



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102770536 B

(45) 授权公告日 2014. 04. 30

(21) 申请号 201080055012. 4

C12N 1/15(2006. 01)

(22) 申请日 2010. 11. 22

C12N 1/19(2006. 01)

(30) 优先权数据

C12N 1/21(2006. 01)

2009-277096 2009. 12. 05 JP

C12N 5/10(2006. 01)

C12N 9/04(2006. 01)

(续)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 06. 04

(56) 对比文件

JP 9-506249 A, 1997. 06. 24, 全文.

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2010/070761 2010. 11. 22

CN 101348795 A, 2009. 01. 21, 全文.

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/068050 JA 2011. 06. 09

Yao Guo et al..Cloning and heterologous expression of glucose oxidase gene from *Aspergillus niger* Z-25 in *Pichia pastoris*. 《Appl Biochem Biotechnol》. 2009, 第162卷(第2期), 498-509.

(73) 专利权人 天野酶株式会社

地址 日本爱知县

Hecht HJ et al..Crystal Structure of Glucose Oxidase from *Aspergillus niger* Refined at 2.3A Reslution. 《J. Mol. Biol.》. 1993, 第229卷(第1期), 153-172.

(72) 发明人 西尾享一 小池田聪

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 金世煜 苗莹

审查员 马俊凯

(51) Int. Cl.

C12N 15/00(2006. 01)

权利要求书1页 说明书24页

序列表73页 附图14页

(54) 发明名称

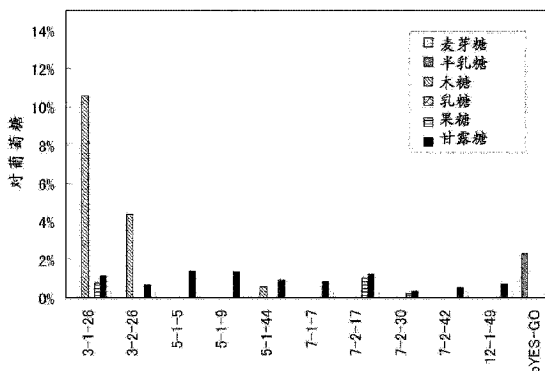
突变酶及其用途

(57) 摘要

本发明的课题在于提供一种显示葡萄糖脱氢酶活性的新型酶。此外,本发明的课题在于提供有关酶的修饰的新型方法。本发明提供一种突变酶,其由在来自微生物的葡萄糖氧化酶的氨基酸序列中选自以下(1)~(13)中的一个或两个以上的氨基酸被其它氨基酸取代而得的氨基酸序列构成:(1)与序列号1所示的氨基酸序列的115位氨基酸对应的氨基酸;(2)与序列号1所示的氨基酸序列的131位氨基酸对应的氨基酸;(3)与序列号1所示的氨基酸序列的132位氨基酸对应的氨基酸;(4)与序列号1所示的氨基酸序列的193位氨基酸对应的氨基酸;(5)与序列号1所示的氨基酸序列的353位氨基酸对应的氨基酸;(6)与序列号1所示的氨基酸序列的436位氨基酸对应的氨基酸;(7)与序列号1所示的氨基酸序列的446位氨基酸对应的氨基酸;(8)与序列号1所示的氨基酸

序列的472位氨基酸对应的氨基酸;(9)与序列号1所示的氨基酸序列的511位氨基酸对应的氨基酸;(10)与序列号1所示的氨基酸序列的535位氨基酸对应的氨基酸;(11)与序列号1所示的氨基酸序列的537位氨基酸对应的氨基酸;(12)与序列号1所示的氨基酸序列的582位氨基酸对应的氨基酸;(13)与序列号1所示的氨基酸序列的583位氨基酸对应的氨基酸。

G0突变株 糖底物特异性(GDH测定)



[ 转续页 ]

CN 102770536 B

[ 接上页 ]

(51) Int. Cl.

*C12Q 1/26* (2006.01)

*C12N 15/09* (2006.01)

1. 一种突变酶,由序列号 7 ~ 21、59 ~ 61 中的任一氨基酸序列所构成。
2. 一种基因,编码权利要求 1 所述的突变酶。
3. 根据权利要求 2 所述的基因,由序列号 22 ~ 36、62 ~ 64 中的任一碱基序列构成。
4. 一种重组 DNA,包含权利要求 2 或 3 所述的基因。
5. 一种微生物,具有权利要求 4 所述的重组 DNA。
6. 一种葡萄糖测定法,其特征在于,使用权利要求 1 所述的突变酶,测定试样中的葡萄糖。
7. 一种葡萄糖测定用试剂,其特征在于,包含权利要求 1 所述的突变酶。
8. 一种葡萄糖测定用试剂盒,包含权利要求 7 所述的葡萄糖测定用试剂。
9. 一种方法,其特征在于,使用权利要求 1 所述的突变酶,降低工业制品或其原料中的葡萄糖量。
10. 一种酶剂,含有权利要求 1 所述的突变酶。
11. 一种突变酶的设计方法,包括以下步骤(i)和(ii):
  - (i)在序列号 1 的氨基酸序列中,确定选自以下(3)、(5)、(7)、(12)中的一个或两个以上的氨基酸的步骤:
    - (3)与序列号 1 所示的氨基酸序列的 132 位氨基酸对应的氨基酸;
    - (5)与序列号 1 所示的氨基酸序列的 353 位氨基酸对应的氨基酸;
    - (7)与序列号 1 所示的氨基酸序列的 446 位氨基酸对应的氨基酸;
    - (12)与序列号 1 所示的氨基酸序列的 582 位氨基酸对应的氨基酸;
  - (ii)基于突变对象酶的氨基酸序列,构建在步骤(i)中确定的氨基酸序列被其它氨基酸取代而得的序列号 7 ~ 21、59 ~ 61 中的任一氨基酸序列的步骤。
12. 根据权利要求 11 所述的设计方法,其中,在步骤(i)中被取代的氨基酸为(3)的氨基酸、(7)的氨基酸或(12)的氨基酸、或者选自它们中的两个以上的氨基酸的组合。
13. 根据权利要求 11 所述的设计方法,其中,在步骤(i)中被取代的氨基酸为(7)的氨基酸及(12)的氨基酸。
14. 一种突变酶的制备方法,包括以下步骤(I)~(III):
  - (I)准备将序列号 7 ~ 21、59 ~ 61 中的任一氨基酸序列进行编码的核酸的步骤;
  - (II)使所述核酸进行表达的步骤,及
  - (III)回收表达产物的步骤。

## 突变酶及其用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及突变酶及酶的修饰方法,提供经脱氢酶(dehydrogenase)化的葡萄糖氧化酶及其制备方法等。本申请主张基于2009年12月5日申请的日本专利申请第2009-277096号的优先权,通过参照的方式援引该专利申请的全部内容。

### 背景技术

[0002] 使用电化学生物传感器的简易型自我血糖测定器得到广泛使用。在该生物传感器中利用以葡萄糖为底物的酶即葡萄糖氧化酶(以下简称为“GO”)、葡萄糖脱氢酶(以下简称为“GDH”)。GO具有针对葡萄糖的特异性高且热稳定性优异这样的优点,但另一方面被指出如下问题:在使用GO的测定中容易受到测定样品中的溶解氧的影响,溶解氧对测定结果造成影响。

[0003] 另一方面,作为不受到溶解氧的影响且在NAD(P)不存在的情况下对葡萄糖发生作用的酶,已知以吡咯喹啉醌(PQQ)为辅酶的GDH(以下,简称为“PQQ-GDH”) (例如参照专利文献1~3)。但是,PQQ-GDH存在如下问题:(1)PQQ容易从酶中离解;(2)针对葡萄糖的选择性低;以及(3)由于一般存在于膜组分,因此其提取、分离操作中存在困难等。

[0004] 除PQQ-GDH以外,作为不受到溶解氧的影响且在NAD(P)不存在的情况下对葡萄糖发生作用的酶,已知以黄素腺嘌呤二核苷酸为辅酶的GDH(以下,简称为“FAD-GDH”)。迄今为止,从米曲霉(非专利文献1~4、专利文献4)及土曲霉(专利文献5)中分别取得FAD-GDH。作为FAD-GDH的一般特性,已知:针对木糖的反应性比较高(例如在专利文献5所公开的FAD-GDH的情况下,对木糖的反应性为对葡萄糖的作用性的10%左右)以及最适温度高(例如专利文献4所公开的FAD-GDH的最适温度为约60°C)。应予说明,以提高实用性等为目的,正在大力尝试酶的修饰。报告FAD-GDH的修饰的文献如下所示(专利文献6~9)。

[0005] 最近,报告了利用GO的结构进行FAD-GDH的立体结构分析,Glu414及Arg502对底物识别是重要的(非专利文献5,6)。

[0006] 专利文献

[0007] 专利文献1:日本特开2000-350588号公报

[0008] 专利文献2:日本特开2001-197888号公报

[0009] 专利文献3:日本特开2001-346587号公报

[0010] 专利文献4:国际公开第2007/139013号小册子

[0011] 专利文献5:国际公开第2004/058958号小册子

[0012] 专利文献6:日本特开2009-225801号公报

[0013] 专利文献7:日本特开2009-225800号公报

[0014] 专利文献8:日本特开2009-159964号公报

[0015] 专利文献9:日本特开2008-237210号公报

[0016] 非专利文献1:Studies on the glucose dehydrogenase of *Aspergillus oryzae*. I. Induction of its synthesis by p-benzoquinone and hydroquinone, T.

C. Bak, and R. Sato, *Biochim. Biophys. Acta*, 139, 265-276 (1967).

[0017] 非专利文献 2: Studies on the glucose dehydrogenase of *Aspergillus oryzae*. II. Purification and physical and chemical properties, T. C. Bak, *Biochim. Biophys. Acta*, 139, 277-293 (1967).

[0018] 非专利文献 3: Studies on the glucose dehydrogenase of *Aspergillus oryzae*. III. General enzymatic properties, T. C. Bak, *Biochim. Biophys. Acta*, 146, 317-327 (1967).

[0019] 非专利文献 4: Studies on the glucose dehydrogenase of *Aspergillus oryzae*. I V. Histidyl residue as an active site, T. C. Bak, and R. Sato, *Biochim. Biophys. Acta*, 146, 328-335 (1967).

[0020] 非专利文献 5: 2009 年度日本药学会年会要旨集卷:129 号:第 3 页:118 演讲题目序号:26Q-pm115

[0021] 非专利文献 6: 2009 年度日本生化学会大会要旨集演讲题目序号:3T5a-5 (3P-109)

### 发明内容

[0022] FAD-GDH 与 PQQ-GDH 相比存在有利之处。另一方面, FAD-GDH 针对木糖的反应性比较高, 因此在测定木糖负荷试验受试者的血糖时存在难以检测出正确的测定值这样的问题。此外, 由于最适温度高, 因此在寒冷地区的测定等温度低的环境下进行测定时, 无法发挥充分的活性。在这种测定条件下需要进行温度修正且还容易产生测定误差。如上所述, 原有的 FAD-GDH 存在待改善之处, 期望实用性的进一步提高。本发明的课题之一在于响应这种要求。本发明目前的一个课题为提供有关酶的修饰的新型方法。

[0023] 作为用于获得实用性高的 GDH 的方法, 大致有: (1) 将现有的 GDH (FAD-GDH、PQQ-GDH) 进行修饰的方法、以及 (2) 将微生物等进行筛选的方法。这些方法大多已有尝试 (例如上述专利文献 6、7), 今后, 与更有效的酶的创造相关的可能性低。鉴于该状况, 本发明的发明人等着眼于葡萄糖氧化酶 (GO) 中没有 FAD-GDH 所具有的上述问题。已知 GO 与 FAD-GDH 的氨基酸序列的同源性比较高。着眼于该同源性, 决定采用对 GO 赋予 GDH 活性, 即将 GO 进行 GDH 化这样的新方法。首先, 选择来自黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 的 GO, 将其氨基酸序列与已知的多种 FAD-GDH 的氨基酸序列进行多重比对。然后, 通过利用比对结果与 GO 的立体结构数据, 从而在位于 GO 的活性中心附近的氨基酸中, 检索出虽然在 FAD-GDH 间保守 (共同性高), 但是在 GO 与 FAD-GDH 之间不同的氨基酸。结果是, 13 处氨基酸位置得到确定。接着, 制作在这些氨基酸位置导入突变而得的突变酶, 研究其特性, 结果认定 GDH 活性与 GO 活性的比率 (GDH 活性 / GO 活性) 上升的突变酶。因此, 决定分析该突变酶的序列。由此, 成功地确定了对 GDH 活性的上升、即 GDH 化有效的 4 处氨基酸位置。该结果一方面启示了在最初确定的 13 处内, 除该 4 处以外, 对 GDH 活性的上升没有效果。但是, 在是通过 GO 与 FAD-GDH 的详细比较而发现的氨基酸位置方面没有不同, 因此对于其余 9 处也隐藏着对底物特性、辅酶特异性、温度稳定性等其它特性的改良、改善有用的可能性。此外, 通过并用两种以上, 也有提高 GDH 活性、其它特性的可能性。由此, 其余 9 处氨基酸位置也有价值, 其活用得到期待。

[0024] 另一方面,进一步研究的结果,成功地确定了对 GDH 化特别有效的取代位置的组合。在采用该组合时,底物特异性也良好(对木糖的反应性低)。此外,对于最优异的组合,尝试取代的最优化(即,最有效的取代后的氨基酸的确定),结果对 GDH 化有效的取代后的氨基酸得到确定,并且发现了带来完全的 GDH 化的取代后的氨基酸。此外,确认了完全 GDH 化的突变体的底物特异性也优异(对木糖的反应性低)。

[0025] 可是,也经历很多通过将有效果的两种氨基酸突变进行组合而产生相加或协同的效果的可能性高的情况。因此,可以说确定成功的 4 处突变对象位置不限于单独,关于其组合也对 GDH 化有效。

[0026] 此外,对于同种酶而言,若鉴于结构(一级结构、立体结构)的相似性高,同样的突变产生同样的效果的概率高这样的技术常识,可以说对于与后述实施例所示的黑曲霉的 GO 之间结构上的相似性实际上非常高的尼崎青霉(*Penicillium amagasakiense*)的 GO、其它 GO,可适用本发明的发明人等发现的突变方法。

[0027] 如上所述,本发明的发明人等成功地将 GO 进行 GDH 化,创造出 GDH 活性高的突变型 GO。同时,还成功地确定了对 GO 的突变有效的氨基酸位置。在所得突变型 GO 中,有的不显示出对木糖的反应性。即,在不显示出对木糖的反应性方面,成功地取得超出现有 FAD-GDH 的 GDH。

[0028] 以上成果一方面证实:在结构相似性高的两种酶之间,将氨基酸序列进行网罗地比较,并且利用活性中心附近的立体结构这样的方法对酶的修饰(特别是,对于修饰对象的酶,赋予其它酶具有的特性或其它酶在更优选的状态下具备的特性)有效。

[0029] 以下示出的本发明基于以上成果。

[0030] [1] 一种突变酶,由在来自微生物的葡萄糖氧化酶的氨基酸序列中选自以下(1)~(13)中的一个或两个以上的氨基酸被其它氨基酸取代而得的氨基酸序列所构成:

[0031] (1) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 115 位氨基酸对应的氨基酸;

[0032] (2) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 131 位氨基酸对应的氨基酸;

[0033] (3) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 132 位氨基酸对应的氨基酸;

[0034] (4) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 193 位氨基酸对应的氨基酸;

[0035] (5) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 353 位氨基酸对应的氨基酸;

[0036] (6) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 436 位氨基酸对应的氨基酸;

[0037] (7) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 446 位氨基酸对应的氨基酸;

[0038] (8) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 472 位氨基酸对应的氨基酸;

[0039] (9) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 511 位氨基酸对应的氨基酸;

[0040] (10) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 535 位氨基酸对应的氨基酸;

[0041] (11) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 537 位氨基酸对应的氨基酸;

[0042] (12) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 582 位氨基酸对应的氨基酸;

[0043] (13) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 583 位氨基酸对应的氨基酸。

[0044] [2] 根据 [1] 所述的突变酶,其中,来自微生物的葡萄糖氧化酶的氨基酸序列为序列号 1 或 2 的氨基酸序列。

[0045] [3] 根据 [1] 或 [2] 所述的突变酶,其中,被取代的氨基酸为(3)的氨基酸、(5)的氨基酸、(7)的氨基酸或(12)的氨基酸、或者选自它们中的两个以上的氨基酸的组合。

[0046] [4] 根据 [3] 所述的突变酶,其中,对于(3)的氨基酸,取代后的氨基酸为丙氨酸,对于(5)的氨基酸,取代后的氨基酸为丙氨酸,对于(7)的氨基酸,取代后的氨基酸为组氨酸,对于(12)的氨基酸,取代后的氨基酸为丝氨酸、精氨酸、亮氨酸或脯氨酸。

[0047] [5] 根据 [1] 或 [2] 所述的突变酶,其中,被取代的氨基酸为(3)的氨基酸、(7)的氨基酸或(12)的氨基酸、或者选自它们中的两个以上的氨基酸的组合。

[0048] [6] 根据 [5] 所述的突变酶,其中,对于(3)的氨基酸,取代后的氨基酸为丙氨酸,对于(7)的氨基酸,取代后的氨基酸为组氨酸,对于(12)的氨基酸,取代后的氨基酸为丝氨酸、精氨酸、亮氨酸或脯氨酸。

[0049] [7] 根据 [1] 或 [2] 所述的突变酶,其中,被取代的氨基酸为(7)的氨基酸及(12)的氨基酸。

[0050] [8] 根据 [7] 所述的突变酶,其中,对于(7)的氨基酸,取代后的氨基酸为组氨酸,对于(12)的氨基酸,取代后的氨基酸为丝氨酸、精氨酸、亮氨酸或脯氨酸。

[0051] [9] 根据 [1] 所述的突变酶,其中,由序列号 7 ~ 21、59 ~ 61 中的任一氨基酸序列所构成。

[0052] [10] 一种基因,编码 [1] ~ [9] 中任一项所述的突变酶。

[0053] [11] 根据 [10] 所述的基因,其中,包含序列号 22 ~ 36、62 ~ 64 中的任一碱基序列。

[0054] [12] 一种重组 DNA,包含 [10] 或 [11] 所述的基因。

[0055] [13] 一种微生物,具有 [12] 所述的重组 DNA。

[0056] [14] 一种葡萄糖测定法,其特征在于,使用 [1] ~ [9] 中任一项所述的突变酶,测定试样中的葡萄糖。

[0057] [15] 一种葡萄糖测定用试剂,其特征在于,包含 [1] ~ [9] 中任一项所述的突变酶。

[0058] [16] 一种葡萄糖测定用试剂盒,包含 [15] 所述的葡萄糖测定用试剂。

[0059] [17] 一种方法,其特征在于,使用 [1] ~ [9] 中任一项所述的突变酶,降低工业制品或其原料中的葡萄糖量。

[0060] [18] 一种酶剂,含有 [1] ~ [9] 中任一项所述的突变酶。

[0061] [19] 一种突变酶的设计方法,包括以下步骤(i)和(ii):

[0062] (i) 在突变对象酶的氨基酸序列中,确定选自以下(1) ~ (13)中的一个或两个以上的氨基酸的步骤,上述突变对象酶为来自微生物的葡萄糖氧化酶或来自微生物的黄素腺嘌呤二核苷酸依赖性葡萄糖脱氢酶:

[0063] (1) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 115 位氨基酸对应的氨基酸;

[0064] (2) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 131 位氨基酸对应的氨基酸;

[0065] (3) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 132 位氨基酸对应的氨基酸;

[0066] (4) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 193 位氨基酸对应的氨基酸;

[0067] (5) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 353 位氨基酸对应的氨基酸;

[0068] (6) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 436 位氨基酸对应的氨基酸;

[0069] (7) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 446 位氨基酸对应的氨基酸;

[0070] (8) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 472 位氨基酸对应的氨基酸;

- [0071] (9) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 511 位氨基酸对应的氨基酸；
- [0072] (10) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 535 位氨基酸对应的氨基酸；
- [0073] (11) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 537 位氨基酸对应的氨基酸；
- [0074] (12) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 582 位氨基酸对应的氨基酸；
- [0075] (13) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 583 位氨基酸对应的氨基酸；
- [0076] (ii) 基于突变对象酶的氨基酸序列,构建在步骤(i)中确定的氨基酸序列被其它氨基酸取代而得的氨基酸序列的步骤。
- [0077] [20] 根据 [19] 所述的设计方法,其中,突变对象酶为来自微生物的葡萄糖氧化酶,在步骤(i)中被取代的氨基酸为(3)的氨基酸、(5)的氨基酸、(7)的氨基酸或(12)的氨基酸、或者选自它们中的两个以上的氨基酸的组合。
- [0078] [21] 根据 [19] 所述的设计方法,其中,突变对象酶为来自微生物的葡萄糖氧化酶,在步骤(i)中被取代的氨基酸为(3)的氨基酸、(7)的氨基酸或(12)的氨基酸、或者选自它们中的两个以上的氨基酸的组合。
- [0079] [22] 根据 [19] 所述的设计方法,其中,突变对象酶为来自微生物的葡萄糖氧化酶,在步骤(i)中被取代的氨基酸为(7)的氨基酸及(12)的氨基酸。
- [0080] [23] 根据 [20] ~ [22] 中任一项所述的设计方法,其中,来自微生物的葡萄糖氧化酶为黑曲霉(*Aspergillus niger*)或尼崎青霉(*Penicillium amagasakiense*)的葡萄糖氧化酶。
- [0081] [24] 根据 [23] 所述的设计方法,其中,葡萄糖氧化酶的氨基酸序列为序列号 1 或 2 的氨基酸序列。
- [0082] [25] 根据 [19] 所述的设计方法,其中,突变对象酶为意大利青霉(*Penicillium italicum*)、薄刺青霉(*Penicillium lilacinoechinulatum*)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)或土曲霉(*Aspergillus terreus*)的黄素腺嘌呤二核苷酸依赖性葡萄糖脱氢酶。
- [0083] [26] 根据 [25] 所述的设计方法,其中,黄素腺嘌呤二核苷酸依赖性葡萄糖脱氢酶的氨基酸序列为序列号 3 ~ 6 中的任一氨基酸序列。
- [0084] [27] 一种突变酶的制备方法,包括以下步骤(I) ~ (III)：
- [0085] (I) 制备将序列号 7 ~ 21、59 ~ 61 中的任一氨基酸序列、或由 [19] ~ [26] 中任一项所述的设计方法构建的氨基酸序列进行编码的核酸的步骤；
- [0086] (II) 使所述核酸进行表达的步骤,及
- [0087] (III) 回收表达产物的步骤。

#### 附图说明

[0088] 图 1 为来自黑曲霉的 G0 的氨基酸序列与来自尼崎青霉的 G0 的氨基酸序列的比较。用下划线表示突变对象的氨基酸。用粗体字表示在突变对象的氨基酸中对 GDH 活性提高有效的氨基酸。箭头为活性中心的氨基酸。“\*”表示同一(identical),“:”表示保守性取代(conserved substitutions),“.”表示半保守性取代(semi-conserved substitutions)。

[0089] 图 2 为来自微生物的 G0 与来自微生物的 FAD-GDH 的氨基酸序列的比较。从上段开始依次表示意大利青霉 FAD-GDH 的氨基酸序列(序列号 3 的 N 末端侧部分)、薄刺青霉 FAD-GDH 的氨基酸序列(序列号 4 的 N 末端侧部分)、米曲霉 FAD-GDH 的氨基酸序列(序列号



5 的 N 末端侧部分)、土曲霉 FAD-GDH 的氨基酸序列(序列号 6 的 N 末端侧部分)、黑曲霉 GO 的氨基酸序列(序列号 1 的 N 末端侧部分)。用下划线表示在处于 GO 的活性中心附近的氨基酸中,在 FAD-GDH 间保守(共同性高)而在 GO 与 FAD-GDH 之间不同的氨基酸,并且从 N 末端侧依次附加序号。

[0090] 图 3 为来自微生物的 GO 与来自微生物的 FAD-GDH 的氨基酸序列的比较(图 1 的接续)。从上段开始依次表示意大利青霉 FAD-GDH 的氨基酸序列(序列号 3 的 C 末端侧部分)、薄刺青霉 FAD-GDH 的氨基酸序列(序列号 4 的 C 末端侧部分)、米曲霉 FAD-GDH 的氨基酸序列(序列号 5 的 C 末端侧部分)、土曲霉 FAD-GDH 的氨基酸序列(序列号 6 的 C 末端侧部分)、黑曲霉 GO 的氨基酸序列(序列号 1 的 C 末端侧部分)。用下划线表示在处于 GO 的活性中心附近的氨基酸中,在 FAD-GDH 间保守(共同性高)而在 GO 与 FAD-GDH 之间不同的氨基酸,从 N 末端侧依次附加序号。箭头为 GO 的活性中心的氨基酸。

[0091] 图 4 为包含用 PCR 扩增的黑曲霉 GO 的基因序列的序列(序列号 37)。在 5' 末端添加 HindIII 位点(框线)与 Kozak 序列(下划线),在 3' 末端侧添加 XhoI 位点(框线)。应予说明,通过添加 Kozak 序列,第 2 个氨基酸从谷氨酰胺变更成丝氨酸。黑曲霉 GO 的基因序列如序列号 38 所示。

[0092] 图 5 为平板测定法的结果。制作包含导入突变的质粒的文库(酿酒酵母(*saccharomyces cerevisiae*)),将生长的菌落在表达平板中复制后,用平板测定法检测 GO 活性及 GDH 活性。

[0093] 图 6 为表示液体培养中的活性确认的结果。对于突变酶转化株内可确认阳性菌落(在 GO 测定中不发色,在 GDH 测定中发色)的转化株进行液体培养,比较 GO 活性及 GDH 活性。与未突变(pYES-GO)进行比较,用网纹表示 GDH 活性值及 GDH 活性与 GO 活性之比(GDH 活性 /GO 活性)同时高的转化株。表中的 pYES-GO 表示未突变的转化株,表中的 pYES2 表示用插入基因前的质粒转化而得的转化株,表中的 GO 表示 GO “Amano”2 (天野酶公司),表中的 FAD-GDH 表示 GDH “Amano”8 (天野酶公司)。

[0094] 图 7 为表示用液体培养的活性确认的结果的图表。用条形表示各突变酶转化株的 GOH 活性及 GO 活性,用折线表示 GDH 活性 /GO 活性。pYES-GO 表示未突变的转化株。图表中的 pYES-GO 表示未突变的转化株,图表中的 pYES2 表示用插入基因前的质粒转化而得的转化株,图表中的 GO 表示 GO “Amano”2 (天野酶公司),图表中的 FAD-GDH 表示 GDH “Amano”8 (天野酶公司)。

[0095] 图 8 为表示确认 GDH/GO 活性比变化大的突变酶转化株的突变的表。推测 5-1-5 的 T353H 起因于混合。同样,推测 7-2-17 的 D446S 及 7-2-42 的 D446R 也起因于混合。

[0096] 图 9 为表示突变型 GO 的底物特异性的图表。以对葡萄糖的反应性的相对值的形式,算出对各底物的反应性。pYES-GO 表示未突变的转化株。

[0097] 图 10 为表示在各酶中的突变对象氨基酸的表。对各酶均表示了(1)与序列号 1 所示的氨基酸序列的 115 位氨基酸对应的氨基酸,(2)与序列号 1 所示的氨基酸序列的 131 位氨基酸对应的氨基酸,(3)与序列号 1 所示的氨基酸序列的 132 位氨基酸对应的氨基酸,(4)与序列号 1 所示的氨基酸序列的 193 位氨基酸对应的氨基酸,(5)与序列号 1 所示的氨基酸序列的 353 位氨基酸对应的氨基酸,(6)与序列号 1 所示的氨基酸序列的 436 位氨基酸对应的氨基酸,(7)与序列号 1 所示的氨基酸序列的 446 位氨基酸对应的氨基酸,(8)与

序列号 1 所示的氨基酸序列的 472 位氨基酸对应的氨基酸, (9) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 511 位氨基酸对应的氨基酸, (10) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 535 位氨基酸对应的氨基酸, (11) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 537 位氨基酸对应的氨基酸, (12) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 582 位氨基酸对应的氨基酸, (13) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 583 位氨基酸对应的氨基酸。

[0098] 图 11 为多重突变型 GO 的活性的比较。以培养上清为样品, 将突变组合不同的各种转化株的 GDH/GO 活性比进行比较。用○表示各突变酶转化株具有的突变。

[0099] 图 12 为具有有效突变的组合的突变酶转化株产生的突变型酶的比活性。用○表示各突变酶转化株具有的突变。

[0100] 图 13 为具有有效突变的组合的突变酶转化株产生的突变型酶的底物特异性。比较对麦芽糖、木糖、果糖、半乳糖、甘露糖及乳糖的反应性。

[0101] 图 14 为 D446 及 V582 多重突变酶的活性的比较。对于取代后的氨基酸不同的各种酶, 比较 GDH/GO 活性比。\* :GO 活性为检测限以下。

[0102] 图 15 为 D446H 及 V582P 多重突变酶的底物特异性。将对麦芽糖、木糖、果糖、半乳糖、甘露糖及乳糖的反应性与 FAD-GDH (GDH “Amano” 8 (天野酶公司)) 进行比较。

## 具体实施方式

[0103] 为了便于说明, 对于用于本发明的用语的一部分, 定义如下。

[0104] (用语)

[0105] 用语“突变酶”为利用本说明书公开的方法将“基础酶”进行突变乃至修饰而得到的酶。“突变酶”、“突变型酶”及“修饰型酶”可交换使用。基础酶典型地为野生型酶。但是, 并不妨碍将已经被施加人工操作的酶作为“基础酶”而适用于本发明。应予说明, 在本说明书中, “基础酶”也被称作“突变对象酶”或“靶标酶”。

[0106] 将使某种酶(为了便于说明称作 A 酶)与其它酶(为了便于说明称作 B 酶)近似, 即, 以使 A 酶的一种以上的特性与 B 酶的对应该特性接近的方式进行修饰称作“将 A 酶进行 B 酶化”。这里的“特性”的示例为酶活性(例如在 A 酶为葡萄糖氧化酶的情况下的葡萄糖氧化酶活性)、底物特异性、温度特性(最适温度、温度稳定性等)、pH 特性(最适 pH、pH 稳定性)、辅酶特异性、与介质的反应性。

[0107] (使葡萄糖氧化酶进行突变而得的酶)

[0108] 本发明的第 1 方面涉及使来自微生物的葡萄糖氧化酶(GO)进行突变而得的酶(以下也称作“突变 GO”)。本发明突变 GO 具有在来自微生物的 GO (突变对象酶)的氨基酸序列中选自以下(1)~(13)中的一个或两个以上的氨基酸被其它氨基酸取代而得的氨基酸序列。

[0109] (1) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 115 位氨基酸对应的氨基酸

[0110] (2) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 131 位氨基酸对应的氨基酸

[0111] (3) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 132 位氨基酸对应的氨基酸

[0112] (4) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 193 位氨基酸对应的氨基酸

[0113] (5) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 353 位氨基酸对应的氨基酸

[0114] (6) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 436 位氨基酸对应的氨基酸

[0115] (7) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 446 位氨基酸对应的氨基酸

[0116] (8) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 472 位氨基酸对应的氨基酸

[0117] (9) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 511 位氨基酸对应的氨基酸

[0118] (10) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 535 位氨基酸对应的氨基酸

[0119] (11) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 537 位氨基酸对应的氨基酸

[0120] (12) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 582 位氨基酸对应的氨基酸

[0121] (13) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 583 位氨基酸对应的氨基酸

[0122] 如后述实施例所示,上述 115 位氨基酸、131 位氨基酸、132 位氨基酸、193 位氨基酸、353 位氨基酸、436 位氨基酸、446 位氨基酸、472 位氨基酸、511 位氨基酸、535 位氨基酸、537 位氨基酸、582 位氨基酸及 583 位氨基酸为通过将黑曲霉的 G0 与多种 FAD-GDH 进行比较而发现的氨基酸,处于 G0 的活性中心附近且具有 G0 特征性。在本发明中,通过使被认为对 G0 特性起到重要作用的与这些氨基酸对应的氨基酸进行突变,从而实现酶特性的改良、改善。

[0123] 在此,在本说明书中对于氨基酸残基使用时的用语“对应”是指在被比较的蛋白质(酶)间对其功能的发挥作出同等贡献。例如,对于基准氨基酸序列(即,序列号 1 的氨基酸序列),将比较对象的氨基酸序列在考虑一级结构(氨基酸序列)的部分同源性的同时,以能够进行最优比较的方式进行排列时(此时可以根据需要导入空位(gap)而使比对最优化),可将与基准氨基酸序列中的特定氨基酸对应的位置的氨基酸确定为“对应的氨基酸”。也可代替一级结构彼此的比较而利用立体结构(三次元结构)彼此的比较,或者不仅利用一级结构彼此的比较,而且还利用立体结构(三次元结构)彼此的比较,确定“对应的氨基酸”。通过利用立体结构信息,可得到可靠性高的比较结果。在该情况下,可采用在将多种酶的立体结构的原子坐标进行比较的同时进行比对的方法。突变对象酶的立体结构信息例如可由蛋白质数据库(Protein Data Bank)([http://www.pdbj.org/index\\_j.html](http://www.pdbj.org/index_j.html))取得。

[0124] 利用 X 射线晶体结构分析的蛋白质立体结构的决定方法的一例如下所示。

[0125] (1) 将蛋白质进行结晶化。为了确定立体结构,结晶化不可缺少,但除此以外,作为蛋白质的高纯度的纯化法、高密度且稳定的保存方法,也有产业上的有用性。在该情况下,优选将作为配体结合有底物或者其类似化合物的蛋白质进行结晶化。

[0126] (2) 对制成的结晶照射 X 射线,收集衍射数据。应予说明,蛋白质结晶因 X 射线照射而受到损害并使衍射能劣化的情形有很多。在该情况下,将结晶急剧地冷却至  $-173^{\circ}\text{C}$  左右,在该状态下收集衍射数据的低温测定技术最近逐渐普及。应予说明,为了最终收集用于确定结构的高分解能数据,亮度高的同步加速器放射光得到利用。

[0127] (3) 在进行晶体结构分析时,除了衍射数据以外,还需要相位信息。对于目标蛋白质,在不知道类似的蛋白质的晶体结构时,不可能用分子取代法确定结构,必须利用重原子同晶取代法解决相位问题。重原子同晶取代法为如下方法:将汞、铂等原子序号大的金属原子导入结晶中,利用金属原子的大 X 射线散射能对 X 射线衍射数据的贡献而得到相位信息的方法。决定的相位可通过将结晶中的溶剂区域的电子密度平滑化而进行改善。溶剂区域的水分子由于波动大而几乎观测不到电子密度,因此通过使该区域的电子密度近似于 0,从而能够接近真正的电子密度,乃至相位得到改善。此外,在非对称单元中包含多种分子时,通过这些分子的电子密度进行平均化,从而相位得到更大幅度的改善。使蛋白质模型符

