



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101374947 B

(45) 授权公告日 2012. 05. 30

(21) 申请号 200780003308. X

C12N 15/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2007. 01. 22

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

60/761, 106 2006. 01. 23 US

W0 00/60063 , 2000. 10. 12, 说明书第 1 页第
21 — 29 行、第 4 — 5 页表格、第 6 页第 23 — 31
行。 .

(85) PCT 申请进入国家阶段日

2008. 07. 23

审查员 曾繁辉

(86) PCT 申请的申请数据

PCT/US2007/060825 2007. 01. 22

(87) PCT 申请的公布数据

W02007/087503 EN 2007. 08. 02

(73) 专利权人 诺维信公司

地址 丹麦鲍斯韦

专利权人 诺维信股份有限公司

(72) 发明人 杰斯珀·文德 金·博尔奇

迈克尔·米克尔森

于尔根·C·F·诺策尔

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 封新琴 巫肖南

(51) Int. Cl.

C12N 9/20 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 28 页

序列表 18 页 附图 3 页

(54) 发明名称

具有脂肪酶活性的多肽和编码该多肽的多核
苷酸

(57) 摘要

本发明涉及具有脂肪酶活性的多肽, 并且在
说明书中给出的测试条件下, 所述多肽进一步具
有至少 0. 8 的 RP 和至少 1. 1 的 BR。

1. 一种具有脂肪酶活性的细毛嗜热霉多肽,所述多肽在说明书中给出的测试条件下进一步具有至少 0.8 的平均相对性能 (RPavg) 和至少 1.1 的效益风险 (BR),并且所述多肽在相应于以下残基的位点包含选自以下组的氨基酸取代:

- a) I202G+T231R+N233R;
- b) I86V+L227G+T231R+N233R+P256K;
- c) Q4V+S58N+V60S+T231R+N233R;
- d) S58N+V60S+I90R+T231R+N233R;
- e) I255Y+T231R+N233R;和
- f) I90A+T231R+N233R+I255V。

2. 权利要求 1 的多肽,所述多肽在说明书中给出的测试条件下进一步具有小于 1.00 的相对 LU/A280。

3. 权利要求 1 的多肽,所述多肽是 SEQ ID NO:2 的多肽所包含的脂肪酶的变体。

4. 权利要求 1 的多肽,所述多肽是 SEQ ID NO:2 的多肽的成熟部分所包含的脂肪酶的变体。

5. 权利要求 1 的多肽,所述多肽是包含 SEQ ID NO:2 的多肽的脂肪酶的变体。

6. 权利要求 1 的多肽,所述多肽是包含 SEQ ID NO:2 的多肽的成熟部分的脂肪酶的变体。

7. 权利要求 1 的多肽,所述多肽由多核苷酸编码,所述多核苷酸在至少高严谨性条件下与 SEQ ID NO:1 的核苷酸 644 至 732 或其互补链杂交。

8. 分离的多核苷酸,其包含编码前述权利要求中任一项的多肽的核苷酸序列。

9. 核酸构建体,其包含权利要求 8 的多核苷酸,所述多核苷酸与一个或多个指导多肽在表达宿主中产生的调控序列可操作地连接。

10. 重组表达载体,其包含权利要求 9 的核酸构建体。

11. 重组宿主细胞,其包含权利要求 9 的核酸构建体。

12. 用于产生权利要求 1-7 中任一项的多肽的方法,包括:

(a) 在有益于所述多肽产生的条件下培养细胞,所述细胞以其野生型形式能够产生所述多肽;和

(b) 回收所述多肽。

13. 用于产生权利要求 1-7 中任一项的多肽的方法,包括:

(a) 在有益于所述多肽产生的条件下培养包含核酸构建体的宿主细胞,所述核酸构建体包含编码所述多肽的核苷酸序列;和

(b) 回收所述多肽。

具有脂肪酶活性的多肽和编码该多肽的多核苷酸

发明领域

[0001] 本发明涉及具有脂肪酶活性的多肽和编码该多肽的多核苷酸。

[0002] 发明背景

[0003] 脂肪酶是有用的,例如,作为洗涤剂酶用于从衣物和其它纺织品去除脂质或脂肪沾污,作为用于面包和其它烘焙产品的生面团的添加剂。因此,源自细毛嗜热霉(*Thermomyces lanuginosus*) (同物异名疏棉状腐质霉(*Humicolalanuginosa*)) 的脂肪酶以商品名 Lipolase® (Novo Nordisk A/S 的产品) 以洗涤剂用途出售。WO 0060063 描述了细毛嗜热霉脂肪酶的变体,其在洗涤剂溶液中具有特别优良的初次洗涤性能(first-wash performance)。WO 9704079、WO9707202 和 WO 0032758 也公开细毛嗜热霉脂肪酶的变体。WO 02062973 公开具有 C-末端延伸的细毛嗜热霉脂肪酶,其具有降低的形成气味(odor) 的趋势。

[0004] 发明概述

[0005] 本发明涉及具有脂肪酶活性的分离的多肽,其选自下组:在说明书给出的测试条件下,具有至少 0.8 的平均相对性能(Relative Performance ;RP) 和至少 1.1 的效益风险(Benefit-Risk ;BR) 的脂肪酶。

[0006] 本发明还涉及气味产生可能性降低的脂肪酶变体,和制备它们的方法。本发明特别涉及细毛嗜热霉脂肪酶的变体,其对长脂肪酸链具有偏好,而同时具有良好的相对性能。

[0007] 在进一步的方面,本发明涉及包含编码所述多肽的核苷酸序列的分离的多核苷酸,包含所述多核苷酸的核酸构建体,包含所述核酸构建体的重组表达载体,和包含所述核酸构建体的重组宿主细胞。

[0008] 本发明还涉及用于产生本发明的脂肪酶的方法。

[0009] 序列表

[0010] SEQ ID NO :1 显示编码源自细毛嗜热霉的脂肪酶的 DNA 序列。

[0011] SEQ ID NO :1 显示源自细毛嗜热霉的脂肪酶的氨基酸序列。

[0012] SEQ ID NO :3-SEQ ID NO :16 显示图 1 中用于比对的序列。

[0013] SEQ ID NO :17 和 SEQ ID NO :18 显示用于比对实例(alignment example) 的序列。

[0014] 定义

[0015] 脂肪酶活性:术语“脂肪酶活性”在本文定义为羧酸酯水解酶活性,其在形成二酰甘油和羧酸酯的情况下,催化三酰甘油的水解。就本发明而言,根据“材料和方法”内的“脂肪酶活性”中描述的方法测定脂肪酶活性。将 1 单位的脂肪酶活性定义为在 30℃,pH 7,每分钟能够释放 1.0 微摩尔丁酸的酶量。

[0016] 作为含有取代 T231R+N233R 的由 SEQ ID NO :2 的成熟多肽所示氨基酸序列组成的多肽的相对性能测量,本发明的多肽具有至少 70%,如至少 75%或 80%或 85%或 90%,更优选至少 95%,甚至更优选 96%或 97%,最优选 98%或 99%,并且最优选至少 100% 的脂肪酶活性。

[0017] 分离的多肽:术语“分离的多肽”用于本文中指,如通过 SDS-PAGE 测定的,是至少

20%纯,优选至少 40%纯,更优选至少 60%纯,甚至更优选至少 80%纯,最优选至少 90%纯,并且甚至最优选至少 95%纯的多肽。

[0018] 基本上纯的多肽 (substantially pure polypeptide):术语“基本上纯的多肽”在本文表示多肽制备物,所述多肽制备物按重量计含有至多 10%,优选至多 8%,更优选至多 6%,更优选至多 5%,更优选至多 4%,至多 3%,甚至更优选至多 2%,最优选至多 1%,并且甚至最优选至多 0.5%的与其天然结合的 (associated) 的其它多肽材料。即,因此,优选所述基本上纯的多肽是按存在于制备物中的全部多肽材料的重量计至少 92%纯,优选至少 94%纯,更优选至少 95%纯,更优选至少 96%纯,更优选至少 96%纯,更优选至少 97%纯,更优选至少 98%纯,甚至更优选至少 99%纯,最优选至少 99.5%纯,并且甚至最优选 100%纯。

[0019] 本发明的多肽优选是基本上纯的形式。具体而言,优选所述多肽是“基本上 (essentially) 纯的形式”,即,所述多肽制备物基本上 (essentially) 不含与其天然结合的其它多肽材料。这能够通过以下方法实现,例如,通过公知的重组方法或由经典纯化方法制备多肽。

[0020] 在本文中,术语“基本上纯的多肽”与术语“分离的多肽”和“分离形式的多肽”同义。

[0021] 同一性:参数“同一性”描述两个氨基酸序列之间或两个核苷酸序列之间的相关性。

[0022] 就本发明而言,通过使用来自 EMBOS 软件包 (<http://emboss.org>) 版本 2.8.0 的 Needle 程序来测定两个氨基酸序列之间的比对。Needle 程序执行总体比对算法,其在 Needleman, S. B. and Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453 中描述。使用的取代矩阵是 BLOSUM62,缺口开启罚分 (gap opening penalty) 是 10,并且缺口延伸罚分 (gap extension penalty) 是 0.5。

[0023] 本发明的氨基酸序列 (“发明序列”;例如 SEQ ID NO:2 的氨基酸 1 至 269) 和不同氨基酸序列 (“外源序列”) 之间的同一性程度如下计算:用两个序列比对中完全匹配的数目除以“发明序列”的长度或“外源序列”的长度中最短的一个。将结果表示为百分比同一性。

[0024] 当“发明序列”和“外源序列”在重叠的相同位置中具有同一氨基酸残基 (在下述比对实例中用“|”表示),发生完全匹配。序列的长度是序列中氨基酸残基的数目 (例如 SEQ ID NO:2 的长度是 269)。

[0025] 在以下比对实例中,重叠是序列 A 的氨基酸序列“HTWGER-NL”;或序列 B 的氨基酸序列“HGWGEDANL”。在本例中缺口用“-”表示。

[0026] 比对实例

[0027] 序列 A:ACMSHTWGER-NL

[0028] | | | | |

[0029] 序列 B: HGWGEDANLAMNPS

[0030] 多肽片段:术语“多肽片段”在本文中定义为从 SEQ ID NO:2 的氨基末端和 / 或羧基末端缺失一个或多个氨基酸的多肽,或其同源序列;其中所述片段具有脂肪酶活性。

[0031] 亚序列 (subsequence):术语“亚序列”在本文中定义为从 SEQ ID NO:1 的 5' 和

/ 或 3' 端缺失一个或多个核苷酸的核苷酸序列,或其同源序列;其中所述亚序列编码具有脂肪酶活性的多肽片段。

[0032] 等位变体 (allelic variant):术语“等位变体”在本文中表示占据相同染色体基因座的基因的任何两种或更多种可选形式。等位变异通过突变天然地发生,并且可导致种群内的多态性。基因突变可以是沉默的(在编码的多肽中无变化)或可以编码具有改变的氨基酸序列的多肽。多肽的等位变体是由基因的等位变体编码的多肽。

[0033] 基本上纯的多核苷酸:术语“基本上纯的多核苷酸”用于本文指不含其它外来的或不期望的核苷酸的多核苷酸制备物,并且所述多核苷酸制备物处于适合于在遗传工程的蛋白质生产体系中使用的形式。因此,基本上纯的多核苷酸按重量计含有至多 10%,优选至多 8%,更优选至多 6%,更优选至多 5%,更优选至多 4%,更优选至多 3%,甚至更优选至多 2%,最优选至多 1%,并且甚至最优选至多 0.5%的与其天然结合的其它多核苷酸材料。然而,基本上纯的多核苷酸可以包括天然存在的 5' 和 3' 非翻译区,例如启动子和终止子。优选基本上纯的多核苷酸是按重量计至少 90%纯,优选至少 92%纯,更优选至少 94%纯,更优选至少 95%纯,更优选至少 96%纯,更优选至少 97%纯,甚至更优选至少 98%纯,最优选至少 99%,并且甚至最优选至少 99.5%纯的。本发明所述多核苷酸优选是基本上纯的形式。具体而言,优选在本文公开的多核苷酸是“基本上 (essentially) 纯的形式”,即,所述多核苷酸制备物基本上不含与其天然结合的其它多核苷酸材料。在本文中,术语“基本上纯的多核苷酸”与术语“分离的多核苷酸”和“分离形式的多核苷酸”同义。所述多核苷酸可以是基因组来源、cDNA 来源、RNA 来源、半合成来源、合成来源的,或它们的任意组合。

[0034] cDNA:术语“cDNA”在本文中定义为能够通过反转录从得自真核细胞的成熟的、已剪接的 mRNA 分子制备的 DNA 分子。cDNA 缺少通常存在于相应基因组 DNA 中的内含子序列。起始的 (initial)、初级的 RNA 转录物是 mRNA 的前体,其通过一系列的步骤加工然后作为成熟的已剪接的 mRNA 出现。这些步骤包括通过称为剪接的过程去除内含子序列。因而源自 mRNA 的 cDNA 没有任何内含子序列。

[0035] 核酸构建体:术语“核酸构建体”用于本文指单链或双链的核酸分子,所述核酸分子分离自天然存在的基因,或将所述核酸分子以本来不存在于 (nototherwise exist) 自然界中的方式修饰以含有核酸的片段。当所述核酸构建体含有表达本发明的编码序列所需的调控序列时,术语核酸构建体与术语“表达盒”同义。

[0036] 调控序列 (control sequence):术语“调控序列”在本文定义为包括对编码本发明多肽的多核苷酸表达是必需的或有利的的所有成分。各种调控序列对于编码所述多肽的核苷酸序列可以是天然的或外源的。这些调控序列包括但不限于前导序列、聚腺苷酸化序列、前肽序列、启动子、信号肽序列和转录终止子。最少的情况,调控序列包括启动子和转录和翻译的终止信号。调控序列可以和用于引入特异性限制位点的接头一起提供,所述特异性限制位点促进调控序列与编码多肽的核苷酸序列编码区的连接。

[0037] 可操作地连接:术语“可操作地连接”在本文表示这样的构型,其中将调控序列置于相对于多核苷酸序列的编码序列的适当位置,使得调控序列指导多肽编码序列的表达。

[0038] 编码序列:当用于本文时术语“编码序列”的意思是直接详明其蛋白产物的氨基酸序列的核苷酸序列。编码序列的边界通常由开读框决定,所述开读框通常以 ATG 起始密码子或可供选择的起始密码子例如 GTG 和 TTG 开始。编码序列可以是 DNA、cDNA 或重组核苷

酸序列。

[0039] 表达：术语“表达”包括涉及多肽产生的任何步骤，其包括但不限于转录、转录后修饰、翻译、翻译后修饰和分泌。

[0040] 表达载体：术语“表达载体”在本文定义为线性的或环状的 DNA 分子，其包含编码本发明多肽的多核苷酸，并且所述多核苷酸与提供用于其表达的额外核苷酸可操作地连接。

[0041] 宿主细胞：如本文中所使用的术语“宿主细胞”包括任何细胞类型，所述细胞类型对于使用包含本发明多核苷酸的核酸构建体的转化、转染、转导等是易感的 (susceptible)。

[0042] 修饰：术语“修饰”在本文的意思是，对由 SEQ ID NO :2 的成熟多肽组成的多肽的任何化学修饰，以及对编码这种多肽的 DNA 的遗传操作。所述修饰可以是氨基酸的取代、缺失和 / 或插入，以及氨基酸侧链的置换。

[0043] 人工变体：当用在本文时，术语“人工变体”的意思是具有脂肪酶活性的多肽，所述多肽由表达 SEQ ID NO :1 的修饰的核苷酸序列的生物产生。所述修饰的核苷酸序列通过人为干预 (human intervention)，通过修饰公开于 SEQ ID NO :1 的核苷酸序列来获得。

[0044] 相对性能 (RP)：术语相对性能反映的是，当作为以特定酶变体洗涤的纺织品样品的亮度来测量时，酶变体相较于参照酶的性能。

[0045] 效益 - 风险因子 (BR)：效益 - 风险因子描述的是，相较于在去除底物时的气味风险的洗涤性能。

[0046] 变体命名规则：

[0047] 为了易于参考，在描述本发明的脂肪酶变体时，采用以下命名法：

[0048] 原始氨基酸：位置：取代氨基酸

[0049] 根据这种命名法，例如，在位置 195 中用谷氨酸取代甘氨酸表示为 G195E。在相同的位置缺失甘氨酸表示为 G195*，而插入额外的氨基酸残基例如赖氨酸表示为 G195GK。

[0050] 与其它脂肪酶相比，当特定脂肪酶含有“缺失”并且在该位置进行插入的情况，就在位置 36 插入天冬氨酸而言，将这种情况表示为 *36D。

[0051] 用加号分隔多个突变，即：R170Y+G195E，分别表示在位置 170 用酪氨酸取代精氨酸，和在位置 195 用谷氨酸取代甘氨酸。

[0052] 当应用所述排列方法时，X231 表示在亲本多肽中对应于位置 231 的氨基酸。X231R 表示用 R 置换所述氨基酸。就 SEQ ID NO :2 而言，X 是 T，因此 T231R 表示用 R 取代位置 231 的 T。当某个位置（例如 231）中的氨基酸可以由选自一组氨基酸的另一个氨基酸取代的情况，例如由 R 和 P 和 Y 组成的组，将这种情况表示为 X231R/P/Y。

[0053] 在所有的情况下，采用 IUPAC 所承认的单字母或三字母的氨基酸缩写。

[0054] 发明详述

[0055] 具有脂肪酶活性的多肽

[0056] 本发明涉及具有脂肪酶活性分离的多肽，其选自下组：在说明书中给出的测试条件下，具有至少 0.8 的 RP 和至少 1.1 的 BR 的脂肪酶。

[0057] 在优选的实施方式中，脂肪酶具有至少 0.9 的 RP，例如 1.0 或 1.1。在更优选的实施方式中，脂肪酶具有至少 1.2 的 RP，例如 1.3 或者甚至 1.4。

[0058] 在另一个优选的实施方式中,脂肪酶具有至少 1.2 的 BR,例如 1.3 或者甚至 1.4。在更优选的实施方式中,脂肪酶具有至少 1.5 的 BR,例如 1.6 或者甚至 1.7。

[0059] 在进一步的方面中,本发明的脂肪酶在说明书中给出的测试条件下,进一步具有小于 1,例如小于 0.95 的相对 LU/A280。在优选的实施方式中,所述相对 LU/A280 小于 0.90,例如小于 0.85,或者甚至小于 0.80。

[0060] 在进一步的方面中,本发明涉及分离的多肽,其具有 SEQ ID NO:2 所包含的氨基酸序列或包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列,或其等位变体;并且所述分离的多肽进一步具有至少 1.1 的 BR 和至少 0.8 的 RP。在另一个方面,本发明涉及分离的多肽,其具有 SEQ ID NO:2 的成熟部分所包含的氨基酸序列或包含 SEQ ID NO:2 的成熟部分的氨基酸序列,或其等位变体;并且所述分离的多肽进一步具有至少 1.1 的 BR 和至少 0.8 的 RP。

[0061] 在更进一步的方面,本发明涉及分离的多肽,其具有与 SEQ ID NO:2 的成熟多肽(即,成熟多肽)具有至少 80%,例如至少 85%或 90%,或者至少 95%,优选至少 97%,最优选至少 98%,并且甚至最优选至少 99%的同一性程度的氨基酸序列,并且所述分离的多肽具有脂肪酶活性(下文中的“同源多肽”)。在优选的方面中,所述同源多肽具有的氨基酸序列与 SEQ ID NO:2 的成熟多肽相差十个氨基酸,相差九个氨基酸,相差八个氨基酸,相差七个氨基酸,相差六个氨基酸,优选相差五个氨基酸,更优选相差四个氨基酸,甚至更优选相差三个氨基酸,最优选相差两个氨基酸,并且甚至最优选相差一个氨基酸。

[0062] 在进一步的方面,本发明涉及具有脂肪酶活性的分离的多肽,所述分离的多肽由多核苷酸编码,所述多核苷酸在非常低严谨性条件下,优选低严谨性条件下,更优选中严谨性条件下,更优选中-高严谨性条件下,甚至更优选高严谨性条件下,并且最优选非常高严谨性条件下,与以下杂交:(i)SEQ ID NO:1 的核苷酸 644-732, (ii)SEQ ID NO:1 的核苷酸 644-732 中包含的 cDNA 序列, (iii) (i) 或 (ii) 的亚序列,或 (iv) (i)、(ii) 或 (iii) 的互补链(J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatus, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2dedition, Cold Spring Harbor, New York)。SEQ ID NO:1 的亚序列含有至少 100 个连续的核苷酸或优选至少 200 个连续的核苷酸。此外,所述亚序列可编码具有脂肪酶活性的多肽片段。

