

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C12N 9/00

C11D 3/00



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02804689.7

[43] 公开日 2004 年 4 月 21 日

[11] 公开号 CN 1491278A

[22] 申请日 2002.2.7 [21] 申请号 02804689.7  
[30] 优先权  
[32] 2001.2.7 [33] DK [31] PA200100195  
[86] 国际申请 PCT/DK02/00084 2002.2.7  
[87] 国际公布 WO02/062973 英 2002.8.15  
[85] 进入国家阶段日期 2003.8.7  
[71] 申请人 诺维信公司  
地址 丹麦鲍斯韦  
[72] 发明人 西格尼·芒克 杰斯珀·文德  
金·博尔奇 沙姆坎特·A·帕特卡  
桑尼·O·S·格拉德  
阿伦·斯文德森

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所  
代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书 3 页 说明书 17 页 序列表 18 页

[54] 发明名称 脂酶变体

[57] 摘要

将肽的延伸物与脂酶 C-末端氨基酸相连可以降低形成气味的趋势。所产生的脂酶变体在洗涤由包含相对短链脂酰基团(例如高达 C8)的脂,例如包含乳脂肪或诸如椰子油和棕榈仁油的热带油的乳品污物污染的织物时,可减少气味生成。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种制备具有脂酶活性的多肽的方法，包括：
  - a) 制备至少一种具有氨基酸序列的多肽，包括：
    - 5 i) 具有脂酶活性的亲代多肽和
    - ii) 附着在亲代多肽 C-末端的多肽的延伸物
  - b) 选择具有脂酶活性的多肽，与亲代多肽相比该多肽具有：
    - 10 i) 对于短链和长链脂肪酰酯的活性之比较低，
    - ii) 中性和碱性 pH 情况下的脂酶活性之比较低，和/或
    - iii) 在具有该多肽的洗涤剂中洗涤有脂污物的织物样品时形成气味的倾向降低，
  - c) 产生所选的多肽。
2. 权利要求 1 的方法，其中亲代多肽具有的氨基酸序列与 SEQ ID NO:2 有至少 50% 的同一性。
- 15 3. 权利要求 1 或 2 的方法，其中肽的延伸物由 2-15 个尤其是 3-10 个氨基酸残基组成。
4. 权利要求 1-3 中的任何之一方法，其中肽的延伸物包含在位置 4, 5 或 6 的带正电荷的氨基酸残基。
5. 权利要求 1-4 中的任何之一方法，其中多肽是通过突变制备，使用  
20 编码亲代多肽的质粒和具有终止子的对应于 2-15 个氨基酸延伸物的寡核苷酸。
6. 具有脂酶活性和氨基酸序列的多肽，包括：
  - i) 具有脂酶活性的亲代多肽和
  - 25 ii) 肽的延伸物，包括附着在亲代多肽 C-末端的带正电荷的氨基酸残基，带负电荷的氨基酸残基或极性氨基酸残基。
7. 权利要求 6 的多肽，其中亲代多肽具有的氨基酸序列与 SEQ ID NO:2 有至少 50% 的同一性。
8. 权利要求 6 或 7 的多肽，其中与 SEQ ID NO:2 相比，亲代多肽包括  
30 在 E1 或 Q249 的 15Å 之内的三维结构表面带正电荷的氨基酸对电中性或带负电荷的氨基酸的取代。

9. 权利要求 6-8 中任意之一的多肽, 其中与 SEQ ID NO:2 相比, 亲代多肽包括在相应于 1-11, 90, 95, 169, 171-175, 192-211, 213-226, 228-258 或 260-252 的位置电中性或带负电荷的氨基酸的取代。
10. 权利要求 6-9 中任意之一的多肽, 其中与 SEQ ID NO:2 相比, 亲代多肽包括在 90-101 区域中带负电荷的氨基酸与相应于 E99K 的取代组合。
11. 权利要求 6-10 中任意之一的多肽, 其中亲代多肽包括在相应于 SEQ ID NO:2 的 E210 位置上的带负电荷的氨基酸。
12. 权利要求 6-11 中任意之一的多肽, 其中亲代多肽包括在相应于 SEQ ID NO:2 的 90-101 区域的带负电荷的氨基酸。
- 10 13. 权利要求 6-12 中任意之一的多肽, 其中亲代多肽包括在相应于 SEQ ID NO:2 的 N94 位置上的中性或带负电荷的氨基酸, 和/或在相应于 SEQ ID NO:2 的 90-101 区域具有负的或中性净电荷。
14. 权利要求 6-13 中任意之一的多肽, 其中肽的延伸物由 2-15 个尤其是 3-10 个氨基酸残基组成。
- 15 15. 权利要求 6-14 中任意之一的多肽, 其中肽的延伸物包括在位置 4, 5 或 6 的带正电荷的氨基酸残基。
16. 权利要求 6-15 中任意之一的多肽, 其中肽的延伸物是 HTPSSGRGGHR 或其截短形式(尤其是 HTPSSGRGG, HTPSSGR, HTPSS 或 HTP), KV, EST, LVY, RHT, SVF, SVT, TAD, TPA, AGVF 或 PGLPFKRV。
- 20 17. 一种洗涤剂组合物, 包括表面活性剂和权利要求 6-16 任一项的多肽。
18. 编码权利要求 6-16 中任一项的多肽的 DNA 序列。
19. 一种携带权利要求 18 的 DNA 序列的表达载体。
20. 一种转化宿主细胞, 包含权利要求 18 的 DNA 序列或权利要求 19
- 25 的表达载体。
21. 一种制备权利要求 6-16 任一项的多肽的方法, 该方法包括在有益于制备所述多肽的条件下培养权利要求 7 的转化宿主细胞和从所产生的培养液中回收该多肽。
22. 一种洗涤剂组合物, 包括表面活性剂和脂酶, 具有:
- 30 a) 在本说明书的测试洗涤条件下消除度升高 ( $\Delta R$ ) 至少 3,

- b)对于三丁酸甘油酯在 pH9 和 pH7 的水解活性的比值(LU9/LU7)至少为 2, 和
- c)对于橄榄油和三丁酸甘油酯的水解活性的比值(SLU/LU)至少为 2。
23. 一种制备洗涤剂的方法, 包括:
- 5 a)测试至少一种脂酶的如下方面:
- i)在洗涤溶液中其首洗性能,
  - ii)在中性和碱性 pH 时其相对脂酶活性, 和
  - iii)对甘油三酯中长链和短链酰基键的相对活性,
- b) 筛选具有如下特征的脂酶:
- 10 i)在本说明书的检测条件下消除度升高至少 3,
- ii)对于三丁酸甘油酯在 pH9 和 pH7 的水解活性的比值(LU9/LU7)至少为 2, 和
  - iii)对于橄榄油和三丁酸甘油酯的水解活性的比值(SLU/LU)至少为 2, 和
- 15 c)混合所选的脂酶和表面活性剂以及任选的其它洗涤成分。

## 脂酶变体

## 5 技术领域

本发明涉及减少气味产生潜能的脂酶变体和制备它们的方法。本发明尤其涉及适合用于洗涤剂组合物的变体，尤其是 *Thermomyces lanuginosus* 脂酶的变体，其在清洗乳脂污染的织物时显示首洗 (first-wash) 效果和降低气味形成的倾向。

10

## 背景技术

脂酶可用作例如洗涤剂酶以除去衣服和其它纺织品上的脂或脂肪污物，还可用作面包和其它烘焙产品的生面团的添加剂。因此，以商品名 Lipolase® (Novo Nordisk A/S 的产品) 出售的源于 *Thermomyces*

15 *lanuginosus* (与 *Humicola lanuginosa* 同义, EP 258 068 和 EP 305 216) 的脂酶用作洗涤剂。WO 0060063 描述了 *T. lanuginosus* 脂酶的变体，其在洗涤剂溶液中具有尤其好的首洗性能。WO 9704079, WO 9707202 和 WO 0032758 还公开了 *T. lanuginosus* 脂酶的变体。

在某些应用中，最小化产生气味的短链脂肪酸的形成是非常重要的。  
20 已知具有脂酶的洗涤剂有时可以遗留下残余气味附着于乳污染的衣物 (EP430315)。

## 发明内容

发明人已经发现将肽的延伸物连接到脂肪酶 C-末端氨基酸可以减小形  
25 成气味的倾向。在洗涤包含相对短链酯酰基团 (例如高达 C8) 的脂污染例如乳品污染 (所述乳品包含乳脂或诸如椰子油和棕榈仁油的热带油) 的织物时，可导致具有减少气味生成的脂酶变体。该变体对长链酰基基团的特异性比对短链酰基基团的特异性提高了，和/或升高了在碱性 pH 与中性 pH 时的活性比，即在冲洗期间的中性 pH (约 pH 7) 时的脂酶活性低于在类似于洗  
30 涤液的 pH 的碱性 pH (例如 pH 9 或 10) 时的脂酶活性。

