



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105431528 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 23

(21) 申请号 201480042186. 5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014. 08. 27

C12N 9/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

C12N 9/28(2006. 01)

61/872, 180 2013. 08. 30 US

C12N 9/42(2006. 01)

61/944, 933 2014. 02. 26 US

C12N 9/50(2006. 01)

61/971, 936 2014. 03. 28 US

C12P 1/00(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2016. 01. 26

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/052905 2014. 08. 27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02015/031477 EN 2015. 03. 05

(71) 申请人 诺维信公司

地址 丹麦鲍斯韦

(72) 发明人 J·江普 N·克里尔 J·桑德斯

M·J·阿克曼

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 史悦

权利要求书4页 说明书61页

序列表37页

(54) 发明名称

酶组合物及其用途

(57) 摘要

本发明涉及酶组合物, 这些酶组合物包括葡糖淀粉酶、 α -淀粉酶、和任选地纤维素分解组合物和 / 或蛋白酶。本发明还涉及在低于初始糊化温度的温度下, 这些酶组合物在通过使含淀粉材料糖化和 / 或发酵从含淀粉材料生产糖和 / 或发酵产物的工艺中的用途。

1. 一种酶组合物,该酶组合物包括葡糖淀粉酶和 α -淀粉酶、以及任选地蛋白酶。
2. 如权利要求 1 所述的酶组合物,该酶组合物包括
 - i) 葡糖淀粉酶;
 - ii) α -淀粉酶;
 - iii) 纤维素分解酶组合物;
 - iv) 任选地蛋白酶。
3. 如权利要求 2 所述的酶组合物,其中该纤维素分解酶组合物源自木霉属的菌株,例如里氏木霉;腐质霉属的菌株,例如特异腐质霉;金孢子菌属的菌株,例如卢克诺文思金孢子菌;或青霉属的菌株,例如斜卧青霉。
4. 如权利要求 1-3 中任一项所述的酶组合物,其中该葡糖淀粉酶源自栓菌属的菌株,例如瓣环栓菌;或厚孢孔菌属,例如纸质厚孢孔菌;或白桩菇属,例如大白桩菇;曲霉属的菌株,优选黑曲霉、泡盛曲霉、或米曲霉;或木霉属的菌株,优选里氏木霉;或篮状菌属的菌株,优选埃默森篮状菌;青霉属的菌株,例如草酸青霉菌的菌株;粘褶菌属的菌株,例如篱边粘褶菌的菌株或密粘褶菌的菌株;或密孔菌属的菌株,优选血红密孔菌。
5. 如权利要求 1-4 中任一项所述的酶组合物,其中该葡糖淀粉酶例如篱边粘褶菌葡糖淀粉酶是选自下组,该组由以下各项组成:
 - (i) 包括在此的 SEQ ID NO:4 的成熟多肽的葡糖淀粉酶;
 - (ii) 包括以下氨基酸序列的葡糖淀粉酶,该氨基酸序列与在此的 SEQ ID NO:4 的成熟多肽具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99% 的一致性。
6. 如权利要求 1-4 中任一项所述的酶组合物,其中该葡糖淀粉酶例如密粘褶菌葡糖淀粉酶是选自下组,该组由以下各项组成:
 - (i) 包括在此的 SEQ ID NO:18 的成熟多肽的葡糖淀粉酶;
 - (ii) 包括以下氨基酸序列的葡糖淀粉酶,该氨基酸序列与在此的 SEQ ID NO:18 的成熟多肽具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99% 的一致性。
7. 如权利要求 36 所述的酶组合物,其中该葡糖淀粉酶是在此的 SEQ ID NO:18 中示出的密粘褶菌葡糖淀粉酶,该密粘褶菌葡糖淀粉酶优选具有以下取代中的一个或多个:S95P、A121P,尤其是 S95P+A21P。
8. 如权利要求 1-37 所述的酶组合物,该酶组合物包括在此的 SEQ ID NO:18 中示出的密粘褶菌葡糖淀粉酶,该密粘褶菌葡糖淀粉酶优选具有以下取代中的一个或多个:S95P、A121P,尤其是 S95P+A121P,并且该酶组合物还包括源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域(SBD)的微小根毛霉的 α -淀粉酶,该 α -淀粉酶优选是披露为在此的 SEQ ID NO:13 的 α -淀粉酶,优选是具有以下取代中的一个或多个的 α -淀粉酶:G128D、D143N,尤其是 G128D+D143N。
9. 如权利要求 1-8 中任一项所述的酶组合物,其中该葡糖淀粉酶例如血红密孔菌葡糖淀粉酶是选自下组,该组由以下各项组成:

(i) 包括在此的 SEQ ID NO:17 的成熟多肽的葡糖淀粉酶；

(ii) 包括以下氨基酸序列的葡糖淀粉酶,该氨基酸序列与在此的 SEQ ID NO:17 的成熟多肽具有至少 60%、至少 70%、例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99% 的一致性。

10. 如权利要求 1-9 所述的酶组合物,其中该酶组合物包括在此的 SEQ ID NO:17 中示出的血红密孔菌葡糖淀粉酶,以及源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域(SBD) 的微小根毛霉的 α -淀粉酶,该 α -淀粉酶优选是披露为在此的 SEQ ID NO:13 的 α -淀粉酶,优选是具有以下取代中的一个或多个的 α -淀粉酶:G128D、D143N,尤其是 G128D+D143N。

11. 如权利要求 1-10 中任一项所述的酶组合物,其中该 α -淀粉酶源自根毛霉属的菌株,优选微小根毛霉的菌株,或源自亚灰树花菌属,优选大型亚灰树花菌的菌株。

12. 如权利要求 1-11 中任一项所述的酶组合物,其中该 α -淀粉酶源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域(SBD) 的微小根毛霉,例如是在此的 SEQ ID NO:13 中示出的 α -淀粉酶、或选自下组的 α -淀粉酶,该组由以下各项组成:

(i) 包括在此的 SEQ ID NO:13 的成熟多肽的 α -淀粉酶;

(ii) 包括以下氨基酸序列的 α -淀粉酶,该氨基酸序列与在此的 SEQ ID NO:13 的成熟多肽具有至少 60%、至少 70%、例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99% 的一致性。

13. 如权利要求 12 所述的酶组合物,其中该 α -淀粉酶是在此的 SEQ ID NO:13 中示出的 α -淀粉酶的变体,该变体具有以下取代或取代组合中的至少一个: D165M; Y141W; Y141R; K136F; K192R; P224A; P224R; S123H+Y141W; G20S+Y141W; A76G+Y141W; G128D+Y141W; G128D+D143N; P219C+Y141W; N142D+D143N; Y141W+K192R; Y141W+D143N; Y141W+N383R; Y141W+P219C+A265C; Y141W+N142D+D143N; Y141W+K192R+V410A; G128D+Y141W+D143N; Y141W+D143N+P219C; Y141W+D143N+K192R; G128D+D143N+K192R; Y141W+D143N+K192R+P219C; G128D+Y141W+D143N+K192R; 或 G128D+Y141W+D143N+K192R+P219C(使用 SEQ ID NO:13 进行编号)。

14. 如权利要求 1-13 中任一项所述的酶组合物,其中该 α -淀粉酶源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域(SBD) 的微小根毛霉,优选披露为在此的 SEQ ID NO:13,优选具有以下取代中的一个或多个: G128D、D143N,优选 G128D+D143N(使用 SEQ ID NO:13 进行编号)。

15. 如权利要求 1-14 中任一项所述的酶组合物,进一步包括选自下组的酶,该组由以下各项构成:海藻糖酶和果胶酶,例如果胶裂解酶或多聚半乳糖醛酸酶。

16. 一种从含淀粉材料生产发酵产物的工艺,该工艺包括:

(i) 在低于初始糊化温度的温度下使含淀粉材料糖化;并且

(ii) 使用发酵生物进行发酵;

其中在以下酶的存在下进行糖化和/或发酵:葡糖淀粉酶和 α -淀粉酶;以及任选地蛋白酶。

17. 如权利要求 16 所述的工艺,其中在糖化和 / 或发酵期间存在如权利要求 1-17 中任一项所述的酶组合物。

18. 如权利要求 16 或 17 中任一项所述的工艺,其中该葡糖淀粉酶是具有以下取代之一的 SEQ ID NO:18 中示出的密粘褶菌葡糖淀粉酶 :S95P+A121P,并且该 α -淀粉酶是具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域 (SBD) 的微小根毛霉 α -淀粉酶,优选是具有以下取代的 α -淀粉酶 :G128D+D143N(使用 SEQ ID NO:13 进行编号)。

19. 如权利要求 16-18 所述的工艺,其中该葡糖淀粉酶是在此的 SEQ ID NO:17 中示出的血红密孔菌葡糖淀粉酶,并且该 α -淀粉酶是具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域 (SBD) 的微小根毛霉 α -淀粉酶,优选是在此的 SEQ ID NO:13 中示出的 α -淀粉酶,优选是具有以下取代中的一个或多个的 α -淀粉酶 :G128D、D143N,尤其是 G128D+D143N。

20. 如权利要求 16-20 中任一项所述的工艺,另外其中糖化和 / 或发酵是在纤维素分解酶组合物的存在下进行的,该纤维素分解酶组合物优选源自木霉属的菌株,例如里氏木霉;腐质霉属的菌株,例如特异腐质霉;金孢子菌属的菌株,例如卢克诺文思金孢子菌;或青霉属的菌株,例如斜卧青霉。

21. 如权利要求 16-20 中任一项所述的工艺,该工艺包括:

(a) 在低于初始糊化温度的温度下使含淀粉材料糖化;并且

(b) 使用发酵生物进行发酵;

其中在以下酶的存在下进行糖化和 / 或发酵:

i) 在此的 SEQ ID NO:18 中示出的源自密粘褶菌的葡糖淀粉酶,或与在此的 SEQ ID NO:18 具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的且优选具有以下取代中的至少一个的葡糖淀粉酶 :V59A ;S95P ;A121P ;T119W ;S95P+A121P ;V59A+S95P ;S95P+T119W ;V59A+S95P+A121P ;或 S95P+T119W+A121P,尤其是 S95P+A121P(使用 SEQ ID NO:18 进行编号);

ii) 源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域 (SBD) 的微小根毛霉的 α -淀粉酶,例如在此的 SEQ ID NO:13 中示出的 α -淀粉酶,或与在此的 SEQ ID NO:13 具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的 α -淀粉酶,优选具有以下取代或取代组合中的至少一个的 α -淀粉酶 :D165M ;Y141W ;Y141R ;K136F ;K192R ;P224A ;P224R ;S123H+Y141W ;G20S+Y141W ;A76G+Y141W ;G128D+Y141W ;G128D+D143N ;P219C+Y141W ;N142D+D143N ;Y141W+K192R ;Y141W+D143N ;Y141W+N383R ;Y141W+P219C+A265C ;Y141W+N142D+D143N ;Y141W+K192R+V410A ;G128D+Y141W+D143N ;Y141W+D143N+P219C ;Y141W+D143N+K192R ;G128D+D143N+K192R ;Y141W+D143N+K192R+P219C ;G128D+Y141W+D143N+K192R ;或 G128D+Y141W+D143N+K192R+P219C,尤其是 G128D+D143N(使用 SEQ ID NO:13 进行编号)。

22. 如权利要求 16-20 中任一项所述的工艺,该工艺包括:

(i) 在低于初始糊化温度的温度下使含淀粉材料糖化;并且

(ii) 使用发酵生物进行发酵;

其中在以下酶的存在下进行糖化和 / 或发酵:

i) 在此的 SEQ ID NO:17 中示出的源自血红密孔菌的葡糖淀粉酶,或与在此的 SEQ ID NO:17 具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的葡糖淀粉酶;

ii) 以及源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域(SBD)的微小根毛霉的 α -淀粉酶,优选在此的 SEQ ID NO:13 中示出的 α -淀粉酶;或与在此的 SEQ ID NO:13 具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的且优选具有以下取代的 α -淀粉酶:G128D+D143N(使用 SEQ ID NO:13 进行编号);

iii) 任选地源自里氏木霉的菌株的纤维素分解酶组合物。

23. 如权利要求 16-22 中任一项所述的工艺,其中葡糖淀粉酶和 α -淀粉酶之间的比率是在 99:1 与 1:2 之间,例如在 98:2 与 1:1 之间,例如在 97:3 与 2:1 之间,例如在 96:4 与 3:1 之间,例如 97:3、96:4、95:5、94:6、93:7、90:10、85:15、83:17 或 65:35(mg EP 葡糖淀粉酶:mg EP α -淀粉酶)。

酶组合物及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及酶组合物和使用此类酶组合物从含淀粉材料生产糖和 / 或发酵产物的工艺。

背景技术

[0002] 从含淀粉材料生产糖和发酵产物例如乙醇的工艺是本领域熟知的,并且在现今得以在商业上使用。

[0003] 当生产发酵产物例如乙醇时,常规地在高于淀粉的初始糊化温度至高于 100°C 的温度下,使用液化酶(例如芽孢杆菌 α -淀粉酶)来将淀粉转化为糊精。使用糖化酶(例如葡糖淀粉酶)将产生的糊精水解为糖,并且使用发酵生物例如源自酿酒酵母的酵母菌株将所述糖发酵为希望的发酵产物。典型地,在同时糖化发酵(SSF)步骤中,进行水解和发酵。

[0004] 今天还在商业上使用另一类型的工艺。在低于淀粉的初始糊化温度的温度下,将淀粉转化为糊精,并且在SSF期间将糊精水解为糖。这一类型的工艺称为生淀粉水解(RSH)工艺,或可替代地,称为“单步骤工艺”或“无蒸煮”工艺。

[0005] US 4514496 涉及通过混合研磨的淀粉质材料与打浆液(mashing liquor)而不蒸煮,添加源自根霉属的糖化酶制剂,并且添加醇发酵酵母,并且发酵浆料,来生产醇的工艺。

[0006] WO 2003/066826 披露了通过使碳底物与至少一种底物转化酶接触以生产中间体并且使所述中间体与至少一种中间体转化酶接触来生产醇的方法。

[0007] WO 2004/080923 涉及用于生产醇产物的工艺,该工艺包括以下顺序的步骤:提供包含水和颗粒状淀粉的浆料;在酸性 α -淀粉酶和葡糖淀粉酶存在的情况下,将所述浆料在比所述颗粒状淀粉的初始糊化温度低 0°C 至 20°C 的温度保持 5 分钟至 12 小时;在酸性 α -淀粉酶、葡糖淀粉酶和酵母存在的情况下,将所述浆料在 10°C 与 35°C 之间的温度保持 20 至 250 小时的时期以产生乙醇。在保持步骤期间,可以存在木聚糖酶、纤维素酶和植酸酶。

[0008] WO 2004/081193 涉及用于从植物材料生产乙醇的工艺,该工艺包括分解植物材料以生产含淀粉材料,用酶组合物使淀粉糖化而不蒸煮,并且发酵孵育的淀粉以产生包含至少 15vol-%乙醇的组合物。

[0009] WO 2006/069289 涉及源自瓣环栓菌、纸质厚孢孔菌、和大白桩菇的葡糖淀粉酶,及其在低于初始糊化温度的温度下从含淀粉材料生产发酵产物的工艺中的用途。

[0010] WO 2011/068803 披露了源自篱边粘褶菌、密粘褶菌或冷杉粘褶菌的葡糖淀粉酶,及其在从含淀粉材料生产发酵产物的工艺中的用途。

[0011] 本发明涉及适合于生淀粉水解工艺的酶组合物,以及此类酶组合物在此类工艺中的用途。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明的酶组合物

[0014] 本发明涉及包含多种酶活性的酶组合物及其在生产糖和 / 或发酵产物例如尤其

是乙醇的工艺中的用途。本发明的酶组合物可以是具有多种不同酶活性的共混物。这些酶活性可以具有相同的或不同的来源。

[0015] 在第一方面,本发明涉及酶组合物,这些酶组合物包括葡糖淀粉酶和 α -淀粉酶、以及任选地蛋白酶。

[0016] 在一个优选实施例中,该酶组合物包括粘褶菌属葡糖淀粉酶,优选密粘褶菌葡糖淀粉酶和 α -淀粉酶。

[0017] 在一个优选实施例中,该 α -淀粉酶源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域(SBD)的微小根毛霉,优选是披露为 WO 2006/069290 的表 5 中的 V039 或在此的 SEQ ID NO:13 的 α -淀粉酶。

[0018] 在一个尤其优选的实施例中,该酶组合物包括在此的 SEQ ID NO:18 中示出的具有以下取代中的一个或多个的密粘褶菌葡糖淀粉酶:S95P、A121P,尤其是 S95P+A121P;以及源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域(SBD)的微小根毛霉的 α -淀粉酶,该 α -淀粉酶优选是在此的 SEQ ID NO:13 中示出的 α -淀粉酶,优选具有以下取代中的一个或多个:G128D、D143N,尤其是 G128D+D143N。

[0019] 在另一实施例中,该酶组合物包括源自密孔菌属的菌株、具体地源自血红密孔菌的菌株,例如 WO 2011/066576 中描述的菌株的葡糖淀粉酶(SEQ ID NO 2、4 或 6)。在一个优选实施例中,该酶组合物包括在 WO 2011/066576 中的 SEQ ID NO:4 或在此的 SEQ ID NO:17 中示出的葡糖淀粉酶以及 α -淀粉酶。

[0020] 在一个优选实施例中,该 α -淀粉酶源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域(SBD)的微小根毛霉,优选是披露为 WO 2006/069290 的表 5 中的 V039 或在此的 SEQ ID NO:13 的 α -淀粉酶。

[0021] 在一个尤其优选的实施例中,该酶组合物包括在此的 SEQ ID NO:17 中示出的血红密孔菌葡糖淀粉酶,或与在此的 SEQ ID NO:17 具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的葡糖淀粉酶,并且该酶组合物还包括源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域(SBD)的微小根毛霉的 α -淀粉酶,该 α -淀粉酶优选是在此的 SEQ ID NO:13 中示出的 α -淀粉酶,或是与在此的 SEQ ID NO:13 具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的且优选具有以下取代中的一个或多个的 α -淀粉酶:G128D、D143N,尤其是 G128D+D143N。

[0022] 在一个优选实施例中,本发明涉及酶组合物,这些酶组合物包括

[0023] i) 葡糖淀粉酶;

[0024] ii) α -淀粉酶;

[0025] iii) 纤维素分解酶组合物;

[0026] iv) 任选地蛋白酶。

[0027] 在一个尤其优选的实施例中,该酶组合物包括在此的 SEQ ID NO:18 中示出的密粘褶菌葡糖淀粉酶,或与 SEQ ID NO:18 具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的且优选具有以下取代中的一个或多个的葡糖淀粉

酶 :S95P、A121P,尤其是 S95P+A121P ;和源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域 (SBD) 的微小根毛霉的 α -淀粉酶,该 α -淀粉酶优选是在此的 SEQ ID NO:13 中示出的 α -淀粉酶,或与在此的 SEQ ID NO:13 具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的且优选具有以下取代中的一个或多个的 α -淀粉酶 :G128D、D143N,尤其是 G128D+D143N,并且该酶组合物还包括 :源自里氏木霉的进一步包括具有纤维素分解增强活性的橙色嗜热子囊菌 GH61A 多肽 (例如 WO 2005/074656 中的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:9) 和烟曲霉 β -葡糖苷酶 (例如 WO 2005/047499 的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:8) 的纤维素分解酶组合物,或者源自里氏木霉的进一步包括埃默森青霉菌 GH61A 多肽 (例如披露为 WO 2011/041397 中的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:10 的多肽) 和烟曲霉 β -葡糖苷酶 (例如披露为 WO 2005/047499 中的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:8 的 β -葡糖苷酶或其变体,该变体优选是具有以下取代中的一个、优选全部的变体 :F100D、S283G、N456E、F512Y)、烟曲霉 CBH I (例如披露为 WO 2011/057140 中的 SEQ ID NO:6 和在此的 SEQ ID NO:6 的 CBH I)、以及烟曲霉 CBH II (例如披露为 WO 2011/057140 中的 SEQ ID NO:18 和在此的 SEQ ID NO:7 的 CBH II) 的纤维素分解酶组合物。

[0028] 在另一个尤其优选的实施例中,该酶组合物包括在此的 SEQ ID NO:17 中示出的血红密孔菌葡糖淀粉酶,或与 SEQ ID NO:17 具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的葡糖淀粉酶,和源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域 (SBD) 的微小根毛霉的 α -淀粉酶,该 α -淀粉酶优选是在此的 SEQ ID NO:13 中示出的 α -淀粉酶,或是与在此的 SEQ ID NO:13 具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的且优选具有以下取代中的一个或多个的 α -淀粉酶 :G128D、D143N,尤其是 G128D+D143N,并且该酶组合物还包括源自里氏木霉的进一步包括具有纤维素分解增强活性的橙色嗜热子囊菌 GH61A 多肽 (例如 WO 2005/074656 中的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:9) 和烟曲霉 β -葡糖苷酶 (例如 WO 2005/047499 的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:8) 的纤维素分解组合物,或者源自里氏木霉的优选进一步包括埃默森青霉菌 GH61A 多肽 (例如披露为 WO 2011/041397 中的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:10 的多肽) 和烟曲霉 β -葡糖苷酶 (例如披露为 WO 2005/047499 中的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:8 的 β -葡糖苷酶或其变体,该变体优选是具有以下取代中的一个、优选全部的变体 :F100D、S283G、N456E、F512Y)、烟曲霉 CBH I (例如披露为 WO 2011/057140 中的 SEQ ID NO:6 和在此的 SEQ ID NO:6 的 CBH I)、以及烟曲霉 CBH II (例如披露为 WO 2011/057140 中的 SEQ ID NO:18 和在此的 SEQ ID NO:7 的 CBH II) 的纤维素分解组合物。

[0029] 在一个实施例中,蛋白酶包括在本发明的酶组合物中。在一个优选实施例中,蛋白酶是金属蛋白酶或丝氨酸蛋白酶。

[0030] 在一个实施例中,酶组合物包括金属蛋白酶,该金属蛋白酶优选源自嗜热子囊菌属的菌株、优选是橙色嗜热子囊菌的菌株 (尤其是橙色嗜热子囊菌 CGMCC 编号 0670),例如

披露为 WO 2003/048353 中披露的 SEQ ID NO:2 的成熟部分或在此的 SEQ ID NO:3 的成熟多肽的金属蛋白酶。

[0031] 在一个实施例中,蛋白酶源自火球菌属的菌株,例如强烈火球菌的菌株,例如 US 6,358,726 中的 SEQ ID NO:1 或在此的 SEQ ID NO:5 中示出的蛋白酶。

[0032] 在一个实施例中,蛋白酶是 WO 2014/037438 的实例 2 中涉及的并且示出为在此的 SEQ ID NO:20 的、来自大型亚灰树花菌蛋白酶 3(肽酶家族 S53 蛋白酶)的成熟序列。在一个实施例中,蛋白酶是示出为在此的 SEQ ID NO:19 和 WO 2014/037438 中的 SEQ ID NO:5 的、来自大型亚灰树花菌的成熟蛋白酶 3 序列。

[0033] 在一个优选实施例中,葡糖淀粉酶和 α -淀粉酶之间的比率是在 99:1 与 1:2 之间,例如在 98:2 与 1:1 之间,例如在 97:3 与 2:1 之间,例如在 96:4 与 3:1 之间,例如 97:3、96:4、95:5、94:6、93:7、90:10、85:15(mg EP(酶蛋白)葡糖淀粉酶:mg EP(酶蛋白) α -淀粉酶)。

[0034] 发明工艺

[0035] 本发明的第二方面涉及从含淀粉材料例如颗粒状淀粉产生发酵产物尤其例如乙醇的工艺,该工艺包括:

[0036] (i) 在低于初始糊化温度的温度下使含淀粉材料糖化;并且

[0037] (ii) 使用发酵生物进行发酵;

[0038] 其中在以下酶的存在下进行糖化和/或发酵:葡糖淀粉酶和 α -淀粉酶、以及任选地蛋白酶。

[0039] 在一个优选实施例中,以下酶是在糖化和/或发酵期间存在的和/或添加的:在此的 SEQ ID NO:18 中示出的密粘褶菌葡糖淀粉酶,或与 SEQ ID NO:18 具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的葡糖淀粉酶,优选是具有以下取代中的一个或多个的葡糖淀粉酶:S95P、A121P,尤其是 S95P+A121P,以及 α -淀粉酶。

[0040] 在一个优选实施例中,该 α -淀粉酶源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域(SBD)的微小根毛霉,披露为 WO 2006/069290 的表 5 中的 V039 或在此的 SEQ ID NO:13。

[0041] 在另一优选实施例中,以下酶是在糖化和/或发酵期间存在的和/或添加的:在此的 SEQ ID NO:18 中示出的密粘褶菌葡糖淀粉酶,或与在此的 SEQ ID NO:18 具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的葡糖淀粉酶,优选是具有以下取代中的一个或多个的葡糖淀粉酶:S95P、A121P,尤其是 S95P+A121P,和源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域(SBD)的微小根毛霉的 α -淀粉酶,该 α -淀粉酶优选是在此的 SEQ ID NO:13 中示出的 α -淀粉酶,或是与在此的 SEQ ID NO:13 具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的 α -淀粉酶,优选是具有以下取代中的一个或多个的 α -淀粉酶:G128D、D143N,尤其是 G128D+143N。

[0042] 在另一优选实施例中,以下酶是在糖化和/或发酵期间存在的和/或添加的:在此的 SEQ ID NO:17 中示出的血红密孔菌葡糖淀粉酶和 α -淀粉酶。

[0043] 在一个优选的实施例中,该 α -淀粉酶源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域(SBD)的微小根毛霉,优选是披露为 WO 2006/069290 的表 5 中的 V039 或在此的 SEQ ID NO:13 的 α -淀粉酶,优选是具有以下取代中的一个或多个的 α -淀粉酶:G128D、D143N,尤其是 G128D+D143N。

[0044] 在一个实施例中,蛋白酶是在糖化和/或发酵期间存在的和/或添加的。在一个优选实施例中,蛋白酶是金属蛋白酶或丝氨酸蛋白酶。在一个实施例中,金属蛋白酶源自嗜热子囊菌属的菌株、优选是橙色嗜热子囊菌的菌株(尤其是橙色嗜热子囊菌 CGMCC 编号 0670),例如披露为 WO 2003/048353 中披露的 SEQ ID NO:2 的成熟部分或在此的 SEQ ID NO:3 的成熟多肽的金属蛋白酶。

[0045] 在一个优选实施例中,蛋白酶是源自亚灰树花菌属的菌株优选大型亚灰树花菌的菌株的肽酶家族 S53 蛋白酶。在一个实施例中,蛋白酶是 WO 2014/037438 的实例 2 中涉及的并且示出为在此的 SEQ ID NO:20 的、来自大型亚灰树花菌蛋白酶 3(肽酶家族 S53 蛋白酶)的成熟序列。在一个实施例中,蛋白酶是示出为在此的 SEQ ID NO:19 和 WO 2014/037438 中的 SEQ ID NO:5 的、来自大型亚灰树花菌的成熟蛋白酶 3 序列。在一个优选实施例中,本发明涉及从含淀粉材料例如颗粒状淀粉产生发酵产物尤其例如乙醇的工艺,该工艺包括:

[0046] (i) 在低于初始糊化温度的温度下使含淀粉材料糖化;并且

[0047] (ii) 使用发酵生物进行发酵;

[0048] 其中在以下酶的存在下进行糖化和/或发酵:

[0049] i) 葡糖淀粉酶;

[0050] ii) α -淀粉酶;

[0051] iii) 纤维素分解酶组合物;

[0052] iv) 任选地蛋白酶。

[0053] 在另一优选实施例中,以下酶是在糖化和/或发酵期间存在的和/或添加的:在此的 SEQ ID NO:18 中示出的密粘褶菌葡糖淀粉酶,优选具有以下取代中的一个或多个的该密粘褶菌葡糖淀粉酶:S95P、A121P、尤其是 S95P+A121P,和源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域(SBD)的微小根毛霉的 α -淀粉酶,该 α -淀粉酶优选是在此的 SEQ ID NO:13 中示出的 α -淀粉酶,优选是具有以下取代中的一个或多个的 α -淀粉酶:G128D、D143N,尤其是 G128D+143N,以及源自里氏木霉的优选进一步包括具有纤维素分解增强活性的橙色嗜热子囊菌 GH61A 多肽(例如 WO 2005/074656 中的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:9)和烟曲霉 β -葡糖苷酶(例如 WO 2005/047499 的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:8)的纤维素分解酶组合物,或源自里氏木霉的进一步包括埃默森青霉菌 GH61A 多肽(例如披露为 WO 2011/041397 中的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:10 的多肽)和烟曲霉 β -葡糖苷酶(例如披露为 WO 2005/047499 中的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:8 的 β -葡糖苷酶或其变体,该变体优选是具有以下取代中的一个、优选全部的变体:F100D、S283G、N456E、F512Y)、烟曲霉 CBH1(例如披露为 WO 2011/057140 中的 SEQ ID NO:6 和在此的 SEQ ID NO:6 的 CBH1)、以及烟曲霉 CBH II(例如披露为 WO 2011/057140 中的 SEQ ID

NO:18 和在此的 SEQ ID NO:7 的 CBH II) 的纤维素分解酶组合物。

[0054] 在一个实施例中,蛋白酶是在糖化和 / 或发酵期间存在的和 / 或添加的。在一个优选实施例中,蛋白酶是金属蛋白酶或丝氨酸蛋白酶。在一个实施例中,金属蛋白酶源自嗜热子囊菌属的菌株、优选是橙色嗜热子囊菌的菌株 (尤其是橙色嗜热子囊菌 CGMCC 编号 0670),例如披露为 WO 2003/048353 中披露的 SEQ ID NO:2 的成熟部分或在此的 SEQ ID NO:3 的成熟多肽的金属蛋白酶。

[0055] 在一个优选实施例中,蛋白酶是源自亚灰树花菌属的菌株优选大型亚灰树花菌的菌株的肽酶家族 S53 蛋白酶。在一个实施例中,蛋白酶是 WO 2014/037438 的实例 2 中涉及的并且示出为在此的 SEQ ID NO:20 的、来自大型亚灰树花菌蛋白酶 3 (肽酶家族 S53 蛋白酶) 的成熟序列,或与 SEQ ID NO:20 具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的蛋白酶。在一个优选实施例中,蛋白酶是示出为在此的 SEQ ID NO:19 和 WO 2014/037438 中的 SEQ ID NO:5 的、来自大型亚灰树花菌的成熟蛋白酶 3 序列。

[0056] 在一个优选实施例中,葡糖淀粉酶和 α -淀粉酶之间的比率是在 99:1 和 1:2 之间,例如在 98:2 和 1:1 之间,例如在 97:3 和 2:1 之间,例如在 96:4 与 3:1 之间,例如 97:3、96:4、95:5、94:6、93:7、90:10、85:15、83:17 或 65:35 (mg EP 葡糖淀粉酶 :mg EP α -淀粉酶)。

[0057] 在一个优选实施例中,葡糖淀粉酶和 α -淀粉酶的总剂量是从 10-1,000 μ g/g DS,例如从 50-500 μ g/g DS,例如 75-250 μ g/g DS。

[0058] 在一个优选实施例中,添加的纤维素分解酶组合物的总剂量是从 10-500 μ g/g DS,例如从 20-400 μ g/g DS,例如 20-300 μ g/g DS。

[0059] 在一个实施例中,添加的蛋白酶的剂量是从 1-200 μ g/g DS,例如从 2-100 μ g/g DS,例如 3-50 μ g/g DS。

[0060] 在一个优选实施例中,同时进行糖化步骤 (a) 和发酵步骤 (b)。在一个优选实施例中,在本发明的工艺中使用上述酶组合物。

[0061] 发明详细说明

[0062] 本发明涉及包含多种酶活性的酶组合物及其在生产糖和 / 或发酵产物例如尤其是乙醇的工艺中的用途。本发明的酶组合物适合用于在低于所讨论的淀粉的初始糊化温度的温度下,作为生淀粉水解工艺 (即无蒸煮工艺) 而进行的用于生产糖和 / 或发酵产物的工艺。当在生淀粉水解工艺中使用本发明的酶组合物时,与其中使用由葡糖淀粉酶和 α -淀粉酶组成的已知酶组合物的相应工艺相比,改进了发酵产物例如乙醇的产率。在一个优选实施例中,与其中单独使用了葡糖淀粉酶或 α -淀粉酶的,或其中使用了由来自瓣环栓菌的葡糖淀粉酶和来自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域 (SBD) 的微小根毛霉的 α -淀粉酶组成的酶组合物的相应工艺相比,改进了发酵产物例如乙醇的产率。

[0063] 在第一方面,本发明涉及酶组合物,这些酶组合物包括葡糖淀粉酶和 α -淀粉酶、以及任选地蛋白酶。

[0064] 在一个优选实施例中,该酶组合物包括粘褶菌属葡糖淀粉酶,优选是密粘褶菌葡糖淀粉酶,尤其是 SEQ ID NO:18 中示出的密粘褶菌葡糖淀粉酶,并且该酶组合物还包括

α -淀粉酶。

[0065] 在一个实施例中,葡糖淀粉酶源自密粘褶菌,例如是在此的 SEQ ID NO:18 中示出的葡糖淀粉酶,或选自下组的葡糖淀粉酶,该组由以下各项组成:

[0066] (i) 包括在此的 SEQ ID NO:18 的成熟多肽的葡糖淀粉酶;

[0067] (ii) 包括以下氨基酸序列的葡糖淀粉酶,该氨基酸序列与在此的 SEQ ID NO:18 的成熟多肽具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99% 的一致性。

[0068] 在一个优选实施例中,在此的 SEQ ID NO:18 中示出的密粘褶菌葡糖淀粉酶具有以下取代中的一个:V59A;S95P;A121P;T119W;S95P+A121P;V59A+S95P;S95P+T119W;V59A+S95P+A121P;或 S95P+T119W+A121P,尤其是 S95P+A121P。

[0069] 在一个优选实施例中, α -淀粉酶源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域(SBD)的微小根毛霉,优选是披露为 WO 2006/069290 的表 5 中的 V039 或在此的 SEQ ID NO:13 的 α -淀粉酶,或与在此的 SEQ ID NO:13 具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99% 一致性的 α -淀粉酶。

[0070] 在一个实施例中, α -淀粉酶是微小根毛霉 α -淀粉酶或具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域(SBD)的微小根毛霉 α -淀粉酶,尤其是具有以下取代或取代组合中的至少一个的微小根毛霉 α -淀粉酶:D165M;Y141W;Y141R;K136F;K192R;P224A;P224R;S123H+Y141W;G20S+Y141W;A76G+Y141W;G128D+Y141W;G128D+D143N;P219C+Y141W;N142D+D143N;Y141W+K192R;Y141W+D143N;Y141W+N383R;Y141W+P219C+A265C;Y141W+N142D+D143N;Y141W+K192R+V410A;G128D+Y141W+D143N;Y141W+D143N+P219C;Y141W+D143N+K192R;G128D+D143N+K192R;Y141W+D143N+K192R+P219C;G128D+Y141W+D143N+K192R;或 G128D+Y141W+D143N+K192R+P219C,尤其是 G128D+D143N(使用在此的 SEQ ID NO:13 进行编号)。

[0071] 在一个实施例中,该酶组合物包括密粘褶菌葡糖淀粉酶,优选 SEQ ID NO:18 中示出的密粘褶菌葡糖淀粉酶,以及源自优选具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域(SBD)的微小根毛霉的、披露为 WO 2006/069290 的表 5 中的 V039 或在此的 SEQ ID NO:13 的 α -淀粉酶。

[0072] 在另一优选实施例中,该酶组合物包括密粘褶菌葡糖淀粉酶,优选在此的 SEQ ID NO:18 中示出的密粘褶菌葡糖淀粉酶,尤其是具有以下取代中的一个或多个的密粘褶菌葡糖淀粉酶:S95P、A121P,尤其是 S95P+A121P(使用在此的 SEQ ID NO:13 进行编号);以及源自优选具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域(SBD)的微小根毛霉的 α -淀粉酶,优选是在此的 SEQ ID NO:13 中示出的 α -淀粉酶,优选是具有以下取代中的一个或多个的 α -淀粉酶:G128D、D143N,尤其是 G128D+D143N(使用在此的 SEQ ID NO:13 进行编号)。

