



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110760453 B

(45) 授权公告日 2021.07.30

(21) 申请号 201911011170.9

(22) 申请日 2019.10.23

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110760453 A

(43) 申请公布日 2020.02.07

(83) 生物保藏信息
CCTCC NO:M 2019399 2019.05.27
CCTCC NO:M 2019400 2019.05.27

(73) 专利权人 波顿(上海)生物技术有限公司
地址 201201 上海市浦东新区瑞庆路528号
12栋

(72) 发明人 黄双成 黄强 杜喜林 张鹏
何汉平

(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 潘颖

(51) Int. Cl.
C12N 1/19 (2006.01)
C12N 15/54 (2006.01)
C12P 7/62 (2006.01)
C12R 1/865 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 104131005 A, 2014.11.05

CN 109609396 A, 2019.04.12

CN 103409332 A, 2013.11.27

黄筱萍等. 酿酒酵母SH003生物转化2-苯乙醇条件的优化.《食品研究与开发》.2015,第36卷(第22期),第154-158页.

黄筱萍等. 酿酒酵母SH003生物转化2-苯乙醇条件的优化.《食品研究与开发》.2015,第36卷(第22期),第154-158页.

刘志彬等. 异常维克汉姆酵母的乙酸苯乙酯合成途径.《中国食品学报》.2015,第15卷(第11期),第48-53页.

Daoyi Guo等. Metabolic Engineering of Escherichia coli for Production of 2-Phenylethanol and 2-Phenylethyl Acetate from Glucose.《Journal of Agricultural and Food Chemistry》.2018,第66卷(第23期),第5886-5891页.

Oscar Martínez等. Bioproduction of 2-phenylethanol and 2-phenethyl acetate by Kluyveromyces marxianus through the solid-state fermentation of sugarcane bagasse.《Appl Microbiol Biotechnol》.2018,第102卷(第11期),第4703-4716页.

审查员 朱兵

权利要求书1页 说明书19页
序列表1页 附图4页

(54) 发明名称
一种高产乙酸苯乙酯的基因工程酵母菌株及其构建方法和生产乙酸苯乙酯的方法

(57) 摘要

本发明涉及生物工程技术领域,特别涉及一种高产乙酸苯乙酯的基因工程酵母菌株及其构建方法和生产乙酸苯乙酯的方法。高产乙酸苯乙酯的基因工程酵母菌株为在高产2-苯乙醇的野生酿酒酵母菌株或基因工程酿酒酵母菌株中过表达醇乙酰转移酶基因的基因工程酵母菌株;醇乙酰转移酶基因为来自酵母菌属的ATF1基因或Lg-ATF1基因。本发明通过过表达醇乙酰转移酶

基因,使得酵母菌株的主要生物转化产物从2-苯乙醇变为转而生产乙酸苯乙酯,从而使得该基因工程酵母菌株可高产乙酸苯乙酯。

1. 一种生产乙酸苯乙酯的方法,其特征在于,利用高产乙酸苯乙酯的基因工程酵母菌株发酵生产乙酸苯乙酯,所述的发酵生产的生产方式为原位分离式方式;

所述高产乙酸苯乙酯的基因工程酵母菌株为在高产2-苯乙醇的野生酿酒酵母菌株或基因工程酿酒酵母菌株中过表达醇乙酰转移酶基因的基因工程酵母菌株;

所述醇乙酰转移酶基因为来自酵母菌属的ATF1基因或Lg-ATF1基因;

所述高产2-苯乙醇的野生酿酒酵母菌株或基因工程酿酒酵母菌株为以L-苯丙氨酸为底物生产2-苯乙醇的、摇瓶产量超过2.0g/L 2-苯乙醇的野生酿酒酵母菌株或者基因工程酿酒酵母菌株。

2. 根据权利要求1所述的生产乙酸苯乙酯的方法,其特征在于,所述野生酿酒酵母菌株为保藏编号为CCTCC NO:M 2019399的酿酒酵母CFFSH010,或*S.cerevisiae* M05。

3. 根据权利要求1所述的生产乙酸苯乙酯的方法,其特征在于,所述基因工程酿酒酵母菌株为保藏编号为CCTCC NO:M 2018669的酿酒酵母CFFSH006或为强化2-苯乙醇合成后的*S.cerevisiae* CEN.PK 2-1C。

4. 根据权利要求1所述的生产乙酸苯乙酯的方法,其特征在于,所述ATF1基因的来源为*Saccharomyces cerevisiae* CFFSH006或*Saccharomyces cerevisiae* S288C,所述Lg-ATF1基因的来源为*Saccharomycespastorianus*。

5. 根据权利要求1所述的生产乙酸苯乙酯的方法,其特征在于,所述高产乙酸苯乙酯的基因工程酵母菌株为保藏编号为CCTCC NO:M 2019400的基因工程酵母菌株CFFSH011。

6. 根据权利要求1生产乙酸苯乙酯的方法中所使用的菌株,其特征在于,所述高产乙酸苯乙酯的基因工程酵母菌株为保藏编号为CCTCC NO:M2019400的基因工程酵母菌株CFFSH011。

一种高产乙酸苯乙酯的基因工程酵母菌株及其构建方法和生产乙酸苯乙酯的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物工程技术领域,特别涉及一种高产乙酸苯乙酯的基因工程酵母菌株及其构建方法和生产乙酸苯乙酯的方法。

背景技术

[0002] 2-苯乙醇(2-Phenylethanol, 2-苯乙醇)是一种具有玫瑰香气的食用香料,又叫乙位苯乙醇、 β -苯乙醇,天然存在于橙花油、玫瑰油、香叶油等芳香油中。因它具有柔和、愉快而持久的玫瑰香气而广泛用于各种食用香精和烟用香精中。天然玫瑰花香组分中,除了苯乙醇外通常苯乙醇的酯类衍生物也是天然玫瑰花香的重要特征组成。在苯乙醇使用量大的香精里,适当添加乙酸苯乙酯可以让显得“沉闷”、“呆滞”的香气“活泼”起来。因此,乙酸苯乙酯常用于调配玫瑰、橙花、紫罗兰、晚香玉等香精,以及果味香精,具有桃香香气。高度稀释、淡弱的乙酸苯乙酯香气有“安神”、“镇定”、催眠的作用,这是“芳香疗法”研究取得的最新结果,通过脑波测试、小白鼠“活动性”实验等都证实了这一点。因此,乙酸苯乙酯今后有望在“芳香疗法”、“芳香养生”方面得到更多的应用。

[0003] 苯乙醇及乙酸苯乙酯的来源包括化学合成、天然提取以及生物合成三种方式。以苯或苯乙烯为原料化学合成的苯乙醇,在醋酸钠存在的条件下,与乙酸或乙酐加热生产乙酸苯乙酯。但这种化学合成的方式存在着污染环境的隐患,产物中副产物难以分离,产品价值低等缺点。提取天然存在于白兰花油和玫瑰油中苯乙醇和乙酸苯乙酯,需要较高的原料成本,产率低。而利用天然原料采取生物发酵方式生产的苯乙醇及乙酸苯乙酯等产品,符合欧盟(EU Directive 88/388/CEE)及美国FDA(CFR-21CFR101.22)对天然香料的法律定义,且具备良好的市场前景与极高的经济价值。

[0004] 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)又称面包酵母或出芽酵母,是与人类关系最广泛的一种酵母。传统上,它用于制作面包和馒头等食品及酿酒,是一种国际公认的安全微生物。在现代分子和细胞生物学中用作长期研究的真核模式生物,是第一个完成基因组测序的真核生物,遗传背景清晰。与其他微生物相比,酿酒酵母对很多工业化环境胁迫因素具有较高耐受性,且具有优良的发酵特性和营养特性,在实际生产中可以根据对酵母代谢产物的需求,按照不同目的来确定酵母发酵的生产工艺。因此,酿酒酵母通常被作为“细胞工厂”,通过合成生物学及代谢工程等方法构建工程菌株,应用于工业化发酵生产各类天然香料。

[0005] 酵母属菌株天然可生成2-苯乙醇被公众所知,但菌株所产生的2-苯乙醇量通常仅有几十毫克每升。例如专利CN107177520A和专利CN107164250A 公开了一株产2-苯乙醇的酿酒酵母CCTCC NO:M 2016785菌株,其可产生 200-450mg/L 2-苯乙醇,可用于黄酒、料酒、果酒、酱油、食醋发酵,利用菌株的产2-苯乙醇特性增加酒、醋、果酒的芳香风味。同时,部分天然酵母或经过改造的基因工程酵母被发现具备利用L-苯丙氨酸高产2-苯乙醇的能力。例如Eshkol公开了一种利用酿酒酵母菌株以苯丙氨酸为底物,生产苯乙醇的技术方案

(Journal of Applied Microbiology, 2009, 106 (2) :534-542, doi:10.1111/j.1365-2672.2008.04023.x)。在Eshkol所公开的方案中,其检测了来自以色列迦密山国家公园中所分离数十株野生酿酒酵母株及实验室标准单倍体菌株*Saccharomyces cerevisiae* Y103和*Saccharomyces cerevisiae* S288C 的苯乙醇的产量,其中野生酵母Ye9-612为产量最高,在摇瓶水平下其2-苯乙醇产量可达0.85g/L,分批补料发酵下可达4.5g/L。中国专利申请 CN109609396A(公开号)公开了一种可利用苯丙氨酸高产2-苯乙醇的酿酒酵母工程菌株CFFSH-006。

[0006] 酵母属菌株也被在发酵过程中会产生香气物质,其中具有花果香气的挥发性酯类是酵母香气中的最重要的组成,这也是啤酒、葡萄酒等酒类酿造过程中产生酯香或花香、水果香的原因之一。在众多的酯类合成酶参与酵母香气挥发性酯类的合成,其中醇乙酰转移酶(alcohol O-acetyltransferase, AATases, EC 2.3.1.84)是其中最重要的一类。醇乙酰转移酶利用乙酰辅酶A 和各种醇催化合成相应的乙酸酯(包括乙酸乙酯、乙酸异戊酯、乙酸异丁酯,乙酸丁酯、乙酸己酯、乙酸庚酯、乙酸辛酯等)(Nancolas B., Bull I.D., Stenner R., Dufour V., Curnow P. *Yeast* 34:239-251 (2017))。已知的酵母菌中的醇乙酰转移酶包括ATF1和ATF2,该两种基因均存在于酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)基因组中。此外,贝酵母(*Saccharomyces bayanus*)、奇异酵母(*Saccharomyces paradoxus*)、巴氏酵母(*Saccharomyces pastorianus*)、芽殖酵母(*Saccharomyces mikitae*)和库德里亚夫酵母(*Saccharomyces kudriavzevii*)、感官酵母(*Saccharomyces sensu*)同样被发现具有ATF1或ATF2基因或高度同源的基因(参考Appl Microbiol Biotechnol (2008) 78:783-792; DOI 10.1007/s00253-008-1366-9)。此外,巴氏酵母(*Saccharomyces pastorianus*)中还发现具有一个与ATF1高度同源的醇乙酰转移酶Lg-ATF1,其与贝酵母和酿酒酵母中的ATF1基因高度相似(Characterization of the ATF1 and Lg-ATF1 Genes Encoding Alcohol Acetyltransferases in the Bottom Fermenting Yeast *Saccharomyces pastorianus* [J]. JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING, Vol. 86, No. 1, 15-20. 1998), 催化功能及调控也高度相似。

