



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104769107 B

(45)授权公告日 2017. 10. 31

(21)申请号 201380048673.8

(22)申请日 2013.09.04

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104769107 A

(43)申请公布日 2015.07.08

(30)优先权数据

1258260 2012.09.05 FR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.03.18

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/FR2013/052036 2013.09.04

(87)PCT国际申请的公布数据

W02014/037667 FR 2014.03.13

(73)专利权人 IFP新能源公司

地址 法国吕埃-马迈松

专利权人 普鲁泰斯公司

国家科学研究中心

(72)发明人 A·马尔若 H·马蒂斯

C·艾林哈克 C·于尔曼

C·佩尔西永 S·福尔

S·阿尔芒 M·佩蒂

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 孟凡宏

(51)Int.Cl.

C12N 9/42(2006.01)

C12P 7/10(2006.01)

C12P 7/04(2006.01)

C12P 7/16(2006.01)

C12P 19/02(2006.01)

C12P 19/14(2006.01)

审查员 张丹丹

权利要求书2页 说明书12页

序列表26页

(54)发明名称

低温下 β -葡萄糖苷酶活性增强的多肽

(57)摘要

本发明涉及在约30℃至约35℃之间的温度下具有增强的 β -葡萄糖苷酶活性的多肽。

1. 一种具有 β -葡萄糖苷酶活性的多肽,其氨基酸序列是SEQ ID NO:1。
2. 一种经纯化的或分离的核酸,其特征在于,它编码权利要求1所述的多肽。
3. 根据权利要求2所述的核酸,其特征在于,它包含核酸序列SEQ ID NO:2。
4. 一种载体,其特征在于,它包含权利要求2或3所述的核酸。
5. 一种分离的宿主细胞,其特征在于,它包含权利要求1所述的多肽、或权利要求2或3所述的核酸、或权利要求4所述的载体。
6. 根据权利要求5所述的分离的宿主细胞,其特征在于,它选自木霉属(*Trichoderma*)、曲霉属(*Aspergillus*)、脉孢菌属(*Neurospora*)、腐质霉属(*Humicola*)、青霉属(*Penicillium*)、镰刀菌属(*Fusarium*)、高温单孢菌属(*Thermomonospora*)、毁丝霉属(*Myceliophthora*)、金孢子菌属(*Chrysosporium*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、埃希氏菌属(*Escherichia*)、梭状芽孢杆菌(*Clostridium*)、纤维单胞菌属(*Cellulomonas*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、耶罗维亚酵母属(*Yarrowia*)、毕赤酵母属(*Pichia*)和酵母属(*Saccharomyces*)。
7. 根据权利要求5或6所述的分离的宿主细胞,其特征在于,它选自里氏木霉(*Trichoderma reesei*)、*Trichoderma viridae*、康氏木霉(*Trichoderma koningii*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)、文氏曲霉(*Aspergillus wentii*)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)、海枣曲霉(*Aspergillus phoenicis*)、粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)、灰腐质霉(*Humicola grisae*)、嗜热毁丝霉(*Myceliophthora thermopila*)、*Chrysosporium lucknowense*、嗜松青霉(*Penicillium pinophilum*)、草酸青霉(*Penicillium oxalicum*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)、糖解梭菌(*Clostridium saccharolyticum*)、拜氏梭菌(*Clostridium benjerinckii*)、丁酸梭菌(*Clostridium butylicum*)、毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、解脂耶罗维亚酵母(*Yarrowia lipolytica*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和它们的混合物。
8. 根据权利要求6所述的分离的宿主细胞,其特征在于,它是里氏木霉。
9. 根据权利要求6所述的分离的宿主细胞,其特征在于,它是酿酒酵母。
10. 权利要求1所述的多肽或权利要求5-9任一项所述的细胞用于水解 β -低聚糖的用途。
11. 权利要求1所述的多肽或权利要求5-9任一项所述的细胞用于将纤维二糖水解为葡萄糖的用途。
12. 权利要求1所述的多肽或权利要求5-9任一项所述的细胞用于生产生物燃料的用途。
13. 作用于木质纤维素生物质的酶组合物,所述酶组合物由丝状真菌产生,且含有至少一种根据权利要求1所述的多肽。
14. 一种从生物质生产生物燃料的方法,包括以下步骤:
 - 将待水解的材料悬浮于水相;
 - 在根据权利要求13所述的酶组合物或根据权利要求5-9任一项所述的细胞存在下水解木质纤维素生物质以产生含有葡萄糖的水解物;
 - 发酵水解物中的葡萄糖以产生发酵液;

-从发酵液中分离生物燃料，
所述水解和发酵步骤同时进行。

低温下 β -葡萄糖苷酶活性增强的多肽

[0001] 由于大量原料的可利用性和对乙醇作为燃料的兴趣,用纤维素生产乙醇的可能性已经得到很大的关注。用于这类工艺的基于纤维素的天然原料被称为“生物质”。已经将许多类型的生物质,例如木材、农业废弃物、草本作物和城市固体垃圾,考虑作为生产生物燃料的潜在原料。这些材料主要由纤维素、半纤维素和木质素组成。

[0002] 纤维素是由 β -1,4键连接的葡萄糖分子组成的聚合物,其对降解或解聚合非常有耐性。一旦纤维素被转化为葡萄糖,后者容易用酵母发酵成生物燃料,如乙醇。

[0003] 研究的用于将纤维素转化为葡萄糖的最古老的方法是基于酸水解。该工艺可以在浓酸或稀酸的存在下进行。然而,几个缺点(例如当使用浓酸时酸回收很少,以及使用稀酸的情况下葡萄糖的产量低)对于酸水解工艺的经济性是不利的。

[0004] 为了克服酸水解工艺的缺点,最近的纤维素转化工艺已经更多地与酶促水解(使用纤维素酶类型的酶)相关。然而,该木质纤维素生物质(如纤维素)的酶促水解的缺点是其工业生产方法较为昂贵。因此,有必要使用越来越有效的分泌纤维素酶的微生物菌株。在这方面,很多微生物包含水解纤维素的酶,例如真菌-木霉属(*Trichoderma*)、曲霉属(*Aspergillus*)、腐质霉属(*Humicola*)、或镰刀菌属(*Fusarium*),以及细菌例如高温单孢菌属(*Thermomonospora*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、纤维单胞菌属(*Cellulomonas*)和链霉菌属(*Streptomyces*)。由这些微生物分泌的酶具有用于将纤维素转化为葡萄糖的三种类型的活性,分为三组:随机攻击纤维素纤维内部的内切葡聚糖酶,攻击纤维末端释放纤维二糖的外切葡聚糖酶,和将该纤维二糖水解为葡萄糖的 β -葡萄糖苷酶。后者构成了纤维素转化过程的限制性步骤。实际上,该过程的第一个难题是纤维二糖到葡萄糖的转化,因为在生物燃料的生产过程中,任何在该过程最后没有被水解的纤维二糖代表了产量的损失。

[0005] 考虑到一些生产纤维素酶的微生物(包括木霉属)产生非常少的 β -葡萄糖苷酶,纤维二糖的积累是酶促水解的一个主要问题。实际上,由工业木霉属菌株分泌的总蛋白的不到1%是 β -葡萄糖苷酶类型。因此,这样少量的 β -葡萄糖苷酶导致了将纤维二糖水解为葡萄糖的低容量,从而造成在系统中纤维二糖的积累。高浓度的纤维二糖碰巧抑制其他纤维素酶,尤其是抑制其反应终产物是纤维二糖的外切葡聚糖酶的活性。为了克服这些缺点,发明人在他们的专利申请W02010/029259中开发了 β -葡萄糖苷酶基因使其能够获得具有增加的比活性的酶,从而大幅度改进将木质纤维素生物质转化为生物燃料的工艺。

[0006] 水解和发酵可以根据各种方案进行。最常见的由独立的水解和发酵(SHF)组成。该方法能够通过维持最佳反应条件来优化各个步骤。发酵在约28℃至约30℃之间的温度即时进行,而水解一般在至少45℃的温度进行。然而,在SHF中,在反应最后释放的糖浓度非常高,导致对酶的抑制,降低了该方法的效率。

[0007] 为了避免这些缺点,可以设想另一种方法(SSF-同时糖化和发酵)。在SSF中,两个步骤(己糖的水解和发酵)同时发生,防止糖积累到抑制酶的浓度。使用单一反应器后,投资成本也降低了。由于没有抑制,之后水解度就提高了,因为释放的糖立即被用于发酵成乙醇。

[0008] 在该方法中,反应器的温度必然由水解和发酵的最佳温度之间的平衡构成,一般

在约30℃至约35℃之间。然而,纤维素分解酶(包括β-葡萄糖苷酶)的活性在该温度被降低了约30%。

[0009] 因此,需要在SSF方法的最佳水解和发酵温度下,尤其是在约30℃至约35℃之间的温度下能够保持有效的β-葡萄糖苷酶活性的酶。

[0010] 发明人已经开发了在约30℃至约35℃之间的温度下具有增强的β-葡萄糖苷酶活性的多肽,尤其是与野生型BGL1蛋白(序列SEQ ID NO:3)的β-葡萄糖苷酶活性相比。BGL1是来自里氏木霉(*Trichoderma reesei*)的β-葡萄糖苷酶。

[0011] 发明人之前已经鉴定出与野生型BGL1蛋白的β-葡萄糖苷酶活性相比具有增强的特异性β-葡萄糖苷酶活性的几个克隆。该结果展示于他们的专利申请W02010/029259中。更具体地,他们已经说明了编码SEQ ID NO:5的多肽的一个具体克隆(称为100B11),在里氏木霉中该克隆在强启动子控制下的表达导致了产生的酶鸡尾酒与由没有表达该酶的菌株产生的酶鸡尾酒相比,其β-葡萄糖苷酶活性提高了26.2倍(专利申请W02010/029259表6)。

[0012] 令人惊讶且出乎意料地,他们现在说明了一个与之前鉴定的克隆100B11相比,编码具有增强活性的酶的新克隆,这是在约30℃至约35℃之间的温度。

[0013] 因此,本发明涉及具有β-葡萄糖苷酶活性的具有氨基酸序列SEQ ID NO:1的多肽。

[0014] 本发明的多肽的氨基酸序列如下:

[0015] MRYRTAAALALATGPFARADSHSTSGASAEAVVPPAGTPWGTAYDKAKAALAKLNLQDKVGIVSGVGWN
GGPCVGNTPASKIGYPQLCLQDGPLGIRFGGSVTAFTPGIQAASTWDELMRQRGEYLGAEAKGCGIHVLLGPVAG
PLGKTPQGGRNWEGFGVDPYLTGIAAETIEGLQSAGVQACAKHYIVNEQELNRETISSNPDDRTLHELILWPFADA
VHANVASVMCSYNKINGSWACEDQYTLQTVLKDQLGFPGYVMTDWNQHTTVQSANGLDMSMPGTDENGNNRLWGP
ALTNAVNSNQVPTSRVDDMVTRILAAWYLTGQDQAGYPSFNI SRNVQGNHKTNVRAIARDGIVLLKNDANILPLKKP
ASIAVVGSAIIIGNHARNSPSCNDKGCDDGALGMGWGSGAVNYPYFVAPYDAINTRASSQGTQVTLSTNDNTSSGAS
AARGKDVAIVFITADSGEGYITVEGNAGDRNNLDPWHNGNALVQAVAGANSNIVVVHSHVGAII LEQILALPQVKAV
VWAGLPSQESGNALVDVLWGDVSPSGKLVYTI AKSPNDYNTRIVSGGSDSFSEGLFIDYKHFDDANITPRYEFYGL
SYTKFNYSRLSVLSTAKSGPATGAVVPGGPSDLFQNVATVTVDIANSQVGTGA EVAQLYITYPSSAPRTPPKQLRGF
AKLNLTPGQSGTATFNIRRRDLSYWD TASQKWVPSGSFGISVGASSRDIRLTSTLSVA。

[0016] 该多肽由核酸序列SEQ ID NO:2编码。

[0017] 优选地,具有氨基酸序列SEQ ID NO:1的该多肽在约30℃至约35℃之间的温度具有增强的β-葡萄糖苷酶活性,尤其是与在这些相同温度下的具有序列SEQ ID NO:3的野生型BGL1蛋白的β-葡萄糖苷酶活性相比。BGL1蛋白由核酸序列SEQ ID NO:4编码。

[0018] 更优选地,具有氨基酸序列SEQ ID NO:1的该多肽在约30℃至约35℃之间的温度与在相同温度下的具有氨基酸序列SEQ ID NO:5的100B11多肽的β-葡萄糖苷酶活性相比具有增强的β-葡萄糖苷酶活性。100B11多肽由核酸序列SEQ ID NO:6编码。

[0019] 此外,根据本发明的多肽具有对葡萄糖的抑制不太敏感的优点,因此,在高葡萄糖浓度存在下保留更好的β-葡萄糖苷酶活性。

[0020] 在一个实施方案中,如之前所述的多肽在葡萄糖存在下测定的β-葡萄糖苷酶活性与野生型蛋白BGL1 (SEQ ID NO:3) 在没有葡萄糖时测定的β-葡萄糖苷酶活性相比增强。

