



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101460615 B

(45) 授权公告日 2015. 04. 29

(21) 申请号 200780020890. 0

C12N 15/31(2006. 01)

(22) 申请日 2007. 04. 10

C12N 15/56(2006. 01)

C12Q 1/34(2006. 01)

(30) 优先权数据

PCT/CA2006/001192 2006. 07. 19 CA

60/791, 541 2006. 04. 12 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2008. 12. 05

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CA2007/000590 2007. 04. 10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02007/115407 EN 2007. 10. 18

(73) 专利权人 加拿大国家研究委员会

地址 加拿大安大略省

(72) 发明人 W · L · 宋

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285

代理人 张广育 姜建成

(51) Int. Cl.

C12N 9/24(2006. 01)

(56) 对比文件

EP 0828002 B1, 1998. 03. 11, 全文.

W0 03046169 A, 2003. 06. 05, 全文.

US 20030166236 A1, 2003. 09. 04, 全文.

W0 9424270 A, 1994. 10. 27, 全文.

审查员 李娟娟

权利要求书2页 说明书44页

序列表54页 附图16页

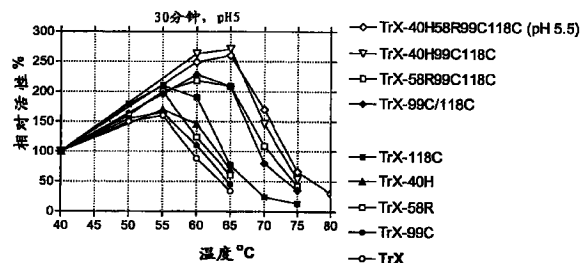
(54) 发明名称

提高木聚糖酶嗜热性、热稳定性和嗜碱性的修饰

(57) 摘要

提供了一种修饰的家族 11 木聚糖酶, 所述木聚糖酶包含位于位置 99 和 118 的半胱氨酸残基以形成分子内二硫键。通过用半胱氨酸置换位于位置 99 和 / 或 118 的氨基酸以形成分子内二硫键来产生所述木聚糖酶。本发明的木聚糖酶与野生型木聚糖酶相比显示了改良的嗜热性、嗜碱性或热稳定性。这样的木聚糖酶可用于需要在高于天然酶的温度和 / 或 pH 值的温度和 / 或 pH 值下的酶活性的多种工业应用中。

木聚糖酶突变体的温度/活性谱



1. 一种修饰的家族 11 木聚糖酶,所述木聚糖酶包含位于位置 40 的选自 Arg、Cys、Phe、Tyr 和 His 的置换氨基酸,和通过用半胱氨酸置换位于位置 99 和 / 或 118 的氨基酸产生的分子内二硫键,所述位置是通过将所述修饰的家族 11 木聚糖酶与如 SEQ ID NO:16 中定义的里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 木聚糖酶 II 氨基酸序列进行序列比对确定的,其中所述修饰的家族 11 木聚糖酶与衍生出其的对应亲本家族 11 木聚糖酶相比表现出增强的嗜热性、嗜碱性、热稳定性或具有以上性质的组合,所述亲本家族 11 木聚糖酶的氨基酸序列为 SEQ ID NO:16。

2. 权利要求 1 的修饰的家族 11 木聚糖酶,其中所述位于位置 40 的置换氨基酸为 His。

3. 权利要求 1 的修饰的家族 11 木聚糖酶,所述木聚糖酶还包含位于位置 58 的置换精氨酸。

4. 权利要求 1 的修饰的家族 11 木聚糖酶,其中所述家族 11 木聚糖酶是里氏木霉木聚糖酶。

5. 权利要求 1 的修饰的家族 11 木聚糖酶,所述木聚糖酶还包含位于位置 10 的置换 His、位于位置 27 的置换 Met 及位于位置 29 的置换 Leu。

6. 权利要求 5 的修饰的家族 11 木聚糖酶,所述木聚糖酶还包含位于位置 75 的置换 Ala、位于位置 105 的置换 His、位于位置 125 的置换 Ala 及位于位置 129 的置换 Glu。

7. 权利要求 6 的修饰的家族 11 木聚糖酶,所述木聚糖酶还包含位于位置 11 的置换 Asp。

8. 权利要求 7 的修饰的家族 11 木聚糖酶,所述木聚糖酶还包含位于位置 131 的置换 Asn。

9. 权利要求 8 的修饰的家族 11 木聚糖酶,所述木聚糖酶还包含位于位置 52 的置换 Cys。

10. 权利要求 9 的修饰的家族 11 木聚糖酶,所述木聚糖酶还包含位于位置 144 和 161 的置换 Arg。

11. 根据权利要求 1 至 10 任一项的修饰的家族 11 木聚糖酶,其中所述修饰的家族 11 木聚糖酶具有介于 65°C 和 85°C 之间的最高有效温度。

12. 根据权利要求 1 至 10 任一项的修饰的家族 11 木聚糖酶,其中所述修饰的家族 11 木聚糖酶具有介于 pH6.5 和 pH8.0 之间的最大有效 pH。

13. 权利要求 1 至 10 任一项的修饰的家族 11 木聚糖酶,其中所述分子内二硫键围成一个 10 至 24 个氨基酸的环。

14. 权利要求 1 的修饰的家族 11 木聚糖酶,由以下氨基酸序列组成:

SEQ ID NO:67 (TrX-40H-99C-118C);

SEQ ID NO:69 (TrX-40H-58R-99C-118C);

SEQ ID NO:70 (TrX-10H-27M-29L-40R-58R-99C-118C);

SEQ ID NO:71 (TrX-10H-27M-29L-40R-58R-75A-99C-118C);

SEQ ID NO:75 (TrX-10H-11D-27M-29L-40C-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E);

SEQ ID NO:76 (TrX-10H-11D-27M-29L-40F-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E);

SEQ ID NO:77 (TrX-10H-11D-27M-29L-40H-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E);

SEQ ID NO:78 (TrX-10H-11D-27M-29L-40Y-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E);

SEQ ID NO :79 (TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E) ;

SEQ ID NO :80 (TrX-10H-11D-27M-29L-40H-52C-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E) ;

或

SEQ ID NO :81 (TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E-144R-161R) 。

提高木聚糖酶嗜热性、热稳定性和嗜碱性的修饰

技术领域

[0001] 本发明涉及木聚糖酶的修饰。更具体来说,本发明涉及可以在高温和高 pH 下发挥功能的经修饰的木聚糖酶。

背景技术

[0002] 木聚糖酶是一组具有广泛商业用途的酶。木聚糖酶的主要应用包括纸张生产过程中纸浆的生物漂白、果汁和葡萄酒中的澄清剂、作为改良家禽和猪饲料可消化性的添加剂,以及作为精密仪器和半导体的洗剂(例如美国专利 No. 5, 078, 802)。

[0003] 在制备用于纸张生产的纸浆的过程中,在存在化学制品的情况下将纤维状材料进行高温和高压处理。这种处理将纤维转化成纸浆,称为制浆。在制浆后进行纸浆漂白。木聚糖酶用于增强对纸浆的漂白作用。所述木聚糖酶处理使得随后的漂白化学试剂例如氯、二氧化氯、过氧化氢或这些化学试剂的组合可更有效地漂白纸浆。用木聚糖酶对纸浆预处理可提高最终纸制品的视白度和质量,并可减少必须用于漂白纸浆的漂白化学试剂的量。这反过来又可降低漂白化学试剂在这类方法产生的污水中的量。

[0004] 最重要的化学制浆方法是生产牛皮纸浆。对于牛皮纸浆,在制浆之后并且在用木聚糖酶处理纸浆之前,使纸浆处于 55-70℃ 的温度和高碱性 pH 下(例如 Nissen et al., 1992)。多数的市售野生型木聚糖酶的缺点是这些酶呈现酸性的 pH 最适条件及约 55℃ 的温度最适条件。因此,为了有效地应用木聚糖酶进行漂白,必须将纸浆酸化至与所使用的具体木聚糖酶的最适 pH 相近的 pH。另外,必须将热纸浆冷却至与所选择的木聚糖酶的酶活性的最适温度接近的温度。为进行木聚糖酶处理而降低纸浆的温度会降低随后的化学漂白的效率。对纸浆的酸化需要使用大量的酸。再者,添加酸会导致腐蚀并且会降低加工设备的寿命。因此,在接近纸浆条件的温度和 pH 条件下具有最佳活性的木聚糖酶在纸浆生产中是有用及有利的。

[0005] 在较高温度下呈现较高活性的木聚糖酶可用于在制浆后立即处理纸浆 而不需要冷却纸浆。相似地,在较高 pH 条件下呈现较高活性的木聚糖酶将需要较少的酸或者不需要酸进行纸浆的中和。在各种工业过程中具有这些性质的木聚糖酶将具有多个优势和重大的经济效益。

[0006] 在现有技术中数种直接用于改良纸浆漂白中使用的木聚糖酶的方法包括从 80-100℃ 下生长的极端嗜热生物例如解糖热解纤维菌 (*Caldocellumsaccharolyticum*)、海栖热袍菌 (*Thermatoga maritima*) 和热袍菌属菌株 FJSS-B.1 (Lü thi et al., 1990; Winterhalter et al., 1995; and Simpson et al., 1991) 中分离热稳定的木聚糖酶。然而,这些热稳定的木聚糖酶较大,分子量为 35-120kDa (320-1100 个残基),并且与其他呈现较好的纸浆纤维可及度的较小木聚糖酶相比呈现出了穿透纸浆块能力的下降。另外,一些极度嗜热的木聚糖酶,如解糖热解纤维菌的木聚糖酶 A 呈现木聚糖酶和纤维素酶双重活性 (Lü thi et al., 1990)。这种额外的分解纤维素活性在纸浆漂白中是不利的,这是因为它对纸中的主要材料——纤维素有破坏作用。再者,在极高温下发挥正常功能的超高热

稳定的木聚糖酶在最佳的纸浆漂白温度范围内具有较低的特异性活性 (Simpson et al., 1991)。

[0007] 大量木聚糖酶已经被通过蛋白工程加以修饰以改良其在工业应用中的性质。例如美国专利 No. 5, 405, 769 (Campbell et al.) 公开了使用定点诱变修饰环状芽胞杆菌 (*Bacillus circulans*) 木聚糖酶 (BcX) 以改良该酶的热稳定性。该位点特异性突变包括用半胱氨酸残基置换两个氨基酸以形成分子内二硫键。这些形成二硫键的突变包括用于两个木聚糖酶分子之间的分子间交联的 S179C (即位于 179 位的丝氨酸被半胱氨酸替换), 以及用于形成分子内交联的 S100C/N148C 和 V98C/A152C。这些二硫键有助于该酶的热稳定性, 而对其嗜热性或嗜碱性没有作用。WO 00/29587 (Sung and Tolan) 公开了里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 木聚糖酶 II (TrX 或 TrX II) 的真菌木聚糖酶中的二硫交联——110/154 和 108/158, 它们对应于 BcX 的二硫键 100/148 和 98/152。与 BcX 的情况类似, 这些交联也提高了 TrX II 的热稳定性, 但对其嗜热性或嗜碱性没有作用。

[0008] 美国专利 No. 5, 405, 769 (见上文) 还公开了木聚糖酶的 N 末端中特定残基的突变, 并且这些突变被发现进一步改良了该酶的热稳定性。在体外分析中, 二硫化突变体在 62°C 下显示了热稳定性, 比天然 BcX 木聚糖酶提高 7°C。然而, 这些热稳定的二硫化突变体未显示嗜热性的增加 (Wakarchuck et al., 1994)。在 BcX 木聚糖酶的 N 末端附近的突变 T3G (BcX 木聚糖酶氨基酸编号)、D4Y (F) 和 N8Y (F) 提供了达 57°C 的热稳定性, 比天然 BcX 提高 2°C (美国专利 No. 5, 405, 769)。然而, 这些酶在工业中的应用仍需要在预处理之后并且在加入酶之前将纸浆冷却及酸化。因此, 仍需要进一步提高热稳定性、嗜热性和最适 pH。

[0009] 本领域中已知修饰里氏木霉木聚糖酶 II (TrX II 或 TrX) 以提高嗜热性和嗜碱性。例如, 美国专利 No. 5, 759, 840 (Sung et al.) 和美国专利 No. 5, 866, 408 (Sung et al.) 公开了 TrX 的 N 末端区 (残基 1-29) 中的突变。人们发现在 TrX 的残基 10、27 和 29 处的三个突变增加了木聚糖酶在升高的温度和碱性 pH 条件下的酶活性。

[0010] WO 01/92487 (Sung) 公开了 TrX II 的突变 S75A、L105R、N125A、I129E 以产生在较高温度和较高 pH 下保持更大活性的木聚糖酶。WO 03/046169 (Sung) 也描述了应用多个变成精氨酸残基的突变 (Y135R、H144R、Q161R) 以提高 TrX II 的最适 pH。突变 Y118C 使得所述木聚糖酶在较高温度下保持其最佳活性。

[0011] Turunen et al. (2002) 描述了在 TrXII 的特异“Ser/Thr 表面”上利用特定的多个精氨酸以提高在较高温度下的酶活性, 但是却降低了热稳定性。该文献还报道了另一个突变 (K58R) 呈现了稍微提高的热稳定性。然而, 该突变与其他精氨酸结合却显示出了较窄的有效 pH 范围。

[0012] Turunen et al. (2001) 公开了补充了相似的二硫键 (S110C/N154C) 的 TrX II 的突变 N11D、N38E、Q162H 以提高木聚糖酶的热稳定性。然而, 包括 N11D 的这些突变也对木聚糖酶的嗜热性和嗜碱性具有不利效应, 导致与天然 TrXII 相比其在较高温度和中性 - 碱性 pH 下的酶活性降低。

[0013] 已经存在多项试图通过引入设计的二硫键来稳定蛋白质的尝试, 得到了各种结果。Sowdhamini et al. (1989) 描述了被称为 MODIP (对蛋白中二硫桥建模 (Modeling of Disulfide bridges in Proteins)) 的计算方法以协助含二硫桥的蛋白的设计。通过该方法, 通常可预测大量潜在的二硫键形成位点, 但无法预言哪些最可能稳定该蛋白。Dani et

al. (2003) 描述了该方法的一个优化版本以协助这种筛选。它预测了任何稳定二硫键中的决定性必要条件是在两个半胱氨酸之间围住一个多于 25 个氨基酸残基的环。少于 25 个残基的环将几乎不具有稳定作用。

[0014] WO 00/29587 (Sung and Tolan) 报道了在里氏木霉木聚糖酶 II 中形成两个二硫键, 一个连接位置 110 和 154, 另一个连接位置 108 和 158 (两者都围住长于 25 残基的环)。两个二硫键都增加了该酶的热稳定性, 但没有提高嗜热性。

[0015] Fenel et al. (2004) 描述了在 TrX II 中通过两个突变 (T2C 和 T28C) 形成二硫桥, 这导致了该酶的最适温度和热稳定性的提高而对依赖于 pH 的活性没有任何改变。该二硫交联在两个半胱氨酸残基之间围住一个长度为 26 个氨基酸残基的环。

[0016] 虽然现有技术公开了修饰木聚糖酶以改变各种特性, 当前工业过程的要求需要具有不断增强的稳定活性 (robust activity) 的酶。本领域中需要在升高的温度和增高的 pH 条件下呈现出提高的酶活性的新的木聚糖酶。这样的酶适合用于各种领域, 例如纸浆的制造及精密仪器和半导体的清洗。

发明内容

[0017] 本发明涉及修饰的木聚糖酶。更具体来说, 本发明涉及在高温和 / 或 pH 条件下具有改良的性能的修饰的木聚糖酶。

[0018] 本发明涉及包含位于位置 99 和 118 的半胱氨酸残基以形成分子内二硫键的修饰的木聚糖酶, 该木聚糖酶是通过用半胱氨酸置换位于位置 99 和 / 或 118 的氨基酸产生的。通过将所述修饰的木聚糖酶与 SEQ ID NO:16 中定义的里氏木霉木聚糖酶 II 氨基酸序列进行序列比对确定氨基酸置换的位置。所述修饰的木聚糖酶呈现嗜热性、嗜碱性、热稳定性或具有以上性质的组合。

[0019] 所述修饰的木聚糖酶可以来自于家族 11 木聚糖酶, 包括但不限于里氏木霉木聚糖酶。所述修饰的木聚糖酶优选地不是天然的曲霉 (*Aspergillus*) 木聚糖酶。

[0020] 本发明还提供了如上述的修饰的木聚糖酶, 所述木聚糖酶还包含位于位置 40 的置换氨基酸残基。所述位于位置 40 的置换氨基酸选自于 His、Cys、Phe、Lys、Tyr 和 Arg。在一个具体的实例中, 所述位于位置 40 的置换氨基酸为包括但不限于 His 的碱性氨基酸。

[0021] 本发明还涉及这样的修饰的木聚糖酶, 其包含位于位置 99 和 158 的半胱氨酸残基并且还包含位于位置 58 的置换氨基酸, 包括但不限于碱性氨基酸 (例如 Arg)。另外, 上述的修饰的木聚糖酶还可以包含位于位置 10 的碱性置换氨基酸、位于位置 27 的疏水性置换氨基酸及位于位置 29 的疏水性置换氨基酸。所述位于位置 10 的碱性置换氨基酸可以是 His、所述位于位置 27 的疏水性置换氨基酸是 Met 并且所述位于位置 29 的疏水性置换氨基酸是 Leu (HML)。除了这些突变之外, 所述修饰的木聚糖酶还可以包含位于位置 75 的非极性置换氨基酸、位于位置 105 的碱性置换氨基酸、位于位置 125 的非极性置换氨基酸及位于位置 129 的酸性氨基酸。所述位于位置 75 的非极性氨基酸可以是 Ala、所述位于位置 105 的碱性氨基酸是 His、所述位于位置 125 的非极性氨基酸可以是 Ala 并且所述位于位置 129 的酸性氨基酸可以是 Glu。所述修饰的木聚糖酶还可以包含位于位置 11 的酸性氨基酸例如 Asp。除了位于位置 11 的突变之外, 所述修饰的木聚糖酶还可以包含位于位置 131 的变成 Asn 的突变。

[0022] 本发明还包括这样的修饰的木聚糖酶,其包含位于位置 99 和 118 的半胱氨酸残基并且还包含位于位置 40 和 58 的碱性氨基酸。所述修饰的木聚糖酶还可以包含位于位置 10 的碱性置换氨基酸、位于位置 27 的疏水性置换氨基酸及位于位置 29 的疏水性置换氨基酸。所述位于位置 10 的碱性置换氨基酸可以是 His、所述位于位置 27 的疏水性置换氨基酸可以是 Met 并且所述位于位置 29 的疏水性置换氨基酸可以是 Leu (HML)。除了这些突变之外,上述修饰的木聚糖酶还可以包含位于位置 75 的非极性置换氨基酸包括但不限于 Ala;位于位置 105 的碱性置换氨基酸包括但不限于 His;位于位置 125 的非极性置换氨基酸包括但不限于 Ala;以及位于位置 129 的酸性氨基酸包括但不限于 Glu。所述修饰的木聚糖酶还可以包含位于位置 11 的酸性置换氨基酸包括但不限于 Asp;以及任选的位于位置 131 的 Asn。上述修饰的木聚糖酶还可以包含位于位置 52 的置换氨基酸包括但不限于 Cys。另外,所述修饰的木聚糖酶还可以包含位于位置 144 和 161 的碱性置换氨基酸包括但不限于 Arg 残基。

[0023] 本发明还涉及这样的修饰的木聚糖酶,其包含在位于位置 99 和 118 的置换氨基酸残基并且具有介于约 65°C 和约 85°C 之间的最高有效温度 (MET) 或者介于具有约 pH6.5 和约 pH8.0 之间的最大有效 pH (MEP)。

[0024] 本发明还涉及选自于以下的修饰的木聚糖酶:

[0025]

突变	名称	序列
TrX-99C-118C	TrX-CC	SEQ ID NO:66
TrX-40H-99C-118C	TrX-H CC	SEQ ID NO:67
TrX-58R-99C-118C	TrX-R CC	SEQ ID NO:68
TrX-40H-58R-99C-118C	TrX-HR CC	SEQ ID NO:69
TrX-10H-27M-29L-40R-58R-99C-118C	TrX-HML RR CC	SEQ ID NO:70
TrX-10H-27M-29L-40R-58R-75A-99C-118C	TrX-HML RRA CC	SEQ ID NO:71
TrX-10H-27M-29L-75A-99C-105H-118C-125A-129E	TrX-HML A CHC AE	SEQ ID NO:72
TrX-10H-27M-29L-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E	TrX-HML RA CHC AE	SEQ ID NO:73
TrX-10H-11D-27M-29L-58R-75A-99C-105H-118C - 125A-129E	TrX-HDML RA CHC AE	SEQ ID NO:74
TrX-10H-11D-27M-29L-40X-58R-75A-99C-105H-118C - 125A-129E, 其中		X为:
X为 C		C- SEQ ID NO:75
X为 F	TrX-HDML XRA CHC AE	F- SEQ ID NO:76
X为 H		H- SEQ ID NO:77
X为 Y		Y- SEQ ID NO:78
X为 R		R- SEQ ID NO:79
TrX-10H-11D-27M-29L-40H-52C-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E	TrX-HDML HCRA CHC AE	SEQ ID NO:80
TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E-144R-161R	TrX-HDML RRA CHC AERR	SEQ ID NO:81
TrX-10H-11D-27M-29L-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E-131N	TrX-HDML RA CHC AEN	SEQ ID NO:82

[0026] 包含位于位置 99 和 118 的半胱氨酸的本发明的木聚糖酶与野生型木聚糖酶相比显示出了改良的嗜热性、嗜碱性或热稳定性。这样的木聚糖酶可用于需要在高于天然酶的温度和 / 或 pH 值的温度和 / 或 pH 值下的酶活性的多种工业应用中。例如,如本文所述的修饰的木聚糖酶可用于下列目的:漂白纸浆、改良家禽和猪饲料的可消化性或者处理精密仪器。

[0027] 本发明还涉及包含位于位置 40 的置换氨基酸的修饰的木聚糖酶,该位置是通过

将修饰的木聚糖酶与 SEQ ID NO:16 中定义的里氏木霉木聚糖酶 II 氨基酸序列进行序列比对确定的。以上定义的修饰的木聚糖酶还可以包含具有一个 10-24 个氨基酸的环的分子内二硫键。可以通过用半胱氨酸置换位于位置 99 和 / 或 118 的氨基酸产生该分子内二硫键。所述位于位置 40 的氨基酸置换优选地是碱性氨基酸包括但不限于 His。

[0028] 本发明的发明内容无须描述本发明的所有必要特征,而且本发明还可以是属于所述特征的亚组合。

附图说明

[0029] 本发明的这些特征和其他特征通过下文的描述将更加显而易见,在下文中参考了附图,其中:

[0030] 图 1 示出了家族 11 木聚糖酶的氨基酸序列比对。在序列上方标出的氨基酸编号对应于里氏木霉木聚糖酶 II (Tr2, 本文也称为 TrX II)。在位于位置 99 和 118 (相对于 Tr2) 的残基为斜体字并用星号标示。至少 75% 的所列出的家族 11 木聚糖酶共有的氨基酸以黑体字标示。所有家族 11 木聚糖酶都共有的残基以下划线标示。对于有纤维素结合结构域的木聚糖酶,仅显示催化核心序列。

[0031] 图 2 示出了 TrX 木聚糖酶的核苷酸序列 (SEQ ID NO:40), 以及用于构建质粒 pTrX 中的编码里氏木霉木聚糖酶 II (TrX) 的序列的合成寡核苷酸 TrX(1-91) 和 TrX(92-190) (SEQ ID NO:61-64)。

[0032] 图 3 示出了与 TrX 相比,在 pH5.0 下孵育 30 分钟期间,温度对修饰的木聚糖酶 TrX-99C、TrX-58R、TrX-40H、TrX-118C、TrX-99C-118C、TrX-58-99C-118C、TrX-40H-99C-118C 和 TrX-40H-58R-99C-118C 的酶活性的作用。数据相对于在 40℃ 下观测的活性进行了标准化。

[0033] 图 4 示出了与 TrX 相比,在 pH5.0 下孵育 30 分钟期间,温度对修饰的木聚糖酶 TrX-99C-118C、TrX-58R-99C-118C、TrX-40H-99C-118C 和 TrX-40H-58R-99C-118C 的酶活性的作用。数据基于图 3 的数据,但相对于最适温度下观测的活性进行了标准化。

[0034] 图 5 示出了与已知木聚糖酶 TrX、TrX-10H-27M-29L 和 TrX-10H-27M-29L-75A-105H-125A-129E 相比,在 pH5.0 下孵育 30 分钟期间 (除非另外指出),温度对修饰的木聚糖酶 TrX-118C、TrX-99C-118C、TrX-40H-58R-99C-118C 和 TrX-10H-27M-29L-40R-58R-99C-118C 的酶活性的作用。数据相对于最适温度下观测的活性进行了标准化。

[0035] 图 6 示出了与已知木聚糖酶 TrX-10H-27M-29L-75A-105H-125A-129E 相比,在 pH5.5 下孵育 30 分钟期间,温度对修饰的木聚糖酶 TrX-10H-27M-29L-40R-58R-99C-118C、TrX-10H-27M-29L-40R-58R-75A-99C-118C、TrX-10H-27M-29L-75A-99C-105H-118C-125A-129E、TrX-10H-27M-29L-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E、TrX-10H-11D-27M-29L-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E、TrX-10H-11D-27M-29L-40H-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E 和 TrX-10H-11D-27M-29L-40H-52C-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E 的酶活性的作用。数据相对于最适温度下观测的活性进行了标准化。

[0036] 图 7 示出了在 pH5.5 下孵育 30 分钟期间,温度对修饰的木聚糖酶 TrX-10H-11D-27M-29L-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E 和 TrX-10H-11D-27M-29L-40X-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E (其中 X 为 T、C、F、Y、R 和 H) 的酶活性的作用。数据相对于最适温度

下观测的活性进行了标准化。

[0037] 图 8 示出了与已知木聚糖酶 TrX、TrX-10H-27M-29L 和 TrX-10H-27M-29L-75A-105H-125A-129E (pH5.5) 相比,在 pH5.5 下孵育 30 分钟期间,温度对修饰的木聚糖酶 TrX-10H-27M-29L-75A-99C-105H-118C-125A-129E、TrX-10H-11D-27M-29L-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E、TrX-10H-11D-27M-29L-40H-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E 和 TrX-10H-11D-27M-29L-40H-52C-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E 的酶活性的作用。数据相对于在 40℃ 下观测的活性进行了标准化。

[0038] 图 9 示出了与已知木聚糖酶 TrX-10H-11D-27M-29L-75A-105H-118C-125A-129E-144R-161R (pH6) 相比,在孵育 30 分钟期间,温度对修饰的木聚糖酶 TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E-144R-161R (pH6.5) 的酶活性的作用。数据相对于最适温度下观测的活性进行了标准化。

[0039] 图 10 示出了与天然 TrX 和已知木聚糖酶 TrX-118C 相比,在 pH4.5-7.5 和 55℃ 下孵育 30 分钟期间,pH 对修饰的木聚糖酶 TrX-99C 和 TrX-99C-118C 的酶活性的作用。数据相对于在最适 pH 下观测的每种酶的活性进行了标准化。

[0040] 图 11 示出了与已知木聚糖酶 TrX-10H-27M-29L-75A-105H-125A-129E 相比,在 pH5.0-8.0 和 65℃ 下孵育 30 分钟期间,pH 对修饰的木聚糖酶 TrX-10H-27M-29L-75A-99C-105H-118C-125A-129E、TrX-10H-27M-29L-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E、TrX-10H-11D-27M-29L-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E 和 TrX-10H-11D-27M-29L-40H-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E 的酶活性的作用。数据相对于在最佳 pH 下观测的每种酶的活性进行标准化。

[0041] 图 12 示出了与已知木聚糖酶 TrX-10H-27M-29L-75A-105H-125A-129E、TrX-10H-27M-29L-75A-105H-125A-129E-144R-161R 和 TrX-10H-11D-27M-29L-75A-105H-116G-118C-125A-129E-144R-161R 相比,在 pH5.0-8.0 和 65℃ 下孵育 30 分钟期间,pH 对修饰的木聚糖酶 TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E-144R-161R 的酶活性的作用。数据相对于在最适 pH 下观测的每种酶的活性进行了标准化。

[0042] 图 13 示出了与天然木聚糖酶 TrX 相比,在 48℃、52℃、56℃ 和 60℃ 及无任何可溶的木聚糖底物的情况下孵育 30 分钟期间,温度对修饰的木聚糖酶 TrX-99C-118C 的残余酶活性的作用。数据相对于在 48℃ 下预孵育之后在室温下观测的活性进行了标准化。

[0043] 图 14 示出了在 pH7 下持续 60 分钟期间,温度对修饰的木聚糖酶 TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E-131N 和 TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E 作用于 1% 小麦阿拉伯木聚糖底物的最大木糖释放的百分数的影响。

[0044] 图 15 示出了在 70℃ 下持续 60 分钟期间,pH 对修饰的木聚糖酶 TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E-131N 和 TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E 作用于硬木纸浆 (稠度为 10%) 的最大木糖释放的百分数的影响。

[0045] 图 16 示出了在 70℃ 下持续 60 分钟期间,pH 对修饰的木聚糖酶 TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E-131N 和 TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E 作用于软木纸浆 (稠度为 10%) 的最大木糖释放的百分数

的影响。

[0046] 图 17 示出了在 50℃、60℃、70℃ 和 80℃ 下孵育 30 分钟之后, 预孵育温度对修饰的木聚糖酶 TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E、TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125E-131N 和 TrX-10H-27M-29L 的相对残余活性(%) 的影响。

具体实施方式

[0047] 本发明涉及修饰的木聚糖酶。更具体来说, 本发明涉及在高温和 pH 的条件下具有改良的性能并且在高温下具有改良的稳定性的修饰的木聚糖酶。

[0048] 以下描述的是(仅通过实例的方式) 优选的实施方案, 而不是对实现本发明效果的必要特征组合的限定。

[0049] 木聚糖酶促进纸浆漂白的机制还未完全明了。不希望拘囿于理论, 已有观点认为有色的木质素通过木聚糖与晶体状纤维素相连接, 木聚糖酶通过水解木聚糖而促进纸浆的漂白, 释放纸浆中的有色木质素。本文给出的修饰的木聚糖酶可用于漂白纸浆或者用于需要在超过野生型酶的温度和 pH 值的温度和 pH 值下具有活性的其他应用。对于纸浆的生物漂白, 优选的木聚糖酶衍生自分类至家族 11 的木聚糖酶(见表 1)。

[0050] 家族 11 木聚糖酶是一组分子量相对低的小型酶(大约 20kDa 且约 200 个氨基酸残基)。家族 11 木聚糖酶的小尺寸使其可以迅速穿透纸浆块。家族 11 木聚糖酶的另一个优点是它们没有纤维素酶活性。迄今为止鉴定的大多数家族 11 木聚糖酶都是嗜中温的并且具有较小的分子量(20kDa)。然而, 该家族也包括至少 3 种较大分子量的热稳定的木聚糖酶: 296 个氨基酸且分子量大约 32kDa 的褐色高温单孢菌(*Thermomonospora fusca*) 木聚糖酶 A(TfX-A) (Irwin et al., 1994; WO 95/12668, 两者都通过引用的方式纳入本文)、194 个氨基酸且分子量大约 22kDa 的嗜热真菌(*Thermomyces lanuginosus*) 木聚糖酶(Tln) (Gruber et al., 1998, 它通过引用的方式纳入本文) 及 511 个氨基酸且分子量大约 56kDa 的粪堆梭菌(*Clostridium stercorarium*) 木聚糖酶 A。粪堆梭菌木聚糖酶 A 在 70℃ 的温度下呈现最大活性(Sakka et al., 1993, 它通过引用的方式纳入本文)。

[0051] 某些大型热稳定的家族 11 木聚糖酶与小型嗜中温酶的不同之处是在酶的延伸 C 末端具有疏水性的纤维素结合域(CBD)。TfX-A 酶由所有家族 11 木聚糖酶共有的 189 个残基的催化核心序列及 107 个残基的纤维素结合域组成。更大的粪堆梭菌木聚糖酶 A 具有 2 个拷贝的纤维素结合域。

[0052] 若 (a) 蛋白具有水解木聚糖聚合物主链中相邻木糖残基之间的内部 β -1,4 糖苷键的能力, 并且 (b) 它具有与家族 11 木聚糖酶相关的一级和二级结构特征, 则该蛋白被分类为家族 11 木聚糖酶。源自细菌和真菌的所有家族 11 木聚糖酶共享主要包含 β 折叠、转角和单个 α 螺旋的相同的通用分子结构。对 82 种家族 11 木聚糖酶的氨基酸序列的比对鉴定出了在 α 螺旋及 β 带(beta strand) B5、B6 和 B8 中高度保守的特征序列(Sapag et al., 2002), 所述木聚糖酶的氨基酸序列的长度在 173-220 个氨基酸的范围内并且具有宽范围的等电点(pI 3.5-10.25)、最适 pH 值(2.0-8.0) 及最适温度(45℃-75℃)。再者, 家族 11 木聚糖酶的二级结构是高度保守的。使用来自蛋白质数据库(PDB) 的结构坐标对 10 种具有 31-97% 同一性的家族 11 木聚糖酶 C- α 原子的两两比较表明它们的均方根偏差

(rmsd) 为 0.6-1.4 Å (Hakulinen et al. 2003 ;它通过引用的方式纳入本文)。该偏差水平在大多数 X- 射线晶体结构的典型分辨率内。再者,所有家族 11 木聚糖酶均包含位于位置 86 和 177 的两个保守谷氨酸残基(参见图 1;基于里氏木霉木聚糖酶 II (TrX II 或 Tr2) 氨基酸编号),它们位于 β 折叠 B4 和 B5 (Torronen & Rouvinen, 1995 ;Sapag et al., 2002, 它们都通过引用的方式纳入本文)。

[0053] 因此,家族 11 木聚糖酶可以被定义为在每个 β 折叠 B5、B6、B8 及 α 螺旋内包含 80-100%或中间的任意量、90-100%或中间的任意量、95-100%或中间的任意量,或者约 80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100%的序列同一性。家族 11 木聚糖酶还可以被定义为包含的位于位置 86 和 177 的谷氨酸,所述位置编号基于 TrX II 氨基酸编号(参见图 1)。

[0054] 给定家族 11 木聚糖酶中的高度保守结构,本领域技术人员就可以运用已知的方法(包括本文给出的方法)提高任何家族 11 木聚糖酶的嗜热性、热稳定性和/或嗜碱性,家族 11 木聚糖酶的非限制性实例在下文表 1 中有所描述。家族 11 木聚糖酶的其他非限制性实例在 Sapag et al., (2002) 和 Hakulinen et al., (2003) 中给出,以及通过 URL :cazy.org/fam/GH11.html 公开,它们都通过引用的方式纳入本文。

[0055] 而且,除了在位置 99 和 118 引入半胱氨酸残基外,所述修饰的家族 11 木聚糖酶还可以包含另外的突变。这些另外的突变应当被引入至氨基酸序列中相容的位置,例如至非保守位置(参见图 1)。再者,通过在引入突变后确定本文所述的嗜热性、嗜碱性和/或热稳定性,本领域技术人员可以容易地确定给定突变是否能与二硫化突变相容。能够与所述 99/118 突变相容的突变的非限制性实例在表 2 中给出。使用已知的重组技术或定向进化(directed evolution)可以引入一种或多种这样的额外突变,并且这样的突变可以进一步促进所述酶的嗜热性、热稳定性、嗜碱性或其组合的提高。

[0056] 表 1 :家族 11 木聚糖酶

[0057] 微生物 木聚糖酶 SEQ ID NO

[0058]