[0073] 在另一实施例中,该酶组合物包括源自密孔菌属的菌株、具体地源自血红密孔菌的菌株,例如 WO 2011/066576 中描述的菌株的葡糖淀粉酶(SEQ ID NO 2、4 或 6)。在一个优选实施例中,该酶组合物包括 WO 2011/066576 的 SEQ ID NO:4 或在此的 SEQ ID NO:17 中示出的葡糖淀粉酶,或与在此的 SEQ ID NO:17 具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、

至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的葡糖淀粉酶,以及 α -淀粉酶。

[0074] 在一个优选实施例中, α -淀粉酶源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域(SBD)的微小根毛霉,优选是披露为WO 2006/069290的表5中的V039或在此的SEQ ID NO:13的 α -淀粉酶,或与在此的SEQ ID NO:13具有至少60%、至少70%,例如至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%一致性的 α -淀粉酶。

[0075] 在一个尤其优选的实施例中,该酶组合物包括在此的SEQ ID NO:17中示出的血红密孔菌葡糖淀粉酶;或与在此的SEQ ID NO:17具有至少60%、至少70%,例如至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%一致性的葡糖淀粉酶,并且该酶组合物还包括源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域(SBD)的微小根毛霉的 α -淀粉酶,该 α -淀粉酶优选是在此的SEQ ID NO:13中示出的 α -淀粉酶,或是与在此的SEQ ID NO:13具有至少60%、至少70%,例如至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%一致性的且优选具有以下取代中的一个或多个的 α -淀粉酶:G128D、D143N,尤其是G128D+D143N。

[0076] 在一个优选实施例中,本发明涉及酶组合物,这些酶组合物包括

[0077] i) 葡糖淀粉酶;

[0078] ii) α -淀粉酶;

[0079] iii) 纤维素分解酶组合物;

[0080] 任选地 iv) 蛋白酶。

[0081] 在一个尤其优选的实施例中,该酶组合物包括在此的SEQ ID NO:18中示出的优选具有以下取代中的一个或多个的密粘褶菌葡糖淀粉酶:S95P、A121P,尤其是S95P+A121P;以及源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域(SBD)的微小根毛霉的 α -淀粉酶,该 α -淀粉酶优选是在此的SEQ ID NO:13中示出的 α -淀粉酶,优选具有以下取代中的一个或多个:G128D、D143N、尤其是G128D+D143N,并且该酶组合物还包括源自里氏木霉的优选进一步包括具有纤维素分解增强活性的橙色嗜热子囊菌GH61A多肽(WO 2005/074656中的SEQ ID NO:2或在此的SEQ ID NO:9)和烟曲霉 β -葡糖苷酶(WO 2005/047499的SEQ ID NO:2或在此的SEQ ID NO:8)的纤维素分解酶组合物,或源自里氏木霉的进一步包括埃默森青霉菌GH61A多肽(披露为WO 2011/041397中的SEQ ID NO:2或在此的SEQ ID NO:10)和烟曲霉 β -葡糖苷酶(披露为WO 2005/047499中的SEQ ID NO:2或在此的SEQ ID NO:8或其变体,该变体优选是具有以下取代中的一个、优选全部的变体:F100D、S283G、N456E、F512Y)、烟曲霉Ce17A CBH1(披露为WO 2011/057140中的SEQ ID NO:6和在此的SEQ ID NO:6的CBH1)、以及烟曲霉CBH II(披露为WO 2011/057140中的SEQ ID NO:18和在此的SEQ ID NO:7的CBH II)的纤维素分解酶组合物。

[0082] 在一个实施例中,该酶组合物包括金属蛋白酶,该金属蛋白酶优选源自嗜热子囊菌属的菌株,优选橙色嗜热子囊菌的菌株,尤其是橙色嗜热子囊菌CGMCC编号0670,例如披露为WO 2003/048353中披露的SEQ ID NO:2的成熟部分或在此的SEQ ID NO:3的成熟多肽的金属蛋白酶,或与在此的SEQ ID NO:3具有至少60%、至少70%,例如至少75%、至少

80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的蛋白酶。

[0083] 在一个优选实施例中,蛋白酶是源自亚灰树花菌属的菌株优选大型亚灰树花菌的菌株的肽酶家族 S53 蛋白酶。在一个实施例中,蛋白酶是 WO 2014/037438 的实例 2 中涉及的并且示出为在此的 SEQ ID NO:20 的、来自大型亚灰树花菌蛋白酶 3(肽酶家族 S53 蛋白酶)的成熟序列,或与在此的 SEQ ID NO:20 具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的蛋白酶。在一个实施例中,蛋白酶是示出为在此的 SEQ ID NO:19 和 WO 2014/037438 中 SEQ ID NO:5 的、来自大型亚灰树花菌的成熟蛋白酶 3 序列,或与在此的 SEQ ID NO:19 具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的蛋白酶。

[0084] 还可以存在其他酶。以下进一步描述确切考虑的酶组分。

[0085] 纤维素分解酶组合物

[0086] 本发明的酶组合物任选地包含纤维素分解酶组合物。该纤维素分解酶组合物由一种或多种纤维素分解酶组成或包括一种或多种纤维素分解酶。该纤维素分解酶组合物可以具有任何来源。在一个优选实施例中,该纤维素分解酶组合物包括真菌来源的纤维素分解酶。

[0087] 在一个实施例中,该纤维素分解酶组合物源自木霉属的菌株,例如里氏木霉;或腐质霉属的菌株,例如特异腐质霉;或金孢子菌属的菌株,例如卢克诺文思金孢子菌(*Chrysosporium lucknowense*);或青霉属的菌株,例如斜卧青霉。在一个优选实施例中,该纤维素分解酶组合物源自里氏木霉的菌株。

[0088] 该纤维素分解酶组合物可以包括 β -葡糖苷酶、纤维二糖水解酶、和内切葡聚糖酶。

[0089] 在一个实施例中,纤维素分解酶组合物包括一种或多种选自下组的多肽,该组由以下各项组成:

[0090] - β -葡糖苷酶;

[0091] - 纤维二糖水解酶 I;

[0092] - 纤维二糖水解酶 II;

[0093] 或它们的混合物。

[0094] 在一个优选实施例中,纤维素分解酶组合物进一步包括具有纤维素分解增强活性的 GH61 多肽。如在 WO 2011/041397(通过引用结合)中所述限定和确定纤维素分解增强活性。

[0095] 术语“具有纤维素分解增强活性的 GH61 多肽”是指通过具有纤维素分解活性的酶增强纤维素材料的水解的 GH61 多肽。出于本发明的目的,纤维素分解增强活性是通过测量由纤维素分解酶在以下条件下水解纤维素材料造成的还原糖的增加或纤维二糖与葡萄糖总量的增加来确定:1-50mg 总蛋白/g 在 PCS(预处理的玉米秸秆)中的纤维素,其中总蛋白由 50% -99.5% w/w 纤维素分解酶蛋白以及 0.5% -50% w/w GH61 多肽(具有纤维素分解增强活性)的蛋白构成,在 50°C 下持续 1-7 天,与在没有纤维素分解增强活性的情

况下用相等的总蛋白负载量(1-50mg 纤维素分解蛋白/g 在 PCS 中的纤维素)的对照水解相比较。在一个优选方面,使用在总蛋白重量的 2% -3%的米曲霉 β -葡糖苷酶(根据 WO 02/095014 在米曲霉中重组地产生的)或总蛋白重量的 2% -3%的烟曲霉 β -葡糖苷酶(如 WO 2002/095014 中所描述在米曲霉中重组地产生的)的纤维素酶蛋白负载量存在的情况下的 CELLUCLAST™1.5L(诺维信公司,巴格斯瓦尔德(Bagsvard),丹麦)的混合物作为纤维素分解活性的来源。

[0096] 该纤维素分解酶组合物包括 β -葡糖苷酶,优选源自曲霉属的菌株例如米曲霉的菌株的 β -葡糖苷酶,例如 WO 2002/095014 中披露的 β -葡糖苷酶或具有 β -葡糖苷酶活性的、WO 2008/057637 中披露的融合蛋白(参见 SEQ ID NO:74 或 76),或源自烟曲霉,例如 WO 2005/047499 的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:8 中披露的 β -葡糖苷酶;或 WO 2012/044915 中披露的烟曲霉 β -葡糖苷酶变体;或源自青霉属菌株的菌株,例如 WO 2007/019442 中披露的巴西青霉的菌株,或源自木霉属的菌株,如里氏木霉的菌株。在一个实施例中,该 β -葡糖苷酶来自曲霉属的菌株,例如烟曲霉的菌株,例如是烟曲霉 β -葡糖苷酶(在此的 SEQ ID NO:8)、或其变体,该变体包括一个或多个选自下组的取代,该组由以下各项组成:L89M、G91L、F100D、I140V、I186V、S283G、N456E 以及 F512Y;例如具有以下取代的其变体:

[0097] -F100D+S283G+N456E+F512Y;

[0098] -L89M+G91L+I186V+I140V;

[0099] -I186V+L89M+G91L+I140V+F100D+S283G+N456E+F512Y。

[0100] 该亲本 β -葡糖苷酶与在此的 SEQ ID NO:8 的成熟多肽具有至少 60%的一致性,例如至少 70%、例如至少 80%、例如至少 90%、例如至少 95%、例如至少 96%、例如至少 97%、例如至少 98%、例如至少 99%的一致性。

[0101] 在 β -葡糖苷酶是 β -葡糖苷酶变体的情况下,它与在此的 SEQ ID NO:8 的成熟多肽具有至少 60%的一致性,例如至少 70%、例如至少 80%、例如至少 90%、例如至少 95%、例如至少 96%、例如至少 97%、例如至少 98%、例如至少 99%、但是小于 100%的一致性。

[0102] 在包括在本发明的酶组合物中的纤维素分解酶组合物包括 GH61 多肽的情况下,它可以源自嗜热子囊菌属例如橙色嗜热子囊菌的菌株的 GH61 多肽,例如在 WO 2005/074656 中描述为 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:9 的 GH61 多肽;或源自梭孢壳属例如土生梭孢壳菌株的 GH61 多肽,例如在 WO 2005/074647 中描述为 SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:8 的 GH61 多肽;或源自曲霉属的菌株例如烟曲霉菌株的 GH61 多肽,例如在 WO 2010/138754 中描述为 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2 的 GH61 多肽;或源自青霉属的菌株例如埃默森青霉菌菌株的 GH61 多肽,例如披露为在 WO 2011/041397 中的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:10 的 GH61 多肽。

[0103] 在一个优选实施例中,该 GH61 多肽,例如源自青霉属的菌株的 GH61 多肽选自下组,该组由以下各项组成:

[0104] (i) 包括在此的 SEQ ID NO:10 的成熟多肽的 GH61 多肽;

[0105] (ii) 包括以下氨基酸序列的 GH61 多肽,该氨基酸序列与在此的 SEQ ID NO:10 的成熟多肽具有至少 60%,例如至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或

至少 99% 的一致性。

[0106] 在一个实施例中,包括在本发明的酶组合物中的纤维素分解酶组合物包括纤维二糖水解酶 I (CBH I),例如源自曲霉属的菌株例如烟曲霉菌株的 CBH I,例如披露在 WO 2011/057140 中的 SEQ ID NO:6 或在此的 SEQ ID NO:6 中的 Cel7a CBHI,或源自木霉属的菌株,例如里氏木霉的菌株。

[0107] 在一个优选实施例中,该纤维二糖水解酶 I,例如源自烟曲霉的菌株的纤维二糖水解酶 I 选自下组,该组由以下各项组成:

[0108] (i) 包括在此的 SEQ ID NO:6 的成熟多肽的纤维二糖水解酶 I;

[0109] (ii) 包括以下氨基酸序列的纤维二糖水解酶 I,该氨基酸序列与在此的 SEQ ID NO:6 的成熟多肽具有至少 60%,例如至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 的一致性。

[0110] 在一个实施例中,包括在本发明的酶组合物中的纤维素分解酶组合物包括纤维二糖水解酶 II (CBH II),例如源自曲霉属的菌株例如烟曲霉菌株的 CBH II;例如披露为在此的 SEQ ID NO:7 的 CBH II,或源自木霉属的菌株,例如里氏木霉,或源自梭孢壳属的菌株,例如土生梭孢壳的菌株,例如是来自土生梭孢壳的纤维二糖水解酶 II CEL6A。

[0111] 在一个优选实施例中,该纤维二糖水解酶 II,例如源自烟曲霉的菌株的纤维二糖水解酶 II 选自下组,该组由以下各项组成:

[0112] (i) 包括在此的 SEQ ID NO:7 的成熟多肽的纤维二糖水解酶 II;

[0113] (ii) 包括以下氨基酸序列的纤维二糖水解酶 II,该氨基酸序列与在此的 SEQ ID NO:7 的成熟多肽具有至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99% 的一致性。

[0114] 在一个实施例中,包括在本发明的酶组合物中的纤维素分解酶组合物包括具有纤维素分解增强活性的 GH61 多肽和 β -葡糖苷酶。

[0115] 在一个实施例中,纤维素分解酶组合物包括源自青霉属的菌株例如埃默森青霉菌菌株的具有纤维素分解增强活性的 GH61 多肽,例如披露为 WO 2011/041397 中的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:10 的 GH61 多肽,以及 β -葡糖苷酶。

[0116] 在一个实施例中,包括在本发明的酶组合物中的纤维素分解酶组合物包括具有纤维素分解增强活性的 GH61 多肽、 β -葡糖苷酶、和 CBHI。

[0117] 在一个实施例中,包括在本发明的酶组合物中的纤维素分解酶组合物包括源自青霉属的菌株例如埃默森青霉菌的菌株的具有纤维素分解增强活性的 GH61 多肽,例如披露为 WO 2011/041397 中的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:10 的 GH61 多肽, β -葡糖苷酶,以及 CBHI。

[0118] 在一个实施例中,包括在本发明的酶组合物中的纤维素分解酶组合物包括具有纤维素分解增强活性的 GH61 多肽、 β -葡糖苷酶、CBHI、和 CBHII。

[0119] 在一个实施例中,包括在本发明的酶组合物中的纤维素分解酶组合物包括源自青霉属的菌株例如埃默森青霉菌菌株的具有纤维素分解增强活性的 GH61 多肽,例如披露为 WO 2011/041397 中的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:10 的 GH61 多肽, β -葡糖苷酶,

CBHI, 以及 CBHII。

[0120] 在一个实施例中, 纤维素分解酶组合物是里氏木霉纤维素分解组合物, 该里氏木霉纤维素分解组合物进一步包括橙色嗜热子囊菌 GH61A 多肽 (WO 2005/074656 中的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:9)、以及米曲霉 β -葡糖苷酶融合蛋白 (WO 2008/057637)。

[0121] 在一个实施例中, 纤维素分解酶组合物是里氏木霉纤维素分解组合物, 该里氏木霉纤维素分解组合物进一步包括具有纤维素分解增强活性的橙色嗜热子囊菌 GH61A 多肽 (WO 2005/074656 中的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:9)、以及烟曲霉 β -葡糖苷酶 (WO 2005/047499 的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:8)。

[0122] 在一个实施例中, 纤维素分解酶组合物是里氏木霉纤维素分解组合物, 该里氏木霉纤维素分解组合物进一步包括披露为 WO 2011/041397 中的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:10 的埃默森青霉菌 GH61A 多肽、和披露为 WO 2005/047499 中的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:8 的烟曲霉 β -葡糖苷酶或其变体 (该变体具有以下取代中的一个、优选全部: F100D、S283G、N456E、F512Y) 以及任选地烟曲霉 CBH1 (例如披露为 WO 2011/057140 中的 SEQ ID NO:6 和在此的 SEQ ID NO:6 的 CBH1)、以及烟曲霉 CBH II (例如披露为 WO 2011/057140 中的 SEQ ID NO:18 和在此的 SEQ ID NO:7 的 CBH II)。

[0123] 在一个实施例中, 包括在本发明的酶组合物中的纤维素分解酶组合物包括以下组分中的一种或多种:

[0124] (i) 烟曲霉纤维二糖水解酶 I;

[0125] (ii) 烟曲霉纤维二糖水解酶 II;

[0126] (iii) 烟曲霉 β -葡糖苷酶或其变体。

[0127] 在一个实施例中, 烟曲霉 β -葡糖苷酶 (在此的 SEQ ID NO:8) 包括选自下组的一个或多个取代, 该组由以下各项组成: L89M、G91L、F100D、I140V、I186V、S283G、N456E、和 F512Y; 例如其变体, 具有以下取代:

[0128] -F100D+S283G+N456E+F512Y;

[0129] -L89M+G91L+I186V+I140V; 或

[0130] -I186V+L89M+G91L+I140V+F100D+S283G+N456E+F512Y。

[0131] 在一个实施例中, 该纤维素分解组合物进一步包括在此的 SEQ ID NO:10 中示出的青霉属 GH61 多肽; 或包括以下氨基酸序列的 GH61 多肽, 该氨基酸序列与在此的 SEQ ID NO:10 的成熟多肽具有至少 60%, 例如至少 70%, 例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99% 的一致性。

[0132] 葡糖淀粉酶

[0133] 本发明的酶组合物包括葡糖淀粉酶。葡糖淀粉酶可以具有任何来源, 例如具有细菌的或真菌的来源。

[0134] 在一个实施例中, 葡糖淀粉酶可以是源自栓菌属的菌株例如瓣环栓菌菌株的葡糖淀粉酶 (在此的 SEQ ID NO:12); 或源自厚孢孔菌属的菌株, 例如纸质厚孢孔菌的菌株; 或源自白桩菇属的菌株, 例如大白桩菇的菌株 (均披露于 WO 2006/069289 中)。

[0135] 在一个优选实施例中, 包括在本发明的酶组合物中的葡糖淀粉酶源自瓣环栓菌的菌株, 例如是选自下组的葡糖淀粉酶, 该组由以下各项组成:

[0136] (i) 包括在此的 SEQ ID NO:12 的成熟多肽的葡糖淀粉酶；

[0137] (ii) 包括以下氨基酸序列的葡糖淀粉酶，该氨基酸序列与在此的 SEQ ID NO:12 的成熟多肽具有至少 60%、至少 70%，例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99% 的一致性。

[0138] 在一个实施例中，包括在本发明的酶组合物中的葡糖淀粉酶来自曲霉属的菌株，优选黑曲霉、泡盛曲霉、或米曲霉；或木霉属的菌株，优选里氏木霉；或篮状菌属的菌株，优选埃默森篮状菌（在此的 SEQ ID NO:11）。

[0139] 在一个实施例中，该葡糖淀粉酶，例如源自埃默森篮状菌的菌株的葡糖淀粉酶选自下组，该组由以下各项组成：

[0140] (i) 包括在此的 SEQ ID NO:11 的成熟多肽的葡糖淀粉酶；

[0141] (ii) 包括以下氨基酸序列的葡糖淀粉酶，该氨基酸序列与在此的 SEQ ID NO:11 的成熟多肽具有至少 60%、至少 70%，例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99% 的一致性。

[0142] 在另一实施例中，该葡糖淀粉酶源自青霉属的菌株，例如草酸青霉菌的菌株。

[0143] 在一个实施例中，该葡糖淀粉酶，例如源自草酸青霉菌的菌株的葡糖淀粉酶选自下组，该组由以下各项组成：

[0144] (i) 包括在此的 SEQ ID NO:16 的成熟多肽的葡糖淀粉酶；

[0145] (ii) 包括以下氨基酸序列的葡糖淀粉酶，该氨基酸序列与在此的 SEQ ID NO:16 的成熟多肽具有至少 60%、至少 70%，例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99% 的一致性。

[0146] 在一个实施例中，该葡糖淀粉酶源自粘褶菌属的菌株，例如源自篱边粘褶菌或密粘褶菌的菌株，例如是在 WO 2011/068803 中披露为 SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14 或 16 中的任一个的葡糖淀粉酶。在一个优选实施例中，该葡糖淀粉酶是 WO 2011/068803 中的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:4。在另一个实施例中，该葡糖淀粉酶是 WO 2011/068803 中的 SEQ ID NO:18。

[0147] 在一个优选实施例中，该葡糖淀粉酶，例如源自篱边粘褶菌的菌株的葡糖淀粉酶选自下组，该组由以下各项组成：

[0148] (i) 包括在此的 SEQ ID NO:4 的成熟多肽的葡糖淀粉酶；

[0149] (ii) 包括以下氨基酸序列的葡糖淀粉酶，该氨基酸序列与在此的 SEQ ID NO:4 的成熟多肽具有至少 60%、至少 70%，例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99% 的一致性。

[0150] 在另一个实施例中，该葡糖淀粉酶源自密孔菌属的菌株，特别是源自血红密孔菌的菌株，例如 WO 2011/066576 中描述的菌株（SEQ ID NO 2、4 或 6）。在一个优选实施例中，该葡糖淀粉酶是 WO 2011/066576 中的 SEQ ID NO:4 或在此的 SEQ ID NO:17 中示出的葡糖淀粉酶。

[0151] 在一个优选实施例中,该葡糖淀粉酶,例如源自血红密孔菌的菌株的葡糖淀粉酶选自下组,该组由以下各项组成:

[0152] (i) 包括在此的 SEQ ID NO:17 的成熟多肽的葡糖淀粉酶;

[0153] (ii) 包括以下氨基酸序列的葡糖淀粉酶,该氨基酸序列与在此的 SEQ ID NO:17 的成熟多肽具有至少 60%、至少 70%、例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99% 的一致性。

[0154] 还考虑了以下葡糖淀粉酶,该葡糖淀粉酶展现与上述葡糖淀粉酶的任一种的高一致性,即,与上述酶序列的成熟部分中的任一个具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、例如 100% 的一致性。

[0155] 在一个优选实施例中,该葡糖淀粉酶,例如源自密粘褶菌的菌株的葡糖淀粉酶选自下组,该组由以下各项组成:

[0156] (i) 包括在此的 SEQ ID NO:18 的成熟多肽的葡糖淀粉酶;

[0157] (ii) 包括以下氨基酸序列的葡糖淀粉酶,该氨基酸序列与在此的 SEQ ID NO:18 的成熟多肽具有至少 60%、至少 70%、例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99% 的一致性。

[0158] 在一个优选实施例中,SEQ ID NO:18 中示出的密粘褶菌葡糖淀粉酶具有以下取代中的一个:V59A;S95P;A121P;T119W;S95P+A121P;V59A+S95P;S95P+T119W;V59A+S95P+A121P;或 S95P+T119W+A121P,尤其是 S95P+A121P。在一个优选实施例中,SEQ ID NO:18 中示出的密粘褶菌葡糖淀粉酶具有以下取代中的一个:V59A;S95P;A121P;T119W;S95P+A121P;V59A+S95P;S95P+T119W;V59A+S95P+A121P;或 S95P+T119W+A121P,尤其是 S95P+A121P(使用在此的 SEQ ID NO:18 进行编号)。将在共同未决申请 EP 13165995.5 和 PCT/EP 2014/058692 中披露的密粘褶菌葡糖淀粉酶变体通过引用特此结合。

[0159] 一种包括以下氨基酸序列的变体,该氨基酸序列与在此的 SEQ ID NO:18 的成熟多肽具有至少 60%、至少 70%、例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%、但是小于 100% 的序列一致性。

[0160] α -淀粉酶

[0161] 本发明的酶组合物包括 α -淀粉酶。该 α -淀粉酶可以具有任何来源,例如具有真菌的或细菌的来源。在一个优选实施例中,该 α -淀粉酶是酸性 α -淀粉酶,即具有低于 7 的 pH 最佳值。

[0162] 在一个实施例中, α -淀粉酶可以源自根毛霉属的菌株,优选微小根毛霉的菌株,例如是 WO 2013/006756 中的 SEQ ID NO:3 中示出的 α -淀粉酶(参见例如实例 1 中的表 1,将其通过引用特此结合),或源自亚灰树花菌属,优选源自大型亚灰树花菌的菌株。

[0163] 在一个优选实施例中, α -淀粉酶源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域(SBD)的微小根毛霉,披露为 WO 2006/069290 的表 5 中的 V039(将其通过引用结合在此)或在此的 SEQ ID NO:13。

[0164] 在一个优选实施例中， α -淀粉酶源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域(SBD)的微小根毛霉，披露于WO 2013/006756(将其通过引用结合在此)或在此的SEQ ID NO:13中。

[0165] 在一个实施例中，微小根毛霉 α -淀粉酶或具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域(SBD)的微小根毛霉 α -淀粉酶具有以下取代或取代组合中的至少一个：D165M；Y141W；Y141R；K136F；K192R；P224A；P224R；S123H+Y141W；G20S+Y141W；A76G+Y141W；G128D+Y141W；G128D+D143N；P219C+Y141W；N142D+D143N；Y141W+K192R；Y141W+D143N；Y141W+N383R；Y141W+P219C+A265C；Y141W+N142D+D143N；Y141W+K192R+V410A；G128D+Y141W+D143N；Y141W+D143N+P219C；Y141W+D143N+K192R；G128D+D143N+K192R；Y141W+D143N+K192R+P219C；G128D+Y141W+D143N+K192R；或G128D+Y141W+D143N+K192R+P219C、尤其是G128D+D143N(使用在此的SEQ ID NO:13进行编号)。

[0166] 在一个实施例中，具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域(SBD)的微小根毛霉 α -淀粉酶选自下组，该组由以下各项组成：

[0167] (i) 包括在此的SEQ ID NO:13的成熟多肽的 α -淀粉酶；

[0168] (ii) 包括以下氨基酸序列的葡糖淀粉酶，该氨基酸序列与在此的SEQ ID NO:13的成熟多肽具有至少60%、至少70%，例如至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%的一致性。

[0169] 在一个优选实施例中， α -淀粉酶是具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域(SBD)的微小根毛霉 α -淀粉酶的变体，其中该 α -淀粉酶变体包括以下氨基酸序列，该氨基酸序列与在此的SEQ ID NO:13的成熟多肽具有至少60%、至少70%，例如至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%的一致性、但是小于100%。

[0170] 在一个优选实施例中， α -淀粉酶变体具有上述取代中的一个，例如：G128D、Y141W、D143W或K192R。

[0171] 在一个优选实施例中， α -淀粉酶(使用在此的SEQ ID NO:13进行编号)具有以下取代：Y141W+D143N。

[0172] 在一个优选实施例中， α -淀粉酶具有以下取代：G128D+Y141W+D143N。

[0173] 在一个优选实施例中， α -淀粉酶具有以下取代：G128D+Y141W+D143N+K192R；

[0174] 在一个优选实施例中， α -淀粉酶具有以下取代：G128D+D143N。

[0175] 一种包括以下氨基酸序列的变体，该氨基酸序列与在此的SEQ ID NO:13的成熟多肽具有至少60%、至少70%，例如至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%、但是小于100%的序列一致性。

[0176] 蛋白酶

[0177] 本发明的酶组合物可以任选地包括蛋白酶。蛋白酶可以具有任何来源，例如具有真菌的或细菌的来源。在一个优选实施例中，蛋白酶是金属蛋白酶。在另一个优选实施例中，蛋白酶是丝氨酸蛋白酶。

[0178] 在一个实施例中,蛋白酶具有真菌来源。

[0179] 在一个实施例中,任选地包括在本发明的酶组合物中的蛋白酶是金属蛋白酶,该金属蛋白酶源自嗜热子囊菌属的菌株、优选橙色嗜热子囊菌的菌株(尤其是橙色嗜热子囊菌 CGMCC 编号 0670),例如披露为 WO 2003/048353 中披露的 SEQ ID NO:2 的成熟部分或在此的 SEQ ID NO:3 的成熟多肽的金属蛋白酶。

[0180] 在一个实施例中,该蛋白酶,例如源自橙色嗜热子囊菌的菌株的蛋白酶选自下组,该组由以下各项组成:

[0181] (i) 包括在此的 SEQ ID NO:3 的成熟多肽的蛋白酶;

[0182] (ii) 包括以下氨基酸序列的蛋白酶,该氨基酸序列与在此的 SEQ ID NO:3 的成熟多肽具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99% 的一致性。

[0183] 在一个实施例中,蛋白酶具有细菌来源。

[0184] 在一个实施例中,任选地包括在本发明的酶组合物中的蛋白酶源自火球菌属的菌株,例如强烈火球菌的菌株,例如是 US 6,358,726 中的 SEQ ID NO:1 或在此的 SEQ ID NO:5 中示出的蛋白酶。

[0185] 在一个实施例中,该蛋白酶,例如源自强烈火球菌的蛋白酶选自下组,该组由以下各项组成:

[0186] (i) 包括在此的 SEQ ID NO:5 的成熟多肽的蛋白酶;

[0187] (ii) 包括以下氨基酸序列的蛋白酶,该氨基酸序列与在此的 SEQ ID NO:5 的成熟多肽具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99% 的一致性。

[0188] 在另一个优选实施例中,任选地包括在本发明的酶组合物中的蛋白酶是丝氨酸蛋白酶,例如肽酶家族 S53 蛋白酶。肽酶家族 S53 的丝氨酸蛋白酶包括两种不同类型的肽酶:三肽氨肽酶(外切型)和内切肽酶;如在 1993,生物化学杂志(Biochem. J.) 290:205-218 和在 MEROPS 蛋白酶数据库,发行 9.4(2011 年 1 月 31 日)(www.merops.ac.uk)中所述的。该数据库描述于罗林斯(Rawlins),N. D.,巴雷特(Barrett),A. J. 和贝特曼(Bateman),A., 2010,“MEROPS:肽酶数据库(MEROPS:the peptidase database)”,核酸研究(Nucl. Acids Res.) 38:D227-D233 中。在一个优选实施例中,蛋白酶是源自亚灰树花菌属的菌株优选大型亚灰树花菌的菌株的肽酶家族 S53 蛋白酶。在一个实施例中,蛋白酶是 WO 2014/037438 的实例 2 中涉及的并且示出为在此的 SEQ ID NO:20 的、来自大型亚灰树花菌蛋白酶 3(肽酶家族 S53 蛋白酶)的成熟序列。在一个实施例中,蛋白酶是示出为在此的 SEQ ID NO:19 和 WO 2014/037438 中的 SEQ ID NO:5 的、来自大型亚灰树花菌的成熟蛋白酶 3 序列。

[0189] 在一个优选实施例中,该蛋白酶,例如大型亚灰树花菌蛋白酶 3 选自下组,该组由以下各项组成:

[0190] (i) 包括在此的 SEQ ID NO:19 的成熟多肽的蛋白酶;

[0191] (ii) 包括以下氨基酸序列的蛋白酶,该氨基酸序列与在此的 SEQ ID NO:19 的成熟多肽具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、

至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99% 的一致性。

[0192] 在一个实施例中,该蛋白酶,例如大型亚灰树花菌蛋白酶 3 选自下组,该组由以下各项组成:

[0193] (i) 包括在此的 SEQ ID NO:20 的成熟多肽的蛋白酶;

[0194] (ii) 包括以下氨基酸序列的蛋白酶,该氨基酸序列与在此的 SEQ ID NO:20 的成熟多肽具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99% 的一致性。

[0195] 普鲁兰酶

[0196] 本发明的酶组合物可以任选地包括普鲁兰酶。普鲁兰酶可以具有任何来源,例如具有真菌的或细菌的来源。

[0197] 在一个实施例中,任选地包括在本发明的酶组合物中的普鲁兰酶源自芽孢杆菌属的菌株,例如是在此的 SEQ ID NO:15 中示出的普鲁兰酶,或源自脱支芽孢杆菌 (*Bacillus deramificans*) 的菌株。

[0198] 在一个实施例中,该普鲁兰酶,例如源自芽孢杆菌属的普鲁兰酶选自下组,该组由以下各项组成:

[0199] (i) 包括在此的 SEQ ID NO:15 的成熟多肽的普鲁兰酶;

[0200] (ii) 包括以下氨基酸序列的普鲁兰酶,该氨基酸序列与在此的 SEQ ID NO:15 的成熟多肽具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99% 的一致性。

[0201] 在一个实施例中,本发明的酶组合物进一步包括普鲁兰酶,例如芽孢杆菌属普鲁兰酶和埃默森篮状菌葡糖淀粉酶和 / 或篱边粘褶菌葡糖淀粉酶。

[0202] 海藻糖酶

[0203] 根据本发明,该酶组合物可以进一步包括海藻糖酶。

[0204] 海藻糖酶可以具有任何来源,例如具有真菌的或细菌的来源。

[0205] 在一个实施例中,海藻糖酶具有真菌来源,例如源自木霉属的菌株,例如里氏木霉,例如是在此的 SEQ ID NO:14 中示出的海藻糖酶。

[0206] 在一个实施例中,海藻糖酶,例如源自里氏木霉的海藻糖酶选自下组,该组由以下各项组成:

[0207] (i) 包括在此的 SEQ ID NO:14 的成熟多肽的海藻糖酶;

[0208] (ii) 包括以下氨基酸序列的海藻糖酶,该氨基酸序列与在此的 SEQ ID NO:14 的成熟多肽具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99% 的一致性。

[0209] 果胶酶

[0210] 根据本发明,该酶组合物可以进一步包括果胶酶,例如果胶裂解酶(也称为果胶裂合酶)和 / 或多聚半乳糖醛酸酶,或它们的组合。

- [0211] 果胶酶可以具有任何来源,例如具有真菌的或细菌的来源。
- [0212] 在一个优选实施例中,果胶酶是果胶裂解酶 (EC 4.2.2.10)。
- [0213] 在一个实施例中,果胶裂解酶源自曲霉属的菌株,例如黑曲霉。
- [0214] 在一个优选实施例中,果胶酶是多聚半乳糖醛酸酶 (EC. 3.2.1.15)。
- [0215] 在一个实施例中,多聚半乳糖醛酸酶源自曲霉属的菌株,例如棘孢曲霉。
- [0216] 在一个实施例中,果胶酶是果胶裂解酶和多聚半乳糖醛酸酶的组合。在一个实施例中,果胶酶是源自黑曲霉的果胶裂解酶和源自棘孢曲霉的多聚半乳糖醛酸酶的组合。

[0217] 酶组合物实施例

[0218] 在一个实施例中,本发明的酶组合物包括真菌葡糖淀粉酶和真菌 α -淀粉酶、以及任选地蛋白酶。

[0219] 在一个优选实施例中,酶组合物包括具有以下取代中的一个或多个的在此的 SEQ ID NO:18 中示出的密粘褶菌葡糖淀粉酶 :S95P、A121P,优选 S95P+A121P,以及 α -淀粉酶,该 α -淀粉酶优选是源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域 (SBD) 的微小根毛霉的、在此的 SEQ ID NO:13 中示出的具有以下取代中的一个或多个的 α -淀粉酶 :G128D、D143N,优选 G128D+D143N。

[0220] 在另一个优选实施例中,酶组合物包括在此的 SEQ ID NO:17 中示出的血红密孔菌葡糖淀粉酶 ;和源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域 (SBD) 的微小根毛霉的 α -淀粉酶,优选是在此的 SEQ ID NO:13 中示出的且优选具有以下取代中的一个或多个的 α -淀粉酶 :G128D、D143N,尤其是 G128D+D143N。

[0221] 在一个优选实施例中,酶组合物包括在此的 SEQ ID NO:4 中示出的篱边粘褶菌葡糖淀粉酶、和 α -淀粉酶,该 α -淀粉酶优选是源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域 (SBD) 的微小根毛霉的、在此的 SEQ ID NO:13 中示出的具有以下取代中的一个或多个的 α -淀粉酶 :G128D、D143N,优选 G128D+D143N。

[0222] 在一个优选实施例中,酶组合物包括在此的 SEQ ID NO:11 中示出的瓣环栓菌葡糖淀粉酶、和 α -淀粉酶,该 α -淀粉酶优选是源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域 (SBD) 的微小根毛霉的、在此的 SEQ ID NO:13 中示出的具有以下取代中的一个或多个的 α -淀粉酶 :G128D、D143N,优选 G128D+D143N。