[0007] 醇乙酰转移酶所产生的酯类的香气是酒类等发酵产品的重要风味 (Flavor-active esters: adding fruitiness to beer. *J. Biosci. Bioeng.* 2003; 96: 110-118。自然条件下,酵母所生产的酯类极低。例如Joaquin公开了一株野生WT-Y182酿酒酵母,其菌株本身ATF1在自然条件下乙酸乙酯和乙酸苯乙酯的产量分别仅有14.54ppm和0.01ppm (Cell report 9 (2), P425-432, 2014, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.09.009>)。Laura Canonico等人(Laura Canonico & Alice Agarbati, *Torulasporea delbrueckii* in the brewing process: A new approach to enhance bioflavour and to reduce ethanol content [J]. *Food Microbiology*, 2016, 56: 45-51) 采取与非酿酒酵母共培养方式以提高酿酒酵母的产香能力,在其最优结果中样品中才检测到最高乙酸苯乙酯含量为0.008 mg/L。Fernando Viana等人(*International Journal of Food Microbiology* 151 (2011) 235-240, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.005) 公开了将汉逊酵母和酿酒酵母进行连续发酵提高酵母产酯能力的方法,其苯乙醇和乙酸苯乙酯产量分别为18.2mg/L和1.70mg/L。

[0008] 天津科技大学肖东光团队(*International Journal of Food Science and*

Technology 2012,doi:10.1111/j.1365-2621.2012.03140.x.Eur Food Res Technol (2013) 236:1009-1014,doi:10.1007/s00217-013-1966-1.J Ind Microbiol Biotechnol (2014) 41:1823-1828,doi:10.1007/s10295-014-1522-4.J Ind Microbiol Biotechnol, doi:10.1007/s10295-017-1907-2) 也多次报道利用醇乙酰转移酶基因ATF1,提高乙酸乙酯等酯香物质产量从而增强酒的香味。除了在酵母菌宿主外,郭涛毅等人(Microbiology Open.2017;e486, doi.org/10.1002/mbo3.486.J.Agric.Food Chem,29May 2018,DOI: 10.1021/acs.jafc.8b01594) 公开了在大肠杆菌种表达酿酒酵母乙酰转移酶基因 ATF1,转化2-苯乙醇生成乙酸苯乙酯,在其公开的技术方案中乙酸苯乙酯产量达到687mg/L。在其技术方案中葡萄糖被用于作为2-苯乙醇和乙酸苯乙酯合成的直接原料,并且由于大肠杆菌本身不具有2-苯乙醇的合成途径,需要构建2-苯乙醇的合成途径,由于以葡萄糖为原料生产2-苯乙醇的代谢途径较长,令菌株的构建过程较为繁琐。同时由于所构建的代谢路径较长,效率较低,加之大肠杆菌本身菌体对于2-苯乙醇及乙酸苯乙酯的耐受能力远远低于酿酒酵母细胞,这使得其在未表达ATF1的情况下,2-苯乙醇产量仅有1.016 g/L,而过表达ATF1之后乙酸苯乙酯产量仅为0.687g/L(同时2-苯乙醇的产量为46mg/L),未能满足工业化水要求。

[0009] 综上所述,现有已知的公开的技术方案中,乙酸苯乙酯的生物合成产量及合成水平均较低,无法满足工业上单产或者高产天然乙酸苯乙酯的实际应用要求。

发明内容

[0010] 有鉴于此,本发明提供了一种高产乙酸苯乙酯的基因工程酵母菌株及其构建方法和生产乙酸苯乙酯的方法。该基因工程酵母菌株可高产乙酸苯乙酯。

[0011] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0012] 本发明提供了一种高产乙酸苯乙酯的基因工程酵母菌株,高产乙酸苯乙酯的基因工程酵母菌株为在高产2-苯乙醇的野生酿酒酵母菌株或基因工程酿酒酵母菌株中过表达醇乙酰转移酶基因的基因工程酵母菌株;

[0013] 醇乙酰转移酶基因为来自酵母菌属的ATF1基因或Lg-ATF1基因。

[0014] 作为优选,高产2-苯乙醇的野生酿酒酵母菌株或基因工程酿酒酵母菌株为以L-苯丙氨酸为底物生产2-苯乙醇的、摇瓶产量超过2.0g/L 2-苯乙醇的野生酿酒酵母菌株或者基因工程酿酒酵母菌株。

[0015] 作为优选,野生酿酒酵母菌株为保藏编号为CCTCC NO:M 2019399的酿酒酵母CFFSH010或为S.cerevisiae M05。

[0016] 作为优选,基因工程酿酒酵母菌株为保藏编号为CCTCC NO:M 2018669 的酿酒酵母CFFSH006,或为强化2-苯乙醇合成后的S.cerevisiae CEN.PK 2-1C。

[0017] 作为优选,ATF1基因的来源为Saccharomyces cerevisiae CFFSH006或Saccharomyces cerevisiae S288C,Lg-ATF1基因的来源为Saccharomyces pastorianus。

[0018] 作为优选,高产乙酸苯乙酯的基因工程酵母菌株为保藏编号为CCTCC NO:M 2019400的酿酒酵母菌株CFFSH011。

[0019] 本发明还提供了该基因工程酵母菌株的构建方法,以高产2-苯乙醇的野生酿酒酵母菌株或基因工程酿酒酵母菌株为出发菌,过表达醇乙酰转移酶基因,得到高产乙酸苯乙

酯的基因工程酵母菌株；

[0020] 醇乙酰转移酶基因为来自酵母菌属的ATF1基因或Lg-ATF1基因。

[0021] 在本发明中,高产2-苯乙醇的野生酿酒酵母菌株或基因工程酿酒酵母菌株为以L-苯丙氨酸为底物生产2-苯乙醇的、摇瓶产量超过2.0g/L 2-苯乙醇的野生酿酒酵母菌株或者基因工程酿酒酵母菌株。

[0022] 作为优选,过表达方式为以多拷贝整合于酵母delta位点。

[0023] 作为优选,整合方式为FLP重组酶介导或CRISPR-Cas9介导。但整合方法并不限定于此。

[0024] 本发明还提供了一种生产乙酸苯乙酯的方法,利用上述的基因工程酵母菌株发酵生产乙酸苯乙酯。

[0025] 在本发明提供的实施例中,发酵所用培养基配方为:10g/L的酵母提取物,60g/L的葡萄糖,10g/L的苯丙氨酸,0.5g/L的磷酸二氢钾,0.5g/L的硫酸镁。

[0026] 作为优选,发酵生产的方式为原位分离式方式。

[0027] 本发明还提供了一种高产2-苯乙醇的野生菌株,菌株为酿酒酵母 CFFSH010。

[0028] 本发明提供了一种高产乙酸苯乙酯的基因工程酵母菌株及其构建方法和生产乙酸苯乙酯的方法。该高产乙酸苯乙酯的基因工程酵母菌株为在高产2-苯乙醇的野生酿酒酵母菌株或基因工程酿酒酵母菌株中过表达醇乙酰转移酶基因的基因工程酵母菌株;醇乙酰转移酶基因为来自酵母菌属的ATF1基因或Lg-ATF1基因。所述的高产2-苯乙醇的野生酿酒酵母菌株或基因工程酿酒酵母意味着该酿酒酵母菌株天然具有或者通过基因改造获得高效2-苯乙醇合成代谢途径。

[0029] 酿酒酵母中天然存在利用L-苯丙氨酸转化为2-苯乙醇的高效代谢途径是现有技术已知的。同时,ATF1基因其能催化相应醇转化为相应乙酸酯的基因功能也是被现有技术已知的,并且已被应用于酒类发酵过程包括乙酸苯乙酯在内的酯香成分的增强。然而,现有技术领域中缺乏一种微生物高产天然乙酸苯乙酯的方法,即便ATF1基因被发现了可以增加酵母酿酒过程中酯类香气成分的含量,但由于这些酯类组分含量仅有若干或几十毫克每升,因此本领域技术人员尚未意识到该基因在高产乙酸苯乙酯的潜在应用价值。在另外一些案例中,虽然ATF1基因在一些现有公开技术方案中已经被利用于乙酸苯乙酯的合成,如在大肠杆菌中人工构建的2-苯乙醇合成代谢途径(Microbiology Open.2017;e486, doi.org/10.1002/mbo3.486.J.Agric.Food Chem,29May 2018, DOI:10.1021/acs.jafc.8b01594)基础上,进一步通过ATF1基因合成乙酸苯乙酯,然而在这些已知的公开案例中2-苯乙醇的合成途径效率是低下的,加之大肠杆菌菌株本身对于2-苯乙醇和乙酸苯乙酯的耐受能力较低,使得这些已知的公开技术方案中,产生的乙酸苯乙酯的产量及效率都非常低,与工业生产的要求相距甚远。

[0030] 本发明对现有技术的贡献包括了提供一种简便的构建方案,便可以实现高效产天然乙酸苯乙酯的菌株的构建。在本发明所提供的技术方案中,酿酒酵母的天然存在的L-苯丙氨酸至2-苯乙醇的高效代谢途径被直接利用了,由于酿酒酵母天然具备2-苯乙醇的合成途径,因此仅需要筛选高产2-苯乙醇天然酿酒酵母菌株,或者通过基因工程技术简单强化已有酿酒酵母的2-苯乙醇的合成途径既可以获得高效的2-苯乙醇高产菌株,在此基础上进一步过表达ATF1可以使得原本高效的2-苯乙醇合成能力转化为乙酸苯乙酯合成能力,从而

实现了乙酸苯乙醇高效合成菌株的构建。

[0031] 本发明具有的技术效果为：

[0032] 1、本发明采用高产2-苯乙醇的野生酵母菌株或者高产2-苯乙醇的基因工程酵母菌株为出发菌株，通过过表达醇乙酰转移酶基因，使得酵母菌株的主要生物转化产物从2-苯乙醇变为转而生产乙酸苯乙酯，从而使得该基因工程酵母菌株可高产乙酸苯乙酯。其中整合表达重组菌株CFFSH011摇瓶发酵的乙酸苯乙酯产量为0.6g/L，2-苯乙醇产量为1.5g/L；通过原位分离发酵方式，剪除产物抑制后，产酯工程菌株CFFSH011的乙酸苯乙酯的总体积产量达15.2g/L，而发酵液终产物中仅含有少量2-苯乙醇（总体积产量2.7g/L），酯醇比率为5.63。另外，由于采用了PPG双液相原位分离的方式，大幅减低了乙酸苯乙酯对细胞的抑制作用，经测定双相发酵液中，乙酸苯乙酯主要转移至PPG1500相中，产酯工程菌株CFFSH011发酵液的PPG1500有机相中的乙酸苯乙酯的浓度高达69.8g/L；

[0033] 2、本发明提供了一种乙酸苯乙酯合成菌株的构建方法，该方法无需再构建2-苯乙醇的合成途径，仅需要利用酿酒酵母自身的高效2-苯乙醇合成途径，并以具有该合成途径的菌株为出发菌株进一步过表达ATF1基因可获得乙酸苯乙酯合成菌株。