[0021] 在一个优选的实施方案中,与具有氨基酸序列SEQ ID NO:5的100B11多肽的β-葡萄糖苷酶活性相比,本发明的多肽在约30℃至约35℃之间的温度下的β-葡萄糖苷酶活性增

强至少10%、优选增强至少20%、优选增强至少30%、甚至更优选增强至少40%。

[0022] 例如,本领域技术人员能够通过酶活性测试手段使用底物对硝基苯基-β-D-葡萄糖苷(pNPG)确定根据本发明的多肽的酶活性的增加或换句话说改进。在β-葡萄糖苷酶作用后所得的对硝基苯酚的量可以,例如,通过读取414nm的光学密度来确定。

[0023] 本领域技术人员可以用来确定根据本发明的多肽与野生型BGL1蛋白相比是否具有增强的酶活性的方案的实例如下:

[0024] -制备表达根据本发明的多肽的大肠杆菌(E.coli)的原种培养物,在37℃过夜;

[0025] -于20℃用1%的原种培养物接种LB培养基24小时;

[0026] -在13000rpm下离心2分钟;

[0027] -用pH5的100mM琥珀酸盐缓冲液重新悬浮细胞沉淀(最终OD₆₀₀=100);

[0028] -于50℃用100μl含有15mM对硝基苯基-β-D-葡萄糖苷(pNPG)的pH5的100mM琥珀酸盐缓冲液孵育50μl细胞1.5小时,然后置于冰上5分钟;

[0029] -加入150μl 0.2M Na₂CO₃;

[0030] -在13000rpm下离心2分钟;

[0031] -在414nm读取150μl上清液的光学密度。

[0032] 此外,本领域技术人员将能够使用上述方案通过用100μl含有15mM pNPG和60g/l葡萄糖的pH5的100mM琥珀酸盐缓冲液于50℃孵育50μl细胞1.5小时来确定根据本发明的多肽是否比野生型BGL1蛋白对葡萄糖抑制更不敏感。

[0033] 这些方案容易适应用于测量在约30℃至约35℃之间的温度条件下β-葡萄糖苷酶活性的增强,尤其是与具有氨基酸序列SEQ ID NO:5的100B11多肽相比。

[0034] 本发明还涉及编码具有氨基酸序列SEQ ID NO:1的多肽的核酸。优选,所述核酸包含核酸序列SEQ ID NO:2。

[0035] 本发明还涉及包含上述核酸的载体。

[0036] 根据本发明,术语“载体”意欲是指在其中有可能插入外源核酸片段的任何DNA序列,载体能够将外源DNA引入宿主细胞。载体的实例有质粒、粘粒、酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)和P1噬菌体衍生的人工染色体(PAC),和病毒衍生的载体。

[0037] 根据本发明,上述核酸可以与启动子、终止子或对于其在宿主细胞中的表达所需的任何其他序列功能性相连。

[0038] 根据本发明的载体还可以携带选择标记。术语“选择标记”意欲是指其表达使包含它的细胞具有能够选择它们的特征。例如,它是耐抗生素的基因。

[0039] 本发明的主题还是能够产生上述的本发明的多肽,或包含编码本发明的所述多肽的核酸的分离的宿主细胞。

[0040] 本领域技术人员将能够通过公知的常规方法将上述的至少多肽、核酸或载体引入宿主细胞。例如,提到的可以是氯化钙处理、电穿孔、或使用粒子枪。

[0041] 根据一个实施方案,本领域技术人员将能够通过常规方法将编码具有增强β-葡萄糖苷酶活性的本发明多肽的几个拷贝的核酸引入宿主细胞。

[0042] 根据一个实施方案,上述分离的宿主细胞选自木霉属、曲霉属、脉胞菌属(Neurospora)、腐质霉属(Humicola)、毁丝霉属(Myceliophthora)、金孢子菌属(Chrysosporium)、青霉属(Penicillium)、镰刀菌属、高温单孢菌属、芽孢杆菌属、假单胞菌

属 (*Pseudomonas*)、埃希氏菌属 (*Escherichia*)、梭状芽孢杆菌 (*Clostridium*)、纤维单胞菌属、链霉菌属、耶罗维亚酵母属 (*Yarrowia*)、毕赤酵母属 (*Pichia*) 和酵母属 (*Saccharomyces*)。

[0043] 根据一个优选的实施方案,上述分离的宿主细胞选自里氏木霉、*Trichoderma viridae*、康氏木霉 (*Trichoderma koningii*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*)、嗜热毁丝霉 (*Myceliophthora thermopila*)、*Chrysosporium lucknowense*、文氏曲霉 (*Aspergillus wentii*)、米曲霉 (*Aspergillus oryzae*)、海枣曲霉 (*Aspergillus phoenicis*)、粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*)、灰腐质霉 (*Humicola grisae*)、嗜松青霉 (*Penicillium pinophilum*)、草酸青霉 (*Penicillium oxalicum*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、丙酮丁醇梭菌 (*Clostridium acetobutylicum*)、糖解梭菌 (*Clostridium saccharolyticum*)、拜氏梭菌 (*Clostridium benjerinckii*)、丁酸梭菌 (*Clostridium butylicum*)、毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)、解脂耶罗维亚酵母 (*Yarrowia lipolityca*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和它们的混合物。

[0044] 根据一个优选的实施方案,上述分离的宿主细胞选自里氏木霉和酿酒酵母。

[0045] 本发明还涉及上述多肽或上述任何一个细胞用于水解 β -低聚糖的用途。

[0046] 本发明还涉及上述多肽或上述任何一个细胞用于将纤维二糖水解为葡萄糖的用途。

[0047] 本发明的一个主题还是上述多肽或上述任何一个细胞用于生产生物燃料的用途。

[0048] 根据本发明,术语“生物燃料”可以定义为来自生物质的转化且可用于能源目的的任何产物。首先,不希望被限制且通过实例的方式可以提到的,可以纳入燃料的产物-沼气(任选地在随后的转化之后)或其本身可以作为燃料,例如酒精(根据使用的发酵生物的类型,乙醇、丁醇和/或异丙醇)、溶剂(丙酮)、酸(丁酸)、脂质及其衍生物(短链或长链脂肪酸、脂肪酸酯)和氢气。

[0049] 优选的,根据本发明的生物燃料是酒精,例如乙醇、丁醇和/或异丙醇。更优选的,根据本发明的生物燃料是乙醇。

[0050] 在另外一个实施方案中,生物燃料是沼气。

[0051] 在另外一个实施方案中,产物是在化学工业中有利的分子,例如其他酒精(如1,2-丙二醇、1,3-丙二醇、1,4-丁二醇、2,3-丁二醇)、有机酸(如乙酸、丙酸、丙烯酸、丁酸、丁二酸、苹果酸、延胡索酸、柠檬酸、或衣康酸),或羟基酸(如乙醇酸、羟基丙酸或乳酸)。

[0052] 除了生产生物燃料,在30℃至35℃之间的温度具有增强的 β -葡萄糖苷酶活性的多肽还可以通过催化各种底物的水解用于其他类型的应用,从而使其释放各种香味/味道。举例来说,它可以通过水解在水果中存在的几种葡萄糖苷或水解葡萄单萜(monoterphenyl) β -葡萄糖苷来释放果味,因此代表了酒的味道的一个重要来源。因此,如上所述的多肽可以用于一些领域,尤其是香水、食品工业、葡萄酒等等。

[0053] 将能够表达根据本发明多肽的丝状真菌菌株,优选木霉,更优选里氏木霉,在选择用于微生物生长的碳基底物(如乳糖或葡萄糖)的存在下在发酵罐中培养。在一个实施方案中,该碳基底物根据其性质在灭菌前引入发酵罐或单独灭菌后再引入灭菌后的发酵罐以获得20-35g/l的初始浓度。

[0054] 然后加入选择用于生产酶的含有底物的水性溶液。最后通过过滤培养基回收由真

菌产生的作用于木质纤维素生物质的酶组合物。该组合物尤其包含内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和根据本发明的 β -葡萄糖苷酶。在一个实施方案中,该选择用于生产酶的含有底物的水性溶液在200-250g/l的浓度制备;该溶液必须包含诱导底物,如乳糖。在初始的碳基底物耗光后加入该水性溶液以提供35-45mg/g的最佳细胞量(分批)。在该分批阶段,培养基中糖的残余浓度小于1g/l,且作用于木质纤维素生物质的酶由真菌分泌。所述酶可以通过过滤培养基回收。

[0055] 本发明的一个主题是作用于木质纤维素生物质的酶组合物,所述酶组合物由丝状真菌或酵母产生且包含如上所述的多肽。

[0056] 最后,本发明的一个主题是从生物质生产生物燃料的方法,包括以下步骤:

[0057] -将待水解的材料悬浮于水相;

[0058] -如上所述在酶组合物存在的情况下水解木质纤维素生物质以产生含有葡萄糖的水解物;

[0059] -发酵水解物中的葡萄糖;

[0060] -从发酵液中分离生物燃料,

[0061] 其特征在于,所述水解和发酵步骤同时进行。

[0062] 本发明的另一个主题是从生物质生产生物燃料的方法,其特征在于该方法包括以下步骤:

[0063] -将待水解的材料悬浮于水相;

[0064] -同时加入如上定义的作用于木质纤维素生物质的酶组合物和发酵微生物,并孵育;

[0065] -从发酵液中分离生物燃料。

[0066] 本发明的另一个主题是从生物质生产生物燃料的方法,其特征在于该方法包括以下连续步骤:

[0067] -将待水解的材料悬浮于水相;

[0068] -在30℃至35℃之间的温度下加入一种或多种如上定义的纤维素分解菌和/或发酵微生物以产生发酵液;

[0069] -从发酵液中分离生物燃料。

[0070] 根据该实施方案,根据本领域技术人员已知的SSF(同时糖化和发酵)方法,在生物质中的纤维素被转化为葡萄糖,同时,在同一反应器中,发酵微生物(例如酵母)将葡萄糖转化为最终产物。取决于发酵微生物的代谢和水解能力,正确进行该操作可能需要加入或多或少量的外源分解纤维素的混合物。

[0071] 在另一个实施方案中,发酵微生物通过分泌或在其细胞表面产生多肽(本发明的主题),任选地与作用于木质纤维素生物质的其他酶一起,从而限制或消除对由丝状真菌产生的酶的需求。

[0072] 因此,使用根据本发明的在约30℃至约35℃之间的温度下显示出更好的 β -葡萄糖苷酶活性的多肽具有获得更好葡萄糖生产产量的优势。因此,本发明能够使用比之前更少的酶,这具有经济优势例如,生物燃料的生产从成本更低。

[0073] 本发明的其他方面、主题、优势和特征将通过实施例的方式阅读以下描述本发明优选实施方案的非限制性描述展示。

具体实施方式

[0074] 实施例1:第一轮重组

[0075] 将里氏木霉的 β -葡萄糖苷酶基因(亲本基因BGL1, SEQ ID NO:4)用推测的具有与BGL1亲本基因70%一致性的球毛壳菌(*Chaetomium globosum*)的葡萄糖苷酶基因(基因A)(由核酸序列SEQ ID NO:8编码的SEQ ID NO:7)根据EP1104457B1中所述的专利方法进行第一轮重组。

[0076] 1-高通量筛选

[0077] 高通量筛选试验能够选择由这两个序列洗牌造成的最佳克隆,例如,与来自里氏木霉的BGL1亲本基因相比,在 β -葡萄糖苷酶活性水平上具有大于2的增强倍数的克隆。

[0078] 第一轮重组的实验室筛选实验根据以下步骤进行:

[0079] -在琼脂上分离表达根据本发明的重组酶的重组变体的大肠杆菌的各种克隆,并于37°C在LB培养基中预培养所述克隆过夜;

[0080] -用所述预培养接种3%的LB培养基,然后于37°C孵育4小时;

[0081] -通过加入100 μ M异丙基-硫代- β -半乳糖苷(IPTG)诱导变体表达,然后于20°C孵育过夜;

[0082] -在13000rpm下离心2分钟;

[0083] -在100 μ l含有2.2mM对硝基苯基- β -D-葡萄糖苷(pNPG)的0.1M琥珀酸盐缓冲液中重新悬浮细胞沉淀;

[0084] -在室温下孵育3小时;

[0085] -碱化后在414nm读取光学密度。

[0086] 在这些筛选条件下,鉴定了一些与BGL1参照酶相比显示出增强的 β -葡萄糖苷酶活性的克隆。

[0087] 2- β -葡萄糖苷酶活性增强的测定

[0088] 2-1/在pNPG底物上

[0089] 为了测定在第一轮重组中选择的变体的相对K_{cat},进行以下过程:

[0090] -于37°C过夜形成表达根据本发明的重组酶的大肠杆菌的原种培养液;

[0091] -于20°C用1%的原种培养液接种LB培养基24小时,同时进行IPTG (250 μ M) 诱导;

[0092] -在13000rpm下离心2分钟;

[0093] -用pH5的100mM琥珀酸盐缓冲液重新悬浮细胞沉淀(最终OD₆₀₀=100);

[0094] -于50°C用100 μ l含有15mM对硝基苯基- β -D-葡萄糖苷(pNPG)的pH5的100mM琥珀酸盐缓冲液孵育50 μ l细胞1.5小时,然后置于冰上5分钟;

