

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12N 9/20 (2006.01)

A23C 19/032 (2006.01)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480011539.1

[43] 公开日 2006年5月31日

[11] 公开号 CN 1780908A

[22] 申请日 2004.4.23

[21] 申请号 200480011539.1

[30] 优先权

[32] 2003.4.28 [33] DK [31] PA200300634

[32] 2003.8.14 [33] DK [31] PA200301163

[86] 国际申请 PCT/DK2004/000279 2004.4.23

[87] 国际公布 WO2004/097012 英 2004.11.11

[85] 进入国家阶段日期 2005.10.28

[71] 申请人 诺维信公司

地址 丹麦鲍斯韦

共同申请人 克尔·汉森公司

[72] 发明人 玛丽·A·斯特林格

蒂恩·M·法塔姆

沙姆坎特·A·帕特卡

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书 3 页 说明书 29 页 序列表 14 页

[54] 发明名称

磷脂酶和其生产方法

[57] 摘要

本发明涉及通过加工表达的真菌肽生产磷脂酶的方法和某些特定的磷脂酶。而且本发明提供用磷脂酶生产干酪的方法。

1. 生产磷脂酶的方法，其包括加工被表达的真菌肽以从 C-末端裂解肽和/或从 N-末端裂解肽以获得有磷脂酶活性的核心肽，其中核心肽包括：
- 5 a) 下列给出的氨基酸序列：SEQ ID NO:1 的氨基酸 146-153，SEQ ID NO:3 的氨基酸 87-94，或 SEQ ID NO:12 的氨基酸 79-86；或除了用另一个氨基酸取代单个氨基酸外与这些氨基酸序列任何一个相同的序列；和
- b) 位于 a)给出的序列的 N-末端侧的至少两个半胱氨酸残基；和
- c) 位于 a)给出的序列的 C-末端侧的至少两个半胱氨酸残基。
- 10 2. 权利要求 1 的方法，其中被表达的肽在用编码被表达肽的 DNA 转化的丝状真菌宿主细胞中表达。
3. 权利要求 2 的方法，其中宿主细胞是曲霉属，镰孢属或木霉属，特别是米曲霉，黑曲霉，*F. venenatum* 或 *T. reesei* 。
4. 权利要求 2 的方法，其中表达的肽被宿主细胞在体内加工。
- 15 5. 权利要求 1-4 任一项的方法，其中核心肽长度为 100-150 个氨基酸。
6. 权利要求 1-5 任一项的方法，其中磷脂酶具有特定的磷脂酶活性，其是表达的肽加工前活性的至少 2 倍。
7. 权利要求 1-6 任一项的方法，其中被表达的肽源自 *Tuber*，轮枝孢属，链孢霉属，曲霉属，或 *Helicosporium*，特别是 *T. borchii*，*T. albidum*，大丽花轮支孢，*V. tenerum*，粗糙链孢霉，米曲霉或 *Helicosporium* sp. HN1。
- 20 8. 权利要求 1-7 任一项的方法，其中当完全表达的肽序列与 SEQ ID NO:1，SEQ ID NO:3，SEQ ID NO:4，SEQ ID NO:5，SEQ ID NO:7，SEQ ID NO:8，SEQ ID NO:10，和 SEQ ID NO:12 给出的序列同时比对时，被表达的肽在与 SEQ ID NO: 1 氨基酸 97-101 比对的序列的 N-末端侧 0-18 氨基酸内
- 25 裂解。
9. 权利要求 1-8 任一项的方法，其中当完全表达的肽序列与 SEQ ID NO:1，SEQ ID NO:3，SEQ ID NO:4，SEQ ID NO:5，SEQ ID NO:7，SEQ ID NO:8，SEQ ID NO:10，和 SEQ ID NO:12 给出的序列同时比对时，被表达的肽在与 SEQ ID NO: 1 氨基酸 204-209 比对的序列的 C-末端侧 0-11 氨基酸内
- 30 裂解。
10. 权利要求 1-9 任一项的方法，其中被表达的肽的裂解在 Kex2 加工位点的 10 个氨基酸内或 FG 序列的 11 个氨基酸内或两者。

11. 水解磷脂的方法，其包括将磷脂与权利要求 1-10 任一项方法生产的磷脂酶接触。
12. 生产干酪的方法，其包括将干酪用乳或干酪用乳的成分与磷脂酶接触，其中磷脂酶包括：
- 5 a) 下列给出的氨基酸序列：SEQ ID NO:1 的氨基酸 146-153，SEQ ID NO:3 的氨基酸 87-94，或 SEQ ID NO:12 的氨基酸 79-86；或除了用另一个氨基酸取代单个氨基酸外与任何这些氨基酸序列等同的序列；和
- b) 位于 a)给出的序列的 N-末端侧的至少两个半胱氨酸残基；和
- c) 位于 a)给出的序列的 C-末端侧的至少两个半胱氨酸残基。
- 10 13. 生产干酪的方法，其包括将干酪用乳或干酪用乳的成分与权利要求 1-10 任一项方法生产的磷脂酶接触。
14. 磷脂酶，其是具有与下列序列至少有 80%同一性的氨基酸序列的多肽：
- SEQ ID NO: 10 (*T. albidum*)中的氨基酸 91-210，SEQ ID NO: 1 (*T. borchii*)
- 15 中的氨基酸 92-211，SEQ ID NO: 12 (*V. tenerum*)中的氨基酸 30-137，SEQ ID NO: 3 (大丽花轮支孢)中的氨基酸 38-145，SEQ ID NO: 4 (粗糙链孢霉)中的氨基酸 44-151，SEQ ID NO: 7 (米曲霉)中的氨基酸 37-157，或者 SEQ ID NO: 8 (粗糙链孢霉)中的氨基酸 58-168。
15. 磷脂酶，其包括：
- 20 a)由克隆到质粒中的 DNA 序列的编码磷脂酶部分编码的多肽，其中质粒在保藏号 DSM 15442 的大肠杆菌中；或
- b) 多肽，其包括 SEQ ID NO: 16 的氨基酸 29-149 的氨基酸序列，或包括可以将其通过取代，缺失，和/或插入一个或多个氨基酸而获得的氨基酸序列；或
- 25 c) (a)或(b)定义的多肽的类似物，其：
- i) 与该肽具有至少 80%同源性，或
- ii) 与抗该纯化形式的多肽的抗体发生免疫反应，或
- iii) 是该多肽的等位基因变体；或
- d)由核酸序列编码的多肽，该核酸序列在低严谨条件下与编码成熟多肽
- 30 的 SEQ ID NO: 15 核酸 133-495 的核酸序列的互补链杂交，或者其具有至少 100 个核苷酸的亚序列。

16. 权利要求 15 的磷脂酶，其是天然的镰孢属的菌株，特别是 *F. venenatum*。
17. 核酸序列，其包括编码权利要求 15 或 16 的磷脂酶的核酸序列。
18. 核酸序列，其包括：
- 5 a) 克隆到 DSM 15442 大肠杆菌中质粒上的编码成熟的磷脂酶的部分 DNA 序列，
- b) SEQ ID NO: 15 核酸 133-495 的编码成熟磷脂酶的部分 DNA 序列，
- c) (a)或(b)定义的序列的类似物，其编码磷脂酶并且：
- i) 与所述 DNA 序列具有至少 80% 同源性，或
- 10 ii) 与所述 DNA 序列的互补链高严谨杂交或其具有至少 100 个核苷酸的亚序列，
- iii) 是它们的等位基因变体；或
- d) a), b)或 c)的互补链。
19. 核酸构建体，其包括权利要求 17 或 18 的核酸序列，其可操作性地
- 15 连接于在合适表达宿主内能够指导磷脂酶表达的一个或多个控制序列。
20. 重组表达载体，其包括权利要求 19 的核酸构建体，启动子，和转录和翻译终止信号。
21. 包括权利要求 20 的核酸构建体的重组宿主细胞。
22. 生产磷脂酶的方法，其包括在利于磷脂酶产生的条件下培养权利要
- 20 求 21 的宿主细胞，和回收磷脂酶。
23. 制备面团或从面团制作烘烤的产品的方法，其包括向面团中加入权利要求 15 的磷脂酶。
24. 包括权利要求 15 的磷脂酶的面团组合物。
25. 包括表面活性剂和权利要求 15 的磷脂酶的去污剂组合物。
- 25 26. 减少植物油中磷含量的方法，其包括在水存在的情况下将油与权利要求 15 的磷脂酶接触，和然后从油中分离水相。
27. 生产干酪的方法，其包括用磷脂酶处理乳组合物，和从乳组合物生产干酪，其中磷脂酶是权利要求 15 的磷脂酶。
28. 生产干酪的方法，其包括用磷脂酶处理乳组合物，和从乳组合物生
- 30 产干酪，其中磷脂酶选自真菌的/细菌的组 X III PLA2 磷脂酶。

磷脂酶和其生产方法

5 技术领域

本发明涉及水解磷脂的方法，生产磷脂酶的方法，制作干酪(cheese)的方法，和磷脂酶。

背景技术

10 Soragni, E.等(2001)EMBO J. 20:5079-5090 公开了来自 *Tuber borchii* 的磷脂酶(TbSP1)和编码它的基因的 cDNA 核苷酸序列。下面的肽序列发表在所示的资源中，来源于所示的生物体：

- COGEME 植物致病(Phytopathogenic)真菌和 Oomycete EST 数据库，Unisequence ID: VD0100C34，大丽花轮支孢(*Verticillium dahliae*)。
- 15 • NCBI 蛋白质数据库，gi: 18307435，粗糙链孢霉(*Neurospora crassa*)
- NCBI 蛋白质数据库，gi: 16519372，*Helicosporium* sp. HN1
- WO0056762，序列号：5954，米曲霉(*Aspergillus oryzae*)
- TREMBL 蛋白质数据库，EAA28927，粗糙链孢霉(*Neurospora crassa*)
- 20 • 美国 6399121 公开了磷脂酶在干酪制造中的应用。

发明概述

发明者们分析了真菌组 X III 磷脂酶 A2 的已知的序列资料，并且从发表的序列资料或者通过筛选自然资源中相关序列，他们鉴定了额外的序列。25 通过在合适的宿主体内表达编码真菌组 X III 磷脂酶 A2，他们发现表达的序列包括在 N-末端或 C-末端或两侧偶联了肽序列的核心肽，并且在合适的宿主体内表达基因可以导致表达的肽断裂以获得核心肽，此核心肽在 N-末端或 C-末端没有任何肽延长。他们进一步发现没有任何肽延长的核心肽比连接30 有肽延长者具有明显更高的磷脂酶活性。最后，他们发现用此方法发现的核心肽在长度和序列上与 *Helicosporium* sp. (Wakatsuki, S. et al. (2001)

Biochim. Biophys. Acta 1522: 74-81)的未知功能的已知成熟肽相似,也和缺乏肽延长(extension)而不是分泌信号的细菌组X III磷脂酶A2相似(Sugiyama, M. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277: 20051-20058)。

5 发明者们也发现与真菌组X III磷脂酶A2有活性位点序列相似性和其半胱氨酸残基保守性的磷脂酶在干酪制造中是有用的。

此外,发明者从 *Fusarium venenatum* A3/5 中发现并分离了编码新磷脂酶的基因,镰孢霉菌 A3/5 最初保藏为 *Fusarium graminearum* ATCC 20334,最近被重新分类为镰孢霉菌,被 Yoder 和 Christianson, 1998, Fungal Genetics and Biology 23: 62-80; 和 O'Donnell 等, 1998, Fungal Genetics and Biology 10 23:57-67。磷脂酶属于真菌/细菌组X III PLA2,其由 Soragni 等定义: Soragni et al., The EMBO Journal, 20 (2001), 5079-5090。发明者也将新的磷脂酶编码基因克隆到大肠杆菌株,并用克隆的基因制备在米曲霉中表达 *Fusarium* 磷脂酶基因的构建体。发明者将米曲霉用此构建体转化,并从曲霉属 (*Aspergillus*)细胞中分离磷脂酶。

15 因此,发明提供生产磷脂酶的方法,其包括加工(processing)表达的真菌肽以从C-末端和/或从N-末端裂解掉肽以获得核心肽 (core peptide),其中核心肽包括:

a) 下列给出的氨基酸序列: SEQ ID NO:1 的氨基酸 146-153, SEQ ID NO:3 的氨基酸 87-94, 或 SEQ ID NO:12 的氨基酸 79-86; 或除了用 20 另一个氨基酸取代单个氨基酸外与任何这些氨基酸序列等同的序列; 和

b) 位于 a)给出的序列的N-末端一侧的至少两个半胱氨酸残基; 和

c) 位于 a)给出的序列的C-末端一侧的至少两个半胱氨酸残基。

发明也提供用本发明的磷脂酶水解磷脂的方法。而且发明提供通过将 25 干酪用乳(cheese milk)或干酪用乳的成分(fraction)与磷脂酶接触并从干酪用乳(cheese milk)生产干酪的方法。