[0034] 3、本发明发现来源于酵母菌株自身的ATF1的过表达，及使用来源于其他酵母的ATF1基因过表达时同样可以实现本发明构想。同时ATF1基因与Lg-ATF1基因具备较高的乙酸苯乙酯产量。这表明采用与ATF1同源性较高的外源醇乙酰转移酶基因在高产2-苯乙醇宿主体内过表达后，同样可以使得宿主高产乙酸苯乙酯，即可部分或全部实现本发明构想；

[0035] 4、酿酒酵母CFFSH010、酿酒酵母S288C、酿酒酵母M05在过表达ATF1后，均能够获得可以转化生产乙酸苯乙酯的有效转化子，ATF1基因可以在不同产2-苯乙醇酵母宿主发挥效用。而酿酒酵母CEN.PK2-1C未能获得有效转化子，其原因可能在于由于菌株本身产2-苯乙醇产量较低，因此即便ATF1发挥功能，可产生的乙酸苯乙酯量因此较少，从而低于有效转化子的认定范围；

[0036] 5、本发明通过强化宿主*S.cerevisiae* CEN.PK2-1C的2-苯乙醇的合成能力，成功获得1株在摇瓶条件下2-苯乙醇产量可以达到1.2g/L的重组菌株CEN25。选择该株重组菌株CEN25作为宿主，将来源与CFFSH006的ATF1基因转入重组菌株CEN25游离表达，最终筛选获得2株有效转化子（2/15），其中有效转化子的乙酸苯乙酯最高摇瓶产量达0.12g/L；

[0037] 6、在酿酒酵母宿主过表达ATF1中，过表达ATF1后2-苯乙醇产量会大幅降低，同时2-苯乙醇降低幅度大于乙酸苯乙酯的新增量，该现象表明乙酸苯乙酯可能具有比2-苯乙醇更强的产物抑制特性，抑制酵母宿主生产2-苯乙醇的活性；

[0038] 7、本专利中利用过表达ATF1基因使得产2-苯乙醇的酿酒酵母可以进一步将2-苯乙醇转化为乙酸苯乙酯。2-苯乙醇与乙酸苯乙酯的比例取决于ATF1基因在酿酒酵母宿主中的表达强度与活性。本发明试验结果显示，工程菌株CFFSH006-ATF1-11可以同时产生2-苯乙醇和乙酸苯乙酯，乙酸苯乙酯总体积产量为8.8g/L，2-苯乙醇总体积产量为7.2g/L，酯醇比率为1.22。与菌株CFFSH011的酯醇比例相差近10倍。表明通过选择ATF1表达活性不同的重组酿酒酵母，可以获得可产生不同比例的2-苯乙醇和乙酸苯乙酯的生产，来满足不同应用对于苯乙醇及乙酸苯乙酯混合香基不同醇酯比率的需求。苯乙醇和乙酸苯乙酯的组合比单一的2-苯乙醇或乙酸苯乙酯更加具有自然真实的香气。因此其混合液可以直接作为香基材料用于香配方的调配。

[0039] 保藏信息

[0040] 酿酒酵母菌株CFFSH010,分类命名为酿酒酵母CFFSH010 (*Saccharomyces cerevisiae* CFFSH010),于2019年5月27日保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC),保藏中心地址为中国武汉武汉大学,保藏编号为CCTCC NO:M 2019399;

[0041] 酿酒酵母菌株CFFSH011,分类命名为酿酒酵母CFFSH011 (*Saccharomyces cerevisiae* CFFSH011),于2019年5月27日保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC),保藏中心地址为中国武汉武汉大学,保藏编号为CCTCC NO:M 2019400。

附图说明

[0042] 图1为实施实例1重组菌株转化子PCR鉴定结果,其中M泳道为Mark,C泳道为阴性对照(即以酿酒酵母CFFSH006基因组为模板进行PCR);

[0043] 图2示GC检测结果的峰图,分别为乙酸苯乙酯、CFFSH006发酵产物、CFFSH006-pATF1-4发酵终产物的GC检测结果;

[0044] 图3示整合表达菌株的筛选;

[0045] 图4示重组菌株摇瓶发酵;

[0046] 图5示CFFSH006的发酵过程中各参数的动态变化;

[0047] 图6示CFFSH011的发酵过程中各参数的动态变化;

[0048] 图7示CFFSH006-ATF1-11的发酵过程中各参数的动态变化。

具体实施方式

[0049] 本发明公开了一种高产乙酸苯乙酯的基因工程酵母菌株及其构建方法和生产乙酸苯乙酯的方法,本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和应用进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0050] 本发明提供一种构建产乙酸苯乙酯菌株的技术方案,发明人采用高产2-苯乙醇的野生酵母菌株或者高产2-苯乙醇的基因工程酵母菌株为出发菌株,通过过表达醇乙酰转移酶基因,使得酵母菌株的主要生物转化产物从2-苯乙醇变为转而生产乙酸苯乙酯。

[0051] 作为优选,所述的酵母菌株为酿酒酵母。

[0052] 在所述的构建产乙酸苯乙酯菌株的技术方案中,所述的醇乙酰转移酶基因的优选是来自酵母菌属的ATF1基因或者是Lg-ATF1基因。

[0053] 在所述的构建产乙酸苯乙酯菌株的技术方案中,所述的高产2-苯乙醇的野生酵母菌株是指也野生酵母菌株中本身具有以L-苯丙氨酸或者其他代谢前体为底物生产2-苯乙醇能力的菌株;所述的高产2-苯乙醇基因工程酵母菌株是利用基因工程技术改造强化或者引入2-苯乙醇合成途径的基因工程酵母菌株。

[0054] 作为优选,选择以L-苯丙氨酸为底物生产2-苯乙醇的摇瓶产量能够超过 2.0g/L的高产2-苯乙醇的野生酵母菌株或者基因工程酵母菌株,作为出发菌株。

[0055] 所述的摇瓶产量是指在摇瓶内进行发酵,摇瓶内除了添加L-苯丙氨酸作为底物以

及必要的碳源、氮源营养物质以外,不添加任何吸附树脂或者原位萃取相时所能够获得的2-苯乙醇产量。

[0056] 作为优选,所述作为出发菌株的产2-苯乙醇的野生酿酒酵母为酿酒酵母CFFSH010(已保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏编号为CCTCC NO:M 2019399)。酿酒酵母CFFSH010为一株从中国上海地区产的陈年酒糟中分离的一株野生酿酒酵母,其可以利用L-苯丙氨酸高效转化为2-苯乙醇,苯乙醇的摇瓶产量可达3.3g/L。

[0057] 作为优选,所述的醇乙酰转移酶基因作为出发菌株的产2-苯乙醇的基因工程菌株为酿酒酵母CFFSH006(已保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏编号为CCTCC NO:M 2018669)。该菌株通过随机整合2-苯乙醇合成途径上的关键代谢基因,具有高水平的2-苯乙醇合成能力(所述菌株的构建过程已经公开于公开号为CN109609396A中国专利申请中。所述的酿酒酵母 CFFSH006苯乙醇的摇瓶产量最高可达3.8g/L。

[0058] 作为优选,所述的醇乙酰转移酶基因的过表达方式为以多拷贝方式整合于酵母宿主的基因组多拷贝位点上。

[0059] 所述的多拷贝位点包括但不限于酵母delta位点;所述的整合方式包括但不限于FLP重组酶介导的整合或者CRISPR-Cas9介导。

[0060] 本发明还提供一株高产2-苯乙醇天然酿酒酵母菌株CFFSH010(CCTCC NO:M 2019399)。

[0061] 本发明还提供一种利用酿酒酵母CFFSH 010发酵高产2-苯乙醇的技术方案。

[0062] 本发明还提供一种产乙酸苯乙酯的基因工程酵母菌株,所述的基因工程菌株的原始宿主本身具备2-苯乙醇生产能力,同时在此基础上过表达了醇乙酰转移酶基因。

[0063] 作为优选,本发明所述的基因工程酵母菌株其宿主是以L-苯丙氨酸为底物生产2-苯乙醇的摇瓶产量能够超过2.0g/L的酵母属菌株。

[0064] 作为优选,本发明所述的基因工程酵母菌株其宿主为酿酒酵母CFFSH 010(CCTCC NO:M 2019399)或酿酒酵母CFFSH006(保藏编号为CCTCC NO:M 2018669)其中任意一种。

[0065] 作为优选,所述的醇乙酰转移酶基因是酵母属的ATF1基因或Lg-ATF1 基因。

[0066] 作为优选,所述的醇乙酰转移酶基因是来自酿酒宿主自身基因组的ATF1 基因或Lg-ATF1基因。

[0067] 作为优选,所述的醇乙酰转移酶基因为序列1。

[0068] 作为优选,所述的醇乙酰转移酶基因的过表达方式为以多拷贝方式整合于酵母宿主的基因组多拷贝位点上。

[0069] 作为优选,所述的基因工程酵母菌株为CFFSH011(已保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏编号为CCTCC NO:M2019400)。

[0070] 本发明还提供一种利用酵母同时生产2-苯乙醇和乙酸苯乙酯的方法,特征在于利用所述的产乙酸苯乙酯的基因工程酵母菌株。

[0071] 本发明还提供一种利用酵母生产乙酸苯乙酯的方法,特征在于利用所述的构建产乙酸苯乙酯菌株的技术方案所构建的菌株生产乙酸苯乙酯。

[0072] 作为优选,所述产乙酸苯乙酯菌株为为CFFSH011(CCTCC NO:M 2019400)。

[0073] 作为优选,所述利用酿酒酵母生产乙酸苯乙酯的方法,在发酵转化过程中采用原位分离式方式进行发酵生产。

[0074] 所述的原位分离式方式(又被称为原位转移)是指为了减少发酵产物对生产菌株的毒害或抑制作用,在发酵过程中采用某些或某项分离手段将在发酵过程中分离或吸附部分发酵产物,以提高总体的发酵产量的生产方式。所述的分离手段包括但不限于采用双相液萃取方式分离发酵产物(Appl Microbiol Biotechnol (2006) 71:440. DOI:10.1007/s00253-005-0281-6);采用树脂固相吸附方式(生物转化法生产β-苯乙醇的方法,中国专利申请,公开号CN102660591A);采用基于膜分离的渗透蒸发和渗透萃取方式(LA李会静, et al. "微生物转化生产2-苯乙醇的原位产物转移技术研究进展." 化工进展31.03 (2012). <http://cas-ir.dicp.ac.cn/handle/321008/118145>)。

[0075] 本发明提供的高产乙酸苯乙酯的基因工程酵母菌株及其构建方法和生产乙酸苯乙酯的方法中所用试剂或仪器均可由市场购得。

[0076] 下面结合实施例,进一步阐述本发明:

[0077] 实施实例1醇乙酰转移酶ATF1基因的游离表达菌株构建

[0078] (1) 游离表达载体pSC01的线性化处理

[0079] 在本实例实例中,采用游离表达质粒pSC01作为酵母宿主过表达醇乙酰转移酶的载体,所述的pSC01质粒的使用案例与全基因序列在公开号为 CN109609396A的中国专利申请文件中已经公开。为过表表达目的基因,首先将质粒pSC01用限制性内切酶BamHI处理3小时,胶回收获得线性化载体,保存备用。