[0095] -加入150 μ l 0.2M Na₂CO₃;

[0096] -在13000rpm下离心2分钟;

[0097] -在414nm读取150 μ l上清液的光学密度。

[0098] 表2给出了在这些实验条件下三个之前鉴定的克隆(称为10H7、59B8和164A2)的K_{cat}值和增强倍数。

[0099] 表2: β -葡萄糖苷酶活性的增强

[0100] (诱导培养的结果)

[0101]	第一轮克隆	克隆	$K_{cat} (min^{-1})$	增强倍数
		10H7	590.0	8
		59B8	518.6	7
		164A2	1437.3	20
	参照蛋白	BGL1	71.0	1

[0102] 结果表明与野生型酶 (BGL1) 相比,三个克隆10H7、59B8和164A2具有非常显著的酶活性的增强。

[0103] 2-2/在纤维二糖上

[0104] 然后在第二种底物:纤维二糖上证实10H7、59B8和164A2克隆活性的增强。

[0105] 在表达根据本发明的重组酶的大肠杆菌培养基上进行该试验。该试验的步骤如下:

[0106] -用IPTG诱导的1%原种培养液接种LB培养基,然后于37℃孵育过夜;

[0107] -于37℃培养所述细胞直到在600nm获得0.4的光学密度;

[0108] -于20℃用250μM IPTG诱导所述细胞20小时;

[0109] -在pH5的100mM琥珀酸盐缓冲液中洗涤细胞沉淀3次以除去培养基葡萄糖;

[0110] -在微孔板上于50℃制备由10μl所述细胞和190μl 263.2mM的纤维二糖组成的反应混合物 (RM1) 12小时;

[0111] -在微孔板上于50℃孵育12小时。

[0112] 启示:

[0113] -制备由以下组成的反应混合物 (RM2):

[0114] -10μl RM1,

[0115] -90μl pH5的100mM琥珀酸盐缓冲液,

[0116] -5μl 44U/ml的葡萄糖氧化酶。

[0117] -在室温下孵育1小时。

[0118] -在室温下混合并孵育以下30分钟:

[0119] -10μl RM2,

[0120] -2μl 10U/ml的辣根过氧化物酶,

[0121] -5μl 100mM的ABTS,

[0122] -83μl pH7.4的50mM磷酸缓冲液。

[0123] -在420nm读取光学密度。

[0124] 表3:β-葡萄糖苷酶活性的增强

[0125] (诱导培养的结果)

[0126]	第一轮克隆	克隆	$K_{cat} (min^{-1})$	增强倍数
		10H7	69.1	13
		59B8	37.7	7
		164A2	213.2	41
	参照蛋白	BGL1	5.2	1

[0127] 相似地,结果表明当纤维二糖被用作底物时,10H7、59B8和164A2克隆与野生型酶 (BGL1) 相比具有非常显著的酶活性的增强。

[0128] 实施例2:第二轮重组

[0129] 随后将在第一轮重组中所得的增强基因的序列进行第二轮重组(仍然根据EP1104457B1所述的专利方法)。为了提高基因多样性,加入至少一种编码与野生型BGL1酶具有70%一致性的 β -葡萄糖苷酶的基因。

[0130] 更具体的,使用推测的粗糙脉胞菌的葡萄糖苷酶基因(基因C)(由核酸序列SEQ ID NO:10编码的SEQ ID NO:9)。

[0131] 1-高通量筛选

[0132] 为了选择最佳克隆,例如与164A2克隆相比,在 β -葡萄糖苷酶活性水平上显示出大于2的增强倍数的克隆,对第二轮重组后所得的克隆进行如上所述的高通量筛选试验(除了IPTG诱导的步骤,因为在第一轮重组中提供的增强允许只基于启动子渗漏的 β -葡萄糖苷酶活性的增强)。

[0133] 在这些筛选条件下,在一些克隆中发现了与参照酶(164A2)相比增强的 β -葡萄糖苷酶活性,尤其包括100B11(由核酸序列SEQ ID NO:6编码的SEQ ID NO:5)和115E1克隆(由核酸序列SEQ ID NO:12编码的SEQ ID NO:11)。

[0134] 2- β -葡萄糖苷酶活性增强的测定[0135] 2-1/在pNPG上

[0136] 为了测定相对 K_{cat} ,用上述活性试验的方法测量100B11和115E1的活性。

[0137] 表4给出了在这些实验条件下100B11和115E1的 K_{cat} 值和增强倍数。

[0138] 表4: β -葡萄糖苷酶活性的增强

[0139] (诱导培养的结果)

[0140]	克隆	$K_{cat} (min^{-1})$	增强倍数
	第二轮克隆	100B11	4342.8
		115E1	3989.2
	参照蛋白	164A2	1437.3
			1

[0141] 结果表明与参照酶(164A2)和BGL1(X60)相比,100B11和115E1克隆具有非常显著的酶活性的增强。

[0142] 2-2/在纤维二糖上

[0143] 然后在第二种底物:纤维二糖上证实100B11和115E1克隆活性的增强。

[0144] 为了测定相对 K_{cat} ,如实施例1的点2-2中所述使用纤维二糖作为底物,于50℃通过上述活性试验方法测量100B11和115E1克隆的活性。

[0145] 表5: β -葡萄糖苷酶活性的增强

[0146] (诱导培养的结果)

[0147]	克隆	$K_{cat} (min^{-1})$	增强倍数
	第二轮克隆	100B11	387.2
		115E1	406.4
	参照蛋白	164A2	213.2
			1

[0148] 相似地,结果表明当纤维二糖被用作底物时,100B11和115E1克隆与参照酶(164A2)相比具有非常显著的酶活性的增强。

[0149] 实施例3:第三轮重组

[0150] 随后将在第二轮重组中所得的14个增强基因(138E12、134G2、100B11、115E1、99G11、127B12、91F6、135F9、116D9、212D11、210A6、124F5、129D2和141F7)的序列进行第三轮重组(仍然根据EP1104457B1所述的专利方法)。为了提高基因多样性,加入至少一种与这些基因具有70%一致性的编码 β -葡萄糖苷酶的基因。在这个实施例中,使用推测的粗糙脉胞菌的葡萄糖苷酶基因(基因C)(由核酸序列SEQ ID NO:10编码的SEQ ID NO:9)和推测的球毛壳菌的葡萄糖苷酶基因(基因A)(由核酸序列SEQ ID NO:8编码的SEQ ID NO:7)。

[0151] 1-高通量筛选

[0152] 对第三轮重组后所得的克隆进行如上所述的高通量筛选试验(除了IPTG诱导的步骤,因为在第一轮重组中提供的增强允许只基于启动子渗漏的 β -葡萄糖苷酶活性的增强)。于30℃和50℃测量这些克隆的活性。

[0153] 在这些筛选条件下,选择了17E5克隆(氨基酸序列是SEQ ID NO:1,由核酸序列SEQ ID NO:2编码),因为它具有有利的30℃/50℃活性比。

[0154] 表6给出了17E5克隆和100B11克隆(来自第二轮重组的参照克隆)在50℃和30℃所得的相对活性。

[0155] 表6:在30℃的相对活性

[0156]

	50℃	30℃
17E5	100%	80%
100B11	100%	53%

[0157] 结果表明与其在50℃的活性相比,17E5克隆在30℃保留了80%的活性,而100B11克隆保留了53%。

[0158] 此外,它的比活性比100B11酶的比活性高2倍。

[0159] 2- β -葡萄糖苷酶活性增强的测定

[0160] 为了测定相对Kcat,于30℃和50℃通过上述活性试验方法测量17E5克隆的活性。

[0161] 表7给出了在这些实验条件下17E5克隆的Kcat值和增强倍数。

[0162] 表7:在30℃ β -葡萄糖苷酶活性的增强

[0163] (诱导培养的结果)

	kcat (min ⁻¹)		增强	
	30℃	50℃	30℃	50℃
17E5	4.2	10.94	2.32	2.17
100B11	1.81	5.03		

[0165] 结果表明与参照克隆相比,17E5克隆的酶活性增强了2倍,这两个温度下是一样的。

[0166] 实施例4:在里氏木霉中 β -葡萄糖苷酶增强变体的表达

[0167] 将17E5基因克隆进允许其在衍生自里氏木霉菌株的RUT(ATCC 56765)、CL847(Durand等,Enzyme Microb.Technol.,1988;10:341-346)中表达的载体,并用潮霉素(吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*)Hph基因)选择。将17E5基因置于cbh1强启动子控制下,该强启动子可以与其他里氏木霉的纤维素酶在同时诱导。

[0168] 根据本领域技术人员已知的常规方法进行里氏木霉的转化(通过钙休克转化原生质体并用50 μ g/ml的潮霉素选择)。通过产孢纯化转化体,然后在选择培养基中继代培养2次以除去不稳定的克隆。

[0169] 然后在24孔板上评估30个克隆的纤维素酶生产。用每个克隆的几个孢子接种具有2ml以下组合物的培养基:20g/l乳糖、20g/l Solka floc纤维素酶、5g/l蛋白胨、15g/l KH_2PO_4 、5g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.6g/l CaCl_2 、0.6g MgSO_4 、0.005g/l FeSO_4 、0.0014g/l MnSO_4 、0.0014g/l ZnSO_4 、0.0037g/l CoCl_2 、11.6g/l of苹果酸、12.1g/l tris和2.08g/l NaOH。将培养瓶于30 $^\circ\text{C}$ 在150rpm振动孵育。

[0170] 5天后,离心该培养液,并用Folin方法测量上清液的蛋白质浓度。在以下条件通过水解对硝基苯基- β -D-葡萄糖苷(pNPG)发色团底物测量上清液的 β -葡萄糖苷酶活性:

[0171] -pH4.8的50mM柠檬酸缓冲液

[0172] -5mM pNPG

[0173] -10 μ l样品

[0174] -于30 $^\circ\text{C}$ 孵育30分钟。

[0175] 通过加入100 μ l 2%碳酸钠停止反应。通过测量410nm的吸光度测量由pNPG水解释放的对硝基苯酚的量,并与对硝基苯酚的范围进行比较。该反应在25-400 μ M对硝基苯酚上是线性的。任意稀释样品,测量的吸光度仍然在线性范围内。还在以上相同条件下于50 $^\circ\text{C}$ 测量 β -葡萄糖苷酶活性用于比较。选择显示出最高 β -葡萄糖苷酶活性(高于初始菌株至少5倍)的克隆。

[0176] 表8示出了根据上述方法测得的分别来自野生型CL847菌株、表达变体100B11的菌株和表达变体17E5的克隆之一的上清液在30 $^\circ\text{C}$ /50 $^\circ\text{C}$ 下的pNPase β -葡萄糖苷酶活性(以 μ mol/min/mg酶计)。

[0177] 表8:野生型CL847、100B11多肽和17E5多肽的 β -葡萄糖苷酶活性

[0178]		30 $^\circ\text{C}$ /50 $^\circ\text{C}$ 活性比	在 30 $^\circ\text{C}$ 的比活性	在 50 $^\circ\text{C}$ 的比活性
	CL847	0.2	0.06	0.3
[0179]	100B11	0.3	3.7	12.5
	17E5	0.5	4.7	9.5

[0180] 注意到17E56克隆30 $^\circ\text{C}$ /50 $^\circ\text{C}$ 比的增加,其比活性在30 $^\circ\text{C}$ 的温度比100B11变体更高。

[0181] 实施例5:野生型 β -葡萄糖苷酶(BGL1)以及增强变体100B11和17E5在酿酒酵母中的重组表达

[0182] 1-在酵母细胞质中BGL1、100B11和17E5蛋白质的产生

[0183] 将里氏木霉的野生型 β -葡萄糖苷酶基因(BGL1)以及100B11和17E5变体的基因不用信号肽克隆进pESC-Leu载体(Agilent Technologies)。该构建体允许在酿酒酵母EBY100菌株的细胞质中蛋白质的表达,所述菌株是亮氨酸和色氨酸营养缺陷型(Boder ET和Wittrup KD,Biotechnol Prog,1998,14:55-62)。该质粒能够将基因表达置于半乳糖诱导的GAL1启动子的控制下,且具有允许转化体选择的选择营养缺陷型标记基因(Leu2)。最后将产生的蛋白质与c-myc标签的N末端融合,从而允许通过亲和层析检测并纯化产生的酶。

[0184] 根据本领域技术人员已知的常规方法(通过热休克和乙酸锂转化酵母)进行酿酒

酵母EBY100的转化。在含有0.67%酵母氮基(YNB)、2%葡萄糖和0.01%色氨酸的YNB-Glc-Trp培养基上选择转化体。

[0185] 用每个基因的一个转化体(Sc-BGL1、Sc-100B11和Sc-17E5)接种15ml含有0.67% YNB、0.5%酪蛋白氨基酸(CAA)、0.01%色氨酸和2%葡萄糖的YNB-Glc-CAA-Trp贫乏培养基。于30℃以220rpm振动预培养24小时后,用三个菌株Sc-BGL1、Sc-100B11和Sc-17E5接种(在OD₆₀₀=0.5时)150ml含有0.67% YNB、0.5%酪蛋白氨基酸(CAA)、0.01%色氨酸和2%半乳糖的YNB-Glc-CAA-Trp培养基。于25℃以220rpm振动孵育该培养液。