[0223] 在一个实施例中,酶组合物包括

[0224] i) 真菌葡糖淀粉酶 ;

[0225] ii) 真菌 α -淀粉酶 ;

[0226] iii) 源自里氏木霉的菌株的纤维素分解酶组合物,该纤维素分解酶组合物进一步包括 GH61 多肽、 β -葡糖苷酶、CBH I 和 CBH II ;

[0227] iv) 任选地蛋白酶。

[0228] 在一个实施例中,本发明的酶组合物包括

[0229] i) 瓣环栓菌葡糖淀粉酶 ;

[0230] ii) 微小根毛霉 α -淀粉酶、或其变体 ;

[0231] iii) 源自里氏木霉的菌株的纤维素分解酶组合物,该纤维素分解酶组合物进一步包括埃默森青霉菌 GH61A 多肽、具有以下取代即 F100D、S283G、N456E、F512Y 的烟曲霉 β -葡糖苷酶、以及任选地烟曲霉 CBH I 和烟曲霉 CBH II ;

- [0232] iv) 任选地来自橙色嗜热子囊菌的蛋白酶、或其变体。
- [0233] 在一个实施例中,本发明的酶组合物包括
- [0234] i) 瓣环栓菌葡糖淀粉酶;
- [0235] ii) 微小根毛霉 α -淀粉酶、或其变体;
- [0236] iii) 源自里氏木霉的菌株的纤维素分解酶组合物,该纤维素分解酶组合物进一步包括埃默森青霉菌 GH61A 多肽、具有以下取代即 F100D、S283G、N456E、F512Y(使用在此的 SEQ ID NO:8 进行编号)的烟曲霉 β -葡糖苷酶、以及任选地烟曲霉 CBH I 和烟曲霉 CBH II;
- [0237] iv) 任选地来自强烈火球菌的蛋白酶,优选中示出的蛋白酶。
- [0238] 在一个实施例中,本发明的酶组合物包括
- [0239] i) 源自瓣环栓菌的葡糖淀粉酶;
- [0240] ii) 源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域(SBD)的微小根毛霉的 α -淀粉酶、或其变体;
- [0241] iii) 源自里氏木霉的菌株的纤维素分解酶组合物;
- [0242] iv) 任选地来自橙色嗜热子囊菌的蛋白酶、或其变体,和/或来自强烈火球菌、或大型亚灰树花菌的蛋白酶。
- [0243] 在一个实施例中,酶组合物包括
- [0244] i) 真菌葡糖淀粉酶;
- [0245] ii) 真菌 α -淀粉酶;
- [0246] iii) 源自里氏木霉的菌株的纤维素分解酶组合物,该纤维素分解酶组合物进一步包括 GH61 多肽、 β -葡糖苷酶、CBH I 和 CBH II;
- [0247] iv) 果胶酶,优选是果胶裂解酶或多聚半乳糖醛酸酶,或它们的组合。
- [0248] 在一个实施例中,果胶酶是源自黑曲霉的果胶裂解酶和源自棘孢曲霉的多聚半乳糖醛酸酶的组合。
- [0249] 在一个实施例中,果胶酶是果胶裂解酶和多聚半乳糖醛酸酶的组合。在一个实施例中,果胶酶是源自黑曲霉的果胶裂解酶和源自棘孢曲霉的多聚半乳糖醛酸酶的组合。
- [0250] 在一个实施例中,酶组合物包括
- [0251] i) 真菌葡糖淀粉酶;
- [0252] ii) 真菌 α -淀粉酶;
- [0253] iv) 果胶酶,优选果胶裂解酶或多聚半乳糖醛酸酶,或它们的组合;
- [0254] iv) 源自里氏木霉的菌株的纤维素分解酶组合物,该纤维素分解酶组合物进一步包括 GH61 多肽、 β -葡糖苷酶、CBH I 和 CBH II;
- [0255] v) 蛋白酶。
- [0256] 在一个实施例中,酶组合物包括
- [0257] i) 真菌葡糖淀粉酶;
- [0258] ii) 真菌 α -淀粉酶;
- [0259] iii) 源自里氏木霉的菌株的纤维素分解酶组合物,该纤维素分解酶组合物进一步包括 GH61 多肽、 β -葡糖苷酶、CBH I 和 CBH II;
- [0260] iv) 任选地蛋白酶。

- [0261] 在一个实施例中,本发明的酶组合物包括
- [0262] i) 瓣环栓菌葡糖淀粉酶;
- [0263] ii) 微小根毛霉 α -淀粉酶、或其变体;
- [0264] iii) 源自里氏木霉的菌株的纤维素分解酶组合物,该纤维素分解酶组合物进一步包括埃默森青霉菌 GH61A 多肽、具有以下取代即 F100D、S283G、N456E、F512Y 的烟曲霉 β -葡糖苷酶、以及任选地烟曲霉 CBH I 和烟曲霉 CBH II;
- [0265] iv) 源自黑曲霉的果胶裂解酶或源自棘孢曲霉的多聚半乳糖醛酸酶,或它们的组合;
- [0266] v) 来自橙色嗜热子囊菌的蛋白酶、或其变体,或来自强烈火球菌、或大型亚灰树花菌的蛋白酶。
- [0267] 在一个优选实施例中,酶组合物包括
- [0268] i) 在此的 SEQ ID NO:18 中示出的具有以下取代中的一个或多个的密粘褶菌葡糖淀粉酶:S95P+A121P;
- [0269] ii) 源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域(SBD)的微小根毛霉的、在此的 SEQ ID NO:13 中示出的具有以下取代的 α -淀粉酶:G128D+D143N;
- [0270] iii) 源自里氏木霉的菌株的纤维素分解酶组合物,该纤维素分解酶组合物进一步包括埃默森青霉菌 GH61A 多肽、具有以下取代即 F100D、S283G、N456E、F512Y 的烟曲霉 β -葡糖苷酶、以及任选地烟曲霉 CBH I 和烟曲霉 CBH II;
- [0271] 任选地 iv) 来自橙色嗜热子囊菌的蛋白酶、或其变体。
- [0272] 在一个优选实施例中,酶组合物包括
- [0273] i) 在此的 SEQ ID NO:17 中示出的血红密孔菌葡糖淀粉酶;
- [0274] ii) 源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域(SBD)的微小根毛霉的、在此的 SEQ ID NO:13 中示出的具有以下取代的 α -淀粉酶:G128D+D143N;
- [0275] iii) 源自里氏木霉的菌株的纤维素分解酶组合物,该纤维素分解酶组合物进一步包括埃默森青霉菌 GH61A 多肽、具有以下取代即 F100D、S283G、N456E、F512Y 的烟曲霉 β -葡糖苷酶、以及任选地烟曲霉 CBH I 和烟曲霉 CBH II;
- [0276] 任选地 iv) 来自橙色嗜热子囊菌的蛋白酶、或其变体。
- [0277] 在一个优选实施例中,酶组合物包括
- [0278] i) 在此的 SEQ ID NO:17 中示出的血红密孔菌葡糖淀粉酶;
- [0279] ii) 源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域(SBD)的微小根毛霉的、在此的 SEQ ID NO:13 中示出的具有以下取代的 α -淀粉酶:G128D+D143N;
- [0280] iii) 源自里氏木霉的菌株的纤维素分解酶组合物,该纤维素分解酶组合物进一步包括埃默森青霉菌 GH61A 多肽、具有以下取代即 F100D、S283G、N456E、F512Y 的烟曲霉 β -葡糖苷酶、以及任选地烟曲霉 CBH I 和烟曲霉 CBH II;
- [0281] 任选地 iv) 来自大型亚灰树花菌的蛋白酶,例如大型亚灰树花菌蛋白酶 3。
- [0282] 在一个优选实施例中,酶组合物包括
- [0283] i) 在此的 SEQ ID NO:17 中示出的血红密孔菌葡糖淀粉酶,或与在此的 SEQ ID NO:17 具有至少 60%、至少 70%、例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少

99%一致性的葡糖淀粉酶；

[0284] ii) 源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域 (SBD) 的微小根毛霉的、在此的 SEQ ID NO:13 中示出的 α -淀粉酶,或与在此的 SEQ ID NO:13 具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的且优选具有以下取代的 α -淀粉酶:G128D+D143N;

[0285] iii) 任选地源自里氏木霉的菌株的纤维素分解酶组合物,该纤维素分解酶组合物进一步包括埃默森青霉菌 GH61A 多肽、具有以下取代即 F100D、S283G、N456E、F512Y(使用在此的 SEQ ID NO:8 进行编号)的烟曲霉 β -葡糖苷酶、以及任选地烟曲霉 CBH I 和烟曲霉 CBH II;

[0286] iv) 来自大型亚灰树花菌的蛋白酶,例如大型亚灰树花菌蛋白酶 3,或与在此的 SEQ ID NO:20 具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的蛋白酶。

[0287] 在一个优选实施例中,酶组合物包括

[0288] i) 在此的 SEQ ID NO:4 中示出的篱边粘褶菌葡糖淀粉酶,或与在此的 SEQ ID NO:4 具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的葡糖淀粉酶;

[0289] ii) 源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域 (SBD) 的微小根毛霉的、在此的 SEQ ID NO:13 中示出的 α -淀粉酶,或与在此的 SEQ ID NO:13 具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的且优选具有以下取代的 α -淀粉酶:G128D+D143N;

[0290] iii) 源自里氏木霉的菌株的纤维素分解酶组合物,该纤维素分解酶组合物优选进一步包括埃默森青霉菌 GH61A 多肽、具有以下取代即 F100D、S283G、N456E、F512Y(使用 SEQ ID NO:8 进行编号)的烟曲霉 β -葡糖苷酶、以及任选地烟曲霉 CBH I 和烟曲霉 CBH II;

[0291] 任选地 iv) 来自橙色嗜热子囊菌的、在此的 SEQ ID NO:3 中示出的蛋白酶,或与在此的 SEQ ID NO:3 具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的蛋白酶、或其变体。

[0292] 在一个优选实施例中,酶组合物包括

[0293] i) 在此的 SEQ ID NO:12 中示出的瓣环栓菌葡糖淀粉酶,或与在此的 SEQ ID NO:12 具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的葡糖淀粉酶;

[0294] ii) 源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域 (SBD) 的微小根毛霉的、在此的 SEQ ID NO:13 中示出的 α -淀粉酶,或与在此的 SEQ ID NO:13 具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至

少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的且具有以下取代的 α -淀粉酶 :G128D+D143N ;

[0295] iii) 源自里氏木霉的菌株的纤维素分解酶组合物,该纤维素分解酶组合物优选进一步包括埃默森青霉菌 GH61A 多肽、具有以下取代即 F100D、S283G、N456E、F512Y(使用在此的 SEQ ID NO:8 进行编号)的烟曲霉 β -葡糖苷酶、以及任选地烟曲霉 CBH I 和烟曲霉 CBH II ;

[0296] 任选地 iv) 来自橙色嗜热子囊菌的蛋白酶,或与在此的 SEQ ID NO:3 具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的蛋白酶、或其变体。

[0297] 发明工艺

[0298] 如以上提及的,本发明的酶组合物可适合用于生淀粉水解 (RSH) 工艺,以用于生产希望的糖和发酵产物。在 RSH 工艺中,因为该工艺是在低于所讨论的淀粉的初始糊化温度的温度下进行,淀粉并不发生糊化。

[0299] 在一个实施例中,希望的发酵产物可以是乙醇,该乙醇是从未糊化的(即未蒸煮的)、优选研磨的谷物(例如玉米)或小粒谷物(例如小麦、燕麦、大麦、黑麦、水稻)或谷类(例如高粱)生产的。在以下“含淀粉材料”部分中列出了适合的含淀粉起始材料的实例。

[0300] 因此,在这一方面,本发明涉及从含淀粉材料生产发酵产物的工艺,这些工艺包括:

[0301] (i) 在低于初始糊化温度的温度下使含淀粉材料糖化;并且

[0302] (ii) 使用发酵生物进行发酵;

[0303] 其中在以下酶的存在下进行糖化和/或发酵:葡糖淀粉酶和 α -淀粉酶、以及任选地蛋白酶。

[0304] 在一个实施例中,葡糖淀粉酶是在此的 SEQ ID NO:18 中示出的具有以下取代中的一个或多个的密粘褶菌葡糖淀粉酶 :S95P、A121P,优选 S95P+A121P,和源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域 (SBD) 的微小根毛霉的、在此的 SEQ ID NO:13 中示出的具有以下取代中的一个或多个的 α -淀粉酶 :G128D、D143N,优选 G128D+D143N。

[0305] 在一个优选实施例中,本发明涉及从含淀粉材料来生产发酵产物的工艺,这些工艺包括:

[0306] (a) 在低于初始糊化温度的温度下使含淀粉材料糖化;并且

[0307] (b) 使用发酵生物进行发酵;

[0308] 其中在以下酶的存在下进行糖化和/或发酵:

[0309] i) 葡糖淀粉酶;

[0310] ii) α -淀粉酶;

[0311] iii) 纤维素分解酶组合物;

[0312] iv) 任选地蛋白酶。

[0313] 在一个优选实施例中,可以作为本发明的酶组合物来添加酶。在一个优选实施例中,同时进行步骤 (a) 和步骤 (b)(即单步骤发酵)。然而,也可以相继地进行步骤 (a) 和 (b)。

[0314] 根据本发明的这一方面,可以在不对包含该含淀粉材料的水性浆料进行液化的情况下,生产希望的发酵产物,例如乙醇。本发明的工艺包括在低于初始糊化温度下,优选在本发明的酶组合物的存在下,糖化(例如研磨的)含淀粉材料,例如颗粒状淀粉。可以通过适合的一种或多种发酵生物,将在糖化期间产生的糖同时发酵为希望的发酵产物。

[0315] 在一个优选实施例中,纤维素分解酶组合物是以上“纤维素分解酶组合物”部分中描述的纤维素分解酶组合物。优选地,将纤维素分解酶组合物添加至本发明的工艺中。

[0316] 在一个优选实施例中,纤维素分解酶组合物是包括在本发明的酶组合物中的。根据本发明,将酶,优选处于本发明的酶组合物的形式,添加至糖化和/或发酵中,优选同时糖化和发酵。应理解,还可以单独地或作为两种、三种、四种或更多种酶的组合物添加酶。在一个实施例中,作为一种共混物组合物添加葡糖淀粉酶和 α -淀粉酶,并且分开地添加纤维素分解酶组合物和任选的蛋白酶。在另一个实施例中,作为一种酶组合物添加纤维素分解酶组合物、葡糖淀粉酶和 α -淀粉酶,并且分开地添加任选的蛋白酶。可以作为一种酶组合物添加所有酶,该酶组合物包括葡糖淀粉酶、 α -淀粉酶、任选地纤维素分解酶组合物、和/或蛋白酶、以及任选地其他酶,这些其他酶包括普鲁兰酶和/或果胶酶,例如果胶裂解酶或多聚半乳糖醛酸酶。

[0317] 发酵产物,例如尤其是液体发酵产物,例如乙醇,可以任选地在发酵之后例如通过蒸馏来回收。继发酵之后,可以将发酵产物从发酵培养基分离。可以将发酵培养基蒸馏以提取希望的发酵产物或可以通过微滤或膜过滤技术从发酵培养基中提取希望的发酵产物。可替代地,可以通过汽提回收发酵产物。用于回收发酵产物的方法是本领域熟知的。

[0318] 发酵生物的实例是酵母,优选是酿酒酵母的菌株。根据本发明,可以将酿酒酵母用于生产乙醇。在以下“发酵生物”部分中列出了其他适合的发酵生物。

[0319] 术语“初始糊化温度”指淀粉的糊化发生的最低温度。通常,在水中加热的淀粉在约 50°C 与 75°C 之间开始糊化。糊化的提取温度取决于具体淀粉并且取决于支链淀粉的交联度。可以由技术人员容易地确定初始糊化温度。初始糊化温度可以根据植物种类、植物种类的具体品种、以及生长条件而变化。在本发明的上下文中,一种给定的含淀粉材料的初始糊化温度可以使用古林斯坦(Gorinstein.)S. 和李(Lii.)C., 淀粉(**Starch/Stärke**) 44卷(12):461-466页(1992)所描述的方法,被确定为使5%的淀粉颗粒丧失双折射的温度。

[0320] 在步骤(a)之前,可以制备具有含淀粉材料的10wt.-%-55wt.-%干燥固体(DS)、优选25wt.-%-45wt.-%干燥固体、更优选30%-40%干燥固体的一种含淀粉材料(例如颗粒状淀粉)的水性浆料。该浆料可以包括水和/或工艺用水,例如釜馏物(逆流)、洗涤器水、蒸发器冷凝物或馏出物、由蒸馏得到的侧流汽提器水,或来自其他发酵产物设备的工艺用水。由于本发明的工艺是在低于该初始糊化温度下进行的并且因此没有发生显著的粘度增加,所以如果希望的话,可以使用高水平的釜馏物。在一个实施例中,水性浆料含有从约1vol.-%至约70vol.-%、优选地15vol.-%-60vol.-%、尤其是从约30vol.-%至50vol.-%的水和/或工艺用水,例如釜馏物(逆流)、洗涤器水、蒸发器冷凝物或馏出物、由蒸馏得到的侧流汽提器水,或来自其他发酵产物设备的工艺用水,或其组合等。

[0321] 在一个实施例中,在步骤(a)之前,将逆流、或另一再循环流添加至浆料,或添加至糖化(步骤(a)),或添加至同时糖化和发酵步骤(组合的步骤(a)和步骤(b))。

[0322] 在经受本发明的工艺之后,含淀粉材料中至少85%、至少86%、至少87%、至少

88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或优选至少 99% 的干固体被转化成可溶性淀粉水解产物。

[0323] 本发明的工艺是在低于初始糊化温度的温度下进行的,意味着进行单独的步骤 (a) 的温度典型地是在 25°C -75°C 之间、例如 30°C -70°C 之间、或 45°C -60°C 之间的范围内。

[0324] 在一个优选实施例中,在步骤 (b) 中的发酵或步骤 (a) 和 (b) 中的同时糖化和发酵期间的温度是在 25°C 和 40°C 之间、优选在 28°C 和 36°C 之间、例如在 28°C 和 35°C 之间、例如 28°C 和 34°C 之间、例如约 32°C。

[0325] 在一个实施例中,本发明发酵进行持续 30 至 150 小时,优选 48 至 96 小时。66。

[0326] 在一个实施例中,进行发酵,这样使得糖水平例如葡萄糖水平保持在低水平,例如低于 6wt.-%、例如低于约 3wt.-%、例如低于约 2wt.-%、例如低于约 1wt.-%、例如低于约 0.5%、或低于 0.25% wt.-%、例如低于约 0.1wt.-%。通过简单地采用调整量的酶和发酵生物就可以实现这样的低水平的糖。本领域的普通技术人员可容易地确定有待使用的酶和发酵生物的剂量/数量。还可以选择酶和发酵生物的所采用的量以在发酵液中维持低麦芽糖浓度。例如,麦芽糖水平可保持在低于约 0.5wt.-%,例如低于约 0.2wt.-%。

[0327] 本发明的工艺可以在从 3 与 7 之间、优选从 3 至 6、或更优选从 3.5 至 5.0 的 pH 下进行。

[0328] 术语“颗粒状淀粉”意思指未蒸煮的生淀粉,即,例如在谷类、块茎或谷物中发现的呈其天然形式的淀粉。淀粉是在植物细胞内作为不溶于水的微小颗粒形式而形成。当放入冷水中时,这些淀粉颗粒可以吸收少量的液体并膨胀。在高达约 50°C 至 75°C 的温度下,膨胀可以是可逆的。然而,在更高温度下,开始不可逆膨胀,称为“糊化”。颗粒状淀粉可以是高度精制的淀粉,优选地至少 90%、至少 95%、至少 97% 或至少 99.5% 纯,或它可以为含更粗糙的淀粉的材料,这些材料包括(例如,研磨的)全谷物,全谷物包含非淀粉部分,例如胚芽残留物和纤维。

[0329] 该原材料(例如全谷物)可以例如通过研磨减小粒度,以便展开结构并且允许进一步加工。在 US 4514496 和 WO 2004/081193(通过引用结合在此)中披露了适合的粒度的实例。根据本发明,以下两种工艺是优选的:湿式和干式研磨。在干式研磨中,整个谷粒被研磨并且使用。湿式研磨使胚芽与粗粉(淀粉颗粒和蛋白)良好分离,并且通常应用于使用淀粉水解产物生产例如糖浆的场所。干式和湿式研磨两者都是淀粉加工领域熟知的。

[0330] 在一个实施例中,该粒度被减小至 0.05 至 3.0mm、优选 0.1-0.5mm 之间,或使得至少 30%、优选至少 50%、更优选至少 70%、甚至更优选至少 90% 的含淀粉材料适合通过一个具有 0.05 至 3.0mm 筛网、优选 0.1-0.5mm 筛网的筛子。在一个优选实施例中,通过优选经研磨减小含淀粉材料的粒度使得至少 50% 的含淀粉材料具有 0.1-0.5mm 的粒度,来制备含淀粉材料。

[0331] 根据本发明,添加酶或酶组合物,使得葡糖淀粉酶按以下量存在:0.001 至 10AGU/g DS、优选从 0.01 至 5AGU/g DS、尤其是 0.1 至 0.5AGU/g DS。

[0332] 根据本发明,添加酶或酶组合物,使得 α -淀粉酶是按以下量存在的或添加的:0.001 至 10FAU/g DS,优选从 0.01 至 5FAU/g DS,尤其是 0.3 至 2FAU/g DS 或 0.001 至 1FAU-F/g DS,优选 0.01 至 1FAU-F/g DS。

[0333] 根据本发明,添加酶或酶组合物,使得纤维素分解酶组合物是按以下量存在的或

添加的 :1-10,000 微克 EP/g DS、例如 2-5,000、例如 3 和 1,000、例如 4 和 500 微克 EP/g DS。

[0334] 根据本发明,添加酶或酶组合物,使得纤维素分解酶组合物是按以下范围中的量存在的或添加的 :0.1-100FPU/克总固体(TS)、优选 0.5-50FPU/克 TS、尤其是 1-20FPU/克 TS。

[0335] 在本发明的一个实施例中,添加酶或酶组合物,使得蛋白酶按 0.0001-1mg 酶蛋白/g DS,优选 0.001 至 0.1mg 酶蛋白/g DS 的量存在。可替代地,蛋白酶按 0.0001 至 1LAPU/g DS,优选 0.001 至 0.1LAPU/g DS 和 / 或 0.0001 至 1mAU-RH/g DS,优选 0.001 至 0.1mAU-RH/g DS 的量存在。

[0336] 在本发明的一个实施例中,添加酶或酶组合物,使得蛋白酶是按 1-1,000 μ g EP/g DS 范围内的量,例如 2-500 μ g EP/g DS,例如 3-250 μ g EP/g DS 存在的或添加的。

[0337] 在一个优选实施例中,葡糖淀粉酶和 α -淀粉酶之间的比率是在 99:1 和 1:2 之间,例如在 98:2 和 1:1 之间,例如在 97:3 和 2:1 之间,例如在 96:4 与 3:1 之间,例如 97:3、96:4、95:5、94:6、93:7、90:10、85:15、83:17 或 65:35 (mg EP 葡糖淀粉酶 :mg EP α -淀粉酶)。

[0338] 在一个优选实施例中,根据本发明,葡糖淀粉酶和 α -淀粉酶的总剂量是从 10-1,000 μ g/g DS,例如从 50-500 μ g/g DS,例如 75-250 μ g/g DS。

[0339] 在一个优选实施例中,添加的纤维素分解酶组合物的总剂量是从 10-500 μ g/g DS,例如从 20-400 μ g/g DS,例如 20-300 μ g/g DS。

[0340] 在一个实施例中,添加的蛋白酶的剂量是从 1-200 μ g/g DS,例如从 2-100 μ g/g DS,例如 3-50 μ g/g DS。

[0341] 含淀粉材料

[0342] 根据本发明的工艺,可以使用任何适合的含淀粉材料,包括颗粒状淀粉(未蒸煮的生淀粉)。通常基于希望的发酵产物来选择起始材料。适合用于本发明的工艺的含淀粉起始材料的实例包括谷类、块茎或谷物。确切地,含淀粉材料可以是玉米、小麦、大麦、黑麦、买罗高粱、西米、木薯、木薯粉、高粱、水稻、豌豆、豆类、或甘薯、或它们的混合物。还考虑了糯与非糯类型的玉米与大麦。

[0343] 在一个优选实施例中,含淀粉起始材料是玉米。

[0344] 在一个优选实施例中,含淀粉起始材料是小麦。

[0345] 在一个优选实施例中,含淀粉起始材料是大麦。

[0346] 在一个优选实施例中,含淀粉起始材料是黑麦。

[0347] 在一个优选实施例中,含淀粉起始材料是买罗高粱。

[0348] 在一个优选实施例中,含淀粉起始材料是西米。

[0349] 在一个优选实施例中,含淀粉起始材料是木薯。

[0350] 在一个优选实施例中,含淀粉起始材料是木薯粉。

[0351] 在一个优选实施例中,含淀粉起始材料是高粱。

[0352] 在一个优选实施例中,含淀粉起始材料是水稻,

[0353] 在一个优选实施例中,含淀粉起始材料是豌豆。

[0354] 在一个优选实施例中,含淀粉起始材料是豆类。

[0355] 在一个优选实施例中,含淀粉起始材料是甘薯。

[0356] 发酵生物

[0357] 根据本发明,“发酵生物”是指适合在发酵工艺中使用并且能够产生希望的发酵产物的任何生物,包括细菌和真菌生物。尤其适合的发酵生物能够使糖(例如葡萄糖或麦芽糖)直接或间接发酵成即转化成希望的发酵产物(尤其是乙醇)。发酵生物的实例包括真菌生物,例如酵母。优选的酵母包括酵母属菌株,特别是酿酒酵母。

[0358] 还考虑了工程化以生产一种或多种酶例如糖解酶(例如葡糖淀粉酶)的发酵生物。还可以将考虑的酵母尤其是酿酒酵母工程化以产生更少的甘油。可以在WO/2011/153516(麦斯科玛公司(Mascoma))中发现这种酵母的实例。在一个实施例中,将该发酵生物添加至发酵培养基中,这样使得每mL的发酵培养基的活发酵生物(如酵母)计数在从 10^5 至 10^{12} 个的范围内,优选从 10^7 至 10^{10} 个,尤其是约 5×10^7 个。

[0359] 可商购的酵母包括例如RED STAR™和ETHANOL RED酵母(可获得自富酶泰斯/乐斯富(Fermentis/Lesaffre),美国),FALI(可获得自弗莱施曼酵母(Fleischmann's Yeast),美国),SUPERSTART和THERMOSACC™新鲜酵母(可获得自乙醇技术(Ethanol Technology),威斯康星州(WI),美国),BIOFERM AFT和XR(可获得自NABC-北美生物产品集团(NABC-North American Bioproducts Corporation),佐治亚州(GA),美国),GERT STRAND(可获得自格特·斯特兰德公司(Gert Strand AB),瑞典)以及FERMIOL(可获得自帝斯曼食品配料部(DSM Specialties))。

[0360] 发酵产物

[0361] 术语“发酵产物”意思指通过一种包括使用一种或多种发酵生物进行的本发明的发酵步骤在内的工艺生产的产物。根据本发明考虑的发酵产物包括醇(例如,乙醇、甲醇、丁醇);有机酸(例如,柠檬酸、乙酸、衣康酸、乳酸、丁二酸、葡糖酸);酮(例如,丙酮);氨基酸(例如,谷氨酸);气体(例如, H_2 和 CO_2);抗生素(例如青霉素和四环素);酶;维生素(例如,核黄素、 B_{12} 、 β -胡萝卜素);和激素。在一个优选实施例中,发酵产物是乙醇,例如燃料乙醇;饮用乙醇,即中性饮用酒精;或用于消费性醇工业(例如,啤酒和酒)、乳制品工业(例如,发酵的乳制品)、皮革工业和烟草工业的工业乙醇或产物。优选的啤酒类型包括爱尔啤酒(ale)、烈性黑啤酒(stout)、波特啤酒(porter)、拉格啤酒(lager)、苦啤酒(bitter)、麦芽酒(malt liquor)、低麦芽啤酒(happoushu)、高醇啤酒、低醇啤酒、低热量啤酒或清淡啤酒。根据本发明获得的发酵产物(例如乙醇)可以优选用作燃料。然而,在乙醇的情况下,它还可以用作饮用乙醇。

[0362] 发酵培养基

[0363] 术语“发酵培养基(fermentation medium)”是指进行发酵的环境并且该环境包括可发酵底物,即可以被一种或多种发酵生物代谢的碳水化合物来源(例如葡萄糖)。

[0364] 发酵培养基可以包括针对一种或多种发酵生物的营养素和/或一种或多种生长刺激剂。营养素和生长刺激剂被广泛地用于发酵领域中并且包括氮源,例如氨;维生素;以及矿物质,或其组合。

[0365] 本发明的工艺的实例

[0366] 在一个实施例中,从本发明的含淀粉材料生产发酵产物的工艺,该工艺包括:

[0367] (a) 在低于初始糊化温度的温度下使含淀粉材料糖化;并且

- [0368] (b) 使用发酵生物进行发酵；
- [0369] 其中在以下酶的存在下进行糖化和 / 或发酵：
- [0370] i) 源自瓣环栓菌、密粘褶菌、篱边粘褶菌、或血红密孔菌的葡糖淀粉酶；
- [0371] ii) 源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域 (SBD) 的微小根毛霉的 α -淀粉酶、或其变体；
- [0372] iii) 源自里氏木霉的纤维素分解酶组合物；
- [0373] iv) 任选地来自橙色嗜热子囊菌的蛋白酶、或其变体, 和 / 或来自强烈火球菌、或大型亚灰树花菌的蛋白酶。
- [0374] 在一个实施例中, 从本发明的含淀粉材料生产发酵产物的工艺, 该工艺包括：
- [0375] (a) 在低于初始糊化温度的温度下使含淀粉材料糖化 ; 并且
- [0376] (b) 使用发酵生物进行发酵；
- [0377] 其中在以下酶的存在下进行糖化和 / 或发酵：
- [0378] i) 在此的 SEQ ID NO:18 中披露的源自密粘褶菌的葡糖淀粉酶, 或与在此的 SEQ ID NO:18 具有至少 60%、至少 70%, 例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的且优选具有以下取代的葡糖淀粉酶 :S95P+A121P；
- [0379] ii) 源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域 (SBD) 的微小根毛霉的、在此的 SEQ ID NO:13 中示出的 α -淀粉酶, 或其变体, 或与在此的 SEQ ID NO:13 具有至少 60%、至少 70%, 例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的且优选具有以下取代的 α -淀粉酶 :G128D+D143N；
- [0380] iii) 源自里氏木霉的纤维素分解酶组合物；
- [0381] iv) 任选地来自橙色嗜热子囊菌的蛋白酶, 或与在此的 SEQ ID NO:3 具有至少 60%、至少 70%, 例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的蛋白酶, 或其变体。
- [0382] 在一个优选实施例中, 从本发明的含淀粉材料生产发酵产物 (例如乙醇) 的工艺, 该工艺包括：
- [0383] (a) 在低于初始糊化温度的温度下使含淀粉材料糖化 ; 以及
- [0384] (b) 使用发酵生物进行发酵；
- [0385] 其中在以下酶的存在下进行糖化和 / 或发酵：
- [0386] i) 在此的 SEQ ID NO:18 中披露的源自密粘褶菌的葡糖淀粉酶, 或与在此的 SEQ ID NO:18 具有至少 60%、至少 70%, 例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的且优选具有以下取代的葡糖淀粉酶 :S95P+A121P；
- [0387] ii) 源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域 (SBD) 的微小根毛霉的、在此的 SEQ ID NO:13 中示出的 α -淀粉酶, 或其变体, 或与在此的 SEQ ID NO:13 具有至少 60%、至少 70%, 例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的且具

有以下取代的 α -淀粉酶 :G128D+D143N ;

[0388] iii) 任选地纤维素分解酶组合物,例如源自里氏木霉的纤维素分解酶组合物 ;

[0389] iv) 来自大型亚灰树花菌的蛋白酶,例如大型亚灰树花菌蛋白酶 3,或与在此的 SEQ ID NO:20 具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的蛋白酶。

[0390] 在一个优选实施例中,从本发明的含淀粉材料生产发酵产物(例如乙醇)的工艺,该工艺包括:

[0391] (a) 在低于初始糊化温度的温度下使含淀粉材料糖化 ;以及

[0392] (b) 使用发酵生物进行发酵 ;

[0393] 其中在以下酶的存在下进行糖化和 / 或发酵 :

[0394] i) 在此的 SEQ ID NO:18 中披露的源自密粘褶菌的葡糖淀粉酶,或与在此的 SEQ ID NO:18 具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的且具有以下取代的葡糖淀粉酶 :S95P+A121P ;

[0395] ii) 源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域(SBD)的微小根毛霉的、在此的 SEQ ID NO:13 中示出的 α -淀粉酶,或其变体,或与在此的 SEQ ID NO:13 具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的且具有以下取代的 α -淀粉酶 :G128D+D143N ;

[0396] iii) 源自里氏木霉的纤维素分解酶组合物 ;

[0397] iv) 来自大型亚灰树花菌的蛋白酶,例如大型亚灰树花菌蛋白酶 3,例如在此的 SEQ ID NO:19 或在此的 SEQ ID NO:20 中披露的蛋白酶,或分别与在此的 SEQ ID NO:19 或在此的 SEQ ID NO:20 具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的蛋白酶。

[0398] 在一个实施例中,从本发明的含淀粉材料生产发酵产物的工艺,该工艺包括:

[0399] (a) 在低于初始糊化温度的温度下使含淀粉材料糖化 ;以及

[0400] (b) 使用发酵生物进行发酵 ;

[0401] 其中在以下酶的存在下进行糖化和 / 或发酵 :

[0402] i) 在此的 SEQ ID NO:17 中示出的源自血红密孔菌的葡糖淀粉酶 ;或与在此的 SEQ ID NO:17 具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的葡糖淀粉酶,

[0403] ii) 源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域(SBD)的微小根毛霉的、在此的 SEQ ID NO:13 中示出的 α -淀粉酶,或其变体,或与在此的 SEQ ID NO:13 具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的且优选具有以下取代的 α -淀粉酶 :G128D+D143N ;

- [0404] iii) 源自里氏木霉的纤维素分解酶组合物；
- [0405] iv) 任选地来自橙色嗜热子囊菌的蛋白酶、或其变体。
- [0406] 在一个实施例中，从本发明的含淀粉材料生产发酵产物的工艺，该工艺包括：
- [0407] (a) 在低于初始糊化温度的温度下使含淀粉材料糖化；并且
- [0408] (b) 使用发酵生物进行发酵；
- [0409] 其中在以下酶的存在下进行糖化和 / 或发酵：
- [0410] i) 在此的 SEQ ID NO:4 中示出的源自篱边粘褶菌的葡糖淀粉酶；或与在此的 SEQ ID NO:4 具有至少 60%、至少 70%，例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的葡糖淀粉酶，
- [0411] ii) 源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域 (SBD) 的微小根毛霉的、在此的 SEQ ID NO:13 中示出的 α -淀粉酶，或其变体，或与在此的 SEQ ID NO:13 具有至少 60%、至少 70%，例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的且具有以下取代的 α -淀粉酶 :G128D+D143N；
- [0412] iii) 源自里氏木霉的纤维素分解酶组合物；
- [0413] iv) 任选地来自橙色嗜热子囊菌的蛋白酶，或与在此的 SEQ ID NO:3 具有至少 60%、至少 70%，例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的蛋白酶，或其变体。
- [0414] 在一个实施例中，从本发明的含淀粉材料生产发酵产物的工艺，该工艺包括：
- [0415] (a) 在低于初始糊化温度的温度下使含淀粉材料糖化；以及
- [0416] (b) 使用发酵生物进行发酵；
- [0417] 其中在以下酶的存在下进行糖化和 / 或发酵：
- [0418] i) 在此的 SEQ ID NO:12 中示出的源自瓣环栓菌的葡糖淀粉酶；或与在此的 SEQ ID NO:12 具有至少 60%、至少 70%，例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的葡糖淀粉酶，
- [0419] ii) 源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域 (SBD) 的微小根毛霉的、在此的 SEQ ID NO:13 中示出的 α -淀粉酶，或其变体，或与在此的 SEQ ID NO:13 具有至少 60%、至少 70%，例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的且优选具有以下取代的 α -淀粉酶 :G128D+D143N；
- [0420] iii) 源自里氏木霉的纤维素分解酶组合物；
- [0421] iv) 任选地来自橙色嗜热子囊菌的蛋白酶，或与在此的 SEQ ID NO:3 具有至少 60%、至少 70%，例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的蛋白酶，或其变体。
- [0422] 材料与amp;方法