[0080] (2) 醇乙酰转移酶ATF1基因克隆

[0081] 设计带有与表达载体pCS01中启动子PGK1和终止子CYC1重组的同源臂引物用于扩增醇乙酰转移酶ATF1基因,本实施实例所设计的引物如表1所示。采用生工生物工程(上海)股份有限公司酵母基因组DNA快速抽提试剂盒B518227,按照试剂盒使用说明书所述方法提取酿酒酵母CFFSH 010的基因组作为PCR模板。PCR采用NEB公司的 Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with HF Buffer试剂盒,依据产品说明书所公开的PCR反应体系进行PCR扩增醇乙酰转移酶ATF1基因。所采用的PCR反应条件为:首先在98°C预变性30s;之后采用98°C保持10s,50°C保持30s,72°C保持1分钟的三段温度循环程序,循环次数3次;之后采取98°C保持10秒,55°C保持30s,72°C保持1分钟的三段温度循环程序,循环次数为29次;然后保持72°C 5min;最后降温至4°C结束PCR反应。将PCR所获得的两端分别含有启动子PGK1和终止子CYC1重组的同源臂的ATF1基因片段,鉴定测序无误后保存备用。经测序以酿酒酵母CFFSH010基因组为模板扩增获得的ATF1基因序列为序列1所示。

[0082] 表1宿主自身的关键酶及调控基因的克隆所用的引物

	引物	5'-sequence-3'
[0083]	PGK1p-ATF1-F	ACAGATCATCAAGGAAGTAATTATCTACTTTTTACAACAAATAT AAAACAATGAATGAAATCGATGAGAAAATC
[0084]	CYC1t-ATF1-R	GATGTGGGGGGAGGGCGTGAATGTAAGCGTGACATAACTAATT ACATGACCTAAGGCCTAAAAGGAGAG

[0085] ATF1基因序列(序列1):

[0086] ATGAATGAAATCGATGAGAAAAATCAGGCCCCGTGCAACAAGAATGCCTGAAAGA GATGATTCAGA
ATGGGCATGCTCGGCGTATGGGATCTGTTGAAGATCTGTATGTTGC TCTCAACAGACAAACTTATATCGGA
TCTGCACATATGGAGAATTGAGTGATTA CTGTACTAGGGATCAGCTCACATTAGCTTTGAGGGAAATCTGCCTGA

AAAATCCAAC TCTTTTACATATTGTTCTACCAATAAGATGGCCAAATCATGAAAATTATTATCGCAG TTCCGAA
TACTATTACGGCCACATCCAGTGCATGATTATATTTTCAGTATTACAGGA ATTGAAACTGAGTGGTGTGGTTCTC
AATGAACAACCTGAGTACAGTGCAGTAATGA AGCAAATATTAGAAGAATTCAAAAATAGTAAGGGTTCCTATACT
GCAAAAATTTTTA AACTTACTACCACTTTGACTATTCCTTACTTTGGACCAACAGGACCGAGTTGGCGGC TAAT
TTGTCTTCCAGAAGAGCACACAGAAAAGTGGAAAAAATTTATCTTTGTATCTA ATCATTGCATGTCTGATGGTGC
GTCTTCGATCCACTTTTTTCATGATTTAAGAGACGA ATTAATAATATTAATAACTCCACCAAAAAAATTAGATTA
CATTTTCAAGTACGAGGA GGATTACCAATTGTTGAGGAACTTCCAGAACCGATCGAAAAGGTGATAGACTTTA
GACCACCGTACTTGTTTATTCCGAAGTCACTTCTTTCTGGGTTTCATCTACAATCATTT GAGATTTTCTTCAAAG
GTGTCTGTATGAGAATGGATGATGTGGAAAAACCGATG ATGTTGTCACCGAGATCATCAATATTTACCAACAG
AATTTCAAGCGATTAAGCAA ATATTAATCAAATATCCAAGGTAAGTGTACTATCACTCCGTTTTTACATGTTT
GTTG GTTTGTATCTCTCATAAATGGGGTAAATTTTTCAAACCATTGAACTTCGAATGGCTT ACGGATATTTTT
ATCCCCGCAGATTGCCGCTCACAACCTACCAGATGATGATGAAATG AGACAGATGTACAGATATGGCGCTAACGTT
GGATTTATTGACTTCACCCCATGGATA AGCGAATTTGACATGAATGATAACAAAGAAAAATTTTGGCCACTTATT
GAGCACTA CCATGAAGTAATTCGGAAGCTTTAAGAAATAAAAAGCATCTCCATGGCTTAGGGTT CAATATACA
AGGCTTCGTTCAAAAAATATGTGAATATTGACAAGGTAATGTGCGATCG TGCCATCGGGAAAAGACGCGGAGGTAC
ATTGTTAAGCAATGTAGGTCTGTTAATC AGTTAGAGGAGCCCGATGCCAAATATTCTATATGCGATTTGGCATT
TGGCCAATTTT AAGGATCCTGGCACCAAGCATTTTCTTGGGTGTTTGTTCGACTAATGTAAGGGGA TGAATA
TTGTTGTTGCTTCAACAAAAAATGTTGTTGGTAGCCAAGAATCTCTCGAAG AGCTTTGCTCCATTTATAAAGCTC
TCCTTTTAGGCCCTTAG

[0087] (3) 重组菌株的构建

[0088] 将本实施例步骤(2)所述保存备用的带有同源臂的ATF1基因片段和实施例步骤(1)所述保存备用的线性化pCS01质粒混合后共转化基因工程酵母菌株CFFSH006(保藏编号为CCTCC NO:M 2018669,该菌株的构建过程已经公开于在公开号为CN109609396A的中国专利申请文件中),在细胞内进行DNA快速组装(Nucleic Acids Res.2009Nov;37(20):6984-90.doi: 10.1093/nar/gkp687.Epub 2009Sep 10.),一步完成了游离表达菌株的构建,同时也构建了质粒,验证了基因的功能。

[0089] 具体实施为:取酿酒酵母CFFSH006单菌落接种于50mL YPD液体培养基,于30℃、200rpm培养至OD₆₀₀为3~3.5左右。将培养后的菌液于4℃,4000rpm离心5min收集菌体;之后,加入16mL预冷的无菌水重悬菌体;再依次加入2mL 10×TE buffer,混匀;2mL 1M醋酸锂,混匀;30℃,85rpm 孵育45min;加入500μL 1M DTT,混匀;30℃,85rpm孵育15min;然后加水补足体积至50mL;4℃,4000rpm离心5min;弃上清后,再加入50mL 预冷的无菌水重悬;之后再次于4℃,4000rpm离心5min;弃上清后,加入 30mL预冷无菌的1M山梨醇重悬,4℃,4000rpm离心5min。弃上清后,加入200μL的预冷无菌的1M山梨醇重悬,获得酿酒酵母CFFSH006感受态细胞。将制备的酿酒酵母CFFSH006感受态细胞按照每支40μL冰上分装。然后,取一支酿酒酵母CFFSH006感受态细胞加入2mm电转杯中,然后加入5μL DNA混合物混合(所述的DNA混合物为本实施例步骤(2)所述保存备用的带有同源臂的ATF1基因片段和实施例步骤(1)所述保存备用的线性化pCS01 质粒的混合物),然后于1.5kV电转化,然后加入1mL 1M山梨醇重悬,取 100μL重悬液涂布于含有300μg/mL G418遗传霉素的YPD琼脂平板,30℃培养,以获得转化子单菌落。

[0090] (4) 重组菌株的鉴定

[0091] 从步骤(3)含G418遗传霉素的YPD琼脂平板选取培养形成的转化子单菌落进行PCR鉴定。鉴定基于载体pCS01的PGK1p启动子序列设计PCR鉴定的上游引物CPGK1p-F;根据ATF1基因序列设计PCR下游引物CATF1-R,其序列如表2所示。以转化子总DNA为模板进行PCR扩增鉴定。同时,以酿酒酵母CFFSH006提取的总DNA为模板进行PCR,作为阴性对照。本次鉴定选取了4个转化子单菌落进行总DNA提取和PCR扩增鉴定。PCR采用上海捷瑞生物工程有限公司即用型高保真PCR扩增试剂盒按照其说明书所述方法进行,PCR扩增结果采用核酸凝胶电泳鉴定,结果如图1所示。所选取的4个转化子的单菌落中,其中3个成功扩增出了目的片段(2-4号,图1),且所获得的目的片段长度与启动子PGK1p与基因ATF1串联片段预期长度结果一致,可以确定三株为阳性转化子。该结果在上述三株阳性转化子内ATF1基因与pCS01线性化载体在胞内组装,形成了完整质粒,该质粒命名为pATF1。

[0092] (5) 转化子的复筛与验证

[0093] 对通过PCR鉴定获得的3株阳性转化子进行进一步的发酵性能检测,以获得质粒在细胞中高表达的转化子。分别挑取3株单克隆于盛有10mL复合培养基的50mL摇瓶中(培养基为10g/L的酵母提取物,60g/L的葡萄糖,10g/L的苯丙氨酸,0.5g/L的磷酸二氢钾,0.5g/L的硫酸镁)进行发酵,于30℃震荡发酵48h,取样检测2-苯乙醇及乙酸苯乙酯的含量。发酵性能检测发酵液中乙酸苯乙酯与苯乙醇含量利用气相色谱检测和液相检测。经检测,所选取的3株阳性转化子中有1株具有较好的乙酸苯乙酯生产能力,命名为CFFSH006-pATF1-4。发酵液GC检测结果如图2所示。

[0094] 表2重组菌株文库鉴定引物

	引物名称	说明	5'-sequence-3'
[0095]	CPGK1p-F	上游引物	CAACAGCCTGTTCTCACACA
	CATF1-R	ATF1下游引物	AGACCGACCATCAGACATGC

[0096] 实施实例2醇乙酰转移酶ATF1基因的整合表达菌株构建

[0097] (1) 扩增需要过表达的ATF1基因表达框

[0098] 利用酵母质粒提取试剂盒(上海捷瑞生物工程有限公司,GK1901)并按其说明书所述方法提取了实施实例1中阳性转化子CFFSH-006-pATF1-4的质粒,获得重组质粒pATF1。将质粒pATF1进行测序(委托苏州金唯智生物科技有限公司完成),pATF1质粒所载的ATF1基因序列为序列1。

[0099] 以pATF1为PCR模板,设计含有酿酒酵母基因组delta位点序列同源臂的引物对deltaHR-F和deltaHR-R(如表3),进行PCR扩增。PCR利用NEB公司的Phusion® High-Fidelity PCR Kit进行PCR反应条件为:98℃保持30s;然后进入三段循环循环(98℃保持10s→55℃保持20s→72℃保持1min,共循环30次);然后72℃保持7mins;最后降温为4℃结束反应。经过PCR扩增,获得了带有酿酒酵母基因组delta序列同源臂ATF1基因表达框的基因片段,命名为PGK1p-ATF1-CYC1t,回收保存待用。