最后,发明提供磷脂酶,其是与某些特定序列具有至少 80%氨基酸序列同一性的多肽。

30 附图说明

图 1 表示真菌组 X III 磷脂酶 A2 的氨基酸序列比对, 显示已知的加工位点(|)。活性位点共有的序列被标记下划线。保守的半胱氨酸残基在共有区的下面用 | 指示。用 Vector NTI 程序 suite v8 的 AlignX 程序进行比对。使用的算法是 ClustalW, 其带有 blosum62mt2 矩阵和 AlignX 默认设置。

5

发明详述

表达的肽

发明使用表达的真菌肽其属于由活性位点序列相似性所定义的组, 并且在 Soragni, E., et al. (2001) EMBO J. 20: 5079-5090 给出的组“真菌/细菌组 X III 磷脂酶 A2”定义中使用半胱氨酸残基保守性。肽是真菌的, 例如源自 Tuber, 轮枝孢属(*Verticillium*), 链孢霉属(*Neurospora*), *Helicosporum*, 或曲霉属, 特别是 *T. borchii*, *T. albidum*, 大丽花轮支孢(*V. dahliae*), *V. tenerum*, 粗糙链孢霉(*N. crassa*), *Helicosporium* sp. HN1 或米曲霉。

肽可以具有磷脂酶活性, 例如磷脂酶 A 活性, 例如磷脂酶 A1 和/或磷脂酶 A2 活性。

一些具体地例子是具有下面序列表中列出的氨基酸序列的已知肽。也说明了源生物体和参考文献:

- SEQ ID NO: 1. *Tuber borchii*. Soragni, E., et al. (2001) EMBO J. 20:5079-5090
 - 20 • SEQ IN NO: 3. 大丽花轮支孢, COGEME 植物致病真菌和 Oomycete EST 数据库, Unisequence ID: VD0100C34.
 - SEQ ID NO: 4. 粗糙链孢霉, NCBI 蛋白质数据库, gi: 18307435.
 - SEQ ID NO: 5. *Helicosporum* sp. HN1. NCBI 蛋白质数据库, gi:16519372.
 - 25 • SEQ ID NO: 7. 米曲霉, WO 0056762, SEQ ID NO: 5954.
 - SEQ ID NO: 8. 粗糙链孢霉, TREMBL 蛋白质数据库, EAA28927.
- 进一步, 发明者从天然来源分离具有所示序列的下面的真菌磷脂酶, 这些天然来源购自公共保藏库或保藏在所示的国家和年代:
- SEQ ID NO: 10. *Tuber albidum*. 购自 Centraalbureau voor Schimmel-cultures, Utrecht, 荷兰, 分离 CBS272.72
 - 30 • SEQ ID NO: 12. *Verticillium tenerum*. 爱尔兰, 1996

发明者将从 *T. albidum* (SEQ ID NO: 9) 来的基因插入大肠杆菌中并按照布达佩斯条约(Budapest Treaty)于 2003 年 2 月 12 日保藏克隆。在德国 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig 进行保藏, 并记录为保藏物号 5 DSM15441。

发明的一个实施方案中提供磷脂酶, 其是与以下氨基酸序列具有至少 80%, 例如 85%, 优选 90%, 更优选至少 95%氨基酸序列同一性的多肽: 与 SEQ ID NO: 10 (*T. albidum*)中的氨基酸 91-210, SEQ ID NO: 1 (*T. borchii*)中的氨基酸 92-211, SEQ ID NO: 12 (*V. tenerum*)中的氨基酸 30-137, SEQ ID NO: 3 (大丽花轮支孢)中的氨基酸 38-145, SEQ ID NO: 4 (粗糙链孢霉)中的氨基酸 44-151, SEQ ID NO: 7 (米曲霉)中的氨基酸 37-157, 或者 SEQ ID NO: 8 (粗糙链孢霉)中的氨基酸 58-168。

肽加工

通过分析列表中的磷脂酶序列, 发明者发现每个表达的氨基酸序列 15 由下述组成, 信号肽, 核心肽, 和附加在核心肽 C-或 N-末端, 或两端的功能未知的额外肽序列。

核心肽

核心肽特点是相同的活性位点序列相似性和半胱氨酸残基保守性, 其 20 由 Soragni, E., et al. (2001) EMBO J. 20: 5079-5090 在真菌的/细菌的组 X III 磷脂酶 A2 观察到。

在发明的优选实施方案中核心肽包括: a) 下列给出的序列: SEQ ID NO:1 的氨基酸 146-153, SEQ ID NO:3 的氨基酸 87-94, 或 SEQ ID NO:12 的氨基酸 79-86; 或除了用另一个氨基酸取代单个氨基酸与这些氨基酸序列 25 任何一个相同的序列; 和 b) 位于 a)给出的序列的 N-末端侧的两个半胱氨酸残基; 和 c) 位于 a)给出的序列的 C-末端侧的两个半胱氨酸残基。

位于 a)给出的序列的 N-末端侧的半胱氨酸残基之一可以与 a)给出的序列相隔例如 0-5 个氨基酸, 例如 0-3 个氨基酸, 优选 0-2 个氨基酸, 甚至更优选 1 个氨基酸。位于 a)给出的序列的 N-末端一侧的另一个半胱氨酸残基 30 可以与 a)给出的序列相隔例如 14-20 个氨基酸, 例如 15-19 个氨基酸, 优选 16-18 个氨基酸, 甚至更优选 17 个氨基酸。

位于 a)给出的序列的 C-末端侧的半胱氨酸残基之一可以与 a)给出的序列相隔例如 22-29 个氨基酸, 例如 23-28 个氨基酸, 优选 24-27 个氨基酸, 甚至更优选 25-26 个氨基酸。位于 a)给出的序列的 C-末端一侧的另一个半胱氨酸残基可以与 a)给出的序列相隔例如 27-49 个氨基酸, 例如 29-46 个氨基酸, 5 优选 30-43 个氨基酸, 甚至更优选 32-42 个氨基酸, 且最优选 35-40 个氨基酸。

在一个优选实施方案中核心肽包括四个半胱氨酸残基, 当完整表达的磷脂酶序列与 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, 和 SEQ ID NO:12 给出的序列 10 同时比对 (aglin) 时, 四个半胱氨酸残基分别与 SEQ ID NO:1 氨基酸 128, 144, 180, 和 194 的半胱氨酸残基比对(aligning)。

按照本发明, 将表达的多肽裂解以从附加肽上分离核心肽。裂解可以通过将其在合适的丝状真菌宿主内表达而在体内进行, 或者在体外, 例如通过用合适的蛋白酶如 Kex2 处理。

15 可以在 FG 序列的 11 个氨基酸里或 Kex2 位点序列的 10 个氨基酸里发现断裂点。Kex2 位点是例如 RR, KR, KK 或 RK。在一个实施方案中核心肽长度 100-150 氨基酸, 例如 110-140 个氨基酸, 115-133 个氨基酸, 118-129 个氨基酸, 或 118-126 个氨基酸。

在发明的一个实施方案中, 当完整表达的磷脂酶序列与 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, 和 SEQ ID NO:12 给出的序列同时比对时, 将表达的磷脂酶在与 SEQ ID NO: 1 的氨基酸 97-101 比对的序列的 N-末端侧 0-18 氨基酸中裂解, 例如 3-16 氨基酸, 优选 5-14 氨基酸。

25 在优选实施方案中, 当完整表达的磷脂酶序列与 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, 和 SEQ ID NO:12 给出的序列同时比对时, 将表达的磷脂酶在与 SEQ ID NO: 1 的氨基酸 204-209 比对的序列的 C-末端侧 0-11 氨基酸内裂解, 例如 0-9 氨基酸, 优选 0-7 氨基酸。

30 在优选的实施方案中, 加工后的磷脂酶具有特异的磷脂酶活性, 其比表达肽加工前的活性高, 例如, 在一个实施方案中特异的磷脂酶活性至少

是表达肽加工前的特异磷脂酶活性的 2 倍, 更优选至少 5 倍, 最优选至少 10 倍。在发明的一个实施方案中表达的肽在加工前没有测定到磷脂酶活性。

磷脂酶活性例如可以用在 pH8.0 和 40°C 水解大豆卵磷脂(L- α -磷脂酰胆碱)2 分钟的 LEU 实验来测定。磷脂酶活性表示为相对于标准, 保持恒定的 pH 必需的滴定消耗(0.1M NaOH)速度。

在丝状真菌宿主细胞中表达

丝状真菌宿主细胞可以是例如下列的细胞: 支顶孢属(*Acremonium*), 曲霉属, 镰孢属(*Fusarium*), 腐殖霉属(*Humicola*), *Myceliophthora*, 链孢霉属(*Neurospora*), 青霉属(*Penicillium*), *Rhizomucor*, *Thermomyces*, *Thielavia*,
10 *Tolyopcladium*, 或木霉属(*Trichoderma*), 特别是泡盛曲霉(*A. awamori*), 臭曲霉(*A. foetidus*), 日本曲霉(*A. japonicus*), 构巢曲霉(*A. nidulans*), 黑曲霉(*A. niger*), 米曲霉, *F. bactridioides*, *F. cerealis*, *F. crookwellense*, 大刀镰孢(*F. culmorum*), 禾谷镰孢(*F. graminearum*), 禾赤镰孢(*F. graminum*), 异孢镰孢(*F. heterosporum*), *F. negundi*(合欢木镰孢), 尖镰孢(*F. oxysporum*), 多枝镰孢(*F. reticulatum*), 玫瑰色镰孢(*F. roseum*), 接骨木镰孢(*F. sambucinum*), 肤色镰孢(*F. sarcochromum*), 拟分枝孢镰孢(*F. sporotrichioides*), 硫色镰孢(*F. sulphureum*), *F. torulosum*, *F. trichothecioides*, *F. Venenatum*, *H. insolens*,
15 *M. thermophila*, 粗糙链孢霉(*N. crassa*), 产紫青霉(*P. purpurogenum*), *R. miehei*, *Thermomyces lanuginosus*, *Thielavia terrestris*, *Trichoderma harzianum*,
20 *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, 绿色木霉(*Trichoderma viride*)。

在优选实施方案中宿主生物体是曲霉属, 镰孢霉属, 或木霉属的菌株, 特别是黑曲霉, 米曲霉, *F. venenatum*, 接骨木曲霉或 *F. cerealis*。

可以通过传统的方法进行转化, 培养, 表达, 回收, 例如通过 EP 238023,
25 EP 305216, WO9600787, EP 244234 或 T. Christensen et al., *BioTechnology*, 第 6 卷, 1988 年 12 月, 1419-22 描述的一般方法。

磷脂酶多肽和 DNA

在一个实施方案中, 本发明涉及有磷脂酶活性的多肽, 并且其中多肽包括, 优选由与 SEQ ID NO: 16(即成熟多肽)的氨基酸 29-149 有一定程度同
30 一性的氨基酸序列组成, 该同一性程度至少 80%, 例如至少 85%, 甚至更

优选至少 90%，最优选至少 95%，例如至少 96%，例如至少 97%，甚至最优选至少 98%，例如至少 99%。

5 优选地，多肽包括 SEQ ID NO: 16 的氨基酸序列；它们的等位基因变体；或具有磷脂酶活性的它们的片段。在另一个优选实施方案中，本发明的多肽包括 SEQ ID NO: 16 的氨基酸 29-149。在进一步优选的实施方案中，多肽由 SEQ ID NO: 16 的氨基酸 29-149 组成。

10 本发明也涉及多核苷酸其包括，优选由与 SEQ ID NO: 15 的核苷酸 133-495 至少 80%同源的核苷酸序列组成。优选地，核苷酸序列与 SEQ ID NO: 15 的核苷酸 133-495 具有至少 85%同源性，例如至少 90%同源性，甚至更优选至少 95%同源性，例如至少 96%同源性，例如至少 97%同源性，甚至最优选至少 98%同源性，例如至少 99%同源性。优选地，核苷酸序列编码具有磷脂酶活性的多肽。

15 在本申请中使用以 DNA 序列为基础设计的探针，磷脂酶可以源自镰孢霉属的菌株，特别是 *F. venenatum*。在一个实施方案中磷脂酶具有磷脂酶 A 的活性。

磷脂酶的生产可以通过用编码磷脂酶的 DNA 序列转化合适的宿主细胞，在允许酶产生的条件下培养转化的微生物，并从培养物中回收酶。

20 宿主微生物优选是真核细胞，特别是真菌细胞，例如酵母细胞或丝状真菌细胞，例如下列菌属的菌株：曲霉属，镰孢霉属，木霉属或酵母属，特别是黑曲霉，米曲霉，*F. venenatum*，接骨木曲霉，*F. cerealis* 或酿酒酵母，例如黑曲霉的产生葡萄糖淀粉酶的菌株，例如 US 3677902 中描述的那些或它们的变体。在这样宿主生物体中磷脂酶的生产可以通过 EP 238,023 (Novo Nordisk)，WO 96/00787 (Novo Nordisk)或 EP 244,234(Alko)描述的一般方法进行。