黑曲霉 (<i>Aspergillus niger</i>)	Xyn A	SEQ ID NO :1
泡盛曲霉 (<i>Aspergillus awamori</i>) 变种 kawachi	Xyn B	SEQ ID NO :19
白曲霉 (<i>Aspergillus kawachii</i>)	Xyn C	—
塔宾曲霉 (<i>Aspergillus tubigenensis</i>)	Xyn A	SEQ ID NO :2
环状芽孢杆菌 (<i>Bacillus circulans</i>)	Xyn A	SEQ ID NO :3
短小芽孢杆菌 (<i>Bacillus pumilus</i>)	Xyn A	SEQ ID NO :4
枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)	Xyn A	SEQ ID NO :5
粪碱纤维单胞菌 (<i>Cellulomonas fimi</i>)	Xyn D	—
钦氏菌属 (<i>Chainia</i> sp.)	Xyn	—
丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)	Xyn B	SEQ ID NO :6
粪堆梭菌 (<i>Clostridium stercorarium</i>)	Xyn A	SEQ ID NO :7
产琥珀酸丝状杆菌 (<i>Fibrobacter succinogenes</i>)	XynII	SEQ ID NO :18
<i>Neocallimastix patriciarum</i>	Xyn A	—
达松维尔拟诺卡氏菌 (<i>Nocardopsis dassonvillei</i>)	XynII	—
生黄瘤胃球菌 (<i>Ruminococcus flavefaciens</i>)	Xyn A	SEQ ID NO :8
裂褶菌 (<i>Schizophyllum commune</i>)	Xyn	SEQ ID NO :9
浅青紫链霉菌 (<i>Streptomyces lividans</i>)	Xyn B	SEQ ID NO :10
浅青紫链霉菌 (<i>Streptomyces lividans</i>)	Xyn C	SEQ ID NO :11
链霉菌 36a (<i>Streptomyces</i> sp.No. 36a)	Xyn	SEQ ID NO :12
热紫链霉菌 (<i>Streptomyces thermoviolaceus</i>)	Xyn II	—
褐色高温单胞菌 (<i>Thermomonospora fusca</i>)	Xyn A	SEQ ID NO :13
嗜热真菌 (<i>Thermomyces lanuginosus</i>)	Xyn	SEQ ID NO :20
哈茨木霉 (<i>Trichoderma harzianum</i>)	Xyn	SEQ ID NO :14
里氏木霉 (<i>Trichoderma reesei</i>)	Xyn I	SEQ ID NO :15
里氏木霉 (<i>Trichoderma reesei</i>)	Xyn II	SEQ ID NO :16
绿色木霉 (<i>Trichoderma viride</i>)	Xyn	SEQ ID NO :17

[0059] 家族 11 木聚糖酶的实例（并不意在进行限制）包括里氏木霉木聚糖酶 II、里氏木霉木聚糖酶 I、绿色木霉木聚糖酶、浅青紫链霉菌木聚糖酶 B 及浅青紫链霉菌木聚糖酶 C。例如，本发明的木聚糖酶突变体可以包含里氏木霉木聚糖酶 II 突变体。

[0060] “修饰的木聚糖酶”是指包含突变或改变的天然木聚糖酶序列的木聚糖酶。该突变或改变在相应的天然木聚糖酶中不存在。使用本领域技术人员已知的技术可以修饰的木聚糖酶分子。这些技术包括但不限于：定向诱变、盒式诱变、随机诱变、合成的寡核苷酸构建、克隆及其他遗传工程技术。定向诱变是这样的合适技术的实例，所述技术可在木聚糖酶中产生使该酶与天然酶相比更加嗜热和 / 或更加嗜碱的突变。然而，本发明的范围还考虑使用本领域技术人员已知的引入突变的其他技术。

[0061] 术语“最佳活性”是指具体的酶在观察到最大活性的 pH（即最适 pH）和观察到最大活性的温度（即最适温度）下在指定时长过程中的活性。

[0062] 若木聚糖酶具有出约 60℃ - 约 90℃ 的最高有效温度，则它是本文所指的“嗜热的”。“最高有效温度”或“MET”是指木聚糖酶呈现至少 80% 的其最佳活性的最高温度。对于本说明书来说，通过使用实施例 2.3 详述的且实施例 3 中改良的用于测量木聚糖酶活性的标准测定方法测量木聚糖酶的温度谱可确定木聚糖酶的 MET。在木聚糖酶的最适 pH 下测量其活性。确定修饰的木聚糖酶呈现至少约 80% 的其最佳（最大）活性的温度，最高温度为 MET。

[0063] 修饰的木聚糖酶的 MET 可为约 60℃、62℃、64℃、65℃、66℃、67℃、68℃、69℃、70℃、71℃、72℃、73℃、74℃、75℃、76℃、77℃、78℃、79℃、80℃、81℃、82℃、83℃、84℃、86℃、88℃ 或 90℃ 或者处于其间的任何温度。在一个非限制的实例中，修饰的木聚糖酶的 MET 可以是约 62℃ - 约 85℃ 或中间任意范围；约 65℃ - 约 85℃ 或中间任意范围；约 68℃ - 约 85℃ 或中间任意范围；或者约 70℃ - 约 85℃ 或中间任意范围。

[0064] 若木聚糖酶具有约 55℃ - 约 85℃ 的 T_{50} ，则它是本文所指的“热稳定的”。“ T_{50} ”是所述修饰的酶或天然酶在 30 分钟的孵育时间后保持 50% 的残余活性的孵育温度。通过实施例 5 中详述的测定方法可以确定木聚糖酶的 T_{50} 。如实施例 5 中指出的，将 48℃ 下的残余活性标准化为 100%。

[0065] 修饰的木聚糖酶的 T_{50} 可为约 55℃、56℃、57℃、58℃、59℃、60℃、64℃、68℃、72℃、76℃、80℃ 或 85℃ 或者处于其间的任何温度。在一个非限制的实例中，修饰的木聚糖酶的 T_{50} 可以是约 54℃ - 约 80℃ 或中间任意范围；约 56℃ - 约 80℃ 或中间任意范围；或者约 58℃ - 约 80℃ 或中间任意范围。

[0066] 因为在过去的文献中术语嗜热性和热稳定性可互换使用，所以它们的使用一直是混淆的。但是，本文定义的这些术语的使用与本领域的所述术语的用法一致 (Mathrani and Ahring, 1992)。

[0067] 若木聚糖酶具有约 pH6.0 至约 pH8.5 的最大有效 pH (MEP)，则它是本文所指的嗜碱的。“最大有效 pH”或“MEP”是指木聚糖酶呈现出至少 80% 的最佳活性时的最大 pH。如实施例 4 中指出的，通过测量木聚糖酶的 pH 谱可以确定 MEP。确定至少 80% 的最佳（最大）活性的 pH，最大 pH 为 MEP。

[0068] 修饰的木聚糖酶的 MEP 可为 pH6.2、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、8.0 或 8.5 或者处于其间的任何 pH。在一个非限制的实例中，该

MEP 可以是约 pH6.5- 约 8.5 或中间任意范围 ; 约 pH6.8- 约 8.0 或中间任意范围 ; 或者约 pH7.0- 约 8.0 或中间任意范围。

[0069] “TrX 编号”是指对应于 TrX(Xyn II- 表 1 ; Tr2- 图 1 ; SEQ ID NO :16) 氨基酸序列的氨基酸位置的编号。如下文公开的并且如图 1 标示的, 家族 11 木聚糖酶呈现出了很大程度的序列相似性。因此, 通过比对氨基酸使木聚糖酶之间的序列相似性最优并且通过使用 TrX 氨基酸的编号作为编号的基础, 可以确定其他木聚糖酶内的氨基酸相对于 TrX 的位置。本领域技术人员已知的标准方法可用于对这些序列进行比对。

[0070] 如本文中更详细描述, 已经制备了数种呈现出提高的嗜热性、嗜碱性和 / 或热稳定性的木聚糖酶突变体。表 2 中列出了数种突变体, 但不能被认为是以任何方式对此进行限制。

[0071] 表 2 : 修饰的木聚糖酶

[0072]

突变体 TrX	涉及的突变	SEQ ID NO:
TrX-R	TrX: K58R	-
TrX-H	TrX: S40H	65
TrX-C	TrX: S99C	-
TrX-CC	TrX: S99C 和 Y118C	66
TrX-R CC	TrX: K58R, S99C 和 Y118C	68
TrX-H CC	TrX: S40H, S99C 和 Y118C	67
TrX-HR CC	TrX: S40H, K58R, S99C 和 Y118C	69
TrX-HML RR CC	TrX: N10H, Y27M, N29L, S40R, K58R, S99C 和 Y118C	70
TrX-HML RRA CC	TrX: N10H, Y27M, N29L, S40R, K58R, S75A, S99C 和 Y118C	71
TrX-HML A CHC AE	TrX: N10H, Y27M, N29L, S75A, S99C, L105H, Y118C, Q125A 和 I129E	72
TrX-HML RA CHC AE	TrX: N10H, Y27M, N29L, K58R, S75A, S99C, L105H, Y118C, Q125A 和 I129E	73
TrX-HDML RA CHC AE	TrX: N10H, N11D, Y27M, N29L, K58R, S75A, S99C, L105H, Y118C, Q125A 和 I129E	74
TrX-HDML HRA CHC AE	TrX: N10H, N11D, Y27M, N29L, S40H, K58R, S75A, S99C, L105H, Y118C, Q125A 和 I129E	77
TrX-HDML CR ACHC AE	TrX: N10H, N11D, Y27M, N29L, S40C, K58R, S75A, S99C, L105H, Y118C, Q125A 和 I129E	75
TrX-HDML TRA CHC AE	TrX: N10H, N11D, Y27M, N29L, S40T, K58R, S75A, S99C, L105H, Y118C, Q125A 和 I129E	-
TrX-HDML YRA CHC AE	TrX: N10H, N11D, Y27M, N29L, S40Y, K58R, S75A, S99C, L105H, Y118C, Q125A 和 I129E	78
TrX-HDML FRA CHC AE	TrX: N10H, N11D, Y27M, N29L, S40F, K58R, S75A, S99C, L105H, Y118C, Q125A 和 I129E	76
TrX-HDML RRA CHC AE	TrX: N10H, N11D, Y27M, N29L, S40R, K58R, S75A, S99C, L105H, Y118C, Q125A 和 I129E	79
TrX-HDML ARA CHC AE	TrX: N10H, N11D, Y27M, N29L, S40A, K58R, S75A, S99C, L105H, Y118C, Q125A 和 I129E	-
TrX-HDML HCRA CHC AE	TrX: N10H, N11D, Y27M, N29L, S40H, Q52C, K58R, S75A, S99C, L105H, Y118C, Q125A 和 I129E	80
TrX-HDML RRA CHC AERR	TrX: N10H, N11D, Y27M, N29L, S40R, K58R, S75A, S99C, L105H, Y118C, Q125A, I129E, H144R 和 Q161R	81
TrX-HDML RA CHC AEN	TrX: N10H, N11D, Y27M, N29L, S40R, S75A, S99C, L105H, Y118C, Q125A, I129E 和 I131N	82

[0073] 对 WO 03/046169、美国专利 No. 5, 759, 840、WO 01/92487 和 WO 2005/093072 (它们的内容通过引用的方式纳入本文) 中记载的木聚糖酶突变体进行进一步修饰以在位置 99

和 118 引入半胱氨酸。可以根据本发明修饰的木聚糖酶突变体的非限制性实例在表 3 中列出。

[0074] 表 3 :WO 03/046169、美国专利 No. 5, 759, 840 和 WO 01/92487 中记载的修饰的木聚糖酶

[0075]

突变体 TrX	突变
TrX-C ^a	TrX: Y118C
TrX-HML ^b	TrX: N10H, Y27M 和 N29L
TrX-HML-AHAE ^c	TrX: N10H, Y27M, N29L, S75A, L105H, Q125A 和 I129E
TrX-HDML AH CAERR ^a	TrX: N10H, N11D, Y27M, N29L, S75A, L105H, Y118C, Q125A, I129E, H144R 和 Q161R
TrX-HDML AHGC AERR ^a	TrX: N10H, N11D, Y27M, N29L, S75A, L105H, D116G, Y118C, Q125A, I129E, H144R 和 Q161R
TrX-HML AHAE RR ^c	TrX: N10H, Y27M, N29L, S75A, L105H, Q125A, I129E, H144R 和 Q161R

[0076] ^aWO 03/046169 (Sung)

[0077] ^b美国专利 No. 5, 759, 840 (Sung et al.)

[0078] ^cWO 01/92487 (Sung)

[0079] 提高木聚糖酶的嗜热性

[0080] 在图 3 中示出了温度对具有单突变 S40H(TrX-40H)、K58R(TrX-58R)、S99C(TrX-99C) 或 Y118C(TrX-118C) 的里氏木霉木聚糖酶 TrX 水解木聚糖的作用。

[0081] 在 WO 03/046169 (Sung) 中已经描述了利用单突变提高了家族 11 木聚糖酶的嗜热性, 例如修饰的木聚糖酶 TrX-118C 中的 Y118C。然而, 还没有报道过基于位于位置 118 的半胱氨酸和另一半胱氨酸产生二硫键以提高木聚糖酶的热稳定性、嗜热性或嗜碱性的可能性。本发明涉及为上述目的而构建 99C/118C 二硫键合, 基于天然出现的或生成的 Cys-118 与在残基 99 处天然出现的或通过 S99C 突变形成的第二半胱氨酸。

[0082] 为了验证在较高温度下任何活性的提高都是形成二硫键的结果, 测试了 S99C 单突变 (TrX-99C; 图 3)。该木聚糖酶突变体 (TrX-99C) 与天然 TrX 相比在较高温度下没有显示出酶活性的提高。因此, 仅 S99C 单突变对 TrX 的温度 / 活性谱没有作用。

[0083] 然而, 当突变 S99C 和 Y118C 结合形成木聚糖酶双突变体 (TrX-99C-118C) 时, 甚至与单突变体 TrX-118C 相比嗜热性都有显著提高 (图 3 和 4)。双突变体 TrX-99C-118C 的最适温度比天然木聚糖酶 (TrX) 和 TrX-118C 分别提高约 7°C 和 5°C (图 3 和 4)。TrX-99C-118C 除了具有更高的最适温度外, 它与 TrX 在各自的最适温度下相比还呈现出更高的最佳活性 (图 3)。

[0084] 在木聚糖酶 TrX-40H 中单突变 S40H 与野生型 TrX 相比, 在较高温度显示了提高的酶活性 (图 3)。当与 TrX-99C-118C 相比时, 该突变对嗜热性产生的正效应在另一种木聚糖酶突变体 TrX-40H-99C-118C (图 3 和 4) 中也得到了确证。

[0085] 在修饰的木聚糖酶 TrX-58R 的情况下, 如 Turunen et al. (2002) 之前所报道的, 突变 K58R 单独无法提高天然 TrX 的活性 (图 3)。然而, 在包含突变 S99C 和 Y118C

的木聚糖酶突变体中,突变 K58R 提高了在较高温度下的酶活性。通过将木聚糖酶突变体 TrX-58R-99C-118C 和 TrX-40H-58R-99C-118C(图 3 和 4) 的嗜热性与木聚糖酶 TrX-99C-118C 和 TrX-40H-99C-118C 的嗜热性分别比较确证了这一点。虽然突变 K58R 单独不能提高木聚糖酶在较高温度下的活性,但是它有可能与其他突变 S40H 和 S99C/Y118C 结合对嗜热性有产生正效应。

[0086] 上述突变与本领域中已述的其他有利的木聚糖酶突变是相容的。如下文所述,在构建具有较高最适温度和最佳活性的木聚糖酶的组合突变体时证明了这些突变与已经公开突变组合的叠加效应。

[0087] 已经以突变体 TrX-10H-27M-29L 的形式证明了突变 N10H、Y27M 和 N29L 提高了 TrX 的嗜热性 (TrX-HML; 见美国专利 No. 5, 759, 840)。突变 S40H、K58R 和 S99C/Y118C 整合到 TrX-10H-27M-29L 中形成木聚糖酶突变体 TrX-10H-27M-29L-40R-58R-99C-118C, 在较高温度下具有进一步提高的酶活性 (图 5)。

[0088] 突变 N10H、Y27M、N29L、S75A、L105H、Q125A 和 I129E 也已经被证明提高了 TrX 的嗜热性 (突变体 TrX-10H-27M-29L-75A-105H-125A-129E; 参见 W001/92487)。突变 S40H、K58R 和 S99C/Y118C 整合到 TrX-10H-27M-29L-75A-105H-125A-129E 中形成木聚糖酶突变体 TrX-10H-27M-29L-40R-58R-75A-99C-118C、TrX-10H-27M-29L-75A-99C-105H-118C-125A-129E 和 TrX-10H-27M-29L-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E, 在较高温度下具有增强的酶活性 (图 6 和 8)。

[0089] 添加 N11D 突变形成了修饰的木聚糖酶 TrX-10H-11D-27M-29L-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E (图 6、7 和 8)。构建了一系列基于该木聚糖酶的在位置 40 携带另一突变的突变体以确定增强该酶嗜热性的那些氨基酸残基。在位置 40 引入不同的突变 (S40C、F、R、Y、A 或 T) 以形成 7 种新木聚糖酶突变体: TrX-10H-11D-27M-29L-40X-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E (其中 X 是 A、C、F、H、R、Y 或 T)。与具有较少突变的木聚糖酶 TrX-40H 和 TrX-40H-99C-118C 类似, 与原酶相比突变 S40H 或 S40R 的引入适度地提高了所得木聚糖酶突变体在较高温度下的相对活性 (图 6、7 和 8)。S40C、S40F 和 S40Y 之类的其他突变也呈现出了相同的增强效应 (图 7), 而 S40T 和 S40A 对温度 / 活性谱的没有这种增强效应 (图 7)。

[0090] 现有技术没有报道通过将 Ser40 突变成 Cys、Phe、Tyr、His 或 Arg 对家族 11 木聚糖酶的嗜热性产生的正效应。已知的家族 11 木聚糖酶在位置 40 都不具有残基 Cys、Phe、Tyr 或 His。Arg 残基虽然存在于嗜热的嗜热真菌 Xyn 中 (图 1), 但是也存在于嗜中温的浅青紫链霉菌 Xln B 中。

[0091] 将另一个突变 Q52C 引入 TrX-10H-11D-27M-29L-40H-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E 中。产生的木聚糖酶突变体 TrX-10H-11D-27M-29L-40H-52C-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E 与原酶相比, 在 80 和 85℃ 下能保持显著高的相对活性 (图 6、7 和 8)。已知家族 11 木聚糖酶在位置 52 都不具有残基 Cys。

[0092] 之前已经证明突变 H144R 和 Q161R 可提高木聚糖酶 TrX-10H-11D-27M-29L-75A-105H-118C-125A-129E-144R-161R (TrK-HDML-AH-118C-AE-RR; WO 03/046169) 的最适 pH。添加突变 S40R、K58R 和 S99C 产生木聚糖酶突变体 TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E-144R-161R (图 9), 它可在 80 和 85℃ 的较高温度下保持较高活性。

[0093] 以上结果证明了突变 S40X(其中 X 是 C、F、H、R 或 Y)、Q52C、K58R 和 S99C/Y118C 对突变木聚糖酶嗜热性的提高效应不仅相互之间是互补的或叠加的,而且与美国专利 No. 5, 759, 840、WO 01/92487 和 WO 03/046169 中记载的突变也是互补的或叠加的。

[0094] 将突变 113N 引入修饰的木聚糖酶 TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E 中。生成的突变木聚糖酶 TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E-131N 与 TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E 相比显示出稍高的最适温度(图 14)。这些结果证明了突变 131N 与 99C/118C 二硫化突变以及提高嗜热性的其他突变是相容的。

[0095] 提高木聚糖酶的嗜碱性

[0096] 二硫化突变 S99C/Y118C 对木聚糖酶 pH/ 活性谱的影响示于图 10 中。木聚糖酶突变体 TrX-99C-118C 与天然木聚糖酶 TrX 相比在 6.5-7.5 的较高 pH 值时保持了较高的活性。木聚糖酶 TrX-99C-118C 保持 80% 最佳活性的 pH 范围是 4.8-7.0, 宽于相应的天然或未修饰的木聚糖酶 TrX 的 4.8-6.0 的范围。这些结果证明所述 99C/118C 突变对木聚糖酶 TrX 嗜碱性的正贡献。

[0097] 为了鉴定在较高 pH 下有较高活性的直接原因,将仅具有 S99C/Y118C 中一个突变的木聚糖酶与 TrX-99C-118C 和天然木聚糖酶 TrX 两者对比。这两种具有单突变 TrX-99C 或 TrX-118C 的木聚糖酶显示了与 TrX 类似的 pH/ 活性谱(图 10)。这确证了在较高 pH 下活性的提高是突变 S99C 和 Y118C 组合而形成的二硫键的结果,而不是单 Cys 突变的结果。

[0098] 还在按照上文所述构建的两组突变体中研究了突变 S40X(其中 X 是 H 或 R)、K58R 和 S99C/Y118C 对木聚糖酶的 pH/ 活性谱的作用。

[0099] 第一组衍生自突变体 TrX-10H-27M-29L-75A-105H-125A-129E(参见 W001/92487)。二硫化木聚糖酶突变体 TrX-10H-27M-29L-75A-99C-105H-118C-125A-129E 在 7.0、7.5 和 8.0 的 pH 值下分别显示为最大活性的 75、60 和 50%(图 11),而原木聚糖酶 TrX-10H-27M-29L-75A-105H-125A-129E 在这些 pH 下分别仅显示为最大活性的 60、40 和 22%。这确证了 99C/118C 突变对木聚糖酶嗜碱性的贡献,并且该突变与本领域已经公开的嗜碱性和嗜热性突变是相容的。

[0100] 构建了在位置 40 和 58 具有额外突变的该组其他成员,这些成员还含有所述 99C/118C 二硫化突变。它们包括 TrX-10H-27M-29L-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E、TrX-10H-11D-27M-29L-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E 和 TrX-10H-11D-27M-29L-40H-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E。然而,这些突变体与原木聚糖酶 TrX-10H-27M-29L-75A-99C-105H-118C-125A-129E 相比在较高 pH 下没有显示出任何的活性提高(图 11)。虽然这些位于位置 40 和 58 的嗜热性突变无法提高木聚糖酶的嗜碱性,但是它们没有不利效应,这因此证明了它们在构建嗜热性和嗜碱性的木聚糖酶时与其他有利突变是相容的。

[0101] 突变 S99C/Y118C 的提高效应还在基于 TrX-10H-27M-29L-75A-105H-125A-129E-144R-161R 的第二组中得到了进一步的证明,该木聚糖酶包含两个突变 H144R 和 Q161R 且在 WO 01/92487 中成功地提高了木聚糖酶的最适 pH。具有突变 99C/118C 的木聚糖酶突变体 TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E-144R-161R 与它的原 TrX-10H-27M-29L-75A-105H-125A-129E-144R-161R 相比在较高 pH 下呈现出更大的活性(图 12)。它还优于另一种木聚糖酶 TrX-10H-11D-27M-29L-75A-105H-116G-118C-125A-129E-1

44R-161R(图 12),后者是 WO 03/046169 的突变木聚糖酶中具有最大改良的 pH/ 活性谱的木聚糖酶突变体。这是证明突变 99C/118C 与其他嗜碱性突变相容的另一个非限制性实例。

[0102] 还研究了突变 131N 对木聚糖酶突变体 TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E 的 pH/ 活性谱的作用。如图 15 和 16 所示,修饰的木聚糖酶 TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E-131N 与 TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E 相比对硬木(图 15)和软木(图 16)两者都有稍宽的最适 pH。这是证明突变 99C/118C 与提高嗜碱性的其他突变相容的另一个非限制性实例。

[0103] 提高木聚糖酶的热稳定性

[0104] 通过在无底物的情况下于不同温度下孵育比较突变体木聚糖酶的热稳定性。在 30 分钟后,用可溶性木聚糖作为底物通过标准测定法确定木聚糖酶的残余活性。

[0105] 通过突变体 TrX-99C-118C 和天然 TrX 的比较研究确定了突变 99C/118C 对木聚糖酶的热稳定性的作用。在较高温度孵育 30 分钟后,前者保持了比后者更高的残余活性(图 13)。

[0106] 确定了 T_{50} 。与 51℃ 的天然木聚糖酶 TrX 的 T_{50} 相比,二硫化木聚糖酶 TrX-99C-118C 的 T_{50} 是 58℃。这表明了通过引入突变 99C/118C,以“ T_{50} ”度量的热稳定性提高了约 7℃。

[0107] 还测试了包含突变 99C/118C 与另外突变的修饰的木聚糖酶的热稳定性并与 TrX-10H-27M-29L 进行了比较。如图 17 所示,TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E-131N 和 TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E 与 TrX-10H-27M-29L 相比都显示了更优的热稳定性。

[0108] 总之,本发明的嗜热性、嗜碱性和 / 或热稳定性增强的木聚糖酶突变体包含位于位置 99 和 118 的半胱氨酸残基。所述修饰的木聚糖酶还可以包含一种或多种的以下的氨基酸置换:

[0109] (i) 在位置 58 的置换氨基酸例如碱性氨基酸,包括但不限于 Arg;

[0110] (ii) 在位置 40 的置换氨基酸,包括但不限于选自 Arg、Cys、Phe、His 和 Tyr 的氨基酸;

[0111] (iii) 在位置 10、27 和 29 的氨基酸置换——例如在位置 10 的置换氨基酸,包括但不限于 His 的碱性;在位置 27 的疏水性置换氨基酸,包括但不限于 Met;及在位置 29 的疏水性置换氨基酸,包括但不限于 Leu;以及

[0112] (iv) 在 (i)-(iii) 中所列突变的任意组合。

[0113] 另外,上述的修饰的木聚糖酶还可以包含一种或多种以下氨基酸置换:

[0114] (v) 在位置 75 和 125 的非极性的置换氨基酸,例如包括但不限于 Ala 或 Glu;在位置 105 的氨基酸置换例如取代的碱性氨基酸,包括但不限于 His、Arg 和 Lys;及 / 或在位置 129 的氨基酸置换例如取代的酸性氨基酸,包括但不限于 Asp 或 Glu;

[0115] (vi) 在位置 52 的氨基酸置换包括但不限于 Cys;

[0116] (vii) 在位置 11 的氨基酸置换例如酸性氨基酸,包括但不限于 Asp;

[0117] (viii) 在位置 144 和 / 或 161 的氨基酸置换包括但不限于碱性氨基酸,例如 Arg;

[0118] (ix) 在位置 131 的变成 Asn 的氨基酸置换;以及

[0119] (x) 在 (v)-(viii) 中所述突变的任意组合。

[0120] 在表 2 中给出了包含 99C/118C 二硫键与上文列出氨基酸置换的木聚糖酶突变体的非限制性实例。

[0121] 将 (v)-(x) 中一种或多种氨基酸置换引入包含突变 99C/118C 且不包含 (i)-(iv) 中所列突变的修饰的木聚糖酶也在本发明的范围内。再者,所述修饰的木聚糖酶可以包含上文未列出的氨基酸置换与突变 99C/118C 的组合。另外,突变 99C/118C 还可以被引入美国专利 No. 5,759,840、WO 03/046169、WO 01/92487 或 WO 2005/093072(它们通过引用的方式纳入本文)中记载的任何木聚糖酶突变体中。

[0122] 还需要理解的是,若 99 或 118 这两个位置之一已经有 Cys 残基,则也可以通过仅将位于位置 99 或 118 的一个位置的氨基酸置换成 Cys 来形成 99C/118C 二硫键。因此,本发明涉及在位置 99 和 118 包含半胱氨酸残基以形成 99C/118C 二硫键的修饰的木聚糖酶,该木聚糖酶是通过将位于位置 99 和 / 或 118 的氨基酸置换成半胱氨酸产生。

[0123] 存在在相当于里氏木霉木聚糖酶 II 位置 99 和 118 的位置具有半胱氨酸残基的曲霉木聚糖酶的天然实例——例如黑曲霉 awamori 变种;白曲霉 XynC;塔宾曲霉(图 1)。然而,与天然 TrX 类似,曲霉木聚糖酶仅在低温(Fushinobuet al.,1998)及酸性 pH(Krengel and Dijkstra,1996)下有功能,且稳定的上限仅为 40 °C(Ito et al.,1992, Biosci. Biotechnol. Biochem. 56 :906-912)。因此,在这些嗜中温曲霉木聚糖酶的位置 99 和 118 存在半胱氨酸残基不能表明在木聚糖酶中形成二硫键会提高其在高温下的活性。再者,这些曲霉木聚糖酶仅能在酸性 pH 值下发挥功能,具有大约 2-3 的酸性的最适 pH(Krengel and Dijkstra,1996;Fushinobu et al.,1998, Esteveset al.,2004;Hakulinen et al.,2003)。因此,这并不表明在另一种嗜酸性木聚糖酶(包括但不限于 TrX)中形成类似的二硫键会提高其在较高 pH 下的活性。而且,很少观察到二硫化突变提高酶嗜碱性的情况。

[0124] 因此,本发明的修饰的木聚糖酶可以衍生自家族 11 木聚糖酶,包括但不限于里氏木霉木聚糖酶。所述修饰的木聚糖酶优选地不是天然的曲霉木聚糖酶。然而,在位置 99 和 118(TrX II 编号)包含天然出现的半胱氨酸残基的曲霉木聚糖酶可用于衍生修饰的木聚糖酶,所述修饰的木聚糖酶包含本文描述的其他突变以提高该曲霉木聚糖酶嗜热性和嗜碱性。

[0125] 再者,一种被称为 MODIP 的计算方法(Sowdhamini et al.,1989;Daniet al.,2003)——它是为协助设计用于稳定蛋白的二硫桥而建立的——已经预测,任何稳定作用的二硫键围住一个含有 25 个或更多个氨基酸残基的环——即两个半胱氨酸残基之间的残基数目。另一项相关研究也得出结论,长度少于 25 个残基的环的稳定作用很小。本发明的 99C/118C 二硫键——具有 19 个残基的环——显然少于所预测的用于稳定作用的二硫键的最少 25 个残基。已经报道的在家族 11 木聚糖酶中任何稳定作用的二硫键的最小环是在 TrX 的 N 末端形成的 2/28 二硫键,其环长度为 26 个残基(Fenel et al.,2004)。该 2/28 二硫键不会在较大 pH 范围内提高木聚糖酶活性。

[0126] 上面的描述并非意在以任何方式限制要求保护的本发明。再者,所讨论的特征的组合对本发明的方案来说不是一定必需的。

[0127] 在以下的实施例中将对本发明进一步阐明。然而,应理解这些实施例只是为了阐明本发明,而不应用于任何方式限制本发明范围。

[0128] 实施例

[0129] 实施例中的木聚糖酶变体的构建需要用到仅包含部分木聚糖酶基因的质粒前体(表 4)。该质粒前体不能够表达木聚糖酶。质粒前体的合成已经在前文中描述。

[0130] 表 4:用于构建新的突变木聚糖酶的包含部分木聚糖酶基因的质粒。

[0131]

质粒前体 ^a	突变
pTrX(1-113) ^a	(114-C 末端) 序列删除

[0132] ^aWO 01/92487 (Sung)

[0133] 还将以下实施例中构建的新木聚糖酶变体与多种选定的已知木聚糖酶变体比较。表达前述的这些木聚糖酶突变体的质粒在表 5 中列出。

[0134] 表 5:本领域中已经报道的表达木聚糖酶的质粒

[0135]

表达质粒 ^{a, b 或 c}	突变
pTrX-118C ^a	TrX :Y118C
pTrX-HML ^b	TrX :N10H, Y27M 和 N29L
pTrX-HML-75A-105H-125A-129E ^c	TrX :N10H, Y27M, N29L, S75A, L105H, Q125A 和 I129E
pTrX-HML-75A-105H-125A-129E-144R-161R ^a	TrX :N10H, Y27M, N29L, S75A, L105H, Q125A, I129E, H144R 和 Q161R
pTrX-HDML-75A-105H-118C-125A-129E-144R-161R ^b	TrX :N10H, N11D, Y27M, N29L, S75A, L105H, Y118C, Q125A, I129E, H144R 和 Q161R

[0136] ^aWO 03/046169 (Sung)

[0137] ^b美国专利 No. 5, 759, 840 (Sung et al.)