[0063] SEQ ID NO:1 的核苷酸序列或其亚序列,以及 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列或其片段,可以用于设计核酸探针,以根据本领域内公知的方法从不同属和种的菌株鉴定和克隆编码具有脂肪酶活性的多肽的 DNA。具体而言,根据标准的 Southern 印迹方法,可将这些探针用于与感兴趣的属或种的基因组或 cDNA 杂交,以从中鉴定和分离相应的基因。这些探针可明显短于完整序列,但长度上应为至少 14,优选至少 25,更优选至少 35,并且最优选至少 70 个核苷酸。然而,优选所述核酸探针是至少 100 个核苷酸长度。例如,所述核酸探针长度上可以是至少 200 个核苷酸,优选至少 300 个核苷酸,更优选至少 400 个核苷酸,或最优选至少 500 个核苷酸。甚至可以使用更长的探针,例如,长度是至少 600 个核苷酸,至少优选至少 700 个核苷酸,或更优选至少 800 个核苷酸的核酸探针。DNA 和 RNA 探针二者均可使用。通常将探针标记以探测相应的基因(例如,用 ^{32}P 、 ^3H 、 ^{35}S 、生物素或抗生物素蛋白(avidin)标记)。将这些探针包含于本发明中。

[0064] 因而,可从由这些其它生物制备的基因组 DNA 或 cDNA 文库中筛选 DNA,所述 DNA 与上述探针杂交并且编码具有脂肪酶活性的多肽。可以通过琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳,

或通过其它分离技术来分离来自这些其它生物的基因组 DNA 或其它 DNA。可以将来自文库的 DNA 或分离的 DNA 转移至硝化纤维素 (nitrocellulose) 或其它合适的载体材料并且固定于其上。为了鉴定与 SEQ ID NO:1 或其亚序列同源的克隆或 DNA, 优选将所述载体材料用在 Southern 印迹中。

[0065] 就本发明而言, 杂交表示核苷酸序列在非常低至非常高严谨性条件下与标记的核酸探针杂交, 所述核酸探针对应于 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列、它的互补链, 或其亚序列。可使用 X 射线片 (X-ray film) 检测在这些条件下与核酸探针杂交的分子。

[0066] 在更进一步的方面, 本发明涉及人工变体, 所述人工变体包含保守取代、缺失和/或插入一个或多个氨基酸的 SEQ ID NO:2 或其成熟多肽, 所述变体具有至少 1.1 的 BR 和至少 0.8 的 RP。优选地, 氨基酸改变对性质是较不重要的 (of a minor nature), 即保守的氨基酸取代或插入, 其不显著影响蛋白质的折叠和/或活性; 小缺失, 通常为 1 至大约 30 个氨基酸的小缺失; 小的氨基或羧基末端延伸, 例如氨基末端甲硫氨酸残基; 多至大约 20-25 个残基的小接头肽; 或通过改变净电荷或其它功能来促进纯化的小延伸, 例如多组氨酸序列 (poly histidine tract)、抗原表位 (antigenic epitope) 或结合域 (binding domain)。

[0067] 保守取代的实例是在以下组之内: 碱性氨基酸组 (精氨酸、赖氨酸和组氨酸)、酸性氨基酸组 (谷氨酸和天冬氨酸)、极性氨基酸组 (谷氨酰胺和天冬酰胺)、疏水性氨基酸组 (亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸)、芳族氨基酸组 (苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸) 和小氨基酸组 (甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸和甲硫氨酸)。通常不改变比活性 (specific activity) 的氨基酸取代是本领域已知的, 并且由例如 H. Neurath and R. L. Hill, 1979, In, The Proteins, Academic Press, New York 描述。最普遍发生的交换是 Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Tyr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu 和 Asp/Gly。

[0068] 除了 20 个基本氨基酸, 非基本氨基酸 (例如 4- 羟脯氨酸、6-N- 甲基赖氨酸、2- 氨基异丁酸、异缬氨酸和 α - 甲基丝氨酸) 可以取代野生型多肽的氨基酸残基。有限数量的非保守氨基酸、不由遗传密码编码的氨基酸和非天然氨基酸可以取代氨基酸残基。“非天然氨基酸”在蛋白质合成后已经过修饰, 和/或在它们的侧链具有不同于基本氨基酸的化学结构。非天然氨基酸能够以化学方法合成, 并且优选是商业上能够获得的, 包括六氢吡啶羧酸 (pipercolic acid)、噻唑烷羧酸 (thiazolidine carboxylic acid)、脱氢脯氨酸、3- 和 4- 甲基脯氨酸, 和 3,3- 二甲基脯氨酸。

[0069] 可供选择的是, 氨基酸改变具有这样的性质以使多肽的物理化学性质改变。例如, 氨基酸改变可改进多肽的热稳定性, 改变底物特异性, 改变最适 pH 等。

[0070] 能够根据本领域已知的方法, 例如定位诱变或丙氨酸分区诱变法 (Cunningham and Wells, 1989, Science 244:1081-1085) 来鉴定亲本多肽中的必需氨基酸。在最后一技术中, 将单一丙氨酸突变引入到分子中的每个残基, 并且测试所得突变分子的生物活性 (即, 脂肪酶活性) 以鉴定对于所述分子的活性关键的氨基酸残基。同样参见 Hilton et al., 1996, J. Biol. Chem. 271:4699-4708。酶的活性部位或其它的生物相互作用也能够通过结构的物理分析而测定, 如通过以下这些技术: 如核磁共振、晶体学、电子衍射或光亲和标记, 连同推定的接触位点氨基酸的突变来测定。参见例如 de Vos et al., 1992, Science 255:306-312; Smith et al., 1992, J. Mol. Biol. 224:899-904; Wlodaver et al., 1992, FEBS

Lett. 309 :59-64。必需氨基酸的同一性也能够从与多肽同一性的分析来推断,所述多肽与根据本发明的多肽相关。

[0071] 能够使用已知的诱变、重组和 / 或改组 (shuffling) 方法,继之以相关的筛选方法,例如那些由 Reidhaar-Olson and Sauer,1988, Science 241 :53-57 ;Bowie and Sauer, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 :2152-2156 ;W0 95/17413 ;或 W0 95/22625 公开的那些方法来进行并测试单个或多个氨基酸取代。能够使用的其它方法包括易错 PCR、噬菌体展示 (例如, Lowman et al., 1991, Biochem. 30 :10832-10837 ;美国专利 No. 5, 223, 409 ;W0 92/06204) 和区域定向的诱变 (Derbyshire et al., 1986, Gene 46 :145 ;Ner et al., 1988, DNA 7 :127)。

[0072] 诱变 / 改组方法能够与高通量、自动化的筛选方法组合以检测由宿主细胞表达的克隆的、诱变的多肽的活性。能够从宿主细胞回收编码活性多肽的诱变的 DNA 分子,并且使用本领域内标准方法快速测序。这些方法允许快速测定感兴趣的多肽中单个氨基酸残基的重要性,并且能够应用于未知结构的多肽。

[0073] 对 SEQ ID NO :2 的氨基酸 1-291 的氨基酸取代、缺失和 / 或插入的总数是 10, 优选 9, 更优选 8, 更优选 7, 更优选至多 6, 更优选至多 5, 更优选 4, 甚至更优选 3, 最优选 2, 并且甚至最优选 1。

[0074] 区和取代的鉴定

[0075] 可以按照本部分公开的内容来鉴定本申请涵盖的取代。

[0076] 下文中的 I 区至 IV 区中所指的位置是 SEQ ID NO :2 中氨基酸残基的位置。为了在不同的脂肪酶中找到相应的 (同源的) 位置,使用在“同源性和比对”中描述的方法。

[0077] I 区中的取代

[0078] I 区由围绕 N 末端残基 E1 的氨基酸残基组成。在这个区中,优选带更多正电 (more positive) 的氨基酸取代亲本脂肪酶的氨基酸。

[0079] I 区包含对应于以下位置的氨基酸残基 :2-11 和 223-239。以下位置是尤其感兴趣的 :4、8、11、223、229、231、233、234、236。

[0080] 具体而言,已经鉴定了以下取代 :X4V、X231R 和 X233R。

[0081] 在优选的实施方式中,变体脂肪酶与 SEQ ID NO :2 具有至少 80%, 例如 85% 或 90%, 例如至少 95% 或 98% 或 99% 同一性。

[0082] II 区中的取代

[0083] II 区由在酰基链的一侧和醇部分的一侧与底物接触的氨基酸残基组成。在这个区中,优选带更多正电的氨基酸或用疏水性较小的氨基酸来取代亲本脂肪酶的氨基酸。

[0084] II 区包含对应于以下位置的氨基酸残基 :202-211 和 249-269。以下位置是尤其感兴趣的 :202、210、211、253、254、255、256。

[0085] 具体而言,已经鉴定了以下取代 :X202G、X255Y/V 和 X256K/R。

[0086] 在优选的实施方式中,变体脂肪酶与 SEQ ID NO :2 具有至少 80%, 例如 85% 或 90%, 例如至少 95% 或 98% 或 99% 同一性。

[0087] III 区中的取代

[0088] III 区由形成柔性结构 (flexible structure) 的氨基酸组成,因此允许底物进入活性部位。在这个区中,优选带更多正电的氨基酸或疏水性较小的氨基酸取代亲本脂肪

酶的氨基酸。

[0089] III 区包含对应于以下位置的氨基酸残基 :82-102。以下位置是尤其感兴趣的 :86、87、90、91、95、96、99。

[0090] 具体而言,已经鉴定了以下取代 :X86V 和 X90A/R。

[0091] 在优选的实施方式中,变体脂肪酶与 SEQ ID NO :2 具有至少 80%,例如 85%或 90%,例如至少 95%或 98%或 99%同一性。

[0092] IV 区中的取代

[0093] IV 区由与表面以静电结合的氨基酸残基组成。在这个区中,优选带更多正电的氨基酸取代亲本脂肪酶的氨基酸。

[0094] IV 区包含对应于以下位置的氨基酸残基 :27 和 54-62。以下位置是尤其感兴趣的 :27、56、57、58、60。

[0095] 具体而言,已经鉴定了以下取代 :X27R、X58N/AG/T/P 和 X60V/S/G/N/R/K/A/L。

[0096] 在优选的实施方式中,变体脂肪酶与 SEQ ID NO :2 具有至少 80%,例如 85%或 90%,例如至少 95%或 98%或 99%同一性。

[0097] 其它位置上的氨基酸

[0098] 亲本脂肪酶可以任选地包含其它氨基酸的取代,特别是少于 10 个或少于 5 个这样的取代。实例是相应于 SEQ ID NO :2 的以下一个或多个位置的取代 :24、46、74、81、83、127、131、137、147、150、203、206、211、263、264、265、267 和 269。在具体的实施方式中,在相应于位置 81、147、150、227 和 249 的至少一个中存在取代。在优选的实施方式中,至少一个取代选自下组 :X81Q/E、X147M/Y、X150G、X227G 和 X249R/I/L。

[0099] 进一步的取代可以,例如,根据本领域已知的原理进行,例如 W092/05249、W094/25577、W095/22615、W097/04079 和 W097/07202 中描述的取代。

[0100] 同源性和比对

[0101] 就本发明而言,可以通过本领域已知的计算机程序的方法适当地测定同源性的程度,所述程序例如 GCG 程序包中提供的 GAP (Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, August 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) (Needleman, S. B. and Wunsch, C. D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48, 443-45), 按照用于多肽序列比较的以下设定来使用 GAP :GAP 产生罚分 (GAP creation penalty) 为 3.0, 和 GAP 延伸罚分 (GAP extension penalty) 为 0.1。

[0102] 在本发明中,通过图 1 中所示的比对定义了在下述脂肪酶序列中相应的(或同源的)位置:曲柄犁头霉 (*Absidia reflexa*)、*Absidia corymbifera*、曼赫根毛霉 (*Rhizomucor miehei*)、德氏根霉 (*Rhizopus delemar*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、塔宾曲霉 (*Aspergillus tubigenensis*)、尖镰孢 (*Fusarium oxysporum*)、异孢镰孢 (*Fusarium heterosporum*)、米曲霉 (*Aspergillus oryzae*)、沙门柏干酪青霉 (*Penicillium camembertii*)、臭曲霉 (*Aspergillus foetidus*)、黑曲霉、细毛嗜热霉(同物异名:疏棉状腐质霉)和 *Landerina penispora*。

[0103] 为了发现所述比对中未显示的脂肪酶序列中的同源位置,将感兴趣的序列与图 1 中显示的序列进行比对。通过使用 GAP 将新序列与 GAP 程序发现的最同源的序列进行比对,来将新序列排入图 1 中的现有比对。GAP 在 GCG 程序包 (Program Manual for the

Wisconsin Package, Version 8, August 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) (Needleman, S. B. and Wunsch, C. D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48, 443-45) 中提供。使用以下设置用于多肽序列比较: GAP 产生罚分为 3.0, GAP 延伸罚分为 0.1。

[0104] 可以使用任何合适的亲本脂肪酶。在优选的实施方式中, 亲本脂肪酶与细毛嗜热霉脂肪酶 (SEQ ID NO:2) 具有至少 50% 的同源性, 特别是至少 55%, 至少 60%, 至少 75%, 至少 85%, 至少 90%, 多于 95%、96%、97% 或多于 98% 或 99% 的同源性。在具体的实施方式中, 亲本脂肪酶与细毛嗜热霉脂肪酶 (SEQ ID NO:2) 相同。

[0105] 具有脂肪酶活性的多肽的来源

[0106] 本发明的多肽可以获得自任意属的微生物。就本发明而言, 用于本文与给定的来源有关的术语“获得自”的意思应为核苷酸序列编码的多肽由所述来源产生, 或由其中插入了来自所述来源的核苷酸序列的菌株产生。在优选的方面, 获得自给定来源的多肽是胞外分泌的。

[0107] 本发明的多肽可以是细菌多肽。例如, 所述多肽可以是革兰氏阳性细菌多肽, 例如芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 多肽, 例如, 嗜碱芽孢杆菌 (*Bacillus alkalophilus*)、解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)、短芽孢杆菌 (*Bacillus brevis*)、环状芽孢杆菌 (*Bacillus circulans*)、凝结芽孢杆菌 (*Bacillus coagulans*)、灿烂芽孢杆菌 (*Bacillus lautus*)、迟缓芽孢杆菌 (*Bacillus lentus*)、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)、巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)、嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 或苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 多肽; 或链霉菌属 (*Streptomyces*) 多肽, 例如, 浅青紫链霉菌 (*Streptomyces lividans*) 或鼠灰链霉菌 (*Streptomyces murinus*) 多肽; 或革兰氏阴性细菌多肽, 例如, 大肠杆菌或假单胞菌属菌种多肽。

[0108] 本发明的多肽还可以是真菌多肽, 并且更优选是酵母多肽, 例如念珠菌属 (*Candida*)、克鲁维酵母属 (*Kluyveromyces*)、毕赤酵母属 (*Pichia*)、酵母属 (*Saccharomyces*)、裂殖酵母属 (*Schizosaccharomyces*) 或西洋蓍霉属 (*Yarrowia*) 多肽; 或更优选是丝状真菌多肽, 例如枝顶孢霉属 (*Acremonium*)、曲霉属 (*Aspergillus*)、短梗霉属 (*Aureobasidium*)、隐球菌属 (*Cryptococcus*)、*Filobasidium*、镰孢属 (*Fusarium*)、腐质霉属 (*Humicola*)、梨孢菌属 (*Magnaporthe*)、毛霉属 (*Mucor*)、毁丝霉属 (*Myceliophthora*)、新考玛脂霉属 (*Neocallimastix*)、脉孢菌属 (*Neurospora*)、拟青霉属 (*Paecilomyces*)、青霉属 (*Penicillium*)、瘤胃壶菌属 (*Piromyces*)、裂褶菌属 (*Schizophyllum*)、踝节菌属 (*Talaromyces*)、热子囊菌属 (*Thermoascus*)、梭孢壳属 (*Thielavia*)、弯颈霉属 (*Tolypocladium*) 或木霉属 (*Trichoderma*) 多肽。

[0109] 在优选的方面, 所述多肽是具有脂肪酶活性的卡尔酵母 (*Saccharomyces carlsbergensis*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、糖化酵母 (*Saccharomyces diastaticus*)、道格拉氏酵母 (*Saccharomyces douglasii*)、克鲁弗酵母 (*Saccharomyces kluyveri*)、诺地酵母 (*Saccharomyces norbensis*) 或卵形酵母 (*Saccharomyces oviformis*) 多肽。

[0110] 在另一个优选的方面, 所述多肽是棘孢曲霉 (*Aspergillus aculeatus*)、

泡盛曲霉 (*Aspergillus awamori*)、烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*)、臭曲霉 (*Aspergillus foetidus*)、日本曲霉 (*Aspergillus japonicus*)、构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、米曲霉、塔宾曲霉 (*Aspergillus turbidus*)、杆孢状镰孢 (*Fusarium bacilliforme*)、禾谷镰孢 (*Fusarium cerealis*)、库威镰孢 (*Fusarium crookwellense*)、大刀镰孢 (*Fusarium culmorum*)、禾本科镰孢 (*Fusarium graminearum*)、禾赤镰孢 (*Fusarium gramineum*)、异孢镰孢 (*Fusarium heterosporum*)、合欢木镰孢 (*Fusarium negundi*)、尖镰孢 (*Fusarium oxysporum*)、多枝镰孢 (*Fusarium reticulatum*)、粉红镰孢 (*Fusarium roseum*)、接骨木镰孢 (*Fusarium sambucinum*)、肤色镰孢 (*Fusarium sarciniforme*)、拟分枝孢镰孢 (*Fusarium sporotrichioides*)、硫色镰孢 (*Fusarium sulphureum*)、圆镰孢 (*Fusarium torulosum*)、拟丝孢镰孢 (*Fusarium trichothecioides*)、镶片镰孢 (*Fusarium venenatum*)、特异腐质霉 (*Humicola insolens*)、细毛嗜热霉 (同物异名: 疏棉状腐质霉)、米赫毛霉 (*Mucor miehei*)、嗜热毁丝霉 (*Myceliophthora thermophila*)、粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*)、产紫青霉 (*Penicillium purpurogenum*)、哈茨木霉 (*Trichoderma harzianum*)、康宁木霉 (*Trichoderma koningii*)、长枝木霉 (*Trichoderma longibrachiatum*)、里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 或绿色木霉 (*Trichoderma viride*) 多肽。

[0111] 在另一个优选的方面,所述多肽是嗜热霉属多肽。

[0112] 在更优选的方面,所述多肽是细毛嗜热霉多肽,例如,具有本发明公开的突变的 SEQ ID NO:2 的多肽。

[0113] 可以理解的是对于前述的种,本发明包含完全和不完全阶段 (perfect and imperfect states) 两种,和其它分类学的等同物 (equivalent),例如,无性型 (anamorph),而无论它们已知的种名。本领域熟练技术人员将轻易地识别适合的等同物的同一性。

[0114] 这些种的菌株在许多培养物保藏中心对于公众能够轻易地取得,所述保藏中心诸如美国典型培养物保藏中心 (the American Type Culture Collection) (ATCC)、德意志微生物和细胞培养物保藏中心 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) (DSMZ)、真菌菌种保藏中心 (Centraalbureau Voor Schimmelcultures) (CBS) 和农业研究机构专利培养物保藏中心,北区研究中心 (Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center) (NRRL)。

[0115] 此外,可以使用上述的探针从其它来源,包括从自然界 (例如,土壤、堆肥、水等) 分离的微生物鉴定和获得这些多肽。用于从天然生境 (habitat) 分离微生物的技术是本领域内公知的。随后可通过相似地筛选另一种微生物的基因组文库或 cDNA 文库来获得所述多核苷酸。一旦用所述探针检测到编码多肽的多核苷酸序列,就能够使用本领域普通技术人员熟知的技术将所述多核苷酸分离或克隆 (参见,例如, Sambrook et al., 1989, 见上文)。

[0116] 本发明的多肽还包括融合多肽或可切割的融合多肽,其中将另一种多肽融合到所述多肽或其片段的 N-末端或 C-末端。通过将编码另一种多肽的核苷酸序列 (或其部分) 融合于本发明的核苷酸序列 (或其部分) 来产生融合的多肽。产生融合多肽的技术是本领域已知的,包括连接编码多肽的编码序列以使它们在阅读框中,并且使融合多肽的表达在