25 发明的表达载体通常包括作为启动子功能的控制序列，翻译起始信号，和，可选择地包括筛选标记，转录终止子，阻遏基因或各种激活基因。载体可以是自主复制载体，或者它可以被整合到宿主基因组中。

序列比对和同源性

30 核苷酸序列的比对可以使用 Vector NT1 Program Suite 7.0 的 AlignX 应用软件进行，使用默认设置，其使用改良的 ClustalW 运算法则(Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson T.J. (1994) Nuc. Acid Res. 22: 4673-4680)，

swgapdnarnt 得分(score)矩阵, 空位开放罚分(gap opening penalty)15 和空位延伸罚分(gap extension penalty)6.66。

氨基酸序列的比对可以使用 Vector NT1 Program Suite v8 的 AlignX 应用软件进行, 使用默认设置, 其使用改良的 ClustalW 运算法则(Thompson, J.D.,
5 Higgins, D.G., and Gibson T.J. 1994) , blosum62mt2 得分矩阵, 空位开放罚分 15 和空位延伸罚分 0.1。

在发明的一个实施方案中, 序列的比对和同源性得分的计算使用 Lipman-Pearson 方法进行(Lipman, D.J. and W.R. Pearson (1985) Rapid and sensitive protein similarity searches. Science 227: 1435-1441), 使用 PAM250 残
10 基 weight table(Dayhoff, M.O., R.M. Schwartz, and B.C. Orcutt (1978) A model of evolutionary change in proteins. In Dayhoff, M.O. (ed.), Atlas of Protein Sequence and Structure. National Biomedical Research Foundation. Washington, D.C. Vol 5. Suppl. 3: pp. 345-358)并用 Lasergene 软件包中 MegAlign 程序
15 v4.03 的默认设置(DNASTAR Inc., 1228 South Park Street, Madison, Wisconsin 53715)。默认设置是 K-tuple 为 2, 空位罚分(gap penalty)为 4, 和空位长度罚分(gap length penulty)为 12。

磷脂水解

可以将发明用于任何磷脂例如卵磷脂, 脑磷脂或 inositide 的水解。

通过替换磷脂酶, 可以将发明用作类似于以前的现有技术的方法和加工
20 工领域中, 例如用于烘烤产品 (WO 0032758, WO9953769)和蛋黄酱(GB 1525929, US4034124)的生产, 或植物油的处理(US 5264367)。

磷脂酶的应用

可以将发明的磷脂酶用于磷脂酶的各种工业应用, 例如下面所描述的。

用于烘烤

25 可以将发明的磷脂酶用于面团, 面包和蛋糕的制备, 例如改善面包或蛋糕的弹性。因此, 可以将磷脂酶用在制作面包的过程中, 包括向面团成分中添加磷脂酶, 捏制面团和将面团烘烤以制成面包。这可以按类似于 US 4567056 或 WO 99/53769 进行。

用于去污剂中

可以将变体用作去污剂的添加物，例如以每克去污剂中 0.001-10(例如 0.01-1)mg 的浓度(表示为纯的酶蛋白)，或每升洗涤液中 0.001-100(例如 0.01-10)mg 的浓度。

5 可以将发明的去污剂组合物配制成例如手洗或机洗去污剂组合物，其包括适于染色织物预处理的洗衣添加剂组合物和加有织物软化剂(softener)组合物的漂洗剂，或配制成用于普通家用硬表面清洗操作的去污剂组合物。在洗衣去污剂中，变体对去除脂肪渍，保持白色和污渍清除是有效的。洗衣去污剂组合物可以按照 GB2247025，WO 9901531 或 WO 9903962 描述的配制。

10 发明的去污剂组合物可以特别配制成适于手洗或机洗的餐具洗涤操作，例如按照 GB2,247,025 (Unilever)或 WO 99/01531(Procter & Gamble)描述的。在餐具洗涤(dishwashing)组合物中，变体对下列可能是有效的：去除油污/油渍，防止餐具和洗碗机的塑料成分被高度着色成分染色或脱色，和避免钙皂在餐具上的沉积。

15 其他应用

可以将发明的磷脂酶用于改善水溶液或糖浆的过滤性，其通过将水溶液或糖浆用磷脂酶处理。这特别适用于含有淀粉水解物的浆液，尤其是小麦淀粉水解物，因为它往往是难以过滤并使滤过物混浊。处理可以按类似于 EP 219,269(CPC 国际的)进行。

20 进一步，可以将发明的磷脂酶用于磷脂，优选卵磷脂的部分水解，以获得改善的磷脂乳化剂。这一应用在 Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (Publisher: VCH Weinheim (1996))，日本专利 2794574，和 JP-B6-087751 中有进一步描述。

25 进一步，可以将发明的磷脂酶用于动物饲料生产的加工，其包括将磷脂酶与饲料原料和至少一种磷脂混合。这可以按类似于 EP 743017 进行。

甚至进一步可以将发明的磷脂酶用于减少食用油中磷脂成分的加工，包括用磷脂酶处理油以水解大部分磷脂，并从油中分离含有水解的磷脂的水相。该过程适用于任何含有磷脂的食用油的纯化，例如植物油如大豆油，油菜籽油和向日葵油。可以将磷脂酶用于例如 JP-A 2-153997 和 US 5264367
30 描述的加工过程。

生产干酪的方法

可以将发明的磷脂酶按类似于 US 6399121 给出的方法用于生产干酪。

在发明的一个优选实施方案中，干酪的生产通过将干酪用乳或干酪用乳的成分与发明的磷脂酶接触并从干酪用乳生产干酪。

5 在进一步的优选实施方案中，干酪的生产通过将干酪用乳或干酪用乳的成分与磷脂酶接触，其中磷脂酶包括：

a) 下列给出的氨基酸序列：SEQ ID NO:1 的氨基酸 146-153，SEQ ID NO:3 的氨基酸 87-94，或 SEQ ID NO:12 的氨基酸 79-86；或其除了用另一个氨基酸取代单个氨基酸外与这些氨基酸序列任何一个相同的序列；；和

10 b) 位于 a) 给出的序列的 N-末端侧的至少两个半胱氨酸残基；和

c) 位于 a) 给出的序列的 C-末端侧的至少两个半胱氨酸残基。

在发明全文中短语干酪用乳意思是包括用于干酪生产的任何以乳为基础的组合物。干酪用乳的成分可以是干酪用乳的任何部分，例如奶油，脱脂乳，牛奶，酪乳，黄油或乳脂肪。

15 在优选实施方案中将干酪用乳或干酪用乳的成分与足量的发明的磷脂酶接触，该量足以减少干酪中去油效应和/或增加干酪产量。去油效应 (oiling-off) 是干酪在贮存和/或融化时形成游离油的倾向。

发明的一个方面涉及生产干酪的加工过程，其包括用发明的磷脂酶处理乳制品组合物并从乳制品组合物生产干酪。

20 发明的另一个方面涉及生产干酪的加工过程其包括用磷脂酶处理乳制品组合物并从乳制品组合物生产干酪，其中磷脂酶选自真菌/细菌组 X III PLA2 磷脂酶。在发明的优选实施方案中真菌/细菌组 X III PLA2 来自真菌，更优选来自属于 (Ascomycetes) 的真菌。属于真菌/细菌组 X III PLA2 的磷脂酶可以是任何属于 Soragni et al., The EMBO Journal, 20 (2001), 5079-5090 所定义的该组的磷脂酶，并且可以是例如从以下菌属：Tuber 属，例如 T. borchii，链霉菌属，例如 S. coelicor，轮枝孢属 (Verticillium)，例如大丽花轮枝孢 (v. danhliae)，曲霉属，例如米曲霉，链孢霉属，例如粗糙链孢霉，或 Helicosporum。

30 按照发明的乳制品组合物可以是任何包含乳成分的组合物。乳成分可以是乳的任何组分，例如乳脂肪，乳蛋白，酪蛋白，乳清蛋白质，和乳糖。乳级分 (fraction) 可以是乳的任何级分例如脱脂乳，黄油乳，乳清，奶油，奶粉，全脂奶粉，脱脂奶粉。在发明的优选实施方案中乳制品组合物包括乳，

脱脂乳，黄油乳，全乳乳清，奶油，或它们的任何组合。在更优选的实施
方案中乳制品组合物由乳，例如脱脂乳，全乳，奶油，黄油，或它们的任
何组合组成。

发明的加工过程中酶处理的进行可以通过将磷脂酶分散在乳制品组合
5 物中，并允许酶反应发生在合适的温度并保持合适的时间。用磷脂酶处理
可以在按照本领域熟知原则选择的适合所选用酶的条件下完成。

可以在任何合适的 pH 进行酶反应，例如在 2-10 的范围，例如在 pH4-9
或 5-7。在一个实施方案中磷脂酶处理在 3-60°C 进行，例如在 25-45°C(例如
至少 5 分钟，例如至少 10 分钟或至少 30 分钟，例如 5-120 分钟)。将磷脂
10 酶以合适的量加入以生产具有目的特性的干酪。优选地，将磷脂酶以有效
减少干酪去油效应和/或增加干酪产量的量加入。磷脂酶合适剂量通常在
每克乳脂肪中 0.001-0.5mg 酶蛋白的范围，优选每克乳脂肪中 0.01-0.3mg 酶
蛋白，更优选地，每克乳脂肪中 0.02-0.1mg 酶蛋白。

按本发明方法生产的干酪包括所有种类的干酪，例如 Campesino，
15 Chester, Danbo, Drabant, Herregard, Manchego, Provolone, Saint Paulin
软干酪(Soft cheese), Svecia, Taleggio, 白干酪(white cheese), 包括通过干酪
凝块的凝乳酶凝固(rennet-coagulation)生产的凝乳酶凝干酪；成熟干酪例如
Cheddar, Colby, Edam, Muenster, Gruyere, Emmenthal, Camembert, Parmesan
和 Romano；青纹奶酪(blue cheese), 例如丹麦青纹奶酪(Danish blue cheese)；
20 新鲜干酪例如 Feta；酸凝干酪例如奶油干酪, Neufchatel, Quarg, Cottage
Cheese, 和 Queso Blanco。在优选实施方案中发明涉及生产 pasta filata 干酪
例如 Mozzarella 和 Pizza 干酪的方法。通过在热水中新鲜凝块的独特的塑型
和控制处理，Pasta filata 或 stretched 凝乳，干酪通常是不一般的，该处理赋
予成品干酪特有的纤维结构和融化和延伸特性，参考例如 Paul S. Kindstedt
25 的“Mozzarella and Pizza cheese”， Cheese: Chemistry, physics and
microbiology, 第 2 卷: Major Cheese groups, 第 2 版, 337-341 页, Chapman
& Hall。

序列列表和微生物保藏

本申请包含序列列表中的信息，其附属于本申请并且也随本申请以数据
30 载体提交。此外，本申请提及保藏的微生物。数据载体的内容和保藏的微
生物在此全部引入以作参考。

生物材料的保藏

下列生物材料已经按照 Budapest 条约保藏在 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, 德国, 并给出下列保藏号:

5	保藏物	保藏号	保藏日
	大肠杆菌	DSM 15441	2003 年 2 月 12 日
	大肠杆菌	DSM 15442	2003 年 2 月 12 日

材料与方法

培养基

10 YP+2%G 培养基

10g 酵母提取物
20g 蛋白胨
加水至 1 升
于 121°C 高压灭菌 20 分钟

15 加入 100ml 20% 无菌葡萄糖溶液

RA 孢子形成培养基

50g 琥珀酸
12.1g 硝酸钠
1g 葡萄糖

20 20ml 50 × Vogel's 盐(Davis, R.H. and F. J. de Serres (1970), Meth. Enzymol. 17A: 79-143)

将成分在 1 升蒸馏水中混匀并过滤除菌

Britton Robinson 缓冲液

0.023M 磷酸
0.023M 乙酸
0.023M 硼酸

25 用 NaOH 或 HCl 滴定到目的 pH

方法

磷脂酶活性(LEU)

30 将卵磷脂在恒定 pH 和温度下水解, 磷脂酶活性测定为中和游离脂肪酸过程中滴定(0.1N NaOH)消耗的速度。

底物是大豆卵磷脂(L- α -磷脂酰胆碱), 条件是 pH 8.00, 40.0°C, 反应时间 2 分钟。单位是相对于标准来定义的。

实施例

实施例 1: 米曲霉中源于 *Tuber albidum* 的磷脂酶 A2 表达

- 5 将 Soragni 等(出处同上)公开的 DNA 序列用于设计从基因组 DNA 进行 TbSP1 PCR 扩增的引物, 向引物末端加入适当的限制性位点以利于 PCR 产物(SEQ ID NO: 13 和 14)的克隆。从 CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utecht, 荷兰)获得 *Tuber albidum* 株, CBS 272.72, 并按 CBS 培养物表 1996 上建议的于 20°C 培养在 X-琼脂上。从板的表面去除菌丝体, 并
- 10 按照生产商的说明使用 FastDNA Spin Kit (BIO101, Inc., Vista, CA) 分离总 DNA。用 Extensor Hi-Fidelity PCR Master Mix (ABgene, Surrey, U.K.)按照生产商的说明进行 PCR 扩增, 并在最初 5 个循环使用 52°C 的退火温度, 后面 25 个循环使用 62°C 退火。获得了单一 PCR 产物, 并且将序列进行测定并表示为 SEQ ID 9, 其排除了添加的合成的限制性位点。基因组序列与 E. Soragni
- 15 等提交的 cDNA 序列对比显示有单个内含子。当将内含子去除, 从 *T. albidum* CBS272.72 来的核苷酸序列与 E. Soragni 等使用的菌株 *T. borchii* ATCC 96540 的序列 92.5% 同一性。从 *T. albidum* CBS272.72 基因序列预测的相应的肽与 Soragni 等报道的肽序列 93.8% 同一性。