[0138] ^cWO 01/92487 (Sung)

[0139] 实施例 1:构建里氏木霉木聚糖酶突变体

[0140] 根据本领域技术人员熟知的已确立的方案(例如 Sung et al., 1986) 或者依照酶或试剂盒厂商推荐的方法进行诸如质粒制备、限制性内切酶消化、聚合酶链式反应、寡核苷酸磷酸化、连接、转化和 DNA 杂交的基本的重组 DNA 方法。用于多种酶的缓冲液为试剂盒的一部分,或者根据厂商的说明书而制备。限制性内切酶、T4 多核苷酸激酶和 T4DNA 连接酶购自 New EnglandBioLabs Ltd, Mississauga, Ontario。GeneAmp PCR 试剂试剂盒购自 Perkin-Elmer。前体质粒 pXYbc——它是具有插入的环状芽胞杆菌木聚糖酶基因的 pUC 型质粒——之前已经被制备并且被公开过(Sung et al., 1993;Campbell et al., 美国专利 No. 5, 405, 769)。将常用的大肠杆菌菌株 HB101 (Clonetech Lab, Palo Alto, CA) 用作所有基因构建体的转化和表达宿主。桦木木聚糖和 Remazol Brilliant Blue R-D- 木聚糖购自 Sigma (St. Louis, Mo)。羧基苯甲酸酰肼 (HBAH) 购自 Aldrich。用 APPLIED BIOSYSTEM DNA 合成仪 (380B 型) 制备寡核苷酸。所有木聚糖酶的测定均在有盖的循环水浴 (Haake, F 4391 型) 中进行,并保持在 $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 温度范围内。

[0141] 1.1 构建携带合成的 TrX (SEQ ID NO :40) 的质粒前体 pTrX

[0142] 以下公开的用于突变的质粒前体 pTrX 已经在现有技术中有记载 (Sung et al., 1995)。该质粒衍生自质粒 pUC119 并具有编码里氏木霉木聚糖酶 (TrX ;图 2) 的合成的核苷酸序列。该木聚糖酶及接下来所述的其他木聚糖酶突变体的表达均在 pUC 质粒的 lacZ 启动子的控制之下。木霉木聚糖酶基因的完全装配需要两个阶段,初始涉及 92-190 区域的连接,随后是 1-92 区域 (TrX 编号)。该基因的构建方案是常规的,并且与用于多种其他基因的标准公开方法相同。该方案需要将编码木聚糖酶的重叠的合成寡核苷酸进行酶促磷酸化。然后将其连接至适当切割的质粒中。

[0143] 为了构建 TrX (92-190), 设计了以下 10 种重叠的寡核苷酸 (参见图 2) :

- [0144] XyTv-101, SEQ ID NO :30 ;
[0145] XyTv-102, SEQ ID NO :31 ;
[0146] TrX-103, SEQ ID NO :32 ;
[0147] XyTv-104, SEQ ID NO :33 ;
[0148] XyTv-105, SEQ ID NO :34 ;
[0149] XyTv-106, SEQ ID NO :39 ;
[0150] XyTv-107, SEQ ID NO :38 ;
[0151] TrX-108, SEQ ID NO :37 ;
[0152] XyTv-109, SEQ ID NO :36 ;和
[0153] XyTv-110, SEQ ID NO :35。

[0154] 用模拟大肠杆菌的密码子使用频率设计这些突变体。两末端寡核苷酸的 SalI 和 BglIII 粘性末端使得可以将所述 10 个片段酶连接至线性质粒 pXYbc 中。在包含 10× 标准激酶缓冲液 (0.4 μL)、1mM ATP (4 μL)、T4 DNA 激酶 (5 单位) 和水 (3 μL) 的混合液中,将编码木霉木聚糖酶 TrX (92-190) 区域的这 10 个寡核苷酸 (50pmol, 每个 1 μL) 磷酸化。在 37℃ 下进行 1 小时的磷酸化反应。然后将溶液合并并且加热至 70℃ 维持 10 分钟。在缓慢冷却至室温之后,将合并的溶液加至 4mM ATP (3.5 μL)、SalI/BglIII 线性化质粒 pXYbc (0.1pmol) 和 T4DNA 连接酶 (3.5 μL) 的混合液中,并且在 12℃ 下孵育 20 小时。将等份的连接混合液用于转化含氨苄青霉素 (100mg/L) 的 YT 平板 (1L 水中溶 8g 酵母提取物、5g 细菌用胰蛋白酶、5g NaCl 和 15g 琼脂) 上的大肠杆菌 HB101。

[0155] 为了制备杂交探针,在 37℃ 下将所述寡核苷酸之一例如 XyTv-110 (10pmol, 1 μL) 用 T4DNA 激酶 (1 μL)、10× 激酶缓冲液 (1 μL) 和水 (4 μL) 以 ³²P-ATP (10pmol, 3 μL) 磷酸化 1 小时。

[0156] 随机选择转化体用于杂交分析。将菌落在具有氨苄青霉素的 YT 平板上培养过夜并转移至尼龙滤膜上。然后将它们用 0.5N NaOH-1.5M NaCl 变性 (10 分钟) 并用 0.5N Tris-HCl (pH7.0)-1.5M NaCl 中和 (10 分钟)。将该滤膜用 254nm 的紫外线照射 8 分钟后,用 6×SSC-0.05% Triton X-100 洗涤 30 分钟。将细胞碎片完全刮掉。在新鲜溶液中再孵育 30 分钟后,将双份滤膜分别转移至单独的 6×SSC-1% 硫酸葡聚糖-0.05% Triton X-100-1× Denhardt 杂交液的混合液中。将 ³²P- 标记的探针加到滤膜上。在 45℃ 下维持 16 小时后,用 6×SSC-0.05% Triton X-100 洗涤滤膜两次:在室温下洗涤 5 分钟,然后在 65℃ 下洗涤 30 分钟。通过放射自显影分析鉴定具有中间质粒 pBcX-TrX 的阳性杂交克隆。

[0157] 上述涉及合成的重叠寡核苷酸的酶促磷酸化及连接至线性化质粒的方案被应用于 TrX (1-92) 区域的装配以及用于随后产生本发明中所述其他木聚糖酶突变体的盒式诱变中。

[0158] 为了装配 TrX (1-92 ; TrX 编号) 区域以获得全长里氏木霉木聚糖酶 II 基因 (TrX), 将中间质粒 pBcX-TrX 用内切核酸酶 NheI 和 KpnI 线性化以释放用于 BcX 的 DNA 插入片段 (1-83)。通过上述的方案,使用 NheI 和 KpnI 粘性末端将编码 TrX (1-91) 序列的 8 个重叠寡核苷酸:

- [0159] TrX-1, SEQ ID NO :22 ;
[0160] XyTv-2, SEQ ID NO :23 ;
[0161] TrX-3, SEQ ID NO :24 ;
[0162] XyTv-4, SEQ ID NO :25 ;

[0163] XyTv-5, SEQ ID NO :29 ;

[0164] TrX-6, SEQ ID NO :28 ;

[0165] XyTv-7, SEQ ID NO :27 ;和

[0166] TrX-8, SEQ ID NO :26

[0167] 连接至线性化质粒 pBcX-TrX(图 2) 中。新质粒 pTrX 因此携带合成的 TrX 基因 (SEQ ID NO :40)。

[0168] 下文所述的所有木聚糖酶突变体都通过盒式诱变的方法构建。盒式诱变的方案与上述基因装配的方案相同。盒式诱变通常包括:(i) 将重叠的合成寡核苷酸进行酶促磷酸化,(ii) 将合成寡核苷酸与线性化的质粒连接,(iii) 将该质粒转化至大肠杆菌 HB101 感受态细胞中,(iv) 通过标记的寡核苷酸杂交鉴定突变转化体,以及 (v) 通过双脱氧核苷酸测序法确证突变。

[0169] 1.2 构建携带外膜蛋白 A 分泌前导序列 (SEQ ID NO :41 和 42) 的质粒 pOmp-TrX

[0170] 接着 1.1 的实验方案,寡核苷酸 Omp-TX-1、-2、-3 和 -4——编码大肠杆菌外膜蛋白 A 分泌前导序列以及重建的 TrX(1-7) 区域——连接至 NheI/PinAI- 切割的质粒 pTrX 上。形成的质粒 pOmp-TrX 通过表达和分泌可以产生有功能的木聚糖酶。

[0171] Omp-TX-1

[0172] [OmpA 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

[0173] K K T A I A I A V A L A G

[0174] 5' -CT AGC AAG AAG ACA GCA ATA GCA ATC GCT GTG GCA TTA G|CC GGC

[0175] G TTC TTC TGT CGT TAT CGT TAG|CGA CAC CGT AAT C GG CCG

[0176] NheI Omp-TX-4 Omp-TX-3

[0177] Omp-TX-2 TrX 序列

[0178] 15 16 17 18 19 20 21][1 2 3 4 5 6 7

[0179] F A T V A Q A Q T I Q P G T

[0180] TTT GCG ACC GTT GCT CAG GCC CAG ACC ATA CAA CCA GGA A(SEQ ID NO :41

[0181] AAA CGC TGG CAA CGA GTC CGG GTC TGG TAT GTT GGT CCT TGG CC(SEQ ID

[0182] NO :42) PinAI

[0183] 1.3 构建质粒前体 pOmp-TrX(1-113)

[0184] 质粒 pOmp-TrX-(1-113) 包含 TrX 的 1-113 位氨基酸序列且不能表达有活性的木聚糖酶。这种转化体通过在蓝色木聚糖平板上转化体菌落周围没有透明区或晕轮而确证。

[0185] 该质粒的构建通过:(i) 通过用限制性内切酶 BamHI 和 BglIII 切割去除质粒 pOmp-TrX 的 TrX(114-190) 编码序列,(ii) 连接线性化质粒的相同粘性末端,(iii) 转化至大肠杆菌 HB101 感受态细胞中,然后涂布含有氨苄青霉素 (100mg/L) 的 YT 平板 (1L 水中溶 5g 酵母提取物、3g 细菌用胰蛋白胨、5g NaCl、15g 琼脂;1g Remazol Brilliant Blue R-D- 木聚糖),(iv) 通过木聚糖酶活性丧失鉴定突变转化体 (40℃ 下过夜后在蓝色木聚糖平板上的菌落周围没有透明区或晕轮),以及 (v) 通过双脱氧核苷酸测序法确证突变。所述每个步骤的方案类似于上述基因装配的方案。

[0186] 1.4 构建质粒前体 pTrX-HML

[0187] 这个质粒前体 pTrX-HML 的构建在美国专利 No. 5, 759, 840 中已经有详细的描述

(参见实施例 1N, 通过引用的方式纳入本文; 被称为 pNI-TX13 的质粒)。TrX-HML 包含天然 TrX 木聚糖酶, 连同 N10H(位于位置 10 的 Asn 被 His 替换)、Y27M 和 N29L 三个突变。包含 N10H、Y27M 和 N29L 的序列的前 30 个氨基酸如下所示。

```
[0188]   TrX                               1  2  3  4  5  6  7  8
[0189]   氨基酸                           Q  T  I  Q  P  G  T  G
[0190]   5' -CT AGC TAA GGA GG CTG CAG ATG CAA ACA ATA CAA CCA GGA ACC GGT
[0191]   3' -G ATT CCT CC GAC GTC TAC GTT TGT TAT GTT GGT CCT TGG CCA
[0192]   NheI                               PinAI
[0193]   9  10  11  12  13  14  15  16  17  18  19  20  21  22  23  24
[0194]   Y  H  N  G  Y  F  Y  S  Y  W  N  D  G  H  G  G
[0195]   TAC CAC AAC GGT TAC TTTTAC AGCTATTGG AAC GAT GGC CATGGA GGC
[0196]   ATG GTG TTG CCA ATG AAA ATG TCG ATA ACC TTG CTA CCG GTA CCT CCG
[0197]   25  26  27  28  29  30
[0198]   V  T  M  T  L  G
```

[0199] GTC ACA ATG ACT CTG GGG (SEQ ID NO :43)

[0200] CAG TGT TAC TGA GAC CCC (SEQ ID NO :44)

[0201] 1.5 构建质粒前体 pOmp-TrX-HML (1-113) 和 pOmp-TrX-HDML (1-113)

[0202] 质粒 pOmp-TrX-HML (1-113) 和 pOmp-TrX-HDML (1-113) 包含 TrX 的 1-113 位氨基酸序列且不能表达有活性的木聚糖酶。这些转化体通过在蓝色木聚糖平板上转化体菌落周围没有透明区或晕轮而确证。

[0203] 在构建质粒 pOmp-TrX-HML (1-113) 的过程中, 以 TX-10H-1 (SEQ NO :45) 和 TX-C1 为 PCR 引物并以 pTrX-HML (表 5) 为模板通过 PCR 产生编码 (8-C 末端) 区域的 DNA 片段。用限制性内切酶 PinAI 和 BamHI 切割该 PCR 产物产生 (8-113) 序列。

[0204] 在构建质粒 pOmp-TrX-HDML (1-113) 的过程中, 以引物 TX-10H11D-1 (SEQNO :46, 它已经被记载于 WO 03/046169 中) 替代 TX-10H-1 通过 PCR 产生 (8-C 末端) 序列。用限制性内切酶 PinAI 和 BamHI 切割该 PCR 产物产生 (8-113) 序列。

[0205] TX-10H-1 (SEQ ID NO :45)

[0206] 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

[0207] G T G Y H N G Y F Y S Y W

[0208] 5' -GGA ACC GGT TAC CAC AAC GGT TAC TTT TAC AGC TAT TGG

[0209] PinAI

[0210] TX-10H11D-1 (SEQ ID NO :46)

[0211] 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

[0212] G T G Y H D G Y F Y S Y W

[0213] 5' -GGA ACC GGT TAC CAC GAC GGT TAC TTT TAC AGC TAT TGG

[0214] PinAI

[0215] 反向 PCR 引物 TX-C1 包含:

[0216] TX-C1 (SEQ ID NO :47)

[0217] 183 184 185 186 187 188 189 190 ter

[0218] G S A S I T V S

[0219] CCA AGG CGA TCA TAA TGT CAC TCG ATT TCT AGA ACT TCG AAC CC-5'

[0220] BglI HindI II

[0221] 合适的 PCR 模板 pTRX-HML (表 5)、引物及用于切割 PCR 产物末端的限制性内切酶列出于下 (表 6)。

[0222] 表 6

[0223]

PCR 产物	PCR 上游引物	PCR 反向引物	PCR 模板	用于 PCR 产物的限制酶
(a)	TX-10H-1	TX-C1	pTrX-HML	<i>PinAI/BamHI</i>
(b)	TX-10H11D-1	TX-C1	pTrX-HML	<i>PinAI/BamHI</i>

[0224] 将所述 PCR 切割产物 (a) 和 (b) (表 6) 连接至 *PinAI/BglIII* 线性化的质粒 pOmp-TrX (在 1.2 中描述) 中以分别产生质粒 pOmp-TrX-HML(1-113) 和 pOmp-TrX-HDML(1-113)。

[0225] 接下来的步骤包括 (i) 转化至大肠杆菌 HB101 感受态细胞中, 然后涂布含有氨苄青霉素 (100mg/L) 的 YT 平板 (1L 水中溶 5g 酵母提取物、3g 细菌用胰蛋白胨、5g NaCl、15g 琼脂; 1g Remazol Brilliant Blue R-D- 木聚糖), (ii) 通过木聚糖酶活性丧失鉴定突变转化体 (40℃ 下过夜后在蓝色木聚糖平板上的菌落周围没有透明区或晕轮), 以及 (iii) 通过双脱氧核苷酸测序法确证突变。所述每个步骤的方案类似于 1.3 中描述的构建质粒 pOmp-TrX-(1-113) 的方案。

[0226] 1.6 构建质粒 pTrX-58R

[0227] 制备了质粒 pTrX-58R, 该质粒与其前体质粒 pTrX 相比具有额外的突变 K58R。

[0228] 用 PCR 产生编码 (54-190) 区且具有突变 K58R 的 DNA 片段。具有突变 K58R (黑体字) 的 PCR 引物显示如下。

[0229] TX-58R-1 (SEQ ID NO :48)

[0230] 53 54 55 56 57 58 59 60 61

[0231] P G T K N R V I N

[0232] 5' -CAA CCC GGG ACC AAA AAT AGG GTG ATC AAC

[0233] Xma I

[0234] 使用合适的 PCR 模板 pTrX (表 5), 引物及用于切割 PCR 产物末端的限制性内切酶列出于下 (表 7)。

[0235] 表 7

[0236]

PCR 产物	PCR 上游引物	PCR 反向引物	用于PCR产物 的限制性内切酶
(c)	TX-58R-1	TX-C1	<i>XmaI/HindIII</i>

[0237] 将所述PCR切割产物(c)(表7)连接至 *XmaI/HindIII* 线性化的质粒 pTrX(1-113) 中以产生质粒 pTrX-58R。

[0238] 1.7 构建质粒 pTrX-40H 和 pTrX-40R

[0239] 制备了质粒 pTrX-40H 和 pTrX-40R, 它们与其前体质粒 pTrX 相比具有额外的突变 S40H 和 S40R。

[0240] 用PCR产生编码(39-190)区且具有突变 S40H 和 S40R 的DNA片段。具有突变 S40H 和 S40R(黑体字)的PCR引物显示如下。

[0241] TX-40H-1 (SEQ ID NO :49)

[0242] 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48

[0243] W H N S G N F V G G

[0244] 5' -GTC AAT TGG CAT AAC TCC GGA AAC TTC GTA GGT GGA

[0245] Mun I

[0246] TX-40R-1 (SEQ ID NO :50)

[0247] 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48

[0248] W R N S G N F V G G

[0249] 5' -GTC AAT TGG CGT AAC TCC GGA AAC TTC GTA GGT GGA

[0250] Mun I

[0251] 使用合适的PCR模板 pTrX, 引物及用于切割PCR产物末端的限制性内切酶列出于下(表8)。

[0252] 表8

[0253]

PCR 产物	PCR 上游引物	PCR 反向引物	用于PCR产物 的限制酶
(d)	TX-40H-1	TX-C1	<i>MunI/HindIII</i>
(e)	TX-40R-1	TX-C1	<i>MunI/HindIII</i>

[0254] 将所述PCR切割产物(d)和(e)(表8)连接至 *MunI/HindIII* 线性化的质粒 pTrX(1-113) 中以产生质粒 pTrX-40H 和 pTrX-40R。

[0255] 1.8 构建质粒 pTrX-99C

[0256] 制备了质粒 pTrX-99C, 该质粒具有其前体质粒 pTrX 中没有的突变 S99C。

[0257] 用 PCR 产生编码 (95-190) 区且具有突变 S99C 的 DNA 片段。

[0258] 具有突变 (黑体字) 的 PCR 引物显示如下。

[0259] TX-99C-1 (SEQ ID NO :51)

[0260] 95 96 97 98 99 100 101

[0261] T Y N P C T G

[0262] 5' -TTC GGT ACC TAC AAT CCG TGTACCGGC

[0263] Kpn I

[0264] 使 E 用合适的 PCR 模板 pTrX, 引物及用于切割 PCR 产物末端的限制性内切 酶列出于下 (表 9)。

[0265] 表 9

[0266]

PCR 产物	PCR 上游引物	PCR 反向引物	用于 PCR 产物 的限制酶
(f)	TX-99C-1	TX-C1	<i>KpnI/HindIII</i>

[0267] 将所述 PCR 切割产物 (f) (表 9) 连接至 KpnI/HindIII 线性化的质粒 pTrX(1-113) (表 4) 中以产生质粒 pTrX-99C。

[0268] 1.9 构建质粒 pOmpTrX-99C-118C

[0269] 制备了质粒 pOmpTrX-99C-118C, 该质粒具有其前体质粒 pTrX 中没有的突变 S99C 和 Y118C 及分泌前导信号序列。

[0270] 用 PCR 产生编码 (95-190) 区且具有突变 S99C 和 Y118C 的 DNA 片段。

[0271] 使用合适的 PCR 模板 pTrX-118C (参见表 5, WO 03/046169), 引物及用于切割 PCR 产物末端的限制性内切酶列出于下 (表 10)。

[0272] 表 10

[0273]

PCR 产物	PCR 上游引物	PCR 反向引物	用于 PCR 产物 的限制酶
(g)	TX-99C-1	TX-C1	<i>KpnI/HindIII</i>

[0274] 将所述 PCR 切割产物 (g) (表 10) 连接至 KpnI/HindIII 线性化的质粒 pOmpTrX(1-113) (见 1.3 所述) 中以产生质粒 pOmpTrX-99C-118C。

[0275] 1.10 构建质粒 pOmpTrX-58R-99C-118C

[0276] 制备了质粒 pOmpTrX-58R-99C-118C, 该质粒与其前体质粒 pTrX 相比具有额外突变 K58R、S99C 和 Y118C 及分泌前导信号序列。

[0277] 用 PCR 产生编码 (54-190) 区且具有突变 K58R、S99C 和 Y118C 的 DNA 片段。

[0278] 使用合适的 PCR 模板 pOmpTrX-99C-118C(见 1.9 所述), 引物及用于切割 PCR 产物末端的限制性内切酶列出于下 (表 11)。

[0279] 表 11

[0280]

PCR 产物	PCR 上游引物	PCR 反向引物	用于PCR产物的 限制酶
(h)	TX-58R-1	TX-C1	<i>XmaI/HindIII</i>

[0281] 将所述 PCR 切割产物 (h) (表 11) 连接至 *XmaI/HindIII* 线性化的质粒 pOmpTrX(1-113) (见 1.3 所述) 中以产生质粒 pOmpTrX-58R-99C-118C。

[0282] 1.11 构建质粒 pOmpTrX-40H-99C-118C 和 pOmpTrX-40H-58R-99C-118C

[0283] 制备了质粒 pOmpTrX-40H-99C-118C, 该质粒与其前体质粒 pTrX 相比具有额外突变 S40H、S99C 和 Y118C 及分泌前导信号序列。pOmpTrX-40H-58R-99C-118C 具有额外的突变 K58R。

[0284] 用 PCR 产生编码 (39-190) 区且具有突变 S40H、S99C 和 Y118C 的 DNA 片段, 该片段具有或不具有突变 K58R (由合适的质粒模板决定)。

[0285] 使用合适的 PCR 模板 pOmpTrX-99C-118C(见 1.9 所述) 用于产生 pOmpTrX-40H-99C-118C, 引物及用于切割 PCR 产物末端的限制性内切酶列出于下 (表 12)。

[0286] 表 12

[0287]

PCR 产物	PCR 上游引物	PCR 反向引物	用于PCR产物的 限制酶
(i)	TX-40H-1	TX-C1	<i>MunI/HindIII</i>

[0288] 使用合适的 PCR 模板 pOmpTrX-58R-99C-118C(见 1.10 所述) 用于产生 pOmpTrX-40H-58R-99C-118C, 引物及用于切割 PCR 产物末端的限制性内切酶列出于下 (表 13)。

[0289] 表 13

[0290]

PCR 产物	PCR 上游引物	PCR 反向引物	用于PCR产物的 限制酶
(j)	TX-40H-1	TX-C1	<i>MunI/HindIII</i>

[0291] 将所述 PCR 切割产物 (i) (表 12) 和 (j) (表 13) 连接至 *MunI/HindIII* 线性化的质粒 pOmpTrX(1-113) (见 1.3 所述) 中以分别产生质粒 pOmpTrX-40H-99C-118C 和 pOmpTrX-40H-58R-99C-118C。

[0292] 1.12 构建质粒 pOmpTrX-HML-40R-58R-99C-118C

[0293] 制备了质粒 pOmpTrX-HML-40R-58R-99C-118C, 该质粒与其前体质粒 pTrX-HML 相比具有额外突变 S40H、K58R、S99C 和 Y118C 及分泌前导信号序列。

[0294] 使用合适的 PCR 模板 pOmpTrX-58R-99C-118C (见 1.10 所述), 引物及用于切割 PCR 产物末端的限制性内切酶列出于下 (表 14)。

[0295] 表 14

[0296]

PCR 产物	PCR 上游引物	PCR 反向引物	用于 PCR 产物 的限制酶
(k)	TX-40R-1	TX-C1	<i>MunI/HindIII</i>

[0297] 将所述 PCR 切割产物 (k) (表 14) 连接至 *MunI/HindIII* 线性化的质粒 pOmpTrX-HML(1-113) (见 1.5 所述) 中以产生质粒 pOmpTrX-10H-27M-29L-40R-58R-99C-118C。

[0298] 1.13 构建质粒 pOmpTrX-10H-27M-29L-40R-58R-75A-99C-118C

[0299] 制备了质粒 pOmpTrX-10H-27M-29L-40R-58R-75A-99C-118C, 该质粒与质粒 pOmpTrX-10H-27M-29L-40R-58R-99C-118C 相比具有额外突变 S75A。具有突变 S75A (黑体字) 的 PCR 引物显示如下。

[0300] TX-75A-1 (SEQ ID NO :52)

[0301] 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81

[0302] N G N S Y L A V Y G W S R

[0303] 5' -T **GGG AAT TCA** TAC TTA GCC GTC TAT GGC TGG TCT AG

[0304] EcoRI

[0305] 使用同时合适于 PCR 产物 (l) 和 (m) 的 PCR 模板 pOmpTrX-10H-27M-29L-40R-58R-99C-118C (见 1.12 所述), 引物及用于切割 PCR 产物末端的限制性内切酶列出于下 (表 15)。

[0306] 表 15

[0307]

PCR 产物	PCR 上游引物	PCR 反向引物	用于PCR产物 的限制酶
(l)	TX-10H-1	TX-C1	<i>PinAI/ EcoRI</i>
(m)	TX-75A-1	TX-C1	<i>EcoRI/HindIII</i>

[0308] 将所述 PCR 切割产物 (l 和 m) (表 15) 连接至 *PinAI/HindIII* 线性化的质粒 pOmpTrX(1-113) (见 1.3 所述) 中以产生质粒 pOmpTrX-10H-27M-29L-40R-58R-75A-99C-118C。

[0309] 1.14 构建质粒 pOmpTrX-10H-27M-29L-75A-99C-105H-118C-125A-129E

[0310] 通过两个 PCR 反应制备了质粒 pOmpTrX-10H-27M-29L-75A-99C-105H-118C-125A-129E, 涉及以下引物:

[0311] TX-118C-1 (SEQ ID NO :53)

[0312] 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122

[0313] D G S V Y D I C R T Q R

[0314] 5' -GAC GGA TCC GTA TAT GAT ATC TGC CGT ACC CAA CGC

[0315] BamHI

[0316] TX-99C105H-1r (SEQ ID NO :54)

[0317] 114 113 112 111 110 109 108 107 106 105 104 103 102

101 100

[0318] V S G D S T V E G H K T A G

T

[0319] 5' -TAC GGA TCC ATC ACT AGTGAC TTC GCC GTG TTT TGT GGC GCC GGT

[0320] BamHI

KasI

[0321] 99 98 97 96

[0322] C P N Y

[0323] ACA CGG ATT GTA

[0324] KasI

[0325] 使用 pTrX-10H-27M-29L-75A-105H-125A-129E 作为 PCR 模板 (表 5), 合成了一个编码 (8-112) 序列的 PCR 产物 (n) 及另一个编码 (113-190) 区域的 PCR 产物 (o)。

[0326] 使用合适的 PCR 模板 pTrX-10H-27M-29L-75A-105H-125A-129E (表 5), 引物及用于切割 PCR 产物末端的限制性内切酶列出于下 (表 16)。

[0327] 表 16

[0328]

PCR 产物	PCR 上游引物	PCR 反向引物	用于PCR产物的 限制酶
(n)	TX-10H-1	TX-99C-105H- 1r	<i>PinAI/BamHI</i>
(o)	TX-118C-1	TX-C1	<i>BamHI/HindIII</i>

[0329] 将所述 PCR 切割产物 (n 和 o) (表 16) 连接至 *PinAI/HindIII* 线性化的质粒 pOmpTrX-HML(1-113) (见 1.5 所述) 中以产生质粒 pOmpTrX-10H-27M-29L-75A-99C-105H-118C-125A-129E。

[0330] 1.15 构建质粒 pOmpTrX-10H-27M-29L-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E

[0331] 产生了质粒 pOmpTrX-10H-27M-29L-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E, 该质粒与其前体质粒 pOmpTrX-10H-27M-29L-75A-99C-105H-118C-125A-129E (见 1.14) 相比具有额外的突变 K58R。

[0332] 使用合适的 PCR 模板 pOmpTrX-10H-27M-29L-75A-99C-105H-118C-125A-129E (见 1.14), 引物及用于切割 PCR 产物末端的限制性内切酶列出于下 (表 17)。

[0333] 表 17

[0334]

PCR 产物	PCR 上游引物	PCR 反向引物	用于PCR产物的 限制酶
(p)	TX-58R-1	TX-C1	<i>XmaI/HindIII</i>

[0335] 将所述 PCR 切割产物 (p) (表 17) 连接至 *XmaI/HindIII* 线性化的质粒 pOmpTrX-HML(1-113) (见 1.5 所述) 中以产生质粒 pOmpTrX-10H-27M-29L-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E。

[0336] 1.16 构建质粒 pOmpTrX-10H-11D-27M-29L-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E

[0337] 使用与 1.15 中用于制备质粒 pOmpTrX-10H-27M-29L-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E 的策略相同的策略制备了具有额外突变 N11D 的质粒 pOmpTrX-10H-11D-27M-29L-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E。

[0338] 将用于构建 pOmpTrX-10H-27M-29L-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E (见 1.15) 的 PCR 切割产物 (p) (表 17) 连接至 *XmaI/HindIII* 线性化的质粒 pOmpTrX-HDML(1-113) (见 1.5 中所述) 中以产生质粒 pOmpTrX-10H-11D-27M-29L-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E。

[0339] 1.17 构建质粒 pOmp-TrX-10H-11D-27M-29L-40X-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E, 其中 X 是 C、F、H、R、Y、A 或 T

[0340] 以同样的策略制备了质粒 pOmpTrX-10H-11D-27M-29L-40X-58R-75A-99C-105H-11

8C-125A-129E, 其中 X 是 C、F、H、R、Y、A 或 T, 使用的是携带合适突变的 PCR 引物:

[0341] TX-40C-1 (SEQ ID NO :55)

[0342] 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48

[0343] W C N S G N F V G G

[0344] 5' -GTC AAT TGG TGT AAC TCC GGA AAC TTC GTA GGT GGA

[0345] Mun I

[0346] TX-40Y-1 (SEQ ID NO :56)

[0347] 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48

[0348] W Y N S G N F V G G

[0349] 5' -GTC AAT TGG TAT AACTCC GGA AAC TTC GTA GGT GGA

[0350] Mun I

[0351] TX-40F-1 (SEQ ID NO :57)

[0352] 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48

[0353] W F N S G N F V G G

[0354] 5' -GTC AAT TGG TTT AAC TCC GGA AAC TTC GTA GGT GGA

[0355] Mun I

[0356] TX-40T-1 (SEQ ID NO :58)

[0357] 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48

[0358] W T N S G N F V G G

[0359] 5' -GTC AAT TGG ACT AAC TCC GGA AAC TTC GTA GGT GGA

[0360] Mun I

[0361] TX-40A-1 (SEQ ID NO :59)

[0362] 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48

[0363] W A N S G N F V G G

[0364] 5' -GTC AAT TGG GCT AAC TCC GGA AAC TTC GTA GGT GGA

[0365] Mun I

[0366] TX-40H-1 和 TX-40R-1 已经在 1.8 中描述。

[0367] 使用合适的 PCR 模板质粒 pOmpTrX-10H-27M-29L-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E (见 1.15 中所述), 引物及用于切割 PCR 产物末端的限制性内切酶列出于下 (表 18)。

[0368] 表 18

[0369]

PCR 产物	PCR 上游引物	PCR 反向引物	用于PCR产物的 限制酶
(q)	TX-40H-1	TX-C1	<i>MunI/HindIII</i>
(r)	TX-40R-1	TX-C1	<i>MunI/HindIII</i>
(s)	TX-40C-1	TX-C1	<i>MunI/HindIII</i>
(t)	TX-40F-1	TX-C1	<i>MunI/HindIII</i>
(u)	TX-40Y-1	TX-C1	<i>MunI/HindIII</i>
(v)	TX-40T-1	TX-C1	<i>MunI/HindIII</i>
(w)	TX-40A-1	TX-C1	<i>MunI/HindIII</i>

[0370] 将所述 PCR 切割产物 (q、r、s、t、u、v 和 w) (表 18) 连接至 *MunI/HindIII* 线性化的质粒 pOmpTrX-HDML (1-113) (见 1.5 中所述) 中以分别产生质粒 pOmpTrX-10H-11D-27M-29L-40H-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E、pOmpTrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E、pOmpTrX-10H-11D-27M-29L-40C-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E、pOmpTrX-10H-11D-27M-29L-40Y-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E、pOmpTrX-10H-11D-27M-29L-40F-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E、pOmpTrX-10H-11D-27M-29L-40T-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E 和 pOmpTrX-10H-11D-27M-29L-40A-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E。

[0371] 1.18 构建质粒 pOmp-TrX-10H-11D-27M-29L-40H-52C-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E

[0372] 通过将两个 PCR 序列,即 *PinAI/XmaI* 线性化的 (8-53) 片段和 *XmaI/HindIII* 线性化的 (54-190) 片段连接起来制备了 pOmpTrX-10H-11D-27M-29L-40H-52C-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E。前者的序列由使用以下携带突变 Q52C 的引物的 PCR 来合成:

[0373] TX-52C-1r (SEQ ID NO :60)

[0374] 54 53 52 51 50 49 48 47 46 45 44

[0375] G P C W G K G G V F N

[0376] 5' -GT CCC GGG ACA CCA ACC TTT TCC ACC TAC GAA GT

[0377] *XmaI*

[0378] 使用合适的 PCR 模板质粒 pOmpTrX-10H-11D-27M-29L-40H-58R-75A-99C-105H-1

18C-125A-129E(见 1.17 中所述),引物及用于切割 PCR 产物末端的限制性内切酶列出于下(表 19)。

[0379] 表 19

[0380]

PCR 产物	PCR 上游引物	PCR 反向引物	用于PCR产物 的限制酶
(x)	TX-10H11D-1	TX-52C-1r	<i>PinAI/XmaI</i>

[0381] 该 (54-190) 片段被制备为 1.15 中表 17 的 *XmaI*/*HindIII*- 切割 PCR 产物 (p)。

[0382] 将 *PinAI/XmaI* 切割的 (8-53) 片段 (x) (表 19) 和 *XmaI/HindIII* 切割的 (54-190) 片段 (p) (表 17) 连接至 *PinAI/HindIII* 线性化的质粒前体 pOmp-TrX-(1-113) (见 1.3 中所述) 中,产生新的质粒 pOmpTrX-10H-11D-27M-29L-40H-52C-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E。

[0383] 1.19 构建质粒 pOmp-TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E-144R-161R

[0384] 制备了质粒 pOmp-TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E-144R-161R,该质粒与 1.18 的 pOmpTrX-10H-11D-27M-29L-40H-52C-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E 相差两个突变:H144R 和 Q161R。

[0385] 它通过将两种合适的 PCR 切割产物连接而合成。所述编码区域 (39-112) 的第一插入片段通过用 *MunI/BamHI* 切割 1.17 的表 18 中已述的 PCR 产物 (r) 产生。

[0386] 所述编码 (113-190) 区域的第二插入片段是使用合适的 PCR 模板质粒 pTrX-10H-27M-29L-75A-105H-125A-129E-144R-161R(W003/046169) 通过 PCR 制备。引物及用于切割 PCR 产物末端的限制性内切酶列出于下(表 20)。

[0387] 表 20

[0388]

PCR 产物	PCR 上游引物	PCR 反向引物	用于PCR产物 的限制酶
(y)	TX-118C-1	TX-C1	<i>BamHI/HindIII</i>

[0389] 将两种合适的 PCR 切割产物 (y) (表 20) 和 *MunI/BamHI* 切割物 (r) 连接至 *MunI/HindIII* 线性化的质粒 pOmpTrX-HDML(1-113) (见 1.5 中所述) 中以产生质粒 pOmp-TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E-144R-161R。

[0390] 实施例 2:木聚糖酶突变体的特征

[0391] 2.1 生产木聚糖酶

[0392] 培养条件包括 5mL 接种至包含氨苄青霉素 (100mg/L) 的 2YT 培养基 (1L 水中溶

16g 酵母提取物、10g 细菌用胰蛋白酶、5g NaCl) 中的隔夜的培养物。将培养物涂布于均匀覆盖有 0.5L 含氨苄青霉素 (100mg/L) 的固体 YT 琼脂 (1L 水中溶 8g 酵母提取物、5g 细菌用胰蛋白酶、5g NaCl 和 15g 琼脂) 的平板 (32×25cm) 上。在 37℃ 下培养所述培养物。40 小时后, 将细胞收获用于提取木聚糖酶。

[0393] 2.2 纯化木聚糖酶突变体

[0394] 将收获的细胞放入试管中进行木聚糖酶的冻融提取。该步骤包括在干冰 / 乙醇浴中 5 分钟的冻结期, 之后是水 / 冰浴中 10 分钟。重复该步骤 3 次。用缓冲液 (5mL, 100mM 柠檬酸钠, pH 5.5) 提取细胞。以 8000×g 离心 30 分钟得到含木聚糖酶的上清液。将该木聚糖酶溶液调节至 pH 5.2。通过在相同条件下离心除去出现的沉淀。根据木聚糖酶重组体的热稳定性, 将上清液加热至 50–60℃ 的范围并维持 30 分钟以将更多不合乎需要的细菌蛋白转换成沉淀, 然后通过离心除去这些沉淀。

[0395] 在进行柱色谱之前, 用醋酸将上清液调节至 pH 4.6 并通过离心除去任何的沉淀。对于所有木聚糖酶突变体来说, 随后的柱色谱步骤都是相同的。

[0396] 经酸化和离心之后, 将木聚糖酶样品灌注至用 10mM 醋酸钠 (pH 5.1) 平衡的 50mL 柱床体积、CM-sepharose 快速流阳离子交换柱上 (PharmaciaBiotech, Uppsala)。用 250mL 线性梯度 (溶于 10mM 醋酸钠中的 0–0.6M NaCl, pH 5.1) 以 1mL/ 分钟的流速洗脱木聚糖酶。木聚糖酶在 150–200mL 的梯度时被洗脱下来。将所收集的组分的样品用 SDS-PAGE 检测, 并将那些含大部分的木聚糖酶的组分合并。对于大多数 TrX 木聚糖酶突变体, 使用 54,600–53,400M⁻¹ 的消光系数在 280nm 下通过分光光度法定量所述纯化的木聚糖酶。从 10g 细胞通常可纯化得到 25mg 木聚糖酶。

[0397] 2.3 测量酶活性的标准测定方法

[0398] 定量测定法确定了由可溶木聚糖产生的还原糖的数目。该测试的底物是来自 5% 的桦木木聚糖 (Sigma Chemical Co.) 悬浮液中的溶解于水中的桦木木聚糖组分。在去除不溶的组分之后, 将上清液冻干并储存于干燥器中。按如下进行活性测量。将含有 100 μL 30mg/mL 的以测试缓冲液 (50mM 柠檬酸钠, pH 5.5 或测试木聚糖酶的最适 pH) 预先稀释的木聚糖、150 μL 测试缓冲液及 50 μL 的以测试缓冲液稀释的酶 (15 μg/mL) 的反应混合液在 40℃ 下孵育。在多个时间间隔, 取出 50 μL 的样品并通过稀释于 1mL 5mM 的 NaOH 中终止反应。用羟基苯甲酸酰肼试剂 (HBAH) 确定还原糖的量 (Lever, 1972, 它通过引用的方式纳入本文)。