[0186] 孵育4天后,于4℃在3000g离心20ml培养液5分钟。将酵母沉淀放入3ml 50mM柠檬酸缓冲液中,并在2.5kbar的压力下机械裂解。于4℃在50000g离心30分钟后获得细胞质提取物。

[0187] 2-β-葡萄糖苷酶活性的测定

[0188] 通过Bradford实验(Bradford MM., Anal Biochem, 1976, 72:248-54)在1.7mg/ml评估细胞质提取物的平均总蛋白浓度。

[0189] 在以下条件通过水解体积为600μl的对硝基苯基-β-D-葡萄糖苷(pNPG)测量细胞质提取物的β-葡萄糖苷酶活性:

[0190] -pH5的50mM柠檬酸缓冲液

[0191] -5mM pNPG

[0192] -含有6.1μg总蛋白的3.6μl细胞质提取物

[0193] -于30℃或50℃孵育30分钟。

[0194] 通过在100μl水解反应中加入100μl 1M碳酸钠停止反应。通过测量415nm的吸光度测定由pNPG水解释放的对硝基苯酚(pNP)的浓度,并与对硝基苯酚的标准范围(0.36-360μM是线性)进行比较。任意稀释细胞质提取物以使其在初始反应速率条件下。

[0195] 表9示出了测得的分别来自表达野生型酶的菌株(Sc-BGL1)、表达100B11的菌株(Sc-100B11)和表达17E5的菌株(Sc-17E5)的细胞质提取物在30℃/50℃下β-葡萄糖苷酶活性比(以μmol.min⁻¹.mg⁻¹总蛋白计)。

[0196] 表9: Sc-BGL1、Sc-100B11和Sc-17E5β-葡萄糖苷酶活性

[0197]

	在 30℃ 的 比活性	在 50℃ 的 比活性	30℃/50℃ 活性比	在 30℃ 下与野生型 BGL1 相比比活性 的增强
Sc-BGL1	0.15	0.41	0.4	-
Sc-100B11	0.18	0.64	0.3	1.2
Sc-17E5	0.46	1.12	0.4	3.1

[0198] 结果表明在30℃下, Sc-17E15菌株的比活性比Sc-BGL1菌株高出3倍,比Sc-100B11高出2.5倍。

[0199] 实施例6:在酿酒酵母中产生的野生型β-葡萄糖苷酶(BGL1)以及增强变体100B11和17E5的纯化和表征

[0200] 1-β-葡萄糖苷酶的纯化

[0201] 根据以下方案用实施例5中的Sc-BGL1、Sc-100B11和Sc-17E5变体的细胞质提取物纯化对应的酶,BGL1、100B11和17E5:

[0202] 将500 μ l细胞质提取物与20 μ l“抗c-myc标签胶”树脂一起于4℃轴向振动孵育1小时。在13000rpm离心10秒钟后,用1xPBS洗涤树脂3次。将该树脂与由1mg. ml^{-1} c-myc肽(EQKLISEEDL)组成的洗脱液一起于4℃孵育5分钟后,通过在13000rpm离心10分钟进行蛋白质的洗脱。

[0203] 2- β -葡萄糖苷酶活性的测定

[0204] 通过用纳米微滴测量在280nm的吸光度获得经纯化的酶的浓度,对天然BGL1使用等于120 125 $\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ 的摩尔消光系数,对100B11和17E5使用120 250 $\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ 。所述浓度平均值等于0.19mg/ml。

[0205] 各个酶的纯度通过在含有SDS的10%聚丙烯酰胺凝胶上电泳进行验证,并用考马斯蓝进行蛋白染色。

[0206] 如上所述在30℃和50℃下测量BGL1以及经纯化的100B11和17E5的活性。

[0207] 表10示出了在30℃和50℃的pNPG水解过程中测定的各个酶的比活性(以 $\mu\text{mol}.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ 酶计)。

[0208] 表10:经纯化的BGL1、100B11和17E5的 β -葡萄糖苷酶活性

[0209]

	在 30℃ 的 比活性	在 50℃ 的 比活性	30℃/50℃ 活性比	在 30℃ 下与野生型 BGL1 相比比活性 的增强
BGL1	5.1	8.9	0.57	-
100B11	7.1	17.2	0.41	1.4
Sc-17E5	10.2	23.6	0.43	2.0

[0210] 结果表明在30℃下,17E15变体的比活性比野生型BGL1高出2倍,比100B11变体高出1.4倍。

序列表

<110> IFP Energies nouvelles

<120> 低温下 β -葡萄糖苷酶活性增强的多肽

<130> BFF120334

<160> 12

<170> BiSSAP 1.0

<210> 1

<211> 744

<212> PRT

<213> 里氏木霉

<400> 1

[0001]

```

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

```

	195	200	205
	Asp Arg Thr Leu His Glu Leu Tyr Leu Trp Pro Phe Ala Asp Ala Val		
	210	215	220
	His Ala Asn Val Ala Ser Val Met Cys Ser Tyr Asn Lys Ile Asn Gly		
	225	230	235
	Ser Trp Ala Cys Glu Asp Gln Tyr Thr Leu Gln Thr Val Leu Lys Asp		240
	245	250	255
	Gln Leu Gly Phe Pro Gly Tyr Val Met Thr Asp Trp Asn Ala Gln His		
	260	265	270
	Thr Thr Val Gln Ser Ala Asn Ser Gly Leu Asp Met Ser Met Pro Gly		
	275	280	285
	Thr Asp Phe Asn Gly Asn Asn Arg Leu Trp Gly Pro Ala Leu Thr Asn		
	290	295	300
	Ala Val Asn Ser Asn Gln Val Pro Thr Ser Arg Val Asp Asp Met Val		
	305	310	315
	Thr Arg Ile Leu Ala Ala Trp Tyr Leu Thr Gly Gln Asp Gln Ala Gly		
	325	330	335
	Tyr Pro Ser Phe Asn Ile Ser Arg Asn Val Gln Gly Asn His Lys Thr		
	340	345	350
	Asn Val Arg Ala Ile Ala Arg Asp Gly Ile Val Leu Leu Lys Asn Asp		
	355	360	365
[0002]	Ala Asn Ile Leu Pro Leu Lys Lys Pro Ala Ser Ile Ala Val Val Gly		
	370	375	380
	Ser Ala Ala Ile Ile Gly Asn His Ala Arg Asn Ser Pro Ser Cys Asn		
	385	390	395
	Asp Lys Gly Cys Asp Asp Gly Ala Leu Gly Met Gly Trp Gly Ser Gly		400
	405	410	415
	Ala Val Asn Tyr Pro Tyr Phe Val Ala Pro Tyr Asp Ala Ile Asn Thr		
	420	425	430
	Arg Ala Ser Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr Leu Ser Asn Thr Asp Asn		
	435	440	445
	Thr Ser Ser Gly Ala Ser Ala Ala Arg Gly Lys Asp Val Ala Ile Val		
	450	455	460
	Phe Ile Thr Ala Asp Ser Gly Glu Gly Tyr Ile Thr Val Glu Gly Asn		
	465	470	475
	Ala Gly Asp Arg Asn Asn Leu Asp Pro Trp His Asn Gly Asn Ala Leu		480
	485	490	495
	Val Gln Ala Val Ala Gly Ala Asn Ser Asn Val Ile Val Val Val His		
	500	505	510
	Ser Val Gly Ala Ile Ile Leu Glu Gln Ile Leu Ala Leu Pro Gln Val		
	515	520	525
	Lys Ala Val Val Trp Ala Gly Leu Pro Ser Gln Glu Ser Gly Asn Ala		
	530	535	540
	Leu Val Asp Val Leu Trp Gly Asp Val Ser Pro Ser Gly Lys Leu Val		

545	550	555	560
Tyr Thr Ile Ala Lys Ser Pro Asn Asp Tyr Asn Thr Arg Ile Val Ser			
	565	570	575
Gly Gly Ser Asp Ser Phe Ser Glu Gly Leu Phe Ile Asp Tyr Lys His			
	580	585	590
Phe Asp Asp Ala Asn Ile Thr Pro Arg Tyr Glu Phe Gly Tyr Gly Leu			
	595	600	605
Ser Tyr Thr Lys Phe Asn Tyr Ser Arg Leu Ser Val Leu Ser Thr Ala			
	610	615	620
Lys Ser Gly Pro Ala Thr Gly Ala Val Val Pro Gly Gly Pro Ser Asp			
625	630	635	640
Leu Phe Gln Asn Val Ala Thr Val Thr Val Asp Ile Ala Asn Ser Gly			
	645	650	655
Gln Val Thr Gly Ala Glu Val Ala Gln Leu Tyr Ile Thr Tyr Pro Ser			
	660	665	670
Ser Ala Pro Arg Thr Pro Pro Lys Gln Leu Arg Gly Phe Ala Lys Leu			
	675	680	685
Asn Leu Thr Pro Gly Gln Ser Gly Thr Ala Thr Phe Asn Ile Arg Arg			
	690	695	700
Arg Asp Leu Ser Tyr Trp Asp Thr Ala Ser Gln Lys Trp Val Val Pro			
705	710	715	720
Ser Gly Ser Phe Gly Ile Ser Val Gly Ala Ser Ser Arg Asp Ile Arg			
	725	730	735
Leu Thr Ser Thr Leu Ser Val Ala			
	740		

[0003]

<210> 2

<211> 2235

<212> DNA

<213> 里氏木霉

<400> 2

atgcgttacc gaacagcage tgcgttggea cttgccactg ggccctttgc tagggcagac	60
agtcactcaa catcgggggc ctcggctgag gcagttgtac ctctgcagg gactccatgg	120
ggaaccgcgt acgacaaggc gaaggcgcga ttggcaaagc tcaatctcca agataaggtc	180
ggcatcgtga gcggtgtcgg ctggaaeggc ggtccttggc ttggaaacac atctccggcc	240
tccaagateg gctatccaca gctatgcctt caagacggac ccctcggtat ccgattcggc	300
ggcagcgtea cagcccttac gccgggcate caageggcct cgacgtggga taccgagttg	360

	atgcgccagc gtggagagta cctgggtgcc gaggccaagg gctgcgggat tcatgtcctg	420
	cttggctctg tggttgggcc gctgggaaag actccgcagg gcggtcgcaa ctgggagggc	480
	ttcggtgtcg atccatatct caagggcatt gccatggcgg agacaatcga gggectgcag	540
	teggccggcg tgcaggcgtg cgcgaagcac tatatcgtca acgagcagga gctcaatcga	600
	gaaaccattt cgagcaaccc agatgaccga actctccatg agctgtatct gtggccattt	660
	gccgacggcg ttacgcctaa tctcgtttct gtcattgtct cgtacaacaa gatcaatggc	720
	agctgggcct gcgaggatca gtacacgttg cagactgtgc tgaaagacca gctggggttc	780
	ccaggetatg tcatgacgga ctggaacgca cagcacacga ctgtccaaag cgcgaattct	840
	gggcttgaca tgtcaatgcc tggcacagac ttcaacggta acaatcggtc ctgggggtcca	900
	gctctcacca atgcggtaaa tagcaatcag gtccccaaga gcagagtga cgatatggtg	960
	actcgtatcc tcgcgcgatg gtacttgaca ggcaggacc aggcaggcta tccgtcgttc	1020
[0004]	aacatcagca gaaatgttca aggaaaccac aagaccaatg tcagggcaat tgccagggac	1080
	ggcatcgttc tgcctcaaga tgacgccaac atcctgccgc tcaagaagcc cgtatgcatt	1140
	gccgtcgttg gatctgccgc aatcattggt aaccacgcca gaaactcgcc ctcttgcaac	1200
	gacaaaggct gcgacgacgg ggccttgggc atgggttggg gtcccgccgc cgtcaactat	1260
	ccgtactteg tcgcgcctta cgatgccatc aataccagag cgtcttcgca gggcaccag	1320
	gttaccttga gcaacaccga caacacgtcc tcaggcgcct ctgcagcaag aggaaaggac	1380
	gtcgcctcg tcttcatcac cgcgaactcg ggtgaaggct acatcacctg ggagggcaac	1440
	gcgggcgacg gcaacaacct ggatccgttg cacaacggca atgccctggt ccaggcggtg	1500
	gcgggtgcca acagcaacgt cattgttgtt gtccactcgg ttggcgcctt cattctggag	1560
	cagattcttg ctcttcgca ggtcaaggcc gttgtctggg cgggtcttcc ttctcaggag	1620
	ageggcaatg cgtctgtcga cgtgctgtgg ggagatgtca gcccttctgg caagctggtg	1680

```

tacaccattg cgaagagccc caatgactat aacactcgca tcgtttccgg cggcagtgac 1740
agcttcagcg agggactgtt catgactat aagcactcg acgacgcaa tatcacgccg 1800
cggtaecagt tcggetatgg actgtcttac accaagttea actaetcaag cctctecgtc 1860
ttgtcgaccg ccaagtctgg tcttgcgact ggggcggttg tgcggggagg cccgagtgat 1920
ctgttccaga atgtcgcgac agtcaccgtt gacategcaa actciggcca agtgactggc 1980
gccgaggtag ccagctgta catcacctac ccacttccag caccaggac ccctccgaag 2040
cagctcgagc gettigccaa gctgaacctc acgcctggtc agageggaae agcaacgttc 2100
aacatccgac gacgagatct cagctactgg gacacggett cgcagaaatg ggtgggtgccg 2160
tcggggtcgt ttggcatcag cgtgggagcg agcagccggg atatcaggct gacgagcact 2220
ctgtcggtag cgtag 2235