[0423] 材料：

[0424] GtAMG：在此的 SEQ ID NO:18 中披露的源自密粘褶菌的且具有以下取代的葡糖淀粉酶：S95P+A121P。

[0425] PsAMG：披露为 WO 2011/066576 中的 SEQ ID NO:4 和在此的 SEQ ID NO:17 中所示的源自血红密孔菌的葡糖淀粉酶。

[0426] TcAMG：在此的 SEQ ID NO:12 或 WO 2006/69289 中的 SEQ ID NO:2 中示出的源自瓣环栓菌的葡糖淀粉酶。

[0427] AAPE096：源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域 (SBD) 的微小根毛霉的、在此的 SEQ ID NO:13 中示出的具有以下取代中的 α -淀粉酶：G128D+D143N。

[0428] 纤维素酶 VD：源自里氏木霉的纤维素分解组合物，该纤维素分解组合物进一步包括披露为 WO 2011/041397 中的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:10 的埃默森青霉菌 GH61A 多肽、和披露为 WO 2005/047499 中的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:8 的烟曲霉 β -葡糖苷酶或其变体（该变体优选是具有以下取代中的一个、优选全部的变体：F100D、S283G、N456E、F512Y）以及烟曲霉 Ce17A CBH1，（披露为 WO 2011/057140 中的 SEQ ID NO:6 和在此的 SEQ ID NO:6）、以及烟曲霉 CBH II（披露为 WO 2011/057140 中的 SEQ ID NO:18 和在此的 SEQ ID NO:7）。

[0429] 蛋白酶 Oxa：披露为 WO 2003/048353 中披露的 SEQ ID NO:2 的成熟部分或在此的 SEQ ID NO:3 的成熟多肽的源自橙色嗜热子囊菌的金属蛋白酶。

[0430] Mg 蛋白酶 3：来自在 WO 2014/037438 的实例 2 中涉及的大型亚灰树花菌的菌株的或 SEQ ID NO:20 的丝氨酸蛋白酶家族 S53 蛋白酶。

[0431] 方法：

[0432] 一致性

[0433] 两个氨基酸序列之间或两个多核苷酸序列之间的相关性由参数“一致性”来描述。

[0434] 为了本发明的目的，两个氨基酸序列之间的一致性程度可使用 Clustal 方法（希金斯 (Higgins), 1989, CABIOS 5:151-153) 来确定，其中使用具有一致性表 (identity table) 的 LASERGENE™MEGALIGN™软件 (DNASTAR, Inc., Madison, WI) 和以下多个比对参数：缺口罚分 10；缺口长度罚分 10。成对比对参数是：K 元组 (Ktuple) = 1, 缺口罚分 = 3, 窗口 = 5, 并且对角线 = 5。

[0435] 对本发明来说，两种多核苷酸序列之间的一致性程度可通过威尔伯-李普曼 (Wilbur-Lipman) 方法（威尔伯 (Wilbur) 和李普曼 (Lipman), 1983, 美国国家科学院院刊 (Proceedings of the National Academy of Science USA) 80:726-730) 使用 LASERGENE™MEGALIGN™软件 (DNASTAR 公司, 麦迪逊 (Madison), 威斯康辛州 (WI)) 用一致性表及以下的多重比对参数进行测定：缺口罚分 10 和缺口长度罚分 10。成对比对参数是：K 元组 = 3, 缺口罚分 = 3 和窗口 = 20。

[0436] 针对海藻糖酶的西格马酶法测定

[0437] 在 pH 5.7, 在 37°C, 一个西格马 (SIGMA) 单位每分钟将转化 1.0 微摩尔的海藻糖为 2.0 微摩尔的葡萄糖（在 pH 7.5, 测定的释放的葡萄糖）。

[0438] 葡糖淀粉酶活性

[0439] 可以按葡糖淀粉酶单位 (AGU) 来测量葡糖淀粉酶活性。

[0440] 葡糖淀粉酶活性 (AGU)

[0441] Novo 葡糖淀粉酶单位 (AGU) 定义为在以下标准条件下每分钟水解 1 微摩尔麦芽糖的酶量 :37℃, pH 4.3, 底物 :麦芽糖 23.2mM, 缓冲液 :乙酸盐 0.1M, 反应时间 5 分钟。

[0442] 可以使用自动分析仪系统。将变旋酶添加到葡萄糖脱氢酶试剂中, 这样使得存在的任何 α -D-葡萄糖变为 β -D-葡萄糖。葡萄糖脱氢酶在以上提到的反应中与 β -D-葡萄糖特异性反应, 形成 NADH, 在 340nm 下使用光度计测定该 NADH 作为原始葡萄糖浓度的量度。

[0443]

AMG 孵育 :	
底物 :	麦芽糖 23.2mM
缓冲液 :	乙酸盐 0.1M
pH :	4.30 ± 0.05
孵育温度 :	37℃ ± 1
反应时间 :	5 分钟
酶工作范围 :	0.5-4.0 AGU/mL

[0444]

颜色反应 :	
GlucDH :	430U/L
变旋酶 :	9U/L
NAD :	0.21mM
缓冲液 :	磷酸盐 0.12M ; 0.15M NaCl
pH :	7.60 ± 0.05
孵育温度 :	37℃ ± 1
反应时间 :	5 分钟
波长 :	340nm

[0445] 更详细描述这种分析方法的文件 (EB-SM-0131.02/01) 可从丹麦的诺维信公司索取得到, 通过引用将该文件包括在此。

[0446] α -淀粉酶活性 (KNU)

[0447] 可采用马铃薯淀粉作为底物来确定 α -淀粉酶活性。此方法是基于由酶分解改性的马铃薯淀粉, 并且该反应随后是将淀粉 / 酶溶液的样品与碘溶液混合。最初形成微黑蓝

色,但淀粉分解过程中蓝色变弱并且逐渐变为红褐色,将其与有色玻璃标准品比较。

[0448] 将一千个 Novo α 淀粉酶单位 (KNU) 定义为在标准条件下 (即,在 $37^{\circ}\text{C} \pm 0.05$; 0.0003M Ca^{2+} ;和 pH 5.6 下) 糊精化 5260mg 淀粉干物质默克可溶性淀粉 (Merck Amylum solubile) 的酶量。

[0449] 更详细地描述这种分析方法的文件夹 [EB-SM-0009.02/01](#) 可以从丹麦的诺维信公司索取得到,通过引用将该文件夹包括在此。

[0450] 酸性 α -淀粉酶活性

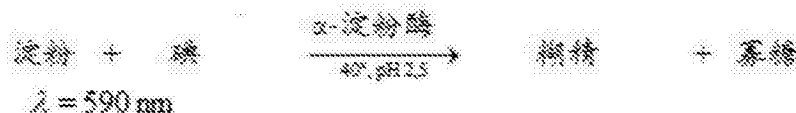
[0451] 当根据本发明使用时,可以按 AFAU (酸性真菌 α -淀粉酶单位) 或 FAU-F 来测量一种酸性 α -淀粉酶的活性。

[0452] 酸性 α -淀粉酶活性 (AFAU)

[0453] 能以 AFAU (酸性真菌 α -淀粉酶单位) 测量酸性 α -淀粉酶活性,相对于酶标准品而确定 AFAU。1AFAU 被定义为在下述标准条件下每小时降解 5.260mg 淀粉干物质的酶量。

[0454] 酸性 α -淀粉酶是内- α -淀粉酶 (1,4- α -D-葡聚糖-葡糖水解酶, E. C. 3.2.1.1), 它水解在淀粉分子的内部区域中的 α -1,4-糖苷键以形成具有不同链长度的糊精和寡糖。与碘形成的颜色的强度跟淀粉的浓度成正比。使用反向比色法将酶活性测定为在指定的分析条件下淀粉浓度的减小。

[0455]



[0456] 蓝色 / 紫色 $t = 23$ 秒。脱色

[0457] 标准条件 / 反应条件:

[0458]

底物:	可溶性淀粉, 大约 0.17 g/L
缓冲液:	柠檬酸盐, 大约 0.03 M
碘 (I ₂):	0.03 g/L
CaCl ₂ :	1.85 mM
pH:	2.50 ± 0.05
孵育温度:	40°C
反应时间:	23 秒
波长:	590 nm
酶浓度:	0.025 AFAU/mL
酶工作范围:	0.01-0.04 AFAU/mL

[0459] 更详细地描述这种分析方法的文件夹 [EB-SM-0259.02/01](#) 可以从丹麦的诺维信公司索取得到,通过引用将该文件夹包括在此。

[0460] FAU-F 的测定

[0461] 相对于具有声明强度的酶标准品测量 FAU-F 真菌 α -淀粉酶单位 (Fungal α -Amylase Units) (芬加密尔 (Fungamyl))。

[0462]

反应条件	
温度	37°C
pH	7.15
波长	405 nm
反应时间	5 min
测量时间	2 min

[0463] 更详细地描述这种标准方法的文件夹 (EB-SM-0216.02) 可以从丹麦的诺维信公司索取得到,通过引用将该文件夹包括在此。

[0464] 使用滤纸测定 (FPU 测定) 来测量纤维素酶活性

[0465] 1. 方法的来源

[0466] 1.1 在阿迪 (Adney), B 和贝克 (Baker), J. 的题为“纤维素酶活性的测量 (Measurement of Cellulase Activities)”的文件中披露了该方法,实验室分析程序 (Laboratory Analytical Procedure), LAP-006, 国家可再生能源实验室 (National Renewable Energy Laboratory) (NREL)。它是基于用于测量纤维素酶活性的 IUPAC 方法 (高斯 ((Ghose), T. K., 纤维素酶活性的测量 (Measurement of Cellulase Activities), 纯化学和应用化学 (Pure&Appl. Chem.), 59, 257-268 页, 1987。

[0467] 2. 程序

[0468] 2.1 如阿迪 (Adney) 和贝克 (Baker), 1996, 同上所述的进行该方法,除了在显色后,使用 96 孔板来读取吸光度值,如以下所述。

[0469] 2.2 酶测定管:

[0470] 2.2.1 将轧制滤纸条 (#1 沃特曼 (Whatman) ;1X 6cm ;50mg) 添加至试管 (13X 100mm) 的底部。

[0471] 2.2.2 向该管添加 1.0mL 的 0.05M 柠檬酸钠缓冲液 (pH 4.80)。

[0472] 2.2.3 在循环水浴中,在 50°C ($\pm 0.1^\circ\text{C}$) 孵育含滤纸和缓冲液的管 5min。

[0473] 2.2.4 在孵育后,添加 0.5mL 的柠檬酸盐缓冲液中的酶稀释物至该管。设计酶稀释物以产生略高于和低于 2.0mg 葡萄糖的目标值的值。

[0474] 2.2.5 通过轻轻涡旋 3 秒来混合管内容物。

[0475] 2.2.6 涡旋后,在循环水浴中,在 50°C ($\pm 0.1^\circ\text{C}$) 孵育这些管 60min。

[0476] 2.2.7 在 60min 孵育后,立即从水浴中移除管,并且将 3.0mL 的 DNS 试剂添加至各管,以停止反应。将这些管涡旋 3 秒以混合。

[0477] 2.3 空白和对照

[0478] 2.3.1 通过将 1.5mL 的柠檬酸盐缓冲液添加至试管来制备试剂空白。

[0479] 2.3.2 通过将轧制滤纸条放进试管的底部,并且添加 1.5mL 的柠檬酸盐缓冲液来制备底物对照。

[0480] 2.3.3 通过混合 1.0mL 的柠檬酸盐缓冲液与 0.5mL 的适当的酶稀释物来针对每一酶稀释物制备酶对照。

[0481] 2.3.4 按与酶测定管相同的方式测定试剂空白、底物对照、和酶对照,并且与它们

一起进行。

[0482] 2.4 葡萄糖标准品

[0483] 2.4.1 制备 100mL 葡萄糖的储备液 (10.0mg/mL), 并且将 5mL 等分部分冷冻。在使用前, 将等分部分解冻并且涡旋以混合。

[0484] 2.4.2 在柠檬酸盐缓冲液中, 制造储备液的稀释如下:

[0485] $G1 = 1.0\text{mL 储备液} + 0.5\text{mL 缓冲液} = 6.7\text{mg/mL} = 3.3\text{mg}/0.5\text{mL}$

[0486] $G2 = 0.75\text{mL 储备液} + 0.75\text{mL 缓冲液} = 5.0\text{mg/mL} = 2.5\text{mg}/0.5\text{mL}$

[0487] $G3 = 0.5\text{mL 储备液} + 1.0\text{mL 缓冲液} = 3.3\text{mg/mL} = 1.7\text{mg}/0.5\text{mL}$

[0488] $G4 = 0.2\text{mL 储备液} + 0.8\text{mL 缓冲液} = 2.0\text{mg/mL} = 1.0\text{mg}/0.5\text{mL}$

[0489] 2.4.3 通过添加 0.5mL 的各稀释物至 1.0mL 的柠檬酸盐缓冲液来制备葡萄糖标准品管。

[0490] 2.4.4 按与酶测定管相同的方式测定葡萄糖标准品管, 并且与它们一起进行。

[0491] 2.5 显色

[0492] 2.5.1 在 60min 孵育和添加 DNS 后, 在水浴中将所有这些管一起煮沸 5min。

[0493] 2.5.2 在煮沸后, 将它们立即在冰 / 水浴中冷却。

[0494] 2.5.3 当冷却时, 将这些管短暂地涡旋, 并且允许浆状物沉降。然后通过将来自该管的 50 微升添加至 96 孔板中的 200 微升的 ddH₂O, 来稀释每个管。混合每个孔, 并且在 540nm 读取吸光度。

[0495] 2.6 计算 (在 NREL 文件中给出实例)

[0496] 2.6.1 通过对四个标准品 (G1-G4) 的葡萄糖浓度 (mg/0.5mL) 对 A_{540} 进行作图, 来制备葡萄糖标准曲线。使用线性回归 (Prism 软件) 来对此进行拟合, 并且使用针对该线的方程式确定每个酶测定管所产生的葡萄糖。

[0497] 2.6.2 制备产生的葡萄糖 (mg/0.5mL) 对比总酶稀释度的曲线图, 其中 Y 轴 (酶稀释度) 是对数标度的。

[0498] 2.6.3 在产生刚好高于 2.0mg 葡萄糖的酶稀释度和产生刚好低于该值的稀释度之间画出一条线。从这一条线, 可确定将已经产生准确地为 2.0mg 葡萄糖的酶稀释度。

[0499] 2.6.4 滤纸单位 /mL (FPU/mL) 计算如下:

[0500] $\text{FPU/mL} = 0.37 / \text{产生 } 2.0\text{mg 葡萄糖的酶稀释度}$

[0501] 蛋白酶测定法 -AU (RH)

[0502] 可以用变性的血红蛋白作为底物测定蛋白水解活性。在用于测定蛋白水解活性的安森-血红蛋白 (Anson-Hemoglobin) 方法中, 变性血红蛋白被消化, 并且用三氯乙酸 (TCA) 沉淀未消化的血红蛋白。用酚试剂确定 TCA 可溶产物的量, 酚试剂可以与酪氨酸和色氨酸一起给出蓝色。

[0503] 将一个安森 (Anson) 单位 (AU-RH) 定义为在标准条件 (即, 25°C, pH 5.5 和 10min 反应时间) 下以初始速率消化血红蛋白, 以使得每分钟释放的 TCA 可溶性产物的量与酚试剂给出与一毫当量的酪氨酸相同的颜色的酶量。

[0504] AU (RH) 法描述于 EAL-SM-0350 中并且可以从丹麦的诺维信公司索取得到。

[0505] 蛋白酶测定法 (LAPU)

[0506] 一个亮氨酸氨肽酶单位 (LAPU) 是在以下条件下每分钟分解 1 μM 底物的酶量:

26mM 的 L-亮氨酸 - 对硝基苯胺作为底物, 0.1M Tris 缓冲液 (pH 8.0), 37°C, 10 分钟反应时间。

[0507] LAPU 描述于可以从丹麦的诺维信公司索取得到的 EB-SM-0298.02/01 中。

[0508] 麦芽糖淀粉酶活性的测定 (MANU)

[0509] 一个 MANU (Maltogenic Amylase Novo Unit, 麦芽糖淀粉酶 Novo 单位) 可以被定义为在浓度为 10mg 麦芽三糖 (西格玛 (Sigma) M 8378) 底物 / 毫升 0.1M 柠檬酸盐缓冲液 (pH 5.0) 下, 在 37°C 下持续 30 分钟, 每分钟释放一微摩尔的麦芽糖所需的酶量。

[0510] 实例

[0511] 实例 1

[0512] 使用 Gt AMG 和 AAPE096 α -淀粉酶的生淀粉乙醇生产

[0513] 产生精细研磨的 (250 微米) 生淀粉浆料用于这一实验。将大约 405g 普通黄玉米粉 (获得自爱荷华州东南部可再生能源 (Southeast Iowa Renewable Energy) 公司, 爱荷华州, 美国 - 室内研磨) 添加至 595g 自来水中, 并且确定干固体 (DS) 水平为 35.00%。分别使用 200g/L 尿素和 1g/L 青霉素的溶液将浆制备为 500ppm 尿素和 3mg/L 青霉素, 并且调节至 pH 4.5。将大约 5g 的制备的浆用移液管移至每个已经在顶部中钻孔的预先称重的 15mL 离心管中。将这些管再次称重, 以确定添加的浆的质量。

[0514] 使 RED STAR™ 酵母再水合, 其中将 5.5g 酵母放置在 100mL 的 32°C 自来水中持续 30 分钟。当浸泡酵母时, 根据下表所述的量和比率, 用葡糖淀粉酶 (AMG) 和 α -淀粉酶 (AA) 给予至每个浆样品。

[0515] 每个处理包含 6 个重复。使用以下方程式计算酶剂量:

[0516]

$$\text{酶剂量 (ml)} = \frac{\text{最终酶剂量 (AGU/g DS)} \times \text{浆重量 (g)} \times \text{固体含量 (\% DS/100)}}{\text{酶浓度 (AGU/ml)}}$$

[0517] 将水添加至每一样品, 使得酶、水、酵母和酸 (在实验结束的时候添加) 的总添加体积是 275 μ L/5g 样品。在每个样品中将再水合酵母给予为 100 μ l 的酵母溶液。在 32°C, 将样品放置在水浴中, 持续 88 小时。在每天的早晨和晚上涡旋每个样品, 以确保良好的混合。在发酵的 72 小时和 88 小时, 从每个处理献出 3 个样品用于 HPLC 分析。用 50 μ l 的 40% v/v H₂SO₄ 给予献出的样品, 涡旋, 并且在 1462xg 离心 10min。通过 0.45um 针筒式过滤器来过滤上清液, 并且将此直接用于 HPLC 分析。在以下系统上分析 HPLC 样品。

[0518]

HPLC 系统	具有化学工作站 (Chem station) 软件的安捷伦 (Agilent) 1100/1200 系列 脱气器 四元泵
---------	---

[0519]

	自动进样器 柱箱/w加热器 折射率检测器 (RI)
柱	伯乐 (Bio-Rad) HPX-87H离子排斥柱, 300 mm x 7.8 mm, 零件号125-0140 伯乐保护柱阳离子H零件号125-0129, 支架零件号125-0131
方法	0.005 M H ₂ SO ₄ 流动相 0.6 ml/min的流速 柱温-65°C RI检测器温度-55°C

[0520] 该方法使用针对糊精 (DP4+)、麦芽三糖、麦芽糖、葡萄糖、果糖、乙酸、乳酸、甘油以及乙醇的校准标准品对分析物进行定量。使用 4 点校准 (包括来源)。

[0521] 表 : 宽范围 AMG:AA 蛋白剂量比率研究

[0522]

处理	蛋白剂量 ($\mu\text{g/g DS}$)	% EtOH 72小时	% EtOH 88小时
50 : 50 GtAMG : AAPE096	100	15.25	15.59
62 : 38 GtAMG : AAPE096	100	15.40	15.63
87 : 13 GtAMG : AAPE096	100	15.52	15.66
100 : 0 (对照) GtAMG : AAPE096	100	7.69	8.39
50 : 50 GtAMG : AAPE096	112	15.26	15.52
62 : 38 GtAMG : AAPE096	112	15.33	15.55
87 : 13 GtAMG : AAPE096	112	15.47	15.64
100 : 0 (对照) GtAMG : AAPE096	112	7.98	8.19

[0523]

50 : 50 GtAMG : AAPE096	138	15.34	15.54
62 : 38 GtAMG : AAPE096	138	15.45	15.58
87 : 13 GtAMG : AAPE096	138	15.57	15.69
100 : 0 (对照) GtAMG : AAPE096	138	8.12	8.65
50 : 50 GtAMG : AAPE096	150	15.46	15.61
62 : 38 GtAMG : AAPE096	150	15.49	15.65
87 : 13 GtAMG : AAPE096	150	15.64	15.76
100 : 0 (对照) GtAMG : AAPE096	150	8.23	8.69

[0524] 表 : 窄范围 AMG:AA 蛋白剂量比率研究

[0525]

处理	蛋白剂量 ($\mu\text{g/g DS}$)	% EtOH 88小时
85 : 15 GtAMG : AAPE096	85	15.06
90 : 10 GtAMG : AAPE096	85	15.09
94 : 6 GtAMG : AAPE096	85	15.14
97 : 3 GtAMG : AAPE096	85	14.97
85 : 15 GtAMG : AAPE096	101	15.09
90 : 10 GtAMG : AAPE096	101	15.12

[0526]

94 : 6 GtAMG : AAPE096	101	15.19
97 : 3 GtAMG : AAPE096	101	15.11
85 : 15 GtAMG : AAPE096	134	15.18
90 : 10 GtAMG : AAPE096	134	15.12
94 : 6 GtAMG : AAPE096	134	15.28
97 : 3 GtAMG : AAPE096	134	15.16
85 : 15 GtAMG : AAPE096	150	15.20
90 : 10 GtAMG : AAPE096	150	15.15
94 : 6 GtAMG : AAPE096	150	15.21
97 : 3 GtAMG : AAPE096	150	15.20

[0527] 实例 2

[0528] 使用 Gt AMG 和 AAPE096 α -淀粉酶 (采用和不采用添加的纤维素酶 VD) 的生淀粉乙醇生产 - 剂量反应

[0529] 在此实例中, AMG 和 AA 比率分别恒定地保持在 93:7 蛋白比率, 并且总剂量如表中所示增加。添加纤维素酶至指示的处理。阐明了剂量 / 克 DS。

[0530] 表 : 采用和不采用添加的纤维素酶 VD 的情况下, Gt AMG 和 AAPE096 α -淀粉酶的剂量反应

[0531]

处理	总 AMG + AA 剂量 ($\mu\text{g/g DS}$)	% EtOH 72 小时	% EtOH 88 小时
Gt AMG + AAPE096	141	15.132	15.212
Gt AMG + AAPE096 + 纤维素酶 VD (100 μg)	141	15.243	15.325
Gt AMG + AAPE096	159	15.128	15.275

[0532]

Gt AMG + AAPE096 + 纤维素酶VD (100 µg)	159	15.261	15.360
Gt AMG + AAPE096	176	15.242	15.266
Gt AMG + AAPE096 + 纤维素酶VD (100 µg)	176	15.336	15.403
Gt AMG + AAPE096	194	15.251	15.237
Gt AMG + AAPE096 + 纤维素酶 (100 µg)	194	15.283	15.399
Gt AMG + AAPE096	212	15.216	15.362
Gt AMG + AAPE096 + 纤维素酶VD (100 µg)	212	15.388	15.436

[0533] 实例 3

[0534] 使用 Gt AMG 和 AAPE096 α - 淀粉酶 (采用纤维素酶 VD 和蛋白酶 Oxa) 的生淀粉乙醇生产

[0535] 在此实例中,在 147.9 µg 总蛋白剂量下,AMG 和 AA 比率分别恒定地保持在 94:6 蛋白比率。在分开的处理中添加指示的量的另外一种或多种酶,并且结果是根据下表获得的。

[0536]

处理	% EtOH 48小时	% EtOH 72小时	% EtOH 88小时
GtAMG + AAPE096	14.33	15.13	15.36
GtAMG + AAPE096 + 纤维素酶VD (100 µg)	14.46	15.14	15.44
GtAMG + AAPE096 + 纤维素酶VD (100 µg) + 蛋白酶Oxa (10 µg)	14.84	15.46	15.80

[0537] 实例 4

[0538] 使用 TcAMG 和 AAPE096 α - 淀粉酶 (采用纤维素酶 VD 和蛋白酶 Oxa) 的生淀粉乙醇生产

[0539] 在此实例中,在 116 µg 总蛋白剂量下,AMG 和 AA 比率分别恒定地保持在 77:23 蛋白比率。在分开的处理中添加指示的量的另外一种或多种酶,并且结果是根据下表获得的。

[0540]

处理	% EtOH 72小时	% EtOH 88小时
TcAMG + AAPE096	15.03	15.17
TcAMG + AAPE096 + 纤维素酶VD (100 µg)	15.15	15.32
TcAMG + AAPE096 + 纤维素酶VD (100 µg) + 蛋白酶Oxa (20 µg)	15.31	15.40
TcAMG + AAPE096 + 蛋白酶Oxa (20 µg)	15.19	15.36

[0541] 实例 5

[0542] 使用 Ps AMG 和 AAPE096 α-淀粉酶的生淀粉乙醇生产

[0543] 产生精细研磨的 (250 微米) 生淀粉浆料用于这一实验。将大约 405g 普通黄玉米粉 (获得自爱荷华州东南部可再生能源 (Southeast Iowa Renewable Energy) 公司, 爱荷华州, 美国 - 室内研磨) 添加至 595g 自来水中, 并且确定干固体 (DS) 水平为 34.71%。分别使用 200g/L 尿素和 1g/L 青霉素的溶液将浆制备为 500ppm 尿素和 3mg/L 青霉素, 并且调节至 pH 4.5。将大约 5g 的制备的浆用移液管移至每个已经在顶部中钻孔的预先称重的 15mL 离心管中。将这些管再次称重, 以确定添加的浆的质量。

[0544] 使 RED STAR™酵母再水合, 其中将 5.5g 酵母放置在 100mL 的 32°C 自来水中持续 30 分钟。当浸泡酵母时, 根据下表所述的量和比率, 用葡糖淀粉酶 (AMG) 和 α-淀粉酶 (AA) 给予至每个浆样品。

[0545] 每个处理包含 6 个重复。使用以下方程式计算酶剂量:

[0546]

$$\text{酶剂量 (ml)} = \frac{\text{最终酶剂量 (AGU/gDS)} \times \text{浆重量 (g)} \times \text{固体含量 (\%DS/100)}}{\text{酶浓度 (AGU/ml)}}$$

[0547] 将水添加至每一样品, 使得酶、水、酵母和酸 (在实验结束的时候添加) 的总添加体积是 275 µL/5g 样品。在每个样品中将再水合酵母给予为 100 µl 的酵母溶液。在 32°C, 将样品放置在水浴中, 持续 88 小时。在每天的早晨和晚上涡旋每个样品, 以确保良好的混合。

[0548] 在发酵的 72 小时和 88 小时, 从每个处理献出 3 个样品用于 HPLC 分析。用 50 µl 的 40% v/v H₂SO₄ 给予献出的样品, 涡旋, 并且在 1462xg 离心持续 10min。通过 0.45µm 针筒式过滤器来过滤上清液, 并且将此直接用于 HPLC 分析。在以下系统上分析 HPLC 样品。

[0549]

HPLC系统	具有化学工作站 (Chem station) 软件的安捷伦 (Agilent) 1100/1200系列 脱气器 四元泵 自动进样器 柱箱/w加热器 折射率检测器 (RI)
柱	伯乐 (Bio-Rad) HPX-87H离子排斥柱, 300 mm x 7.8 mm, 零件号125-0140 伯乐保护柱阳离子H零件号125-0129, 支架零件号125-0131
方法	0.005 M H ₂ SO ₄ 流动相 0.6 ml/min的流速 柱温-65°C RI检测器温度-55°C

[0550] 该方法使用针对糊精 (DP4+)、麦芽三糖、麦芽糖、葡萄糖、果糖、乙酸、乳酸、甘油以及乙醇的校准标准品对分析物进行定量。使用 4 点校准 (包括来源)。

[0551] 表: 宽范围 AMG:AA 蛋白剂量比率研究

[0552]

处理	蛋白剂量 (ug/g DS)	% EtOH 72小时	% EtOH 88小时
65 : 35 PsAMG : AAPE096	75	14.536	14.982
83 : 17 PsAMG : AAPE096	75	14.663	15.067
94 : 6 PsAMG : AAPE096	75	14.590	15.029
100 : 0 (对照) PsAMG : AAPE096	75	6.036	6.463
65 : 35 PsAMG : AAPE096	94	14.843	15.126
83 : 17 PsAMG : AAPE096	94	14.894	15.174
94 : 6 PsAMG : AAPE096	94	14.838	15.177
100 : 0 (对照) PsAMG : AAPE096	94	6.191	6.639
65 : 35 PsAMG : AAPE096	131	14.990	15.231
83 : 17 PsAMG : AAPE096	131	15.070	15.200

[0553]

94 : 6 PsAMG : AAPE096	131	15.067	15.237
100 : 0 (对照) PsAMG : AAPE096	131	6.634	6.943
65 : 35 PsAMG : AAPE096	150	15.130	15.268
83 : 17 PsAMG : AAPE096	150	15.138	15.308
94 : 6 PsAMG : AAPE096	150	15.157	15.326
100 : 0 (对照) PsAMG : AAPE096	150	6.773	7.094

[0554] 表 : 窄范围 AMG:AA 蛋白剂量比率研究 (浆% DS = 34.17%)

[0555]

处理	蛋白剂量 (ug/g DS)	% EtOH 88小时
85 : 15 PsAMG : AAPE096	85	15.057
90 : 10 PsAMG : AAPE096	85	15.060
94 : 6 PsAMG : AAPE096	85	14.983
97 : 3 PsAMG : AAPE096	85	14.964
85 : 15 PsAMG : AAPE096	101	15.085
90 : 10 PsAMG : AAPE096	101	15.100
94 : 6 PsAMG : AAPE096	101	15.064
97 : 3 PsAMG : AAPE096	101	15.125
85 : 15 PsAMG : AAPE096	134	15.244
90 : 10 PsAMG : AAPE096	134	15.106
94 : 6 PsAMG : AAPE096	134	15.159
97 : 3 PsAMG : AAPE096	134	15.164
85 : 15 PsAMG : AAPE096	150	15.132
90 : 10 PsAMG : AAPE096	150	15.144
94 : 6 PsAMG : AAPE096	150	15.140
97 : 3 PsAMG : AAPE096	150	15.241

[0556] 实例 6

[0557] 使用 Ps AMG 和 AAPE096 α -淀粉酶 (采用和不采用添加的纤维素酶 VD) 的生淀粉乙醇生产 - 剂量反应

[0558] 在此实例中, AMG 和 AA 分别恒定地保持在 90:10 蛋白比率, 并且总剂量如下表中所示增加。将纤维素酶 VD 和蛋白酶 Oxa 添加至指示的处理。剂量阐明为 ug 酶蛋白 / 克 DS。

[0559] 表 : 采用和不采用添加的纤维素酶 VD 的情况下, Ps AMG 和 PE 96 的剂量反应

(浆% DS = 35.49%)

[0560]

处理	总AMG + AA剂量 (ug/g DS)	% EtOH 72小时	% EtOH 88小时
Ps AMG + AAPE096	169	15.86	16.16
Ps AMG + AAPE096 + 纤维素酶VD (100 ug)	169	15.92	16.17
Ps AMG + AAPE096	198	15.95	16.15
Ps AMG + AAPE096 + 纤维素酶VD (100 ug)	198	15.98	16.20

[0561] 表:采用和不采用添加的纤维素酶VD和蛋白酶Oxa时的Ps AMG和AAPE096(浆% DS = 34.56%)

[0562]

处理	总AMG + AA剂量 (ug/g DS)	% EtOH 88小时
Ps AMG + PE 96	169	15.24
Ps AMG + PE 96 + 纤维素酶VD (100 ug)	169	15.41
Ps AMG + AAPE096 + 纤维素酶VD (100 ug) + 蛋白酶Oxa (10 ug)	169	15.42

[0563] 实例 7

[0564] 使用 PsAMG、AAPE096 α -淀粉酶,和 Mg 蛋白酶 3 的生淀粉乙醇生产

[0565] 将大约 795g 普通黄玉米(获得自林肯道乙醇(Lincolnway Ethanol)公司;用设置在邦恩(Bunn)咖啡研磨机上的土耳其式磨来进行室内研磨)添加至 1205g 自来水,并且将干固体(DS)水平确定为 34.64%(方法参见下文)。此混合物补充有 3ppm 青霉素和 500ppm 尿素。用 40% H_2SO_4 将浆料调节至 pH 4.5。将大约 5g 的这一浆料添加至 15mL 管。根据表 1,用酶给予每个管,随后给予 100 μ L 的再水合酵母(100mL H_2O 中 5.5g 富酶泰斯(Fermentis)乙醇红酵母,在磁力搅拌下,在 32°C 孵育 30min)。表 2 示出用于这一实验的酶。将水添加至每个管,使得总添加体积(酶+水)达到浆的初始重量的 5.3%。这一体积校正使得实验中的所有管达到相同的总固体百分比,使得乙醇浓度在处理之间直接可比较。

[0566]