相同启动子和终止子的控制下。

[0117] 多核苷酸

[0118] 本发明还涉及分离的多核苷酸,所述分离的多核苷酸具有编码本发明的多肽的核苷酸序列。本发明还包含编码 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的变体多肽或其成熟多肽的核苷酸序列,由于遗传密码的简并性这种核苷酸序列不同于编码核苷酸序列。本发明还涉及 SEQ ID NO:1 的亚序列,其编码具有脂肪酶活性的 SEQ ID NO:2 的片段,所述片段具有至少 1.1 的 BR 和至少 0.8 的 RP。

[0119] 用于分离或克隆编码多肽的多核苷酸的技术是本领域内已知的,包括从基因组 DNA 分离,从 cDNA 制备,或其组合。可通过例如使用熟知的聚合酶链式反应 (PCR) 或表达文库的抗体筛选来检测具有共有结构特性的克隆 DNA 片段,从而实现从这种基因组 DNA 克隆本发明的多核苷酸。参见,例如,Innis et al.,1990,PCR:A Guide to Methods and Application,Academic Press,New York。可以使用其它核酸扩增方法,例如连接酶链式反应 (LCR)、连接活化转录 (ligated activated transcription;LAT) 和基于核苷酸序列的扩增 (NASBA)。可以从嗜热酶属的菌株,或从其它或相关的生物克隆多核苷酸,并且因此可以是例如所述核苷酸序列的多肽编码区的等位基因变体或种变体 (species variant)。

[0120] 本发明还涉及具有下述核苷酸序列的多核苷酸,所述核苷酸序列与 SEQ ID NO:1 的成熟多肽编码序列具有至少 60%,优选至少 65%,更优选至少 70%,更优选至少 75%,更优选至少 80%,更优选至少 85%,更优选至少 90%,甚至更优选至少 95%,并且最优选至少 97%、98% 或 99% 同一性的同一性程度,所述多核苷酸编码具有脂肪酶活性以及至少 1.1 的 BR 和至少 0.8 的 RP 的多肽。

[0121] 修饰编码本发明的多肽的核苷酸序列对于合成与所述多肽基本上相似的多肽可能是必需的。术语与所述多肽“基本上相似”指多肽的非天然存在的形式。这些多肽可能以一些工程改造的方式而不同于从其天然来源分离的多肽,例如,比活性、热稳定性、最适 pH 等方面不同的人工变体。可以在作为 SEQ ID NO:1 的多肽编码区存在的核苷酸序列,例如其亚序列的基础上,和 / 或通过引入如下的核苷酸取代来构建变体序列:所述取代不产生由核苷酸序列编码的多肽的其它氨基酸序列,但是符合意欲产生酶的宿主生物的密码子选择;或者所述取代可产生不同的氨基酸序列。关于核苷酸取代的概述,参见,例如,Ford et al.,1991,Protein Expression and Purification 2:95-107。

[0122] 对于本领域技术人员显而易见的是,这些取代能够在对于分子功能重要的区域之外进行,并且仍然产生活性多肽。对于由本发明的分离的多核苷酸编码的多肽活性关键的并且因此优选不进行取代的氨基酸残基,可以根据本领域公知的方法,例如定位诱变或丙氨酸分区诱变法(参见,例如,Cunningham and Wells,1989,Science 244:1081-1085)来鉴定。在后一技术中,将突变引入到分子中的每个正电残基处,并且测试所得突变分子的脂肪酶活性,以鉴定对于所述分子的活性关键的氨基酸残基。底物-酶相互作用的位点也能够通过分析三维结构测定,通过如核磁共振分析、晶体学或光亲和标记这样的技术来测定(参见,例如,de Vos et al.,1992,Science 255:306-312;Smith et al.,1992,Journal of Molecular Biology 224:899-904;Wlodaver et al.,1992,FEBS Letters 309:59-64)。

[0123] 本发明还涉及编码本发明多肽的分离的多核苷酸,所述分离的多核苷酸在非常低严紧条件下,优选低严紧条件,更优选中严紧条件,更优选中-高严紧条件,甚至更优选

高严谨条件,并且最优选非常高的严谨条件下,与以下杂交:(i)SEQ ID NO:1 的,(ii)SEQ ID NO:1 中包含的 cDNA 序列,或 (iii)(i) 至 (ii) 的互补链;或它们的等位变体和亚序列 (Sambrook et al.,1989,见上文),如本文所定义的。

[0124] 本发明还涉及分离的多核苷酸,所述分离的多核苷酸通过以下方法获得:(a) 在非常低、低、中、中-高、高或非常高严谨条件下,将 DNA 的群体与以下杂交:(i) 核苷酸 SEQ ID NO:1, (ii)SEQ ID NO:1 的核苷酸中包含的 cDNA 序列,或 (iii)(i) 或 (ii) 的互补链;和 (b) 分离杂交的多核苷酸,其编码具有脂肪酶活性的多肽。

[0125] 核酸构建体

[0126] 本发明还涉及包含本发明的分离的多核苷酸的核酸构建体,所述分离的多核苷酸与一个或多个调控序列可操作地连接,所述调控序列在合适的宿主细胞中在与该调控序列相容的条件下指导编码序列的表达。

[0127] 可以用许多方式操作编码本发明多肽的分离的多核苷酸以提供多肽的表达。依赖于表达载体,在将多核苷酸的序列插入载体之前对其进行操作可能是理想的或必需的。使用重组 DNA 方法修饰多核苷酸序列的技术是本领域熟知的。

[0128] 调控序列可以是合适的启动子序列,其是由用于表达编码本发明多肽的多核苷酸的宿主细胞识别的核苷酸序列。启动子序列含有介导多肽的表达的转录调控序列。启动子可以是在所选的宿主细胞中显示转录活性的任何核苷酸序列,包括突变的、截断的和杂合的启动子,并且可以从编码与宿主细胞同源或异源的胞外或胞内多肽的基因获得。

[0129] 用于指导本发明的核酸构建体转录(特别是在细菌宿主细胞中转录)的合适启动子的实例是从下述获得的启动子:大肠杆菌 lac 操纵子、天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) 琼脂糖酶基因 (dagA)、枯草芽孢杆菌果聚糖蔗糖酶基因 (sacB)、地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶基因 (amyL)、嗜热脂肪芽孢杆菌产麦芽淀粉酶基因 (amyM)、解淀粉芽孢杆菌 α -淀粉酶基因 (amyQ)、地衣芽孢杆菌青霉素酶基因 (penP)、枯草芽孢杆菌 xylA 和 xylB 基因和原核 β -内酰胺酶基因 (Villa-Kamaroff et al.,1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75:3727-3731),以及 tac 启动子 (DeBoer et al., 1983, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80:21-25)。另外的启动子在 "Useful proteins from recombinant bacteria" in Scientific American,1980, 242:74-94 中;和在 Sambrook et al.,1989,见上文中有所描述。

[0130] 用于指导本发明的核酸构建体在丝状真菌宿主细胞中转录的合适启动子的实例是从下列酶的基因获得的启动子:米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) TKA 淀粉酶、曼赫根毛霉 (*Rhizomucor miehei*) 天冬氨酸蛋白酶、黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 中性 α -淀粉酶、黑曲霉酸稳定性 α -淀粉酶、黑曲霉或泡盛曲霉 (*Aspergillus awamori*) 葡糖淀粉酶 (glaA)、曼赫根毛霉脂肪酶、米曲霉碱性蛋白酶、米曲霉丙糖磷酸异构酶、构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*) 乙酰胺酶、镰片镰孢 (*Fusarium venenatum*) 淀粉葡糖苷酶 (WO 00/56900)、镰片镰孢 Daria (WO 00/56900)、镰片镰孢 Quinn (WO 00/56900)、尖镰孢 (*Fusarium oxysporum*) 胰蛋白酶样蛋白酶 (WO 96/00787)、里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) β -葡糖苷酶、里氏木霉纤维二糖水解酶 I、里氏木霉内切葡聚糖酶 I、里氏木霉内切葡聚糖酶 II、里氏木霉内切葡聚糖酶 III、里氏木霉内切葡聚糖酶 IV、里氏木霉内切葡聚糖酶 V、里氏木霉木聚糖酶 I、里氏木霉木聚糖酶 II、里氏木霉 β -木糖苷酶,以及 NA2-tpi 启动子(来自黑曲霉中性

α -淀粉酶基因和米曲霉丙糖磷酸异构酶基因的启动子的杂合体);和它们的突变的、截断的和杂合的启动子。

[0131] 在酵母宿主中,有用的启动子从如下蛋白的基因获得:酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 烯醇化酶 (ENO-1)、酿酒酵母半乳糖激酶 (GAL1)、酿酒酵母醇脱氢酶 / 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (ADH1, ADH2/GAP)、酿酒酵母丙糖磷酸异构酶 (TPI)、酿酒酵母金属硫蛋白 (CUP1) 和酿酒酵母 3-磷酸甘油酸激酶。对于酵母宿主细胞其它有用的启动子由 Romanos et al., 1992, *Yeast* 8:423-488 描述。

[0132] 调控序列也可以是合适的转录终止子序列,即由宿主细胞识别以终止转录的序列。所述终止子序列与编码所述多肽的核苷酸序列的 3' 末端可操作地连接。可以将所选宿主细胞中有功能的任何终止子用在本发明中。

[0133] 对于丝状真菌宿主细胞优选的终止子从如下酶的基因获得:米曲霉 TAKA 淀粉酶、黑曲霉葡萄糖淀粉酶、构巢曲霉邻氨基苯甲酸合酶、黑曲霉 α -葡萄糖苷酶和尖镰孢胰蛋白酶样蛋白酶。

[0134] 对于酵母宿主细胞优选的终止子从如下酶的基因获得:酿酒酵母烯醇化酶、酿酒酵母细胞色素 C (CYC1) 和酿酒酵母甘油醛-3-磷酸脱氢酶。对于酵母宿主细胞其它有用的终止子由 Romanos et al., 1992, 见上文描述。

[0135] 调控序列还可以是合适的前导序列,其是对于宿主细胞的翻译重要的 mRNA 非翻译区。前导序列可操作地连接于编码多肽的核苷酸序列的 5'-末端。可以将所选宿主细胞中有功能的任何前导序列用在本发明中。

[0136] 对于丝状真菌宿主细胞优选的前导序列从如下酶的基因获得:米曲霉 TAKA 淀粉酶和构巢曲霉丙糖磷酸异构酶。

[0137] 对于酵母宿主细胞合适的前导序列从如下酶的基因获得:酿酒酵母烯醇化酶 (ENO-1)、酿酒酵母 3-磷酸甘油酸激酶、酿酒酵母 α 因子和酿酒酵母醇脱氢酶 / 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (ADH2/GAP)。

[0138] 调控序列也可以是聚腺苷酸化序列,其是与核苷酸序列的 3' 末端可操作地连接的序列,并且在转录时,宿主细胞将其识别为将聚腺苷残基添加至转录的 mRNA 的信号。可以将所选宿主细胞中有功能的任何聚腺苷酸化序列在本发明中使用。

[0139] 对于丝状真菌宿主细胞优选的聚腺苷酸化序列从如下酶的基因获得:米曲霉 TAKA 淀粉酶、黑曲霉葡萄糖淀粉酶、构巢曲霉邻氨基苯甲酸合酶、尖镰孢胰蛋白酶样蛋白酶和黑曲霉 α -葡萄糖苷酶。

[0140] 对于酵母宿主细胞有用的聚腺苷酸化序列由 Guo and Sherman, 1995, *Molecular Cellular Biology* 15:5983-5990 描述。

[0141] 调控序列还可以是信号肽编码区,其编码与多肽的氨基末端相联的氨基酸序列,并且指导编码的多肽进入细胞分泌途径。核苷酸序列的编码序列 5' 端可固有地包含信号肽编码区,其与编码分泌多肽的编码区片段一起天然地连接在翻译阅读框中。可供选择的是,编码序列 5' 端可含有对于所述编码序列异源的信号肽编码区。异源信号肽编码区在编码序列不天然地含有信号肽编码区时可能是必需的。或者,外源信号肽编码区可以简单地取代天然信号肽编码区以增强多肽的分泌。然而,指导表达的多肽进入所选宿主细胞的分泌途径的任何信号肽编码区可在本发明中使用。

[0142] 对于细菌宿主细胞有效的信号肽编码区是从如下酶的基因获得的信号肽编码区：芽孢杆菌属 NCIB 11837 产麦芽糖淀粉酶、嗜热脂肪芽孢杆菌 α -淀粉酶、地衣芽孢杆菌枯草溶菌素 (subtilisin)、地衣芽孢杆菌 β -内酰胺酶、嗜热脂肪芽孢杆菌中性蛋白酶 (nprT、nprS、nprM) 和枯草芽孢杆菌 prsA。另外的信号肽由 Simonen and Palva, 1993, Microbiological Reviews 57:109-137 描述。

[0143] 对于丝状真菌宿主细胞有效的信号肽编码区是从如下酶的基因获得的信号肽编码区：米曲霉 TAKA 淀粉酶、黑曲霉中性淀粉酶、黑曲霉葡萄糖淀粉酶、曼赫根毛霉天冬氨酸蛋白酶、特异腐质霉纤维素酶和疏棉状腐质霉脂肪酶。

[0144] 对于酵母宿主细胞有用的信号肽从酿酒酵母 α 因子和酿酒酵母转化酶的基因获得。其它有用的信号肽编码区由 Romanos et al., 1992, 见上文描述。

[0145] 调控序列还可以是前肽编码区, 其编码位于多肽氨基末端的氨基酸序列。所得多肽称为酶原 (proenzyme) 或前多肽 (propeptide) (或在某些情况下称为酶原 (zymogen))。前多肽通常是无活性的并且能够通过前肽的催化或自催化切割从前多肽转化成成熟活性多肽。可以从枯草芽孢杆菌碱性蛋白酶 (aprE)、枯草芽孢杆菌中性蛋白酶 (nprT)、酿酒酵母 α 因子、曼赫根毛霉天冬氨酸蛋白酶和嗜热毁丝霉漆酶 (WO 95/33836) 的基因获得前肽编码区。

[0146] 当信号肽和前肽区二者均出现在多肽的氨基末端时, 将前肽区置于紧接着 (next to) 多肽氨基末端, 并且将信号肽区置于紧接着前肽区的氨基末端。

[0147] 同样理想的是添加调节序列, 其允许相对于宿主细胞的生长来调节多肽的表达。调节系统的实例是响应化学或物理刺激物, 包括调节化合物的存在而引起基因表达开启或关闭的那些系统。原核系统中的调节系统包括 lac、tac 和 trp 操纵基因系统。在酵母中, 可以使用 ADH2 系统或 GAL1 系统。在丝状真菌中, 可以使用 TAKA α -淀粉酶启动子、黑曲霉葡萄糖淀粉酶启动子和米曲霉葡萄糖淀粉酶启动子作为调节序列。调节序列的其它实例是那些允许基因扩增的序列。在真核系统中, 这些序列包括在氨甲蝶呤 (methotrexate) 存在下扩增的二氢叶酸还原酶基因, 和以重金属 (with heavy metal) 扩增的金属硫蛋白基因。在这些情况下, 编码多肽的核苷酸序列将与调节序列可操作地连接。

[0148] 表达载体

[0149] 本发明还涉及重组表达载体, 所述重组表达载体包含本发明的多核苷酸、启动子和转录和翻译终止信号。上文所述的多种核酸和调控序列可以结合在一起以产生重组表达载体, 所述表达载体可以包括一个或多个方便的限制位点以允许在这些位点插入或取代编码多肽的核苷酸序列。可供选择的是, 可以通过在合适的用于表达的载体中插入包含所述序列的核苷酸序列或核酸构建体来表达本发明的核苷酸序列。在制备表达载体的过程中, 将编码序列置于载体中, 从而将该编码序列与合适的表达调控序列可操作地连接。

[0150] 重组表达载体可以是任何载体 (例如, 质粒或病毒), 其能够方便地进行重组 DNA 步骤, 并且能够产生核苷酸序列的表达。载体的选择将通常依赖于载体与将引入该载体的宿主细胞的相容性。载体可以是线状或闭合环状质粒。

[0151] 载体可以是自主复制载体, 即, 作为染色体外实体 (entity) 存在的载体, 其复制独立于染色体复制, 例如, 质粒、染色体外元件、微型染色体 (minichromosome) 或人工染色体。载体可以含有任何用于确保自复制的手段 (means)。或者, 载体可以是一种当被引入宿

主细胞中时,整合到基因组中并且与整合了该载体的染色体一起复制的载体。此外,可以使用单独的载体或质粒或两个或更多个载体或质粒,其共同含有待引入宿主细胞基因组的完整 DNA (total DNA),或可以使用转座子 (transposon)。

[0152] 本发明的载体优选地含有一个或多个选择性标记,其允许简单选择经转化的细胞。选择性标记是基因,其产物提供杀生物剂或病毒抗性、对重金属的抗性、对营养缺陷型的原养性 (prototrophy to auxotrophs) 等。

[0153] 条件性必需基因 (conditionally essential gene) 可以作为非抗生素选择性标记发挥作用。细菌条件性必需非抗生素选择性标记的非限制性实例是来自枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌或其它芽孢杆菌属 (Bacilli) 的 *dal* 基因,所述基因仅当在缺乏 D- 丙氨酸条件下培养细菌时是必需的。当将细胞在存在半乳糖的条件下培养或在引起半乳糖存在的培养基中培养时,编码 UDP- 半乳糖转换中涉及的酶的基因同样能够作为细胞中的条件性必需标记发挥功能。这些基因的非限定性实例是来自枯草芽孢杆菌或地衣芽孢杆菌的编码 UTP 依赖性磷酸化酶 (EC 2.7.7.10)、UDP- 葡萄糖依赖性尿苷酰转移酶 (UDP-glucose-dependent uridylyltransferase) (EC 2.7.7.12) 或 UDP- 半乳糖差向异构酶 (EC 5.1.3.2) 的那些基因。在木糖作为唯一碳源的基本培养基中培养的细胞中,木糖异构酶基因例如芽孢杆菌属的 *xylA* 同样能够用作选择性标记。在葡糖酸作为唯一碳源的基本培养基中培养的细胞中,对于利用葡糖酸必需的基因 *gntK* 和 *gntP* 也能够用作选择性标记。条件性必需基因的其它实例是本领域已知的。抗生素选择性标记赋予对抗生素如氨苄青霉素、卡那霉素、氯霉素、红霉素、四环素、新霉素、潮霉素或氨甲喋呤的抗生素抗性。

[0154] 对于酵母宿主细胞合适的标记是 *ADE2*、*HIS3*、*LEU2*、*LYS2*、*MET3*、*TRP1* 和 *URA3*。用于丝状真菌宿主细胞的选择性标记包括但不限于 *amdS* (乙酰胺酶)、*argB* (鸟氨酸氨甲酰基转移酶)、*bar* (草铵膦 (phosphinothricin) 乙酰转移酶)、*hph* (潮霉素磷酸转移酶)、*niaD* (硝酸还原酶) (nitrate reductase)、*pyrG* (乳清酸核苷-5'-磷酸脱羧酶) (orotidine-5'-phosphate decarboxylase)、*sC* (硫酸腺苷酰转移酶) 和 *trpC* (邻氨基苯甲酸合酶 (anthranilate synthase)) 以及它们的等价物。优选用在曲霉属细胞中的是构巢曲霉或米曲霉的 *amdS* 和 *pyrG* 基因和吸水链霉菌 (*Streptomyces hygroscopicus*) 的 *bar* 基因。

[0155] 本发明的载体优选含有元件,其允许载体整合入宿主细胞基因组或载体在细胞中独立于基因组的自主复制。

[0156] 为了整合入宿主细胞基因组,载体可依赖编码多肽的多核苷酸的序列或用于通过同源或非同源重组整合入基因组的任何其它载体元件。或者,载体可以含有额外的核苷酸序列,用于指导通过同源重组整合入宿主细胞基因组染色体中的精确位置。为了增加在精确位置整合的可能性,整合元件应该优选含有足够数量的核酸,如 100 至 10,000 碱基对,优选 400 至 10,000 碱基对,并且最优选 800 至 10,000 碱基对,其与相应的目标序列具有高度同一性以增强同源重组的概率。整合元件可以是任何序列,其与宿主细胞基因组中的目标序列同源。此外,整合元件可以是非编码或编码核苷酸序列。另一方面,可以将载体通过非同源重组整合到宿主细胞基因组中。

