[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12N 1/00 (2006.01)
C12N 9/42 (2006.01)

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680044575.7

[43] 公开日 2008 年 12 月 10 日

[11] 公开号 CN 101321857A

[22] 申请日 2006.9.29
[21] 申请号 200680044575.7
[30] 优先权
[32] 2005. 9.30 [33] US [31] 60/722,579
[86] 国际申请 PCT/US2006/038556 2006.9.29
[87] 国际公布 WO2007/089290 英 2007.8.9
[85] 进入国家阶段日期 2008.5.28
[71] 申请人 诺维信股份有限公司
地址 美国加利福尼亚州
[72] 发明人 保罗·哈里斯 迈克尔·雷伊
丁晗澍
[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
代理人 封新琴 巫肖南
权利要求书 5 页 说明书 70 页 序列表 3 页
附图 5 页

[54] 发明名称

用于增强纤维素材料降解或转化的方法

[57] 摘要

本发明涉及用于降解或转化纤维素材料的方法和用于从纤维素材料产生物质的方法。

1. 用于降解或转化纤维素材料的方法，其包括：在有效量的具有增强纤维素分解的活性的多肽存在下，用有效量的一种或多种纤维素分解蛋白处理所述纤维素材料，其中与缺乏所述具有增强纤维素分解的活性的多肽时相比，具有增强纤维素分解的活性的多肽的存在使纤维素材料的降解增加，并且其中所述具有增强纤维素分解的活性的多肽选自下组：

(a)多肽，其包含与 SEQ ID NO: 2 的成熟多肽具有至少 70%同一性的氨基酸序列；

(b)多肽，其由在至少中严紧条件下与以下杂交的多核苷酸编码：(i) SEQ ID NO: 1 的成熟多肽编码序列，(ii)包含 SEQ ID NO: 1 的成熟多肽编码序列的基因组 DNA 序列，或(iii) (i)或(ii)的互补链；

(c)包含[ILMV]-P-x(4,5)-G-x-Y-[ILMV]-x-R-x-[EQ]-x(3)-A-[HNQ]的多肽，其中 x 是任何氨基酸，x(4,5)是在 4 或 5 个邻接位置上的任何氨基酸，并且 x(3)是在 3 个邻接位置上的任何氨基酸；和

(d)变体，其包含保守取代、缺失和/或插入一个或多个氨基酸的 SEQ ID NO: 2 的成熟多肽。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述纤维素材料选自下组：草本材料、农业残余物、林业残余物、市政固体废物、废纸和纸浆及造纸厂残余物。

3. 权利要求 1 或 2 的方法，其中所述一种或多种纤维素分解酶选自下组：纤维素酶、内切葡聚糖酶、纤维二糖水解酶和 β-葡糖苷酶。

4. 权利要求 1-3 中任一项的方法，还包括用有效量的选自下组的一种或多种酶处理所述纤维素材料：半纤维素酶、酯酶、蛋白酶、漆酶、过氧化物酶或其混合物。

5. 权利要求 1-4 中任一项的方法，其中所述方法是预处理方法，是同时糖化和发酵方法(SSF)中的步骤，或是混合水解和发酵方法(HHF)中的步骤。

6. 权利要求 1-5 中任一项的方法，还包括回收降解的纤维素材料。

7. 权利要求 6 的方法，其中所述降解的纤维素材料是糖。

8. 权利要求 1-7 中任一项的方法，其中所述纤维素分解蛋白和/或具有增强纤维素分解的活性的多肽以含有或不含细胞的发酵液的形式存在。

9. 权利要求 1 的方法，其中所述具有增强纤维素分解的活性的多肽包含

的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 2 的成熟多肽具有优选至少 70%同一性，更优选至少 75%同一性，甚至更优选至少 80%同一性，甚至更优选至少 85%同一性，甚至更优选至少 90%同一性，最优选至少 95%同一性，并且甚至最优选至少 97%同一性。

10. 权利要求 1 的方法，其中所述具有增强纤维素分解的活性的多肽包含 SEQ ID NO: 2 或其成熟多肽或它们具有增强纤维素分解的活性的片段，或者由 SEQ ID NO: 2 或其成熟多肽或它们具有增强纤维素分解的活性的片段组成。

11. 权利要求 1 的方法，其中所述具有增强纤维素分解的活性的多肽由多核苷酸编码，所述多核苷酸在优选至少中严紧条件，更优选至少中-高严紧条件，并且最优选至少高严紧条件下与以下杂交：(i) SEQ ID NO: 1 的成熟多肽编码序列，(ii)包含 SEQ ID NO: 1 的成熟多肽编码序列的基因组 DNA 序列，或(iii) (i)或(ii)的互补链。

12. 权利要求 1 的方法，其中所述具有增强纤维素分解的活性的多肽是变体，所述变体包含保守取代、缺失和/或插入一个或多个氨基酸的 SEQ ID NO: 2 的成熟多肽。

13. 权利要求 1 的方法，其中所述具有增强纤维素分解的活性的多肽由多核苷酸编码，所述多核苷酸包含在大肠杆菌 NRRL B-30878 中含有的质粒 pTr3337 中。

14. 权利要求 1 或 11 的方法，其中所述 SEQ ID NO: 1 的成熟多肽编码序列是 SEQ ID NO: 1 的核苷酸 77 至 766。

15. 权利要求 1、9、10 和 12 中任一项的方法，其中所述 SEQ ID NO: 2 的成熟多肽是 SEQ ID NO: 2 的氨基酸 20 至 249。

16. 权利要求 1 的方法，其中所述具有增强纤维素分解的活性的多肽包含[ILMV]-P-x(4,5)-G-x-Y-[ILMV]-x-R-x-[EQ]-x(3)-A-[HNQ]，其中 x 是任何氨基酸，x(4,5)是在 4 或 5 个邻接位置上的任何氨基酸，并且 x(3)是在 3 个邻接位置上的任何氨基酸。

17. 用于生产物质的方法，其包括：

(A)在有效量具有增强纤维素分解的活性的多肽存在下，用有效量的一种或多种纤维素分解蛋白将纤维素材料糖化，其中与缺乏所述具有增强纤维素分解的活性的多肽时相比，具有增强纤维素分解的活性的多肽的存在使纤维素材料的降解增加，并且其中所述具有增强纤维素分解的活性的多肽选自下

组:

(i)多肽，其包含与 SEQ ID NO: 2 的成熟多肽具有至少 70%同一性的氨基酸序列;

(ii)多肽，其由在至少中严紧条件下与以下杂交的多核苷酸编码: (a) SEQ ID NO: 1 的成熟多肽编码序列，(b)包含 SEQ ID NO: 1 的成熟多肽编码序列的基因组 DNA 序列，或(c) (a)或(b)的互补链;

(iii) 包含 [ILMV]-P-x(4,5)-G-x-Y-[ILMV]-x-R-x-[EQ]-x(3)-A-[HNQ] 的多肽，其中 x 是任何氨基酸，x(4,5)是在 4 或 5 个邻接位置上的任何氨基酸，并且 x(3)是在 3 个邻接位置上的任何氨基酸; 和

(iv)变体，其包含保守取代、缺失和/或插入一个或多个氨基酸的 SEQ ID NO: 2 的成熟多肽;

(B)用一种或多种发酵微生物发酵步骤(a)中糖化的纤维素材料; 和

(C)从发酵回收所述物质。

18. 权利要求 17 的方法，其中所述纤维素材料选自下组: 草本材料、农业残余物、林业残余物、市政固体废物、废纸和纸浆及造纸厂残余物。

19. 权利要求 17 或 18 的方法，其中所述一种或多种纤维素分解蛋白选自下组: 纤维素酶、内切葡聚糖酶、纤维二糖水解酶和 β-葡糖苷酶。

20. 权利要求 17-19 中任一项的方法，还包括用有效量的选自下组的一种或多种酶来处理纤维素材料: 半纤维素酶、酯酶、蛋白酶、漆酶、过氧化物酶或其混合物。

21. 权利要求 17-20 中任一项的方法，其中以同时糖化和发酵同时进行步骤(a)和(b)。

22. 权利要求 17-21 中任一项的方法，其中所述物质是醇、有机酸、酮、氨基酸或气体。

23. 权利要求 17-22 中任一项的方法，其中所述纤维素分解蛋白和/或具有增强纤维素分解的活性的多肽以含有或不含细胞的发酵液的形式存在。

24. 权利要求 17 的方法，其中所述具有增强纤维素分解的活性的多肽包含氨基酸序列，所述氨基酸序列与 SEQ ID NO: 2 的成熟多肽具有优选至少 70%同一性，更优选至少 75%同一性，甚至更优选至少 80%同一性，甚至更优选至少 85%同一性，甚至更优选至少 90%同一性，最优选至少 95%同一性，并且甚至最优选至少 97%同一性。

25. 权利要求 17 的方法，其中所述具有增强纤维素分解的活性的多肽包含 SEQ ID NO: 2 或其成熟多肽或它们具有增强纤维素分解的活性的片段，或者由 SEQ ID NO: 2 或其成熟多肽或它们具有增强纤维素分解的活性的片段组成。

26. 权利要求 17 的方法，其中所述具有增强纤维素分解的活性的多肽由多核苷酸编码，所述多核苷酸在优选至少中严紧条件，更优选至少中-高严紧条件，并且最优选至少高严紧条件下与以下杂交：(i) SEQ ID NO: 1 的成熟多肽编码序列，(ii)包含 SEQ ID NO: 1 的成熟多肽编码序列的基因组 DNA 序列，或(iii) (i)或(ii)的互补链。

27. 权利要求 17 的方法，其中所述具有增强纤维素分解的活性的多肽是变体，其包含保守取代、缺失和/或插入一个或多个氨基酸的 SEQ ID NO: 2 的成熟多肽。

28. 权利要求 17 的方法，其中所述具有增强纤维素分解的活性的多肽由多核苷酸编码，所述多核苷酸包含在大肠杆菌 NRRL B-30878 中含有的质粒 pTr3337 中。

29. 权利要求 17 或 26 的方法，其中所述 SEQ ID NO: 1 的成熟多肽编码序列是 SEQ ID NO: 1 的核苷酸 77 至 766。

30. 权利要求 17、24、25 和 27 中任一项的方法，其中所述 SEQ ID NO: 2 的成熟多肽是 SEQ ID NO: 2 的氨基酸 20 至 249。

31. 权利要求 17 的方法，其中所述具有增强纤维素分解的活性的多肽包含[ILMV]-P-x(4,5)-G-x-Y-[ILMV]-x-R-x-[EQ]-x(3)-A-[HNQ]，其中 x 是任何氨基酸，x(4,5)是在 4 或 5 个邻接位置上的任何氨基酸，并且 x(3)是在 3 个邻接位置上的任何氨基酸。

32. 洗涤剂组合物，其包含具有增强纤维素分解的活性的多肽，所述多肽选自下组：

(a)多肽，其包含与 SEQ ID NO: 2 的成熟多肽具有至少 70%同一性的氨基酸序列；

(b)多肽，其由在至少中严紧条件下与以下杂交的多核苷酸编码：(i) SEQ ID NO: 1 的成熟多肽编码序列；(ii)包含 SEQ ID NO: 1 的成熟多肽编码序列的基因组 DNA 序列，或(iii) (i)或(ii)的互补链；

(c)包含[ILMV]-P-x(4,5)-G-x-Y-[ILMV]-x-R-x-[EQ]-x(3)-A-[HNQ]的多肽，其中 x 是任何氨基酸，x(4,5)是在 4 或 5 个邻接位置上的任何氨基酸，并且 x(3)

是在 3 个邻接位置上的任何氨基酸；和

(d)变体，其包含保守取代、缺失和/或插入一个或多个氨基酸的 SEQ ID NO: 2 的成熟多肽。

33. 权利要求 32 的洗涤剂组合物，其中所述多肽包含的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 2 的成熟多肽具有优选至少 70%同一性，更优选至少 75%同一性，甚至更优选至少 80%同一性，甚至更优选至少 85%同一性，甚至更优选至少 90%同一性，最优选至少 95%同一性，并且甚至最优选至少 97%同一性。

34. 权利要求 32 的洗涤剂组合物，其中所述具有增强纤维素分解的活性的多肽包含 SEQ ID NO: 2 或其成熟多肽或它们具有增强纤维素分解的活性的片段，或者由 SEQ ID NO: 2 或其成熟多肽或它们具有增强纤维素分解的活性的片段组成。

35. 权利要求 32 的洗涤剂组合物，其中所述具有增强纤维素分解的活性的多肽由下述多核苷酸编码，所述多核苷酸在优选至少中严紧条件，更优选至少中-高严紧条件，并且最优选至少高严紧条件下与以下杂交：(i) SEQ ID NO: 1 的成熟多肽编码序列，(ii)包含 SEQ ID NO: 1 的成熟多肽编码序列的基因组 DNA 序列，或(iii) (i)或(ii)的互补链。

36. 权利要求 32 的洗涤剂组合物，其中所述具有增强纤维素分解的活性的多肽是变体，所述变体包含保守取代、缺失和/或插入一个或多个氨基酸的 SEQ ID NO: 2 的成熟多肽。

37. 权利要求 32 的洗涤剂组合物，其中所述具有增强纤维素分解的活性的多肽由多核苷酸编码，所述多核苷酸包含在大肠杆菌 NRRL B-30878 中含有的质粒 pTr3337 中。

38. 权利要求 32 或 35 的洗涤剂组合物，其中所述 SEQ ID NO: 1 的成熟多肽编码序列是 SEQ ID NO: 1 的核苷酸 77 至 766。

39. 权利要求 32、33、34 和 36 中任一项的洗涤剂组合物，其中所述 SEQ ID NO: 2 的成熟多肽是 SEQ ID NO: 2 的氨基酸 20 至 249。

40. 权利要求 32 的洗涤剂组合物，其中所述具有增强纤维素分解的活性的多肽包含[ILMV]-P-x(4,5)-G-x-Y-[ILMV]-x-R-x-[EQ]-x(3)-A-[HNQ]，其中 x 是任何氨基酸，x(4,5)是在 4 或 5 个邻接位置上的任何氨基酸，并且 x(3)是在 3 个邻接位置上的任何氨基酸。

用于增强纤维素材料降解或转化的方法

对于在联邦资助的研究和开发下所进行发明的权利声明

本发明依据能源部(Department of Energy)授予的基本合同(Prime Contract) DE-AC36-98GO10337、NREL 转包合同(Subcontract) No. ZCO-30017-02 在政府支持下完成。政府对本发明具有一定的权利。

发明背景

发明领域

本发明涉及用于降解或转化纤维素材料的方法和用于从纤维素材料生产物质的方法。

相关领域描述

纤维素是单糖葡萄糖通过β-1,4-键共价连接的聚合物。许多微生物产生水解β-连接的葡聚糖的酶。这些酶包括内切葡聚糖酶、纤维二糖水解酶和β-葡糖苷酶。内切葡聚糖酶在随机位置消化纤维素聚合物，将其打开(opening it)以受到纤维二糖水解酶攻击(attack)。纤维二糖水解酶继而从纤维素聚合物的末端释放纤维二糖的分子。纤维二糖是水溶性的β-1,4-连接的葡萄糖二聚体。β-葡糖苷酶将纤维二糖水解成葡萄糖。

将纤维素原料转化为乙醇具有以下优势：大量原料现成可用，避免燃烧或填埋材料的愿望，和乙醇燃料的清洁性。木材、农业残余物、草本作物和城市固体废物被认为是用于乙醇生产的原料。这些材料主要由纤维素、半纤维素和木质素组成。一旦将纤维素转化成葡萄糖，葡萄糖将容易地由酵母发酵成乙醇。

改进转化纤维素原料的能力在本领域中将是有利的。

美国公开专利申请序列号2003/0113734公开了鉴定为EGVII的分离的纤维素酶蛋白，和编码EGVII的核酸。

本发明的目的是提供具有增强纤维素分解的活性(celluolytic enhancing activity)的分离的多肽和编码所述多肽的分离的核酸序列以改进纤维素原料

的转化。

发明简述

本发明涉及用于降解或转化纤维素材料的方法，其包括：在有效量的具有增强纤维素分解的活性的多肽存在下，用有效量的一种或多种纤维素分解蛋白处理所述纤维素材料，其中与缺乏所述具有增强纤维素分解的活性的多肽时相比，具有增强纤维素分解的活性的多肽的存在使纤维素材料的降解增加，并且其中所述具有增强纤维素分解的活性的多肽选自下组：

(a)包含[ILMV]-P-x(4,5)-G-x-Y-[ILMV]-x-R-x-[EQ]-x(3)-A-[HNQ]的多肽，其中 x 是任何氨基酸，x(4,5)是在 4 或 5 个邻接位置上的任何氨基酸，并且 x(3)是在 3 个邻接位置上的任何氨基酸；

(b)多肽，其包含与 SEQ ID NO: 2 的成熟多肽具有至少 70%同一性的氨基酸序列；

(c)由多核苷酸编码的多肽，所述多核苷酸在至少中严紧条件下与以下杂交：(i) SEQ ID NO: 1 的成熟多肽编码序列，(ii)包含 SEQ ID NO: 1 的成熟多肽编码序列的基因组 DNA 序列，或(iii) (i)或(ii)的互补链；和

(d)变体，其包含保守取代、缺失和/或插入一个或多个氨基酸的 SEQ ID NO: 2 的成熟多肽。

本发明还涉及用于产生物质的方法，包括：

(A)在有效量的具有增强纤维素分解的活性的多肽存在下，用有效量的一种或多种纤维素分解蛋白将纤维素材料糖化，其中与缺乏所述具有增强纤维素分解的活性的多肽时相比，具有增强纤维素分解的活性的多肽的存在使纤维素材料的降解增加，并且其中所述具有增强纤维素分解的活性的多肽选自下组：

(i)包含[ILMV]-P-x(4,5)-G-x-Y-[ILMV]-x-R-x-[EQ]-x(3)-A-[HNQ]的多肽，其中 x 是任何氨基酸，x(4,5)是在 4 或 5 个邻接位置上的任何氨基酸，并且 x(3)是在 3 个邻接位置上的任何氨基酸；和

(ii)多肽，其包含与 SEQ ID NO: 2 的成熟多肽具有至少 70%同一性的氨基酸序列；

(iii)由多核苷酸编码的多肽，所述多核苷酸在至少中严紧条件下与以下杂交：(a) SEQ ID NO: 1 的成熟多肽编码序列，(b)包含 SEQ ID NO: 1 的成熟多

肽编码序列的基因组 DNA 序列，或(c) (a)或(b)的互补链；和

(iv)变体，其包含保守取代、缺失和/或插入一个或多个氨基酸的 SEQ ID NO: 2 的成熟多肽;

(B)用一种或多种发酵微生物来发酵步骤(a)的糖化纤维素材料；和

(C)从所述发酵回收物质。

在优选的方面，成熟多肽是 SEQ ID NO: 2 的氨基酸 20 至 249。在另一个优选的方面，成熟多肽编码序列是 SEQ ID NO: 1 的核苷酸 77 至 766。

本发明还涉及洗涤剂组合物，其包含这些具有增强纤维素分解的活性的多肽。

附图简述

图 1 显示里氏木霉(*Trichoderma reesei*) RutC30 (ATCC 56765) GH61B 多肽的 cDNA 序列和推导的氨基酸序列(分别为 SEQ ID NOs: 1 和 2)，所述多肽具有增强纤维素分解的活性。预测的内含子以斜体表示。预测的信号肽以下划线表示。

图 2 显示 pTr3337 的限制图谱。

图 3 显示 pTr61B 的限制图谱。

图 4 显示用补充或未补充里氏木霉 GH61B 的表达米曲霉(*Aspergillus oryzae*) β-葡糖苷酶(CLF)的里氏木霉培养液来水解 PCS (P020502CS，100 MF 高压灭菌的，10 g/L)。水解在 50ºC、pH 5.0 进行指定的时间。Celluclast Plus 的加样量是 2.5 或 3.125 mg 每克 PCS，并且所述混合物含有 2.5 mg CLF 和 0.625 mg GH61B 每克 PCS。

图 5 显示用补充有 GH61B 蛋白的 Celluclast Plus 水解 PCS (P020502CS，100 MF 高压灭菌的，10 g/L)。添加不含重组蛋白(Jal250)的米曲霉培养液作为对照。在 50ºC 温育 115 小时。

定义

增强纤维素分解的活性：术语“增强纤维素分解的活性”在本文定义为使具有纤维素分解活性的蛋白增强对纤维素材料的水解的生物活性。就本发明而言，通过在以下条件测量来自纤维素材料通过纤维素分解蛋白的水解的还原糖增加来测定增强纤维素分解的活性：5.0 mg 纤维素分解蛋白/g PCS 中的

纤维素，在 50°C 持续 5-7 天，在存在或缺失 0.01-2.5 mg 增强纤维素分解的活性/g PCS 中的纤维素的条件下，与使用相等总蛋白加样量的不含增强纤维素分解的活性的对照水解比较(5.01-7.5 mg 纤维素分解蛋白/g PCS 中的纤维素)。在优选的方面，在纤维素酶蛋白加样量为 3%的米曲霉 β-葡糖苷酶(根据 WO 02/095014 在米曲霉中重组产生)或 3%的烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*) β-葡糖苷酶(根据 WO 02/095014 的实施例 22 在米曲霉中重组产生)的存在下，使用 Celluclast® 1.5L (Novozymes A/S, Bagsværd, Denmark)的混合物作为纤维素分解活性的来源。

具有增强纤维素分解的活性的多肽具有 SEQ ID NO: 2 的成熟多肽的多肽的增强纤维素分解的活性的至少 20%，优选至少 40%，更优选至少 50%，更优选至少 60%，更优选至少 70%，更优选至少 80%，甚至更优选至少 90%，最优选至少 95%，并且最优选至少 100%。

纤维素分解活性：术语“纤维素分解活性”在本文定义为水解纤维素材料的生物活性。就本发明而言，通过在以下条件下测量纤维素分解混合物对纤维素材料的水解相对于不添加纤维素分解蛋白的对照水解的增加来测定纤维素分解活性：1-10 mg 纤维素分解蛋白/g PCS 中的纤维素，在 50°C 持续 5-7 天。在优选的方面，将存在纤维素酶蛋白加样量为 3%米曲霉 β-葡糖苷酶(根据 WO 02/095014 在米曲霉中重组产生)或 3%烟曲霉 β-葡糖苷酶(根据 WO 02/095014 的实施例 22 在米曲霉中重组产生)的 Celluclast® 1.5L (Novozymes A/S, Bagsværd, Denmark)的混合物作为纤维素分解活性的来源。

预处理的玉米秸秆：术语“PCS”或“预处理的玉米秸秆”在本文定义为通过用热和稀酸处理的源自玉米秸秆的纤维素材料。就本发明而言，PCS 由实施例 1 中描述的方法或该方法在时间、温度和酸量上有变化的方法制造。

家族 61 糖苷水解酶：术语“家族 61 糖苷水解酶”或“家族 GH61”在本文定义为根据 Henrissat B., 1991, A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities, *Biochem. J.* 280: 309-316 和 Henrissat B., and Bairoch A., 1996, Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases, *Biochem. J.* 316: 695-696 属于糖苷水解酶家族 61 的多肽。目前，Henrissat 将 GH61 家族列为未分类，说明就属于此家族的多肽而言，诸如机制、催化亲核体/基体、催化质子供体和 3-D 结构等性质是未知的。

纤维素材料：纤维素材料可以是含有纤维素的任何材料。纤维素通常存

在于例如植物的茎、叶、外壳(hull)、外壳(husk)和穗轴(cob)中，或树的叶、枝和木材中。纤维素材料还可以是但不限于草本材料、农业残余物、林业残余物、市政固体废物、废纸和纸浆及造纸厂残余物。在本文中可理解的是纤维素可以是木质纤维素的形式，木质纤维素为在混合基质中含有木质素、纤维素和半纤维素的植物细胞壁材料。

在优选的方面，纤维素材料是玉米秸秆。在另一个优选的方面，纤维素材料是玉米纤维。在另一个优选的方面，纤维素材料是稻草(rice straw)。在另一个优选的方面，纤维素材料是造纸和纸浆加工废料。在另一个优选的方面，纤维素材料是木本或草本植物。在另一个优选的方面，纤维素材料是蔗渣。

可以按原样使用纤维素材料或可使用本领域已知的常规方法将纤维素材料进行预处理。例如，物理预处理技术可包括多种类型的磨制、照射、蒸煮/蒸汽爆炸和水热分解(hydrothermolysis)；化学预处理技术可包括稀酸、碱、有机溶剂、氨、二氧化硫、二氧化碳和 pH 控制的水热分解；而生物预处理技术可包括应用溶解木质素的微生物(参见，例如，Hsu, T.-A., 1996, Pretreatment of biomass, in *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212; Ghosh, P., and Singh, A., 1993, Physicochemical and biological treatments for enzymatic/microbial conversion of lignocellulosic biomass, *Adv. Appl. Microbiol.* 39: 295-333; McMillan, J. D., 1994, Pretreating lignocellulosic biomass: a review, in *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*, Himmel, M. E., Baker, J. O., and Overend, R. P., eds., ACS Symposium Series 566, American Chemical Society, Washington, DC, chapter 15; Gong, C. S., Cao, N. J., Du, J., and Tsao, G. T., 1999, Ethanol production from renewable resources, in *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Scheper, T., ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 65: 207-241; Olsson, L., and Hahn-Hagerdal, B., 1996, Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production, *Enz. Microb. Tech.* 18: 312-331; and Vallander, L., and Eriksson, K.-E. L., 1990, Production of ethanol from lignocellulosic materials: State of the art, *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* 42: 63-95)。