[0100] 表3基于酿酒酵母基因组delta序列同源臂的引物

	引物	5'-sequence-3'
[0101]	deltaHR-F	ACTACCAATATATTATCATATACGGTGTAGACGATGACATAAGATACGAACTGTAATTGCTTTTAGTTGTG
[0102]	deltaHR-R	TTATTCCTCATTCCGTTTTATATGTTTCATTATCCTATTA CATTATCAATAAATTAAAGCCTTCGAGCG

[0103] (2) 醇乙酰转移酶基因ATF1在酵母基因组delta位点的随机整合表达

[0104] 本实施例采用Crispr/Cas9介导的delta位点整合方案,所采用的Crispr/Cas9工具质粒为以pCAS质粒为sgRNA的载体(来源于Addgene, Plasmid编号#60847,质粒详细信息可见<http://www.addgene.org/>)。以质粒pCAS为模板,以delta-gRNA-F和delta-gRNA-R为引物进行环形延伸PCR克隆(Circular polymerase extension cloning,其方法原理过程详细记载于PLoS One.2009;4(7):e6441;doi:10.1371/journal.pone.0006441)。PCR采用NEB公司的Phusion® High-Fidelity PCR Kit,PCR反应条件为:98℃保持1min;然后进入三段循环循环(98℃保持30s→58℃保持1min→72℃保持10min,共循环30次);然后72℃保持10min;最后降温为4℃结束反应。所述的引物delta-gRNA-F和delta-gRNA-R的基因序列如表4所示,其含有酵母基因组delta位点断裂的特异性sgRNA序列5'-GGAAGTTCATCGAAGTTAG-3'。

[0105] 表4基于酿酒酵母基因组delta位点断裂的特异性sgRNA序列的引物

	引物	5'-sequence-3'
[0106]	delta-gRNA-F:	CGGGTGGCGAATGGGACTTTGGAAGTTCATCGAAGTT AGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
	delta-gRNA-R	GCTATTTCTAGCTCTAAAACCTAAGTTCGATGACAGTT CCAAAGTCCCATTCGCCACCCG

[0107] PCR产物的利用限制性内切酶DpnI酶切6h,酶切产物转化感受态大肠杆菌DH5α,并涂布于含有50μg/mL的卡那霉素LB平板分离单克隆。挑取5个单克隆测序,测序验证正确,将所构建的质粒保存,所获得的质粒新命名为pCd5。

[0108] 将本实施例步骤(1)所获得PGK1p-ATF1-CYC1t与质粒pCd5混合后,通过电转化方式共同转化酿酒酵母CFFSH006菌株。电转化条件与实施实例1第(3)步骤中所述的电转化流程与条件相同。将电转化后的菌液稀释后涂布于含G418遗传霉素抗性(300ug/mL)的YPD琼脂固定平板上,用于分离单一的转化子菌落。

[0109] (3) 整合表达菌株的筛选

[0110] 从本实施实例步骤(2)含G418遗传霉素抗性(300ug/mL)的YPD琼脂固定平板挑取转化子。由于本次实验中转转化子较多,仅从所获得的转化子中挑选了12株菌落较大的单克隆进行初步发酵检测。初步发酵验证:以出发菌株CFFSH006为对照组,分别挑取单克隆于盛有10mL复合培养基的50mL摇瓶中(培养基为10g/L的酵母提取物,60g/L的葡萄糖,8g/L的苯丙氨酸,0.5g/L的磷酸二氢钾,0.5g/L的硫酸镁)于30℃震荡发酵48h,取样检测2-苯乙醇及乙酸苯乙酯的含量。结果如图3所示,12株转化子都产生了乙酸苯乙酯(对照组摇瓶不能检测到乙酸苯乙酯)。说明12株全为阳性,其中菌株编号为3的菌株的酯醇比最高(酯醇比=

乙酸苯乙酯浓度/2-苯乙醇浓度),且乙酸苯乙酯产量最高,将菌株编号为3的菌株命名为重组菌株CFFSH011。

[0111] 实施实例3重组菌株的摇瓶发酵验证

[0112] 本实施实例将获得的游离表达重组菌株CFFSH006-pATF1-4,整合表达重组菌株CFFSH011,以及宿主菌CFFSH006进行了摇瓶发酵检测。所采用的发酵培养基为:葡萄糖60g/L,酵母浸粉10g/L,硫酸镁0.5g/L,磷酸二氢钾 0.5g/L,L-苯丙氨酸8g/L。其发酵过程为将酿酒酵母分别接种于装有50mL发酵培养基的250mL摇瓶,于恒温摇床震荡发酵48h(30℃,200rpm),以 HPLC检测其2-苯乙醇产量,以GC检测其乙酸苯乙酯产量,经测定结果如图 4所示,游离表达重组菌株CFFSH006-pATF1-4乙酸苯乙醇产量为0.3g/L,2-苯乙醇产量为1.8g/L,整合表达重组菌株CFFSH011乙酸苯乙醇产量为0.6 g/L,2-苯乙醇产量为1.5g/L,而对照组CFFSH006菌株发酵液中并未检测到乙酸苯乙酯,2-苯乙醇产量为3.1g/L。从图中还可以看出,随着乙酸苯乙酯的产量的提高,2-苯乙醇的产量显著下降,说明乙酸苯乙酯对菌株的生成2-苯乙醇具有抑制作用。此抑制作用或许能在两相发酵中得到解除。需要留意的是在本发明中重组菌株摇瓶测试时,重组菌株CFFSH011的乙酸苯乙酯产量为0.6g/L同时其2-苯乙醇含量仍有1.5g/L,表明该菌株2-苯乙醇的合成是高效的,仅是由于受到产物抑制培养基中含有的2-苯乙醇未能进一步的转化为乙酸苯乙酯。CFFSH011菌株的可以通过剪除产物抑制进一步提高2-苯乙醇的转化率,将含有的1.5g/L的2-苯乙醇进一步转化为乙酸苯乙酯,菌株仍有较大的产量提升潜能(见实施实例8和实施实例9)。而在已经公开的对比技术方案中(Microbiology Open.2017;e486,doi.org/10.1002/mbo3.486.J.Agric. Food Chem,29May 2018,DOI:10.1021/acs.jafc.8b01594),由于采用的是一个非高产的2-苯乙醇的菌株为出发菌株(2-苯乙醇摇瓶产量为1.016g/L,低于2 g/L),虽然其在过表达ATF1后菌株可以产生0.68g/L的乙酸苯乙酯,但其 2-苯乙醇几乎已经消耗完毕仅为0.046g/L,限制其产量的因素是2-苯乙醇合成的效率过低了,即便剪除了产物抑制,由于生成的2-苯乙醇有限,2-苯乙醇的转化率也无法进一步提高。

[0113] 实施实例4以不同来源醇乙酰转移酶基因构建产乙酸苯乙酯

[0114] 本实施实例中以基因工程酵母菌株CFFSH006为宿主,利用其他来源的外源醇乙酰转移酶基因在宿主细胞中过表达。

[0115] (1) 醇乙酰转移酶基因的来源

[0116] 以模式酿酒酵母菌株*Saccharomyces cerevisiae* S288C的基因组为模板,分别利用PCR扩增其ATF1基因与ATF2基因,经测序其基因序列与NCBI 数据库中已经公开的*Saccharomyces cerevisiae* S288C的ATF1基因(NCBI Reference Sequence:NP_015022.3)和ATF2基因(NCBI Reference Sequence: NP_011693.1)一致。另外,按照NCBI数据库中已经公开的巴氏酵母(*Saccharomyces pastorianus*)Lg-ATF1氨基酸序列(GenBank: AAP72995.1)合成对应的Lg-ATF1基因序列,该基因的合成委托委托苏州金唯智生物科技有限公司完成。本实施例中过表达的各个醇乙酰转移酶基因与实施实例1从来源于*Saccharomyces cerevisiae* CFFSH006的ATF1的蛋白氨基酸序列同源性如表5所示。

[0117] 表5各基因蛋白氨基酸序列同源性比对结果

基因	基因来源	Per. Ident	基因编号 ^注
[0118] ATF1	alcohol O-acetyltransferase [<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CFFSH006]	100.00%	序列 1
[0118] ATF1	alcohol O-acetyltransferase [<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C]	99.62%	NP_015022.3
[0118] Lg-ATF1	lager alcohol acetyltransferase I [<i>Saccharomyces pastorianus</i>]	80.23%	AAP72995.1
[0119] ATF2	alcohol O-acetyltransferase [<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C]	37.33%	NP_011693.1

[0120] 注:除序列1已在本发明文件中记载外,所有基因序列可根据基因编号从NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)获得

[0121] 按照实施实例2步骤(1)至(2)所述的技术方案,分别将ATF1基因(来源于*Saccharomyces cerevisiae* S288C)、ATF2基因(来源于*Saccharomyces cerevisiae* S288C)以及Lg-ATF1基因(来源于*Saccharomyces pastorianus*)整合于酿酒酵母宿主CFFSH006的基因组上,以获得整合有醇乙酰转移酶基因的阳性转化子克隆。对于每种不同的醇乙酰转移酶整合表达的重组菌株分别各挑取15个阳性转化子按照实施实例2步骤(3)进行转化子筛选。其中整合表达有来源于*Saccharomyces cerevisiae* S288C的ATF1基因的转化子中(简称为CFFSH006-pATF1(S288C)),可以成功检测到乙酸苯乙酯产生的转化酯为13(13/15)个。而在所挑取的15株整合表达有来源于*Saccharomyces pastorianus*的Lg-ATF1基因的转化子中(简称为CFFSH006-pLg-ATF1)15株(15/15)均可检测到乙酸苯乙酯的生成。在所选取的15株整合表达有来源于*Saccharomyces cerevisiae* S288C的ATF2基因的转化子(简称为CFFSH006-pATF2(S288C))中,有6株(6/15)可检测到乙酸苯乙酯的生成。

[0122] 分别在各醇乙酰转移酶整合表达的重组转化子菌株,挑选其中乙酸苯乙酯产量最高的转化子,进行摇瓶发酵验证。摇瓶发酵验证条件为分别接种于含有10mL复合培养基的50mL摇瓶中(复合培养基为10g/L的酵母提取物,60g/L的葡萄糖,8g/L的苯丙氨酸,0.5g/L的磷酸二氢钾,0.5g/L的硫酸镁)进行发酵。发酵条件为30℃震荡发酵48h,取样检测2-苯乙醇及乙酸苯乙酯的含量。同时,分别选取酿酒酵母CFFSH006单菌落以相同发酵培养条件培养作为摇瓶发酵验证的阴性对照。选取酿酒酵母CFFSH011作为摇瓶发酵验证的阳性对照,摇瓶发酵验证结果如表6所示。结果显示,三种重组菌株都有部分转化子产生了不同比例的2-苯乙醇和乙酸苯乙酯。其中,ATF1基因与Lg-ATF1基因具备较高的乙酸苯乙酯产量。该实施例表明采用与ATF1同源性较高的外源醇乙酰转移酶基因在高产2-苯乙醇宿主体内过表达后,可以使得宿主高产乙酸苯乙酯。