因此，本发明提供一种制备脂酶的方法，是通过将肽延伸物附着在亲代脂酶的 C-末端并筛选所得的肽来找到具有任何上述改进特性的脂酶。

本发明还提供一种具有脂酶活性和氨基酸序列的多肽，其包括具有脂酶活性的亲代多肽和附着在亲代多肽的 C-末端的肽的延伸物。

- 5 本发明还提供一种洗涤剂组合物和使用具有上述特性的脂酶制备洗涤剂的方法。

#### 发明详述

##### 亲代脂酶

- 10 亲代脂酶可以是氨基酸序列与 SEQ ID NO: 2 所示的 *T. lanuginosus* 脂酶的序列具有至少 50%同一性的真菌脂酶。

因此，亲代脂酶可以通过使用基于此说明书中的 DNA 序列所设计的探针，从踝节菌属 (*Talaromyces*) 菌株或者 *Thermomyces* 菌株，尤其是 *Talaromyces thermophilus* , *Thermomyces ibadanensis* , *Talaromyces emersonii* 或者 *Talaromyces byssochlamydoides* 得来的。

更具体的是，亲代脂酶可以是自下面所示的生物体分离出的脂酶，具有所示的氨基酸序列。根据布达佩斯条约保藏于 DSMZ 的含有该基因的大肠杆菌菌株如下：

生物来源	基因和多肽序列	克隆保藏号	保藏日期
<i>Thermomyces lanuginosus</i> DSM 4109	SEQ ID NO:1 和 2		
<i>Talaromyces thermophilus</i> ATCC 10518	SEQ ID NO:3 和 4	DSM 14051	2001 年 2 月 8 日
<i>Thermomyces ibadanensis</i> CBS 281.67	SEQ ID NO:5 和 6	DSM 14049	2001 年 2 月 8 日
<i>Talaromyces emersonii</i> UAMH 5005	SEQ ID NO:7 和 8	DSM 14048	2001 年 2 月 8 日
<i>Talaromyces byssochlamydoides</i> CBS 413.71	SEQ ID NO:9 和 10	DSM 14047	2001 年 2 月 8 日

20

根据贸易条款上述来源的生物体可以容易地得到。菌株在下面地址保藏：

DSMZ (德意志微生物和细胞培养物保藏中心 Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH), MascheroderWeg 1b, D-38124  
25 Braunschweig DE.

ATCC (美国典型培养物保藏中心 American Type Culture Collection),  
10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA.

CBS (荷兰真菌菌种保藏中心 Centraalbureau voor  
Schimmelcultures), Uppsalalaan 8, 3584 CT Utrecht, The Netherlands.

5 UAMH (加拿大阿尔伯达大学植物霉菌培养物保藏中心 University of  
Alberta Mold Herbarium & Culture Collection), Devonian Botanic  
Garden, Edmonton, Alberta, Canada T6G 3G1.

或者, 亲代脂酶可以是通过改变上述任何脂酶的氨基酸序列获得的变  
体, 尤其是 WO 0060063 中所述的或下面所述的具有首洗活性的变体。

10

C-末端的肽延伸物

本发明通过肽键将添加的肽附着到亲代脂酶的 C-末端氨基酸(例如  
SEQ ID NO: 2 所示的 *T lanuginosus* 脂酶的 L269)。肽的延伸物可以通过  
定点突变或随机突变实现附着。

15 在 C-末端的肽的延伸物可以由 2-15 个氨基酸残基, 尤其是 2-11 或 3-10  
例如 2, 3, 4, 5, 7, 9 或 11 个氨基酸残基组成。

延伸物尤其可以具有在所示的位置的以下残基(从 C-末端起始计数):

· 在第一位置的带负电荷的氨基酸(negative amino acid)残基(例  
如 D 或 E),

20 · 在第二和/或第三位置的小的不带电荷的氨基酸(例如 S, T, V 或  
L), 和/或

· 在第 3 到第 7 尤其是第 4, 5 或 6 位置的带正电荷的氨基酸(positive  
amino acid)残基(例如 H 或 K)。

25 肽的延伸物可以是 HTPSSGRGGHR 或其截短形式, 例如 HTPSSGRGG,  
HTPSSGR, HTPSS 或 HTP。其它的实例为 KV, EST, LVY, RHT, SVF, SVT, TAD,  
TPA, AGVF 和 PGLPFKRV。

肽的延伸物可以通过使用编码亲代多肽的载体(质粒)和相应于 C-末端  
的 2-15 个氨基酸延伸物的具有终止密码子的寡核苷酸得以附着。在 C-末  
端和终止密码子之间的核苷酸可以是随机的或可以是偏好上述氨基酸的。

30 一种实施方式是设计寡 DNA(DNA oligo), 其包含所需的随机突变以及具有  
与目的基因 3' 端杂交所必需的序列。该寡 DNA 在 PCR 反应中与具有能与互

补 DNA 链(本领域技术人员已知的)杂交的寡核苷酸(oligo)一起使用,然后将 PCR 片段克隆入目的物(表达载体)。

#### 提高对长链/短链的特异性

- 5 与亲代脂酶相比,本发明的脂酶提高了对长链/短链的特异性,例如提高了对长链(例如 C<sub>16</sub>-C<sub>20</sub>)甘油三酸酯的活性/对短链(例如 C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub>)甘油三酸酯的活性的比值。这可以通过以橄榄油作底物的 SLU 的比值和以三丁酸甘油酯为底物的 LU 的比值测定(方法在说明书后面描述)。

#### 10 提高碱性 pH 活性 / 中性 pH 活性的比值

与亲代脂酶相比,本发明的脂酶提高了碱性 pH 活性 / 中性 pH 活性的比值,即升高了在碱性 pH (例如 pH 9-10)和在中性 pH(约 pH 7)情况下的脂酶活性的比值。这可以用后面说明书描述的以三丁酸甘油酯为底物的方法进行测定。

15

#### 用带正电荷的氨基酸进行取代

亲代脂酶可以在接近相应于 SEQ ID NO: 2 的 E1 或 Q249 的位置包括一个或多个(例如 2-4 个,尤其是 2 个)用带正电荷的氨基酸取代中性或带负电荷的氨基酸。带正电荷的氨基酸可以是 K, R 或 H,尤其是 R。负的和中性氨基酸可以是其它任何氨基酸。

20

取代可以在距离 SEQ ID NO: 2 的 E1 或 Q249 15Å 内的三维结构表面进行,例如相应于 1-11, 90, 95, 169, 171-175, 192-211, 213-226, 228-258 或 260-262 的任何一位置。

25 取代可以在 E1 或 Q249 的 10Å 内,例如相应于 1-7, 10, 175, 195, 197-202, 204-206, 209, 215, 219-224, 230-239, 242-254 的任何位置。

取代可以在 E1 的 15Å 内,例如相应于 111, 169, 171, 192-199, 217-225, 228-240, 243-247, 249, 261-262 的任何位置。

取代最优选的是在 E1 的 10Å 内,例如相应于 1-7, 10, 219-224 和 230-239 的任何位置。

30 因此,一些特殊的取代是相应于 S3R, S224R, P229R, T231R, N233R, D234R 和 T244R 的那些。



### 在 90-101 和 210 位置的氨基酸

亲代脂酶可特殊地满足在相应的 90-101 和 210 位置的带电荷的氨基酸的某种限定。满足电荷限制的脂酶特别是在有高浓度阴离子的洗涤剂中有效。

因此,氨基酸 210 可以是带负电荷的。E210 可以是未改变的或其具有 E210D/C/Y, 尤其是 E210D 取代。

脂酶可以包含在 90-101 (尤其是 94-101)任何位置的带负电荷氨基酸, 例如在 D96 和/或 E99 位置。

而且,脂酶可以在 N94 包含中性或带负电荷的氨基酸,即 N94 (中性或带负电荷的)例如 N94N/D/E。

脂酶在 90-101(尤其是 94-101)区可具有负的或中性净电荷,即带负电荷的氨基酸数可以等于或大于带正电荷的氨基酸数。因此,该区可来自于 Lipolase, 不做改变,具有两个带负电荷的氨基酸(D96 和 E99)和一个带正电荷的(K98), 并且在位置 94 (N94)具有中性氨基酸, 或该区可以通过一个或多个取代修饰。

或者,三个氨基酸 N94, N96 和 E99 中的两个可以具有负的或未改变的电荷。因此所有三个氨基酸可以不变化或通过保守或带负电荷的取代而改变,即 N94 (中性或负的), D (负的)和 E99 (负的)。实例为 N94D/E 和 D96E。

进一步地,三个氨基酸 N94, N96 和 E99 之一可以被取代以增加电荷即 N94 (正的), D96 (中性或正的)或 E99 (中性或正的)。实例是 N94K/R, D96I/L/N/S/W 或 E99N/Q/K/R/H。