[0157] 为了自主复制,载体可以进一步包含复制起点,其使载体能够在所述的宿主细胞中自主地复制。复制起点可以是介导自主复制的任何质粒复制子 (replicator),其在细胞

中发挥功能。术语“复制起点”或“质粒复制子”在本文定义为能够使质粒或载体体内复制的核苷酸序列。

[0158] 细菌复制起点的实例是允许在大肠杆菌中复制的质粒 pBR322、pUC19、pACYC177 和 pACYC184 的复制起点,和允许在芽孢杆菌属中复制的质粒 pUB 110、pE194、pTA1060 和 pAM β 1 的复制起点。

[0159] 用于酵母宿主细胞中的复制起点的实例是 2 微米复制起点,ARS1,ARS4,ARS1 和 CEN3 的组合,和 ARS4 和 CEN6 的组合。

[0160] 在丝状真菌细胞中有用的复制起点的实例是 AMA1 和 ANS 1 (Gems et al.,1991, Gene 98:61-67;Cullen et al.,1987, Nucleic Acids Research 15:9163-9175;WO 00/24883)。分离 AMA1 基因和构建包含该基因的质粒或载体能够根据公开于 WO 00/24883 中的方法完成。

[0161] 可以将多于一个拷贝的本发明的多核苷酸插入宿主细胞以增加基因产物的产生。多核苷酸拷贝数的增加可通过如下方法获得:将至少一个额外拷贝的序列整合入宿主细胞基因组,或包括与可多核苷酸一起扩增的选择性标记基因,这样可通过在合适的选择剂 (selectable agent) 存在下培养细胞来选择含有选择性标记基因的扩增的拷贝的细胞,并由此选择多核苷酸的额外拷贝。

[0162] 用于连接上述元件以构建本发明重组表达载体的方法是本领域技术人员熟知的 (参见,例如,Sambrook et al.,1989,见上文)。

[0163] 宿主细胞

[0164] 本发明还涉及重组宿主细胞,所述重组宿主细胞包含本发明的多核苷酸,将其有利地用于多肽的重组产生中。将包含本发明多核苷酸的载体引入宿主细胞中,从而将该载体保留作为染色体整合体 (chromosomal integrant) 或作为前述的自复制的染色体外载体。术语“宿主细胞”包含亲本细胞的任何子代,其由于复制过程中发生的突变而与亲本细胞不相同。宿主细胞的选择将很大程度依赖于编码多肽的基因和它的来源。

[0165] 宿主细胞可以是单细胞微生物,例如,原核生物,或非单细胞微生物,例如,真核生物。

[0166] 有用的单细胞微生物是细菌细胞,例如革兰氏阳性细菌,包括但不限于芽孢杆菌属细胞,例如,嗜碱芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、短芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、克劳氏芽孢杆菌 (Bacillus clausii)、凝结芽孢杆菌、灿烂芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌;或链霉菌属细胞,例如,浅青紫链霉菌和鼠灰链霉菌,或革兰氏阴性细菌例如大肠杆菌和假单胞菌属菌种。在优选的方面,细菌宿主细胞是迟缓芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌或枯草芽孢杆菌细胞。在另外优选的方面,芽孢杆菌属细胞是嗜碱的芽孢杆菌属。

[0167] 可通过如下方法实现将载体引入到细菌宿主细胞:例如原生质体转化 (参见,例如,Chang and Cohen,1979,Molecular General Genetics 168:111-115),使用感受态细胞 (参见,例如,Young and Spizizen,1961,Journal of Bacteriology 81:823-829 或 Dubnau and Davidoff-Abelson,1971, Journal of Molecular Biology 56:209-221),电穿孔 (参见,例如,Shigekawa and Dower,1988, Biotechniques 6:742-751) 或接合 (参见,例如, Koehler and Thorne,1987, Journal of Bacteriology 169:5771-5278)。

[0168] 宿主细胞还可以是真核生物,例如哺乳动物、昆虫、植物或真菌细胞。

[0169] 在优选的方面,宿主细胞是真菌细胞。“真菌”用在本文包括以下门:子囊菌门 (Ascomycota)、担子菌门 (Basidiomycota)、壶菌门 (Chytridiomycota) 和接合菌门 (Zygomycota) (如由 Hawksworth et al., In, Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8th edition, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UK 所定义) 以及卵菌门 (Oomycota) (如 Hawksworth et al., 1995, 见上, 171 页中所引用), 和所有有丝分裂孢子真菌 (mitosporic fungi) (Hawksworth et al., 1995, 见上)。

[0170] 在更优选的方面,真菌宿主细胞是酵母细胞。“酵母”用在本文包括产子囊酵母 (ascosporogenous yeast) (内孢霉目 (Endomycetales))、产担子酵母 (basidiosporogenous yeast) 和属于半知菌类 (Fungi Imperfecti) (芽孢纲 (Blastomycetes)) 的酵母。由于酵母的分类在未来可能改变,就本发明而言,将酵母定义为如 Biology and Activities of Yeast (Skinner, F. A., Passmore, S. M., and Davenport, R. R., eds, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series No. 9, 1980) 中所述。

[0171] 在更加优选的方面,酵母宿主细胞是念珠菌属、汉逊酵母属 (Hansenula)、克鲁维酵母属、毕赤酵母属、酵母属、裂殖酵母属或西洋蓍霉属细胞。

[0172] 在最优选的方面,酵母宿主细胞是卡尔酵母、酿酒酵母、糖化酵母、道格拉氏酵母、克鲁弗酵母、诺地酵母或卵形酵母细胞。在另外最优选的方面,酵母宿主细胞是乳酸克鲁维酵母 (*Kluyveromyces lactis*) 细胞。在另外最优选的方面,酵母宿主细胞是 *Yarrowia lipolytica* 细胞。

[0173] 在另外更优选的方面,真菌宿主细胞是丝状真菌细胞。“丝状真菌”包括真菌门 (Eumycota) 和卵菌门的亚门 (如由 Hawksworth et al., 1995, 见上文, 所定义) 的所有丝状形式。丝状真菌通常的特征在于由壳多糖 (chitin)、纤维素、葡聚糖、壳聚糖 (chitosan)、甘露聚糖和其它复杂多糖组成的菌丝体壁。通过菌丝延伸进行营养生长,而碳分解代谢是专性需氧的。相反,酵母例如酿酒酵母的营养生长通过单细胞菌体的出芽生殖 (budding) 进行,而碳分解代谢可以是发酵的。

[0174] 在甚至更优选的方面,丝状真菌宿主细胞是枝顶孢霉属 (*Acremonium*)、曲霉属、短梗霉属 (*Aureobasidium*)、烟管霉属 (*Bjerkandera*)、*Ceriporiopsis*、鬼伞属 (*Coprinus*)、革盖菌属 (*Coriolus*)、隐球菌属 (*Cryptococcus*)、网孢菌属 (*Filobasidium*)、镰孢属 (*Fusarium*)、腐质霉属 (*Humicola*)、梨孢菌属 (*Magnaporthe*)、毛霉属 (*Mucor*)、毁丝霉属 (*Myceliophthora*)、新考玛脂霉属 (*Neocallimastix*)、脉孢菌属 (*Neurospora*)、拟青霉属 (*Paecilomyces*)、青霉属 (*Penicillium*)、平革菌属 (*Phanerochaete*)、射脉菌属 (*Phlebia*)、瘤胃壶菌属 (*Piromyces*)、侧耳属 (*Pleurotus*)、裂褶菌属 (*Schizophyllum*)、踝节菌属 (*Talaromyces*)、嗜热子囊菌属 (*Thermoascus*)、梭孢壳属 (*Thielavia*)、弯颈霉属 (*Tolypocladium*)、栓菌属 (*Trametes*) 或木霉属 (*Trichoderma*) 细胞。

[0175] 在最优选的方面,丝状真菌宿主细胞是泡盛曲霉、烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*)、臭曲霉 (*Aspergillus foetidus*)、日本曲霉 (*Aspergillus japonicus*)、构巢曲霉、黑曲霉或米曲霉细胞。在另外的最优选方面,丝状真菌宿主细胞是杆孢状镰孢 (*Fusarium bactridioides*)、禾谷镰孢 (*Fusarium cerealis*)、库威镰孢 (*Fusarium crookwellense*)、大刀镰孢 (*Fusarium culmorum*)、禾本科镰孢 (*Fusarium*

graminearum)、禾赤镰孢 (*Fusarium gramineum*)、异孢镰孢 (*Fusarium heterosporum*)、合欢木镰孢 (*Fusarium negundi*)、尖镰孢 (*Fusarium oxysporum*)、多枝镰孢 (*Fusarium reticulatum*)、粉红镰孢 (*Fusarium roseum*)、接骨木镰孢 (*Fusarium sambucinum*)、肤色镰孢 (*Fusarium sarcochromum*)、拟分枝孢镰孢 (*Fusarium sporotrichioides*)、硫色镰孢 (*Fusarium sulphureum*)、圆镰孢 (*Fusarium torulosum*)、拟丝孢镰孢 (*Fusarium trichothecioides*) 或镶片镰孢 (*Fusarium venenatum*) 细胞。在另外最优选的方面,丝状真菌宿主细胞是黑刺烟管菌 (*Bjerkandera adusta*)、*Ceriporiopsis aneirina*、*Ceriporiopsis aneirina*、*Ceriporiopsis caregiea*、*Ceriporiopsis gilvescens*、*Ceriporiopsis pannocinta*、*Ceriporiopsis rivulosa*、*Ceriporiopsis subrufa*、*Ceriporiopsis subvermispora*、灰盖鬼伞 (*Coprinus cinereus*)、毛革盖菌 (*Coriolus hirsutus*)、特异腐质霉、疏棉状腐质霉、米赫毛霉 (*Mucor miehei*)、嗜热毁丝霉 (*Myceliophthora thermophila*)、粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*)、产紫青霉 (*Penicillium purpurogenum*)、黄孢平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*)、辐射射脉菌 (*Phlebia radiata*)、*Pleurotus eryngii*、土生梭孢霉 (*Thielavia terrestris*)、绒毛栓菌 (*Trametes villosa*)、杂色栓菌 (*Trametes versicolor*)、哈茨木霉 (*Trichoderma harzianum*)、康宁木霉 (*Trichoderma koningii*)、长枝木霉 (*Trichoderma longibrachiatum*)、里氏木霉或绿色木霉 (*Trichoderma viride*) 菌株细胞。

[0176] 可以将真菌细胞通过涉及原生质体形成、原生质体转化和细胞壁重建的方法以本身公知的方式转化。用于转化曲霉属和木霉属宿主细胞的合适方法在 EP 238 023 和 Yelton et al., 1984, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81: 1470-1474 中描述。用于转化镰孢属菌种的合适方法由 Malardier et al., 1989, Gene 78: 147-156 和 WO 96/00787 描述。可以使用由如下文献描述的方法转化酵母: Becker and Guarente, In Abelson, J.N. and Simon, M.I., editors, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Volume 194, pp 182-187, Academic Press, Inc., New York; Ito et al., 1983, Journal of Bacteriology 153:163; 和 Hinnen et al., 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75:1920。

[0177] 产生方法

[0178] 本发明还涉及用于产生本发明多肽的方法,其包括:(a) 在有益于产生多肽的条件下培养细胞,所述细胞以其野生型形式能够产生所述多肽;和 (b) 回收所述多肽。优选地,所述细胞是曲霉属的细胞,并且更优选是米曲霉的细胞。

[0179] 本发明还涉及用于产生本发明的多肽的方法,其包括:(a) 在有益于产生多肽的条件下培养宿主细胞;和 (b) 回收所述多肽。

[0180] 本发明还涉及用于产生本发明的多肽的方法,其包括:(a) 在有益于产生多肽的条件下培养宿主细胞,其中所述宿主细胞包含突变核苷酸序列,其在 SEQ ID NO:1 的成熟多肽编码区中具有至少一个突变,其中所述突变核苷酸序列编码的多肽是 SEQ ID NO:2 的多肽所包含的脂肪酶或包含 SEQ ID NO:2 的多肽的脂肪酶,和 (b) 回收所述多肽。在优选的实施方案中,所述核苷酸序列编码的多肽是 SEQ ID NO:2 的多肽的成熟部分所包含的脂肪酶或包含 SEQ ID NO:2 的多肽的成熟部分的脂肪酶,和 (b) 回收所述多肽。

[0181] 在本发明的产生方法中,使用本领域熟知的方法在适合于产生所述多肽的营养培

培养基中培养细胞。例如,可以通过在合适培养基中和允许表达和 / 或分离所述多肽的条件下进行的摇瓶培养,和实验室或工业发酵罐中的小规模或大规模发酵(包括连续、分批、补料分批或固态发酵)来培养细胞。使用本领域已知的方法在合适的营养培养基中进行培养,所述营养培养基包含碳源和氮源和无机盐。合适的培养基能够从商业供应商获得或可以根据公布的成分制备(例如,在美国典型培养物保藏中心的目录中)。如果多肽分泌到营养培养基中,该多肽能够从所述培养基中直接回收。如果多肽不分泌,其能够从细胞裂解物(lysate)回收。

[0182] 可以使用本领域已知的对于所述多肽是特异性的方法来检测多肽。这些检测方法可包括特异性抗体的使用、酶产物的形成或酶底物的消失。例如,酶试验(enzyme assay)可用于测定如本文所述的多肽的活性。

[0183] 所得多肽可以使用本领域已知的方法回收。例如,多肽可以通过常规方法从营养培养基中回收,所述常规方法包括但不限于离心、过滤、提取、喷雾干燥、蒸发或沉淀。

[0184] 本发明的多肽可以通过多种本领域已知的方法纯化,所述方法包括但不限于层析(例如,离子交换、亲和、疏水、层析聚焦和大小排阻)、电泳方法(例如,制备型(preparative)等电聚焦)、差示溶解度(例如,硫酸铵沉淀)、SDS-PAGE 或提取(参见,例如,Protein Purification, J. -C. Janson and Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989)。

[0185] 组合物

[0186] 本发明还涉及包含本发明的多肽的组合物。优选地,所述组合物富含这种多肽。术语“富含”表示将所述组合物的脂肪酶活性增加,例如,以至少 1.1 的富集因数(enrichment factor)增加。

[0187] 所述组合物可以包含本发明的多肽作为主要酶成分,例如,单成分组合物。或者,所述组合物可以包含多种酶活性,例如氨肽酶、淀粉酶、糖酶、羧肽酶、过氧化氢酶、纤维素酶、几丁质酶、角质酶、环糊精糖基转移酶、脱氧核糖核酸酶、酯酶、 α -半乳糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、 α -葡糖苷酶、 β -葡糖苷酶、卤素过氧化酶、转化酶、漆酶、脂肪酶、甘露糖苷酶、氧化酶、果胶分解酶、肽谷氨酰胺酶(peptidoglutaminase)、过氧化物酶、肌醇六磷酸酶、多酚氧化酶、蛋白水解酶、核糖核酸酶、转谷氨酰胺酶或木聚糖酶。额外的酶可以通过例如属于以下属或种的微生物产生:曲霉属,优选棘孢曲霉(*Aspergillus aculeatus*)、泡盛曲霉、烟曲霉、臭曲霉、日本曲霉、构巢曲霉、黑曲霉或米曲霉;镰孢属,优选杆孢状镰孢、禾谷镰孢、库威镰孢、大刀镰孢、禾本科镰孢、禾赤镰孢、异孢镰孢、合欢木镰孢、尖镰孢、多枝镰孢、粉红镰孢、接骨木镰孢、肤色镰孢、硫色镰孢、圆镰孢、拟丝孢镰孢或镶片镰孢;腐质霉属,优选特异腐质霉或疏棉状腐质霉;或木霉属,优选哈茨木霉、康宁木霉、长枝木霉、里氏木霉或绿色木霉。

[0188] 可以依照本领域内已知的方法制备多肽组合物,并且可以是液体或干组合物的形式。例如,所述多肽组合物可以是颗粒(granulate)或微粒(microgranulate)的形式。可以将包括于所述组合物中的多肽依照本领域内已知方法稳定。

[0189] 以下提供的实施例是本发明多肽组合物的优选的用途。本发明的多肽组合物的剂量和使用该组合物的其它条件可以基于本领域内已知的方法确定。

[0190] 洗涤剂应用

[0191] 可以将本发明的酶添加至洗涤剂组合物,并且由此成为该洗涤剂组合物的成分。

[0192] 可以将本发明的洗涤剂组合物配制为例如手洗或机洗的洗涤剂组合物,包括适于预处理沾污织物的洗衣添加剂组合物和添加了漂洗剂的织物柔软剂组合物,或将其配制为用于通常家庭硬表面清理操作的洗涤剂组合物,或配制用于手洗或机洗的洗碟(dishwashing)操作。

[0193] 酶

[0194] 在具体的方面,本发明提供洗涤剂添加剂,其包含本发明的酶。所述洗涤剂添加剂以及洗涤剂组合物可以包含一种或多种其它酶,例如蛋白酶、脂肪酶、角质酶、淀粉酶、糖酶、纤维素酶、果胶酶、甘露聚糖酶、阿拉伯糖酶(arabinase)、半乳聚糖酶、木聚糖酶、氧化酶例如漆酶,和/或过氧化物酶。

[0195] 选择的酶的性质通常应该与选择的洗涤剂相容(即最适 pH,与其它酶和非酶成分的相容性等),并且所述酶应该以有效量存在。

[0196] 蛋白酶:

[0197] 合适的蛋白酶包括动物、植物或微生物来源的那些。微生物来源是优选的。包括化学修饰的或蛋白质工程化的突变体。所述蛋白酶可以是丝氨酸蛋白酶或金属蛋白酶,优选碱性微生物蛋白酶或胰蛋白酶样蛋白酶。碱性蛋白酶的实例是枯草蛋白酶(subtilisin),特别是源自芽孢杆菌属的那些,例如,枯草蛋白酶 Novo、枯草蛋白酶 Carlsberg、枯草蛋白酶 309、枯草蛋白酶 147 和枯草蛋白酶 168(在 WO 89/06279 中描述)。胰蛋白酶样蛋白酶的实例是胰蛋白酶(例如,猪或牛来源)和镰孢属蛋白酶,在 WO 89/06270 和 WO 94/25583 中描述。

[0198] 有用的蛋白酶的实例是在 WO 92/19729、WO 98/20115、WO 98/20116 和 WO 98/34946 中描述的变体,特别是在以下位置中的一个或多个具有取代的变体:27、36、57、68、76、87、97、101、104、106、120、123、167、170、194、206、218、222、224、235、245、252 和 274,和具有以下突变的其它变体中的变体:(K27R, V104Y, N123S, T124A)、(N76D, S103A, V104I) 或 (S101G, S103A, V104I, G159D, A232V, Q236H, Q245R, N248D, N252K)。

[0199] 优选的商业上能够获得的蛋白酶包括 Alcalase™、Savinase™、Primase™、Duralase™、Esperase™、Coronase™、Polarzyme™ 和 Kannase™(Novozymes A/S), Maxatase™、Maxacal™、Maxapem™、Properase™、Purafect™、PurafectPrime™、Purafect Oxp™、FN2、FN3 和 FN4(Genencor International Inc.)。

[0200] 脂肪酶:

[0201] 脂肪酶包括细菌或真菌来源的那些。包括化学修饰的或蛋白质工程化的突变体。有用的脂肪酶的实例包括:源自腐质霉属(同物异名嗜热霉属)的脂肪酶,例如,如 EP 258 068 和 EP 305 216 中所述来自疏棉状腐质霉(同物异名细毛嗜热霉),或如 WO 96/13580 中所述来自特异腐质霉;假单胞菌属脂肪酶,例如源自产碱假单胞菌(*P. alcaligenes*)或类产碱假单胞菌(*P. pseudoalcaligenes*)(EP 218272)、洋葱假单胞菌(*P. cepacia*)(EP 331376)、施氏假单胞菌(*P. stutzeri*)(GB 1,372,034)、荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)、假单胞菌属菌种菌株 SD 705(WO 95/06720 和 WO 96/27002)、威斯康星假单胞菌(*P. wisconsinensis*)(W096/12012);芽孢杆菌属脂肪酶,例如,源自枯草芽孢杆菌(Dartois et al. (1993), Biochemica et Biophysica Acta, 1131, 253-360)、嗜热脂肪