[0123] 表6不同醇乙酰转移酶在酿酒酵母CFFSH006中表达

名称	过表达的醇乙酰转移酶基因	产量		
		有效转化子	最优转化子	
		有效数量个	2-苯乙醇产物浓度 g/L	乙酸苯乙酯产物浓度 g/L
CFFSH006	无	NG	3.32±0.35	未检出
[0124] CFFSH011	ATF1[来源于 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CFFSH006]	NG	1.51±0.25	0.68±0.16
CFFSH006-p ATF1(S288C)	ATF1[来源于 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C]	13	1.77±0.37	0.62±0.11
CFFSH006-p ATF2(S288C)	ATF2[来源于 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C]	6	2.88±0.25	0.1±0.14
CFFSH006-p Lg-ATF1	Lg-ATF1 来源于 [<i>Saccharomyces pastorianus</i>]	15	1.86±0.33	0.55±0.18

[0125] 注释NG表示为不适用该项。

[0126] 实施实例5不同产2-苯乙醇酵母宿主产乙酸苯乙酯

[0127] 本实施例选取4株不同的酿酒酵母作为宿主,将来源于CFFSH006的 ATF1基因分别在上述4株不同的酿酒酵母宿主中进行过表达。所述的酿酒酵母宿主如表7所列,其中酿酒酵母CFFSH010为一株由本发明人从酒糟中筛选分离获得的高产2-苯乙醇野生型酿酒酵母菌株,该菌株已经保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏编号为CCTCC NO:M 2019399。酿酒酵母CEN.PK 2-1C和酿酒酵母S288C均为公开的为本领域技术人员熟知并使用的模式菌株。啤酒酵母M05为Mangrove Jack's公司(地址:328Rosedale Road,Albany, Auckland 0632,New Zealand)市售用于蜂蜜酒酿造的产酯香的酿酒酵母。所有酿酒酵母宿主均在100mL摇瓶(装液量为25mL)中进行2-苯乙醇的产量验证。产量验证培养条件为:培养基为10g/L的酵母提取物,60g/L的葡萄糖,10g/L的苯丙氨酸,0.5g/L的磷酸二氢钾,0.5g/L的硫酸镁,初始pH 6.8,30℃下培养48h,以气相色谱测定2-苯乙醇及乙酸苯乙酯含量。本实施例中,4株作为宿主菌株的酿酒酵母初始2-苯乙醇及乙酸苯乙酯产量如表7所列。

[0128] 表7实施实例5用于表达ATF1的酿酒酵母宿主

原始宿主	菌株说明	2-苯乙醇产量 (g/L)	乙酸苯乙酯 产量 (g/L)
<i>S.cerevisiae</i> CFFSH010	由发明人从酒糟中筛选分离获得的高产 2-苯乙醇野生型酿酒酵母菌株	3.45±0.31	0.03
<i>S.cerevisiae</i> CEN .PK 2-1C	模式菌株	0.40±0.12	未检出
[0129] <i>S.cerevisiae</i> S288C	模式菌株	2.43±0.05	0.03
<i>S.cerevisiae</i> M05	蜂蜜酒用商品化酿酒酵母，以高产酯产香著称，由 Mangrove Jack's, BSGi NZ Ltd. 公司生产，商品名称为 M05 MEAD YEAST，产品链接： https://mangrovejacks.com/products/mead-m05-yeast-10g	2.88 ±0.26	0.07

[0130] 本实施实例中，ATF1 (来自CFFSH006) 在4种不同酿酒酵母内的过表达采取游离表达方式，其实施步骤与本专利申请实施实例1的步骤一致，唯一的差异是实施实例1中所采用宿主菌株为酿酒酵母CFFSH006而本实施实例中是则是以酿酒酵母CFFSH010、酿酒酵母CEN.PK 2-1C、酿酒酵母 S288C、酿酒酵母M05分别作为宿主菌株。在按照实施实例1的步骤(1)至(4)获取胞内含有完整游离表达质粒的阳性转化子后，按照实施实例1的步骤(5)进行复筛与验证，分别挑取若干数量的阳性转化子按照该步骤所述方法进行发酵性能检测(实施实例1中因仅有3个阳性转化子，所以仅选取了3个阳性转化子进行验证，本实施实例中根据获得阳性转化子的数量挑选8-15个)，本次发酵性能检测结果如表8所示。由于，酿酒酵母菌株自身携带的脂肪酶与醇乙酰转移酶能够天然合成少量的乙酸苯乙酯，因此，在本实施实例中有效转化子被认定发酵性能检测时乙酸苯乙酯产量大于或等于0.1g/L的菌株。其中酿酒酵母CFFSH010、酿酒酵母S288C、酿酒酵母M05在过表达 ATF1后，均能够获得可以转化生产乙酸苯乙酯的有效转化子，ATF1基因可以在不同产2-苯乙醇酵母宿主发挥效用。而酿酒酵母CEN.PK 2-1C未能获得有效转化子，其原因可能在于由于菌株本身产2-苯乙醇产量较低，因此即便 ATF1发挥功能，可产生的乙酸苯乙酯量因此较少，从而低于有效转化子的认定范围或低于气相色谱的仪器的检测限。

[0131] 表8游离过表达表达ATF1酿酒酵母宿主

宿主菌株	有效转化子	最高产量组 ^{注释1}	
	有效转化子数量/选取转化子数量 (个/个)	2-苯乙醇产量 (g/L)	乙酸苯乙酯 产量 (g/L)
[0132] <i>S.cerevisiae</i> CFFSH010	3/10	2.60	0.28
<i>S.cerevisiae</i> CEN .PK 2-1C	0/8	NG	NG
<i>S.cerevisiae</i> S288C	6/15	1.88	0.15
<i>S.cerevisiae</i> M05	5/15	1.96	0.16

[0133] NG表示不适用;注释1表示实验中乙酸苯乙酯产量最高的有效转化子所对应的2-苯乙醇及乙酸苯乙酯产量。

[0134] 实施实例6*S.cerevisiae* CEN.PK 2-1C强化2-苯乙醇合成后过表达ATF1基因

[0135] 在实施实例5中由于宿主菌株*S.cerevisiae* CEN.PK 2-1C自身生产2-苯乙醇能力较弱,因此导致其再过表达ATF1基因后使得其无法获得有效转化子(乙酸苯乙酯产量低于有效转化酯认定范围或低于色谱的检出限)。因此,本实施实例中,首先强化了宿主*S.cerevisiae* CEN.PK2-1C的2-苯乙醇的合成能力,所采用的技术方案为中国专利申请CN109609396A中实施实例7所公开的将aro8、aro9、aro10、sfa1基因随机组合整合于宿主*S.cerevisiae* CEN.PK 2-1C的基因组上过表达,以促进2-苯乙醇的合成。本实施实例,按照中国专利申请CN109609396A中实施实例7所述的实验步骤构建了随机整合表达aro8、aro9、aro10、sfa1基因的重组菌株,并按照其实验步骤所述的两轮筛选成功获得1株在摇瓶条件下2-苯乙醇产量可以达到1.2g/L的重组菌株CEN25(10mL复合培养基的50mL摇瓶培养,培养基为10g/L的酵母提取物,60g/L的葡萄糖,8g/L的苯丙氨酸,0.5g/L的磷酸二氢钾,0.5g/L的硫酸镁,30℃震荡发酵48h,)。经测定重组菌株摇瓶瓶发酵48h后,其乙酸苯乙酯产量低于气相色谱仪器的检出限。选择该株重组菌株CEN25作为宿主,按照本专利申请实施实例6所述步骤,将来源于CFFSH006的ATF1基因转入重组菌株CEN25游离表达,最终筛选获得2株有效转化子(2/15),其中有效转化子的乙酸苯乙酯最高摇瓶产量达0.12g/L。

[0136] 实施实例7乙酸苯乙酯对酿酒酵母宿主的抑制

[0137] 在实施实例5中,在酿酒酵母宿主过表达ATF1中,过表达ATF1后2-苯乙醇产量会大幅降低,同时2-苯乙醇降低幅度大于乙酸苯乙酯的新增量,该现象表明乙酸苯乙酯可能具有比2-苯乙醇更强的产物抑制特性,抑制酵母宿主生产2-苯乙醇的活性。在本实施实例中,采用最小抑菌浓度法对乙酸苯乙酯抑制特性进行评价。所采用方法是以稀释调整浓度为 3×10^4 - 3×10^5 CFU/mL酵母菌株细胞悬液涂布于含有不同浓度2-苯乙醇或乙酸苯乙酯YPD琼脂培养基(Solarbio[®],生物试剂,货号LA0220)平板上,于30℃培养36h。以36h后无

菌落形成的2-苯乙醇或乙酸苯乙酯浓度为其最小抑菌浓度。本实施实例中分别选取酿酒酵母CFFSH006、CFFSH010、CEN.PK2-1C、S288C、大肠杆菌BL21作为最小抑菌浓度的测试菌株，其结果如表9所示。结果表明对于多数酵母，乙酸苯乙酯的抑制特性要远远高于2-苯乙醇。

[0138] 表9 2-苯乙醇和乙酸苯乙酯的最小抑菌浓度

菌株	最小抑菌浓度 MIC (g/L)	
	2-苯乙醇	乙酸苯乙酯
[0139] <i>S.cerevisiae</i> CFFSH006	3.8	0.8
<i>S.cerevisiae</i> CFFSH010	3.8	1.0
[0140] <i>S.cerevisiae</i> CEN .PK 2-1C	2.8	0.6
<i>S.cerevisiae</i> S288C	3.2	0.8
<i>E.coli</i> BL21	1.2	1.0

[0141] 实施实例8酿酒酵母CFFSH011在原位分离发酵工艺下生产乙酸苯乙酯

[0142] 由于乙酸苯乙酯存在比2-苯乙醇更强的产物抑制特性。因此本实施实例采取以聚乙二醇为分离相的原位分离工艺进行发酵生产乙酸苯乙酯。所述的原位分离工艺参照了中国专利CN109609396A申请实施实例5所公开的原位分离发酵技术方案，并作局部调整。本实施实例中选取了整合表达ATF1基因的工程菌株酿酒酵母CFFSH011作为发酵菌株，以同时选取未过表达ATF1的原宿主菌株酿酒酵母CFFSH006作为实验对照。

[0143] 本实施实例的实施步骤如下：(1) 将酿酒酵母CFFSH011菌株(或酿酒酵母CFFSH006)先接种至YPD琼脂培养平板上，置于30℃培养48h以活化菌株；(2) 将活化后的菌株，接入至装有50mL YPD液体培养基的摇瓶30℃震荡培养18h，作为一级种子液，之后取转接至420mL YPD液体培养基的摇瓶30℃继续震荡培养6h，作为二级发酵种子液；(3) 将培养好的二级发酵种子液以6% (v/v) 的接种量接入装载有7L发酵培养基的15L发酵罐(培养基为60g/L蔗糖为碳源，5g/L KH_2PO_4 ，5g/L K_2HPO_4 ，初始pH 5.5)，30℃培养24h后，投入210g L-苯丙氨酸粉末及1L聚丙二醇1500 (PPG-1500，AR，江苏省海安石油化工厂)，同时补加150g白砂糖固体粉末。之后每6小时补加150g白砂糖粉末直至发酵66h发酵结束；(4) 发酵液中的2-苯乙醇含量由HPLC测定(210nm检测，C-18柱)，乙酸苯乙酯由气相色谱测定。其中，总体积产物浓度为取发酵液以漩涡振荡器震荡使得PPG-1500与发酵培养基充分混合均匀后，取1mL以甲醇稀释至色谱线性检测范围，以HPLC或气相色谱测定2-苯乙醇或乙酸苯乙酯的总体积产物浓度。本实施实例中所述的总体积产物浓度是指发酵罐中产物相对于装液总体积(8L)的浓度(即发酵液中产物的总质量与总装液体积之比，g/L)。发酵液中PPG-1500相内所含有的产物浓度，是指在发酵液取样后以离心并静置，使得PPG相与培养基水相两相分离，形成清晰的双液相液面。然后从利用移液枪移取从PPG液层取1mL，以甲醇稀释至色谱线性检测范围，以HPLC或气相色谱测定2-苯乙醇或乙酸苯乙酯浓度。

