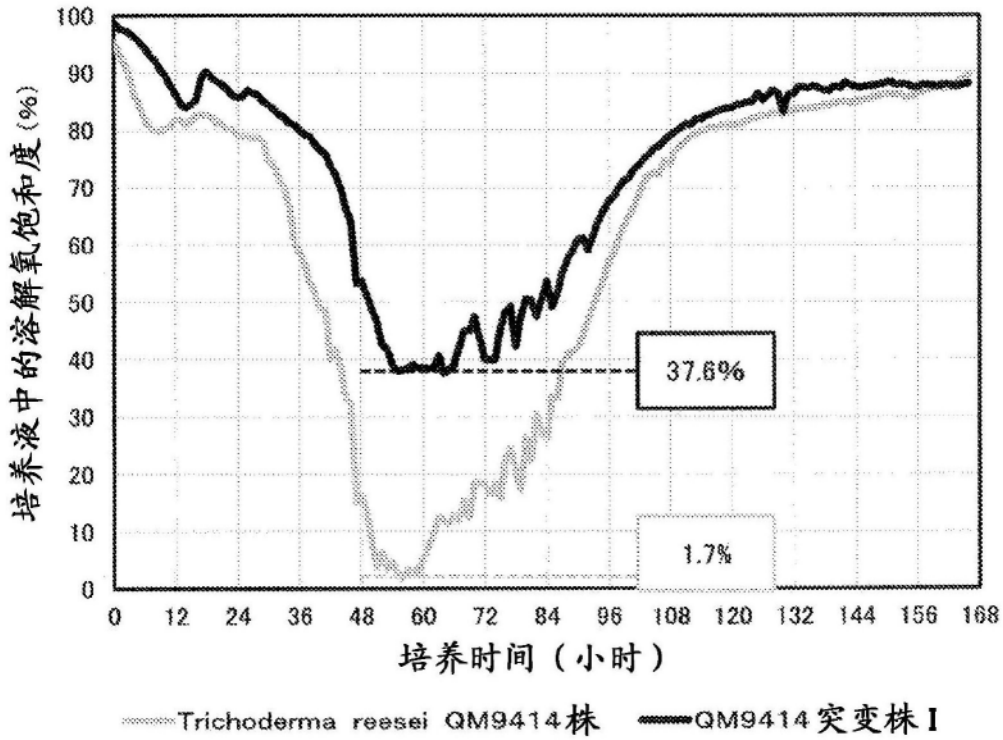


图2

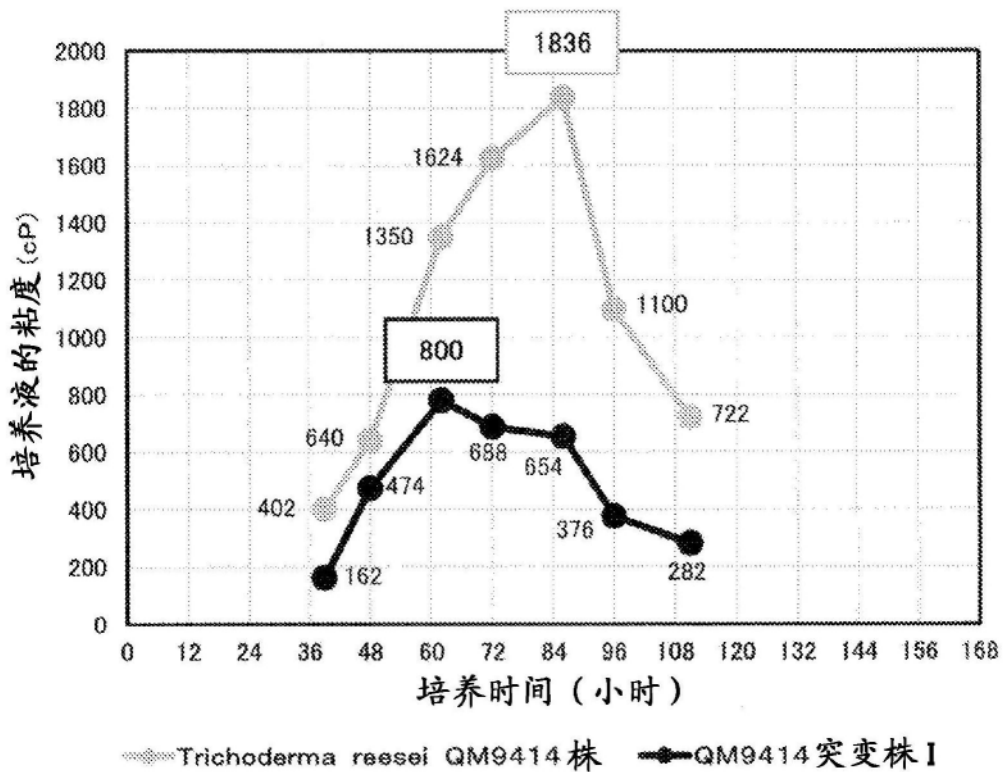


图3