亲代脂酶可以包括 E99K 取代, 并且合并有相应的 90-101 区的带负电荷的氨基酸, 例如 D96D/E。

用带负电荷的氨基酸取代中性的氨基酸(N94D/E)可以改进在阴离子洗涤剂中的性能。用带正电荷的氨基酸取代中性氨基酸(N94K/R)可以提供具有在阴离子洗涤剂和阴离子/非离子洗涤剂(含有例如占总表面活性剂 40-70%的阴离子的洗涤剂)中具有好的性能的脂酶变体。

其它位置的氨基酸

亲代脂酶可以任选地包含其它氨基酸的取代,尤其是少于10个或5个所述的取代。实例是在SEQ ID NO: 2中相应于Q249R/K/H, R209P/S和G91A的取代。进一步的取代例如可以根据本领域已知的原理进行,例如在WO 92/05249, WO 94/25577, WO 95/22615, WO 97/04079和WO 97/07202中所述的。

#### 亲代脂酶变体

亲代脂酶包含相应于SEQ ID NO:2中的G91G/A+E99E/D/R/K+T231T/S/R/K+N233N/Q/R/K+Q249Q/N/R/K的取代。一些特定的实例是具有

15	T231R+ N233R
	D96L+ T231R+ N233R
	G91A+ E99K+ T231R+ N233R+ Q249R
	R209P +T231R +N233R
	E87K +G91D +D96L +G225P +T231R +N233R +Q249R +N251D
	G91A +E99K +T189G +T231R +N233R +Q249R
20	D102G +T231R +N233R +Q249R
	N33Q +N94K +D96L +T231R +N233R +Q249R
	N33Q +D96S +T231R +N233R +Q249R
	N33Q +D96S +V228I + +T231R +N233R +Q249R
	D62A +S83T + G91A +E99K +T231R +N233R +Q249R
	E99N +N101S +T231R +N233R +Q249R
	R84W +G91A +E99K +T231R +N233R +Q249R
	V60G +D62E +G91A +E99K +T231R +N233R +Q249R
	E99K +T231R +N233R +Q249R
	T231R +N231R +Q249R

#### 25 氨基酸修饰的命名法

本文所用的定义突变的命名法实质上如WO 92/05249中所述。因此, T231 R表示在位置231用R取代T。

270PGLPFKRV表示附加到SEQ ID NO: 2的C-末端(L269)的延伸物。

#### 30 氨基酸分组

本说明书中，根据氨基酸在 pH 10 情况下的电荷将它们分类为带负电荷，带正电荷，或电中性的氨基酸，这在洗涤剂中是很常用的。因此，带负电荷的氨基酸是 E, D, C (半胱氨酸)和 Y,尤其是 E 和 D。带正电荷的氨基酸是 R, K 和 H, 尤其是 R 和 K。中性氨基酸是 G, A, V, L, I, P, F, W, S, T, M, N, Q 和形成二硫桥部分时的 C。将在同组(正, 负或中性)氨基酸中用其它氨基酸的取代定义为保守取代。

中性氨基酸可以分为疏水或非极性的(G, A, V, L, I, P, F, W 和作为二硫桥部分的 C)和亲水或极性的(S, T, M, N, Q)。

### 10 氨基酸同一性

亲代脂酶与 T lanuginosus 脂酶(SEQ ID NO: 2)具有至少 50%的同一性, 尤其是至少 55%, 至少 60%, 至少 75%, 至少 85%, 至少 90%, 高于 95% 或高于 98%的同一性。

同一性的程度可以通过本领域已知的计算机程序诸如 GCG 程序包提供的 GAP 进行测定(Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, August 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) (Needleman, S. B. and Wunsch, C. D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48,443-45), 利用 GAP 进行多肽序列比较时采用下列设定值: GAP 生成罚分(creation penalty)为 3.0 和 GAP 延伸罚分(extension penalty)为 0.1。

### 氨基酸序列对比

在本说明书中，氨基酸残基通过 SEQ ID NO: 2 确定。为了在另一脂酶序列中找到相应的位置,使用 GAP 序列对比将该序列与 SEQ ID NO: 2 对比。GAP 在 GCG 程序包(Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, August 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) (Needleman, S. B. and Wunsch, C. D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48,443-45)中提供。下面的设定值用于多肽序列的比较: GAP 生成罚为 3.0 和 GAP 延伸罚为 0.1。

30

DNA 序列, 表达载体, 宿主细胞以及脂酶的制备

本发明提供了一种编码本发明脂酶的 DNA 序列，一种携带该 DNA 序列的表达载体，一种包含该 DNA 序列或表达载体的转化宿主细胞。这些可以通过本领域已知的方法获得。

5 本发明还提供一种制备脂酶的方法，是通过在有益于制备该脂酶和从培养液回收该脂酶的条件下培养转化的宿主细胞进行的。该方法可以根据本领域已知的原理进行。

#### 脂酶活性

在中性和碱性 pH 条件下对三丁酸甘油酯的脂酶活性(LU7 和 LU9)  
10 通过使用阿拉伯胶作为乳化剂乳化丁酸甘油酯(glycerin tributyrate)制备脂酶的底物。然后在 pH-stat 滴定实验中在 30°C 于 pH 7 或 9 进行丁酸甘油酯的水解。一单位的脂酶活性(1 LU7 或 1 LU9)等于在 pH 7 或 9 时每分钟释放 1 $\mu$ mol 丁酸的酶量。LU7 也称为 LU。

在中性和碱性 pH 条件下相对酶活性可以表示为 LU9/LU7。该比值至  
15 少为 2.0。

#### 对三羧酸甘油酯的脂酶活性(SLU)

以被固定的橄榄油乳化液(Sigma catalog No. 800-1)为底物，在 30°C，  
pH 9 包含 40 mM NaCl 和 5 mM 氯化钙的 5 mM Tris 缓冲液中测定脂酶活  
20 性。将 2.5 ml 底物与 12.5 ml 缓冲液混合，调节 pH 到 9，添加 0.5 ml 稀释的脂酶样品。接着用 pH stat 滴定形成的油酸的量。

一 SLU 是在这些条件下每分钟释放 1 $\mu$ mol 可滴定的油酸的脂酶的量。

脂酶可以具体地具有至少 4000 或至少 5000 SLU 活性/mg 酶蛋白。

在碱性 pH 条件下，针对甘油三酯长链或短链酰基键的相对活性可以表  
25 示为 SLU 与 LU9 的比值。SLU/LU9 可以至少是 2.0，至少 3.0 或至少 4.0。

#### 首洗性能

脂酶的首洗性能如下测定：

将 Style 400 棉在 95°C 用去离子水清洗并剪成 9x9 cm 的样品。将 50 $\mu$ l  
30 猪油(lard)/苏丹红 (0.75 mg 染料/g 猪油)涂到样品的中心，将污染的样品在 70°C 加热 25 分钟，过夜处理。7 个污染的样品在 30°C Terg-O-Tometer 检测

洗衣机中用含有 4 g/L 检测洗涤剂的 1000 ml 洗涤液，在硬度为 15°dH ( $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  4:1 的水中) 洗涤 20 分钟，接着用水龙头的水冲洗 15 分钟干燥过夜。

将脂酶以每升 0.25 mg 酶蛋白的剂量加入洗涤液中。对照没有添加脂酶变体。

- 5 污染的去除了通过在首次洗涤循环之后于 460 nm 测定消除度(remission) 来进行评估，结果以减去相同条件下没有脂酶洗涤的空白消除度所得的  $\Delta R$  来表示。

#### 检测洗涤剂

- 10 本说明书所用的检测洗涤剂具有以下组合物(重量%):

直链烷基苯磺酸盐, $\text{C}_{10}\text{-C}_{13}$	12.6
烷基硫酸盐, $\text{C}_{16}\text{-C}_{18}$	3.2
脂肪酸, $\text{C}_{16}\text{-C}_{18}$ , 18:2	0.9
脂肪醇乙氧基化物, $\text{C}_{12}\text{-C}_{18}$ , 6.7EO	13.2
沸石	35.2
碳酸钠	1.2
碳酸氢钠	1.3
硅酸钠	4.8
硫酸钠	1.9
四硼酸钠	2.7
磷酸酯[1-羟基乙烷-1, 2-diylbis (磷酸)]	0.1
一水合过硼酸钠	11.2
四乙酰乙烯二胺(TAED)	6.3
Copoly (丙烯酸/马来酸)	4.3
SRP (污物释放聚合物 soil release polymer)	1.2

#### 洗涤剂添加剂

- 根据发明，脂酶可以通常用作洗涤剂组合物的添加剂。该添加剂可以方便地制成为非粉状颗粒(non-dusting granulate)，稳定液，浆或防护酶(protected enzyme)。添加剂可以通过本领域已知的方法制备。
- 15

### 洗涤剂组合物

本发明的洗涤剂组合物可以例如制成手洗或机洗的洗涤剂组合物，包括洗衣添加剂组合物和适合用于污染织物的预处理的组合物，漂洗添加的  
5 织物软化剂组合物，通常家用硬表面清洁应用的以及清洗餐具所用的组合物。