合使用这样改善的相位计算出的电子密度图。该工艺在计算机绘图的基础上使用 MSI 公司(美国)的 QUANTA 等程序进行。然后,使用 MSI 公司的 X-PLOR 等程序,进行结构精密化,完成结构分析。对于目标蛋白质,在类似的蛋白质的晶体结构是已知的情况下,使用已知蛋白质的原子坐标,利用分子取代法可进行决定。分子取代与结构精密化可用程序 CNS SOLVE ver. 11 等进行。

[0128] 突变对象酶即来自微生物的 G0 的示例为来自黑曲霉的 G0 及来自尼崎青霉的 G0。在公共数据库中登记的来自黑曲霉的 G0 的氨基酸序列及来自尼崎青霉的 G0 的氨基酸序列分别如序列号 1 及序列号 2 所示。此外,这两种氨基酸序列的比对比较如图 1 所示。

[0129] 在以具有序列号 1 的氨基酸序列的来自黑曲霉的 G0 为突变对象酶时,上述(1)的氨基酸为序列号 1 的 115 位氨基酸,上述(2)的氨基酸为序列号 1 的 131 位氨基酸,上述(3)的氨基酸为序列号 1 的 132 位氨基酸,上述(4)的氨基酸为序列号 1 的 193 位氨基酸,上述(5)的氨基酸为序列号 1 的 353 位氨基酸,上述(6)的氨基酸为序列号 1 的 436 位氨基酸,上述(7)的氨基酸为序列号 1 的 446 位氨基酸,上述(8)的氨基酸为序列号 1 的 472 位氨基酸,上述(9)的氨基酸为序列号 1 的 511 位氨基酸,上述(10)的氨基酸为序列号 1 的 535 位氨基酸,上述(11)的氨基酸为序列号 1 的 537 位氨基酸,上述(12)的氨基酸为序列号 1 的 582 位氨基酸,上述(13)的氨基酸为序列号 1 的 583 位氨基酸。

[0130] 另一方面,在以具有序列号 2 的氨基酸序列的来自尼崎青霉的 G0 为突变对象酶时,上述(1)的氨基酸为序列号 2 的 115 位氨基酸,上述(2)的氨基酸为序列号 2 的 131 位氨基酸,上述(3)的氨基酸为序列号 2 的 132 位氨基酸,上述(4)的氨基酸为序列号 2 的 193 位氨基酸,上述(5)的氨基酸为序列号 2 的 353 位氨基酸,上述(6)的氨基酸为序列号 2 的 436 位氨基酸,上述(7)的氨基酸为序列号 2 的 446 位氨基酸,上述(8)的氨基酸为序列号 2 的 472 位氨基酸,上述(9)的氨基酸为序列号 2 的 511 位氨基酸,上述(10)的氨基酸为序列号 2 的 535 位氨基酸,上述(11)的氨基酸为序列号 2 的 537 位氨基酸,上述(12)的氨基酸为序列号 2 的 582 位氨基酸,上述(13)的氨基酸为序列号 2 的 583 位氨基酸。

[0131] 被取代的氨基酸优选为(3)的氨基酸、(5)的氨基酸、(7)的氨基酸或(12)的氨基酸。这些如后述实施例所示,为对 GDH 活性的提高有效得到确认的氨基酸。在这些氨基酸中的至少一个被取代的突变 G0 中,与突变前的酶相比能够发挥高的 GDH 活性。(3)的氨基酸被取代的突变 G0 的具体例为由序列号 7 的氨基酸序列所构成的酶。同样,(5)的氨基酸被取代的突变 G0 的具体例为由序列号 8 的氨基酸序列所构成的酶,(7)的氨基酸被取代的突变 G0 的具体例为由序列号 9 的氨基酸序列所构成的酶,(12)的氨基酸被取代的突变 G0 的具体例为由序列号 10 的氨基酸序列所构成的酶。这些突变 G0 均与突变前的酶即来自黑曲霉的 G0 相比显示出高的 GDH 活性。

[0132] 取代后的氨基酸的种类没有特别限定,但优选以不属于所谓“保守性氨基酸取代”的方式,选择取代后的氨基酸。这里的“保守性氨基酸取代”是指将某种氨基酸残基取代成具有同样性质的侧链的氨基酸残基。氨基酸残基根据其侧链而分成碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、非带电极性侧链(例如甘氨酸、天门冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、色氨酸)、 $\beta$  分支侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)、芳香族侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)之类的若干族。保守性氨基

酸取代典型地为同一族内的氨基酸残基间的取代。

[0133] 若举出取代后的氨基酸的示例,对于(3)的氨基酸而言为丙氨酸,对于(5)的氨基酸而言为丙氨酸,对于(7)的氨基酸而言为组氨酸,对于(12)的氨基酸而言为丝氨酸,精氨酸、亮氨酸及脯氨酸。

[0134] 上述(1)~(13)的氨基酸内,两种以上的氨基酸可得到取代。如下列举出被取代的氨基酸的组的示例。

[0135] (3)与(5)的组合

[0136] (3)与(7)的组合

[0137] (3)与(12)的组合

[0138] (5)与(7)的组合

[0139] (5)与(12)的组合

[0140] (7)与(12)的组合

[0141] (3)、(5)与(7)的组合

[0142] (3)、(5)与(12)的组合

[0143] (3)、(7)与(12)的组合

[0144] (5)、(7)与(12)的组合

[0145] (3)、(5)、(7)与(12)的组合

[0146] 应用以上的组合而得到的突变酶的氨基酸序列的示例如序列号 11 ~ 21 所示。这些序列为针对黑曲霉的 G0 应用上述组合而得到的突变 G0 的氨基酸序列。序列号与突变的组合的对应关系如下所述。

[0147] 序列号 11 : (3) 与 (5) 的组合

[0148] 序列号 12 : (3) 与 (7) 的组合

[0149] 序列号 13 : (3) 与 (12) 的组合

[0150] 序列号 14 : (5) 与 (7) 的组合

[0151] 序列号 15 : (5) 与 (12) 的组合

[0152] 序列号 16 : (7) 与 (12) 的组合

[0153] 序列号 17 : (3)、(5) 与 (7) 的组合

[0154] 序列号 18 : (3)、(5) 与 (12) 的组合

[0155] 序列号 19 : (3)、(7) 与 (12) 的组合

[0156] 序列号 20 : (5)、(7) 与 (12) 的组合

[0157] 序列号 21 : (3)、(5)、(7) 与 (12) 的组合

[0158] 序列号 59 : (7) 与 (12) 的组合

[0159] 序列号 60 : (7) 与 (12) 的组合

[0160] 序列号 61 : (7) 与 (12) 的组合

[0161] 若按照后述实施例(确认突变组合的效果)中表示的实验结果,则在以上组合中,优选(3)与(12)的组合,(7)与(12)的组合,及(3)、(7)与(12)的组合。特别优选的组合为(7)与(12)的组合(该组合的突变酶的氨基酸序列的具体例如上所述为序列号 16、59 ~ 61)。取代后的氨基酸对于(7)而言优选组氨酸,对于(12)而言优选丝氨酸(序列号 16)、精氨酸(序列号 59)、亮氨酸(序列号 60)或脯氨酸(序列号 61)。对于(12),特别优选取代后的

氨基酸为脯氨酸。

[0162] 不过,一般而言,在使某种蛋白质的氨基酸序列的一部分进行突变时,有时突变后的蛋白质具有与突变前的蛋白质同等的功能。即,有时氨基酸序列的突变对于蛋白质的功能未带来实质性的影响,蛋白质的功能在突变前后得以维持。若考虑到该技术常识,则在与由选自上述(1)~(13)中的一个或两个以上的氨基酸被其它氨基酸取代而得的氨基酸序列所构成的突变 G0 进行比较时,虽然氨基酸序列的稍微不同未被确认(其中,氨基酸序列的不同在实施了上述氨基酸取代的位置以外的位置发生),但是特性中实质性的差异未被确认的酶可被认为是与上述突变 G0 实质同一的酶。这里的“氨基酸序列的稍微不同”典型地是指利用构成氨基酸序列的 1~数个(上限为例如 3 个、5 个、7 个、10 个)氨基酸的缺失、取代,或者 1 个~数个(上限为例如 3 个、5 个、7 个、10 个)氨基酸的添加、插入、或这些组合而在氨基酸序列中产生突变(变化)。“实质同一的酶”的氨基酸序列与作为基准的上述突变 G0 的氨基酸序列的同一性(%)优选为 90% 以上,更优选为 95% 以上,进一步优选为 98% 以上,最优选为 99% 以上。应予说明,氨基酸序列的不同可以在多个位置产生。“氨基酸序列的稍微不同”优选由保守性氨基酸取代产生。

[0163] (编码突变 G0 的核酸等)

[0164] 本发明的第 2 方面提供与本发明突变 G0 相关的核酸。即,提供能够作为用于鉴别编码突变 G0 的基因、编码突变 G0 的核酸的探针使用的核酸;能够作为用于使编码突变 G0 的核酸扩增或突变等的引物使用的核酸。

[0165] 编码突变 G0 的基因典型地用于突变 G0 的制备。根据使用编码突变 G0 的基因的基因工程学的制备方法,可得到更均质状态的突变 G0。此外,该方法在制备大量的突变 G0 时也可以说是优选的方法。此外,编码突变 G0 的基因的用途不限于突变 G0 的制备。例如,作为以突变 G0 作用机制的解释等为目的的实验用工具,或者作为用于设计或制作酶的进一步的突变体的工具,也可利用该核酸。

[0166] 在本说明书中,所谓“编码突变 G0 的基因”是指在使该基因表达时得到该突变 G0 的核酸,当然包含具有与该突变 G0 的氨基酸序列对应的碱基序列的核酸,还包含在这种核酸中附加有不编码氨基酸序列的序列而成的核酸。此外,还考虑密码子的简并。

[0167] 编码突变 G0 的基因的序列的示例如序列号 22~36、62~64 所示。这些序列为编码在黑曲霉的 G0 中实施了特定的氨基酸取代而得的突变 G0 的基因。各序列中的氨基酸取代如下所述。

[0168] 序列号 22 :T132A

[0169] 序列号 23 :T353A

[0170] 序列号 24 :D446H

[0171] 序列号 25 :V582S

[0172] 序列号 26 :T132A 及 T353A

[0173] 序列号 27 :T132A 及 D446H

[0174] 序列号 28 :T132A 及 V582S

[0175] 序列号 29 :T353A 及 D446H

[0176] 序列号 30 :T353A 及 V582S

[0177] 序列号 31 :D446H 及 V582S

[0178] 序列号 32 :T132A、T353A 及 D446H

[0179] 序列号 33 :T132A、T353A 及 V582S

[0180] 序列号 34 :T132A、D446H 及 V582S

[0181] 序列号 35 :T353A、D446H 及 V582S

[0182] 序列号 36 :T132A、T353A、D446H 及 V582S

[0183] 序列号 62 :D446H 及 V582R

[0184] 序列号 63 :D446H 及 V582L

[0185] 序列号 64 :D446H 及 V582P

[0186] 本发明的核酸可参考本说明书或所附序列表公开的序列信息,通过使用标准的基因工程学方法、分子生物学方法、生物化学方法等,制备成分离状态。

[0187] 在本发明的其它方式中,提供了一种核酸,其在与编码本发明突变 G0 的基因的碱基序列相比时,虽然其编码的蛋白质的功能相同,但是一部分碱基序列不同(以下,也称作“同源核酸”。此外,将规定同源核酸的碱基序列也称作“同源碱基序列”)。作为同源核酸的示例,可举出如下编码如下蛋白质的 DNA,所述蛋白质由以编码本发明突变 G0 的核酸的碱基序列为基准来包含 1 个或者多个碱基的取代、缺失、插入、添加、或倒位的碱基序列所构成,且具有突变 G0 特征性的酶活性(即,GDH 活性)。碱基的取代、缺失等可在多个部位产生。这里的“多个”根据该核酸编码的蛋白质的立体结构中的氨基酸残基的位置、种类不同而异,例如为 2 ~ 40 个碱基,优选为 2 ~ 20 个碱基,更优选为 2 ~ 10 个碱基。

[0188] 如上所述的同源核酸例如可以如下得到:限制性内切酶处理;利用核酸外切酶、DNA 连接酶等的处理;利用定位突变导入法(Molecular Cloning, Third Edition, Chapter 13, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)、随机突变导入法(Molecular Cloning, Third Edition, Chapter 13, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)的突变导入等。此外,通过紫外线照射等其它方法也可得到同源核酸。

[0189] 本发明的其它方式涉及一种核酸,其具有相对于编码本发明突变 G0 的基因的碱基序列互补的碱基序列。本发明的进一步其它方式提供一种核酸,其具有相对于编码本发明突变 G0 的基因的碱基序列或者与其互补的碱基序列为至少约 60%、70%、80%、90%、95%、99%、99.9% 同一的碱基序列。

[0190] 本发明的进一步其它方式涉及一种核酸,其具有相对于编码本发明突变 G0 的基因的碱基序列或与其同源碱基序列互补的碱基序列在严谨型条件下进行杂交的碱基序列。这里的“严谨型条件”是指形成所谓特异性杂交而不形成非特异性杂交的条件。这样的严谨型条件是本领域技术人员公知的,例如可参照 Molecular Cloning (Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)、Current protocols in molecular biology (edited by Frederick M. Ausubel et al., 1987)进行设定。作为严谨型条件,例如可举出用杂交液(50% 甲醛、10×SSC (0.15M NaCl、15mM 柠檬酸钠, pH 7.0)、5×Denhardt 溶液、1%SDS、10% 硫酸葡聚糖、10 μg/ml 的变性鲑鱼精子 DNA、50mM 磷酸缓冲液(pH7.5)),在约 42℃~约 50℃下进行温育,然后用 0.1×SSC、0.1%SDS 在约 65℃~约 70℃下清洗的条件。作为进一步优选的严谨型条件,例如可举出,作为杂交液,使用 50% 甲醛、5×SSC(0.15M NaCl、15mM 柠檬酸钠, pH 7.0)、1×Denhardt 溶液、1%SDS、10% 硫酸葡聚糖、10 μg/ml 的变性鲑鱼精子 DNA、50mM 磷酸缓冲液(pH7.5))的条件。

[0191] 本发明的进一步其它方式提供了一种核酸(核酸片段),其具有编码本发明突变 GO 的基因的碱基序列或者与其互补的碱基序列的一部分。这种核酸片段可用于将具有编码本发明突变 GO 的基因的碱基序列的核酸等进行检测、鉴别和 / 或扩增等。核酸片段例如以如下方式设计:在编码本发明突变 GO 的基因的碱基序列中连续的核苷酸部分(例如约 10 ~ 约 100 碱基长度,优选约 20 ~ 约 100 碱基长度,更优选约 30 ~ 约 100 碱基长度)中至少包含杂交部分。在用作探针时,可标记核酸片段。在标记中例如可使用荧光物质、酶、放射性同位素。

[0192] 本发明的进一步其它方式涉及包含本发明的基因(编码突变 GO 的基因)的重组 DNA。本发明的重组 DNA 例如以载体的形态提供。在本说明书中用语“载体”是指能够将插入其中的核酸输送到靶标内的核酸性分子。

[0193] 根据使用目的(克隆、蛋白质的表达),此外考虑宿主细胞的种类而选择适当的载体。作为大肠菌为宿主的载体,可例示 M13 噬菌体或其修饰体、 $\lambda$  噬菌体或其修饰体、pBR322 或其修饰体(pB325、pAT153、pUC8 等)等,作为以酵母为宿主的载体,可例示 pYepSec1、pMFa、pYES2 等,作为以昆虫细胞为宿主的载体,可例示 pAc、pVL 等,作为以哺乳类细胞为宿主的载体,可例示 pCDM8、pMT2PC 等。

[0194] 本发明的载体优选为表达载体。“表达载体”是指能够将插入其中的核酸导入到目标细胞(宿主细胞)内,且能够使之在该细胞内进行表达的载体。表达载体通常包含对所插入的核酸的表达必需的启动子序列、促进表达的增强子序列等。也可以使用包含选择标记的表达载体。在使用该表达载体时,可利用选择标记而确认表达载体导入的有无(及其程度)。

[0195] 本发明的核酸向载体的插入、选择标记基因的插入(必要时)、启动子的插入(必要时)等可使用标准的重组 DNA 技术(例如,可参照 Molecular Cloning, Third Edition, 1. 84, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 的、使用限制性内切酶及 DNA 连接酶的公知方法)进行。

[0196] 作为宿主细胞,从操作容易方面考虑,优选使用大肠菌(*Escherichiacoli*)、芽殖酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)等微生物,但只要是重组 DNA 可复制且突变 GO 的基因可表达的宿主细胞则可利用。作为大肠菌的示例,在利用 T7 系启动子时,可举出大肠菌 BL21 (DE3) pLysS, 在并非这样时可举出大肠菌 JM109。此外,作为芽殖酵母的示例,可举出芽殖酵母 SHY2、芽殖酵母 AH22 或者芽殖酵母 INVSc1 (Invitrogen 公司)。

[0197] 本发明的其它方面涉及具有本发明重组 DNA 的微生物(即,转化体)。本发明的微生物可利用使用上述本发明载体的转染乃至转化而得到。例如,可利用氯化钙法(*Journal of Molecular Biology* (J. Mol. Biol. ), 第 53 卷, 第 159 页(1970))、Hanahan 法(*Journal of Molecular Biology*, 第 166 卷, 第 557 页(1983))、SEM 法(基因(Gene), 第 96 卷, 第 23 页(1990)), Chung 等的方法(*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 第 86 卷, 第 2172 页(1989))、磷酸钙共沉降法、电穿孔(Potter, H. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 7161-7165 (1984))、脂质转染法(Felgner, P. L. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 7413-7417 (1984))等实施。应予说明,本发明的微生物可用于生产本发明的突变 GO (参照后述突变酶的制备方法栏)。

[0198] (突变 GO 的用途)



[0199] 本发明的第 3 方式涉及突变 GO 的用途。在该方式中,首先提供了使用突变 GO 的葡萄糖测定法。在本发明的葡萄糖测定法中,利用由本酶所致的氧化还原反应,测定试样中的葡萄糖量。本发明例如用于血糖值的测定、食品(调味料、饮料等)中的葡萄糖浓度的测定等。此外,在发酵食品(例如食醋)或发酵饮料(例如啤酒、酒)的制造工序中为了研究发酵度,也可利用本发明。

[0200] 本发明还提供了包含本酶的葡萄糖测定用试剂。该试剂用于上述本发明的葡萄糖测定法中。

[0201] 本发明进一步提供了用于实施本发明的葡萄糖测定法的试剂盒(葡萄糖测定用试剂盒)。本发明的试剂盒除了包含本酶的葡萄糖测定用试剂以外,还包含反应用试剂、缓冲液、葡萄糖标准液等作为任意要素。此外,在本发明的葡萄糖测定试剂盒中通常附有使用说明书。

[0202] 本发明作为进一步的用途,提供了通过使本发明的突变 GO 对工业制品(各种加工食品、点心类、清凉饮料水、醇饮料、营养辅助食品等食品;化妆材料等)或其原料等进行作用而使葡萄糖含量降低的方法及用于该用途的酶剂。例如,在将本发明突变 GO 应用于食品时,可通过降低葡萄糖含量而抑制美拉德反应。本发明的酶剂除了有效成分(突变 GO)以外,还可含有赋形剂、缓冲剂、混悬剂、稳定剂、保存剂、防腐剂、生理盐水等。作为赋形剂,可使用淀粉、糊精、麦芽糖、海藻糖、乳糖、D-葡萄糖、山梨醇、D-甘露糖醇、白糖、甘油等。作为缓冲剂,可使用磷酸盐、柠檬酸盐、醋酸盐等。作为稳定剂,可使用丙二醇、抗坏血酸等。作为保存剂,可使用苯酚、苯扎氯铵、苄醇、氯丁醇、羟基苯甲酸甲酯等。作为防腐剂,可使用乙醇、苯扎氯铵、对羟基苯甲酸、氯丁醇等。

[0203] (突变酶的设计方法)

[0204] 本发明的另一方面涉及突变酶的设计方法。在本发明的设计方法中,实施以下步骤(i)及(ii)。

[0205] 步骤(i):在来自微生物的葡萄糖氧化酶(来自微生物的 GO)或来自微生物的黄素腺嘌呤二核苷酸依赖性葡萄糖脱氢酶(来自微生物的 FDA-GDH)即突变对象酶的氨基酸序列中,确定选自如下的一个或两个以上的氨基酸。

[0206] (1) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 115 位氨基酸对应的氨基酸

[0207] (2) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 131 位氨基酸对应的氨基酸

[0208] (3) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 132 位氨基酸对应的氨基酸

[0209] (4) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 193 位氨基酸对应的氨基酸

[0210] (5) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 353 位氨基酸对应的氨基酸

[0211] (6) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 436 位氨基酸对应的氨基酸

[0212] (7) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 446 位氨基酸对应的氨基酸

[0213] (8) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 472 位氨基酸对应的氨基酸

[0214] (9) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 511 位氨基酸对应的氨基酸

[0215] (10) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 535 位氨基酸对应的氨基酸

[0216] (11) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 537 位氨基酸对应的氨基酸

[0217] (12) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 582 位氨基酸对应的氨基酸

[0218] (13) 与序列号 1 所示的氨基酸序列的 583 位氨基酸对应的氨基酸

[0219] 上述取代对象氨基酸(1)~(13)是利用来自微生物的GO与多种来自微生物的FAD-GDH的比较而发现的。期待通过取代这些氨基酸而使酶的特性发生变化。若列举能够变化的特性的示例,则为GO活性、GDH活性、底物特异性、温度特性(最适温度、温度稳定性等)、pH特性(最适pH、pH稳定性)、辅酶特异性、与介质的反应性。

[0220] 本发明设计方法中的突变对象酶为来自微生物的GO或来自微生物的FAD-GDH。突变对象酶典型地为野生型酶(天然发现的酶)。但是,并不妨碍以已经实施有某种突变乃至修饰的酶为突变对象酶。来自微生物的GO的示例为黑曲霉的GO及尼崎青霉的GO,来自微生物的FAD-GDH的示例为意大利青霉的FAD-GDH、薄刺青霉的FAD-GDH、米曲霉的FAD-GDH及土曲霉的FAD-GDH。作为在此例示的酶的氨基酸序列,在公共数据库中登记的序列如下所示。应予说明,在优选的一个方式中,以其中的任意氨基酸序列所构成的酶作为突变对象酶。

[0221] 黑曲霉(*Aspergillus niger*)的GO:序列号1的氨基酸序列

[0222] 尼崎青霉(*Penicillium amagasakiense*)的GO:序列号2的氨基酸序列

[0223] 意大利青霉(*Penicillium italicum*)的FAD-GDH:序列号3的氨基酸序列

[0224] 薄刺青霉(*Penicillium lilacinocochinulatum*)的FAD-GDH:序列号4的氨基酸序列

[0225] 米曲霉(*Aspergillus oryzae*)的FAD-GDH:序列号5的氨基酸序列

[0226] 土曲霉(*Aspergillus terreus*)的FAD-GDH:序列号6的氨基酸序列

[0227] 应予说明,对于以上例示的各酶,将属于上述(1)~(13)的氨基酸的氨基酸汇总示于图10的表中。

[0228] 本发明中在步骤(i)后,进行以下步骤(ii)。

[0229] 步骤(ii):基于突变对象酶的氨基酸序列,构成在步骤(i)中确定的氨基酸序列被其它氨基酸取代的氨基酸序列。

[0230] 取代后的氨基酸的种类没有特别限定。因此,可以为保守性氨基酸取代,也可以为非保守性氨基酸取代。这里的“保守性氨基酸取代”是指将某种氨基酸残基取代成具有同样性质的侧链的氨基酸残基。氨基酸残基根据其侧链可分成碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、非带电极性侧链(例如天门冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、色氨酸)、 $\beta$ 分支侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)、芳香族侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸)之类的若干族。保守性氨基酸取代优选为同一族内的氨基酸残基间的取代。

[0231] (突变酶的制备方法)

[0232] 本发明的另一方式涉及突变酶的制备方法。在本发明的突变酶制备方法的一个方式中,将本发明的发明人等成功取得的突变GO用基因工程学方法进行制备。在该方式的情况下,准备编码序列号7~10的任意氨基酸序列的核酸(步骤(I))。在此,“编码特定的氨基酸序列的核酸”是在使之表达的情况下可得到具有该氨基酸序列的多肽的核酸,当然可以由与该氨基酸序列对应的碱基序列所构成的核酸,也可以在这样的核酸中添加多余的序列(可以为编码氨基酸序列的序列,也可以为不编码氨基酸序列的序列)。此外,还考虑到密码子的简并。“编码序列号7~10的任意氨基酸序列的核酸”为参考本说明书或所附

序列公开的序列信息,通过使用标准的基因工程学方法、分子生物学方法、生物化学方法等,可制备成分离状态。在此,序列号 7~10 的氨基酸序列均为对来自黑曲霉的 G0 的氨基酸序列实施突变而得的。因此,对于编码来自黑曲霉的 G0 的基因(序列号 38),通过施加必要的突变,也可得到编码序列号 7~10 中的任意氨基酸序列的核酸(基因)。用于位置特异性碱基序列取代的方法在该技术领域已知有很多(例如,参照 *Molecular Cloning, Third Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York),可由其中选择使用恰当的方法。作为位置特异性突变导入法,可采用位置特异性氨基酸饱和和突变法。位置特异性氨基酸饱和和突变法为基于蛋白的立体结构,推定所要求的功能的关联位置,导入氨基酸饱和和突变的“半推理半随机(Semi-rational, semi-random)”方法(*J. Mol. Biol.* 331,585-592 (2003))。例如,可使用 Quick change (Stratagene 公司)等试剂盒、Overlap extension PCR (*Nucleic Acid Res.* 16,7351-7367 (1988))而导入位置特异性氨基酸饱和和突变。用于 PCR 的 DNA 聚合酶可使用 Taq 聚合酶等。但是,优选使用 KOD-PLUS-(东洋纺社)、Pfu turbo (Stratagene 公司)等精度高的 DNA 聚合酶。

[0233] 在本发明的其它一方式中,基于利用本发明的设计方法设计的氨基酸序列而制备突变酶。在该方式的情况下,在步骤(I)中准备将利用本发明的设计方法而构建的氨基酸序列进行编码的核酸。例如,基于利用本发明的设计方法构建的氨基酸序列,对于编码突变对象酶的基因施加必要的突变(即,在表达产物即蛋白质中的特定位置的氨基酸的取代),得到编码突变酶的核酸(基因)。

[0234] 步骤(I)之后,使准备的核酸进行表达(步骤(II))。例如,首先,准备插入了上述核酸而得的表达载体,使用此表达载体转化宿主细胞。“表达载体”是指可将插入其中的核酸导入目标细胞(宿主细胞)内,且可在该细胞内使之表达的载体。表达载体通常包含对插入的核酸的表达必要的启动子序列、促进表达的增强子序列等。也可使用包含选择标记的表达载体。在使用该表达载体时,可利用选择标记而确认表达载体导入的有无(及其程度)。

[0235] 接着,在产生表达产物即突变酶的条件下培养转化体。转化体的培养按照常规方法即可。作为用于培养基的碳源,只要是可同化的碳化合物即可,例如使用葡萄糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖、糖蜜、丙酮酸等。此外,作为氮源,只要是可利用的氮化合物即可,例如使用蛋白胨、肉提取物、酵母提取物、酪蛋白水解物、大豆渣碱提取物等。除此以外,根据需要使用磷酸盐、碳酸盐、硫酸盐、镁、钙、钾、铁、锰、锌等的盐类;特定的氨基酸;特定的维生素等。

[0236] 另一方面,培养温度可设定在 30℃~40℃的范围内(优选 37℃附近)。培养时间可考虑培养对象的转化体的生长特性、突变型酶的产生特性等而进行设定。培养基的 pH 在生长转化体且产生酶的范围范围内调制。优选将培养基的 pH 设为 6.0~9.0 左右(优选 pH7.0 附近)。

[0237] 接着,回收表达产物(突变酶)(步骤(III))。可以将培养后的包含菌体的培养液直接作为酶溶液利用,或者经过浓缩、杂质的除去等后作为酶溶液利用,但是一般而言,将表达产物从培养液或菌体中暂时回收。若表达产物为分泌型蛋白质,则从培养液中回收,除此以外,可从菌体内回收。在从培养液中回收时,例如将培养上清进行过滤、离心处理而除去不溶物,然后将减压浓缩、膜浓缩、利用硫酸铵、硫酸钠的盐析、利用甲醇、乙醇或丙酮等的分步沉淀法、透析、加热处理、等电点处理、凝胶过滤、吸附色谱法、离子交换色谱法、亲和色谱法等各种色谱法(例如,利用葡聚糖凝胶(GE Healthcare Bioscience 公司)等的凝胶

过滤, DEAE 琼脂糖凝胶 CL-6B (GE Healthcare Bioscience 公司), 辛基琼脂糖凝胶 CL-6B (GE Healthcare Bioscience 公司), CM 琼脂糖凝胶 CL-6B (GE Healthcare Bioscience 公司) 等组合而进行分离、纯化, 从而得到突变酶的纯化品。另一方面, 在从菌体内回收时, 通过将培养液进行过滤、离心处理等, 采集菌体, 接着将菌体用加压处理、超声波处理等机械方法或者利用溶酶体等的酶法进行破坏后, 与上述同样进行分离、纯化, 从而可得到突变酶的纯化品。

[0238] 也可将如上所述得到的纯化酶例如利用冷冻干燥、真空干燥或者喷雾干燥等粉末化而进行提供。此时, 可预先使纯化酶预溶解于磷酸缓冲液、三乙醇胺缓冲液、tris 盐酸缓冲液、GOOD 的缓冲液中。可优选使用磷酸缓冲液、三乙醇胺缓冲液。应予说明, 在此, 作为 GOOD 的缓冲液, 可举出 PIPES、MES 或 MOPS。

[0239] 通常, 如上所述利用适当的宿主-载体体系而进行基因的表达~表达产物(突变酶)的回收, 但是也可利用无细胞合成系统。在此, “无细胞合成系统(无细胞转录系统、无细胞转录/翻译系统)”是指不使用活细胞, 而是使用来自活细胞的(或者用基因工程学方法得到)核糖体、转录·翻译因子等, 从模板核酸(DNA、mRNA)体外合成其编码的 mRNA、蛋白质。在无细胞合成系统中一般使用将细胞破碎液根据需要进行纯化而得的细胞提取液。在细胞提取液中一般包含对蛋白质合成必要的核糖体、起始因子等各种因子、tRNA 等各种酶。在进行蛋白质的合成时, 在该细胞提取液中添加各种氨基酸、ATP、GTP 等能量源、肌酸磷酸等对蛋白质的合成必要的其它物质。当然, 在合成蛋白质时, 可根据需要补充另行准备的核糖体、各种因子、和/或各种酶等。

[0240] 也报告了再构成对蛋白质合成必要的各分子(因子)的转录/翻译系统的开发(Shimizu, Y. et al. : Nature Biotech., 19, 751-755, 2001)。在该合成系中, 将构成细菌的蛋白质合成系统的 3 种起始因子、3 种类的伸长因子、参与终止的 4 种因子、使各氨基酸与 tRNA 结合的 20 种氨基酸酰基 tRNA 合成酶, 及由甲硫氨酰 tRNA 甲酰化转移酶构成的 31 种因子的基因从大肠菌基因组进行扩增, 使用这些, 体外再构成蛋白质合成系统。在本发明中可利用这样的再构成合成系统。

[0241] 用语“无细胞转录/翻译系统”可与无细胞蛋白质合成系统、体外翻译系统或体外转录/翻译系统交换使用。在体外翻译系中, RNA 被用作模板而合成蛋白质。作为模板 RNA, 使用总 RNA、mRNA、体外转录产物等。在另外的体外转录/翻译系统中 DNA 被用作模板。模板 DNA 应当包含核糖体结合区域, 此外优选包含恰当的终止序列。应予说明, 在体外转录/翻译系统中, 以转录反应及翻译反应连续进行的方式, 设定对各反应必要的因子被添加的条件。

## 实施例

[0242] 在创造实用性高的 GDH 这样的目标下, 摸索出代替以往的方法(将现有的 GDH 进行修饰的方法、以筛选为中心的方法)的新方法。首先着眼于没有 FAD-GDH 特有的问题(针对木糖的反应性比较高, 最适温度高)的葡萄糖氧化酶(GO)。已知 GO 与 FAD-GDH 的氨基酸序列的同源性比较高。采用如下新方法: 重视该同源性, 对 GO 赋予 GDH 活性, 即, 利用修饰将 GO 进行 GDH 化。

[0243] 1. GO 与 FAD-GDH 的比对比较

[0244] 从来自黑曲霉的 G0 与来自目前氨基酸序列已知的米曲霉、土曲霉、意大利青霉、薄刺青霉的 FAD-GDH 的比对比较,以及立体结构明确的来自黑曲霉的 G0 的立体结构来看,在处于 G0 的活性中心附近的氨基酸中,在 FAD-GDH 间保守(共同性高),但是在 G0 与 FAD-GDH 之间检索出不同的氨基酸(图 2、3)。应予说明,在比对比较中,设有在 ClustalW2 (EMBL (European Molecular Biology Laboratory) -EBI (European Bioinformatics Institute)的主页内专用的位点。使用 <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>)。

[0245] 以利用检索确定的 13 个的氨基酸(L115、G131、T132、V193、T353、F436、D446、Y472、I511、P535、Y537、V582、M583)为突变导入对象。

[0246] 2. G0 基因的取得、突变导入及平板测定法

[0247] 对于 G0 基因,过去没有在大肠菌中表达的报告,因此决定在 pYES2 (Invitrogen 公司)的 HindIII-XhoII 部分中插入 G0 基因,以酿酒酵母(*S. cerevisiae*)为宿主,使之进行表达。

[0248] 从黑曲霉 G0-1 号菌(天野酶公司拥有)用 Gen Elute Plant Genomic DNA kit (Sigma 公司)提取基因组 DNA 后,利用 PCR 取得 G0 基因。以下,表示 PCR 的条件。

[0249] (反应液的组成)

[0250] 10×LA 缓冲液(Takara-bio 株式会社)5 μL

[0251] 2.5mM dNTPs (Takara-bio 株式会社)8 μL

[0252] 25mM MgCl<sub>2</sub> (Takara-bio 株式会社)5 μL

[0253] 正向引物(50 μM)1 μL

[0254] 反向引物(50 μM)1 μL

[0255] 模板 1 μL

[0256] LA Taq (Takara-bio 株式会社)0.5 μL

[0257] stH<sub>2</sub>O 28.5 μL

[0258] (引物序列)