分离的多肽：术语“分离的多肽”用于本文中指，如通过 SDS-PAGE 测定的，其为至少 20%纯，优选至少 40%纯，更优选至少 60%纯，甚至更优选至

少 80%纯，最优选至少 90%纯，并且甚至最优选至少 95%纯的多肽。

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

具有增强纤维素分解的活性的多肽优选是基本上纯的形式。具体而言，优选所述多肽是“基本上(essentially)纯的形式”，即，所述多肽制备物基本上(essentially)不含与其天然结合的其它多肽材料。这能够通过以下方法实现，例如，通过公知的重组方法或由经典纯化方法制备多肽。

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

成熟多肽：术语“成熟多肽”在本文中定义为具有增强纤维素分解的活性的多肽，所述多肽以其在翻译和任何翻译后修饰之后的最终形式存在，所述修饰例如 N-末端加工、C-末端截断、糖基化等。

成熟多肽编码序列：术语“成熟多肽编码序列”在本文中定义为编码成熟多肽的核苷酸序列，所述成熟多肽具有增强纤维素分解的活性。

同一性：参数“同一性”描述两个氨基酸序列之间或两个核苷酸序列之间的相关性。

就本发明而言，两个氨基酸序列之间的同一性程度使用 EMBOSS 的 Needle 程序中执行的 Needleman-Wunsch 算法(Needleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48: 443-453)来测定，使用缺口开启罚分(gap open penalty) 10，缺口延伸罚分(gap extension penalty) 0.5 和 EBLOSUM62 矩阵。使用 Needle 标记的“最长同一性”的输出作为百分比同一性并且如下计算:

(同一的残基 x 100)/(比对的长度 – 比对中的缺口数)

就本发明而言，两个核苷酸序列之间的同一性程度使用 EMBOSS 的 Needle 程序中执行的 Needleman-Wunsch 算法(Needleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48: 443-453)来测定，使用缺口开启罚分 10，缺口延伸罚分 0.5 和

EDNAFULL 矩阵。使用 Needle 标记的“最长同一性”的输出作为百分比同一性并且如下计算:

(同一的残基 x 100)/(比对的长度 – 比对中的缺口数)

同源序列: 术语“同源序列”在本文定义为使用 blastp (用于蛋白质数据库)或 tblastn (用于核酸数据库)算法,使用 BLOSUM62 矩阵、字长(wordsize) 3、缺口存在分值(gap existence cost) 11、缺口延伸分值(gap extension cost) 1、无低复杂性过滤并且使用成熟 GH61B 蛋白序列作为查询对象时，E 值(或预期得分(expectancy score))小于 0.001 的序列。参见 Altschul *et al.*, 1997, *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402。

多肽片段: 术语“多肽片段”在本文中定义为从 SEQ ID NO: 2 的成熟多肽的氨基和/或羧基末端缺失一个或多个氨基酸的多肽，或其同源序列；其中所述片段具有增强纤维素分解的活性。优选地，SEQ ID NO: 2 的成熟多肽的片段含有至少 200 个氨基酸残基，更优选至少 210 个氨基酸残基，并且最优选至少 220 个氨基酸残基。

亚序列: 术语“亚序列(subsequence)”在本文中定义为从 SEQ ID NO:1 的成熟多肽编码序列的 5’和/或 3’端缺失一个或多个核苷酸的核苷酸序列，或其同源序列，其中所述亚序列编码具有增强纤维素分解的活性的多肽片段。优选地,SEQ ID NO: 1 的成熟多肽编码序列的亚序列含有至少 600 个核苷酸，更优选至少 630 个核苷酸，并且最优选至少 660 个核苷酸。

等位变体(allelic variant): 术语“等位变体”在本文中表示占据相同染色体基因座的基因的任何两种或两种以上可选形式。等位变异通过突变天然地发生，并且可导致种群内的多态性。基因突变可以是沉默的(在编码的多肽中无变化)或可以编码具有改变的氨基酸序列的多肽。多肽的等位变体是由基因的等位变体编码的多肽。

分离的多核苷酸: 术语“分离的多核苷酸”用于本文中指，如通过琼脂糖电泳测定的，其为至少 20%纯，优选至少 40%纯，更优选至少 60%纯，甚至更优选至少 80%纯，最优选至少 90%纯，并且甚至最优选至少 95%纯的多核苷酸。

基本上纯的多核苷酸: 术语“基本上纯的多核苷酸”用于本文指不含其它外来的或不期望的核苷酸的多核苷酸制备物，并且所述多核苷酸制备物处于适合于在遗传工程的蛋白质生产体系中使用的形式。因此，基本上纯的多

核苷酸按重量计含有至多 10%，优选至多 8%，更优选至多 6%，更优选至多 5%，更优选至多 4%，更优选至多 3%，甚至更优选至多 2%，最优选至多 1%，并且甚至最优选至多 0.5%的与其天然结合的其它多核苷酸材料。然而，基本上纯的多核苷酸可以包括天然存在的 5'和 3'非翻译区，例如启动子和终止子。优选基本上纯的多核苷酸是按重量计至少 90%纯，优选至少 92%纯，更优选至少 94%纯，更优选至少 95%纯，更优选至少 96%纯，更优选至少 97%纯，甚至更优选至少 98%纯，最优选至少 99%，并且甚至最优选至少 99.5%纯的。所述多核苷酸优选为基本上纯的形式。具体而言，优选本文公开的多核苷酸是“基本上(essentially)纯的形式”，即，所述多核苷酸制备物基本上不含与其天然结合的其它多核苷酸材料。在本文中，术语“基本上纯的多核苷酸”与术语“分离的多核苷酸”和“分离形式的多核苷酸”同义。所述多核苷酸可以是基因组、cDNA、RNA、半合成、合成来源的，或它们的任何组合。

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

核酸构建体：术语“核酸构建体”用于本文指单链或双链的核酸分子，所述核酸分子分离自天然存在的基因，或将所述核酸分子以本来不存在于(not otherwise exist)自然界中的方式修饰以含有核酸的片段。当所述核酸构建体含有表达编码序列所需的调控序列时，术语核酸构建体与术语“表达盒”同义。

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

可操作地连接：术语“可操作地连接”在本文表示这样的构型，其中将

调控序列置于相对于多核苷酸序列的编码序列的适当位置，使得调控序列指导多肽编码序列的表达。

编码序列：当用于本文时术语“编码序列”的意思是直接指定其蛋白产物的氨基酸序列的核苷酸序列。编码序列的边界通常由开读框决定，所述开读框通常以 ATG 起始密码子或可替换的起始密码子例如 GTG 和 TTG 开始，并且以终止密码子例如 TAA、TAG 和 TGA 结束。编码序列可以是 DNA、cDNA 或重组核苷酸序列。

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

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

宿主细胞：如本文中所使用的术语“宿主细胞”包括任何细胞类型，所述细胞类型对于用包含多核苷酸的核酸构建体或表达载体的转化、转染、转导等是易感的(susceptible)。

修饰：术语“修饰”在本文的意思是，对由 SEQ ID NO: 2 的成熟多肽或其同源序列组成的多肽的任何化学修饰；以及对编码这种多肽的 DNA 的遗传操作。所述修饰可以是一个或多个氨基酸的取代、缺失和/或插入，以及一个或多个氨基酸侧链的置换。

人工变体：当用在本文时，术语“人工变体”的意思是具有增强纤维素分解的活性的多肽，所述多肽由表达 SEQ ID NO: 1 的成熟多肽编码序列的修饰的核苷酸序列或其同源序列的生物体产生。所述修饰的核苷酸序列通过人为干预(human intervention)，通过修饰公开于 SEQ ID NO: 1 或其同源序列的核苷酸序列来获得。

发明详述

本发明涉及用于降解或转化纤维素材料的方法，其包括：在有效量的具有增强纤维素分解的活性的多肽存在下，用有效量的纤维素分解蛋白处理所述纤维素材料，其中与缺乏所述具有增强纤维素分解的活性的多肽时相比，具有增强纤维素分解的活性的多肽的存在使纤维素材料的降解增加，并且其中所述具有增强纤维素分解的活性的多肽选自下组：

(a)包含[ILMV]-P-x(4,5)-G-x-Y-[ILMV]-x-R-x-[EQ]-x(3)-A-[HNQ]的多肽，其中 x 是任何氨基酸，x(4,5)是在 4 或 5 个邻接位置上的任何氨基酸，并且 x(3)是在 3 个邻接位置上的任何氨基酸；

(b)多肽，其包含与 SEQ ID NO: 2 的成熟多肽具有至少 70%同一性的氨基酸序列；

(c)由多核苷酸编码的多肽，所述多核苷酸在至少中严紧条件下与以下杂交：(i) SEQ ID NO: 1 的成熟多肽编码序列，(ii)包含 SEQ ID NO: 1 的成熟多肽编码序列的基因组 DNA 序列，或(iii) (i)或(ii)的互补链；和

(d)变体，其包含保守取代、缺失和/或插入一个或多个氨基酸的 SEQ ID NO: 2 的成熟多肽。

本发明进一步包括回收降解或转化的纤维素材料。可使用本领域熟知的技术例如离心、过滤和重力沉降，将纤维素材料的降解或转化的可溶产物与不溶的纤维素材料分离。

本发明还涉及产生物质的方法，其包括：(A)在有效量的具有增强纤维素分解的活性的多肽存在下，用有效量的一种或多种纤维素分解蛋白糖化纤维素材料，其中与缺乏所述具有增强纤维素分解的活性的多肽时相比，具有增强纤维素分解的活性的多肽的存在使纤维素材料的降解增加，并且其中所述具有增强纤维素分解的活性的多肽选自下组：(i)包含[ILMV]-P-x(4,5)-G-x-Y-[ILMV]-x-R-x-[EQ]-x(3)-A-[HNQ]的多肽，其中 x 是任何氨基酸，x(4,5)是在 4 或 5 个邻接位置上的任何氨基酸，并且 x(3)是在 3 个邻接位置上的任何氨基酸；(ii)多肽，其包含与 SEQ ID NO: 2 的成熟多肽具有至少 70%同一性的氨基酸序列；(iii)由多核苷酸编码的多肽，所述多核苷酸在至少中严紧条件下与以下杂交：(a) SEQ ID NO: 1 的成熟多肽编码序列，(b)包含 SEQ ID NO: 1 的成熟多肽编码序列的基因组 DNA 序列，或(c) (a)或(b)的互补链；和(iv)变体，其包含保守取代、缺失和/或插入一个或多个氨基酸的 SEQ ID NO: 2 的成熟多肽；(B)用一种或多种发酵微生物来发酵步骤(a)的经糖化的纤维素材料；和(C)从所述发酵回收物质。

本文描述的具有增强纤维素分解的活性的多肽和宿主细胞可用于单糖、二糖和多糖的产生中，其作为来自生物质的化学品或发酵原料用于产生乙醇、塑料、其它产物或中间产物。具体而言，可以使用多肽和宿主细胞通过部分或完全溶解纤维素或半纤维素来增加加工残余物(干酒糟、来自酿造的酒糟、

甘蔗渣等)的价值。在通过纤维素分解蛋白来推进纤维素材料变为葡萄糖、木糖、甘露糖、半乳糖和阿拉伯糖、它们的聚合物或如下所述源自它们的产品的加工中，所述具有增强纤维素分解的活性的多肽可以是含有或不含细胞的粗发酵液形式或半纯化或纯化的酶制备物的形式。增强纤维素分解的蛋白可以是单组分制备物，例如家族 61 蛋白；多组分蛋白制备物，例如多种家族 61 蛋白；或多组分和单组分蛋白制备物的组合。增强纤维素分解的蛋白可以在酸性、中性或碱性 pH 范围内提高纤维素分解蛋白的活性。或者，在使用生物质的发酵方法中可以使用宿主细胞作为这种多肽的来源。所述宿主细胞也可以含有编码纤维素分解蛋白以及在生物质加工中有用的其它酶的天然或异源基因。

生物质可包括但不限于木材资源、市政固体废物、废纸、作物和作物残余物(参见，例如，Wiselogel *et al.*, 1995, in Handbook on Bioethanol (Charles E. Wyman, editor), pp.105-118, Taylor & Francis, Washington D.C.; Wyman, 1994, *Bioresource Technology* 50: 3-16; Lynd, 1990, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 24/25: 695-719; Mosier *et al.*, 1999, Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics, in *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, T. Scheper, managing editor, Volume 65, pp.23-40, Springer-Verlag, New York)。

生物质的初级细胞壁中的主要多糖是纤维素，第二丰富的多糖是半纤维素，而第三是果胶。在细胞停止生长之后产生的次级细胞壁也含有多糖，并且其通过与半纤维素共价交联的聚合木质素来强化。纤维素是无水纤维二糖的均聚物，并且因此是线性的 β-(1-4)-D-葡聚糖，而半纤维素包括多种化合物，例如带有一系列取代基的复杂分支结构的木聚糖、木葡聚糖、阿拉伯木聚糖和甘露聚糖。尽管通常是多形态的，纤维素在植物组织中主要作为平行葡聚糖链的不溶晶体基质存在。半纤维素通常与纤维素以及与其它半纤维素通过氢键连接，其辅助使细胞壁基质稳定。

具有增强纤维素分解的活性的多肽及其多核苷酸

在第一个方面，具有增强纤维素分解的活性的分离的多肽包含以下基序：

[ILMV]-P-x(4,5)-G-x-Y-[ILMV]-x-R-x-[EQ]-x(3)-A-[HNQ]，

其中 x 是任何氨基酸，x(4,5)是在 4 或 5 个邻接位置上的任何氨基酸，并

且 x(3)是在 3 个邻接位置上的任何氨基酸。在以上基序中，采用公认的 IUPAC 单字母氨基酸缩写。

在第二个方面，具有增强纤维素分解的活性的多肽具有的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 2 的成熟多肽(即，成熟多肽)具有至少 75%同一性程度，优选至少 80%，更优选至少 85%，甚至更优选至少 90%，最优选至少 95%，并且甚至最优选至少 96%、97%、98%或 99%同一性程度，所述多肽具有增强纤维素分解的活性(下文中的"同源多肽")。在优选的方面，所述同源多肽具有的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 2 的成熟多肽相差十个氨基酸，优选相差五个氨基酸，更优选相差四个氨基酸，甚至更优选相差三个氨基酸，最优选相差两个氨基酸，并且甚至最优选相差一个氨基酸。

本发明具有增强纤维素分解的活性的多肽优选包含 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列或其等位变体；或它们的具有增强纤维素分解的活性的片段。在优选的方面，多肽包含 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列。在另一个优选的方面，多肽包含 SEQ ID NO: 2 的成熟多肽。在另一个优选的方面，多肽包含 SEQ ID NO: 2 的氨基酸 20 至 249，或其等位变体；或它们的具有增强纤维素分解的活性的片段。在另一个优选的方面，多肽包含 SEQ ID NO: 2 的氨基酸 20 至 249。在另一个优选的方面，多肽由 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列或其等位变体组成；或由它们的具有增强纤维素分解的活性的片段组成。在另一个优选的方面，多肽由 SEQ ID NO: 2 组成。在另一个优选的方面，多肽由 SEQ ID NO: 2 的成熟多肽组成。在另一个优选的方面，多肽由 SEQ ID NO: 2 的氨基酸 20 至 249 或其等位变体组成；或由它们的具有增强纤维素分解的活性的片段组成。在另一个优选的方面，多肽由 SEQ ID NO: 2 的氨基酸 20 至 249 组成。

在第三个方面，本发明涉及具有增强纤维素分解的活性的分离的多肽，所述多肽由多核苷酸编码，所述多核苷酸在至少非常低严紧条件下，优选至少低严紧条件下，更优选至少中严紧条件下，更优选至少中-高严紧条件下，甚至更优选至少高严紧条件下，并且最优选至少非常高严紧条件下，与以下杂交：(i) SEQ ID NO: 1 的成熟多肽编码序列，(ii)包含 SEQ ID NO: 1 的成熟多肽编码序列的基因组 DNA 序列，(iii) (i)或(ii)的亚序列，或(iv) (i)、(ii)或(iii)的互补链(J. Sambrook, E.F. Fritsch, and T. Maniatus, 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2d edition, Cold Spring Harbor, New York)。SEQ ID NO: 1 的成熟多肽编码序列的亚序列含有至少 100 个邻接的核苷酸或优选至少 200

个邻接的核苷酸。此外，所述亚序列可编码具有增强纤维素分解的活性的多肽片段。在优选的方面，成熟多肽编码序列是 SEQ ID NO: 1 的核苷酸 77 至 766。

SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列或其亚序列；以及 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列或其片段，可以用于设计核酸探针，以根据本领域内公知的方法从不同属和种的菌株鉴定和克隆编码具有增强纤维素分解的活性的多肽的 DNA。具体而言，根据标准的 Southern 印迹方法，可将这些探针用于与感兴趣的属或种的基因组或 cDNA 杂交，以鉴定和分离其中相应的基因。这些探针可明显短于完整序列，但长度上应为至少 14，优选至少 25，更优选至少 35，并且最优选至少 70 个核苷酸。然而，优选所述核酸探针是至少 100 个核苷酸长度。例如，所述核酸探针长度上可以是至少 200 个核苷酸，优选至少 300 个核苷酸，更优选至少 400 个核苷酸，或最优选至少 500 个核苷酸。甚至可以使用更长的探针，例如，长度是至少 600 个核苷酸，至少优选至少 700 个核苷酸，更优选至少 800 个核苷酸，或最优选至少 900 个核苷酸的核酸探针。DNA 和 RNA 探针二者均可使用。通常将探针标记以探测相应的基因(例如，用 ^{32}P、^{3}H、^{35}S、生物素或抗生物素蛋白(avidin)标记)。将这些探针包含于本发明中。

因而，可从由这些其它生物体制备的基因组 DNA 或 cDNA 文库中筛选 DNA，所述 DNA 与上述探针杂交并且编码具有增强纤维素分解的活性的多肽。可以通过琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳，或通过其它分离技术来分离来自这些其它生物体的基因组或其它 DNA。可以将来自文库的 DNA 或分离的 DNA 转移至硝化纤维素(nitrocellulose)或其它合适的载体材料上并且固定于其上。为了鉴定与 SEQ ID NO:1 或其亚序列同源的克隆或 DNA，优选将所述载体材料用在 Sounthern 印迹中。

就本发明而言，杂交表示核苷酸序列在非常低至非常高的严紧条件下与标记的核酸探针杂交，所述核酸探针对应于 SEQ ID NO:1 所示的成熟多肽编码序列、包含 SEQ ID NO:1 的成熟多肽编码序列的基因组 DNA 序列、它的互补链或其亚序列。可使用例如 X 射线片(X-ray film)检测在这些条件下与核酸探针杂交的分子。

在优选的方面，核酸探针是 SEQ ID NO: 1 的成熟多肽编码序列。在另一个优选的方面，核酸探针是 SEQ ID NO: 1 的核苷酸 73 至 1259。在另一个优选的方面，核酸探针是编码 SEQ ID NO: 2 的多肽的多核苷酸序列，或其亚序

列。在另一个优选的方面，核酸探针是 SEQ ID NO: 1。在另一个优选的方面，核酸探针是质粒 pTr3337 中包含的多核苷酸序列，所述质粒包含在大肠杆菌 NRRL B-30878 中，其中它的多核苷酸序列编码具有增强纤维素分解的活性的多肽。在另一个优选的方面，核酸探针是质粒 pTr3337 中包含的成熟多肽编码区，所述质粒包含在大肠杆菌 NRRL B-30878 中。

对于长度至少 100 个核苷酸的长探针，将非常低至非常高的严紧条件定义为在 42°C，在 5X SSPE、0.3% SDS、200 μg/ml 已剪切并且变性的鲑精 DNA 中，并且对于非常低和低严紧性为 25%的甲酰胺，对于中和中-高严紧性为 35%的甲酰胺，或对于高和非常高严紧性为 50%的甲酰胺，根据标准的 Southern 印迹法进行预杂交和杂交最佳 12 至 24 小时。

对于长度为至少 100 个核苷酸的长探针，使用 2X SSC、0.2% SDS 优选至少在 45°C (非常低严紧性)，更优选至少在 50°C (低严紧性)，更优选至少在 55°C (中严紧性)，更优选至少在 60°C (中-高严紧性)，甚至更优选至少在 65°C (高严紧性)，并且最优选至少在 70°C (非常高严紧性)将载体材料最终洗涤三次，每次 15 分钟。

对于长度大约 15 个核苷酸至大约 70 个核苷酸的短探针，将严紧条件定义为在比采用根据 Bolton 和 McCarthy 计算法(1962, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 48:1390)得出的 T_m 低大约 5°C 至大约 10°C，在 0.9 M NaCl，0.09 M Tris-HCl pH 7.6，6 mM EDTA，0.5% NP-40，1X Denhardt's 溶液，1 mM 焦磷酸钠(sodium pyrophosphate)，1 mM 磷酸二氢钠(sodium monobasic phosphate)，0.1 mM ATP 和 0.2 mg 每 ml 的酵母 RNA 中，根据标准的 Southern 印迹步骤进行预杂交、杂交和杂交后洗涤最佳 12 至 24 小时。

对于长度大约 15 个核苷酸至大约 70 个核苷酸的短探针，将所述载体材料在 6X SSC 加 0.1% SDS 中洗涤一次 15 分钟，并用 6X SSC 在比计算的 T_m 低 5°C 至 10°C 的温度下洗涤两次，每次 15 分钟。

在第四个方面，具有增强纤维素分解的活性的多肽可以是人工变体，所述人工变体包含保守取代、缺失和/或插入一个或多个氨基酸的 SEQ ID NO:2 的成熟多肽或其同源序列；或它们的成熟多肽。优选氨基酸改变对性质是较不重要的(of a minor nature)，即保守的氨基酸取代或插入，其不显著影响蛋白质的折叠和/或活性；通常为 1 至大约 30 个氨基酸的小缺失；小的氨基或羧

基末端延伸，例如氨基末端甲硫氨酸残基；多至大约 20-25 个残基的小接头肽；或通过改变净电荷或其它功能来促进纯化的小延伸，例如多组氨酸序列(poly histidine tract)、抗原表位(antigenic epitope)或结合域(binding domain))。

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

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

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

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

al., 1992, *FEBS Lett.* 309: 59-64。必需氨基酸的同一性也能够从与多肽的同一性分析来推断，所述多肽与根据本发明的多肽相关。

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

诱变/改组方法能够与高通量、自动化的筛选方法组合以检测由宿主细胞表达的克隆的、诱变的多肽的活性(Ness *et al.*, 1999, *Nature Biotechnology* 17: 893-896)。能够从宿主细胞回收编码活性多肽的诱变的 DNA 分子，并且使用本领域的标准方法快速测序。这些方法允许快速测定感兴趣的多肽中单个氨基酸残基的重要性，并且能够应用于未知结构的多肽。

SEQ ID NO: 2 的成熟多肽的氨基酸取代、缺失和/或插入的总数是 10，优选 9，更优选 8，更优选 7，更优选至多 6，更优选 5，更优选 4，甚至更优选 3，最优选 2，并且甚至最优选 1。

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

本发明的多肽可以是细菌多肽。例如，所述多肽可以是革兰氏阳性细菌多肽，例如具有增强纤维素分解的活性的芽孢杆菌属(*Bacillus*)、链球菌属(*Streptococcus*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、梭菌属(*Clostridium*)、土芽孢杆菌属(*Geobacillus*)或海洋芽孢杆菌属(*Oceanobacillus*)多肽；或者可以是革兰氏阴性细菌多肽，例如具有增强纤维素分解的活性的大肠杆菌、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、沙门氏菌属(*Salmonella*)、弯曲杆菌属(*Campylobacter*)、螺杆菌属(*Helicobacter*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、梭杆菌属(*Fusobacterium*)、泥杆菌属(*Ilyobacter*)、奈瑟氏菌属(*Neisseria*)或尿枝原

体属(*Ureaplasma*)多肽。

在优选的方面，所述多肽是具有增强纤维素分解的活性的嗜碱芽孢杆菌(*Bacillus alkalophilus*)、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)、短芽孢杆菌(*Bacillus brevis*)、环状芽孢杆菌(*Bacillus circulans*)、克劳氏芽孢杆菌(*Bacillus clausii*)、凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)、坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus*)、灿烂芽孢杆菌(*Bacillus lautus*)、迟缓芽孢杆菌(*Bacillus lentus*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)、短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)、嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)或苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)多肽。

在另一个优选的方面，所述多肽是具有增强纤维素分解的活性的似马链球菌(*Streptococcus equisimilis*)、酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、乳房链球菌(*Streptococcus uberis*)或马链球菌兽瘟亚种(*Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus*)多肽。

在另一个优选的方面，所述多肽是具有增强纤维素分解的活性的不产色链霉菌(*Streptomyces achromogenes*)、除虫链霉菌(*Streptomyces avermitilis*)、天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)、灰色链霉菌(*Streptomyces griseus*)或浅青紫链霉菌(*Streptomyces lividans*)多肽。