本发明的洗涤剂组合物包含本发明的脂酶和表面活性剂。或者，还可任选地包含助洗剂，另外的酶，抑泡剂，软化剂，染料转移抑制剂以及洗涤剂中常规使用的其它成分诸如污物悬浮剂，污物释放剂(soil-releasing  
10 agents)，荧光增白剂，研磨剂，杀菌剂，酶暗抑制剂，着色剂和/或封装(encapsulated)或非封装香料。

本发明的洗涤剂组合物可以是液体形式的，膏状的，胶状的，棒状，片状或颗粒状形式。

pH 值(在所用浓度的水溶液中测定)通常是中性的或碱性的，例如在  
15 7-11 的范围，尤其是 9-11 范围。本发明颗粒状组合物也可以是压缩形式为 550-950 g/l，即它们比常规颗粒状组合物具有相对高的密度。

本发明的脂酶，或任选地掺入洗涤剂组合物中的另外的酶通常为组合物酶蛋白的 0.00001%-2%(按重量算)，优选的是 0.0001%-1%，更优选的是 0.001%-0.5%，甚至更优选的是 0.01%-0.2%。

20 本发明的洗涤剂组合物包含脂酶的量可以相应的是每克洗涤剂 1-5,000 LU，优选的是 2-500 LU/g，例如 10-100 LU/g。洗涤剂可以溶于水中以产生每升洗涤溶液包含脂酶 2.5-1,500 LU，尤其是 10-500 LU/l，例如，30-200 LU/l 的洗涤溶液。脂酶蛋白的量可以是每克洗涤剂 0.001-10 mg 或每升洗涤溶液 0.001-100 mg。

25 表面活性剂系统可以包含非离子的，阴离子的，阳离子的，两性的，和/或两性离子的表面活性剂。如上所述，本发明的脂酶变体尤其适合于包含阴离子和非离子表面活性剂组合的洗涤剂，其中阴离子表面活性剂的重量百分比是 70-100%而非离子表面活性剂的重量百分比为 0-30%，尤其是阴离子表面活性剂为 80-100%而非离子表面活性剂为 0-20%。进一步地，  
30 本发明一些优选的脂酶还适合于包含 40-70% 阴离子和 30-60% 非离子表面活性剂的洗涤剂。表面活性剂按重量算通常以 0.1%-60%，例如 1%-40%，

尤其是 10-40 % 的水平存在。优选的是约 3%-约 20%。一些表面活性剂的实例在下面描述。

阴离子表面活性剂的实例是烷基硫酸盐, 烷基乙氧基硫酸盐, 直链烷基苯磺酸盐, 烷基烷氧基化硫酸盐。

- 5 阴离子表面活性剂的实例是烷基苯酚的聚环氧烷(例如聚环氧乙烷)冷凝物, 初级和次级脂肪醇和环氧乙烷的冷凝产物。烷基苯酚的聚环氧乙烷冷凝物, 初级和次级脂肪醇、烷基多糖与烷基苯酚乙氧基化物和脂肪醇乙氧基化物的冷凝物。

- 更具体的是, 本发明的脂酶可以掺入到 WO 97/04079, WO 97/07202,  
10 WO 97/41212, WO 98/08939 和 WO 97/43375 中所述的洗涤剂组合物中。

### 实施例

实施例 1: 使用 C-末端库(library)制备脂酶变体

#### 制备库

- 15 目的是为了将 3 个额外的氨基酸加入到 C-末端。将额外的氨基酸加到 C 末端后, 与针对短链三丁酸甘油酯的活性相比, 提高了针对长链三丁酸甘油酯的活性, 与在 pH10 条件下的活性相比, 抑制了 pH7 条件下的活性, 并由此降低了洗涤期间或洗涤之后的洗涤剂中脂酶的气味。

- 用编码具有 G91A+ E99K+ T231R+N233R+ Q249R 取代的 SEQ ID NO:  
20 2 所示氨基酸序列的脂酶基因构建质粒 pENi1576。

使用寡 19671 和 991222j1 (SEQ ID NO: 11 和 12)以 pENi1576 为模板, 总体积为 100 $\mu$ l, 利用 PWO 聚合酶(Boehringer Mannheim)进行 PCR 反应。寡 991222J1 在 C-末端添加 3 个额外的氨基酸。

PCR 片段在 Biorad 柱上纯化并且用 BamHI/SacII 切割。

- 25 质粒 pENi1861(在 PCT/DK01/00805 中描述)用 BamHI/SacI 切割。

PCR 片段和质粒载体在 1 % 凝胶上纯化。载体和 PCR 片段被连接过夜, 并电转化入大肠杆菌菌株 DH10B, 产生 123,000 个独立的大肠杆菌转化体。

对 10 个独立的克隆测序显示出满意的多样性。

- 30 自所有的克隆制备 DNA-prep。

#### 曲霉属菌株的转化和筛选

将约 5 $\mu$ g DNA 质粒转化入 JaI355 (在 WO 00/24883 中提到的)。与 PEG 培养 20 分钟后, 用 1.2 M 山梨醇, 10 mM Tris pH7.5 洗原生质体两次(以除去 CaCl<sub>2</sub>)。

5 将原生质体在藻酸盐溶液中混合(1.5 % 藻酸盐, 1 % 葡聚糖, 1.2 M 山梨醇, 10 mM Tris pH 7.5)。使用泵(Ole Dich 110ACR. 80G38. CH5A)将该藻酸盐溶液从 15 cm 高度滴入 CaCl<sub>2</sub>-溶液(1.2M 山梨醇, 10 mM Tris pH 7.5, 0.2 M CaCl<sub>2</sub>)。以每个次级珠(second bead)约一个转化的原生质体生成直径约 2.5 mm 的藻酸盐珠。生成约 55,000 个转化体。

10 在珠制成之后, 将它们转移到 1.2 M 山梨醇, 10 mM Tris pH7.5, 10 mM CaCl<sub>2</sub> 中 30 $^{\circ}$ C 生长过夜。用灭菌水冲洗珠两次, 之后转移到 1\*vogel (没有碳源, 已经存在于藻酸盐珠中(葡聚糖))。将该珠于 30 $^{\circ}$ C 培养过夜。

过夜培养后, 将珠铺到含有 TIDE 和橄榄油的平板上(1 g/L 琼脂糖, 0.1 M Tris pH 9.0, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 ml/L 橄榄油, 1.4 g/L TIDE, 0.004 % 亮绿)。将平板于 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。

15 将 384 个阳性珠转移到四个 96 孔微量滴定板中, 每孔包含 150 $\mu$ l 1\*vogel, 2 % 麦芽糖。

平板在 34 $^{\circ}$ C 生长 3 天。

20 针对 pnp-棕榈酸酯(pnp-valerate)和 pnp-戊酸酯(pnp-palmitate)在 pH7.5 的活性检测培养基(如 WO 00/24883 所述)。对长链底物(pnp-棕榈酸酯)具有最高活性和对短链底物(pnp-戊酸酯)具有低活性的 64 个克隆在小平板上从培养其所用的 96 孔微量滴定板中分离, 所述板的每个孔中包含 150 $\mu$ l 1\*vogel, 2 % 麦芽糖。

在 34 $^{\circ}$ C 生长 3 天之后, 再一次检测培养基针对 pnp-戊酸酯和 pnp-棕榈酸酯在 pH7.5 的活性, 以及针对 pnp-棕榈酸酯在 pH10 的活性。

25 有 10 个克隆针对 pnp-棕榈酸酯在 pH10 显示好的活性, 针对 pnp-戊酸酯在 pH7.5 显示不好的活性。

由于在寡 DNA 中的缺失, 一变体意外地在 C-末端具有 11 个额外氨基酸残基而不是 3 个。

在第一轮中鉴定为阳性的有:

30 G91A +E99K +T231 R +N233R +Q249R +270SVT  
G91A +E99K +T231 R +N233R +Q249R +270TPA



G91A+E99K+T231R+N233R +Q249R+270SVF

G91A +E99K +T231 R +N233R +Q249R +270HTPSSGRGGHR

再次重复曲霉属菌株筛选方法，由此鉴定出下面阳性的变体：

G91 A +E99K +T231 R +N233R +Q249R +270LVY

5 G91 A +E99K +T231 R +N233R +Q249R +270EST

G91A +E99K +T231 R +N233R +Q249R +270KV

G91A +E99K +T231 R +N233R +Q249R +270RHT

G91A +E99K +T231 R +N233R +Q249R +270TAD

10 实施例 2：评估气味和洗涤性能

对基于 SEQ ID NO: 2 的以下脂酶变体进行评估：

N94K +D96L +T231 R +N233R +Q249R +270PGLPFKRV

G91A +E99K +T231 R +N233R +Q249R + 270AGVF

G91A +E99K +T231 R +N233R +Q249R +270HTPSSGRGGHR

15 G91A +E99K +T231 R +N233R +Q249R +270HTPSSGRGG

G91A +E99K +T231R +N233R +Q249R +270HTPSSGR

G91A +E99K +T231R +N233R +Q249R +270HTPSS

G91A +E99K +T231R +N233R +Q249R +270HTP

G91A +E99K +T231R +N233R +Q249R +270SVF

20 G91A +E99K +T231R +N233R +Q249R +270LVY

G91A +E99K +T231R +N233R +Q249R +270EST

G91A +E99K +T231R +N233R +Q249R +270RHT

G91A +E99K +T231R +N233R +Q249R +270TAD

25 用污染有不同污物的样品进行洗涤测试：猪油(lard)/苏丹红和黄油(butter)/苏丹红。污染有猪油样品和污染有黄油的样品在 70℃热处理 25 分钟并放置过夜。污染的样品在 30℃Terg-O-Tometer 检测冲洗机中用洗涤液(在硬度为 15°dH 的水中含有 4 g/L 检测洗涤剂)洗涤 20 分钟，接着用水龙头的水冲洗 15 分钟干燥过夜。