[0399] 实施例 3: 木聚糖酶突变体的嗜热性

[0400] 检测嗜热性以测试不同温度对于由不同木聚糖酶突变体对可溶木聚糖的酶促水解的作用。

[0401] 该测定的步骤类似于标准测定, 不同之处是孵育温度和时间。将木聚糖酶 (15 μg/mL) 和可溶桦木木聚糖——在 50mM pH 5.5 的柠檬酸钠缓冲液中或者另外声明——混合, 并孵育于不同温度的循环水浴中。在孵育 30 分钟后, 用 HBAH 分析确定从木聚糖释放的还原糖的量, 并将其计算为相对活性, 以 40℃ 或最适温度下的值作为 100%。

[0402] 图 3 示出温度对于由具有 S40H、K58R、S99C 或 Y118C 之类单突变的里氏木霉木聚糖酶 TrX 对水解木聚糖的水解的作用。

[0403] 木聚糖酶 TrX-40H 中的突变 S40H 与 TrX 相比在较高温度下显示了适度改良的酶

活性（图 3）。对于木聚糖酶 TrX-58R 的情况，如 Turunen et al. (2002) 已报道的，单突变 K58R 与 TrX 相比没有出现改良（图 3）。

[0404] 虽然单突变 Y118C 在如木聚糖酶 TrX-118C 中提高嗜热性（图 3）已经在本领域中记载（WO 03/046169），但是从来没有研究通过引入半胱氨酸-118 形成二硫键的可能性。该突变有可能与残基 99 处的半胱氨酸置换形成二硫键合。

[0405] 首先以木聚糖酶突变体 TrX-99C 形式测试了单突变 S99C（图 3），它在较高温度没有明显的酶活性提高，因此这证明了该突变对 TrX 的温度 / 活性谱没有作用。然而，当以木聚糖酶双突变体 TrX-99C-118C 的形式整合突变 S99C 和 Y118C 时，嗜热性有显著提高（图 3），甚至是当与单突变体 TrX-118C 相比时。双突变体 TrX-99C-118C 的最适温度比天然木聚糖酶 TrX 提高约 7℃（图 4）。TrX-99C-118C 除了有较高的最适温度（图 4）外，它与 TrX 相比在各自的最适温度下还呈现出更高的最佳活性（图 3）。

[0406] 突变 S40H 和 K58R 对突变 99C/118C 有叠加效应以提高在较高温度下的酶活性，以木聚糖酶突变体 TrX-58R-99C-118C、TrX-40H-99C-118C 和 TrX-40H-58R-99C-118C 的形式确证了这一事实（图 3 和 4）。虽然突变 K58R 单独不能提高木聚糖酶在较高温度下的活性（图 3），但是已经证明了它与其他突变 S40H 和 S99C/Y118C 结合有正效应。

[0407] 这些新突变与本领域中已经记载的其他有利突变是相容的。这在下文中具有较高最适温度和最佳活性的木聚糖酶变体的制备中得到了证明。

[0408] 已经记载了——以突变体 TrX-10H-27M-29L（或 TrX-HML）的形式——突变 N10H、Y27M 和 N29L 提高了 TrX 的嗜热性（美国专利 No. 5, 759, 840）。制备了木聚糖酶变体 TrX-10H-27M-29L-40R-58R-99C-118C（图 5）和 TrX-10H-27M-29L-40R-58R-75A-99C-118C，它们具有进一步提高的嗜热性（图 5）。

[0409] WO 01/92487 中记载了——以突变体 TrX-10H-27M-29L-75A-105H-125A-129E（TrX-HML-AHAE）的形式——突变 N10H、Y27M、N29L、S75A、L105H、Q125A 和 I129E 提高了 TrX 的嗜热性。制备了木聚糖酶变体 TrX-10H-27M-29L-75A-99C-105H-118C-125A-129E（图 6 和 8）和 TrX-10H-27M-29L-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E（图 6），二者都具有进一步提高的嗜热性。

[0410] WO 03/046169 中记载了突变 N11D。添加该突变制备了变体 TrX-10H-11D-27M-29L-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E（图 6、7 和 8）。在该变体中引入突变 40（S40C、A、F、H、R、Y 或 T）的变异产生了新的突变体 TrX-10H-11D-27M-29L-40X-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E（其中 X = C、A、F、H、R、Y 和 T）。如上文的研究所表明的，引入突变 S40H 或 S40R 与宿主酶相比适度改良了较高温度下的相对活性（图 6、7 和 8）。再者，其他突变 S40C、S40F 和 S40Y 呈现出相同的提高效应（图 7），而 S40T 和 S40A 对温度 / 活性谱没有这种提高效应（图 7）。

[0411] 将另一突变 Q52C 引入 TrX-10H-11D-27M-29L-40H-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E 中。木聚糖酶突变体 TrX-10H-11D-27M-29L-40H-52C-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E 也能够 80 和 85℃ 的较高温度下保持显著高的相对活性（图 6、7 和 8）。

[0412] 已经证明突变 H144R 和 Q161R（见 WO03/046169 所述）可提高木聚糖酶 TrX-10H-11D-27M-29L-75A-105H-118C-125A-129E-144R-161R（或 TrX-10H-11D-27M-29L-AH-118C-AE-RR）的最适 pH。添加突变 S40R、K58R 和 S99C 使得木聚糖酶突变体 TrX-10H-11D-27M-29

L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E-144R-161R 在 80 和 85℃ 的较高温度下保持较高的活性（图 9）。

[0413] 上文的结果证明了突变 S40X(X = C、F、H、R 或 Y)、Q52C、K58R 及二硫化突变 S99C/Y118C 对木聚糖酶突变体嗜热性的提高效应不仅在彼此之间是互补的或叠加的，而且与本领域已公开的其他突变（美国专利 No. 5, 759, 840、WO 01/92487 和 WO 03/046169）也是互补的或叠加的。

[0414] 实施例 4：木聚糖酶突变体的嗜碱性

[0415] 检测遗传修饰的木聚糖酶的嗜碱性以测试不同 pH 条件对木聚糖酶突变体酶促水解可溶桦木木聚糖的作用。该测定的步骤类似于标准测定，不同之处是孵育温度和时间。将遗传修饰的木聚糖酶（15 μ g/mL）样品和可溶木聚糖在 pH 处于 4-8 之间的 50mM 柠檬酸钠缓冲液中在 55℃ 或 65℃ 下共同孵育，如所述。在孵育 30 分钟后，用 HBAH 分析确定从木聚糖底物释放的还原糖的量，并且以最大活性作为 100% 为多种木聚糖酶突变体计算酶活性，所述酶活性是 pH 的函数。

[0416] 研究了突变 S99C/Y118C 对木聚糖酶 pH/ 活性谱的作用。这种新的二硫化突变体 TrX-99-C118C 与天然木聚糖酶 TrX 相比在 6.5-7.5 的较高 pH 值下保持了较大的活性（图 10）。该木聚糖酶的二硫化突变体 TrX-99-C118C 保持 80% 最大活性的 pH 范围是 4.8-7.0，而天然木聚糖酶 TrX 仅为 4.8-6.0，这表明前者具有更宽的有效 pH 范围。

[0417] 具有单突变 TrX-99C 和 TrX-118C 的木聚糖酶也与 TrX-99C-118C 和天然木聚糖酶 TrX 进行了对比。TrX-99C 和 TrX-118C 都与 TrX 具有相同的 pH/ 活性谱（图 10）。这确证了在较高 pH 下活性的改良是突变 S99C 和 Y118C 结合形成二硫键的结果，而非单 Cys 突变的结果。

[0418] 还在上文构建的两组突变体中研究了突变 S40X(X 为 H 或 R)、K58R 和二硫化 S99C/Y118C 对木聚糖酶 pH/ 活性谱的作用。

[0419] 第一组衍生自突变体 TrX-10H-27M-29L-75A-105H-125A-129E（或 TrX-HML-AH-AE）并在 WO01/92487 中有记载。如 TrX-10H-27M-29L-75A-99C-105H-118C-125A-129E、TrX-10H-27M-29L-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E、TrX-10H-11D-27M-29L-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E 和 TrX-10H-11D-27M-29L-40H-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E 的衍生物与亲本 TrX-10H-27M-29L-75A-105H-125A-129E 相比在较高 pH 下显示了更大的活性（图 11）。然而，TrX-10H-27M-29L-75A-99C-105H-118C-125A-129E 活性的极大改良——与亲本木聚糖酶 TrX-10H-27M-29L-75A-105H-125A-129E 相比——是通过添加 99C/118C 二硫化实现的。该系列中具有突变 S40H 或 K58R 的其他木聚糖酶突变体对木聚糖酶活性的没有其他作用。

[0420] 突变 S99C/Y118C 的提高作用还在基于 TrX-10H-27M-29L-75A-105H-125A-129E-144R-161R 的第二组中被进一步证实，这个木聚糖酶包含两个已经被证明可成功增加木聚糖酶最适 pH 的突变 H144R 和 Q161R（参见 WO 01/92487）。这个构建体 TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E-144R-161R 在较高 pH 下呈现出比其亲本 TrX-10H-27M-29L-75A-105H-125A-129E-144R-161R 更大的活性（图 12）。它还优于另一个木聚糖酶 TrX-10H-11D-27M-29L-75A-105H-116G-118C-125A-129E-144R-161R（图 12），一种在 WO 03/046169 的木聚糖酶突变体中显示出最大改良的 pH/ 活性谱的木聚糖酶突变体。

[0421] 实施例 5 :木聚糖酶突变体的热稳定性

[0422] 在无底物的情况下研究了木聚糖酶对不同温度孵育的耐受性。将溶于测定缓冲液 (50mM 柠檬酸钠, pH5.0) 中的木聚糖酶 (150 μ g/mL) 在 48、52、56 和 60℃ 下孵育 30 分钟。将样品冷却至室温 (大约 20℃) 并通过在 55℃ 下利用 HBAH 测定法测定 30 分钟确定这些样品的残余酶活性。将 48℃ 下的残余酶活性标准化为 100%。

[0423] 在较高温度下孵育之后,二硫化突变 TrX-99C-118C 保持了比天然木聚糖酶 TrX 更高的残余活性 (图 13)。该二硫化木聚糖酶的 T_{50} 为 58℃,与天然木聚糖酶 TrX 的 51℃ 的 T_{50} (图 13) 相比,前者的热稳定性提高了约 7℃。

[0424] 虽然本发明已经描述了呈现出了改良的嗜热性、嗜碱性和热稳定性的木聚糖酶突变体以及与这些酶在纸浆生产中具有的优点,但是也可以将这些木聚糖酶突变体用于其他的工业过程中,例如但不限于清洗精密仪器和半导体。再者,得益于木聚糖酶突变体的提高的嗜热性和热稳定性,它们可以被用于使用少量变性剂或去污剂或者溶剂的化学处理中,所述溶剂例如但不限于少量非极性溶剂——例如但不限于己烷、二噁烷、四氯化碳、苯、醚、氯仿、醋酸和二氯甲烷;以及极性溶剂——例如但不限于丙酮、乙醇、二甲基酰胺、乙腈、环丁砜、二甲基亚砷和水。

[0425] 实施例 6 :分离里氏木霉基因组 DNA 并构建里氏木霉基因组文库

[0426] 里氏木霉菌株 M2C38 是 Iogen Corporation 的专利菌株,所述菌株衍生自里氏木霉 RutC30 (ATCC#56765;Montenecourt and Eveleigh,1979),后者又衍生自里氏木霉 Qm6A (ATCC # 13631;Mandels and Reese,1957)。本领域技术人员应理解,本文描述的方法、来自这些菌株的遗传构建体及遗传构建体在这些菌株中的表达均适用于所有衍生自 Qm6A 的木霉菌株。

[0427] 为了分离基因组 DNA,用无菌接种环将从马铃薯葡萄糖琼脂平板收集的里氏木霉孢子接种于 50mL 的马铃薯葡萄糖肉汤 (Difco) 中。在 28℃ 下以 200rpm 将培养物振荡 2-3 天。将菌丝体在 GFA 玻璃微纤维过滤器 (Whatman) 上过滤并用冷的去离子水清洗。将真菌块在液氮中冻结并且用预冷的研钵和研杵将其研磨成粉末;将 0.5g 粉末化的生物菌体悬浮于 5mL pH 7.5 的 100mM Tris、50mMEDTA 加 1% 的十二烷基硫酸钠 (SDS) 溶液中。将裂解产物离心 (4℃,5000g 20 分钟) 以使细胞碎片成片状沉淀。将上清液用 1 倍体积的缓冲液 (10mM Tris、1mMEDTA, pH8.0) 饱和的苯酚萃取,然后用 1 倍体积的缓冲液饱和的苯酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1) 萃取以去除可溶蛋白。通过添加 0.1 体积 pH5.2 的 3M 醋酸钠及 2.5 体积冷的 95% 乙醇从溶液中沉淀 DNA。在 -20℃ 下放置至少 1 小时后,通过离心 (4℃,5000g 20 分钟) 使 DNA 沉淀成片,用 10mL 70% 乙醇冲洗,在空气中晾干并再悬浮于 1mL pH8.0 的 10mM Tris、1mMEDTA 溶液中。通过加入核糖核酸酶 A (Boehringer Mannheim) 至终浓度 0.1mg/mL 并在 37℃ 下孵育 1 小时消化 RNA。依次用 1 倍体积的缓冲液饱和的苯酚和 1 倍体积的缓冲液饱和的苯酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1) 萃取以用于从该 DNA 溶液中去除核糖核酸酶。再次用 0.1 体积 pH5.2 的 3M 醋酸钠及 2.5 体积冷的 95% 乙醇沉淀 DNA,通过离心使之成片,用 70% 的乙醇冲洗,在空气中晾干并再悬浮于 50 μ L pH8.0 的 10mM Tris、1mM EDTA 溶液中。通过测量溶液在 260nm 下的吸光度确定 DNA 的浓度 (p. Clin Sambrook et al.,1989,Molecular Cloning :A Laboratory Manual,2nd. ed. Cold Spring Harbor, New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press)。

[0428] 使用从里氏木霉菌株 M2C38 分离的基因组 DNA 构建两个质粒文库和一个噬菌体文库。在质粒 pUC119 中构建质粒文库 (Viera and Messing, 1987), 步骤如下: 将体积 100 μ L 的 10 μ g 基因组 DNA 在 37°C 下用 2 单位 / μ g 的 BamHI 或 EcoRI 限制性内切酶消化 20 小时。将该消化的 DNA 在 0.75% 琼脂糖凝胶上于 0.04M Tris-醋酸盐、1mMEDTA 中电泳进行分离并用溴化乙锭染色。将对应于目的基因大小 (基于发表的信息和 DNA 印迹) 的凝胶片切下并经过电洗脱以回收 DNA 片段 (Sambrook et al., 第 6.28-6.29 页)。在含有 20-50 μ g/mL 的载体:插入 DNA 摩尔比为 2:1 的 DNA、1mM ATP 及 5 单位 T4 DNA 连接酶且总体积为 10-15 μ L 的连接反应液中于 4°C 下反应 16 小时, 将这些富集的 DNA 片段连接至 pUC119 中以形成基因文库。使用 Cell Porator System (Gibco/BRL) 依照厂商的方案以该连接反应物电穿孔大肠杆菌菌株 HB101, 并在含 70 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 琼脂上筛选转化体。

[0429] 在 λ 载体 λ DASH (Stratagene, Inc.) 中构建噬菌体文库, 步骤如下: 用 2、1、0.5 和 0.5 单位 / μ g 的 BamHI 在 37°C 下消化基因组 DNA (3 μ g) 1 小时以产生 9-23kB 大小的片段。将每次消化产生的 DNA 通过以下步骤纯化: 用 1 倍体积的 Tris-饱和的苯酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1) 萃取, 然后用 10 μ L pH 5.2 的 3M 醋酸钠及 250 μ L 95% 乙醇 (-20°C) 沉淀。通过微量离心使该消化的 DNA 成片沉淀, 用 0.5mL 冷的 70% 乙醇冲洗, 在空气中晾干并再悬浮于 10 μ L 无菌的去离子水中。通过琼脂糖凝胶电泳 (在 0.04M Tris-醋酸盐、1mMEDTA 中的 0.8% 琼脂糖) 确认 9-23kB 大小的 DNA 片段的富集。在含有 2 单位 T4 DNA 连接酶和 1mM ATP 的总体积为 5 μ L 的反应液中于 4°C 下反应过夜, 将消化的 DNA (0.4 μ g) 连接至 1 μ g 以 BamHI (Stratagene) 预消化的 λ DASH 臂中。使用 GigaPack[®] II Gold 包装蛋白 (packaging extracts) (Stratagene) 依照厂商的方案将连接混合物包装至噬菌体颗粒中。用大肠杆菌宿主菌株 XL1-Blue MRA (P2) 滴定该文库, 发现其含有 3×10^5 个独立克隆。

[0430] 实施例 7: 从里氏木霉 M2C38 文库中分离基因组克隆

[0431] 7.1 从 pUC119 文库克隆纤维二糖水解酶 I (cbh1) 和纤维二糖水解酶 II (cbh2) 基因

[0432] 通过菌落转移杂交 (colony lift hybridization) 鉴定了携带来自于重组体 pUC119-BamHI 或 -EcoRI 文库的克隆 cbh1 或 cbh2 的大肠杆菌 HB101 转化体: 将 $1-3 \times 10^4$ 个菌落转移至 HyBond 尼龙膜 (Amersham) 上; 将膜的菌落面向上置于用 0.5M NaOH、1M NaCl 饱和的印迹纸 (VWR 238) 上 5 分钟以裂解细菌细胞并变性 DNA; 然后通过将膜的菌落面向上置于用 pH7.5 的 1.5M Tris、1M NaCl 饱和的印迹纸 (VWR 238) 上 5 分钟进行中和; 将膜在空气中干燥 30 分钟, 然后通过 80°C 下烘烤 2 小时将 DNA 固定于膜上。

[0433] 在含有 10-50ng 靶 DNA、0.2mM 每种 d(GCT)TP、0.5 μ M dATP、20-40 μ Ci α -³²P-dATP、10pmole 寡核苷酸引物和 0.5 单位 Taq 聚合酶且总体积为 20 μ L 的标记反应液中, 通过从 BamHI 或 EcoRI 片段的富集池中分别 PCR 扩增 cbh1 和 cbh2 编码区的短片段 (0.7-1.5kB) 制备了 ³²P-标记的探针。该反应经过 6-7 个扩增循环 (95°C, 2 分钟; 56°C, 1.5 分钟; 70°C, 5 分钟)。通过加入 0.5mL 10% (w/v) 三氯醋酸和 0.5mg 酵母 tRNA 沉淀所述扩增的 ³²P-标记的 DNA。通过微量离心使 DNA 成片沉淀, 用 1mL 70% 的乙醇洗涤 2 次, 在空气中晾干并再悬浮于 pH 7.5 的 1M Tris、1mM EDTA 溶液中。

[0434] 将已经固定有重组 pUC119 质粒的尼龙膜在热封口的袋中于 60-65°C 下用含 100 μ g/mL 变性的剪切鲑精 DNA 的 pH 7.5 的 1M NaCl、1% SDS、50mM Tris、1mM EDTA 溶

液预杂交 1 小时。在热封口的袋中于 60–65℃ 用仅含 50 μ g/mL 变性的剪切鲑精 DNA 及 5×10^6 – 5×10^7 cpm 变性的 cbh1 或 cbh2 探针的相同缓冲液中杂交 16–20 小时。将膜用 1M NaCl、0.5% SDS 于 60℃ 下洗涤 1 次,持续 15 分钟;用 0.3M NaCl、0.5% SDS 于 60℃ 下洗涤 2 次,每次持续 15 分钟;用 0.03M NaCl、0.5% SDS 于 55℃ 下洗涤 1 次,持续 15 分钟。将膜再次放入热封口的袋中并在 -70℃ 下暴露于 Kodak RP X 射线胶片下 16–48 小时。依照厂商的方案将 X- 射线胶片显影。挑选显示强信号或弱信号的克隆并在含 70 μ g/mL 氨苄青霉素的 2xYT 培养基中培养。使用碱裂解法 (Sambrook, et al., 第 1.25–1.28 页) 从这些培养物中分离质粒 DNA, 并通过限制性内切酶酶切消化、DNA 杂交 (Sambrook, et al., 第 9.38–9.44 页) 和 PCR 分析 (Sambrook, et al., 第 14.18–14.19 页) 进行分析。

[0435] 通过用 0.7kb 的 cbh1 探针进行的 pUC119–BamH1 文库的菌落转移杂交鉴定了携带 cbh1 基因的克隆,所述探针是使用设计用于扩增公开的 cbh1 序列 (Shoemaker et al., 1983.) 的 bp 597–1361 的寡核苷酸引物制备的。分离了 cbh1 克隆 pCOR132,它包含 5.7kb 的对应于启动子 (4.7kb) 和 1kb 的 cbh1 结构基因的 BamH1 片段。通过这,将 2.5kb 的含有 cbh1 启动子 (2.1kb) 和 5' 末端 cbh1 编码区 (0.4kb) 的 EcoR1 片段亚克隆至 pUC119 中以产生 pCB152。通过用 1.5kb 的 cbh2 探针进行的对 pUC119–EcoR1 文库的菌落转移杂交鉴定了携带 cbh2 的克隆,所述探针是使用设计用于扩增公开 cbh2 序列 (Chen et al. 1987) 的 bp 580–2114 的寡核苷酸引物制备的。分离了 cbh2 克隆 pZUK600,它包含 4.8kb 的对应于启动子 (600bp)、结构基因 (2.3kb) 和终止子 (1.9kb) 的 EcoR1 片段。

[0436] 7.2 从 λ DASH 文库克隆 cbh1 终止子和木聚糖酶 II (xln2) 基因

[0437] 使用 DIG 标记和探测试剂盒 (Boehringer Mannheim) 并依照厂商方案,通过随机引物标记从 cbh1 和 xln2 基因的 PCR 扩增编码区制备了异羟基洋地黄毒苷配基-11-dUTP (Digoxigenin-11-dUTP) 标记的探针。通过 λ DASH 文库的噬斑转印杂交鉴定了含有 cbh1 和 xln2 基因的基因组克隆。对于每个目的基因,将 1×10^4 个克隆转移至 **Nytran®** (Schleicher and Schull) 尼龙膜。通过将膜的噬斑面向上置于用 0.5M NaOH、1M NaCl 饱和的印迹纸 (VWR 238) 上 5 分钟裂解噬菌体颗粒并变性噬菌体 DNA;然后将膜的噬斑面向上置于用 pH 7.5 的 1.5M Tris、1M NaCl 饱和的印迹纸 (VWR 238) 上 5 分钟进行中和;将膜在空气中干燥 30 分钟,然后通过 80℃ 下烘烤 2 小时将 DNA 固定于膜上。将膜在热封口的袋中于 65℃ 下用含 6 $\times$ SSPE、5 $\times$ Denhardt 溶液、1% SDS 加 100 μ g/mL 变性的剪切鲑精 DNA 的溶液预杂交 2 小时。然后将膜在热封口的袋中于 65℃ 下用含 50 μ g/mL 变性的剪切鲑精 DNA 及 0.5 μ g 异羟基洋地黄毒苷配基-dUTP 标记探针的相同缓冲液杂交过夜。将膜用 2 $\times$ SSPE、0.1% SDS 于室温下洗涤 15 分钟 2 次,用 0.2 $\times$ SSPE、0.1% SDS 于 65℃ 下洗涤 15 分钟 2 次,用 2 $\times$ SSPE 洗涤 5 分钟 1 次。依照厂商的方案,通过与抗-异羟基洋地黄毒苷配基/碱性磷酸酶抗体缀合物、5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸和 4-硝基蓝四氮唑 (Boehringer Mannheim) 的反应鉴定了阳性杂交克隆。通过用异羟基洋地黄毒苷配基-dUTP 标记探针的第二轮筛选进一步纯化了阳性杂交克隆。

[0438] 单个克隆的分离及噬菌体 DNA 的纯化如 Sambrook et al. (1989) 第 2.118–2.121 页中的描述,不同之处是 CsCl 梯度步骤由使用 1 倍体积的苯酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1) 及 1 倍体积的氯仿:异戊醇 (24:1) 的萃取所替代。用 0.1 体积 pH 5.2 的 3M 醋酸钠及 2.5 体积冷的 95% 乙醇沉淀 DNA。用 0.5mL 冷的 70% 乙醇冲洗沉淀的噬菌体 DNA,在空气中晾

干并再悬浮于 50 μ L pH 8.0 的 10mM Tris、1mM EDTA 溶液中。通过将纯化噬菌体 DNA 限制性消化及使用与用于筛选 λ DASH 文库的相同的异羟基洋地黄毒苷配基-dUTP 标记探针进行 DNA 印迹杂交 (Sambrook, et al., 第 9.38-9.44 页), 鉴定包含目的基因的限制片段。通过与用于噬斑转印的相同的方法杂交所述膜并显影阳性杂交的片段。一旦鉴定了来自每个 λ DASH 克隆的所需限制片段, 重复进行限制性消化, 将片段于 TAE 中在 0.8% 琼脂糖凝胶上分离并切下所需的带。使用 SephaglasBandPrep 试剂盒 (Pharmacia) 依照厂商的方案从凝胶片上洗脱 DNA。

[0439] 通过使用含有公开 cbh1 序列 (Shoemaker et al.) 的 bp45-2220 的 cbh1 探针进行的对 λ DASH 文库 (实施例 7) 的菌落转移杂交, 鉴定了携带 cbh1 基因的克隆。通过将 λ DASH cbh1 克隆纯化的噬菌体 DNA 进行限制性消化分离了 1.8kb 的含 cbh1 编码区 (0.5kb) 的 3' 端和 cbh1 终止子 (1.3kb) 的 BamHI 片段。将该片段亚克隆入大肠杆菌质粒载体 pUC119 的 BamHI 位点以产生质粒 pCB1Ta。通过使用含有公开 xln2 序列 (Saarelainen et al., 1993, Mol. Gen. Genet. 241:497-503) 的 bp100-783 的 xln2 探针进行的对 λ DASH 文库 (实施例 7) 的菌落转移杂交, 鉴定了携带 xln2 基因的克隆。通过将 λ DASHxln2 克隆纯化的噬菌体 DNA 进行限制性消化分离了 5.7kb 的含 xln2 的启动子 (2.3kb)、编码区 (0.8kb) 和终止子 (2.6kb) 的 KpnI 片段。将该片段亚克隆入 pUC119 的 KpnI 位点以产生质粒 pXYN2K-2。

[0440] 实施例 8: 构建在里氏木霉中指导修饰的家族 11 木聚糖酶表达的载体

[0441] 使用 xln2- 专用引物 (包含位于 bp190-195 的 PinAI 或密码子 31 和 32) 和 pUC 反向引物 (可与位于 xln2 基因 5' 末端的 KpnI 位点的下游退火) (Cat. No. 18432-013, Gibco/BRL) 以 Pwo 聚合酶从基因组 xln2 亚克隆 pXYN2K-2 (实施例 7) 扩增 2.4kb 的含有 xln2 基因启动子和分泌信号 (bp-2150 至 +195, 其中 +1 表示 ATG 起始密码子且 +193-195 代表密码子 32) 的片段。将该 xln2PCR 产物作为平末端片段以某一方向插入至 pUC119 聚合接头的 SmaI 位点中, 所述方向即聚合接头的 BamHI 位点位于 PinAI 位点的 3' 端; 这产生了质粒 pUC/XynPSS (Pin)。通过用 EcoRI (其被从 pXYN2K-2 扩增出来作为 pUC119 聚合接头的一部分) 和 BamHI 进行消化从 pUC/XynPSS (Pin) 中再分离相同的 xln2PCR 产物, 并将其插入至质粒 pBR322L (pBR322 的衍生物, 在位于 bp565 和 650 的原 SphI 和 SalI 位点之间含有 SphI-NotI-SalI 接头) 中, 也用 EcoRI 和 BamHI 消化以产生质粒 pBR322LXP。为了促进修饰的木聚糖酶的高水平表达, 将 pBR322LXP 中 1.23kb 的含有 xln2 启动子的 bp-1400 至 -121 的 HindIII 片段替换为通过 HindIII 消化 pCOR132 分离的 1.2kb 的含有 cbh1 启动子的 bp-1399 至 -204 的 HindIII 片段; 这产生了质粒 pBR322LXC。最后, 然后将 pBR322LXC 的 EcoRI 位点用 Klenow 进行钝化, 并且加入 SpeI 接头 (Cat. No. 1086, NewEngland Biolabs) 以产生 pBR322SpXC。

[0442] 将含有通过用 NheI 和 BamHI 消化从质粒 pUC/HML (下文实施例 9.1 中所述) 分离的包含突变 N27H、Y27M 和 N29L 的木聚糖酶基因第 1-190 位密码子的片段插入至 NheI 和 BamHI 消化的 pCB219N-N 中以产生 pHML/C2ter。为了制备 pCB219N-N, 使用与 cbh2 基因 (Chen et al., 1987) 的公开 3' 非翻译区的 bp 2226-2242 同源并含有在 5' 末端包含 XbaI-NheI-BamHI-SmaI-KpnI 位点的短聚合接头的引物以及可与 pZUK600 (上文实施例 7 中所述) 中位于 cbh23' 末端的 EcoRI 上游退火的 pUC 正向引物 (Cat. No. 1224, New

EnglandBiolabs), 从 pZUK600 模板扩增 cbh2 终止子片段。在改造的 XbaI 和 EcoRI 位点消化该片段并且将其插入至 pUC119 的相应位点以产生 pCB219。将 EcoRI-NotI 接头 (Cat. No. 35310-010, Gibco/BRL) 插入至 pCB219 的单 EcoRI 位点以产生 pCB219N。通过用 PinAI 和 NotI 消化从 pHTX4/C2ter 中分离 2.7kb 的含有 HTX4 基因第 9-190 密码子及 cbh2 终止子的片段, 并将其插入至 PinAI 和 NotI 消化的 pBR322SpXC 中以产生表达盒 pc/xHML-EC。

[0443] 实施例 9: 诱变里氏木霉木聚糖酶 II 以产生变体 TRX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E-131N

[0444] 9.1 引入突变 N10H、27M 和 Y29L

[0445] 将 pTrX-HML (实施例 1.4) 中包含第 32-190 密码子的合成 DNA 替换成包含位于密码子 58 处的 108bp 的内含子的里氏木霉 xln2 的相应基因组片段, 该片段是使用基因组里氏木霉 DNA 作为模板扩增的并在密码子 31 和 32 处引入单 PinAI 位点及在 TAG 终止密码子的直接下游区引入单 BamHI。这产生了 pUC/HML。

[0446] 9.2 引入突变 75A、105H、125A 和 129E

[0447] 将 3.2kb 的包含启动子区、xln2 基因和一部分的 cbh2 终止子的 SstI 片段从 pc/xHML-EC (实施例 8) 中分离并克隆进入诱变载体 pALTER[®]-1 (Promega) 的聚合接头的 SstI 位点中。进行了 4 个连续的诱变循环以改变特定的氨基酸, 使用的是为引入所需突变而专门设计的引物:

[0448] S75A: AGCTACCTCG CCGTGTACGG (SEQ ID NO:83)

[0449] L105H: CCACCAAGCA CGGCGAGGT (SEQ ID NO:84)

[0450] S125A: ACGCAGCGCG TCAACGCCCC GTCCATCATC GGC (SEQ ID NO:85)

[0451] I129E: AACGCCCCGT CCATCGAGGG CACCGCCACC TTT (SEQ ID NO:86)

[0452] (参见 WO 01/92487 和 WO 03/046169; 相关的方法通过引入的方式纳入本文); 这产生了质粒 pALT-TrX-10H-27M-29L-75A-105H-125A-129E。所有引入的突变通过 DNA 序列分析进行了验证。

[0453] 9.3 引入突变 K58R、S99C 和 Y118C

[0454] 使用 Promega Altered **Sites®** II 体外诱变系统及引物序列:

[0455] K58R: GGC ACC AAG AAC CGC TAA GAC TAC CTA (SEQ ID NO:87)

[0456] S99C: ACC TAC AAC CCG TGC ACG GGC GCC ACC (SEQ ID NO:88)

[0457] Y118C: C TAC GAC ATT TGC CGC ACG C (SEQ ID NO:89)

[0458] 对质粒 pALT-TrX-10H-27M-29L-75A-105H-125A-129E 进行一个循环的诱变以引入突变 K58R、S99C 和 Y118C 并产生 pALT-TrX-10H-27M-29L-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E。所有引入的突变通过 DNA 序列分析进行了验证。

[0459] 9.4 引入突变 N11D 和 S40R

[0460] 使用 Promega Altered **Sites®** II 体外诱变系统及引物序列:

[0461] N11D: GGT TAC CAC GAC GGT TAC T (SEQ ID NO:90)

[0462] S40R: TCC GTC AAC TGG CGC AAC TCG GGC AAC (SEQ ID NO:91) 对质粒 pALT-TrX-10H-27M-29L-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E 进行一个循环的诱变以引入突变 N11D 和 S40R 并产生 pALT-TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E。所有引入的突变通过 DNA 序列分析进行了验证。

[0463] 9.5 引入突变 T131N

[0464] 使用 Promega Altered **Sites®** II 体外诱变系统及引物序列：

[0465] T131N： CCG TCC ATC GAG GGC AAC GCC ACC TTT TAC (SEQ ID NO :92) 对质粒 pALT-TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E 进行一个循环的诱变以引入突变 T131N 并产生 pALT-TRX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E-131N。引入的突变通过 DNA 序列分析进行了验证。

[0466] 实施例 10 :构建在里氏木霉中指导 TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E-131N 表达的载体

[0467] 将 3640bp 的来自 pALT-TRX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E-131N 且包含启动子区、修饰 xln2 基因及一部分的 cbh2 终止子的 SacI 片段克隆至含有 pSP72 中保留的 cbh2 终止子序列的质粒 SacI 位点中。该步骤产生包含质粒 pc/xTRX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E-131N-PSP 的表达盒。含有质粒 pNCBg1NSNB(r) 的选择盒衍生自包含链孢霉 (*N. crassa*) pyr4 的质粒 pFB6 (Radford et al, 1985)。将 3.2kb 的来自质粒 pFB6 并包含链孢霉 pyr4 基因 (GenBank 登记号 M13448) 及其启动子、终止子和某些 5' 序列的 BglIII 片段克隆至在聚合接头 (EcoRI 和 SacI 之间) 中 pUC119 的 BamHI 位点中以产生 pNCBg1-NSNB(r), 所述 pUC119 的 BamHI 经过了修饰以包含 NotI、SmaI、NheI 和 BglIII 位点。将 2238bp 的包含整个链孢霉 pyr4 编码区、启动子和终止子的 KpnI 片段从 pNCBg1-NSNB(r) 分离并克隆至包含所述表达盒的单 KpnI 位点的质粒中以产生 pc/xTRX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E-131N-TV。

[0468] 实施例 11 :转化里氏木霉 M2C38

[0469] 将 5×10^6 个 M2C38aux5 的孢子置于添加 5mM 尿苷的马铃薯葡萄糖琼脂上的无菌玻璃纸上并在 30°C 下孵育 20 小时以促进孢子萌发和菌丝体生长。将含菌丝体的玻璃纸片转移至 10mL 原生质体溶液中, 所述原生质体溶液是在含 0.6M 硫酸铵的 pH6.5 的 50mM 磷酸钾缓冲液 (缓冲液 P) 中含 7.5g/L 崩溃碱 (Driselase) 及 125 单位的不合蛋白酶的 β 葡聚糖酶 (InterSpex Products Inc., 货号分别为 0465-1 和 0410-3)。以 60rpm 振荡 5 小时消化菌丝体丛。通过以无菌的 No. 30MIRACLOTH 的过滤从未消化的菌丝体分离原生质体, 将其收集至无菌的 50mL 圆底离心管中并在常温下通过以 1000-1500 $\times g$ 离心 10 分钟进行回收。用 5mL 缓冲液 P 洗涤原生质体并在室温下以 1000-1500 $\times g$ 再次离心 10 分钟。将原生质体重新悬浮于 1mL 的 STC 缓冲液中 (1.2M 山梨糖醇、10mM CaCl₂、10mM Tris-HCl, pH7.5)。为了进行转化, 0.1mL 再悬浮的原生质体与 10 μg 载体 DNA 和 25 μL 的 PEG 溶液 (25% PEG 4000、50mM CaCl₂、10 mM Tris-HCl, pH7.5) 组合。在冰水浴中孵育 30 分钟后, 加入 1mL 的 PEG 溶液并将混合物在室温下孵育 5 分钟。用 2mL 1.2M 的山梨糖醇的 PEG 溶液稀释转化混合液, 并将整个混合液加入冷却至约 47°C 的 25mL 融化 MMSS 琼脂培养基 (见下文) 中, 然后将原生质体悬浮液倾倒入 MMSS 琼脂上。将平板在 30°C 下孵育直至长成可见的菌落。将转化体转移至含 MM 琼脂的单平板上并使得孢子形成。收集孢子并以高度稀释铺平板于 MM 琼脂上以分离同核体转化体, 然后将所述转化体铺平板于 PDA 上以使其生长并形成足够的孢子用于接种如下文实施例 12 中所述的筛选培养物。