具有增强纤维素分解的活性的多肽还可以是真菌多肽，并且更优选是酵母多肽例如具有增强纤维素分解的活性的念珠菌属(*Candida*)、克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)、毕赤酵母属(*Pichia*)、酵母属(*Saccharomyces*)、裂殖酵母属(*Schizosaccharomyces*)或西洋著霉属(*Yarrowia*)多肽;或更优选是丝状真菌多肽例如具有增强纤维素分解的活性的枝顶孢霉属(*Acremonium*)、曲霉属(*Aspergillus*)、短梗霉属(*Aureobasidium*)、隐球菌属(*Cryptococcus*)、*Filibasidium*、镰孢属(*Fusarium*)、腐质霉属(*Humicola*)、梨孢菌属(*Magnaporthe*)、毛霉属(*Mucor*)、毁丝霉属(*Myceliophthora*)、新考玛脂霉属(*Neocallimastix*)、脉孢菌属(*Neurospora*)、拟青霉属(*Paecilomyces*)、青霉属(*Penicillium*)、瘤胃壶菌属(*Piromyces*)、裂褶菌属(*Schizophyllum*)、踝节菌属(*Talaromyces*)、热子囊菌属(*Thermoascus*)、梭孢壳属(*Thielavia*)、弯颈霉属(*Tolypocladium*)或木霉属(*Trichoderma*)多肽。

在优选的方面，所述多肽是具有增强纤维素分解的活性的卡尔酵母(*Saccharomyces carlsbergensis*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、糖化酵

母(*Saccharomyces diastaticus*)、道格拉氏酵母(*Saccharomyces douglasii*)、克鲁弗酵母(*Saccharomyces kluyveri*)、诺地酵母(*Saccharomyces norbensis*)或卵形酵母(*Saccharomyces oviformis*)多肽。

在另一个优选的方面，所述多肽是具有增强纤维素分解的活性的棘孢曲霉(*Aspergillus aculeatus*)、泡盛曲霉(*Aspergillus awamori*)、烟曲霉、臭曲霉(*Aspergillus foetidus*)、日本曲霉(*Aspergillus japonicus*)、构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、米曲霉、灰盖鬼伞(*Coprinus cinereus*)、棉色二孢(*Diplodia gossyppina*)、杆孢状镰孢(*Fusarium bactridioides*)、禾谷镰孢(*Fusarium cerealis*)、库威镰孢(*Fusarium crookwellense*)、大刀镰孢(*Fusarium culmorum*)、禾本科镰孢(*Fusarium graminearum*)、禾赤镰孢(*Fusarium graminum*)、异孢镰孢(*Fusarium heterosporum*)、合欢木镰孢(*Fusarium negundi*)、尖镰孢(*Fusarium oxysporum*)、多枝镰孢(*Fusarium reticulatum*)、粉红镰孢(*Fusarium roseum*)、接骨木镰孢(*Fusarium sambucinum*)、肤色镰孢(*Fusarium sarcochroum*)、拟分枝孢镰孢(*Fusarium sporotrichioides*)、硫色镰孢(*Fusarium sulphureum*)、圆镰孢(*Fusarium torulosum*)、拟丝孢镰孢(*Fusarium trichothecioides*)、镶片镰孢(*Fusarium venenatum*)、特异腐质霉(*Humicola insolens*)、疏棉状腐质霉(*Humicola lanuginosa*)、灰梨孢菌(*Magnaporthe grisea*)、米赫毛霉(*Mucor miehei*)、嗜热毁丝霉(*Myceliophthora thermophila*)、粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)、产紫青霉(*Penicillium purpurogenum*)、黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)、淡黑假黑盘菌(*Pseudoplectania nigrella*)、橙色嗜热子囊菌(*Thermoascus aurantiacus*)、土生梭孢霉(*Thielavia terrestris*)、哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)、康宁木霉(*Trichoderma koningii*)、长枝木霉(*Trichoderma longibrachiatum*)、里氏木霉(*Trichoderma reesei*)、绿色木霉(*Trichoderma viride*)或 *Trichophaea saccata* 多肽。

在更优选的方面，所述多肽是里氏木霉多肽。在最优选的方面，所述多肽是里氏木霉 RutC30 (ATCC 56765)多肽，例如，具有 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列或其片段(例如，成熟多肽)的多肽。

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

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

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

具有增强纤维素分解的活性的多肽还包括融合多肽或可切割的融合多肽，其中将另一种多肽融合到所述多肽或其具有增强纤维素分解的活性的片段的 N 末端或 C 末端。通过将编码另一种多肽的核苷酸序列(或其部分)融合于具有增强纤维素分解的活性的多肽的编码核苷酸序列(或其部分)来产生融合的多肽。产生融合多肽的技术是本领域已知的，包括连接编码多肽的编码序列以使它们在阅读框中，并且使融合多肽的表达在相同启动子和终止子的控制下。

多核苷酸具有核苷酸序列，所述核苷酸序列编码具有增强纤维素分解的活性的多肽，可分离所述多核苷酸并且用于实施本发明的方法，如本文所述。

在优选的方面，所述核苷酸序列示于 SEQ ID NO: 1。在另一个更优选的方面，所述核苷酸序列是质粒 pTr3337 中包含的序列，所述质粒包含在大肠杆菌 NRRL B-30878 中。在另一个优选的方面，所述核苷酸序列是 SEQ ID NO: 1 的成熟多肽编码区。在另一个优选的方面，所述核苷酸序列是 SEQ ID NO: 1 的核苷酸 77 至 766。在另一个更优选的方面，所述核苷酸序列是质粒 pTr3337 中包含的成熟多肽编码区，所述质粒包含在大肠杆菌 NRRL B-30878 中。本发明还包含核苷酸序列，所述核苷酸序列编码具有 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列或其成熟多肽的多肽，由于遗传密码的简并性，所述核苷酸序列不同于 SEQ ID NO: 1 或其成熟多肽编码序列。本发明还涉及 SEQ ID NO: 1 的亚序列，所

述亚序列编码具有增强纤维素分解的活性的 SEQ ID NO: 2 的片段。

本发明还涉及在 SEQ ID NO:1 的成熟多肽编码序列中包含至少一个突变的突变多核苷酸，其中所述突变核苷酸序列编码 SEQ ID NO: 2 的成熟多肽。在优选的方面，所述成熟多肽是 SEQ ID NO: 2 的氨基酸 20 至 249。

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

在本发明的方法中，所述多核苷酸具有下述核苷酸序列，所述核苷酸序列与 SEQ ID NO: 1 的成熟多肽编码序列(即，核苷酸 388 至 1332)具有至少 75%的同一性程度，优选至少 80%，更优选至少 85%，甚至更优选至少 90%，最优选至少 95%，并且甚至最优选至少 96%、97%、98%或 99%同一性，其编码活性多肽。

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

对于本领域技术人员显而易见的是，这些取代能够在对于分子功能重要的区域之外进行，并且仍然产生活性多肽。对于由本发明的分离的多核苷酸编码的多肽活性关键的并且因此优选不进行取代的氨基酸残基，可以根据本

领域公知的方法，例如定位诱变或丙氨酸分区诱变法(参见，例如，Cunningham and Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085)来鉴定。在后一的技术中，将突变引入到分子中的每个正电残基处，并且测试所得突变分子增强纤维素分解的活性，以鉴定对于所述分子的活性关键的氨基酸残基。底物-酶相互作用的位点也能够通过分析三维结构测定，通过如核磁共振分析、晶体学或光亲和标记这样的技术来测定(参见，例如，de Vos *et al.*, 1992, *Science* 255: 306-312; Smith *et al.*, 1992, *Journal of Molecular Biology* 224: 899-904; Wlodaver *et al.*, 1992, *FEBS Letters* 309: 59-64)。

所述多核苷酸可以是具有增强纤维素分解的活性的多肽的编码多核苷酸，其在至少非常低严紧条件下，优选至少低严紧条件，更优选至少中严紧条件，更优选至少中-高严紧条件，甚至更优选至少高严紧条件，并且最优选至少非常高严紧条件下，与以下杂交: (i) SEQ ID NO: 1 的成熟多肽编码序列，(ii)包含 SEQ ID NO: 1 的成熟多肽编码序列的基因组 DNA 序列，或(iii) (i)或(ii)的互补链；或它们的等位变体和亚序列(Sambrook *et al.*, 1989, 见上文)，如本文所定义的。在优选的方面，所述成熟多肽编码序列是 SEQ ID NO: 1 的核苷酸 77 至 766。

核酸构建体

分离的多核苷酸，其编码具有增强纤维素分解的活性的多肽，可以用许多方式操作所述分离的多核苷酸，从而通过构建核酸构建体来提供多肽的表达，所述核酸构建体包含分离的多核苷酸，其编码具有增强纤维素分解的活性的多肽并且与一个或多个调控序列可操作地连接，所述调控序列在合适的宿主细胞中在与该调控序列相容的条件下指导编码序列表达。依赖于表达载体，在将多核苷酸的序列插入载体之前对其进行操作可能是理想的或必需的。使用重组 DNA 方法修饰多核苷酸序列的技术是本领域熟知的。

调控序列可以是合适的启动子序列，其是由宿主细胞识别的核苷酸序列，所述宿主细胞用于表达编码具有增强纤维素分解的活性的多肽的多核苷酸。启动子序列含有介导所述多肽表达的转录调控序列。启动子可以是在所选的宿主细胞中显示转录活性的任何核苷酸序列，包括突变的、截断的和杂合的启动子，并且可以从编码与宿主细胞同源或异源的胞外或胞内多肽的基因获得。

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

用于指导所述核酸构建体在丝状真菌宿主细胞中转录的合适启动子的实例是从下述酶的基因获得的启动子：米曲霉 TAKA 淀粉酶、曼赫根毛霉(*Rhizomucor miehei*)天冬氨酸蛋白酶、黑曲霉中性 α-淀粉酶、黑曲霉酸稳定性 α-淀粉酶、黑曲霉或泡盛曲霉葡糖淀粉酶(*glaA*)、曼赫根毛霉脂肪酶、米曲霉碱性蛋白酶、米曲霉丙糖磷酸异构酶、构巢曲霉乙酰胺酶、镶片镰孢淀粉葡糖苷酶(WO 00/56900)、镶片镰孢 Daria (WO 00/56900)、镶片镰孢 Quinn (WO 00/56900)、尖镰孢胰蛋白酶样蛋白酶(WO 96/00787)、里氏木霉 β-葡糖苷酶、里氏木霉纤维二糖水解酶 I、里氏木霉纤维二糖水解酶 II、里氏木霉内切葡聚糖酶 I、里氏木霉内切葡聚糖酶 II、里氏木霉内切葡聚糖酶 III、里氏木霉内切葡聚糖酶 IV、里氏木霉内切葡聚糖酶 V、里氏木霉木聚糖酶 I、里氏木霉木聚糖酶 II、里氏木霉 β-木糖苷酶，以及 NA2-tpi 启动子(来自黑曲霉中性 α-淀粉酶基因和米曲霉丙糖磷酸异构酶基因的启动子的杂合体)；和它们的突变的、截断的和杂合的启动子。

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

调控序列也可以是合适的转录终止子序列，其是由宿主细胞识别以终止转录的序列。所述终止子序列与编码所述多肽的核苷酸序列的 3'末端可操作

地连接。可以将在所选宿主细胞中有功能的任何终止子用在本发明中。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

分泌途径(即，分泌至培养基中)的任何信号肽编码区可在本发明中使用。

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

对于丝状真菌宿主细胞有效的信号肽编码区是从如下蛋白的基因获得的信号肽编码区：米曲霉 TAKA 淀粉酶、黑曲霉中性淀粉酶、黑曲霉葡糖淀粉酶、曼赫根毛霉天冬氨酸蛋白酶、特异腐质霉纤维素酶、特异腐质霉内切葡聚糖酶 V 和疏棉状腐质霉脂肪酶。

在优选的方面，信号肽包含 SEQ ID NO: 2 的氨基酸 1 至 19 或由 SEQ ID NO: 2 的氨基酸 1 至 19 组成。在另一个优选的方面，信号肽编码区包含 SEQ ID NO: 1 的核苷酸 20 至 76 或由 SEQ ID NO: 1 的核苷酸 20 至 76 组成。

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

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

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

同样理想的是添加调节序列，其允许相对于宿主细胞的生长来调节多肽的表达。调节系统的实例是引起基因表达响应化学或物理刺激物，包括调节化合物的存在而开启或关闭的那些系统。原核系统中的调节系统包括 *lac*、*tac* 和 *trp* 操纵基因系统。在酵母中，可以使用 ADH2 系统或 GAL1 系统。在丝状真菌中，可以使用 TAKA α-淀粉酶启动子、黑曲霉葡糖淀粉酶启动子和米曲霉葡糖淀粉酶启动子作为调节序列。调节序列的其它实例是那些允许基因扩增的序列。在真核系统中，这些序列包括在氨甲蝶呤(methotrexate)存在下

扩增的二氢叶酸还原酶基因，和以重金属(with heavy metal)扩增的金属硫蛋白基因。在这些情况下，编码多肽的核苷酸序列将与调节序列可操作地连接。

表达载体

可以将本文描述的多种核酸和调控序列结合在一起以产生重组表达载体，其包含编码具有增强纤维素分解的活性的多肽的多核苷酸、启动子和转录和翻译的终止信号。所述表达载体可以包括一种或多种方便的限制位点以允许在这些位点插入或取代编码所述多肽的核苷酸序列。可供选择的是，可以通过将所述核苷酸序列或包含该序列的核酸构建体插入用于表达的适当载体中来表达编码具有增强纤维素分解的活性的多肽的多核苷酸。在制备表达载体的过程中，将编码序列置于载体中，从而将该编码序列与适当的表达调控序列可操作地连接。

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

载体可以是自主复制载体，即，作为染色体外实体(entity)存在的载体，其复制独立于染色体复制，例如，质粒、染色体外元件、微型染色体(minichromosome)或人工染色体。载体可以含有任何用于确保自复制的手段(means)。或者，载体可以是一种当被引入宿主细胞中时，整合到基因组中并且与整合了该载体的染色体一起复制的载体。此外，可以使用单独的载体或质粒或两个或更多个载体或质粒，其共同含有待引入宿主细胞基因组的完整 DNA (total DNA)，或可以使用转座子(transposon)。

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

细菌选择性标记的实例是来自枯草芽孢杆菌或地衣芽孢杆菌的 *dal* 基因，或赋予抗生素抗性的标记，所述抗生素抗性例如氨苄青霉素、卡那霉素、氯霉素或四环素抗性。对于酵母宿主细胞合适的标记是 ADE2、HIS3、LEU2、LYS2、MET3、TRP1 和 URA3。用于丝状真菌宿主细胞的选择性标记包括但不限于 *amdS* (乙酰胺酶)、*argB* (鸟氨酸氨甲酰基转移酶)、*bar* (草铵膦(phosphinothricin)乙酰转移酶)、*hph* (潮霉素磷酸转移酶)、*niaD* (硝酸还原酶)

(nitrate reductase)、*pyrG* (乳清酸核苷-5'-磷酸脱羧酶) (orotidine-5'-phosphate decarboxylase)、*sC* (硫酸腺苷酰转移酶)和 *trpC* (邻氨基苯甲酸合酶(anthranilate synthase))以及它们的等价物。优选用在曲霉属细胞中的是构巢曲霉或米曲霉的 *amdS* 和 *pyrG* 基因和吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*)的 *bar* 基因。

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

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

为了自主复制，载体可以进一步包含复制起点，其使载体能够在所述的宿主细胞中自主地复制。复制起点可以是介导自主复制的任何质粒复制子(replicator)，其在细胞中发挥功能。术语“复制起点”或“质粒复制子”在本文定义为能够使质粒或载体在体内复制的核苷酸序列。

细菌复制起点的实例是允许在大肠杆菌中复制的质粒 pBR322、pUC19、pACYC177 和 pACYC184 的复制起点，和允许在芽孢杆菌属中复制的质粒 pUB110、pE194、pTA1060 和 pAMß1 的复制起点。

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

在丝状真菌细胞中有用的复制起点的实例是 AMA1 和 ANS1 (Gems *et al.*, 1991, *Gene* 98: 61-67; Cullen *et al.*, 1987, *Nucleic Acids Research* 15: 9163-9175; WO 00/24883)。分离 AMA1 基因和构建包含该基因的质粒或载体能够根据公开于 WO 00/24883 中的方法完成。

可以将多于一个拷贝的多核苷酸插入宿主细胞以增加基因产物的产生，所述多核苷酸编码具有增强纤维素分解的活性的多肽。多核苷酸拷贝数的增加可通过如下方法获得: 将至少一个额外拷贝的序列整合入宿主细胞基因组，

或使所述核酸序列包括可扩增选择性标记基因，其中可通过在合适的选择剂(selectable agent)存在下培养细胞来选择含有选择性标记基因的扩增拷贝的细胞，并且由此得到核酸序列的额外拷贝。

用于连接上述元件以构建所述重组表达载体的方法是本领域技术人员熟知的(参见，例如，Sambrook *et al.*, 1989, 见上文)。

宿主细胞

重组宿主细胞，其包含编码具有增强纤维素分解的活性的多肽的多核苷酸，可将所述重组宿主细胞有利地使用在所述多肽的重组产生中。将包含这种多核苷酸的载体引入宿主细胞中，从而将该载体保留作为染色体整合体(chromosomal integrant)或作为前述的自复制的染色体外载体。术语“宿主细胞”包含亲本细胞的任何子代，其由于复制过程中发生的突变而与亲本细胞不相同。宿主细胞的选择将很大程度依赖于编码多肽的基因和它的来源。

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

细菌宿主可以是任何革兰氏阳性细菌或革兰氏阴性细菌。革兰氏阳性细菌包括但不限于芽孢杆菌属、链球菌属、链霉菌属、葡萄球菌属、肠球菌属、乳杆菌属、乳球菌属、梭菌属、土芽孢杆菌属或海洋芽孢杆菌属。革兰氏阴性细菌包括但不限于大肠杆菌、假单胞菌属、沙门氏菌属、弯曲杆菌属、螺杆菌属、黄杆菌属、梭杆菌属、泥杆菌属、奈瑟氏菌属或尿枝原体属。

细菌宿主细胞可以是任何芽孢杆菌属细胞。在本发明的实施中有用的芽孢杆菌属细胞包括但不限于嗜碱芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、短芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、克劳氏芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、坚强芽孢杆菌、灿烂芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌细胞。

在优选的方面，细菌宿主细胞是解淀粉芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌或枯草芽孢杆菌细胞。在更优选的方面，细菌宿主细胞是解淀粉芽孢杆菌细胞。在另一个更优选的方面，细菌宿主细胞是克劳氏芽孢杆菌细胞。在另一个更优选的方面，细菌宿主细胞是地衣芽孢杆菌细胞。在另一个更优选的方面，细菌宿主细胞是枯草芽孢杆菌细胞。

细菌宿主细胞还可以是任何链球菌属细胞。在本发明的实施中有用的链

球菌属细胞包括但不限于似马链球菌、酿脓链球菌、乳房链球菌和马链球菌兽瘟亚种。

在优选的方面，细菌宿主细胞是似马链球菌细胞。在另一个优选的方面，细菌宿主细胞是酿脓链球菌细胞。在另一个优选的方面，细菌宿主细胞是乳房链球菌细胞。在另一个优选的方面，细菌宿主细胞是马链球菌兽瘟亚种细胞。

细菌宿主细胞还可以是任何链霉菌属细胞。在本发明的实施中有用的链霉菌属细胞包括但不限于不产色链霉菌、除虫链霉菌、天蓝色链霉菌、灰色链霉菌和浅青紫链霉菌。

在优选的方面，细菌宿主细胞是不产色链霉菌细胞。在另一个优选的方面，细菌宿主细胞是除虫链霉菌细胞。在另一个优选的方面，细菌宿主细胞是天蓝色链霉菌细胞。在另一个优选的方面，细菌宿主细胞是灰色链霉菌细胞。在另一个优选的方面，细菌宿主细胞是浅青紫链霉菌细胞。

可通过如下方法实现将 DNA 引入芽孢杆菌属细胞: 例如通过原生质体转化(参见，例如，Chang and Cohen, 1979, *Molecular General Genetics* 168: 111-115)，通过使用感受态细胞(参见，例如，Young and Spizizen, 1961, *Journal of Bacteriology* 81: 823-829 或 Dubnau and Davidoff-Abelson, 1971, *Journal of Molecular Biology* 56: 209-221)，通过电穿孔(参见，例如，Shigekawa and Dower, 1988, *Biotechniques* 6: 742-751)或通过接合(参见，例如，Koehler and Thorne, 1987, *Journal of Bacteriology* 169: 5771-5278)。可通过如下方法实现将 DNA 引入大肠杆菌细胞: 例如通过原生质体转化(参见，例如，Hanahan, 1983, *J. Mol. Biol.* 166: 557-580)或通过电穿孔(参见，例如，Dower *et al.*, 1988, *Nucleic Acids Res.* 16: 6127-6145)。可通过如下方法实现将 DNA 引入链霉菌属细胞: 例如通过原生质体转化和电穿孔(参见，例如，Gong *et al.*, 2004, *Folia Microbiol. (Praha)* 49: 399-405)通过接合(参见，例如，Mazodier *et al.*, 1989, *J. Bacteriol.* 171: 3583-3585)，或通过转导(参见，例如，Burke *et al.*, 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:6289-6294)。可通过如下方法实现将 DNA 引入假单胞菌属细胞: 例如通过电穿孔(参见，例如，Choi *et al.*, 2006, *J. Microbiol. Methods* 64: 391-397)或通过接合(参见，例如，Pinedo and Smets, 2005, *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 51-57)。可通过如下方法实现将 DNA 引入链球菌属细胞: 例如通过天然感受态(参见，例如，Perry and Kuramitsu, 1981, *Infect. Immun.* 32:

1295-1297)，通过原生质体转化(参见，例如，Catt and Jollick, 1991, *Microbios.* 68: 189-2070)，通过电穿孔(参见，例如，Buckley *et al.*, 1999, *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3800-3804)或通过接合(参见，例如，Clewell, 1981, *Microbiol. Rev.* 45: 409-436)。然而，可以使用任何将DNA引入宿主细胞的已知方法。

宿主细胞还可以是真核细胞，例如哺乳动物、昆虫、植物或真菌细胞。

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

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

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

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

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

以是发酵的。

在甚至更优选的方面，丝状真菌宿主细胞是枝顶孢霉属、曲霉属、短梗霉属、烟管霉属(*Bjerkandera*)、拟蜡菌属(*Ceriporiopsis*)、鬼伞属(*Coprinus*)、革盖菌属(*Coriolus*)、隐球菌属、*Filibasidium*、镰孢属、腐质霉属、梨孢菌属(*Magnaporthe*)、毛霉属、毁丝霉属、新考玛脂霉属(*Neocallimastix*)、脉孢菌属、拟青霉属、青霉属、平革菌属(*Phanerochaete*)、射脉菌属(*Phlebia*)、瘤胃壶菌属(*Piromyces*)、侧耳属(*Pleurotus*)、裂褶菌属、踝节菌属、嗜热子囊菌属、梭孢壳属、弯颈霉属(*Tolypocladium*)、栓菌属(*Trametes*)或木霉属细胞。

在最优选的方面，丝状真菌宿主细胞是泡盛曲霉、烟曲霉、臭曲霉、日本曲霉、构巢曲霉、黑曲霉或米曲霉细胞。在另一个的最优选方面，丝状真菌宿主细胞是杆孢状镰孢、禾谷镰孢、库威镰孢、大刀镰孢、禾本科镰孢、禾赤镰孢、异孢镰孢、合欢木镰孢、尖镰孢、多枝镰孢、粉红镰孢、接骨木镰孢、肤色镰孢、拟分枝孢镰孢、硫色镰孢、圆镰孢、拟丝孢镰孢或镶片镰孢细胞。在另外最优选的方面，丝状真菌宿主细胞是黑刺烟管菌(*Bjerkandera adusta*)、干拟蜡菌(*Ceriporiopsis aneirina*)、干拟蜡菌、*Ceriporiopsis caregiea*、*Ceriporiopsis gilvescens*、*Ceriporiopsis pannocinta*、*Ceriporiopsis rivulosa*、*Ceriporiopsis subrufa*、虫拟蜡菌(*Ceriporiopsis subvermispora*)、灰盖鬼伞、毛革盖菌(*Coriolus hirsutus*)、特异腐质霉、疏棉状腐质霉、米赫毛霉、嗜热毁丝霉、粗糙脉孢菌、产紫青霉、黄孢平革菌、辐射射脉菌(*Phlebia radiata*)、刺芹侧耳(*Pleurotus eryngii*)、土生梭孢霉、长绒毛栓菌(*Trametes villosa*)、杂色栓菌(*Trametes versicolor*)、哈茨木霉、康宁木霉、长枝木霉、里氏木霉或绿色木霉细胞。

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

National Academy of Sciences USA 75: 1920。

产生方法

本发明还涉及用于产生具有增强纤维素分解的活性的多肽的方法，其包括：(a)在有益于产生多肽的条件下培养细胞，所述细胞以其野生型形式能够产生所述多肽；和(b)回收所述多肽。优选所述细胞是木霉属的细胞，更优选是里氏木霉，并且最优选是里氏木霉 RutC30。