30 以每升 0.25 或 1.0 mg 酶蛋白的剂量将脂酶变体加到洗涤液中。对照没有加脂酶变体，参考试验用的是具有相同氨基酸序列而没有任何肽延伸物的脂酶。

在没有脂酶的情况下第二次洗涤样品。

如下进行性能评估:

通过感官(sensory panel)评估气味的产生, 将洗涤后污染有黄油的样品保存在小瓶直到评估。

- 5 通过在首次或第二次洗涤后测定染有猪油的样品的清除度来评估洗涤性能。所有的变体在一轮洗涤测试中显示显著的性能。

用首次或二次洗涤后对染有猪油的样品的性能值除以染有黄油的样品的气味值算出利益/风险比值(benefit/risk ratio)。改善的利益/风险比值表明, 洗涤性能在参考水平而气味下降时, 使用脂酶剂量可以高于参考水平。

- 10 与在 C-末端没有肽延伸物的相同脂酶相比, 所有检测的变体都显示产生较少的气味和/或较高的利益/风险比值。

实施例 3: 首洗性能, 在碱性/中性 pH 条件下的活性, 对长链/短链的活性

对基于 SEQ ID NO: 2 的下面的脂酶变体进行评估:

- 15 G91A +E99K +T231 R +N233R +Q249R +270HTPSSGRGGHR  
 G91A +E99K +T231R +N233R +Q249R +270HTPSSGRGG  
 G91 A +E99K +T231 R +N233R +Q249R +270HTPSSGR  
 G91 A +E99K +T231 R +N233R +Q249R +270HTPSS  
 G91A +E99K +T231 R +N233R +Q249R +270EST

- 20 如上所述评估首洗性能, 发现每个脂酶变体消除度升高( $\Delta R$ )大于 3.0。  
 通过上述的方法测定脂酶的活性 LU7, LU9 和 SLU。发现每个脂酶变体具有 LU9/LU7 的比值高于 2.0 并且 SLU/LU9 比值高于 2.0。

25

30

## 提交原件 - 07.02.2002 09: 30: 02 AM 印制

0-1	表-PCT/RO/134 (EASY) 关于制备使用的微生物或其他生物材料	PCT-EASY Version 2.92 (2002年01月01日修改)
0-1-1	保藏的说明(PCT Rule 13bis)	
0-2	国际申请号	PCT/DK02/00084
0-3	申请人或代理人文件参考	10124-WO
1	以下说明涉及在说明书中提及的被保藏 的微生物或其他生物材料:	
1-1,1-2	页 行	2 13 - 19
1-3	保藏证明	
1-3-1	保藏机构名称	德意志微生物和细胞培 养物保藏中心
1-3-2	保藏机构地址	Mascheroder Weg 1b,D- 38124 Braunschweig,德国
1-3-3	保藏日期	2001年2月8日
1-3-4	保藏号	DSMZ 14047
1-4	附加信息	无
1-5	本说明所适用的国家	所有指定的国家
1-6	另外的说明(后来提交国际局)	无
2	保藏的微生物或其他生物材料在说明书 中的说明:	
2-1,2-2	页 行	2 13 - 19
2-3	保藏证明	
2-3-1	保藏机构名称	德意志微生物和细胞培 养物保藏中心
2-3-2	保藏机构地址	Mascheroder Weg 1b,D- 38124 Braunschweig,德国
2-3-3	保藏日期	
2-3-4	保藏号	

	保藏日期	2001年2月8日 (08.02.2001)
	保藏号	DSMZ 14048
2-4	附加信息	无
2-5	本说明所适用的国家	所有指定的国家
2-6	另外的说明(这些说明以后将提交国际局)	无
3 3-1,3-2	保藏的微生物或其他生物材料在说明书中的说明: 页 行	2 13 - 19
3-3 3-3-1 3-3-2 3-3-3 3-3-4	保藏证明 保藏机构名称 保藏机构地址 保藏日期 保藏号	德意志微生物和细胞培养物保藏中心 Mascheroder Weg 1b,D-38124 Braunschweig,德国 2001年2月8日 (08.02.2001) DSMZ 14049
3-4	附加信息	无
3-5	本说明所适用的国家	所有指定的国家
3-6	另外的说明(这些说明以后将提交国际局)	无
4 4-1,4-2	保藏的微生物或其他生物材料在说明书中的说明: 页 行	2 13 - 17
4-3 4-3-1 4-3-2 4-3-3	保藏证明 保藏机构名称 保藏机构地址	德意志微生物和细胞培养物保藏中心 Mascheroder Weg 1b,D-

4-3-4	保藏日期 保藏号	38124 Braunschweig, 德国 2001年2月8日 (08.02.2001) DSMZ 14051
4-4	附加信息	无
4-5	本说明所适用的国家	所有指定的国家
4-6	另外的说明(这些说明以后将提交国际局)	无

仅用于国际局

0-5	国际局收到该表格的日期:	
-----	--------------	--

提交的原件 - 2002年2月7日 09:30:02AM 印制

0-5-1	被授权的官员	
-------	--------	--

## 序列表

&lt;110&gt; 诺维信公司 (Novozymes A/S)

&lt;120&gt; 脂酶变体

&lt;130&gt; 10130

&lt;160&gt; 12

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 918

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Thermomyces lanuginosus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1).. (873)

&lt;223&gt;

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; sig-peptide

&lt;222&gt; (1).. (66)

&lt;223&gt;

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; mat-peptide

&lt;222&gt; (67).. 0

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 1

```

atg agg agc tcc ctt gtg ctg ttc ttt gtc tct gcg tgg acg gcc ttg      48
Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu
      -20                -15                -10

```

```

gcc agt cct att cgt cga gag gtc tcg cag gat ctg ttt aac cag ttc      96
Ala Ser Pro Ile Arg Arg Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe
      -5                -1 1                5                10

```

```

aat ctc ttt gca cag tat tct gca gcc gca tac tgc gga aaa aac aat      144
Asn Leu Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn
                15                20                25

```

```

gat gcc cca gct ggt aca aac att acg tgc acg gga aat gcc tgc ccc      192
Asp Ala Pro Ala Gly Thr Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro
                30                35                40

```

```

gag gta gag aag gcg gat gca acg ttt ctc tac tcg ttt gaa gac tct      240
Glu Val Glu Lys Ala Asp Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser
                45                50                55

```

```

gga gtg ggc gat gtc acc ggc ttc ctt gct ctc gac aac acg aac aaa      288
Gly Val Gly Asp Val Thr Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys
                60                65                70

```

```

ttg atc gtc ctc tct ttc cgt ggc tct cgt tcc ata gag aac tgg atc      336

```

Leu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile  
 75 80 85 90  
 ggg aat ctt aac ttc gac ttg aaa gaa ata aat gac att tgc tcc ggc 384  
 Gly Asn Leu Asn Phe Asp Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly  
 95 100 105  
 tgc agg gga cat gac ggc ttc act tcg tcc tgg agg tct gta gcc gat 432  
 Cys Arg Gly His Asp Gly Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp  
 110 115 120  
 acg tta agg cag aag gtg gag gat gct gtg agg gag cat ccc gac tat 480  
 Thr Leu Arg Gln Lys Val Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr  
 125 130 135  
 cgc gtg gtg ttt acc gga cat agc ttg ggt ggt gca ttg gca act gtt 528  
 Arg Val Val Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val  
 140 145 150  
 gcc gga gca gac ctg cgt gga aat ggg tat gat atc gac gtg ttt tca 576  
 Ala Gly Ala Asp Leu Arg Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser  
 155 160 165 170  
 tat ggc gcc ccc cga gtc gga aac agg gct ttt gca gaa ttc ctg acc 624  
 Tyr Gly Ala Pro Arg Val Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr  
 175 180 185  
 gta cag acc ggc gga aca ctc tac cgc att acc cac acc aat gat att 672  
 Val Gln Thr Gly Gly Thr Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile  
 190 195 200  
 gtc cct aga ctc ccg ccg cgc gaa ttc ggt tac agc cat tct agc cca 720  
 Val Pro Arg Leu Pro Pro Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro  
 205 210 215  
 gag tac tgg atc aaa tct gga acc ctt gtc ccc gtc acc cga aac gat 768  
 Glu Tyr Trp Ile Lys Ser Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Arg Asn Asp  
 220 225 230  
 atc gtg aag ata gaa ggc atc gat gcc acc ggc ggc aat aac cag cct 816  
 Ile Val Lys Ile Glu Gly Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro  
 235 240 245 250  
 aac att ccg gat atc cct gcg cac cta tgg tac ttc ggg tta att ggg 864  
 Asn Ile Pro Asp Ile Pro Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly  
 255 260 265  
 aca tgt ctt tagtggccgg cgcgctggg tccgactcta gcgagctcga gatct 918  
 Thr Cys Leu  
 <210> 2  
 <211> 291  
 <212> PRT  
 <213> Thermomyces lanuginosus  
 <400> 2  
 Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu  
 -20 -15 -10