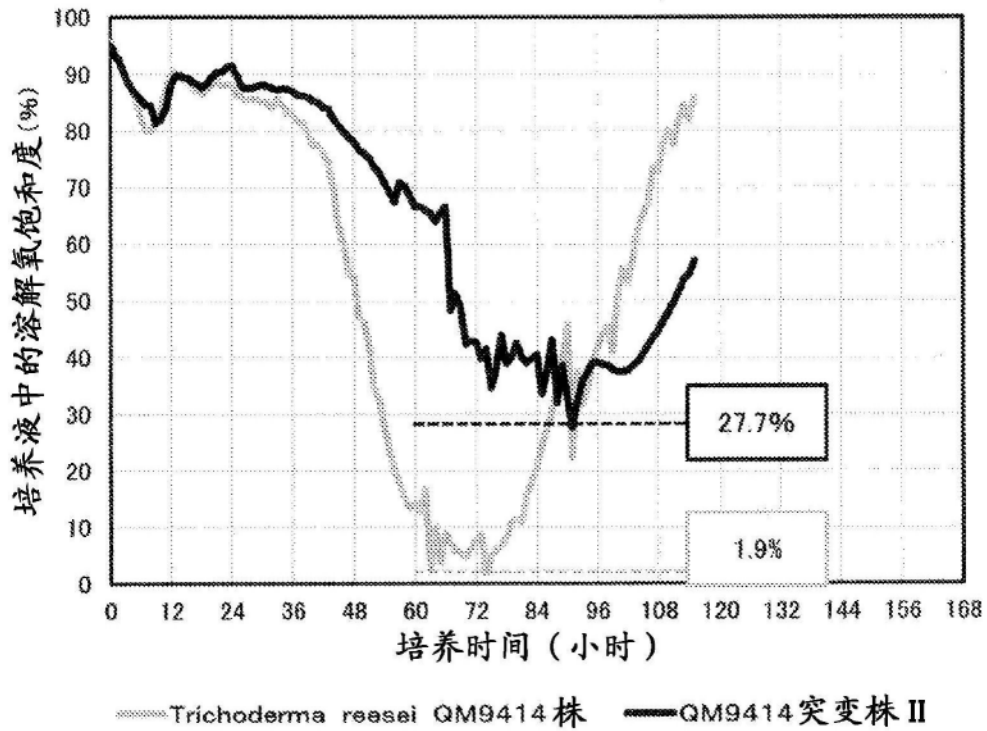


图4

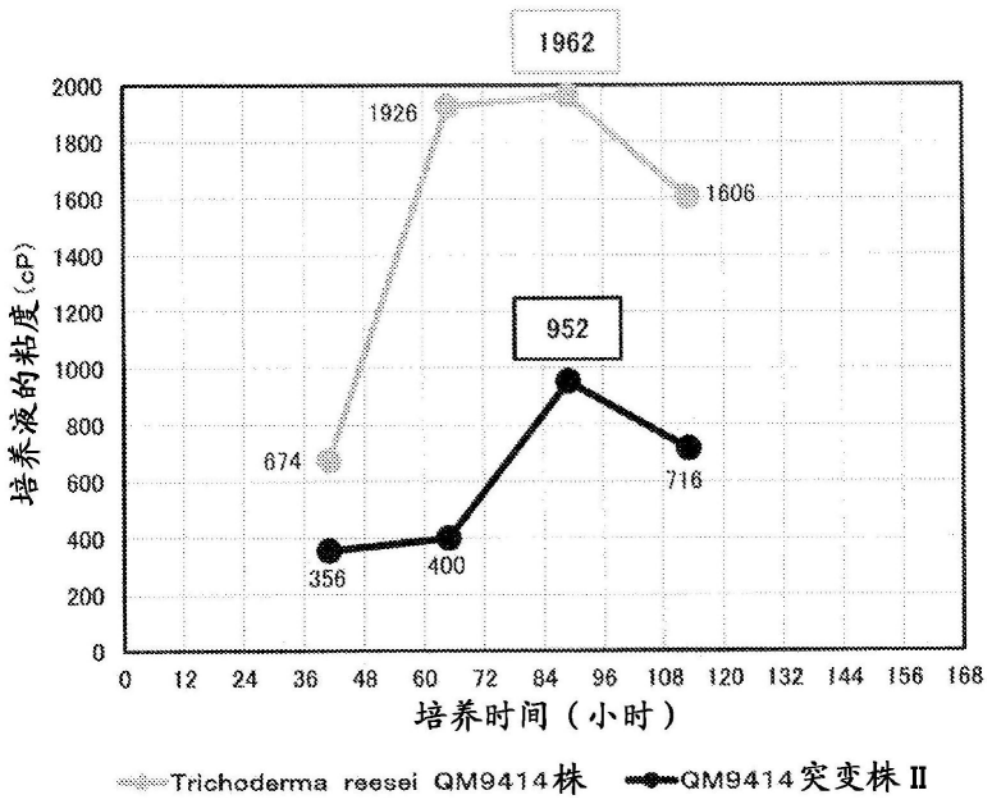


图5