本发明还涉及用于产生具有增强纤维素分解的活性的多肽的方法，其包括：(a)在有益于产生所述多肽的条件下培养重组宿主细胞；和(b)回收所述多肽。

本发明还涉及用于产生具有增强纤维素分解的活性的多肽的方法，其包括：(a)在有益于产生所述多肽的条件下培养宿主细胞，其中所述宿主细胞包含突变核苷酸序列，其在 SEQ ID NO:1 的成熟多肽编码序列中具有至少一个突变，其中所述突变核苷酸序列编码由 SEQ ID NO: 2 的成熟多肽组成的多肽，和(b)回收所述多肽。在优选的方面，SEQ ID NO: 2 的成熟多肽是 SEQ ID NO: 2 的氨基酸 20 至 249。

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

使用本文描述的方法来检测具有增强纤维素分解的活性的多肽。

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

可以通过多种本领域已知的方法纯化所述多肽以获得基本上纯的多肽，所述方法包括但不限于层析(例如，离子交换、亲和、疏水、层析聚焦和大小

排阻)、电泳方法(例如，制备型(preparative)等电聚焦)、差示溶解度(例如，硫酸铵沉淀)、SDS-PAGE 或提取(参见，例如，*Protein Purification*, J.-C. Janson and Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989)。

纤维素分解蛋白

在本发明的方法中，纤维素分解蛋白可以是以下加工中涉及的任何蛋白：将纤维素材料加工成为葡萄糖，或将半纤维素加工成为木糖、甘露糖、半乳糖和阿拉伯糖，它们的聚合物，或如下所述源自它们的产物。纤维素分解蛋白可以是单成分制备物，例如，纤维素酶；多成分制备物，例如，内切葡聚糖酶、纤维二糖水解酶、葡糖水解酶(glucohydrolase)、β-葡糖苷酶，如下文定义；或多成分和单成分蛋白制备物的组合。纤维素分解蛋白可以在酸性、中性或碱性 pH 范围内具有活性，即，水解纤维素。

纤维素分解蛋白可以是真菌或细菌来源的，其可以从已知能够产生纤维素分解酶的微生物中获得，或从该微生物中分离和纯化，所述微生物例如如下属的菌种：芽孢杆菌属、假单胞菌属、腐质霉属、鬼伞属、梭孢壳属、镰孢属、毁丝霉属、枝顶孢霉属、头孢属(*Cephalosporium*)、柱顶孢属(*Scytalidium*)、青霉属或曲霉属(参见，例如，EP 458162)，特别是由选自下组的菌株产生的那些纤维素分解蛋白：特异腐质霉(重分类为嗜热柱顶孢(*Scytalidium thermophilum*)，参见例如，美国专利 No. 4,435,307)、灰盖鬼伞、尖镰孢、嗜热毁丝霉、巨多孔菌(*Meripilus giganteus*)、土生梭孢霉、枝顶孢霉属菌种(*Acremonium* sp.)、桃色枝顶孢霉(*Acremonium persicinum*)、枝顶孢枝顶孢霉(*Acremonium acremonium*)、*Acremonium brachypenium*、*Acremonium dichromosporum*、*Acremonium obclavatum*、*Acremonium pinkertoniae*、红灰枝顶孢霉(*Acremonium roseogriseum*)、*Acremonium incoloratum* 和 *Acremonium furatum*；优选来自特异腐质霉 DSM 1800、尖镰孢 DSM 2672、嗜热毁丝霉 CBS 117.65、头孢属菌种(*Cephalosporium* sp.) RYM-202、枝顶孢霉属菌种 CBS 478.94、枝顶孢霉属菌种 CBS 265.95、桃色枝顶孢霉 CBS 169.65、枝顶孢枝顶孢霉 AHU 9519、头孢属菌种 CBS 535.71、*Acremonium brachypenium* CBS 866.73、*Acremonium dichromosporum* CBS 683.73、*Acremonium obclavatum* CBS 311.74、*Acremonium pinkertoniae* CBS 157.70、红灰枝顶孢霉 CBS 134.56、*Acremonium incoloratum* CBS 146.62 和 *Acremonium furatum* CBS 299.70H。纤

维素分解蛋白还可以获得自木霉属(特别是绿色木霉、里氏木霉和康宁木霉)、嗜碱的芽孢杆菌属(alkalophilic *Bacillus*) (参见，例如，美国专利 No. 3,844,890 和 EP 458162)和链霉菌属(参见，例如，EP 458162)。也可以使用纤维素分解蛋白的化学修饰或蛋白质工程的突变体。

特别合适的纤维素分解蛋白是碱性或中性纤维素酶。这些纤维素酶的实例是 EP 495,257、EP 531,372、WO 96/11262、WO 96/29397、WO 98/08940 中描述的纤维素酶。其它实例是纤维素变体，例如在 WO 94/07998、EP 531,315、美国专利 No. 4,435,307、美国专利 No. 5,457,046、美国专利 No. 5,648,263、美国专利 No. 5,686,593、美国专利 No. 5,691,178、美国专利 No. 5,763,254、美国专利 No. 5,776,757、WO 89/09259、WO 95/24471、WO 98/12307 和 PCT/DK98/00299 中描述的那些。

可以使用本领域已知的方法(参见，例如，Bennett, J.W. and LaSure, L. (eds.), *More Gene Manipulations in Fungi*, Academic Press, CA, 1991)，通过在含有合适的碳源和氮源和无机盐的营养培养基中发酵上述微生物菌株来产生本发明的方法中使用的纤维素分解蛋白。合适的培养基能够从商业供应商获得或可以根据公布的组成制备(例如，在美国典型培养物保藏中心的目录中)。适合于生长和产生纤维素分解蛋白的温度范围和其它条件是本领域内已知的(参见，例如，Bailey, J.E., and Ollis, D.F., *Biochemical Engineering Fundamentals*, McGraw-Hill Book Company, NY, 1986)。

所述发酵可以是致使纤维素分解蛋白的表达或分离的任何细胞培养方法。因此，可以将发酵理解为包括在合适的培养基中和允许表达或分离所述纤维素分解蛋白或增强纤维素分解的蛋白的条件下进行的摇瓶培养，或在实验室或工业发酵罐中的小规模或大规模发酵(包括连续、分批、补料分批或固态发酵)。

可以通过如本文所述的常规方法，从发酵培养基中回收和纯化通过上述方法产生的所得纤维素分解蛋白。

纤维素分解蛋白可能水解或水解羧甲基纤维素(CMC)，由此减少温育混合物的粘度。可以通过振动粘度计(vibration viscosimeter) (例如，MIVI 3000 来自 Sofraser, France)来测定所产生的粘度上的降低。纤维素酶活性的测定按照纤维素酶粘度单位(CEVU)来测量，所述测定通过测量样品降低羧甲基纤维素(CMC)溶液粘度的能力来定量该样品中存在的催化活性的量。所述测试在

适合于纤维素分解蛋白和底物的温度和 pH 下进行。对于 Celluclast™ (Novozymes A/S, Bagsværd, Denmark)，将测试在 40°C 在 0.1 M 磷酸盐 pH 9.0 缓冲液中进行 30 分钟，使用 CMC 作为底物(33.3 g/L 羧甲基纤维素 Hercules 7 LFD)和大约 3.3-4.2 CEVU/ml 的酶浓度。相对于公开的酶标准品例如 CELLUZYME™ Standard 17-1194 (从 Novozymes A/S, Bagsværd, Denmark 获得)来计算 CEVU 活性。

适合用于本发明的纤维素分解制备物的实例包括，例如 CELLUCLAST™ (可以从 Novozymes A/S 获得)和 NOVOZYM™ 188 (可以从 Novozymes A/S 获得)。可以使用的其它商业上能够获得的包含纤维素酶的制备物包括 CELLUZYME™ 、 CEREFLO™ 和 ULTRAFLO™ (Novozymes A/S)， LAMINEX™和 SPEZYME™ CP (Genencor Int.)，和 ROHAMENT™ 7069 W (Röhm GmbH)。将纤维素酶以有效量添加，所述有效量是固体的大约 0.001%至大约 5.0%重量，更优选固体的大约 0.025%至大约 4.0%重量，并且最优选固体的大约 0.005%至大约 2.0%重量。

如上所述，本发明方法中使用的纤维素分解蛋白或增强纤维素分解的蛋白可以是单成分制备物，即，基本上(essentially)不含其它纤维素分解成分的成分。所述单一成分可以是重组成分，即，通过克隆编码单一成分的 DNA 序列，继而使用所述 DNA 序列转化细胞并且在宿主中表达来产生的成分(参见，例如，WO 91/17243 和 WO 91/17244)。单成分纤维素分解蛋白的其它实例包括但不限于在 JP-07203960-A 和 WO-9206209 中公开的那些。所述宿主优选是异源宿主(酶对于宿主是异源的)，但是在一些条件下宿主也可以是同源宿主(酶对于宿主是固有的)。单成分纤维素分解蛋白还可以通过从发酵培养液纯化这种蛋白来制备。

在实施本发明的方法中有用的单成分纤维素分解蛋白的实例包括但不限于内切葡聚糖酶、纤维二糖水解酶、葡糖水解酶和 β-葡糖苷酶。

术语“内切葡聚糖酶”在本文中定义为内型-1,4-(1,3;1,4)-β-D-葡聚糖 4-葡聚糖水解酶(endo-1,4-β-D-glucan 4-glucanohydrolase) (E.C. No. 3.2.1.4)，其催化纤维素、纤维素衍生物(例如羧甲基纤维素和羟乙基纤维素)、地衣淀粉、混合的 β-1,3 葡聚糖如谷物 β-D-葡聚糖或木葡聚糖中的 β-1,4 键和其它含有纤维素成分的生物材料中 1,4-β-D-糖苷键的水解。就本发明而言，根据 Ghose, 1987, *Pure and Appl. Chem.* 59: 257-268 的方法，使用羧甲基纤维素(CMC)水解来测

定内切葡聚糖酶活性。

外型-1,4-β-D-葡聚糖酶包括纤维二糖水解酶和葡糖水解酶两种。就本发明而言，根据 Himmel *et al.*, 1986, *J. Biol. Chem.* 261: 12948-12955 描述的方法来测定外切葡聚糖酶活性。

术语“纤维二糖水解酶”在本文定义为 1,4-β-D-葡聚糖纤维二糖水解酶(E.C. 3.2.1.91)，其催化纤维素、纤维寡糖或任何含有 β-1,4-连接的葡萄糖的聚合物中 1,4-β-D-糖苷键的水解，从链的还原或非还原端释放纤维二糖。就本发明而言，根据 Lever *et al.*, 1972, *Anal. Biochem.* 47: 273-279 和 van Tilbeurgh *et al.*, 1982, *FEBS Letters* 149: 152-156; van Tilbeurgh and Claeyssens, 1985, *FEBS Letters* 187: 283-288 描述的方法来测定纤维二糖水解酶活性。在本发明中，使用 Lever *et al.*方法来评估玉米秸秆中纤维素的水解，同时使用 van Tilbeurgh *et al.*的方法来测定对于荧光二糖衍生物的纤维二糖水解酶活性。

术语“葡糖水解酶”在本文定义为 1,4-β-D-葡聚糖葡糖水解酶(E.C. 3.2.1.74)，其催化 1,4-β-D-葡聚糖中 1,4-键(O-糖基键)的水解，从而去除连续的葡萄糖单位。

术语“β-葡糖苷酶”在本文定义为 β-D-葡糖苷葡糖水解酶(E.C. 3.2.1.21)，其催化末端非还原性 β-D-葡萄糖残基的水解，并且释放 β-D-葡萄糖。就本发明而言，根据 Venturi *et al.*, 2002, *J. Basic Microbiol.* 42: 55-66 描述的基本方法来测定 β-葡糖苷酶活性，但是采用如本文所述的不同的条件。将 1 单位的 β-葡糖苷酶活性定义为在 50°C、pH 5，从 100 mM 柠檬酸钠、0.01%Tween-20 中作为底物的 4 mM 对硝基苯基-β-D-吡喃型葡糖苷每分钟产生 1.0 微摩尔对硝基苯酚。

加工纤维素材料

本发明的方法可用于将纤维素材料加工成许多有用的物质，例如，化学品和燃料。除乙醇之外，能够从纤维素产生的某些通用和专用化学品(commodity and specialty chemical)包括木糖、丙酮、乙酸、甘氨酸、赖氨酸、有机酸(例如，柠檬酸)、1,3-丙二醇、丁二醇、甘油、乙二醇、糠醛、多羟基烷酸酯(polyhydroxyalkanoate)和顺,顺-粘康酸(cis,cis-muconic acid) (Lynd, L. R., Wyman, C. E., and Gerngross, T. U., 1999, *Biocommodity Engineering*, *Biotechnol. Prog.*, 15: 777-793; Philippidis, G. P., 1996, Cellulose bioconversion

technology, in *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212; 和 Ryu, D. D. Y., and Mandels, M., 1980, Cellulases: biosynthesis and applications, *Enz. Microb. Technol.*, 2: 91-102)。潜在的共同产生的益处不限于从可发酵的糖合成多种有机产物。在生物加工之后剩余的富含木质素的残余物能够转化为木质素衍生的化学品，或用于发电。

按照本发明所述方法用于加工纤维素材料的常规方法是本领域技术人员清楚理解的。可以使用设置为按照本发明来操作的任何常规生物质加工设备实施本发明的方法。

这种设备可以包括间歇搅拌反应器(batch-stirred reactor)、带有超滤的连续流搅拌反应器(continuous flow stirred reactor with ultrafiltration)、连续活塞流柱式反应器(continuous plug-flow column reactor) (Gusakov, A. V., and Sinitsyn, A. P., 1985, Kinetics of the enzymatic hydrolysis of cellulose: 1. A mathematical model for a batch reactor process, *Enz. Microb. Technol.* 7: 346-352)、碾磨反应器(attrition reactor) (Ryu, S. K., and Lee, J. M., 1983, Bioconversion of waste cellulose by using an attrition bioreactor, *Biotechnol. Bioeng.* 25: 53-65)或带有电磁场引起的强力混合的反应器(Gusakov, A. V., Sinitsyn, A. P., Davydkin, I. Y., Davydkin, V. Y., Protas, O. V., 1996, Enhancement of enzymatic cellulose hydrolysis using a novel type of bioreactor with intensive stirring induced by electromagnetic field, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 56: 141-153)。

常规方法包括但不限于糖化、发酵、分别水解和发酵(SHF)、同时糖化和发酵(SSF)、同时糖化和共发酵(SSCF)、混合水解和发酵(HHF)和直接微生物转化(DMC)。

SHF 使用分开的处理步骤，首先将纤维素酶水解成葡萄糖，其后将葡萄糖发酵成乙醇。在 SSF 中，将纤维素的酶水解和葡萄糖发酵成乙醇组成在一个步骤中(Philippidis, G. P., 1996, Cellulose bioconversion technology, in *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212)。SSCF 包括多种糖的共发酵(Sheehan, J., and Himmel, M., 1999, Enzymes, energy and the environment: A strategic perspective on the U.S. Department of Energy's research and development activities for bioethanol, *Biotechnol. Prog.* 15: 817-827)。HHF 包括两个分开的

步骤，其在相同的反应器中，但是在不同的温度下进行，即高温酶糖化，其后是在发酵菌株能够耐受的低温下的 SSF。DMC 将全部三个处理(纤维素酶产生、纤维素水解和发酵)组合在一个步骤中(Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H., and Pretorius, I. S., 2002, Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology, *Microbiol. Mol. Biol. Reviews* 66: 506-577)。

“发酵”或“发酵方法”指任何发酵方法或任何包括发酵步骤的方法。发酵方法包括但不限于用于产生发酵产物的发酵方法，所述发酵产物包括醇(例如，阿拉伯糖醇、丁醇、乙醇、甘油、甲醇、1,3-丙二醇、山梨醇和木糖醇)；有机酸(例如，乙酸、醋酮酸、己二酸、抗坏血酸、柠檬酸、2,5-二酮-D-葡糖酸、甲酸、延胡索酸、葡糖二酸、葡糖酸、葡糖醛酸、戊二酸、3-羟基丙酸、衣康酸、乳酸、苹果酸、丙二酸、草酸、丙酸、琥珀酸和木糖酸)；酮类(例如，丙酮)；氨基酸(例如，天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、赖氨酸、丝氨酸和苏氨酸)；气体(例如，甲烷、氢气(H_2)、二氧化碳(CO_2)和一氧化碳(CO))。发酵方法还包括在可消费醇工业(例如，啤酒和葡萄酒(wine))、乳品工业(例如，发酵乳制品)、皮革工业和烟草工业中使用的发酵方法。

具有增强纤维素分解的活性的多肽可以是含有或不含细胞的粗发酵液形式，或是半纯化或纯化的酶制备物形式。增强纤维素分解的蛋白可以是单成分制备物，例如，家族 61 蛋白；多成分蛋白制备物，例如，多种家族 61 蛋白；或多成分和单成分蛋白制备物的组合。

所述物质可以是源自发酵的任何物质。在优选的方面，所述物质是醇。应该理解术语“醇”包含含有一个或多个羟基的物质。在更优选的方面，所述醇是阿拉伯糖醇。在另一个更优选的方面，所述醇是丁醇。在另一个更优选的方面，所述醇是乙醇。在另一个更优选的方面，所述醇是甘油。在另一个更优选的方面，所述醇是甲醇。在另一个更优选的方面，所述醇是 1,3-丙二醇。在另一个更优选的方面，所述醇是山梨醇。在另一个更优选的方面，所述醇是木糖醇。参见，例如，Gong, C. S., Cao, N. J., Du, J., and Tsao, G. T., 1999, Ethanol production from renewable resources, in *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Scheper, T., ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 65: 207-241；Silveira, M. M., and Jonas, R., 2002, The biotechnological production of sorbitol, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 400-408；Nigam, P., and Singh, D., 1995, Processes for fermentative production of xylitol – a sugar

substitute, *Process Biochemistry* 30 (2): 117-124; Ezeji, T. C., Qureshi, N. and Blaschek, H. P., 2003, Production of acetone, butanol and ethanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 and *in situ* recovery by gas stripping, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19 (6): 595-603。

另一个优选的方面，所述物质是有机酸。在另一个更优选的方面，所述有机酸是乙酸。在另一个更优选的方面，所述有机酸是醋酮酸。在另一个更优选的方面，所述有机酸是己二酸。在另一个更优选的方面，所述有机酸是抗坏血酸。在另一个更优选的方面，所述有机酸是柠檬酸。在另一个更优选的方面，所述有机酸是 2,5-二酮-D-葡糖酸。在另一个更优选的方面，所述有机酸是甲酸。在另一个更优选的方面，所述有机酸是延胡索酸。在另一个更优选的方面，所述有机酸是葡糖二酸。在另一个更优选的方面，所述有机酸是葡糖酸。在另一个更优选的方面，所述有机酸是葡糖醛酸。在另一个更优选的方面，所述有机酸是戊二酸。在另一个优选的方面，所述有机酸是 3-羟基丙酸。在另一个更优选的方面，所述有机酸是衣康酸。在另一个更优选的方面，所述有机酸是乳酸。在另一个更优选的方面，所述有机酸是苹果酸。在另一个更优选的方面，所述有机酸是丙二酸。在另一个更优选的方面，所述有机酸是草酸。在另一个更优选的方面，所述有机酸是丙酸。在另一个更优选的方面，所述有机酸是琥珀酸。在另一个更优选的方面，所述有机酸是木糖酸。参见，例如，Chen, R., and Lee, Y. Y., 1997, Membrane-mediated extractive fermentation for lactic acid production from cellulosic biomass, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 63-65: 435-448。

在另一个优选的方面，所述物质是酮。应该理解的是术语“酮”涵盖含有一个或多个酮基的物质。在另一个更优选的方面，所述酮是丙酮。参见，例如，Qureshi and Blaschek, 2003，见上文。

在另一个优选的方面，所述物质是氨基酸。在另一个更优选的方面，所述有机酸是天冬氨酸。在另一个更优选的方面，所述氨基酸是谷氨酸。在另一个更优选的方面，所述氨基酸是甘氨酸。在另一个更优选的方面，所述氨基酸是赖氨酸。在另一个更优选的方面，所述氨基酸是丝氨酸。在另一个更优选的方面，所属氨基酸是苏氨酸。参见，例如，Richard, A., and Margaritis, A., 2004, Empirical modeling of batch fermentation kinetics for poly(glutamic acid) production and other microbial biopolymers, *Biotechnology and Bioengineering*

87 (4): 501-515。

在另一个优选的方面，所述物质是气体。在另一个更优选的方面，所述气体是甲烷。在另一个更优选的方面，所述气体是 H_2。在另一个更优选的方面，所述气体是 CO_2。在另一个更优选的方面，所述气体是 CO。参见，例如，Kataoka, N., A. Miya, and K. Kiriyama, 1997, Studies on hydrogen production by continuous culture system of hydrogen-producing anaerobic bacteria, *Water Science and Technology* 36 (6-7): 41-47; 和 Gunaseelan V.N. in *Biomass and Bioenergy*, Vol. 13 (1-2), pp. 83-114, 1997, Anaerobic digestion of biomass for methane production: A review。

从纤维素材料产生物质通常需要四个主要步骤。这四个步骤是预处理、酶水解、发酵和回收。下文示例的是用于产生乙醇的方法，但是应该理解的是可将类似的方法用于产生其它物质，例如上文所述的物质。

预处理。在预处理或预水解步骤中，加热纤维素材料以破坏木质素和糖结构，溶解大部分半纤维素，并且使纤维素级分可接近纤维素分解酶。用蒸汽直接进行加热，或在浆料中进行加热，其中还可向材料添加催化剂以加速反应。催化剂包括强的酸，例如硫酸和 SO_2；或碱，例如氢氧化钠。预处理步骤的目的是增进酶和微生物的透过性。还可对纤维素生物质进行水热蒸汽爆炸(steam explosion)预处理(参见美国专利申请 No. 20020164730)。

糖化。在也称为糖化的酶水解步骤中，将如本文所述的酶添加至经预处理的材料以将纤维素级分转化为葡萄糖和/或其它糖。糖化通常在受控的 pH、温度和混合条件下，在搅拌釜式反应器或发酵罐中进行。糖化步骤可以持续多至 200 小时。可以在大约 30°C 至大约 65°C，尤其是在大约 50°C 的温度，和大约 4 至大约 5 的 pH，特别是在大约 pH 4.5 进行糖化。为了产生酵母能够代谢的葡萄糖，水解通常在 β-葡糖苷酶存在下进行。

发酵。在发酵步骤中，将作为预处理和酶水解步骤的结果从纤维素材料释放的糖通过发酵微生物例如酵母发酵成乙醇。发酵还可与酶水解在相同容器中，同样在受控的 pH、温度和混合条件下同时进行。当糖化和发酵在相同的容器中同时进行时，通常将该方法称为同时糖化和发酵或 SSF。

在实施本发明时，任何合适的纤维素底物或原料可以用于发酵方法中。所述底物通常基于期望的发酵产物来选择，即，基于将要由发酵获得的物质来选择，还基于使用的方法来选择，如本领域内所熟知的。适用于本发明的

方法的底物的实例包括含有纤维素的材料，例如木材或植物残余物；或获得自经加工的纤维素材料的低分子糖 DP1-3，其能够由发酵微生物代谢；并且所述底物可以通过直接添加至发酵培养基来提供。

术语“发酵培养基”应理解为指在添加发酵微生物之前的培养基，例如，糖化处理产生的培养基，以在同时糖化和发酵方法(SSF)中使用的培养基。

“发酵微生物”指适用于期望的发酵方法中的任何微生物。根据本发明的合适的发酵微生物能够发酵，即，能够直接或间接地将糖，例如葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、甘露糖、半乳糖或寡糖转化成期望的发酵产物。发酵微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种，尤其是酿酒酵母。商业上能够获得的酵母包括，例如，Red Star®/™/Lesaffre Ethanol Red (可从 Red Star/Lesaffre, USA 获得) FALI (可从 Burns Philp Food Inc., USA 的分公司 Fleischmann's Yeast 获得)，SUPERSTART (可从 Alltech 获得)，GERT STRAND (可从 Gert Strand AB, Sweden 获得)和 FERMIOL (可从 DSM Specialties 获得)。

在优选的方面，酵母是酵母属菌种。在更优选的方面，酵母是酿酒酵母。在另一个更优选的方面，酵母是糖化酵母(*Saccharomyces distaticus*)。在另一个更优选的方面，酵母是葡萄汁酵母(*Saccharomyces uvarum*)。在另一个优选的方面，酵母是克鲁维酵母属。在另一个更优选的方面，酵母是马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)。在另一个更优选的方面，酵母是脆壁克鲁维酵母(*Kluyveromyces fragilis*)。在另一个优选的方面，酵母是念珠菌属。在另一个更优选的方面，酵母是假热带念珠菌(*Candida pseudotropicalis*)。在另一个更优选的方面，酵母是芸苔念珠菌(*Candida brassicae*)。在另一个优选的方面，酵母是棍孢属(*Clavispora*)。在另一个更优选的方面，酵母是葡萄牙棍孢(*Clavispora lusitaniae*)。在另一个更优选的方面，酵母是仙人掌棍孢(*Clavispora opuntiae*)。在另一个优选的方面，酵母是管囊酵母属(*Pachysolen*)。在另一个更优选的方面，酵母是管囊酵母(*Pachysolen tannophilus*)。在另一个优选的方面，酵母是酒香酵母属(*Bretannomyces*)。在另一个更优选的方面，酵母是克劳森酒香酵母(*Bretannomyces clausenii*) (Philippidis, G. P., 1996, Cellulose bioconversion technology, in *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212)。