Ala Ser Pro Ile Arg Arg Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe  
 -5 -1 1 5 10

Asn Leu Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn  
 15 20 25

Asp Ala Pro Ala Gly Thr Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro  
 30 35 40

Glu Val Glu Lys Ala Asp Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser  
 45 50 55

Gly Val Gly Asp Val Thr Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys  
 60 65 70

Leu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile  
 75 80 85 90

Gly Asn Leu Asn Phe Asp Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly  
 95 100 105

Cys Arg Gly His Asp Gly Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp  
 110 115 120

Thr Leu Arg Gln Lys Val Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr  
 125 130 135

Arg Val Val Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val  
 140 145 150

Ala Gly Ala Asp Leu Arg Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser  
 155 160 165 170

Tyr Gly Ala Pro Arg Val Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr  
 175 180 185

Val Gln Thr Gly Gly Thr Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile  
 190 195 200

Val Pro Arg Leu Pro Pro Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro  
 205 210 215



Glu Tyr Trp Ile Lys Ser Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Arg Asn Asp  
 220 225 230

Ile Val Lys Ile Glu Gly Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro  
 235 240 245 250

Asn Ile Pro Asp Ile Pro Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly  
 255 260 265

Thr Cys Leu

<210> 3  
 <211> 1083  
 <212> DNA  
 <213> 嗜热踝节菌 (*Talaromyces thermophilus*)

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(67)  
 <223>

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (139)..(307)  
 <223>

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (370)..(703)  
 <223>

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (778)..(1080)  
 <223>

<220>  
 <221> mat\_peptide  
 <222> (67)..0  
 <223>

<400> 3  
 atg agg agc tcg ctc gtg ctg ttc ttc gtt tct gcg tgg acg gcc ttg 48  
 Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu  
 -20 -15 -10

gcc agt cct gtc cga cga g gatatgtaa caccgggtat acttttcatg 97  
 Ala Ser Pro Val Arg Arg  
 -5 -1

cattgcatgt cgaacctgct gtactaagat tgcgcgcaca g ag gtc tcg cag gat 152  
 Glu Val Ser Gln Asp  
 5

ctg ttt gac cag ttc aac ctc ttt gcg cag tac tcg gcg gcc gca tac Leu Phe Asp Gln Phe Asn Leu Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Ala Tyr	200
10 15 20	
tgc gcg aag aac aac gat gcc ccg gca ggt ggg aac gta acg tgc agg Cys Ala Lys Asn Asn Asp Ala Pro Ala Gly Gly Asn Val Thr Cys Arg	248
25 30 35	
gga agt att tgc ccc gag gta gag aag gcg gat gca acg ttt ctc tac Gly Ser Ile Cys Pro Glu Val Glu Lys Ala Asp Ala Thr Phe Leu Tyr	296
40 45 50	
tcg ttt gag ga gtaggtgtca acaagagtac aggcaccct agtagaaata Ser Phe Glu Asp	347
55	
gcagactaac tgggaaatgt ag t tct gga gtt ggc gat gtc acc ggg ttc Ser Gly Val Gly Asp Val Thr Gly Phe	397
60 65	
ctt gct ctc gac aac acg aac aga ctg atc gtc ctc tct ttc cgc ggc Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Arg Leu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly	445
70 75 80	
tct cgt tcc ctg gaa aac tgg atc ggg aat atc aac ttg gac ttg aaa Ser Arg Ser Leu Glu Asn Trp Ile Gly Asn Ile Asn Leu Asp Leu Lys	493
85 90 95	
gga att gac gac atc tgc tct ggc tgc aag gga cat gac ggc ttc act Gly Ile Asp Asp Ile Cys Ser Gly Cys Lys Gly His Asp Gly Phe Thr	541
100 105 110	
tcc tcc tgg agg tcc gtt gcc aat acc ttg act cag caa gtg cag aat Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asn Thr Leu Thr Gln Gln Val Gln Asn	589
115 120 125 130	
gct gtg agg gag cat ccc gac tac cgc gtc gtc ttc act ggg cac agc Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr Arg Val Val Phe Thr Gly His Ser	637
135 140 145	
ttg ggt ggt gca ttg gca act gtg gcc ggg gca tct ctg cgt gga aat Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val Ala Gly Ala Ser Leu Arg Gly Asn	685
150 155 160	
ggg tac gat ata gat gtg gtatgtagga aaaatgatcc ccgtggagcg Gly Tyr Asp Ile Asp Val	733
165	
gtcatgtgga aatgtgcagg ggtgtctaata acacagacca acag ttc tca tat ggc Phe Ser Tyr Gly	789
170	
gct ccc cgc gtc gga aac agg gct ttt gcg gaa ttc ctg acc gca cag Ala Pro Arg Val Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr Ala Gln	837
175 180 185	

acc ggc ggc acc ttg tac cgc atc acc cac acc aat gat att gtc ccc 885  
 Thr Gly Gly Thr Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile Val Pro  
 190 195 200

aga ctc ccg cca cgc gaa ttg ggt tac agc cat tct agc cca gag tat 933  
 Arg Leu Pro Pro Arg Glu Leu Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro Glu Tyr  
 205 210 215 220

tgg atc acg tct gga acc ctc gtc cca gtg acc aag aac gat atc gtc 981  
 Trp Ile Thr Ser Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Lys Asn Asp Ile Val  
 225 230 235

aag gtg gag ggc atc gat tcc acc gat gga aac aac cag cca aat acc 1029  
 Lys Val Glu Gly Ile Asp Ser Thr Asp Gly Asn Asn Gln Pro Asn Thr  
 240 245 250

ccg gac att gct gcg cac cta tgg tac ttc ggg tca atg gcg acg tgt 1077  
 Pro Asp Ile Ala Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Ser Met Ala Thr Cys  
 255 260 265

ttg taa 1083  
 Leu

<210> 4  
 <211> 291  
 <212> PRT  
 <213> 嗜热踝节菌 (*Talaromyces thermophilus*)

<400> 4  
 Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu  
 -20 -15 -10

Ala Ser Pro Val Arg Arg Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asp Gln Phe  
 -5 -1 1 5 10

Asn Leu Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Ala Lys Asn Asn  
 15 20 25

Asp Ala Pro Ala Gly Gly Asn Val Thr Cys Arg Gly Ser Ile Cys Pro  
 30 35 40

Glu Val Glu Lys Ala Asp Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser  
 45 50 55

Gly Val Gly Asp Val Thr Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Arg  
 60 65 70

Leu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Arg Ser Leu Glu Asn Trp Ile  
 75 80 85 90

Gly Asn Ile Asn Leu Asp Leu Lys Gly Ile Asp Asp Ile Cys Ser Gly  
 95 100 105

Cys Lys Gly His Asp Gly Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asn  
 110 115 120

Thr Leu Thr Gln Gln Val Gln Asn Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr  
 125 130 135

Arg Val Val Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val  
 140 145 150

Ala Gly Ala Ser Leu Arg Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser  
 155 160 165 170

Tyr Gly Ala Pro Arg Val Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr  
 175 180 185

Ala Gln Thr Gly Gly Thr Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile  
 190 195 200

Val Pro Arg Leu Pro Pro Arg Glu Leu Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro  
 205 210 215

Glu Tyr Trp Ile Thr Ser Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Lys Asn Asp  
 220 225 230

Ile Val Lys Val Glu Gly Ile Asp Ser Thr Asp Gly Asn Asn Gln Pro  
 235 240 245 250

Asn Thr Pro Asp Ile Ala Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Ser Met Ala  
 255 260 265