[0259] 正向引物 :GATCAGAAGCTTAAAAAATGTCTACTCTCCTTGTGAGCTCG (序列号 39)

[0260] 反向引物 :GATCAGCTCGAGTCACTGCATGGAAGCATAATC (序列号 40)

[0261] (反应条件)

[0262] 于 94℃ 反应 2 分钟后,将于 94℃ 反应 30 秒、于 52℃ 反应 30 秒、于 72℃ 反应 2 分钟的反应循环重复 35 次,然后于 72℃ 反应 7 分钟,最后于 4℃ 放置。

[0263] 将 PCR 后的扩增产物插入 pYES2,制成 pYES-G0-K-P-2 质粒,确认了插入物的序列(图 4)。由于序列中没有发现问题,因此以构建的 pYES-G0-K-P-2 质粒为模板,基于以将 L115、G131、T132、V193、T353、F436、D446、Y472、I511、P535、Y537、V582、M583 分别取代成多种氨基酸的方式进行设计的下述合成寡聚核苷酸及与其互补的合成寡聚核苷酸,使用 QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene 公司),按照所附方案进行突变操作,构建具有突变葡萄糖氧化酶的质粒。

[0264] G0-L115- 突变用引物 :CCACCAACAATCAGACTGCGNNATCCGCTCCGAAATGG (序列号 41)

[0265] G0-G131- 突变用引物 :GCTCTACCCTCGTCAACGGTNNACCTGGACTCGCCCC (序列号 42)

[0266] G0-T132- 突变用引物 :CTCGTCAACGGTGGCENNNTGGACTCGCCCCAC (序列号 43)

- [0267] GO-V193- 突变用引物 :CATGGTATCAATGGTACTNNNCACGCCGGACCCCGCG (序列号 44)
- [0268] GO-T353- 突变用引物 :CAACCTTCAGGACCAGACCNNNTCTACCGTCCGCTCAC (序列号 45)
- [0269] GO-F436- 突变用引物 :GTCGCATACTCGGAACTCNNNCTCGACACGGCCGGAG (序列号 46)
- [0270] GO-D446- 突变用引物 :GCCGGAGTGGCCAGTTTCNNNGTGTGGGATCTTCTGC (序列号 47)
- [0271] GO-Y472- 突变用引物 :CATCCTCCGCCATTTTCGANNNGACCCTCAGTACTTTCTCAAC (序列号 48)
- [0272] GO-I551- 突变用引物 :CTTATTTTCGCTGGAGAGACTNNNCCC GG TGACAACCTCGC (序列号 49)
- [0273] GO-P535- 突变用引物 :CCCGTACAACCTCCGCNNNACTACCATGGTGTGGGTACTTG(序列号 50)
- [0274] GO-Y537- 突变用引物 :GTACAACCTCCGCCCTAACNNNCATGGTGTGGGTACTTGCTC(序列号 51)
- [0275] GO-V582- 突变用引物 :CTACGCAAATGTCGTCCCATNNNATGACGGTCTTTTATGCCATGG(序列号 52)
- [0276] GO-M583- 突变用引物 :CTACGCAAATGTCGTCCCATGTTNNNACGGTCTTTTATGCCATGG(序列号 53)
- [0277] 将突变导入后的质粒转化到大肠菌 DH5  $\alpha$  中后,进行质粒提取,制作突变文库。将所得文库转化到酿酒酵母 INVSc1 (Invitrogen 公司)中,将生长的菌落复制到表达平板后,用平板测定法确认表达及突变导入(图 5)。对于 F436,无法确认突变酶转化株的生长。应予说明,实验操作参考 pYES2 的手册。
- [0278] 平板测定方法
- [0279] 将各发色液浸渍于 80mm 的滤纸后,载置于平板上,确认发色。
- [0280] <GO 测定>
- [0281] 50mM PIPES-NaOH (cont. 0.1%Triton X-100) pH 7. 020mL
- [0282] 10% 葡萄糖 5mL
- [0283] 25u/mL PO “Amano” 3 (天野酶公司) 5mL
- [0284] 邻联茴香胺(o- ジアニジン) 5mg
- [0285] <GDH 测定>
- [0286] 50mM PIPES-NaOH (cont. 0.1%Triton X-100) pH 7. 023mL
- [0287] 10% 葡萄糖 5mL
- [0288] 3mmol/L 1- 甲氧基 PMS 1mL
- [0289] 6. 6mmol/L NTB 1mL
- [0290] 3. 液体培养的活性确认
- [0291] 对于能够用平板测定法确认的阳性菌落(用 GO 测定不发色,用 GDH 测定发色),进行液体培养,研究 GO 活性及 GDH 活性。应予说明,实验操作参考 pYES2 的手册。
- [0292] <GO 测定用试剂>
- [0293] 含苯酚的磷酸缓冲液 19mL
- [0294] 10% 葡萄糖 5mL
- [0295] 25u/mL PO”Amano” 3 (天野酶公司) 5mL
- [0296] 0. 4g/dL 4- 氨基安替比林 1mL
- [0297] <GDH 测定用试剂>
- [0298] 50mM PIPES-NaOH (cont. 0.1%Triton X-100) pH 7. 021mL
- [0299] 10% 葡萄糖 5mL
- [0300] 3mmol/L PMS 3mL
- [0301] 6. 6mmol/L NTB 1mL

[0302] 向各试剂 200  $\mu$ L 中添加 20  $\mu$ L 的培养上清,于 37 $^{\circ}$ C 使之反应。在反应开始后 10 分钟与 60 分钟时测定吸光度,由吸光度差求出 GO 活性及 GDH 活性。对于各突变酶转化株,算出 GDH 活性与 GO 活性之比(GDH 活性 /GO 活性),进行比较(图 6、7)。应予说明,以具有未突变 GO 的转化株(图 6、7 中表示为 pYES-GO)、用插入 GO 基因前的质粒转化而得的转化株(图 6、7 中表示为 pYES-2)、GO" Amano" 2 (图 6、7 中表示为 GO)、GDH" Amano" 8 (图 6、7 中表示为 FAD-GDH) 为比较对象(对照)。

[0303] 针对认定 GDH/GO 活性比变化大的突变酶转化株,确认突变导入点的氨基酸序列(图 8)。基于图 6 ~ 8 所示的结果,确定有效突变。首先,对于 T132,与具有 T132V(从苏氨酸到缬氨酸的取代)的突变酶转化株相比,具有 T132A(从苏氨酸到丙氨酸的取代)的突变酶转化株的 GDH/GO 活性比高,因此以 T132A 为有效突变。对于 T353,在突变酶转化株(5-1-5)中认定了两种突变 T353A 及 T353H,但是由于存在单独具有 T353A 的突变酶转化株(5-1-9、5-1-44),因此推测 5-1-5 株为两种株的混合,以 T353A 为有效突变。对于 D446,也基于同样的推测,以 D446H 为有效突变。此外,突变酶转化株 12-1-49 具有的突变 V582S 也为有效突变。应予说明,单独或组合具有以上 4 种突变的 GO 的氨基酸序列及对应的碱基序列(基因序列)列举如下。

[0304] 突变 :氨基酸序列 :碱基序列

[0305] T132A :序列号 7 :序列号 22

[0306] T353A :序列号 8 :序列号 23

[0307] D446H :序列号 9 :序列号 24

[0308] V582S :序列号 10 :序列号 25

[0309] T132A 及 T353A :序列号 11 :序列号 26

[0310] T132A 及 D446H :序列号 12 :序列号 27

[0311] T132A 及 V582S :序列号 13 :序列号 28

[0312] T353A 及 D446H :序列号 14 :序列号 29

[0313] T353A 及 V582S :序列号 15 :序列号 30

[0314] D446H 及 V582S :序列号 16 :序列号 31

[0315] T132A, T353A 及 D446H :序列号 17 :序列号 32

[0316] T132A, T353A 及 V582S :序列号 18 :序列号 33

[0317] T132A, D446H 及 V582S :序列号 19 :序列号 34

[0318] T353A, D446H 及 V582S :序列号 20 :序列号 35

[0319] T132A, T353A, D446H 及 V582S :序列号 21 :序列号 36

[0320] 4. 突变型 GO 的底物特异性的确认

[0321] 对于具有有效突变的酶(突变型 GO),研究 GDH 活性中的底物特异性。

[0322] <GDH 测定用试剂 >

[0323] 50mM PIPES-NaOH (cont. 0.1%Triton X-100) pH 7.021mL

[0324] 10% 底物 5mL

[0325] 3mmol/L PMS 1mL

[0326] 6.6mmol/L NTB 3mL

[0327] 向各试剂 200  $\mu$ L 中添加突变酶转化株(3-1-26、3-2-26、5-1-5、5-1-9、5-1-44、

7-1-7、7-2-17、7-2-30、7-2-42、12-1-49)的培养上清 20  $\mu$  L,于 37 $^{\circ}$ C 进行反应。反应开始后 10 分钟和 60 分钟时测定吸光度,从吸光度差求出 GDH 活性。将在使用各底物时的 GDH 活性以相对于以葡萄糖为底物时的 GDH 活性(100%)的比率进行表示。应予说明,以具有未突变 G0 的转化株(图 9 中表示为 pYES-G0)为对照。

[0328] 如图 9 所示,突变酶转化株中确认了底物特异性变化。在突变酶转化株 5-1-5、5-1-9、7-1-7、7-2-17、7-2-30、7-2-42、12-1-49 中没有对木糖的反应性。这些转化株具有的突变型 G0 在没有显示出对木糖的反应性方面可以说比现有的 FAD-GDH 优异。这样,利用氨基酸取代,成功地将 G0 进行 GDH 化,同时解决了现有的 FAD-GDH 中特有的问题。应予说明,由针对 T132 的突变而导致产生对木糖的反应性,因此启示了 FAD-GDH 中与该突变对应的部位参与对木糖的反应性的可能性。

[0329] 5. 突变组合的效果的确认

[0330] 对于认为是有效突变的基因突变的组合,验证了效果。为了简略后面的纯化,利用 PCR 反应而制作对来自黑曲霉 G0-1 号菌的葡萄糖氧化酶基因的 C 末端添加了组氨酸标签的 G0 基因(G0-3),将其插入 pYES2 中,构建 pYES-G0-3 质粒。

[0331] (反应液的组成)

[0332] 10 $\times$ LA 缓冲液(Takara-bio 株式会社)5  $\mu$  L

[0333] 2.5mM dNTPs (Takara-bio 株式会社)8  $\mu$  L

[0334] 25mM MgCl<sub>2</sub> (Takara-bio 株式会社)5  $\mu$  L

[0335] 正向引物(50  $\mu$  M)1  $\mu$  L

[0336] 反向引物(50  $\mu$  M)1  $\mu$  L

[0337] 模板 1  $\mu$  L

[0338] LA Taq (Takara-bio 株式会社)0.5  $\mu$  L

[0339] stH20 28.5  $\mu$  L

[0340] (引物的序列)

[0341] 正向引物 :GATCAGAAGCTTAAAAAATGTCTACTCTCCTTGTGAGCTCG (序列号 39)

[0342] 反向引物 :GATCAGCTCGAGTCAATGGTGATGGTGATGCTGCATGGAAGCATAATC (序列号 54)

[0343] (反应条件)

[0344] 在于 94 $^{\circ}$ C 反应 2 分钟后,将于 94 $^{\circ}$ C 反应 30 秒,于 52 $^{\circ}$ C 反应 30 秒、于 72 $^{\circ}$ C 反应 2 分钟的反应循环重复 35 次后,于 72 $^{\circ}$ C 反应 7 分钟,最后于 4 $^{\circ}$ C 放置。

[0345] 将 PCR 后的扩增产物插入 pYES2,制成 pYES-G0-3 质粒,确认插入物的序列。对序列没有发现问题,因此以构建的 pYES-G0-3 质粒为模板,基于设计成对 T132A、T353A、D446H、V582S 进行取代的下述合成寡聚核苷酸及与其互补的合成寡聚核苷酸,使用 QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene 公司),按照所附方案进行突变操作,构建出具有多重突变葡萄糖氧化酶的质粒。

[0346] G0-T132A-1 :CTCGTCAACGGTGGCGCTTGGACTCGCCCCAC (序列号 55)

[0347] G0-T353A-1 :CCTTCAGGACCAGACCGCTTCTACCGTCCGCTCAC (序列号 56)

[0348] G0-D446H-1 :GGAGTGGCCAGTTTCCATGTGTGGGATCTTCTGC (序列号 57)

[0349] G0-V582S-1 :CGCAAATGTCGTCCTCCATTCTATGACGGTCTTTTATGCCATGG (序列号 58)

[0350] 将突变导入后的质粒在大肠菌 DH5  $\alpha$  中转化后,进行质粒提取,制作突变文库。将



所得文库转化到酿酒酵母 INVSc1 (Invitrogen 公司) 中, 对于生长的菌落, 进行液体培养, 研究 GO 活性及 GDH 活性。应予说明, 实验操作参考 pYES2 的手册。

[0351] <GO 测定用试剂>

[0352] 含苯酚的磷酸缓冲液 19mL

[0353] 10% 葡萄糖 5mL

[0354] 25u/mL PO-35mL

[0355] 0.4g/dL 4-A. A 1mL

[0356] <GDH 测定用试剂>

[0357] 50mM PIPES-NaOH (cont. 0.1%Triton X-100) pH 7.021mL

[0358] 10% 葡萄糖 5mL

[0359] 3mmol/L PMS 3mL

[0360] 6.6mmol/L NTB 1mL

[0361] 向各试剂 200  $\mu$  L 中添加 20  $\mu$  L 的培养上清, 于 37°C 使之反应。反应开始后 10 分钟与 30 分钟时测定吸光度, 从吸光度差求出 GO 活性及 GDH 活性。对于各突变酶转化株, 算出 GDH 活性与 GO 活性的比 (GDH 活性 / GO 活性), 进行比较。应予说明, 以具有插入组氨酸标签的未突变 GO 的转化株 (表示为 pYES-GO-3)、用插入 GO 基因前的质粒转化而成的转化株 (表示为 pYES-2)、GO “Amano” 2 (表示为 GO), GDH “Amano” 8 (表示为 FAD-GDH) 为比较对象 (对照)。

[0362] 结果如图 11 所示。用 T132A 及 V582S (pYES-GO-M7)、D446H 及 V582S (pYES-GO-M10)、T132A、D446H 及 V582S (pYES-GO-M13) 的多重突变酶分别与单独的突变酶或突变导入前的野生酶 (pYES-GO-3) 进行比较, 确认 GDH/GO 活性比变化大。

[0363] 6. 纯化多重突变型酶的比活性及底物特异性的确认

[0364] 接着, 对于确认了效果的 T132A、D446H、V582S 的组合 (T132A 及 D446H、T132A 及 V582S、D446H 及 V582S、T132A、D446H 及 V582S), 进行转化株的液体培养, 用 Ni-琼脂糖凝胶进行纯化后, 研究比活性及底物特异性。应予说明, 在液体培养中的表达参考 pYES2 的手册。

[0365] <GDH 测定用试剂>

[0366] 50mM PIPES-NaOH (cont. 0.1%Triton X-100) pH7.021mL

[0367] 10% 葡萄糖 5mL

[0368] 3mmol/L PMS 3mL

[0369] 6.6mmol/L NTB 1mL

[0370] 向各试剂 200  $\mu$  L 中添加 20  $\mu$  L 的纯化酶溶液或标准酶溶液, 然后于 37°C 使之反应, 求出从反应开始 5 分钟与 10 分钟时的吸光度差。由用标准酶求出的校正曲线求出活性值, 与用 Bradford 法求出的蛋白量一起算出比活性。结果如图 12 所示。所得纯化酶的比活性为约 3 ~ 8u/mg (蛋白质)。

[0371] 对于具有有效突变的酶, 使用纯化酶, 研究 GDH 活性中底物特异性。

[0372] <GDH 测定用试剂>

[0373] 50mM PIPES-NaOH (cont. 0.1%Triton X-100) pH 7.021mL

[0374] 10% 底物 5mL

[0375] 3mmol/L PMS 3mL

[0376] 6.6mmol/L NTB 1mL

[0377] 对于各试剂 200  $\mu$  L, 添加突变酶转化株 (M6、M7、M10、M13) 的培养上清 20  $\mu$  L, 于 37°C 使之反应。反应开始后 5 分钟与 10 分钟时测定吸光度, 由吸光度差求出 GDH 活性。将使用各底物时的 GDH 活性用相对于以葡萄糖为底物时的 GDH 活性 (100%) 的比率进行表示。应予说明, 以 GDH “Amano” 8 (表示为 FAD-GDH) 为对照。

[0378] 结果如图 13 所示。突变酶转化株中确认底物特异性变化。特别是, 在 D446H 及 V582S (pYES-GO-M10) 中没有对木糖的反应性。本转化株具有的突变型 GO 在没有显示出对木糖的反应性方面可以说比现有的 FAD-GDH 优异。这样利用氨基酸取代, 在将 GO 进行 GDH 化的同时成功地解决了现有的 FAD-GDH 中特有的问题。

[0379] 7. D446 及 V582 多重突变酶的最优氨基酸的研究

[0380] 对于 D446 及 V582 的突变组合, 以各个氨基酸成为最优的氨基酸组合的方式, 以 pYES-GO-K-P-2 质粒为模板, 基于序列号 47 及序列号 52 的合成寡聚核苷酸及与其互补的合成寡聚核苷酸, 使用 QuikChangeSite-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene 公司), 按照所附方案, 进行突变操作, 构建具有突变葡萄糖氧化酶的质粒。将突变导入后的质粒转化到大肠菌 DH5  $\alpha$  中后, 进行质粒提取, 制作 D446 及 V582 多重突变文库。将所得文库在酿酒酵母 INVSc1 (Invitrogen 公司) 中进行转化, 对于所得转化体, 使用 96 孔深孔板, 进行液体培养, 以实施研究前的组合即 D446H 及 V582S 为对照, 取得了 GDH 活性及 GDH/GO 活性比提高的转化体。应予说明, 实验操作参考 pYES2 的手册。

[0381] 结果如图 14 所示。在 D446H 及 V582R、D446H 及 V582L、D446H 及 V582P 的组合中, 与实施研究前的组合 D446H 及 V582S 相比, GDH 活性及 GDH/GO 活性比提高。其中, D446H 及 V582P 的 GO 活性在检测限以下, 利用氨基酸取代, 成功地完全 GDH 化。

[0382] 8. D446H 及 V582P 多重突变酶的性质研究

[0383] (1) 培养及纯化

[0384] 液体培养中的表达如下进行: 参考 pYES2 的手册, 由保存板接种到在 500mL 摇瓶 (坂口フラスコ) 中制成的 100mL 含有 0.67% 的不含氨基酸酵母氮源 (Nippon Becton Dickinson 株式会社制)、2% 葡萄糖的培养基 (pH5.4) 中, 进行 30°C、140 转 / 分钟、20 小时的预培养。

[0385] 预培养结束后, 将菌体离心回收, 再次以成为 OD660=0.4 的方式接种到在 500mL 摇瓶中制成的 100mL 的含有 0.67% 不含氨基酸酵母氮源 (Nippon Becton Dickinson 株式会社制)、2% 半乳糖及 1% 蜜三糖的培养基 (pH5.4) 中, 进行 30°C、140 转 / 分钟、5 小时的本培养。

[0386] 培养结束后, 利用超滤膜 (商品名 MICROZA, 分组分子量 6000, 旭化成社制) 进行脱盐浓缩, 对于上述脱盐浓缩液, 使之在用 20mM 磷酸缓冲液 (pH7.0) 平衡化的阴离子交换树脂 (商品名 HiTrap DEAE FF, GE Healthcare Japan 公司制) 柱中进行吸附, 用上述缓冲液进行清洗。清洗后, 使用含有 NaCl 的 30mM MOPS 缓冲液 (pH7.0), 利用 NaCl 浓度 0 ~ 1.0M 的 Liner gradient 法进行溶出。可得到由如上所述的纯化方法部分纯化的突变型 GO (D446H, V582P 多重突变酶)。

[0387] (2) 底物特异性的确认

[0388] 对于突变型 GO 部分纯化酶(D446H、V582P 多重突变酶),研究 GDH 活性中的底物特异性。

[0389] <GDH 测定用试剂>

[0390] 50mM PIPES-NaOH (cont. 0.1%Triton X-100) pH 7.021mL

[0391] 10% 底物 5mL

[0392] 3mmol/L PMS 3mL

[0393] 6.6mmol/L NTB 1mL

[0394] 对于各试剂 200  $\mu$  L,添加突变型 GO 部分纯化酶(D446H、V582P 多重突变酶)20  $\mu$  L,于 37 $^{\circ}$ C 使之反应。反应开始后 10 分钟与 30 分钟时测定吸光度,由吸光度差求出 GDH 活性。将使用各底物时的 GDH 活性用相对于以葡萄糖为底物时的 GDH 活性(100%)的比率进行表示。应予说明,以 GDH “Amano”8 (图 6、7 中表示为 FAD-GDH) 为对照。

[0395] 结果如图 15 所示。突变型 GO 部分纯化酶(D446H、V582P 多重突变酶)未显示出对木糖的反应性,与 GDH “Amano”8 相比,底物特异性格外优异。

[0396] 产业上的利用可能性

[0397] 本发明提供的突变 GO 在试样中的葡萄糖量的检测、定量中 useful。另一方面,本发明的设计方法、制备方法作为取得特性提高的 GDH 或 GO 取得的方法得到利用。特别是,期待作为用于取得 GDH 化的 GO 或 GO 化的 GDH 的方法来利用。

[0398] 本发明并不限定于任何上述发明实施方式及实施例的说明。在不脱离本发明所要保护的范围内,本领域技术人员可容易想到的范围内的各种变型方式也包含在本发明中。

[0399] 本说明书中明示的论文、公开专利公报、及专利公报等内容通过援引其全部内容而得到引用。

[0400] 另附序列列表文本

[0401] 序列号 39 ~ 40, 54 :人工序列的说明 :PCR 用引物

[0402] 序列号 41 ~ 53, 55 ~ 58 :人工序列的说明 :突变导入用引物

[0001]

## 序列表

<110> 天野酶公司  
 西尾享一  
 小池田聪  
 <120> 突变酶及其用途  
 <130> AE09010P  
 <150> JP P2009-277096  
 <151> 2009-12-05  
 <160> 64  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 605  
 <212> PRT  
 <213> 黑曲霉  
 <400> 1  
 Met Gln Thr Leu Leu Val Ser Ser Leu Val Val Ser Leu Ala Ala Ala  
 1 5 10 15  
 Leu Pro His Tyr Ile Arg Ser Asn Gly Ile Glu Ala Ser Leu Leu Thr  
 20 25 30  
 Asp Pro Lys Glu Val Ala Gly Arg Thr Val Asp Tyr Ile Ile Ala Gly  
 35 40 45  
 Gly Gly Leu Thr Gly Leu Thr Thr Ala Ala Arg Leu Thr Glu Asn Pro  
 50 55 60  
 Asp Ile Thr Val Leu Val Ile Glu Ser Gly Ser Tyr Glu Ser Asp Arg  
 65 70 75 80  
 Gly Pro Ile Ile Glu Asp Leu Asn Ala Tyr Gly Asp Ile Phe Gly Ser  
 85 90 95  
 Ser Val Asp His Ala Tyr Glu Thr Val Glu Leu Ala Thr Asn Asn Gln  
 100 105 110  
 Thr Ala Leu Ile Arg Ser Gly Asn Gly Leu Gly Gly Ser Thr Leu Val  
 115 120 125  
 Asn Gly Gly Thr Trp Thr Arg Pro His Lys Ala Gln Val Asp Ser Trp  
 130 135 140  
 Glu Thr Val Phe Gly Asn Glu Gly Trp Asn Trp Asp Ser Val Ala Ala  
 145 150 155 160  
 Tyr Ser Leu Gln Ala Glu Arg Ala Arg Ala Pro Asn Ala Lys Gln Ile  
 165 170 175  
 Ala Ala Gly His Tyr Phe Asn Ala Ser Cys His Gly Ile Asn Gly Thr  
 180 185 190  
 Val His Ala Gly Pro Arg Asp Thr Gly Asp Asp Tyr Ser Pro Ile Val  
 195 200 205

[0002]

Lys Ala Leu Met Ser Ala Val Glu Asp Arg Gly Val Pro Thr Lys Lys  
 210 215 220

Asp Leu Gly Cys Gly Asp Pro His Gly Val Ser Met Phe Pro Asn Thr  
 225 230 235 240

Leu His Glu Asp Gln Val Arg Ser Asp Ala Ala Arg Glu Trp Leu Leu  
 245 250 255

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

Gly Lys Val Leu Leu Ser Gln Asn Ala Thr Thr Pro Arg Ala Val Gly  
 275 280 285

Val Glu Phe Gly Thr His Lys Gly Asn Thr His Asn Val Tyr Ala Lys  
 290 295 300

His Glu Val Leu Leu Ala Ala Gly Ser Ala Val Ser Pro Thr Ile Leu  
 305 310 315 320

Glu Tyr Ser Gly Ile Gly Met Lys Ser Ile Leu Glu Pro Leu Gly Ile  
 325 330 335

Asp Thr Val Val Asp Leu Pro Val Gly Leu Asn Leu Gln Asp Gln Thr  
 340 345 350

Thr Ser Thr Val Arg Ser Arg Ile Thr Ser Ala Gly Ala Gly Gln Gly  
 355 360 365

Gln Ala Ala Trp Phe Ala Thr Phe Asn Glu Thr Phe Gly Asp Tyr Ala  
 370 375 380

Glu Lys Ala His Glu Leu Leu Asn Thr Lys Leu Glu Gln Trp Ala Glu  
 385 390 395 400

Glu Ala Val Ala Arg Gly Gly Phe His Asn Thr Thr Ala Leu Leu Ile  
 405 410 415

Gln Tyr Glu Asn Tyr Arg Asp Trp Ile Val Lys Asp Asn Val Ala Tyr  
 420 425 430

Ser Glu Leu Phe Leu Asp Thr Ala Gly Val Ala Ser Phe Asp Val Trp  
 435 440 445

Asp Leu Leu Pro Phe Thr Arg Gly Tyr Val His Ile Leu Asp Lys Asp  
 450 455 460

Pro Tyr Leu Arg His Phe Ala Tyr Asp Pro Gln Tyr Phe Leu Asn Glu  
 465 470 475 480

Leu Asp Leu Leu Gly Gln Ala Ala Ala Thr Gln Leu Ala Arg Asn Ile  
 485 490 495

Ser Asn Ser Gly Ala Met Gln Thr Tyr Phe Ala Gly Glu Thr Ile Pro  
 500 505 510

[0003]

Gly Asp Asn Leu Ala Tyr Asp Ala Asp Leu Ser Ala Trp Val Glu Tyr  
 515 520 525  
 Ile Pro Tyr Asn Phe Arg Pro Asn Tyr His Gly Val Gly Thr Cys Ser  
 530 535 540  
 Met Met Pro Lys Glu Met Gly Gly Val Val Asp Asn Ala Ala Arg Val  
 545 550 555 560  
 Tyr Gly Val Gln Gly Leu Arg Val Ile Asp Gly Ser Ile Pro Pro Thr  
 565 570 575  
 Gln Met Ser Ser His Val Met Thr Val Phe Tyr Ala Met Ala Leu Lys  
 580 585 590  
 Val Ala Asp Ala Ile Leu Ala Asp Tyr Ala Ser Met Gln  
 595 600 605  
 <210> 2  
 <211> 605  
 <212> PRT  
 <213> 尼崎青霉  
 <400> 2  
 Met Val Ser Val Phe Leu Ser Thr Leu Leu Leu Ser Ala Ala Ala Val  
 1 5 10 15  
 Gln Ala Tyr Leu Pro Ala Gln Gln Ile Asp Val Gln Ser Ser Leu Leu  
 20 25 30  
 Ser Asp Pro Ser Lys Val Ala Gly Lys Thr Tyr Asp Tyr Ile Ile Ala  
 35 40 45  
 Gly Gly Gly Leu Thr Gly Leu Thr Val Ala Ala Lys Leu Thr Glu Asn  
 50 55 60  
 Pro Lys Ile Lys Val Leu Val Ile Glu Lys Gly Phe Tyr Glu Ser Asn  
 65 70 75 80  
 Asp Gly Ala Ile Ile Glu Asp Pro Asn Ala Tyr Gly Gln Ile Phe Gly  
 85 90 95  
 Thr Thr Val Asp Gln Asn Tyr Leu Thr Val Pro Leu Ile Asn Asn Arg  
 100 105 110  
 Thr Asn Asn Ile Lys Ala Gly Lys Gly Leu Gly Gly Ser Thr Leu Ile  
 115 120 125  
 Asn Gly Asp Ser Trp Thr Arg Pro Asp Lys Val Gln Ile Asp Ser Trp  
 130 135 140  
 Glu Lys Val Phe Gly Met Glu Gly Trp Asn Trp Asp Asn Met Phe Glu  
 145 150 155 160  
 Tyr Met Lys Lys Ala Glu Ala Ala Arg Thr Pro Thr Ala Ala Gln Leu  
 165 170 175  
 Ala Ala Gly His Ser Phe Asn Ala Thr Cys His Gly Thr Asn Gly Thr

[0004]

180	185	190
Val Gln Ser Gly Ala Arg Asp Asn Gly Gln Pro Trp Ser Pro Ile Met 195 200 205		
Lys Ala Leu Met Asn Thr Val Ser Ala Leu Gly Val Pro Val Gln Gln 210 215 220		
Asp Phe Leu Cys Gly His Pro Arg Gly Val Ser Met Ile Met Asn Asn 225 230 235 240		
Leu Asp Glu Asn Gln Val Arg Val Asp Ala Ala Arg Ala Trp Leu Leu 245 250 255		
Pro Asn Tyr Gln Arg Ser Asn Leu Glu Ile Leu Thr Gly Gln Met Val 260 265 270		
Gly Lys Val Leu Phe Lys Gln Thr Ala Ser Gly Pro Gln Ala Val Gly 275 280 285		
Val Asn Phe Gly Thr Asn Lys Ala Val Asn Phe Asp Val Phe Ala Lys 290 295 300		
His Glu Val Leu Leu Ala Ala Gly Ser Ala Ile Ser Pro Leu Ile Leu 305 310 315 320		
Glu Tyr Ser Gly Ile Gly Leu Lys Ser Val Leu Asp Gln Ala Asn Val 325 330 335		
Thr Gln Leu Leu Asp Leu Pro Val Gly Ile Asn Met Gln Asp Gln Thr 340 345 350		
Thr Thr Thr Val Ser Ser Arg Ala Ser Ser Ala Gly Ala Gly Gln Gly 355 360 365		
Gln Ala Val Phe Phe Ala Asn Phe Thr Glu Thr Phe Gly Asp Tyr Ala 370 375 380		
Pro Gln Ala Arg Asp Leu Leu Asn Thr Lys Leu Asp Gln Trp Ala Glu 385 390 395 400		
Glu Thr Val Ala Arg Gly Gly Phe His Asn Val Thr Ala Leu Lys Val 405 410 415		
Gln Tyr Glu Asn Tyr Arg Asn Trp Leu Leu Asp Glu Asp Val Ala Phe 420 425 430		
Ala Glu Leu Phe Met Asp Thr Glu Gly Lys Ile Asn Phe Asp Leu Trp 435 440 445		
Asp Leu Ile Pro Phe Thr Arg Gly Ser Val His Ile Leu Ser Ser Asp 450 455 460		
Pro Tyr Leu Trp Gln Phe Ala Asn Asp Pro Lys Phe Phe Leu Asn Glu 465 470 475 480		
Phe Asp Leu Leu Gly Gln Ala Ala Ala Ser Lys Leu Ala Arg Asp Leu		

[0005]





Leu Asp Gly Ser Gly Val Ser Phe Asp Pro Ala Tyr His Gly Phe Thr  
 165 170 175  
 Gly Pro Leu Lys Val Gly Trp Ser Ser Thr Gln Leu Asn Asp Gly Leu  
 180 185 190  
 Ala Gln Lys Leu Asn Ala Thr Tyr Gln Ser Leu Asp Val Pro Val Pro  
 195 200 205  
 Tyr Asn Arg Asp Ala Asn Ser Gly Asp Met Val Gly Tyr Ser Val Tyr  
 210 215 220  
 Pro Lys Thr Val Asn Ala Asp Leu Asn Ile Arg Glu Asp Ala Ala Arg  
 225 230 235 240  
 Ala Phe Tyr Tyr Pro Tyr Gln Asn Arg Thr Asn Leu His Val Trp Leu  
 245 250 255  
 Asn Thr His Ala Asn Lys Ile Thr Trp Asn Glu Gly Ser Glu Ala Thr  
 260 265 270  
 Ala Asn Gly Val Glu Val Thr Leu Ser Asn Gly Lys Lys Thr Val Val  
 275 280 285  
 Lys Ala Thr Arg Glu Val Ile Leu Ala Ala Gly Ala Leu Lys Ser Pro  
 290 295 300  
 Val Leu Leu Glu Leu Ser Gly Val Gly Asn Pro Asp Ile Leu Ser Lys  
 305 310 315 320  
 His Gly Ile Thr Thr Lys Ile Asn Leu Pro Thr Val Gly Glu Asn Leu  
 325 330 335  
 Gln Asp Gln Met Asn Asn Gly Leu Lys Phe Glu Ser Lys Lys Thr Tyr  
 340 345 350  
 Ser Thr Asp Lys Gly Ser Ser Tyr Val Ala Tyr Pro Ser Ala Asp Gln  
 355 360 365  
 Leu Phe Pro Asn Ser Thr Ala Leu Gly Ala Asp Leu Leu Arg Lys Leu  
 370 375 380  
 Pro Ala Tyr Ala Ala Gln Val Ala Ser Ala Asn Gly Asn Ile Thr Lys  
 385 390 395 400  
 Ala Arg Asp Ile Tyr Arg Phe Phe Lys Ile Gln Trp Asp Leu Ile Phe  
 405 410 415  
 Lys Asp Glu Ile Pro Val Ala Glu Ile Leu Leu Ser Gly Ser Gly Ala  
 420 425 430  
 Ser Tyr Ser Gly Glu Tyr Trp Gly Ser Val Pro Phe Ser Arg Gly Ser  
 435 440 445  
 Val His Leu Ser Ser Ala Asp Pro Thr Ala Ala Pro Thr Ile Asp Pro  
 450 455 460

[0007]