- 使用标准技术将 PCR 片段用 BamH I 和 Xho I 限制性酶切并克隆到曲
- 20 霉属表达载体 pMStr57 中。表达载体 pMStr57 含有与 pCaHj483 (WO 98/00529)相同的元件, 具有对曲霉属 NA2 启动子的最少修饰, 并有用于在大肠杆菌中筛选和繁殖的序列, 和用于在曲霉属中筛选和表达的序列。具体地, 通过构巢曲霉的 amdS 基因使在曲霉属中筛选变得容易, 其允许使用乙酰胺作为唯一的氮源。在曲霉属菌种中的表达由来自黑曲霉的修饰的中性淀粉酶 II (NA2) 启动子介导, 该启动子被融合到来自构巢曲霉的丙糖磷酸异构酶(tpi)编码基因的 5' 前导序列, 并且终止子来自黑曲霉的淀粉葡萄糖苷酶的编码基因。将所得到曲霉属菌种表达构建体 pMStr57 的磷脂酶 A2 编码
- 25 基因测序, 并将序列与以前测定的未克隆的 PCR 片段 SEQ ID 9 对比。发现在终止密码的下游 52bp 处一个 T 突变成 C。

- 30 使用 Christensen, T. et al., (1988), *Biotechnology* 6, 1419-1422 描述的标准技术, 用 pMStr57 转化米曲霉。将转化体在 YP+2%G 培养基中于 30°C,

振荡 275RPM 培养, 并用 SDS-PAGE 监测 Tuber 磷脂酶 A2, TbPLA2 的表达。

蛋白鉴定

SDS-PAGE 显示大约分子量为 25 和 16kDa 的两条带。将上清在 SP-琼脂糖柱上用离子交换层析纯化, 柱用 50mM 乙酸盐缓冲液平衡, 用 1M NaCl pH 5.0 洗脱。两种蛋白质洗脱在两个不同的组分中。用 Roche 的 Protein Assay ESL 测定蛋白质的浓度。用 LEU 实验测定活性。

	分子量 kDa	浓度 mg/ml	活性 LEU/ml	比活性 LEU/mg
Pool 1	23-25	1.32	61	46
Pool 2	16	0.42	272	648

将蛋白质进行 N-末端测序。发现 Pool 1(23-25kDa 带)的 N-末端序列相应于 SEQ ID NO: 10 的氨基酸 32-50。Pool 2(16kDa 带)的印迹显示具有 N-末端序列分别相应于氨基酸 86-98 和 91-103 的两条带。两条带的质谱分析显示质量分别为 13934 和 14348 Da, 分别与 SEQ ID NO: 10 的氨基酸 86-210 和 91-210 序列的计算值相差 5 Da 以内。

15 实施例 2: 在米曲霉中表达的两种形式的 T. albidum PLA2 的纯化方法

在实施例 1 描述的产生 T. albidum PLA2 的米曲霉转化体的大多数发酵物纯化过程中检测到两种类型的酶。一种类型在 SDS-PAGE 中电泳在 22-23kDa 并相应于 Soragni 等(出处同上)报道的肽。此外, 检测到一种新类型, 其电泳在 SDS-PAGE 的 16-17kDa 并具有高度比活性和高等电点。

20 22-23kDa 肽的纯化

将来自在米曲霉中表达的含有源于 T. albidum 的磷脂酶的(实施例 1 中制备的)发酵上清过滤除菌, 其使用购自 Seitz Schenk Bad Kreuznach, Bettringerstrasse 42, Germany D-73550, Waldstetten 的 EKS 滤器。

然后调节无菌过滤的上清至 pH 8 和离子强度在 4 mSi 以下。

25 阴离子交换层析

纯化的第一步使用购自 Amersham Pharmacia 的 50ml Fast flow QTM 琼脂糖柱上阴离子交换层析进行。将柱用 50mM Tris 乙酸盐缓冲液 pH 8 预平

衡。然后将无菌过滤的发酵液加在柱上，并将柱用同样缓冲液洗涤直至所有未结合物质被洗掉。

将结合的蛋白质用含有 1M 氯化钠 pH 8 的相同缓冲液以 5ml/min 的流速洗脱，并且最终体积达 500ml 总缓冲液。以每 5ml 一个级分用级分收集器收集，所有级分含有的磷脂酶活性使用购自 Sigma 产品号 P-5638 的 L- α -磷脂酰胆碱以卵磷脂作为底物定性测定，并且测定活性使用购自德国 Wako Chemicals GmbH, Nissan Strasse 2, 41468 Neuss 的 NEFA C 试剂盒。详细的测定描述如下。

用不同缓冲液制备含有 10mg/ml 卵磷脂底物的底物溶液，例如用含有 10 购自 Fluka chemicals 的 2 mM CaCl_2 和 0.1% Triton X-100 的 50mM 乙酸盐 pH 5 或 50mM HEPES pH 7 或 50mM Tris 乙酸盐 pH 9 作为缓冲液。通过搅拌并加温成 50°C 使底物乳化，然后冷却至 40°C 并用作底物。

活性的测定如下进行：用 300 μl 底物乳化剂与 25 μl 酶级分在 40°C 保温 20 分钟，然后将 30 μl 测定混合物转移至按生产商描述制备的 300 μl 15 NEFA C 显色试剂 A，并于 37°C 保温 10 分钟，向混合物加入 600 μl 显色试剂 NEFA C B 溶液并再保温 10 分钟。然后将所形成的蓝色在分光光度计上于 505nm 测定。

蛋白鉴定

然后将含有活性的级分混合，并用 SDS-PAGE 电泳分析分子量特征，20 电泳使用购自美国 Invitrogen Life Technologies, Carlsbad CA 92008 的 Novex Pre casted gels 4-20% Tris-甘氨酸凝胶。

检测和印迹了 22-23kDa 的蛋白质并用 Applied Biosystem 测序仪进行 N-末端分析。

测定了 N-末端的前 19 个氨基酸残基并发现具有 SEQ ID NO: 10 的氨基 25 酸 32-50 序列。

16-17kDa 肽的纯化

将来自表达在米曲霉中 *T. albidum* 的过滤除菌发酵上清调节至 pH 4.7 并将离子强度调节至 4 mSi 以下。

阳离子交换层析

SP-sepharoseTM fast flow 购自 Amersham Pharmacia。 填充 50ml 的柱并用 50mM 乙酸盐缓冲液 pH 4.7 平衡，然后将发酵上清加在柱上，并将未结合物质用同样缓冲液洗去。

5 将具有高等电点的结合蛋白质用含有 1M 氯化钠的 pH 4.7 的 50mM 乙酸盐缓冲液进行线性盐梯度洗脱。级分和流速与用于低等电点类型磷脂酶的相同。在级分中的磷脂酶活性按照上面用 NEFA 试剂盒定性测定。将含有磷脂酶活性的级分混合并按照上面描述的进行 SDS-PAGE。

观察 16-17kDa 蛋白质其具有高等电点，在 9 以上。

10 蛋白质印迹后使用 Applied Biosystem 测序仪进行蛋白质的 N-末端分析，其显示出完全不同于 Soragni 等(出处同上)发表的 N-末端。因此，发现 *T. albidum* PLA2 具有两种类型，其源自不同的 N-末端加工，具有分别相应于 SEQ ID NO: 10 氨基酸 86-105 和 91-110 的 N-末端序列。

实施例 3: 用 *T. albidum* 磷脂酶的干酪制作

15 使用巴氏杀菌的，非均质奶油(北卡罗来纳州大学乳品厂(North Carolina State University Dairy Plant)将五百克巴氏杀菌的，非均质脱脂乳(北卡罗来纳州大学乳品厂)标准化为 3.5%脂肪因此生产全脂 mozzarella 干酪。将每个实验用的干酪用乳或者用按照实施例 2 制备的 16-17kDa *T. albidum* 磷脂酶，或者用商业磷脂酶 Lecitase®10L(Novozymes A/S, Bagsvaerd, 丹麦)处理，并放置在 35℃ 水浴中直至平衡至该温度。测量干酪用乳的起始 pH 并加入 20 0.01%(w/w)引子培养物。

监测 pH 直至 pH 达到 6.4。将 250 μl 凝乳酶(rennet)(Novozym 89L)用去离子水稀释至 9ml 总溶液，将 1ml 该溶液加入干酪用乳中并用力搅拌干酪用乳 3 分钟。取出搅拌子并允许凝乳酶凝的乳品放置于 35℃。

25 上面的处理之后，当将抹刀(spatula)插入可以看见明显的边界时则凝乳准备好进行切割。干酪的切割通过把刀压下并且当触到烧杯时快速反转刀具(cutter)并最后将刀拔出进行。允许凝乳放置 5 分钟然后用匙轻轻搅动。温度升至 41℃ 伴随间断的轻轻搅动 ~ 45 分钟或直至 pH 降至 6.0-5.9。将凝乳用干酪用粗棉布沥干然后放回烧杯中并保持在 41℃ 水浴中，根据需要倒出乳清。

当凝乳达到 pH5.3 时，将盛有凝乳的不锈钢碗在 69℃ 水浴中浸泡 (flood)5 分钟然后用手拉伸。将凝乳在冷的冰水中处理(temper)30 分钟。将干酪凝乳用纸巾干燥，称重并冷藏过夜。

除了不加磷脂酶，对照干酪制作实验用同一批号乳品按照同样程序进行。

实际干酪产量计算为相对于干酪用乳总重量拉伸(stretch)后干酪的重量。

调节过湿度的干酪产量表示为调节至标准恒定湿度水平的实际产量。调节过湿度的产量通过实际产量乘以实际湿度对标准湿度比来计算，并按照下面公式：

$$Y_{\text{adj}} = (Y_{\text{act}} \times 1 - M_{\text{act}}) / (1 - M_{\text{std}})$$

其中 Y_{adj} = 调节过湿度的干酪产量， Y_{act} = 实际干酪产量， M_{act} = 实际湿度分数 & M_{std} = 标准湿度分数 (0.48)

所有实验组和对照组的调节过湿度的干酪产量如表 1 所示。

表 1

处理	磷脂酶 mg 酶蛋白/g 脂肪	调节过湿度的干酪产量	比对照增加的产量
对照	0	10.72	
T. albidum PLA2	0.055	11.04	2.9%
对照	0	11.25	
T. albidum PLA2	0.055	11.57	2.8%
对照	0	9.22	
Lecitase® 10L	0.18	9.48	2.7%
对照	0	9.62	
Lecitase® 10L	0.18	9.90	2.8%

实施例 4: 源于 *Fusarium venenatum* 的磷脂酶(FvPLA2)在米曲霉中克隆和表达

- 5 将 *Fusarium venenatum* A 3/5 的细胞(最初保藏为禾谷镰孢 ATCC 20334, 最近被重新分类为 *Fusarium venenatum*: 被 Yoder 和 Christianson, 1998, *Fungal Genetics and Biology* 23: 62-80; 和 O'Donnell 等, 1998, *Fungal Genetics and Biology* 23:57-67.)在 Vogel's 最低限度培养基(Davis, R. H. and F. J. de Serres (1970), *Meth. Enzymol.* 17A: 79-143)中于 28°C 震荡培养生长两天, 用无菌 Miracloth (Calbiochem, 圣地亚哥, 加利福尼亚, 美国)过滤, 并
- 10 转移至“RA 孢子形成培养基”中, 将其于 28°C 再摇动培养保温 24 小时。离心收集细胞和孢子并裂解, 提取 RNA 并转录成 cDNA, 将该 cDNA 按 WO 00/56762 描述的方法克隆到 pZErO-2 中。扩增前此文库中独立克隆的数目是 2.5×10^5 , 其中 92% 含有插入序列, 其大小从 550-2500bp 不等。对
- 15 大约 1000 个随机选择克隆进行局部 DNA 测序测定, 并将序列按照 WO 00/56762 描述的方法存储在计算机中。

E. Soragni 等 2001 年报道了编码一种 *Tuber borchii* 的磷脂酶 A2 - TbSP1 的 cDNA 核苷酸序列, 和相应翻译的肽。用 TFASTXY 程序, 3.3t08 版(Pearson et al., 1997)将该翻译的肽与 *Fusarium venenatum* 部分 cDNA 序列的翻译产物