[0470] 基本培养基 (MM) 琼脂包含表 21 中所列的成分。

[0471] 表 21

[0472]

试剂	每 L
KH_2PO_4	10 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6 g
Na_3 柠檬酸 $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.6 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.4 mg
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2 mg
琼脂	20 g
20% 葡萄糖 f.s.	50 mL
1 M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ f.s.	4 mL
pH 至 5.5	

[0473] MMSS 琼脂含有与 MM 琼脂相同的成分并添加 1.2M 山梨糖醇、1g/L YNB (无氨基酸酵母氮源,购自于 DIFCO Cat.No. 291940) 及 0.12g/L 氨基酸 (-UraD0 Supplement,购自于 BD Biosciences Cat.No.630416)。

[0474] 实施例 12 :在里氏木霉培养物过滤液中检测嗜热性木聚糖酶活性

[0475] 通过在 65℃ 下测量从可溶性小麦阿拉伯木聚糖底物释放的还原糖确定里氏木霉转化体的培养物过滤液中存在嗜热性木聚糖酶活性。具体地,将 30 μL 适当稀释的培养物过滤液在 65℃ 下预孵育 5 分钟。接着,将 300 μL 的 1.5% 小麦阿拉伯木聚糖 (Megazyme International) 溶液 (将小麦阿拉伯木聚糖重新溶解于含 0.04% 土温的 pH 7.0 磷酸盐缓冲液中) 也在 65℃ 下预孵育 5 分钟,并且加入至微量离心管的酶样品中。将管短暂涡旋以促进混合,然后将反应物在 65℃ 下孵育 20 分钟。通过加入 150 μL 含 43.64mM 2-羟基-3,5-二硝基苯甲酸、0.93M 酒石酸钠钾、0.4M 氢氧化钠和 0.4M 氢氧化钾的终止溶液终止酶促水解反应。然后将生成的溶液煮沸 10 分钟以促进 2-羟基-3,5-二硝基苯甲酸与通过酶从阿拉伯木聚糖底物释放的还原糖的反应。将该管在冰上冷却 5 分钟,然后加入 1.5mL 去离子水。在 530nm 测定该溶液的吸光度。在孵育过程中通过嗜热性木聚糖酶释放的还原糖的量通过以下的标准曲线计算,即与相同终止溶液反应的多个稀释度纯木糖溶液的 A530 测量值的标准曲线。

[0476] 实施例 13 :在液体培养物中生产修饰的木聚糖酶

[0477] 将木霉的单菌落转移至 PDA 平板用于繁殖每种培养物。为了将用于测试培养物产生嗜热性木聚酶和纤维素酶能力的微培养物进行统一接种,孢子形成是必需的。培养基组成如下:

[0478] 表 22

[0479]

组分	g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	12.7
KH ₂ PO ₄	8.00
MgSO ₄ ·7H ₂ O	4.00
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.02
玉米浆	5.00
CaCO ₃	20.00
碳源 **	30-35
微量元素 *	2 mL/L

[0480] * 微量元素溶液含 5g/L FeSO₄·7H₂O ;1.6g/L MnSO₄·H₂O ;1.4g/L ZnSO₄·7H₂O。

[0481] ** 葡萄糖、纤维素粉 (Solka flocc)、纤维二糖、槐糖、玉米糖浆或微晶纤维素。碳源可以 pH2-7 的水溶液形式单独进行灭菌并在起始时或者在发酵过程中加入至其他培养基中。

[0482] 在 24- 孔微型板上,将单转化体以 1mL 培养物的规模培养于上述培养基中。起始 pH 为 5.5,在接种前将培养基用蒸汽高压灭菌器在 121℃ 灭菌 30 分钟。对于天然细胞和转化细胞,从 PDA 平板分离孢子,悬浮于水中并以 10⁴-10⁶孢子 /mL 用于接种每种培养物。在 30℃ 的温度下以 500rpm 振荡培养物 6 天的时间。通过以 12,000rpm 离心从含分泌蛋白的过滤液分离生物菌体。使用 Bio-Rad 蛋白测定方法 (Cat. No. 500-0001) 确定蛋白浓度。如实施例 12 中所述确定木聚糖酶活性。选择表达最高的木聚糖酶活性及呈现出高总蛋白产量的菌株用于在 30 升试发酵中培养。

[0483] 实施例 14 :在 30L 补料分批发酵中生产木聚糖酶

[0484] 将里氏木霉菌株在 28-30℃ 下培养于马铃薯葡萄糖琼脂上,直至孢子的菌苔汇聚。收集孢子并用于接种 2L 培养瓶中 750mL 的 Berkeley 培养基 (10g/L 葡萄糖、1.4g/L (NH₄)₂SO₄、2.0g/L KH₂PO₄、0.31g/L MgSO₄·7H₂O、0.53g/L CaCl₂、5.1g/L 干玉米浆、5mg/L FeSO₄·7H₂O ;0.8mg/L MnSO₄·H₂O、0.7mg/L ZnSO₄·7H₂O)。在 28℃ 及 150rpm 下培养 3 天后,将该培养物用于接种 23L 具有以下初始组分的发酵培养基中 :31g/L 葡萄糖、4.4g/L (NH₄)₂SO₄、2.77g/L KH₂PO₄、1.4g/L MgSO₄·7H₂O、0.37g/L CaCl₂、12g/L 干玉米浆、3.5mg/L FeSO₄·7H₂O、1.12mg/L MnSO₄·H₂O、0.98g/L ZnSO₄·7H₂O。将使用实施例 13 中所列的一种或多种诱导性碳水化合物源的补料分批发酵在 30L NewBrunswick Microferm 发酵罐中于 pH4.5 和 28℃ 下进行 6 天。在 6 天后,将培养物经 Harborlite 过滤并将培养物过滤液调节至 pH4.5,然后加 0.5% 的苯甲酸盐储存以防止微生物生长。

[0485] 每天用 Bio-Rad 蛋白测定方法 (Cat. No. 500-0001) 确定发酵罐样品中的蛋白浓度。如实施例 12 所述确定木聚糖酶活性。

[0486] 来自转化的里氏木霉菌株的 TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E-131N 和 TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E 在

30L 发酵中的表达（生物量和木聚糖酶活性）显示于以下的表 23。

[0487] 表 23

[0488]

株	酶	蛋白 (mg/mL)	木聚糖酶 活性 (XU/g)
P345A	TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R- 75A-99C-105H-118C-125A-129E- 131N	63-88	12021
P275H	TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R- 75A-99C-105H-118C-125A-129E	69	7145

[0489] 实施例 15：修饰的木聚糖酶 TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E-131N 和 TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E 的嗜碱性和嗜热性

[0490] 利用木霉菌株 P345A 和 P275H 制备的修饰的木聚糖酶 TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E-131N 和 TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E 的 pH 和温度谱显示于图 14、15 和 16 中。数据是通过测量在多种条件下从小麦阿拉伯木聚糖、硬木纸浆或软木纸浆释放的还原糖形成的。

[0491] 图 14 显示 TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E-131N 的最适温度稍微高于 TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E 的最适温度。每种酶的温度谱是通过于 pH7 持续作用于 1% 小麦阿拉伯木聚糖 (Megazyme International) 底物上 60 分钟产生。

[0492] 图 15 和 16 显示, 来自 P345A 的嗜热的 / 嗜碱的酶 TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E-131N 作用于硬木木浆和软木木浆上时的最适 pH 范围都比来自菌株 P275H 的 TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E 稍微宽。pH 谱是通过在 70℃ 下持续作用于 10% 稠度的木浆上 60 分钟产生。以 400mL/t 纸浆的剂量添加酶 TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E-131N, 以 800mL/t 纸浆的剂量添加酶 TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E。

[0493] 实施例 16：修饰的木聚糖酶 TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E-131N、TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E 和 TrX-10H-27M-29L 的热稳定性测试

[0494] 在无底物的条件下研究了修饰的木聚糖酶 TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E-131N、TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E 和 TrX-10H-27M-29L 对不同温度孵育的耐受性。将修饰的木聚糖酶在 pH8.0 的 200mM Bis-Tris-丙烷缓冲液中稀释 10 倍 -50 倍并在 50℃、60℃、70℃ 和 80℃ 下孵育 30 分钟。在孵育期结束时, 如实施例 12 所述确定残余酶活性, 但有以下不同: 将所述处理过的酶溶液的样品以 100 倍稀释度加入至预孵育至 70℃ 的 pH7.0 的溶于 200mM bis-tris-丙烷缓冲液的 1% 桦木木聚糖溶液中 (对于 TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E-131N 和 TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E) 或者

预孵育至 55℃的 pH6.5 的溶于 200mM Bis-Tris- 丙烷缓冲液的 1%桦木木聚糖溶液中。将残余活性标准化为每种酶在 50℃预孵育 0 分钟后测量的活性。

[0495] 包含二硫化 99C-118C 的 TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E-131N 和 TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E 都显示优于无二硫化 99C-118C 的 TrX-HML 的热稳定性。二硫化木聚糖酶的 T_{50} 被确定为 71-72℃, 作为对比的是 TrX-10H-27M-29L 的 65℃的 T_{50} (图 17)。

[0496] 以上通过优选的实施方案描述了本发明。然而, 对于本领域技术人员显而易见的是, 只要不背离本文描述的本发明的范围, 可进行多种修改和修饰。

[0497] 所有的参考文献和引用通过引用的方式纳入本文。

[0498] 参考文献

[0499] Arase, A., Yomo, T., Urabe, I., Hata, Y., Katsube, Y. and Okada, H. (1993) FEBS Lett. 316 :123-127.

[0500] Campbell, R. L., Rose, D. R., Sung, W. L., Yaguchi, M. and Wakarchuk, W., U. S. Patent No. 5, 405, 769.

[0501] Dani, V. S., Ramakrishnan, C. and Varadarajan, R. (2003) Protein Engineering 16 :187-193.

[0502] Esteves, F. D. L., Ruelle, V., Lamotte-Brasseur, J., Quinting, B. and Frere, J. -M. (2004) Protein Science 13 :1209-1218.

[0503] Fenel, F., Leisola, M., Janis, J. and Turunen (2004) J. Biotechnology 108 : 137-143.

[0504] Fushinobu, S., Ito, K., Konno, M., Wakagi, T. and Matsuzawa, H. (1998) Protein Engineering 11 :1121-1128.

[0505] Gruber, K., Klintschar, G., Hayn, M., Schlacher, A., Steiner, W. and Kratky, C. (1998) Biochemistry 37 :13475-13485.

[0506] Hakulinen, N., Turunen, O., Janis, J., Leisola, M. and Rouvinen, J. (2003) Eur. J. Biochem. 270 :1399-1412.

[0507] Irwin, D., Jung, E. D. and Wilson, D. B. (1994) Appl. Environ. Microbiol. 60 : 763-770.

[0508] Krengel, U. and Dijkstra, B. W. (1996) J. Mol. Biol. 263 :70-78.

[0509] Lee, S. L., Forsberg, C. W., and Rattray, J. B. (1987) Appl. Environ. Microbiol. 53 :644-650.

[0510] Lever (1972) Analytical Biochem 47 :273-279.

[0511] Lüthi, E., Jasrnat, N. B., and Bergquist, P. L. (1990) Appl. Environ. Microbiol. 56 :2677-2683.

[0512] Mathrani, I. M. and Ahring, B. K. (1992) Appl. Microbiol. Biotechnol. 38 :23-27.

[0513] Misset, O. (1993) in Stability and Stabilization of Enzymes, edited by W. J. J. van den Tweel, A. Harder and R. M. Buitelaar; published by Elsevier Science Publishers B. V. pp111-131.

[0514] Nissen A. M., Anker, L., Munk, N., and Lange, N. K. in Xylans and Xylanases,

edited by J. Visser, G. Beldman, M. A. Kusters-van Someren and A. G. J. Voragen, published by Elsevier, Amsterdam, 1992. p325-337.

[0515] Sakka, K., Kojima Y., Kondo, T., Karita, S., Ohmiya, K. and Shimada, K. (1993) Biosci. Biotech. Biochem. 57 :273-277.

[0516] Sapag, A., Wouters, J., Lambert, C., de Ioannes, P., Eyzaguirre, J. and Depiereux, E. (2002) J. Biotechnology 95 :109-131.

[0517] Simpson, H. D., Haufler, U. R., and Daniel, R. M. (1991) Biochem. J. (1991) 277 : 413-417.

[0518] Sowdhamini, R., Srinivasan, N., Shoichet, B., Santi, D. V., Ramakrishnan, C. and Balaram, P. (1989) Protein Engineering 3 :95-103.

[0519] Sung, W. L., Yao, F.-L., Zahab, D. M. and Narang, S. A. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 :561-565.

[0520] Sung, W. L., Luk, C. K., Zahab, D. M. and Wakarchuk, W. (1993) Protein Expression Purif. 4 :200-206.

[0521] Sung, W. L., Luk, C. K., Chan, B., Wakarchuk, W., Yaguchi, M., Campbell, R., Willick, G., Ishikawa, K. and Zahab, D. M. (1995) Biochem. Cell. Biol. 73 :253-259.

[0522] Torronen, A., and Rouvinen, J. (1995) Biochemistry 34 :847-856

[0523] Turunen, O., Etuaho, K., Fenel, F., Vehmaanpera, J., Wu, X., Rouvinen, J. and Leisola, M. (2001) J. Biotechnology 88 :37-46.

[0524] Turunen, O., Vuorio, M., Fenel, F. and Leisola, M. (2002) Protein Engineering (2002) 15 :141-145.

[0525] Wakarchuk W. W., Sung, W. L., Campbell, R. L., Cunningham, A., Watson, D. C. and Yaguchi, M. (1994) Protein Engineering 7 :1379-1386.

[0526] Winterhalter C. and Liebl, W. (1995) Appl. Environ. Microbiol. 61 :1810-1815.

[0001]

序列表

<110> 加拿大国家研究委员会

<120> 提高木聚糖酶嗜热性、热稳定性和嗜碱性的修饰

<130> V8905584cnW01

<140> 200780020890.0

<141> 2007-04-10

<150> PCT/CA2006/001192

<151> 2006-07-19

<150> 60/791,541

<151> 2006-04-12

<160> 110

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 184

<212> PRT

<213> 黑曲霉 (*Aspergillus niger*)

<400> 1

Ser Ala Gly Ile Asn Tyr Val Gln Asn Tyr Asn Gly Asn Leu Gly Asp
1 5 10 15

Phe Thr Tyr Asp Glu Ser Ala Gly Thr Phe Ser Met Tyr Trp Glu Asp
20 25 30

Gly Val Ser Ser Asp Phe Val Val Gly Leu Gly Trp Thr Thr Gly Ser
35 40 45

Ser Asn Ala Ile Thr Tyr Ser Ala Glu Tyr Ser Ala Ser Gly Ser Ser
50 55 60

Ser Tyr Leu Ala Val Tyr Gly Trp Val Asn Tyr Pro Gly Ala Glu Tyr
65 70 75 80

Tyr Ile Val Glu Asp Tyr Gly Asp Tyr Asn Pro Cys Ser Ser Ala Thr
85 90 95

Ser Leu Gly Thr Val Tyr Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Gln Val Cys Thr
100 105 110

Asp Thr Arg Ile Asn Glu Pro Ser Ile Thr Gly Thr Ser Thr Phe Thr
115 120 125

[0002]

Gln Tyr Phe Ser Val Arg Glu Ser Thr Arg Thr Ser Gly Thr Val Thr
130 135 140

Val Ala Asn His Phe Asn Phe Trp Ala Gln His Gly Phe Gly Asn Ser
145 150 155 160

Asp Phe Asn Tyr Gln Val Met Ala Val Glu Ala Trp Ser Gly Ala Gly
165 170 175

Ser Ala Ser Val Thr Ile Ser Ser
180

<210> 2

<211> 184

<212> PRT

<213> 塔宾曲霉 (*Aspergillus tubingensis*)

<400> 2

Ser Ala Gly Ile Asn Tyr Val Gln Asn Tyr Asn Gly Asn Leu Gly Asp
1 5 10 15

Phe Thr Tyr Asp Glu Ser Ala Gly Thr Phe Ser Met Tyr Trp Glu Asp
20 25 30

Gly Val Ser Ser Asp Phe Val Val Gly Leu Gly Trp Thr Thr Gly Ser
35 40 45

Ser Asn Ala Ile Thr Tyr Ser Ala Glu Tyr Ser Ala Ser Gly Ser Ala
50 55 60

Ser Tyr Leu Ala Val Tyr Gly Trp Val Asn Tyr Pro Gln Ala Glu Tyr
65 70 75 80

Tyr Ile Val Glu Asp Tyr Gly Asp Tyr Asn Pro Cys Ser Ser Ala Thr
85 90 95

Ser Leu Gly Thr Val Tyr Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Gln Val Cys Thr
100 105 110

Asp Thr Arg Thr Asn Glu Pro Ser Ile Thr Gly Thr Ser Thr Phe Thr
115 120 125

Gln Tyr Phe Ser Val Arg Glu Ser Thr Arg Thr Ser Gly Thr Val Thr
130 135 140

Val Ala Asn His Phe Asn Phe Trp Ala His His Gly Phe Gly Asn Ser
145 150 155 160

Asp Phe Asn Tyr Gln Val Val Ala Val Glu Ala Trp Ser Gly Ala Gly
165 170 175

[0003]

Ser Ala Ser Val Thr Ile Ser Ser
180

<210> 3

<211> 185

<212> PRT

<213> 环状芽孢杆菌 (Bacillus circulans)

<400> 3

Ala Ser Thr Asp Tyr Trp Gln Asn Trp Thr Asp Gly Gly Gly Ile Val
1 5 10 15

Asn Ala Val Asn Gly Ser Gly Gly Asn Tyr Ser Val Asn Trp Ser Asn
20 25 30

Thr Gly Asn Phe Val Val Gly Lys Gly Trp Thr Thr Gly Ser Pro Phe
35 40 45

Arg Thr Ile Asn Tyr Asn Ala Gly Val Trp Ala Pro Asn Gly Asn Gly
50 55 60

Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Trp Thr Arg Ser Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr
65 70 75 80

Val Val Asp Ser Trp Gly Thr Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly
85 90 95

Thr Val Lys Ser Asp Gly Gly Thr Tyr Asp Ile Tyr Thr Thr Thr Arg
100 105 110

Tyr Asn Ala Pro Ser Ile Asp Gly Asp Arg Thr Thr Phe Thr Gln Tyr
115 120 125

Trp Ser Val Arg Gln Ser Lys Arg Pro Thr Gly Ser Asn Ala Thr Ile
130 135 140

Thr Phe Thr Asn His Val Asn Ala Trp Lys Ser His Gly Met Asn Leu
145 150 155 160

Gly Ser Asn Trp Ala Tyr Gln Val Met Ala Thr Glu Gly Tyr Gln Ser
165 170 175

Ser Gly Ser Ser Asn Val Thr Val Trp
180 185

<210> 4

<211> 201

<212> PRT

[0004]

<213> 短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*)

<400> 4

Arg Thr Ile Thr Asn Asn Glu Met Gly Asn His Ser Gly Tyr Asp Tyr
1 5 10 15

Glu Leu Trp Lys Asp Tyr Gly Asn Thr Ser Met Thr Leu Asn Asn Gly
20 25 30

Gly Ala Phe Ser Ala Gly Trp Asn Asn Ile Gly Asn Ala Leu Phe Arg
35 40 45

Lys Gly Lys Lys Phe Asp Ser Thr Arg Thr His His Gln Leu Gly Asn
50 55 60

Ile Ser Ile Asn Tyr Asn Ala Ser Phe Asn Pro Gly Gly Asn Ser Tyr
65 70 75 80

Leu Cys Val Tyr Gly Trp Thr Gln Ser Pro Leu Ala Glu Tyr Tyr Ile
85 90 95

Val Asp Ser Trp Gly Thr Tyr Arg Pro Thr Gly Ala Tyr Lys Gly Ser
100 105 110

Phe Tyr Ala Asp Gly Gly Thr Tyr Asp Ile Tyr Glu Thr Thr Arg Val
115 120 125

Asn Gln Pro Ser Ile Ile Gly Ile Ala Thr Phe Lys Gln Tyr Trp Ser
130 135 140

Val Arg Gln Thr Lys Arg Thr Ser Gly Thr Val Ser Val Ser Ala His
145 150 155 160

Phe Arg Lys Trp Glu Ser Leu Gly Met Pro Met Gly Lys Met Tyr Glu
165 170 175

Thr Ala Phe Thr Val Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ala Asn Val
180 185 190

Met Thr Asn Gln Leu Phe Ile Gly Asn
195 200

<210> 5

<211> 185

<212> PRT

<213> 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)

<400> 5

Ala Ser Thr Asp Tyr Trp Gln Asn Trp Thr Asp Gly Gly Gly Ile Val
1 5 10 15

[0005]

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

<210> 6

<211> 211

<212> PRT

<213> 丙酮丁醇梭菌 (Clostridium acetobutylicum)

<400> 6

Ser Ala Phe Asn Thr Gln Ala Ala Pro Lys Thr Ile Thr Ser Asn Glu
 1 5 10 15
 Ile Gly Val Asn Gly Gly Tyr Asp Tyr Glu Leu Trp Lys Asp Tyr Gly
 20 25 30
 Asn Thr Ser Met Thr Leu Lys Asn Gly Gly Ala Phe Ser Cys Gln Trp
 35 40 45
 Ser Asn Ile Gly Asn Ala Leu Phe Arg Lys Gly Lys Lys Phe Asn Asp
 50 55 60

[0006]

Thr Gln Thr Tyr Lys Gln Leu Gly Asn Ile Ser Val Asn Tyr Asn Cys
 65 70 75 80
 Asn Tyr Gln Pro Tyr Gly Asn Ser Tyr Leu Cys Val Tyr Gly Trp Thr
 85 90 95
 Ser Ser Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Asp Ser Trp Gly Ser Trp
 100 105 110
 Arg Pro Pro Gly Gly Thr Ser Lys Gly Thr Ile Thr Val Asp Gly Gly
 115 120 125
 Ile Tyr Asp Ile Tyr Glu Thr Thr Arg Ile Asn Gln Pro Ser Ile Gln
 130 135 140
 Gly Asn Thr Thr Phe Lys Gln Tyr Trp Ser Val Arg Arg Thr Lys Arg
 145 150 155 160
 Thr Ser Gly Thr Ile Ser Val Ser Lys His Phe Ala Ala Trp Glu Ser
 165 170 175
 Lys Gly Met Pro Leu Gly Lys Met His Glu Thr Ala Phe Asn Ile Glu
 180 185 190
 Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Lys Ala Asp Val Asn Ser Met Ser Ile Asn
 195 200 205
 Ile Gly Lys
 210

<210> 7

<211> 206

<212> PRT

<213> 粪堆梭菌 (Clostridium stercorarium)

<400> 7

Gly Arg Ile Ile Tyr Asp Asn Glu Thr Gly Thr His Gly Gly Tyr Asp
 1 5 10 15

Tyr Glu Leu Trp Lys Asp Tyr Gly Asn Thr Ile Met Glu Leu Asn Asp
 20 25 30

Gly Gly Thr Phe Ser Cys Gln Trp Ser Asn Ile Gly Asn Ala Leu Phe
 35 40 45

Arg Lys Gly Arg Lys Phe Asn Ser Asp Lys Thr Tyr Gln Glu Leu Gly
 50 55 60

Asp Ile Val Val Glu Tyr Gly Cys Asp Tyr Asn Pro Asn Gly Asn Ser

[0007]

65	70	75	80
Tyr Leu Cys Val Tyr	Gly Trp Thr Arg Asn	Pro Leu Val Glu Tyr Tyr	
	85	90	95
Ile Val Glu Ser Trp	Gly Ser Trp Arg Pro Pro	Gly Ala Thr Pro Lys	
	100	105	110
Gly Thr Ile Thr Gln Trp	Met Ala Gly Thr Tyr Glu	Ile Tyr Glu Thr	
	115	120	125
Thr Arg Val Asn Gln Pro	Ser Ile Asp Gly Thr Ala	Thr Phe Gln Gln	
	130	135	140
Tyr Trp Ser Val Arg	Thr Ser Lys Arg Thr Ser	Gly Thr Ile Ser Val	
	145	150	155
Thr Glu His Phe Lys	Gln Trp Glu Arg Met Gly	Met Arg Met Gly Lys	
	165	170	175
Met Tyr Glu Val Ala	Leu Thr Val Glu Gly Tyr	Gln Ser Ser Gly Tyr	
	180	185	190
Ala Asn Val Tyr Lys	Asn Glu Ile Arg Ile Gly	Ala Asn Pro	
	195	200	205

<210> 8

<211> 211

<212> PRT

<213> 生黄瘤胃球菌 (Ruminococcus flavefaciens)

<400> 8

Ser Ala Ala Asp Gln	Gln Thr Arg Gly Asn	Val Gly Gly Tyr Asp Tyr
1	5	10

Glu Met Trp Asn Gln	Asn Gly Gln Gly Gln	Ala Ser Met Asn Pro Gly
20	25	30

Ala Gly Ser Phe Thr	Cys Ser Trp Ser Asn	Ile Glu Asn Phe Leu Ala
35	40	45

Arg Met Gly Lys Asn	Tyr Asp Ser Gln Lys	Lys Asn Tyr Lys Ala Phe
50	55	60

Gly Asn Ile Val Leu	Thr Tyr Asp Val Glu	Tyr Thr Pro Arg Gly Asn
65	70	75

Ser Tyr Met Cys Val	Tyr Gly Trp Thr Arg	Asn Pro Leu Met Glu Tyr
85	90	95

Tyr Ile Val Glu Gly Trp Gly Asp Trp Arg Pro Pro Gly Asn Asp Gly

[0008]

100	105	110
Glu Val Lys Gly Thr Val Ser	Ala Asn Gly Asn Thr	Tyr Asp Ile Arg
115	120	125
Lys Thr Met Arg Tyr Asn Gln Pro	Ser Leu Asp Gly Thr Ala Thr Phe	
130	135	140
Pro Gln Tyr Trp Ser Val Arg Gln Thr Ser Gly Ser Ala Asn Asn Gln		
145	150	155
Thr Asn Tyr Met Lys Gly Thr Ile Asp Val Thr Lys His Phe Asp Ala		
165	170	175
Trp Ser Ala Ala Gly Leu Asp Met Ser Gly Thr Leu Tyr Glu Val Ser		
180	185	190
Leu Asn Ile Glu Gly Tyr Arg Ser Asn Gly Ser Ala Asn Val Lys Ser		
195	200	205
Val Ser Val		
210		

<210> 9

<211> 197

<212> PRT

<213> 裂褶菌 (Schizophyllum commune)

<400> 9

Ser Gly Thr Pro Ser Ser Thr Gly Thr Asp Gly Gly Tyr Tyr Tyr Ser		
1	5	10
Trp Trp Thr Asp Gly Ala Gly Asp Ala Thr Tyr Gln Asn Asn Gly Gly		
20	25	30
Gly Ser Tyr Thr Leu Thr Trp Ser Gly Asn Asn Gly Asn Leu Val Gly		
35	40	45
Gly Lys Gly Trp Asn Pro Gly Ala Ala Ser Arg Ser Ile Ser Tyr Ser		
50	55	60
Gly Thr Tyr Gln Pro Asn Gly Asn Ser Tyr Leu Ser Val Tyr Gly Trp		
65	70	75
Thr Arg Ser Ser Leu Ile Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Ser Tyr Gly Ser		
85	90	95
Tyr Asp Pro Ser Ser Ala Ala Ser His Lys Gly Ser Val Thr Cys Asn		
100	105	110

[0009]

Gly Ala Thr Tyr Asp Ile Leu Ser Thr Trp Arg Tyr Asn Ala Pro Ser
 115 120 125
 Ile Asp Gly Thr Gln Thr Phe Glu Gln Phe Trp Ser Val Arg Asn Pro
 130 135 140
 Lys Lys Ala Pro Gly Gly Ser Ile Ser Gly Thr Val Asp Val Gln Cys
 145 150 155 160
 His Phe Asp Ala Trp Lys Gly Leu Gly Met Asn Leu Gly Ser Glu His
 165 170 175
 Asn Tyr Gln Ile Val Ala Thr Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Thr Ala
 180 185 190
 Thr Ile Thr Val Thr
 195

<210> 10

<211> 191

<212> PRT

<213> 浅青紫链霉菌Xyn B (Streptomyces lividans Xyn B)

<400> 10

Asp Thr Val Val Thr Thr Asn Gln Glu Gly Thr Asn Asn Gly Tyr Tyr
 1 5 10 15
 Tyr Ser Phe Trp Thr Asp Ser Gln Gly Thr Val Ser Met Asn Met Gly
 20 25 30
 Ser Gly Gly Gln Tyr Ser Thr Ser Trp Arg Asn Thr Gly Asn Phe Val
 35 40 45
 Ala Gly Lys Gly Trp Ala Asn Gly Gly Arg Arg Thr Val Gln Tyr Ser
 50 55 60
 Gly Ser Phe Asn Pro Ser Gly Asn Ala Tyr Leu Ala Leu Tyr Gly Trp
 65 70 75 80
 Thr Ser Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Asp Asn Trp Gly Thr
 85 90 95
 Tyr Arg Pro Thr Gly Glu Tyr Lys Gly Thr Val Thr Ser Asp Gly Gly
 100 105 110
 Thr Tyr Asp Ile Tyr Lys Thr Thr Arg Val Asn Lys Pro Ser Val Glu
 115 120 125
 Gly Thr Arg Thr Phe Asp Gln Tyr Trp Ser Val Arg Gln Ser Lys Arg
 130 135 140

[0010]

Thr Gly Gly Thr Ile Thr Thr Gly Asn His Phe Asp Ala Trp Ala Arg
145 150 155 160

Ala Gly Met Pro Leu Gly Asn Phe Ser Tyr Tyr Met Ile Asn Ala Thr
165 170 175

Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ile Asn Val Gly Gly
180 185 190

<210> 11

<211> 191

<212> PRT

<213> 浅青紫链霉菌Xyn C (Streptomyces lividans Xyn C)

<400> 11

Ala Thr Thr Ile Thr Thr Asn Gln Thr Gly Thr Asp Gly Met Tyr Tyr
1 5 10 15

Ser Phe Trp Thr Asp Gly Gly Gly Ser Val Ser Met Thr Leu Asn Gly
20 25 30

Gly Gly Ser Tyr Ser Thr Gln Trp Thr Asn Cys Gly Asn Phe Val Ala
35 40 45

Gly Lys Gly Trp Ser Thr Gly Asp Gly Asn Val Arg Tyr Asn Gly Tyr
50 55 60

Phe Asn Pro Val Gly Asn Gly Tyr Gly Cys Leu Tyr Gly Trp Thr Ser
65 70 75 80

Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Asp Asn Trp Gly Ser Tyr Arg
85 90 95

Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ser Asp Gly Gly Thr Tyr
100 105 110

Asp Ile Tyr Gln Thr Thr Arg Tyr Asn Ala Pro Ser Val Glu Gly Thr
115 120 125

Lys Thr Phe Gln Gln Tyr Trp Ser Val Arg Gln Ser Lys Val Thr Ser
130 135 140

Gly Ser Gly Thr Ile Thr Thr Gly Asn His Phe Asp Ala Trp Ala Arg
145 150 155 160

Ala Gly Met Asn Met Gly Gln Phe Arg Tyr Tyr Met Ile Asn Ala Thr
165 170 175

Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser Asn Ile Thr Val Ser Gly
180 185 190

[0011]

<210> 12
 <211> 189
 <212> PRT
 <213> 链霉菌属种36a (Streptomyces sp. No. 36a)

 <400> 12
 Ala Thr Thr Ile 1 • Thr Asn Glu Thr Gly Tyr Asp Gly Met Tyr Tyr Ser
 1 5 10 15
 Phe Trp Thr Asp Gly Gly Gly Ser Val Ser Met Thr Leu Asn Gly Gly
 20 25 30
 Gly Ser Tyr Ser Thr Arg Trp Thr Asn Cys Gly Asn Phe Val Ala Gly
 35 40 45
 Lys Gly Trp Ala Asn Gly Gly Arg Arg Thr Val Arg Tyr Thr Gly Trp
 50 55 60
 Phe Asn Pro Ser Gly Asn Gly Tyr Gly Cys Leu Tyr Gly Trp Thr Ser
 65 70 75 80
 Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Asp Asn Trp Gly Ser Tyr Arg
 85 90 95
 Pro Thr Gly Glu Thr Arg Gly Thr Val His Ser Asp Gly Gly Thr Tyr
 100 105 110
 Asp Ile Tyr Lys Thr Thr Arg Tyr Asn Ala Pro Ser Val Glu Ala Pro
 115 120 125
 Ala Ala Phe Asp Gln Tyr Trp Ser Val Arg Gln Ser Lys Val Thr Ser
 130 135 140
 Gly Thr Ile Thr Thr Gly Asn His Phe Asp Ala Trp Ala Arg Ala Gly
 145 150 155 160
 Met Asn Met Gly Asn Phe Arg Tyr Tyr Met Ile Asn Ala Thr Glu Gly
 165 170 175
 Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Thr Val Ser Gly
 180 185

<210> 13
 <211> 189
 <212> PRT
 <213> 褐色高温单孢菌 (Thermomonospora fusca)

 <400> 13

[0012]

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

<210> 14

<211> 190

<212> PRT

<213> 哈茨木霉 (Trichoderma harzianum)

<400> 14

Gln	Thr	Ile	Gly	Pro	Gly	Thr	Gly	Tyr	Ser	Asn	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Ser
1				5					10					15	

Tyr	Trp	Asn	Asp	Gly	His	Ala	Gly	Val	Thr	Tyr	Thr	Asn	Gly	Gly	Gly
			20					25					30		

Gly	Ser	Phe	Thr	Val	Asn	Trp	Ser	Asn	Ser	Gly	Asn	Phe	Val	Gly	Gly
		35					40					45			

[0013]

Lys Gly Trp Gln Pro Gly Thr Lys Asn Lys Val Ile Asn Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Tyr Asn Pro Asn Gly Asn Ser Tyr Leu Ser Ile Tyr Gly Trp Ser
 65 70 75 80
 Arg Asn Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Asn Phe Gly Thr Tyr
 85 90 95
 Asn Pro Ser Thr Gly Ala Thr Lys Leu Gly Glu Val Thr Ser Asp Gly
 100 105 110
 Ser Val Tyr Asp Ile Tyr Arg Thr Gln Arg Val Asn Gln Pro Ser Ile
 115 120 125
 Ile Gly Thr Ala Thr Phe Tyr Gln Tyr Trp Ser Val Arg Arg Asn His
 130 135 140
 Arg Ser Ser Gly Ser Val Asn Thr Ala Asn His Phe Asn Ala Trp Ala
 145 150 155 160
 Ser His Gly Leu Thr Leu Gly Thr Met Asp Tyr Gln Ile Val Ala Val
 165 170 175
 Glu Gly Tyr Phe Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ile Thr Val Ser
 180 185 190

<210> 15

<211> 178

<212> PRT

<213> 里氏木霉Xyn I (Trichoderma reesei Xyn I)