Lys Tyr Phe Met Leu Asp Phe Asp Leu His Ala Gln Ala Gln Ala Ala  
 465 470 475 480  
 Arg Phe Ile Arg Glu Ile Phe Lys Thr Glu Pro Leu Ala Asp Thr Ala  
 485 490 495  
 Gly Ala Glu Thr Thr Pro Gly Leu Ser Thr Val Ala Ala Gly Ala Asp  
 500 505 510  
 Asp Glu Ala Trp Ser Lys Phe Ile Tyr Ser Lys Tyr Arg Ser Asn Tyr  
 515 520 525  
 His Pro Ile Thr Thr Ala Gly Met Leu Pro Lys Glu Leu Gly Gly Val  
 530 535 540  
 Val Asp Thr Ser Leu Lys Val Tyr Gly Thr Ser Asn Val Arg Val Val  
 545 550 555 560  
 Asp Ala Ser Val Met Pro Phe Gln Val Cys Gly His Leu Gln Ser Thr  
 565 570 575  
 Val Tyr Ala Val Ala Glu Arg Ala Ala Asp Ile Ile Lys Gly Glu Leu  
 580 585 590  
 <210> 4  
 <211> 590  
 <212> PRT  
 <213> 薄刺青霉  
 <400> 4  
 Met Arg Ser Leu Ile Ser Leu Ala Leu Leu Pro Leu Ala Ala Ala Val  
 1 5 10 15  
 Pro His Val Ser Arg Ser Ser Glu Thr Thr Tyr Asp Tyr Ile Val Val  
 20 25 30  
 Gly Gly Gly Thr Ser Gly Leu Val Ile Ala Asn Arg Leu Ser Glu Leu  
 35 40 45  
 Glu Lys Val Asn Val Leu Val Ile Glu Ala Gly Gly Ser Val Tyr Asn  
 50 55 60  
 Asn Pro Asn Val Thr Asp Thr Ala Gly Tyr Gly Lys Ala Phe Gly Thr  
 65 70 75 80  
 Asp Ile Asp Trp Ala Tyr Glu Thr Val Lys Gln Glu Trp Gly Gly Gly  
 85 90 95  
 Thr Lys Gln Thr Val Arg Ala Gly Lys Ala Leu Gly Gly Thr Ser Thr  
 100 105 110  
 Ile Asn Gly Met Val Tyr Leu Arg Ala Gln Lys Ser Gln Ile Asp Ala  
 115 120 125  
 Trp Glu Lys Ile Gly Asn Asp Gly Trp Asn Trp Lys Asn Leu Phe Pro  
 130 135 140

[0008]

Tyr Tyr Arg Lys Gly Glu Lys Phe Gln Val Pro Thr Asp Tyr Ala Phe  
 145 150 155 160

Leu Glu Gly Thr Gly Val Ala Tyr Asp Pro Ala Phe His Gly Tyr Asn  
 165 170 175

Gly Pro Leu Lys Val Gly Trp Thr Ser Thr Gln Leu Asn Asp Gly Leu  
 180 185 190

Ala Gln Val Met Asn Ser Thr Tyr Gln Asn Met Ser Val Pro Val Pro  
 195 200 205

Tyr Asn Lys Asp Pro Asn Gly Gly Gln Met Val Gly Tyr Ser Val Tyr  
 210 215 220

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

Ala Tyr Tyr Tyr Pro Tyr Gln Asn Arg Thr Asn Leu His Val Trp Leu  
 245 250 255

Asn Ser His Val Asn Lys Leu Val Trp Lys Asp Gly Ala Asn Met Thr  
 260 265 270

Ala Asp Gly Val Glu Val Lys Phe Ser Asn Gly Thr Thr Ala Thr Val  
 275 280 285

Lys Ala Ala Arg Glu Val Ile Leu Ala Ala Gly Ala Leu Lys Ser Pro  
 290 295 300

Leu Leu Leu Glu Leu Ser Gly Val Gly Asn Pro Asp Ile Leu Ser Arg  
 305 310 315 320

His Gly Ile Asp Thr Lys Ile Asn Leu Pro Thr Ile Gly Glu Asn Leu  
 325 330 335

Gln Asp Gln Met Asn Asn Gly Leu Ala Tyr Thr Ser Lys Lys Asn Tyr  
 340 345 350

Thr Lys Ala Ala Ser Tyr Val Ala Tyr Pro Ser Ala Glu Glu Leu Phe  
 355 360 365

Thr Asn Ala Thr Thr Ile Gly Ala Gln Leu Leu Arg Lys Leu Pro Ala  
 370 375 380

Tyr Ala Ala Gln Val Ala Ser Ala Asn Gly Asn Val Thr Arg Ala Ala  
 385 390 395 400

Asp Ile Glu Arg Phe Phe Lys Ile Gln Trp Asp Leu Ile Phe Lys Ser  
 405 410 415

His Ile Pro Val Ala Glu Ile Leu Leu Glu Pro Phe Gly Phe Thr Tyr  
 420 425 430

Asp Ser Glu Tyr Trp Gly Ser Val Pro Phe Ser Arg Gly Ser Ile His  
 435 440 445

[0009]

Ile Ser Ser Ser Asp Pro Thr Ala Pro Ala Ile Ile Asp Pro Lys Tyr  
 450 455 460  
 Phe Met Leu Asp Phe Asp Phe His Ala Gln Val Glu Ala Ala Arg Phe  
 465 470 475 480  
 Ile Arg Glu Leu Phe Lys Thr Glu Pro Phe Ala Asp Met Ala Gly Ala  
 485 490 495  
 Glu Thr Ser Pro Gly Leu Ser Ala Val Ser Ser Asn Ala Asp Asp Glu  
 500 505 510  
 Gly Trp Ser Ser Phe Leu Lys Ser Asn Phe Arg Ser Asn Phe His Pro  
 515 520 525  
 Ile Thr Thr Ala Gly Met Met Pro Lys Glu Ile Gly Gly Val Val Asp  
 530 535 540  
 Thr Ser Leu Lys Val Tyr Gly Thr Ser Asn Val Arg Val Val Asp Ala  
 545 550 555 560  
 Ser Val Ile Pro Phe Gln Val Cys Gly His Leu Gln Ser Thr Ile Tyr  
 565 570 575  
 Ala Val Ala Glu Arg Ala Ala Asp Ile Ile Lys Ala Gln Met  
 580 585 590  
 <210> 5  
 <211> 593  
 <212> PRT  
 <213> 米曲霉  
 <400> 5  
 Met Leu Phe Ser Leu Ala Phe Leu Ser Ala Leu Ser Leu Ala Thr Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Pro Ala Gly Arg Ala Lys Asn Thr Thr Thr Tyr Asp Tyr Ile Val  
 20 25 30  
 Val Gly Gly Gly Thr Ser Gly Leu Val Val Ala Asn Arg Leu Ser Glu  
 35 40 45  
 Asn Pro Asp Val Ser Val Leu Leu Leu Glu Ala Gly Ala Ser Val Phe  
 50 55 60  
 Asn Asn Pro Asp Val Thr Asn Ala Asn Gly Tyr Gly Leu Ala Phe Gly  
 65 70 75 80  
 Ser Ala Ile Asp Trp Gln Tyr Gln Ser Ile Asn Gln Ser Tyr Ala Gly  
 85 90 95  
 Gly Lys Gln Gln Val Leu Arg Ala Gly Lys Ala Leu Gly Gly Thr Ser  
 100 105 110  
 Thr Ile Asn Gly Met Ala Tyr Thr Arg Ala Glu Asp Val Gln Ile Asp  
 115 120 125

[0010]

Val Trp Gln Lys Leu Gly Asn Glu Gly Trp Thr Trp Lys Asp Leu Leu  
 130 135 140  
 Pro Tyr Tyr Leu Lys Ser Glu Asn Leu Thr Ala Pro Thr Ser Ser Gln  
 145 150 155 160  
 Val Ala Ala Gly Ala Ala Tyr Asn Pro Ala Val Asn Gly Lys Glu Gly  
 165 170 175  
 Pro Leu Lys Val Gly Trp Ser Gly Ser Leu Ala Ser Gly Asn Leu Ser  
 180 185 190  
 Val Ala Leu Asn Arg Thr Phe Gln Ala Ala Gly Val Pro Trp Val Glu  
 195 200 205  
 Asp Val Asn Gly Gly Lys Met Arg Gly Phe Asn Ile Tyr Pro Ser Thr  
 210 215 220  
 Leu Asp Val Asp Leu Asn Val Arg Glu Asp Ala Ala Arg Ala Tyr Tyr  
 225 230 235 240  
 Phe Pro Tyr Asp Asp Arg Lys Asn Leu His Leu Leu Glu Asn Thr Thr  
 245 250 255  
 Ala Asn Arg Leu Phe Trp Lys Asn Gly Ser Ala Glu Glu Ala Ile Ala  
 260 265 270  
 Asp Gly Val Glu Ile Thr Ser Ala Asp Gly Lys Val Thr Arg Val His  
 275 280 285  
 Ala Lys Lys Glu Val Ile Ile Ser Ala Gly Ala Leu Arg Ser Pro Leu  
 290 295 300  
 Ile Leu Glu Leu Ser Gly Val Gly Asn Pro Thr Ile Leu Lys Lys Asn  
 305 310 315 320  
 Asn Ile Thr Pro Arg Val Asp Leu Pro Thr Val Gly Glu Asn Leu Gln  
 325 330 335  
 Asp Gln Phe Asn Asn Gly Met Ala Gly Glu Gly Tyr Gly Val Leu Ala  
 340 345 350  
 Gly Ala Ser Thr Val Thr Tyr Pro Ser Ile Ser Asp Val Phe Gly Asn  
 355 360 365  
 Glu Thr Asp Ser Ile Val Ala Ser Leu Arg Ser Gln Leu Ser Asp Tyr  
 370 375 380  
 Ala Ala Ala Thr Val Lys Val Ser Asn Gly His Met Lys Gln Glu Asp  
 385 390 395 400  
 Leu Glu Arg Leu Tyr Gln Leu Gln Phe Asp Leu Ile Val Lys Asp Lys  
 405 410 415  
 Val Pro Ile Ala Glu Ile Leu Phe His Pro Gly Gly Gly Asn Ala Val  
 420 425 430

[0011]

Ser Ser Glu Phe Trp Gly Leu Leu Pro Phe Ala Arg Gly Asn Ile His  
 435 440 445  
 Ile Ser Ser Asn Asp Pro Thr Ala Pro Ala Ala Ile Asn Pro Asn Tyr  
 450 455 460  
 Phe Met Phe Glu Trp Asp Gly Lys Ser Gln Ala Gly Ile Ala Lys Tyr  
 465 470 475 480  
 Ile Arg Lys Ile Leu Arg Ser Ala Pro Leu Asn Lys Leu Ile Ala Lys  
 485 490 495  
 Glu Thr Lys Pro Gly Leu Ser Glu Ile Pro Ala Thr Ala Ala Asp Glu  
 500 505 510  
 Lys Trp Val Glu Trp Leu Lys Ala Asn Tyr Arg Ser Asn Phe His Pro  
 515 520 525  
 Val Gly Thr Ala Ala Met Met Pro Arg Ser Ile Gly Gly Val Val Asp  
 530 535 540  
 Asn Arg Leu Arg Val Tyr Gly Thr Ser Asn Val Arg Val Val Asp Ala  
 545 550 555 560  
 Ser Val Leu Pro Phe Gln Val Cys Gly His Leu Val Ser Thr Leu Tyr  
 565 570 575  
 Ala Val Ala Glu Arg Ala Ser Asp Leu Ile Lys Glu Asp Ala Lys Ser  
 580 585 590  
 Ala  
 <210> 6  
 <211> 591  
 <212> PRT  
 <213> 土曲霉  
 <400> 6  
 Met Leu Gly Lys Leu Ser Phe Leu Ser Ala Leu Ser Leu Ala Val Ala  
 1 5 10 15  
 Ala Pro Leu Ser Asn Ser Thr Ser Ala Lys Tyr Asp Tyr Ile Val Ile  
 20 25 30  
 Gly Gly Gly Thr Ser Gly Leu Ala Val Ala Asn Arg Leu Ser Glu Asp  
 35 40 45  
 Pro Asn Val Asn Val Leu Ile Leu Glu Ala Gly Gly Ser Val Trp Asn  
 50 55 60  
 Asn Pro Asn Val Thr Asn Val Asp Gly Tyr Gly Leu Ala Phe Gly Ser  
 65 70 75 80  
 Asp Ile Asp Trp Gln Tyr Gln Ser Val Asn Gln Pro Tyr Gly Gly Asn  
 85 90 95  
 Leu Ser Gln Val Leu Arg Ala Gly Lys Ala Leu Gly Gly Thr Ser Thr

[0012]

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

[0013]





Ser Val Asp His Ala Tyr Glu Thr Val Glu Leu Ala Thr Asn Asn Gln  
 100 105 110

Thr Ala Leu Ile Arg Ser Gly Asn Gly Leu Gly Gly Ser Thr Leu Val  
 115 120 125

Asn Gly Gly Ala Trp Thr Arg Pro His Lys Ala Gln Val Asp Ser Trp  
 130 135 140

Glu Thr Val Phe Gly Asn Glu Gly Trp Asn Trp Asp Ser Val Ala Ala  
 145 150 155 160

Tyr Ser Leu Gln Ala Glu Arg Ala Arg Ala Pro Asn Ala Lys Gln Ile  
 165 170 175

Ala Ala Gly His Tyr Phe Asn Ala Ser Cys His Gly Ile Asn Gly Thr  
 180 185 190

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

Lys Ala Leu Met Ser Ala Val Glu Asp Arg Gly Val Pro Thr Lys Lys  
 210 215 220

Asp Leu Gly Cys Gly Asp Pro His Gly Val Ser Met Phe Pro Asn Thr  
 225 230 235 240

Leu His Glu Asp Gln Val Arg Ser Asp Ala Ala Arg Glu Trp Leu Leu  
 245 250 255

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

Gly Lys Val Leu Leu Ser Gln Asn Ala Thr Thr Pro Arg Ala Val Gly  
 275 280 285

Val Glu Phe Gly Thr His Lys Gly Asn Thr His Asn Val Tyr Ala Lys  
 290 295 300

His Glu Val Leu Leu Ala Ala Gly Ser Ala Val Ser Pro Thr Ile Leu  
 305 310 315 320

Glu Tyr Ser Gly Ile Gly Met Lys Ser Ile Leu Glu Pro Leu Gly Ile  
 325 330 335

Asp Thr Val Val Asp Leu Pro Val Gly Leu Asn Leu Gln Asp Gln Thr  
 340 345 350

Thr Ser Thr Val Arg Ser Arg Ile Thr Ser Ala Gly Ala Gly Gln Gly  
 355 360 365

Gln Ala Ala Trp Phe Ala Thr Phe Asn Glu Thr Phe Gly Asp Tyr Ala  
 370 375 380

Glu Lys Ala His Glu Leu Leu Asn Thr Lys Leu Glu Gln Trp Ala Glu  
 385 390 395 400

[0015]

Glu Ala Val Ala Arg Gly Gly Phe His Asn Thr Thr Ala Leu Leu Ile  
 405 410 415  
 Gln Tyr Glu Asn Tyr Arg Asp Trp Ile Val Lys Asp Asn Val Ala Tyr  
 420 425 430  
 Ser Glu Leu Phe Leu Asp Thr Ala Gly Val Ala Ser Phe Asp Val Trp  
 435 440 445  
 Asp Leu Leu Pro Phe Thr Arg Gly Tyr Val His Ile Leu Asp Lys Asp  
 450 455 460  
 Pro Tyr Leu Arg His Phe Ala Tyr Asp Pro Gln Tyr Phe Leu Asn Glu  
 465 470 475 480  
 Leu Asp Leu Leu Gly Gln Ala Ala Ala Thr Gln Leu Ala Arg Asn Ile  
 485 490 495  
 Ser Asn Ser Gly Ala Met Gln Thr Tyr Phe Ala Gly Glu Thr Ile Pro  
 500 505 510  
 Gly Asp Asn Leu Ala Tyr Asp Ala Asp Leu Ser Ala Trp Val Glu Tyr  
 515 520 525  
 Ile Pro Tyr Asn Phe Arg Pro Asn Tyr His Gly Val Gly Thr Cys Ser  
 530 535 540  
 Met Met Pro Lys Glu Met Gly Gly Val Val Asp Asn Ala Ala Arg Val  
 545 550 555 560  
 Tyr Gly Val Gln Gly Leu Arg Val Ile Asp Gly Ser Ile Pro Pro Thr  
 565 570 575  
 Gln Met Ser Ser His Val Met Thr Val Phe Tyr Ala Met Ala Leu Lys  
 580 585 590  
 Val Ala Asp Ala Ile Leu Ala Asp Tyr Ala Ser Met Gln  
 595 600 605  
 <210> 8  
 <211> 605  
 <212> PRT  
 <213> 黑曲霉  
 <400> 8  
 Met Ser Thr Leu Leu Val Ser Ser Leu Val Val Ser Leu Ala Ala Ala  
 1 5 10 15  
 Leu Pro His Tyr Ile Arg Ser Asn Gly Ile Glu Ala Ser Leu Leu Thr  
 20 25 30  
 Asp Pro Lys Glu Val Ala Gly Arg Thr Val Asp Tyr Ile Ile Ala Gly  
 35 40 45  
 Gly Gly Leu Thr Gly Leu Thr Thr Ala Ala Arg Leu Thr Glu Asn Pro  
 50 55 60

[0016]

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

[0017]

Gln Ala Ala Trp Phe Ala Thr Phe Asn Glu Thr Phe Gly Asp Tyr Ala  
 370 375 380

Glu Lys Ala His Glu Leu Leu Asn Thr Lys Leu Glu Gln Trp Ala Glu  
 385 390 395 400

Glu Ala Val Ala Arg Gly Gly Phe His Asn Thr Thr Ala Leu Leu Ile  
 405 410 415

Gln Tyr Glu Asn Tyr Arg Asp Trp Ile Val Lys Asp Asn Val Ala Tyr  
 420 425 430

Ser Glu Leu Phe Leu Asp Thr Ala Gly Val Ala Ser Phe Asp Val Trp  
 435 440 445

Asp Leu Leu Pro Phe Thr Arg Gly Tyr Val His Ile Leu Asp Lys Asp  
 450 455 460

Pro Tyr Leu Arg His Phe Ala Tyr Asp Pro Gln Tyr Phe Leu Asn Glu  
 465 470 475 480

Leu Asp Leu Leu Gly Gln Ala Ala Ala Thr Gln Leu Ala Arg Asn Ile  
 485 490 495

Ser Asn Ser Gly Ala Met Gln Thr Tyr Phe Ala Gly Glu Thr Ile Pro  
 500 505 510

Gly Asp Asn Leu Ala Tyr Asp Ala Asp Leu Ser Ala Trp Val Glu Tyr  
 515 520 525

Ile Pro Tyr Asn Phe Arg Pro Asn Tyr His Gly Val Gly Thr Cys Ser  
 530 535 540

Met Met Pro Lys Glu Met Gly Gly Val Val Asp Asn Ala Ala Arg Val  
 545 550 555 560

Tyr Gly Val Gln Gly Leu Arg Val Ile Asp Gly Ser Ile Pro Pro Thr  
 565 570 575

Gln Met Ser Ser His Val Met Thr Val Phe Tyr Ala Met Ala Leu Lys  
 580 585 590

Val Ala Asp Ala Ile Leu Ala Asp Tyr Ala Ser Met Gln  
 595 600 605

<210> 9  
 <211> 605  
 <212> PRT  
 <213> 黑曲霉

<400> 9

Met Ser Thr Leu Leu Val Ser Ser Leu Val Val Ser Leu Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

Leu Pro His Tyr Ile Arg Ser Asn Gly Ile Glu Ala Ser Leu Leu Thr  
 20 25 30

[0018]

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

[0019]

Asp Thr Val Val Asp Leu Pro Val Gly Leu Asn Leu Gln Asp Gln Thr  
 340 345 350  
 Thr Ser Thr Val Arg Ser Arg Ile Thr Ser Ala Gly Ala Gly Gln Gly  
 355 360 365  
 Gln Ala Ala Trp Phe Ala Thr Phe Asn Glu Thr Phe Gly Asp Tyr Ala  
 370 375 380  
 Glu Lys Ala His Glu Leu Leu Asn Thr Lys Leu Glu Gln Trp Ala Glu  
 385 390 395 400  
 Glu Ala Val Ala Arg Gly Gly Phe His Asn Thr Thr Ala Leu Leu Ile  
 405 410 415  
 Gln Tyr Glu Asn Tyr Arg Asp Trp Ile Val Lys Asp Asn Val Ala Tyr  
 420 425 430  
 Ser Glu Leu Phe Leu Asp Thr Ala Gly Val Ala Ser Phe His Val Trp  
 435 440 445  
 Asp Leu Leu Pro Phe Thr Arg Gly Tyr Val His Ile Leu Asp Lys Asp  
 450 455 460  
 Pro Tyr Leu Arg His Phe Ala Tyr Asp Pro Gln Tyr Phe Leu Asn Glu  
 465 470 475 480  
 Leu Asp Leu Leu Gly Gln Ala Ala Ala Thr Gln Leu Ala Arg Asn Ile  
 485 490 495  
 Ser Asn Ser Gly Ala Met Gln Thr Tyr Phe Ala Gly Glu Thr Ile Pro  
 500 505 510  
 Gly Asp Asn Leu Ala Tyr Asp Ala Asp Leu Ser Ala Trp Val Glu Tyr  
 515 520 525  
 Ile Pro Tyr Asn Phe Arg Pro Asn Tyr His Gly Val Gly Thr Cys Ser  
 530 535 540  
 Met Met Pro Lys Glu Met Gly Gly Val Val Asp Asn Ala Ala Arg Val  
 545 550 555 560  
 Tyr Gly Val Gln Gly Leu Arg Val Ile Asp Gly Ser Ile Pro Pro Thr  
 565 570 575  
 Gln Met Ser Ser His Val Met Thr Val Phe Tyr Ala Met Ala Leu Lys  
 580 585 590  
 Val Ala Asp Ala Ile Leu Ala Asp Tyr Ala Ser Met Gln  
 595 600 605  
 <210> 10  
 <211> 605  
 <212> PRT  
 <213> 黑曲霉  
 <400> 10  
 Met Ser Thr Leu Leu Val Ser Ser Leu Val Val Ser Leu Ala Ala Ala

[0020]

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

[0021]





<211> 605  
 <212> PRT  
 <213> 黑曲霉  
 <400> 11  
 Met Ser Thr Leu Leu Val Ser Ser Leu Val Val Ser Leu Ala Ala Ala  
 1 5 10 15  
 Leu Pro His Tyr Ile Arg Ser Asn Gly Ile Glu Ala Ser Leu Leu Thr  
 20 25 30  
 Asp Pro Lys Glu Val Ala Gly Arg Thr Val Asp Tyr Ile Ile Ala Gly  
 35 40 45  
 Gly Gly Leu Thr Gly Leu Thr Thr Ala Ala Arg Leu Thr Glu Asn Pro  
 50 55 60  
 Asp Ile Thr Val Leu Val Ile Glu Ser Gly Ser Tyr Glu Ser Asp Arg  
 65 70 75 80  
 Gly Pro Ile Ile Glu Asp Leu Asn Ala Tyr Gly Asp Ile Phe Gly Ser  
 85 90 95  
 Ser Val Asp His Ala Tyr Glu Thr Val Glu Leu Ala Thr Asn Asn Gln  
 100 105 110  
 Thr Ala Leu Ile Arg Ser Gly Asn Gly Leu Gly Gly Ser Thr Leu Val  
 115 120 125  
 Asn Gly Gly Ala Trp Thr Arg Pro His Lys Ala Gln Val Asp Ser Trp  
 130 135 140  
 Glu Thr Val Phe Gly Asn Glu Gly Trp Asn Trp Asp Ser Val Ala Ala  
 145 150 155 160  
 Tyr Ser Leu Gln Ala Glu Arg Ala Arg Ala Pro Asn Ala Lys Gln Ile  
 165 170 175  
 Ala Ala Gly His Tyr Phe Asn Ala Ser Cys His Gly Ile Asn Gly Thr  
 180 185 190  
 Val His Ala Gly Pro Arg Asp Thr Gly Asp Asp Tyr Ser Pro Ile Val  
 195 200 205  
 Lys Ala Leu Met Ser Ala Val Glu Asp Arg Gly Val Pro Thr Lys Lys  
 210 215 220  
 Asp Leu Gly Cys Gly Asp Pro His Gly Val Ser Met Phe Pro Asn Thr  
 225 230 235 240  
 Leu His Glu Asp Gln Val Arg Ser Asp Ala Ala Arg Glu Trp Leu Leu  
 245 250 255  
 Pro Asn Tyr Gln Arg Pro Asn Leu Gln Val Leu Thr Gly Arg Tyr Val  
 260 265 270  
 Gly Lys Val Leu Leu Ser Gln Asn Ala Thr Thr Pro Arg Ala Val Gly  
 275 280 285

[0023]

Val Glu Phe Gly Thr His Lys Gly Asn Thr His Asn Val Tyr Ala Lys  
 290 295 300

His Glu Val Leu Leu Ala Ala Gly Ser Ala Val Ser Pro Thr Ile Leu  
 305 310 315 320

Glu Tyr Ser Gly Ile Gly Met Lys Ser Ile Leu Glu Pro Leu Gly Ile  
 325 330 335

Asp Thr Val Val Asp Leu Pro Val Gly Leu Asn Leu Gln Asp Gln Ala  
 340 345 350

Thr Ser Thr Val Arg Ser Arg Ile Thr Ser Ala Gly Ala Gly Gln Gly  
 355 360 365

Gln Ala Ala Trp Phe Ala Thr Phe Asn Glu Thr Phe Gly Asp Tyr Ala  
 370 375 380

Glu Lys Ala His Glu Leu Leu Asn Thr Lys Leu Glu Gln Trp Ala Glu  
 385 390 395 400

Glu Ala Val Ala Arg Gly Gly Phe His Asn Thr Thr Ala Leu Leu Ile  
 405 410 415

Gln Tyr Glu Asn Tyr Arg Asp Trp Ile Val Lys Asp Asn Val Ala Tyr  
 420 425 430

Ser Glu Leu Phe Leu Asp Thr Ala Gly Val Ala Ser Phe Asp Val Trp  
 435 440 445

Asp Leu Leu Pro Phe Thr Arg Gly Tyr Val His Ile Leu Asp Lys Asp  
 450 455 460

Pro Tyr Leu Arg His Phe Ala Tyr Asp Pro Gln Tyr Phe Leu Asn Glu  
 465 470 475 480

Leu Asp Leu Leu Gly Gln Ala Ala Ala Thr Gln Leu Ala Arg Asn Ile  
 485 490 495

Ser Asn Ser Gly Ala Met Gln Thr Tyr Phe Ala Gly Glu Thr Ile Pro  
 500 505 510

Gly Asp Asn Leu Ala Tyr Asp Ala Asp Leu Ser Ala Trp Val Glu Tyr  
 515 520 525

Ile Pro Tyr Asn Phe Arg Pro Asn Tyr His Gly Val Gly Thr Cys Ser  
 530 535 540

Met Met Pro Lys Glu Met Gly Gly Val Val Asp Asn Ala Ala Arg Val  
 545 550 555 560

Tyr Gly Val Gln Gly Leu Arg Val Ile Asp Gly Ser Ile Pro Pro Thr  
 565 570 575

Gln Met Ser Ser His Val Met Thr Val Phe Tyr Ala Met Ala Leu Lys  
 580 585 590

[0024]

Val Ala Asp Ala Ile Leu Ala Asp Tyr Ala Ser Met Gln  
 595 600 605  
 <210> 12  
 <211> 605  
 <212> PRT  
 <213> 黑曲霉  
 <400> 12  
 Met Ser Thr Leu Leu Val Ser Ser Leu Val Val Ser Leu Ala Ala Ala  
 1 5 10 15  
 Leu Pro His Tyr Ile Arg Ser Asn Gly Ile Glu Ala Ser Leu Leu Thr  
 20 25 30  
 Asp Pro Lys Glu Val Ala Gly Arg Thr Val Asp Tyr Ile Ile Ala Gly  
 35 40 45  
 Gly Gly Leu Thr Gly Leu Thr Thr Ala Ala Arg Leu Thr Glu Asn Pro  
 50 55 60  
 Asp Ile Thr Val Leu Val Ile Glu Ser Gly Ser Tyr Glu Ser Asp Arg  
 65 70 75 80  
 Gly Pro Ile Ile Glu Asp Leu Asn Ala Tyr Gly Asp Ile Phe Gly Ser  
 85 90 95  
 Ser Val Asp His Ala Tyr Glu Thr Val Glu Leu Ala Thr Asn Asn Gln  
 100 105 110  
 Thr Ala Leu Ile Arg Ser Gly Asn Gly Leu Gly Gly Ser Thr Leu Val  
 115 120 125  
 Asn Gly Gly Ala Trp Thr Arg Pro His Lys Ala Gln Val Asp Ser Trp  
 130 135 140  
 Glu Thr Val Phe Gly Asn Glu Gly Trp Asn Trp Asp Ser Val Ala Ala  
 145 150 155 160  
 Tyr Ser Leu Gln Ala Glu Arg Ala Arg Ala Pro Asn Ala Lys Gln Ile  
 165 170 175  
 Ala Ala Gly His Tyr Phe Asn Ala Ser Cys His Gly Ile Asn Gly Thr  
 180 185 190  
 Val His Ala Gly Pro Arg Asp Thr Gly Asp Asp Tyr Ser Pro Ile Val  
 195 200 205  
 Lys Ala Leu Met Ser Ala Val Glu Asp Arg Gly Val Pro Thr Lys Lys  
 210 215 220  
 Asp Leu Gly Cys Gly Asp Pro His Gly Val Ser Met Phe Pro Asn Thr  
 225 230 235 240  
 Leu His Glu Asp Gln Val Arg Ser Asp Ala Ala Arg Glu Trp Leu Leu  
 245 250 255

[0025]

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

Gly Lys Val Leu Leu Ser Gln Asn Ala Thr Thr Pro Arg Ala Val Gly  
 275 280 285

Val Glu Phe Gly Thr His Lys Gly Asn Thr His Asn Val Tyr Ala Lys  
 290 295 300

His Glu Val Leu Leu Ala Ala Gly Ser Ala Val Ser Pro Thr Ile Leu  
 305 310 315 320

Glu Tyr Ser Gly Ile Gly Met Lys Ser Ile Leu Glu Pro Leu Gly Ile  
 325 330 335

Asp Thr Val Val Asp Leu Pro Val Gly Leu Asn Leu Gln Asp Gln Thr  
 340 345 350

Thr Ser Thr Val Arg Ser Arg Ile Thr Ser Ala Gly Ala Gly Gln Gly  
 355 360 365

Gln Ala Ala Trp Phe Ala Thr Phe Asn Glu Thr Phe Gly Asp Tyr Ala  
 370 375 380

Glu Lys Ala His Glu Leu Leu Asn Thr Lys Leu Glu Gln Trp Ala Glu  
 385 390 395 400

Glu Ala Val Ala Arg Gly Gly Phe His Asn Thr Thr Ala Leu Leu Ile  
 405 410 415

Gln Tyr Glu Asn Tyr Arg Asp Trp Ile Val Lys Asp Asn Val Ala Tyr  
 420 425 430

Ser Glu Leu Phe Leu Asp Thr Ala Gly Val Ala Ser Phe His Val Trp  
 435 440 445

Asp Leu Leu Pro Phe Thr Arg Gly Tyr Val His Ile Leu Asp Lys Asp  
 450 455 460

Pro Tyr Leu Arg His Phe Ala Tyr Asp Pro Gln Tyr Phe Leu Asn Glu  
 465 470 475 480

Leu Asp Leu Leu Gly Gln Ala Ala Ala Thr Gln Leu Ala Arg Asn Ile  
 485 490 495

Ser Asn Ser Gly Ala Met Gln Thr Tyr Phe Ala Gly Glu Thr Ile Pro  
 500 505 510

Gly Asp Asn Leu Ala Tyr Asp Ala Asp Leu Ser Ala Trp Val Glu Tyr  
 515 520 525

Ile Pro Tyr Asn Phe Arg Pro Asn Tyr His Gly Val Gly Thr Cys Ser  
 530 535 540

Met Met Pro Lys Glu Met Gly Gly Val Val Asp Asn Ala Ala Arg Val  
 545 550 555 560

[0026]

Tyr Gly Val Gln-Gly Leu Arg Val Ile Asp-Gly Ser Ile Pro Pro Thr  
 565 570 575

Gln Met Ser Ser His Val Met Thr Val Phe Tyr Ala Met Ala Leu Lys  
 580 585 590

Val Ala Asp Ala Ile Leu Ala Asp Tyr Ala Ser Met Gln  
 595 600 605

<210> 13  
 <211> 605  
 <212> PRT  
 <213> 黑曲霉

<400> 13

Met Ser Thr Leu Leu Val Ser Ser Leu Val Val Ser Leu Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

Leu Pro His Tyr Ile Arg Ser Asn Gly Ile Glu Ala Ser Leu Leu Thr  
 20 25 30

Asp Pro Lys Glu Val Ala Gly Arg Thr Val Asp Tyr Ile Ile Ala Gly  
 35 40 45

Gly Gly Leu Thr Gly Leu Thr Thr Ala Ala Arg Leu Thr Glu Asn Pro  
 50 55 60

Asp Ile Thr Val Leu Val Ile Glu Ser Gly Ser Tyr Glu Ser Asp Arg  
 65 70 75 80

Gly Pro Ile Ile Glu Asp Leu Asn Ala Tyr Gly Asp Ile Phe Gly Ser  
 85 90 95

Ser Val Asp His Ala Tyr Glu Thr Val Glu Leu Ala Thr Asn Asn Gln  
 100 105 110

Thr Ala Leu Ile Arg Ser Gly Asn Gly Leu Gly Gly Ser Thr Leu Val  
 115 120 125

Asn Gly Gly Ala Trp Thr Arg Pro His Lys Ala Gln Val Asp Ser Trp  
 130 135 140

Glu Thr Val Phe Gly Asn Glu Gly Trp Asn Trp Asp Ser Val Ala Ala  
 145 150 155 160

Tyr Ser Leu Gln Ala Glu Arg Ala Arg Ala Pro Asn Ala Lys Gln Ile  
 165 170 175

Ala Ala Gly His Tyr Phe Asn Ala Ser Cys His Gly Ile Asn Gly Thr  
 180 185 190

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

Lys Ala Leu Met Ser Ala Val Glu Asp Arg Gly Val Pro Thr Lys Lys  
 210 215 220

[0027]

Asp Leu Gly Cys Gly Asp Pro His Gly Val Ser Met Phe Pro Asn Thr  
 225 230 235 240

Leu His Glu Asp Gln Val Arg Ser Asp Ala Ala Arg Glu Trp Leu Leu  
 245 250 255

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

Gly Lys Val Leu Leu Ser Gln Asn Ala Thr Thr Pro Arg Ala Val Gly  
 275 280 285

Val Glu Phe Gly Thr His Lys Gly Asn Thr His Asn Val Tyr Ala Lys  
 290 295 300

His Glu Val Leu Leu Ala Ala Gly Ser Ala Val Ser Pro Thr Ile Leu  
 305 310 315 320