芽孢杆菌 (JP64/744992) 或短小芽孢杆菌 (*B. pumilus*) (WO 91/16422)。

[0202] 其它实例是脂肪酶变体,例如在 WO 92/05249、WO 94/01541、EP 407225、EP 260105、WO 95/35381、WO 96/00292、WO 95/30744、WO 94/25578、WO 95/14783、WO 95/22615、WO 97/04079 和 WO 97/07202 中描述的那些。

[0203] 其它商业上能够获得的脂肪酶包括 Lipolase[™]、Lipolase Ultra[™] 和 Lipex[™](Novozymes A/S)。

[0204] 优选的脂肪酶是本发明的脂肪酶。

[0205] 淀粉酶:

[0206] 合适的淀粉酶(α 和 / 或 β) 包括细菌和真菌来源的那些。包括化学修饰的或蛋白质工程化的突变体。淀粉酶包括例如从芽孢杆菌属,例如地衣芽孢杆菌的特殊菌株获得的 α -淀粉酶,在 GB 1,296,839 中有更详细的描述。

[0207] 有用的淀粉酶的实例是在 WO 94/02597、WO 94/18314、WO 96/23873 和 WO 97/43424 中描述的变体,特别在以下位置中的一个或多个具有取代的变体:15、23、105、106、124、128、133、154、156、181、188、190、197、202、208、209、243、264、304、305、391、408 和 444。

[0208] 商业上能够获得的淀粉酶是 Duramyl[™]、Termamyl[™]、Stainzyme[™]、Stainzyme Ultra[™]、Fungamyl[™] 和 BAN[™](Novozymes A/S), Rapidase[™] 和 Purastar[™](来自 Genencor International Inc.)。

[0209] 纤维素酶:

[0210] 合适的纤维素酶包括细菌或真菌来源的那些。包括化学修饰或蛋白质工程化的突变体。合适的纤维素酶包括来自芽孢杆菌属、假单胞菌属、腐质霉属、镰孢属、梭孢壳属、枝顶孢霉属的纤维素酶,例如,产生自特异腐质霉、嗜热毁丝霉和尖镰孢的真菌纤维素酶,其公开于 US 4,435,307、US 5,648,263、US 5,691,178、US 5,776,757 和 WO 89/09259。

[0211] 特别合适的纤维素酶是碱性或中性纤维素酶,其具有保护颜色的效益(colour care benefits)。这种纤维素酶的实例是在 EP 0 495 257、EP 0 531 372、WO 96/11262、WO 96/29397、WO 98/08940 中描述的纤维素酶。其它实例是纤维素酶变体,例如在 WO 94/07998、EP 0 531 315、US 5,457,046、US 5,686,593、US 5,763,254、WO 95/24471、WO 98/12307 和 PCT/DK98/00299 中描述的那些。

[0212] 商业上能够获得的纤维素酶包括 Renozyme[™]、Celluzyme[™] 和 Carezyme[™](Novozymes A/S), Clazinase[™] 和 Puradax HA[™](Genencor International Inc.), 以及 KAC-500(B)[™](Kao Corporation)。

[0213] 过氧化物酶 / 氧化酶:

[0214] 合适的过氧化物酶 / 氧化酶包括植物、细菌或真菌来源的那些。包括化学修饰或蛋白质工程化的突变体。有用的过氧化物酶的实例包括来自鬼伞属例如来自灰盖鬼伞的过氧化物酶,及其变体,如在 WO 93/24618、WO 95/10602 和 WO 98/15257 中描述的那些。

[0215] 商业上能够获得的过氧化物酶包括 Guardzyme[™](Novozymes A/S)。

[0216] 洗涤剂

[0217] 通过添加含有一种或多种酶的单独的添加剂,或通过添加包含所有这些酶的组合添加剂,可将洗涤剂酶包括在洗涤剂组合物中。可将本发明的洗涤剂添加剂,即单独的添加

剂或组合的添加剂,配制成例如,颗粒、液体、浆等。优选的洗涤剂添加剂剂型是颗粒,特别是无粉尘(non-dusting)颗粒,液体,特别是稳定的液体,或浆。

[0218] 例如,可以如 US 4,106,991 和 4,661,452 中所公开的产生无粉尘颗粒,并且可以任选地通过本领域已知的方法包覆。蜡制包覆材料(waxy coating material)的实例是具有 1000 至 20000 的平均摩尔量的聚(环氧乙烷)产品(聚乙二醇,PEG);具有 16 至 50 个的环氧乙烷单元的乙氧基化壬基酚;乙氧基化脂肪醇,其中醇含有 12 至 20 个碳原子,并且其中存在 15 至 80 个环氧乙烷单元;脂肪醇;脂肪酸;和脂肪酸的单酸甘油酯和甘油二酯和甘油三酯。适合于流化床技术应用的成膜包覆材料的实例提供于 GB 1483591。例如,可以根据已经建立的方法通过添加多元醇例如丙二醇、糖或糖醇、乳酸或硼酸来稳定液体酶制剂。可以根据公开于 EP 238,216 中的方法来制备保护酶(protected enzyme)。

[0219] 本发明的洗涤剂组合物可以是任何方便的形式,例如,条、片剂、粉剂、颗粒、糊剂或液体。液体洗涤剂可以是含水的,通常含有多至 70% 的水和 0-30% 的有机溶剂,或非水的(non-aqueous)。

[0220] 洗涤剂组合物包含一种或多种表面活性剂,其可以是非离子的,包括半极性的和/或阴离子的和/或阳离子的和/或两性离子的。所述表面活性剂通常以按重量计 0% 至 60% 的水平存在。

[0221] 当包括于本文中时,所述洗涤剂将通常含有大约 0% 至大约 40% 的阴离子表面活性剂,例如线性烷基苯磺酸盐、 α -烯烃磺酸盐(olefinsulfonate)、烷基硫酸盐(脂肪醇硫酸酯)、醇乙氧基硫酸盐(alcohol ethoxysulfate)、仲链烷磺酸盐(secondary alkanesulfonate)、 α -磺基脂肪酸甲酯、烷基-或烯基琥珀酸或肥皂(soap)。

[0222] 当包括在本文中时,洗涤剂将通常含有大约 0% 至大约 40% 的非离子表面活性剂,例如醇乙氧基化物、壬基苯酚乙氧基化物、烷基聚糖苷(alkylpolyglycoside)、烷基二甲基氧化胺(alkyldimethylamineoxide)、乙氧基化脂肪酸单乙醇酰胺(ethoxylated fatty acid monoethanolamide)、脂肪酸单乙醇酰胺、多羟基烷基脂肪酸酰胺或葡糖胺的 N-酰基 N-烷基衍生物(“葡糖酰胺(glucamide)”)。

[0223] 洗涤剂可以含有 0-65% 的洗涤剂增效剂或复合剂例如沸石、二磷酸盐、三磷酸盐、膦酸盐(phosphonate)、碳酸盐(carbonate)、柠檬酸盐、氮川三乙酸(nitrilotriacetic acid)、乙二胺四乙酸、二亚乙基三胺五乙酸、烷基-或烯基琥珀酸、可溶硅酸盐或分层硅酸盐(例如来自 Hoechst 的 SKS-6)。

[0224] 洗涤剂可包含一种或多种聚合物。实例是羧甲基纤维素、聚(乙烯基吡咯烷酮)、聚(乙二醇)、聚(乙烯醇)、聚(乙烯吡啶-N-氧化物)、聚(乙烯咪唑)、聚羧酸酯(polycarboxylates)例如聚丙烯酸酯(polyacrylates)、马来酸/丙烯酸共聚物和甲基丙烯酸月桂酯/丙烯酸共聚物。

[0225] 洗涤剂可以含有漂白体系,其可以包含 H_2O_2 源例如过硼酸盐或过碳酸盐,其可以与形成过酸的漂白激活剂例如四乙酰乙二胺或壬酰氧苯磺酸盐(nonanoyloxybenzenesulfonate)组合。或者,漂白体系可以包含例如,酰胺、二酰亚胺(imide)或砜类型的过氧酸。

[0226] 本发明的洗涤剂组合物的酶可以使用常规稳定剂来稳定,例如,多元醇例如丙二醇或甘油、糖或糖醇、乳酸、硼酸或硼酸衍生物,例如,芳香硼酸酯,或苯基硼酸(phenyl

boronic acid) 衍生物例如 4- 甲酰苯基硼酸 (4-formylphenylboronic acid), 并且可以例如 WO 92/19709 和 WO 92/19708 中所述配制所述组合物。

[0227] 洗涤剂还可以含有其它常规洗涤剂成分, 例如, 织物整理剂 (fabricconditioner) 包括粘土、泡沫促进剂、抑泡剂、防腐蚀剂、悬污剂、防污再沉积剂、染料、杀菌剂、光亮剂 (optical brightener)、水溶助剂 (hydrotrope)、晦暗抑制剂 (tamish inhibitors) 或香料。

[0228] 目前期望的是, 在洗涤剂组合物中的任何酶, 特别是本发明的酶, 可以按相当于每升洗涤液 0.001-100mg 酶蛋白, 例如 0.01-50mg 或 0.03-30mg 酶蛋白, 优选每升洗涤液 0.05-5mg 酶蛋白, 特别是每升洗涤液 0.1-1mg 酶蛋白的量添加。

[0229] 本发明的酶可以额外地并入公开于 WO 97/07202、WO 04/041979、W004/074419 的洗涤剂配制物, 将这些文献作为参考文献并入本文。

[0230] 用途

[0231] 本发明还针对使用具有脂肪酶活性的多肽的方法。

[0232] 可以根据现有技术类推将本发明的变体用于已知的脂肪分解酶应用中, 例如:

[0233] 可以将具有脂肪酶活性的变体用于纸浆和造纸工业中, 以从使用过的纸去除树脂 (pitch) 或去除墨水。WO 9213130、WO 9207138、JP 2160984A、EP374700。

[0234] 可以将具有磷脂酶和 / 或半乳糖脂肪酶活性的变体用于制备生面团、面包和蛋糕, 例如, 用于增加生面团稳定性和生面团的操作性质, 或者用于改进面包或蛋糕的弹性 (elasticity)。WO 94/04035、WO 00/32758。

[0235] 可以将具有磷脂酶活性的变体用于减少食用油中磷脂含量的方法。US5,264,367 (Metallgesellschaft, **Röhm**); K.Dahlke & H.Buchold, INFORM, 6(12), 1284-91 (1995); H.Buchold, Fat Sci. Technol., 95(8), 300-304 (1993); JP-A2-153997 (Showa Sangyo); 或 EP 654,527 (Metallgesellschaft, **Röhm**)。

[0236] 可以将具有溶血磷脂酶活性的变体用于改进碳水化合物来源的浆料或水溶液的滤过性, 例如淀粉水解产物, 特别是小麦淀粉水解产物的滤过性。EP219,269。

[0237] 可以将具有磷脂酶活性的变体用来制备溶血磷脂, 例如用于生产蛋黄酱 (EP 628256、EP 398666 或 EP 319064) 的溶血卵磷脂 (EP 870840、JP-A 10-42884、JP-A 4-135456 或 JP-A 2-49593)。

[0238] 还可以将具有磷脂酶活性的变体用于乳制品和其它食品的加工中, 例如, 如 EP 567,662 (Nestlé)、EP 426,211 (Unilever)、EP 166,284 (Nestlé)、JP-A57-189638 (Yakult) 或 US 4,119,564 (Unilever) 中所述。

[0239] 可以将具有磷脂酶活性的变体使用在皮革工业中。GB 2233665、EP505920。

[0240] 可以在整理织物期间将具有脂肪酶活性的变体用于去除含有疏水酯 (例如甘油三酯) 的脂肪物质。WO 93/13256。

[0241] 通过以下实施例进一步对本发明进行描述, 但不应将其理解为对本发明范围的限制。

[0242] 实施例

[0243] 用作缓冲剂和底物的化学品是至少试剂等级的商业产品。

[0244] 培养基和溶液

- [0245] 产品 商品名称
- [0246] LAS : Surfac PS
- [0247] 沸石 A Wessalith P
- [0248] 材料
- [0249] 产品 供应商
- [0250] EMPA221 EMPA St.Gallen, Lerchfeldstrasse 5, CH-9014 St.Gallen, Switzerland
- [0251] 实施例 1
- [0252] 酶的产生
- [0253] 使用本领域的标准方法构建含有编码脂肪酶的基因的质粒,并且转化至合适的宿主细胞中。
- [0254] 使用温度为 34C 的恒定培养基和 1.2 升的起始体积,按照补料分批发酵来进行发酵。将培养基的初始 pH 设为 6.5。一旦 pH 增加至 7.0,通过添加 10% H_3PO_4 来保持该值。通过改变搅拌速率和使用 1.0 升空气每升培养基每分钟的固定通气速率来控制培养基中的溶解氧水平。在整个补料分批阶段过程中,将补料添加速率保持在恒定水平。
- [0255] 分批培养基含有麦芽糖糖浆作为碳源,尿素和酵母提取物作为氮源,以及痕量金属和盐的混合物。在补料分批阶段期间连续添加的补料含有麦芽糖糖浆作为碳源,而添加酵母提取物和尿素以确保氮的充足供应。
- [0256] 可以通过使用本领域已知的标准方法来进行脂肪酶的纯化,例如通过过滤发酵上清,继之以疏水层析和离子交换层析,例如如 EP 0 851 913 EP,实施例 3 中所述。
- [0257] 实施例 2
- [0258] AMSA- 自动化机械应力试验 - 用于计算 RP
- [0259] 使用自动机械应力试验 (Automatic Mechanical Stress Assay ;AMSA) 测试本申请的酶变体。使用 AMSA 测试,能够检查大量小体积酶洗涤剂溶液的洗涤性能。AMSA 平板具有用于测试溶液的多个槽 (slot),和将待洗涤的纺织品样品相对于所有槽的开口 (slot opening) 压紧的盖。在洗涤时间中,剧烈摇动平板、测试溶液、纺织品和盖以使测试溶液与纺织品接触并且施以机械应力。进一步的描述参见 WO 02/42740,特别是第 23-24 页的段落“特殊方法实施方式”。含有洗涤剂测试溶液的容器由金属平板中的圆柱形孔洞 (直径 6mm, 深 10mm) 组成。沾污的织物 (测试材料) 放置在金属平板顶部,并将沾污的织物用作盖子密封在所述容器上。另一个金属平板放置在沾污织物的顶部以避免从各个容器中的任何溢出。以 2mm 振幅和 30Hz 的频率将两块金属平板连同沾污织物上下振动。
- [0260] 在下文指定的实验条件下进行所述试验 :
- [0261]

测试溶液	0.5g/l LAS 0.52g/lNa ₂ CO ₃ 1.07g/l 沸石 A 0.52g/l 柠檬酸钠 (Na3Citrate)
测试溶液体积	160 微升
pH	不予改变 (as is) (≈ 9.9)
洗涤时间	20 分钟
温度	30℃
水硬度	15° dH Ca ²⁺ /Mg ²⁺ /NaHCO ₃ 比例 :4 : 1 : 7.5
测试溶液中的酶浓度	0.125, 0.25, 0.50, 1.0mg ep/l
干燥	洗涤性能 :在洗涤之后,立即在自来水中冲洗纺织品片,并且在 85℃ 风干 5 分钟 气味 :洗涤之后,立即在自来水中冲洗纺织品片,并且在室温 (20℃) 干燥 2 小时
测试材料	如下所述的奶油姜黄 (cream turmeric) 样品 (使用 EMPA221 作为棉布纺织品)

[0262] 表 1

[0263] 通过将 5g 姜黄 (Santa Maria, Denmark) 与 100g 奶油 (38% 脂肪, Arla, Denmark) 在 50℃ 混合来制备奶油 - 姜黄样品, 将所述混合物在该温度保持大约 20 分钟, 并且过滤 (50℃) 以去除任何未溶解的颗粒。将混合物冷却至 20℃, 并且将编织的棉布样品 EMPA221 浸入所述奶油 - 姜黄混合物, 之后允许其在室温干燥过夜, 并且冷冻直到使用。奶油 - 姜黄样品的制备在专利 W02006/125437 中公开。

[0264] 将酶变体的性能作为用特定酶变体洗涤的纺织品样品的颜色亮度来测量。也可以将亮度表示为当用白光照射时, 从纺织品样品反射的光的强度。当纺织品被沾污时, 反射光的强度与清洁纺织品的反射光强度相比较低。因此, 能够使用反射光的强度来测量酶变体的洗涤性能。

[0265] 使用专业平板扫描仪 (PFU DL2400pro) 进行颜色测量, 使用该扫描仪来捕捉经洗涤纺织品样品的图像。使用 200dpi 的分辨率和 24 比特 (bit) 的输出色深度来进行扫描。为了获得精确的结果, 经常性地使用 Kodak 反射 IT8 指标校准扫描仪。

[0266] 为了从扫描的图像提取光强度的值, 使用特殊设计的软件应用程序 (Novozymes

Color Vector Analyzer)。该程序从所述图像恢复 24 比特像素值,并且将它们转化为红、绿和蓝的值 (RGB)。通过将 RGB 值加在一起作为矢量,再取所得矢量的长度来计算强度值 (Int) :

$$[0267] \quad Int = \sqrt{r^2 + g^2 + b^2}$$

[0268] 根据下式计算变体的洗涤性能 (P) :

$$[0269] \quad P = Int(v) - Int(r)$$

[0270] 其中

[0271] Int(v) 是用酶洗涤的纺织品表面的光强度值,和

[0272] Int(r) 是不用酶洗涤的纺织品表面的光强度值。

[0273] 根据以下定义,给出相对性能评分作为 AMSA 洗涤的结果 :

[0274] 相对性能评分 (RP) 概括了测试酶变体的性能 (P) 相对于参照酶 :

$$[0275] \quad RP = P(\text{测试酶}) / P(\text{参照酶})$$

[0276] RPavg 表示在全部三种酶浓度 (0.125、0.25、0.5、1.0mg ep/l) 时,与参照酶相比的平均相对性能。

$$[0277] \quad RPavg = \text{avg}(RP(0.125), RP(0.25), RP(0.5), RP(1.0))$$

[0278] 如果变体表现优于参照,则认为变体呈现出改进的洗涤性能。

[0279] 在本发明的上下文中,参照酶是具有取代 T231R+N233R 的 SEQ ID NO:2 的成熟部分。

[0280] 实施例 3

[0281] GC- 气相层析 - 用于计算风险因子

[0282] 使用以下方法通过 Solid Phase Micro Extraction Gas Chromatography (SPME-GC) 测量来自经脂肪酶洗涤的样品的丁酸释放。将在含有 1mg/L 脂肪酶的表 1 中指定溶液中洗涤的四个纺织品片 (直径 5mm) 转移至气相层析 (GC) 瓶。在装备有 Stabilwax-DA w/Integra-Guard 柱 (30m, 0.32mm ID 和 0.25 微米 df) 和 Carboxen PDMS SPME 纤维 (75 微米) 的 Varian 3800GC 上分析样品。将各个样品在 40℃ 预温育 10 分钟,接着用 SPME 纤维在纺织品片之上的顶部空间 (head space) 进行 20 分钟采样。继而将样品注射到柱上 (注射器温度 = 250℃)。柱流速 = 2ml 氦 / 分钟。柱加热炉温度梯度: 0 分钟 = 40℃, 2 分钟 = 40℃, 22 分钟 = 240℃, 32 分钟 = 240℃。由 FID 检测法检测出丁酸,并且基于丁酸标准曲线来计算丁酸量。

[0283] 脂肪酶变体的风险性能气味 (Risk Performance Odour) R 是:经脂肪酶变体洗涤的样品释放的丁酸量和使用 SEQ ID NO:2 的脂肪酶成熟部分洗涤的样品释放的丁酸量之间的比例,在计算比例之前将这两个值根据无脂肪酶洗涤的样品释放的丁酸量进行修正。根据下式计算变体的风险 (R) :

[0284] 气味 = 以相对于空白校正的在 1mg 酶蛋白 / 升产生的微克丁酸测量

$$[0285] \quad \text{Alpha}_{\text{测试酶}} = \text{气味}_{\text{测试酶}} - \text{空白}$$

$$[0286] \quad \text{Alpha}_{\text{参照酶}} = \text{气味}_{\text{参照酶}} - \text{空白}$$

$$[0287] \quad R = \text{Alpha}_{\text{测试酶}} / \text{Alpha}_{\text{参照酶}}$$

[0288] 如果 R 因子小于 1,则认为变体与参照相比表现出减少的气味。

[0289] 实施例 4

[0290] 相对于 280nm 吸光度的活性 (LU)