<400> 15

Ala Ser Ile Asn Tyr Asp Gln Asn Tyr Gln Thr Gly Gly Gln Val Ser
1 5 10 15

Tyr Ser Pro Ser Asn Thr Gly Phe Ser Val Asn Trp Asn Thr Gln Asp
20 25 30

Asp Phe Val Val Gly Val Gly Trp Thr Thr Gly Ser Ser Ala Pro Ile
35 40 45

Asn Phe Gly Gly Ser Phe Ser Val Asn Ser Gly Thr Gly Leu Leu Ser
50 55 60

Val Tyr Gly Trp Ser Thr Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Met Glu
65 70 75 80

Asp Asn His Asn Tyr Pro Ala Gln Gly Thr Val Lys Gly Thr Val Thr
85 90 95

[0014]

Ser Asp Gly Ala Thr Tyr Thr Ile Trp Glu Asn Thr Arg Val Asn Glu
100 105 110

Pro Ser Ile Gln Gly Thr Ala Thr Phe Asn Gln Tyr Ile Ser Val Arg
115 120 125

Asn Ser Pro Arg Thr Ser Gly Thr Val Thr Val Gln Asn His Phe Asn
130 135 140

Ala Trp Ala Ser Leu Gly Leu His Leu Gly Gln Met Asn Tyr Gln Val
145 150 155 160

Val Ala Val Glu Gly Trp Gly Gly Ser Gly Ser Ala Ser Gln Ser Val
165 170 175

Ser Asn

<210> 16

<211> 190

<212> PRT

<213> 里氏木霉Xyn II (Trichoderma reesei Xyn II)

<400> 16

Gln Thr Ile Gln Pro Gly Thr Gly Tyr Asn Asn Gly Tyr Phe Tyr Ser
1 5 10 15

Tyr Trp Asn Asp Gly His Gly Gly Val Thr Tyr Thr Asn Gly Pro Gly
20 25 30

Gly Gln Phe Ser Val Asn Trp Ser Asn Ser Gly Asn Phe Val Gly Gly
35 40 45

Lys Gly Trp Gln Pro Gly Thr Lys Asn Lys Val Ile Asn Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Tyr Asn Pro Asn Gly Asn Ser Tyr Leu Ser Val Tyr Gly Trp Ser
65 70 75 80

Arg Asn Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Asn Phe Gly Thr Tyr
85 90 95

Asn Pro Ser Thr Gly Ala Thr Lys Leu Gly Glu Val Thr Ser Asp Gly
100 105 110

Ser Val Tyr Asp Ile Tyr Arg Thr Gln Arg Val Asn Gln Pro Ser Ile
115 120 125

Ile Gly Thr Ala Thr Phe Tyr Gln Tyr Trp Ser Val Arg Arg Asn His
130 135 140

[0015]

Arg Ser Ser Gly Ser Val Asn Thr Ala Asn His Phe Asn Ala Trp Ala
145 150 155 160

Gln Gln Gly Leu Thr Leu Gly Thr Met Asp Tyr Gln Ile Val Ala Val
165 170 175

Glu Gly Tyr Phe Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ile Thr Val Ser
180 185 190

<210> 17

<211> 190

<212> PRT

<213> 绿色木霉 (*Trichoderma viride*)

<400> 17

Gln Thr Ile Gly Pro Gly Thr Gly Phe Asn Asn Gly Tyr Phe Tyr Ser
1 5 10 15

Tyr Trp Asn Asp Gly His Gly Gly Val Thr Tyr Thr Asn Gly Pro Gly
20 25 30

Gly Gln Phe Ser Val Asn Trp Ser Asn Ser Gly Asn Phe Val Gly Gly
35 40 45

Lys Gly Trp Gln Pro Gly Thr Lys Asn Lys Val Ile Asn Phe Ser Gly
50 55 60

Thr Tyr Asn Pro Asn Gly Asn Ser Tyr Leu Ser Val Tyr Gly Trp Ser
65 70 75 80

Arg Asn Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Asn Phe Gly Thr Tyr
85 90 95

Asn Pro Ser Thr Gly Ala Thr Lys Leu Gly Glu Val Thr Ser Asp Gly
100 105 110

Ser Val Tyr Asp Ile Tyr Arg Thr Gln Arg Val Asn Gln Pro Ser Ile
115 120 125

Ile Gly Thr Ser Thr Phe Tyr Gln Tyr Trp Ser Val Arg Arg Thr His
130 135 140

Arg Ser Ser Gly Ser Val Asn Thr Ala Asn His Phe Asn Ala Trp Ala
145 150 155 160

Gln Gln Gly Leu Thr Leu Gly Thr Met Asp Tyr Gln Ile Val Ala Val
165 170 175

Glu Gly Tyr Phe Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ile Thr Val Ser

[0016]

180	185	190
<210> 18		
<211> 202		
<212> PRT		
<213> 产琥珀酸丝状杆菌 (Fibrobacter succinogenes)		
<400> 18		
Asn Ser Ser Val Thr Gly Asn Val Gly Ser Ser Pro Tyr His Tyr Glu		
1	5	10
Ile Trp Tyr Gln Gly Gly Asn Asn Ser Met Thr Phe Tyr Asp Asn Gly		
20	25	30
Thr Tyr Lys Ala Ser Trp Asn Gly Thr Asn Asp Phe Leu Ala Arg Val		
35	40	45
Gly Phe Lys Tyr Asp Glu Lys His Thr Tyr Glu Glu Leu Gly Pro Ile		
50	55	60
Asp Ala Tyr Tyr Lys Trp Ser Lys Gln Gly Ser Ala Gly Gly Tyr Asn		
65	70	75
Tyr Ile Gly Ile Tyr Gly Trp Thr Val Asp Pro Leu Val Glu Tyr Tyr		
85	90	95
Ile Val Asp Asp Trp Phe Asn Lys Pro Gly Ala Asn Leu Leu Gly Gln		
100	105	110
Arg Lys Gly Glu Phe Thr Val Asp Gly Asp Thr Tyr Glu Ile Trp Gln		
115	120	125
Asn Thr Arg Val Gln Gln Pro Ser Ile Lys Gly Thr Gln Thr Phe Pro		
130	135	140
Gln Tyr Phe Ser Val Arg Lys Ser Ala Arg Ser Cys Gly His Ile Asp		
145	150	155
Ile Thr Ala His Met Lys Lys Trp Glu Glu Leu Gly Met Lys Met Gly		
165	170	175
Lys Met Tyr Glu Ala Lys Val Leu Val Glu Ala Gly Gly Gly Ser Gly		
180	185	190
Ser Phe Asp Val Thr Tyr Phe Lys Met Thr		
195	200	

<210> 19

<211> 189

[0017]

<212> PRT

<213> 泡盛曲霉变种kawachi (*Aspergillus awamori* var. kawachi)

<400> 19

Arg Ser Thr Pro Ser Ser Thr Gly Glu Asn Asn Gly Tyr Tyr Tyr Ser
 1 5 10 15

Phe Trp Thr Asp Gly Gly Gly Asp Val Thr Tyr Thr Asn Gly Asn Ala
 20 25 30

Gly Ser Tyr Ser Val Glu Trp Ser Asn Val Gly Asn Phe Val Gly Gly
 35 40 45

Lys Gly Trp Asn Pro Gly Ser Ala Lys Asp Ile Thr Tyr Ser Gly Asn
 50 55 60

Phe Thr Pro Ser Gly Asn Gly Tyr Leu Ser Val Tyr Gly Trp Thr Thr
 65 70 75 80

Asp Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Ser Tyr Gly Asp Tyr Asn
 85 90 95

Pro Gly Ser Gly Gly Thr Thr Arg Gly Asn Val Ser Ser Asp Gly Ser
 100 105 110

Val Tyr Asp Ile Tyr Thr Ala Thr Arg Thr Asn Ala Pro Ser Ile Gln
 115 120 125

Gly Thr Ala Thr Phe Ser Gln Tyr Trp Ser Val Arg Gln Asn Lys Arg
 130 135 140

Val Gly Gly Thr Val Thr Thr Ser Asn His Phe Asn Ala Trp Ala Lys
 145 150 155 160

Leu Gly Met Asn Leu Gly Thr His Asn Tyr Gln Ile Leu Ala Thr Glu
 165 170 175

Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser Ile Thr Ile Gln
 180 185

<210> 20

<211> 194

<212> PRT

<213> 嗜热真菌 (*Thermomyces lanuginosus*)

<400> 20

Gln Thr Thr Pro Asn Ser Glu Gly Trp His Asp Gly Tyr Tyr Tyr Ser
 1 5 10 15

Trp Trp Ser Asp Gly Gly Ala Gln Ala Thr Tyr Thr Asn Leu Glu Gly

[0018]

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

<210> 21
 <211> 184
 <212> PRT
 <213> 白曲霉Xyn C (Aspergillus kawachii Xyn C)
 <400> 21

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

[0019]

Ser Asn Ala Ile Ser Tyr Ser Ala Glu Tyr Ser Ala Ser Gly Ser Ser
50 55 60

Ser Tyr Leu Ala Val Tyr Gly Trp Val Asn Tyr Pro Gln Ala Glu Tyr
65 70 75 80

Tyr Ile Val Glu Asp Tyr Gly Asp Tyr Asn Pro Cys Ser Ser Ala Thr
85 90 95

Ser Leu Gly Thr Val Tyr Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Gln Val Cys Thr
100 105 110

Asp Thr Arg Thr Asn Glu Pro Ser Ile Thr Gly Thr Ser Thr Phe Thr
115 120 125

Gln Tyr Phe Ser Val Arg Glu Ser Thr Arg Thr Ser Gly Thr Val Thr
130 135 140

Val Ala Asn His Phe Asn Phe Trp Ala Gln His Gly Phe Gly Asn Ser
145 150 155 160

Asp Phe Asn Tyr Gln Val Met Ala Val Glu Ala Trp Ser Gly Ala Gly
165 170 175

Ser Ala Ser Val Thr Ile Ser Ser
180

<210> 22
<211> 76
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: TrX-1

<400> 22
ctagctaagg aggctgcaga tgcaaacaat acaaccagga accggttaca acaacggtta 60
cttttacagc tattgg 76

<210> 23
<211> 78
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: XyTv-2

<400> 23
aacgatggcc atggtggtgt tacctataca aacgggcccc gaggcccaatt tagcgtcaat 60

[0020]

tggtctaact ccggaac

78

<210> 24

<211> 78

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: TrX-3

<400> 24

ttcgtaggtg gaaaagggtg gcaacccggg accaaaaata aggtgatcaa cttctctgga 60
tcttataatc cgaatggg 78

<210> 25

<211> 74

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: XyTv-4

<400> 25

aattcatact taagcgtcta tggctggtct agaaaccac tgattgaata ttacattgtc 60
gaaaatttcg gtac 74

<210> 26

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: TrX-8

<400> 26

gattcctcgc acgtctacgt ttgttatggt ggtccttggc caatgttggt g 51

<210> 27

<211> 84

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: XyTv-7

<400> 27

ccaatgaaaa tgtcgataac cttgctaccg gtaccaccac aatggatatg ttgccccggg 60
cctccggtta aatcgagtt aacc 84

[0021]

<210> 28
<211> 78
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: TrX-6

<400> 28
agattgaggc ctttgaagca tccacctttt ccaaccgttg ggccctggtt tttattccac 60
tagttgaaga gacctaga 78

<210> 29
<211> 85
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: XyTv-5

<400> 29
atattaggct tacccttaag tatgaattcg cagataccga ccagatcttt gggtgactaa 60
cttataatgt aacagctttt aaage 85

<210> 30
<211> 58
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: XyTv-101

<400> 30
tcgacaattt cggtacctac aatccgagta ccggcgccac aaaattagc gaagtcac 58

<210> 31
<211> 53
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: XyTv-102

<400> 31
tagtgatgga tccgtatatg atatctaccg tacccaacgc gttaatcagc cat 53

[0022]

<210> 32
<211> 59
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: TrX-103

<400> 32
cgatcattgg aaccgccacc tttatcagt actggagtgt tagacgtaat catcgagc 59

<210> 33
<211> 69
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: XyTv-104

<400> 33
tccggttcgg ttaatactgc gaatcacttt aatgcatggg cacagcaagg gttaacccta 60
ggtacaatg 69

<210> 34
<211> 67
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: XyTv-105

<400> 34
gattatcaaa tcgtagcggg ggaaggctac ttctcgagtg gttccgctag tattacagt 60
agctaaa 67

<210> 35
<211> 73
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: XyTv-110

<400> 35
gttaaagcca tggatgtag gctcatggcc gcggtgtttt aatccgcttc agtgatcact 60
acctaggcat ata 73

[0023]

<210> 36
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: XyTv-109

<400> 36
ctatagatgg catgggttgc gcaattagtc gtagctagt aaccttggcg gtgg 54

<210> 37
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: XyTv-108

<400> 37
aaaatagtca tgacctcaca atctgcatta gtagcctcga ggccaagcca attatgacgc 60

<210> 38
<211> 66
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: XyTv-107

<400> 38
ttagtgaaat tacgtaccgc tgcgttccc aattgggatc catgttacct aatagtttag 60
catcgc 66

<210> 39
<211> 53
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: XyTv-106

<400> 39
caccttcga tgaagagctc accaaggcga tcataatgtc actcgatttc tag 53

<210> 40

[0024]

<211> 596
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: TrX

<400> 40
ctagctaagg aggctgcaga tgcaacaat acaaccagga accggttaca acaacggtta 60
cttttacagc tattggaacg atggccatgg tgggtgttacc tatacaaacg ggcccggagg 120
ccaatttagc gtcaattggc ctaactccgg aaacttcgta ggtggaaaag gttggcaacc 180
cgggaccaaa aataaggtga tcaacttctc tggatcttat aatccgaatg ggaattcata 240
cttaagcgtc tatggctggc ctagaacccc actgattgaa tattacattg tcgaaaattt 300
cggtagctac aatccgagta ccggcgccac aaaattagga gaagtcacta gtgatggatc 360
cgtatatgat atctaccgta cccaacgcgt taatcagcca tcgatcattg gaaccgccac 420
cttttatcag tactggagtg ttagacgtaa tcatcggagc tccggttcgg ttaatactgc 480
gaatcacttt aatgcatggg cacagcaagg gttaacccta ggtacaatgg attatcaaatt 540
cgtagcggtg gaaggtact tctcgagtgg ttccgctagt attacagtga gctaaa 596

<210> 41
<211> 84
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 蛋白A的分泌前导序列

<400> 41
ctagcaagaa gacagcaata gcaatcgtg tggcattagc cggttttgcg accgttgctc 60
aggcccagac catacaacca ggaa 84

<210> 42
<211> 84
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 蛋白A的互补分泌前导序列

<400> 42
gttcttctgt cgttatcgtt agcgacaccg taatcggccg aaacgctggc aacgagtccg 60
ggctcgggat gttggtcctt ggcc 84

<210> 43
<211> 112
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

[0025]

<223> 人工序列描述: TrX-HML

<400> 43

ctagctaagg aggctgcaga tgcaaacaat acaaccagga accggttacc acaacggtta 60
cttttacagc tattggaacg atggccatgg aggcgtcaca atgactctgg gg 112

<210> 44

<211> 108

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: TrX-HML互补序列

<400> 44

gattcctccg acgtctacgt ttgttatggt ggtccttgge caatggtgtt gccaatgaaa 60
atgtcgataa ccttgctacc ggtacctcg cagtgttact gagacccc 108

<210> 45

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: TX-10H-1

<400> 45

ggaaccggtt accacaacgg ttactttttac agctattgg 39

<210> 46

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 互补人工序列描述: TX-10H11D-1

<400> 46

ggaaccggtt accacgacgg ttactttttac agctattgg 39

<210> 47

<211> 44

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: Tx-C1

<400> 47

[0026]

cccaagcttc aagatcttta gctcactgta atactagcgg aacc 44

<210> 48
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: Tx-58R-1

<400> 48
caaccggga ccaaaaatag ggtgatcaac 30

<210> 49
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: Tx-40H-1

<400> 49
gtcaattggc ataactccgg aaacttcgta ggtgga 36

<210> 50
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: Tx-40R-1

<400> 50
gtcaattggc gtaactccgg aaacttcgta ggtgga 36

<210> 51
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: Tx-99C-1

<400> 51
ttcggtagct acaatccgtg taccggc 27

<210> 52
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

[0027]

<220>		
<223>	人工序列描述: Tx-75A-1	
<400>	52	
	tggaattca tacttagccg tctatggctg gtctag	36
<210>	53	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列描述: Tx-118C-1	
<400>	53	
	gacggatccg tatatgatat ctgccgtacc caacgc	36
<210>	54	
<211>	57	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列描述: Tx-99C105H-1r	
<400>	54	
	tacggatcca tcactagtga cttcgccgtg ttttgtggcg ccggtacacg gattgta	57
<210>	55	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列描述: Tx-40C-1	
<400>	55	
	gtcaattggt gtaactccgg aaacttcgta ggtgga	36
<210>	56	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列描述: Tx-40Y-1	
<400>	56	
	gtcaattggt ataactccgg aaacttcgta ggtgga	36
<210>	57	

[0028]

<211> 36	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列描述: Tx-40F-1	
<400> 57	
gtcaattggt ttaactccgg aaacttcgta ggtgga	36
<210> 58	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列描述: Tx-40T-1	
<400> 58	
gtcaattgga ctaactccgg aaacttcgta ggtgga	36
<210> 59	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列描述: Tx-40A-1	
<400> 59	
gtcaattggg ctaactccgg aaacttcgta ggtgga	36
<210> 60	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列描述: Tx-52C-1r	
<400> 60	
gtcccgggac accaaccttt tccacctacg aagt	34
<210> 61	
<211> 306	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列描述: TrX(1-91)	
<400> 61	

[0029]

```

ctagctaagg aggctgcaga tgcaaacaat acaaccagga accggttaca acaacggtta 60
cttttacagc tattggaacg atggccatgg tgggtgttacc tatacaaacg ggccccgagg 120
ccaatttagc gtcaattggc ctaactccgg aaacttcgta ggtggaaaag gttggcaacc 180
cgggacaaaa aataagggtga tcaacttctc tggatcttat aatccgaatg ggaattcata 240
cttaagecgtc tatggctggc ctagaaaccc actgattgaa tattacattg tcgaaaattt 300
cggtac 306

```

<210> 62

<211> 298

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 与TrX(1-91)互补

<400> 62

```

gattcctccg acgtctacgt ttgttatgtt ggctcctggc caatgttggt gccaatgaaa 60
atgtcgataa ccttgctacc ggtaccacca caatggatat gtttgcccgg gcctccggtt 120
aaatcgcagt taaccagatt gaggcctttg aagcatccac cttttccaac cgttgggccc 180
tggtttttat tccactagtt gaagagacct agaattattg gcttaccctt aagtatgaat 240
tcgcagatac cgaccagatc tttgggtgac taacttataa tgtaacagct tttaaagc 298

```

<210> 63

<211> 290

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: TrX(92-190)

<400> 63

```

ctacaatecg agtaccggcg ccacaaaatt aggccaagtc actagtgatg gatccgtata 60
tgatatctac cgtacccaac gcgttaatca gccatcgatc attggaaccg ccacctttta 120
tcagtactgg agtgtagac gtaatcatcg gagctccggt tcggttaata ctgcgaatca 180
ctttaatgca tgggcacagc aagggttaac cctaggtaca atggattatc aaatcgtagc 240
ggtggaaggc tacttctcga gtggttccgc tagtattaca gtgagctaaa 290

```

<210> 64

<211> 306

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 与TrX(92-190)互补

<400> 64

[0030]

```

gttaaagcca tggatgtag gctcatggcc gcggtgtttt aatccgcttc agtgatcact 60
acctaggcat atactataga tggcatgggt tgcgcaatta gtcggtagct agtaaccttg 120
gcggtggaaa atagtcatga cctcacaatc tgcattagta gcctcgaggc caagccaatt 180
atgacgctta gtgaaattac gtaccegtgt cgttcccaat tgggatccat gttacctaat 240
agtttagcat cgccaccttc cgatgaagag ctcaccaagg cgatcataat gtcactcgat 300
ttctag                                     306

```

<210> 65

<211> 190

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 修饰的木聚糖酶TrX-40H

<400> 65

```

Gln Thr Ile Gln Pro Gly Thr Gly Tyr Asn Asn Gly Tyr Phe Tyr Ser
  1              5              10              15

```

```

Tyr Trp Asn Asp Gly His Gly Gly Val Thr Tyr Thr Asn Gly Pro Gly
          20              25              30

```

```

Gly Gln Phe Ser Val Asn Trp His Asn Ser Gly Asn Phe Val Gly Gly
          35              40              45

```

```

Lys Gly Trp Gln Pro Gly Thr Lys Asn Lys Val Ile Asn Phe Ser Gly
          50              55              60

```

```

Ser Tyr Asn Pro Asn Gly Asn Ser Tyr Leu Ser Val Tyr Gly Trp Ser
          65              70              75              80

```

```

Arg Asn Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Asn Phe Gly Thr Tyr
          85              90              95

```

```

Asn Pro Ser Thr Gly Ala Thr Lys Leu Gly Glu Val Thr Ser Asp Gly
          100             105             110

```

```

Ser Val Tyr Asp Ile Tyr Arg Thr Gln Arg Val Asn Gln Pro Ser Ile
          115             120             125

```

```

Ile Gly Thr Ala Thr Phe Tyr Gln Tyr Trp Ser Val Arg Arg Asn His
          130             135             140

```

```

Arg Ser Ser Gly Ser Val Asn Thr Ala Asn His Phe Asn Ala Trp Ala
          145             150             155             160

```

```

Gln Gln Gly Leu Thr Leu Gly Thr Met Asp Tyr Gln Ile Val Ala Val
          165             170             175

```

```

Glu Gly Tyr Phe Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ile Thr Val Ser
          180             185             190

```

[0031]

<210> 66

<211> 190

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 修饰的木聚糖酶TrX-99C-118C

<400> 66

Gln Thr Ile Gln Pro Gly Thr Gly Tyr Asn Asn Gly Tyr Phe Tyr Ser
 1 5 10 15

Tyr Trp Asn Asp Gly His Gly Gly Val Thr Tyr Thr Asn Gly Pro Gly
 20 25 30

Gly Gln Phe Ser Val Asn Trp Ser Asn Ser Gly Asn Phe Val Gly Gly
 35 40 45

Lys Gly Trp Gln Pro Gly Thr Lys Asn Lys Val Ile Asn Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Tyr Asn Pro Asn Gly Asn Ser Tyr Leu Ser Val Tyr Gly Trp Ser
 65 70 75 80

Arg Asn Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Asn Phe Gly Thr Tyr
 85 90 95

Asn Pro Cys Thr Gly Ala Thr Lys Leu Gly Glu Val Thr Ser Asp Gly
 100 105 110

Ser Val Tyr Asp Ile Cys Arg Thr Gln Arg Val Asn Gln Pro Ser Ile
 115 120 125

Ile Gly Thr Ala Thr Phe Tyr Gln Tyr Trp Ser Val Arg Arg Asn His
 130 135 140

Arg Ser Ser Gly Ser Val Asn Thr Ala Asn His Phe Asn Ala Trp Ala
 145 150 155 160

Gln Gln Gly Leu Thr Leu Gly Thr Met Asp Tyr Gln Ile Val Ala Val
 165 170 175

Glu Gly Tyr Phe Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ile Thr Val Ser
 180 185 190

<210> 67

<211> 190

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 修饰的木聚糖酶TrX-40H-99C-118C

[0032]

<400> 67

Gln Thr Ile Gln Pro Gly Thr Gly Tyr Asn Asn Gly Tyr Phe Tyr Ser
 1 5 10 15

Tyr Trp Asn Asp Gly His Gly Gly Val Thr Tyr Thr Asn Gly Pro Gly
 20 25 30

Gly Gln Phe Ser Val Asn Trp His Asn Ser Gly Asn Phe Val Gly Gly
 35 40 45

Lys Gly Trp Gln Pro Gly Thr Lys Asn Lys Val Ile Asn Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Tyr Asn Pro Asn Gly Asn Ser Tyr Leu Ser Val Tyr Gly Trp Ser
 65 70 75 80

Arg Asn Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Asn Phe Gly Thr Tyr
 85 90 95

Asn Pro Cys Thr Gly Ala Thr Lys Leu Gly Glu Val Thr Ser Asp Gly
 100 105 110

Ser Val Tyr Asp Ile Cys Arg Thr Gln Arg Val Asn Gln Pro Ser Ile
 115 120 125

Ile Gly Thr Ala Thr Phe Tyr Gln Tyr Trp Ser Val Arg Arg Asn His
 130 135 140

Arg Ser Ser Gly Ser Val Asn Thr Ala Asn His Phe Asn Ala Trp Ala
 145 150 155 160

Gln Gln Gly Leu Thr Leu Gly Thr Met Asp Tyr Gln Ile Val Ala Val
 165 170 175

Glu Gly Tyr Phe Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ile Thr Val Ser
 180 185 190

<210> 68

<211> 190

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 修饰的木聚糖酶TrX-58R-99C-118C

<400> 68

Gln Thr Ile Gln Pro Gly Thr Gly Tyr Asn Asn Gly Tyr Phe Tyr Ser
 1 5 10 15

Tyr Trp Asn Asp Gly His Gly Gly Val Thr Tyr Thr Asn Gly Pro Gly
 20 25 30

[0033]

Gly Gln Phe Ser Val Asn Trp Ser Asn Ser Gly Asn Phe Val Gly Gly
 35 40 45
 Lys Gly Trp Gln Pro Gly Thr Lys Asn Arg Val Ile Asn Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Tyr Asn Pro Asn Gly Asn Ser Tyr Leu Ser Val Tyr Gly Trp Ser
 65 70 75 80
 Arg Asn Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Asn Phe Gly Thr Tyr
 85 90 95
 Asn Pro Cys Thr Gly Ala Thr Lys Leu Gly Glu Val Thr Ser Asp Gly
 100 105 110
 Ser Val Tyr Asp Ile Cys Arg Thr Gln Arg Val Asn Gln Pro Ser Ile
 115 120 125
 Ile Gly Thr Ala Thr Phe Tyr Gln Tyr Trp Ser Val Arg Arg Asn His
 130 135 140
 Arg Ser Ser Gly Ser Val Asn Thr Ala Asn His Phe Asn Ala Trp Ala
 145 150 155 160
 Gln Gln Gly Leu Thr Leu Gly Thr Met Asp Tyr Gln Ile Val Ala Val
 165 170 175
 Glu Gly Tyr Phe Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ile Thr Val Ser
 180 185 190
 <210> 69
 <211> 190
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 修饰的木聚糖酶TrX-40H-58R-99C-118C
 <400> 69
 Gln Thr Ile Gln Pro Gly Thr Gly Tyr Asn Asn Gly Tyr Phe Tyr Ser
 1 5 10 15
 Tyr Trp Asn Asp Gly His Gly Gly Val Thr Tyr Thr Asn Gly Pro Gly
 20 25 30
 Gly Gln Phe Ser Val Asn Trp His Asn Ser Gly Asn Phe Val Gly Gly
 35 40 45
 Lys Gly Trp Gln Pro Gly Thr Lys Asn Arg Val Ile Asn Phe Ser Gly
 50 55 60

[0034]

Ser Tyr Asn Pro Asn Gly Asn Ser Tyr Leu Ser Val Tyr Gly Trp Ser
 65 70 75 80
 Arg Asn Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Asn Phe Gly Thr Tyr
 85 90 95
 Asn Pro Cys Thr Gly Ala Thr Lys Leu Gly Glu Val Thr Ser Asp Gly
 100 105 110
 Ser Val Tyr Asp Ile Cys Arg Thr Gln Arg Val Asn Gln Pro Ser Ile
 115 120 125
 Ile Gly Thr Ala Thr Phe Tyr Gln Tyr Trp Ser Val Arg Arg Asn His
 130 135 140
 Arg Ser Ser Gly Ser Val Asn Thr Ala Asn His Phe Asn Ala Trp Ala
 145 150 155 160
 Gln Gln Gly Leu Thr Leu Gly Thr Met Asp Tyr Gln Ile Val Ala Val
 165 170 175
 Glu Gly Tyr Phe Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ile Thr Val Ser
 180 185 190

<210> 70

<211> 190

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 修饰的木聚糖酶TrX-HML-40R-58R-99C-118C

<400> 70

Gln Thr Ile Gln Pro Gly Thr Gly Tyr His Asn Gly Tyr Phe Tyr Ser
 1 5 10 15
 Tyr Trp Asn Asp Gly His Gly Gly Val Thr Met Thr Leu Gly Pro Gly
 20 25 30
 Gly Gln Phe Ser Val Asn Trp Arg Asn Ser Gly Asn Phe Val Gly Gly
 35 40 45
 Lys Gly Trp Gln Pro Gly Thr Lys Asn Arg Val Ile Asn Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Tyr Asn Pro Asn Gly Asn Ser Tyr Leu Ser Val Tyr Gly Trp Ser
 65 70 75 80
 Arg Asn Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Asn Phe Gly Thr Tyr
 85 90 95

[0035]

Asn Pro Cys Thr Gly Ala Thr Lys Leu Gly Glu Val Thr Ser Asp Gly
100 105 110

Ser Val Tyr Asp Ile Cys Arg Thr Gln Arg Val Asn Gln Pro Ser Ile
115 120 125

Ile Gly Thr Ala Thr Phe Tyr Gln Tyr Trp Ser Val Arg Arg Asn His
130 135 140

Arg Ser Ser Gly Ser Val Asn Thr Ala Asn His Phe Asn Ala Trp Ala
145 150 155 160

Gln Gln Gly Leu Thr Leu Gly Thr Met Asp Tyr Gln Ile Val Ala Val
165 170 175

Glu Gly Tyr Phe Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ile Thr Val Ser
180 185 190

<210> 71

<211> 190

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 修饰的木聚糖酶TrX-HML-40R-58R-75A-99C-118C

<400> 71

Gln Thr Ile Gln Pro Gly Thr Gly Tyr His Asn Gly Tyr Phe Tyr Ser
1 5 10 15

Tyr Trp Asn Asp Gly His Gly Gly Val Thr Met Thr Leu Gly Pro Gly
20 25 30

Gly Gln Phe Ser Val Asn Trp Arg Asn Ser Gly Asn Phe Val Gly Gly
35 40 45

Lys Gly Trp Gln Pro Gly Thr Lys Asn Arg Val Ile Asn Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Tyr Asn Pro Asn Gly Asn Ser Tyr Leu Ala Val Tyr Gly Trp Ser
65 70 75 80

Arg Asn Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Asn Phe Gly Thr Tyr
85 90 95

Asn Pro Cys Thr Gly Ala Thr Lys Leu Gly Glu Val Thr Ser Asp Gly
100 105 110

Ser Val Tyr Asp Ile Cys Arg Thr Gln Arg Val Asn Gln Pro Ser Ile
115 120 125

[0036]

Ile Gly Thr Ala Thr Phe Tyr Gln Tyr Trp Ser Val Arg Arg Asn His
130 135 140

Arg Ser Ser Gly Ser Val Asn Thr Ala Asn His Phe Asn Ala Trp Ala
145 150 155 160

Gln Gln Gly Leu Thr Leu Gly Thr Met Asp Tyr Gln Ile Val Ala Val
165 170 175

Glu Gly Tyr Phe Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ile Thr Val Ser
180 185 190

<210> 72

<211> 190

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 修饰的木聚糖酶TrX-HML-75A-99C-105H-118C-125A-129E

<400> 72

Gln Thr Ile Gln Pro Gly Thr Gly Tyr His Asn Gly Tyr Phe Tyr Ser
1 5 10 15

Tyr Trp Asn Asp Gly His Gly Gly Val Thr Met Thr Leu Gly Pro Gly
20 25 30

Gly Gln Phe Ser Val Asn Trp Ser Asn Ser Gly Asn Phe Val Gly Gly
35 40 45

Lys Gly Trp Gln Pro Gly Thr Lys Asn Lys Val Ile Asn Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Tyr Asn Pro Asn Gly Asn Ser Tyr Leu Ala Val Tyr Gly Trp Ser
65 70 75 80

Arg Asn Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Asn Phe Gly Thr Tyr
85 90 95

Asn Pro Cys Thr Gly Ala Thr Lys His Gly Glu Val Thr Ser Asp Gly
100 105 110

Ser Val Tyr Asp Ile Cys Arg Thr Gln Arg Val Asn Ala Pro Ser Ile
115 120 125

Glu Gly Thr Ala Thr Phe Tyr Gln Tyr Trp Ser Val Arg Arg Asn His
130 135 140

Arg Ser Ser Gly Ser Val Asn Thr Ala Asn His Phe Asn Ala Trp Ala
145 150 155 160

[0037]

Gln Gln Gly Leu Thr Leu Gly Thr Met Asp Tyr Gln Ile Val Ala Val
165 170 175

Glu Gly Tyr Phe Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ile Thr Val Ser
180 185 190

<210> 73

<211> 190

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 修饰的木聚糖酶TrX-HML-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E

<400> 73

Gln Thr Ile Gln Pro Gly Thr Gly Tyr His Asn Gly Tyr Phe Tyr Ser
1 5 10 15

Tyr Trp Asn Asp Gly His Gly Gly Val Thr Met Thr Leu Gly Pro Gly
20 25 30

Gly Gln Phe Ser Val Asn Trp Ser Asn Ser Gly Asn Phe Val Gly Gly
35 40 45

Lys Gly Trp Gln Pro Gly Thr Lys Asn Arg Val Ile Asn Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Tyr Asn Pro Asn Gly Asn Ser Tyr Leu Ala Val Tyr Gly Trp Ser
65 70 75 80

Arg Asn Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Asn Phe Gly Thr Tyr
85 90 95

Asn Pro Cys Thr Gly Ala Thr Lys His Gly Glu Val Thr Ser Asp Gly
100 105 110

Ser Val Tyr Asp Ile Cys Arg Thr Gln Arg Val Asn Ala Pro Ser Ile
115 120 125

Glu Gly Thr Ala Thr Phe Tyr Gln Tyr Trp Ser Val Arg Arg Asn His
130 135 140

Arg Ser Ser Gly Ser Val Asn Thr Ala Asn His Phe Asn Ala Trp Ala
145 150 155 160

Gln Gln Gly Leu Thr Leu Gly Thr Met Asp Tyr Gln Ile Val Ala Val
165 170 175

Glu Gly Tyr Phe Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ile Thr Val Ser
180 185 190

[0038]

<210> 74

<211> 190

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 修饰的木聚糖酶TrX-10H-11D-27M-29L-58R-75A-99C-
105H-118C-125A-129E

<400> 74

Gln Thr Ile Gln Pro Gly Thr Gly Tyr His Asp Gly Tyr Phe Tyr Ser
1 5 10 15

Tyr Trp Asn Asp Gly His Gly Gly Val Thr Met Thr Leu Gly Pro Gly
20 25 30

Gly Gln Phe Ser Val Asn Trp Ser Asn Ser Gly Asn Phe Val Gly Gly
35 40 45

Lys Gly Trp Gln Pro Gly Thr Lys Asn Arg Val Ile Asn Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Tyr Asn Pro Asn Gly Asn Ser Tyr Leu Ala Val Tyr Gly Trp Ser
65 70 75 80

Arg Asn Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Asn Phe Gly Thr Tyr
85 90 95

Asn Pro Cys Thr Gly Ala Thr Lys His Gly Glu Val Thr Ser Asp Gly
100 105 110

Ser Val Tyr Asp Ile Cys Arg Thr Gln Arg Val Asn Ala Pro Ser Ile
115 120 125

Glu Gly Thr Ala Thr Phe Tyr Gln Tyr Trp Ser Val Arg Arg Asn His
130 135 140

Arg Ser Ser Gly Ser Val Asn Thr Ala Asn His Phe Asn Ala Trp Ala
145 150 155 160

Gln Gln Gly Leu Thr Leu Gly Thr Met Asp Tyr Gln Ile Val Ala Val
165 170 175

Glu Gly Tyr Phe Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ile Thr Val Ser
180 185 190

<210> 75

<211> 190

<212> PRT

<213> 人工序列

[0039]

<220>

<223> 修饰的木聚糖酶TrX-10H-11D-27M-29L-40C-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E

<400> 75

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

<210> 76

<211> 190

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 修饰的木聚糖酶TrX-10H-11D-27M-29L-40F-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E