对比。F. venenatum 序列的一个翻译产物与 TbSP1 具有 125 个氨基酸重叠的 42% 同源性。测定相应克隆 FM0700 的 cDNA 插入子全序列, 并用 SEQ ID NO: 15 显示, 从此序列翻译的肽, FvPLA2 用 SEQ ID NO: 16 显示。将此序列用作设计从 FM0700 PCR 扩增编码 FvPLA2 的基因的引物 FvPLA1 和 FvPLA2.2, 其有加于引物末端的合适的限制性位点以利于 PCR 产物的亚克隆。

FvPLA1: CTGGGATCCTCAAGATGAAGTTCAGCG

FvPLA2.2: GACCTCGAGACCCGCCATTTAAGATT

使用 Extensor Hi-Fidelity PCR Master Mix (AB-gene, Surrey, U.K.) 按照生产商的说明进行 PCR 扩增, 并使用 52°C 的退火温度和 60°C 的延伸温度进行 20 个循环。

使用标准技术将 PCR 片段用 BamH I 和 Xho I 限制性酶切并克隆到曲霉属表达载体 pMStr57 中。表达载体 pMStr57 含有与 pCaHj483 (WO 98/00529) 相同的元件, 并如 WO 01/12794 中对载体 pMT2188 所描述的具有对曲霉属 NA2 启动子的最少修饰, 并有在大肠杆菌中筛选和繁殖的序列, 和在曲霉属中筛选和表达的序列。具体地, 通过构巢曲霉的 amdS 基因使在曲霉属中筛选变得容易, 其允许使用乙酰胺作为唯一的氮源。在曲霉属 (Aspergillus) 中的表达由来自黑曲霉的修饰的中性淀粉酶 II (NA2) 启动子介导, 该启动子被融合到来自构巢曲霉的丙糖磷酸异构酶 (tpi) 编码基因的 5' 前导序列, 并且终止子来自黑曲霉的淀粉葡萄糖苷酶的编码基因。将所得到的曲霉属表达构建体 pMStr77 的磷脂酶编码基因测序, 序列与以前测定的 FM0700 的插入子完全一致。

使用标准技术 (Christensen, T. et al., 1988) 用 pMStr57 转化米曲霉菌株 BECh2 (WO 00/39322)。将转化体在 YP+2%G 培养基中于 30°C, 275RPM 摇动培养, 并用 SDS-PAGE 监测 FvPLA2 的表达。

发明者将含有从 F. venenatum 来的磷脂酶编码基因的大肠杆菌 (Escherichia coli) 菌株按照 Budapest 条约的条款保藏, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, 德国, 贮存日期为 2003 年 2 月 12 日, 登录号为 DSM15442。

30 实施例 5: FvPLA2 的纯化和序列比对

将从实施例 4 发酵物的 FvPLA2 在 SP-琼脂糖柱上用离子交换层析纯化，其中柱用 50mM 乙酸盐缓冲液 pH 4.7 平衡并用 1M NaCl pH 4.7 洗脱。级分用 SDS-PAGE 分析，将含有 14kDa 蛋白质的级分混合。纯的蛋白质的同一性通过测定 N-末端序列来确认，其与 SEQ ID NO: 16 的氨基酸 (aa) 5 29-40 序列相同。此外，由于从 SDS-PAGE 估计的表观大小，14kDa，小于通过加工 SEQ ID NO: 16 中理论肽而预测的肽的大小，所以用质谱分析判断肽的质量。发现纯化的，激活的 FvPLA2 质量为 13336kDa。此分子质量意味着在 C-末端的另外的加工，并与 SEQ ID NO: 16 中氨基酸 149 和 150 间的断裂一致，因为从氨基酸 29 到 149 的肽序列具有理论质量 13335,66Da。

10 加工成熟的肽(SEQ ID NO: 16 的氨基酸 29-149)与已知序列的比对显示最接近的本领域的以前序列是从 Unisequence ID: VD0100C34 翻译的大丽花轮支孢的磷脂酶，其中 Unisequence ID: VD0100C34 属于 COGEME 植物致病真菌和 Oomycete EST 数据库版本 1.2 (<http://cogeme.ex.ac.uk/>) (Soanes et al. 15 Genomics of phytopathogenic fungi and the development of bioinformatic resources. Mol Plant Microbe Interact. 15 (5): 421-7)。通过与发现的 FvPLA2 加工对比估计从大丽花轮支孢序列预测的部分肽的加工。计算 SEQ ID NO: 16 的氨基酸 29-149 与大丽花轮支孢磷脂酶成熟肽的估计序列的同源性为 77%。

实施例 6: FvPLA2 的物理特性

20 催化活性

对实施例 4 的 FvPLA2 用 LEU 实验来测定作为酶浓度函数的磷脂酶活性。结果如表 1 所示。

表 1

酶浓度 (μ g/ml)	LEU (μ eq NaOH/min)
71.1	14.0
53.3	12.7
21.3	10.6
10.7	7.4
5.3	5.6
2.7	4.1

温度模式

测定浓度 5.3 $\mu\text{g/ml}$ 酶溶液的作为温度函数的酶活性。其他条件同 LEU 实验。结果如表 2 所示。

表 2

温度 ($^{\circ}\text{C}$)	LEU ($\mu\text{eq NaOH/min}$)
25	3.10
35	4.87
40	5.41
45	6.97
50	7.86
55	9.03
60	8.27
65	6.90

5

pH 稳定性

将酶在 30°C ，特定 pH 用 Britton Robinson 缓冲液稀释 30 分钟。进一步用水稀释后用 LEU 实验测定催化活性。结果如表 3 所示。

10

表 3

pH	LEU ($\mu\text{eq NaOH/min}$)
2	3.78
3	5.11
4	5.60
5	5.49
6	5.37
7	5.61
8	5.52
9	5.64
10	5.50
11	5.21

热稳定性

将酶在 pH3 和 10 时分别用 Britton Robinson 缓冲液稀释，在 pH 7 时用 30%山梨醇稀释。在特定温度保温 30 分钟后，将溶液冷却至反应温度并用 LEU 实验测定。结果如表 4 所示；活性表示为相对于最高测定的活性。

5 表 4. 作为 pH 和温度函数的相对活性(%)

温度 (°C)	pH 3	pH 10	pH 7/30%山梨醇
30	100%	100%	87%
40	95%	92%	100%
50	16%	14%	68%
60	1%	0%	2%

实施例 7: 用 FvPLA2 制作干酪

用巴氏杀菌的，非均质奶油(北卡罗来纳州大学乳品厂)将五百克巴氏杀菌的，非均质脱脂乳(北卡罗来纳州大学乳品厂)标准化为 3.5%脂肪因此生产全脂 mozzarella 干酪。

10 将每个实验用的干酪用乳或者用按照实施例 5 制备的 *F. venenatum* 磷脂酶(FvPLA2)，或者用商业磷脂酶 Lecitase®10L(Novozymes A/S, Bagsvaerd, 丹麦)处理，并放置在 35°C 水浴中直至平衡至该温度。测量干酪用乳的起始 pH 并加入 0.01%(w/w)引子培养物。

15 监测 pH 直至 pH 达到 6.4。将 250 μ l 凝乳酶(Novozym 89L)用去离子水稀释至 9ml 总溶液，将 1ml 该溶液加入干酪用乳中并用力搅拌干酪用乳 3 分钟。取出搅拌子并允许凝乳酶凝的乳品放置于 35°C。

20 上面的处理之后，当将抹刀插入可以看见明显的边界时则凝乳准备好被切割。干酪的切割通过把刀压下并且当触到杯(beaker)时快速转刀具并最后将刀拔出进行。允许凝乳放置 5 分钟然后用匙轻轻搅动。温度升至 41°C 伴随间断的轻轻搅动 ~ 45 分钟或直至 pH 降至 6.0-5.9。将凝乳用干酪用粗棉布沥干然后放回杯中并保持在 41°C 水浴中，根据需要倒出乳清。

25 当凝乳达到 pH5.3 时，将盛有凝乳的不锈钢碗在 69°C 水浴中浸泡 5 分钟然后用手拉伸(hand stretched)。将凝乳在冷的冰水中回火 30 分钟。将干酪凝乳用纸巾干燥，称重并冷藏过夜。

除了不加磷脂酶，对照干酪制作实验用同一批号乳品按照同样程序进行。

实际干酪产量计算为拉伸后干酪的重量相对于干酪用乳总重量。

湿度调节过的干酪产量表示为调节至标准恒定湿度水平的实际产量。

- 5 调节过湿度的产量通过实际产量乘以实际湿度对标准湿度比来计算，并按照下面公式：

$$Y_{adj} = Y_{act} \times (1 - M_{act}) / (1 - M_{std})$$

其中 Y_{adj} = 调节过湿度的干酪产量， Y_{act} = 实际干酪产量， M_{act} = 实际湿度分数 & M_{std} = 标准湿度分数 (0.48)

- 10 所有实验和对照的调节过湿度的干酪产量如表 5 所示。

表 1

处理	磷脂酶 mg 酶蛋白/g 脂肪	湿度调节过的干酪产量	比对照增加的产量
对照	0	11.70	
FvPLA2	0.071	11.95	2.1%
对照	0	11.50	
FvPLA2	0.071	11.83	2.8%
对照	0	9.22	
Lecitase® 10L	0.18	9.48	2.7%
对照	0	9.62	
Lecitase® 10L	0.18	9.90	2.8%

实施例 8: 用 FvPLA2 制作干酪

- 15 将乳于 72°C 巴氏杀菌 15 秒，然后冷却至 10°C 以下。将乳用奶油标准化至 2.4% 脂肪。标准化后将乳在热交换仪中于 34.5°C 的成熟前温度预加热。每个干酪缸中倒入 150 克乳并加入 15 克培养物 (F-DVS ST-M6)。将实施例 5 的磷脂酶以 5 LEU/g 脂肪的剂量加入，并且将乳于 34.5°C 保温 1 小时。加入凝乳酶 (Chy-Max Plus, 200 IMCU) 并继续搅动不超过 4 分钟。

大约 60 分钟后，当断定凝固物好了时将其用 10mm 刀切割。将搅拌子放回缸内并在 10 分钟后通过在 30 分钟内升温至 41℃ 启动热烫(scalding)。当达到 41℃ 后继续搅拌大约 20 分钟直至达到 0.15-0.16% 的可滴定酸度。允许凝块放置在缸中，沥干乳清。将凝块切成均匀一致的块，并将块反转(turn)并堆成 2 个一组。随后，每间隔 10 分钟，将凝块反转并堆成 2 个一组。在 pH 大约 5.15-5.20 时，将凝块在碾磨机(milling machine)上打磨。凝块中加入 2% 盐(重量/重量)。

打磨后将所有凝块加入含有 70L 预热至 74℃ 水的 stretcher 中。将大约 20L 热水转移到上面格子(chamber)中并加入干酪。当凝块温度达到 62℃ 时，终止拉伸并将凝块移至挤压机。将干酪挤压成 8-9 个干酪块，每个 2.3kg，并在 5-7℃ 水中冷却 20 分钟。将冷却的干酪移至饱和盐水中并在 5-6℃ 腌渍 1.5 小时。盐水的制作通过混合 120 公斤水，加入盐至 22Be, 750 克 CaCl₂(34% 溶液)并调节至 pH 5.1。腌渍后将每块干酪干燥大约 30 分钟，并于真空包装前称重。在冷藏室贮存大约 1 周后，进行样品的 pH 和成分分析(湿度，盐，脂肪和蛋白质)。

将实际产量(AY)调节成干酪中湿度为 48%。

$$\text{调节的产量(Adj Yield)} = \frac{\text{AY} \times (100 - \% \text{湿度})}{100 - 48}$$

20

表 6

	调节的产量(公斤) 对照组	调节的产量(公斤) 实验组	产量增加平均值 (公斤)	增加的产量 (%)
1 天	10.62	10.81		
	10.70	10.90	0.195	1.8
2 天	9.90	10.16		
	9.95	10.14	0.225	2.3
3 天	10.00	10.15		
	10.01	10.16	0.15	1.5

实施例 9: 在米曲霉中米曲霉 PLA2 (AoPLA2) 的过表达 培养基

DAP2C-1

11g MgSO₄·7H₂O

1g KH₂PO₄

2g 柠檬酸，一水化物

30g 麦芽糊精

5 6g K₃PO₄·3H₂O

0.5g 酵母提取物

0.5ml 痕量金属溶液

1ml Pluronic PE6100 (BASF, Ludwigshafen, 德国)