	葡萄糖苷酶	剂量	单位	淀粉酶	剂量	单位	AGU/FAU/F	蛋白酶	剂量	单位
1	TrAMG	0.5	AGU/g DS	AAPE096	0.0476	FAU-Fig DS	10.6			
2	PsAMG	0.7	AGU/g DS	AAPE096	0.0141	FAU-Fig DS	49.6			
3	PsAMG	0.85	AGU/g DS	AAPE096	0.0172	FAU-Fig DS	49.6			
4	PsAMG	1	AGU/g DS	AAPE096	0.0202	FAU-Fig DS	49.6			
5	PsAMG	0.7	AGU/g DS	AAPE096	0.0206	FAU-Fig DS	33.6			
6	PsAMG	0.85	AGU/g DS	AAPE096	0.0253	FAU-Fig DS	33.6			
7	PsAMG	1	AGU/g DS	AAPE096	0.0296	FAU-Fig DS	33.6			
8	PsAMG	0.7	AGU/g DS	AAPE096	0.0331	FAU-Fig DS	21.2			
9	PsAMG	0.85	AGU/g DS	AAPE096	0.0402	FAU-Fig DS	21.2			
10	PsAMG	1	AGU/g DS	AAPE096	0.0473	FAU-Fig DS	21.2			
11	PsAMG	0.7	AGU/g DS	AAPE096	0.0141	FAU-Fig DS	49.6	蛋白酶 Oxa	0.005	mg EP/g DS
12	PsAMG	0.85	AGU/g DS	AAPE096	0.0172	FAU-Fig DS	49.6	蛋白酶 Oxa	0.005	mg EP/g DS
13	PsAMG	1	AGU/g DS	AAPE096	0.0202	FAU-Fig DS	49.6	蛋白酶 Oxa	0.005	mg EP/g DS
14	PsAMG	0.7	AGU/g DS	AAPE096	0.0206	FAU-Fig DS	33.6	蛋白酶 Oxa	0.005	mg EP/g DS
15	PsAMG	0.85	AGU/g DS	AAPE096	0.0253	FAU-Fig DS	33.6	蛋白酶 Oxa	0.005	mg EP/g DS
16	PsAMG	1	AGU/g DS	AAPE096	0.0296	FAU-Fig DS	33.6	蛋白酶 Oxa	0.005	mg EP/g DS
17	PsAMG	0.7	AGU/g DS	AAPE096	0.0331	FAU-Fig DS	21.2	蛋白酶 Oxa	0.005	mg EP/g DS
18	PsAMG	0.85	AGU/g DS	AAPE096	0.0402	FAU-Fig DS	21.2	蛋白酶 Oxa	0.005	mg EP/g DS
19	PsAMG	1	AGU/g DS	AAPE096	0.0473	FAU-Fig DS	21.2	蛋白酶 Oxa	0.005	mg EP/g DS
20	PsAMG	0.7	AGU/g DS	AAPE096	0.0141	FAU-Fig DS	49.6	Mg 蛋白酶 3	0.005	mg EP/g DS
21	PsAMG	0.85	AGU/g DS	AAPE096	0.0172	FAU-Fig DS	49.6	Mg 蛋白酶 3	0.005	mg EP/g DS
22	PsAMG	1	AGU/g DS	AAPE096	0.0202	FAU-Fig DS	49.6	Mg 蛋白酶 3	0.005	mg EP/g DS
23	PsAMG	0.7	AGU/g DS	AAPE096	0.0206	FAU-Fig DS	33.6	Mg 蛋白酶 3	0.005	mg EP/g DS
24	PsAMG	0.85	AGU/g DS	AAPE096	0.0253	FAU-Fig DS	33.6	Mg 蛋白酶 3	0.005	mg EP/g DS
25	PsAMG	1	AGU/g DS	AAPE096	0.0296	FAU-Fig DS	33.6	Mg 蛋白酶 3	0.005	mg EP/g DS
26	PsAMG	0.7	AGU/g DS	AAPE096	0.0331	FAU-Fig DS	21.2	Mg 蛋白酶 3	0.005	mg EP/g DS
27	PsAMG	0.85	AGU/g DS	AAPE096	0.0402	FAU-Fig DS	21.2	Mg 蛋白酶 3	0.005	mg EP/g DS
28	PsAMG	1	AGU/g DS	AAPE096	0.0473	FAU-Fig DS	21.2	Mg 蛋白酶 3	0.005	mg EP/g DS

[0567] 表:给予方案

[0568] 根据以下公式,实际酶剂量是基于每个管中玉米浆料的准确重量:

[0569]

$$\text{酶剂量 } (\mu\text{L}) = \frac{\text{最终酶剂量 } (\text{mg/g DS}) \times \text{浆重量 } (\text{g}) \times \text{干固体含量 } (\% \text{DS}) \times 1000}{\text{储备酶浓度 } (\text{mg/mL})}$$

[0570] 在 32°C 孵育管,并且每个处理运行 6 个重复的发酵。在 24、48 和 70 小时涡旋所有管。在 72 小时献出三个样品用于 HPLC 分析,并且在 88 小时也献出 3 个样品。HPLC 制备由以下组成:通过添加 50 μL 的 40% H₂SO₄ 停止反应,在 1462xg 离心 10min,并且通过 0.45 μm 滤器过滤。将样品保存在 4°C。

[0571] HPLC 分析

[0572] HPLC 系统 - 具有化学工作站 (ChemStation) 软件的安捷伦 1100/1200 系列

[0573] 柱 - 伯乐 (Bio-Rad) HPX-87H 离子排斥柱,300mm x 7.8mm,零件号 125-0140

[0574] 伯乐保护柱阳离子 H 零件号 125-0129,支架零件号 125-0131 方法 -0.005M H₂SO₄ 流动相

[0575] 0.6mL/min 的流速

[0576] 柱温 -65°C

[0577] RI 检测器温度 -55°C

[0578] 该方法使用针对 DP4+、DP3、DP2、葡萄糖、果糖、乙酸、乳酸、甘油以及乙醇的校准标准品对分析物进行定量。使用四点校准 (包括来源)。

[0579] 干固体分析

[0580] 将大约 3-5g 玉米浆料的样品放置在预先称重的 A1 盘上,并且将具有样品的盘放入梅特勒 (Mettler) 托利多 (Toledo) HB43-S 卤素水分分析仪 (梅特勒托利多公司, 哥伦布, 俄亥俄州)。在水分天平上的设置如下 - 干燥程序:标准;温度设定点:160°C;关闭模式:自由;时间间隔:30 秒。

[0581] 在 JMP (SAS 公司, 卡里 (Cary), 北卡罗来纳州) 中分析数据。用图基-克雷默诚实显著差异检验 (Tukey-Kramer Honestly Significant Difference test) 来比较处理与对照 ($p < 0.05$)。

[0582]

72 小时 PsAMG/AAPE096 (无蛋白酶)				88 小时 PsAMG/AAPE096 (无蛋白酶)			
AGU 剂量				AGU 剂量			
	49.6	33.6	21.2		49.6	33.6	21.2
0.7	0.81%	0.95%	1.40%	0.7	0.20%	0.26%	0.08%
0.85	1.17%	1.98%	1.59%	0.85	0.92%	-0.02%	0.15%
1	1.75%	1.43%	1.77%	1	0.66%	0.36%	0.23%
72 小时 PsAMG/AAPE096 + 蛋白酶 Oxa				88 小时 PsAMG/AAPE096 + 蛋白酶 Oxa			
AGU 剂量				AGU 剂量			
	49.6	33.6	21.2		49.6	33.6	21.2
0.7	1.35%	1.81%	1.81%	0.7	-0.18%	0.55%	0.14%
0.85	1.54%	1.87%	2.26%	0.85	0.82%	0.16%	0.60%
1	1.92%	2.26%	2.15%	1	0.26%	0.74%	0.37%
72 小时 PsAMG/AAPE096 + Mg 蛋白酶 3				88 小时 PsAMG/AAPE096 + Mg 蛋白酶 3			
AGU 剂量				AGU 剂量			
	49.6	33.6	21.2		49.6	33.6	21.2
0.7	1.81%	1.39%	1.77%	0.7	1.03%	0.62%	1.59%
0.85	2.29%	2.27%	2.54%	0.85	1.00%	1.74%	0.64%
1	2.35%	1.98%	2.45%	1	0.46%	0.86%	1.28%

[0583] 表:在 72 和 88 小时的发酵后,与对照样品 (0.5AGU/g DS TcAMG/AAPE096) 相比,每种蛋白酶处理所产生乙醇的变化百分比。

[0584] 结论

[0585] 蛋白酶有助于提高发酵动力学和最终总乙醇产率。与 TcAMG/PE096、PsAMG/AAPE096 (无蛋白酶) 和 PsAMG/AAPE096+ 蛋白酶 Oxa 相比, Mg 蛋白酶 3 显著改进了乙醇生产和更快的发酵速率。

[0586] 在以下编号的段落中进一步描述本发明:

[0587] 1. 一种酶组合物,该酶组合物包括葡糖淀粉酶和 α -淀粉酶、以及任选地蛋白酶。

[0588] 2. 如段落 1 所述的酶组合物,该酶组合物包括

[0589] i) 葡糖淀粉酶;

[0590] ii) α -淀粉酶;

[0591] iii) 纤维素分解酶组合物;

[0592] iv) 任选地蛋白酶。

[0593] 3. 如段落 2 所述的酶组合物,其中该纤维素分解酶组合物源自木霉属的菌株,例如里氏木霉;腐质霉属的菌株,例如特异腐质霉;金孢子菌属的菌株,例如卢克诺文思金孢子菌;或青霉属的菌株,例如斜卧青霉。

[0594] 4. 如段落 2 或 3 所述的酶组合物,其中该纤维素分解酶组合物源自里氏木霉的菌

株,并且里氏木霉包括 β -葡糖苷酶、纤维二糖水解酶、和内切葡聚糖酶。

[0595] 5. 如段落 1-4 中任一项所述的酶组合物,其中该纤维素分解酶组合物包括一种或多种选自下组的多肽,该组由以下各项组成:

[0596] - β -葡糖苷酶;

[0597] - 纤维二糖水解酶 I;

[0598] - 纤维二糖水解酶 II;

[0599] 或它们的混合物。

[0600] 6. 如段落 1-5 中任一项所述的酶组合物,其中该纤维素分解酶组合物进一步包括 GH61 多肽。

[0601] 7. 如段落 1-6 中任一项所述的酶组合物,其中该纤维素分解酶组合物包括 β -葡糖苷酶,优选源自曲霉属的菌株例如米曲霉的 β -葡糖苷酶,例如是 WO 2002/095014 中披露的 β -葡糖苷酶或 WO 2008/057637 中披露的具有 β -葡糖苷酶活性的融合蛋白,或烟曲霉,例如在 WO 2005/047499 中的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:6 中披露的 β -葡糖苷酶,或 WO 2012/044915 中披露的烟曲霉 β -葡糖苷酶变体;或该 β -葡糖苷酶源自青霉属菌株的菌株,例如在 WO 2007/019442 中披露的巴西青霉的菌株,或木霉属的菌株,例如里氏木霉的菌株。

[0602] 8. 如段落 1-7 中任一项所述的酶组合物,其中该 β -葡糖苷酶来自曲霉属的菌株例如烟曲霉菌株,例如是烟曲霉 β -葡糖苷酶(在此的 SEQ ID NO:8)、或其变体,该变体包括一个或多个选自下组的取代,该组由以下各项组成:L89M、G91L、F100D、I140V、I186V、S283G、N456E 以及 F512Y;例如其变体,具有以下取代:

[0603] -F100D+S283G+N456E+F512Y;

[0604] -L89M+G91L+I186V+I140V;

[0605] -I186V+L89M+G91L+I140V+F100D+S283G+N456E+F512Y。

[0606] 9. 如段落 1-8 中任一项所述的酶组合物,其中该亲本 β -葡糖苷酶与在此的 SEQ ID NO:8 的成熟多肽具有至少 60%的一致性,例如至少 70%、例如至少 80%、例如至少 90%、例如至少 95%、例如至少 96%、例如至少 97%、例如至少 98%、例如至少 99%的一致性。

[0607] 10. 如段落 1-9 中任一项所述的酶组合物,其中该 β -葡糖苷酶变体与在此的 SEQ ID NO:8 的成熟多肽具有至少 60%的一致性,例如至少 70%、例如至少 80%、例如至少 90%、例如至少 95%、例如至少 96%、例如至少 97%、例如至少 98%、例如至少 99%、但是小于 100%的一致性。

[0608] 11. 如段落 1-19 中任一项所述的酶组合物,其中该纤维素分解酶组合物包括 GH61 多肽,例如源自嗜热子囊菌属如橙色嗜热子囊菌的菌株的 GH61 多肽,例如在 WO 2005/074656 中描述为 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:9 的 GH61 多肽;或源自梭孢壳属例如土生梭孢壳菌株的 GH61 多肽,例如在 WO 2005/074647 中描述为 SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:8 的 GH61 多肽;或源自曲霉属的菌株例如烟曲霉菌株的 GH61 多肽,例如在 WO 2010/138754 中描述为 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2 的 GH61 多肽;或源自青霉属的菌株例如埃默森青霉菌菌株的 GH61 多肽,例如在 WO 2011/041397 或在此的 SEQ ID NO:10 中披露的 GH61 多肽。

[0609] 12. 如段落 11 所述的酶组合物,其中该 GH61 多肽,例如青霉属 GH61 多肽选自下组,该组由以下各项组成:

[0610] (i) 包括在此的 SEQ ID NO:10 的成熟多肽的 GH61 多肽;

[0611] (ii) 包括以下氨基酸序列的 GH61 多肽,该氨基酸序列与在此的 SEQ ID NO:10 的成熟多肽具有至少 60%,例如至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%的一致性。

[0612] 13. 如段落 1-12 中任一项所述的酶组合物,其中该纤维素分解酶组合物包括纤维二糖水解酶 I (CBH I),例如源自曲霉属的菌株如烟曲霉菌株的纤维二糖水解酶 I,例如披露于 WO 2011/057140 中的 SEQ ID NO:6 或在此的 SEQ ID NO:6 中的 Cel17a CBH I,或源自木霉属的菌株,例如里氏木霉的菌株。

[0613] 14. 如段落 1-13 中任一项所述的酶组合物,其中该纤维二糖水解酶 I,例如烟曲霉纤维二糖水解酶 I 选自下组,该组由以下各项组成:

[0614] (i) 包括在此的 SEQ ID NO:6 的成熟多肽的纤维二糖水解酶 I;

[0615] (ii) 包括以下氨基酸序列纤维二糖水解酶 I,该氨基酸序列与在此的 SEQ ID NO:6 的成熟多肽具有至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的一致性。

[0616] 15. 如段落 1-14 中任一项所述的酶组合物,其中该纤维素分解酶组合物包括纤维二糖水解酶 II (CBH II),例如源自曲霉属的菌株例如烟曲霉菌株的 CBH II;例如披露为在此的 SEQ ID NO:7 的 CBH II,或源自木霉属的菌株,例如里氏木霉,或梭孢壳属的菌株,例如土生梭孢壳的菌株,例如是来自土生梭孢壳的纤维二糖水解酶 II CEL6A。

[0617] 16. 如段落 15 所述的酶组合物,其中该纤维二糖水解酶 II,例如烟曲霉纤维二糖水解酶 II 选自下组,该组由以下各项组成:

[0618] (i) 包括在此的 SEQ ID NO:7 的成熟多肽的纤维二糖水解酶 II;

[0619] (ii) 包括以下氨基酸序列的纤维二糖水解酶 II,该氨基酸序列与在此的 SEQ ID NO:7 的成熟多肽具有至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%的一致性。

[0620] 17. 如段落 1-16 中任一项所述的酶组合物,其中该纤维素分解酶组合物包括具有纤维素分解增强活性的 GH61 多肽和 β -葡糖苷酶。

[0621] 18. 如段落 1-17 中任一项所述的酶组合物,其中该纤维素分解酶组合物包括具有纤维素分解增强活性的 GH61 多肽和 β -葡糖苷酶。

[0622] 19. 如段落 1-18 中任一项所述的酶组合物,其中该纤维素分解酶组合物包括具有纤维素分解增强活性的 GH61 多肽、 β -葡糖苷酶、和 CBHI。

[0623] 20. 如段落 1-19 中任一项所述的酶组合物,其中该纤维素分解酶组合物包括具有纤维素分解增强活性的 GH61 多肽、 β -葡糖苷酶、CBHI、和 CBHII。

[0624] 21. 如段落 1-20 中任一项所述的酶组合物,其中该纤维素分解酶组合物是里氏木霉纤维素分解组合物,该里氏木霉纤维素分解组合物进一步包括橙色嗜热子囊菌 GH61A 多

肽 (WO 2005/074656 中的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:9), 和米曲霉 β - 葡糖苷酶融合蛋白 (WO 2008/057637)。

[0625] 22. 如段落 1-21 中任一项所述的酶组合物, 其中该纤维素分解酶组合物是里氏木霉纤维素分解组合物, 该里氏木霉纤维素分解组合物进一步包括具有纤维素分解增强活性的橙色嗜热子囊菌 GH61A 多肽 (WO 2005/074656 中的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:9)、以及烟曲霉 β - 葡糖苷酶 (WO 2005/047499 的 SEQ ID NO:2) 或在此的 SEQ ID NO:8。

[0626] 23. 如段落 1-22 中任一项所述的酶组合物, 其中该纤维素分解酶组合物是里氏木霉纤维素分解组合物, 该里氏木霉纤维素分解组合物进一步包括 WO 2011/041397 中披露的埃默森青霉菌 GH61A 多肽 (在此的 SEQ ID NO:10)、和烟曲霉 β - 葡糖苷酶 (WO 2005/047499 的 SEQ ID NO:2) 或在此的 SEQ ID NO:8 或其变体 (该变体具有以下取代: F100D、S283G、N456E、F512Y) 以及任选地烟曲霉 CBH1 (披露为 WO 2011/057140 中的 SEQ ID NO:6 和在此的 SEQ ID NO:6)、以及烟曲霉 CBH II (披露为 WO 2011/057140 中的 SEQ ID NO:18 和在此的 SEQ ID NO:7)。

[0627] 24. 如段落 1-23 中任一项所述的酶组合物, 其中该纤维素分解酶组合物包括以下组分中的一种或多种:

[0628] (i) 烟曲霉纤维二糖水解酶 I;

[0629] (ii) 烟曲霉纤维二糖水解酶 II;

[0630] (iii) 烟曲霉 β - 葡糖苷酶或其变体。

[0631] 25. 如段落 24 所述的酶组合物, 其中该烟曲霉 β - 葡糖苷酶 (在此的 SEQ ID NO:8) 包括选自下组的一个或多个取代, 该组由以下各项组成: L89M、G91L、F100D、I140V、I186V、S283G、N456E、和 F512Y; 例如其变体, 具有以下取代:

[0632] -F100D+S283G+N456E+F512Y;

[0633] -L89M+G91L+I186V+I140V;

[0634] -I186V+L89M+G91L+I140V+F100D+S283G+N456E+F512Y。

[0635] 26. 如段落 24 或 25 所述的酶组合物, 该酶组合物进一步包括在此的 SEQ ID NO:10 中示出的青霉属 GH61 多肽; 或包括以下氨基酸序列的 GH61 多肽, 该氨基酸序列与在此的 SEQ ID NO:10 的成熟多肽具有至少 60%, 例如至少 70%, 例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99% 的一致性。

[0636] 27. 如段落 1-25 中任一项所述的酶组合物, 其中该葡糖淀粉酶源自栓菌属的菌株, 例如瓣环栓菌; 或厚孢孔菌属, 例如纸质厚孢孔菌; 或白桩菇属, 例如大白桩菇。

[0637] 28. 如段落 1-27 中任一项所述的酶组合物, 其中该葡糖淀粉酶, 例如瓣环栓菌葡糖淀粉酶选自下组, 该组由以下各项组成:

[0638] (i) 包括在此的 SEQ ID NO:12 的成熟多肽的葡糖淀粉酶;

[0639] (ii) 包括以下氨基酸序列的葡糖淀粉酶, 该氨基酸序列与在此的 SEQ ID NO:12 的成熟多肽具有至少 60%、至少 70%, 例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99% 的一致性。

[0640] 29. 如段落 1-28 中任一项所述的酶组合物, 其中该葡糖淀粉酶来自曲霉属的菌

株,优选黑曲霉、泡盛曲霉、或米曲霉;或木霉属的菌株,优选里氏木霉;或篮状菌属的菌株,优选埃默森篮状菌。

[0641] 30. 如段落 1-29 中任一项所述的酶组合物,其中该葡糖淀粉酶,例如埃默森篮状菌葡糖淀粉酶选自下组,该组由以下各项组成:

[0642] (i) 包括在此的 SEQ ID NO:11 的成熟多肽的葡糖淀粉酶;

[0643] (ii) 包括以下氨基酸序列的葡糖淀粉酶,该氨基酸序列与在此的 SEQ ID NO:11 的成熟多肽具有至少 60%、至少 70%、例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99% 的一致性。

[0644] 31. 如段落 32 所述的酶组合物,其中该葡糖淀粉酶源自青霉属的菌株,例如草酸青霉菌的菌株。

[0645] 32. 如段落 1-32 中任一项所述的酶组合物,其中该葡糖淀粉酶,例如草酸青霉菌葡糖淀粉酶选自下组,该组由以下各项组成:

[0646] (i) 包括在此的 SEQ ID NO:16 的成熟多肽的葡糖淀粉酶;

[0647] (ii) 包括以下氨基酸序列的葡糖淀粉酶,该氨基酸序列与在此的 SEQ ID NO:16 的成熟多肽具有至少 60%、至少 70%、例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99% 的一致性。

[0648] 33. 如段落 1-32 中任一项所述的酶组合物,其中该葡糖淀粉酶源自粘褶菌属的菌株,例如篱边粘褶菌的菌株,例如是 WO 2011/068803 中的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:4 中示出的葡糖淀粉酶。

[0649] 34. 如段落 1-33 中任一项所述的酶组合物,其中该葡糖淀粉酶,例如篱边粘褶菌葡糖淀粉酶选自下组,该组由以下各项组成:

[0650] (i) 包括在此的 SEQ ID NO:4 的成熟多肽的葡糖淀粉酶;

[0651] (ii) 包括以下氨基酸序列的葡糖淀粉酶,该氨基酸序列与 WO 2011/068803 中的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:4 的成熟多肽具有至少 60%、至少 70%、例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99% 的一致性。

[0652] 35. 如段落 1-34 中任一项所述的酶组合物,其中该葡糖淀粉酶源自粘褶菌属的菌株,例如是源自密粘褶菌的菌株的葡糖淀粉酶,例如 SEQ ID NO:18 中示出的葡糖淀粉酶。

[0653] 36. 如段落 1-35 中任一项所述的酶组合物,其中该葡糖淀粉酶选自下组,该组由以下各项组成:

[0654] (i) 包括在此的 SEQ ID NO:18 的成熟多肽的葡糖淀粉酶;

[0655] (ii) 包括以下氨基酸序列的葡糖淀粉酶,该氨基酸序列与在此的 SEQ ID NO:18 的成熟多肽具有至少 60%、至少 70%、例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99% 的一致性。

[0656] 37. 如段落 36 所述的酶组合物,其中该葡糖淀粉酶是在此的 SEQ ID NO:18 中示出的优选具有以下取代中的一个或多个的密粘褶菌葡糖淀粉酶:S95P、A121P,尤其是

S95P+A21P。

[0657] 38. 如段落 1-37 所述的酶组合物,包括在此的 SEQ ID NO:18 中示出的优选具有以下取代中的一个或多个的密粘褶菌葡糖淀粉酶:S95P、A121P,尤其是 S95P+A121P,和源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域(SBD)的微小根毛霉的 α -淀粉酶,该 α -淀粉酶优选是披露为 WO 2006/069290 中的表 5 中的 V039 或在此的 SEQ ID NO:13 的 α -淀粉酶,优选是具有以下取代中的一个或多个的 α -淀粉酶:G128D、D143N,尤其是 G128D+D143N。

[0658] 39. 如段落 1-38 所述的酶组合物,其中该葡糖淀粉酶源自密孔菌属,优选血红密孔菌,尤其是在此的 SEQ ID NO:17 中示出的葡糖淀粉酶。

[0659] 40. 如段落 1-39 所述的酶组合物,其中该酶组合物包括在此的 SEQ ID NO:17 中示出的血红密孔菌葡糖淀粉酶,和源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域(SBD)的微小根毛霉的 α -淀粉酶,该 α -淀粉酶优选是披露为 WO 2006/069290 中的表 5 中的 V039 或在此的 SEQ ID NO:13 的 α -淀粉酶,优选是具有以下取代中的一个或多个的 α -淀粉酶:G128D、D143N,尤其是 G128D+D143N。

[0660] 41. 如段落 1-40 中任一项所述的酶组合物,其中该葡糖淀粉酶选自下组,该组由以下各项组成:

[0661] (i) 包括在此的 SEQ ID NO:17 的成熟多肽的葡糖淀粉酶;

[0662] (ii) 包括以下氨基酸序列的葡糖淀粉酶,该氨基酸序列与在此的 SEQ ID NO:17 的成熟多肽具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%的一致性。

[0663] 42. 如段落 1-41 中任一项所述的酶组合物,该酶组合物进一步包括普鲁兰酶,例如源自芽孢杆菌属的普鲁兰酶,例如在此的 SEQ ID NO:15 中示出的普鲁兰酶。

[0664] 43. 如段落 42 所述的酶组合物,其中该普鲁兰酶,例如芽孢杆菌属普鲁兰酶选自下组,该组由以下各项组成:

[0665] (i) 包括在此的 SEQ ID NO:15 的成熟多肽的普鲁兰酶;

[0666] (ii) 包括以下氨基酸序列的普鲁兰酶,该氨基酸序列与在此的 SEQ ID NO:15 的成熟多肽具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%的一致性。

[0667] 44. 如段落 42 或 43 所述的酶组合物,该酶组合物包括普鲁兰酶例如脱支芽孢杆菌普鲁兰酶,埃默森篮状菌葡糖淀粉酶和 / 或篱边粘褶菌葡糖淀粉酶。

[0668] 45. 如段落 1-44 中任一项所述的酶组合物,其中该 α -淀粉酶具有真菌的或细菌的来源。

[0669] 46. 如段落 1-45 中任一项所述的酶组合物,其中该 α -淀粉酶源自根毛霉属的菌株,优选微小根毛霉的菌株,例如是 WO 2013/006756 的 SEQ ID NO:3 中示出的 α -淀粉酶,或源自亚灰树花菌属,优选大型亚灰树花菌的菌株。

[0670] 47. 如段落 1-46 中任一项所述的酶组合物,其中该 α -淀粉酶源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域(SBD)的微小根毛霉,例如是在此的 SEQ ID NO:13 中示出

的 α -淀粉酶,或选自下组的 α -淀粉酶,该组由以下各项组成:

[0671] (i) 包括在此的 SEQ ID NO:13 的成熟多肽的 α -淀粉酶;

[0672] (ii) 包括以下氨基酸序列的葡糖淀粉酶,该氨基酸序列与在此的 SEQ ID NO:13 的成熟多肽具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99% 的一致性。

[0673] 48. 如段落 45-48 中任一项所述的酶组合物,其中该 α -淀粉酶是在 SEQ ID NO:13 中示出的 α -淀粉酶的变体,该变体具有以下取代或取代组合中的至少一个:D165M;Y141W;Y141R;K136F;K192R;P224A;P224R;S123H+Y141W;G20S+Y141W;A76G+Y141W;G128D+Y141W;G128D+D143N;P219C+Y141W;N142D+D143N;Y141W+K192R;Y141W+D143N;Y141W+N383R;Y141W+P219C+A265C;Y141W+N142D+D143N;Y141W+K192R+V410A;G128D+Y141W+D143N;Y141W+D143N+P219C;Y141W+D143N+K192R;G128D+D143N+K192R;Y141W+D143N+K192R+P219C;G128D+Y141W+D143N+K192R;或 G128D+Y141W+D143N+K192R+P219C(使用 SEQ ID NO:13 进行编号)。

[0674] 49. 如段落 1-48 中任一项所述的酶组合物,其中该 α -淀粉酶源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域(SBD)的微小根毛霉,优选披露为在此的 SEQ ID NO:13,优选具有以下取代中的一个或多个:G128D、D143N,优选 G128D+D143N(使用 SEQ ID NO:13 进行编号)。

[0675] 50. 如段落 1-49 中任一项所述的酶组合物,其中该蛋白酶具有真菌来源。

[0676] 51. 如段落 1-50 中任一项所述的酶组合物,其中该蛋白酶是金属蛋白酶,该金属蛋白酶源自嗜热子囊菌属的菌株、优选橙色嗜热子囊菌的菌株(尤其是橙色嗜热子囊菌 CGMCC 编号 0670),例如是披露为 WO 2003/048353 中披露的 SEQ ID NO:2 的成熟部分或在此的 SEQ ID NO:3 的成熟多肽的金属蛋白酶。

[0677] 52. 如段落 1-51 中任一项所述的酶组合物,其中该蛋白酶,例如橙色嗜热子囊菌蛋白酶选自下组,该组由以下各项组成:

[0678] (i) 包括在此的 SEQ ID NO:3 的成熟多肽的蛋白酶;

[0679] (ii) 包括以下氨基酸序列的蛋白酶,该氨基酸序列与在此的 SEQ ID NO:3 的成熟多肽具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99% 的一致性。

[0680] 53. 如段落 1-52 中任一项所述的酶组合物,其中该蛋白酶具有细菌来源。

[0681] 54. 如段落 1-53 中任一项所述的酶组合物,其中该蛋白酶源自火球菌属的菌株,例如强烈火球菌的菌株,例如是 US 6,358,726 中的 SEQ ID NO:1 或在此的 SEQ ID NO:5 中示出的蛋白酶。

[0682] 55. 如段落 1-54 中任一项所述的酶组合物,其中该蛋白酶,例如强烈火球菌蛋白酶选自下组,该组由以下各项组成:

[0683] (i) 包括在此的 SEQ ID NO:5 的成熟多肽的蛋白酶;

[0684] (ii) 包括以下氨基酸序列的蛋白酶,该氨基酸序列与在此的 SEQ ID NO:5 的成熟多肽具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、

至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99% 的一致性。

[0685] 56. 如段落 1-55 中任一项所述的酶组合物,其中该蛋白酶源自大型亚灰树花菌,例如示出为在此的 SEQ ID NO:19 和 WO 2014/037438 中的 SEQ ID NO:5 的大型亚灰树花菌蛋白酶 3。

[0686] 57. 如段落 1-56 中任一项所述的酶组合物,其中该蛋白酶,例如大型亚灰树花菌蛋白酶 3 选自下组,该组由以下各项组成:

[0687] (i) 包括在此的 SEQ ID NO:19 的成熟多肽的蛋白酶;

[0688] (ii) 包括以下氨基酸序列的蛋白酶,该氨基酸序列与在此的 SEQ ID NO:19 的成熟多肽具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99% 的一致性。

[0689] 58. 如段落 1-57 中任一项所述的酶组合物,其中该蛋白酶源自大型亚灰树花菌,例如是 WO 2014/037438 中的实例 2 中涉及的并且示出为在此的 SEQ ID NO:20 的大型亚灰树花菌蛋白酶 3(肽酶家族 S53 蛋白酶)。

[0690] 59. 如段落 1-58 中任一项所述的酶组合物,其中该蛋白酶,例如大型亚灰树花菌蛋白酶 3 选自下组,该组由以下各项组成:

[0691] (i) 包括在此的 SEQ ID NO:20 的成熟多肽的蛋白酶;

[0692] (ii) 包括以下氨基酸序列的蛋白酶,该氨基酸序列与在此的 SEQ ID NO:20 的成熟多肽具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99% 的一致性。

[0693] 60. 如段落 1-59 中任一项所述的酶组合物,其中该组合物包括

[0694] i) 真菌葡糖淀粉酶;

[0695] ii) 真菌 α -淀粉酶;

[0696] iii) 源自里氏木霉的菌株的纤维素分解酶组合物,该纤维素分解酶组合物进一步包括 GH61 多肽、 β -葡糖苷酶、CBH I 和 CBH II;

[0697] iv) 任选地蛋白酶。

[0698] 61. 如段落 1-60 中任一项所述的酶组合物,其中该组合物包括

[0699] i) 瓣环栓菌葡糖淀粉酶;

[0700] ii) 微小根毛霉 α -淀粉酶、或其变体;

[0701] iii) 源自里氏木霉的菌株的纤维素分解酶组合物,该纤维素分解酶组合物进一步包括埃默森青霉菌 GH61A 多肽、具有以下取代即 F100D、S283G、N456E、F512Y 的烟曲霉 β -葡糖苷酶、以及任选地烟曲霉 CBH I 和烟曲霉 CBH II;任选地

[0702] iv) 来自橙色嗜热子囊菌的蛋白酶、或其变体。

[0703] 62. 如段落 1-61 中任一项所述的酶组合物,其中该组合物包括

[0704] i) 瓣环栓菌葡糖淀粉酶;

[0705] ii) 微小根毛霉 α -淀粉酶、或其变体,

[0706] iii) 源自里氏木霉的菌株的纤维素分解酶组合物,该纤维素分解组合物进一步包

括埃默森青霉菌 GH61A 多肽、具有以下取代即 F100D、S283G、N456E、F512Y 的烟曲霉 β -葡糖苷酶、以及任选地烟曲霉 CBH I 和烟曲霉 CBH II；

[0707] 任选地 iv) 来自强烈火球菌的蛋白酶。

[0708] 63. 如段落 1-62 中任一项所述的酶组合物, 该酶组合物进一步包括选自下组的酶, 该组由以下各项构成: 海藻糖酶和果胶酶, 例如果胶裂解酶或多聚半乳糖醛酸酶。

[0709] 64. 如段落 63 所述的酶组合物, 其中该海藻糖酶具有真菌来源, 例如源自木霉属的菌株, 例如里氏木霉, 例如是在此的 SEQ ID NO:14 中示出的海藻糖酶。

[0710] 65. 如段落 63 或 64 所述的酶组合物, 其中该海藻糖酶, 例如里氏木霉海藻糖酶选自下组, 该组由以下各项组成:

[0711] (i) 包括在此的 SEQ ID NO:14 的成熟多肽的海藻糖酶;

[0712] (ii) 包括以下氨基酸序列的海藻糖酶, 该氨基酸序列与在此的 SEQ ID NO:14 的成熟多肽具有至少 60%、至少 70%, 例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99% 的一致性。

[0713] 66. 一种从含淀粉材料生产发酵产物的工艺, 该工艺包括:

[0714] (i) 在低于初始糊化温度的温度下使含淀粉材料糖化; 并且

[0715] (ii) 使用发酵生物进行发酵;

[0716] 其中在以下酶的存在下进行糖化和 / 或发酵: 葡糖淀粉酶和 α -淀粉酶; 以及任选地蛋白酶。

[0717] 67. 如段落 66 所述的工艺, 其中该葡糖淀粉酶是粘褶菌属葡糖淀粉酶, 优选是密粘褶菌葡糖淀粉酶。

[0718] 68. 如段落 66 或 67 中任一项所述的工艺, 其中该葡糖淀粉酶是 SEQ ID NO:18 中示出的密粘褶菌葡糖淀粉酶, 或与在此的 SEQ ID NO:18 具有至少 60%、至少 70%, 例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99% 一致性的葡糖淀粉酶。

[0719] 69. 如段落 66-68 中任一项所述的工艺, 其中该葡糖淀粉酶是 SEQ ID NO:18 中示出的具有以下取代之之一的密粘褶菌葡糖淀粉酶: V59A; S95P; A121P; T119W; S95P+A121P; V59A+S95P; S95P+T119W; V59A+S95P+A121P; 或 S95P+T119W+A121P, 尤其是 S95P+A121P。

[0720] 70. 如段落 66-69 中任一项所述的工艺, 其中该 α -淀粉酶源自优选具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域 (SBD) 的微小根毛霉, 优选是披露为 WO 2006/069290 的表 5 中的 V039 或在此的 SEQ ID NO:13 的 α -淀粉酶。

[0721] 71. 如段落 66-70 中任一项所述的工艺, 其中该 α -淀粉酶源自微小根毛霉。

[0722] 72. 如段落 66-71 中任一项所述的工艺, 其中该葡糖淀粉酶选自下组, 该组由以下各项组成:

[0723] (i) 包括在此的 SEQ ID NO:18 的成熟多肽的葡糖淀粉酶;

[0724] (ii) 包括以下氨基酸序列的葡糖淀粉酶, 该氨基酸序列与在此的 SEQ ID NO:18 的成熟多肽具有至少 60%、至少 70%, 例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99% 的一致性。

[0725] 73. 如段落 66-72 中任一项所述的工艺,其中该 α -淀粉酶是具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域(SBD)的微小根毛霉 α -淀粉酶,优选是具有以下取代或取代组合中的至少一个的 α -淀粉酶:D165M;Y141W;Y141R;K136F;K192R;P224A;P224R;S123H+Y141W;G20S+Y141W;A76G+Y141W;G128D+Y141W;G128D+D143N;P219C+Y141W;N142D+D143N;Y141W+K192R;Y141W+D143N;Y141W+N383R;Y141W+P219C+A265C;Y141W+N142D+D143N;Y141W+K192R+V410A;G128D+Y141W+D143N;Y141W+D143N+P219C;Y141W+D143N+K192R;G128D+D143N+K192R;Y141W+D143N+K192R+P219C;G128D+Y141W+D143N+K192R;或G128D+Y141W+D143N+K192R+P219C,尤其是G128D+D143N(使用SEQ ID NO:13进行编号)。

[0726] 74. 如段落 66-73 中任一项所述的工艺,其中该葡糖淀粉酶是在此的SEQ ID NO:18中示出的具有以下取代之密的粘褶菌葡糖淀粉酶:S95P+A121P,并且该 α -淀粉酶是具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域(SBD)的微小根毛霉 α -淀粉酶,优选是具有以下取代的 α -淀粉酶:G128D+D143N(使用SEQ ID NO:13进行编号)。