[0040]

<400> 76

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

<210> 77

<211> 190

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 修饰的木聚糖酶TrX-10H-11D-27M-29L-40H-58R-75A-99C-
 105H-118C-125A-129E

<400> 77

Gln Thr Ile Gln Pro Gly Thr Gly Tyr His Asp Gly Tyr Phe Tyr Ser
 1 5 10 15

[0041]

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

<210> 78

<211> 190

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 修饰的木聚糖酶TrX-H-11D-ML-40Y-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E

<400> 78

Gln Thr Ile Gln Pro Gly Thr Gly Tyr His Asp Gly Tyr Phe Tyr Ser
 1 5 10 15
 Tyr Trp Asn Asp Gly His Gly Gly Val Thr Met Thr Leu Gly Pro Gly
 20 25 30
 Gly Gln Phe Ser Val Asn Trp Tyr Asn Ser Gly Asn Phe Val Gly Gly

[0042]

Ser Tyr Asn Pro Asn Gly Asn Ser Tyr Leu Ala Val Tyr Gly Trp Ser
65 70 75 80

Arg Asn Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Asn Phe Gly Thr Tyr
85 90 95

Asn Pro Cys Thr Gly Ala Thr Lys His Gly Glu Val Thr Ser Asp Gly
100 105 110

Ser Val Tyr Asp Ile Cys Arg Thr Gln Arg Val Asn Ala Pro Ser Ile
115 120 125

Glu Gly Thr Ala Thr Phe Tyr Gln Tyr Trp Ser Val Arg Arg Asn His
130 135 140

Arg Ser Ser Gly Ser Val Asn Thr Ala Asn His Phe Asn Ala Trp Ala
145 150 155 160

Gln Gln Gly Leu Thr Leu Gly Thr Met Asp Tyr Gln Ile Val Ala Val
165 170 175

Glu Gly Tyr Phe Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ile Thr Val Ser
180 185 190

<210> 80

<211> 190

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 修饰的木聚糖酶TrX-10H-11D-27M-29L-40H-52C-58R-75A-
99C-105H-118C-125A-129E

<400> 80

Gln Thr Ile Gln Pro Gly Thr Gly Tyr His Asp Gly Tyr Phe Tyr Ser
1 5 10 15

Tyr Trp Asn Asp Gly His Gly Gly Val Thr Met Thr Leu Gly Pro Gly
20 25 30

Gly Gln Phe Ser Val Asn Trp His Asn Ser Gly Asn Phe Val Gly Gly
35 40 45

Lys Gly Trp Cys Pro Gly Thr Lys Asn Arg Val Ile Asn Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Tyr Asn Pro Asn Gly Asn Ser Tyr Leu Ala Val Tyr Gly Trp Ser
65 70 75 80

Arg Asn Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Asn Phe Gly Thr Tyr
85 90 95

[0044]

Asn Pro Cys Thr Gly Ala Thr Lys His Gly Glu Val Thr Ser Asp Gly
100 105 110

Ser Val Tyr Asp Ile Cys Arg Thr Gln Arg Val Asn Ala Pro Ser Ile
115 120 125

Glu Gly Thr Ala Thr Phe Tyr Gln Tyr Trp Ser Val Arg Arg Asn His
130 135 140

Arg Ser Ser Gly Ser Val Asn Thr Ala Asn His Phe Asn Ala Trp Ala
145 150 155 160

Gln Gln Gly Leu Thr Leu Gly Thr Met Asp Tyr Gln Ile Val Ala Val
165 170 175

Glu Gly Tyr Phe Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ile Thr Val Ser
180 185 190

<210> 81

<211> 190

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 修饰的木聚糖酶TrX-10H-11D-27M-29L-40R-58R-75A-99C-
105H-118C-125A-129E-144R-161R

<400> 81

Gln Thr Ile Gln Pro Gly Thr Gly Tyr His Asp Gly Tyr Phe Tyr Ser
1 5 10 15

Tyr Trp Asn Asp Gly His Gly Gly Val Thr Met Thr Leu Gly Pro Gly
20 25 30

Gly Gln Phe Ser Val Asn Trp Arg Asn Ser Gly Asn Phe Val Gly Gly
35 40 45

Lys Gly Trp Gln Pro Gly Thr Lys Asn Arg Val Ile Asn Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Tyr Asn Pro Asn Gly Asn Ser Tyr Leu Ala Val Tyr Gly Trp Ser
65 70 75 80

Arg Asn Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Asn Phe Gly Thr Tyr
85 90 95

Asn Pro Cys Thr Gly Ala Thr Lys His Gly Glu Val Thr Ser Asp Gly
100 105 110

Ser Val Tyr Asp Ile Cys Arg Thr Gln Arg Val Asn Ala Pro Ser Ile

[0045]

	115		120		125	
Glu Gly Thr Ala Thr Phe Tyr Gln Tyr Trp Ser Val Arg Arg Asn Arg						
130			135		140	
Arg Ser Ser Gly Ser Val Asn Thr Ala Asn His Phe Asn Ala Trp Ala						
145		150		155		160
Arg Gln Gly Leu Thr Leu Gly Thr Met Asp Tyr Gln Ile Val Ala Val						
	165		170			175
Glu Gly Tyr Phe Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ile Thr Val Ser						
	180		185			190

<210> 82

<211> 190

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 修饰的木聚糖酶TrX-10H-11D-27M-29L-58R-75A-99C-105H-118C-125A-129E-131N

<400> 82

Gln Thr Ile Gln Pro Gly Thr Gly Tyr His Asp Gly Tyr Phe Tyr Ser						
1		5		10		15
Tyr Trp Asn Asp Gly His Gly Gly Val Thr Met Thr Leu Gly Pro Gly						
	20		25			30
Gly Gln Phe Ser Val Asn Trp Ser Asn Ser Gly Asn Phe Val Gly Gly						
	35		40			45
Lys Gly Trp Gln Pro Gly Thr Lys Asn Arg Val Ile Asn Phe Ser Gly						
	50		55			60
Ser Tyr Asn Pro Asn Gly Asn Ser Tyr Leu Ala Val Tyr Gly Trp Ser						
	65		70		75	80
Arg Asn Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Asn Phe Gly Thr Tyr						
		85		90		95
Asn Pro Cys Thr Gly Ala Thr Lys His Gly Glu Val Thr Ser Asp Gly						
	100		105			110
Ser Val Tyr Asp Ile Cys Arg Thr Gln Arg Val Asn Ala Pro Ser Ile						
	115		120			125
Glu Gly Asn Ala Thr Phe Tyr Gln Tyr Trp Ser Val Arg Arg Asn His						
	130		135			140

[0046]

Arg Ser Ser Gly Ser Val Asn Thr Ala Asn His Phe Asn Ala Trp Ala
145 150 155 160

Gln Gln Gly Leu Thr Leu Gly Thr Met Asp Tyr Gln Ile Val Ala Val
165 170 175

Glu Gly Tyr Phe Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ile Thr Val Ser
180 185 190

<210> 83

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S75A引物

<400> 83

agctacctcgccgtgtacgg

20

<210> 84

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> L105H引物

<400> 84

ccaccaagcacggcgaggt

19

<210> 85

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S125A引物

<400> 85

acgcagcgcggtcaacgccccgtccatcatcggc

33

[0047]

<210> 86
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> I129E引物

<400> 86

aacgccccgtccatcgagggcacgcacaccttt

33

<210> 87
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> K58R引物

<400> 87

ggcaccaagaaccgctaagactaccta

27

<210> 88
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> S99C引物

<400> 88

acctacaaccggtgcacgggcgccacc

27

<210> 89
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Y118C引物

[0048]

<400> 89

ctacgacatttgccgcacgc

20

<210> 90

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> N11D引物

<400> 90

ggttaccacgacggttact

19

<210> 91

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S40R引物

<400> 91

tccgtcaactggcgcaactcgggcaac

27

<210> 92

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> T131N引物

<400> 92

ccgtccatcgagggaacgccaccttttac

30

[0049]

<210> 93
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 蛋白A的分泌前导序列的2至28位氨基酸

<400> 93

Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr
1 5 10 15

Val Ala Gln Ala Gln Thr Ile Gln Pro Gly Thr
20 25

<210> 94
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TrX-HML的1至30位氨基酸

<400> 94

Gln Thr Ile Gln Pro Gly Thr Gly Tyr His Asn Gly Tyr Phe Tyr Ser
1 5 10 15

Tyr Trp Asn Asp Gly His Gly Gly Val Thr Met Thr Leu Gly
20 25 30

<210> 95
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TX-10H-1的6至18位氨基酸

<400> 95

Gly Thr Gly Tyr His Asn Gly Tyr Phe Tyr Ser Tyr Trp
1 5 10

<210> 96

[0050]

<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 互补序列TX-10H11D-1的6至18位氨基酸

<400> 96

Gly Thr Gly Tyr His Asp Gly Tyr Phe Tyr Ser Tyr Trp
1 5 10

<210> 97
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TX-C1的183至190位氨基酸

<400> 97

Gly Ser Ala Ser Ile Thr Val Ser
1 5

<210> 98
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TX-58R-1的53至61位氨基酸

<400> 98

Pro Gly Thr Lys Asn Arg Val Ile Asn
1 5

<210> 99
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TX-40H-1的39至48位氨基酸

<400> 99

Trp His Asn Ser Gly Asn Phe Val Gly Gly

[0051]

1	5	10
---	---	----

<210> 100

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> TX-40R-1的39至48位氨基酸

<400> 100

Trp	Arg	Asn	Ser	Gly	Asn	Phe	Val	Gly	Gly
1				5				10	

<210> 101

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> TX-99C-1的95至101位氨基酸

<400> 101

Thr	Tyr	Asn	Pro	Cys	Thr	Gly
1				5		

<210> 102

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> TX-75A-1的69至81位氨基酸

<400> 102

Asn	Gly	Asn	Ser	Tyr	Leu	Ala	Val	Tyr	Gly	Trp	Ser	Arg
1				5					10			

<210> 103

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> TX-118C-1的111至122位氨基酸

[0052]

<400> 103

Asp Gly Ser Val Tyr Asp Ile Cys Arg Thr Gln Arg
1 5 10

<210> 104

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> TX-99C-105H-1r的114至96位氨基酸

<400> 104

Val Ser Gly Asp Ser Thr Val Glu Gly His Lys Thr Ala Gly Thr Cys
1 5 10 15

Pro Asn Tyr

<210> 105

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> TX-40C-1的39至48位氨基酸

<400> 105

Trp Cys Asn Ser Gly Asn Phe Val Gly Gly
1 5 10

<210> 106

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> TX-40Y-1的39至48位氨基酸

<400> 106

Trp Tyr Asn Ser Gly Asn Phe Val Gly Gly
1 5 10

[0053]

<210> 107
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TX-40F-1的39至48位氨基酸

<400> 107

Trp	Phe	Asn	Ser	Gly	Asn	Phe	Val	Gly	Gly
1				5				10	

<210> 108
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TX-40T-1的39至48位氨基酸

<400> 108

Trp	Thr	Asn	Ser	Gly	Asn	Phe	Val	Gly	Gly
1				5				10	

<210> 109
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TX-40A-1的39至48位氨基酸

<400> 109

Trp	Ala	Asn	Ser	Gly	Asn	Phe	Val	Gly	Gly
1				5				10	

<210> 110
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TX-52C-1r的54至44位氨基酸

<400> 110

[0054]

Gly	Pro	Cys	Trp	Gly	Lys	Gly	Gly	Val	Phe	Asn
1				5					10	

Ca	1				S	AFNTQAAP	9
Cs	1					G	1
Tr2#		10	20	30	40		
Bp	1	RTITNNEMGN	HSGYDYELWK	DYGNT-SMTL	NNGGAFSAGW	N--NIGNA	45
Ca	10	KTITSNEIGV	NGGYDYELWK	DYGNT-SMTL	KNNGAFSCQW	S--NIGNA	54
Fs	1	NSSVTGNVG	SSPYHYEIWY	QGG-NNSMTF	YDNGTYKASW	N--GTNDF	44
Cs	2	RIIYDNETGT	HGGYDYELWK	DYGNT-IMEL	NDGGTFSCQW	S--NIGNA	46
Rf	1	SAADQQTRGN	VGGYDYEMWN	QNGQGQASMN	PGAGSFTCSW	S--NIENF	46
Tr2	1	QTIQPGTGY	NGGYFYSYWN	DGHGGVITYN	GPGGQFSVNW	S--NSGNF	45
Tv	1	QTIGPGTGF	NGGYFYSYWN	DGHGGVITYN	GPGGQFSVNW	S--NSGNF	45
Th	1	QTIGPGTGY	SNGYYYSYWN	DGHAGVITYN	GGGGSFTVNW	S--NSGNF	45
Sc	1	SGTPSSTGT	DGGYYYSWWT	DGAGDATYQN	NGGGSYTLTW	SG--NNGNL	46
An	1		S AGINYVQNYN	GNLGDFTY-D	ESAGTFSMYW	EDGVSSDF	38
Ak	1		S AGINYVQNYN	GNLADFTY-D	ESAGTFSMYW	EDGVSSDF	38
At	1		S AGINYVQNYN	GNLGDFTY-D	ESAGTFSMYW	EDGVSSDF	38
Tr1	1		ASINYDQNYQ	TGG-QVSY-	PSNTGFSVNW	N--TQDDF	34
Aa	1	RSTPSSTGE	NNGYYYSEWT	DGGGDVITYN	GNAGSYSVEW	S--NVGNF	45
Ss	1	ATTIT-NETGY	D-GMYYSEWT	DGGGSVSMTL	NGGGSYSTRW	T--NCGNF	45
SlB	1	DTVVTNQEGT	NNGYYYSEWT	DSQGTVMNM	GSGGQYSTSW	R--NTGNF	47
SlC	1	ATTITTNETGT	D-GMYYSEWT	DGGGSVSMTL	NGGGSYSTOW	T--NCGNF	46
Tl	1	QTTPNSEGW	HDGYYYSWWS	DGGAQATYTN	LEGGTYEISW	G--DGGNL	45
Tf	1	AVTSNETGY	HDGYFYSEWT	DAPGTVMEL	GPGGNYSTSW	R--NTGNF	45
Bc	1		ASTDYWQNW	DGGGIVNAVN	GSGGNYSVNW	S--NTGNF	36
Bs	1		ASTDYWQNW	DGGGIVNAVN	GSGGNYSVNW	S--NTGNF	36

图 1

Tr2#		50		60		70		80	
							*		
Bp	46	LFRK-GKKFD	ST-RTHHQLG	NISINYNASF	N-PGGNSYLC	VYGWTQSP		90	
Ca	55	LFRK-GKKFN	DT-QTYKQLG	NISVNYNCNY	Q-PYGNSYLC	VYGWTSSP		99	
Fs	45	LARV-GFKYD	EK-HTYEELGP	IDAYYKWSKQ	GSAGGYNYIG	IYGVTVDP		91	
Cs	47	LFRK-GRKFN	SD-KTYQELG	DIVVEYGC DY	N-PNGNSYLC	VYGVTRNP		91	
Rf	47	LARM-GKNYD	SQKKNYKAFG	NIVLTYDVEY	T-PRGNSYMC	VYGVTRNP		92	
Tr2	46	VGGK-GWQPG	TKNKV-----	---INFS-GS	YNPNNGNSYLS	VYGVSRNP		83	
Tv	46	VGGK-GWQPG	TKNKV-----	---INFS-GT	YNPNNGNSYLS	VYGVSRNP		83	
Th	46	VGGK-GWQPG	TKNKV-----	---INFS-GS	YNPNNGNSYLS	IYGVSRNP		83	
Sc	47	VGGK-GWNPG	AASRS-----	---ISYS-GT	YQPNNGNSYLS	VYGVTRSS		84	
An	39	VVGL-GWTTG	SSNA-----	---ITYSAEY	SASGSSSYLA	VYGVVNYP		76	
Ak	39	VVGL-GWTTG	SSNA-----	---ITYSAEY	SASGSSSYLA	VYGVVNYP		76	
At	39	VVGL-GWTTG	SSNA-----	---ITYSAEY	SASGSASYLA	VYGVVNYP		76	
Tr1	35	VVGW-GWTTG	SSAP-----	---INFGGSF	SVNSGTGLLS	VYGVSTNP		72	
Aa	46	VGGK-GWNPG	SAKD-----	---ITYSGNF	T-PSGNGYLS	VYGVTTDP		82	
Ss	46	VAGK-GWANG	GR-RT-----	---VRYT-GW	FNPSGNGYGC	IYGVTSNP		82	
SlB	48	VAGK-GWANG	GR-RT-----	---VQYS-GS	FNPSGNAYLA	IYGVTSNP		84	
SlC	47	VAGK-GWSTG	DGN-----	---VRYN-GY	FNVPVNGYGC	IYGVTSNP		82	
Tl	46	VGGK-GWNPG	LNARA-----	---IHFE-GV	YQPNNGNSYLA	VYGVTRNP		83	
Tf	46	VAGK-GWATG	GR-RT-----	---VTYS-AS	FNPSGNAYLT	IYGVTRNP		82	
Bc	37	VVGK-GWTTG	SPFRT-----	---INYNAGV	WAPNGNGYLT	IYGVTRSP		75	
Bs	37	VVGK-GWTTG	SPFRT-----	---INYNAGV	WAPNGNGYLT	IYGVTRSP		75	
Tr2#		90		100		110		120	
							*		
Bp	91	LAEEYIVDSW	GTYR-PT--G	AYKGSFYADG	GTYDIYETTR	VNQPSIIG		135	
Ca	100	LVEEYIVDSW	GSWRPP--GG	TSKGTITVDG	GIYDIYETTR	INQPSIQG		145	
Fs	92	LVEEYIVDDW	FNKPGANLLG	QRKGEFTVDG	DTYEIWQNTTR	VQQPSIKG		139	
Cs	92	LVEEYIVESW	GSWRPP--GA	TPKGTITQWMAGT	YEIYETTR	VNQPSIDG		138	
Rf	93	LMEYIIVEGW	GDWRPPGNDG	EVKGTVSANG	NTYDIRKTMR	YNQPSLDG		140	
Tr2	84	LIEYIIVENF	GTYN-PSTGA	TKLGEVTS DG	SVYDIYRTOR	VNQPSIIG		130	
Tv	84	LIEYIIVENF	GTYN-PSTGA	TKLGEVTS DG	SVYDIYRTOR	VNQPSIIG		130	
Th	84	LIEYIIVENF	GTYN-PSTGA	TKLGEVTS DG	SVYDIYRTOR	VNQPSIIG		130	
Sc	85	LIEYIIVESY	GSYD-PSSAA	SHKGSVTCNG	ATYDILSTWR	YNAPSIDG		131	
An	77	GAEEYIVEDY	GDYN-PCSSA	TSLGTVYSDG	STYQVCTDTR	INEPSITG		123	
Ak	77	QAEEYIVEDY	GDYN-PCSSA	TSLGTVYSDG	STYQVCTDTR	TNEPSITG		123	
At	77	QAEEYIVEDY	GDYN-PCSSA	TSLGTVYSDG	STYQVCTDTR	TNEPSITG		123	
Tr1	73	LVEEYIMEDN	HNY--PAQ-G	TVKGTVTS DG	ATYTIWENTR	VNEPSIQG		117	
Aa	83	LIEYIIVESY	GDYN-PGSGG	TTRGNVSSDG	SVYDIYTATR	TNAPSIIQ		129	
Ss	83	LVEEYIVDNW	GSYR-PT--G	ETRGTVHSDG	GTYDIYKTTR	YNAPSVEA		127	
SlB	85	LVEEYIVDNW	GTYR-PT--G	EYKGTVTS DG	GTYDIYKTTR	VNKPSVEG		129	
SlC	83	LVEEYIVDNW	GSYR-PT--G	TYKGTVSSDG	GTYDIYQTTR	YNAPSVEG		127	
Tl	84	LVEYIIVENF	GTYD-PSSGA	TDLGTVECDG	SIYRLGKTTR	VNAPSIDG		130	
Tf	83	LVEYIIVESW	GTYR-PT--G	TYMGTVTTDG	GTYDIYKTTR	YNAPSIEG		127	
Bc	76	LIEYIVVDSW	GTYR-PT--G	TYKGTVKSDG	GTYDIYTTTR	YNAPSIDG		120	
Bs	76	LIEYIVVDSW	GTYR-PT--G	TYKGTVKSDG	GTYDIYTTTR	YNAPSIDG		120	

图 1 续

Tr2#		140		150		160	
Bp	136	-IAT <u>TFKQYWS</u>	<u>VRQTKRTS</u> --	----- <u>GT</u> VS	VSA <u>HFRKWES</u>	<u>LG</u> M <u>PM</u> -GK	173
Ca	146	-NT <u>TFKQYWS</u>	<u>VRRTKRTS</u> --	----- <u>GT</u> IS	VSK <u>HFAAWES</u>	<u>KG</u> M <u>PL</u> -GK	183
Fs	140	-TQ <u>TFPOYFS</u>	<u>VRKSARSC</u> --	----- <u>GH</u> ID	ITA <u>HMKKWE</u> E	<u>LG</u> M <u>KM</u> -GK	177
Cs	139	-TAT <u>TFQYWS</u>	<u>VRTSKRTS</u> --	----- <u>GT</u> IS	VTE <u>HFKQWER</u>	<u>MG</u> M <u>RM</u> -GK	176
Rf	141	-TAT <u>TFQYWS</u>	<u>VRQTS</u> GSANN	QTN <u>YMKGT</u> ID	VT <u>KHFD</u> AWSA	<u>AG</u> L <u>DMS</u> GT	187
Tr2	131	-TAT <u>TFYQYWS</u>	<u>VRRNHR</u> -S-S	----- <u>GS</u> VN	TAN <u>HFN</u> AWAQ	<u>QGL</u> T <u>L</u> -GT	168
Tv	131	-TST <u>TFYQYWS</u>	<u>VRRTHR</u> -S-S	----- <u>GS</u> VN	TAN <u>HFN</u> AWAQ	<u>QGL</u> T <u>L</u> -GT	168
Th	131	-TAT <u>TFYQYWS</u>	<u>VRRNHR</u> -S-S	----- <u>GS</u> VN	TAN <u>HFN</u> AWAS	<u>HGL</u> T <u>L</u> -GT	168
Sc	132	-TQ <u>TFEQFWS</u>	<u>VRNPKKAPGG</u>	SIS-- <u>GT</u> VD	VQ <u>CHFD</u> AWKG	<u>LG</u> M <u>NLG</u> SE	175
An	124	-TST <u>TFQYFS</u>	<u>VRESTRTS</u> --	----- <u>GT</u> VT	VAN <u>HFNFW</u> AWAQ	<u>HGF</u> GN-SD	161
Ak	124	-TST <u>TFQYFS</u>	<u>VRESTRTS</u> --	----- <u>GT</u> VT	VAN <u>HFNFW</u> AWAQ	<u>HGF</u> GN-SD	161
At	124	-TST <u>TFQYFS</u>	<u>VRESTRTS</u> --	----- <u>GT</u> VT	VAN <u>HFNFW</u> AH	<u>HGF</u> GN-SD	161
Tr1	118	-TAT <u>FNQYIS</u>	<u>VRNSPR</u> -T-S	----- <u>GT</u> VT	VQ <u>NHFN</u> AWAS	<u>LGL</u> H <u>L</u> GQM	156
Aa	130	-TAT <u>FSQYWS</u>	<u>VRQNK</u> R-VG-	----- <u>GT</u> VT	TSN <u>HFN</u> AWAK	<u>LG</u> M <u>NL</u> -GT	167
Ss	128	-PAA <u>FDQYWS</u>	<u>VRQSKVT</u> --S	----- <u>GT</u> IT	TGN <u>HFD</u> AWAR	<u>AG</u> M <u>NMG</u> NF	166
SlB	130	TR- <u>TFDQYWS</u>	<u>VRQSKR</u> -TG-	----- <u>GT</u> IT	TGN <u>HFD</u> AWAR	<u>AG</u> M <u>PLG</u> NF	168
SlC	128	TK- <u>TFQYWS</u>	<u>VRQSKVTSGS</u>	----- <u>GT</u> IT	TGN <u>HFD</u> AWAR	<u>AG</u> M <u>NMG</u> QF	168
Tl	131	TQ- <u>TFDQYWS</u>	<u>VRQDKR</u> -T-S	----- <u>GT</u> VQ	TG <u>CHFD</u> AWAR	<u>AG</u> L <u>NVNG</u> D	169
Tf	128	TR- <u>TFDQYWS</u>	<u>VRQSKRTS</u> --	----- <u>GT</u> IT	AGN <u>HFD</u> AWAR	<u>HGM</u> H <u>L</u> GTH	166
Bc	121	DRT <u>TFQYWS</u>	<u>VRQSKRPTGS</u>	N----- <u>AT</u> IT	FTN <u>HVN</u> AWKS	<u>HGM</u> N <u>L</u> GSN	163
Bs	121	DRT <u>TFQYWS</u>	<u>VRQSKRPTGS</u>	N----- <u>AT</u> IT	FSN <u>HVN</u> AWKS	<u>HGM</u> N <u>L</u> GSN	163

Tr2#		170		180		190	
Bp	174	MYETAFTV <u>EG</u>	<u>YQSSGS</u> ANVM	TNQLFI <u>GN</u>		201	
Ca	184	MHETAFNI <u>EG</u>	<u>YQSSG</u> KADV <u>N</u>	SMSINIGK		211	
Fs	178	MYEAKVLV <u>EA</u>	GGG <u>SGS</u> FDV-	TYFKMT		202	
Cs	177	MYEVALTV <u>EG</u>	<u>YQSSG</u> YANVY	KNEIRIGANP		206	
Rf	188	LYEVSLNI <u>EG</u>	<u>YRSNG</u> SANVK	SVSV		211	
Tr2	169	MDYQIVAV <u>EG</u>	<u>YFSSGS</u> ASI-	TVS		190	
Tv	169	MDYQIVAV <u>EG</u>	<u>YFSSGS</u> ASI-	TVS		190	
Th	169	MDYQIVAV <u>EG</u>	<u>YFSSGS</u> ASI-	TVS		190	
Sc	176	HNYQIVAT <u>EG</u>	<u>YQSSG</u> TATI-	TVT		197	
An	162	FNYQVMVA <u>EA</u>	WSGAG <u>SASV</u> -	TISS		184	
Ak	162	FNYQVMVA <u>EA</u>	WSGAG <u>SASV</u> -	TISS		184	
At	162	FNYQVVVA <u>EA</u>	WSGAG <u>SASV</u> -	TISS		184	
Tr1	157	-NYQVVAV <u>EG</u>	WGG <u>SGS</u> ASQ-	SVSN		178	
Aa	168	HNYQILAT <u>EG</u>	<u>YQSSG</u> SSSI-	TIQ		189	
Ss	167	RYYMINAT <u>EG</u>	<u>YQSSG</u> SSSTI-	TVSG		189	
SlB	169	SYYMIMATE <u>EG</u>	<u>YQSSG</u> SSSI-	NVGG		191	
SlC	169	RYYMIMATE <u>EG</u>	<u>YQSSG</u> SSNI-	TVSG		191	
Tl	170	HYYQIVAT <u>EG</u>	<u>YFSSG</u> YARI-	TVADV <u>G</u>		194	
Tf	167	D-YMIMATE <u>EG</u>	<u>YQSSG</u> SSNV <u>T</u>	LGTS		189	
Bc	164	WAYQVMAT <u>EG</u>	<u>YQSSG</u> SSNV-	TVW		185	
Bs	164	WAYQVMAT <u>EG</u>	<u>YQSSG</u> SSNV-	TVW		185	

图 1 续

Bp	短小芽孢杆菌	(SEQ ID NO: 4)
Ca	丙酮丁醇梭菌 P262 Xyn B	(SEQ ID NO: 6)
Cs	粪堆梭菌 Xyn A	(SEQ ID NO: 7)
Rf	生黄瘤胃球菌	(SEQ ID NO: 8)
Tr2	里氏木霉 Xyn II	(SEQ ID NO: 16)
Tv	绿色木霉	(SEQ ID NO: 17)
Th	哈茨木霉	(SEQ ID NO: 14)
Sc	裂褶菌 Xyn A	(SEQ ID NO: 9)
An	黑曲霉 awamori 变种	(SEQ ID NO: 1)
Ak	白曲霉 Xyn C	(SEQ ID NO: 21)
At	塔宾曲霉	(SEQ ID NO: 2)
Tr1	里氏木霉 Xyn I	(SEQ ID NO: 15)
Aa	泡盛曲霉 kawachi 变种 Xyn B	(SEQ ID NO: 19)
Fs	产琥珀酸丝状杆霉 Xyn II	(SEQ ID NO: 18)
Ss	链霉菌 36a	(SEQ ID NO: 12)
SIB	浅青紫链霉菌 Xyn B	(SEQ ID NO: 10)
SIC	浅青紫链霉菌 Xyn C	(SEQ ID NO: 11)
TI	嗜热真菌 Xyn	(SEQ ID NO: 20)
Tf	褐色高温单孢菌 TfxA	(SEQ ID NO: 13)
Bc	环状芽孢杆菌	(SEQ ID NO: 3)
Bs	枯草芽孢杆菌	(SEQ ID NO: 5)