Thr Cys Leu

<210> 5  
 <211> 1070  
 <212> DNA  
 <213> *Thermomyces ibadanensis*

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(67)  
 <223>

```

<220>
<221> CDS
<222> (128)..(296)
<223>

<220>
<221> CDS
<222> (357)..(690)
<223>

<220>
<221> CDS
<222> (765)..(1067)
<223>

<220>
<221> mat_peptide
<222> (67)..0
<223>

<400> 5
atg cgg agc tcc ctc gtg ctg ttc ttc ctc tct gcg tgg acg gcc ttg      48
Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Leu Ser Ala Trp Thr Ala Leu
      -20                -15                -10

gcg cgg cct gtt cga cga g gtatgtagca agggacacta ttacatgttg      97
Ala Arg Pro Val Arg Arg
      -5                -1

accttggtga ttctaagact gcatgcgcag cg gtt ccg caa gat ctg ctc gac      150
                        Ala Val Pro Gln Asp Leu Leu Asp
                                5

cag ttt gaa ctc ttt tca caa tat tcg gcg gcc gca tac tgt gcg gca      198
Gln Phe Glu Leu Phe Ser Gln Tyr Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Ala Ala
      10                15                20

aac aat cat gct cca gtg ggc tca gac gta acg tgc tcg gag aat gtc      246
Asn Asn His Ala Pro Val Gly Ser Asp Val Thr Cys Ser Glu Asn Val
      25                30                35                40

tgc cct gag gta gat gcg gcg gac gca acg ttt ctc tat tct ttt gaa      294
Cys Pro Glu Val Asp Ala Ala Asp Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu
                        45                50                55

ga gtgggtgtcg acaaagcaca gagacagtag tagagacagc agtctaactg      346
Asp

agatgtgcag t tct gga tta ggc gat gtt acc ggc ctt ctc gct ctc gac      396
                        Ser Gly Leu Gly Asp Val Thr Gly Leu Leu Ala Leu Asp
                                60                65                70

aac acg aat aaa ctg atc gtc ctc tct ttc cgc ggc tct cgc tca gta      444
Asn Thr Asn Lys Leu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Arg Ser Val
                        75                80                85

```

gag aac tgg atc gcg aac ctc gcc gcc gac ctg aca gaa ata tct gac 492  
 Glu Asn Trp Ile Ala Asn Leu Ala Ala Asp Leu Thr Glu Ile Ser Asp  
                   90                                  95                                  100

atc tgc tcc ggc tgc gag ggg cat gtc ggc ttc gtt act tct tgg agg 540  
 Ile Cys Ser Gly Cys Glu Gly His Val Gly Phe Val Thr Ser Trp Arg  
                   105                                  110                                  115

tct gta gcc gac act ata agg gag cag gtg cag aat gcc gtg aac gag 588  
 Ser Val Ala Asp Thr Ile Arg Glu Gln Val Gln Asn Ala Val Asn Glu  
                   120                                  125                                  130

cat ccc gat tac cgc gtg gtc ttt acc gga cat agc ttg gga ggc gca 636  
 His Pro Asp Tyr Arg Val Val Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala  
                   135                                  140                                  145                                  150

ctg gca act att gcc gca gca gct ctg cga gga aat gga tac aat atc 684  
 Leu Ala Thr Ile Ala Ala Ala Ala Leu Arg Gly Asn Gly Tyr Asn Ile  
                                   155                                  160                                  165

gac gtg gtagtggtga agaagccacc cagacaaaca attatgtgga aacatgcaag 740  
 Asp Val

gatggctaatacaggtccaacag ttc tca tat ggc gcg ccc cgc gtc ggt 791  
   Phe Ser Tyr Gly Ala Pro Arg Val Gly  
   170                                  175

aac agg gca ttt gca gaa ttc ctg acc gca cag acg ggc ggc acc ctg 839  
 Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr Ala Gln Thr Gly Gly Thr Leu  
                   180                                  185                                  190

tat cgc atc acc cat acc aat gat atc gtc cct aga ctc cct cct cga 887  
 Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile Val Pro Arg Leu Pro Pro Arg  
                   195                                  200                                  205

gac tgg ggt tac agc cac tct agc ccg gag tac tgg gtc acg tct ggt 935  
 Asp Trp Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro Glu Tyr Trp Val Thr Ser Gly  
                   210                                  215                                  220                                  225

aac gac gtc cca gtg acc gca aac gac atc acc gtc gtg gag ggc atc 983  
 Asn Asp Val Pro Val Thr Ala Asn Asp Ile Thr Val Val Glu Gly Ile  
                                   230                                  235                                  240

gat tcc acc gac ggg aac aac cag ggg aat atc cca gac atc cct tcg 1031  
 Asp Ser Thr Asp Gly Asn Asn Gln Gly Asn Ile Pro Asp Ile Pro Ser  
                   245                                  250                                  255

cat cta tgg tat ttc ggt ccc att tca gag tgt gat tag 1070  
 His Leu Trp Tyr Phe Gly Pro Ile Ser Glu Cys Asp  
                   260                                  265

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 291

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Thermomyces ibadanensis

&lt;400&gt; 6

Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Leu Ser Ala Trp Thr Ala Leu  
 -20 -15 -10

Ala Arg Pro Val Arg Arg Ala Val Pro Gln Asp Leu Leu Asp Gln Phe  
 -5 -1 1 5 10

Glu Leu Phe Ser Gln Tyr Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Ala Ala Asn Asn  
 15 20 25

His Ala Pro Val Gly Ser Asp Val Thr Cys Ser Glu Asn Val Cys Pro  
 30 35 40

Glu Val Asp Ala Ala Asp Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser  
 45 50 55

Gly Leu Gly Asp Val Thr Gly Leu Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys  
 60 65 70

Leu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Arg Ser Val Glu Asn Trp Ile  
 75 80 85 90

Ala Asn Leu Ala Ala Asp Leu Thr Glu Ile Ser Asp Ile Cys Ser Gly  
 95 100 105

Cys Glu Gly His Val Gly Phe Val Thr Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp  
 110 115 120

Thr Ile Arg Glu Gln Val Gln Asn Ala Val Asn Glu His Pro Asp Tyr  
 125 130 135

Arg Val Val Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Ile  
 140 145 150

Ala Ala Ala Ala Leu Arg Gly Asn Gly Tyr Asn Ile Asp Val Phe Ser  
 155 160 165 170

Tyr Gly Ala Pro Arg Val Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr  
 175 180 185

Ala Gln Thr Gly Gly Thr Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile  
 190 195 200

Val Pro Arg Leu Pro Pro Arg Asp Trp Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro  
 205 210 215

Glu Tyr Trp Val Thr Ser Gly Asn Asp Val Pro Val Thr Ala Asn Asp  
 220 225 230

Ile Thr Val Val Glu Gly Ile Asp Ser Thr Asp Gly Asn Asn Gln Gly  
 235 240 245 250

Asn Ile Pro Asp Ile Pro Ser His Leu Trp Tyr Phe Gly Pro Ile Ser  
 255 260 265

Glu Cys Asp

<210> 7  
 <211> 1064  
 <212> DNA  
 <213> Talaromyces emersonii

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1).. (88)  
 <223>

<220>  
 <221> mat\_peptide  
 <222> (88).. 0  
 <223>

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (142).. (310)  
 <223>

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (362).. (695)  
 <223>

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (756).. (1061)  
 <223>

<400> 7  
 atg ttc aaa tcg gcc gct gtg cgg gcc att gct gcc ctc gga ctg act 48  
 Met Phe Lys Ser Ala Ala Val Arg Ala Ile Ala Ala Leu Gly Leu Thr  
 -25 -20 -15

gcg tca gtc ttg gct gct cct gtt gaa ctg ggc cgt cga g gtaaggaagc 98  
 Ala Ser Val Leu Ala Ala Pro Val Glu Leu Gly Arg Arg  
 -10 -5 -1

atgacggaga gaacaccctg tgcgacctgc tgacatcctt cag at gtt tct cag 152





gtc acg cat tcc gat gac cct gtc ccc aag ctg cct ccc agg agt ttt 884  
 Val Thr His Ser Asp Asp Pro Val Pro Lys Leu Pro Pro Arg Ser Phe  
 200 205 210

gga tac agc caa ccg agc cca gag tac tgg atc acc tca ggg aac aat 932  
 Gly Tyr Ser Gln Pro Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Thr Ser Gly Asn Asn  
 215 220 225

gta act gtt caa ccg tcc gac atc gag gtc atc gaa ggc gtc gac tcc 980  
 Val Thr Val Gln Pro Ser Asp Ile Glu Val Ile Glu Gly Val Asp Ser  
 230 235 240

act gca ggc aac gac ggc acc cct gct ggc ctt gac att gat gct cat 1028  
 Thr Ala Gly Asn Asp Gly Thr Pro Ala Gly Leu Asp Ile Asp Ala His  
 245 250 255

cgg tgg tac ttt gga ccc att agc gca tgt tcg tga 1064  
 Arg Trp Tyr Phe Gly Pro Ile Ser Ala Cys Ser  
 260 265 270

