

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101374948 B

(45) 授权公告日 2012. 04. 11

(21) 申请号 200480008007. 2

C12P 21/06 (2006. 01)

(22) 申请日 2004. 03. 26

C12Q 1/68 (2006. 01)

C07H 21/04 (2006. 01)

(30) 优先权数据

60/459, 734 2003. 04. 01 US

(56) 对比文件

WO 03000941 A2, 2003. 01. 03,

Shou Takashima, 等. Cloning, sequencing, and expression of the cellulase genes of *Humicola grisea* var. *thermoidea*. 《Journal of Biotechnology》. 1996, 第 50 卷 (第 2-3 期), 图 1, 摘要.

(85) PCT 申请进入国家阶段日

2005. 09. 23

(86) PCT 申请的申请数据

PCT/US2004/009296 2004. 03. 26

(87) PCT 申请的公布数据

W02005/001065 EN 2005. 01. 06

审查员 廖雅静

(73) 专利权人 金克克国际有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 E·A·拉雷纳斯 F·胡德埃格伯

P·瓜尔费第 C·米钦森

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 凌立

(51) Int. Cl.

C12N 9/24 (2006. 01)

C12N 9/42 (2006. 01)

C12N 15/70 (2006. 01)

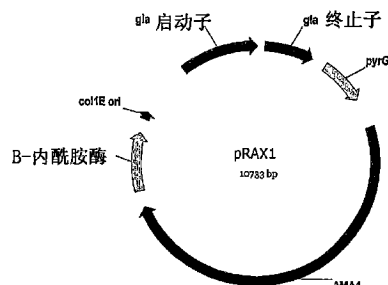
权利要求书 1 页 说明书 30 页 附图 16 页

(54) 发明名称

灰腐质霉 CBH1. 1 变体

(57) 摘要

公开了灰腐质霉 (*Humicola grisea*) Ce17A (CBH1. 1) 变体、红褐肉座菌 (*H. jecorina*) CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 (*S. thermophilum*) CBH1, 和编码它们的核酸, 以及产生它们的方法。变体纤维素酶具有糖基水解酶 7A 家族的氨基酸序列, 但在其中, 一个或多个氨基酸残基被替代。



pRAX1

1. 按重量计至少 92% 的具有纤维二糖水解酶 I 活性的多肽, 其中所述多肽是序列为 SEQ ID NO :3 的 CBH1.1 变体。
2. 权利要求 1 所述的多肽, 其来自灰腐质霉 (*H. grisea*)。
3. 编码纤维二糖水解酶的多核苷酸, 其中所述纤维二糖水解酶是序列为 SEQ ID NO :3 的 CBH1.1 变体。
4. 核酸构建物, 其含有权利要求 3 所述的核苷酸序列, 该核苷酸序列有效连接于一个或多个调控序列。
5. 重组表达载体, 其包含权利要求 4 所述的核酸构建物。
6. 重组宿主细胞, 其包含权利要求 4 所述的核酸构建物。
7. 用于生产 CBH1 多肽的方法, 所述方法包括:
  - a) 用包含权利要求 3 所述的多核苷酸的核酸转化宿主细胞;
  - b) 在产生多肽的条件下, 培养所述宿主细胞; 和
  - c) 回收所述多肽。
8. 组合物, 其含有权利要求 1 所述的具有纤维二糖水解酶 I 活性的多肽。
9. 将生物材料转化为糖的方法, 其包括: 将所述生物材料与权利要求 1 所述的多肽接触, 其中所述多肽相比于里氏木霉具有增强的活性, 所述的活性是在 65°C 下的 PCS 转化测定中, 或者在 38°C 下的 PASC 测定中测定得到。
10. 细胞培养组合物, 其包括具有纤维二糖水解酶 I 活性的多肽, 其中所述多肽是序列为 SEQ ID NO :3 的 CBH1.1 变体。
11. 权利要求 10 所述的细胞培养组合物, 其中所述多肽进一步包括单个序列。
12. 权利要求 10 所述的细胞培养组合物, 其中所述培养物中的所述细胞是丝状真菌细胞。

## 灰腐质霉 CBH1.1 变体

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求 2003 年 4 月 1 日提交的美国临时申请 60/459,734 ( 律师案卷编号是 GC794P) 的优先权, 该临时申请在此并入, 作为参考。

[0003] 关于在联邦政府资助的研究和开发项目中做出的发明的权利的声明

[0004] 本工作的一部分由与美国国家再生能源实验室签定的分包合同 ZC0-0-30017-01 资助进行, 而该分包合同隶属于与美国能源部签定的基本合同 DE-AC36-99G010337。因此, 美国政府可以拥有本发明的某些权利。

### 技术领域

[0005] 本发明涉及具有纤维二糖水解酶 I ( 也表示为 CBH I 或 CBH1) 活性的多肽, 以及具有编码所述多肽的核苷酸序列的多核苷酸。本发明也涉及核酸构建物、载体和含有所述核酸构建物的宿主细胞, 以及产生和使用所述多肽的方法。

### 背景技术

[0006] 纤维素是重要的工业原材料和可再生资源。天然纤维素的物理结构和形态是复杂的, 其结构的细节之处很难用试验的方法确定。然而, 纤维素的化学组成却是简单的, 由通过  $\beta$ -1,4-糖苷键连接起来的 D-葡萄糖残基组成, 形成线性链。

[0007] 要有效地消化纤维素, 需要多种类型的酶共同作用。要将纤维素转化为葡萄糖, 至少 3 类酶是必需的: 内切 (1,4)- $\beta$ -D-葡聚糖酶 (EC 3.1.4), 其随机切割纤维素链; 纤维二糖水解酶 (EC 3.1.91), 其从纤维素链末端切割掉纤维二糖单元, 和  $\beta$ -葡糖苷酶 (EC 3.1.21), 其将纤维二糖和可溶性纤维糊精转化为葡萄糖。在这 3 类涉及纤维素降解的酶中, 纤维二糖水解酶是降解天然晶体状纤维素的关键酶。

[0008] 外切纤维二糖水解酶 ( 纤维二糖水解酶 I 或 CBH1) 是指这样的纤维二糖水解酶, 其通过从纤维素聚合物链的非还原端水解出纤维二糖来降解纤维素。

[0009] 本发明的一个目标是提供具有纤维二糖水解酶 I 活性的改良多肽, 和编码所述多肽的多核苷酸。所述的改良多肽可以具有改善的比活性和 / 或改善的稳定性, 特别是改善的热稳定性。

[0010] 尽管纤维素组合物在之前已被描述过, 但仍存在着对新的和改进的纤维素组合物的需求, 它们将用于家用洗涤剂、石磨洗组合物或者洗衣洗涤剂, 等等。显示出改进的性能的纤维素酶是特别有价值的。

[0011]

### 参考文献

[0012] Altschul, S. F., et al., J. Mol. Biol. 215 :403-410, 1990.

[0013] Altschul, S. F., et al., Nucleic Acids Res. 25 :3389-3402, 1997.

[0014] Aro, N., et al., J. Biol. Chem., 10. 1074/M003624200, April 13, 2001.

[0015] Aubert, et al., Ed., p11 et seq., Academic Press, 1988.

[0016] Ausubel G. M., et al. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, JohnWiley &

Sons, New York, N. Y. ,1993.

- [0017] Baker et al. , *Appl. Biochem. and Biotechnol.* 45/46 :245-256,1994.
- [0018] Bhikhabhai, R. et al. , *J. Appl. Biochem.* 6 :336,1984.
- [0019] Boel et al. *EMBO J* 3 :1581-1585 1984.
- [0020] Brumbauer, A. et al. , *Bioseparation* 7 :287-295,1999.
- [0021] Deutscher, M. P. , *Methods Enzymol.* 182 :779-80,1990.
- [0022] Ellouz, S. et al. , *J. Chromatography* 396 :307,1987.
- [0023] Filho, et al. *Can. J. Microbiol.* 42 :1-5,1996.
- [0024] Fliess, A. , et al. , *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17 :314,1983.
- [0025] Goedegebuur et al. , *Curr. Genet.* 41 :89-98,2002.
- [0026] Goyal, A. et al. *Bioresource Technol.* 36 :37,1991.
- [0027] Hazell, B. W. et al. , *Lett. Appl. Microbiol.* 30 :282-286,2000.
- [0028] Herr et al. , *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 5 :29-36,1978.
- [0029] Hu et al. , *Mol. Cell. Biol.* 11 :5792-9,1991.
- [0030] Jeeves et al. , *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 9 :327-369,1991.
- [0031] Kawaguchi, T et al. , *Gene* 173(2) :287-8,1996.
- [0032] Kelley et al. *EMBO J.* 4 :475-479,1985.
- [0033] Knowles, J. et al. , *TIBTECH* 5, 255-261,1987.
- [0034] Krishna, S. et al. , *Bioresource Tech.* 77 :193-196,2001.
- [0035] Kuhis K. et al. , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93(15) :7755-7760,1996.
- [0036] Kumar, A. , et al. , *Textile Chemist and Colorist* 29 :37-42,1997.
- [0037] Medve, J. et al. , *J. Chromatography A* 808 :153,1998.
- [0038] Mohagheghi, A. et al. , *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36 :435-443,1986.
- [0039] Nieves et al. , *Appl. Biochem. and Biotechnol.* 51/52 211-223,1995.
- [0040] Nunberg et al. *Mol. Cell Biol.* 4 :2306-2315 1984.
- [0041] Ohmiya et al. , *Biotechnol. Gen. Engineer. Rev.* 14 :365-414,1997.
- [0042] Okada, M. et al. , *Appl. Environ. Microbiol.* , 64 :555-563,1988.
- [0043] Ooi et al. , *Nucleic Acid Res.* 18 :5884,1990
- [0044] Penttila et al. , *Gene* 45 :253-263,1986.
- [0045] Penttila et al. , *Gene* 61 :155-164,1987.
- [0046] Penttila et al. , *Gene* 63 :103-112,1988.
- [0047] Pere, J. , et al. , In *Proc. Tappi Pulping Conf.* , Nashville, TN, 27-31, pp. 693-696,1996.
- [0048] Saarilahti et al. , *Gene* 90 :9-14,1990.
- [0049] Sakamoto et al. , *Curr. Genet.* 27 :435-439,1995.
- [0050] Saloheimo M, et al. , *Gene* 63 :11-22,1988.
- [0051] Saloheimo, A. et al. , *Molecular Microbiology*, 13 :219-228,1994.
- [0052] Saloheimo, M. et al. , *Eur. J. Biochem.* , 249 :584-591,1997.
- [0053] Sambrook et al. , *MOLECULAR CLONING :A LABORATORY MANUAL* (Second Edition),

Cold Spring Harbor Press, Plainview, N. Y. ,1989.

- [0054] Schulen, Methods Enzymol. ,160,25, pages 234 et seq,1988.
- [0055] Scopes, Methods Enzymol. 90 Pt E :479-90,1982.
- [0056] Shoemaker et al. , Biochem. Biophys. Acat. 523 :133-146 1978.
- [0057] Shoemaker, S. et al. , Bio/Technology, 1 :691-696,1983
- [0058] Srisodsuk, M. et al. J. Biol. Chem. 268 (28) :20756-20761,1993.
- [0059] Strathern et al. , eds. (1981)The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces.
- [0060] Suurnakki, A. et al. , Cellulose 7 :189-209,2000.
- [0061] Teeri, T. et al. , Gene, 51 :43-52,1987
- [0062] Tilbeurgh, H. et al. , FEBS Lett. 16 :215,1984.
- [0063] Tomaz, C. and Queiroz, J. , J. Chromatography A 865 :123-128,1999.
- [0064] Tomme, P. et al. , Eur. J. Biochem. 170 :575-581,1988.
- [0065] Van Tilbeurgh, H. et al. , FEBS Lett. 204 :223-227,1986.
- [0066] Ward, M. et al. , Appl. Microbiol. Biotechnol. 39 :738-743,1993.
- [0067] Wood, Biochem. Soc. Trans. , 13, pp. 407-410,1985.
- [0068] Wood et al. , METHODS IN ENZYMOLOGY, 160,25, p. 87 et seq. , Academic Press, New York,1988.

[0069] 发明概述

[0070] 在一个方面,本发明涉及具有纤维二糖水解酶 I 活性的多肽,其选自:

[0071] a) 灰腐质霉 (*Humicola grisea*)CBH1.1 变体,来源于 CBS 225.63;

[0072] b) 灰腐质霉 CBH1.1 变体,其具有图 3 中给出的序列;

[0073] c) 灰腐质霉 CBH1.1 变体,其具有图 4 中给出的序列;

[0074] d) 红褐肉座菌 (*Hypocrea jecorina*)CBH1 变体,如本文中所述;和

[0075] e) 嗜热小柱孢霉 (*Scytalidium thermophilum*)CBH1,来源于 CBS 671.88。

[0076] 在第二个方面,本发明涉及多核苷酸,其编码灰腐质霉 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1。在一种实施方案中,多核苷酸编码来源于 CBS 225.63 的灰腐质霉 CBH1.1 变体。在另一实施方案中,多核苷酸编码显示于图 3 中的灰腐质霉 CBH1.1 变体。在另一实施方案中,多核苷酸编码显示于图 4 中的灰腐质霉 CBH1.1 变体。

[0077] 在一种一般性的实施方案中,编码灰腐质霉 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 的多核苷酸与本文中提供的灰腐质霉 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 编码序列具有至少 90%,优选至少 95%、98%,或更多的序列同一性(sequence identity),其中序列同一性可以使用序列联配程序(sequence alignment program)来测定。

[0078] 在第三个方面,本发明涉及包含核苷酸序列的核酸构建物,所述核苷酸序列编码本发明的 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1,它们可有效连接(operably linked)于一个或多个控制序列(control sequences),所述控制序列指导 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 在合适的宿主中产生。

[0079] 在第四个方面,本发明涉及重组表达载体,其包含本发明的核酸构建物。

[0080] 在第五个方面,本发明涉及重组宿主细胞,其包含本发明的核酸构建物。

[0081] 在第六个方面,本发明涉及用于产生 CBH1 的方法,该方法包括:

[0082] a) 用编码本文中描述的灰腐质霉 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 的核酸转化宿主细胞;

[0083] b) 在产生多肽的条件下培养宿主细胞;和

[0084] c) 回收所述多肽。

[0085] 附图简述

[0086] 图 1 是灰腐质霉 CBH1.1 的基因组 DNA 序列 (SEQ ID NO :1)。推定的内含子用粗体和下划线表示。

[0087] 图 2 是灰腐质霉 CBH1.1 的 cDNA 序列 (SEQ ID NO :2)。推定的内含子序列 (图 1 中的核苷酸 413-472) 已被删除。

[0088] 图 3 是灰腐质霉 CBH1.1 的信号序列和成熟氨基酸序列 (SEQ ID NO :3)。信号序列用粗体和下划线表示。

[0089] 图 4 是灰腐质霉 CBH1.1 的成熟氨基酸序列 (SEQ ID NO :4)。

[0090] 图 5 显示了两个公开序列与变异灰腐质霉 CBH1.1 成熟序列的联配比对。两个公开序列是 X17258 (SEQ ID NO :5) 和 D63515 (SEQ ID NO :6)。

[0091] 图 6 是 pRAX1 质粒。该载体是以质粒 pGAPT2 为基础,不同的是构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*) 基因组 DNA 片段 AMA1 序列的 5259bp 的 HindIII 片段 (*Molecular Microbiology* 1996 19 :565-574) 被插入。碱基 1-1134 包含黑曲霉葡萄糖淀粉酶基因启动子。碱基 3098 至 3356 和 4950 至 4971 包含黑曲霉葡萄糖淀粉酶终止子。构巢曲霉 pyrG 基因被插入到 3357 至 4949,作为真菌转化的标记 (marker)。存在可以插入基因的多克隆位点 (MCS)。

[0092] 图 7 是 pRAXdes2 载体骨架 (backbone)。此载体是基于质粒载体 pRAX1。入门 (gateway) 序列盒已被插入 pRAX1 载体 (用环状质粒内的箭头表示)。此序列盒含有重组序列 attR1 和 attR2 和选择性标记 (marker) catH 和 ccdB。该载体是根据 Gateway™ Cloning Technology 第一版 34-38 页中的指南被制备,并且仅可以在 invitrogen 的大肠杆菌 DB3.1 中复制;在其它大肠杆菌宿主中,ccdB 基因是致命的。首先,用含有 attB1/2 重组序列的引物获得 PCR 片段。将此片段与 pDONR201 (可以从 Invitrogen 公司购得) 重组;此载体含有 attP1/2 重组序列,catH 和 ccdB 位于重组位点之间。应用 invitrogen 的 BP clonase 酶,将该 PCR 片段重组到被称为 ENTRY 的载体中,带有插入的 PCR 片段的克隆可以用 50  $\mu$ g/ml 卡那霉素选择出来,原因是表达 ccdB 的克隆不存活。现在,att 序列被改变,并且被称为 attL1 和 attL2。第二个步骤是,用 pRAXdes2 载体 (在重组位点之间含有 attR1 和 attR2 catH 和 ccdB) 重组此克隆。应用 invitrogen 的 LP clonase 酶,将来自 ENTRY 载体的插入片段重组到目标载体 (destination vsctor) 中。应用 100  $\mu$ g/ml 氨苄青霉素,仅 pRAXCBH1 载体被选择出来,原因是 ccdB 是致命的,而且 ENTRY 载体对氨苄青霉素敏感。通过这种方法,现在,表达载体得以制备并且可以用于转化黑曲霉。灰腐质霉 CBH1.1 表达在曲霉葡萄糖淀粉酶启动子和终止子的控制之下。转化标记 pyrG 基因和 AMA1 序列来自构巢曲霉。

[0093] 图 8 显示了 pRAXdes2cbh1 载体,其被用于在曲霉中表达编码 CBH1.1 变体的核酸。通过 att 序列的同源重组,编码 CBH1.1 酶变体的核酸被克隆入载体。

[0094] 图 9 显示了各种 CBH1 纤维素酶在纤维素转化测定中的活性,该测定在 38℃ 进行一天,每 g 纤维素总酶用量为 15mg,使用预处理的玉米秸秆 (PCS) 作为底物。该测定按约 50 : 50 的质量比,将待测试的 CBH1.1 样品与已剔除 CBH1 的里氏木霉菌株生长物上清液混合。在该测定中,38℃ 时,灰腐质霉 CBH1.1 不突出。

[0095] 文字说明 :de1CBH1 是去除了内源性 CBH1 的菌株 ;它是 CBH1 缺陷型。rCBH1 是从黑曲霉菌株纯化得到的酶,该黑曲霉菌株插入有里氏木霉 CBH1 基因。Aniger 是从过量表达其内源性纤维素酶 CBHB 的黑曲霉菌株得到的纯化的 CBHB ;Hschweinitzii/An 是从黑曲霉菌株获得的纯化的 CBH1,该黑曲霉菌株表达来自施韦尼兹肉座菌 (*Hypocrea schweinitzii*) 的插入的异源 CBH1 基因。Tpseudokoni/An 是从黑曲霉菌株获得的纯化的 CBH1,该黑曲霉菌株表达来自假康宁木霉 (*Trichoderma pseudokoningii*) 的插入的异源 CBH1 基因。Hgrisea/An-1 是从一个黑曲霉克隆获得的纯化的 CBH1.1,该克隆表达来自灰腐质霉的插入的异源 CBH1 基因。Hgrisea/An-2 是来自第二个黑曲霉克隆的纯化的 CBH1.1,该克隆表达来自灰腐质霉的插入的异源 CBH1.1 基因。Hgrisea/An-1 和 Hgrisea/An-2 是来自黑曲霉的同一次转化的两个克隆,该转化是用灰腐质霉变异 CBH1.1 基因进行转化。

[0096] 图 10 显示了 CBH1 纤维素酶在纤维素转化测定中的活性,该测定在 65℃ 进行一天,每 g 纤维素总酶用量为 15mg,使用预处理的玉米秸秆 (PCS) 作为底物。该测定按约 50 : 50 的质量比,将待测试的 CBH1 样品与已剔除 CBH1 的里氏木霉菌株生长物上清液混合。与在 38℃ 下获得的结果不同,两个灰腐质霉 CBH1.1 样品明显比其他样品更好。文字说明 :与图 9 相同。

[0097] 图 11 显示了灰腐质霉 CBH1.1 和里氏木霉 CBH1 纤维素酶在纤维素转化测定中的活性,该测定在 38℃ 进行一天,每 g 纤维素总酶用量为 15mg,使用预处理的玉米秸秆 (PCS) 作为底物。该测定按约 50 : 50 的质量比,将待测试的 CBH1.1 样品与已剔除 CBH1 的里氏木霉菌株生长物上清液混合。在该测定中,38℃ 时,灰腐质霉 CBH1.1 不突出。使用本领域已知的方法,从里氏木霉全纤维素酶中纯化得到天然 CBH1 (nCBH1) (参见如下描述的用于纯化 CBH 的方法)。

[0098] 图 12 显示了灰腐质霉 CBH1.1 和里氏木霉 rCBH1 酶各自在纤维素转化测定中的活性,该测定在 65℃ 进行一天,每 g 纤维素总酶用量为 15mg,使用预处理的玉米秸秆 (PCS) 作为底物。该测定按约 50 : 50 的质量比,将待测试的 CBH1 样品与已剔除 CBH1 的里氏木霉菌株生长物上清液混合。与 38℃ 时的结果不同,灰腐质霉 CBH1.1 样品优于里氏木霉。

[0099] 图 13A-C 显示了在纤维素转化测定中,CBH1 纤维素酶在不同时刻,对磷酸溶胀纤维素 (PASC) 的活性。在图 A 中,温度是 38℃,测定进行 120 分钟。在图 B 中,在 65℃ 进行测定。在图 C 中,在 70℃ 进行测定。可以看出,在任何测定时间,变异体灰腐质霉 CBH1.1 都比里氏木霉 CBH1 释放出更多的纤维二糖。

[0100] 图 14A-14C 显示了嗜热小柱孢霉 CBH1 的基因组 DNA (SEQ ID NO :7)、cDNA (SEQ ID NO :8) 和氨基酸 (SEQ ID NO :9) 序列。