能够有效地将葡萄糖发酵成乙醇的细菌包括例如运动发酵单孢菌

(*Zymomonas mobilis*)和热纤维梭菌(*Clostridium thermocellum*) (Philippidis, 1996,见上文)。

本领域公知的是上述生物还可用于产生其它物质，如本文所述。

酿酒酵母中异源基因的克隆(Chen, Z., Ho, N. W. Y., 1993, Cloning and improving the expression of *Pichia stipitis* xylose reductase gene in *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 39-40: 135-147; Ho, N. W. Y., Chen, Z, Brainard, A. P., 1998, Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effectively cofermenting glucose and xylose, *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1852-1859)，或细菌中异源基因的克隆，例如大肠杆菌中(Beall, D. S., Ohta, K., Ingram, L. O., 1991, Parametric studies of ethanol production from xylose and other sugars by recombinant *Escherichia coli*, *Biotech. Bioeng.* 38: 296-303)，产酸克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytoca*)中(Ingram, L. O., Gomes, P. F., Lai, X., Moniruzzaman, M., Wood, B. E., Yomano, L. P., York, S. W., 1998, Metabolic engineering of bacteria for ethanol production, *Biotechnol. Bioeng.* 58: 204-214)和运动发酵单孢菌中(Zhang, M., Eddy, C., Deanda, K., Finkelstein, M., and Picataggio, S., 1995, Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*, *Science* 267: 240-243; Deanda, K., Zhang, M., Eddy, C., and Picataggio, S., 1996, Development of an arabinose-fermenting *Zymomonas mobilis* strain by metabolic pathway engineering, *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4465-4470)异源基因的克隆致使构建出能够将己糖和戊糖转化成乙醇(共发酵)的生物。

通常将酵母或其它微生物添加至降解的纤维素或水解产物，并且将发酵进行大约 24 至大约 96 小时，例如大约 35 至大约 60 小时。温度通常在大约 26°C 至大约 40°C，特别是大约 32°C，并且在大约 pH 3 至大约 pH 6，特别是大约 pH 4-5。

在优选的方面，将酵母或其它微生物应用于降解的纤维素或水解产物，并且将发酵进行大约 24 至大约 96 小时，例如通常为 35-60 小时。在优选的方法，温度通常是大约 26 至大约 40°C，特别是大约 32°C，并且 pH 通常是大约 pH 3 至大约 pH 6，优选大约 pH 4-5。优选将酵母或其它微生物以大约 10^5 至 10^{12}，优选大约 10^7 至 10^{10}，特别是大约 $5x10^7$ 活细胞计数每 ml 发酵液的量应用。在产生乙醇的过程中，酵母细胞计数应该优选在大约 10^7 至 10^{10}，特

别是大约 2 x 10^8。有关使用酵母发酵的其它指导可参见例如“The Alcohol Textbook” (Editors K. Jacques, T.P. Lyons and D.R. Kelsall, Nottingham University Press, United Kingdom 1999)，将其并入本文以作参考。

本领域内最广泛使用的方法是同时糖化和发酵(SSF)方法，其中对于糖化不存在保持阶段(holding stage)，意味着将酵母和酶一同添加。

对于乙醇产生，在发酵之后蒸馏醪以提取乙醇。根据本发明的方法获得的乙醇可以用作例如燃料乙醇、饮用乙醇，即，可饮用中性酒精(potable neutral spirits)；或工业乙醇。

可以将发酵刺激物(fermentation stimulator)与本文描述的任何酶方法组合使用以进一步改进发酵方法，特别是改进发酵微生物的性能，例如，速率提高和乙醇产率。“发酵刺激物”指对于培养发酵微生物，特别是酵母的生长的刺激物。优选的用于生长的发酵刺激物包括维生素和矿物。维生素的实例包括多种维生素、生物素、泛酸、烟酸、内消旋肌醇、硫胺素、吡哆醇、对氨基苯甲酸、叶酸、核黄素和维生素 A、B、C、D 和 E。参见，例如，Alfenore *et al.*, Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process, Springer-Verlag (2002)，将其通过引用并入本文。矿物的实例包括能够提供营养物的矿物和矿物盐，其包括 P、K、Mg、S、Ca、Fe、Zn、Mn 和 Cu。

回收。从发酵的纤维素材料分离醇并且通过常规蒸馏方法来纯化。能够获得纯度高至大约 96 体积%的乙醇，其可以用作例如燃料乙醇，饮用乙醇，即，可饮用中性酒精；或工业乙醇。

对于其它物质，可以使用本领域已知的任何方法，包括但不限于层析(例如，离子交换、亲和、疏水、层析聚焦和大小排阻)、电泳方法(例如，制备型等电聚焦)、差示溶解度(例如，硫酸铵沉淀)、SDS-PAGE、蒸馏或提取。

在本发明的方法中，可以向纤维素分解蛋白和增强纤维素分解的多肽补充一种或多种额外的酶活性，以改进纤维素材料的降解。优选的额外的酶是半纤维素酶、酯酶(例如，脂肪酶、磷脂酶和/或角质酶(cutinase))、蛋白酶、漆酶、过氧化物酶或它们的混合。

在本发明的方法中，可以在发酵之前或发酵期间添加所述额外的酶，包括在发酵微生物的增殖期间或之后添加所述额外的酶。

本文参照的酶可以源自或获得自任何合适的来源，包括细菌、真菌、酵

母或哺乳动物来源。术语“获得”在本文的意思是已经将酶从天然产生该酶作为天然酶的生物中分离。术语“获得”在本文还表示所述酶可在宿主生物中重组产生，其中所述重组产生的酶对于该宿主生物是天然的或外源的，或具有修饰的氨基酸序列，例如缺失、插入和/或取代一个或多个氨基酸，即重组产生的酶是天然氨基酸序列的突变体和/或片段，或通过本领域已知的核酸改组方法产生的酶。天然酶的意思中包含天然变体，而外源酶的意思中包含重组获得的变体，例如通过定位诱变或改组获得的变体。

酶也可以是纯化的。术语“纯化”用于本文中包括不含其它成分的酶，所述其它成分来自酶所来源的生物。术语“纯化”还包括不含来自获得该酶的天然生物的成分的酶。酶可以是纯化的，仅存在少量其它蛋白质。表述“其它蛋白质”具体涉及其它酶。术语“纯化”用于本文还指去除存在于本发明所述酶的细胞来源中的其它成分，特别是其它蛋白质，并且最特别是其它酶。酶可以是“基本上纯的多肽”，即不含来自产生该酶的生物的其它成分，即例如，重组产生酶的宿主生物。

本发明中使用的酶可以是适合用于本发明描述的方法中的任何形式，例如，含有或不含细胞的粗发酵液、干粉或颗粒、无尘颗粒、液体、稳定化的液体或保护的酶。例如，颗粒可以如美国专利 Nos. 4,106,991 和 4,661,452 所公开的来产生，并且可以任选地通过本领域内已知的方法来涂覆。例如，液体酶制备物可以根据已经建立的方法通过添加稳定剂来稳定化，所述稳定剂例如糖、糖醇或其它多元醇，和/或乳酸或其它有机酸。保护的酶可以根据 EP 238,216 中公开的方法制备。

半纤维素酶

半纤维素的酶水解能够由多种真菌和细菌进行。类似于纤维素降解，半纤维素水解需要许多酶的协调作用。可将半纤维素酶分为三个总类型：内作用酶(endo-acting enzyme)，其攻击多糖链的内部键；外作用酶，其从多糖链的还原或非还原端向前(processively)作用；以及附属酶、乙酰酯酶和酯酶，其水解木质素糖苷键，例如香豆酸酯酶和阿魏酸酯酶(Wong, K.K.Y., Tan, L. U. L., and Saddler, J. N., 1988, Multiplicity of β-1,4-xylanase in microorganisms: Functions and applications, *Microbiol. Rev.* 52: 305-317; Tenkanen, M., and Poutanen, K., 1992, Significance of esterases in the degradation of xylans, in *Xylans and Xylanases*, Visser, J., Beldman, G., Kuster-van Someren, M. A., and

Voragen, A. G. J., eds., Elsevier, New York, NY, 203-212; Coughlan, M. P., and Hazlewood, G. P., 1993, *Hemicellulose and hemicellulases*, Portland, London, UK; Brigham, J. S., Adney, W. S., and Himmel, M. E., 1996, Hemicellulases: Diversity and applications, in *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 119-141)。

半纤维素酶包括木聚糖酶、阿拉伯呋喃糖苷酶、乙酰木聚糖酯酶、葡糖醛酸糖苷酶、内切半乳聚糖酶、甘露聚糖酶、内切或外切阿拉伯糖酶、外切半乳聚糖酶和它们的混合物。内作用的半纤维素酶和辅助酶的实例包括内切阿聚糖酶、内切阿拉伯半乳聚糖酶、内切葡聚糖酶、内切甘露聚糖酶、内切木聚糖酶和 feraxan 内切木聚糖酶(feraxan endoxylanase)。外作用半纤维素酶和辅助酶的实例包括α-L-阿拉伯糖苷酶、β-L-阿拉伯糖苷酶、α-1,2-L-岩藻糖苷酶、α-D-半乳糖苷酶、β-D-半乳糖苷酶、β-D-葡糖苷酶、β-D-葡糖醛酸糖苷酶、β-D-甘露糖苷酶、β-D-木糖苷酶、外切葡糖苷酶、外切纤维二糖水解酶、外切甘露二糖水解酶、外切甘露聚糖酶、外切木聚糖酶、木聚糖α-葡糖醛酸糖苷酶和松柏苷β-葡糖苷酶。酯酶的实例包括乙酰酯酶(乙酰半乳聚糖酯酶、乙酰甘露聚糖酯酶和乙酰木聚糖酯酶)和芳基酯酶(香豆酸酯酶和阿魏酸酯酶)。

优选地，半纤维素酶是外作用的半纤维素酶，并且更优选在 pH 7 以下的酸性条件下具有水解半纤维素能力的外作用半纤维素酶。适用于本发明的半纤维素酶的实例包括 VISCOZYME™ (可从 Novozymes A/S, Denmark 获得)。以有效量添加半纤维素酶，所述有效量是大约 0.001%至大约 5.0%固体重量，更优选大约 0.025%至大约 4.0%固体重量，并且最优选大约 0.005%至大约 2.0%固体重量。

木聚糖酶(E.C. 3.2.1.8)可以从任何合适的来源获得，包括真菌和细菌生物，例如曲霉属、*Disporotrichum*、青霉属、脉孢菌属、镰孢属、木霉属、腐质霉属、嗜热霉属(*Thermomyces*)和芽孢杆菌属。优选的商业上能够获得的包含木聚糖酶的制备物包括 SHEARZYME®、BIOFEED WHEAT®、BIO-FEED Plus® L、CELLUCLAST®、ULTRAFLO®、VISCOZYME®、PENTOPAN MONO® BG、and PULPZYME® HC (Novozymes A/S); 和 LAMINEX®和 SPEZYME® CP (Genencor Int.)。

<u>酯酶</u>

能够用于生物转化纤维素的酯酶包括乙酰酯酶例如乙酰半乳聚糖酯酶、乙酰甘露聚糖酯酶和乙酰木聚糖酯酶，和水解木质素糖苷键的酯酶，例如香豆酸酯酶和阿魏酸酯酶。

如用于本文，“酯酶”也成为羧酸酯水解酶，指作用于酯键的酶，并且包括根据酶命名法(*Enzyme Nomenclature*, 1992, Academic Press, San Diego, California, 以及 Supplement 1 (1993), Supplement 2 (1994), Supplement 3 (1995), Supplement 4 (1997) and Supplement 5，分别参见 *Eur. J. Biochem.* 223: 1-5, 1994; *Eur. J. Biochem.* 232: 1-6, 1995; *Eur. J. Biochem.* 237: 1-5, 1996; *Eur. J. Biochem.* 250: 1-6, 1997 和 *Eur. J. Biochem.* 264: 610-650, 1999)分类在 EC 3.1.1 羧酸酯水解酶中的酶。酯酶的非限定性实例包括芳基酯酶、三酰甘油脂肪酶、乙酰酯酶、乙酰胆碱酯酶、胆碱酯酶、托品酯酶、果胶酯酶、固醇酯酶、叶绿素酶、L-阿拉伯糖内酯酶、葡糖酸内酯酶、尿内酯酶、鞣酸酶、棕榈酸视黄酯酯酶、羟基丁酸酯二聚体水解酶、酰基甘油脂肪酶、3-氧代己二酸烯醇-内酯酶(3-oxoadipate enol-lactonase)、1,4-内酯酶、半乳糖脂肪酶、4-吡哆醇内酯酶、酰基肉碱水解酶、氨酰基-tRNA 水解酶、D-阿拉伯糖内酯酶、6-磷酸葡糖酸内酯酶、磷脂酶 A1、6-乙酰葡萄糖脱乙酰酶、脂蛋白脂肪酶、二氢香豆素脂肪酶、柠檬素-D-环内酯酶、类固醇内酯酶、三乙酸内酯酶、放线菌素内酯酶、苔色酸缩酚酸类水解酶、头孢菌素 C 脱乙酰酶、绿原酸水解酶、α-氨基酸酯酶、4-甲基草酰乙酸酯酯酶、羧甲烯丁烯羟酸内酯酶(carboxymethylenebutenolidase)、脱氧柠檬酸 A-环内酯酶、2-乙酰-1-烷基甘油磷酸胆碱酯酶、镰孢氨酸-C 鸟氨酸酯酶、芥子碱酯酶、蜡酯水解酶、大戟二萜醇二酯水解酶、磷脂酰肌醇脱酰酶、唾液酸 O-乙酰酯酶、乙酰氧基丁炔基二噻吩脱乙酰酶(acetoxybutynylbithiophene deacetylase)、乙酰水杨酸脱乙酰酶、甲基繖酮乙酸脱乙酰酶(methylumbelliferyl-acetate deacetylase)、2-吡喃酮-4,6-二羧酸内酯酶、N-乙酰半乳糖胺聚糖脱乙酰酶、保幼激素酯酶、二(2-乙基己基)邻苯二甲酸酯酶、蛋白质-谷氨酸甲基酯酶、11-顺-视黄基-棕榈酸水解酶、全-反-视黄基-棕榈酸水解酶、L-鼠李糖-1,4-内酯酶(L-rhamnono-1,4-lactonase)、5-(3,4-双乙酸基丁-1-炔基)-2,2'-二噻吩脱乙酰酶、脂肪酰基乙酯合酶、木糖-1,4-内酯酶(xylono-1,4-lactonase)、N-乙酰葡糖胺酰磷脂酰肌醇脱乙酰酶、苯甲西曲酸酯酯酶(cetraxate benzylesterase)、乙酰烷基甘油乙酰水解酶和乙酰木聚糖酯酶。

用于本发明中的优选的酯酶是脂肪分解酶，例如，脂肪酶(分类为 EC 3.1.1.3、EC 3.1.1.23 和/或 EC 3.1.1.26)和磷脂酶(分类为 EC 3.1.1.4 和/或 EC 3.1.1.32，包括分类为 EC 3.1.1.5 的溶血磷脂酶)。其它优选的酯酶是角质酶(分类为 EC 3.1.1.74)。

可以添加有效量的酯酶以获得期望的效益来改进发酵微生物的性能，例如，改变发酵微生物内部和/或外部或者发酵微生物细胞膜中的脂肪组成/浓度，在发酵期间致使溶质进和/或出发酵微生物的运动有所改进，和/或提供更多可代谢能量源(例如，通过将例如来自玉米底物的油等成分转化成对于发酵微生物有用的成分例如不饱和脂肪酸和甘油)，从而增加乙醇产率。酯酶的有效量的实例是大约 0.01 至大约 400 LU/g DS (干固体)。优选地，以大约 0.1 至大约 100 LU/g DS，更优选大约 0.5 至大约 50 LU/g DS，并且甚至更优选大约 1 至大约 20 LU/g DS 的量使用酯酶。其后使用本领域已知的标准方法能够获得酯酶量的进一步优化。

1 脂肪酶单位(LU)是在 30°C、pH 7.0 (磷酸盐缓冲液)使用三丁酸甘油酯(tributyrin)作为底物和阿拉伯胶作为乳化剂时，每分钟释放 1.0 μmol 可滴定的脂肪酸的酶量。

在优选的方面，酯酶是脂肪分解酶，更优选是脂肪酶。如用于本文，“脂肪分解酶”指脂肪酶和磷脂酶(包括溶血磷脂酶)。脂肪分解酶优选是微生物来源，特别是细菌、真菌或酵母来源。使用的脂肪分解酶可以源自任何来源，包括例如以下属和种的菌株：犁头酶属(*Absidia*)，具体为 *Absidia blakesleena* 和伞枝犁头酶(*Absidia corymbifera*)；无色杆菌属(*Achromobacter*)，具体为解毒无色杆菌(*Achromobacter iophagus*)；气单孢菌属(*Aeromonas*)；链格孢属(*Alternaria*)，具体为甘蓝链格孢(*Alternaria brassiciola*)；曲霉属，具体为黑曲霉、米曲霉、烟曲霉和黄曲霉(*Aspergillus* flavus)；无色杆菌属，具体为解毒无色杆菌；短梗酶属，具体为出芽短梗酶(*Aureobasidium pullulans*)；芽孢杆菌属，具体为短小芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌；白僵菌属(*Beauveria*)；索丝菌属(*Brochothrix*)，具体为热杀索丝菌(*Brochothrix thermosohata*)；念珠菌属，具体为 *Candida cylindracea* (皱褶念珠菌(*Candida rugosa*))、副解脂念珠菌(*Candida paralipolytica*)和南极念珠菌(*Candida Antarctica*)；色杆菌属(*Chromobacter*)，具体为粘稠色杆菌(*Chromobacter viscosum*)；鬼伞属，具体为灰盖鬼伞；镰孢属，具体为禾本科镰孢、尖镰孢、

腐皮镰孢(*Fusarium solani*)、豌豆腐皮镰孢(*Fusarium solani pisi*)、大刀粉红镰孢(*Fusarium roseum clmorum*)和镶片镰孢；地霉属(*Geotricum*)，具体为潘氏地霉(*Geotricum penicillatum*)；汉逊酵母属菌株，具体为异常汉逊酵母(*Hansenula anomala*)；腐质霉属，具体为短孢腐质霉(*Humicola brevispora*)、*Humicola brevis* var. *thermoidea* 和特异腐质霉；*Hyphozyma* 属；乳杆菌属，具体为弯曲乳杆菌(*Latobacillus curvatus*)；绿僵菌属(*Metarhizium*)；毛霉属；拟青霉属；青霉属，具体为圆弧青霉(*Penicillium cyclopium*)、皮落青霉(*Penillum crustosum*)和扩展青霉(*Penillium expansum*)；假单胞菌属，具体为铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、产碱假单胞菌(*Psedomonas alcaligenes*)、洋葱假单胞菌(*Pseudomonas cepacia*)(同物异名洋葱伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia cepacia*))、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、莓实假单胞菌(*Pseudomonas fragi*)、嗜麦芽假单胞菌(*Pseudomonas maltophilia*)、门多萨假单胞菌(*Pseudomonas mendocina*)、解脂臭味假单胞菌(*Pseudomonas mephitica lipolytica*)、产碱假单胞菌、植物假单胞菌(*Pseudomonas plantari*)、类产碱假单胞菌(*Pseudomonas pseudoal caligenes*)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)、施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)和威斯康星假单胞菌(*Pseudomonas wisconsinensi*)；丝核菌属(*Rhizooctonia*)，具体为立枯丝核菌(*Rhizooctonia solani*)；根毛霉属(*Rhizomucor*)，具体为曼赫根毛霉；根霉菌属(*Rhizopus*)菌株，具体为日本根霉(*Rhizopus japonics*)、小孢根霉(*Rhizopus microsporus*)和结节根霉(*Rhizopus nodosus*)；红冬孢酵母属(*Rhodosporidium*)菌株，具体为红冬孢酵母(*Rhodosporidium toruloides*)；红酵母属(*Rhodotorula*)菌株，具体为胶粘红酵母(*Rhodotorula glutinis*)；掷孢酵母属(*Sporobolomyces*)菌株，具体为 *Sporobolomyces shibatanus*；嗜热霉属，具体为细毛嗜热霉(*Thermomyces lanuginosus*)(先前为疏棉状腐质霉)；*Thiarosporella*，具体为 *Thiarosporella phaseolina*；木霉属，具体为哈茨木霉和里氏木霉和/或轮枝孢属(*Verticillium*)。

在优选的方面，脂肪分解酶源自曲霉属、无色杆菌属、芽孢杆菌属、念珠菌属、色杆菌属、镰孢属、腐质霉属、*Hyphozyma*、假单胞菌属、根毛霉属、根霉属或嗜热霉属。

在更优选的方面，脂肪分解酶是脂肪酶。在本文中可以应用脂肪酶对发酵培养基(包括发酵酵母)中三酰甘油油脂(例如，从玉米底物产生)的结构和组成的修饰能力。脂肪酶催化不同类型的三酰甘油转化，例如水解、酯化和转

酯作用。合适的脂肪酶包括酸性、中性和碱性脂肪酶，如本领域内公知的，尽管酸性脂肪酶(例如，脂肪酶 G AMANO 50，可以从 Amano 获得)与中性或碱性脂肪酶相比在较低的脂肪酶浓度下看起来更有效。优选用于本发明的脂肪酶包括南极念珠菌脂肪酶和 *Candida cylindracea* 脂肪酶。更优选的脂肪酶是纯化的脂肪酶，例如南极念珠菌脂肪酶(脂肪酶 A)、南极念珠菌脂肪酶(脂肪酶 B)、*Candida cylindracea* 脂肪酶和沙门柏干酪青霉(*Penicillium camembertii*)脂肪酶。

所述脂肪酶可以是在 EP 258,068-A 中公开的脂肪酶，或者可以是脂肪酶变体例如在 WO 00/60063 或 WO 00/32758 中公开的变体，将其并入本文作为参考。

优选以大约 1 至大约 400 LU/g DS，优选大约 1 至大约 10 LU/g DS，并且更优选大约 1 至大约 5 LU/g DS 的量添加脂肪酶。

在另一个优选的方面，酯酶是角质酶。角质酶是能够降解角质的酶。角质酶可以源自任何来源。在优选的方面，角质酶源自以下属和种的菌株：曲霉属，具体为米曲霉；链格孢属，具体为甘蓝链格孢；镰孢属，具体为腐皮镰孢、豌豆腐皮镰孢、大刀粉红镰孢或接骨木粉红镰孢(*Fusarium roseum sambucium*)；长蠕孢属(*Helminthosporum*)，具体为麦根腐长蠕孢(*Helminthosporum sativum*)；腐质霉属，具体为特异腐质霉；假单胞菌属，具体为门多萨假单胞菌或恶臭假单胞菌；丝核菌属(*Rhizooctonia*)，具体为立枯丝核菌(*Rhizooctonia solani*)；链霉菌属，具体为疮痂病链霉菌(*Streptomyces scabies*)或单隔孢属(*Ulocladium*)，具体为群生单隔孢(*Ulocladium consortiale*)。在最优选的方面，角质酶源自特异腐质霉的菌株，具体为菌株特异腐质霉 DSM 1800。特异腐质霉角质酶在 WO 96/13580 中描述，将其并入本文作为参考。角质酶可以是变体，例如 WO 00/34450 和 WO 01/92502 中公开的变体之一，将其并入本文作为参考。优选的角质酶变体包括 WO 01/92502 的实施例 2 中所列的变体，特别将其并入本文作为参考。角质酶的有效量是大约 0.01 至大约 400 LU/g DS，优选大约 0.1 至大约 100 LU/g DS，并且更优选大约 1 至大约 50 LU/g DS。其后可以使用本领域内已知的标准方法获得角质酶量的进一步优化。

在另一个优选的方面，酯酶是磷脂酶。如在本文中使用，术语“磷脂酶”是针对磷脂具有活性例如水解活性的酶。磷脂例如卵磷脂或磷脂酰胆碱，由

酯化的甘油组成，在外部(sn-1)和中间(sn-2)位置以 2 个脂肪酸酯化，在第 3 个酯化部位以磷酸酯化。磷酸可酯化成氨基醇。可以区分磷脂酶活性的几种类型，包括磷脂酶 A1 和 A2，其水解一个脂肪酰基(分别在 sn-1 和 sn-2 位置)形成溶血磷酸脂；和溶血磷脂酶(或磷脂酶 B)，其水解溶血磷脂中剩余的脂肪酰基。磷脂酶 C 和磷脂酶 D(磷酸二酯酶)分别释放二酰基甘油或磷脂酸。