<210> 8  
 <211> 299  
 <212> PRT  
 <213> *Talaromyces emersonii*

<400> 8

Met Phe Lys Ser Ala Ala Val Arg Ala Ile Ala Ala Leu Gly Leu Thr  
 -25 -20 -15

Ala Ser Val Leu Ala Ala Pro Val Glu Leu Gly Arg Arg Asp Val Ser  
 -10 -5 -1 1

Gln Asp Leu Phe Asp Gln Leu Asn Leu Phe Glu Gln Tyr Ser Ala Ala  
 5 10 15

Ala Tyr Cys Ser Ala Asn Asn Glu Ala Ser Ala Gly Thr Ala Ile Ser  
 20 25 30 35

Cys Ser Ala Gly Asn Cys Pro Leu Val Gln Gln Ala Gly Ala Thr Ile  
 40 45 50

Leu Tyr Ser Phe Asn Asn Ile Gly Ser Gly Asp Val Thr Gly Phe Leu  
 55 60 65

Ala Leu Asp Ser Thr Asn Gln Leu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser  
 70 75 80

Glu Thr Leu Glu Asn Trp Ile Ala Asp Leu Glu Ala Asp Leu Val Asp  
 85 90 95

Ala Ser Ala Ile Cys Ser Gly Cys Glu Ala His Asp Gly Phe Leu Ser  
100 105 110 115

Ser Trp Asn Ser Val Ala Ser Thr Leu Thr Ser Lys Ile Ser Ser Ala  
120 125 130

Val Asn Glu His Pro Ser Tyr Lys Leu Val Phe Thr Gly His Ser Leu  
135 140 145

Gly Ala Ala Leu Ala Thr Leu Gly Ala Val Ser Leu Arg Glu Ser Gly  
150 155 160

Tyr Asn Ile Asp Leu Tyr Asn Tyr Gly Cys Pro Arg Val Gly Asn Thr  
165 170 175

Ala Leu Ala Asp Phe Ile Thr Thr Gln Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Arg  
180 185 190 195

Val Thr His Ser Asp Asp Pro Val Pro Lys Leu Pro Pro Arg Ser Phe  
200 205 210

Gly Tyr Ser Gln Pro Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Thr Ser Gly Asn Asn  
215 220 225

Val Thr Val Gln Pro Ser Asp Ile Glu Val Ile Glu Gly Val Asp Ser  
230 235 240

Thr Ala Gly Asn Asp Gly Thr Pro Ala Gly Leu Asp Ile Asp Ala His  
245 250 255

Arg Trp Tyr Phe Gly Pro Ile Ser Ala Cys Ser  
260 265 270

<210> 9

<211> 1074

<212> DNA

<213> *Talaromyces byssochlamydoides*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(85)

<223>

<220>

<221> CDS

```

<222> (150)..(318)
<223>

<220>
<221> CDS
<222> (376)..(709)
<223>

<220>
<221> CDS
<222> (760)..(1071)
<223>

<220>
<221> mat_peptide
<222> (85)..()
<223>

<400> 9
atg ttc aaa tca act gtc cgg gcc atc gcc gcc ctc gga ctg acc tcg      48
Met Phe Lys Ser Thr Val Arg Ala Ile Ala Ala Leu Gly Leu Thr Ser
          -25                -20                -15

tca gtc ttt gct gct cct atc gaa ctg ggc cgt cga g gtaaggggca      95
Ser Val Phe Ala Ala Pro Ile Glu Leu Gly Arg Arg
          -10                -5                -1

tgaaaactcc ctgtatggca tctcatctgg cagcatatct actgacatcc tcag at      151
                                         Asp

gtt tcg gag cag ctc ttc aac cag ttc aat ctc ttc gag cag tat tcc      199
Val Ser Glu Gln Leu Phe Asn Gln Phe Asn Leu Phe Glu Gln Tyr Ser
          5                10                15

gcg gct gcg tac tgt cca gcc aac ttt gag tcc gct tcc ggc gcg gca      247
Ala Ala Ala Tyr Cys Pro Ala Asn Phe Glu Ser Ala Ser Gly Ala Ala
          20                25                30

att tct tgt tcc aca ggc aat tgc ccg ctc gtc caa cag gct ggc gca      295
Ile Ser Cys Ser Thr Gly Asn Cys Pro Leu Val Gln Gln Ala Gly Ala
          35                40                45

acc acc ctg tat gca ttc aac aa  gtgagtgtca tggaaaggct tgttggtaca      348
Thr Thr Leu Tyr Ala Phe Asn Asn
          50                55

ccgtacgggt atgttgactg tcatcag c atc ggc tct ggc gat gtg acg ggt      400
                               Ile Gly Ser Gly Asp Val Thr Gly
                               60                65

ttt ctt gct gtc gat ccg acc aac cga ctc atc gtc ttg tcg ttc cgg      448
Phe Leu Ala Val Asp Pro Thr Asn Arg Leu Ile Val Leu Ser Phe Arg
          70                75                80

ggg tca gag agt ctc gag aac tgg atc act aat ctc agc gcc gac ctg      496
Gly Ser Glu Ser Leu Glu Asn Trp Ile Thr Asn Leu Ser Ala Asp Leu
          85                90                95

```

gtc gat gcc tct gca atc tgt tcc ggg tgt gaa gcc cat gac gga ttc 544  
 Val Asp Ala Ser Ala Ile Cys Ser Gly Cys Glu Ala His Asp Gly Phe  
 100 105 110

tat tcg tct tgg caa tca gtt gcc agc act ctg acc tcc caa atc tcg 592  
 Tyr Ser Ser Trp Gln Ser Val Ala Ser Thr Leu Thr Ser Gln Ile Ser  
 115 120 125

tcg gcc ctc tcg gca tat cca aac tac aag ctg gtc ttc acc ggc cac 640  
 Ser Ala Leu Ser Ala Tyr Pro Asn Tyr Lys Leu Val Phe Thr Gly His  
 130 135 140 145

agt ctc gga gcc gcc tta gct aca ctt gga gct gtc tct ctc agg gag 688  
 Ser Leu Gly Ala Ala Leu Ala Thr Leu Gly Ala Val Ser Leu Arg Glu  
 150 155 160

agt gga tac aat atc gac ctc gtaagttcct ggcatgcca tcatgaaag 739  
 Ser Gly Tyr Asn Ile Asp Leu  
 165

agactcacag ttaactgtag tac aac ttt ggc tgt ccc cgg gtc ggc aac act 792  
 Tyr Asn Phe Gly Cys Pro Arg Val Gly Asn Thr  
 170 175

gcg ctc gca gac ttt att acc aac caa acc ggt ggc aca aat tac cgg 840  
 Ala Leu Ala Asp Phe Ile Thr Asn Gln Thr Gly Gly Thr Asn Tyr Arg  
 180 185 190 195

gta acg cat tac gag gac cct gtc ccc aag ctg cct ccc agg agt ttt 888  
 Val Thr His Tyr Glu Asp Pro Val Pro Lys Leu Pro Pro Arg Ser Phe  
 200 205 210

gga tac agc caa cct agc ccg gaa tac tgg atc acg tcg gga aac aat 936  
 Gly Tyr Ser Gln Pro Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Thr Ser Gly Asn Asn  
 215 220 225

gtg act gtg act tcg tcc gac atc gat gtc gtc gtg ggt gtc gac tcg 984  
 Val Thr Val Thr Ser Ser Asp Ile Asp Val Val Val Gly Val Asp Ser  
 230 235 240

act gca ggc aac gac ggg acg cct gat ggc ctt gac act gct gcc cat 1032  
 Thr Ala Gly Asn Asp Gly Thr Pro Asp Gly Leu Asp Thr Ala Ala His  
 245 250 255

agg tgg tat ttt gga cct act acc gaa tgt tcg tcg tca tga 1074  
 Arg Trp Tyr Phe Gly Pro Thr Thr Glu Cys Ser Ser Ser  
 260 265 270

<210> 10  
 <211> 300  
 <212> PRT  
 <213> *Talaromyces byssochlamydoides*

<400> 10

Met Phe Lys Ser Thr Val Arg Ala Ile Ala Ala Leu Gly Leu Thr Ser

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

Tyr Ser Gln Pro Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Thr Ser Gly Asn Asn Val  
 215 220 225

Thr Val Thr Ser Ser Asp Ile Asp Val Val Val Gly Val Asp Ser Thr  
 230 235 240

Ala Gly Asn Asp Gly Thr Pro Asp Gly Leu Asp Thr Ala Ala His Arg  
 245 250 255 260

Trp Tyr Phe Gly Pro Thr Thr Glu Cys Ser Ser Ser  
 265 270

<210> 11  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> Oligo 19671

<400> 11  
 ctcccttctc tgaacaataa accc

24

<210> 12  
 <211> 77  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> Oligo 991222J1

<220>  
 <221> misc-feature  
 <222> (50)..(57)  
 <223> n是C或G或T或A

<400> 12  
 cctctagatc tcgagctcgg tcaccggtgg cctccgcggc cgctgctawn nwnnwnaag

60

acatgtccca attaacc

77