Glu Tyr Ser Gly Ile Gly Met Lys Ser Ile Leu Glu Pro Leu Gly Ile  
 325 330 335

Asp Thr Val Val Asp Leu Pro Val Gly Leu Asn Leu Gln Asp Gln Thr  
 340 345 350

Thr Ser Thr Val Arg Ser Arg Ile Thr Ser Ala Gly Ala Gly Gln Gly  
 355 360 365

Gln Ala Ala Trp Phe Ala Thr Phe Asn Glu Thr Phe Gly Asp Tyr Ala  
 370 375 380

Glu Lys Ala His Glu Leu Leu Asn Thr Lys Leu Glu Gln Trp Ala Glu  
 385 390 395 400

Glu Ala Val Ala Arg Gly Gly Phe His Asn Thr Thr Ala Leu Leu Ile  
 405 410 415

Gln Tyr Glu Asn Tyr Arg Asp Trp Ile Val Lys Asp Asn Val Ala Tyr  
 420 425 430

Ser Glu Leu Phe Leu Asp Thr Ala Gly Val Ala Ser Phe Asp Val Trp  
 435 440 445

Asp Leu Leu Pro Phe Thr Arg Gly Tyr Val His Ile Leu Asp Lys Asp  
 450 455 460

Pro Tyr Leu Arg His Phe Ala Tyr Asp Pro Gln Tyr Phe Leu Asn Glu  
 465 470 475 480

Leu Asp Leu Leu Gly Gln Ala Ala Ala Thr Gln Leu Ala Arg Asn Ile  
 485 490 495

Ser Asn Ser Gly Ala Met Gln Thr Tyr Phe Ala Gly Glu Thr Ile Pro  
 500 505 510

Gly Asp Asn Leu Ala Tyr Asp Ala Asp Leu Ser Ala Trp Val Glu Tyr  
 515 520 525

[0028]

Ile Pro Tyr Asn Phe Arg Pro Asn Tyr His Gly Val Gly Thr Cys Ser  
 530 535 540

Met Met Pro Lys Glu Met Gly Gly Val Val Asp Asn Ala Ala Arg Val  
 545 550 555 560

Tyr Gly Val Gln Gly Leu Arg Val Ile Asp Gly Ser Ile Pro Pro Thr  
 565 570 575

Gln Met Ser Ser His Ser Met Thr Val Phe Tyr Ala Met Ala Leu Lys  
 580 585 590

Val Ala Asp Ala Ile Leu Ala Asp Tyr Ala Ser Met Gln  
 595 600 605

<210> 14  
 <211> 605  
 <212> PRT  
 <213> 黑曲霉

<400> 14

Met Ser Thr Leu Leu Val Ser Ser Leu Val Val Ser Leu Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

Leu Pro His Tyr Ile Arg Ser Asn Gly Ile Glu Ala Ser Leu Leu Thr  
 20 25 30

Asp Pro Lys Glu Val Ala Gly Arg Thr Val Asp Tyr Ile Ile Ala Gly  
 35 40 45

Gly Gly Leu Thr Gly Leu Thr Thr Ala Ala Arg Leu Thr Glu Asn Pro  
 50 55 60

Asp Ile Thr Val Leu Val Ile Glu Ser Gly Ser Tyr Glu Ser Asp Arg  
 65 70 75 80

Gly Pro Ile Ile Glu Asp Leu Asn Ala Tyr Gly Asp Ile Phe Gly Ser  
 85 90 95

Ser Val Asp His Ala Tyr Glu Thr Val Glu Leu Ala Thr Asn Asn Gln  
 100 105 110

Thr Ala Leu Ile Arg Ser Gly Asn Gly Leu Gly Gly Ser Thr Leu Val  
 115 120 125

Asn Gly Gly Thr Trp Thr Arg Pro His Lys Ala Gln Val Asp Ser Trp  
 130 135 140

Glu Thr Val Phe Gly Asn Glu Gly Trp Asn Trp Asp Ser Val Ala Ala  
 145 150 155 160

Tyr Ser Leu Gln Ala Glu Arg Ala Arg Ala Pro Asn Ala Lys Gln Ile  
 165 170 175

Ala Ala Gly His Tyr Phe Asn Ala Ser Cys His Gly Ile Asn Gly Thr  
 180 185 190

Val His Ala Gly Pro Arg Asp Thr Gly Asp Asp Tyr Ser Pro Ile Val

[0029]

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

[0030]



500 506 510

Gly Asp Asn Leu Ala Tyr Asp Ala Asp Leu Ser Ala Trp Val Glu Tyr  
515 520 525

Ile Pro Tyr Asn Phe Arg Pro Asn Tyr His Gly Val Gly Thr Cys Ser  
530 535 540

Met Met Pro Lys Glu Met Gly Gly Val Val Asp Asn Ala Ala Arg Val  
545 550 555 560

Tyr Gly Val Gln Gly Leu Arg Val Ile Asp Gly Ser Ile Pro Pro Thr  
565 570 575

Gln Met Ser Ser His Val Met Thr Val Phe Tyr Ala Met Ala Leu Lys  
580 585 590

Val Ala Asp Ala Ile Leu Ala Asp Tyr Ala Ser Met Gln  
595 600 605

<210> 15  
<211> 605  
<212> PRT  
<213> 黑曲霉

<400> 15

Met Ser Thr Leu Leu Val Ser Ser Leu Val Val Ser Leu Ala Ala Ala  
1 5 10 15

Leu Pro His Tyr Ile Arg Ser Asn Gly Ile Glu Ala Ser Leu Leu Thr  
20 25 30

Asp Pro Lys Glu Val Ala Gly Arg Thr Val Asp Tyr Ile Ile Ala Gly  
35 40 45

Gly Gly Leu Thr Gly Leu Thr Thr Ala Ala Arg Leu Thr Glu Asn Pro  
50 55 60

Asp Ile Thr Val Leu Val Ile Glu Ser Gly Ser Tyr Glu Ser Asp Arg  
65 70 75 80

Gly Pro Ile Ile Glu Asp Leu Asn Ala Tyr Gly Asp Ile Phe Gly Ser  
85 90 95

Ser Val Asp His Ala Tyr Glu Thr Val Glu Leu Ala Thr Asn Asn Gln  
100 105 110

Thr Ala Leu Ile Arg Ser Gly Asn Gly Leu Gly Gly Ser Thr Leu Val  
115 120 125

Asn Gly Gly Thr Trp Thr Arg Pro His Lys Ala Gln Val Asp Ser Trp  
130 135 140

Glu Thr Val Phe Gly Asn Glu Gly Trp Asn Trp Asp Ser Val Ala Ala  
145 150 155 160

Tyr Ser Leu Gln Ala Glu Arg Ala Arg Ala Pro Asn Ala Lys Gln Ile  
165 170 175

[0031]

Ala Ala Gly His Tyr Phe Asn Ala Ser Cys His Gly Ile Asn Gly Thr  
180 185 190

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

Lys Ala Leu Met Ser Ala Val Glu Asp Arg Gly Val Pro Thr Lys Lys  
210 215 220

Asp Leu Gly Cys Gly Asp Pro His Gly Val Ser Met Phe Pro Asn Thr  
225 230 235 240

Leu His Glu Asp Gln Val Arg Ser Asp Ala Ala Arg Glu Trp Leu Leu  
245 250 255

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

Gly Lys Val Leu Leu Ser Gln Asn Ala Thr Thr Pro Arg Ala Val Gly  
275 280 285

Val Glu Phe Gly Thr His Lys Gly Asn Thr His Asn Val Tyr Ala Lys  
290 295 300

His Glu Val Leu Leu Ala Ala Gly Ser Ala Val Ser Pro Thr Ile Leu  
305 310 315 320

Glu Tyr Ser Gly Ile Gly Met Lys Ser Ile Leu Glu Pro Leu Gly Ile  
325 330 335

Asp Thr Val Val Asp Leu Pro Val Gly Leu Asn Leu Gln Asp Gln Ala  
340 345 350

Thr Ser Thr Val Arg Ser Arg Ile Thr Ser Ala Gly Ala Gly Gln Gly  
355 360 365

Gln Ala Ala Trp Phe Ala Thr Phe Asn Glu Thr Phe Gly Asp Tyr Ala  
370 375 380

Glu Lys Ala His Glu Leu Leu Asn Thr Lys Leu Glu Gln Trp Ala Glu  
385 390 395 400

Glu Ala Val Ala Arg Gly Gly Phe His Asn Thr Thr Ala Leu Leu Ile  
405 410 415

Gln Tyr Glu Asn Tyr Arg Asp Trp Ile Val Lys Asp Asn Val Ala Tyr  
420 425 430

Ser Glu Leu Phe Leu Asp Thr Ala Gly Val Ala Ser Phe Asp Val Trp  
435 440 445

Asp Leu Leu Pro Phe Thr Arg Gly Tyr Val His Ile Leu Asp Lys Asp  
450 455 460

Pro Tyr Leu Arg His Phe Ala Tyr Asp Pro Gln Tyr Phe Leu Asn Glu  
465 470 475 480

[0032]

Leu Asp Leu Leu Gly Gln Ala Ala Ala Thr Gln Leu Ala Arg Asn Ile  
 485 490 495

Ser Asn Ser Gly Ala Met Gln Thr Tyr Phe Ala Gly Glu Thr Ile Pro  
 500 505 510

Gly Asp Asn Leu Ala Tyr Asp Ala Asp Leu Ser Ala Trp Val Glu Tyr  
 515 520 525

Ile Pro Tyr Asn Phe Arg Pro Asn Tyr His Gly Val Gly Thr Cys Ser  
 530 535 540

Met Met Pro Lys Glu Met Gly Gly Val Val Asp Asn Ala Ala Arg Val  
 545 550 555 560

Tyr Gly Val Gln Gly Leu Arg Val Ile Asp Gly Ser Ile Pro Pro Thr  
 565 570 575

Gln Met Ser Ser His Ser Met Thr Val Phe Tyr Ala Met Ala Leu Lys  
 580 585 590

Val Ala Asp Ala Ile Leu Ala Asp Tyr Ala Ser Met Gln  
 595 600 605

<210> 16  
 <211> 605  
 <212> PRT  
 <213> 黑曲霉

<400> 16

Met Ser Thr Leu Leu Val Ser Ser Leu Val Val Ser Leu Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

Leu Pro His Tyr Ile Arg Ser Asn Gly Ile Glu Ala Ser Leu Leu Thr  
 20 25 30

Asp Pro Lys Glu Val Ala Gly Arg Thr Val Asp Tyr Ile Ile Ala Gly  
 35 40 45

Gly Gly Leu Thr Gly Leu Thr Thr Ala Ala Arg Leu Thr Glu Asn Pro  
 50 55 60

Asp Ile Thr Val Leu Val Ile Glu Ser Gly Ser Tyr Glu Ser Asp Arg  
 65 70 75 80

Gly Pro Ile Ile Glu Asp Leu Asn Ala Tyr Gly Asp Ile Phe Gly Ser  
 85 90 95

Ser Val Asp His Ala Tyr Glu Thr Val Glu Leu Ala Thr Asn Asn Gln  
 100 105 110

Thr Ala Leu Ile Arg Ser Gly Asn Gly Leu Gly Gly Ser Thr Leu Val  
 115 120 125

Asn Gly Gly Thr Trp Thr Arg Pro His Lys Ala Gln Val Asp Ser Trp  
 130 135 140

[0033]

Glu Thr Val Phe Gly Asn Glu Gly Trp Asn Trp Asp Ser Val Ala Ala  
 145 150 155 160

Tyr Ser Leu Gln Ala Glu Arg Ala Arg Ala Pro Asn Ala Lys Gln Ile  
 165 170 175

Ala Ala Gly His Tyr Phe Asn Ala Ser Cys His Gly Ile Asn Gly Thr  
 180 185 190

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

Lys Ala Leu Met Ser Ala Val Glu Asp Arg Gly Val Pro Thr Lys Lys  
 210 215 220

Asp Leu Gly Cys Gly Asp Pro His Gly Val Ser Met Phe Pro Asn Thr  
 225 230 235 240

Leu His Glu Asp Gln Val Arg Ser Asp Ala Ala Arg Glu Trp Leu Leu  
 245 250 255

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

Gly Lys Val Leu Leu Ser Gln Asn Ala Thr Thr Pro Arg Ala Val Gly  
 275 280 285

Val Glu Phe Gly Thr His Lys Gly Asn Thr His Asn Val Tyr Ala Lys  
 290 295 300

His Glu Val Leu Leu Ala Ala Gly Ser Ala Val Ser Pro Thr Ile Leu  
 305 310 315 320

Glu Tyr Ser Gly Ile Gly Met Lys Ser Ile Leu Glu Pro Leu Gly Ile  
 325 330 335

Asp Thr Val Val Asp Leu Pro Val Gly Leu Asn Leu Gln Asp Gln Thr  
 340 345 350

Thr Ser Thr Val Arg Ser Arg Ile Thr Ser Ala Gly Ala Gly Gln Gly  
 355 360 365

Gln Ala Ala Trp Phe Ala Thr Phe Asn Glu Thr Phe Gly Asp Tyr Ala  
 370 375 380

Glu Lys Ala His Glu Leu Leu Asn Thr Lys Leu Glu Gln Trp Ala Glu  
 385 390 395 400

Glu Ala Val Ala Arg Gly Gly Phe His Asn Thr Thr Ala Leu Leu Ile  
 405 410 415

Gln Tyr Glu Asn Tyr Arg Asp Trp Ile Val Lys Asp Asn Val Ala Tyr  
 420 425 430

Ser Glu Leu Phe Leu Asp Thr Ala Gly Val Ala Ser Phe His Val Trp  
 435 440 445

[0034]

Asp Leu Leu Pro Phe Thr Arg Gly Tyr Val His Ile Leu Asp Lys Asp  
 450 455 460

Pro Tyr Leu Arg His Phe Ala Tyr Asp Pro Gln Tyr Phe Leu Asn Glu  
 465 470 475 480

Leu Asp Leu Leu Gly Gln Ala Ala Ala Thr Gln Leu Ala Arg Asn Ile  
 485 490 495

Ser Asn Ser Gly Ala Met Gln Thr Tyr Phe Ala Gly Glu Thr Ile Pro  
 500 505 510

Gly Asp Asn Leu Ala Tyr Asp Ala Asp Leu Ser Ala Trp Val Glu Tyr  
 515 520 525

Ile Pro Tyr Asn Phe Arg Pro Asn Tyr His Gly Val Gly Thr Cys Ser  
 530 535 540

Met Met Pro Lys Glu Met Gly Gly Val Val Asp Asn Ala Ala Arg Val  
 545 550 555 560

Tyr Gly Val Gln Gly Leu Arg Val Ile Asp Gly Ser Ile Pro Pro Thr  
 565 570 575

Gln Met Ser Ser His Ser Met Thr Val Phe Tyr Ala Met Ala Leu Lys  
 580 585 590

Val Ala Asp Ala Ile Leu Ala Asp Tyr Ala Ser Met Gln  
 595 600 605

<210> 17  
 <211> 605  
 <212> PRT  
 <213> 黑曲霉

<400> 17

Met Ser Thr Leu Leu Val Ser Ser Leu Val Val Ser Leu Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

Leu Pro His Tyr Ile Arg Ser Asn Gly Ile Glu Ala Ser Leu Leu Thr  
 20 25 30

Asp Pro Lys Glu Val Ala Gly Arg Thr Val Asp Tyr Ile Ile Ala Gly  
 35 40 45

Gly Gly Leu Thr Gly Leu Thr Thr Ala Ala Arg Leu Thr Glu Asn Pro  
 50 55 60

Asp Ile Thr Val Leu Val Ile Glu Ser Gly Ser Tyr Glu Ser Asp Arg  
 65 70 75 80

Gly Pro Ile Ile Glu Asp Leu Asn Ala Tyr Gly Asp Ile Phe Gly Ser  
 85 90 95

Ser Val Asp His Ala Tyr Glu Thr Val Glu Leu Ala Thr Asn Asn Gln  
 100 105 110

[0035]

Thr Ala Leu Ile Arg Ser Gly Asn Gly Leu Gly Gly Ser Thr Leu Val  
 115 120 125

Asn Gly Gly Ala Trp Thr Arg Pro His Lys Ala Gln Val Asp Ser Trp  
 130 135 140

Glu Thr Val Phe Gly Asn Glu Gly Trp Asn Trp Asp Ser Val Ala Ala  
 145 150 155 160

Tyr Ser Leu Gln Ala Glu Arg Ala Arg Ala Pro Asn Ala Lys Gln Ile  
 165 170 175

Ala Ala Gly His Tyr Phe Asn Ala Ser Cys His Gly Ile Asn Gly Thr  
 180 185 190

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

Lys Ala Leu Met Ser Ala Val Glu Asp Arg Gly Val Pro Thr Lys Lys  
 210 215 220

Asp Leu Gly Cys Gly Asp Pro His Gly Val Ser Met Phe Pro Asn Thr  
 225 230 235 240

Leu His Glu Asp Gln Val Arg Ser Asp Ala Ala Arg Glu Trp Leu Leu  
 245 250 255

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

Gly Lys Val Leu Leu Ser Gln Asn Ala Thr Thr Pro Arg Ala Val Gly  
 275 280 285

Val Glu Phe Gly Thr His Lys Gly Asn Thr His Asn Val Tyr Ala Lys  
 290 295 300

His Glu Val Leu Leu Ala Ala Gly Ser Ala Val Ser Pro Thr Ile Leu  
 305 310 315 320

Glu Tyr Ser Gly Ile Gly Met Lys Ser Ile Leu Glu Pro Leu Gly Ile  
 325 330 335

Asp Thr Val Val Asp Leu Pro Val Gly Leu Asn Leu Gln Asp Gln Ala  
 340 345 350

Thr Ser Thr Val Arg Ser Arg Ile Thr Ser Ala Gly Ala Gly Gln Gly  
 355 360 365

Gln Ala Ala Trp Phe Ala Thr Phe Asn Glu Thr Phe Gly Asp Tyr Ala  
 370 375 380

Glu Lys Ala His Glu Leu Leu Asn Thr Lys Leu Glu Gln Trp Ala Glu  
 385 390 395 400

Glu Ala Val Ala Arg Gly Gly Phe His Asn Thr Thr Ala Leu Leu Ile  
 405 410 415

[0036]

Gln Tyr Glu Asn Tyr Arg Asp Trp Ile Val Lys Asp Asn Val Ala Tyr  
 420 425 430

Ser Glu Leu Phe Leu Asp Thr Ala Gly Val Ala Ser Phe His Val Trp  
 435 440 445

Asp Leu Leu Pro Phe Thr Arg Gly Tyr Val His Ile Leu Asp Lys Asp  
 450 455 460

Pro Tyr Leu Arg His Phe Ala Tyr Asp Pro Gln Tyr Phe Leu Asn Glu  
 465 470 475 480

Leu Asp Leu Leu Gly Gln Ala Ala Ala Thr Gln Leu Ala Arg Asn Ile  
 485 490 495

Ser Asn Ser Gly Ala Met Gln Thr Tyr Phe Ala Gly Glu Thr Ile Pro  
 500 505 510

Gly Asp Asn Leu Ala Tyr Asp Ala Asp Leu Ser Ala Trp Val Glu Tyr  
 515 520 525

Ile Pro Tyr Asn Phe Arg Pro Asn Tyr His Gly Val Gly Thr Cys Ser  
 530 535 540

Met Met Pro Lys Glu Met Gly Gly Val Val Asp Asn Ala Ala Arg Val  
 545 550 555 560

Tyr Gly Val Gln Gly Leu Arg Val Ile Asp Gly Ser Ile Pro Pro Thr  
 565 570 575

Gln Met Ser Ser His Val Met Thr Val Phe Tyr Ala Met Ala Leu Lys  
 580 585 590

Val Ala Asp Ala Ile Leu Ala Asp Tyr Ala Ser Met Gln  
 595 600 605

<210> 18  
 <211> 605  
 <212> PRT  
 <213> 黑曲霉

<400> 18

Met Ser Thr Leu Leu Val Ser Ser Leu Val Val Ser Leu Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

Leu Pro His Tyr Ile Arg Ser Asn Gly Ile Glu Ala Ser Leu Leu Thr  
 20 25 30

Asp Pro Lys Glu Val Ala Gly Arg Thr Val Asp Tyr Ile Ile Ala Gly  
 35 40 45

Gly Gly Leu Thr Gly Leu Thr Thr Ala Ala Arg Leu Thr Glu Asn Pro  
 50 55 60

Asp Ile Thr Val Leu Val Ile Glu Ser Gly Ser Tyr Glu Ser Asp Arg  
 65 70 75 80

Gly Pro Ile Ile Glu Asp Leu Asn Ala Tyr Gly Asp Ile Phe Gly Ser

[0037]

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

[0038]





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

[0040]

Gln Ala Ala Trp Phe Ala Thr Phe Asn Glu Thr Phe Gly Asp Tyr Ala  
 370 375 380

Glu Lys Ala His Glu Leu Leu Asn Thr Lys Leu Glu Gln Trp Ala Glu  
 385 390 395 400

Glu Ala Val Ala Arg Gly Gly Phe His Asn Thr Thr Ala Leu Leu Ile  
 405 410 415

Gln Tyr Glu Asn Tyr Arg Asp Trp Ile Val Lys Asp Asn Val Ala Tyr  
 420 425 430

Ser Glu Leu Phe Leu Asp Thr Ala Gly Val Ala Ser Phe His Val Trp  
 435 440 445

Asp Leu Leu Pro Phe Thr Arg Gly Tyr Val His Ile Leu Asp Lys Asp  
 450 455 460

Pro Tyr Leu Arg His Phe Ala Tyr Asp Pro Gln Tyr Phe Leu Asn Glu  
 465 470 475 480

Leu Asp Leu Leu Gly Gln Ala Ala Ala Thr Gln Leu Ala Arg Asn Ile  
 485 490 495

Ser Asn Ser Gly Ala Met Gln Thr Tyr Phe Ala Gly Glu Thr Ile Pro  
 500 505 510

Gly Asp Asn Leu Ala Tyr Asp Ala Asp Leu Ser Ala Trp Val Glu Tyr  
 515 520 525

Ile Pro Tyr Asn Phe Arg Pro Asn Tyr His Gly Val Gly Thr Cys Ser  
 530 535 540

Met Met Pro Lys Glu Met Gly Gly Val Val Asp Asn Ala Ala Arg Val  
 545 550 555 560

Tyr Gly Val Gln Gly Leu Arg Val Ile Asp Gly Ser Ile Pro Pro Thr  
 565 570 575

Gln Met Ser Ser His Ser Met Thr Val Phe Tyr Ala Met Ala Leu Lys  
 580 585 590

Val Ala Asp Ala Ile Leu Ala Asp Tyr Ala Ser Met Gln  
 595 600 605

<210> 20  
 <211> 605  
 <212> PRT  
 <213> 黑曲霉

<400> 20

Met Ser Thr Leu Leu Val Ser Ser Leu Val Val Ser Leu Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

Leu Pro His Tyr Ile Arg Ser Asn Gly Ile Glu Ala Ser Leu Leu Thr  
 20 25 30

[0041]

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

[0042]

Asp Thr Val Val Asp Leu Pro Val Gly Leu Asn Leu Gln Asp Gln Ala  
 340 345 350  
 Thr Ser Thr Val Arg Ser Arg Ile Thr Ser Ala Gly Ala Gly Gln Gly  
 355 360 365  
 Gln Ala Ala Trp Phe Ala Thr Phe Asn Glu Thr Phe Gly Asp Tyr Ala  
 370 375 380  
 Glu Lys Ala His Glu Leu Leu Asn Thr Lys Leu Glu Gln Trp Ala Glu  
 385 390 395 400  
 Glu Ala Val Ala Arg Gly Gly Phe His Asn Thr Thr Ala Leu Leu Ile  
 405 410 415  
 Gln Tyr Glu Asn Tyr Arg Asp Trp Ile Val Lys Asp Asn Val Ala Tyr  
 420 425 430  
 Ser Glu Leu Phe Leu Asp Thr Ala Gly Val Ala Ser Phe His Val Trp  
 435 440 445  
 Asp Leu Leu Pro Phe Thr Arg Gly Tyr Val His Ile Leu Asp Lys Asp  
 450 455 460  
 Pro Tyr Leu Arg His Phe Ala Tyr Asp Pro Gln Tyr Phe Leu Asn Glu  
 465 470 475 480  
 Leu Asp Leu Leu Gly Gln Ala Ala Ala Thr Gln Leu Ala Arg Asn Ile  
 485 490 495  
 Ser Asn Ser Gly Ala Met Gln Thr Tyr Phe Ala Gly Glu Thr Ile Pro  
 500 505 510  
 Gly Asp Asn Leu Ala Tyr Asp Ala Asp Leu Ser Ala Trp Val Glu Tyr  
 515 520 525  
 Ile Pro Tyr Asn Phe Arg Pro Asn Tyr His Gly Val Gly Thr Cys Ser  
 530 535 540  
 Met Met Pro Lys Glu Met Gly Gly Val Val Asp Asn Ala Ala Arg Val  
 545 550 555 560  
 Tyr Gly Val Gln Gly Leu Arg Val Ile Asp Gly Ser Ile Pro Pro Thr  
 565 570 575  
 Gln Met Ser Ser His Ser Met Thr Val Phe Tyr Ala Met Ala Leu Lys  
 580 585 590  
 Val Ala Asp Ala Ile Leu Ala Asp Tyr Ala Ser Met Gln  
 595 600 605  
 <210> 21  
 <211> 605  
 <212> PRT  
 <213> 黑曲霉  
 <400> 21

[0043]

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

[0044]

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

[0045]

<210>	22	
<211>	1818	
<212>	DNA	
<213>	黑曲霉	
<400>	22	
atgttactc	tccttgtgag ctogettgtg gtctccctcg ctgcggccct cccacactac	60
atcaggagca	atggcatcga agccagcctc ctgactgacc ccaaggaggt tgccggccgc	120
actgtcgaet	acatcactcge tgggtggaggf ctgactggac tcaccactgc tgeccgtctg	180
acggagaace	ccgatatcac tgtgettgtc atcgaaagtg gctectacga gtctgacaga	240
ggctcctatca	ttaggacct gaacgcttac ggtgacattt ttggcagcag tgtggaccac	300
gcctacgaga	ctgtcgaget ccccaccaac aatcagactg cgtgatecg ctccggaaat	360
ggtctcgggtg	gtctaccct cgtcaacggt ggccttggga ctgccecca caaggecaaa	420
gttgactcat	gggagaccgt ctteggaaat gaggcttggga actgggacag cgtggccgc	480
tactcctcctc	aggetgagcg tctctcgca ccaaatgcca aacagattgc tgetggccac	540
tactttaatg	cactctgcca tggatatcaat gctaetgtcc acgccggacc cgcgatacc	600
ggigtatgact	actccccat cgtcaagget ccatgagcgc ctgtcgaaga cagggcggtt	660
cccaccaaga	aggacttggg atgcggtgac cccatgggtg tctccatggt ccccaacacc	720
ttgcacgaag	accaagtgcg ctctgatgcc gctcgtgaat ggctcctccc caactaccag	780
cttcccaccc	tcaagtctct cactggaccg tatgttggaa aggtcctgct cagccagaac	840
gtaccacac	ctcgtgcctg tggcgtggaa ttggcacc ccaagggcaa caccacacac	900
gtctacgcta	agcaagaggt cctctggccc gctggatccg ctgtctctcc caccatctc	960
gaatattccg	gtatcggaat gaagtccatt ctagaccctc ttggaattga caccgtcgtt	1020
gaectgcccc	ttggtctcaa ccttcaggac cagaccacct ctaccgtccg ctacgcatt	1080
acctccgcgcg	gtgcgggaca gggacaggcc gcttggctcg ctacctcaa cgagaccitt	1140
ggcgactacg	ccgaaaagcc tcacgagctg ctcaacacca agctggagca gtgggcccga	1200
gagcgctgctg	ccgtggcgg attccacaac accaccgctt tctcctccca gtacgagaac	1260
taccgcgaet	ggatctgcaa ggacaatgct gcatactcgg aactctctct cgacacggcc	1320
ggagtggcca	gtttcagatg gtggatctt ctgccttcca ctaggagata cgtacacatc	1380
ctcgacaagg	acctctacct cgcctatttc gcatacagc ctctagtact tctcaacgag	1440
cttgacctgc	tggcccagcc tgcgccact cagctggccc gcaacatctc caactccggt	1500
gccatgcaaa	cttatttctg tggagagact attcccggtg acaacctcgc gtatgatgcc	1560
gacttgagcg	cctgggttga gtatacccc tacaacttcc gccttaacta ccatgggtgtg	1620
ggtacttctc	ccatgatgcc gaaggagatg ggcggtgttg tgcacaatgc tgeccgtgtg	1680
tatggtgtgc	agggactcgc agtcatcgat gttctctatc cccctacgca aatgtctgcc	1740
catgttatga	cggctcttta tgcctatgcc ttgaaggttg cggatccat ctggcggat	1800
tatgettcca	tgcagtga	1818
<210>	23	
<211>	1818	
<212>	DNA	
<213>	黑曲霉	
<400>	23	
atgttactc	tccttgtgag ctogettgtg gtctccctcg ctgcggccct cccacactac	60

[0046]



atcaggagca atggcatcga agccagcctc ctgactgacc ccaaggaggt tgccggccgc 120  
 actgtegact acatcctcgc tggaggaggt ctgactggac tcaccactgc tgccegtctg 180  
 accgagaacc ccgatatcac tgtgtttgic atcgaaagtg gctcctacga gtctgacaga 240  
 ggtcctatca ttgaggacct gaaeccttac ggtgacattt ttggcagcag tgtggaccac 300  
 gcctacgaga ctgtcgagct cgccaccaac aatcagactg cgtgatccg ctccggaaat 360  
 ggtctcggtg gctctaccct cgtaacgggt ggcacctgga ctgccececa caaggcaaaa 420  
 gttgactcat gggagaccgt ctccgaaat gagggetgga actgggacag cgtggccgcc 480  
 taictccctc aggetgagcg tgcctcgcca ccaaatgcca aacagattgc tgetgcccac 540  
 tactttaatg cactctgcca tggatcaat ggtactgtcc acgcccagcc ccgcgatacc 600  
 ggtgatgact actccccat cgtaagget ctcatgagcg ctgtgaaga cagggcgctt 660  
 cccaccaaga aggacttggg atggggtgac cccatggtg tgtccatggt ccccaacacc 720  
 ttgacgaag accaagtgcg ctctgatgcc gctcgtgaat ggctcctccc caactaccag 780  
 cgtcccaacc tgcaagtctt cactggacgg tatgttggaa aggtcctget cagccagaac 840  
 gctaccacac ctctgtccgt tggcgtggaa ttggcaccce acaagggcaa caccacaac 900  
 gtctacgcta agcagaggt cctcctggcc gctggatccg ctgtctctec caccatctc 960  
 gaatatctcg gtatcggaat gaagtcatt ctagaccctc ttggaattga caccgtctgt 1020  
 gacctgcccg ttggctcaa ccttcaggac cagctacct ctaccgtccg ctacgcatt 1080  
 accctccgcg gtgcgggaca gggacaggcc gcttggttcg ctacctcaa cgagacctt 1140  
 ggcgactacg ccgaaaagcg tcacgagctg ctcaacacca agctggagca gtggcccgaa 1200  
 gaggccgtcg cccgtggcgg attccacaac accaccgctt tctctatcca gtaagagaac 1260  
 taaccggaact ggatgtcaa ggacaatgtc gcatactcgg aactctctct cgacaaggcc 1320  
 ggagtggcca gttctgatgt gtggatctt ctgccttca ctaggagata cgtacacatc 1380  
 ctgacaagg accctacct ccgccatttc gcatacagcc ctacgtactt tctcaacgag 1440  
 ctigacctgc tggccagcg tgcgccact cagctggccc gcaacatctc caactccggt 1500  
 gccatgcaaa cttatttcgc tggagagact attcccgtg acaacctcgc gtatgatgcc 1560  
 gacttgagcg cctgggttga gtatatccc tacaacttcc gccctaacta ccatggtgtg 1620  
 ggtacttget ccatgatgcc gaaggagatg ggcggtgttg tgacaatgc tgcccgtgtg 1680  
 tatggtgtgc agggactgcg agtcacgat ggttctatc ccctacgca aatgtctcc 1740  
 catgttatga cggctcttta tgcctatgcc ttgaaggttg cggatgceat ctiggcggat 1800  
 tatgcttcca tgcagtga 1818

<210> 24  
 <211> 1818  
 <212> DNA  
 <213> 黑曲霉

<400> 24  
 atgtctactc tcttgtgag ctctcttctg gctcctctcg ctgcggccct cccacactac 60  
 atcaggagca atggcatcga agccagcctc ctgactgacc ccaaggaggt tgccggccgc 120  
 actgtegact acatcctcgc tggaggaggt ctgactggac tcaccactgc tgccegtctg 180  
 accgagaacc ccgatatcac tgtgtttgic atcgaaagtg gctcctacga gtctgacaga 240

[0047]

ggtcetatca ttgaggacct gaacgettac ggtgacattt ttggcagcag tgtggaccac	300
gcctacgaga ctgtcgagct cggcaccaac aatcagactg cgtgategc ctcgggaaat	360
ggtctcgggtg getctacect cgtcaacggg ggcacctgga ctgcceccca caaggcacia	420
gttgactcat gggagaccgt ctctggaaat gagggetgga actgggacag cgtggccgce	480
tactcctcct aggetgagcg tctctcgcca ccaaatgcca aacagattgc tctggcccac	540
tactttaatg catcctgcca tggatcaat gtaactgtcc acgcccagcc ccgcgatacc	600
ggtgatgact actcctccat cgtcaaggct ctcatgagcg ctgtcgaaga caggggcggt	660
cccaccaaga aggacttggg atgcgggtgac ccccatggig tgtccatggt ccccaacacc	720
ttgcacgaag accaagtgcg ctctgatgcc getcgtgaat ggctcctccc caactaceag	780
ctgcccaccc tgcgaagtcct cactggacgg tatgttggaa aggtcctgct cagccagaa	840
getaccacac ctctgtccgt tggcgtggaa ttggccacc ccaaggcaca caccacacac	900
gtctacgcta agcaagaggt cctcctggcc getggategc ctgtctctcc caccatcctc	960
gaatattccg gtatcggat gaagtccatt ctagagcctc tiggaaattga caccgtcgtt	1020
gaactgcccc ttggtctcaa ccttcaggac cagaccacct ctaccgtccg ctcaacgatt	1080
acctccgccc gtgcgggaca gggacaggcc gcttggttcg ctaccttcaa cgagaccttt	1140
ggcgactacg ccgaaaagcg tcaagagctg ctcaacacca agctggagca gtgggcccga	1200
gaggecgctg ccctgtggcg attccacac accaacctgt tctcctcaca gtaagagaac	1260
taccgagact ggatcgtcaa ggacaatgct gcatactcgg aactcttctc cgacacggcc	1320
ggagtggcca gtttccatgt gtgggatctt ctgcccctca ctagaggata cgtacacatc	1380
ctcgacaagg accctacact ccgcccattc gcatacagc ctcaagtact tctcaacgag	1440
cttgactcgc tggcccagcg tgcgccaact cagctggccc gcaacatctc caactccggt	1500
gccatgcaaa cttatttctg tggagagact attcccggig acaacctcgc gtatgatgcc	1560
gacttggagc cctgggttga gtatacctc tacaacttcc gccctaacta ccatggtgig	1620
ggtacttctc ccatgatgcc gaaggagatg ggcgggtgtg tgcacaatgc tgcctgtgtg	1680
tatggtgtgc agggactgcg agtcatcgat gttctctatc cccctacgca aatgtctctc	1740
catgttatga cggctcttta tgcctatgcc ttgaaggttg cggatgccc ctgtggcgat	1800
tatgcttcca tgcagtga	1818