术语“磷脂酶”包括具有磷脂酶活性的酶，例如，磷脂酶 A (A1 或 A2)、磷脂酶 B 活性、磷脂酶 C 活性或磷脂酶 D 活性。术语“磷脂酶 A”用于本文意在包括具有磷脂酶 A1 和/或磷脂酶 A2 活性的酶。可以由还具有其它活性的酶来提供磷脂酶活性，例如具有磷脂酶活性的脂肪酶。例如，脂肪酶活性可以来自具有磷脂酶副活性的脂肪酶。在其它方面，通过基本上仅具有磷脂酶活性的酶来提供磷脂酶酶活性，并且其中所述磷脂酶酶活性不是副活性。

磷脂酶可以是任何来源的，例如，动物来源(例如，哺乳动物，例如，牛或猪的胰腺)，或蛇毒或蜂毒。或者，磷脂酶也可以是微生物来源，例如来自丝状真菌、酵母或细菌，例如曲霉属，例如泡盛曲霉、臭曲霉、日本曲霉、黑曲霉或米曲霉；网柄菌属(*Dictyostelium*)，例如，盘基网柄菌(*D. discoideum*)；镰孢属，例如，大刀镰孢、禾本科镰孢、异孢镰孢、腐皮镰孢、尖镰孢或镶片镰孢；毛霉属，例如，爪哇毛霉(*M. javanicus*)、大毛霉(*M. mucedo*)或细孢毛霉(*M. subtilissimus*)；脉孢菌属，例如，粗糙脉孢菌；根毛霉属，例如，微小根毛霉(*R. pusillus*)；根霉菌属，例如，少根根霉(*R. arrhizus*)、日本根霉或匍枝根霉(*R. stolonifer*)；核盘菌属(*Sclerotinia*)，例如，大豆核盘菌(*S. libertiana*)；毛藓菌属(*Trichophyton*)，例如，红色毛藓菌(*T. rubrum*)；*Whetzelinia*，例如，*W. sclerotiorum*；芽孢杆菌属，例如，巨大芽孢杆菌或枯草芽孢杆菌；柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)，例如，弗氏柠檬酸杆菌(*C. freundii*)；肠杆菌属(*Enterobacter*)，例如，产气肠杆菌(*E. aerogenes*)或阴沟肠杆菌(*E.cloacae*)；爱德华氏菌属(*Edwardsiella*)，迟钝爱德华氏菌(*E. tarda*)；欧文氏菌属(*Erwinia*)，例如，草生欧文氏菌(*E. herbicola*)；埃希氏菌属(*Escherichia*)，例如，大肠杆菌；克雷伯氏菌属，例如，肺炎克雷伯氏菌(*K. pneumoniae*)；变形菌属(*Proteus*)，例如，普通变形菌(*P. vulgaris*)；普罗威登斯菌属(*Providencia*)，例如，斯氏普罗威登斯菌(*P. stuartii*)；沙门氏菌属，例如，鼠伤寒沙门氏菌(*S. typhimurium*)；沙雷氏菌属(*Serratia*)，例如，液化沙雷氏菌(*S. liquefasciens*)、粘质沙雷氏菌(*S. marcescens*)；志贺氏菌属(*Shigella*)，例如，弗氏志贺氏菌(*S. flexneri*)；链霉菌

属，紫红链霉菌(*S. violeceoruber*)；或耶尔森氏菌属，例如，小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Y. enterocolitica*)。

优选的商业磷脂酶包括 LECITASE™和 LECITASE™ ULTRA (可以从 Novozymes A/S, Denmark 获得)。

磷脂酶的有效量是大约 0.01 至大约 400 LU/g DS，优选大约 0.1 至大约 100 LU/g DS，并且更优选大约 1 至大约 50 LU/g DS。其后可以使用本领域内已知的标准方法获得磷脂酶量的进一步优化。

蛋白酶

在本发明另一个优选的方面，将至少一种表面活性剂和至少一种产生糖的酶与至少一种蛋白酶组合使用。例如，可以使用蛋白酶来消化蛋白以产生游离氨基氮(FAN)。这些游离氨基酸发挥酵母营养物的功能，由此增强酵母的生长，继而提高乙醇的产生。

可以通过在至少一种蛋白酶存在下使发酵微生物增殖来产生发酵方法中使用的发酵微生物。尽管不限于任何一种操作理论，但是相信与在不添加蛋白酶的相同条件下增殖的发酵微生物相比，在有效量的至少一种蛋白酶存在下增殖发酵微生物使得在其后的发酵方法中使用该发酵微生物时发酵微生物的滞后时间减少。在增殖过程中蛋白酶的作用被认为直接或间接导致分别对有害基因或有益基因的阻抑或表达，由此减少滞后时间并且产生更快的发酵循环。

蛋白酶是本领域熟知的，并且指催化肽键切割的酶。合适的蛋白酶包括真菌和细菌蛋白酶。优选的蛋白酶是酸性蛋白酶，即特征在于在 pH 7 以下的酸性条件下能够水解蛋白的蛋白酶。合适的酸性真菌蛋白酶包括源自以下菌属的真菌蛋白酶：曲霉属、毛霉属、根霉属、念珠菌属、革盖菌属、内座壳属(*Endothia*)、*Enthomophtra*、耙菌属(*Irpex*)、青霉属、小核菌属(*Sclerotium*)和球拟酵母属(*Torulopsis*)。特别期望的是源自以下菌种的蛋白酶：黑曲霉(参见，例如，Koaze *et al.*, 1964, *Agr. Biol. Chem.* Japan 28: 216)、斋藤曲霉(*Aspergillus saitoi*) (参见，例如，Yoshida, 1954, *J. Agr. Chem. Soc. Japan* 28: 66)、泡盛曲霉 (Hayashida *et al.*, 1977, *Agric. Biol. Chem.* 42: 927-933、棘孢曲霉(WO 95/02044)或米曲霉；和源自微小毛霉(*Mucor pusillus*)或米赫毛霉的酸性蛋白酶。

不是酸性蛋白酶的细菌蛋白酶包括商业上能够获得的产品

ALCALASE™和 NEUTRASE™ (可以从 Novozymes A/S 获得)。其它蛋白酶包括来自 Genencor International, Inc., USA 的 GC106 和来自 Novozymes A/S 的 NOVOZYM™ 50006。

优选地，蛋白酶是天冬氨酸蛋白酶，例如 *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Edited by A.J. Barrett, N.D. Rawlings and J.F. Woessner, Academic Press, San Diego, 1998, Chapter 270 中所述。天冬氨酸蛋白酶的合适的实例包括例如 Berka *et al.*, 1990, Gene 96: 313; Berka *et al.*, 1993, *Gene* 125: 195-198 和 Gomi *et al.*, 1993, *Biosci. Biotech. Biochem.* 57: 1095-1100 描述的那些。

过氧化物酶

具有过氧化物酶活性的其它化合物可以是任何过氧化物酶(EC 1.11.1.7)，或者可以是源自它们的具有过氧化物酶活性的任何片段，其显示过氧化物酶活性。

优选地，过氧化物酶由植物(例如，辣根或大豆过氧化物酶)或微生物例如真菌或细菌产生。

某些优选的真菌包括属于半知菌亚门(subdivision Deuteromycotina)、丝孢纲(class Hyphomycetes)的菌株，例如，镰孢属、腐质霉属、木霉属(*Tricoderma*)、漆斑菌属(*Myrothecium*)、轮枝孢属(*Verticillum*)、*Arthromyces*、卡尔黑霉属(*Caldariomyces*)、单隔孢属、埃里砖格孢属(*Embellisia*)、支孢属(*Cladosporium*)或 *Dreschlera*，具体为尖镰孢 (DSM 2672)、特异腐质霉、里氏木霉、疣孢漆斑菌(*Myrothecium verrucaria*) (IFO 6113)、黄萎轮枝孢(*Verticillum alboatrum*)、大丽花轮枝孢(*Verticillum dahlia*)、*Arthromyces ramosus* (FERM P-7754)、*Caldariomyces fumago*、纸单隔孢(*Ulocladium chartarum*)、*Embellisia alli* 或 *Dreschlera halodes*。

其它优选的真菌包括属于担子菌亚门(subdivision *Basidiomycotina*)、担子菌纲(class *Basidiomycetes*)的菌株，例如，鬼伞属、平革菌属、革盖菌属或栓菌属，具体为灰盖鬼伞小孢变型(*coprinus cinereus* f. *microsporus*) (IFO 8371)、长根鬼伞(*Coprinus macrorhizus*)、黄孢平革菌(例如 NA-12)或栓菌属(先前称为多孔菌属(*Polyporus*))，例如杂色栓菌(例如，PR4 28-A)。

进一步优选的真菌包括属于接合菌亚门(subdivision *Zygomycotina*)、*Mycoraceae* 纲的菌株，例如根霉属或毛霉属，具体为冻土毛霉(*Mucor hiemalis*)。

某些优选的细菌包括放线菌目(order *Actinomycetales*)的菌株，例如类球形链霉菌(*Streptomyces spheroides*) (ATTC 23965)、热紫链霉菌(*Streptomyces thermoviolaceus*) (IFO 12382)或轮丝链轮丝菌轮丝亚种(*Streptoverticillum verticillium* ssp. *verticillium*)。

其它优选的细菌包括类球红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)、*Rhodomonas palustri*、乳链球菌(*Streptococcus lactis*)、*Pseudomonas purrocinia* (ATCC 15958)、荧光假单胞菌(NRRL B-11)和芽孢杆菌属菌株，例如，短小芽孢杆菌(ATCC 12905)和嗜热脂肪芽孢杆菌。

进一步优选的细菌包括属于粘球菌属(*Myxococcus*)的菌株，例如，变绿粘球菌(*M. virescens*)。

过氧化物酶还可以是通过以下方法产生的过氧化物酶，所述方法包括：在培养基中在允许过氧化物酶表达的条件下，培养用重组 DNA 载体转化的宿主细胞，所述载体携带编码过氧化物酶的 DNA 序列以及用于表达该过氧化物酶编码 DNA 序列的 DNA 序列；和从培养物回收过氧化物酶。

在优选的方面，重组产生的过氧化物酶是源自鬼伞属菌种(*Coprinus* sp.)的过氧化物酶，具体为源自根据 WO 92/16634 的长根鬼伞或灰盖鬼伞的过氧化物酶。

在本发明中，具有过氧化物酶活性的化合物包含过氧化物酶和源自细胞色素、血红蛋白或过氧化物酶的过氧化物酶活性片段。

1 过氧化物酶单位(POXU)是在以下条件每分钟催化 1 微摩尔过氧化氢转化的酶量：在 30°C，在 0.1 M 磷酸盐缓冲液 pH 7.0、0.88 mM 过氧化氢和 1.67 mM 2,2'-连氮基-二(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸) (ABTS)中。对反应在 418 nm 吸光度的改变跟踪 60 秒(混合之后 15 秒)，其应该为 0.15-0.30。对于活性的计算，使用 36 mM-1 cm-1 的氧化 ABTS 的吸光系数和 1 微摩尔转化的 H_2O_2/两微摩尔氧化的 ABTS 的化学计量。

漆酶

在本发明中，漆酶和漆酶相关酶包含分类为 EC 1.10.3.2 的任何漆酶、分类为 EC 1.10.3.1 的任何儿茶酚氧化酶、分类为 EC 1.3.3.5 的任何胆红素氧化酶或分类为 EC 1.14.18.1 的任何单酚单加氧酶。

上述酶可以是微生物的，即，获得自细菌或真菌(包括丝状真菌和酵母)，或者它们可以源自植物。

来自真菌的合适的实例包括源自以下菌属或菌种的菌株的漆酶：曲霉属；脉孢菌属，例如，粗糙脉孢菌；柄孢壳属(*Podospora*)；葡糖孢属(*Botrytis*)；金钱菌属(*Collybia*)；层孔菌属(*Fomes*)；香菇属(*Lentinus*)；侧耳属(*Pleurotus*)；栓菌属，例如 *T. villosa* 和杂色栓菌；丝核菌属(*Rhizooctonia*)，例如，立枯丝核菌；鬼伞属，例如，灰盖鬼伞、毛头鬼伞(*C. comatus*)、费赖斯鬼伞(*C. friesii*)和皱纹鬼伞(*C. plicatilis*)；小脆柄菇属(*Psathyrella*)，例如，*P. condelleana*；斑褶菇属(*Panaeolus*)，例如，蝶形斑褶菇(*P. papilionaceus*)；毁丝霉属，例如，嗜热毁丝霉；柱顶孢属(*Schytalidium*)，例如，嗜热柱顶孢(*S. thermophilum*)；多孔菌属，例如，*P. pinsitus*；密孔菌属(*Pycnoporus*)，例如，朱红密孔菌(*P. cinnabarinus*)；射脉菌属，例如，射脉菌(*P. radita*) (WO 92/01046)或革盖菌属，例如，毛革盖菌(JP 2-238885)。

来自细菌的合适的实例包括从芽孢杆菌属菌株获得的漆酶。

从鬼伞属、毁丝霉属、多孔菌属、密孔菌属、柱顶孢属(*Scytalidium*)或丝核菌属获得的漆酶是优选的；具体为获得自灰盖鬼伞、嗜热毁丝霉、*Polyporus pinsitus*、朱红密孔菌、嗜热柱顶孢或立枯丝核菌的漆酶。

商业上能够获得的漆酶是 NS51001 (*Polyporus pinsitius* 漆酶，可以从 Novozymes A/S, Denmark 获得)和 NS51002 (嗜热毁丝霉漆酶，可以从 Novozymes A/S, Denmark 获得)。

漆酶或漆酶相关的酶还可以是通过以下方法产生的漆酶，所述方法包括：在培养基中在允许漆酶表达的条件下，培养用重组 DNA 载体转化的宿主细胞，所述载体携带编码漆酶的 DNA 序列以及用于表达该漆酶编码 DNA 序列的 DNA 序列；和从培养物回收漆酶。

在好氧条件下在 pH 5.5 从丁香醛连氮(syringaldazine)的氧化测定漆酶活性(LACU)。在 530 nm 测定产生的紫色。分析条件是 19 mM 丁香醛连氮，23 mM 乙酸缓冲液、pH 5.5，30°C，1 分钟反应时间。1 漆酶单位(LACU)是在以上条件下每分钟催化 1.0 微摩尔丁香醛连氮转化的酶量。

在好氧条件下在 pH 7.5 从丁香醛连氮的氧化来测定漆酶活性(LAMU)。在 530 nm 用光度计测定产生的紫色。分析条件是 19 mM 丁香醛连氮，23 mM Tris/马来酸 pH 7.5，30°C，1 分钟反应时间。1 漆酶单位(LAMU)是在以上条件下每分钟催化 1.0 微摩尔丁香醛连氮转化的酶量。

具有增强纤维素分解的活性的多肽可以与上述酶和/或纤维素分解蛋白

结合使用以进一步降解生物质底物的纤维素成分，(参见，例如，Brigham *et al.*, 1995, in *Handbook on Bioethanol* (Charles E. Wyman, editor), pp.119-141, Taylor & Francis, Washington D.C.; Lee, 1997, *Journal of Biotechnology* 56: 1-24)。

具有增强纤维素分解的活性的多肽的最优量和纤维素分解蛋白的最优量依赖于几个因素，所述因素包括但不限于成分纤维素分解蛋白的混合物、纤维素底物、纤维素底物浓度、纤维素底物预处理、温度、时间、pH 和发酵微生物(例如，用于同时糖化和发酵的酵母)的内含物(inclusion)。

在优选的方面，具有增强纤维素分解的活性的多肽对于纤维素材料的有效量是每克纤维素材料大约 0.01 至大约 2.0 mg，优选大约 0.025 至大约 1.5 mg，更优选大约 0.05 至大约 1.25 mg，更优选大约 0.075 至大约 1.25 mg，更优选大约 0.1 至大约 1.25 mg，甚至更优选大约 0.15 至大约 1.25 mg，并且最优选大约 0.25 至大约 1.0 mg。

在另一个优选的方面，纤维素分解蛋白对于纤维素材料的有效量是每克纤维素材料大约 0.5 至大约 50 mg，优选大约 0.5 至大约 40 mg，更优选大约 0.5 至大约 25 mg，更优选大约 0.75 至大约 20 mg，更优选大约 0.75 至大约 15 mg，甚至更优选大约 0.5 至大约 10 mg，并且最优选大约 2.5 至大约 10 mg。

在优选的方面，具有增强纤维素分解的活性的多肽对于纤维素分解蛋白的有效量是每克纤维素分解蛋白大约 0.005 至大约 1.0 g，优选大约 0.01 至大约 1.0 g，更优选大约 0.15 至大约 0.75 g，更优选大约 0.15 至大约 0.5 g，更优选大约 0.1 至大约 0.5 g，甚至更优选大约 0.1 至大约 0.5 g，并且最优选大约 0.05 至大约 0.2 g。

洗涤剂组合物

可以将具有增强纤维素分解的活性的多肽添加至洗涤剂组合物，并且由此成为该洗涤剂组合物的成分。

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

在具体的方面，本发明提供洗涤剂添加剂，其包含如本文所述具有增强纤维素分解的活性的多肽。所述洗涤剂添加剂以及洗涤剂组合物可以包含一

种或多种酶，例如蛋白酶、脂肪酶、角质酶、淀粉酶、糖酶、纤维素酶、果胶酶、甘露聚糖酶、阿拉伯糖酶(arabinase)、半乳聚糖酶、木聚糖酶、氧化酶例如漆酶，和/或过氧化物酶。

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

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

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

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

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

有用的蛋白酶的实例是在 WO 92/19729、WO 98/20115、WO 98/20116 和 WO 98/34946 中描述的变体，特别是在以下位置中的一个或多个具有取代的变体：27、36、57、76、87、97、101、104、120、123、167、170、194、206、

218、222、224、235 和 274。

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

脂肪酶：合适的脂肪酶包括细菌或真菌来源的那些。包括化学修饰的或蛋白质工程化的突变体。有用的脂肪酶的实例包括：源自腐质霉属(同物异名嗜热霉属)的脂肪酶，例如，如 EP 258 068 和 EP 305 216 中所述来自疏棉状腐质霉(细毛嗜热霉)，或如 WO 96/13580 中所述来自特异腐质霉；假单胞菌属脂肪酶，例如源自产碱假单胞菌或类产碱假单胞菌(EP 218 272)、洋葱假单胞菌(EP 331 376)、施氏假单胞菌(GB 1,372,034)、荧光假单胞菌、假单胞菌属菌种菌株 SD 705 (WO 95/06720 和 WO 96/27002)、*P. wisconsinensis* (WO 96/12012)；芽孢杆菌属脂肪酶，例如，源自枯草芽孢杆菌(Dartois *et al.*, 1993, *Biochemica et Biophysica Acta*, 1131: 253-360)、嗜热脂肪芽孢杆菌(JP 64/744992)或短小芽孢杆菌(WO 91/16422)。

其它实例是脂肪酶变体，例如在 WO 92/05249、WO 94/01541、EP 407 225、EP 260 105、WO 95/35381、WO 96/00292、WO 95/30744、WO 94/25578、WO 95/14783、WO 95/22615、WO 97/04079 和 WO 97/07202 中公开的那些。

优选的商业上能够获得的脂肪酶包括 Lipolase™、Lipex™ 和 Lipolase Ultra™ (Novozymes A/S)。

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

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

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

过氧化物酶/氧化酶：合适的过氧化物酶/氧化酶包括植物、细菌或真菌来

源的那些。包括化学修饰或蛋白质工程的突变体。有用的过氧化物酶的实例包括来自鬼伞属例如来自灰盖鬼伞的过氧化物酶，及其变体，如在 WO 93/24618、WO 95/10602 和 WO 98/15257 中描述的那些。

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

通过添加含有一种或多种酶的单独的添加剂，或通过添加包含所有这些酶的组合添加剂，可将洗涤剂酶包括在洗涤剂组合物中。可将本发明的洗涤剂添加剂(即单独的添加剂或组合的添加剂)配制成例如颗粒、液体、浆等。优选的洗涤剂添加剂剂型是颗粒，尤其是无粉尘(non-dusting)颗粒，液体，尤其是稳定化的液体，或浆。

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

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

洗涤剂组合物包含一种或多种表面活性剂，其可以是非离子的，包括半极性的和/或阴离子的和/或阳离子的和/或两性离子的。所述表面活性剂通常以按重量计 0.1%至 60%的水平存在。

当包括于此时，所述洗涤剂将通常含有大约 1%至大约 40%的阴离子表面活性剂，例如线性烷基苯磺酸盐、α-烯烃磺酸酯(olefinsulfonate)、烷基硫酸盐(脂肪醇硫酸酯)、醇乙氧基硫酸盐(alcohol ethoxysulfate)、仲烷磺酸盐(secondary alkanesulfonate)、α-磺基脂肪酸甲酯、烷基-或烯基琥珀酸，或肥皂(soap)。

当包括于此时，洗涤剂将通常含有大约 0.2%至大约 40%的非离子表面活性剂，例如醇乙氧基化物、壬基酚乙氧基化物、烷基聚糖苷(alkylpolyglycoside)、烷基二甲基氧化胺(alkyldimethylamineoxide)、乙氧基化脂肪酸单乙醇酰胺

(ethoxylated fatty acid monoethanolamide)、脂肪酸单乙醇酰胺、多羟基烷基脂肪酸酰胺或葡糖胺的 N-酰基 N-烷基衍生物(“葡糖酰胺(glucamide)”)。

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

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

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

本发明的洗涤剂组合物的酶可以使用常规稳定剂稳定，例如，多元醇例如丙二醇或甘油、糖或糖醇、乳酸、硼酸或硼酸衍生物，例如，芳香硼酸酯，或苯基硼酸(phenyl boronic acid)衍生物例如 4-甲酰苯基硼酸(4-formylphenyl boronic acid)，并且例如可以如 WO 92/19709 和 WO 92/19708 中的描述来配制所述组合物。

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

在洗涤剂组合物中，任何酶成分可以按相当于每升洗涤液 0.01-100 mg 酶蛋白，优选每升洗涤液 0.05-5 mg 酶蛋白，特别是每升洗涤液 0.1-1 mg 酶蛋白的量添加。

在洗涤剂组合物中，具有增强纤维素分解的活性的多肽可以按相当于每升洗洗涤液 0.001-100 mg 蛋白，优选 0.005-50 mg 蛋白，更优选 0.01-25 mg 蛋白，甚至更优选 0.05-10 mg 蛋白，最优选 0.05-5 mg 蛋白，并且甚至最优选 0.01-1 mg 蛋白的量添加。

还可以将具有增强纤维素分解的活性的本发明多肽并入 WO 97/07202 中

公开的洗涤剂制剂，该文件并入本文作为参考。

通过以下实施例进一步对本发明进行描述，但不应将其理解为对本发明范围的限制。

实施例

材料

作为缓冲液和底物使用的化学品是至少试剂等级的商业产品。

菌株

使用里氏木霉 RutC30 (ATCC 56765; Montenecourt and Eveleigh, 1979, *Adv. Chem. Ser.* 181: 289-301)作为编码家族 61 多肽的里氏木霉基因的来源，所述家族 61 多肽具有增强纤维素分解的活性。使用米曲霉 JaL250 菌株(WO 99/61651)来表达具有增强纤维素分解的活性的里氏木霉家族 61 多肽。

培养基

PDA 平板由每升 39 克马铃薯葡糖琼脂组成。

MDU2BP 培养基由如下物质组成：每升 45 g 麦芽糖、1 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、1 g NaCl、2 g K_2SO_4、12 g KH_2PO_4、7 g 酵母提取物、2 g 尿素和 0.5 ml AMG 痕量金属溶液，pH 至 5.0。

AMG 痕量金属由如下物质组成：每升 14.3 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$、2.5 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$、0.5 g $NiCl_2 \cdot 6H_2O$、13.8 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$、8.5 g $MnSO_4 \cdot H_2O$ 和 3 g 柠檬酸。

LB 平板由如下物质组成：每升 10 g 胰蛋白胨、5 g 酵母提取物、5 g 氯化钠和 15 g 细菌用琼脂(Bacto Agar)。

SOC 培养基由如下物质组成：2%胰蛋白胨、0.5%酵母提取物、10 mM NaCl、2.5 mM KCl、10 mM $MgCl_2$ 和 10 mM $MgSO_4$；并且在高压灭菌之后添加过滤除菌的葡萄糖至 20 mM。

实施例 1：发酵和菌丝组织

将里氏木霉菌株 RutC30 培养在中试规模发酵罐中的含有复合碳源的生长培养基中。所述碳源包括葡萄糖、纤维素或经预处理并洗涤的玉米秸秆。

从 1 升样品中收集真菌菌丝，立即在液氮中冷冻并且贮藏在-80°C。

从 U.S. Department of Energy National Renewable Energy Laboratory (NREL)获得经预处理的玉米秸秆(PCS)。PCS 中水不溶性的固体是 56.5%纤维素、4.6%半纤维素和 28.4%木质素。预处理条件是玉米秸秆，1.4% (重量/体积)硫酸，165°C，107 psi，持续 8 分钟。在测试之前，用大体积的蒸馏去离子水在玻璃滤器上洗涤 PCS。其后使用咖啡研磨机研磨 PCS 以降低颗粒大小，并且进一步用水在 22 μm Millipore 滤膜上(6P Express Membrane, Stericup, Millipore, Billerica, MA)洗涤。将洗涤的 PCS 重悬在去离子水中以获得 20 mg/ml 悬液，并且在 4°C 贮藏。