```

[0005]

<210> 3

<211> 744

<212> PRT

<213> 里氏木霉

<400> 3

```

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

```

[0006]

Gly Glu Glu Val Lys Ala Ser Gly Ile His Val Ile Leu Gly Pro Val		
130	135	140
Ala Gly Pro Leu Gly Lys Thr Pro Gln Gly Gly Arg Asn Trp Glu Gly		
145	150	155
Phe Gly Val Asp Pro Tyr Leu Thr Gly Ile Ala Met Gly Gln Thr Ile		
165	170	175
Asn Gly Ile Gln Ser Val Gly Val Gln Ala Thr Ala Lys His Tyr Ile		
180	185	190
Leu Asn Glu Gln Glu Leu Asn Arg Glu Thr Ile Ser Ser Asn Pro Asp		
195	200	205
Asp Arg Thr Leu His Glu Leu Tyr Thr Trp Pro Phe Ala Asp Ala Val		
210	215	220
Gln Ala Asn Val Ala Ser Val Met Cys Ser Tyr Asn Lys Val Asn Thr		
225	230	235
Thr Trp Ala Cys Glu Asp Gln Tyr Thr Leu Gln Thr Val Leu Lys Asp		
245	250	255
Gln Leu Gly Phe Pro Gly Tyr Val Met Thr Asp Trp Asn Ala Gln His		
260	265	270
Thr Thr Val Gln Ser Ala Asn Ser Gly Leu Asp Met Ser Met Pro Gly		
275	280	285
Thr Asp Phe Asn Gly Asn Asn Arg Leu Trp Gly Pro Ala Leu Thr Asn		
290	295	300
Ala Val Asn Ser Asn Gln Val Pro Thr Ser Arg Val Asp Asp Met Val		
305	310	315
Thr Arg Ile Leu Ala Ala Trp Tyr Leu Thr Gly Gln Asp Gln Ala Gly		
325	330	335
Tyr Pro Ser Phe Asn Ile Ser Arg Asn Val Gln Gly Asn His Lys Thr		
340	345	350
Asn Val Arg Ala Ile Ala Arg Asp Gly Ile Val Leu Leu Lys Asn Asp		
355	360	365
Ala Asn Ile Leu Pro Leu Lys Lys Pro Ala Ser Ile Ala Val Val Gly		
370	375	380
Ser Ala Ala Ile Ile Gly Asn His Ala Arg Asn Ser Pro Ser Cys Asn		
385	390	395
Asp Lys Gly Cys Asp Asp Gly Ala Leu Gly Met Gly Trp Gly Ser Gly		
405	410	415
Ala Val Asn Tyr Pro Tyr Phe Val Ala Pro Tyr Asp Ala Ile Asn Thr		
420	425	430
Arg Ala Ser Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr Leu Ser Asn Thr Asp Asn		
435	440	445
Thr Ser Ser Gly Ala Ser Ala Ala Arg Gly Lys Asp Val Ala Ile Val		
450	455	460
Phe Ile Thr Ala Asp Ser Gly Glu Gly Tyr Ile Thr Val Glu Gly Asn		
465	470	475
		480

Ala Gly Asp Arg Asn Asn Leu Asp Pro Trp His Asn Gly Asn Ala Leu
485 490 495
Val Gln Ala Val Ala Gly Ala Asn Ser Asn Val Ile Val Val Val His
500 505 510
Ser Val Gly Ala Ile Ile Leu Glu Gln Ile Leu Ala Leu Pro Gln Val
515 520 525
Lys Ala Val Val Trp Ala Gly Leu Pro Ser Gln Glu Ser Gly Asn Ala
530 535 540
Leu Val Asp Val Leu Trp Gly Asp Val Ser Pro Ser Gly Lys Leu Val
545 550 555 560
Tyr Thr Ile Ala Lys Ser Pro Asn Asp Tyr Asn Thr Arg Ile Val Ser
565 570 575
Gly Gly Ser Asp Ser Phe Ser Glu Gly Leu Phe Ile Asp Tyr Lys His
580 585 590
Phe Asp Asp Ala Asn Ile Thr Pro Arg Tyr Glu Phe Gly Tyr Gly Leu
595 600 605
Ser Tyr Thr Lys Phe Asn Tyr Ser Arg Leu Ser Val Leu Ser Thr Ala
610 615 620
Lys Ser Gly Pro Ala Thr Gly Ala Val Val Pro Gly Gly Pro Ser Asp
625 630 635 640
Leu Phe Gln Asn Val Ala Thr Val Thr Val Asp Ile Ala Asn Ser Gly
[0007] 645 650 655
Gln Val Thr Gly Ala Glu Val Ala Gln Leu Tyr Ile Thr Tyr Pro Ser
660 665 670
Ser Ala Pro Arg Thr Pro Pro Lys Gln Leu Arg Gly Phe Ala Lys Leu
675 680 685
Asn Leu Thr Pro Gly Gln Ser Gly Thr Ala Thr Phe Asn Ile Arg Arg
690 695 700
Arg Asp Leu Ser Tyr Trp Asp Thr Ala Ser Gln Lys Trp Val Val Pro
705 710 715 720
Ser Gly Ser Phe Gly Ile Ser Val Gly Ala Ser Ser Arg Asp Ile Arg
725 730 735
Leu Thr Ser Thr Leu Ser Val Ala
740

<210> 4

<211> 2235

<212> DNA

<213> 里氏木霉

<400> 4

atgcgttacc gaacagcagc tgcgctggca cttgccactg ggcctttgc tagggcagac

60

	agtcactcaa catcgggggc ctcggtgag gcagttgtac ctctgcagg gactccaagg	120
	ggaaccgcgt acgacaaggc gaagccgca ttggcaaage tcaatctcca agataaggtc	180
	ggcatcgtga gcggtgtcgg ctggaacggc ggctcttgcg ttggaacac atctecggcc	240
	tccaagatca gtatccatc gctatgcctt caagacggac cctcgggtgt tcgatactcg	300
	acaggcagca cagccittac gccgggcgtt caagcggcct cgacgtggga tgcattttg	360
	atccgcgaac gtggacagtt catcggtgag gaggtgaagg cctcggggat tcatgtcata	420
	cttggctctg tggctgggcc gctgggaaag actccgcagg gcggtcgcaa ctgggagggc	480
	ttcgtgtcg atccatatct caccggcatt gccatgggtc aaaccatcaa cggcatccag	540
	tcggtaggcg tgcaggcgac agcgaagcac tatatctca acgagcagga gctcaatga	600
	gaaaccatct cgagcaaccc agatgaccga actctccatg agctgtatac ttggccattt	660
	gccgacggg ttcaggccaa tctcgtctt gtcattgtct cgtacaacaa ggtcaatacc	720
[0008]	acctgggcct gcgaggatca gtacacgtg cagactgtgc tgaaagacca gctgggggtc	780
	ccaggctatg tcatgacgga ctggaacgca cagcacagca ctgtccaaag cgcgaattct	840
	gggcttgaca tgcattgcc tggcacagac tccaacggta acaatcggct ctggggacca	900
	gctctacca atgcggtaaa tagcaatcag gtcccacga gcagagtga cgatatggtg	960
	actcgtatcc tcgcgcctg gtacttgaca ggccaggacc aggcaggcta tccgtcgtc	1020
	aacatcagca gaaatgttca aggaaaccac aagaccaatg tcagggaat tgcaggagc	1080
	ggcatcgttc tgcctaaaga tgacccaac atcctgccgc tcaagaagcc cgtatgcatt	1140
	gccgtcgtg gatctgccgc aatcatiggt aaccacgca gaaactgcc ctctgcaac	1200
	gacaaaggct gcgacgacgg ggcttgggc atgggttggg gttccggcgc cgtcaactat	1260
	ccttacttcg tcgcgccta cgatccatc aataccagag cgtcttcga gggcaccag	1320
	gttacctga gcaacacga caacacgtc tcaggcgcct ctgcagcaag aggaaaggac	1380

gtcgcacatcg tcttcatcac cgccgactcg ggtgaaggct acatcacctg ggagggcaac	1440
gcgggcgacg gcaacaacct ggatccgtgg cacaacggca atgccctggt ccaggcggtg	1500
gccggtgcca acagcaacgt cattgttgtt gtccactccg ttggegecat cattctggag	1560
cagattcttg ctcttccgca ggtcaaggcc gttgtctggg cgggtcttcc ttctcaggag	1620
agcggcaatg cgctcgtcga cgtgctgtgg ggagatgtca gcccttctgg caagctggtg	1680
tacaccattg cgaagagccc caatgactat aacactcgca tcgtttccgg cggcagtgac	1740
agcttcagcg agggactgtt catcgactat aagcacttcg acgacgcca tatcacgccg	1800
eggtacgagt tcggetatgg actgtcttac accaagtcca actactcacg cctctccgtc	1860
ttgtcgaccg ccaagtctgg tcttgcgact ggggccttg tgcggggagg cccgagtgat	1920
ctgttccaga atgtcgcgac agtcaccgtt gacatcgcaa actctggcca agtgactggt	1980
gccgagglag cccagctgta caacacctac ccacttccag cacccaggac ccttccgaag	2040
[0009] cagctcgag gctttgcca gctgaacctc acgcctggtc agagcggaac agcaacgttc	2100
aacatccgac gacgagatct cagctactgg gacacggcct cgcagaaatg ggtggtgccg	2160
tcggggtcgt ttggcatcag cgtgggagcg agcagccggg atatcaggct gacgagcact	2220
ctgtcggtag cgtag	2235

<210> 5

<211> 744

<212> PRT

<213> 里氏木霉

<400> 5

Met Arg Tyr Arg Thr Ala Ala Ala Leu Ala Leu Ala Thr Gly Pro Phe

1 5 10 15

Ala Arg Ala Asp Ser His Ser Thr Ser Gly Ala Ser Ala Glu Ala Val

20 25 30

Val Pro Pro Ala Gly Thr Pro Trp Gly Thr Ala Tyr Asp Lys Ala Lys

35 40 45

[0010]

Ala Ala Leu Ala Lys Leu Asn Leu Gln Asp Lys Val Gly Ile Val Ser			
50	55	60	
Gly Val Gly Trp Asn Gly Gly Pro Cys Val Gly Asn Thr Ser Pro Ala			
65	70	75	80
Ser Lys Ile Ser Tyr Pro Ser Leu Cys Leu Gln Asp Gly Pro Leu Gly			
85	90	95	
Ile Arg Phe Gly Thr Gly Ser Thr Ala Phe Thr Pro Gly Val Gln Ala			
100	105	110	
Ala Ser Thr Trp Asp Thr Glu Leu Met Arg Gln Arg Gly Glu Tyr Leu			
115	120	125	
Gly Ala Glu Ala Lys Gly Cys Gly Ile His Val Leu Leu Gly Pro Val			
130	135	140	
Ala Gly Pro Leu Gly Lys Thr Pro Gln Gly Gly Arg Asn Trp Glu Gly			
145	150	155	160
Phe Gly Val Asp Pro Tyr Leu Thr Gly Ile Ala Met Ala Glu Thr Ile			
165	170	175	
Glu Gly Leu Gln Ser Ala Gly Val Gln Ala Cys Ala Lys His Tyr Ile			
180	185	190	
Val Asn Glu Gln Glu Leu Asn Arg Glu Thr Ile Ser Ser Asp Val Asp			
195	200	205	
Asp Arg Thr Met His Glu Leu Tyr Leu Trp Pro Phe Ala Asp Ala Val			
210	215	220	
Gln Ala Asn Val Ala Ser Val Met Cys Ser Tyr Asn Lys Ile Asn Gly			
225	230	235	240
Ser Trp Ala Cys Glu Asp Gln Tyr Thr Leu Gln Thr Val Leu Lys Asp			
245	250	255	
Gln Leu Gly Phe Pro Gly Tyr Val Met Thr Asp Trp Asn Ala Gln His			
260	265	270	
Thr Thr Val Gln Ser Ala Asn Ser Gly Leu Asp Met Ser Met Pro Gly			
275	280	285	
Thr Asp Phe Asn Gly Asn Asn Arg Leu Trp Gly Pro Ala Leu Thr Asn			
290	295	300	
Ala Val Asn Ser Asn Gln Val Pro Thr Ser Arg Val Asp Asp Met Val			
305	310	315	320
Thr Arg Ile Leu Ala Ala Trp Tyr Leu Thr Gly Gln Asp Gln Ala Gly			
325	330	335	
Tyr Pro Ser Phe Asn Ile Ser Arg Asn Val Gln Gly Asn His Lys Thr			
340	345	350	
Asn Val Arg Ala Ile Ala Arg Asp Gly Ile Val Leu Leu Lys Asn Asp			
355	360	365	
Ala Asn Ile Leu Pro Leu Lys Lys Pro Ala Ser Ile Ala Val Val Gly			
370	375	380	
Ser Ala Ala Ile Ile Gly Asn His Ala Arg Asn Ser Pro Ser Cys Asn			
385	390	395	400