[0727] 75. 如段落 66-74 中任一项所述的工艺,其中该葡糖淀粉酶是在此的SEQ ID NO:17中示出的血红密孔菌葡糖淀粉酶。

[0728] 76. 如段落 66-75 中任一项所述的工艺,其中该葡糖淀粉酶选自下组,该组由以下各项组成:

[0729] (i) 包括在此的SEQ ID NO:17的成熟多肽的葡糖淀粉酶;

[0730] (ii) 包括以下氨基酸序列的葡糖淀粉酶,该氨基酸序列与在此的SEQ ID NO:17的成熟多肽具有至少60%、至少70%,例如至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%的一致性。

[0731] 77. 如段落 66-76 中任一项所述的工艺,其中该葡糖淀粉酶是在此的SEQ ID NO:17中示出的血红密孔菌葡糖淀粉酶,或与在此的SEQ ID NO:17具有至少60%、至少70%,例如至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%一致性的葡糖淀粉酶,并且该 α -淀粉酶是具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域(SBD)的微小根毛霉 α -淀粉酶,优选是披露为WO 2006/069290的表5中的V039或在此的SEQ ID NO:13中示出的 α -淀粉酶,或是与在此的SEQ ID NO:13具有至少60%、至少70%,例如至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%一致性的 α -淀粉酶,优选是具有以下取代中的一个或多个的 α -淀粉酶:G128D、D143N,尤其是G128D+D143N。

[0732] 78. 如段落 66-77 中任一项所述的工艺,其中葡糖淀粉酶和 α -淀粉酶之间的比率是在99:1与1:2之间,例如在98:2与1:1之间,例如在97:3与2:1之间,例如在96:4与3:1之间,例如97:3、96:4、95:5、94:6、93:7、90:10、85:15、83:17或65:35(mg EP葡糖淀粉酶:mg EP α -淀粉酶)。

[0733] 79. 如段落 66-78 中任一项所述的工艺,其中添加的葡糖淀粉酶和 α -淀粉酶的总剂量是从10-1,000 μ g/g DS,例如从50-500 μ g/g DS,例如75-250 μ g/g DS。

[0734] 76. 如段落 66-75 中任一项所述的工艺,其中添加的纤维素分解酶组合物的总剂

量是从 10–500 $\mu\text{g/g DS}$, 例如从 20–400 $\mu\text{g/g DS}$, 例如 20–300 $\mu\text{g/g DS}$ 。

[0735] 77. 如段落 66–77 中任一项所述的工艺, 其中添加的蛋白酶的剂量是从 1–200 $\mu\text{g/g DS}$, 例如从 2–100 $\mu\text{g/g DS}$, 例如 3–50 $\mu\text{g/g DS}$ 。

[0736] 78. 如段落 66–77 中任一项所述的工艺, 其中该蛋白酶源自大型亚灰树花菌, 例如示出为在此的 SEQ ID NO:19 和 WO 2014/037438 中的 SEQ ID NO:5 的大型亚灰树花菌蛋白酶 3。

[0737] 79. 如段落 66–78 中任一项所述的工艺, 其中该蛋白酶, 例如大型亚灰树花菌蛋白酶 3 选自下组, 该组由以下各项组成:

[0738] (i) 包括在此的 SEQ ID NO:19 的成熟多肽的蛋白酶;

[0739] (ii) 包括以下氨基酸序列的蛋白酶, 该氨基酸序列与在此的 SEQ ID NO:19 的成熟多肽具有至少 60%、至少 70%、例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99% 的一致性。

[0740] 80. 如段落 66–79 中任一项所述的工艺, 其中该蛋白酶源自大型亚灰树花菌, 例如 WO 2014/037438 中的实例 2 中涉及的并且示出为在此的 SEQ ID NO:20 的大型亚灰树花菌蛋白酶 3 (肽酶家族 S53 蛋白酶)。

[0741] 81. 如段落 66–80 中任一项所述的工艺, 其中该蛋白酶, 例如大型亚灰树花菌蛋白酶 3 选自下组, 该组由以下各项组成:

[0742] (i) 包括在此的 SEQ ID NO:20 的成熟多肽的蛋白酶;

[0743] (ii) 包括以下氨基酸序列的蛋白酶, 该氨基酸序列与在此的 SEQ ID NO:20 的成熟多肽具有至少 60%、至少 70%、例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99% 的一致性。

[0744] 82. 如段落 66–81 中任一项所述的生产工艺, 包括:

[0745] (a) 在低于初始糊化温度的温度下使含淀粉材料糖化; 并且

[0746] (b) 使用发酵生物进行发酵;

[0747] 其中在以下酶的存在下进行糖化和 / 或发酵:

[0748] i) 葡糖淀粉酶;

[0749] ii) α -淀粉酶;

[0750] iii) 纤维素分解酶组合物;

[0751] 任选地 iv) 蛋白酶。

[0752] 83. 如段落 66–82 中任一项所述的工艺, 其中如段落 1–81 中任一项所述的酶组合物是在糖化和 / 或发酵期间添加的或存在的。

[0753] 84. 如段落 66–83 中任一项所述的工艺, 其中糖化和发酵是分开地或同时地进行 (即作为单步骤工艺或无蒸煮工艺)。

[0754] 85. 如段落 66–85 中任一项所述的工艺, 其中在发酵后回收发酵产物, 例如乙醇。

[0755] 86. 如段落 66–85 中任一项所述的工艺, 其中该含淀粉材料是选自以下项的植物材料: 玉米 (玉蜀黍)、玉米芯、小麦、大麦、黑麦、买罗高粱、西米、木薯、木薯粉、高粱、水稻、豌豆、豆类、甘薯、或它们的混合物, 优选玉米。

- [0756] 87. 如段落 66-86 中任一项所述的工艺,其中该含淀粉材料是颗粒状淀粉。
- [0757] 88. 如段落 66-87 中任一项所述的工艺,其中该工艺是在 3 和 7 之间、优选从 3 至 6、或更优选从 3.5 至 5.0 的范围内的 pH 下进行的。
- [0758] 89. 如段落 66-88 中任一项所述的工艺,其中该干固体含量 (DS) 是在从 10wt.-% -55wt.-% (DS)、优选 25wt.-% -45wt.-%、更优选 30% -40% 的含淀粉材料的范围内。
- [0759] 90. 如段落 66-89 中任一项所述的工艺,其中在糖化和发酵期间,该糖浓度保持在低于约 6wt.-%、优选 3wt.-% 的水平,尤其是低于 0.25wt.-%。
- [0760] 91. 如段落 66-90 中任一项所述的工艺,其中在步骤 (a) 之前制备一种包含具有减少的粒度和水的含淀粉材料的浆料。
- [0761] 92. 如段落 66-91 中任一项所述的工艺,其中通过优选研磨减小含淀粉材料的粒度使得至少 50% 的含淀粉材料具有 0.1-0.5mm 的粒度来制备该含淀粉材料。
- [0762] 93. 如段落 66-92 中任一项所述的工艺,其中将该含淀粉植物材料的粒度减小,例如通过干式或湿式研磨或者使用粒度乳化技术。
- [0763] 94. 如段落 66-93 中任一项所述的工艺,其中发酵进行 30 至 150 小时,优选 48 至 96 小时。
- [0764] 95. 如段落 66-94 中任一项所述的工艺,其中在步骤 (b) 中的发酵或步骤 (a) 和 (b) 中的同时糖化和发酵期间的温度是在 25°C 和 40°C 之间、优选在 28°C 和 36°C 之间、例如 28°C 和 35°C 之间、例如 28°C 和 34°C 之间、例如约 32°C。
- [0765] 96. 如段落 66-95 中任一项所述的工艺,其中另外地,在糖化和 / 或发酵期间存在蛋白酶。
- [0766] 97. 如段落 66-96 中任一项所述的工艺,其中该葡糖淀粉酶是按以下量存在的和 / 或添加的:0.001 至 10AGU/g DS、优选从 0.01 至 5AGU/g DS、尤其是 0.1 至 0.5AGU/g DS。
- [0767] 98. 如段落 66-97 中任一项所述的工艺,其中该葡糖淀粉酶是按 10-1,000 微克酶蛋白 /g DS 的量存在的和 / 或添加的。
- [0768] 99. 如段落 66-98 中任一项所述的工艺,其中该 α -淀粉酶是按以下量存在的和 / 或添加的:0.001 至 10FAU/g DS、优选从 0.01 至 5FAU/g DS,尤其是 0.3 至 2FAU/g DS,或 0.001 至 1FAU-F/g DS,优选 0.01 至 1FAU-F/g DS。
- [0769] 100. 如段落 66-99 中任一项所述的工艺,其中该 α -淀粉酶是按 10-1,000 微克酶蛋白 /g DS 的量存在的和 / 或添加的。
- [0770] 101. 如段落 66-100 中任一项所述的工艺,其中纤维素分解酶组合物是按以下量存在的和 / 或添加的:1-10,000 微克 EP/g DS、例如 2-5,000、例如 3 和 1,000、例如 4 和 500 微克 EP/g DS。
- [0771] 102. 如段落 66-101 中任一项所述的工艺,其中纤维素分解酶组合物是按以下范围中的量存在的和 / 或添加的:从 0.1-100FPU/克总固体 (TS)、优选 0.5-50FPU/克 TS、尤其是 1-20FPU/克 TS。
- [0772] 103. 如段落 66-102 中任一项所述的工艺,其中蛋白酶是按 1-1,000 μ g EP/g DS 范围内的量,例如 2-500 μ g EP/g DS,例如 3-250 μ g EP/g DS 存在的和 / 或添加的。
- [0773] 104. 如段落 66-104 中任一项所述的工艺,其中该发酵生物是酵母,例如源自酵母

属的菌株（酿酒酵母的菌株）的酵母。

[0774] 105. 如段落 66-104 中任一项所述的工艺,其中将该发酵生物例如酵母添加至该发酵,使得每 mL 的发酵培养基的计数是在从 10^5 至 10^{12} 个的范围内,优选从 10^7 至 10^{10} 个,尤其是约 5×10^7 个。

[0775] 106. 如段落 66-105 中任一项所述的工艺,该工艺包括:

[0776] (a) 在低于初始糊化温度的温度下使含淀粉材料糖化;并且

[0777] (b) 使用发酵生物进行发酵;

[0778] 其中在以下酶的存在下进行糖化和/或发酵:

[0779] i) 源自瓣环栓菌的葡糖淀粉酶;

[0780] ii) 源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域(SBD)的微小根毛霉的 α -淀粉酶、或其变体。

[0781] 107. 如段落 66-106 中任一项所述的工艺,该工艺包括:

[0782] (a) 在低于初始糊化温度的温度下使含淀粉材料糖化;并且

[0783] (b) 使用发酵生物进行发酵;

[0784] 其中在以下酶的存在下进行糖化和/或发酵:

[0785] i) 源自瓣环栓菌的葡糖淀粉酶;

[0786] ii) 源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域(SBD)的微小根毛霉的 α -淀粉酶、或其变体;

[0787] iii) 源自里氏木霉的菌株的纤维素分解酶组合物;

[0788] 任选地 iv) 来自橙色嗜热子囊菌的蛋白酶、或其变体,和/或来自强烈火球菌、或大型亚灰树花菌的蛋白酶。

[0789] 108. 如段落 66-107 中任一项所述的工艺,该工艺包括:

[0790] (a) 在低于初始糊化温度的温度下使含淀粉材料糖化;并且

[0791] (b) 使用发酵生物进行发酵;

[0792] 其中在以下酶的存在下进行糖化和/或发酵:

[0793]) 在此的 SEQ ID NO:18 中示出的源自密粘褶菌的葡糖淀粉酶,或与在此的 SEQ ID NO:18 具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的且优选具有以下取代中的至少一个的葡糖淀粉酶:V59A;S95P;A121P;T119W;S95P+A121P;V59A+S95P;S95P+T119W;V59A+S95P+A121P;或 S95P+T119W+A121P,尤其是 S95P+A121P(使用 SEQ ID NO:18 进行编号);

[0794] ii) 源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域(SBD)的微小根毛霉的 α -淀粉酶,或与在此的 SEQ ID NO:18 具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的 α -淀粉酶,优选是具有以下取代或取代组合中的至少一个的 α -淀粉酶:D165M;Y141W;Y141R;K136F;K192R;P224A;P224R;S123H+Y141W;G20S+Y141W;A76G+Y141W;G128D+Y141W;G128D+D143N;P219C+Y141W;N142D+D143N;Y141W+K192R;Y141W+D143N;Y141W+N383R;Y141W+P219C+A265C;Y141W+N142D+D143N;Y141W+K192R+V410A;G128D+Y141W+D143N;Y141W+D143N+P219C;Y141W+D143N+K192R;

G128D+D143N+K192R ;Y141W+D143N+K192R+P219C ;G128D+Y141W+D143N+K192R ; 或 G128D+Y141W+D143N+K192R+P219C,尤其是 G128D+D143N(使用 SEQ ID NO:13 进行编号)。

[0795] 109. 如段落 66-108 中任一项所述的工艺,该工艺包括:

[0796] (a) 在低于初始糊化温度的温度下使含淀粉材料糖化;并且

[0797] (b) 使用发酵生物进行发酵;

[0798] 其中在以下酶的存在下进行糖化和/或发酵:

[0799] i) SEQ ID NO:18 中示出的源自密粘褶菌的葡糖淀粉酶,或与 SEQ ID NO:18 具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的且优选具有以下取代中的至少一个的葡糖淀粉酶:V59A ;S95P ;A121P ;T119W ;S95P+A121P ;V59A+S95P ;S95P+T119W ;V59A+S95P+A121P ;或 S95P+T119W+A121P,尤其是 S95P+A121P(使用 SEQ ID NO:18 进行编号);

[0800] ii) 源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域(SBD)的微小根毛霉的 α -淀粉酶,优选是具有以下取代或取代组合中的至少一个的 α -淀粉酶:D165M ;Y141W ;Y141R ;K136F ;K192R ;P224A ;P224R ;S123H+Y141W ;G20S+Y141W ;A76G+Y141W ;G128D+Y141W ;G128D+D143N ;P219C+Y141W ;N142D+D143N ;Y141W+K192R ;Y141W+D143N ;Y141W+N383R ;Y141W+P219C+A265C ;Y141W+N142D+D143N ;Y141W+K192R+V410A ;G128D+Y141W+D143N ;Y141W+D143N+P219C ;Y141W+D143N+K192R ;G128D+D143N+K192R ;Y141W+D143N+K192R+P219C ;G128D+Y141W+D143N+K192R ; 或 G128D+Y141W+D143N+K192R+P219C,尤其是 G128D+D143N(使用 SEQ ID NO:13 进行编号);

[0801] iii) 源自里氏木霉的菌株的纤维素分解酶组合物;优选源自里氏木霉的纤维素分解酶组合物,该纤维素分解酶组合物进一步包括披露为 WO 2011/041397 中的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:10 的埃默森青霉菌 GH61A 多肽、和披露为 WO 2005/047499 中的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:8 的烟曲霉 β -葡糖苷酶或其变体(该变体优选是具有以下取代中的一个、优选全部的变体:F100D、S283G、N456E、F512Y)以及任选地烟曲霉 Ce17A CBH1(披露为 WO 2011/057140 中的 SEQ ID NO:6 和在此的 SEQ ID NO:6)、以及烟曲霉 CBH II(披露为 WO 2011/057140 中的 SEQ ID NO:18 和在此的 SEQ ID NO:7);

[0802] 任选地 iv) 来自橙色嗜热子囊菌的蛋白酶、或其变体,和/或来自强烈火球菌、或大型亚灰树花菌的蛋白酶。

[0803] 110. 如段落 66-109 中任一项所述的工艺,该工艺包括:

[0804] (i) 在低于初始糊化温度的温度下使含淀粉材料糖化;并且

[0805] (ii) 使用发酵生物进行发酵;

[0806] 其中在以下酶的存在下进行糖化和/或发酵:

[0807] i) 在此的 SEQ ID NO:17 中示出的源自血红密孔菌的葡糖淀粉酶,或与在此的 SEQ ID NO:17 具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的葡糖淀粉酶;

[0808] ii) 源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域(SBD)的微小根毛霉的 α -淀粉酶,或与在此的 SEQ ID NO:13 具有至少 60%、至少 70%,例如至少 75%、至少 80%、

至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的 α -淀粉酶,优选是具有以下取代或取代组合中的至少一个的 α -淀粉酶: D165M; Y141W; Y141R; K136F; K192R; P224A; P224R; S123H+Y141W; G20S+Y141W; A76G+Y141W; G128D+Y141W; G128D+D143N; P219C+Y141W; N142D+D143N; Y141W+K192R; Y141W+D143N; Y141W+N383R; Y141W+P219C+A265C; Y141W+N142D+D143N; Y141W+K192R+V410A; G128D+Y141W+D143N; Y141W+D143N+P219C; Y141W+D143N+K192R; G128D+D143N+K192R; Y141W+D143N+K192R+P219C; G128D+Y141W+D143N+K192R; 或 G128D+Y141W+D143N+K192R+P219C, 尤其是 G128D+D143N(使用 SEQ ID NO:13 进行编号);

[0809] iii) 源自里氏木霉的菌株的纤维素分解酶组合物; 优选源自里氏木霉的纤维素分解酶组合物, 该纤维素分解酶组合物进一步包括披露为 WO 2011/041397 中的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:10 的埃默森青霉菌 GH61A 多肽、和披露为 WO 2005/047499 中的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:8 的烟曲霉 β -葡糖苷酶或与在此的 SEQ ID NO:8 具有至少 60%、至少 70%, 例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的 β -葡糖苷酶或其变体(该变体优选是具有以下取代中的一个、优选全部的变体: F100D、S283G、N456E、F512Y(使用 SEQ ID NO:8 进行编号))以及任选地烟曲霉 Ce17A CBH1(披露为 WO 2011/057140 中的 SEQ ID NO:6 和在此的 SEQ ID NO:6)以及烟曲霉 CBH II(披露为 WO 2011/057140 中的 SEQ ID NO:18 和在此的 SEQ ID NO:7)。

[0810] 任选地 iv) 来自橙色嗜热子囊菌的蛋白酶、或其变体, 和 / 或来自强烈火球菌、或大型亚灰树花菌的蛋白酶。

[0811] 111. 如段落 66-110 中任一项所述的工艺, 该工艺包括:

[0812] (i) 在低于初始糊化温度的温度下使含淀粉材料糖化; 并且

[0813] (ii) 使用发酵生物进行发酵;

[0814] 其中在以下酶的存在下进行糖化和 / 或发酵:

[0815] i) 在此的 SEQ ID NO:17 中示出的源自血红密孔菌的葡糖淀粉酶, 或与在此的 SEQ ID NO:17 具有至少 60%、至少 70%, 例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的葡糖淀粉酶;

[0816] ii) 源自具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和淀粉结合结构域(SBD)的微小根毛霉的且具有以下取代的 α -淀粉酶: G128D+D143N(使用在此的 SEQ ID NO:13 进行编号);

[0817] iii) 任选地源自里氏木霉的菌株的纤维素分解酶组合物;

[0818]) 大型亚灰树花菌蛋白酶 3, 优选是 SEQ ID NO:20 中示出的蛋白酶, 或是与 SEQ ID NO:20 具有至少 60%、至少 70%, 例如至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%一致性的蛋白酶。

[0819] 112. 如段落 66-111 中任一项所述的工艺, 其中葡糖淀粉酶和 α -淀粉酶之间的比率是在 99:1 与 1:2 之间, 例如在 98:2 与 1:1 之间, 例如在 97:3 与 2:1 之间, 例如在 96:4 与 3:1 之间, 例如 97:3、96:4、95:5、94:6、93:7、90:10、85:15、83:17 或 65:35 (mg EP 葡糖淀粉酶 : mg EP α -淀粉酶)。

[0820] 113. 如段落 66-112 所述的工艺,其中该糖化和发酵是同时进行的。

[0821] 114. 如段落 66-113 所述的工艺,其中将如段落 1-65 所述的酶组合物用作糖化或发酵或同时糖化和发酵中的酶 / 酶组合物。

[0822] 在此描述并且提出权利要求的发明的范围不限于在此公开的具体实施例,因为这些实施例旨在举例说明本发明的若干方面。任何等价的实施例都旨在处于本发明的范围之内。实际上,除在此所示和描述的那些之外,本发明的不同修改对于本领域普通技术人员而言从前述描述将变得清楚。此类修改也旨在落入所附权利要求书的范围内。在有冲突的情况下,以包括定义的本披露为标准。

[0823] 在此引用了不同的参考,其披露通过引用以其全部内部结合在此。

[0001]

序列表

<110> 诺维信公司
 江普·约瑟夫 (Jump, Joseph)
 阿克曼·迈克尔 (Akerman, Michael)
 克里尔·纳撒尼尔 (Kreel, Nathaniel)
 桑德斯·杰里米 (Saunders, Jeremy)

<120> 酶组合物及其用途
 <130> 12698-WO-PCT
 <160> 20
 <170> PatentIn 3.5版
 <210> 1
 <211> 515
 <212> PRT
 <213> 嗜热脂肪芽孢杆菌

<220>
 <221> 成熟肽
 <222> (1)..(515)

<400> 1

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

[0002]

195	200	205
Pro Glu Val Val Thr Glu Leu Lys Asn Trp Gly Lys Trp Tyr Val Asn 210 215 220		
Thr Thr Asn Ile Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys 225 230 235 240		
Phe Ser Phe Phe Pro Asp Trp Leu Ser Tyr Val Arg Ser Gln Thr Gly 245 250 255		
Lys Pro Leu Phe Thr Val Gly Glu Tyr Trp Ser Tyr Asp Ile Asn Lys 260 265 270		
Leu His Asn Tyr Ile Thr Lys Thr Asn Gly Thr Met Ser Leu Phe Asp 275 280 285		
Ala Pro Leu His Asn Lys Phe Tyr Thr Ala Ser Lys Ser Gly Gly Ala 290 295 300		
Phe Asp Met Arg Thr Leu Met Thr Asn Thr Leu Met Lys Asp Gln Pro 305 310 315 320		
Thr Leu Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Glu Pro Gly Gln 325 330 335		
Ala Leu Gln Ser Trp Val Asp Pro Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala 340 345 350		
Phe Ile Leu Thr Arg Gln Glu Gly Tyr Pro Cys Val Phe Tyr Gly Asp 355 360 365		
Tyr Tyr Gly Ile Pro Gln Tyr Asn Ile Pro Ser Leu Lys Ser Lys Ile 370 375 380		
Asp Pro Leu Leu Ile Ala Arg Arg Asp Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln His 385 390 395 400		
Asp Tyr Leu Asp His Ser Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Val 405 410 415		
Thr Glu Lys Pro Gly Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro 420 425 430		
Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Gln His Ala Gly Lys Val 435 440 445		
Phe Tyr Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile Asn Ser 450 455 460		
Asp Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Trp 465 470 475 480		
Val Pro Arg Lys Thr Thr Val Ser Thr Ile Ala Arg Pro Ile Thr Thr 485 490 495		
Arg Pro Trp Thr Gly Glu Phe Val Arg Trp Thr Glu Pro Arg Leu Val 500 505 510		

[0003]

Ala Trp Pro
515

<210> 2
<211> 1068
<212> DNA
<213> 橙色嗜热子囊菌

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (1065)

<220>
<221> 尚未归类的信号
<222> (1).. (57)

<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (58).. (534)

<220>
<221> 成熟肽
<222> (535).. (1068)

<400> 2
atg cgg ctc gtt get tcc cta acg gcc ttg gtg gcc ttg tcc gta 45
Met Arg Leu Val Ala Ser Leu Thr Ala Leu Val Ala Leu Ser Val
-175 -170 -165

cct gtc ttt ccc get get gtc aac gtg aag cgt get tgg tcc tac 90
Pro Val Phe Pro Ala Ala Val Asn Val Lys Arg Ala Ser Ser Tyr
-160 -155 -150

ctg gag atc act ctg agc cag gtc agc aac act ctg atc aag gcc 135
Leu Glu Ile Thr Leu Ser Gln Val Ser Asn Thr Leu Ile Lys Ala
-145 -140 -135

gtg gtc cag aac act ggt agc gac gag ttg tcc ttc gtt cac ctg 180
Val Val Gln Asn Thr Gly Ser Asp Glu Leu Ser Phe Val His Leu
-130 -125 -120

aac ttc ttc aag gac ecc get cct gtc aaa aag gta tgg gtc tat 225
Asn Phe Phe Lys Asp Pro Ala Pro Val Lys Lys Val Ser Val Tyr
-115 -110 -105

cgc gat ggg tct gaa gtc cag ttc gag gcc att ttg agc cgc tac aaa 273
Arg Asp Gly Ser Glu Val Gln Phe Glu Gly Ile Leu Ser Arg Tyr Lys
-100 -95 -90

tgg act ggc ctc tct cgt gac gcc ttt act tat ctg get ccc gga gag 321
Ser Thr Gly Leu Ser Arg Asp Ala Phe Thr Tyr Leu Ala Pro Gly Glu
-85 -80 -75

tcc gtc gag gac gtt ttt gat att get tgg act tac gat ctg acc agc 369
Ser Val Glu Asp Val Phe Asp Ile Ala Ser Thr Tyr Asp Leu Thr Ser
-70 -65 -60

ggc gcc cct gta act atc cgt act gag gga gtt gtt ccc tac gcc acc 417
Gly Gly Pro Val Thr Ile Arg Thr Glu Gly Val Val Pro Tyr Ala Thr
-55 -50 -45 -40

get aac agc act gat att gcc gcc tac atc tca tac tgg tct aat gtg 465
Ala Asn Ser Thr Asp Ile Ala Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Ser Asn Val
-35 -30 -25

ttg acc att gat gtc gat ggc gcc get get gcc act gtc tcc aag gca 513
Leu Thr Ile Asp Val Asp Gly Ala Ala Ala Thr Val Ser Lys Ala
-20 -15 -10

atc act cct ttg gac cgc cgc act agg atc agt tcc tgc tcc gcc agc 561
Ile Thr Pro Leu Asp Arg Arg Thr Arg Ile Ser Ser Cys Ser Gly Ser
-5 -1 1 5

[0004]

aga cag agc gct ctt act acg gct ctc aga aac get get tct ctt gcc Arg Gln Ser Ala Leu Thr Thr Ala Leu Arg Asn Ala Ala Ser Leu Ala 10 15 20 25	609
aac gca get gec gac gcc get cag tct gga tea get tea aag ttc agc Asn Ala Ala Ala Asp Ala Ala Gln Ser Gly Ser Ala Ser Lys Phe Ser 30 35 40	657
gag tac ttc aag act act tct agc tct acc cgc cag acc gtg get gcc Glu Tyr Phe Lys Thr Thr Ser Ser Thr Arg Gln Thr Val Ala Ala 45 50 55	705
cgt ctt cgg get gtt gcc cgg gag gca tct teg tct tct teg gga gcc Arg Leu Arg Ala Val Ala Arg Glu Ala Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ala 60 65 70	753
acc acg tac tac tgc gac gat ccc tac gcc tac tgt tcc tcc aac gtc Thr Thr Tyr Tyr Cys Asp Asp Pro Tyr Gly Tyr Cys Ser Ser Asn Val 75 80 85	801
ctg get tac acc ctg cct tea tac aac ata atc gcc aac tgt gac att Leu Ala Tyr Thr Leu Pro Ser Tyr Asn Ile Ile Ala Asn Cys Asp Ile 90 95 100 105	849
ttc tat act tac ctg cgg get ctg acc agt acc tgt cac get cag gat Phe Tyr Thr Tyr Leu Pro Ala Leu Thr Ser Thr Cys His Ala Gln Asp 110 115 120	897
caa ggg acc act gec ctt cae gag ttc acc caa gcc cct ggc gtc tac Gln Ala Thr Thr Ala Leu His Glu Phe Thr His Ala Pro Gly Val Tyr 125 130 135	945
agc cct gcc acg gac gac cgg gcc tat gcc tac cag get gcc atg ggt Ser Pro Gly Thr Asp Asp Leu Ala Tyr Gly Tyr Gln Ala Ala Met Gly 140 145 150	993
ctc agc agc agc cag get gtc atg aac get gac acc tac get ctc tat Leu Ser Ser Ser Gln Ala Val Met Asn Ala Asp Thr Tyr Ala Leu Tyr 155 160 165	1041
gcc aat gcc ata tac ctt ggt tgc taa Ala Asn Ala Ile Tyr Leu Gly Cys 170 175	1068
<210> 3 <211> 355 <212> PRT <213> 橙色嗜热子囊菌	
<400> 3	
Met Arg Leu Val Ala Ser Leu Thr Ala Leu Val Ala Leu Ser Val -175 -170 -165	
Pro Val Phe Pro Ala Ala Val Asn Val Lys Arg Ala Ser Ser Tyr -160 -155 -150	
Leu Glu Ile Thr Leu Ser Gln Val Ser Asn Thr Leu Ile Lys Ala -145 -140 -135	
Val Val Gln Asn Thr Gly Ser Asp Glu Leu Ser Phe Val His Leu -130 -125 -120	
Asn Phe Phe Lys Asp Pro Ala Pro Val Lys Lys Val Ser Val Tyr -115 -110 -105	
Arg Asp Gly Ser Glu Val Gln Phe Glu Gly Ile Leu Ser Arg Tyr Lys -100 -95 -90	
Ser Thr Gly Leu Ser Arg Asp Ala Phe Thr Tyr Leu Ala Pro Gly Glu	

[0005]

```

-85          -80          -75
Ser Val Glu Asp Val Phe Asp Ile Ala Ser Thr Tyr Asp Leu Thr Ser
-70          -65
Gly Gly Pro Val Thr Ile Arg Thr Glu Gly Val Val Pro Tyr Ala Thr
-55          -50          -45          -40
Ala Asn Ser Thr Asp Ile Ala Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Ser Asn Val
-35          -30          -25
Leu Thr Ile Asp Val Asp Gly Ala Ala Ala Ala Thr Val Ser Lys Ala
-20          -15          -10
Ile Thr Pro Leu Asp Arg Arg Thr Arg Ile Ser Ser Cys Ser Gly Ser
-5          -1 1 5
Arg Gln Ser Ala Leu Thr Thr Ala Leu Arg Asn Ala Ala Ser Leu Ala
10          15          20          25
Asn Ala Ala Ala Asp Ala Ala Gln Ser Gly Ser Ala Ser Lys Phe Ser
30          35          40
Gln Tyr Phe Lys Thr Thr Ser Ser Thr Arg Gln Thr Val Ala Ala
45          50          55
Arg Leu Arg Ala Val Ala Arg Glu Ala Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ala
60          65          70
Thr Thr Tyr Tyr Cys Asp Asp Pro Tyr Gly Tyr Cys Ser Ser Asn Val
75          80          85
Leu Ala Tyr Thr Leu Pro Ser Tyr Asn Ile Ile Ala Asn Cys Asp Ile
90          95          100          105
Phe Tyr Thr Tyr Leu Pro Ala Leu Thr Ser Thr Cys His Ala Gln Asp
110          115          120
Gln Ala Thr Thr Ala Leu His Glu Phe Thr His Ala Pro Gly Val Tyr
125          130          135
Ser Pro Gly Thr Asp Asp Leu Ala Tyr Gly Tyr Gln Ala Ala Met Gly
140          145          150
Leu Ser Ser Ser Gln Ala Val Met Asn Ala Asp Thr Tyr Ala Leu Tyr
155          160          165
Ala Asn Ala Ile Tyr Leu Gly Cys
170          175
<210> 4
<211> 573
<212> PRT
<213> 篱边粘褶菌
<400> 4
Met Tyr Arg Phe Leu Val Cys Ala Leu Gly Leu Ala Ala Ser Val Leu
1 5 10 15

```

[0006]

Ala Gln Ser Val Asp Ser Tyr Val Ser Ser Glu Gly Pro Ile Ala Lys
20 25 30

Ala Gly Val Leu Ala Asn Ile Gly Pro Asn Gly Ser Lys Ala Ser Gly
35 40 45

Ala Ser Ala Gly Val Val Val Ala Ser Pro Ser Thr Ser Asp Pro Asp
50 55 60

Tyr Trp Tyr Thr Trp Thr Arg Asp Ser Ser Leu Val Phe Lys Ser Leu
65 70 75 80

Ile Asp Gln Tyr Thr Thr Gly Ile Asp Ser Thr Ser Ser Leu Arg Thr
85 90 95

Leu Ile Asp Asp Phe Val Thr Ala Glu Ala Asn Leu Gln Gln Val Ser
100 105 110

Asn Pro Ser Gly Thr Leu Thr Thr Gly Gly Leu Gly Glu Pro Lys Phe
115 120 125

Asn Val Asp Glu Thr Ala Phe Thr Gly Ala Trp Gly Arg Pro Gln Arg
130 135 140

Asp Gly Pro Ala Leu Arg Ser Thr Ala Leu Ile Thr Tyr Gly Asn Trp
145 150 155 160

Leu Leu Ser Asn Gly Asn Thr Ser Tyr Val Thr Ser Asn Leu Trp Pro
165 170 175

Ile Ile Gln Asn Asp Leu Gly Tyr Val Val Ser Tyr Trp Asn Gln Ser
180 185 190

Thr Tyr Asp Leu Trp Glu Glu Val Asp Ser Ser Ser Phe Phe Thr Thr
195 200 205

Ala Val Gln His Arg Ala Leu Arg Glu Gly Ala Ala Phe Ala Thr Ala
210 215 220

Ile Gly Gln Thr Ser Gln Val Ser Ser Tyr Thr Thr Gln Ala Asp Asn
225 230 235 240

Leu Leu Cys Phe Leu Gln Ser Tyr Trp Asn Pro Ser Gly Gly Tyr Ile
245 250 255

Thr Ala Asn Thr Gly Gly Gly Arg Ser Gly Lys Asp Ala Asn Thr Leu
260 265 270

Leu Ala Ser Ile His Thr Tyr Asp Pro Ser Ala Gly Cys Asp Ala Ala
275 280 285

Thr Phe Gln Pro Cys Ser Asp Lys Ala Leu Ser Asn Leu Lys Val Tyr
290 295 300

Val Asp Ser Phe Arg Ser Val Tyr Ser Ile Asn Ser Gly Val Ala Ser
305 310 315 320

[0007]

Asn Ala Ala Val Ala Thr Gly Arg Tyr Pro Glu Asp Ser Tyr Gln Gly
 325 330 335

Gly Asn Pro Trp Tyr Leu Thr Thr Phe Ala Val Ala Glu Gln Leu Tyr
 340 345 350

Asp Ala Leu Asn Val Trp Glu Ser Gln Gly Ser Leu Glu Val Thr Ser
 355 360 365

Thr Ser Leu Ala Phe Phe Gln Gln Phe Ser Ser Gly Val Thr Ala Gly
 370 375 380

Thr Tyr Ser Ser Ser Ser Ser Thr Tyr Ser Thr Leu Thr Ser Ala Ile
 385 390 395 400

Lys Asn Phe Ala Asp Gly Phe Val Ala Ile Asn Ala Lys Tyr Thr Pro
 405 410 415

Ser Asn Gly Gly Leu Ala Glu Gln Tyr Ser Lys Ser Asp Gly Ser Pro
 420 425 430

Leu Ser Ala Val Asp Leu Thr Trp Ser Tyr Ala Ser Ala Leu Thr Ala
 435 440 445

Phe Glu Ala Arg Asn Asn Thr Gln Phe Ala Gly Trp Gly Ala Ala Gly
 450 455 460

Leu Thr Val Pro Ser Ser Cys Ser Gly Asn Ser Gly Gly Pro Thr Val
 465 470 475 480

Ala Val Thr Phe Asn Val Asn Ala Glu Thr Val Trp Gly Glu Asn Ile
 485 490 495

Tyr Leu Thr Gly Ser Val Asp Ala Leu Glu Asn Trp Ser Ala Asp Asn
 500 505 510

Ala Leu Leu Leu Ser Ser Ala Asn Tyr Pro Thr Trp Ser Ile Thr Val
 515 520 525

Asn Leu Pro Ala Ser Thr Ala Ile Glu Tyr Lys Tyr Ile Arg Lys Asn
 530 535 540

Asn Gly Ala Val Thr Trp Glu Ser Asp Pro Asn Asn Ser Ile Thr Thr
 545 550 555 560

Pro Ala Ser Gly Ser Thr Thr Glu Asn Asp Thr Trp Arg
 565 570

<210> 5
 <211> 412
 <212> PRT
 <213> 强烈火球菌

<220>
 <221> 成熟肽
 <222> (1) (412)
 <223> 强烈火球菌蛋白酶 (Pfu)