实施例 2: 里氏木霉定向(directional) cDNA 文库构建

通过用硫氰酸胍提取，其后通过 5.7 M CsCl 垫(cushion)超速离心(Chirgwin *et al*., 1979, *Biochemistry* 18: 5294-5299)，采用以下修改从实施例 1 中描述的里氏木霉菌丝样品制备总 RNA。用研钵和研杵将冷冻的菌丝体在液氮中研磨成细粉末，之后在预冷的咖啡研磨机中研磨，并且立即悬浮在 5 体积的 RNA 提取缓冲液(4 M 硫氰酸胍、0.5%月桂酰肌氨酸钠、25 mM 柠檬酸钠 pH 7.0、0.1 M ß-巯基乙醇)中。在室温将所述混合物搅拌 30 分钟并且离心(在 12,000 *x g* 20 分钟)以使细胞碎片形成沉淀(pellet)。收集上清并且小心地铺至 5.7 M CsCl 垫(5.7 M CsCl，10 mM EDTA，pH 7.5，0.1%焦碳酸二乙酯(DEPC)；使用之前经高压灭菌)上，每 12.0 ml CsCl 垫使用 26.5 ml 上清，并且离心以获得总 RNA (Beckman SW 28 转子，25,000 rpm，室温，24 小时)。离心之后将上清小心地去除并且将含有 RNA 沉淀的试管底部切下并且用 70%乙醇漂洗。将总 RNA 沉淀转移至 Eppendorf 管，在 500 μl TE (10 mM Tris-0.1 mM EDTA)，pH 7.6 中悬浮(如有困难，不时地在 65°C 加热 5 分钟)，酚提取，并且在-20°C 用乙醇沉淀 12 小时(2.5 体积乙醇，0.1 体积 3M 乙酸钠 pH 5.2)。通过离心(在 12,000 *x g* 30 分钟)收集 RNA，在 70%乙醇中洗涤，并且在最少体积的 DEPC 处理的水中重悬。通过测量在 260 nm 的吸光度来测定总 RNA 浓度。

通过寡(dT)-纤维素亲和色谱法来分离多聚$(A)^+$RNA (Aviv & Leder, 1972, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 69: 1408-1412)。将全部 0.2 g 寡(dT)纤维素(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)在 10 ml 1X 柱加样

缓冲液(20 mM Tris-Cl, pH 7.6, 0.5 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.1%SDS)中预先溶胀(pre-swell)，加样至 DEPC 预处理的、填充的(plugged)塑料柱(Poly Prep Chromatography Column, BioRad, Hercules, CA)上，并且用 20 ml 1X 加样缓冲液平衡。将总 RNA (1-2 mg)在 65°C 加热 8 分钟，在冰上冷激(quench) 5 分钟，在添加 1 体积 2X 柱加样缓冲液之后将所述总 RNA 加样至该柱。收集洗脱液，并如上所述通过来加热样品且在每次加样之前在冰上冷激来重加样 2-3 次。将寡(dT)柱用 10 体积 1X 加样缓冲液洗涤，其后用 3 体积培养基盐缓冲液(20 mM Tris-Cl，pH 7.6，0.1 M NaCl，1 mM EDTA，0.1% SDS)洗涤，接着用预热至 65°C 的 3 体积的洗脱缓冲液(10 mM Tris-Cl pH 7.6，1 mM EDTA，0.05% SDS)洗脱多聚$(A)^+$ RNA，收集 500 μl 级分。读取每个收集的级分在 260 nm 的吸光度，再汇集含有 mRNA 的级分并且在-20°C 乙醇沉淀 12 小时。通过离心收集多聚$(A)^+$ RNA，在 DEPC 处理的水中重悬，并且以 5-10 μg 的等分试样贮藏在-80°C。

通过RNase H方法(Gubler and Hoffman 1983, *Gene* 25: 263-270; Sambrook *et al.*, 1989, *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)使用发夹修饰由 5 μg 里氏木霉 RutC30 多聚$(A)^+$ RNA 合成双链 *Eco* RI-*Not* I-定向的 cDNA。在预硅化的、不含 RNA 酶的 Eppendorf 管中在 70°C 将所述多聚$(A)^+$ RNA (5 μg，于 5 μl DEPC 处理的水中)加热 8 分钟，在冰上冷激，并且与逆转录酶缓冲液(50 mM Tris-Cl pH 8.3、75 mM KCl、3 mM $MgCl_2$、10 mM DTT)组合于终体积 50 μl，所述逆转录酶缓冲液含有 1 mM dATP、dGTP 和 dTTP，0.5 mM 5-甲基-dCTP，40 单位人胎盘核糖核酸酶抑制剂(Promega, Madison, WI)，4.81 μg 寡$(dT)_{18}$-*Not* I 引物和 1000 单位 SuperScript II RNase H – 逆转录酶(Life Technologies, Inc., Rockville, MD)。通过将所述反应混合物在 45°C 温育 1 小时来合成第一链 cDNA。合成之后，根据制造商的说明书通过 MicroSpin S-400 HR 离心柱(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)将 mRNA:cDNA 杂交混合物凝胶过滤。

凝胶过滤之后，将杂交体在 250 μl 第二链缓冲液(20 mM Tris-Cl pH 7.4，90 mM KCl, 4.6 mM $MgCl_2$，10 mM $(NH_4)_2SO_4$，0.16 mM NAD^+)中稀释，所述缓冲液含有 dNTP 各 200 μM，60 单位大肠杆菌 DNA 聚合酶 I (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)，5.25 单位 RNase H 和 15 单位大肠杆菌 DNA 连接酶(New England Biolabs, Inc., Beverly, MA)。通过将反应试管在 16°C 温育 2

小时，并且在 25°C 温育额外的 15 分钟来进行第二链 cDNA 合成。通过添加 EDTA 至 20 mM 终浓度来终止反应，之后是酚和氯仿提取。

通过添加 2 体积 96%乙醇和 0.2 体积 10 M 乙酸铵将双链 cDNA 在-20°C 乙醇沉淀 12 小时，通过离心回收，在 70%乙醇中洗涤，干燥(SpeedVac)，并且在含有 25 单位绿豆核酸酶的 30 μl 绿豆核酸酶缓冲液(30 mM 乙酸钠 pH 4.6，300 mM NaCl，1 mM $ZnSO_4$，0.35 mM 二硫苏糖醇，2%甘油)中重悬。通过在 30°C 将所述反应温育 30 分钟使单链发夹 DNA 夹合(clip)，其后添加 70 μl 10 mM Tris-Cl pH 7.5、1 mM EDTA，酚提取，并且用 2 体积 96%乙醇和 0.1 体积 3 M 乙酸钠 pH 5.2 在冰上乙醇沉淀 30 分钟。

通过离心(30,000 x *g* 持续 30 分钟)回收双链 cDNA，并且通过将反应混合物在 16°C 温育 1 小时用 30 μl T4 DNA 聚合酶缓冲液(20 mM Tris-乙酸 pH 7.9，10 mM 乙酸镁，50 mM 乙酸钾，1 mM 二硫苏糖醇)中的 T4 DNA 聚合酶来平端化，所述缓冲液含有 0.5 mM 的每种 dNTP 和 5 单位 T4 DNA 聚合酶。通过添加 EDTA 至 20 mM 终浓度来终止反应，其后是酚和氯仿提取，并且通过添加 2 体积 96%乙醇和 0.1 体积 3 M 乙酸钠 pH 5.2 在-20°C 乙醇沉淀 12 小时。

在补平反应(fill-in reaction)之后，如上通过离心回收 cDNA，在 70%乙醇中洗涤，并且在 SpeedVac 中干燥 DNA 沉淀。通过将反应混合物在 16°C 温育 12 小时，在 25 μl 连接缓冲液(30 mM Tris-Cl pH 7.8，10 mM $MgCl_2$，10 mM 二硫苏糖醇，0.5 mM ATP)中重悬 cDNA 粒状沉淀，所述缓冲液含有 2 μg *Eco* RI 衔接头(adaptor) (0.2 μg/μl, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)和 20 单位 T4 连接酶(Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN)。通过在 65°C 加热 20 分钟来终止反应，其后置于冰上 5 分钟。通过添加 20 μl 高压灭菌水、5 μl 10X *Not* I 限制酶缓冲液和 50 单位 *Not* I，其后在 37°C 温育 3 小时，从而用 *Not* I 消化衔接的 cDNA。通过将样品在 65°C 加热 15 分钟来终止反应。通过在 44 mM Tris Base、44 mM 硼酸、0.5 mM EDTA (TBE)缓冲液(在高压灭菌水中)中 0.8% SeaPlaque GTG 低熔点琼脂糖凝胶(FMC, Rockland, ME)上的琼脂糖凝胶电泳将 cDNA 大小分级，从而分离未连接的衔接头和小 cDNA。将凝胶在 15 V 运行 12 小时，并且通过切割琼脂糖凝胶的靠下部分以 0.7 kb 为限选择 cDNA 的大小。其后将 1.5%琼脂糖凝胶倾倒在含有 cDNA 的凝胶之前，并且通过反向跑胶直至其作为压缩的带出现在凝胶上来浓缩双链 cDNA。将含有 cDNA 的凝胶片从凝胶上切下，并且使用 GFX Gel Band Purification Kit

(Amersham, Arlington Heights, IL)从凝胶如下提取 cDNA。在 2 ml 不含核酸酶的微量离心管(ISC BioExpress, Kaysville, UT)中称量修剪的凝胶切片。其后向每 10 mg 凝胶切片添加 10 ml Capture Buffer (Amersham, Arlington Heights, IL)。通过在 60ºC 温育 10 分钟来溶解凝胶切片，直至琼脂糖完全溶解，其后通过短暂的离心(2 分钟，于 8,000 x *g*)使样品形成沉淀。将熔化的样品转移至置于收集管中的 GFX 离心柱，在 25ºC 温育 1 分钟，其后在微量离心机中以最高速(15,000 x *g*)离心 30 秒。弃去流出液(flow-through)，并且用 500 μl 洗涤缓冲液(GFX Gel Band Purification Kit, Amersham, Arlington Heights, IL)洗涤该柱，然后以最高速离心 30 秒。弃去收集管，并且将柱置于 1.5 ml Eppendorf 管中，其后通过向柱的中央添加 50 μl TE pH 7.5，在 25°C 温育 1 分钟，并且最终通过在最高速(15,000 x *g*)离心 1 分钟来洗脱 cDNA。将洗脱的 cDNA 贮藏在-20ºC 直至文库构建。

根据制造商的说明书(QIAGEN, Valencia, CA)使用 QIAGEN Tip-100 来纯化含有 *Eco* RI-*Not* I 插入物的 pYES2.0 cDNA 克隆的质粒 DNA 制备物。通过添加用于 *Eco* RI 的 6 μl 10X NEBuffer (New England Biolabs, Beverly, MA)、40 单位 *Not* I 和 20 单位 *Eco* RI，其后在 37°C 温育 6 小时，从而在总体积 60 μl 中用 *Not* I 和 *Eco* RI 完全消化全部 10 μg 纯化的质粒 DNA。通过将样品在 65°C 加热 20 分钟来终止反应。将消化的质粒 DNA 用酚-氯仿提取一次，然后用氯仿提取，其后通过添加 2 体积 96%乙醇和 0.1 体积 3 M 乙酸钠 pH 5.2 在-20°C 乙醇沉淀 12 小时。将沉淀的 DNA 在 25 μl TE pH 7.5 中重悬，加样至 TBE 缓冲液中的 0.8% SeaKem 琼脂糖凝胶上，并且在 60 V 运行 3 小时。将消化的载体从凝胶切下，并且根据制造商的说明书使用 GFX Gel Band Purification Kit 从该凝胶提取 DNA。通过在 260 nm 的吸光度测量 DNA 浓度之后，将洗脱的载体贮藏在-20ºC 直至文库构建。

为了建立用于 cDNA 文库的最优连接条件，在 10 μl 连接缓冲液(30 mM Tris-Cl pH 7.8、10 mM $MgCl_2$、10 mM DTT、0.5 mM ATP)中进行了四个测试连接，所述连接缓冲液含有 7 μl 双链 cDNA (对应于 cDNA 样品中总体积的大约 1/10)、2 单位 T4 连接酶和分别为 25 ng、50 ng 和 75 ng 的 *Eco* RI-*Not* I 切割的 pYES2.0 载体(Invitrogen, Carlsbad, CA)。载体背景对照连接反应含有 75 ng *Eco* RI-*Not* I 切割的 pYES.0 载体，而不含 cDNA。通过在 16°C 温育 12 小时来进行连接反应，在 65°C 加热 20 分钟，其后向每个试管添加 10 μl 高压灭

菌的水。将 1 μl 连接混合物电穿孔(200 W，2.5 kV，25 mF)至 40 μl 电感受态大肠杆菌 DH10B 细胞(Life Technologies, Gaithersburg, MD)。在向每个转化混合物添加 1 ml SOC 培养基(Birren *et al.*, 1998. *Genome Analysis, Vol. 2. Detecting Genes*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)之后，在 37°C 培养细胞 1 小时。其后将来自每个电穿孔的 50 μl 和 5 μl 涂布至补充有 100 μg/ml 氨苄青霉素的 LB 平板上，并且在 37°C 培养 12 小时。使用最优条件，在大肠杆菌中建立了含有 1-2.5x10^7个独立集落形成单位的里氏木霉 RutC30 cDNA 文库，载体背景为大约 1%。将该 cDNA 文库贮藏为：(1)在-80°C 在 20%甘油中的独立库(individual pool) (25,000 c.f.u./库); (2)在-20°C，相同的库的细胞沉淀；(3)在-20°C，来自独立库的 QIAGEN Tip 100 纯化的质粒 DNA；和(4)在-20°C，定向的双链 cDNA。

实施例 3：里氏木霉 EST 模板制备

根据制造商提供的说明书使用 96 孔多重质粒制备系统(96-well manifold plasmid preparation system (QIAGEN, Valencia, CA))来纯化来自独立大肠杆菌菌落的质粒 DNA，所述菌落来自实施例 2 中描述的 cDNA 文库。

实施例 4：分析 cDNA 克隆的 DNA 序列数据

在 PHRED/PHRAP 软件(University of Washington, Seattle, WA)的辅助下进行碱基判定(base calling)、质量值指定(quality value assignment)和载体修整(vector trimming)。用 Blastx 程序(Altschul *et. al.*,1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410)在 32 节点 Linux 簇(Paracel, Inc., Pasadena, CA)上使用 BLOSUM 62 矩阵(Henikoff, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915-10919)进行装配的 EST 序列相对于 PIR 数据库的序列同源性分析。

实施例 5：鉴定编码具有增强纤维素分解的活性的家族 61 多肽(GH61B)的 cDNA 克隆

起初通过 cDNA 克隆的翻译产物与公共数据库中存在的其它已知家族 61 多肽的相似性来鉴定编码具有增强纤维素分解的活性的家族 61 多肽(GH61B)的 cDNA 克隆。具体而言，这种分析说明预测的多肽与家族 61 的已知成员里氏木霉内切葡聚糖酶 IV (Saloheimo *et al.*, 1997, *Eur. J. Biochem.* 249: 584-591)

的核心域在蛋白质水平上是 50%同一的。在这种初始鉴定之后，从其原始冷冻原种平板上提取 EST 克隆并且划线接种至补充有 100 μg/ml 氨苄青霉素的 LB 平板上。将平板在 37°C 温育过夜，并且在次日将来自每个平板的单菌落用于接种补充有 100 μg/ml 氨苄青霉素的 3 ml LB。将液体培养物在 37°C 温育过夜，并且用 BioRobot 9600 (QIAGEN Inc., Valencia, CA)制备质粒 DNA。将来自每个 EST 克隆的质粒 DNA 再次用 Big-Dye™终止化学(Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA)测序，使用 M13 正向和下文所示的 Poly-T 引物来测序克隆的 3'端。

5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN-3' (SEQ ID NO: 3)

其中 V=G、A 或 C，而 N= G、A、C 或 T

选择一个克隆用于核苷酸序列分析，该克隆是命名为 pTr3337 的里氏木霉 EST Tr3337。

实施例 6: 表征编码具有增强纤维素分解的活性的多肽的里氏木霉 cDNA 克隆

设计了下文所示的三个新引物来从 EST pTr3337 (图 2)延伸序列信息。

5'-TGTCCATGGCCGAGA-3' (SEQ ID NO: 4)

5'-ATACTGGTCACTTCCCCAA-3' (SEQ ID NO: 5)

5'-GCGCTGGGTCAAGATT-3' (SEQ ID NO: 6)

在 Perkin-Elmer Biosystems Model 377 XL Automated DNA Sequencer 上使用染料-终止化学来进行 DNA 测序(Giesecke *et al.*, 1992, *Journal of Virology Methods* 38: 47-60)。测序 1.17 kb cDNA 片段的 Phred 质量值为 36。

里氏木霉 GH61B cDNA 克隆编码区的核苷酸序列(SEQ ID NO: 1)和推定的氨基酸序列(SEQ ID NO: 2)示于图 1。编码序列包括终止密码子为 750 bp。编码的预测蛋白质为 249 个氨基酸。编码区为 56.8% G+C。使用 SignalP 程序(Nielsen *et al.*, 1997, *Protein Engineering* 10: 1-6)，预测了 19 个残基的信号肽。预测的成熟蛋白含有 230 个氨基酸，分子量为 25.1 kDa，且等电点(pI)为 7.36。

使用 Interproscan 程序(Zdobnov and Apweiler, 2001, *Bioinformatics* 17: 847-8)分析成熟肽显示: 由克隆 Tr3337 编码的基因含有糖基水解酶家族 61 蛋白的序列特征(sequence signature)。这种被称为 Pfam 模式 PF03443 的序列特征(Bateman *et. al.*, 2004, *Nucleic Acids Research* 32: 138-141)位于残基 20 至

241，这确认克隆 Tr3337 编码里氏木霉家族 61 基因。

使用如 EMBOSS 的 Needle 程序中执行的 Needleman-Wunsch 算法(Needleman and Wunsch, 1970, *supra*)及缺口开启罚分 10，缺口延伸罚分 0.5，和 EBLOSUM62 矩阵来测定氨基酸序列的比较配对全局比对。比对显示所述里氏木霉基因(其编码具有增强纤维素分解的活性的 GH61B 成熟多肽)的推定氨基酸序列与源自里氏木霉(GeneSeP ADH34517)和球毛壳(*Chaetomium globosum*) (UniProt Q2GPR1)的两种糖基水解酶家族 61 蛋白的推定氨基酸序列分别具有 100%和 62%同一性(不包括缺口)。

将含有质粒 pTr3337 的大肠杆菌菌株以 NRRL B-30878 保藏在农业研究机构专利培养我保藏中心，北方区研究中心(1815 University Street, Peoria, Illinois, 61604)，保藏日期为 2005 年 9 月 20 日。

实施例 7：构建用于里氏木霉家族 GH61B 基因的米曲霉表达载体

设计了下文所示的两个合成寡核苷酸引物以从所述 cDNA 克隆来 PCR 扩增里氏木霉家族 GH61B 基因。使用 InFusion Cloning Kit (BD Biosciences, Palo Alto, CA)将所述片段直接克隆至表达载体 pAILo2 (WO 2005/074647)中，不需要限制性消化和连接。

正向引物:

5'-ACTGGATTTACC**ATGAAGTCCTGCGCCATTCTTGC**-3' (SEQ ID NO: 7)

反向引物:

5'-AGTCACCTCTAGT**TAGCCTTGCCACAGGGCTGG**-3' (SEQ ID NO: 8)

粗体字母表示编码序列。剩余序列与 pAlLo2 的插入位点同源。

将上述每种引物各 50 皮摩尔用于 PCR 反应，所述反应含有 100 ng 里氏木霉 cDNA 克隆(如实施例 5 中所述制备)，1X Pfx Amplification Buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA)，6 μl 10 mM dATP、dTTP、dGTP 和 dCTP 的混合物，2.5 单位 Platinum *Pfx* DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA)，1 μl 50 mM $MgSO_4$ 和 5 μl 10X pCRx Enhancer Solution (Invitrogen, Carlsbad, CA)，终体积为 50 μl。扩增条件是在 94°C 2 分钟的一个循环；和在 94°C 15 秒、55°C 30 秒和 68°C 3 分钟的 30 个循环。其后加热块进行 4°C 保温循环(soak cycle)。

将反应产物在 1.0%琼脂糖凝胶上分离，使用 40 mM Tris 碱-20 mM 乙酸钠-1 mM EDTA 二钠(TAE)缓冲液，其中将 3 kb 产物条带从该凝胶切下并且根据制造商的说明书使用 QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA)进行纯化。

其后使用 InFusion Cloning Kit 将片段克隆至 pAlLo2 中。用 *Nco* I 和 *Pac* I 消化载体(使用制造商指定的条件)。通过凝胶电泳和 QIAquick 凝胶纯化来纯化片段。将基因片段和消化的载体在反应中组合在一起，产生表达质粒 pTr61B (图 3)，其中家族 GH61B 基因的转录在 NA2-tpi 启动子(来自黑曲霉中性 α-淀粉酶基因和米曲霉丙糖磷酸异构酶基因的启动子的杂合体)的调控下。重组反应(20 μl)由 1X InFusion Buffer (BD Biosciences, Palo Alto, CA)、1X BSA (BD Biosciences, Palo Alto, CA)、1 μl InFusion 酶(以 1:10 稀释) (BD Biosciences, Palo Alto, CA)、100 ng 用 *Nco* I 和 *Pac* I 消化的 pAlLo2 和 100 ng 里氏木霉 GH61B 纯化 PCR 产物组成。将反应在室温温育 30 分钟。使用 1 μl 所述反应来转化大肠杆菌 XL10 Solopac Gold 细胞(Stratagene, La Jolla, CA)。通过限制酶消化来鉴定含有 pTr61B (GH61B 基因)的大肠杆菌转化体，并且使用 QIAGEN BioRobot 9600 来制备质粒 DNA。

实施例 8: 在米曲霉 JaL250 中表达编码具有增强纤维素分解的活性的家族 GH61B 多肽的里氏木霉 cDNA

根据 Christensen *et al.*, 1988, *Bio/Technology* 6: 1419-1422 的方法来制备米曲霉 JaL250 原生质体。使用 5 μg pTr61B (以及 pAlLo2 作为载体对照)来转化米曲霉 JaL250。

用 pTr61B (GH61B 基因)转化米曲霉 JaL250 产生了大约 70 个转化体。将 10 个转化体分离至单独的 PDA 平板。

用 5 ml 0.01% Tween 80 洗涤全部转化体的铺满的(confluent) PDA 平板，并将其分开接种至 125 ml 玻璃摇瓶中的 25 ml MDU2BP 培养基中并且在 34°C、200 rpm 温育。温育 5 天之后，根据制造商的说明书使用 8-16% Tris-Glycine SDS-PAGE 凝胶(Invitrogen, Carlsbad, CA)来分析来自每个培养物的 5 μl 上清。培养物的 SDS-PAGE 分布(profile)显示了几个转化体具有大约 25 kDa 的新的主条带。

用 10 ml 0.01% Tween 20 洗涤一个转化体(在 PDA 上培养)的铺满平板并

将其接种至含有 500 ml MDU2BP 培养基的 2 升 Fernbach 中，以产生用于表征酶的培养液。在第五天收获摇瓶并且使用 0.22 μm GP Express plus Membrane (Millipore, Bedford, MA)过滤。

实施例 9: 里氏木霉 GH61B 对使用表达米曲霉 β-葡糖苷酶的里氏木霉发酵液水解经预处理的玉米秸秆的影响

在水解实验之前，将里氏木霉 GH61B (如实施例 8 中所述在米曲霉中重组产生)脱盐，并且使用带有 Biomax-5 膜(5000 NMWL; Millipore, Bedford, MA)的 Centricon Plus-20 离心滤器交换至 50 mM 乙酸钠 pH 5.0。如 WO 2005/074647 中所述制备表达米曲霉 β-葡糖苷酶的不含细胞的里氏木霉发酵液，将该发酵液用于不脱盐并且不交换缓冲液的水解试验。

在各试验之前，从贮藏在-20°C 的酶母液制备新鲜的酶稀释液。

使用对羟基苯甲酸酰肼(PHBAH)试验(Lever, M., 1972, A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates, *Anal. Biochem.* 47: 273-279)来测定还原糖(RS)，对该方法进行修饰并且使其适合于 96 孔微量培养板形式。

将稀释样品的 90 μl 等分试样置于 96 孔圆锥形底面微量培养板(Corning Inc., Acton, MA, Costar, clear polycarbonate)的每个孔中。通过向每个孔中添加 60 μl 2%氢氧化钠中的 1.25% PHBAH 来起始试验。将不加盖的平板在订制的加热块上在 95°C 加热 10 分钟。将微量培养板冷却至室温之后，向每个孔中添加 35 μl 去离子水。从每个孔中去除 100 μl 等分试验并且转移至平底 96 孔板(Corning Inc., Acton, MA, Costar, medium binding polystyrene)。使用 SpectraMAX Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)测量在 410 nm 的吸光度(A_{410})。使用标准曲线将 A_{410} 值转化为葡萄糖当量。