[0011]

```

Asp Lys Gly Cys Asp Asp Gly Ala Leu Gly Met Gly Trp Gly Ser Gly
      405                      410                      415
Ala Val Asn Tyr Pro Tyr Phe Val Ala Pro Tyr Asp Ala Ile Asn Thr
      420                      425                      430
Arg Ala Ser Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr Leu Ser Asn Thr Asp Asn
      435                      440                      445
Thr Ser Ser Gly Ala Ser Ala Ala Arg Gly Lys Asp Val Ala Ile Val
      450                      455                      460
Phe Ile Thr Ala Asp Ser Gly Glu Gly Tyr Ile Thr Val Glu Gly Asn
      465                      470                      475                      480
Ala Gly Asp Arg Asn Asn Leu Asp Pro Trp His Asn Gly Asn Ala Leu
      485                      490                      495
Val Gln Ala Val Ala Gly Ala Asn Ser Asn Val Ile Val Val Val His
      500                      505                      510
Ser Val Gly Ala Ile Ile Leu Glu Gln Ile Leu Ala Leu Pro Gln Val
      515                      520                      525
Lys Ala Val Val Trp Ala Gly Leu Pro Ser Gln Glu Ser Gly Asn Ala
      530                      535                      540
Leu Val Asp Val Leu Trp Gly Asp Val Ser Pro Ser Gly Lys Leu Val
      545                      550                      555                      560
Tyr Thr Ile Ala Lys Ser Pro Asn Asp Tyr Asn Thr Arg Ile Val Ser
      565                      570                      575
Gly Gly Ser Asp Ser Phe Ser Glu Gly Leu Phe Ile Asp Tyr Lys His
      580                      585                      590
Phe Asp Asp Ala Asn Ile Thr Pro Arg Tyr Glu Phe Gly Tyr Gly Leu
      595                      600                      605
Ser Tyr Thr Lys Phe Asn Tyr Ser Arg Leu Ser Val Phe Ser Thr Ala
      610                      615                      620
Lys Ser Gly Pro Ala Thr Gly Ala Val Val Pro Gly Gly Pro Ser Asp
      625                      630                      635                      640
Leu Phe Gln Asn Val Ala Thr Val Thr Val Asp Ile Ala Asn Ser Gly
      645                      650                      655
Gln Val Thr Gly Ala Glu Val Ala Gln Leu Tyr Ile Thr Tyr Pro Ser
      660                      665                      670
Ser Ala Pro Arg Thr Pro Pro Lys Gln Leu Arg Gly Phe Ala Lys Leu
      675                      680                      685
Asn Leu Thr Pro Gly Gln Ser Gly Thr Ala Thr Phe Asn Ile Arg Arg
      690                      695                      700
Arg Asp Leu Ser Tyr Trp Asp Thr Ala Ser Gln Lys Trp Val Val Pro
      705                      710                      715                      720
Ser Gly Ser Phe Gly Ile Ser Val Gly Ala Ser Ser Arg Asp Ile Arg
      725                      730                      735
Leu Thr Ser Thr Leu Ser Val Ala
      740

```

<210> 6
 <211> 2235
 <212> DNA
 <213> 里氏木霉

<400> 6

atgcgttacc gaacagcagc tgcgctggca cttgccactg ggccttttgc tagggcagac	60
agtcactcaa catcgggggc ctcggctgag gcagttgtac ctctgcagg gactccatgg	120
ggaaccgcgt acgacaaggc gaaggccgca ttggcaaage tcaatctcca agataaggtc	180
ggcatcgtga gcggtgtcgg ctggaacggc ggtccttgcg ttggaaacac atctccggcc	240
tccaagatca gctatccate gctatgcctt caagacggac ccctcggtat cegattcggc	300
acaggcagca cagcctttac gccgggcgtt caagcggcct cgacgtggga taccgagttg	360
atgcgccagc gtggagagta cctgggtgcc gaggccaaagg gctgcgggat tcatgtctg	420
[0012] cttggtcctg tggctgggce gctgggaaag actccgcagg gcggtcgcaa ctgggagggc	480
ttcgggtgtc atccatatct caccggcatt gccatggccg agacaatcga gggcctgcag	540
tcggccggcg tgcaggcgtg cgcgaagcac tatatctca acgagcagga gctcaatcga	600
gaaaccattt cgagcgacgt cgaatgaccga actatgcatg agctgtatct gtggccattt	660
gccgacgcgg ttcaggccaa tctcgttctt gtcattgtct cgtacaacaa gatcaatgce	720
agctgggcct gcgaggatca gtacacgctg cagactgtgc tgaaagacca gctggggttc	780
ccaggctatg tcatgacgga ctggaacgca cagcacacga ctgtccaaag cgcgaattct	840
gggcttgaca tgtcaatgcc tggcacagac ttcaacggta acaatcggtc ctgggggtcca	900
gctctcacca atgcggtaaa tagcaatcag gtccccacga gcagagtega cgatatggtg	960
actcgtatec tcgccgcatg gtacttgaca ggccaggacc aggcaggcta tccgtcgttc	1020
aacatcagca gaaatgttca aggaaaccac aagaccaatg tcagggcaat tgccagggac	1080

	ggcatcggtc tgctcaagaa tgacgccaac atcctgccgc tcaagaagcc cgctagcatt	1140
	gccgtcggtg gatctgccgc aatcattggt aaccacgcca gaaactcgcc etcgtgcaac	1200
	gacaaaggct gcgaegacgg gcccttgggc atgggttggg gticcggcgc cgtcaactat	1260
	ccgtacttcg tcgcgcccta cgatgccate aataccagag cgtcttcgca gggcaccag	1320
	gttaccttga gcaacaccga caacacgtcc tcaggcgcat ctgcagcaag aggaaaggac	1380
	gtcgccatcg tcttcatcac cgccgactcg ggtgaaggct acatcacctg ggagggaac	1440
	gcgggcgatc gcaacaacct ggatccgtgg cacaacggca atgccctggt ccaggcggtg	1500
	gccggtgcca acagcaacgt cattgttgtt gtccactccg ttggcgccat cattctggag	1560
	cagattcttg ctcttcgca ggtcaaggcc gttgtctggg cgggtcttcc ttctcaggag	1620
	agcggcaatg cgctcgtcga cgtgctgtgg ggagatgtca gcccttcttg caagctggtg	1680
	tacaccattg cgaagagccc caatgactat aacactcgca tcgtttccgg cggcagtgac	1740
[0013]	agcttcagcg agggactgtt catcgactat aagcacttcg acgacgcaa tatcacccg	1800
	cggtaacagt tcggctatgg actgtcttac accaagtcca actactcacg cctctccgic	1860
	ttttcgaccg ccaagtctgg tcttgcgaact ggggccgttg tgccgggagg cccgagtgat	1920
	ctgttcagaa atgtcgcgac agtcaccgtt gacatcgcaa actctggcca agtgactggt	1980
	gccgaggtag cccagctgta catcacctac ccattctcag caccaggaac cccctcgaag	2040
	cagctgcgag gctttgcca gctgaacetc acgcttggtc agagcggaa agcaacgttc	2100
	aacatccgac gacgagatct cagctactgg gacacggcct cgcagaaatg ggtggtgccg	2160
	tcggggtcgt ttggcatcag cgtgggagcg agcagccggg atatcaggt gacgagcact	2220
	ctgtcggtag cgtag	2235

<210> 7

<211> 726

<212> PRT

<213> 球毛壳菌

<400> 7

Met Thr Thr Leu Arg Asn Phe Ala Leu Leu Ala Ala Ala Val Leu Ala
 1 5 10 15
 Arg Val Glu Ala Leu Glu Ala Ala Asp Trp Ala Ala Ala Glu Ala Ser
 20 25 30
 Ala Lys Thr Ala Leu Ala Lys Met Ser Gln Gln Asp Lys Ile Ser Ile
 35 40 45
 Val Thr Gly Ile Gly Trp Asp Lys Gly Pro Cys Val Gly Asn Thr Ala
 50 55 60
 Ala Ile Asn Ser Ile Asn Tyr Pro Gln Leu Cys Leu Gln Asp Gly Pro
 65 70 75 80
 Leu Gly Ile Arg Phe Gly Thr Gly Ser Thr Ala Phe Thr Pro Gly Val
 85 90 95
 Gln Ala Ala Ser Thr Trp Asp Thr Glu Leu Met Arg Gln Arg Gly Glu
 100 105 110
 Tyr Leu Gly Ala Glu Ala Lys Gly Cys Gly Ile His Val Leu Leu Gly
 115 120 125
 Pro Val Ala Gly Ala Leu Gly Lys Ile Pro His Gly Gly Arg Asn Trp
 130 135 140
 Glu Gly Phe Gly Thr Asp Pro Tyr Leu Ala Gly Ile Ala Met Ala Glu
 145 150 155 160
 Thr Ile Glu Gly Leu Gln Ser Ala Gly Val Gln Ala Cys Ala Lys His
 165 170 175
 Tyr Ile Val Asn Glu Gln Glu Leu Asn Arg Glu Thr Ile Ser Ser Asp
 180 185 190
 Val Asp Asp Arg Thr Met His Glu Leu Tyr Leu Trp Pro Phe Ala Asp
 195 200 205
 Ala Val His Ala Asn Val Ala Ser Val Met Cys Ser Tyr Asn Lys Ile
 210 215 220
 Asn Gly Ser Trp Gly Cys Glu Asn Asp His Ala Gln Asn Gly Leu Leu
 225 230 235 240
 Lys Lys Glu Leu Gly Phe Lys Gly Tyr Val Val Ser Asp Trp Asn Ala
 245 250 255
 Gln His Thr Thr Asp Gly Ala Ala Asn Asn Gly Met Asp Met Thr Met
 260 265 270
 Pro Gly Ser Asp Tyr Asn Gly Asn Asn Val Leu Trp Gly Pro Gln Leu
 275 280 285
 Ser Asn Ala Val Asn Ser Asn Arg Val Ser Arg Asp Arg Leu Asp Asp
 290 295 300
 Met Ala Lys Arg Ile Leu Thr Ser Trp Tyr Leu Leu Gly Gln Asn Ser
 305 310 315 320

[0015]

Gly Tyr Pro Asn Ile Asn Ile Asn Ala Asn Val Gln Gly Asn His Lys
 325 330 335
 Glu Asn Val Arg Ala Val Ala Arg Asp Gly Ile Val Leu Leu Lys Asn
 340 345 350
 Asp Glu Gly Val Leu Pro Leu Lys Lys Pro Gly Lys Val Ala Leu Val
 355 360 365
 Gly Ser Ala Ala Ser Val Asn Ser Ala Gly Pro Asn Ala Cys Val Asp
 370 375 380
 Lys Gly Cys Asn Thr Gly Ala Leu Gly Met Gly Trp Gly Ser Gly Ser
 385 390 395 400
 Val Asn Tyr Pro Tyr Phe Val Ala Pro Tyr Asp Ala Leu Lys Thr Arg
 405 410 415
 Ala Gln Ala Asp Gly Thr Thr Leu Ser Leu His Asn Ser Asp Ser Thr
 420 425 430
 Asn Gly Val Ser Gly Val Val Ser Gly Ala Asp Val Ala Ile Val Val
 435 440 445
 Ile Thr Ala Asp Ser Gly Glu Gly Tyr Ile Thr Val Glu Gly His Ala
 450 455 460
 Gly Asp Arg Asn His Leu Asp Pro Trp His Asp Gly Asn Ala Leu Val
 465 470 475 480
 Lys Ala Val Ala Ala Ala Asn Lys Asn Thr Ile Val Val Val His Ser
 485 490 495
 Thr Gly Pro Ile Ile Leu Glu Thr Ile Leu Ala Thr Glu Gly Val Lys
 500 505 510
 Ala Val Val Trp Ala Gly Leu Pro Ser Gln Glu Asn Gly Asn Ala Leu
 515 520 525
 Val Asp Val Leu Tyr Gly Leu Thr Ser Pro Ser Gly Lys Leu Val Tyr
 530 535 540
 Ser Ile Ala Lys Arg Pro Glu Asp Tyr Gly Thr Ala Pro Ser Lys Gly
 545 550 555 560
 Ser Asn Asp Lys Phe Thr Glu Gly Leu Phe Val Asp Tyr Arg His Phe
 565 570 575
 Asp Asn Ala Lys Ile Glu Pro Arg Tyr Glu Phe Gly Phe Gly Leu Ser
 580 585 590
 Tyr Thr Glu Phe Thr Tyr Ala Asp Leu Ser Val Thr Ser Thr Val Thr
 595 600 605
 Ala Gly Pro Ala Ser Gly Glu Thr Ile Pro Gly Gly Ala Ala Asp Leu
 610 615 620
 Trp Glu Thr Val Ala Thr Val Thr Ala Ser Ile Thr Asn Ser Gly Glu
 625 630 635 640
 Val Glu Gly Ala Glu Val Ala Gln Leu Tyr Ile Thr Leu Pro Ser Ala
 645 650 655
 Ala Pro Ser Thr Pro Pro Lys Gln Leu Arg Gly Phe Ala Lys Leu Lys
 660 665 670