<210> 25  
 <211> 1818  
 <212> DNA  
 <213> 黑曲霉

<400> 25	
atgtctacte tcttgtgag ctctctgtg gtctcctctg ctgcccctc cccacactac	60
atcaggagca atggcactga agccagcctc ctgactgacc ccaaggaggt tgcggcgcg	120
actgtcactc acatcctcgc tgggtgagggt ctgactggac tcaacctcgc tgcctgtctg	180
acggagaacc ccgatacacc tgtctctgtc atcgaagtg gctcctacga gctgacaga	240
ggtctatca ttgaggacct gaacgettac ggtgacattt ttggcagcag tgtggaccac	300
gcctacgaga ctgtcgagct cggcaccaac aatcagactg cgtgategc ctcgggaaat	360
ggtctcgggt getctacct cgtcaacggg ggcacctgga ctgcceccca caaggcacia	420
gttgactcat gggagaccgt ctctggaaat gagggetgga actgggacag cgtggccgce	480

[0048]

tactcectec aggetgagcg tgcctgcgca ccaaatgcca aacagattgc tgcctggccac 540  
 tactttaatg catcctgcca tggatcaat ggtactgtec acgceggacc ccgcgatacc 600  
 ggtgatgact actcecccat cgtaagget ctcctgagcg ctgtcgaaga caggggcggt 660  
 cccaccaaga aggaattggg atgcggtagc ccccatgggt tctccatggt ccccaacacc 720  
 ttgcacaag accaagtgcg ctctgatgcc gctcgtgaat ggtcctccc caactaccag 780  
 cgtcccaacc tgcaagtcc cactggaegg taigtggaa aggtcctgct cagccagaac 840  
 getaccacac ctctgcccgt tggcgtggaa ttgggeacce acaagggeaa caccacaaac 900  
 gtctacgcta agcagaggt cctcctggcc gctggatccg ctgtctctcc caccatcctc 960  
 gaattatcgc gtatcggaat gaagtcatt ctagaccctc ttggaatga caccgtcgtt 1020  
 gacctgcccg ttggtctcaa ccttcaggac cagaccacct ctaccgtccg ctacgcatt 1080  
 acctcgcgcg gtgcgggaca gggacaggcc gcttggcttc ctacctca cgagacctt 1140  
 ggcgaactac cggaaaaggc tcacgagctg ctcaacacca agctggagca gtggccgaa 1200  
 gaggccgtcg cccgtggcgg atccacaac accaccgctt tgcctatcca gtaagagaac 1260  
 taccgcgact ggatcgtcaa ggacaatgct gcatactcgg aactcttctc cgacacggcc 1320  
 ggagtggcca gttctgatgt gtgggatctt ctgcccttca ctaggagata cgtacacatc 1380  
 ctgcacaagg accctacct ccgccttttc gcatacagcc ctctactctt tctcaacgag 1440  
 ctgacctgc tccgccagcg tccgccact cagctggccc gcaacatctc caactccggt 1500  
 gccatgcaaa cttatttgcg tggagagact attcccggtg acaacctcgc gtatgatgcc 1560  
 gacttgagcg cctgggttga gtatatcccg tacaacttcc gcctaacta ccatggtgtg 1620  
 ggtacttgct ccatgatgcc gaaggagatg ggcgggtgtg tcgacaatgc tgcctgtgtg 1680  
 tatggtgtgc agggactgcg agtcctgatg gttctcttcc cccctacgea aatgtctcc 1740  
 cattctatga cggctcttta tgcctggccc ttgaagggtg cggatgccat ctgcccggat 1800  
 tatcttcca tgcagtga 1818

<210> 26  
 <211> 1818  
 <212> DNA  
 <213> 黑曲霉

<400> 26  
 atgtctactc tccctgtgag ctctctgtg gctcctctcg ctgcggccct cccacaetae 60  
 atcaggagca atggcatcga agccagcctc ctgactgacc ccaaggaggt tgcggccgc 120  
 actgtcgaact acatcatcgc tgggtggaggt ctgactggac tcaccactgc tgcctgctg 180  
 acggagaacc ccgatatac tgtgttgtc atcgaaagtg gctcctaega gtctgacaga 240  
 ggtctatca ttgaggacct gaacgcttac ggtgacattt ttggcagcag tgtggaccac 300  
 gcctaegaga ctgtcagct cgcaccaac aatcagactg cgtgatccg ctccgaaat 360  
 ggtctcgggt gctctacct cgtaacggt ggccttga ctgcctcca caagcaaca 420  
 gttgaatcat gggagaccgt ctccgaaat gaggcttga actgggacag cgtggccgc 480  
 tactcctcc aggetgagcg tgcctgcgca ccaaatgcca aacagattgc tgcctggccac 540  
 tactttaatg catcctgcca tggatcaat ggtactgtec acgceggacc ccgcgatacc 600  
 ggtgatgact actcecccat cgtaagget ctcctgagcg ctgtcgaaga caggggcggt 660

[0049]

```

cccaccaaga aggaactiggg atgcggtgac ccccatggtg tgtccatggt ccccaacacc 720
ttgcacgaag accaagtgcg ctctgatgcc gctcgtgaat ggctcctccc caactaccag 780
cgtcccaace tgcaagtcct cactggacgg tatgttggaa aggtcctgct cagccagaac 840
getaccacac ctctgcccgt tggcgtggaa ttccgcaacc acaagggeaa caccacaaac 900
gtctacgcta agcaacaggt cctcctggcc gctggatccg ctgtctctcc caccatectc 960
gaatattccg gtatcggaat gaagtcatt ctagagcctc tiggaaattga caccgtcgtt 1020
gaactgcccg ttggtctcaa ccttcaggac caggetacct ctaccgtecg ctcaacgatt 1080
acctccgccc gtgcccggaca gggacaggcc gcttggttcg ctaccttcaa cgagaccttt 1140
ggcgactacg ccgaaaagge tcacgagctg ctcaacacca agctggagca gtgggccgaa 1200
gagggcgtcg cccgtggggg attccacaac accacegett tgetcateca gtacgagaac 1260
taccgcgact ggatcgtcaa ggacaatgtc gcatactcgg aactcttctc cgacaaggcc 1320
ggagtggcca gtttcgatgt gtgggatctt ctgcccttca ctagaggata cgtacacate 1380
ctcgacaagg accctacct ccgccatitc gcatacgacc ctcactactt tctcaacgag 1440
cttgactcgc tcggccaggc tgcgccact cagctggccc gcaacatctc caactccggt 1500
gccatgcaaa ctattttcgc tggagagact attcccggtg acaacctcgc gtatgatgcc 1560
gaottgagcg cctgggttga gtatacccg tacaacttcc gccctaaata ccatggtgtg 1620
ggtacttget ccatgatgcc gaagagatg ggcggtgttg tcgacaatgc tgcctgtgtg 1680
tatggtgtgc agggactcgc agtcacgat gttctatctt cccctacgca aatgtcgtcc 1740
catgttatga cggcttttta tgccatggcc ttgaaggttg cggatgceat ctggccggat 1800
tatgcttcca tgcagtga 1818

```

```

<210> 27
<211> 1818
<212> DNA
<213> 黑曲霉

```

```

<400> 27
atgtctacte tcttctgag ctctctgtg gtctctctcg ctgcccctt cccacactac 60
atcaggagca atggcactga agccagcctc ctgactgacc ccaaggaggt tgcggccgcg 120
actgtcgaact acatcctcgc ttgtggaggt ctgactggac tcaccactgc tgcctgtctg 180
acggagaacc ccgatatcac tgtcttctg atcgaaagtg gctcctacga gctgacaga 240
ggctctatea ttgaggacct gaacgettae ggtgacattt ttggcagcag tgtggaccac 300
gcctacgaga ctgtcagact cgcaccacac aatcagactg cctcgatecg ctccggaaat 360
ggctctcggg gctctacctt ctcaacaggi ggcctctgga ctgcctccca caaggcaaaa 420
gttgactcat gggagacctt ctccggaaat gaggcctgga actgggacag cgtggccgcg 480
tactcctctc aggtcagcgc tctctcgcga ccaaatgcca aacagattgc tcttggccac 540
tactttaatg catctctgca ttgtaicatt ggtactgtcc acgcccagcc ccgcgatacc 600
ggtgatgact actccccat ctcaagget ctcatgagcg ctgtcgaaga cagggcgctt 660
cccaccaaga aggaactiggg atgcggtgac ccccatggtg tgtccatggt ccccaacacc 720
ttgcacgaag accaagtgcg ctctgatgcc gctcgtgaat ggctcctccc caactaccag 780
cgtcccaace tgcaagtcct cactggacgg tatgttggaa aggtcctgct cagccagaac 840
getaccacac ctctgcccgt tggcgtggaa ttccgcaacc acaagggeaa caccacaaac 900

```

[0050]

gtctacgcta agcacgaggt cctcctggcc gctggatccg ctgtctctcc caccatcctc 960  
 gaatattccg gtatcggaat gaagtcatt ctagaccctc ttggaattga caccgtcggt 1020  
 gacctgcccg ttggctctca ccttcaggac cagaccacct ctaccgtccg ctacgcatt 1080  
 acctccgccg gtgcccagca gggacaggcc gcttggttcg ctacctca caagacctt 1140  
 ggcgactacg ccgaaaagc tcacgagctg ctcaacacca agctggagca gtgggcccga 1200  
 gaggccgtcg cccgtggcgg atccacaac accaccgctt tgcctatcca gtacgagaac 1260  
 taccggact ggatgtcaa ggacaatgtc gatactcgg aactctctc cgacaaggcc 1320  
 ggagtggcca gtttccatgt gtgggactt ctgcccctca ctaggagata cgtacacatc 1380  
 ctgcacaagg acctctacct ccgcatctt gcatacgacc ctcaactt tctcaacgag 1440  
 cttgacctgc tcggccagc tgcgccact cagctggccc gcaacatctc caactccggt 1500  
 gccatgcaaa cttatttcg ttgagagact atcccggtg acaacctcgc gtatgatgcc 1560  
 gacttgagcg cctgggttga gtatatccc tacaacttcc gccttaacta ccatggtgtg 1620  
 ggtacttget ccatgatcc gaaggagatg ggcggtgtt tegacaatgc tgcctgtgtg 1680  
 tatggtgtgc agggactcgc agtcatgat gttctatc cccctacgca aatgtctcc 1740  
 catgtaatga cggctcttca tgcctatgcc ttgaaggtt cggatgceat cttggcggat 1800  
 tatgcttcca tgcagtga 1818

<210> 28  
 <211> 1818  
 <212> DNA  
 <213> 黑曲霉

<400> 28  
 atgtctactc tecttgtgag ctgcttgtg gtctcctcg ctgcggccct cccacactac 60  
 atcaggagca atggcatcga agccagcctc ctgactgacc ccaaggaggt tgcggcgcg 120  
 actgtcgact acatcatcgc tgggtgaggt ctgactggac tcaccactgc tgcctctctg 180  
 acggagaacc ccgatatcac tgtgcttctc atcgaaagtg gctcctacga gtctgacaga 240  
 ggtctatca ttgaggacct gaacgcttac ggtgacattt ttggcagcag tgtggaccac 300  
 gccctacgaga ctgtcgagct cgcaccaac aatcagactg cgtctgacg ctccggaaat 360  
 ggtctcgggt gctctacct cgtcaacggt ggcgcttga ctgcctccc caaggcaca 420  
 gttgactcat gggagaccgt ctccgaaat gagggttga actgggacag cgtggcccgc 480  
 tactcctcc agcctgagcg tctctcgcga ccaaatgcca aacagattgc tcttgcccac 540  
 tactttaatg catctgcca tggatcaat ggtactgtcc acgcccagcc ccgcatacc 600  
 ggtgatgact actccccat cgtcaagct ctcatgagcg ctgtcgaaga caggggcggt 660  
 cccaccaaga aggaattggg atgcgggtgac cccatggtg tctccatggt ccccaacacc 720  
 ttgcacgaag accaagtgcg ctctgatgcc gctcgtgat ggctcctccc caactaccag 780  
 cgtcccaccc tgcagtctc cactggacgg taigtggaa agtctctgt cagccagaac 840  
 gtaccacac ctctgcccg ttggctggaa ttggcacc ccaaggcaca ccccacac 900  
 gtctacgcta agcacgaggt cctcctggcc gctggatccg ctgtctctcc caccatcctc 960  
 gaatattccg gtatcggaat gaagtcatt ctagaccctc ttggaattga caccgtcggt 1020  
 gacctgcccg ttggctctca ccttcaggac cagaccacct ctaccgtccg ctacgcatt 1080

[0051]

acctecgccg gtgccggaca gggacaggec gcttggttcg ctacctcaaa cgagaccttt	1140
ggcgactacg ccgaaaagge tcacgagctg ccaaacacca agctggagca gtgggcccga	1200
gaggecgteg cccgtggggg attccacaac accacegctt tgctcateca gtacgagaac	1260
taccgcgaet ggatcgtcaa ggacaatgtc gcatactcgg aactcttctt cgacaaggec	1320
ggagtggcca gtttcgatgt gtgggatctt ctgcccttca ctgaggata cgtacacatc	1380
ctcgacaagg acccctacct ccgccatttc gcatacgacc ctacgtactt tetcaacgag	1440
cttgacctgc tcggccagge tgcgccact cagctggccc gcaacatctc caactecggt	1500
gccatgcaaa cttatttcgc tggagagact attcccggtg acaacctcgc giatgatgcc	1560
gaettgagcg cctgggttga gtatacccc tacaacttcc gccctaacta ccattggtgtg	1620
ggtacttctt ccatgatgcc gaaggagatg ggcggtgttg tcgacaatgc tgcccgtgtg	1680
tatggtgtgc agggactgeg agtcacgat gttctatctt cccctacgca aatgtcttcc	1740
cattctatga cggctcttta tgccatggcc tgaaggttg cggatgccc ctggcggtat	1800
tatgcttcca tgcagtga	1818
<210> 29	
<211> 1818	
<212> DNA	
<213> 黑曲霉	
<400> 29	
atgtctactc tccttgtgag ctgcctgtg gtctccctcg ctgcccctt cccacactac	60
atcaggagca atggcatcga agccagcctc ctgactgacc ccaaggaggt tgcccgcgcg	120
actgtcgaet acatcatcgc tgggtggaggt ctgactggac tcaccactgc tgcccgtctg	180
acggagaacc ccgatacacc tgtgcttgc atcgaaagtg gctcctacga gctgacaga	240
ggtcctatca ttgaggacct gaacgettac ggtgacattt ttggcagcag tgtggaccac	300
gcctacgaga ctgtcgagct cggccaccaac aatcagactg cgtgatccg ctccggaaat	360
ggtctcggtg gctctacctt cgtcaacggt ggcacctgga ctgcgccca caaggeacaa	420
gttactcatf gggagacctt ctccgaaat gagggttga actgggacag cgtgcccgcg	480
tactctctcc aggtgagcg tctctcgcca ccaaatgcca aacagattgc tctgtgcccac	540
tactttaatg catctcgcca tggtaicaat ggtactgtcc acgcccagcc ccgcgatacc	600
ggtgatgact actcccctat cgtcaagget ctcatgagcg ctgtcgaaga caggggcggt	660
cccaccaaga aggaattggg atgcggtgac ccccatggtg tgtccatgtt ccccaacacc	720
ttgcacgaag acaagtgcg ctctgatgcc gctctgtaat ggtctctccc caactaccag	780
cttcccaccc tgcagtctct caetggacgg tatgttggaa aggtctctgt cagccagaac	840
gtaccacacc ctctgcccgt ttgcttggaa ttccgacccc acaagggcaa caccacacac	900
gtctacgcta agcaagaggt ctcccggccc gctggatccg ctgtctctcc caccatctct	960
gaatattccg gtatcggaaat gaagtcattt ctgagcctc ttggaattga caccgtcgtt	1020
gacctgcccg ttggtctcaa ccttcaggac caggctacct ctaccgtccg ctacgcattt	1080
acctecgccg gtgccggaca gggacaggec gcttggttcg ctacctcaaa cgagaccttt	1140
ggcgactacg ccgaaaagge tcacgagctg ccaaacacca agctggagca gtgggcccga	1200
gaggecgteg cccgtggggg attccacaac accacegctt tgctcateca gtacgagaac	1260
taccgcgaet ggatcgtcaa ggacaatgtc gcatactcgg aactcttctt cgacaaggec	1320

[0052]

ggagtggcca gtttccatgt gtgggatctt ctgcccttca ctaggagata cgtacacate 1380  
 ctgacaagg acccctacct cegccatttc gcatacgacc ctcaagtact tctcaacgag 1440  
 cttgacctgc tgggccaggc tgcgccact cagctggccc gcaacatctc caactccggt 1500  
 gccatgcaaa cttatttcgc tggagagact attcccggtg acaacctcgc gtatgatgcc 1560  
 gacttgagcg cctgggttga gtatacccc tacaacttec gccctaacta ceatggigtg 1620  
 ggtacttget ccatgatgcc gaaggagatg ggcgggttg tcgacaatgc tgcocgtgtg 1680  
 tatggtgtgc agggactgeg agtcategat gttctatctt cccctaegca aatgtctgcc 1740  
 catgttatga cggcttttta tgcctatgcc ttgaagggtg cggatgceat ctiggcggat 1800  
 tatgcttcca tgcagtga 1818

<210> 30  
 <211> 1818  
 <212> DNA  
 <213> 黑曲霉

<400> 30  
 atgtctactc tccttgtgag ctctctgtg gtctctctcg ctgcggccct cccacaactac 60  
 atcaggagca atggcatcga agccagctc ctgactgacc ccaaggaggt tgcggccgc 120  
 acigtgact acatcatcgc tgggtggagt ctgactggac tcaccactgc tgcocgtctg 180  
 acggagaacc ccgatcacac tgtctgtg atcgaaagt gctctacga gctgacaga 240  
 ggtctatca ttgaggacct gaacgcttac ggtgacattt ttggcagcag tgtggaccac 300  
 gccacgaga ctgtcagct cgcaccaac aatcagactg cgtgatccg ctccggaat 360  
 ggtctcgggt gctctacct cgtcaacggt ggcacctgga ctgcoccca caaggcaca 420  
 gttgactcat gggagaccgt ctccggaat gagggtgga actgggacag cgtggccgc 480  
 tactccctc aggtgagcg tctctcgc ccaatgcc aacagattgc tctggccac 540  
 tactttaatg catctgcc tggatcaat ggtactgtcc acgccgacc ccgcatacc 600  
 ggtgatgact actccccc atgcaaggt ctcatgagc ctgtgaaga caggggcgtt 660  
 cccaccaaga aggaactggg atgcgggtg cccatgggtg tctccatgtt ccccaacacc 720  
 ttgcacgaag accaagtgc ctctgatgcc gctctgtaat ggctctccc caactaccag 780  
 cgtccaacc tgcaagtct cactggacgg tatgttgaa aggtctctc cagccagaac 840  
 gctaccacac ctctgcccgt tggcgttgaa ttggcacc ccaagggcaa caccacaac 900  
 gctacgeta agcagaggt cctcttgccc gctggatccg ctgtctctc caccatctc 960  
 gaattatccg gtatcggaat gaagtccatt ctagacctc ttggaattga caccgtctgt 1020  
 gaactgccc ttggtctcaa ccttcaggac caggctacct ctaccgtccg ctacgcatt 1080  
 acctccgccc gtgccgaca gggacaggcc gcttggcttg ctacctca cgagacctt 1140  
 ggcactacg ccgaaaaggc tcacgagctg ctcaacacca agctggagca gtggccgaa 1200  
 gaggccgtcg cccgtggcgg atccacaac accaccgctt tctctatcca gtaagagaac 1260  
 taecgegact ggategtcaa ggacaatgta gcatactcg aactctctc cgacaaggcc 1320  
 ggagtggcca gttctgatgt gtgggatctt ctgcccttca ctaggagata cgtacacate 1380  
 ctgacaagg acccctacct cegccatttc gcatacgacc ctcaagtact tctcaacgag 1440  
 cttgacctgc tgggccaggc tgcgccact cagctggccc gcaacatctc caactccggt 1500

[0053]

gceatgcaaa cttatttgcg tggagagact attcecggtg acaacetege gtatgatgce	1560
gacttgagcg cctgggttga gtataicccg tacaacttcc gccctaacta ccatgggtgtg	1620
ggtaacttget ccatgatgce gaaggagatg ggcgggtgtg tegacaatgc tgcccgtgtg	1680
tatgggtgtge agggactgcg agtcategat gtttetatte cccctacgea aatgtctgce	1740
cattctatga cggcttttta tgccatggcc tgaagggtg cggatgceat ctggcggat	1800
tatgcttcca tgcagtga	1818
<210> 31	
<211> 1818	
<212> DNA	
<213> 黑曲霉	
<400> 31	
atgtctacte tccttgtgag ctctctgtg gctcctctcg ctgcccct cccacaactac	60
atcaggagca atggcatcga agccagcctc ctgactgacc ccaaggaggt tgcccggccg	120
actgtcgact acateatgc tgggtggaggt ctgactggac tcaccactgc tgcccgtctg	180
acggagaacc ccgatacacc tgtcttctg atcgaaagt gctcctacga gctgacaga	240
ggtcctatca ttgaggacct gaacgcttac ggtgacatt ttggcagcag tgtggaccac	300
gctacgaga ctgtcgact cgcaccaac aatcagactg cgtgategc ctccggaaat	360
ggtctcggtg gctctacct cgtcaacggt ggcacctgga ctgccccca caaggcacia	420
gttactcat gggagaccgt ctccgaaat gagggtgga actgggacag cgtggccgcc	480
tactcctcc agctgagcg tctctcgca ccaatgcca aacagattgc tgctggccac	540
tactttaatg catcctgcca tggatcaat ggtactgtcc acgcccagcc ccgcgatacc	600
ggtgatgact acicccecat cgtcaaggt ctcatgagcg ctgtcgaaga caggggcgtt	660
cccacaaga aggaactggg atgagggtac cccatggtg tgtecatgtt ccccaacacc	720
ttgcacgaag accaagtgcg ctctgatgce gctctgtaat ggtctctccc caactaccag	780
cgtcccaccc tgcgaagcct cactggacgg tatgttggaa aggtctctgt cagccagaac	840
gtaccacacc ctctgcccgt tggcgtggaa ttccgacc accaaggcaa caccacacac	900
gtctacgcta agcagaggt cctcttgccc gctggategc ctgtctctcc caccatctc	960
gaatattccg gtatcggaat gaagtccatt ctagaccctc ttggaattga caccgtcgtt	1020
gaactgccc ttggtctcaa ccttcaggac cagaccacct ctaccgtccg ctacgcatt	1080
acctccgccc gtgcccagca gggacagccc gcttggttcg ctacctcaaa cgagacctt	1140
ggcgaactac ccgaaaagc tcacgagctg ctcaacacca agctggagca gtgggcccga	1200
gagccctgct cccttggcgg attccacac accaccgctt tctctatcca gtaccagaac	1260
taccggaact ggategtcaa ggacaatgtc gatactcgg aactcttctt agacacggcc	1320
ggagtggcca gtttccatgt gtgggatctt ctgcccctca ctaggagata cgtacacatc	1380
ctcgacaagg accctacct ccgcatctt gatacagacc ctacgtactt tctcaacgag	1440
cttgacctgc tcggccagc tcccgcact cagctgccc gcaacatctc caactccggt	1500
gceatgcaaa cttatttgcg tggagagact attcecggtg acaacetege gtatgatgce	1560
gacttgagcg cctgggttga gtataicccg tacaacttcc gccctaacta ccatgggtgtg	1620
ggtaacttget ccatgatgce gaaggagatg ggcgggtgtg tegacaatgc tgcccgtgtg	1680
tatgggtgtge agggactgcg agtcategat gtttetatte cccctacgea aatgtctgce	1740

[0054]



cattctatga cggctcttta tgccatgccc ttgaagggtg eggatgceat ctigggcggat	1800
tatgcttcca tgcagtga	1818
<210> 32	
<211> 1818	
<212> DNA	
<213> 黑曲霉	
<400> 32	
atgtctactc tcccttgtag etcgcttgig gctcctctcg ctggcgcct cccacactac	60
atcaggagca atggcatega agccagcctc ctgactgacc ccaaggaggt tgcggcgcgc	120
actgtcgaact acatcatcgc tgggtggaggt ctgactggac tcaccactgc tgcctgctg	180
aeggagaacc ccgatatac tgigtctgtc atcgaaagtg gctcctacga gtcgacaga	240
ggctctatca ttgaggacct gaacgtctac ggtgacattt ttggcagcag tgtggaccac	300
gcctacgaga ctgtcgagct cgcaccaac aatcagactg cgtgatccg ctccggaaaf	360
ggtctcggig gctctacct cgtcaacggt ggccttggga ctgcgccca caaggcacia	420
gctgactcat gggagaccgt ctccgaaat gagggctgga actgggacag cgtggcgcgc	480
tactcctcc aggetgagcg tctctcgcga ccaatgcc aacagattgc tctggcccac	540
tactttaatg cactctgcca tggatatcaat ggtactgtcc acgcccagcc cccgataacc	600
ggtgatgact actcccacc cgtcaaggt ctcatgagcg ctgtcgaaga cagggcgctt	660
cccaccaaga aggaactggg atgcgggtgac cccatgggtg tctccatggt ccccaacacc	720
ttgcacgaag accaagtgcg ctctgatgcc gctcgtgaat ggcctcctcc caactaccag	780
cgteccaacc tgcgaagctc cactggaagg taigtiggaa aggtcctgct cagccagaac	840
gtaccacac ctctgtccgt tggcgtggaa ttccgcacc acaaggcaca caccacacac	900
gtctacgcta agcacgaggt cctcctggcc gctggatccg ctgtctctcc caccatctc	960
gaatatcccg gtatcgaat gaagtcatt etagagctc ttggaattga caccgtgctt	1020
gacctgccg ttggtctcaa ccttcaggac caggctacct ctaccgtcc ctcaagcatt	1080
acctccgcg gtgcgggaca gggacagcc gcttgggtcg ctacctca cagaccttt	1140
ggcgactac ccgaaaagc tcacgagctg ctcaacacca agctggagca gtggcgcgaa	1200
gaggcctgc ccggtggcg attccacaac accaccgctt tctctatcca gtacgagaac	1260
taccgcgact ggatcgtcaa ggacaatgtc gcatactcgg aactcttctc cgacacggcc	1320
ggagtggcca gtttccatgt gtgggatctt ctgccttca ctaggagata cgtacacatc	1380
ctcgacaagg accctacct ccgcatctc gcatacagcc ctcaatctt tctcaacgag	1440
cttgacctgc tggccagcc tgcgcacat cagctggccc gcaacatctc caactccggt	1500
gcatgcaaa ctatcttgc tggagagact attcccggtg acaacctcgc gtatgatgcc	1560
gacttgagcg cctgggttga gtatatccc tacaacttcc gccctaacta ccatgggtgtg	1620
ggtacttgc ccatgatgcc gaaggagatg ggcgggtgtg tcgacaatgc tgcctgtgtg	1680
tatggtgtgc agggactgc agtcacgat ggtctctatc cccctacgca aatgtcttcc	1740
catgttatga cggctcttta tgccatgccc ttgaagggtg eggatgceat ctigggcggat	1800
tatgcttcca tgcagtga	1818
<210> 33	

[0055]

<211>	1818	
<212>	DNA	
<213>	黑曲霉	
<400>	33	
atgtctactc	tccttgtgag	ctcgtttgtg gttctcctcg ctgggacct cccacactac 60
atcaggagca	atggcatcga	agccagcctc ctgactgacc ccaaggaggt tgcggccgc 120
actgicgact	acatcategc	tggtggaggt ctgactggac tcaccactgc tgeccgtctg 180
acggagaacc	cegatateac	tgtgcttgtc atcgaaagtg gctcctacga gtctgacaga 240
ggtcctatca	ttgaggacct	gaacgcttac ggtgacattt ttggcagcag tgtggaccac 300
gcctacgaga	ctgtcgagct	cgccaccaac aatcagactg cgtctatccg ctccggaaat 360
ggtctcggig	gctctaccct	cgtaacgggt ggcgtttgga ctgcgcccca caaggcacia 420
gttgactcat	gggagacct	cttcggaaat gagggttga actgggacag cgtggccgcc 480
tactcctccc	aggtgagcg	tgtctcgcca ccaaatgcca aacagattgc tctgtgccac 540
tacttaaatg	catctgcca	tggtatacat ggtactgccc acgcccagcc cctcgatacc 600
ggtgatgact	actcccccat	cgtaaggtct ctatgagcg ctgtcgaaga cagggcgctt 660
cccaccaaga	aggacttggg	atggcgctac cccatgggtg tctccatggt ccccaacacc 720
ttgcacgaag	accaagtgcg	ctctgatgcc gctcgtgaat gctcctccc caactaccag 780
cgcccccaac	tgcaagtctc	cactggacgg tatgttggaa aggtcctgct cagccagaac 840
gctaccacac	ctcgtgccc	tggcgttggaa ttccggcacc acaagggcaa caaccacaac 900
gtctacgcta	agcaagaggt	ctctctggcc gctggatccg ctgtctctcc caaccctctc 960
gaatattccg	gtatcggaat	gaagtcattc cttagacctc ttggaattga caactctggt 1020
gacctgccc	ttggtctcaa	cttcaggac caggtacctc ctaccgtccg ctacgcatt 1080
acctcggccg	gigccggaca	gggacaggcc gcttggctcg ctaccttcaa cgagaccttt 1140
ggcgactacg	ccgaaaagge	tcacgagctg ctcaacacca agctggagca gtggccgaa 1200
gaggccgtcg	cccgtggcgg	attccacaac accaccgctt tctctatcca gtacgagaac 1260
taccgcgact	ggatcgtcaa	ggacaatgic gcatactcgg aactcttctc cgacaaggcc 1320
ggagtggcca	gtttcgatgt	gtgggatctt ctgccttcaa ctaggagata cgtacacatc 1380
ctcgacaagg	acctctacct	ctgccatttc gcatacgacc ctcaactatt tetcaacgag 1440
cttgacctgc	tcggccagcc	tgcccacctc cagctggccc gcaacatctc caactccggt 1500
gcatatgaaa	cttatctcgc	tggagagact attcccgggt acaacctcgc gtatgatgcc 1560
gacttgagcg	cttggttga	gtatctccc tacaacttcc gccctaacta ccatggtgtg 1620
ggtacttctc	ccatgatgcc	gaaggagatg ggcggtgttg tcgacaatgc tgcctgtgtg 1680
tatggtgtgc	agggaactgc	agtcacgat ggttctatc cccctacgca aatgtctccc 1740
cattctatga	eggtctttta	tgccatggcc ttgaaggttg cggatgccc ctgtggcgat 1800
tatgtctcca	tgcagtga	
<210>	34	
<211>	1818	
<212>	DNA	
<213>	黑曲霉	
<400>	34	
atgtctactc	tccttgtgag	ctcgtttgtg gttctcctcg ctgggacct cccacactac 60

[0056]

atcaggagca atggcatcga agccagcctc ctgactgacc ccaaggaggt tgccggccgc	120
actgtcgact acatcatcgc tggtaggagt ctgactggac tcaccactgc tgcccgtctg	180
acggagaacc ccgatatcac tgtgttgtc atcgaaagtg gctcctacga gtctgacaga	240
ggctctatca ttgaggacct gaacgcttac ggtgacattt ttggcagcag tgtggaccac	300
gcctacgaga ctgtcgagct cggcaccaac aatcagactg cgctgatccg ctccggaaat	360
ggtctcggtg gctctacct cgtcaacggt ggcgcttga ctgccecca caaggcaca	420
gttgactcat gggagaccgt ctccgaaat gaggcttga actgggacag cgtggccgc	480
tactcctcc aggctgagcg tctctcgca ccaaatgcca aacagattgc tctggccac	540
tactttaatg cactctgcca tggatcaat ggtactgtcc aegccggacc cgcgatacc	600
ggtgatgact actccccat cgtcaaggt ctcctgagcg ctgtcgaaga caggggcgtt	660
cccaccaaga aggaattggg atgggtgac cccatggtg tctccatgtt ccccaacacc	720
ttgcacgaag accaagtgcg ctctgatcc gctctgtaat ggcctctccc caactaccag	780
cgccccaac tcaagtctt cactggacgg tatgttggaa aggtcctgct cagccagaac	840
gtaccacac ctctgcccgt tggcgtggaa ttggcacc ccaaggcaca caccacac	900
gtctacgcta agcagaggt cctcctggcc gctggatccg ctgtctctcc caccatctc	960
gaatatctcg gctatggagt gaagtcatt ctgagcctc ttggaatga caccgtcgtt	1020
gacctcccc ttggtctcaa ccttcaggac cagaccact ctaccgtccg ctacagcatt	1080
acctccgcc gtgcccgaca gggacagcc gcttggttcg ctacctca cgagacctt	1140
ggcgactac ccgaaaagc tcacgagctg ctcaacacca agctggagca ggggcccga	1200
gaggccgtcg ccctggcgg attccacac accaccgctt tctctctca gtaagagaac	1260
taccgcgact ggategtcaa ggacaatgt gcatactcg aactctctt cgacacggcc	1320
ggagtggcca gtttccatgt gtgggatctt ctgccctca ctgaggata cgtacacatc	1380
ctcgacaagg accctacct ccgccatttc gcatacagc ctacgtactt tctcaacgag	1440
cttgacctgc tggccagge tgcgccact cagctggccc gcaacatct caactccggt	1500
gccatgcaa cttatttgc tggagagact attcccgtg acaacctgc gfatgatgc	1560
gacttgagc ccgtgggtga gctatctcc tacaacttcc gccctaac taatggtgtg	1620
ggtacttget ccatgatcc gaaggagatg ggcggtgtg tcgacaatgc tgcccgtgtg	1680
tatggtgtgc agggactgc agtcagatg ggttctatc ccctacgca aatgtctcc	1740
cattctatga cggctcttta tgcctggcc ttgaaggttg cggatgcat ctggcggat	1800
tatgcttcca tgcagtga	1818