[0101] 图 15 显示了成熟形式 (即,无信号序列) 的灰腐质霉 CBH1.1、红褐肉座菌 CBH1 (SEQ ID NO :10) 和嗜热小柱孢霉 CBH1 (SEQ ID NO :11) 之间的联配比对。也显示了共有序列 (SEQ ID NO :12)。红褐肉座菌 CBH1 催化结构域的 6 个残基用粗体和下划线示出,表示这些位点对于增加的稳定性是重要的。

[0102] 图 16A 和 B 显示了灰腐质霉 CBH1.1 和嗜热小柱孢霉 CBH1 的热稳定性。

[0103] 发明详述

[0104] 现在,将通过参考下面的定义和实施例来详细描述本发明。此处提及的所有的专利和出版物,包括在这些专利和出版物中公开的序列,都特意地以引用方式并入。

[0105] 除非本文另有定义,此处应用的所有技术术语和科学术语,皆具有本发明所属领域的普通技术人员所普遍理解的含义。Singleton, et al., DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, 2D ED., John Wiley and Sons, New York (1994) 和 Hale & Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY, Harper Perennial, NY (1991) 向技术人员提供了本发明中应用的许多术语的一般性解释。尽管与此处描述的方法和材料相似或者等价的任意方法和材料可以被用于本发明的实践或者试验中,但仍描述了优选的方法和材料。数字范围包括用于限定该范围的端值。除非另有指明,核酸以 5' -3' 的方向从左至右书写;氨基酸序列以氨基末端向羧基末端的方向从左至右书写。关于本领域的定义和术语,实践者可以特别地参考 Sambrook et al., 1989 和 Ausubel FM et al., 1993。应该理解,本发明不限于所描述的具体的方法学、方案和试剂,因为它们可以变化。

[0106] 本文提出的标题不是对本发明各个方面或者各种实施方案的限制,可以通过参考整个说明书来考虑它们。因此,通过将说明书作为一个整体来参考,下面即将被定义的术语可以被更加全面地定义。

[0107] 本文引用的所有出版物均特意地通过引用方式并入本文,以用于描述和揭示可能与本发明联系使用的组合物和方法学。

[0108] I. 定义

[0109] “纤维素酶”(cellulase)、“纤维水解酶”(cellulolytic enzymes) 或者“纤维素酶酶”(cellulase enzymes) 是指细菌或者真菌的外切葡聚糖酶(exoglucanases) 或者外切纤维二糖水解酶(exocellobiohydrolases), 和/或内切葡聚糖酶(endoglucanases), 和/或  $\beta$ -葡糖苷酶。

[0110] 术语“纤维素酶”指一类能将纤维素聚合物水解成更短的纤维寡糖低聚物、纤维二糖和/或葡萄糖的酶。纤维素酶的许多例子,诸如外切葡聚糖酶、外切纤维二糖水解酶、内切葡聚糖酶和葡糖苷酶已经从分解纤维素的微生物中获得,所述的微生物特别地包括真菌和细菌。由这些微生物产生的酶是具有三类功能的蛋白的混合物:内切葡聚糖酶(EG)、纤维二糖水解酶(CBH) 和  $\beta$ -葡糖苷酶,它们可用于将纤维素转化为葡萄糖。这三类不同的纤维素酶协同发挥作用,以将纤维素和它的衍生物转化为葡萄糖。

[0111] 许多微生物产生水解纤维素的酶,包括真菌木霉(Trichoderma)、堆肥细菌高温单孢菌(Thermomonospora)、杆菌(Bacillus) 和纤维单孢菌(Cellulomonas);链霉菌(Streptomyces);和真菌腐质霉(Humicola)、曲霉(Aspergillus) 和镰孢菌(Fusarium)。

[0112] “纤维二糖水解酶 I 活性”指纤维素 1,4- $\beta$ -纤维二糖酶(也称为外切-葡聚糖酶、外切-纤维二糖水解酶、CBH1 或 1,4- $\beta$ -纤维二糖水解酶)活性,如酶分类 EC3.2.1.91 中所定义的,其催化纤维素和纤维四糖的 1,4- $\beta$ -D-糖苷键连接的水解,从而由纤维素链的非还原端释放纤维二糖。对于本发明,CBH1 活性可以依据实施例 4 中描述的方法进行测定。

[0113] 术语“宿主细胞(host cell)”是指这样的细胞,其含有载体并支持该表达构建物

的复制和 / 或转录或转录和翻译 (表达)。用于本发明的宿主细胞可以是原核细胞, 诸如大肠杆菌, 或真核细胞, 诸如酵母、植物、昆虫、两栖动物或哺乳动物细胞。一般来说, 宿主细胞是丝状真菌。

[0114] 术语“重组子”, 当用于例如细胞或者核酸、蛋白、载体时, 表示该细胞、核酸、蛋白或者载体已经通过异源性核酸或蛋白的导入或者天然核酸或蛋白的改造而被修饰, 或者该细胞衍生于如此修饰的细胞。因此, 例如, 重组细胞表达在该细胞的天然 (非重组) 形式中未发现的基因, 或者表达的是天然基因, 但是该天然基因在其它情况下是异常地表达、表达不足或者根本不表达。

[0115] 术语“促分泌信号序列”表示编码多肽 (“促分泌肽” 或者 “分泌信号肽”) 的 DNA 序列, 促分泌肽作为更大的多肽的一部分, 指导该更大的多肽穿过合成它的细胞的分泌通路。在通过所述分泌通路的过程中, 该更大的肽通常被切割, 以去除促分泌肽, 从而产生分泌信号肽和较小的肽, 后者通常被称为成熟多肽 (mature polypeptide)。

[0116] 如此处所应用, 短语“全纤维素酶制备物 (whole cellulase preparation)”和“全纤维素酶组合物 (whole cellulase composition)”可以互换地应用, 可以指天然发生和非天然发生的组合物。“天然发生的”组合物是由天然发生的来源产生的, 其含有一个或者多个纤维二糖水解酶类型、一个或者多个内切葡聚糖酶类型, 和一个或者多个  $\beta$ - 葡糖苷酶成分, 其中这些成分中的每一个以由所述来源所产生的比率被发现。天然发生的组合物是由就纤维素水解酶而言未加以修饰的生物体产生的组合物, 因此酶成分的比率与由天然生物体生成的相比没有改变。

[0117] “非天然发生的”组合物包括那些如下产生的组合物: (1) 以天然发生的比率或者非天然发生的比率即改变的比率将纤维水解酶成分组合起来; 或者 (2) 修饰生物体, 以过量表达或者抑制表达一种或者多种纤维素水解酶; 或者 (3) 修饰生物体, 以致于至少一种纤维素水解酶被剔除; 或者 (4) 修饰生物体, 以表达异源的纤维素水解酶成分。

[0118] 如此处所应用, 术语“启动子”是指核酸序列, 其功能是指导下游基因的转录。启动子通常适用于表达靶基因的宿主细胞。启动子与其它转录调节核酸序列和翻译调节核酸序列 (也被称为“调控序列”), 对表达特定的基因是必需的。通常地, 转录调节序列和翻译调节序列包括但不限于, 启动子序列、核糖体结合位点、转录起始序列和转录终止序列、翻译起始序列和翻译终止序列, 以及增强子或者激活子序列。启动子可以是在正常情况下与下游基因相联系的启动子, 或它可以是异源的, 即, 来自于其它基因或其它微生物, 只要它能发挥指导该基因表达的功能。在一个方面, 启动子是诱导型启动子。在一个方面, 启动子是里氏木霉 *cbh1* 启动子, 其在 GenBank 中的编号为 D86235。在另一方面, 启动子是 *acbhII* 或木聚糖酶启动子, 其来自于里氏木霉。

[0119] 启动子包括来自下述基因的启动子: 泡盛曲霉 (*A. awamori*) 或黑曲霉葡萄糖淀粉酶基因 (Nunberg, J. H. et al. (1984) *Mol. Cell. Biol.* 4, 2306-2315; Boel, E. et al. (1984) *EMBO J.* 3, 1581-1585); 此处的米黑毛霉 (*Mucor miehei*) 羧基蛋白酶基因; 里氏木霉纤维二糖水解酶 I 基因 (Shoemaker, S. P. et al. (1984) 欧洲专利申请 EP00137280A1); 构巢曲霉 *trpC* 基因 (Yelton, M. et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1470-1474; Mullaney, E. J. et al. (1985) *Mol. Gen. Genet.* 199, 37-45); 构巢曲霉 *alcA* 基因 (Lockington, R. A. et al. (1986) *Gene* 33, 137-149); 构巢曲霉 *tpiA* 基因 (McKnight, G. L. et al. (1986) *Cell* 46,

143-147) ; 构巢曲霉 *amdS* 基因 (Hynes, M. J. et al. (1983) *Mol. Cell Biol.* 3, 1430-1439) ; 里氏木霉 *xln* 基因 ; 里氏木霉 *cbh2* 基因 ; 里氏木霉 *egl1* 基因 ; 里氏木霉 *egl2* 基因 ; 里氏木霉 *egl3* 基因, 以及高等真核生物启动子, 诸如 SV40 早期启动子 (Barclay, S. L. and E. Meller (1983) *Molecular and Cellular Biology* 3, 2117-2130) 。

[0120] 当一个核酸被置于与另一个核酸序列的功能联系中时, 该核酸便是“有效连接的 (operably linked)”。例如, 如果多肽是以参与该多肽的分泌的前蛋白形式被表达, 那么编码促分泌前导序列即信号肽的 DNA 便与该多肽的 DNA 是有效连接的 ; 如果启动子或增强子可影响编码序列的转录, 那么该启动子或增强子便是有效连接于该序列 ; 或者, 如果核糖体结合位点被定位以致于可协助翻译, 那么该核糖体结合位点便是有效连接于编码序列。通常地, “有效连接”意味着被连接的 DNA 序列是相邻的, 而且在促分泌前导序列的情形中, 是相邻的和处于正确的阅读框架中的。然而, 增强子不一定是相邻的。连接可以通过在方便的限制性位点进行连接而完成。如果这样的位点不存在, 可以按照常规的实践, 应用合成的寡核苷酸接头或者连接子。

[0121] 如此处所应用, 术语“基因”是指参与生成多肽链的 DNA 片段, 可以包括或者不包括编码区之前的区域和之后的区域, 例如, 5' 非翻译区 (5' UTR) 或者“前导”序列和 3' UTR 或者“尾部”序列, 也可以包括或者不包括各个编码片段 (外显子) 之间的间插序列 (内含子)。

[0122] 基因可以编码在治疗上具有重要意义的蛋白质或肽, 诸如生长因子、细胞因子、配体、受体和抑制剂, 以及疫苗和抗体。基因可以编码具有重要商业价值的重要工业用蛋白或肽, 诸如酶, 例如纤维素酶, 诸如灰腐质霉 CBH1. 1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1。感兴趣的基因可以是天然发生的基因、突变的基因或合成的基因。

[0123] 本发明的“丝状真菌”是真核微生物, 包括所有丝状形式的真菌亚门 (Eumycotina) (参见 Alexopoulos, C. J. (1962), *Introductory Mycology*, New York : Wiley)。这些真菌的特征在于营养菌丝, 具有由几丁质、纤维素和其它复合多糖组成的细胞壁。本发明的丝状真菌在形态学、生理学和遗传性上不同于酵母。丝状真菌的营养生长是通过菌丝的延长, 并且碳代谢是专性需氧的。与之不同, 酵母如酿酒酵母的营养生长是通过单细胞原植体的出芽, 并且碳代谢可以是发酵的。酿酒酵母具有显著的十分稳定的二倍体期, 而在丝状真菌, 例如曲霉和脉孢菌中, 二倍体仅短暂地出现于减数分裂之前。酿酒酵母有 17 条染色体, 而构巢曲霉 (*A. nidulans*) 和粗糙脉孢菌 (*N. crassa*) 分别具有 8 条和 7 条。酿酒酵母和丝状真菌的进一步的例证包括, 酿酒酵母不能加工曲霉和木霉内含子, 不能识别丝状真菌的许多转录调控因子 (Innis, M. A. et al. (1985) *Science*, 228, 21-26)。

[0124] 当用于谈及核酸部分时, 术语“异源的”(“heterologous”)表示, 该核酸含有 2 个或者更多个子序列 (subsequences), 其在正常情况下在自然界中未发现相互之间具有同样的关系。例如, 该核酸典型地通过重组产生, 具有例如来源于不相关的基因的 2 个或者更多个序列, 它们被排列以形成具有新功能的核酸, 例如, 所述的序列可以是一个来源的启动子和另一个来源的编码区域。类似地, 异源蛋白常常涉及两个或者更多个子序列, 其在自然界中并未发现具有同样的相互关系 (例如, 融合蛋白)。

[0125] 如此处所应用, 术语“分离的”或者“纯化的”是指与同其天然联系的至少一种成分分离的核酸或者氨基酸。

[0126] 在本文中,术语“基本上纯的多肽 (substantially pure polypeptide)”是指这样的多肽制备物,其含有按重量计最多 10%的与之天然联系的其他多肽材料(其他多肽材料的更低百分比是优选的,例如按重量计最多 8%、按重量计最多 6%、按重量计最多 5%、按重量计最多 4%、按重量计最多 3%、按重量计最多 2%、按重量计最多 1%、按重量计最多 0.5%)。因此,基本上纯的多肽的纯度优选为至少 92%,即,按重量计该基本上纯的多肽占存在于制备物中总多肽材料的至少 92%,更高的百分比是优选的,例如纯度至少 94%、纯度至少 95%、纯度至少 96%、纯度至少 97%、纯度至少 98%、纯度至少 99%、纯度至少 99.5%。公开于本文中的多肽优选为基本上纯的形式。特别地,公开于本文中的多肽优选是“实质上纯的形式 (essentially pure form)”,即,该多肽制备物实质上不含有与之天然联系的其它多肽材料。这可以,例如,通过利用已知的重组方法制备多肽来实现。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”是同义的。

[0127] 一般来说,在中度至高度严紧 (stringency) 的条件下,编码灰腐质霉 CBH1.1 变体的核酸分子会和本文提供为 SEQ ID NO :1 (灰腐质霉 CBH1.1 变体) 的序列杂交。然而,在一些情形下,应用的是具有大体上不同的密码子使用的编码 CBH1 的核苷酸序列,而由该编码 CBH1 的核苷酸序列编码的蛋白质具有和天然蛋白质相同的或者大体上相同的氨基酸序列。例如,根据特定密码子被宿主应用的频率,编码序列可以被修饰以有利于 CBH1 在特定原核细胞或者真核细胞表达系统中更快地表达,例如,Te'o, et al. (2000) 描述了在丝状真菌中表达基因的最优化方式。

[0128] 如果两个序列在中度至高度严紧的杂交和洗脱条件下彼此特异地杂交,那么便认为其中一个核酸对于另一个参照核酸,是“可选择性地杂交”的。杂交温度是基于核酸结合复合物或者探针的解链温度 ( $T_m$ )。例如“最大的严紧性”典型地发生在大约  $T_m - 5^\circ\text{C}$  (低于探针的  $T_m - 5^\circ\text{C}$ );“高严紧性”发生在低于  $T_m$  大约  $5-10^\circ\text{C}$ ;“中度”或者“中间严紧性”发生在低于探针的  $T_m$  大约  $10-20^\circ\text{C}$ ;“低严紧性”发生在低于  $T_m$  大约  $20-25^\circ\text{C}$ 。从功能上来说,最大严紧条件可以被用来鉴定与杂交探针具有严格同一性或者接近严格的同一性的序列,而高严紧条件被用来鉴定与探针具有大约 80% 或者更多的序列同一性的序列。

[0129] 中度严紧和高度严紧的杂交条件在本领域是公知的(参见,例如, Sambrook, et al., 1989, Chapters 9 and 11, 以及 Ausubel, F. M., et al., 1993, 在此特意地并入作为参考)。高度严紧条件的例子包括,在大约  $42^\circ\text{C}$ , 在 50% 甲酰胺、 $5\times\text{SSC}$ 、 $5\times\text{Denhardt}'\text{s}$  溶液、0.5% SDS 和  $100\ \mu\text{g/ml}$  变性载体 DNA 中杂交,随后,用  $2\times\text{SSC}$  和 0.5% SDS 室温洗涤 2 次,用  $0.1\times\text{SSC}$  和 0.5% SDS 在  $42^\circ\text{C}$  再洗涤 2 次。

[0130] 术语“% 同源性 (% homology)”与术语“% 同一性 (% identity)”在本文中可被交替使用,表示的是当使用序列联配程序进行比对时,编码灰腐质霉 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 氨基酸序列的核酸序列之间的核酸或氨基酸序列同一性水平。

[0131] 例如,如本文中所使用的,80% 同源性 与 80% 序列同一性是同一回事,它们由指定的算法测定,并且就此而言,对于某一长度的给定序列,该给定序列的同源物具有高于 80% 的序列同一性。与某一给定的序列例如本文所述的灰腐质霉 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 的编码序列相比,序列同一性的示范性水平包括但不限于 80%、85%、90%、95%、98% 或更高的同一性。

[0132] 可以被用来测定两序列之间的同一性的示范性计算机程序包括,但不限于 BLAST 程序组,诸如 BLASTN、BLASTX 和 TBLASTX、BLASTP 和 TBLASTN,其可以因特网上公开获得,网址为 [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)。也可参见,Altschul, et al., 1990 和 Altschul, et al., 1997。

[0133] 当评价给定核酸序列与在 GenBank DNA 序列数据库和其他公共数据库中的核酸的相关性时,通常使用 BLASTN 程序进行序列搜索。BLASTX 程序优选用于搜索这样的核酸序列,其所有阅读框已在 GenBank 蛋白序列数据库和其他公共数据库中被翻译成氨基酸序列。使用 BLASTN 和 BLASTX 的默认参数 (defaultparameters): 开放空位罚分 (open gap penalty) 为 11.0; 延伸空位罚分 (extended gap penalty) 为 1.0, 并利用 BLOSUM-62 矩阵。(参见如 Altschul, et al., 1997.)

[0134] 为了测定两条和更多条序列之间的“%同一性”,对选择的序列的优选联配,使用例如 MacVector version 6.5 的 CLUSTAL-W 程序来实施,用默认参数进行操作,包括开放空位罚分 10.0, 延伸空位罚分 0.1, 和 BLOSUM 30 相似性矩阵。

[0135] 如本文所应用,当用于描述细胞时,术语“转化的”、“稳定转化的”或者“转基因的”是指该细胞具有非天然的(异源的)核酸序列,其被整合入细胞的基因组中或者作为附加体质粒,经过多代之后依然被维持。

[0136] 如本文所应用,术语“表达”是指根据基因的核酸序列产生多肽的过程。此过程既包括转录又包括翻译。

[0137] 在谈及将核酸序列插入到细胞中时,术语“导入”是指“转染”或者“转化”或者“转导”,包括将核酸序列整合到真核细胞或者原核细胞中,其中所述核酸序列可以被并入到细胞的基因组(例如,染色体、质粒、质体或者线粒体 DNA),转变为自主复制子,或者短暂地表达(例如,转染的 mRNA)。

[0138] 术语“CBH1.1 表达 (CBH1.1 expression)”是指 CBH1.1 纤维素酶变体基因的转录和翻译,其产物包括前体 RNA、mRNA、多肽、翻译后加工的多肽。作为例子,对于 CBH1.1 表达的分析包括对 CBH1.1 蛋白进行蛋白质印迹、对 CBH1 mRNA 进行 Northern 印迹分析和逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 测定,和内切葡聚糖酶活性分析,如 Shoemaker S. P. and Brown R. D. Jr. (Biochim. Biophys. Acta, 1978, 523 :133-146) 以及 Schulen (1988) 描述的。类似地,如本文中所使用的,“CBH1 表达 (CBH1 expression)”指红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶基因的转录和翻译,其产物包括前体 RNA、mRNA、多肽、翻译后加工多肽。

[0139] 如本文中所使用的,术语“表面活性剂”是指在本领域通常被认为具有表面活性性质的任何化合物。因此,例如,表面活性剂包括阴离子、阳离子表面活性剂和非离子型表面活性剂,如通常发现于洗涤剂中的那些表面活性剂。阴离子表面活性剂包括线性的或者分支的烷基苯磺酸盐;具有线性或分支烷基基团或者烯基基团的烷基或烯基醚硫酸盐;烷基或烯基硫酸盐;烯基磺酸盐和烷基磺酸盐。兼性表面活性剂包括季铵磺酸盐和甜菜碱型兼性表面活性剂。这样的兼性表面活性剂在同一分子中既有正电荷基团又负电荷基团。非离子型表面活性剂可以包括聚乙二醇,以及更高级的脂肪酸链烷醇酰胺或者其氧化烯加合物、脂肪酸甘油单酯,和类似物。

[0140] 如本文所应用,术语“含纤维素的织物 (cellulose containing fabric)”是指

任何缝制或者非缝制的织物、纱或者纤维,由含棉或者不含棉的纤维素制成,或者由含棉或者不含棉的纤维素混合物制成,所述的纤维素混合物包括天然纤维素和人造纤维素(如黄麻、亚麻、苧麻、人造丝和莱赛尔纤维(lyocell))。

[0141] 如本文中所使用的,术语“含棉织物(cotton-containing fabric)”指缝制或者非缝制的织物、纱或纤维,其由纯棉或棉混合物制成,棉混合物包括棉织物(cottonwoven fabrics)、棉编织物(cotton knits)、斜纹粗棉布(cotton denims)、棉纱(cottonyarns)、原棉和类似物。

[0142] 如本文中所应用,术语“石磨洗组合物”是指用于石磨洗含纤维素的织物的制剂。石磨洗组合物被用于在出售之前,即,在生产过程中修饰含纤维素的织物。与之不同,洗涤剂组合物主要用于清洁污染的衣服,而不是用在生产过程中。