[0144] 图5和图6分别为对照组CFFSH006和工程菌株CFFSH011的为发酵过程参数动态图。结果表明，在未过表达ATF1的情况下，对照组酿酒酵母 CFFSH006仅产生少量的乙酸苯乙

酯,总体积产物浓度只有0.9g/L,并且其产物主要为2-苯乙醇,2-苯乙醇总体积产物浓度高达19.2g/L。在过表达ATF1后,产酯工程菌株CFFSH011的主要产物变为了乙酸苯乙酯,其中乙酸苯乙酯的总体积产量达15.2g/L,而发酵液终产物中仅含有少量2-苯乙醇(总体积产量2.7g/L),酯醇比率为5.63。另外,由于采用了PPG双液相原位分离的方式,大幅减低了乙酸苯乙酯对细胞的抑制作用,经测定双相发酵液中,乙酸苯乙酯主要转移至PPG1500相中,产酯工程菌株CFFSH011发酵液的 PPG1500有机相中的乙酸苯乙酯的浓度高达69.8g/L。

[0145] 实施实例9原位分离手段对CFFSH011产乙酸苯乙酯的影响

[0146] 实施实例8中提供了一种利用添加1L,PPG1500来解除乙酸苯乙酯对菌体的产物抑制影响从而提高乙酸苯乙酯总产量的例子。在本实施实例中,不同的PPG添加量及不同的分离介质被应用于乙酸苯乙酯的生产。其实施方案如下,按照实施实例8所述的发酵方案,以酿酒酵母CFFSH011为生产菌株进行产乙酸苯乙酯发酵,其中实施实例8中步骤(3)中接种后24小时加入PPG1500 1L的实验条件替换为本实施实例的原位分离条件,其余步骤与条件均与实施实例8一致。本实施实例中实施的原位分离条件包括:a.添加 PPG1500 0.5L;b.添加PPG1500 1.0L;c.添加PPG1500 2.0L;d.添加 PPG1500 3.0L;e.添加大孔树脂XDA-4 10g;f.添加大孔树脂XDA-4 40g。经过发酵,罐内所产生的单罐乙酸苯乙酯总产量的结果如表10所列,所述的单罐乙酸苯乙酯总产量是指罐内所含有的乙酸苯乙酯总质量(g),包括罐体内发酵液水相内所含有的乙酸苯乙酯及PPG相中说含有乙酸苯乙酯(或者大孔树脂所吸附的乙酸苯乙酯)之和。

[0147] 表10原位分离条件对乙酸苯乙酯产量的影响

原位分离手段		单罐乙酸苯乙酯总产量 (g)
[0148] 采用 PPG 双液相原位分离	PPG 添加量 (L)	
	0.5	76.2
	1.0	121.6
	2.0	156.3
	3.0	162.4
采用大孔树脂原位分离	树脂添加量 (g)	
	10	54.3
	40	117.5

[0149] 实施实例10酿酒酵母同时生产2-苯乙醇与乙酸苯乙酯

[0150] 苯乙醇和乙酸苯乙酯的组合比单一的2-苯乙醇或乙酸苯乙酯更加具有自然真实的香气。因此其混合液可以直接作为香基材料用于香配方的调配。本专利中利用过表达ATF1基因使得产2-苯乙醇的酿酒酵母可以进一步将2-苯乙醇转化为乙酸苯乙酯。2-苯乙醇与乙酸苯乙酯的比例取决于ATF1基因在酿酒酵母宿主中的表达强度与活性。由于酿酒酵母CFFSH011是一株ATF1基因过表达活性较高的菌株,其ATF1酶活力较高,这使得在实施实例8中,在减少乙酸苯乙酯的产物抑制作用后,酿酒酵母CFFSH011可以高产乙酸苯乙酯,其主要

产物为乙酸苯乙酯,而仅含有少量的2-苯乙醇。如果,选择一株ATF1表达活力较低的菌株,则可以实现一定比例的2-苯乙醇与乙酸苯乙酯的混合香基的同步生产。

[0151] 在本实施实例中,实验所用的ATF1低活性的菌株来自于实施实例2步骤(1)至(2)所述的方法与步骤所构建的表达ATF1的酿酒酵母整合ATF1的转化子。在按照实施实例步骤(1)至(2)获得12株重组转化子后,按照实施实例2步骤(3)所述的方法与步骤对获得的转化子单菌落进行筛选,其结果如图3所示,其中菌株编号3的菌株酯醇比最高,而菌株编号为11的酯醇比比率最低(酯醇比=乙酸苯乙酯浓度/2-苯乙醇浓度)。将菌株编号为11的菌株命名为CFFSH006-ATF1-11,作为低ATF1活力的菌株用于本实施实例的发酵菌株。按照实施实例8中所公开的实验方案,以CFFSH006-ATF1-11为发酵菌株对其进行发酵罐发酵生产乙酸苯乙酯及2-苯乙醇混合产品的测试。发酵结果及过程曲线如图7所示。结果显示,工程菌株CFFSH006-ATF1-11可以同时产生2-苯乙醇和乙酸苯乙酯,乙酸苯乙酯总体积产量为8.8g/L,2-苯乙醇总体积产量为7.2g/L,酯醇比率为1.22。与菌株CFFSH011的酯醇比例相差近10倍。该实施实例表明通过选择ATF1表达活性不同的重组酿酒酵母,可以获得可产生不同比例的2-苯乙醇和乙酸苯乙酯的生产,来满足不同应用对于苯乙醇及乙酸苯乙酯混合香基不同醇酯比率的需求。

[0152] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 波顿(上海)生物技术有限公司
- [0003] <120> 一种高产乙酸苯乙酯的基因工程酵母菌株及其构建方法和生产乙酸苯乙酯的方法
- [0004] <130> MP1922890
- [0005] <160> 1
- [0006] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 1578
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0011] <400> 1
- [0012] atgaatgaaa tcgatgagaa aaatcaggcc cccgtgcaac aagaatgcct gaaagagatg 60
- [0013] attcagaatg ggcatgctcg gcgtatggga tctgttgaag atctgtatgt tgctctcaac 120
- [0014] agacaaaact tatatcgaa cttctgcaca tatggagaat tgagtgatta ctgtactagg 180
- [0015] gatcagctca cattagcttt gagggaaatc tgcctgaaaa atccaactct tttacatatt 240
- [0016] gttctaccaa taagatggcc aaatcatgaa aattattatc gcagttccga atactattca 300
- [0017] cgccacatc cagtgcata ttatatttca gtattacagg aattgaaact gagtggtgtg 360
- [0018] gttctcaatg aacaacctga gtacagtga gtaatgaagc aaatattaga agaattcaaa 420
- [0019] aatagtaagg gttcctatac tgcaaaaatt tttaaactta ctaccacttt gactattcct 480
- [0020] tactttggac caacaggacc gagttggcgg ctaatttgc ttccagaaga gcacacagaa 540
- [0021] aagtggaaaa aatttatctt tgtatctaat cattgcatgt ctgatggtcg gtcttcgac 600
- [0022] cactttttc atgatttaag agacgaatta aataatatta aaactccacc aaaaaatta 660
- [0023] gattacattt tcaagtacga ggaggattac caattgttga ggaaacttc agaaccgatc 720
- [0024] gaaaaggatg tagactttag accaccgtac ttgtttatc cgaagtcact tctttcgggt 780
- [0025] ttcatctaca atcatttgag attttcttca aaagggtctc gtatgagaat ggatgatgtg 840
- [0026] gaaaaaacg atgatgtgt caccgatc atcaatattt caccaacaga atttcaagcg 900
- [0027] attaaagcaa atattaaatc aaatatcaa ggtaagtgt ctatcactcc gtttttcat 960
- [0028] gttgttgggt ttgtatctc tcaataatgg ggtaaattt tcaaaccatt gaacttcgaa 1020
- [0029] tggcttacg atatttttat ccccgcat tgccgctcac aactaccaga tgatgatgaa 1080
- [0030] atgagacaga tgtacagata tggcgtaac gttggattta ttgacttcac cccatggata 1140
- [0031] agcgaatttg acatgaatga taacaaagaa aaattttggc cacttattga gcactacat 1200
- [0032] gaagtaattt cggaagcttt aagaaataa aagcatctc atggcttagg gttcaatata 1260
- [0033] caagcttcg ttcaaaaata tgtgaatatt gacaaggtaa tgtgcatcg tgccatcggg 1320
- [0034] aaaagacgc gaggtacatt gtttaagcaat gtaggtctgt ttaatcagtt agaggagccc 1380
- [0035] gatgccaaat attctatatg cgatttggca tttggccaa ttcaaggatc ctggcaccaa 1440
- [0036] gcattttcct tgggtgttg ttcgactaat gtaaaagga tgaatattgt tgttgcttca 1500
- [0037] acaaaaaatg ttgttgtag ccaagaatct ctcgaagagc tttgctccat ttataaagct 1560
- [0038] ctcttttag gcccttag 1578