将各成分混合于 1 升蒸馏水中并分装在烧瓶中，每 150ml 部分加入

10 250mgCaCO₃。

将培养基高压灭菌。冷却后向 1 升培养基中加入下列物质：

23 ml 50% w/v (NH₄)₂HPO₄，过滤除菌

33 ml 20%乳酸，过滤除菌

痕量金属溶液

15 6.8g ZnCl₂

2.5g CuSO₄ 5H₂O

0.24g NiCl₂ 6H₂O

13.9g FeSO₄ 7H₂O

8.45g MnSO₄ H₂O

20 3g 柠檬酸，一水化物

将各成分混合在 1 升蒸馏水中。

编码米曲霉磷脂酶 A2 的 cDNA 的克隆和局部测序描述于 WO 00/56762。克隆，AS3812 的全长序列，列于 SEQ ID NO:6。

25 将此序列用于设计引物 AoPLA1，其在从 AS3812 进行 PLA2 编码基因的 PCR 扩增中与载体引物 pYESrev 一起使用，其有加于引物末端的合适的限制性位点以利于 PCR 产物的亚克隆。

AoPLA1: TGAGGATCCATCATGAAGAACATCTTCG

FvPLA2.2: gggcgtgaatgtaagcgtgac

30 使用 Extensor Hi-Fidelity PCR Master Mix (AB-gene, Surrey, U.K.)按照生产商的说明进行 PCR 扩增，并在前 5 个循环中使用 52℃ 的退火温度，后 25 个循环使用 62℃ 的退火温度，延伸时间 1.5 分钟。

使用标准技术将 PCR 片段用 BamH I 和 Xho I 限制性酶切并克隆到曲霉属表达载体 pMStr57 中(实施例 1 中描述的)。将所得到曲霉属表达构建体 pMStr71 的磷脂酶编码基因测序, 序列与以前测定的 AS3812 的插入子完全一致。

- 5 使用标准技术 (T. Christensen, et al., 1988) 用 pMStr71 转化米曲霉菌株 BECh2 (WO 00/39322)。将转化体在 DAP2C-1 培养基中于 37°C, 270RPM 摇动培养, 并且用 SDS-PAGE 监测磷脂酶的表达。

实施例 10: 加工肽的纯化和测定

- 将来自实施例 9 发酵物的米曲霉磷脂酶用购自 Pall 公司 (Pall
10 SeitzSchenk Filter systems GmbH Pianiger Str. 137 D-55543 Bad Kreuznach, Germany) 的 0.22 μ m 除菌过滤器 Seitz-EKS 过滤除菌。然后用稀乙酸调节无菌过滤的溶液至 pH 4.7。然后调节发酵物上清的离子强度以使盐浓度降低并且离子强度在 4 mSi 以下。使用购自 Amersham Pharmacia SP-sepharoseTM fast flow, 通过阳离子交换层析获得目的 PLA2 蛋白的纯化。用 50mM 乙酸盐
15 缓冲液 pH 4.7(缓冲液 A)将阳离子交换基质在购自 Amersham Pharmacia 的 XK26 柱上填装、洗涤和预平衡。然后将调节了 pH 和离子强度的含有目的 PLA2 的发酵物上清加在柱上。将未结合物质用缓冲液 A 洗去, 直至所有吸收 UV 物质被洗去, 其用附加于级分收集器装置的紫外光检测仪监测。然后将结合的蛋白质用缓冲液 B 线性盐梯度洗脱, 其中缓冲液 B 为在 pH 4.7 的
20 50mM 乙酸盐缓冲液含有 1M 氯化钠的盐。线性梯度达到 1M 盐浓度的总体积大约是 500ml(10 倍柱体积)。在洗脱中每 10ml 收集为一个级分。用购自 Sigma chemicals 的卵磷脂作底物测定所有级分的磷脂酶活性。与磷脂酶保温时从卵磷脂释放的脂肪酸用购自 Waco chemicals 的 NEFA C 试剂盒检测。用标准 SDS-PAGE 技术检查含有磷脂酶活性级分的蛋白质纯度。将含有显
25 示出分子量大约 16kDa 单一条带的目的 PLA2 的级分混合, 其中分子量的测定通过与购自 Amersham-Pharmacia 的分子量标准对比。

- 纯的蛋白质的同一性通过测定 N-末端序列来确认, 其中与 SEQ ID NO: 7 的氨基酸 (aa) 37-45 序列相同。此外, 用质谱分析判断肽的质量。纯的活化的曲霉属 PLA2 有两种质量, 14114 和 14242Da。这些分子质量意味着在
30 C-末端的另外的加工, 并与 SEQ ID NO: 7 中氨基酸 121 和 122 间的断裂一致, 因为从氨基酸 37 到 121 的肽序列具有理论质量 14114.11Da, 和在氨基

酸 122 和 123 间断裂, 预计从氨基酸 37-123 的肽序列理论质量为 14242.29Da。

实施例 11: 源于米曲霉和 *Fusarium venenatum* 不完全加工的磷脂酶的表达

5 米曲霉 PLA2 (AoPLA2)和 *Fusarium venenatum* PLA2 (FvPLA2)在 N-和 C-末端两端的加工发生在单个或多个基本残基上(赖氨酸或精氨酸), 是经常负责前肽加工的 Kexin-样成熟酶的典型断裂位点 (Jalving, R., et al. (2000) Appl. Environ. Microbiol. 66: 363-368)。为了测定加工对 AoPLA2 和 FvPLA2 活性的影响, 将酶在 Kexin 缺陷米曲霉株中表达。然后用 SDS-PAGE 评价
10 加工, 测定野生型和 Kexin 缺陷型本底(background)表达 AoPLA2 和 FvPLA2 的菌株培养物的磷脂酶活性。

通过本领域建立的方法, 例如 WO 98/12300 和 US6013452 描述的破坏米曲霉的 *kexB* 基因(EMBL:AB056727)构建 Kexin 缺陷的米曲霉菌株(*kexB*⁻)。KexB 的破坏通过 Southern 印迹分析和通过监测已知由 *kexB* 负责其成熟
15 的肽的表达确认。将 *KexB*⁻ 菌株用实施例 9 描述的 AoPLA2 表达构建体和实施例 4 描述的 FvPLA2 表达构建体转化。将这些菌株, 连同实施例 9 和 4 描述的 *kexB*⁺ 的 AoPLA2 和 FvPLA2 表达菌株在 YP+2%G 中于 30°C 发酵, 并用未转化的菌株作为对照。将 AoPLA2 表达菌株于 200RPM 摇动培养 4 天, 而将 FvPLA2 表达菌株摇动 275RPM 培养 3 天。用 SDS-PAGE 评价
20 磷脂酶的表达和加工。

SDS-PAGE 分析中, 分辨出 AoPLA2 在 *kexB*⁺ 和 *kexB*⁻ 的菌株中都为清晰的单一条带。当表达在 *kexB*⁺ 菌株时, AoPLA2 电泳在 ca.16kDa 处, 与前面观察到的完全加工的 AoPLA2(实施例 10)迁移一致, 而在 *kexB*⁻ 菌株, AoPLA2 电泳在 ca.27-28kDa 处, 与缺乏加工或不完全加工的一致。当表达
25 在 *kexB*⁺ 菌株时, 分辨出 FvPLA2 为表观分子量 17kDa 和 14kDa 的两条带。14kDa 条带相应于完全加工的肽(实施例 5), 而 17kDa 肽是部分加工的形式。当表达在 *kexB*⁻ 菌株时, FvPLA2 泳在 ca.18-19kDa 的单一条带, 大小与不完全加工的一致。来自未转化的菌株的任何对照样品未观察到相似条带。相对的条带强度表明 AoPLA2 在 *kexB*⁻ 菌株中的表达是其在 *kexB*⁺ 菌株表达
30 水平的 1/5 至 1/10, 而 FvPLA2 在 *kexB*⁻ 菌株中的表达与其在 *kexB*⁺ 菌株表达水平相同至 1/2。

用 LEU 实验判断每种菌株产生的磷脂酶的活性并表示于表 7。

表 7

菌株基因型			活性 LEU/ml
KexB	FvPLA2	AoPLA2	
+	-	-	0
-	-	-	0
+	+	-	38
-	+	-	0
+	-	+	56
-	-	+	0

0-1	表格 PCT/RO/134 (SAFE)	
0-1-1	涉及保藏的微生物或其它生物材料说明(PCT Rule 13 bis) prepared using	PCT-SAFE [EASY 方式] 版本 3.50 (Build 0002, 162)
0-2	国际申请号	
0-3	申请者或代理者的文件参考	10342.504-WO

1	下面做出的涉及说明书中提及的保藏微生物或其它生物材料的说明	
1-1	页	12
1-2	行	6
1-3	保藏物的证明	
1-3-1	保藏单位的名称	DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
1-3-2	保藏单位的地址	Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany
1-3-3	保藏日期	2003年2月12日(12.02.2003)
1-3-4	登陆号	DSMZ 15441
1-5	对指定国家所作的说明	全部指定
2	下面做出的涉及说明书中提及的保藏微生物或其它生物材料的说明	
2-1	页	12
2-2	行	7
2-3	保藏物的证明	
2-3-1	保藏单位的名称	DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
2-3-2	保藏单位的地址	Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany
2-3-3	保藏日期	2003年2月12日(12.02.2003)
2-3-4	保藏号	DSMZ 15442
2-5	对指定国家所作的说明	全部指定

仅供受理局使用

0-4	此表格被国际申请接受: (是或否)	
0-4-1	审定的官员	

5

仅供国际局专用

0-5	此表格被国际局接受:	
0-5-1	审定的官员	

<110> 诺维信公司 (Novozymes A/S)
 <120> 磷脂酶表达
 <130> 10342.504-WO
 <160> 16
 <170> PatentIn version 3.2
 <210> 1
 <211> 211
 <212> PRT
 <213> Tuber borchii
 <400> 1
 Met Val Lys Ile Ala Ala Ile Ile Leu Leu Met Gly Ile Leu Ala Asn
 1 5 10 15
 Ala Ala Ala Ile Pro Val Ser Glu Pro Ala Ala Leu Asn Lys Arg Gly
 20 25 30
 Asn Ala Glu Val Ile Ala Glu Gln Thr Gly Asp Val Pro Asp Phe Asn
 35 40 45
 Thr Gln Ile Thr Glu Pro Thr Gly Glu Gly Asp Arg Gly Asp Val Ala
 50 55 60
 Asp Glu Thr Asn Leu Ser Thr Asp Ile Val Pro Glu Thr Glu Ala Ala
 65 70 75 80
 Ser Phe Ala Ala Ser Ser Val Ser Ala Ala Leu Ser Pro Val Ser Asp
 85 90 95
 Thr Asp Arg Leu Leu Tyr Ser Thr Ala Met Pro Ala Phe Leu Thr Ala
 100 105 110
 Lys Arg Asn Lys Asn Pro Gly Asn Leu Asp Trp Ser Asp Asp Gly Cys
 115 120 125
 Ser Lys Ser Pro Asp Arg Pro Ala Gly Phe Asn Phe Leu Asp Ser Cys
 130 135 140
 Lys Arg His Asp Phe Gly Tyr Arg Asn Tyr Lys Lys Gln His Arg Phe
 145 150 155 160
 Thr Glu Ala Asn Arg Lys Arg Ile Asp Asp Asn Phe Lys Lys Asp Leu
 165 170 175
 Tyr Asn Glu Cys Ala Lys Tyr Ser Gly Leu Glu Ser Trp Lys Gly Val
 180 185 190
 Ala Cys Arg Lys Ile Ala Asn Thr Tyr Tyr Asp Ala Val Arg Thr Phe
 195 200 205

Gly Trp Leu
210

<210> 2
<211> 588
<212> DNA
<213> *Verticillium dahliae*

<220>
<221> misc-feature
<222> (25)..(26)
<223> n 为 a, c, g, 或 t

<220>
<221> CDS
<222> (72)..(587)

<400> 2
cagtttgaag tcccagcccc tgctnntcct cctgcttctc cccgtccagt ctttgggatt 60
ttccttcat c atg aag ttc aac gca att ctc ctg gcc ctc gtg cct gcc 110
Met Lys Phe Asn Ala Ile Leu Leu Ala Leu Val Pro Ala
1 5 10
gcc ctg gct ctg ccc acc acc gac gag gcg cag acc ccc aag ctc gcc 158
Ala Leu Ala Leu Pro Thr Thr Asp Glu Ala Gln Thr Pro Lys Leu Ala
15 20 25
gcg cgc cag agc atc acg gcc gtc acc gac agc ctg tcc ttc tcc ctg 206
Ala Arg Gln Ser Ile Thr Ala Val Thr Asp Ser Leu Ser Phe Ser Leu
30 35 40 45
acg ctg cct cag ttc acc acg cgc cgc aac aac cgc aac ccc gcc aac 254
Thr Leu Pro Gln Phe Thr Thr Arg Arg Asn Asn Arg Asn Pro Ala Asn
50 55 60
ctc gac tgg agc tcc gac ggc tgc aca acg tct cct gac aac cca ttc 302
Leu Asp Trp Ser Ser Asp Gly Cys Thr Thr Ser Pro Asp Asn Pro Phe
65 70 75
gga ttc ccc ttt gtg ccg gcc tgc cac cgc cac gac ttt ggc tac cac 350
Gly Phe Pro Phe Val Pro Ala Cys His Arg His Asp Phe Gly Tyr His
80 85 90
aac ttc cgc gcc cag acc cgc ttc acc gag agc aac aag ctc cgc atc 398
Asn Phe Arg Ala Gln Thr Arg Phe Thr Glu Ser Asn Lys Leu Arg Ile
95 100 105
gac aac cag ttc agg acc gat ctg agg ttc cag tgc cag tct tcg agc 446
Asp Asn Gln Phe Arg Thr Asp Leu Arg Phe Gln Cys Gln Ser Ser Ser
110 115 120 125
gtg cgc ggc gtg tgc aac gcc ctg gcg gac gtc tac tac tct gcc gtc 494
Val Arg Gly Val Cys Asn Ala Leu Ala Asp Val Tyr Tyr Ser Ala Val
130 135 140
cgg cgc ttc ggc ggt gac gac gcc acc ccc ggc aag agg gac gag cac 542
Arg Ala Phe Gly Gly Asp Asp Ala Thr Pro Gly Lys Arg Asp Glu His
145 150 155
tcg gaa ctc gtc ggc atc tac gac gag aag gtc ggc atc tac gat a 588
Ser Glu Leu Val Gly Ile Tyr Asp Glu Lys Val Gly Ile Tyr Asp
160 165 170