[0143] 如本文中所应用,术语“洗涤剂组合物(detergent composition)”是指打算应用于洗涤介质中用于洗涤污染的含纤维素织物的混合物。就本发明来说,除了纤维素酶和表面活性剂,这样的组合物还可以包括另外的水解酶、增洁剂、漂白剂、漂白催化剂、蓝色漂白剂(bluing agents)和荧光染料、结块抑制剂、掩蔽剂(maskingagents)、纤维素酶激活剂、抗氧化剂和增溶剂。

[0144] 如本文中所应用,术语“cbh1.1基因表达的降低或者消除”是指cbh1.1基因已经从基因组中删除,因此不能被重组宿主微生物表达,或者cbh1.1基因已经被修饰以致于有功能的CBH1.1酶不能被宿主微生物产生。

[0145] 术语“变体cbh1.1基因(variant cbh1.1 gene)”,或者“变体CBH1.1(variantCBH1.1)”分别指,来自灰腐质霉的cbh1.1基因的核酸序列已经通过去除、增加和/或操纵编码序列而被改变,或者被表达的蛋白的氨基酸序列已经被修饰,与本文所描述的发明一致。

[0146] 术语“变体cbh1基因”,或者“变体CBH1”分别指,来自红褐肉座菌的cbh1基因的核酸序列已经通过去除、增加和/或操纵编码序列而被改变,或者被表达的蛋白的氨基酸序列已经被修饰,与本文所描述的发明一致。

[0147] 如本文中所应用,术语“活性的”或者“生物活性的”是指与特定蛋白相关联的生物活性,它们在此可以互换应用。例如,与蛋白酶相关联的酶活性是蛋白水解,因此,活性蛋白酶具有蛋白水解活性。这样,特定蛋白的生物活性是指本领域技术人员通常认为该蛋白具有的任何生物活性。

[0148] 当应用于酶溶液时,同源或变异CBH1.1、红褐肉座菌CBH1变体或嗜热小柱孢霉CBH1成分通常被加入的量足以允许可溶性糖以最大速度从生物材料中释放出来。加入的同源或变异CBH1.1、红褐肉座菌CBH1变体或嗜热小柱孢霉CBH1的量取决于要被糖化的生物材料的类型,这可以被技术人员容易地确定。然而,当被应用时,同源或变异CBH1.1、红褐肉座菌CBH1变体或嗜热小柱孢霉CBH1成分相对于纤维素酶组合物中存在的EG类型成分的重量百分比是从优选地大约1、优选地大约5、优选地大约10、优选地大约15或者优选地大约20的重量百分比至优选地大约25、优选地大约30、优选地大约35、优选地大约40、优选地大约45或者优选地大约50的重量百分比。进一步地,优选的范围可以是,大约0.5至大约15的重量百分比、大约0.5至大约20的重量百分比、从大约1至大约10的重量百分比、从大约1至大约15的重量百分比、从大约1至大约20的重量百分比、从大约1至大约

25 的重量百分比、从大约 5 至大约 20 的重量百分比、从大约 5 至大约 25 的重量百分比、从大约 5 至大约 30 的重量百分比、从大约 5 至大约 35 的重量百分比、从大约 5 至大约 40 的重量百分比、从大约 5 至大约 45 的重量百分比、从大约 5 至大约 50 的重量百分比、从大约 10 至大约 20 的重量百分比、从大约 10 至大约 25 的重量百分比、从大约 10 至大约 30 的重量百分比、从大约 10 至大约 35 的重量百分比、从大约 10 至大约 40 的重量百分比、从大约 10 至大约 45 的重量百分比、从大约 10 至大约 50 的重量百分比、从大约 15 至大约 20 的重量百分比、从大约 15 至大约 25 的重量百分比、从大约 15 至大约 30 的重量百分比、从大约 15 至大约 35 的重量百分比、从大约 15 至大约 40 的重量百分比、从大约 15 至大约 45 的重量百分比、从大约 15 至大约 50 的重量百分比。

#### [0149] II. 宿主生物

[0150] 丝状真菌包括所有丝状形式的真菌亚门 (Eumycota) 和卵菌亚门 (Oomycota)。丝状真菌的特征在于营养菌丝,其具有由几丁质、葡聚糖、壳聚糖、甘露聚糖和其它复杂多糖组成的细胞壁,营养生长是通过菌丝的延长,碳分解代谢是专性好氧的。

[0151] 在本发明中,丝状真菌亲代细胞可以是下述种—但不限于这些种—的细胞:木霉,如长梗木霉 (*Trichoderma longibrachiatum*)、绿色木霉 (*Trichoderma viride*)、康宁木霉 (*Trichoderma koningii*)、哈茨木霉 (*Trichoderma harzianum*);青霉属某种 (*Penicillium* sp.);腐质霉属某种 (*Humicola* sp.) 包括异常腐质霉 (*Humicolainsolens*) 和灰腐质霉 (*Humicola grisea*);金孢菌某种 (*Chrysosporium* sp.) 包括拉克淖金孢菌 (*C. lucknowense*);粘帚霉某种 (*Gliocladium* sp.);曲霉属某种;镰孢菌属某种 (*Fusarium* sp.)、脉孢菌属某种 (*Neurospora* sp.)、肉座菌属某种 (*Hypocrea* sp.) 和裸孢壳属某种 (*Emericella* sp.)。如本文中所使用的,术语“木霉”或“木霉属某种”指之前已被归入木霉属的任何真菌菌株或目前被归入木霉属的任何真菌菌株。

[0152] 在一种优选实施方案中,丝状真菌亲代细胞是黑曲霉、泡盛曲霉 (*Aspergillus awamori*)、棘孢曲霉 (*Aspergillus aculeatus*) 或构巢曲霉细胞。

[0153] 在另外一种优选实施方案中,丝状真菌亲代细胞是里氏木霉细胞。

#### [0154] III. 纤维素酶

[0155] 在本领域中,认为纤维素酶是水解纤维素 ( $\beta$ -1,4 葡聚糖或者  $\beta$ D- 葡糖苷键) 从而导致形成葡萄糖、纤维二糖、纤维寡糖和类似物质的酶。如前面所阐明,纤维素酶传统地被分为三个主要类型:内切葡聚糖酶 (EC 3.2.1.4) (“EG”)、外切葡聚糖酶或者纤维二糖水解酶 (EC 3.2.1.91) (“CBH”) 和  $\beta$ - 葡糖苷酶 (EC 3.2.1.21) (“BG”) (Knowles, et al., 1987; Schulen, 1988)。

[0156] 一些真菌产生包括外切-纤维二糖水解酶或者 CBH- 型纤维素酶、内切葡聚糖酶或者 EG- 型纤维素酶、 $\beta$ - 葡糖苷酶或者 BG- 型纤维素酶在内的完整的纤维素酶系统 (Schulein, 1988)。然而,有时这些系统缺乏 CBH- 型纤维素酶,细菌纤维素酶通常也含有很少的 CBH- 型纤维素酶或者不含有 CBH- 型纤维素酶。此外,已经表明,EG 成分和 CBH 成分协同地相互作用,以更加有效地降解纤维素。参见,例如,Wood, 1985。多组分或者完整的纤维素酶系统中的不同成分,即,各种内切葡聚糖酶和外切纤维二糖水解酶,通常具有不同的性质,如等电点、分子量、糖基化程度、底物特异性和酶作用方式。

[0157] 也已经表明,纤维素酶组合物可降解含棉织物,导致织物减弱的强度丧失 (美国

专利 4,822,516),这造成了在商业洗涤剂应用中不愿使用纤维素酶组合物。已经有提示,与含有完整的纤维素酶系统的组合物相比,包含内切葡聚糖酶成分的纤维素酶组合物对含棉织物显示出降低的强度丧失。

[0158] 也已经表明,纤维素酶可以用于将纤维素生物材料降解为乙醇(其中纤维素酶降解纤维素为葡萄糖,酵母或者其它微生物进一步酵解葡萄糖为乙醇),用于机械纸浆处理(Pere et al.,1996),用作饲料添加剂(WO 91/04673)和用在谷物湿磨(wet milling)中。

[0159] 大多数 CBH 和 EG 具有由通过连接肽分隔开的纤维素结合结构域(CBD)和核心结构域组成的多结构域结构(Suurnakki et al.,2000)。核心结构域含有活性位点,而 CBD 通过使酶结合于纤维素而与纤维素发生作用(van Tilbeurgh et al.,1986;Tomme et al.,1988)。CBD 在晶体状纤维素的水解中特别重要。已经表明,当 CBD 不存在时,纤维二糖水解酶降解晶体状纤维素的能力明显降低(Linder and Teeri,1997)。然而,CBD 的确切作用和作用机制仍然是一种推论。已经有人提出,CBD 仅仅通过增加纤维素表面的有效酶浓度(Stahlberg et al.,1991),和/或通过从纤维素表面松开单个的纤维素链(Tormo et al.,1996)来增强酶活性。涉及纤维素酶结构域对不同底物的作用的大多数研究是应用纤维二糖水解酶的核心蛋白来进行的,原因是它们的核心蛋白可以容易地通过木瓜蛋白酶的有限蛋白水解而产生(Tomme et al.,1988)。许多纤维素酶已经在科学文献中被描述,其例子包括:来自里氏木霉:Shoemaker, S. et al., Bio/Technology, 1:691-696,1983,其公开了 CBHI;Teeri, T. et al., Gene, 51:43-52,1987,其公开了 CBHII。来自不同于木霉的其它种的纤维素酶也已经被描述,例如 Ooi et al.,1990,其公开了编码棘孢曲霉产生的内切葡聚糖酶 F1-CMC 的 cDNA 序列;Kawaguchi T et al.,1996,其公开了编码棘孢曲霉的  $\beta$ -葡糖苷酶的 cDNA 的克隆和测序;Sakamoto et al.,1995,其公开了编码白曲霉(*Aspergillus kawachii*) IFO 4308 的内切葡聚糖酶 CMCCase-1 的 cDNA 序列;Saarilahti et al.,1990,其公开了来自欧氏杆菌(*Erwinia carotovora*)的内切葡聚糖酶;Spilliaert R, et al.,1994,其公开了 bglA 的克隆和测序,bglA 编码 *Rhodothermus marinus* 的热稳定  $\beta$ -葡聚糖酶;Halldorsdottir S et al.,1998,其公开了 *Rhodothermus marinus* 基因的克隆、测序和过量表达,*Rhodothermus marinus* 基因编码糖基水解酶家族 12 的热稳定性纤维素酶。然而,仍然需要鉴定和表征新型的纤维素酶,它们应具有改良的特性,诸如在热应激下或在表面活性剂存在的情况下改善的性能、增加的比活性、改变的底物切割模式和/或体外高水平的表达。

[0160] 对含有不同含量 CBH 类型纤维素酶的新的和改进的纤维素酶组合物的开发,对下列用途是有价值的:(1)用在洗涤剂组合物中,其表现出增强的清洗能力,起到柔软剂的作用和/或改善棉织物的手感(例如,“石磨洗”或者“生物抛光(biopolishing)”;(2)用在用于将木浆或者其它生物材料降解为糖的组合物中(例如,用于生物乙醇生产);和/或(3)用在饲料组合物中。

#### [0161] IV. 分子生物学

[0162] 在一种实施方案中,本发明提供了在丝状真菌中变异灰腐质霉 CBH1.1 纤维素酶基因在有功能的启动子控制下的表达。因此,本发明依赖于重组遗传学领域中的常规技术。公开了用于本发明的一般性方法的基本文献包括:Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2nd ed. 1989);Kriegler, Gene Transfer and Expression:

A Laboratory Manual(1990),和 Ausubel et al.,eds.,Current Protocols inMolecular Biology(1994)。

[0163] A. 用于鉴定变异 CBH1.1 基因的方法

[0164] 两个已公开可获得的灰腐质霉 CBH1.1 核酸序列显示于图 5 中。本发明,在一个方面,包括编码本文中描述的变异灰腐质霉 CBH1.1 的核酸分子。该核酸可以是 DNA 分子。

[0165] 可以被用来分离编码变异 CBH1.1 的 DNA 序列的技术在本领域中是公知的,包括但不限于,用同源 DNA 探针进行 cDNA 文库筛选和 / 或基因组文库筛选,用活性分析或者抗 CBH1 抗体进行表达筛选。这些方法中的任一种都可以发现于 Sambrook, et al. 或者 CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, F. Ausubel, et al., ed. Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York(1987) (" Ausubel" )。

[0166] B. 核酸构建物 / 表达载体

[0167] 编码灰腐质霉 CBH1.1 纤维素酶变体 (a variant *H. grisea* CBH1.1 cellulose) 的天然或者合成的多核苷酸片段 ("编码灰腐质霉 CBH1.1 纤维素酶变体的核酸序列) 可以被并入异源的核酸构建物或者载体,它们能够导入到丝状真菌或者酵母细胞中并在其中复制。此处公开的载体和方法适于在宿主细胞中应用以便表达 CBH1.1 纤维素酶变体。任何载体都可以被应用,只要它能够在导入的细胞中复制和存活。大量的合适载体和启动子对本领域的技术人员是已知的,并且是商业上可得到的。在 Sambrook et al.,1989,Ausubel FM et al.,1989 和 Strathern et al.,1981 中也描述了克隆载体和表达载体,其每一个在此特意地并入作为参考。van den Hondel,C. A. M. J. J. et al. (1991) In :Bennett, J. W. and Lasure, L. L. (eds.) More Gene Manipulations in Fungi. Academic Press, pp. 396-428 中描述了用于真菌的合适表达载体。通过各种方法,可以将合适的 DNA 序列插入质粒或者载体 (此处统称为 "载体")。一般地,通过标准方法,将 DNA 序列插入合适的限制性酶切位点。相信这样的方法和相关的亚克隆方法是在本领域技术人员的知识范围内。

[0168] 通过将含有 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶的编码序列的异源核酸构建物导入所选择的丝状真菌菌株的细胞中,可以产生含有 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶的编码序列的重组丝状真菌。

[0169] 一旦获得期望形式的 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体、嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶核酸序列,它可以用许多方法进行修饰。当序列涉及非编码侧翼区时,侧翼区可以进行切除、突变等。因此,可以在天然存在的序列上进行转移、颠换、缺失和插入。

[0170] 依据熟知的重组技术,所选择的 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶编码序列可以被插入到合适的载体中,并被用于转化能够表达纤维素酶的丝状真菌中。由于遗传密码子的固有简并性,编码基本上相同或功能上等同的氨基酸序列的其他核酸序列可以被用来克隆和表达 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶。因此,可以理解,在编码区域进行的此类替代落入本发明所覆盖的序列变体中。

[0171] 本发明也包括重组核酸构建物,其包括上述的一个或多个编码 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶的核酸序列。所述构建物包括载体,例如质粒载体或者病毒载体,本发明的序列被插入其中,方向为正向或者反向。

[0172] 异源核酸构建物可以包括 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉

CBH1 纤维素酶的编码序列,该编码序列可以处于如下的状态:(i) 处于分离状态;(ii) 与另外的编码序列组合,例如融合蛋白或者信号肽编码序列,其中所需纤维素酶的编码序列是主要的编码序列;(iii) 与非编码序列组合,例如内含子和调控元件,如启动子和终止子元件或者 5' 和 / 或 3' 非翻译区,它们对合适宿主中编码序列的表达是有影响的;和 / 或 (iv) 在载体或者宿主环境中,其中 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶的编码序列是异源基因。

[0173] 在本发明的一个方面,应用异源核酸构建物,在体外将编码 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶的核酸序列转移到细胞中,已确立的丝状真菌和酵母系是优选的。对于所需纤维素酶的长期生产,稳定的表达是优选的。可以有效地生成稳定的转化子的任何方法都可以被用于实施本发明。

[0174] 合适的载体典型地带有编码选择性标记的核酸序列、插入位点和合适的控制元件,如启动子和终止序列。载体可以包括调节序列,包括,例如,非编码序列,如内含子和调控元件,即,启动子和终止元件或者 5' 和 / 或 3' 非翻译区,它们对宿主细胞中(和 / 或在修饰的可溶性蛋白抗原编码序列不被正常表达的载体或者宿主细胞环境中)编码序列的表达是有影响的,并有效连接于编码序列。大量的合适载体和启动子对于本领域技术人员是已知的,它们中的许多可以从商业渠道获得和 / 或描述于 Sambrook, et al., (supra)。

[0175] 代表性的启动子包括组成型启动子和诱导型启动子,其例子包括 CMV 启动子、SV-40 早期启动子、RSV 启动子和 EF-1 $\alpha$  启动子,在 tet 开启和 tet 关闭系统中含有 tet 应答元件 (TRE) 的启动子 (ClonTech and BASF)、 $\beta$ -肌动蛋白启动子和金属硫蛋白启动子,其可以通过加入某些金属盐而上调。启动子序列是用于表达目的而被特定的丝状真菌识别的 DNA 序列。它可有效连接于编码 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 多肽的 DNA 序列。这样的连接包括在所公开的表达载体中,将启动子相对于编码 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 多肽的 DNA 序列的起始密码子进行定位。启动子序列含有转录和翻译调控序列,其介导 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 多肽的表达。例子包括来自下列基因的启动子:黑曲霉、泡盛曲霉或米曲霉葡萄糖淀粉酶、 $\alpha$ -淀粉酶或  $\alpha$ -葡糖苷酶编码基因;构巢曲霉 *gpdA* 或 *trpC* 基因;粗糙脉孢菌 *cbh1* 或 *trp1* 基因;黑曲霉或 *Rhizomucor miehei* 天冬氨酸蛋白酶编码基因;红褐肉座菌 *cbh1*、*cbh2*、*egl1*、*egl2* 或其他纤维素酶编码基因。

[0176] 合适的选择性标记的选择将取决于宿主细胞,不同宿主细胞的合适的标记是本领域熟知的。典型的选择性标记基因包括 *argB*, 来自构巢曲霉或红褐肉座菌;*amdS*, 来自构巢曲霉;*pyr4*, 来自粗糙脉孢菌或红褐肉座菌;*pyrG*, 来自黑曲霉或构巢曲霉。其他的示范性选择性标记包括但不限于 *trpC*、*trp1*、*oliC31*、*niaD* 或 *leu2*, 它们可以被纳入用于转化突变菌株诸如 *trp-*、*pyr-*、*leu-* 和类似菌株的异源核酸构建物中。

[0177] 这样的选择性标记赋予转化子利用通常不被丝状真菌代谢的代谢物的能力。例如,红褐肉座菌的编码乙酰胺酶的 *amdS* 基因使得转化细胞可以以乙酰胺作为氮源来生长。选择性标记(如 *pyrG*) 可以恢复营养缺陷型突变菌株在选择性基本培养基中生长的能力,或者选择性标记(如 *oliC31*) 可以赋予转化子在抑制性药物或抗生素存在的条件下生长的能力。

[0178] 使用本领域中通常使用的方法,将选择性标记的编码序列克隆到任何合适的质粒

中。示范性的质粒包括 pUC18、pBR322、pRAX 和 pUC100。pRAX 质粒包含来自构巢曲霉的 AMA1 序列,这使得它能在黑曲霉中进行复制。

[0179] 除非另有指明,本发明的实践将应用分子生物学、微生物学、重组 DNA 和免疫学的传统技术,它们在本领域技术人员知识范围内。这样的技术在文献中有充分的描述。参见,例如, Sambrook et al., 1989; Freshney, 1987; Ausubel, et al., 1993 和 Coligan et al., 1991。此处提及的所有专利、专利申请、论文和出版物在此特意地通过引用方式并入。

[0180] C. 用于转化宿主细胞的方法

[0181] 在本发明中,丝状真菌亲代细胞可以是下述种—但不限于下述种—的细胞:木霉,如长梗木霉(里氏)、绿色木霉、康宁木霉、哈茨木霉;青霉菌属某种;腐质霉属某种,包括异常腐质霉;金孢菌某种,包括拉克淖金孢菌;粘帚霉某种;曲霉属某种(*Aspergillus* sp.);镰孢菌某种,脉孢菌某种,肉座菌某种和裸孢壳属某种。如本文中所使用的,术语“木霉”或“木霉属某种”是指先前已被分入木霉属的任何丝状菌株或目前被分入木霉属的任何丝状菌株。

[0182] 可以为了表达灰腐质霉 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 而被处理和/或修饰的亲代细胞系的例子包括但不限于丝状真菌细胞。用于实施本发明的合适的原代细胞类型的例子包括,但不限于曲霉和木霉。

[0183] 在一种实施方案中,丝状真菌亲代细胞是黑曲霉、泡盛曲霉、棘孢曲霉或构巢曲霉细胞。

[0184] 在第二种实施方案中,丝状真菌亲代细胞是红褐肉座菌细胞。该细胞以前被称为里氏木霉。

[0185] 在编码 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 的 DNA 序列被克隆入 DNA 构建物之后,该 DNA 被用于转化微生物。有利地,待转化以用于表达本发明的 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 的微生物,可以包括来自木霉属某种的菌株。因此,用于制备本发明的 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶的优选方式,包括用含有编码 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 的部分或所有序列的 DNA 的至少一个片段的 DNA 构建物来转化木霉属某种(*Trichoderma* sp.) 宿主细胞。该 DNA 构建物一般将在功能上联系于,即有效连接于启动子。转化的细胞然后在一定条件下生长,以便表达灰腐质霉 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1。随后,灰腐质霉 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 可以被分离。以基本上纯的形式获得灰腐质霉 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 是可以被要求的。类似地,以实质上纯的形式,获得灰腐质霉 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 是可期望的。

[0186] 然而,可能的事实是,编码 CBH1.1 变体的特定 DNA 的最佳表达媒介可能不同于红褐肉座菌。因此,在与 CBH1.1 变体的来源生物体种系发生相似的转化宿主中表达蛋白,可能会最有利。在一种可以选择的实施方案中,黑曲霉可以被用作表达媒介。关于黑曲霉的转化技术的描述,参见 WO 98/31821,其公开内容通过引用方式整体并入。

[0187] 因此,在此对木霉多个种(*Trichoderma* spp.) 表达系统的描述,仅仅是提供用作阐释的目的,为表达本发明的变体 CBH1.1 提供一个选择。然而,本领域的技术人员可以选