- <210> 35
- <211> 1818
- <212> DNA
- <213> 黑曲霉

<400> 35	
atgtctactc tcttgtgag ctgcctgtg gctctctc ctgcggccct cccacactac	60
atcaggagca atggcatcga agccagcctc ctgactgacc ccaaggaggt tgccggccgc	120
actgtcgact acatcatcgc tggtaggagt ctgactggac tcaccactgc tgcccgtctg	180
acggagaacc ccgatatcac tgtgttgtc atcgaaagtg gctcctacga gtctgacaga	240
ggctctatca ttgaggacct gaacgcttac ggtgacattt ttggcagcag tgtggaccac	300

[0057]

gcctacgaga ctgtcgaget cgccaccaac aatcagactg cgtgatccg ctccggaat 360  
 ggtctcgggt gctctaccct cgtcaacggt ggcacctgga ctgccecca caaggcacia 420  
 gttgactcat gggagaccgt ctccgaaat gagggtgga actgggacag cgtggccgcc 480  
 tactccctcc aggctgagcg tgcctcgca ccaaatgcca aacagattgc tctggccac 540  
 tactttaatg catctcgca tggatcaat ggtactgtec acgccgacc ccgcgatacc 600  
 ggtgatgaact actccccat cgtaacggt ctcatgagcg ctgtcgaaga cagggcggtt 660  
 cccaccaaga aggaattggg atgcccggac cccatggtg tctccatggt ccccaacacc 720  
 ttgcacgaag accaagtgcg ctctgaigcc gctcgtgaat ggctctccc caactaccag 780  
 cgtcccaacc tgcaagtctt cactggaccg tatgttggaa agtctctgct cagccagaac 840  
 gctaccacac ctctgcccgt tggcgtggaa ttccgaccc acaaggcaca caccacaac 900  
 gtctacgcta agcaccaggt cctctggcc gctggatccg ctgtctctcc caccatctc 960  
 gaatattccg gtatcggaat gaagtccatt ctagaccctc ttggaattga caccgtcttt 1020  
 gacctgcccg ttggtctcaa ccttcaggac cagctacct ctaccgtccg ctacgcatt 1080  
 acctcccgcg gtcccgaca gggacaggcc gottggttcg ctacctcaaa cgagaccttt 1140  
 ggcgactacg ccgaaaaggc tcacgagctg ctcaacacca agctggagea gtggccgaa 1200  
 gaggccgtcg cccgtggcgg attccacaac accaccgctt tgcctatcca gtacgagaac 1260  
 taccgcgact ggatcgtcaa ggacaatgc gcatactcgg aactctctct cgacacggcc 1320  
 ggagtggcca gtttccatgt gtgggatctt ctgcccctca ctagaggata cgtacacatc 1380  
 ctgacaagg accctacct ccgccatttc gcatacgacc ctctactctt tctcaacgag 1440  
 cttgacctgc tcggccagcg tgcgccact cagctggccc gcaacatctc caactccggt 1500  
 gccatgcaaa cttatttccg tggagagact attcccgggt acaacctcgc gtatgatgcc 1560  
 gacttgagcg cctgggttga gtatatccg tacaacttcc gcctaacta ccatggtgtg 1620  
 ggtacttgc tcatgatgcc gaaggagatg ggcgggttg tcgacaatgc tgcctgtgtg 1680  
 tatggtgtgc agggactgcg agtcatgat gttctatct cccctacgea aatgtctcc 1740  
 cactctatga cggctcttta tgccatggcc ttgaaggttg cggatgccc cttggccgat 1800  
 tatgcttcca tgcagtga 1818

<210> 36  
 <211> 1818  
 <212> DNA  
 <213> 黑曲霉

<400> 36  
 atgtetaete tectgtgag ctctctgtg gtctccctcg ctgcgcccct cccacaactac 60  
 atcaggagca atggcctcga agccagctc ctgactgacc ccaaggaggt tgcgcccgc 120  
 actgtcgaact acatcctcgc tgggtggaggt ctgactggac tcaccaactgc tgcctctctg 180  
 acggagaacc ccgatatac tgtctctgct atcgaaagtg gctcctacga gctgacaga 240  
 ggtctctaca ttgaggacct gaacgcttac ggtgacattt ttggcagcag tgtggaccac 300  
 gcctacgaga ctgtcgaget cgccaccaac aatcagactg cgtgatccg ctccggaat 360  
 ggtctcgggt gctctaccct cgtcaacggt ggccttggga ctgccecca caaggcacia 420  
 gttgactcat gggagaccgt ctccgaaat gagggtgga actgggacag cgtggccgcc 480

[0058]

tactcctcc agcctgagcg tgctcgcga ccaaatgcca aacagattgc tgctggccac	540
tacttiaatg calccctgcca tggtaiccat ggtactgtcc acgceggacc cecgatacc	600
ggtgatgact actccccat cgtcaagget ctcatgagcg ctgtcgaaga caggggcgtt	660
cccaccaaga aggaactggg atggcgtgac ccccatggtg tgtecatggt ccccaacacc	720
ttgcacgaag accaagtgcg ctctgatgcc gctcgtgaat ggctcctccc caactaccag	780
cgccccaaac tgcaagtcct cactggacgg tatgttggaa aggtcctgct cagccagaac	840
gtaccacac ctcgtgccgt tggcgiggaa ttoggcacc acaagggcaa caccacaaac	900
gtctacgcta agcacgaggt cctcciggcc gctggatccg ctgtctctcc caccatctc	960
gaatattccg gtatcggaat gaagtcatt ctagaccctc ttggaattga caccgtcgtt	1020
gacctgccc ttggtctcaa ccttcaggac caggetacct ctaccgctcg ctcacgcat	1080
acctccgccc gtgceggaca gggacagccc gcttggttcg ctacctcaa cgagaacttt	1140
ggcgactacg ccgaaaagcg tcacgagctg ctcaacacca agctggagca ggggcccga	1200
gagcccgctg cccgtggcgg attccacaac accaccgctt tgctcatcca gtaccgaaac	1260
taccgcgaet ggategtcaa ggacaatgct gcatactcgg aactcttctt cgacacggcc	1320
ggagtggcca gtttccatgt gtgggatctt ctgcccttca ctagaggata cgtacacatc	1380
ctcgacaagg accctacct cgcctatct gcatacgacc ctacgtactt tctcaacgag	1440
cttgacctge tggccagge tgcgccact cagctgccc gcaacatct caactccggt	1500
gccatgcaaa cttatttccg tggagagact attcccgtg acaacctcgc gtatgatgcc	1560
gacttgagcg cctgggttga gtatctccc tacaacttcc gccctaacta ccatggtgtg	1620
ggtacttget ccatgatgcc gaaggagatg ggcggtgtt tgacaatgc tgcctgtgtg	1680
tatggtgtgc agggactgcg agtcategat ggttctatc cccctacgca aatgtcgtcc	1740
cattctatga cggctcttta tgccatggcc ttgaaggttg cggatgccc cttggcggat	1800
tatgcttcca tgcagtga	1818

- <210> 37
- <211> 1836
- <212> DNA
- <213> 黑曲霉

<400> 37	
aagcttaaaa aaatgtctac tctcttgtg agctcgtttg ttgtctccct cgtcgggcc	60
ctcccacact acatcaggag caatggcacc gaagccagcc tctgactga ccccaggag	120
gctgcggccc gcaactgtca ctacatcacc gctggtggag gctgactgg actcaccact	180
gctgcctgct tgacggagaa ccccgatata actgtgcttg tcatcgaaag ttgctcttcc	240
gagcttgaca gaggtctat cattgaggac ctgaacgctt acggtgacat ttttggcagc	300
agtggtggacc acccttacga gactgtcag ctccgccaca acaatcagac tgcctgata	360
cgtcctggaa atggtctcgg ttgctctacc ctctcaacg gtggcaccct gactcgcctc	420
cacaaggcac aagttgactc atgggagacc gctctcggaa atgagggctg gaactgggac	480
agcgtggccc cctactccct ccagctgag cgtctcgcg caccacatgc caaacagatt	540
gtgtctggcc actactttaa tgcactctgc catggtatca atggtactgt ccacgcccga	600
cccccgata ccggtgatga ctactcccc atctcgaagg ctctcatgag cgtctcgaa	660
gacagggggc ttcaccacaa gaaggacttg gcatcgggtg accccatgg tgtgtccatg	720

[0059]

ttecccaaca ccttgcacga agaccaagtg cgctctgatg cegctcgtga atggctcctc 780  
 cccaactacc agegtcccaa cctgcaagtc ctcactggac ggtatgttgg aaaggtectg 840  
 ctcagccaga acgtaccac acctogtgcg gttggcgtgg aatteggcac ccacaagggc 900  
 aacaccacaca acgtetacgc taagcacgag gtcctctctg ccgctggatc cgetgtctct 960  
 cccaccatcc tcgaatattc cggatcggga atgaagteca ttctagagcc tcttggaaatt 1020  
 gacaccgtcg ttgacctgac cgttggctc aaccttcagg accagaccac ctctaccgtc 1080  
 cgetoacgca ttacctccgc cggtgccgga cagggacagg ccgcttggtt cgetaccctc 1140  
 aacgagacct ttggcgacta cgcgaaaag gctcagagc tgctcaaac caagctggag 1200  
 cagtgggcgc aagaggccgt cgcctgtgga gattccaca acaccaccgc ttigtctatc 1260  
 cagtaagaga actaccgcga ctggatcgtc aaggacaatg tcgcatactc ggaactcttc 1320  
 ctcgacacgg ccggagtggc cagtctgatg gttgggac ttctgccctt cactagagga 1380  
 taactacaca tccctgacaa ggacccttac ctccgccatt tcgcatacga cctcagtac 1440  
 tttctcaacg agcttgacct gctcggccag gctgcgcca ctcaagctgc ccgcaacatc 1500  
 tccaactccg gtgcaatgca aacttatttc gctggagaga ctattccggg tgacaacctc 1560  
 gcgtatgatg ccgacttgag cgcctgggtt gactatatec cgtacaactt ccgccctaac 1620  
 taccatggtg tgggtacttg ctccatgatg ccgaaggaga tggcggtgt tctcgacaat 1680  
 gctccccgtg tgtatggtg gcaggactg ccagtcacgc atggtctctat tccccctacg 1740  
 caaatgtcgt cccatgttat gacggctttt tatgccatgg ccttgaaggt tgggatgccc 1800  
 atcttggcgg attatgcttc catgcagtga ctcgag 1836

<210> 38  
 <211> 1818  
 <212> DNA  
 <213> 黑曲霉

<400> 38  
 atgcagactc tccttgtgag ctgcttctg gctcctctcg ctgcggccct cccacaactac 60  
 atcaggagca atggcaatgca agccagcctc ctgaactgacc ccaaggagggt tgcgggcgcg 120  
 actgtcgact acatcctcgc tgggtggagggt ctgaactggac tcaccactgc tgcctctctg 180  
 acggagaacc ccgatatcac tgtgcttctc atcgaagtg gctcctacga gctcgacaga 240  
 ggtcctatca ttgaggacct gaacgcttac ggtgacattt ttggcagcag tgtggaccac 300  
 gccacgaga ctgtcagact cgcaccacac aatcagactg cgtgatccg ctccggaat 360  
 ggtctcggtg gctctacctt cgtcaacggt ggcacctgga ctgcgcccca caaggeacaa 420  
 gttgactcat gggagaccgt ctccggaat gagggetgga actgggacag cgtggccgcc 480  
 tactccctcc aggetgagcg tctcgcgca ccaaatgcca aacagattgc tgetgcccac 540  
 tactttaatg cactctgcca tggatcaat ggtactgtcc acgcccagcc ccgcgafacc 600  
 ggtgatgact actccccat cgtcaaggt ctcatgagcg ctgtcgaaga cagggcgctt 660  
 cccaccaaga aggaattggg atgcggtgac ccccatggtg tctccatgtt ccccaacacc 720  
 ttgcacgaag accaagtgcg ctctgatgca gctcgtgaat ggctcctccc caactaccag 780  
 cgtcccaacc tgcaagtctt cactggacgg tatgttggaa aggtcctgct cagccagaac 840  
 gctaccacac ctctgcccgt tggcgtggaa ttcggcacc ccaagggcaa caccacaac 900

[0060]

gtctacgcta agcaegaggt cctcctggcc getggatecg ctgtctctcc caccatectc 960  
 gaataitccg gtaicgggaat gaagtccatt ciagagcctc ttggaattga caccgtcgtt 1020  
 gaactgcccc ttggtctcaa ccttcaggac cagaccacct ctaccgtccg ctcacgcatt 1080  
 acctccgceg gtgccggaca gggacaggcc gcttggttcg ctaccttcaa cgagaccttt 1140  
 ggcgactacg ccgaaaagge tcacgagctg ctcaacacca agctggagca gtgggcccga 1200  
 gaggcctcgc cccgtggcgg attccacaac accaccgctt tgetcatalca glacgagaac 1260  
 taccgcgaact ggatcgtcaa ggacaatgtc gcatactcgg aactcttctc cgacacggcc 1320  
 ggagtgccca gtttcgatgt gtgggatctt ctgcccttca ctagaggata cgtacacatc 1380  
 ctcgacaagg acccctacct ccgccatttc gcatacagcc ctacagtaett tctcaacgag 1440  
 cttgacctgc tcggccagge tgccgccact cagctggccc gcaacatctc caactccggt 1500  
 gccatgcaaa cttatttctc tggagagact attcccgtg acaacctcgc gtatgatgcc 1560  
 gacttgagcg cctgggttga gtatatcccg tacaacttcc gccttaacta ccatggtgtg 1620  
 ggtaettgct ccatgatgcc gaaggagatg ggcggtgttg tcgacaatgc tgcccgtgtg 1680  
 tatggtgtgc agggactgeg agtcacgat ggtttctatc cccctacgca aatgtctcc 1740  
 catgttatga cggctcttta tgccatgccc tgaaggttg cggatgccc ctggcggat 1800  
 tatgcttcca tgcagtga 1818

<210> 39  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> PCR用引物

<400> 39  
 gatcagaage ttaaaaaaat gtctactctc ctgtgagct cg 42

<210> 40  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> PCR用引物

<400> 40  
 gatcagctcg agtcaactgca tggaaacata atc 33

<210> 41  
 <211> 40  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 突变用引物

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (21)..(23)  
 <223> n为 a、c、g、或t

<400> 41  
 ccaccaacaa tcagactcgc mnatecgt ccggaatgg 40

<210> 42

[0061]

<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	突变用引物	
<220>		
<221>	混杂特征	
<222>	(21)..(23)	
<223>	n为 a、c、g、或t	
<400>	42	
	getctaccct cgtcaacggt mnnacctgga ctcgcccc	38
<210>	43	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	突变用引物	
<220>		
<221>	混杂特征	
<222>	(16)..(18)	
<223>	n为 a、c、g、或t	
<400>	43	
	ctcgtcaacg gttgcnmtg gactcgcce cac	33
<210>	44	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	突变用引物	
<220>		
<221>	混杂特征	
<222>	(19)..(21)	
<223>	n为 a、c、g、或t	
<400>	44	
	catgtatca atggtactm ncaagccgga ccccgcg	37
<210>	45	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	突变用引物	
<220>		
<221>	混杂特征	
<222>	(20)..(22)	
<223>	n为 a、c、g、或t	
<400>	45	
	caaccttcag gaccagaccn nmtctaccgt ccgctcac	38
<210>	46	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

[0062]



<220>		
<223>	突变用引物	
<220>		
<221>	混杂特征	
<222>	(19)..(21)	
<223>	n为 a、c、g、或t	
<400>	46	
	gtgcataact cggaactcnn nctcgacacg gcgggag	37
<210>	47	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	突变用引物	
<220>		
<221>	混杂特征	
<222>	(19)..(21)	
<223>	n为 a、c、g、或t	
<400>	47	
	gcgggagtgg ccagtttcnn nggtgggat cttctgc	37
<210>	48	
<211>	43	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	突变用引物	
<220>		
<221>	混杂特征	
<222>	(20)..(22)	
<223>	n为 a、c、g、或t	
<400>	48	
	catectcege catttcgcan nngacctca gtactttctc aac	43
<210>	49	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	突变用引物	
<220>		
<221>	混杂特征	
<222>	(21)..(23)	
<223>	n为 a、c、g、或t	
<400>	49	
	cttatttege tggagagaact nnnccgggtg acaacctege	40
<210>	50	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	突变用引物	
<220>		

[0063]

<221> 混杂特征	
<222> (17)..(19)	
<223> n为 a、c、g、或t	
<400> 50	
cccgtagaac ttccgcnna actaccatgg tgtgggtact tg	42
<210> 51	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 突变用引物	
<220>	
<221> 混杂特征	
<222> (20)..(22)	
<223> n为 a、c、g、或t	
<400> 51	
gtacaacttc cgcctaacn nncatgggtg gggtagttgc tc	42
<210> 52	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 突变用引物	
<220>	
<221> 混杂特征	
<222> (21)..(23)	
<223> n为 a、c、g、或t	
<400> 52	
ctacgcaaat gtctgccat nnnatgacgg tcttttatgc catgg	45
<210> 53	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 突变用引物	
<220>	
<221> 混杂特征	
<222> (24)..(26)	
<223> n为 a、c、g、或t	
<400> 53	
ctacgcaaat gtctgccat gtttnnaegg tcttttatgc catgg	45
<210> 54	
<211> 51	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR用引物	
<400> 54	
gatcagctcg agtcaatggt gatgggatg atgctgcatg gaagcataat c	51
<210> 55	
<211> 33	

[0064]

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 突变用引物	
<400> 55	
ctcgtcaacg gtggcgcttg gactcgcccc cac	33
<210> 56	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 突变用引物	
<400> 56	
ccttcaggac cagaccgctt ctaccgtccg ctcac	35
<210> 57	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 突变用引物	
<400> 57	
ggagtggcca gtttccatgt gtgggatctt ctgc	34
<210> 58	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 突变用引物	
<400> 58	
cgcaaatgtc gtcccattct atgacggtct tttatgcat gg	42
<210> 59	
<211> 605	
<212> PRT	
<213> 黑曲霉	
<400> 59	
Met Ser Thr Leu Leu Val Ser Ser Leu Val Val Ser Leu Ala Ala Ala	
1                    5                    10                    15	
Leu Pro His Tyr Ile Arg Ser Asn Gly Ile Glu Ala Ser Leu Leu Thr	
20                    25                    30	
Asp Pro Lys Glu Val Ala Gly Arg Thr Val Asp Tyr Ile Ile Ala Gly	
35                    40                    45	
Gly Gly Leu Thr Gly Leu Thr Thr Ala Ala Arg Leu Thr Glu Asn Pro	
50                    55                    60	
Asp Ile Thr Val Leu Val Ile Glu Ser Gly Ser Tyr Glu Ser Asp Arg	
65                    70                    75                    80	
Gly Pro Ile Ile Glu Asp Leu Asn Ala Tyr Gly Asp Ile Phe Gly Ser	
85                    90                    95	

[0065]

Ser Val Asp His Ala Tyr Glu Thr Val Glu Leu Ala Thr Asn Asn Gln  
 100 105 110

Thr Ala Leu Ile Arg Ser Gly Asn Gly Leu Gly Gly Ser Thr Leu Val  
 115 120 125

Asn Gly Gly Thr Trp Thr Arg Pro His Lys Ala Gln Val Asp Ser Trp  
 130 135 140

Glu Thr Val Phe Gly Asn Glu Gly Trp Asn Trp Asp Ser Val Ala Ala  
 145 150 155 160

Tyr Ser Leu Gln Ala Glu Arg Ala Arg Ala Pro Asn Ala Lys Gln Ile  
 165 170 175

Ala Ala Gly His Tyr Phe Asn Ala Ser Cys His Gly Ile Asn Gly Thr  
 180 185 190

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

Lys Ala Leu Met Ser Ala Val Glu Asp Arg Gly Val Pro Thr Lys Lys  
 210 215 220

Asp Leu Gly Cys Gly Asp Pro His Gly Val Ser Met Phe Pro Asn Thr  
 225 230 235 240

Leu His Glu Asp Gln Val Arg Ser Asp Ala Ala Arg Glu Trp Leu Leu  
 245 250 255

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

Gly Lys Val Leu Leu Ser Gln Asn Ala Thr Thr Pro Arg Ala Val Gly  
 275 280 285

Val Glu Phe Gly Thr His Lys Gly Asn Thr His Asn Val Tyr Ala Lys  
 290 295 300

His Glu Val Leu Leu Ala Ala Gly Ser Ala Val Ser Pro Thr Ile Leu  
 305 310 315 320

Glu Tyr Ser Gly Ile Gly Met Lys Ser Ile Leu Glu Pro Leu Gly Ile  
 325 330 335

Asp Thr Val Val Asp Leu Pro Val Gly Leu Asn Leu Gln Asp Gln Thr  
 340 345 350

Thr Ser Thr Val Arg Ser Arg Ile Thr Ser Ala Gly Ala Gly Gln Gly  
 355 360 365

Gln Ala Ala Trp Phe Ala Thr Phe Asn Glu Thr Phe Gly Asp Tyr Ala  
 370 375 380

Glu Lys Ala His Glu Leu Leu Asn Thr Lys Leu Glu Gln Trp Ala Glu  
 385 390 395 400

[0066]

Glu Ala Val Ala Arg Gly Gly Phe His Asn Thr Thr Ala Leu Leu Ile  
 405 410 415  
 Gln Tyr Glu Asn Tyr Arg Asp Trp Ile Val Lys Asp Asn Val Ala Tyr  
 420 425 430  
 Ser Glu Leu Phe Leu Asp Thr Ala Gly Val Ala Ser Phe His Val Trp  
 435 440 445  
 Asp Leu Leu Pro Phe Thr Arg Gly Tyr Val His Ile Leu Asp Lys Asp  
 450 455 460  
 Pro Tyr Leu Arg His Phe Ala Tyr Asp Pro Gln Tyr Phe Leu Asn Glu  
 465 470 475 480  
 Leu Asp Leu Leu Gly Gln Ala Ala Ala Thr Gln Leu Ala Arg Asn Ile  
 485 490 495  
 Ser Asn Ser Gly Ala Met Gln Thr Tyr Phe Ala Gly Glu Thr Ile Pro  
 500 505 510  
 Gly Asp Asn Leu Ala Tyr Asp Ala Asp Leu Ser Ala Trp Val Glu Tyr  
 515 520 525  
 Ile Pro Tyr Asn Phe Arg Pro Asn Tyr His Gly Val Gly Thr Cys Ser  
 530 535 540  
 Met Met Pro Lys Glu Met Gly Gly Val Val Asp Asn Ala Ala Arg Val  
 545 550 555 560  
 Tyr Gly Val Gln Gly Leu Arg Val Ile Asp Gly Ser Ile Pro Pro Thr  
 565 570 575  
 Gln Met Ser Ser His Arg Met Thr Val Phe Tyr Ala Met Ala Leu Lys  
 580 585 590  
 Val Ala Asp Ala Ile Leu Ala Asp Tyr Ala Ser Met Gln  
 595 600 605  
 <210> 60  
 <211> 605  
 <212> PRT  
 <213> 黑曲霉  
 <400> 60  
 Met Ser Thr Leu Leu Val Ser Ser Leu Val Val Ser Leu Ala Ala Ala  
 1 5 10 15  
 Leu Pro His Tyr Ile Arg Ser Asn Gly Ile Glu Ala Ser Leu Leu Thr  
 20 25 30  
 Asp Pro Lys Glu Val Ala Gly Arg Thr Val Asp Tyr Ile Ile Ala Gly  
 35 40 45  
 Gly Gly Leu Thr Gly Leu Thr Thr Ala Ala Arg Leu Thr Glu Asn Pro  
 50 55 60

[0067]

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

[0068]

Gln Ala Ala Trp Phe Ala Thr Phe Asn Glu Thr Phe Gly Asp Tyr Ala  
 370 375 380  
 Glu Lys Ala His Glu Leu Leu Asn Thr Lys Leu Glu Gln Trp Ala Glu  
 385 390 395 400  
 Glu Ala Val Ala Arg Gly Gly Phe His Asn Thr Thr Ala Leu Leu Ile  
 405 410 415  
 Gln Tyr Glu Asn Tyr Arg Asp Trp Ile Val Lys Asp Asn Val Ala Tyr  
 420 425 430  
 Ser Glu Leu Phe Leu Asp Thr Ala Gly Val Ala Ser Phe His Val Trp  
 435 440 445  
 Asp Leu Leu Pro Phe Thr Arg Gly Tyr Val His Ile Leu Asp Lys Asp  
 450 455 460  
 Pro Tyr Leu Arg His Phe Ala Tyr Asp Pro Gln Tyr Phe Leu Asn Glu  
 465 470 475 480  
 Leu Asp Leu Leu Gly Gln Ala Ala Ala Thr Gln Leu Ala Arg Asn Ile  
 485 490 495  
 Ser Asn Ser Gly Ala Met Gln Thr Tyr Phe Ala Gly Glu Thr Ile Pro  
 500 505 510  
 Gly Asp Asn Leu Ala Tyr Asp Ala Asp Leu Ser Ala Trp Val Glu Tyr  
 515 520 525  
 Ile Pro Tyr Asn Phe Arg Pro Asn Tyr His Gly Val Gly Thr Cys Ser  
 530 535 540  
 Met Met Pro Lys Glu Met Gly Gly Val Val Asp Asn Ala Ala Arg Val  
 545 550 555 560  
 Tyr Gly Val Gln Gly Leu Arg Val Ile Asp Gly Ser Ile Pro Pro Thr  
 565 570 575  
 Gln Met Ser Ser His Leu Met Thr Val Phe Tyr Ala Met Ala Leu Lys  
 580 585 590  
 Val Ala Asp Ala Ile Leu Ala Asp Tyr Ala Ser Met Gln  
 595 600 605  
 <210> 61  
 <211> 605  
 <212> PRT  
 <213> 黑曲霉  
 <400> 61  
 Met Ser Thr Leu Leu Val Ser Ser Leu Val Val Ser Leu Ala Ala Ala  
 1 5 10 15  
 Leu Pro His Tyr Ile Arg Ser Asn Gly Ile Glu Ala Ser Leu Leu Thr  
 20 25 30  
 Asp Pro Lys Glu Val Ala Gly Arg Thr Val Asp Tyr Ile Ile Ala Gly

[0069]

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

[0070]



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

<210> 62  
 <211> 1818  
 <212> DNA  
 <213> 黑曲霉

<400> 62  
 atgtctacte tcttgtgag ctctgtgtg gtctccctcg ctgggacct cccaeactac 60  
 atcaggagca atggcatcga agccagctc ctgactgacc ccaaggaggt tgcggcgc 120

[0071]

actgtegaact acatcatcgc tgggtggaggt ctgactggac teaccactgc tgcccgtctg	180
acggagaacc ccgatatac tgtgcttgtc atcgaaagtg gctcctacga gcttgacaga	240
ggtcctatca ttgaggacct gaacgcttac ggtgacattt ttggcagcag tgtggaccac	300
gcctacgaga ctgtegaget cgcaccaaac aatcagactg cgetgatccg ctccggaat	360
ggtctcgggt gctctacct cgtcaacggt ggcacctgga ctgccecca caaggcaca	420
gltgaetcat gggagaccgt ctteggaaat gagggctgga actgggacag cgtggccgcc	480
tactcctcc aggetgagcg tctctcgca ccaaatgcca aacagattgc tgetggccac	540
tactttaatg cactctgcca tggatatcaat gtaetgtcc acgceggacc ccgcgatacc	600
ggtgatgact actccccat cgtcaagget ctcatgagcg ctgtcgaaga caggggcggt	660
cccaccaaga aggacttggg atgceggtag ccccatggtg tgtccatggt ccccaacacc	720
ttgcaagaag accaagtgcg ctctgatccc gctctgtaat ggctctccc caactaccag	780
cgccccaac tgcagtctc cactggacgg tatgttggaa aggtctctct cagccagaac	840
getaccacac ctctgtccgt tggcgtggaa ttccgacccc acaagggcaa caccacaac	900
gtctacgcta agcaagaggt cctcctggcc gotggatecg ctgtctctcc caccatctc	960
gaatattccg gtatcggaat gaagtcatt ctagaccctc ttggaattga caecgtctgt	1020
gacctgcccg ttggtctcaa ccttcaggac cagaccacct ctaccgtccg ctacagcatt	1080
acctccgccg gtgccggaca gggacaggcc gcttggttcg ctacctcaa cgagaccttt	1140
ggcgactacg ccgaaaagc tcaagagctg ctcaacacca agctggagca gtgggccgaa	1200
gaggccgtcg cccgtggcgg attccacaac accaccgctt tgetcatcca gtacgagaac	1260
taccggcact ggatcgtcaa ggacaatgct gcatactcgg aactctctct cgacacggcc	1320
ggagtggcca gtttccatgt gtgggatctt ctgcccttca ctaggagata cgtacacate	1380
ctcgacaagg accctacct ccgccatttc gcatacgacc ctcagtaact tctcaacgag	1440
cttgacctgc tcggccagcg tgcgccact cagetggccc gcaacatctc caactccggt	1500
gccatgcaaa cttatttctc tggagagact attcccgtg acaacctcgc gtatgatccc	1560
gacttgagcg cctgggttga gtatatccc tacaacttcc gcctaacta ccatggtgtg	1620
ggtacttctc ccatgatgcc gaaggagatg ggcggtgttg tcgacaatgc tgcccgtgtg	1680
tatggtgtgc agggactgcg agtcatgat gttctatct cccctacgca aatgtctctc	1740
cataggatga cggcttttta tgccatgccc ttgaaggttg cggatgccc cttggcggat	1800
tatgcttcca tgcagtga	1818

<210> 63  
 <211> 1818  
 <212> DNA  
 <213> 黑曲霉

<400> 63	
atgtctactc tcttgtgag ctctcttctg gctcctctg ctgcggccct cccacactac	60
ateaggagca atggcatega agccagcctc ctgaetgacc ccaaggaggt tgcggccgc	120
actgtegaact acateatcgc tgggtggaggt ctgaetggac teaccactgc tgcccgtctg	180
acggagaacc ccgatatac tgtgcttgtc atcgaaagtg gctcctacga gcttgacaga	240
ggtcctatca ttgaggacct gaacgcttac ggtgacattt ttggcagcag tgtggaccac	300

[0072]

gectacgaga ctgtcgaget egccaccaac aatcagactg cgctgatecg ctccggaaat	360
ggictcgggtg gctctaccct cgtcaacggt ggcacctgga ctgcceccca caaggcacia	420
gttgactcat gggagaccgt cttcgaaat gagggetgga actgggacag cgtggccgcc	480
tactcctccc aggetgagcg tgctcgegea ccaaatgcca aacagattgc tgctggccac	540
tactttaatg catcctgcca tggatcaat ggtactgtcc acgcccggacc ccgcgatacc	600
ggigtatgact actcecccat cgtcaaggt ctcctgagcg ctgtcgaaga cagggcggtt	660
cccaccaaga aggacttggg atgcggtgac ccccatggtg tgtccatggt ccccaacacc	720
ttgcacgaag accaagtgcg cctgatgcc gctcgtgaat ggctcctccc caactaccag	780
ctgcccaccc tcaagtctc cactggacgg tatgttggaa aggtcctgct cagccagaac	840
getaccacac ctctgcccgt tggcgiggaa ttccgacccc acaagggeaa caccacacac	900
gtctacgcta agcaagaggt cctcctggcc getggatecg ctgtctctcc caccatctc	960
gaatatctcc gctatcggaat gaagtccatt ctagagctc ttggaattga caccgtcgtt	1020
gacctgccc ttggtctcaa ccttcaggac cagaccacct ctaccgtccg ctcaagcatt	1080
acctccccc gtgcccgaca gggacagccc gcttggctcg ctacctca cgagaccttt	1140
ggcgactacg ccgaaaagc tcacgagctg ctcaacacca agctggagca gtggccgaa	1200
gagccgctcg ccctggcgg attcacacac accaccgctt tgctcctcca gtacgagaac	1260
facccgact ggatctca ggaacatgtc gcatactcg aactctctc cgacacggcc	1320
ggagtggcca gttccatgt gtggatctt ctgcccctca ctgaggata cgtacacatc	1380
ctcgacaagg accctacct ccgccccttc gcatacagcc ctcaagcatt tctcaagag	1440
cttgacctgc tggccagge tgcgcccact cagctggccc gcaacatctc caactccgtt	1500
gcaatgcaaa cttattctgc tggagagact atcccggtg acaacctcgc gtatgatgcc	1560
gacttgagcg cctgggttga gtatatccc tacaacttcc gcctaaacta ccatgggtg	1620
ggtaactgct ccatgatgcc gaaggagatg ggcgggttg tegacaatgc tgcctgtg	1680
tatgggtgag agggactgcg agtcctgat gttctatct cccctacgca aatgtctcc	1740
catttgatga cggctcttta tgccatgccc ttgaaggttg cggatgccc ctggcgcat	1800
tatgcttcca tgcagtga	1818

- <210> 64
- <211> 1818
- <212> DNA
- <213> 黑曲霉

<400> 64	
atgtctactc tcttggag ctctctgtg gtctcctcg ctgggccc cccacactac	60
atcaggagca atggcatca agccagctc ctgactgacc caaggaggt tgcggccc	120
actgtcact acatcctgc tggtgaggt ctgactggac tcaccactgc tgcctctg	180
acggagaacc ccgatacct tgtgctgtc atcgaaagt gctcctacga gctgacaga	240
ggctctatca ttgaggacct gaaccttac ggtgacatt ttggcagcag tgtggaccac	300
gectacgaga ctgtcgaget egccaccaac aatcagactg cgtgatecg ctccggaaat	360
ggtctcgggtg gctctaccct cgtcaacggt ggcacctgga ctgcceccca caaggcacia	420
gttgactcat gggagaccgt cttcgaaat gagggetgga actgggacag cgtggccgcc	480
tactcctccc aggetgagcg tgctcgegea ccaaatgcca aacagattgc tgctggccac	540