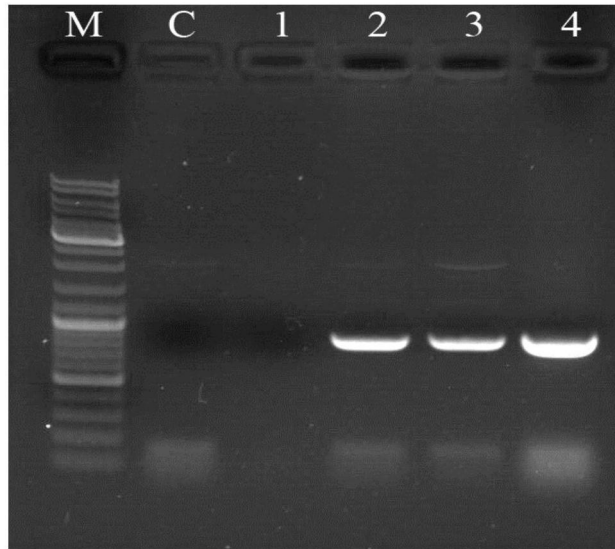


图1

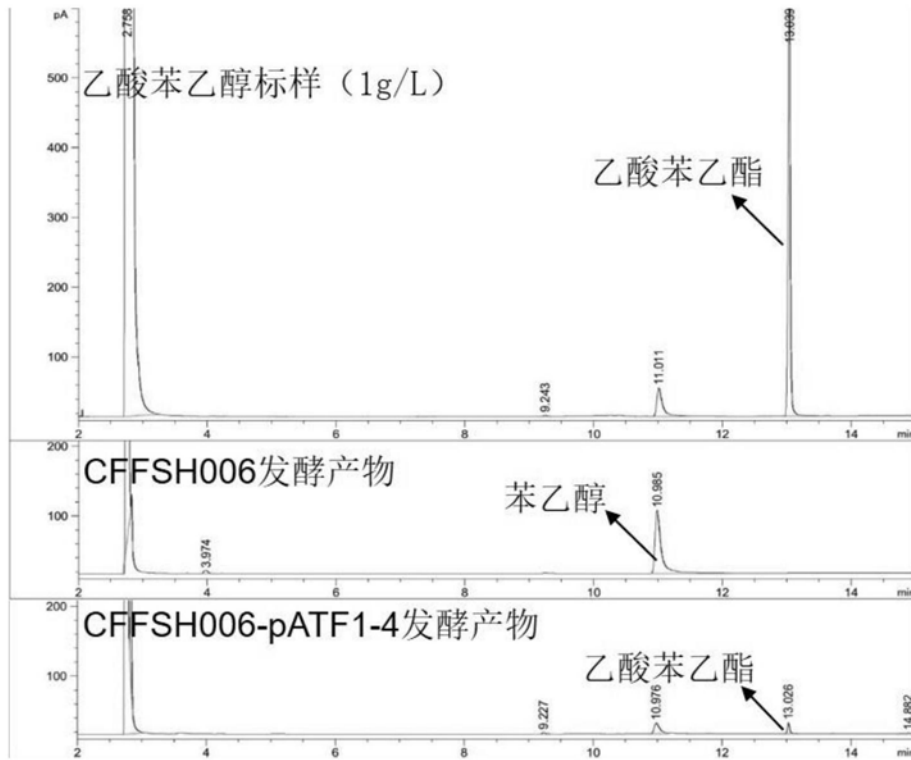


图2

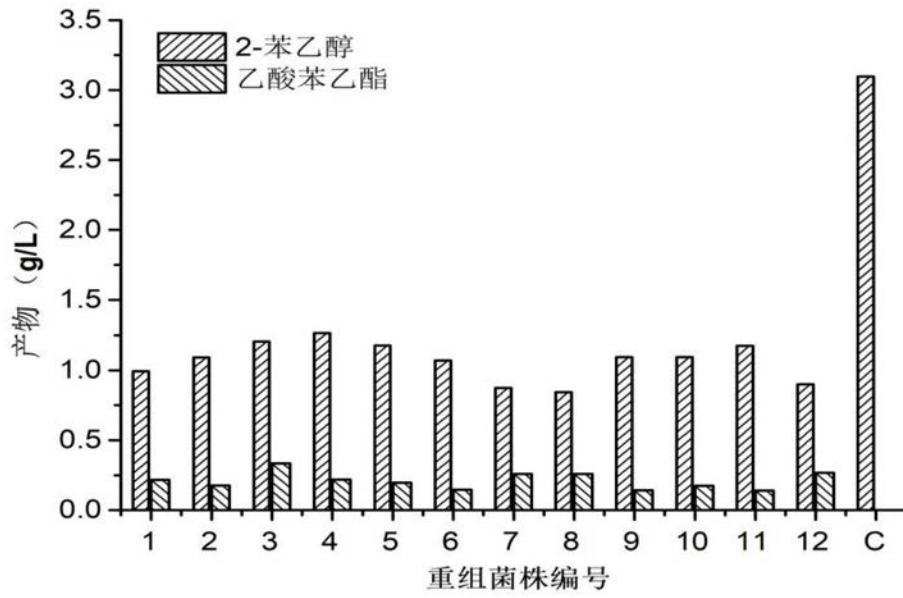


图3

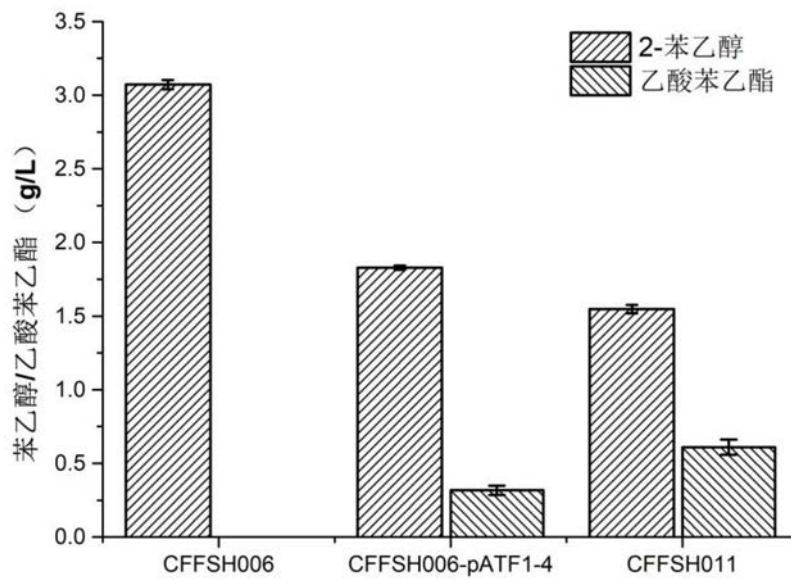


图4

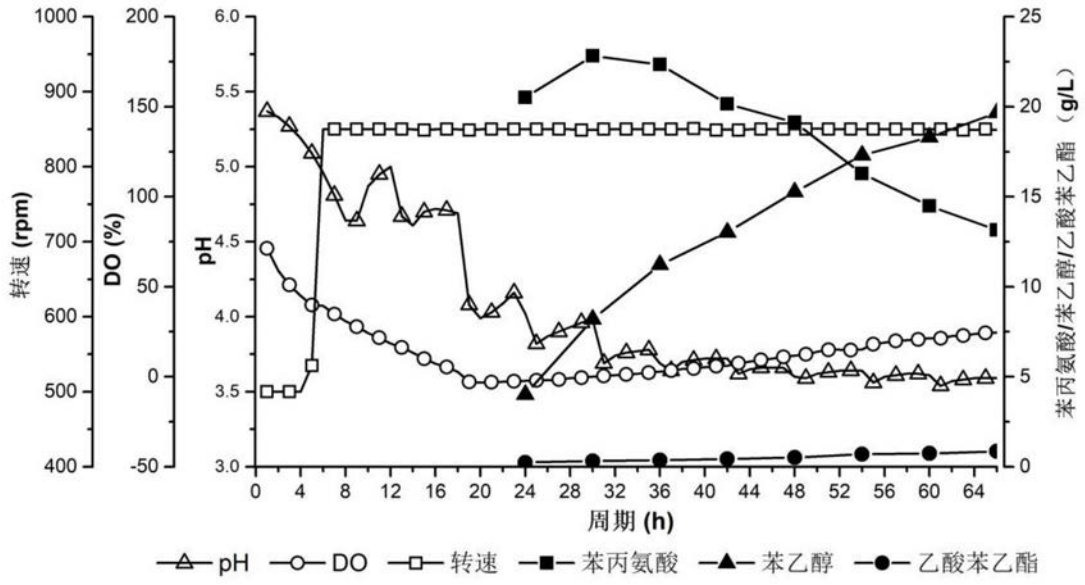


图5

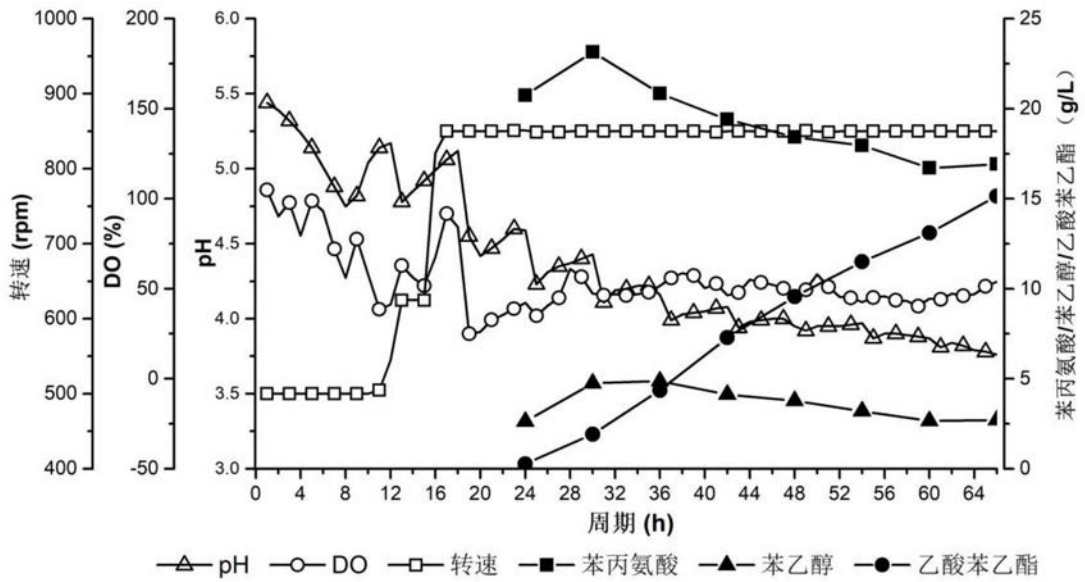


图6

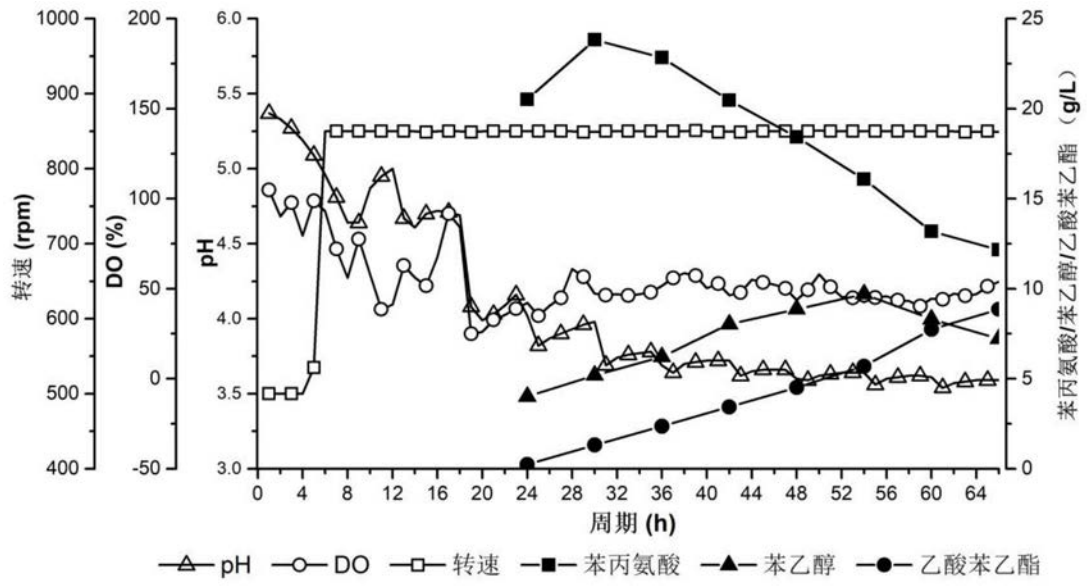


图7