择在不同的宿主细胞中表达编码变体 CBH1.1 的 DNA,如果是合适的话,并且应该理解,在确定最佳表达宿主时,变体 CBH1.1 的来源应该被考虑。另外地,本领域技术人员将能够应用本领域中可利用的手段,通过常规技术选择针对特定基因的最佳表达系统。

[0188] D. 用于表达 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 的方法

[0189] 本发明的方法依赖于应用细胞来表达变体 CBH1.1 纤维素酶,而不是要求某种特定的表达方法。

[0190] 本发明提供了用表达载体转导、转化或转染的宿主细胞,所述的表达载体含有编码 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶的核酸序列。培养条件,诸如温度、pH 和类似条件是在转导、转化或转染之前用于培养亲代宿主细胞的那些培养条件,并且对本领域技术人员是显而易见的。

[0191] 在一种方法中,用能在宿主细胞系中发挥作用的表达载体转染丝状真菌细胞或者酵母细胞,所述的表达载体具有启动子或者生物活性启动子片段或者一个或多个(例如,一系列)增强子,其有效连接于编码 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶的 DNA 片段,这样,CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶在细胞系中被表达。

[0192] 因此,本发明提供了丝状真菌,其包括的细胞已经被修饰、选择和培养,相对于对应的非转化亲代真菌,它们可以有效地生产或表达 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶。

[0193] 可以被处理和/或修饰以获得期望的纤维素酶表达的亲代丝状真菌的例子包括,但不限于木霉、青霉菌属某种、腐质霉属某种包括异常腐质霉;曲霉属某种包括黑曲霉、金孢菌某种、镰孢菌某种、肉座菌某种和裸孢壳属某种。

[0194] 表达 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶的细胞在通常用于培养亲代真菌株系的条件下进行培养。通常地,将细胞在含有生理盐和营养物的标准培养基中培养,如 Pourquie, J. et al., *Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation*, eds. Aubert, J. P. et al., Academic Press, pp. 71-86, 1988 和 Ilmen, M. et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 63 :1298-1306, 1997 中所描述。培养条件也是标准的,例如,将培养物在 28°C,在振荡培养器或者发酵器中培育,直至获得所需水平的变体 CBH1.1 纤维素酶表达。

[0195] 对于给定的丝状真菌的优选培养条件可以在科学文献中找到,和/或从真菌的来源处例如美国典型培养物保藏中心(ATCC;[www.atcc.org](http://www.atcc.org))找到。真菌的生长条件被确立后,将细胞暴露于可有效引起或允许变体 CBH1.1 纤维素酶表达的环境中。

[0196] 在 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶编码序列受到诱导型启动子控制的情况下,诱导试剂,诸如糖、金属盐或抗生素被加入到培养基中,加入的浓度足以有效诱导 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶进行表达。

[0197] 在一种实施方案中,菌株包括黑曲霉,该菌株是获得过量表达的蛋白质的有用菌株。例如,已经知道,黑曲霉泡盛变种(*A. niger* var *awamori*) dgr246 分泌数量提高的分泌型纤维素酶(Goedegebuur et al, *Curr. Genet* (2002) 41 :89-98)。黑曲霉泡盛变种的其他菌株,诸如 GCDAP3、GCDAP4 和 GAP3-4 也是已知的,参见 Ward 等(Ward, M, Wilson, L. J. and

Kodama, K. H., 1993, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39 :738-743)。

[0198] 在另一实施方案中,菌株包括里氏木霉,其是获得过量表达的蛋白质的有用菌株。例如,已经知道,被 Sheir-Neiss, et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20 :46-53(1984) 描述的 RL-P37 分泌数量提高的分泌型纤维素酶。RL-P37 的功能等同物包括里氏木霉菌株 RUT-C30(ATCC 号 :56765) 和菌株 QM9414(ATCC 号 :26921)。应该理解的是,这些菌株在过量表达 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 中也是有用的。

[0199] 当希望在没有潜在不利的天然纤维素水解活性的情况下获得想要的纤维素酶时,在导入含有编码 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶的 DNA 片段的 DNA 构建物或质粒之前,获得一个或多个纤维素酶基因已被剔除的宿主细胞是有用的。此类菌株可以用美国专利 5,246,853 和 W092/06209 中公开的方法制备得到,其公开内容通过引用方式并入本文。通过在缺失一种或多种纤维素酶基因的宿主微生物中表达 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶,鉴定和随后的纯化程序可以被简化。木霉属某种中已被克隆的任何基因都可以被剔除,例如,cbh1、cbh2、egl1 和 eg/2 基因,以及那些编码 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 蛋白质的基因(分别参见,如美国专利 5,475,101 和 WO 94/28117)。

[0200] 基因的剔除可以这样来完成:应用本领域中已知的方法,将待剔除或破坏的基因的一种形式插入质粒。然后,将该剔除质粒(deletion plasmid)在位于基因编码区域内部的合适的(多个)限制性酶切位点处进行切割,并用选择性标记置换该基因编码序列或者其部分。待剔除或破坏的基因的基因座的侧翼 DNA 序列——优选地在大约 0.5 至 2.0kb——位于选择性标记基因的两侧。合适的剔除质粒通常具有独特的限制性酶切位点,这样的位点的存在使得含有包括侧翼 DNA 序列在内的被剔除基因和选择性标记基因可以作为单个线性片段被移走。

[0201] 选择性标记的选择必须能够便于检测转化的微生物。任何在选择的微生物中表达的选择性标记基因是合适的。例如,对于曲霉,选择性标记的选择要保证该选择性标记在转化子中的存在不会明显影响其性质。这样的选择性标记可以是编码可测定的产物的基因。例如,一种曲霉基因的功能拷贝可以被使用,如果在宿主菌株中缺少该基因拷贝,则会导致宿主菌株表现出营养缺陷型表型。

[0202] 在一种实施方案中,曲霉属某种的 pyrG<sup>-</sup> 衍生菌株用功能 pyrG 基因转化,该功能基因从而为转化提供了选择性标记。pyrG<sup>-</sup> 衍生菌株可以通过选择对氟乳清酸(FOA)有抗性的曲霉属某种菌株而获得。pyrG 基因编码乳清苷-5'-单磷酸脱羧酶,该酶是尿苷生物合成所需要的酶。具有完整 pyrG 基因的菌株能在缺少尿苷的培养基中生长,但对氟乳清酸敏感。能够通过选择 FOA 抗性,选出这样的 pyrG<sup>-</sup> 衍生菌株,其缺少功能乳清苷单磷酸脱羧酶,并需要尿苷才能生长。使用 FOA 选择技术,也可能获得需要尿嘧啶核苷、缺乏功能性的焦磷酸核糖乳清酯转移酶(orotate pyrophosphoribosyl transferase)的菌株。也能用编码该酶的基因的功能拷贝转化这些细胞(Berges & Barreau, *Curr. Genet.* 19 :359-365(1991), 和 vanHartingsveldte et al., (1986)Development of a homologous transformation system for *Aspergillus niger* based on the pyrG gene. *Mol. Gen. Genet.* 206 :71-75)。使用上面提及的 FOA 抗性技术,容易地选择出衍生菌株,并因此,pyrG 优选用作选择标记。在另一实施方案中,木霉属某种的 pyr4<sup>-</sup> 衍生菌株用功能 pyr4 基因转化,其从而为转化提

供选择性标记。尽管下面论述了曲霉属系统,但也可以利用木霉和其他真菌系统采用类似的方法,这可被本领域技术人员理解。

[0203] 为了转化  $\text{pyrG}^-$  曲霉,以便它不能表达一种或多种纤维素酶基因,包含被破坏或剔除的纤维素酶基因的单个 DNA 片段从剔除质粒中分离出来,并用于转化合适的  $\text{pyr}^-$  曲霉宿主。然后基于它们表达  $\text{pyrG}$  基因产物和改变宿主菌株尿苷营养缺陷型的能力,鉴定和选择转化子。然后对所获得的转化子进行 DNA 印迹分析,以鉴定和确认双交换整合 (double crossover integration) 事件的发生,在该事件中  $\text{pyr4}$  选择性标记替换了待剔除的基因的基因组拷贝的部分或所有的编码区域。

[0204] 尽管上面描述的特定质粒载体是涉及  $\text{pyr}^-$  转化子的制备,但本发明不限于这些载体。应用上面的技术,可以对曲霉菌株中的各种基因进行剔除和替换。此外,如上面所讨论,可以使用任何可利用的选择性标记。事实上,应用上面描述的策略,可以将任何已被克隆和鉴定的曲霉基因从基因组中剔除。

[0205] 如上所述,所使用的宿主菌株是曲霉属某种的衍生菌株,其缺少或者具有与所选的选择性标记相对应的一种或多种非功能基因。例如,如果选择  $\text{pyrG}$  选择性标记,那么特定的  $\text{pyrG}^-$  衍生菌株在转化程序中用作接受体。类似地,也可使用包括曲霉属某种基因的选择性标记,该曲霉属某种基因等同于构巢曲霉基因  $\text{amdS}$ 、 $\text{argB}$ 、 $\text{trpC}$ 、 $\text{niaD}$ 。相应的接受体菌株因此必须是衍生菌株,诸如分别是  $\text{argB}^-$ 、 $\text{trpC}^-$ 、 $\text{niaD}^-$ 。

[0206] 然后制备编码变体 CBH1.1 纤维素酶的 DNA,并插入合适的微生物中。根据本发明,编码变体 CBH1.1 纤维素酶的 DNA 包括编码具有功能性纤维素水解活性的蛋白质所必需的 DNA。编码 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶的 DNA 片段,可以功能性地结合到真菌启动子序列上,例如  $\text{glaA}$  基因的启动子。

[0207] 也考虑到,编码 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶的 DNA 的多于一个的拷贝可以被再组合到菌株中以帮助过量表达。编码 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶的 DNA 可以通过携带编码纤维素酶的 DNA 的表达载体的构建而制备。携带编码 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶的插入 DNA 片段的表达载体,可以是能够在特定宿主生物体中自我复制或者能够整合入宿主 DNA 的任何载体,典型地为质粒。在优选的实施方案中,用于获得基因的表达的两类表达载体被考虑。第一类含有 DNA 序列,其中启动子、基因编码区域和终止子序列均起源于将要被表达的基因。如果需要的话,可以通过删除不需要的 DNA 序列(例如,编码不需要的结构域的 DNA 序列),留下将要表达的结构域使其处于它自己的转录和翻译调控序列的控制之下,由此获得截短的基因。选择性标记物也被包含在载体中,以便整合到宿主中的多个拷贝的新基因序列得以选择。

[0208] 第二类表达载体是预先装配的,并且含有高水平转录所需的序列和选择性标记。已预期到,基因的编码区域或其一部分可以被插入到这种通用的表达载体中,这样,它便处于表达序列盒启动子和终止子序列的转录调控之下。例如,pRAX 是这样的一种通用表达载体。基因或者其一部分可以被插入到  $\text{glaA}$  强启动子的下游。整合表达载体的例子是 pTrex 载体。基因或者其一部分可以被插入强  $\text{cbh1}$  启动子的下游。

[0209] 在该载体中,编码本发明的 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶的 DNA 序列可以被有效连接于转录和翻译序列,即,合适的启动子序列和处

于结构基因的阅读框架中的信号序列。启动子可以是在宿主细胞中表现出转录活性的任何 DNA 序列,可以是来自编码与宿主细胞同源或者异源的蛋白的基因。可任选的信号肽可用来使 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶在细胞外出现。编码信号肽的 DNA 优选是,与所要表达的基因有天然联系的 DNA,然而,来自任何合适来源的信号序列均在本发明的预期中。

[0210] 用于将编码本发明的 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶的 DNA 序列和启动子融合进入合适载体的方法,在本领域中是已知的。

[0211] 各种方法可以被用来在体外将上述的表达载体、DNA 载体或构建物送入细胞。将核酸导入用于表达异源核酸序列的细胞的方法是本领域技术人员所熟知的,包括但不限于电穿孔法;核显微注射法或直接显微注射入细胞;与完整细胞进行细菌原生质体融合;使用聚阳离子,如 1,5-二甲基-1,5-二氮十一亚甲基聚甲溴化物 (polybrene) 或聚鸟氨酸 (polyornithine);利用脂质体、脂转染胺试剂或脂转染介导的转染进行的膜融合;用 DNA 包覆的微粒进行的高速轰击;磷酸钙-DNA 沉淀进行培育;DEAE-右旋糖苷介导的转染;用修饰的病毒核酸进行感染;农杆菌介导的 DNA 转移;和类似物的方法。此外,包括编码变体 CBH1.1 的核酸序列的异源核酸构建物可以被体外转录,并通过熟知的方法,诸如注射,将所得到的 RNA 导入宿主细胞。

[0212] 本发明中制备用于转化的曲霉属某种的优选方法,包括由真菌菌丝体制备原生质体。参见, Campbell et al. Improved transformation efficiency of *A. niger* using homologous *niaD* gene for nitrate reductase. *Curr. Genet.* 16:53-56;1989。菌丝体可以从出芽的营养孢子获得。用消化细胞壁的酶处理菌丝体,得到原生质体。然后,通过在悬浮培养基中加入渗透压稳定剂,原生质体得以被保护。这些稳定剂包括山梨糖醇、甘露醇、氯化钾、硫酸镁和类似物。通常地,这些稳定剂的浓度在 0.8M 到 1.2M 之间变化。优选地在悬浮培养液中应用大约 1.2M 的山梨醇溶液。

[0213] 宿主曲霉菌株对 DNA 的摄取依赖于钙离子浓度。通常大约 10mM  $\text{CaCl}_2$  至 50mM  $\text{CaCl}_2$  之间的  $\text{CaCl}_2$  被应用于摄取溶液中。在该摄取溶液中,除了对钙离子的需求之外,其它通常被纳入的物质是缓冲系统如 TE 缓冲液 (10mM Tris, pH 7.4;1mM EDTA) 或者 10mM MOPS, pH 6.0 缓冲液 (吗啉代丙烷磺酸) 和聚乙二醇 (PEG)。聚乙二醇的作用被认为是融合细胞膜,从而使培养基的成分传送到曲霉菌的胞浆,并且质粒 DNA 被传送到核。该融合常常使得多拷贝的质粒 DNA 温和地整合入宿主染色体。

[0214] 通常地,在转化中使用含有曲霉菌原生质体或者细胞的悬浮液,所述的原生质体或者细胞已经经历过渗透性处理,密度为  $10^5$  至  $10^6$ /mL,优选  $2 \times 10^5$ /mL。体积为 100  $\mu$ l 的含有这些原生质体或者细胞的合适溶液 (例如,1.2M 山梨醇;50mM  $\text{CaCl}_2$ ) 与所需 DNA 混合。通常地,高浓度的 PEG 被加入到摄取溶液。0.1 至 1 倍体积的 25% PEG 4000 可以被加入到原生质体悬浮液。然而,优选地向原生质体悬浮液中加入大约 0.25 个体积。添加剂如二甲亚砜、肝素、亚精胺、氯化钾和类似物质,也可以被加入到该摄取溶液,并协助转化。对于其他真菌细胞,也有类似的方法。参见,如美国专利 6,268,328,其内容通过引用并入本文。

[0215] 通常地,然后在大约 0°C 温育该混合物,持续 10 至 30 分钟。之后,将另外的 PEG 加入该混合物,以进一步增强所需基因或 DNA 序列的摄取。通常地,将 25% PEG4000 以等同于转化混合物的体积的 5 至 15 倍的体积加入;然而,更大或者更小的体积可以是适合的。

25% PEG4000 的体积优选是转化混合物体积的大约 10 倍。将 PEG 加入之后,在加入山梨醇和  $\text{CaCl}_2$  溶液之前,将转化混合物在室温或者冰上温育。然后,将原生质体悬浮液进一步加入到生长培养基的融化等份中。此生长培养基仅允许转化子生长。适于培养所需的转化子的任何生长培养基可以被用于本发明。然而,如果正在选择的是  $\text{Pyr}^+$  转化子,则优选地使用不含有尿嘧啶核苷的生长培养基。随后获得的克隆被转移到无尿苷的生长培养基中,并被纯化。

[0216] 在此阶段,可以将稳定的转化子与不稳定的转化子区分开来,前者具有更快的生长速度,在缺乏尿苷的固体培养基上所形成的环状克隆具有平滑的而非粗糙的轮廓。此外,在一些情形下,可以对稳定性作进一步的测试,这通过非选择性固体培养基(即,含有尿嘧啶核苷)上培养转化子、从该培养基中收获孢子并测定这些孢子随后在缺乏尿嘧啶核苷的选择性培养基中出芽并生长的百分数来完成。

[0217] 在上述方法的具体实施方案中,在液体培养基中生长之后,作为 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶合适的翻译后加工的结果,CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶以活性形式从宿主细胞中回收得到。

[0218] E. CBH1 核酸编码序列和 / 或蛋白质表达的分析方法

[0219] 在用编码 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶的核酸构建物转化细胞系之后,为了评价该细胞系对 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶的表达,可以在蛋白水平、RNA 水平进行分析,或者应用特异于纤维二糖水解酶活性和 / 或表达的功能性生物分析进行分析。

[0220] 在本文描述的 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶核酸和蛋白序列的一个代表性应用中,丝状真菌例如里氏木霉的遗传修饰菌株,被加以改造以产生增加量的 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶。这样的遗传修饰的丝状真菌对产生纤维水解能力大大增强的纤维素酶产物是有用的。在一种方法中,这是通过将 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶的编码序列导入合适的宿主来完成的,合适的宿主例如丝状真菌,如黑曲霉。

[0221] 因此,本发明包括在丝状真菌或其他合适的宿主中表达 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶的方法,该方法通过将含有编码 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶的 DNA 序列的表达载体导入丝状真菌或其他合适的宿主中进行。

[0222] 在另一方面,本发明包括修饰 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶在丝状真菌或其他合适的宿主中表达的方法。此种修饰包括减少或消除内源性 CBH 的表达。

[0223] 一般,用于分析 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶表达的测定方法包括,Northern 印迹、斑点印迹法(DNA 或 RNA 分析)、RT-PCR(逆转录聚合酶链反应)或原位杂交,使用被恰当标记的探针(基于核酸编码序列)和传统的 DNA 印迹以及放射自显影。

[0224] 此外,可以在样品中直接测定 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶的产生和 / 或表达,例如,分析纤维二糖水解酶活性、表达和 / 或产生。例如,在 Becker et al., Biochem J. (2001) 356:19-30 和 Mitsuishi et al., FEBS(1990) 275:

135-138 中描述了这样的分析,每一篇文献均在此清楚地引入作为参考。CBH1 水解分离的可溶和不溶底物的能力可以应用 Srisodsuk et al., J. Biotech. (1997) 57:49-57 和 Nidetzky and Claeysens Biotech. Bioeng. (1994) 44:961-966 中描述的分析方法来测定。用于分析纤维二糖水解酶活性、内切葡聚糖酶活性或者  $\beta$ -葡糖苷酶活性的有用底物包括晶体状纤维素、纤维纸、磷酸溶胀纤维素 (phosphoric acid swollen cellulose)、纤维寡糖、甲基伞形酯乳糖苷 (methylumbelliferyl lactoside)、甲基伞形酯纤维二糖苷 (cellobiosidemethylumbelliferyl)、邻硝基苯基乳糖苷 (orthonitrophenyl lactoside)、对硝基苯基乳糖苷 (paranitrophenyl lactoside)、邻硝基苯基纤维二糖苷 (orthonitrophenyl cellobioside)、对硝基苯基纤维二糖苷 (paranitrophenyl cellobioside)。

[0225] 此外,蛋白质表达也可以通过免疫学的方法进行评价,诸如细胞、组织切片的免疫组织化学染色 (immunohistochemical staining) 或组织培养基的免疫测定方法,例如通过蛋白质印迹或 ELISA 进行。此种免疫测定可以被用于定量和定性评价 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶的表达。此类方法的细节是本领域技术人员知道的,并且用于此类方法的许多试剂可从商业渠道获得。

[0226] 纯化形式的 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶可以被用来生产对表达的蛋白质具有特异性的单克隆或多克隆抗体,它们可以用于各种免疫测定(参见如 Hu et al., 1991)。示范性测定方法包括 ELISA、竞争性免疫测定、放射免疫测定、蛋白质印迹、间接免疫荧光测定和类似方法。总之,通过商业渠道获得的抗体和/或试剂盒可以被用于纤维二糖水解酶蛋白的表达水平的定量免疫测定。

[0227] F. 用于纯化 CBH1 的方法

[0228] 一般地,在细胞培养物产生的 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶蛋白被分泌入培养基,并且可以被纯化或分离,例如,将细胞培养基中不需要的成分除去。然而,在一些情形下,CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶蛋白可以以细胞内的形式产生,这就使得必须从细胞裂解液中进行回收。在这样的情形下,应用本领域技术人员常规应用的技术,将 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶蛋白从产生它的细胞中纯化出来。例子包括但不限于,亲和层析 (Tilbeurghet et al., 1984)、离子交换层析方法 (Goyal et al., 1991; Fliess et al., 1983; Bhikhabhai et al., 1984; Ellouz et al., 1987), 包括应用了具有高分辨能力的材料的离子交换层析 (Medve et al., 1998)、疏水作用层析 (Tomaz and Queiroz, 1999) 和两相分配 (two-phase partitioning) (Brumbauer, et al., 1999)。

[0229] 典型地, CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶蛋白被分级,以分离出具有选择的性质的蛋白,所述的性质例如对特定的结合试剂如抗体或受体的结合亲和性;或者具有选择的分子量范围或等电点范围。

[0230] 一旦实现了特定的 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶蛋白的表达,由此产生的 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶蛋白从细胞或者细胞培养物中纯化出来。适于这样的纯化的代表性方法包括:抗体-亲和柱层析、离子交换层析;乙醇沉淀;反相 HPLC;在硅上或在阳离子交换树脂如 DEAE 上进行的层析;层析聚焦;SDS-PAGE;硫酸氨沉淀;以及应用例如 Sephadex G-75 的凝胶过

滤。可以应用各种蛋白纯化方法,这些方法在本领域中是已知的,在例如 Deutscher, 1990 ; Scopes, 1982 中有描述。所选择的纯化步骤将取决于,例如,所使用的生产工艺的性质和所产生的具体蛋白。