[0291] 通过以下试验来测定相对于 280nm 吸光度的脂肪酶活性：

[0292] LU/A_{280} ；

[0293] 通过使用阿拉伯胶作为乳化剂乳化三丁酸甘油酯（甘油三丁酸酯）来制备用于脂肪酶的底物。在 pH 7 或 9 在 30℃ 水解三丁酸甘油酯，之后进行 pH 恒定的滴定实验。1 单位的脂肪酶活性 (1LU) 等于在 pH 7 能够释放 1 微摩尔丁酸 / 分钟的酶量。

[0294] 测量纯化的脂肪酶在 280nm 的吸光度 (A_{280})，并且计算比例 LU/A_{280} 。用变体的 LU/A_{280} 除以参照酶的 LU/A_{280} 来计算相对 LU/A_{280} 。在本发明的上下文中，参照酶是具有突变 T231R 和 N233R 的 SEQ ID NO :2 的成熟部分。

[0295] 实施例 5

[0296] BR- 效益风险

[0297] 效益风险因子描述的是与减少的气味风险相比的性能，因此将效益风险定义为：

[0298] $BR = RP_{avg}/R$

[0299] 如果 BR 因子高于 1，则认为变体显示出改进的洗涤性能和减少的气味。

[0300] 应用以上方法获得了以下结果：

[0301]

变体	在 SEQ ID NO :2 的多肽的成熟部分中的突变	RP	BR	LU/A_{280}
1	I202G+T231R+N233R	0.84	1.41	未测定
2	I86V+L227G+T231R+N233R+P256K	1.08	1.52	1700
3	Q4V+S58N+V60S+T231R+N233R	0.87	1.73	1950
4	S58N+V60S+I90R+T231R, N233R	1.06	1.27	2250
5	I255Y+T231R+N233R	1.19	1.17	3600
6	I90A+T231R+N233R+I255V	1.13	1.14	2700
参照	T231R+N233R	1.00	1.00	3650
7	G91A+E99K+T231R+N233R+Q249R+ 270H+271T+272P+273S+274S+275G+ 276R+277G+278G+279H+280R	0.43	未测定	850
8	G91A+E99K+T231R, N233R+Q249R+ 270H+271T+272P+273S+274S+275G+ 276R+277G+278G	0.13	未测定	500

[0302] 表 2

[0303] 表 2 中的参照脂肪酶和变体 7 和 8 在 WO 2000/060063 中描述。

[0304] 本文所描述和要求保护的本发明其范围不限于本文公开的具体方面,因为这些方面旨在说明本发明的几个方面。任何等同的方面意欲在本发明的范围之内。实际上,根据前文的描述,除本文显示和描述的内容之外对本发明的各种修饰对于本领域技术人员将是显而易见的。这些修饰也意欲落入所附权利要求的范围之内。如有冲突,以包括定义的本公开为准。

[0305] 本文引用了多篇参考文件,通过引用以它们的完整形式并入这些参考文件的内容。

[0001]	序列表	
[0002]	<110> 诺维信公司 (Novozymes A/S)	
[0003]	诺维信股份有限公司 (Novozymes Inc.)	
[0004]	<120> 具有脂肪酶活性的多肽和编码该多肽的多核苷酸	
[0005]	<130>10927. 204-W0	
[0006]	<160>18	
[0007]	<170>PatentIn version 3.4	
[0008]	<210>1	
[0009]	<211>873	
[0010]	<212>DNA	
[0011]	<213> 细毛嗜热霉 (Thermomyces lanuginosus)	
[0012]	<220>	
[0013]	<221>CDS	
[0014]	<222>(1).. (873)	
[0015]	<220>	
[0016]	<221> 信号肽	
[0017]	<222>(1).. (51)	
[0018]	<220>	
[0019]	<221> 前肽	
[0020]	<222>(52).. (66)	
[0021]	<220>	
[0022]	<221> 成熟肽	
[0023]	<222>(67).. ()	
[0024]	<400>1	
[0025]	atg agg agc tcc ctt gtg ctg ttc ttt gtc tct gcg tgg acg gcc ttg	48
[0026]	Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu	
[0027]	-20 -15 -10	
[0028]	gcc agt cct att cgt cga gag gtc tcg cag gat ctg ttt aac cag ttc	96
[0029]	Ala Ser Pro Ile Arg Arg Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe	
[0030]	-5 -1 1 5 10	
[0031]	aat ctc ttt gca cag tat tct gca gcc gca tac tgc gga aaa aac aat	144
[0032]	Asn Leu Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn	
[0033]	15 20 25	
[0034]	gat gcc cca gct ggt aca aac att acg tgc acg gga aat gcc tgc ccc	192
[0035]	Asp Ala Pro Ala Gly Thr Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro	
[0036]	30 35 40	
[0037]	gag gta gag aag gcg gat gca acg ttt ctc tac tcg ttt gaa gac tct	240
[0038]	Glu Val Glu Lys Ala Asp Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser	

[0039]	45	50	55	
[0040]	gga gtg ggc gat gtc acc ggc ttc ctt gct ctc gac aac acg aac aaa	288		
[0041]	Gly Val Gly Asp Val Thr Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys			
[0042]	60	65	70	
[0043]	ttg atc gtc ctc tct ttc cgt ggc tct cgt tcc ata gag aac tgg atc	336		
[0044]	Leu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile			
[0045]	75	80	85	90
[0046]	ggg aat ctt aac ttc gac ttg aaa gaa ata aat gac att tgc tcc ggc	384		
[0047]	Gly Asn Leu Asn Phe Asp Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly			
[0048]	95	100	105	
[0049]	tgc agg gga cat gac ggc ttc act tcg tcc tgg agg tct gta gcc gat	432		
[0050]	Cys Arg Gly His Asp Gly Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp			
[0051]	110	115	120	
[0052]	acg tta agg cag aag gtg gag gat gct gtg agg gag cat ccc gac tat	480		
[0053]	Thr Leu Arg Gln Lys Val Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr			
[0054]	125	130	135	
[0055]	cgc gtg gtg ttt acc gga cat agc ttg ggt ggt gca ttg gca act gtt	528		
[0056]	Arg Val Val Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val			
[0057]	140	145	150	
[0058]	gcc gga gca gac ctg cgt gga aat ggg tat gat atc gac gtg ttt tca	576		
[0059]	Ala Gly Ala Asp Leu Arg Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser			
[0060]	155	160	165	170
[0061]	tat ggc gcc ccc cga gtc gga aac agg gct ttt gca gaa ttc ctg acc	624		
[0062]	Tyr Gly Ala Pro Arg Val Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr			
[0063]	175	180	185	
[0064]	gta cag acc ggc gga aca ctc tac cgc att acc cac acc aat gat att	672		
[0065]	Val Gln Thr Gly Gly Thr Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile			
[0066]	190	195	200	
[0067]	gtc cct aga ctc ccg ccg cgc gaa ttc ggt tac agc cat tct agc cca	720		
[0068]	Val Pro Arg Leu Pro Pro Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro			
[0069]	205	210	215	
[0070]	gag tac tgg atc aaa tct gga acc ctt gtc ccc gtc acc cga aac gat	768		
[0071]	Glu Tyr Trp Ile Lys Ser Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Arg Asn Asp			
[0072]	220	225	230	
[0073]	atc gtg aag ara gaa ggc atc gat gcc acc ggc ggc aat aac cag cct	816		
[0074]	Ile Val Lys Ile Glu Gly Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro			
[0075]	235	240	245	250
[0076]	aac att ccg gat atc cct gcg cac cta tgg tac ttc ggg tta att ggg	864		
[0077]	Asn Ile Pro Asp Ile Pro Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly			

[0078]		255	260	265	
[0079]	aca tgt ctt				873
[0080]	Thr Cys Leu				
[0081]	<210>2				
[0082]	<211>291				
[0083]	<212>PRT				
[0084]	<213> 细毛嗜热霉 (Thermomyces lanuginosus)				
[0085]	<400>2				
[0086]	Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu				
[0087]	-20	-15	-10		
[0088]	Ala Ser Pro Ile Arg Arg Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe				
[0089]	-5	-1 1	5	10	
[0090]	Asn Leu Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn				
[0091]	15	20	25		
[0092]	Asp Ala Pro Ala Gly Thr Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro				
[0093]	30	35	40		
[0094]	Glu Val Glu Lys Ala Asp Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser				
[0095]	45	50	55		
[0096]	Gly Val Gly Asp Val Thr Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys				
[0097]	60	65	70		
[0098]	Leu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile				
[0099]	75	80	85	90	
[0100]	Gly Asn Leu Asn Phe Asp Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly				
[0101]	95	100	105		
[0102]	Cys Arg Gly His Asp Gly Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp				
[0103]	110	115	120		
[0104]	Thr Leu Arg Gln Lys Val Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr				
[0105]	125	130	135		
[0106]	Arg Val Val Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val				
[0107]	140	145	150		
[0108]	Al a Gly Ala Asp Leu Arg Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser				
[0109]	155	160	165	170	
[0110]	Tyr Gly Ala Pro Arg Val Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr				
[0111]	175	180	185		
[0112]	Val Gln Thr Gly Gly Thr Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile				
[0113]	190	195	200		
[0114]	Val Pro Arg Leu Pro Pro Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro				
[0115]	205	210	215		
[0116]	Glu Tyr Trp Ile Lys Ser Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Arg Asn Asp				

[0117]	220	225	230
[0118]	Ile Val Lys Ile Glu Gly Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro		
[0119]	235	240	245
[0120]	Asn Ile Pro Asp Ile Pro Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly		
[0121]	255	260	265
[0122]	Thr Cys Leu		
[0123]	<210>3		
[0124]	<211>265		
[0125]	<212>PRT		
[0126]	<213> 曲柄犁头酶 (Absidia reflexa)		
[0127]	<400>3		
[0128]	Ser Ser Ser Ser Thr Gln Asp Tyr Arg Ile Ala Ser Glu Ala Glu Ile		
[0129]	1	5	10
[0130]	Lys Ala His Thr Phe Tyr Thr Ala Leu Ser Ala Asn Ala Tyr Cys Arg		
[0131]	20	25	30
[0132]	Thr Val Ile Pro Gly Gly Arg Trp Ser Cys Pro His Cys Gly Val Ala		
[0133]	35	40	45
[0134]	Ser Asn Leu Gln Ile Thr Lys Thr Phe Ser Thr Leu Ile Thr Asp Thr		
[0135]	50	55	60
[0136]	Asn Val Leu Val Ala Val Gly Glu Lys Glu Lys Thr Ile Tyr Val Val		
[0137]	65	70	75
[0138]	Phe Arg Gly Thr Ser Ser Ile Arg Asn Ala Ile Ala Asp Ile Val Phe		
[0139]	85	90	95
[0140]	Val Pro Val Asn Tyr Pro Pro Val Asn Gly Ala Lys Val His Lys Gly		
[0141]	100	105	110
[0142]	Phe Leu Asp Ser Tyr Asn Glu Val Gln Asp Lys Leu Val Ala Glu Val		
[0143]	115	120	125
[0144]	Lys Ala Gln Leu Asp Arg His Pro Gly Tyr Lys Ile Val Val Thr Gly		
[0145]	130	135	140
[0146]	His Ser Leu Gly Gly Ala Thr Ala Val Leu Ser Ala Leu Asp Leu Tyr		
[0147]	145	150	155
[0148]	His His Gly His Ala Asn Ile Glu Ile Tyr Thr Gln Gly Gln Pro Arg		
[0149]	165	170	175
[0150]	Ile Gly Thr Pro Ala Phe Ala Asn Tyr Val Ile Gly Thr Lys Ile Pro		
[0151]	180	185	190
[0152]	Tyr Gln Arg Leu Val His Glu Arg Asp Ile Val Pro His Leu Pro Pro		
[0153]	195	200	205
[0154]	Gly Ala Phe Gly Phe Leu His Ala Gly Glu Glu Phe Trp Ile Met Lys		
[0155]	210	215	220

[0156]	Asp Ser Ser Leu Arg Val Cys Pro Asn Gly Ile Glu Thr Asp Asn Cys
[0157]	225 230 235 240
[0158]	Ser Asn Ser Ile Val Pro Phe Thr Ser Val Ile Asp His Leu Ser Tyr
[0159]	245 250 255
[0160]	Leu Asp Met Asn Thr Gly Leu Cys Leu
[0161]	260 265
[0162]	<210>4
[0163]	<211>264
[0164]	<212>PRT
[0165]	<213>Absidia corymbifera
[0166]	<400>4
[0167]	Ser Ser Ser Thr Gln Asp Tyr Arg Ile Ala Ser Glu Ala Glu Ile Lys
[0168]	1 5 10 15
[0169]	Ala His Thr Phe Tyr Thr Ala Leu Ser Ala Asn Ala Tyr Cys Arg Thr
[0170]	20 25 30
[0171]	Val Ile Pro Gly Gly Gln Trp Ser Cys Pro His Cys Asp Val Ala Pro
[0172]	35 40 45
[0173]	Asn Leu Asn Ile Thr Lys Thr Phe Thr Thr Leu Ile Thr Asp Thr Asn
[0174]	50 55 60
[0175]	Val Leu Val Ala Val Gly Glu Asn Glu Lys Thr Ile Tyr Val Val Phe
[0176]	65 70 75 80
[0177]	Arg Gly Thr Ser Ser Ile Arg Asn Ala Ile Ala Asp Ile Val Phe Val
[0178]	85 90 95
[0179]	Pro Val Asn Tyr Pro Pro Val Asn Gly Ala Lys Val His Lys Gly Phe
[0180]	100 105 110
[0181]	Leu Asp Ser Tyr Asn Glu Val Gln Asp Lys Leu Val Ala Glu Val Lys
[0182]	115 120 125
[0183]	Ala Gln Leu Asp Arg His Pro Gly Tyr Lys Ile Val Val Thr Gly His
[0184]	130 135 140
[0185]	Ser Leu Gly Gly Ala Thr Ala Val Leu Ser Ala Leu Asp Leu Tyr His
[0186]	145 150 155 160
[0187]	His Gly His Asp Asn Ile Glu Ile Tyr Thr Gln Gly Gln Pro Arg Ile
[0188]	165 170 175
[0189]	Gly Thr Pro Glu Phe Ala Asn Tyr Val Ile Gly Thr Lys Ile Pro Tyr
[0190]	180 185 190
[0191]	Gln Arg Leu Val Asn Glu Arg Asp Ile Val Pro His Leu Pro Pro Gly
[0192]	195 200 205
[0193]	Ala Phe Gly Phe Leu His Ala Gly Glu Glu Phe Trp Ile Met Lys Asp
[0194]	210 215 220

[0195]	Ser Ser Leu Arg Val Cys Pro Asn Gly Ile Glu Thr Asp Asn Cys Ser
[0196]	225 230 235 240
[0197]	Asn Ser Ile Val Pro Phe Thr Ser Val Ile Asp His Leu Ser Tyr Leu
[0198]	245 250 255
[0199]	Asp Met Asn Thr Gly Leu Cys Leu
[0200]	260
[0201]	<210>5
[0202]	<211>269
[0203]	<212>PRT
[0204]	<213> 曼赫根毛霉 (Rhizomucor miehei)
[0205]	<400>5
[0206]	Ser Ile Asp Gly Gly Ile Arg Ala Ala Thr Ser Gln Glu Ile Asn Glu
[0207]	1 5 10 15
[0208]	Leu Thr Tyr Tyr Thr Thr Leu Ser Ala Asn Ser Tyr Cys Arg Thr Val
[0209]	20 25 30
[0210]	Ile Pro Gly Ala Thr Trp Asp Cys Ile His Cys Asp Ala Thr Glu Asp
[0211]	35 40 45
[0212]	Leu Lys Ile Ile Lys Thr Trp Ser Thr Leu Ile Tyr Asp Thr Asn Ala
[0213]	50 55 60
[0214]	Met Val Ala Arg Gly Asp Ser Glu Lys Thr Ile Tyr Ile Val Phe Arg
[0215]	65 70 75 80
[0216]	Gly Ser Ser Ser Ile Arg Asn Trp Ile Ala Asp Leu Thr Phe Val Pro
[0217]	85 90 95
[0218]	Val Ser Tyr Pro Pro Val Ser Gly Thr Lys Val His Lys Gly Phe Leu
[0219]	100 105 110
[0220]	Asp Ser Tyr Gly Glu Val Gln Asn Glu Leu Val Ala Thr Val Leu Asp
[0221]	115 120 125
[0222]	Gln Phe Lys Gln Tyr Pro Ser Tyr Lys Val Ala Val Thr Gly His Ser
[0223]	130 135 140
[0224]	Leu Gly Gly Ala Thr Ala Leu Leu Cys Ala Leu Asp Leu Tyr Gln Arg
[0225]	145 150 155 160
[0226]	Glu Glu Gly Leu Ser Ser Ser Asn Leu Phe Leu Tyr Thr Gln Gly Gln
[0227]	165 170 175
[0228]	Pro Arg Val Gly Asp Pro Ala Phe Ala Asn Tyr Val Val Ser Thr Gly
[0229]	180 185 190
[0230]	Ile Pro Tyr Arg Arg Thr Val Asn Glu Arg Asp Ile Val Pro His Leu
[0231]	195 200 205
[0232]	Pro Pro Ala Ala Phe Gly Phe Leu His Ala Gly Glu Glu Tyr Trp Ile
[0233]	210 215 220

[0234]	Thr Asp Asn Ser Pro Glu Thr Val Gln Val Cys Thr Ser Asp Leu Glu
[0235]	225 230 235 240
[0236]	Thr Ser Asp Cys Ser Asn Ser Ile Val Pro Phe Thr Ser Val Leu Asp
[0237]	245 250 255
[0238]	His Leu Ser Tyr Phe Gly Ile Asn Thr Gly Leu Cys Thr
[0239]	260 265
[0240]	<210>6
[0241]	<211>271
[0242]	<212>PRT
[0243]	<213> 米根霉 (<i>Rhizopus oryzae</i>)
[0244]	<400>6
[0245]	Ser Ala Ser Asp Gly Gly Lys Val Val Ala Ala Thr Thr Ala Gln Ile
[0246]	1 5 10 15
[0247]	Gln Glu Phe Thr Lys Tyr Ala Gly Ile Ala Ala Thr Ala Tyr Cys Arg
[0248]	20 25 30
[0249]	Ser Val Val Pro Gly Asn Lys Trp Asp Cys Val Gln Cys Gln Lys Trp
[0250]	35 40 45
[0251]	Val Pro Asp Gly Lys Ile Ile Thr Thr Phe Thr Ser Leu Leu Ser Asp
[0252]	50 55 60
[0253]	Thr Asn Gly Tyr Val Leu Arg Ser Asp Lys Gln Lys Thr Ile Tyr Leu
[0254]	65 70 75 80
[0255]	Val Phe Arg Gly Thr Asn Ser Phe Arg Ser Ala Ile Thr Asp Ile Val
[0256]	85 90 95
[0257]	Phe Asn Phe Ser Asp Tyr Lys Pro Val Lys Gly Ala Lys Val His Ala
[0258]	100 105 110
[0259]	Gly Phe Leu Ser Ser Tyr Glu Gln Val Val Asn Asp Tyr Phe Pro Val
[0260]	115 120 125
[0261]	Val Gln Glu Gln Leu Thr Ala His Pro Thr Tyr Lys Val Ile Val Thr
[0262]	130 135 140
[0263]	Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Gln Ala Leu Leu Ala Gly Met Asp Leu
[0264]	145 150 155 160
[0265]	Tyr Gln Arg Glu Pro Arg Leu Ser Pro Lys Asn Leu Ser Ile Phe Thr
[0266]	165 170 175
[0267]	Val Gly Gly Pro Arg Val Gly Asn Pro Thr Phe Ala Tyr Tyr Val Glu
[0268]	180 185 190
[0269]	Ser Thr Gly Ile Pro Phe Gln Arg Thr Val His Lys Arg Asp Ile Val
[0270]	195 200 205
[0271]	Pro His Val Pro Pro Gln Ser Phe Gly Phe Leu His Pro Gly Val Glu
[0272]	210 215 220