[0073]

taetttaatg cafcctgeca tggatacaat ggtaactgtec acgeccggacc ccgcgatacc	600
ggtgatgact actoccccat cgtcaagget ctcctgagcg ctgtcgaaga caggggcgtt	660
cccaccaaga aggacttggg atgcggtagc ccccattggtg tgiccatgtt ccccacacc	720
tfgacagaag accaagtgcg ctcctgatgcc gctcgtgaat ggctcclecc caactaccag	780
cgteccaacc tgcaagtcct cactggacgg tatgttggaa aggtcctgct cagccagaac	840
gtaceacac ctogtgccgt tggcgtggaa ttcggcacc ccaaggcaaa caccacaaac	900
gictacgcta agcaagaggt cctcctggcc gctggatccg ctgtctctcc caccatcctc	960
gaatattccg gtatcggaa gaagtcatt ctagaccctc ttggaattga caccgtcgtt	1020
gacctgccg ttggtctcaa ccttcaggac cagaccacct ctaccgtccg ctacgcgatt	1080
acctccgccc gtgcgggaca gggacagccc gcttggttcg ctacttcaa cgagaccctt	1140
ggcgactacg ccgaaaaggc tcacgagctg ctcaacacea agctggagca gtggccgaa	1200
gagcccgctg cccgtggcgg attcacaac accaccgctt tgcctatcca gtacgagaac	1260
taccgcgact ggatgctcaa ggacaatgic gcatactcgg aactcttctc cgacaagccc	1320
ggagtggcca gtttccatgt gtgggatctt ctgcccttca ctagaggata cgtacacatc	1380
ctcgacaagg accctacct ccgccatttc gcatacgaac ctacgtactt tetcaacgag	1440
cttgacctgc tcggccagcc tgcgccact cagctggccc gcaacatctc caactccggt	1500
gccatgcaaa cttatttgcg tggagagact attcccggtg acaacctcgc gtatgatgcc	1560
gacttgagcg cctgggttga gtatctccg tacaacttcc gccttaacta ccatgggtgtg	1620
ggtacttget ccatgatgcc gaaggagatg ggcgggtgtg tcgacaatgc tgcctgtgtg	1680
tatgggtgtc agggactgcg agtcatgat ggttctatc ccctacgca aatgtcgtcc	1740
catectatga cggcttttta tgccatgccc ttgaaggttg cggatgcat cttgcccgat	1800
tatgcttcca tgcagtga	1818



FAD-GDH[P. 意大利青霉]	-MRS <sup>1</sup> LIGLALLPLAVAVPHASHKS-----DSTYDYIIVGGG 35
FAD-GDH[P. 薄刺青霉]	-MRS <sup>1</sup> LISLALLPLAAAVPHVSRSS-----ETTYDYIVVGGG 35
FAD-GDH[A. 米曲霉]	MLFSLAFLSALS <sup>1</sup> SLATASPAGRAKN-----TTTYDYIVVGGG 36
FAD-GDH[A. 土曲霉]	MLGKLSFLSALS <sup>1</sup> LAVAAPLSNST-----SAKYDYIVVGGG 35
GO[A. 黑曲霉]	MQTL <sup>1</sup> LVSSLVVSLAAALPHYIRSN <sup>1</sup> GIEASLLTDPKEVAGRTVDYIIAGGG 50
FAD-GDH[P. 意大利青霉]	TSGLV <sup>1</sup> VANRLSEQKDTTVLVIEAGGSVYN-NPNVNTILGYGKAFGTDIDW 84
FAD-GDH[P. 薄刺青霉]	TSGLV <sup>1</sup> IANRLSELEKVNVLVIEAGGSVYN-NPNVTDITAGYKAFGTDIDW 84
FAD-GDH[A. 米曲霉]	TSGLV <sup>1</sup> ANRLSENPDVSVLLEAGASVFN-NPDVTNANGYGLAFGSAIDW 85
FAD-GDH[A. 土曲霉]	TSGLAVANRLSEDPNVNVLILEAGGSVWN-NPNVTNVDGYGLAFGSDIDW 84
GO[A. 黑曲霉]	LTGLT <sup>1</sup> TAARLTENPDITVLVIESGSYESDRGPIIEDLNAYGDI <sup>1</sup> FGSSVDH 100
FAD-GDH[P. 意大利青霉]	AYETTAQEHAGGFPQ <sup>1</sup> IVRAGKALGGTSTINGMAYLRAQAAQIDAWE <sup>1</sup> TVG- 133
FAD-GDH[P. 薄刺青霉]	AYETVKQEWGGGKQ <sup>1</sup> TVRAGKALGGTSTINGM <sup>1</sup> VYLRAQKSQIDAWEKIG- 133
FAD-GDH[A. 米曲霉]	QYQSINQSYAGGKQ <sup>1</sup> VL <sup>1</sup> RAGKALGGTSTINGMAYTRAEDVQIDVWQKLG- 134
FAD-GDH[A. 土曲霉]	QYQSVNQPYGGNLSQ <sup>1</sup> VL <sup>1</sup> RAGKALGGTSTINGMAYTRAEDVQIDAWE <sup>1</sup> TIG- 133
GO[A. 黑曲霉]	AYETVELATN-NQ <sup>1</sup> TALIRSGNGLGGSTLVN <sup>1</sup> GGTWTWRPHKAQVDSWETVFG 149
	1                      2 3
FAD-GDH[P. 意大利青霉]	NKGWNWKTLLPYFKKSEQ <sup>1</sup> QDPAKYPFLDGS <sup>1</sup> GVSFDPAYHGFTG <sup>1</sup> PLKVGW 183
FAD-GDH[P. 薄刺青霉]	NDGWNWKNLFPY <sup>1</sup> YRKGKQVPTDYAFLEGTGVAYDPAFHIGYNG <sup>1</sup> PLKVGW 183
FAD-GDH[A. 米曲霉]	NEGWTWKDLLPY <sup>1</sup> YKSENLTAPTSSQVAAG--AAYNPAVNGKEG <sup>1</sup> PLKVGW 182
FAD-GDH[A. 土曲霉]	NTGWTWKNLFPY <sup>1</sup> YRKENFTVPTKSQTSLG--ASYEAGAHGHEG <sup>1</sup> PLDVAF 181
GO[A. 黑曲霉]	NEGWNWDSVAAYS <sup>1</sup> LQAERARAPNAKQIAAG--HYFNASCHING <sup>1</sup> T <sup>1</sup> VHAGP 197
	4
FAD-GDH[P. 意大利青霉]	SSTQLNDG-LAQKLNATYQSLDVPVPY <sup>1</sup> NRDANS <sup>1</sup> GDMVGYSVY <sup>1</sup> PKTVNADL 232
FAD-GDH[P. 薄刺青霉]	TSTQLNDG-LAQVMNSTYQ <sup>1</sup> NMSVVPY <sup>1</sup> PNKDPNGGQMVGYSVY <sup>1</sup> PKTVNSEL 232
FAD-GDH[A. 米曲霉]	SGSLASGN-LSVALNRTFQAAG--VPWVEDVNGGKMRGF <sup>1</sup> NIYPSTLDVDL 229
FAD-GDH[A. 土曲霉]	T-QIESNN-LTTYLNRTFQGMG--LPWTE <sup>1</sup> DVNGGKMRGF <sup>1</sup> NLYP-TVNLEE 226
GO[A. 黑曲霉]	RDTGDDYSPIVKALMSAVE <sup>1</sup> DRG--VP <sup>1</sup> TKDLGCGDPHGVS <sup>1</sup> MPNTLHEDQ 245
FAD-GDH[P. 意大利青霉]	NIREDAARAFYYPYQ <sup>1</sup> NRNLHVWLNTHANKITWN---EGSEATANGVEVT 279
FAD-GDH[P. 薄刺青霉]	NIREDAARAYYYPYQ <sup>1</sup> NRNLHVWLN <sup>1</sup> SHV <sup>1</sup> NKLVWK---DGANMTADGVEYK 279
FAD-GDH[A. 米曲霉]	NVREDAARAYYFPY <sup>1</sup> DDRKNLHLENTTANRLFWK-NGSAEEA <sup>1</sup> IADGVEIT 278
FAD-GDH[A. 土曲霉]	YVREDAARAYYWPY <sup>1</sup> KSRPNLHVLLNTFANRIVWDGEAHDGHITASGVEIT 276
GO[A. 黑曲霉]	-VRS <sup>1</sup> DAAREWLLPNYQ <sup>1</sup> RPNLQVLTGRYVGVK <sup>1</sup> VLLS--QNATTPRAVGVEFG 292
FAD-GDH[P. 意大利青霉]	LSNGKKT <sup>1</sup> VVKATREVILAAGALKSPV <sup>1</sup> LLELSG <sup>1</sup> VGNPDILSKHGITTKINL 329
FAD-GDH[P. 薄刺青霉]	FSNGTTATVKAAREVILAAGALKSP <sup>1</sup> LLELSG <sup>1</sup> VGNPDILSRHGIDTKINL 329
FAD-GDH[A. 米曲霉]	SADGKVTRVHAKKEVIISAGALRSP <sup>1</sup> LILELSG <sup>1</sup> VGNPTILKKNITPRVDL 328
FAD-GDH[A. 土曲霉]	SRNGTVRVINAKEKIVSAGALKSPA <sup>1</sup> LILELSG <sup>1</sup> IGNPSVLDKHNIPVKVNL 326
GO[A. 黑曲霉]	THRG <sup>1</sup> NTHNVYAKHEVLLAAGSAVSPTILEYSGIG <sup>1</sup> MKSILEPLGIDTVVDL 342

图 2



<u>AAGCTT</u> AAAA AAATGTCAC TCTCCTTGTG AGCTGCTTG TGGTCTCCCT CGCTGCGGCC	60
<i>Hind</i> III Kozak 序列	
CTCCACACT ACATCAGGAG CAATGGCATC GAAGCCAGCC TCCTGACTGA CCCCAGGAG	120
GTTGCCGGCC GCACTGTGCA CTACATCATC GCTGGTGGAG GTCTGACTGG ACTCACCCT	180
GCTGCCCGTC TGACGGAGAA CCCCATATC ACTGTGCTTG TCATCGAAAG TGGCTCCTAC	240
GAGTCTGACA GAGGTCCTAT CATTGAGGAC CTGAACGCTT ACGGTGACAT TTTTGGCAGC	300
AGTGTGGACC ACGCCTACGA GACTGTGCGAG CTCGCCACCA ACAATCAGAC TGCCTGTATC	360
CGCTCCGGAA ATGGICTCGG TGGCTCTACC CTCGTCAACG GTGGCACCTG GACTCGCCCC	420
CACAAGGCAC AAGTTGACTC ATGGGAGACC GTCTTCGGAA ATGAGGGCTG GAACTGGGAC	480
AGCGTGGCCG CCTACTCCCT CCAGGCTGAG CGTGTCTCGG CACCAAAATGC CAAACAGATT	540
GCTGTGCGCC ACTACTTTAA TGCATCCTGC CATGGTATCA ATGGTACTGT CCACGCCGGA	600
CCCCGCGATA CCGGTGATGA CTACTCCCC ATCGTCAAGG CTCTCATGAG CGCTGTCGAA	660
GACAGGGCGG TTCCCACCAA GAAGGACTTG GGATGCGGTG ACCCCCATGG TGTGTCCATG	720
TFCCCAACA CCTTGCACGA AGACCAAGTG CGTCTGATG CCGCTCGTGA ATGGCTCCTC	780
CCCAACTACC AGCGTCCCAA CCTGCAAGTC CTCACTGGAG GGTATGTTGG AAAGGTCCTG	840
CTCAGCCAGA ACGCTACCAC ACCTCGTGCC GTTGGCGTGG AATTCGGCAC CCACAAGGGG	900
AACACCCACA ACGTCTACGC TAAGCAGGAG GTCTCTCTGG CCGCTGGATC CGCTGCTCT	960
CCCACCATCC TCGAATATTC CCGTATCGGA ATGAAGTCCA TTCTAGAGCC TCTTGAATT	1020
GACACCGTGC TTGACCTGCC CGTGGTCTC AACCTTCAGG ACCAGACCAC CTCTACCGTC	1080
CGETCACGCA TTACCTCCGC CCGTGCCGGA CAGGGACAGG CCGCTTGGTT CGCTACCTTC	1140
AACGAGACCT TTGGCGACTA CGCCGAAAAG GCTCAGGAGC TGCTCAACAC CAAGCTGGAG	1200
CAGTGGGCGG AAGAGGCCGT CGCCCGTGGC GGATTCCACA ACACCACCGC TTTGCTCATC	1260
CAGTACGAGA ACTACCGCA CIGGATCGTC AAGGACAATG TCGCATACTC GGAACCTCTC	1320
CTCGACACGG CCGGAGTGGC CAGTTTCGAT GTGTGGGATC TTCTGCCCTT CACTAGAGGA	1380
TACGTACACA TCCTGACAA GGACCCCTAC CTCGCCATT TCGCATACTA CCCTCAGTAC	1440
TTTCTCAACG AGCTTGACCT GCTGGCCAG GCTGCCGCA CTCAGCTGGC CCGCAACATC	1500
TCCAACTCCG GTGCCATGCA AACTTATTC GCTGGAGAGA CTATTCCTCG TGACAACTC	1560
GCGTATGATG CCGACTTGAG CGCTGGGTT GAGTATATCC CGTACAACCT CCGCCCTAAC	1620
TACCATGGTG TGGTACTTG CTCCATGATG CCGAAGGAGA TGGCGGTGT TGTGACAAT	1680
GCTGCCCGTG TGATATGGTG GCAGGGACTG CGAGTCATCG ATGGTCTAT TCCCCTACG	1740
CAAATGTCGT CCCATGTTAT GACGGTCTTT TATGCCATGG CCTTGAAGGT TGGGGATGCC	1800
ATCTTGGCGG ATATATGCTTC CATGCAGTGA <u>CTCGAG</u>	1836 (序列号37)

*Xho*I

图 4



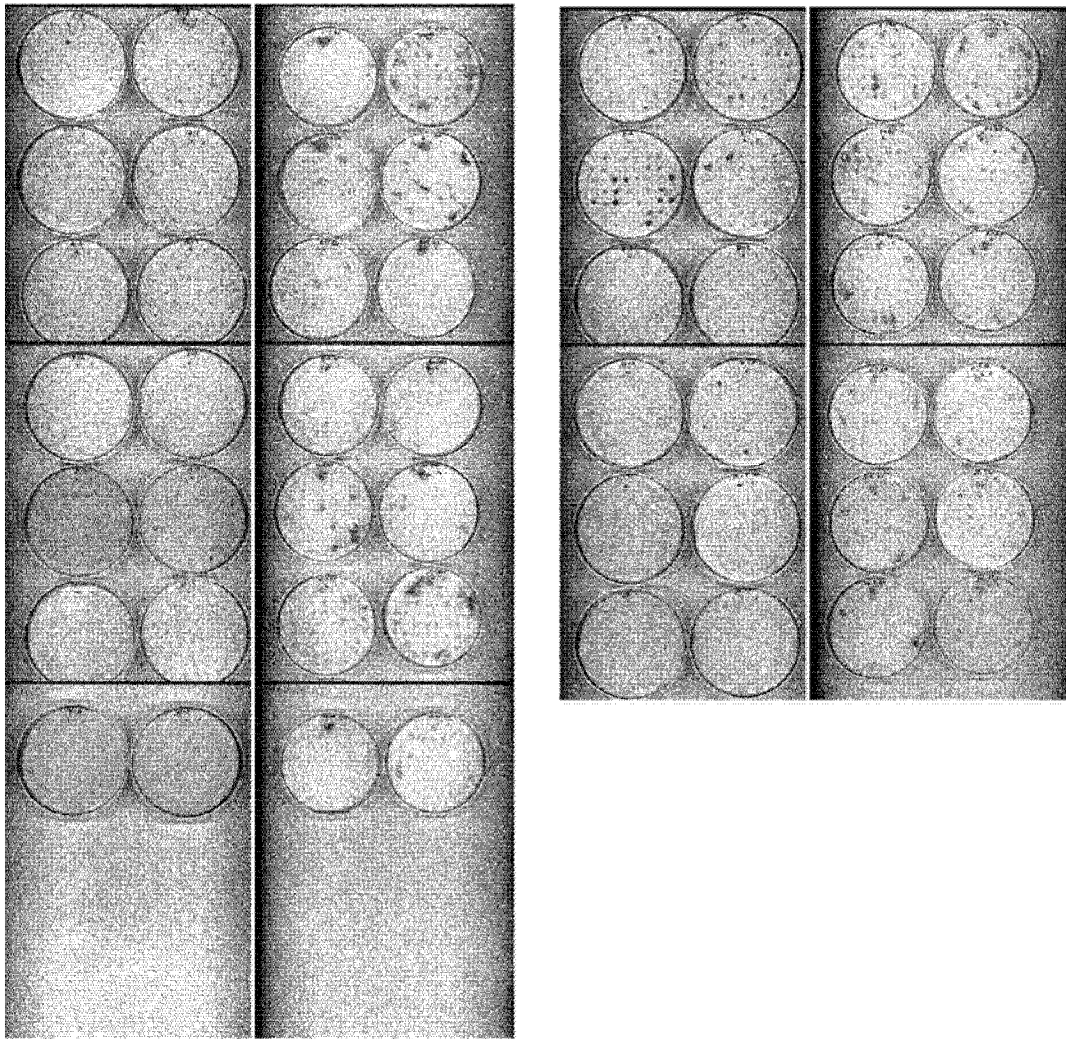


图 5

	GDH	GO	GDH/GO	
1:1-1-16	0.113	0.115	1.0	
2:2-1-6	0.015	0.004	3.8	
3:2-1-28	0.003	0.004	0.7	
4:3-1-26	0.179	0.032	5.6	
5:3-1-32	0.215	0.206	1.0	
6:3-2-26	0.769	0.131	5.9	
7:5-1-5	0.185	0.076	2.4	
8:5-1-8	0.016	0.006	2.7	
9:5-1-9	0.196	0.187	1.0	
10:5-1-10	0.026	0.01	2.6	
11:5-1-23	0.077	0.028	2.8	
12:5-1-25	0.033	0.014	2.4	
13:5-1-44	0.389	0.164	2.4	
14:5-1-45	0.036	0.014	2.6	
15:5-2-3	0.002	0.005	0.4	
16:5-2-4	0.036	0.013	2.8	
17:7-1-7	0.257	0.036	7.1	
18:7-1-16	0.068	0.02	3.4	
19:7-2-17	0.329	0.073	4.5	
20:7-2-21	0.099	0.026	3.8	
21:7-2-22	0.095	0.027	3.5	
22:7-2-26	0.091	0.028	3.3	
23:7-2-30	0.352	0.052	6.8	
24:7-2-33	0.111	0.036	3.1	
25:7-2-34	0.024	0.011	2.2	
26:7-2-38	0.083	0.024	3.5	
27:7-2-40	0.021	0.01	2.1	
28:7-2-42	0.295	0.038	7.8	
29:7-2-47	0.095	0.025	3.8	
30:8-1-7	0.051	0.054	0.9	
31:8-2-16	-0.003	0.004	-0.8	
32:9-2-46	0.053	0.039	1.4	
33:10-1-9	-0.005	0.005	-1.0	
34:10-1-26	-0.006	0.005	-1.2	
35:10-1-32	-0.002	0.004	-0.5	
36:10-1-42	0.011	0.008	1.4	
37:10-1-47	0.006	0.006	1.0	
38:10-2-5	0.006	0.004	1.5	
39:10-2-6	0.007	0.005	1.4	
40:10-2-7	0.006	0.005	1.2	
41:10-2-33	0.002	0.006	0.3	
42:12-1-8	0.01	0.007	1.4	
43:12-1-40	0.011	0.008	1.4	
44:12-1-48	0.057	0.03	1.9	
45:12-1-49	0.194	0.031	6.3	
46:12-2-24	0.101	0.018	5.6	
47:12-2-45	0.064	0.023	2.8	
48:13-2-9	0.01	0.006	1.7	
49:13-2-47	0.064	0.089	0.7	
50:pYES-GO	0.166	0.256	0.6	
51:pYES2	0	0.005	0.0	
GO <sup>2</sup> Amano <sup>2</sup>	GO	0.156	0.257	0.6
GDH <sup>8</sup> Amano <sup>8</sup>	FAD-GDH	1.896	0.003	632.0

图 6

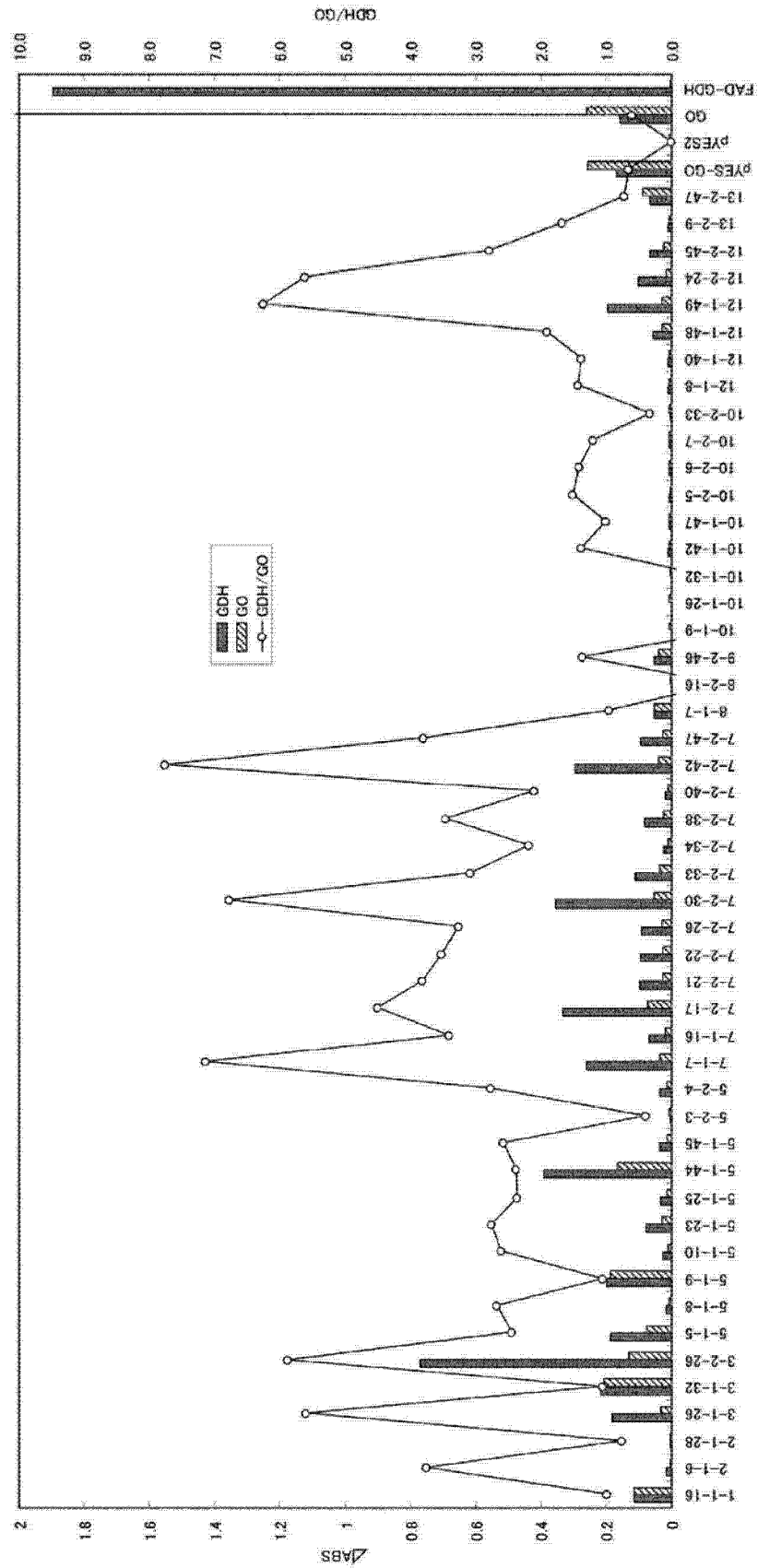


图 7

3-1-26	T132V
3-2-26	T132A
5-1-5	T353A
	T353H
5-1-9	T353A
5-1-44	T353A
7-1-7	D446H
7-2-17	D446S
	D446H
7-2-30	D446H
7-2-42	D446H
	D446R
12-1-49	V582S

图 8

GO突变株 糖底物特异性 (GDH测定)

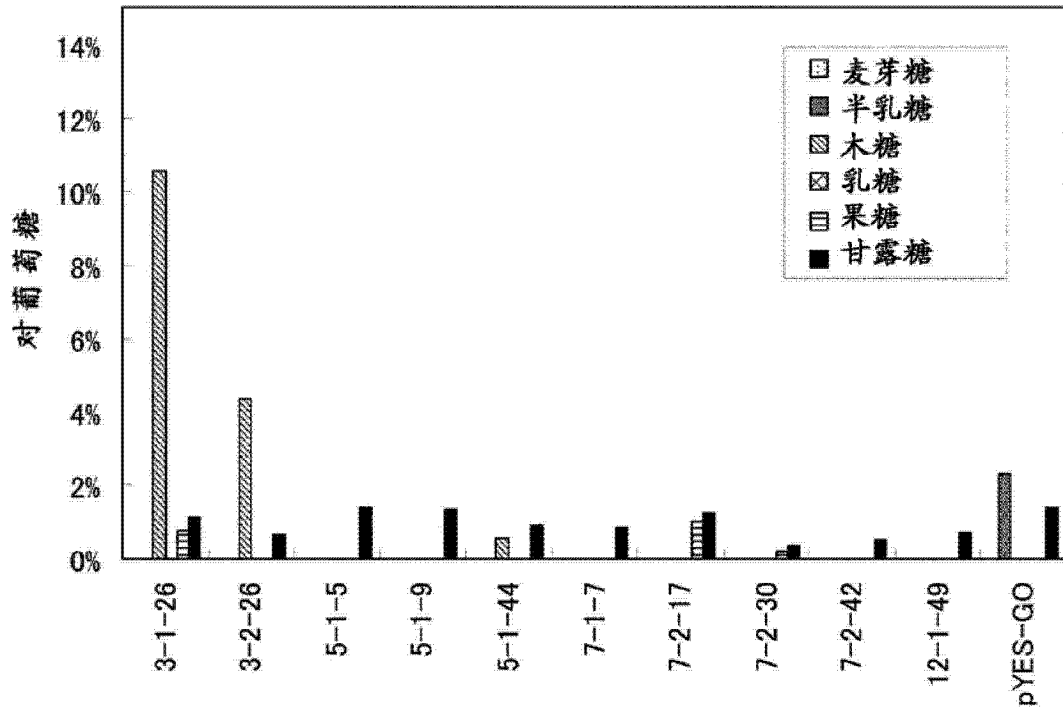


图 9

	与(1)对应	与(2)对应	与(3)对应	与(4)对应	与(5)对应	与(6)对应	与(7)对应	与(8)对应	与(9)对应	与(10)对应	与(11)对应	与(12)对应	与(13)对应
A.黑曲霉 (序列号1)	L115	G131	T132	V193	T353	F436	D446	Y472	I511	P535	Y537	V582	M583
P.尼崎青霉 (序列号2)	N115	D131	S132	V193	T353	F436	D446	N472	L511	P535	W537	V582	M583
P.意大利青霉 (序列号3)	I100	M116	A117	L179	N341	L426	E437	I462	T501	S526	Y528	L573	Q574
P.薄刺青霉 (序列号4)	T100	M116	V117	L179	N341	L424	E435	I460	S499	S524	F526	L571	Q572
A.米曲霉 (序列号5)	V101	M117	A118	L178	N340	L423	E435	I460	K489	S524	F526	L571	V572
A.土曲霉 (序列号6)	V100	M116	A117	L177	N338	L421	E433	I458	T496	S522	F524	L569	V570

图 10

	T132A	T353A	D446H	V582S	GO 测定		GDH 测定		GDH/GO
					测定值	$\Delta$ ABS	测定值	$\Delta$ ABS	
1 pYES-GO-M-1	○				0.099	0.098	0.586	0.570	5.8
2 pYES-GO-M-2		○			0.072	0.071	0.195	0.179	2.5
3 pYES-GO-M-3			○		0.016	0.015	0.215	0.199	13.3
4 pYES-GO-M-4				○	0.027	0.026	0.275	0.259	10.0
5 pYES-GO-M-5	○	○			0.037	0.036	0.208	0.192	5.3
5 pYES-GO-M-6	○		○		0.013	0.012	0.217	0.201	16.8
7 pYES-GO-M-7	○			○	0.013	0.012	0.746	0.736	60.8
8 pYES-GO-M-8		○	○		0.020	0.019	0.172	0.156	8.2
9 pYES-GO-M-9		○		○	0.013	0.012	0.281	0.265	22.1
10 pYES-GO-M-10			○	○	0.007	0.006	0.270	0.254	42.3
11 pYES-GO-M-11	○	○	○		0.008	0.007	0.093	0.077	11.0
12 pYES-GO-M-12	○	○		○	0.008	0.007	0.186	0.170	24.3
13 pYES-GO-M-13	○		○	○	0.003	0.002	0.126	0.110	55.0
14 pYES-GO-M-14		○	○	○	0.006	0.005	0.133	0.117	23.4
15 pYES-GO-M-15	○	○	○	○	0.003	0.002	0.064	0.048	24.0
16 pYES-GO-3					0.173	0.172	0.093	0.077	0.4
17 pYES2					0.001	0.000	0.036	0.020	-
18 0.02u/mL GO-2					0.147	0.146	0.139	0.123	0.8
19 0.02u/mL GDH-8					0.003	0.002	1.589	1.573	786.5
20 试剂空白					0.001	0.000	0.016	0.000	

图 11

	T132A	D446H	V582S	Dm	PMS-NTB 0.1% Triton X-100		∇10-5		活性 u/mL	蛋白量 μg/mL	比活性 u/mg
					测定值T	空白B:T-B	∇ABS	∇ABS			
pYES-GO-M-6	○	○		3	0.751	0.002	0.749	0.747	0.12	18.6	6.7
pYES-GO-M-7	○		○	3	1.267	0.001	1.266	1.264	0.22	24.7	8.8
pYES-GO-M-10		○	○	3	0.742	0.002	0.740	0.738	0.12	15.3	8.1
pYES-GO-M-13	○	○	○	3	0.433	0.002	0.431	0.429	0.07	17.9	3.8
GDH-8					1.420	0.001	1.419	1.417			
0.25u/mL					0.669	0.001	0.668	0.666			
0.1u/mL					0.353	0.001	0.352	0.350			
0.05u/mL					0.151	0.002	0.149	0.147			
0.02u/mL					0.003	0.001	0.002	0.000			
空白											

图 12



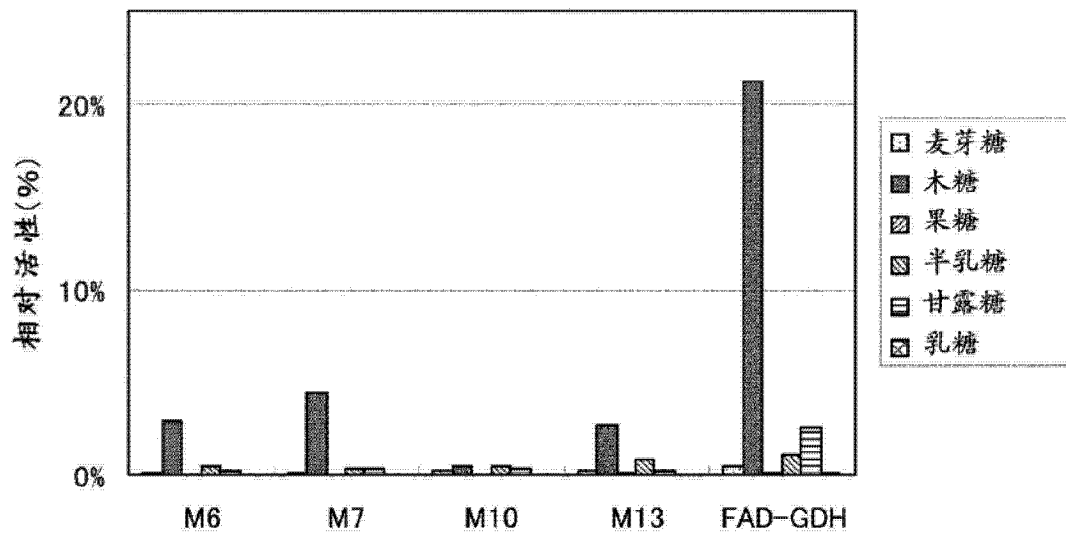


图 13

	GO 活性	GDH 活性	GDH/GO
D446H, V582S	0.007	0.157	24.2
D446H, V582R	0.008	0.281	35.1
D446H, V582L	0.021	0.665	31.7
D446H, V582P	0.000	0.761	—(*)

图 14

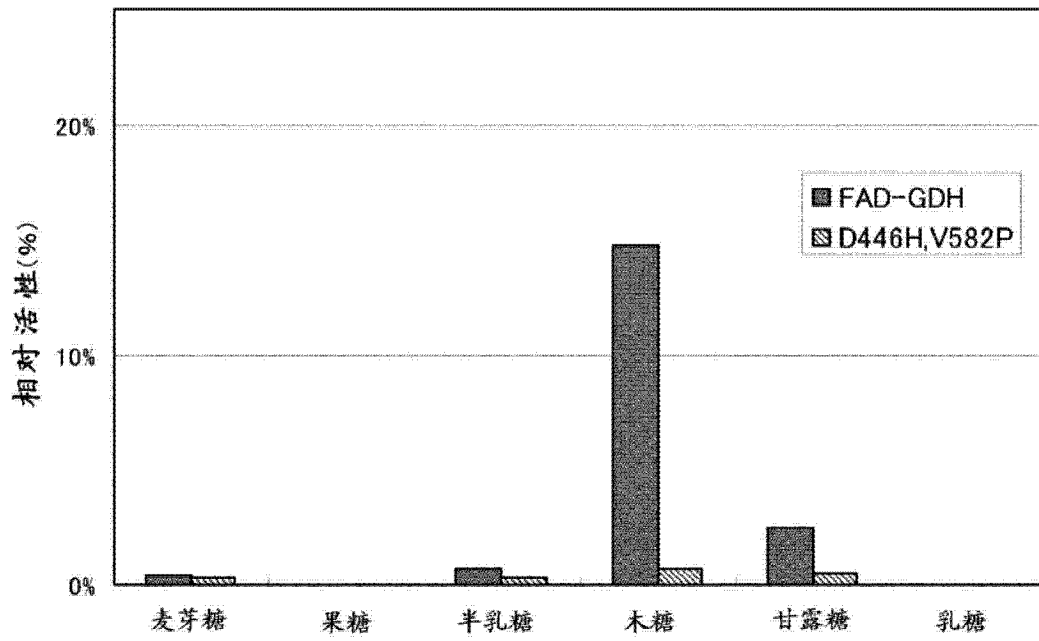


图 15