[0231] V. cbh1 和 CBH1 的效用

[0232] 可以理解的是, CBH1. 1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶核酸 ;CBH1. 1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶蛋白质 ;以及含有 CBH1. 1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶蛋白质活性的组合物可以用于许多应用中,其中一些用途在下文中被描述。

[0233] 含有变化数量的 CBH1. 1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶的新的和改进的纤维素酶组合物在洗涤剂组合物中是有用的,其表现出增强的清洗能力、充当柔软剂和 / 或改善棉织物的手感 (例如,“石磨洗”或者“生物抛光”),它们还可以用在将木浆降解为糖的组合物中 (例如,用于生物乙醇生产),和 / 或用在饲料组合物中。对每种类型的纤维素酶的分离和表征使得能够控制这样的组合物的各个方面。

[0234] 具有降低的热稳定性的 CBH1. 1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶在某些情况中是有用的,例如,需要该酶的活性在较低温度时便被中和,以便可能存在的其它酶不受影响。此外,酶可以在纤维质的限制性转变中起作用,例如,可以用于控制结晶程度和纤维素链长度。在达到所需的转变程度之后,糖化过程的温度可以升至该去稳定化的 CBH1. 1、褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 的存活温度以上。由于 CBH1 活性对于晶体状纤维素的水解是必需的,所以晶体状纤维素的转变在升高的温度下会停止。

[0235] 在一种方法中,本发明的 CBH1. 1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶用于洗涤剂组合物中或用于处理织物,以改善手感和外观。

[0236] 由于纤维素产品的水解速率可以通过使用具有至少一个额外拷贝的 CBH1. 1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶基因的转化子来实现——所述的额外拷贝是作为可复制的质粒而存在或者被插入到基因组中,所以含有纤维素或者杂多糖的产品可以以更快的速度和更大的程度被降解。在垃圾中由纤维素制成的产品如纸、棉布、纤维质尿布和类似物可以被更有效的降解。因此,从多个转化子或者单独的转化子获得的发酵产物可以被用于组合物中,以通过液化的方法来帮助降解在过度拥挤的填埋垃圾中的各种纤维素产品。

[0237] 分开进行的糖化和发酵过程可以用来将存在于生物材料例如玉米秆中的纤维素转变为葡萄糖,随后酵母菌株将葡萄糖转变为乙醇。同时进行的糖化和发酵过程可以将存在于生物材料例如玉米秆中的纤维素转变为葡萄糖,同时,在同一反应器中,酵母菌株将葡萄糖转变为乙醇。因此,在另一种方法中,本发明的所需纤维素酶可以在将生物材料降解为乙醇的过程中起作用。利用可容易地获得的纤维素来源进行乙醇生产,提供了稳定的、可更新的燃料资源。

[0238] 基于纤维素的供给料由农业废物、草和木材和其它低价值的生物材料如城市废物 (例如,回收纸、院落修剪物等等) 组成。乙醇可以通过对任何这些纤维素质供给料进行发酵而产生。然而,在转变为乙醇之前,纤维素必须首先转变为糖。因此,本文中描述的 CBH1 纤维素酶可以用于将生物材料转化为糖。

[0239] 各种不同的供给料可以与本发明的 CBH1. 1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小

柱孢霉 CBH1 纤维素酶联合应用,具体选择哪一种可能取决于实施转变过程的地区。例如,在美国中西部,农业废物如麦秆、玉米茎和甘蔗渣是主要的,而在加利福尼亚,稻秆是主要的。然而,应该理解,任何可获得的纤维素质生物材料可以被用于任何地区。

[0240] 含有增加数量的纤维二糖水解酶的纤维素酶组合物,在乙醇生产中有用。由该方法获得的乙醇可以进一步用作辛烷助剂或者直接作为替代汽油的燃料,它的好处在于,乙醇作为燃料来源,比石油衍生产品更加环保。已知知道,乙醇的应用会改善空气质量,并且可能降低局部臭氧水平和烟雾。而且,乙醇替代汽油的应用在缓冲由不可再生能源和石油化学品供应的突然变化造成的影响方面,具有战略上的重要性。

[0241] 利用纤维素质生物材料例如树、草本植物、城市固体废物和农业残留物及林业残留物的糖化和发酵过程可以产生乙醇。然而,由微生物产生的天然发生的纤维素酶混合物中各纤维素酶的比例对于生物材料中的纤维素至葡萄糖的快速转变,可能不是最有效的。已知,内切葡聚糖酶的作用是,生成新的纤维素链末端,而这样的末端本身又是纤维二糖水解酶的作用底物,由此可以改善整个纤维素酶系统的水解效率。因此,应用增加的和优化的纤维二糖水解酶活性,可以大大提高乙醇的产量。

[0242] 因此,本发明纤维二糖水解酶可以用于将纤维素水解为它的糖组分。在一种实施方案中,在加入发酵生物之前,将 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶加入到生物材料 (biomass) 中。在第二种实施方案中,将 CBH1.1 变体、红褐肉座菌 CBH1 变体或嗜热小柱孢霉 CBH1 纤维素酶与发酵生物同时加入到生物材料中。可任选地,在每种实施方案中,可以存在其它的纤维素酶成分。使用本文中描述的 CBH1 多肽,增强的纤维素转化可以在更高的温度下实现。

[0243] 在另一种实施方案中,纤维素质的供给料可以被预处理。预处理可以通过升高温度和加入稀酸、浓酸或者稀碱溶液中的任意一种。加入预处理溶液处理一段时间,这足以至少部分地水解半纤维素成分,然后再进行中和。

[0244] 除了纤维素酶组合物(不论纤维二糖水解酶的含量为多少,即,没有纤维二糖水解酶、基本上没有纤维二糖水解酶,或者具有增加的纤维二糖水解酶),本发明的洗涤剂组合物还可以使用表面活性剂包括阴离子、非离子和两性表面活性剂、水解酶、增洁剂、漂白剂、蓝色漂白剂和荧光染料、抗结块剂、增溶剂、阳离子表面活性剂和类似物。所以这些成分在洗涤剂领域中是已知的。上面描述的纤维素酶组合物可以被加入洗涤剂组合物,以液体稀释液、颗粒、乳剂、凝胶、浆糊或者类似的任意形式。这些形式对本领域技术人员是已知的。当使用的是固体洗涤剂组合物时,纤维素酶组合物优选地被配制为颗粒。优选地,配制的颗粒可以含有纤维素酶保护剂。对于更全面的讨论,参见美国专利 6,162,782,标题是“Detergent compositions containing cellulase compositions deficient in CBH1 type components”,在此并入作为参考。

[0245] 优选地,被使用的纤维素酶组合物相对于整个洗涤剂组合物的重量百分数为大约 0.00005 至大约 5。更优选地,被使用的纤维素酶组合物相对于整个洗涤剂组合物的重量百分数为大约 0.0002 至大约 2。

[0246] 另外,所需纤维素酶核酸序列可以用于鉴定和表征相关的核酸序列。可以用于确定(预测或证实)相关基因或基因产物的功能的众多技术包括但不限于,(A) DNA/RNA 分析,如 (1) 过量表达、异常表达和在其它物种中的表达;(2) 基因敲除(反向遗传学、靶向敲除

(targeted knock-out)、病毒诱导的基因沉默 (VIGS, 参见 Baulcombe, 1999); (3) 基因甲基化状况的分析, 特别是侧翼调控区域; 和 (4) 原位杂交; (B) 基因产物分析, 诸如 (1) 重组蛋白表达; (2) 抗血清产生; (3) 免疫定位; (4) 催化活性或其他活性的生物化学测定; (5) 磷酸化作用状况; 和 (6) 通过酵母双杂交分析与其他蛋白质的相互作用; (C) 通路分析, 诸如基于基因过量表达的表型或与相关基因的序列同源性, 将基因或基因产物置于特定的生物化学或信号通路中; 和 (D) 其他分析, 也可以被实施以便确定或证实分离出的基因和它的产物参与特定的代谢或信号通路的情况, 并帮助确定基因功能。

[0247] 实施例

[0248] 下面的实施例进一步详细描述了本发明, 这些实施例的意图并不在于以任何方式限制本发明的范围。附图被认为是本发明的说明书和描述的一个部分。所有引用的参考文献在此特意地并入作为参考, 用于在此描述的所有内容。

[0249] 实施例 1

[0250] CBH1.1 变体的鉴定

[0251] 该实施例描述了编码变体灰腐质霉 CBH1.1 的核酸的分离和表征。

[0252] 基因组 DNA 的分离

[0253] 使用本领域已知的方法, 可以分离出基因组 DNA。在该组实验中, 灰腐质霉高温变种 (*Humicola grisea* var *thermoidea*) (CBS 225.63) 的样品被获得。可以使用下述方法:

[0254] 细胞在 45°C, 20ml 马铃薯葡萄糖肉汤 (Potato Dextrose Broth, PDB) 中生长 24 小时。按 1 : 20 的比例用新鲜的 PDB 培养基将细胞稀释, 过夜生长。将 2 毫升细胞离心, 用 1ml KC (60g KCl, 2g 柠檬酸每升, 用 1M KOH 调 pH 至 6.2) 清洗沉淀。用 900  $\mu$ l KC 重悬浮细胞沉淀。加入 100  $\mu$ l (20mg/ml) Novozyme <sup>®</sup>, 轻轻混合, 于 37°C 在显微镜下操作原生质体形成 (protoplastation), 直到超过 95% 的原生质体被形成, 最长的时间为 2 小时。以 1500rpm (460g) 的速度离心细胞 10 分钟。加入 200  $\mu$ l TES/SDS (10mM Tris, 50mM EDTA, 150mM NaCl, 1% SDS), 混合并室温温育 5 分钟。应用 Qiagen 小量制备分离试剂盒 (Qiagen) 分离 DNA。用 100  $\mu$ l milli-Q 水洗脱柱子, 并收集 DNA。

[0255] 该方法可用于从 45°C 下的 PDA 平板上分离灰腐质霉高温变种的基因组 DNA。可以期望应用其它的方法, 其中可以使用 FastPrep <sup>®</sup>。该系统由用于分离核酸的 FastPrep <sup>®</sup> 仪器和 FastPrep <sup>®</sup> 试剂盒组成。可以从 Qbiogene 获得 FastPrep <sup>®</sup>。

[0256] 引物构建

[0257] 在标准 PCR 仪器上进行 PCR, 诸如来自 MJ Research Inc. 的 PTC-200 Peltier Thermal Cycler, 条件如下:

[0258] 1) 96°C, 1 分钟, 1 个循环

[0259] 2) 94°C, 30 秒

[0260] 55°C, 60 秒

[0261] 72°C, 2 分钟

[0262] 3) 将步骤 2 重复 30 个循环

[0263] 4) 72°C, 7 分钟, 1 个循环, 和

[0264] 5) 将温度降至 15°C, 以保存和进行进一步研究。

[0265] 构建下面的 DNA 引物, 其用于从由各种微生物分离出的基因组 DNA 中扩增出同源

CBH1 基因。此处针对蛋白和 DNA 使用的所有符号与 IUPAC IUB 生物化学命名委员会代码 (Biochemical Nomenclature Commission codes) 相符。

[0266] 同源 5' (PVS203) 和 3' (PVS204) 引物,是在灰腐质霉高温变种 (IF09854) 的 CBH1 序列的基础上开发得到。该菌株表达在联对比图中标示为 D63515 的序列 (图 5)。两条引物在其 5' 端包含来自 Invitrogen® 的入门克隆序列 (Gatewaycloning sequences)。引物 PVS203 包含 attB1 序列,引物 PVS204 包含 attB2 序列。

[0267] PVS203 的序列,未显示 attB1 :

[0268] 5' ATGCGTACCGCCAAGTTCGC 3' (CBH1 的信号序列)

[0269] PVS204 的序列,未显示 attB2 :

[0270] 5' TTACAGGCACTGAGAGTACCAG 3' (CBH1 的纤维素结合模块)

[0271] PCR 条件如下:20  $\mu$  L 的 5 $\times$  反应缓冲液 (5 $\times$  反应缓冲液包括:50mM TrisHCl, pH8.5;87.5mM(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>;6.25mM MgCl<sub>2</sub>;2.5 % Teen20(v/v),7.5 % DMSO(v/v));dATP、dTTP、dGTP、dCTP 各 0.2mM (最终浓度),1  $\mu$  L 的 100ng/ $\mu$  L 基因组 DNA,1  $\mu$  L 的 1 单位/ $\mu$  L Tgo 聚合酶 (Roche diagnostics GmbH,Cat#3186199),引物 PVS203 和 PVS204 各 0.2  $\mu$  M (最终浓度),并加入水至 100 $\mu$  L。

[0272] 变体灰腐质霉 CBH1.1 基因序列的分离

[0273] 通过使用 N 末端 (PVS203) 和 C 末端 (PVS204) 引物,直接获得全长序列。使用 Vector NTI 软件,该全长 DNA 序列按照 3 个开放阅读框架被翻译。将 DNA 和蛋白质序列与灰腐质霉 Cel7A 的两个已知序列 (X17258 和 D63515) 相比较,以鉴定出任何推定的内含子序列。对不带有内含子序列的基因组 DNA 进行翻译,揭示出变体灰腐质霉 CBH1.1 的蛋白质序列。已经获得全长基因,并提供于图 1 中 (基因组 DNA)。推定的 cDNA 显示于图 2 中。

[0274]

## 实施例 2

[0275]

### CBH1.1 变体的表达

[0276] 下面的实施例详细描述了如何表达变体灰腐质霉 CBH1.1 基因。

[0277] 从实施例 1 获得的全长基因被转移到黑曲霉入门相容性目标载体 (Gatewaycompatible destination vector) 中,其由 Genencor 开发得到。根据 Gateway™ CloningTechnology:version 1 page 34-38 给出的指南,应用如图 6 所示的 pRAX1 作为骨架,构建出该载体。

[0278] 新开发出的表达载体显示于图 7 中;这是将新基因转移到目标载体 pRAXdes2 得到的产物。这导致获得称为 pRAXdesCBH1.1 的最终表达载体 (参见图 8)。

[0279] 根据 Cao 等描述的方法 (Cao Q-N, Stubbs M, Ngo KQP, Ward M, CunninghamA, Pai EF, Tu G-C and Hofmann T(2000)Penicillopepsin-JT2 a recombinant enzyme from Penicillium janthinellum and contribution of a hydrogen bond in subsite S3 to kcatProtein Science 9:991-1001),将该构建物转移入黑曲霉泡盛变种。

[0280] 将转化子在基本培养基平板上划线 (Ballance DJ, Buxton FP, and Turner G(1983)Transformation of Aspergillus nidulans by the orotidine-5' -phosphatede carboxylase gene of Neurospora crassa Biochem Biophys Res Commun112:284-289),在 30 $^{\circ}$ C 生长 4 天。使用本领域已知的方法,收集孢子 (参见 [www.fgsc.net/fgn48/Kaminsky.j.htm](http://www.fgsc.net/fgn48/Kaminsky.j.htm))。在水中收获构巢曲霉分生孢子 (用无菌弯曲玻璃棒刮擦产分生孢子的培养物的表

面,以刮下孢子),这些分生孢子可以在4℃保藏数周至数月而没有活力的严重丧失。然而,新鲜获得的孢子以更强的繁殖能力发芽。对于长期的保藏,孢子可以保藏在-20℃,50%的甘油中,或-80℃,15-20%的甘油中。当为80%的水溶液时,甘油可以更容易用吸管吸取。将800 μl的分生孢子含水悬液(制备后可4℃保存)加入到200 μl 80%甘油中,用于-80℃保藏;将400 μl悬浮液加入到600 μl 80%甘油中,用于-20℃保藏。冷冻之前,进行涡旋混合。为了收集突变体,小部分的产分生孢子培养物可以被移离,置于20%甘油中,涡旋混合,-80℃冷冻保存。在我们的实施中,我们将它们保藏在-80℃,50%甘油中。

[0281] 将黑曲霉泡盛变种转化子培养在无尿苷的基本培养基上(Ballance et al. 1983)。通过将来自产孢子生长琼脂平板(sporulated grown agar plate)的1cm<sup>2</sup>的孢子悬浮物接种到100ml摇瓶中,37℃下培育3天,筛选出具有纤维素酶活性的转化子,如Cao et al. (2000)中所述。

[0282] CBH1活性测定是基于非荧光4-甲基伞形酯-β-乳糖苷被水解成乳糖和7-羟基-4-甲基香豆素产物,后一产物导致产生荧光信号。移取170 μl 50mM NaAc缓冲液,pH4.5,加入到适于进行荧光分析的96孔微量滴定板(MTP)(Greiner, Fluotrac200, art. nr. 655076)中。加入10 μl的上清液,然后加入10 μl的MUL(溶于milli Q水中的1mM的4-甲基伞形酯-β-乳糖苷(MUL)),将该MTP放到Fluostar Galaxy(BMG Labtechnologies; D-77656 Offenburg)中。在50℃,使用λ<sub>320nm</sub>(激发光)和λ<sub>460nm</sub>(发射光),测量动力学数据,该测量进行16分钟(8个循环,每循环120秒)。然后对具有CBH1活性的上清液进行疏水作用层析,如下面实施例3中所述。

[0283] 根据实施例1中描述的方法,推断出氨基酸序列。变异CBH1.1的氨基酸序列显示于图3中,其具有信号序列,而在图4中的序列不带有信号序列。信号序列在图3中用粗体和下划线表示。

[0284] 实施例3

[0285] CBH1变体的热稳定性

[0286] 下面的实施例详细描述了灰腐质霉CBH1.1变体的热稳定性如何不同于里氏木霉CBH1纤维素酶。

[0287] CBH I纤维素酶变体被克隆和表达,如上所述(参见实施例2)。然后通过柱层析,Cel17A野生型和变体从这些培养物的无细胞上清液中纯化得到。使用疏水作用层析(HIC)纯化蛋白质。使用Porost® 20HP2树脂,将柱子在BioCAD® SprintPerfusion Chromatography System上运行,两者都由Applied Biosystems制造。

[0288] HIC柱用5倍柱体积的0.020M磷酸钠,0.5M硫酸铵,pH6.8平衡。将硫酸铵加入到上清液,使得最终浓度为约0.5M,将pH调节到6.8。过滤后,将上清液上样到柱上。上样完毕后,柱子用10个柱体积的平衡缓冲液洗脱,然后用10个柱体积的硫酸铵洗脱,硫酸铵为0.5M至零的梯度,其处于0.02M磷酸钠中,pH6.8。Cel17A在大约中间的梯度被洗脱出来。基于还原性SDS-PAGE凝胶分析,收集并合并级分。

[0289] 根据Luo, et al., Biochemistry 34:10669和Gloss, et al., Biochemistry 36:5612中的方法,测定熔点。

[0290] 利用Aviv 215圆二色光谱仪收集数据。在25℃,获得变体在210和260纳米之间的光谱。缓冲条件是50mM双(三(羟甲基))氨基丙烷(Bis Tris Propane)/50mM醋酸铵

/冰醋酸, pH 5.5。蛋白质浓度保持在 0.25 和 0.5mg/ml 之间。确定用于监测去折叠的最佳波长后, 通过将温度从 25°C 升到 75°C, 对样品进行热变性。每 2 度, 收集一次数据, 时间为 5 秒。在 0.1 厘米路径长度的样品池中, 用 230 纳米波长来监测部分可逆的去折叠。

[0291] 相比起野生型里氏木霉 CBH1, 灰腐质霉 CBH 1.1 变体纤维素酶具有增加的热稳定性表现。灰腐质霉 CBH1.1 变体的  $T_m$  为 72.5°C; 里氏木霉的  $T_m$  为 62.3°C。

[0292]

#### 实施例 4

[0293]

#### CBH1 变体的活性

[0294] 下面的实施例详细描述了如何评估灰腐质霉 CBH1.1 变体的活性。

[0295] 利用本领域已知的技术来评价纤维素的转化 (cellulose conversion)。参见, 例如, Baker et al, Appl Biochem Biotechnol 1998 Spring ;70-72 :395-403。

[0296] 在实验中, 使用标准的纤维素转化测定方法。在该测定方法中, 将酶和缓冲底物置于容器中, 并在某一温度温育一段时间。用足量的 100mM 甘氨酸, pH 11.0 将反应混合物的 pH 调至至少 pH10, 从而使反应猝灭。一旦反应猝灭, 用 0.2 微米膜过滤反应混合物的一小等份, 以去除固体。根据 Baker et al., Appl. Biochem. Biotechnol. 70-72 :395-403 (1998) 描述的方法, 用 HPLC 测定过滤溶液中的可溶性糖。

[0297] 预处理的玉米秸秆 (PCS)—玉米秸秆用 2% w/w  $H_2SO_4$  预处理, 如 Schell, D. et al., J. Appl. Biochem. Biotechnol. 105 :69-86 (2003) 中所述, 然后用去离子水洗涤多次, 使 pH 值为 4.5。加入醋酸钠, 使最终浓度为 50mM, 通过滴定法使 pH 值为 5.0。在反应混合物中的纤维素浓度约为 7%。

[0298] 磷酸溶胀纤维素 (PASC)—根据 Walseth (1971) Tappi 35 :228 (1971) 和 Wood Biochem J. 121 :353 (1971) 中描述的方法, 由微晶纤维素 (Avicel) 制备得到 PASC。该材料用缓冲液和水稀释, 以获得 0.63% w/v 的混合物, 这样, 醋酸钠的最终浓度为 50mM, pH 5.0。酶的剂量为每克纤维素 1.6mg 总蛋白。