[0273]	Ser Trp Ile Lys Ser Gly Thr Ser Asn Val Gln Ile Cys Thr Ser Glu		
[0274]	225	230	235 240
[0275]	Ile Glu Thr Lys Asp Cys Ser Asn Ser Ile Val Pro Phe Thr Ser Ile		
[0276]		245	250 255
[0277]	Leu Asp His Leu Ser Tyr Phe Asp Ile Asn Glu Gly Ser Cys Leu		
[0278]		260	265 270
[0279]	<210>7		
[0280]	<211>267		
[0281]	<212>PRT		
[0282]	<213> 黑曲霉 (Aspergillus niger)		
[0283]	<400>7		
[0284]	Thr Ala Gly His Ala Leu Ala Ala Ser Thr Gln Gly Ile Ser Glu Asp		
[0285]	1	5	10 15
[0286]	Leu Tyr Ser Arg Leu Val Glu Met Ala Thr Ile Ser Gln Ala Ala Tyr		
[0287]		20	25 30
[0288]	Ala Asp Leu Cys Asn Ile Pro Ser Thr Ile Ile Lys Gly Glu Lys Ile		
[0289]		35	40 45
[0290]	Tyr Asn Ser Gln Thr Asp Ile Asn Gly Trp Ile Leu Arg Asp Asp Ser		
[0291]		50	55 60
[0292]	Ser Lys Glu Ile Ile Thr Val Phe Arg Gly Thr Gly Ser Asp Thr Asn		
[0293]	65	70	75 80
[0294]	Leu Gln Leu Asp Thr Asn Tyr Thr Leu Thr Pro Phe Asp Thr Leu Pro		
[0295]		85	90 95
[0296]	Gln Cys Asn Gly Cys Glu Val His Gly Gly Tyr Tyr Ile Gly Trp Val		
[0297]		100	105 110
[0298]	Ser Val Gln Asp Gln Val Glu Ser Leu Val Lys Gln Gln Val Ser Gln		
[0299]		115	120 125
[0300]	Tyr Pro Asp Tyr Ala Leu Thr Val Thr Gly His Ser Leu Gly Ala Ser		
[0301]		130	135 140
[0302]	Leu Ala Ala Leu Thr Ala Ala Gln Leu Ser Ala Thr Tyr Asp Asn Ile		
[0303]	145	150	155 160
[0304]	Arg Leu Tyr Thr Phe Gly Glu Pro Arg Ser Gly Asn Gln Ala Phe Ala		
[0305]		165	170 175
[0306]	Ser Tyr Met Asn Asp Ala Phe Gln Ala Ser Ser Pro Asp Thr Thr Gln		
[0307]		180	185 190
[0308]	Tyr Phe Arg Val Thr His Ala Asn Asp Gly Ile Pro Asn Leu Pro Pro		
[0309]		195	200 205
[0310]	Val Glu Gln Gly Tyr Ala His Gly Gly Val Glu Tyr Trp Ser Val Asp		
[0311]		210	215 220

[0312]	Pro Tyr Ser Ala Gln Asn Thr Phe Val Cys Thr Gly Asp Glu Val Gln			
[0313]	225	230	235	240
[0314]	Cys Cys Glu Ala Gln Gly Gly Gln Gly Val Asn Asn Ala His Thr Thr			
[0315]		245	250	255
[0316]	Tyr Phe Gly Met Thr Ser Gly Ala Cys Thr Trp			
[0317]		260	265	
[0318]	<210>8			
[0319]	<211>266			
[0320]	<212>PRT			
[0321]	<213> 塔宾曲霉 (<i>Aspergillus tubingensis</i>)			
[0322]	<400>8			
[0323]	Thr Ala Gly His Ala Leu Ala Ala Ser Thr Gln Gly Ile Ser Glu Asp			
[0324]	1	5	10	15
[0325]	Leu Tyr Ser Arg Leu Val Glu Met Ala Thr Ile Ser Gln Ala Ala Tyr			
[0326]		20	25	30
[0327]	Ala Asp Leu Cys Asn Ile Pro Ser Thr Ile Ile Lys Gly Glu Lys Ile			
[0328]		35	40	45
[0329]	Tyr Asn Ser Gln Thr Asp Ile Asn Gly Trp Ile Leu Arg Asp Asp Ser			
[0330]		50	55	60
[0331]	Ser Lys Glu Ile Ile Thr Val Phe Arg Gly Thr Gly Ser Asp Thr Asn			
[0332]	65	70	75	80
[0333]	Leu Gln Leu Asp Thr Asn Tyr Thr Leu Thr Pro Phe Asp Thr Leu Pro			
[0334]		85	90	95
[0335]	Gln Cys Asn Ser Cys Glu Val His Gly Gly Tyr Tyr Ile Gly Trp Ile			
[0336]		100	105	110
[0337]	Ser Val Gln Asp Gln Val Glu Ser Leu Val Gln Gln Gln Val Ser Gln			
[0338]		115	120	125
[0339]	Phe Pro Asp Tyr Ala Leu Thr Val Thr Gly His Ser Leu Gly Ala Ser			
[0340]		130	135	140
[0341]	Leu Ala Ala Leu Thr Ala Ala Gln Leu Ser Ala Thr Tyr Asp Asn Ile			
[0342]	145	150	155	160
[0343]	Arg Leu Tyr Thr Phe Gly Glu Pro Arg Ser Asn Gln Ala Phe Ala Ser			
[0344]		165	170	175
[0345]	Tyr Met Asn Asp Ala Phe Gln Ala Ser Ser Pro Asp Thr Thr Gln Tyr			
[0346]		180	185	190
[0347]	Phe Arg Val Thr His Ala Asn Asp Gly Ile Pro Asn Leu Pro Pro Ala			
[0348]		195	200	205
[0349]	Asp Glu Gly Tyr Ala His Gly Val Val Glu Tyr Trp Ser Val Asp Pro			
[0350]		210	215	220

[0351]	Tyr Ser Ala Gln Asn Thr Phe Val Cys Thr Gly Asp Glu Val Gln Cys
[0352]	225 230 235 240
[0353]	Cys Glu Ala Gln Gly Gly Gln Gly Val Asn Asn Ala His Thr Thr Tyr
[0354]	245 250 255
[0355]	Phe Gly Met Thr Ser Gly His Cys Thr Trp
[0356]	260 265
[0357]	<210>9
[0358]	<211>276
[0359]	<212>PRT
[0360]	<213>尖镰孢 (<i>Fusarium oxysporum</i>)
[0361]	<400>9
[0362]	Ala Val Gly Val Thr Thr Thr Asp Phe Ser Asn Phe Lys Phe Tyr Ile
[0363]	1 5 10 15
[0364]	Gln His Gly Ala Ala Ala Tyr Cys Asn Ser Glu Ala Ala Ala Gly Ser
[0365]	20 25 30
[0366]	Lys Ile Thr Cys Ser Asn Asn Gly Cys Pro Thr Val Gln Gly Asn Gly
[0367]	35 40 45
[0368]	Ala Thr Ile Val Thr Ser Phe Val Gly Ser Lys Thr Gly Ile Gly Gly
[0369]	50 55 60
[0370]	Tyr Val Ala Thr Asp Ser Ala Arg Lys Glu Ile Val Val Ser Phe Arg
[0371]	65 70 75 80
[0372]	Gly Ser Ile Asn Ile Arg Asn Trp Leu Thr Asn Leu Asp Phe Gly Gln
[0373]	85 90 95
[0374]	Glu Asp Cys Ser Leu Val Ser Gly Cys Gly Val His Ser Gly Phe Gln
[0375]	100 105 110
[0376]	Arg Ala Trp Asn Glu Ile Ser Ser Gln Ala Thr Ala Ala Val Ala Ser
[0377]	115 120 125
[0378]	Ala Arg Lys Ala Asn Pro Ser Phe Asn Val Ile Ser Thr Gly His Ser
[0379]	130 135 140
[0380]	Leu Gly Gly Ala Val Ala Val Leu Ala Ala Ala Asn Leu Arg Val Gly
[0381]	145 150 155 160
[0382]	Gly Thr Pro Val Asp Ile Tyr Thr Tyr Gly Ser Pro Arg Val Gly Asn
[0383]	165 170 175
[0384]	Ala Gln Leu Ser Ala Phe Val Ser Asn Gln Ala Gly Gly Glu Tyr Arg
[0385]	180 185 190
[0386]	Val Thr His Ala Asp Asp Pro Val Pro Arg Leu Pro Pro Leu Ile Phe
[0387]	195 200 205
[0388]	Gly Tyr Arg His Thr Thr Pro Glu Phe Trp Leu Ser Gly Gly Gly Gly
[0389]	210 215 220

[0390]	Asp Lys Val Asp Tyr Thr Ile Ser Asp Val Lys Val Cys Glu Gly Ala
[0391]	225 230 235 240
[0392]	Ala Asn Leu Gly Cys Asn Gly Gly Thr Leu Gly Leu Asp Ile Ala Ala
[0393]	245 250 255
[0394]	His Leu His Tyr Phe Gln Ala Thr Asp Ala Cys Asn Ala Gly Gly Phe
[0395]	260 265 270
[0396]	Ser Trp Arg Arg
[0397]	275
[0398]	<210>10
[0399]	<211>273
[0400]	<212>PRT
[0401]	<213> 异孢镰孢 (Fusarium heterosporum)
[0402]	<400>10
[0403]	Thr Val Thr Thr Gln Asp Leu Ser Asn Phe Arg Phe Tyr Leu Gln His
[0404]	1 5 10 15
[0405]	Ala Asp Ala Ala Tyr Cys Asn Phe Asn Thr Ala Val Gly Lys Pro Val
[0406]	20 25 30
[0407]	His Cys Ser Ala Gly Asn Cys Pro Asp Ile Glu Lys Asp Ala Ala Ile
[0408]	35 40 45
[0409]	Val Val Gly Ser Val Val Gly Thr Lys Thr Gly Ile Gly Ala Tyr Val
[0410]	50 55 60
[0411]	Ala Thr Asp Asn Ala Arg Lys Glu Ile Val Val Ser Val Arg Gly Ser
[0412]	65 70 75 80
[0413]	Ile Asn Val Arg Asn Trp Ile Thr Asn Phe Asn Phe Gly Gln Lys Thr
[0414]	85 90 95
[0415]	Cys Asp Leu Val Ala Gly Cys Gly Val His Thr Gly Phe Leu Asp Ala
[0416]	100 105 110
[0417]	Trp Glu Glu Val Ala Ala Asn Val Lys Ala Ala Val Ser Ala Ala Lys
[0418]	115 120 125
[0419]	Thr Ala Asn Pro Thr Phe Lys Phe Val Val Thr Gly His Ser Leu Gly
[0420]	130 135 140
[0421]	Gly Ala Val Ala Thr Ile Ala Ala Ala Tyr Leu Arg Lys Asp Gly Phe
[0422]	145 150 155 160
[0423]	Pro Phe Asp Leu Tyr Thr Tyr Gly Ser Pro Arg Val Gly Asn Asp Phe
[0424]	165 170 175
[0425]	Phe Ala Asn Phe Val Thr Gln Gln Thr Gly Ala Glu Tyr Arg Val Thr
[0426]	180 185 190
[0427]	His Gly Asp Asp Pro Val Pro Arg Leu Pro Pro Ile Val Phe Gly Tyr
[0428]	195 200 205

[0429]	Arg His Thr Ser Pro Glu Tyr Trp Leu Asn Gly Gly Pro Leu Asp Lys
[0430]	210 215 220
[0431]	Asp Tyr Thr Val Thr Glu Ile Lys Val Cys Glu Gly Ile Ala Asn Val
[0432]	225 230 235 240
[0433]	Met Cys Asn Gly Gly Thr Ile Gly Leu Asp Ile Leu Ala His Ile Thr
[0434]	245 250 255
[0435]	Tyr Phe Gln Ser Met Ala Thr Cys Ala Pro Ile Ala Ile Pro Trp Lys
[0436]	260 265 270
[0437]	Arg
[0438]	<210>11
[0439]	<211>278
[0440]	<212>PRT
[0441]	<213>米曲霉 (<i>Aspergillus oryzae</i>)
[0442]	<400>11
[0443]	Asp Ile Pro Thr Thr Gln Leu Glu Asp Phe Lys Phe Trp Val Gln Tyr
[0444]	1 5 10 15
[0445]	Ala Ala Ala Thr Tyr Cys Pro Asn Asn Tyr Val Ala Lys Asp Gly Glu
[0446]	20 25 30
[0447]	Lys Leu Asn Cys Ser Val Gly Asn Cys Pro Asp Val Glu Ala Ala Gly
[0448]	35 40 45
[0449]	Ser Thr Val Lys Leu Ser Phe Ser Asp Asp Thr Ile Thr Asp Thr Ala
[0450]	50 55 60
[0451]	Gly Phe Val Ala Val Asp Asn Thr Asn Lys Ala Ile Val Val Ala Phe
[0452]	65 70 75 80
[0453]	Arg Gly Ser Tyr Ser Ile Arg Asn Trp Val Thr Asp Ala Thr Phe Pro
[0454]	85 90 95
[0455]	Gln Thr Asp Pro Gly Leu Cys Asp Gly Cys Lys Ala Glu Leu Gly Phe
[0456]	100 105 110
[0457]	Trp Thr Ala Trp Lys Val Val Arg Asp Arg Ile Ile Lys Thr Leu Asp
[0458]	115 120 125
[0459]	Glu Leu Lys Pro Glu His Ser Asp Tyr Lys Ile Val Val Val Gly His
[0460]	130 135 140
[0461]	Ser Leu Gly Ala Ala Ile Ala Ser Leu Ala Ala Ala Asp Leu Arg Thr
[0462]	145 150 155 160
[0463]	Lys Asn Tyr Asp Ala Ile Leu Tyr Ala Tyr Ala Ala Pro Arg Val Ala
[0464]	165 170 175
[0465]	Asn Lys Pro Leu Ala Glu Phe Ile Thr Asn Gln Gly Asn Asn Tyr Arg
[0466]	180 185 190
[0467]	Phe Thr His Asn Asp Asp Pro Val Pro Lys Leu Pro Leu Leu Thr Met

[0468]	195	200	205
[0469]	Gly Tyr Val His Ile Ser Pro Glu Tyr Tyr Ile Thr Ala Pro Asp Asn		
[0470]	210	215	220
[0471]	Thr Thr Val Thr Asp Asn Gln Val Thr Val Leu Asp Gly Tyr Val Asn		
[0472]	225	230	235
[0473]	Phe Lys Gly Asn Thr Gly Thr Ser Gly Gly Leu Pro Asp Leu Leu Ala		
[0474]	245	250	255
[0475]	Phe His Ser His Val Trp Tyr Phe Ile His Ala Asp Ala Cys Lys Gly		
[0476]	260	265	270
[0477]	Pro Gly Leu Pro Leu Arg		
[0478]	275		
[0479]	<210>12		
[0480]	<211>278		
[0481]	<212>PRT		
[0482]	<213> 卡门柏青霉 (<i>Penicillium camemberti</i>)		
[0483]	<400>12		
[0484]	Asp Val Ser Thr Ser Glu Leu Asp Gln Phe Glu Phe Trp Val Gln Tyr		
[0485]	1	5	10
[0486]	Ala Ala Ala Ser Tyr Tyr Glu Ala Asp Tyr Thr Ala Gln Val Gly Asp		
[0487]	20	25	30
[0488]	Lys Leu Ser Cys Ser Lys Gly Asn Cys Pro Glu Val Glu Ala Thr Gly		
[0489]	35	40	45
[0490]	Ala Thr Val Ser Tyr Asp Phe Ser Asp Ser Thr Ile Thr Asp Thr Ala		
[0491]	50	55	60
[0492]	Gly Tyr Ile Ala Val Asp His Thr Asn Ser Ala Val Val Leu Ala Phe		
[0493]	65	70	75
[0494]	Arg Gly Ser Tyr Ser Val Arg Asn Trp Val Ala Asp Ala Thr Phe Val		
[0495]	85	90	95
[0496]	His Thr Asn Pro Gly Leu Cys Asp Gly Cys Leu Ala Glu Leu Gly Phe		
[0497]	100	105	110
[0498]	Trp Ser Ser Trp Lys Leu Val Arg Asp Asp Ile Ile Lys Glu Leu Lys		
[0499]	115	120	125
[0500]	Glu Val Val Ala Gln Asn Pro Asn Tyr Glu Leu Val Val Val Gly His		
[0501]	130	135	140
[0502]	Ser Leu Gly Ala Ala Val Ala Thr Leu Ala Ala Thr Asp Leu Arg Gly		
[0503]	145	150	155
[0504]	Lys Gly Tyr Pro Ser Ala Lys Leu Tyr Ala Tyr Ala Ser Pro Arg Val		
[0505]	165	170	175
[0506]	Gly Asn Ala Ala Leu Ala Lys Tyr Ile Thr Ala Gln Gly Asn Asn Phe		

[0507]	180	185	190
[0508]	Arg Phe Thr His Thr Asn Asp Pro Val Pro Lys Leu Pro Leu Leu Ser		
[0509]	195	200	205
[0510]	Met Gly Tyr Val His Val Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Thr Ser Pro Asn		
[0511]	210	215	220
[0512]	Asn Ala Thr Val Ser Thr Ser Asp Ile Lys Val Ile Asp Gly Asp Val		
[0513]	225	230	235
[0514]	Ser Phe Asp Gly Asn Thr Gly Thr Gly Leu Pro Leu Leu Thr Asp Phe		
[0515]	245	250	255
[0516]	Glu Ala His Ile Trp Tyr Phe Val Gln Val Asp Ala Gly Lys Gly Pro		
[0517]	260	265	270
[0518]	Gly Leu Pro Phe Lys Arg		
[0519]	275		
[0520]	<210>13		
[0521]	<211>270		
[0522]	<212>PRT		
[0523]	<213> 臭曲霉 (<i>Aspergillus foetidus</i>)		
[0524]	<400>13		
[0525]	Ser Val Ser Thr Ser Thr Leu Asp Glu Leu Gln Leu Phe Ala Gln Trp		
[0526]	1	5	10
[0527]	Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Ser Asn Asn Ile Asp Ser Lys Asp Ser Asn		
[0528]	20	25	30
[0529]	Leu Thr Cys Thr Ala Asn Ala Cys Pro Ser Val Glu Glu Ala Ser Thr		
[0530]	35	40	45
[0531]	Thr Met Leu Leu Glu Phe Asp Leu Thr Asn Asp Phe Gly Gly Thr Ala		
[0532]	50	55	60
[0533]	Gly Phe Leu Ala Ala Asp Asn Thr Asn Lys Arg Leu Val Val Ala Phe		
[0534]	65	70	75
[0535]	Arg Gly Ser Ser Thr Ile Glu Asn Trp Ile Ala Asn Leu Asp Phe Ile		
[0536]	85	90	95
[0537]	Leu Glu Asp Asn Asp Asp Leu Cys Thr Gly Cys Lys Val His Thr Gly		
[0538]	100	105	110
[0539]	Phe Trp Lys Ala Trp Glu Ser Ala Ala Asp Glu Leu Thr Ser Lys Ile		
[0540]	115	120	125
[0541]	Lys Ser Ala Met Ser Thr Tyr Ser Gly Tyr Thr Leu Tyr Phe Thr Gly		
[0542]	130	135	140
[0543]	His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Leu Gly Ala Thr Val Leu Arg		
[0544]	145	150	155
[0545]	Asn Asp Gly Tyr Ser Val Glu Leu Tyr Thr Tyr Gly Cys Pro Arg Ile		