<210> 3
 <211> 172
 <212> PRT
 <213> *Verticillium dahliae*
 <400> 3
 Met Lys Phe Asn Ala Ile Leu Leu Ala Leu Val Pro Ala Ala Leu Ala
 1 5 10 15
 Leu Pro Thr Thr Asp Glu Ala Gln Thr Pro Lys Leu Ala Ala Arg Gln
 20 25 30
 Ser Ile Thr Ala Val Thr Asp Ser Leu Ser Phe Ser Leu Thr Leu Pro
 35 40 45
 Gln Phe Thr Thr Arg Arg Asn Asn Arg Asn Pro Ala Asn Leu Asp Trp
 50 55 60
 Ser Ser Asp Gly Cys Thr Thr Ser Pro Asp Asn Pro Phe Gly Phe Pro
 65 70 75 80
 Phe Val Pro Ala Cys His Arg His Asp Phe Gly Tyr His Asn Phe Arg
 85 90 95
 Ala Gln Thr Arg Phe Thr Glu Ser Asn Lys Leu Arg Ile Asp Asn Gln
 100 105 110
 Phe Arg Thr Asp Leu Arg Phe Gln Cys Gln Ser Ser Ser Val Arg Gly
 115 120 125
 Val Cys Asn Ala Leu Ala Asp Val Tyr Tyr Ser Ala Val Arg Ala Phe
 130 135 140
 Gly Gly Asp Asp Ala Thr Pro Gly Lys Arg Asp Glu His Ser Glu Leu
 145 150 155 160
 Val Gly Ile Tyr Asp Glu Lys Val Gly Ile Tyr Asp
 165 170

<210> 4
 <211> 185
 <212> PRT
 <213> 粗糙链孢霉 (*Neurospora crassa*)
 <400> 4

Met Lys Phe Phe Ser Ala Leu Ala Leu Ser Ser Leu Leu Pro Thr Ala
 1 5 10 15
 Ala Trp Ala Trp Thr Gly Ser Glu Ser Asp Ser Thr Gly Ala Asp Ser
 20 25 30
 Leu Phe Arg Arg Ala Glu Thr Ile Gln Gln Thr Thr Asp Arg Tyr Leu
 35 40 45

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

Pro Ala Thr Leu Asp Trp Ser Ser Asp Ser Cys Ser Tyr Ser Pro Asp
65 70 75 80

Asn Pro Leu Gly Phe Pro Phe Ser Pro Ala Cys Asn Arg His Asp Phe
85 90 95

Gly Tyr Arg Asn Tyr Lys Ala Gln Ser Arg Phe Thr Asp Asn Asn Lys
100 105 110

Leu Lys Ile Asp Gly Asn Phe Lys Thr Asp Leu Tyr Tyr Gln Cys Asp
115 120 125

Thr His Gly Tyr Gly Ser Thr Cys His Ala Leu Ala Asn Val Tyr Tyr
130 135 140

Ala Ala Val Arg Glu Phe Gly Arg Thr Lys Gly Glu Leu Gln Glu Glu
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Leu Leu Ala His Tyr Asn Glu Leu Val Ala Glu Ala Ile
165 170 175

Ala Lys Gly Glu Asp Pro Leu Tyr Tyr
180 185

<210> 5
<211> 169
<212> PRT
<213> Helicosporium sp.

<400> 5

Met Lys Ser Phe Thr Phe Val Val Leu Ala Leu Leu Pro Phe Ser Ser
1 5 10 15

Ala Leu Pro Phe Gly Leu Phe His Arg Gly Gly Ile Ala Ser Arg Ala
20 25 30

Thr Ile Glu Glu Thr Thr Asp Thr Leu Leu Phe Ser Thr Pro Ile Ala
35 40 45

Gln Phe Glu Ala Ala Arg Asn Ala Gln Asn Pro Ser Thr Leu Asp Trp
50 55 60

Ser Ser Asp Gly Cys Ser Ser Ser Pro Asp Asp Pro Phe Gly Phe Asp
65 70 75 80

Phe Leu Ser Ser Cys His Arg His Asp Phe Gly Tyr Arg Asn Tyr Lys
85 90 95

Lys Gln Asn Arg Phe Thr Ala Pro Asn Lys Ala Arg Ile Asp Thr Asn

100 105 110
 Phe Lys Thr Asp Met Tyr Asn Gln Cys Asn Thr Glu Ser Asn Ile Phe
 115 120 125
 Thr Arg Ala Ala Cys Lys Ala Val Ala Asp Ile Tyr Tyr Glu Ala Val
 130 135 140
 Lys Thr Phe Gly Ser Lys Lys Arg Ala Ala Glu Ala Leu Ala Ala Arg
 145 150 155 160
 Gln Met Glu Glu Asn Val Ala Lys Ala
 165

<210> 6
 <211> 942
 <212> DNA
 <213> 米曲霉 (*Aspergillus oryzae*)

<220>
 <221> CDS
 <222> (61)..(726)

<400> 6
 cgcaagcatc acatctactt cttattgcct attctgtccg agtgctagcc acttatcatc 60
 atg aag aac atc ttc gtt gcc act ttg ggc ctg ttc gcc gca gtt tcg 108
 Met Lys Asn Ile Phe Val Ala Thr Leu Gly Leu Phe Ala Ala Val Ser
 1 5 10 15
 tct gcc ttg ccc tac aca acc cct gtc aat gac aat ccc atc tct gct 156
 Ser Ala Leu Pro Tyr Thr Thr Pro Val Asn Asp Asn Pro Ile Ser Ala
 20 25 30
 tta caa gca cgc gcg aca aca tgc tcg gcc aag gcc acg gat aac ctc 204
 Leu Gln Ala Arg Ala Thr Thr Cys Ser Ala Lys Ala Thr Asp Asn Leu
 35 40 45
 atc ttc aag gtc tcc atg aag acc ttc cag aag gcg cgc aag gcc aag 252
 Ile Phe Lys Val Ser Met Lys Thr Phe Gln Lys Ala Arg Lys Ala Lys
 50 55 60
 aac ccc tcc aag tgc aac tgg tca tcg gac aac tgc tcc aag tca ccc 300
 Asn Pro Ser Lys Cys Asn Trp Ser Ser Asp Asn Cys Ser Lys Ser Pro
 65 70 75 80
 gat aag ccc gat gga tac aac ttc atc ccc agc tgc caa aga cac gat 348
 Asp Lys Pro Asp Gly Tyr Asn Phe Ile Pro Ser Cys Gln Arg His Asp
 85 90 95
 ttc ggc tac cgg aac acg aag aag cag aag cgc ttc aca aag gcc atg 396
 Phe Gly Tyr Arg Asn Thr Lys Lys Gln Lys Arg Phe Thr Lys Ala Met
 100 105 110
 aag aag cgc att gac gac aac ttc aag aag gat ctc tac aag tac tgc 444
 Lys Lys Arg Ile Asp Asp Asn Phe Lys Lys Asp Leu Tyr Lys Tyr Cys
 115 120 125
 agc caa ttc tcg ggc tgg agc tca tgg aag gga gtg gag tgc cgt cgc 492
 Ser Gln Phe Ser Gly Trp Ser Ser Trp Lys Gly Val Glu Cys Arg Arg
 130 135 140
 ctt gcg gat gtc tac tat act gct gtc cgc cac ttt ggc aag cgt gat 540

Leu Ala Asp Val Tyr Tyr Thr Ala Val Arg His Phe Gly Lys Arg Asp
 145 150 155 160
 gaa gcg ctt gag ttt gac cct gag gtt gag ttc gag aag cgt gat gag 588
 Glu Ala Leu Glu Phe Asp Pro Glu Val Glu Phe Glu Lys Arg Asp Glu
 165 170 175
 gtg gcc gat gtc cag cct gac gaa ttt gat aac ttt gac ggt tct gaa 636
 Val Ala Asp Val Gln Pro Asp Glu Phe Asp Asn Phe Asp Gly Ser Glu
 180 185 190
 gtt gac cct gat atc gag ggc cag gtc att ccc gaa gtt ctt gaa gat 684
 Val Asp Pro Asp Ile Glu Gly Gln Val Ile Pro Glu Val Leu Glu Asp
 195 200 205
 gat gga gtg gat gtg gag aac ctc gac gat att gaa aac ctg 726
 Asp Gly Val Asp Val Glu Asn Leu Asp Asp Ile Glu Asn Leu
 210 215 220
 taggttttcg gcattggctc tacactttgc aaatgggtcg tcataatcca ttggaagccg 786
 gaggaggagg gaaatcaagg catcttttgg ttgtcagtaa ctttgagtgc ctagtttgtg 846
 aattgttttt tgaggttcta ttggaattct gcttttgttc aatcttatag cttcctacgt 906
 tgttgtcatt taaaaatgga caggagtatc tgtgag 942

 <210> 7
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> 米曲霉 (*Aspergillus oryzae*)

 <400> 7
 Met Lys Asn Ile Phe Val Ala Thr Leu Gly Leu Phe Ala Ala Val Ser
 1 5 10 15
 Ser Ala Leu Pro Tyr Thr Thr Pro Val Asn Asp Asn Pro Ile Ser Ala
 20 25 30
 Leu Gln Ala Arg Ala Thr Thr Cys Ser Ala Lys Ala Thr Asp Asn Leu
 35 40 45
 Ile Phe Lys Val Ser Met Lys Thr Phe Gln Lys Ala Arg Lys Ala Lys
 50 55 60
 Asn Pro Ser Lys Cys Asn Trp Ser Ser Asp Asn Cys Ser Lys Ser Pro
 65 70 75 80
 Asp Lys Pro Asp Gly Tyr Asn Phe Ile Pro Ser Cys Gln Arg His Asp
 85 90 95
 Phe Gly Tyr Arg Asn Thr Lys Lys Gln Lys Arg Phe Thr Lys Ala Met
 100 105 110
 Lys Lys Arg Ile Asp Asp Asn Phe Lys Lys Asp Leu Tyr Lys Tyr Cys
 115 120 125
 Ser Gln Phe Ser Gly Trp Ser Ser Trp Lys Gly Val Glu Cys Arg Arg
 130 135 140

Leu Ala Asp Val Tyr Tyr Thr Ala Val Arg His Phe Gly Lys Arg Asp
145 150 155 160

Glu Ala Leu Glu Phe Asp Pro Glu Val Glu Phe Glu Lys Arg Asp Glu
165 170 175

Val Ala Asp Val Gln Pro Asp Glu Phe Asp Asn Phe Asp Gly Ser Glu
180 185 190

Val Asp Pro Asp Ile Glu Gly Gln Val Ile Pro Glu Val Leu Glu Asp
195 200 205

Asp Gly Val Asp Val Glu Asn Leu Asp Asp Ile Glu Asn Leu
210 215 220

<210> 8

<211> 249

<212> PRT

<213> 粗糙链孢霉 (*Neurospora crassa*)