[0299] 第一组实验检测 12.66% 预处理的玉米秸秆 (PCS) (参见, Schell, D. et al., J. Appl. Biochem. Biotechnol. (2003) 105 :69-86) 的百分转化率, 检测在 38°C 的温度进行一天, 酶剂量为 15.5mg 酶 /gm 纤维素。样品以 700rpm 搅拌。在下述之间进行比较 :1) 来自 CBH1 剔除的木霉属菌株的纤维素酶 (delCBH1) ;2) 插入有里氏木霉 CBH1 基因的黑曲霉菌株 (rCBH1) ;3) 过量表达它的天然 CBHB 的黑曲霉菌株 (Aniger) ;4) 插入有施韦尼兹肉座菌 (H. schweinitzii) CBH1 基因的黑曲霉菌株 (Hschweinitzii/An) ;5) 插入有假康宁木霉 (T. pseudokoningii) CBH1 基因的黑曲霉菌株 (Tpseudokoni/An) ;6) 插入有灰腐质霉变异 CBH1.1 基因的黑曲霉菌株 (Hgrisea/An-1) ;7) 插入有灰腐质霉变异 CBH1.1 基因的黑曲霉菌株 (Hgrisea/An-2)。Hgrisea/An-1 和 Hgrisea/An-2 是来自同一转化子的两个克隆, 该转化子来自具有灰腐质霉变异 CBH1.1 基因的黑曲霉。第一组实验的结果显示于图 9 中。从中可以看出灰腐质霉变异 CBH1.1 的功能表现并不比任何其他测试 CBH 超出很多。图 11 是灰腐质霉变异 CBH1.1 与里氏木霉 nCBH1 的比较, 它们来自同样的实验条件。

[0300] 第二组实验检测百分转化率, 条件类似于第一组实验, 除了温育温度为 65°C, 不是 38°C。这组实验的结果在图 10 中给出。可以看到, 灰腐质霉变异 CBH1.1 的性能超出其他测试 CBH。图 12 是灰腐质霉变异 CBH1.1 与里氏木霉 rCBH1 进行的比较, 它们来自同样的实验条件。

[0301] 第三组实验检测的是由 PASC 生成纤维二糖的速度,在类似于先前实验描述的条件下进行,使用的温度为 38°C、65°C 和 70°C。结果在图 13 中给出。可以看到,在所有的测试温度下,灰腐质霉变异 CBH1.1 的性能表现均超过里氏木霉 CBH1。

[0302] 实施例 5

[0303] 嗜热小柱孢霉 CBH1 的分离

[0304] 该实施例说明了编码嗜热小柱孢霉 CBH1 的核酸的分离和表征。

[0305] 基因组 DNA 的分离和引物构建

[0306] 克隆、表达和纯化嗜热小柱孢霉 CBH1 的方法与灰腐质霉高温变种 CBH1.1 中所述的相同(参见实施例 1)。嗜热小柱孢霉的 CBH1 基因从公共菌种收藏条目号(public strain collection entry)CBS 671.88 的基因组 DNA 扩增得到,其中使用与用于扩增灰腐质霉高温变种 CBH1.1 相同的引物 PVS203 和 PVS204。

[0307] 嗜热小柱孢霉 CBH1 基因序列的分离

[0308] 通过使用 N 末端(PVS203)和 C 末端(PVS204)引物,直接获得全长序列。使用 Vector NTI 软件,全长 DNA 序列按三个开放阅读框被翻译。不带有内含子序列的基因组 DNA 序列的翻译显示了嗜热小柱孢霉 CBH1 的蛋白质序列。已获得全长基因,并提供于图 14A 中(基因组 DNA)。推定的 cDNA 在图 14B 中给出。携带或不携带信号序列的氨基酸序列分别显示于图 14C 和 15 中。

[0309] 将嗜热小柱孢霉 CBH1、灰腐质霉高温变种 CBH1.1 和红褐肉座菌 CBH1 蛋白序列进行比对。参见图 15。

[0310] 通过鉴定灰腐质霉高温变种 CBH1.1 和明显更稳定的嗜热小柱孢霉 CBH1 之间的差异位点,并使用图 15 中的比对,鉴定红褐肉座菌 CBH1 中的相应位点,红褐肉座菌 CBH1 不如灰腐质霉高温变种 CBH1.1 或嗜热小柱孢霉 CBH1 稳定。在红褐肉座菌 CBH1 中的下列位点(成熟蛋白质残基编号)被鉴定认为对于稳定性是重要的:

[0311] Thr(T)55, 优选 Thr55Glu(T55E) & Thr55Lys(T55K)

[0312] Ser(S)58, 优选 Ser58Thr(S58T)

[0313] Gln(Q)101, 优选 Gln101Tyr(Q101Y) & Gln101His(Q101H)

[0314] Asn(N)250, 优选 Asn250Asp(N250D) & Asn250Glu(N250E)

[0315] Pro(P)265, 优选 Pro265Ala(P265A) & Pro265Ser(P265S)

[0316] Leu(L)288, 优选 Leu288Ile(L288I)。

[0317] 实施例 6

[0318] 嗜热小柱孢霉 CBH1 的热稳定性

[0319] 该实施例描述了嗜热小柱孢霉 CBH1 和灰腐质霉高温变种 CBH1.1 的热稳定性测定。

[0320] 嗜热小柱孢霉 CBH1 和灰腐质霉高温变种 CBH1.1 用实施例 2 中描述的方法进行表达,用实施例 3 中的方法进行纯化,使用 Microcal VP-DSC 通过差示扫描量热法进行分析。样品从 30°C 到 95°C,以 90°C / 小时的速度进行扫描。纯化的蛋白质在 50mM 醋酸铵和 50mM 双(三(羟甲基))氨基丙烷(bis-tris propane), pH 5.5 中去盐。对于所有样品,最终浓度在 0.05 和 0.25mg/mL 之间。

[0321] 观察到,嗜热小柱孢霉 CBH1 的热转变的中点(midpoint)为 78.3°C,灰腐质霉

CBH1.1 转变中点为 76.0°C, 参见图 16。

[0322] 应该理解, 此处描述的实施例和实施方案仅是为了阐述的目的, 本领域技术人员可以对其进行各种修改和变化, 而这些修改和变化包含在本申请的精神和范围之内, 并包含在权利要求的范围内。此处引用的所有出版物、专利和专利申请以其整体在此并入作为参考, 用于各个论题。

## 灰腐质霉CBH1.1

总基因组序列（1638个核苷酸）：

1	ATGCGTACCG	CCAAGTTCGC	CACCCTCGCC	GCCCTTGTGG	CCTCGGCCGC	50
51	CGCCCAGCAG	GCGTGCAGTC	TCACCACCGA	GAGGCACCCT	TCCCTCTCTT	100
101	GGAAGAAGTG	CACCGCCGGC	GGCCAGTGCC	AGACCGTCCA	GGCTTCCATC	150
151	ACTCTCGACT	CCAACTGGCG	CTGGACTCAC	CAGGTGTCTG	GCTCCACCAA	200
201	CTGCTACACG	GGCAACAAGT	GGGATACTAG	CATCTGCACT	GATGCCAAGT	250
251	CGTGCGCTCA	GAAGTGTGTC	GTCGATGGTG	CCGACTACAC	CAGCACCTAT	300
301	GGCATCACCA	CCAACGGTGA	TTCCCTGAGC	CTCAAGTTCG	TCACCAAGGG	350
351	CCAGCACTCG	ACCAACGTGC	GCTCGCGTAC	CTACCTGATG	GACGGCGAGG	400
401	ACAAGTATCA	<b>GAGTACGTT</b>	<b>TATCTTCAGC</b>	<b>CTTCTCGCGC</b>	<b>CTTGAATCCT</b>	450
451	<b>GGCTAACGTT</b>	<b>TACACTTCAC</b>	<b>AGCCTTCGAG</b>	<b>CTCCTCGGCA</b>	<b>ACGAGTTCAC</b>	500
501	CTTCGATGTC	GATGTCTCCA	ACATCGGGTG	CGGTCTCAAC	GGCGCCCTGT	550
551	ACTTCGTCTC	CATGGACGCC	GATGGTGGTC	TCAGCCGCTA	TCCTGGCAAC	600
601	AAGGCTGGTG	CCAAGTACGG	TACCGGCTAC	TGCGATGCTC	AGTGCCCCCG	650
651	TGACATCAAG	TTCATCAACG	GCGAGGCCAA	CATTGAGGGC	TGGACCGGCT	700
701	CCACCAACGA	CCCCAACGCC	GGCGCGGGCC	GCTATGGTAC	CTGCTGTCTT	750
751	GAGATGGATA	TCTGGGAAGC	CAACAACATG	GCTACTGCCT	TCACTCCTCA	800
801	CCCTTGACAC	ATCATTGGCC	AGAGCCGCTG	CGAGGGCGAC	TCGTGCGGTG	850
851	GCACCTACAG	CAACGAGCGC	TACGCCGGCG	TCTGCGACCC	CGATGGCTGC	900
901	GACTTCAACT	CGTACCGCCA	GGGCAACAAG	ACCTTCTACG	GCAAGGGCAT	950
951	GACCGTCGAC	ACCACCAAGA	AGATCACTGT	CGTCACCCAG	TTCTCAAGG	1000
1001	ATGCCAACGG	CGATCTCGGC	GAGATCAAGC	GCTTCTACGT	CCAGGATGGC	1050
1051	AAGATCATCC	CCAACTCCGA	GTCCACCATC	CCCGGCGTCG	AGGGCAATTC	1100
1101	CATCACCCAG	GACTGGTGGC	ACCGCCAGAA	GGTTGCCTTT	GGCGACATTG	1150
1151	ACGACTTCAA	CCGCAAGGGC	GGCATGAAGC	AGATGGGCAA	GGCCCTCGCC	1200
1201	GGCCCCATGG	TCCTGGTCAT	GTCCATCTGG	GATGACCACG	CCTCCAACAT	1250
1251	GCTCTGGCTC	GACTCGACCT	TCCCTGTCTG	TGCCGCTGGC	AAGCCCGGCG	1300
1301	CCGAGCGCGG	TGCCTGCCCC	ACCACCTCGG	GTGTCCCTGC	TGAGGTTGAG	1350
1351	GCCGAGGCCC	CCAACAGCAA	CGTCGTCTTC	TCCAACATCC	GCTTCGGCCC	1400
1401	CATCGGCTCG	ACCGTTGCTG	GTCTCCCCGG	CGCGGGCAAC	GGCGGCAACA	1450
1451	ACGGCGGCAA	CCCCCGGCC	CCCACCACCA	CCACCTCCTC	GGCTCCGGCC	1500
1501	ACCACCACCA	CCGCCAGCGC	TGGCCCCAAG	GCTGGCCGCT	GGCAGCAGTG	1550
1551	CGGCGGCATC	GGCTTCACTG	GCCGACCCA	GTGCGAGGAG	CCCTACACTT	1600
1601	GCACCAAGCT	CAACGACTGG	TACTCTCAGT	GCCTGTAA		1638

图 1

## 灰腐质霉CBH1.1

删除推定的内含子序列 (GTACGTT...CAG = 413-472),  
得到cDNA序列 (1578个核苷酸)

1	ATGCGTACCG	CCAAGTTCGC	CACCCTCGCC	GCCCTTGTGG	CCTCGGCCGC	50
51	CGCCCAGCAG	GCGTGCAGTC	TCACCACCGA	GAGGCACCCT	TCCCTCTCTT	100
101	GGAAGAAGTG	CACCGCCGGC	GGCCAGTGCC	AGACCGTCCA	GGCTTCCATC	150
151	ACTCTCGACT	CCAAGTGGCG	CTGGACTCAC	CAGGTGTCTG	GCTCCACCAA	200
201	CTGCTACACG	GGCAACAAGT	GGGATACTAG	CATCTGCACT	GATGCCAAGT	250
251	CGTGCGCTCA	GAAGTGTGCT	GTCGATGGTG	CCGACTACAC	CAGCACCTAT	300
301	GGCATCACCA	CCAACGGTGA	TTCCCTGAGC	CTCAAGTTCG	TCACCAAGGG	350
351	CCAGCACTCG	ACCAACGTCG	GCTCGCGTAC	CTACCTGATG	GACGGCGAGG	400
401	ACAAGTATCA	GACCTTCGAG	CTCCTCGGCA	ACGAGTTCAC	CTTCGATGTC	450
451	GATGTCTCCA	ACATCGGCTG	CGGTCTCAAC	GGCGCCCTGT	ACTTCGTCTC	500
501	CATGGACGCC	GATGGTGGTC	TCAGCCGCTA	TCTTGGCAAC	AAGGCTGGTG	550
551	CCAAGTACGG	TACCGGCTAC	TGCGATGCTC	AGTGCCCCCG	TGACATCAAG	600
601	TTCATCAACG	GCGAGGCCAA	CATTGAGGGC	TGGACCGGCT	CCACCAACGA	650
651	CCCCAACGCC	GGCGCGGGCC	GCTATGGTAC	CTGCTGCTCT	GAGATGGATA	700
701	TCTGGGAAGC	CAACAACATG	GCTACTGCCT	TCACTCCTCA	CCCTTGACC	750
751	ATCATTGGCC	AGAGCCGCTG	CGAGGGCGAC	TCGTGCGGTG	GCACCTACAG	800
801	CAACGACGCG	TACGCCGGCG	TCTGCGGACC	CGATGGCTGC	GACTTCAACT	850
851	CGTACCGCCA	GGCAACAAG	ACCTTCTACG	GCAAGGGCAT	GACCGTCGAC	900
901	ACCACCAAGA	AGATCACTGT	CGTCACCCAG	TTCCTCAAGG	ATGCCAACGG	950
951	CGATCTCGGC	GAGATCAAGC	GCTTCTACGT	CCAGGATGGC	AAGATCATCC	1000
1001	CCAAGTCCGA	GTCCACCATC	CCCGGCGTCG	AGGGCAATTC	CATCACCAG	1050
1051	GACTGGTGGC	ACCGCCAGAA	GGTTGCCTTT	GGCGACATTG	ACGACTTCAA	1100
1101	CCGCAAGGGC	GGCATGAAGC	AGATGGGCAA	GGCCCTCGCC	GGCCCCATGG	1150
1151	TCTTGGTCAT	GTCCATCTGG	GATGACCACG	CCTCCAACAT	GCTCTGGCTC	1200
1201	GACTCGACCT	TCCCTGTGCA	TGCCGCTGGC	AAGCCCGGCG	CCGAGCGCGG	1250
1251	TGCCTGCCCG	ACCACCTCGG	GTGTCCCTGC	TGAGGTTGAG	GCCGAGGCC	1300
1301	CCAACAGCAA	CGTCGTCTTC	TCCAACATCC	GCTTCGGCCC	CATCGGCTCG	1350
1351	ACCGTTGCTG	GTCTCCCGG	CGCGGGCAAC	GGCGGCAACA	ACGGCGGCAA	1400
1401	CCCCCGGCC	CCCACCACCA	CCACCTCCTC	GGCTCCGGCC	ACCACCACCA	1450
1451	CCGCCAGCGC	TGGCCCCAAG	GCTGGCCGCT	GGCAGCAGTG	CGGCGGCATC	1500
1501	GGCTTCACTG	GCCCGACCCA	GTGCGAGGAG	CCCTACACTT	GCACCAAGCT	1550
1551	CAACGACTGG	TACTCTCAGT	GCCTGTAA			1578

图 2

翻译cDNA序列, 得到灰腐质霉高温变种CBH1.1前体  
(即: 具有信号序列) 的蛋白质序列 (525个氨基酸):

1	<u>MRTAKFATLA</u>	<u>ALVASAAAQ</u>	ACSLTTERHP	SLSWKKCTAG	GQCQTVQASI	50
51	TLDSNWRWTH	QVSGSTNCYT	GNKWDTSICT	DAKSCAQNCC	VDGADYTSTY	100
101	GITTNGDLSL	LKFVTKGQHS	TNVGSRTYLM	DGEDKYQTFE	LLGNEFTFDV	150
151	DVSNIGCGLN	GALYFVSMDA	DGGLSRYPGN	KAGAKYGTGY	CDAQCPRIK	200
201	FINGEANIEG	WTGSTNDPNA	GAGRYGTCCS	EMDIWEANNM	ATAFTPHPCT	250
251	IIGQSRCEGD	SCGGTYSNER	YAGVCDPDGC	DFNSYRQGNK	TFYKGKMTVD	300
301	TTKKITVVVQ	FLKDANGDLG	EIKRFYVQDG	KIIPNSESTI	PGVEGNSITQ	350
351	DWCDRQKVAF	GDIDDFNRKG	GMKQMGKALA	GPMVLVMSIW	DDHASNMLWL	400
401	DSTFPVDAAG	KPGAERGACP	TTSVPAEVE	AEAPNSNVVF	SNIRFGPIGS	450
451	TVAGLPGAGN	GGNNGGNPPP	PTTTTSSAPA	TTTTASAGPK	AGRWQQCGGI	500
501	GFTGPTQCEE	PYTCTKLNW	YSQCL			525

图 3

成熟（即：去除推定的信号序列的  
表达蛋白）蛋白序列（507个氨基酸）：

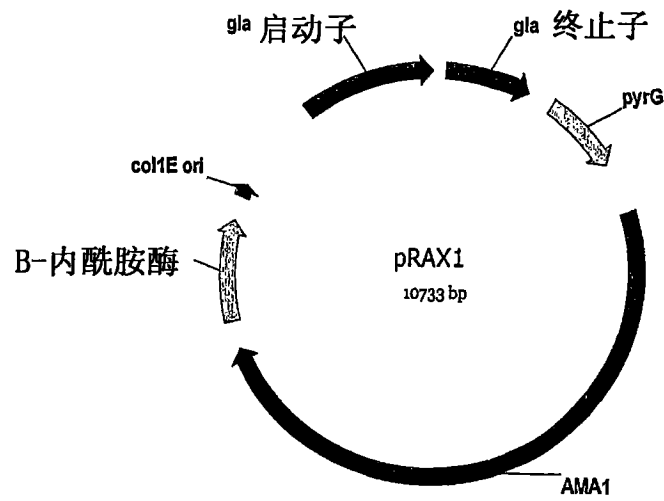
1	QQACSLTTER	HPSLSWKKCT	AGGQCQTVQA	SITLDSNWRW	THQVSGSTNC	50
51	YTGKWDTSI	CTDAKSCAQN	CCVDGADYTS	TYGITTINGDS	LSLKFVTKGQ	100
101	HSTNVGSRTY	LMDGEDKYQT	FELLGNEFTF	DVDVSNIGCG	LNGALYFVSM	150
151	DADGGLSRYP	GNKAGAKYGT	GYCDAQCPRD	IKFINGEANI	EGWTGSTNDP	200
201	NAGAGRYGTC	CSEMDIWEAN	NMATAFTPHP	CTIIGQSRCE	GDSCGGTYSN	250
251	ERYAGVCDPD	GCDFNSYRQG	NKTFYKGMT	VDTTKKITVV	TQFLKDANGD	300
301	LGEIKRFYVQ	DGKLIIPNSES	TIPGVEGNSI	TQDWCDRQKV	AFGDIDDFNR	350
351	KGGMKQMGKA	LAGPMVLVMS	IWDDHASNML	WLDSTFPVDA	AGKPGAERGA	400
401	CPTTSGVPAE	VEAEAPNSNV	VFSNIRFGPI	GSTVAGLPGA	GNGGNNGGNP	450
451	PPPTTTTSSA	PATTTTASAG	PKAGRWQQCG	GIGFTGPTQC	EEPYTCTKLN	500
501	DWYSQCL					507

图 4



CBS 225.63	1	75
D63515 成熟	(1)	QQACSLTTERHPSLSWKCCTAGGQOQWQASIHLSNWRNLEHVGSGTNCYQNKWPTSTTDDAKSQAQNGCQMDG
X17258 成熟	(1)	QQACSLTTERHPSLSWKCCTAGGQOQWQASIHLSNWRNLEHVGSGTNCYQNKWPTSTTDDAKSQAQNGCQMDG
共有序列	(1)	QQACSLTTERHPSLSWKCCTAGGQOQWQASIHLSNWRNLEHVGSGTNCYQNKWPTSTTDDAKSQAQNGCQMDG
CBS 225.63	76	150
D63515 成熟	(76)	ADYTSVGLIINEDSTSLTFYFKGQHSINVGSRVYKMDGEDIYQVRESDIENETNNDVYVNTICGELNGLAFYVSM
X17258 成熟	(76)	ADYTSVGLIINEDSTSLTFYFKGQHSINVGSRVYKMDGEDIYQVRESDIENETNNDVYVNTICGELNGLAFYVSM
共有序列	(76)	ADYTSVGLIINEDSTSLTFYFKGQHSINVGSRVYKMDGEDIYQVRESDIENETNNDVYVNTICGELNGLAFYVSM
CBS 225.63	151	225
D63515 成熟	(151)	DADGGLSRYPGNKAGAKYGTGYCDAQCPRIKFIKINGEANLEGWTSNDPNAGAGRYGTCCEMDIWEANNMATA
X17258 成熟	(151)	DADGGLSRYPGNKAGAKYGTGYCDAQCPRIKFIKINGEANLEGWTSNDPNAGAGRYGTCCEMDIWEANNMATA
共有序列	(151)	DADGGLSRYPGNKAGAKYGTGYCDAQCPRIKFIKINGEANLEGWTSNDPNAGAGRYGTCCEMDIWEANNMATA
CBS 225.63	226	300
D63515 成熟	(226)	FPPHPCYIIGOSPCGEGSCEGYSNERVAGVCDPDEGDFNSZQGNKTEYGGQWVPTNATITWVQKADANGD
X17258 成熟	(226)	FPPHPCYIIGOSPCGEGSCEGYSNERVAGVCDPDEGDFNSZQGNKTEYGGQWVPTNATITWVQKADANGD
共有序列	(226)	FPPHPCYIIGOSPCGEGSCEGYSNERVAGVCDPDEGDFNSZQGNKTEYGGQWVPTNATITWVQKADANGD
CBS 225.63	301	375
D63515 成熟	(301)	LGEIKRFYVQDGKLIIPNSESIIPGVEGNSIQDWCDDRQKVAFGDIDDVFNKGGMKQMGKALAGPMVLVMSIWDDH
X17258 成熟	(301)	LGEIKRFYVQDGKLIIPNSESIIPGVEGNSIQDWCDDRQKVAFGDIDDVFNKGGMKQMGKALAGPMVLVMSIWDDH
共有序列	(301)	LGEIKRFYVQDGKLIIPNSESIIPGVEGNSIQDWCDDRQKVAFGDIDDVFNKGGMKQMGKALAGPMVLVMSIWDDH
CBS 225.63	376	450
D63515 成熟	(376)	ASNMLWLDSTFPVDAAGKPGABERGACPTTSGVPAEVEABAPNSNVVFSNIRFGPIGSIYAGLPGAGNGGNGNP
X17258 成熟	(376)	ASNMLWLDSTFPVDAAGKPGABERGACPTTSGVPAEVEABAPNSNVVFSNIRFGPIGSIYAGLPGAGNGGNGNP
共有序列	(376)	ASNMLWLDSTFPVDAAGKPGABERGACPTTSGVPAEVEABAPNSNVVFSNIRFGPIGSIYAGLPGAGNGGNGNP
CBS 225.63	451	507
D63515 成熟	(451)	PPPTTTSSAPATTTTASAGKAGRWQCCGGIGFTGTQCEEPYCTKLNWDWYSQCL
X17258 成熟	(451)	PPPTTTSSAPATTTTASAGKAGRWQCCGGIGFTGTQCEEPYCTKLNWDWYSQCL
共有序列	(451)	PPPTTTSSAPATTTTASAGKAGRWQCCGGIGFTGTQCEEPYCTKLNWDWYSQCL