使用六个葡萄糖标准品(0.005、0.010、0.025、0.050、0.075 和 0.100 mg/ml)获得标准曲线，对所述标准品进行类似于样品的处理。通过用去离子水稀释 10 mg/ml 葡萄糖母液来制备葡萄糖标准品。

使用以下等式计算纤维素转化成还原糖的程度(转化率，%):

$$转化率_{(\%)} = RS_{(mg/ml)} * 100 * 162 / (纤维素_{(mg/ml)} * 180) =$$

$$= RS_{(mg/ml)} * 100 / (纤维素_{(mg/ml)} * 1.111)$$

在该等式中，RS 是溶液中以葡萄糖当量测量的还原糖浓度(mg/ml)，而因子 1.111 反映在纤维素转化成葡萄糖时的重量增加。

通过表达米曲霉 β-葡糖苷酶的不含细胞的里氏木霉发酵液水解磨碎的PCS (以干重为基础 1%重量/体积)，所述水解在盖有 Deepwell Mats 96 (Brinkmann, Westbury, NY)的 Deepwell Plates 96 (1.2 ml, Brinkmann, Westbury, NY)中进行。将初始体积为 1 ml 的全部反应在 50 mM 乙酸钠 pH 5.0 中进行，在 50°C 间歇搅拌。

对含有每克 PCS 2.5 mg 的里氏木霉发酵液的时程(time-course)反应，补充以每克 PCS 0.625 mg 的里氏木霉 GH61B (如本文所述在米曲霉中重组产生)(纤维素酶蛋白加样量的 25%)，并且将结果与每克 PCS 2.5 和 3.125 mg 的未补充的里氏木霉培养液的结果比较，或与仅含有每克 PCS 2.5 mg 里氏木霉 GH61B 蛋白的结果比较。

对含有每克 PCS 2.5 mg 里氏木霉发酵液的蛋白加样反应，补充以每克 PCS 0.2、0.4、0.6 或 1.2 mg 的里氏木霉 GH61B 蛋白(如本文所述在米曲霉中重组产生)，并且温育 115 小时。将结果与每克 PCS 2.5 和 3.5 mg 未补充的里氏木霉培养液的结果比较。

使用 8 通道移液器在特定时间点从 PCS 水解反应中移出 20 μl 等分试样，并且将等分试样添加至 MultiScreen HV 96 孔过滤平板(Millipore, Bedford, MA)中的 180 μl 碱性混合物(102 mM Na_2CO_3 和 58 mM $NaHCO_3$)以终止反应。将样品真空过滤至另一个平底微量培养板以去除 PCS 残余物。适当稀释之后，使用下文所述 PHBAH 试验分析滤出液的 RS。

示于图 4 的结果说明了向表达米曲霉 β-葡糖苷酶的里氏木霉发酵液补充里氏木霉 GH61B 蛋白在全部采样时间点改进了水解产率。与相同蛋白加样量的单独里氏木霉发酵液相比观察到更大的改进。所述改进不能以仅通过 GH61B 多肽的水解来解释，因为其即使在每克 PCS 2.5 mg 这种高得多的蛋白质加样量下在 115 小时处总计仅有 1.2%。

图 5 中所示的结果说明在 GH61B 多肽一定范围的蛋白加样量内观察到提高，最大提高在蛋白加样量为里氏木霉发酵液蛋白加样量的大约 16%处。

生物材料的保藏

依据布达佩斯条约的条款，下述的生物材料已经保藏于农业研究机构专利培养物保藏中心，北区研究中心，1815 University Street, Peoria, Illinois, 61604，并给出了下述的登录号:

保藏物	登录号	保藏日期
大肠杆菌菌株 pTr3337	NRRL B-30878	2005 年 9 月 20 日

该菌株于下述条件下保藏：确保在本专利申请未决期间，由专利与商标委员依据 37 C. F. R. §1.14 和 35 U. S. C. §122 授权的人能够获得该培养物。该保藏物为所保藏菌株的基本上纯的培养物。在提交了该申请的副本，或其后续文本的国家，依据该外国专利法律的要求，可以获得该保藏物。然而，应当理解，保藏物的获得并不构成对实施本发明的许可，实施本发明是对政府行为所授予的专利权的侵犯。

此处，本文中所描述和要求保护的本发明在范围上并非限定于本文所公开的具体方面，因为这些方面意欲作为本发明几个方面的说明。任何等价的方面意欲在本发明的范围之内。事实上，从前面的说明中，对于本领域技术人员来说，除本文所显示和描述的之外，本发明的多种修改将是显而易见的。这些修改也意欲落入所附的权利要求的范围内。在冲突的情况下，将以包括定义部分的本公开为准。

本文引用了多篇参考文献，将其公开的全部内容并入作为参考。

<110> 诺维信股份有限公司(Novozymes, Inc.)

<120> 用于增强纤维素材料降解或转化的方法

<130> 10825.204-WO

<150> 60/722,579
<151> 2006-09-30

<160> 8

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
<211> 1172
<212> DNA
<213> 里氏木霉(Trichoderma reesei)

<400> 1
ggatctaagc cccatcgata tgaagtcctg cgccattctt gcagcccttg gctgtcttgc 60

cgggagcgtt ctcggccatg gacaagtcca aaacttcacg atcaatggac aatacaatca 120

gggtttcatt ctcgattact actatcagaa gcagaatact ggtcacttcc ccaacgttgc 180

tggctggtac gccgaggacc tagacctggg cttcatctcc cctgaccaat acaccacgcc 240

cgacattgtc tgtcacaaga acgcggcccc aggtgccatt tctgccactg cagcggccgg 300

cagcaacatc gtcttccaat ggggccctgg cgtctggcct cacccctacg gtcccatcgt 360

tacctacgtg gctgagtgca gcggatcgtg cacgaccgtg aacaagaaca acctgcgctg 420

ggtcaagatt caggaggccg gcatcaacta taacacccaa gtctgggcgc agcaggatct 480

gatcaaccag ggcaacaagt ggactgtgaa gatcccgtcg agcctcaggc ccggaaacta 540

tgtcttccgc catgaacttc ttgctgccca tggtgcctct agtgcgaacg gcatgcagaa 600

ctatcctcag tgcgtgaaca tcgccgtcac aggctcgggc acgaaagcgc tccctgccgg 660

aactcctgca actcagctct acaagcccac tgaccctggc atcttgttca acccttacac 720

aacaatcacg agctacacca tccctggccc agccctgtgg caaggctaga tccaggggta 780

cggtgttggc gttcgtgaag tcggagctgt tgacaaggat atctgatgat gaacggagag 840

gactgatggg cgtgactgag tgtatatatt tttgatgacc aaattgtata cgaaatccga 900

acgcatggtg atcattgttt atccctgtag tatattgtct ccaggctgct aagagcccac 960

cgggtgtatt acggcaacaa agtcaggaat ttgggtggca atgaacgcag gtctccatga 1020

atgtatatgt gaagaggcat cggctggcat gggcattacc agatataggc cctgtgaaac 1080

atatagtact tgaacgtgct actggaacgg atcataagca agtcatcaac atgtgaaaaa 1140

acactacatg taaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 1172

<210> 2

<211> 249
<212> PRT
<213> 里氏木霉(Trichoderma reesei)

<400> 2

Met Lys Ser Cys Ala Ile Leu Ala Ala Leu Gly Cys Leu Ala Gly Ser
1 5 10 15

Val Leu Gly His Gly Gln Val Gln Asn Phe Thr Ile Asn Gly Gln Tyr
20 25 30

Asn Gln Gly Phe Ile Leu Asp Tyr Tyr Tyr Gln Lys Gln Asn Thr Gly
35 40 45

His Phe Pro Asn Val Ala Gly Trp Tyr Ala Glu Asp Leu Asp Leu Gly
50 55 60

Phe Ile Ser Pro Asp Gln Tyr Thr Thr Pro Asp Ile Val Cys His Lys
65 70 75 80

Asn Ala Ala Pro Gly Ala Ile Ser Ala Thr Ala Ala Ala Gly Ser Asn
85 90 95

Ile Val Phe Gln Trp Gly Pro Gly Val Trp Pro His Pro Tyr Gly Pro
100 105 110

Ile Val Thr Tyr Val Val Glu Cys Ser Gly Ser Cys Thr Thr Val Asn
115 120 125

Lys Asn Asn Leu Arg Trp Val Lys Ile Gln Glu Ala Gly Ile Asn Tyr
130 135 140

Asn Thr Gln Val Trp Ala Gln Gln Asp Leu Ile Asn Gln Gly Asn Lys
145 150 155 160

Trp Thr Val Lys Ile Pro Ser Ser Leu Arg Pro Gly Asn Tyr Val Phe
165 170 175

Arg His Glu Leu Leu Ala Ala His Gly Ala Ser Ser Ala Asn Gly Met
180 185 190

Gln Asn Tyr Pro Gln Cys Val Asn Ile Ala Val Thr Gly Ser Gly Thr
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Pro Ala Thr Gln Leu Tyr Lys Pro Thr
210 215 220

Asp Pro Gly Ile Leu Phe Asn Pro Tyr Thr Thr Ile Thr Ser Tyr Thr
225 230 235 240

Ile Pro Gly Pro Ala Leu Trp Gln Gly
245

<210> 3
<211> 25
<212> DNA
<213> 里氏木霉(Trichoderma reesei)

<220>
<221> misc_feature

<222> (24)..(24)
<223> V= G、A 或 C

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(25)
<223> N= A、C、G 或 T

<400> 3
tttttttttt tttttttttt tttvn 25

<210> 4
<211> 15
<212> DNA
<213> 里氏木霉(Trichoderma reesei)

<400> 4
tgtccatggc cgaga 15

<210> 5
<211> 19
<212> DNA
<213> 里氏木霉(Trichoderma reesei)

<400> 5
atactggtca cttccccaa 19

<210> 6
<211> 16
<212> DNA
<213> 里氏木霉(Trichoderma reesei)

<400> 6
gcgctgggtc aagatt 16

<210> 7
<211> 35
<212> DNA
<213> 里氏木霉(Trichoderma reesei)

<400> 7
actggattta ccatgaagtc ctgcgccatt cttgc 35

<210> 8
<211> 33
<212> DNA
<213> 里氏木霉(Trichoderma reesei)

<400> 8
agtcacctct agttagcctt gccacagggc tgg 33

GGATCTAAGCCCCATCGATATGAAGTCCTGCGCCATTCTTGCAGCCCTTGGCTGTCTTGCCGGGAGCGTTCTCGGCCATG
M K S C A I L A A L G C L A G S V L G H
GACAAGTCCAAAACTTCACGATCAATGGACAATACAATCAGGGTTTCATTCTCGATTACTACTATCAGAAGCAGAATACT
G Q V Q N F T I N G Q Y N Q G F I L D Y Y Y Q K Q N T
GGTCACTTCCCCAACGTTGCTGGCTGGTACGCCGAGGACCTAGACCTGGGCTTCATCTCCCCTGACCAATACACCACGCC
G H F P N V A G W Y A E D L D L G F I S P D Q Y T T P
CGACATTGTCTGTCACAAGAACGCGGCCCCAGGTGCCATTTCTGCCACTGCAGCGGCCGGCAGCAACATCGTCTTCCAAT
D I V C H K N A A P G A I S A T A A A G S N I V F Q
GGGGCCCTGGCGTCTGGCCTCACCCCTACGGTCCCATCGTTACCTACGTGGCTGAGTGCAGCGGATCGTGCACGACCGTG
W G P G V W P H P Y G P I V T Y V V E C S G S C T T V
AACAAGAACAACCTGCGCTGGGTCAAGATTCAGGAGGCCGGCATCAACTATAACACCCAAGTCTGGGCGCAGCAGGATCT
N K N N L R W V K I Q E A G I N Y N T Q V W A Q Q D L
GATCAACCAGGGCAACAAGTGGACTGTGAAGATCCCGTCGAGCCTCAGGCCCGGAAACTATGTCTTCCGCCATGAACTTC
I N Q G N K W T V K I P S S L R P G N Y V F R H E L
TTGCTGCCCATGGTGCCTCTAGTGCGAACGGCATGCAGAACTATCCTCAGTGCGTGAACATCGCCGTCACAGGCTCGGGC
L A A H G A S S A N G M Q N Y P Q C V N I A V T G S G
ACGAAAGCGCTCCCTGCCGGAACTCCTGCAACTCAGCTCTACAAGCCCACTGACCCTGGCATCTTGTTCAACCCTTACAC
T K A L P A G T P A T Q L Y K P T D P G I L F N P Y T
AACAATCACGAGCTACACCATCCCTGGCCCAGCCCTGTGGCAAGGCTAGATCCAGGGGTACGGTGTTGGCGTTCGTGAAG
T I T S Y T I P G P A L W Q G .
TCGGAGCTGTTGACAAGGATATCTGATGATGAACGGAGAGGACTGATGGGCGTGACTGAGTGTATATATTTTTGATGACC

AAATTGTATACGAAATCCGAACGCATGGTGATCATTGTTTATCCCTGTAGTATATTGTCTCCAGGCTGCTAAGAGCCCAC

CGGGTGTATTACGGCAACAAAGTCAGGAATTTGGGTGGCAATGAACGCAGGTCTCCATGAATGTATATGTGAAGAGGCAT

CGGCTGGCATGGGCATTACCAGATATAGGCCCTGTGAAACATATAGTACTTGAACGTGCTACTGGAACGGATCATAAGCA

AGTCATCAACATGTGAAAAAACACTACATGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

图 1

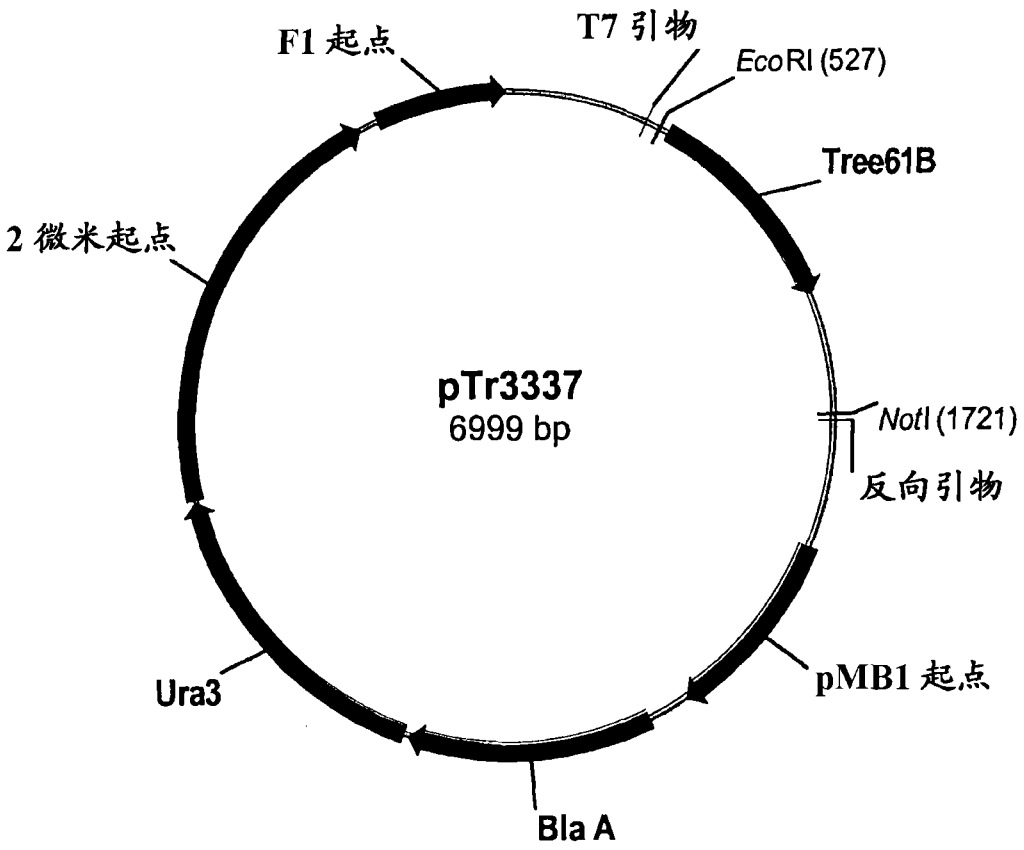
F1 起点
T7 引物
EcoRI (527)
Tree61B
2 微米起点
pTr3337
6999 bp
NotI (1721)
反向引物
pMB1 起点
Ura3
Bla A

图 2

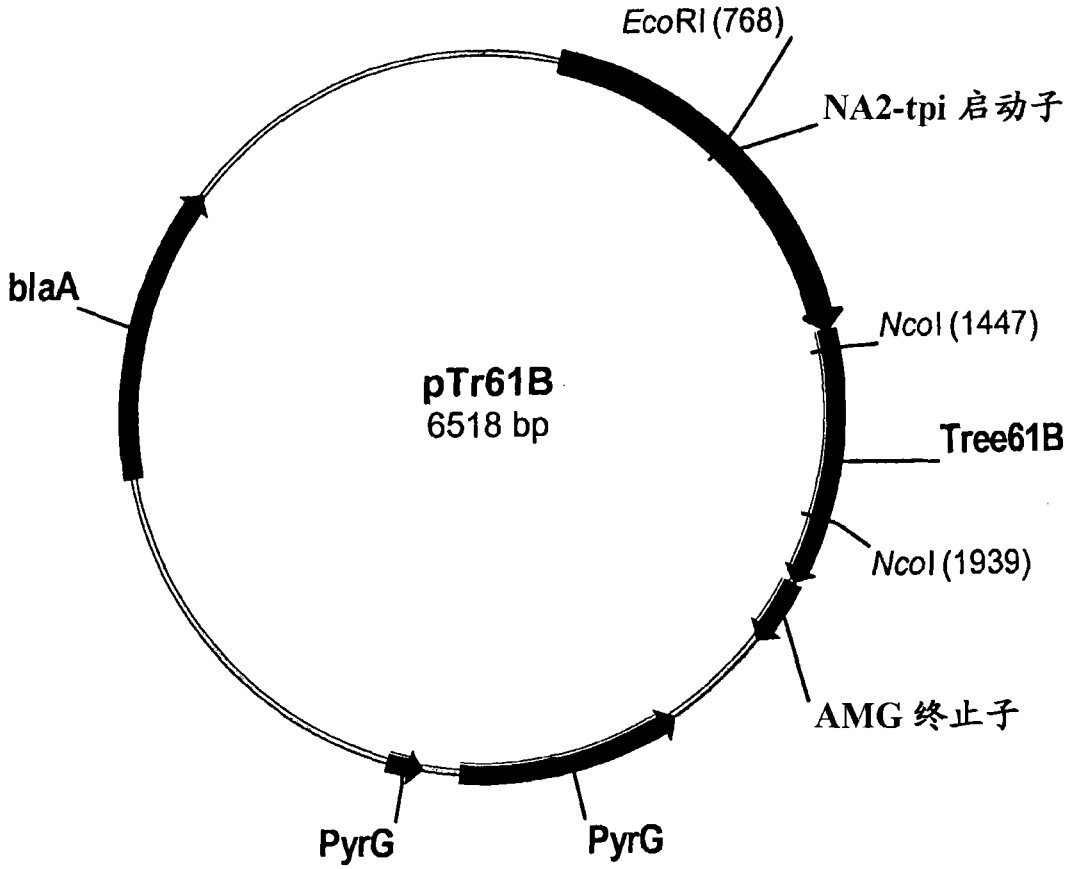
EcoRI (768)
NA2-tpi 启动子
blaA
NcoI (1447)
pTr61B
6518 bp
Tree61B
NcoI (1939)
AMG 终止子
PyrG
PyrG

图 3

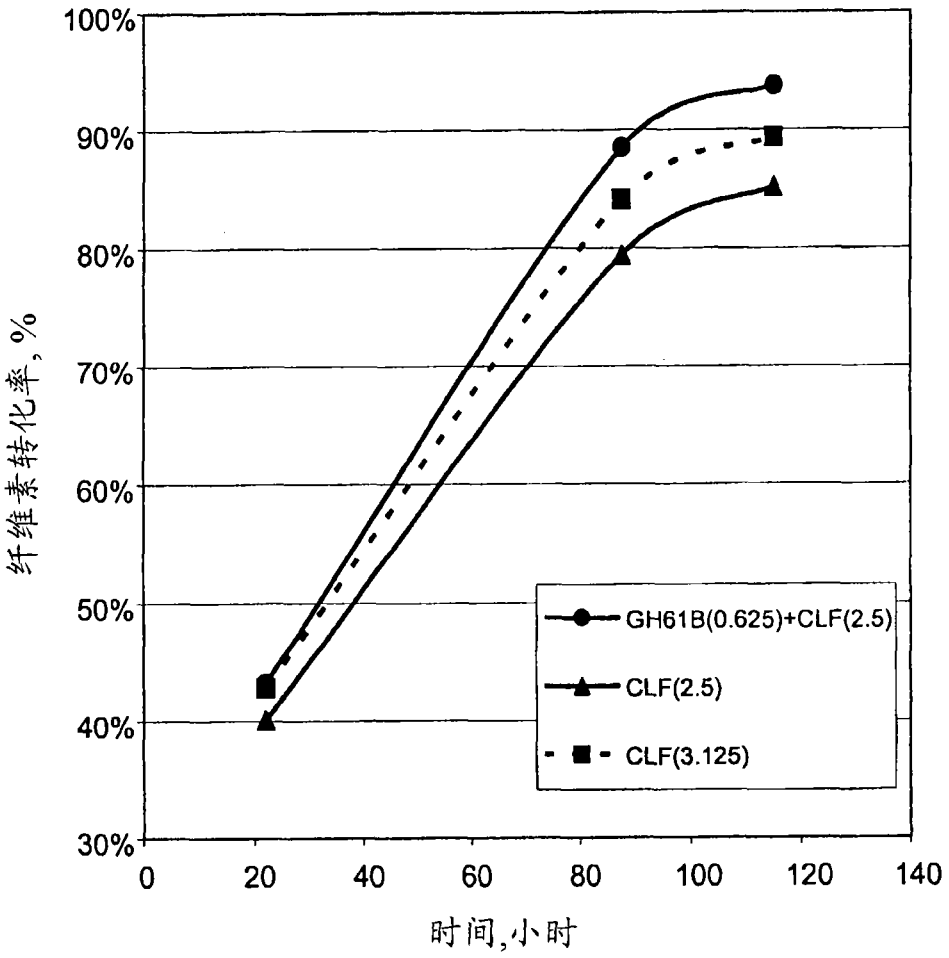
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
纤维素转化率,%
0
20
40
60
80
100
120
140
时间,小时
GH61B(0.625)+CLF(2.5)
CLF(2.5)
CLF(3.125)

图 4

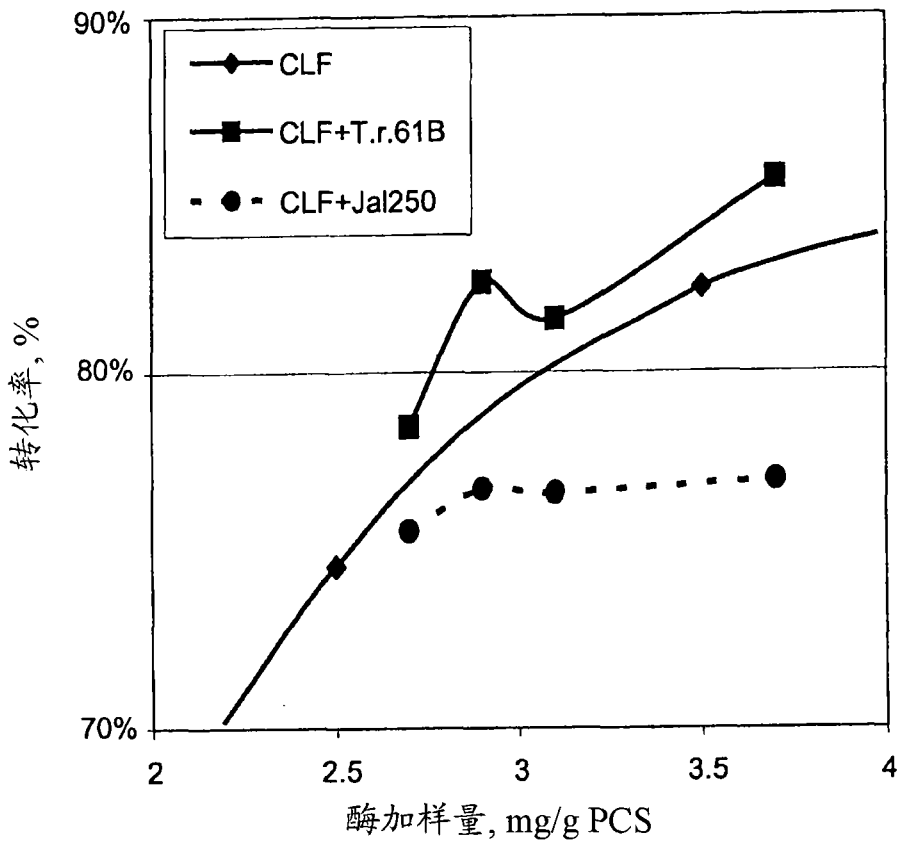

图 5