<400> 8

Met Lys Pro Phe Phe Leu Ile Ser Leu Leu Val Thr Val Phe Met Ser
1 5 10 15

Leu Met Leu Ala Thr Thr Ala Gln Pro Ser Leu Pro Leu Asn Asn Arg
20 25 30

Arg Glu Leu Ala Glu His Pro Pro Val Lys Gly Asn Pro Pro Asn Thr
35 40 45

Gly Tyr Ala Leu Asp Trp Cys Lys Tyr Thr Ala Gly Met Leu Phe Gln
50 55 60

Trp Asp Leu Pro Thr Phe Ile Lys His Arg Glu Ala Asn Phe Ser Leu
65 70 75 80

Gly Arg Leu Thr Trp Asp Trp Ser Ser Asp Gly Cys Thr His Val Pro
85 90 95

Asp Asn Pro Val Gly Phe Pro Phe Lys Pro Ala Cys Gln Arg His Asp
100 105 110

Phe Gly Tyr Arg Asn Tyr Gln Val Gln Phe His Phe Thr Pro Arg Ala
115 120 125

Arg Trp Lys Ile Asp Glu Asn Phe Leu Lys Glu Met Lys Phe Gln Cys
130 135 140

Ile Gly His Asn Ile Phe Asn Ala Cys His Phe Met Ala His Val Tyr
145 150 155 160

His Trp Gly Val Arg Thr Phe Tyr Lys Gly His Glu Gln Tyr Arg Glu
165 170 175

Ser Glu Pro Ser His Lys Met Met Asp Thr Met Val Ala Ser Glu Ser
180 185 190

Ser Asp Val Phe Asp Gly Met Asp Ala Asp Glu Ala Arg Asp Ala Leu
195 200 205

Asn Pro Tyr Leu Ser Glu Glu Lys Thr Lys Glu Tyr Tyr Asp Arg Ala
210 215 220

Leu Ala Arg Tyr Asn Lys Cys Val Glu Glu Ala Met Ala Gln Gly Ile
225 230 235 240

Asp Leu Gln Lys Tyr Trp Ala Ala Phe
245

<210> 9
<211> 832
<212> DNA
<213> Tuber albidum

<220>
<221> CDS
<222> (2).. (426)

<220>
<221> CDS
<222> (476).. (680)

<400> 9
a atg gtc aag att gct gcc att gtc ctc cta atg gga att cta gcc aat 49
Met Val Lys Ile Ala Ala Ile Val Leu Leu Met Gly Ile Leu Ala Asn
1 5 10 15
gct gcc gcc atc cct gtc agc gag cca gca gcc ctg gcg aag cgt gga 97
Ala Ala Ala Ile Pro Val Ser Glu Pro Ala Ala Leu Ala Lys Arg Gly
20 25 30
aac gct gag gtc att gct gaa caa act ggt gat gtc cgg gat ttc aac 145
Asn Ala Glu Val Ile Ala Glu Gln Thr Gly Asp Val Pro Asp Phe Asn
35 40 45
act caa att aca gag cca act ggg gag gga gac cgt ggg gat gtg gtc 193
Thr Gln Ile Thr Glu Pro Thr Gly Glu Gly Asp Arg Gly Asp Val Val
50 55 60
gac gaa acc gat ttg tcc acg gat att gtc cca gag acc gag gct gct 241
Asp Glu Thr Asp Leu Ser Thr Asp Ile Val Pro Glu Thr Glu Ala Ala
65 70 75 80
tcc ttc gcc gct agt tca gta tct gca gcc tca cca gca tct gac acc 289
Ser Phe Ala Ala Ser Ser Val Ser Ala Ala Ser Pro Ala Ser Asp Thr
85 90 95
gac agg ctt ctc tac tca acc tcc atg ccc gcc ttc ttg act gct aag 337
Asp Arg Leu Leu Tyr Ser Thr Ser Met Pro Ala Phe Leu Thr Ala Lys
100 105 110
cgc aat aag aac ccc ggc aac ttg gac tgg agc gat gat gga tgc agc 385
Arg Asn Lys Asn Pro Gly Asn Leu Asp Trp Ser Asp Asp Gly Cys Ser

115	120	125	
aac tcc ccg gac agg cct gca ggg ttt aac ttc ctt gac tc			426
Asn Ser Pro Asp Arg Pro Ala Gly Phe Asn Phe Leu Asp Ser			
130	135	140	
gtaagtcctc cttcatttat gctatctaca ttcactaata ttcgaacag c tgc aag			482
			Cys Lys
cgt cac gac ttc ggg tac cgc aac tac aag aag cag cgc cgc ttc aca			530
Arg His Asp Phe Gly Tyr Arg Asn Tyr Lys Lys Gln Arg Arg Phe Thr			
145	150	155	160
gag cct aat cgc aag cgc att gat gac aat ttc aag aag gac cta tat			578
Glu Pro Asn Arg Lys Arg Ile Asp Asp Asn Phe Lys Lys Asp Leu Tyr			
165	170	175	
aat gag tgc gcc aag tac tct ggc ctc caa tcc tgg aaa ggt gtt gcc			626
Asn Glu Cys Ala Lys Tyr Ser Gly Leu Gln Ser Trp Lys Gly Val Ala			
180	185	190	
tgc cgc aaa atc gcg aac act tac tac gat gct gta cgc tcc ttc ggt			674
Cys Arg Lys Ile Ala Asn Thr Tyr Tyr Asp Ala Val Arg Ser Phe Gly			
195	200	205	
tgg ttg taaatgtgcg gaagagatat caagtgggat cgaggaagag gatggtgaaa			730
Trp Leu			
210			
gagctgagag gtggatttct ttacattccg caatggctac tacagaagaa ctgtgctcct			790
caaatttaat ctcatttttg tgtctatcta tccactctag aa			832
<210>	10		
<211>	210		
<212>	PRT		
<213>	Tuber albidum		
<400>	10		
Met Val Lys Ile Ala Ala Ile Val Leu Leu Met Gly Ile Leu Ala Asn			
1	5	10	15
Ala Ala Ala Ile Pro Val Ser Glu Pro Ala Ala Leu Ala Lys Arg Gly			
20	25	30	
Asn Ala Glu Val Ile Ala Glu Gln Thr Gly Asp Val Pro Asp Phe Asn			
35	40	45	
Thr Gln Ile Thr Glu Pro Thr Gly Glu Gly Asp Arg Gly Asp Val Val			
50	55	60	
Asp Glu Thr Asp Leu Ser Thr Asp Ile Val Pro Glu Thr Glu Ala Ala			
65	70	75	80
Ser Phe Ala Ala Ser Ser Val Ser Ala Ala Ser Pro Ala Ser Asp Thr			
85	90	95	
Asp Arg Leu Leu Tyr Ser Thr Ser Met Pro Ala Phe Leu Thr Ala Lys			
100	105	110	

Arg Asn Lys Asn Pro Gly Asn Leu Asp Trp Ser Asp Asp Gly Cys Ser
 115 120 125

Asn Ser Pro Asp Arg Pro Ala Gly Phe Asn Phe Leu Asp Ser Cys Lys
 130 135 140

Arg His Asp Phe Gly Tyr Arg Asn Tyr Lys Lys Gln Arg Arg Phe Thr
 145 150 155 160

Glu Pro Asn Arg Lys Arg Ile Asp Asp Asn Phe Lys Lys Asp Leu Tyr
 165 170 175

Asn Glu Cys Ala Lys Tyr Ser Gly Leu Gln Ser Trp Lys Gly Val Ala
 180 185 190

Cys Arg Lys Ile Ala Asn Thr Tyr Tyr Asp Ala Val Arg Ser Phe Gly
 195 200 205

Trp Leu
 210

<210> 11
 <211> 961
 <212> DNA
 <213> *Verticillium tenerum*

<220>
 <221> CDS
 <222> (5)..(628)

<400> 11
 caac atg aag acc acc gct gtt ctc tcc ctc gcc atg ctc cag gcc acc 49
 Met Lys Thr Thr Ala Val Leu Ser Leu Ala Met Leu Gln Ala Thr
 1 5 10 15
 tgg gcc tcg ccc gtg gcc aag cgc cag aac gac gtc tcc ctc gtc gac 97
 Trp Ala Ser Pro Val Ala Lys Arg Gln Asn Asp Val Ser Leu Val Asp
 20 25 30
 aac tac atg ttc ggc atc tcg ctg ccc acc ttc tcc aac cac cac tcc 145
 Asn Tyr Met Phe Gly Ile Ser Leu Pro Thr Phe Ser Asn His His Ser
 35 40 45
 aac agg aac ccc cct cgc ctg gac tgg acc acc gac ggc tgc acc tcg 193
 Asn Arg Asn Pro Pro Arg Leu Asp Trp Thr Thr Asp Gly Cys Thr Ser
 50 55 60
 tcg ccc aac aac ccg ctc ggc ttc ccc ttc ctg ccc gcc tgc cac cgc 241
 Ser Pro Asn Asn Pro Leu Gly Phe Pro Phe Leu Pro Ala Cys His Arg
 65 70 75
 cac gac ttt ggc tac cag aac ttc cgc atc cag agc cgc ttc acc cag 289
 His Asp Phe Gly Tyr Gln Asn Phe Arg Ile Gln Ser Arg Phe Thr Gln
 80 85 90 95
 agc aac aag ctc cgc atc gac gac aag ttc aag gag gac ctc tac cac 337
 Ser Asn Lys Leu Arg Ile Asp Asp Lys Phe Lys Glu Asp Leu Tyr His
 100 105 110
 cag tgc gac ggc cac tgg gcc tgg gtt gcc tgc gct gcc ctc gcc gag 385

Gln Cys Asp Gly His Trp Ala Trp Val Ala Cys Ala Ala Leu Ala Glu
 115 120 125
 gtc tac tac gcc gcc gtc cgc gcc ttc ggc ggt ggt gac gcc acc ccg 433
 Val Tyr Tyr Ala Ala Val Arg Ala Phe Gly Gly Gly Asp Ala Thr Pro
 130 135 140
 gga cgc atg cac gtc gcc gtc ttc ggc cag acc cag gcc gag cac gac 481
 Gly Arg Met His Val Ala Val Phe Gly Gln Thr Gln Ala Glu His Asp
 145 150 155
 gcc ctc gtc tcc atc tac gag gag aag ctc gcg gcc tac gag gct gcc 529
 Ala Leu Val Ser Ile Tyr Glu Glu Lys Leu Ala Ala Tyr Glu Ala Ala
 160 165 170 175
 gtc gcc gag gcc gag gcc cgc ggc gag atc ccc cac gtc gag gag acc 577
 Val Ala Glu Ala Glu Ala Arg Gly Glu Ile Pro His Val Glu Glu Thr
 180 185 190
 ctc ccc gag gag cct gcc gcc gag gag ccc gcc gcc gag gag gag cag 625
 Leu Pro Glu Glu Pro Ala Ala Glu Glu Pro Ala Ala Glu Glu Glu Gln
 195 200 205
 aag taaacacgag ccccttttag gaccgactag ctcggtgtcg ctgggctagg 678
 Lys
 ctgagctgag tgacggggag gcacgaaaga gagcaatgca tcagacaggc tggaacatgc 738
 cttgtctga gtgatggatg gactigatgg acttgatgga cttggatgca tttatgatac 798
 cgccagtgtt gactggcaga gcgagcgact tgattttgga tttcttgaaa ggacggatgt 858
 cccgaggtgg ataagggatg ccttatcacc aacttcttca tgtatatatt gtactgcgca 918
 gagaagcgcg ccccgaaaaa tggattgatt cttgatgaga cgt 961

 <210> 12
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> *Verticillium tenerum*

 <400> 12
 Met Lys Thr Thr Ala Val Leu Ser Leu Ala Met Leu Gln Ala Thr Trp
 1 5 10 15
 Ala Ser Pro Val Ala Lys Arg Gln Asn Asp Val Ser Leu Val Asp Asn
 20 25 30
 Tyr Met Phe Gly Ile Ser Leu Pro Thr Phe Ser Asn His His Ser Asn
 35 40 45
 Arg Asn Pro Pro Arg Leu Asp Trp Thr Thr Asp Gly Cys Thr Ser Ser
 50 55 60
 Pro Asn Asn Pro Leu Gly Phe Pro Phe Leu Pro Ala Cys His Arg His
 65 70 75 80
 Asp Phe Gly Tyr Gln Asn Phe Arg Ile Gln Ser Arg Phe Thr Gln Ser
 85 90 95

Asn Lys Leu Arg Ile Asp Asp Lys Phe Lys Glu Asp Leu Tyr His Gln
 100 105 110

Cys Asp Gly His Trp Ala Trp Val Ala Cys Ala Ala Leu Ala Glu Val
 115 120 125

Tyr Tyr Ala Ala Val Arg Ala Phe Gly Gly Gly Asp Ala Thr Pro Gly
 130 135 140

Arg Met His Val Ala Val Phe Gly Gln Thr Gln Ala Glu His Asp Ala
 145 150 155 160

Leu Val Ser Ile Tyr Glu Glu Lys Leu Ala Ala Tyr Glu Ala Ala Val
 165 170 175

Ala Glu Ala Glu Ala Arg Gly Glu Ile Pro His Val Glu Glu Thr Leu
 180 185 190

Pro Glu Glu Pro Ala Ala Glu Glu Pro Ala Ala Glu Glu Glu Gln Lys
 195 200 205

<210> 13
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> TbPLA1 引物

<220>
 <221> misc-feature
 <222> (4)..(9)
 <223> BamHI 位点

<400> 13
 caaggatcca aaatggtaa gattgctgc

29

<210> 14
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> TbPLA2 引物

<220>
 <221> misc-feature
 <222> (4)..(9)
 <223> XhoI 位点

<400> 14
 tgcctcgagt tttttctaga gtggatagat agac

34

<210> 15
 <211> 690
 <212> DNA
 <213> Fusarium venenatum

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