图 1 续

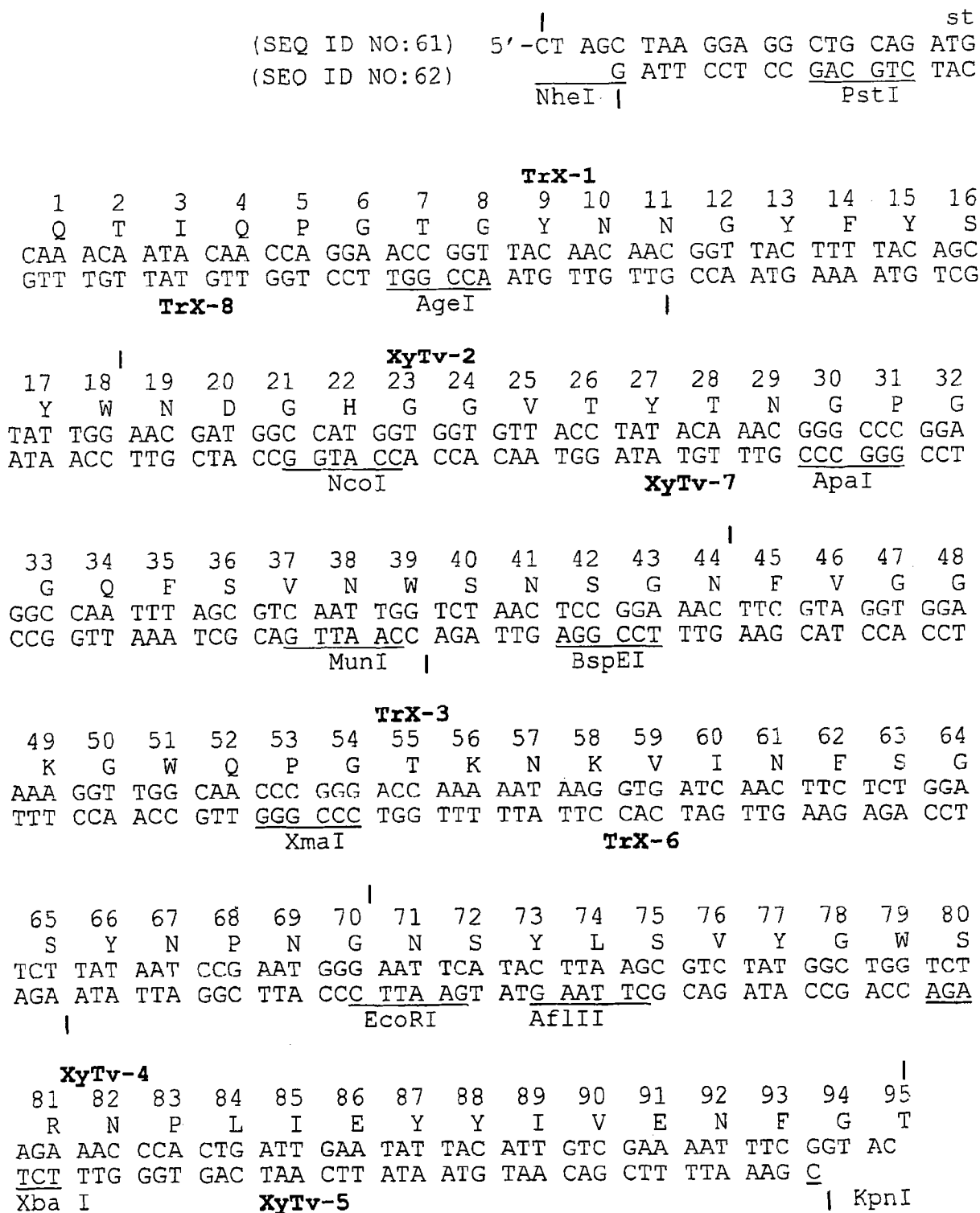


图 2

图 2 续

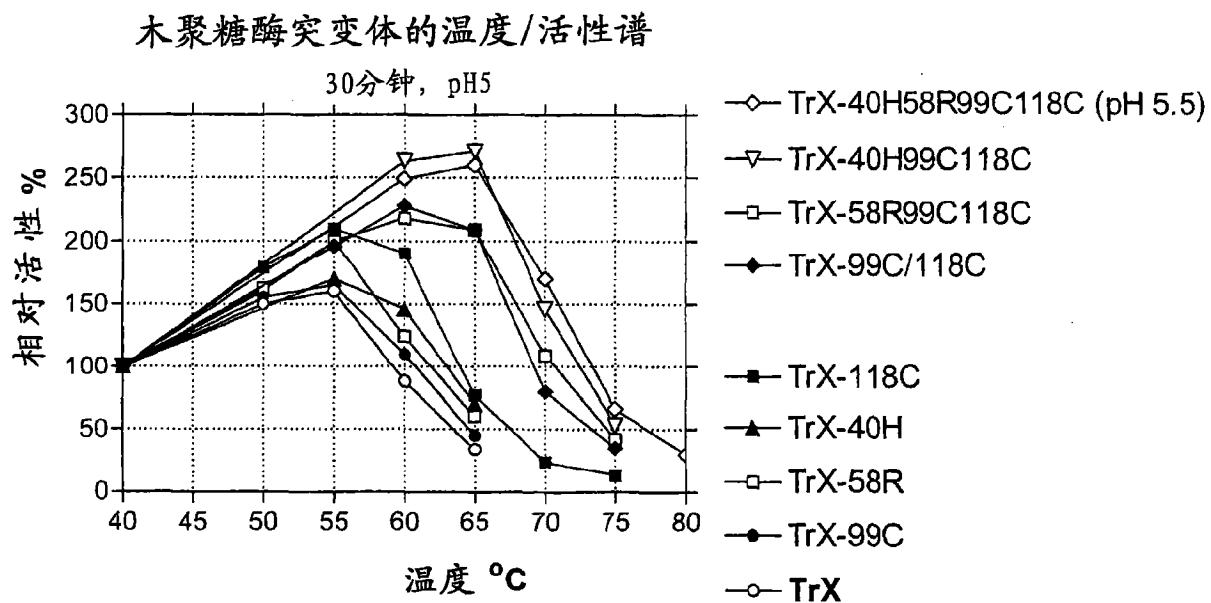


图 3

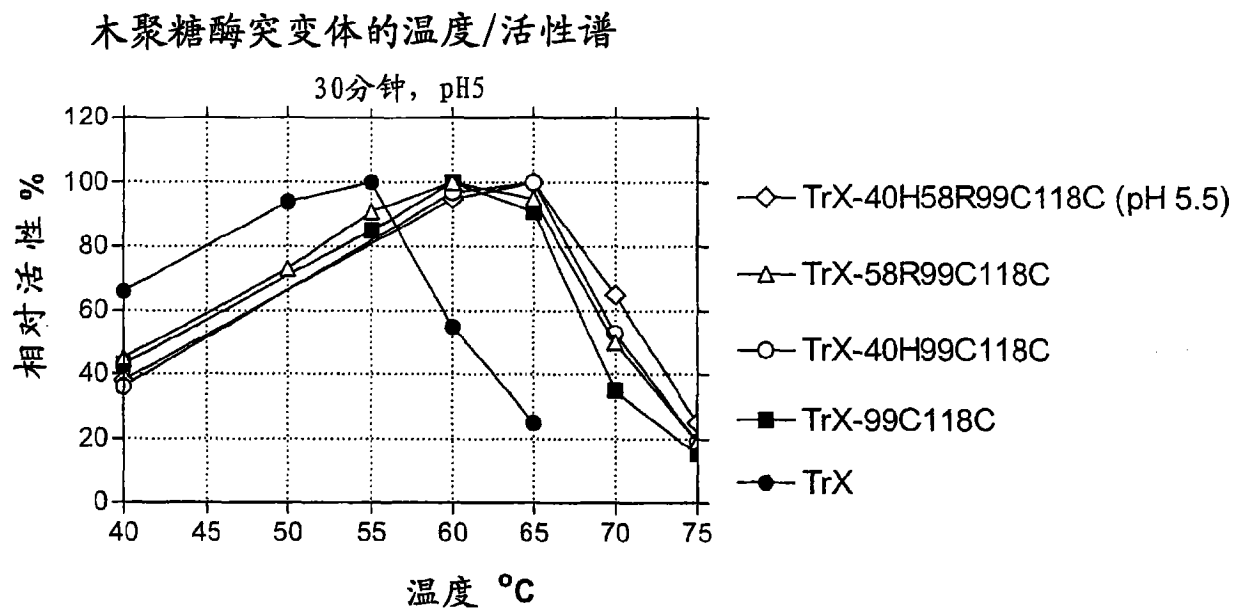


图 4

木聚糖酶突变体的温度/活性谱

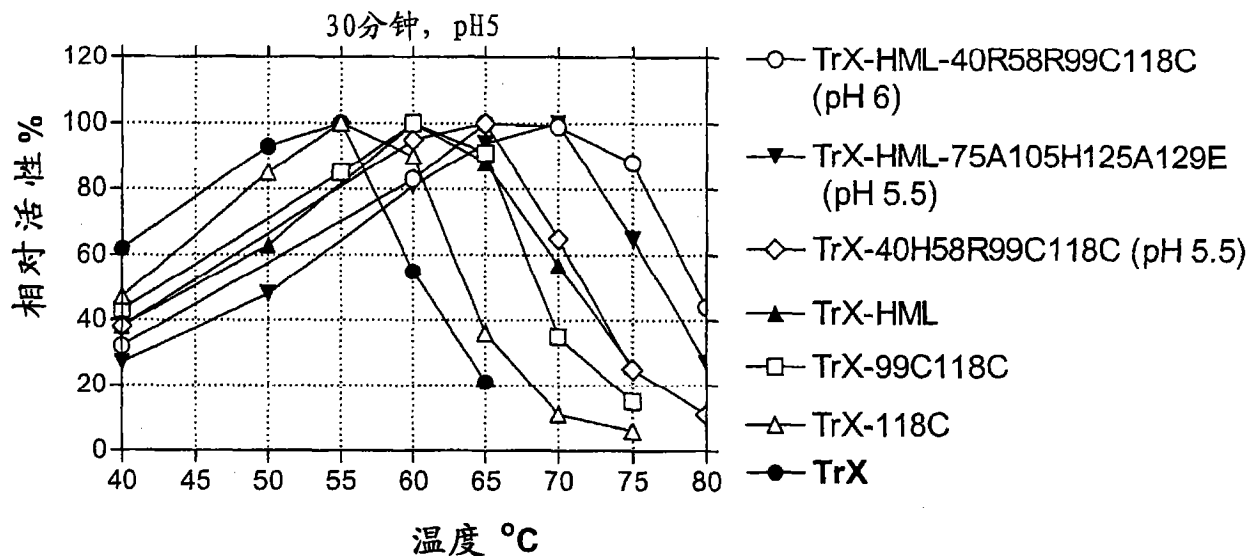


图 5

木聚糖酶突变体的温度/活性谱

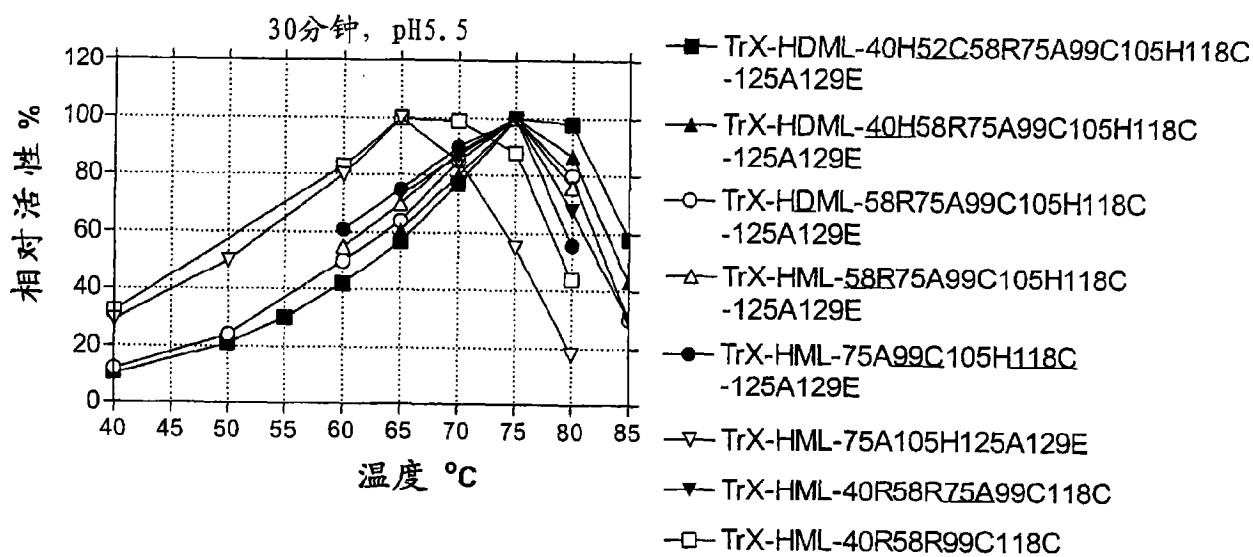


图 6

具有不同突变-40的木聚糖酶突变体的 温度/活性谱

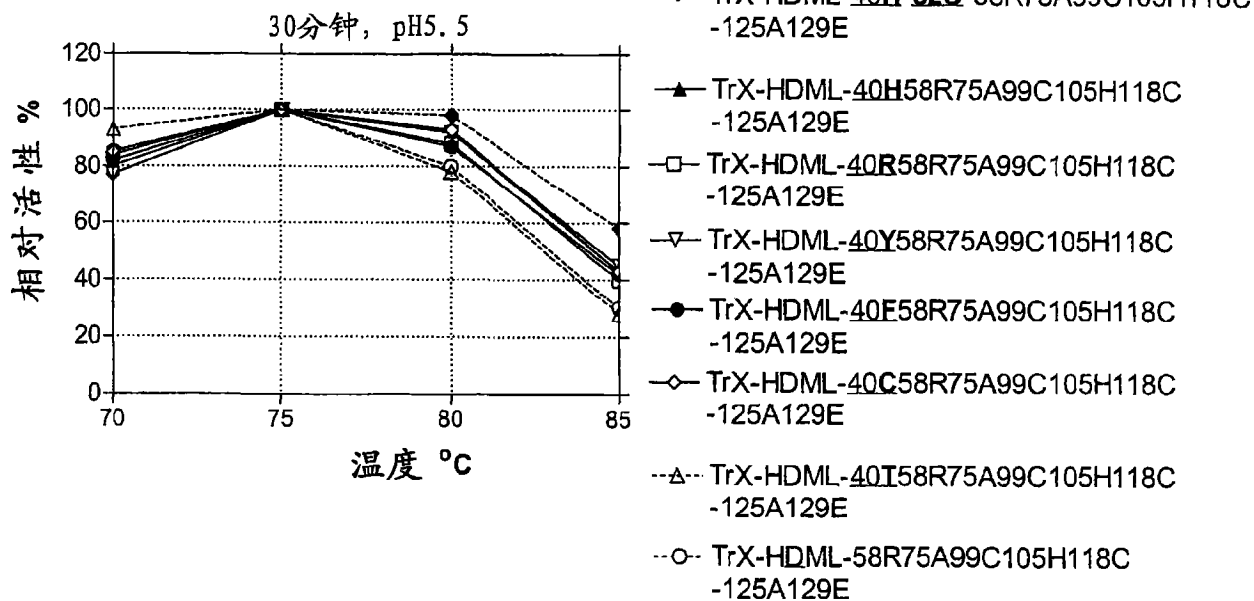


图 7

木聚糖酶突变体的温度/活性谱

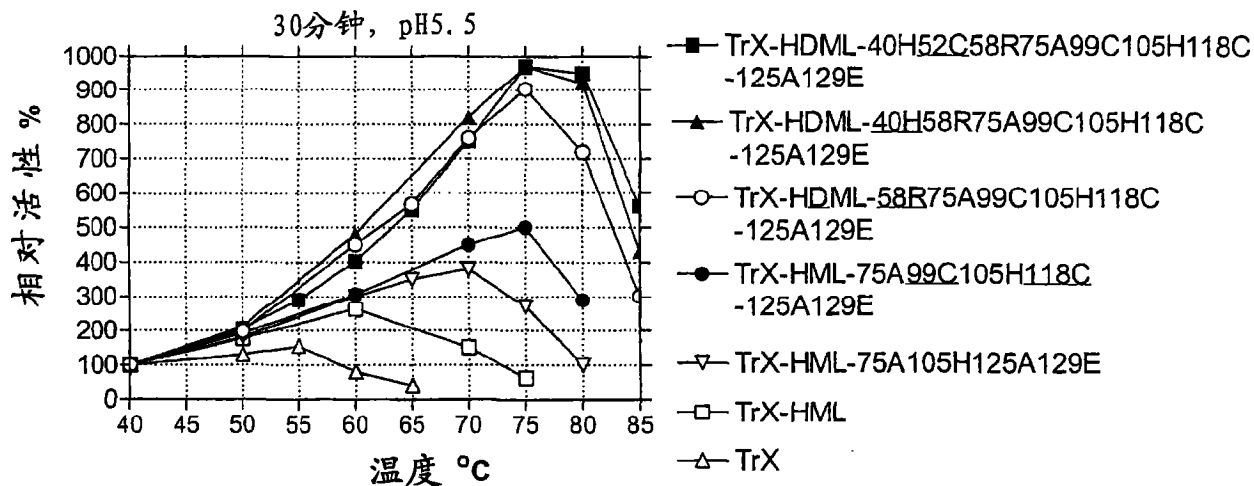


图 8

木聚糖酶突变体的温度/活性谱

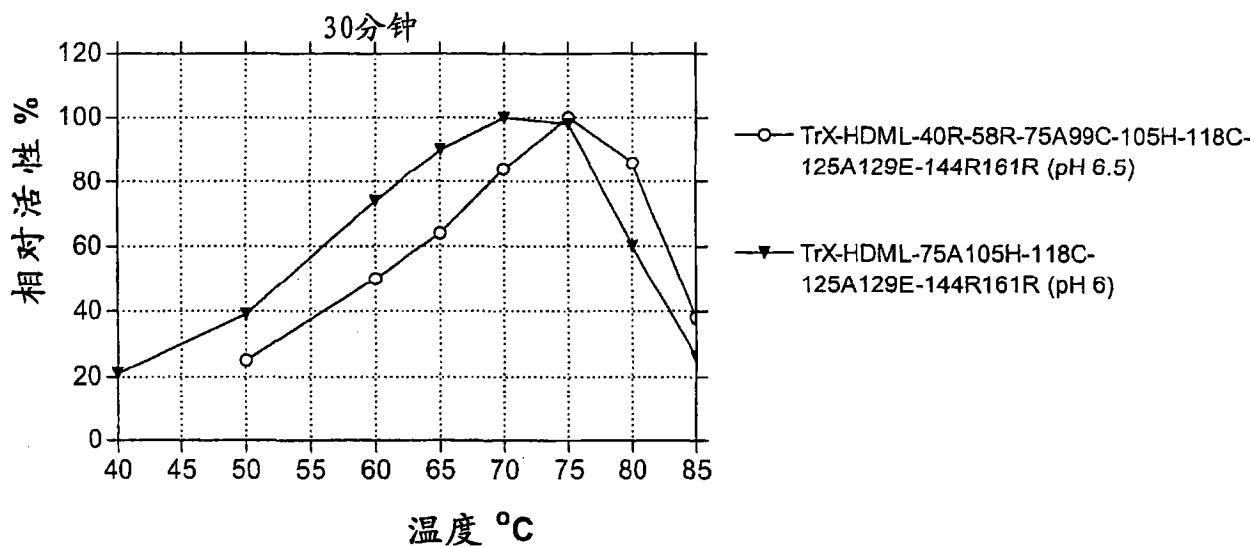


图 9

木聚糖酶TrX-99C118C的pH/活性谱

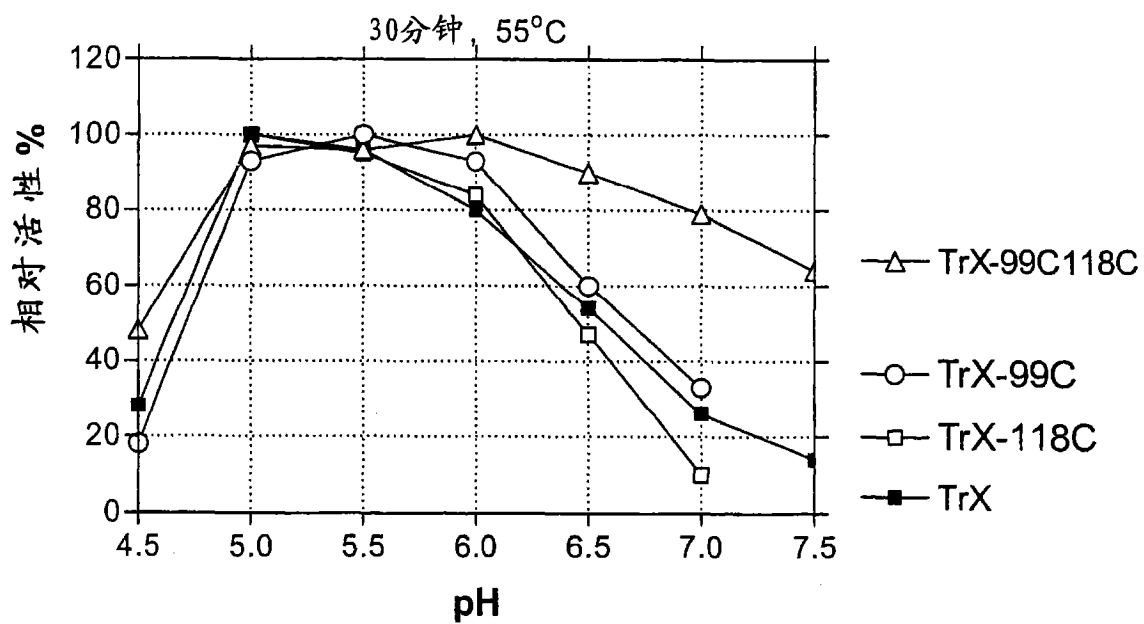


图 10

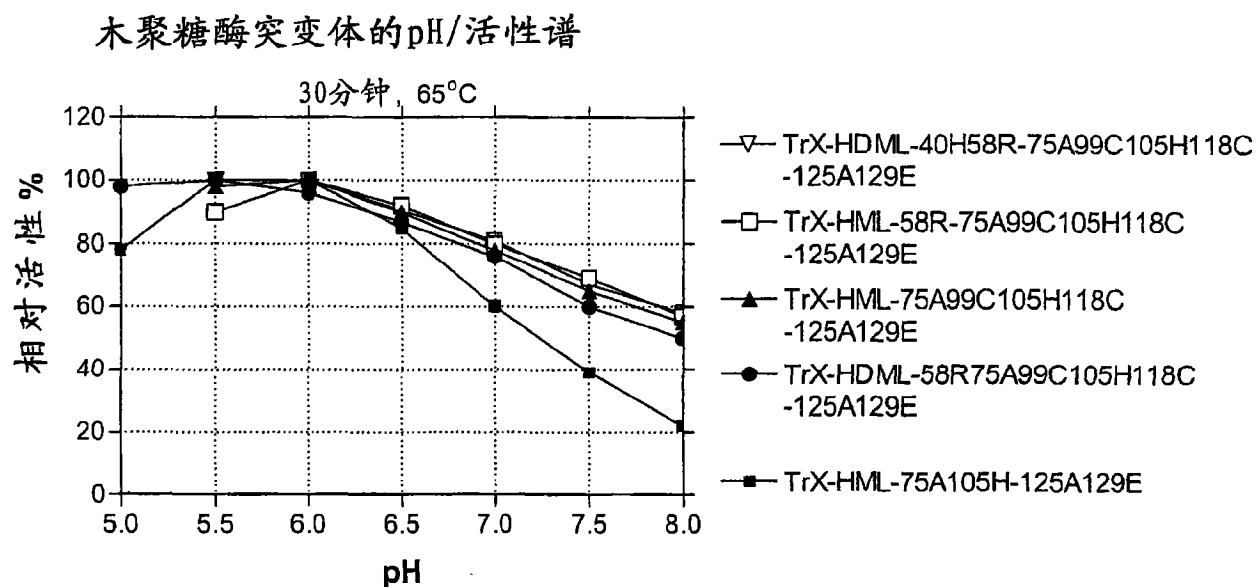


图 11

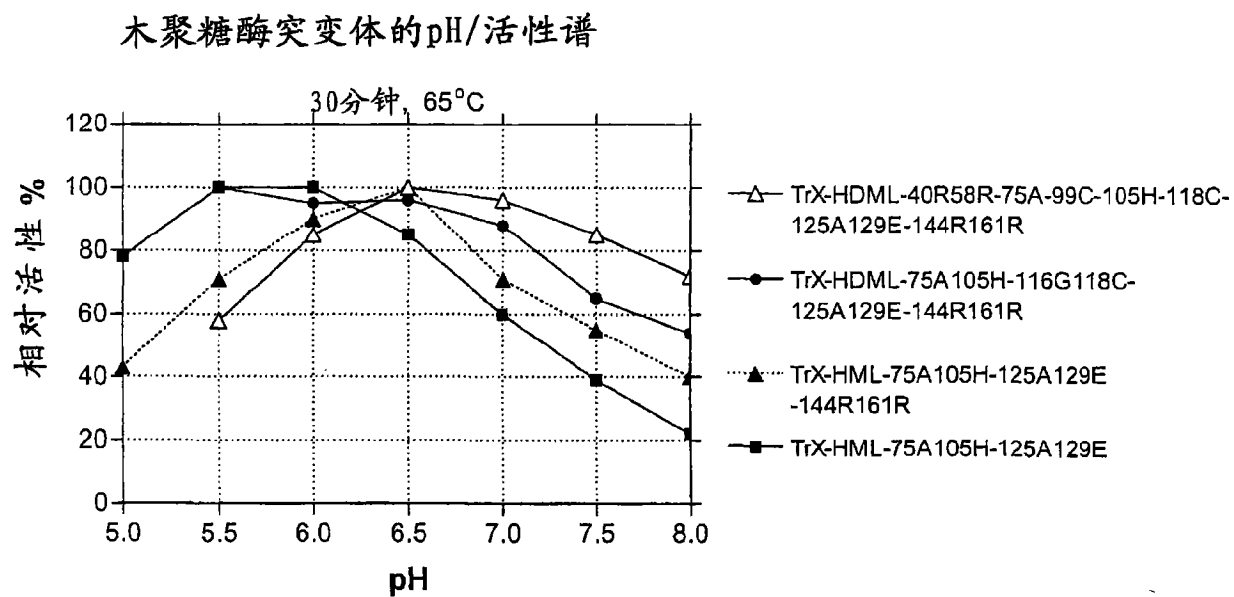


图 12

预孵育温度对木聚糖酶突变体稳定性的作用

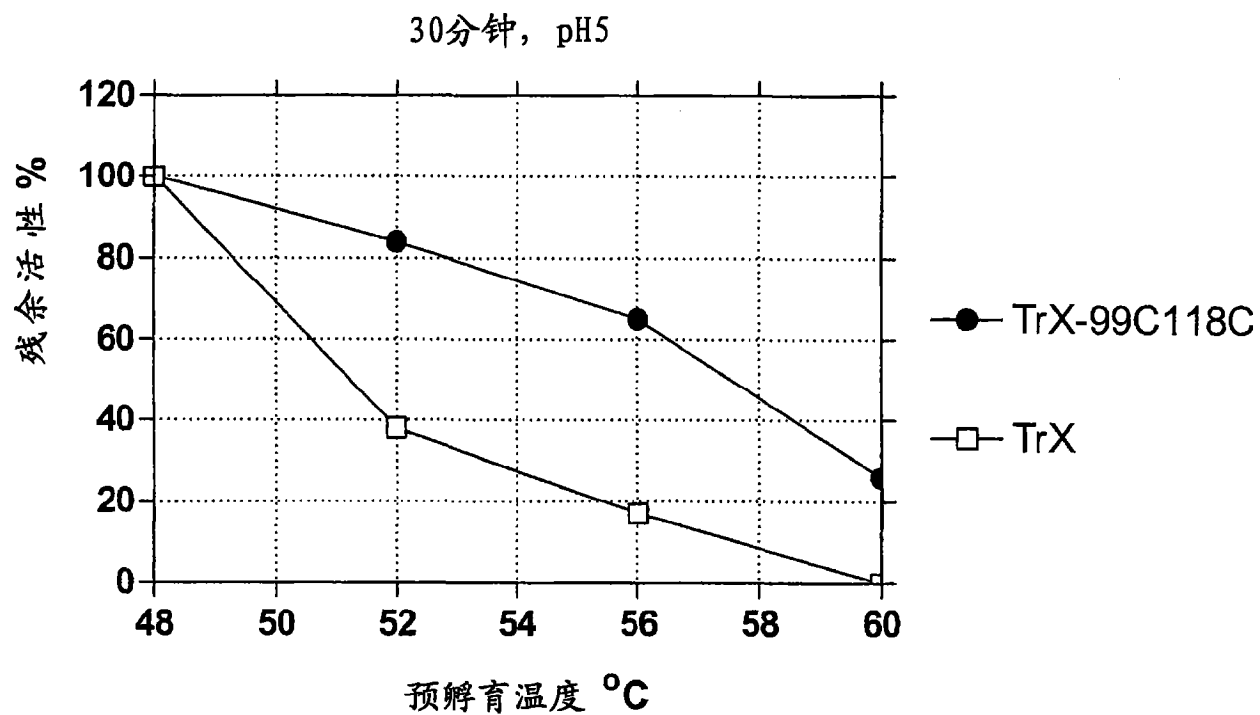


图 13

木聚糖酶突变体的温度/活性谱
(pH7, 60分钟)

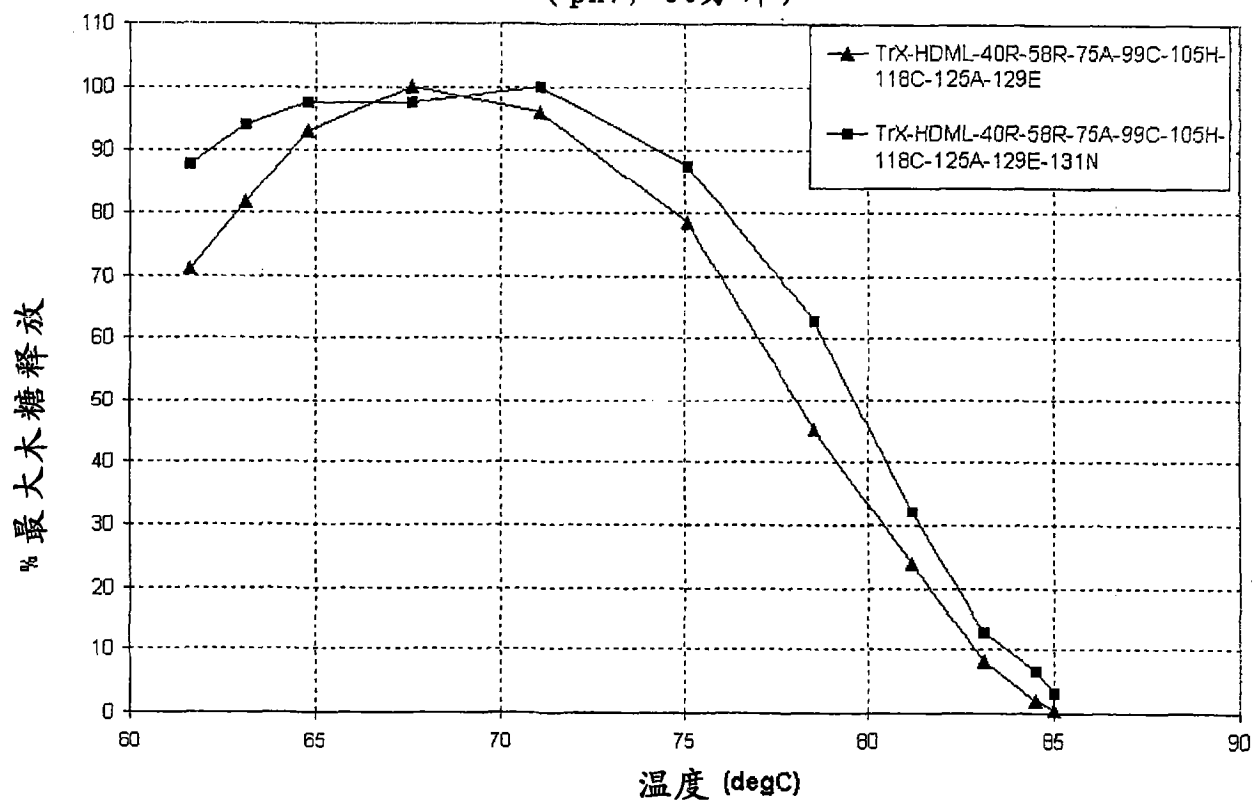


图 14

木聚糖酶在硬木木浆上的pH/活性谱

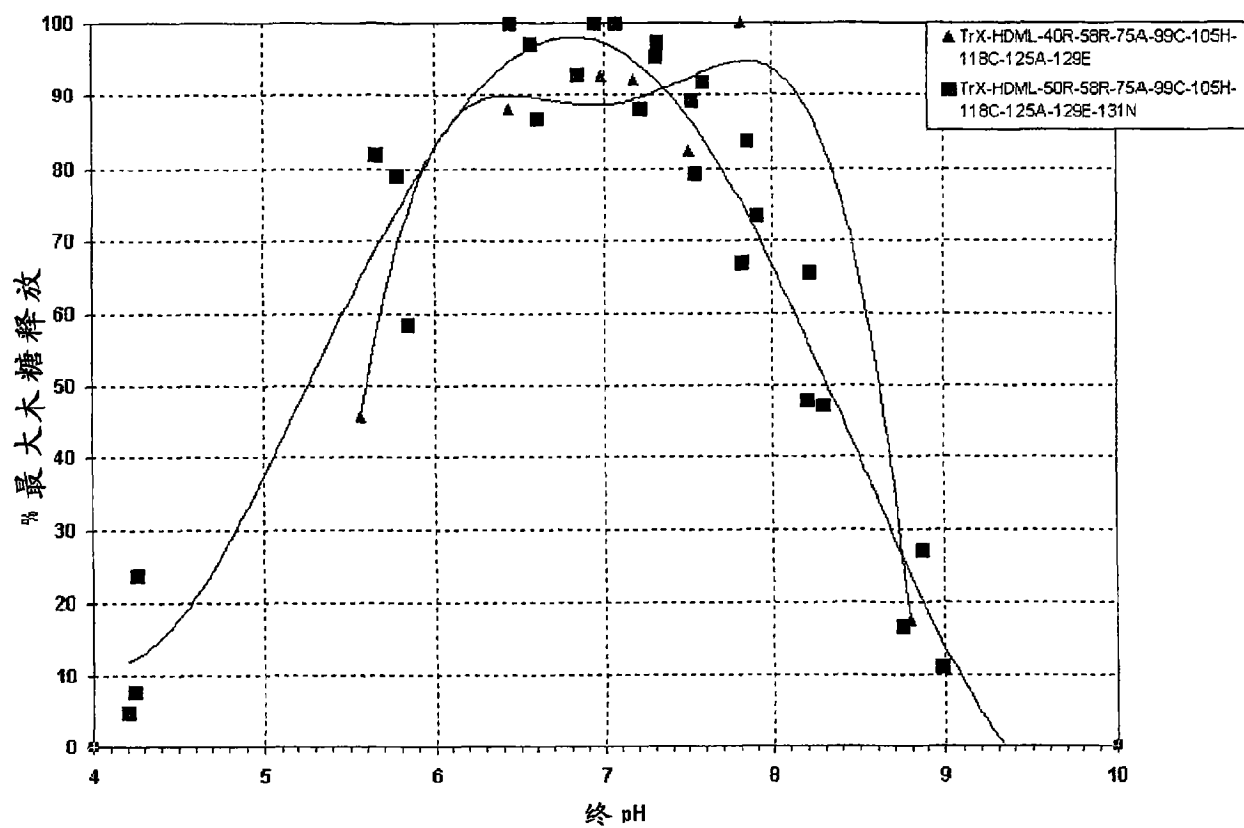


图 15

木聚糖酶在软木木浆上的pH/活性谱

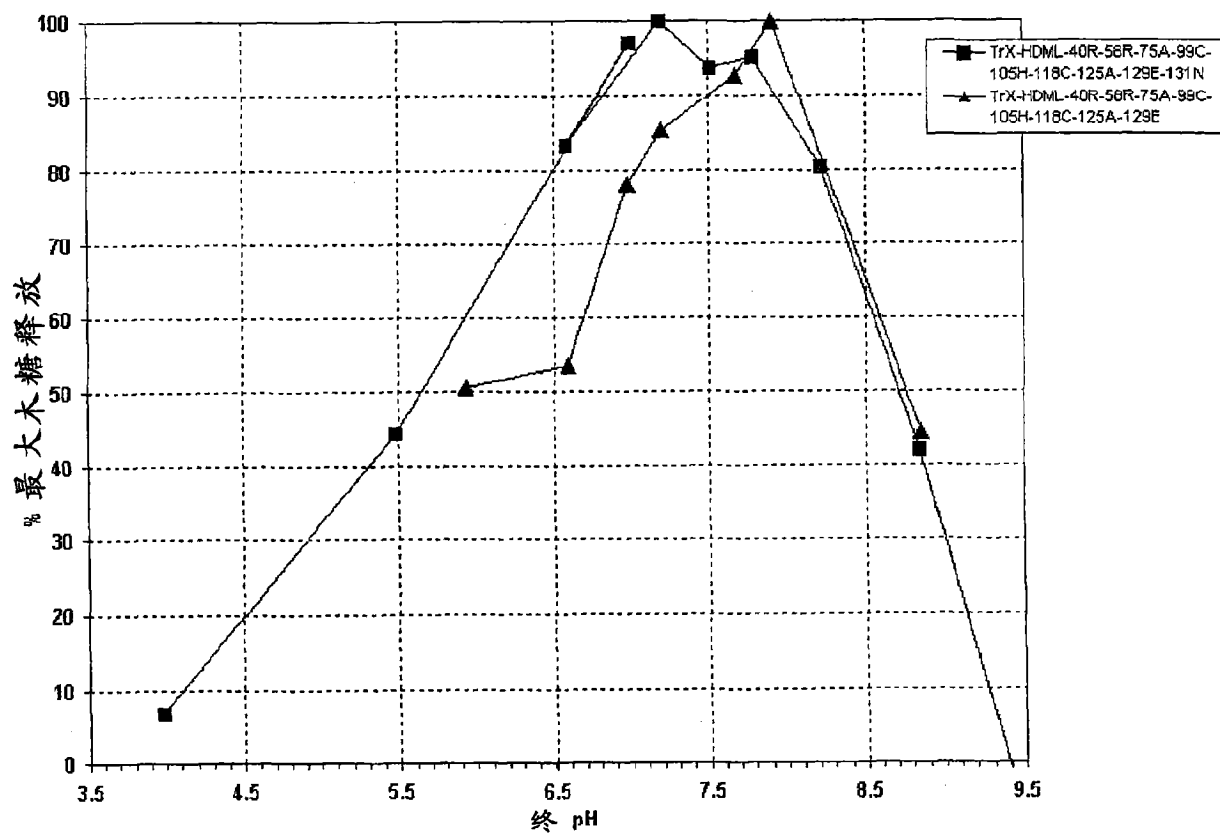


图 16

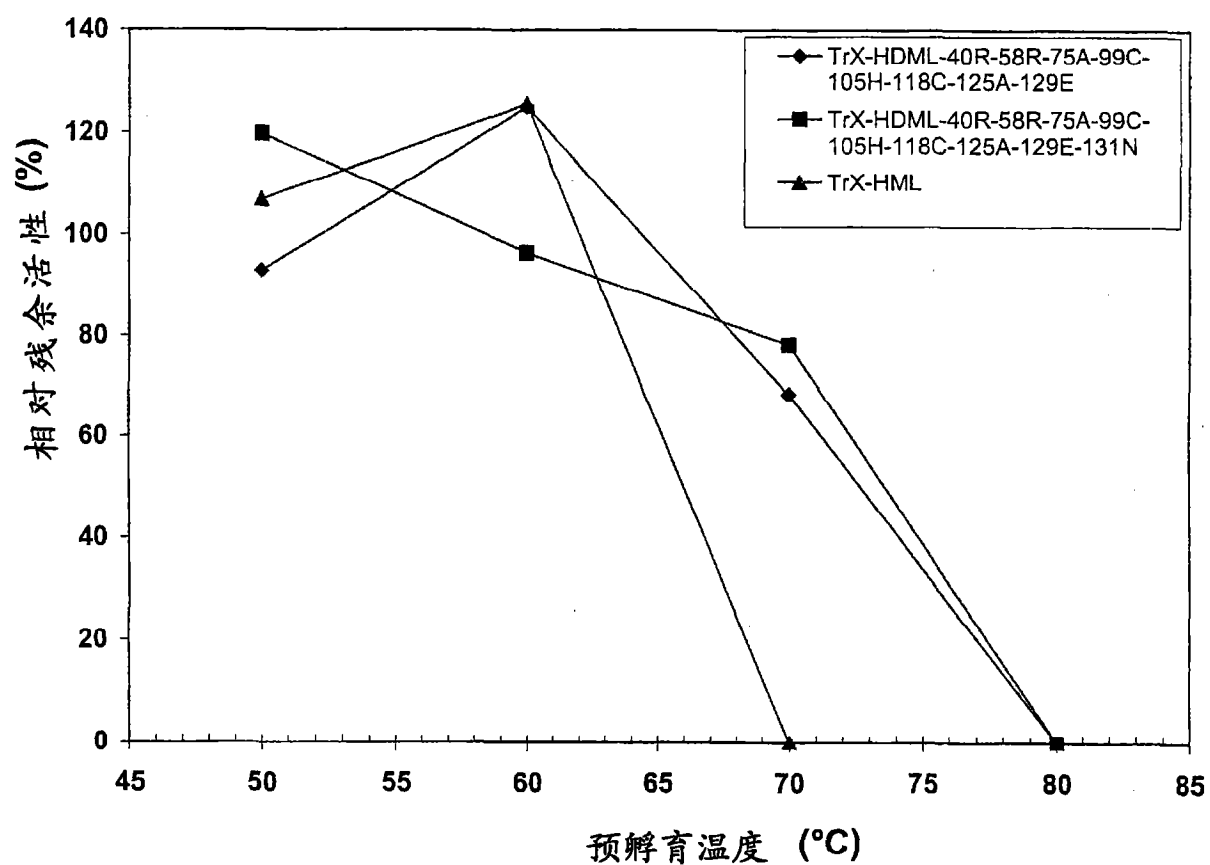


图 17