两个公开序列和灰腐质霉CBH1.1变体之间的序列联配比对



pRAX1

图 6

用于在黑曲霉中进行表达的目标载体pRAXdes2

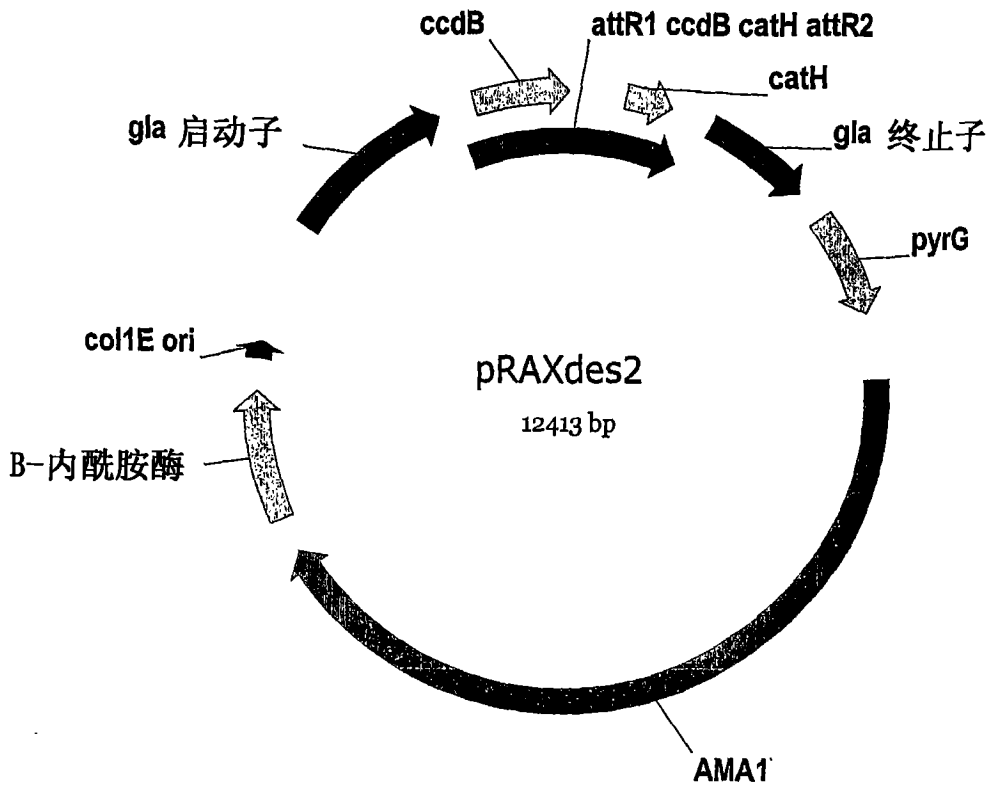


图 7

CBH1基因的可重复表达pRAXdesCBH1载体,  
处于葡糖淀粉酶启动子的控制之下

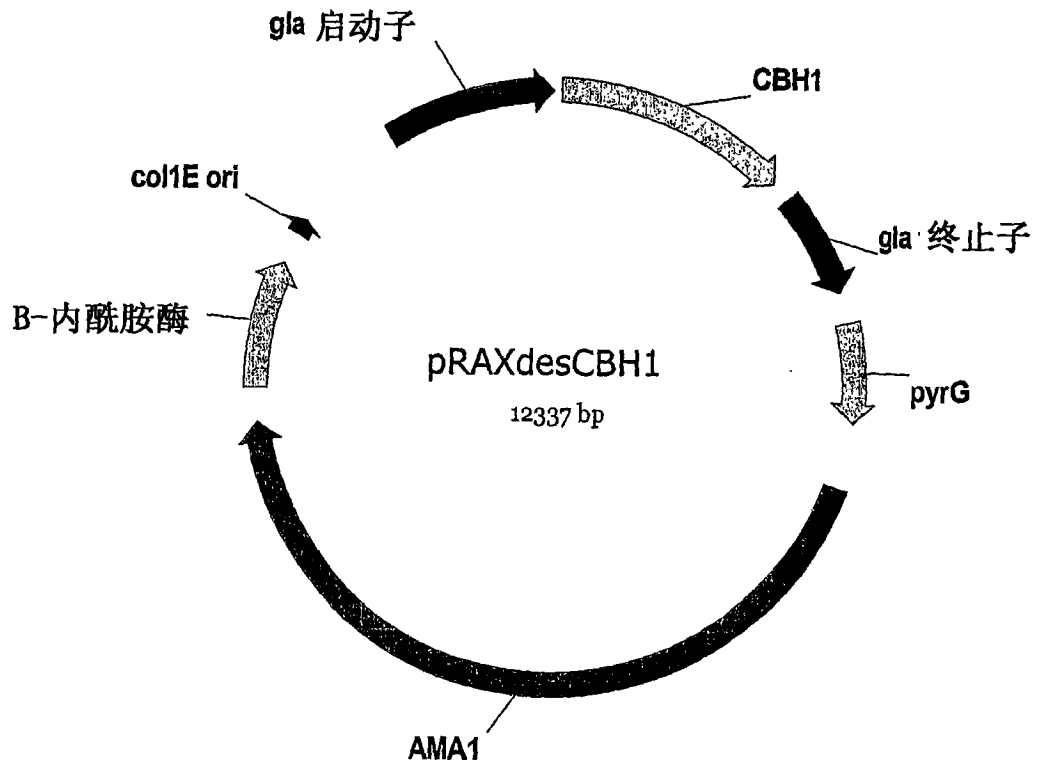


图 8

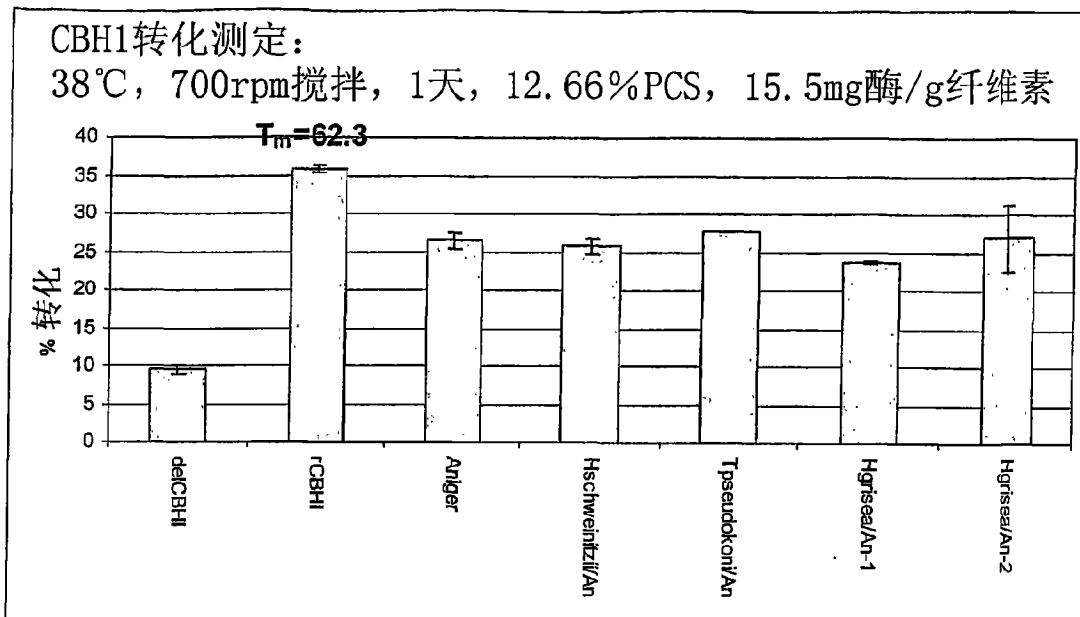


图9

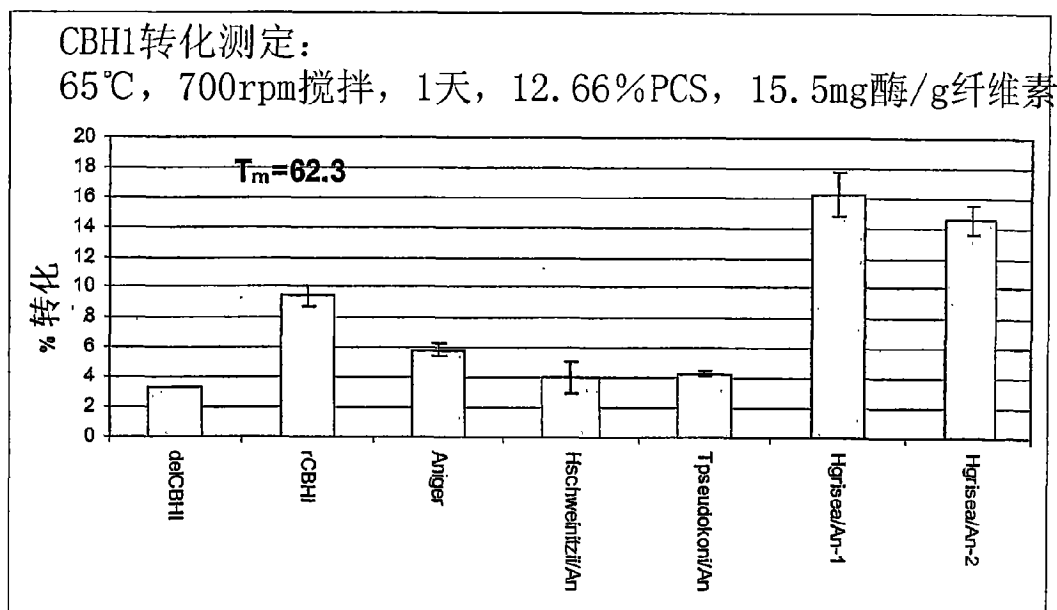


图10

CBH1转化测定：  
38℃，700rpm搅拌，1天，12.66%PCS，15.5mg酶/g纤维素

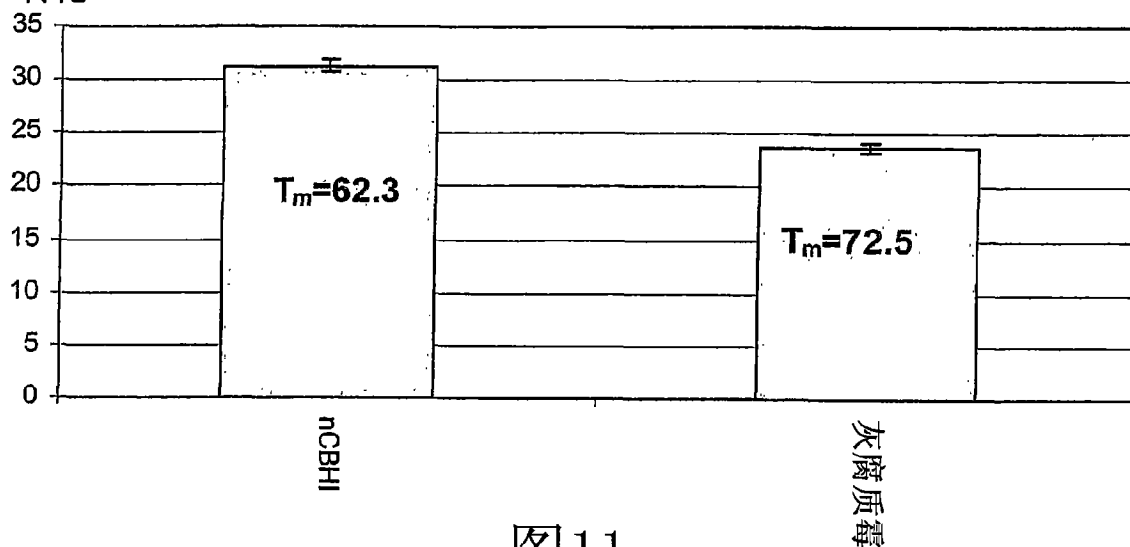


图11

CBH1转化测定：  
65℃，700rpm搅拌，1天，12.66%PCS，15.5mg酶/g纤维素

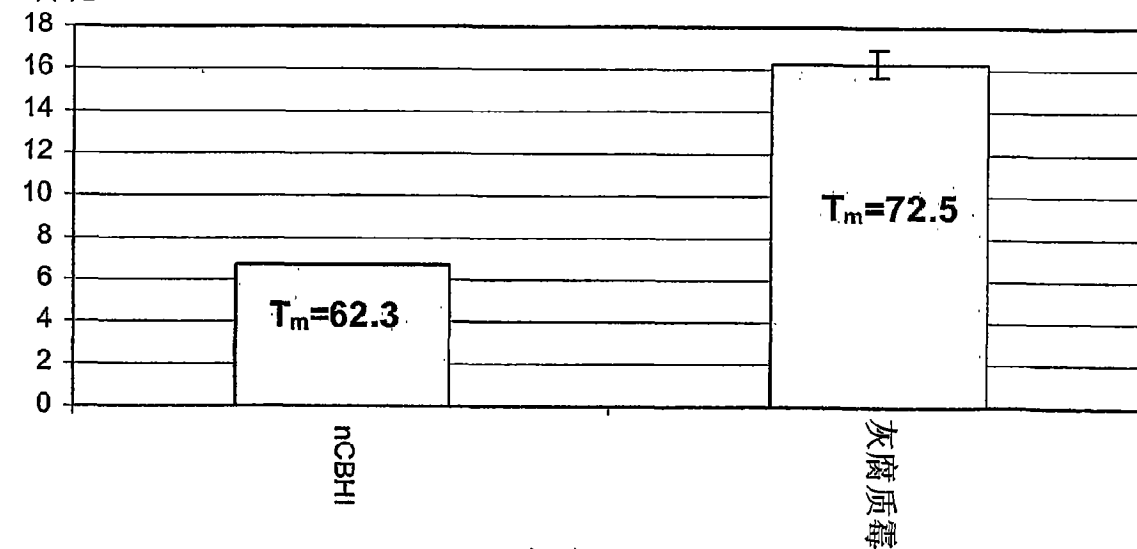


图12

图13A  
b/n灰腐质霉和rCBHI之间3倍速率差异

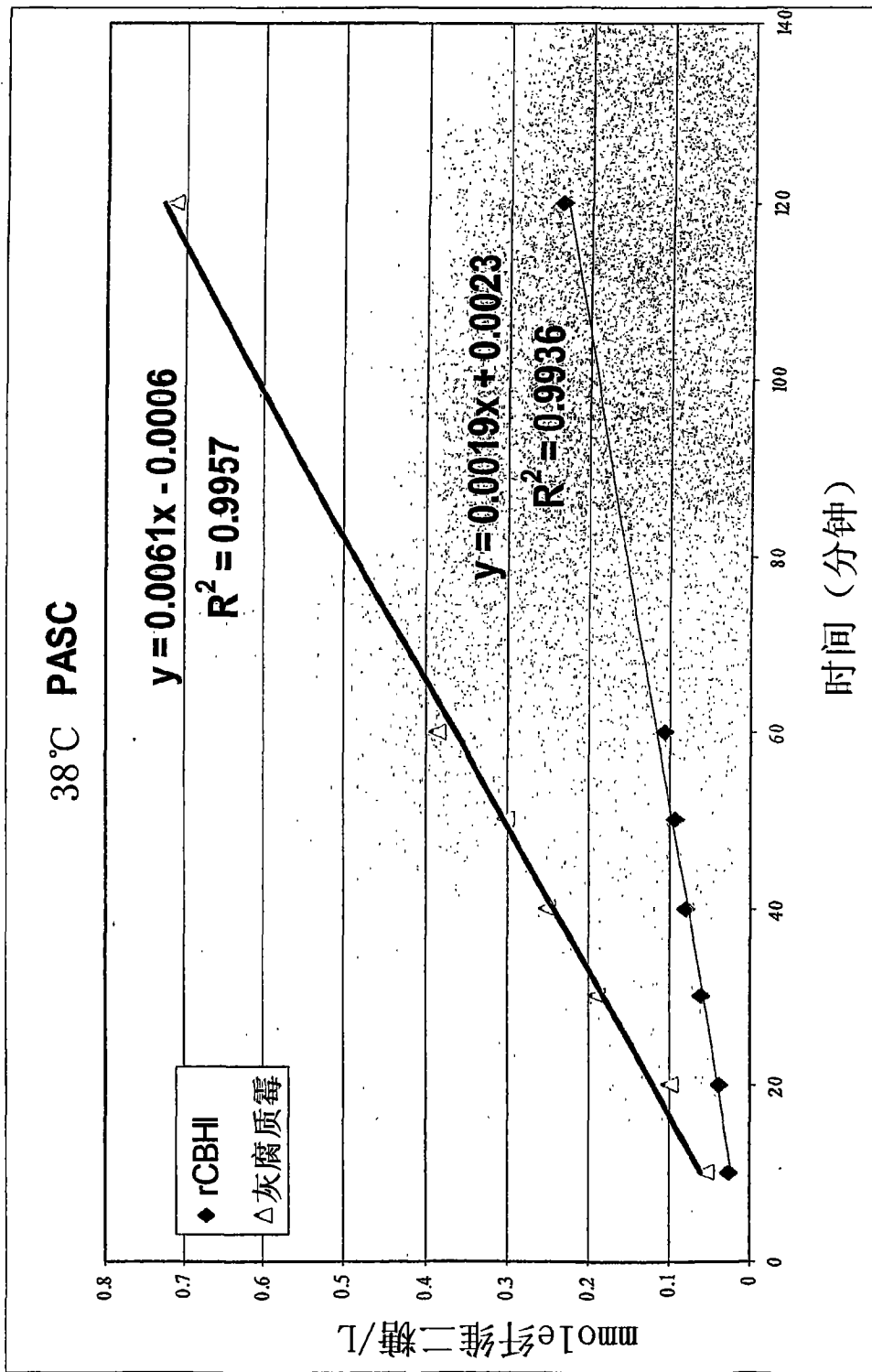


图13B  
4.8倍速率差异

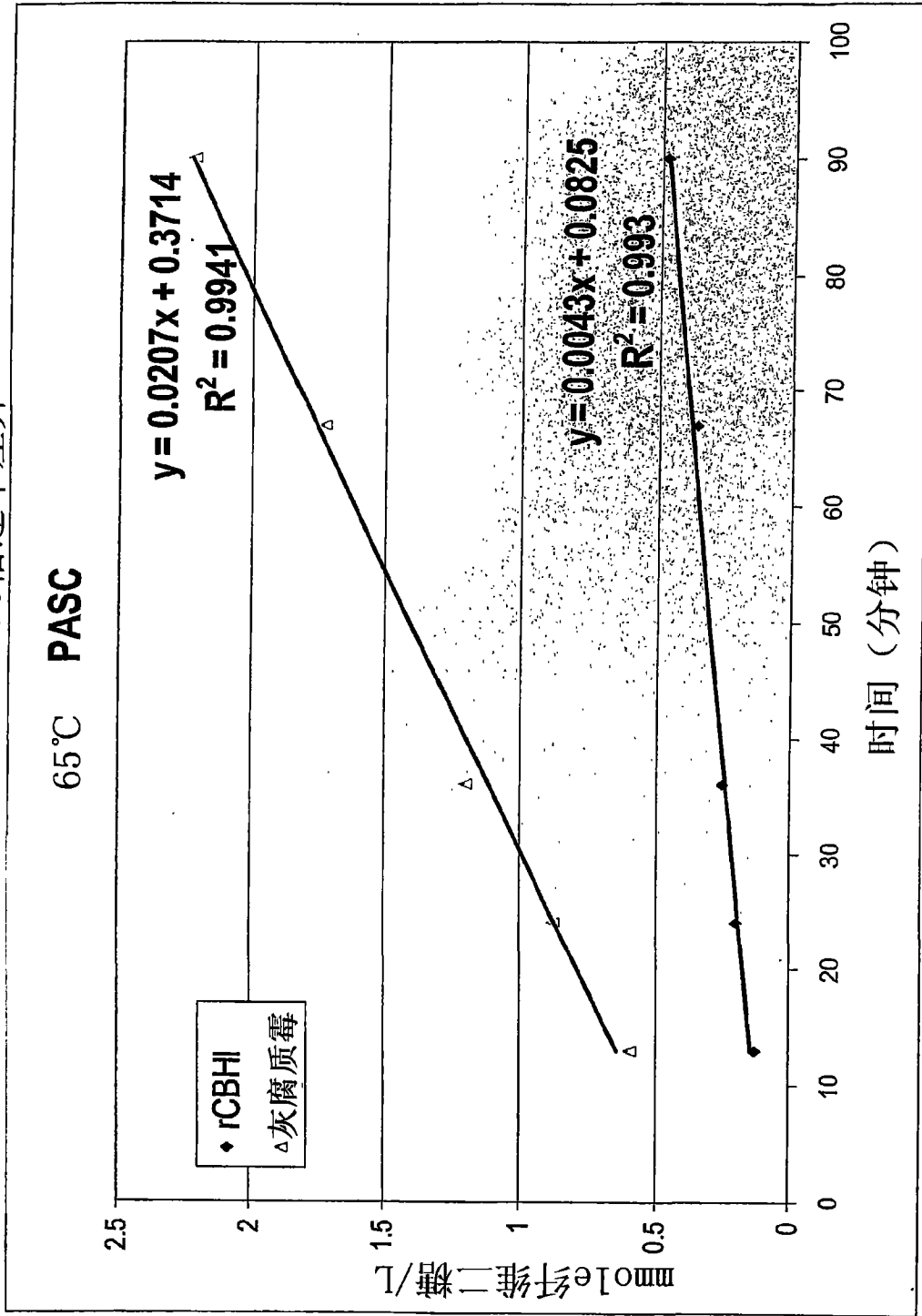
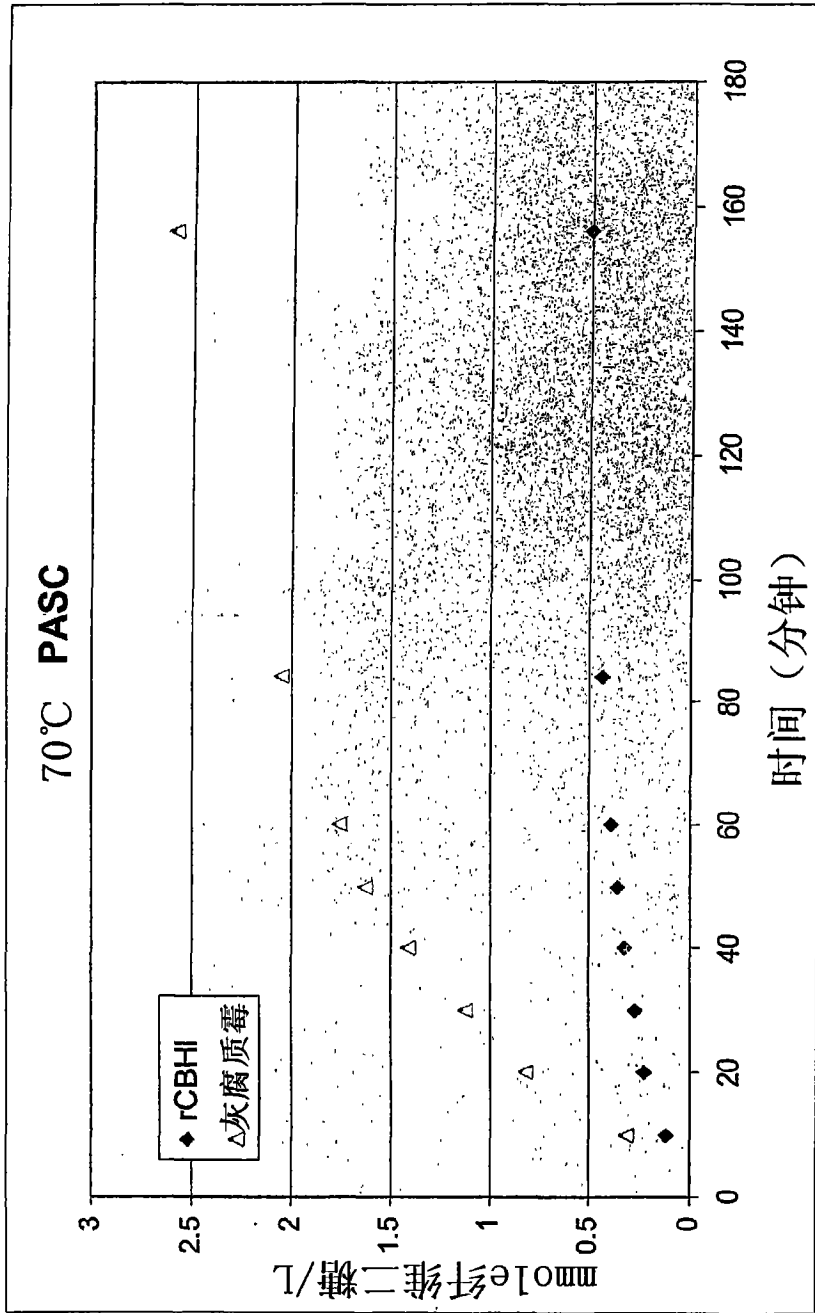


图13C



```

1  ATGCGTACCG CCAAGTTCGC CACCCTCGCC GCCCTTGTGG CCTCGGCCGC
51  CGCCCAGCAG GCGTGCAGCC TCACCACCGA GAGGCACCCT TCCCTCTCCT
101 GGAAGAAGTG CACCGCCGGC GGCCAGTGCC AGACCGTCCA GGCTTCCATC
151 ACTCTCGACT CCAACTGGCG CTGGACTCAC CAGGTGTCTG GCTCCACCAA
201 CTGCTACACG GGCAACGAGT GGGATTCTAG CATCTGCACT GATGCCAAGT
251 CGTGCGCTCA GAACTGCTGC GTCGATGGTG CTGACTACAC CAGCACCTAT
301 GGCATACCA CCAACGGTGA TTCCCTGAGC CTCAAGTTCG TCACCAAGGG
351 CCACTACTCG ACCAACGTCG GCTCGCGTAC CTACCTGATG GACGGCGAGG
401 ACAAGTATCA GAGTAGGTTT TATCTTCAGC CTTCTCGCGC CTTGAATCCT
451 GGCTAACTTT TACACTTCAC AGCCTTCGAG CTCCTCGGCA ACGAGTTCAC
501 CTTGATGTC GATGTCTCCA ACATCGGCTG CCGTCTCAAC GGCGCCCTGT
551 ACTTCGTCTC CATGGACGCC GATGGTGGTC TCAGCCGCTA TCCTGGCAAC
601 AAGGCTGGTG CCAAGTACGG TACCGGTAC TCGCATGCTC AGTGCCCCCG
651 TGACATCAAG TTCATCAACG GCGAGGCCAA CATTGAGGGC TGGACCGGCT
701 CCACCAACGA CCCCAACGCC GGCGCGGGCC GCTATGGTAC CTGCTGCTCT
751 GAGATGGATA TCTGGGAGGC CAACAACATG GCTACTGCCT TCACTCCTCA
801 CCCTTGCACT ATCATTTGGC AGAGCCGCTG CGAGGGCGAC TCGTGCGGTG
851 GCACCTACAG CAACGACCGC TACGCCGGCG TCTGCGACCC CGATGGCTGC
901 GACTTCAACG CGTATCGCCA GGGCAACAAG ACCTTCTACG GCAAGGGCAT
951 GACCGTCGAC ACCACCAAGA AGCTCACCGT CGTCACCCAG TTCCTCAAGG
1001 ACGCCAACGG CGATCTCGGC GAGATCAAGC GCTTCTACGT CCAGGATGGG
1051 AAGATCATCC CCAACTCCGA GTCCACCATC CCCGGCGTCG AGGGCAACTC
1101 CATCACCCAG GATTGGTGCG ACCGCCAGAA GGTTGCCTTT GCGCATTG
1151 ACGACTTCAA CCGCAAGGGC GGCATGAAGC AGATGGGCAA GGCCCTCGCC
1201 GGCCCCATGG TCCTGGTCAT GTCCATCTGG GATGACCACG CCTCCAACAT
1251 GCTCTGGCTC GACTCGACCT TCCCTGTGCA TGCCGCTGGC AAGCCCGGCG
1301 CCGAGCGCGG TGCCCTGCCC ACCACCTCGG GTGTCCCTGC TGAGGTTGAG
1351 GCCGAGGCCC CCAACAGCAA CGTCGTCTTC TCCAACATCC GCTTCGGCCC
1401 CATCGGCTCG ACCGTTGCCG GCCTTCCAG CGATGGCGGC AACACGGCG
1451 GCAACACCAC CGTCCAGCCC CCGCCCAGCA CCACCACCAC CTCTGCCAGC
1501 AGCAGCACCA CCTCGGCTCC TGCCACCACC ACCACCGCCA GCGCTGGCCC
1551 CAAGGCTGGC CGCTGGCAGC AGTGCGGCGG CATCGGCTTC ACTGGCCCGA
1601 CCCAGTGCGA GGAGCCCTAC ACTTGACCA AGCTCAACGA CTGGTACTCT
1651 CAGTGCTGT AA

```

## 嗜热小柱孢霉CBH1的基因组DNA

图 14A

```

1   ATGCGTACCG CCAAGTTCGC CACCCTCGCC GCCCTTGTGG CCTCGGCCCG
   CGCCCAGCAG GCGTGCAGCC TCACCACCGA GAGGCACCCT TCCCTCTCCT
101  GGAAGAAGTG CACCGCCGGC GGCCAGTGCC AGACCGTCCA GGCTTCCATC
   ACTCTCGACT CCAACTGGCG CTGGACTCAC CAGGTGTCTG GCTCCACCAA
201  CTGCTACACG GGCAACGAGT GGGATTCTAG CATCTGCACT GATGCCAAGT
   CGTGCGCTCA GAACTGCTGC GTCGATGGTG CTGACTACAC CAGCACCTAT
301  GGCATCACCA CCAACGGTGA TTCCCTGAGC CTC AAGTTCG TCACCAAGGG
   CCAGTACTCG ACCAACGTCG GCTCGCGTAC CTACCTGATG GACGGCGAGG
401  ACAAGTATCA GACCTTCGAG CTCCTCGGCA ACGAGTTCAC CTTCGATGTC
   GATGTCTCCA ACATCGGCTG CGGTCTCAAC GGCGCCCTGT ACTTCGTCTC
501  CATGGACGCC GATGGTGGTC TCAGCCGCTA TCCTGGCAAC AAGGCTGGTG
   CCAAGTACGG TACCGGCTAC TGCGATGCTC AGTGCCCCCG TGACATCAAG
601  TTCATCAACG GCGAGGCCAA CATTGAGGGC TGGACCGGCT CCACCAACGA
   CCCCAACGCC GCGCGGGGCC GCTATGGTAC CTGCTGCTCT GAGATGGATA
701  TCTGGGAGGC CAACAACATG GCTACTGCCT TCACTCCTCA CCCTTGCACT
   ATCATTGGCC AGAGCCGCTG CGAGGGCGAC TCGTGCGGTG GCACCTACAG
801  CAACGACCGC TACGCCGGCG TCTGCGACCC CGATGGCTGC GACTTCAACG