Leu Glu Pro Gly Ala Ser Gly Val Ala Thr Phe Asn Leu Arg Arg Arg
 675 680 685
 Asp Leu Ser Tyr Trp Asp Ala Gly Arg Gly Gln Trp Val Val Pro Ala
 690 695 700
 Gly Glu Phe Thr Val Ser Val Gly Ala Ser Ser Arg Asp Val Arg Leu
 705 710 715 720
 Thr Gly Ser Leu Thr Ala
 725

<210> 8

<211> 2181

<212> DNA

<213> 球毛壳菌

<400> 8

[0016]

atgacgacgc tccgcaactt tgcgctgctc gcagcggcgg tgcttgcgcg ggtcgaggcc 60
 ctcgaggccg ccgactgggc tgcggctgag gcctcagcca aaaccgcaact ggcaaagatg 120
 tcacaacaag acaaaatcag cattgtgacg ggcatcggtt gggacaaggg tccctgtgtc 180
 ggcaacacgg ccgccatcaa ctcgatcaac taccgcgagc tctgcctaca ggacggcccg 240
 ctcgggatcc gcttcggcac cggctcgacg gccttcaccc cgggcgtcca agccgcctcg 300
 acatgggata ccgagctgat gcgccagcgc ggcgagtacc tcggggccga ggccaagggg 360
 tgcggcatcc acgtgttgct gggccccgtg gceggggcac tgggcaagat cccgcacggc 420
 gggcgcaact gggaaggatt cgggacggac ccgtacctgg cgggcctcgc catggccgag 480
 acgatcgagg ggcctgcagtc ggcgggggtg caggcgtgcg ccaagcaeta catcgtcaac 540
 gagcaggagc tcaaccgcga gaccatcagc agegacgtcg acgaccgcac catgcaagag 600
 ctgtacctgt ggcccttcgc cgacgccgtg cagccaacg tggccagcgt catgtgcagc 660
 tacaacaaga tcaacggctc gtggggetgc gagaacgacc acgccccaaa cggcctgtc 720
 aagaaggagc tcggttcaa gggttacgtc gtcagegact ggaacgcgca gcacacgacc 780
 gacggcgccg ccaacaacgg catggacatg accatgccgg gcagcgacta caacggcaac 840

	aacgtgctct ggggcccga gctcagcaac gccgtcaaca gcaaccgggt ctgcgcgac	900
	cggtcgcagc acatggccaa acgcatectc acctcatggt acctcctggg ccagaactcg	960
	ggctacccca acatcaacat caagcccaac gtgcaggga accacaagga gaacgtgcgg	1020
	geggtggcgc gcgacggcat cgtgctgctc aagaacgacg agggcgtget cccgctgaag	1080
	aagccaggca aggtggtctt cgtcggatcg gcggcctcgg tcaacagcgc gggccccaac	1140
	gcgtgcgtcg acaagggtcg caacacgggc gcgtcggca tgggctgggg gtcgggtcc	1200
	gtcaactacc cctactttgt ggcccccctac gacgcgtca agacgcgcgc ccaggccgac	1260
	ggcaccacgc tcagcctgca caactcggac tcgaccaacg gcgtatcggg cgtggtgctg	1320
	ggcgcgcgac tggccatcgt ggtgatcacg gcggactcgg gcgagggcta catcacggtc	1380
	gagggccacg ccggcgaccg caaccacctg gaccctggc acgacggcaa cgcgctggtt	1440
	aaggcgttgg ccgcggccaa caagaacacc atcgtggtag tgcacagcac agggcccatc	1500
[0017]	atcctcgaga ccatacctggc gacggagggt gtcaaggcgg ttgtgtgggc cggcctgccg	1560
	agtcaggaga acggcaacgc gctagttgac gttttgtacg gcctgacttc gccctcaggc	1620
	aaactggtct actccatcgc caagcgcgcc gaggactatg gcacggcccc ctccaagggc	1680
	agtaacgaca agttcacga aggcctgttt gtgcactacc ggcacttga caacgccaag	1740
	attgagccgc ggtacgagtt tggttttgtt ttgtctaca ccgaattcac ctacgcgcac	1800
	ctctccgtca ctccaccgt aacggccggc cccgcctcag gcgagaccat acccggcggc	1860
	gcggccgacc tctgggagac tgtcgaacg gtcacggcgt ccatcacgaa cagcggcgag	1920
	gtggaggggc ccgagggtgc gcagctgtac atcacgtgc cgtcgggggc cccctcgacg	1980
	ccgccaage agctgcgcgg gttcgccaag ctcaagctcg agccgggggc gtcgggcgtc	2040
	gcgaccttca acctgcgccg tcgcgacttg agttattggg atgccggggc cggccagtgg	2100
	gtggtgccgg cgggcgagtt tacggtttcg gttggtgcga gttcgaggga tgtgcgttg	2160

acggggagct tgactgctta g

2181

<210> 9

<211> 735

<212> PRT

<213> 粗糙脉胞菌

<400> 9

Met His Leu Arg Ile Phe Ala Val Leu Ala Ala Thr Ser Leu Ala Trp
 1 5 10 15
 Ala Glu Thr Ser Glu Lys Gln Ala Arg Gln Ala Gly Ser Gly Phe Ala
 20 25 30
 Ala Trp Asp Ala Ala Tyr Ser Gln Ala Ser Thr Ala Leu Ser Lys Leu
 35 40 45
 Ser Gln Gln Asp Lys Val Asn Ile Val Thr Gly Val Gly Trp Asn Lys
 50 55 60
 Gly Pro Cys Val Gly Asn Thr Pro Ala Ile Ala Ser Ile Gly Tyr Pro
 65 70 75 80
 Gln Leu Cys Leu Gln Asp Gly Pro Leu Gly Ile Arg Phe Gly Gly Ser
 85 90 95
 Val Thr Ala Phe Thr Pro Gly Ile Gln Ala Ala Ser Thr Trp Asp Val
 100 105 110
 Glu Leu Ile Arg Gln Arg Gly Val Tyr Leu Gly Ala Glu Ala Arg Gly
 115 120 125
 Val Gly Val His Val Leu Leu Gly Pro Val Ala Gly Ala Leu Gly Lys
 130 135 140
 Ile Pro Asn Gly Gly Arg Asn Trp Glu Gly Phe Gly Pro Asp Pro Tyr
 145 150 155 160
 Leu Thr Gly Ile Ala Met Ser Glu Thr Ile Glu Gly Ile Gln Ser Asn
 165 170 175
 Gly Val Gln Ala Cys Ala Lys His Phe Ile Leu Asn Glu Gln Glu Thr
 180 185 190
 Asn Arg Asp Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Asp Arg Thr Met His Glu
 195 200 205
 Leu Tyr Leu Phe Pro Phe Ala Asp Ala Val His Ser Asn Val Ala Ser
 210 215 220
 Val Met Cys Ser Tyr Asn Lys Val Asn Gly Thr Trp Ala Cys Glu Asn
 225 230 235 240
 Asp Lys Ile Gln Asn Gly Leu Leu Lys Lys Glu Leu Gly Phe Lys Gly
 245 250 255
 Tyr Val Met Ser Asp Trp Asn Ala Gln His Thr Thr Asn Gly Ala Ala
 260 265 270

[0018]

[0019]

```

Asn Ser Gly Met Asp Met Thr Met Pro Gly Ser Asp Phe Asn Gly Lys
  275                      280                      285
Thr Ile Leu Trp Gly Pro Gln Leu Asn Thr Ala Val Asn Asn Gly Gln
  290                      295                      300
Val Ser Lys Ala Arg Leu Asp Asp Met Ala Lys Arg Ile Leu Ala Ser
  305                      310                      315                      320
Trp Tyr Leu Leu Glu Gln Asn Ser Gly Tyr Pro Ala Thr Asn Leu Lys
                      325                      330                      335
Ala Asn Val Gln Gly Asn His Lys Glu Asn Val Arg Ala Val Ala Arg
  340                      345                      350
Asp Gly Ile Val Leu Leu Lys Asn Asp Asp Asn Ile Leu Pro Leu Lys
  355                      360                      365
Lys Pro Ser Lys Leu Ala Ile Ile Gly Ser Ser Ser Val Val Asn Pro
  370                      375                      380
Ala Gly Arg Asn Ala Cys Thr Asp Arg Gly Cys Asn Thr Gly Ala Leu
  385                      390                      395                      400
Gly Met Gly Trp Gly Ser Gly Thr Ala Asp Tyr Pro Tyr Phe Val Ala
                      405                      410                      415
Pro Tyr Asp Ala Leu Lys Thr Arg Ala Gln Ser Asp Gly Thr Thr Val
  420                      425                      430
Asn Leu Leu Ser Ser Asp Ser Thr Ser Gly Val Ala Asn Ala Ala Ser
  435                      440                      445
Gly Ala Asp Ala Ala Leu Val Phe Ile Thr Ala Asp Ser Gly Glu Gly
  450                      455                      460
Tyr Ile Thr Val Glu Gly Val Thr Gly Asp Arg Pro Asn Leu Asp Pro
  465                      470                      475                      480
Trp His Asn Gly Asn Gln Leu Val Gln Ala Val Ala Gln Ala Asn Lys
  485                      490                      495
Asn Thr Ile Val Val Val His Ser Thr Gly Pro Ile Ile Leu Glu Thr
  500                      505                      510
Ile Leu Ala Gln Pro Gly Val Lys Ala Val Val Trp Ala Gly Leu Pro
  515                      520                      525
Ser Gln Glu Asn Gly Asn Ala Leu Val Asp Val Leu Tyr Gly Leu Val
  530                      535                      540
Ser Pro Ser Gly Lys Leu Pro Tyr Thr Ile Ala Lys Ser Glu Ser Asp
  545                      550                      555                      560
Tyr Gly Thr Ala Val Gln Arg Gly Gly Thr Asp Leu Phe Thr Glu Gly
  565                      570                      575
Leu Phe Ile Asp Tyr Arg His Phe Asp Lys Asn Gly Ile Ala Pro Arg
  580                      585                      590
Tyr Glu Phe Gly Phe Gly Leu Ser Tyr Thr Asn Phe Thr Tyr Ser Ser
  595                      600                      605
Leu Ser Ile Thr Ser Thr Ala Ser Ser Gly Pro Ala Ser Gly Asp Thr
  610                      615                      620

```

Ile Pro Gly Gly Arg Ala Asp Leu Trp Glu Thr Val Ala Thr Val Thr
 625 630 635 640
 Ala Val Val Lys Asn Thr Gly Gly Val Gln Gly Ala Glu Ala Pro Gln
 645 650 655
 Leu Tyr Ile Thr Leu Pro Ser Ser Ala Pro Ser Ser Pro Pro Lys Gln
 660 665 670
 Leu Arg Gly Phe Ala Lys Leu Lys Leu Ala Pro Gly Glu Ser Lys Thr
 675 680 685
 Ala Thr Phe Ile Leu Arg Arg Arg Asp Leu Ser Tyr Trp Asp Thr Gly
 690 695 700
 Ser Gln Asn Trp Val Val Pro Ser Gly Ser Phe Gly Val Val Val Gly
 705 710 715 720
 Ala Ser Ser Arg Asp Leu Arg Leu Asn Gly Lys Phe Asp Val Tyr
 725 730 735

<210> 10

<211> 2208

<212> DNA

<213> 粗糙脉胞菌

[0020]