<400> 5

[0008]

Ala Glu Leu Glu Gly Leu Asp Glu Ser Ala Ala Gln Val Met Ala Thr
1 5 10 15

Tyr Val Trp Asn Leu Gly Tyr Asp Gly Ser Gly Ile Thr Ile Gly Ile
20 25 30

Ile Asp Thr Gly Ile Asp Ala Ser His Pro Asp Leu Gln Gly Lys Val
35 40 45

Ile Gly Trp Val Asp Phe Val Asn Gly Arg Ser Tyr Pro Tyr Asp Asp
50 55 60

His Gly His Gly Thr His Val Ala Ser Ile Ala Ala Gly Thr Gly Ala
65 70 75 80

Ala Ser Asn Gly Lys Tyr Lys Gly Met Ala Pro Gly Ala Lys Leu Ala
85 90 95

Gly Ile Lys Val Leu Gly Ala Asp Gly Ser Gly Ser Ile Ser Thr Ile
100 105 110

Ile Lys Gly Val Glu Trp Ala Val Asp Asn Lys Asp Lys Tyr Gly Ile
115 120 125

Lys Val Ile Asn Leu Ser Leu Gly Ser Ser Gln Ser Ser Asp Gly Thr
130 135 140

Asp Ala Leu Ser Gln Ala Val Asn Ala Ala Trp Asp Ala Gly Leu Val
145 150 155 160

Val Val Val Ala Ala Gly Asn Ser Gly Pro Asn Lys Tyr Thr Ile Gly
165 170 175

Ser Pro Ala Ala Ala Ser Lys Val Ile Thr Val Gly Ala Val Asp Lys
180 185 190

Tyr Asp Val Ile Thr Ser Phe Ser Ser Arg Gly Pro Thr Ala Asp Gly
195 200 205

Arg Leu Lys Pro Glu Val Val Ala Pro Gly Asn Trp Ile Ile Ala Ala
210 215 220

Arg Ala Ser Gly Thr Ser Met Gly Gln Pro Ile Asn Asp Tyr Tyr Thr
225 230 235 240

Ala Ala Pro Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ile Ala
245 250 255

Ala Leu Leu Leu Gln Ala His Pro Ser Trp Thr Pro Asp Lys Val Lys
260 265 270

Thr Ala Leu Ile Glu Thr Ala Asp Ile Val Lys Pro Asp Glu Ile Ala
275 280 285

Asp Ile Ala Tyr Gly Ala Gly Arg Val Asn Ala Tyr Lys Ala Ile Asn
290 295 300

Tyr Asp Asn Tyr Ala Lys Leu Val Phe Thr Gly Tyr Val Ala Asn Lys

[0009]

305 310 315 320
 Gly Ser Gln Thr His Gln Phe Val Ile Ser Gly Ala Ser Phe Val Thr
 325 330 335
 Ala Thr Leu Tyr Trp Asp Asn Ala Asn Ser Asp Leu Asp Leu Tyr Leu
 340 345 350
 Tyr Asp Pro Asn Gly Asn Gln Val Asp Tyr Ser Tyr Thr Ala Tyr Tyr
 355 360 365
 Gly Phe Glu Lys Val Gly Tyr Tyr Asn Pro Thr Asp Gly Thr Trp Thr
 370 375 380
 Ile Lys Val Val Ser Tyr Ser Gly Ser Ala Asn Tyr Gln Val Asp Val
 385 390 395 400
 Val Ser Asp Gly Ser Leu Ser Gln Pro Gly Ser Ser
 405 410
 <210> 6
 <211> 532
 <212> PRT
 <213> 烟曲霉
 <400> 6
 Met Leu Ala Ser Thr Phe Ser Tyr Arg Met Tyr Lys Thr Ala Leu Ile
 1 5 10 15
 Leu Ala Ala Leu Leu Gly Ser Gly Gln Ala Gln Gln Val Gly Thr Ser
 20 25 30
 Gln Ala Glu Val His Pro Ser Met Thr Trp Gln Ser Cys Thr Ala Gly
 35 40 45
 Gly Ser Cys Thr Thr Asn Asn Gly Lys Val Val Ile Asp Ala Asn Trp
 50 55 60
 Arg Trp Val His Lys Val Gly Asp Tyr Thr Asn Cys Tyr Thr Gly Asn
 65 70 75 80
 Thr Trp Asp Thr Thr Ile Cys Pro Asp Asp Ala Thr Cys Ala Ser Asn
 85 90 95
 Cys Ala Leu Glu Gly Ala Asn Tyr Glu Ser Thr Tyr Gly Val Thr Ala
 100 105 110
 Ser Gly Asn Ser Leu Arg Leu Asn Phe Val Thr Thr Ser Gln Gln Lys
 115 120 125
 Asn Ile Gly Ser Arg Leu Tyr Met Met Lys Asp Asp Ser Thr Tyr Glu
 130 135 140
 Met Phe Lys Leu Leu Asn Gln Glu Phe Thr Phe Asp Val Asp Val Ser
 145 150 155 160
 Asn Leu Pro Cys Gly Leu Asn Gly Ala Leu Tyr Phe Val Ala Met Asp
 165 170 175

[0010]

Ala Asp Gly Gly Met Ser Lys Tyr Pro Thr Asn Lys Ala Gly Ala Lys
180 185 190

Tyr Gly Thr Gly Tyr Cys Asp Ser Gln Cys Pro Arg Asp Leu Lys Phe
195 200 205

Ile Asn Gly Gln Ala Asn Val Glu Gly Trp Gln Pro Ser Ser Asn Asp
210 215 220

Ala Asn Ala Gly Thr Gly Asn His Gly Ser Cys Cys Ala Glu Met Asp
225 230 235 240

Ile Trp Glu Ala Asn Ser Ile Ser Thr Ala Phe Thr Pro His Pro Cys
245 250 255

Asp Thr Pro Gly Gln Val Met Cys Thr Gly Asp Ala Cys Gly Gly Thr
260 265 270

Tyr Ser Ser Asp Arg Tyr Gly Gly Thr Cys Asp Pro Asp Gly Cys Asp
275 280 285

Phe Asn Ser Phe Arg Gln Gly Asn Lys Thr Phe Tyr Gly Pro Gly Met
290 295 300

Thr Val Asp Thr Lys Ser Lys Phe Thr Val Val Thr Gln Phe Ile Thr
305 310 315 320

Asp Asp Gly Thr Ser Ser Gly Thr Leu Lys Glu Ile Lys Arg Phe Tyr
325 330 335

Val Gln Asn Gly Lys Val Ile Pro Asn Ser Glu Ser Thr Trp Thr Gly
340 345 350

Val Ser Gly Asn Ser Ile Thr Thr Glu Tyr Cys Thr Ala Gln Lys Ser
355 360 365

Leu Phe Gln Asp Gln Asn Val Phe Glu Lys His Gly Gly Leu Glu Gly
370 375 380

Met Gly Ala Ala Leu Ala Gln Gly Met Val Leu Val Met Ser Leu Trp
385 390 395 400

Asp Asp His Ser Ala Asn Met Leu Trp Leu Asp Ser Asn Tyr Pro Thr
405 410 415

Thr Ala Ser Ser Thr Thr Pro Gly Val Ala Arg Gly Thr Cys Asp Ile
420 425 430

Ser Ser Gly Val Pro Ala Asp Val Glu Ala Asn His Pro Asp Ala Tyr
435 440 445

Val Val Tyr Ser Asn Ile Lys Val Gly Pro Ile Gly Ser Thr Phe Asn
450 455 460

Ser Gly Gly Ser Asn Pro Gly Gly Gly Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr
465 470 475 480

[0011]

Gln Pro Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ala Gly Asn Pro Gly Gly Thr Gly
 485 490 495

Val Ala Gln His Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Trp Thr Gly Pro
 500 505 510

Thr Thr Cys Ala Ser Pro Tyr Thr Cys Gln Lys Leu Asn Asp Tyr Tyr
 515 520 525

Ser Gln Cys Leu
 530

<210> 7
 <211> 454
 <212> PRT
 <213> 烟曲霉

<400> 7

Met Lys His Leu Ala Ser Ser Ile Ala Leu Thr Leu Leu Leu Pro Ala
 1 5 10 15

Val Gln Ala Gln Gln Thr Val Trp Gly Gln Cys Gly Gly Gln Gly Trp
 20 25 30

Ser Gly Pro Thr Ser Cys Val Ala Gly Ala Ala Cys Ser Thr Leu Asn
 35 40 45

Pro Tyr Tyr Ala Gln Cys Ile Pro Gly Ala Thr Ala Thr Ser Thr Thr
 50 55 60

Leu Thr Thr Thr Thr Ala Ala Thr Thr Thr Ser Gln Thr Thr Thr Lys
 65 70 75 80

Pro Thr Thr Thr Gly Pro Thr Thr Ser Ala Pro Thr Val Thr Ala Ser
 85 90 95

Gly Asn Pro Phe Ser Gly Tyr Gln Leu Tyr Ala Asn Pro Tyr Tyr Ser
 100 105 110

Ser Glu Val His Thr Leu Ala Met Pro Ser Leu Pro Ser Ser Leu Gln
 115 120 125

Pro Lys Ala Ser Ala Val Ala Glu Val Pro Ser Phe Val Trp Leu Asp
 130 135 140

Val Ala Ala Lys Val Pro Thr Met Gly Thr Tyr Leu Ala Asp Ile Gln
 145 150 155 160

Ala Lys Asn Lys Ala Gly Ala Asn Pro Pro Ile Ala Gly Ile Phe Val
 165 170 175

Val Tyr Asp Leu Pro Asp Arg Asp Cys Ala Ala Leu Ala Ser Asn Gly
 180 185 190

Glu Tyr Ser Ile Ala Asn Asn Gly Val Ala Asn Tyr Lys Ala Tyr Ile
 195 200 205

Asp Ala Ile Arg Ala Gln Leu Val Lys Tyr Ser Asp Val His Thr Ile
 210 215 220

[0012]

Leu Val Ile Glu Pro Asp Ser Leu Ala Asn Leu Val Thr Asn Leu Asn
 225 230 235 240
 Val Ala Lys Cys Ala Asn Ala Gln Ser Ala Tyr Leu Glu Cys Val Asp
 245 250 255
 Tyr Ala Leu Lys Gln Leu Asn Leu Pro Asn Val Ala Met Tyr Leu Asp
 260 265 270
 Ala Gly His Ala Gly Trp Leu Gly Trp Pro Ala Asn Leu Gly Pro Ala
 275 280 285
 Ala Thr Leu Phe Ala Lys Val Tyr Thr Asp Ala Gly Ser Pro Ala Ala
 290 295 300
 Val Arg Gly Leu Ala Thr Asn Val Ala Asn Tyr Asn Ala Trp Ser Leu
 305 310 315 320
 Ser Thr Cys Pro Ser Tyr Thr Gln Gly Asp Pro Asn Cys Asp Glu Lys
 325 330 335
 Lys Tyr Ile Asn Ala Met Ala Pro Leu Leu Lys Glu Ala Gly Phe Asp
 340 345 350
 Ala His Phe Ile Met Asp Thr Ser Arg Asn Gly Val Gln Pro Thr Lys
 355 360 365
 Gln Asn Ala Trp Gly Asp Trp Cys Asn Val Ile Gly Thr Gly Phe Gly
 370 375 380
 Val Arg Pro Ser Thr Asn Thr Gly Asp Pro Leu Gln Asp Ala Phe Val
 385 390 395 400
 Trp Ile Lys Pro Gly Gly Glu Ser Asp Gly Thr Ser Asn Ser Thr Ser
 405 410 415
 Pro Arg Tyr Asp Ala His Cys Gly Tyr Ser Asp Ala Leu Gln Pro Ala
 420 425 430
 Pro Glu Ala Gly Thr Trp Phe Gln Ala Tyr Phe Glu Gln Leu Leu Thr
 435 440 445
 Asn Ala Asn Pro Ser Phe
 450
 <210> 8
 <211> 863
 <212> PRT
 <213> 烟曲霉
 <400> 8
 Met Arg Phe Gly Trp Leu Glu Val Ala Ala Leu Thr Ala Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Ala Asn Ala Gln Glu Leu Ala Phe Ser Pro Pro Phe Tyr Pro Ser Pro
 20 25 30

[0013]

Trp Ala Asp Gly Gln Gly Glu Trp Ala Asp Ala His Arg Arg Ala Val
 35 40 45
 Glu Ile Val Ser Gln Met Thr Leu Ala Glu Lys Val Asn Leu Thr Thr
 50 55 60
 Gly Thr Gly Trp Glu Met Asp Arg Cys Val Gly Gln Thr Gly Ser Val
 65 70 75 80
 Pro Arg Leu Gly Ile Asn Trp Gly Leu Cys Gly Gln Asp Ser Pro Leu
 85 90 95
 Gly Ile Arg Phe Ser Asp Leu Asn Ser Ala Phe Pro Ala Gly Thr Asn
 100 105 110
 Val Ala Ala Thr Trp Asp Lys Thr Leu Ala Tyr Leu Arg Gly Lys Ala
 115 120 125
 Met Gly Glu Glu Phe Asn Asp Lys Gly Val Asp Ile Leu Leu Gly Pro
 130 135 140
 Ala Ala Gly Pro Leu Gly Lys Tyr Pro Asp Gly Gly Arg Ile Trp Glu
 145 150 155 160
 Gly Phe Ser Pro Asp Pro Val Leu Thr Gly Val Leu Phe Ala Glu Thr
 165 170 175
 Ile Lys Gly Ile Gln Asp Ala Gly Val Ile Ala Thr Ala Lys His Tyr
 180 185 190
 Ile Leu Asn Glu Gln Glu His Phe Arg Gln Val Gly Glu Ala Gln Gly
 195 200 205
 Tyr Gly Tyr Asn Ile Thr Glu Thr Ile Ser Ser Asn Val Asp Asp Lys
 210 215 220
 Thr Met His Glu Leu Tyr Leu Trp Pro Phe Ala Asp Ala Val Arg Ala
 225 230 235 240
 Gly Val Gly Ala Val Met Cys Ser Tyr Asn Gln Ile Asn Asn Ser Tyr
 245 250 255
 Gly Cys Gln Asn Ser Gln Thr Leu Asn Lys Leu Leu Lys Ala Glu Leu
 260 265 270
 Gly Phe Gln Gly Phe Val Met Ser Asp Trp Ser Ala His His Ser Gly
 275 280 285
 Val Gly Ala Ala Leu Ala Gly Leu Asp Met Ser Met Pro Gly Asp Ile
 290 295 300
 Ser Phe Asp Asp Gly Leu Ser Phe Trp Gly Thr Asn Leu Thr Val Ser
 305 310 315 320
 Val Leu Asn Gly Thr Val Pro Ala Trp Arg Val Asp Asp Met Ala Val
 325 330 335
 Arg Ile Met Thr Ala Tyr Tyr Lys Val Gly Arg Asp Arg Leu Arg Ile

[0014]

			340						345						350
Pro	Pro	Asn	Phe	Ser	Ser	Trp	Thr	Arg	Asp	Glu	Tyr	Gly	Trp	Glu	His
		355					360					365			
Ser	Ala	Val	Ser	Glu	Gly	Ala	Trp	Thr	Lys	Val	Asn	Asp	Phe	Val	Asn
	370					375					380				
Val	Gln	Arg	Ser	His	Ser	Gln	Ile	Ile	Arg	Glu	Ile	Gly	Ala	Ala	Ser
385					390					395					400
Thr	Val	Leu	Leu	Lys	Asn	Thr	Gly	Ala	Leu	Pro	Leu	Thr	Gly	Lys	Glu
				405					410					415	
Val	Lys	Val	Gly	Val	Leu	Gly	Glu	Asp	Ala	Gly	Ser	Asn	Pro	Trp	Gly
			420					425					430		
Ala	Asn	Gly	Cys	Pro	Asp	Arg	Gly	Cys	Asp	Asn	Gly	Thr	Leu	Ala	Met
		435					440						445		
Ala	Trp	Gly	Ser	Gly	Thr	Ala	Asn	Phe	Pro	Tyr	Leu	Val	Thr	Pro	Glu
	450					455					460				
Gln	Ala	Ile	Gln	Arg	Glu	Val	Ile	Ser	Asn	Gly	Gly	Asn	Val	Phe	Ala
465					470					475					480
Val	Thr	Asp	Asn	Gly	Ala	Leu	Ser	Gln	Met	Ala	Asp	Val	Ala	Ser	Gln
				485					490					495	
Ser	Ser	Val	Ser	Leu	Val	Phe	Val	Asn	Ala	Asp	Ser	Gly	Glu	Gly	Phe
		500						505					510		
Ile	Ser	Val	Asp	Gly	Asn	Glu	Gly	Asp	Arg	Lys	Asn	Leu	Thr	Leu	Trp
		515					520						525		
Lys	Asn	Gly	Glu	Ala	Val	Ile	Asp	Thr	Val	Val	Ser	His	Cys	Asn	Asn
	530					535							540		
Thr	Ile	Val	Val	Ile	His	Ser	Val	Gly	Pro	Val	Leu	Ile	Asp	Arg	Trp
545					550					555					560
Tyr	Asp	Asn	Pro	Asn	Val	Thr	Ala	Ile	Ile	Trp	Ala	Gly	Leu	Pro	Gly
				565					570					575	
Gln	Glu	Ser	Gly	Asn	Ser	Leu	Val	Asp	Val	Leu	Tyr	Gly	Arg	Val	Asn
			580					585						590	
Pro	Ser	Ala	Lys	Thr	Pro	Phe	Thr	Trp	Gly	Lys	Thr	Arg	Glu	Ser	Tyr
		595					600						605		
Gly	Ala	Pro	Leu	Leu	Thr	Glu	Pro	Asn	Asn	Gly	Asn	Gly	Ala	Pro	Gln
	610					615						620			
Asp	Asp	Phe	Asn	Glu	Gly	Val	Phe	Ile	Asp	Tyr	Arg	His	Phe	Asp	Lys
625					630					635					640
Arg	Asn	Glu	Thr	Pro	Ile	Tyr	Glu	Phe	Gly	His	Gly	Leu	Ser	Tyr	Thr
				645					650					655	

[0015]

Thr Phe Gly Tyr Ser His Leu Arg Val Gln Ala Leu Asn Ser Ser Ser
 660 665 670
 Ser Ala Tyr Val Pro Thr Ser Gly Glu Thr Lys Pro Ala Pro Thr Tyr
 675 680 685
 Gly Glu Ile Gly Ser Ala Ala Asp Tyr Leu Tyr Pro Glu Gly Leu Lys
 690 695 700
 Arg Ile Thr Lys Phe Ile Tyr Pro Trp Leu Asn Ser Thr Asp Leu Glu
 705 710 715 720
 Asp Ser Ser Asp Asp Pro Asn Tyr Gly Trp Glu Asp Ser Glu Tyr Ile
 725 730 735
 Pro Glu Gly Ala Arg Asp Gly Ser Pro Gln Pro Leu Leu Lys Ala Gly
 740 745 750
 Gly Ala Pro Gly Gly Asn Pro Thr Leu Tyr Gln Asp Leu Val Arg Val
 755 760 765
 Ser Ala Thr Ile Thr Asn Thr Gly Asn Val Ala Gly Tyr Glu Val Pro
 770 775 780
 Gln Leu Tyr Val Ser Leu Gly Gly Pro Asn Glu Pro Arg Val Val Leu
 785 790 795 800
 Arg Lys Phe Asp Arg Ile Phe Leu Ala Pro Gly Glu Gln Lys Val Trp
 805 810 815
 Thr Thr Thr Leu Asn Arg Arg Asp Leu Ala Asn Trp Asp Val Glu Ala
 820 825 830
 Gln Asp Trp Val Ile Thr Lys Tyr Pro Lys Lys Val His Val Gly Ser
 835 840 845
 Ser Ser Arg Lys Leu Pro Leu Arg Ala Pro Leu Pro Arg Val Tyr
 850 855 860
 <210> 9
 <211> 250
 <212> PRT
 <213> 橙色嗜热子囊菌
 <220>
 <221> 信号
 <222> (1)..(22)
 <400> 9
 Met Ser Phe Ser Lys Ile Ile Ala Thr Ala Gly Val Leu Ala Ser Ala
 1 5 10 15
 Ser Leu Val Ala Gly His Gly Phe Val Gln Asn Ile Val Ile Asp Gly
 20 25 30
 Lys Lys Tyr Tyr Gly Gly Tyr Leu Val Asn Gln Tyr Pro Tyr Met Ser
 35 40 45

[0016]

Asn Pro Pro Glu Val Ile Ala Trp Ser Thr Thr Ala Thr Asp Leu Gly
 50 55 60
 Phe Val Asp Gly Thr Gly Tyr Gln Thr Pro Asp Ile Ile Cys His Arg
 65 70 75 80
 Gly Ala Lys Pro Gly Ala Leu Thr Ala Pro Val Ser Pro Gly Gly Thr
 85 90 95
 Val Glu Leu Gln Trp Thr Pro Trp Pro Asp Ser His His Gly Pro Val
 100 105 110
 Ile Asn Tyr Leu Ala Pro Cys Asn Gly Asp Cys Ser Thr Val Asp Lys
 115 120 125
 Thr Gln Leu Glu Phe Phe Lys Ile Ala Glu Ser Gly Leu Ile Asn Asp
 130 135 140
 Asp Asn Pro Pro Gly Ile Trp Ala Ser Asp Asn Leu Ile Ala Ala Asn
 145 150 155 160
 Asn Ser Trp Thr Val Thr Ile Pro Thr Thr Ile Ala Pro Gly Asn Tyr
 165 170 175
 Val Leu Arg His Glu Ile Ile Ala Leu His Ser Ala Gln Asn Gln Asp
 180 185 190
 Gly Ala Gln Asn Tyr Pro Gln Cys Ile Asn Leu Gln Val Thr Gly Gly
 195 200 205
 Gly Ser Asp Asn Pro Ala Gly Thr Leu Gly Thr Ala Leu Tyr His Asp
 210 215 220
 Thr Asp Pro Gly Ile Leu Ile Asn Ile Tyr Gln Lys Leu Ser Ser Tyr
 225 230 235 240
 Ile Ile Pro Gly Pro Pro Leu Tyr Thr Gly
 245 250
 <210> 10
 <211> 253
 <212> PRT
 <213> 埃默森青霉菌
 <220>
 <221> 信号
 <222> (1)..(25)
 <400> 10
 Met Leu Ser Ser Thr Thr Arg Thr Leu Ala Phe Thr Gly Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Leu Leu Ser Ala Pro Leu Val Lys Ala His Gly Phe Val Gln Gly Ile
 20 25 30
 Val Ile Gly Asp Gln Phe Tyr Ser Gly Tyr Ile Val Asn Ser Phe Pro
 35 40 45

[0017]

Tyr Glu Ser Asn Pro Pro Pro Val Ile Gly Trp Ala Thr Thr Ala Thr
 50 55 60
 Asp Leu Gly Phe Val Asp Gly Thr Gly Tyr Glu Gly Pro Asp Ile Ile
 65 70 75 80
 Cys His Arg Asn Ala Thr Pro Ala Pro Leu Thr Ala Pro Val Ala Ala
 85 90 95
 Gly Gly Thr Val Glu Leu Gln Trp Thr Pro Trp Pro Asp Ser His His
 100 105 110
 Gly Pro Val Ile Thr Tyr Leu Ala Pro Cys Asn Gly Asn Cys Ser Thr
 115 120 125
 Val Asp Lys Thr Thr Leu Glu Phe Phe Lys Ile Asp Gln Gln Gly Leu
 130 135 140
 Ile Asp Asp Thr Ser Pro Pro Gly Thr Trp Ala Ser Asp Asn Leu Ile
 145 150 155 160
 Ala Asn Asn Asn Ser Trp Thr Val Thr Ile Pro Asn Ser Val Ala Pro
 165 170 175
 Gly Asn Tyr Val Leu Arg His Glu Ile Ile Ala Leu His Ser Ala Asn
 180 185 190
 Asn Lys Asp Gly Ala Gln Asn Tyr Pro Gln Cys Ile Asn Ile Glu Val
 195 200 205
 Thr Gly Gly Gly Ser Asp Ala Pro Glu Gly Thr Leu Gly Glu Asp Leu
 210 215 220
 Tyr His Asp Thr Asp Pro Gly Ile Leu Val Asp Ile Tyr Glu Pro Ile
 225 230 235 240
 Ala Thr Tyr Thr Ile Pro Gly Pro Pro Glu Pro Thr Phe
 245 250
 <210> 11
 <211> 618
 <212> PRT
 <213> 埃默森篮状菌
 <400> 11
 Met Ala Ser Leu Val Ala Gly Ala Leu Cys Ile Leu Gly Leu Thr Pro
 1 5 10 15
 Ala Ala Phe Ala Arg Ala Pro Val Ala Ala Arg Ala Thr Gly Ser Leu
 20 25 30
 Asp Ser Phe Leu Ala Thr Glu Thr Pro Ile Ala Leu Gln Gly Val Leu
 35 40 45
 Asn Asn Ile Gly Pro Asn Gly Ala Asp Val Ala Gly Ala Ser Ala Gly
 50 55 60
 Ile Val Val Ala Ser Pro Ser Arg Ser Asp Pro Asn Tyr Phe Tyr Ser
 65 70 75 80

[0018]

Trp Thr Arg Asp Ala Ala Leu Thr Ala Lys Tyr Leu Val Asp Ala Phe
 85 90 95
 Ile Ala Gly Asn Lys Asp Leu Glu Gln Thr Ile Gln Gln Tyr Ile Ser
 100 105 110
 Ala Gln Ala Lys Val Gln Thr Ile Ser Asn Pro Ser Gly Asp Leu Ser
 115 120 125
 Thr Gly Gly Leu Gly Glu Pro Lys Phe Asn Val Asn Glu Thr Ala Phe
 130 135 140
 Thr Gly Pro Trp Gly Arg Pro Gln Arg Asp Gly Pro Ala Leu Arg Ala
 145 150 155 160
 Thr Ala Leu Ile Ala Tyr Ala Asn Tyr Leu Ile Asp Asn Gly Glu Ala
 165 170 175
 Ser Thr Ala Asp Glu Ile Ile Trp Pro Ile Val Gln Asn Asp Leu Ser
 180 185 190
 Tyr Ile Thr Gln Tyr Trp Asn Ser Ser Thr Phe Asp Leu Trp Glu Glu
 195 200 205
 Val Glu Gly Ser Ser Phe Phe Thr Thr Ala Val Gln His Arg Ala Leu
 210 215 220
 Val Glu Gly Asn Ala Leu Ala Thr Arg Leu Asn His Thr Cys Ser Asn
 225 230 235 240
 Cys Val Ser Gln Ala Pro Gln Val Leu Cys Phe Leu Gln Ser Tyr Trp
 245 250 255
 Thr Gly Ser Tyr Val Leu Ala Asn Phe Gly Gly Ser Gly Arg Ser Gly
 260 265 270
 Lys Asp Val Asn Ser Ile Leu Gly Ser Ile His Thr Phe Asp Pro Ala
 275 280 285
 Gly Gly Cys Asp Asp Ser Thr Phe Gln Pro Cys Ser Ala Arg Ala Leu
 290 295 300
 Ala Asn His Lys Val Val Thr Asp Ser Phe Arg Ser Ile Tyr Ala Ile
 305 310 315 320
 Asn Ser Gly Ile Ala Glu Gly Ser Ala Val Ala Val Gly Arg Tyr Pro
 325 330 335
 Glu Asp Val Tyr Gln Gly Gly Asn Pro Trp Tyr Leu Ala Thr Ala Ala
 340 345 350
 Ala Ala Glu Gln Leu Tyr Asp Ala Ile Tyr Gln Trp Lys Lys Ile Gly
 355 360 365
 Ser Ile Ser Ile Thr Asp Val Ser Leu Pro Phe Phe Gln Asp Ile Tyr
 370 375 380

[0019]

Pro Ser Ala Ala Val Gly Thr Tyr Asn Ser Gly Ser Thr Thr Phe Asn
 385 390 395 400
 Asp Ile Ile Ser Ala Val Gln Thr Tyr Gly Asp Gly Tyr Leu Ser Ile
 405 410 415
 Val Glu Lys Tyr Thr Pro Ser Asp Gly Ser Leu Thr Glu Gln Phe Ser
 420 425 430
 Arg Thr Asp Gly Thr Pro Leu Ser Ala Ser Ala Leu Thr Trp Ser Tyr
 435 440 445
 Ala Ser Leu Leu Thr Ala Ser Ala Arg Arg Gln Ser Val Val Pro Ala
 450 455 460
 Ser Trp Gly Glu Ser Ser Ala Ser Ser Val Pro Ala Val Cys Ser Ala
 465 470 475 480
 Thr Ser Ala Thr Gly Pro Tyr Ser Thr Ala Thr Asn Thr Val Trp Pro
 485 490 495
 Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ser Thr Thr Thr Ser Ser Ala Pro Cys Thr
 500 505 510
 Thr Pro Thr Ser Val Ala Val Thr Phe Asp Glu Ile Val Ser Thr Ser
 515 520 525
 Tyr Gly Glu Thr Ile Tyr Leu Ala Gly Ser Ile Pro Glu Leu Gly Asn
 530 535 540
 Trp Ser Thr Ala Ser Ala Ile Pro Leu Arg Ala Asp Ala Tyr Thr Asn
 545 550 555 560
 Ser Asn Pro Leu Trp Tyr Val Thr Val Asn Leu Pro Pro Gly Thr Ser
 565 570 575
 Phe Glu Tyr Lys Phe Phe Lys Asn Gln Thr Asp Gly Thr Ile Val Trp
 580 585 590
 Glu Asp Asp Pro Asn Arg Ser Tyr Thr Val Pro Ala Tyr Cys Gly Gln
 595 600 605
 Thr Thr Ala Ile Leu Asp Asp Ser Trp Gln
 610 615
 <210> 12
 <211> 574
 <212> PRT
 <213> 瓣环栓菌
 <400> 12
 Met Arg Phe Thr Leu Leu Thr Ser Leu Leu Gly Leu Ala Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 Phe Ala Gln Ser Ser Ala Ala Asp Ala Tyr Val Ala Ser Glu Ser Pro
 20 25 30
 Ile Ala Lys Ala Gly Val Leu Ala Asn Ile Gly Pro Ser Gly Ser Lys

[0020]

35	40	45
Ser Asn Gly Ala Lys Ala Gly Ile Val Ile Ala Ser Pro Ser Thr Ser 50	55	60
Asn Pro Asn Tyr Leu Tyr Thr Trp Thr Arg Asp Ser Ser Leu Val Phe 65	70	75
Lys Ala Leu Ile Asp Gln Phe Thr Thr Gly Glu Asp Thr Ser Leu Arg 85	90	95
Thr Leu Ile Asp Glu Phe Thr Ser Ala Glu Ala Ile Leu Gln Gln Val 100	105	110
Pro Asn Pro Ser Gly Thr Val Ser Thr Gly Gly Leu Gly Glu Pro Lys 115	120	125
Phe Asn Ile Asp Glu Thr Ala Phe Thr Asp Ala Trp Gly Arg Pro Gln 130	135	140
Arg Asp Gly Pro Ala Leu Arg Ala Thr Ala Ile Ile Thr Tyr Ala Asn 145	150	155
Trp Leu Leu Asp Asn Lys Asn Thr Thr Tyr Val Thr Asn Thr Leu Trp 165	170	175
Pro Ile Ile Lys Leu Asp Leu Asp Tyr Val Ala Ser Asn Trp Asn Gln 180	185	190
Ser Thr Phe Asp Leu Trp Glu Glu Ile Asn Ser Ser Ser Phe Phe Thr 195	200	205
Thr Ala Val Gln His Arg Ala Leu Arg Glu Gly Ala Thr Phe Ala Asn 210	215	220
Arg Ile Gly Gln Thr Ser Val Val Ser Gly Tyr Thr Thr Gln Ala Asn 225	230	235
Asn Leu Leu Cys Phe Leu Gln Ser Tyr Trp Asn Pro Thr Gly Gly Tyr 245	250	255
Ile Thr Ala Asn Thr Gly Gly Gly Arg Ser Gly Lys Asp Ala Asn Thr 260	265	270
Val Leu Thr Ser Ile His Thr Phe Asp Pro Ala Ala Gly Cys Asp Ala 275	280	285
Val Thr Phe Gln Pro Cys Ser Asp Lys Ala Leu Ser Asn Leu Lys Val 290	295	300
Tyr Val Asp Ala Phe Arg Ser Ile Tyr Ser Ile Asn Ser Gly Ile Ala 305	310	315
Ser Asn Ala Ala Val Ala Thr Gly Arg Tyr Pro Glu Asp Ser Tyr Met 325	330	335
Gly Gly Asn Pro Trp Tyr Leu Thr Thr Ser Ala Val Ala Glu Gln Leu 340	345	350

[0021]

Tyr Asp Ala Leu Ile Val Trp Asn Lys Leu Gly Ala Leu Asn Val Thr
 355 360 365
 Ser Thr Ser Leu Pro Phe Phe Gln Gln Phe Ser Ser Gly Val Thr Val
 370 375 380
 Gly Thr Tyr Ala Ser Ser Ser Ser Thr Phe Lys Thr Leu Thr Ser Ala
 385 390 395 400
 Ile Lys Thr Phe Ala Asp Gly Phe Leu Ala Val Asn Ala Lys Tyr Thr
 405 410 415
 Pro Ser Asn Gly Gly Leu Ala Glu Gln Tyr Ser Arg Ser Asn Gly Ser
 420 425 430
 Pro Val Ser Ala Val Asp Leu Thr Trp Ser Tyr Ala Ala Ala Leu Thr
 435 440 445
 Ser Phe Ala Ala Arg Ser Gly Lys Thr Tyr Ala Ser Trp Gly Ala Ala
 450 455 460
 Gly Leu Thr Val Pro Thr Thr Cys Ser Gly Ser Gly Gly Ala Gly Thr
 465 470 475 480
 Val Ala Val Thr Phe Asn Val Gln Ala Thr Thr Val Phe Gly Glu Asn
 485 490 495
 Ile Tyr Ile Thr Gly Ser Val Pro Ala Leu Gln Asn Trp Ser Pro Asp
 500 505 510
 Asn Ala Leu Ile Leu Ser Ala Ala Asn Tyr Pro Thr Trp Ser Ile Thr
 515 520 525
 Val Asn Leu Pro Ala Ser Thr Thr Ile Glu Tyr Lys Tyr Ile Arg Lys
 530 535 540
 Phe Asn Gly Ala Val Thr Trp Glu Ser Asp Pro Asn Asn Ser Ile Thr
 545 550 555 560
 Thr Pro Ala Ser Gly Thr Phe Thr Gln Asn Asp Thr Trp Arg
 565 570
 <210> 13
 <211> 583
 <212> PRT
 <213> 微小根毛霉
 <400> 13
 Ala Thr Ser Asp Asp Trp Lys Gly Lys Ala Ile Tyr Gln Leu Leu Thr
 1 5 10 15
 Asp Arg Phe Gly Arg Ala Asp Asp Ser Thr Ser Asn Cys Ser Asn Leu
 20 25 30
 Ser Asn Tyr Cys Gly Gly Thr Tyr Glu Gly Ile Thr Lys His Leu Asp
 35 40 45

[0022]