   CGTATCGCCA GGGCAACAAG ACCTTCTACG GCAAGGGCAT GACCGTCGAC
901  ACCACCAAGA AGCTCACCGT CGTCACCCAG TTCCTCAAGG ACGCCAACGG
   CGATCTCGGC GAGATCAAGC GCTTCTACGT CCAGGATGGG AAGATCATCC
1001 CCAACTCCGA GTCCACCATC CCCGGCGTCG AGGGCAACTC CATCACCAG
   GATTGGTGCG ACCGCCAGAA GGTTGCCTTT GGCACATTG ACGACTTCAA
1101 CCGCAAGGGC GGCATGAAGC AGATGGGCAA GGCCCTCGCC GGCCCCATGG
   TCCTGGTCAT GTCCATCTGG GATGACCACG CCTCCAACAT GCTCTGGCTC
1201 GACTCGACCT TCCCTGTCGA TGCCGCTGGC AAGCCC GGCG CCGAGCGCGG
   TGCC TGCCCG ACCACCTCGG GTGTCCCTGC TGAGGTTGAG GCCGAGGCC
1301 CCAACAGCAA CGTCGTCTTC TCCAACATCC GCTTCGGCCC CATCGGCTCG
   ACCGTGCGCG GCCTTCCCAG CGATGGCGGC AACACGGCG GCAACACCAC
1401 CGTCCAGCCC CCGCCCAGCA CCACCACCAC CTCTGCCAGC AGCAGCACCA
   CCTCGGCTCC TGCCACCACC ACCACCGCCA GCGCTGGCCC CAAGGCTGGC
1501 CGCTGGCAGC AGTGCGGCGG CATCGGCTTC ACTGGCCCCG CCCAGTGCGA
   GGAGCCCTAC ACTTGACCA AGCTCAACGA CTGGTACTCT CAGTGCCTGT
1601 AA

```

## 嗜热小柱孢霉CBH1的cDNA

图 14B

1 MRTAKFATLAALVASAAAQQACSLTTERHPSLSWKKCTAGGQCQTVQASI 50

51 TLDSNWRWTHQVSGSTNCYTGNEWDSSICTDAKSCAQNCCVDGADYTSTY 100

101 GITTINGDSLKLVTKGQYSTNVGSRTYLMGDKYQTFELLGNEFTFDV 150

151 DVSNIGCGLNGALYFVSMADGGLSRYPGNKAGAKYGTGYCDAQCPRIK 200

201 FINGEANIEGWTGSTNDPNAGAGRYGTCCSEMDIWEANNMATAFTPHPCT 250

251 IIGQSRCEGDSCGGTYSNDRYAGVCDPDGCFNAYRQGNKTFYKGMTVD 300

301 TTKKLTVVVTQFLKDANGDLGEIKRFYVQDGKIIPNSESTIPGVEGNSITQ 350

351 DWCDRQKVAFGDIDDFNRKGGMKQMGKALAGPMVLVMSIWDDHASNMLWL 400

401 DSTFPVDAAGKPGAERGACPTTSGVPAEVEAEAPNSNVVFSNIRFGPIGS 450

451 TVAGLPSDGGNNGGNTTVQPPSTTTTSASSSTTSAPATTTTASAGPKAG 500

501 RWQQCGGIGFTGPTQCEEPYTCTKLNDWYSQCL- 534

### 嗜热小柱孢霉CBH1，包括信号序列

图 14C

红褐肉座菌CBH1.1和嗜热小柱孢霉CBH1.1的成熟蛋白序列之间的联配比对

Genencor红褐肉座菌Cel17A	1	75
灰腐质霉CBH1.1	(1)	QSACTLQSETHPEPLFWQKCSGGTCTQQTGCVVVIDANWRWTHATNSSTNCYDGNWWSSTLCPDNETCAKNCCLDG
嗜热小柱孢霉 69	(1)	QOACSLTTERHPSLSWKKWAGGQCQTVQASLTLDSNRWTHQVSGSTNCYTGKWDTSICTDAKSAQNCQCCVDG
共有序列	(1)	QOACSLTTERHPSLSWKKWAGGQCQTVQASLTLDSNRWTHQVSGSTNCYTGKWDSSICTDAKSAQNCQCCVDG
Genencor红褐肉座菌Cel17A	76	150
灰腐质霉CBH1.1	(76)	AAYASTYGYVTTSGNSLSIGFVTSQAQKN-VGARLYLMAASDTTYQEFFLLGNEFSFDVDSQLPCLGALYFVSM
嗜热小柱孢霉 69	(76)	ADYTSTYGIITNGDLSLSLKFVTKGQSTNVGSRTYLMDGEDKYQTFELLGNEFTFDVDSVNIIGCGLGALYFVSM
共有序列	(76)	ADYTSTYGIITNGDLSLSLKFVTKGQSTNVGSRTYLMDGEDKYQTFELLGNEFTFDVDSVNIIGCGLGALYFVSM
Genencor红褐肉座菌Cel17A	151	225
灰腐质霉CBH1.1	(150)	DADGGVSKYPTNTAGAKYGTGYCDSQCPRDLKFINQANVEGWEPSSNNANTIGGGHSCCSEMDIWEANNMATA
嗜热小柱孢霉 69	(151)	DADGGLSRYPCNKAGAKYGTGYCDAQCPRDIKFINGEANIEGWTGSTNDPNAGAGRYGTCCSEMDIWEANNMATA
共有序列	(151)	DADGGLSRYPCNKAGAKYGTGYCDAQCPRDIKFINGEANIEGWTGSTNDPNAGAGRYGTCCSEMDIWEANNMATA
Genencor红褐肉座菌Cel17A	226	300
灰腐质霉CBH1.1	(225)	LTPHPCTTVQGEICEGDCGGEFYSDNRYGTCDDWNPYRLGNTSFYGPSSFTLDTTKKLFVVVTQFETSG-
嗜热小柱孢霉 69	(226)	FTPHPCIIIGQSRCEGDCGGEFYSDRYAGVCDPDGCDNFNSRQGNKTFYKGG--MTVDTTKKLTVVVTQFLKDN
共有序列	(226)	FTPHPCIIIGQSRCEGDCGGEFYSDRYAGVCDPDGCDNFNSRQGNKTFYKGG--MTVDTTKKLTVVVTQFLKDN
Genencor红褐肉座菌Cel17A	301	375
灰腐质霉CBH1.1	(299)	----AINRYVQNGVTFQOPNAELGSYSGNELNDDYCTAEERAFEGSS-FSDKGLTQFKKATSGGMVLMVMSIWD
嗜热小柱孢霉 69	(299)	GDLGEIKRFYVQDGKIIIPNSSTIPGVEGNSITQDWCDCRQKVAFGDIDDFNRKGMKQMGKALAGPMVLMVMSIWD
共有序列	(301)	GDLGEIKRFYVQDGKIIIPNSSTIPGVEGNSITQDWCDCRQKVAFGDIDDFNRKGMKQMGKALAGPMVLMVMSIWD
Genencor红褐肉座菌Cel17A	376	450
灰腐质霉CBH1.1	(369)	DYANMLWLDSTYPTNETSSTPGAVRGCSTSSGVPAQVESQSPNAKVTFSNIKFGPIGSTGNPSSGNP-----
嗜热小柱孢霉 69	(374)	DHASNMLWLDSTFPVDAAG-KPGAERGACPTSGVPAEVEAEAPNSNVVFSNIRFGPIGSTVAGLPGAG--NGEN
共有序列	(376)	DHASNMLWLDSTFPVDAAG-KPGAERGACPTSGVPAEVEAEAPNSNVVFSNIRFGPIGSTVAGLPGAG--NGEN
Genencor红褐肉座菌Cel17A	451	518
灰腐质霉CBH1.1	(438)	PGGNPPG-----TTTTTRRPAATTTGSSPGPTQSHYGQCGGIGYSGPTVCASGTTQVNLNPFYYSQCL
嗜热小柱孢霉 69	(446)	NGGNPPP-----PTTTTSSAPATTTASAGPKAGRWQCCGGIGFTGPTQCEEPYCTKLNWDWYSQCL
共有序列	(451)	PTTTTSSAPATTTASAGPKAGRWQCCGGIGFTGPTQCEEPYCTKLNWDWYSQCL

图15

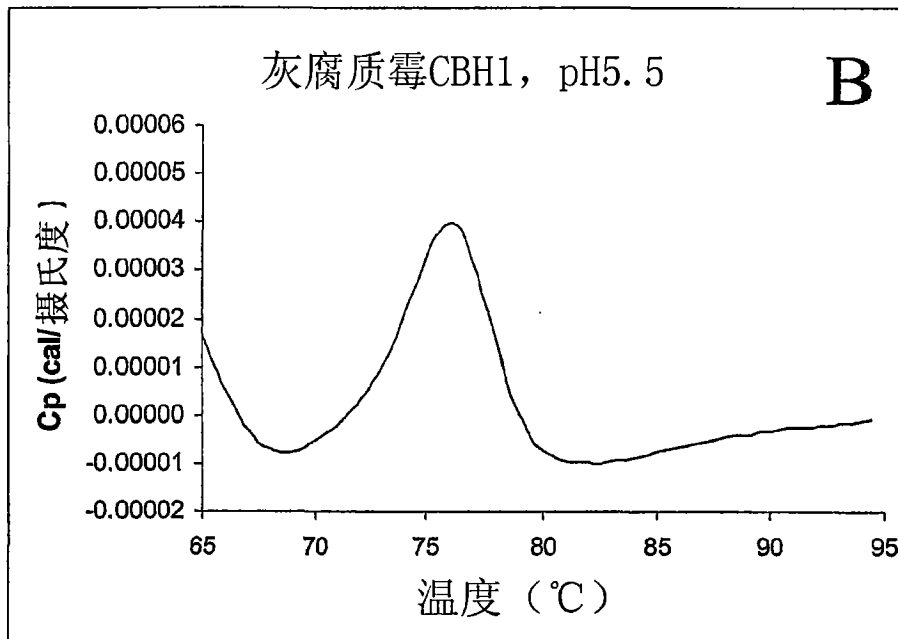
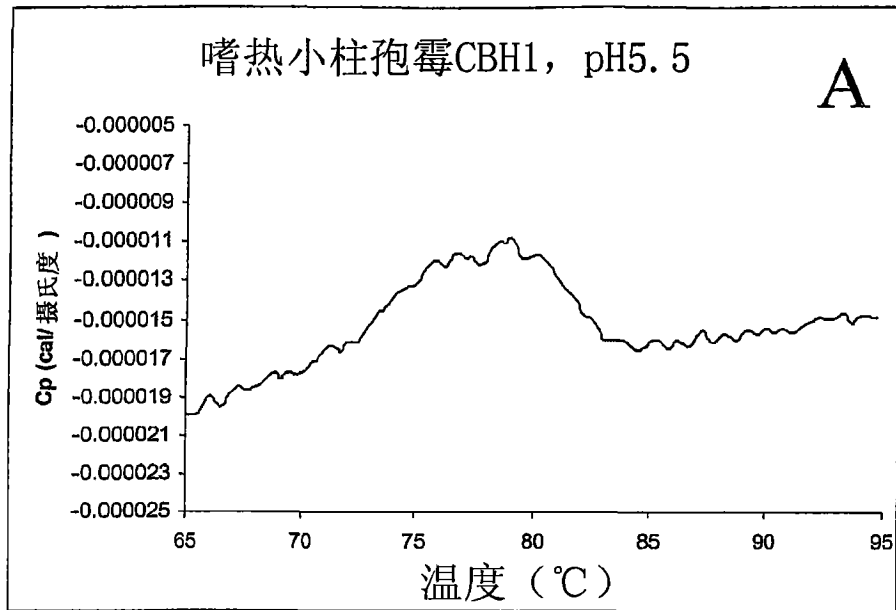


图 16