<400> 10

atgcaccttc gaatatttgc ggtgtttggcc ggcacttccc tcgcctgggc cgagactagc 60
 gagaaacaag ctctgtcaagc tggctcaggt ttgctggcgt gggacgcagc ctattctcag 120
 gcaagcacig ctctctccaa gctttcacag caagacaagg tcaacatcgt caccggagtc 180
 ggcttgaata agggcccatg tgtttgcaac accccagcta ttgcatcaat cggttatccc 240
 cagctctgtt tacaagacgg cctctcggc attcggtttg gaggaagtgt caccgcgttc 300
 acgcctggta tccaggcggc ttcaacatgg gacgtcgaac tgattcgaca gcgcggcgtc 360
 tacctcggtg cagaagccag aggggttggc gtacatgtcc ttcttggacc cgtggccgga 420
 gcgcttggca agatccccaa tgggtggacgt aactgggagg gctttggtec ggatccctac 480
 ctcacaggta ttgcatgag cgaaacaatt gaagggatcc agagcaatgg tgtacaagct 540
 tgcgccaagc acttcattct caacgaacag gagacaaacc gcgatactat cagcagtgtc 600
 gtgcagcacc gcacatgca tgaactatac ctcttccctt ttgcccgtgc cgtacactca 660

	aatgttgcaa gtgtgatgtg cagctacaac aaggtcaacg gtacgtgggc atgtgagaat	720
	gacaaaatcc agaattgcct tctcaagaaa gagctaggct tcaaaggata tgtcatgagt	780
	gattggaacg cccagcacac cacgaacggc getgcaaaca gtggtatgga tatgacgatg	840
	ccaggcagtg actttaatgg caagacgac cttgtggggac cacagctcaa caccgccgtc	900
	aacaatggcc aggtctccaa agcaagactg gacgacatgg ccaagcgcct tctcgcatcg	960
	tggtattttac tcgagcaaaa ctccaggctac cctgcgacta acctcaaggc caatgttcaa	1020
	ggaaaccaca aggagaacgt tcgcgcagtg gcaagagacg gcattgttct gctgaagaac	1080
	gacgataaca tcttcccgct caagaagcct agcaagctgg caatcattgg gtcacgtccc	1140
	gttgtcaacc ctgcgggaag gaacgcctgc accgatcgag gatgcaaac cgggtgcgtc	1200
	ggcatgggtt ggggctccgg caccggcgat taacctact tcgtacgacc ctatgatgt	1260
	ctcaagacgc gggtcagtc cgacggaaca actgtcaacc tactcagctc tgacagcacc	1320
[0021]	agcggcgtag ccaacgtgc ctccggagcc gacgcggcac tagtcttcat cacagccgat	1380
	tccggcgaag gtacatcac ggtcgagggc gtgaccggcg accgtcccaa cctcgatccc	1440
	tggcacaacg gcaaccagct agtccaagcc gtggctcaag ccaacaagaa caccattgtc	1500
	gtcgtccaca gtaccggccc catcattctg gagactatcc tcgcgcagcc gggcgtcaag	1560
	gcggctgtgt gggcgggtct cccagccaa gagaacggca acgcccttgt cgatgtccta	1620
	tacggtttgg tctctccctc gggtaaactg ccgtatacta tcgccaagag cgaaagcgac	1680
	tacggcactg ccgtgcaaag gggagggacg gatctgttca ctgagggtct gttcatcgat	1740
	taccgcaact ttgacaagaa cggatcgct ccccggtatg agttcggttt cggttcttcc	1800
	tacacgaact tcacctactc ctccctctcc atcaacteca ccgcctctc cggteccgcc	1860
	tcgggtgaca ccattccctgg cggccgcgcc gacctctggg aaaccgtggc aaccgtcact	1920
	gccgtcgtea aaaacacggg tgggtgtgcag ggcgcgagg caccctcagct atacatcacc	1980

```

ttgccctctt cgcgcgcgtc gagcccgccg aaacagctca gagggtttgc aaagctgaag 2040

ctggcgcccc gggagagcaa gacagctacg ttcaattttgc ggaggaggga tttgagttat 2100

tgggatacgg gcagccagaa ttgggtggtg cctagtgcca gctttggggt ggtagtgggt 2160

gctagttcga gggatttgag gttgaatggg aagtttgatg titattga 2208

```

<210> 11

<211> 744

<212> PRT

<213> 里氏木霉

<400> 11

[0022]

```

Met Arg Tyr Arg Thr Ala Ala Ala Leu Ala Leu Ala Thr Gly Pro Phe
1           5           10           15
Ala Arg Ala Asp Ser His Ser Thr Ser Gly Ala Ser Ala Glu Ala Val
20          25          30
Val Pro Pro Ala Gly Thr Pro Trp Gly Thr Ala Tyr Asp Lys Ala Lys
35          40          45
Ala Ala Leu Ala Lys Leu Asn Leu Gln Asp Lys Val Gly Ile Val Ser
50          55          60
Gly Val Gly Trp Asn Gly Gly Pro Cys Val Gly Asn Thr Ser Pro Ala
65          70          75          80
Ser Lys Ile Ser Tyr Pro Ser Leu Cys Leu Gln Asp Gly Pro Leu Gly
85          90          95
Ile Arg Phe Gly Thr Gly Ser Thr Ala Phe Thr Pro Gly Val Gln Ala
100         105         110
Ala Ser Thr Trp Asp Val Asn Leu Ile Arg Glu Arg Gly Gln Phe Ile
115         120         125
Gly Glu Glu Val Lys Ala Ser Gly Ile His Val Ile Leu Gly Pro Val
130         135         140
Ala Gly Pro Leu Gly Lys Ile Pro His Gly Gly Arg Asn Trp Glu Gly
145         150         155         160
Phe Gly Val Asp Pro Tyr Leu Thr Gly Ile Ala Met Ala Glu Thr Ile
165         170         175
Glu Gly Leu Gln Ser Ala Gly Val Gln Ala Cys Ala Lys His Tyr Ile
180         185         190
Leu Asn Glu Gln Glu Leu Asn Arg Glu Thr Ile Ser Ser Asn Pro Asp
195         200         205
Asp Arg Thr Leu His Glu Leu Tyr Thr Trp Pro Phe Ala Asp Ala Val
210         215         220

```

[0023]

His Ala Asn Val Ala Ser Val Met Cys Ser Tyr Asn Lys Ile Asn Gly			
225	230	235	240
Ser Trp Ala Cys Glu Asp Gln Tyr Thr Leu Gln Thr Val Leu Lys Asp			
245	250	255	
Gln Leu Gly Phe Pro Gly Tyr Val Met Thr Asp Trp Asn Ala Gln His			
260	265	270	
Thr Thr Val Gln Ser Ala Asn Ser Gly Leu Asp Met Ser Met Pro Gly			
275	280	285	
Thr Asp Phe Asn Gly Asn Asn Arg Leu Trp Gly Pro Ala Leu Thr Asn			
290	295	300	
Ala Val Asn Ser Asn Gln Val Pro Thr Ser Arg Val Asp Asp Met Val			
305	310	315	320
Thr Arg Ile Leu Ala Ala Trp Tyr Leu Thr Gly Gln Asp Gln Ala Gly			
325	330	335	
Tyr Pro Ser Phe Asn Ile Ser Arg Asn Val Gln Gly Asn His Lys Thr			
340	345	350	
Asn Val Arg Ala Ile Ala Arg Asp Gly Ile Val Leu Leu Lys Asn Asp			
355	360	365	
Ala Asn Ile Leu Pro Leu Lys Lys Pro Ala Ser Ile Ala Val Val Gly			
370	375	380	
Ser Ala Ala Ile Ile Gly Asn His Ala Arg Asn Ser Pro Ser Cys Asn			
385	390	395	400
Asp Lys Gly Cys Asp Asp Gly Ala Leu Gly Met Gly Trp Gly Ser Gly			
405	410	415	
Ala Val Asn Tyr Pro Tyr Phe Val Ala Pro Tyr Asp Ala Ile Asn Thr			
420	425	430	
Arg Ala Ser Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr Leu Ser Asn Thr Asp Asn			
435	440	445	
Thr Ser Ser Gly Ala Ser Ala Ala Arg Gly Lys Asp Val Ala Ile Val			
450	455	460	
Phe Ile Thr Ala Asp Ser Gly Glu Gly Tyr Ile Thr Val Glu Gly Asn			
465	470	475	480
Ala Gly Asp Arg Asn Asn Leu Asp Pro Trp His Asn Gly Asn Ala Leu			
485	490	495	
Val Gln Ala Val Ala Gly Ala Asn Ser Asn Val Ile Val Val Val His			
500	505	510	
Ser Val Gly Ala Ile Ile Leu Glu Gln Ile Leu Ala Leu Pro Gln Val			
515	520	525	
Lys Ala Val Val Trp Ala Gly Leu Pro Ser Gln Glu Ser Gly Asn Ala			
530	535	540	
Leu Val Asp Val Leu Trp Gly Asp Val Ser Pro Ser Gly Lys Leu Val			
545	550	555	560
Tyr Thr Ile Ala Lys Ser Pro Asn Asp Tyr Asn Thr Arg Ile Val Ser			
565	570	575	

Gly Gly Ser Asp Ser Phe Ser Glu Gly Leu Phe Ile Asp Tyr Lys His
 580 585 590
 Phe Asp Asp Ala Asn Ile Thr Pro Arg Tyr Glu Phe Gly Tyr Gly Leu
 595 600 605
 Ser Tyr Thr Lys Phe Asn Tyr Ser Arg Leu Ser Val Leu Ser Thr Ala
 610 615 620
 Lys Ser Gly Pro Ala Thr Gly Ala Val Val Pro Gly Gly Pro Ser Asp
 625 630 635 640
 Leu Phe Gln Asn Val Ala Thr Val Thr Val Asp Ile Ala Asn Ser Gly
 645 650 655
 Gln Val Thr Gly Ala Glu Val Ala Gln Leu Tyr Ile Thr Tyr Pro Ser
 660 665 670
 Ser Ala Pro Arg Thr Pro Pro Lys Gln Leu Arg Gly Phe Ala Lys Leu
 675 680 685
 Asn Leu Thr Pro Gly Gln Ser Gly Thr Ala Thr Phe Asn Ile Arg Arg
 690 695 700
 Arg Asp Leu Ser Tyr Trp Asp Thr Ala Ser Gln Lys Trp Val Val Pro
 705 710 715 720
 Ser Gly Ser Phe Gly Ile Ser Val Gly Ala Ser Ser Arg Asp Ile Arg
 725 730 735
 Leu Thr Ser Thr Leu Ser Val Ala
 [0024] 740

<210> 12

<211> 2235

<212> DNA

<213> 里氏木霉

<400> 12

atgcgttacc gaacagcagc tgcgctggca ctggccactg ggccctttgc tagggcagac 60
 agtcactcaa catcgggggc ctcggctgag gcagttgtac ctctgcagg gactccatgg 120
 ggaaccgcgt acgacaagge gaaggccgca ttggcaaage tcaatctcca agataaggtc 180
 ggcatcgtga gcggtgtcgg ctggaacgga ggtcctttgc ttggaaacac atctccggcc 240
 tccaagatca gctatccate gctatgcctt caagacggac ccctcggtat ccgattcgcc 300
 acaggcagca cagcctttac gccggggcgtt caagcggcct cgacgtggga tgtaatttg 360
 atccgcgaac gtggacagtt catcggtgag gaggtgaagg cctcggggat tcatgtcata 420

	cttggtcctg tggctgggcc gctgggaaag atccccgcacg gcggtcgcaa ctgggagggc	480
	ticggtgtcg atccatatct cacgggcatt gccatggccg agacaatcga gggectgcag	540
	tcgcccgcg tgcaggcgtg cgcgaagcac tatatectca acgagcagga getcaatcga	600
	gaaaccattt cgagcaaccc agatgaccga actctccatg agctgtatac ttggccattt	660
	gccgacggg ttcaagccaa tgtcgcttct gtcattgtgt cgtacaacaa gatcaatggc	720
	agctgggcct gcgaggatca gtacacgctg cagactgtgc tgaaagacca gctggggttc	780
	ccaggetatg tcatgacgga ctggaacgca cagcacacga ctgtccaaag cgcgaattct	840
	gggcttgaca tgtcaatgcc tggcacagac ttcaacggta acaatcggtt ctgggggtcca	900
	gctctcacca atgcggtaaa tagcaatcag gtccccacga gcagagtcca cgatatggtg	960
	actcgtatcc tcgcgcgatg gtacttgaca ggccaggacc aggcaggcta tccgtcgttc	1020
	aacatcagca gaaatgttca aggaaccac aagaccaatg tcagggaat tgcaggggac	1080
[0025]	ggcatcgttc tgcacaagaa tgacgccaac atcctgccgc tcaagaagcc cgtatgcatt	1140
	gccgtcgttg gatctgccgc aatcattggt aaccacgcca gaaactcgcc ctctgtcaac	1200
	gacaaaggct gcgacgacgg ggccittggc atgggttggg gtcccgccgc cgtcaactat	1260
	ccttacttcg tcgcgcccta cgatgccatc aataccagag cgtcttcgca gggcacccag	1320
	gttaccttga gcaacaccga caacacgtcc tcaggcgcct ctgcagcaag aggaaaggac	1380
	gtcgccatcg tcttcacac cgccgactcg ggtgaaggct acatcacctg ggaggccaac	1440
	gcgggcgatc gcaacaacct ggatccgtgg cacaacggca atgccctggt ccaggcgtg	1500
	gccggtgcca acagcaacgt cattgttgtt gtccactcgt ttggcgccat cattctggag	1560
	cagattcttg ctcttcgca ggtcaaggcc gttgtctggg egggtcttc ttctcaggag	1620
	agcggcaatg cgctcgtcga cgtgctgtgg ggagatgtca gccctctgg caagctggtg	1680
	tacaccattg cgaagagccc caatgactat aacactcgca tcgtttccgg cggcagtga	1740

	agcttcagcg agggactgtt catcgactat aagcacttcg acgacgcaa tatcacgccg	1800
	cggtagcagt tcggctatgg actgtcttac accaagtcca actactcacg cctctccgtc	1860
	ttgtcgaccg ccaagtctgg tcctgcgact gggggcgttg tgcggggagg cccgagtgat	1920
	ctgttccaga atgtcgcgac agtcaccgtt gacatcgcaa actctggcca agtgactggt	1980
[0026]	gccgaggtag cccagctgta catcacctac ccctcttcag caccaggaac cctccgaag	2040
	cagctgcgag gctttgcca gctgaacctc acgcctggtc agagcggaac agcaacgttc	2100
	aacatccgac gacgagatct cagctactgg gacacggctt cgcagaaatg ggtggtgccg	2160
	tcggggtcgt ttggcatcag cgtgggagcg agcagccggg atatcaggt gacgagcact	2220
	ctgtcggtag cgtag	2235