[0546]		165		170		175
[0547]	Gly Asn Tyr Ala Leu Ala Glu His Ile Thr Ser Gln Gly Ser Gly Ala					
[0548]		180		185		190
[0549]	Asn Phe Arg Val Thr His Leu Asn Asp Ile Val Pro Arg Val Pro Pro					
[0550]		195		200		205
[0551]	Met Asp Phe Gly Phe Ser Gln Pro Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Thr Ser					
[0552]		210		215		220
[0553]	Gly Asn Gly Ala Ser Val Thr Ala Ser Asp Ile Glu Val Ile Glu Gly					
[0554]	225		230		235	240
[0555]	Ile Asn Ser Thr Ala Gly Asn Ala Gly Glu Ala Thr Val Ser Val Leu					
[0556]		245		250		255
[0557]	Ala His Leu Trp Tyr Phe Phe Ala Ile Ser Glu Cys Leu Leu					
[0558]		260		265		270
[0559]	<210>14					
[0560]	<211>270					
[0561]	<212>PRT					
[0562]	<213> 黑曲霉 (Aspergillus niger)					
[0563]	<400>14					
[0564]	Ser Val Ser Thr Ser Thr Leu Asp Glu Leu Gln Leu Phe Ser Gln Trp					
[0565]	1	5		10		15
[0566]	Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Ser Asn Asn Ile Asp Ser Asp Asp Ser Asn					
[0567]		20		25		30
[0568]	Val Thr Cys Thr Ala Asp Ala Cys Pro Ser Val Glu Glu Ala Ser Thr					
[0569]		35		40		45
[0570]	Lys Met Leu Leu Glu Phe Asp Leu Thr Asn Asn Phe Gly Gly Thr Ala					
[0571]	50		55		60	
[0572]	Gly Phe Leu Ala Ala Asp Asn Thr Asn Lys Arg Leu Val Val Ala Phe					
[0573]	65		70		75	80
[0574]	Arg Gly Ser Ser Thr Ile Lys Asn Trp Ile Ala Asp Leu Asp Phe Ile					
[0575]		85		90		95
[0576]	Leu Gln Asp Asn Asp Asp Leu Cys Thr Gly Cys Lys Val His Thr Gly					
[0577]		100		105		110
[0578]	Phe Trp Lys Ala Trp Glu Ala Ala Ala Asp Asn Leu Thr Ser Lys Ile					
[0579]		115		120		125
[0580]	Lys Ser Ala Met Ser Thr Tyr Ser Gly Tyr Thr Leu Tyr Phe Thr Gly					
[0581]		130		135		140
[0582]	His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Leu Gly Ala Thr Val Leu Arg					
[0583]	145		150		155	160
[0584]	Asn Asp Gly Tyr Ser Val Glu Leu Tyr Thr Tyr Gly Cys Pro Arg Val					

[0585]	165	170	175
[0586]	Gly Asn Tyr Ala Leu Ala Glu His Ile Thr Ser Gln Gly Ser Gly Ala		
[0587]	180	185	190
[0588]	Asn Phe Pro Val Thr His Leu Asn Asp Ile Val Pro Arg Val Pro Pro		
[0589]	195	200	205
[0590]	Met Asp Phe Gly Phe Ser Gln Pro Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Thr Ser		
[0591]	210	215	220
[0592]	Gly Thr Gly Ala Ser Val Thr Ala Ser Asp Ile Glu Leu Ile Glu Gly		
[0593]	225	230	235
[0594]	Ile Asn Ser Thr Ala Gly Asn Ala Gly Glu Ala Thr Val Asp Val Leu		
[0595]	245	250	255
[0596]	Ala His Leu Trp Tyr Phe Phe Ala Ile Ser Glu Cys Leu Leu		
[0597]	260	265	270
[0598]	<210>15		
[0599]	<211>269		
[0600]	<212>PRT		
[0601]	<213> 米曲霉 (<i>Aspergillus oryzae</i>)		
[0602]	<400>15		
[0603]	Asp Val Ser Ser Ser Leu Leu Asn Asn Leu Asp Leu Phe Ala Gln Tyr		
[0604]	1	5	10
[0605]	Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Asp Glu Asn Leu Asn Ser Thr Gly Thr Lys		
[0606]	20	25	30
[0607]	Leu Thr Cys Ser Val Gly Asn Cys Pro Leu Val Glu Ala Ala Ser Thr		
[0608]	35	40	45
[0609]	Gln Ser Leu Asp Glu Phe Asn Glu Ser Ser Ser Tyr Gly Asn Pro Ala		
[0610]	50	55	60
[0611]	Gly Tyr Leu Ala Ala Asp Glu Thr Asn Lys Leu Leu Val Leu Ser Phe		
[0612]	65	70	75
[0613]	Arg Gly Ser Ala Asp Leu Ala Asn Trp Val Ala Asn Leu Asn Phe Gly		
[0614]	85	90	95
[0615]	Leu Glu Asp Ala Ser Asp Leu Cys Ser Gly Cys Glu Val His Ser Gly		
[0616]	100	105	110
[0617]	Phe Trp Lys Ala Trp Ser Glu Ile Ala Asp Thr Ile Thr Ser Lys Val		
[0618]	115	120	125
[0619]	Glu Ser Ala Leu Ser Asp His Ser Asp Tyr Ser Leu Val Leu Thr Gly		
[0620]	130	135	140
[0621]	His Ser Tyr Gly Ala Ala Leu Ala Ala Leu Ala Ala Thr Ala Leu Arg		
[0622]	145	150	155
[0623]	Asn Ser Gly His Ser Val Glu Leu Tyr Asn Tyr Gly Gln Pro Arg Leu		

[0624]	165	170	175
[0625]	Gly Asn Glu Ala Leu Ala Thr Tyr Ile Thr Asp Gln Asn Lys Gly Gly		
[0626]	180	185	190
[0627]	Asn Tyr Arg Val Thr His Thr Asn Asp Ile Val Pro Lys Leu Pro Pro		
[0628]	195	200	205
[0629]	Thr Leu Leu Gly Tyr His His Phe Ser Pro Glu Tyr Tyr Ile Ser Ser		
[0630]	210	215	220
[0631]	Ala Asp Glu Ala Thr Val Thr Thr Thr Asp Val Thr Glu Val Thr Gly		
[0632]	225	230	235
[0633]	Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asp Gly Thr Asp Gly Thr Ser Ile Asp		
[0634]	245	250	255
[0635]	Ala His Arg Trp Tyr Phe Ile Tyr Ile Ser Glu Cys Ser		
[0636]	260	265	
[0637]	<210>16		
[0638]	<211>251		
[0639]	<212>PRT		
[0640]	<213>Landerina penisapora		
[0641]	<400>16		
[0642]	Pro Gln Asp Ala Tyr Thr Ala Ser His Ala Asp Leu Val Lys Tyr Ala		
[0643]	1	5	10
[0644]	Thr Tyr Ala Gly Leu Ala Tyr Gln Thr Thr Asp Ala Trp Pro Ala Ser		
[0645]	20	25	30
[0646]	Arg Thr Val Pro Lys Asp Thr Thr Leu Ile Ser Ser Phe Asp His Thr		
[0647]	35	40	45
[0648]	Leu Lys Gly Ser Ser Gly Tyr Ile Ala Phe Asn Glu Pro Cys Lys Glu		
[0649]	50	55	60
[0650]	Ile Ile Val Ala Tyr Arg Gly Thr Asp Ser Leu Ile Asp Trp Leu Thr		
[0651]	65	70	75
[0652]	Asn Leu Asn Phe Asp Lys Thr Ala Trp Pro Ala Asn Ile Ser Asn Ser		
[0653]	85	90	95
[0654]	Leu Val His Glu Gly Phe Leu Asn Ala Tyr Leu Val Ser Met Gln Gln		
[0655]	100	105	110
[0656]	Val Gln Glu Ala Val Asp Ser Leu Leu Ala Lys Cys Pro Asp Ala Thr		
[0657]	115	120	125
[0658]	Ile Ser Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Cys Ile Ser		
[0659]	130	135	140
[0660]	Met Val Asp Thr Ala Gln Arg His Arg Gly Ile Lys Met Gln Met Phe		
[0661]	145	150	155
[0662]	Thr Tyr Gly Gln Pro Arg Thr Gly Asn Gln Ala Phe Ala Glu Tyr Val		

[0663]	165	170	175
[0664]	Glu Asn Leu Gly His Pro Val Phe Arg Val Val Tyr Arg His Asp Ile		
[0665]	180	185	190
[0666]	Val Pro Arg Met Pro Pro Met Asp Leu Gly Phe Gln His His Gly Gln		
[0667]	195	200	205
[0668]	Glu Val Trp Tyr Glu Gly Asp Glu Asn Ile Lys Phe Cys Lys Gly Glu		
[0669]	210	215	220
[0670]	Gly Glu Asn Leu Thr Cys Glu Leu Gly Val Pro Phe Ser Glu Leu Asn		
[0671]	225	230	235
[0672]	Ala Lys Asp His Ser Glu Tyr Pro Gly Met His		240
[0673]	245	250	
[0674]	<210>17		
[0675]	<211>12		
[0676]	<212>PRT		
[0677]	<213> 人工的		
[0678]	<220>		
[0679]	<223> 用于比对实例的序列		
[0680]	<400>17		
[0681]	Ala Cys Met Ser His Thr Trp Gly Glu Arg Asn Leu		
[0682]	1	5	10
[0683]	<210>18		
[0684]	<211>14		
[0685]	<212>PRT		
[0686]	<213> 人工的		
[0687]	<220>		
[0688]	<223> 用于比对实例的序列		
[0689]	<400>18		
[0690]	His Gly Trp Gly Glu Asp Ala Asn Leu Ala Met Asn Pro Ser		
[0691]	1	5	10

```

ID NO 1: SSSSTQDYRIASEAEIKAHTFYTALSANA
ID NO 2: SSSTQDYRIASEAEIKAHTFYTALSANA
ID NO 3: SIDGGIRAATSQEINELTYTTLANS
ID NO 4: SASDGGKVVAATTAQIQEFTKYAGIAATA
ID NO 5: TAGHALAASTQ GISEDLYSRL VEMATISQAA
ID NO 6: TAGHALAASTQ GISEDLYSRL VEMATISQAA
ID NO 7: AVGVTTTDFSNFKFYIQHGAAA
ID NO 8: TVTTQDLSNFRFYLOHADAA
ID NO 9: DIPTTQLEDFKFWVQYAAAT
ID NO 10: DVSTSELDQFEFWVQYAAAS
ID NO 11: SVSTSTLDELQQLFAQWSAAA
ID NO 12: SVSTSTLDELQQLFSQWSAAA
ID NO 13: DVSSLLNNLDLFAQYSAAA
ID NO 14: EVSQDLFNQFNLFQYSAAA
ID NO 15: PQDAYTASHADLVKYATYAGLA

ID NO 1: YCRTVIPG GRWSCPHCGVAS NLQITKTFST LITDTNVLVAV
ID NO 2: YCRTVIPG GQWSCPHCDVAP NLNITKTFTT LITDTNVLVAV
ID NO 3: YCRTVIPG ATWDCIHCDATE DLKIIKTWST LIYDTNAMVAR
ID NO 4: YCRSVVPG NKWDCVQCQKWVP DGKIITTFST LLSDTNGYVLR
ID NO 5: YADLCNIPST IIKGEKIYNSQTDINGWILR
ID NO 6: YADLCNIPST IIKGEKIYNSQTDINGWILR
ID NO 7: YC NSEAAA GSKITCSNNGCPTVQNGATIVTSF VGSKTGIGGYVAT
ID NO 8: YC NFNTAV GKPVHCSAGNCPDIEKDAAIVVGSV VGTKTGIGAYVAT
ID NO 9: YCPNNYVAKD GEKLNCSSVGNC PDVEAAGSTVKLSFS DDTITDTAGFVAV
ID NO 10: YYEADYTAQV GDKLSCSKGNCPEVEATGATVSYDFS DSTITDTAGYIAV
ID NO 11: YCSNNID SK DSNLTCTANACPSVEEASTMMLLEFDLTNDFFGGTAGFLAA
ID NO 12: YCSNNID SD DSNVTCTADACPSVEEASTKMLLEFDLTNNFFGGTAGFLAA
ID NO 13: YCDENLN ST GTKLTCSVGNCPLVEAASTQSLDEFNESSSYGNPAGYLAA
ID NO 14: YCGKNNDAFA GTNITCTGNACPEVEKADATFLYSFE DSGVGDVTGFLAL
ID NO 15: YQTTDAWPA RTVPKDITLISFDT HTLKGSSGYIAF

ID NO 1: GEKEKTIYVV FRGTSSIRNA IADIVFVVPN YPPV NGA KVHKGFLDSY
ID NO 2: GENEKTIYVV FRGTSSIRNA IADIVFVVPN YPPV NGA KVHKGFLDSY
ID NO 3: GDSEKTIYIV FRGSSSIRNW IADLTFVPVS YPPV SGT KVHKGFLDSY
ID NO 4: SDKQKTIYLV FRGTNSFRSA ITDIVFNFS YKPV KGA KVHAGFLSSY
ID NO 5: DDSSKEIITV FRGTGSDTNL QLDNTNYTLP FDTLPQCNGC EVHGGYYIGW
ID NO 6: DDSSKEIITV FRGTGSDTNL QLDNTNYTLP FDTLPQCNSC EVHGGYYIGW
ID NO 7: DSARKEIVVS FRGSINIRNW LTNLDFG QE DCSL VSGC GVHSGFQRAW
ID NO 8: DNARKEIVVS VRGSINIRNW ITNFNFG QK TCDL VAGC GVHTGFELDAW
ID NO 9: DNTNKAIIVA FRGSYSIRNW VTDATFP QT DPGL CDGC KAEGLFWTAW
ID NO 10: DHTNSAVVLA FRGSYSVRNW VADATFV HT NPGL CDGC LAELGFWSSW
ID NO 11: DNTNKRLVVA FRGSSTIENW IANLDFILED NDDL CTGC KVHTGFWKAW
ID NO 12: DNTNKRLVVA FRGSSTIKNW IADLDFILQD NDDL CTGC KVHTGFWKAW
ID NO 13: DETNKLIVLS FRGSADLANW VANLNFGLED ASDL CSGC EVHSGFWKAW
ID NO 14: DNTNKLIVLS FRGSRSIENW IGNLNFDLKE INDI CSGC RGHGFTTSSW
ID NO 15: NEPCKEIIVA YRGDSLIDW LTNLNFDKTA WPAN ISNS LVHEGFLNAY

ID NO 1: NEVQDKLVAE VKAQLDRHPG YKIVVTGHSL GGATAVLSALDLYHHGHA
ID NO 2: NEVQDKLVAE VKAQLDRHPG YKIVVTGHSL GGATAVLSALDLYHHGHD
ID NO 3: GEVQNELVAT VLDQFKQYPS YKVAVTGHSL GGATALLCALDLYQREEGLS
ID NO 4: EQVVNDYFPV VQEQLTAPHT YKIVVTGHSL GGAQALLAGMDLYQREPRLS
ID NO 5: VSVQDQVESL VKQQVSQYFD YALVTGHSL GASLAALTAAQL SATYD
ID NO 6: ISVQDQVESL VQQQVSQYFD YALVTGHSL GASLAALTAAQL SATYD
ID NO 7: NEISSQATAA VASARKANPS FNVISTGHSL GGAVAVLAAANLRVGGT
ID NO 8: EEVAANVKA VSAAKTANPT FKFVVTGHSL GGAVATIAAAYLRKDG
ID NO 9: KVVDRRIKT LDELKPEHSD YKIVVGHSL GAAIASLAAADLRTKNY
ID NO 10: KLVRDDIIE LKEVVAQNP YELVVVGHSL GAAVATLAATDLRGKGY
ID NO 11: ESAADELTSK IKSAMSTYSG YTLYFTGHSL GGALATLGATVLRNDGY
ID NO 12: EAAADNLTSK IKSAMSTYSG YTLYFTGHSL GGALATLGATVLRNDGY
ID NO 13: SEIADTITSK VESALSDHSD YSLVLTGHSL GAALAAALATLRNSGH

```

图 1

ID NO 14: RSVADTLRQK VEDAVREHPD YRVVFTGHSL GGALATVAGADLRNGY
 ID NO 15: LVSMQVQEA VDSLLAKCPD ATISFTGHSL GGALACISMVDTAQRHRGI

 ID NO 1: NIEIYTQG QPRIGTPAFA NYVIGT KIPYQRLVHERDIVPHL
 ID NO 2: NIEIYTQG QPRIGTPEFA NYVIGT KIPYQRLVNERDIVPHL
 ID NO 3: SSNLFlyTQG QPRVGDPFAFA NYVVST GIPYRRTVNERDIVPHL
 ID NO 4: PKNLSIFTVG GPRVGNPTFA YYVEST GIPFQRTVHKRDIVPHV
 ID NO 5: NIRLYTFG EPRSGNQAFSA SYMNDAFQASSPDTTQYFRVTHANDGIPNL
 ID NO 6: NIRLYTFG EPRS NQAFSA SYMNDAFQASSPDTTQYFRVTHANDGIPNL
 ID NO 7: PVDIYTYG SPRVGNAQLS AFVSNQ AGGEYRVTHADDPVPRL
 ID NO 8: PFDLYTYG SPRVGNDFFA NFVTQQ TGAERYVTHGDDPVPRL
 ID NO 9: DAILYAYA APRVANKPLA EFITNQ GNNYRFTHNDPVPKL
 ID NO 10: SAKLYAYA SPRVGNAALA KYITAQ GNNFRFTHNDPVPKL
 ID NO 11: SVELYTYG CPRIGNYALA EHITSQ GSGANFRVTHLNDIVPRV
 ID NO 12: SVELYTYG CPRVGNLYALA EHITSQ GSGANFPVTHLNDIVPRV
 ID NO 13: SVELYNYG QPRLGNEALA TYITDQ NKGGNYRVTHNDIVPKL
 ID NO 14: DIDVFSYG APRVGNRAFA EFLTVQ TGGTLYRITHNDIVPRL
 ID NO 15: KMQMFTYG QPRTGNQAFSA EYVENL GHPVFRVVRHDIVPRM

 ID NO 1: PPGAFGFLHA GEEFWIMK DSSLRVCNPGIETDNCNSIV
 ID NO 2: PPGAFGFLHA GEEFWIMK DSSLRVCNPGIETDNCNSIV
 ID NO 3: PPAAGFLHA GEEYWITD NSPETVQVCTSDLETSDCNSIV
 ID NO 4: PPQSFGLHP GVESWIKS GTSNVQICTSEIETKDCNSIV
 ID NO 5: PPVEQGYAHG GVEYWSV DPYSAQNTFVCTGDEVQCCE AQGGQG
 ID NO 6: PPADEGYAHG VVEYWSV DPYSAQNTFVCTGDEVQCCE AQGGQG
 ID NO 7: PPLIFGYRHT TPEFWLSGGGDKVDYITISDVKVCEGAANLG CNGGTL
 ID NO 8: PPIVFGYRHT SPEYWLNG GPLDKDYTVTEIKVCEGANVM CNGGTI
 ID NO 9: PLLTMGYVHI SPEYYITA PDNTTVTDNQTVLDGYVNFK GNTGTS
 ID NO 10: PLLSMGYVHV SPEYWITS PNNATVSTSDIKVIDGDVSFD GNTGTG
 ID NO 11: PPMDFGFSQP SPEYWITS GNGASVTASDIEVIEGINSTA GNAGEA
 ID NO 12: PPMDFGFSQP SPEYWITS GTGASVTASDIEVIEGINSTA GNAGEA
 ID NO 13: PPTLLGYHHF SPEYYISS ADEATVTTTVDVTEVTGIDATG GNDGTD
 ID NO 14: PPREFGYSHS SPEYWIKS GTLVPVTRNDIVKIEGIDATG GNNQPN
 ID NO 15: PPMDLGFQHH GQEVWYEG DENIKFCKGEGENLTCELGVP

 ID NO 1: PFT SVIDHLSYLDMMNTGL CL
 ID NO 2: PFT SVIDHLSYLDMMNTGL CL
 ID NO 3: PFT SVLDHLSYFGINTGL CT
 ID NO 4: PFT SILDHLSYFDINEGS CL
 ID NO 5: VN NAHTTYF GMTSGACTW
 ID NO 6: VN NAHTTYF GMTSGHCTW
 ID NO 7: GL DIAAHLHYF QATDA CNAGGFSWR R
 ID NO 8: GL DILAHITYF QSMAT CAPIAIPWK R
 ID NO 9: GGLPDLAFHSHVWYFIHADACKGPGPLPR
 ID NO 10: LPLLTDFEAHIWYF VQVDA GKGPGLPFK R
 ID NO 11: TV SVLAHLWYF FAISE CLL
 ID NO 12: TV DVLAHLWYF FAISE CLL
 ID NO 13: GT SIDAHRWYF IYISE CS
 ID NO 14: IP DIPAHLWYF GLIGT CL
 ID NO 15: FSEL NAKDHSEYP GMH

ID NO:	微生物	SEQ ID NO.:
1.	曲柄犁头霉	3
2.	<i>Absidia corymbifera</i>	4
3.	曼赫根毛霉	5
4.	德氏根霉(米)	6
5.	黑曲霉	7
6.	塔宾曲霉	8
7.	尖镰孢	9
8.	异孢镰孢	10
9.	米曲霉	11
10.	沙门柏干酪青霉	12

图 1(续)

11.	臭曲霉	13
12	黑曲霉	14
13.	米曲霉	15
14.	细毛嗜热霉	2
15.	<i>Landerina penisapora</i>	16

脂肪酶序列的比对

图 1(续)