Tyr Ile Ser Gly Met Gly Phe Asp Ala Ile Trp Ile Ser Pro Ile Pro
 50 55 60
 Lys Asn Ser Asp Gly Gly Tyr His Gly Tyr Trp Ala Thr Asp Phe Tyr
 65 70 75 80
 Gln Leu Asn Ser Asn Phe Gly Asp Glu Ser Gln Leu Lys Ala Leu Ile
 85 90 95
 Gln Ala Ala His Glu Arg Asp Met Tyr Val Met Leu Asp Val Val Ala
 100 105 110
 Asn His Ala Gly Pro Thr Ser Asn Gly Tyr Ser Gly Tyr Thr Phe Gly
 115 120 125
 Asp Ala Ser Leu Tyr His Pro Lys Cys Thr Ile Asp Tyr Asn Asp Gln
 130 135 140
 Thr Ser Ile Glu Gln Cys Trp Val Ala Asp Glu Leu Pro Asp Ile Asp
 145 150 155 160
 Thr Glu Asn Ser Asp Asn Val Ala Ile Leu Asn Asp Ile Val Ser Gly
 165 170 175
 Trp Val Gly Asn Tyr Ser Phe Asp Gly Ile Arg Ile Asp Thr Val Lys
 180 185 190
 His Ile Arg Lys Asp Phe Trp Thr Gly Tyr Ala Glu Ala Ala Gly Val
 195 200 205
 Phe Ala Thr Gly Glu Val Phe Asn Gly Asp Pro Ala Tyr Val Gly Pro
 210 215 220
 Tyr Gln Lys Tyr Leu Pro Ser Leu Ile Asn Tyr Pro Met Tyr Tyr Ala
 225 230 235 240
 Leu Asn Asp Val Phe Val Ser Lys Ser Lys Gly Phe Ser Arg Ile Ser
 245 250 255
 Glu Met Leu Gly Ser Asn Arg Asn Ala Phe Glu Asp Thr Ser Val Leu
 260 265 270
 Thr Thr Phe Val Asp Asn His Asp Asn Pro Arg Phe Leu Asn Ser Gln
 275 280 285
 Ser Asp Lys Ala Leu Phe Lys Asn Ala Leu Thr Tyr Val Leu Leu Gly
 290 295 300
 Glu Gly Ile Pro Ile Val Tyr Tyr Gly Ser Glu Gln Gly Phe Ser Gly
 305 310 315 320
 Gly Ala Asp Pro Ala Asn Arg Glu Val Leu Trp Thr Thr Asn Tyr Asp
 325 330 335
 Thr Ser Ser Asp Leu Tyr Gln Phe Ile Lys Thr Val Asn Ser Val Arg
 340 345 350
 Met Lys Ser Asn Lys Ala Val Tyr Met Asp Ile Tyr Val Gly Asp Asn

[0023]

355 360 365
 Ala Tyr Ala Phe Lys His Gly Asp Ala Leu Val Val Leu Asn Asn Tyr
 370 375 380
 Gly Ser Gly Ser Thr Asn Gln Val Ser Phe Ser Val Ser Gly Lys Phe
 385 390 395 400
 Asp Ser Gly Ala Ser Leu Met Asp Ile Val Ser Asn Ile Thr Thr Thr
 405 410 415
 Val Ser Ser Asp Gly Thr Val Thr Phe Asn Leu Lys Asp Gly Leu Pro
 420 425 430
 Ala Ile Phe Thr Ser Ala Thr Gly Gly Thr Thr Thr Thr Ala Thr Pro
 435 440 445
 Thr Gly Ser Gly Ser Val Thr Ser Thr Ser Lys Thr Thr Ala Thr Ala
 450 455 460
 Ser Lys Thr Ser Thr Ser Thr Ser Ser Thr Ser Cys Thr Thr Pro Thr
 465 470 475 480
 Ala Val Ala Val Thr Phe Asp Leu Thr Ala Thr Thr Thr Tyr Gly Glu
 485 490 495
 Asn Ile Tyr Leu Val Gly Ser Ile Ser Gln Leu Gly Asp Trp Glu Thr
 500 505 510
 Ser Asp Gly Ile Ala Leu Ser Ala Asp Lys Tyr Thr Ser Ser Asp Pro
 515 520 525
 Leu Trp Tyr Val Thr Val Thr Leu Pro Ala Gly Glu Ser Phe Glu Tyr
 530 535 540
 Lys Phe Ile Arg Ile Glu Ser Asp Asp Ser Val Glu Trp Glu Ser Asp
 545 550 555 560
 Pro Asn Arg Glu Tyr Thr Val Pro Gln Ala Cys Gly Thr Ser Thr Ala
 565 570 575
 Thr Val Thr Asp Thr Trp Arg
 580
 <210> 14
 <211> 661
 <212> PRT
 <213> 里氏木霉
 <400> 14
 Leu Tyr Ile Asn Gly Ser Val Ile Ala Pro Cys Asp Ser Pro Ile Tyr
 1 5 10 15
 Cys His Gly Asp Ile Leu Arg Glu Ile Glu Leu Ala His Pro Phe Ser
 20 25 30
 Asp Ser Lys Thr Phe Val Asp Met Pro Ala Lys Arg Pro Leu Ser Glu
 35 40 45

[0024]

Ile Gln Thr Ala Phe Ala Asn Leu Pro Lys Pro Leu Arg Asn Asp Ser
 50 55 60

Ser Leu Gln Thr Phe Leu Ala Ser Tyr Phe Ala Asp Ala Gly Gly Glu
 65 70 75 80

Leu Ile Gln Val Pro Arg Ala Asn Leu Thr Thr Asn Pro Thr Phe Leu
 85 90 95

Ser Lys Ile Asn Asp Thr Val Ile Glu Gln Phe Val Thr Gln Val Ile
 100 105 110

Asp Ile Trp Pro Asp Leu Thr Arg Arg Tyr Ala Gly Asp Ala Ala Val
 115 120 125

Lys Asn Cys Ser Ser Cys Pro Asn Ser Phe Ile Pro Val Asn Arg Thr
 130 135 140

Phe Val Val Ala Gly Gly Arg Phe Arg Gln Pro Tyr Tyr Trp Asp Ser
 145 150 155 160

Tyr Trp Ile Val Gln Gly Leu Leu Arg Thr Gly Gly Ala Phe Val Gly
 165 170 175

Ile Ala Arg Asn Thr Ile Asp Asn Phe Leu Asp Phe Ile Glu Arg Phe
 180 185 190

Gly Phe Val Pro Asn Gly Ala Arg Leu Tyr Tyr Leu Asn Arg Ser Gln
 195 200 205

Pro Pro Leu Leu Ser Arg Met Val Lys Val Tyr Ile Asp His Thr Asn
 210 215 220

Asp Thr Ala Ile Leu Arg Arg Ala Leu Pro Leu Leu Val Lys Glu His
 225 230 235 240

Glu Phe Trp Thr Arg Asn Arg Thr Val Asp Val Arg Val Asn Asn Lys
 245 250 255

Thr Tyr Val Leu Asn Gln Tyr Ala Val Gln Asn Thr Gln Pro Arg Pro
 260 265 270

Glu Ser Phe Arg Glu Asp Phe Gln Thr Ala Asn Asn Arg Ser Tyr Tyr
 275 280 285

Ala Ala Ser Gly Ile Ile Tyr Pro Ala Thr Lys Pro Leu Asn Glu Ser
 290 295 300

Gln Ile Glu Glu Leu Tyr Ala Asn Leu Ala Ser Gly Ala Glu Ser Gly
 305 310 315 320

Asn Asp Tyr Thr Ala Arg Trp Leu Ala Asp Pro Ser Asp Ala Met Arg
 325 330 335

Asp Val Tyr Phe Pro Leu Arg Ser Leu Asn Asn Lys Asp Ile Val Pro
 340 345 350

[0025]

Val Asp Leu Asn Ser Ile Leu Tyr Gly Asn Glu Leu Ala Ile Ala Gln
 355 360 365
 Phe Tyr Asn Gln Thr Gly Asn Thr Thr Ala Ala Arg Glu Trp Ser Ser
 370 375 380
 Leu Ala Ala Asn Arg Ser Ala Ser Ile Gln Ala Val Phe Trp Asn Glu
 385 390 395 400
 Thr Leu Phe Ser Tyr Phe Asp Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Ser Gln Asn
 405 410 415
 Ile Tyr Val Pro Leu Asp Lys Asp Ala Val Ala Leu Asp Arg Gln Thr
 420 425 430
 Ala Pro Pro Gly Lys Gln Val Leu Phe His Val Gly Gln Phe Tyr Pro
 435 440 445
 Phe Trp Thr Gly Ala Ala Pro Glu Tyr Leu Arg Asn Asn Pro Phe Ala
 450 455 460
 Val Thr Arg Ile Phe Asp Arg Val Lys Ser Tyr Leu Asp Thr Arg Pro
 465 470 475 480
 Gly Gly Ile Pro Ala Ser Asn Val Asn Thr Gly Gln Gln Trp Asp Gln
 485 490 495
 Pro Asn Val Trp Pro Pro His Met His Ile Leu Met Glu Ser Leu Asn
 500 505 510
 Ser Val Pro Ala Thr Phe Ser Glu Ala Asp Pro Ala Tyr Gln Asp Val
 515 520 525
 Arg Asn Leu Ser Leu Arg Leu Gly Gln Arg Tyr Leu Asp Phe Thr Phe
 530 535 540
 Cys Thr Trp Arg Ala Thr Gly Gly Ser Thr Ser Glu Thr Pro Lys Leu
 545 550 555 560
 Gln Gly Leu Thr Asp Gln Asp Val Gly Ile Met Phe Glu Lys Tyr Asn
 565 570 575
 Asp Asn Ser Thr Asn Ala Ala Gly Gly Gly Gly Glu Tyr Gln Val Val
 580 585 590
 Glu Gly Phe Gly Trp Thr Asn Gly Val Leu Leu Trp Thr Ala Asp Thr
 595 600 605
 Phe Gly Ser Gln Leu Lys Arg Pro Gln Cys Gly Asn Ile Met Ala Gly
 610 615 620
 His Pro Ala Pro Ser Lys Arg Ser Ala Val Gln Leu Asp Met Trp Asp
 625 630 635 640
 Ala Ser Arg Val Lys Lys Phe Gly Arg Arg Ala Glu Gly Arg Met Gly
 645 650 655
 Thr Leu His Ala Trp

[0026]

660

<210> 15
 <211> 862
 <212> PRT
 <213> 芽孢杆菌属

<220>
 <221> 信号
 <222> (1)..(33)

<400> 15

Met Ser Leu Ile Arg Ser Arg Tyr Asn His Phe Val Ile Leu Phe Thr
 1 5 10 15

Val Ala Ile Met Phe Leu Thr Val Cys Phe Pro Ala Tyr Lys Ala Leu
 20 25 30

Ala Asp Ser Thr Ser Thr Glu Val Ile Val His Tyr His Arg Phe Asp
 35 40 45

Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Asp Leu Trp Met Trp Pro Tyr Gln Pro Val
 50 55 60

Asn Gly Asn Gly Ala Ala Tyr Glu Phe Ser Gly Lys Asp Asp Phe Gly
 65 70 75 80

Val Lys Ala Asp Val Gln Val Pro Gly Asp Asp Thr Gln Val Gly Leu
 85 90 95

Ile Val Arg Thr Asn Asp Trp Ser Gln Lys Asn Thr Ser Asp Asp Leu
 100 105 110

His Ile Asp Leu Thr Lys Gly His Glu Ile Trp Ile Val Gln Gly Asp
 115 120 125

Pro Asn Ile Tyr Tyr Asn Leu Ser Asp Ala Gln Ala Ala Ala Thr Pro
 130 135 140

Lys Val Ser Asn Ala Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Thr Val Leu Ala Lys
 145 150 155 160

Leu Thr Asn Pro Met Thr Leu Ser Asp Gly Ser Ser Gly Phe Thr Val
 165 170 175

Thr Asp Lys Thr Thr Gly Glu Gln Ile Pro Val Thr Ala Ala Thr Asn
 180 185 190

Ala Asn Ser Ala Ser Ser Ser Glu Gln Thr Asp Leu Val Gln Leu Thr
 195 200 205

Leu Ala Ser Ala Pro Asp Val Ser His Thr Ile Gln Val Gly Ala Ala
 210 215 220

Gly Tyr Glu Ala Val Asn Leu Ile Pro Arg Asn Val Leu Asn Leu Pro
 225 230 235 240

Arg Tyr Tyr Tyr Ser Gly Asn Asp Leu Gly Asn Val Tyr Ser Asn Lys
 245 250 255

[0027]

Ala Thr Ala Phe Arg Val Trp Ala Pro Thr Ala Ser Asp Val Gln Leu
260 265 270

Leu Leu Tyr Asn Ser Glu Thr Gly Pro Val Thr Lys Gln Leu Glu Met
275 280 285

Gln Lys Ser Asp Asn Gly Thr Trp Lys Leu Lys Val Pro Gly Asn Leu
290 295 300

Lys Asn Trp Tyr Tyr Leu Tyr Gln Val Thr Val Asn Gly Lys Thr Gln
305 310 315 320

Thr Ala Val Asp Pro Tyr Val Arg Ala Ile Ser Val Asn Ala Thr Arg
325 330 335

Gly Met Ile Val Asp Leu Glu Asp Thr Asn Pro Pro Gly Trp Lys Glu
340 345 350

Asp His Gln Gln Thr Pro Ala Asn Pro Val Asp Glu Val Ile Tyr Glu
355 360 365

Val His Val Arg Asp Phe Ser Ile Asp Ala Asn Ser Gly Met Lys Asn
370 375 380

Lys Gly Lys Tyr Leu Ala Phe Thr Glu His Gly Thr Lys Gly Pro Asp
385 390 395 400

Asn Val Lys Thr Gly Ile Asp Ser Leu Lys Glu Leu Gly Ile Asn Ala
405 410 415

Val Gln Leu Gln Pro Ile Glu Glu Phe Asn Ser Ile Asp Glu Thr Gln
420 425 430

Pro Asn Met Tyr Asn Trp Gly Tyr Asp Pro Arg Asn Tyr Asn Val Pro
435 440 445

Glu Gly Ala Tyr Ala Thr Thr Pro Glu Gly Thr Ala Arg Ile Thr Gln
450 455 460

Leu Lys Gln Leu Ile Gln Ser Ile His Lys Asp Arg Ile Ala Ile Asn
465 470 475 480

Met Asp Val Val Tyr Asn His Thr Phe Asn Val Gly Val Ser Asp Phe
485 490 495

Asp Lys Ile Val Pro Gln Tyr Tyr Tyr Arg Thr Asp Ser Ala Gly Asn
500 505 510

Tyr Thr Asn Gly Ser Gly Val Gly Asn Glu Ile Ala Thr Glu Arg Pro
515 520 525

Met Val Gln Lys Phe Val Leu Asp Ser Val Lys Tyr Trp Val Lys Glu
530 535 540

Tyr His Ile Asp Gly Phe Arg Phe Asp Leu Met Ala Leu Leu Gly Lys
545 550 555 560

[0028]

Asp Thr Met Ala Lys Ile Ser Lys Glu Leu His Ala Ile Asn Pro Gly
 565 570 575

Ile Val Leu Tyr Gly Glu Pro Trp Thr Gly Gly Thr Ser Gly Leu Ser
 580 585 590

Ser Asp Gln Leu Val Thr Lys Gly Gln Gln Lys Gly Leu Gly Ile Gly
 595 600 605

Val Phe Asn Asp Asn Ile Arg Asn Gly Leu Asp Gly Asn Val Phe Asp
 610 615 620

Lys Ser Ala Gln Gly Phe Ala Thr Gly Asp Pro Asn Gln Val Asn Val
 625 630 635 640

Ile Lys Asn Gly Val Met Gly Ser Ile Ser Asp Phe Thr Ser Ala Pro
 645 650 655

Ser Glu Thr Ile Asn Tyr Val Thr Ser His Asp Asn Met Thr Leu Trp
 660 665 670

Asp Lys Ile Ser Ala Ser Asn Pro Asn Asp Thr Gln Ala Asp Arg Ile
 675 680 685

Lys Met Asp Glu Leu Ala Gln Ala Val Val Phe Thr Ser Gln Gly Val
 690 695 700

Pro Phe Met Gln Gly Gly Glu Glu Met Leu Arg Thr Lys Gly Gly Asn
 705 710 715 720

Asp Asn Ser Tyr Asn Ala Gly Asp Ser Val Asn Gln Phe Asp Trp Ser
 725 730 735

Arg Lys Ala Gln Phe Glu Asn Val Phe Asp Tyr Tyr Ser Trp Leu Ile
 740 745 750

His Leu Arg Asp Asn His Pro Ala Phe Arg Met Thr Thr Ala Asp Gln
 755 760 765

Ile Lys Gln Asn Leu Thr Phe Leu Asp Ser Pro Thr Asn Thr Val Ala
 770 775 780

Phe Glu Leu Lys Asn His Ala Asn His Asp Lys Trp Lys Asn Ile Ile
 785 790 795 800

Val Met Tyr Asn Pro Asn Lys Thr Ala Gln Thr Leu Thr Leu Pro Ser
 805 810 815

Gly Asn Trp Thr Ile Val Gly Leu Gly Asn Gln Val Gly Glu Lys Ser
 820 825 830

Leu Gly His Val Asn Gly Thr Val Glu Val Pro Ala Leu Ser Thr Ile
 835 840 845

Ile Leu His Gln Gly Thr Ser Glu Asp Val Ile Asp Gln Asn
 850 855 860

[0029]

<210> 16
 <211> 616
 <212> PRT
 <213> 草酸青霉菌

 <400> 16
 Met Arg Leu Thr Leu Leu Ser Gly Val Ala Gly Val Leu Cys Ala Gly
 1 5 10 15

 Gln Leu Thr Ala Ala Arg Pro Asp Pro Lys Gly Gly Asn Leu Thr Pro
 20 25 30

 Phe Ile His Lys Glu Gly Glu Arg Ser Leu Gln Gly Ile Leu Asp Asn
 35 40 45

 Leu Gly Gly Arg Gly Lys Lys Thr Pro Gly Thr Ala Ala Gly Leu Phe
 50 55 60

 Ile Ala Ser Pro Asn Thr Glu Asn Pro Asn Tyr Tyr Thr Trp Thr
 65 70 75 80

 Arg Asp Ser Ala Leu Thr Ala Lys Cys Leu Ile Asp Leu Phe Glu Asp
 85 90 95

 Ser Arg Ala Lys Phe Pro Ile Asp Arg Lys Tyr Leu Glu Thr Gly Ile
 100 105 110

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

 Ser Gly Thr Leu Lys Asp Gly Ser Gly Leu Gly Glu Pro Lys Phe Glu
 130 135 140

 Ile Asp Leu Asn Pro Phe Ser Gly Ala Trp Gly Arg Pro Gln Arg Asp
 145 150 155 160

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

 Ile Ser His Gly Gln Lys Ser Asp Val Ser Gln Val Met Trp Pro Ile
 180 185 190

 Ile Ala Asn Asp Leu Ala Tyr Val Gly Gln Tyr Trp Asn Asn Thr Gly
 195 200 205

 Phe Asp Leu Trp Glu Glu Val Asp Gly Ser Ser Phe Phe Thr Ile Ala
 210 215 220

 Val Gln His Arg Ala Leu Val Glu Gly Ser Gln Leu Ala Lys Lys Leu
 225 230 235 240

 Gly Lys Ser Cys Asp Ala Cys Asp Ser Gln Pro Pro Gln Ile Leu Cys
 245 250 255

 Phe Leu Gln Ser Phe Trp Asn Gly Lys Tyr Ile Thr Ser Asn Ile Asn
 260 265 270

 Thr Gln Ala Ser Arg Ser Gly Ile Asp Leu Asp Ser Val Leu Gly Ser
 275 280 285

[0030]

Ile His Thr Phe Asp Pro Glu Ala Ala Cys Asp Asp Ala Thr Phe Gln
 290 295 300
 Pro Cys Ser Ala Arg Ala Leu Ala Asn His Lys Val Tyr Val Asp Ser
 305 310 315 320
 Phe Arg Ser Ile Tyr Lys Ile Asn Ala Gly Leu Ala Glu Gly Ser Ala
 325 330 335
 Ala Asn Val Gly Arg Tyr Pro Glu Asp Val Tyr Gln Gly Gly Asn Pro
 340 345 350
 Trp Tyr Leu Ala Thr Leu Gly Ala Ser Glu Leu Leu Tyr Asp Ala Leu
 355 360 365
 Tyr Gln Trp Asp Arg Leu Gly Lys Leu Glu Val Ser Glu Thr Ser Leu
 370 375 380
 Ser Phe Phe Lys Asp Phe Asp Ala Thr Val Lys Ile Gly Ser Tyr Ser
 385 390 395 400
 Arg Asn Ser Lys Thr Tyr Lys Lys Leu Thr Gln Ser Ile Lys Ser Tyr
 405 410 415
 Ala Asp Gly Phe Ile Gln Leu Val Gln Gln Tyr Thr Pro Ser Asn Gly
 420 425 430
 Ser Leu Ala Glu Gln Tyr Asp Arg Asn Thr Ala Ala Pro Leu Ser Ala
 435 440 445
 Asn Asp Leu Thr Trp Ser Phe Ala Ser Phe Leu Thr Ala Thr Gln Arg
 450 455 460
 Arg Asp Ala Val Val Pro Pro Ser Trp Gly Ala Lys Ser Ala Asn Lys
 465 470 475 480
 Val Pro Thr Thr Cys Ser Ala Ser Pro Val Val Gly Thr Tyr Lys Ala
 485 490 495
 Pro Thr Ala Thr Phe Ser Ser Lys Thr Lys Cys Val Pro Ala Lys Asp
 500 505 510
 Ile Val Pro Ile Thr Phe Tyr Leu Ile Glu Asn Thr Tyr Tyr Gly Glu
 515 520 525
 Asn Val Phe Met Ser Gly Asn Ile Thr Ala Leu Gly Asn Trp Asp Ala
 530 535 540
 Lys Lys Gly Phe Pro Leu Thr Ala Asn Leu Tyr Thr Gln Asp Gln Asn
 545 550 555 560
 Leu Trp Phe Ala Ser Val Glu Phe Ile Pro Ala Gly Thr Pro Phe Glu
 565 570 575
 Tyr Lys Tyr Tyr Lys Val Glu Pro Asn Gly Asp Ile Thr Trp Glu Lys
 580 585 590

[0031]

Gly Pro Asn Arg Val Phe Val Ala Pro Thr Gly Cys Pro Val Gln Pro
 595 600 605

His Ser Asn Asp Val Trp Gln Phe
 610 615

<210> 17
 <211> 573
 <212> PRT
 <213> 血红密孔菌

<220>
 <221> 信号
 <222> (1)..(18)

<400> 17

Met Arg Phe Thr Leu Leu Ala Ser Leu Ile Gly Leu Ala Val Gly Ala
 1 5 10 15

Phe Ala Gln Ser Ser Ala Val Asp Ala Tyr Val Ala Ser Glu Ser Pro
 20 25 30

Ile Ala Lys Gln Gly Val Leu Asn Asn Ile Gly Pro Asn Gly Ser Lys
 35 40 45

Ala His Gly Ala Lys Ala Gly Ile Val Val Ala Ser Pro Ser Thr Glu
 50 55 60

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

Lys Leu Leu Ile Asp Gln Phe Thr Ser Gly Asp Asp Thr Ser Leu Arg
 85 90 95

Gly Leu Ile Asp Asp Phe Thr Ser Ala Glu Ala Ile Leu Gln Gln Val
 100 105 110

Ser Asn Pro Ser Gly Thr Val Ser Thr Gly Gly Leu Gly Glu Pro Lys
 115 120 125

Phe Asn Ile Asp Glu Thr Ala Phe Thr Gly Ala Trp Gly Arg Pro Gln
 130 135 140

Arg Asp Gly Pro Ala Leu Arg Ala Thr Ser Ile Ile Arg Tyr Ala Asn
 145 150 155 160

Trp Leu Leu Asp Asn Gly Asn Thr Thr Tyr Val Ser Asn Thr Leu Trp
 165 170 175

Pro Val Ile Gln Leu Asp Leu Asp Tyr Val Ala Asp Asn Trp Asn Gln
 180 185 190

Ser Thr Phe Asp Leu Trp Glu Glu Val Asp Ser Ser Ser Phe Phe Thr
 195 200 205

Thr Ala Val Gln His Arg Ala Leu Arg Glu Gly Ala Thr Phe Ala Ser
 210 215 220

[0032]

Arg Ile Gly Gln Ser Ser Val Val Ser Gly Tyr Thr Thr Gln Ala Asp
 225 230 235 240
 Asn Leu Leu Cys Phe Leu Gln Ser Tyr Trp Asn Pro Ser Gly Gly Tyr
 245 250 255
 Val Thr Ala Asn Thr Gly Gly Gly Arg Ser Gly Lys Asp Ser Asn Thr
 260 265 270
 Val Leu Thr Ser Ile His Thr Phe Asp Pro Ala Ala Gly Cys Asp Ala
 275 280 285
 Ala Thr Phe Gln Pro Cys Ser Asp Lys Ala Leu Ser Asn Leu Lys Val
 290 295 300
 Tyr Val Asp Ala Phe Arg Ser Ile Tyr Thr Ile Asn Asn Gly Ile Ala
 305 310 315 320
 Ser Asn Ala Ala Val Ala Thr Gly Arg Tyr Pro Glu Asp Ser Tyr Met
 325 330 335
 Gly Gly Asn Pro Trp Tyr Leu Thr Thr Ser Ala Val Ala Glu Gln Leu
 340 345 350
 Tyr Asp Ala Leu Tyr Val Trp Asp Gln Leu Gly Gly Leu Asn Val Thr
 355 360 365
 Ser Thr Ser Leu Ala Phe Phe Gln Gln Phe Ala Ser Gly Leu Ser Thr
 370 375 380
 Gly Thr Tyr Ser Ala Ser Ser Ser Thr Tyr Ala Thr Leu Thr Ser Ala
 385 390 395 400
 Ile Arg Ser Phe Ala Asp Gly Phe Leu Ala Ile Asn Ala Lys Tyr Thr
 405 410 415
 Pro Ala Asp Gly Gly Leu Ala Glu Gln Tyr Ser Arg Asn Asp Gly Thr
 420 425 430
 Pro Leu Ser Ala Val Asp Leu Thr Trp Ser Tyr Ala Ala Ala Leu Thr
 435 440 445
 Ala Phe Ala Ala Arg Glu Gly Lys Thr Tyr Gly Ser Trp Gly Ala Ala
 450 455 460
 Gly Leu Thr Val Pro Ala Ser Cys Ser Gly Gly Gly Ala Thr Val
 465 470 475 480
 Ala Val Thr Phe Asn Val Gln Ala Thr Thr Val Phe Gly Glu Asn Ile
 485 490 495
 Tyr Ile Thr Gly Ser Val Ala Ala Leu Gln Asn Trp Ser Pro Asp Asn
 500 505 510
 Ala Leu Ile Leu Ser Ala Ala Asn Tyr Pro Thr Trp Ser Ile Thr Val
 515 520 525
 Asn Leu Pro Ala Asn Thr Val Val Gln Tyr Lys Tyr Ile Arg Lys Phe

[0033]

530 535 540

Asn Gly Gln Val Thr Trp Glu Ser Asp Pro Asn Asn Gln Ile Thr Thr
545 550 555 560

Pro Ser Gly Gly Ser Phe Thr Gln Asn Asp Val Trp Arg
565 570

<210> 18
<211> 576
<212> PRT
<213> 密粘褶菌

<220>
<221> 信号
<222> (1)..(17)

<220>
<221> 成熟肽
<222> (18)..(576)

<400> 18

Met Tyr Arg Phe Leu Val Cys Ala Leu Gly Leu Leu Gly Thr Val Leu
-15 -10 -5

Ala Gln Ser Val Asp Ser Tyr Val Gly Ser Glu Gly Pro Ile Ala Lys
-1 1 5 10 15

Ala Gly Val Leu Ala Asn Ile Gly Pro Asn Gly Ser Lys Ala Ser Gly
20 25 30

Ala Ala Ala Gly Val Val Val Ala Ser Pro Ser Lys Ser Asp Pro Asp
35 40 45

Tyr Trp Tyr Thr Trp Thr Arg Asp Ser Ser Leu Val Phe Lys Ser Leu
50 55 60

Ile Asp Gln Tyr Thr Thr Gly Ile Asp Ser Thr Ser Ser Leu Arg Ser
65 70 75

Leu Ile Asp Ser Phe Val Ile Ala Glu Ala Asn Ile Gln Gln Val Ser
80 85 90 95

Asn Pro Ser Gly Thr Leu Thr Thr Gly Gly Leu Gly Glu Pro Lys Phe
100 105 110

Asn Val Asp Glu Thr Ala Phe Thr Gly Ala Trp Gly Arg Pro Gln Arg
115 120 125

Asp Gly Pro Ala Leu Arg Ala Thr Ala Leu Ile Thr Tyr Gly Asn Trp
130 135 140

Leu Leu Ser Asn Gly Asn Thr Thr Trp Val Thr Ser Thr Leu Trp Pro
145 150 155

Ile Ile Gln Asn Asp Leu Asn Tyr Val Val Gln Tyr Trp Asn Gln Thr
160 165 170 175

Thr Phe Asp Leu Trp Glu Glu Val Asn Ser Ser Ser Phe Phe Thr Thr
180 185 190

[0034]

Ala Val Gln His Arg Ala Leu Arg Glu Gly Ala Ala Phe Ala Thr Lys
195 200 205

Ile Gly Gln Thr Ser Ser Val Ser Ser Tyr Thr Thr Gln Ala Ala Asn
210 215 220

Leu Leu Cys Phe Leu Gln Ser Tyr Trp Asn Pro Thr Ser Gly Tyr Ile
225 230 235

Thr Ala Asn Thr Gly Gly Gly Arg Ser Gly Lys Asp Ala Asn Thr Leu
240 245 250 255

Leu Ala Ser Ile His Thr Tyr Asp Pro Ser Ala Gly Cys Asp Ala Thr
260 265 270

Thr Phe Gln Pro Cys Ser Asp Lys Ala Leu Ser Asn Leu Lys Val Tyr
275 280 285

Val Asp Ser Phe Arg Ser Val Tyr Ser Ile Asn Ser Gly Ile Ala Ser
290 295 300

Asn Ala Ala Val Ala Thr Gly Arg Tyr Pro Glu Asp Ser Tyr Gln Gly
305 310 315

Gly Asn Pro Trp Tyr Leu Thr Thr Phe Ala Val Ala Glu Gln Leu Tyr
320 325 330 335

Asp Ala Leu Asn Val Trp Ala Ala Gln Gly Ser Leu Asn Val Thr Ser
340 345 350

Ile Ser Leu Pro Phe Phe Gln Gln Phe Ser Ser Ser Val Thr Ala Gly
355 360 365

Thr Tyr Ala Ser Ser Ser Thr Thr Tyr Thr Thr Leu Thr Ser Ala Ile
370 375 380

Lys Ser Phe Ala Asp Gly Phe Val Ala Ile Asn Ala Gln Tyr Thr Pro
385 390 395

Ser Asn Gly Gly Leu Ala Glu Gln Phe Ser Arg Ser Asn Gly Ala Pro
400 405 410 415

Val Ser Ala Val Asp Leu Thr Trp Ser Tyr Ala Ser Ala Leu Thr Ala
420 425 430

Phe Glu Ala Arg Asn Asn Thr Gln Phe Ala Gly Trp Gly Ala Val Gly
435 440 445

Leu Thr Val Pro Thr Ser Cys Ser Ser Asn Ser Gly Gly Gly Gly Gly
450 455 460

Ser Thr Val Ala Val Thr Phe Asn Val Asn Ala Gln Thr Val Trp Gly
465 470 475

Glu Asn Ile Tyr Ile Thr Gly Ser Val Asp Ala Leu Ser Asn Trp Ser
480 485 490 495

[0035]

Pro Asp Asn Ala Leu Leu Leu Ser Ser Ala Asn Tyr Pro Thr Trp Ser
 500 505 510

Ile Thr Val Asn Leu Pro Ala Ser Thr Ala Ile Gln Tyr Lys Tyr Ile
 515 520 525

Arg Lys Asn Asn Gly Ala Val Thr Trp Glu Ser Asp Pro Asn Asn Ser
 530 535 540

Ile Thr Thr Pro Ala Ser Gly Ser Val Thr Glu Asn Asp Thr Trp Arg
 545 550 555

<210> 19
 <211> 366
 <212> PRT
 <213> 大型亚灰树花菌

<400> 19

Ala Ile Pro Ala Ser Cys Ala Ser Thr Ile Thr Pro Ala Cys Leu Gln
 1 5 10 15

Ala Ile Tyr Gly Ile Pro Thr Thr Lys Ala Thr Gln Ser Ser Asn Lys
 20 25 30

Leu Ala Val Ser Gly Phe Ile Asp Gln Phe Ala Asn Lys Ala Asp Leu
 35 40 45

Lys Ser Phe Leu Ala Gln Phe Arg Lys Asp Ile Ser Ser Ser Thr Thr
 50 55 60

Phe Ser Leu Gln Thr Leu Asp Gly Gly Glu Asn Asp Gln Ser Pro Ser
 65 70 75 80

Glu Ala Gly Ile Glu Ala Asn Leu Asp Ile Gln Tyr Thr Val Gly Leu
 85 90 95

Ala Thr Gly Val Pro Thr Thr Phe Ile Ser Val Gly Asp Asp Phe Gln
 100 105 110

Asp Gly Asn Leu Glu Gly Phe Leu Asp Ile Ile Asn Phe Leu Leu Gly
 115 120 125

Glu Ser Asn Pro Pro Gln Val Leu Thr Thr Ser Tyr Gly Gln Asn Glu
 130 135 140

Asn Thr Ile Ser Ala Lys Leu Ala Asn Gln Leu Cys Asn Ala Tyr Ala
 145 150 155 160

Gln Leu Gly Ala Arg Gly Thr Ser Ile Leu Phe Ala Ser Gly Asp Gly
 165 170 175

Gly Val Ser Gly Ser Gln Ser Ala His Cys Ser Asn Phe Val Pro Thr
 180 185 190

Phe Pro Ser Gly Cys Pro Phe Met Thr Ser Val Gly Ala Thr Gln Gly
 195 200 205

Val Ser Pro Glu Thr Ala Ala Ala Phe Ser Ser Gly Gly Phe Ser Asn

[0036]

Glu Ser Asn Pro Pro Gln Val Leu Thr Thr Ser Tyr Gly Gln Asn Glu
 130 135 140

Asn Thr Ile Ser Ala Lys Leu Ala Asn Gln Leu Cys Asn Ala Tyr Ala
 145 150 155 160

Gln Leu Gly Ala Arg Gly Thr Ser Ile Leu Phe Ala Ser Gly Asp Gly
 165 170 175

Gly Val Ser Gly Ser Gln Ser Ala His Cys Ser Asn Phe Val Pro Thr
 180 185 190

Phe Pro Ser Gly Cys Pro Phe Met Thr Ser Val Gly Ala Thr Gln Gly
 195 200 205

Val Ser Pro Glu Thr Ala Ala Ala Phe Ser Ser Gly Gly Phe Ser Asn
 210 215 220

Val Phe Gly Ile Pro Ser Tyr Gln Ala Ser Ala Val Ser Gly Tyr Leu
 225 230 235 240

Ser Ala Leu Gly Ser Thr Asn Ser Gly Lys Phe Asn Arg Ser Gly Arg
 245 250 255

Gly Phe Pro Asp Val Ser Thr Gln Gly Val Asp Phe Gln Ile Val Ser
 260 265 270

Gly Gly Gln Thr Ile Gly Val Asp Gly Thr Ser Cys Ala Ser Pro Thr
 275 280 285

Phe Ala Ser Val Ile Ser Leu Val Asn Asp Arg Leu Ile Ala Ala Gly
 290 295 300

Lys Ser Pro Leu Gly Phe Leu Asn Pro Phe Leu Tyr Ser Ser Ala Gly
 305 310 315 320

Lys Ala Ala Leu Asn Asp Val Thr Ser Gly Ser Asn Pro Gly Cys Ser
 325 330 335

Thr Asn Gly Phe Pro Ala Lys Ala Gly Trp Asp Pro Val Thr Gly Leu
 340 345 350

Gly Thr Pro Asn Phe Ala Lys Leu Leu Thr Ala Val Gly Leu Arg His
 355 360 365

Gln His Gln
 370